

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-534124

(P2016-534124A)

(43) 公表日 平成28年11月4日 (2016.11.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 213/16 (2006.01)	C O 7 D 213/16 C S P	4 B O 1 8
C07D 417/04 (2006.01)	C O 7 D 417/04 Z N A	4 C O 3 3
A61P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	4 C O 5 0
A61P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C O 5 5
A61K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-537878 (P2016-537878)	(71) 出願人	391058060
(86) (22) 出願日	平成26年8月29日 (2014.8.29)		ベイラー カレッジ オブ メディシン
(85) 翻訳文提出日	平成28年4月26日 (2016.4.26)		BAYLOR COLLEGE OF M
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/053334		E D I C I N E
(87) 国際公開番号	W02015/031710		アメリカ合衆国, テキサス 77030,
(87) 国際公開日	平成27年3月5日 (2015.3.5)		ヒューストン, ワン ベイラー プラザ
(31) 優先権主張番号	14/270,130		(番地なし)
(32) 優先日	平成26年5月5日 (2014.5.5)	(74) 代理人	100082072
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清原 義博
(31) 優先権主張番号	14/013,918	(72) 発明者	上杉 志成
(32) 優先日	平成25年8月29日 (2013.8.29)		日本国大阪府寝屋川市高宮あさひ丘9-1
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ワキル, サリフ, ジェイ.
(31) 優先権主張番号	14/052,074		アメリカ合衆国 77024 テキサス州
(32) 優先日	平成25年10月11日 (2013.10.11)		ヒューストン ターマー・サークル 4
(33) 優先権主張国	米国 (US)		14

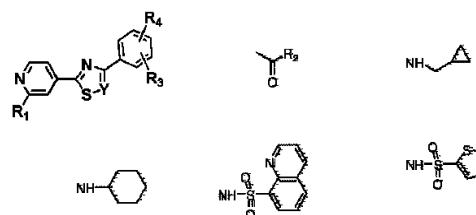
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 代謝並びに体重関連疾患の処置のための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、更に独立して置換され得るピペリジニル、ピロリニルまたはピリジニルの環A、チアゾールの環B、またはフェニルの環Cを有する三者間の構造A - B - Cを有する化合物、医薬組成物および製剤に関する。さらに、本明細書中の化合物、医薬組成物および製剤で、代謝障害または細胞の過剰増殖性の疾患を処置する方法が提供される。更に、本明細書に記載の構造A - B - Cの化合物、または以下の式の構造の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩または立体異性体または両方を用いて、体重を減少させるか、または体重減少中に熱産性を増加させる方法が提供され、

【化1】



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化学構造：A - B - Cを有する化合物であって、

式中、A はピリジンまたは置換ピリジン、ピペリジンまたは置換ピペリジン、ピロリジンまたは置換ピロリジン、チアゾールまたは置換チアゾール、フェニル環または置換フェニル環であり、

B はチオアゾールまたは置換チオアゾール、ピペラジンまたは置換ピペラジン、フェニル環または置換フェニル環であり、および

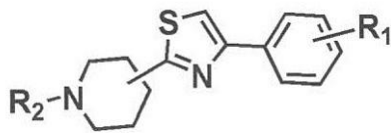
C はフェニル環または置換フェニル環、ピリジンまたは置換ピリジン、チアゾールまたは置換チアゾールである

ことを特徴とする化合物。

【請求項 2】

前記化学構造は、

【化 1】



であり、

式中、 R_1 は、H、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-OC_{1-3}$ アルコキシ、 $-OC(O)R_3$ であり；

R_3 は、 C_{1-3} アルキルまたはアリール、 $-OCH_2-C(O)OR_4$ であり；

R_4 は H または C_{1-3} アルキル、 $-NHR_5$ であり；

R_5 は、H、 C_{1-4} アルキル、アルキルシクロプロパン、ベンジル、 $-NHC(O)C_{1-3}$ アミド、 $-NHC(O)O-R_5$ カルバマートであり；

R_5 は *tert*-ブチルまたはフルオレニルメチルまたは、 $-NH-SO_2-R_7$ スルホンアミドであり；

R_7 はアルキルまたはアリールであり、

R_2 はアルキルまたは $R_8OC(O)-$ であり、および

R_8 は C_3-C_5 アルキルまたはアリールである

ことを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

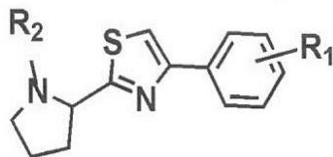
【請求項 3】

前記ハロゲンは臭素であることを特徴とする請求項 2 記載の化合物。

【請求項 4】

前記化学構造は、

【化 2】



であり、

式中、 R_1 は、H、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-OC_{1-3}$ アルコキシ、 $-OC(O)R_3$ であり；

R_3 は、 C_{1-3} アルキルまたはアリール、 $-OCH_2-C(O)OR_4$ であり；

R_4 は H または C_{1-3} アルキル、 $-NHR_5$ であり；

R_5 は、H、 C_{1-4} アルキル、アルキルシクロプロパン、ベンジル、 $-NHC(O)C_{1-3}$ アミド、 $-NHC(O)O-R_5$ カルバマートであり；

10

20

30

40

50

R_5 は *tert*-ブチルまたはフルオレニルメチルまたはベンジル、 $-NH-SO_2-$
 R_7 スルホンアミドであり；
 R_7 はアルキルまたはアリールであり、
 R_2 はアルキルまたは $R_8OC(O)-$ であり、および
 R_8 は C_3-C_5 アルキルまたはアリールである
 ことを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 5】

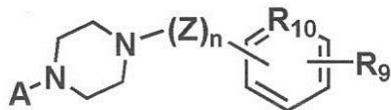
前記ハロゲンは臭素であることを特徴とする請求項 4 記載の化合物。

【請求項 6】

前記化学構造は、

10

【化 3】



であり、

式中、 R_9 は、 H 、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-O-C_1-C_3$ アルコキシ、 $-OC(O)R_{11}$ であり；

R_{11} は、 C_1-C_3 アルキルまたはアリール、 $-OCH_2-C(O)OR_{12}$ であり；

20

R_{12} は H または C_1-C_3 アルキル、 $-NHR_{13}$ であり；

R_{13} は、 H 、 C_1-C_4 アルキル、アルキルシクロプロパン、ベンジル、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アミド、 $-NHC(O)O-R_{14}$ カルバマートであり；

R_{14} は *tert*-ブチルまたはフルオレニルメチル、 $-NH-SO_2-R_{15}$ スルホンアミドであり；

R_{15} はアルキルまたはアリールまたは $-SO_2-NH-R_{16}$ スルホンアミドであり、

R_{16} はアルキルまたはアリールであり、

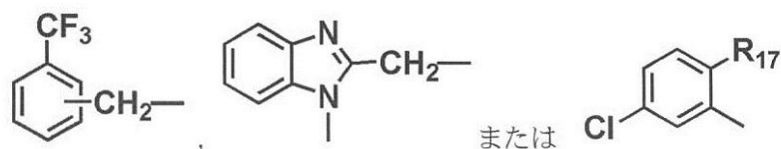
R_{10} は窒素またはメチレンであり、

n は 0 または 1 であり、 n が 1 である場合、 Z は $-C=O$ であり、および

30

A は次の構造であり、

【化 4】



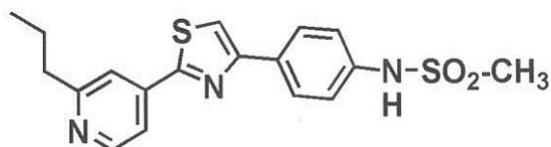
式中 R_{17} は H または C_1-C_3 アルキルであることを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 7】

40

前記化学構造は、

【化 5】



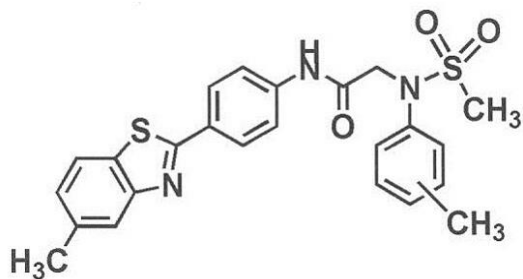
であることを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 8】

前記化学構造は、

50

【化 6】



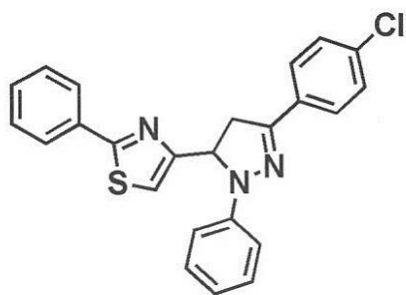
であることを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

10

【請求項 9】

前記化学構造は、

【化 7】



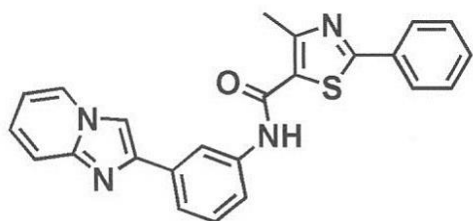
20

であることを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 10】

前記化学構造は、

【化 8】



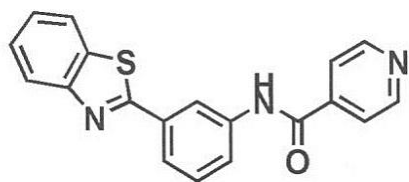
30

であることを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 11】

前記化学構造は、

【化 9】



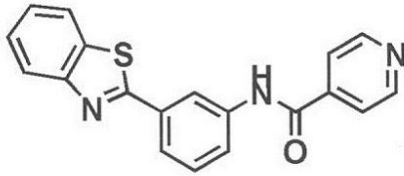
40

であることを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 12】

前記化学構造は、

【化 1 0】

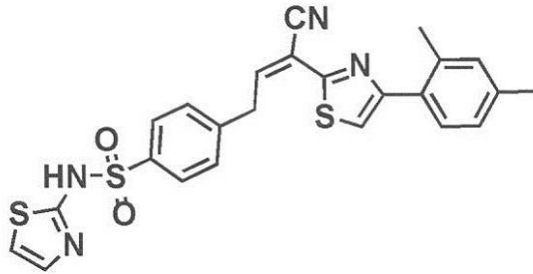


であることを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 1 3】

前記化学構造は、

【化 1 1】



であることを特徴とする、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 1 4】

動物における代謝障害を処置する方法であって、該方法は、治療上有効な量の、少なくとも 1 つの請求項 1 の化合物、あるいはその薬学的に許容可能な塩またはそれらの立体異性体またはそれらの組合せを、動物に投与する工程を含む、方法。

【請求項 1 5】

前記動物に第 2 の治療を提供する工程をさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

第 2 の治療は、食事療法、理学療法、行動療法、手術、薬物療法、またはそれらの組み合わせを含むことを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

第 2 の治療は、ライフスタイルの変更、抗高血糖薬、インシュリン、グルカゴン様ペプチド (GLP)、ジペプチジルペプチダーゼ - 4 阻害剤、チアゾリジンジオン、脂質低下化合物、またはそれらの二つ以上の組み合わせであることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記代謝障害は、細胞の過剰増殖に関連する疾患、体重関連疾患、高脂血症、糖尿病またはその合併症、脂肪肝、高血圧症または心疾患であることを特徴とする、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記代謝障害は、肥満、高血圧症、動脈硬化症、喘息、高脂血症、高インスリン血症、非アルコール性の脂肪肝およびインシュリン抵抗性に引き起こされる 2 型糖尿病であることを特徴とする、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記細胞の過剰増殖に関連する疾患は、癌であることを特徴とする、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

癌は、乳癌、気道の癌、脳の癌、生殖器の癌、前立腺癌、消化管の癌、尿路癌、目の癌、肝臓癌、皮膚癌、頭部および頸部の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、リンパ腫、肉腫、黒色腫、固形腫瘍、白血病、または固形腫瘍の遠隔転移であることを特徴とする、請求項 2 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 22】

前記代謝疾患は体重関連疾患であり、前記治療上有効な量の化合物は脱共役タンパク質 1、脱共役タンパク質 2 または脱共役タンパク質 3 の発現を増加させることを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

前記代謝疾患は体重関連疾患であり、前記治療上有効な量の化合物は、動物における体重減少中に除脂肪体重を減少させずに熱産性を増加させることを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 24】

必要とする患者において細胞の過剰増殖性の疾患を処置するための方法であって、該方法は、治療上有効な量の、少なくとも 1 つの請求項 1 の化合物、あるいはその薬学的に許容可能な塩またはそれらの立体異性体またはそれらの組合せを、患者に投与する工程を含む、方法。

10

【請求項 25】

細胞の過剰増殖性の疾患は、乳癌、気道の癌、脳の癌、生殖器の癌、前立腺癌、消化管の癌、尿路癌、目の癌、肝臓癌、皮膚癌、頭部および頸部の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、リンパ腫、肉腫、黒色腫、固形腫瘍、白血病、または固形腫瘍の遠隔転移であることを特徴とする、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

必要とする患者において体重を減少させる方法であって、該方法は、薬学的に許容可能な量の溶媒中の、治療上有効な量の 1 以上の請求項 1 の化合物を、動物に投与する工程を含む、方法。

20

【請求項 27】

前記動物は、肥満、高血圧症、動脈硬化症、喘息、高脂血症、高インスリン血症、非アルコール性の脂肪肝、またはインシュリン抵抗性に引き起こされる 2 型糖尿病、またはそれら組み合わせであることを特徴とする、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

請求項 1 の化合物と、食品、動物飼料材料または薬とを含む製剤。

【請求項 29】

動物における体重減少中に除脂肪体重を減少させずに熱産性を増加させる方法であって、該方法は、治療上有効な量の請求項 28 の製剤を動物に投与する工程を含む、方法

30

【請求項 30】

請求項 1 の化合物と薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 31】

必要とする患者において癌を処置する方法であって、該方法は、治療上有効な量の 1 以上の請求項 30 の医薬組成物を患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項 32】

請求項 1 の化合物と、化合物を収容する容器とを含むキット。

【請求項 33】

化合物であって：

40

t e r t - ブチル 2 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピロリジン - 1 - カルボキシラート、
 ベンジル - 2 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピロリジン - 1 - カルボキシラート、
 4 - (4 - プロモフェニル) - 2 - (ピロリジン - 2 - イル) チアゾール、
 4 - (4 - プロモフェニル) - 2 - (1 - プロピルピロリジン - 2 - イル) チアゾール、
 t e r t - ブチル 3 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシラート、
 ベンジル - 3 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシラート

50

3 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) - 1 - プロピルピペリジン、
 ベンジル 4 - (4 - (4 - プロモフェニルチアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カル

ボキシラート、
 ベンジル - (R) - 2 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール -

2 - イル) ピロリジン - 1 - カルボキシラート、
 ベンジル 3 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール - 2 - イル)

ピペリジン - 1 - カルボキシラート、
 ベンジル 4 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール - 2 - イル)

ピペリジン - 1 - カルボキシラート、
 4 - (3 - (ピリジン - 2 - イル) - [1 , 2 , 4] トリアゾロ [4 , 3 - b] ピリダジ

ン (ピリダジン) - 6 - イル) - N - トシルベンゼンアミン、
 (4 - (5 - クロロ - 2 - メチルフェニル ピペラジン - 1 - イル) (4 - トシルアミノ

) フェニルメタノン、
 4 - (4 - ((1 - メチル - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール - 2 - イル) メチル) ピペ

ラジン - 1 - イル) - N - トシルベンゼンアミン、
 3 - クロロ - 4 - メチル - N - (6 - (4 - (3 - (トリフルオロメチルベンジル) ピペ

ラジン - 1 - イル) ピリジン - 3 - イル) ベンゼンスルホンアミド、
 4 - クロロ - N - (4 - (4 - ((1 - メチル - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール - 2 -

イル) メチル) ピペラジン - 1 - イル) フェニル) ベンゼンスルホンアミド、
 (Z) - 4 - (3 - シアノ - 3 - (4 - (2 , 4 - ジメチルフェニル) チアゾール - 2 -

イル) アリル) - N - (チアゾール - 2 - イル) ベンゼンスルホンアミド、
 N - (3 - (H - イミダゾ [1 , 2 - a] ピリジン - 2 - イル) フェニル) - 4 - メチル

- 2 - フェニルチアゾール - 5 - カルボキサミド、
 N - (3 - (ベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) フェニル) イソニコチンアミド、

3 - (4 - クロロフェニル) - 4 , 5 - ジヒドロ - 1 - フェニル - 5 - (2 - フェニルチ

アゾール - 4 - イル) - 1 H - ピラゾール、
 N - (4 - (6 - メチルベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) フェニル) - 2 - (N - m

- トリルメチルスルホンアミド) アセトアミド ; あるいは
 N - (4 - (6 - メチルベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) フェニル) - 2 - (N - p

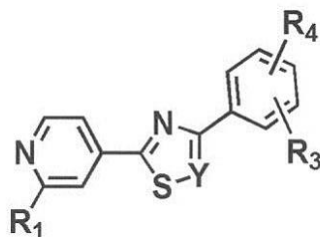
- トリルメチルスルホンアミド) アセトアミド

である化合物。

【請求項 3 4】

動物における体重減少中に除脂肪体重を減少させずに熱産性を増加させる方法であって、
 該方法は、薬学的に許容可能な溶媒中の、治療上有効な量の以下の構造を有する化合物、
 またはその薬学的に許容可能な塩または立体異性体またはそれらの組み合わせを、動物
 に投与する工程を含み、

【化 1 2】



式中、R₁ は H、Et、OMe または n - プロピルであり ;

Y は CH または

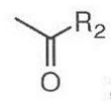
10

20

30

40

【化 1 3】



であり；

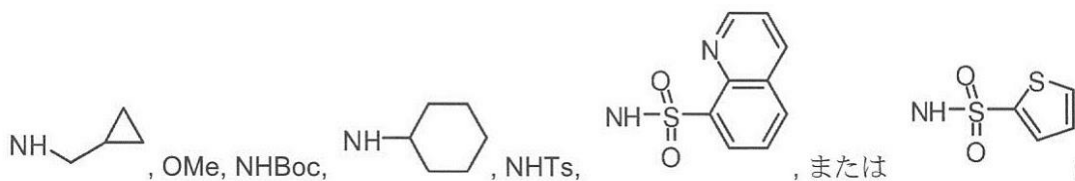
R_2 は OH、OMe または NH i -Pr であり；

R_3 は H、F または Cl であり；および

R_4 は、H、Me、Cl、Br、F、OH、OBz、OCH₂COOMe、OCH₂COOH、NH₂、NH i -Pr、NHCOMe、NHSO₂Me、NHBn、

10

【化 1 4】



である、方法。

【請求項 3 5】

動物は、肥満、高血圧症、動脈硬化症、喘息、高脂血症、高インスリン血症、非アルコール性の脂肪肝およびインシュリン抵抗性に引き起こされる 2 型糖尿病の、体重関連疾患を有することを特徴とする、請求項 3 4 に記載の方法。

20

【請求項 3 6】

ライフスタイルの変更、抗高血糖薬、インシュリン、グルカゴン様ペプチド (GLP)、ジペプチジルペプチダーゼ - 4 阻害剤、チアゾリジンジオン、脂質低下化合物、またはそれらの二つ以上の組み合わせを包含する第 2 の治療を動物に提供する工程を、更に含むことを特徴とする請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

化合物が、食品、動物飼料材料または薬として製剤されることを特徴とする、請求項 3 4 に記載の方法。

30

【請求項 3 8】

化合物が、脱共役タンパク質 1、脱共役タンパク質 2 および脱共役タンパク質 3 の発現を増加させることを特徴とする、請求項 3 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

< 関連出願への相互参照 >

【0002】

本国際出願は 2014 年 5 月 5 日に提出された米国特許出願第 14 / 270130 号の優先権の利益を米国特許法の下で主張し、該出願は、2013 年 10 月 11 日に提出された米国特許出願第 14 / 052074 号の優先権の利益を米国特許法の下で主張し、前記出願は 2013 年 8 月 29 日に提出された米国特許出願第 14 / 013, 918 号の優先権の利益を米国特許法の下で主張し、これらすべての全体が引用により本明細書に組み込まれる。

40

【0003】

< 連邦資金の説明 >

本発明は、国立衛生研究所助成金 GM - 63115 および国防総省助成金番号 DAMD 17 - 03 - 1 - 0228 からの連邦政府補助金を利用した。合衆国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0004】

50

< 発明の分野 >

本発明は、一般に、例えば、医学、細胞生物学、分子生物学、および生化学の分野に関する。特定の態様では、発明の分野は、肥満などの代謝障害の治療のための特定の組成物に関する。ある態様では、組成物は、例えば、ファスタチン A およびその類似体または誘導体を含む。

【背景技術】

【0005】

< 関連技術の説明 >

代謝症候群は、多数の心血管危険因子（高血圧症、脂質異常症（*dyslipidaemia*）、肥満、2型糖尿病、膵臓細胞機能障害、およびアテローム性動脈硬化症が含まれる）を対象とする。脂肪または炭水化物の含有量が様々な食事は、動物（ヒトが含まれる）のエネルギー代謝に寄与する。長鎖脂肪酸は、主なエネルギー供給源であり、細胞膜を含む脂質の重要な成分である。長鎖脂肪酸は、食品に由来し、デノボ（*de novo*）で複雑な一連の反応を介してアセチル-CoA から合成される。コレステロールも食品に由来し、同様に複雑な反応を介してアセチル-CoA から合成される。デノボ脂肪酸およびコレステロール合成を介した炭水化物のアシルグリセリドへの変換は、それぞれ、少なくとも12および23の酵素反応を含む。これらの酵素をコードする遺伝子の発現レベルは、ステロール調節エレメント結合タンパク質（SREBP）と呼ばれる3つの転写因子（SREBP-1a、SREBP-1c、およびSREBP-2）によって調節される（非特許文献1；非特許文献2）。これらの膜結合タンパク質は、ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス・ロイシンジッパー転写因子ファミリークラスのメンバーである。他のロイシンジッパー転写因子メンバーと異なり、SREBPは、小胞体膜結合前駆体として合成され、小胞体膜結合前駆体は核内の標的遺伝子の転写を活性化するためにゴルジ膜に結合する2つのプロテアーゼ（サイト-1およびサイト-2プロテアーゼ）によってタンパク質分解的に放出される必要がある。

10

20

【0006】

SREBPのタンパク質分解性活性は、SREBP切断活性化タンパク質（SCAP）（SREBPの小胞体膜結合エスコートタンパク質）との相互作用を介してステロールによって強く調節される。ステロールが小胞体膜中に蓄積される場合、SCAP/SREBP複合体はERからゴルジに排出することができず、それにより、SREBPのタンパク質分解プロセッシングは抑制される。SREBPは、脂肪代謝のホメオスタシスを支配する重要な脂質合成転写因子である先行技術は、様々な代謝異常の処置に役立つ新しい組成物および方法を欠いている。本発明この長年のニーズおよび当該技術分野の要望を満たす。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

< 発明の概要 >

本発明は、限定されないが細胞の過剰増殖性の疾患（例えば癌または体重関連疾患）などの代謝障害を処置するための、化合物、製剤およびそれらの医薬組成物およびその使用を教示している。

40

【0008】

本発明は一般構造：A-B-Cを有する化合物に向けられ：環Aはピリジンまたは置換ピリジン、ピペリジンまたは置換ピペリジン、ピロリジンまたは置換ピロリジン、チアゾールまたは置換チアゾール、フェニル環または置換フェニル環である。環Bはチオアゾール（*thioazole*）または置換チオアゾール（*thioazole*）、ピペラジンまたは置換ピペラジン、フェニル環または置換フェニル環である。環Cはフェニル環または置換フェニル環、ピリジンまたは置換ピリジン、チアゾールまたは置換チアゾールである。

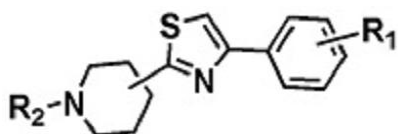
【0009】

本発明はさらに、以下の化学構造を有する化合物に向けられ、

50

【 0 0 1 0 】

【 化 1 】



R_1 は、H、ハロゲン、 OH 、 $-O-C_1-C_3$ アルコキシ、 $-OC(O)R_3$ であり； R_3 は、 C_1-C_3 アルキルまたはアリール、 $-OCH_2-C(O)OR_4$ であり； R_4 はHまたは C_1-C_3 アルキル、 NHR_5 であり； R_5 は、H、 C_1-C_4 アルキル、アルキルシクロプロパン、ベンジル、 $NHC(O)C_1-C_3$ アミド、 $NHC(O)O-R_5$ カルバマートであり； R_5 は *tert*-ブチルまたはベンジル、 $-NH-SO_2-R_7$ スルホンアミドであり、および R_7 はアルキルまたはアリールである。 R_2 置換分はアルキルまたは $R_8OC(O)$ であり得、 R_8 は C_3-C_5 アルキルまたはアリールである。

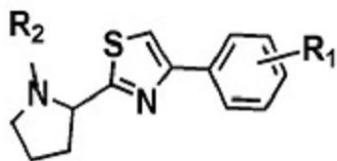
10

【 0 0 1 1 】

本発明はさらになお、以下の化学構造を有する化合物に向けられ、

【 0 0 1 2 】

【 化 2 】



20

R_1 置換基は、H、ハロゲン、 OH 、 $-O-C_1-C_3$ アルコキシ、 $-OC(O)R_3$ であり； R_3 は、 C_1-C_3 アルキルまたはアリール、 $-OCH_2-C(O)OR_4$ であり； R_4 はHまたは C_1-C_3 アルキル、 NHR_5 であり； R_5 は、H、 C_1-C_4 アルキル、アルキルシクロプロパン、ベンジル、 $NHC(O)C_1-C_3$ アミド、 $NHC(O)O-R_5$ カルバマートであり； R_5 は *tert*-ブチルまたはベンジル、 $-NH-SO_2-R_7$ スルホンアミドであり、および R_7 はアルキルまたはアリールである。 R_2 置換基はアルキルまたは $R_8OC(O)$ であり得、 R_8 は C_3-C_5 アルキルまたはアリールである。

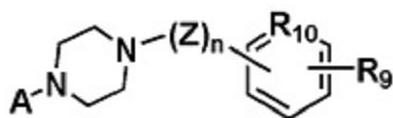
30

【 0 0 1 3 】

本発明はさらになお、以下の化学構造を有する化合物に向けられ、

【 0 0 1 4 】

【 化 3 】



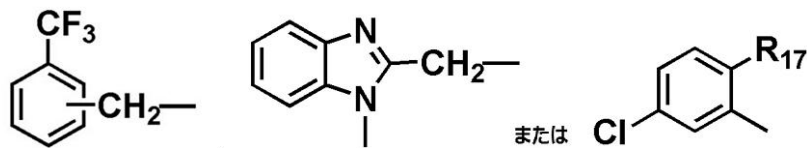
40

R_9 は、H、ハロゲン、 OH 、 $-O-C_1-C_3$ アルコキシ、 $-OC(O)R_{11}$ であり； R_{11} は、 C_1-C_3 アルキルまたはアリール、 $-OCH_2-C(O)OR_{12}$ であり； R_{12} はHまたは C_1-C_3 アルキル、 $-NHR_{13}$ ； R_{13} は、H、 C_1-C_4 アルキル、アルキルシクロプロパン、ベンジル、 $NHC(O)C_1-C_3$ アミド、 $NHC(O)O-R_{14}$ カルバマートであり； R_{14} は *tert*-ブチルまたはベンジル、 $-NH-SO_2-R_{15}$ スルホンアミドであり； R_{15} はアルキルまたはアリールまたは $-SO_2-NH-R_{16}$ スルホンアミドであり、および R_{16} はアルキルまたはアリールである。 R_{10} は窒素またはメチレンである。 n は0または1であり、及び、 n が1である場合、 Z は $C=O$ である。 A は次の構造

【 0 0 1 5 】

50

【化 4】



を有し得、式中 R_{17} は H または $\text{C}_1 - \text{C}_3$ アルキル基である。

10

【0016】

本発明は、薬学的に許容可能な賦形剤中の医薬組成物として、または食品、動物飼料材料または薬を含む製剤として製剤される、本明細書に記載の化合物に向けられる。本発明はまた、本明細書に記載される化合物またはその組み合わせまたはその医薬組成物または他のそれらの製剤、および化合物を収容する容器を含むキットへと向けられる。

【0017】

本発明は、以下の化合物に更になお向けられる、N - (4 - (2 - (2 - プロピルピロリジン - 4 - イル) チアゾール - 4 - イル) フェニル) メタンスルホンアミド (tert - ブチル - 2 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イルピロリジン - 1 - カルボキシラート) 、ベンジル 2 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピロリジン - 1 - カルボキシラート、4 - (4 - プロモフェニル - 2 - (ピロリジン - 2 - イル) チアゾール、4 - (4 - プロモフェニル) - 2 - (1 - プロピルピロリジン - 2 - イル) チアゾール、tert - ブチル 3 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシラート、ベンジル 3 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イルピペリジン - 1 - カルボキシラート、3 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) - 1 - プロピルピペリジン、ベンジル 4 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシラート)) ベンジル (R) - 2 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール - 2 - イル) ピロリジン - 1 - カルボキシラート、ベンジル 3 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシラート、ベンジル 4 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシラート、4 - (3 - (ピリジン - 2 - イル) - [1, 2, 4] トリアゾロ [4, 3 - b] ピリダジン (ピリダジン) - 6 - イル) - N - トシルベンゼンアミン (トシルベンゼンアミン) 、(4 - (5 - クロロ - 2 - メチルフェニル) ピペラジン - 1 - イル) (4 - (トシルアミノ (トシルアミノ)) フェニルメタノン、4 - (4 - ((1 - メチル - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール - 2 - イル) メチル) ピペラジン - 1 - イル) - N - トシルベンゼンアミン (トシルベンゼンアミン) 、3 - クロロ - 4 - メチル - N - (6 - (4 - (3 - (トリフルオロメチルベンジル) ピペラジン - 1 - イル) ピリジン - 3 - イル) ベンゼンスルホンアミド、4 - クロロ - N - (4 - (4 - ((1 - メチル - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール - 2 - イル) メチル) ピペラジン - 1 - イル) フェニル) ベンゼンスルホンアミド、(Z) - 4 - (3 - シアノ - 3 - (4 - (2, 4 - ジメチルフェニル) チアゾール - 2 - イル) アリル) - N - (チアゾール - 2 - イル) 、N - (3 - (H - イミダゾ [1, 2 - a] ピリジン - 2 - イル)) ベンゼンスルホンアミド (フェニル) - 4 - メチル - 2 - フェニルチアゾール - 5 - カルボキサミド) 3 - (4 - クロロフェニル) - 4, 5 - ジヒドロ - 1 - フェニル - 5 - (2 - フェニルチアゾール - 4 - イル) - 1 H - ピラゾール 3 - (4 - クロロフェニル) - 4, 5 - ジヒドロ - 1 - フェニル - 5 - (2 - フェニルチアゾール - 4 - イル) - 1 H - ピラゾール、(N - (3 - (ベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) フェニル) (4 - (6 - メチル - ベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) フェニル) - 2 - (N - p - トリルメチル)) イソニコチンアミド、N - (4 - (6 - メチルベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) フェニル) - 2 - (N - m - トリ

20

30

40

50

ルメチルスルホンアミド)アセトアミド(N)-スルホンアミド)アセトアミド、薬学的に許容可能な塩、立体異性体;およびそれら組み合わせ。

【0018】

本発明は、動物における代謝障害を処置するための方法に更になお向けられ、該方法は、個体に治療上有効な量の、A-B-Cまたは本明細書に具体的に記載されるような化学構造を有する少なくとも1つの化合物、あるいは薬学的許容可能な塩または立体異性体又はそれらの組み合わせを投与する工程を含む。好ましい態様において、代謝性疾患は、癌または体重関連障害である。本発明はさらに、第2の療法を提供する工程を含む、関連した方法に向けられる。第2の療法は、食事療法、理学療法、行動療法、手術、薬物療法、およびそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、代謝障害は糖尿病であり、付加的な療法は、食事療法、理学療法、および薬物療法を含む。

10

【0019】

本発明は、必要とする患者において細胞の過剰増殖性の疾患(c e l l h y p e r p r o l i f e r a t i v e d i s e a s e)を処置する方法へと更になお向けられる。方法は、治療上有効な量の、本明細書に記載の少なくとも1つの化合物、あるいはその薬学的に許容可能な塩またはそれらの立体異性体またはそれらの組合せを、患者に投与する工程を含む。

【0020】

本発明は、必要とする動物の体重を減少させるための関連する方法に更になお向けられる。方法は、治療上有効な量の、本明細書に記載の少なくとも1つの化合物、あるいはその薬学的に許容可能な塩またはそれらの立体異性体またはそれらの組合せを、患者に投与する工程を含む。

20

【0021】

本発明は、必要とする動物の体重を減少させるための方法に更になお向けられる。方法は、薬学的許容可能な溶媒中の、A-B-Cまたは本明細書に具体的に記載されるような化学構造を有する少なくとも1つの治療上有効な量の化合物、あるいは薬学的許容可能な塩または立体異性体又はそれらの組み合わせを、動物に投与する工程を含む。環Aはピリジンまたは置換ピリジン、ペリジンまたは置換ペリジン、ピロリジンまたは置換ピロリジン、チアゾールまたは置換チアゾール、フェニル環または置換フェニル環であり得る。環Bはチオアゾール(t h i o a z o l e)または置換チオアゾール(t h i o a z o l e)、ピペラジンまたは置換ピペラジン、フェニル環または置換フェニル環であり得る。環Cはフェニル環または置換フェニル環、ピリジンまたは置換ピリジン、チアゾールまたは置換チアゾールであり得る。

30

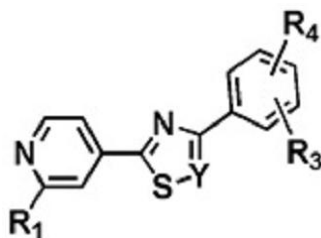
【0022】

本発明はまた、動物における体重減少中に除脂肪体重を減少させずに熱産性を増加させる方法であって、該方法は、薬学的に許容可能な溶媒中の、治療上有効な量の以下の構造を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩または立体異性体またはそれらの組み合わせを、動物に投与する工程を含む方法に、向けられている。

【0023】

【化5】

40



式中、R₁置換基はH、Et、OMeまたはn-プロピルであり得; YはCHまたは

【0024】

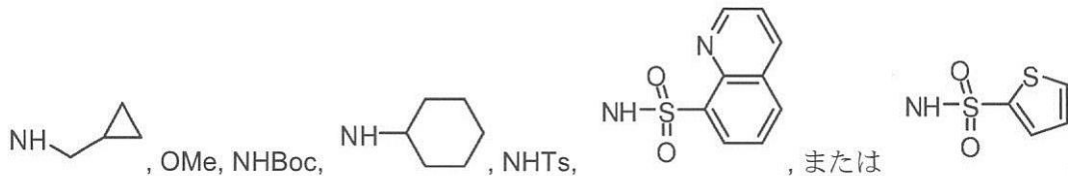
【化 6】



であり得、R 置換基 2 は OH、OMe または NH i - P r であり得；R 置換基は H、F または Cl であり得；および R₄ 置換基は、H、Me、Cl、Br、F、OH、OBz、OCH₂COOMe、OCH₂COOH、NH₂、NH i - P r、NHCOMe、NH SO₂Me、NHBn、

【0025】

【化 7】



である。

【0026】

上記は、むしろ、以下の発明の詳細な説明をより理解することができるように、本発明の特徴および技術的利点を概説している。本発明のさらなる特徴および利点を、以下に記載しており、これは本発明の主題を形成する。当業者は、開示の概念および特定の実施形態を、本発明の目的を実施するための他の構築物の修正またはデザインに基づいて容易に使用することができることを認識すべきである。当業者は、かかる等価な構築物は添付の特許請求の範囲に記載の本発明の精神および範囲に逸脱しないとも理解すべきである。その機構および操作方法の両方に関するその本発明の特徴であると考えられる新規の特徴は、さらなる目的および利点と共に、添付の図面と併せて考慮した場合に、以下の説明からより深く理解されるであろう。しかし、各図面は、本発明の例示および説明のみを目的として提供され、本発明を制限することを意図しないと明らかに理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0027】

本発明をより完全に理解するために、添付の図面と併せて示した以下の説明をここに参照する。

【0028】

【図 1】図 1 の A - B は、RT - PCR によるマイクロアレイの結果を確認する。DU 145 細胞を、DMSO (レーン 1) および 5 μM ファトスタチン A (レーン 2) で 6 時間処理した (図 1 の A)。総 RNA を抽出し、RT - PCR に供した (図 1 の B)。RT - PCR およびマイクロアレイデータのまとめ。ACL、ATP クエン酸リアーゼ；HMG CoAR、3 - ヒドロキシ - 3 - メチル - グルタリル - CoA レダクターゼ；LDLR、低密度リポタンパク質受容体、MVD、メバロン酸ピロリン酸デカルボキシラーゼ；SCD、ステアリル - CoA デヒドロゲナーゼ；INSIG 1、インスリン誘導性遺伝子 1；GAPDH、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ。

【図 2】図 2 の A ~ C は、ファトスタチン A が内因性 SREBP のレポーター遺伝子を活性化する能力を抑制することを示す。HEK 293 細胞を、SRE - 1 駆動ルシフェラーゼレポーター (pSRE - Luc) (図 2 の A) およびアクチンプロモーター下で調節された - gal レポーター (図 2 の B) で同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、無脂質血清含有培地中の種々の濃度のファトスタチン A または DMSO のみによって処理した。20 時間のインキュベーション後、ルシフェラーゼ活性を測定し、データを、- ガラクトシダーゼ活性によって正規化した。図 2 の C において、HEK 293 細胞を、pCMV - SREBP - 1 c (1 - 436) および pSRE - Luc でトラン

10

20

30

40

50

スフェクトし、トランスフェクトした細胞を無脂質血清含有培地において、20 mM ファスタチン A を使用して、または使用せずに処理した。各値は、3 つの独立した実験の平均を示す。

【図 3】図 3 の A ~ 図 3 の H は、SREBP - 1 および SREBP - 2 に対するファスタチン A の効果を示す。DU145 細胞を、DMSO のみまたはファスタチン A (1 μ M および 5 μ M) で 6 時間処理した。SREBP - 1 (図 3 の A) または SREBP - 2 (図 3 の B) の前駆体および成熟形態のレベルを、ウェスタンブロットによって試験した。アクチンのウェスタンブロットを、負荷対照として下のパネルに示す。(図 3 の C ~ 図 3 の H) SREBP - 1 の局在化を、免疫染色によって試験した。細胞を、DMSO のみ (図 3 の C ~ 図 3 の E) または 5 mM のファスタチン A (図 3 の F ~ 図 3 の H) で処理し、次いで、DAPI (図 3 の C および 図 3 の F) または抗 SREBP - 1 (図 3 の D および 図 3 の G) で染色した。

10

【図 4】図 4 の A ~ 図 4 の G は、SREBP - 1 の siRNA ノックダウンによるインスリン誘導性脂肪生成の阻害を示す。SREBP - 1 発現がノックダウンされた 3T3 - L1 細胞の 2 つの安定にトランスフェクトされたクローンを確立し、脂肪細胞に分化するように誘導した。ノックダウン細胞が分化しなかったのに対して (図 4 の D および 図 4 の F)、空のベクター (neo) でトランスフェクトした 3T3 - L1 細胞のほとんどが脂肪細胞に分化した (図 4 の B)。図 4 の A、C、および E は、インスリン誘導しない細胞を示す。図 4 の G は、SREBP - 1 の首尾の良いノックダウンを示すクローンのウェスタンブロット分析である。

20

【図 5】図 5 の A ~ 図 5 の 5 B は、SREBP - 1 の siRNA ノックダウンが DU145 前立腺癌細胞の血清非依存性成長を遮断することを示す。図 5 の A において、SREBP - 1 発現がノックダウンされた DU145 細胞の 2 つの安定にトランスフェクトされたクローンを確立し、無血清であるか、2 % ウシ胎児血清 (FBS)、2 % 無脂肪ウシ胎児血清、または 1 μ g / mL の IGF 1 を含む MEM 培地中で 3 日間成長させた。成長速度を WST - 1 アッセイによって測定した。ノックダウン細胞は、無血清であるか、2 % 無脂肪 FBS、または 1 μ g / mL の IGF 1 を含む MEM 培地中で成長できなかったが、血清の非存在下の対照細胞ほどの成長を示した。実験を三連で行った。図 5 の B は、クローン 1 および 2 における SREBP - 1 ノックダウンの程度を示すウェスタンブロットである。

30

【図 6 A】図 6 の A ~ 図 6 の G は、絶食 / 無脂肪食再給餌後のマウスに対するファスタチン A の影響を示す。1 日前から 48 時間の絶食を開始し、その後さらに 48 時間の無脂肪食の摂取を行う全実験について、マウスに 30 mg / kg のファスタチン A を腹腔内に毎日注射した。体重の減少 (図 6 の A) および摂食 (図 6 の B) を、48 時間の給餌終了時に決定した。図 6 の C は、処置マウスおよび対照マウスの血清成分を示す。図 6 の D は、対照マウスおよびファスタチン A 処置マウス由来の 2 つの異なるマウス由来の肝臓抽出物の SREBP - 1 の代表的なウェスタンブロット。タンパク質の負荷量を正規化した。図 6 の E は、肝臓抽出物の FAS 発現 (上のパネル) および負荷対照のクーマーシー染色ゲル (下) を示す代表的なウェスタンブロットである。図 6 の F および G は、肝臓抽出物中の FAS 活性および ACC 活性である。データは、平均 \pm SD (n = 5) である。* P < 0.05。

40

【図 6 A】図 6 A は、絶食 / 無脂肪食再給餌後のマウスに対するファスタチン A の影響を示す。1 日前から 48 時間の絶食を開始し、その後さらに 48 時間の無脂肪食の摂取を行う全実験について、マウスに 30 mg / kg のファスタチン A を腹腔内に毎日注射した。体重の減少 (図 6 A) を、48 時間の給餌終了時に決定した。データは、平均 \pm SD (n = 5) である。* P < 0.05。

【図 6 B】図 6 B は、絶食 / 無脂肪食再給餌後のマウスに対するファスタチン A の影響を示す。1 日前から 48 時間の絶食を開始し、その後さらに 48 時間の無脂肪食の摂取を行う全実験について、マウスに 30 mg / kg のファスタチン A を腹腔内に毎日注射した。摂食 (図 6 B) を、48 時間の給餌終了時に決定した。データは、平均 \pm SD (n

50

= 5) である。 * $P < 0.05$ 。

【図 6 C】図 6 C は、絶食 / 無脂肪食再給餌後のマウスに対するファスタチン A の影響を示す。1 日前から 48 時間の絶食を開始し、その後にさらに 48 時間の無脂肪食の摂取を行う全実験について、マウスに 30 mg / kg のファスタチン A を腹腔内に毎日注射した。図 6 C は、処置マウスおよび対照マウスの血清成分を示す。データは、平均 \pm SD ($n = 5$) である。 * $P < 0.05$ 。

【図 6 D】図 6 D は、絶食 / 無脂肪食再給餌後のマウスに対するファスタチン A の影響を示す。1 日前から 48 時間の絶食を開始し、その後にさらに 48 時間の無脂肪食の摂取を行う全実験について、マウスに 30 mg / kg のファスタチン A を腹腔内に毎日注射した。図 6 の D は、対照マウスおよびファスタチン A 処置マウス由来の 2 つの異なるマウス由来の肝臓抽出物の SREBP - 1 の代表的なウェスタンブロットである。データは、平均 \pm SD ($n = 5$) である。 * $P < 0.05$ 。

【図 6 E】図 6 E は、絶食 / 無脂肪食再給餌後のマウスに対するファスタチン A の影響を示す。1 日前から 48 時間の絶食を開始し、その後にさらに 48 時間の無脂肪食の摂取を行う全実験について、マウスに 30 mg / kg のファスタチン A を腹腔内に毎日注射した。図 6 E は、肝臓抽出物の FAS 発現 (上のパネル) および負荷対照のクーマーシー染色ゲル (下) を示す代表的なウェスタンブロットである。データは、平均 \pm SD ($n = 5$) である。 * $P < 0.05$ 。

【図 6 F】図 6 F は、絶食 / 無脂肪食再給餌後のマウスに対するファスタチン A の影響を示す。1 日前から 48 時間の絶食を開始し、その後にさらに 48 時間の無脂肪食の摂取を行う全実験について、マウスに 30 mg / kg のファスタチン A を腹腔内に毎日注射した。図 6 F は、肝臓抽出物中の FAS 活性および ACC 活性である。データは、平均 \pm SD ($n = 5$) である。 * $P < 0.05$ 。

【図 6 G】図 6 G は、絶食 / 無脂肪食再給餌後のマウスに対するファスタチン A の影響を示す。1 日前から 48 時間の絶食を開始し、その後にさらに 48 時間の無脂肪食の摂取を行う全実験について、マウスに 30 mg / kg のファスタチン A を腹腔内に毎日注射した。図 6 G は、肝臓抽出物中の FAS 活性および ACC 活性である。データは、平均 \pm SD ($n = 5$) である。 * $P < 0.05$ 。

【図 7】図 7 の A ~ 7 E は、マウスに対するファスタチン A の 2 週間の処置の効果を示す。5 ~ 6 月齢マウスに、 30 mg / kg ファスタチン A または 10% DMSO のいずれかで 2 週間にわたって毎日注射した。図 7 の A は、ファスタチン A での処置前および処置後の体重を示し、図 7 の B は処置後の体重減少量を示す。図 7 の C は処置マウスおよび対照マウスにおけるグルコース、コレステロール、およびトリグリセリド (TG) の血清レベルを示す。図 7 の D は肝臓抽出物中の FAS 活性を示す。図 7 の E は対照群および処置群それぞれについての 3 匹のマウスの肝臓の抽出物の代表的なウェスタンブロット分析である。タンパク質の負荷量を正規化した。データは平均 \pm SD ($n = 5$) である。 * $P < 0.05$ 。

【図 8】図 8 の A ~ 図 8 の C は、体重および飼料消費に対するファスタチン A の効果を示す。2 群の o b / o b 雄マウス ($n = 5$) は 4 週間にわたって、PBS 中のファスタチン A を腹腔内注射し、または PBS 中の 10% DMSO を対照群へ腹腔内注射した。マウスに通常の固形飼料を与え、試験初日およびその後毎日マウスの体重および飼料消費量を測定した。図 8 の A は、代表的な対照マウスおよびファスタチン A 処置マウスの写真である。図 8 の B は、各群内の各マウスの体重を毎日測定したことを示す。体重の平均および分散を示す。図 8 の C において、摂食を毎日測定し、28 日にわたるマウスあたりの累積摂食として示した。

【図 9】図 9 の A ~ 図 9 の H は、対照およびファスタチン A 処置 o b / o b マウスの血清成分を示す。血液を、一晚絶食マウスの尾静脈から採取し、細胞からの分離後に血清を回収した。成分を、以下に記載のように決定した。データを、平均 \pm SD として示す (各群中、 $n = 5$ マウス)。

【図 10 A】図 10 A は、o b / o b マウスの肝臓および脂肪組織に対するファスタチン

10

20

30

40

50

ンの効果を示す。図10Aは、ファスタチンA処置マウス(左)および対照(右)の肝臓を示す。データを、平均±SDとして示す(各群中、n=5マウス)($*P<0.05$)。

【図10B】図10Bは、ob/obマウスの肝臓および脂肪組織に対するファスタチンの効果を示す。図10Bは、脂肪滴を検出するためにオイルレッドOで染色し、マイヤーヘマトキシリンで対比染色した対照およびファスタチンA ob/obマウスの肝臓の凍結切片の組織学的分析を示す。ファスタチンAで処置した3匹の異なるマウスの肝臓は、赤色に染色された液滴の劇的な減少を示し(上)、対照の肝臓は処置マウスと比較して多数の赤色に染色された脂肪滴を示す(下)。データを、平均±SDとして示す(各群中、n=5マウス)($*P<0.05$)。

【図10C】図10Cは、ob/obマウスの肝臓および脂肪組織に対するファスタチンの効果を示す。図10Cは、ファスタチンA処置ob/obマウス(左)および対照(右)から単離した精巢上体脂肪パッドを示す。データを、平均±SDとして示す(各群中、n=5マウス)($*P<0.05$)。

【図10D】図10Dは、ob/obマウスの肝臓および脂肪組織に対するファスタチンの効果を示す。図10Dは、ob/ob対照およびファスタチンA処置マウスから単離した肝臓および精巢上体脂肪パッドの平均重量を示す。データを、平均±SDとして示す(各群中、n=5マウス)($*P<0.05$)。

【図11】図11のA-Bは、対照およびファスタチンA処置ob/obマウスの肝臓におけるトリグリセリドレベル(図11のA)およびコレステロールレベル(図11のB)を示す。脂質を肝臓から抽出し、トリグリセリドおよびコレステロールを、本実施例のための例示的な材料および方法に記載のように定量した。データを、平均±SDとして示す(各群中、n=5マウス)($*P=0.0004$; $\dagger P=0.03$)。

【図12A】図12Aは、ファスタチンAが脂質合成酵素の発現レベルおよび活性を減少させることを示す。図12Aは、下記のように定量されたob/obマウスの肝臓抽出物中のアセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACC)の活性を示す。データを、平均±SDとして示す(各群中、n=5マウス)($\dagger P=0.005$; $\ddagger P=0.002$; $*P<0.05$)。

【図12B】図12Bは、ファスタチンAが脂質合成酵素の発現レベルおよび活性を減少させることを示す。図12Bは下記のように定量されたob/obマウスの肝臓抽出物中の脂肪酸シンターゼの活性を示す。データを、平均±SDとして示す(各群中、n=5マウス)($\dagger P=0.005$; $\ddagger P=0.002$; $*P<0.05$)。

【図12C】図12Cは、ファスタチンAが脂質合成酵素の発現レベルおよび活性を減少させることを示す。図12Cは、ウェスタンブロット分析であり、3匹の各ob/obマウス由来の肝臓粗抽出物を4~12%NuPAGE MESゲルによって分離し、異なる抗体で探索し、ECLで検出した。データを、平均±SDとして示す(各群中、n=5マウス)($\dagger P=0.005$; $\ddagger P=0.002$; $*P<0.05$)。

【図12D】図12Dは、ファスタチンAが脂質合成酵素の発現レベルおよび活性を減少させることを示す。図12Dは、アクチンに対する正規化後の対照マウスに対するファスタチンA由来の異なる脂質合成酵素の特異的バンドの強度の比を示す。データを、平均±SDとして示す(各群中、n=5マウス)($\dagger P=0.005$; $\ddagger P=0.002$; $*P<0.05$)。

【図13】図13は、ファスタチンA ob/obマウスと比較した対照における肝臓脂質合成酵素の転写レベルを示す。各遺伝子のmRNAレベルを、アクチンに対して正規化した。RNAを対照およびファスタチンA処置マウス(n=5)から単離し、リアルタイム定量RT-PCRによって測定した。 $*P<0.05$ 対対照。

【図14A】図14Aは、本発明の例示的な化合物1-66を示す。

【図14B】図14Bは、本発明の例示的な化合物1-66を示す。

【図14C】図14Cは、本発明の例示的な化合物1-66を示す。

【図14D】図14Dは、本発明の例示的な化合物1-66を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 4 E】図 1 4 D は、本発明の例示的な化合物 1 - 6 6 を示す。

【図 1 4 F】図 1 4 E は、本発明の例示的な化合物 1 - 6 6 を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、例示的な類似体 2 - 1 8 を使用した標準的なルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを示す。

【図 1 6】図 1 6 は、例示的な類似体 1 9 - 3 4 を使用した標準的なルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを示す。

【図 1 7】図 1 7 は、例示的な類似体 3 5 - 4 4 を使用した標準的なルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを示す。

【図 1 8 A】図 1 8 A は、ファスタチンが S R E B P の活性化を遮断することを示す。無脂質血清を含む培地中で内因性 S R E B P がルシフェラーゼレポーター遺伝子を活性化する能力のファスタチンによる抑制（図 1 8 A）。P および N は、それぞれ、S R E B P - 2 の非切断膜前駆体および切断核形態を示す。

【図 1 8 B】図 1 8 B は、ファスタチンが S R E B P の活性化を遮断することを示す。C H O - K 1 細胞を、S R E - 1 駆動ルシフェラーゼレポーター（p S R E - L u c）でトランスフェクトした細胞を、無脂質血清含有培地中の種々の濃度のファスタチンにより処理した。無脂質血清含有培地中の p C M V - S R E B P - 1 c（1 - 4 3 6）および p S R E - L u c により同時トランスフェクトした。C H O - K 1 細胞に対するファスタチンの効果（図 1 8 B）。P および N は、それぞれ、S R E B P - 2 の非切断膜前駆体および切断核形態を示す。

【図 1 8 C】図 1 8 C は、ファスタチンが S R E B P の活性化を遮断することを示す。トランスフェクトした C H O - K 1 細胞中の P L A P - B P 2 は、ゴルジ中で S 1 P によって切断されて、培養培地中に分泌されない限り、膜結合を維持する（左）。ファスタチン（2 0 μ M）またはステロール（1 0 μ g / m L コレステロールおよび 1 μ g / m L 2 5 - ヒドロキシコレステロール）での処理は、E t O H 対照と比較して P L A P - B P 2 の切断に影響を及ぼす（図 1 8 C）。P および N は、それぞれ、S R E B P - 2 の非切断膜前駆体および切断核形態を示す。

【図 1 8 D】図 1 8 D は、ファスタチンが S R E B P の活性化を遮断することを示す。ファスタチンで処理した C H O - K 1 細胞のウェスタンブロット分析（図 1 8 D）。P および N は、それぞれ、S R E B P - 2 の非切断膜前駆体および切断核形態を示す。

【図 1 9】図 1 9 の A - 図 1 9 の B は、ファスタチンが E R からゴルジへの S R E B P の転位を遮断することを示す。図 1 9 の A は、E t O H のみ、ステロール（1 0 μ g / m L コレステロールおよび 1 μ g / m L 2 5 - ヒドロキシコレステロール）、または 2 0 μ M ファスタチンで処理した C H O - K 1 細胞のプレフェルジン A の効果を示すウェスタンブロット分析である。図 1 9 の B は、2 0 μ M ファスタチンまたはステロール（1 0 μ g / m L コレステロールおよび 1 μ g / m L 2 5 - ヒドロキシコレステロール）の非存在下または存在下で成長した細胞の、抗 S C A P I g G - 9 D 5 を使用したウェスタンブロット分析を示す。右の数字は、プロテアーゼ保護 S C A P フラグメント上に存在する N 結合糖鎖の数を示す。

【図 2 0 A】図 2 0 A は、ダンシルファスタチン、ファスタチン - ポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体（c o n j u g a t e）、およびポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体の構造と、それらで処理された細胞を示す。図 2 0 A は、ファスタチン分子のより良好な投影のためにポリプロリンリンカーを挿入した（S a t o ら、2 0 0 7）。

【図 2 0 B】図 2 0 B は、ダンシルファスタチン、ファスタチン - ポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体（c o n j u g a t e）、およびポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体の構造と、それらで処理された細胞を示す。図 2 0 B において、E R 中のダンシルファスタチンの局在化を示すダンシルファスタチンおよび E R - トラッカーレッドで処理した C H O - K 1 細胞。スケールバー = 1 0 μ m。

【図 2 0 C】図 2 0 C は、ダンシルファスタチン、ファスタチン - ポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体（c o n j u g a t e）、およびポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体の構造と、それらで処理された細胞を示す。図 2 0 C は、C H O - K 1 膜抽出物中

10

20

30

40

50

のビオチン化ファトスタチンで飽和したニュートラアビジン - アガロースビーズに結合したタンパク質の抗 S C A P 抗体、抗 S R E B P - 1 抗体、抗 S R E B P - 2 抗体、および抗 A T F 6 抗体を使用したウェスタンブロット分析によって示したファトスタチンの S C A P との相互作用を示す。

【図 2 0 D】図 2 0 D は、ダンシルファトスタチン、ファトスタチン - ポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体 (c o n j u g a t e)、およびポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体の構造と、それらで処理された細胞を示す。図 2 0 D は、競合アッセイのために、膜抽出物を、E t O H のみ、コレステロール、またはファトスタチンとブレインキューベートしたことを示す。

【図 2 1】図 2 1 は、肝臓に対するファトスタチンの影響および o b / o b ハマウスの脂肪組織を示す。赤染色脂肪滴を示している、ファトスタチン処置したマウスおよび対照マウスの肝臓の切片。

【図 2 2】図 2 2 は、ファトスタチンで処理した C H O - K 1 細胞のウェスタンブロット分析を示す P および N は、それぞれ、S R E B P - 1 の非切断膜前駆体および切断核形態を示します。

【図 2 3】図 2 3 は、ファトスタチン、ダンシルファトスタチン、およびファトスタチン - ポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体の合成の模式図である。

【図 2 4】図 2 4 は、無脂質血清を含む培地中でルシフェラーゼレポーター遺伝子を活性化するための、内因性 S R E B P s の能力のファトスタチン類似体による抑制を示している。p S R E - L u c で C H O - K 1 細胞をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、無脂質血清を含む培地でファトスタチン、ダンシルファトスタチン、またはイソプロピルアミン誘導体の様々な濃度により処理した。

【図 2 5 A】図 2 5 A は、ファトスタチンが、脂質合成酵素の発現レベルおよび活性を低下させることを示している。アセチル C o A カルボキシラーゼ (A C C) の活性 (図 2 5 A) を、O B / o b マウスの肝臓抽出物中で測定した。データは、平均 \pm S D、各グループに 5 匹のマウスとして示される ($\dagger P = 0.005$; $\ddagger P = 0.002$; $* P < 0.05$)。

【図 2 5 B】図 2 5 B は、ファトスタチンが、脂質合成酵素の発現レベルおよび活性を低下させることを示している。脂肪酸シンターゼ (F A S) の活性 (図 2 5 B) を、O B / o b マウスの肝臓抽出物中で測定した。データは、平均 \pm S D、各グループに 5 匹のマウスとして示される ($\dagger P = 0.005$; $\ddagger P = 0.002$; $* P < 0.05$)。

【図 2 5 C】図 2 5 C は、ファトスタチンが、脂質合成酵素の発現レベルおよび活性を低下させることを示している。肝臓粗抽出液のウェスタンブロット解析を行なった (図 2 5 C)。データは、平均 \pm S D、各グループに 5 匹のマウスとして示される ($\dagger P = 0.005$; $\ddagger P = 0.002$; $* P < 0.05$)。

【図 2 5 D】図 2 5 D は、ファトスタチンが、脂質合成酵素の発現レベルおよび活性を低下させることを示している。ファトスタチンの異なる脂質合成酵素の、アクチンに正規化した後の対照マウスに対する特異的バンドの強度の比が示されている (図 2 5 D)。データは、平均 \pm S D、各グループに 5 匹のマウスとして示される ($\dagger P = 0.005$; $\ddagger P = 0.002$; $* P < 0.05$)。

【図 2 6】図 2 6 は、化合物 5 3 の合成の模式図を提供する。

【図 2 7】図 2 6 は、化合物 1 9 および化合物 1 7 の合成の模式図を提供する。

【図 2 8】図 2 8 は、典型的な類似化合物 4 5 - 5 5 および 1 9 での標準 S R E B P 活性化アッセイを示す。

【図 2 9】図 2 9 は、典型的な類似化合物 5 6 - 6 1 および 1 9 での標準 S R E B P 活性化アッセイを示す。

【図 3 0】図 3 0 は、典型的な類似化合物 6 2 - 6 6 および 1 9 での標準 S R E B P 活性化アッセイを示す。

【図 3 1】図 3 1 は、典型的な化合物 5 3 の阻害濃度 (I n h i b i t o r y C o n c e n t r a t i o n) (s u b 5 0) のデータを示す。

10

20

30

40

50

【図 3 2】図 3 2 は、典型的な化合物 5 8 および 6 1 の阻害濃度 (s u b 5 0) のデータを示す。

【図 3 3】図 3 3 の A - B は、化合物 1 9 が乳癌細胞株 S U M 1 5 9 の増殖を阻害したことを示す。細胞を、2 % チャコール処理した血清を含む $100 \mu\text{l}$ の培地中に、 10000 細胞 / ウェルの密度で 96 ウェルにて播種した。24 時間の後、化合物 1 9 を示された濃度で細胞に加え、さらに 48 時間加えた。細胞の生存率は W S T - 1 アッセイを使用して決定した。図 3 3 の A : $A450 \text{ nm}$ での吸光度の変化から明らかなように、細胞増殖に対する異なる濃度の化合物 1 9 の効果を示す。図 3 3 の B : R T P C R 分析 (黒バー) により決定されるように、脂質生成遺伝子の発現レベルが H e p G 2 細胞の $10 \mu\text{M}$ で処理によって有意にダウンレギュレートされた。値は、平均 \pm S D として示される。 * $P < 0.05$

10

【図 3 4】図 3 4 の A - C は、化合物 1 9 がヒト肝癌細胞株 H e p G 2 の増殖を阻害したことを示す。細胞を、2 % チャコール処理した血清を含む $100 \mu\text{l}$ の培地中に、 100000 細胞 / ウェルの密度で、 16 ウェルプレートに播種した。24 時間の後、化合物 1 9 を示された濃度で細胞に加えた、さらに 48 時間処理した。図 3 4 の A は、対照と、25、50 および $100 \mu\text{M}$ の化合物 1 9 で処理した H e p G 2 細胞の写真を示す。図 3 4 の B は、処理された細胞 (T) が未処理の対照と比較して S R E B P - 1 および前駆体のより高いレベルの成熟および活性形のレベルの低下があったことを示す代表的なウェスタンブロット分析を示している。図 3 4 C は、R T P C R 分析によって決定されるように、H e p G 2 細胞の $10 \mu\text{M}$ 処置が脂質生成の遺伝子の発現レベルを著しくダウンレギュレートし、S R E B P によって調整されるとは知られていない I N S I G 2 に影響しなかったことを示す。値は、平均 \pm S D として示される。 * $P < 0.05$

20

【図 3 5 A】図 3 5 A は、化合物 1 9 が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株 M O L T - 4 およびヒト多発性骨髄腫細胞株 R P M I 8 2 2 6 の増殖を阻害することを示す。 100000 の M O L T - 4 細胞 (図 3 5 A - 図 3 5 C) および $20,000$ の R P M I 8 2 2 6 細胞 (図 3 5 D - 3 5 F) を、5 % F B S または無脂肪チャコール処理した血清 (F F - F B S) を含む R P M I 1 6 4 0 培地中で、 37°C で 24 時間 96 ウェルプレートに播種した。M O L T - 4 および R P M I 8 2 2 6 細胞を、異なる濃度の化合物 1 9 でさらに 48 時間処理した。(D M S O なしの対照、1、2、5、10 および $20 \mu\text{M}$ の D M S O を備えたビヒクル、R P M I 8 2 2 6 細胞は、D M S O 中 $3 \mu\text{M}$ で処理した)。48 時間の終わりに、生存度を決定するために細胞を M T T 分析にさらした。値は、平均 \pm S D として示される。 * $P < 0.05$

30

【図 3 5 B】図 3 5 B は、化合物 1 9 が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株 M O L T - 4 およびヒト多発性骨髄腫細胞株 R P M I 8 2 2 6 の増殖を阻害することを示す。 100000 の M O L T - 4 細胞 (図 3 5 A - 図 3 5 C) および $20,000$ の R P M I 8 2 2 6 細胞 (図 3 5 D - 3 5 F) を、5 % F B S または無脂肪チャコール処理した血清 (F F - F B S) を含む R P M I 1 6 4 0 培地中で、 37°C で 24 時間 96 ウェルプレートに播種した。M O L T - 4 および R P M I 8 2 2 6 細胞を、異なる濃度の化合物 1 9 でさらに 48 時間処理した。(D M S O なしの対照、1、2、5、10 および $20 \mu\text{M}$ の D M S O を備えたビヒクル、R P M I 8 2 2 6 細胞は、D M S O 中 $3 \mu\text{M}$ で処理した)。48 時間の終わりに、生存度を決定するために細胞を M T T 分析にさらした。値は、平均 \pm S D として示される。 * $P < 0.05$

40

【図 3 5 C】図 3 5 C は、化合物 1 9 が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株 M O L T - 4 およびヒト多発性骨髄腫細胞株 R P M I 8 2 2 6 の増殖を阻害することを示す。 100000 の M O L T - 4 細胞 (図 3 5 A - 図 3 5 C) および $20,000$ の R P M I 8 2 2 6 細胞 (図 3 5 D - 3 5 F) を、5 % F B S または無脂肪チャコール処理した血清 (F F - F B S) を含む R P M I 1 6 4 0 培地中で、 37°C で 24 時間 96 ウェルプレートに播種した。M O L T - 4 および R P M I 8 2 2 6 細胞を、異なる濃度の化合物 1 9 でさらに 48 時間処理した。(D M S O なしの対照、1、2、5、10 および $20 \mu\text{M}$ の D M S O を備えたビヒクル、R P M I 8 2 2 6 細胞は、D M S O 中 $3 \mu\text{M}$ で処理した)。48 時間の

50

終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均±SDとして示される。* $P < 0.05$

【図35D】図35Dは、化合物19が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4およびヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226の増殖を阻害することを示す。10000のMOLT-4細胞(図35A-図35C)および20,000のRPMI8226細胞(図35D-35F)を、5%FBSまたは無脂肪チャコール処理した血清(FF-FBS)を含むRPMI1640培地中で、37℃で24時間96ウェルプレートに播種した。MOLT-4およびRPMI8226細胞を、異なる濃度の化合物19でさらに48時間処理した。(DMSOなしの対照、1、2、5、10および20μMのDMSOを備えたビヒクル、RPMI8226細胞は、DMSO中3μMで処理した)。48時間の終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均±SDとして示される。* $P < 0.05$

10

【図35E】図35Eは、化合物19が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4およびヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226の増殖を阻害することを示す。10000のMOLT-4細胞(図35A-図35C)および20,000のRPMI8226細胞(図35D-35F)を、5%FBSまたは無脂肪チャコール処理した血清(FF-FBS)を含むRPMI1640培地中で、37℃で24時間96ウェルプレートに播種した。MOLT-4およびRPMI8226細胞を、異なる濃度の化合物19でさらに48時間処理した。(DMSOなしの対照、1、2、5、10および20μMのDMSOを備えたビヒクル、RPMI8226細胞は、DMSO中3μMで処理した)。48時間の終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均±SDとして示される。* $P < 0.05$

20

【図35F】図35Fは、化合物19が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4およびヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226の増殖を阻害することを示す。10000のMOLT-4細胞(図35A-図35C)および20,000のRPMI8226細胞(図35D-35F)を、5%FBSまたは無脂肪チャコール処理した血清(FF-FBS)を含むRPMI1640培地中で、37℃で24時間96ウェルプレートに播種した。MOLT-4およびRPMI8226細胞を、異なる濃度の化合物19でさらに48時間処理した。(DMSOなしの対照、1、2、5、10および20μMのDMSOを備えたビヒクル、RPMI8226細胞は、DMSO中3μMで処理した)。48時間の終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均±SDとして示される。* $P < 0.05$

30

【図36A】図36Aは、化合物17が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4およびヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226の増殖を阻害することを示す。20,000のMOLT-4細胞(図36A-図36C)および20,000のRPMI8226細胞(図35D-35F)を、5%ウシ胎仔血清(FBS)または無脂肪チャコール処理した血清(FF-FBS)を含むRPMI1640培地中で、37℃で24時間96ウェルプレートに播種した。MOLT-4およびRPMI8226細胞を、異なる濃度の化合物19でさらに48時間処理した。(None DMSOなしの対照、1、2、3、5、10および20μMのMDMSOを備えたビヒクル、RPMI8226細胞は、DMSO中3μMで処理した)。48時間処理の終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均±SDとして示される。* $P < 0.05$ * * $P = 0.001$; * * * $P = 0.0001$.

40

【図36B】図36Bは、化合物17が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4およびヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226の増殖を阻害することを示す。20,000のMOLT-4細胞(図36A-図36C)および20,000のRPMI8226細胞(図35D-35F)を、5%ウシ胎仔血清(FBS)または無脂肪チャコール処理した血清(FF-FBS)を含むRPMI1640培地中で、37℃で24時間96ウェルプレートに播種した。MOLT-4およびRPMI8226細胞を、異なる濃度の化合物19でさらに48時間処理した。(None DMSOなしの対照、1、2、3、5

50

、10および20 μ のMDMSOを備えたビヒクル、RPMI 8226細胞は、DMSO中3 μ Mで処理した)。48時間処理の終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均 \pm SDとして示される。* $P < 0.05$ * * $P = 0.001$; * * * $P = 0.0001$.

【図36C】図36Cは、化合物17が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4およびヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI 8226の増殖を阻害することを示す。20,000のMOLT-4細胞(図36A-図36C)および20,000のRPMI 8226細胞(図35D-35F)を、5%ウシ胎仔血清(FBS)または無脂肪チャコール処理した血清(FF-FBS)を含むRPMI 1640培地中で、37 で24時間96ウェルプレートに播種した。MOLT-4およびRPMI 8226細胞を、異なる濃度の化合物19でさらに48時間処理した。(None DMSOなしの対照、1、2、3、5、10および20 μ のMDMSOを備えたビヒクル、RPMI 8226細胞は、DMSO中3 μ Mで処理した)。48時間処理の終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均 \pm SDとして示される。* $P < 0.05$ * * $P = 0.001$; * * * $P = 0.0001$.

10

【図36D】図36Dは、化合物17が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4およびヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI 8226の増殖を阻害することを示す。20,000のMOLT-4細胞(図36A-図36C)および20,000のRPMI 8226細胞(図35D-35F)を、5%ウシ胎仔血清(FBS)または無脂肪チャコール処理した血清(FF-FBS)を含むRPMI 1640培地中で、37 で24時間96ウェルプレートに播種した。MOLT-4およびRPMI 8226細胞を、異なる濃度の化合物19でさらに48時間処理した。(None DMSOなしの対照、1、2、3、5、10および20 μ のMDMSOを備えたビヒクル、RPMI 8226細胞は、DMSO中3 μ Mで処理した)。48時間処理の終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均 \pm SDとして示される。* $P < 0.05$ * * $P = 0.001$; * * * $P = 0.0001$.

20

【図36E】図36Eは、化合物17が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4およびヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI 8226の増殖を阻害することを示す。20,000のMOLT-4細胞(図36A-図36C)および20,000のRPMI 8226細胞(図35D-35F)を、5%ウシ胎仔血清(FBS)または無脂肪チャコール処理した血清(FF-FBS)を含むRPMI 1640培地中で、37 で24時間96ウェルプレートに播種した。MOLT-4およびRPMI 8226細胞を、異なる濃度の化合物19でさらに48時間処理した。(None DMSOなしの対照、1、2、3、5、10および20 μ のMDMSOを備えたビヒクル、RPMI 8226細胞は、DMSO中3 μ Mで処理した)。48時間処理の終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均 \pm SDとして示される。* $P < 0.05$ * * $P = 0.001$; * * * $P = 0.0001$.

30

【図36F】図36Fは、化合物17が、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4およびヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI 8226の増殖を阻害することを示す。20,000のMOLT-4細胞(図36A-図36C)および20,000のRPMI 8226細胞(図35D-35F)を、5%ウシ胎仔血清(FBS)または無脂肪チャコール処理した血清(FF-FBS)を含むRPMI 1640培地中で、37 で24時間96ウェルプレートに播種した。MOLT-4およびRPMI 8226細胞を、異なる濃度の化合物19でさらに48時間処理した。(None DMSOなしの対照、1、2、3、5、10および20 μ のMDMSOを備えたビヒクル、RPMI 8226細胞は、DMSO中3 μ Mで処理した)。48時間処理の終わりに、生存度を決定するために細胞をMTT分析にさらした。値は、平均 \pm SDとして示される。* $P < 0.05$ * * $P = 0.001$; * * * $P = 0.0001$.

40

【図37A】RDとHFHC食事を供給する3週間後のSDラットにおけるト体重および組成(脂肪と除脂肪)。約193 \pm 7.0グラム/ラットの初期体重である6-7週令の雄

50

S Dラットに、3週間通常の食事(RD)または高脂肪、高炭水化物食を与えた。体重(図37B)脂肪重量(図37C)および除脂肪体重(図37D)の量を、ECHO MRI法15を使用して測定した。

【図37B】RDとHFHC食事を供給する3週間後のSDラットにおけるト体重および組成(脂肪と除脂肪)。約 193 ± 7.0 グラム/ラットの初期体重である6-7週令の雄SDラットに、3週間通常の食事(RD)または高脂肪、高炭水化物食を与えた。体重(図37B)脂肪重量(図37C)および除脂肪体重(図37D)の量を、ECHO MRI法15を使用して測定した。

【図37C】RDとHFHC食事を供給する3週間後のSDラットにおけるト体重および組成(脂肪と除脂肪)。約 193 ± 7.0 グラム/ラットの初期体重である6-7週令の雄SDラットに、3週間通常の食事(RD)または高脂肪、高炭水化物食を与えた。体重(図37B)脂肪重量(図37C)および除脂肪体重(図37D)の量を、ECHO MRI法15を使用して測定した。

【図37D】RDとHFHC食事を供給する3週間後のSDラットにおけるト体重および組成(脂肪と除脂肪)。約 193 ± 7.0 グラム/ラットの初期体重である6-7週令の雄SDラットに、3週間通常の食事(RD)または高脂肪、高炭水化物食を与えた。体重(図37B)脂肪重量(図37C)および除脂肪体重(図37D)の量を、ECHO MRI法15を使用して測定した。

【図38】図38のA-図38のBは、化合物19を用いた処置の8週間後の累積体重増加(図38のA)および食物摂取量(図38のB)を示す。SDラットには、さらに8週間のあいだ、経口強制飼養または綿実油のビヒクルを介して化合物19の異なる用量での処置を開始する前に、3週間HFHC食餌を与えた。体重および食物摂取量を測定し、累積値を計算した。(値は平均 \pm S.E.Mである；)* $P < 0.05$ ；処置群は、対照ビヒクル群と比較された。

【図39A】図39Aは、ECHO MRI法により求めた体組成の脂肪および除脂肪質量を示す。図39Aは、化合物19の投与後のグラムでの総体重を示している。図39Bは、化合物19の投与後グラムの総体脂肪を示している。図39Cは、化合物19の投与後の動物当たりの脂肪の割合を示している。図39Dは、化合物19の投与後のグラムでの総除脂肪体重を示している。図39Eは、化合物19の投与後のグラム当たりのパーセント除脂肪重量を示している。異なる実験群のラットは隔週で身体組成分析にさらした。脂肪と除脂肪量の割合は、脂肪の重量と体重に対する相対的な質量から算出した。図39B-図39Eのラベルは、図39Aと同じグループに対応している。アスタリスクは、処置群と対照群間の有意差を示す(* $P < 0.05$)。データは $n = 15$ の平均 \pm S.E.Mである。

【図39B】図39Bは、ECHO MRI法により求めた体組成の脂肪および除脂肪質量を示す。図39Aは、化合物19の投与後のグラムでの総体重を示している。図39Bは、化合物19の投与後グラムの総体脂肪を示している。図39Cは、化合物19の投与後の動物当たりの脂肪の割合を示している。図39Dは、化合物19の投与後のグラムでの総除脂肪体重を示している。図39Eは、化合物19の投与後のグラム当たりのパーセント除脂肪重量を示している。異なる実験群のラットは隔週で身体組成分析にさらした。脂肪と除脂肪量の割合は、脂肪の重量と体重に対する相対的な質量から算出した。図39B-図39Eのラベルは、図39Aと同じグループに対応している。アスタリスクは、処置群と対照群間の有意差を示す(* $P < 0.05$)。データは $n = 15$ の平均 \pm S.E.Mである。

【図39C】図39Cは、ECHO MRI法により求めた体組成の脂肪および除脂肪質量を示す。図39Aは、化合物19の投与後のグラムでの総体重を示している。図39Bは、化合物19の投与後グラムの総体脂肪を示している。図39Cは、化合物19の投与後の動物当たりの脂肪の割合を示している。図39Dは、化合物19の投与後のグラムでの総除脂肪体重を示している。図39Eは、化合物19の投与後のグラム当たりのパーセント除脂肪重量を示している。異なる実験群のラットは隔週で身体組成分析にさらした。

脂肪と除脂肪量の割合は、脂肪の重量と体重に対する相対的な質量から算出した。図 3 9 B - 図 3 9 E のラベルは、図 3 9 A と同じグループに対応している。アスタリスクは、処置群と対照群間の有意差を示す (* P < 0 . 0 5) 。データは n = 1 5 の平均 ± S . E . M である。

【図 3 9 D】図 3 9 D は、E C H O M R I 法により求めた体組成の脂肪および除脂肪質量を示す。図 3 9 A は、化合物 1 9 の投与後のグラムでの総体重を示している。図 3 9 B は、化合物 1 9 の投与後グラムの総体脂肪を示している。図 3 9 C は、化合物 1 9 の投与後の動物当たりの脂肪の割合を示している。図 3 9 D は、化合物 1 9 の投与後のグラムでの総除脂肪体重を示している。図 3 9 E は、化合物 1 9 の投与後のグラム当たりのパーセント除脂肪重量を示している。異なる実験群のラットは隔週で身体組成分析にさらした。脂肪と除脂肪量の割合は、脂肪の重量と体重に対する相対的な質量から算出した。図 3 9 B - 図 3 9 E のラベルは、図 3 9 A と同じグループに対応している。アスタリスクは、処置群と対照群間の有意差を示す (* P < 0 . 0 5) 。データは n = 1 5 の平均 ± S . E . M である。

【図 3 9 E】図 3 9 E は、E C H O M R I 法により求めた体組成の脂肪および除脂肪質量を示す。図 3 9 A は、化合物 1 9 の投与後のグラムでの総体重を示している。図 3 9 B は、化合物 1 9 の投与後グラムの総体脂肪を示している。図 3 9 C は、化合物 1 9 の投与後の動物当たりの脂肪の割合を示している。図 3 9 D は、化合物 1 9 の投与後のグラムでの総除脂肪体重を示している。図 3 9 E は、化合物 1 9 の投与後のグラム当たりのパーセント除脂肪重量を示している。異なる実験群のラットは隔週で身体組成分析にさらした。脂肪と除脂肪量の割合は、脂肪の重量と体重に対する相対的な質量から算出した。図 3 9 B - 図 3 9 E のラベルは、図 3 9 A と同じグループに対応している。アスタリスクは、処置群と対照群間の有意差を示す (* P < 0 . 0 5) 。データは n = 1 5 の平均 ± S . E . M である。

【図 4 0 A】図 4 0 A は H F H C を与えられた S D ラットの肝臓に対する化合物 1 9 の効果を示す図である。図 4 0 A : 処理された (2 . 5 および 1 0 m g / k g) ラットおよび対照のラットの代表的な肝臓 (各群 n = 5) 。図 4 0 B : 肝臓の凍結切片のオイルレッド O 染色。油滴は赤で表示されている。バーは 2 0 0 ミクロンを示している。図 4 0 C : 対照及び処置動物における肝臓組織からの T G およびコレステロールのレベル。図 4 0 D : リアルタイム P C R により測定された、対照と比較した処置したラットにおける、S R E B P - 1 及び 2 によって制御される遺伝子発現の変化の倍変化。A C C : アセチル C o A カルボキシラーゼ ; A C L : A T P シトレートリアーゼ ; S C D : ステリル - C o A デサチュラーゼ M V D メバロン酸塩デカルボキシラーゼ ; L D L R ; L D L レセプタ ; I N S I G - 1 : インシュリン誘導遺伝子 1 ; 平均は ± S E ; * P 0 . 0 5

【図 4 0 B】図 4 0 B は H F H C を与えられた S D ラットの肝臓に対する化合物 1 9 の効果を示す図である。図 4 0 A : 処理された (2 . 5 および 1 0 m g / k g) ラットおよび対照のラットの代表的な肝臓 (各群 n = 5) 。図 4 0 B : 肝臓の凍結切片のオイルレッド O 染色。油滴は赤で表示されている。バーは 2 0 0 ミクロンを示している。図 4 0 C : 対照及び処置動物における肝臓組織からの T G およびコレステロールのレベル。図 4 0 D : リアルタイム P C R により測定された、対照と比較した処置したラットにおける、S R E B P - 1 及び 2 によって制御される遺伝子発現の変化の倍変化。A C C : アセチル C o A カルボキシラーゼ ; A C L : A T P シトレートリアーゼ ; S C D : ステリル - C o A デサチュラーゼ M V D メバロン酸塩デカルボキシラーゼ ; L D L R ; L D L レセプタ ; I N S I G - 1 : インシュリン誘導遺伝子 1 ; 平均は ± S E ; * P 0 . 0 5

【図 4 0 C】図 4 0 C は H F H C を与えられた S D ラットの肝臓に対する化合物 1 9 の効果を示す図である。図 4 0 A : 処理された (2 . 5 および 1 0 m g / k g) ラットおよび対照のラットの代表的な肝臓 (各群 n = 5) 。図 4 0 B : 肝臓の凍結切片のオイルレッド O 染色。油滴は赤で表示されている。バーは 2 0 0 ミクロンを示している。図 4 0 C : 対照及び処置動物における肝臓組織からの T G およびコレステロールのレベル。図 4 0 D : リアルタイム P C R により測定された、対照と比較した処置したラットにおける、S R E

B P - 1 及び 2 によって制御される遺伝子発現の変化の倍変化。A C C : アセチル C o A カルボキシラーゼ ; A C L : A T P シトレートリアーゼ ; S C D : ステリル - C o A デサチュラーゼ M V D メパロン酸塩デカルボキシラーゼ ; L D L R ; L D L レセプタ ; I N S I G - 1 : インシュリン誘導遺伝子 1 ; 平均は \pm S E ; * P 0 . 0 5

【図 4 0 D】図 4 0 D は H F H C を与えられた S D ラットの肝臓に対する化合物 1 9 の効果を示す図である。図 4 0 A : 処理された (2 . 5 および 1 0 m g / k g) ラットおよび対照のラットの代表的な肝臓 (各群 n = 5) 。図 4 0 B : 肝臓の凍結切片のオイルレッド O 染色。油滴は赤で表示されている。バーは 2 0 0 ミクロンを示している。図 4 0 C : 対照及び処置動物における肝臓組織からの T G およびコレステロールのレベル。図 4 0 D : リアルタイム P C R により測定された、対照と比較した処置したラットにおける、S R E B P - 1 及び 2 によって制御される遺伝子発現の変化の倍変化。A C C : アセチル C o A カルボキシラーゼ ; A C L : A T P シトレートリアーゼ ; S C D : ステリル - C o A デサチュラーゼ M V D メパロン酸塩デカルボキシラーゼ ; L D L R ; L D L レセプタ ; I N S I G - 1 : インシュリン誘導遺伝子 1 ; 平均は \pm S E ; * P 0 . 0 5

10

【図 4 1】図 4 1 は、化合物 1 9 で処理したラットにおいて、対照と比較した U C P 2 の遺伝子発現の倍変化を示している。総 R N A は、対照および示された用量の化合物 1 9 で処置したラットの、肝臓組織から抽出し、U C P の m R N A のレベルを、リアルタイム P C R を用いて決定した。

【発明を実施するための形態】

【0029】

20

< 発明の詳細な説明 >

< 発明の一般的な実施形態 >

本発明の化合物を使用して、代謝障害を治療および / または予防する。例えば、脂肪酸およびコレステロールの無制御な合成および食物性脂肪の過剰摂取は、多数の医学的合併症 (少なくとも肥満、糖尿病、高血圧症、および心血管疾患が含まれる) と相関する。ある態様では、これらの状態を、本発明の化合物を使用して治療および / または予防する。疫学的証拠により、代謝性疾患 (肥満が含まれる) が浸潤型前立腺癌の発症も促進することを示している。

【0030】

脂肪枯渇の際、ステロール調節エレメント結合タンパク質 (S R E B P) は、膜からタンパク質分解的に放出されて核に転位し、核でこれらがコレステロールおよび脂肪酸の合成に關与する遺伝子の転写を活性化する。本発明は、S R E B P 活性化の選択的インヒビターとして脂肪生成および癌細胞成長の両方を遮断することが以前に知られている合成小分子を特定し、この分子の類似体および誘導体も提供する。薬物様分子ファスタチン A は S R E B P のタンパク質分解活性を低下させ、それにより、細胞中でのその応答遺伝子の転写を減少させる。マウスでは、ファスタチン A は、肝臓中の S R E B P - 1 の活性化を遮断し、体重を減少させ、血中のコレステロールおよびグルコースレベルを低下させ、脂質合成酵素を下方制御する。脂肪酸シンターゼおよびアセチル - C o A カルボキシラーゼの活性およびその発現レベルは、処置マウスの肝臓中で減少した。ファスタチン A は、細胞経路を理解するためのツールとしての機能を果たし、ある態様において、代謝性疾患の薬理的介入の少なくとも出発点としてのコンセンサス分子を提供する。

30

40

【0031】

特定の実施形態では、代謝関連表現型を調整する小分子は、複合体会合を分析するためのツールとしての機能を果たす。ファスタチン A は、培養哺乳動物細胞中で以下の 2 つの異なる表現型を生じる : 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞のインスリン誘導性脂肪生成の完全な阻害および D U 1 4 5 ヒト前立腺癌細胞の血清非依存性インスリン様成長因子 1 (I G F 1) 依存性成長の選択的抑制。

【0032】

本発明のある態様では、ファスタチン A は、ステロール調節エレメント結合タンパク質 (S R E B P) (コレステロールおよび脂肪酸の合成に關与する特異的遺伝子を活性化

50

する重要な脂質合成転写因子)の活性化を選択的に遮断する。SREBPのインヒビターとしてのファトスタチンAの同定は、その抗脂肪生成性と一致し、前立腺癌のIGF1依存性成長におけるSREBPの役割を示す。本発明は、例えば実験マウスで示されるように、少なくともSREBP-1の活性化を遮断する化合物としてのファトスタチンAに関する。ファトスタチンAの肥満ob/obマウスへの投与により、体重が減少し、内蔵脂肪が顕著に減少した。さらに、脱共役タンパク質1、脱共役タンパク質2および脱共役タンパク質3の発現は増加し、熱産生は体重減少中に除脂肪体重を縮小せずに増加した。

【0033】

本発明は、代謝障害の少なくとも1つの症状の治療および/または予防に関する。代謝障害は、その症状が本発明の化合物を使用して改善または予防される限り、任意の種類の代謝障害であり得る。それにもかかわらず、特に、代謝性疾患は、欠損代謝酵素に起因する遺伝形質(例えば、調節タンパク質および輸送機構の変異に關与する1つまたは複数の変異または障害を有するもの)などの1つまたは複数の先天性代謝異常(遺伝障害ということもできる)に由来する。

【0034】

一般に、代謝障害は、細胞内のエネルギー生産に影響を及ぼす障害と定義することができる。ほとんどの代謝障害が遺伝性であるにもかかわらず、いくつかは、1つまたは複数の要因(食事、毒素、および感染などが含まれる)の結果として獲得され得る。遺伝性代謝障害は、細胞の代謝過程のいくつかの工程に必要な酵素が喪失されるか不適切に構築される遺伝的欠損に起因し得る。代謝障害の最大のカテゴリーには、以下が含まれる: 1) 糖原貯蔵障害(糖原病またはデキストリン蓄積症ともいう)(炭水化物代謝に影響を及ぼす障害が含まれる); 2) 脂肪代謝および脂肪成分の代謝に影響を及ぼす脂肪酸化障害; ならびに3) ミトコンドリアに影響を及ぼすミトコンドリア障害。糖原貯蔵障害(GSD)の例には、少なくとも、GSD I型(グルコース-6-ホスファターゼ欠損症; フォンギエルケ病); GSD II型(酸性マルターゼ欠損症; ボンペ病); GSD III型(グリコーゲン脱分枝欠損症; コリ病またはフォーブス病); GSD IV型(グリコーゲン分枝酵素欠損症; アンダーセン病); GSD V型(筋肉グリコーゲンホスホリラーゼ欠損症; マッカードル病); GSD VI型(肝臓ホスホリラーゼ欠損症、エール病); GSD VII型(筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症; 垂井病); GSD IX型(ホスホリラーゼキナーゼ欠損症); およびGSD XI型(グルコース輸送体欠損症; ファンコニー・ビッケル病)が含まれる。

【0035】

脂肪酸代謝欠損症を、ある実施形態では、脂肪酸化障害または脂質貯蔵障害と説明することができる。脂肪酸代謝欠損症は、例えば、筋肉内、肝臓内、および他の細胞型内のエネルギー生産のために脂肪酸を酸化する身体能力に影響を及ぼす酵素欠損症に起因する1つまたは複数の先天性代謝異常を含み得る。脂肪酸代謝欠損症の例には、少なくとも、補酵素Aデヒドロゲナーゼ欠損症; 他の補酵素A酵素欠損症; カルニチン関連障害; または脂質貯蔵障害が含まれる。補酵素Aデヒドロゲナーゼ欠損症の例には、少なくとも、超長鎖アシル-補酵素Aデヒドロゲナーゼ欠損症(VLCAD); 長鎖3-ヒドロキシアシル-補酵素Aデヒドロゲナーゼ欠損症(LCHAD); 中鎖アシル-補酵素Aデヒドロゲナーゼ欠損症(MCAD); 短鎖アシル-補酵素Aデヒドロゲナーゼ欠損症(SCAD); および短鎖L-3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症(SCHAD)が含まれる。他の補酵素A酵素欠損症の例には、少なくとも、2,4ジエノイル-CoAレダクターゼ欠損症; 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoAリアーゼ欠損症; およびマロニル-CoAデカルボキシラーゼ欠損症が含まれる。カルニチン関連欠損症の例には、少なくとも、原発性カルニチン欠損症; カルニチン-アシルカルニチントランスポーターゼトランスポーター欠損症; カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼI欠損症(CPT); およびカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼII欠損症(CPT2)が含まれる。脂質蓄積症の例には、酸性リパーゼ疾患; ウォルマン病; コレステリルエステル蓄積症; ゴーシェ病; ニーマン-ピック病; ファブリー病; ファーバー病; ガングリオシ

10

20

30

40

50

ドーシス；クラッペ病；および異染性白質ジストロフィが含まれる。他の脂肪酸代謝障害には、少なくとも、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症；電子伝達フラボタンパク質（E T F）デヒドロゲナーゼ欠損症（G A I I & M A D D）；タンジール病；および妊娠性急性脂肪肝が含まれる。ミトコンドリア病の例には、少なくとも、進行性外眼筋麻痺（P E O）；真性糖尿病および聴覚消失（D A D）；レーバー遺伝性視神経症（L H O N）ミトコンドリア脳筋症、乳酸アシドーシス、および脳卒中様症候群（M E L A S）；赤色ぼろ線維を伴うミオクローヌステんかん（M E R R F）；リー症候群；亜急性硬化性脳症；ニューロパシー、運動失調症、網膜色素変性、および下垂症（N A R P）；カーンズ・セイアー症候群（K S S）；筋神経原性胃腸脳症（M N G I E）が含まれる。本発明の特定の態様では、代謝障害は、1つまたは複数の以下であるか、その合併症の1つとして1つまたは複数の以下を有する：肥満、高脂質血症、糖尿病、脂肪肝、高血圧症、および心血管疾患。

10

【0036】

現在の発明は、細胞の過剰増殖と関連する疾患の処置に関係がある。特定の例において、細胞の過剰増殖は、癌または他の腫瘍の疾患又は障害によって引き起こされ得る。制限されないが、細胞の過剰増殖性の疾患は、乳癌、気道の癌、脳の癌、生殖器の癌、前立腺癌、消化管の癌、尿路癌、目の癌、肝臓癌、皮膚癌、頭部および頸部の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、リンパ腫、肉腫、黒色腫、固形腫瘍、白血病、多発性骨髄腫、または固形腫瘍の遠隔転移であり得る。

20

【0037】

< 本発明の通常の組成物 >

概略的に、本発明は一般式：A - B - Cを有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩および立体異性体を提供し、式中、A、B、およびCは同一であっても異なってもよく、それぞれ、5員環、6員環、または7員環または縮合二環式環系であり得、環は、複素環もしくは非複素環、置換環、または非置換環であり、A、B、およびCは、直接接続されるか、または介在する原子鎖又はリンカーを介して接続され、原子鎖またはリンカーは、追加の官能基を伴って又は伴わずに、飽和している炭素鎖または不飽和の炭素鎖である。

【0038】

好ましくは、環Aは、1つのヘテロ原子を有する6員複素環である。環Aは置換され得る。好ましい実施形態では、環はピリジン環であり、より好ましくは、ピリジン環の窒素原子は、環Bの位置に対して4位または2位にある。もっとも好ましくは、ピリジン環は、窒素ヘテロ原子に対して1位にある炭素上のn - プロピル基と置換される。他の好ましい実施形態では、環A上に1～5原子の側鎖、より好ましくは1～5個の炭素の側鎖が存在する。他の例示的且つ非限定的な実施形態では、環Aは、例えば、フェニル、ピロール、チオフェン、フラン、ピリミジン、イソキノリン、キノリン、ベンゾフラン、インドール、オキサゾール、ナフチル、ピペリジン、ピロリジン、イミダゾール、イミダゾール[1, 2 - a]ピリジン、ベンゾイミダゾール、チアゾールまたはベンゾチアゾールであり得る。

30

【0039】

本発明の一態様では、環Aは、ピペリジン環である。好ましくは、ピペリジン環の窒素原子は、B環の位置に対して4位にある。他の関連する態様では、ピペリジン環の窒素原子は、B環の位置3の位置にある。さらにピペリジンの窒素原子はさらに置換されてもよく、ここで置換基は、アルキル、スルホキシド、スルホン、アルキルまたはアリルスルホナート、スルホン酸およびそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される。例えば、置換は、プロピル基、tert - ブチルオキシカルボニル（B O C）またはベンジルオキシカルボニル基であってもよい。

40

【0040】

本発明の一態様では、環Aは、ピペリジン環である。好ましくは、ピペリジン環の窒素原子は、環Bの位置に対して2位にある。ピロリジンの窒素原子はさらに置換されてもよ

50

く、ここで置換基は、アルキル、スルホキシド、スルホン、アルキルまたはアリルスルホナート、スルホン酸およびそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される。例えば、置換は、プロピル基、tert-ブチルオキシカルボニル(BOC)またはベンジルオキシカルボニル基であってもよい。

【0041】

好ましくは、環Bは、少なくとも2つのヘテロ原子を有する5員環である。環Bを置換することができる。好ましい実施形態では、環Bはチアゾール環である。他の例示的且つ非限定的な実施形態では、環Bは、例えば、オキサゾール、イミダゾール、イソオキサゾール、イミダゾール、チフェン、フラン、ピリミジン、ピラゾール、またはイソチアゾールであり得る。他の例示的且つ非限定的な実施形態では、環Bは、例えば、オキサゾール、イミダゾール、イソオキサゾール、イミダゾール、チフェン、フラン、ピリミジン、ピラゾール、イソチアゾール、チアゾロピリダジン、アリルまたはピラゾールであってもよい。輪Bはさらに2つのヘテロ原子を備えた6員環であってもよい。例えば、輪Bはピペラジン環である。好ましくは、環Cは、6員環、最も好ましくはフェニル環である。環Cを置換することができる。好ましい実施形態では、環Cはメチル置換される。他の例示的且つ非限定的な実施形態では、環Cは、例えば、フェニル、ピリジン、ピロール、チオフェン、フラン、ピリミジン、イソキノリン、キノリン、ベンゾフラン、インドール、オキサゾール、またはナフチルであり得る。

【0042】

例示的化合物を、図14に示す。図14の化合物1を参照して、n-プロピル置換ピリジン環は一般式の環Aに対応し、2,4-置換チアゾール環は一般式の環Bに対応し、メチル置換フェニル環は一般式の環Cに対応する。置換が任意の環A、環B、および環C中の任意の位置で許容可能であり、任意の置換が任意の他の置換と同一であっても異なってもよいと理解すべきである。置換の非限定的な例には、図14A-Fに示す置換に加えて、以下の基が含まれる：H(すなわち、非置換)；ヒドロキシ；C₁₋₁₀アルキル；C₂₋₁₀アルケニル；C₂₋₁₀アルキニル；C₃₋₆シクロアルキル；アリール；ヘテロアリール(ここで、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、およびヘテロアリール基は、ヒドロキシ、-(C=O)R^a；-(C=O)OR^a、-(C=O)H、-(C=O)OH、O(CH₂)_nCOOR^a(式中、n=1-10であり、R^aはC₁₋₁₀アルキル、C₂₋₁₀アルケニル、C₂₋₁₀アルキニル、またはC₃₋₆シクロアルキルである)、アリール、ヘテロアリール、フルオロ、クロロ、プロモ、ヨード、シアノ、カルボキシ、アミノ、一置換アミノおよび二置換アミノ、一置換アミドおよび二置換アミド、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1-5個の基と任意選択的に置換される)；-(C=O)R^a；-(C=O)OR^a、-(C=O)H；-(C=O)OH；-O(CH₂)_nCOOR^a(式中、n=1-10であり、R^aは、C₁₋₁₀アルキル、C₂₋₁₀アルケニル、C₂₋₁₀アルキニル、またはC₃₋₆シクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール、フルオロ、クロロ、プロモ、ヨード；シアノ；カルボキシ；アミノ；アミド、C₁₋₁₀アルキル、C₂₋₁₀アルケニル、C₂₋₁₀アルキニル、C₃₋₆シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、スルホキシド、スルホン、スルホナート、アルキルスルホナート、スルホン酸、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される置換を有する一置換アミノおよび二置換アミノである)；(ここで、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、およびヘテロアリールは、ヒドロキシ、-(C=O)R^a、-(C=O)OR^a、-(C=O)H、-(C=O)OH、-O(CH₂)_nCOOR^a(式中、n=1-10であり、R^aは、C₁₋₁₀アルキル、C₂₋₁₀アルケニル、C₂₋₁₀アルキニル、またはC₃₋₆シクロアルキル、アリールおよびヘテロアリール；フルオロ；クロロ；プロモ；ヨード；シアノ；カルボキシ；アミノ；1つまたは複数のC₁₋₁₀アルキル基、C₂₋₁₀アルケニル基、C₂₋₁₀アルキニル基、およびそれらの任意の組み合わせとの一置換アミノおよび二置換アミノである)からなる群から選択される1-5個の基と任意選択的に置換される)；ならびにC₁₋₁₀アルキル、C₂₋₁₀ア

ルケニル、 C_{2-10} アルケニル、 C_{3-6} シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、スルホキシド、スルホン、スルホナート、アルキルスルホナート、スルホン酸、スルホナート、アルキルスルホナート、スルホン酸、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される置換を有する一置換アミドおよび二置換アミド（ここで、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、およびヘテロアリールは、ヒドロキシル； $-(C=O)R^a$ ； $-(C=O)OR^a$ 、 $-(C=O)H$ ； $-(C=O)OH$ 、 $-O(CH_2)_nCOOR^a$ （式中、 $n=1\sim 10$ であり、 R^a は、 C_{1-10} アルキル、 C_{2-10} アルケニル、 C_{2-10} アルキニル、または C_{3-6} シクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールである）；フルオロ；クロロ；プロモ；ヨード；シアノ；カルボキシ；アミノ；1つまたは複数の C_{1-10} アルキル基、 C_{2-10} アルケニル基、 C_{2-10} アルキニル基との一置換アミノおよび二置換アミノである）およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1～5個の基と任意選択的に置換される）。

【0043】

本発明において、一般式：A-B-Cを有する化合物またはその薬学的に許容可能な塩または立体異性体が存在し、式中、A、B、およびCは同一であっても異なってもよく、式中、それぞれ、5員環、6員環、または7員環または縮合二環式環系を含み、環は、複素環もしくは非複素環、置換環、または非置換環であり、式中、A、B、およびCは、直接接続されるか、または介在する原子鎖又はリンカーを介して接続され、式中、原子鎖またはリンカーは、追加の官能基伴って又は伴わずに、飽和している炭素鎖または不飽和の炭素鎖であり、式中、A、B、及びCのいずれかの1つ、2つ、または3つのすべてが非置換であるか、または1つ以上の置換基を有し、任意の置換は任意の他の置換と同一かまたは異なってもよく、置換基は、以下のものから成っていてもよい；a) ヒドロキシ；b) C_{1-10} アルキル；c) C_{2-10} アルケニル；d) C_{2-10} アルキニル；e) C_{3-6} シクロアルキル；f) アリール；g) ヘテロアリール；ここで、b)、c)、d)、e)、f)、および/またはg)中の置換は、以下：1) ヒドロキシ；2) $-(C=O)R^a$ ；3) $-(C=O)OR^a$ ；4) $-(C=O)H$ ；5) $-(C=O)OH$ ；6) $-O(CH_2)_nCOOR^a$ （式中、 $n=1\sim 10$ ）；7) ハロ；8) シアノ；9) カルボキシ；10) アミノ；11) 一置換アミノ；12) 二置換アミノ；13) アミド；14) 一置換アミド；15) 二置換アミド；およびそれらの任意の組み合わせ；ここで、2)、3)、または6)において、 R^a は、 C_{1-10} アルキル、 C_{2-10} アルケニル、 C_{2-10} アルキニル、 C_{3-6} シクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、h) $-(C=O)R^a$ ；i) $-(C=O)OR^a$ ；j) $-(C=O)H$ ；k) $-(C=O)OH$ ；l) $-O(CH_2)_nCOOR^a$ （式中、 $n=1\sim 10$ ）、ここで、h)、i)、またはl)において、 R^a は、 C_{1-10} アルキル、 C_{2-10} アルケニル、 C_{2-10} アルキニル、 C_{3-6} シクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、m) ハロ；n) シアノ；o) カルボキシ；p) アミノ；q) 一置換アミノ；r) 二置換アミノ、s) アミド；t) 一置換アミド；およびu) 二置換アミドからなる群から選択され、ここで、該一置換アミノ、二置換アミノ、一置換アミド、および二置換アミドの1つまたは複数は、 C_{1-10} アルキル、 C_{2-10} アルケニル、 C_{2-10} アルキニル、 C_{3-6} シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、スルホキシド、スルホン、スルホナート、アルキルスルホナート、スルホン酸、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される置換を有し、ここで、u)において、該アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールは、以下：i) ヒドロキシ；ii) $-(C=O)R^a$ ；iii) $-(C=O)OR^a$ ；iv) $-(C=O)H$ ；v) $-(C=O)OH$ ；vi) $-O(CH_2)_nCOOR^a$ （式中、 $n=1\sim 10$ ）、ここで、ii)、iii)、またはvi)において、 R^a は、 C_{1-10} アルキル、 C_{2-10} アルケニル、 C_{2-10} アルキニル、 C_{3-6} シクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、vii) ハロ；viii) シアノ；ix) カルボキシ；x) アミノ；xi) 一置換アミノ；xii) 二置換アミノ；xiii) アミド；xiv) 一置換アミド；xv) 二置換アミド；およびxvi) それら

10

20

30

40

50

の任意の組み合わせからなる群から選択される。

【0044】

< 典型的な化合物、組成物、製剤および使用方法 >

1つの実施形態では、化学構造：A - B - Cを有する化合物が提供され、式中、Aはピリジンまたは置換ピリジン、ピペリジンまたは置換ピペリジン、ピロリジンまたは置換ピロリジン、チアゾールまたは置換チアゾール、フェニル環または置換フェニル環であり、Bはチオアゾールまたは置換チオアゾール、ピペラジンまたは置換ピペラジン、フェニル環または置換フェニル環である。Cはフェニル環または置換フェニル環、ピリジンまたは置換ピリジン、チアゾールまたは置換チアゾールである。

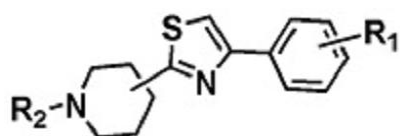
【0045】

1つの好ましい態様では、化学構造は以下であり：

【0046】

【0047】

【化8】



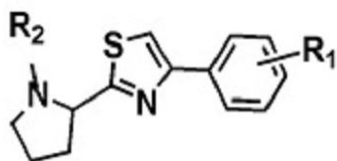
式中、 R_1 は、H、ハロゲン、OH、 OC_{1-3} アルコキシ、 $-OC(O)R_3$ であり； R_3 は、 C_1-C_3 アルキルまたはアリール、 $-OCH_2-C(O)OR_4$ であり； R_4 はHまたは C_1-C_3 アルキル、 NHR_5 であり； R_5 は、H、 C_1-C_4 アルキル、アルキルシクロプロパン、ベンジル、 $NHC(O)C_1-C_3$ アミド、 $NHC(O)O-R_5$ カルバマートであり； R_5 はtert-ブチルまたはフルオレニルメチルまたはベンジル、 $-NH-SO_2-R_7$ スルホンアミドであり； R_7 はアルキルまたはアリールであり、Rはアルキルまたは $R_8OC(O)-$ であり、 R_8 は C_3-C_5 アルキルまたはアリールである。特に、ハロゲンは臭素であってもよい。

【0048】

別の好ましい態様では、化学構造は以下であり：

【0049】

【化9】



式中、 R_1 は、H、ハロゲン、OH、 OC_{1-3} アルコキシ、 $-OC(O)R_3$ であり； R_3 は、 C_1-C_3 アルキルまたはアリール、 $-OCH_2-C(O)OR_4$ であり； R_4 はHまたは C_1-C_3 アルキル、 NHR_5 であり； R_5 は、H、 C_1-C_4 アルキル、アルキルシクロプロパン、ベンジル、 $NHC(O)C_1-C_3$ アミド、 $NHC(O)O-R_5$ カルバマートであり； R_5 はtert-ブチルまたはフルオレニルメチルまたはベンジル、 $-NH-SO_2-R_7$ スルホンアミドであり； R_7 はアルキルまたはアリールであり、Rはアルキルまたは $R_8OC(O)-$ であり、 R_8 は C_3-C_5 アルキルまたはアリールである。特に、ハロゲンは臭素であってもよい。

【0050】

また別の態様では、化学構造は以下であり：

【0051】

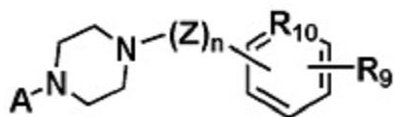
10

20

30

40

【化 1 0】

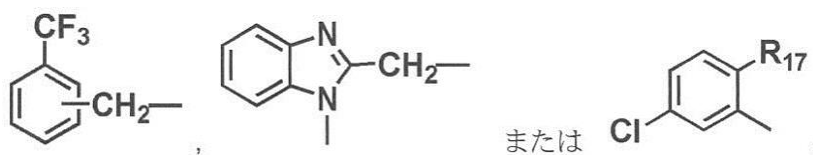


式中、 R_9 は、H、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-O-C_1-C_3$ アルコキシ、 $-OC(O)R_{11}$ であり； R_{11} は、 C_1-C_3 アルキルまたはアリール、 $-OCH_2-C(O)OR_{12}$ であり； R_{12} は H または C_1-C_3 アルキル、 $-NHR_{13}$ であり； R_{13} は、H、 C_1-C_4 アルキル、アルキルシクロプロパン、ベンジル、 $NHC(O)C_1-C_3$ アミド、 $NHC(O)O-R_{14}$ カルバマートであり； R_{14} は *tert*-ブチルまたはフルオレニルメチル、 $-NH-SO_2-R_{15}$ スルホンアミドであり； R_{15} はアルキルまたはアリールまたは $-SO_2-NH-R_{16}$ スルホンアミドであり、 R_{16} はアルキルまたはアリールであり、 R_{10} は窒素またはメチレンであり、 n は 0 または 1 であり、 n が 1 である場合、 Z は $C=O$ であり、および A は次の構造

10

【0052】

【化 1 1】



20

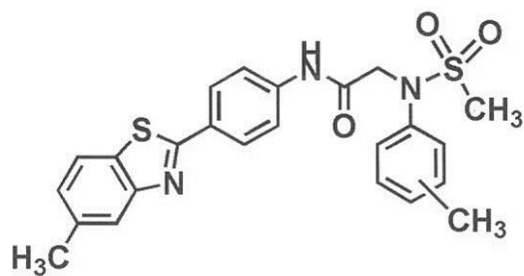
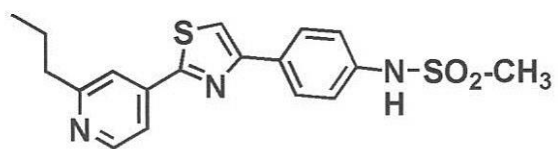
であり、式中 R_{17} は H または C_1-C_3 アルキル基である。

【0053】

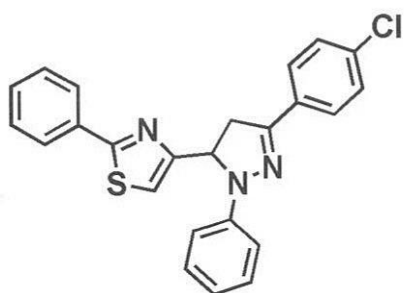
他の好ましい態様では、化学構造は以下であり：

【0054】

【化 1 2 - 1】



10



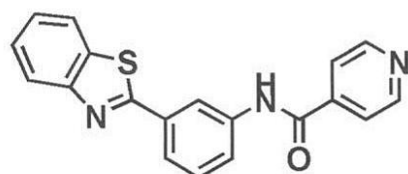
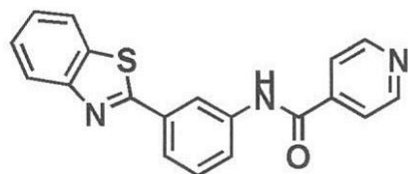
20

【 0 0 5 5 】

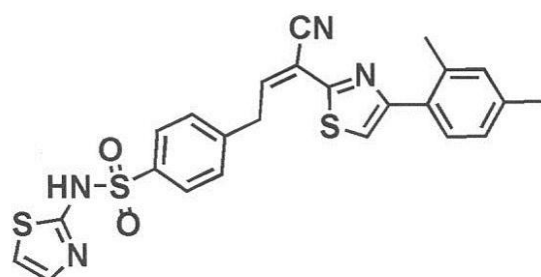
【化 1 2 - 2】



10



20



30

【 0 0 5 6 】

関連する実施形態において、上述の化合物と薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物が提供される。別の関連する実施形態において、食品、動物飼料材料または薬として製剤される上述の化合物が提供される。また別の関連する実施形態において、上述の化合物と化合物を収容する容器とを含むキットが提供される。容器は、当該技術分野で既知である薬物を保存するのに適した任意の適切な入れ物であり得、市販で入手可能である。

【 0 0 5 7 】

本発明は、以下の化合物に更になお向けられる：N - (4 - (2 - (2 - プロピルピリジン - 4 - イル) チアゾール - 4 - イル) フェニル) メタンスルホンアミド (t e r t - ブチル - 2 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イルピロリジン - 1 - カルボキシレート) である化合物およびベンジル 2 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピロリジン - 1 - カルボキシレート、4 - (4 - プロモフェニル - 2 - (ピロリジン - 2 - イル) チアゾール、4 - (4 - プロモフェニル) - 2 - (1 - プロピルピロリジン - 2 - イル) チアゾール、t e r t - ブチル 3 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシレート、ベンジル 3 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イルピペリジン - 1 - カルボキシレート、3 - (4 - (4 - プロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) - 1 - プロピルピペリジン、ベンジル

40

50

4 - (4 - (4 - ブロモフェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシラート)) ベンジル (R) - 2 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール - 2 - イル) ピロリジン - 1 - カルボキシラート、ベンジル 3 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシラート、ベンジル 4 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール - 2 - イル) ピペリジン - 1 - カルボキシラート、4 - (3 - (ピリジン - 2 - イル) - [1 , 2 , 4] トリアゾロ [4 , 3 - b] ピリダジン (ピリダジン) - 6 - イル) - N - トシルベンゼンアミン (トシルベンゼンアミン)、(4 - (5 - クロロ - 2 - メチルフェニル ピペラジン - 1 - イル) (4 - (トシルアミノ (トシルアミノ)) フェニルメタノン、4 - (4 - ((1 - メチル - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール - 2 - イルメチルピペラジン - 1 - イル - N - トシルベンゼンアミメチル) ピペラジン - 1 - イル) - N - トシルベンゼンアミン (トシルベンゼンアミン)、3 - クロロ - 4 - メチル - N - (6 - (4 - (3 - (トリフルオロメチルベンジル) ピペラジン - 1 - イル) ピリジン - 3 - イル) ベンゼンスルホンアミド、4 - クロロ - N - (4 - (4 - ((1 - メチル - 1 H - ベンゾ [d] イミダゾール - 2 - イル) メチル) ピペラジン - 1 - イル) フェニル) ベンゼンスルホンアミド、(Z) - 4 - (3 - シアノ - 3 - (4 - (2 , 4 - ジメチルフェニル) チアゾール - 2 - イル) アリル) - N - (チアゾール - 2 - イル) ベンゼンスルホンアミド、N - (3 - (H - イミダゾ [1 , 2 - a , ピリジン - 2 - イル]) フェニル) 4 - メチル - 2 - フェニルチアゾール - 5 - カルボキサミド、N - (3 - (ベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) フェニル) - イソニコチンアミド、3 - (4 - クロロフェニル) - 4、5 - ジヒドロ - 1 - フェニル - 5 - (2 - フェニルチアゾール - 4 - イル)、1 H - ピラゾール、N - (4 - (6 - メチルベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) フェニル) - 2 - (N - m - トリルメチルスルホンアミド) アセトアミド、N - (4 - (6 - メチルベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) フェニル) - 2 - (p - トリルメチルスルホンアミド) アセトアミド、薬学的に許容可能な塩、立体異性体、又はそれらの任意の組み合わせ。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

本発明は、動物における代謝障害を処置するための方法に更になお向けられ、該方法は、個体に治療上有効な量の、A - B - Cまたは本明細書に具体的に記載されるような化学構造を有する少なくとも1つの化合物、あるいは薬学的許容可能な塩または立体異性体又はそれらの組み合わせを投与する工程を含む。

【 0 0 5 9 】

本実施形態において更に、方法は、動物に第二の治療を提供する工程を含む。さらなる実施形態において、第2の治療は、食事療法、理学療法、行動療法、手術、薬物療法、化学療法、およびそれらの組み合わせを含む。特に第2の治療は、ライフスタイル変更、抗高血糖薬、インシュリン、グルカゴン様ペプチド (G L P)、ジペプチジルペプチダーゼ - 4 阻害剤、チアゾリジンジオン、脂質低下化合物、またはそれらの二つ以上の組み合わせであってもよい。

【 0 0 6 0 】

両実施形態において、代謝障害は、体重関連疾患、細胞の過剰増殖に関連する疾患、高脂血症、糖尿病またはその合併症、脂肪肝、高血圧症または心疾患である。特に、前記代謝障害は、肥満、高血圧症、動脈硬化症、喘息、高脂血症、高インスリン血症、非アルコール性の脂肪肝およびインシュリン抵抗性に引き起こされる2型糖尿病であってもよい。3実施形態の態様において、代謝疾患は体重関連疾患であり、ここで治療上有効な量の化合物は脱共役タンパク質1、脱共役タンパク質2または脱共役タンパク質3の発現を増加させる。さらに、この様相では、治療上有効な量の化合物は、動物の体重減少中に除脂肪体重を縮小させずに、熱発生を増加させる。別の様相では、細胞の過剰増殖と関係する疾病は癌である。特に、癌は、乳癌、気道の癌、脳の癌、生殖器の癌、前立腺癌、消化管の癌、尿路癌、目の癌、肝臓癌、皮膚癌、頭部および頸部の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、リンパ腫、肉腫、黒色腫、固形腫瘍、白血病、または固形腫瘍の遠隔転移である。

【 0 0 6 1 】

本発明は、必要とする患者における細胞の過剰増殖性の疾患を処置するための方法に更になお向けられ、該方法は、患者に治療上有効な量の、A - B - Cまたは本明細書に具体的に記載されるような化学構造を有する少なくとも1つの化合物、あるいは薬学的許容可能な塩または立体異性体又はそれらの組み合わせを投与する工程を含む。特に、細胞の過剰増殖性の疾患は上述の癌であってもよい。

【0062】

関連する実施形態において、必要とする患者において癌を処置する方法が提供され、該方法は、治療上有効な量の1以上の上述の医薬組成物を患者に投与する工程を含む、方法である。癌は本明細書に記載されたようなものであり得る。

【0063】

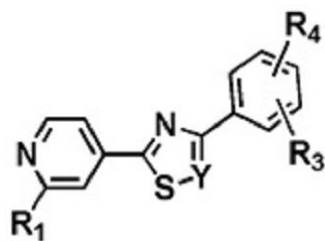
別の実施形態において、必要とする患者において体重を減少させる方法が提供され、該方法は、薬学的に許容可能な量の溶媒中の、治療上有効な量の1以上の上述の化合物を、動物に投与する工程を含む、方法である。

【0064】

さらに別の実施形態において、動物における体重減少中に除脂肪体重を減少させずに熱産性を増加させる方法が提供され、該方法は、薬学的に許容可能な溶媒中の、治療上有効な量の以下の構造を有する化合物、またはその薬学的に許容可能な塩または立体異性体またはそれらの組み合わせを、動物に投与する工程を含み、

【0065】

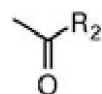
【化13】



式中、 R_1 はH、Et、OMeまたはn - プロピルであり；YはCHまたは

【0066】

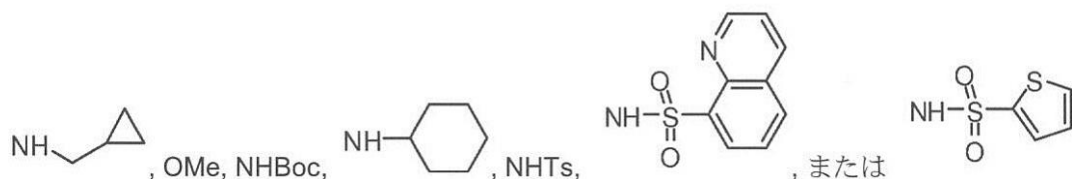
【化14】



であり、 R_2 はOH、OMeまたはNH i - Prであり； R_3 はH、FまたはClであり；およびまた、 R_4 は、H、Me、Cl、Br、F、OH、OBz、 OCH_2COOMe 、 OCH_2COOH 、 NH_2 、NH i - Pr、 $NHCOMe$ 、 $NHSO_2Me$ 、 $NHBn$ 、

【0067】

【化15】



であり。本方法を使用して、動物中の全身脂肪は前述の化合物の投与によって減少する。

【0068】

これらの実施形態および態様において、当業者は、限定されないが、細胞の過剰増殖または体重関連疾患などの代謝障害に応じて、処置または所望の結果をもたらすような、

本発明の化合物の有用な投与量を、容易に決定することができる。典型的には、化合物は、約 100 mg / kg まで、約 1 mg / kg の用量で投与される。化合物は、食品、動物飼料の材料、または薬剤の形態である組成物で投与され得る。好ましい態様において、体重は、除脂肪体重の同時の減少と伴う又は伴わずに、切り離された熱産生の増加によって、動物において低減される。を有するまたは典型的には、化合物は、脱共役タンパク質の発現を増加させる。脱共役タンパク質の代表的な例は脱共役タンパク質 1、脱共役タンパク質 2 および脱共役タンパク質 3 を含んでいる。本発明の方法は、限定されないが様々な状況に有用であり、ここで動物は、肥満、高血圧症、動脈硬化症、喘息、高脂血症、高インスリン血症、非アルコール性の脂肪肝およびインシュリン抵抗性に引き起こされる 2 型糖尿病からなる群から選択される、体重関連疾患にかかっている。さらに、当業者は、動物に第 2 の治療を提供する有用性を容易に認識しており、該第 2 の治療は、限定されないが、ライフスタイル変更、抗高血糖薬、インシュリン、グルカゴン様ペプチド (GLP)、ジペプチジルペプチダーゼ - 4 阻害剤、チアゾリジンジオン、脂質低下化合物、およびそれらの二つ以上の組み合わせである。

10

20

30

40

50

【0069】

本明細書中で使用される場合、「a」または「an」は、1 つまたは複数を意味し得る。特許請求の範囲で用語「～を含む」と併せて使用する場合、用語「a」または「an」は、1 つ以上を意味し得る。本明細書中で使用される場合、「別の」は、少なくとも第 2 以上を意味し得る。特定の実施形態では、本発明の態様は、例えば、1 つまたは複数の本発明の配列「から本質的になる」または「からなる」ことができる。本発明のいくつかの実施形態は、本発明の 1 つまたは複数の要素、方法工程、および / または方法からなるかから本質的になることができる。本明細書中に記載の任意の方法または組成物を本明細書中に記載の任意の他の方法または組成物に関連して実施することができる。

【0070】

本明細書で使用する用語「動物」は、本明細書に記載の化合物、組成物および製剤の 1 以上を受けるか投与される、哺乳動物、好ましくはヒト、患者、被検体、または個体を指す。

【0071】

本明細書中で使用する場合、用語「アルキル」は、直鎖または分岐鎖の非環式炭化水素からの 1 水素原子の概念的除去によって誘導される 1 価の置換（すなわち、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-C(CH_3)_3$ など）をいう。

【0072】

本明細書中で使用する場合、用語「アルケニル」は、少なくとも 1 つの炭素 - 炭素二重結合を含む直鎖または分岐鎖の非環式不飽和炭化水素からの 1 水素原子の概念的除去によって誘導される 1 価の置換（すなわち、 $-CH=CH_2$ 、 $-CH=CHCH_3$ 、 $-C(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH=CH_2$ など）をいう。

【0073】

本明細書中で使用する場合、用語「アルキニル」は、少なくとも 1 つの炭素 - 炭素三重結合を含む直鎖または分岐鎖の非環式不飽和炭化水素からの 1 水素原子の概念的除去によって誘導される 1 価の置換（すなわち、 $-C\equiv CH$ 、 $-C\equiv CCH_3$ 、 $-C\equiv CCH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2C\equiv CH$ など）をいう。

【0074】

本明細書中で使用する場合、用語「アリーロキシ」は、架橋酸素原子を有するアリール基（フェノキシ ($-OC_6H_5$) またはベンゾキシ ($-OCH_2C_6H_5$) など）をいう。「アリールアミノ」は、架橋アミン官能基を有するアリール基 ($-NHCH_2C_6H_5$ など) を意味する。「アリールアミド」は、架橋アミド基を有するアリール基 ($-(C=O)NHCH_2C_6H_5$ など) を意味する。

【0075】

本明細書中で使用する場合、用語「アルキリデン」は、同一炭素原子からの 2 水素原子

の概念的除去によって直鎖または分岐鎖の非環式飽和炭化水素から誘導される 2 価の置換（すなわち、 $=CH_2$ 、 $=CHCH_3$ 、 $=C(CH_3)_2$ など）をいう。

【0076】

本明細書中で使用する場合、用語「シクロアルキル」は、飽和単環式炭化水素からの 1 水素原子の概念的除去によって誘導される 1 価の置換（すなわち、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、またはシクロヘプチル）をいう。

【0077】

明細書中で使用する場合、用語「アリール」は、単環式または二環式の芳香族炭化水素からの 1 水素原子の概念的除去によって誘導される 1 価の置換をいう。アリール基の例は、フェニル、インデニル、およびナフチルである。

10

【0078】

本明細書中で使用する場合、用語「ヘテロアリール」は、N、O、または S から選択される 1、2、3、または 4 個のヘテロ原子を含む単環式または二環式の芳香環系からの 1 水素原子の概念的除去によって誘導される 1 価の置換をいう。ヘテロアリール基の例には、ピロリル、フリル、チエニル、イミダゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、ピリジリル、ピリミジニル、ピラジニル、ベンズイミダゾリル、インドリル、およびプリニルが含まれるが、これらに限定されない。ヘテロアリール置換を、炭素原子に結合させるか、ヘテロ原子を介して結合させることができる。単環式ヘテロアリール基の例には、ピロリル、フリル、チエニル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、およびピリジリルが含まれる。二環式ヘテロアリール基の例には、ピリミジニル、ピラジニル、ベンズイミダゾリル、インドリル、およびプリニルが含まれる。各環は、5 または 6 原子を有することができる。したがって、これには、4 員の単環式ヘテロアリール基および 5 員の単環式ヘテロアリール基が含まれる。これには、1 つの 5 員環および 1 つの 6 員環を有する二環式ヘテロアリール基および 2 つの 6 員環を有する二環式ヘテロアリール基も含まれる。

20

【0079】

用語「ハロ」には、ヨード、プロモ、クロロ、およびフルオロが含まれる。

【0080】

用語「置換」は、置換による複数の置換度が含まれると考えられるものとする。化学基または化学部分の原子価が水素以外の原子または官能基によって満たされる場合に置換が起こる。複数の置換の場合、置換化合物を、1 つまたは複数の開示または特許請求の範囲に記載の置換部分と単独または複数で独立して置換することができる。「独立して置換する」は、（2 つ以上の）置換が同一であっても異なってもよいことを意味する。

30

【0081】

用語「薬学的に許容可能な塩」は、本明細書中で、薬学的に許容可能であり、親化合物の所望の薬理活性を有する塩をいう。かかる塩には、以下が含まれる：（1）塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、およびリン酸などの無機酸を使用して形成された、または酢酸、プロピオン酸、ヘキサ酸、シクロペンタンプロピオン酸、グリコール酸、ビルビン酸、乳酸、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、3 - （4 - ヒドロキシベンゾイル）安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1, 2 - エタン - ジスルホン酸、2 - ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4 - クロロベンゼンスルホン酸、2 - ナフタレンスルホン酸、4 - トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、4 - メチルピシクロ[2.2.2] - オクト - 2 - エン - 1 - カルボン酸、グルコヘプトン酸、3 - フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、tert - ブチル酢酸、ラウリル硫酸、グルコン酸、グルタミン酸、ヒドロキシナフトエ酸（hydroxynaphthoic acid）、サリチル酸、ステアリン酸、およびムコン酸などの有機酸を使用して形成された酸付加塩；あるいは（2）親化合物中に存在する酸性プロトンが金属イオン（例えば、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、またはアルミニウムイオン）と置換された場合に形成される塩；またはエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、および

40

50

N - メチルグルカミンなどの有機塩基との錯体。

【0082】

用語「立体異性体」は、その原子連結性が1つまたは複数の他の分子と同一であるが、空間におけるその原子配置が異なる異性体分子を意味する。この定義には、鏡像異性体、ジアステレオマー、シス異性体、トランス異性体、配座異性体が含まれる。

【0083】

用語「非置換」は、化学基または化学部分の原子価が水素によって満たされている全ての物質を意味する。

【0084】

本明細書で使用される用語「飽和炭素鎖」は、直線か分枝鎖の非環式の飽和炭化水素（すなわち CH_3 、 CH_2 、 CH_2CH_3 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ など）を指す。本明細書で使用される用語「不飽和炭素鎖」は、少なくとも1つの炭素炭素二重結合（すなわち $\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 $\text{CH}=\text{CHCH}_3$ 、 $-\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ など）または少なくとも1つの炭素炭素三重結合（すなわち CCH 、 $-\text{C}-\text{C}-$ 、 $-\text{C}-\text{CCH}_3$ 、 $-\text{C}-\text{CCH}-$ 、 $-\text{C}-\text{CCH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}-\text{CH}$ など）を含んでいる直線か分枝鎖の非環式の不飽和炭化水素を指す。

【0085】

本発明はまた、本明細書中に開示の化合物の保護誘導体を含む。例えば、本発明の化合物がヒドロキシルまたはカルボニルなどの基を含む場合、これらの基を安定な保護基で保護することができる。適切な保護基の総合リストを、T. W. Greene、Protective Groups in Organic Synthesis、John Wiley & Sons, Inc. 1981（その開示全体が本明細書中で参照として引用される）に見出すことができる。本発明の化合物の保護誘導体を、当該分野で周知の方法によって調製することができる。

【0086】

本発明の化合物は、不斉中心、キラル軸、およびキラル面を有することができ、ラセミ体、ラセミ化合物、および各ジアステレオマーとして生じ、全ての可能なその異性体および混合物（光学異性体が含まれる）が本発明に含まれる。さらに、本明細書中に開示の化合物は、互変異性体として存在することができ、両互変異性体は、一方の互変異性体構造しか示していないが、本発明の範囲内に含まれることが意図される。

【0087】

本発明の特定の実施形態では、本発明の組成物は、ステロール調節エレメント結合タンパク質（SREBP）経路の1つまたは複数のメンバーを対象とする。経路は、特定の態様で細胞質から核への輸送を容易にする膜結合転写因子（SREBP）のタンパク質分解性放出に関する。ここで、SREBPは、脂質産生に関連する酵素をコードする遺伝子の調節領域に存在するステロール調節エレメント（SRE）と呼ばれるエレメントに結合する。SREBPのDNAへの結合の際、標的遺伝子の転写は調整（例えば、上方制御など）される。

【0088】

< 薬学的調製物 >

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容可能な担体に溶解または分散された有効量の1つまたは複数の本発明の組成物（およびさらなる薬剤（必要に応じて））を含む。句「薬学的または薬理学的に許容可能な」は、例えば、必要に応じて、ヒトなどの動物に投与した場合に副作用、アレルギー反応、または他の有害反応を引き起こさない分子の実体および組成物をいう。少なくとも1つのファスタチンA類似体もしくは誘導体またはさらなる有効成分を含む薬学的組成物の調製は、Remington's Pharmaceutical Sciences、18th Ed. Mack Printing Company、1990（本明細書中で参照として引用される）に例示されるように、本開示を

10

20

30

40

50

考慮して当業者に公知であろう。さらに、動物（例えば、ヒト）投与のために、調製物は、FDAの生物学的基準に必要とされる無菌性、発熱性、一般的安全性、および純度の基準を満たすべきであると理解されるであろう。

【0089】

本明細書中で使用する場合、「薬学的に許容可能な担体」には、当業者に公知のように、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、防腐剤（例えば、抗菌薬、抗真菌薬）、等張剤、吸収遅延剤、塩、防腐剤、薬物、薬物安定剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、矯味矯臭剤、色素、それらの類似の物質および組み合わせが含まれる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289 - 1329（本明細書中で参照として引用される）を参照のこと）。任意の従来の担体が有効成分と不適合である場合を除き、薬学的組成物中でのその使用が意図される。

10

【0090】

ファスタチンA類似体または誘導体は、固体、液体、またはエアゾール形態のいずれかで投与するか、注射などの投与経路に対して無菌である必要があるかどうかに応じて、異なる担体型を含むことができる。本発明は、当業者に公知のように、静脈内、皮内、経皮、髄腔内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、腔内、直腸内、局所、筋肉内、皮下、粘膜、口腔、局所、局部、吸入（例えば、エアゾール吸入）、注射、注入、連続注入、直接的に標的細胞を浸漬する局在化灌流、カテーテル、洗浄液、クリーム、脂質組成物（例えば、リポソーム）、または他の方法または上記の任意の組み合わせによって投与することができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990（本明細書中で参照として引用される）を参照のこと）。

20

【0091】

ファスタチンA類似体または誘導体を、遊離塩基形態、中性形態、または塩形態の組成物に処方することができる。薬学的に許容可能な塩には、酸付加塩（例えば、タンパク質組成物の遊離アミノを使用して形成されたか、あるいは、例えば、塩酸またはリン酸などの無機酸または酢酸、シュウ酸、酒石酸、またはマンデル酸などの有機酸を使用して形成された酸付加塩）が含まれる。遊離カルボキシル基を使用して形成された塩はまた、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、またはプロカインなどの有機塩基に由来し得る。処方の際、溶液を、投薬処方物に適合する様式および治療に有効な量などで投与するであろう。処方物は、種々の投薬形態（注射液などの非経口投与のために処方した投薬形態などまたは肺への送達のためのエアゾール、または薬物放出カプセルなどの摂取投与のために処方した投薬形態）で容易に投与される。

30

【0092】

さらに、本発明によれば、投与に適切な本発明の組成物を、不活性希釈剤を含むか、または含まない薬学的に許容可能な担体中に準備する。担体は吸収可能であるべきであり、液体、半固体（すなわち、ペースト）、または固体の担体が含まれる。任意の従来の媒質、薬剤、希釈剤、または担体がレシipientまたはこれらに含まれる組成物の治療有効性に悪影響をもたらす場合を除き、本発明の方法の実施で用いる投与可能な組成物を使用することが適切である。担体または希釈剤の例には、脂肪、油、水、生理食塩水、脂質、リポソーム、樹脂、結合剤、および充填剤などのまたはそれらの組み合わせが含まれる。組成物はまた、1つまたは複数の成分の酸化を遅延するための種々の抗酸化剤を含むことができる。さらに、種々の抗生物質および抗真菌薬などの防腐剤（パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チロメサル、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない）によって微生物作用を予防することができる。本発明によれば、組成物を、任意の都合の良く且つ実践

40

50

【 0 0 9 3 】

【 0 0 9 4 】

【 0 0 9 5 】

【 0 0 9 6 】

【 0 0 9 7 】

【 0 0 9 8 】

他の非限定的な例では、用量は、投与あたり約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $10 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $100 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $200 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $350 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $500 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $1 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $5 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $10 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $50 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $100 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $200 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $350 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$

／体重、約 500 mg / kg / 体重から約 1000 mg / kg / 体重までまたはそれを超える用量、およびこれらの数値内から導かれる任意の範囲も含むことができる。本明細書中に列挙した数値から導かれる範囲の非限定的な例では、上記数値に基づいて、約 5 mg / kg / 体重～約 100 mg / kg / 体重の範囲、約 5 μg / kg / 体重～約 500 mg / kg / 体重の範囲などを投与することができる。

【0099】

< 消化管組成物および処方物ファトスタチン A >

アナログまたは派生語は食物のルート経路で処理されるために製剤化される。消化管経路には、組成物が消化管に直接接触する全ての可能な投与経路が含まれる。具体的には、本明細書中に開示の薬学的組成物を、経口、口腔、直腸、または舌下に投与することができる。そのようなものとして、これらの組成物を、不活性希釈剤または吸収可能な食用担体を使用して処方することができるか、硬ゼラチンカプセルまたは軟ゼラチンカプセル中に封入することができるか、打錠することができるか、あるいは食物と直接組み込むことができる。

【0100】

ある実施形態では、活性化合物を、賦形剤と組み込み、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、およびウェハーなどの形態で 사용할ことができる (Mathiowitz ら、1997; Hwang ら、1998; 米国特許第 5,641,515 号; 同第 5,580,579 号; および同第 5,792,451 号 (それぞれ、その全体が本明細書中に具体的に引用される))。錠剤、トローチ、丸薬、およびカプセルなどはまた、以下も含むことができる: 結合剤 (例えば、トラガカントガム、アカシア、トウモロコシデンプン、ゼラチン、またはそれらの組み合わせなど); 賦形剤 (例えば、第二リン酸カルシウム、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、またはそれらの組み合わせなど); 崩壊剤 (例えば、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸、またはそれらの組み合わせなど); 潤滑剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウムなど); 甘味剤 (例えば、スクロース、ラクトース、サッカリン、またはそれらの組み合わせなど); 矯味矯臭剤 (例えば、ペパーミント、ウィンターグリーン油、チェリーフレーバー、オレンジフレーバーなど)。投薬単位形態がカプセルである場合、上記物質型に加えて、液体担体を含むことができる。種々の他の材料がコーティングとして、またはそうでなければ投薬単位の物理的形態を改変するために存在することができる。例えば、錠剤、丸薬、またはカプセルを、シェラック、糖、またはその両方でコーティングすることができる。投薬形態がカプセルである場合、上記材料型に加えて、液体担体などの担体を含むことができる。ゼラチンカプセル、錠剤、または丸薬を、腸溶コーティングすることができる。腸溶コーティングは、pH が酸性である胃内または小腸上部中での組成物の変性を防止する。例えば、米国特許第 5,629,001 号を参照のこと。小腸への到達の際、小腸中の塩基性 pH によりコーティングが溶けて、組成物が放出され、特殊化細胞 (例えば、上皮腸細胞およびパイエル板 M 細胞) によって吸収される。エリキシルのシロップは、活性化合物、甘味剤としてのスクロース、防腐剤としてのメチルパラベンおよびプロピルパラベン、色素、およびフレーバー (チェリーフレーバーまたはオレンジフレーバーなど) を含むことができる。勿論、任意の投薬単位形態の調製で使用する任意の材料は、薬学的に純粋であり、使用量で実質的に非毒性でなければならない。さらに、活性化合物を、徐放性の調製物および処方物に組み込むことができる。

【0101】

経口投与のために、本発明の組成物を、代替法として、含嗽剤、歯磨剤、口腔錠、口腔噴霧剤、または舌下経口投与処方物の形態で 1 つまたは複数の賦形剤と組み込むことができる。例えば、適切な溶媒 (ホウ酸ナトリウム溶液 (Dobell's Solution) など) 中に必要量の有効成分を組み込んだ含嗽剤を調製することができる。あるいは、有効成分を、経口溶液 (ホウ酸ナトリウム、グリセリン、および重炭酸カリウムを含む経口溶液など) に組み込むか、歯磨剤中に分散させるか、水、結合剤、研磨剤、矯味矯臭

10

20

30

40

50

剤、起泡剤、および保湿剤を含むことができる組成物に治療有効量で添加することができる。あるいは、組成物を、舌下に置くことができるか、あるいは口腔内で溶解することができる錠剤または溶液に構築することができる。

【0102】

他の消化管投与様式に適切なさらなる処方物には、座剤が含まれる。座剤は、種々の重量および形状の固体投薬形態であり、通常、直腸に挿入するように薬物適用される。挿入後、座剤は、腔液中で軟化、融解、または溶解する。一般に、座剤のために、伝統的な担体には、例えば、ポリアルキレングリコール、トリグリセリド、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。ある実施形態では、座剤を、例えば、約0.5%～約10%、好ましくは約1%～約2%の範囲の有効成分を含む混合物から形成することができる。

10

【0103】

<非経口組成物および処方物>

さらなる実施形態では、ファスタチンA類似体または誘導体を、非経口経路を介して投与することができる。本明細書中で使用する場合、用語「非経口」には、消化管を回避する経路が含まれる。具体的には、本明細書中に開示の薬学的組成物を、例えば、静脈内、皮内、筋肉内、動脈内、髄腔内、皮下、または腹腔内（これらに限定されない）に投与することができる。米国特許第6,537,514号、同第6,613,308号、同第5,466,468号、同第5,543,158号、同第5,641,515号、および同第5,399,363号（それぞれ、その全体が本明細書中で参照として具体的に引用される）。

20

【0104】

遊離塩基または薬理学的に許容可能な塩としての活性化合物の溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水中に調製することができる。グリセロール、脂質ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物、ならびに油中に分散体を調製することもできる。通常の保存および使用条件下で、これらの調製物は微生物の増殖を防止するための防腐剤を含む。注射に適切な薬学的形態には、滅菌水溶液または滅菌分散体および滅菌注射溶液または滅菌注射分散体の即時調製のための滅菌粉末が含まれる（米国特許第5,466,468号（その全体が本明細書中で参照として具体的に引用される））全ての場合において、形態は、無菌でなければならず、容易に注射可能な範囲の流動体でなければならない。製造および保存条件下で安定でなければならず、微生物（細菌および真菌など）の汚染作用から防御されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（すなわち、グリセロール、プロピレングリコール、および脂質ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および/または植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散体の場合の必要な粒子サイズの維持、および界面活性剤の使用によって適切な流動性を維持することができる。種々の抗菌薬および抗真菌薬（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、およびチロメサルなど）によって微生物作用を防止することができる。多くの場合、等張剤（例えば、糖または塩化ナトリウム）を含めることが好ましいであろう。組成物中の吸収遅延剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の使用によって注射組成物を持続的に吸収させることができる。

30

40

【0105】

水溶液中での非経口投与のために、例えば、必要に応じて溶液を適切に緩衝化し、液体希釈剤を最初に十分な生理食塩水またはグルコースで等張にすべきである。これらの特定の水溶液は、特に、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に適切である。これに関連して、使用することができる滅菌水媒体は、本開示を考慮して、当業者に公知であろう。例えば、ある投薬量を、1mLの等張NaCl溶液中に溶解し、1000mLの皮下注入液に添加するか、適切な注入部位に注射することができる（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」15th Edition、pages 1035-1038および1570-1580を参照のこと）。治療される被験体の状態に応じて、投薬量のいくつかのバリエーションが必然的に生じるであろう

50

。投与を行う者は、任意の事象で、各被験体に適切な用量を決定するであろう。

【0106】

滅菌注射液を、上に列挙の種々の他の成分を含む適切な溶媒中の必要量の活性化合物の組み込みおよびその後の必要に応じた濾過滅菌によって調製する。一般に、塩基性分散媒および上に列挙の必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルへの種々の滅菌有効成分の組み込みによって分散体を調製する。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、事前に濾過滅菌したその溶液からの有効成分および任意のさらなる所望の成分の粉末が得られる真空乾燥技術および凍結乾燥技術である。粉末組成物を、安定剤を含むかまたは含まない液体担体（例えば、水または生理食塩水など）と合わせる。

【0107】

本発明の他の好ましい実施形態では、活性化合物ファトスタチン A 類似体または誘導体を、種々の多岐にわたる経路（例えば、局所（すなわち、経皮）投与、粘膜投与（鼻腔内、膈など）および/または吸入）を介した投与のために処方することができる。局所投与のための薬学的組成物は、軟膏、ペースト、クリーム、または粉末などの医学的適用のために処方された活性化合物を含むことができる。軟膏には、局所適用のための全ての油脂性物質、吸着物質、乳濁液、および水溶性ベースの組成物が含まれる一方で、クリームおよびローションは、乳濁液基剤のみを含む組成物である。局所的に投与される医薬品は、皮膚を介した有効成分の吸着を促進するための浸透促進剤を含むことができる。適切な浸透促進剤には、グリセリン、アルコール、アルキルメチルスルホキシド、ピロリドン、およびラウロカプラム（l u a r o c a p r a m）が含まれる。局所適用のための組成物に可能な基剤には、ポリエチレングリコール、ラノリン、コールドクリーム、およびペトロラタム、ならびに任意の他の適切な吸収、乳濁液、または水溶性軟膏基剤が含まれる。局所調製物には、必要に応じて、有効成分を保存し、均一な混合物を得るための乳化剤、ゲル化剤、および抗菌防腐剤も含まれ得る。本発明の経皮投与は、「パッチ」の使用も含むことができる。例えば、パッチは、所定の速度および固定期間にわたる連続的様式で1つまたは複数の活性物質を供給することができる

【0108】

薬学的組成物は、点眼薬、鼻腔内噴霧、吸入、および/または他のエアゾール送達ビヒクルによって送達され得る。鼻内エアゾール噴霧を介して肺へ組成物を直接送達させる方法は、例えば、米国特許第5,756,353号および同第5,804,212号（それぞれ、その全体が本明細書中で参照として引用される）に記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂（T a k e n a g a ら、1998）およびリゾホスファチジル-グリセロール化合物（米国特許第5,725,871号（その全体が本明細書中で具体的に引用される））を使用した薬物の送達も薬学分野で周知である。ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックスの形態での経粘膜薬物送達は、米国特許第5,780,045号（その全体が本明細書中で具体的に引用される）に記載されている。

【0109】

用語「エアゾール」は、液化または圧縮ガス噴射剤中に分散させた液体粒子の微粉化固体のコロイド系をいう。吸入用の典型的な本発明のエアゾールは、液体噴射剤または液体噴射剤と適切な溶媒との混合物中の有効成分の懸濁液からなるであろう。適切な噴射剤には、炭化水素および炭化水素エーテルが含まれる。

【0110】

< 併用療法 >

本発明の組成物の有効性を増加させるために、代謝障害を有する個体に付加療法を送達することができる。例えば、肥満個体に、肥満のための別の療法に加えて、本発明の組成物を投与することができる。さらなる肥満療法には、例えば、食事療法、理学療法（運動）、薬物療法、手術、および行動療法が含まれる。例示的薬物療法には、例えば、X e n i c a l O r l i s t a t（登録商標）、フェンテルミン、およびシブトラミン（M e r i d i a（登録商標））が含まれる。例示的手術には、例えば、脂肪吸引および胃バイパスが含まれる。

10

20

30

40

50

【0111】

糖尿病個体のために、例えば、治療のための例示的なさらなる化合物には、1つまたは複数の以下が含まれる：アクトス（ピオグリチゾン（pioglitazone））；ACTOS Plus Met；アマリール（グリメピリド）；アバンドリル（アバンジア+グリミペリド）；アバンジア（ロシグリタゾン）；アバンドメット（マレイン酸ロシグリタゾンおよび塩酸メルホルミン）；バイエタップ（Byetta）；デュエタクト（Duetact）（ピオグリタゾンHClおよびグリメピリド）；ガルブス（Galvus）（ビルダグリプチン）；グリピジド（スルホニル尿素）；グルコファージ（メルホルミン）；グリメピリド；グルコパンス（グリブリド/メルホルミン）；グルコトロールXL（持続放出グリピジド）；グリブリド；グリセット（ミグリトール）グルコシダーゼインヒビター；ジャンユーピア（リン酸シタグリプチン）；メタグリップ（グリピジド+メルホルミン）；メルホルミン-ピグアニド；ブランジン（レバグリニド）；プレコース（アカルボース）；レズリン（トログリタゾン）；スターリックス（ナテグリニド）。他の糖尿病療法には、食事および運動の改善が含まれる。

【0112】

< 例示的な代謝障害治療の測定 >

本発明の特定の態様では、個体に、1つまたは複数の本発明の組成物を投与し、個体を、代謝障害の少なくとも1つの症状の改善について評価する。例えば、代謝障害が肥満である特定の実施形態では、肥満の改善を、1つまたは複数の本発明の組成物の治療中および/または治療後に決定することができる。肥満の改善を、任意の標準的手段によって測定することができるが、特定の態様では、肥満の改善を、例えば、体重測定、体型指数（BMI）測定、および/または体部位のサイズの測定（腰囲測定）によって測定する。例示的なBMI計算方法は、個体の体重（キログラム）をその身長（メートル）の2乗で割ること（体重[kg]身長[m]²）を含む。BMI 30以上を肥満と見なし、BMI 25~29.9を過体重と見なす。本発明の他の態様では、糖尿病個体を、本発明の療法の個体への実施後の改善について試験する。1つの特定の実施形態では、糖尿病のモニタリングを血液検査によって行う。例えば、血液検査は、化学的A1Cを測定することができる。血糖値が高いほど、A1Cレベルが高いであろう。いくつかの場合、コレステロール（HDLおよび/またはLDLコレステロールが含まれる）および/またはトリグリセリドを、当該分野の標準的手段などによって測定する。特定の場 合、当該分野の標準的手段などによって空腹時リポタンパク質プロファイルを行う。

【0113】

< 本発明のキット >

本明細書中に記載の任意の組成物を、キット中に含めることができる。非限定的な例では、キットは、1つまたは複数の代謝障害の治療および/または予防に適切な組成物を含む。本発明の他の実施形態では、キットは、個体からサンプルを得るための1つまたは複数の装置を含む。かかる装置は、例えば、1つまたは複数のスワブ（綿スワブなど）、爪楊枝、小刀、スパチュラ、およびシリンジなどであり得る。別の実施形態では、さらなる化合物（代謝障害の治療および/または予防のためのさらなる化合物など）をキット中に提供する。キット中に提供される任意の組成物を、例えば、水媒体または凍結乾燥形態のいずれかにパッケージングすることができる。キットの容器手段には、一般に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または他の容器手段が含まれるであろう。この容器手段に、成分を配置し、好ましくは、適切に等分することができる。キット中に1つを超える成分が存在する場合、キットはまた、一般に、さらなる成分を個別に配置することができる第2、第3、または他のさらなる容器を含むであろう。

本発明の好ましい実施形態を証明するために以下の実施例を含める。当業者は、以下の実施例に開示の技術は、発明者らによって発見された技術を示し、本発明の実施において十分に機能し、したがって、好ましいその実施様式を構成すると見なすことができると認識すべきである。しかし、当業者は、本開示を考慮して、開示の特定の実施形態における多数の変更を行い、本発明の精神および範囲を逸脱することなく同様または類似の結果が

依然として得られることを認識すべきである。

【実施例】

【0114】

<実施例1>

ファトスタチンAはSREBP応答性遺伝子の発現を減少させる

薬物処理細胞および非処理細胞の遺伝子発現プロファイルの比較により、ファトスタチンAによって影響を受ける特異的分子経路を明らかにすることができる。DU145細胞を、ファトスタチンAまたはDMSOのみで処理し、抽出mRNAサンプルを、33,000遺伝子をマッピングするAffimetrix DNAマイクロアレイによって分析した(表1)。

【0115】

【表 1】

表 1

SREBPによって調節されることが知られているか、または可能性が高い遺伝子がファストスタチンAによって制御されており、マイクロアレイの結果で示された

SREBPにより調節されることが既知の遺伝子		
遺伝子コード	減少 (倍)	遺伝子名
NM_000527.2	0.574349	低密度リボタンパク質受容体(LDLR)
NM000859.1	0.5	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイム (HMG CoA R)
NM 0002130.1	0.353553	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムシンターゼ1 (HMG CoA S)
NM_001096.1	0.574349	ATPクエン酸リアーゼ
NM_000664.1	0.574349	アセチルコエンザイムAカルボキシラーゼアルファ
NM_005063.1	0.574349	ステアロイル-CoAデサチュラーゼ (SCD)
NM_002004.1	0.659754	ファルネシルピロリン酸syntletase
AK000162	0.535887	アセチルCoA合成酵素
NM_000431.1	0.5	メバロナート キナーゼ (MVK)
NM002461.1	0.329877	メバロン酸デカルボキシラーゼ (MVD)
NM 003129.2	0.5	スクアレンエポキシダーゼ
ステロール/脂肪合成に関係する遺伝子		
Gene Code	Decreased fold	
NM_022977.1	0.707107	脂肪酸コエンザイムリガーゼ長鎖4
NM_004457.2	0.707107	脂肪酸コエンザイムリガーゼ長鎖3
NM005931.1	0.659754	脂肪酸デサチュラーゼ1
NM0019312	0.659754	ジヒドロS-アセチルトランスフェラーゼ
AF167438	0.659754	ホモサピエンスアンドロゲン調節短鎖デヒドロゲナーゼレダクターゼ1
NM006579.1	0.615572	エモバミル-結合タンパク質 (ステロールイソメラーゼ)
D63807.1	0.615572	ラノステロール合成酵素
BC000408.1	0.574349	アセチルコエンザイムA2 アセチルトランスフェラーゼ
NM_004462.1	0.535887	ファルネシル二リン酸のファメルシロランスフェラーゼ1
D85181.1	0.5	ステロール-C5-デサチュラーゼ
NM_016371.1	0.466517	ヒドロキシ (17-β) デヒドロゲナーゼ7
NM 005542.1	0.329877	インスリン誘導遺伝子1 (INSIG1)

結果は、ファスタチン A によって下方制御された (0.7 倍未満) 遺伝子の 55% がステロール調節エレメント結合タンパク質 (SREBP) (LDL 受容体、HMG-CoA レダクターゼ、および脂肪酸シンターゼが含まれる) によって調節されることが公知であるか、または可能性が高い遺伝子であることを示した (Horton ら、2003)。代表的な SREBP 応答性遺伝子の下方制御を、RT-PCR 実験によって確認した (図 1 の A および 1 B)。これらの結果は、ファスタチン A が SREBP 経路の選択的インヒビターであることを示した。

【0117】

ファスタチン A が SREBP の機能を妨害することを示すために、内因性 SREBP が SREBP 応答性レポーター遺伝子の転写を活性化する能力を、HEK293 細胞においてファスタチン A の存在下または非存在下で測定した (図 2 の A B)。ファスタチン A は、濃度依存様式でレポーター遺伝子の活性化を減少させ、ここで、ルシフェラーゼ発現がステロール調節エレメントの 3 つの反復によって調節される。対照的に、ファスタチン A は外因的に発現した SREBP-1 の成熟形態 (アミノ酸 1~500) がレポーター遺伝子活性を活性化する能力を妨害することができなかった (図 2 の C)。これらの結果は、ファスタチン A が細胞中の SREBP の活性化過程を選択的に遮断することを示す。

10

【0118】

< 実施例 2 >

ファスタチン A は SREBP のタンパク質分解活性を遮断する

20

ファスタチン A が SREBP のタンパク質分解活性に影響を及ぼすかどうかを試験するために、ファスタチン A で処理した DU145 細胞の全細胞溶解物を、SREBP-1 の NH2 末端に対する抗体を使用したウェスタンブロットによって分析した (図 3 の A)。ファスタチン A の処理により、用量依存様式で SREBP-1 の 68 kDa 成熟形態の量が減少した一方で、125 kDa 前駆体形態の量が増加した。その COOH 末端に対する抗体を使用して、SREBP-2 について類似の結果が得られた (図 3 の B)。これらの結果は、ファスタチン A が両 SREBP イソ型のタンパク質分解活性を直接または間接的に妨害することを示す。

【0119】

SREBP のタンパク質分解活性の阻害は、SREBP の核転位を妨害するであろう。SREBP-1 の細胞内局在に対するファスタチン A の効果を、SREBP-1 の NH2 末端に対する抗体を使用した免疫蛍光顕微鏡法によって分析した。細胞を DMSO のみで処理した場合、SREBP-1 は、無血清 (無脂肪) 培地中にて核内にほぼ排他的に局在化した (図 3 の C ~ 3 E)。対照的に、細胞をファスタチン A とインキュベートした場合、核内の SREBP-1 の免疫蛍光が減少し、核の外側で相互に増加した (図 3 の F ~ 3 H)。これは、ファスタチン A が SREBP-1 の核局在化を阻害することを示す。

30

【0120】

< 実施例 3 >

SREBP-1 のノックダウンによるファスタチン表現型の検証ファスタチン A により、培養細胞中に以下の 2 つの表現型が生じる: (i) 3T3-L1 細胞のインスリン誘導性脂肪生成の阻害および (ii) DU145 前立腺癌細胞の血清非依存性成長の抑制 (Choi ら、2003)。第 1 の表現型は、脂質合成における SREBP-1 の公知の役割のために、ファスタチン A が SREBP-1 の遮断薬であるという本発明者らの結論と完全に一致する (Tontonoz ら、1993; Kim and Spiegelman、1996)。細胞培養条件下で 3T3-L1 細胞中の SREBP-1 発現が SREBP-1 に特異的な小さな干渉 RNA (siRNA) の発現ベクターのトランスフェクションによってサイレンシングされたことを確認するために (図 4 G)、インスリン誘導性脂肪生成に対するサイレンシングの効果を試験した。予想通り、SREBP-1 発現のノックダウンによって 3T3-L1 細胞の油滴形成が完全に遮断されたのに対して (図 4 D

40

50

および 4 F、クローン 1 および 2)、空のベクター (neo) でトランスフェクトした対照細胞は、親 3 T 3 - L 1 細胞ほどの脂肪蓄積を示した (図 4 B)。これらの結果は、3 T 3 - L 1 細胞におけるファスタチン A 誘導性表現型が SREBP - 1 阻害によって媒介されることを示す。

【0121】

ファスタチン A による SREBP - 1 の阻害が DU 1 4 5 細胞の血清非依存性成長の抑制を媒介するかどうかを試験するために、DU 1 4 5 細胞中の SREBP - 1 発現を、SREBP - 1 特異的 siRNA の発現ベクターのトランスフェクションによって同様にサイレンシングした (図 5 B)。空のベクター (neo) でトランスフェクトした対照細胞は、血清または IGF 1 のいずれかの存在下で成長し、親 DU 1 4 5 細胞と同様であった。対照的に、SREBP - 1 発現がサイレンシングされたノックダウン細胞 (クローン 1 および 2) は、血清非依存性 IGF 1 駆動成長を減少させたのに対して、その血清依存性成長はほとんど影響を受けなかった (図 5 A)。

10

【0122】

血清非依存性成長における SREBP - 1 の要件は、無血清培地中の外部脂肪供給源の欠如に起因し得る。外因性脂肪酸が血清中に存在しない場合、細胞は、細胞成長を維持するために脂肪酸およびコレステロール (膜の基礎単位) を合成する必要がある。細胞成長における脂肪酸の重要性を試験するために、無脂肪血清培地中の SREBP - 1 ノックダウン細胞の成長をモニタリングした (図 5 A)。SREBP - 1 サイレncingにより、無血清 IGF 1 含有培地ほどに無脂肪培地中の細胞成長が妨害された。これらの結果は、ファスタチン A が SREBP - 1 阻害によって癌細胞の血清非依存性成長を遮断することを示す。

20

【0123】

< 実施例 4 >

ファスタチン A は、マウスにおいて体重を減少させ、コレステロールレベルおよびグルコースレベルを低下させ、脂質合成酵素を下方制御する

ファスタチン A の薬物様化学構造により、本発明者らは、全動物の肝臓中の SREBP - 1 を阻害する能力の調査に駆り立てられた。長期絶食 (48 時間) およびその後のさらなる 48 時間の無脂肪高炭水化物食の摂取による脂質合成条件下での肝臓 SREBP - 1 に対するファスタチン A の効果を試験した。マウスに、30 mg / kg / 日のファスタチン A を、48 時間の絶食期間の 1 日前から開始して 5 日間腹腔内注射した。48 時間の絶食後、処置群は対照群よりも多くの体重が減少した (4.9 ± 0.3 g / マウスと比較して 6.12 ± 0.6; p = 0.01) (図 6 A)。処置中に摂食の減少や明らかな毒性は認められなかった (図 6 B)。興味深いことに、無脂肪高炭水化物食の再摂取 48 時間後、ファスタチン A 処置マウスの血清中のグルコースレベル (137 ± 14 mg / dl と比較して 110 ± 23; P = 0.06) およびコレステロール (120 ± 19 mg / dl と比較して 93 ± 20; P = 0.12) が低下する傾向があった (図 6 C)。HDL および LDL の両方は、処置マウス群で減少した。しかし、LDL レベルの減少がより有意なようであった (30 ± 6 mg / dl と比較して 16 ± 5) (図 6 C)。

30

【0124】

肝臓抽出物中の SREBP - 1 の発現レベルを、ウェスタンブロットによって試験した。細胞培養物の結果と一致して、ファスタチン A で処置したマウス由来の肝臓抽出物は、SREBP - 1 の 68 KDa 成熟形態の量が減少し、125 KDa 前駆体形態の量が増加した (図 6 D)。脂肪酸シンターゼ (FAS) (代表的な SREBP - 1 応答性脂質合成酵素 (Boizard ら、1998)) の肝臓発現も処置後に決定した。肝臓抽出物のウェスタンブロット分析により、ファスタチン A 処置によって FAS 発現レベルが 30 % まで減少したことが示された (図 6 E)。発現の減少と一致して、抽出物中のその酵素活性も同様に減少した (図 6 F)。FAS について認められるように、SREBP - 1 によっても調節されるアセチル - CoA カルボキシラーゼ (ACC) 活性は、肝臓抽出物中で減少した (図 6 G)。これらの結果は、培養細胞で見出されるように、ファスタチン

40

50

A がマウス肝臓中での S R E B P - 1 の活性化を遮断することを示す。

【 0 1 2 5 】

普通食を与えた別のマウス群のより長い処置（2週間）によって体重が10%減少したのに対して、対照群は、体重が変化しなかった（図7AB）。摂食は、両群間で類似していた（処置マウスおよび対照マウスについて、それぞれ、3.8および3.5g/マウス/日）。無脂肪食を絶食/再摂取したマウスの結果と一致して、普通食を与えたマウスは、有意に低いグルコースレベルを示し、血中のトリグリセリド（TG）レベルおよびコレステロールレベルがより低い傾向があった（図7C）。FAS活性およびそのタンパク質レベルも約30%減少した（図7Dおよび7E）。

【 0 1 2 6 】

< 実施例 5 >

本発明の有意性

生物活性小分子は、代謝経路が含まれる複雑な細胞過程を調査するための有益なツールであることが証明されている。脂質ホメオスタシスおよびインスリン作用の重要なレギュレーターは、S R E B P 転写因子のファミリーである（Brown and Goldstein、1997）。S R E B P 機能を調整する小分子は、代謝性疾患の治療で使うことができ、疾患のさらなる分子的理解のためのツールとしての機能を果たすことができる。細胞ベースおよび動物のデータは、ファスタチン A が核内の成熟 S R E B P - 1 形体の量のダウンレギュレートを通じて脂質生成遺伝子の発現を阻害することを示唆している。

【 0 1 2 7 】

S R E B P - 1 および - 2 を活性化する小分子は、報告されている。これらの LDL 低下分子は、S R E B P のタンパク質分解活性の刺激によって LDL 受容体の発現を上方制御する。作用の分子機構は完全に解明されていないが、データにより、SCAP が分子の主な標的であることが示唆された。これらの分子と異なり、ファスタチン A は S R E B P の活性化を阻害し、S R E B P 応答性遺伝子（LDL 受容体遺伝子が含まれる）の発現を下方制御する（表1）。

【 0 1 2 8 】

ファスタチン A の動物データは、細胞培養の結果と一致する。無脂肪食の再摂取下で、ファスタチン A で処置したマウスの肝臓抽出物では、有意に成熟 S R E B P - 1 形態のレベルが低く、前駆体形態のレベルが高かった。他方では、予想されるように、対照群の肝臓抽出物において、成熟形態のレベルは、前駆体形態より高かった（Hortonら、1998）。興味深いことに、形態の組み合わせの総量の変化はなく、核（成熟）形態とサイトゾル（前駆体）形態との間で分布のみが異なるようである。これらのデータは、ファスタチン A が S R E B P - 1 の発現レベルを変化させることができず、むしろ、前駆体の切断過程を強化し、それにより、その量が減少し、成熟形態および活性形態が増加することを示す。脂肪合成における S R E B P - 1 切断の重要性は、SCAP 欠損マウスを使用した実験によって示されている：マウスの肝臓は、再摂取条件下での ACC および FAS の発現を誘導できなかった（Liangら、2002）。

【 0 1 2 9 】

核 S R E B P - 1 レベルの減少の生理学的有意性を評価するために、ACC および FAS のレベルおよび活性を決定した。肝臓抽出物中のこれらの活性は、ファスタチン A 処置に应答して下方制御された（図6および7）。これらの結果は、脂肪酸合成経路のレギュレーターとしての S R E B P - 1 の役割と一致する（Shimano、2000）。Shimanoらは、S R E B P - 1 - / - マウスに高炭水化物食を与えた場合に FAS レベルおよび ACC レベルが誘導されないことを示し（Shimanoら、1997）、脂質合成酵素発現の調節における S R E B P - 1 の役割が確認された。

【 0 1 3 0 】

ファスタチン A 処置マウスにおける興味深い所見は、体重および血糖の減少である。体重減少についての1つの可能性は、ACC および FAS などの脂質合成酵素の下方制御

10

20

30

40

50

の結果としての脂質合成率の低下に起因する。さらに、マロニルCoA (ACCの生成物およびカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼの強力なインヒビター)の減少により、脂肪酸酸化および脂肪燃焼を増強することができる。本発明の特定の実施形態では、ファスタチンAによるSREBP-1切断の阻害により、脂質合成酵素が下方制御され、脂肪酸酸化が増強され、体重が減少し、インスリン感受性が増加してグルコースが低下する。

【0131】

<実施例6>

材料

脂質枯濁血清を、記載のように調製した (Goldsteinら、1983)。無脂肪FBSをFisherから入手した。ウサギ抗SREBP-1 (sc-8984) およびヤギ抗アクチン (sc-1616) ポリクローナル抗体を、Santa Cruz Biotechnologyから購入した。マウス抗SREBP-2 ポリクローナル抗体およびマウス抗FAS抗体をBD Biosciencesから入手した。抗ヤギIgG HRPおよび抗ウサギIgG HRPを、Promegaから入手した。DAPIを含むProLong Gold antifade試薬を、Molecular Probes Invitrogen Detection Technologiesから入手した。抗ウサギIgG FITCを、Chemicon Internationalから入手した。デキサメタゾン (DEX) および1-メチル-3-イソブチルキサンチン (MIX) を、Sigmaから入手した。

【0132】

ファスタチンAの調製

2-プロモ-4'-メチルアセトフェノン (1.22 g、5.70 mmol) およびプロチオナミド (1.03 g、5.70 mmol) の混合物を含むエタノール (20 mL) を、攪拌しながら70 °Cで0.5時間加熱し、次いで、0 °Cに冷却した。形成された黄色沈殿を濾過し、冷エタノールで洗浄し、乾燥させて、黄色針状結晶としてファスタチンAのHBr塩を得た (1.78 g、83%) : ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 8.88 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.46 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 8.36 (dd, $J = 1.4, 6.2$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.03 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.80 (m, 2H), 0.96 (t, $J = 7.6$, 3H); $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{S} + \text{H}$ について計算したHRMS (FAB) の正確な質量は m/z 295.1269が必要である。実測値 m/z 295.1269。 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{S} + \text{H}$ について計算したHRMS (FAB) の正確な質量は m/z 295.1269が必要である。実測値 m/z 295.1269

【0133】

細胞培養

DU145ヒトアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 (ATCC) を、2 mM L-グルタミン、1.0 mM ピルビン酸ナトリウム、0.1 mM 非必須アミノ酸、および1.5 g/L 重炭酸ナトリウムを10%ウシ胎児血清、100単位/mLペニシリン、および100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシンと共に含むイーグル最少必須培地中にて37 °Cの5% CO_2 下で維持した。3T3-L1線維芽細胞 (ATCC) を、5.5 mM グルコース、10%ウシ胎児血清、50 $\mu\text{g/mL}$ ゲンタマイシン、0.5 mM グルタミン、および0.5 $\mu\text{g/mL}$ ファンギゾンを含むダルベッコ改変イーグル培地中にて37 °Cで維持した。ヒト胎児由来腎臓293細胞 (ATCC) を、10%ウシ胎児血清、100単位/mLペニシリン、および100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地中にて37 °Cの5% CO_2 下で維持した。

【0134】

オリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析

DU145前立腺癌細胞を、1 $\mu\text{g/mL}$ のIGF1の存在下にて無血清培地中で5 μ

10

20

30

40

50

MのファスタチンAまたはDMSOのみで6時間処理し、TRI試薬(Molecular Research Center)中に総RNAを抽出し、RNeasyミニキット(Qiagen)によってさらに単離した。精製mRNAを、約33,000個の十分に実証されたヒト遺伝子由来の39,000個を超える転写物を代表するほぼ45,000個のプロブ組からなるAffymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array(Affymetrix, Inc.)によってBaylor College of Medicine Microarray Core Facilityにて分析した。

【0135】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

0日目に、HEK293細胞を、10%ウシ胎児血清、100単位/mLペニシリン、および100 μ g/mL硫酸ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地を含む96ウェルプレートに5 \times 10³/ウェルの密度にて三連でプレートした。2日目に、細胞を、リポフェクタミン試薬(Invitrogen)の使用によって以下のプラスミドで一過性に同時トランスフェクトした: 0.4 μ g/ウェルpSRE-Luc(SRE-1駆動ルシフェラーゼレポーター構築物; Hua, X., Sakai, J., Ho, Y. K., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1995 J Biol Chem 270, 29422-7)および0.1 μ g/ウェル -galレポーター(-gal発現が最終体積150 μ Lでアクチンプロモーターによって調節される)。37で5時間のインキュベーション後、細胞をリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、次いで、ファスタチンAの非存在下または存在下で10%脂質枯渇血清、100単位/mLペニシリン、および100 μ g/mL硫酸ストレプトマイシンを含む100 μ Lのダルベッコ改変イーグル培地中にインキュベートした。20時間のインキュベーション後、各ウェル中の細胞を20 μ Lの1ラレポーター溶解緩衝液(Promega)で溶解し、アリコートをしてルシフェラーゼ活性(10 μ L)および -ガラクトシダーゼ活性(10 μ L)の測定のために使用した。ルシフェラーゼアッセイのために、光子生成を、Wallac 1420 ARVOsxマルチラベルカウンター(PerkinElmer)にてカウント毎秒として検出した。 -ガラクトシダーゼアッセイのために、37で0.5時間のインキュベーション後に、波長405nmのマイクロプレートリーダー(Tecan)によってO-ニトロフェニル - D -ガラクトシダーゼの加水分解を測定した。ルシフェラーゼ活性(カウント毎秒)を、 -ガラクトシダーゼ活性(OD単位)によって正規化した。SREBP-1cのN末端成熟形態の過剰発現について、pCMV-SREBP-1c(1~436)を、pSRE-Lucと同時にトランスフェクトした。pSRE-LucおよびpCMV-SREBP-1c(1~436)は、J. L. Goldstein(University of Texas Southwestern Medical Center)から提供された。

【0136】

RT-PCR実験

総RNAを、TRI試薬(Molecular Research Center)中でDU145細胞から抽出し、RNeasyミニキット(Qiagen)を使用して単離した。RNAサンプルを、Access RT-PCRシステム(Promega)の使用によってRT-PCRに供した。RT-PCR反応物は、総RNA、1 μ Mの各プライマー、0.2mMdNTP、1mMMgSO₄、AMV逆転写酵素(2単位)、およびTf1 DNAポリメラーゼ(2単位)を最終体積25 μ Lで含んでいた。使用したプライマー対は以下である: 5' - TCA GAC CGG GAC TGC TTG GAC GGC TCA GTC - 3' (配列番号1)および5' - CCA CTT AGG CAG TGG AAC TCG AAG GCC G - 3' (配列番号2) (低密度リポタンパク質受容体(LDLR)用); 5' - GCC TGC TTG ATA ATA TAT AAA C - 3' (配列番号3)および5' - CAC TTG AAT TG A GCT TTA G - 3' (配列番号4) (ステアロイル-CoAデヒドロゲナーゼ

10

20

30

40

50

(S C D) 用) ; 5 ' - A A G A A A A A G T G T C A G A C A G C T G G - 3 ' (配列番号 5) および 5 ' - T G G A C T G A A G G G G T G T T A G C - 3 ' (配列番号 6) (A T P クエン酸リアーゼ (A C L) 用) ; 5 ' - G C C C G A C A G T T C T G A A C T G G A A C A - 3 ' (配列番号 7) および 5 ' - G A A C C T G A G A C C T C T C T G A A A G A G - 3 ' (配列番号 8) (3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - C o A レダクターゼ (H M G C o A R) 用) ; 5 ' - C T G C C T G A C T G C C T C A G C - 3 ' (配列番号 9) および 5 ' - A C C T C T C C T G A C A C C T G G G - 3 ' (配列番号 10) (メパロン酸キナーゼ (M V D) 用) ; 5 ' - A A G A C T T C A G G G T A A G T C A T C A - 3 ' (配列番号 11) および 5 ' - C G T G T A T A A T G G T G T C T A T C A G - 3 ' (配列番号 12) (インスリン誘導遺伝子 1 (I N S I G 1) 用) 。増幅条件は以下である : 94 で 4 分間を 1 サイクル、その後 94 で 40 秒間の変性、50 で 40 秒間のアニーリング、68 で 2 分間の伸長を、S C D および H M G C o A R については 22 サイクル行い、L D L R および I N S I G 1 については 24 サイクル行って 58 でアニーリングし、A T P クエン酸リアーゼ (A C L) については 24 サイクル行って 60 でアニーリングし、M V D については 30 サイクル行って 55 でアニーリングした。増幅 DNA を、アガロースゲルによって分析し、S c i o n - i m a g e (バージョン 4 . 02) ソフトウェアを使用して定量した。

【 0 1 3 7 】

ウェスタンブロッティング

D U 1 4 5 前立腺癌細胞を、 2×10^5 細胞 / ウェルの密度で無血清 M E M を含む 6 ウェルプレートに播種し、37 で一晩インキュベートした。次いで、細胞を、I G F 1 ($1 \mu\text{g} / \text{mL}$) の存在下にて D M S O またはファスタチン A (1 または 5 m M) で処理した。インキュベーション 6 時間後、細胞を P B S 中に回収し、S D S 緩衝液中に溶解した。サンプルを、10 % S D S - P A G E ゲルで分離し、ウサギ抗 S R E B P - 1 抗体および抗 S R E B P - 2 抗体の使用によってブロッティングした。特異的バンドを、増強蛍光 (e n h a n c e d c h e m i l u m i n e s c e n t) (E C L) 検出試薬 (A m e r s h a m) の使用によって視覚化した。

【 0 1 3 8 】

免疫蛍光実験

D U 1 4 5 前立腺癌細胞を、無血清 M E M を含むカバースリップ上に一晩播種し、次いで、I G F 1 ($1 \mu\text{g} / \text{mL}$) を含む無血清 M E M 中にて 5 μM のファスタチン A または D M S O のみで処理した。インキュベーション 6 時間後、細胞を - 20 のメタノール中で 20 分間固定し、5 % ミルクおよび 0 . 1 % T w e e n 20 を含む P B S 中で 1 時間ブロッティングした。サンプルを、ウサギポリクローナル抗 S R E B P - 1 (S a n t a C r u z : s c - 8984) とインキュベートし、次いで、フルオレセインイソチオシアナート抱合抗ウサギ I g G 抗体 (C h e m i c o n I n c) とインキュベートした。カバースリップを、蛍光検出に適切なフィルターを用いた N i k o n T E 200 蛍光顕微鏡下にて 400 倍で視覚化した。

【 0 1 3 9 】

S R E B P の s i R N A ノックダウン

S R E B P - 1 遺伝子配列由来の相補オリゴヌクレオチド (512 ~ 531) 、5 ' - G A T C C C C C G C C C A C A T T G A G C T C C T C T C T T C T T C A A G A G A G A G A G G A G C T C A A T G T G G C T T T T T T G G A A A - 3 ' (配列番号 13) 、および 5 ' - A G C T T T T T C C C A A A A A G C C A C A T T G A G C T C C T C T C T C T T G A A G G A G G A G C T C A A T G T G G C G G G - 3 ' (配列番号 14) を、p S U P E R ベクター (O l i g o E n g i n e) に挿入した。得られたプラスミドを、F u g e n e 6 (R o c h e) を使用して 3 T 3 - L 1 または D U 1 4 5 細胞にトランスフェ

クトした。安定にトランスフェクトしたクローンを確立するために、ネオマイシン誘導体 G 4 1 8 (G i b c o) を濃度 5 0 0 μ g / m L で使用し、安定な形質転換体を確立した。S R E B P - 1 の発現レベルを、ウェスタンブロットによって評価した。脂肪生成試験のために、3 T 3 - L 1 細胞を、1 0 % ウシ胎児血清を含む D M E M を含む 9 6 ウェルプレートに播種し、完全なコンフルエンスまでさらに 2 日間インキュベートした。0 日目に、培地を以下の誘導培地と交換した：1 0 % ウシ胎児血清、5 μ g / m L のインスリン、0 . 5 m M 1 - メチル - 3 - イソブチルキサンチン (M I X) 、および 1 μ M デキサメタゾン (D E X) を含む D M E M 。2 日目に、誘導培地を除去し、1 0 % ウシ胎児血清および 5 μ g / m L のインスリンを含む D M E M 培地と交換した。1 0 日目に、脂肪油滴をオイルレッド O で染色した。細胞成長実験のために、D U 1 4 5 細胞を、密度 2 , 0 0 0 細胞 / ウェルで血清を含まない、あるいは 1 μ g / m L の I G F 1 、2 % 無脂肪ウシ胎児血清、または 2 % ウシ胎児血清を含む M E M を含む 9 6 ウェルプレートに播種した。3 日後、細胞成長を W S T - 1 アッセイによって評価した。実験を三連で行った。

【 0 1 4 0 】

ファスタチン A を使用した動物研究

雄マウス (1 2 9 S v バックグラウンド) を、管理条件下 (1 2 時間の明暗サイクル ; 2 5) で A n i m a l C a r e C e n t e r a t B a y l o r C o l l e g e o f M e d i c i n e に収容し、標準的な実験動物用飼料 (P u r i n a M i l l s) および水を自由に与えた。動物実験を、米国国立衛生研究所によって公開された G u i d e f o r t h e C a r e a n d U s e o f L a b o r a t o r y A n i m a l s (N I H P u b l i c a t i o n N o . 8 5 - 2 3 、 1 9 9 6 改訂) にしたがって行った。ファスタチン A を、2 つの異なるプロトコルを使用して、5 ~ 6 月齢の雄マウス (1 2 9 S v バックグラウンド) に腹腔内投与した (3 0 m g / k g ; 1 5 0 m L) 。第 1 のプロトコルは、マウスの 4 8 時間の絶食、その後のさらに 4 8 時間にわたる無脂肪食の再摂取を含む。この処置により、S R E B P に加えて脂質合成酵素 (A C C および F A S など) の活性およびレベルの両方が誘導される。ファスタチン A または 1 0 % D M S O を含む P B S の対照群 (n = 5) への投与を、絶食の 2 4 時間前に開始し、これを実験終了まで毎日続ける。第 2 のプロトコルでは、2 つの雄マウス群 (n = 5) を、3 0 m g / k g ファスタチン A または 1 0 % D M S O を含む P B S のいずれかで 2 週間毎日処置した。摂食および体重を毎日測定した。実験終了時、マウスを 4 ~ 5 時間の短期にわたって絶食し、血清成分の決定のために採血した。次いで、マウスを屠殺し、その肝臓を迅速に取り出し、液体窒素中で粉碎した。粉末組織を 0 . 1 m M P M S F 、5 m M ベンズアミジン、および 5 m g / m L プロテアーゼインヒビターカクテル (R o c h e) を含む 1 0 m L の P B S 中に懸濁し、P o l y t r o n (3 x 3 0 秒、高速) を使用してホモジナイズし、短時間超音波処理して D N A を破壊した。抽出物を 1 6 , 0 0 0 x g で 2 0 分間の遠心分離によって清澄化した。次いで、サンプルを、市販の F A S および S R E B P - 1 に対する抗体を使用したウェスタンブロット分析に供した。F A S および A C C 活性を、前に記載のように決定した (M a o ら、2 0 0 6) 。

【 0 1 4 1 】

< 実施例 7 >

ファスタチン A は、肥満 O B / O B マウスにおいて脂肪肝を予防し、高血糖を低下させ、体重減少を誘導する

摂食およびエネルギーバランスを調節するネットワークを解明する努力にもかかわらず、どのようにして肥満がこれらの疾患を引き起こすのかについては完全に理解されていない。雄 o b マウスに対するファスタチン A の影響、特に、白色脂肪サイズ、糖尿病状態、および脂肪肝の軽減による体重増加を防止する効果を調査した。前に記載のように、ファスタチン A は、S R E B P - 1 作用の阻害による主な転写調節のインヒビターである。ファスタチン A で処置した正常マウスは体重が減少し、グルコースおよびコレステロールのレベルが低下した。ファスタチン A は、対照と比較して、処置マウスの肝臓中の S R E B P - 1 の活性成熟形態を減少させることも示した。

【0142】

SREBP-1および-2は、脂肪酸およびコレステロールの生合成において関連するが異なる役割を果たす。SREBP-1は脂肪酸合成に必要な遺伝子を優先的に活性化し、SREBP-2はコレステロール生成を促進する。ファスタチンAがSREBP-1およびおそらくSREBP-2の活性化を遮断するので、本発明の特定の実施形態では、ファスタチンAの肥満ob/obマウスへの投与により、脂肪酸およびコレステロールの両方の生合成が一過性に調整され、肥満マウスにおける興味深い表現型が明らかとなる。

【0143】

体重および摂食に対するファスタチンAの影響

本研究は、平均体重が約23g/マウスの4~5週齢の雄ob/obマウスを使用した。ファスタチンA(30mg/kg/日)を毎日腹腔内に送達させ、体重および摂食を測定した。図8Aおよび8Bに示すように、処置したマウスの体重増加は、対照よりも有意に低かった。治療の最初の週の終了時に、DMSOを注射したob対照マウスは平均4.82g/マウス増加したのに対して(23.58±0.62から28.40±1.45への増加)、ファスタチン処置群は約3.37g/マウス増加した(23.08±1.53から26.45±1.2g/マウスへの増加)($P=0.03$)。処置28日後、ファスタチンA処置群は、数週、対照よりも約12%軽かった(ファスタチンについて36.2±2.2g/マウスと比較して32.1±1.4)($P=0.02$)。累積摂食は両群で類似していた(図8C)。平均して、処置群では、摂食は、それぞれ、5.9±1.4g/マウス/日と比較して対照は5.4±1.5であり、有意に異ならなかった。

10

20

【0144】

血中のグルコースおよび脂質プロファイルに対するファスタチンAの影響

ob/obマウスにおける最も特徴的な表現型の1つは、インスリン抵抗性状態の結果としての高血糖である。血糖および脂質に対するファスタチンAの効果を決定するために、グルコース、トリグリセリド、およびコレステロールの血清レベルを、標準的な飼料を与えたob/obマウスで分析した。

【0145】

図9に示すように、一晩の絶食後の処置動物由来の血清中のグルコースレベルは、対照よりも約70%低かった(それぞれ、153.2±30.5および42.9.4±8.7mg/dl($P=0.003$))。処置動物の血清中のグルコースレベルは、機能的ob遺伝子を有するwtマウスに類似するようになったのに対して、DMSOを投与した対照マウスは予想通り高血糖であった。興味深いことに、ケトン体(β-ヒドロキシブチラート)は、対照と比較して処置動物で約7倍に増加した(それぞれ、3.62±1.41および0.5±0.37mg/dl($P=0.004$))。ファスタチンA動物中の高レベルのケトン体は、肝臓中で脂肪酸酸化が有意に増加していることを示し、肝臓中の主な生成物は血中に分泌されるケトン体である。また、処置動物で増加した血液成分は、血清中で測定された非エステル化遊離脂肪酸(NEFA)であり、これは、対照より約70%高かった(1.93±0.26および0.7±0.2meq/l($P=0.028$))。このNEFAレベルの増加は、脂肪酸酸化の要求の増加に起因する脂肪組織由来の脂肪分解の増加に起因し得る。FFAは、動物およびヒトにおけるインスリン抵抗性に関連すること知られている。しかし、ファスタチンA処置ob/obマウスの血清中のFFAレベルの上昇にも関わらず、グルコースレベルは対照より有意に低く、これは、おそらくインスリンシグナル伝達の改善に起因するインスリン感受性の改善を示す。さらに、変異アセチルCoAカルボキシラーゼマウス(Acc2-/-変異マウス)のマウス組織(肝臓、脂肪、および筋肉)中の脂肪酸酸化の増加の結果として、血中のケトン体がより高くなり、脂肪細胞中の脂肪分解増加の結果としてNEFAが増加することが最近示されている。血清中のトリグリセリド(TG)レベルは、対照と比較して処置マウスで約30%増加し(それぞれ、115±11および79±12($P=0.006$))、これは、ファスタチンAが肝臓からのTG分泌および移動を増加させることを示していた。血清総コレステロールレベルは、ファスタチン処置動物でより低い傾向が認められ、21.9±1.8mg/

30

40

50

d l と比較して 1 8 3 ア 1 6 ($P = 0.06$) であった。しかし、約 3 5 % の L D L が有意に減少し (4 8 ア 8 と比較して 3 1 ア 3 ; $P = 0.02$)、約 2 2 % の H D L がより小幅に減少した (1 4 4 ア 1 1 および 1 8 3 ア 1 2 ; $P = 0.02$)。ファスタチン A 処置マウスの血清中の L D L レベルは H D L レベルより多く減少したので、これはファスタチン A での処置の望ましい結果を示す。トリグリセリド、リン脂質、およびコレステロールを輸送し、T G レベルに基づいて算出される V L D L レベルは、約 5 0 % 増加した (1 5 . 8 ア 2 . 4 m g / d l と比較して 2 3 . 1 ア 2 . 3)。

【 0 1 4 6 】

ファスタチン A は精巢上体脂肪サイズを減少させ、脂肪肝を改善する

無制御の摂食のために、o b / o b マウスは病的に肥満になり、過剰レベルの脂肪が脂肪組織および異なる器官に蓄積する (肝臓に起因する非アルコール性脂肪肝およびインスリン抵抗性など) (H o o k m a n a n d B a r k i n , 2 0 0 3)。約 8 ~ 9 週齢の対照処置マウスは、ファスタチン A で処置したマウスと比較して、淡色から明らかなように、肝臓サイズが拡大し、脂肪が蓄積した (図 1 0 A)。ファスタチン A 処置マウスの肝臓の平均重量は、対照より約 3 2 % 軽かった (2 . 3 4 ア 0 . 1 5 と比較して 1 . 5 9 ア 0 . 2 ; $P = 0.06$) (図 1 0 D)。オイルレッドで脂肪滴を染色した対照マウスの肝臓切片が脂肪滴を豊富に含んでいたのに対して、ファスタチン A 処置マウスの肝臓切片は脂肪滴を欠き、これは主にトリグリセリドである (図 1 0 B)。S R E B P - 1 を過剰発現するトランスジェニックマウスが脂肪肝を発症することが示されている (H o r t o n ら、2 0 0 3)。しかし、S R E B P - 1 を欠く o b / o b マウス (l e p o b / o b X S r e b p 1 - / -) では、脂肪肝状態は有意に改善され、S R E B P - 1 が o b / o b マウスにおける脂肪肝発症の主な原因であることが示唆される。

【 0 1 4 7 】

4 週間のファスタチン A 処置後、処置マウスは対照よりも軽かった。主な白色脂肪組織である精巢上体脂肪パッドの試験により、ファスタチン A 処置マウスは有意により小さな脂肪パッドを有していることが見出された (図 1 0 C)。脂肪パッドの平均重量は、対照より約 2 0 % 軽かった (3 . 6 ア 0 . 2 と比較して 2 . 7 ア 0 . 1 ; $P = 0.02$) (図 1 0 D)。より小さな脂肪パッドは、脂質保存の減少および / または脂質合成の減少ならびに脂肪中の脂肪酸酸化の増強に起因し得る。A c c 2 - / - 変異体マウスを使用した以前の研究により、A C C 2 の非存在によっても肝臓中の脂肪が減少し、精巢上体脂肪パッドがより小さくなり、異なる組織 (肝臓が含まれる) 中の脂肪酸酸化が増強されることが示されている。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼにおける A C C 2 産生マロニル C o A による阻害の欠如に起因する脂肪酸酸化の増強により、マウスはインスリン感受性が高くなり、食事誘導性の肥満および糖尿病から防御されることがそこに示された。特定の態様では、ファスタチン A による A C C 酵素の下方制御により、異なる組織 (例えば、肝臓、脂肪、および筋肉など) において脂肪酸酸化が増加し、脂肪酸合成が阻害される。o b / b 対照と比較したファスタチン A 処置 o b / o b マウスの肝臓中の T G レベルおよびコレステロールレベルを決定した。図 1 1 に示すように、処置マウスの肝臓中の T G レベルは約 6 5 % 減少した (それぞれ、1 4 . 8 ア 3 . 7 および 3 8 . 7 ア 6 . 0 m g / g 肝臓 ; $P = 0.0004$)。肝臓中のコレステロールレベルもファスタチン A によって 2 0 % 超減少した (2 . 8 ア 0 . 5 および 3 . 6 ア 0 . 1 ; $P = 0.03$) (図 1 1 の B)。これらの結果はオイルレッド O 染色をさらに確認し、肝臓脂質合成の増加に一部起因する o b / o b マウス中の脂肪肝をファスタチン A での処置によって完全に予防することができることを示す。本発明の特定の態様では、処置 o b / o b マウスの肝臓中のこれらの脂質の減少は、T G およびコレステロールまたはその前駆体の合成に必要な脂質合成酵素の有意な阻害に起因する。さらに、異なるマウス組織 (肝臓が含まれる) による脂肪酸酸化の需要の増加により、肝臓リパーゼ活性が増加し、異なる脂肪酸酸化組織 (心臓および筋肉など) による利用のための肝臓から循環へのこれらの脂質の移動も増強される。特定の態様では、これは、ファスタチン A 処置 o b / o b マウスの血中のより高い T G レベルに関連する。

10

20

30

40

50

【0148】

ファスタチンAはob/bマウス肝臓中の脂質合成酵素を下方制御する。脂質合成経路中の酵素は、転写因子(PPARおよびSREBPなど)によって調節される。処置ob/obマウスにおける脂質合成酵素のレベルおよび活性に対するファスタチンAの効果を試験した。脂肪酸合成の律速段階を行うアセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACC)活性を決定した。ACCは、アセチル-CoAのカルボキシル化を触媒してマロニルCoA(別の多官能酵素(脂肪酸シンターゼ(FAS))によって行われる脂肪酸合成の基礎単位)が得られる。脂肪酸合成におけるマロニルCoAの役割に加えて、これは、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1(CPT1)の阻害による脂肪酸酸化で重要な役割を果たす。脂質合成酵素はob/obマウスで有意に誘導され、これは、これらのマウスの病的な肥満表現型を部分的に説明している。ファスタチンA処置マウスの肝臓抽出物中のACC活性は、約40%減少した(5.55ア0.57nmol/min.mgと比較して3.44ア0.44)(図12A)。脂肪酸シンターゼ活性も、ファスタチンA処置ob/obマウスの肝臓抽出物中で有意に下方制御された。FAS活性は、処置マウスで70%超減少した(22.6ア1.37nmol/min.mgと比較して8.64ア1.91)(図12B)。両酵素についてウェスタンブロット分析で示すように、ACCおよびFAS活性の両方の減少は、両酵素の発現レベルの減少に起因する(図12C)。その生成物である脂肪酸(C14:0およびC16:0)は、非処置対照マウスの肝臓中よりファスタチンA処置ob/obマウスの肝臓中で有意に低下する(約50%)(表2を参照のこと)。

10

20

【0149】

ACCはリン酸化/脱リン酸化機構によって急速に調節され、それにより、それぞれ、酵素を阻害および活性化する。図12Cに示すように、ホスホロ-ACCレベルは対照マウスでより高いが、ACCの発現レベルも同レベルに高いので、これにより、ファスタチンAが特異的リン酸化レベル(P-ACC/ACCタンパク質)を変化させないことが示唆される。これらの結果は、ACC活性の下方制御が酵素レベルの減少のみに起因し、リン酸化状態の減少に起因しないことを示す(図12C-12D)。肝臓中に脂肪の合成および酸化をそれぞれ調節する異なる役割を果たす以下の2つのACCイソ型が存在することが以前に示されていた: ACC1(肝臓中の主なイソ型)およびACC2(筋肉内の主なイソ型)ACC活性およびFAS活性の減少は、ファスタチンA処置マウスの肝臓中で脂質合成が減少するのに対して、脂肪燃焼は有意に増強されることを示し、これは、図9A-9Hに示すように、ob/obファスタチンA処置マウスの血中のケトン体の7倍増加と一致する。SREBP-1の転写調節下にもある脂肪酸代謝における2つの重要な酵素(ATPクエン酸リアーゼ(ACL)およびステロイル-CoAデヒドロゲナーゼ1(SCD1))のレベルを決定した。サイトゾルクエン酸塩をアセチル-CoA(脂肪酸合成のためにマロニルCoAを得るためのACCの基質である)に変換するACLのタンパク質レベルは、ファスタチンAマウスの肝臓抽出物中で約70%減少した。このACLレベルの下方制御は、肝臓などの脂質合成組織での脂質合成過程の減少に対するファスタチンAの効果をさらに増幅する。SCD1は、脂肪アシルCoA(パルミトイル-CoAおよびステアロイル-CoAなど)の9位のシス二重結合の導入による一飽和脂肪酸の生合成の律速段階を触媒する。生成物であるパルミトレオイル-CoA(16:1)およびオレオイル-CoA(18:1)は、トリグリセリドおよびコレステロールエステルの重要な成分であり、マウス(ob/obマウスが含まれる)におけるSCD1の欠失により、代謝率が増加し、脂肪過多症が減少し、脂肪肝が予防され、食事によって誘導された糖尿病を防御した。図12Dに示すように、SCD1のタンパク質レベルは、対照と比較して、ファスタチンA処置マウスの肝臓抽出物で約50%減少した。これを、一不飽和脂肪酸C16:1、C18:1、およびC20:1が約70%の減少ならびにその伸長生成物である(C18:2)N-6、(C18:3)N-6、(C20:2)N-6、および(C20:3)N-6の不飽和化の約50%の減少によって確認した(表2を参照のこと)。本発明の特定の実施形態では、SCD1の減少に対するこの影響は、体

30

40

50

重減少、肝臓中のTGレベルの減少および脂肪肝からの防御における重要な要因である。興味深いことに、FADS1または5デヒドロゲナーゼのタンパク質レベルは、ファトスタチンA処置の結果として変化しなかった。

【0150】

【表2】

表2

OB/OB処置マウスおよびその非処置コントロールマウスの肝臓中の脂肪酸のガスクロマトグラフィ質量分析(GC-MS)分析

脂肪酸	ファトスタチン A μmole/gram 肝臓	対照 μmole/gram 肝臓	比率 処置：対照	P 値
(14:0)	1224.567 ± 508.88	2378.586 ± 329.454	0.51483	0.047781
(16:0)	37143.23 ± 3656.16	85044.75 ± 5716.175	0.436749	0.001619
(18:0)	15067.14 ± 916.48	14129.2 ± 272.7029	1.066383	0.260833
(20:0)	164.3537 ± 22.89	192.9773 ± 16.46977	0.851674	0.059842
(22:0)	116.1305 ± 25.97	91.74762 ± 12.60782	1.26576	0.2499
(24:0)	157.8261 ± 7.02	120.6449 ± 19.37201	1.308188	0.052305
(16:1)	11429.29 ± 227.5	34787.26 ± 4482.311	0.328548	0.005542
(18:1)	44471.72 ± 8840.37	152218.4 ± 12872.57	0.292157	0.001621
(20:1)	593.7212 ± 119.68	1829.537 ± 230.8927	0.32452	0.00368
(22:1)	94.94588 ± 14.91	109.0117 ± 11.47413	0.870969	0.379216
(24:1)	397.92 ± 216.3	234.2073 ± 26.9417	1.699008	0.214302
(18:2)N-6	29673.93 ± 2456.22	46513.4 ± 2825.032	0.637965	0.00455
(18:3)N-6	237.1671 ± 40.5	560.4358 ± 61.89641	0.423183	0.00546
(20:2)N-6	426.6694 ± 63.52	914.0388 ± 90.59441	0.466796	0.001424
(20:3)N-6	1630.394 ± 193.18	2589.236 ± 154.791	0.629682	0.008568
(20:4)N-6	8747.289 ± 781.41	7772.095 ± 110.7878	1.125474	0.171108
(22:4)N-6	280.2708 ± 46.1	292.2569 ± 11.81504	0.958988	0.810355
(22:5)N-6	172.9715 ± 64.89	146.5646 ± 14.54166	1.180173	0.879433
(18:3)N-3	4416.975 ± 643.658	3625.879 ± 220.5747	1.21818	0.703923
(20:5)N-3	2145.643 ± 265.17	3067.856 ± 299.7701	0.699395	0.04467
(22:5)N-3	1720.424 ± 221.16	2338.451 ± 234.2185	0.735711	0.092988
(22:6)N-3	9223.38 ± 700.31	8718.014 ± 532.5817	1.057968	0.448218

5

【0151】

肝臓サンプル(100mg)をファトスタチンA処置ob/obマウスおよび非処置対照マウスから得て、脂肪酸含有量について分析するまで-80℃で保存した。脂肪酸を、Folchのプロトコールにしたがって抽出し、ガスクロマトグラフィ質量分析(GC-MSM)を使用して定量的に分析した。上記表に示すように、C14:0およびC16:0(デノボ脂肪酸合成の生成物)が約50%減少し、一不飽和脂肪酸C16:1、C18:1、およびC20:1ならびにその伸長脱飽和生成物(C18:2)N-6、(C18:3)N-6、(C20:2)N-6、(C20:3)N-6、および(C20:5)N-3が約70%減少する。ミリスタート(C14:0)およびパルミタート(C16:0)(FASの生成物)は、約50%減少した(P<0.05)。C18レベルは変化しなかった。このC18レベルは、FASによるデノボ脂肪酸合成だけでなく、食物および鎖伸長系にも由来する。興味深いことに、C20:0が約15%低下し(P=0.059)、C24:0が30%増加する(P=0.05)傾向が強かった。長鎖飽和脂肪酸の有意

10

20

30

40

50

な減少と並行して、結果は、一不飽和脂肪酸 C 16 : 1、C 18 : 1、および C 20 : 1 のレベルを約 70 % 有意に減少させたことを示す ($P < 0.004$)。また、多価不飽和長鎖脂肪酸 (18 : 2) N - 6、(18 : 3) N - 6、(20 : 2) N - 6、(20 : 3) N - 6、および (20 : 5) N - 3 のレベルが 30 ~ 60 % 低下した。これらの減少は、転写および翻訳での脂質合成経路中の重要な酵素 (FAS、ACC および SCD、ACL) の下方制御の結果である。これらの結果は、肝臓中で作製されたトリグリセリドレベルの減少による脂肪肝状態の改善におけるファスタチン A の効果を説明するための一助となる。

【0152】

脂質合成酵素の mRNA レベルの下方制御

タンパク質レベルの減少は、転写および翻訳の調節に起因し得る。リアルタイム PCR を使用して、脂質合成転写因子 PPAR に加えて、代表的な脂質合成遺伝子である ACC1、FAS、および SCD1 の mRNA レベルを決定した。ACC1、FAS、および SCD1 の mRNA レベルが約 80 % 減少した (図 13)。これらの結果は、より低い酵素のタンパク質レベルおよび活性レベルと一致し、SREBP-1 の成熟の阻害によってファスタチン A が脂質合成を低下させることを強く示す。脂質合成酵素の下方制御は、特定の実施形態では、その主な転写因子である PPAR の 1 つを含む。この転写因子の mRNA レベルは、ファスタチン A 処置マウスの抽出物中で約 40 % 減少した (図 13)。ファスタチン A で処置した ob / ob マウスの高血糖が減少し、脂肪肝が予防されるので、これは、特定の態様では、肝臓中の PPAR がこれらの病的状態に影響を及ぼし得るいくつかの要因のうちの 1 つであることを示す。まとめると、SREBP-1 に対するその作用を介したファスタチン A は、処置 ob / ob マウスにおいて肝臓 TG 貯蔵の減少によって脂肪肝を改善し、脂肪過多症を軽減し、高血糖を低下させた。これらの研究は、ファスタチン A およびその類似体が、例えば、肥満、脂肪肝、および糖尿病に対する有用な薬剤であることを示す。

【0153】

4 ~ 5 週齢のホモ接合体雄肥満 (ob / ob) マウス (C57BL / 6J、The Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME) を、管理条件下 (12 時間の明暗サイクル; 25 °C) で Animal Care Center at Baylor College of Medicine に収容した。動物実験を、米国立衛生研究所によって公開された Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23、1996 改訂) にしたがって行った。1 ケージあたり 5 匹の動物を収容し、標準的な実験動物用飼料 (Purina Mills、Richmond IN) および水を到着後 1 週間自由に与えた。実験第 1 日目およびその後毎日、マウスの体重および飼料の消費量を測定した。マウスおよび飼料の残量を、ファスタチン A (30 mg / kg; 150 mL) 注射前の午後 3 時 ~ 5 時に毎日測定した。ファスタチン A または 10 % DMSO を含む PBS の対照群 ($n = 5$) への投与を、研究終了まで、4 週間にわたって毎日継続した。

【0154】

ファスタチン A マウスへの 28 日間にわたる毎日の注射の 28 日後に、マウスを一晩絶食させ、採血し、全血糖および β -ヒドロキシブチラートを、Glucometer Precision Xtra (Abbott) を使用して測定した。血清成分の決定のために、Comparative Pathology Laboratory (Baylor College of Medicine) によってグルコース、トリグリセリド、およびコレステロールの測定を行った。血清非エステル化脂肪酸 (NEFA) を、NEFA キット (Wako Chemicals、Richmond、VA) の使用によって測定した。

【0155】

マウスを屠殺し、肝臓および精巣上体脂肪パッドを秤量した。以前に記載のように、各

動物由来の肝臓スライスの凍結切片を、オイルレッドOで染色して、肝臓スライス中の脂肪滴(TG)を視覚化した(Abu-Elheigaら、2001)。残りの肝臓組織を、液体窒素中で凍結し、さらなる分析のために-80℃に保持した。肝臓トリグリセリドおよびコレステロール含有量を、参考文献(Chandlerら、2003)に記載のように、96ウェルプレート形式での比色分析に適合したコレステロールキット(Wako)およびInfinityトリグリセリドキット(Thermo Electron、Melbourne、Australia)を使用して測定した。

【0156】

酵素活性およびウェスタンブロット分析

凍結肝臓の一部を、液体窒素中で粉砕した。粉末組織を、0.1mM PMSF、5mMベンズアミジン、および5mg/mLプロテアーゼインヒビターカクテル(Roche)を含む10mLのPBS中に懸濁し、Polytron(3x30秒、高速)を使用してホモジナイズし、短時間超音波処理してDNAを破壊した。抽出物を16,000xgで20分間の遠心分離によって清澄化した。上清中のタンパク質濃度を決定し、以下の酵素に対する市販の抗体を使用したウェスタンブロット分析に供した:FAS(BD Biosciences)、クエン酸リアーゼSCD1、FADS1、ACC、およびホスホ-AACC抗体。タンパク質を、Amersham ECL Plus(商標)ウェスタンブロット検出試薬を使用して視覚化した。目的のタンパク質の特異的バンドの強度をスキャンし、定量のために、 α -アクチンに対して正規化した。肝臓抽出物由来のFAS活性およびACC活性を、以前に記載のように決定した(Maoら、2006)。

【0157】

定量的リアルタイムPCR

TRIzol試薬(Invitrogen)を使用して、マウス組織から総RNAを調製した。5匹のマウス由来の等量のRNAをプールし、DNアーゼI(Turbo DNA-free、Ambion, Inc.)で処理した。Superscript II RNアーゼH-逆転写酵素(Invitrogen)を使用したランダムな6マーのプライマーによって、第1のcDNA鎖を2 μ gのDNアーゼI処理総RNAから合成した。リアルタイムPCRは、最終体積20 μ Lで、10ngの逆転写総RNA、0.5 μ Mの順方向プライマーおよび逆方向プライマー、ならびに10 μ LのDyNAmo HS SYBR Green qPCRキット(Finnzymes)の2ラマスターミックスを含んでいた。DNA Engine Opticon System(MJ Research, Inc)を使用して、96ウェルプレートでPCRを行った。全反応を三連で行い、mRNAの相対量を、比較C(t)法を使用して計算した。サイクル閾値C(t)を、Opticon Monitor software 2.02(MJ Research)を使用して計算した。マウス α -アクチンのmRNAを内部対照として使用した。データを、平均 \pm SDとして示す。2群間の相違を、対応のない両側(unpaired two-tailed)スチューデントt検定を使用して評価した。

【0158】

<実施例8>

ファスタチンAおよびその類似体または誘導体の標的分子の同定 本発明のある態様では、ファスタチンAまたはその類似体または誘導体の1つまたは複数の標的を同定する。かかる同定のために任意の適切な方法を使用することができるにも関わらず、特定の実施形態では、ファスタチンAまたはその類似体または誘導体を標識する。例示的な標識には、例えば、ビオチンが含まれる。

【0159】

<実施例9>

例示的な化合物およびその修飾

図14は、本発明の例示的化合物を示し、その与えられた名称を表3に示す。図15~17は、図2のAと同一の方法による20 μ Mのこれらの例示的化合物についての例示的ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを示す。以前に記載のように脂肪生成アッセイ

を行った（Choiら、2003）。細胞中の油滴形成を完全に阻害した類似体を、脂肪生成阻害類似体と記録した。

【0160】

【表 3 - 1】

表 3:本発明の例示的化合物

名称	エン トリ ー	Luc/Gal	STDEV	脂肪生成の阻 害
	なし	9.4426	1.0577	
2-プロピル-4-(4-p-トリルチアゾール-2-イル) ピリジン	1	6.2297	1.1014	+
4-(4-(4-ブromoフェニル) チアゾール-2-イル) -2-プロピルピリジン	2	4.5130	0.6176	-
4-(4-フェニルチアゾール-2-イル) -2-プロピルピリジン	3	7.4643	2.2215	-
4-(4-(4-クロロフェニル) チアゾール-2-イル) -2-プロピルピリジン	4	6.3808	2.0425	-
4-(4-(4-エチルフェニル) チアゾール-2-イル) ピリジン	5	7.6190	1.6221	-
4-(4-p-トリルチアゾール-2-イル) ピリジン	6	13.4689	1.6735	-
4-(4-(4-メトキシフェニル) チアゾール-2-イル) ピリジン	7	18.3174	2.9172	-
4-(2-(2-プロピルピリジン-4-イル) チアゾール-4-イル) フェニルベンゾエート	8	7.7585	1.6193	+
4-(2-(2-プロピルピリジン-4-イル) チアゾール-4-イル) フェノール	9	14.5234	2.7276	+
メチル 2-(4-(2-(2-プロピルピリジン-4-イル) チアゾール-4-イル) フェノキシ) アセテート	10	10.7717	0.8662	-
4-(4-クロロフェニル) -2-(3,4-ジメトキシフェニル) チアゾール	12	5.9214	1.2693	-
4-(4-(3,4-ジクロロフェニル) チアゾール-2-イル) -2-プロピルピリジン	13	5.2391	0.4021	-
4-(4-(4-フルオロフェニル) チアゾール-2-イル) -2-プロピルピリジン	14	9.6605	0.9824	-
4-(4-(2,4-ジフルオロフェニル) チアゾール-2-イル) -2-プロピルピリジン	15	10.8383	1.7661	-
4-(2-(2-プロピルピリジン-4-イル) チアゾール-4-イル) ベンゼンアミン	16	10.3338	2.0763	+
N-イソプロピル-4-(2-(2-プロピルピリジン-4-イル) チアゾール-4-イル) ベンゼンアミン	17	4.7079	1.2781	+
N-(4-(2-(2-プロピルピリジン-4-イル) チアゾール-4-イル) フェニル) アセトアミド	18	11.7685	6.8358	+
	None	15.0759	0.8305	
2-プロピル-4-(4-p-トリルチアゾール-2-イル) ピリジン	1	7.5537	0.9784	+
N-(4-(2-(2-プロピルピリジン-4-イル) チアゾール-4-イル) フェニル) メタンスルホンアミド	19	4.1981	0.4653	+

10

20

30

40

【表 3 - 2】

N-ベンジル-4- (2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-4-イル) ベンゼンアミン	20	5.6748	0.0613	+
N- (シクロプロピルメチル) -4- (2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-4-イル) ベンゼンアミン	21	6.4378	1.2736	+
4- (4-プロモフェニル) -2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-5-カルボン酸	22	21.5911	0.8383	-
4- (4-プロモフェニル) -2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-5-カルボンキシラート	23	8.1137	2.5369	+
4- (4- (4-メトキシフェニル) チアゾール-2-イル) -2- プロピルピリジン	24	11.0367	2.1112	-
4- (4- (3-メトキシフェニル) チアゾール-2-イル) -2- プロピルピリジン	25	7.8536	1.2799	-
4- (4- (2-メトキシフェニル) チアゾール-2-イル) -2- プロピルピリジン				
2-フェニル 4-P-トリチアゾール	26	8.3046	2.6780	+
2-フェニル 4-P-トリチアゾール	27	13.8222	1.3938	-
3- (2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-4-イル) フェノール	28	12.7791	1.1429	-
2- (2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-4-イル) フェノール	29	8.2379	1.9501	-
4- (4-プロモフェニル) -N-イソプロピル-2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-5-カルボキサミド	30	16.0226	2.1917	-
4- (4- (4-クロロフェニル) チアゾール-2-イル) ピリジン	31	16.9971	2.6512	-
4- (4- (4-クロロフェニル) チアゾール-2-イル) -2-エチルピリジン	32	9.5798	0.8524	-
4- (4-クロロフェニル) -2-フェニル	33	17.8175	3.7158	-
2-プロピル-4- (4- (チオフェン-2-イル) チアゾール-2-イル) ピリジン	34	12.1593	1.5587	+
2-フェニル 4-P-トリチアゾール	27	13.8222	1.3938	-
	None	18	2	
2-プロピル-4- (4-P-トリチアゾール -2-イル) ピリジン	1	9.413845	0.840651	+
4- (4'-メチル[1,1'-ビフェニル] -4-イル) -2-プロピル) ピリジン	35	11.35866	0.881475	+
2- (2- プロピルピリジン -4-イル) -4-P-トリチアゾール -5-カルボンキシラート	36	18.98889	2.082093	
2-エチル-4- (4-P-トリチアゾール -2-イル) ピリジン	37	9.869906	0.71108	
4-フェニル-2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-5-カルボンキシラート	38	22.65811	3.898667	
メチル 2- (2- プロピルピリジン -4-イル) -4-P-トリチアゾール -5-カルボンキシラート	39	14.92978	2.600443	
	None	8.2181	0.5097	

10

20

30

40

【表 3 - 3】

2-プロピル-4- (4-P-トリチアゾール -2-イル) ピリジン	1	3.4437	0.2720	
tert-ブチル 4- (2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-4-イル) フェニルカルバメート	40	2.4390	0.4730	
N-シクロヘキシル-4- (2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-4-イル) ベンゼンアミン	41	6.5229	0.8638	
4- (2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-4-イル) -N- トシルベンゼンアミン	42	3.3957	0.3619	
N- (4- (2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-4-イル) フェニル) -8- キノリンスルホンアミド	43	2.8506	0.6396	
N- (4- (2- (2- プロピルピリジン -4-イル) チアゾール-4-イル) フェニル) -2-チオフェンスルホンアミド	44	1.8538	0.1240	

10

【 0 1 6 3 】

20

【表 4 - 1】

表 4

名称	化合物
4- (4-ブロモフェニル) -2- (ピロリジン-2-イル) チアゾール	45
4- (4-ブロモフェニル) -2- (1- プロピルピロリジン -2-イル) チアゾール	46
<i>tert</i> -ブチル 2- (4- (4-ブロモフェニル) チアゾール-2-イル) ピロリジン-1-カルボンキシラート	47
ベンジル 2- (4- (4-ブロモフェニル) チアゾール-2-イル) ピロリジン-1-カルボンキシラート	48
3- (4- (4-ブロモフェニル) チアゾール-2-イル) -1-プロピルピペリジン	49
<i>tert</i> -ブチル 3- (4- (4-ブロモフェニル) チアゾール-2-イル) ピペリジン-1-カルボンキシラート	50
ベンジル 3- (4- (4-ブロモフェニル) チアゾール-2-イル) ピペリジン-1-カルボンキシラート	51
ベンジル 4- (4- (4-ブロモフェニル) チアゾール-2-イル) ピペリジン-1-カルボンキシラート	52
ベンジル (R) -2- (4- (4- (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール-2-イル) ピロリジン-1-カルボンキシラート	53
ベンジル、3- (4- (4- (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール-2-イル) ピペリジン-1-カルボンキシラート	54
ベンジル 4- (4- (4- (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール-2-イル) ピペリジン-1-カルボンキシラート	55
4- (3- (ピリジン-2-イル) - [1,2,4]トリアゾロ[4,3-b]ピリダジン-6-イル) -N- トシルベンゼンアミン	56
3-クロロ-4-メチル-N- (6- (4- (3- (トリフルオロメチル) ベンジル) ピペラジン-1-イル) ピリジン-3-イル) ベンゼンスルホンアミド	57
(4- (5-クロロ-2-メチルフェニル) ピペラジン-1-イル) (4- (トシルアミノ) フェニル) メタノン	58
4- (4- ((1-メチル-1H-ベンゾ[d]イミダゾール-2-イル) メチル) ピペラジン-1-イル) -N- トシルベンゼンアミン	59
4-クロロ-N- (4- (4- ((1-メチル-1H-ベンゾ[d]イミダゾール-2-イル) メチル) ピペラジン-1-イル) フェニル) ベンゼンスルホンアミド	60
(Z) -4- (3-シアノ-3- (4- (2,4-ジメチルフェニル) チアゾール-2-イル) アリル) -N- (チアゾール-2-イル) ベンゼンスルホンアミド	61
N- (3- (H- イミダゾ[1,2-a]ピリジン-2-イル) フェニル) -4-メチル-2-フェニルチアゾール-5-カルボキサミド	62
N- (3- (ベンゾ[d]チアゾール-2-イル) フェニル) イソニコチンアミド	63
3- (4-クロロフェニル) -4,5-ジヒドロ-1-フェニル-5- (2- フェニルチアゾール -4-イル) -1H-ピラゾール	64
N- (4- (6-メチルベンゾ[d]チアゾール-2-イル) フェニル) -2- (N-M-トリルメチルスルホンアミド) アセトアミド	65
N N- (4- (6-メチルベンゾ[d]チアゾール-2-イル) フェニル) -2- (N-P-トリルメチルスルホンアミド) アセトアミド	66

【 0 1 6 4 】

さらに、当業者は、他の適切な化合物の同定を補助するために例示的な化合物の 1 つまたは複数の態様を修飾することが適切かもしれないと認識する。例えば、 1 つまたは複数

10

20

30

40

50

の代謝障害の治療および／または予防のための特定の化合物の適合性の決定の際、化合物を、同一または異なる代謝障害のために使用される他の関連化合物が同定されるように修飾することができる。特定の実施形態では、本明細書中に記載の例示的な化学基にしたがってかかる変更を行うことができる。

【0165】

<実施例10>

SREBP活性化の阻害による脂肪合成の遮断

細胞中の脂肪枯渇の際、ステロール調節エレメント結合タンパク質(SREBP)が膜からタンパク質分解的に放出され、核に転位し、ここで、コレステロールおよび脂肪酸の生合成に關与する遺伝子の転写を活性化する。本発明では、脂肪生成を遮断する合成小分子がSREBP活性化の選択的インヒビターであることを示す。現在はファスタチンと呼ばれるジアリールチアゾール誘導体はSREBPのタンパク質分解活性を妨害し、それにより、細胞中の脂質合成遺伝子の転写が減少する。ファスタチンの分子標的は、SREBP切断活性化タンパク質(SCAP)のようである。ファスタチンは、摂食の制御下でさえも、肥満ob/obマウスにおける体重、血糖、および肝臓脂肪蓄積の増加を遮断した。

10

【0166】

本明細書中で使用する場合、ファスタチンは、3T3-L1細胞のインスリン誘導性脂肪生成およびDU145細胞の血清非依存性成長を阻害する(Choiら、2003)。薬物処理細胞および非処理細胞の遺伝子発現プロファイルを比較して、ファスタチンによって影響を受ける特異的分子経路についての情報を得た。DU145細胞を、ファスタチンまたはDMSOのみで処理し、抽出mRNAサンプルを、33、000遺伝子をマッピングするAffymetrix DNAマイクロアレイによって分析した。これらの遺伝子(これらの遺伝子は全て、ワールドワイドウェブ上のNational Center for Biotechnology InformationのGenBankデータベースで利用可能であり、その全てが本明細書中で参照として引用される)のうち、63遺伝子の転写レベルが、ファスタチン処理に応答して少なくとも35%減少した(表5)。影響を受けた遺伝子のうちの34個は、脂肪合成またはステロール合成に直接関連し(生合成酵素をコードする遺伝子など)、影響を受けた遺伝子のうちの18個は、SREBPによって調節されることが報告されている(Hortonら、2003)。影響を受けたSREBP応答性遺伝子の下方制御を、RT-PCR実験によって確認した(図18BおよびC)。下方制御された遺伝子のリスト中に公知のSREBP応答性遺伝子および脂肪/コレステロール生合成遺伝子が多数出現することは、ファスタチンがSREBP経路に直接または間接的に作用することを意味する。

20

30

【0167】

【表 5 - 1】

表 5

P	D	0.707107	Hs.17414	NM_00109	ATP クエン酸リアーゼ/FL=gb:NM_001096.1
P	D	0.707107	Hs.11223	NM_00589	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1 (NADP+), 可溶性/FL=gb:AF020038.1 gb:AF113917
P	D	0.707107	Hs.268012	D89053.1	脂肪酸補酵素 A リガーゼ、長鎖 3 / FL =gb:NM_004457.2 gbz:D89053.1 gb:AF116690.1
P	D	0.707107	Hs.155976	AI670819	カリン 4B/FL=gb:NM_003588.1 gb:AB014595.1
P	D	0.707107	Hs.41693	BG252490	DNAJ (HSP40) ホモログ、サブファミリー B、メンバー 4/FL=gb:U40992.2 gb:NM_007034.2
P	D	0.707107	Hs.14732	AL049699	リンゴ酸酵素 1、NADP (+) - 依存、サイトゾル//FL=gb:NM_002395.2
P	D	0.707107	Hs.213289	S70123.1	低密度リポタンパク質受容体 (家族性高コレステロール血症)
P	D	0.707107	Hs.6986	AL565516	ヒト偽グルコーストランスポーター
P	D	0.659754	Hs.75616	NM_014676	seladin-1/FL=gb:AF261758.1 gb:BC004375.1 gb:NM_014762.1
P	D	0.659754	Hs.77393	NM_00200	ファルネシルニリン酸合成酵素 (ファルネシルピロリン酸合成酵素、ジメチルアリル-トランストランスフェラーゼ、ゲラニルトランストランスフェラーゼ)
P	D	0.659754	Hs.132898	NM_00593	脂肪酸デサチュラーゼ 1
P	D	0.659754	Hs.274398	BC002654	Homo sapiens, チューブリン、beta4 に似た、クローン MGC:4083, mRNA, complete cds
P	D	0.659754		BC005838	Homo sapiens, チューブリン、beta5
P	D	0.659754	Hs.115285	BF978872	ジヒドロ S-アセチルトランスフェラーゼ (ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の E2 成分)
P	D	0.659754	Hs.159154	AL565749	チューブリン、ベータ 4
P	D	0.659754	Hs.179817	AF167438	Homo sapiens アンドロゲン調節短鎖デヒドロゲナーゼレダクターゼ 1 (ARSDR1)
P	D	0.615572	Hs.213289	NM_00052	低密度リポタンパク質受容体 (家族性高コレステロール血症) /FL=gb:NM_000527.2
P	D	0.615572	Hs.75105	NM_00657	エモパミル結合タンパク質 (ステロールイソメラーゼ) /FL=gb:NM_006579.1
P	D	0.615572	Hs.74304	NM_00270	Homo sapiens 髄膜腫(PPL)
A	D	0.615572	Hs.268515	NM_00243	髄膜腫 (平衡転座において破壊) 1/FL=gb:D63807.1
P	D	0.615572	UG=Hs.31	AF096304	Homo sapiens 推定されるステロールリダクタンスの SR-1 (TM7SF2) 膜貫通 7 スーパーファミリー 2 2/FL=gb:AF096304.1
P	D	0.615572	Hs.93199	D63807.1	I ラノステロール合成酵素 (2,3-オキシスクアレン - ラノステロールシクラーゼ) =gb:D63807.1
P	D	0.574349	Hs.119597	AB032261	ステアロイル CoA デサチュラーゼ (デルタ-9 デサチュラーゼ) /FL=gb:AF097514.1

10

20

30

40

【表 5 - 2】

					gb:NM_005063 gbL/ab932261.1	
P	D	0.574349	Hs.174140	AI971281	ATP クエン酸リアーゼ/FL=gb:NM_001096.1	
P	D	0.574349	Hs.171825	NM_00367	ラス B を含む基本 helix - ループ - ヘリックス ドメイン, 2/FL=gb:AB004066.1 gb:NM_003670.1	
P	D	0.574349	Hs.79103	AW235051	シトクロム b5 ミトコンドリア外膜前駆体 /FL=gb:BC004373.1 gb:NM_030579.1	
P	D	0.574349	Hs.11806	NM_00136	デヒドロコレステロール還元酵素 //FL=gb:BC000054.1 gb:AF034544.1 gb:AF067127.1 gb:AF096305 gb:NM_001360.1	10
P	D	0.574349	Hs.3838	NM_00662	血清誘導性キナーゼ/FL=gb:AF059617.1 gb:NM_006622.1 gb:AF223574.1	
P	D	0.574349	Hs.213289	AI861942	I 低密度リポタンパク質受容体 (家族性高コレ ステロール血症) /FL=gb:NM_000527.2	
P	D	0.574349	Hs.92199	AW084510	ラノステロール合成酵素 (2,3-オキシドスクア レン - ラノステロールシクラーゼ) /FL=gb:NM_002340.1 gb:NM_U22526.1	
P	D	0.574349	Hs.5920	NM_00547	UDP-N-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼ -N-アセチルマンノサミンキナーゼ	20
P	D	0.574349	Hs.1524	NM_00381	腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリ ー、メンバー9/FL=gb:NM_003811.1 gb:U03308.1	
P	D	0.574349	Hs.278544	BC000408	アセチルコエンザイムアセチルトランスフェ ラーゼ 2 (アセトアセチルコエンザイム A チ オラーゼ) /FL=gb: BC000408.1	
P	D	0.574349	Hs.174140	U18197.1	ATP クエン酸リアーゼ /FL=gb:U18197.1	
P	D	0.574349	Hs.7232	B3855983	アセチルコエンザイム A カルボキシラーゼア ルファ /FL=gb:NM_000664.1 gb:U19822.1	30
P	D	0.535887	Hs.226213	NM_00078	チトクローム P450、51 (ラノステロール 14 アルファジメチラーゼ) /FL=gb:U23042.1 gb:NM_000786 gb:D55653.1	
A	D	0.535887	Hs.268490	NM_00047	核内受容体サブファミリーO、グループ B、メ ンバー1 /FL=gb:NM_000475.2	
P	D	0.535887	Hs.48876	:AA872727	ファルネシルニリン酸ファルネシルトランス フェラーゼ/FL=gb:L06070.1 gb:L06105.1 gb:NM_004462.1	
P	D	0.535887	Hs.65270	NM_00603	リパーゼ、内皮/FL=gb:AF118767.1 gb:NM_006033.1	40
		0.535887	Hs.14779	AK000162	アセチル CoA 合成酵素	
		0.535887	Hs.44499	U59479.1	ピニン、デスモソーム関連タンパク質/DEF= ヒト好中球タンパク質 mRNA, 部分 cds	
P	D	0.5	Hs.154654	AU144855	チトクローム P450、サブファミリーI (ダイオ キシシン誘導性)、ポリペプチド 1 (緑内障 3、 一次乳児)	
P	D	0.5	Hs.11899	AL518627	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイ ム /FL=gb:M11058.1 gb:NM_000859.1	

【表 5 - 3】

		0.5	Hs.2178	NM_00352	H2B ヒストンファミリー、メンバー Q/FL=gb: NM_003528.1	
P	D	0.5	Hs.130607	NM_00043	<u>メバロン酸キナーゼ (メバロン酸尿症)</u> <u>/FL=gb:M88468.1 gbz:NM_000431.1</u>	
P	D	0.5	Hs.284244	NM_00200	線維芽細胞増殖因子 2 (基本) /FL=gb: M27968.1gb:NM_002006.1	
P	D	0.5	Hs.71465	AF098865	<u>スクアレンエポキシダーゼ/FL=gb:D78130.1</u> <u>gb:AF098865.1 gb:NM_003129.2</u>	10
P	D	0.5	Hs.288031	D85181.1	ステロール-C5-デサチュラーゼ (真菌 ERG3 、 デルタ-5-デサチュラーゼ) 様 /FL=gb:D85181.1	
A	D	0.5		L32662.1	プロスタグランジン E2 受容体/DB_XREF=gi: 484163/FL=gb:L32662.1	
P	D	0.5	Hs.81412	D80010.1	リピン 1	
P	D	0.466517	Hs.11899	NM_00085	<u>3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイム</u> <u>/FL=gb:M11058.1 gb:NM_000859.1</u>	
P	D	0.466517	Hs.79440	NM_00654	IGF-II の mRNA 結合タンパク質 3/FL=gb: U07188.1 gb:U76705.1 gb:AF117108.1 gb:NM_006547.1	20
P	D	0.466517	Hs.75318	AL575074	チューブリン、アルファ 1 (精巣特異的)	
P	D	0.466517	Hs.226213	U40053	<u>チトクローム P450、51 (ラノステロール 14</u> <u>アルファデメチラーゼ)</u>	
P	D	0.466517	Hs.187579	NM_01637	ヒドロキシ (17-β) デヒドロゲナーゼ 7 /FL=gb:AF098786.2 gb:NM_016371.1	
P	D	0.466517	Hs.76038	BC005247	イソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼ /FL=gb:BC005247.1	
P	D	0.466517	Hs.57698	BC000245	NAD (P) 依存ステロイドデヒドロゲナーゼ 様; H105e3; H105e3/FL=gb:BC000245.1 gb:U4710 gb:NM_015922.1	30
P	D	0.353553	Hs.77910	NM_00213	<u>3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイム</u> <u>シンターゼ 1 (可溶性)</u> <u>/FL=gb:BC000297.1 gb:L25798.1</u> <u>gb:NM_015922.1</u>	
P	D	0.329877	Hs.56205	BE300521	<u>インスリン誘導遺伝子 1/FL=gb:NM_005542.1</u>	
P	D	0.329877	Hs.154654	NM_00010	チトクローム P450、サブファミリー I (ダイオキシン誘導性)、ポリペプチド 1 (緑内障 3、プライマリ乳児) /FL=gb:NM_000104.2 gb:U0	
P	D	0.329877	Hs.3828	AI189359	<u>メバロン酸 (ニリン酸) デカルボキシラーゼ</u> <u>/FL=gb:U49260.1 gb:CB000011.1</u> <u>gb:NM_002461.1</u>	40

【 0 1 7 0 】

ファスタチンが S R E B P 機能を妨害することを確認するために、C H O - K 1 細胞中の内因性 S R E B P が S R E B P 応答性レポーター遺伝子の転写を活性化する能力を、ファスタチンの存在下または非存在下で測定した (図 1 8 A)。ファスタチンはレポーター遺伝子の活性化を減少させ、ここでルシフェラーゼ発現がステロール調節エレメントによって調節される。外因的に発現された S R E B P - 1 の成熟形態 (アミノ酸 1 ~ 4 3 6) がレポーター遺伝子を活性化する能力に対するファスタチンの影響が制限され (図 1 8 B)、ファスタチンが S R E B P の活性化過程を妨害することが示された。

【0171】

ファトスタチンがER - ゴルジ転位およびSREBPのタンパク質分解性プロセッシングに影響を及ぼすかどうかを決定するために、本発明者らは、Sakaiら(1998)によって開発されたレポーターアッセイを使用した。もしゴルジの中のS1Pがそれを開裂せず、培地へ分泌しなければ、トランスフェクトされたCHO - K1細胞のPLAP - BP2は膜結合型のままである。本アッセイでは、NH2末端DNA結合ドメイン(PLAP - BP2513 - 1141)を欠くSREBP - 2フラグメントと融合した分泌アルカリホスファターゼは、蛍光ホスファターゼ基質の蛍光の変化によって転位およびプロセッシングをモニタリング可能である(図18C)。細胞をPLAP - BP2513 - 1141およびSCAPをコードするプラスミドで同時トランスフェクトした場合、PLAPホスファターゼが分泌され、蛍光シグナルが生成された。ファトスタチンまたはステロールの添加によって、分泌が同様に減少した(図18C)。SREBP活性化のファトスタチン媒介性阻害を、SREBPのウェスタンブロット分析によって確認した。ファトスタチンでのCHO - K1細胞の処理により、SREBP - 2の68KDa成熟形態の量が減少し、125KDa前駆体形態の量が増加した(図18D)。SREBP - 1について類似の結果が得られた(図22)。これらの結果を、集合的に、ファトスタチンがSREBPの両イソ型の活性化過程を遮断すると示す。

10

【0172】

本発明者らは、ファトスタチンがゴルジ装置中でのSREBPのタンパク質分解的切断またはSCAP/SREBP複合体のER - ゴルジ間転位のいずれかを妨害すると見なした。プレフェルジンA(ERからゴルジへのタンパク質の順行性移動を遮断する天然生成物)は、SREBPをステロール非応答性にし、ゴルジからERへのS1Pの再配置によってER中にSREBPを構成性にプロセッシングさせることが公知である(DeBosse - Boydら、1999)。プレフェルジンAの存在下で、ファトスタチンは、SREBPプロセッシングに影響を及ぼさず(図19のA)、ファトスタチンがタンパク質分解自体を遮断しないと示唆された。

20

【0173】

ファトスタチンがSCAP/SREBP複合体のER - ゴルジ間転位を遮断するかどうかを決定するために、本発明者らは、ゴルジ装置中のSCAPのN結合グリコシル化の範囲を分析した。SCAPは、トリプシンによって蛋白質分解から防御され、抗SCAP IgG9D5を認識する糖鎖形成した管腔のループを含んでいる。SCAPがERに存在する場合、ループ中の2つのオリゴサッカライドはエンドグリコシダーゼHに敏感である。ゴルジにSCAPを輸送するとともに、その糖はエンドグリコシダーゼHによる消化に強くなる。転位したSCAPはグリコシル化レベルが高く、ER結合SCAPよりもエンドグリコシダーゼH耐性が高い。ステロールは、ER - ゴルジ転位の阻害によってSCAPがエンドグリコシダーゼH耐性を示すようになるのを防ぐ(図19のB)(Nohrturfftら、1998)。細胞をファトスタチンまたはステロールの存在下または非存在下で成長させ、膜機能を、トリプシンおよびエンドグリコシダーゼHを使用して連続的に処理した。ファトスタチンおよびステロールを使用せずに成長した細胞では、SCAPのトリプシンフラグメントはエンドグリコシダーゼHに対してより高い耐性を示し、1つまたは2つの糖鎖を有していた(図19のB、レーン1)。細胞をファトスタチンまたはステロールの存在下で成長させた場合、SCAPフラグメントはエンドグリコシダーゼHへの耐性がより低く、0または1つの糖鎖を有していた(図19のB、レーン2および3)。したがって、ファトスタチンは、ERからゴルジへのSCAPの転位を阻害するようである。

30

40

【0174】

ファトスタチンの構造活性相関の研究により、そのトルエン部分を種々のアルキルスルホンアミド基またはアリールスルホンアミド基で修飾した場合に、分子は生物活性を保持するかさらに増加させることが示された。1つの蛍光誘導体であるダンシルファトスタチン(図20A)は、SREBP活性化を遮断する能力を保持し(図24)、顕微プローブ

50

としての役割を果たした。共焦点顕微鏡分析により、ダンシルファトスタチンの局在化が E R - トラッカーレッド (E R の特異的マーカー) の局在化と重複する (図 2 0 B) ことが明らかとなった。対照的に、ファトスタチンを欠く対照ダンシル分子は、いかなるオルガネラにも局在化できなかった。選択的 E R 局在化は、ファトスタチンが E R 中のタンパク質に結合することを意味する ; もっとも可能性の高い候補は S C A P (S R E B P 調節のためのコレステロール標的) である (R ^a d h a k r i s h n a n ら、2004)。この仮説を試験するために、ファトスタチン - ポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体に結合するタンパク質 (図 2 0 A) (S a t o ら、2007) を細胞溶解物から精製し、S C A P、S R E B P - 1、S R E B P - 2、および A T F 6 (無関係の E R 結合転写因子) に対する抗体を使用したウェスタンブロットによって分析した (Y e ら、2000)。結果は、ファトスタチンは S C A P に結合するが、他のタンパク質には結合しなかったことを示した (図 2 0 C)。過剰なファトスタチンの添加の際に結合が喪失するが、過剰なコレステロールでは喪失せず (図 2 0 D)、ファトスタチンがコレステロールと異なる部位で S C A P と相互作用するという興味深い可能性が高まる。

【 0 1 7 5 】

脂質合成における S R E B P の重要な役割が確立されたので、次いで、o b / o b マウス (無制御の摂食を用いたマウス肥満モデル) に対するファトスタチンの薬理学的影響を試験した。ファトスタチンを毎日腹腔内送達させ、摂食および体重をモニタリングした。処置マウスによる 1 日摂食量の平均は、コントロールと有意に異ならず (それぞれ、5 . 4 + 1 . 5 対 5 . 9 + 1 . 4 g / マウス / 日、p > 0 . 05)、処置中に明らかな毒性は認められなかった。ファトスタチンでの 2 8 日間の処置後、処置マウスは非処置コントロールより約 1 2 % 軽かった (それぞれ、3 2 . 1 ± 1 . 4 および 3 6 . 2 ± 2 . 2 g / マウス、P = 0 . 02)。o b / o b マウスにおける最も特徴的な表現型の 1 つは、インスリン抵抗性に起因する高血糖である。血液成分の試験により、処置マウスの平均グルコースレベルは非処置マウスよりも約 7 0 % 低かった (それぞれ、1 5 3 . 2 ± 3 0 . 5 対 4 2 9 . 4 ± 8 7 m g / d l、P = 0 . 003) ことが明らかとなり、これは、正常なグルコースレベルの範囲である。これらの結果は、肝臓インスリン抵抗性の病理発生における報告された S R E B P - 1 c の役割と一致する (I d e ら、2004)。

【 0 1 7 6 】

o b / o b マウスの別の表現型は、器官中の脂肪の過剰な蓄積 (非アルコール性脂肪肝が含まれる) である。肥大した肝臓および脂肪肝は非処置 o b / o b マウスの淡色から明らかである一方で、ファトスタチンで処置したマウスの肝臓は正常なようであった。処置マウスの肝臓は、平均して約 3 2 % の体重が減少し、脂肪パッドは非処置マウスより小さかった。肝臓切片のオイルレッド染色は、非処置 o b / o b マウスの肝臓が豊富な脂肪滴を含む一方で、処置マウスの肝臓は脂質蓄積レベルがより低いことを示した (図 2 1)。処置マウスの肝臓中のトリグリセリドレベルおよびコレステロールレベルも減少した。ファトスタチンによる o b / o b マウスにおける脂肪肝の予防は、脂肪肝発症における S R E B P - 1 の報告された役割と一致し、S R E B P - 1 を過剰発現するトランスジェニックマウスは脂肪肝を発症する一方で (H o r t o n ら、2003)、S R E B P - 1 を欠く o b / o b マウス (l e p ^{o b / o b} X S r e b p 1 ^{- / -}) は健康な肝臓を有していた (Y a h a g i ら、2002)。

【 0 1 7 7 】

処置マウスにおける肝臓脂肪レベルの減少は、S R E B P 応答性脂質合成酵素の肝臓発現の減少に起因すると考えられた。したがって、代表的な S R E B P 応答性脂質合成酵素 (脂肪酸シンターゼ (F A S)、アセチル - C o A カルボキシラーゼ (A C C)、ステアロイル - C o A デヒドロゲナーゼ 1 (S C D 1)、および A T P クエン酸リアーゼ (A C L) が含まれる) の肝臓タンパク質レベルおよび酵素活性に対するファトスタチンの効果を試験した。生化学分析により、ファトスタチン処置マウスの肝臓抽出物中の脂質合成酵素のタンパク質レベルおよび活性が減少したことを示した (図 2 5 A - 2 5 C)。したがって、ファトスタチンは、肝臓中の S R E B P - 1 プロセッシングを遮断し、脂質合成酵

10

20

30

40

50

素を下方制御し、肝臓トリグリセリド貯蔵を減少させる。ファスタチンは、SREBPの活性化を阻害する第1の非ステロール様合成分子に相当する。

【0178】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ。0日目に、CHO-K1細胞を、培地A（5%ウシ胎児血清、100単位/mLペニシリン、および100μg/mL硫酸ストレプトマイシンを含むHamのF-12培地とダルベッコ改変イーグル培地との1:1混合物）を含む96ウェルプレートにプレートした。2日目に、細胞を、リポフェクタミン試薬（Invitrogen）を使用して、pSRE-Luc（SRE-1駆動ルシフェラーゼレポーター構築物）（Huaら、1995）およびpAc- - gal（ - gal発現がアクチンプロモーターによって調節される - galレポーター）で同時トランスフェクトした。5時間のインキュベーション後、細胞をリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で洗浄し、次いで、ファスタチンの非存在下または存在下にて、培地B（5%脂質枯渇血清、100単位/mLペニシリン、100μg/mL硫酸ストレプトマイシン、50μMコンパクチン、および50μMメバロン酸ナトリウムを含むHamのF-12培地とダルベッコ改変イーグル培地との1:1混合物）中でインキュベートした。20時間のインキュベーション後、各ウェル中の細胞を溶解し、アリコートを使用してルシフェラーゼ活性および - ガラクトシダーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性を、 - ガラクトシダーゼ活性によって正規化した。SREBP-1cのN末端成熟形態の過剰発現について、pCMV-SREBP-1c（1~436）を、pSRE-LucおよびpAc- - galで同時トランスフェクトした。

10

20

【0179】

SREBPプロセシングのウェスタンブロット分析。0日目に、CHO-K1細胞を、培地Aを含む100mm皿にプレートした。2日目に、細胞をPBSで洗浄し、次いで、ファスタチンの非存在下または存在下にて培地B中でインキュベートした。3日目に、細胞を冷PBSで1回洗浄し、次いで、10mMTris-HCl（pH7.6）、100mMNaCl、1%（w/v）SDS、およびプロテアーゼインヒビター混合物（1μg/mLペプスタチンA、10μg/mLロイペプチン、200μMフェニルメチルスルホニルフルオリド）を含む緩衝液で処理した。各総タンパク質抽出物のタンパク質濃度を測定し（BCAキット；Pierce）、その後、22~33μgアリコートの細胞抽出物を0.25倍体積の緩衝液（250mMTris-HCl（pH6.8）、10%SDS、25%グリセロール、0.2%（w/v）プロモフェノールブルー、および5%（v/v）2-メルカプトエタノール）と混合し、95℃で7分間加熱した。サンプルを、10%SDS-PAGEゲルで分離し、SREBP-2に対するマウスモノクローナル抗体（IgG-7D4）を使用してプロットティングした（Yangら、1995）。特異的バンドを、増強蛍光（ECL）検出試薬（Amersham）を使用して視覚化した。

30

【0180】

SCAPオリゴサッカリドの修飾。細胞膜画分を、本明細書中の他の場所に記載のように調製した。膜ペレットを、10mMHepes・KOH（pH7.4）、10mMKCl、1.5mMMgCl₂、1mMEDTAナトリウム、および100mMNaClを含む0.1mLの緩衝液中に再懸濁した。次いで、タンパク質のアリコートを、総体積58μLで、1μgのトリプシンの非存在下または存在下にて30℃で30分間インキュベートした。2μL（400単位）のダイズトリプシンインヒビターの添加によって反応を停止させた。エンドグリコシダーゼHでのその後の処理のために、各サンプルに、3.5%（wt/vol）SDSおよび7%（vol/vol）2-メルカプトエタノールを含む10μLの溶液を添加した。100℃で10分間の加熱後、各サンプルに、9μLの0.5Mクエン酸ナトリウム（pH5.5）、17μgプロテアーゼインヒビター（濃度1倍、10μg/mLロイペプチン、5μg/mLペプスタチンA、および2μg/mLアプロチニンに相当）を含む5μL溶液、その後1μL（5単位）のエンドグリコシダーゼHを連続的に添加した。37℃で一晩反応させ、0.25MTris・HCl（pH6.8）、2%SDS、10%（vol/vol）グリセロール、0.05%（wt/vol）

40

50

ブロモフェノールブルー、および4%2-メルカプトエタノールを含む20 μ Lの緩衝液の添加によって反応を停止させた。次いで、混合物を100 で5分間加熱し、SDS/PAGE(12%ゲル)に供した。

【0181】

共焦点顕微鏡分析。ガラス底96ウェルプレート(Grainer)上の密集度が約70%のCHO-K1細胞を、0.2 μ M ER-トラッカーレッド(Invitrogen)および5 μ M ダンシルファタスタチンと1時間インキュベートした。蛍光画像を取り込み、CSU10スピニングディスク共焦点スキャナ(Yokogawa Electric Corporation)およびORCA-CCDカメラ(Hamamatsu Photonics)を備えたCarl Zeiss LSM 510共焦点顕微鏡を使用して分析した。画像をIPLabソフトウェア(Solution Systems)を使用して分析した。結合アッセイ。細胞膜画分を、補足方法(Supplementary Methods)に記載のように調製した。膜画分を、0.1%FOS-Choline 10(Hampton Research)を含むPBSで抽出した。抽出物を、ピオチン化ファタスタチンで飽和したニュートラアビジン-アガロースビーズ(10 μ L)と混合し、1時間インキュベートした。結合したタンパク質を、0.1%FOS-Choline 10を含むPBSで4回洗浄し、25 μ LのSDSサンプル緩衝液中で煮沸し、ウェスタンブロッティングに供した。競合アッセイのために、飽和量のコレステロールまたはファタスタチンを膜抽出物に添加し、その後ビーズとインキュベートした。

10

【0182】

動物研究手順。4~5週齢のホモ接合体雄肥満(ob/ob)マウス(C57BL/6J、The Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME)を、管理条件下(12時間の明暗サイクル;25)でAnimal Care Center at Baylor College of Medicineに収容した。1ケージあたり5匹の動物を収容し、標準的な実験動物用飼料(Purina Mills、Richmond IN)および水を到着後1週間自由に与えた。実験第1日目およびその後毎日、各マウスの体重および摂食量を、午後3時と午後5時の間に測定した。体重測定後、処置マウスにファタスタチン(30mg/kg;150mL)を腹腔内注射し、対照マウスに10% DMSOを含むPBSを投与した。研究終了まで、注射を4週間にわたって毎日継続した。

20

30

【0183】

血液成分。ファタスタチンマウスの28日間にわたる毎日の注射の28日後に、マウスを5~6時間絶食させ、全血糖および -ヒドロキシブチラートを、Glucose meter Precision Xtra(Abbott)を使用して測定した。血清成分の決定のために、Comparative Pathology Laboratory(Baylor College of Medicine)によってグルコース、トリグリセリド、およびコレステロールの測定を行った。血清非エステル化脂肪酸(NEFA)を、NEFA Cキット(Wako Chemicals、Richmond、VA)を使用して測定した。

【0184】

肝臓分析。マウスを屠殺し、肝臓および精巣上体脂肪パッドを秤量した。以前に記載のように、各動物由来の肝臓スライスの凍結切片を、オイルレッドOで染色して、肝臓スライス中の脂肪滴(トリグリセリド)を視覚化した(Abu-Elheigaら、2001)。残りの肝臓組織を、液体窒素中で凍結し、さらなる分析のために-80 に保持した。組織トリグリセリドおよびコレステロール含有量。肝臓トリグリセリドおよびコレステロール含有量を、Chandlerら(2003)に記載のように、コレステロールEキット(Wako)およびInfinity トリグリセリドキット(Thermo Electron、Melbourne、Australia)を使用して測定した。

40

【0185】

ファタスタチン(1)、ダンシルファタスタチン、およびファタスタチン-ポリプロリ

50

ンリンカー - ビオチン抱合体の合成。図 23 は、ファスタチン (1)、ダンシルファスタチン、およびファスタチン - ポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体および合成中間体の生成を示す。ファスタチンの合成 (1) 2 - プロピル - 4 - (4 - p - トリルチアゾール - 2 - イル) ピリジン。プロチオナミド (5) (1.03 g、5.70 mmol) と 2 - プロモ - 4' - メチルアセトフェノン (6) (1.22 g、5.70 mmol) との混合物を含むエタノール (20 mL) を、撹拌しながら 70 で 0.5 時間加熱し、次いで、0 に冷却した。形成された黄色沈殿を濾過し、冷エタノールで洗浄し、乾燥させて、黄色針状結晶としてファスタチン (1) HBr 塩を得た (1.78 g、83%)。mp: 190 ~ 193 ; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): 8.88 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.46 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 8.36 (dd, $J = 1.4, 6.2$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.03 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.80 (m, 2H), 0.96 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): 161.3, 158.5, 156.9, 146.2, 143.2, 138.4, 130.4, 129.5, 126.3, 122.3, 120.3, 119.5, 35.0, 22.4, 20.9, 13.4; HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+ \text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{S}$ の計算値 295.1269; 実測値 295.1269。

10

【0186】

4 - (2 - (2 - プロピルピリジン - 4 - イル) チアゾール - 4 - イル) ベンゼンアミン (16) の合成。圧力管に 2 (1.08 g、3.0 mmol)、ベンゾフェノン・イミン (0.57 g、3.3 mmol)、Pd d b a 3 (86 mg、0.15 mmol)、BINAP (280 mg、0.45 mmol)、ナトリウム tert - ブトキシド (1.44 g、9.0 mmol)、および乾燥トルエン (30 mL) を充填し、アルゴンガスをバージした。圧力管をシールし、100 の浴中で 20 時間加熱した。室温への冷却後、反応混合物をクロマトグラフ分析して (SiO₂、4:1 ヘキサン: EtOAc)、黄色オイルとして 1.35 g の 8 (98%) を得た。次いで、8 (1.35 g、2.9 mmol) を含む THF (20 mL) 溶液に、2 N HCl 水溶液 (15 mL) を添加した。室温で 2 時間の撹拌後、反応混合物を、減圧濃縮し、次いで、EtOAc (100 mL) で希釈し、飽和 Na₂CO₃ (50 mL) 溶液で洗浄した。水性洗浄物を、EtOAc (3 x 40 mL) で抽出し、合わせた EtOAc 層を Na₂SO₄ で乾燥させ、濃縮した。粗生成物をクロマトグラフ分析して (SiO₂、4:1 ヘキサン: EtOAc)、白色結晶として 0.73 g の 9 (82%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl₃): 8.61 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.75 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 1.4, 4.8$ Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.75 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 3.82 (br s, 1H), 2.85 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.01 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl₃): 164.9, 163.4, 157.3, 150.0, 146.8, 140.8, 127.7, 124.8, 119.2, 117.8, 115.1, 111.3, 40.4, 23.1, 13.9; HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+ \text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{S}$ の計算値 296.1221; 実測値 296.1228。

20

30

40

【0187】

ダンシルファスタチンの合成。16 (50 mg、0.17 mmol) およびピリジン (27 mg、0.34 mmol) を含む CH₂Cl₂ (5 mL) の磁氣的に撹拌した溶液に、ダンシルクロリド (50 mg、0.18 mmol) を添加した。17 時間の撹拌後、反応混合物を減圧濃縮し、残渣を EtOAc (50 mL) と飽和 NH₄Cl 溶液 (20 mL) との間で分配した。水相を EtOAc (2 x 20 mL) で抽出した。合わせた抽出物を、飽和 NaHCO₃ 溶液で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濃縮した。粗生成物を、クロマトグラフ分析して (SiO₂、2:1 ヘキサン: EtOAc)、黄色結晶とし

50

て2 (6 5 m g、7 3 %) を得た。¹ H N M R (6 0 0 M H z , C D C l ₃) : 8 . 6 0 (d , J = 4 . 8 H z , 1 H) , 8 . 5 0 (d , J = 8 . 2 H z , 1 H) , 8 . 3 6 (d , J = 8 . 3 H z , 1 H) , 8 . 2 1 (d , J = 8 . 3 H z , 1 H) , 7 . 7 6 (d , J = 8 . 6 H z , 2 H) , 7 . 7 0 (d , J = 1 . 5 H z , 1 H) , 7 . 6 2 (d d , J = 1 . 5 , 4 . 8 H z , 1 H) , 7 . 6 1 (t , J = 8 . 3 H z , 1 H) 7 . 4 4 (s , 1 H) , 7 . 4 3 (d d , J = 7 . 5 , 8 . 2 H z , 1 H) , 7 . 1 9 (d , J = 7 . 5 H z , 1 H) , 7 . 0 4 (d , J = 8 . 6 H z , 2 H) , 6 . 9 7 (b r s , 1 H) , 2 . 8 7 (s , 6 H) , 2 . 8 4 (t , J = 7 . 6 H z , 2 H) , 1 . 8 1 (m , 2 H) , 1 . 0 0 (t , J = 7 . 6 H z , 3 H) ; ¹³ C N M R (1 5 0 M H z , C D C l ₃) : 1 6 5 . 5 , 1 6 3 . 5 , 1 5 6 . 1 , 1 5 2 . 2 , 1 5 0 . 0 , 1 4 0 . 5 , 1 3 6 . 7 , 1 3 4 . 0 , 1 3 1 . 1 , 1 3 1 . 0 , 1 3 0 . 5 , 1 2 9 . 8 , 1 2 9 . 7 , 1 2 8 . 7 , 1 2 7 . 3 , 1 2 3 . 1 , 1 2 1 . 6 , 1 1 9 . 2 , 1 1 8 . 3 , 1 1 7 . 8 , 1 1 5 . 3 , 1 1 3 . 8 , 4 5 . 4 , 4 0 . 4 , 2 3 . 1 , 1 3 . 9 ; H R M S (m / z) : [M + H] ⁺ C 2 9 H 2 9 N 4 O 2 S 2 の計算値 5 2 9 . 1 7 3 2 ; 実測値 5 2 9 . 1 7 3 3 。

10

【 0 1 8 8 】

t e r t - ブチル 4 - (2 - (2 - プロピルピリジン - 4 - イル) チアゾール - 4 - イル) フェニルカルバメート (4 0) の合成

1 6 (0 . 5 7 g、1 . 9 2 m m o l) および 4 - (ジメチルアミノ) ピリジン (5 m g、0 . 4 m m o l) を含む T H F (2 0 m L) の磁氣的に攪拌した溶液に、ジカルボン酸ジ (t e r t - ブチル) (0 . 4 9 g、2 . 2 1 m m o l) を添加した。1 7 時間の攪拌後、反応混合物を減圧濃縮し、残渣を、E t O A c (1 0 0 m L) と飽和 N H 4 C l 溶液 (3 0 m L) との間で分配した。水相を E t O A c (2 x 5 0 m L) で抽出した。合わせた抽出物を、飽和 N a H C O 3 溶液で洗浄し、N a 2 S O 4 で乾燥させ、濃縮した。粗生成物を、クロマトグラフ分析して (S i O 2、2 : 1 ヘキサン : E t O A c)、黄色泡として 1 0 (0 . 3 3 g、4 3 %) を得た。¹ H N M R (3 0 0 M H z , C D C l ₃) : 8 . 6 8 (d , J = 5 . 1 H z , 1 H) , 7 . 9 3 (d , J = 8 . 4 H z , 2 H) , 7 . 7 9 (s , 1 H) , 7 . 7 2 (d , J = 5 . 1 H z , 1 H) , 7 . 5 2 (s , 1 H) , 7 . 4 7 (d , J = 8 . 4 H z , 2 H) , 6 . 5 8 (s , 1 H) , 2 . 9 0 (t , J = 7 . 5 H z , 2 H) , 1 . 8 7 (m , 2 H) , 1 . 5 5 (s , 9 H) , 1 . 0 3 (t , J = 7 . 5 H z , 3 H) ; ¹³ C N M R (7 5 M H z , C D C l ₃) : 1 6 3 . 1 , 1 5 6 . 5 , 1 5 2 . 3 , 1 4 9 . 6 , 1 4 0 . 6 , 1 3 8 . 5 , 1 2 8 . 7 , 1 2 8 . 1 , 1 2 7 . 0 , 1 1 8 . 3 , 1 1 7 . 7 , 1 1 4 . 3 , 1 1 2 . 9 , 8 0 . 6 , 4 1 . 0 , 2 8 . 4 , 2 4 . 1 , 1 3 . 7 ; H R M S (m / z) : [M + H] ⁺ C 2 2 H 2 6 N 3 O 2 S の計算値 3 9 6 . 1 7 4 6 ; 実測値 3 9 6 . 1 7 3 8 。

20

30

【 0 1 8 9 】

R = N (B o c) C H ₂ C H ₂ C H ₂ C O O H 中間体の合成。

N ₂ 雰囲気下で、4 0 (2 0 0 m g、0 . 5 1 m m o l) を、N a H (6 0 % 鉱物油分散体、2 4 m g、0 . 6 m m o l) を含む D M F (5 m L) の懸濁液に添加し、混合物を室温で 2 時間攪拌した。次いで、N a I (9 1 m g、0 . 6 m m o l) および 4 - プロモ酪酸エチル (0 . 1 2 g、0 . 6 m m o l) を含む D M F (2 m L) を添加した。1 8 時間の攪拌後、反応混合物を水 (2 0 m L) に注ぎ、E t O A c (2 x 5 0 m L) で抽出した。合わせた抽出物を、N a 2 S O 4 で乾燥させ、濃縮した。粗生成物をクロマトグラフ分析して (S i O 2、2 : 1 ヘキサン : A c O E t)、黄色オイルとして 1 1 (3 5 m g、1 3 %) を得た。次いで、1 1 (3 0 m g、2 . 9 m m o l) を含む T H F (1 m L) および M e O H (0 . 5 m L) の溶液に、2 N N a O H 水溶液 (0 . 2 m L) を添加した。室温で 1 8 時間の攪拌後、反応混合物を減圧濃縮し、次いで、E t O A c (1 0 m L) で希釈し、飽和 N H 4 C l 溶液 (5 m L) で洗浄した。水性洗浄物を、E t O A c (2 x 1 0 m L) で抽出し、合わせた E t O A c 層を N a 2 S O 4 で乾燥させ、濃縮した。粗生成物をクロマトグラフ分析して (S i O 2、E t O A c)、白色泡として 1 4 m g の

40

50

12 (50%)を得た。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8.69 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 2.92 (m, 4H), 2.33 (m, 2H), 1.90 (m, 4H), 1.50 (s, 9H), 1.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 174.2, 162.9, 156.3, 152.9, 149.6, 140.6, 138.5, 129.3, 128.9, 127.2, 119.0, 117.9, 114.8, 113.3, 80.8, 41.0, 40.3, 32.1, 28.4, 24.1, 21.1, 13.7; HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ の計算値 482.2114; 実測値 482.2120。

10

【0190】

4 - (4 - (2 - (2 - プロピルピリジン - 4 - イル) チアゾール - 4 - イル) フェニルアミノ) - N - イソプロピルブタンアミドの合成

$\text{R} = \text{N}(\text{Boc})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 中間体 (17 mg、0.035 mmol)、トリエチルアミン (17 μL 、0.14 mmol)、およびイソプロピルアミン (4 μL 、0.046 mmol) を含む DMF (0.5 mL) 溶液に、HATU (16 mg、0.042 mmol) を添加した。18 時間の攪拌後、反応混合物を減圧濃縮し、残渣を、EtOAc (20 mL) と飽和 NH_4Cl 溶液 (10 mL) との間で分配した。水相を、EtOAc (2 x 10 mL) で抽出した。合わせた抽出物を飽和 NaHCO_3 溶液で洗淨し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濃縮した。粗生成物をクロマトグラフィ分析して (SiO_2 、2:1 ヘキサン: EtOAc)、黄色オイルとして 13 (14 mg、77%) を得た。次いで、13 (12 mg、2.9 mmol) を含む THF (1 mL) 溶液に、TFA (0.2 mL) を添加した。室温で 18 時間の攪拌後、反応混合物を減圧濃縮し、次いで、EtOAc (20 mL) で希釈し、飽和 NH_4Cl 溶液 (10 mL) で洗淨した。水性洗淨物を EtOAc (2 x 5 mL) で抽出し、合わせた EtOAc 層を Na_2SO_4 で乾燥させ、濃縮した。粗生成物をクロマトグラフィ分析して (SiO_2 、2:1 ヘキサン: EtOAc)、黄色泡として 6.2 mg の 14 (63%) を得た。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8.69 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.04 (1H, s), 7.96 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 6.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.03 (m, 4H), 2.35 (m, 2H), 1.92 (m, 4H), 1.25 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.03 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 171.6, 162.9, 156.3, 152.9, 140.6, 138.5, 129.3, 128.9, 127.2, 119.0, 117.9, 114.8, 113.3, 42.2, 41.0, 40.3, 32.1, 24.1, 23.2, 21.1, 13.7; HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_5$ の計算値 423.2219; 実測値 423.2216。

20

30

【0191】

ファスタチン - ポリプロリンリンカー - ビオチン抱合体の合成

ファスタチン - KPGQFLYELKKPPPPPPPPPKK (配列番号 15) - アミノカプロン酸 - ビオチン。抱合体 3 および 4 を、N - Fmoc 保護アミノ酸、N - Fmoc - アミノカプロン酸、12、ビオチン (以前に記載のように逆相 HPLC によって精製 (Sato ら、2007)) のカップリングによって Rink - Amide MBHA 樹脂にて合成した。抱合体 3: $\text{C}_{155}\text{H}_{238}\text{N}_{35}\text{O}_{29}\text{S}_2$ の計算値 3119.9。実測値 (MALDI - TOF - MS) 3119.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

40

【0192】

プラスミド。pSRE - Luc、pCMV - SREBP - 1c (1 - 436)、pCMV - PLAP - BP2 (513 - 1141)、および pCMV - SCAP は、J. L. Goldstein および M. S. Brown (University of Tex

50

as Southwestern Medical Center) から譲り受けた (Sakaiら、1998; Huaら、1995)。

【0193】

抗体。モノクローナル抗SREBP-1 IgG (2A4)、抗SCAP IgG (9D5)、および抗ATF6 IgG (H-280)を、Santa Cruz Biotechnologyから購入した。モノクローナル抗SREBP-2 IgG-7D4は、J.L. Goldstein and M.S. Brown (University of Texas Southwestern Medical Center) から譲り受けた。ポリクローナル抗FAS、抗ACC、抗SCD1、および抗ACL IgGは、BD Biosciencesから購入した。

10

【0194】

細胞培養。チャイニーズハムスター卵巢細胞K1 (CHO-K1)細胞を、5%ウシ胎児血清、100単位/mLペニシリン、および100μg/mL硫酸ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地/HamのF12培地[1:1]中にて37°Cの5%CO₂下で維持した。ヒトアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞(DU145)を、2mM L-グルタミン、1.0mMピルビン酸ナトリウム、0.1mM非必須アミノ酸、および1.5g/L重炭酸ナトリウムを10%ウシ胎児血清、100単位/mLペニシリン、および100μg/mL硫酸ストレプトマイシンと共に含むイーグル最少必須培地中にて37°Cの5%CO₂下で維持した。

20

【0195】

膜画分の調製。細胞を回収し、次いで、緩衝液(10mM HEPES・KOH (pH 7.4)、10mM KCl、1.5mM MgCl₂、および1mM EDTAナトリウム)に再懸濁し、22ゲージニードルを通過させ、1,000×gで5分間遠心分離した。ポスト核(postnuclear)上清を、15,000×gで30分間遠心分離し、上清を除去した。オリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析。DU145前立腺癌細胞を、1μg/mLのIGF1の存在下にて無血清培地中で5μMのファスタチンまたはDMSOのみで6時間処理し、TRI試薬(Molecular Research Center)中に総RNAを抽出し、RNeasyミニキット(Qiagen)によってさらに単離した。精製mRNAを、約33,000個の十分に実証されたヒト遺伝子由来の39,000個を超える転写物を代表するほぼ45,000個のプロブ組からなるAffymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Inc.)によってBaylor College of Medicine Microarray Core Facilityにて分析した。

30

【0196】

RT-PCR実験

総RNAを、TRI試薬(Molecular Research Center)中でDU145細胞から抽出し、RNeasyミニキット(Qiagen)で単離した。RNAサンプルを、Access RT-PCRシステム(Promega)の使用によってRT-PCRに供した。RT-PCR反応物は、総RNA、1μMの各プライマー、0.2mM dNTP、1mM MgSO₄、AMV逆転写酵素(2単位)、およびTf1 DNAポリメラーゼ(2単位)を最終体積25μLで含んでいた。使用したプライマー対は以下である: 5'-TCA GAC CGG GAC TGC TTG GAC GGC TCA GTC-3' (配列番号16)および5'-CCA CTT AGG CAG TGG AAC TCG AAG GCC G-3' (配列番号17) (低密度リポタンパク質受容体(LDLR)用); 5'-GCC TGC TTG ATA ATA TAT AAA C-3' (配列番号18)および5'-CAC TTG AAT TGA GCT TTA G-3' (配列番号19) (ステアロイル-CoAデヒドロゲナーゼ(SCD)用); 5'-AAG AAA AAG TGT CAG ACA GCT GG-3' (配列番号20)および5'-TGG ACT GAA GGG GTG TTA GC-3' (配列番号21) (ATPクエン酸リアーゼ(ACL)用); 5'-G

40

50

CC CGA CAG TTC TGA ACT GGA ACA - 3' (配列番号 22)
) および 5' - GAA CCT GAG ACC TCT CTG AAA GAG - 3'
 ' (配列番号 23) (3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - CoA レダクターゼ (HMG - CoA R) 用); 5' - CTG CCT GAC TGC CTC AGC - 3'
 ' (配列番号 24) および 5' - ACC TCT CCT GAC ACC TGG G
 - 3' (配列番号 25) (メバロン酸ピロリン酸デカルボキシラーゼ (MVD) 用); 5'
 ' - AAG ACT TCA GGG TAA GTC ATC A - 3' (配列番号 26)
) および 5' - CGT GTA TAA TGG TGT CTA TCA G - 3'
 (配列番号 27) (インスリン誘導遺伝子 1 (INSIG1) 用)。増幅条件は以下であ
 る: 94 で 4 分間を 1 サイクル、その後 94 で 40 秒間の变性、50 で 40 秒
 間のアニーリング、68 で 2 分間の伸長を、SCD および HMG CoA R について
 は 22 サイクル行い、LDLR および INSIG1 については 24 サイクル行って 58
 でアニーリングし、ACL については 24 サイクル行って 60 でアニーリングし、MV
 D については 30 サイクル行って 55 でアニーリングした。増幅 DNA を、アガロース
 ゲルによって分析し、Scion - image ソフトウェアを使用して定量した。

【0197】

PLAP - BP2 切断。0 日目に、CHO - K1 細胞を、培地 A を含む 96 ウェルブレ
 ードにプレートした。2 日目に、細胞を、リポフェクタミン試薬 (Invitrogen)
) を使用して、pCMV - PLAP - BP2 (513 - 1141)、pCMV - SCAP
 、および pAc - gal で一過性に同時トランスフェクトした。5 時間のインキュベ
 ーション後、細胞を PBS で洗浄し、次いで、ファスタチン (20 μ M) またはステロ
 ール (10 μ g/mL コレステロールおよび 1 μ g/mL 25 - ヒドロキシコレステロール)
 の非存在下または存在下にて培地 B 中でインキュベートした。20 時間のインキュベ
 ーション後、培地のアリコートをし、分泌アルカリホスファターゼ活性についてアッセイし
 た。各ウェル中の細胞を溶解し、 β - ガラクトシダーゼ活性の測定のために使用した。アル
 カリホスファターゼ活性を、 β - ガラクトシダーゼ活性によって正規化した。

【0198】

酵素活性およびウェスタンブロット分析。凍結肝臓の一部を、液体窒素中で粉砕した。
 粉末組織を 0.1 mM PMSF、5 mM ベンズアミジン、および 5 mg/mL プロテアー
 ゼインヒビターカクテル (Roche) を含む 10 mL の PBS 中に懸濁し、Polyt
 ron (3 x 30 秒、高速) を使用してホモジナイズし、短時間超音波処理して DNA を
 破壊した。抽出物を 16,000 x g で 20 分間の遠心分離によって清澄化した。上清中
 のタンパク質濃度を決定し、FAS、ACC、SCD1、および ACL に対する抗体を使
 用したウェスタンブロット分析に供した。目的のタンパク質の特異的バンドの強度をスキ
 ャンし、定量のために β - アクチンに対して正規化した。肝臓抽出物由来の FAS 活性お
 よび ACC 活性を、以前に記載のように決定した (Maora, 2006)。

【0199】

< 実施例 11 >

ベンジル (R) - 2 - (4 - (4 - (メチルスルホンアミド) フェニル) チアゾール - 2
 - イル) ピロリジン - 1 - カルボキシラート 53 の合成

図 26 に示されるようにアセトニトリル、(100 mL) 中の L - プロリンアミド (1
 .14 g、10.0 mmol) の溶液に、クロロギ酸ベンジル (1.55 mL、11
 .0 mmol) およびトリエチルアミン (2.79 mL、20 mmol) を、室
 温で追加した。混合物を 12 時間室温で攪拌し、AcOEt で希釈した。混合物を 0.1
 M HCl 溶液へ注ぎ、有機質層と水層の間で分離した。有機質層を飽和 NaHCO₃ 水溶
 液とブラインで洗浄し、乾燥させ (Na₂SO₄)、ろ過し、濃縮した。残留物をシリカ
 ゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、67 (2.26 g、91%) を無色の油
 として得た。

【0200】

トルエン (30 mL) 中の 67 (586 mg、2.36 mmol) と Lawesson の

試薬 (1 . 0 5 g、2 . 6 0 m m o l) の混合物を、1 時間 9 0 で撹拌した。冷却後、溶媒は蒸発させた。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、6 8 (4 9 5 m g , 7 9 %) を白色の無定形固体として得た。

【 0 2 0 1 】

E t O H (1 0 m L) 中の 6 8 (3 0 0 m g , 1 . 1 3 m m o l) と 4 - ブロモフェナシルプロミド (b r o m o p h e n a c y l b r o m i d e) (3 1 8 m g , 1 . 1 3 m m o l) の混合物を、1 時間 9 0 で撹拌した。蒸発後、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、4 8 (2 6 5 m g , 5 3 %) を白色の固形物として得た。トルエン (5 . 0 m L) 中の、4 8 (2 3 0 m g、0 . 5 1 9 m m o l)、P d 2 (d b a) 3 (9 . 5 0 m g、2 m o l %)、B I N A P (9 7 %、2 0 . 0 m g、6 m o l %)、ナトリウム t - ブトキシド (6 9 . 8 m g、0 . 7 2 7 m m o l)、およびベンゾフェノン・イミン (0 . 1 0 5 m L (0 . 6 2 3 m m o l) の混合物を、8 時間還流した。室温まで冷却した後、混合物をセライトによろろ過し、濾液は蒸発させた。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、6 9 (2 2 8 m g , 8 1 %) を黄色の無定形固体として得た。

10

【 0 2 0 2 】

T H F (3 m L) 中の 6 9 (1 7 5 m g、0 . 3 2 1 m m o l) の溶液に、H C l 水溶液 (4 M、0 . 3 m L) を加え、混合物を 1 時間室温で撹拌した。混合物を飽和 N a H C O 3 水溶液で中和し、A c O E t で抽出した。有機質層を飽和 N a H C O 3 水溶液とブラインで洗浄し、乾燥させ (N a 2 S O 4)、ろ過し、濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、7 0 (1 1 3 m g , 9 3 %) を無色の油として得た。

20

【 0 2 0 3 】

C H 2 C l 2 (2 m L) 中の 7 0 (9 2 m g , 0 . 2 4 m m o l)、メタンスルホニルクロリド (0 . 0 2 1 m L , 0 . 2 7 m m o l) およびピリジン (0 . 0 4 3 m L , 0 . 5 3 m m o l) の混合物を、8 時間室温で撹拌した。M e O H を加えた後、混合物を A c O E t で希釈し、飽和 N a H C O 3 水溶液とブラインで洗浄した。有機質層を、N a 2 S O 4 で乾燥させ、ろ過し、濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、5 3 (9 1 m g , 8 3 %) を白色の無定形固体として得た。 ¹ H N M R (C D C l 3 , 6 0 0 M H z , t w o r o t a m e r s , r a t i o = 1 : 0 . 9 5) 7 . 8 0 - 7 . 8 6 (m , 2 H) , 7 . 1 4 - 7 . 4 1 (m , 7 H) , 6 . 6 4 (s , 1 H , m a j o r r o t a m e r) , 6 . 8 3 (s , 1 H , m i n o r r o t a m e r) , 5 . 0 7 - 5 . 3 6 (m , 3 H) , 3 . 7 3 (m , 1 H) , 3 . 5 9 (m , 1 H) , 3 . 0 3 (s , 3 H , m a j o r r o t a m e r) , 3 . 0 0 (s , 3 H , m i n o r r o t a m e r) , 2 . 2 8 - 2 . 3 9 (m , 2 H) , 2 . 0 0 - 2 . 1 0 (m , 2 H) ; ¹³ C N M R (C D C l 3 , 1 5 0 M H z , t w o r o t a m e r s , m a j o r p e a k s a r e s h o w n) 1 7 4 . 7 , 1 5 5 . 4 , 1 5 4 . 4 , 1 3 6 . 4 , 1 3 1 . 9 , 1 2 8 . 5 , 1 2 8 . 3 , 1 2 7 . 9 , 1 2 7 . 8 , 1 2 7 . 7 , 1 2 7 . 7 , 1 2 0 . 8 , 1 1 2 . 3 , 6 7 . 1 , 5 9 . 4 , 4 7 . 2 , 3 9 . 4 , 3 2 . 9 , 2 3 . 1 ; H R M S (F A B) : E x a c t m a s s c a l c d . f o r C 2 2 H 2 4 N 3 O 4 S 2 [M + H] + , 4 5 8 . 1 2 0 3 ; F o u n d 4 5 8 . 1 2 0 0 .

30

40

【 0 2 0 4 】

< 実施例 1 2 >

N - (4 - (4 - (2 - (2 - プロピルピリジン - 4 - イル) チアゾール - 4 - イル) フェニル) メタンスルホンアミド (1 9) の合成。

図 2 7 に示されるように、E t O H (4 0 0 m L) 中のプロチオナミド (p r o t h i o n a m i d e) (9 . 0 1 g , 5 0 . 0 m m o l) と 4 - ブロモフェナシルプロミド 6 a (1 3 . 9 g , 5 0 . 0 m m o l) の混合物を、1 時間 7 0 で撹拌した。室温に冷却後、沈殿物を E t O A c で濾過し、E t O A c と飽和 N a H

50

CO₂ 水溶液で洗浄した。ブラインで有機質層を洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥させ、濃縮して、淡黄色固体として4-(4-プロモフェニル)-2-(2-プロピルピリジン-4-イル)チアゾール2(14.3 g、79%)を得た。

【0205】

反応(b)において、圧力管に2(1.08 g、3.0 mmol)、ベンゾフェノン・イミン(0.57 g、3.3 mmol)、Pd₂dba₃(86 mg、0.15 mmol)、BINAP(280 mg、0.45 mmol)、ナトリウムtert-ブトキシド(1.44 g、9.0 mmol)、および乾燥トルエン(30 mL)を充填し、アルゴンガスをパージした。圧力管をシールし、100 °Cの浴中で20時間加熱した。室温への冷却後、反応混合物をクロマトグラフ分析して(SiO₂、4:1 ヘキサン:EtOAc)、黄色オイルとして1.35 gの71(98%)を得た。

10

【0206】

次いで、反応(c)において、THF(20 mL)中の71(1.35 g、2.9 mmol)の溶液に、2 M HCl水溶液(15 mL)を添加した。室温で2時間の攪拌後、反応混合物を、減圧濃縮し、次いで、EtOAc(100 mL)で希釈し、飽和Na₂CO₃(50 mL)溶液で洗浄した。水性洗浄物を、EtOAc(3 x 40 mL)で抽出し、合わせたEtOAc層をNa₂SO₄で乾燥させ、濃縮した。粗生成物をクロマトグラフ分析して(SiO₂、4:1 ヘキサン:EtOAc)、白色結晶として0.73 gの9(82%)を得た。

20

【0207】

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 8.61 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.75 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.67 (dd, J = 1.4, 4.8 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.75 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 3.82 (brs, 1H), 2.85 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.01 (t, J = 7.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): 164.9, 163.4, 157.3, 150.0, 146.8, 140.8, 127.7, 124.8, 119.2, 117.8, 115.1, 111.3, 40.4, 23.1, 13.9; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₇H₁₈N₃S, 296.1221; found, 296.1228.

30

【0208】

反応(d)において、メタンスルホニルクロリド(0.23 mL、2.97 mmol)を、CH₂Cl₂(20 mL)中の16(800 mg、2.71 mmol)およびピリジン(0.66 mL、8.1 mmol)の攪拌された溶液に加えた。0.5時間の攪拌後、反応混合物を2 M クエン酸溶液に注ぎ、EtOAcで抽出した。合わせた抽出物を飽和NaHCO₃溶液で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濃縮し、N-(4-(4-(2-(2-プロピルピリジン-4-イル)チアゾール-4-イル)フェニル)メタンスルホンアミド(19)(880 mg, 87%)黄色の泡状物(foam)として産出した。

40

【0209】

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): 8.55 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.90 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.84 (dd, J = 1.9, 5.2 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.86 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.01 (t, J = 7.3 Hz, 3H). m/z = 374 [M+H]⁺.

【0210】

<実施例13>

50

N - イソプロピル - 4 - (2 - (2 - プロピルピリジン - 4 - イル) チアゾール - 4 - イル) ベンズアミド (19) の合成図 27 に示されるように、化合物 17 を合成するための手順は、実施例 12 で化合物 19 について記載したのと同じステップ a - c である。ステップ e の化合物 17 については、CH₂Cl₂ (20 mL) 中の 16 (1.02 g、3.45 mmol) の溶液に、アセトン (2.5 mL、34.5 mmol) と酢酸 (2.0 mL、34.5 mmol) を加えた。1 時間混合物を撹拌した後、Na (OAc) 3 BH (1.5 g、6.9 mmol) を加えた。20 時間その混合物を撹拌した。混合物を飽和 NaHCO₃ 溶液に注ぎ、EtOAc で抽出しました。合わせた抽出物を、Na₂SO₄ で乾燥させ、濃縮した。粗生成物 (SiO₂, 4 : 1 ヘキサン / EtOAc) のクロマトグラフィーにより、白色の泡状物として 17 (845 mg, 73%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : 8.61 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.76 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.68 (dd, J = 1.4, 5.2 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.65 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 3.70 (m, 1H), 2.86 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.25 (d, J = 6.0 Hz, 6H), 1.02 (t, J = 7.4 Hz, 3H). m/z = 338 [M + H]⁺.

【 0211 】

< 実施例 14 >

化合物 45 - 66 のための SREBP 活性化アッセイ

標準 SREBP 活性化アッセイは、実施例 1 におけるファスタチン A の方法に従って、表 4 に同定された例示的な化合物について行われた。SREBP 応答性レポーター遺伝子の転写を活性化する内因性 SREBPs の能力は、化合物 45 - 55 および 19 (図 28)、化合物 56 - 61 及び 19 (図 29) および化合物 62 - 66 (図 30) の存在下または非存在下で、5 μM で CHO K1 細胞において測定された。これらのうち、化合物 61 は約 25% の、化合物 53 は約 30% の、化合物 58 は約 42% の、および化合物 19 は約 45% の、SREBP 活性化の阻害を示した。化合物 53 (図 31) および化合物 58 と 61 (図 32) の阻害濃度を決定した。

【 0212 】

< 実施例 15 >

化合物 19 は、細胞株は、SUM159 ヒト乳癌の増殖を阻害し、脂質合成経路をダウンレギュレートする

48 時間の化合物 19 の異なる濃度での SUM159 細胞の処理は、細胞増殖の阻害および毒性効果を引き起こす (図 33 の A)。細胞を、2% チャコール処理した血清を含む 100 μl の培地中に、5000 細胞 / ウェルの密度で播種した。24 時間後、化合物 19 の異なる濃度をさらに 48 時間加えた。細胞生存率を WST-1 細胞生存及び増殖アッセイ (Sciencell Research Laboratory, Carlsbad CA) を用いて測定した。10 μM で処理された細胞において、脂質生成の遺伝子 mRNA の発現レベルの変化を決定した。転写因子 SREBPs の制御下にある遺伝子の有意なダウンレギュレーションがあった。これらの転写因子によって調節されることが知られていない Insig2 遺伝子は、処理によって影響されなかった (図 33 の B)。

【 0213 】

化合物 19 の効果はまた、ヒト肝細胞癌細胞株 (HepG2 細胞) で実証された。図 34 A - 34 B において示されるように、形態の劇的な変化および処理された細胞の増殖の阻害により証明されるように、化合物 19 は、高いレベルの毒性を生成した。HepG2 細胞を、25 μM の化合物 19 ので処理した場合、成熟および活性型のレベルの有意な減少、および、SREBP-1 の前駆体の増加とその結果としての SREBP (図 34 の A - 図 34 の B) によって制御される遺伝子の発現レベルの増加があった。これらの結果は SREBP 活性化の阻害を介した脂質生成の阻害剤としての、化合物 19 の概念的な

活性と、一致しおよびこれを支持している。

【0214】

化合物19は、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4の増殖を阻害する

MOLT-4細胞を、2つの異なる条件即ち、5%ウシ胎児血清(FBS)下で、および5%FBS無脂質血清(チャコール処理した血清)下で増殖させた。10,000個の細胞を、化合物19の異なる濃度での処理を開始する24時間前に、96ウェルプレートに播種した。DMSOに溶解された化合物19を、MTTアッセイを用いて細胞増殖を測定する前に、48時間細胞に添加した。図35Aは、5%FBSおよび無脂質のFBSの下で細胞の増殖は類似していた。化合物19は、両方の増殖条件の下で10および20μMで約75から80パーセントの細胞増殖を阻害した。これらの結果は、10および20μMにて、化合物19が外因性の脂質の存在下においてもなお等しく有効であったことを示し、これは、デノボ脂質合成結果の阻害が癌細胞株の増殖阻害を引き起こしたことを示唆している。興味深いことに、FBSの無脂質血清下において、2および5μMの化合物19による30-50%増殖阻害があり(図35C)、および5μMの5%FBS条件でこの阻害の強い傾向があった(図35B)。

10

【0215】

化合物19は、ヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226の増殖を阻害する

RPMI8226細胞を、MOLT-4細胞と同じ条件下で増殖させた。20,000細胞を、MOLT-4細胞について記載したように、化合物19の濃度を増加させて処理する24時間前に96ウェルプレートに播種した。図35のDに示されるようは、5%FBSおよび脂質フリーFBS下での細胞の増殖は、5%FF FBS中の5μMの化合物19が、5%FBSにおいて相当する量よりも約1.5倍増殖を阻害したことを除いて、同様であった。化合物19は、で5%FBSおよび5%のFF FBSにおいて10μMおよび20μM同様に有効であった。5%FBS条件においては3μMから(図35E)、FBS無脂質血清においては2μMから(図35F)、阻害の傾向は強くなった。

20

【0216】

<実施例16>

化合物17は、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株MOLT-4の増殖を阻害する

MOLT-4細胞を、2つの異なる条件即ち、5%ウシ胎児血清(FBS)下で、および5%FBS無脂質血清(チャコール処理した血清)下で増殖させた。20,000個の細胞を、化合物17の異なる濃度での処理を開始する24時間前に、96ウェルプレートに播種した。DMSOに溶解された化合物17を、MTTアッセイを用いて細胞増殖を測定する前に、48時間細胞に添加した。図36Aは、5%FBSおよび無脂質のFBSの下で細胞の増殖は、5,10および20μMで強力に阻害されていた。3μM5%FF FBSの下では、5%FBS条件下での約2.5倍の阻害を示した。化合物17は、両方の増殖条件の下で5,10および20μMで約85-100パーセントの細胞増殖を阻害した。5%FBSおよび5%FBS無脂質血清下では、1μMで始まる阻害の強い傾向があった(図36B-36C)。

30

【0217】

化合物17は、ヒト多発性骨髄腫細胞株RPMIの増殖を阻害する

RPMI8226細胞を、MOLT-4細胞と同じ条件下で増殖させた。RPMI8226細胞を、MOLT-4細胞と同じ条件下で増殖させた。20,000細胞を、MOLT-4細胞について記載したように、化合物19の濃度を増加させて処理する24時間前に96ウェルプレートに播種した。図36Dに示されるようは、5%FBSおよび脂質フリーFBS下での細胞の増殖ははじめ同様であるが、5%FF FBS中の化合物17は、5,10および20μMの5%FBSにおいて相当する量よりも約1.5乃至6倍増殖を阻害した。5%FBS条件においては3μMから(図35E)、5%FBS無脂質血清においては2μMから(図35F)、阻害の傾向は強くなった。

40

【0218】

<実施例17>

50

化合物 19 は、脱共役タンパク質 2 (UCP2) アップレギュレートし、体脂肪を減少させる

SD 雄ラットは炭水化物 (35% キロカロリー) と脂肪 (45% キロカロリー) の両方が豊富である西洋食 (高脂肪高炭水化物 (HFHC)) を供給された。MTD 研究の結果は、最大有効用量が 100 mg / kg であるか、またはそれを下り得ることを示唆している。従って、効能研究用に、100 mg / kg の 1 / 40 および 1 / 10 を選んだ。HFHC 治療食を与えられたラットを 15 匹の動物の 4 つのグループに分けた: (1) 任意の処置を受けなかった対照群; (2) 1 ml の綿実油を受けた対照群; (3) 2.5 mg / kg の化合物 19 で処置された実験群; (4) 10 mg / kg の化合物 19 で処置された目標実験群。最後に、グループ (n = 5) は通常のラット餌 (RD) を与えられた。

10

【0219】

化合物 19 は、体重及び全身の脂肪を減少させるのに有効であった

HFHC 食を 3 週間与えると、通常の食餌を与えたラットよりも約 12% 以上体重が増加する (それぞれ 332 ± 6.5 対 375 ± 4.0 グラム) (図 37A)。予想されたように、通常の食事をとったラットにおける総体脂肪および%脂肪は、HFHC 食をとったラットに比べて有意に低かった (444.0 ± 2.5 対 62.4 ± 2.4 g / ラットおよび 13.95 ± 0.5 対 $18.48 \pm 0.48\%$, それぞれ)。やせのパーセント (percent lean) も、HFHC を与えられたラットに比べ、RD を与えられたラットで高かった (図 37B、37C および 37D)。

20

【0220】

体重および体組成に対する化合物 19 の効果

体重を毎日測定し、食物摂取は、2 - 3 日毎に測定した。ラットは日曜日から始めて金曜日まで 6 日間、綿実油中の化合物 19 を与えられた。用量は、薬物と対照ビヒクルの投与の日の体重に基づいて計算された。図 38 に示されるように、動物は HFHC の食餌を与えて 3 週間後かつ処置の開始前において、約 200 グラム体重が増加した (図 38 の A)。HFHC の食餌を与えられるが綿実油を与えられない対照群と、第二の対照群 (対照ビヒクル) とでは、同様に体重が増加し、これは、ビヒクルは体重の変化に寄与しないことを示唆している (図 38 の B)。処置開始の 2 週間後において、2.5 mg / kg および 10 mg / kg の処置群に体重の有意な減少がみられた。8 週間の処置の終わりに、2.5 mg / kg は、対照ビヒクルよりも約 15% 少ない体重増加となった (それぞれ、 357.7 ± 10.4 g / ラット、 420.9 ± 2.4 g / ラットと比較して)。(図 38 の A)。10 mg / kg の処置ラットの体重増加の減少は、対照ビヒクル群のそれ (それぞれ、 321.4 ± 10.3 グラム / ラット) よりも約 24% 低かった。累積食物摂取量は、対照と 2.5 mg / kg との間で類似しており (それぞれ 1370 ± 21 対 1320 ± 18 g / ラット)、10 mg / kg の群でわずかに減少した (1245 ± 21 , 図 2 参照)。総体重増加の割合を食物摂取と比較して計算したところ、2.5 および 10 mg / kg 群では対照群と比較して約 13% および 16% 少ない体重増加であった (それぞれ 0.326 ± 0.011 , 0.313 ± 0.014 対 0.373 ± 0.011 ,)。食物摂取が減少していない 2.5 mg / kg 投与群における減少量は、ob / ob マウスで観察されたように、食物摂取を減少させない場合に薬物が体重を減少させることを意味すると解釈され得る。

30

40

【0221】

体重増加の減少は、体脂肪を低下させる主な要因であった

化合物 19 の全身脂肪体組成 (total body fat body composition) を減少させる上効果を決定するために、隔週の ECHOMRI 法を用いられた。2.5 および 10 mg / kg で処置したラットの総体重は、処置の 2 週間後後の対照と対照ビヒクルの両方の群よりも低かった (図 39A)。この減少は主に、やせた量が顕著な変化によるものではなく、低い体脂肪によるものであった。(図 39B) 処置の 8 週間後に、2.5 および 10 mg / kg の処置ラットの体重は、対照群よりも 8% から 15% 低かった (それぞれ、 545.6 ± 9.7 , 502.8 ± 7.8 および $592.9 \pm$

50

5.4 g / ラット、図 39 A を参照)。10 mg / kg の群の体重は、通常の食餌を与えられたラットと同様の値に達した。より重要なことには、体重の差のほとんどは、処置と対照群 (図 39 B) の間の脂肪含量の差に帰することができる。8 週間の処置の後、全身脂肪重量は、2.5 および 10 mg / kg では対照ビヒクルと比較して約 25 および 43 % 低かった (それぞれ 114.7 ± 5.2 , 86.5 ± 3.2 および 150.9 ± 4.2 g / ラット)。合計の % 脂肪についても顕著に低く、2.5 mg / kg の群が通常の食餌を与えられたラット群と同様の % 脂肪を有し、10 mg / kg が通常の食餌より低い割合を有していた。 26.6 ± 0.53 (対照); 21.9 ± 0.82 (2.5 mg / kg); 18.0 ± 0.6 (10 mg / kg) および 21.2 ± 0.82 (通常の食餌) (図 39 C)。パーセント除脂肪は 2.5 および 10 mg / kg において対照群と比較して高いが、パーセント除脂肪体重は、全ての群の間で有意差はなかった (図 29 の D および図 39 E)。

【0222】

化合物 19 は、HFHC の食餌とデノボ脂質生成の下方調節された遺伝子の発現によって、および潜在的には脱共役タンパク質および熱のアップレギュレーションによって引き起こされる脂肪肝の状態を改善した。

高脂肪食を与えた Sprague - Dawley ラットは、肥満を誘導するのみならず、これらの肝臓に蓄積されたトリグリセリドのレベルが高い脂肪肝の状態を引き起こした。HFHC の食事を与えられた SD ラットの肝臓に対する化合物 19 の効果は、処置の 8 週間後に検査された。図 40 A に示すように、対照ラットは、処置されたラットと比較して大きく脂肪に富んだ肝臓を発達させた。これはさらに、オイルレッド O 染色で各グループの 5 匹の動物からの肝臓の凍結切片の染色によって確認され、ここで、脂肪蓄積は全ての処置群において対照群と比較して低かった ($n = 5$) (図 40 B)。これらの結果は、対照および処置ラットにおける TG およびコレステロールレベルを測定することにより確認された。図 40 C に示すように、TG およびコレステロールレベルは両方の処置動物群においてそれぞれ 40 および 25 % 低かった (図 40 C)。リアルタイム PCR 法を用いて、我々は、SREBP - 1 (ACC, SCD および ACL) の制御下にある遺伝子、および SREBP - 2 MVD, LDLR および INSIG - 1 の制御下にある遺伝子が 40 - 80 % まで顕著にダウンレギュレートされていることを見出した (図 40 D)。これらの結果は、化合物 19 は、全身の脂肪を減少させるだけでなく、脂肪肝状態を改善し、ヒト脂肪肝疾患に対する有望な薬剤であることを示唆している。

【0223】

化合物 19 を投与したラットの肝臓における脱共役タンパク質 2 (UCP2) のアップレギュレーション

UCPs が熱発生のアップレギュレーションに関与していることはよく記載されている。それらはミトコンドリア膜電位を低下させることにより熱として代謝エネルギーを消費する。肝臓は特に脂質合成において、非常に活発な代謝器官である。本発明は、対照ラットと化合物 19 で処置されたラットとの間で食料消費は顕著に異なっていないことを示した。脂質合成食を給餌したにもかかわらず、処置動物は、肝臓を含めて有意に低い体脂肪を蓄積した。肝臓はエネルギーが非結合され得る例として検査され、肝臓における主要な UCP である UCP2 のレベルが決定された。リアルタイム PCR 法を用いて、図 41 に示すように、UCP2 のレベルは有意に高く、2.5 および 10 mg / kg 処置群でそれぞれ約 1.5 および 3 倍増加した。これらの結果は、肝臓中の脂質含量の減少が、エネルギーの一部が非結合熱発生によって消費される、合成の減少および脱共役の結果であるということを強く示唆する。

【0224】

以下の引用文献が、本明細書中で引用される。

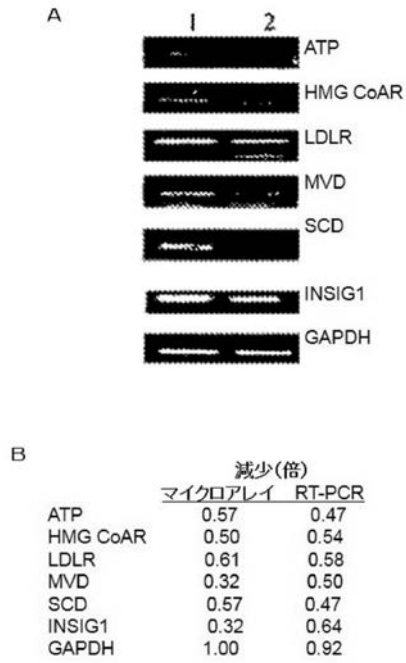
Abu - Elheiga et al., (2001) Science 291, 2613 - 6.

Abu - Elheiga, L. et al., (2003) Proc Natl Ac 50

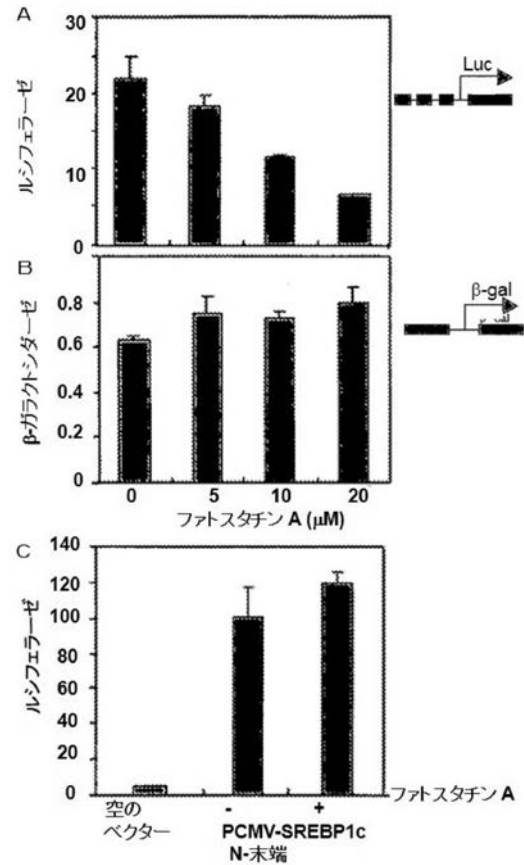
- ad Sci U S A 100, 10207-12.
- Abu-Elheiga, L. et al., (1997) J Biol Chem 272, 10669-10677.
- Abu-Elheiga, L. et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 1444-1449.
- Abu-Elheiga, L. et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4011-4015.
- Boden G, C. X. et al., (1994) J Clin Invest. 93(6):2438-46 93(6), 2438-2446.
- Boizard, M. et al., (1998) J Biol Chem 273, 29164-71. 10
- Brown, M. S. et al., (1997) Cell 89, 331-40.
- Chalkley, S. M. et al., (1998) Metabolism 47(9), 1121.
- Choi, Y. et al., (2003) J Biol Chem 278, 7320-4.
- Cohen, P. et al., (2002) Science 297(5579), 240-243.
- Goldstein, J. L. et al., (1983) Methods Enzymol 98, 241-60. 20
- Goldstein, J. L. et al., (2006) Cell 124, 35-46.
- Grand-Perret, T. et al., (2001) Nat Med 7, 1332-8.
- Hastings, N. et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(25), 14304-14309.
- Hookman et al., (2003) American Journal of Gastroenterology 98(9), 2093-2097.
- Horton, J. D. et al., (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 5987-92. 30
- Horton, J. D., et al., (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100, 12027-32.
- Horton, J. D. et al., (2003) J. Biol. Chem. 278(38), 36652-36660.
- Hua, X. et al. et al., (1996) Cell 87, 415-26.
- Hua, X. et al., (1995) J Biol Chem 270, 29422-29427.
- Ingalis, A. M. et al., (1950) J. Hered 41, 317-318. 40
- Kim, J. B. et al., (1996) Genes Dev 10, 1096-107.
- Ktorza A, B. C. et al., (1997) Diabetes Metab. Suppl 2, 38-46.
- Kubota N, T. Y., et al. (1999) Mol. Cell 4, 597-609.
- Liang, G., et al., (2002) J Biol Chem 277, 9520-8.
- Mao, J. et al., (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103, 8552-7. 50

- Marquardt, A., et al., (2000) Genomics 66 (2), 175.
- Matsusue, K., et al., (2003) J. Clin. Invest. 111(5), 737-747.
- Miyazaki, M., et al., (2000) J. Biol. Chem. 275(39), 30132-30138.
- Moller, D. E. et al., (2005) Annual Review of Medicine 56(1), 45-62.
- Nakamura, M. T. et al., (2004) Annual Review of Nutrition 24(1), 345-376. 10
- Ntambi, J. M., et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99(17), 11482-11486.
- Oh, W., et al., (2005) Proc Natl Acad Sci U S A 102, 1384-9.
- Osborne, T. F. (2000) J Biol Chem 275, 32379-82.
- Rader, D. J. (2001) Nat Med 7, 1282-4.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990.
- Sakai, J. et al., (1996) Cell 85, 1037-46. 20
- Sakai, J. et al. MMol Cell 2, 505-14 (1998).
- Sato, S. et al. J Am Chem Soc 129, 873-80 (2007).
- Sheng, et al., (1995) Proc Natl Acad Sci U S A 92, 935-938.
- Shimano, H. (2000) Trends Cardiovasc Med 10, 275-8.
- Shimano, H., et al., (1999) J Biol Chem 274, 35832-9.
- Tontonoz, P., et al., (1993) Mol Cell Biol 13, 4753-9. 30
- Yahagi, N., et al., (2002) J. Biol. Chem. 277(22), 19353-19357.
- Zambrowicz, B. P et al., (2003) Nat Rev Drug Discov. 2(1), 38-51.

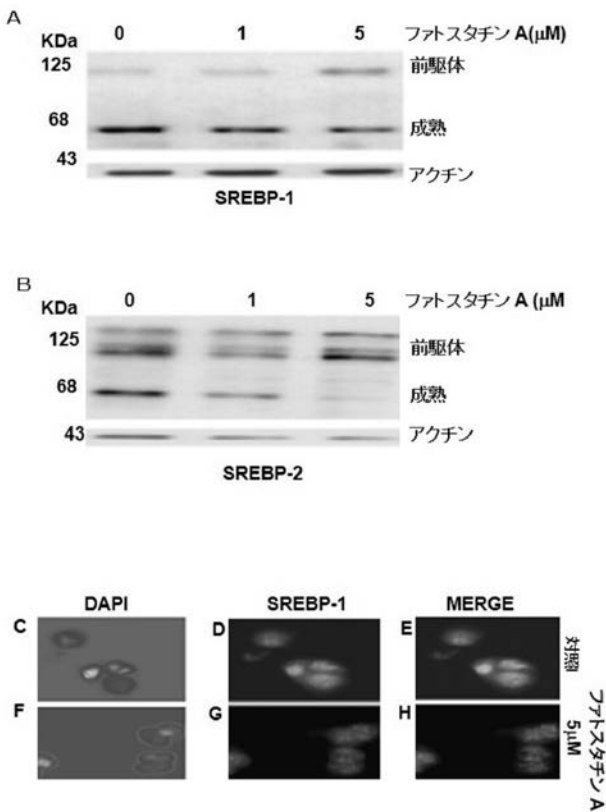
【 図 1 】



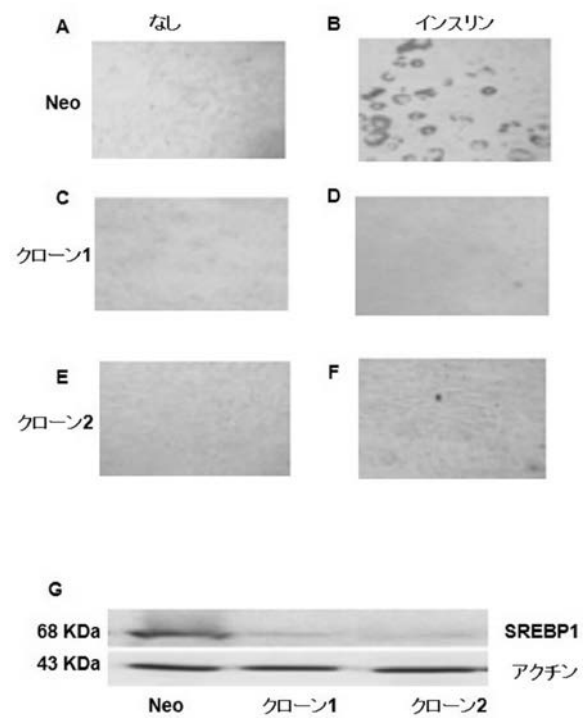
【 図 2 】



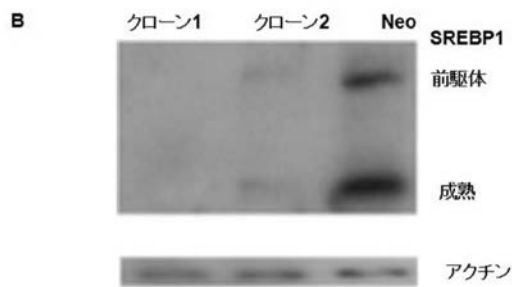
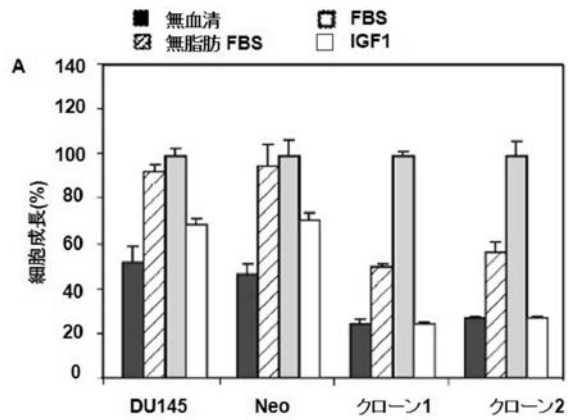
【 図 3 】



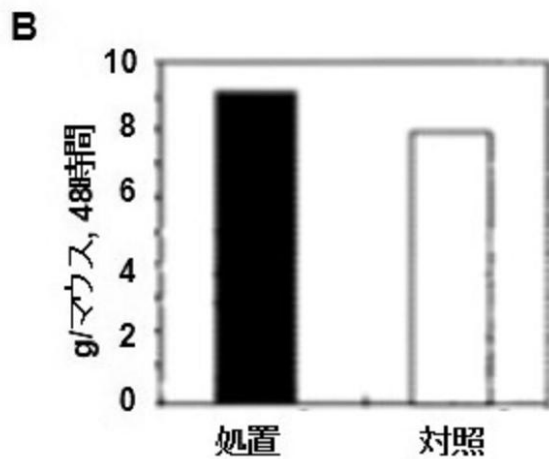
【 図 4 】



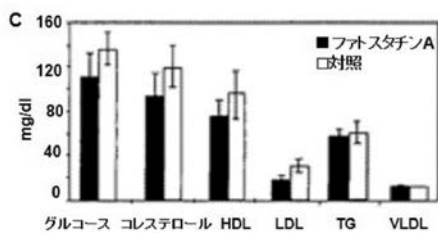
【図 5】



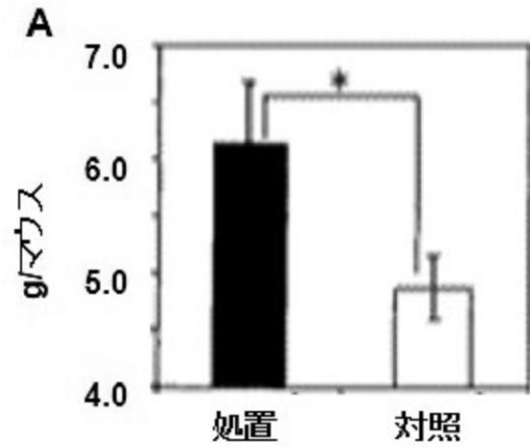
【図 6 B】



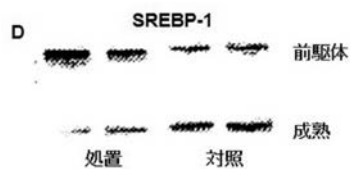
【図 6 C】



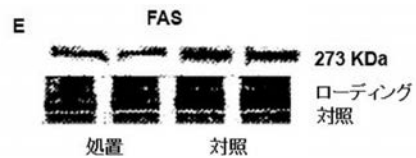
【図 6 A】



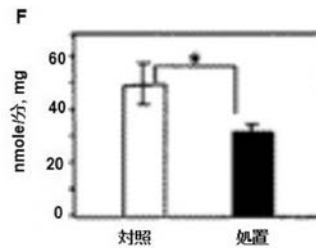
【図 6 D】



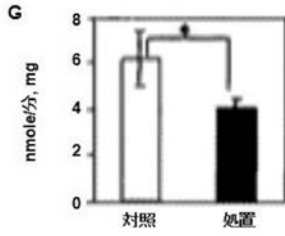
【図 6 E】



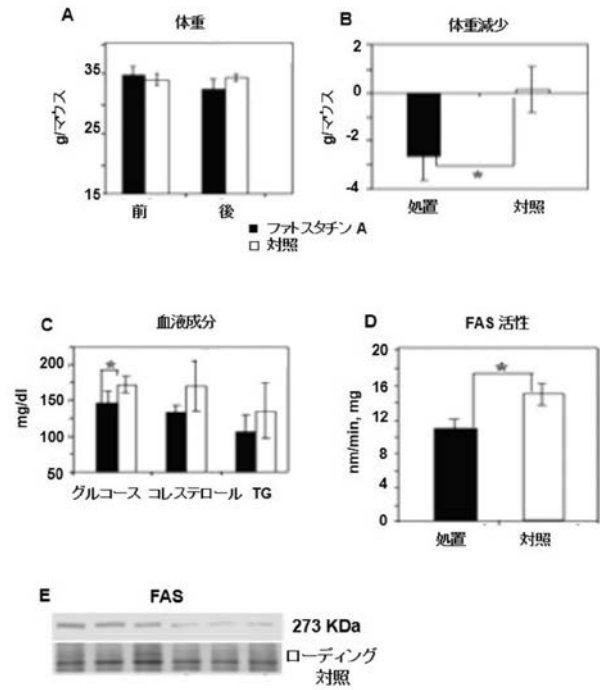
【図 6 F】



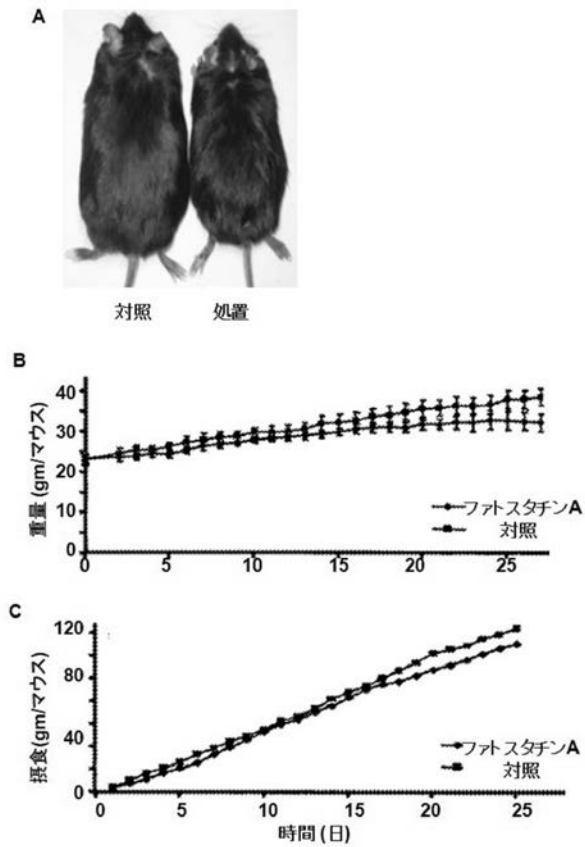
【図 6 G】



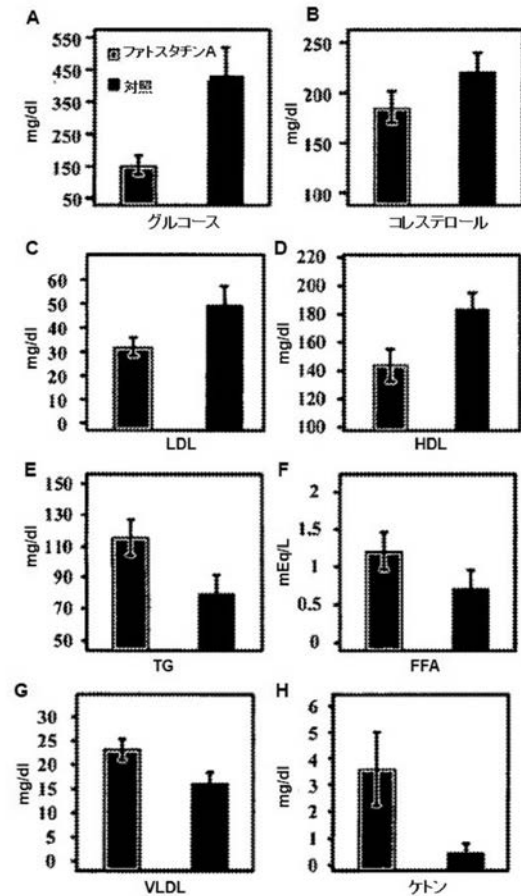
【図 7】



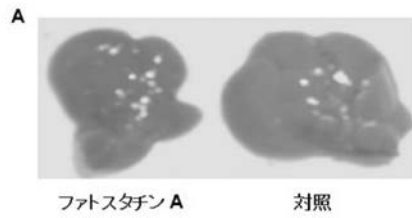
【図 8】



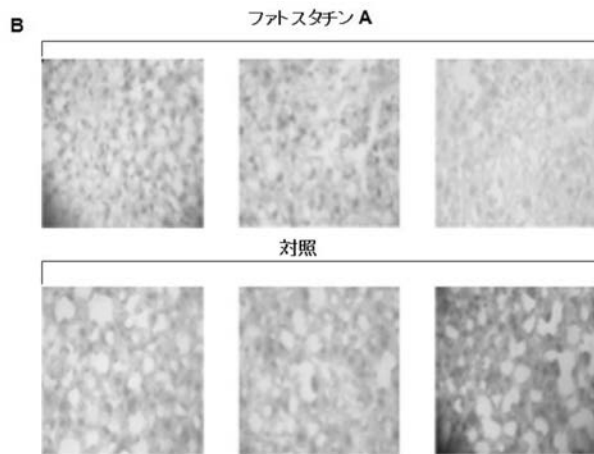
【図 9】



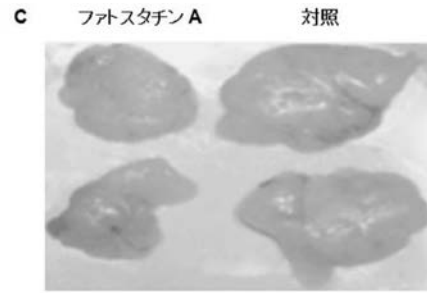
【図 10 A】



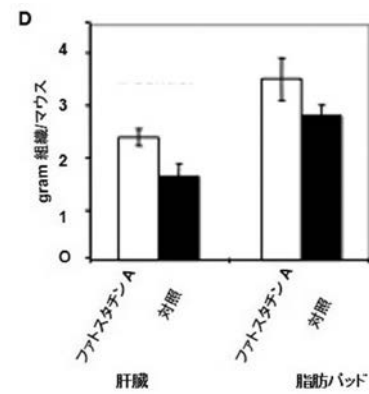
【図 10 B】



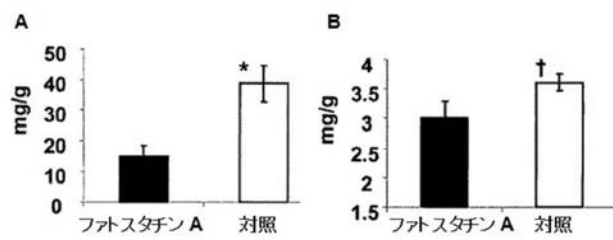
【図 10 C】



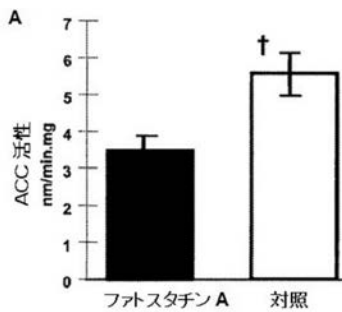
【図 10 D】



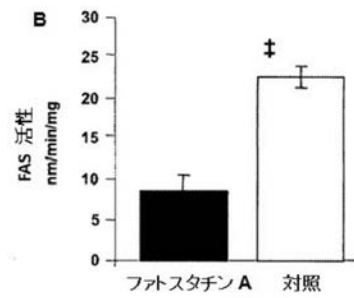
【図 11】



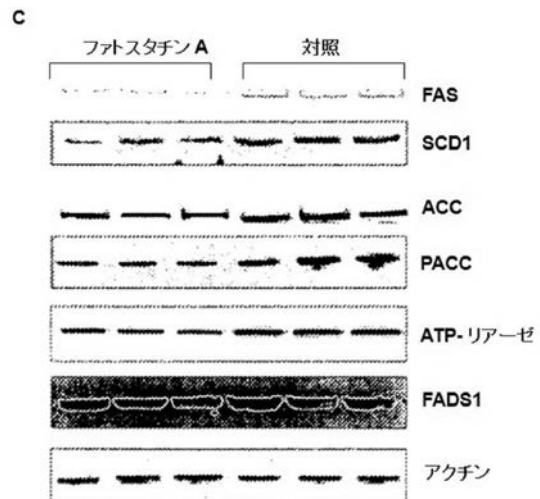
【図 12 A】



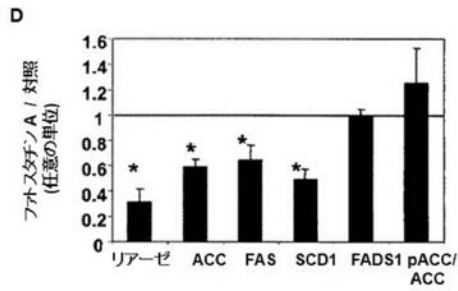
【図 12 B】



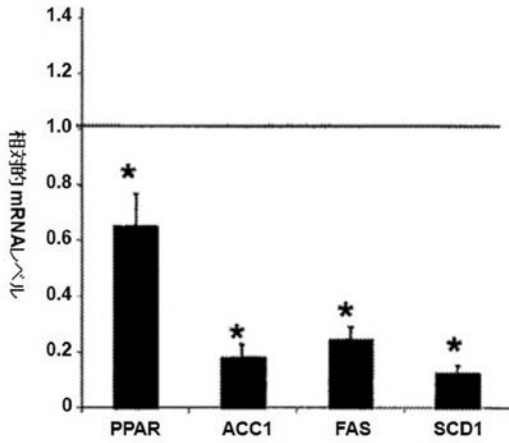
【図 12 C】



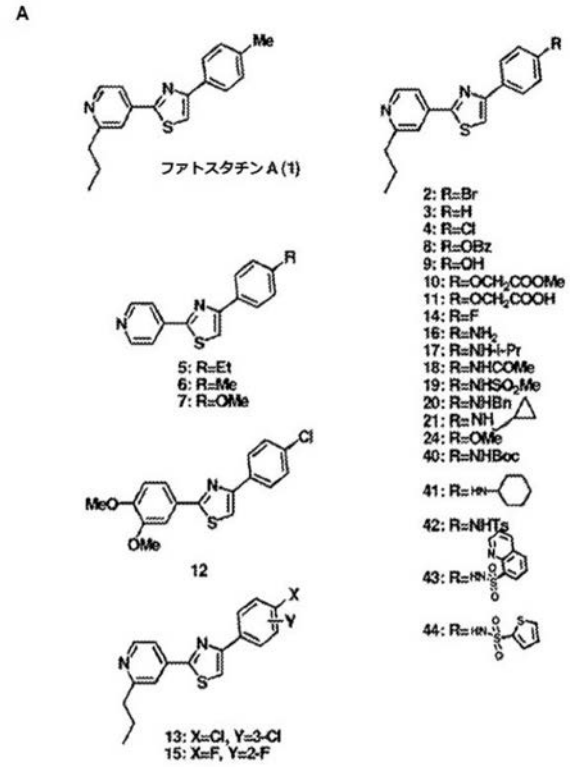
【図12D】



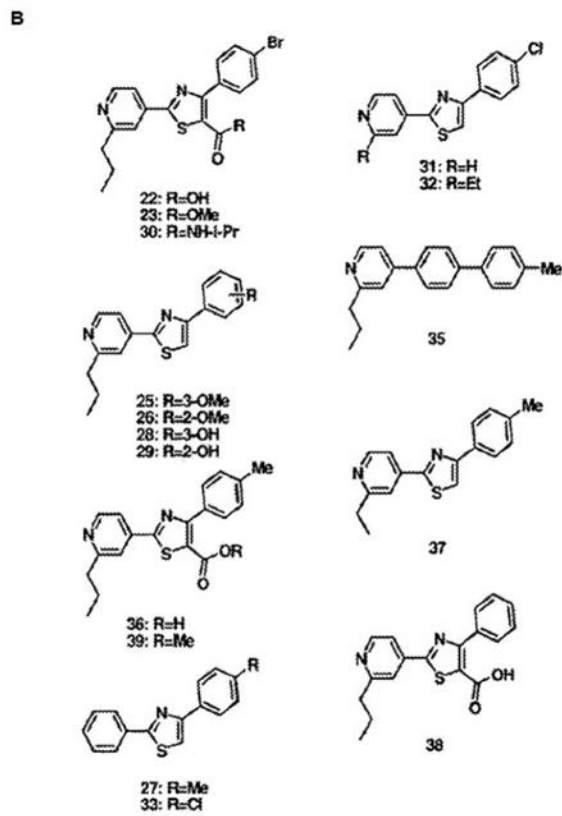
【図13】



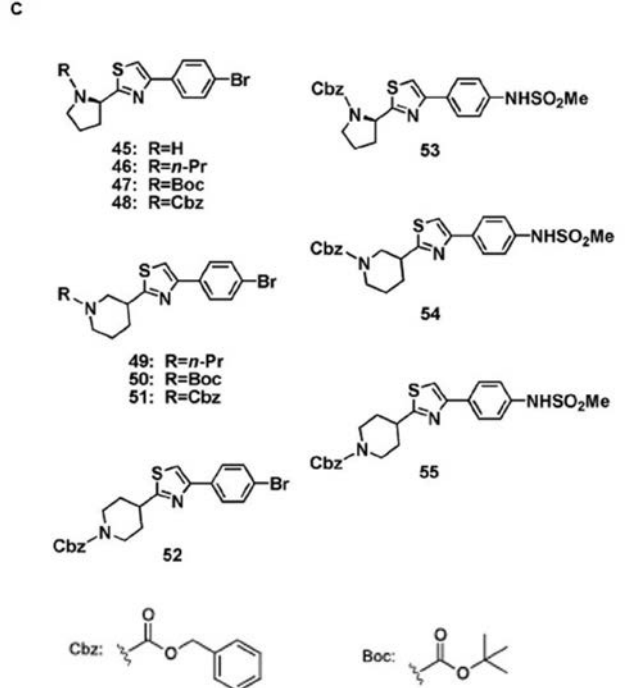
【図14A】



【図14B】

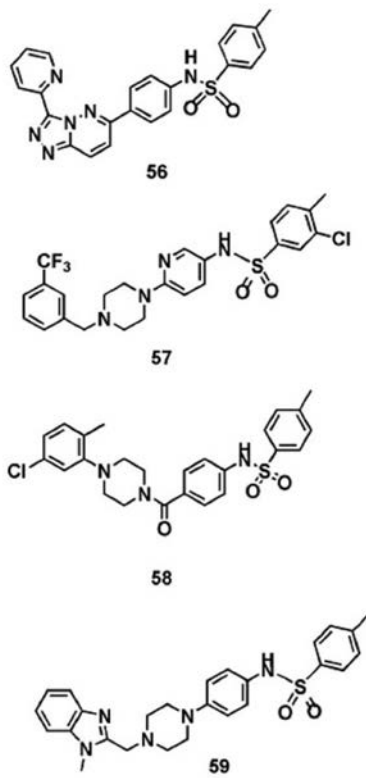


【図14C】



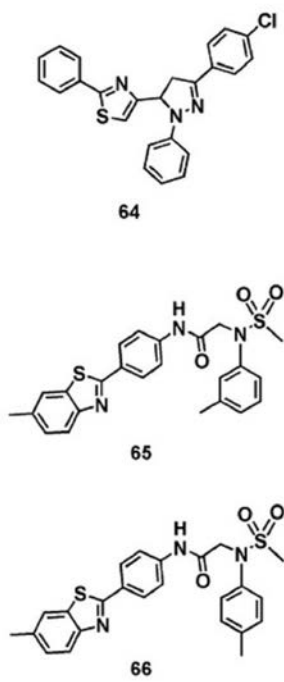
【 図 1 4 D 】

D



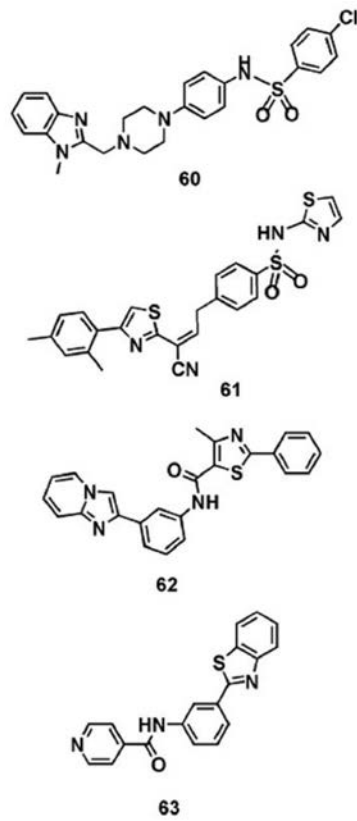
【 図 1 4 F 】

F

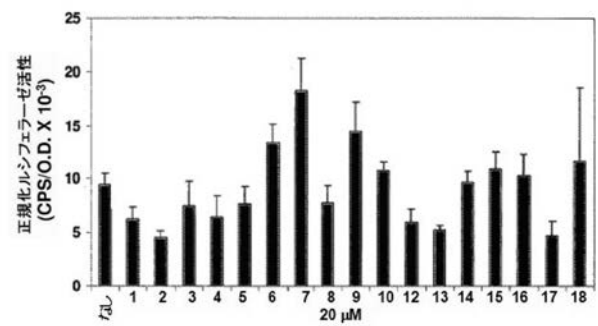


【 図 1 4 E 】

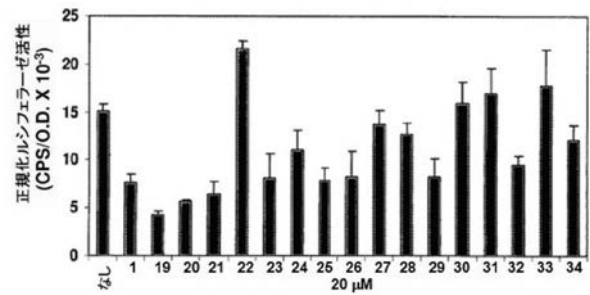
E



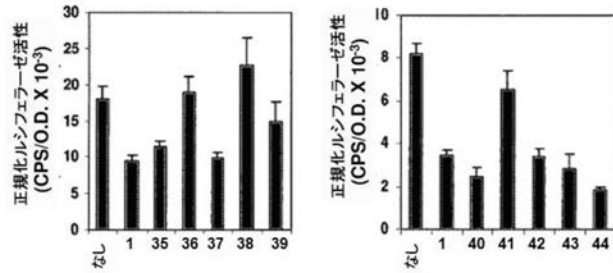
【 図 1 5 】



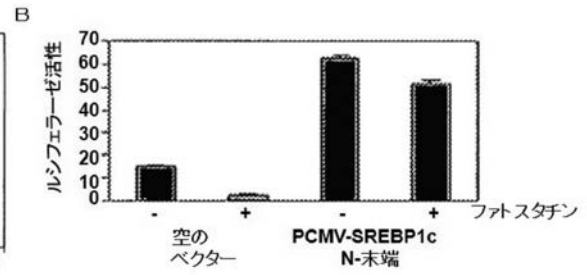
【 図 1 6 】



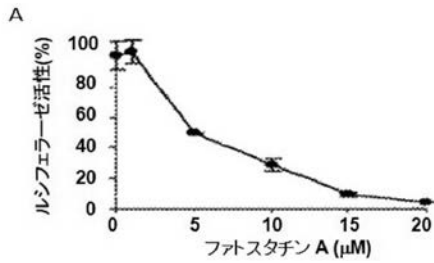
【図 17】



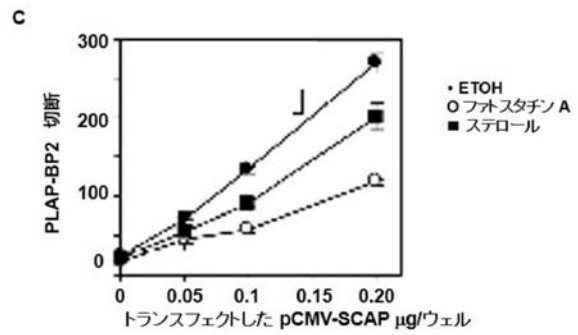
【図 18 B】



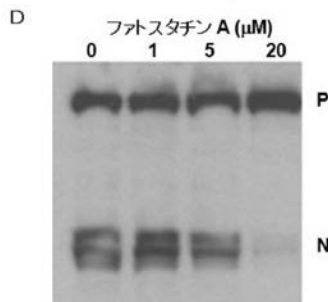
【図 18 A】



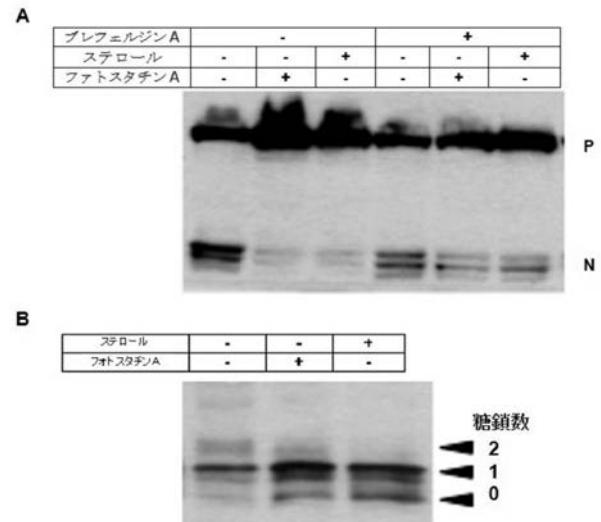
【図 18 C】



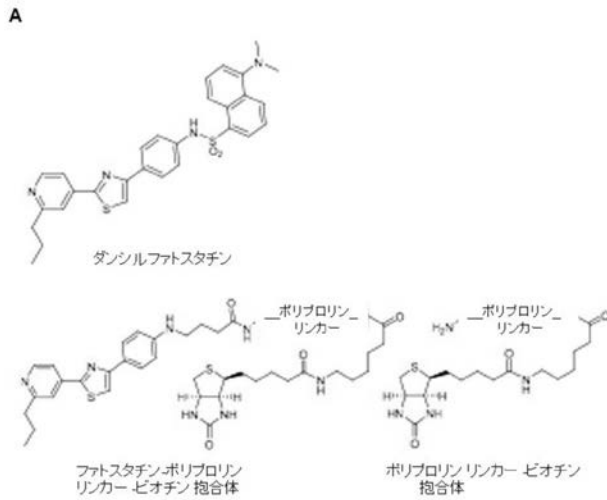
【図 18 D】



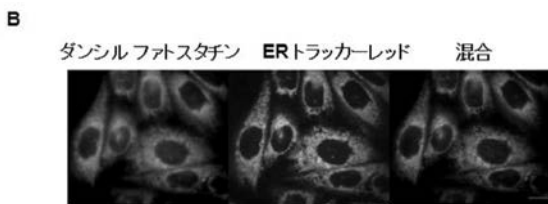
【図 19】



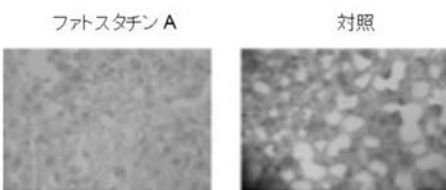
【図 20 A】



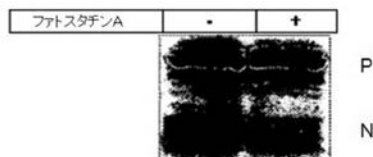
【図 20 B】



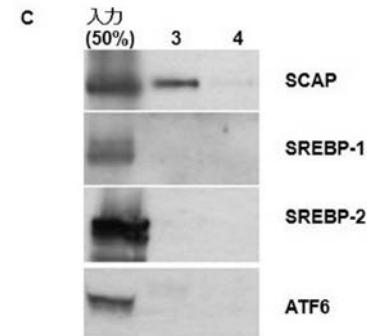
【図 21】



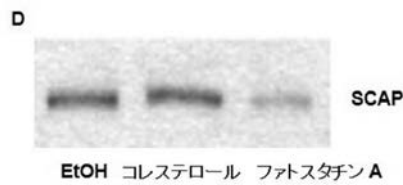
【図 22】



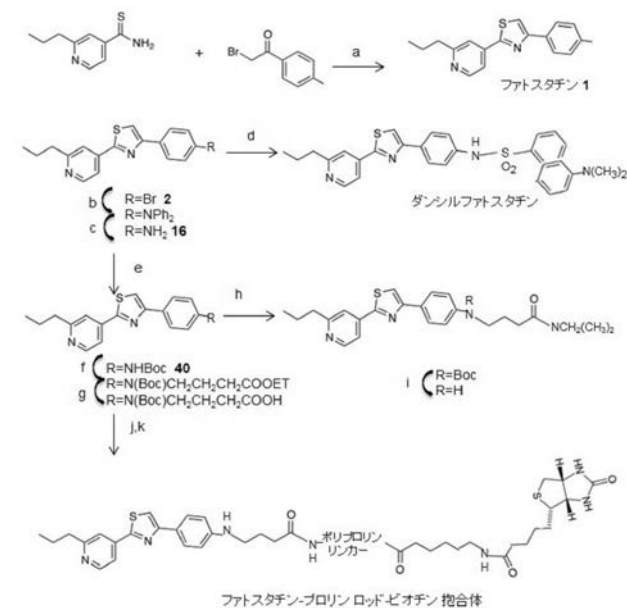
【図 20 C】



【図 20 D】

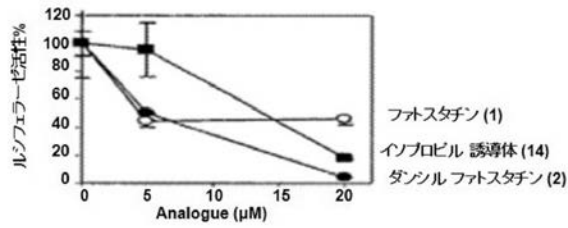


【図 23】

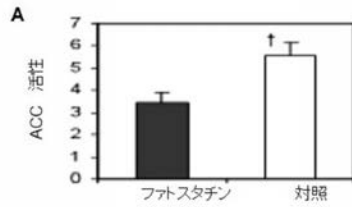


試薬: a) EtOH; b) ペンゾフェノニミド, Pd₂dba₃, BINAP, NaOtBu, トルエン; c) HCl aq, THF; d) ダンシルクロライド, ピリジン, CH₂Cl₂; e) (Boc)₂O, DMAP, THF; f) Ethyl 4-プロモブチレート, NaI, NaH, DMF; g) NaOH aq, THF, MeOH; h) IPNH₂, Et₃N, HATU, DMF; i) TFA, THF; j) レシチン-ポリプロリン-ビオチン-ジヒドロピリカルボジミド, NMP; k) TFA, エタノール, テオアニソール, PhOH, H₂O

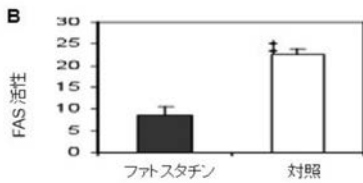
【図 2 4】



【図 2 5 A】



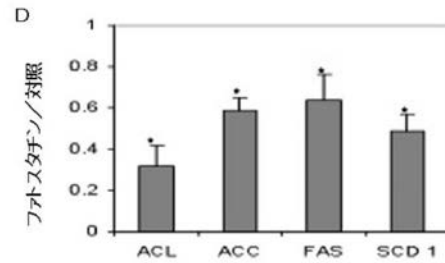
【図 2 5 B】



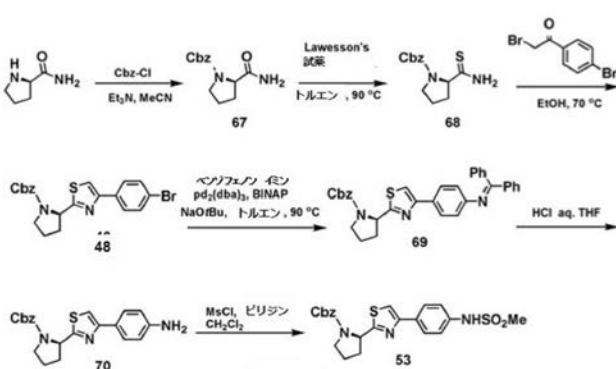
【図 2 5 C】



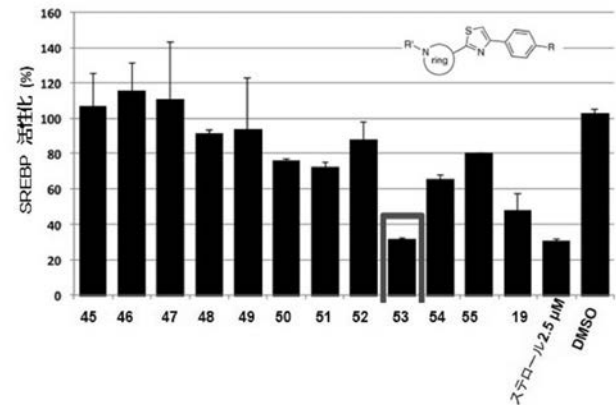
【図 2 5 D】



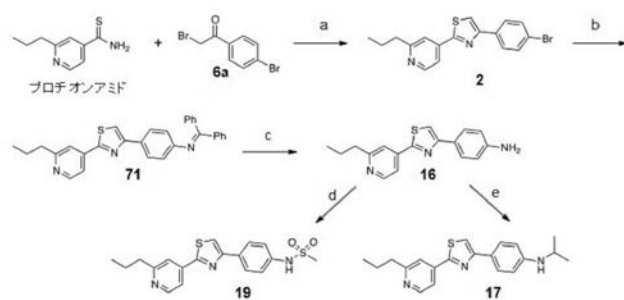
【図 2 6】



【図 2 8】

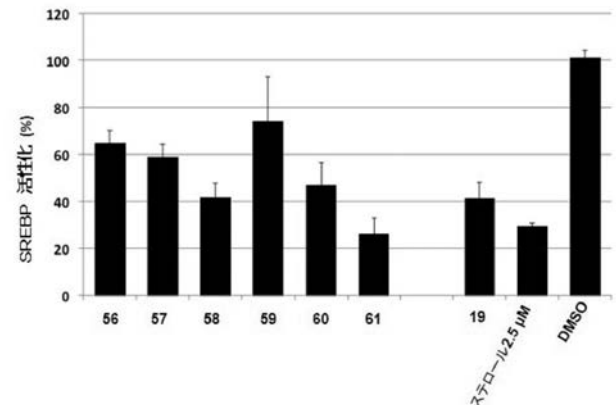


【図 2 7】

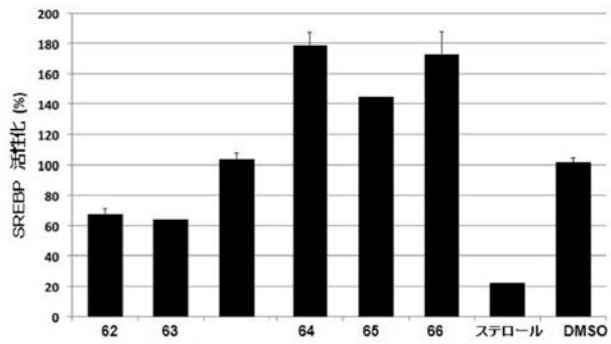


試薬と条件: a) EtOH, 70 °C; b) ベンゾフェノンイミン, Pd₂(dba)₃, BINAP, NaOtBu, トルエン, 還流; c) HCl aq, THF; d) MsCl, ピリジン, CH₂Cl₂, 0 °C; e) アセトン, AcOH, Na(OAc)₃BH, CH₂Cl₂, rt

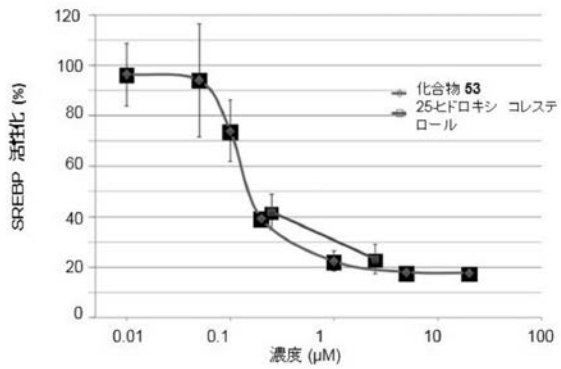
【図 2 9】



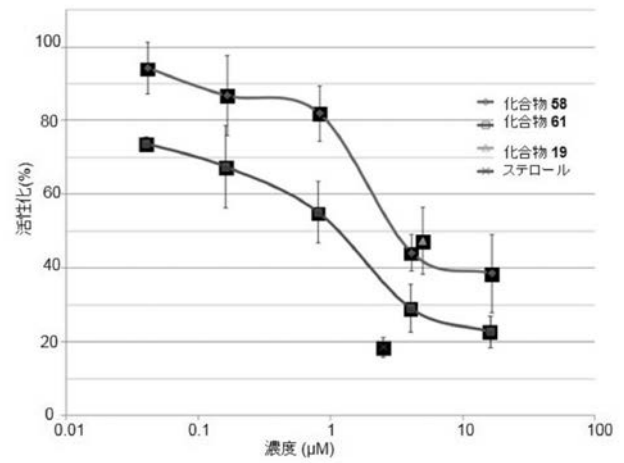
【図 3 0】



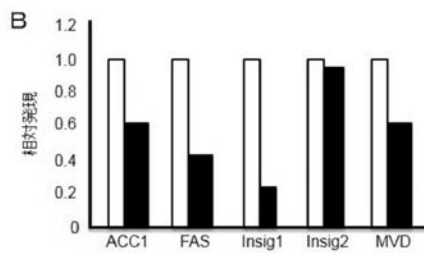
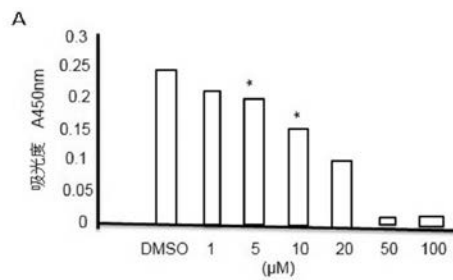
【図 3 1】



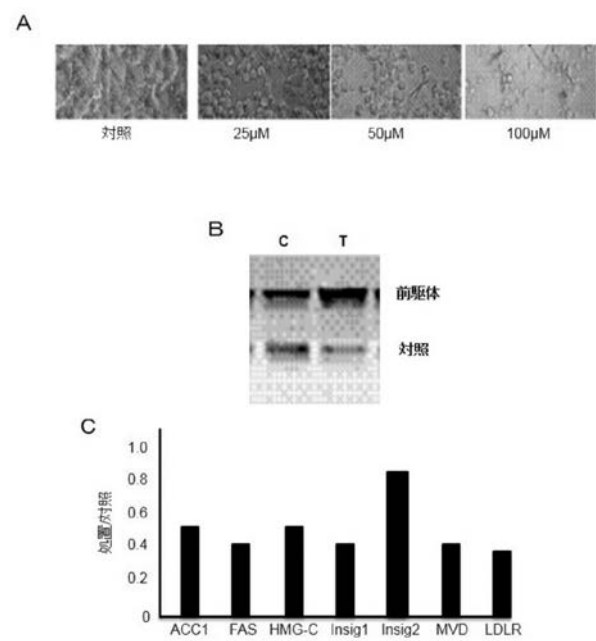
【図 3 2】



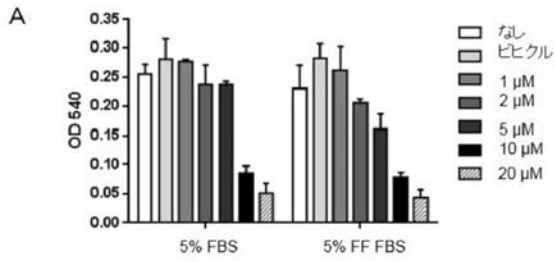
【図 3 3】



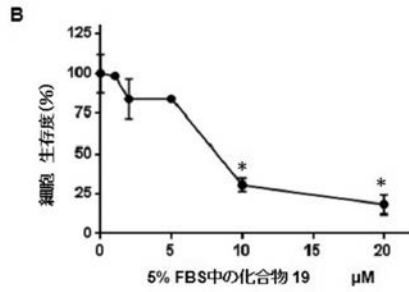
【図 3 4】



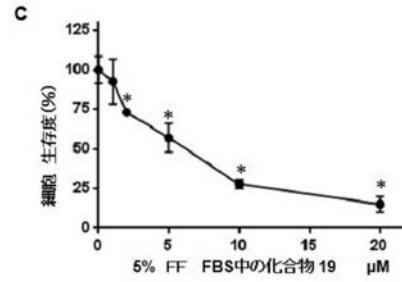
【図 3 5 A】



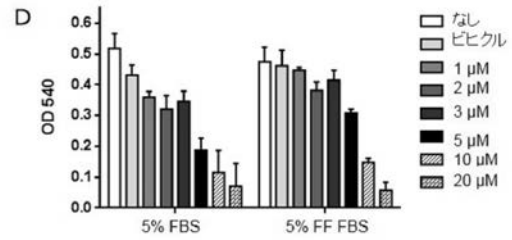
【図 3 5 B】



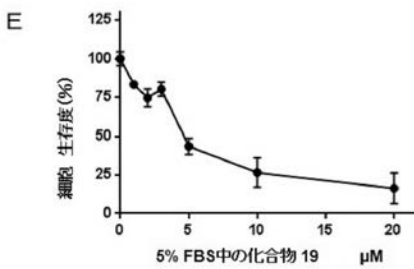
【図 3 5 C】



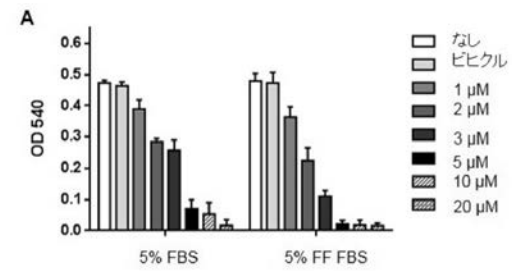
【図 3 5 D】



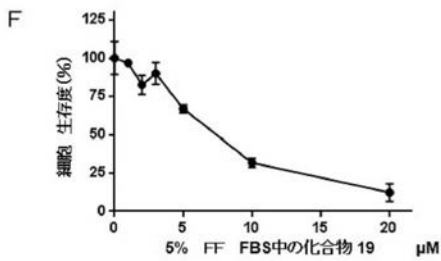
【図 3 5 E】



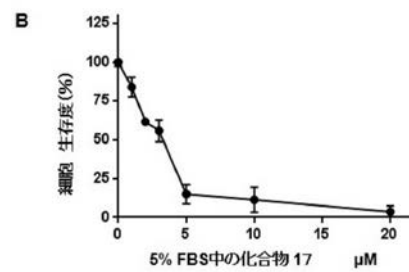
【図 3 6 A】



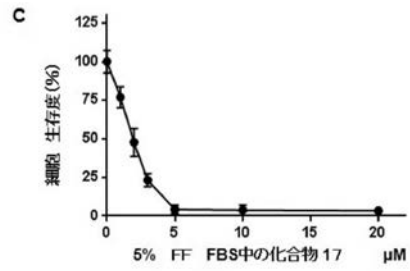
【図 3 5 F】



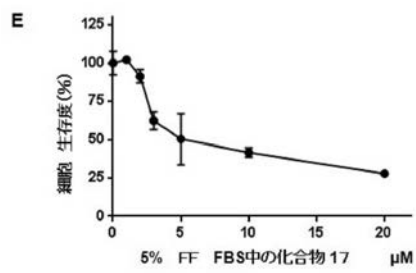
【図 3 6 B】



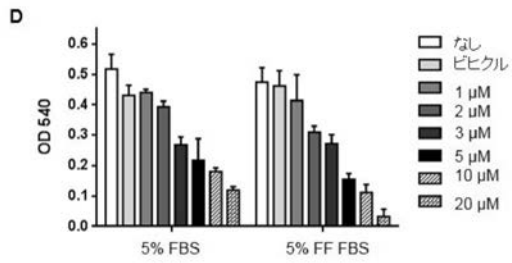
【図 3 6 C】



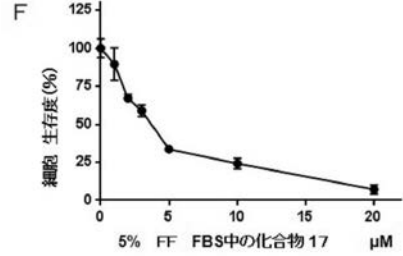
【図 3 6 E】



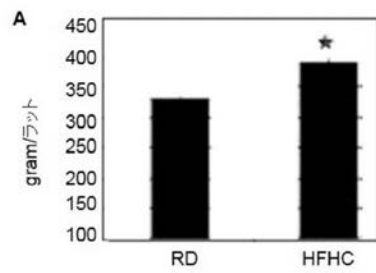
【図 3 6 D】



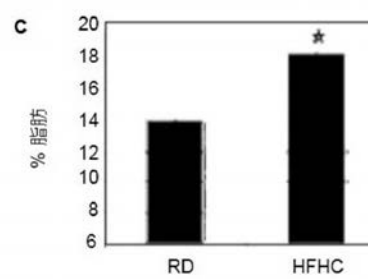
【図 3 6 F】



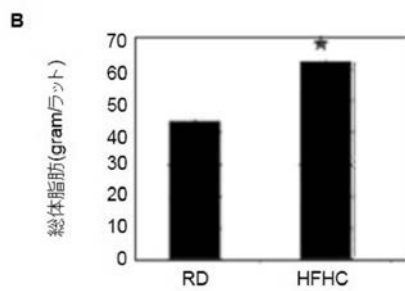
【図 3 7 A】



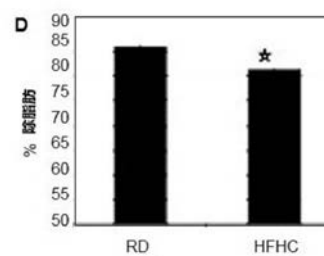
【図 3 7 C】



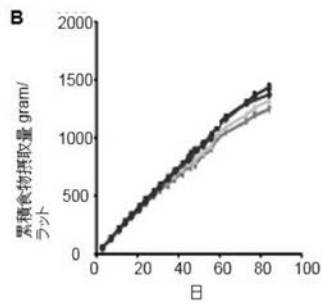
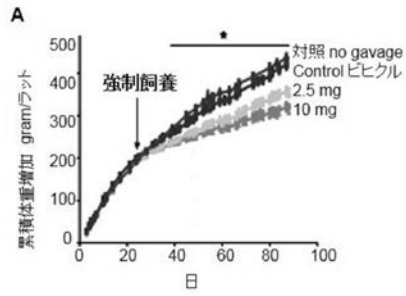
【図 3 7 B】



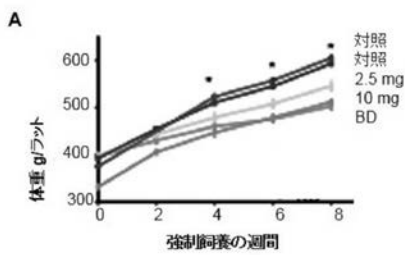
【図 3 7 D】



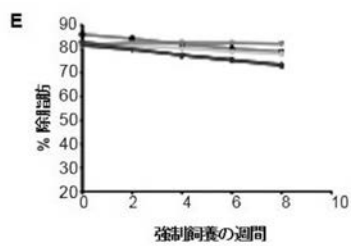
【図 38】



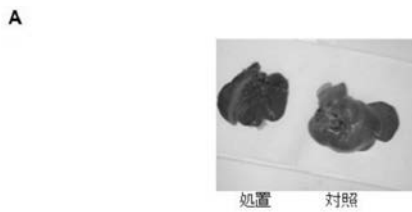
【図 39 A】



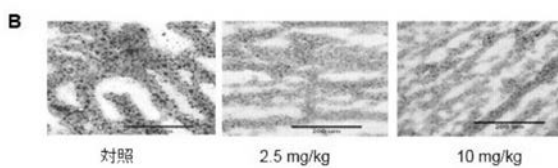
【図 39 E】



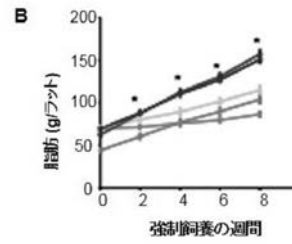
【図 40 A】



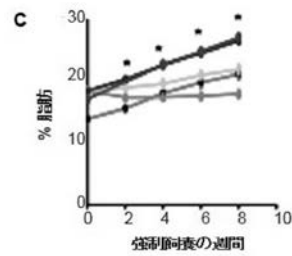
【図 40 B】



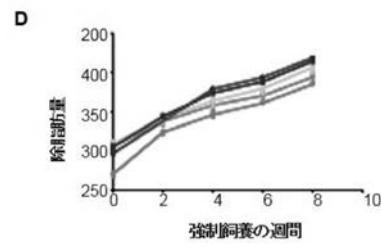
【図 39 B】



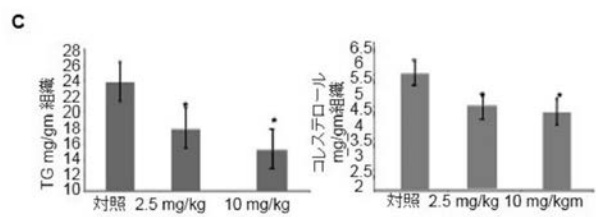
【図 39 C】



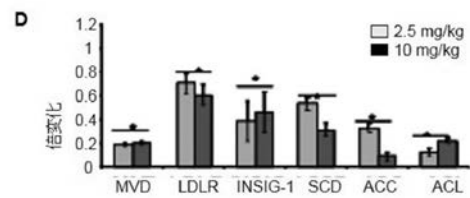
【図 39 D】



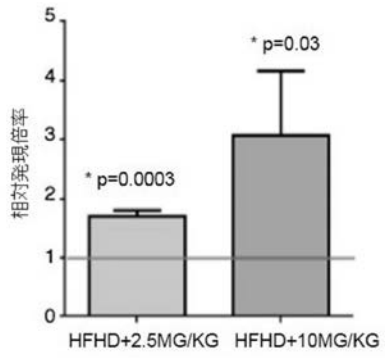
【図 40 C】



【図 40 D】



【 図 4 1 】



【 配 列 表 】

2016534124000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 2014/053334
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1-6, 14-32, 34-39 (all partially), 8-13 (completely) because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
<p>Claim 1 refers to an extreme large number of possible compounds due to the huge breadth of radical definitions and a meaningful search over the whole breadth of the claims is impossible. Moreover support and disclosure in the sense of Articles 5 and 6 is to be found for a very small proportion of the compounds claimed. Consequently, the search and examination have been restricted to those claimed compounds, which appear to be supported, i.e. compounds given in fig. 14A-14C and compounds having three rings directly linked to each other, wherein the first ring (ring A) is phenyl substituted with one or two substituents selected from methoxy, alkyl or halogen, or pyridine substituted in the 2nd position with alkyl and linked to the second ring at the 3rd position; the second ring (ring B) is thiazole linked in the 2nd position to ring A and in the 4th position to ring C and substituted at the 5th position with -COOH, COOMe or -CONH-alkyl. The third ring (ring C) is phenyl substituted in the 4th position. Because of these restrictions, compounds defined in claims 8-13 were not searched. However, even in view of the above-mentioned restrictions the initial phase of the search revealed a very large number of documents relevant to the issue of novelty, and only a few of them are cited in the search report.</p>	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2014/053334
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (see extra sheet) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D 417/04, 417/14, 231/06, 277/22, 277/24, 213/06, 277/22, 277/66, A61K 31/4439, 31/426, A61P 3/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Espacenet, STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/097835 A2 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE et al.) 14.08.2008, p. 1-8, paragraphs [0022], [0053]-[0134], [0154], [0178]-[0185], examples, fig. 14, claims	1-7, 14-39
X	WO 2013/110007 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK et al.) 25.07.2013, paragraphs [0066]-[0069], [0073]-[0089], claims	1, 7, 18, 20, 21-25, 28, 30-32, 38, 39
X	WO 2012/129562 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE et al.) 27.09.2012, 7 th compound in Table 1 on p. 69	1, 30
X	WO 2011/085128 A1 (SELEXAGEN THERAPEUTICS, INC. et al.) 14.07.2011, paragraphs [0003], [0027]-[0031], pp. 28-29, compounds given in examples 152-179, paragraphs [00174-00179], claims	1, 24, 25, 30-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 December 2014 (03.12.2014)		Date of mailing of the international search report 25 December 2014 (25.12.2014)
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, Russia, 125993 Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Authorized officer M. Gorbatovskaya Telephone No. 8(495)531-64-81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 2014/053334

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/090716 A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. et al.) 12.08.2010, paragraph [0008], pp. 177-178, compounds 1B-7B, 9B, 10B, pp. 201-212, compounds 1C-24C, 26C-27C, 29C-36C, 39C-49C, 53C-57C, 59C-64C, examples on pp. 251-268, example 111B, examples on pp. 409, 446-458, 459-466, claims 1, 67-75, 78, 102-104	1, 24, 25, 30-32
X	WO 2010/059611 A2 (SCHERING CORPORATION et al.) 27.05.2010, p. 81, example 15, p. 87, example 27, p. 91, p.114, compound 143, claims	1, 14, 19, 26, 30, 32
X	WO 2010/013975 A2 (DONG WHA PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 04.02.2010, p. 4, paragraph 16 – p. 7, paragraph 50, compounds 21, 26, 27, 33, 34, 40, 41, 49, 56, 79, 164, 166, 167, 236, 239, 330, 332	1, 30, 32
X	WO 2009/055917 A1 (METHYLGENE INC. et al.) 07.05.2009, paragraphs [0202]-[0205], [0209], pp. 78-79, 82, compounds 13, 14, 17, Table 5, compound 52, p. 86, compounds 49, 50, p. 92, compound 74, example 9a, p. 93, example 10a, compound 80, compounds 113, 117, 120 and 122, Table 8, compounds 132-133, 142, 144-148, 151, 153, 158, Table 9, compound 208	1, 24, 30, 32
X	WO 2009/027346 A2 (UNIVERSITAT DES SAARLANDES et al.) 05.03.2009, p. 16, line 23 – p. 17, p. 51, compounds 54-56 – p. 54, compound 61, p. 54, compound 64 – p. 57, compound 71, p. 70, compound 105, p. 71, compounds 107-108 – p. 73, compound 113, p. 79, compound 126, Table 6, claims	1, 24, 25, 30-32
X	WO 2008/090382 A1 (THE UNIVERSITY OF SHEFFIELD et al.) 31.07.2008, p. 1, line 24 – p. 3, pp. 9-10, 26-30, 40-45, examples, claims	1, 24, 30-32
X	WO 2007/062222 A2 (UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA et al.) 31.05.2007, pp. 12-13, 67, claims 28, 60, 67-90	1, 24, 25, 30, 32
X	WO 2007/052843 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED et al.) 10.05.2007, pp. 799-801, examples 361-363, p. 1100, example 555, p. 1226, example 612	1, 14-19, 30, 32
X	WO 2007/020194 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.) 22.02.2007, p. 35, example, stage A, line 14, stage D, lines 33-34, p. 37, stage (B), line 13	1
X	WO 2007/005785 A1 (DR. REDDY'S LABORATORIES LTD. et al.) 11.01.2007, p. 19, 3 rd - 5 th compounds in Table, p. 21, compounds in the Table	1, 30
X	US 4153703 A (UNIROYAL, INC. et al.) 08.05.1979, examples in Table 1, claim 1	1
X	[online] REGISTRY via STN, 18.04.2011, RN 1282016-56-1; 29.06.2011, RN 1310695-72-7; 13.12.2010, RN 1256384-71-0; 18.10.2010, RN 1246471-51-1; 07.04.2003, RN 501914-24-5; 09.10.2001, RN 361199-89-5; 03.09.1988, RN 116227-98-6; 15.02.2007, RN 921134-76-1; 15.02.2007, RN 921110-77-2	1, 33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Classification of subject matter

International application No.

PCT/US 2014/053334

C07D 417/04 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
C07D 231/06 (2006.01)
C07D 277/24 (2006.01)
C07D 213/06 (2006.01)
C07D 277/22 (2006.01)
C07D 277/66 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 6 5
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 31/4436 (2006.01)	A 6 1 K 31/4436	
C 0 7 D 277/24 (2006.01)	C 0 7 D 277/24	
A 6 1 K 31/426 (2006.01)	A 6 1 K 31/426	
C 0 7 D 417/14 (2006.01)	C 0 7 D 417/14	
A 6 1 K 31/4706 (2006.01)	A 6 1 K 31/4706	
C 0 7 D 277/22 (2006.01)	C 0 7 D 277/22	
A 6 1 K 31/4418 (2006.01)	A 6 1 K 31/4418	
A 6 1 K 31/454 (2006.01)	A 6 1 K 31/454	
A 6 1 K 31/5025 (2006.01)	A 6 1 K 31/5025	
C 0 7 D 213/76 (2006.01)	C 0 7 D 213/76	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 K 31/496	
C 0 7 D 295/192 (2006.01)	C 0 7 D 295/192	
A 6 1 K 31/495 (2006.01)	A 6 1 K 31/495	
C 0 7 D 277/52 (2006.01)	C 0 7 D 277/52	
A 6 1 K 31/427 (2006.01)	A 6 1 K 31/427	
C 0 7 D 471/04 (2006.01)	C 0 7 D 471/04	1 0 8 K
A 6 1 K 31/437 (2006.01)	A 6 1 K 31/437	
A 6 1 K 31/4155 (2006.01)	A 6 1 K 31/4155	
C 0 7 D 277/66 (2006.01)	C 0 7 D 277/66	
A 6 1 K 31/428 (2006.01)	A 6 1 K 31/428	
C 0 7 D 487/04 (2006.01)	C 0 7 D 487/04	1 4 5
C 0 7 D 235/14 (2006.01)	C 0 7 D 235/14	
A 2 3 L 33/10 (2016.01)	A 2 3 L 33/10	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG

(72)発明者 アブ - エルヘイガ, ルトフィ

アメリカ合衆国 7 7 0 2 5 テキサス州 ヒューストン マリポサ 9 7 2 1

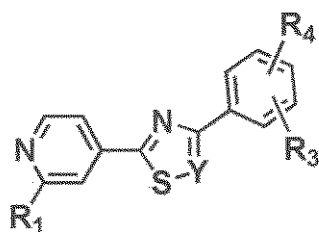
(72)発明者 渡邊 瑞貴

日本国京都府宇治市五ヶ庄官有地 1 1 - 4 1 2 京都大学寮

Fターム(参考) 4B018 LB10 LE06 MD07 ME01 ME14 MF14

4C033 AD09 AD13 AD17 AD20
 4C050 AA01 BB06 CC08 EE04 FF05 FF10 GG01 HH04
 4C055 AA01 BA02 BA06 BA52 BB10 CA01 CA02 CA50 CB07 DA01
 DA08
 4C063 AA01 AA03 BB01 BB08 BB09 CC62 CC92 DD03 DD10 DD12
 DD22 DD62 EE01
 4C065 AA03 BB06 DD02 EE02 HH01 JJ01 KK05 LL01 PP17
 4C084 AA19 MA52 MA55 NA14 ZA42 ZA45 ZA61 ZA70 ZA75 ZB26
 ZB27 ZC21 ZC33 ZC35 ZC75
 4C086 AA01 AA02 AA03 BC39 BC82 BC84 CB05 GA04 GA07 GA08
 GA10 GA12 MA01 MA04 MA52 MA55 NA14 ZA42 ZA45 ZA61
 ZA70 ZA75 ZB26 ZB27 ZC21 ZC33 ZC35 ZC75

【要約の続き】



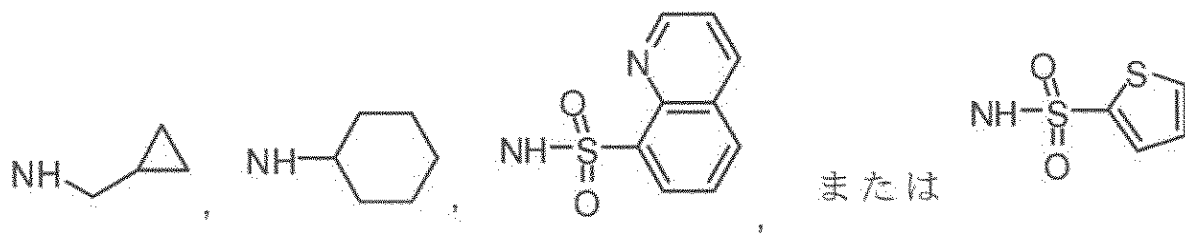
式中、 R_1 は H、Et、OMe または n - プロピルであり；Y は CH または

【化 2】



であり、 R_2 は OH、OMe または $NH-i-Pr$ であり； R_3 は H、F または Cl であり；および、 R_4 は、H、Me、Cl、Br、F、OH、OBz、 OCH_2COOMe 、 OCH_2COOH 、 NH_2 、 $NH-i-Pr$ 、 $NHCOMe$ 、 $NHSO_2Me$ 、 $NHBn$ 、OMe、 $NHBoc$ 、 $NHTs$ 、

【化 3】



である。

【選択図】なし