

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5539653号
(P5539653)

(45) 発行日 平成26年7月2日(2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日(2014.5.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q	1/02	(2006.01)	C 12 Q	1/02
C 12 Q	1/68	(2006.01)	C 12 Q	1/68
C 12 Q	1/26	(2006.01)	C 12 Q	1/68
C 12 Q	1/48	(2006.01)	C 12 Q	1/26
C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 Q	1/48

請求項の数 8 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-556587 (P2008-556587)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月27日 (2007.2.27)
 (65) 公表番号 特表2009-533017 (P2009-533017A)
 (43) 公表日 平成21年9月17日 (2009.9.17)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2007/062871
 (87) 國際公開番号 WO2007/101191
 (87) 國際公開日 平成19年9月7日 (2007.9.7)
 審査請求日 平成22年2月26日 (2010.2.26)
 (31) 優先権主張番号 60/777,096
 (32) 優先日 平成18年2月27日 (2006.2.27)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/821,230
 (32) 優先日 平成18年8月2日 (2006.8.2)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 507300641
 ターゲット・モレキュラー・ダイアグ
 ナスティクス・エルエルシー
 アメリカ合衆国・イリノイ・60559・
 ウエストモント・オークモント・レーン・
 610
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞脂肪を減少させるため、心毒性を予測するため、チロシンキナーゼ阻害剤による処置による組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

チロシンキナーゼ阻害剤での処置に反応した心毒性を予測するための方法であって、
 チロシンキナーゼ阻害剤で心筋細胞を処置する段階と、
 脂肪酸酸化障害が前記処置された心筋細胞に存在するかどうかを判定する段階とを含み
 、
 それによって、前記処置された心筋細胞の脂肪酸酸化障害の存在により、チロシンキナーゼ阻害剤での心筋細胞の処置が毒性である可能性が高いことが予測される、方法。

【請求項 2】

チロシンキナーゼ阻害剤がerbB阻害剤である請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

チロシンキナーゼ阻害剤がトラスツズマブである請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

脂肪酸酸化障害が、チロシンキナーゼ阻害剤での処置による脂肪酸酸化障害の無い細胞中の脂質含量の減少と比較して、チロシンキナーゼ阻害剤での処置による細胞の脂質含量の減少を測定することによって判定される請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

脂肪酸酸化障害が、脂肪酸酸化障害の無い細胞と比較して、細胞中の脂肪酸酸化代謝経路における少なくとも1種の酵素活性の減少量を測定することによって判定される請求項1に記載の方法。

20

【請求項 6】

脂肪酸酸化障害が、脂肪酸酸化障害の無い細胞と比較して、細胞中の脂肪酸酸化代謝経路における少なくとも1種の酵素をコードするmRNAの減少量を測定することによって判定される請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

脂肪酸酸化障害が、チロシンキナーゼ阻害剤での正常細胞の処置による細胞中の脂肪酸酸化代謝経路における少なくとも1種の酵素量を測定することによって判定される請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

脂肪酸酸化障害が、チロシンキナーゼ阻害剤での正常細胞の処置によるATP量の減少を測定することによって判定される請求項1に記載の方法。 10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

心臓は、生物の一生の間、効率的なポンプとしてそれを機能させるATP産生に関して大きな能力を有する。成人の心筋は、その主要なエネルギー源として、脂肪酸(FA)および/またはグルコース酸化を使用する。通常の条件下、成人の心臓は、ミトコンドリア中の脂肪酸の酸化を介してそのエネルギーの大部分を導き出す。

【0002】

心筋細胞は、種々の生理的かつ食事条件下、ATP産生が一定速度に維持されるように炭水化物の解糖とクレブスサイクルとの間で脂肪燃料源に切り替える能力を有する。この代謝および燃料選択の柔軟性は、正常な心臓機能にとって重要である。心臓エネルギー変換能力および代謝フラックスは、多数のレベルで調節されるが、1つの重要な調節機序は、遺伝子発現レベルで生じる。複数のエネルギー変換経路に関与する遺伝子発現は、発達的、生理的および病態生理学的なきっかけに応答して動的に調節される。 20

【0003】

これらの重要なエネルギー代謝経路に関与する遺伝子は、核受容体スーパーファミリーのメンバー、特に脂肪酸活性化ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)および核受容体活性化補助因子、PPARコアクチベーター-1 (PGC-1)、ならびにエストロゲン受容体関連タンパク質ERR、ERRおよびERR、ならびにそれらのアクチベーターPGR-1およびPERCにより転写調節される。生理的および病態生理学的状態による心臓PPAR/PGC-1複合体の動的調節を、より詳細に以下に説明する。 30

【0004】

PGC-1は、褐色脂肪中の適応的熱産生に関連するPPAR活性化補助因子である。構造的に関連する2つのタンパク質、PGC-1およびPARCは、クローン化されており、エネルギー代謝経路の調節に関与していると思われる。組織特異的およびPGC-1発現の誘導性により、ミトコンドリアの合成および酸化、肝臓でのグルコース新生、および骨格筋のグルコース取り込みなど、細胞のエネルギー産生代謝過程の動的調節への関与を示唆している。PGC-1は、心臓、骨格筋、褐色脂肪、および肝臓などの酸化性の高い組織において選択的に発現する。心臓におけるPGC-1の発現は、出生時に急激に増加する。これは、グルコース代謝から脂肪酸化への周産期シフトと一致する。PGC-1活性および発現レベルはまた、寒冷暴露、絶食、および運動;酸化的代謝を促進することが知られている刺激により誘導されることが知られている。培養時に心筋細胞中のPGC-1の強制発現により、複数のミトコンドリアのエネルギー変換/エネルギー産生経路に関与する核およびミトコンドリア遺伝子の発現を誘導し、細胞ミトコンドリア数を増加させ、連結した呼吸作用を刺激する。p38 MAPキナーゼ、-アドレナリン作動性/cAMP、酸化窒素、AMPキナーゼ、およびCa²⁺-カルモジュリンキナーゼを含むこれらの刺激に関連するシグナル伝達経路は、PGC-1発現またはそのトランス活性化機能のいずれかを増加させることにより、PGC-1およびその下流標的遺伝子を活性化する。 40

【0005】

50

これらの代謝的および構造的变化により、心臓における拡張心筋症および弛緩期機能不全を生じ得る。興味深いことに、ミトコンドリアの増殖は可逆性であり、心筋症は、導入遺伝子発現が減少すれば救出できる。このことから、PGC-1 は、PPARを介して細胞脂肪酸代謝のアクチベーターとして役立つことに加えて、ミトコンドリアの生合成に関連することが示唆される。したがって、PGC-1 は、酸化的エネルギー代謝のマスター モジュレーターとして役立つと思われ、細胞エネルギー状態の変化に応答する。

【 0 0 0 6 】

オーファン核受容体のエストロゲン関連受容体(ERR)ファミリーは、心臓および骨格筋エネルギー代謝のPGC-1活性化調節剤として機能する証拠が出現している。ERRファミリーの3つのメンバー: ERR 、 ERR およびERR が存在する。ERR およびERR の発現は、心臓および緩徐な単収縮骨格筋など、主としてATP産生に関するミトコンドリアの酸化的代謝に依存する成人組織において上昇する。ERR の発現は、細胞の脂肪酸取込みおよびミトコンドリアの酸化に関する酵素の全体的なアップレギュレーションと平行して出生後の心臓において劇的に増大する。最近、ERR およびERR は、活性化補助因子のPGC-1ファミリーに対する新規なパートナーとして同定された。ERRイソ体とPGC-1 との間のこの機能的関係により、エネルギー代謝におけるERRの役割に刺激的な興味が持たれている。

【 0 0 0 7 】

ERR 遺伝子の欠失により、脂質代謝の構成的調節におけるERR に対する組織特異的役割が明らかにされる。ERR -'-マウスでは、脂肪細胞のサイズおよび脂質合成率の減少と同時に白色脂肪質量が減少する。対照的に、ERR は、PGC-1 との機能的相互作用と調和して、恐らく心臓における脂質異化作用において役割を果たしているであろう。明白な心臓表現型を示さないERR -'-マウスは、心臓PGC-1 およびERR の発現において代償的増加を示す。これらの結果により、ERRイソ体が、心臓における脂肪酸代謝遺伝子の構成的な発現に寄与していることを示唆している。しかしながら、遺伝子発現における変化の代謝作用は依然として知られていない。

【 0 0 0 8 】

ERR を過剰発現する心筋細胞における遺伝子発現プロファイリングが、心臓ERR 標的遺伝子を同定するために使用されている。ERR は、細胞脂肪酸取込み(LPL、CD36/FAT、H-FABP、FACS-1)、 -酸化(MCAD、 VLCAD、 LCHAD)、およびミトコンドリアの電子輸送/酸化的リン酸化(チトクロームc、 COXIV、 COXVIII、 NADHユビキノンデヒドロゲナーゼ、 フラビンタンパク質-ユビキノンオキシドレダクターゼ、 ATPシンターゼ)を含む、エネルギー产生経路に関する遺伝子を活性化する。ERR はまた、心筋細胞におけるパルミテート酸化速度を増加させる。ERR による -酸化酵素遺伝子の活性化は、PPAR シグナル伝達経路を含む。ERR は、PPAR 遺伝子発現、およびMCADのERR 媒介調節を直接活性化し、M-CPT Iは、PPA -'-マウスに由来する細胞中で消滅する。ERR はまた、ミトコンドリアの生合成のPGC-1 調節に関与することが現在知られている。それは、NRF-2複合体のサブユニットをコードし、転写レベルにおいてミトコンドリアの酸化的代謝に関する遺伝子を直接活性化するGapba遺伝子の調節を介してNRF経路のPGC-1 活性化を媒介することが知られている。活性化補助因子PGC-1 と一緒にERR は、MCAD、チトクロームc、およびATPシンターゼ 遺伝子プロモーターを活性化する。結論として、これらの結果により、PGC-1調節サーキットへの関与を介して心臓の酸化的エネルギー代謝の調節剤としてERR が確認される。しかしながら、心臓におけるERRの正確な生物学的役割は確認されていない。

【 0 0 0 9 】

核受容体ERR (エストロゲン関連受容体)は、心臓、骨格筋、腎臓、および脳、ならびに発達神経系において高度に発現する。哺乳動物細胞における活性化補助因子PGC-1 およびPGC-1 の発現は、ERR による転写活性化を強力に増大させる。オーファン受容体の構成的活性化機能2(AF-2)は、相乗的増強のために重要である。ERR 2イソ体およびPGC-1 に特異的なさらなるアミノ末端活性化機能を確認するために、機能的受容体の切断分析が用いられている。インビトロ実験により、両活性化補助因子と一緒にになってERR の

10

20

30

40

50

直接的相互作用が示された。これらの知見は、ERR に対する組織特異的な活性化補助因子としてのPGC-1 およびPGC-1 に関する明確な調節的機能の仮説と一致する。それにもかかわらず、これらの機能をさらに限定するためのさらなる研究が必要とされている。

【0010】

遺伝子導入マウスにおけるPGC-1の心臓特異的過剰発現により、心筋細胞において無制御なミトコンドリアの増殖が生じ、サルコメア構造の喪失および拡張心筋症に至る。このように、PGC-1は、心臓ミトコンドリア数およびエネルギー需要に応じた機能の制御における重要な調節分子である。

【非特許文献1】Fabianら、「A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors」、Nature Biotechnology 23、329頁

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

これらの調節経路の全てではないが、その大部分は、シグナル伝達経路の中間体のリン酸化を含む。種々のキナーゼ阻害剤の作用などによるリン酸化の阻害はこれらのシグナル伝達経路に影響を及ぼして、脂肪酸代謝に変化を生じさせ、心毒性などの器官毒性を引き起こし得る。多数の新規な抗癌薬はキナーゼ阻害剤であり、毒性を伴う。したがって、薬物が毒性作用を伴うかどうか、またこの毒性作用が患者に生じやすいかどうかを確認する方法が必要とされている。これら阻害剤のリン酸化受容体標的に対する効力を維持しつつ、それらの毒性作用を回避する方法もまた必要とされている。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

毒性、特に心毒性が、チロシンキナーゼ阻害剤またはerbB阻害剤などの種々の薬物による処置について選択された患者に生じる可能性が高いかどうかを診断する方法を開示する。候補薬物が、毒性または心毒性作用を有する可能性が高いかどうかを評価する方法もまた開示する。一方法において、脂肪酸酸化障害が存在するかどうかを判定するために、トリグリセリドおよびコレステロールなどの脂質を分析することができる。別の方法において、観察された脂肪酸酸化の原因となるMCADなどの酵素を決定することができる。脂質レベルに関して、正常細胞中では、AMP活性化タンパク質キナーゼの活性化により、脂質レベルの特徴的な減少、ならびに解糖作用によるより短い炭素鎖中間体、例えば、C₂からC₆炭素中間体の対応する増加に至り得ることが考えられる。本開示の目的のために、正常細胞における特徴的な脂質減少からの統計的に有意な偏差はいずれも、脂肪酸酸化障害を考慮することができる。同様に、本開示の目的のために、これらの代謝経路に関与する酵素に関して、ウェスタン、ノーザン、PCRまたは他の技法により測定されたこれら酵素の活性量またはレベルにおける正常細胞に比較して統計的に有意な変化はいずれも、脂肪酸酸化障害を考慮することができる。脂肪酸酸化障害の診断は、毒性の危険性増大を予測するためにおよび恐らく薬物使用のための禁忌指標として使用することができる。あるいは、薬物が、脂肪酸酸化障害を有する患者に使用される場合、これらの方法は、患者の心臓機能を密接に追跡調査する必要性を示すために使用することができる。あるいは、グルコースの取込みは、ポジトロン放出断層撮影によるなど、既知の方法により測定することができる。チロシンキナーゼ阻害薬物の投与の際にグルコースの取込みが減少しないか、または正常な非癌性細胞と同程度に減少しない場合、その薬物処置は、非癌性細胞に対して毒性である可能性が高い。あるいは、チロシンキナーゼ阻害剤への暴露の際に、正常な非癌性細胞内よりもATPレベルが減少する場合、チロシンキナーゼ阻害剤は毒性であることが予測される。

30

【0013】

チロシンキナーゼ阻害剤、特にerbB阻害剤などの薬物による処置について選択された患者において心毒性があるかどうかを予測する別の方法は、腫瘍もしくは血液のいずれか、または双方における患者のTNF を評価することである。TNF のレベルは、患者が薬物、特にヘルセプチン(Herceptin)療法に起因する心毒性に関連する有害事象を有する可能性

40

50

が高いかどうかを予測するために使用することができる。

【0014】

美容上の理由または体重減少を目的として、患者の脂質および脂肪を減少させるために、一定のチロシンキナーゼ阻害剤など、AMP活性化タンパク質キナーゼ(AMPK)を活性化する薬物の投与方法もまた開示する。この方法は、脂質が、より小型の炭素中間体へと酸化されるように、AMP活性化タンパク質キナーゼのアクチベーターは、細胞代謝におけるシフトを引き起こすという驚くべき発見に基づいている。代謝のシフトにより、処置細胞における脂質含量の驚くべき減少がもたらされる。細胞が脂質含量の一部を放出させるために、AMP活性化タンパク質キナーゼを活性化するのに十分な量のAMP活性化タンパク質キナーゼアクチベーターの投与を使用することができる。このような化合物を細胞に投与する多数の方法が知られており、使用することができる。局所投与または全身投与を用いることができる。局所投与は、注射、皮膚パッチまたは軟膏もしくはローションによって行うことができる。

10

【0015】

虚血、サイトカイン放出、グルコース欠乏のような外傷に通常起因する思われる急性の苦痛、およびこのような病態が診断される細胞および器官において代謝緊張を引き起こす同様の事象から心筋および/または脳細胞などの器官を保護するのに十分な量で、AMP活性化タンパク質キナーゼアクチベーターを患者に投与する方法、または器官とのインキュベーションのために培地中にそれを含む方法もまた開示する。デュアルキナーゼ阻害剤、特にAMP活性化タンパク質キナーゼ活性の増大を引き起こすチロシンキナーゼ阻害剤もまた使用することができる。このようなキナーゼ阻害剤は、詳細な説明でさらに記載されているように、それらの標的に対して特異的であることが好ましい。多数の投与方法が知られており、用いることができる。例えば、薬物は、器官を灌流する溶液に含有させることもできるし、全身に投与することもできる。

20

【0016】

移植用器官を保存する方法もまた開示する。該方法は、AMPKアクチベーターを含む保存溶液を調製する段階と、器官を該保存溶液と接触させる段階とを含む。器官に対して改善された保護を提供するために、保存溶液は、AMPKアクチベーターが十分な量で添加される任意の既知の保存溶液であり得る。

30

さらなる特徴および利点は、本明細書に記載されており、以下の詳細な説明および図面から明らかとなろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

一態様において、本開示は、ヘルセプチンおよびラバチニブ(Tykerb)のようなチロシンキナーゼ阻害剤などの薬物が、脂質代謝経路に関連する遺伝子発現に影響を及ぼし、細胞内の脂質量に劇的な影響を及ぼすという発見に基づいている。そうでない場合には、正常な細胞または正常なタンパク質チロシンキナーゼ調節を有する細胞を本発明のキナーゼ阻害剤により処置することによって、脂肪酸を酸化するそのような細胞の能力を増大または減少させることにより脂肪酸代謝に影響を及ぼす。培養液中に増殖させた正常な脂肪細胞が、GW2974、GW572016などのキナーゼ阻害剤に暴露されると、これらの細胞内に保存された脂質は急速に消失する。心細胞にもこの観察がなされている。このような試験は、脂質に関してオイルレッドO染色を用いて実施することができる。このように、ラバチニブ(tykerb)および他のHer1/Her2チロシンキナーゼ阻害剤による処置により、脂質合成率の減少および/または脂質酸化率の増大と一致するこのような細胞からの脂肪の喪失が引き起こされる。ヘルセプチンなどの他の薬物により、NDF脂質含量が増加するように思われる。

40

【0019】

多数のキナーゼ阻害剤はまた、化学療法剤として有用であることが知られている。一部の患者において、これらの薬物は心毒性を生じる。本開示は、心毒性を脂肪酸代謝の欠損に関連付けることができるという驚くべき発見に基づいている。このように、脂肪酸代謝

50

にある一定の機能不全を有するか、または血中に高レベルのTNF を有する患者、およびキナーゼ阻害剤により処置を受けている患者は、erbBチロシンキナーゼ阻害剤などのキナーゼ阻害剤による処置の際に心筋症などの心機能障害を受ける可能性が高い。さらに、腫瘍組織または血清中に、高レベルのTNF 、またはその下流生存因子NF- Bを有する患者は、一般にヘルセプチンに対してより良好な応答を有することが見出されている。この発見により、キナーゼ阻害剤単独またはある一定の細胞タンパク質のリン酸化状態に影響を及ぼす他の活性剤との併用を含めて、薬物による処置の際に、患者が心毒性を受けるかどうかを予測するための新規な方法の開発が導かれている。

【 0 0 2 0 】

トリグリセリドおよびコレステロールなどの患者の脂質および/または、中でもMCADなどの脂質代謝酵素を分析する方法を開示する。次にこのような分析結果を、心毒性が、キナーゼ阻害剤処置から生じ得る場合を予測するために、またヘルセプチン、GW572016または他のerbB阻害剤を含むキナーゼ阻害剤などの薬物による処置を受けている患者において心機能を密接にモニターする必要がある早期の指標を提供するために使用することができる。

10

【 0 0 2 1 】

他の組織においてアセチル-CoAカルボキシラーゼをリン酸化し、不活化することが示されている5'-AMP活性化タンパク質キナーゼの活性は、虚血の結果、有意に増加することが発見されており、再灌流の間上昇したままである。虚血中の5'-AMPの蓄積により、再灌流中、アセチル-CoAカルボキシラーゼをリン酸化し、不活化するAMP活性化タンパク質キナーゼの活性化をもたらす。マロニルCoAレベルの引き続く減少により、虚血心臓の再灌流中に脂肪酸酸化速度を加速する結果となり得る。

20

【 0 0 2 2 】

心毒性に関して、種々の脂肪酸酸化障害が知られており、下表1に挙げられている。このような障害が患者に検出される場合、それは、キナーゼ阻害剤が心臓に対して毒性となり得る指標を提供することができる。

【 0 0 2 3 】

【表1】

表1

Acyl-CoAアシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損	
Acyl-CoAデヒドロゲナーゼ、短鎖(SCAD)	
Acyl-CoAデヒドロゲナーゼ、中鎖(MCAD)	
Acyl-CoAデヒドロゲナーゼ、長鎖(LCAD)	
Acyl-CoAデヒドロゲナーゼ、超長鎖(VLCAD)	
2-エノイル-CoAヒドラターゼ欠損	
L-3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損	
L-3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ、短鎖(SCHAD)	10
三機能タンパク質:長鎖FA(LCHAD)	
アルファサブユニット(HADHA)	
ベータサブユニット(HADHB)	
3-ケトアシル-CoAチオラーゼ欠損	
3-ケトアシル-CoAチオラーゼ、中鎖(MCKAT)	
三機能タンパク質	
α -メチルアシル-CoAラセマーゼ(AMACR)欠損	
カルニチン-アシルカルニチントランスロカーゼ欠損: 3p21	
2,4-ジエノイル-CoAレダクター欠損: 8q21	
電子移動フラビンタンパク質(ETF)欠損: 15q23	
魚鱗癬様紅皮症(NCIE2): CGI58遺伝子; 3p21	
三機能タンパク質欠損:サブユニットAおよびB	20
チロシン血症	
カルニチン代謝の1°障害	
脂肪酸およびカルニチン輸送経路	
脂肪酸酸化経路	
脂質障害	
ミトコンドリア: 生化学的異常状態	
ペルオキシソーム障害	

【0024】

30

このような障害は、任意の好適な方法により検出することができる。例えば、ある種の障害において、脂肪酸を個体に摂取させて、それらの代謝を追跡することができる。あるいは、例えば、ウェスタンプロットなどで酵素レベルを決定することができるか、またはある一定の遺伝子産物に関してmRNAレベルを分析することができる。任意の検出可能な減少によって、脂肪酸酸化障害が存在し、チロシンキナーゼ阻害剤による処置が正常な細胞および器官に対して毒性となり得るという指標を提供する。

【0025】

40

一方において、キナーゼ阻害剤による処置の候補である患者は、心筋細胞毒性を有する可能性が高いかどうかを判定するためにこれらの疾患に関してスクリーニングすることができる。例えば、生体高分子は、これらの高分子のレベルが候補薬物の投与によりどのように影響を受けるかを判定するために培養液中で増殖させた心筋細胞で決定することができる。一方において、ヒト心筋細胞を培養液中で増殖させ、リン酸化されたAMP活性化タンパク質キナーゼのレベルを、候補薬物の存在下でモニターすることができる。これは、リン酸化されたAMP活性化キナーゼを検出するウェスタンプロットにより決定することができる。

【0026】

本発明を限定するのではないが、低酸素症、虚血、グルコース欠乏、および絶食などのストレス条件下、細胞内AMP:ATPの比率の増加により、AMP活性化タンパク質キナーゼ(AMPK)、細胞エネルギーバランスを維持するために設計された応答がアロステリックに活性化されると考えられている。AMP活性化タンパク質キナーゼは、当初、アセチル-CoAカルボ

50

キシラーゼ(ACC)および3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoAレダクターゼ(HMG-CoAレダクターゼ、HMGR)の調製を阻止することが発見された。AMPKの活性化により、細胞を活性なATP消費(例えば、脂肪酸、コレステロールおよびタンパク質の生合成)からATP産生(例えば、脂肪酸およびグルコース酸化)へと切り替える一連の下流リン酸化事象が開始すると考えられている。AMPKのストレス誘導活性化は、カルモジュリン依存キナーゼのキナーゼ(CAMKK)、カルシウム活性化タンパク質キナーゼ、およびLKB1、ポイツ-ジェガーズ症候群腫瘍抑制遺伝子によりコード化されたセリン/トレオニンキナーゼを含む、1つまたは複数の上流AMPKキナーゼ(AMPKK)により、サブユニット上のトレオニン172でのそのリン酸化後に生じると考えられている。骨格筋および心臓におけるAMPKの活性化は、リン酸化およびアセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACC)の阻害に至ると考えられており、次に、それ自体カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1(CPT 1)の阻害剤であるマロニル-CoAのレベルを減少させると考えられる。CPT 1の抑制解除により、脂肪酸の -酸化の同時増大を引き起こすと考えられ、それにより、ATPのミトコンドリア産生の増加に至ると考えられる。AMPKのストレス誘導活性化はまた、mTORを阻害し、心臓保護に関連することが知られている翻訳延長因子であるeEF2を直接調節することにより、タンパク質合成を阻害すると考えられる。重要なこととして、ミトコンドリア機能の変化は、イマチニブにより心筋細胞死に至ると考えられる。さらに、AMPK媒介TSC2リン酸化を経るキャップ依存翻訳の阻害は、ATP欠乏に応答して細胞生存にとって極めて重要であると考えられる。AMPK活性化後のATPの消費ではなくてATPの生合成の増大もまた、虚血傷害に対して心筋細胞を保護し得る。

10

20

【 0 0 2 7 】

AMPKおよびその下流基質を活性化できるラパチニブと同様の活性プロフィールを有する効力のある小型分子のHER2/EGFRチロシンキナーゼ阻害剤であるGW2974などの分子は、脂肪酸酸化を刺激し、次いでHER2-発現ヒト心筋細胞においてATP産生を増大させて、心不全で検出された既知のサイトカインであるTNF により誘導されるアポトーシスに対して保護することが発見されている。逆に、AMPKを活性化しないトラスツズマブなどの分子は、TNF に応答して心筋細胞の細胞死の増大をもたらす。AMPKに対して特異的なHER2標的療法の効果およびその結果としてのエネルギー産生により、心筋症に関連した危険性を予測し、新規なHER2特異的治療方式を提供でき、急性虚血傷害後のTNF の死滅作用または他の前アポトーシス刺激から心筋を保護することができる。

30

【 0 0 2 8 】

さらに、チロシンキナーゼ阻害剤は、細胞、特に普通なら正常であるか、またはタンパク質チロシンキナーゼ活性媒介疾患の無い細胞中の脂肪を減少させるために使用することができる。この目的のために、哺乳動物または組織の少なくとも一部を、細胞内の脂質量を減少させるようにキナーゼ阻害剤により処置することができる。任意の好適なキナーゼ阻害剤を用いることができる。好適な阻害剤を判定する方法はよく知られている。例えば、脂肪細胞のサンプルを、キナーゼ阻害剤の存在下または非存在下で増殖させ、既知の方法によりオイルレッド0で染色して、キナーゼ阻害剤が貯蔵脂肪の減少を引き起こすかどうかを判定することができる。脂肪貯蔵の観察可能な減少を引き起こすこれらのキナーゼ阻害剤は、本発明に好適である。本発明に好適な代表的キナーゼ阻害剤としては、erbB阻害剤、特にGW2974、GW572016などが挙げられる。下表IIは、GW2974を用いた処置により得られた脂質含量の減少を示している。Au565細胞を、当業界に知られた通常の条件下で増殖させ、GW2974(25 μ M)により2日間処置した。細胞を採取し、洗浄し、水中で音波処理した(200 μ Lの水中2,000,000個の細胞)。該細胞を遠心沈殿させ、細胞内代謝に関してMS/MSによるアシルカルニチン(ミトコンドリア脂肪酸酸化の副生成物)に対して試験した。

40

【 0 0 2 9 】

【表2】

表II

アシルカルニチン(ピコモルのタンパク質)

	C18:1	C16	C2	
対照(細胞ペレット)	8.56	4.09	148.54	
GW2974(細胞ペレット)	4.1	0.83	258.88	10

【0030】

一方法において、脂質貯蔵を減少させるために、細胞を好適なキナーゼ阻害剤で処置することができる。この方法は、細胞それ自体に貯蔵脂質のある量、好ましくは、貯蔵脂質の大部分、またはより好ましくは、実質的に全ての過剰貯蔵脂質を除去させるために、細胞を十分量の好適なチロシンキナーゼ阻害剤と接触させるステップを含むことができる。細胞は、インビトロ細胞培養液中に存在し得るか、または個体に存在し得る。この方法は、疾患が無いか、またはタンパク質チロシンキナーゼ活性関連疾患の無い細胞に使用された場合に特に有効である。

【0031】

20

脂肪酸酸化作用に対抗し、心筋および/または脳細胞を保護するために、心臓再灌流中または心臓発作時などの患者に、チロシンキナーゼ阻害剤またはデュアルチロシンキナーゼ阻害剤などのキナーゼ阻害剤を投与する方法もまた開示する。虚血、サイトカイン放出、グルコース欠乏またはこのような細胞に代謝的にストレスを生じさせる他の疾患により引き起こされる急性の苦痛から、心細胞、脳細胞ならびに他の組織および器官からの細胞を保護するためにこのような処置を使用することができる。

【0032】

キナーゼ阻害剤は、それらが代謝活性におけるシフトを生じさせ、無関係な標的に影響を及ぼさないように、特異的であることが好ましい。種々のキナーゼ阻害剤の特異性は、参照として援用されるFabianら、「A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors」、Nature Biotechnology 23、329頁に記載されている方法により判定することができる。代謝活性におけるシフトは、AMP活性化タンパク質キナーゼ活性の増大を介して引き起こされると考えられる。

30

【0033】

活性剤は、経口的に、注射または皮膚パッチ、軟膏もしくはローションにより局所的に個体に投与することができるか、あるいはその脂質減少効果を働かせるのに十分な量で目的の標的細胞にそれが到達する限り、非経口的に投与することができる。例えば、脂質含量の減少を生じさせるために、脂質を貯蔵する脂肪組織などの組織にAMP活性化タンパク質キナーゼアクチベーターを局所的に投与することができる。代謝ストレス、心臓発作、虚血などに対して治療を必要とする患者には、全身的に投与することもできる。

40

【0034】

AMP活性化タンパク質キナーゼアクチベーターは、塩もしくは溶媒和物としてまたは遊離化学物質として投与することができるが、製剤の形態で阻害剤を投与することができる。該製剤は、活性剤に加えて1つまたは複数の薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を含有することができる。

【0035】

製剤は、単位用量当り予め決められた量の活性成分を含有する単位用量形態で提供することができる。このような単位は、投与経路ならびに患者の年令、体重および病態に依って、例えば、0.5mgから1g、好ましくは70mgから700mg、より好ましくは5mgから100mgの活性剤を含有することができる。例えば、マウスでは、絶食期間中の心臓を保護するために

50

100mg/kgのGW2974を投与することができる。

【0036】

製剤は、例えば、経口(頬側または舌下を含む)、直腸、鼻腔、局所(頬側、舌下または経皮を含む)、膣または非経口(皮下、筋内、静脈内または皮内を含む)経路による、任意の適切な経路による投与に適応させることができる。このような製剤は、例えば、活性成分を担体または賦形剤と共に組み合わせることによって、薬業界に知られた任意の方法により調製することができる。

【0037】

経口投与に適応させた製剤は、カプセル剤または錠剤;散剤または顆粒剤;水性もしくは非水性液体中の液剤または懸濁剤;食用泡剤またはホイップ剤;あるいは水中油の液体乳濁剤または油中水の液体乳濁剤およびリポソーム中の乳濁剤の形態であり得る。

10

【0038】

経皮投与に関する製剤は、長時間レシピエントの皮膚と密接に接触させ続けることを意図した個別のパッチとして提供することができる。活性成分は、既知の方法によるイオン浸透療法によりパッチから送達することができる。

【0039】

局所投与に関する製剤は、軟膏剤、クリーム剤、懸濁液剤、ローション剤、散剤、液剤、ペースト剤、ゲル剤、スプレー剤、エアゾール剤または油剤として製剤化できる。

【0040】

外部組織の処置に関する製剤は、局所軟膏剤またはクリーム剤として塗布することができる。軟膏剤で製剤化された場合、活性成分は、パラフィンまたは水易溶性軟膏ベースと共に使用することができる。あるいは、活性成分は、水中油クリームベースまたは油中水ベースによるクリーム中に製剤化することもできる。このような軟膏剤は、活性剤が皮膚を透過し、特に脂肪状態の組織および器官における脂肪の改善のために標的細胞および組織と接触させることが好ましい。

20

【0041】

口腔内の局所投与に適応させた製剤としては、舐剤、香錠および含嗽剤が挙げられる。

【0042】

吸入による投与に関する製剤としては、種々のタイプの計測用量加圧エアゾール、ネブライザーまたは注入器により発生させることができる微粒子粉末またはミストが挙げられる。

30

【0043】

膣投与に関する製剤は、ペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、泡剤またはスプレー剤として提供することができる。

【0044】

非経口投与に関する製剤としては、トコフェロールなどの抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および製剤を目的のレシピエントの血液と等張にする溶質をさらに含むことができる水性または非水性滅菌注射液;および懸濁化剤および増粘剤を含むことができる水性または非水性滅菌懸濁液、を挙げることができる。

【0045】

製剤は、単位用量または多用量容器、例えば、密封アンプルおよびバイアル中に提供することができ;使用直前に滅菌液体担体、例えば、注射用水の添加だけを必要とする凍結乾燥条件で保存することができる。即時調合注射液および懸濁液は、滅菌散剤、顆粒剤および錠剤から調製することができる。

40

【0046】

好ましい単位剤形製剤は、活性成分の毎日の用量もしくはサブ用量、または適切な画分を含有するものである。

【0047】

特に上記の成分に加えて、当然のことながら製剤は、当業界において当の製剤タイプに係わる通常の他の試剤を含むことができ、例えば、経口投与に好適なものとしては風味剤

50

を含むことができる。

【0048】

本発明の化合物、塩または溶媒和物による処置を必要とする動物は、通常人間などの哺乳動物である。

【0049】

本発明の活性剤、塩または溶媒和物の治療的有効量は、例えば、動物の年令および体重、処置を必要とする病態の重症度、製剤の性質、ならびに投与経路などのいくつかの因子に依存し、最終的には、担当医師および獣医師の裁量に委ねられるであろう。しかしながら、毒性の処置のために本発明の化合物の有効量は、一般に1日当り0.1から500mg/レシピエント(哺乳動物)の体重1kgの範囲であり、さらに通常、1日当り1から200mg/体重1kgの範囲である。したがって、70kgの成体哺乳動物に関して、1日当りの実際量は、通常70から700mgまでとなり、この量は、1日当りの単一用量または毎日の全用量が同一となるように1日当り任意のサブ用量数で与えることができる。本発明の塩または溶媒和物の有効量は、化合物それ自体の有効量の割合として決定することができる。

【0050】

本発明の化合物およびそれらの塩ならびに溶媒和物は、単独でまたは他の治療剤と併用して使用することができる。したがって、本発明による併用療法は、本発明の少なくとも1種のAMP活性化タンパク質キナーゼアクチベーターまたは薬学的に許容できるその塩または溶媒和物ならびに癌治療剤などの少なくとも1種の他の薬学的に活性な薬剤の投与を含む。併用活性剤は、一緒にまたは別個に投与することができ、別個に投与する場合は、同時にまたは任意の順序で逐次投与することができる。本発明のキナーゼ阻害剤および他の薬学的活性剤の量ならびに投与の相対的タイミングは、所望の併用療法効果を達成するように選択される。

【実施例1】

【0051】

以下の実施例は、Au565細胞のインビトロ細胞培養においてヘルセプチンの処置により影響を及ぼされる遺伝子の同定を示す。Au565細胞を、通常の条件下で増殖させ、ヘルセプチンで処置するか、または未処置のままにした。細胞をペレット化し、液体窒素中で瞬間凍結し、標準的条件を用いてマイクロアレイで分析した。Cy3およびCy5標識cDNAを、細胞ペレットから単離されたRNAから調製した。脂質代謝に関与する遺伝子を表IIIに示している。アップレギュレートまたはダウンレギュレートされた他の経路に関与した遺伝子もまた、図1に示している。

【0052】

【表3A】

表III

未処置またはヘルセプチンで処置されたAu-565細胞のマイクロアレイ分析による代謝遺伝子の変化

遺伝子	説明	未処置細胞と比較したヘルセプチン処置細胞の相対的变化	
NKX2-5	心臓特異的ホメオボックス。心臓発達およびおそらくはアポトーシスに関する転写因子;対応する遺伝子の変異は、先天的心疾患、中隔および伝達欠損症、ならびにファロー四徴症に関連する。	4.71 x	10
ESRR6	エストロゲン関連受容体ガンマ。エストロゲン応答エレメントに結合し、リガンドと独立に転写を活性化する。組織分化および維持において役割を有し得る。	4.18 x	
FABP1	脂肪酸結合タンパク質1、肝臓。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アルファ(PPARA)の正の調節因子。脂肪酸輸送、細胞増殖およびアポトーシスにおいて役割を果たす。発現の増大は前立腺癌に関連する。	-6.29 x	20
NRG1	ニューレグリン(Neuregulin)1、分泌タンパク質。チロシンキナーゼ受容体のEGF受容体ファミリーのERBB2および他のメンバーを活性化する。細胞移動、細胞増殖および神経形成を誘導する;遺伝子増幅は、幾つかの乳房腫瘍に関連する。	-5.07 x	
PERC	PGC-1関連エストロゲン受容体アルファコアクチベーター(PPARガンマコアクチベーター1ペータ)。核ホルモン受容体に結合し、これを活性化する転写コアクチベーター。グルコース新生または脂肪酸酸化において役割を果たすことができる。	-5.20 x	30
ERBB4	トリ赤芽球症発癌遺伝子B4、EGF受容体ファミリーの受容体チロシンキナーゼ。ノイレグリンリガンドにより活性化される。細胞移動、細胞増殖および分化において役割を果たす。多発悪性新生物形成の病因に関与する。	4.48 x	

遺伝子	説明	対数比	
BBOX1	ブチロベタイン(ガンマ)2-オキソグルタレートジオキシゲナーゼ(ガンマ-ブチロベタインヒドロキシラーゼ)1。カルニチン生合成においてガンマブチロベタインのL-カルニチンへの変換を触媒する。	5.13E-01	40
GLS	腎臓型グルタミナーゼ。グルタミンのグルタメートおよびアンモニアへの加水分解を触媒する。TCAサイクル中間体を提供する。酸塩基バランスの維持を補助する。神経伝達物質を産生する。グルタミン異化作用を開始する。	5.12E-01	

【表3B】

遺伝子	説明	対数比	
IQGAP2	IQモチーフ含有GTPアーゼ活性化タンパク質2。CD C42およびRAC1のGTPアーゼ活性を阻害する。ア クチンに結合し、細胞形状のRhoファミリーGTPアーゼ調節において役割を果たすことができる。	4.85E-01	
TRPM4	一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリー Mメンバー4。一価カチオンに透過性のCa ²⁺ 活性化 チャネル。Gタンパク質結合受容体媒介Ca ²⁺ 上昇 に応答する。膜電位脱分極によりCa ²⁺ の流入を阻 止する。	4.43E-01	10
SAT	スペルミジン/スペルミンN1-アセチルトランスフェ ラーゼ。ポリアミン異化作用の律速段階を触媒する 。ポリアミンホメオスタシスを促進する。酸化スト レスおよび熱ショック応答に関する。腫瘍形成能 および幾つかの抗癌薬に対する感受性を調節する。	4.04E-01	
I_1152020	幾つかの細胞外タンパク質に見られる3種のコラ ゲン三重ヘリックス反復およびC末端C1qドメイン を含有するタンパク質。エネルギーバランス、イン スリン感受性、および脂肪細胞を制御するマウスA crp30と中程度の類似性を有する。	4.00E-01	20
CLSP	カルモジュリン様皮膚タンパク質。カルシウム結合 タンパク質のカルモジュリンファミリーのメンバ 。ケラチノサイトの分化において役割を果たすこと ができる。日光損傷皮膚において発現の変化を示す。	-4.03E-01	
ME1	リンゴ酸酵素1。マレートの酸化的脱炭酸を触媒し てビルペートを形成する。脂質生成において役割を 果たすことができる;変異体は乳癌に関連し得る。	-4.04E-01	
ACAT2	ヒトアセチル-補酵素Aアセチルトランスフェラーゼ 2(アセトアセチル補酵素Aチオラーゼ)(ACAT2)、m RNA	-4.33E-01	30
ACAT2	アセチル-補酵素Aアセチルトランスフェラーゼ2(細 胞基質アセトアセチル補酵素Aチオラーゼ)、アシ ル-CoA代謝において機能する肝臓酵素	-5.30E-01	
ACAT2	ヒトアセチル-補酵素Aアセチルトランスフェラーゼ 2(アセトアセチル補酵素Aチオラーゼ)(ACAT2)、m RNA	-4.33E-01	
ACAT2	アセチル-補酵素Aアセチルトランスフェラーゼ2(細 胞基質アセトアセチル補酵素Aチオラーゼ)、アシ ル-CoA代謝において機能する肝臓酵素	-5.30E-01	40
ALDOA	アルドラーゼA(フルクトース-ビスホスフェートア ルドラーーゼ)。解糖作用によりフルクトース-1,6-ビ スホスフェートのジヒドロキシアセトンホスフェー トおよびグリセルアルデヒド-3-ホスフェートへの 開裂または縮合を触媒する。欠損は溶血性貧血およ び代謝ミオパシーとして出現する。	-4.54E-01	

【0054】

【表3C】

遺伝子	説明	対数比	
NFKBIL2	NF-カッパB阻害剤様2、IカッパBファミリーのメンバー。NFKB1-RELA NF-カッパBヘテロダイマーおよびNFKB1ホモダイマーのDNA結合、IgカッパからのNF-カッパB媒介転写を阻害し、上皮細胞におけるNF-カッパB機能を調節することができる。	-4.90E-01	
ENO1	エノラーゼ1(アルファエノラーゼ)。解糖作用により2-ホスホ-D-グリセレートをホスホエノールピルベートに変換する。多発性自己免疫疾患における自己抗原。より短い代替型c-mycプロモーター結合タンパク質(MPB1)は転写レプレッサーである。	-5.01E-01	10
GSTT2	グルタチオンS-トランスフェラーゼシータ2。シタクラスグルタチオントランスフェラーゼおよびペルオキシダーゼ。生体異物代謝に関与する。脂肪酸ヒドロペルオキシドの解毒に関与し、発癌物質を不活化することにより癌予防において役割を果たすことができる。	-5.33E-01	
APOL1	アポリポタンパク質L。大型、アポA-I(APOA1)含有、高密度リポタンパク質の成分。脂質輸送および代謝に関与し得る;前頭皮質における発現上昇は精神分裂症に関連する。	-6.43E-01	20
AKR1C2	アルドケトレダクターゼファミリー1メンバーC2(ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ)。胆汁輸送、ステロイド代謝および生体異物代謝において機能する。選択的セロトニン再取り込み阻害剤により媒介される挙動変化において役割を果たすことができる。	-7.44E-01	
AKR1C2	アルドケトレダクターゼファミリー1メンバーC2(ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ)。胆汁輸送、ステロイド代謝および生体異物代謝において機能する。選択的セロトニン再取り込み阻害剤により媒介される挙動変化において役割を果たすことができる	-8.23E-01	30
CAMK4	カルシウム/カルモジュリン依存タンパク質キナーゼIV。CREBBP依存遺伝子発現を含む、Ca(2+)調節遺伝子発現に関与するタンパク質キナーゼ	4.46E-01	
FKSG14	SoxLZ/Sox6に結合し、カルシウム/カルモジュリン依存タンパク質キナーゼIV(マウスCamk4)と共にSoxLZ/Sox6媒介転写活性を増強する、精巣(マウスSolt)のSoxLZ-Sox6ロイシンジッパー結合タンパク質と高類似性を有するタンパク質	-4.57E-01	
SOAT1	アシル補酵素A:コレステロールアシルトランスフェラーゼ。コレステロールおよび長鎖脂肪酸アシル補酵素Aからコレステロールエステルを合成する。リポタンパク質代謝、コレステロールホメオスタシスおよび単球分化において作用する;アテローム硬化症に関連する。	-4.05E-01	40

【0055】

【表3D】

遺伝子	説明	対数比
I_962304.FL1	カリウム電位作動型チャネル(Shal関連サブファミリー、メンバー1)。ニューロンおよび心細胞[647-a a形態]の興奮性の制御に重要であるA型一過性外向きK ⁺ 電流を発生すると予測される。	-4.16E-01
SCN2A2	ナトリウムチャネル電位作動型II型アルファ2。電位依存およびナトリウム選択性の電流を示す。テトロドトキシンに感受性の興奮性細胞における活動電位の上昇相において役割を果たすことができる。	4.54E-01
SCN1A	ナトリウムチャネル電位作動型I型(アルファサブユニット)。電位感受性ナトリウムチャネル;変異は、乳児期の重症の間代性筋痙攣性癲癇および熱性の癲癇発作プラスによる全身性癲癇に関連する。	4.14E-01
SCN11A	ナトリウムチャネル電位作動型XI型アルファポリペプチド。末梢知覚ニューロンにおけるテトロドトキシン耐性ナトリウム電流を生じ得る推定上の電位感受性ナトリウムチャネル。疼痛伝達および神経障害痛において役割を果たすことができる。	4.02E-01
FASN	脂肪酸シンターゼ。食事タンパク質および炭水化物から脂肪酸を合成する多機能性酵素。発現の増大は種々の癌に関連し、この阻害は乳癌および前立腺癌の治療となり得る。	-4.29E-01
ELOVL2	ヒト超長鎖脂肪酸(FEN1/Elo2、SUR4/Elo3、酵母)様2(ELOVL2)伸長、mRNA	-4.36E-01
HPCAL1	ヒッポカルシン(Hippocalcin)様1。推定上のカルシウム感受性タンパク質。カルシウム結合タンパク質の神経ビシン(visinin)様(NVP)ファミリーのメンバー。アクソンおよび樹状突起に局在化している。中枢神経系の神経シグナル伝達において役割を果たすことができる。	-4.53E-01
KCNG2	カリウム電位チャネルサブファミリーガンマ2。イオンチャネルのKv6ファミリーのメンバー。Kv2.1アルファサブユニットとの相互作用の際に電位作動型カリウムチャネルとして機能する。心臓増強作用の再分極に寄与し得る。	-5.53E-01
CCL14	小型誘導性サイトカインサブファミリーAメンバー14。骨髓始原細胞の増殖を増強し、HIV 1ウィルスの複製に影響を及ぼし得る化学誘引物質。AIDS病因およびケモカイン受容体CCR 1関連疾患において役割を果たすことができる。	-4.49E-01
CLCA1	カルシウム活性化クロリドチャネル1。粘膜上皮細胞中の粘膜産生において役割を果たし、腫瘍抑制因子として機能できるクロリドチャネル;調節不全は、喘息および大腸癌の進行の一因となり得る。	-6.70E-01

【0056】

【表3E】

遺伝子	説明	対数比	
FABP1	脂肪酸結合タンパク質1、肝臓。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アルファ(PPARA)の正の調節因子。脂肪酸輸送、細胞増殖およびアポトーシスにおいて役割を果たす。発現の増大は前立腺癌に関連する。	-7.22E-01	
BBOX1	ブチロベタイン(ガンマ)2-オキソグルタレートジオキシゲナーゼ(ガンマ-ブチロベタインヒドロキシラーゼ)1。カルニチン生合成においてガンマブチロベタインのL-カルニチンへの変換を触媒する。	5.13E-01	10
GLS	腎臓型グルタミナーゼ。グルタミンのグルタメートおよびアンモニアへの加水分解を触媒する。TCAサイクル中間体を提供する。酸塩基バランスの維持を補助する。神経伝達物質を産生する。グルタミン異化作用を開始する。	5.12E-01	
IQGAP2	IQモチーフ含有GTPアーゼ活性化タンパク質2。CD C42およびRAC1のGTPアーゼ活性を阻害する。アクチンに結合し、細胞形状のRhoファミリーGTPアーゼ調節において役割を果たすことができる。	4.85E-01	20
TRPM4	一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリーMのメンバー4。一価カチオンに透過性のCa ²⁺ 活性化チャネル。Gタンパク質結合受容体媒介Ca ²⁺ 上昇に応答する。膜電位脱分極によりCa ²⁺ の流入を阻止する。	4.43E-01	
SAT	スペルミジン/スペルミンN1-アセチルトランスフェラーゼ。ポリアミン異化作用の律速段階を触媒する。ポリアミンホメオスタシスを促進する。酸化ストレスおよび熱ショック応答に関与する。腫瘍形成能および幾つかの抗癌薬に対する感受性を調節する。	4.04E-01	30
I_1152020	幾つかの細胞外タンパク質に見られる3種のコラーゲン三重ヘリックス反復およびC末端C1qドメインを含有するタンパク質。エネルギーバランス、インスリン感受性および脂肪細胞を制御するマウスAcrp30と中程度の類似性を有する。	4.00E-01	

【実施例2】

【0057】

脂肪細胞が、小型分子のチロシンキナーゼ阻害剤、GW2974で処置された場合、脂質が喪失することを本実施例は立証している。図2は、ErbB刺激性リガンドであるNDF、またはモノクローナル抗体のヘルセプチンのいずれかで処置されたAu565細胞について、双方は脂質の産生をもたらすことを示している。これは、細胞のパックグラウンド対比染色(ヘマトキシリン)に対してオイルレッド(脂質は赤点により表される)での脂質の染色により示される。脂質は、未処置Au565細胞に存在するが、デュアルEGFRおよびErbB2阻害剤、GW2974で処置された細胞において減少することを図3は示している。図4は、GW2974、ヘルセプチンまたはNDFで処置された心筋細胞を示している。脂質は、ヘルセプチンおよびNDFで処置された細胞中に増加するが(未処置細胞と比較して)、GW2974で処置された細胞中では減少しない。図5は、対照、ヘルセプチンおよびGW2974処置細胞中の脂質の定量的測定を示している。

【 0 0 5 8 】

GW2974での細胞の処置により、細胞内カルシウムの再分布を生じる(図6)。これは、カルシウムがフルオロ-4による蛍光で検出されるMDA-MB-468の乳癌細胞に見ることができる。このカルシウムの再分布により、AMPKの活性化およびリン酸化をもたらす。活性化AMPKは、翻訳因子eEF-2のリン酸化により翻訳が抑制され(図7)、このリン酸化は、eEF-2を不活性化し、タンパク質合成、既知のTKIの効果を抑制する。図7Aは、刺激性リガンド(EGF)またはGW2974で処置され、p-eEF-2に対してプローブ化されたAu565のウェスタンプロットを示している。GW2974の処置後、p-eEF-2は劇的に増加する。図7Bは、IHCによるp-eEF-2の発現を示している。C225およびヘルセプチニンは、p-eEF-2を増加させないが、Iressa、GW2974およびラパマイシンのようなTKIは増加させる。

10

【 0 0 5 9 】

ERR は、心細胞中の脂質代謝において役割を果たし、MCADは、脂質および脂肪酸を分解する酵素である。MCADの変異は、特に北部ヨーロッパの家系の変異において共通の遺伝的障害である。図8は、ヘルセプチニン処置細胞において、ERR のレベルは僅かに減少したことを示している。MCADは、ヘルセプチニン処置細胞において発現するが、GW2974処置細胞からは完全に欠如している。

【 実施例 3 】**【 0 0 6 0 】**

以下の実施例は、GW2974で処置された細胞のmRNA発現プロフィールの変化を立証している。

20

【 0 0 6 1 】

Au565細胞は、通常の条件下で増殖し、未処置か、またはGW2974(25 μ M)で処置された。細胞をペレット化し、液体窒素中で瞬間凍結し、マイクロアレイ分析に供した。Agilent Total RNA Isolation Kitを用いてRNAを単離した。Cy3およびCy5標識cRNAは、Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kitを用いて調製した。標識cRNAは、18 K超の十分に特性化された完全長、ヒト遺伝子を表す60merオリゴヌクレオチドからなるG4 110Aヒト1A(V2)マイクロアレイにハイブリダイズされた。表IVは、表形態での結果を提供する。

【 0 0 6 2 】

【表4A】

表IV A-イオンチャネル

遺伝子名	説明	対照と比較された GW2974の変化
FLJ12476	IQカルモジュリン結合ドメインを含有するタンパク質	5.0 x
CAMK4	カルシウム/カルモジュリン依存タンパク質キナーゼIV。CREBBP依存遺伝子発現を含む、Ca(2+)調節遺伝子発現に関与するタンパク質キナーゼ	4.5 x
AVIL	アクチンフィラメントをキャッピングし、切断し、束ねるカルシウム調節アクチン結合タンパク質、ゲルソリンファミリーのメンバーであり、ビリンヘッドピースドメインを含有するビリン1(ヒトVIL1)と高類似性を有するタンパク質	4.2 x
SCN1A	ナトリウムチャネル電位作動型I型(アルファサブユニット)。電位感受性ナトリウムチャネル;変異は、乳児期の重症の間代性筋痙攣性癲癇および熱性の癲癇発作プラスによる全身性癲癇に関する。	4.1 x
CLSP	カルモジュリン様皮膚タンパク質。カルシウム結合タンパク質のカルモジュリンファミリーのメンバー。ケラチノサイトの分化において役割を果たすことができる。日光損傷皮膚において発現の変化を示す。	-4.0 x
GNB5	グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)ペータ5。Gタンパク質結合受容体からのシグナルを下流エフェクタータンパク質に伝達するヘテロトリマーGタンパク質複合体の成分。カルシウムチャネル活性を調節し得る。	-4.1 x
KCNK6	カリウムチャネルサブファミリーKメンバー6(TWIK-2)。タンデムポアドメインK+チャネルファミリーのpH感受性外向きおよび緩和な内向き整流メンバー。細胞の静止膜電位の設定および心細胞の興奮性において役割を果たすことができる。	-4.1 x
CASK	カルシウム/カルモジュリン依存セリンタンパク質キナーゼ。MAGUKファミリーのメンバー。細胞膜における多タンパク質複合体の動員に関する。細胞外マトリックスをアクチン細胞骨格に結合することができる。シナプス小胞エキソサイトシスを調節することができる。	-4.2 x
I_962304.FL1	カリウム電位作動型チャネル(Shal関連サブファミリー、メンバー1)。ニューロンおよび心細胞[647-a a形態]の興奮性の制御に重要であるA型一過性外向きK+電流を発生すると予測される。	-4.2 x
CD38	CD38抗原。周期的なADP-リボース形成および加水分解活性の双方を有する。細胞内カルシウム動員を調節する。超抗原誘導性T細胞増殖において役割を果たすことができる。自己抗体は非インスリン依存糖尿病の一因となり得る。	-4.4 x

【表4B】

遺伝子名	説明	対照と比較された GW2974の変化
HPCAL1	ヒッポカルシン(Hippocalcin)様1。推定上のカルシウム感受性タンパク質。カルシウム結合タンパク質の神経ビシン(NVP)ファミリーのメンバー。アクソンおよび樹状突起に局在化している。中枢神経系の神経シグナル伝達において役割を果たすことができる。	-4.5 x
FKSG14	SoxLZ/Sox6に結合し、カルシウム/カルモジュリン依存タンパク質キナーゼIV(マウスCamk4)と共にSoxLZ/Sox6媒介転写活性を増強する、精巣(マウスSolt)のSoxLZ-Sox6ロイシンジッパー結合タンパク質と高類似性を有するタンパク質	-4.6 x
CCR2	CCケモカイン受容体2。CCサブファミリーケモカインに結合し、化学走性および細胞内カルシウムフラックスを媒介するGタンパク質結合受容体;CCR2の変異体は、ヒト免疫不全ウィルス感染後の生存の増加を付与できる	-5.0 x
FREQ	フレケニン(Frequenin)ホモログ(ショウジョウバエ)。カルシウム結合タンパク質および推定上のキナーゼ阻害剤。Ca2+依存的にKV4K+チャネルに結合しその活性を調節する。分泌において調節的役割を有し得る。	-5.3 x
STK33	セリン-トレオニンタンパク質キナーゼ33。カルシウム/カルモジュリン依存タンパク質キナーゼファミリーのメンバーであり得る推定上のセリン-トレオニンキナーゼ	-5.3 x
S100A9	S100カルシウム結合タンパク質A9(カルグラヌリンB)。ベータ2インテグリン(ITGB2)リガンド結合を活性化し、それによって炎症中の好中球接着を媒介するS100A8との複合体(27e10抗原)の一部。脂肪酸に結合し、それを輸送する。	-5.5 x
KCNG2	カリウム電位チャネルサブファミリーガンマ2。イオンチャネルのKv6ファミリーのメンバー。Kv2.1アルファサブユニットとの相互作用の際に電位作動型カリウムチャネルとして機能する。心臓増強作用の再分極に寄与し得る。	-5.5 x
CLCA1	カルシウム活性化クロリドチャネル1。粘膜上皮細胞中の粘膜産生において役割を果たし、腫瘍抑制因子として機能できるクロリドチャネル;調節不全は、喘息および大腸癌の進行の一因となり得る。	-6.7 x
AKAP5	キナーゼアンカータンパク質5。タイプ2調節性サブユニット、PRKAR2AおよびPRKAR2Bに結合することによって、cAMP依存タンパク質キナーゼをシナプス後密度に固定し、これにより、シナプス後事象を調節し得る;カルモジュリンおよびタンパク質キナーゼCにも結合する	-7.3 x

【表5】

表IV B-心臓調節

遺伝子名	説明	対照と比較された GW2974の変化	
PRKG1	cGMP依存タンパク質キナーゼタイプ1。血管平滑筋を弛緩させ、血小板凝集を阻止する。心収縮性に関与し得る。高血圧およびアテローム硬化症に関連し得る。マウスPrkg1は勃起不全に関連する。	6.51 x	
TGF β 1	形質転換成長因子ベータ誘導68kDa(ケラト-エピセリン)。形質転換成長因子ベータ(TGFB1)により誘導された細胞外接着タンパク質。骨形成および肺構造/機能において役割を果たすことができる。遺伝子変化は角膜ジストロフィーを引き起こす。	5.31 x	10
NRXN3	ニューレキシン3。シナプス細胞表面タンパク質のニューレキシンファミリーのメンバーおよびアクソングイダンスにおいて役割を有し得る推定上の細胞膜内タンパク質。心臓イソ体はジストロゲリカンと複合体を形成し、細胞内結合を媒介することができる。	4.58 x	
KCNK6	カリウムチャネルサブファミリーKメンバー6(TWI K-2)。タンデムポアドメインK ⁺ チャネルファミリーのpH感受性外向きおよび緩和な内向き整流メンバー。細胞の静止膜電位の設定および心細胞の興奮性において役割を果たすことができる。	-4.08 x	20
I_962304.FL1	カリウム電位作動型チャネル(Shal関連サブファミリー、メンバー1)。ニューロンおよび心細胞[647-aa形態]の興奮性の制御に重要であるA型一過性外向きK ⁺ 電流を発生すると予測される。	-4.16 x	
KCNG2	カリウム電位チャネルサブファミリーガンマ2。イオンチャネルのKv6ファミリーのメンバー。Kv2.1アルファサブユニットとの相互作用の際に電位作動型カリウムチャネルとして機能する。心臓増強作用の再分極に寄与し得る。	-5.53 x	30

【0065】

【表 6 A】

表IV C-脂肪酸およびアミノ酸代謝

遺伝子名	説明	対照と比較された GW2974の変化
PRKG1	cGMP依存タンパク質キナーゼタイプ1。血管平滑筋を弛緩させ、血小板凝集を阻止する。心収縮性に関与し得る。高血圧およびアテローム硬化症に関連し得る;マウスPrkg1は勃起不全に関連する。	6.5 x
BBOX1	ブチロベタイン(ガンマ)2-オキソグルタレートジオキシゲナーゼ(ガンマ-ブチロベタインヒドロキシラーゼ)1。カルニチン生合成においてガンマブチロベタインのL-カルニチンへの変換を触媒する。	5.1
GLS	腎臓型グルタミナーゼ。グルタミンのグルタメートおよびアンモニアへの加水分解を触媒する。TCAサイクル中間体を提供する。酸塩基バランスの維持を補助する。神経伝達物質を産生する。グルタミン異化作用を開始する。	5.1
NRXN3	ニューレキシン3。シナプス細胞表面タンパク質のニューレキシンファミリーのメンバーおよびアクソングイダンスにおいて役割を有し得る推定上の細胞膜内タンパク質。心臓イソ体はジストログリカンと複合体を形成し、細胞内結合を媒介することができる。	4.6 x
CYP2C8	チトクロームP450サブファミリーII(C(メフェニトイン4-ヒドロキシラーゼ)ポリペプチド8。ステロイド、脂肪酸および生体異物を代謝するヘム結合モノオキシゲナーゼスーパーファミリーのメンバー;肝臓発現は、リファンピン処置によりアップレギュレートされる。	4.5 x
SAT	スペルミジン/スペルミンN1-アセチルトランスフェラーゼ。ポリアミン異化作用の律速段階を触媒する。ポリアミンホメオスタシスを促進する。酸化ストレスおよび熱ショック応答に関与する。腫瘍形成能および幾つかの抗癌薬に対する感受性を調節する。	4.4
SOAT1	アシル補酵素A:コレステロールアシルトランスフェラーゼ。コレステロールおよび長鎖脂肪酸アシル-補酵素Aからコレステロールエステルを合成する。リボタンパク質代謝、コレステロールホメオスタシス、および単球分化において作用する;アテローム硬化症に関連する。	-4.0 x
KCNK6	カリウムチャネルサブファミリーKメンバー6(TWI K-2)。タンデムポアドメインK ⁺ チャネルファミリーのpH感受性外向きおよび緩和な内向き整流メンバー。細胞の静止膜電位の設定および心細胞の興奮性において役割を果たすことができる。	-4.1 x

【 0 0 6 6 】

【表 6 B】

遺伝子名	説明	対照と比較された GW2974の変化
I_962304.FL1	カリウム電位作動型チャネル(Shai関連サブファミリー、メンバー1)。ニューロンおよび心細胞[647-aa形態]の興奮性の制御に重要であるA型一過性外向きK ⁺ 電流を発生すると予測される。	-4.2 x
HPA8	熱ショック70kDタンパク質8。分子シャペロンの熱ショックHSP70ファミリーの構成的発現のメンバー;発現は、肥厚性心筋症患者の心臓において上昇する。	-4.2 x
FASN	脂肪酸シンターゼ。食事タンパク質および炭水化物から脂肪酸を合成する多機能性酵素。発現の増大は種々の癌に関連し、この阻害は乳癌および前立腺癌の治療となり得る。	-4.3 x
ELOVL2	ヒト超長鎖脂肪酸(FEN1/Elo2、SUR4/Elo3、酵母)様2(ELOVL2)伸長、mRNA	-4.4 x
PFKL	肝臓ホスホフルクトキナーゼ。解糖作用においてフルクトース-6-ホスフェートからフルクトース-1,6-ビスホスフェートへのリン酸化を触媒する。欠損は糖原蓄積症VII型に関連するが、過剰発現はダウン症候群の認知障害をもたらす恐れがある	-4.7
LDLR	低密度リポタンパク質受容体。低密度リポタンパク質の取込みを媒介する。脂質代謝に関与する;遺伝子変異は、家族性高コレステロール血症、高血圧、アテローム硬化症および冠動脈疾患に関連する。	-5.2 x
GSTT2	グルタチオンS-トランスフェラーゼシータ2。シータクラスグルタチオントランスフェラーゼおよびペルオキシダーゼ。生体異物代謝に関与する。脂肪酸ヒドロペルオキシドの解毒に関与し、発癌物質を不活化することにより癌予防において役割を果たすことができる	-5.3
ACAT2	アセチル-補酵素Aアセチルトランスフェラーゼ2(細胞基質アセトアセチル補酵素Aチオラーゼ)。アシル-CoA代謝において機能する肝臓酵素	-5.3
S100A9	S100カルシウム結合タンパク質A9(カルグラヌリンB)。ベータ2インテグリン(ITGB2)リガンド結合を活性化し、それによって炎症中の好中球接着を媒介するS100A8との複合体(27e10抗原)の一部。脂肪酸に結合し、それを輸送する。	-5.4
KCNG2	カリウム電位チャネルサブファミリーガンマ2。イオンチャネルのKv6ファミリーのメンバー。Kv2.1アルファサブユニットとの相互作用の際に電位作動型カリウムチャネルとして機能する。心臓増強作用の再分極に寄与し得る。	-5.5 x

【表 6 C】

遺伝子名	説明	対照と比較された GW2974の変化
FABP1	脂肪酸結合タンパク質1、肝臓。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アルファ(PPARA)の正の調節因子。脂肪酸輸送、細胞増殖およびアポトーシスにおいて役割を果たす。発現の増大は前立腺癌に関連する。	-7.2

10

【0068】

当然のことながら、目下のところ本明細書に記載された好ましい実施形態に対する種々の変更および修正は、当業者にとって明らかとなる。このような変更および修正は、本主題の趣旨および範囲から逸脱することなく、その意図された利点を減ずることなくなされ得る。したがって、このような変更および修正は、添付の特許請求の範囲により含まれるように意図されている。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】Au565細胞においてヘルセプチン処置により調節された遺伝子を示す一覧表である。

20

【図2】NDFまたはヘルセプチンにより処置され、脂質に関して染色されたAu-565細胞を示す写真である。

【図3】GW-2974により処置され、脂質に関して染色されたAu-565細胞を示す写真である。

【図4】種々の条件下で増殖され、脂質に関して染色された一次的ヒト心筋細胞を示す写真である。

【図5】種々の条件下で脂質に関して陽性のヒト心筋細胞試験のパーセンテージを示す棒グラフである。

【図6】GW-2974により処置されたMDA-MB-468細胞およびフルオロ-4により検出された細胞内Caを示す写真である。

30

【図7】図7 Aは、発現p-eEF2およびp-AMPKに対する一定のチロシンキナーゼ阻害剤の影響を示すウェスタンプロットの写真である。図7 Bは、種々の化合物の存在下、Au565細胞中のp-eEF2の発現を示す染色細胞の写真である。

【図8】種々のキナーゼ阻害剤による処置の有無下で心筋細胞中のERR およびMCADを示す写真である。

【図9】異なるタイプのerbB阻害剤およびTNF の組合せで処置されたHMCの増殖阻害を示す棒グラフである。

【図10】TNF 、GW2974またはヘルセプチンのいずれか(または組合せ)による処置後、NF- Bに対してプローブ化されたHMCのウェスタンプロットを示す図である。

40

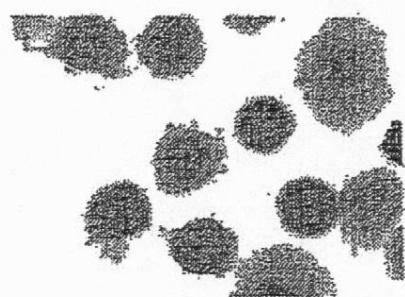
【図1】

図1 Au565細胞におけるヘリセナチン位置により調節される遺伝子

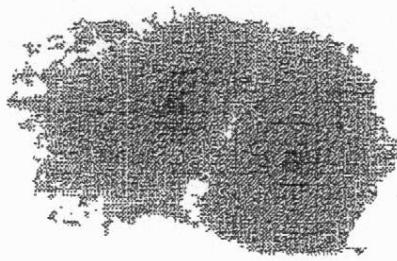
DNA修復(上方制御)	・イオンチャネル(上方制御) ・RAD51和D1作用タンパク質(PR51) ・p53結合蛋白タンパク質(WG1) ・エキソヌクレアーゼ1(EXO1) *SRC42 *RAD51 *RAD54
細胞サイクルおよびDNA合成(上方制御)	・カルシウム活性化ドチャネル ・Aキナーゼアンカーナンパク質(AKAP5)
翻訳(上方制御)	・カルシウム活性化ドチャネル ・Aキナーゼアンカーナンパク質(AKAP5)
翻訳(上方制御)	・酵母Dns1pと同様(DS結合) ・翻訳(下方制御) ・真核生物開始因子5A(EIF4A)
アポトーシス(上方制御)	・NC2-5 *ACD2 *APP *S100A9 ・翻訳(下方制御) EMD TEAD1 *KCHH2 *SOT1 *PAPC *CREB4V
アポトーシス(下方制御)	・TNFR1 *TRAIL ・フナーケットドボックス3A(FOX3A) アポトーシス(下方制御) *FLIP ・NF- κ B抑制因子(NFkBII) ・結合親属性因子(CTCF) ・マイトシジェン誘導性遺伝子(MIG-6)

【図2】

図2 NDFまたはヘルセプチンにより処置され、脂質に関して染色されたAu-565細胞



未処置



NDFにより処置



ヘルセプチンにより処置

【図3】

図3 GW-2974により処置され、脂質に関して染色されたAu-565細胞



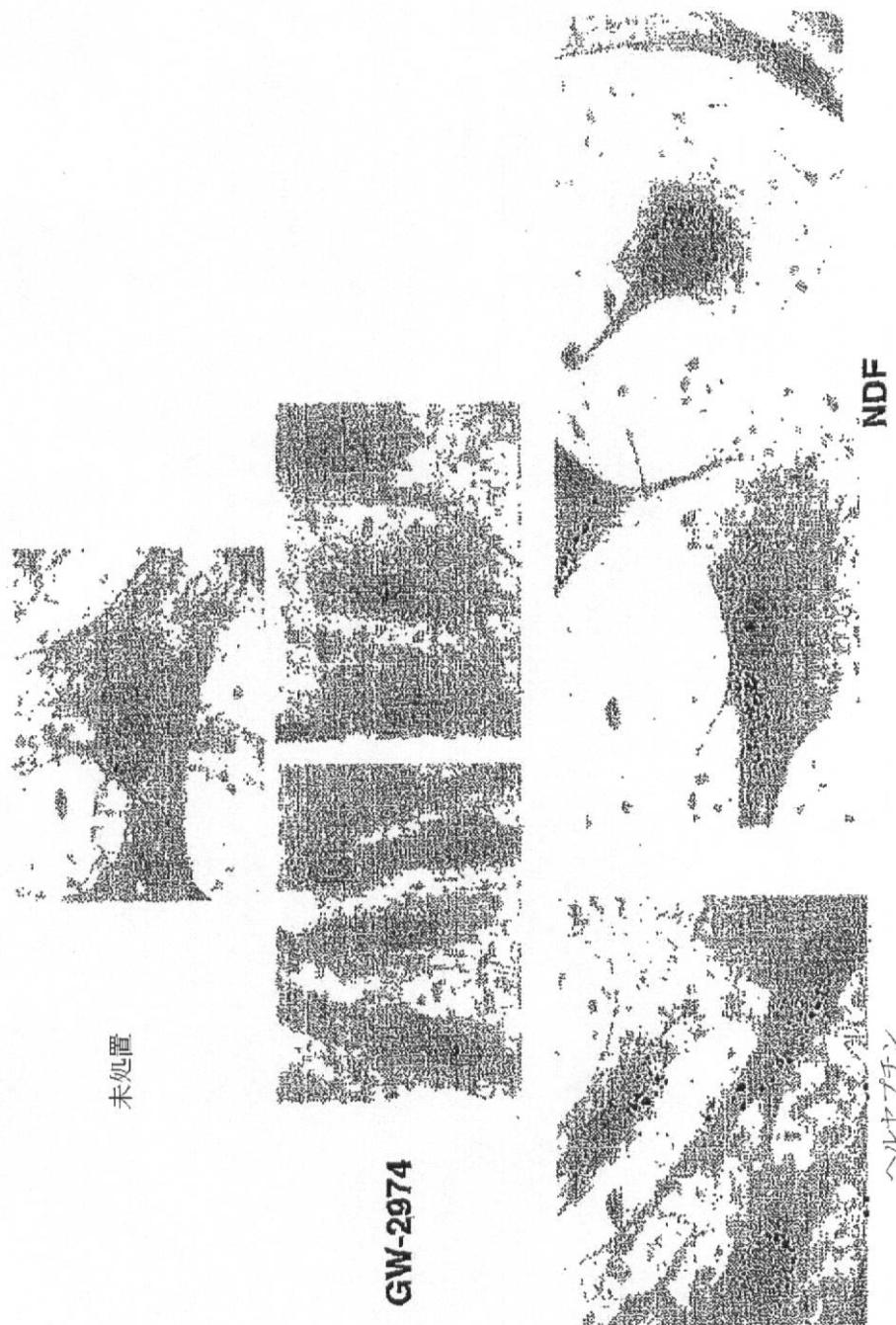
未処置



GW-2974により処置

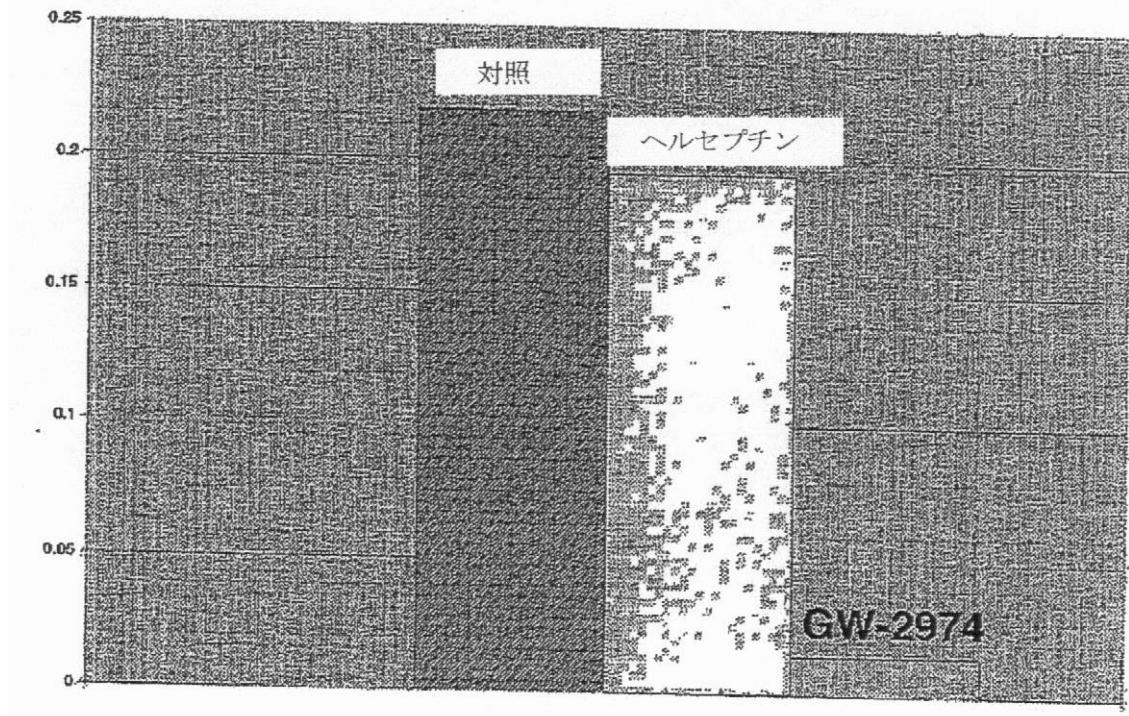
【図4】

図4 脂質に関して染色された一次ヒト心筋細胞



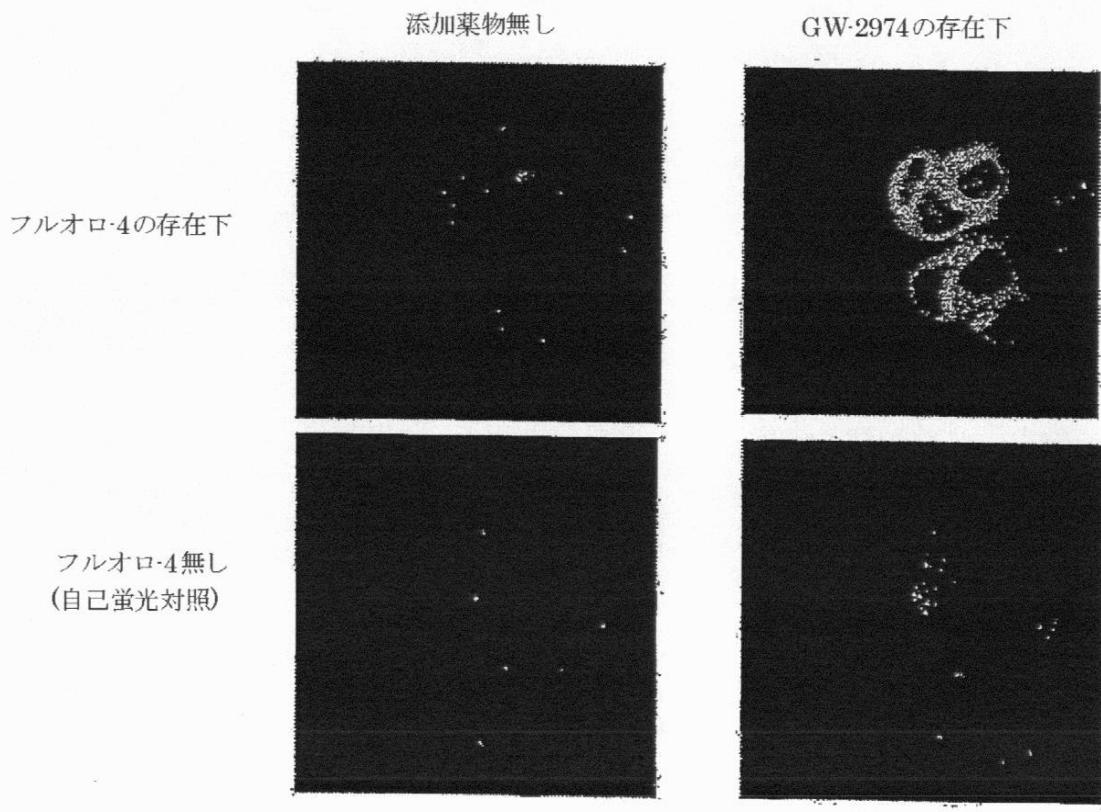
【図5】

図5 ヒト心筋細胞:脂質に関して陽性の細胞の%



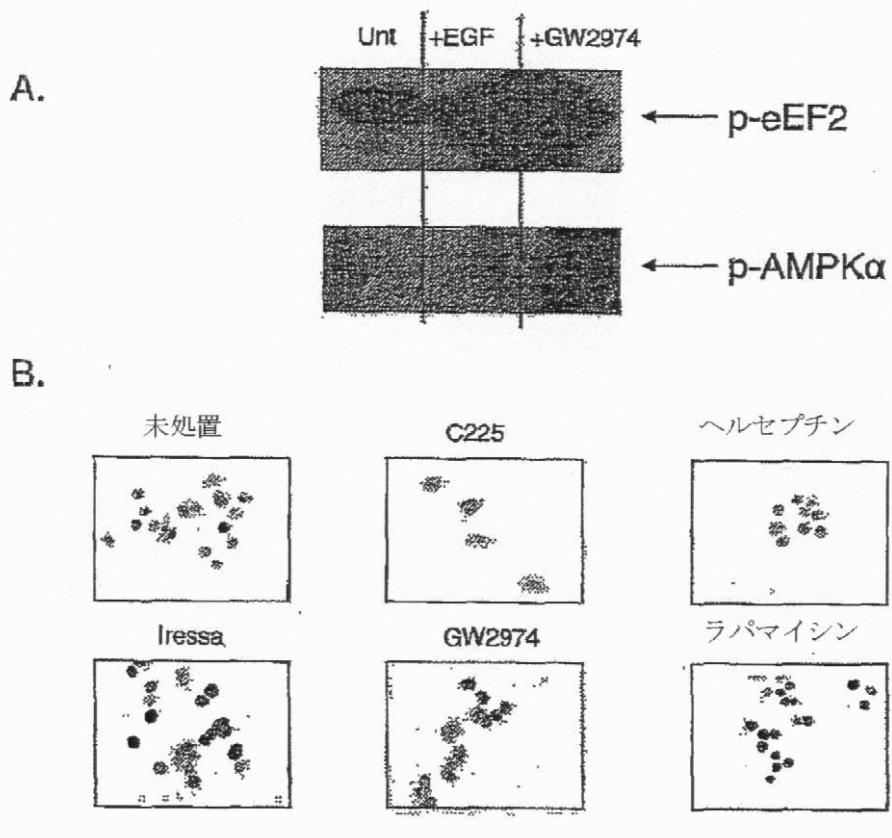
【図6】

図6 GW-2974により処置されたMDA-MB-468細胞およびフルオロ-4により検出された細胞内Ca

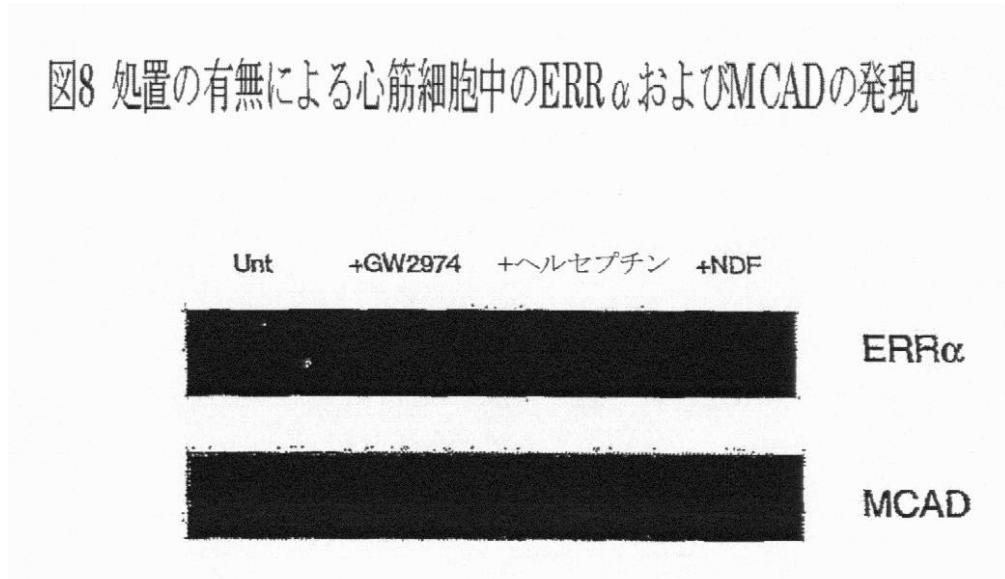


【図7】

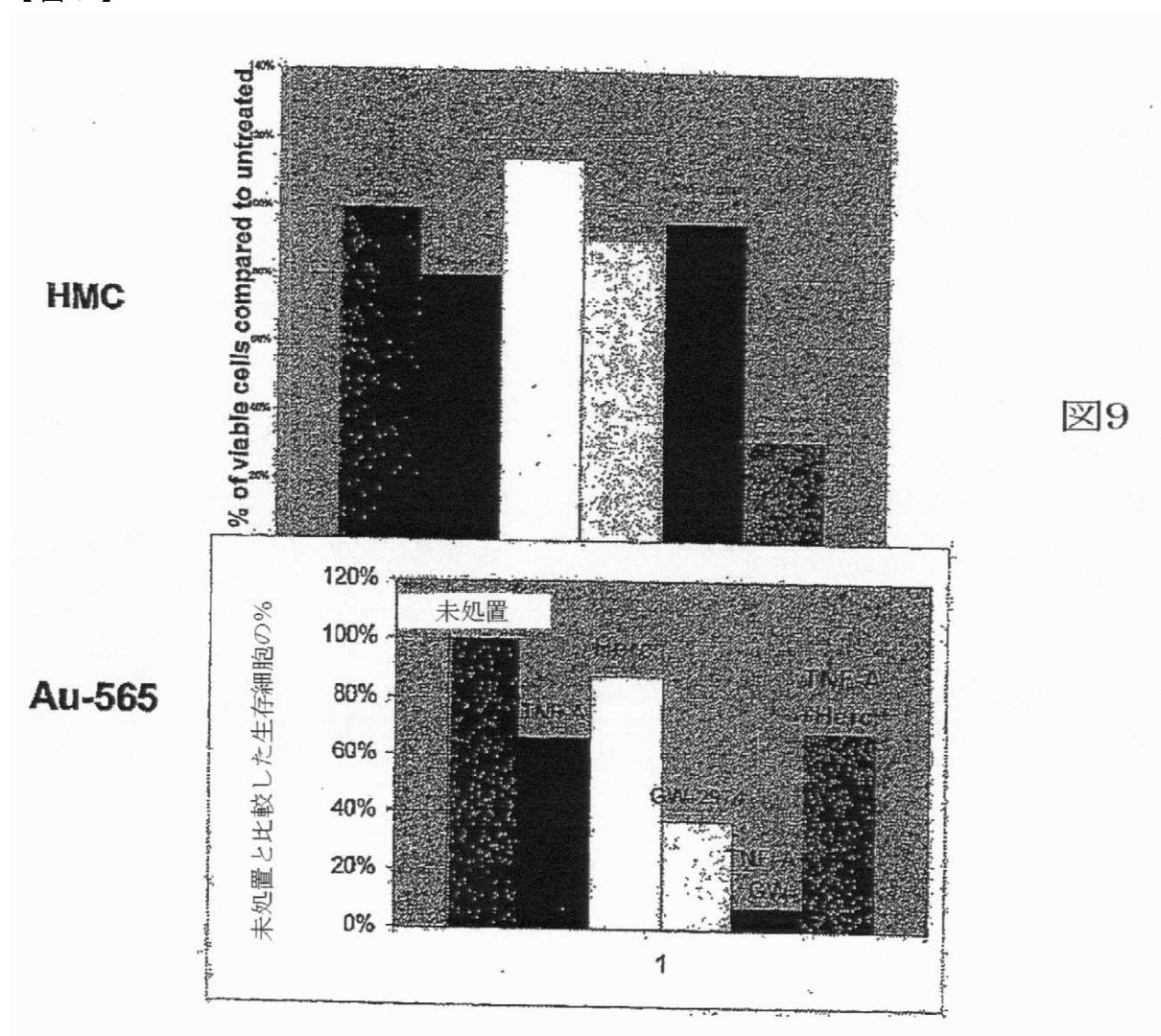
図7 TKI類は翻訳の調節に関する



【図8】

図8 処置の有無による心筋細胞中のERR α およびMCADの発現

【図9】



【図10】

ヒト処置心筋細胞

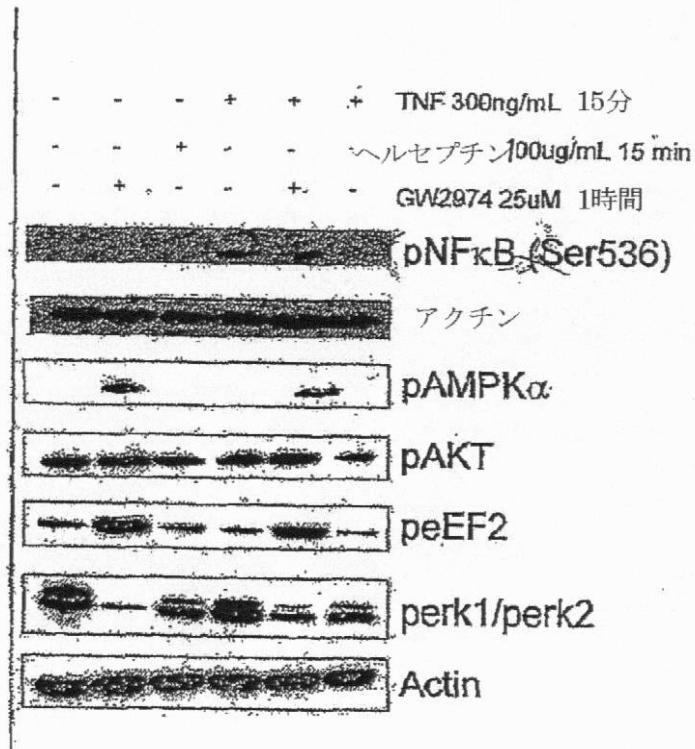


図10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/00

A

(31)優先権主張番号 60/827,372

(32)優先日 平成18年9月28日(2006.9.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/828,345

(32)優先日 平成18年10月5日(2006.10.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/867,736

(32)優先日 平成18年11月29日(2006.11.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 サラ・エス・バッカス

アメリカ合衆国・イリノイ・60559・ウェストモント・オークモント・レーン・610

審査官 木原 啓一郎

(56)参考文献 Cancer Res. , 2003年 1月 1日, Vol.63, No.1, p.132-139

SPECTOR, N.L. et al., PNAS, 2007年 6月 19日, Vol.104, No.25, p.10607-10612

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S (S T N)