(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5172146号
(P5172146)

(45)発行日　平成25年3月27日(2013.3.27)　(24)登録日　平成25年1月11日(2013.1.11)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/527	(2006.01)	C12Q	1/527	
A61K 31/5383	(2006.01)	A61K	31/5383	
A61K 31/365	(2006.01)	A61K	31/365	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	

請求項の数 7　(全 27 頁)

(21)出願番号　特願2006-532848 (P2006-532848)
(86)(22)出願日　平成16年5月7日(2004.5.7)
(65)公表番号　特表2007-500216 (P2007-500216A)
(43)公表日　平成19年1月11日(2007.1.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/014263
(87)国際公開番号　WO2004/100885
(87)国際公開日　平成16年11月25日(2004.11.25)
審査請求日　平成19年5月7日(2007.5.7)
(31)優先権主張番号　60/469,233
(32)優先日　平成15年5月9日(2003.5.9)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　500429103
ザ・トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・ペンシルバニア
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１９１０４－６２８３，フィラデルフィア，チェスナット・ストリート　３１６０，スウィート　２００
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(74)代理人　100092967
弁理士　星野　修

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌を標的化するための組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
その周囲の組織の好気性解糖よりも高率の好気性解糖を有するか又は内部で合成された脂肪酸に依存しない癌細胞を含む癌に対して抗癌活性を有する化合物を同定する方法であって、ＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害剤として試験化合物を同定し、そして当該化合物がアポトーシスを誘導するか否かを決定するアポトーシスアッセイを実施する工程を含むが、その際、ＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害剤であり且つアポトーシスを誘導する試験化合物が、その周囲の組織の好気性解糖よりも高率の好気性解糖を有するか又は内部で合成された脂肪酸に依存しない癌細胞を含む癌に対して抗癌活性を有する化合物である、方法。
【請求項２】
試験化合物がＡＴＰクエン酸リアーゼの活性を阻害するか否かについて決定するためのアッセイを実施することにより、ＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害剤として試験化合物が同定される、請求項１記載の方法。
【請求項３】
その周囲の組織の好気性解糖よりも高率の好気性解糖を有するか又は内部で合成された脂肪酸に依存しない癌細胞を含む癌に対して抗癌活性を有する化合物を同定する方法であって：
（ａ）ＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害剤として試験化合物を同定する工程；および
（ｂ）当該試験化合物がアポトーシスを誘導するか否かを決定するアポトーシスアッセイを実施する工程

を含み、
ここで、もし当該試験化合物がＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤であれば、当該試験化合物は、癌細胞においてＡＴＰリアーゼ活性を阻害して、当該癌細胞におけるクエン酸のオキサロ酢酸およびアセチルＣｏＡへの変換の阻害をもたらすのに十分であり、当該癌細胞にアポトーシスをもたらすのに十分なミトコンドリアの過分極および増加した活性酸素種を導き、
ここで、ＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害剤であってそしてアポトーシスを誘導する試験化合物は、その周囲の組織の好気性解糖よりも高率の好気性解糖を有するか又は内部で合成された脂肪酸に依存しない癌細胞を含む癌に対して抗癌活性を有する化合物である、方法。

【請求項４】
その周囲の組織の好気性解糖よりも高率の好気性解糖を有する癌細胞を有するとして同定された個体を治療するための組成物であって、ここで当該癌は、その周囲の組織の好気性解糖よりも高率の好気性解糖を有する細胞を含む癌として同定されたものであり、
当該組成物は治療的有効量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を含み、ここで該治療的有効量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、当該癌細胞においてＡＴＰリアーゼ活性を阻害して、当該癌細胞におけるクエン酸のオキサロ酢酸およびアセチルＣｏＡへの変換の阻害をもたらすのに十分であり、当該癌細胞にアポトーシスをもたらすのに十分なミトコンドリアの過分極および増加した活性酸素種を導き、
そしてここでＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は（－）ヒドロキシクエン酸、ＳＢ-２０１０７６、及びＳＢ-２０４９９０からなる群より選択される、組成物。

【請求項５】
^{18}フルオロ－デオキシグルコースを用いたＰＥＴイメージングにより上記の癌が高率の好気性解糖を有する癌細胞を含む癌であると決定される、請求項４に記載の組成物。

【請求項６】
その周囲の組織の好気性解糖よりも高率の好気性解糖を有する癌細胞にアポトーシスを誘導するための組成物であって、ここで当該癌細胞はその周囲の組織の好気性解糖よりも高率の好気性解糖を有するとして同定され；
当該組成物は、当該細胞にアポトーシスを誘導するのに有効なＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を含む組成物の有効投与量を当該癌細胞に送達し、ここでＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の当該治療的有効量は、当該癌細胞においてＡＴＰリアーゼ活性を阻害して、当該癌細胞におけるクエン酸のオキサロ酢酸およびアセチルＣｏＡへの変換の阻害をもたらすのに十分であり、当該癌細胞にアポトーシスをもたらすのに十分なミトコンドリアの過分極および増加した活性酸素種を導き、
そしてここでＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は（－）ヒドロキシクエン酸、ＳＢ-２０１０７６、及びＳＢ-２０４９９０からなる群より選択される、組成物。

【請求項７】
^{18}フルオロ－デオキシグルコースを用いたＰＥＴイメージングにより上記の癌が高率の好気性解糖を有する癌細胞を含む癌であると決定される、請求項６に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】
【発明の開示】
【０００１】
発明の分野
本発明は、クエン酸リアーゼ及び／又はトリカルボキシル酸輸送体の阻害剤を含む組成物及びそのような組成物を用いて癌と診断された患者を治療する方法に関する。
【０００２】
発明の背景
各年に、百万を超える侵入性の癌が米国のみで報告される。治療における改善及び多くの成功にも拘わらず、癌は、死及び数え切れない苦痛の顕著な原因であり続ける。
多数の証拠が示唆することは、癌細胞が、大多数の体細胞のそれらとは明らかに異なる

代謝要求性を有することである。癌細胞の代謝要求性の違いは、ある特定の悪性腫瘍、例えば、幼少期の白血病におけるＬ－アスパラギナーゼにおいて治療上の利点を生かしてきたが、癌細胞の唯一の代謝を生かすための一般化された機構は考案されて（deviced）いない。

癌を標的化するための追加の薬剤及び方法に関する要求が残されている。

【０００３】

発明の概要

本発明は、癌を有する個体（individual）を治療する方法に関し、高率の好気性解糖を有する癌細胞を含む癌のような癌を同定し、そして治療上有効な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を個体に投与する工程を含む。

【０００４】

本発明は、さらに、癌を有すると認定された個体を治療する方法に関する。当該方法は、個体に、１ｍＭ未満の濃度にてインビトロアポトーシスアッセイにおいて５０％を超える細胞においてアポトーシスを誘導するのに有効な治療上有効な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を投与する工程を含む。

【０００５】

本発明は、さらに、癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法に関し、癌細胞においてアポトーシスを誘導するのに有効な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を癌細胞に送達する工程を含む。ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、１ｍＭ未満の濃度にてインビトロアポトーシスアッセイにおいて５０％を超える細胞においてアポトーシスを誘導するのに有効である。

【０００６】

本発明は、さらに、癌が内生的に合成される脂肪酸に依存しない細胞を含む癌を有すると認定された個体を治療する方法に関する。当該方法は、治療上有効な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を個体に投与する工程を含む。

【０００７】

本発明は、さらに、内生的に合成される脂肪酸に依存しない癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法に関する。当該方法は、細胞内でアポトーシスを誘導するのに有効な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を癌細胞に送達させる工程を含む。

【０００８】

本発明は、癌を有すると認定された個体を治療する方法に関する。当該方法は、治療上有効な量のトリカルボキシル酸輸送体阻害剤を個体に投与する工程を含む。

本発明は、さらに、癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法に関し、細胞においてアポトーシスを誘導するのに有効な量のトリカルボキシル酸輸送体阻害剤を癌細胞に投与する工程を含む。

【０００９】

本発明は、さらに、癌を有する個体を治療する方法に関し、高率の好気性解糖を有する癌細胞を含む癌として癌を認定し、そして次に、治療上有効な量のトリカルボキシル酸輸送体阻害剤を個体に投与する工程を含む。

【００１０】

本発明は、さらに、癌を有すると認定された個体を治療する方法に関し、ＡＴＰクエン酸リアーゼ又はトリカルボキシル酸輸送体の発現を阻害する化合物を治療上有効な量で個体に投与することを含む。

【００１１】

本発明は、さらに、抗癌活性を有する化合物を同定する方法に関する。当該方法は、ＡＴＰクエン酸リアーゼ又はトリカルボキシル酸輸送体として試験化合物を同定し、そして当該化合物がアポトーシスを誘導するか否かについてアポトーシスアッセイを実施する工程を含む。

【００１２】

発明の詳細な説明

定義

本明細書にて使用される用語「癌を有すると認定された個体」及び「癌患者」は、交換可能に使用され、そして癌を有すると診断された個体を意味する。癌を有する個体を認定するためのよく知られた手段は多数存在する。いくつかの態様において、癌の診断は、ＰＥＴイメージングを用いて作成されるか又は確認される。発明のいくつかの態様は、癌を有する個体を認定する工程を含む。

【００１３】

本明細書にて使用される用語「高率な好気性解糖により特徴付けされる癌」は、その周囲の組織のそれらよりも高率な好気性解糖を呈する細胞を有する癌を意味する。そのような癌細胞は、環境からのグルコースを平均を上回る量で吸収する。高率な好気性解糖により特徴付けされる癌は、ＰＥＴイメージング技術を用いて、好ましくは^{18}フッ素－デオキシグルコースにより同定できる。そのような試験を用いた腫瘍の陽性検出は、癌が高率な好気性解糖により特徴付けされることを示す。ＰＥＴの方法論は、Ｃｚｅｒｎｉｎ，Ｊ．２００２　Ａｃｔａ　Ｍｅｄｉｃａ　Ａｕｓｔｒｉａｃａ　２９：１６２－１７０に記載されており、引用により本明細書に編入される。

【００１４】

本明細書にて使用される用語「ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤」は、ＡＴＰクエン酸リアーゼ活性を阻害することができる化合物を意味する。当該化合物は、小分子、大分子、ペプチド、オリゴヌクレオチド等であり得る。

【００１５】

本明細書にて使用される用語「トリカルボキシル酸輸送体阻害剤」は、トリカルボキシル酸輸送体活性を阻害することができる化合物を意味する。当該化合物は、小分子、大分子、ペプチド、オリゴヌクレオチド等であり得る。

【００１６】

本明細書にて使用される用語「治療上有効な量」は、治療される患者の、兆候を軽減するか又は妨げるか、腫瘍のサイズを小さくするか、又は寿命を延ばすのに有効な薬剤又は組み合わせの量を意味する。治療上有効な量の決定は、当業者の能力の範囲内で、特に、本明細書に提供された詳細な開示に照らして容易になされる。

【００１７】

本明細書にて使用される用語「インビトロアポトーシスアッセイ」は、培養された細胞ないでアポトーシスを誘導する化合物の能力を評価して測定するアッセイを意味する。

【００１８】

高率な好気性解糖を有する癌細胞の代謝及びそのような細胞におけるアポトーシスの誘導

本発明は、多くのヒトの癌が高率の好気性解糖を示すこと、及びこの高率の好気性解糖が生長期の（ｖｅｇｅｔａｔｉｖｅ）細胞の生存に通常は必要ない特定の代謝酵素に対する癌細胞の増加した依存性を誘導するという観察から生まれる。そのような酵素に対する増加した依存性が、そのような酵素の阻害剤による処理に対して癌細胞を感受性に誘導するか否かを決定する探索が企てられた。それらの環境からのグルコースの過剰な取り込みのために高率の好気性解糖を示す癌細胞の一つの鍵となる特徴は、当該細胞が莫大な量のピルビン酸（ｐｙｒｕｖａｔｅ）を生産することである。そのようなピルビン酸のミトコンドリアマトリックスへの輸送及びピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体によるそのさらなる分解は、トリカルボキシル酸サイクル（ＴＣＡ）への増加したアセチル－ＣｏＡの侵入をもたらす。ＴＣＡサイクルにより生産されたＮＡＤＨが酸化的リン酸化を通した電子の輸送及び細胞性ＡＴＰの生産を維持するのに必要な量を超えるなら、連続的なミトコンドリアの過分極及び電子輸送連鎖（ｅｌｅｃｔｒｏｎ　ｔｒａｎｓｐｏｒｔ　ｃｈａｉｎ）からの増加した活性酸素種（ＲＯＳ）の生産が結果として起こり得る。ミトコンドリアの過分極及び電子輸送連鎖からの増加したＲＯＳ生産は、最終的に、細胞のアポトーシスをもたらす（Ｖａｎｄｅｒ　Ｈｅｉｄｅｎ，Ｍ．Ｇ．，ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ，９１：６２７－６３７，１９９７；引用により本明細書に編入される）。

【００１９】

増加したＮＡＤＨはＴＣＡサイクルにおいていくつかの酵素のアロステリック阻害剤として作用できるが、癌細胞は、主に、ＴＣＡサイクルの第１反応の最終生産物であるクエン酸をサイトゾルに輸送することによりピルビン酸の代謝により生産されるアセチル－ＣｏＡの増加した負荷に対処するらしい。クエン酸はアセチル－ＣｏＡとオキサロ酢酸の縮合により形成される。結果として生じるクエン酸はミトコンドリアからトリカルボキシル酸輸送体の輸送活性により濃縮勾配の方へ輸送され得る。サイトゾル中では、クエン酸がＡＴＰクエン酸リアーゼ（ＡＣＬ）の活性の結果として再度オキサロ酢酸とアセチル－ＣｏＡに変換され得る。サイトゾル中のオキサロ酢酸のさらなる代謝は、細胞合成反応のためのＮＡＤＨ及びピルビン酸を生成し、オキサロ酢酸の再生利用（ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ）のためにミトコンドリアへ再度輸送され得る。サイトゾルのアセチル－ＣｏＡは、１）蛋白質の安定性を増加させるための蛋白質のＮ－アセチル化のため、２）ヒストン及び転写制御因子のアセチル化による活性クロマチンの維持のため、３）プレニル化及びアシル化による膜蛋白質の脂質修飾のため、及び４）ステロール類、スフィンゴリピド類及びホスホリピド類を含むバルクの脂質の合成のために、生長する細胞により利用されることにより鍵となる生長基質を生成し得る。ペンタニルピロリン酸は、パルミチル化、ゲラニルゲラニル化（ｇｅｒａｎｙｌｇｅｒａｎｙｌａｔｉｏｎ）又はファルネシル化による蛋白質の脂質修飾のため、並びにスフィンゴミエリンの細胞内合成のために必要である。

【００２０】

ＡＴＰクエン酸リアーゼの役割は肝臓及び脂肪の組織中のサイトゾルアセチル－ＣｏＡ及びＮＡＤＨの生産に制限され、長鎖脂肪酸の生産のためにこれらの組織内で使用されることが示唆されている（図１）（Ｅｌｓｈｏｕｒｂａｇｙ，Ｎ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，２６５：１４３０－１４３５，１９９０；Ｅｌｓｈｏｕｒｂａｇｙ，Ｎ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．Ｅｕｒ　Ｊ　Ｂｉｏｃｈｅｍ，２０４：４９１－４９９，１９９２，及びＦｕｋｕｄａ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｂｉｏｃｈｅｍ（Ｔｏｋｙｏ），１２６：４３７－４４４，１９９９、引用により本明細書に各々が編入される）。この総説に一致して、ＡＴＰクエン酸リアーゼが主として脂質生成細胞中で発現されることを、様々な研究が示唆した。他の生長期の組織は、当該酵素を全くか又はほとんど発現しない。

【００２１】

腫瘍細胞系を特性決定するに際して、生長細胞の特徴が、高いレベルのＡＴＰクエン酸リアーゼ活性の誘導であることを発見した。データは、ミトコンドリア高分極及び電子輸送連鎖からのＲＯＳ生成を阻害することにおけるＡＴＰクエン酸リアーゼの役割を示す。さらに、ＡＴＰクエン酸リアーゼが肝臓以外の組織においてサイトゾルのアセチル－ＣｏＡの合成に関与する主要な酵素であるらしいため、ＡＴＰクエン酸リアーゼが細胞の生長に必要であるか否かを決定するための調査が企てられた。単純な生物においては、サイトゾルのアセチル－ＣｏＡの主要な生成が酢酸塩を前駆体として用いてアセチル－ＣｏＡシンセターゼにより起こる。しかしながら、肝臓の代謝活性のために、相対的にわずかな酢酸塩しか哺乳類組織において細胞の生長には利用可能ではない。蛋白質の合成の要求される増加の結果として、ヒストンのアセチル化により活性クロマチン構造を維持する要求の結果として、パルミチル化、ゲラニルゲラニル化、又はファルネシル化によりシグナルトランスダクション蛋白質の活性化のために特化された蛋白質を生成する要求並びに脂質膜内でスフィンゴミエリン：コレステロールのラフト（ｒａｆｔｓ）の生成によるシグナリング複合体のアッセンブリーを生成する要求の結果として、生長細胞は高いレベルのアセチル－ＣｏＡを必要とする。データは、細胞の生長に要求されるアセチル－ＣｏＡのこの高いレベルの生産が、成長因子又はオンコジーン刺激性解糖、クエン酸のミトコンドリアによる増加した生成、及びＡＴＰクエン酸リアーゼの活性を必要とすることを示す。これらのデータは、ＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害が生長を阻害して、形質転換された細胞のミトコンドリア誘導性アポトーシスを導くことを示す。

【００２２】

データは、癌細胞の生長を阻害すること及び形質転換された細胞の細胞死を誘導することにおいて、ＡＴＰクエン酸リアーゼを阻害する効果の証拠を提供する。さらに、この方

法は、非生長性の体細胞がＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の効果に対して相対的に耐性であること及び非形質転換細胞が細胞サイクルの停止によりＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害に適合できることにおける選択性の利益を有する。

【００２３】

トリカルボキシル酸輸送体の阻害は、癌細胞の生長を阻害するため、及び形質転換された細胞の細胞死を誘導するための、代わりの方法である。そのような阻害は、サイトゾルへのクエン酸の輸送を減少させるか又は阻害し、そして最終的には、細胞のアポトーシスをもたらす上記の条件及び事象を導く。

【００２４】

癌患者のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤による治療

発明のいくつかの態様は、癌を治療するためのＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の使用を含む。

本発明の態様は、高率の好気性解糖を有するとして同定された癌を有する個体を治療するのに特に有用である。いくつかの態様において、癌を有する個体を治療する方法は、高率の好気性解糖を有するとして癌を最初に同定し、そして次に治療上有効な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤をそのような個体に投与する工程を含む。いくつかの好ましい態様において、高率の好気性解糖を有するという癌の同定は、ＰＥＴイメージング、好ましくは^{18}フルオロ－デオキシグルコースにより実施される。いくつかの態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、１ｍＭ未満の濃度においてインビトロにおいてアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、５０μＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。

【００２５】

本発明のいくつかの態様において、癌を有すると同定された個体を治療する方法は、１ｍＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導することが知られているＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を治療上有効な量にてそのような個体に投与することを含む。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、０．１ｍＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、５０μＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を投与する前に、癌が高率の好気性解糖により特徴付けされる癌であることを確認する。そうすることの好ましい方法は、ＰＥＴイメージングであり、好ましくは、^{18}フルオロ－デオキシグルコースを用いる。

【００２６】

癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法が提供される。当該方法は、細胞においてアポトーシスを誘導するのに有効な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を癌細胞に送達することを含む。使用されるＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、１ｍＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、０．１ｍＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、５０μＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。

【００２７】

本発明の態様は、好ましくは、内部で合成された脂肪酸に依存しない癌細胞を有する癌を有する患者を治療するのに特に有用である。そのような癌は、ほとんどの癌を含み、そして脂質生産に関連する組織において生じる癌、例えば肝臓癌及び脂肪細胞を含む癌を一

般には除く。内部で合成された脂肪酸に依存する癌細胞は、一般には、肝腫瘍、脂肪腫及び脂肪肉腫に限定される。即ち、発明のいくつかの方法は、内部で合成された脂肪に依存しない癌を有する癌患者を治療する方法に関し（即ち、内部で合成される脂肪酸を使用できる癌細胞）、そのような方法は、治療上有効な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤をそのような個体に投与する工程を含む。好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、１ｍＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効であることが知られている。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、０．１ｍＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、５０μＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。内部で合成される脂肪酸に依存する癌細胞は、一般には、高いレベルの脂肪酸合成酵素を有する。そのような細胞における内部の脂肪酸合成は、典型的には、１分あたり２００，０００細胞あたりの１０ｆｍｏｌｅｓを超えるアセチル－ＣｏＡのアシルグリセリドへの取り込み速度にて起こる。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を投与する前に、癌が高率の好気性解糖により特徴付けされる癌であることを確認する。そうすることの好ましい方法は、ＰＥＴイメージングであり、好ましくは、^{18}フルオロ－デオキシグルコースを用いる。

【００２８】

内部で合成される脂肪酸に依存しない癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法が提供される。当該方法は、細胞においてアポトーシスを誘導するのに有効な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を癌細胞に送達することを含む。使用されるＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、１ｍＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、０．１ｍＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。いくつかの好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、５０μＭ未満の濃度においてインビトロのアポトーシスアッセイにて５０％より多い細胞にアポトーシスを誘導するのに有効である。

【００２９】

ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤

当業界においては、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の例が多数ある。Ｇｒｉｂｂｌｅらに対して１９９５年９月５日に発行された米国特許第５，４４７，９５４号、Ｃｈｅｎｇらに対して２００２年７月２日に発行された米国特許第６，４１４，００２号、Ｃｈｅｎｇらにより２００３年５月８日に公開された米国出願公開番号２００３００８７９３５Ａ１、Ｃｈｅｎｇらにより２００３年４月１０日に公開された米国出願公開番号２００３００６９２７５　Ａ１、及びＢａｒｒｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，”Ａｎｔｉｍｙｃｉｎｓ，Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ　ｏｆ　ＡＴＰ－Ｃｉｔｒａｔｅ　Ｌｙａｓｅ，ｆｒｏｍ　ａ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．”，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ，ｖｏｌ．５０，Ｎｏ．９，ｐｐ．７２９（１９７７）の各々は、引用により本明細書に各々編入され、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤である化合物を開示する。好ましい態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤は、米国特許第５，４４７，９５４号において構造Ｉとして示された式により定義される構造を有する化合物からなる群から選択され、好ましくは、そこに開示されて特別に記載された構造の一つを有する化合物、好ましくはそこに示された実施例中の特別の化合物、好ましくはその中の図４において示された構造を有する化合物である。他の公知の阻害剤は、（－）ヒドロキシクエン酸、（Ｒ，Ｓ）－Ｓ－（３，４－ジカルボキシ－３－ヒドロキシ－３－メチル－ブチル）－ＣｏＡ、及びＳ－カルボキシメチル－ＣｏＡを含む。

【００３０】

化合物がＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤であるか否かの決定は、当業者の範囲内である

。ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を同定するのに有用なアッセイの例は、Ｈｏｆｆｍａｎｎ ＧＥ，ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １９８０ Ｏｃｔ ６；６２０（１）：１５１－８；Ｓｚｕｔｏｗｉｃｚ Ａ，ｅｔ ａｌ．Ａｃｔａ Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｐｏｌ １９７６；２３（２－３）：２２７－３４；及びＳｕｌｌｉｖａｎ ＡＣ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ １９７７ Ｎｏｖ １０；２５２（２１）７５８３－９０に記載されたものを含み、各々は引用により本明細書に編入される。化合物がＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤であるかを如何にして決定するかについての一つの例は、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤を単離することである。当該蛋白質は、ＡＴＰクエン酸リアーゼが天然に発現される細胞から単離するか、又はＡＴＰクエン酸リアーゼ蛋白質の発現を指示するウイルスによる遺伝子構築物のトランスフェクション又は感染により過剰発現する細胞から単離することができる。ＡＴＰクエン酸リアーゼをコードするｍＲＮＡの核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋ受け入れ番号Ｕ１８１９７であり、引用により本明細書に編入される。さらに、ＡＴＰクエン酸リアーゼは、宿主細胞中で組換え発現することもできる。当該蛋白質を単離する際に、当業者は、有力なＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の存在又は不在下で、好ましくは、陽性及び／又は陰性対照を用いてその活性を測定することができる。活性が、根拠とされた阻害剤の不在下よりも存在下の方が低ければ、その化合物はＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤である。化合物が癌を治療するのに有用なＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤であることを確認するために、日常のアポトーシスアッセイにおいて当該化合物をさらに試験して、その活性がアポトーシスを誘導することを確認及び評価してよい。

【００３１】

トリカルボキシル酸輸送体阻害剤による癌患者の治療

発明のいくつかの態様は、癌を治療するためのトリカルボキシル酸輸送体阻害剤の使用を含む。

本発明のいくつかの態様において、癌を有するとして同定された個体を治療する方法は、治療上有効な量のトリカルボキシル酸輸送体阻害剤をそのような個体に投与することを含む。いくつかの態様において、本発明の方法は、内部で合成される脂肪酸に依存しない癌細胞を有する癌を有する患者を治療するのに特に有用である。いくつかの好ましい態様において、トリカルボキシル酸輸送体阻害剤の投与前に、癌が高率の好気性解糖により特徴付けされる癌であることを確認する。そうすることの好ましい方法は、ＰＥＴイメージングであり、好ましくは、^{18}フルオロ－デオキシグルコースを用いる。

【００３２】

癌を有する個体を治療する方法は、高率の好気性解糖を有するとして癌を同定し、そして次に治療上有効な量のトリカルボキシル酸輸送体阻害剤をそのような個体に投与する工程を含む。高率の好気性解糖を有するという癌の同定の好ましい方法は、ＰＥＴイメージング、好ましくは^{18}フルオロ－デオキシグルコースによる。

【００３３】

癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法が提供される。当該方法は、細胞においてアポトーシスを誘導するのに有効な量のトリカルボキシル酸輸送体阻害剤を癌細胞に送達することを含む。

【００３４】

トリカルボキシル酸輸送体阻害剤

当業界においては、トリカルボキシル酸輸送体阻害剤の例が多数ある。そのような例は、１，２，３－ベンゼントリカルボキシル酸、イソクエン酸、マレイン酸、ホスホエノールピルビン酸、ｎ－ブチルマロン酸、スルフィドリル試薬、ジエチルピロカルボン酸、２，３－ブタンジオン、フェニルグリオキサル、ピリドキサル、５－ホスフェートジカルボキシル酸、琥珀酸、マレイン酸、オキサロ酢酸、トリカルボキシル酸、イソクエン酸、トリカルバリル酸、及びパルミトイル－ＣｏＡを含む。

【００３５】

化合物がトリカルボキシル酸輸送体阻害剤であるか否かの決定は、当業者の範囲内であ

る。化合物がトリカルボキシル酸輸送体阻害剤であるかを如何にして決定するかについての一つの例は、トリカルボキシル酸輸送体阻害剤を単離することであり、その方法は、Ｋａｐｌａｎ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ １９９０ Ａｕｇ ５；２６５（２２）：１３３７９－８５；Ｚａｒａ Ｖ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ １９９６ Ｊｕｎ ２５；２２３（３）：５０８－１３；Ｓｔｉｐａｎｉ ｅｔ ａｌ．ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ １９８３ Ｓｅｐ １９；１６１（２）：２６９－７４に開示されており、引用により本明細書に各々編入される。当該蛋白質は、トリカルボキシル酸輸送体が天然に発現される細胞から単離するか、又はトリカルボキシル酸輸送体蛋白質の発現を指示するウイルスによる遺伝子構築物のトランスフェクション又は感染により過剰発現する細胞から単離することができる。さらに、トリカルボキシル酸輸送体は、宿主細胞中で組換え発現することもできる。当該蛋白質を単離する際に、当業者は、有力なトリカルボキシル酸輸送体阻害剤の存在又は不在下で、好ましくは、陽性及び／又は陰性対照を用いてその活性を測定することができる。トリカルボキシル酸輸送体の活性が、根拠とされた阻害剤の不在下よりも存在下の方が低ければ、その化合物はトリカルボキシル酸輸送体阻害剤である。あるいは、細胞又はミトコンドリアを用いてアッセイを実施することができ、Ｌａｗ Ｄ ｅｔ ａｌ．Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ １９９２ Ｊｕｌ；２６３（１ Ｐｔ １）：Ｃ２２０－５；及びＰａｒａｄｉｅｓ Ｇ ｅｔ ａｌ．Ａｒｃｈ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ １９９０ Ｍａｙ １；２７８（２）：４２５－３０に記載されているとおりであって、引用により本明細書に各々編入される。化合物が癌を治療するのに有用なトリカルボキシル酸輸送体阻害剤であることを確認するために、日常のアポトーシスアッセイにおいて当該化合物をさらに試験して、その活性がアポトーシスを誘導することを確認及び評価してよい。

【００３６】

アポトーシスアッセイ

アポトーシスは、当業者にはよく知られた多くの手法により検出できる。アポトーシスを検出する方法の例は、限定ではないが、ＴＵＮＥＬアッセイ、カスパーゼ活性を測定すること、アネキシン－Ｖ染色、等を含む。アポトーシス活性は、実施例１に記載されたアッセイにおいて示されたとおりに測定される。

【００３７】

併用療法

いくつかの態様においては、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤及び／又はトリカルボキシル酸輸送体阻害剤を他の治療剤及び／又は放射線治療を含む治療養生法の一部と同時に投与することができる。

【００３８】

治療剤の同時投与は、連続するか又は同時の何れかの逐次服用であり得る。いくつかの態様において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤及び／又はトリカルボキシル酸輸送体阻害剤は、ひとつを超える追加の治療剤と同時投与する。化学治療剤の例は、共通の、細胞障害性又は細胞増殖抑制性の薬剤、例えば、メトトレキセート（アメトプテリン）、ドクソルビシン（アドリマイシン）、ダウノルビシン、サイトシナラビノシド、エトポシド、５－４フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシル、及び他の窒素マスタード（例えば、シクロホスファミド）、シス－プラチン、ビンデシン（及び他のビンカのアルカロイド類）、マイトマイシン及びブレオマイシンを含む。他の化学治療剤は、プロチオニン（大麦の花のオリゴペプチド）、マクロモマイシン、１，４－ベンゾキノン誘導体及びトレニモンを含む。抗癌性抗生物質、例えば、ヘルセプチン、及び毒素も、他の追加の治療剤の例である。

【００３９】

治療養生法は、連続又は同時の何れかによるＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤及び／又はトリカルボキシル酸輸送体阻害剤の逐次服用投与と放射線治療の開始を含み得る。当業者は、適切な放射線治療養生法を容易に処方することができる。Ｃａｒｌｏｓ Ａ Ｐｅｒｅｚ ＆ Ｌｕｔｈｅｒ Ｗ Ｂｒａｄｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔ

ｉｃｅ ｏｆ Ｒａｄｉａｔｉｏｎ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２ｎｄ Ｅｄ．ＪＢ Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏ，Ｐｈｉｌａ．，１９９２は、、引用により本明細書に編入され、本発明において使用可能な放射線治療のプロトコルとパラメーターを記載する。ＧＢＭｓ（神経膠芽細胞腫、ほとんどの悪性神経膠脳腫瘍）に関しては、Ｓｉｍｐｓｏｎ Ｗ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．：Ｉｎｆｌｕｅｎｃｅ ｏｆ ｌｏｃａｔｉｏｎ ａｎｄ ｅｘｔｅｎｔ ｏｆ ｓｕｒｇｉｃａｌ ｒｅｓｅｃｔｉｏｎ ｏｎ ｓｕｒｖｉｖａｌ ｏｆ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｇｌｉｏｂｌａｓｔｏｍａ ｍｕｌｔｉｆｏｒｍｓ：Ｒｅｓｕｌｔｓ ｏｆ ｔｈｒｅｅ ｃｏｎｓｅｃｕｔｉｖｅ Ｒａｄｉａｔｉｏｎ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｇｒｏｕｐ（ＲＴＯＧ）ｃｌｉｎｉｃａｌ ｔｒｉａｌｓ．Ｉｎｔ Ｊ Ｒａｄｉａｔ Ｏｎｃｏｌ Ｂｉｏｌ Ｐｈｙｓ ２６：２３９－２４４，１９９３が引用により本明細書に編入され、本発明の方法において有用な臨床プロトコルを記載する。同様に、Ｂｏｒｇｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ ｐａｌｌｉａｔｉｏｎ ｏｆ ｂｒａｉｎ ｍｅｔａｓｔａｓｅｓ：Ｆｉｎａｌ ｒｅｓｕｌｔｓ ｏｆ ｔｈｅ ｆｉｒｓｔ ｔｗｏ ｓｔｕｄｉｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｒａｄｉａｔｉｏｎ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｇｒｏｕｐ．Ｉｎｔ Ｊ Ｒａｄｉａｔ Ｏｎｃｏｌ Ｂｉｏｌ Ｐｈｙｓ ６：１－９，１９８０が本明細書に編入され、本発明の方法において有用な臨床プロトコルを記載する。いくつかの好ましい態様において、ガンマ照射を用いた放射線治療が提供される。

【００４０】

併用療法の一部として使用される場合、治療上有効な量の上記阻害剤は、他の治療手法なしに使用されるなら、有効であるのに必要な用量よりも低い量であるように調節してよい。

いくつかの好ましい態様において、発明による薬学組成物による治療は、外科医の介入が先行する。

【００４１】

薬学組成物及び投与経路

薬学組成物は、当業者により、選択された投与様式に依存して選択された組成物を用いて製剤化してよい。適切な薬学上の担体は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ａ．Ｏｓｏｌの最近の版に記載されており、この分野の標準の参照テキストである。

【００４２】

上記薬学組成物を投与することは、当業者に知られている様々な方法の何れかを用いて、遂げられるか又は実施され得る。全身性製剤は、注射、例えば、皮下、静脈内、筋肉内、くも膜下又は腹膜内注射による投与のためにデザインされた製剤並びに経皮、経粘膜、経口又は肺投与のためにデザインされた製剤を含む。

【００４３】

注射のためには、発明の化合物を水溶液、好ましくは生理学上適合可能なバッファー、例えばハンクス溶液、リンゲル溶液又は整理食塩水バッファー中に製剤化してよい。当該溶液は、処方剤（ｆｏｒｍｕｌａｔｏｒｙ ａｇｅｎｔｓ）、例えば、懸濁剤、安定剤及び／又は分散剤を含んでよい。注射可能物（ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅｓ）は、滅菌であり、発熱物質フリーである。あるいは、上記化合物は、使用前の、適切な媒質、例えば、滅菌の発熱物質フリーの水による再構成のための、粉末形態であってよい。経粘膜投与のためには、浸透されるバリアに対して適切な浸透剤を処方に使用する。そのような浸透剤は一般に当業界で知られている。

【００４４】

非経口投与のためには、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤又はトリカルボキシル酸輸送体阻害剤は、薬学上受容可能な非経口媒質と共に、例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン又は凍結乾燥粉末として製剤化することができる。そのような媒質の例は、水、塩溶液、リンゲル溶液、デキストロース溶液、５％ヒト血清アルブミン、リンゲルデキストロース、デキストロースと塩化ナトリウム、乳酸化リンゲルと不揮発性オイル、ポリエチレングリ

コール、ポリビニルピロリドン、レシチン、落花生油又はゴマ油である。リポソーム及び非水性媒質、例えば不揮発性油を使用してもよい。媒質又は凍結乾燥粉末は、等張性を維持する付加物（例えば、塩化ナトリウム、マニトール）及び化学安定性を維持する付加物（例えば、バッファー及び保存剤）を含んでよい。製剤は、普通に使用される技術により滅菌される。非経口の投薬形態は、水又は別の滅菌担体を用いて調製してよい。例えば、注射による投与のために適した非経口組成物は、１．５重量％の活性成分を０．９％の塩化ナトリウム溶液に溶解することにより調製される。あるいは、当該溶液を凍結乾燥し、そして次に投与直前に適切な溶剤により戻される。

【００４５】

薬学上受容可能な担体は、当業者に知られており、限定ではないが、０．０１－０．１Ｍ、好ましくは０．０５Ｍのリン酸バッファー又は０．８％の塩溶液を含む。静脈内担体は、液体及び栄養素補給剤、電解質補給剤、例えばリンゲルデキストロース等に基づくものを含む。さらに、そのような薬学上受容可能な担体は、水性又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルジョンであり得る。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、及び注射可能な有機エステル、例えば、オレイン酸エチルである。水性担体は、水、エタノール、アルコール／水性溶液、グリセロール、エマルジョン又は懸濁液を含み、塩溶液及びバッファー媒質を含む。

【００４６】

薬学組成物は、慣用の薬学賦形剤及び化合物化技術を用いて調製できる。経口投薬形態は、処置される患者による経口摂取のための、エリキシル、シロップ、タブレット、ピル、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等であってよい。典型的な固形賦形剤は、不活性物質、例えば、ラクトース、スターチ、グルコース、セルロース調製剤、例えば、トウモロコシのスターチ、コムギのスターチ、コメのスターチ、ポテトのスターチ、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルーせるろーす、ソディウムカルボキシメチルセルロース、及び／又はポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）；顆粒化剤；結合剤、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウム、マニトール等であってよい。カプセルの形態の組成物は、日常の封入手法を用いて製造することができる。例えば、活性成分を含む沈殿物を標準担体を用いて調製し、そして次に堅いゼラチンのカプセル内に充填することができる；あるいは、あらゆる適切な薬学上の担体、例えば、水性ゴム、セルロース、珪酸塩又はオイルを用いて分散液又は懸濁物を調製し、次に、分散液又は懸濁物を柔らかいゼラチンカプセルに充填することができる。一般的な液体の経口賦形剤は、エタノール、グリセロール、グリセリン、非水性溶剤、例えば、ポリエチレングリコール、オイル、又は懸濁剤、保存剤、芳香剤又は発色剤等を含む水を含む。全ての賦形剤は、投薬形態を製造する当業者には知られている慣用の技術を用いて、錠剤分解剤、希釈剤、潤滑剤等を用いて要求により混合してよい。所望なら、錠剤分解剤を加えてよいが、例えば、架橋結合されたポリビニルピロリドン、寒天又はアルギン酸又はその塩、例えば、アルギン酸ナトリウムである。所望なら、固形の投薬形態は、標準の技術を用いて糖を被覆するか又は腸溶被覆（ｅｎｔｅｒｉｃ－ｃｏａｔｅｄ）されてよい。経口の液体調製物、例えば、懸濁液、エリキシル及び溶液、適切な担体、賦形剤又は希釈剤は、水、グリコール、オイル、アルコール等を含む。さらに、芳香剤、保存剤、発色剤等を加えてよい。

【００４７】

口内（ｂｕｃｃａｌ）投与のためには、上記化合物を、タブレット、トローチ剤などなどの慣用の様式にて製剤化された形態を採ってよい。上記化合物は、直腸又は膣組成物、例えば、座薬又は浣腸剤に製剤化してもよい。典型的な座薬製剤は、結合剤及び／又は潤滑剤、例えば、ポリマー性グリコール類、グリセリド類、ゼラチン類又はココアバター又は他の低融点の植物又は合成のワックス又は脂肪を含む。吸入による投与のためには、本発明による用途のための化合物は、加圧されたパック又は噴霧器からのエアロゾルスプレーの形態で都合よく送達され、適切な推進剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の適切なガスの

使用を伴う。加圧されたエアロゾルの場合、計量された量を送達するためにバルブを用意することにより、投薬ユニットを決定してよい。吸入器（ｉｎｈａｌｅｒ）又は吸入器（ｉｎｓｕｆｆｌａｔｏｒ）における使用のための例えばゼラチンのカプセル及びカートリッジは、化合物の粉末混合物及び適切な粉末ベース、例えばラクトース又はスターチを含んで製剤化してよい。

【００４８】

製剤は、移植（例えば、皮下又は筋肉内）によるか又は筋肉内注射により投与できる貯蔵物調製物（ｄｅｐｏｔ　ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ）であってもよい。そのような態様においては、上記化合物を適切なポリマー又は疎水性物質（例えば、受容可能なオイル中のエマルジョンとして）又はイオン交換樹脂と共に、又はゆるやかな溶解性の誘導体として、例えば、ゆるやかな溶解性の塩として、製剤化してよい。

【００４９】

あるいは、他の薬学送達システムを用いてよい。リポソーム及びエマルジョンは、使用してよい送達媒体のよく知られた例である。特定の有機溶剤、例えば、ジメチルスルフォキシドを使用してもよいが、通常は多大な毒性を犠牲にする。さらに、上記化合物は、持続性放出システム、例えば、治療剤を含む固形ポリマーの半透過性マトリックスを用いて送達してよい。様々な持続性放出物質が確立されており、当業者にはよく知られている。持続性放出カプセルは、それらの化学特性に依存して、数週間から１００日にわたり上記化合物を放出してよい。治療剤の化学特性及び生物学的安定性に依存して、蛋白質の安定化のための追加の戦略を用いてよい。

【００５０】

発明において使用される化合物は、巨丸剤注射（ｂｏｌｕｓ　ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ）又は連続注入により非経口投与のために製剤化してもよく、そしてユニット投薬形態、例えばアンプル、バイアル、小容量注入剤又は予め充填されたシリンジ内、又は付加された保存剤を伴う複数投薬コンテナー内に提供してよい。

【００５１】

保存剤及び他の付加物は、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス等であることもできる。全ての担体は、必要に応じて崩壊剤、希釈剤、顆粒化剤（ｇｒａｎｕｌａｔｉｎｇ　ａｇｅｎｔｓ）、潤滑剤、結合剤などなどと共に当業界で公知の慣用技術を用いて混合することができる。

【００５２】

投薬及び治療養生法

本発明によれば、癌を有すると同定された個体において癌を治療する方法は、そのような個体に、個体において腫瘍細胞内でアポトーシスを誘導するのに十分な量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤又はトリカルボキシル酸輸送体阻害剤を送達することにより実施される。そうすることにより、腫瘍細胞は、アポトーシスを経て、腫瘍自体がサイズを減少させるか又は完全に除去される。即ち、アポトーシス誘導投薬においてＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤又はトリカルボキシル酸輸送体阻害剤の投与を含まない治療に比較して、患者の生存が伸びるか、及び／又は生活の質が改善される。本発明は、癌細胞内でアポトーシスを誘導する方法を提供し、アポトーシスを誘導するのに有効な量にて、クエン酸リアーゼ阻害剤又はトリカルボキシル酸輸送体阻害剤をそのような細胞に送達する工程を含む。

【００５３】

上で記載された薬学組成物は、個体のからだにおいて薬剤の作用部位に活性薬剤を到達させることができるあらゆる手段により投与してよい。投与される投薬量は、因子：薬力学特性；その投与様式及び投与経路；レシピエントの年齢；健康状態及び体重；兆候の性質及び程度；同時処置の種類；及び処置の頻度に依存して変更される。

【００５４】

投与される化合物の量は、処置される被験者、被験者の体重、苦痛の重度、投与の様式及び処方する意志の判定に依存することになる。いくつかの態様において、投薬量の範囲は、約１から３０００ｍｇ、特に約１０から１０００ｍｇ又は約２５から５００ｍｇの活

性成分を、いくつかの態様においては１日あたり１から４回、平均（７０ｋｇ）のヒトに関してである。一般には、発明で使用される個々の化合物の活性は変わる。

【００５５】

治療効果を維持するために十分な化合物の血漿レベルを提供するために、投薬量及び間隔は個別に調節してよい。通常、活性成分の投薬量は体重ｋｇあたり約１マイクログラムから１００ミリグラムであり得る。いくつかの態様において、投薬量は体重ｋｇあたり０．０５ｍｇから約２００ｍｇである。別の態様においては、有効な投薬量は約０．５ｍｇから約５０ｍｇを送達するのに十分な投薬量である。通常は０．０１から５０ミリグラム、そしていくつかの態様においては０．１から２０ミリグラムをキログラムあたり１日に１から６回に分割された投薬であるか又は持続された放出形態において、所望の結果を得るのに有効である。いくつかの態様において、注射による投与のための患者の投薬量は、０．１から５ｍｇ／ｋｇ／日、好ましくは約０．５から１ｍｇ／ｋｇ／日の範囲である。治療上有効な血清レベルは複数投薬を毎日投与することにより達成してよい。延長された期間の処置は有効な治療に必要であると認識されよう。

【００５６】

いくつかの態様において、経路は、経口投与によるか又は静脈注入によってよい。経口投薬量は、通常、毎日、約０．０５から１００ｍｇ／ｋｇの範囲である。発明において使用されるいくつかの化合物は、１日約０．０５から約５０ｍｇ／ｋｇの範囲にて経口投与してよいが、他は１日０．０５から２０ｍｇ／ｋｇにて投薬してよい。注入投薬量は約１．０から１．０ｔｉｍｅｓ．10^4マイクログラム／ｋｇ／分の阻害剤の範囲であることができ、数分から数日の範囲の期間にわたり薬学上の担体と混合される。

【００５７】

発現の阻害

本発明は、さらに、ＡＴＰクエン酸リアーゼ又はトリカルボキシル酸輸送体の発現を阻害することにより癌を治療する方法に関する。発現の阻害は、アンチセンス、ＲＮＡｉ技術又はリボソームを用いて、癌の中のＡＴＰクエン酸リアーゼ又はトリカルボキシル酸輸送体の生産を阻害することができる。当業者は、本明細書に記載されたとおり、発明の様々な態様を実施するために、本明細書に記載された阻害剤の代わりに治療上有効な量のそのような化合物を作成して使用することができる。

【００５８】

種

ヒトに加えて、本発明の方法は、癌を罹患した他の種の動物を治療するために使用してよく、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ウシ及びヒツジ上を含む。

【００５９】

実施例

実施例１：インビトロアポトーシスアッセイ

処理されたか又は未処理の（０．５－１ｘ10^6細胞／ｍｌの濃度にて）細胞５００μｌをＦＡＣＳチューブに取り出し、５０μｌの１０Ｘアネキシン Ｖ結合バッファー（ＢＤバイオサイエンス　ファーミンゲン、サンディエゴ、ＣＡ）を各チューブに加えた。アネキシンＶ－ＦＩＴＣ（ＢＤバイオサイエンス　ファーミンゲン、サンディエゴ、ＣＡ）により、４μｌのアネキシンＶ－ＦＩＴＣ及びヨウ化プロピジウム（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）を最終濃度３μｇ／ｍｌ細胞にて細胞を染色。当該細胞は、好ましくは、造血ＩＬ－３依存性細胞系、例えば、異なるトランス遺伝子（Ｂｃｌ－ｘＬ，ｍｙｒＡｋｔ）又はベクター対照プラスミドをトランスフェクトされたＩＬ－３依存性ＦＬ５．１２　ｐｒｏ－Ｂ細胞及びＢａｘ－／－Ｂａｋ－／－ノックアウトマウスの骨髄から単離されたＩＬ－３依存性細胞である。３７℃において３０分間インキュベートする。初期アポトーシス細胞はアネキシンＶに陽性であり、ヨウ化プロピジウムには陰性であるが、後期アポトーシス細胞はアネキシンＶ及びヨウ化プロピジウムの両方に陽性である。

【００６０】

実施例２
ＡＴＰクエン酸活性は転写／翻訳及び翻訳後の機構の両方により増殖細胞内でアップ制御される
細胞増殖の有糸分裂促進物質の刺激に応答したＡＴＰクエン酸リアーゼの可能な誘導を調査するために、細胞抽出物中のＡＴＰクエン酸リアーゼ（ＡＣＬ）活性を定量するアッセイを開発した。陽性対照として、細胞増殖ノックアウト誘導のためにＩＬ－３に依存する細胞系の安定なトランスフェクト体も生成した。野生型細胞及びＡＴＰクエン酸リアーゼをトランスフェクトされた細胞からのサイトゾル抽出物を、ＮＡＤＨによるオキサロ酢酸のマレイン酸デヒドロゲナーゼにより触媒された還元により測定された、10^6細胞あたりのＡＴＰクエン酸リアーゼ活性のレベルを測定することにより、分析した。ＮＡＤＨの消費は、３４０ｎｍにおいて反応を監視することにより測定した。５ｍＭのＡＴＰ及び３００μＭのＣｏＡの存在下で１００μＭにおいてクエン酸を提供することによりアッセイを走らせた。陽性対照として、ＡＣＬ－トランスフェクトされた細胞はＡＴＰクエン酸リアーゼ活性において３．５倍の増加を示したことから、アッセイの有効性が証明された（図２）。成長因子ＩＬ－３を培養物から取り出したとき、停止（ｗｉｔｈｄｒａｗａｌ）の１２時間後に細胞から細胞周期停止を誘導すると、ＡＣＬ活性の降下がネクター対照とＡＣＬ－トランスフェクト細胞の両方において観察された。合わせると、これらは、ＡＣＬ活性が増殖細胞中で誘導されること、及びＡＣＬをトランスフェクトされた細胞中のＡＣＬ活性は翻訳後に有糸分裂活性化細胞に関連した事象の結果として修飾できることを示唆する。

【００６１】
以前の研究は、ヒドロキシクエン酸が培養された脂肪及び肝臓細胞において、ＡＴＰクエン酸リアーゼ活性の拮抗阻害剤として作用し得ることを示唆した（Ｂｅｒｋｈｏｕｔ，Ｔ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ．２７２：１８１－１８６，１９９０，引用により本明細書に編入する）。結果として、我々は、インターロイキン－３により刺激されたＦＬ５．１２細胞の増殖性応答を阻害するヒドロキシクエン酸の能力を調査した。図３において、我々は、ヒドロキシクエン酸のＩＬ－３含有ＦＬ５．１２培養物への添加が、細胞培養物中の全細胞数及び細胞生存性の漸進性下降を導くことを証明する（図３）。この効果のＩＣ５０は、ＡＣＬ－依存性脂肪酸合成を阻害するヒドロキシクエン酸の効果に近づき、他から報告されたとおりである（Ｐｅａｒｃｅ　ｅｔ　ａｌ．１９９８）。合わせると、これらのデータは、増殖する細胞が増殖に応答してＡＴＰクエン酸リアーゼ活性を誘導するのみならず、ＡＣＬ活性が成長する有糸分裂促進物質誘導性細胞系の連続する増殖及び生存に必要であることを論じる。

【００６２】
細胞増殖及び細胞生存の阻害はＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の一般的特性である
ヒドロキシクエン酸の効果がＡＴＰクエン酸リアーゼ活性を阻害することにおいてその証明された活性に相当し、ＡＣＬ活性及び細胞増殖及びアポトーシスの阻害を誘導するのに必要な相対的に高い濃度によりもたらされる混交の（ｐｒｏｍｉｓｃｕｏｕｓ）効果ではないことを調査するため、我々は、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤として作用すると最近報告されている一連の化合物による二次的な結果を確認した（図４）。ヒドロキシクエン酸とは対照的に、これらの化合物は、細胞抽出物中でＡＴＰクエン酸リアーゼ活性のマイクロモラー阻害剤として作用する。３－カルボキシ－１１－（２，４－ジクロロフェニル）－３，５－ジヒドロウンデカン酸（構造に関しては図４を参照）を有糸分裂促進物質で刺激されて約３μＭのＩＣ５０を有する細胞抽出物に加えたとき、及び細胞を細胞浸透性γ－ラクトン誘導体で処理したとき、約１０μＭの濃度において細胞増殖が阻害され、そして細胞増殖と細胞生存性の両方が３０μＭの濃度において阻害された（図６）。固定された造血細胞内の細胞増殖の阻害の再現性を、さらに、独立の細胞クローンを調査することにより調査したところ、細胞増殖が約５０％各クローンにおいて１０から３０μＭの間の投薬量にて阻害されたことが証明された（図７）。３０μＭの濃度の細胞浸透性化合物による処理は、有糸分裂促進物質により刺激された細胞及び増殖形質転換された細胞の

培養物のＧ１抑止に関連しており（図８）、そしてアネキシン－Ｖ陽性の素早い誘導（図９）はアネキシンの誘導を示唆する。

【００６３】

癌遺伝子形質転換はＡＣＬ阻害により感受性の細胞を作る

我々の研究室における以前の研究は、Ａｋｔの活性化された変異又は腫瘍サプレッサー機能、ＰＴＥＮの損失の何れかにより形質転換された細胞がそれらの解糖率の劇的なアップ制御を示すことを証明した（Ｐｌａｓ　ｅｔ　ａｌ．２００１；Ｆｒａｕｗｉｒｔｈ　ｅｔ　ａｌ．２００２）。これは、それらが侵入性で転移性の表現型に進むように多くのヒトの悪性腫瘍により証明される特徴であり、そしてＷａｒｂｕｒｇらにより１９２９年に最初に記載されて、フルオロデオキシグルコースを用いてＰＥＴスキャニングの臨床使用の増加により最近広範囲に確認された。Ａｋｔによる形質転換がＡＴＰクエン酸リアーゼ活性をさらに増加させるか否かを決定するため、我々は、ＩＬ－３依存性細胞系の安定なトランスフェクト体、ＦＬ５．１２を作成し、Ａｋｔの構成的に活性化されたバージョンがＮ末端におけるミリストイル化の添加により生成された。我々は、ＩＬ－３存在下で成長させた場合のＡｋｔ－形質転換された細胞が、ＡＣＬ－トランスフェクトされた細胞内で観察されたよりもさらに高いレベルのＡＣＬ活性を有したことを見いだした（図１０）。これは、ＡＣＬがＡｋｔリン酸化の基質であるということ（Ｂｅｒｗｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．２００２）及びＡｋｔがＡＣＬ活性の翻訳後活性化のための一つの分子機構であるかもしれないという他者の最近の報告と一致する。さらに、ＡＣＬ－及びＢｃｌ－x_L－トランスフェクトされたクローンとは対照的に、ミリストイル化されたＡｋｔによりトランスフェクトされたクローンは、細胞周期からの停止を通常は伴うＡＣＬ活性の下降に対して耐性である。Ａｋｔ形質転換された細胞は、非増殖状態においてさえ、高率の解糖を維持する。これが増殖性応答の不在下でさえもＡＣＬ阻害にそれらを感受性にし続けるか否かを決定するために、我々は、有糸分裂促進物質ＩＬ－３の存在又は不在下で、ミリストイル化されたＡｋｔ細胞のＡＣＬ阻害に体する感受性を調査した（図１１）。ミリストイル化されたＡｋｔをトランスフェクトされた細胞は、細胞がＩＬ－３存在下で成長したか又は細胞周期のＧ０／Ｇ１期がＩＬ－３に対する応答として停止したか否かについて細胞生存性により測定したところ、ＡＣＬ阻害に対するそれらのＩＣ５０に差異は示さない。対照的に、ＡＣＬ活性を増加させないし且つ成長因子停止（ｗｉｔｈｄｒａｗａｌ）に際してＡＣＬ活性の下降を示す癌遺伝子Ｂｃｌ－x_Lをトランスフェクトされた細胞は、有糸分裂促進物質ＩＬ－３の存在又は不在下でＡＣＬの阻害に際して細胞死に対する感受性において多大な差異を示す。ＡＴＰクエン酸リアーゼのγ－ラクトン阻害剤３０μＭにおいて、有糸分裂促進物質により誘導された細胞増殖のほぼ完全な阻害があり、そしてアポトーシス性細胞死の誘導がある。対照的に、非成長細胞中の３０μＭの同じ化合物は相対的に非毒性である。これは、解糖を活性化する癌遺伝子の添加による細胞の癌遺伝子形質転換が、形質転換された細胞のＡＣＬ活性化に対してのさらに増強された感受性を導くことを示唆する。さらに、活性化に対するこの感受性は細胞周期に非依存性である。

【００６４】

ヒトの腫瘍細胞はＡＣＬ阻害に対して感受性である

初期ヒト腫瘍由来の細胞系における我々の結果を確認するため、我々は、患者から単離された神経膠芽細胞腫の細胞系を分析した（図１２）。２つのそのような神経膠芽細胞腫の細胞系は、ＬＮ１８とＬＮ２２９である。これらの２つの腫瘍は培養物及びインビボにおいて類似の成長速度を示すが、ＬＮ１８はＡｋｔの構成的に活性な形態を有するらしく、一方ＬＮ２２９は有糸分裂促進物質の刺激に応答してのみＡｋｔを活性化する。血清の不在下で成長させると、増殖する細胞培養物の両方が、ＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害剤に応答して細胞蓄積の投薬量依存性抑止と細胞生存性の阻害を呈する。Ａｋｔ形質転換された細胞系に関しては、活性化されたＡｋｔを有する神経膠芽細胞腫ＬＮ１８が、増加した感受性を示した。これがＡｋｔ活性に相関するか否かを決定するため、ＬＮ２２９神経膠芽細胞腫の細胞を構成的形態のＡｋｔでトランスフェクトし、ＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害に対するそれらの感受性に関して再度試験した。ミリストイル化されたＡｋｔをト

ランスフェクトされたＬＮ２２９細胞は、ベクターのみをトランスフェクトされた細胞に比較して、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害に応答してアポトーシスを経ることに対する感度の増加を示した。これらのデータは、ヒトの腫瘍がＡＴＰクエン酸リアーゼに応答して細胞成長抑止及びアポトーシスを経ることに感受性を示すこと、及びこの感受性がそのような細胞の好気性解糖を刺激する癌遺伝子によりさらに増強され得ることを確認する。

【００６５】

生長期の細胞はＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の処理に対して増殖性細胞よりも感受性が低い

ヒトにおける細胞の大多数は生長期であるか又は非増殖状態である。癌治療が治療ウインドーを有するためには、ドラッグが非増殖細胞に対するよりも増殖クローン又は形質転換された細胞に対して高い効果を有することが重要である。これらの問題に、インビトロ培養システムにおいて接近するために、我々は、前アポトーシス（ｐｒｏａｐｏｐｔｏｔｉｃ）分子であるＢａｘ及びＢａｋの枯渇によりアポトーシスを欠損させた有糸分裂促進物質依存性細胞系の有用性を利用した。ＩＬ－３の存在下では、これらの細胞系は、培養において連続して生長するが、ＩＬ－３の剥奪に際して、当該細胞は細胞周期から撤退する（ｗｉｔｈｄｒａｗ）が、数週は生長期にて生存する。細胞増殖がＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害に対する細胞の感受性を増加させるか否かを決定するために、我々は、ＩＬ－３の存在下で生長させるときに、Ｂａｘ／Ｂａｋ－欠損、ＩＬ－３依存性細胞系を、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤で処理した（図１３）。ＩＬ－３に応答した細胞生長はＡＣＬ阻害に対する細胞の感受性を劇的に増加させた。これらの細胞は、我々が、細胞生長に対するＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害の効果を二次的に試験することを可能にもさせた。休止しているＢａｘ／Ｂａｋ－欠損細胞をＩＬ－３で処理することにより、それらの生長及び細胞周期への再侵入を誘導した。我々は、投薬量依存性様式のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤が投薬量依存性様式において有糸分裂促進物質誘導性細胞生長を阻害したことを証明することができた。３０μＭのＳＢ２０４９９において、これらの細胞系の有糸分裂促進物質誘導性細胞の生長をほぼ完全に阻害した（図１４）。さらに、我々は、それらの生長期の対応物に比較したときに、有糸分裂促進物質刺激が、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の効果に対して静止期の細胞をより感受性にしたことを証明できた。有糸分裂促進物質により処理された生長期細胞は、細胞の生存により測定したところ、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の処理に対して、選択的に、より感受性になった（図１５）。合わせると、これらのデータが示唆するのは、形質転換された細胞が高率の好気性解糖を呈し、そしてアポトーシス性細胞死の誘導の細胞増殖の阻害により明らかにされた、ＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害に対して高い感受性を示すことである。さらに、非増殖性細胞は、そのような阻害剤の効果に対して相対的な耐性を示し、そして非形質転換細胞は中間の感受性を示すことから、癌の治療においてＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の効果に関する治療ウインドーが存在することを示唆する。

【００６６】

ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の作用の機構

ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の作用の分子上の根拠をさらに決定するために、追加の研究に着手した。我々は、Ａｋｔ－形質転換された細胞がそれらの増殖性及び細胞生存性を維持するために高率の解糖代謝に依存するようになったことを以前に証明した。ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害の一つの予測される効果は、サイトゾル中のクエン酸の蓄積（ｂｕｉｌｄ－ｕｐ）であり、解糖経路の負のアロステリック制御因子として作用し得る。ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤による処理がＡｋｔ－形質転換された細胞の高率解糖の阻害を導くか否かを試験するために、我々は、ＡＣＬ阻害剤による簡単な処理が投薬量依存性様式にてＡｋｔ－形質転換された細胞の解糖率を抑圧できるか否かを試験した（図１６）。高率の解糖を示す形質転換細胞においては、サイトゾル中のＡＴＰクエン酸リアーゼの阻害及びクエン酸の蓄積が、これらの細胞に高率の解糖を通してそれらのバイオエネルギーを維持させないかもしれず、即ち、選択的毒性をもたらさないかもしれない。

【００６７】

ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の二次的な結果は、クエン酸がもはやサイトゾルでは消費され得ず、よって、ミトコンドリアのマトリックスに蓄積することであり、ＴＣＡサイクルへの基質の利用可能性を増大させ、即ち、ＮＡＤＨの生成及び電子輸送鎖の活性を増加させることである。これに一致して、我々は、増加した投薬量のＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤により処理された細胞内のミトコンドリアの電位を測定し、ミトコンドリア膜電位に投薬量依存性増加があることを見いだした（図１７）。我々は、ミトコンドリアの持続性の高分極がミトコンドリアの膨張及び脂質膜の過酸化を通してアポトーシスを導き得ることを以前に公表した（Ｖａｎｄｅｒ　Ｈｅｉｄｅｎ　ｅｔ　ａｌ．１９９７）。このミトコンドリアの高分極が細胞内のアポトーシスの誘導に先行するか否かを決定するため、我々は、癌遺伝子形態のＡｋｔをトランスフェクトされた細胞内のアネキシンＶ陽性におけるミトコンドリアの高分極の時間経過を試験した。前の図に示したとおり、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の添加は、ミトコンドリア膜電位の投薬量依存性増加を導く。ミトコンドリアの高分極の最大の誘導の直後に、ミトコンドリアの電位の下降があり、アポトーシス性細胞死の開始の指標であるアネキシンＶ陽性の誘導に続く（図１８）。即ち、解糖刺激及びミトコンドリアの高分極の阻害は、アポトーシスの誘導に対して、処理された細胞を前もって処理するらしい。

【００６８】

結論

上記のデータは、癌細胞が、解糖経路の制御、ミトコンドリアの生理機能、及び細胞成長においてＡＴＰクエン酸リアーゼ活性の生成物に関する要求に対しての、機構に基づく効果を通して、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤に対して選択的感受性を示すことを示唆する。さらに、ＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害に対する感受性は増殖する細胞の方が非増殖細胞よりもはるかに高く、そして好気性解糖の誘導を導く癌遺伝子形質転換を経た細胞において劇的に増強される。我々は、よって、癌の治療におけるＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の用途を提案し、そしてＡｋｔの活性化又はＰＴＥＮの枯渇を通して形質転換された細胞、ＰＥＴイメージングにより測定された好気性解糖の増強率を示す細胞、及び転移部位において成長する細胞においてそれが特に有用であることを示唆する。

引用により本明細書に各々編入された引用文献

【００６９】

【表１】

1. Barth, C., Hackenschmidt, J., Ulmann, H., and Decker, K. Inhibition of cholesterol synthesis by (-)-hydroxycitrate in perfused rat liver. Evidence for an extramitochondrial mevalonate synthesis from acetyl coenzyme A. FEBS Lett, *22*: 343-346, 1972.

2. Benjamin, W. B., Pentyala, S. N., Woodgett, J. R. Hod, Y., and Marshak, D. ATP citrate lyase and glycogen synthase kinase-3 beta in 3T3-L1 cells during differentiation into adipocytes. Biochem J, *300*: 477-482, 1994.

3. Berkhout, T.A., Havekes, K. M., Pearce, N. J., and Groot, P. H. The effect of (-)-hydroxycitrate on the activity of the low-density-lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in the human hepatoma cell line Hep G2. Biochem J. *272*: 181-186, 1990.

4. Berwick, D. C., Hers, I., Heesom, K. J., Moule, S. K., and Tavare, J. M. The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. J Biol Chem, *277*:33895-33900, 2002.

5. Dolle, R. E., McNair, D., Hughes, M. J., Kruse, L. I., Eggelston, D., Saxty, B. A., Wells, T. N., and Groot, P. H. ATP-citrate lyase as a target for hypolipidemic intervention.

【００７０】

【表２】

Sulfoximine and 3-hydroxy-beta-lactam containing analogues of citric acid as potential tight-binding inhibitors. J Med Chem, *35*: 4875-4884, 1992.

6. Dolle, R. E., Gribble, A., Wilkes, T., Kruse, L. I., Eggleston, D., Saxty, B. A., Wells, T. N., and Groot, P. H. Synthesis of novel thiol-containing citric acid analogues. Kinetic evaluation of these and other potential active-site-directed and mechanism-based inhibitors of ATP citrate lyase. J Med Chem, *38*: 537-543, 1995.

7. Elshourbagy, N. A., Near, J. C., Kmetz, P. J., Sathe, G. M., Southan, C., Strickler, J. E., Gross, M., Young, J. F., Wells, T. N., and Groot, P. H. Rat ATP citrate lyase. Molecular cloning and sequence analysis of a full-length cDNA and mRNA abundance as a function of diet, organ, and age. J Biol Chem, *265*: 1430-1435, 1990.

8. Elshourbagy, N. A., Near, J. C. Kmetz, P. J., Wells, T. N., Groot, P. H., Saxty, B. A., Hughes, S. A., Franklin, M., and Gloger, I. S. Cloning and expression of a human ATP-citrate lyase cDNA. Eur J Biochem, *204*: 491-499, 1992.

9. Fang, M. and Lowenstein, J. M. Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. The regulation of fatty acid synthesis by rat liver extracts. Biochem J, *105*: 803:811, 1967.

10. Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V. Rathmell, J. C., Plas, D. R., Elstrom, R. L., June, C. H., and Thompson, C. B. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. Immunity, *16*:769-777, 2002.

11. Fukuda, H. and Iritani, N. Regulation of ATP citrate lyase gene expression in hepatocytes and adipocytes in normal and genetically obese rats. J Biochem (Tokyo), *126*: 437-444, 1999.

12. Gribble, A. D., Doll, R. E., Shaw, A., McNair, D., Novelli, R., Novelli, C. E., Slingsby, B. P., Shah, V. P., Tew, D., Saxty, B. A., Allen, M., Groot, P. H., Pearce, N., and Yates, J. ATP-citrate lyase as a target for hypolipidemic intervention. Design and synthesis of 2-substituted butanedioic acids as novel, potent inhibitors of the enzyme. J Med Chem, *39*:3569-3584, 1996.

13. Gribble, A. D., Ife, R. J., Shaw, A., McNair, D., Novelli, C. E., Bakewell, S., Shah, V. P., Dolle, R. E., Groot, P. H., Pearce, N., Yates, J., Tew, D., Boyd, H., Ashman, S., Eggleston, D. S., Haltiwanger, R. C., and Okafo, G. ATP-Citrate lyase as a target for hypolipidemic intervention. 2. Synthesis and evaluation of (3R,5S)-omega-substituted-3-

【００７１】

【表３】

carboxy-3, 5-dihydroxyalkanoic acids and their gamma-lactone prodrugs as inhibitors of the enzyme in vitro and in vivo. J Med Chem, *41*:3582-3595, 1998.

14. Inoue, J., Suzuki, F., Fukunishi, K., Adachi, K., and Takeda, Y. Studies on ATP citrate lyase of rat liver. J Biol Chem, *60*:543-553, 1966.

15. Lowenstein, J. M. Effect of (-)-hydroxycitrate on fatty acid synthesis by rat liver in vivo. J Biol Chem, *246*:629-632, 1971.

16. Morikawa, J., Nishimura, Y., Uchida, A., and Tanaka, T. Molecular cloning of novel mouse and human putative citrate lyase beta-subunit. Biochem Biophys Res Commun, *289*:1282-1286, 2001.

17. Pearce, N. J., Yates, J. W., Berkhout, T. A., Jackson, B., Tew, D., Boyd, H., Camilleri, P., Sweeney, P., Gribble, A. D., Shaw, A., and Groot, P. H. The role of ATP citrate lyase in the metabolic regulation of plasma lipids. Hypolipidaemic effects of SB-204990, a lactone prodrug of the potent ATP citrate lyase inhibitor SB-201076. Biochem J, *334*: 113-119, 1998.

18. Plas, D. R., Talapatra, S., Edinger, A. L., Rathmell, J. C., and Thompson, C. B. Akt and Bcl-x_L promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. J Biol Chem, *276*:12041-12048, 2001.

19. Saxty, B. A., Novelli, R., Dolle, R. E., Kruse, L. I., Reid, D. G. Camilleri, P., and Wells, T. N. Synthesis and evaluation of (+) and (-)-2,2-difluorocitrate as inhibitors of rat-liver ATP-citrate lyase and porcine-heart aconitase. Eur J Biochem, *202*: 889-896, 1991.

20. Sullivan, A. C., Triscari, J., Hamilton, J. G., Miller, O. N., and Wheatley, V. R. Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in the rat. I. Lipogenesis. Lipids, *9*:121-128, 1974.

21. Sullivan, A. C., Triscari, J., Hamilton, J. G., and Miller, O. N. Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in the rat. II. Appetite. Lipids, *9*: 129-134, 1974.

22. Sullivan, A. C., Dairman, W., and Triscari, J. (--)-threo-Chlorocitric acid: a novel anorectic agent. Pharmacol Biochem Behav, *15*: 303-310, 1981.

【００７２】

【表４】

23. Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. Bel-x_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. Cell, *91*:627-637, 1997.

24. Vander Heiden, M. G., Plas, D. R., Rathmell, J. C., Fox, C. J., Harris, M. H., and Thompson, C. B. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. Mol Cell Biol, *21*:5899-5912, 2001.

25. Watson, J. A. and Lowenstein, J. M. Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. Fatty acid synthesis by a combination of cytoplasm and mitochondria. J Biol Chem, *245*: 5993-6002, 1970.

【００７３】

実施例３

米国国立がん研究所の癌のアルファベット順のリストは以下を含む：急性リンパ芽球、

成人；急性リンパ芽球白血病、小児；急性骨髄性白血病、成人；副腎皮質カルシノーマ；副腎皮質カルシノーマ、小児；ＡＩＤＳ－関連リンパ腫ＡＩＤＳ－関連悪性腫瘍；肛門癌；星状細胞腫、小児小脳；星状細胞腫、小児大脳；胆管癌、肝外；膀胱癌；膀胱癌、小児；骨癌、骨肉腫／悪性繊維状組織球腫（ｍａｌｉｇｎａｎｔ　ｆｉｂｒｏｕｓ　Ｈｉｓｔｉｏｃｙｔｏｍａ）；脳幹神経膠腫、小児；脳腫瘍、成人；脳腫瘍、脳幹神経膠腫、小児；脳腫瘍、小脳星状細胞腫、小児；脳腫瘍、大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、小児；脳腫瘍、上衣細胞腫、小児；脳腫瘍、骨髄腫、小児；脳腫瘍、天膜上始原神経外胚葉腫瘍、小児；脳腫瘍、視覚経路及び視床下部の神経膠腫、小児；脳腫瘍、小児（その他）；胸部癌；胸部癌及び妊娠；胸部癌、小児；胸部癌、男性；気管支腺腫（アデノーマ）／カルチノイド、小児；カルチドイド腫瘍、小児；カルチドイド腫瘍、胃腸；カルシノーマ、副腎皮質；カルシノーマ、島細胞；未知の始原のカルシノーマ；中枢神経系リンパ腫、始原；小脳星状細胞腫、小児；大脳星状細胞腫／悪性腫瘍神経膠腫、小児；頸管癌；小児が癌；慢性リンパ球白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性疾患；腱（Ｔｅｎｄｏｎ）の鞘（Ｓｈｅａｔｈｓ）の明細胞肉腫；結腸癌；結腸直腸癌、小児；皮膚Ｔ－細胞リンパ腫；子宮内膜癌；上衣細胞腫、小児；上皮癌、卵巣；食道癌；食道癌、小児；腫瘍のユーイングファミリー；頭蓋外胚細胞腫瘍、小児；生殖腺外胚細胞腫瘍；肝外胆管癌；目の癌、眼内メラノーマ；目の癌、網膜芽腫；胆嚢癌；胃（腹部）癌；胃（腹部）癌、小児；胃腸カルチノイド腫瘍；胚細胞腫瘍、頭蓋外、小児；胚細胞腫瘍、生殖腺外；胚細胞腫瘍、卵巣；妊娠期間栄養膜腫瘍；神経膠腫、小児脳幹；神経膠腫、小児視覚経路及び視床下部；毛髪細胞白血病；頭部及び頸部の癌；肝細胞（肝臓）癌、成人（始原）；肝細胞（肝臓）癌、小児（始原）；ホジキンのリンパ腫、成人；ホジキンのリンパ腫、小児；妊娠中のホジキンのリンパ腫；下咽頭癌；視床下部及び視覚経路の神経膠腫、小児；眼内メラノーマ；島細胞カルシノーマ（内分泌膵臓）；カポジ肉腫；腎臓癌；喉頭癌；喉頭癌、小児；白血病、急性リンパ芽球、成人；白血病、急性リンパ芽球、小児；白血病、急性骨髄性、成人；白血病、急性骨髄性、小児；白血病、慢性リンパ球性；白血病、慢性骨髄性；白血病、毛髪細胞；唇及び口腔癌；肝臓癌、成人（始原）；肝臓癌、小児（始原）；肺癌、非小細胞；肺癌、小細胞；リンパ芽球白血病、成人急性；リンパ芽球白血病、小児急性；リンパ球性白血病、慢性；リンパ腫、ＡＩＤＳ－関連；リンパ腫、中枢神経系（始原）；リンパ腫、皮膚Ｔ－細胞；リンパ腫ホジキン、成人；リンパ腫、ホジキン、小児；リンパ腫、妊娠の間のホジキン；リンパ腫、非ホジキン、成人；リンパ腫、非ホジキン、小児；リンパ腫、妊娠の間の非ホジキン；リンパ腫、始中枢神経系；マクログロブリン血症、ワルデンストローム；男性の胸部癌；悪性腫瘍中皮腫、成人；悪性腫瘍中皮腫、小児；悪性腫瘍胸腺腫；髄芽腫、小児；メラノーマ；メラノーマ、眼内；メルケル細胞カルシノーマ；中皮腫、悪性；オカルト始（Ｏｃｃｕｌｔ　Ｐｒｉｍａｒｙ）を伴う転移性の偏平上皮頸部癌（Ｓｑｕａｍｏｕｓ　Ｎｅｃｋ　Ｃａｎｃｅｒ）；集合性（Ｍｕｌｔｉｐｌｅ）内分泌腫瘍形成症候群、小児；集合性骨髄腫／血漿細胞腫瘍形成；骨髄異形成症候群；骨髄性白血病、慢性；骨髄性白血病、小児急性；骨髄腫、集合性；骨髄増殖性疾患、慢性；鼻腔及び鼻腔付近の副鼻腔癌（Ｓｉｎｕｓ　Ｃａｎｃｅｒ）；鼻咽腔癌（Ｎａｓｏｐｈａｒｙｎｇｅａｌ　Ｃａｎｃｅｒ）；鼻咽腔癌、小児；神経芽腫；非ホジキンリンパ腫、成人；非ホジキンリンパ腫、小児；妊娠中の非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺癌；口腔癌、小児；口腔及び唇の癌；口腔咽頭癌；骨肉腫／骨の悪性繊維性組織球腫；卵巣癌、小児；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣の未発達の（Ｌｏｗ）悪性腫瘍潜在性（Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ）腫瘍；膵臓癌；膵臓癌、小児；膵臓癌、島細胞；副鼻腔癌（Ｓｉｎｕｓ　Ｃａｎｃｅｒ）及び鼻腔癌；上皮小体（Ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ）癌、陰茎癌；クロム親和性細胞腫；松果体及び原始神経外胚葉性腫瘍、小児；下垂体腫瘍；血漿細胞腫瘍形成／集合性骨髄腫；プリューロ肺（Ｐｌｅｕｒｏｐｕｌｍｏｎａｒｙ）芽腫；妊娠及び胸部癌；妊娠及びホジキンリンパ腫；妊娠及び非ホジキンリンパ腫；始原中枢神経系リンパ腫；始原肝臓癌、成人；始原肝臓癌、小児；前立腺癌；直腸癌；腎臓細胞（腎臓）癌；腎臓細胞（腎臓）癌、小児；腎臓骨盤及び尿管、転移性細胞癌；網膜芽腫；横紋筋肉腫、小児；唾液腺癌；唾液腺癌、小児；肉腫、腫瘍のユーイングファミリー；肉腫、カポジ；肉腫（骨肉腫）／骨の悪

性繊維性組織球腫；肉腫、横紋筋肉腫、小児；肉腫、柔組織、成人；肉腫、柔組織、小児；セザリー症候群；皮膚癌；皮膚癌、小児；皮膚癌（メラノーマ）；皮膚カルシノーマ、メルケル細胞；小細胞肺癌、小腸癌；柔組織肉腫、成人；柔組織肉腫、小児；（Ｏｃｃｕｌｔ　Ｐｒｉｍａｒｙ）を伴う転移性の偏平上皮頸部癌（Ｓｑｕａｍｏｕｓ　Ｎｅｃｋ　Ｃａｎｃｅｒ）、転移性；腹部（胃）癌；腹部（胃）癌、小児；原始神経外胚葉性腫瘍、小児；Ｔ－細胞リンパ腫、皮膚；精巣癌；胸腺腫、小児；胸腺腫、悪性；甲状腺癌；甲状腺癌、小児；腎臓の骨盤及び尿管の転移性細胞癌；栄養膜腫瘍、妊娠期間；未知の始原部位、の癌（Ｃａｎｃｅｒ　ｏｆ）、小児；小児の異常な癌；尿管及び腎臓骨盤、繊維性細胞の癌；尿管癌；子宮肉腫；膣癌；視覚経路及び視床下部の神経膠腫、小児；外陰部の癌；ワルデンストロームのマクログロブリン血症；及びウイルムズ腫瘍を含む。本発明の方法はそのような種類の癌を治療するのに有用であるかもしれない。

【図面の簡単な説明】

【００７４】

【図１】図１は代謝経路を描写する。

【図２】図２は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図３】図３は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図４】図４は発明のいくつかの態様において有用なＡＴＰクエン酸リアーゼ阻害剤の構造を開示する。

【図５】図５は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図６】図６は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図７】図７は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図８】図８は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図９】図９は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１０】図１０は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１１】図１１は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１２Ａ】図１２Ａは実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１２Ｂ】図１２Ｂは実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１３】図１３は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１４Ａ】図１４Ａは実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１４Ｂ】図１４Ｂは実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１５】図１５は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

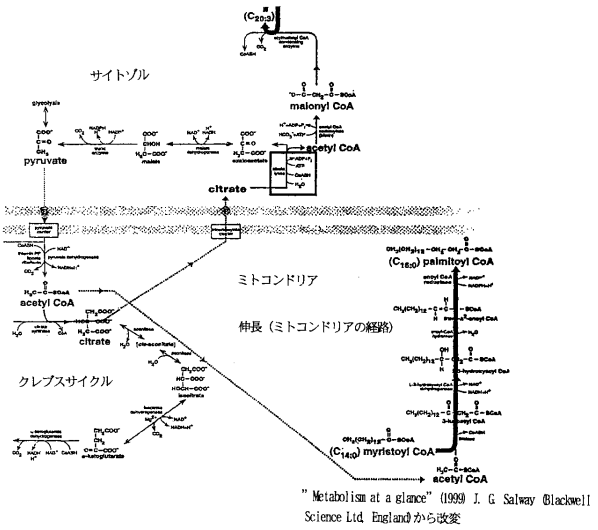
【図１６】図１６は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１７】図１７は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１８】図１８は実施例２において記載された実験で生じたデータを描写する。

【図１】

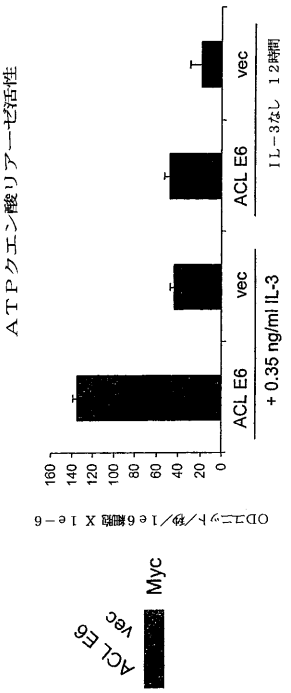
ＡＴＰクエン酸リアーゼ（ＡＣＬ）はサイトゾルのアセチルＣｏＡの生産を触媒する



”Metabolism at a glance” (1999) J. G. Salway (Blackwell Science Ltd. England)から改変

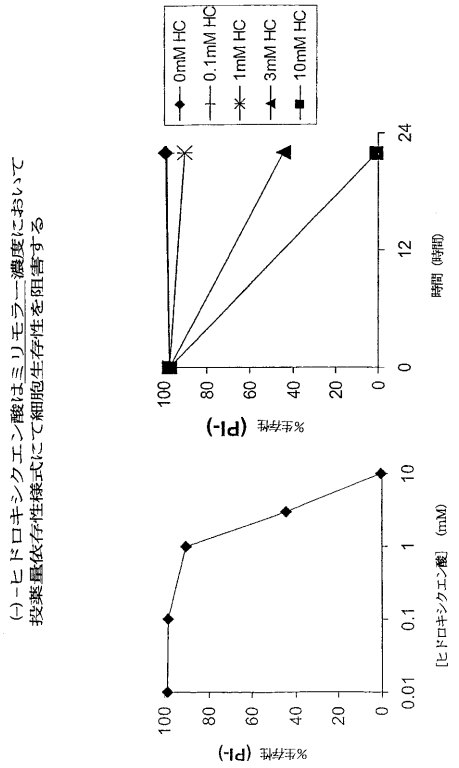
【図２】

ＡＣＬ活性は転写後の機構により休止細胞においてダウン制御される



【図３】

(−)−ヒドロキシクエン酸はミリモラー濃度において投薬量依存性様式にて細胞生存性を阻害する



【図４】

有力なＡＴＰ阻害剤及びそのプロドラッグの構造

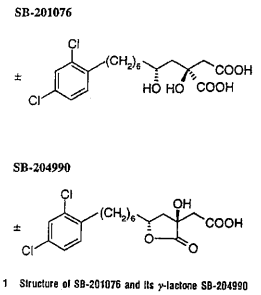
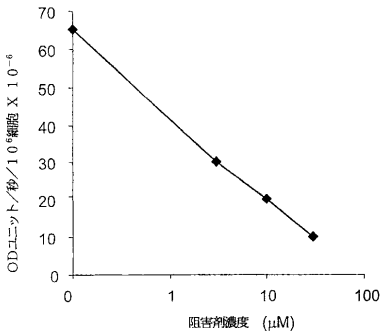


Figure 1 Structure of SB-201076 and its γ-lactone SB-204990

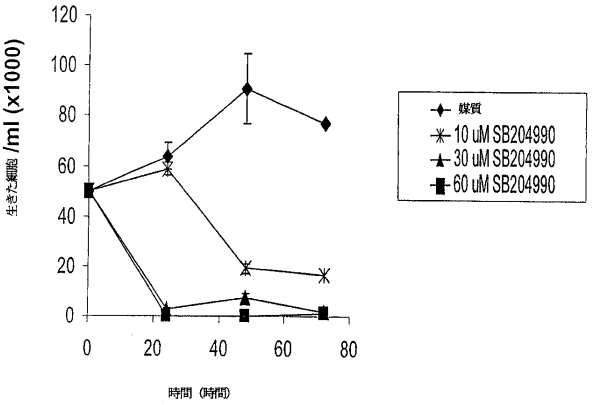
【図５】

ＳＢ２０１０７６は投薬量依存性様式において
ＡＣＬ活性を阻害する



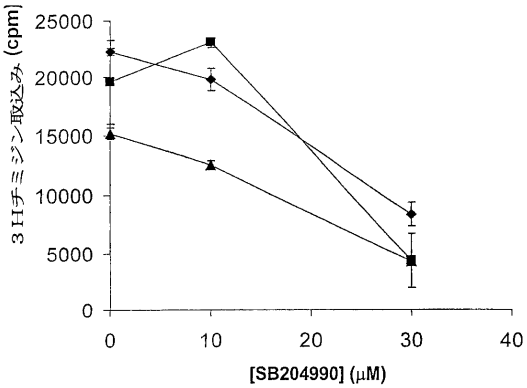
【図６】

ＳＢ２０４９９０はミリモラー濃度において
投薬量依存性様式にて細胞の増殖と生存性を阻害する



【図７】

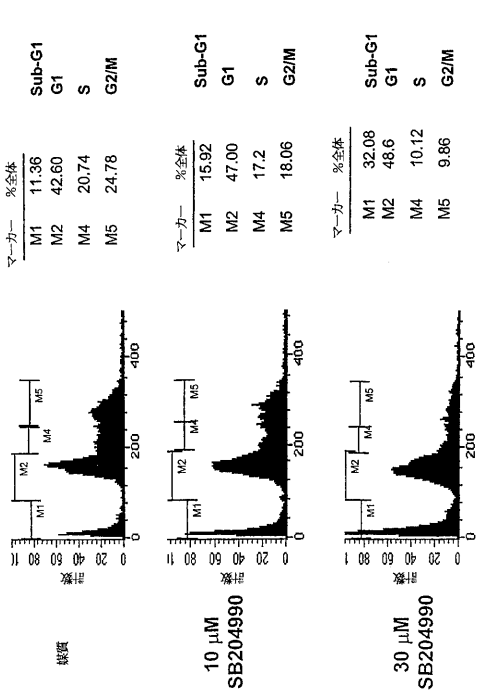
ＡＣＬは投薬量依存性様式にて固定化
された造血細胞の増殖を妨害する



（ＩＬ３存在下でドラッグにより２０時間処理された３つの別個のＦＬ５．１２安定クローン）

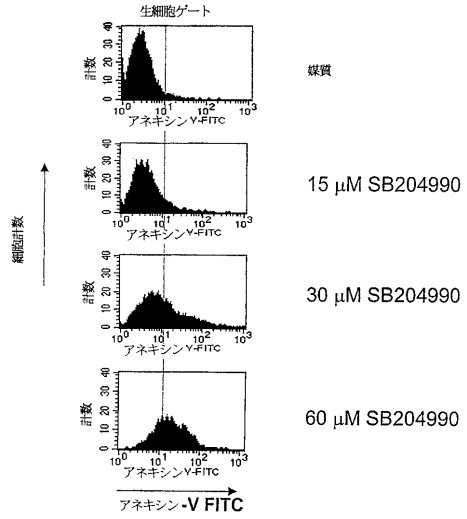
【図８】

ＡＣＬは増殖する細胞のＧ１抑止及びアポトーシスを誘導する

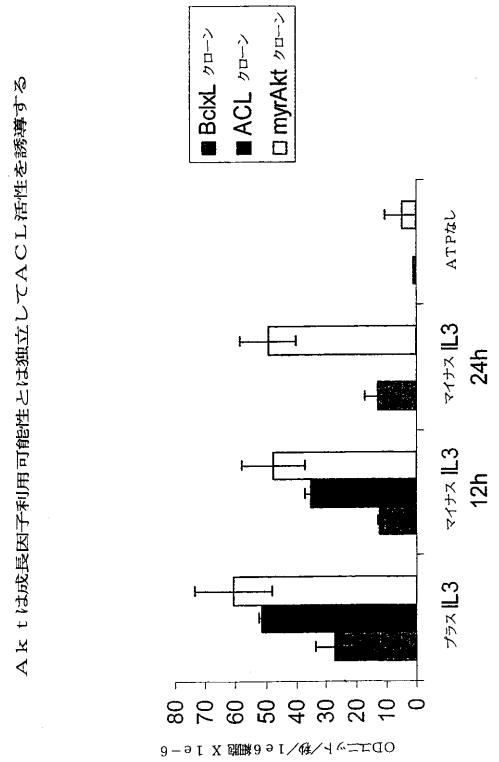


【図９】

ＡＣＬは投薬量依存性様式にてアポトーシス性マーカーアネキシンＶの表面発現を誘導する

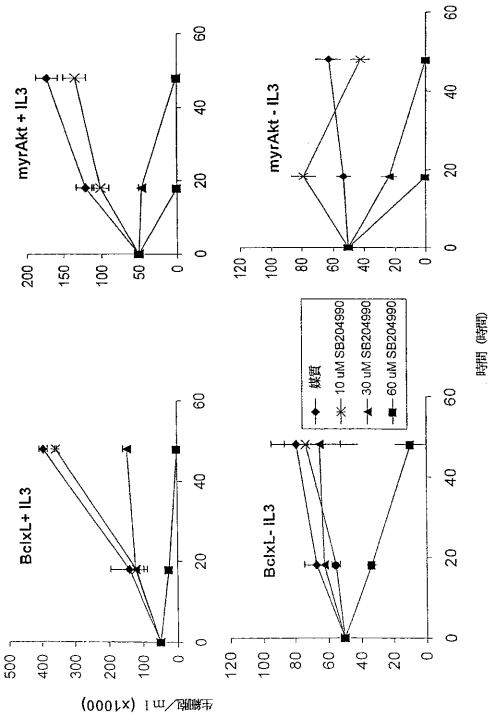


【図１０】



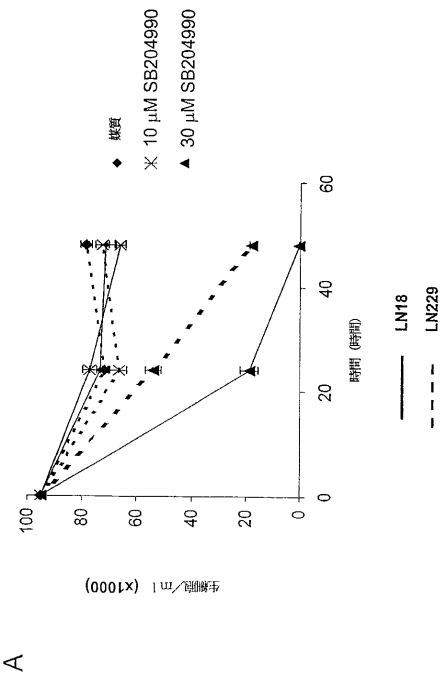
【図１１】

ＡＣＬ阻害は増殖する細胞及び活性なＡｋｔを発現する細胞に対して選択的に毒性である

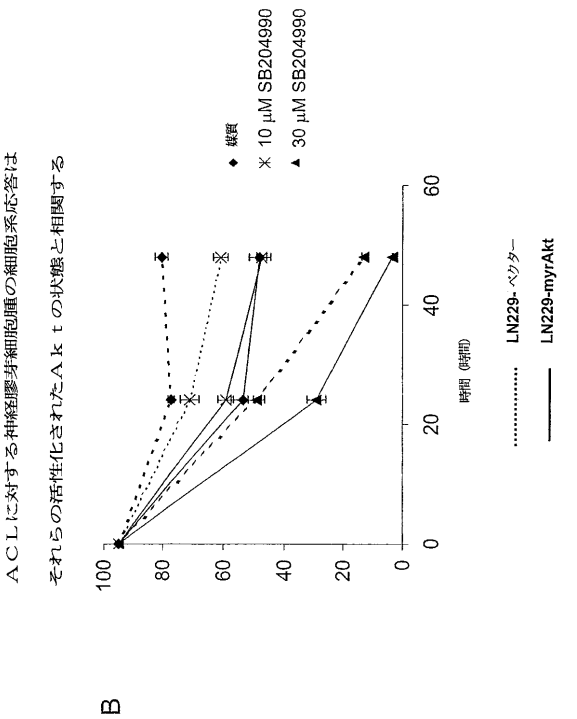


【図１２Ａ】

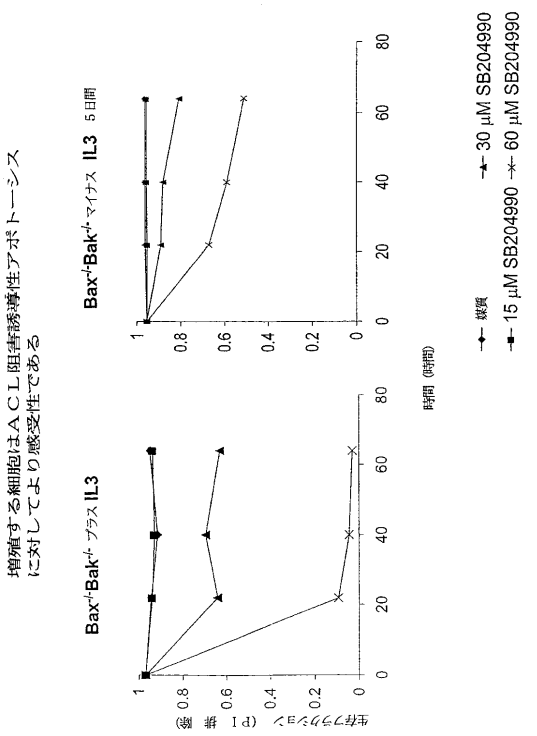
ＡＣＬに対する神経膠芽細胞腫の細胞系応答はそれらの活性化されたＡｋｔの状態と相関する



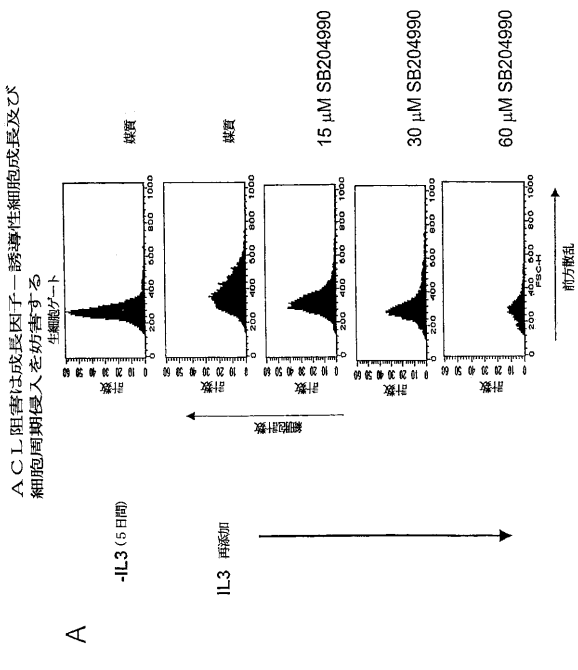
【図１２Ｂ】



【図１３】

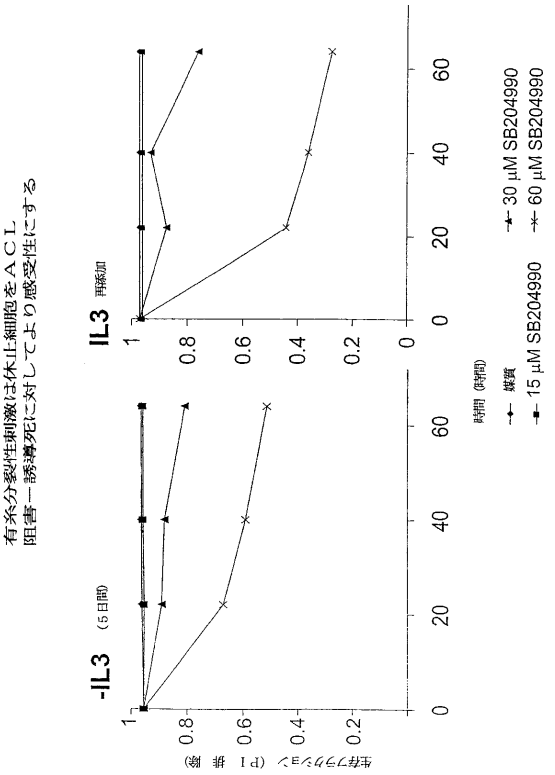


【図１４Ａ】

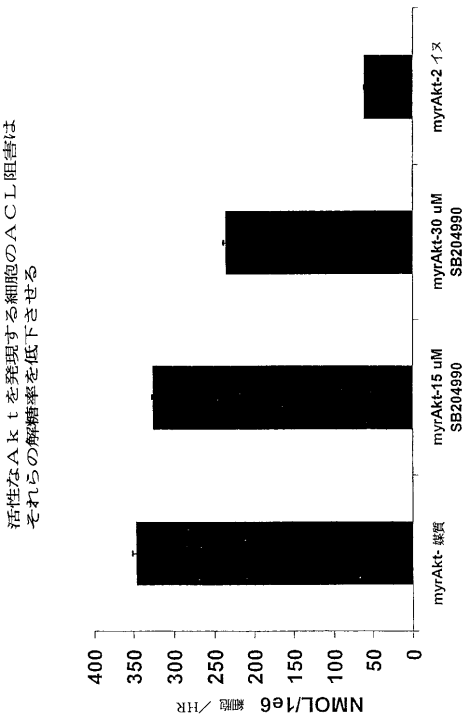


【図１４Ｂ】

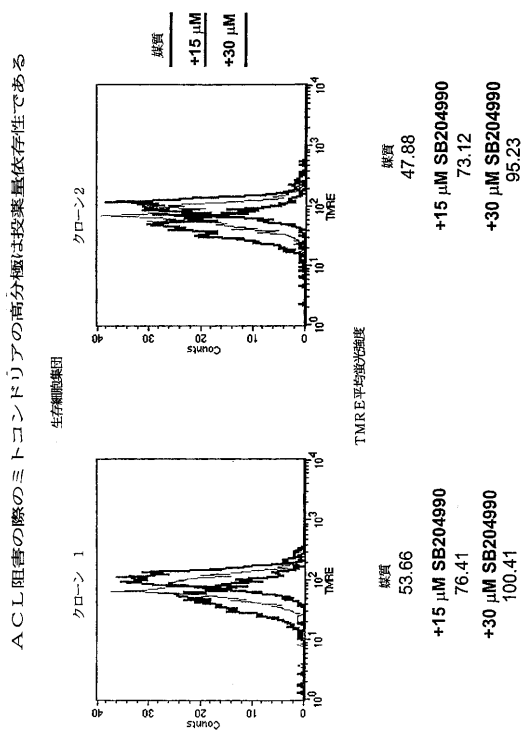
【図１５】



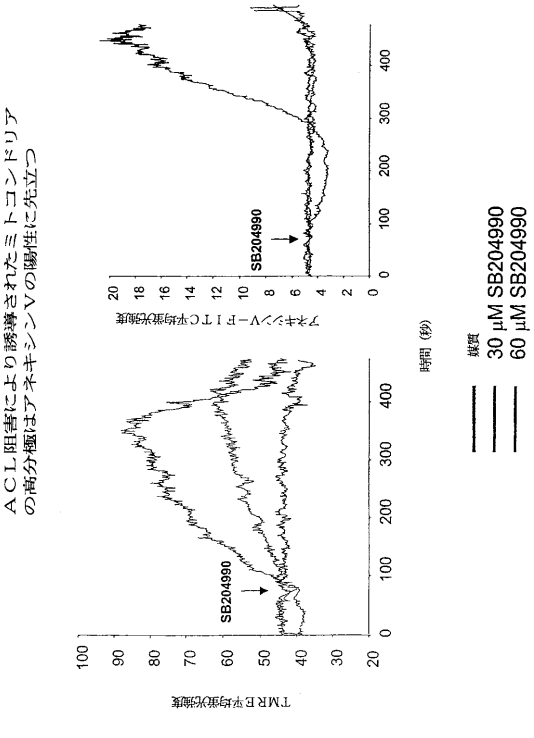
【図１６】



【図１７】



【図１８】



フロントページの続き

(74)代理人 100091638
弁理士 江尻 ひろ子
(72)発明者 トンプソン，クレイグ・ビー
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１９０６６，メリオン・ステイション，モールワイド・ロード３０４
(72)発明者 バウアー，ダニエル
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１９１０３，フィラデルフィア，サウス・トゥエンティセカンド・ストリート ２５１
(72)発明者 ハッズィヴァッシリオウ，ジョージア
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１９１４６，フィラデルフィア，ロンバード・ストリート ２４２５

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 国際公開第０２／０７０６７６（WO，Ａ１）
特表平０８－５００８５（ＪＰ，Ａ）
特表平０７－５０９４７０（ＪＰ，Ａ）
The role of ATP citrate-lyase in the metabolic regulation of plasma lipids: Hypolipidaemic effects of SB-204990, a lactone prodrug of the potent ATP cytrate-lyase inhibitor SB-201076, Biochem. J., １９９８年 ８月１５日, Vol.334, No.1, P.113-119
Lu,H. et al., Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycosis implicates the Warburg effect in carcinogenesis, J. Biol. Chem., ２００２年 ６月２８日, Vol.277, No.26, P.23111-23115
Racker,E. et al., Warburg effect revisited: Merger of biochemistry and molecular biology, Science, １９８１年 ７月１７日, Vol.213, No.4505, P.303-307

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 45/00
C12Q 1/527
CA/REGISTRY(STN)
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)