

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6175076号  
(P6175076)

(45) 発行日 平成29年8月2日(2017.8.2)

(24) 登録日 平成29年7月14日(2017.7.14)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 38/16	(2006.01)	A 61 K	38/16	Z N A
A 61 K 45/06	(2006.01)	A 61 K	45/06	
A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K	48/00	
A 61 K 31/433	(2006.01)	A 61 K	31/433	
A 61 P 3/10	(2006.01)	A 61 P	3/10	

請求項の数 12 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-553448 (P2014-553448)
(86) (22) 出願日	平成25年1月18日 (2013.1.18)
(65) 公表番号	特表2015-505535 (P2015-505535A)
(43) 公表日	平成27年2月23日 (2015.2.23)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/022126
(87) 國際公開番号	W02013/109876
(87) 國際公開日	平成25年7月25日 (2013.7.25)
審査請求日	平成27年12月29日 (2015.12.29)
(31) 優先権主張番号	61/588,959
(32) 優先日	平成24年1月20日 (2012.1.20)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者 513004571  
ボード オブ スーパーバイザーズ オブ  
ルイジアナ ステート ユニバーシティ  
ー アンド アグリカルチュラル アンド  
メカニカル カレッジ  
アメリカ合衆国 ルイジアナ 70808  
-4124 バトン ルージュ, ビー10  
35, パーキンス ロード 6400, ペ  
ニントン バイオメディカル リサーチ  
センター  
(73) 特許権者 314017370  
デュランダー, ニキル  
アメリカ合衆国 ルイジアナ 70810  
バトン ルージュ, サウス レイクサイ  
ド オークス アベニュー 11152  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 AD36E4ORF1 およびAKT1阻害剤を使用した血糖コントロールの向上

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

アデノウイルス36組成物を含む、AKT1阻害剤と組み合わせた使用において個体における血糖コントロールを改善するための医薬組成物であって、前記アデノウイルス36組成物は、配列番号2のアミノ酸配列を有するアデノウイルス36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体を含み、前記機能性変異体は、配列番号2と少なくとも約85%類似したアミノ酸配列を有し、血糖コントロールは、脂質生成の実質的な増加なしに改善される、医薬組成物。

## 【請求項2】

アデノウイルス36組成物を含む、AKT1阻害剤と組み合わせた使用において個体における血糖コントロールを改善するための医薬組成物であって、前記アデノウイルス36組成物は、配列番号2のアミノ酸配列を有するアデノウイルス36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体を含み、前記機能性変異体は、配列番号2と少なくとも約85%類似したアミノ酸配列を有し、インスリン感受性は、脂質生成の実質的な増加なしに増大される、医薬組成物。

## 【請求項3】

アデノウイルス36組成物を含む、AKT1阻害剤と組み合わせた使用において個体における糖尿病の症状を治療または予防するための医薬組成物であって、前記アデノウイルス36組成物は、配列番号2のアミノ酸配列を有するアデノウイルス36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体を含み、前記機能性変異体は、配列番号2と少なくと

10

20

も約 85%類似したアミノ酸配列を有し、前記個体の症状は、脂質生成の実質的な增加なしに改善する、医薬組成物。

【請求項4】

配列番号2のアミノ酸配列を有するアデノウイルス36 E4orf1タンパク質を含むアデノウイルス36組成物およびAKT1阻害剤を含む、個体における血糖コントロールを改善するための医薬組成物。

【請求項5】

アデノウイルス36組成物を含む、AKT1阻害剤と組み合わせた使用において個体における血糖コントロールを改善するための医薬組成物であって、前記アデノウイルス36組成物は、アデノウイルス-36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体をコードする核酸を含み、アデノウイルス-36 E4orf1タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を有し、前記機能性変異体は、配列番号2と少なくとも約85%類似したアミノ酸配列を有し、血糖コントロールは、脂質生成の実質的な増加なしに改善される、医薬組成物。

10

【請求項6】

アデノウイルス36組成物を含む、AKT1阻害剤と組み合わせた使用において個体における血糖コントロールを改善するための医薬組成物であって、前記アデノウイルス36組成物は、アデノウイルス-36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体をコードする核酸を含み、アデノウイルス-36 E4orf1タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を有し、前記機能性変異体は、配列番号2と少なくとも約85%類似したアミノ酸配列を有し、インスリン感受性は、脂質生成の実質的な増加なしに増大される、医薬組成物。

20

【請求項7】

アデノウイルス36組成物を含む、AKT1阻害剤と組み合わせた使用において個体における糖尿病の症状を治療または予防するための医薬組成物であって、前記アデノウイルス36組成物は、アデノウイルス-36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体をコードする核酸を含み、アデノウイルス-36 E4orf1タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を有し、前記機能性変異体は、配列番号2と少なくとも約85%類似したアミノ酸配列を有し、前記個体の症状は、脂質生成の実質的な増加なしに改善する、医薬組成物。

30

【請求項8】

前記核酸は、アデノウイルス-36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体の発現を可能とする様式で、前記核酸を個体に導入することにより投与される、請求項5～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記核酸は、電気穿孔、DEAEデキストラントランスクレクション、リン酸カルシウムトランスクレクション、カチオン性リポソーム融合、原形質体融合、インビオ電場の形成、DNA被覆微粒子銃、組み換え複製欠損ウイルスの注入、相同的組み換え、インビオ遺伝子治療、エキソビオ遺伝子治療、ウイルスベクター、および裸のDNA移入からなる群から選択される方法により導入される、請求項8に記載の医薬組成物。

40

【請求項10】

前記核酸は、配列番号1を含む核酸配列を含む、請求項5～9のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項11】

前記個体は、ヒトである、請求項1～10のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記AKT1阻害剤は、2-アミノチアジアゾール(2-ATD)である、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

**【0001】****関連特許**

本出願は、2012年1月20日出願の米国仮特許出願第61/588,959号の利益を主張し、その出願の全教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

**【背景技術】****【0002】**

インスリンのその細胞表面受容体に対する結合は、インスリン受容体基質（IRS）を介したホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）の活性化に関する細胞シグナリングのカスケードを開始する（図1）。一方、PI3Kは、酵素AKTを活性化し、グルコース輸送体（Glut4）の細胞表面への転移をもたらす。グルコース輸送体は細胞内のグルコースを持ち出す。グルコースの細胞取り込みの欠陥は、細胞外（循環内）のグルコースの蓄積をもたらし、高血糖または糖尿病状態を引き起こす可能性がある。対照的に、細胞グルコース取り込みの増加は、循環からそれを排除することができ、従って高血糖または糖尿病を改善する。10

**【0003】**

Ad36は、実験的に感染させた動物における脂肪症を増加させたヒトアデノウイルスであるが、その血糖コントロールを改善する（1、2）。人間において、Ad36への自然感染は、より良好な血糖コントロールに関連する（1）。細胞シグナリングの研究では、Ad36が、従来のインスリン-IRS経路を介してではなく、代わりにRasの活性化を介してPI3K活性化を上方制御し（図1）、これが脂肪細胞および筋細胞内のグルコース取り込みの向上をもたらすことが示されている（3～5）。脂肪細胞およびその前駆細胞では、Ad36は、脂質生成を開始する重要な遺伝子であるPPARを上方制御し、これが脂肪細胞のより大きな分化、および脂質蓄積、および結果的により重い脂肪症をもたらす（6、7）。一方、Ad36は、脂肪組織および脂肪細胞におけるグルコース取り込みを増加させる（8）。したがって、Ad36は、脂肪症を増加させるが血糖コントロールを改善する二重の特性を有する。20

**【0004】**

Ad36の脂質生成および血糖作用は、PPARを上方制御し、脂肪症を増加させ、細胞グルコース取り込みを増加させるそのE4orf1タンパク質により媒介される（9、10）。PPARの上方制御はまた、改善された血糖コントロールと関連する。チアゾリジンジオン（TZD）クラスの抗糖尿病薬は、PPARを上方制御し、血糖コントロールを改善すると同時に、脂肪症を増加させる（11、12）。Ad36またはそのE4orf1タンパク質の二重作用は、チアゾリジンジオン（TZD）薬の二重作用と同様である。残念ながら、過度の脂肪症は、不健康および血糖コントロールの不良に関連する。30

**【0005】**

多くのAKT阻害剤が、当該技術分野において知られており、がん治療に提案されている。（Lindsley, C.W., Curr, Topics in Med. Chem.; 10(4): 458-477 (2010).）40

**【0006】**

したがって、脂質生成とは無関係に血糖コントロールを改善することができる新たな治療法が必要とされている。

**【発明の概要】****【0007】**

本発明は、個人における血糖コントロールを改善する方法であって、それを必要とする個人に、治療上効果的な量のAd36組成物およびAKT1阻害剤を投与することを含み、血糖コントロールは、脂質生成の実質的な増加なしに改善される方法に関する。

**【0008】**

本発明はまた、個人における糖尿病を処置または予防する方法であって、それを必要とする個人に、治療上効果的な量のAd36組成物およびAKT1阻害剤を投与することを50

含み、個人の症状は、脂質生成の実質的な増加なしに改善する方法に関する。

【0009】

A d 3 6 組成物は、アデノウイルス - 3 6 E 4 o r f 1 タンパク質もしくはその機能性変異体、アデノウイルス - 3 6 E 4 o r f 1 もしくはその機能性変異体をコードする核酸、またはアデノウイルス - 3 6 E 4 o r f 1 の類似体もしくは誘導体を含んでもよい。例えば、アデノウイルス - 3 6 E 4 o r f 1 タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 2 またはその機能性変異体であってもよい。別の例において、A d 3 6 組成物は、配列番号 1 またはその機能性変異体を含む核酸配列を含んでもよい。

【0010】

一態様において、アデノウイルス - 3 6 E 4 o r f 1 タンパク質をコードする核酸は 10 、アデノウイルス - 3 6 E 4 o r f 1 タンパク質の発現を可能とする様式で、アデノウイルス - 3 6 E 4 o r f 1 タンパク質をコードする核酸配列を個人に導入することにより投与される。例えば、核酸配列は、電気穿孔、D E A E デキストラントランスフェクション、リン酸カルシウムトランスフェクション、カチオン性リポソーム融合、原形質体融合、インビオ電場の形成、D N A 被覆微粒子銃、組み換え複製欠損ウイルスの注入、相同的組み換え、インビオ遺伝子治療、エキソビオ遺伝子治療、ウイルスベクター、および裸のD N A 移入からなる群から選択される方法により導入される。

【0011】

一態様において、個人は、人間等の哺乳動物であってもよい。

【0012】

一態様において、A K T 1 阻害剤は、2 - アミノチアジアゾール(2 - A T D)であつてもよい。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】インスリンがその細胞表面受容体に結合した後に開始されるホスファチジルイノシトール3 - キナーゼ(P I 3 K)の活性化が関与する、細胞シグナリングのカスケードを示す概略図である。

【図2】図2 A、アデノウイルスA d 3 6 またはA d 2(陰性対照ウイルス)による感染から20週間後に致死させたH F 負荷マウスの脂肪組織から単離された、全ての、およびリン酸化した(活性化した)A K T 2 タンパク質のレベルを示すウェスタンプロットである。図2 B、A d 2 感染マウスではなくA d 3 6 感染マウスが、模擬感染と比較してより高いA K T 2 活性化を有していた(より高いリン酸化により示されるように)ことを示すグラフである(\* p < 0 . 0 5)。

30

【図3】図3 A、A d 3 6 もしくはA d 2 による感染または模擬感染から12週間後に致死させた給餌マウスの脂肪組織から単離された、全ての、およびリン酸化したA K T 1 およびA K T 2 タンパク質のレベルを示すウェスタンプロットである。図3 B およびC、A d 2 感染マウスではなくA d 3 6 感染マウスが、模擬感染と比較して、それより高いA K T 1 およびA K T 2 活性化を有していた(より高いリン酸化により示されるように)ことを示すグラフである(\* p < 0 . 0 5 またはそれより良好)。

【図4】図4 A、脂肪細胞に分化するように誘導された3 T 3 L 1 細胞からの、全ての、およびリン酸化したA K T 1 およびA K T 2 タンパク質のレベルを示すウェスタンプロットである。図4 B およびC、A d 3 6 が、模擬と比較して、それよりA K T 1 およびA K T 2 活性化の増加を有意に誘導したこと示すグラフである(\* p < 0 . 0 5 またはそれより良好)。A K T に対するA d 3 6 の効果は、インスリンの効果と同様であるか、またはそれより良好である。

40

【図5】図5 A、分化した3 T 3 L 1 脂肪細胞から単離された、全ての、およびリン酸化したA K T 2 タンパク質のレベルを示すウェスタンプロットである。図5 B、A d 3 6 が、模擬と比較して、有意にA K T 2 活性化を増加させたことを示すグラフである(\* p < 0 . 0 5)。

【図6】s i R N A によるA K T ノックダウン後のグルコース取り込みを示すグラフであ

50

る。データは、Ad36が細胞グルコース取り込みを向上させるためには、AKT1ではなくAKT2が必要であることを示している。

【図7】3T3-L1細胞の顕微鏡写真である。図7A～Cは、空ベクター(pTRE)を有し、ドキシサイクリンに応答してE4orf1を発現しない3T3-L1細胞を示す。図7D～Fは、ドキシサイクリンに暴露されるとAd36-E4orf1を発現する、それぞれ0、1、または5μの2ATD(AKT1シグナリングの特異的阻害剤)で処理された3T3-L1細胞を示す。結果は、2-ATDが脂質生成および脂質蓄積を遮断したことを示している(染色は脂質蓄積を示す)。

【図8】図8A、2-ATDを使用したAKT1の化学的阻害の、誘導可能なE4orf1安定性細胞株におけるPPAR発現に対する効果を示すグラフである。図8B、2-ATDを使用したAKT1の化学的阻害の、アディポネチン発現に対する効果を示すグラフである。図AおよびBは、2-ATDに暴露された際の、脂質生成遺伝子、PPARおよびアディポネクチンのmRNA発現の下方制御を示す。

【図9】2-ATDの存在下での基礎取り込みおよびインスリン刺激グルコース取り込みを示すグラフである。グラフは、2-ATDに暴露されると、E4orf1発現がグルコース摂取を増加し続けることを示している。

【図10】ATDがPPARタンパク質の存在量を阻害することを示すグラフである。3T3-L1脂肪細胞をヌルベクター(V5)でトランスフェクトして10μTZDに暴露するか、またはE4orf1タンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトした。両方の群を、0、1、または5μATDに暴露した。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0014】

###### 概説

人間における自然Ad36感染は、より良好な血糖コントロールに関連するが、Ad36感染はまた脂肪症を増加させる。本明細書に記載のように、AKT1阻害剤を使用した研究の結果は、AKT1阻害剤と組み合わされたAd36-E4orf1タンパク質またはその類似体もしくは誘導体が、脂質生成を誘導することなく血糖コントロールを向上させることを実証している。

##### 【0015】

本発明者らは、さらに、AKT1阻害剤が、前脂肪細胞における脂質生成および脂質蓄積を遮断することができ、脂質生成タンパク質PPARおよびアディポネクチンをコードするmRNAのレベルを低減することを発見した。AKT1が阻害されると、脂質生成が遮断されるが、E4orf1はグルコース取り込みを増加し続ける。Ad36-E4orf1構造およびある特定の代謝機能が、2007年6月7日に国際特許公開第WO2007/064836号として公開された国際特許出願第PCT/US2006/045919号に記載されている。

##### 【0016】

本発明は、血糖コントロールを改善するための方法であって、効果的な量のAd36-E4orf1またはその機能性変異体、類似体もしくは誘導体、およびAKT1阻害剤を、それを必要とする個人に投与することを含む方法に関する。本発明者らの発見に基づき、高血糖、インスリン耐性、前糖尿病、1型糖尿病および2型糖尿病が、効果的な量のAd36-E4orf1またはその機能性変異体、類似体もしくは誘導体、およびAKT1阻害剤を、それを必要とする個人に投与することにより、処置またはさらに予防され得る。

##### 【0017】

本明細書において使用される場合、「血糖コントロール」とは、グルコースレベルを正常範囲内に維持する身体の能力を指す。血糖コントロールは、インスリン感受性が増加すると改善される。インスリン耐性は、血糖コントロールに対して反対の効果を有する。

##### 【0018】

本明細書において使用される場合、「グルコース取り込み」は、細胞がその周囲から取

10

20

30

40

50

り込むグルコースの量を指す。一般に、筋肉細胞または脂肪細胞（脂肪細胞および前脂肪細胞）によるより高いグルコース取り込みは、循環からグルコースを排除して高血糖（血中正常グルコースより高い）を改善するため有益である。

#### 【0019】

本明細書において使用される場合、「類似体」とは、Ad-36 E4orf1タンパク質またはその断片と構造が同様であり、インスリン感受性に対し Ad-36 E4orf1タンパク質と質的に同様の効果を示す小分子（例えば1kDa未満）を指す。

#### 【0020】

本明細書において使用される場合、「誘導体」は、修飾されたAd-36 E4orf1タンパク質または機能性変異体を指す。例えば、誘導体は、Ad-36 E4orf1タンパク質または1つ以上のD-アミノ酸もしくは非自然発生アミノ酸を含有する機能性変異体、ペグ化Ad-36 E4orf1、あるいは、インスリン感受性に対してAd-36 E4orf1タンパク質と質的に同様の効果を示す、タンパク質またはその機能性変異体における他のいくつかの変化型であってもよい。

#### 【0021】

本明細書において使用される場合、「選択的AKT1阻害剤」とは、AKT2を実質的には阻害しないAKT1阻害剤である。例えば、選択的AKT阻害剤は、AKT2のIC<sub>50</sub>よりも少なくとも10倍、少なくとも25倍、または少なくとも50倍低いAKT1のIC<sub>50</sub>を有し得る（例えば、AKT1阻害剤のIC<sub>50</sub>は4.6であり、AKT2のIC<sub>50</sub>は>250である（参考文献（8）を参照されたい））。好ましくは、選択的AKT1阻害剤は、AKT2を全く阻害しない。

#### 【0022】

##### 治療方法

本発明は、脂質生成の増加なしに血糖コントロールを改善するための治療方法を提供する。したがって、本発明は、脂質生成の増加なしに、高血糖、インスリン耐性、前糖尿病または糖尿病（1型もしくは2型）を処置するための方法を提供する。

#### 【0023】

一態様において、本発明は、個人（例えば、人間または他の靈長類等の哺乳動物）における血糖コントロールを改善するための方法を提供する。治療上効果的な量のAd36組成物およびAKT1阻害剤が、それを必要とする個人における血糖コントロールを改善するために、その個人に投与される。

#### 【0024】

一態様において、本発明は、高血糖、インスリン耐性、前糖尿病または糖尿病（1型もしくは2型）の症状の処置および予防のための方法を提供する。治療上効果的な量のAd36組成物およびAKT1阻害剤が、高血糖、インスリン耐性、前糖尿病または糖尿病（1型もしくは2型）を処置または予防するために、それを必要とする個人（例えば、人間または他の靈長類等の哺乳動物）に投与される。

#### 【0025】

一態様において、本発明は、インスリン耐性を処置または予防するための方法を提供する。治療上効果的な量のAd36組成物およびAKT1阻害剤が、インスリン耐性を処置または予防するために、それを必要とする個人（例えば、人間または他の靈長類等の哺乳動物）に投与される。

#### 【0026】

投与されるAd36組成物は、単離された、または組み換えAd36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体であってもよい。Ad36組成物はまた、Ad36 E4orf1タンパク質の類似体または誘導体であってもよい。投与されるAd36組成物は、Ad36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体をコードする、単離された、または組み換え核酸であってもよい。

#### 【0027】

AKT1阻害剤は、Ad36組成物の投与の前に、それと実質的に同時に、またはその

10

20

30

40

50

後に投与され得る。好ましくは、Ad36組成物およびAKT1阻害剤は、それらの薬理学的活性の実質的な重複を提供するように、および脂質生成の実質的な増加なしに（例えば、5%未満、好ましくは10%未満の脂質生成の増加）改善された血糖コントロールを提供するように投与される。例えば、AKT1阻害剤およびAd36組成物は、一緒に製剤化されて同時に投与され得る。

#### 【0028】

##### Ad36組成物

本発明に従い投与されるAd36組成物は、様々な形態を有し得る。好ましくは、組成物は、E4orf1またはその機能性変異体を含む。例えば、Ad36組成物は、Ad36ウイルスもしくは弱毒変異体、またはAd36の不活性化形態、例えば熱殺菌もしくは漂白殺菌されたAd36、または複製欠損組み換えAd36であってもよい。Ad36組成物は、単離された、または組み換えAd36タンパク質、好ましくはE4orf1タンパク質またはその機能性変異体を含んでもよい。Ad36組成物は、E4orf1タンパク質またはその機能性変異体をコードする核酸を含んでもよい。Ad36組成物は、E4orf1タンパク質の類似体または誘導体、例えば化学的類似体または構造的類似体を含んでもよい。

#### 【0029】

##### タンパク質およびペプチド

Ad36組成物は、単離された、または組み換えAd36タンパク質、好ましくはE4orf1タンパク質またはその機能性変異体を含んでもよい。本明細書において「単離された」と言及されるタンパク質またはポリペプチドは、それらが感染した哺乳動物細胞において存在する状態を超える状態まで精製されたタンパク質またはポリペプチドである。E4orf1およびその機能性変異体を含むAd36タンパク質は、周知の方法を使用して、例えば組み換え発現および精製、化学合成（例えば合成ペプチド）、または生物学的および化学的方法の組合せにより、ならびに単離された組み換えタンパク質またはポリペプチドを使用して生成され得る。タンパク質は、少なくとも約50重量%、好ましくは少なくとも約75重量%、より好ましくは本質的に純粋な形態の単離された状態で得ることができる。本明細書において「組み換え」と言及されるタンパク質またはポリペプチドは、組み換え核酸の発現により生成されるタンパク質またはポリペプチドである。

#### 【0030】

本明細書において使用される場合、「Ad36 E4orf1」とは、アデノウイルス36からの自然発生または内因性E4orf1タンパク質、自然発生または内因性の対応するAd36 E4orf1のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有するタンパク質（例えば、組み換えおよび合成タンパク質）、ならびに前記タンパク質のそれぞれの機能性変異体（例えば、突然変異誘発および/または組み換え技術により生成された機能性断片および/または変異）を指す。したがって、本明細書において定義されるように、この用語は、成熟Ad36 E4orf1、グリコシル化または非グリコシル化Ad36 E4orf1タンパク質、多型または対立遺伝子変異体、およびAd36 E4orf1の他のアイソフォーム（例えば、代替的なスプライシングまたは他の細胞プロセスにより生成される）、ならびに機能性断片を含む。

#### 【0031】

Ad36 E4orf1の「機能性変異体」は、機能性断片および機能性変異タンパク質を含む。一般に、本発明に包含されるAd36 E4orf1の断片または一部は、欠失（すなわち、1つ以上の欠失）を有するものを含む。例えば、1個から約75個、例えば1個から約50個、または1個から約25個、または1個から約10個の連続または非連続アミノ酸が、Ad36 E4orf1から欠失してもよい。PDZドメイン結合モチーフ（配列番号2の最後の4つのアミノ酸）は、改変されるべきではない重要な領域であるため、その完全性が維持されるべきである。成熟Ad36 E4orf1に対して連続アミノ酸のみが欠失した、または非連続アミノ酸が欠失した断片または一部もまた想定される。一般に、本発明に包含されるAd36 E4orf1の変異または誘導体は、1つ

10

20

30

40

50

以上の連続もしくは非連続アミノ酸残基の追加、欠失および／もしくは置換により異なる自然もしくは人工変異体、または1つ以上の残基が修飾された修飾ポリペプチド、および1つ以上の修飾残基を含む変異を含む。好ましい変異は、1つ以上の連続または非連続アミノ酸残基の追加、欠失および／または置換により異なる、Ad36 E4orf1の自然もしくは人工変異体である。

#### 【0032】

Ad36 E4orf1の「機能性断片または部分」とは、肝脂肪変性の減衰、グルコース処理の向上、および／または血糖コントロールの改善等のAd36 E4orf1の少なくとも1つの特性、活性および／または機能特性を有する、単離された、および／または組み換えタンパク質またはオリゴペプチドを指す。

10

#### 【0033】

Ad36組成物はまた、異種アミノ酸配列を有するE4orf1またはその機能性断片もしくは変異体を含む機能性融合タンパク質を含有し得る。

#### 【0034】

一般に、Ad36 E4orf1または機能性変異体は、変異体の長さにわたり、配列番号2または配列番号4と少なくとも約85%類似した、少なくとも約90%類似した、少なくとも約95%類似した、少なくとも約96%類似した、少なくとも約97%類似した、少なくとも約98%類似した、または少なくとも約99%類似したアミノ酸配列を有する。

#### 【0035】

いくつかの実施形態において、例えば現在利用可能な組み換えタンパク質生成を使用して、Ad-36 E4orf1の精製されたタンパク質を作製するために、配列番号1または配列番号3が使用される。アミノ酸配列同定は、CLUSTAL W等の好適なアミノ酸配列アラインメントアルゴリズムを使用し、初期設定パラメータを用いて決定され得る。(Thompson J. D. et al., Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680 (1994).)

20

#### 【0036】

##### 核酸およびベクター

Ad36組成物は、Ad36のタンパク質、好ましくはE4orf1タンパク質またはその機能性変異体をコードする単離された、または組み換え核酸を含み得る。

30

#### 【0037】

Ad36 E4orf1タンパク質またはその機能性変異体をコードする、単離された、および／または組み換え（例えば本質的に純粋なものを含む）核酸は、in situでAd36 E4orf1生成を引き起こすために投与され得る。本明細書において「単離された」と言及される核酸は、その起源のゲノムDNAまたは細胞RNA（例えば、細胞内またはライプラリ等の核酸の混合物中に存在するため）の核酸から分離された核酸であり、さらなる処理を受けていてもよい。「単離された」核酸は、本質的に純粋な核酸、化学合成により、生物学的および化学的方法の組合せにより生成される核酸、ならびに単離された組み換え核酸を含む、本明細書に記載の方法、同様の方法または他の好適な方法により得られる核酸を含む。本明細書において「組み換え」と言及される核酸は、人工的組み換えの方法、例えばポリメラーゼ鎖反応（PCR）および／または制限酵素を使用したベクターへのクローニングに依存する手順により生成される核酸を含む、組み換えDNA法により生成された核酸である。「組み換え」核酸はまた、細胞の自然のメカニズムにより生じる組み換え事象から生じるものであるが、所望の組み換え事象を許容し可能とするように設計された核酸の細胞への導入後に選択される。

40

#### 【0038】

これらの基準を満たす単離された、および／または組み換え核酸は、自然発生Ad36 E4orf1およびその一部をコードする配列と同一の配列、または自然発生配列の機能性変異体を有する核酸を含む。そのような機能性変異体は、本明細書においてさらに説明されるような1つ以上の残基の追加、欠失または置換により異なる変異を含み、例えば

50

、1つ以上のヌクレオチドが修飾された修飾核酸（例えば、DNAまたはRNA類似体）によりコードされ得る。配列は、個人における発現のために、コドン最適化またはコドン非最適化されてもよい。

#### 【0039】

一態様において、Ad36 E4orf1または機能性変異体は、変異体の長さにわたり、配列番号1または配列番号3と少なくとも約85%類似した、少なくとも約90%類似した、少なくとも約95%類似した、少なくとも約96%類似した、少なくとも約97%類似した、少なくとも約98%類似した、または少なくとも約99%類似した核酸配列を有する核酸によりコードされる。核酸配列同定は、CLUSTAL W等の好適な核酸配列アラインメントアルゴリズムを使用し、初期設定パラメータを用いて決定され得る。

(Thompson J. D. et al., Nucleic Acids Res. 22: 4673 - 4680 (1994).)

#### 【0040】

核酸は、DNA、RNAの形態であってもよく、また一本鎖または二本鎖であってもよい。一般に、核酸は、複製源、プロモーター、およびエンハンサー等の発現制御配列に作用可能に結合している（例えば、Queen, et al., Immunol. Rev. 89: 49 - 68, 1986を参照されたい）。所望の細胞における組み換えタンパク質の発現のためのいくつかの好適なベクターは、当該技術分野において周知であり、従来的である。好適なベクターは、以下の1つ以上を含むがこれらに限定されないいくつかの成分を含有し得る：複製源；選択可能マーカー遺伝子；1つ以上の発現制御要素、例えば転写制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター）、および／または1つ以上の翻訳シグナル；ならびに、選択された宿主細胞における分泌経路への標的化のためのシグナル配列またはリーダー配列。所望される場合、ベクターは、検出可能なマーカーを含み得る。

#### 【0041】

ある特定の実施形態において、発現ベクターが遺伝子治療において使用される。発現には、宿主細胞における対象遺伝子の発現を推進する、エンハンサー／プロモーター等の適切な制御要素がベクターに提供されることが必要である。宿主細胞におけるメッセンジャーRNA安定性および翻訳可能性を最適化するように設計された要素もまた知られている。

#### 【0042】

発現ベクターが細胞内に導入され得るいくつかの手法がある。本発明のある特定の実施形態において、発現コンストラクトは、ウイルスまたはウイルスゲノムから得られた改変コンストラクトを含む。受容体媒介エンドサイトーシスにより細胞に進入する、宿主細胞ゲノムに一体化する、ならびに安定および効率的にウイルス遺伝子を発現する、ある特定のウイルスの能力によって、それらは、哺乳動物細胞への外来遺伝子の移入のための魅力的な候補となつた（Ridgeway, 1988: Nicolas and Rubinstein, In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494 - 513, 1988.; Baichwal and Sugden, Baichwal, In: Gene Transfer, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117 - 148, 1986. 1986; Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati, R. ed., New York, Plenum Press, pp. 149 - 188, 1986）。好ましい遺伝子治療ベクターは、一般にウイルスベクターである。

#### 【0043】

AKT1阻害剤

Ad36組成物は、2-ATD; AKT-I-1(8); 2,3-ジフェニルキノキサ

10

20

30

40

50

リン(9)；5,6-ジフェニルピラジン-2(1H)-オン(ピラジノン)の位置異性体(9)；または8-[4-(1-アミノシクロブチル)フェニル]-9-フェニル[1,2,4]トリアゾロ[3,4-f]-1,6-ナフチリジン-3(2H)-オン(米国特許第7,576,209号)を含む、任意のAKT1阻害剤を含み得る。好ましくは、AKT1阻害剤は、2-ATDである。

#### 【0044】

##### A d 3 6 組成物およびAKT1阻害剤の投与

必ずしもこれらに限定されないが、非経口(例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下注射)、経口(例えば、食事)、局所、吸入(例えば、気管支内、鼻腔内、もしくは経口吸引、点鼻)、または経直腸を含む、様々な投与経路が可能である。

10

#### 【0045】

アデノウイルス-36 E 4 or f 1 タンパク質またはその断片は、アデノウイルス-36 E 4 or f 1 タンパク質の発現を可能とする様式で、アデノウイルス-36 E 4 or f 1 タンパク質をコードする核酸配列を哺乳動物に導入することにより投与され得る。そのような方法において、核酸配列は、電気穿孔、DEAEデキストラントランスクレクション、リン酸カルシウムトランスクレクション、カチオン性リポソーム融合、原形質体融合、インビボ電場の形成、DNA被覆微粒子錠、組み換え複製欠損ウイルスの注入、相同的組み換え、インビボ遺伝子治療、エキソビボ遺伝子治療、ウイルスペクター、裸のDNA移入、ならびにナノ技術送達システムの使用からなる群から選択される方法により導入され得る。

20

#### 【0046】

投与されるA d 3 6 組成物およびAKT1阻害剤の製剤は、選択される投与経路(例えば、溶液、エマルジョン、カプセル)および処置される個人によって変動する。投与される化合物を含む適切な組成物は、生理学的に許容されるビヒクルまたは担体中で調製され得る。溶液またはエマルジョンの場合、好適な担体は、例えば、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水性またはアルコール/水性の溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含む。非経口ビヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース(Ringer's dextrose)、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、または不揮発性油を含み得る。静脈内ビヒクルは、様々な添加剤、保存料、または流体、栄養物もしくは電解質補給物を含み得る(一般に、Remington's Pharmaceutical Science, 16th Edition, Mack, Ed. 1980を参照されたい)。吸引の場合、化合物は、可溶化されて、好適な投与用ディスペンサー(例えば、噴霧器、ネプライザーもしくは加圧エアロゾルディスペンサー)内に装填されるか、または呼吸可能な乾燥粉末として製剤化される。A d 3 6 組成物およびAKT1阻害剤は、別個に製剤化されても、または一緒に製剤化されてもよい。

30

#### 【0047】

A d 3 6 組成物およびAKT1阻害剤は、単回用量または複数回用量で投与され得る。治療上効果的な量が投与される。治療上効果的な量は、投与条件下で意図される効果を生成するのに十分な量である。例えば、脂肪酸化を増加させる、肝臓から脂肪を輸送する、肝臓内のG lut 2 存在量を低下させる、肝臓内のG 6 Pase を低減する、アディポネクチンおよび/もしくはG lut 4 を向上させる、血糖コントロールを改善する、ならびに/または肝機能を改善するのに十分なA d 3 6 組成物の量が投与され得る。脂質生成を阻害する、PPAR のmRNA レベルおよび/またはアディポネクチン機能を低減するのに十分なAKT1阻害剤の量が投与され得る。適切な用量は、個人の年齢、薬物感受性、薬物耐性、疾患の重症度および全体的な健康状態、ならびに他の因子を考慮した、当該技術分野において知られている方法を使用して、通常の技術を有する臨床医学者により決定され得る。好適な用量は、処置当たり約0.1mg/kgから約10.0mg/kg(体重)であってもよい。

40

#### 【0048】

50

本明細書において引用される全ての文書の全教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

A d 3 6 E 4 o r f 1 配列

A d - 3 6 E 4 o r f 1 DNA 配列(配列番号1)

A T G G C T G A A T C T C T G T A T G C T T T C A T A G A T A G C C C T G G A G  
G

G A T C G C T C C C G T C C A G G A A G G G G C T A G C A A T A G A T A T A C  
T T C T T T T G C C

C C G A A T C T T T C C A C A T T C C T C C G C A T G G G G T G A T A T T G C T  
T C A C C T C A G A

G T G A G C G T G C T G G T T C C T A C T G G A T A T C A G G G C A G A T T A  
T G G C C T T G A A

T G A C T A C C A T G C C A G G G G C A T A C T A A C C C A G T C C G A T G T G  
A T A T T T G C C G

G G A G A A G A C A T G A T C T C T C T G T G C T G C T C T T A A C C A C A C  
G G A C C G A T T T

T T G T A T G T C C G C G A G G G C C A C C C A G T G G G A A C C C T G C T G C  
T G G A G A G A

G T G A T T T T C C T C A G T G A G A A T A G C C A C C C T G G T T T A G

A d - 3 6 E 4 o r f 1 タンパク質翻訳(配列番号2)

M A E S L Y A F I D S P G G I A P V Q E G A S N R Y I F F C P E S F H I P P H G  
V

I L L H L R V S V L V P T G Y Q G R F M A L N D Y H A R G I L T Q S D V I F A G  
R R H D L S V L L F

N H T D R F L Y V R E G H P V G T L L I E R V I F P S V R I A T L V

### 【実施例】

#### 【0049】

##### 実施例

本明細書において開示される試験の結果は、人間におけるA d 3 6 感染とより良好な血糖コントロールとの間に関連性があることを明らかにした。また、結果は、A d 3 6 E 4 o r f 1 タンパク質が、AKT 1阻害剤と組み合わされた場合、脂質生成の増加なしにグルコース処理を改善することを実証している。したがって、本明細書において開示されるこれらの試験は、AKT 1と組み合わされたA d 3 6、A d 3 6 E 4 o r f 1、および機能性変異体が、脂質生成の増加なしに、高血糖、インスリン耐性、前糖尿病、糖尿病(1型または2型)を処置または予防するために、および血糖コントロールを改善するために使用され得ることを示している。

#### 【0050】

A d 3 6 のAKTとの相互作用を調査した。AKT 1、AKT 2およびAKT 3は、この酵素のアイソフォームである。AKT 1の活性化は、PPARの上方制御および結果的な脂質生成をもたらし、一方、AKT 2の活性化は、グルコース取り込みの増加をもたらす。AKT 3は、主として脳内で発現される。

#### 【0051】

A d 3 6 感染は、マウスにおいてAKT 1およびAKT 2の活性化を上方制御した(図2および3)。A d 3 6 に感染した給餌マウスは、感染に応答して脂質生成を増加させたが、その血糖コントロールを改善した。これは、A d 3 6 感染給餌マウスにおけるAKT 1およびAKT 2のより高い活性化に反映されている。一方、高脂肪負荷マウスはすでに太っており、A d 3 6 感染に応答して脂質生成をそれ以上増加させなかつた。しかしながら、それらのマウスは、A d 3 6 感染に応答して血糖コントロールを改善する。これは、非感染対照と比較して、これらのマウスにおけるより高いAKT 2活性化に反映されている(但しAKT 1活性化に差はない)。また、A d 3 6 が分化している前脂肪細胞(3T

10

20

30

40

50

3-L1細胞)においてAKT1およびAKT2の活性化を有意に増加させ、分化した3T3-L1脂肪細胞においてAKT2活性化を増加させる(図4および5)ことが発見された。3T3-L1細胞は、本明細書においてさらに説明されるように、AKT酵素を研究するためのモデルとして使用された。さらに、siRNAを使用してAKT1またはAKT2を選択的にノックダウンすることにより、Ad36が細胞グルコース取り込み向上させるためにはAKT1ではなくAKT2が必要であることが示された(図6)。

#### 【0052】

##### 実施例1

Ad36は、高脂肪(HF)負荷マウスにおいてAKT2を活性化する

アデノウイルスAd36もしくはAd2(陰性対照ウイルス)による感染または模擬感染から20週間後に致死させたHF負荷マウスの脂肪組織から、タンパク質を単離した(n=3匹のマウス/群)。AKT2タンパク質を、免疫沈降法により、アイソフォーム特異的AKT抗体を使用して単離した。全ての、およびリン酸化したAKT2のレベルを、ウェスタンプロットにより決定した(図2A)。密度測定分析を使用して、タンパク質存在量を定量し、平均±SEと比較した。Ad2感染群ではなく、Ad36感染マウスが、模擬感染と比較して、より高いAKT2活性化を有していた(より高いリン酸化により示されるように)(\*p<0.05)(図2B)。

#### 【0053】

##### 実施例2:

Ad36は、給餌マウスにおいてAKT1およびAKT2を活性化する

Ad36もしくはAd2による感染または模擬感染から12週間後に致死させた給餌マウスの脂肪組織から、タンパク質を単離した(n=3匹のマウス/群)。AKT1およびAKT2タンパク質を、免疫沈降法により、アイソフォーム特異的AKT抗体を使用して単離した。全ての、およびリン酸化したAKT1およびAKT2のレベルを、ウェスタンプロットにより決定した(図3A)。密度測定分析を使用して、タンパク質存在量を定量し、平均±SEと比較した。Ad2感染マウスではなく、Ad36感染マウスが、模擬感染と比較して、より高いAKT1およびAKT2活性化を有していた(より高いリン酸化により示されるように)(\*p<0.05またはそれ以上)(図3Bおよび3C)。

#### 【0054】

##### 実施例3:

Ad36は、分化中の3T3L1細胞においてAKT1およびAKT2を活性化する

3T3L1前脂肪細胞を、Ad36または模擬感染させた(n=3/群)。3T3L1細胞を脂肪細胞に分化するように誘導した。感染から24、48および72時間後に、タンパク質を採取した。AKT1およびAKT2タンパク質を、免疫沈降法により、アイソフォーム特異的AKT抗体を使用して単離した。全ての、およびリン酸化したAKT1およびAKT2のレベルを、ウェスタンプロットにより決定した(図4A)。密度測定分析を使用して、タンパク質存在量を定量し、平均±SEと比較した。Ad36は、模擬感染と比較して、AKT1およびAKT2活性化の増加を有意に誘導した(\*p<0.05またはそれより良好)(図4Bおよび4C)。AKTに対するAd36の効果は、インスリンの効果と同様であるか、またはそれより良好である。

#### 【0055】

##### 実施例4:

Ad36は、脂肪細胞中の3T3L1においてAKT2を活性化する

分化した3T3L1脂肪細胞を、Ad36または模擬感染させた(n=3/群)。感染から24時間後に、タンパク質を採取した。AKT2タンパク質を、免疫沈降法により、アイソフォーム特異的AKT抗体を使用して単離した。全ての、およびリン酸化したAKT2のレベルを、ウェスタンプロットにより決定した(図5A)。密度測定分析を使用して、タンパク質存在量を定量し、平均±SEと比較した。Ad36は、模擬感染と比較して、AKT2活性化を有意に増加させた(\*p<0.05)(図5B)。

#### 【0056】

10

20

30

40

50

**実施例 5 :**

s i R N A による A K T ノックダウン後のグルコース取り込み

3 T 3 - L 1 前脂肪細胞において、トランスフェクションから 3 日後に、基礎およびインスリン刺激条件下で 2 - デオキシグルコース ( 2 D G ) 取り込みを決定した。N T : 非標的化 s i R N A でトランスフェクトされた細胞。A k t 1 および A k t 2 : A k t 1 および A k t 2 s i R N A でトランスフェクトされた細胞。N T + A d 3 6 : 非標的化 s i R N A でトランスフェクトされ、A d 3 6 に感染した細胞。A k t 1 + 3 6 および A k t 2 + 3 6 : A k t 1 および A k t 2 s i R N A で別個にトランスフェクトされ、A d 3 6 に感染した細胞。N t - I n s : 非標的化 s i R N A + インスリンでトランスフェクトされた細胞。A k t 1 + I n s および A k t 2 + I n s : A k t 1 および A k t 2 s i R N A + インスリンでトランスフェクトされた細胞。予期されるように、A d 3 6 はグルコース取り込みを有意に増加させた。結果は、A K T 1 ではなく A K T 2 のノックダウンが、A d 3 6 誘導グルコース取り込みを減少させたことを示している (\* p < 0 . 0 5) ( 図 6 )。

**【 0 0 5 7 】****実施例 6 :**

誘導可能な E 4 o r f 1 安定細胞株における 2 - A T D を使用した A K T 1 の化学的阻害

ドキシサイクリン ( 1 0 ) に暴露されると A d 3 6 E 4 o r f 1 を発現する 3 T 3 - L 1 細胞を生成した。空ベクター ( p T R E ) を有し、ドキシサイクリンに応答して E 4 o r f 1 を発現しない細胞を、対照として使用した。コンフルエントな E 4 o r f 1 および p T R E 細胞を、脂質生成培地に暴露し、分化を誘導した。さらに、細胞を、0、1 または 5  $\mu$  の 2 A T D ( A K T 1 シグナリングの特異的阻害剤 ) で処理した。この培地を、最長 9 日間、2 日おきに補充した。脂質生成分化を、オイルレッド O 染色により検証した ( 図 7 A ~ F )。

**【 0 0 5 8 】****実施例 7 :**

誘導可能な E 4 o r f 1 安定細胞株における 2 - A T D を使用した A K T 1 の化学的阻害

コンフルエントな E 4 o r f 1 および p T R E 細胞を、脂質生成培地に暴露し、分化を誘導した。さらに、細胞を、0 または 5  $\mu$  の 2 A T D ( A K T 1 シグナリングの特異的阻害剤 ) で処理した。この培地を、最長 9 日間、2 日おきに補充した。1 0 0 0 n g / m l のドキシサイクリンの存在下での P P A R およびアディポネクチン ( 脂質生成のマーカー ) の発現の誘導から 2 4 時間後に、基礎およびインスリン刺激 2 D G 取り込みを q R T - P C R により測定した。予期されるように、E 4 o r f 1 発現は、P P A R およびアディポネクチンの発現を有意に増加させ、2 - A T D 処理は、p T R E および E 4 o r f 1 発現細胞における P P A R 発現 ( 図 8 A ) 、ならびに E 4 o r f 1 発現細胞 ( 図 8 B ) におけるアディポネクチン発現を有意に低減した。

**【 0 0 5 9 】****実施例 8**

2 - A T D の存在下での基礎およびインスリン刺激グルコース取り込み

E 4 o r f 1 および p T R E 誘導可能な安定な細胞を、脂質生成培地に暴露して分化を誘導し、0 または 5  $\mu$  の 2 - A T D で処理した。基礎およびインスリン刺激 2 D G を、インスリンの存在下または非存在下で、ドキシサイクリン ( 1 0 0 0 n g / m l ) への暴露から 2 4 時間後に決定した (\* p < 0 . 0 5)。E 4 o r f 1 発現は、p T R E の場合と比較して、グルコース取り込みを増加させた。2 - A T D 処理にもかかわらず、E 4 o r f 1 発現細胞は、有意により高いグルコース取り込みを示し続けた ( 図 9 )。

**【 0 0 6 0 】****実施例 9**

A T D は P P A R タンパク質存在量を阻害する

3 T 3 - L 1 脂肪細胞をヌルベクターでトランスフェクトして 1 0  $\mu$  T Z D に暴露するか、または E 4 o r f 1 タンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトした。

両方の群を、0、1、または5 μ A T D に暴露した。A T D は、P P A R タンパク質存在量を低減した。A T D 濃度の増加は、T Z D の存在下でグルコース取り込みを有意に低減したが、E 4 o r f 1 でトランスフェクトされた場合有意に低減しなかった（図10）。脂肪細胞におけるグルコース取り込みは、T Z D の存在下ではP P A R 依存性であったが、E 4 o r f 1 により誘導された場合P P A R 依存性ではなかった。したがって、A K T - 1 シグナリングを下方制御することにより、E 4 o r f 1 を使用して、それ以上脂質蓄積を増加させることなく脂肪細胞によるグルコース取り込みを向上させることができる。これらのデータは、脂質生成作用のないE 4 o r f 1 の抗糖尿病薬としての可能性を利用する手法を示している。

## 【0061】

10

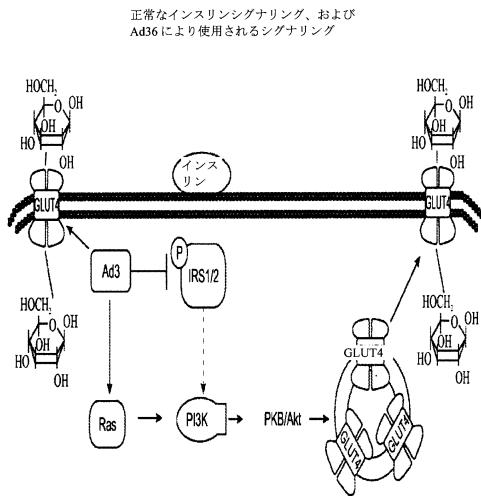
## 参考文献

1. Lindsley CW. The Akt/PKB family of protein kinases: a review of small molecule inhibitors and progress towards target validation: a 2009 update. *Curr Top Med Chem* 2010; 10: 458-477.
2. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Bimbaum MJ. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 2001 ; 276: 38349-38352.
3. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 2001 ; 292: 1728-1731.
4. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, et al. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 2003; 112: 197-208.
5. Hill MM, Clark SF, Tucker DF, Birnbaum MJ, James DE, Macaulay SL, A role for protein kinase Bbeta/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes, *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7771 -7781.
6. Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, et al. Role for Akt3 / protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1869-1878.
7. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer : rationale and promise. *Cancer Cell* 2003; 4: 257-262.
8. Barnett SF, Defeo-Jones D, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Jones RE, et al. Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and iso enzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem J* 2005; 385: 399-408.
9. Lindsley CW, Zhao Z, Leister WH, Robinson RG, Barnett SF, Defeo-Jones D, et al. Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 761-764.

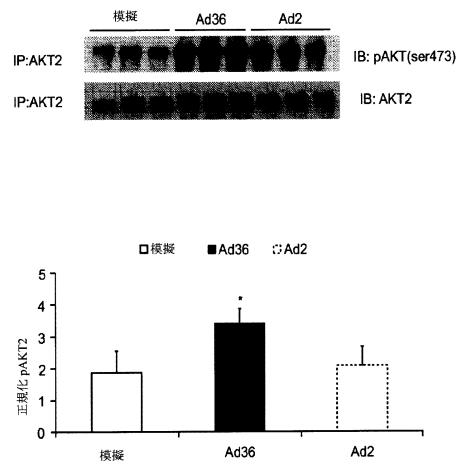
20

30

【図1】



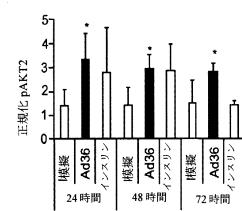
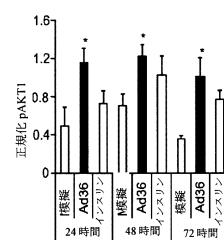
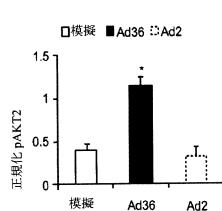
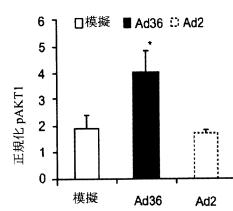
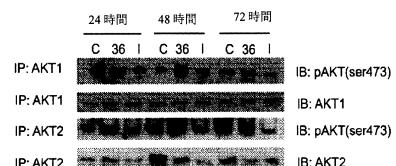
【図2】



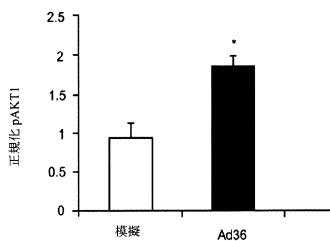
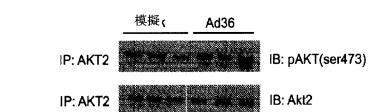
【図3】



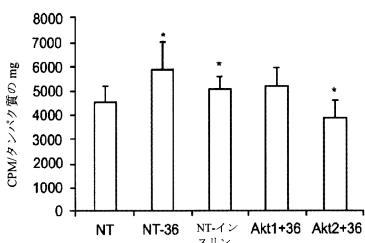
【図4】



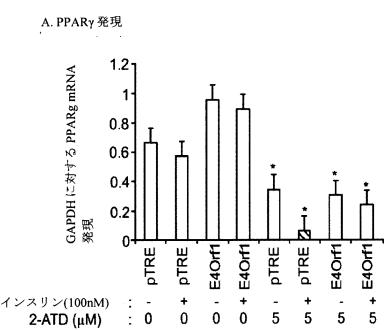
【図5】



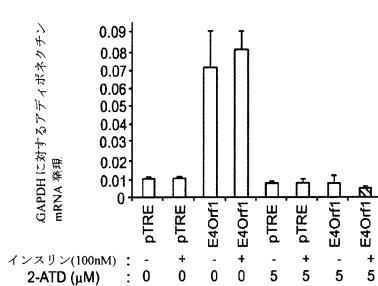
【図6】



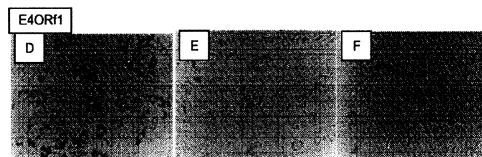
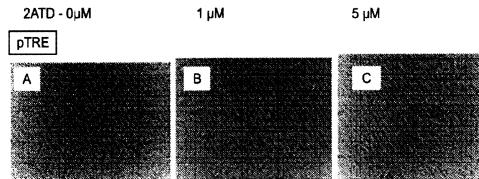
【図8】



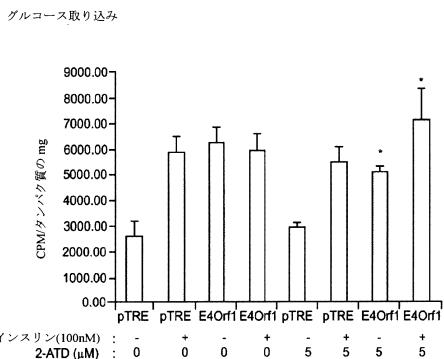
B. アディポネクチン発現



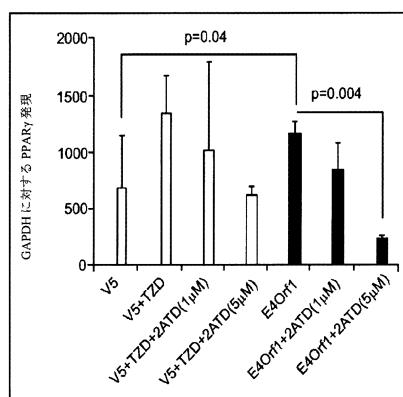
【図7】



【図9】



【図10】



【配列表】

0006175076000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1  
A 6 1 P 43/00 1 2 1

(73)特許権者 314017381

クリシュナプラム, ラシュミ  
アメリカ合衆国 ルイジアナ 70809 バトン ルージュ, アパートメント ナンバー 18  
0, エッセン レーン 4155

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

(72)発明者 デュランダー, ニキル

アメリカ合衆国 ルイジアナ 70810 バトン ルージュ, サウス レイクサイド オークス  
アベニュー 11152

(72)発明者 クリシュナプラム, ラシュミ

アメリカ合衆国 ルイジアナ 70809 バトン ルージュ, アパートメント ナンバー 18  
0, エッセン レーン 4155

審査官 新熊 忠信

(56)参考文献 国際公開第2007/064836 (WO, A1)

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010年, Vol.20, p.1652-1656

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 38 / 00 - 38 / 58  
A 6 1 K 41 / 00 - 45 / 08  
A 6 1 K 48 / 00  
A 6 1 K 50 / 00 - 51 / 12  
A 6 1 K 31 / 00 - 33 / 44  
A 6 1 P 3 / 00  
A 6 1 P 43 / 00  
J ST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream III)  
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)