

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-1311

(P2010-1311A)

(43) 公開日 平成22年1月7日(2010.1.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	4 C 2 0 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 31/165 (2006.01)	A 6 1 K 31/165	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-221681 (P2009-221681)	(71) 出願人	591217403
(22) 出願日	平成21年9月25日 (2009.9.25)		
(62) 分割の表示	特願2002-284313 (P2002-284313) の分割		
原出願日	平成14年9月27日 (2002.9.27)		
(31) 優先権主張番号	60/325, 311		
(32) 優先日	平成13年9月27日 (2001.9.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/334, 041		
(32) 優先日	平成13年10月31日 (2001.10.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心肥大のための処置としてのヒストンデアセチラーゼの阻害

(57) 【要約】

【課題】本発明は、心肥大を処置および予防する方法を提供する。クラス I I H D A C (クロマチン構造および遺伝子発現の調節に関係があるとして公知である) は、心肥大に対して有益な効果を有することが示されている。驚くことに、本発明は、H D A C インヒビターが胎児の心臓遺伝子発現を阻害することおよび筋節構築を妨げることによって心肥大を阻害することを示す。

【解決手段】病的な心肥大および心不全を処置する方法であって、この方法は、(a) 病的な心肥大を有する患者を同定する工程；および (b) この患者にヒストンデアセチラーゼインヒビターを投与する工程を包含する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(3. 発明の詳細な説明)

(発明の背景)

政府は、国立衛生研究所からの助成金番号 N I H R O 1 H L 6 1 5 4 4 に従って、本発明の権利を有する。本発明は、米国仮出願番号 6 0 / 3 2 5 , 3 1 1 (2 0 0 1 年 9 月 2 7 日出願) および同第 6 0 / 3 3 4 , 0 4 1 (2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日出願) (これらの内容全体は、無条件で参考として本明細書によって援用される) に対する優先権の権利を主張する。

10

【0002】

(1. 発明の分野)

本発明は、一般的に、発生生物学および分子生物学の分野に関する。より詳細には、本発明は、心筋細胞における遺伝子調節および細胞生理学に関する。特に、本発明は、心肥大および心不全を処置するための H D A C インヒビターの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

(2. 関連技術の説明)

心臓に課された増加した仕事量に応答した心肥大は、基本的な適応性機構である。これは、神経刺激、内分泌刺激または機械的刺激のいずれかまたはこれらの組み合わせ結果としての、(細胞数よりもむしろ)細胞サイズおよび細胞質量における定量的な増加を反映する特殊なプロセスである。高血圧(心肥大に関与する別の因子)は、鬱血性心不全の頻出する前駆体である。心不全が生じる場合、左心室は通常、肥大かつ膨張し、そして心収縮機能(例えば、駆出率)が減少される。明らかに、心肥大応答は、複雑な症候群であり、そして心肥大を導く経路の解明が、種々の刺激から生じる心疾患の処置において有益である。

20

【0004】

転写因子のファミリー(筋細胞増強因子-2ファミリー(MEF2))は、心肥大に関与する。例えば、種々の刺激が、細胞内カルシウムを上昇させ得、細胞内シグナル伝達系または細胞内シグナル伝達経路のカスケード(カルシニューリン、CAMキナーゼ、PKCおよびMAPキナーゼを含む)を引き起こす。これらのシグナルの全ては、MEF2を活性化し、そして心肥大を引き起こす。しかし、種々のシグナル系がどのようにその効果をMEF2にもたらし、そしてその肥大性シグナル伝達をどのように調節するかは、未だ完全に理解されていない。特定のヒストンデアセチラーゼタンパク質(HDAC 4、HDAC 5、HDAC 7、HDAC 9、およびHDAC 10)が、MEF2活性の調節に関与することが知られている。

30

【0005】

11個の異なるHDACが、脊椎動物の生物からクローン化されている。全てが、触媒領域において相同性を共有する。ヒストンデアセチラーゼおよびヒストンデアセチラーゼは、遺伝子発現の制御において主要な役割を果たす。ヒストンデアセチラーゼ(通常、アセチルトランスフェラーゼ(HAT)と呼ばれる)の活性とヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の活性との間の均衡が、ヒストンアセチル化レベルを決定する。結果として、脱アセチル化クロマチンが一般的に転写的に不活性であるのに対し、アセチル化されたヒストンは、クロマチンの遅延および遺伝子転写の活性化を引き起こす。以前の報告において、本発明者らの研究室は、HDAC 4およびHDAC 5がMEF2と二量体化し、そしてMEF2の転写活性を抑制すること、そしてさらに、この相互作用が、HDAC 4タンパク質およびHDAC 5タンパク質のN末端の存在を必要とすることを実証した。Mc

40

50

Kinseyら(2000a, b)。

【0006】

別の状況において、近年の研究はまた、癌生物学におけるHDACの重要な役割を強調してきた。事実、HDACの種々のインヒビターが、癌細胞において細胞分化および/またはアポトーシスを誘導するそれらの能力について試験されている。Marksら(2000)。このようなインヒビターとしては、スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)(Butlerら、2000; Marksら、2001); m-カルボキシ桂皮酸ビス-ヒドロキサミド(Coffeyら、2001); およびピロキサミド(pyroxamide)(Butlerら、2001)が挙げられる。これらの研究は、以下に示されるように要約されている: 「ヒドロキサム酸ベースのHPC(特に、SAHAおよびピロキサミド)が、インピトロおよびインピボにおいてHDACの強力なインヒビターであり、そして形質転換された細胞の増殖停止、分化またはアポトーシス細胞死を誘導し... [従って]ヒドロキサム酸ベースのHPCのファミリーの間にあるリード化合物であり、そして現在第I相試験中である」、Marksら(2000)。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

現在までに、筋細胞肥大に対するHDACインヒビターの効果およびストレスへの応答に対するHDACインヒビターの効果に関する報告は、報告されていない。

【課題を解決するための手段】

20

【0008】

本発明は、以下を提供する:

1. 病的な心肥大および心不全を処置する方法であって、この方法は、以下:

(a) 病的な心肥大を有する患者を同定する工程; および

(b) この患者にヒストンデアセチラーゼインヒビターを投与する工程、

を包含する、方法。

【0009】

2. 項目1に記載の方法であって、ここで、上記ヒストンデアセチラーゼインヒビターがトリコスタチンA、トラボキシニンB、MS 275-27、m-カルボキシ桂皮酸ビス-ヒドロキサミド、デブデシン、オキサムフラチン、アピシジン、スベロイルアニリドヒドロキサム酸、スクリプタイド、ピロキサミド、2-アミノ-8-オキソ-9,10-エポキシ-デカノイル、3-(4-アロイル-1H-ピロール-2-イル)-N-ヒドロキシ-2-プロペンアミドおよびFR901228からなる群より選択される、方法。

30

【0010】

3. 投与する工程が上記ヒストンデアセチラーゼインヒビターの静脈内投与を包含する、項目1に記載の方法。

【0011】

4. 投与する工程が経口投与、経皮投与、徐放性投与、坐剤投与、または舌下投与を包含する、項目1に記載の方法。

【0012】

40

5. 上記患者に第二の治療的養生を投与する工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0013】

6. 上記第二の治療的養生が遮断剤、イオントロップ、利尿剤、ACE-I、AIIアンタゴニスト、およびCa⁺⁺遮断剤からなる群より選択される、項目5に記載の方法。

【0014】

7. 上記第二の治療的養生が上記ヒストンデアセチラーゼインヒビターと同時に投与される、項目5に記載の方法。

【0015】

50

8. 上記第二の治療的養生が上記ヒストンデアセチラーゼインヒビターの前または後のいずれかで投与される、項目5に記載の方法。

【0016】

9. 処置が心肥大の1つ以上の症候を改善する工程を包含する、項目1に記載の方法。

【0017】

10. 項目9に記載の方法であって、上記1つ以上の症候が増加した運動能力、増加した血液駆出量、左心室末端拡張圧、肺毛細管くさび圧、心拍出量、心臓インデックス、肺動脈圧、左心室末端収縮寸法および左心室末端拡張寸法、左心室壁ストレスおよび右心室壁ストレス、壁緊張、生活の質、疾患関連罹患率および疾患関連死亡率を含む、方法。

10

【0018】

11. 病的な心肥大および心不全を予防する方法であって、この方法は以下：

(a) 病的な心肥大が発生する危険がある患者を同定する工程；および

(c) この患者にヒストンデアセチラーゼインヒビターを投与する工程、

を包含する、方法。

【0019】

12. 項目11に記載の方法であって、ここで、上記ヒストンデアセチラーゼインヒビターがトリコスタチンA、トラポキシンB、MS 275-27、m-カルボキシ桂皮酸ビス-ヒドロキサミド、デブデシン、オキサムフラチン、アピシジン、スベロイルアニリドヒドロキサム酸、スクリプタイド、ピロキサミド、2-アミノ-8-オキソ-9,10-エポキシ-デカノイル、3-(4-アロイル-1H-ピロール-2-イル)-N-ヒドロキシ-2-プロペンアミドおよびFR901228からなる群より選択される、方法。

20

【0020】

13. 投与する工程が上記ヒストンデアセチラーゼインヒビターの静脈内投与を包含する、項目11に記載の方法。

【0021】

14. 投与する工程が経口投与、経皮投与、徐放性投与、坐剤投与、または舌下投与を包含する、項目11に記載の方法。

【0022】

15. 危険にさらされている上記患者が長期の未制御の高血圧、未修復の弁疾患、慢性アンギナおよび/または最近の心筋梗塞を含むもののうちの1つ以上を示し得る、項目11に記載の方法。

30

【0023】

16. 心肥大のインヒビターを同定する方法であって、この方法は、

(a) ヒストンデアセチラーゼインヒビターを提供する工程；

(b) このヒストンデアセチラーゼインヒビターで筋細胞を処理する工程；および

(c) 1つ以上の心肥大パラメーターの発現を測定する工程、

を包含し、

ここで、このヒストンデアセチラーゼインヒビターで処置されていない筋細胞における1つ以上の心肥大パラメーターと比較した、この1つ以上の心肥大パラメーターにおける変化が、心肥大のインヒビターとしてこのヒストンデアセチラーゼインヒビターを同定する、

40

方法。

【0024】

17. 上記筋細胞が上記1つ以上の心肥大パラメーターにおける肥大応答を誘発する刺激に供される、項目16に記載の方法。

【0025】

18. 上記刺激が導入遺伝子の発現である、項目17に記載の方法。

【0026】

50

19. 上記刺激が薬物を用いた処置である、項目17に記載の方法。
【0027】
20. もう1つの心肥大パラメーターが上記筋細胞における1つ以上の標的遺伝子の発現レベルを含み、ここでこの1つ以上の標的遺伝子の発現レベルが心肥大を示す、項目16に記載の方法。
【0028】
21. 項目20に記載の方法であって、ここで、上記1つ以上の標的遺伝子が、ANF、 α -MyHC、 β -MyHC、 α -骨格アクチン、SERCA、シトクロムオキシダーゼサブユニットVII、マウスT-複合体タンパク質、インスリン増殖因子結合タンパク質、 α -微小管結合タンパク質、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ、Thy-1細胞表面糖タンパク質、またはMyHCクラスI抗原からなる群より選択される、方法。
【0029】
22. 上記発現レベルが標的遺伝子プロモーターに作動可能に連結されたレポータータンパク質コード領域を使用して測定される、項目20に記載の方法。
【0030】
23. 上記レポータータンパク質がルシフェラーゼ、 β -gal、または緑色蛍光タンパク質である、項目22に記載の方法。
【0031】
24. 上記発現レベルが、標的mRNAまたは増幅された核酸産物への核酸プローブのハイブリダーゼーションを使用して測定される、項目20に記載の方法。
【0032】
25. 上記1つ以上の心肥大パラメーターが細胞性形態の1つ以上の局面を含む、項目16に記載の方法。
【0033】
26. 上記細胞性形態の1つ以上の局面が筋節アセンブリ、細胞サイズ、または細胞収縮性を含む、項目25に記載の方法。
【0034】
27. 上記筋細胞が単離された筋細胞である、項目16に記載の方法。
【0035】
28. 上記筋細胞が単離されたインタクトな組織に含まれる、項目16の方法。
【0036】
29. 上記筋細胞が心筋細胞である、項目16に記載の方法。
【0037】
30. 上記心筋細胞がインピボで機能性のインタクトな心筋に位置する、項目29に記載の方法。
【0038】
31. 上記機能性のインタクトな心筋が、1つ以上の心肥大パラメーターにおいて肥大応答を誘発する刺激に供される、項目30に記載の方法。
【0039】
32. 上記刺激が大動脈バンディング、急速な心臓ペーシング、誘導性心筋梗塞、または導入遺伝子発現である、項目31に記載の方法。
【0040】
33. 上記1つ以上の心肥大パラメーターが右心室駆出率、左心室駆出率、心室壁の厚さ、心臓重量/体重の比、または心臓重量の標準化測定値を含む、項目31に記載の方法。
【0041】
34. 上記1つ以上の心肥大パラメーターが総タンパク質合成を含む、項目16に記載の方法。
【0042】

10

20

30

40

50

35. 心肥大のインヒビターを同定する方法であって、この方法は、
 (a) 少なくとも1つのクラスIIヒストンデアセチラーゼおよび少なくとも1つのクラスIヒストンデアセチラーゼを提供する工程；
 (b) 候補インヒビター物質とこのヒストンデアセチラーゼを接触させる工程；ならびに

(c) このヒストンデアセチラーゼの活性を測定する工程、
 を包含し、

ここで、クラスIIヒストンデアセチラーゼ活性よりも大きいクラスIヒストンデアセチラーゼ活性における減少が、心肥大のインヒビターとしてこの候補インヒビター物質を同定する、方法。

【0043】

36. 上記ヒストンデアセチラーゼが全細胞から精製される、項目35に記載の方法。

【0044】

37. 上記ヒストンデアセチラーゼがインタクトな細胞に位置する、項目35に記載の方法。

【0045】

38. 上記細胞が筋細胞である、項目35に記載の方法。

【0046】

39. 上記筋細胞が心筋細胞である、項目38に記載の方法。

【0047】

40. 上記クラスIヒストンデアセチラーゼがHDAC1、HDAC2、HDAC3、およびHDAC8からなる群より選択される、項目35に記載の方法。

【0048】

41. 上記クラスIIヒストンデアセチラーゼがHDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9、およびHDAC10からなる群より選択される、項目35に記載の方法。

【0049】

42. 1つより多いクラスIヒストンデアセチラーゼの上記活性が測定される、項目35に記載の方法。

【0050】

43. 1つより多いクラスIIヒストンデアセチラーゼの上記活性が測定される、項目35に記載の方法。

【0051】

44. 1つより多いクラスIヒストンデアセチラーゼの上記活性および1つより多いクラスIIヒストンデアセチラーゼのこの活性が測定される、項目35に記載の方法。

【0052】

45. 上記候補インヒビター物質が少なくとも1つのクラスIヒストンデアセチラーゼに対して阻害活性を有し、かつ、少なくとも1つのクラスIIヒストンデアセチラーゼに対して活性を有さない、項目35に記載の方法。

【0053】

46. 上記候補インヒビター物質が複数のクラスIヒストンデアセチラーゼに対して阻害活性を有し、かつ、複数のクラスIIヒストンデアセチラーゼに対して活性を有さない、項目45に記載の方法。

【0054】

47. 上記候補インヒビター物質が、少なくとも1つのクラスIIヒストンデアセチラーゼに対するその阻害活性より少なくとも2倍高い少なくとも1つのクラスIヒストンデアセチラーゼに対する阻害活性を有する、項目35に記載の方法。

【0055】

48. 上記候補インヒビター物質が、少なくとも1つのクラスIIヒストンデアセチ

10

20

30

40

50

ラーゼに対するその阻害活性より少なくとも5倍より高い少なくとも1つのクラスIヒストンデアセチラーゼに対する阻害活性を有する、項目47に記載の方法。

【0056】

49. HDAC活性を測定する工程がヒストンからの標識されたアセチル基の放出を測定する工程を包含する、項目35に記載の方法。

【0057】

50. 上記アセチル基が放射性標識、蛍光標識または発色団で標識される、項目49に記載の方法。

【0058】

従って、本発明に従って、病的肥大および心不全を処置する方法が提供され、この方法は、(a)肥大を有する患者を同定する工程；ならびに(b)この患者にヒストンデアセチラーゼインヒビターを投与する工程を包含する。投与は、静脈内投与、経口投与、経皮投与、徐放性投与、坐剤投与、または舌下投与を含み得る。方法はさらに、第2の治療養生(例えば、遮断剤、イオントロプ(iotropes)、利尿薬、ACE-I、AIIアンタゴニストまたはCa⁺⁺遮断剤)を投与する工程を包含し得る。第2の治療養生は、ヒストンデアセチラーゼインヒビターと同じときか、あるいはヒストンデアセチラーゼインヒビターの前または後のいずれかで投与され得る。処置は、以下に提供されるような心不全の1つ以上の症状を改善し得る：増加した運動能力、増加した血液駆出量、左心室末端拡張圧(left ventricular end diastolic pressure)、肺毛細管くさび圧(plumonary capillary wedge pressure)、心拍出量、心臓インデックス、肺動脈圧、左心室末端収縮寸法(left ventricular end systolic dimension)および左心室末端拡張寸法(left ventricular end diastolic dimension)、左心室壁ストレスおよび右心室壁ストレス、壁緊張(wall tension)および壁の厚み、生活の質、疾患関連罹患率および疾患関連死亡率。

10

20

【0059】

なお別の実施形態において、病的肥大および心不全を予防する方法が提供され、この方法は、以下(a)肥大を発生する危険性がある患者を同定する工程；ならびに(b)この患者にヒストンデアセチラーゼインヒビターを投与する工程を包含する。投与は、静脈内投与、経口投与、経皮投与、徐放性投与、坐剤投与、または舌下投与を含み得る。危険性がある患者は、長期の未制御の高血圧、未修復の弁疾患、慢性アングナおよび/または最近の心筋梗塞のうちの1つ以上を示し得る。

30

【0060】

先述の実施形態に従って、ヒストンデアセチラーゼインヒビターは、ヒストンデアセチラーゼの活性における減少をもたらす任意の分子であり得る。これは、タンパク質、ペプチド、DNA分子(アンチセンスを含む)、RNA分子(RNAiおよびアンチセンスを含む)ならびに低分子を含む。この低分子としては、トリコスタチンA(trichostatin A)、トラポキシニンB(trapoxin B)、MS 275-27、m-カルボキシ桂皮酸ビス-ヒドロキサミド、デプデシン(depudecin)、オキサムフラチン(oxamflatin)、アピシジン(apicidin)、スベロイルアニリドヒドロキサム酸、スクリプタイド(Scriptaid)、ピロキサミド(pyroxamide)、2-アミノ-8-オキソ-9,10-エポキシ-デカノイル、3-(4-アロイル-1H-ピロール-2-イル)-N-ヒドロキシ-2-プロペンアミドならびにFR901228が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、以下の参考文献が、本発明に使用するために選択され得るヒストンデアセチラーゼインヒビターを記載する：AU 9,013,101；AU 9,013,201；AU 9,013,401；AU 6,794,700；EP 1,233,958；EP 1,208,086；EP 1,174,438；EP

40

1,173,562；EP 1,170,008；EP 1,123,111；JP

50

2001/348340; U.S. 2002/103192; U.S. 2002/65282; U.S. 2002/61860; WO 02/51842; WO 02/50285; WO 02/46144; WO 02/46129; WO 02/30879; WO 02/26703; WO 02/26696; WO 01/70675; WO 01/42437; WO 01/38322; WO 01/18045; WO 01/14581; Furumai 5 (2002); Hinnebusch 5 (2002); Mai 5 (2002); Vigushin 5 (2002); Gottlicher 5 (2001); Jung (2001); Komatsu 5 (2001); Su 5 (2000)。

【0061】

なお別の実施形態において、心肥大のインヒビターを同定する方法が提供され、この方法は、以下：(a) ヒストンデアセチラーゼインヒビターを提供する工程；(b) 筋細胞をこのヒストンデアセチラーゼインヒビターを用いて処理する工程；および(c) 1つ以上の心肥大パラメーターの発現を測定する工程であって、ここで、ヒストンデアセチラーゼインヒビターで処理されていない筋細胞における1つ以上の心肥大パラメーターと比較して、1つ以上の心肥大パラメーターにおける変更が、心肥大のインヒビターとしてのヒストンデアセチラーゼインヒビターを同定する工程を包含する。筋細胞は、1つ以上の心肥大パラメーターにおいて肥大応答を誘起する刺激（例えば、導入遺伝子の発現または薬物を用いた処理）に供され得る。

10

【0062】

1つ以上の心肥大パラメーターは、筋細胞における1つ以上の標的遺伝子の発現レベルを含み得、ここで、1つ以上の標的遺伝子の発現レベルが、心肥大を示す。1つ以上の標的遺伝子は、以下からなる群より選択され得る：ANF、 α -MyHC、 β -MyHC、 α -骨格アクチン、SERCA、シトクロムオキシダーゼサブユニットVII、マウスT-複合体タンパク質、インスリン増殖因子結合タンパク質、 α -微小管結合タンパク質、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ、Thy-1細胞表面糖タンパク質、またはMyHCクラスI抗原。発現レベルは、標的遺伝子プロモーターに作動可能に連結されたレポータータンパク質（例えば、ルシフェラーゼタンパク質、 β -galタンパク質、または緑色蛍光タンパク質）コード領域を用いて測定され得る。発現レベルは、標的mRNAまたは増幅された核酸産物に対する核酸プローブのハイブリダイゼーションを用いて測定される。

20

30

【0063】

1つ以上の心肥大パラメーターがまた、細胞形態（例えば、筋節アセンブリ、細胞サイズ、または細胞収縮性）の1つ以上の局面を含み得る。筋細胞は、単離された筋細胞であっても、単離されたインタクトな組織中に含まれてもよい。筋細胞はまた、心筋細胞であり得、そして機能的なインタクトな心筋（例えば、1つ以上の心肥大パラメーターにおける肥大性応答を誘起する刺激に供される機能的なインタクトな心筋）中にインビボで配置され得る。刺激は、大動脈バンディング（aortic banding）、急速な心臓ペースング（rapid cardiac pacing）、誘導性心筋梗塞または導入遺伝子発現であり得る。1つ以上の心肥大パラメーターは、右心室駆出率、左心室駆出率、心室壁の厚み、心臓重量/体重の比、または心臓重量の標準化測定値を含む。1つ以上の心肥大パラメーターは、総タンパク質合成もまた含み得る。

40

【0064】

なおさらに別の実施形態において、心肥大のインヒビターを同定する方法が提供され、この方法は、以下：(a) 少なくとも1つのクラスI ヒストンデアセチラーゼおよび少なくとも1つのクラスII ヒストンデアセチラーゼを提供する工程；(b) これらのヒストンデアセチラーゼを候補阻害物質と接触させる工程；ならびに(c) ヒストンデアセチラーゼの活性を測定する工程であって、ここで、クラスII ヒストンデアセチラーゼ活性よりもはるかに減少したクラスI ヒストンデアセチラーゼ活性が、候補インヒビター物質を心肥大のインヒビターとして同定する工程を包含する。ヒストンデアセチラーゼは、細胞全体から離れて精製されているものであっても、インタクトな細胞中に位置して

50

もよい。細胞は、筋細胞（例えば、心筋細胞）であり得る。HDAC活性の測定は、ヒストンからの標識されたアセチル基の放出を測定することを含み得る。この標識は、放射性標識、蛍光標識または発色団であり得る。

【0065】

クラスI ヒストンデアセチラーゼは、HDAC 1、HDAC 2、HDAC 3、またはHDAC 8であり得る。クラスII ヒストンデアセチラーゼは、HDAC 4、HDAC 5、HDAC 6、HDAC 7、HDAC 9、またはHDAC 10であり得る。1個より多くのクラスI ヒストンデアセチラーゼの活性が、測定され得る。1個より多くのクラスII ヒストンデアセチラーゼの活性が、測定され得る。1個より多くのクラスI ヒストンデアセチラーゼの活性および1個より多くのクラスII ヒストンデアセチラーゼの活性が、測定され得る。候補インヒビター物質は、少なくとも1つのクラスI ヒストンデアセチラーゼに対して阻害活性を有し得、そして少なくとも1つのクラスII ヒストンデアセチラーゼに対して活性を有さない。候補インヒビター物質は、複数のクラスI ヒストンデアセチラーゼに対して阻害活性を有し得、そして複数のクラスII ヒストンデアセチラーゼに対して活性を有さない。候補インヒビター物質は、少なくとも1つのクラスII ヒストンデアセチラーゼに対するその阻害活性よりも少なくとも2倍高い、少なくとも1つのクラスI ヒストンデアセチラーゼに対する阻害活性を有し得る。候補インヒビター物質は、少なくとも1つのクラスII ヒストンデアセチラーゼに対するその阻害活性よりも少なくとも5倍高い、少なくとも1つのクラスI ヒストンデアセチラーゼに対する阻害活性を有し得る。

10

20

【図面の簡単な説明】

【0066】

以下の図面は、本明細書の一部をなし、そして本発明の特定の局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書中に示した具体的な実施形態の詳細な説明と合わせて、これらの図面の1つ以上を参照することにより、より良く理解され得る。

【図1】図1A-C。TSAは、アゴニスト誘導遺伝子抑制を変化させる。培養心筋細胞をPE (20 $\mu\text{mol/L}$) またはIL-1 (1 ng/mL) で48時間処理した。TSA (30 nmol/L) を、PEまたはIL-1での処理の30分前に添加した。筋細胞特異的mRNA発現 (SERCA2a (図1A)、 MyHC (図1B)、 MyHC (図1C)) を、RNase保護アッセイによって5 μg 総RNAにおいてアッセイした。平均データは、4つの培養物由来であり、GAPDHシグナルに対する正規化後のコントロールの%として表す。

30

【図2】図2A-D。HDACの過剰発現は、筋特異的プロモーターを抑制する。培養筋細胞を72時間、Flagタグ化HDAC1, 4, 5についての発現ベクター (約3 \times 10⁵細胞当たり2 μg) (またはそのバックボーンベクター)、およびSERCA遺伝子 (図2A)、 MyHC遺伝子 (図2B)、 MyHC遺伝子 (図2Cおよび2D) についてのCATレポーター (5 μg) 構築物、加えてSV40駆動分泌アルカリホスファターゼ (SEAP 1 μg 、Clontech) でトランスフェクトした。TSAを30 nmol/Lで使用し、トランスフェクションのちょうど後に添加した。PE22 (20 $\mu\text{mol/L}$) を24時間後に添加し、CATアッセイをさらに48時間後に実施した。平均データは、n = 3の異なる培養物由来であり、培地中のSEAP活性に対する正規化後のpCMVの%として表す。HDACの過剰発現は、Flagについてのウェスタンプロットによって確認した。

40

【図3A】図3A-D。HDACインヒビターは、細胞傷害性を生じることなくフェニレフリンによるANFレポーターの活性化をブロックする。新生児ラット心筋細胞を、全体で1 μg のマウス3kb ANFプロモーターフラグメントおよびCMV-LacZプラスミドで同時トランスフェクトした。(図3A) ANFプロモーターは、未刺激心筋細胞において最小限に活性である。HDACインヒビターの添加は、ANFプロモーター活性を誘導しない。フェニレフリン (phenylephrine) の添加は、ANFプロモ-

50

ターを活性化したが、フェニレフリンおよびHDACインヒビター(TSA(85 nM)、NaBut(5 mM)、またはHC毒素(5 ng/ml))での心筋細胞の同時処理は、フェニレフリン(phenylephrine)(100 μM)によるANFプロモーターの活性化を妨害した。(図3B)構成的プロモーターCMVによるLacZ発現。HDACインヒビターでの処理は、フェニレフリン同時処理あり、およびなしでCMV活性を増強した。(図3Cおよび3D)グラフは、アデニル酸キナーゼ活性の測定値が、肥大刺激因子FBS、PE、またはET-1の不在または存在下での心筋細胞の培養のX時間後の培地において不変であることを示す。

【図3B】図3A-D。HDACインヒビターは、細胞傷害性を生じることなくフェニレフリンによるANFレポーターの活性化をブロックする。新生児ラット心筋細胞を、全体で1 μgのマウス3 kb ANFプロモーターフラグメントおよびCMV-LacZプラスミドで同時トランスフェクトした。(図3A)ANFプロモーターは、未刺激心筋細胞において最小限に活性である。HDACインヒビターの添加は、ANFプロモーター活性を誘導しない。フェニレフリン(phenylephrine)の添加は、ANFプロモーターを活性化したが、フェニレフリンおよびHDACインヒビター(TSA(85 nM)、NaBut(5 mM)、またはHC毒素(5 ng/ml))での心筋細胞の同時処理は、フェニレフリン(phenylephrine)(100 μM)によるANFプロモーターの活性化を妨害した。(図3B)構成的プロモーターCMVによるLacZ発現。HDACインヒビターでの処理は、フェニレフリン同時処理あり、およびなしでCMV活性を増強した。(図3Cおよび3D)グラフは、アデニル酸キナーゼ活性の測定値が、肥大刺激因子FBS、PE、またはET-1の不在または存在下での心筋細胞の培養のX時間後の培地において不変であることを示す。

【図3C】図3A-D。HDACインヒビターは、細胞傷害性を生じることなくフェニレフリンによるANFレポーターの活性化をブロックする。新生児ラット心筋細胞を、全体で1 μgのマウス3 kb ANFプロモーターフラグメントおよびCMV-LacZプラスミドで同時トランスフェクトした。(図3A)ANFプロモーターは、未刺激心筋細胞において最小限に活性である。HDACインヒビターの添加は、ANFプロモーター活性を誘導しない。フェニレフリン(phenylephrine)の添加は、ANFプロモーターを活性化したが、フェニレフリンおよびHDACインヒビター(TSA(85 nM)、NaBut(5 mM)、またはHC毒素(5 ng/ml))での心筋細胞の同時処理は、フェニレフリン(phenylephrine)(100 μM)によるANFプロモーターの活性化を妨害した。(図3B)構成的プロモーターCMVによるLacZ発現。HDACインヒビターでの処理は、フェニレフリン同時処理あり、およびなしでCMV活性を増強した。(図3Cおよび3D)グラフは、アデニル酸キナーゼ活性の測定値が、肥大刺激因子FBS、PE、またはET-1の不在または存在下での心筋細胞の培養のX時間後の培地において不変であることを示す。

【図3D】図3A-D。HDACインヒビターは、細胞傷害性を生じることなくフェニレフリンによるANFレポーターの活性化をブロックする。新生児ラット心筋細胞を、全体で1 μgのマウス3 kb ANFプロモーターフラグメントおよびCMV-LacZプラスミドで同時トランスフェクトした。(図3A)ANFプロモーターは、未刺激心筋細胞において最小限に活性である。HDACインヒビターの添加は、ANFプロモーター活性を誘導しない。フェニレフリン(phenylephrine)の添加は、ANFプロモーターを活性化したが、フェニレフリンおよびHDACインヒビター(TSA(85 nM)、NaBut(5 mM)、またはHC毒素(5 ng/ml))での心筋細胞の同時処理は、フェニレフリン(phenylephrine)(100 μM)によるANFプロモーターの活性化を妨害した。(図3B)構成的プロモーターCMVによるLacZ発現。HDACインヒビターでの処理は、フェニレフリン同時処理あり、およびなしでCMV活性を増強した。(図3Cおよび3D)グラフは、アデニル酸キナーゼ活性の測定値が、肥大刺激因子FBS、PE、またはET-1の不在または存在下での心筋細胞の培養のX時間後の培地において不変であることを示す。

10

20

30

40

50

【図4A】図4A-C。HDACインヒビターは、肥大アゴニストにより通常誘導される内因性ANF発現を妨害する。(図4A)グラフは、いくつかのドットプロット実験(n=4)の要約を示す。トランスフェクション実験におけるように、フェニレフリン(100μM)は、ANF発現を3倍以上誘導する。HDACインヒビター(TSA 85nM; 酪酸ナトリウム、5mM; HC毒素5ng/ml)での処理は、ANFメッセージの蓄積をブロックする。(図4Bおよび4C)グラフは、肥大刺激因子FBS、PE、またはET-1と同時培養する場合のHDACインヒビターTSA(図4B)および酪酸ナトリウム(図4C)の濃度の増大に伴う培養培地におけるANFの化学発光検出の減少を示す。

【図4B】図4A-C。HDACインヒビターは、肥大アゴニストにより通常誘導される内因性ANF発現を妨害する。(図4A)グラフは、いくつかのドットプロット実験(n=4)の要約を示す。トランスフェクション実験におけるように、フェニレフリン(100μM)は、ANF発現を3倍以上誘導する。HDACインヒビター(TSA 85nM; 酪酸ナトリウム、5mM; HC毒素5ng/ml)での処理は、ANFメッセージの蓄積をブロックする。(図4Bおよび4C)グラフは、肥大刺激因子FBS、PE、またはET-1と同時培養する場合のHDACインヒビターTSA(図4B)および酪酸ナトリウム(図4C)の濃度の増大に伴う培養培地におけるANFの化学発光検出の減少を示す。

【図4C】図4A-C。HDACインヒビターは、肥大アゴニストにより通常誘導される内因性ANF発現を妨害する。(図4A)グラフは、いくつかのドットプロット実験(n=4)の要約を示す。トランスフェクション実験におけるように、フェニレフリン(100μM)は、ANF発現を3倍以上誘導する。HDACインヒビター(TSA 85nM; 酪酸ナトリウム、5mM; HC毒素5ng/ml)での処理は、ANFメッセージの蓄積をブロックする。(図4Bおよび4C)グラフは、肥大刺激因子FBS、PE、またはET-1と同時培養する場合のHDACインヒビターTSA(図4B)および酪酸ナトリウム(図4C)の濃度の増大に伴う培養培地におけるANFの化学発光検出の減少を示す。

【図5】図5A-B。HDACインヒビターでの心筋細胞の処理は、心筋細胞肥大と関連した胎児遺伝子プログラムをブロックする。(図5A)グラフは、フェニレフリンによるSK-アクチン発現の倍数変化、およびTSA処理サンプルにおける遺伝子活性化の欠如を示す。(図5B)グラフは、MyHCおよびMyHC RNA発現の倍数変化を示す。フェニレフリン処理は、心筋細胞におけるMyHC発現(胎児遺伝子)の活性化を誘導する。一方、フェニレフリン単独では、MyHC遺伝子(成体イソ型)を活性化しない。TSAでの処理は、MyHCの活性化を妨害するが、MyHCの発現を刺激した。グラフは、3つ以上の独立した実験を表す。

【図6】図6。筋節の再構築およびタンパク質合成に対するTSA処理の効果。心筋細胞におけるS6リボソームタンパク質の測定値のグラフは、フェニレフリンおよび血清が、心筋細胞におけるタンパク質合成を増大することを示す。TSAでの心筋細胞の処理は、6時間後にこの増大を変化させない(左側のグラフ)。右側のグラフは、PEおよび濃度を増加させたTSAでの、または血清および濃度を増加させたTSAでの24時間同時処理の後の心筋細胞におけるS6リボソームタンパク質の含有量を示す。

【図7】図7A-B。TSAは、心筋細胞分化に關与する遺伝子の活性化を誘導する。(図7A)3つの遺伝子が、フェニレフリンによりアップレギュレートされ、そしてTSAによりダウンレギュレートされた。(図7B)4つの遺伝子がフェニレフリンにより不活性化され、そしてTSAにより活性化された(1つのフェニレフリンチップ、2つのフェニレフリン/TSAチップ、および1つのTSAチップからの結果)。

【発明を実施するための形態】

【0067】

(例示的な実施形態の説明)

心不全は、世界中で罹患率および死亡率の主要な原因のうちの1つである。米国単独に

10

20

30

40

50

において、300万人の人が心筋症を有しながら現在生存し、そして別の400,000人が年基準で診断されていることが、推定で示されている。拡張型心筋症(DCM)はまた、「うっ血性心筋症」ともいわれ、このうっ血性心筋症は、心筋症の最も一般的な形態であり、そして推定100,000人の個体当たり40人に近い罹患率を有する(Durandra, 1995)。DCMの他の症例も存在するが、よく知られている拡張型心筋症は、約20%の「特発性」DCMを示すと指摘されている。DCM症例の約半分が、特発性であり、残りは、既知の疾患プロセスと関連している。例えば、重篤な心筋損傷が、癌化学療法に使用される特定の薬物(例えば、ドキソルビシンおよびダウノルビシン)から生じ得る。さらに、多くのDCM患者は、慢性アルコール中毒である。幸運にも、これらの患者について、心不全の進行は、疾患経過の初期にアルコール消費を減らすかまたは止める場合、停止または逆転し得る。産褥性心筋症は、感染性続発症と関連する疾患なので、DCMの別の特発性形態である。要するに、心筋症(DCMを含む)は、重要な公衆衛生の問題である。

【0068】

心筋症自体は、典型的に、心臓損傷が心不全を生じるのに十分なほど重篤になるまで、いずれの症状も生成しないので、心筋症の症状は、心不全と関連する症状である。これらの症状としては、短い呼吸、労作に伴う疲労、呼吸が短くなること無く水平に寝ることができないこと(起座呼吸)、発作性夜間呼吸困難、拡大した心臓の大きさ、および/または下脚の腫脹が挙げられる。患者はまた、しばしば、増加した血圧、超過した(extra)心臓音、心臓雑音、肺および全身性塞栓、胸の痛み、肺鬱血、ならびに動悸を表す。さらに、DCMは、減少した駆出率(すなわち、内因性の収縮性機能およびリモデリングの両方の測定)を引き起こす。この疾患はさらに、心室拡張および減少した心筋収縮性に起因したひどく損傷した収縮性機能によって特徴付けられ、これは、多くの患者において拡張性心不全を引き起こす。罹患した心臓はまた、筋細胞/心筋不全の結果として細胞/チャンバリモデリングを引き起こし、これは、「DCM表現型」に寄与する。疾患が進行するにつれ、症状も同様に進行する。拡張型心筋症を有する患者はまた、生命を脅かす不整脈(心筋頻拍および心筋細動を含む)の発生率を大きく増加した。これらの患者において、失神(めまい感)のエピソードが、突然死の前兆とみなされる。

【0069】

拡張型心筋症の診断は、代表的に、拡大した心臓チャンバ、特に、拡大した心室の提示に依存する。拡大は、一般的に、胸部X線において観察可能であるが、心エコー図を使用してより正確に評価される。DCMはしばしば、急性心筋炎、弁心疾患、冠状動脈疾患、および高血圧性心疾患との識別が困難である。一旦、拡張型心筋症の診断がなされると、潜在的に可逆的な原因を同定および処置するため、ならびにさらなる心臓損傷を回避するためにあらゆる努力がなされる。例えば、冠状動脈疾患および弁心臓疾患が、除外されなければならない。貧血、異常頻拍、栄養欠乏、アルコール中毒症、甲状腺疾患および/または他の問題が、取り込まれそして制御される必要がある。

【0070】

心筋症の基底にある原因を同定し、そして安定化させるための試みの間に、これらの症状を最小化し、そして欠損している心臓の効率を最適化するために、処置が一般的に設定される。投薬は、処置の主要部のままであるが、一般的に心不全の症例に使用されるもの以外に、拡張型心筋症の処置のための特別の処置は存在しない。移植外科手術が、1つの選択である。実に、拡張型心筋症は、米国における心臓移植に関する最も一般的な原因と示されている。

【0071】

非薬理的処置が、主に薬理的処置に対する補助として使用される。非薬理的処置の1つの手段は、食餌中のナトリウムを減少することを含む。さらに、非薬理的処置がまた、特定の沈降薬物(陰性の強心薬(例えば、特定のカルシウムチャネル遮断剤および不整脈薬様ジソピラミド)、心臓毒性(例えば、アンフェタミン)、および血漿容積エキスパンダー(例えば、非ステロイド性抗炎症剤およびグルココルチコイド)を含む)の排

10

20

30

40

50

除を必要とする。

【0072】

薬理的薬剤を用いた処理は、心不全の発現を減少または排除するための主要な機構を表す。利尿剤は、中間から温和な心不全についての処置の最初の手順である。不運なことに、一般的に使用される利尿剤（例えば、サイアザイド）の多くは、多数の有害な影響を与える。例えば、特定の利尿剤は、血清コレステロールおよびトリグリセリドを増加し得る。さらに、利尿剤は、一般的に、重篤な心不全に罹患した患者に対して効果的ではない。

【0073】

利尿剤が効果的ではない場合、血管拡張薬が、使用され得る；アンジオテンシン変換酵素（ACE）インヒビター（例えば、エナラプリル（enalapril）およびリジノプリル）は、症候の軽減を提供するだけでなく、これらはまた、死亡率を減少することが報告されている（Youngら、1989）。しかし、また、ACEインヒビターは、有害な影響（これは、特定の疾患状態（例えば、腎臓動脈狭窄）を有する患者に禁忌をもたらす）と関連する。

10

【0074】

同様に、強心薬治療（すなわち、心筋収縮の力を増加することによって心拍出量を改善する薬物）がまた、利尿剤が十分な軽減を引き起こさなかった場合、示され得る。外来患者によって使用される最も一般的に強心薬は、ジギタリスである。しかし、これは、数々の有害反応（胃腸問題および中枢神経系機能不全を含む）と関連する。

20

【0075】

従って、現在使用される薬理的薬剤は、特定の患者集団において重篤な不足を有する。新規、安全、かつ有効な薬剤の利用可能性が、現在利用可能な薬理的物理療法を使用し得ないかまたはこれらの物理療法から十分な軽減を受けないかのいずれかである患者にとって間違いなく有益である。DCMを有する患者に関する予後は変動しやすく、そして心室機能不全の程度に依存し、その大半が、診断の5年以内に死を引き起こす。

【0076】

（I. 本発明）

本発明者らは、MEF2が、そのカルボキシ末端活性化ドメインの3つの保存された部位のMAPキナーゼリン酸化によって活性化されることを以前に示した（Katoら、1998を参照のこと）。CaMKシグナル伝達がまた、クラスII HDAC（これは、成体心臓において高レベルで発現され、ここで、MEF2活性化を抑制し得る）をリン酸化することによってMEF2を活性化する。リン酸化の際、これらのHDACは、14-3-3に結合し、そしてMEF2から分離し、核への移動およびMEF2依存性転写の活性化を引き起こす。リン酸化され得ないクラスII HDACの変異体は、MEF2から分離し得ず、そしてMEF2標的遺伝子の発現を不可逆性にブロックする。

30

【0077】

HDAC 5のリン酸化不可能な変異体をコードするアデノウイルスが、多様なシグナル伝達経路に応答してインピトロで心筋細胞肥大を予防し得ることがまた、示された（Luら、2000を参照のこと）。これらの知見は、クラスII HDACにおけるこれらの保存された部位のリン酸化が、心肥大の開始に必須な工程であることを示唆する。これらの知見に基づいて、TSAによるHDAC活性化の阻害が、肥大性応答遺伝子の抑制解除に起因して、心肥大の誘導を引き起こすということを予想し得る。対照的に、本発明者らは、TSAが実際に心肥大を回避することを代わりに見出した。これらの予期せぬ知見は、少なくともいくつかのHDACが、肥大に必要とされること、およびHDAC触媒活性の阻害が肥大性遺伝子の活性化を回避し得ることを示唆する。

40

【0078】

どのようにこれらの明らかに矛盾する結果が説明され得るのか？1つのモデルは、クラスII HDACおよびクラスI HDACは、心筋細胞中の遺伝子の異なるセットを制御し得ることを議論する。このモデルに従って、クラスI HDACは、肥大に必要とされる

50

転写因子（例えば、MEF2）と相互作用し、そしてこの転写因子の活性を抑制する。このことは、クラスI HDACのリン酸化不可能な変異体が肥大をブロックする理由を説明する。対照的に、クラスI HDAC（特に、HDAC1およびHDAC3）が、抗肥大性遺伝子の発現を抑制することが提案されている。従って、TSAへの心筋細胞の曝露は、これら抗肥大性遺伝子の抑制および肥大の遮断を引き起こす。このモデルはまた、このような抗肥大性遺伝子の活性が、クラスI HDACの活性よりも優勢であることを推定する。なぜなら、これら抗肥大性遺伝子の活性もまた、TSAによって非常に抑制されるからであり、これによって、肥大性プログラムが抑制解除されることが予期される。

【0079】

いずれの場合も、そして正確な分子基礎にもかかわらず、本発明は、驚くべきことにHDACインヒビターが心肥大および心不全の処置に有益であることを示す。

10

【0080】

（II. ヒストンデアセチラーゼ）

ヌクレオソーム（クロマチン折り畳みの基本骨格）は、動的な高分子構造であり、クロマチン溶液コンフォメーションに影響を与える（WorkmanおよびKingston、1998）。ヌクレオソームコアは、ヒストンタンパク質であるH2A、HB、H3およびH4で構成される。ヒストンアセチル化は、変更された生物物理学的特性をふるまうヌクレオソームおよびヌクレオソーム配置を引き起こす。ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）の活性とデアセチラーゼ（HDAC）の活性との間の均衡が、ヒストンアセチル化のレベルを決定する。脱アセチル化クロマチンが一般的に転写的に不活性化

20

【0081】

11個の異なるHDACが、脊椎動物の生物からクローン化されている。同定された最初の3つのヒトHDACは、HDAC1、HDAC2およびHDAC3（クラスIヒトHDACと称される）、およびHDAC8（Van den Wyngaertら、2000）が、このリストに加えられた。近年、クラスIIヒトHDAC（HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC

7、HDAC9およびHDAC10）（Kaorら、2000）が、クローン化され、そして同定されている（Grozingerら、1999；Zhouら、2001；Tongら、2002）。さらに、HDAC11が、同定されたが、クラスIまたはクラスIIのいずれかは未だ分類されていない（Gaorら、2002）。全てが、触媒領域中に相同性を共有する。しかし、HDAC4、HDAC5、HDAC7、HDAC9およびHDAC10は、他のHDACに見出されない特有のアミノ末端伸長部を有する。このアミノ末端領域は、MEF2結合ドメインを含む。HDAC4、HDAC5およびHDAC7は、心臓遺伝子発現の調節に関与することが示され、そして特定の実施形態において、MEF2転写活性を抑制することが示されている。クラスI HDACがMEF2活性を抑制する正確な機構は、完全に理解されていない。1つの可能性は、MEF2へのHDAC結合が、競合的にかまたはネイティブな転写的に活性であるMEF2のコンフォメーションを不安定化することのいずれかによって、MEF2転写活性を阻害

30

40

【0082】

（III. デアセチラーゼインヒビター）

ヒストンデアセチラーゼに対する種々のインヒビターが同定されている。提唱される用途は、広範にわたるが、主に癌治療に集中している。Saundersら（1999）；Jungら（1997）；Jungら（1999）；Vigushinら（1999）；Kimら（1999）；Kitazomora（2001）；Vigusinら（2001）；Hoffmannら（2001）；Kramerら（2001）；Massaら（2

50

001); Komatsu (2001); Han (2001)。このような治療は、固形癌および非ホジキンリンパ腫のNIHに支援された第1相治験の対象である。HDACがまた、導入遺伝子の転写を増加し、従って遺伝子治療に対する可能な補助剤を構成する。Yamano (2000); Su (2000)。

【0083】

HDACは、種々の異なる機構(タンパク質、ペプチド、および核酸(アンチセンス分子およびRNAi分子を含む))を介して阻害され得る。クローニング、遺伝子構築物(ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含む)の移入および発現、ならびにリポソームに関する方法が、当業者に広範に知られている。ウイルスベクターとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、およびヘルペスウイルスが挙げられる。

10

【0084】

低分子インヒビターがまた、意図される。おそらく、HDAC機能の最も広範に知られる低分子インヒビターは、Trichostatin A(ヒドロキサム酸)である。これは、過剰アセチル化を誘導し、そしてrasトランスフォーメーション細胞の正常形態への変換を引き起こすこと(Taunton (1996)、そしてマウスモデルにおいて免疫抑制を誘導すること(Takahashi (1996))が、示されている。これは、BIOMOL Research Labs, Inc., Plymouth Meeting, PAから市販される。

【0085】

本明細書中に参考として援用される以下の参考文献は、全て、本発明における用途が見出され得るHDACインヒビターを記載する: AU 9,013,101; AU 9,013,201; AU 9,013,401; AU 6,794,700; EP 1,233,958; EP 1,208,086; EP 1,174,438; EP 1,173,562; EP 1,170,008; EP 1,123,111; JP 2001/348340; U.S. 2002/103192; U.S. 2002/65282; U.S. 2002/61860; WO 02/51842; WO 02/50285; WO 02/46144; WO 02/46129; WO 02/30879; WO 02/26703; WO 02/26696; WO 01/70675; WO 01/42437; WO 01/38322; WO 01/18045; WO 01/14581; Furumai (2002); Hinnebusch (2002); Mai (2002); Vigushin (2002); Gottlicher (2001); Jung (2001); Komatsu (2001); Su (2000)。

20

30

【0086】

いくつかの特異的なHDACインヒビターの例を表1に示す。

【0087】

【表 1】

インヒビター	化合物の型	化学組成	生物
トラネキシン B	モノリン誘導体	C ₂₁ H ₃₀ N ₄ O ₆	<i>H. ambiens</i>
MS 27-275	ペンタミド誘導体	C ₂₁ H ₂₀ N ₄ O ₃	
スクリアイド ¹	ヒドロキシル酸	C ₁₈ H ₁₂ N ₂ O ₄	
FR901228	シクロプロピド	C ₂₄ H ₃₆ N ₄ O ₆ S ₂	<i>C. violaceum</i> (#968)
デブデシン	真菌代謝物	C ₁₁ H ₁₆ O ₄	<i>A. brassiciola</i>
オキサゾリジン	芳香族アミン	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₄ S ₁	
ヒドロキシミド (N ⁶ -ロイノ-3-アミノ-ヒドロキシル酸)	ヒドロキシル酸	C ₁₃ H ₂₀ N ₄ O ₃	
2-アミノ-8-オキシノ-9,10-イソキノリンカノール (AEO)	ケトン	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	
3-(4-アミノ-1-ヒドロキシ-2-イソキノリン-2-アミノ)ペンタミド	アミノアミド	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₃	
N ⁶ -ロイノリド ¹ ヒドロキシル酸	ヒドロキシル酸	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	
m-カカチン桂皮酸ビスヒドロキシル酸	ヒドロキシル酸	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₄	
アピジニン ¹	シクロプロピド	C ₂₉ H ₃₈ N ₂ O ₆	<i>Fusarium</i> spp.
CHAP1 (トリコスタチン A およびヒドロキシシン B)	ヒドロキシル酸/モノリン誘導体		

¹ シクロ(N-0-メチル-L-トリプトファン-L-トリプトファン-L-トリプトファン-D-ヒドロキシ-L-ニコチン-L-2-アミノ-L-8-オキシノカノール)

(I V . 心肥大を処置する方法)
(A . 治療養生法)

本発明の1つの実施形態において、H D A C インヒビターを使用する心肥大の処置のための方法が、提供される。本願の目的のために、処置は、以下のような心肥大の1つ以上の症状を減少させる工程を包含する：減少した運動能力、減少した血液駆出量、増加した左心室末端拡張圧、増加した肺毛細管くさび圧、減少した心拍出量、心臓インデックス、増加した肺動脈圧、増加した左心室末端収縮寸法および左心室末端拡張寸法、および増加した左心室壁ストレス、壁緊張および壁の厚み、ならびに右心室についての同様の症状。さらに、H D A C インヒビターの使用は、心肥大およびその関連する症状が生じるのを回避し得る。

10
20
30
40
50

【0088】

処置養生法は、臨床状態に依存して変化する。しかし、長期の維持が、ほとんどの状況において適切なようである。間欠的にH D A Cインヒビターを用いて心肥大を処置すること（例えば、疾患進行の間の短時間のウィンドウ内で）がまた、望ましくあり得る。現在のところ、H D A Cインヒビターについての最適な投薬量は、有意な毒性が生じる前の最大用量であることが、試験によって示されている。

【0089】

（B．併用治療）

別の実施形態において、他の治療様式と組み合わせて、H D A C阻害を使用することが考えられている。従って、上記の治療に加えて、患者により多くの「標準的」薬学的心臓治療をまた提供し得る。標準的治療の例としては、制限することなく、いわゆる「遮断剤」、抗高血圧剤、強心剤、抗血栓剤、血管拡張薬、ホルモン拮抗薬、イオントロープ（ionotropes）、利尿薬、エンドセリン拮抗薬、カルシウムチャンネル遮断剤、ホスホジエステラーゼインヒビター、A C Eインヒビター、2型アンジオテンシン拮抗薬およびサイトカイン遮断剤/インヒビターが挙げられる。

【0090】

組み合わせは、単一の組成物または両方の薬剤を含む薬理的処方物と心臓細胞を接触させることによってか、2つの別個の組成物または処方物と細胞を同時に接触させることによって達成され得、ここで、一方の組成物は、発現構築物を含み、他方は、薬剤を含む。あるいは、H D A Cインヒビター治療は、数分～数週間の範囲の間隔で他の薬剤の投与に先行し得るかまたはそれに続き得る。他の薬剤および発現構築物が、細胞に別々に適用される実施形態において、一般に、有意な時間が、各送達の時間の間に終了しないように保証し、その結果、薬剤および発現構築物はなお、細胞に対して有利に組み合わせた効果を発揮し得る。このような例において、お互いに約12～24時間以内に、より好ましくはお互いに約6～12時間以内に、最も好ましくは約12時間のみ遅延時間を有して、両方の様式を用いて細胞を接触させることが企図される。いくつかの状況において、処置のための時間を有意に延長することが所望であり得るが、ここで、それぞれの投与の間に、数日（2、3、4、5、6または7）～数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）が経過する。

【0091】

H D A Cインヒビターまたは他の薬剤のいずれかの1つ以上の投与が所望されることはまた、考え得る。この点において、種々の組成物が、使用され得る。例示の目的で、H D A Cインヒビターが「A」であり、他の薬剤が「B」である場合、3回および4回の総投与に基づいた以下の順列が例示される。

【0092】

【化1】

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

他の組み合わせも同様に意図される。

【0093】

（C．患者への投与のための薬物処方物および経路）

臨床適用が意図される場合、薬学的組成物は、意図される適用のために適切な形態で調製される。一般に、これは、発熱物質、ならびにヒトまたは動物に有害であり得る他の不純物が基本的に含まない組成物を調製することを伴う。

【0094】

一般に、送達ベクターを安定にし、そして標的細胞による取り込みを可能にする適切な塩および緩衝液を使用することが所望される。緩衝液はまた、組換え細胞が患者に導入される場合に使用され得る。本発明の水溶性組成物は、薬学的に受容可能なキャリアまたは水溶性媒体中に溶解または分散された、有効量のベクターまたは細胞を含む。成句「薬学的に受容可能または薬理的に受容可能」は、動物またはヒトに投与される場合、有害な、アレルギー性の、または他の厄介な反応物を生成しない分子および組成物をいう。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬品（例えば、ヒトへの投与に適切な医薬品）を処方する際の使用のために受容可能な溶媒、緩衝液、溶液、分散媒体、コーティング、抗生物質および抗菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来媒体または薬剤が、本発明の活性成分と不適合である範囲を除いて、治療組成物におけるその使用が、意図される。補助的な活性成分はまた、これらが組成物のベクターまたは細胞を不活化しない条件で、組成物に取り込まれ得る。

10

【0095】

本発明の活性組成物は、伝統的な薬学的調製物を含み得る。本発明に従うこれらの組成物の投与は、標的組織がその経路を介して入手可能である限り、任意の通常経路を介し得る。これは、経口経路、経鼻経路、または口腔内経路を含む。あるいは、投与は、経皮注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射または静脈内注射による投与であり得る。このような組成物は、上記のように、薬学的に受容可能な組成物として通常投与される。

20

【0096】

活性化合物はまた、非経口的または腹腔内に投与され得る。例示のために、遊離塩基としての活性化合物または薬理的に受容可能な塩の溶液が、界面活性剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース）と適切に混合した水中で調製され得る。分散剤もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物中で、ならびに油中で調製され得る。貯蔵および使用の通常条件下で、これらの調製物は一般に、微生物の増殖を防ぐための防腐剤を含む。

【0097】

注射可能な用途に適切な薬学的形態としては、例えば、滅菌水溶液または分散剤、および滅菌注射可能な溶液または分散剤の即席調製のための無菌粉末が挙げられる。一般に、これらの調製物は、滅菌されており、そして容易な注射可能性が存在する程度に流動性である。調製物は、製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の混入作用に対して保護されるべきである。適切な溶媒または分散媒体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、その適切な混合物、および植物油を含み得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散剤の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、そして界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌抗真菌剤（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、チメロサルなど）によってもたらされ得る。多数の場合において、等張剤（例えば、糖または塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注射可能な組成物の長期の吸収は、吸収を遅延する薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の組成物中の使用によってもたらされ得る。

30

40

【0098】

滅菌注射可能な溶液は、ろ過滅菌後に、所望のように任意の他の成分（例えば、上に列挙されるような）と共に溶媒中に適切な量で、活性化合物を取り込むことによって調製され得る。一般に、分散剤は、塩基性分散媒体および所望の他の成分（例えば、上に列挙されるような）を含む滅菌ビヒクル中に種々の滅菌活性成分を取り込むことによって調製される。滅菌注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、以前に滅菌ろ過されたその溶液から活性成分の粉末および任意のさらなる所望の成分を生じる、真空乾燥および凍結乾燥技術を含む。

50

【0099】

経口投与のために、一般に、本発明のポリペプチドは、賦形剤と共に取り込まれ得、そして摂取可能でない洗口剤および歯磨剤の形態で使用され得る。洗口剤は、適切な溶媒（例えば、ホウ酸ナトリウム溶液（D o b e l l 溶液））中に必要な量で、活性成分を取り込んで調製され得る。あるいは、活性成分は、ホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび炭酸水素カリウムを含む消毒洗浄液に取り込まれ得る。活性成分はまた、ゲル、ペースト、粉末およびスラリーを含む歯磨剤中で分散され得る。この活性成分は、水、結合剤、研磨剤、香味料、発泡剤、および湿潤剤を含み得るペースト状歯磨剤に、治療有効量で添加され得る。

【0100】

本発明の組成物は一般に、中性形態または塩形態で処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩化水素またはリン酸）または有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸）などに由来する、酸添加塩（タンパク質の遊離アミノ基で形成された）が挙げられる。タンパク質の遊離カルボキシル基で形成された塩はまた、無機塩基（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、または水酸化鉄）または有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、ヒスチジン、プロカイン）などに由来し得る。

【0101】

処方の際に、溶液は、好ましくは、投薬処方物と適合性の様式で、かつ、それが治療的に有効であるような量で、投与される。処方物は、注射可能な溶液、薬物放出カプセルなどのような種々の投薬形態で容易に投与され得る。水溶液での経口投与のために、例えば、この溶液は一般に適切に緩衝化され、そして液体希釈液は、例えば、十分な生理食塩水またはグルコースを用いて最初に等張性にされる。このような適切な水溶液は、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与および腹腔内投与のために使用され得る。好ましくは、特に本発明の開示を考慮して、当業者に公知であるような滅菌水性媒体が使用される。例示のために、単回用量は、1mlの等張性NaCl溶液に溶解され得、そして1000mlの皮下注入流体に添加されるか、または注入の提案された部位で注射されるかのいずれかである（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1035-1035頁および1570-1580頁を参照のこと）。投薬におけるいくつかの改変が、処置される被験体の状態に依存して、必然的に生じる。投与を担うヒトは、任意の事象において、個々の被験体のための適切な用量を決定する。さらに、ヒトへの投与のために、調製は、生物製剤基準のFDA事務所によって必要とされるような無菌、発熱性（pyrogenicity）、一般的な安全および純度基準を満たすべきである。

【0102】

（V.スクリーニング方法）

本発明はさらに、心肥大の予防または逆転において有用であるHDACのインヒビターを同定するための方法を包含する。これらのアッセイは、候補物質の大きいライブラリーの無作為スクリーニングを含み得る；あるいは、これらのアッセイは、それらにHDACの機能をより阻害させるようである構造的属性に眼を向けて選択された特定のクラスの化合物に集中するために使用され得る。

【0103】

HDACインヒビターを同定するために、一般的に候補物質の存在下または非存在下においてHDACの機能を決定する。例えば、方法は、一般に以下の工程：

- （a）候補モジュレーターを提供する工程；
- （b）候補モジュレーターをHDACと混合する工程；
- （c）HDAC活性を測定する工程；および

（d）工程（c）における活性を、候補モジュレーターの非存在下における活性と比較する工程、

を包含し、ここで、測定された活性の間の差異が、候補化合物が、実際に、化合物、細胞

10

20

30

40

50

または動物のモジュレーターであることを示す。

【0104】

アッセイはまた、単離された細胞または生物体中で行なわれ得る。代表的に、HDAC活性は、標識されたアセチル基を有するヒストンを提供することおよびヒストン分子から標識の放出を測定することによって測定される。

【0105】

もちろん、本発明の全てのスクリーニング方法は、有効な候補が見出されないかもしれないという事実に関わらず、それ自体有用であることが理解される。本発明は、このような候補をスクリーニングするための方法を提供し、単にこれらを見出す方法を提供するのではない。

10

【0106】

(1. モジュレーター)

本明細書中で使用される場合、用語「候補物質」は、HDAC活性を潜在的に阻害し得る任意の分子をいう。この候補物質は、タンパク質もしくはそのフラグメント、低分子、または核酸でさえあり得る。このことは、最も有用な薬理学的化合物が、本明細書中のいずれかに列挙される、公知のHDACインヒビターに構造的に関連している化合物である場合に判明し得る。改善した化合物を開発するのを助けるためのリード化合物を使用することは、「合理的薬物設計」として公知であり、そして公知のインヒビターおよび活性化因子との比較だけでなく、標的分子の構造に関する推定を含む。

20

【0107】

合理的薬物設計の目的は、生物学的に活性なポリペプチドまたは標的化合物の構造的アナログを生成することである。このようなアナログを作製することによって、天然分子よりもより活性であるか安定している薬物（これは、変更に対して異なる感受性を有するか、または種々の他の分子の機能に影響し得る）を作ることが可能である。他のアプローチにおいて、標的分子またはそのフラグメントの三次元構造を作製する。これは、X線結晶学、コンピューターモデリング、または両方のアプローチの組み合わせによって達成され得る。

【0108】

標的化合物の活性化因子またはインヒビターの構造を確認するために、抗体を使用することはまた可能である。原則として、このアプローチは、引き続き薬物設計が基づく薬物コア (pharmacore) を生じる。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗イディオタイプ抗体を作製することによってタンパク質結晶学を迂回することが可能である。鏡像の鏡像として、抗イディオタイプの結合部位は、本来の抗原のアナログであることが予期される。次いで、抗イディオタイプは、化学的または生物学的に生成されたペプチド群からペプチドを同定および単離するために使用され得る。次いで、選択されたペプチドは、薬物コアとして機能する。抗イディオタイプは、抗原として抗体を使用して、本明細書中に記載された抗体を産生するための方法を使用して生成される。

30

【0109】

他方、種々の商業的供給源から、有用な化合物の同定を「力づくで行なう (brute force)」ために有用な薬物のための基本的基準を満たすと考えられている低分子ライブラリーを簡単に獲得し得る。このようなライブラリー（コンビナトリアルに作製されたライブラリー（例えば、ペプチドライブラリー）を含む）のスクリーニングは、多数の関連（および関連していない）化合物を活性についてスクリーニングするたえの迅速かつ効率的な方法である。コンビナトリアルアプローチはまた、活性であるが、他に所望でない化合物をモデルとした、第2、第3および第4世代の化合物の作製によって、潜在的な薬物の迅速な進化に役立つ。

40

【0110】

候補化合物は、天然に存在する化合物のフラグメントまたは部分を含み得るか、またはさもなければ不活性である公知の化合物の活性な組み合わせとして見出され得る。天然供給源（例えば、動物、細菌、真菌、植物供給源（葉および樹皮を含む））ならびに海のサ

50

ンプルから単離された化合物は、潜在的に有用な薬学的薬剤の存在についての候補としてアッセイされ得る。スクリーニングされる薬学的薬剤はまた、化学的組成物または人工化合物に由来し得るかまたはそれらから合成され得ることが理解される。従って、本発明によって同定された候補物質は、ペプチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、低分子インヒビター、または公知のインヒビターまたは刺激物質から始まる合理的薬物設計を介して設計され得る任意の他の化合物であり得る。

【0111】

他の適切なモジュレーターとしては、アンチセンス分子、リボザイム、および抗体（単鎖抗体を含む）が挙げられ、これらの各々は、標的分子に特異的である。このような化合物は、本明細書中の他でより詳細に記載される。例えば、翻訳または転写開始部位、またはスプライス接合部に結合されるアンチセンス分子は、理想的な候補インヒビターである。

10

【0112】

最初に同定された化合物を調節することに加えて、本発明者らはまた、他の立体的に類似した化合物が、モジュレーターの構造の重要な部分を模倣するように処方され得ることを意図する。このような化合物（これらは、ペプチドモジュレーターのペプチド模倣物を含み得る）は、最初のモジュレーターと同じ様式で使用され得る。

【0113】

（2．インビトロアッセイ）

実行するのに速く、安価な、そして容易なアッセイは、インビトロアッセイである。このようなアッセイ（速くそして多数で実行され得る）は一般に、単離された分子を使用し、それにより、短い期間で得られ得る情報の量を増加する。種々の容器（試験管、プレート、シャーレ、およびディップスティックまたはビーズのような他の表面）がアッセイを実行するために使用され得る。

20

【0114】

化合物のハイスループットスクリーニングのための技術は、WO 84 / 03564において記載されている。多数の低分子ペプチド試験化合物が、固体基板（例えば、プラスチックピンまたはいくつかの他の表面）上で合成される。このようなペプチドは、HDACを結合および阻害するそれらの能力について迅速にスクリーニングされ得る。

【0115】

（3．インサイト（in cyto）アッセイ）

本発明はまた、細胞中のHDACを調節するそれらの能力について化合物をスクリーニングすることを意図する。この目的のために特に操作された細胞を含む、種々の細胞株が、このようなスクリーニングアッセイに利用され得る。

30

【0116】

（4．インビトロアッセイ）

インビボアッセイは、特定の欠損を有するように操作されているトランスジェニック動物、または生物体内に異なる細胞に到達しそして影響する候補物質の能力を測定するために使用され得る輸送マーカを含む、心臓病の種々の動物モデルの使用を含む。これらのサイズ、取り扱いの容易さ、およびこれらの生理学および遺伝子構成に関する情報に起因して、マウスは、特にトランスジェニックについて、好ましい実施形態である。しかし、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、スナネズミ、マーモット、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマおよびサル（チンパンジー、ギボンおよびヒヒを含む）を含む他の動物も同様に適切である。インヒビターについてのアッセイは、これらの種のいずれかに由来する動物モデルを使用して行なわれ得る。

40

【0117】

試験化合物を用いる動物の処置は、動物への化合物（適切な形態で）の投与を含む。投与は、臨床目的のために利用され得る任意の経路による。インビボで化合物の効果を決定することは、種々の異なる基準を含み得る。また、毒性および用量応答を測定することは、インビトロまたはインサイトアッセイ中でより意味のある様式で動物中で行なわれ得る

50

。

【0118】

(VI. 定義)

本明細書中で使用される場合、用語「心不全」は、心臓の血液を汲み出す能力を減少させる任意の状態をいうために広範に使用される。結果として、うっ血および水腫が、組織において発生する。最も頻繁に、心不全は、減少した冠血流より生じる心筋層の減少した収縮性によって引き起こされる；しかし、心臓弁に対する損傷、ビタミン不足、および原発性心筋疾患を含む、多数のほかの因子が、心不全を生じ得る。心不全の正確な生理学的機構は、完全に理解されていないが、心不全は、交感神経、副交感神経、および圧受容体応答を含む、いくつかの心臓の自律神経特性における障害に関連すると一般に考えられている。成句「心不全の発現」は、心不全に関連する実験室知見を含む、心不全に関連する全ての続発症（例えば、短い呼吸、圧痕水腫、拡大した過敏な肝臓、うっ積した頸部静脈、肺ラ音など）を含むように広範に使用される。

10

【0119】

用語「処置」または文法上の等価物は、心不全（心臓が血液を汲み出す能力）の症状の改善および/または逆転を含む。心臓の「生理学的機能における改善」は、本明細書中に記載される任意の測定（例えば、駆出率、率の減少、左心室内法、心拍数の測定）ならびに動物の生存に対する任意の効果を使用して評価され得る。動物モデルの使用において、処置されたトランスジェニック動物および未処理のトランスジェニック動物の応答を、本明細書中に記載されるアッセイのいずれかを使用して比較する（さらに、コントロールとしての処理された動物および未処理の動物を含み得る）。それにより、本発明のスクリーニング方法において使用される心不全に関連する任意のパラメーターにおける改善を引き起こす化合物は、治療化合物として同定され得る。

20

【0120】

用語「拡張した心筋症」は、乏しい収縮期の収縮機能を有する対称的に拡張した左心室の存在によって特徴付けられ、さらに右心室を頻繁に含む、心不全の型をいう。

【0121】

用語「化合物」は、身体機能の疾患、疾病、病気または障害を処置または予防するために使用され得る任意の化学的物体、医薬品、薬物などをいう。化合物は、公知の治療化合物および潜在的な治療化合物の両方を含む。化合物は、本発明のスクリーニング方法を使用するスクリーニングによって、治療剤であると決定され得る。「公知の治療化合物」は、このような治療において効果的であることが示されている（例えば、動物試験または以前のヒトへの投与経験を介して）治療化合物をいう。言い換えると、公知の治療化合物は、心不全の処置において有効な化合物に制限されない。

30

【0122】

本明細書中で使用される場合、用語「アゴニスト」は、「ネイティブな」または「天然の」化合物の作用を模倣する分子または化合物をいう。アゴニストは、コンフォメーション、電荷、または他の特徴に関して、これらの天然の化合物に対して相同であり得る。従って、アゴニストは、細胞表面上で発現されるレセプターによって認識され得る。この認識は、細胞中で生理学的および/または生化学的变化を生じ得、その結果、細胞は、天然化合物が存在するかのように、同じ様式でアゴニストの存在に反応する。アゴニストとしては、タンパク質、核酸、炭水化物、または分子、レセプター、および/もしくはは目的の経路と相互作用する任意の他の分子が挙げられ得る。

40

【0123】

本明細書中で使用される場合、用語「心肥大」は、成体心筋細胞が、肥大増殖を介するストレスに応答するプロセスをいう。このような増殖は、細胞分裂なしで増加する細胞のサイズ、力の生成を最大化するために細胞中でさらなる筋節を構築すること、および致死的な心臓遺伝子プログラムの活性化によって特徴付けられる。心肥大はしばしば、増加した罹患率および死亡率の危険性に関連し、従って、心肥大の分子機構を理解することを目的とする研究は、ヒトの健康に対する重要な影響を与え得る。

50

【0124】

本明細書中で使用される場合、用語「アンタゴニスト」および「インヒビター」は、心肥大に関連し得る細胞性因子の作用を阻害する分子または化合物をいう。アンタゴニストは、コンフォメーション、電荷または他の特徴に関して、これらの天然の化合物に相同であってもよいし、そうでなくてもよい。従って、アンタゴニストは、アゴニストによって認識される同じかまたは異なるレセプターによって認識され得る。アンタゴニストは、アゴニストの作用を防止するアロステリックな効果を有し得る。あるいは、アンタゴニストは、アゴニストの機能を防止し得る。アゴニストとは対照的に、拮抗化合物は、細胞内で生理学および/または生物学的変化を生じないので、その結果、細胞は、細胞性因子が存在するかのように、同じ様式でアンタゴニストの存在に反応する。アンタゴニストおよびインヒビターとしては、タンパク質、核酸、炭水化物、またはレセプター、分子、および/もしくは目的の経路と相互作用する任意の他の分子が挙げられ得る。

10

【0125】

本明細書中で使用される場合、用語「調節する」は、生物学的活性における変化または変更をいう。調節は、タンパク質活性における増加または減少、結合特徴における変化、または目的のタンパク質または他の構造の活性に関連した生物学的、機能的、または免疫学的特性における任意の他の変化であり得る。用語「モジュレーター」は、上記のように、生物学的活性を変化または変更し得る任意の分子または化合物をいう。

【0126】

用語「 β -アドレナリン作用性レセプターアンタゴニスト」は、 β 型のアドレナリンレセプター（すなわち、カテコールアミン（特に、ノルエピネフリン）に応答するアドレナリン系のレセプター）を部分的にかまたは完全にかのいずれかでブロックし得る化学的化合物または化学的物体をいう。いくつかの β -アドレナリン作用性レセプターアンタゴニストは、1つのレセプターサブタイプ（一般に β_1 ）にある程度の特異性を示す；このようなアンタゴニストは、「 β_1 特異的アドレナリン作用性レセプターアンタゴニスト」および「 β_2 特異的アドレナリン作用性レセプターアンタゴニスト」と呼ばれる。用語「 β -アドレナリン作用性レセプターアンタゴニスト」は、選択的アンタゴニストおよび非選択的アンタゴニストである化学的化合物をいう。 β -アドレナリン作用性アンタゴニストの例としては、アセプトロール、アテノロール、ブトキサミン、カルテオロール、エスモロール、ラベタロール、メトプロロール、ナドロール、ペンプトロール、プロパノロール、およびチモロールが挙げられるがこれらに限定されない。公知の β -アドレナリン作用性レセプターアンタゴニストの誘導体の使用は、本発明の方法によって包含される。確かに、 β -アドレナリン作用性レセプターアンタゴニストとして機能的に挙動する任意の化合物は、本発明の方法によって包含される。

20

30

【0127】

用語「アンギオテンシン変換酵素インヒビター」または「ACEインヒビター」は、レニン-アンギオテンシン系において、比較的不活性なアンギオテンシンIの活性なアンギオテンシンIIへの変換に関与する酵素を部分的または完全に阻害し得る化学的化合物または化学的物体をいう。さらに、ACEインヒビターは同時に、ブラジキニン（これは、ACEインヒビターの抗高血圧効果を有意に強化するようである）の分解を阻害する。ACEインヒビターの例としては、ベナゼプリル、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、キアプリル（*quisipril*）およびラミプリルが挙げられるがこれらに限定されない。公知のACEインヒビターの誘導体の使用は、本発明の方法によって含まれる。確かに、任意の化合物（これは、ACEインヒビターとして機能的に挙動する）は、本発明の方法によって包含される。

40

【0128】

本明細書中で示されるように、用語「遺伝子型」は、生物体の実際の遺伝子構成をいい、一方、「表現型」は、個体によって示される物理的形質をいう。さらに、「表現型」は、ゲノムの選択的発現の結果である（すなわち、これは、細胞履歴の発現およびその細胞外環境に対する応答である）。確かに、ヒトゲノムは、推定30,000~35,000

50

個の遺伝子を含む。各細胞型において、これらの遺伝子の少数（すなわち、10～15%）の割合のみが発現される。

【実施例】

【0129】

（VII. 実施例）

以下の実施例は、本発明の種々の局面をさらに例示するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、発明者らによって発見された技術および/または組成物が本発明の実施において十分に機能することを示し、従って、その実行のための好ましい様式を構成すると考えられ得ることが当業者によって理解されるべきである。しかし、当業者は、本発明の開示を考慮して、多数の改変が開示された特定の実施形態においてなされ得、そしてなお本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果を得ることを理解するべきである。

10

【0130】

（実施例1）

（材料および方法）

（細胞培養）

1日齢のラット由来の心室筋細胞を、5%ウシ血清を含むMEM中に低密度でプレートし、そして無血清MEM中で研究した。培養物を、PE（#P6126、Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO）、IL-1（#501-RL, R & D Systems, Minneapolis, MN）、TSA（#GR-309, B I O M O L Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA）またはそれらのビヒクル（PEについてはアスコルビン酸；IL-1についてはウシ血清アルブミン；TSAについてはジメチルスルホキシド）で処理した。

20

【0131】

（アセチル化リジン残基の検出）

総細胞抽出物を、Cell Signaling Technology（Beverly, MA）からの抗体（アセチル化リジン抗体：#9441、リジン9におけるアセチル化ヒストンH3抗体：#9671、リジン23におけるアセチル化ヒストンH3抗体：#9674、ヒストンH3抗体：#9712）を使用するウェスタンブロット分析に供した。アセチル化ヒストンH3の核局在化を、同じ抗体を使用する免疫染色によって試験した。

30

【0132】

（筋細胞肥大および筋細胞特異的mRNA発現の定量）

培養した筋細胞の増殖を、¹⁴C-フェニルアラニンと共に連続的にインキュベートした後、放射性標識されたタンパク質の含有量を定量した。筋細胞遺伝子プログラムの評価のために、総RNAを、TRIzol（GIBCO, Carlsbad, California）を用いて細胞から抽出して、そしてSERCA、¹-MyHC、ANP、BNP、および心臓の¹-アクチンについてのプローブを用いてRNase保護アッセイにおいて使用した。全てのサンプルはまた、RNAローディングのための中間コントロールとして、グルセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）を含んだ。

40

【0133】

（トランスフェクション）

筋細胞を、HDAC1、4、5についてのサイトメガロウイルスプロモーター駆動FLAGタグ化発現ベクター、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子の発現を駆動するSERCA（3500bp）、MyHC（2900bp）、またはMyHC（3300bp）についてのラットプロモーターを保有するレポータープラスミドを用いるリン酸カルシウム同時沈澱を使用して、トランスフェクトした。レポーター発現を、SEAP（BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA）を用いるトランスフェクション効率についての補正を用いて、以

50

前に記載されるように、48時間後に評価した。HDACの過剰発現を、抗Flag M2抗体(Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO)を使用するウェスタンブロット分析によって確認した。

【0134】

(結果)

(TSAは筋細胞におけるタンパク質アセチル化を増加する)

TSAは、タンパク質アセチル化における全体の増加を生じるはずであると考えていたので、最初の実験は、TSAが筋細胞におけるHDAC活性を阻害し得ることを確認することに指向した。アセチル化の程度を、アセチル化リジン残基に特異的な抗体を使用して決定した。発明者らは、ウェスタンブロットおよび細胞免疫蛍光分析の両方によって、24時間のTSAへの曝露が、多数のタンパク質において、そして特にヒストンH3において、アセチル化リジン残基を効果的に増加したことを示した。

10

【0135】

(TSAはアゴニスト誘導性増殖を増強するが、肥大関連遺伝子の抑制を逆転する)

TSA自体は、筋細胞増殖に影響を与えないが、発明者らは、TSAがPEおよびIL-1の両方に対する個々の肥大応答を増強することを見出した。両方の肥大刺激は、SERCA(図1A)およびMyHC(図1B)発現を下方制御し、そして両方のアゴニストに対する組み合わせた曝露は、さらなる抑制を生じた。対照的に、TSAは、SERCA2aおよびMyHC mRNAの両方の基底発現を増加させた。TSAの前処理はまた、両方の肥大刺激によるSERCA発現の抑制における実質的な逆転を生じた。明らかに、TSAは、MyHC発現に対するPEの効果のほぼ完全な逆転を生じたが、この効果は、IL-1処理(または同時処理)細胞の場合において、より顕著ではなかった。発明者らは以前に、PEおよびIL-1を用いた筋細胞の同時処理が、通常のMyHC発現のPE誘導をほぼ50%抑制することを示した。TSAは、この遺伝子の基底発現またはPE誘導のいずれに対しても影響を与えなかったが、IL-1単独の存在下でMyHC発現を増加し、そしてPE/IL-1同時処理細胞においてIL-1の効果逆転した。同様の逆転がまた、sACT遺伝子で見られた(WangおよびLong、未公開データ)。明らかに、TSAは、任意の肥大処理条件下で、心臓の α -アクチン、ANP、BNPの遺伝子発現に影響を与えなかった(データは示されていない)。

20

【0136】

(HDACの過剰発現は、筋細胞特異的遺伝子のプロモーター活性を抑制した)

これらの標的遺伝子についてのmRNA発現の研究と一致して、TSAはまた、SERCA2(図2A)およびMyHC(図2B)遺伝子の両方の基底プロモーター活性を増加したが、MyHC(図2C)の活性は増加しなかった。さらに、HDAC1または4についての発現ベクターを有するこれらの構築物の同時発現はまた、SERCA(図2A)およびMyHC(図2D)遺伝子の両方のプロモーター活性を減少した。しかし、対照的に、HDAC5は、他のアイソフォームの発現レベルと同様の発現レベルにも関わらず、いずれの遺伝子のプロモーター活性をも阻害することに失敗した(データは示されていない)。明らかに、3つ全てのHDAC構築物は、MyHCプロモーター活性(図2D)におけるPE誘導性の増加を減弱し得た。

30

40

【0137】

(実施例2)

(材料および方法)

(心筋細胞単離)

心臓を、妊娠15日目の雌性Sprague-Dawleyラット(Harlan, Houston, TX)から回収した。リン酸緩衝化生理食塩水中で刻んだ後、筋細胞を、0.1%(w/v)Pancreatin(Sigma, St. Louis, MO)溶液の連続消化画分から単離した。画分を回収し：プレート培地に再懸濁し；プールし；次いで心筋細胞集団から線維芽細胞を分離するために2時間プレートした。懸濁細胞を、再び回収し、そしてトランスフェクションおよび免疫蛍光実験のために 1×10^6 細胞/ウ

50

エルで6ウェルシャーレ中にプレートし、そしてRNA分析のために10cmシャーレ中で 2×10^6 細胞をプレートした。

【0138】

(転写アッセイ)

プレートの24時間後、細胞を、Lipofectamine Plus試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して、総量 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で5時間トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をインキュベートし、次いで、さらに24時間処理した。細胞を、溶解し、そしてそれらの溶解物を、Lucysoft 2照度計 (Rosys Anthos, New Castle, DE) を使用して、蛍光についてLuciferase Assay System (Promega, Madison, WI) を用いてアッセイした。

10

【0139】

(化学発光)

新生児心筋細胞を、96ウェルプレートに播種して、そして72時間処理した。細胞を、 $1 \times \text{PBS}$ 中で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド/ $1 \times \text{PBS}$ 中で固定し、そして0.1% Triton-X 100を用いて浸透させた。ブロッキング後、細胞を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ モノクローナル抗ANF抗体 (Biodesign) と共に1時間インキュベートした。ウェルを、1%BSA/ $1 \times \text{PBS}$ で2回洗浄し、次いで $1 \times \text{PBS}/1\% \text{BSA}$ 中1:1000でヤギ抗マウスIgG-Fc-HRP (Jackson Labs, location) と共に1時間インキュベートした。細胞を、1%BSA/ $1 \times \text{PBS}$ で2回洗浄し、 $1 \times \text{PBS}$ で2回洗浄し、次いでプロットし、乾燥した。Luminol (Pierce, Rockford, IL) を添加し、そして化学発光を、Fusion Plate Reader (Perkin Elmer/Packard) で検出した。

20

【0140】

(ドットプロット分析)

総RNAを、未処理、フェニレフリン処理、TSA処理、またはフェニレフリンおよびTSAの同時処理のいずれかの心筋細胞から単離した。1マイクログラムのRNAを、Nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA) にプロットし、そして末端標識オリゴで50 で14時間ハイブリダイズした。

30

【0141】

【化2】

(ANF, 5'-

aaigtgaccaagctgctgacacaccacaaggccttaggatctttgcatctgctcaag-3', 配列番号1 ; αSK
actin5'-tggagcaaacagaatggctgctttaatgcttcaagttttccatttccctccacaggg-3', 配列番号2 ;
 αMyHC 5'-cgaacgtttatgtttatgtgattggccacagcagggctgctggagagg-3', 配列番号3 ;
 βMyHC 5'-gctttat tctgctccacctaaggcgtgtgcaaa ggctccaggtctgagggcttc-3', 配列番号4 ;
GAPDH5'-ggaacatgtagaccatgtag ttgaggtcaatgaag-3', 配列番号5).

40

プロットを、 $2 \times \text{SSC}/0.5\% \text{SDS}$ 溶液中で2回洗浄し、フィルム (Kodak, Rochester, NY) またはphosphorimager (Amersham Bioscience, Sunnyvale, CA) に露光した。プローブのハイブリダイゼーション強度を、ImageQuant (著作権) (Amersham Bioscience, Sunnyvale, CA) を用いて測定した。

【0142】

(免疫染色)

ガラスカバーガラスを、 $1 \times \text{PBS}$ ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) 中でラミニンを溶解することによって、カバーガラスを溶液中に浸漬することによって、そしてそれらを風乾することによって、

50

よって、ラミニン (Invitrogen, Carlsbad, CA) でコーティングした。細胞を、24時間処理し、洗浄し、3.7%ホルムアミドで10分間固定し、1×PBSで洗浄し、そして3%BSAおよび0.1%NP-40 (Sigma, St. Louis, MO) を含む1×PBSで浸漬した。一次抗体を、3%BSAおよび0.1%NP-40を含む1×PBS中で30分間置き、次いで1×PBS中で3回洗浄した。二次FITC抗体またはTRITC抗体 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) を、一次抗体と同じ緩衝溶液中でインキュベートし (1:200)、次いで1×PBSで洗浄し、カバーし引き続き可視化した。イメージを、デジタルカメラ (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) を使用して取り込んだ。

10

【0143】

(タンパク質合成)

心筋細胞を、処理したRPMI培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中で (1.0 μ Ci/ml; 172 Ci/mmol sp. 活性) トリチウム化ロイシン (ICN Biochemicals, Inc., Irvine, CA) と共にインキュベートした。6時間のインキュベーション後、細胞を、1×PBSで2回洗浄し、次いで氷上で30分間、10%TCA中でインキュベートした。その後、細胞を、5%TCAで2回洗浄し、水で1回洗浄し、次いで0.25 NaOH中で溶解した。溶解物を、シンチレーションカウンター (Beckman, Fullerton, CA) によってシンチレーション液の6分の1容量で測定した。

20

【0144】

(S6リボソームプロトコル)

ブロッキング後、細胞を、50 μ g/ml 抗S6タンパク質 (Cell Signaling, location) を含む1%BSA/1×PBS中で、1時間インキュベートした。洗浄後、細胞を、1:400の希釈率で、IgG-HRP (Jackson Labs, location) と共にインキュベートした。次いで、細胞を、1%BSA/1×PBS中で2回洗浄し、1×PBS中で洗浄し、次いでプロットし、乾燥した。Luminol (Pierce, Rockford, IL) を添加し、そして化学発光を、Fusion Reader (Perkin Elmer/Packard) で検出した。

30

【0145】

(遺伝子チップおよび分析)

RNAを、未処理、フェニレフリン処理、TSA処理、およびフェニレフリン/TSA同時処理ラット新生児心筋細胞から、Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して単離した。RNAを、調製し、そしてAffymetrixプロトコルに従って、U34Aチップ (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) 上でハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションの強度を、Micro Array Suite 5.0 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) によって検出し、そして遺伝子発現における変化を決定し、そしてMicro Array Suite 5.0 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) によって分析した。

40

【0146】

(結果)

ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) が遺伝子発現を調節するので、本発明者らは、HDAC阻害が、心肥大と関連した遺伝子の発現を変化させるか否かを分析した。心房性ナトリウム利尿因子 (ANF) はこのような遺伝子の1つであり、そしてその発現は、肥アゴニストの存在下で増大する。HDAC阻害がANF遺伝子活性化に影響するか否かを決定するために、トランスフェクション実験をANFプロモーターを用いて実施し、そしてトランスフェクトされた心筋細胞をフェニレフリンおよびいくつかのHDACインヒビターで処理した。トリコスタチン (TSA)、酪酸ナトリウム (NaBut) またはHC

50

毒素 (HC) での心筋細胞の処理は、ANFプロモーターを活性化しなかった。しかし、HDACインヒビターは、フェニレフリン処理によるプロモーターの活性化を完全にブロックした (図3A)。この効果は特異的であった。なぜなら、各HDACインヒビターを単独でまたはフェニレフリンと一緒にかのいずれかで処理した心筋細胞は、CMV-LacZレポーターの転写活性を増大したからである (図3B)。このことは、これらの薬理的薬剤の作用が、ANFの転写制御に特異的であって、一般的な転写阻害に由来しなかったことを示す。

【0147】

発明者らは、次いで、TSAおよび酪酸ナトリウムの用量の増加が、培養心筋細胞に対して細胞傷害性であるか否かを調べた。細胞死亡率を決定するために、心筋細胞から培養培地へのアデニル酸キナーゼの放出をアッセイした。このアッセイは、細胞膜の完全性について公知の測定である：膜は、細胞が死亡する際に透過性になり、これら細胞にアデニル酸キナーゼを放出させる。TSA (100 nMまで) および酪酸ナトリウム (25 nMまで) の用量の増加は、培養培地においてアデニル酸キナーゼを増大させるようにほとんど働かなかった。このことは、TSAおよび酪酸ナトリウムによって細胞死の増大がなかったことを示す (図3Cおよび3D)。単一時点実験において85 nM TSAまたは5 mM酪酸ナトリウムを用いたところ、この結果は、ANF転写の不活性化がHDAC阻害の直接的な効果であって、HDACインヒビターによる細胞傷害性の間接的な結果ではないことを示す。

10

【0148】

内因性遺伝子発現がトランスフェクションの結果と対応するか否かを決定するために、本発明者らは、種々の処理条件下で心筋細胞からのANFの内因性RNAレベルを見た。フェニレフリン処理心筋細胞のRNAドットプロット分析は、フェニレフリン処理に応じて、ANF発現において、およそ3倍の増加を示した。しかし、異なるHDACインヒビター (TSA、NaBut、またはHC毒素) でのフェニレフリン処理細胞の同時処理は、以前に述べたトランスフェクション結果と一致して、フェニレフリン誘導ANF応答を妨害した (図4A)。

20

【0149】

先のデータは、低用量のTSAが、ANF遺伝子座のアセチル化により、および転写リプレッサー (NRSE) の不活性化によりANF発現を誘導し得ることを示した。HDACインヒビターの用量依存性効果があるか否かに取り組むために、発明者らは、肥大刺激因子である血清 (FBS)、フェニレフリン (PE) またはエンドテリン-1 (ET-1) の不在または存在下でTSA (図4B) および酪酸ナトリウム (図4C) の濃度を増加させながら一次心筋細胞を処理した後のANF発現を調べた。酪酸ナトリウムの非常に低い用量 (0.2 nM) では (図4C)、発明者らは、ANF発現において、2倍近くの増加を観察した。TSAでは、限界的な増加しかなかった (図4B)。しかし、他のすべての濃度でのHDACインヒビターは、ANF産生を誘導せず、そして濃度を増加させるにつれて、それらは、増殖刺激因子であるFBS、PE、およびET-1での培養心筋細胞の処理後に通常観察されるANF発現の誘導に対抗した (図4Bおよび4C)。各増殖刺激因子の肥大応答を阻害した最小濃度は、40 nM TSAおよび5 mM酪酸ナトリウムであった。これらは、トランスフェクションおよびドットプロット実験において観察される転写におけるANFの3~4倍の減少を模倣した。これらの用量は、細胞傷害性の閾値を十分に下回った。

30

40

【0150】

心肥大は、ANFに加えて胎児遺伝子の再プログラミングに関連する。本発明者らは、胎児遺伝子カスケードの他のメンバーがTSAの処理によって影響されるか否かを決定することを望んだ。ANFに加えて、*-sk* 発現および *MyHC* の倍数変化の定量的分析は、HDAC阻害が肥大刺激因子フェニレフリンにより活性化された他の遺伝子の抑制を生じることを示した (図5AおよびB)。さらに、胎児ミオシン鎖イソ型 (*MyHC*) イソ型のダウンレギュレートに加えて、心筋細胞のTSA処理は、*MyHC* (肥大心

50

筋細胞において通常減少する成体ミオシン重鎖イソ型)の発現を誘導した(図5B)。これらのデータをまとめると、HDAC阻害が、心筋細胞肥大と関連した遺伝子カスケードの転写再プログラミングを抑制することが示される。

【0151】

ANFタンパク質についての染色は、フェニレフリンまたは血清で処理した心筋細胞が、未刺激細胞に比較して、ANFタンパク質の核周囲蓄積を誘導することを示した(データは示さず)。TSAで処理した心筋細胞にはANFタンパク質の蓄積がなく、フェニレフリンまたは血清のいずれかで処理した心筋細胞へのTSAの添加は、ANFタンパク質の蓄積を劇的に減少した。 - アクチニン(actinin)についての免疫細胞化学染色は、HDAC阻害が、筋節の再構築(心筋細胞肥大と関連した別の現象)を拮抗することを示した。未刺激の心筋細胞は無定形の形状を維持し、筋節の見かけ上の構造的構築(- アクチニン)を生じなかった。肥大アゴニストであるフェニレフリン、血清、およびET-1は、高次の細胞骨格構造の一部として筋節の構築を強力に刺激した。興味深いことに、TSAは、心筋細胞形態学に影響を及ぼした。TSA処理細胞は大きさを変えなかったが、それらは、細胞の本体部から細く伸長していくことにより「星をちりばめた(starred)」外見を獲得する傾向にあった。しかし、それらには筋節の構築がなかった。TSA処理の効果は、増殖刺激因子の存在下で、より劇的であった。なぜなら、これは、フェニレフリン、血清、またはET-1により通常誘導される肥大形態学に影響したからである。TSA処理心筋細胞には、完全に構築された筋節はなかった。

10

【0152】

本発明者らは、次いで、タンパク質合成の変化についてアッセイし、そしてリボソームサブユニットS6のタンパク質含有量の蓄積を測定することにより、TSAが、肥大応答と通常関連するタンパク質合成の増加を拮抗したか否かを決定した。フェニレフリンは、刺激6時間後に心筋細胞におけるタンパク質合成を2倍高めた。しかし、HDACインヒビターであるTSAおよび酪酸ナトリウムとのフェニレフリンとの同時培養は、フェニレフリンで通常誘導されるタンパク質合成の刺激に対してほとんど効果がなかった(図6)。けれども、同時処理の24時間後まで、HDACインヒビターは、用量依存性様式でPEまたは血清により通常誘導されるタンパク質合成を拮抗した(図6)。このことは、HDAC阻害による筋節の構築の妨害が、転写調節に特異的な効果であることを示唆する。

20

【0153】

以前の研究は、酵母のTSA処理が、遺伝子のサブセットにおいてのみ遺伝子発現の変化を生じることを示した。このことが心筋細胞についても当てはまるのであれば、限定された数の遺伝子が、肥大表現型の抑制の原因となると考えられる。これらの遺伝子を同定するために、発明者らは、遺伝子チップアレイによりおよそ8000の遺伝子の発現をアッセイした。フェニレフリン処理細胞とフェニレフリン/TSA処理細胞との遺伝子変化の間の発現のアッセイの続くグラフ分析は、大多数の遺伝子が線状に群がることを明らかにした。フェニレフリン処理細胞由来のRNAとハイブリダイズしたチップと、フェニレフリン/TSA処理細胞由来のRNAとハイブリダイズしたチップとの間で、大多数の転写物は、比較的变化がなかった(遺伝子発現の変化は3倍未満であった)。このことは、TSA処理によるフェニレフリン誘導心筋細胞増殖の抑制を担う遺伝子の相対数が低いことを示唆する。

30

40

【0154】

フェニレフリン、TSAまたはそれらの組み合わせにより発現レベルが変化した少ない数の遺伝子から、発明者らは、フェニレフリン処理群とTSA処理群(フェニレフリン/TSAおよびTSA)との間で一貫して2倍以上の差異を有した7つの遺伝子を同定した。3つの遺伝子は、フェニレフリン処理によってアップレギュレートされ、そしてTSA(シトクロムオキシダーゼサブユニットVII、マウスT複合タンパク質、およびインスリン増殖因子結合タンパク質-3)によってダウンレギュレートされた(図7A)。フェニレフリンによってダウンレギュレートされ、そしてTSAによってアップレギュレートされた4つの遺伝子は、大きな 微小管関連タンパク質、ユビキチンカルボキシル末端

50

ヒドロラーゼ、Thy-1細胞表面糖タンパク質、およびMyHCクラスI抗原であった（図7B）。ノーザン分析により、遺伝子チップアレイの発現結果が確認された（データは示さず）。

【0155】

本明細書中に開示し、そして請求した全ての組成物および方法は、本開示を考慮して過度の実験を行うことなく製造され、そして実行され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態によって記載したが、これら組成物および方法に、ならびに本明細書中に記載の方法の工程、および工程の順序において、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、変更が適用され得ること、は、当業者に明らかである。より詳細には、同じまたは類似の結果が達成されれば、本明細書中に記載の薬剤の代わりに、化学的および生理学的に関連する特定の薬剤を用いてもよいことは明らかである。当業者に明らかでないような類似の全ての置換および改変が、付随の特許請求の範囲によって定義されるような本発明の精神、範囲および概念内にあるとみなされる。

10

【0156】

（XI．参考文献）

以下の参考文献は、それらが本明細書の記載を補充して典型的な手順または他の詳細を提供する程度に、本明細書中に参考として詳細に援用される：

【0157】

【表2】

20

Aus. Pat. No. 6,794,700.

Aus. Pat. No. 9,013,101.

Aus. Pat. No. 9,013,201.

Aus. Pat. No. 9,013,401.

Butler *et al.*, *Cancer Res.*, 60:5165-5170, 2000.

Butler *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 7:962-970, 2001.

Chien *et al.*, *Ann. Rev. Physiol.*, 55, 77-95, 1993.

Coffey *et al.*, *Cancer Res.*, 61:3591-3594, 2001.

Durand *et al.*, *Ann. Med.*, 27:311-317, 1995.

Eur. Pat. No. 1,123,111.

Eur. Pat. No. 1,170,008.

30

Eur. Pat. No. 1,173,562.

Eur. Pat. No. 1,174,438.

Eur. Pat. No. 1,208,086.

Eur. Pat. No. 1,233,958.

Furumai *et al.*, *Cancer Res.*, 62:4916-21, 2002.

Gao *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277:25748-55, 2002.

Gottlicher *et al.*, *EMBO J.*, 20:6969-78, 2001.

Grozinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4868-4873, 1999.

Han *et al.*, *Cancer Research*, 60:6068-6074, 2000.

Hinnebusch *et al.*, *J. Nutr.*, 132:1012-7, 2002.

Hoffmann *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 12:51-55, 2001.

40

Japanese Patent Application No. 2001/348340.

Jones *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 98:1906-1917, 1996.

Jung, *Curr. Med. Chem.*, 8:1505-11, 2001.

Jung *et al.*, *J. Med. Chem.*, 42:4669-4679, 1999.

Jung *et al.*, *Med. Chem. Lett.*, 7:1655-1658, 1997.

Kao *et al.*, *Genes Dev.*, 14:55-66, 2000.

- Katoh *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:1511-18, 1998.
- Kim *et al.*, *Oncogene*, 18:2461-2470, 1999.
- Kitazono *et al.*, *J. Clinical Endoc. Metabol.*, 86(7):3430-3435, 2001.
- Komastu *et al.*, *Cancer Res.*, 61:4459-4466, 2001.
- Kramer *et al.*, *Trends in Endoc. Metabolism*, 12(7):294-300, 2001.
- Lu *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97:4070-4075, 2000.
- Mai *et al.*, *J. Med. Chem.*, 45:1778-1784, 2002.
- Marks *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 92(15):1210-1216, 2000.
- Marks *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 7:759-760, 2001.
- Massa *et al.*, *J. Med. Chem.*, 44:2069-2072, 2001. 10
- McKinsey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:14400-14405, 2000a.
- McKinsey *et al.*, *Nature*, 408:106-111, 2000b.
- Molkentin *et al.*, *Cell*, 93:215-228, 1998.
- PCT Application No. WO 84/03564.
- PCT Application No. WO 01/14581.
- PCT Application No. WO 01/18045.
- PCT Application No. WO 01/38322.
- PCT Application No. WO 01/42437.
- PCT Application No. WO 01/70675.
- PCT Application No. WO 02/26696. 20
- PCT Application No. WO 02/26703.
- PCT Application No. WO 02/30879.
- PCT Application No. WO 02/46129.
- PCT Application No. WO 02/46144.
- PCT Application No. WO 02/50285.
- PCT Application No. WO 02/51842.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- Sadoshima and Izumo, *Ann. Rev. Physiol.*, 59:551-571, 1997.
- Saunders *et al.*, *Cancer Res.*, 59:399-409, 1999.
- Su *et al.*, *Cancer Res.*, 60:3137-3142, 2000. 30
- Takahashi *et al.*, *Antibiotics*, 49:453, 1996.
- Taunton *et al.*, *Science*, 272:371, 1996.
- Tong *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 30:1114-23, 2002.
- United States App. 2002/61860.
- United States App. 2002/65282.
- United States App. 2002/103192.
- Van den Wyngaert *et al.*, *FEBS Lett.*, 478:77-83, 2000.
- Vigushin *et al.*, *Anticancer Drugs*, 13:1-13, 2002. 40
- Vigushin *et al.*, *Cancer Res.*, 5(Suppl), 1999.
- Vigushin *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 7:971-976, 2001.
- Workman and Kingston, *Annu. Rev. Biochem.*, 67:545-579, 1998.
- Yamano *et al.*, *Amer. Soc. Gene Ther.*, 2000.
- Young *et al.*, *Handbook of Applied Therapeutics*, 7.1-7.12 ~~7.1-9.10~~ 9.1-9.10, 1989.
- Zhou *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:10572-10577, 2001.

【 0 1 5 8 】

結論として、本発明は、心肥大を処置する方法および予防する方法を提供する。クラス I I HDAC (クロマチン構造および遺伝子発現の調節に関与することが知られている

) が心肥大に対して有益な効果を有することが示されている。驚くべきことに、本発明は、H D A C インヒビターが、胎児心臓遺伝子発現を阻害し、そして筋節の構築を妨害することにより、心肥大を阻害することを実証する。

【 0 1 5 9 】

(配列表)

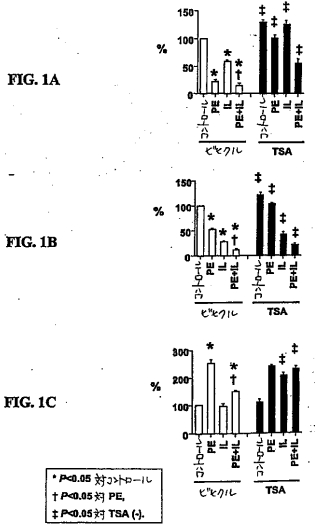
【 0 1 6 0 】

【 表 3 】

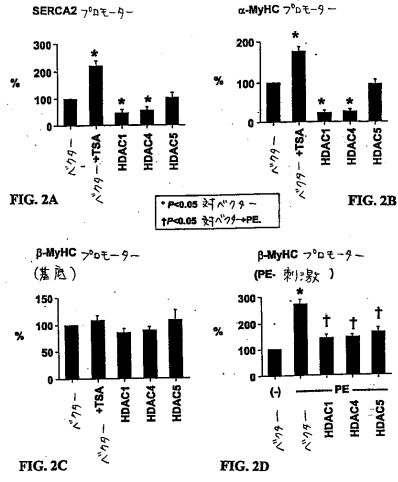
SEQUENCE LISTING

<p><110> LONG, CARLIN OLSON, ERIC N. BRISTOW, MICHAEL MCKINSEY, TIMOTHY A.</p>	10
<p><120> INHIBITION OF HISTONE DEACETYLASE AS A TREATMENT FOR CARDIAC HYPERTROPHY</p>	
<p><130> MYOG:034JP/EP</p>	
<p><140> UNKNOWN <141> 2002-09-24</p>	
<p><150> 60/325,311 <151> 2001-09-27</p>	
<p><150> 60/334,041 <151> 2001-10-31</p>	
<p><160> 5</p>	
<p><170> PatentIn Ver. 2.1</p>	
<p><210> 1 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence</p>	20
<p><220> <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer</p>	
<p><400> 1 ccgaggccag ttgagatcag tc</p>	22
<p><210> 2 <211> 60 <212> DNA <213> Artificial Sequence</p>	
<p><220> <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer</p>	30
<p><400> 2 aatgtgacca agctgcgtga cacaccacaa gggcttagga tcttttgcga tctgctcaag 60</p>	
<p><210> 3 <211> 60 <212> DNA <213> Artificial Sequence</p>	
<p><220> <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer</p>	
<p><400> 3 tggagcaaaa cagaatggct ggctttaatg ctccaagttt tccatttctt ttccacaggg 60</p>	
<p><210> 4 <211> 52 <212> DNA <213> Artificial Sequence</p>	40
<p><220> <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer</p>	
<p><400> 4 cgaacgttta tgtttattgt ggattggcca cagcgagggt ctgctggaga gg</p>	52
<p><210> 5 <211> 57 <212> DNA <213> Artificial Sequence</p>	
<p><220> <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer</p>	
<p><400> 5 gctttattct gcttccacct aaagggtgt tgcaagggt ccaggtctga gggcttc</p>	57

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 A 】

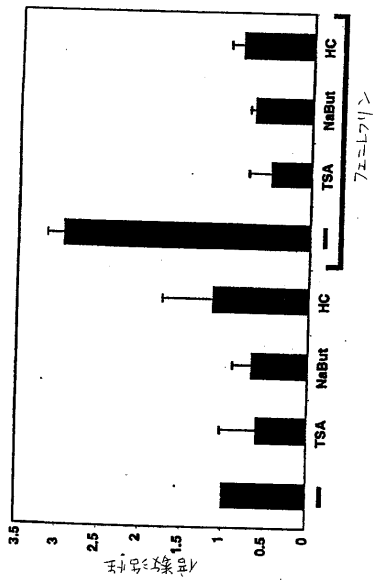


FIG. 3A

【 図 3 B 】

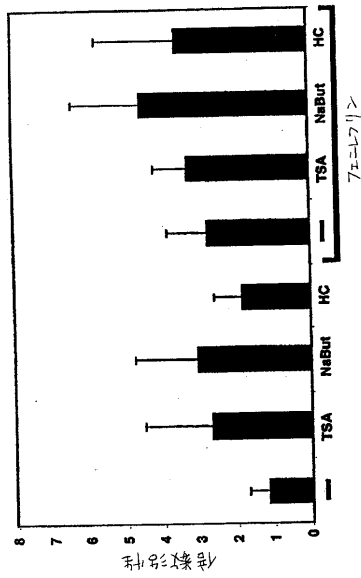


FIG. 3B

【 図 3 C 】

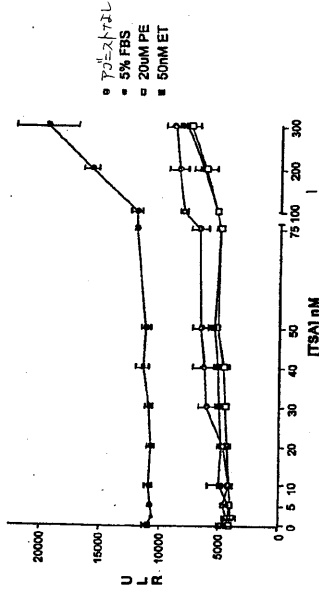


FIG. 3C

【 図 3 D 】

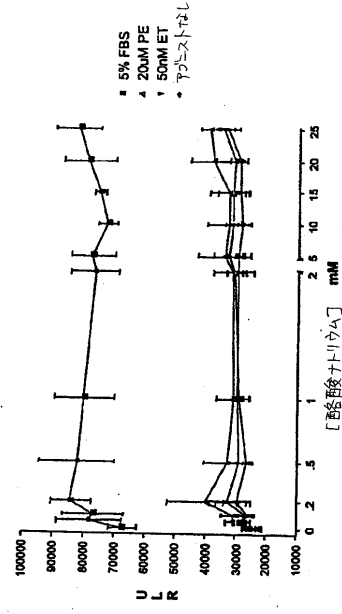


FIG. 3D

【 図 4 A 】

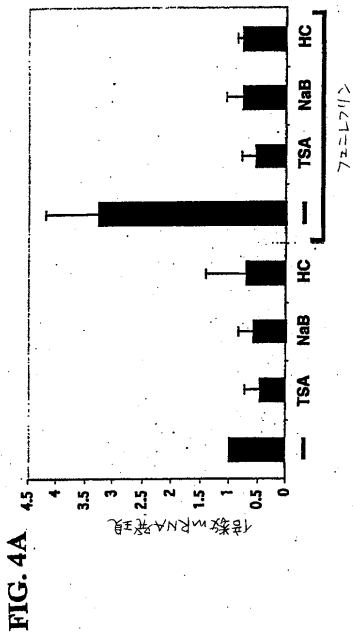


FIG. 4A

【 図 4 B 】

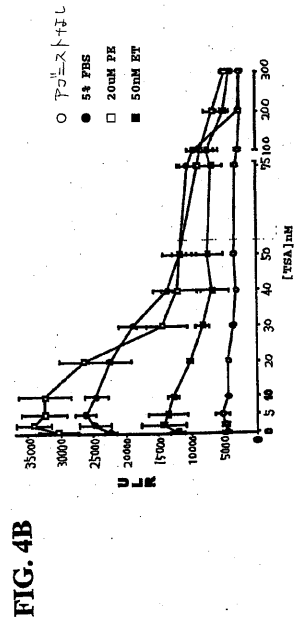


FIG. 4B

【 図 4 C 】

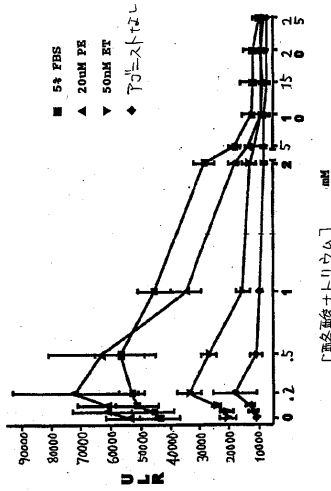


FIG. 4C

【 図 5 】

FIG. 5A

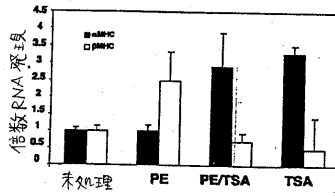
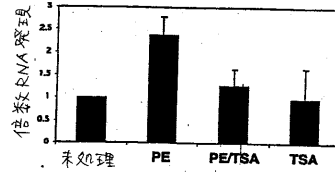


FIG. 5B

【 図 6 】

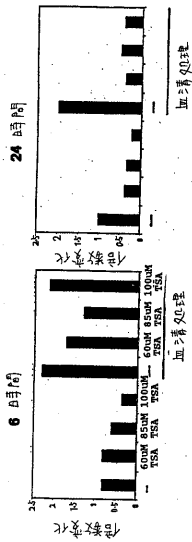


FIG. 6

【 図 7 】

FIG. 7A

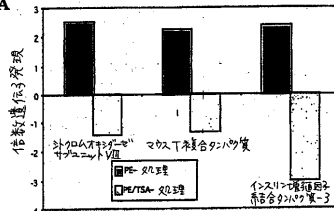
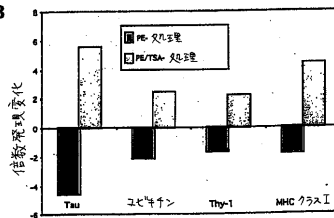


FIG. 7B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
		G 0 1 N 33/50	Z

(71)出願人 502352678

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ コロラド, ア ボディー コーポレイト
 THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO, A
 BODY CORPORATE
 アメリカ合衆国 コロラド 80203, デンバー, グラント ストリート 1800, 8
 ティーエイチ フロアー

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 エリック エヌ. オルソン

アメリカ合衆国 テキサス 75225, ダラス, サウスウエスタン ブールバード 321
 9

(72)発明者 ティモシー エイ. マッキンジー

アメリカ合衆国 テキサス 75220, ダラス, クローバー レーン 3884

(72)発明者 マイケル アール. プリストウ

アメリカ合衆国 コロラド 80110, チェリー ヒルズ ビレッジ, ブラックマー ロー
 ド 5

(72)発明者 カーリン ロング

アメリカ合衆国 コロラド 80204, デンバー, ロカスト ストリート 1745

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 BB51 CB01 DA20 FA11 FB13 GC15

4C084 AA17 AA20 MA17 MA21 MA28 MA31 MA37 MA43 MA56 MA57

MA59 MA63 MA66 NA14 ZA36 ZA37 ZA40 ZA42 ZC20 ZC75

4C206 AA01 AA02 HA16 MA01 MA02 MA04 MA37 MA41 MA48 MA51

MA57 MA63 MA76 MA77 MA79 MA80 MA83 MA86 NA14 ZA36

ZA37 ZA40 ZA42 ZC20 ZC75