

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780013697.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
C12P 13/22 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

[43] 公开日 2009年5月20日

[11] 公开号 CN 101438155A

[22] 申请日 2007.2.27

[21] 申请号 200780013697.4

[30] 优先权

[32] 2006. 2. 27 [33] US [31] 60/777,096

[32] 2006. 8. 2 [33] US [31] 60/821,230

[32] 2006. 9. 28 [33] US [31] 60/827,372

[32] 2006. 10. 5 [33] US [31] 60/828,345

[32] 2006. 11. 29 [33] US [31] 60/867,736

[86] 国际申请 PCT/US2007/062871 2007.2.27

[87] 国际公布 WO2007/101191 英 2007.9.7

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.16

[71] 申请人 靶向分子诊断有限责任公司

地址 美国伊利诺斯

[72] 发明人 S·S·巴克斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 陈轶兰

权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图 10 页

[54] 发明名称

用于减少细胞脂肪和预测用酪氨酸激酶抑制剂治疗后的心脏毒性的组合物和方法

[57] 摘要

本发明公开了确定器官毒性特别是心脏毒性是否将在选择用各种激酶抑制剂如酪氨酸激酶抑制剂更特别是 erbB 抑制剂如赫赛汀治疗的患者中发生的方法。此外，还公开了确定潜在药物是否可能产生心脏毒性效应的方法。所述方法涉及分析脂质水平或者脂肪酸氧化酶、pAMP 活化的蛋白激酶的表达、葡萄糖摄取，以确定是否存在脂肪酸氧化紊乱。鉴定脂肪酸氧化紊乱可用作毒性特别是心脏毒性的预测物，和用作为如果施用诸如酪氨酸激酶抑制剂的药物应小心监测器官功能的指示。还公开了保护器官免于代谢性应激和处理细胞如脂肪细胞以减少其脂质含量的方法。

1. 一种预测响应使用酪氨酸激酶抑制剂处理的毒性的方法，包括：鉴定待用酪氨酸激酶抑制剂处理的靶细胞群，确定在所述细胞中是否存在脂肪酸氧化紊乱，由此在所述细胞中脂肪酸氧化紊乱的存在预测使用酪氨酸激酶抑制剂处理细胞可能有毒。
2. 权利要求1的方法，用于预测心脏毒性，其中与在酪氨酸激酶抑制剂存在下无脂肪酸氧化紊乱的细胞的葡萄糖吸收相比，通过对在酪氨酸激酶抑制剂存在下的葡萄糖吸收的正电子发射断层摄影术，确定脂肪酸氧化紊乱。
3. 权利要求1的方法，其中所述酪氨酸激酶抑制剂为 erbB 抑制剂。
4. 权利要求1的方法，其中所述激酶抑制剂为赫赛汀。
5. 权利要求1的方法，其中脂肪酸氧化紊乱通过测量与经酪氨酸激酶抑制剂处理无脂肪酸氧化紊乱的细胞中脂质含量的减少相比经酪氨酸激酶抑制剂处理的细胞脂质含量的减少而确定。
6. 权利要求1的方法，其中脂肪酸氧化紊乱通过测量与无脂肪酸氧化紊乱的细胞相比所述细胞中降低量的脂肪酸氧化代谢途径中至少一种酶的活性而确定。
7. 权利要求1的方法，其中脂肪酸氧化紊乱通过测量与无脂肪酸氧化紊乱的细胞相比所述细胞中减少量的编码脂肪酸氧化代谢途径中至少一种酶的 mRNA 而确定。
8. 权利要求1的方法，其中脂肪酸氧化紊乱通过测量经酪氨酸激酶抑制剂处理正常细胞后所述细胞内脂肪酸氧化代谢途径中至少一种酶的量而确定。
9. 权利要求1的方法，其中脂肪酸氧化紊乱通过测量经酪氨酸激酶抑制剂处理正常细胞后 ATP 量的减少而确定。
10. 权利要求1的方法，其中生物大分子为磷酸化的 AMP 活化的激酶。

11. 权利要求 1 的方法，其中生物大分子为细胞因子。
12. 权利要求 1 的方法，其中生物大分子为 $\text{TNF}\alpha$ 。
13. 权利要求 1 的方法，其中生物大分子为 $\text{pNF}\kappa\text{B}$ 。
14. 权利要求 1 的方法，其中分析患者体内生物大分子的方法包括从患者组织获得提取物并且在微阵列分析器上分析该提取物。
15. 减少细胞中的细胞脂肪的方法，包括：将细胞与足量的 AMPK 激活因子接触以导致细胞中脂肪的实质性减少。
16. 权利要求 15 的减少脂肪的方法，其中 AMPK 激活因子为酪氨酸激酶抑制剂。
17. 权利要求 15 的减少脂肪的方法，其中 AMPK 激活因子为 ErbB 酪氨酸激酶抑制剂。
18. 权利要求 15 的减少细胞脂肪的方法，其中将 AMPK 激活因子非肠道施用。
19. 权利要求 15 的减少细胞脂肪的方法，其中将 AMPK 激活因子局部施用。
20. 权利要求 15 的减少细胞脂肪的方法，其中将 AMPK 激活因子通过注射局部施用。
21. 权利要求 15 的减少细胞脂肪的方法，其中将 AMPK 激活因子通过皮肤贴剂局部施用。
22. 权利要求 15 的减少细胞脂肪的方法，其中将 AMPK 激活因子通过软膏局部施用。
23. 权利要求 15 的减少细胞脂肪的方法，其中将 AMPK 激活因子以洗剂或通过注射局部施用或者以全身治疗施用。
24. 治疗患有缺血发作的患者的方法，包括大致在缺血期间或再灌注期间对患者施用一定量的 AMPK 激活因子。
25. 治疗患者以保护心脏或脑细胞的方法，包括：诊断会诱导对心脏或脑细胞的代谢性应激的情况并且施用足以保护所述细胞免于急性窘迫的一定量的 AMPK 激活因子。
26. 权利要求 25 的方法，其中会诱导代谢性应激的情况选自缺

血、细胞因子释放和葡萄糖剥夺。

27. 保存用于移植的器官的方法，包括：制备包含 AMPK 激活因子的保存溶液并且将所述器官与该保存溶液接触。

用于减少细胞脂肪和预测用酪氨酸激酶抑制剂治疗后的 心脏毒性的组合物和方法

背景

[0001] 心脏具有强大的 ATP 生成能力,使其在生物的一生中行使高效泵的功能。成年人的心肌利用脂肪酸(FA)和/或葡萄糖氧化作为其主要能量来源。正常情况下,成年人的心脏通过线粒体中脂肪酸的氧化获得其绝大多数的能量。

[0002] 心肌细胞具有在碳水化合物糖酵解和 Krebs 循环(三羧酸循环)之间转换并转换至脂肪养料源的能力,从而在不同的生理学和饮食条件下维持 ATP 以恒定速率生成。该代谢和养料选择的灵活性对于正常的心功能至关重要。尽管心脏能量转化容量和代谢通量在多个层面上受到调节,一个重要的调节机制发生在基因表达的层面上。参与多重能量转导途径的基因的表达响应于发育、生理学和病理生理学的信号而受到动态调节。

[0003] 参与这些关键能量代谢途径的基因由核受体超家族成员特别是脂肪酸活化的过氧化物酶体增殖因子活化受体(PPAR)和核受体辅激活因子-PPAR γ 辅激活因子-1 α (PGC-1 α)以及雌激素受体相关蛋白 ERR α 、ERR β 和 ERR γ 和它们的激活因子 PGR-1 和 PERC 在转录水平上进行调节。根据生理学和病理生理学状态心脏 PPAR/PGC-1 复合物的动态调节将在下面进行更为详尽的说明。

[0004] PGC-1 α 为 PPAR γ 辅激活因子,与在棕色脂肪中适应性生热有关。两个结构相关的蛋白 PGC-1 β 和 PARC 已经得到克隆并且表现出参与调节能量代谢途径。PGC-1 α 的组织特异性且诱导型表达提示其参与细胞能量生成代谢过程(包括线粒体的生物发生和氧化、肝糖原异生以及骨骼肌葡萄糖摄取)的动态调节。PGC-1 α 在强氧化作用的组织(例如心脏、骨骼肌、棕色脂肪和肝脏)中选择性地表达。心脏

中 PGC-1 α 的表达在出生时急剧增加。这与从葡萄糖代谢到脂肪氧化的围产期转换相吻合。还已经知道 PGC-1 α 的活性和表达水平受冷暴露、禁食以及锻炼（已知促进氧化代谢的刺激）的诱导。培养的心肌细胞中 PGC-1 的被迫表达诱导参与多重线粒体能量转换/能量产生途径的核与线粒体基因的表达，增加细胞线粒体数量并且刺激偶联的呼吸作用。与这些刺激相关的信号传导途径（包括 p38 MAP 激酶、 β -肾上腺素能/cAMP、一氧化氮、AMP 激酶和 Ca²⁺-钙调蛋白激酶）通过增加 PGC-1 α 表达或通过其反式激活功能激活 PGC-1 α 和其下游靶基因。

[0005] 这些代谢和结构的改变可导致扩张性心肌病和心脏的舒张功能障碍。有趣的是，线粒体增殖是可逆的并且心肌病可以通过转基因表达的减少得到补救。这表明除了通过 PPAR 作用为细胞脂肪酸代谢的激活因子，PGC-1 α 与线粒体生物发生相关。因此，PGC-1 α 表现出作用为氧化能量代谢的主要调节因子并响应细胞能量状况的变化。

[0006] 新出现证据表明孤儿核受体的雌激素相关受体 (ERR) 家族作用为心脏和骨骼肌能量代谢的 PGC-1-活化调节因子。ERR 家族有三个成员：ERR α 、ERR β 、和 ERR γ 。在主要依赖于线粒体氧化代谢以生成 ATP 的成年组织（例如心脏和慢收缩骨骼肌）中 ERR α 和 ERR γ 的表达升高。出生后在心脏中 ERR α 的表达急剧增加，伴随参与细胞脂肪酸摄入和线粒体氧化的酶的全面上调。近来已将 ERR α 和 ERR γ 确定为辅激活因子 PGC-1 家族的新配偶体。这种在 ERR 同种型和 PGC-1 α 之间功能上的关联激发了对 ERR 在能量代谢中作用的兴趣。

[0007] ERR α 基因的缺失揭示了 ERR α 在脂质代谢的组成型调节中的组织特异性作用。在 ERR α ^{-/-}小鼠中白色脂肪质量的减少与脂肪细胞大小和脂质合成速率的减少一致。相反地，ERR α 很可能在心脏中的脂质分解代谢中起作用，与其和 PGC-1 α 的功能相互作用相一致。不表现出明显的心脏表型的 ERR α ^{-/-}小鼠显示出心脏 PGC-1 α 和 ERR γ 表达的代偿性增加。这些结果表明 ERR 同种型促成心脏中脂肪酸代谢基因的组成型表达。然而基因表达改变引起的代谢上的影响尚未为人所知。

[0008] 正使用过量表达 ERR α 的心肌细胞中的基因表达分析鉴定心脏 ERR α 靶基因。ERR α 激活了参与能量生成途径包括细胞脂肪酸摄取 (LPL、CD36/FAT、H-FABP、FACS-1)、 β -氧化 (MCAD、VLCAD、LCHAD) 以及线粒体电子传递/氧化磷酸化 (细胞色素 c、COXIV、COXVIII、NADH 泛醌脱氢酶、黄素蛋白-泛醌氧化还原酶、ATP 合酶 β) 的基因。ERR α 也增加心肌细胞中棕榈酸的氧化速率。ERR α 对 β -氧化酶基因的活化涉及 PPAR α 信号传导途径。ERR α 直接激活 PPAR α 基因表达, 并且在来自于 PPAR $\alpha^{-/-}$ 小鼠的细胞中 ERR α 介导的对 MCAD 和 M-CPT I 的调节被消除。目前还已知道 ERR α 参与 PGC-1 α 调节线粒体生物发生。已知其通过调节 *Gapba* 基因 (编码 NRF-2 复合物的一个亚基并且直接在转录水平上激活参与线粒体氧化代谢的基因) 介导 PGC-1 α 活化 NRF 途径。ERR α 和其辅激活因子 PGC-1 α 激活 MCAD、细胞色素 c 和 ATP 合酶 β 基因启动子。综合起来这些结果将 ERR α 确定为通过参与 PGC-1 调节路径对心脏氧化能量代谢的调节因子。然而, 在心脏中 ERR 的精确生物学作用尚未确定。

[0009] 核受体 ERR γ (雌激素相关受体 γ) 在心脏、骨骼肌、肾脏和脑以及发育中的神经系统中高表达。哺乳动物细胞中辅激活因子 PGC-1 α 和 PGC-1 β 的表达有力地增强了由 ERR γ 引起的转录激活。孤儿受体的组成型活化功能 2 (AF-2) 对于协同增强至关重要。功能性受体截短分析已经用于鉴定额外的氨基末端活化功能, 这对于 ERR γ 2 同种型和 PGC-1 α 是特异性的。体外实验表明 ERR γ 与这两种辅激活因子均有直接相互作用。这些发现与 PGC-1 α 和 PGC-1 β 作为对 ERR γ 的组织特异性辅激活因子的不同调节功能的假设相吻合。不过需要更多的研究进一步定义这些功能。

[00010] 在转基因小鼠中 PGC-1 的心脏特异性过表达导致心肌细胞中线粒体失控增殖, 致使肌节结构丧失和扩张性心肌病。因此, PGC-1 是在对能量需求的响应中控制心脏线粒体数量和功能的重要调节分子。

[00011] 即使不是所有的, 大多数这些调节途径涉及信号传导途径

中中间体的磷酸化。对磷酸化的抑制，例如通过多种不同的激酶抑制剂的作用，影响这些信号传导途径，导致脂肪酸代谢的改变，其可引起器官毒性，包括心脏毒性。许多新的抗癌药物为激酶抑制剂并且伴有毒性。因此，需要方法以鉴定药物是否伴有毒性作用，以及该毒性作用是否可能在患者体内发生。还需要方法在维持其对抗磷酸化的受体靶的效力同时避免这些抑制剂的毒性作用。

概述

[00012]公开了诊断毒性特别是心脏毒性是否可能在选择用多种药物（例如酪氨酸激酶抑制剂或者 erbb 抑制剂）进行治疗的患者中发生的方法。此外还公开了评估一种候选药物是否可能具有毒性或者心脏毒性作用的方法。在一种方法中，可分析脂质例如甘油三酯和胆固醇以确定是否存在脂肪酸氧化紊乱。在另一种方法中，可测定负责所观察到的脂肪酸氧化的酶（例如 MCAD）。关于脂质水平，认为在正常细胞中 AMP 活化的蛋白激酶的活化可导致脂质水平的特征性减少，以及糖酵解的和较短碳链中间产物（例如 C₂ 至 C₆ 碳中间产物）的相应增加。对于本公开内容的目的而言，可将与正常细胞中的特征性脂质减少的任何统计学显著偏差视为脂肪酸氧化紊乱。类似地，对于本公开内容的目的而言，对于参与这些代谢途径的酶，这些酶的活性或水平的量相对于正常细胞的任何统计学显著改变（通过 Western、Northern、PCR 或者其它技术测量）可视为脂肪酸氧化紊乱。脂肪酸氧化紊乱的诊断可用于预测增加的毒性风险并且可能作为药物使用的禁忌指示。或者，如果一种药物用在患有脂肪酸氧化紊乱的患者身上，可使用所述方法指示密切关注患者心脏功能的必要性。或者可以通过诸如正电子发射断层摄影术的已知方法测量葡萄糖摄取。对于施用酪氨酸激酶抑制剂药物时葡萄糖摄取不减少或不减少至与正常非癌细胞相同程度的情况下，则该药物治疗可能对于非癌细胞有毒。或者，在暴露于酪氨酸激酶抑制剂时，如果 ATP 水平的减少超过在正常非癌细胞中，则预示该酪氨酸激酶抑制剂有毒。

[00013] 另一种用于预测选择用药物（例如酪氨酸激酶抑制剂，特别是 erbB 抑制剂）治疗的患者是否具有心脏毒性的方法是评估患者体内 TNF α 的水平（无论在肿瘤或血液或在二者中）。TNF α 的水平可以用于预测患者是否可能由于药物（特别是赫赛汀）治疗导致具有与心脏毒性相关的不良事件。

[00014] 此外还公开了施用激活 AMP 活化的蛋白激酶 (AMPK) 的药物（例如某些酪氨酸激酶抑制剂）以为了美容原因或体重减轻而减少患者的脂质和脂肪的方法。该方法基于惊人的发现 - AMP 活化的蛋白激酶的激活因子导致细胞代谢转换，从而将脂质氧化为较少碳的中间产物。该代谢转换导致受处理细胞脂质含量的惊人减少。以足以激活 AMP 活化的蛋白激酶的量施用 AMP 活化的蛋白激酶的激活因子可用于使细胞去掉一部分其脂质含量。已知有许多向细胞施用此类化合物的方法并可以使用。可使用局部或者全身施用。可通过注射、通过皮肤贴剂或软膏或洗液进行局部施用。

[00015] 此外还公开一种方法用于将 AMP 活化的蛋白激酶的激活因子施用于患者，或者将其包含在一种介质中与器官温育，使用的量足以保护器官例如心肌和/或脑细胞免于急性窘迫 (acute distress)，所述急性窘迫通常会由创伤诸如缺血、细胞因子释放、葡萄糖剥夺和在诊断出这类情况的细胞和器官中导致代谢压力的类似事件引起。还可以使用双激酶抑制剂，特别是导致 AMP 活化的蛋白激酶活性增加的酪氨酸激酶抑制剂。优选地如详述中进一步所说明的，这类激酶抑制剂对于其靶将是特异性的。已知并且可使用许多施用方法。例如该药物可包含在溶液中以对器官进行灌注或可进行全身施用。

[00016] 此外还公开一种方法用于保存器官用来移植。该方法涉及制备含有 AMPK 激活因子的保存溶液并且使器官与该保存溶液接触。该保存溶液可以是任何添加足够量 AMPK 激活因子以提供对器官的改进保护的已知保存溶液。

[00017] 在此描述了另外的特点和长处，并将由以下详述和附图清楚地说明。

附图简述

[00018]图 1 为在 Au565 细胞中受赫赛汀处理调节的基因列表。

[00019]图 2 为用 NDF 或赫赛汀处理并且进行脂质染色的 Au-565 细胞的照片。

[00020]图 3 为用 GW-2974 处理并且进行脂质染色的 Au-565 细胞的照片。

[00021]图 4 为在不同条件下生长并且进行脂质染色的原代人心肌细胞的照片。

[00022]图 5 为显示在不同条件下检测脂质呈阳性人心肌细胞的百分比的条形图。

[00023]图 6 为 MDA-MB-468 细胞用 GW-2974 处理并通过 Fluoro-4 检测胞内 Ca 的照片。

[00024]图 7A 为显示某些酪氨酸激酶抑制剂对于 p-eEF2 和 p-AMPK α 表达的影响的 Western 印迹照片。

[00025]图 7B 为显示不同化合物存在下 Au565 细胞中的 p-eEF2 表达的染色细胞照片。

[00026]图 8 为经过或经过不同激酶抑制剂处理的心肌细胞中 ERR α 和 MCAD 的照片。

[00027]图 9 为显示用不同类型 erbB 抑制剂和 TNF α 组合处理的 HMC 的生长抑制的条形图。

[00028]图 10 为用 TNF α 、GW2974 或者赫赛汀（或者组合）处理后探测 NF- κ B 的 HMC 的 Western 印迹。

详述

[00029]一方面，本公开是基于发现药物（例如酪氨酸激酶抑制剂，如赫赛汀和拉帕替尼（lapatinib, Tykerb））影响与脂质代谢途径相关的基因的表达并且强烈影响细胞内脂质的量。用本发明的激酶抑制剂对其它方面正常的细胞或具有正常蛋白质酪氨酸激酶调节的细胞进

行处理，通过增加或减少所述细胞氧化脂肪酸的能力而影响脂肪酸代谢。当培养生长的正常脂肪细胞暴露于例如 GW2974、GW572016 的激酶抑制剂时，所述细胞中储存的脂质迅速消失。该观察结果也在心脏细胞中观察到。可使用油红 O 脂质染色进行该类研究。因此，用拉帕替尼 (tykerb) 和其它 Her1/Her2 酪氨酸激酶抑制剂处理致使该类细胞丢失脂肪，这与降低的脂质合成速率和/或增加的脂质氧化速率相吻合。用其它药物（例如赫赛汀），NDF 脂质含量表现出增加。

[00030] 还已经知道许多激酶抑制剂可用作化疗剂。在一些患者中这些药物产生心脏毒性。本公开基于可以将脂肪酸代谢的缺陷与心脏毒性相联系的惊人发现。因此，在脂肪酸代谢方面具有特定功能障碍或者血液中 $TNF\alpha$ 水平高、并且经受激酶抑制剂治疗的患者，用例如 erbB 酪氨酸激酶抑制剂的激酶抑制剂治疗后，更有可能遭受心脏功能失常例如心肌病。另外，已经发现在肿瘤组织或血清中具有高水平的 $TNF\alpha$ 或其下游存活因子 $NF-\kappa B$ 的患者通常对赫赛汀有更好的反应。该发现引出了新方法的开发，用于预测患者在用影响某些细胞蛋白质磷酸化状态的药物（包括激酶抑制剂，单独或与其它活性剂联合使用）治疗时是否将遭受心脏毒性。

[00031] 公开一种方法用于分析患者的脂质包括甘油三酯及胆固醇和/或脂质代谢酶例如尤其是 MCAD。这类分析的结果可用于预测何时可能由激酶抑制剂治疗引起心脏毒性并且提供对经受药物（例如激酶抑制剂，包括赫赛汀、GW572016 或者其它 erbB 抑制剂）治疗的患者应该密切监测其心脏功能的早期指示。

[00032] 已经发现 5'-AMP-活化的蛋白激酶（已显示它在其它组织中使乙酰辅酶 A 羧化酶磷酸化并且失活）的活性在缺血末期显著增加，并且在再灌注的过程中保持升高。在缺血过程中 5'-AMP 的累积导致 AMP 活化的蛋白激酶的活化，在再灌注过程中 AMP 活化的蛋白激酶使乙酰辅酶 A 羧化酶磷酸化并且失活。随后的丙二酰辅酶 A 水平的降低可导致在缺血心脏的再灌注过程中脂肪酸氧化速率的增加。

[00033] 对于心脏毒性，已知有多种脂肪酸氧化紊乱并且在下面表

1 中列出。如果在患者中检测出这样一种紊乱，可以提供激酶抑制剂可对心脏有毒的指示。

表 I

酰基辅酶 A 脱氢酶缺陷

酰基辅酶 A 脱氢酶，短链 (SCAD)

酰基辅酶 A 脱氢酶，中链 (MCAD)

酰基辅酶 A 脱氢酶，长链 (LCAD)

酰基辅酶 A 脱氢酶，极长链 (VLCAD)

2-烯酰辅酶 A 水合酶缺陷

L-3-羟酰辅酶 A 脱氢酶缺陷

L-3-羟酰辅酶 A 脱氢酶，短链 (SCHAD)

三官能蛋白质：长链 FA (LCHAD)

α 亚基 (HADHA)

β 亚基 (HADHB)

3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶缺陷

3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶，中链 (MCKAT)

三官能蛋白质

α -甲基酰基辅酶 A 消旋酶 (AMACR) 缺陷

肉碱-酰基肉碱移位酶缺陷：3p21

2,4-二烯酰辅酶 A 还原酶缺陷：8q21

电子传递黄素蛋白 (ETF) 缺陷：15q23

鱼鳞癣状红皮病 (NCIE2)：CGI58 基因；3p21

三官能蛋白质缺陷：亚基 A 和 B

酪氨酸血症

1° 肉碱代谢紊乱

脂肪酸和肉碱转运途径

脂肪酸氧化途径

脂质紊乱

线粒体：生化异常

过氧化物酶体紊乱

这类紊乱可以通过任何适当的方法进行检测。例如，在某些紊乱中可将脂肪酸饲喂给个体并且追踪其代谢。或者，例如，可以测定酶水平，如通过 Western 印迹，或者对某些基因产物可以分析 mRNA 水平。任何可检测到的减少表明存在脂肪酸氧化紊乱，并且用酪氨酸激酶抑制剂治疗可能对正常细胞和器官有毒。

[00034] 在一种方法中，可对作为用激酶抑制剂治疗候选人的患者进行这些疾病的筛选以确定他们是否有可能遭受心肌细胞毒性。例如可对培养生长的心肌细胞中的生物大分子进行测定以确定施用候选药物如何影响这些大分子的水平。在一种方法中，可将人心肌细胞培养生长并且可在候选药物存在的情况下对磷酸化的 AMP 活化的蛋白激酶的水平进行监测。这可以通过检测磷酸化的 AMP 活化的蛋白激酶的 Western 印迹法进行测定。

[00035] 并非对本发明进行限制，相信在应激条件（例如缺氧、缺血、葡萄糖剥夺和饥饿）下，细胞内 AMP:ATP 比例的增加变构激活 AMP 活化的蛋白激酶（AMPK），这是一种意图保持细胞能量平衡的反应。最初发现 AMP 活化的蛋白激酶抑制乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（HMG-CoA 还原酶，HMGR）的制备物。AMPK 的活化被认为起始了一系列下游磷酸化事件，使细胞从活跃的 ATP 消耗（例如脂肪酸、胆固醇和蛋白质的生物合成）转换为 ATP 生成（例如脂肪酸和葡萄糖氧化）。应激诱导的 AMPK 活化被认为是在一个或多个上游 AMPK 激酶（AMPKK）对其 α 亚基上 172 位的苏氨酸的磷酸化之后发生，所述上游 AMPK 激酶包括钙调蛋白依赖性激酶激酶 β （CAMKK β ）（一种钙激活的蛋白激酶）和 LKB1（由 Peutz-Jegher 综合征肿瘤抑制基因编码的丝氨酸/苏氨酸激酶）。相信在骨骼肌和心脏中 AMPK 的活化导致对乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）的磷酸化和抑制，认为这

进而又减少了丙二酰辅酶 A（其自身为肉碱棕榈酰转移酶 1 (CPT 1) 的抑制剂）的水平。认为 CPT1 的去抑制导致了伴随的脂肪酸 β -氧化的增加，这被认为引起了线粒体生成 ATP 增加。应激诱导的 AMPK 活化还被认为通过抑制 mTOR 并且直接调节 eEF2（已知与心脏保护相关的翻译延伸因子）来抑制蛋白质合成。重要的是，线粒体功能的改变被认为可引起由伊马替尼（imatinib）所致的心肌细胞死亡。另外，通过 AMPK 介导的 TSC2 磷酸化对帽依赖性翻译的抑制被认为在响应 ATP 耗尽的细胞存活中极其重要。AMPK 活化后增加的 ATP 生物合成而非消耗，可能还保护心肌细胞免于缺血性损伤。

[00036] 已发现可激活 AMPK 及其下游底物的分子例如 GW2974（一种强有效的小分子 HER2/EGFR 酪氨酸激酶抑制剂，具有类似于拉帕替尼的活性谱），刺激脂肪酸氧化，这进而又增加在表达 HER2 的人心肌细胞中 ATP 的生成，形成对由 $\text{TNF } \alpha$ （一种在心衰中检测到的已知细胞因子）诱导的细胞凋亡的保护。相反地，不活化 AMPK 的分子例如曲妥珠单抗（trastuzumab）导致响应 $\text{TNF } \alpha$ 的增加的心肌细胞死亡。对于 AMPK 和随之的能量生成的特异性 HER2-靶向疗法的效果可以预测心肌病相关的风险，并且提供一种新的 HER2-引导的治疗策略，以保护心肌在急性缺血损伤之后免于 $\text{TNF } \alpha$ 或其它促细胞凋亡刺激物的杀伤效应。

[00037] 另外，酪氨酸激酶抑制剂可用于减少细胞中的脂肪，特别是其它方面正常或无蛋白质酪氨酸激酶活性介导的疾病的细胞。对于这个目标，哺乳动物或组织的至少一部分可用激酶抑制剂处理，从而减少细胞中脂类的量。可使用任何合适的激酶抑制剂。确定合适的抑制剂的方法是人所熟知的。例如，脂肪细胞的样品可在存在和缺乏激酶抑制剂的条件下生长，并且以已知方法用油红 O 染色以确定该激酶抑制剂是否导致储存脂肪的减少。导致可观察到的脂肪储存减少的激酶抑制剂适合于本发明。适合于本发明的例示性激酶抑制剂包括 erbB 抑制剂，特别包括 GW2974、GW572016 等。下面的表 II 显示了用 GW2974 处理所获得的脂类含量的减少。Au565 在本领域已知的正常

条件下生长，并用 GW2974 (25 μ M) 处理两天。收集细胞、清洗并在水中超声波处理 (200 μ L 水中 2,000,000 个细胞)。将细胞旋转离心下来并且通过对胞内代谢物的 MS/MS 检测酰基肉碱 (线粒体脂肪酸氧化的副产物)。

表 II

酰基肉碱 (pmol 蛋白)

	C18:1	C16	C2
对照 (细胞沉淀)	8.56	4.09	148.54
GW2974 (细胞沉淀)	4.1	0.83	258.88

[00038] 在一种方法中，细胞可用合适的激酶抑制剂处理以减少脂肪储量。该方法可包括以下步骤：用足量合适的酪氨酸激酶抑制剂接触细胞以使细胞除去其自身中一定量并且优选大部分或更优选几乎所有其过剩储存脂类。所述细胞可处于体外细胞培养中或位于个体中。当用于无疾病或无蛋白质酪氨酸激酶活性相关疾病的细胞时，本方法特别有效。

[00039] 还公开将激酶抑制剂 (例如酪氨酸激酶抑制剂或者双重酪氨酸激酶抑制剂) 施用于患者的方法，例如在心脏再灌注期间或心脏病发作期间，以抵消脂肪酸氧化效应并且保护心肌和/或脑细胞。该处理可用于保护心脏细胞、脑细胞和来源于其它组织和器官的细胞，免于由缺血、细胞因子释放、葡萄糖剥夺或其它在代谢上胁迫这类细胞的病症所造成的急性窘迫。

[00040] 优选所述激酶抑制剂是特异性的，在于它们导致代谢活性转换并且不影响无关的靶。各种不同的激酶抑制剂的特异性可通过 *Fabian* 等, A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors, *Nature Biotechnology* 23, p. 329 (通过参考文献引用并入) 描述的方法进行测定。相信代谢活性的转换是通过 AMP 活化的蛋白激酶活性的增加带来的。

[00041] 可将活性剂经口施用、通过注射或通过皮肤贴剂、软膏或洗剂局部施用给个体，或者可不经肠道施用，只要其以足够的量到达目标靶细胞以发挥其减少脂类的效用。例如优选在储存脂质的组织例如脂肪组织局部施用 AMP 活化的蛋白激酶的激活因子以使脂质含量减少。可将其全身施用给需要治疗代谢性应激、心脏病发作、缺血等的患者。

[00042] 可将 AMP 活化的蛋白激酶的激活因子以盐类或溶剂化物或者游离化学物质进行施用，然而，优选以药物制剂形式施用该抑制剂。制剂除活性剂外可包含一种或多种药用载体、稀释剂或赋形剂。

[00043] 药物制剂可以单位剂量形式呈现，包含预先确定量的活性成分/每单位剂量。如此一个单位可根据施用途径和患者的年龄、体重和状态包含例如 0.5 mg 至 1 g，优选 70 mg 至 700 mg，更优选 5 mg 至 100 mg 的活性剂。例如在小鼠中，饥饿期间可施用 100 mg/kg 的 GW2974 以保护心脏。

[00044] 药物制剂可适合以任何适宜途径施用，例如经口（包括口含或舌下）、直肠、鼻、局部（包括口含、舌下或透皮）、阴道或非肠道（包括皮下、肌肉、静脉内或皮内）途径。这样的制剂可通过制药领域已知的任何方法制备，例如通过将活性成分与载体或赋形剂相结合。

[00045] 适用于口服的药物制剂可以采取的形式为：胶囊或片剂；粉剂或颗粒；在水性或非水性液体中的溶液或悬液；可食用的泡沫或搅拌糊（whip）；或水包油液体乳剂或者油包水液体乳剂以及在脂质体中。

[00046] 用于透皮施用的药物制剂可呈现为不连续贴剂，旨在与受治者的皮肤保持长时间的紧密接触。可以通过已知方法以离子渗入疗法从贴剂中递送活性成分。

[00047] 用于局部施用的药物制剂可配制为软膏、乳霜、悬液剂、洗剂、粉剂、溶液剂、糊剂、凝胶、喷雾剂、气雾剂或油剂。

[00048] 对于外部组织的治疗，制剂可以局部用的软膏或乳霜形式

应用。当配制为软膏时，活性剂可以和石蜡质或者可与水混溶的软膏基质一起使用。或者，活性剂还可以与水包油乳霜基质或油包水基质配制在乳霜中。优选地这类软膏可使活性剂渗透入皮肤并与靶细胞和组织接触，特别在脂肪蓄积的组织 and 器官中对于脂肪进行改善。

[00049]适于在口中局部施用的药物制剂包括糖锭、锭剂和漱口水。

[00050]通过吸入施用的药物制剂包括精细颗粒尘剂或雾剂，可通过多种类型已计量剂量的加压气雾剂、喷雾器或吹入器的方式产生。

[00051]用于阴道施用的药物制剂可呈现为子宫托、棉塞条、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或者喷雾制剂。

[00052]非肠道施用的药物制剂可以包括水性和非水性的无菌注射溶液，其可进一步包括例如生育酚的抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与目标受治者血液等渗的溶质；以及水性和非水性的无菌悬液剂，其可包括助悬剂和增稠剂。

[00053]制剂可呈现于单位剂量或多剂量容器中，例如密封的安瓿瓶和小瓶，并且可在冷冻干燥（冻干）条件下保存，只需要在使用前即刻加入无菌的液体载体例如注射用水。临时注射溶液和悬液可从无菌粉剂、颗粒和片剂制备。

[00054]优选的单位剂量制剂为含有活性成分的每日剂量或亚剂量，或者适当的部分量。

[00055]应当了解的是除了上述特别提到的成分外，制剂还可包括关系到所讨论制剂类型的本领域常规的其它试剂，例如适合于口服的制剂可包括调味剂。

[00056]需要用本发明的化合物、盐或溶剂化物进行治疗的动物通常为哺乳动物，例如人类。

[00057]本发明的活性剂、盐或溶剂化物的治疗有效量将取决于多种因素，包括例如动物的年龄和体重、需要治疗的情况的严重度、制剂的性质和施用途径，并且最终在于主治医生或兽医的判断力。不过本发明化合物对于毒性治疗的有效量通常在受试者（哺乳动物）每天

每公斤体重 0.1 至 500 mg 的范围内，更通常在每天 1 - 200mg/kg 体重范围内。因此对于一个 70 公斤的成年哺乳动物，每天的实际用量通常为 70 至 700mg，并且该量可以每天单剂量给予或以每天任何数目的亚剂量给予以使总日剂量相同。本发明的盐或溶剂化物的有效量可以作为化合物本身的有效量的比例确定。

[00058] 本发明的化合物及其盐和溶剂化物可单独或与其它治疗剂联合使用。从而根据本发明的联合疗法包括施用至少一种本发明的 AMP 活化的蛋白激酶的激活因子或其药用盐或溶剂化物，以及至少一种其它药学活性剂，例如癌症治疗剂。组合的活性剂可以一起或者分别施用，并且当分别施用时可同时或以任何顺序序贯施用。本发明的激酶抑制剂和其它药学活性剂的量以及相关的给药时机为达到期望的联合治疗效果目的进行选择。

实施例 1

[00059] 以下实施例展示了在 Au565 细胞的体外细胞培养物中受到赫赛汀处理影响的基因的鉴定。Au565 细胞在正常条件下生长并且用赫赛汀处理或不做处理。将细胞沉淀，用液氮快速冷冻并且使用标准条件进行微阵列分析。从由细胞沉淀物分离的 RNA 制备 Cy3 和 Cy5 标记的 cDNA。表 III 显示参与脂质代谢的基因。受到上调或下调的参与其它途径的基因也显示于图 1 中。

表 III

通过微阵列分析不使用或使用赫赛汀处理的 Au565 细胞
代谢基因的改变

基因	描述	与未处理细胞相比用赫赛汀处理的细胞的相对改变
NKX2-5	心脏特异的同源异型框，为参与心脏发育并且可能参与细胞凋亡的转录因子；相应基因的突变与先天性心脏病、隔膜和传导缺陷以及法洛式三联症相关	4.71 x
ESRR6	雌激素相关受体 γ ，与雌激素响应元件结合并且以不依赖于配体的方式激活转录，可在组织分化和维持中起作用	4.18 x

基因	描述	与未处理细胞相比用赫赛汀处理的细胞的相对改变
FABP1	脂肪酸结合蛋白 1 (肝脏), 过氧化物酶体增殖因子活化受体 α (PPARA)的正调节因子, 在脂肪酸转运、细胞增殖和细胞凋亡中起作用, 表达的增加与前列腺癌相关	-6.29 x
NRG1	神经调节蛋白 1, 一个分泌型蛋白质, 激活 ERBB2 和酪氨酸激酶受体 EGF 受体家族的其它成员, 诱导细胞迁移、细胞增殖和神经发生; 基因扩增与某些乳腺肿瘤相关	-5.07 x
PERC	PGC-1 相关的雌激素受体 α 辅激活因子 (PPAR γ 辅激活因子 1 β), 一个转录辅激活因子, 结合并激活核激素受体, 可在糖原异生或脂肪酸氧化中起作用	-5.20 x
ERBB4	鸟类成红细胞增多症致癌基因 B4, 一个 EGF 受体家族的受体酪氨酸激酶, 受神经调节蛋白配体活化, 在细胞迁移、增殖和分化中起作用, 参与多种恶性肿瘤形成的发病机理	4.48 x

基因	描述	对数比
BBOX1	丁酰甜菜碱 (γ) 2-氧代戊二酸双加氧酶 (γ 丁酰甜菜碱羟化酶) 1, 催化肉碱生物合成中 γ 丁酰甜菜碱向 L-肉碱的转化	5.13E-01
GLS	肾型谷氨酰胺酶, 催化谷氨酰胺水解为谷氨酸和氨, 提供 TCA 循环的中间产物, 帮助维持酸碱平衡, 生成神经递质, 并且起始谷氨酰胺分解代谢	5.12E-01
IQGAP2	含 IQ 基元的 GTP 酶激活蛋白质 2, 抑制 CDC42 和 RAC1 的 GTP 酶活性, 可结合肌动蛋白并在 Rho 家族 GTP 酶对细胞形状的调节中起作用	4.85E-01
TRPM4	瞬时受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 4, 一个容许单价阳离子透过的 Ca^{2+} -活化通道, 响应 G 蛋白偶联受体介导的 Ca^{2+} 升高, 抑制通过膜电位去极化的 Ca^{2+} 流入	4.43E-01
SAT	亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶, 催化多胺分解代谢的限速步骤, 促进多胺内环境稳定, 参与氧化应激和热激响应, 调节肿瘤发生和对一些抗癌药物的敏感性	4.04E-01
I_1152020	含有三个在一些细胞外蛋白中发现的胶原蛋白三螺旋重复序列的蛋白质, 并且含有 C-末端 C1q 结构域, 与小鼠 Acrp30 (其控制能量平衡、胰岛素敏感性和脂肪细胞) 有中等相似度	4.00E-01
CLSP	钙调蛋白样皮肤蛋白质, 钙结合蛋白的钙调蛋白家族成员, 可在角质细胞分化中起作用, 在晒伤皮肤中表现出改变了的表达。	-4.03E-01

基因	描述	对数比
ME1	苹果酸酶 1, 催化苹果酸的氧化脱羧作用以生成丙酮酸, 并且可在脂肪生成中起作用; 变体可与乳癌相关。	-4.04E-01
ACAT2	智人乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 2 (乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶) (ACAT2), mRNA	-4.33E-01
ACAT2	乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 2 (胞质乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶), 一个在酰基辅酶 A 新陈代谢中起作用的肝酶	-5.30E-01
ACAT2	智人乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 2 (乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶) (ACAT2), mRNA	-4.33E-01
ACAT2	乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 2 (胞质乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶), 一个在酰基辅酶 A 新陈代谢中起作用的肝酶	-5.30E-01
ALDOA	醛缩酶 A (果糖 - 二磷酸醛缩酶), 催化糖酵解中果糖 - 1, 6 - 二磷酸的裂解或缩合形成二羟丙酮磷酸和甘油醛 - 3 - 磷酸, 缺陷表现为溶血性贫血和代谢性肌病	-4.54E-01
NF κ BIL2	NF κ B 抑制剂样 2, I κ B 家族成员, 抑制 NF κ B1-RELA NF- κ B 异型二聚体和 NF κ B1 同型二聚体的 DNA 结合, 抑制 NF- κ B 介导的由 Ig κ 增强子的转录, 并且可调节上皮细胞中的 NF- κ B 的功能	-4.90E-01
ENO1	烯醇化酶 1 (α 烯醇化酶), 糖酵解中将 2 - 磷酸 - D - 甘油酸转化为磷酸烯醇丙酮酸, 一种在多种自身免疫病中的自身抗原, 较短替换型 c-myc 启动子结合蛋白 (MPB1) 为转录阻抑蛋白	-5.01E-01
GSTT2	谷胱甘肽 S - 转移酶 θ 2, θ 类谷胱甘肽转移酶和过氧化物酶, 参与生物异源物质代谢, 可参与脂肪酸氢过氧化物的解毒并且通过使致癌物失活在癌症预防中起作用	-5.33E-01
APOL1	载脂蛋白 L, 大的含有 apoA-I (APOA1) 的高密度脂蛋白的组成成分, 可参与脂质转运和代谢; 在额叶前皮质中表达增高与精神分裂症相关	-6.43E-01
AKR1C2	醛酮还原酶家族 1 成员 C2 (二氢二醇脱氢酶), 在胆汁转运、类固醇代谢和生物异源物质代谢中起作用, 可在由选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂介导的行为改变中起作用	-7.44E-01
AKR1C2	醛酮还原酶家族 1 成员 C2 (二氢二醇脱氢酶), 在胆汁转运、类固醇代谢和生物异源物质代谢中起作用, 可在由选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂介导的行为改变中起作用	-8.23E-01
CAMK4	钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 IV, 一种参与 Ca (2+) - 调节的基因表达 (包括 CREBBP 依赖的基因表达) 的蛋白激酶	4.46E-01

基因	描述	对数比
FKSG14	与睾丸中 SoxLZ-Sox6 亮氨酸拉链结合蛋白(小鼠 Solt)高度相似的蛋白质,其结合 SoxLZ/Sox6 并和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 IV(小鼠 Camk4)一起增强 SoxLZ/Sox6 介导的转录激活	-4.57E-01
SOAT1	酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶,从胆固醇和长链脂肪酰基辅酶 A 合成胆固醇酯,在脂蛋白代谢、胆固醇内环境稳定和单核细胞分化中起作用,与动脉粥样硬化相关	-4.05E-01
I_962304. FL1	钾电压门控通道 (Shal-相关亚家族,成员 1),预测产生对于控制神经元和心脏细胞兴奋性重要的 A 型瞬时外向 K ⁺ 电流 [647-aa 形式]	-4.16E-01
SCN2A2	钠通道电压门控 II 型 $\alpha 2$,表现出电压依赖性和钠选择性的电流,可在可兴奋细胞动作电位的上升相起作用,对河豚毒素敏感	4.54E-01
SCN1A	钠通道电压门控 I 型 (α 亚基),一个电压敏感的钠通道;突变与婴幼儿期的严重肌阵挛性癫痫和伴有发热性惊厥的全身性癫痫相关	4.14E-01
SCN11A	钠通道电压门控 XI 型 α 多肽,一个推定的电压敏感钠通道 1,可在周围感觉神经元中产生抗河豚毒素钠电流,能在疼痛传递和神经性疼痛中起作用	4.02E-01
FASN	脂肪酸合酶,为从饮食蛋白质和碳水化合物合成脂肪酸的多功能酶,增加的表达与多种癌症相关,并且其抑制可能对乳癌和前列腺癌有疗效	-4.29E-01
ELOVL2	智人延伸极长链脂肪酸 (FEN1/E1o2, SUR4/E1o3, 酵母) - 样 2 (ELOVL2), mRNA	-4.36E-01
HPCAL1	海马钙结合蛋白样 1,一个推定的钙感知蛋白,钙结合蛋白的神经视锥蛋白样 (NVP) 家族成员,定位于轴突和树突,可在中枢神经系统中的神经元信号传导中起作用	-4.53E-01
KCNG2	钾电压通道亚家族 $\gamma 2$, 离子通道 Kv6 家族成员,与 Kv2.1 α 亚基相互作用后充当电压门控钾通道作用,能有助于心脏动作电位复极化	-5.53E-01
CCL14	小的诱导型细胞因子亚家族 A 成员 14,一种增强髓系祖细胞增殖的化学吸引剂,并且可影响 HIV1 病毒的复制,可在 AIDS 致病机理和趋化因子受体 CCR1 相关疾病中起作用	-4.49E-01
CLCA1	钙活化氯通道 1,一种在粘液性表皮细胞的粘液生成中起作用的氯通道,并且可充当肿瘤抑制因子;失调可促成哮喘和结肠直肠癌的进展	-6.70E-01
FABP1	脂肪酸结合蛋白 1 (肝脏),过氧化物酶体增殖因子活化受体 α (PPARA) 的正调节因子,在脂肪酸转运、细胞增殖和细胞凋亡中起作用,表达的增加与前列腺癌相关	-7.22E-01

基因	描述	对数比
BBOX1	丁酰甜菜碱 (γ) 2-氧代戊二酸双加氧酶 (γ 丁酰甜菜碱羟化酶) 1, 催化肉碱生物合成中 γ 丁酰甜菜碱向 L-肉碱的转化	5.13E-01
GLS	肾型谷氨酰胺酶, 催化谷氨酰胺水解为谷氨酸和氨, 提供 TCA 循环的中间产物, 帮助维持酸碱平衡, 生成神经递质, 并且起始谷氨酰胺分解代谢	5.12E-01
IQGAP2	含 IQ 基元的 GTP 酶激活蛋白质 2, 抑制 CDC42 和 RAC1 的 GTP 酶活性, 可结合肌动蛋白并在 Rho 家族 GTP 酶对细胞形状的调节中起作用	4.85E-01
TRPM4	瞬时受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 4, 一个容许单价阳离子透过的 Ca^{2+} -活化通道, 响应 G 蛋白偶联受体介导的 Ca^{2+} 上升, 抑制通过膜电位去极化的 Ca^{2+} 流入	4.43E-01
SAT	亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶, 催化多胺分解代谢的限速步骤, 促进多胺内环境稳定, 参与氧化应激和热激响应, 调节肿瘤发生和对一些抗癌药物的敏感性	4.04E-01
I-1152020	含有三个在一些细胞外蛋白中发现的胶原蛋白三螺旋重复序列的蛋白质, 并且含有 C-末端 C1q 结构域, 与小鼠 Acrp30 (其控制能量平衡、胰岛素敏感性和脂肪细胞) 有中等相似度	4.00E-01

实施例 2

[00060] 本实施例证明在用一种小分子酪氨酸激酶抑制剂 GW2974 处理时脂肪细胞失去脂质。图 2 显示用一种 ErbB 刺激性配体 NDF 或单克隆抗体赫赛汀处理的 Au565 细胞, 二者均导致脂质的生成。这通过相对细胞背景复染 (苏木精) 用油红进行脂质染色来显示 (脂质由红色点表示)。图 3 显示脂质在未处理的 Au565 细胞中存在, 但在用 EGFR 和 ErbB2 的双重抑制剂 GW2974 处理的细胞中减少。图 4 显示用 GW2974、赫赛汀或 NDF 处理的心肌细胞。用赫赛汀和 NDF 处理的细胞中脂质增加 (与未处理细胞相比), 但在用 GW2974 处理的细胞中不减少。图 5 显示在对照细胞、赫赛汀和 GW2974 处理的细胞中对脂质的定量测量。

[00061] 用 GW2974 处理细胞导致了胞内钙的重新分布 (图 6)。这可以在 MDA-MB-468 乳癌细胞中看到, 其中钙通过 Fluoro-4 以荧光进行检测。这种钙的重新分布导致 AMPK 的活化和磷酸化。被活化的

AMPK 通过对翻译因子 eEF-2 的磷酸化 (其使 eEF-2 失活并抑制蛋白质合成, 为 TKI 的已知效果) 抑制翻译 (图 7)。图 7A 显示 Au565 细胞使用一种刺激性配体 (EGF) 或 GW2974 处理并且对 p-eEF-2 进行探测的 western 印迹。p-eEF-2 在 GW2974 处理后引人注目地增加。图 7B 显示 p-eEF-2 表达 (通过 IHC)。C225 和赫赛汀不使 p-eEF-2 增加, 然而例如易瑞沙、GW2974 和雷帕霉素的 TKI 增加 p-eEF-2。

[00062] ERR α 在心脏细胞的脂质代谢中起作用, 并且 MCAD 为分解脂质和脂肪酸的酶。MCAD 的突变为常见的遗传病, 特别是在北欧家系中。图 8 显示在赫赛汀处理的细胞中, ERR α 的水平轻微减少。MCAD 在经赫赛汀处理的细胞中表达, 但在 GW2974 处理的细胞中完全缺失。

实施例 3

[00063] 以下实施例展示了用 GW2974 处理的细胞的 mRNA 表达谱中的变化。

[00064] Au565 细胞在正常条件下生长并且不用或用 GW2974 (25 μ M) 进行处理。将细胞沉淀, 用液氮快速冷冻并且进行微阵列分析。使用 Agilent 总 RNA 分离试剂盒分离得到 RNA。使用 Agilent 低 RNA 输入荧光线性扩增试剂盒制备 Cy3 和 Cy5 标记的 cRNA。将经标记的 cRNA 与 G4110A 人 1A (V2) 微阵列 (由代表涵盖 18K 个清楚表征的、全长的人类基因的 60 聚体寡核苷酸构成) 杂交。表 IV 以表格形式提供了结果。

表 IV

表 IV A - 离子通道

基因名称	描述	与对照相比 GW2974 变化
FLJ12476	含有 IQ 钙调蛋白结合结构域的蛋白质	5.0 x
CAMK4	钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 IV, 一种参与 Ca(2+)-调节的基因表达 (包括 CREBBP 依赖性基因表达) 的蛋白激酶	4.5 x
AVIL	与绒毛蛋白 1 (人 VIL1) 具有高相似性的蛋白质, 为一	4.2 x

基因名称	描述	与对照相比 GW2974 变化
	个将肌动蛋白纤维加帽、切割和成束的钙调节肌动蛋白结合蛋白，为凝溶胶蛋白家族成员，含有绒毛蛋白头片结构域	
SCN1A	钠通道电压门控 I 型 (α 亚基)，一个电压敏感的钠通道；突变与婴幼儿期的严重肌阵挛性癫痫和伴有发热性惊厥的全身性癫痫相关	4.1 x
CLSP	钙调蛋白样皮肤蛋白质，钙结合蛋白的钙调蛋白家族成员，可在角质细胞分化中起作用，在晒伤皮肤中表现出改变了的表达	- 4.0 x
GNB5	鸟苷酸结合蛋白 (G 蛋白) $\beta 5$ ，异源三聚体 G 蛋白复合物 (将信号从 G 蛋白偶联受体转导至下游效应蛋白质) 的一个组分，可调节钙通道活性	- 4.1 x
KCNK6	钾通道亚家族 K 成员 6 (TWIK-2)，串联孔结构域 K^+ 通道家族的一个 pH 敏感性外向和轻度内向整流成员，可在设定细胞静息膜电位和心脏细胞兴奋性中起作用	- 4.1 x
CASK	钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶，MAGUK 家族成员，参与在细胞膜上多蛋白复合物的募集，可将胞外基质与肌动蛋白细胞骨架相连，可调节突触小泡胞吐作用	- 4.2 x
I_962304.FL1	钾电压门控通道 (Shal-相关亚家族，成员 1)，预测产生对于控制神经元和心脏细胞兴奋性重要的 A 型瞬时外向 K^+ 电流 [647-aa 形式]	- 4.2 x
CD38	CD38 抗原，兼有环 ADP 核糖形成和水解活性，调节细胞内钙动员，可在超抗原诱导的 T 细胞增殖中起作用，自身抗体可促成非胰岛素依赖型糖尿病	- 4.4 x
HPCAL1	海马钙结合蛋白样 1，一个推定的钙感知蛋白，钙结合蛋白的神经视锥蛋白样 (NVP) 家族成员，定位于轴突和树突，可在中枢神经系统中的神经元信号转导中起作用	- 4.5 x
FKSG14	与睾丸中 SoxLZ-Sox6 亮氨酸拉链结合蛋白 (小鼠 Solt) 高度相似的蛋白质，其结合 SoxLZ/Sox6 并和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 IV (小鼠 Camk4) 一起增强 SoxLZ/Sox6 介导的转录激活	- 4.6 x
CCR2	CC 趋化因子受体 2，一个 G 蛋白偶联受体，结合 CC 亚家族趋化因子并且介导趋化性和胞内钙流；CCR2 变体可使在人免疫缺陷病毒感染后存活增加	- 5.0 x
FREQ	常见蛋白同源物 (果蝇)，一个钙结合蛋白和推定的激酶抑制剂，以 Ca^{2+} -依赖性方式结合并调节 KV4 K^+ 通道活性，可在分泌中起调节作用	- 5.3 x
STK33	丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 33，一个推定的丝氨酸-苏氨酸激酶，可能为钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶家族成员	- 5.3 x
S100A9	S100 钙结合蛋白 A9 (钙粒蛋白 B)，为与 S100A8 的复合物 (27e10 抗原) 的一部分，激活 $\beta 2$ 整合蛋白 (ITGB2)	- 5.5 x

基因名称	描述	与对照相比 GW2974 变化
	配体结合, 从而介导炎症期间的嗜中性粒细胞粘附	
KCNQ2	钾电压通道亚家族 $\gamma 2$, 离子通道 Kv6 家族成员, 与 Kv2.1 α 亚基相互作用后充当电压门控钾通道, 可有助于心脏动作电位复极化	- 5.5 x
CLCA1	钙活化氯通道 1, 在粘液性表皮细胞中的粘液生成中起作用的氯通道, 并且可作为肿瘤抑制因子作用; 失调可促成哮喘和结肠直肠癌的进展	- 6.7 x
AKAP5	激酶锚蛋白 5, 通过结合 2 型调节亚基 PRKAR2A 和 PRKAR2B 将 cAMP 依赖性蛋白激酶锚定到突触后密度, 并且由此可调节突触后事件; 还结合钙调蛋白和蛋白激酶 C	- 7.3 x

表 IV B - 心脏调节

基因名称	描述	与对照相比 GW2974 变化
PRKG1	cGMP 依赖性蛋白激酶 1 型, 松弛血管平滑肌并且抑制血小板聚集, 可能参与心脏收缩性, 可能与高血压和动脉粥样硬化相关, 小鼠 Prkg1 与勃起功能障碍相关	6.51 x
TGF β 1	转化生长因子 β 诱导的 68 kDa (kerato-epithelin), 由转化生长因子 β (TGF β 1) 诱导的细胞外粘附蛋白, 可能在骨发生和肺结构/功能中起作用; 基因改变导致角膜营养不良	5.31 x
NRXN3	神经元表面蛋白 3, 突触细胞表面蛋白的神经元表面蛋白家族成员和推定的膜整合蛋白, 可能在轴突导向中起作用, 心脏同种型可能与营养不良蛋白聚糖形成复合物并且介导胞间连接	4.58 x
KCNK6	钾通道亚家族 K 成员 6 (TWIK-2), 串联孔结构域 K ⁺ 通道家族的一个 pH 敏感性外向和轻度内向整流成员, 可能在设定细胞静息膜电位和心脏细胞兴奋性中起作用	- 4.08 x
I_962304.FL1	钾电压门控通道 (Shal-相关亚家族, 成员 1), 预测产生对于控制神经元和心脏细胞兴奋性重要的 A 型瞬时外向 K ⁺ 电流 [647-aa 形式]	- 4.16 x
KCNQ2	钾电压通道亚家族 $\gamma 2$, 离子通道 Kv6 家族成员, 与 Kv2.1 α 亚基相互作用后充当电压门控钾通道作用, 可有助于心脏动作电位复极化	- 5.53 x

表 IV C - 脂肪酸和氨基酸代谢

基因名称	描述	与对照相比 GW2974 变化
------	----	--------------------

基因名称	描述	与对照相比 GW2974 变化
PRKG1	cGMP 依赖性蛋白激酶 1 型, 松弛血管平滑肌并且抑制血小板聚集, 可参与心脏收缩性, 可能与高血压和动脉粥样硬化相关, 小鼠 Prkg1 与勃起功能障碍相关	6.5 x
BBOX1	丁酰甜菜碱 (γ) 2-氧代戊二酸双加氧酶 (γ 丁酰甜菜碱羟化酶) 1, 催化肉碱生物合成中 γ 丁酰甜菜碱向 L-肉碱的转化	5.1
GLS	肾型谷氨酰胺酶, 催化谷氨酰胺水解为谷氨酸和氨, 提供 TCA 循环的中间产物, 帮助维持酸碱平衡, 生成神经递质, 并且起始谷氨酰胺分解代谢	5.1
NRXN3	神经元表面蛋白 3, 突触细胞表面蛋白的神经元表面蛋白家族成员和推定的膜整合蛋白, 可能在轴突导向中起作用, 心脏同种型可能与营养不良蛋白聚糖形成复合物并且介导胞间连接	4.6 x
CYP2C8	细胞色素 P450 亚家族 IIC (美芬妥英 4-羟化酶) 多肽 8, 血红素结合单加氧酶超家族成员, 代谢类固醇、脂肪酸和生物异源物质; 肝脏中的表达受利福平处理上调	4.5 x
SAT	亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶, 催化多胺分解代谢的限速步骤, 促进多胺内环境稳定, 参与氧化应激和热激响应, 调节肿瘤发生和对一些抗癌药物的敏感性	4.4
SOAT1	酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶, 从胆固醇和长链脂肪酸酰基辅酶 A 合成胆固醇酯, 在脂蛋白代谢、胆固醇内环境稳定和单核细胞分化中起作用, 与动脉粥样硬化相关	-4.0 x
KCNK6	钾通道亚家族 K 成员 6 (TWIK-2), 串联孔结构域 K ⁺ 通道家族的一个 pH 敏感性外向和轻度内向整流成员, 可能在设定细胞静息膜电位和心脏细胞兴奋性中起作用	- 4.1 x
I-962304.FL1	钾电压门控通道 (Shal-相关亚家族, 成员 1), 预测产生对于控制神经元和心脏细胞兴奋性重要的 A 型瞬时外向 K ⁺ 电流 [647-aa 形式]	- 4.2 x
HSPA8	热激 70kD 蛋白 8, 分子伴侣热激蛋白 HSP70 家族的组成型表达成员; 在肥大性心肌病患者的心脏中表达升高	- 4.2 x
FASN	脂肪酸合酶, 为从饮食蛋白质和碳水化合物合成脂肪酸的多功能酶, 增加的表达与多种癌症相关, 并且其抑制可能对乳癌和前列腺癌有疗效	- 4.3 x
ELOVL2	智人延伸极长链脂肪酸 (FEN1/E1o2, SUR4/E1o3, 酵母)-样 2 (ELOVL2), mRNA	-4.4 x
PFKL	肝脏果糖磷酸激酶, 在糖酵解中催化果糖-6-磷酸的磷酸化形成果糖-1,6-二磷酸, 缺陷与 VII 型糖原病相关而过表达可能导致唐氏综合征的认知障碍	-4.7
LDLR	低密度脂蛋白受体, 介导低密度脂蛋白的摄取, 参与脂质代谢; 基因变异与家族性高胆固醇血症、高血压、	-5.2 x

基因名称	描述	与对照相比 GW2974 变化
	动脉粥样硬化以及冠状动脉疾病相关	
GSTT2	谷胱甘肽 S-转移酶 $\theta 2$, θ 类谷胱甘肽转移酶和过氧化物酶, 参与生物异源物质代谢, 可参与脂肪酸氢过氧化物的解毒并且通过使致癌物失活在癌症预防中起作用	-5.3
ACAT2	乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 2 (胞质乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶), 一个在酰基辅酶 A 代谢中起作用的肝酶	-5.3
S100A9	S100 钙结合蛋白 A9 (钙粒蛋白 B), 与 S100A8 的复合物 (27e10 抗原) 的一部分, 激活 $\beta 2$ 整合蛋白 (ITGB2) 配体结合, 从而介导炎症期间的嗜中性粒细胞粘附, 结合并转运脂肪酸	- 5.4
KCNG2	钾电压通道亚家族 $\gamma 2$, 离子通道 Kv6 家族成员, 与 Kv2.1 α 亚基相互作用后充当电压门控钾通道, 能有助于心脏动作电位复极化	-5.5 x
FABP1	脂肪酸结合蛋白 1 (肝脏), 过氧化物酶体增殖因子活化受体 α (PPARA) 的正调节因子, 在脂肪酸转运、细胞增殖和细胞凋亡中起作用, 表达的增加与前列腺癌相关	-7.2

[00065]应当了解, 对于本领域技术人员, 对本文所描述的目前优选的实施方案的多种变化和修改是显而易见的。此类变化和修改可在不偏离本主题内容的精神和范围以及不减少其预期优势下进行。因此旨在将此类变化和修改包含在所附权利要求中。

Au565 细胞中受赫赛汀处理而调节的基因

离子通道 (上调)

- 含有 IQ 钙调蛋白结合结构域的蛋白
 - 钠通道电压门控 I 型 (α 亚基) (SCN1A)
- 离子通道 (下调)
- 钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶 (CASK)
 - 丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 33 (STK33)
 - 钙活化的氯通道 1
 - A 激酶锚定蛋白 5 (AKAP5)

翻译 (上调)

- 类似干酵母 Bms1p (40S 生物发生)

翻译 (下调)

- 真核起始因子 5A (EIF5A)

脂肪酸代谢/调节 (上调)

- NKX2-5
- ACOX2
- AFP
- S100A9

脂肪酸代谢/调节 (下调)

- EMD
- TEAD1
- KCNH2
- SOAT1
- PERC
- FABP1
- CRBP1V

DNA 修复 (下调)

- RAD51-相互作用蛋白 (PIRS1)
- p53 靶锌指蛋白 (WIG1)
- 外切核酸酶 I (EXO1)
- BRCA2
- RAD51
- RAD54

细胞周期和 DNA 合成 (下调)

- 细胞周期蛋白 A2
- 细胞周期蛋白 D1
- 细胞周期蛋白 E2
- CHK1
- 胸苷激酶 1 (TK1)
- 早期生长反应 1 (EGR1)
- CTP 合成酶 (CTPS)
- 胸苷酸合酶 (TS)

细胞凋亡 (上调)

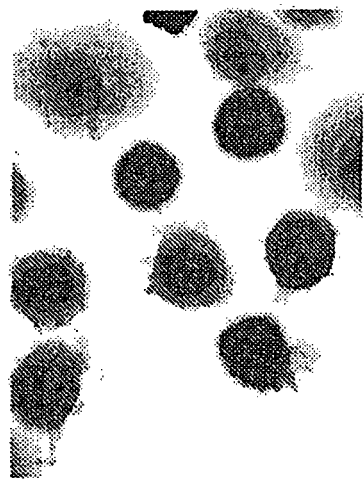
- TNFR1
- TRAIL

Forkhead box O3A (FOXO3A)细胞凋亡 (下调)

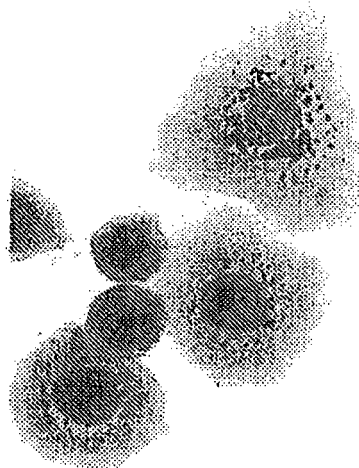
- FLIP
- NF- κ B 抑制剂样 2 (NFKBIL2)
- 结缔组织生长因子 (CTGF)
- 促分裂原诱导的基因 6 (MIG-6)

图 1

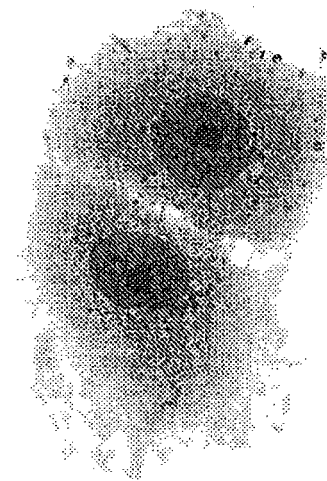
用NDF或赫赛汀处理Au-565细胞并进行脂质染色



未处理



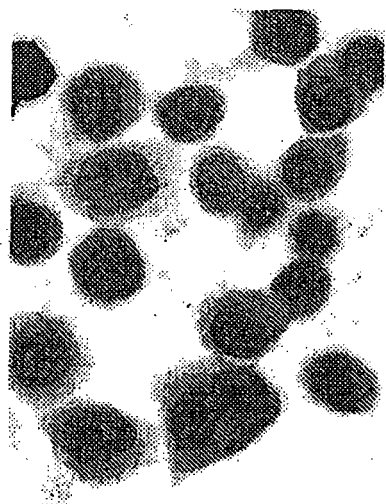
用赫赛汀处理



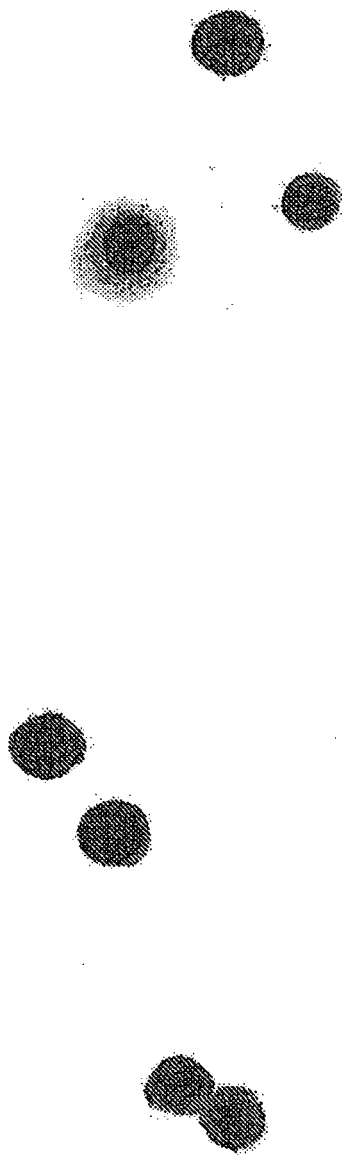
用NDF处理

图2

用GW-2974处理Au-565细胞并进行脂质染色



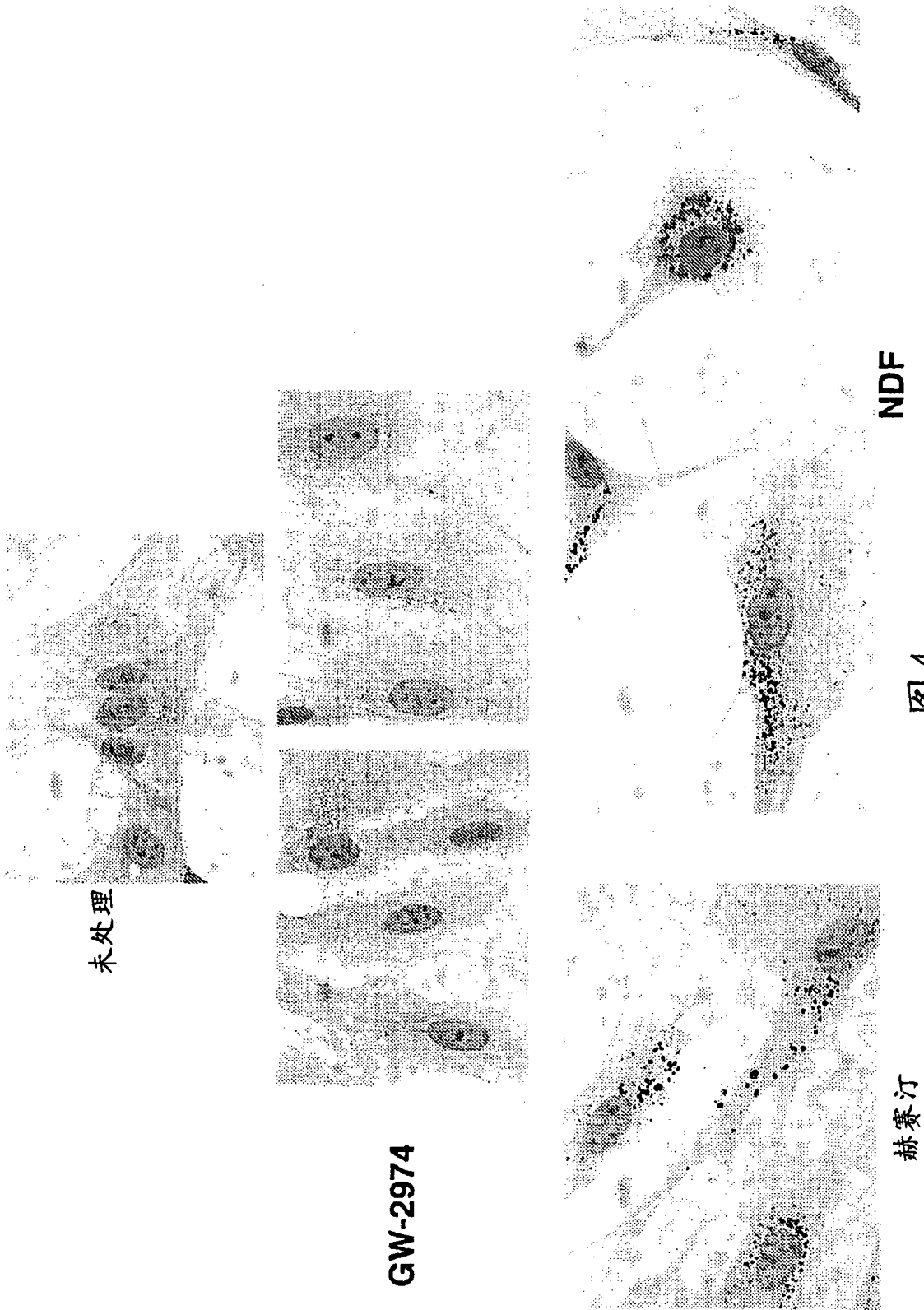
未处理



用GW-2974处理

图3

原代人心肌细胞并脂质染色



赫赛汀

图4

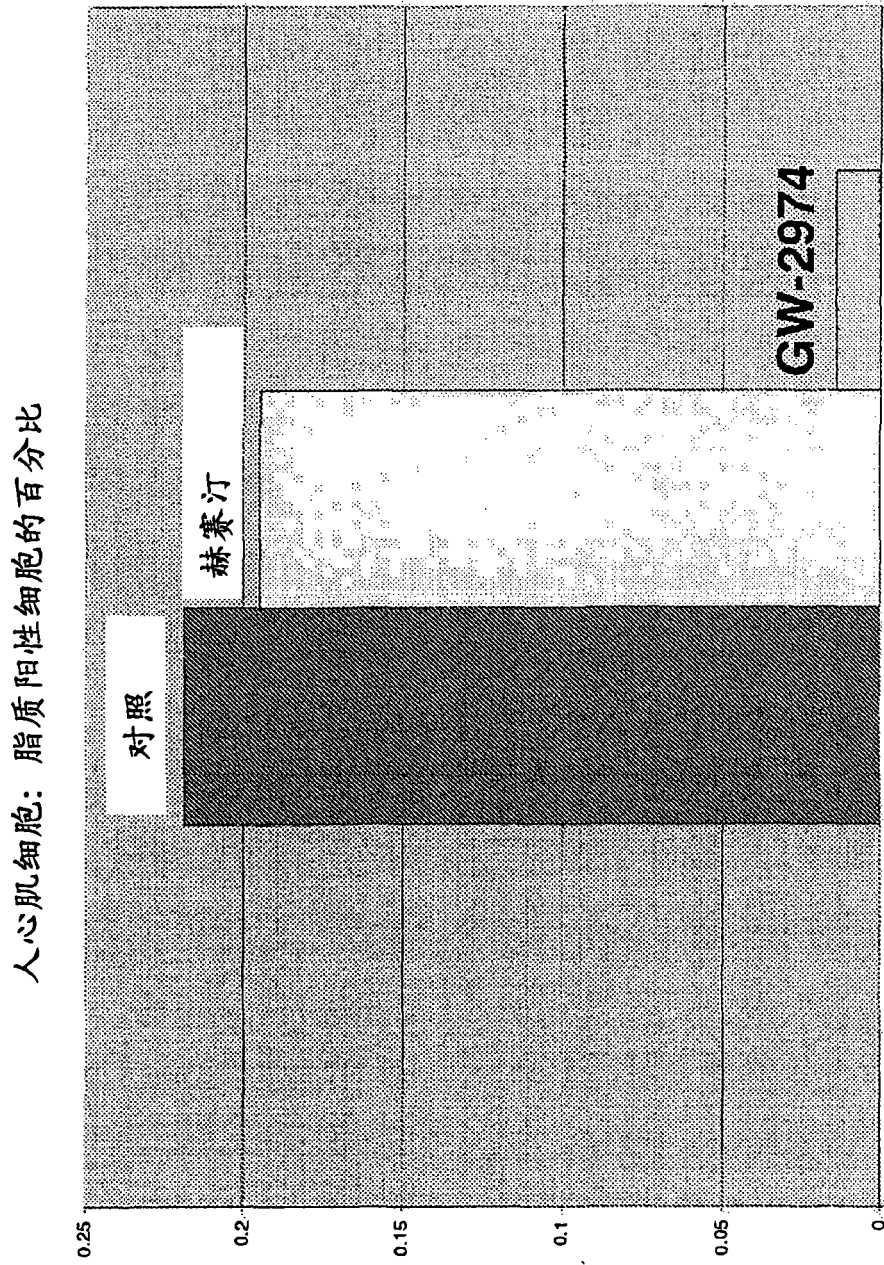


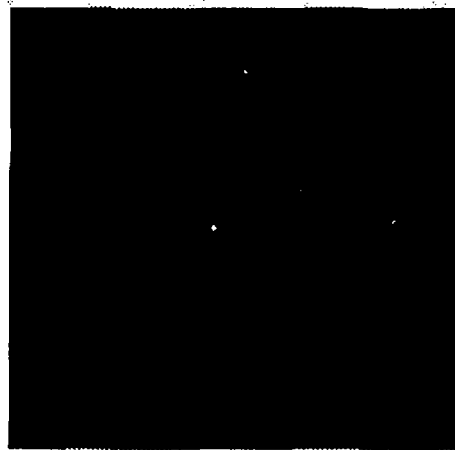
图5

用GW-2974处理MDA-MB-468细胞，
并用Fluoro-4检测胞内Ca

未加药物



Fluoro-4
存在下



无Fluoro-4
(自体荧光对照)

GW-2974存在下

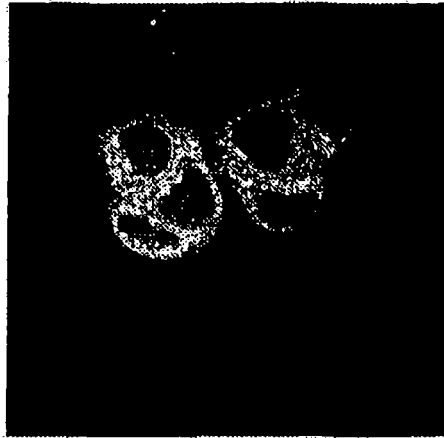
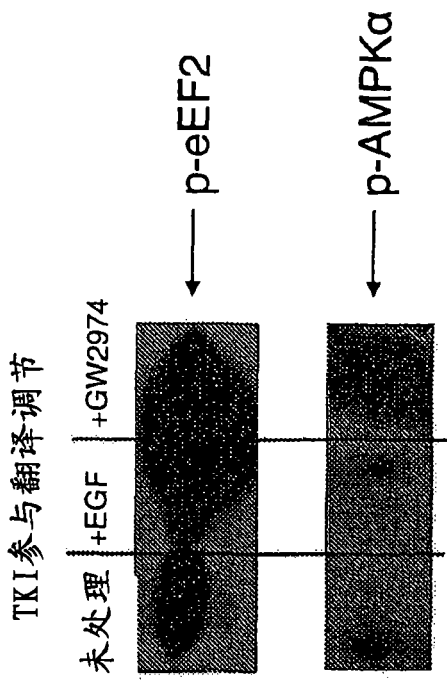
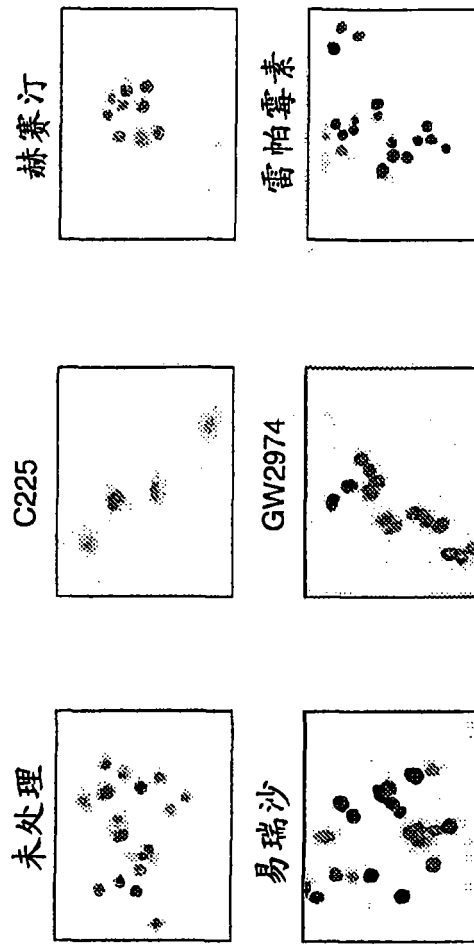


图6



A.



B.

图7

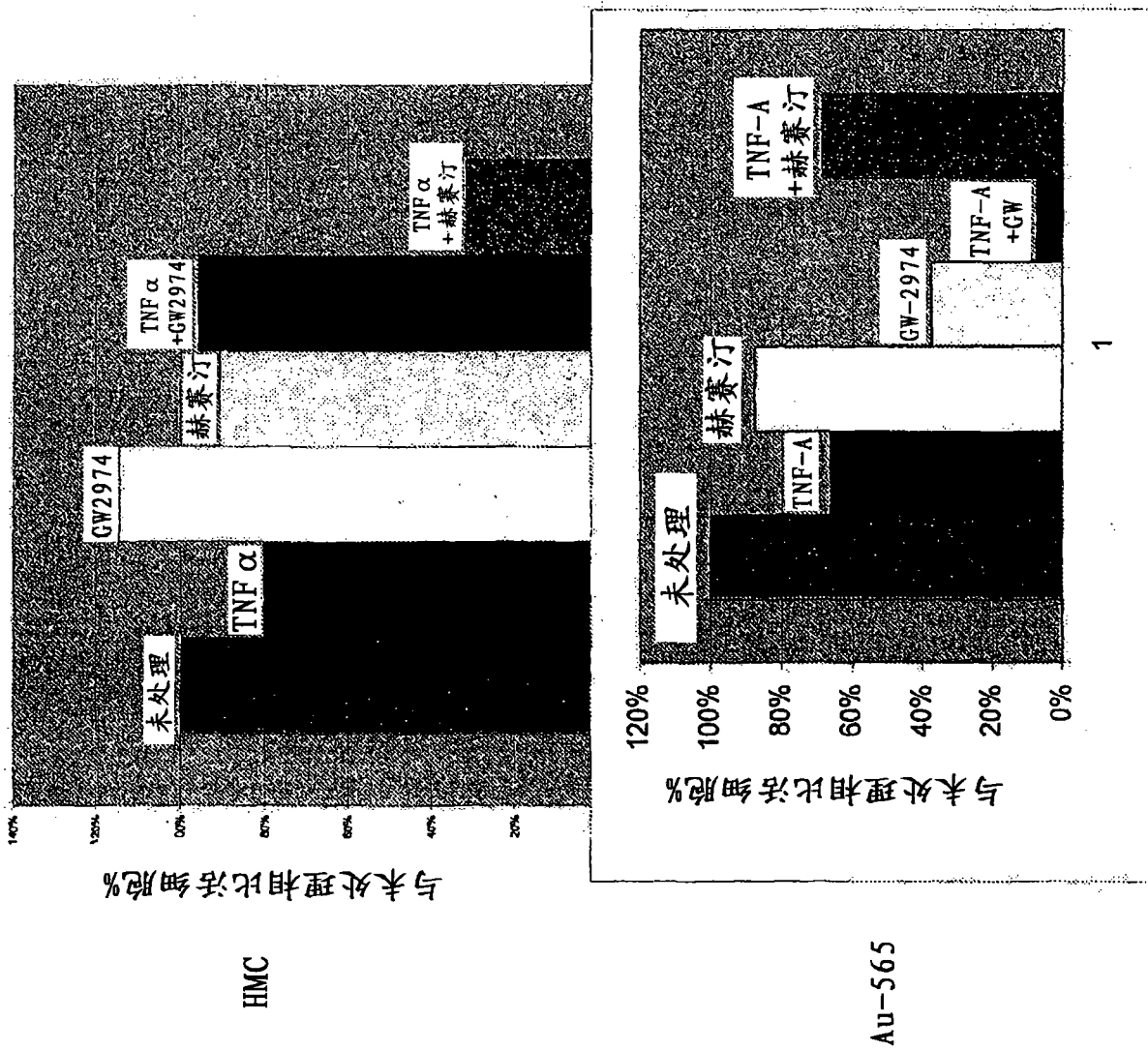


图9

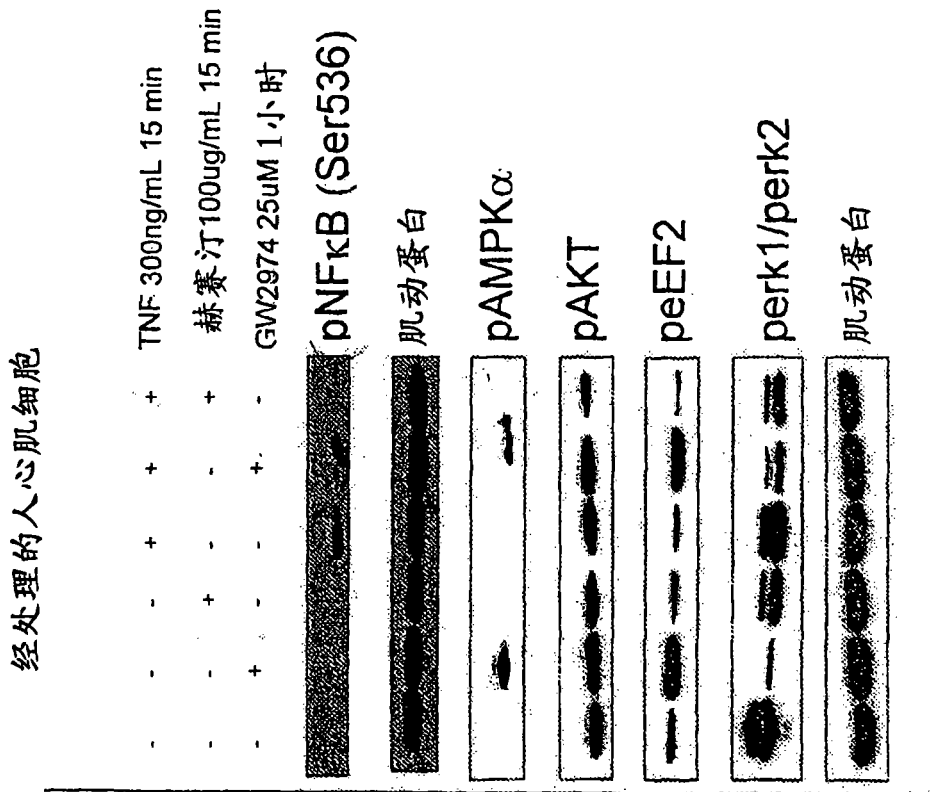


图10

专利名称(译)	用于减少细胞脂肪和预测用酪氨酸激酶抑制剂治疗后的心脏毒性的组合物和方法		
公开(公告)号	CN101438155A	公开(公告)日	2009-05-20
申请号	CN200780013697.4	申请日	2007-02-27
[标]发明人	SS巴克斯		
发明人	S·S·巴克斯		
IPC分类号	G01N33/53 C12P13/22 C12N15/09		
CPC分类号	G01N2333/81 G01N2333/4706 G01N33/5061 G01N33/5091 G01N2800/52 A61P3/02		
优先权	60/777096 2006-02-27 US 60/821230 2006-08-02 US 60/827372 2006-09-28 US 60/828345 2006-10-05 US 60/867736 2006-11-29 US		
其他公开文献	CN101438155B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了确定器官毒性特别是心脏毒性是否将在选择用各种激酶抑制剂如酪氨酸激酶抑制剂更特别是erbB抑制剂如赫赛汀治疗的患者中发生的方法。此外，还公开了确定潜在药物是否可能产生心脏毒性效应的方法。所述方法涉及分析脂质水平或者脂肪酸氧化酶、pAMP活化的蛋白激酶的表达、葡萄糖摄取，以确定是否存在脂肪酸氧化紊乱。鉴定脂肪酸氧化紊乱可用作为毒性特别是心脏毒性的预测物，和用作为如果施用诸如酪氨酸激酶抑制剂的药物应小心监测器官功能的指示。还公开了保护器官免于代谢性应激和处理细胞如脂肪细胞以减少其脂质含量的方法。

酰基辅酶 A 脱氢酶缺陷
 酰基辅酶 A 脱氢酶，短链 (SCAD)
 酰基辅酶 A 脱氢酶，中链 (MCAD)
 酰基辅酶 A 脱氢酶，长链 (LCAD)
 酰基辅酶 A 脱氢酶，极长链 (VLCAD)
 2-烯酰辅酶 A 水合酶缺陷
 L-3-羟酰辅酶 A 脱氢酶缺陷
 L-3-羟酰辅酶 A 脱氢酶，短链 (SCHAD)
 三官能蛋白质：长链 FA (LCHAD)
 α亚基 (HADHA)
 β亚基 (HADHB)
 3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶缺陷
 3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶，中链 (MCKAT)
 三官能蛋白质
 α-甲基酰基辅酶 A 消旋酶 (AMACR) 缺陷
 肉碱-酰基肉碱移位酶缺陷：3p21
 2,4-二烯酰辅酶 A 还原酶缺陷：8q21
 电子传递黄素蛋白 (ETF) 缺陷：15q23
 鱼鳞状红皮病 (NCIE2)：CG158 基因；3p21
 三官能蛋白质缺陷：亚基 A 和 B
 酪氨酸血症
 1° 肉碱代谢紊乱
 脂肪酸和肉碱转运途径
 脂肪酸氧化途径