

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-515274

(P2006-515274A)

(43) 公表日 平成18年5月25日(2006.5.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07C 49/497 (2006.01)	C O 7 C 49/497	2 G O 4 5
A61K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 2 2
A61K 31/175 (2006.01)	A 6 1 K 31/175	4 C O 2 3
A61K 31/536 (2006.01)	A 6 1 K 31/536	4 C O 3 1
A61K 31/166 (2006.01)	A 6 1 K 31/166	4 C O 3 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-543548 (P2004-543548)	(71) 出願人	596060697 マサチューセッツ・インスティテュート・オブ・テクノロジー アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139ケンブリッジ, マサチューセッツ・アヴェニュー・77
(86) (22) 出願日	平成15年10月8日 (2003.10.8)	(71) 出願人	503404073 ザ シービーアール インスティテュート フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 02115、ボストン、ハンチントン アベニュー 800
(85) 翻訳文提出日	平成17年6月7日 (2005.6.7)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/031918		
(87) 国際公開番号	W02004/032716		
(87) 国際公開日	平成16年4月22日 (2004.4.22)		
(31) 優先権主張番号	60/417,083		
(32) 優先日	平成14年10月8日 (2002.10.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 コレステロール輸送の調節のための化合物

(57) 【要約】

脂質およびコレステロールの取り込みを調節するための方法が、記載されており、この方法は、SR-BI HDLレセプターの発現または機能を調節することに基づく。実施例は、エストロゲンは、LDLレセプターの絶大なアップレギュレーション条件下で、SR-BIを劇的にダウンレギュレートすることを示す。実施例はまた、エストロゲンで処理したラット副腎膜およびエストロゲンで処理した動物由来の他の非胎盤ステロイド産生組織におけるSR-BIのアップレギュレーションを示すが、他の非胎盤非ステロイド産生組織（肺、肝臓、および皮膚）ではSR-BIのアップレギュレーションはないことを示す。実施例はさらに、動物の肝臓細胞中への蛍光標識HDLの取り込みを示す。これは、その動物をエストロゲンで処理した場合には生じない。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

処置される必要があるヒトまたは動物を処置するために有効な量で、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせられた、SR-BIの結合活性を特異的に変化させる化合物であって、該化合物は、SR-BI結合活性またはSR-BI発現の変化について化合物ライブラリーをスクリーニングすることによって得られる、化合物。

【請求項 2】

表 I に示される群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の化合物であって、BLT-1 (MIT 9952-53)、BLT-2 (MIT 9952-61)、BLT-3 (MIT 9952-19)、BLT-4 (MIT 9952-29)、および BLT-5 (MIT 9952-6) からなる群より選択される、化合物。 10

【請求項 4】

細胞内または細胞外へとコレステロール輸送を変化させるための方法であって、SR-BI発現またはSR-BI活性を阻害する工程を包含し、該阻害は、請求項 1～3 に記載の組成物を、該阻害を必要とする動物またはヒトに投与することを包含する、方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、前記組成物は、HDL に対する SR-BI の結合親和性を増加することによって、HDL 結合を増強する、方法。 20

【請求項 6】

請求項 4 に記載の方法であって、前記阻害された SR-BI 結合活性は、SR-BI 媒介性脂質輸送をブロックする、方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、前記阻害された SR-BI 結合活性は、SR-BI 媒介性の選択的脂質取り込みをブロックする、方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法であって、前記脂質は、HDL コレステリルエステルである、方法。

【請求項 9】

請求項 4 に記載の方法であって、前記阻害された SR-BI 結合活性は、細胞コレステロールの HDL への流出をブロックする、方法。 30

【請求項 10】

SR-BI 結合活性または SR-BI 発現を変化させる化合物を同定する方法であって、化合物ライブラリーをスクリーニングする工程を包含する、方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、前記 SR-BI 発現は、ノーザン分析によって決定される、方法。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の方法であって、前記ライブラリーは、化学物質ライブラリーである、方法。 40

【請求項 13】

請求項 10 に記載の方法であって、前記 SR-BI 結合活性が、阻害される、方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法であって、前記阻害された SR-BI 結合活性は、SR-BI 媒介性脂質輸送をブロックする、方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法であって、前記阻害された SR-BI 結合活性は、SR-BI 媒介性の選択的脂質取り込みをブロックする、方法。 50

【請求項 16】

請求項 15 に記載の方法であって、前記脂質は、HDL コレステリルエーテルである、方法。

【請求項 17】

請求項 10 に記載の方法であって、前記阻害された SR - BI 結合活性は、細胞コレステロールの HDL への流出をブロックする、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の援用)

本出願は、2002 年 10 月 8 日に提出した米国特許仮出願番号 60 / 417 , 083 に対する優先権を主張する。

【0002】

米国政府は、National Institutes of Health - National Heart, Lung and Blood Institute からの助成金 HL 52212、HL 66105 および HL 64737 によって、本発明の特定の権利を有する。

【0003】

(発明の分野)

本発明は、一般に、SR - BI スカベンジャーレセプターを介して媒介されるコレステロール輸送の調節および脂質調節のための、化合物の領域にある。

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

循環系を通る脂質の細胞間輸送には、これらの疎水性分子を水溶性キャリア (リポタンパク質と呼ばれる) 中のパッケージングすること、およびレセプター媒介性経路によって適切な組織へのこれらのリポタンパク質の調節された標的化が必要である。最も良く特徴付けられているリポタンパク質レセプターは、LDL レセプターである。LDL レセプターは、アポリポタンパク質 B - 100 (apo B - 100) およびアポリポタンパク質 E (apo E) に結合する。これらのアポリポタンパク質は、低密度リポタンパク質 (LDL) (ヒト血漿中の主要なコレステリルエステル輸送体)、超低密度リポタンパク質 (VLDL) (肝臓により合成されるトリグリセリドがリッチなキャリア)、中間密度リポタンパク質 (IDL) および代謝されたカイロミクロンの構成成分である。

【0005】

Kreiger ら、WO 96 / 00288 「Class BI and CI Scavenger Receptors」Massachusetts Institute of Technology, 米国特許第 6,359,859 号および同第 6,429,289 号 (「Kreiger ら」は、SR - BI (AcLDL および LDL に結合するスカベンジャーレセプター) のハムスターホモログおよびマウスホモログを特徴付けでクローン化した。Kreiger によって、SR - BI レセプターは、ステロイド産生組織および肝臓において主に発現され、HDL 輸送およびコレステロール取り込みを媒介するようであることが、報告された。競合結合研究によって、SR - BI が、LDL、改変型 LDL、負に荷電したリン脂質、および HDL に結合することが示される。直接結合研究によって、哺乳動物細胞 (例えば、CHO 細胞の改変体) において発現した SR - BI が、HDL - アポリポタンパク質の細胞分解を伴わずに HDL に結合し、脂質が、このレセプターを発現する細胞内に蓄積されることが示される。これらの研究は、SR - BI が、末梢組織から、HDL を介する、肝臓およびステロイド産生組織へのコレステロールの輸送において主要な役割を果たし得ること、および肝臓または他の組織における発現の増加もしくは減少は、SR - BI を発現する細胞によるコレステロールの取り込みを調節し、それによって泡沫細胞におけるレベルおよびアテローム発生に関与する部位における沈着

10

20

30

40

50

を減少するために、有用であり得ることを示した。

【0006】

その後の研究によって、SR-BIは、脂質に結合するだけではなく、細胞内および細胞外へとコレステロールを輸送もすることが、Krieglerらに対する米国特許第5,962,322号および同第5,925,333号に記載されるように、確認された。さらに、SR-BIは、ステロイド産生組織において主に発現され、脂質調節において一定の役割を果たし、コレステロールレベルだけではなく、雌の受胎能に対しても、Massachusetts Institute of TechnologyによるWO99/11288に記載されるように、影響を与える。

【0007】

コレステロールの取り込み及び輸送におけるSR-BIの役割は、例えば、Miettinenら(2001)J. Clin. Invest. 108(11):1717~1722により記載されるように、雌の受胎能を回復するためにプロブコール処置を使用することによって、示されるようにSR-BIを介して操作され得る。この研究は、SR-BI媒介性の脂質取り込みおよび脂質代謝を刺激または阻害するさらなる薬物の必要性を、明らかに示す。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

SR-BIへの結合およびSR-BIにより媒介される脂質移動を刺激または阻害し得、かつ細胞による脂質およびコレステロールの取り込みおよび代謝を変更(redirect)し得る、薬物ならびにその薬物を設計するための方法および試薬を提供することが、本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0009】

SR-BIの発現または機能の調節に基づいて、コレステロール輸送を調節するための化合物が、記載される。SR-BIは、脂質(主にコレステロールエステル)のHDLから細胞への選択的取り込み、および細胞からリポタンパク質へのコレステロールの流出の両方を媒介する。これらの脂質輸送の基礎となる機構は、古典的なレセプター媒介性エンドサイトーシスとは別個であるが、不十分にしか理解されていないままである。SR-BIの作用機構およびインビボでの機能を調査するために、ハイスループットスクリーニングが、インタクトな細胞におけるSR-BI媒介性脂質輸送の低分子インヒビターを同定するために開発された。低ナノモル濃度~マイクロモル濃度の範囲で、脂質輸送(選択的取り込みおよび流出の両方)をブロックする200個の化合物(BLT)が、同定された。これらの化合物の効果は、SR-BI経路に高度に特異的であった。なぜなら、これらの化合物は、クラスリンベースのレセプターが媒介するエンドサイトーシスに干渉すること、細胞内小胞輸送に干渉することでもなかったからである。実施例により示されるように、5つのBLT(BLT-1[MIT9952-53]; BLT-2[MIT9952-61]; BLT-3[MIT9952-19]; BLT-4[MIT9952-29]およびBLT-5[MIT9952-6])は、HDLに対するSR-BIの結合親和性を増加する(解離速度の減少)ことによって、HDL結合を阻害するどころかむしろ増強した。他のものは、HDL結合を阻害した。これらは、アテローム性動脈硬化症の管理、不妊症の処置において、または逆に、避妊薬として、およびタンジアー病の処置において、有用であるはずである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

(発明の詳細な説明)

(I. コレステロールのSR-BI輸送の調節因子)

化合物ライブラリーが、HDL結合の変化について、下記のアッセイのようなアッセイを使用してスクリーニングされた。これらの化合物は、タンパク質、DNA配列、多糖、

10

20

30

40

50

または合成有機化合物であり得る。活性を有すると同定された約 200 個が、下記表 I に列挙される。

【0011】

(II. SR-BI 活性を阻害または増強する化合物のスクリーニング)

上記 SR-BI タンパク質および抗体ならびにそれらの DNA は、SR-BI の活性および/または発現を調節する薬物のスクリーニングにおいて使用され得る。SR-BI をコードする cDNA は、クローン化されており、米国特許第 6,359,859 号および同第 6,429,289 号において報告されており、GenBank において列挙されている。SR-BI をコードする cDNA は、509 アミノ酸の推定タンパク質配列を生じる。SR-BI 活性を増強する薬物は、アテローム性動脈硬化症、脂肪細胞による脂肪取り込み、およびいくつかの種類の内分泌障害を処置または予防する際に有用である。SR-BI 活性を阻害する薬物は、避妊薬として、およびタンジアー病の処置において、有用である。

10

【0012】

下記のアッセイは、特定の化合物(例えば、放射標識した改変型 HDL および LDL、またはポリイオン)の結合に対する阻害効果について化合物が試験され得る、慣用的方法論を明らかに提供する。その後、上記レセプターに対する選択的結合を阻害するようである化合物のインビトロ研究が、動物試験によって確認され得る。それらの分子は、非常に進化上保存されているので、実験室動物(例えば、マウス)における研究を行ってヒトにおける影響を予測することが、可能である。

20

【0013】

結合の阻害に基づく研究は、レセプター結合の変化の間接的影響について予測的である。例えば、SR-BI レセプターへのコレステロール-HDL 結合の阻害は、細胞にりようコレステロールの取り込みの減少をもたらし、従って、その SR-BI レセプターを発現する細胞によるコレステロール輸送を阻害する。細胞へのコレステロール-HDL 結合を増加すると、血流からの脂質除去が増加し、それにより、血流中の脂質沈着が減少する。コレステロールのマクロファージ取り込みを増強するために刺激因子を使用し、それによりアテローム性動脈硬化症を処置する研究が、M-CSF を使用して実行された(Schaubら、1994、Arterioscler. Thromb. 14(1)、70~76; Inabaら、1993、J. Clin. Invest. 92(2)750~757)。

30

【0014】

以下のアッセイが、SR-BI 発現、SR-BI 濃度、またはコレステロール輸送を変化させるための方法において有効な化合物についてスクリーニングするために使用される。

【0015】

(SR-BI 結合または SR-BI 発現の変化についてのアッセイ)

マウス組織のノーザンブロット分析は、SR-BI が、副腎、卵巣、肝臓、精巣、および脂肪において最も発現されること、および SR-BI が、他のいくつかの組織においてはより低レベルで存在することを、示す。SR-BI mRNA の発現は、3T3-L1 細胞から脂肪細胞への分化の際に誘導される。SR-BI および CD36 の両方が、アセチル化 LDL についての高い親和性結合を示し、見かけの解離定数は、約 5 μg タンパク質/ml の範囲にある。競合アッセイにより決定される CD36 および SR-BI のリガンド結合特異性は、類似するが、同一ではない。両方とも、改変型タンパク質(アセチル化 LDL、メチル化 BSA)に結合するが、クラス A レセプターのリガンドである広範囲の他のポリアニオン(例えば、フコイジン、ポリイノシン酸、ポリグアノシン酸)には結合しない。SR-BI は、HDL の細胞分解を付随しない HDL の高親和性かつ飽和可能な結合を示す。HDL は、CD36 に対する AcLDL の結合を阻害する。これは、SR-BI と同様に、CD36 が、HDL に結合することを示唆する。ネイティブ LDL (これは、クラス A レセプターまたは CD36 のいずれかに対するアセチル化 LDL の結合に

40

50

ついて競合しないn)は、SR-BIへの結合について競合する。

【0016】

(¹²⁵I-AcLDLの結合、取り込み、および分解のアッセイ)

37におけるスカベンジャーレセプター活性は、Krieger、Cell 33、413~422、1983;およびFreemanら(1991)Proc Natl Acad Sci USA, 1991 Jun 1; 99(11)493~5により記載されるような、リガンドの結合、取り込み、および分解のアッセイによって、測定される。結合についての値および取り込みについての値は、合わされ、そして5時間のインキュベーション後に観察される結合+取り込みとして提示され、そして、細胞タンパク質1mg当たりの5時間当たりの¹²⁵I-AcLDLタンパク質のngとして、表される。分解活性は、細胞タンパク質1mg当たりの5時間に分解された¹²⁵I-AcLDLのngとして表される。特定の高親和性値は、過剰な非標識競合リガンドの存在下(単回測定)で得られた結果と、その非存在下(二連測定)で得られた結果との間の差を示す。細胞表面での4での結合は、示されるような方法Aまたは方法Bのいずれかを使用してアッセイされる。方法Aにおいて、細胞は、氷上で15分間事前冷却され、10%(v/v)ウシ胎仔血清を補充して75~200μg/mlの非標識M-BSAを含むかまたは含まない氷冷した培地B中で¹²⁵I-AcLDLを再供給され、振盪機にて4で2時間インキュベートされる。その後、細胞は、2mg/ml BSAを含むTris洗浄緩衝液(50mM Tris-HCl、0.15M NaCl, pH 7.4)で迅速に3回洗浄され、その後、BSAを含まないTris洗浄緩衝液を用いる5分間の洗浄を2回、迅速な洗浄を2回行われる。これらの細胞は、振盪機において、室温で20分間、1mlの0.1N NaOH中で可溶化され、タンパク質測定用に30μlが取り出され、残りにおける放射能が、LKB カウンターを使用して測定される。方法は、細胞が45分間事前冷却され、培地が10mM HEPESを含みかつ5%(v/v)ヒトリボタンパク質欠損血清(ウシ胎仔血清ではなく)を含み、硫酸デキストランを用いる処理により放出される細胞関連放射能がKrieger(1993)Cell 33、413~422; Freemanら(1991)Proc Natl Acad Sci USA, 1991 Jun 1; 88(11):4931~5により記載されるように測定されるという点が、方法Aと異なる。

【0017】

(ノーザンブロット分析)

Baldiniら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 5049~5052により記載されるように、種々のマウス組織からか、または脂肪細胞への分化を開始した0日間後、2日間後、4日間後、6日間後、または8日間後に、3T3-L1細胞から、調製した0.5μgのポリ(A)+RNAが、ホルムアルデヒド/アガロースゲル(1.0%)上で分画され、その後、BiotransTMナイロン膜上にブロットされ固定される。このブロットに、³²P標識(2×10⁶ dpm/ml、ランダムプライム標識システム)されたプローブを用いてハイブリダイズされる。42および50それぞれにおけるハイブリダイゼーション条件および洗浄条件は、Charronら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86、2535~2539により記載されるように実施される。SR-BI mRNA分析のためのプローブは、そのcDNAコード領域からの0.6kb BamHIフラグメントであった。マウスサイトゾルhs p70遺伝子のコード領域(HuntおよびCalderwood、1990、Gene 87、199~204)が、等しいmRNAローディングについてのコントロールプローブとして使用される。

【0018】

組織におけるSR-BIタンパク質は、SR-BIに対するポリクローナル抗体を用いてブロットングすることによって検出される。

【0019】

(HDL結合研究)

10

20

30

40

50

S R - B I および C D 3 6 に対する、H D L および V L D L の結合が、L D L および 改変型 L D L について記載されるように実行される。

【 0 0 2 0 】

S R - B I に結合している H D L が分解または再利用されるか否か、および H D L に結合している脂質が細胞中に輸送されるか否かを決定するために実行される研究は単一濃度 (1 0 μ g タンパク質 / m l) でトランスフェクト細胞または非トランスフェクト細胞の培養物に添加される、蛍光脂質標識 H D L 、³ H - コレステリルエステル標識 H D L および^{1 2 5} I - H D L を使用して実施される。上記細胞に結合した H D L が、経時的に測定される。定常状態には、約 3 0 分間 ~ 1 時間で達する。蛍光リガンドである D i I または³ H - コレステロールエステルが、細胞による脂質 (例えば、コレステロールまたはコレステロールエステル) 取り込みについてのマーカーとして使用される。漸増濃度の D i I は、脂質が、H D L からレセプターへと輸送され、その後、細胞によりインターナライズされることを示す。その後、D i I 欠如 H D L が、放出され、別の H D L 分子により置換される。

10

【 0 0 2 1 】

(S R - B I への H D L 結合)

競合結合研究は、H D L および V L D L (4 0 0 μ g / m l) が、S R - B I に対する^{1 2 5} I - A c L D L の結合を競合的に阻害することを示す。S R - B I を発現する^{1 2 5} I - H D L の直接的結合もまた、測定される。

【 0 0 2 2 】

(S R - B I の組織分布)

S R - B I の生理学的機能を探索するために、S R - B I の組織分布が、マウス組織 (コントロール動物およびエストロゲン処理動物の両方において) において、以下の実施例に記載されるようにして、測定された。各レーンに、種々のマウス組織 (腎臓、肝臓、副腎、卵巣、脳、精巣、脂肪、横隔膜、心臓、肺、脾臓、または他の組織) から調製された 0 . 5 μ g のポリ (A) + R N A がローディングされる、そのプロットに、S R - B I のコード領域の 7 5 0 塩基対フラグメントを用いてハイブリダイズされる。S R - B I m R N A は、副腎、卵巣、および肝臓において最も高度に発現され、供給源に依存して脂肪において中程度または高度に発現され、そして他の組織においてより低レベルで発現される。S R - B I の細胞質領域に対するポリクローナル抗体を使用するプロットは、非常に高レベルのタンパク質が、マウスの肝臓、副腎組織および卵巣において存在するが、非常にわずかまたは検出不能なレベルでしか、白色脂肪および褐色脂肪、筋肉、または種々の他の組織において存在しないことを示す。ラット組織におけるバンドは、約 8 2 k D にて存在した。マウス組織において、肝臓およびステロイド産生組織において観察される 9 2 k D 形態は、S R - B I でトランスフェクトした培養細胞において観察されるのと同じサイズである。

20

30

【 0 0 2 3 】

有用な活性について化合物を試験するためのアッセイは、このレセプタータンパク質 (好ましくは、上記の細胞のような、トランスフェクト細胞の表面上に発現される) との相互作用のみに基づき得るが、その指標がリポタンパク質の結合の阻害または増加である場合には、溶液中のタンパク質または不活性基材上に固定されたタンパク質もまた、利用され得る。

40

【 0 0 2 4 】

あるいは、上記アッセイは、上記レセプタータンパク質をコードする遺伝子配列 (好ましくは、上記レセプタータンパク質の発現を指示する調節配列) との相互作用に基づき得る。例えば、上記調節配列および / または上記タンパク質コード配列に結合する、アンチセンスが、標準的オリゴヌクレオチド合成化学を使用して合成され得る。このアンチセンスは、標準的方法 (リボソームもしくはミクロスフェア中へのカプセル化 ; 分解に対して抵抗性の改変型ヌクレオチドまたはエンドヌクレアーゼに対する抵抗性を増加する基 (たとえば、ホスホロチオエートおよびメチル化) の導入) を使用して、薬学的用途のために

50

安定化され得、その後、上記レセプターを発現するトランスフェクト細胞または天然に存在する細胞においてまず、その後、実験室動物においてインビボで、レセプター活性の変化についてまずスクリーニングされ得る。代表的には、上記アンチセンスは、発現を阻害する。しかし、合成を「オフにする」配列をブロックする配列もまた、標的とされ得る。

【0025】

(II. SR-BI コレステロール輸送の調節方法)

HDL レセプターである SR-BI は、HDL の構造および代謝の制御において重要な役割を果たす (Acton ら (1996)、Science 271、518~20; Krieger, M. (1999) Annu Rev Biochem 68、523~58)。マウスにおける研究は、SR-BI 発現の変化が、いくつかの生理学的系 (胆コレステロール分泌、雌不妊症、赤血球発生、アテローム性動脈硬化症、および冠状心疾患の発症を含む) に大いに影響を与え得ることを示した (Trigatti ら (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96、9322~7; Kozarsky ら (2000) Arterio. Thromb. Vasc. Biol. 20、721~7; Arai ら (1999) J. Biol. Chem. 274、2366~71; Holm ら (2002) Blood 99、1817~24; Miettinen ら (2001) J. Clin. Invest. 108、1717~22; Ueda ら (2000) J. Biol. Chem. 275、20368~73; Kozarsky ら (1997) Nature 387、414~7; Braun ら (2002) Cir. Res. 90、270~276; Mardones ら (2001) J. Lipid Res. 42、170~180)。SR-BI は、血漿 HDL からのコレステリルエステルおよび他の脂質の選択的細胞取り込みを媒介することによって、HDL 代謝を制御する。選択的取り込みの間に (Glass ら (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80、5435~9; Glass ら (1985) J. Biol. Chem. 260、744~50; Stein ら (1983) Biochimica et Biophysica Acta 752、98~105)、HDL は、SR-BI に結合し、その粒子コアにあるその脂質 (主に、中性脂質 (例えば、コレステリルエステル) は、細胞へと輸送される。脂質が欠如した粒子は、その後、細胞外空間へと戻る。SR-BI 媒介性選択的脂質取り込みとその後のこれらの脂質の細胞内輸送の機構は、探索され始めたばかりに過ぎない (Krieger 1999; Krieger, M. (2001) J. Clin. Invest. 108、793~7; Uittenbogard ら (2002) J. Biol. Chem. 277、4925~4931) が、この機構は、低密度リポタンパク質 (LDL) レセプターによって LDL から細胞へとコレステロールエステルを送達するために使用されるクラスリンコートされた小窩 (pit) および小胞を介するレセプター媒介性エンドサイトーシス経路 (Brown, M. S. および Goldstein, J. L. (1986) Science 232、34~47) とは、明らかに基本的に異なる。SR-BI はまた、細胞から HDL へとコレステロール流出を媒介し得る Temeel ら (2002) J. Biol. Chem. 8、8)。

【0026】

SR-BI は、HDL 脂質代謝およびコレステロール輸送において重要な役割を果たすことが、現在示されている。SR-BI は、ステロイド産生組織および肝臓へのコレステロール送達を担うようであり、実際、HDL 粒子から肝臓細胞を通して胆カニキュリ (canniculi) へとコレステロールを輸送し、ここで、コレステロールは腸へと通り抜ける。データは、SR-BI はまた、腸粘膜においても発現されることを示す。コレステロール取り込みが増加され得る細胞において SR-BI の発現を増加して、HDL がコレステロールを貯蔵細胞 (例えば、泡沫細胞 (ここで、HDL は、アテローム性動脈硬化症において一定の役割を果たし得る) から取り出すための手段として自由に役立たせることは、有用である。

【0027】

レセプタータンパク質結合を変化させる化合物は、好ましくは、薬学的に受容可能なビ

ヒクル中で投与される。適切な薬学的ビヒクルは、当業者にとって公知である。非経口投与のために、上記化合物は、滅菌水、リン酸緩衝化生理食塩水、または生理食塩水中に、通常は溶解または懸濁される。経腸投与のために、上記化合物は、錠剤、液体、またはカプセルの形態で、不活性キャリア中に組み込まれる。適切なキャリアは、デンプンであっても、糖であってもよく、これは、潤滑剤、矯味矯臭剤、結合剤、および同じ性質の他の物質を含み得る。上記化合物はまた、溶液、クリーム、ゲル、またはポリマー性物質（例えば、PluronicTM、BASF）の局所適用によって、局所投与され得る。上記化合物はまた、徐放または遅延放出のために処方され得る。

【0028】

あるいは、上記化合物は、リポソームまたはミクロスフェア（または微粒子）中で投与され得る。患者に投与されるリポソームおよびミクロスフェアを調製するための方法は、当業者にとって公知である。米国特許第4,789,734号は、リポソーム中に生物学的物質をカプセル化するための方法を記載する。本質的には、上記物質は、水溶液中に溶解され、適切なリン脂質および脂質が（必要な場合には、界面活性剤とともに）添加され、必要な場合には、上記物質は、透析または超音波処理され得る。公知の方法の概説は、G. Gregoriadis, 第14章、「Liposomes」Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287~341 (Academic Press, 1979)。ポリマーからかまたはタンパク質から形成されるミクロスフェアは、当業者にとって周知であり、胃腸管を通して血流中に直接通るために調整され得る。あるいは、上記化合物は、一定期間（数日間～数ヶ月間）にわたる徐放のために移植されたミクロスフェア中またはミクロスフェア複合体に組み込まれ得る。例えば、米国特許第4,906,474号、同第4,925,673号および同第3,625,214号を参照のこと。

【0029】

本発明は、以下の非限定的実施例を参照することによって、さらに理解される。

【実施例】

【0030】

（実施例1：HDLレセプターであるSR-BIにより媒介される脂質の選択的輸送の化学的インヒビターの同定）

（略語）

HDL	高密度リポタンパク質
mSR-BI	マウススカベンジャーレセプター（クラスB、I型）
LDL	低密度リポタンパク質
BLT	脂質輸送をブロックする
DiI	1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンパークロレート
CE	コレステリルエーテル
DMSO	ジメチルスルホキシド
PBS	リン酸緩衝化生理食塩水
EGF	上皮増殖因子
VSV-G	水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質
EGFP	増強型緑色蛍光タンパク質
IC	阻害濃度
EC	有効濃度
ACTH	副腎皮質刺激ホルモン
FC	遊離コレステロール。

【0031】

SR-BI媒介性脂質輸送の強力な低分子インヒビターを同定するための化学物質ライブラリーのハイスループットスクリーニング。脂質輸送をブロックする（block lipid transport）（BLT-1は、MIT 9952-53に対応する；B

L T - 2 は、M I T 9 9 5 2 - 6 1 に対応する ; B L T - 3 は、M I T 9 9 5 2 - 1 9 似
 対応する ; B L T - 4 は、M I T 9 9 5 2 - 2 9 に対する ; B L T - 5 は、M I T 9 9 5
 2 - 6 に対応する)、ならびに培養細胞における S R - B I 活性に対するそれらの影響を
 試験した。5 つすべてが、H D L からの S R - B I 媒介性選択的脂質取り込み、および H
 D L への細胞コレステロールの流出を阻害した。これらのうちの 1 つである B L T - 1 は
 、特に強力であり、低ナノモル濃度の範囲において、脂質輸送を阻害した。予期せぬこと
 に、5 つすべての B L T は、S R - B I への H D L 結合を、その結合親和性を増加すること
 によって、増強した。

【 0 0 3 2 】

(方法)

(リポタンパク質および細胞)

ヒト H D L を、単離し、^{1 2 5} I (^{1 2 5} I - H D L)、1 , 1 ' - ジオクタデシル -
 3 , 3 , 3 '、3 ' - テトラメチルインドカルボシアニンパークロレート (D i I , M o
 l e c u l a r P r o b e s ; D i I - H D L) または [³ H] コレステリルオレイル
 エーテル [³ H] C E、[³ H] C E - H D L) のいずれかで標識した (G u ら (1 9 9
 8) J . B i o l . C h e m . 2 7 3 , 2 6 3 3 8 ~ 4 8 ; G u ら (2 0 0 0) J . B i
 o l . C h e m . 2 7 5 , 2 9 9 9 3 ~ 3 0 0 0 1 ; A c t o n ら (1 9 9 4) J . B i
 o l . C h e m . 2 6 9 , 2 1 0 0 3 ~ 9 ; P i t a s ら (1 9 8 1) A r t e r i o s
 c l e r o s i s 1、1 7 7 ~ 8 5)。低レベルの内因性 S R - B I を発現する L D L
 レセプター欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞、l D L A - 7 細胞 (K i n g s l e y
 ら (1 9 8 4) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 1、5 4 5 4 ~ 8)
 、高レベルのマウス S R - B I を発現するように安定にトランスフェクトされた I d I A
 - 7 細胞 (l D L A [m S R - B I]) (A c t o n ら、1 9 9 6)、A C T H を用いて
 誘導した後に高レベルの S R - B I を発現する Y 1 - B S 1 マウス副腎皮質細胞 (R i g
 o t t i ら (1 9 9 6) J . B i o l . C h e m . 2 7 1 , 3 3 5 4 5 ~ 9)、サル腎臓
 B S - C 1 細胞 (K a p o o r ら (2 0 0 0) J o u r n a l o f C e l l B i o
 l o g y 1 5 0、9 7 5 ~ 8 8) および H e L a 細胞 (T e m e l ら (2 0 0 2) J
 B i o l C h e m 8、8) を、以前に記載されたように維持した。

【 0 0 3 3 】

(ハイスループットスクリーニング)

0 日目に、l D L A [m S R - B I] 細胞を、底が透明で壁が黒い 3 8 4 ウェル黒色ア
 ッセイプレート (C o s t a r) 中に、培地 A (2 m M L - グルタミン酸、5 0 単位 /
 m l のペニシリン / 5 0 μ g / m l ストレプトマイシン、および 0 . 2 5 m g / m l の G
 4 1 8 を補充した、H a m ' s F 1 2) に、1 0 % ウシ胎仔血清を補充したもの (培地
 B) 5 0 μ l 中に 1 5 , 0 0 0 細胞 / ウェルでプレートした。1 日目に、細胞を、培地
 C (培地 A に、1 % (w / v) ウシ血清アルブミン (B S A) および 2 5 m M H E P E
 S、p H 7 . 4 を含むが G 4 1 8 は含まない) で 1 回洗浄し、4 0 μ l の培地 C を再供給
 した。1 0 0 % D M S O 中に溶解した化合物 (D i v e r S e t E , C h e m b r i
 d e g e C o r p . k a r a n o 1 6 , 3 2 0) を、上記ウェルに個々にロボットによ
 り「ピン (p i n)」で移し (4 0 n l) (<http://iccb.med.harvard.edu>)、名目上の濃度 1 0 μ M (0 . 0 1 % D M S O) を得た。3 7 にお
 いて 1 時間のインキュベーションの後、2 0 μ l の培地 C 中の D i I - H D L (最終濃度
 1 0 μ g タンパク質 / m l) を、添加した。2 時間後、蛍光を、室温にて、A n a l y s
 t プレートリーダー (ロードミン B 二色性フィルター、発光 5 2 5 n m および励起 5 8 0
 n m ; L J L B i o s y s t e m s) を使用して、インキュベーション培地を除去する
 前 (自己蛍光および消光について試験するため) および培地除去して 8 0 μ l の P B S /
 1 m M M g C l 2 / 0 . 1 m M C a C l 2 で 4 回洗浄した後 (D i I の細胞取り込み
 を測定するため) の両方で測定した。すべての化合物を、異なるプレート上にて二連でサ
 ンプリングした。各スクリーニングは、4 0 倍過剰の非標識 H D L の存在下および / また
 は非存在下で、l D L A - 7 細胞および I d A [m S R - B I] 細胞を含んだが、コント

10

20

30

40

50

ルールとして化合物は添加しなかった。

【0034】

(アッセイ)

上記アッセイのために、すべての培地および緩衝液は、化合物の可溶性を維持するために、0.5% DMSOおよび0.5%ウシ血清アルブミンを含んだ。細胞を、BLTとともに1時間(またはトランスフェリン、EGFおよびコレラ毒素の取り込み実験のためには2.5時間)、ブレインキュベートした。すべての実験は、37℃にて実施した。BLTおよびその影響の詳細な特徴付けを、LC-MSによってその正体および純度を確認した化合物を用いて実施した。

【0035】

((i) HDLからの脂質取り込みアッセイ、HDLへのコレステロール流出アッセイ、およびHDL結合アッセイ)

DiI-HDLおよび $[^3\text{H}]$ CE-HDLからの脂質取り込みアッセイ、標識細胞からの $[^3\text{H}]$ コレステロールの流出アッセイ、および ^{125}I -HDL結合を、Actonら、Science (1996) Jan 26; 271 (5248): 518~20; Guら、J Biol Chem. (2000) Sep 29; 275 (39): 29993~30001; およびJiら、J. Biol. Chem. (1997) 272、20982~5により記載されるとおりに実施した。いくつかの実験において、値を正規化して、コントロールの100%が、化合物の非存在下での活性を示し、0%が、40倍過剰な非標識HDLの存在下で決定した活性、またはY1-BS1細胞についてはLLB-1 20 処断抗体の1:500希釈物の存在下で決定した活性を示すようにした(Guら(2000)、Karen Kzarskyからの寛大な贈り物)。細胞結合 $[^3\text{H}]$ コレステリルエーテルの量は、 ^{125}I -HDL結合の相対量と $[^3\text{H}]$ CE取り込みの相対量との直接比較を可能にする $[^3\text{H}]$ CE-HDLタンパク質の等価量(ng)として表される。

【0036】

細胞からのHDL解離速度を、その細胞を ^{125}I -HDL(10 μg /タンパク質、2時間、37℃)とともに、かつBLTとともにかまたはBLTを伴わずに、インキュベーションすることによって、測定した。その後、培地を、同じ培地(^{125}I -HDLを、40倍過剰な非標識HDLで置換した)または同じ培地(40倍過剰な非標識HDLを、標識インキュベーション培地に添加した)のいずれかで置換した。その後、細胞結合型 ^{125}I -HDLを、時間の関数として決定した。上記2つの方法は、同様の結果を生じた。 30

【0037】

((ii) 細胞内輸送および細胞骨格組織化の蛍光顕微鏡分析)

HeLa細胞(Spiroら(1996) Mol Biol Cell 7、355~67)によるAlexa-594標識トランスフェリンもしくはFITC標識上皮増殖因子(EGF、Molecular Probes)のレセプター媒介性エンドサイトーシス、およびBSC-1細胞によるAlexa-594標識ホロコレラ毒素(Wayer Lencer博士、Childrens Hospital, HMSからの親切な贈り物) 40 を、蛍光顕微鏡によって検出した。水疱性口内炎ウイルスの温度感受性糖タンパク質(VSVG^{ts045})がカルボキシル末端でEGFPに融合したもの(VSVG^{ts045}-EGFP)が、40℃から32℃へと2時間シフトした後に、小胞体から形質膜への細胞内輸送を、蛍光顕微鏡によって測定した。ローダミン標識ファロイジンを使用するアクチンの分布に対する上記化合物の影響、およびFITC標識DM1モノクローナル抗体(Sigma Co.)を使用するチューブリンの分布に対する上記化合物の影響を、1DLA[mSR-BI]細胞において、Rigottiら(1996) J. Biol. Chem. 271, 33545~9により記載される通りに、空中63 \times 対物レンズ(Nikon)を使用する蛍光顕微鏡によって、測定した。

【0038】

10

20

30

40

50

((i i i) S R - B I 細胞表面発現のフローサイトメトリー分析)

細胞を、 1×10^5 濃度の B L T とともにまたはそれを伴わずに、3 時間 (培地 C) インキュベートし、2 m M E D T A および化合物および含む P B S を用いて収集し、非固定細胞における S R - B I 表面発現レベルを、K K B - 1 抗体 (G u ら (1 9 9 8) J . B i o l . C h e m . 2 7 3 , 2 6 3 3 8 ~ 4 8) を用いるフローサイメトリーによって測定した。

【 0 0 3 9 】

(結果)

(S R - B I 媒介性選択的脂質取り込みのインヒビターについてのハイスループットスクリーニング)

D i I 標識 H D L (D i I - H D L) からの蛍光二色性色素 D i I の細胞取り込みおよび細胞蓄積は、H D L におけるコレステリルエステルの S R - B I 依存性選択的取り込みの信頼できる代理である。S R - B I 媒介性選択的脂質取り込みの低分子インヒビターを同定するために、C h e m b r i d g e l i b r a r y c o l l e c t i o n の D i v e r S e t E を示す 1 6 , 3 2 0 個の化合物を、D i I - H D L からの D i I の細胞取り込みをブロックするそれらの化合物の能力についてスクリーニングした。上記化合物を、高レベルで m S R - B I を発現する l D l A [m S R - B I] を使用して、3 8 4 ウェルプレートアッセイにおいて、名目濃度 1 0 μ M にて試験した。

【 0 0 4 0 】

図 1 は、コントロール (化合物なし、過剰な非標識 H D L の添加、または非トランスフェクト l D l A - 7 細胞の使用) とともに、代表的アッセイプレートの結果を示す。この図は、第 1 回のハイスループットスクリーニングの間の 1 つの 3 8 4 ウェルプレートから得た蛍光読み取りの例である。S R - B I 発現 l D l A [m S R - B I] 細胞を、3 8 4 ウェルプレート中にプレートし、D i I - H D L (1 0 μ g タンパク質 / m l) からの D i I の取り込みに対する約 1 0 μ M 化合物の影響を、高速蛍光プレートリーダーを使用して測定した。カラム 1 ~ 2 0 は、1 つのプレートからの 1 つのカラム (別々の色の記号) 当たり 1 6 個の独立したウェルからの結果 (蛍光 (任意単位)) を示し、合計 3 2 0 個の化合物を示す。化合物を用いないコントロールは、4 0 倍過剰な非標識 H D L の非存在下もしくは存在下で l D l A [m S R - B I] 細胞を含むウェル、または l D l A - 7 細胞 (非常に低い S R - B I 発現) を含むウェルのいずれかである。B L T - 1 と名づけた阻害化合物を含むウェル、および D i I - H D L 蛍光を消光する化合物 (Q) を含むウェルが、示される。

【 0 0 4 1 】

D i I - H D L の固有の蛍光を消光する化合物 (「 Q 」) または増強する化合物は、さらには試験しなかった。最初の回のスクリーニングにおいて D i I 取り込みを再現的にブロックした約 2 0 0 個の化合物を、再試験した。これらが、表 I に示される。

【 0 0 4 2 】

(表 I : S R - B I インヒビターの構造)

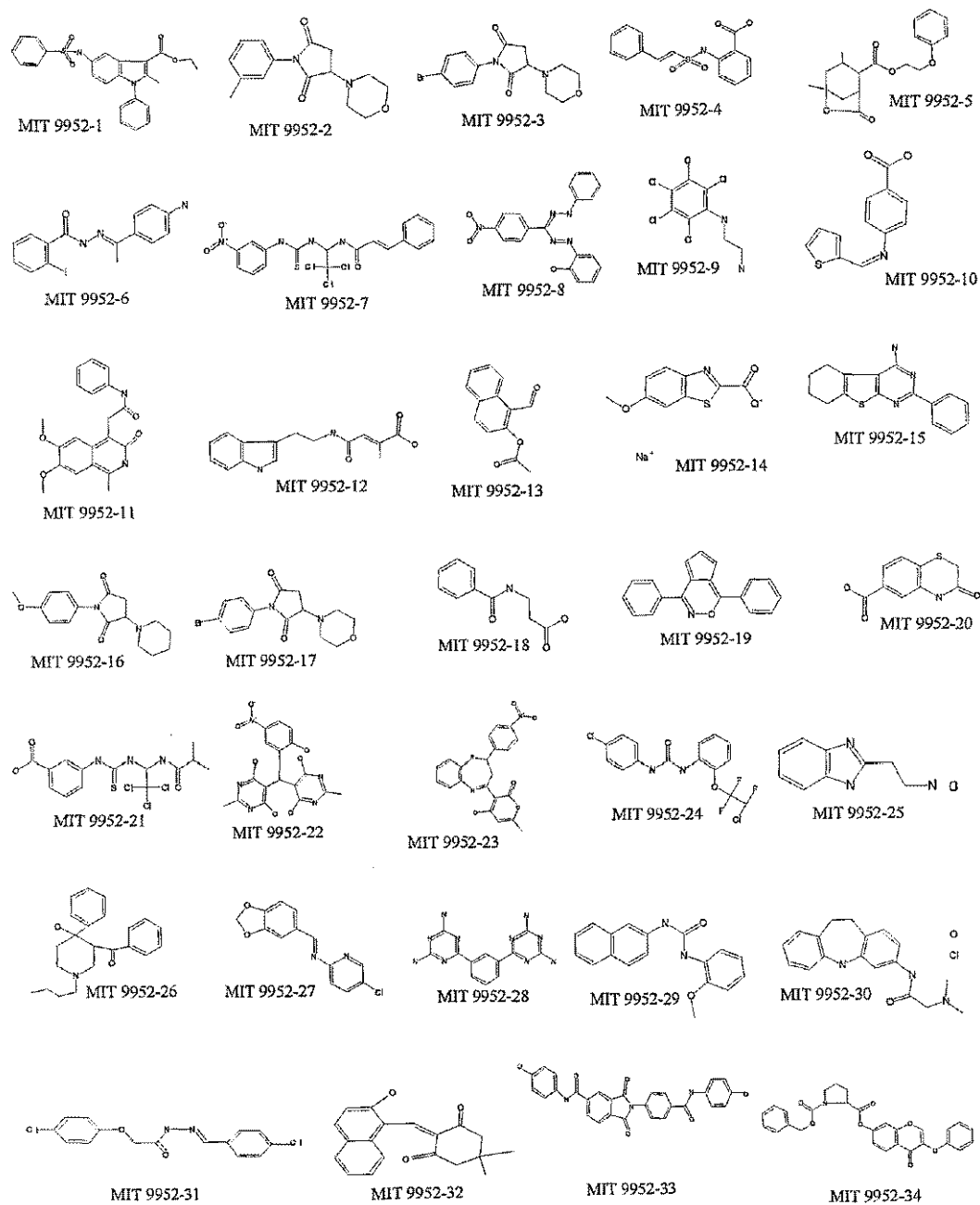
【 0 0 4 3 】

10

20

30

【表 1 - 1】



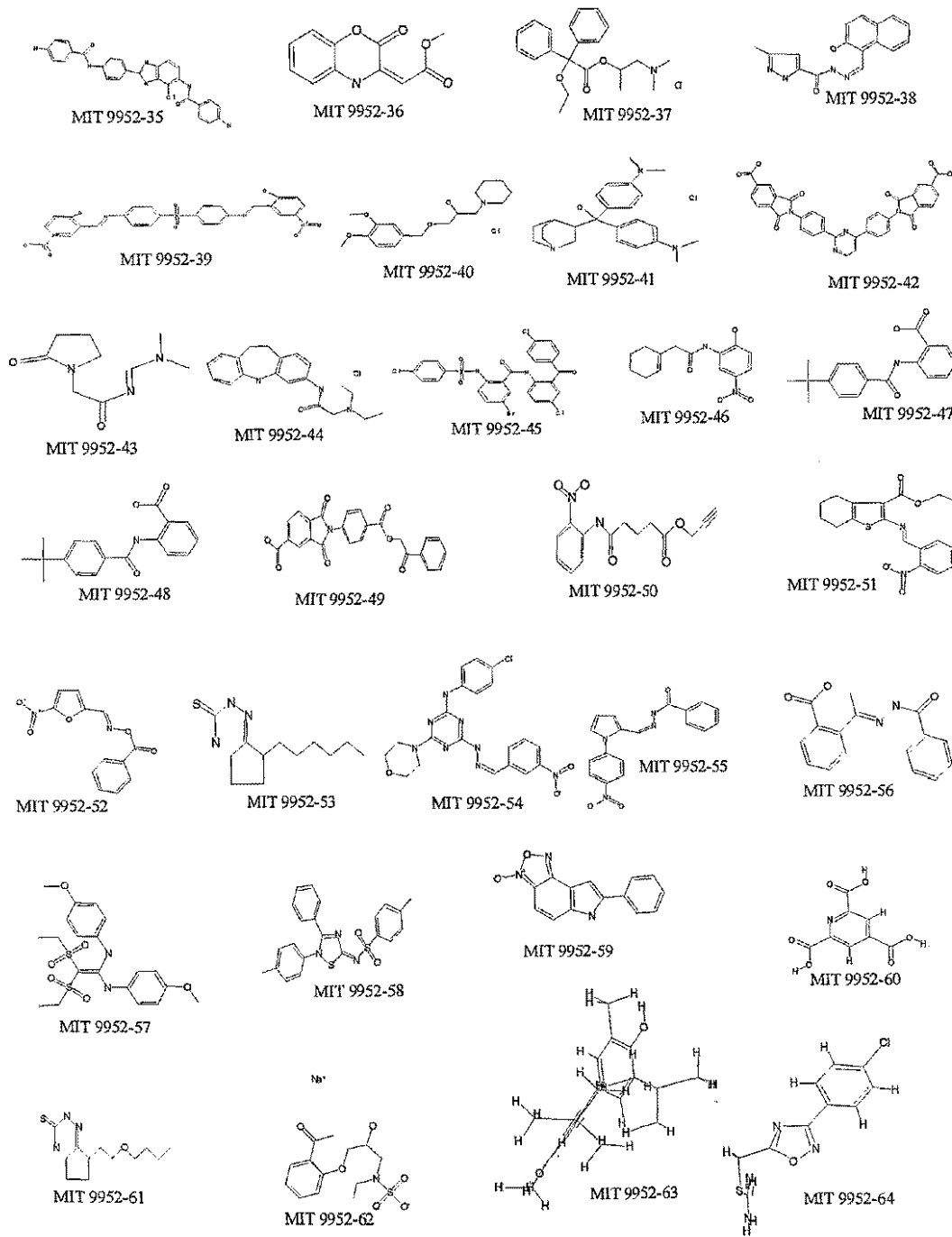
10

20

30

【 0 0 4 4 】

【表 1 - 2】



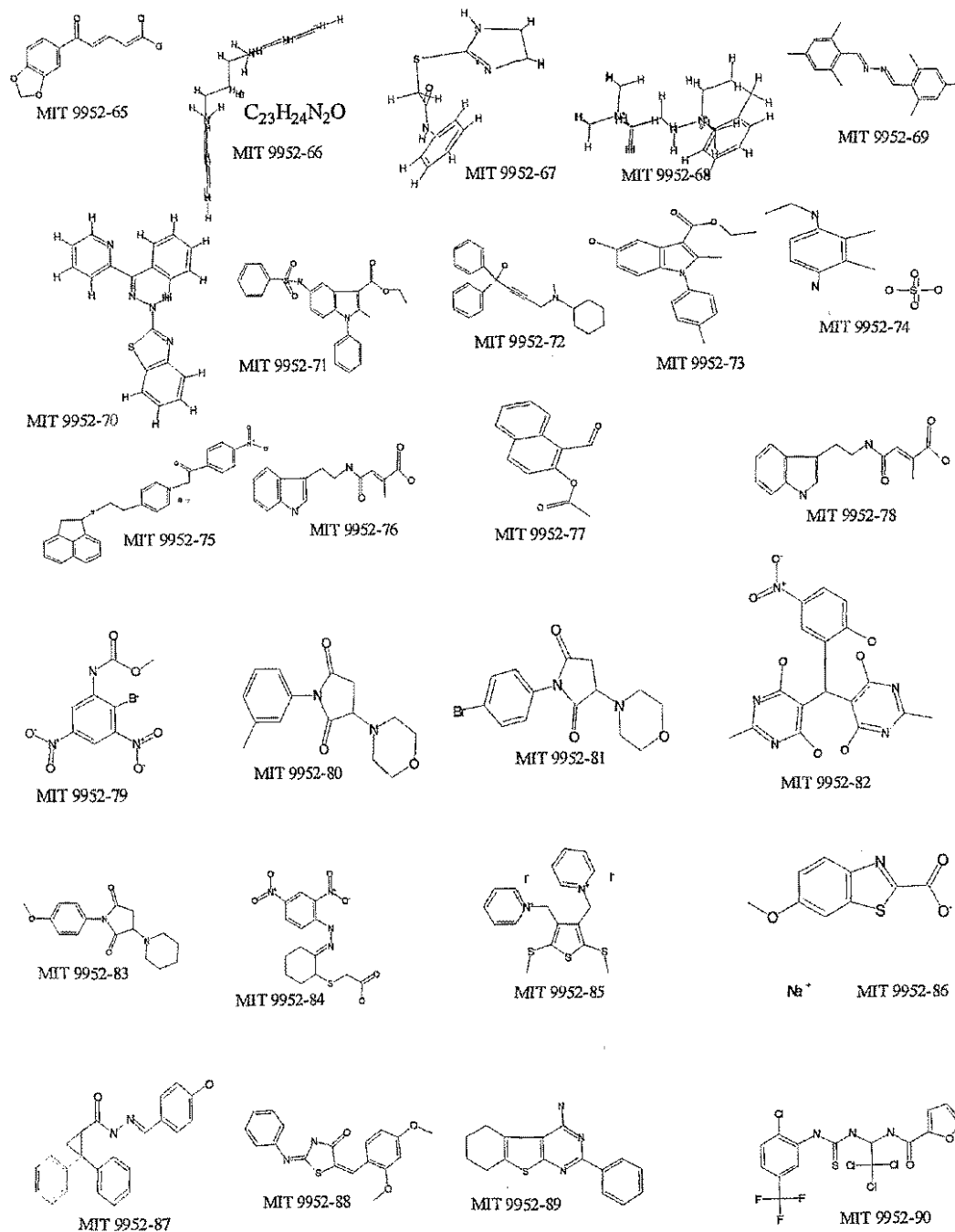
10

20

30

40

【表 1 - 3】



10

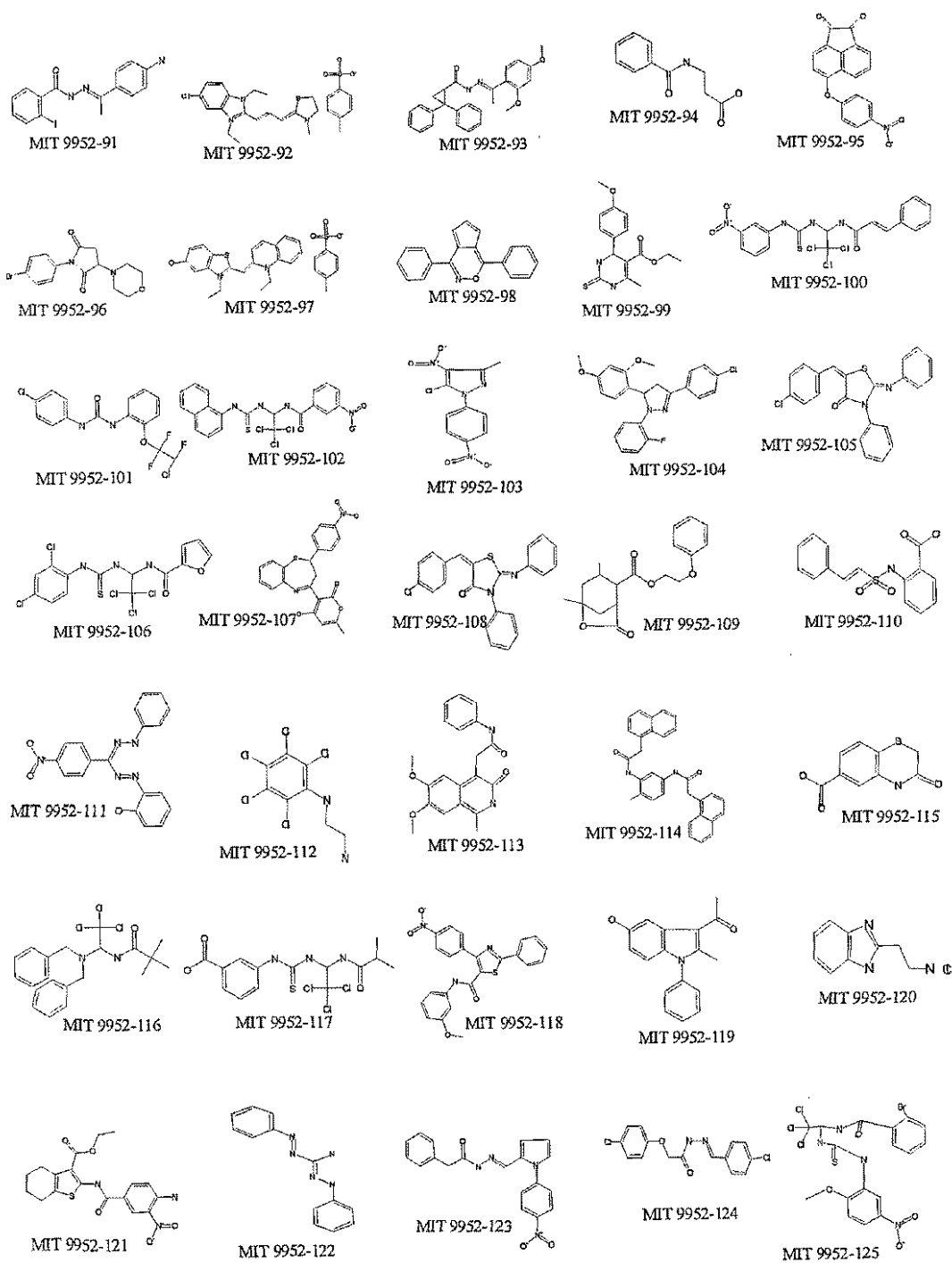
20

30

【 0 0 4 6 】

40

【表 1 - 4】



10

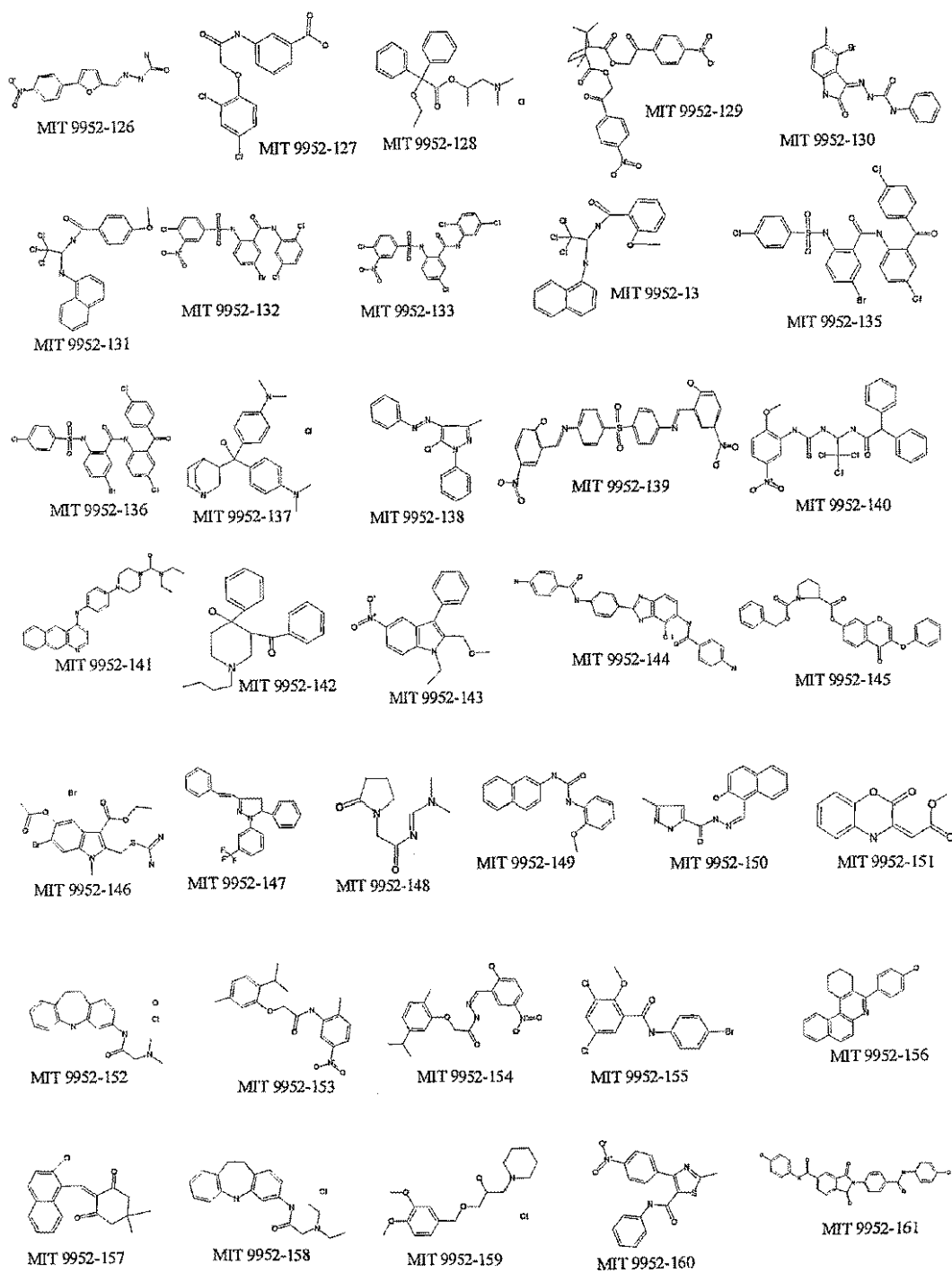
20

30

40

【 0 0 4 7 】

【表 1 - 5】



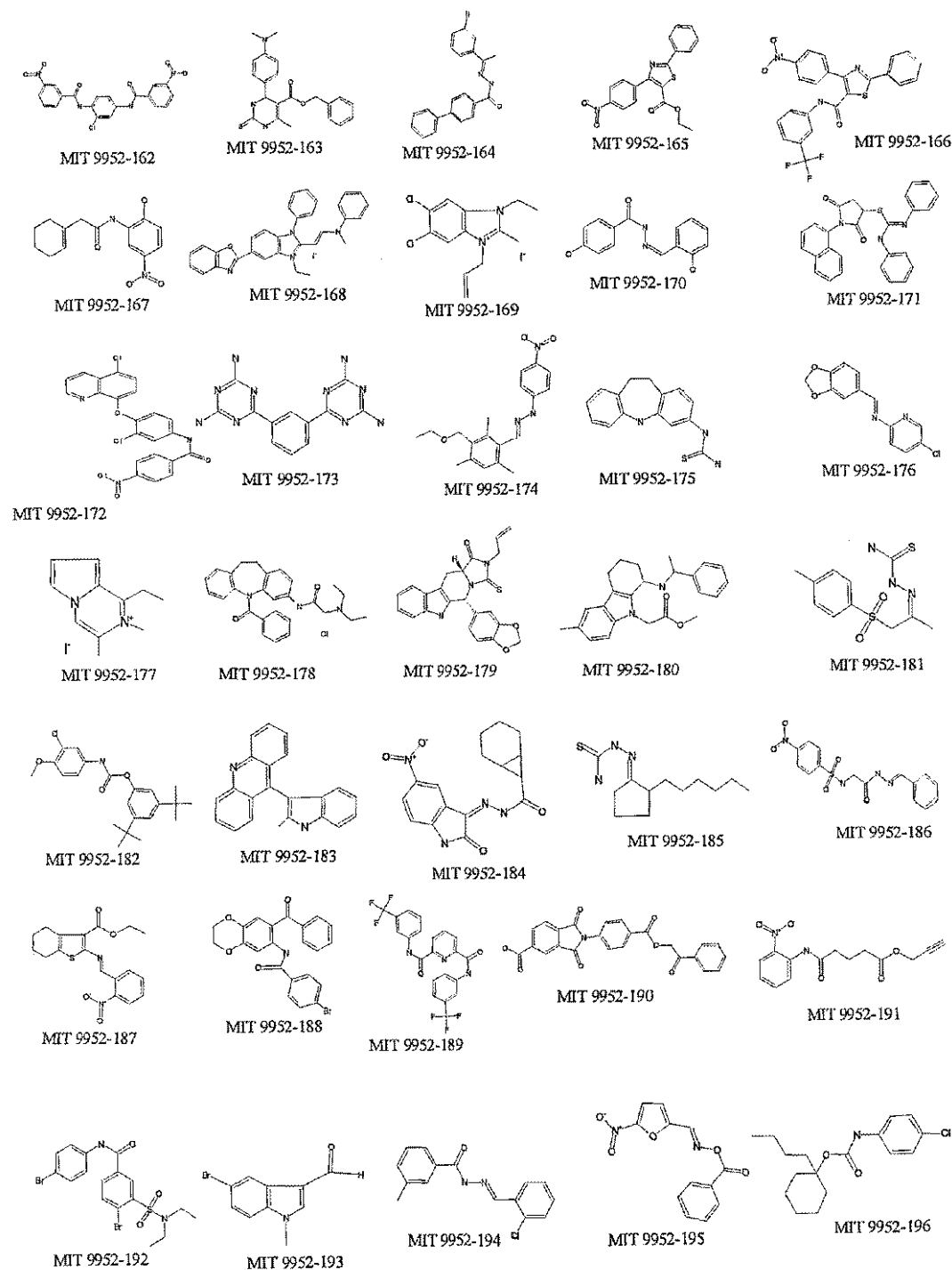
10

20

30

40

【表 1 - 6】



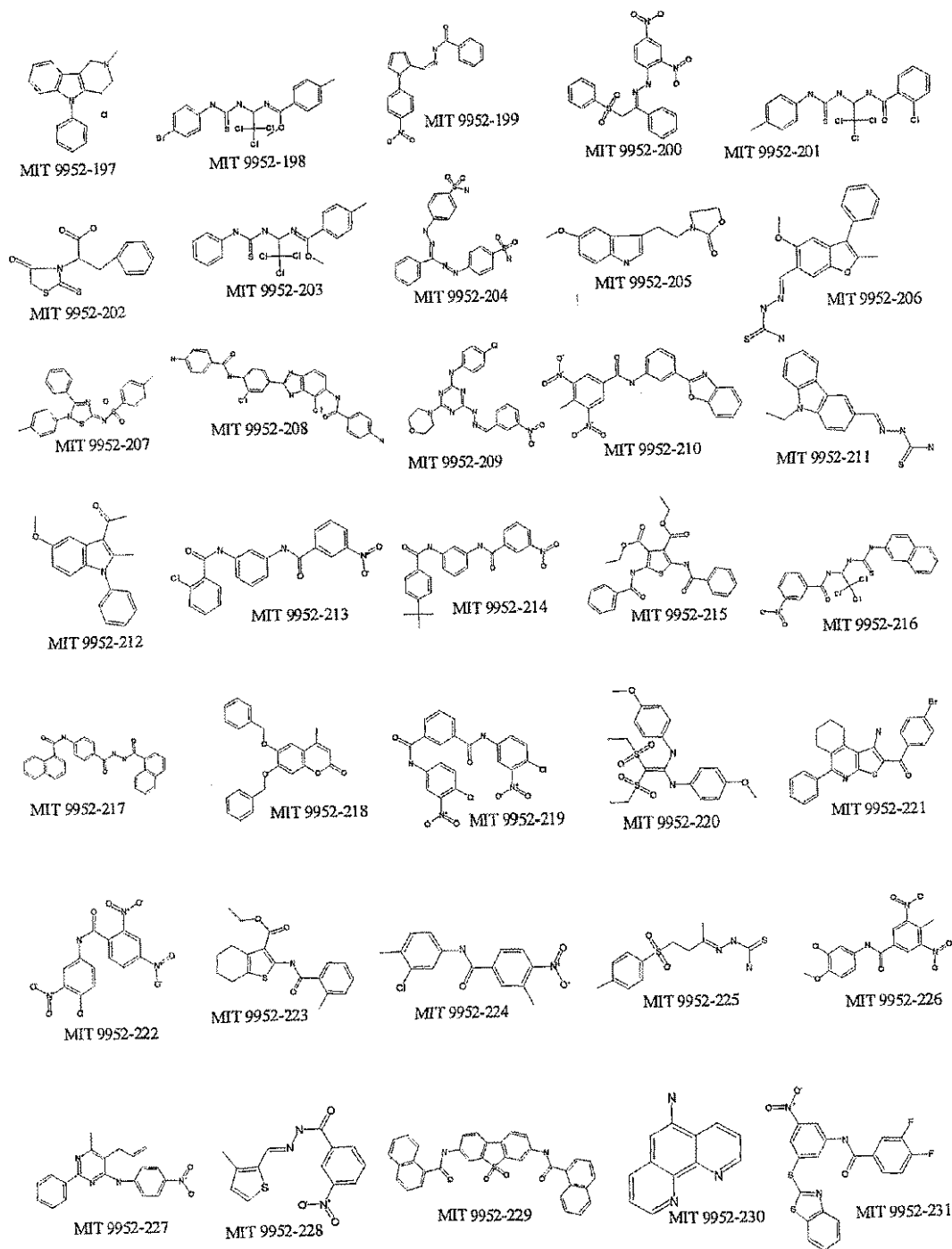
10

20

30

40

【表 1 - 7】



10

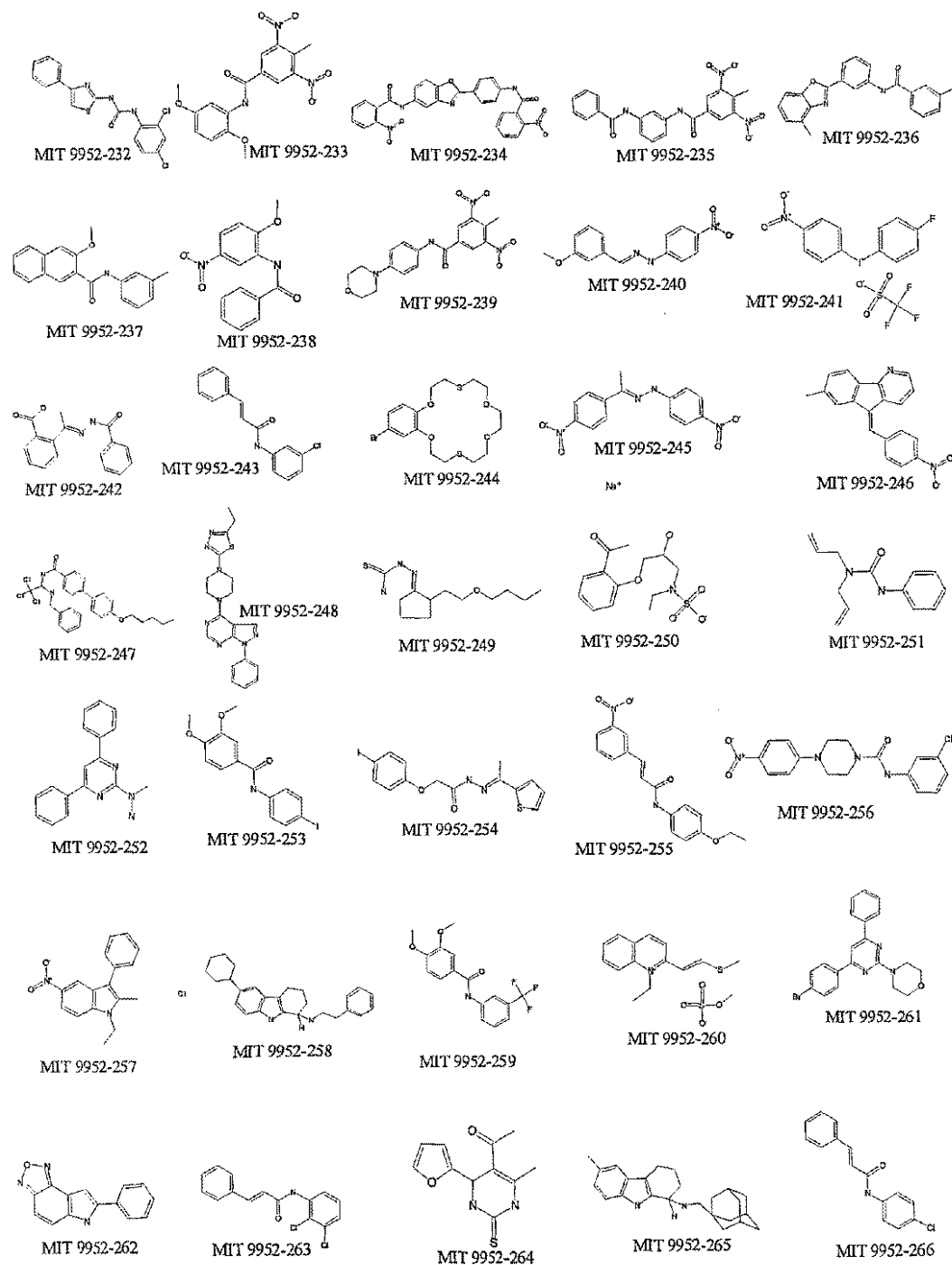
20

30

40

【 0 0 5 0 】

【表 1 - 8】



10

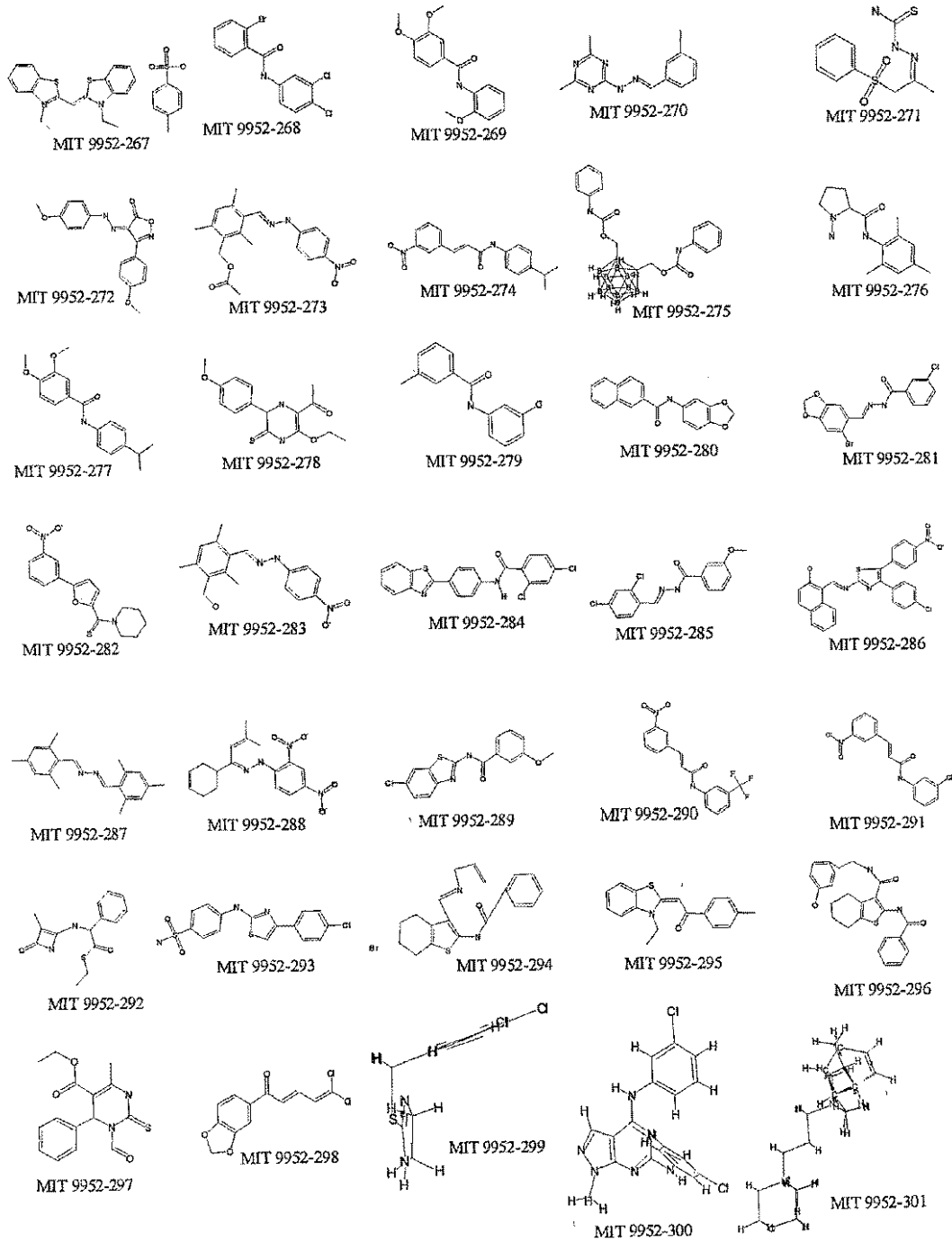
20

30

40

【 0 0 5 1 】

【表 1 - 9】

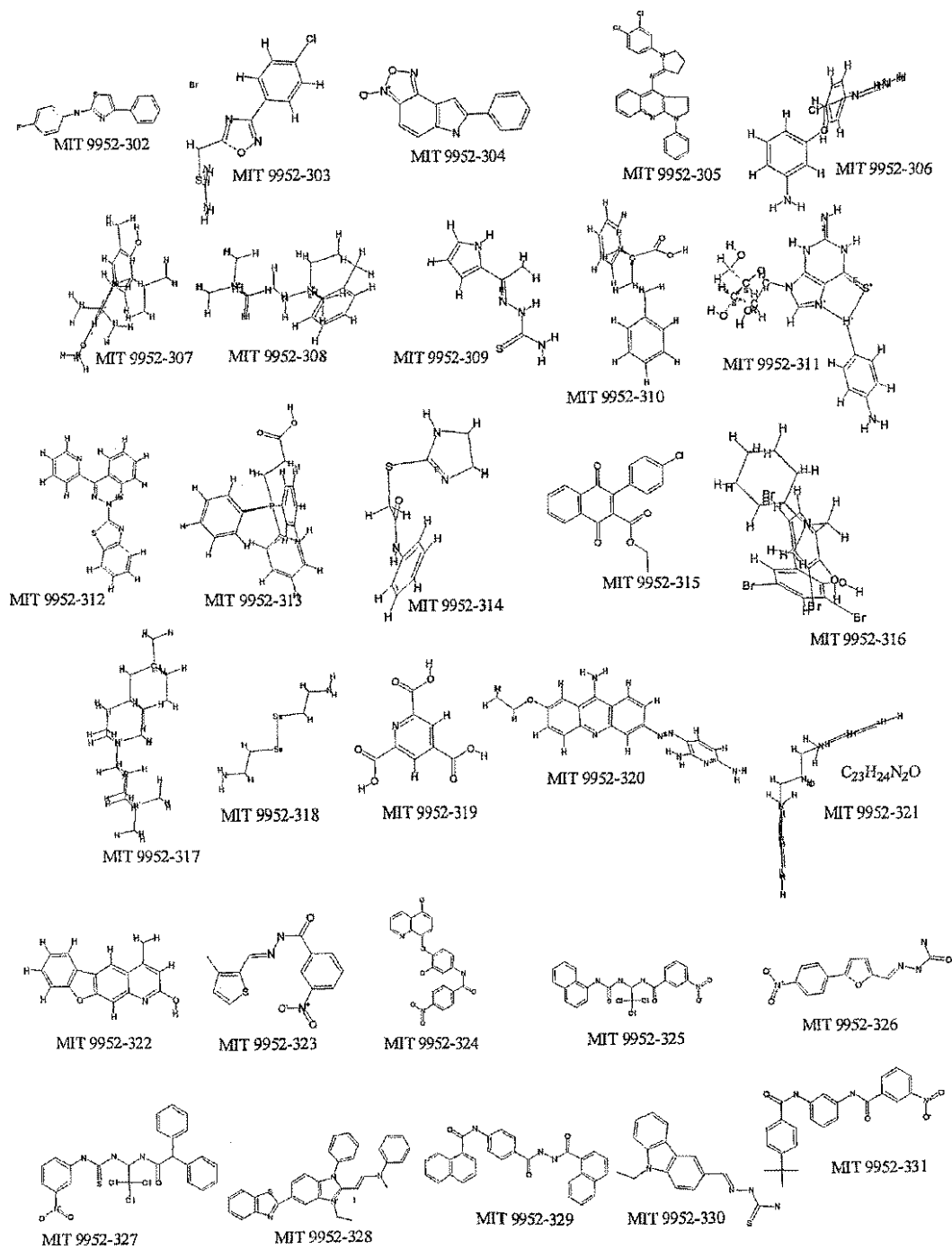


10

20

30

【表 1 - 10】



10

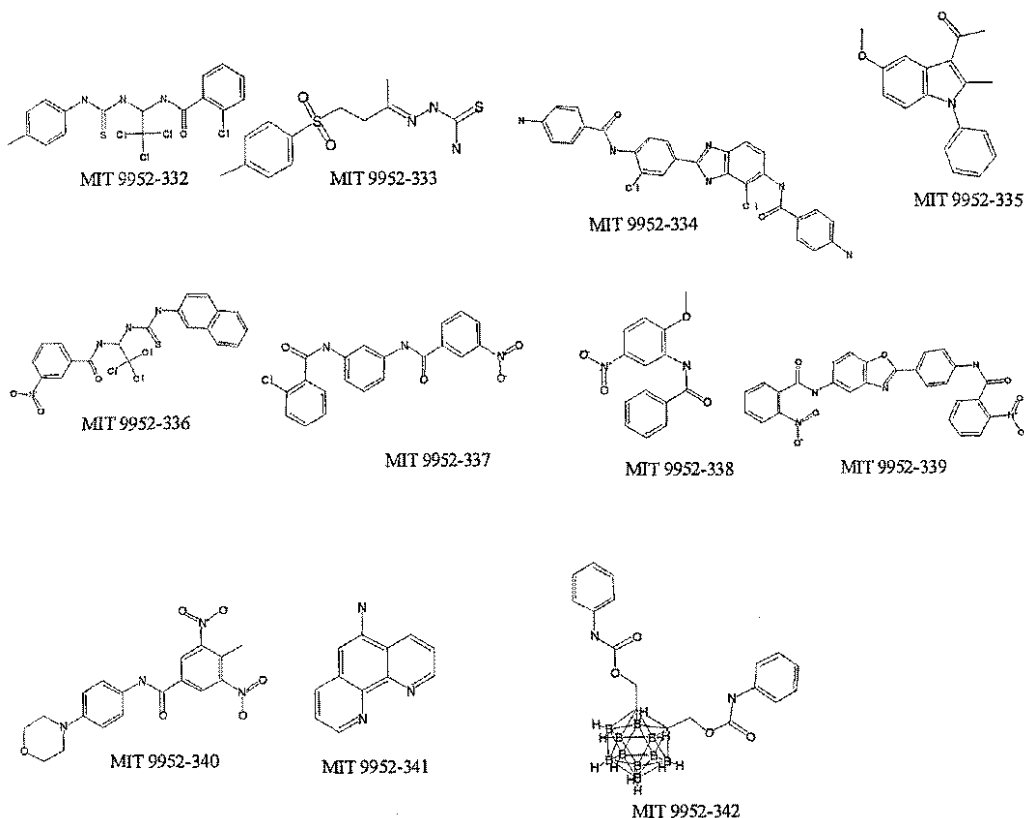
20

30

【0053】

40

【表 1 - 1 1】



10

20

30

40

μM またはより低い範囲の IC_{50} を有する最も有効な化合物のうちの5つ(図2A)を、BLT1~BLT5と名づけて、さらに特徴付けた。著しいことに、これらのうちの最も強力なBLT-1およびBLT-2は、 nM 範囲にて阻害し、これらは、構造的に関連する(表II)。DiI取り込みの阻害は、新規なタンパク質合成を必要としなかった。なぜなら、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロヘキシミドで30分間細胞を事前処理すると、その阻害効果を消滅しなかったからである。最後に、上記BLTのうちのいずれも、最少量のSR-BIしか発現しない非トランスフェクトd1A-7細胞によるDiIまたは $[^3\text{H}]\text{CE}$ の低いバックグラウンドレベルの取り込みを、実質的に阻害しなかった。

【0054】

d1A[mSR-BI]細胞により $[^3\text{H}]\text{CE-HDL}$ からのより生理的脂質である $[^3\text{H}]\text{コレステリルエーテル}([^3\text{H}]\text{CE})$ の取り込みの阻害についての IC_{50} は、DiI取り込みについての IC_{50} と同様であった(図2Bおよび表II)。 $[^3\text{H}]\text{CE}$ 取り込みの阻害は、可逆的であった(化合物との1時間のインキュベーション、その後3~6時間の洗浄期間)。さらに、上記化合物はまた、高レベルのSR-BIを発現するY1-BS1副腎皮質細胞(Rigottiら(1996)J. Biol. Chem. 271, 33545~9)による $[^3\text{H}]\text{CE}$ の取り込みをブロックした(表II)。このことは、上記化合物による阻害効果は、細胞型特異的ではないことを示す。上記細胞または標識HDLを上記化合物とともにプレインキュベートする実験は、上記HDLよりも上記細胞が、上記化合物の標的であることを示した。

【0055】

(表2: SR-BI結合についての試験の結果)

【0056】

【表 2 - 1】

化学物質 ID	ENDOVIS		ENDOHD		ENDOQUENCH	
	テスト1	テスト2	テスト1	テスト2	テスト1	テスト2
MIT 9952-1	0		0.62	0.55	1.04	1.14
MIT 9952-2	0		1.34	1.2	1.1	1.06
MIT 9952-3	0		1.32	1.17	1.06	1.2
MIT 9952-4	0		1.17	1.33	1.06	1
MIT 9952-5	0		1.19	1.75	1.02	1.03
MIT 9952-6	0		0.52	0.54	0.99	1.03
MIT 9952-7	0		0.5	0.51	1.02	1.1
MIT 9952-8						
MIT 9952-9	0					
MIT 9952-10						
MIT 9952-11						
MIT 9952-12	0		1.25	1.26	0.9	0.93
MIT 9952-13	0		0.55	0.67	0.94	0.94
MIT 9952-14	0		1.24	1.21	1.16	1.07
MIT 9952-15	0		0.55	0.61	0.87	0.81
MIT 9952-16	0		1.25	1.26	0.92	0.99

10

20

【 0 0 5 7 】

【表 2 - 2】

MIT 9952-17	0		1.32	1.17	1.06	1.12
MIT 9952-18	0		1.21	1.22	1.01	1.06
MIT 9952-19	0	5				
MIT 9952-20	0	0				
MIT 9952-21	0		1.26	1.58	0.94	0.94
MIT 9952-22	0		1.27	1.4	1.01	1
MIT 9952-23	1	1				
MIT 9952-24	0	0				
MIT 9952-25	0		1.21	1.69	0.98	0.98
MIT 9952-26	0		1.28	1.32	0.95	0.97
MIT 9952-27	0		1.36	1.17	0.9	0.88
MIT 9952-28	7		1.96	1.61	1.0	1.06
MIT 9952-29	0		0.62	0.6	0.94	0.99
MIT 9952-30	0		0.51	0.43	0.91	0.88
MIT 9952-31	0		1.33	1.17	1.01	1.07
MIT 9952-32	0		1.26	1.21	0.9	1.0
MIT 9952-33	0		1.37	1.5	1.04	1.0
MIT 9952-34	0		1.28	1.34	0.94	1.09
MIT 9952-35	0		0.56	0.56	0.99	0.93
MIT 9952-36	0		1.22	1.36	1.02	1.97
MIT 9952-37	0		1.23	1.36	1.03	1.13
MIT 9952-38	0		0.34	0.52	0.17	0.12
MIT 9952-39	0		1.22	1.39	1.08	1.05
MIT 9952-40	0		1.28	1.23	1.01	1.97
MIT 9952-41	0		1.32	1.25	1.06	0.92
MIT 9952-42	0		1.27	1.21	0.97	0.99
MIT 9952-43	0		1.44	1.32	1.09	1.08
MIT 9952-44	0		0.42	0.39	0.86	0.95
MIT 9952-45	0		0.44	0.46	1.35	1.27
MIT 9952-46	0		1.32	1.18	0.99	0.98
MIT 9952-47	0		1.18	1.37	1.14	0.98

10

20

30

40

【 0 0 5 8 】

【表 2 - 3】

MIT 9952-48	0		0.68	0.49	1.13	1.18
MIT 9952-49	0		1.47	1.35	0.95	0.91
MIT 9952-50	0		1.27	1.98	1.02	0.98
MIT 9952-51	0		0.33	0.46	1.02	0.93
MIT 9952-52	0		1.22	1.35	0.92	0.91
MIT 9952-53	0		0.53	0.46	1.0	1.03
MIT 9952-54	6		0.46	0.59	0.95	0.9
MIT 9952-55	0		0.52	0.46	0.98	1.05
MIT 9952-56	0		1.26	1.26	0.91	0.95
MIT 9952-57	0		1.13	1.25	1.05	1.96
MIT 9952-58	0		1.28	1.19	1.02	1.11
MIT 9952-59	0		0.35	0.44	0.86	0.93
MIT 9952-60	0		1.13	1.17	0.89	1.07
MIT 9952-61	0		0.7	0.57	1.09	1.01
MIT 9952-62	0		1.28	1.24	0.99	0.9
MIT 9952-63	0		0.69	0.63	0.95	0.85
MIT 9952-64	0		0.58	0.58	0.98	0.92
MIT 9952-65	0		1.29	1.24	1.07	1.02
MIT 9952-66	0		1.22	1.11	1.96	1.03
MIT 9952-67	0		0.55	0.54	1.24	0.94
MIT 9952-68	0		0.57	0.69	0.84	0.98
MIT 9952-69	0		1.18	1.32	1.07	1.1
MIT 9952-70 (1 st)	0		0.45	0.75	0.97	0.88
MIT 9952-71	0		0.62	0.55	1.04	1.14
MIT 9952-72	0	0	1.07	1.12	1.01	0.93
MIT 9952-73	0	0	0.61	0.59	1.02	1.04
MIT 9952-74	0	0	0.71	0.69	0.83	0.88
MIT 9952-75	0	0	0.64	0.71	1.05	1.95
MIT 9952-76	0		1.25	1.26	0.9	0.93
MIT 9952-77	0		0.55	0.67	0.94	0.94

10

20

30

40

【表 2 - 4】

MIT 9952-78	0		1.25	1.26	0.9	0.93
MIT 9952-79	1		0.61	0.63	1.0	0.97
MIT 9952-80	0		1.34	1.2	1.1	1.06
MIT 9952-81	0		1.32	1.17	1.06	1.2
MIT 9952-82	0		1.27	1.4	1.02	1.0
MIT 9952-83	0		1.25	1.26	0.92	0.99
MIT 9952-84	0	0	0.74	0.66	0.83	0.81
MIT 9952-85	0	0	0.56	0.68	1.03	1.12
MIT 9952-86	0		1.24	1.21	1.16	1.07
MIT 9952-87	0	0	0.67	0.67	0.9	0.99
MIT 9952-88	0	0	0.73	0.77	0.92	0.97
MIT 9952-89	0		0.55	0.61	0.87	0.81
MIT 9952-90	0	0	0.62	0.61	1.14	1.02
MIT 9952-91	0	0	0.52	0.54	0.99	1.03
MIT 9952-92	0	0	0.7	0.63	1.11	1
MIT 9952-93	0	0	0.66	0.71	0.95	0.91
MIT 9952-94	0		1.21	1.22	1.01	1.06
MIT 9952-95	2	2	0.79	0.73	0.96	1.03
MIT 9952-96	0		1.32	1.17	1.06	1.2
MIT 9952-97	5	5	0.74	0.69	0.94	0.9
MIT 9952-98	0	5				
MIT 9952-99	0	0				
MIT 9952-100	0		0.5	0.51	1.02	1.1
MIT 9952-101	0	0				
MIT 9952-102	0	0	0.56	0.49	1.05	1.05
MIT 9952-103	1	1	0.56	0.61	0.96	1.09
MIT 9952-104	0	0				
MIT 9952-105	0	0				
MIT 9952-106	0	0	0.6	0.53	1.16	1.16
MIT 9952-107	1	1				
MIT 9952-108	0	0				

10

20

30

40

【 0 0 6 0 】

【表 2 - 5】

MIT 9952-109	0		1.19	1.75	1.02	1.03
MIT 9952-110	0		1.17	1.33	1.06	1.1
MIT 9952-111						
MIT 9952-112	0	0				
MIT 9952-113						
MIT 9952-114	0	0				
MIT 9952-115 (2 nd)						
MIT 9952-116	0	0				
MIT 9952-117	0		1.26	1.58	0.94	0.94
MIT 9952-118	0		0.51	0.63	0.91	1.11
MIT 9952-119	0	0	0.62	0.64	1.06	1.04
MIT 9952-120	0		1.21	1.69	0.98	0.98
MIT 9952-121	0	0	0.54	0.57	0.95	1.02
MIT 9952-122	0	0	0.55	0.82	0.82	0.82
MIT 9952-123	0	0	0.59	0.64	1.02	1.05
MIT 9952-124	0		1.33	1.17	1.01	1.17
MIT 9952-125	0	0	0.63	0.66	1.0	0.99
MIT 9952-126	0	0	0.55	0.53	0.93	0.98
MIT 9952-127	0	0	0.62	0.6	0.97	0.92
MIT 9952-128	0		1.23	1.36	1.03	1.13
MIT 9952-129	0	0	0.57	0.54	0.8	0.79
MIT 9952-130	0	0	0.62	0.65	0.96	1.05
MIT 9952-131	0	0	0.56	0.52	0.9	0.92
MIT 9952-132	0	0	0.65	0.46	1.15	1.17
MIT 9952-133	0	0	0.5	0.52	1.15	1.09
MIT 9952-134	0	0	0.58	0.59	0.9	0.9
MIT 9952-135	0	0	0.44	0.46	1.35	1.27
MIT 9952-136	0	0	0.63	0.59	1.12	1.1
MIT 9952-137	0	0	1.32	1.25	1.06	0.92
MIT 9952-138	0	0	0.54	0.63	1.11	1.04

10

20

30

40

【 0 0 6 1 】

【表 2 - 6】

MIT 9952-139	0		1.22	1.39	1.08	1.05
MIT 9952-140	0	0	0.52	0.58	1.44	1.37
MIT 9952-141	0	0	0.63	0.77	1.0	0.99
MIT 9952-142	0		1.28	1.32	0.95	0.97
MIT 9952-143	0	0	0.66	0.65	1.15	1.03
MIT 9952-144	0		0.56	0.56	0.99	0.93
MIT 9952-145	0		1.28	1.34	0.94	1.09
MIT 9952-146	0	0	0.62	0.71	0.95	1.02
MIT 9952-147	0	0	0.63	0.53	0.9	0.99
MIT 9952-148	0		1.44	1.32	1.09	1.08
MIT 9952-149	0	0	0.62	0.6	0.94	0.99
MIT 9952-150	0		0.34	0.52	0.17	0.16
MIT 9952-151(3 rd)	0		1.22	1.36	1.02	1.97
MIT 9952-152	0		0.51	0.43	0.91	0.88
MIT 9952-153	0	0	0.6	0.57	0.88	0.91
MIT 9952-154	0	0	0.47	0.45	0.07	0.08
MIT 9952-155	0	0	0.69	0.47	1.04	1.17
MIT 9952-156	0	0	0.57	0.62	1.09	1.03
MIT 9952-157	0	0	1.26	1.21	0.9	1.0
MIT 9952-158	0		0.42	0.39	0.86	0.95
MIT 9952-159	0		1.28	1.23	1.01	0.97
MIT 9952-160	0		0.48	0.55	0.96	1.0
MIT 9952-161	0	0	1.37	1.5	1.04	1.0
MIT 9952-162	0	0	0.55	0.4	1.01	0.95
MIT 9952-163	0	0	0.6	0.69	1.0	1.01
MIT 9952-164	0		0.6	0.61	0.88	0.89
MIT 9952-165	0		0.57	0.6	0.93	0.94
MIT 9952-166	0		0.56	0.67	0.95	0.99
MIT 9952-167	0		1.32	1.18	0.99	0.98
MIT 9952-168	4	4	0.5	0.56	0.93	1.12

10

20

30

40

【 0 0 6 2 】

【表 2 - 7】

MIT 9952-169	0	0	0.54	0.6	1.0	1.04
MIT 9952-170	0	0	0.54	0.54	0.12	0.1
MIT 9952-171	0	0	0.58	0.54	0.96	1.03
MIT 9952-172	0	0	0.55	0.56	0.92	0.84
MIT 9952-173	7		1.96	1.61	1.0	1.06
MIT 9952-174	0	0	0.6	0.62	0.85	0.84
MIT 9952-175	0	0	0.42	0.51	1.0	0.98
MIT 9952-176	0		1.36	1.17	0.9	0.88
MIT 9952-177	0	0	0.68	0.49	1.13	1.18
MIT 9952-178	0	0	0.4	0.38	0.95	0.86
MIT 9952-179	0	0	0.54	0.54	1.08	1.04
MIT 9952-180(4 th)	0	0	0.43	0.45	1.14	1.02
MIT 9952-181	0	0	0.6	0.54	1.07	0.95
MIT 9952-182	0	0	0.71	0.41	0.95	1.1
MIT 9952-183	0	0	0.59	0.65	0.94	1.0
MIT 9952-184	0	0	0.6	0.58	0.93	0.94
MIT 9952-185	0	0	0.53	0.46	1.0	1.03
MIT 9952-186	0	0	0.5	0.5	1.07	1.05
MIT 9952-187	0		0.33	0.46	1.02	0.93
MIT 9952-188	0	0	0.61	0.58	0.94	1.08
MIT 9952-189	0	0	0.56	0.58	1.09	1.0
MIT 9952-190	0		1.47	1.35	0.95	0.91
MIT 9952-191	0		1.27	1.98	1.02	0.98
MIT 9952-192	0	0	0.57	0.52	1.1	1.09
MIT 9952-193	0	0	0.66	0.69	0.92	1.0
MIT 9952-194	0	0	0.76	0.46	0.97	1.02
MIT 9952-195	0		1.22	1.35	0.92	0.91
MIT 9952-196	0	0	0.63	0.6	1.09	1.07
MIT 9952-197	0	0	0.58	0.71	0.95	0.96
MIT 9952-198	0	0	0.67	0.64	1.07	1.11

10

20

30

40

【 0 0 6 3 】

【表 2 - 8】

MIT 9952-199	0	0	0.52	0.46	0.98	1.05
MIT 9952-200	0	0	0.73	0.8	1.02	0.96
MIT 9952-201	0	0	0.69	0.67	1.26	1.25
MIT 9952-202	0	0	1.23	1.11	0.98	1.03
MIT 9952-203	0	0	0.73	0.7	0.97	1.0
MIT 9952-204	0	0	0.55	0.62	0.78	1.07
MIT 9952-205	0	0	1.08	1.0	0.93	1.03
MIT 9952-206	0	0	0.56	0.52	1.05	1.1
MIT 9952-207	0		1.28	1.19	1.02	1.11
MIT 9952-208	0	0	0.57	0.55	0.95	0.98
MIT 9952-209 (5 th)	6		0.46	0.59	0.95	0.9
MIT 9952-210	0	0	0.59	0.56	0.88	0.91
MIT 9952-211	0	0	0.59	0.56	1.02	1.07
MIT 9952-212	0	0	0.57	0.49	1.0	0.95
MIT 9952-213	0	0	0.66	0.57	0.92	0.96
MIT 9952-214	0	0	0.63	0.35	1.05	1.0
MIT 9952-215	0	0	0.57	0.53	1.03	1.04
MIT 9952-216	0	0	0.54	0.58	1.1	1.14
MIT 9952-217	0	0	0.57	0.53	1.0	0.98
MIT 9952-218	0	0	0.64	0.33	1.06	1.0
MIT 9952-219	0	0	0.55	0.55	0.95	0.98
MIT 9952-220	0	0	1.13	1.25	1.05	0.96
MIT 9952-221	0	0	0.62	0.59	1.01	0.91
MIT 9952-222	4	4	0.58	0.6	1.07	0.9
MIT 9952-223	0	0	0.64	0.57	1.06	1.05
MIT 9952-224	0	0	0.6	0.5	0.99	0.97
MIT 9952-225	0	0	0.56	0.59	1.05	1.03
MIT 9952-226	0	0	0.5	0.56	0.95	1.0
MIT 9952-227	0	0	0.58	0.53	0.96	1.0
MIT 9952-228	0	0	0.46	0.63	0.93	0.94

10

20

30

40

【 0 0 6 4 】

【表 2 - 9】

MIT 9952-229	0	0	0.58	0.58	1.22	1.31
MIT 9952-230	2	2	0.61	0.51	0.99	1.01
MIT 9952-231	0	0	0.46	0.54	0.99	0.96
MIT 9952-232	0	0	0.61	0.56	0.99	1.02
MIT 9952-233	0	0	0.59	0.33	1.0	0.94
MIT 9952-234	0	0	0.58	0.54	0.94	0.93
MIT 9952-235	0	0	0.62	0.33	0.91	1.06
MIT 9952-236	0	0	0.57	0.38	0.97	1.23
MIT 9952-237	0	0	0.53	0.39	0.91	0.83
MIT 9952-238	0	0	0.61	0.6	1.01	1.13
MIT 9952-239 (6 th)	0	0	0.48	0.4	0.9	0.96
MIT 9952-240	0	0	0.64	0.71	0.97	1.07
MIT 9952-241	1	1	0.48	0.52	0.92	0.93
MIT 9952-242	0		1.26	1.26	0.91	0.95
MIT 9952-243	0	0	0.42	0.6	1.05	1.09
MIT 9952-244	0	0	0.56	0.54	1.02	1.07
MIT 9952-245	0	0	0.54	0.64	1.03	1.02
MIT 9952-246	0	0	0.56	0.52	0.99	0.98
MIT 9952-247	0	0	0.63	0.64	1.05	1.03
MIT 9952-248	0	0	0.68	0.66	0.98	0.91
MIT 9952-249	0	0	0.7	0.57	1.09	1.01
MIT 9952-250	0	0	1.28	1.24	0.99	0.9
MIT 9952-251	0	0	0.52	0.57	1.06	1.06
MIT 9952-252	1	1	0.58	0.39	0.98	0.9
MIT 9952-253	0	0	0.59	0.65	1.03	1.06
MIT 9952-254			0.69	1.01	0.91	1.05
MIT 9952-255	0	0	0.61	0.6	1.01	0.94
MIT 9952-256	0	0	0.65	0.92	0.92	0.97
MIT 9952-257	0	0	0.66	0.61	1.0	1.0
MIT 9952-258	0	0	0.51	1.0	0.88	0.82

10

20

30

40

【 0 0 6 5 】

【表 2 - 1 0】

MIT 9952-259	0	0	0.59	0.55	0.96	0.94
MIT 9952-260	0	0	0.56	0.58	1.06	1.04
MIT 9952-261	0	0	0.62	0.66	1.05	1.05
MIT 9952-262	0	0	0.53	0.45	0.98	1.01
MIT 9952-263	0	0	0.66	0.65	1.04	0.98
MIT 9952-264	0	0	0.45	0.56	1.1	1.11
MIT 9952-265	0	0	0.26	0.89	0.8	0.87
MIT 9952-266	0	0	0.71	0.68	1.08	1.01
MIT 9952-267	0	0	0.57	1.11	0.96	1.07
MIT 9952-268 (7 th)	0	0	0.59	0.65	0.98	1.04
MIT 9952-269	0	0	0.74	0.66	0.99	1.05
MIT 9952-270	0	0	0.66	0.66	0.95	0.96
MIT 9952-271	0	0	0.59	0.54	0.94	0.89
MIT 9952-272	0	0	0.61	0.51	0.91	0.92
MIT 9952-273	0	0	0.51	0.48	0.79	0.73
MIT 9952-274	0	0	0.65	0.6	0.93	0.93
MIT 9952-275	0	0	0.43	0.44	0.92	0.97
MIT 9952-276	0	0	0.73	0.68	1.03	1.0
MIT 9952-277	0	0	0.66	0.65	1.0	1.0
MIT 9952-278	0	0	0.71	0.67	1.09	0.98
MIT 9952-279	0	0	0.64	0.63	1.12	1.11
MIT 9952-280	0	0	0.75	0.67	1.01	1.12
MIT 9952-281	0	0	0.59	0.34	1.0	0.96
MIT 9952-282	0	0	0.49	0.5	0.82	0.89
MIT 9952-283	0	0	0.53	0.48	0.97	1.0
MIT 9952-284	0	0	0.65	0.54	0.91	0.96
MIT 9952-285	0	0	0.57	0.53	0.9	1.07
MIT 9952-286	0	0	0.62	0.64	0.96	1.11
MIT 9952-287	0		1.18	1.32	1.07	1.1
MIT 9952-288	0	0	0.59	0.52	0.77	0.77

10

20

30

40

【 0 0 6 6 】

【表 2 - 1 1】

MIT 9952-289	0	0	0.6	0.64	1.0	0.98
MIT 9952-290	0	0	0.52	0.56	0.87	0.82
MIT 9952-291	0	0	0.55	0.51	0.94	0.97
MIT 9952-292	0	0	0.47	0.58	1.06	1.01
MIT 9952-293	0	0	0.69	0.67	0.85	0.95
MIT 9952-294	0	0	0.61	0.56	0.93	0.95
MIT 9952-295	0	0	0.64	0.58	1.01	0.95
MIT 9952-296	0	0	0.63	0.61	1.05	0.98
MIT 9952-297	0	0	0.56	0.46	1.07	1.09
MIT 9952-298 (8 th)	0	0	1.29	1.24	1.07	1.02
MIT 9952-299	0		0.73	0.57	1.05	0.99
MIT 9952-300	0		0.66	0.66	1.18	0.97
MIT 9952-301	0		0.71	0.7	1.01	0.98
MIT 9952-302	0	0	0.52	0.55	0.79	0.85
MIT 9952-303	0		0.58	0.58	0.98	0.92
MIT 9952-304	0		0.35	0.44	0.86	0.93
MIT 9952-305	0	0	0.67	0.6	1.07	1.01
MIT 9952-306	0		0.79	0.72	1.0	0.96
MIT 9952-307	0		0.69	0.63	0.95	0.85
MIT 9952-308	0		0.57	0.69	0.84	0.98
MIT 9952-309	0		0.7	0.68	1.14	1.08
MIT 9952-310	0		0.97	1.11	0.96	1.01
MIT 9952-311	0		0.63	0.65	0.98	0.99
MIT 9952-312	0		0.45	0.75	0.97	0.88
MIT 9952-313	0		0.79	0.77	0.94	0.98
MIT 9952-314	0		0.55	0.54	1.24	0.94
MIT 9952-315	0	0	0.51	0.53	0.86	0.73
MIT 9952-316	0		0.71	0.72	1.13	1.1
MIT 9952-317	0		0.69	0.73	1.0	0.96
MIT 9952-318	0		0.67	0.81	1.18	0.94

10

20

30

40

【 0 0 6 7 】

【表 2 - 1 2】

MIT 9952-319	0		1.13	1.17	0.89	1.07
MIT 9952-320	0		0.54	0.83	1.04	1.01
MIT 9952-321	0		1.22	1.11	1.96	1.03
MIT 9952-322	0		0.79	0.86	0.1	0.96
MIT 9952-323	0	0	0.46	0.63	0.93	0.94
MIT 9952-324	0	0	0.55	0.56	0.92	0.84
MIT 9952-325	0	0	0.56	0.49	1.05	1.05
MIT 9952-326	0	0	0.55	0.53	0.93	0.98
MIT 9952-327	0	0	0.4	0.45	1.18	1.13
MIT 9952-328	4	4	0.5	0.56	0.93	1.12
MIT 9952-329	0	0	0.57	0.53	1.0	0.98
MIT 9952-330	0	0	0.59	0.56	1.02	1.07
MIT 9952-331	0	0	0.63	0.35	1.05	1.0
MIT 9952-332	0	0	0.69	0.67	1.26	1.25
MIT 9952-333	0	0	0.56	0.59	1.05	1.03
MIT 9952-334	0	0	0.57	0.55	0.95	0.98
MIT 9952-335	0	0	0.57	0.49	1.0	0.95
MIT 9952-336	0	0	0.54	0.58	1.1	1.14
MIT 9952-337	0	0	0.6	0.57	0.92	0.96
MIT 9952-338 (9 th)	0	0	0.61	0.6	1.01	1.13
MIT 9952-339	0	0	0.58	0.54	0.94	0.93
MIT 9952-340	0	0	0.48	0.44	0.9	0.96
MIT 9952-341	2	2	0.61	0.51	0.99	1.01
MIT 9952-342	0	0	0.43	0.44	0.92	0.97

(B L T により選択的脂質取り込みの障害は、特異的である)

B L T 障害の特異性を、[³ H] C E 取り込みを 9 5 % 障害する濃度 (I C ₅₀ 9 5) でいくつかの他の細胞特性に対するそれらの B L T の影響を試験することによって、試験した (図 3) 。上記 B L T のうちのいずれも、アクチンネットワークおよびチューブリンネットワークの完全性を破壊しなかった。これらはまた、蛍光標識したエンドサイトーシスレセプターリガンドであるトランスフェリンおよび上皮増殖因子の取り込みを障害することも、それらの細胞内分布を変化させることもなかった。上記 B L T はまた、細胞表面から、部分的にコレステロールリッチな脂質漂流物 (r a f t) およびスフィンゴ脂質リッチな脂質漂流物 (r a f t) に依存すると考えられる経路 (L e n c e r ら (1 9 9 9) B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 1 4 5 0 、 1 7 7 ~ 1 9 0) を通る、核周囲領域への、蛍光標識コレラ毒素の取り込みを障害しなかった。さらに、B L T は、増強型緑色蛍光タンパク質 - 標識した内在性ウイルス膜糖タンパク質である V S V G (V S V G ^{t s 0 4 5} - E G F P) の輸送の分析によって評価した場合、その分泌経路を妨害しなかった。従って、B L T は、クラスリン依存性細胞内膜輸送およびクラスリン非依存性細胞内膜輸送においても、細胞骨格の組織化においても、一般的欠損を誘導せず、これら

の基準によって、SR-BI依存性脂質取り込みの特異的インヒビターである。

【0068】

(BLTは、細胞からHDLへのSR-BI媒介性コレステロール流出を阻害する)
HDLからの選択的脂質取り込みを媒介することに加えて、SR-BIは、細胞からHDL粒子への非エステル化コレステロールの流出を促進し得る(Jianら(1998) J Biol Chem 273、5599~606、Jiら(1997) J Biol Chem 272、20982~5)。上記BLTがこのSR-BI媒介性脂質輸送経路を阻害し得るか否かを決定するために、細胞を、 $[^3\text{H}]$ コレステロールで標識し、非標識HDLへのその流出を、上記BLTの存在下または非存在下で測定した。(図2C、表II)。
細胞を、 $50\mu\text{M}$ BLT-1(MIT9952-53)の非存在下(上図)または存在下(下図)で3時間インキュベートし、エピ蛍光顕微鏡を使用して、蛍光標識したトランスフェリン(A、B; HeLa細胞)およびEGF(C、D; HeLa細胞)のクラスリン依存性エンドサイトーシス; 蛍光標識したコレラ毒素のクラスリン非依存性エンドサイトーシス(E、F; BSC-1細胞)、ならびにERから細胞表面への温度感受性蛍光膜タンパク質VSVG^{ts045}-EGFPの輸送(G、H; BSC-1細胞)といった、細胞活性をモニターした。さらに、アクチン細胞骨格の細胞内分布(ローダミン標識ファロイジンを用いて可視化した)およびチューブリンネットワークの細胞内分布(-チューブリンに特異的な蛍光標識抗体を用いて可視化。K、L; BSC-1細胞)を測定した。BLT-1(MIT9952-53)および他のBLT(示さず)は、これらの細胞特性または細胞活性のいずれに対しても、影響を有さなかった。

10

20

【0069】

表IIIにおいて示されるように、すべてのBLTは、SR-BI媒介性コレステロール流出を、 $[^3\text{H}]$ CE取り込みについての相対能力と類似する相対能力(IC_{FC}50)で阻害した。しかし、BLT-3(MIT9952-19)、BLT-4(MMIT9952-29)およびBLT-5(MIT9952-6)の場合には、流出のIC_{FC}50は、取り込みについてよりも高かった。このことは、上記BLTは、取り込み機構と流出機構との間に差があり得ることを明らかにし得ることを示唆する。上記BLTは、SR-BI非依存性流出(特異的抗SR-BI遮断抗体KKB-1によって阻害されなかった)(Kapoorら(2000) Journal of Cell Biology 150、975~88)に対してほとんど影響を有さなかった。比較的低レベルの内因性SR-BIを発現する非トランスフェクトldlA-7細胞において、全コレステロール流出およびSR-BI依存性(例えば、KKB-1により阻害可能な)コレステロール流出は、ldlA[mSR-BI]細胞においてよりもかなり低かった(約5~10分の1)。上記BLTは、ldlA-7細胞における低いSR-BI依存性コレステロール流出を阻害可能であったが、同様に低いSR-BI非依存性流出に対しては、何ら阻害効果を有さなかった。

30

【0070】

(表III)

【0071】

【表 3】

		BLT-1		BLT-2		BLT-3		BLT-4		BLT-5		Ro BLT	
		平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
(A) EC50 (μM)													
DLI-HDL 取り込み	3	0.06 ± 0.04	0.35 ± 0.18	0.51 ± 0.15	2.0 ± 1.0	7.1 ± 3.7	-	-	-	-	-	-	-
[³ H]CEt HDL 取り込み	6	0.11 ± 0.08	0.24 ± 0.1	2.3 ± 1.5	3.9 ¹ ± 0.76	13.8 ¹ ± 8.5	-	-	-	-	-	-	-
(Y1-BS1 細胞)	2	0.38 NA	0.41 NA	1.7 NA	4.4 NA	8.0 NA	-	-	-	-	-	-	-
[³ H] コレステロール 流出	3	0.15 ± 0.09	0.47 ± 0.23	17.2 ± 4.0	54.9 ± 35.2	75.3 ± 40.1	-	-	-	-	-	-	-
¹²⁵ I-HDL	3	0.088 ± 0.05	0.25 ± 0.13	46.5 ± 49.3	24.9 ± 14.8	18.0 ± 3.7	-	-	-	-	-	-	-
(B) 結合パラメーター													
見かけの K _d (μg ml ⁻¹)	3	4.7 ± 0.05	6.0 ± 6.0	8.0 ± 4.0	8.9 ± 2.3	12.0 ± 1.6	16.6 ± 1.5	-	-	-	-	-	-
K _{on} (分 ⁻¹)	2	0.06 NA	0.062 NA	0.08 NA	0.082 NA	0.079 NA	0.11 NA	-	-	-	-	-	-
B _{max} (%)		95.8 ± 10.1	93.0 ± 20.5	85.8 ± 15.8	79.9 ± 15.9	92.1 ± 36.8	100.0 ± 18.4	-	-	-	-	-	-
EC ₅₀ (μM)								-	-	-	-	-	-

¹n=5

脚注：すべての実験には、記載した場合以外は、Id1A[mSR-BI]細胞を用いた。

(BLTは、SR-BIの表面発現を変化させない)

BLTがその細胞表面発現を減少することによりSR-BI機能を阻害したか否かを決定するために、本発明者らは、KKB-1抗mSR-BI抗体およびフローサイトメトリーを使用して、表面発現を測定した。図4は、ICCE95(BLT1(MIT9952-53)およびBLT2(MIT9952-61)については1μM、BLT3~5(MIT9952-19、MIT9952-29、およびMIT9952-6)については50μMに対応する)での3時間のインキュベーションの後に、BLTは、Id1A[mSR-BI]細胞の表面上でのmSR-BIの発現を変化しなかったことを示す。

【0072】

(BLTは、SR-BIに対するHDLの結合を増強する)

上記BLTは、SR-BIに対するHDLの結合を阻害することにより機能することが、まず予期された。しかし、細胞を、亜飽和濃度の [³H]CE-HDLまたは¹²⁵I標識HDL(¹²⁵I-HDL)のいずれか(10μgタンパク質/ml)および漸増量の化合物(図5)とともにインキュベートした場合、[³H]CE取り込み(実線、記号なし、図2Bからのデータ)の減少および[³H]コレステロール流出(破線、図2Cからのデータ)の減少には、対応する¹²⁵I-HDL結合の増加(実線、四角の記号)が付随した。¹²⁵I-HDL結合の濃度依存性を、ICCE95濃度でのBLTの存在下または非存在下で測定した(図6および表II)。上記BLTは、結合部位の数(B_{max})を実質的には変化させなかったが、むしろ、HDLについてのSR-BIの親和性の小さいが有意な増加(より低い見かけのK_d)を誘導した。さらに、上記BLTは、SR-BIからの¹²⁵I-HDLの解離速度を減少させた(表II)。このことは、上記BLTにより誘導されるより緊密な結合は、少なくとも部分的には、上記解離速度の減少に起因したことを示す。

【0073】

(考察)

表Iに示される、SR-BI媒介性脂質輸送を変化させる200個の化合物が、インビトロアッセイを使用して同定された。試験の結果が、表IIに示される。BLT-1(MIT9952-53)~BLT-5(MIT9952-6)は、HDLレセプターであるSR-BIによって媒介される、HDLと細胞との間の脂質輸送を阻害する低分子として同定された。BLTは、HDLコレステリルエーテルの選択的な細胞脂質取り込みおよびHDLへの細胞コレステロールの流出の両方を阻害した。上記BLTの阻害効果は、特異的(例えば、これらは、SR-BI結合を特異的に変化させる)である。なぜなら、これらは、活性SR-BIレセプターの発現を必要とし、かつこれらは、いくつかのクラスリン依存性エンドサイトーシス経路およびクラスリン非依存性エンドサイトーシス経路を妨

10

20

30

40

50

害せず、その分泌経路も、アクチン細胞骨格ネットワークもチューブリン細胞骨格ネットワークも妨害しなかったからである。顕著なことに、BLTによる脂質輸送の障害は、増強されたHDL結合親和性（減少した解離速度）を伴った。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1A】図1A～図1Cは、HDLと細胞との間のSR-BI媒介性脂質輸送の、BLTによる障害の濃度依存性のグラフである。LDLA[mSR-BI]細胞を、指示した濃度のBLTとともにインキュベートした。(A)DiI-HDLからのDiI取り込み、(B)[³H]CE-HDLからの[³H]CE取り込み、および(C)細胞からHDLへの[³H]コレステロールの流出に対する、BLTの影響が、決定された。コントロール値の100%は、(A)50.6ng HDLタンパク質等価物/ウェル(384ウェルプレート)、および(B)3908ng HDLタンパク質等価物/mg細胞タンパク質であった。(C)において、データは正規化されて、化合物の非存在下での細胞からHDLへと輸送された[³H]コレステロールの最大量(合計の55.7%)が、100%に設定された。0%値は、BLTがなく、かつ飽和阻害量の特異的抗SR-BI遮断モノクローナル抗体KKB-1の存在下で、LDLA[mSR-BI]細胞からHDLへと輸送された[³H]コレステロールの流出(合計の15%)に対応する。KKBIの非存在下または存在下で測定されたLDLA-7細胞からの[³H]コレステロールの流出は、それぞれ、全細胞[³H]コレステロールの15%および15%であった。

【図1B】図1A～図1Cは、HDLと細胞との間のSR-BI媒介性脂質輸送の、BLTによる障害の濃度依存性のグラフである。LDLA[mSR-BI]細胞を、指示した濃度のBLTとともにインキュベートした。(A)DiI-HDLからのDiI取り込み、(B)[³H]CE-HDLからの[³H]CE取り込み、および(C)細胞からHDLへの[³H]コレステロールの流出に対する、BLTの影響が、決定された。コントロール値の100%は、(A)50.6ng HDLタンパク質等価物/ウェル(384ウェルプレート)、および(B)3908ng HDLタンパク質等価物/mg細胞タンパク質であった。(C)において、データは正規化されて、化合物の非存在下での細胞からHDLへと輸送された[³H]コレステロールの最大量(合計の55.7%)が、100%に設定された。0%値は、BLTがなく、かつ飽和阻害量の特異的抗SR-BI遮断モノクローナル抗体KKB-1の存在下で、LDLA[mSR-BI]細胞からHDLへと輸送された[³H]コレステロールの流出(合計の15%)に対応する。KKBIの非存在下または存在下で測定されたLDLA-7細胞からの[³H]コレステロールの流出は、それぞれ、全細胞[³H]コレステロールの15%および15%であった。

【図1C】図1A～図1Cは、HDLと細胞との間のSR-BI媒介性脂質輸送の、BLTによる障害の濃度依存性のグラフである。LDLA[mSR-BI]細胞を、指示した濃度のBLTとともにインキュベートした。(A)DiI-HDLからのDiI取り込み、(B)[³H]CE-HDLからの[³H]CE取り込み、および(C)細胞からHDLへの[³H]コレステロールの流出に対する、BLTの影響が、決定された。コントロール値の100%は、(A)50.6ng HDLタンパク質等価物/ウェル(384ウェルプレート)、および(B)3908ng HDLタンパク質等価物/mg細胞タンパク質であった。(C)において、データは正規化されて、化合物の非存在下での細胞からHDLへと輸送された[³H]コレステロールの最大量(合計の55.7%)が、100%に設定された。0%値は、BLTがなく、かつ飽和阻害量の特異的抗SR-BI遮断モノクローナル抗体KKB-1の存在下で、LDLA[mSR-BI]細胞からHDLへと輸送された[³H]コレステロールの流出(合計の15%)に対応する。KKBIの非存在下または存在下で測定されたLDLA-7細胞からの[³H]コレステロールの流出は、それぞれ、全細胞[³H]コレステロールの15%および15%であった。

【図2A】図2A～図2Dは、SR-BIの細胞表面発現のグラフである。LDLA[mSR-BI]細胞およびLDLA-7細胞を、BLT(その対応するIC₅₀濃度)(BLT-1[MIT9952-53]およびBLT-2[MIT9952-61])につ

いて、 $1\mu\text{M}$ ；BLT-3 [MIT9952-19]；BLT-4 [MIT9952-29] および BLT-5 [MIT9952-6] について、 $50\mu\text{M}$ で3時間処理したか、または処理せず、その後、フローサイトメトリーによってSR-BIの表面発現レベルを決定した。図A～Cは、それぞれ、BLTを用いないLDLA [mSR-BI] 細胞についての表面発現、 $1\mu\text{M}$ BLT-1 (MIT9952-53) で処理したLDLA [mSR-BI] 細胞についての表面発現、およびBLTを用いないLDLA-7細胞についての表面発現のヒストグラムを示す。図Dは、5つのすべてのBLTについてのLDLA [mSR-BI] 細胞における結果を要約しており、化合物を用いずに決定した値を100%に設定した。nは、独立した測定の数であり、SDは、標準偏差である。

【図2B】図2A～図2Dは、SR-BIの細胞表面発現のグラフである。LDLA [mSR-BI] 細胞およびLDLA-7細胞を、BLT (その対応するIC₅₀濃度) (BLT-1 [MIT9952-53] およびBLT-2 [MIT9952-61] について、 $1\mu\text{M}$ ；BLT-3 [MIT9952-19]；BLT-4 [MIT9952-29] およびBLT-5 [MIT9952-6] について、 $50\mu\text{M}$) で3時間処理したか、または処理せず、その後、フローサイトメトリーによってSR-BIの表面発現レベルを決定した。図A～Cは、それぞれ、BLTを用いないLDLA [mSR-BI] 細胞についての表面発現、 $1\mu\text{M}$ BLT-1 (MIT9952-53) で処理したLDLA [mSR-BI] 細胞についての表面発現、およびBLTを用いないLDLA-7細胞についての表面発現のヒストグラムを示す。図Dは、5つのすべてのBLTについてのLDLA [mSR-BI] 細胞における結果を要約しており、化合物を用いずに決定した値を100%に設定した。nは、独立した測定の数であり、SDは、標準偏差である。

【図2C】図2A～図2Dは、SR-BIの細胞表面発現のグラフである。LDLA [mSR-BI] 細胞およびLDLA-7細胞を、BLT (その対応するIC₅₀濃度) (BLT-1 [MIT9952-53] およびBLT-2 [MIT9952-61] について、 $1\mu\text{M}$ ；BLT-3 [MIT9952-19]；BLT-4 [MIT9952-29] およびBLT-5 [MIT9952-6] について、 $50\mu\text{M}$) で3時間処理したか、または処理せず、その後、フローサイトメトリーによってSR-BIの表面発現レベルを決定した。図A～Cは、それぞれ、BLTを用いないLDLA [mSR-BI] 細胞についての表面発現、 $1\mu\text{M}$ BLT-1 (MIT9952-53) で処理したLDLA [mSR-BI] 細胞についての表面発現、およびBLTを用いないLDLA-7細胞についての表面発現のヒストグラムを示す。図Dは、5つのすべてのBLTについてのLDLA [mSR-BI] 細胞における結果を要約しており、化合物を用いずに決定した値を100%に設定した。nは、独立した測定の数であり、SDは、標準偏差である。

【図2D】図2A～図2Dは、SR-BIの細胞表面発現のグラフである。LDLA [mSR-BI] 細胞およびLDLA-7細胞を、BLT (その対応するIC₅₀濃度) (BLT-1 [MIT9952-53] およびBLT-2 [MIT9952-61] について、 $1\mu\text{M}$ ；BLT-3 [MIT9952-19]；BLT-4 [MIT9952-29] およびBLT-5 [MIT9952-6] について、 $50\mu\text{M}$) で3時間処理したか、または処理せず、その後、フローサイトメトリーによってSR-BIの表面発現レベルを決定した。図A～Cは、それぞれ、BLTを用いないLDLA [mSR-BI] 細胞についての表面発現、 $1\mu\text{M}$ BLT-1 (MIT9952-53) で処理したLDLA [mSR-BI] 細胞についての表面発現、およびBLTを用いないLDLA-7細胞についての表面発現のヒストグラムを示す。図Dは、5つのすべてのBLTについてのLDLA [mSR-BI] 細胞における結果を要約しており、化合物を用いずに決定した値を100%に設定した。nは、独立した測定の数であり、SDは、標準偏差である。

【図3A】図3A～図3Eは、HDLからのSR-BI媒介性コレステロールエーテル取り込み、HDLへの細胞コレステロール流出、およびHDL結合に対する、BLTの影響を示す。[³H]CE-HDLからの[³H]CEのSR-BI媒介性取り込み(実線、記号なし)、細胞からHDLへの[³H]コレステロールの流出(破線)、または細胞への¹²⁵I-HDLの結合(実線、黒塗り記号)に対する、示した濃度のBLTの影響(

図 A ~ E) を、LDL A [mSR - BI] 細胞を使用して決定した。比較を単純にするために、観察された最小の $[^3\text{H}]$ CE 取り込み値および $[^3\text{H}]$ コレステロール流出値 (図 2 から) を 0 % として、BLT の非存在下での値を 100 % として、比較した。BLT の非存在下での ^{125}I - HDL 結合についての 100 % コントロール値は、403 ng HDL タンパク質 / mg 細胞タンパク質であった。

【図 3 B】図 3 A ~ 図 3 E は、HDL からの SR - BI 媒介性コレステロールエーテル取り込み、HDL への細胞コレステロール流出、および HDL 結合に対する、BLT の影響を示す。 $[^3\text{H}]$ CE - HDL からの $[^3\text{H}]$ CE の SR - BI 媒介性取り込み (実線、記号なし)、細胞から HDL への $[^3\text{H}]$ コレステロールの流出 (破線)、または細胞への ^{125}I - HDL の結合 (実線、黒塗り記号) に対する、示した濃度の BLT の影響 (図 A ~ E) を、LDL A [mSR - BI] 細胞を使用して決定した。比較を単純にするために、観察された最小の $[^3\text{H}]$ CE 取り込み値および $[^3\text{H}]$ コレステロール流出値 (図 2 から) を 0 % として、BLT の非存在下での値を 100 % として、比較した。BLT の非存在下での ^{125}I - HDL 結合についての 100 % コントロール値は、403 ng HDL タンパク質 / mg 細胞タンパク質であった。

【図 3 C】図 3 A ~ 図 3 E は、HDL からの SR - BI 媒介性コレステロールエーテル取り込み、HDL への細胞コレステロール流出、および HDL 結合に対する、BLT の影響を示す。 $[^3\text{H}]$ CE - HDL からの $[^3\text{H}]$ CE の SR - BI 媒介性取り込み (実線、記号なし)、細胞から HDL への $[^3\text{H}]$ コレステロールの流出 (破線)、または細胞への ^{125}I - HDL の結合 (実線、黒塗り記号) に対する、示した濃度の BLT の影響 (図 A ~ E) を、LDL A [mSR - BI] 細胞を使用して決定した。比較を単純にするために、観察された最小の $[^3\text{H}]$ CE 取り込み値および $[^3\text{H}]$ コレステロール流出値 (図 2 から) を 0 % として、BLT の非存在下での値を 100 % として、比較した。BLT の非存在下での ^{125}I - HDL 結合についての 100 % コントロール値は、403 ng HDL タンパク質 / mg 細胞タンパク質であった。

【図 3 D】図 3 A ~ 図 3 E は、HDL からの SR - BI 媒介性コレステロールエーテル取り込み、HDL への細胞コレステロール流出、および HDL 結合に対する、BLT の影響を示す。 $[^3\text{H}]$ CE - HDL からの $[^3\text{H}]$ CE の SR - BI 媒介性取り込み (実線、記号なし)、細胞から HDL への $[^3\text{H}]$ コレステロールの流出 (破線)、または細胞への ^{125}I - HDL の結合 (実線、黒塗り記号) に対する、示した濃度の BLT の影響 (図 A ~ E) を、LDL A [mSR - BI] 細胞を使用して決定した。比較を単純にするために、観察された最小の $[^3\text{H}]$ CE 取り込み値および $[^3\text{H}]$ コレステロール流出値 (図 2 から) を 0 % として、BLT の非存在下での値を 100 % として、比較した。BLT の非存在下での ^{125}I - HDL 結合についての 100 % コントロール値は、403 ng HDL タンパク質 / mg 細胞タンパク質であった。

【図 3 E】図 3 A ~ 図 3 E は、HDL からの SR - BI 媒介性コレステロールエーテル取り込み、HDL への細胞コレステロール流出、および HDL 結合に対する、BLT の影響を示す。 $[^3\text{H}]$ CE - HDL からの $[^3\text{H}]$ CE の SR - BI 媒介性取り込み (実線、記号なし)、細胞から HDL への $[^3\text{H}]$ コレステロールの流出 (破線)、または細胞への ^{125}I - HDL の結合 (実線、黒塗り記号) に対する、示した濃度の BLT の影響 (図 A ~ E) を、LDL A [mSR - BI] 細胞を使用して決定した。比較を単純にするために、観察された最小の $[^3\text{H}]$ CE 取り込み値および $[^3\text{H}]$ コレステロール流出値 (図 2 から) を 0 % として、BLT の非存在下での値を 100 % として、比較した。BLT の非存在下での ^{125}I - HDL 結合についての 100 % コントロール値は、403 ng HDL タンパク質 / mg 細胞タンパク質であった。

【図 4】図 4 は、LDL A [mSR - BI] 細胞への ^{125}I - HDL 結合の濃度依存性に対する、BLT - 1 (MIT 9952 - 53) の影響のグラフである。LDL A [mSR - BI] 細胞への ^{125}I - HDL の結合を、1 μM BLT - 1 (MIT 9952 - 53; IC₅₀ 95) の存在下 (青色) または非存在下 (黒色) において、示した HDL 濃度にて、二連で決定した。各値は、BLT - 1 (MIT 9952 - 53) の存在下での

10

20

30

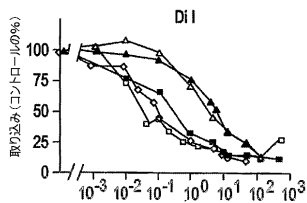
40

50

LDL A [mSR - BI] 細胞に対する、40倍過剰な非標識HDLの疎な時下での¹²⁵I - HDLの結合について、補正した。

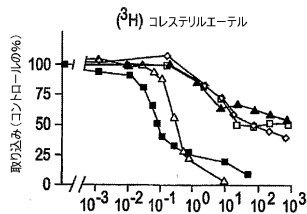
【図1A】

FIG. 1A



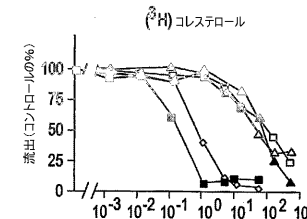
【図1B】

FIG. 1B



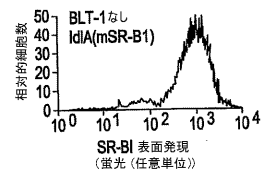
【図1C】

FIG. 1C



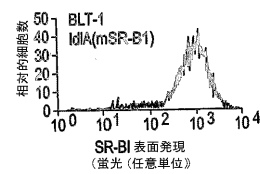
【図2A】

FIG. 2A



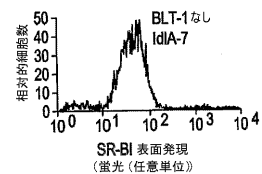
【図2B】

FIG. 2B



【図2C】

FIG. 2C

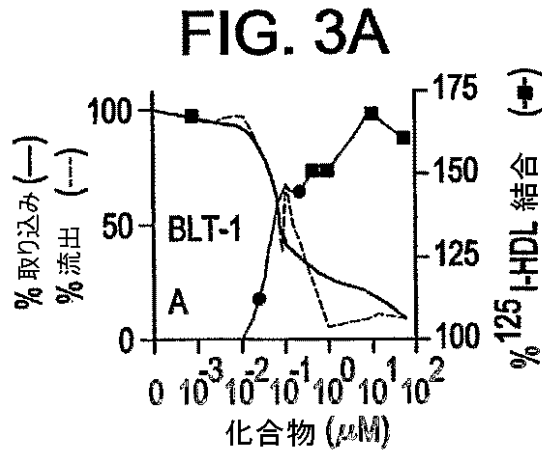


【図 2 D】

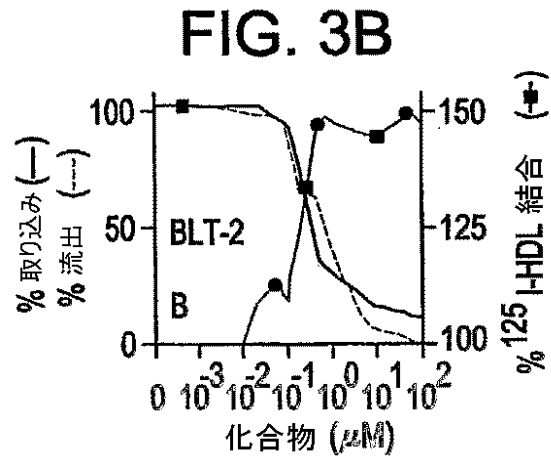
FIG. 2D

化合物	n	SR-BI表面 発現%±SD
BLTなし	8	100.0
BLT-1	6	94.4 ± 4.5
BLT-2	4	99.6 ± 10.1
BLT-3	3	91.7 ± 10.7
BLT-4	3	97.2 ± 5.1
BLT-5	5	102.5 ± 2.7

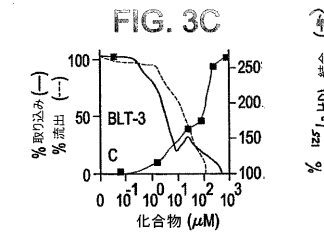
【図 3 A】



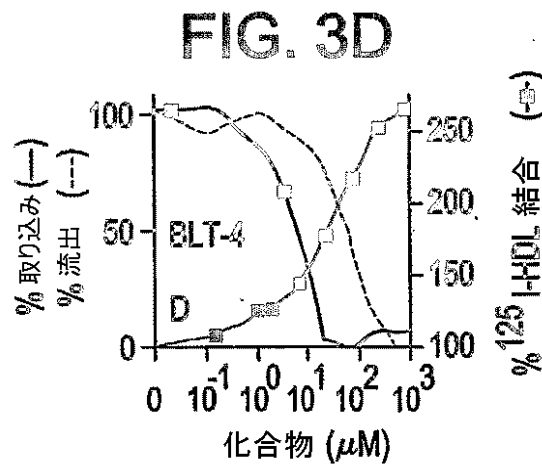
【図 3 B】



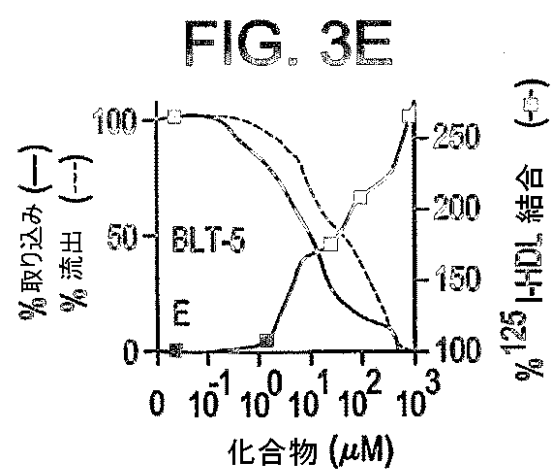
【図 3 C】



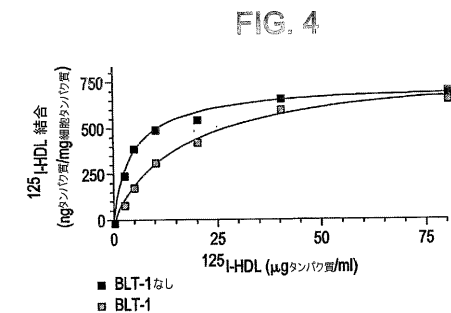
【図 3 D】



【図 3 E】



【図 4】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/31918
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 31/56, 31/255, 31/192, 31/145, 38/00; A61P 3/06 US CL : 514/ 169, 177, 182, 517, 571, 649 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0099040 A1 (KRIEGER) 25 July 2002 (25.07.2002) See entire document especially examples 1-8.	1-17
X	US 2002/0016364 A1 (LUCHOOMUN et al) 07 February 2002 (07.02.2002), see entire document especially examples 1-7.	1-17
X	US 5,965,790 A (ACTON) 12 October 1999 (12.10.1999), see entire document.	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 May 2004 (27.05.2004)		Date of mailing of the international search report 08 JUL 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Venkataraman Balasubramanian Telephone No. (703) 308-1235 <i>Janice Ford for</i>

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)
A 6 1 P 15/18 (2006.01)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)
C 0 7 D 265/02 (2006.01)
C 0 7 D 277/64 (2006.01)
C 0 7 D 277/66 (2006.01)
C 0 7 D 277/82 (2006.01)
C 0 7 D 495/04 (2006.01)
A 6 1 K 31/519 (2006.01)
C 0 7 D 235/14 (2006.01)
A 6 1 K 31/4184 (2006.01)
C 0 7 D 235/22 (2006.01)
C 0 7 D 317/32 (2006.01)
C 0 7 D 317/28 (2006.01)
C 0 7 D 307/79 (2006.01)
A 6 1 K 31/343 (2006.01)
C 0 7 D 251/18 (2006.01)
C 0 7 D 251/70 (2006.01)
C 0 7 D 251/22 (2006.01)
C 0 7 D 295/10 (2006.01)
C 0 7 D 295/12 (2006.01)
C 0 7 D 295/20 (2006.01)
C 0 7 D 215/28 (2006.01)
A 6 1 K 31/53 (2006.01)
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)
A 6 1 K 31/4453 (2006.01)
A 6 1 K 31/538 (2006.01)
A 6 1 K 31/4015 (2006.01)
A 6 1 K 31/402 (2006.01)
A 6 1 K 31/4245 (2006.01)
A 6 1 K 31/423 (2006.01)
C 0 7 D 307/73 (2006.01)
A 6 1 K 31/341 (2006.01)
C 0 7 D 307/52 (2006.01)
C 0 7 D 209/44 (2006.01)
C 0 7 D 209/88 (2006.01)
C 0 7 D 207/416 (2006.01)
C 0 7 D 209/86 (2006.01)
C 0 7 D 263/56 (2006.01)
C 0 7 D 209/08 (2006.01)
C 0 7 D 261/14 (2006.01)
A 6 1 K 31/4045 (2006.01)
A 6 1 K 31/454 (2006.01)
A 6 1 K 31/451 (2006.01)
A 6 1 K 31/4035 (2006.01)
C 0 7 D 209/42 (2006.01)

A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 15/18
G 0 1 N 33/50
G 0 1 N 33/15
C 0 7 D 265/02
C 0 7 D 277/64
C 0 7 D 277/66
C 0 7 D 277/82
C 0 7 D 495/04
A 6 1 K 31/519
C 0 7 D 235/14
A 6 1 K 31/4184
C 0 7 D 235/22
C 0 7 D 317/32
C 0 7 D 317/28
C 0 7 D 307/79
A 6 1 K 31/343
C 0 7 D 251/18
C 0 7 D 251/70
C 0 7 D 251/22
C 0 7 D 295/10
C 0 7 D 295/12
C 0 7 D 295/20
C 0 7 D 215/28
A 6 1 K 31/53
A 6 1 K 31/5377
A 6 1 K 31/4453
A 6 1 K 31/538
A 6 1 K 31/4015
A 6 1 K 31/402
A 6 1 K 31/4245
A 6 1 K 31/423
C 0 7 D 307/73
A 6 1 K 31/341
C 0 7 D 307/52
C 0 7 D 209/44
C 0 7 D 209/88
C 0 7 D 207/416
C 0 7 D 209/86
C 0 7 D 263/56
C 0 7 D 209/08
C 0 7 D 261/14
A 6 1 K 31/4045
A 6 1 K 31/454
A 6 1 K 31/451
A 6 1 K 31/4035
C 0 7 D 209/42

Z

Z

1 0 5 Z

E

F

C

Z

Z

A

4 C 0 3 4

4 C 0 3 6

4 C 0 3 7

4 C 0 5 0

4 C 0 5 4

4 C 0 5 5

4 C 0 5 6

4 C 0 6 3

4 C 0 6 4

4 C 0 6 5

4 C 0 6 9

4 C 0 7 1

4 C 0 7 2

4 C 0 8 4

4 C 0 8 6

4 C 2 0 4

4 C 2 0 6

4 H 0 0 6

C 0 7 D 209/16	(2006.01)	C 0 7 D 209/16	
C 0 7 D 211/52	(2006.01)	C 0 7 D 211/52	
C 0 7 D 209/48	(2006.01)	C 0 7 D 209/48	Z
C 0 7 D 265/36	(2006.01)	C 0 7 D 265/36	
C 0 7 D 207/27	(2006.01)	C 0 7 D 207/27	Z
C 0 7 D 207/335	(2006.01)	C 0 7 D 207/335	
C 0 7 D 271/06	(2006.01)	C 0 7 D 271/06	
C 0 7 D 209/12	(2006.01)	C 0 7 D 209/12	
C 0 7 D 209/40	(2006.01)	C 0 7 D 209/40	
C 0 7 D 207/16	(2006.01)	C 0 7 D 207/16	
C 0 7 D 401/04	(2006.01)	C 0 7 D 401/04	
C 0 7 D 401/12	(2006.01)	C 0 7 D 401/12	
C 0 7 D 403/10	(2006.01)	C 0 7 D 403/10	
C 0 7 D 405/04	(2006.01)	C 0 7 D 405/04	
C 0 7 D 405/12	(2006.01)	C 0 7 D 405/12	
C 0 7 D 409/14	(2006.01)	C 0 7 D 409/14	
C 0 7 D 413/04	(2006.01)	C 0 7 D 413/04	
C 0 7 D 413/06	(2006.01)	C 0 7 D 413/06	
C 0 7 D 417/04	(2006.01)	C 0 7 D 417/04	
C 0 7 D 417/06	(2006.01)	C 0 7 D 417/06	
C 0 7 D 417/14	(2006.01)	C 0 7 D 417/14	
A 6 1 K 31/4025	(2006.01)	A 6 1 K 31/4025	
A 6 1 K 31/422	(2006.01)	A 6 1 K 31/422	
A 6 1 K 31/443	(2006.01)	A 6 1 K 31/443	
A 6 1 K 31/4436	(2006.01)	A 6 1 K 31/4436	
A 6 1 K 31/4709	(2006.01)	A 6 1 K 31/4709	
A 6 1 K 31/473	(2006.01)	A 6 1 K 31/473	
A 6 1 K 31/502	(2006.01)	A 6 1 K 31/502	
A 6 1 K 31/554	(2006.01)	A 6 1 K 31/554	
C 0 7 D 333/22	(2006.01)	C 0 7 D 333/22	
C 0 7 D 333/38	(2006.01)	C 0 7 D 333/38	
C 0 7 D 333/68	(2006.01)	C 0 7 D 333/68	
C 0 7 D 327/00	(2006.01)	C 0 7 D 327/00	
A 6 1 K 31/381	(2006.01)	A 6 1 K 31/381	
A 6 1 K 31/39	(2006.01)	A 6 1 K 31/39	
C 0 7 D 231/38	(2006.01)	C 0 7 D 231/38	Z
A 6 1 K 31/415	(2006.01)	A 6 1 K 31/415	
C 0 7 D 233/42	(2006.01)	C 0 7 D 233/42	
C 0 7 D 231/16	(2006.01)	C 0 7 D 231/16	
C 0 7 D 231/06	(2006.01)	C 0 7 D 231/06	C
C 0 7 D 205/08	(2006.01)	C 0 7 D 205/08	Z
A 6 1 K 31/337	(2006.01)	A 6 1 K 31/337	
C 0 7 D 277/68	(2006.01)	C 0 7 D 277/68	
A 6 1 K 31/428	(2006.01)	A 6 1 K 31/428	
C 0 7 D 279/16	(2006.01)	C 0 7 D 279/16	
A 6 1 K 31/5415	(2006.01)	A 6 1 K 31/5415	
C 0 7 D 285/08	(2006.01)	C 0 7 D 285/08	
A 6 1 K 31/433	(2006.01)	A 6 1 K 31/433	
C 0 7 D 277/20	(2006.01)	C 0 7 D 277/42	
C 0 7 D 277/42	(2006.01)	A 6 1 K 31/426	

A 6 1 K 31/426	(2006.01)	C 0 7 D 277/32	
C 0 7 D 277/32	(2006.01)	C 0 7 D 277/36	
C 0 7 D 277/36	(2006.01)	C 0 7 D 277/74	
C 0 7 D 277/74	(2006.01)	C 0 7 D 277/48	
C 0 7 D 277/48	(2006.01)	C 0 7 D 319/18	
C 0 7 D 319/18	(2006.01)	A 6 1 K 31/36	
A 6 1 K 31/36	(2006.01)	C 0 7 D 223/22	
C 0 7 D 223/22	(2006.01)	C 0 7 D 217/24	
C 0 7 D 217/24	(2006.01)	A 6 1 K 31/472	
A 6 1 K 31/472	(2006.01)	C 0 7 D 221/08	
C 0 7 D 221/08	(2006.01)	A 6 1 K 31/496	
A 6 1 K 31/496	(2006.01)	C 0 7 D 221/18	
C 0 7 D 221/18	(2006.01)	C 0 7 D 239/52	
C 0 7 D 239/52	(2006.01)	C 0 7 D 453/02	
C 0 7 D 453/02	(2006.01)	C 0 7 D 471/04	1 1 2 T
C 0 7 D 471/04	(2006.01)	C 0 7 D 487/04	1 4 3
C 0 7 D 487/04	(2006.01)	C 0 7 D 487/04	1 4 0
C 0 7 D 491/048	(2006.01)	C 0 7 D 491/048	
A 6 1 K 31/439	(2006.01)	A 6 1 K 31/439	
A 6 1 K 31/4375	(2006.01)	A 6 1 K 31/4375	
A 6 1 K 31/437	(2006.01)	A 6 1 K 31/437	
A 6 1 K 31/4355	(2006.01)	A 6 1 K 31/4355	
C 0 7 D 498/04	(2006.01)	C 0 7 D 498/04	1 0 3
C 0 7 C 211/53	(2006.01)	C 0 7 C 211/53	
C 0 7 C 211/50	(2006.01)	C 0 7 C 211/50	
C 0 7 C 215/26	(2006.01)	C 0 7 C 215/26	
C 0 7 C 219/22	(2006.01)	C 0 7 C 219/22	
C 0 7 C 69/157	(2006.01)	C 0 7 C 69/157	
C 0 7 C 251/86	(2006.01)	C 0 7 C 251/86	
C 0 7 C 233/15	(2006.01)	C 0 7 C 233/15	
C 0 7 C 233/76	(2006.01)	C 0 7 C 233/76	
C 0 7 C 233/07	(2006.01)	C 0 7 C 233/07	
C 0 7 C 251/88	(2006.01)	C 0 7 C 251/88	
C 0 7 C 275/34	(2006.01)	C 0 7 C 275/34	
C 0 7 C 235/24	(2006.01)	C 0 7 C 235/24	Z
C 0 7 C 271/58	(2006.01)	C 0 7 C 271/58	
C 0 7 C 271/38	(2006.01)	C 0 7 C 271/38	
C 0 7 C 275/28	(2006.01)	C 0 7 C 275/28	
C 0 7 C 243/38	(2006.01)	C 0 7 C 243/38	
C 0 7 D 213/79	(2006.01)	C 0 7 D 213/79	
A 6 1 K 31/4409	(2006.01)	A 6 1 K 31/4409	
C 0 7 C 337/06	(2006.01)	C 0 7 C 337/06	

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

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ニーランド, トーマス ジェイ. エフ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02143 ソマービル, リンカーン パークウェイ 3
2, アpartment ナンバー 3

(72)発明者 クリーガー, モンティ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02494, ニードハム, ウッドバイン サークル 3
3

(72)発明者 カークハウゼン, トマス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02135, ブライトン, スパーホーク ストリート
19 アール

F ターム(参考) 2G045 AA40 FA11 FB12

4C022 KA01

4C023 DA03 HA05

4C031 FA07

4C033 AD03 AD08 AD12 AD13 AD15 AD17 AD20 AE06 AE09 AE17
AE20

4C034 AM06 CJ03 DT06

4C036 AA07 AA17 AB20 AD05 AD27 AD30

4C037 HA25 HA26 MA02 PA08

4C050 AA01 AA08 BB05 BB07 CC08 CC16 EE01 EE04 FF01 FF02
GG03 GG04 HH01 HH04

4C054 AA02 BB01 CC02 EE04 EE14 FF05 FF24

4C055 AA01 BA03 BA05 BA57 CA01 DA06 DA33

4C056 AA01 AB02 AC01 AC02 AC05 AD01 AD03 AE03 CA03 CA09
CC01 CD01 FA07 FA08 FB01 FB09 FC014C063 AA01 AA03 BB01 BB02 BB03 BB06 BB08 BB09 CC16 CC31
CC52 CC62 CC75 CC79 CC81 CC92 DD03 DD06 DD07 DD12

DD14 DD26 DD31 DD37 DD44 EE01

4C064 AA06 CC01 DD04 EE01 FF01 GG03

4C065 AA04 BB09 CC09 DD02 EE02 HH01 JJ01 KK01 LL07 PP01

4C069 AA20 AB12 AC02 AC32

4C071 AA01 AA07 BB01 BB05 CC02 CC21 EE13 FF05 GG01 HH17
JJ01

4C072 AA01 AA07 BB02 BB06 CC03 CC11 EE02 FF03 GG07 HH02

4C084 AA16 NA14 ZA451 ZA861 ZC331

4C086 AA01 AA02 BC72 MA01 NA14 ZA45 ZA86 ZC33

4C204 BB01 CB03 CB04 CB25 DB14 DB18 DB30 DB31 EB02 EB03
FB01 FB08 FB16 FB27 GB01 GB17 GB21 GB24 GB26 GB32

4C206 AA01 AA02 HA08 HA30 NA14 ZA45 ZA86 ZC33

4H006 AA01 AA03 AB20 AB23 BJ50 BP10 BQ30

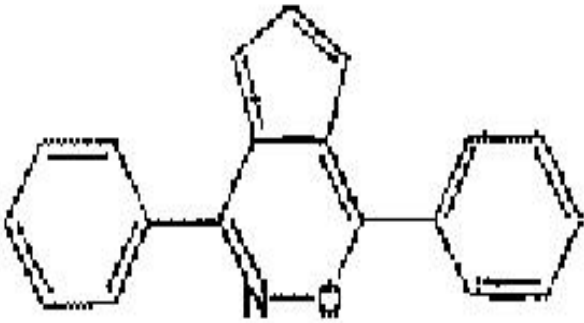
专利名称(译)	调节胆固醇转运的化合物		
公开(公告)号	JP2006515274A	公开(公告)日	2006-05-25
申请号	JP2004543548	申请日	2003-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	麻省理工学院 该CB伯爵生物医学研究所有限公司		
申请(专利权)人(译)	麻省理工学院 该CB伯爵生物医学研究所，公司		
[标]发明人	ニーランドトーマスジェイエフ クリーガーモンティ カークハウゼントマス		
发明人	ニーランド, トーマス ジェイ. エフ. クリーガー, モンティ カークハウゼン, トマス		
IPC分类号	C07C49/497 A61K45/00 A61K31/175 A61K31/536 A61K31/166 A61P9/10 A61P15/18 G01N33/50 G01N33/15 C07D265/02 C07D277/64 C07D277/66 C07D277/82 C07D495/04 A61K31/519 C07D235 /14 A61K31/4184 C07D235/22 C07D317/32 C07D317/28 C07D307/79 A61K31/343 C07D251/18 C07D251/70 C07D251/22 C07D295/10 C07D295/12 C07D295/20 C07D215/28 A61K31/53 A61K31 /5377 A61K31/4453 A61K31/538 A61K31/4015 A61K31/402 A61K31/4245 A61K31/423 C07D307/73 A61K31/341 C07D307/52 C07D209/44 C07D209/88 C07D207/416 C07D209/86 C07D263/56 C07D209 /08 C07D261/14 A61K31/4045 A61K31/454 A61K31/451 A61K31/4035 C07D209/42 C07D209/16 C07D211/52 C07D209/48 C07D265/36 C07D207/27 C07D207/335 C07D271/06 C07D209/12 C07D209 /40 C07D207/16 C07D401/04 C07D401/12 C07D403/10 C07D405/04 C07D405/12 C07D409/14 C07D413/04 C07D413/06 C07D417/04 C07D417/06 C07D417/14 A61K31/4025 A61K31/422 A61K31 /443 A61K31/4436 A61K31/4709 A61K31/473 A61K31/502 A61K31/554 C07D333/22 C07D333/38 C07D333/68 C07D327/00 A61K31/381 A61K31/39 C07D231/38 A61K31/415 C07D233/42 C07D231 /16 C07D231/06 C07D205/08 A61K31/337 C07D277/68 A61K31/428 C07D279/16 A61K31/5415 C07D285/08 A61K31/433 C07D277/20 C07D277/42 A61K31/426 C07D277/32 C07D277/36 C07D277 /74 C07D277/48 C07D319/18 A61K31/36 C07D223/22 C07D217/24 A61K31/472 C07D221/08 A61K31 /496 C07D221/18 C07D239/52 C07D453/02 C07D471/04 C07D487/04 C07D491/048 A61K31/439 A61K31/4375 A61K31/437 A61K31/4355 C07D498/04 C07C211/53 C07C211/50 C07C215/26 C07C219/22 C07C69/157 C07C251/86 C07C233/15 C07C233/76 C07C233/07 C07C251/88 C07C275 /34 C07C235/24 C07C271/58 C07C271/38 C07C275/28 C07C243/38 C07D213/79 A61K31/4409 C07C337/06 A61B A61K31/145 A61K31/192 A61K31/255 A61K31/56 A61K38/00 A61P3/06 G01N33 /53 G01N33/543		
CPC分类号	A61K31/145 A61K31/175 A61K31/192 A61K31/255 A61K31/536 A61K31/56 A61P15/18		
FI分类号	C07C49/497 A61K45/00 A61K31/175 A61K31/536 A61K31/166 A61P9/10 A61P15/18 G01N33/50.Z G01N33/15.Z C07D265/02 C07D277/64 C07D277/66 C07D277/82 C07D495/04.105.Z A61K31/519 C07D235/14 A61K31/4184 C07D235/22 C07D317/32 C07D317/28 C07D307/79 A61K31/343 C07D251 /18.E C07D251/70.F C07D251/22.C C07D295/10.Z C07D295/12.Z C07D295/20.A C07D215/28 A61K31 /53 A61K31/5377 A61K31/4453 A61K31/538 A61K31/4015 A61K31/402 A61K31/4245 A61K31/423 C07D307/73 A61K31/341 C07D307/52 C07D209/44 C07D209/88 C07D207/416 C07D209/86 C07D263 /56 C07D209/08 C07D261/14 A61K31/4045 A61K31/454 A61K31/451 A61K31/4035 C07D209/42 C07D209/16 C07D211/52 C07D209/48.Z C07D265/36 C07D207/27.Z C07D207/335 C07D271/06 C07D209/12 C07D209/40 C07D207/16 C07D401/04 C07D401/12 C07D403/10 C07D405/04 C07D405 /12 C07D409/14 C07D413/04 C07D413/06 C07D417/04 C07D417/06 C07D417/14 A61K31/4025 A61K31/422 A61K31/443 A61K31/4436 A61K31/4709 A61K31/473 A61K31/502 A61K31/554 C07D333 /22 C07D333/38 C07D333/68 C07D327/00 A61K31/381 A61K31/39 C07D231/38.Z A61K31/415		

C07D233/42 C07D231/16 C07D231/06.C C07D205/08.Z A61K31/337 C07D277/68 A61K31/428
C07D279/16 A61K31/5415 C07D285/08 A61K31/433 C07D277/42 A61K31/426 C07D277/32 C07D277
/36 C07D277/74 C07D277/48 C07D319/18 A61K31/36 C07D223/22 C07D217/24 A61K31/472
C07D221/08 A61K31/496 C07D221/18 C07D239/52 C07D453/02 C07D471/04.112.T C07D487/04.143
C07D487/04.140 C07D491/048 A61K31/439 A61K31/4375 A61K31/437 A61K31/4355 C07D498/04.
103 C07C211/53 C07C211/50 C07C215/26 C07C219/22 C07C69/157 C07C251/86 C07C233/15
C07C233/76 C07C233/07 C07C251/88 C07C275/34 C07C235/24.Z C07C271/58 C07C271/38
C07C275/28 C07C243/38 C07D213/79 A61K31/4409 C07C337/06

F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/FA11 2G045/FB12 4C022/KA01 4C023/DA03 4C023/HA05 4C031/FA07 4C033 /AD03 4C033/AD08 4C033/AD12 4C033/AD13 4C033/AD15 4C033/AD17 4C033/AD20 4C033/AE06 4C033/AE09 4C033/AE17 4C033/AE20 4C034/AM06 4C034/CJ03 4C034/DT06 4C036/AA07 4C036 /AA17 4C036/AB20 4C036/AD05 4C036/AD27 4C036/AD30 4C037/HA25 4C037/HA26 4C037/MA02 4C037/PA08 4C050/AA01 4C050/AA08 4C050/BB05 4C050/BB07 4C050/CC08 4C050/CC16 4C050 /EE01 4C050/EE04 4C050/FF01 4C050/FF02 4C050/GG03 4C050/GG04 4C050/HH01 4C050/HH04 4C054/AA02 4C054/BB01 4C054/CC02 4C054/EE04 4C054/EE14 4C054/FF05 4C054/FF24 4C055 /AA01 4C055/BA03 4C055/BA05 4C055/BA57 4C055/CA01 4C055/DA06 4C055/DA33 4C056/AA01 4C056/AB02 4C056/AC01 4C056/AC02 4C056/AC05 4C056/AD01 4C056/AD03 4C056/AE03 4C056 /CA03 4C056/CA09 4C056/CC01 4C056/CD01 4C056/FA07 4C056/FA08 4C056/FB01 4C056/FB09 4C056/FC01 4C063/AA01 4C063/AA03 4C063/BB01 4C063/BB02 4C063/BB03 4C063/BB06 4C063 /BB08 4C063/BB09 4C063/CC16 4C063/CC31 4C063/CC52 4C063/CC62 4C063/CC75 4C063/CC79 4C063/CC81 4C063/CC92 4C063/DD03 4C063/DD06 4C063/DD07 4C063/DD12 4C063/DD14 4C063 /DD26 4C063/DD31 4C063/DD37 4C063/DD44 4C063/EE01 4C064/AA06 4C064/CC01 4C064/DD04 4C064/EE01 4C064/FF01 4C064/GG03 4C065/AA04 4C065/BB09 4C065/CC09 4C065/DD02 4C065 /EE02 4C065/HH01 4C065/JJ01 4C065/KK01 4C065/LL07 4C065/PP01 4C069/AA20 4C069/AB12 4C069/AC02 4C069/AC32 4C071/AA01 4C071/AA07 4C071/BB01 4C071/BB05 4C071/CC02 4C071 /CC21 4C071/EE13 4C071/FF05 4C071/GG01 4C071/HH17 4C071/JJ01 4C072/AA01 4C072/AA07 4C072/BB02 4C072/BB06 4C072/CC03 4C072/CC11 4C072/EE02 4C072/FF03 4C072/GG07 4C072 /HH02 4C084/AA16 4C084/NA14 4C084/ZA451 4C084/ZA861 4C084/ZC331 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/BC72 4C086/MA01 4C086/NA14 4C086/ZA45 4C086/ZA86 4C086/ZC33 4C204/BB01 4C204/CB03 4C204/CB04 4C204/CB25 4C204/DB14 4C204/DB18 4C204/DB30 4C204/DB31 4C204 /EB02 4C204/EB03 4C204/FB01 4C204/FB08 4C204/FB16 4C204/FB27 4C204/GB01 4C204/GB17 4C204/GB21 4C204/GB24 4C204/GB26 4C204/GB32 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/HA08 4C206 /HA30 4C206/NA14 4C206/ZA45 4C206/ZA86 4C206/ZC33 4H006/AA01 4H006/AA03 4H006/AB20 4H006/AB23 4H006/BJ50 4H006/BP10 4H006/BQ30
代理人(译)	夏木森下
优先权	60/417083 2002-10-08 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

描述了用于调节脂质和胆固醇摄取的方法，其基于对SR-BI HDL受体的表达或功能的调节。这些实施例表明，在LDL受体的极大上调的条件下，雌激素极大地下调了SR-BI。实施例还证明了在用雌激素治疗的动物的大鼠肾上腺膜和其他非胎盘类固醇生成组织中SR-BI的上调，但在包括肺，肝和皮肤在内的其他非胎盘类固醇生成组织中没有上调。实施例进一步证明了荧光标记的HDL进入动物肝细胞的摄取，当用雌激素治疗动物时不会发生这种情况。实例还证明了在重组腺病毒感染后瞬时过表达肝SR-BI的小鼠中SR-BI表达对HDL代谢的体内影响。肝组织中SR-BI的过度表达导致胆固醇血液水平急剧下降。这些结果表明，可以直接或间接地调节SR-BI水平，以调节血液中的胆固醇水平。



MIT 9952-19