

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5783721号

(P5783721)

(45) 発行日 平成27年9月24日(2015.9.24)

(24) 登録日 平成27年7月31日(2015.7.31)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 11 (全 89 頁)

(21) 出願番号	特願2010-526974 (P2010-526974)	(73) 特許権者	510084149
(86) (22) 出願日	平成20年9月26日(2008.9.26)		ダナ ファーバー キャンサー インステ
(65) 公表番号	特表2010-539933 (P2010-539933A)		イテュート インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成22年12月24日(2010.12.24)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/011500		2 2 1 5 - 5 4 5 0 ボストン ブルック
(87) 国際公開番号	W02009/042237		リン アベニュー 4 5 0
(87) 国際公開日	平成21年4月2日(2009.4.2)	(73) 特許権者	508245253
審査請求日	平成23年9月26日(2011.9.26)		ナショナル インスティテューツ オブ
(31) 優先権主張番号	60/995,545		ヘルス
(32) 優先日	平成19年9月26日(2007.9.26)		アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5
(33) 優先権主張国	米国 (US)		2 - 3 8 0 4, ロックビル, エグゼク
(31) 優先権主張番号	61/124,221		ティブ ブールバード 6 0 1 1, スイ
(32) 優先日	平成20年4月14日(2008.4.14)		ート 3 2 5, オフィス オブ テクノ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ロジー トランスファー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B C L - 2 ファミリーポリペプチドを調節する方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

方法が、

a) B A X ポリペプチドを、当該 B A X ポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するのに適している条件下で化合物と接触させること；

b) 当該化合物が、配列番号 1 に記載の B A X ポリペプチドのアミノ酸配列の Met 2 0、L y s 2 1、A l a 2 4、G l n 2 8、G l n 3 2、G l u 1 3 1、A r g 1 3 4、M e t 1 3 7、L e u 1 4 1、A s p 1 4 2 に対応する 1 つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合することを確認すること；及び

c) 当該化合物による当該 B A X ポリペプチドの活性化を検出すること；
を含有してなる、B A X ポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化する調節因子を同定する方法。

【請求項 2】

工程 b) において、当該化合物が、配列番号 1 に記載の B A X ポリペプチドのアミノ酸配列の Met 2 0、L y s 2 1、A l a 2 4、G l n 2 8、G l n 3 2、G l u 1 3 1、A r g 1 3 4、M e t 1 3 7、L e u 1 4 1、A s p 1 4 2 に対応するアミノ酸残基に結合することを確認する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

当該化合物が、配列番号 1 3 に記載の配列のコンセンサスアミノ酸配列を含有してなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

20

【請求項 4】

当該化合物が、配列番号 3 に記載の配列と 40% 同一であって、配列番号 2 に記載の配列の L e u 9 2、G l y 9 6 及び A s p 9 7、又は配列番号 9 に記載の配列の L e u 1 5 2、G l y 1 5 6 及び A s p 1 5 7 に対応するアミノ酸残基を含有してなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

当該化合物が、配列番号 4 に記載の配列と 40% 同一であって、配列番号 6 に記載の配列の L e u 9 0、G l y 9 4 及び A s p 9 5 に対応するアミノ酸残基を含有してなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 6】

当該化合物が、配列番号 5 に記載の配列と 40% 同一であって、配列番号 7 に記載の配列の L e u 1 4 1、A l a 1 4 5 及び A s p 1 4 6 に対応するアミノ酸残基を含有してなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 7】

当該化合物が、配列番号 12 に記載の配列と 40% 同一であって、配列番号 1 に記載の配列の L e u 6 3、G l y 6 7 及び A s p 6 8 に対応するアミノ酸残基を含有してなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 8】

当該化合物が、BH3 SAHBポリペプチドである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 9】

BH3 SAHBポリペプチドが、共有結合架橋可能部分を含有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

BH3 SAHBポリペプチドが、常磁性標識を含有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

当該化合物が、配列番号 3、38～86、4、87～96、5、97～108、12、150～155 に記載のアミノ酸配列を含有してなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2007年9月26日出願の米国仮特許出願第60/995,545号及び2008年4月14日出願の同第61/124,221号の優先権を主張する。上記出願の全ての教示は参照して本出願に組み込まれている。

【0002】

(米国政府の権利の陳述)

本発明の資金援助は一部分米国国立衛生研究所に属する、国立心肺血液研究所(National Heart Lung and Blood Institute)の壁内研究プログラム(Intramural Reserach Program)からの支援によってなされた。従って、米国政府は本発明における及び本発明に対する幾らかの権利を有している。

【背景技術】

【0003】

BCL-2ファミリータンパク質相互作用は、アポトーシス、身体から損傷した又は不要な細胞を取り除くように意図された組織的な一連の事象、及び正常な発達並びに生命体の恒常性に重要な過程を調節する(Adams, J. M., and Cory, S. (1998), Science 281, 1322-1326; Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004), Cell 116, 205-219)。BCL-2のようなマルチドメイン抗アポトーシスタンパク質は細胞死を防ぐのに対して、BAXのようなマルチドメインプロアポトーシスタンパク質はミトコンドリア損傷を介する細胞死への経路を構成する。マルチドメインアポトーシスタンパク質は、4つ以下のBCL-2相同(BH)ドメイン内で配列保存を提示するが、プロアポトーシスタンパク質の「

10

20

30

40

50

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

【0004】

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

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

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

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

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

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

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

10

20

30

40

50

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

【課題を解決するための手段】

【0006】

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

10

【0007】

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

20

【0008】

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

30

【0009】

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

40

【0010】

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

50

【0011】

更に別の実施態様では、本発明は、BAXポリペプチドのアポトーシス活性を活性化又は阻害することによる、個人における脱制御アポトーシスの疾患（例えば、過剰増殖性疾患、糖尿病）を治療又は予防する方法を目的としている。この方法は、BAX活性部位の、Glu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147を含む1つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合してBAXポリペプチドのアポトーシス活性を活性化又は阻害するBH3ポリペプチド、又はその化学類似薬の薬理学的有効用量を、それを必要とする個人に投与することを必要とする。

10

【0012】

別の態様では、本発明は、個人におけるBCL-2関連疾患を治療又は予防するための化合物を目的としている。この化合物は、BCL-2ファミリーポリペプチドの活性部位に結合するとBCL-2ファミリーポリペプチドの活性を調節する。

【0013】

更なる態様では、本発明は、個人における脱制御アポトーシスの疾患（例えば、過剰増殖性疾患、糖尿病）を治療又は予防する化合物を目的としている。この化合物は、配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147を含む1つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合すると、BAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化又は阻害するBH3ポリペプチド又はその化学類似薬である。

20

【0014】

更に別の態様では、本発明は、図8で表されるアミノ酸配列を伴うBIM BH3ポリペプチドを有する組成物を目的としている。更に別の態様では、本発明は、配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも40%同一であり；相互作用残基Ile148、Ala149、Leu152、Arg153、Arg154、Ile155、Gly156、Asp157、Glu158、Asn160、Ala161、Tyr163、又はそれらの保存アミノ酸置換を包含している；アミノ酸配列を伴う、BIM BH3ポリペプチドを有する組成物を目的としている。更に別の態様では、本発明は、BID、PUMA、及び／又はBAXのBH3ドメインのような、BAX上の活性部位に結合する代替BH3に40%同一性を有する組成物を目的としている。

30

【0015】

別の態様では、本発明は、別のBCL-2ファミリーメンバーにおける相同調節部位を同定するために、その配列及びBAX活性化部位の三次元構造を使用することを目的としている。例えば、ポリペプチド配列の三次元構造相似性又は合致に基づいて、BAX活性化部位に相同する領域を同定して、次いで相互作用化合物のBCL-2ポリペプチドのアポトーシス活性を調節する能力について試験することがことができる。

40

【0016】

別の態様では、本発明は、1つ又はそれ以上の架橋可能な部分を包含しているBH3 SAHBポリペプチド及びそれを使用する方法を目的としている。例えば、架橋可能なBH3 SAHBを標的ポリペプチド上の活性部位を同定する方法において使用することができる。この方法は、標的ポリペプチドを、共有架橋可能部位を含んでいるBH3 SA

50

H Bポリペプチドと共に培養すること、及びB H 3 S A H Bポリペプチドを標的ポリペプチドに架橋すること、及びB H 3 S A H Bポリペプチドの標的ポリペプチドに対する相互作用部位を同定することを含んでいる。

【0017】

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

【図面の簡単な説明】

【0018】

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

10

【図2】図2は、多数のB C L-2ファミリーポリペプチドのB H 3ドメインのアミノ酸配列及び配置を説明している(表示順に、それぞれ、配列番号15~34)。

【図3】図3aは、螺旋 $\alpha 1 \sim \alpha 9$ を示すB A X構造を表すリボン図である。B I M S A H B結合の影響を受けるB A X残基のC ^{α} 原子を灰色の球体で示している。右図の表示は左図の表示を180度回転させていて、B I M S A H Bの影響を受ける残基の殆どがタンパク質構造の一方の面にあることを示している。タンパク質構造の全てのリボン図は、M O L M O Lを用いて作成した。図3bは、B I M S A H B滴定での¹⁵N-標識B A Xにおける骨格アミドの化学シフト変化を記録している。化学シフト変化をB A Xの残基番号の機能としてプロットしている。有意な骨格アミド化学シフト変化(>0.01 ppm)を有する残基をオレンジ色に着色している。

20

【図4】図4aは、B A X結合部位を説明する表面図である。溶媒で露光した結合部位の残基が示されている。黄色の陰影は、疎水性残基M 20、A 24、L 27、I 31、I 33、M 137、及びL 141の側鎖を示している。赤及び青の陰影は、正電荷残基(K 21、R 134)及び負電荷残基(E 131)の側鎖をそれぞれ示している。緑色の陰影は、親水性残基(Q 28、Q 32)の側鎖を示している。図4bは、B I M S A H B-B A X相互作用のNMR分析がB H 3が介在するB A X活性化のための新しい部位を明らかにしている。B I M S A H Bは、B A Xを、アンチアポトーシスタンパク質に対して同定されている標準的なB H 3結合部位とは異なる構造位置に組み込む。

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

30

【図6A-D】図6は、新規なB A X結合部位にあるB I M S A H Bの幾何学的配置である。(a) B I M S A H Bを、システイン残基をペプチドのN-又はC-末端の何れかに位置付けて、導入されたチオール基をM T S Lと反応させてニトロキシドスピン標識に組み込ませて生成した常磁性に標識化した誘導体に変異させた(表示順に、それぞれ、配列番号35~37)。(b) B A Xの交差ピーク強度比(B I M S A H B_{W 147 C-M T S L} [I_{O X}/I_{r e d}]/B I M S A H B_{A 164 C-M T S L} [I_{O X}/I_{r e d}]) 対それぞれのM T S L標識によって最大に影響を与えられている重要なB A X残基の残基数の比較プロットである。(c) B A X $\alpha 1$ 残基(例えば、S e r 16)は、B I M S A H B_(A 164 C-M T S L)の酸化形態(赤)及び還元形態(黒)を比較するP R E実験の影響を受ける(上図)のに対して、B A X $\alpha 6$ 残基(例えば、D 142)は対応するB I M S A H B_(W 147 C-M T S L)実験に影響を及ぼす(下図)ということを、相関スペクトルが明らかにしている。(d) P R Eで得られた右から左方向に配置したN-末端からC-末端を用いて、 α 螺旋1と6に関してB I M S A H Bを約90度に配列させた両方のM T S L組み込み部位からの分子間距離を用いて作成された計算構造。

40

【図6E】(e) B A X及びB I M B H 3上の新規な相互作用部位の間の複合体の計算構造。

【図7】図7は、B A X、B A K及びB C L-wの $\alpha 1$ 及び $\alpha 6$ ドメインを説明している

50

。

【図8-1】図8は、多数のBIM SAHBポリペプチドを説明している（表示順に、それぞれ、配列番号3及び38～86）。

【図8-2】図8は、多数のBIM SAHBポリペプチドを説明している（表示順に、それぞれ、配列番号3及び38～86）。

【図9】図9は、多数のBID SAHBポリペプチドを説明している（表示順に、それぞれ、配列番号4及び87～96）。

【図10】図10は、多数のPUMA SAHBポリペプチドを説明している（表示順に、それぞれ、配列番号5及び97～108）。

【図11】図11は、架橋アッセイで用いることができる多数のBIM、BID及びPUMA SAHB誘導体を説明している。UはBpaであるが、その他の公知の架橋可能部分の何れもを示すことができる（表示順に、それぞれ、配列番号109～148）。

【図12A-B】BIM SAHBはインビトロでBAXのオリゴマー化を直接開始して、BAXの機能的な放出活性を誘発する。（a）単量体BAXのBIM SAHBによる所定比での処理は、室温で15分間培養した後の単量体-オリゴマー状態のサイズ排除クロマトグラフィーによるモニタリングに反映されているように、用量反応性のBAXオリゴマー化を誘発した。（b）対応する比のBIM SAHB-BAX混合物を6A7抗体と共に培養した後、免疫沈降を行って、リガンドが誘発したBAXのN-末端エピートープ（残基12～24）の露出、活性により観察されるBAXにおける構造変化の兆候を評価した。

【図12C-D】免疫沈降したBAXの量は、BIM SAHB-BAXの比に従って増大した。BIM SAHBによるBAXの特異的で強力な機能的活性化を更に、（c）インビトロFITC-デキストランリポソーム放出アッセイ、及び（d）ミトコンドリアチトクロームc放出によって明らかにする。

【図13A-B】BIM SAHBが誘発するBAX活性化の特異性：点突然変異生成。

（a）その相互作用面をBAXで突然変異させたBIM SAHB化合物のパネル（表示順に、それぞれ、配列番号35、55、61及び63）。BIM SAHBの点突然変異生成は、（b）野生型BAXをオリゴマー化して（c）BAXが介在するチトクロームc放出を誘発する、その能力を無効にする。（d）BAX K21E及びR134E突然変異生成は、BIM SAHBが誘発するBAXのオリゴマー化を減弱する。

【図13C-D】BIM SAHBが誘発するBAX活性化の特異性：点突然変異生成。

（a）その相互作用面をBAXで突然変異させたBIM SAHB化合物のパネル（表示順に、それぞれ、配列番号35、55、61及び63）。BIM SAHBの点突然変異生成は、（b）野生型BAXをオリゴマー化して（c）BAXが介在するチトクロームc放出を誘発する、その能力を無効にする。（d）BAX K21E及びR134E突然変異生成は、BIM SAHBが誘発するBAXのオリゴマー化を減弱する。

【図14A-C】BIM SAHBが誘発したBAX活性化の特異性：連結スキャン 異なったi、i+4連結位置を有するBIM SAHB化合物のパネルを用いて、BIM SAHBの疎水性相互作用面に位置している連結だけがBAXのオリゴマー化及びBAXが介在するチトクロームc放出を妨害することを明らかにする。選択性は、BAXを活性化するためのBIM SAHB_Aのように同一の連結位置を有しているにも関わらず、BAD SAHB_Aの無能力によっても協調される（表示順に、それぞれ、配列番号69、72、74、35、76及び149）。

【図14D】BIM SAHBが誘発したBAX活性化の特異性：連結スキャン 異なったi、i+4連結位置を有するBIM SAHB化合物のパネルを用いて、BIM SAHBの疎水性相互作用面に位置している連結だけがBAXのオリゴマー化及びBAXが介在するチトクロームc放出を妨害することを明らかにする。選択性は、BAXを活性化するためのBIM SAHB_Aのように同一の連結位置を有しているにも関わらず、BAD SAHB_Aの無能力によっても協調される（表示順に、それぞれ、配列番号69、72、74、35、76及び149）。

【図15】図15は、BAX相互作用部位の突然変異が、BAXのオリゴマー化(a)、BAXが介在するチトクロームc放出(b)、及びBAXが再構成したBax^{-/-}Bak^{-/-}マウス胚線維芽細胞のBIM SAHB及びスタウロスポリンの両方が誘発するアポトーシスを妨害することを説明している。

【図16】図16は、(a) BAX BH3 SAHB (表示順に、それぞれ、配列番号12及び150～155) 及び(b) BAX螺旋9 SAHB (表示順に、それぞれ、配列番号14及び156～163) の例を説明している。

【図17】図17は、生理学的標的の共有結合捕獲のための多機能性SAHB化合物の化学設計を図示している。

【図18】図18は、(a) 光解離性カルベン生成官能性及び(b) 光解離性ニトレン生成官能性で誘導体化したSAHBを説明している。 10

【図19】BIM SAHBに結合するとBAX側鎖のNMR化学シフトは変化する。BAXのスペクトルを、等モルのBIM SAHBの存在下及び非存在下で、それぞれ、赤及び青で着色してある。(a) グルタミンのNH₂側鎖について交差ピークを示している¹H-¹⁵N HSQCスペクトルのサブセット。Gln 28、Gln 32、及びGln 52について有意な差を観察できる。(b) ¹H-¹³C CT-HSQCスペクトルのイソロイシンのC_{γ2}メチル基の領域。Ile 31-C^{γ2}-H₃ 及び Ile 133-C^{γ2}-H₃ について顕著な変化が見られる。

【図20A-1】図20は、新規なBAX相互作用部位を結合するためのBIM BH3 (配列番号3)、PUMA BH3 (配列番号5)、及びBAXBH3 (配列番号164) ドメイン中のコンセンサス配列(b)の同定を含んでいる、(a) BIM、BID、PUMA、BAX、及びBCL-2のような、BCL-2ファミリーポリペプチドのBH3領域中のアミノ酸配列を説明していて、高度に保存されたアミノ酸は強調されている。 20

【図20A-2】図20は、新規なBAX相互作用部位を結合するためのBIM BH3 (配列番号3)、PUMA BH3 (配列番号5)、及びBAXBH3 (配列番号164) ドメイン中のコンセンサス配列(b)の同定を含んでいる、(a) BIM、BID、PUMA、BAX、及びBCL-2のような、BCL-2ファミリーポリペプチドのBH3領域中のアミノ酸配列を説明していて、高度に保存されたアミノ酸は強調されている。

【図20B】図20は、新規なBAX相互作用部位を結合するためのBIM BH3 (配列番号3)、PUMA BH3 (配列番号5)、及びBAXBH3 (配列番号164) ドメイン中のコンセンサス配列(b)の同定を含んでいる、(a) BIM、BID、PUMA、BAX、及びBCL-2のような、BCL-2ファミリーポリペプチドのBH3領域中のアミノ酸配列を説明していて、高度に保存されたアミノ酸は強調されている。 30

【発明を実施するための形態】

【0019】

I. 定義

本明細書で用いられている用語「BCL-2ファミリーポリペプチド」は、僅か1つから4つもの数の保存的BCL-2相同ドメイン(BH1、BH2、BH3及び/又はBH4)を有するタンパク質の進化的保存ファミリーを示す。このBHドメインはアルファ螺旋断片であって、BCL-2ファミリーのアンチアポトーシス及びプロアポトーシスポリペプチドの両方に含まれる。BCL-2ファミリーポリペプチドは、BCL-2、BCL-X1、BCL-w、MCL-1、BCL-B、A1/BFL-1、BOO/DIVA、Nr-13、CED-9、BAX、BAK、BOK/MTD、BID BAD、BIK/NBK、BLK HRK BIM/BOD、BNIP3、NIX、NOXA、PUMA、BMF AND EGL-1、及びウィルス性同族体を包含する。 40

【0020】

用語「活性部位」は、その形状、アミノ酸含量及び帯電電位の結果として、様々な共有及び/又は非共有結合力によって、他の薬剤(これらに制限されないが、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、分子、化合物、抗生物質又は薬剤を含む)と有利に相互作用又は結合する、BCL-2ファミリーポリペプチドの領域を示す。「活性部位」は疎水性パッ 50

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

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

10

【0021】

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

20

用語「変異体」は、タンパク質又はその他の何れかの機能ドメイン内にある、参照BCL-2相同ドメインと少なくとも30%のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を示す。より詳細には、用語「変異体」は、これに限定されないが、配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147に対応する少なくとも2つのBAXアミノ酸残基の相対的構造座標を含む三次元構造によって特徴付けられる活性部位を含有しているBCL-2ファミリーポリペプチドを包含し、何れの場合も、これらの残基の保存骨格原子からの+/-標準偏差は最高1.1オングストローム、より好ましくは最高1.0オングストローム、そして最も好ましくは最高0.5オングストロームである。

30

【0022】

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

40

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

【0023】

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

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

【0024】

50

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

ある特定の態様では、荷電した／親水性の周辺は配列番号1に記載の配列のL y s 2 1, G l u 2 8, G l n 3 2, A s p 3 3, G l n 5 2, G l u 1 7, A r g 1 3 4, T h r 1 3 5, A s p 1 4 2, A r g 1 4 5, A r g 1 4 7に対応するアミノ酸残基を含有している。

【0025】

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

10

【0026】

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

【0027】

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

20

【0028】

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

【0029】

用語「アンチアポトーシスポリペプチド」は、1つ又はそれ以上のアミノ酸相同ドメイン、B H 1、B H 2、B H 3、及び／又はB H 4を有していて、アポトーシスを軽減又は阻害して細胞の生存を促進することの特徴としているB C L－2ファミリーポリペプチドを示す。「アンチアポトーシスポリペプチド」は更に、B C L－2ファミリーポリペプチド内のアンチアポトーシスB C L－2相同ドメインにアミノ酸配列が少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上類似しているようなタンパク質、又はその生物学的活性断片を包含する。

30

好ましい態様では、B C L－2相同ドメインは、B c l－2（配列番号8）のL e u 9 7、G l y 1 0 1及びA s p 1 0 2に対応するアミノ酸残基のような、1つ又はそれ以上の保存的アミノ酸残基を含有している；アンチアポトーシスポリペプチドはB C L－2、B C L－X 1、B C L－w、M C L－1、B C L－B、A 1／B F L－1、B O O／D I V A、N r－1 3又はC E D－9、及びウィルス性同族体を包含する。

【0030】

40

用語「プロアポトーシスポリペプチド」は、B H 1、B H 2、及び／又はB H 3を包含する1つ又はそれ以上のアミノ酸相同ドメインを有していてアポトーシスを活性化して細胞死を促進することの特徴としているB C L－2ファミリーポリペプチドを示す。「プロアポトーシスポリペプチド」は更に、B C L－2ファミリーポリペプチド内のプロアポトーシスB C L－2相同ドメインにアミノ酸配列が少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上類似しているようなタンパク質、又はその生物学的活性断片を包含する。プロアポトーシスポリペプチドは、B I M（配列番号2）のL e u 9 2、G l y 9 6及びA s p 9 7又はB I M（配列番号1）のL e u 6 3、A l a 6 7及びA s p 6 8に対応するアミノ酸残基のような、1つ又はそれ以上の保存的アミノ酸残基を有していると同定することができる

50

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

【0031】

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

10

【0032】

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

【0033】

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

20

【0034】

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

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

30

【0035】

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

40

【0036】

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

50

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

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

【0037】

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

【0038】

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

【0039】

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

【0040】

本明細書で用いられている用語「BIM BH3ポリペプチド」は、BIMのBCL-2相同ドメイン3を有しているポリペプチドを示す。一態様では、BIM BH3ポリペプチドは、配列番号3に記載の配列に；及び／又は図8に示されているようなアミノ酸配列に30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一のアミノ酸配列を有していて、配列番号2に記載の配列のLeu92、Gly96及びAsp97；又は配列番号9に記載の配列のLeu152、Gly156及びAsp157に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基、又はその同類置換を含んでいてもよい。好ましい態様では、BIM BH3ポリペプチドは配列番号3に記載のアミノ酸配列を有している。

【0041】

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

【0042】

本明細書で用いられている用語「PUMA BH3ポリペプチド」は、PUMAのBCL-2相同ドメイン3を有しているポリペプチドを示す。一態様では、PUMA BH3ポリペプチドは、配列番号5に記載の配列に；及び／又は図10に示されているようなアミノ酸配列に30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一のアミノ酸配列を有していて、配列番号7に記載の配列のLeu141、Ala145及びAsp146に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基、又はその同類置換を含んでいてもよい。好ましい態様では、PUMA BH3ポリペプチドは配列番号5に記載のアミノ酸配列を有している。

【0043】

本明細書で用いられている用語「BAX BH3ポリペプチド」は、BAXのBCL-2相同ドメイン3を有しているポリペプチドを示す。一態様では、BAX BH3ポリペプチドは、配列番号12に記載の配列に；及び／又は図16aに示されているようなアミノ酸配列に30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一のアミノ酸配列を有していて、配列番号1に記載の配列のLeu63、Ala67及びAsp68に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基、又はその同類置換を含んでいてもよい。好ましい態様では、BAX BH3ポリペプチドは配列番号12に記載のアミノ酸配列を有している。

【0044】

本明細書で用いられている用語「BH3コンセンサス配列」は、配列番号13の及び図20bに示されているようなアミノ酸コンセンサス配列、又はその同類置換を有しているポリペプチドを示す。一般に、BH3ポリペプチドは配列番号13に記載のアミノ酸コンセンサス配列を有していて、それはBIM、PUMA、BAX BH3アミノ酸配列に少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である。好ましい態様では、BH3ポリペプチドは配列番号13に記載のアミノ酸配列を含有している。更に好ましい態様では、BH3ポリペプチドはアルファ螺旋構造を形成するために炭化水素が連結されている。

【0045】

本明細書で用いられている用語「BAX α -螺旋9ポリペプチドは、BAXの螺旋9を有しているポリペプチドを示す。一態様では、BAX α -螺旋9ポリペプチドは、図16bに示されているようなアミノ酸配列に30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一のアミノ酸配列を有している。

【0046】

用語「薬理学的有効量」、「治療有効量」、「薬理学的有効用量」又は単に「有効量」は、意図した薬理学的、治療又は予防の結果を生じるのに有効な薬剤の量を示す。薬理学的有効量は、疾患の1つ又はそれ以上の症状の緩和をもたらし、又は疾患の進展を阻止し、或は疾患の退行をもたらし。例えば、疾患又は過剰な細胞生存或は増殖の治療については、治療有効量は、少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも100%、腫瘍生育速度を減少し、腫瘍量を減少し、転移の数を減少し、腫瘍の進展時間を延長し、又は生存期間を延長する治療剤の量を示すことが好ましい。

【0047】

例えば、細胞死が増大する疾患、例えば虚血の治療に関しては、治療有効量は、治療を施さなかったら生じ得る組織及び／又は細胞の損傷を阻止又は制限する治療剤の量を示すことが好ましい。治療剤は、本発明の治療剤の投与を行わずに生じる損傷に比べると、少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少

10

20

30

40

50

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

【0048】

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

10

【0049】

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

20

【0050】

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

【0051】

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

30

【0052】

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

【0053】

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

40

【0054】

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

50

C L-2 ファミリーポリペプチドの構造座標は当該技術分野で公知であって、例えば、Protein Data Bank (「PDB」) (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <http://www.rcsb.org>) から入手できる。例えば、公知の B C L-2 ファミリー構造座標は、B A X (PDB ID No. 1 f 1 6)、B A K (PDB ID No. 2 i m s)、B C L-2 (PDB ID No. 1 g 5 m)、B I M (PDB ID No. 2 p q k) 及び B C L-X L (PDB ID No. 1 1 x 1)、本発明に関連するものに加えて：B I M B H 3-B A X (PDB ID No. 2 k 7 w)、更に当該技術分野で公知のその他のものも包含する。

【0055】

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

【0056】

本明細書でアミノ酸の位置、例えば配列番号1に記載の配列の A 1 a 1 4 9、に関して用いられているような、用語「～に対応する」は、第一ポリペプチドと参照ポリペプチドの配列を相同性又は別のアルゴリズム（例えば構造比較）によってアラインメントするときに、参照ポリペプチド配列、例えば B A K、中の所定のアミノ酸と一致する第一ポリペプチド配列、例えば B A X、中のアミノ酸を示す。例えば、配列番号2に記載の配列の L e u 9 2 は、配列番号6に記載の配列の L e u 9 0 及び配列番号7に記載の配列の L e u 1 4 1 に対応する。同様に、配列番号2に記載の配列の G 1 y 9 6 は配列番号6に記載の配列の G 1 y 9 4 及び配列番号7に記載の配列の A 1 a 1 4 5 に対応する。このアラインメントは、この目的のためにデザインされたソフトウェア、例えば B L A S T P バージョン 2. 2. 2 をこのバージョン用のデフォルトパラメータと共に用いて、当業者によって実行される。対応するアミノ酸は、第一ポリペプチド配列と第二ポリペプチド配列の構造比較によっても特定することができる。このような構造比較は当該技術分野で公知であって本明細書に記載されている。例えば、Petros et al. Biochimica et Biophysica Acta 1644;83-94 (2004) 及び Suzuki et al., Cell. 103:645-654 (2000) は、B C L-2 ファミリーメンバー中の B C L-2 相同ドメイン間の構造アラインメントを説明している。

【0057】

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

【0058】

「非-必須」アミノ酸残基は、その B A X 結合能を消失若しくは実質的に変化させることなく、ポリペプチド（例えば、B I M B H 3）の野生型配列から変えることができる残基である。「必須」アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型から変えると、ポリペプチドの B A X 活性部位への結合活性の消失又は実質的な消失をもたらす残基である。B H 3 ドメインの必須及び非-必須アミノ酸残基は、当該技術分野で公知で本明細書に記載されている方法によって容易に確認することができる。本明細書で用いられている用語「必須」アミノ酸残基は、必須アミノ酸の同類置換を包含する。一般に、「必須」アミノ酸残基

10

20

30

40

50

はBH3ポリペプチドの相互作用面（BAXと相互作用する残基）で見出される。

【0059】

「保存アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換わっていることである。例えば、類似の側鎖を有しているアミノ酸残基のファミリーが当該技術分野において定義されている。これらのファミリーは塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含んでいるアミノ酸を包含する。その他の保存アミノ酸置換は、ペプチドの電荷を修正するためにアスパラギンをアスパラギン酸に置換するときのように、アミノ酸側鎖ファミリー全体にわたって生じてよい。従って、BH3ドメインポリペプチドにおける予測される非一必須アミノ酸残基を、例えば、同じ側鎖ファミリー又はファミリー全体にわたる同族（例えば、アスパラギンをアスパラギン酸に、グルタミンをグルタミン酸に）由来の別のアミノ酸残基で置き換えることが好ましい。更に、コードされる配列中の単一アミノ酸又はアミノ酸の僅かな部分を修正、付加又は抹消するそれぞれの置換、削除又は付加も「同類置換」と考えられる。

10

【0060】

2つ又はそれ以上の核酸又はポリペプチド配列に関連している用語「同一の」又は「パーセント同一の」は、以下の配列比較アルゴリズムのうちの1つを用いるか、又は目視検査によって測定するように、最大一致について比較及びアラインメントしたときに、同一であるか、又は特定の割合の同一であるヌクレオチド又はアミノ酸を有する、2つ又はそれ以上の配列又は部分配列を示す。

20

【0061】

2つ又はそれ以上のポリペプチドに関連している「類似」又は「パーセント類似」は、以下の配列比較アルゴリズムのうちの1つを用いるか、又は目視検査によって測定するように、最大一致について比較及びアラインメントしたときに、同一であるか、又は特定の割合の同一であるアミノ酸残基又はその同類置換を有する、2つ又はそれ以上の配列又は部分配列を示す。例を挙げると、以下で検討されているように、第1領域中に含まれる数と等しい数のアミノ酸の何れかの配列と比較したとき、又は当該技術分野で公知のコンピューター同一性プログラムによってアラインメントされているアンチアポトーシスBCL-2ファミリーメンバータンパク質のアラインメントと比較したときに、第2アンチアポトーシスBCL-2ファミリーメンバータンパク質の領域と第1領域のアミノ酸配列が、少なくとも40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、又は95%も同一又は同類置換されていならば、第1タンパク質領域は、アンチアポトーシスBCL-2ファミリーメンバータンパク質の領域と類似していると考えられ得る。第1タンパク質及び第2タンパク質のポリペプチド領域が、例えば図2で示されているように、1つ又はそれ以上の保存的アミノ酸を包含していることが好ましい。

30

【0062】

II. 説明

本発明は、BCL-2ファミリータンパク質上の新規な調節部位を標的にすることによってBCL-2ファミリーポリペプチドの活性を調節する方法、キット及び組成物を目的としている。本発明の方法及び化合物は、BCL-2ファミリーの1つ又はそれ以上のポリペプチドの脱制御を特徴とする疾患（例えば、過剰増殖疾患）を治療又は予防するのに有用である。更に、本発明の方法及び化合物は、過剰な細胞増殖又は生存、又は過剰な細胞死（例えば、アポトーシス）に関連する、BCL-2に関連していない疾患の治療においても有用である。本発明は、少なくともその一部が、化合物が結合すると、BAXポリペプチドのアポトーシス活性を修正する、BAXポリペプチド上の活性部位の同定に基づいている。少なくとも一部は、この活性部位の同一性及び位置は、炭化水素が連結されて

40

50

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

【0063】

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

【0064】

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

【0065】

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

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

【0066】

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

【0067】

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

10

20

30

40

50

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

一態様では、化合物はBH3領域のポリペプチドである。適切なBH3領域のポリペプチドは、BH3領域を含有する何れかのBCL-2ポリペプチド由来であってよい（例えば、図1及び図2）。例えば、適切なBH3領域のポリペプチドは、Bim、Bid、Bad、Bik/Nbk、Blk、Hrk、Bim/Bod、Bnip3、Nix、Noxa、Puma、Bmf又はEg1-1、又はBH3ドメインを含有している別の何れかのBCL-2ポリペプチドに由来してよい。

【0068】

10

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

【0069】

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

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

20

【0070】

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

30

【0071】

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

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

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

40

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

【0072】

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

50

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

10

【0073】

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

【0074】

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

20

【0075】

一態様では、3次元構造はBCL-2ファミリーポリペプチドの全長からなっている。別の態様では、3次元構造は活性部位を含んでいるBCL-2ファミリーポリペプチドの断片からなっている。

30

BCL-2ファミリーポリペプチドの活性部位は、荷電した疎水性の残基の周辺で囲まれている中心となる疎水性表面を含んでいて、BIMBH3、BIDBH3、PUMABH3、BAXBH3、又はBCL-2ドメインの別の安定化されたアルファ螺旋と結合でき、そしてBAXのアルファ螺旋1及び6の並置によって形成されている。活性部位は、疎水性パッチ及び荷電した疎水性のアミノ酸の周辺の両方を有している。

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

40

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

【0076】

50

候補調節物質は、ポリペプチドの活性部位に結合する、有機化合物又はポリペプチド、又はこれらの組合わせの何れであってもよい。候補調節物質が、配列番号1に記載の配列のMet 20、Lys 21、Ala 24、Leu 27、Gln 28、Gln 32、Glu 131、Arg 134、Thr 135、Met 137、Gly 138、Leu 141、Asp 142に対応する活性部位の1つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合することが好ましい。

別の態様では、候補調節物質は、配列番号1に記載の配列のGlu 17、Met 20、Lys 21、Thr 22、Ala 24、Leu 25、Leu 27、Gln 28、Gly 29、Ile 31、Gln 32、Asp 33、Leu 47、Asp 48、Pro 49、Val 50、Pro 51、Gln 52、Asp 53、Thr 56、Arg 89、Phe 92、Phe 93、Pro 130、Glu 131、Ile 133、Arg 134、Thr 135、Met 137、Gly 138、Trp 139、Leu 141、Asp 142、Phe 143、Arg 145、Glu 146、Arg 147に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合する。

一態様では、候補調節物質はBH3領域ポリペプチドである。適切なBH3領域ポリペプチドは、BH3領域を発現するBCL-2ポリペプチドの何れかから誘導することができる（例えば、図1又は2）。例えば、適切なBH3領域ポリペプチドは、Bid、Bad、Bik/Nbk、Bik、Hrk、Bim/Bod、Bnip3、Nix、Noxa、Puma、Bmf又はEg1-1、又はBH3ドメインを含有するBCL-2ファミリーポリペプチドの何れかから誘導することができる。

【0077】

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

一態様では、化合物は、配列番号3又は図1、2、8、9、10、16a、又は20に例示されているBH3領域と95%同一のアミノ酸配列を有しているBH3領域ポリペプチドであって、配列番号9に記載の配列のLeu 52及びAsp 157に対応するアミノ酸残基又はその同類置換を有している。

更なる態様では、候補調節物質は、配列番号9に記載の配列のIle 148、L152、Arg 153、Arg 154、Lle 155、Gly 156、Asp 157、Glu 158、Asn 160、Ala 161、Tyr 163に対応するアミノ酸残基を有している。

【0078】

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

更により好ましい態様では、化合物は、BIM BH3 SAHBポリペプチド（配列番号3）、BID BH3 SAHBポリペプチド（配列番号4）又はPUMA BH3 SAHBポリペプチド（配列番号5）又はBAX BH3 SAHB（配列番号12）である。BH3 SAHBポリペプチドは、安定化されたアルファ螺旋構造を有するように、炭化水素が連結されている。BH3 SAHBを作成する方法は当該技術分野で公知であって、2004年11月5日に出願された、米国特許出願公開第US 2005/0250680号に記載されており、これはその全てを参照して本明細書に取り込まれている。

【0079】

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

10

20

30

40

50

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

【0080】

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

10

【0081】

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

20

【0082】

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

【0083】

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

30

【0084】

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

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

40

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

【0085】

50

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

10

【0086】

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

好ましくは、化合物は活性部位の1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する。

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

20

【0087】

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

30

【0088】

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

【0089】

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

40

【0090】

更なる態様では、化合物は、配列番号9に記載の配列のIle148、Ala149、L152、Arg153、Arg154、L155、Gly156、Asp157、Glu158、Asn160、Ala161、Tyr163に対応するアミノ酸残基を有している。

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

50

列番号10)から誘導される。

更により好ましい態様では、化合物は、BIM BH3 SAHBポリペプチド(配列番号3)、BID BH3 SAHBポリペプチド(配列番号4)、PUMA BH3 SAHBポリペプチド(配列番号5)又はBAX BH3 SAHB(配列番号12)である。

【0091】

BIM BH3 SAHBポリペプチドは、安定化されたアルファ螺旋構造を有するように、炭化水素が連結されている。BH3 SAHBを作成する方法は当該技術分野で公知であって、2004年11月5日に出願された、米国特許出願公開第US2005/0250680号に記載されており、これはその全てを参照して本明細書に取り込まれている。

10

【0092】

化合物のBCL-2ポリペプチドへの活性部位への結合は、BCL-2活性(例えば、プロアポトーシス又はアンチアポトーシス活性)の調節をもたらす。

一態様では、調節はプロアポトーシス活性の活性化(例えば、アポトーシスの増大、細胞死)又は阻害(アポトーシスの減少、細胞生存)の何れかである。

別の態様では、調節はアンチアポトーシス活性の活性化(例えば、細胞生存の増大、アポトーシスの減少)又は阻害(例えば、アポトーシス、細胞死の増大)の何れかである。

【0093】

更なる態様では、本発明は、BAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化することによって、個人における過剰増殖性疾患(例えば、癌、化学療法抵抗性の癌)を治療又は予防する方法を目的としている。この方法はこれを必要としている個人に、BAX活性部位の配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基と結合して、BAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するBH3ポリペプチドの薬理学的有効用量を投与することを必要としている。

20

30

【0094】

別の態様では、本発明は、個人におけるBCL-2関連疾患を治療又は予防するための化合物を目的としている。この化合物は、BCL-2ファミリーポリペプチドの活性部位に結合するとBCL-2ファミリーポリペプチドの活性を調節する。

【0095】

更なる態様では、本発明は、個人における過剰増殖性疾患(例えば、癌、化学療法抵抗性の癌)を治療又は予防するための化合物を目的としている。この化合物は配列番号1に記載の配列のMet20、Lys21、Ala24、Leu27、Gln28、Gln32、Glu131、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Leu141、Asp142、に対応するアミノ酸残基と結合するとBAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するBH3ポリペプチドである。

40

別の態様では、この化合物は配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147に対応するアミノ酸残基と結合するとBAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するBH3ポリペプチドである。

【0096】

50

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

10

【0097】

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

20

【0098】

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

【0099】

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

【0100】

30

III. ペプチドのBCL-2ファミリー

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

【0101】

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

40

【0102】

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

50

I D、B A D、B I M、B I K、N O X A、P U M A) に分かれる。

B C L-2 ファミリーメンバーは、競合結合及びプロアポトーシス及びアンチアポトーシスタンパク質濃度間の比率が細胞死刺激に対する感受性を決定するということを示唆する、ホモ-及びヘテロ-二量体を形成する能力を有している。

アンチアポトーシスタンパク質は、プロアポトーシス過剰、すなわち、過剰にプログラムされた細胞死、から細胞を保護する機能を有している。

ある特定の細胞型では、細胞膜で受信した細胞死信号が、ミトコンドリア経路を介してアポトーシスを誘発する。ミトコンドリアは、致命的な下流のタンパク質分解事象を統制する、カスパーゼ9を活性化する細胞質複合体の重要な成分である、チトクロームcを隔離することによって細胞死の管理物質として機能できる。

10

【0103】

B C L-2 / B C L-X L 及び B A K / B A X のようなマルチドメインタンパク質は、B C L-2 ファミリーの上流 B H 3 オンリーメンバーによって更に調節されるそれらの活性をもって、ミトコンドリア膜で監視及び死刑執行と対決する役割を果たす。例えば、B I D は、プロアポトーシスタンパク質の「B H 3 ドメイン-オンリー」サブセットのメンバーであって、細胞膜で受け取った死の信号をミトコンドリア膜のエフェクタープロアポトーシスタンパク質に伝達する。B I D 及び B I M のような、精選した B H 3 -オンリーメンバーは「活性化因子」と呼ばれていて (Letai, A., et al. Cancer Cell 2, 183-192 (2002))、プロアポトーシスとアンチアポトーシスの両方と相互作用するという固有の能力を有している (Walensky Mol Cell 2006)。カスパーゼ8の活性化によって、B I D が開裂して切断された付加物、t B I D がチトクロームcの放出及びB C L-2 ファミリータンパク質の関与によるミトコンドリアアポトーシスを誘発する。

20

【0104】

欠失突然変異誘発試験は、プロアポトーシスファミリーメンバーの両親媒性アルファ螺旋 B H 3 セグメントが死のドメインとして機能することにより、マルチドメインのアポトーシスタンパク質と相互作用する重要な構造モチーフを示すことを確認した。B H 3 螺旋が、B H 1、2 及び 3 の境界面により形成される疎水性溝に挿入することによってアンチアポトーシスタンパク質と相互作用することを、構造研究が明らかにした。t B I D と B I M はアンチアポトーシスタンパク質 (例えば、B C L-2 及び B C L-X L) によって結合され及び隔離でき、チトクロームcの放出及びミトコンドリアアポトーシスのプログラムを誘導する、プロアポトーシスタンパク質 B A X 及び B A K の活性化を誘発する。

30

【0105】

B C L-2 関連卵巢キラー (B O K) はプロアポトーシスマルチドメインサブグループの第3のメンバーであって、B I D 及び B I M S A H B のような、S A H B リガンドによっても結合される。B O K は卵巢 c D N A のライブラリーからクローン化されて、卵巢、子宮及び睪丸中で高度に発現されることが見出された。B O K m R N A 種はその後、心臓、脾臓、肝臓、結腸、肺、腸、甲状腺、副腎、膵臓及び骨髄を包含する、広く分布した組織中及び特定の癌細胞株中で同定されている。

【0106】

B C L-2 ファミリータンパク質 (B C L-X L) の最初の X 線及び N M R 構造は 1996 年に報告された。B C L-X L は、8 個のアルファ螺旋から成っていて、そのうちの 2 個は孔形成ジフテリア毒素及びコリシンの膜内挿入ドメインに類似した中心疎水性核を形成する。この構造類似性が、B C L-2 ファミリーメンバーが、核螺旋 5 及び 6 に基づく活性である、リポソーム及びミトコンドリアシステムにおける孔形成を調節できるという実験的な確認を導いた。

40

【0107】

プロアポトーシス側の、B H 3 -オンリー B I D 及びマルチドメインプロアポトーシス B A X の N M R 構造が、細胞死の促進及び阻止の間の類似点を明らかにした (図 3、7)。B I D 及び B A X は、それぞれが 6 個又は 7 個の両親媒性螺旋で囲まれている 2 つの中心角螺旋を同様に保持している。B I D 及び B A X のアミノ末端部位は、B C L-2 及び

50

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

【0108】

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

10

【0109】

IV. BCL-2の活性部位

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

20

【0110】

BAXと共複合しているBIM BH3 SAHBのNMR構造分析は、BAXアルファ螺旋1及び6 (図3及び4) の並置によって形成されるBAXの活性部位を明らかにした。BIM SAHBと複合しているBAXポリペプチド (図6) のNMRデータは、BIM BH3の結合及びBAXの活性化に寄与する疎水性パッチと荷電した親水性残基の周辺の両方から成っていることを示す。疎水性パッチは、これに限定されないが、アミノ酸残基、Ala24、Met20、Leu25、Leu27、Ile31、Ile133、Met137、Gly138、Trp139、Leu141から成り、一方荷電した親水性領域は、これに限定されないが、配列番号1に記載の配列のLys21、Gln28、Gln32、Asp33、Gln52、Glu17、Arg134、Thr135、Asp142、Arg145、Arg147から成っている。これらの疎水性アミノ酸は、BIM SAHBの疎水性アミノ酸残基Ile148、Ala149、Leu152、Ile155、Gly156、及びPhe159と順に結合し、そして荷電した親水性アミノ酸残基はBIM SAHBの荷電した親水性アミノ酸残基のArg153、Arg154、Asp157、Glu158、Asn160、及びTyr163と結合する。

30

【0111】

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

40

【0112】

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

50

【 0 1 1 3 】

20

一態様では、S A H Bポリペプチドは式（I）を有している。

【化 1】

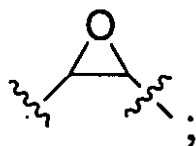


40

Kは、O、S、SO、SO₂、CO、CO₂、CONR₆、又は

【 0 1 1 7 】

【化 2】



【0118】

である。

R_6 は、H、アルキル、又は治療剤である。

n は、1～4の整数である。

x は、2～10の整数である。

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

。

そしてそれぞれの Xaa は、独立してアミノ酸である。

S A A B ポリペプチドは本明細書に記載のアミノ酸配列を包含していてもよい。

【0119】

繫鎖は、アルキル、アルケニル、又はアルキニル部分（例えば、 C_5 、 C_8 又は C_{11} アルキル又は C_5 、 C_8 又は C_{11} アルケニル、又は C_5 、 C_8 又は C_{11} アルキニル）を包含してよい。繫鎖アミノ酸はアルファ二置換（例えば、 $C_1 \sim C_3$ 又はメチル）されていてもよい。

ある場合は、 x が 2、3、又は 6 である。

ある場合は、それぞれの y が独立して 3 と 15 の間の整数である。

ある場合は、それぞれの y が独立して 1 と 15 の間の整数である。

ある場合は、 R_1 及び R_2 がそれぞれ独立して H 又は $C_1 \sim C_6$ アルキルである。

ある場合は、 R_1 及び R_2 がそれぞれ独立して $C_1 \sim C_3$ のアルキルである。

ある場合は、 R_1 及び R_2 のうち少なくとも 1 つがメチルである。例えば、 R_1 及び R_2 の両方がメチルである。

【0120】

ある場合は、 R_3 がアルキル（例えば、 C_8 アルキル）であり、そして x が 3 である。

ある場合は、 R_3 が C_{11} アルキルであり、そして x が 6 である。

ある場合は、 R_3 がアルケニル（例えば、 C_8 アルケニル）であり、そして x が 3 である。

ある場合は、 x が 6 であり、そして R_3 が C_{11} アルケニルである。

ある場合は、 R_3 が直鎖アルキル、アルケニル、又はアルキニルである。

ある場合は、 R_3 が $--CH_2--CH_2--CH_2--CH=CH--CH_2--CH_2--CH_2--$ である。

ある特定の実施態様では、2つのアルファ、アルファ二置換立体中心が、R 配置又は S 配置（例えば、 i 番目と $i+4$ 番目が架橋）の両方であるか、又は一方の立体中心が R で、他方が S（例えば、 i 番目と $i+7$ 番目が架橋）である。

従って、式 (I) を次のように表現する場合、

【0121】

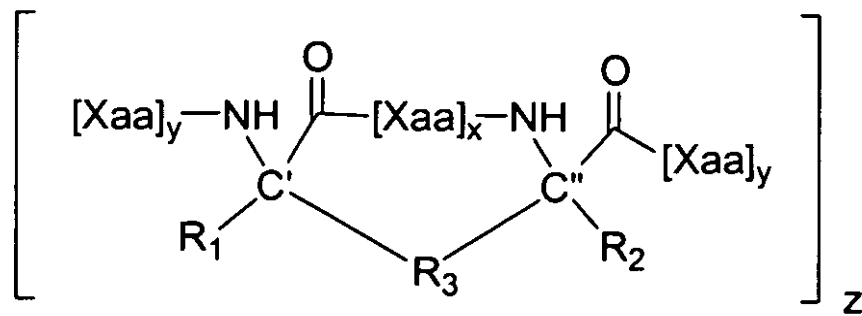
10

20

30

40

【化 3】



10

【0122】

C' 及び C'' 二置換立体中心は、例えば x が 3 のときは、両方が R 配置でもよく、又はこれらは両方が S 配置でもよい。x が 6 の場合は、C' 二置換立体中心が R 配置で、C'' 二置換立体中心が S 配置である。R₃ の二重結合は E 又は Z の立体化学配置であってよい。

【0123】

ある場合は、R₃ が [R₄--K--R₄] であり、そして R₄ が直鎖アルキル、アルケニル、又はアルキニルである。

20

【0124】

ある場合は、SAHBポリペプチドはBH3ドメインの少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50個又はそれ以上の連続したアミノ酸を含有することができる。

それぞれの [Xaa]_y は、それぞれにBH3ドメインの少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25個又はそれ以上の連続したアミノ酸を含有することができるペプチドである。

[Xaa]_x は、BH3ドメインの酸の3又は6個の連続したアミノ酸を含有することができる。

30

【0125】

SAHBポリペプチドはBH3ドメインの酸の少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50個又はそれ以上の連続したアミノ酸を含有することができ、ここではアミノ酸2個、3個又は6個分離している2つのアミノ酸が、R₃ を介して結合しているアミノ酸置換によって置き換わっている。従って、少なくとも2つのアミノ酸を繋鎖アミノ酸又は繋鎖アミノ酸置換によって置き換えることができる。

従って、式 (I) を次のように表現する場合、

【0126】

40

【 0 1 2 7 】

【 0 1 2 8 】

【 0 1 2 9 】

【 0 1 3 0 】

【化 5】



【 0 1 2 7 】

【 0 1 2 8 】

20

【 0 1 2 9 】

【 0 1 3 0 】

【化 5】



【 0 1 3 1 】

40

x は 2、3、又は 6 である。

それぞれの y は独立して、 $0 \sim 100$ の整数である。

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

○

それぞれの X a a は、独立してアミノ酸である。

【 0 1 3 2 】

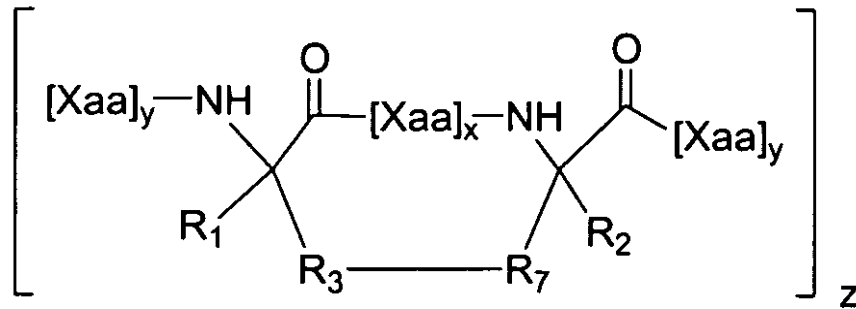
50

【 0 1 3 3 】

更に別の態様では、本発明の S A H B ポリペプチドは式 (I I I) を有している。

【 0 1 3 4 】

【化 6】



10

【 0 1 3 5 】

式中の、それぞれのR₁及びR₂は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、又はヘテロシクリルアルキルである。

R₃ は、アルキル、アルケニル、アルキニル、[R₄--K--R₄]_n、又は天然のアミノ酸側鎖であり、これらのそれぞれは0～6個のR₅で置換されている。

R₄ は、アルキル、アルケニル、又はアルキニルである。

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

Kは、O、S、SO₂、CO、CONR₆、又は

【 0 1 3 6 】

【化 7】



30

【 0 1 3 7 】

である。

R₆ は、H、アルキル、又は治療薬剤である。

R₇ は、アルキル、アルケニル、アルキニル、[R₄--K--R₄]_n、又は天然のアミノ酸側鎖であり、これらのそれぞれは0～6個のR₅で置換されている。

n は、 $1 \sim 4$ の整数である。

x は、2 ~ 10 の整数である。

それぞれの v は独立して、 $0 \sim 100$ の整数である。

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

○

そして、それぞれの X_{aa} は、独立してアミノ酸である。

【 0 1 3 8 】

このポリペプチドはアルファ螺旋を形成して、本明細書に開示されているアミノ酸配列に約30%又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含有している。

【 0 1 3 9 】

炭化水素の繫鎖は記載されているが、別の繫鎖も想定される。例えば、繫鎖は、1つ又

50

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

【0140】

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

10

【0141】

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

【0142】

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

20

【0143】

V. 薬物設計

30

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

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

【0144】

40

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

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

50

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

【0145】

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

【0146】

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

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

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

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

【0147】

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

【0148】

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

【0149】

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

10

20

30

40

50

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

【0150】

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

10

【0151】

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

【0152】

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

20

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

【0153】

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

30

一態様では、BCL-2 ファミリーポリペプチドの完全な構造座標を入力する。

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

構造座標は当該技術分野で公知であるか、又はホモロジーモデリングに基づいている。例えば、公知の BCL-2 ファミリー構造座標は、BAX (PDB ID No. 1f16)、BAK (PDB ID No. 2ims)、BCL-2 (PDB ID No. 1g5m)、及び BCL-XL (PDB ID No. 1lxl)、本発明に関連するものに加えて：BIMBH3-BAX (PDB ID No. 2k7w)、更に当該技術分野で公知のその他のものも包含する。。多くの公知の BCL-2 ファミリーポリペプチドの構造座標は、Protein Data Bank (「PDB」) (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <http://www.rcsb.org>) から入手できる。

40

【0154】

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

50

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

【0155】

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

10

【0156】

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

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

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

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

20

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

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

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

30

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

【0157】

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

40

【0158】

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

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

50

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

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

【0159】

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

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

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

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

【0160】

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

【0161】

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

【0162】

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

【0163】

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

【0164】

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

10

20

30

40

50

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

【0165】

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

10

【0166】

ある特定の態様では、調節因子は、BCL-2 ファミリーポリペプチドに対して、0.2 mM未満の、0.1 mM未満の、750 μ M未満の、500 μ M未満の、250 μ M未満の、100 μ M未満の、50 μ M未満の、500 nM未満の、250 nM未満の、50 nM未満の、30 nM未満の、20 nM未満の、10 nM未満の、5 nM未満の、3 nM未満の、1 nM未満の、又は0.5 nM未満のKdを有している。

20

【0167】

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

【0168】

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

30

40

【0169】

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

【0170】

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

50

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

【0171】

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

10

【0172】

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

【0173】

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

20

【0174】

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

30

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

40

【0175】

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

50

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

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

10

【0176】

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

20

【0177】

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

【0178】

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

30

候補化合物を、インビトロでの生物活性を、例えば、構造特異的抗体 (例えば、BAX 6A7 抗体、図 12b) によって又は HSQC NMR 分析によって測定されるような BCL-2 ファミリータンパク質の構造変化、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による分析 (図 12a、13b、13d) 又は動的光散乱によって観察されるような BCL-2 ファミリータンパク質 (例えば、BAX) のオリゴマー化状態の変化、リポソームからフルオロフォア又はタンパク質結合フルオロフォア誘発放出、及び/又は精製されたミトコンドリアからのチトクローム c 放出 (図 12c、12d) を誘発する用量反応性の効果を測定することによって、スクリーニングすることもできる。

40

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

【0179】

50

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

【0180】

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

【0181】

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

【0182】

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

【0183】

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

【0184】

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

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

【0185】

VII. 化合物のインビボ試験

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

10

20

30

40

50

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

【0186】

本発明の BCL-2 ファミリー調節化合物のインビボ抗腫瘍活性は、治療していない担癌動物と比較して、哺乳動物（例えば、マウス）における腫瘍細胞の減少及び結果として現れる生存時間の増大によってアッセイすることができる。例えば、CDF1 マウスに p388 マウスリンパ球性白血病細胞、エールリッヒ癌細胞、B16 メラノーマ細胞、又は Me th-A 繊維肉腫細胞の懸濁液を腹腔内投与する。注射投与されたマウスの一部は次ぎに、本発明の BCL-2 ファミリー調節化合物で腹腔内へ処理され、その他のマウスは食塩水で処理される。次いで、化合物のインビボ活性を %T/C（食塩水治療群の平均生存時間に対する治療群の平均生存時間の比 $\times 100$ ）の観点から確認する。Yokoi, et al., 米国特許第 4, 584, 377 号；Kelly, et al., 米国特許第 5, 155, 208 号；Warnic-Pickle, et al., J. Antibiot. 34(11):1402-7 (1981); 及び Pandley, et al., 上記参照。

【0187】

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

【0188】

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

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

【0189】

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

10

20

30

40

50

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

【0190】

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

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

10

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

【0191】

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

20

このような結果は、当業者、例えば、癌専門医によって確認できる。

【0192】

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

30

【0193】

VIII. 治療方法

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

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

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

40

【0194】

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

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

50

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

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

【0195】

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

10

【0196】

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

20

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

【0197】

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

30

【0198】

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

40

【0199】

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

50

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

【0200】

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

10

【0201】

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

【0202】

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

20

【0203】

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

【0204】

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

30

【0205】

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

40

【0206】

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

50

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

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

【0207】

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

【0208】

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

【0209】

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

【0210】

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

【0211】

IX. 調節因子の投与

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

【0212】

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

10

20

30

40

50

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

【0213】

この態様の一実施態様では、患者は別の治療方法を受けていたか或は受けている。

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

【0214】

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

【0215】

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

【0216】

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

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

【0217】

ある態様では、患者における事前治療は失敗している。

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

【0218】

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

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

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

10

20

30

40

50

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

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

【0219】

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

10

【0220】

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

【0221】

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

20

【0222】

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

【0223】

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

30

【0224】

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

【0225】

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

40

【0226】

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

【0227】

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

50

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

【0228】

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

10

【0229】

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

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

20

【0230】

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

【0231】

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

30

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

【0232】

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

40

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

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

【0233】

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

50

8、10、15、20回、又はそれ以上の投与)で投与することを含有している。

【0234】

一態様では、予防及び／又は治療レジメンは、本発明の化合物又はその医薬組成物を患者に、反復投与法で投与することを含有している。反復投与法で投与する場合は、化合物又は医薬組成物を疾患を予防、治療、及び／又は管理するのに十分な頻度及び量で投与する。

一態様では、投与の頻度は、1日1回から8週間に1回までの範囲である。別の態様では、投与の頻度は、1週間に1回から6週間に1回までの範囲である。別の態様では、投与の頻度は、3週間に1回から4週間に1回までの範囲である。

【0235】

一般に、癌を予防、治療、及び／又は管理するために対象に投与される本発明の化合物の用量は、対象の体重の、0.01～500mg/kgの範囲、より典型的には0.1mg/kg～100mg/kgの範囲である。一態様では、対象に投与される用量は、対象の体重の、0.1mg/kg～50mg/kg、又は1mg/kg～50mg/kgの範囲、より好ましくは、対象の体重の、0.1mg/kg～25mg/kg、又は1mg/kg～25mg/kgの範囲である。

【0236】

特定の態様では、患者の癌を予防、治療、及び／又は管理するために対象に投与される本発明の化合物の用量は、患者の体重の、500mg/kg又はそれ以下、好ましくは250mg/kg又はそれ以下、100mg/kg又はそれ以下、95mg/kg又はそれ以下、90mg/kg又はそれ以下、85mg/kg又はそれ以下、80mg/kg又はそれ以下、75mg/kg又はそれ以下、70mg/kg又はそれ以下、65mg/kg又はそれ以下、60mg/kg又はそれ以下、55mg/kg又はそれ以下、50mg/kg又はそれ以下、45mg/kg又はそれ以下、40mg/kg又はそれ以下、35mg/kg又はそれ以下、30mg/kg又はそれ以下、25mg/kg又はそれ以下、20mg/kg又はそれ以下、15mg/kg又はそれ以下、10mg/kg又はそれ以下、5mg/kg又はそれ以下、2.5mg/kg又はそれ以下、2mg/kg又はそれ以下、1.5mg/kg又はそれ以下、又は1mg/kg又はそれ以下である。

【0237】

別の特定の態様では、患者の癌を予防、治療、及び／又は管理するために対象に投与される本発明の化合物の用量は、0.1～50mg、0.1mg～20mg、0.1mg～15mg、0.1mg～12mg、0.1mg～10mg、0.1mg～8mg、0.1mg～7mg、0.1mg～5mg、0.1mg～2.5mg、0.25mg～20mg、0.25mg～15mg、0.25mg～12mg、0.25mg～10mg、0.25mg～8mg、0.25mg～7mg、0.25mg～5mg、0.5mg～2.5mg、1mg～20mg、1mg～15mg、1mg～12mg、1mg～10mg、1mg～8mg、1mg～7mg、1mg～5mg、又は1mg～2.5mgの単位用量である。

【0238】

特定の態様では、患者の癌を予防、治療、及び／又は管理するために対象に投与される本発明の化合物の用量は、患者の体表面積の、0.01～10g/m²の範囲、そしてより典型的には、0.1g/m²～7.5g/m²の範囲である。一態様では、対象に投与する用量は、対象の体表面積の、0.5g/m²～5g/m²、又は1g/m²～5g/m²の範囲である。

【0239】

別の態様では、予防及び／又は治療レジメンは、本発明の化合物の有効量の1つ又はそれ以上の用量を患者に投与することを含有していて、そこでは有効量の用量は、本発明の化合物の少なくとも0.1μg/mL、少なくとも0.5μg/mL、少なくとも1μg/mL、少なくとも2μg/mL、少なくとも5μg/mL、少なくとも6μg/mL、少なくとも10μg/mL、少なくとも15μg/mL、少なくとも20μg/mL、少

10

20

30

40

50

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

【0240】

別の態様では、予防及び／又は治療レジメンは、本発明の化合物の有効量の複数の用量を患者に投与することを含有していて、そこでは複数の用量は本発明化合物の血漿濃度を、少なくとも $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $125 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $175 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $225 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $275 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $325 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $350 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $375 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は少なくとも $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ に、少なくとも1日、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月、24ヶ月、又は36ヶ月に渡って保持する。

【0241】

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

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

【0242】

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

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

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

【0243】

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

【0244】

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

【0245】

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

【0246】

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

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

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

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

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

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

【0247】

X. 製剤

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

【0248】

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

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

例えば、化合物を固体、液体又は気体（エアゾール）の形態にすることができる。

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

10

20

30

40

50

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

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

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

【0249】

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

【0250】

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

【0251】

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

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

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

【0252】

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

【0253】

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

【0254】

医薬組成物がカプセルの形態、例えば、ゼラチンカプセル、である場合は、上記の種類の物質に加えて、ポリエチレングリコール、シクロデキストリン又は脂肪油のような液体の担体を含有することができる。

【0255】

医薬組成物を液体の形態、例えば、エリキシル、シロップ、溶液、乳液又は懸濁液、であってよい。液体は経口投与用に又は注射による送達用に有用である。

経口投与を意図する場合は、組成物は1つ又はそれ以上の甘味剤、保存剤、染料／着色剤及び風味増強剤を含有することができる。

注射投与用の組成物では、1つ又はそれ以上の界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝剤、安定化剤及び等張剤も含有することができる。

10

【0256】

本発明の液体組成物は、これらが溶液、懸濁液又は他の同様の形態であろうとなかろうと、1つ又はそれ以上の以下のものを含有することもできる：注射用蒸留水、食塩水溶液、好ましくは生理食塩溶液、リンゲル液、等張食塩水、溶媒又は懸濁化剤として働く合成モノ又はジグリセリドのような固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、シクロデキストリン、プロピレングリコール又はその他の溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のようなキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩のような緩衝剤；及び塩化ナトリウム又はデキストロースのような張力調節剤。

20

非経口用組成物を、ガラス、プラスチック又は別の材料で作られたアンプル、使い捨て注射器又は複数回投与用バイアルに封入することができる。生理食塩水が好ましいアジュバントである。注射用組成物は滅菌されていることが好ましい。

【0257】

医薬組成物は、適切な用量が得られるように本発明の化合物の有効量を含有している。医薬組成物は、それらの個々の疾患に対して現在処方されているように、化合物の公知の有効量を含有することができる。

【0258】

一般的に、有効量は組成物の重量に対して本発明の化合物が少なくとも0.01%である。経口投与を意図する場合は、この量は組成物の重量に対して0.1%と80%の間で変化しうる。好ましい経口用組成物は組成物の重量に対して本発明の化合物を4%と50%の間で含有することができる。本発明の好ましい組成物は、非経口用量単位が本発明の化合物を0.01%と2%の間の重量%含有するように調製される。

30

【0259】

本発明の化合物は何れかの便利な経路によって、例えば、点滴又はボラス注入によって、上皮層又は皮膚粘膜層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜等）を介する吸着によって、投与することができる。投与は全身又は局所であってよい。様々な送達システム、例えば、微小粒子、マイクロカプセル、カプセル等が知られていて、本発明の化合物を投与するために有用である。

ある特定の態様では、本発明の1つ以上の化合物を対象に投与する。投与の方法は、これに限定されないが、経口投与及び非経口投与（非経口投与は、これに限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下を包含する）、鼻腔内、硬膜外、舌下、鼻腔内、脳内、脳室内、鞘内、腔内、経皮、直腸内、吸入による、耳、鼻、眼又は皮膚に局所的に投与することを包含する。好ましい投与様式は医師の裁量に委ねられ、そして一部は病状の部位（癌、癌性腫瘍又は前癌状態の部位のような）によって決まるだろう。

40

【0260】

一態様では、本発明の化合物を非経口で投与する。特定の態様では本発明の化合物を静脈内に投与する。

【0261】

特定の態様では、1つ又はそれ以上の本発明の化合物を治療を必要とする領域（例えば

50

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

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

【0262】

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

10

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

【0263】

更に別の態様では、本発明の化合物を放出制御システムで送達することができる。

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

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

20

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

30

【0264】

別の態様では、高分子材料を、本発明の化合物の制御放出又は持続放出を達成するためにもちいることができる (例えば、米国特許第 5, 679, 377 号; 米国特許第 5, 916, 597 号; 米国特許第 5, 921, 015 号; 米国特許第 5, 989, 463 号; 米国特許第 5, 128, 326 号; PCT 公開第 WO 99/15154 号公報; 及び PCT 公開第 WO 99/20253 号公報を参照されたい)。持続放出製剤で用いられる高分子の例は、これに限定されないが、ポリ (2-ヒドロキシメタクリル酸エチル)、ポリ (メタクリル酸メチル)、ポリ (アクリル酸)、ポリ (エチレン- α -酢酸ビニル)、ポリ (メタクリル酸)、ポリグリコリド (PLG)、ポリ無水物、ポリ (N-ビニルピロリドン)、ポリ (ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ (エチレングリコール)、ポリラクチド (PLA)、ポリ (ラクチド- α -グリコリド) (PLGA)、及びポリオルトエステルを包含する。

40

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

【0265】

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

50

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

【0266】

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

【0267】

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

【実施例】

【0268】

実施例1. 機能的活性化を誘発するBAX上のBH3相互作用部位の同定

BCL-2ドメイン又はヒトBIM BH3 (BIM SAB_{A1}) の21アミノ酸断片に対応するSAHBの安定化したアルファ螺旋は、水溶液中で80%のアルファヘリシティを示し、24 nMの親和性³でプロアポトーシスBAXと結合し、そして既に記載されている (Walensky, L.D., et al. Mol Cell 24(2), 199-210 (2006)) ようにして調製した。アルファ螺旋のN-アセチル化及びC-アミド化20-mer (図8) BIM SAHB誘導体 (BIM SAHB_{A2}) 及びその他の類縁体を構造研究のために調製した。BIM SAHB_{A2}は、水溶液中0.5 mM以下の濃度で、BAXと1:1の安定な複合体を形成した。BIM SAHBsの円二色性スペクトルは、これらの組み換えペプチドが天然のBH3ドメインのアルファ螺旋構造を繰り返すことを明らかにした。

【0269】

BIM SAHB_{A2} 及び¹H-¹⁵N-BAXを用いる異種核単一量子相関 (HSQC) 滴定は、アルファ螺旋1のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、及びアルファ螺旋6のPro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147を含む、BAX残基の離散したサブセットの化学シフトを明らかにした。Gln28、Gln32、及びGln52の側鎖NH₂に関して有意な変化も観察された。BIM SAHB_{A2}との複合体中のBAXの¹H-¹³C相関スペクトルも実施して、Leu27-C^{δ1}-H₃及びC^{δ2}-H₃、並びにIle31-C^{δ2}-H₃及びIle133-C^{δ2}-H₃を含む同じ領域に位置する疎水性残基の側鎖に関して¹H-¹³C共鳴の顕著な変化が観察された。

【0270】

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

【0271】

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

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

【0272】

BAXの相互作用部位にBIM SAHBをアラインメントするために、我々は常磁性緩和増強 (PRE) NMR実験を実施した。これはNMR条件下で複合体の寿命に適合するタイムスケール上で実施することができる。メタンチオスルホン酸 (MTSL) 誘導体化BIM SAHB化合物 (図6a) を用いて酸化状態で、ニトロキシド還元後にこれを繰り返して、 $^1\text{H}-^15\text{N}$ -BAX HSQCスペクトルを得た。注目すべきは、BIM SAHBとの複合体中のBAX、及びMTSL標識化誘導体の化学シフト摂動マップが、BAX1及び6、及び $\alpha 1-\alpha 2$ ループの一貫性のある変化を明らかにした。BAX $\alpha 1$ 残基の強度が酸化されたC-末端標識の存在下で圧倒的に減少するのに対して、BAX $\alpha 6$ 残基の強度は酸化されたN-末端標識の存在下で圧倒的に減少する (図6b)。

【0273】

例として、BIM SAHB (A164C-MTSL) はSer16 ($\alpha 1$) の著名な信号抑制を引き起こしたがAsp142 ($\alpha 6$) に対する影響を本質的に有していなかったのに対して、BIM SAHB (W-147C-MTSL) はSer16 ($\alpha 1$) に対する影響を有していなかったが、Asp142 ($\alpha 6$) 信号を減少した (図6下の図)。PREの程度が、ニトロキシド標識と影響を受けたBAX残基の間の距離と相関する (Battiste, J.L. & Wagner, G. Biochemistry 39(18), 5355-5365(2000)) ので、PRE由来の拘束及び化学シフト摂動データを用いる構造計算を実施して、新規なBAX部位におけるBIM SAHBの方向を明確にした。

【0274】

実際に、計算した構造を収束して、BIM SAHB垂直面を、右から左に向いているNからC末端方向性をもってBAX螺旋 $\alpha 1$ 及び $\alpha 6$ に設置した (図6d)。そしてBIM BH3とBAXの間の主要な相互作用を確定した (図6e)。BIM SAHBの疎水性残基Ile148、Ala149、Leu152、Ile155、Gly156、及びPhe159はBAXの疎水性の溝を嵌め込むのに対して、BIM SAHBの荷電した親水性残基Arg153、Arg154、Asp157、Glu158、Asn160、及びTyr163はBAX上の荷電した親水性の相補的残基と相互作用する。

【0275】

BIM BH3のアンチアポトースタンパク質との安定な抑制性相互作用とは対照的に、BAX活性化相互作用はBAXの構造変化及びオリゴマー化を含む強力な一連の事象を誘発する。特に興味深いのは、BAXの $\alpha 1-\alpha 2$ ループ中の残基のNMR共鳴がBIM SAHB結合によって有意にシフトした。単量体BAXでは、ループの中心が $\alpha 6$ 螺旋の残基Ile133及びMet137と弱く結合している (Suzuki & Tjandra, Cell 103(4), 645-654 (2000))。ループ残基中で観察される変化は、BIM SAHB結合によるループ構造の開状態へのシフトによって容易に説明できる。リガンド関与によるループの移動がBAXの構造変化を開始できるので、我々は溶液中でBIM SAHB結合が直接BAXを活性化できるのか否かを検討した。

【0276】

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

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

【0277】

B I M S A H B が誘発する B A X のオリゴマー化の S E C による検出が、B A X のその放出活性についての機能的な活性化を反映しているということを確認するために、相関的リポソーム及びミトコンドリアアッセイを実施した。その他の因子の非存在下で機能的な B A X の活性化を直接誘発する B I M S A H B の能力を明確に探索するリポソームアッセイで、B I M S A H B と B A X の組み合わせは、封入されている F I T C デキストランのリポソーム放出を用量反応的に生じた（図12c、上の図）。B I M S A H B 活性の特異性を、B I M S A H B R 1 5 3 D 突然変異生成による活性破棄によって、又はアンチアポトーシス B C L - X_L Δ C の付加によって確認した（図12c、下の図）。同様に、A l b - c r e^{P O S} B a x^{f l o x} / - B a k^{-/-} マウスから調製した B A X / B A K 二重欠損マウスの肝ミトコンドリアを用いるミトコンドリア放出アッセイで、B I M S A H B は B A X 介在チトクローム c 放出を用量反応的に誘発した（図12d）。従って、リガンドが誘発する B A X 活性化を測定する4つの異なったインビトロアッセイにおいて、B I M S A H B は直接的にそして用量反応的に B A X を誘発した。

【0278】

B I M S A H B の B A X との相互作用の特異性を確認するために、B I M B H 3 S A H B 結合表面に幾つかの点突然変異を作りだし（図13a）、次いでインビトロの B A X オリゴマー化アッセイ及びミトコンドリアのチトクローム c 放出アッセイを実施して B A X の機能的な活性化を試験した。それぞれの場合で、相互作用表面に沿った逆極性（R 1 5 3 D、D 1 5 7 R）及び疎水性で荷電した（I 1 5 5 E）突然変異はリガンドが誘発する野生型 B A X のオリゴマー化（図13b）及び B A X 介在のチトクローム c 放出（図13c）を無効にした。B A X 相互作用部位の特異性を立証するために、B A X 残基 K 2 1 及び R 1 3 4 を、これらが B I M S A H B 結合による明確な NMR の化学シフトを示すかについて試験した。単一の逆極性突然変異 K 2 1 及び R 1 3 4 E を包含している組み換え B A X を作出し、次いで B I M S A H B 誘発 B A X オリゴマー化アッセイを行い、これが B I M S A H B 誘発 B A X K 2 1 E 及び B A X R 1 3 4 D 活性化の有意な欠損を明らかにした（図13d）。総合すれば、これらの突然変異生成試験は、B I M B H 3 - B A X 相互作用の優れた特異性を強調し、そして新規な結合部位の関与を B A X 活性化を開始する誘発メカニズムに関係付けている。

【0279】

B I M S A H B が誘発する B A X の活性化の特異性が新規な部位における相互作用であることを明らかにして関連付けを行うために、次ぎに「連結精査（ステイプルスキャン）」を実施した。B H 3 コア配列中のアミノ酸の対を架橋ノルロイシン様側鎖で効果的に置換するステイプルスキャンを実施して、どの残基が B I M B H 3 と B A X の間の機能的な相互作用に必須であるかについて、そして更に B I M B H 3 螺旋のどちらの面が B A X 関与に必須であるかについて同時に取り組んだ（図14a）。W 1 4 7、A 1 4 9、E 1 5 1、R 1 5 3、R 1 5 4、E 1 5 8、又は Y 1 6 2 位置の非天然アミノ酸の置換は B I M S A H B が誘発する B A X のオリゴマー化（図14b）又は B A X が介在するチトクローム c の放出（図14c、d）を中断しなかった。実際に、B A X 上の疎水性接触部位に向いていない表面の螺旋の長さによって配置された炭化水素の連結は B I M S A H B 類縁体と B A X の間の機能的な相互作用を中断しなかった。しかしながら、I 1 4 8 及びより高度に保存されている L 1 5 2 を置き換え、B I M B H 3 螺旋上の B A X に対して疎水性接触表面に位置している連結位置（図14a）は、B A X のオリゴマー化（図14b）及び B A X が介在するチトクローム c の放出（図13c、d）を顕著に減少し、結果は、B I M S A H B_C による ¹⁵N - B A X の B I M S A H B が誘発する化学シフト摂動が殆ど無くなるのとは一致していた。更に、B I M S A H B_A として同じ連結位置を有しているが、それ以外は異なったアミノ酸配列を有している、B A D S A H B_A は、結合せず、又は B A X のオリゴマー化（図14b）、或は B A X が介在するチトクロ-

ムcの放出(図14c、d)を行わなかった。

【0280】

$\alpha 1-\alpha 6$ 相互作用部位におけるBAX_{K21E}突然変異生成の影響を試験するために、オリゴマー化アッセイ(図13d、15a)によって測定されるBIM SAHBが誘発するBAX_{K21E}活性化の減少も、BIM SAHBに応答する鈍化したBAX_{K21E}が介在するチトクロームc放出(図15b)に反映していることを明らかにした。新規なBAX結合部位内の単一点突然変異が細胞状況においてBAXを活性化する能力に影響を及ぼすかを確認するために、野生型又はBAX_{K21E}の何れかを用いて、レトロウイルスによってBax^{-/-}Bak^{-/-}マウス胚繊維芽細胞(DKO MEFs)を再構築して、BIM SAHBに応答するアポトーシスの誘導を観察した。アネキシンV結合によって定量したように、BIM SAHBはBAXが再構築したMEFの時間依存的なアポトーシスを誘導したのに対して、新規なBAX結合部位内の単一K21E点突然変異はBIM SAHBが誘発するアポトーシスを減少した(図15c)。このBAX_{K21E}が介在するアポトーシスの減少は、オリゴマー化及びチトクロームc放出の両方のアッセイ(図15a、15b)においてBIM SAHBによるBAX_{K21E}の低下した活性と関連している。特異性の更なる測定として、リポソームにおいてそのBAX活性化能力、BAXオリゴマー化、及びチトクロームc放出アッセイを消去する(それぞれ図12cの下図、13b、13c)BIM SAHBのR153D突然変異生成が、同様に細胞状況においてBIM SAHBが誘導するBAX及びBAX_{K21E}の活性化を無くしたことを見出した(図15c)。

【0281】

新規なBAX活性化部位の広範な生理学的影響を調べるために、BAX及びBAX_{K21E}で再構築したDKO MEFsの、BIMを包含し、内因性BH3オンリータンパク質を介して作用することが知られている一般的な刺激剤である、スタウロスポリン(STS)に対するアポトーシス応答を試験した。K21E突然変異生成は、時間をかけてアネキシンV結合を観察すると、STS誘導アポトーシスを低下した。BAX_{K21E}の減少した活性は、細胞下分画ウェスタン分析及び間接免疫蛍光分析によって検出したように、低下したチトクロームc放出にも反映した。BAX_{K21E}で再構築したDKO MEFsのSTSに対する鈍化した応答はオリゴマー化(図15a)、チトクロームc放出(図15b)、及び細胞に基づいたアポトーシスアッセイ(図15c)におけるBIM SAHBによるBAX_{K21E}の低下した活性化と一様に一致している。従って、MEFの検討は、直接BAX活性化の機能的関連を、新規なBH3相互作用部位における単一アミノ酸突然変異形成によってBAXが介在するアポトーシスが低下する細胞状況に広げている。まとめると、インビトロ及び細胞による突然変異形成実験は、BIM BH3-BAX相互作用の優れた特異性を強調し、そして新規な結合部位の関与をBAX活性化を開始する誘発メカニズムに関係付けている。

【0282】

BIM SAHBが細胞中のBAXを特異的に標的としているかを確認するために、細胞透過性BIM SAHB_{A1}化合物の蛍光イソチオシアネート(FITC)誘導体化類縁体をジャーカットT細胞(Jurkat T-cell)に加えて細胞の取り込みをFACS分析によって記録した。BIM SAHB_{A1}が18時間の培養によってジャーカットT細胞に用量依存的なアポトーシス誘導を誘発したのに対して、BIM SAHB_{A1}(R153D)は効果がなかった。BIM SAHBが細胞質BAXと相互作用することを実証するために、ジャーカットT細胞をFITC-BIM SAHB_{A1}化合物と4時間培養した後、1%CHAPS中で細胞溶解して、抗FITC抗体でSAHBの免疫沈降を行った。実際に、FITC-BIM SAHB_{A1}は、ジャーカットT細胞の細胞質からBAXを共免疫沈降することができた。従って、BIM SAHBは無傷細胞を貫通できて、細胞中の細胞質BAXを刺激してアポトーシスを受けるようにできる。

【0283】

実施例2.(NMR)分光法を用いるBOK及びBAKの高分解溶液構造の確認

10

20

30

40

50

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

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

【0284】

ヒトの全長BOK及びBAK cDNAをpTYB1ベクター中にサブクローニングしてキチン結合融合タンパク質を作成して、その後キチン親和性クロマトグラフィー、DTTによるキチン分解、及びゲルろ過によるFPLC精製を行うことができる。次いで、形質転換した大腸菌BL21(DE3)細胞を37℃で生育して、LB培地（非標識化タンパク質用に）、又はそれぞれ均一な¹⁵N-標識化又は¹⁵N、¹³C-標識化タンパク質を得るために、¹⁵N-NH₄Cl（1g/l）と¹³C-グルコース（2g/l）で又は¹⁵N-NH₄Cl（1g/l）だけで置換したM9-最小培地の何れかにおいて1mMのIPTGを誘導した。細胞を¹⁵N-NH₄Cl及び¹³C-グルコースで補完した75%D₂O中で生育させることによって、重水素化、均一¹⁵N¹³C-標識化タンパク質を作成できる。次いでNMR試料（0.5～1mM）をD₂O又はH₂O/D₂O（9：1）中の10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH9：1）中で作成する。

【0285】

NMRスペクトルを25℃で、z-シールド勾配及び三重共鳴CryoProbeを備えた、Bruker Advanceの600MHz、700MHz、又は800MHzスペクトロメータ上で記録した。化学シフトの帰属は標準的な技術を用いて行った。¹H、¹³C、¹⁵N共鳴の骨格帰属については、以下の三重共鳴3D実験を記録した：H₂O中の均一¹⁵N、¹³C標識化タンパク質上のHNCO、HNCACO、HNCA、HNCOCA、HNCA CB及びCBCA(CO)NH。側鎖の帰属は以下の標準3D実験を用いて実施した：¹H¹⁵N TOCSY-HSQC、C(CO)NH-TOCSY、H(CCO)NH-TOCSY及びHCCH-TOCSY。何れの不明確な帰属も、D₂O中の均一¹⁵N、¹³C-標識化タンパク質上の3D¹³C分解[¹H-¹H]NOESY実験の分析によって更に確認することができる。芳香族側鎖¹H及び¹³Cの共鳴は2D HMQCと3D¹³C分解[¹H-¹H]NOESYを組み合わせて帰属できる。構造抑制は、¹³C分解（100又は120分混合時間）及び¹⁵N分解（120分混合時間）[¹H-¹H]NOESY実験に由来する。

【0286】

NMRのデータセットをNMRPipe (Delaglio, et al. (1995) NMRPipe J Biomol NMR 6(3), 277-293) スペクトル分析及びNMRView (Johnson, B.A. (2004) Methods Mol. Biol. 278, 313-352) ソフトウェアパッケージで処理する。骨格のψ及びΨのねじれ角抑制をプログラムTALOS (Comilescu, G., et al. (1999) J Biomol NMR 13(3) 289-302)を用いて、¹³C_{αβ}化学シフトから計算する。3J_{NH H_α}結合定数を、既述 (Kuboniwa, H. et al. (1994) J Biomol NMR 4(6), 871-878) のようにHMQC-J実験から測定する。残余双極子カップリング(RDCs)をフィラメント状ファージPf1を加えたNMR試料の緩衝液中で測定する (Bax, A., Kontaxis, et al. (2001) Methods Enzymol 339, 127-174)。NOEの帰属を、プログラムCYANA 2.1.4 (Gunte

10

20

30

40

50

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

【0287】

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

【0288】

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

B H 3 ポリペプチド及びその模倣薬と、多数の B C L - 2 ファミリーポリペプチドの間の更なる結合相互作用が、本発明で意図されている。以下の方法も、B H 3 ポリペプチド及びその模倣化学化合物と B C L - 2 ファミリーポリペプチドとの結合相互作用を試験及び最適化するのに適用できる。

【0289】

$^1 H$, $^1 5 N$ - B A X / B A K / B O K タンパク質の発現及び精製を実施例 2 に記載したようにして実施した。NMR 滴定のために、B A X / B A K / B O K と S A H B の 1 : 1 複合体を、 D_2O 又は H_2O / D_2O (9 : 1) 中の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中で、S A H B 濃度を 0.5 mM まで徐々に増大して作成した。S A H B の相互作用部位を同定するために、S A H B ペプチドの添加による骨格アミドの化学シフト摂動を、それぞれ一連の $^1 H - ^1 5 N$ H S Q C 及びデータセットの処理、及び N M R P i p e スペクトル分析及び N M R v i e w ソフトウェアパッケージを用いる化学シフトの測定の後に行う。B A X / B A K / B O K の全体的な構造変化を同定するために、骨格アミドを観察して、実施例 2 に記述するように実施して化学シフトの帰属を行うことができる。S A H B 複合体について構造計算を容易にするために、 $^1 H$ - N M R 2 D T O C S Y 及び N E O S Y 実験が B A X / B A K / B O K に化学シフトを誘導する個々の S A H B に対して溶液構造をもたらす。分子間 N O E を、非標識化 S A H B と結合している均一 $^1 5 N$, $^1 3 C$ 標識化 B A X / B A K / B O K の試料について実施される、N O E S Y 及び 3 D $^1 3 C$ - 編集、 $^1 2 C$ - 選択 N O E S Y 実験から得ることができる。更に、B A X / B A K / B O K - S A H B 複合体の構造精密化に対する距離情報は、選択部位に位置しているランタニド - D O T A キレートで誘導体化した S H A B を用いるか (Vlasie, M.D. et al. (2007) *Chemistry* 13(6), 1715-1723) (Battiste, J.L. et al. (2000) *Biochemistry* 39(18), 5355-5365) 又は実施例 1 に記載され、図 6 に明らかにされている M T S L - 標識化 S A H B を用いて実施する H S Q C 実験からもたらされるであろう。

【0290】

例えば、S A H B に結合した D O T A キレートは、ランタニドの活性化によって、B A X / B A K / B O K タンパク質の近接 $^1 H$ - N M R 共鳴の緩和及び線幅拡張を 25 Å までの距離依存的に増強する。常磁性緩和増強 (P R E) 測定結果を、既述 (Battiste, J.L.

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

【0291】

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

【0292】

特異的な B A X / B A K / B O K 構造領域の S A H B 結合による運動の変化を確認するために、既述 (Farrow, N.A. et al. (1994) Biochemistry 33(19), 5984-6003) のようにして、T 1、T 2 及び ^1H - ^15N 異核 N O E データを測定することによって、緩和分析を実施する。T 1 縦軸回復遅延を 11、65、150、246、363、523、758 及び 1142 分に設定する。T 2 横軸回復遅延をそれぞれ、21.6、43.2、64.8、86.4、108.0、151.1、194.3、及び 237.5 に設定する。C P M G 配列の繰り返し率を 550 μs に設定する。 ^1H - ^15N N O E を、3 秒の ^1H 飽和時間を用いて補正する。それぞれの場合に、誤差を 2 つの (T 1、T 2 及び N O E) 実験の標準偏差として測定する。データをソフトウェアパッケージ N M R V i e w (Johnson, B.A. (2004) Methods Mol Biol 278, 313-352) を用いて分析できる。

【0293】

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

【0294】

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

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

【0295】

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

【0296】

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

BAX／BAK／BOK及びその他のBCL-2 ファミリーポリペプチドの活性形態は、ヘテロ及びホモ二量化による高次構造を含んでいると考えられる。例えば、BAX及びBAKオリゴマーはミトコンドリア膜中で同定され、そしてミトコンドリアから必須のアポトーシス因子を放出するポア形成に関与していると考えられている。本明細書に記載されているSAHBはBAXを活性化してこのような高次で機能的なオリゴマーを形成するので、オリゴマーを作成して構造的に特徴付けるために、溶媒中で又は再結晶によってこのような構造を作成するためにSAHBを用いることができる。このオリゴマーはミトコンドリアアポトーシスを誘導するために機能的に必要なのであるので、このようなオリゴマーポアの活性化又は阻害は治療的に有益であろう。BAXのような、BCL-2 ファミリーポリペプチドにSAHB化合物を、リガンド比の勾配により、並びに各種の塩及び当該技術分野で公知のその他の条件を用いて、添加することによって、区別されるBAX構造異性体及びオリゴマーを作成でき、NMR分析（本明細書に記載されているような）又は当該技術分野で公知のX線結晶解析法を使用するために安定化することができる。例えば、0.5：1～4：1のBIM：BAX溶液を用いて、高度に精製されたBAXオリゴマーが作成され、高純度に単離されている。

10

【0297】

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

20

【0298】

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

30

40

【0299】

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

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

【0300】

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

50

ングすることによってミリストイル化誘導体を製造した。

【0301】

実施例6. 化合物のアポトーシスを活性化するか又は阻害する能力の評価

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

【0302】

ミトコンドリア放出アッセイ：

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

【0303】

C末端を、可溶性がより高いBAX C末端で置換したBAKキメラ体も意図している。さらに別の態様では、BAKの活性化を評価するミトコンドリア試験を、内因性のBAKを含んでいるがBAX及びBOKを欠損している野生型マウスの肝臓ミトコンドリアで実施する。別の態様では、BOKの活性化を評価するミトコンドリア試験を、組み換えBOK又は内因性BOKを含んでいるがBAX及びBAKを欠損しているマウスミトコンドリアを用いて(すなわち、Alb-cre^{POS}Bax^{fl ox}/Bak^{-/-}マウス由来のBAX/BAK-nu11ミトコンドリアを用いて)実施する。

【0304】

リポソーム放出アッセイ：

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

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

【0305】

LUVからFITC-標識化デキストラン-10 kDの放出を、FluoroMax-2 蛍光分光計 (SPEX) を用い、恒温1 cm路長石英キュベット中、37℃で攪拌を続けて、監視する。励起及び放射波長はそれぞれ、488 nm及び525 nmである (スリット、2 nm)。蛍光マーカーの放出量は、式： $[(F_t - F_0) / (F_{100} - F_0) \times 100]$ (ここで、 F_t はt時に測定した試薬で処理したLUVの蛍光発光であり、 F_0 は試薬を添加する前の1～2分にわたるLUV懸濁液の平均蛍光発光であり、そして F_{100} はトリトンX-100 (最終濃度、0.66 mM) の添加によってLUVが完全に崩壊した後の最終1～2分にわたる平均蛍光発光値である) に従って百分率で定量化する。実験は、脂質濃度10 µg/ml、15 nMのBAX/BAK/BOK、25～200 nMのSAHBを単独で又は組み合わせて、及びBCL-X_L ΔC又はその他のアンチアポトーシス遮断剤 (100～800 nM) を用いて実施する。

10

【0306】

オリゴマー化アッセイ：

単量体のBAX (38 µM) を含有している200 µLの溶液 (20 mMのHepes / KOH、pH 7.2～7.4、150 mMのKCl) に、BIMSAHBを、0.5 : 1、1 : 1、2 : 1及び4 : 1のBIMSAHB : BAX比で、添加した。この混合物及びBAX単量体のみの試料を22℃で15分間培養し、次いでSD75カラムを用いるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による分析を行った。クロマトグラムはそれぞれ～11.5分及び～6.5分における単量体とオリゴマーのピークを示す。タンパク質標準品 (GE Healthcare) を用いてゲルろ過ピークの分子量を校正した。時間依存性分析のために、BIMSAHBを単量体のBAXに1 : 1の比で添加して、22℃で30、60、及び90分間培養した後に混合物をSECで分析した。比較の基準値として、BAX単量体のみを0時間及び上記の時点で分析した。

20

【0307】

構造変化アッセイ：

単量体のBAX (9 µM) を含有している20 µLのPBS溶液に、BIMSAHBを、0.5 : 1、1 : 1、2 : 1及び4 : 1のBIMSAHB : BAX比で、添加した。この混合物 (10 µL) 及びBAX単量体試料 (10 µL) を22℃で15分間培養し、次いで15 µLの6A7抗BAX抗体を含有しているBSAの3% PBS溶液 (250 µL) に加えて4℃で1時間培養した。さらに、それぞれの入力試料 (10%) の1 µLを、50 µLのSDS-試料緩衝液と混合して、試料を横断するBAX濃度の基準値を測定した。精製前のセファロースビーズ (50 µL) をBIMSAHB : BAX及びBAX単量体溶液に添加して4℃でさらに2時間培養した。セファロースビーズを遠心分離し、BSAの3% PBS溶液1 mLで3回洗浄し、50 µLのSDS-試料緩衝液中に再懸濁して95℃で2分間煮沸した。入力した試料及び免疫沈降試料のそれぞれ10 µLを分析に用いた。試料を、PVDF膜上にブロットした、12% SDS-PAGEビスートリスゲル上で分離して、ウサギポリクローナルN20抗BAX抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 及び化学発光による検出 (PerkinElmer) を用いてウェスタン分析を実施した。

30

【0308】

細胞に基づくアポトーシスの検討：

BCL-2ファミリーポリペプチドの調節を確認するための更に別の手法は細胞に基づく検討である。化合物を、複数の骨髓腫、白血病、リンパ腫、肉腫、網膜芽腫、及び乳腺、前立腺、結腸、肺、腎臓、甲状腺、及び副腎の癌を示している腫瘍細胞株のパネルに対してスクリーニングする。多くのこのような細胞株はDNAマイクロアレイ発現プロファイリング (Mitsiades, C.S. et al. (2004) Cancer Cell 5(3), 211-230) によって特徴付けられている。それらの適切な培地中の癌細胞は96ウェルフォーマットに固定され化合物の連続希釈に曝される。癌細胞の生存能力に対する化合物治療の効果を、製造会社 (Roche) のプロトコールに従って、12～48時間にMTTアッセイで測定して、ELISAマイクロプレートリーダー (Biorad) によって定量化する。IC₅₀値はPrismソフトウェア (Graphpad) を用いる非線形回復分析によって決定する。このアッセイにおい

40

50

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

【0309】

培養した癌細胞 ($0.5 \sim 1 \times 10^5$ 個) を化合物とMTTアッセイで有効であると観察された濃度で24時間培養する。次いで細胞を洗浄して、製造会社 (BD Bioscience) のプロトコールに従いヨウ化プロピジウム ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 及びFITC標識アネキシンVで染色する。アポトーシスの誘導を、FACS及びFlowJoソフトウェア (Tree Star) を用いるデータ分析によって定量化する。化合物がアポトーシスの遺伝経路を介して機能していることを確認するために、点突然変異によって作出した不活性SAHB類縁体を陰性対照として用いる。更に、カスパーゼ3阻害剤Z-DEVD-FMK (BD Biosciences) のような、カスパーゼ阻害剤を用いて、SAHB誘導アポトーシスがカスパーゼの不活性化によって回復することを確認する。これらの細胞に基づく検討の目標は、癌細胞アポトーシスの再活性化におけるBAX/BAK/BOKの直接関与の寄与メカニズムを検討する根拠として、特定の化合物を感受性癌細胞株と一致させることである。

【0310】

化合物に感受性の癌細胞株へのSAHBの効果の、リアルタイムな生理学的読み出しは更に、ミトコンドリア形態の微視的評価 (Scorrano, L. et al. (2002) Dev Cell 2(1), 55-67)、ミトコンドリアのカルシウム摂取の落射蛍光画像 (Scorrano, L. et al. (2003) Science 300(5616), 135-139)、ミトコンドリア呼吸及び膜電位変化の測定 (Li, H. et al. (1998) J. Cell Biol 144(4), 491-501; Scorrano, L. et al. (2002) Dev Cell 2(1), 55-67)、間接免疫蛍光法による細胞内チトクロームcの局在化の追跡 (Yin, X. et al. (1999) Nature 400(6747), 886-891)、細胞分画及びウェスタン分析によるチトクロームc放出の定量 (Kim, H. (2006) Nat Cell Biol 8, 1348-1358) 及び/又は蛍光発生基質を用いるエフェクターカスパーゼ3活性の定量 (Wei, M.C. et al. (2001) Science 292(5517), 727-730) を包含する。

【0311】

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

【0312】

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

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

的にされているGST-BCL-X_LΔC断片のアミノ酸配列を同定した。

【0313】

新規な活性部位にアクセスするために、上記(図11)のような光活性可能なように架橋できる部分を含有するように、BIM、BID、及びPUMA SAHBを作出した。実際に、全てのBIM SAHBは、350nmの光に露光して用量及び時間依存手法によって標的化して共有結合作出したBAXを誘導体化する。現実には、BAX単量体分子量の真上に移動する二重項の種が、これらのSAHB試薬に曝すことによる、別の結合手法の存在、及びそれによる異なったBAX移動を強調することが確認された。BIM SAHB:BAXの異なった比を用いて架橋実験を実施したときに、BIM SAHB化合物を含有している高次BAXオリゴマーの架橋及び安定化が捕捉され、新規な活性部位に接近するためのBIM SAHB誘導体の相互作用の有用性を強調し、そしてその活性化からもたらされるBAXの生理学的オリゴマーも捕捉された。

10

【0314】

細胞内におけるSAHB活性を捕捉して明確にするために、上記の誘導体化したSAHBを培養細胞に加えて、時限の培養時間後に、氷上で1時間以内350nmの光を照射した後、細胞溶解及び抗FITC免疫沈降を行った。免疫沈降物を電気泳動して、クーマシー及び銀染色、蛍光ゲル画像化、及びアポトーシスタンパク質に対するウェスタンブロッティングによって分析した。検出物の特異性を確認するための陰性対照実験は、(1) Bpaを混入していない対応するFITC-SAHB化合物、(2) 非照射試料、及び(3) 点突然変異FITC-SAHB Bpa化合物を包含した。特異的で分離した電気泳動のバンドを切り取って、質量分析で同定した。免疫沈降物を電気泳動して、クーマシー及び銀染色、蛍光ゲル画像化、及びアポトーシス及びその他のタンパク質に対するウェスタンブロッティングによって分析した。

20

【0315】

共有結合複合体の抗FITCプルダウンを見据えた検索的戦略を達成するために、多官能性の手段をSAHB化合物に化学的に融合した。この設計は、細胞処理、in situでの結合及び照射工程で用いるために、アルキン含有カルボン酸(4-ペンチン酸)でのSAHBの初期カップリングを包含した。細胞溶解(共有結合捕捉に引き続く)により、架橋したSAHB化合物のN-末端プロパルギル基が、銅の存在下でアジド含有多官能性リンカーでの選択的な環付加を受ける(すなわち、「クリック化学」、Saghatelian, A., et al. Proc Natl Acad Sci U S A 101(27), 10000-10005 (2004); Rabuka, D., et al. J Am Chem Soc 128(37), 12078-12079(2006); Speers, A.E., et al. J Am Chem Soc 125(16), 4686-4687 (2003); Speers, A.E., et al. Chem. Biol 11(4), 535-546 (2004))。

30

【0316】

アジド官能性に加えて、ストレプトアビジンを捕獲するためのビオチン部分、検出するための蛍光色素分子、及びプロテオーム解析のためにストレプトアビジンビーズから付加したSAHB-タンパク質複合体の穏やかな放出を確認するプロテアーゼ確認部位を含有するように設計した(Adam, G.C., et al. Mol Cell Proteomics. 1(10), 828-835 (2002))(図17)。放出した蛍光色素標識SAHB-タンパク質複合体を、分子量を確認するためにMALDI-MS及びLC-MS技術によって分析し、その後トリプシン又はリシルエンドペプチダーゼで消化して、高分解能質量分析を用いるタンパク質同定のために断片を産生した。上で定義した構造的アプローチを補足する、この方法の更なる利点は、タンデム質量分析(MS-MS)又はMS_n分析による配列確認のための蛍光色素標識断片を用いる標的タンパク質上のSAHB相互作用の部位を同定することを可能にすることである。

40

【0317】

従って、癌及びその他の疾患を滅亡させるためにアポトーシス経路を最大限に活用するために、癌における細胞死をプロアポトーシス剤が如何に特異的に再活性化するかを注意深く詳細に分析することが必要である。合成による挑戦は、共有結合捕獲部分を小分子に包含すること、及びその結果として化合物の活性を修正するという付随するリスクと関連

50

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

【0318】

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

【0319】

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

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

【0320】

SAHB化合物の活性及び選択性を評価するために、BH3置換を、BAX/BAK/BOKを活性化する対応BH3オンリータンパク質 (複数も) を除去したものに由来する疾患モデルで実施した。例えば、Bim^{-/-}マウスの臓器中に見出されたリンパ球浸潤において、アポトーシスを再活性化するBIM SAHBの能力を試験した。年齢及び性別を一致させたBim^{-/-}及び野生型マウスの試験群を賦形剤 (2.5%のDMSO/D5W) 又はBIM SAHB (10mg/kg) の何れかで毎日、5~7日間治療し、その後、安楽死させ、組織を摘出し、病理組織学的に評価し、そして免疫組織化学検査を行った。腎臓、肺、及び肝臓の明確なB-系列リンパ球浸潤を詳細に観察した。賦形剤及びBIM SAHBで処理した野生型動物の組織構造は両群において正常であったのに対して、リンパ球浸潤の明確な兆候がBim^{-/-}マウスの臓器で明らかであった。特筆すべきは、BIM SAHBで処理したBim^{-/-}マウスがリンパ球浸潤において核片貪食マクロファージ (tingible-body macrophages) の顕著な流入を示した。B220+細胞の断片が免疫組織化学によってマクロファージ内で明白であって、湿潤の至る所に散在している細胞は活性化カスパーゼ3に対して陽性であって; TUNEL-陽性も観察された。賦形剤で処理したBim^{-/-}マウスの臓器にはこれらの結果は見られず、BIM SAHBがBim^{-/-}臓器内の病的湿潤のアポトーシスを開始することを示唆している。これらの検討を拡張するために、照射した (450cGy) 雌性Rag2^{-/-}gamma (c)^{-/-}マウス (10~12週齢) を、統計分析のための広く一様な群 (n=10) を作るために、Bim^{-/-}マウス由来の骨髓細胞2x10⁶個で再構築した。再構築

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

【0321】

例えば、この試験デザインは、移植12週間後に、賦形剤、BIM SAHB (3、10 mg/kg)、又は陰性対照 SAHB (例えば、突然変異 SAHB 又は BAD SAHB のような異なった SAHB; 3、10 mg/kg) の何れかで毎日7日間処理する5群を含んでいた。試験の0、4、及び7日目に、全血球計数、末梢血リンパ球の FACS 分析、セリン BUN/クレアチン、及び臓器体積に対する脾臓及び腎臓の超音波測定及び RF モードのエコー輝度測定 (Vevo 770、(光学音速に対する脾臓及び腎臓の超音波測定)) を実施した。8日目に、動物を屠殺して、病理組織学的及び免疫組織化学的に分析した (例えば、腎臓浸潤の高倍率視野当たりの TUNEL-及び活性化カスパーゼ-3-陽性細胞)。リンパ球計数 (CBC)、リンパ球サブセット (FACS)、腎機能 (BUN/クレアチン)、脾臓及び腎臓の体積 (超音波) 及び RF モードの後方散乱スペクトル (アポトーシスの超音波証明) のデータを検査して、必要により、処理群を越えて分散を安定化するために数学的に変換した。分散の反復測定分析を、0、4、及び7日目に測定した血液及び画像パラメータに用いて、そしてモデル内の差異を処理群間の基準値からの変化を評価するために用いられるだろう。例えば、8日目に屠殺して得られた、臓器浸潤の病理組織学的分析を、3群比較のためのクラスカル・ワイリス (Kruskal-Wallis) 検定及び BIM SAHB 処理動物と対照を比較するためのウィルコクソンの順位和検定を用いて群間で評価する。群当たり10匹の動物で、ウィルコクソンの順位和検定は、0.10の片側有意水準を試験して、群間の標準偏差を1つ検定するために80%の検出力を有している。

【0322】

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

【0323】

更に別の方法では、SAHBの有効性試験を、特定のSAHB感受性細胞株に対応するマウス異種移植モデルを用いても実施できる。目的のSAHB感受性癌細胞株を、既述 (Armstrong, S.A., et al. Cancer Cell 3(2), 173-183 (2003)) のようにして安定なルシフェラーゼ発現 (pMMP-LucNeo) を達成するためにレトロウィルスで形質導入される。転写及び移植された腫瘍の生育の成功をスクリーニングするために、SCID ベージュマウス (6~8週齢の雌、Jackson Laboratory) に300 cGyを全身照射 (Gammacell 40, Atomic Energy of Canada, LTD) して、3時間後に尾静脈に癌細胞 (すなわち、 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 2.5×10^6 、又は 5×10^6 注射細胞) を注射する。隔日にインビボで腫瘍画像を得るために、マウスを吸入イソフルランで麻酔して、同時にD-ルシフェリンの腹腔内注射 (60 mg/kg) で処理する。Xenogen In Vivo Imaging System を用いて光子の放出を画像化 (2分露光) して、Xenogen's Living Image Software を用いて光子流量 (光子/秒) の積分によって全身の生物発光を定量する。

【0324】

癌発生の経時変化は、増大する生物発光の監視、及び病気と見られる動物の剖検で確認した癌の診断によって確認する。着実な異種移植を達成するための最適な細胞投与量は、それぞれの選択した細胞株によって決まる。これらの4種の細胞投与量での長期にわたる検討のためには、1群あたり7匹の動物を検討すべきである。この実験デザインは、投与群間の平均発光レベルの標準偏差が、所定の用量レベルで処理された動物内の標準偏差の70%であると考えられるので、全般に0.05の有意レベルで試験して、実際に発光に

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

【0325】

異種移植検討は、6群のマウス ($n=10$) を、賦形剤のみ、S A H B の低用量及び高用量 ($3\sim30\text{mg/kg}$)、又はS A H B 突然変異対照の低用量及び高用量で処理して試験できる。実験1日目に開始して ($14\sim16$ の範囲の ln [全身発光] で)、マウスは1日1回尾静脈内注射を受け、次いで試験の期間中、腫瘍の毎日の生育及び生存を追跡するために隔日に画像化する。1群当たり10匹の動物を用いると、0.05%の名目有意差で試験して、治療群の30%と比較して、定時点までに90%の動物が病死する対照群を区別するのに80%の能力を有する。

10

【0326】

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

20

【0327】

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

多くの癌細胞及びそれらの再発性／化学療法抵抗性変異株は、B C L - 2 ファミリーのアンチアポトーシスメンバーを大量に過剰発現することによって、細胞不死に達する。B H 3 模倣薬及び小分子を用いる、アンチアポトーシス阻害は、アポトーシス阻害を克服する1つの方法である。しかしながら、B H 3 模倣薬又は小分子が、M C L - 1 の過剰発現 (Van Delft et al, Cancer Cell. 2006 Nov; 10(5):389-99; Konopleva et al, Cancer Cell. 2006 Nov; 10(5):375-88; Deng et al, Cancer Cell. 2007 Aug; 12(2):171-85) のような、特異的なアンチアポトーシス阻害を標的にできない特異的なプロファイルを有しているときは、直接的なB A X 調節が、治療効果のためのこのようなアポトーシス阻害を避けるか、又はこれと協調させることができる。実際に、B I D 及びB I M S A H B は、B A X / B A K と直接結合して活性化して、そしてアンチアポトーシス標的を阻害するという二重の能力を有しているので、M C L - 1 過剰発現或は化学療法抵抗性癌細胞のアポトーシスを再活性化することにおいて、A B T - 7 3 7 - 又はB A D S A H B のような、その他のB H 3 模倣薬よりもかなり有効である。例えば、M C L - 1 及びA 1 を過剰発現するファイファー (Pfeiffer) リンパ腫細胞株は、A B T - 7 3 7 に耐性であるが、B I M S A H B によって強殺される。

30

【0328】

従って、M C L - 1 及びA 1 のようなアンチアポトーシスタンパク質を過剰発現する癌又はその他の疾患の細胞、又はB I M のような、活性化因子B H 3 - オンリータンパク質を、B I M 欠損マウスモデルよりも、例えばマントル細胞リンパ腫 (Tagawa et al Oncogene. 2005 Feb 17; 24(8):1348-58; Mestre-Escorihuela, Blood. 2007 Jan 1; 109(1):271-80) 中で、特異的に下方調節する癌又は疾患性細胞の何れかは、B I M S A H B 又はそれらの誘導体及び模倣薬が、新規なB A X 活性化部位の直接関与によりアポトーシスを再活性化して、それにより治療目的のためのそして前記アポトーシス阻害に関係のないアポトーシスを誘発するために理想的な適するものである。

40

【0329】

本発明の態様を示せば、以下のとおりとなる。

50

(1) 方法が、

a) B C L-2 ファミリーポリペプチドを、当該 B C L-2 ファミリーポリペプチドの活性を調節するのに適している条件下で化合物と接触させること；及び

b) 化合物による当該 B C L-2 ファミリーポリペプチドの活性の調節を検出すること（ここにおいて、化合物は当該 B C L-2 ファミリーポリペプチド中の活性部位と相互作用する）；

を含有してなる、B C L-2 ファミリーポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法。

【0330】

(2) 当該化合物が有機化合物である、前記(1)に記載の方法。

10

(3) 当該化合物がポリペプチドである、前記(1)に記載の方法。

(4) 当該化合物が、有機化合物、ポリペプチド、核酸又はこれらの組合わせである、前記(1)に記載の方法。

(5) 当該 B C L-2 ファミリーポリペプチドがプロアポトーシスポリペプチドである、前記(1)～(4)の何れか一項に記載の方法。

(6) 当該プロアポトーシスポリペプチドが B A X である、前記(5)に記載の方法。

(7) 当該プロアポトーシスポリペプチドが B O K 又は B A K である、前記(5)に記載の方法。

(8) 当該 B C L-2 ファミリーポリペプチドがアンチアポトーシスポリペプチドである、前記(1)～(4)の何れか一項に記載の方法。

20

(9) 当該アンチアポトーシスポリペプチドが、B C L-2、B c l-X 1、B c l-w、B C L-B、A 1/B F L-1、M C L-1、B O O/D I V A、N r-1 3 又は C E D-9、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれる、前記(8)に記載の方法。

【0331】

(10) 当該活性がプロアポトーシス活性である、前記(1)に記載の方法。

(11) 当該活性がアンチアポトーシス活性である、前記(1)に記載の方法。

(12) 当該活性の調節が、当該プロアポトーシス活性の活性化である、前記(1)に記載の方法。

(13) 当該活性の調節が、当該プロアポトーシス活性の阻害である、前記(1)に記載の方法。

30

(14) 当該活性の調節が、当該アンチアポトーシス活性の活性化である、前記(1)に記載の方法。

(15) 当該活性の調節が、当該アンチアポトーシス活性の阻害である、前記(1)に記載の方法。

(16) 工程(b)の検出が、二量化、オリゴマー化又は立体構造状態の変化、及び／又は1つの細胞内コンパートメントから別のコンパートメントへの転座の検出、ミトコンドリアチトクロームcの放出、リポソームの放出、細胞死、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアのカルシウム摂取、ミトコンドリアの膜透過性定量、及びカスパーゼ3活性又はアネキシンV結合の定量よりなる群から選ばれるアッセイを用いて実施される、前記(1)～(15)のいずれか一項に記載の方法。

40

(17) 当該活性部位が、B A X のアルファ螺旋1及びアルファ螺旋6を含有してなる、前記(1)～(16)の何れか一項に記載の方法。

(18) 活性部位が、B A X の $\alpha 1-\alpha 2$ ループ及び螺旋4由来のアミノ酸残基を更に含有してなる、前記(17)に記載の方法。

【0332】

(19) 当該化合物が配列番号1に記載の配列の L y s 2 1 に対応するアミノ酸残基に結合する、前記(1)～(18)の何れか一項に記載の方法。

(20) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列の G l u 1 7、M e t 2 0、L y s 2 1、T h r 2 2、A l a 2 4、L e u 2 5、L e u 2 7、G l n 2 8、G l y 2 9、I l e 3 1、G l n 3 2、A s p 3 3、L e u 4 7、A s p 4 8、P r o 4 9、V a l 5 0、

50

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

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

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

【0333】

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

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

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

【0334】

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

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

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

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

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

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

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

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

【0335】

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

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

10

20

30

40

50

一項に記載の方法。

(36) 当該化合物が、配列番号5に記載の配列と40%同一であって、配列番号7に記載の配列のLeu141、Ala145及びAsp146に対応するアミノ酸残基又はその同類置換を含有してなる、BH3領域ポリペプチドである、前記(1)～(22)の何れか一項に記載の方法。

(37) 当該化合物が、配列番号12に記載の配列と40%同一であって、配列番号1に記載の配列のLeu63、Gly67及びAsp68に対応するアミノ酸残基又はその同類置換を含有してなる、BH3領域ポリペプチドである、前記(1)～(22)の何れか一項に記載の方法。

(38) 当該化合物が、 $<1\text{ mM}$ の親和性で当該活性部位に結合する、前記(1)～(37)の何れか一項に記載の方法。

10

【0336】

(39) 当該化合物が、配列番号3に記載のアミノ酸配列又は図8、9、10又は16aに記載のアミノ酸配列を含有してなる、前記(1)～(22)の何れか一項に記載の方法。

(40) 当該化合物が、Bid、Bad、Bik/Nbk、Blk、Hrk、Bim/Bod、Bnip3、Nix、Noxa、Puma、Bmf及びEg1-1よりなる群から選ばれるポリペプチド又はそれらのBIM領域を含有してなる、前記(1)～(22)の何れか一項に記載の方法。

(41) 当該化合物が、BCL-2、Bcl-X1、Bcl-w、Mcl-1、BCL-2B、A1/BFL-1、BOO/DIVA、Nr-13又はCED-9、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記(1)～(22)の何れか一項に記載の方法。

20

(42) 当該化合物が、BAX、BAK及びBOKよりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記(1)～(22)の何れか一項に記載の方法。

(43) 当該方法が、当該BCL-2ファミリーポリペプチドをコードする核酸でトランスフェクトされた細胞を使用する、前記(1)～(42)の何れか一項に記載の方法。

【0337】

(44) 方法が、

a) BAXポリペプチドを、当該BAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化するのに適している条件下で化合物と接触させること；及び

30

b) 当該化合物による当該BAXポリペプチドの活性化を検出すること（ここにおいて、当該化合物は配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する）；

40

を含有してなる、BAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化する化合物を同定する方法。

【0338】

(45) 方法が、

a. 当該BCL-2ファミリーポリペプチドの活性部位の三次元構造を用いて、BCL-2ファミリーポリペプチド相互作用テンプレートを形成すること；及び

b. 当該BCL-2ファミリーポリペプチド相互作用テンプレートを使用して、当該BCL-2ファミリーポリペプチド候補化合物を選択すること（ここにおいて、当該候補化合物は当該活性部位に結合する）；

を含有してなる、BCL-2ファミリーポリペプチドの候補化合物を同定する方法。

50

【0339】

(46) 方法が、

- a. BAXポリペプチドの活性部位の三次元構造を提供すること；
- b. 当該活性部位と化合物の間の結合相互作用をシミュレートすること；及び
- c. 当該化合物が、当該活性部位の配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、及びArg147よりなる群から選ばれるアミノ酸残基と結合するか否かを確認すること（ここにおいて、活性部位の当該アミノ酸残基に結合する当該化合物は当該候補化合物である）；

を含有してなる、BAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化する候補化合物を同定する方法。

【0340】

(47) 当該候補化合物が有機化合物である、前記(45)又は(46)に記載の方法。

(48) 当該候補化合物がポリペプチドである、前記(45)又は(46)に記載の方法。

(49) 当該候補化合物が有機化合物、ポリペプチド、核酸又はそれらの組合わせである、前記(45)又は(46)に記載の方法。

(50) 当該BCL-2ファミリーポリペプチドがプロアポトーシスポリペプチドである、前記(45)に記載の方法。

(51) 当該プロアポトーシスポリペプチドがBAXである、前記(50)に記載の方法。

(52) 当該プロアポトーシスポリペプチドがBOK又はBAKである、前記(50)に記載の方法。

(53) 当該BCL-2ファミリーポリペプチドがアンチアポトーシスポリペプチドである、前記(45)に記載の方法。

(54) 当該アンチアポトーシスポリペプチドが、BCL-2、Bcl-X1、Bcl-w、Mcl-1、BCL-B、A1/BFL-1、BOO/DIVA、Nr-13又はCED-9、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれる、前記(53)に記載の方法。

【0341】

(55) 当該候補化合物が、プロアポトーシス活性の活性化因子である、前記(45)に記載の方法。

(56) 当該候補化合物が、プロアポトーシス活性の阻害因子である、前記(45)に記載の方法。

(57) 当該候補化合物が、アンチアポトーシス活性の活性化因子である、前記(45)に記載の方法。

(58) 当該候補化合物が、アンチアポトーシス活性の阻害因子である、前記(45)に記載の方法。

(59) 当該候補化合物を生物学的アッセイで試験することを更に含有してなる、前記(45)～(58)の何れか一項に記載の方法。

(60) 当該生物学的アッセイが、二量化、オリゴマー化又は立体構造状態の変化、及び／又は1つの細胞コンパートメントから別のコンパートメントへの転座の検出、ミトコンドリアのチトクロームc放出、リポソーム放出、細胞死、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアのカルシウム摂取、ミトコンドリアの膜透過性定量、カスパーゼ3活性又はアネキシン結合性の定量よりなる群から選ばれる、前記(59)に記載の方法。

10

20

30

40

50

(61) 当該活性部位が、BAXのアルファ螺旋1及びアルファ螺旋6を含有してなる、前記(45)～(60)の何れか一項に記載の方法。

(62) 活性部位が、BAXの $\alpha 1-\alpha 2$ ループ及び螺旋4由来のアミノ酸残基を更に含有している、前記(61)に記載の方法。

【0342】

(63) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のLys21に対応するアミノ酸残基に結合する、前記(45)～(62)の何れか一項に記載の方法。

(64) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記(45)～(62)の何れか一項に記載の方法。

10

(65) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のMet20、Lys21、Ala24、Gln28、Gln32、Glu131、Arg134、Met137、Leu141、Asp142に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記(45)～(62)の何れか一項に記載の方法。

(66) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のMet20、Lys21、Ala24、Gln28、Gln32、Glu131、Arg134、Met137、Leu141、Asp142に対応するアミノ酸残基に結合する、前記(45)～(62)の何れか一項に記載の方法。

20

【0343】

(67) 当該化合物が、配列番号3に記載の配列と40%又はそれ以上同一のアミノ酸配列、又は図8、9、10又は16aに記載のアミノ酸配列を含有していて、そして配列番号9に記載の配列のLeu152及びAsp157に対応するアミノ酸残基、又はそれらの同類置換を含有してなる、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(68) 当該化合物が、配列番号9に記載の配列のIle148、Ala149、Leu152、Arg153、Arg154、Ile155、Gly156、Asp157、Glu158、Asn160、Ala161、Tyr163に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなる、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

30

(69) 当該化合物が、配列番号13に記載のコンセンサスアミノ酸配列又はそれらの同類置換を含有してなる、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(70) 当該化合物が、BIMポリペプチドのBH3領域である、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(71) 当該化合物が、BIM BH3 SAHBポリペプチドである、前記(70)に記載の方法。

(72) 当該化合物が、BIDポリペプチドのBH3領域である、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

40

(73) 当該化合物が、BID BH3 SAHBポリペプチドである、前記(72)に記載の方法。

(74) 当該化合物が、PUMAポリペプチドのBH3領域である、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(75) 当該化合物が、PUMA BH3 SAHBポリペプチドである、前記(74)に記載の方法。

(76) 当該化合物が、BAXポリペプチドのBH3領域である、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(77) 当該化合物が、BAX BH3 SAHBポリペプチドである、前記(76)に

50

記載の方法。

【0344】

(78) 当該化合物が、配列番号3に記載の配列と40%同一で、配列番号2に記載の配列のLeu92、Gly96及びAsp97に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(79) 当該化合物が、配列番号4に記載の配列と40%同一で、配列番号6に記載の配列のLeu90、Gly94及びAsp95に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してないBH3領域ポリペプチドである、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

10

(80) 当該化合物が、配列番号5に記載の配列と40%同一で、配列番号7に記載の配列のLeu141、Ala145及びAsp146に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(81) 当該化合物が、配列番号12に記載の配列と40%同一で、配列番号1に記載の配列のLeu63、Gly67及びAsp68に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(82) 当該化合物が、<1mMの親和性で当該活性部位に結合する、前記(45)～(81)の何れか一項に記載の方法。

20

【0345】

(83) 当該化合物が、配列番号3に記載のアミノ酸配列、又は図8、9、10又は16aに記載のアミノ酸配列を含有してなる、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(84) 当該化合物が、Bid、Bad、Bik/Nbk、Blk、Hrk、Bim/Bod、Bnip3、Nix、Noxa、Puma、Bmf及びEg1-1よりなる群から選ばれるポリペプチド又はそれらのBIM領域を含有してなる、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(85) 当該化合物が、BCL-2、Bcl-X1、Bcl-w、Mcl-1、BCL-B、A1/BFL-1、BOO/DIVA、Nr-13又はCED-9、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

30

(86) 当該化合物が、BAX、BAK及びBOKよりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記(45)～(66)の何れか一項に記載の方法。

(87)

当該方法が、当該BCL-2ファミリーポリペプチドをコードする核酸でトランスフェクトされた細胞を使用する、前記(45)～(86)の何れか一項に記載の方法。

【0346】

(88)

a. 標的ポリペプチドを、共有結合架橋可能部分を含有しているBH3 SAHBポリペプチドと培養すること；

40

b. 当該BH3 SAHBポリペプチドを当該標的ポリペプチドに架橋すること；及び

c. 当該BH3 SAHBポリペプチドの当該標的ポリペプチドに対する相互作用部位を同定すること；

を含有してなる、標的ポリペプチド上の活性部位を同定する方法。

【0347】

(89)

a. MTS L誘導体化BH3 SAHBポリペプチドをBAXに接触させること；及び

b. NMR分析を実施し、それによってBH3 SAHBポリペプチドとBAXの間の結合相互作用を確認すること；

50

を含有してなる、BAX-BH3結合相互作用を確認する方法。

【0348】

(90) 治療を必要としている対象に、前記(1)～(87)の何れか一項に記載の方法で同定された化合物の有効量を投与することを含有してなる、対象における疾患を治療する方法。

(91) 当該疾患が、異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患である、前記(90)に記載の方法。

(92) 当該異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患が癌又は自己免疫疾患である、前記(91)に記載の方法。

(93) 当該癌が、固形腫瘍、白血病、及びリンパ腫よりなる群から選ばれる、前記(92)に記載の方法。 10

(94) 当該癌が、化学療法抵抗性の癌である、前記(92)に記載の方法。

(95) 当該化学療法抵抗性の癌が、ABT-737又はABT-263に耐性である、前記(94)に記載の方法。

【0349】

(96) BCL-2ファミリーポリペプチドを、当該BCL-2ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する化合物で調節することによって、疾患を治療する方法。

(97) 当該疾患が、異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患である、前記(96)に記載の方法。

(98) 当該異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患が癌又は自己免疫疾患である、前記(97)に記載の方法。 20

(99) 当該癌が、固形腫瘍、白血病、及びリンパ腫よりなる群から選ばれる、前記(98)に記載の方法。

(100) 当該癌が、化学療法抵抗性の癌である、前記(98)に記載の方法。

(101) 当該化学療法抵抗性の癌が、ABT-737又はABT-263に耐性である、前記(100)に記載の方法。

【0350】

(102) 当該化合物が有機化合物である、前記(96)～(101)の何れか一項に記載の方法。

(103) 当該化合物がポリペプチドである、前記(96)～(101)の何れか一項に記載の方法。 30

(104) 当該化合物が、有機化合物、ポリペプチド、核酸又はこれらの組合わせである、前記(96)～(101)の何れか一項に記載の方法。

(105) 当該BCL-2ファミリーポリペプチドが、プロアポトーシスポリペプチドである、前記(96)～(104)の何れか一項に記載の方法。

(106) 当該プロアポトーシスポリペプチドが、BAXである、前記(105)に記載の方法。

(107) 当該プロアポトーシスポリペプチドが、BOK又はBAKである、前記(105)に記載の方法。

(108) 当該BCL-2ファミリーポリペプチドが、アンチアポトーシスポリペプチドである、前記(96)～(104)の何れか一項に記載の方法。 40

(109) 当該アンチアポトーシスポリペプチドが、BCL-2、Bcl-X1、Bcl-w、Mcl-1、BCL-B、A1/BFL-1、BOO/DIVA、Nr-13又はCED-9、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれる、前記(108)に記載の方法。

【0351】

(110) 当該化合物が、プロアポトーシス活性を活性化する、前記(96)～(104)の何れか一項に記載の方法。

(111) 当該化合物が、プロアポトーシス活性を阻害する、前記(96)～(104)の何れか一項に記載の方法。 50

(112) 当該化合物が、アンチアポトーシス活性を活性化する、前記(96)～(104)の何れか一項に記載の方法。

(113) 当該化合物が、アンチアポトーシス活性を阻害する、前記(96)～(104)の何れか一項に記載の方法。

(114) 当該活性部位が、BAXのアルファ螺旋1及びアルファ螺旋6を含有してなる、前記(96)～(113)の何れか一項に記載の方法。

(115) 活性部位が、BAXの $\alpha 1-\alpha 2$ ループ及び螺旋4由来のアミノ酸残基を更に包含している、前記(114)に記載の方法。

【0352】

(116) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のLys21に対応するアミノ酸残基に結合する、前記(96)～(115)の何れか一項に記載の方法。 10

(117) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記(96)～(115)の何れか一項に記載の方法。

(118) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のMet20、Lys21、Ala24、Gln28、Gln32、Glu131、Arg134、Met137、Leu141、Asp142に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記(96)～(115)の何れか一項に記載の方法。 20

(119) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のMet20、Lys21、Ala24、Gln28、Gln32、Glu131、Arg134、Met137、Leu141、Asp142に対応するアミノ酸残基に結合する、前記(96)～(115)の何れか一項に記載の方法。

【0353】

(120) 当該化合物が、配列番号3に記載の配列と40%又はそれ以上同一のアミノ酸配列、又は図8、9、10又は16aに記載のアミノ酸配列を含有していて、そして配列番号9に記載の配列のLeu152及びAsp157に対応するアミノ酸残基、又はそれらの同類置換を含有してなる、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。 30

(121) 当該化合物が、配列番号3に記載の配列のIle148、Ala149、Leu152、Arg153、Arg154、Ile155、Gly156、Asp157、Glu158、Asn160、Ala161、Tyr163に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなる、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

(122) 当該化合物が、配列番号13に記載のコンセンサスアミノ酸配列又はそれらの同類置換を含有してなる、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

(123) 当該化合物が、BIMポリペプチドのBH3領域である、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。 40

(124) 当該化合物が、BIM BH3 SAHBポリペプチドである、前記(123)に記載の方法。

(125) 当該化合物が、BIDポリペプチドのBH3領域である、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

(126) 当該化合物が、BID BH3 SAHBポリペプチドである、前記(125)に記載の方法。

(127) 当該化合物が、PUMAポリペプチドのBH3領域である、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

(128) 当該化合物が、PUMA BH3 SAHBポリペプチドである、前記(12 50

7) に記載の方法。

(129) 当該化合物が、BAXポリペプチドのBH3領域である、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

(130) 当該化合物が、BAX BH3 SAHBポリペプチドである、前記(129)に記載の方法。

【0354】

(131) 当該化合物が、配列番号3に記載の配列と40%同一で、配列番号9に記載の配列のLeu92、Gly96及びAsp97に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

10

(132) 当該化合物が、配列番号4に記載の配列と40%同一で、配列番号6に記載の配列のLeu90、Gly94及びAsp95に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

(133) 当該化合物が、配列番号5に記載の配列と40%同一で、配列番号7に記載の配列のLeu141、Ala145及びAsp146に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

(134) 当該化合物が、配列番号12に記載の配列と40%同一で、配列番号1に記載の配列のLeu63、Gly67及びAsp68に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

20

(135) 当該化合物が、<1mMの親和性で当該活性部位に結合する、前記(96)～(134)の何れか一項に記載の方法。

【0355】

(136) 当該化合物が、配列番号3に記載のアミノ酸配列、又は図8、9、10又は16aに記載のアミノ酸配列を含有してなる、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

(137) 当該化合物が、Bid、Bad、Bik/Nbk、Blk、Hrk、Bim/Bod、Bnip3、Nix、Noxa、Puma、Bmf及びEg1-1よりなる群から選ばれるポリペプチド又はそれらのBIM領域を含有してなる、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

30

(138) 当該化合物が、BCL-2、Bcl-X1、Bcl-w、Mc1-1、BCL-B、A1/BFL-1、BOO/DIVA、Nr-13又はCED-9、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

(139) 当該化合物が、BAX、BAK及びBOKよりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記(96)～(119)の何れか一項に記載の方法。

【0356】

(140) 治療を必要としている患者に、BAXポリペプチドのプロアポトーシス活性を活性化する化合物を投与することを含有してなる腫瘍を治療する方法(ここにおいて、当該化合物は配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147の1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合し、当該化合物はBH3ポリペプチド又はその模倣薬である)。

40

【0357】

50

(141) BCL-2に関連する疾患を治療する化合物であって、当該化合物はBCL-2ファミリーポリペプチドの活性を調節して、当該BCL-2ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する、化合物。

(142) 当該疾患が、異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患である、前記(141)に記載の化合物。

(143) 当該異常細胞増殖又はアポトーシス阻害の疾患が癌又は自己免疫疾患である、前記(142)に記載の化合物。

(144) 当該癌が、固形腫瘍、白血病、及びリンパ腫よりなる群から選ばれる、前記(143)に記載の化合物。

(145) 当該癌が、化学療法抵抗性の癌である、前記(143)に記載の化合物。

10

【0358】

(146) 当該化合物が有機化合物である、前記(141)～(145)の何れか一項に記載の化合物。

(147) 当該化合物がポリペプチドである、前記(141)～(145)の何れか一項に記載の化合物。

(148) 当該化合物が有機化合物、ポリペプチド、核酸又はこれらの組合わせである、前記(141)～(145)の何れか一項に記載の化合物。

(149) 当該活性部位が、BAXのアルファ螺旋1及びアルファ螺旋6を含有してなる、前記(141)～(148)の何れか一項に記載の化合物。

(150) 当該活性部位が、BAXの $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ループ及び螺旋4由来のアミノ酸残基を更に包含してなる、前記(149)に記載の化合物。

20

【0359】

(151) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のLys21に対応するアミノ酸残基に結合する、前記(141)～(150)の何れか一項に記載の化合物。

(152) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のGlu17、Met20、Lys21、Thr22、Ala24、Leu25、Leu27、Gln28、Gly29、Ile31、Gln32、Asp33、Leu47、Asp48、Pro49、Val50、Pro51、Gln52、Asp53、Thr56、Arg89、Phe92、Phe93、Pro130、Glu131、Ile133、Arg134、Thr135、Met137、Gly138、Trp139、Leu141、Asp142、Phe143、Arg145、Glu146、Arg147に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記(141)～(150)の何れか一項に記載の化合物。

30

(153) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のMet20、Lys21、Ala24、Gln28、Gln32、Glu131、Arg134、Met137、Leu141、Asp142に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する、前記(141)～(150)の何れか一項に記載の化合物。

(154) 当該化合物が、配列番号1に記載の配列のMet20、Lys21、Ala24、Gln28、Gln32、Glu131、Arg134、Met137、Leu141、Asp142に対応するアミノ酸残基に結合する、前記(141)～(150)の何れか一項に記載の化合物。

40

【0360】

(155) 当該化合物が、図8、9、10又は16aに記載のアミノ酸配列と40%又はそれ以上同一であり、そして配列番号9に記載の配列のLeu152及びAsp157に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなる、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(156) 当該化合物が、配列番号9に記載の配列のIle148、Ala149、Leu152、Arg153、Arg154、Ile155、Gly156、Asp157、Glu158、Asn160、Ala161、Tyr163に対応する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなる、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

50

(157) 当該化合物が、配列番号13に記載のコンセンサスアミノ酸配列又はそれらの同類置換を含有してなる、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(158) 当該化合物が、BIMポリペプチドのBH3領域である、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(159) 当該化合物が、BIM BH3 SAHBポリペプチドである、前記(158)に記載の化合物。

(160) 当該化合物が、BIDポリペプチドのBH3領域である、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(161) 当該化合物が、BID BH3 SAHBポリペプチドである、前記(160)に記載の化合物。

10

(162) 当該化合物が、PUMAポリペプチドのBH3領域である、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(163) 当該化合物が、PUMA BH3 SAHBポリペプチドである、前記(162)に記載の化合物。

(164) 当該化合物が、BAXポリペプチドのBH3領域である、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(165) 当該化合物が、BAX BH3 SAHBポリペプチドである、前記(164)に記載の化合物。

【0361】

(166) 当該化合物が、配列番号3に記載の配列と40%同一で、配列番号2に記載の配列のLeu92、Gly96及びAsp97に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

20

(167) 当該化合物が、配列番号4に記載の配列と40%同一で、配列番号6に記載の配列のLeu90、Gly94及びAsp95に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(168) 当該化合物が、配列番号5に記載の配列と40%同一で、配列番号7に記載の配列のLeu141、Ala145及びAsp146に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

30

(169) 当該化合物が、配列番号12に記載の配列と40%同一で、配列番号1に記載の配列のLeu63、Gly67及びAsp68に対応するアミノ酸残基又はそれらの同類置換を含有してなるBH3領域ポリペプチドである、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(170) 当該化合物が、<1mMの親和性で当該活性部位に結合する、前記(141)～(169)の何れか一項に記載の化合物。

【0362】

(171) 当該化合物が、配列番号3に記載のアミノ酸配列、又は図8、9、10又は16aに記載のアミノ酸配列を含有してなる、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

40

(172) 当該化合物が、Bid、Bad、Bik/Nbk、Blk、Hrk、Bim/Bod、Bnip3、Nix、Noxa、Puma、Bmf及びEg1-1よりなる群から選ばれるポリペプチド又はそれらのBIM領域を含有してなる、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(173) 当該化合物が、BCL-2、Bcl-X1、Bcl-w、Mcl-1、BCL-B、A1/BFL-1、BOO/DIVA、Nr-13又はCED-9、及びウィルス類縁体よりなる群から選ばれるポリペプチドを含有してなる、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

(174) 当該化合物が、BAX、BAK及びBOKよりなる群から選ばれるポリペプ

50

チドである、前記(141)～(154)の何れか一項に記載の化合物。

【0363】

(175) BH3 SAHBポリペプチドが共有結合架橋可能部分を含有してなる、BH3 SAHBポリペプチド

(176) 当該共有結合架橋可能部分がベンゾフェノンである、前記(175)に記載のBH3 SAHBポリペプチド。

(177) 当該BH3 SAHBポリペプチドが、BIMポリペプチドのBH3領域である、前記(175)又は(176)に記載のBH3 SAHBポリペプチド。

(178) 当該BH3 SAHBポリペプチドが、BIDポリペプチドのBH3領域である、前記(175)又は(176)に記載のBH3 SAHBポリペプチド。

10

(179) 当該BH3 SAHBポリペプチドが、PUMAポリペプチドのBH3領域である、前記(175)又は(176)に記載のBH3 SAHBポリペプチド。

(180) 当該BH3 SAHBポリペプチドが、BAXポリペプチドのBH3領域である、前記(175)又は(176)に記載のBH3 SAHBポリペプチド。

(181) 当該BH3 SAHBポリペプチドが、図11に記載のポリペプチドからなる群から選ばれる、前記(175)又は(176)に記載のBH3 SAHBポリペプチド。

【0364】

(182) BH3ポリペプチドを含有してなる組成物であって、当該BH3ポリペプチドが、本質的に図7、9、10又は16aに記載のアミノ酸配列を包含している、組成物

20

(183) BAX α -螺旋9 SAHBポリペプチドを含有してなる組成物であって、当該ポリペプチドは図16bに記載のアミノ酸配列と40%又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含有しているか、又はその同類置換を含んでなる、組成物。

(184) 常磁性標識を有するBH3 SAHBポリペプチドを含有してなる組成物。

【0365】

(185) 治療を必要としている対象に、当該対象が疾患を治療されるように、前記(1)～(87)の何れか一項に記載の方法で同定された化合物及びBAX α -螺旋9 SAHBポリペプチド(配列番号14)の有効量を投与することを含有してなる、対象における疾患を治療する方法。

30

(186) 当該BAX α -螺旋9 SAHBポリペプチドが図16bに記載のアミノ酸配列と40%又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含有しているか、又はその同類置換を含んでなる、前記(185)に記載の方法。

【0366】

(187) BCL-2ファミリーポリペプチドの活性部位に結合する化合物及び使用説明書を含有してなる、キット。

(188) 配列番号13に記載のコンセンサスアミノ酸配列又はその同類置換を含有してなる、単離したポリペプチド。

(189) 当該ポリペプチドが炭化水素を連結している、前記(188)に記載のポリペプチド。

40

(190) 前記(189)に記載のポリペプチドを含有してなる、組成物。

【図 1】

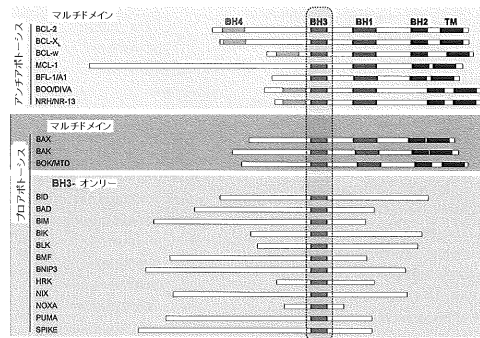


図 1 BCL-2 ファミリーメンバー保存的BCL-2相同(BH)ドメインを共有する。

【図 2】

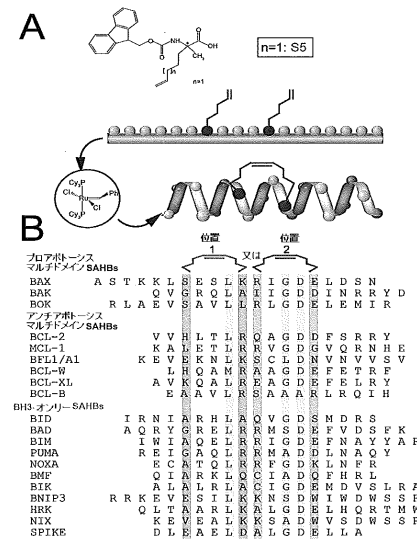


図 2 (A) BCL-2ファミリーポリペプチドBH3ドメインの炭化水素-連結ペプチドの合成

(B) 2つi, i+4の連結位置を備えた、SAHB化合物の化学ツールボックス。保存される残基が黄色で強調されている。連結位置はペプチド配列中の何れの位置でも可能であることに留意されたい。

【図 3】

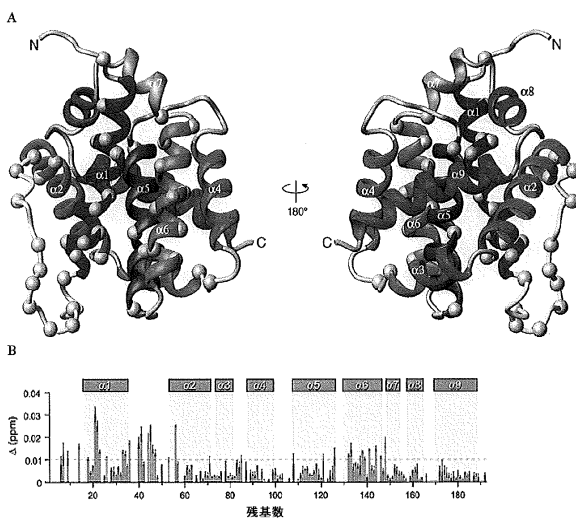


図 3 (a) BIM SAHB滴定による¹⁵N-標識BAXのNMR分析で確認されたように、BIM SAHB結合の影響を受けるそれらの残基を示している灰色球体を伴うBAX構造を表すリボン図。(b) 化学シフト変化をBAXの残基番号の機能としてプロットしている。有意な骨格アミド化学シフト変化(>0.01ppm)を有する残基をオレンジ色に着色している。

【図 4】

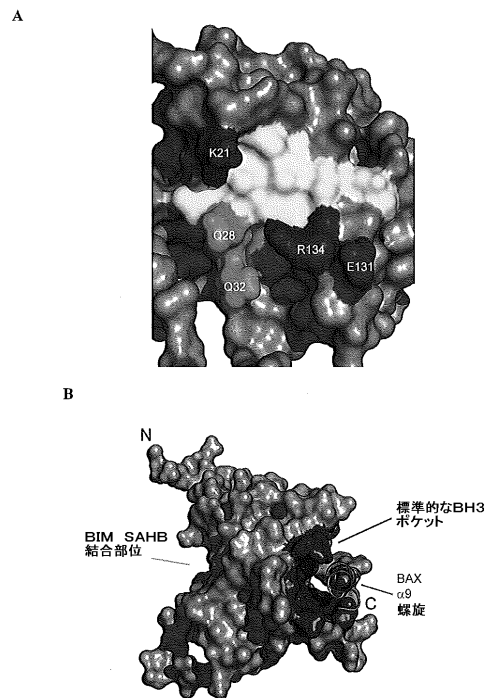


図 4 (a) BAX結合部位を説明する表面図。(b) BIM SAHB-BAX相互作用のNMR分析がBH3介在型BAX活性化のための新しい結合部位を明らかにしている。BIM SAHBは、BAXを、アンチアポトーシスタンパク質に対して同定されている標準的なBH3結合部位とは異なる構造位置に組み込む。

【図 5】

配列番号 1

ヒトBAX一次アミノ酸配列

MDGSGEFGGGFSSSEIMKTALLOGFIQDSARMGEEFLLDPVPQDASTIKL
 SECIRIGDELINMELORMIAASPREVFFRVAADMFSDGNFNWIRVVALFYFA
 KILKALTKVPEIRTMGWTLDEIRERLLGWIQDQGGWDGLLSYFGTPTWQTVTIEV
 AGVLTASLTIWKKMG

BIM SAHB相互作用部位の残基 : 黄色

RESIDUES AT BIM SAHB INTERACTION SITE: YELLOW

RESIDUES AT BIM SAHB INTERACTION SITE: RED

BIM SAHB結合による影響を受ける追加の残基 : 赤色

図5 α 螺旋1及び6の主要残基、 α 螺旋1と2の間のループ、及びBAXの螺旋2と4における、BIM SAHBのような活性化因子SAHBのための新規な結合部位の形成に関与する選択残基が強調されている、BAXの一次アミノ酸配列。 α 螺旋 1-9は、その配列に下線を付して、 α 螺旋1と6が太字で示されている。

【図 6 A - D】

図 6A

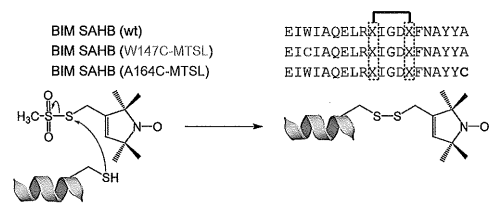
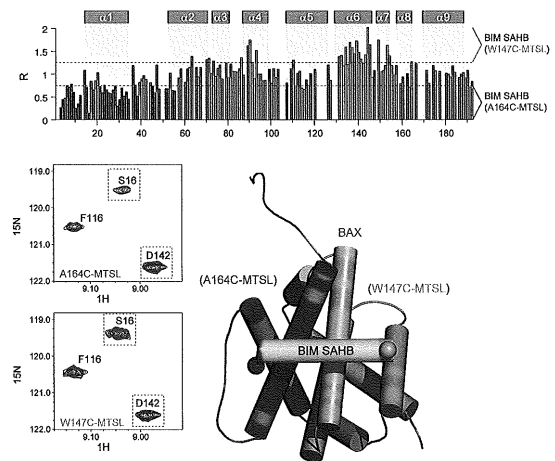


図 6B-D



【図 6 E】

図 6E

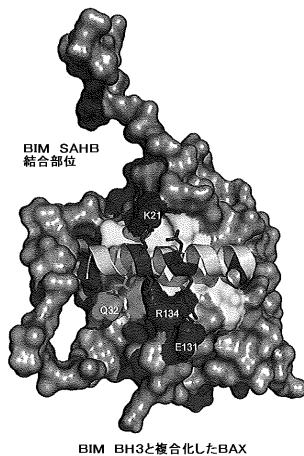


図6 新規なBAX結合部位にあるBIM SAHBの幾何学的配置。

- (a) BIM SAHBを、システイン残基をペプチドのN-又はC-末端の何れかに位置付けて、導入されたチオール基をMTSLと反応させてニトロキシドスピン標識に組み込ませて生成した常磁性に標識化した誘導体に変異させた。
- (b) BAXの交差ピーク強度比(BIM SAHB_{W147C-MTSL}[I_{OX}/I_{RED}])/BIM SAHB_{A164C-MTSL}[I_{OX}/I_{RED}] 対 それぞれのMTSL標識によって最大に影響を与えられている重要なBAX残基の残基数の比プロット。
- (c) 相関スペクトルは、BAX α 1 残基(例えば、Ser16)は、BIM SAHB_{A164C-MTSL}の酸化形態(赤)及び還元形態(黒)を比較するPRE実験の影響を受ける(上図)のに対して、BAX α 6 残基(例えば、D142)は対応するBIM SAHB_{W147C-MTSL}実験に影響を及ぼす(下図)ということを示している。
- (d) PREで得られた右から左方向に配置したN-末端からC-末端を用いて、 α 螺旋1と6に関してBIM SAHBを約90度配列させた両方のMTSL組み込み部位からの分子間距離を用いて作成された計算構造。
- (e) BAX及びBIM BH3上の新規な相互作用部位の間の複合体の計算構造。

【図 7】

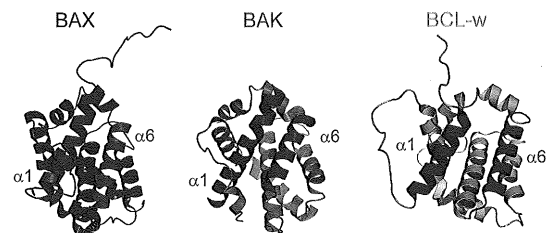


図 7 BCL-2ポリペプチドの構造比較は、 α 螺旋1,6の接触面での及び α 螺旋1と2の間のフレキシブルなループ領域に隣接する新規なBAX結合部位の形態的相同性を強調している。

【図 8－1】

図 8-1

BIM SAHB の実例

N-末端は、アセチル、FITC- β Ala、ビオチン、プロパルジル、ミリストイル、ミリストイル-Lys (FITC)、FITC-Lys (ミリストイル) を含む。

C-末端は、アミド、カルボン酸塩を含む。

hBIM BH3	EIWIAQELRRIGDEFNAYYARR (配列番号 3)
mBIM BH3	IRIAQELR*IGD*FNETYTRR
mBIM SAHB _{A2}	IRIAQELR*IGD*FNETYTRR
mBIM SAHB _{A2}	ERIAQELR*IGD*FNETYTR
BIM SAHB _{A1} (G→E)	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} (L, D→A, A)	IWIAQELR*IGA*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} (G→S)	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} (E→R)	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} (R→D)	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} (E, R→R, D)	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} (W→R)	IRIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} (A→E)	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} (Y→T)	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} (A→T)	IWIAQELR*IGD*FNAYYTRR
BIM SAHB _{A2} (G→E)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (L, D→A, A)	EIWIAQELR*IGA*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (G→S)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (E→R)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (R→D)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (E, R→R, D)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (W→R)	ERIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (A→E)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (Y→T)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (A→T)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYT
BIM SAHB _{A2} (I→E)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (E→R)	RIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (D→R)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (N→R)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (N→E)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (D, N→R, E)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (D, N→R, R)	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A1}	I*IAQ*LRIGDEFNAYYARR
BIM SAHB _{A2}	EI*IAQ*LRIGDEFNAYYA
BIM SAHB _{A2} (E→K)	EI*IAQ*LRIGDEFNAYYA
BIM SAHB _{C1}	IW*AQE*RRIGDEFNAYYARR
BIM SAHB _{C2}	EIW*AQE*RRIGDEFNAYYA
BIM SAHB _{D1}	EIW*QEL*RRIGDEFNAYYARR
BIM SAHB _{D2}	EIW*QEL*RRIGDEFNAYYA
BIM SAHB _{A1}	IWIAQELRRIGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{C1}	EIWIAQELRRIGD*FNAYYA
BIM SAHB _{F1}	IWIA*ELR*IGDEFNAYYARR
BIM SAHB _{F2}	EIWIA*ELR*IGDEFNAYYA
BIM SAHB _{D1}	IWIAQELRRIGDEFNAYY*RR
BIM SAHB _{D2}	EIWIAQELRRIGDEFNAYY*

【図 10】

図 10

PUMA SAHB 誘導体の実例

N-末端は、アセチル、FITC- β Ala、ビオチン、プロパルジルを含む。

C-末端は、アミド、カルボン酸塩を含む。

hPUMA BH3	EQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER (配列番号 5)
PUMA SAHB _{A1}	QWAREIGLQAR*BAD*LNAYQY
PUMA SAHB _{A1} (L, D→A, A)	QWAREIGAQAR*BA*LNAYQY
PUMA SAHB _{A1} (G→E)	QWAREIGLQAR*BED*LNAYQY
PUMA SAHB _{A1} (R→D)	QWAREIGLQAD*BAD*LNAYQY
PUMA SAHB _{A2}	EQWAREIGLQAR*BAD*LNAYQY
PUMA SAHB _{A3}	EQWAREIGLQAR*BAD*LNAYQY
PUMA SAHB _{A1}	QW*REI*LQARRBADDLNAQY
PUMA SAHB _{A3}	EQW*REI*LQARRBADDLNAQY
PUMA SAHB _{A1} (R→D)	QW*REI*LQADRBADDLNAQY
PUMA SAHB _{A3} (R→D)	EQW*REI*LQADRBADDLNAQY
PUMA SAHB _{A1} (D→R)	QW*REI*LQARRBADDLNAQY
PUMA SAHB _{A3} (D→R)	EQW*REI*LQARRBADDLNAQY

*炭化水素連結部位

【図 8－2】

図 8-2

誘導体は、システインによるMTS Lの取り込み及びリジンによるDOTAの取り込みを含んでいる：

BIM SAHB _{A2} (W→C/K)	EI (C/K) IAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (A→C/K)	EIWI (C/K) QELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (G→C/K)	EIWIAQELR*I (C/K) D*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} (Y→C/K)	EIWIAQELR*IGD*FNA (C/K) YA
BIM SAHB _{A2} (Y→C/K)	EIWIAQELR*IGD*FNAY (C/K) A
BIM SAHB _{A2} (A→C/K)	EIWIAQELR*IGD*FNAY (C/K)

*炭化水素連結部位

【図 9】

図 9

BID SAHB 誘導体の実例

N-末端は、アセチル、FITC- β Ala、ビオチン、プロパルジル、ミリストイル、ミリストイル-Lys (FITC)、FITC-Lys (ミリストイル) を含む。

C-末端は、アミド、カルボン酸塩を含む。

hBID BH3	ESQEDIIRNIARHLAQVGDMDRSI (配列番号 4)
mBID BH3	ESQEEIIRNIARHLAQVGDMDRSI
BID SAHB _{A1}	DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
mBID SAHB _{A1}	EIIRNIARHLA*IGD*BDHNI
BID SAHB _{A2}	ESQEDIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
mBID SAHB _{A2}	ESQEEIIRNIARHLA*IGD*BDHNI
BID SAHB _{A1} (G→E)	DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHB _{A1} (G→S)	DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHB _{A1} (L, D→A, A)	DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHB _{A1} (B, D→A, A)	DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHB _{A1} (G→E)	DIIRNIARHLA*VAD*BDRSI

*炭化水素連結部位

【図 11】

図 11

特異性分析のための点突然変異を含んでいる

共有結合捕獲用BIM、BID及びPUMA SAHBの誘導体

N-末端は、アセチル、FITC- β Ala、ビオチン、プロパルジル、ミリストイル、ミリストイル-Lys (FITC)、FITC-Lys (ミリストイル) を含む。

C-末端は、アミド、カルボン酸塩を含む。

BIM:

BIM SAHB _{A1} Bpa-1	IUIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-2	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-3	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-4	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-5	IRIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-6	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-7	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-8	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-9	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-10	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A1} Bpa-11	IWIAQELR*IGD*FNAYYARR
BIM SAHB _{A2} Bpa-1	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-2	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-3	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-4	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-5	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-6	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-7	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-8	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-9	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-10	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA
BIM SAHB _{A2} Bpa-11	EIWIAQELR*IGD*FNAYYA

BID:

BID SAHB _{A1} Bpa-1	UDIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHB _{A1} Bpa-2	DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHB _{A1} Bpa-3	DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHB _{A1} Bpa-4	DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI
BID SAHB _{A1} Bpa-5	DIIRNIARHLA*VGD*BDRSI

PUMA:

PUMA SAHB _{A1} Bpa-1	UQWAREIGLQAR*BAD*LNAYQY
PUMA SAHB _{A1} Bpa-2	QWAREIGLQAR*BAD*LNAYQY
PUMA SAHB _{A1} Bpa-3	QWAREIGLQAR*BAD*LNAYQY
PUMA SAHB _{A1} Bpa-4	QWAREIGLQAR*BAD*LNAYQY
PUMA SAHB _{A1} Bpa-5	QWAREIGLQAR*BAD*LNAYQY
PUMA SAHB _{A1} Bpa-6	QWAREIGLQAR*BAD*LNAYQY

BIM、BID及びPUMA SAHB及びそれらの誘導体と変異体は結合する標的を共有結合的に捕獲するために作出した。U=Bpaであるが、他の当該技術分野で公知の他の架橋可能部分を示すこともできる。

*炭化水素連結部位

【図 1 2 A - B】

A

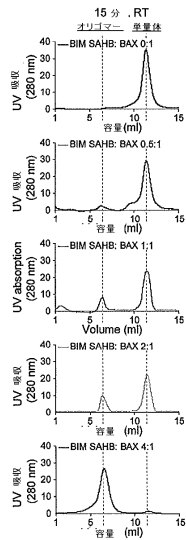
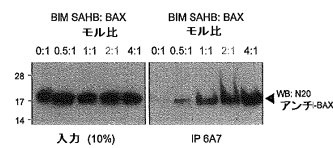


図 12AB

(a)単量体-オリゴマー状態のサイズ排除クロマトグラフィー、及び(b)増加したBIM SAHB-BAX割合を伴う、6A7抗体による活性化されたBAXの確認、によって明らかなように、BIM SAHBはインビトロでBAXのオリゴマー化を直接開始する。

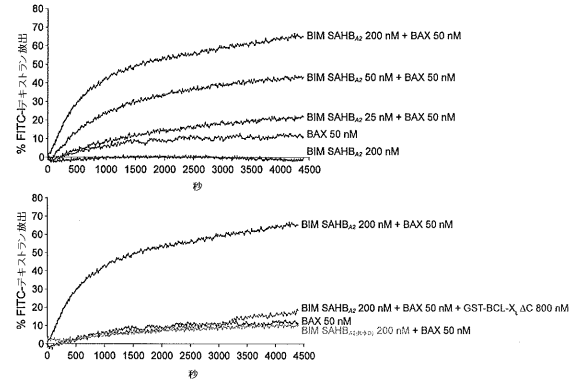
B



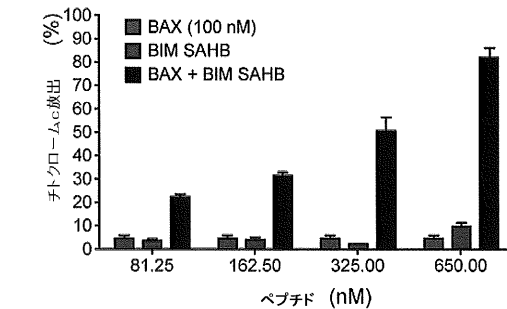
【図 1 2 C - D】

図 12CD (c) インビトロ F I T C-デキストランリボソーム放出アッセイ、及び (d) ミトコンドリアチトクローム c 放出によって評価されるような、B I M S A H B に誘発される直接的 B A X の活性化の特異的で強力な有効性。

C



D



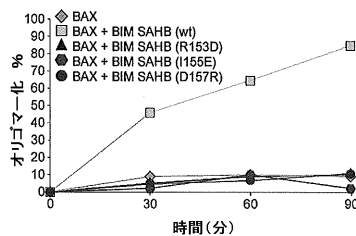
【図 1 3 A - B】

図 13. BIM SAHBが誘発するBAX活性化の特異性:点突然変異生成。(a)その相互作用面をBAXで突然変異させたBIM SAHB化合物のパネル。(b)BIM SAHBの点突然変異生成は、野生型BAXをオリゴマー化して、(c)BAXが介在するチトクロームc放出を誘発する、その能力を無効にする。(d)BAX K21E及びR134E突然変異生成は、BIM SAHBが誘発するBAXのオリゴマー化を減弱する。

図 13A

BIM SAHB (wt) EIWIAQELR**X**IGDXFNAYYA
 BIM SAHB (R153D) EIWIAQELD**X**IGDXFNAYYA
 BIM SAHB (I155E) EIWIAQELR**X**EGDXFNAYYA
 BIM SAHB (D157R) EIWIAQELR**X**IGRXFNAYYA

図 13B



【図 1 3 C - D】

図 13C

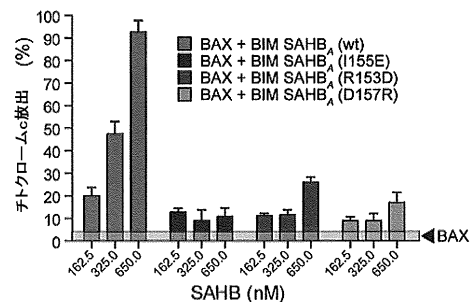
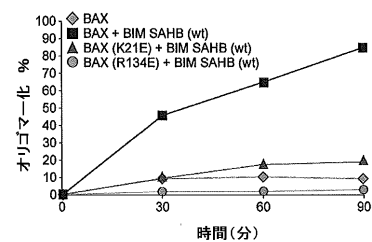


図 13D



【図 14 A - C】

図 14A

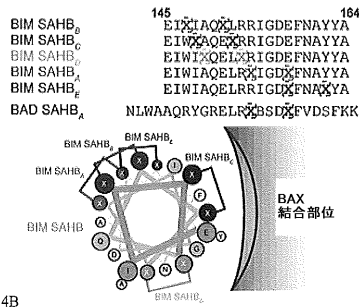


図 14B

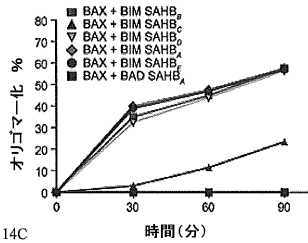
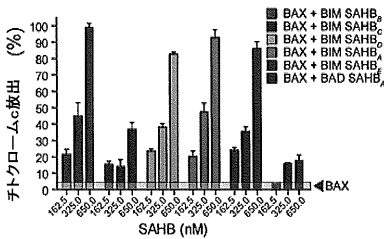


図 14C



【図 14 D】

図 14D

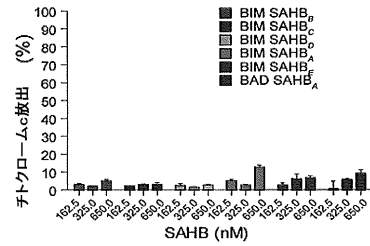


図 14. BIM SAHBが誘発したBAX活性化の特異性:連結スキャン。

(a) 異なったi, i+4連結位置を有するBIM SAHB化合物のパネル。(b) BIM SAHB疎水性相互作用表面に位置している炭化水素連結によるコア疎水性残基I148及びL152の置き換えが、BAXオリゴマー化を選択的に妨害する。BIM BH3 α 螺旋の非相互作用表面に沿った炭化水素連結の位置では、BIM SAHBが誘発するBAXのオリゴマー化が一樣に保存された。BIM SAHB_Aと同一の連結位置を有しているが、BAD SAHB_AはBAXのオリゴマー化を誘発しなかった。(c) 一致して、BIM SAHB_B, A, B, D及びDは、BAXが介在するチトクロームc放出を誘発した一方で、BIM SAHB_C及びBAD SAHB_Aはそれぞれに殆ど全く影響がなかった。(d) SAHBが誘発するミトコンドリアチトクロームc放出がBAX一依存性であることを明らかにする対照実験。

【図 15】

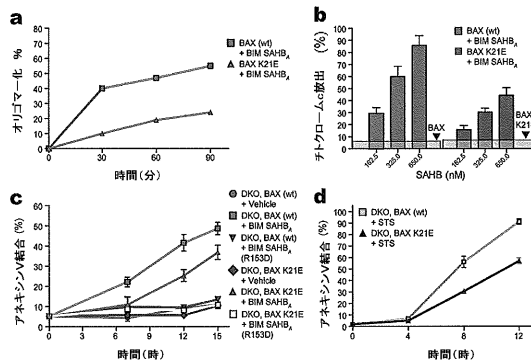


図15 BAX相互作用部位の突然変異生成が、活性化及びBAXが介在するアポトーシスを妨害する。(a) BAX K21E突然変異生成がBIM SAHB_Aが誘発するBAXのオリゴマー化を妨害した。(b) BAXが介在するチトクロームc放出を減少した。(c) 野生型BAXで再構成したBax^{-/-}Bak^{-/-}MEFは、アネキシン-V結合により評価されたように、BIM SAHB_A(R153D)ではなくBIM SAHB_Aにตอบสนองしてアポトーシス化された。BAX_{K21E}で再構成したBax^{-/-}Bak^{-/-}MEFは、BIM SAHB_Aに対する鈍化したアポトーシス応答を明らかにした。(d) BAXで再構築したDKO MEFsのスタウロスポリン(STS)が誘発するアポトーシスは、同様に、K21E突然変異生成によって減少した。誤差は、少なくとも3種の値の平均、 $\pm$ s. d. を示す。

【図 16】

図 16 BAX及びBAX BH3 の後にモデル化されたBAX SAHB及びBAX₉螺旋9、BAXオリゴマー化を調整するためにデザインされた。A
BAX BH3 SAHBs

BAX BH3 WT QDASTKKLSECLKRIGDELDSN (配列番号 12)
 BAX SAHB_A QDASTKKLSECLK*IGD*LDNS
 BAX SAHB_B QDASTKKLSE*LRIGDELDSN
 BAX SAHB_B(R $\rightarrow$ D) QDASTK*LSE*LDRIDELDSN
 BAX SAHB_B(D $\rightarrow$ R) QDASTK*LSE*LKRIGDELDSN
 BAX SAHB_C QDASTKK*SEC*KRIGDELDSN
 BAX SAHB_D QDASTKKL*ECL*RIIGDELDSN

B
BAX 螺旋 9 SAHBs

BAX_{B9} WT TWQTVTIFVAGVLTASLTIIWKK (配列番号 14)
 BAX_{B9} SAHB_{A1} TWQTVTIFVA*VLT*SLTIWKK
 BAX_{B9} SAHB_{A2} TWQTVTDFVA*VLT*SLTIWKK
 BAX_{B9} SAHB_{A3} TWETVTDFVA*CLT*SLTIWKK
 BAX_{B9} SAHB_{A4} TWETVTDFVA*VLT*SLTIWKK
 BAX_{B9} SAHB_{B1} TWQTVT*FVA*VLTASLTIIWKK
 BAX_{B9} SAHB_{B2} TWQTVT*FVA*VLTDSLTIWKK
 BAX_{B9} SAHB_{B3} TWETVT*FVA*VLTDSLTIW
 BAX_{B9} SAHB_{B4} TWETVT*FVA*VLTDSLTIWKK

* 炭化水素連結部位

【図 17】

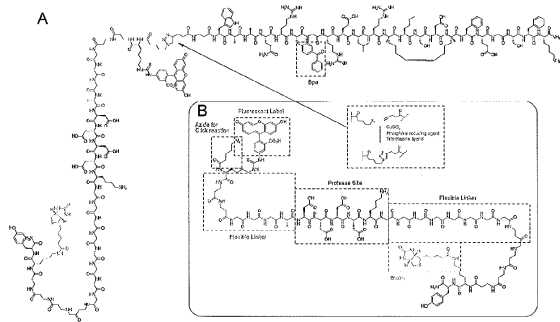


図 17 生理学的標的の共有結合捕獲のための多機能性SAHB化合物の化学設計。Bpa 部分は他の架橋可能な/挿入部分に置換することができる。

【図 18】

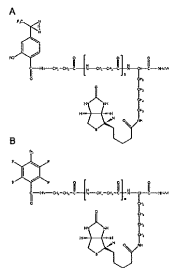


図18 光解離性カルベン(A)及びニトロベン (B)生成官能性で誘導体化したSAHB

【図 19】

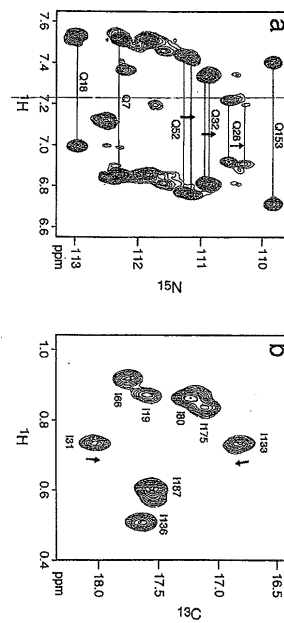


図19

【図 20A-1】

図 20A-1

ヒト BIM- 配列番号 2

BIML

MAKQPSDVSSECDREGRLQPAERPPQLRPGAPTSLQTEPQDRSPAPMSCDKSTQTPSP
PCQAFNHYLSAMASMRQAEPADMRPEIWIQAELRRIGDEFNAYYARRVFLNNYQAAEDH
PRMVILRLRLRYIVRLVWRMH

Leu92
Gly96
Asp97

BIMEL -- 配列番号 9

MAKQPSDVSSECDREGRLQPAERPPQLRPGAPTSLQTEPQGNPEGNHGEGDSCPHGS
PQGLAPPASPGPFATRSPLFIIMRRSSLLSRSSSGYFSFDTRSPAPMSCDKSTQTPS
PCCQAFNHYLSAMASMRQAEPADMRPEIWIQAELRRIGDEFNAYYARRVFLNNYQAAED
HPRMVILRLRLRYIVRLVWRMH

Leu152
Gly156
Asp157

ヒト BID- 配列番号 6

MDCEVNGSSRLDECITNLLVFGFLQSCSDNSFRRELDALGHELPLVLAQWEGYDELQT
DGNRSSHSRLGRIEADSESQEDIIRNIARHLAQVGDSDMRISPPGLVNLALQLRNTSR
SEEDRNRDLATALEQLLQAYPRDMEKEKTMVLVALLAKKVASHTPSLLRDVFHTTVNF
INQNLRTYVRSRLARNGMD

Leu90
Gly94
Asp95

ヒト PUMA- 配列番号 7

PUMA-α

MARARQEGSSPEPVEGLARDGPRPFPLGRVPSAVSCGLCEPLAAAPAPTLLPAAYL
CAPTAPPVAVTAALGGSRWPGGPRSRPRGPRPDGPQPSLSLAQHLESFVPSAPGALAG
PTQAPGVRGEEQWAEIQAQLRRMADDLNAQYERRRQEEQQRHRPSPWRVLYNLIMG
LLPLPRGRHRAPEMEPN

Leu141

【図 20A-2】

図 20A-2

Ala145
Asp146

PUMA-β 配列番号 10

MKFGMGSAQACPCQVPRAASTTWVPCQICGFPQPSLSLAQHLESFVPSAPGALAGGPTQ
AAPGVRGEEQWAEIQAQLRRMADDLNAQYERRRQEEQQRHRPSPWRVLYNLIMGLLP
LPRGRHRAPEMEPN

Leu79
Ala83
Asp84

ヒト BCL-2 配列番号 8

BCL-2-α

MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAGDVGAAPPGAAPAGIFSSQPGHTPHF
AASRDVPARTSPLQTPAAPGAAAGPALSFPVPPVHLLTRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQ
LHLLPTFARGRFATVVEELFRDGVNWGRIVAFEFEGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWM
TEYLNRLHLLTWIQDNGGWDVVELYGFMSMRPLFDFSWLSLKTLLSLALVGACITLGAYL
GHK

Leu97
Gly101
Asp102

BCL-2-β 配列番号 11

MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAGDVGAAPPGAAPAGIFSSQPGHTPHF
AASRDVPARTSPLQTPAAPGAAAGPALSFPVPPVHLLTRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQ
LHLLPTFARGRFATVVEELFRDGVNWGRIVAFEFEGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWM
TEYLNRLHLLTWIQDNGGWDVVELYGFMSMRPLFDFSWLSLKTLLSLALVGACITLGAYL

Leu97
Gly101
Asp102

【図 20 B】

図 20B

α -螺旋相互作用表面でのBIM, PUMA
及びBAX BH3ドメイン間の保存性残基:

BIM BH3	EIWI	QELRRIGDE	NAYYARR
PUMA BH3	EQWAREI	QAQLRRMAD	DLNAQYER
BAX BH3	QDASTKK	QECLE	KRIGDELD

黄色: アミノ酸同一性
青色: 保存性変化

コンセンサス (配列番号13):
I/L A/S/G X X L K/R R I/M/V D D/E L/F N/D A/S X Y/M

【配列表】

0005783721000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100102668

弁理士 佐伯 憲生

(72)発明者 ローレン ディー ワレンスキー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02467 チェスナット・ヒル グッドナフ・ロード
9

(72)発明者 ニコ チャンドラ

アメリカ合衆国 メリーランド州 20851 ロックヴィル クローフォード・ドライブ 57
18

(72)発明者 エウリピデス ガヴァチオティス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02169 クインシー ハンコック・ストリート 12
05, アpartment 209

(72)発明者 モトシ スズキ

アメリカ合衆国 メリーランド州 20850 ロックヴィル カレッジ・パークウェイ 838

(72)発明者 グレゴリー エイチ バード

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー州 03076 ペラム シーニック・ビュー・ドライブ
15

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 特表2002-539760 (JP, A)

国際公開第2006/034454 (WO, A1)

特表平09-502088 (JP, A)

特表2002-515267 (JP, A)

国際公開第2005/044839 (WO, A1)

国際公開第2006/036779 (WO, A1)

Science, 2004年, vol.305 no.5689, pp.1466-1470 (pp.1-10)

J. Am. Chem. Soc., 2000年, vol.122, pp.7394-7395

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00

PubMed

CiNii