

(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2010-500283

(P2010-500283A)

(43) 公表日 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	4 C 0 6 3
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	4 C 0 6 5
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-513311 (P2009-513311)	(71) 出願人	504394593
(86) (22) 出願日	平成19年5月31日 (2007.5.31)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(85) 翻訳文提出日	平成21年1月22日 (2009.1.22)		ザ レランド スタンフォード ジュニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/013033		ユニバーシティー
(87) 国際公開番号	W02007/143146		アメリカ合衆国 カリフォルニア 943
(87) 国際公開日	平成19年12月13日 (2007.12.13)		05, スタンフォード
(31) 優先権主張番号	60/810,030	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成18年5月31日 (2006.5.31)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チロシンキナーゼ阻害剤を用いて炎症性疾患を治療する方法

(57) 【要約】

チロシンキナーゼ阻害剤を用いて炎症性疾患を治療および防止するための方法を提供する。阻害剤は例えばTリンパ球、及び/又はBリンパ球の機能、線維芽細胞増殖、肥満細胞活性化、及び/又は単球分化を抑制する。1つの特徴において、少なくとも1つのチロシンキナーゼの活性を抑制する為に十分な量において炎症性疾患に罹患している対象にチロシンキナーゼ阻害剤を経口投与することを含む炎症性疾患を治療するための方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの受容体チロシンキナーゼの活性を抑制する為に十分な量において炎症性疾患に罹患している対象にチロシンキナーゼ阻害剤を経口投与すること；
を含む炎症性疾患を治療するための方法。

【請求項 2】

前記チロシンキナーゼ阻害剤がイマチニブ、CGP53716、SU9518、PD166326 及び GW2580 から選択される請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記チロシンキナーゼ阻害剤がイマチニブであり、そして前記受容体チロシンキナーゼが c - F m s、c - K i t、PDGFR、PDGFR、FGFR 及び A b l から選択される請求項 2 記載の方法。 10

【請求項 4】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が CGP53716 であり、そして前記受容体チロシンキナーゼが PDGFR、FGFR 及び c - K i t から選択される請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が GW2580 であり、そして前記受容体チロシンキナーゼが c - F m s 及び PDGFR から選択される請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が PD166326 であり、そして前記受容体チロシンキナーゼが c - K i t 及び A b l から選択される請求項 2 記載の方法。 20

【請求項 7】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が SU9518 であり、そして前記受容体チロシンキナーゼが PDGFR 及び FGFR である請求項 2 記載の方法。

【請求項 8】

前記炎症性疾患が自己免疫疾患である請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記炎症性疾患が慢性関節リウマチである請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記炎症性疾患が全身性硬化症である請求項 8 記載の方法。 30

【請求項 11】

前記炎症性疾患が多発性硬化症である請求項 8 記載の方法。

【請求項 12】

前記炎症性疾患が乾癬、乾癬性関節炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、及び肺線維症から選択される請求項 8 記載の方法。

【請求項 13】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が約 0.2 マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が約 1 マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される請求項 1 記載の方法。 40

【請求項 15】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が約 5 マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が一日当たり約 1 回経口投与される請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

炎症性疾患に罹患した対象にチロシンキナーゼ阻害剤をキナーゼ 2 つ以上を阻害するために十分な量において経口投与することにより該炎症性疾患を治療することを含む炎症性疾患を治療するための方法。 50

- 【請求項 18】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が単一の化合物である請求項 17 記載の方法。
- 【請求項 19】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が PDGFR を阻害する請求項 17 記載の方法。
- 【請求項 20】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が c - K i t を阻害する請求項 17 記載の方法。
- 【請求項 21】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が c - F m s を阻害する請求項 17 記載の方法。
- 【請求項 22】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が c - A b l を阻害する請求項 17 記載の方法。 10
- 【請求項 23】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が F G F R を阻害する請求項 17 記載の方法。
- 【請求項 24】
前記炎症性疾患が自己免疫疾患である請求項 17 記載の方法。
- 【請求項 25】
前記炎症性疾患が慢性関節リウマチである請求項 24 記載の方法。
- 【請求項 26】
前記炎症性疾患が全身性硬化症である請求項 24 記載の方法。
- 【請求項 27】
前記炎症性疾患が多発性硬化症である請求項 24 記載の方法。 20
- 【請求項 28】
前記炎症性疾患が乾癬、乾癬性関節炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、及び肺線維症から選択される請求項 24 記載の方法。
- 【請求項 29】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が約 0 . 2 マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される請求項 17 記載の方法。
- 【請求項 30】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が約 1 マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される請求項 17 記載の方法。 30
- 【請求項 31】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が約 5 マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される請求項 17 記載の方法。 30
- 【請求項 32】
前記チロシンキナーゼ阻害剤が一日当たり約 1 回経口投与される請求項 17 記載の方法。
- 【請求項 33】
前記チロシンキナーゼ阻害剤がイマチニブ、CGP53716、SU9518、PD166326 及び GW2580 から選択される請求項 17 記載の方法。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】 40
- 【0001】
(関連出願への相互参照)
本願は、2006年5月31日に出願された米国仮特許出願第 60 / 8 1 0 , 0 3 0 号の利益を主張する。米国仮特許出願第 60 / 8 1 0 , 0 3 0 号は、本明細書中に参考として援用される。
- 【0002】
(政府の関与に関する声明)
本研究は、部分的に、NIH K08 AR02133、NIH NHLBI contract N01 HV 28183、NIH F31 Fellowship Award、および Department of Veterans Affairs 基金に 50

よって支援された。したがって、米国合衆国政府は、本発明における一定の権利を有する。

【0003】

(技術分野)

本明細書に記載した主題はチロシンキナーゼ阻害剤を用いて炎症性疾患を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

(背景)

炎症性及び自己免疫疾患は合衆国及び世界人口の3～5%に及んでいると推定されている(Jacobson等(1997)Clin Immunol. Immunopathol. 84:223-43)。正常個体においては、免疫応答はウイルス及び細菌感染に対抗して保護を与える。自己免疫疾患においては、これらの同様の細胞応答は宿主組織をターゲティングし、臓器及び/又は組織の損傷を、例えば、関節、皮膚、膵臓、脳、甲状腺又は胃腸管に対してもたらす。自己免疫障害の別の顕在化も慢性の炎症状態における調節不全の宿主細胞応答により誘発される。

10

【0005】

本明細書に記載する方法及び組成物は、後述する背景情報が提供されるチロシンキナーゼ及び炎症性の疾患、障害、及び状態に関する。

【0006】

A. チロシンキナーゼ

キナーゼによる標的蛋白のホスホリル化はシグナリングトランスダクションにおいて、そして、酵素活性の調節のための重要な機序である。チロシンキナーゼ(TK)はポリペプチド中のチロシン残基にATPからホスフェート基を転移させる100を超える異なる酵素のクラスである(表1)。チロシンキナーゼはシグナリング、アダプター、酵素及び他のポリペプチドをホスホリル化し、そのようなポリペプチドにシグナルを伝達させて特定の細胞機能および応答を活性化(不活性化)する。チロシンキナーゼには2つの主要なサブタイプ、即ち受容体チロシンキナーゼ及び細胞質/非受容体チロシンキナーゼが存在する。

20

【0007】

1. 受容体チロシンキナーゼ

今日までヒトにおいて報告されている約60の受容体チロシンキナーゼ(RTK; チロシン受容体キナーゼ(TRK)としても知られている)が存在している。これらのキナーゼはホルモン、成長因子及びサイトカインに対する高親和性の受容体である(表1)(Robinson等(2001)Oncogene 19:5548-57)。ホルモン、成長因子、及び/又はサイトカインの結合は一般的にこれらのキナーゼを活性化することにより細胞の成長及び分裂を増進する。例示されるものはインスリン様成長因子受容体、表皮成長因子受容体、血小板誘導成長因子受容体等である。大部分の受容体チロシンキナーゼは単一サブユニット受容体であるが、一部のもの、例えばインスリン受容体は多量体複合体である。各単量体は細胞外N末端領域、25～38アミノ酸の単一の膜貫通スパニングドメイン、及びC末端細胞内ドメインを含有している。細胞外N末端領域は細胞外リガンド、例えば特定の成長因子又はホルモンに結合する極めて大型の蛋白ドメインを有する。C末端細胞内領域はこれらの受容体のキナーゼ活性を与える。今日まで、受容体チロシンキナーゼの約20種の異なるサブクラスが発見されている(表1)(Robinson等(2001)Oncogene 19:5548-57)。受容体チロシンキナーゼは正常な細胞プロセスの不可欠な調節物質であり、そして多くの型の癌の発生及び進行において重要な役割を果たす(Zwick等(2001)Endocr. Relat. Cancer 8:161-173)。

30

40

【0008】

RTKはそれらのリガンドに対する細胞外結合部位、膜貫通ドメイン、及び細胞質内の

50

キナーゼドメインを包含する。RTKは更にATP結合部位、キナーゼ基質に結合するためのドメイン、及びホスフェート基を転移させるための触媒部位を包含する。触媒部位は開放（活性）又は閉鎖（不活性）の型であることができる裂溝の内部に存在する。閉鎖型は基質及び他の残基が触媒部位に運搬され得るようにし、そして解放型はATPとの接触を可能にすることにより触媒反応を駆動する（Roskoski, R (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun. 388: 1307-15）。

【0009】

クラスIIIのRTKはPDGFR、PDGFR、c-Fms、c-Kit及びFms様チロシンキナーゼ3 (Flt-3)を包含し、それらの細胞外結合部位内部の5つの免疫グロブリン様ドメイン並びにキナーゼドメイン内の70~100アミノ酸インサートを有することにおいて他のクラスのRTKとは区別される（Roskoski, R. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun. 338: 1307-15）。クラスIIIのRTK内の構造的同様性はPDGFRa、PDGFRb、c-Fms、及びc-Kitをブロックするイマチニブの場合において顕在化する通りリガンドに関して交差反応性をもたらす。血小板誘導成長因子受容体 (PDGFR)はPDGFR-アルファ (PDGFR)及びPDGFR-ベータ (PDGFR)を包含する（Yu, J.等 (2001) Biochem Biophys Res Commun. 282: 697-700）。PDGFのB鎖ホモ2量体BDGFBFはPDGFR及びPDGFRの両方を活性化し、そして線維芽細胞、平滑筋及び他の細胞における増殖、遊走及び他の細胞機能を増進する。PDGF-A鎖のホモ2量体PDGFAAはPDGFRのみを活性化する。PDGF-ABはPDGFRに高親和性で結合し、そしてPDGFRの非存在下ではより低い親和性において結合できる（Seifert, R. A.等 (1993) J. Biol. Chem. 268: 4473-80）。最近、PDGF-CC及びPDGF-DDを包含する別のPDGFRリガンドが発見された。線維芽細胞及び他の間葉の細胞は組織修復、創傷治癒、血管形成及び他の細胞機能を媒介する線維芽細胞成長因子受容体 (FGFR)を発現する。

【0010】

チロシンキナーゼ活性をブロックするための数種の直接及び間接の経路が存在し、例えば (i) ATP結合部位の競合的抑制、(ii) 解放型から閉鎖型への裂溝の遷移を妨害すること、(iii) 基質のチロシンキナーゼの結合部位への結合を直接ブロックすること、及び (iv) リガンド又は基質の生成又はリクルートメントをブロックすることを包含する。イマチニブ、CGP53716及びGW2580はキナーゼへのATP結合の競合的阻害剤である小分子チロシンキナーゼ阻害剤の例である。イマチニブはAb1の閉鎖（不活性）型に結合するのに対し、開放（活性）型はイマチニブの結合に関しては立体的に不適合である。ATPはイマチニブが結合している場合にはTKに結合することができず、そして基質はホスホリル化されることができない。今日まで認可されている小分子チロシンキナーゼ阻害剤（表2）はATP結合部位に結合し、そしてATPの結合をブロックすることにより、チロシンキナーゼがその基質標的をホスホリル化することを抑制する。

【0011】

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

【表 1】

表1:チロシンキナーゼ:細胞分布及び細胞機能の概要		
チロシンキナーゼ	細胞発現キナーゼ	細胞機能
受容体		
PDGFRファミリー:		
c-Fms	単球、マクロファージ、破骨細胞	細胞成長、増殖、分化、生存、及びプライミング
PDGFRα	線維芽細胞、平滑筋細胞、ケラチノサイト、グリア細胞、軟骨細胞	細胞成長、増殖、分化、及び生存
PDGFRβ	線維芽細胞、平滑筋細胞、ケラチノサイト、グリア細胞、軟骨細胞	細胞成長、増殖、分化、及び生存
c-Kit	造血系先祖細胞、肥満細胞、原始生殖細胞、カハル間質細胞	細胞成長、増殖、分化、及び生存
Flt-3	造血系先祖細胞	細胞成長、増殖、分化、及び生存
VEGFRファミリー:		
VEGFR1	単球、マクロファージ、内皮細胞	単球及びマクロファージの遊走、血管透過性
VEGFR2	内皮細胞	脈管形成;血管形成
VEGFR3	リンパ管内皮細胞	脈管形成;リンパ管形成
FGFRファミリー:	線維芽細胞及び他の間葉細胞	組織修復、創傷治癒、血管形成
非受容体(細胞質)		
ABLファミリー:	遍在性	細胞増殖、生存、細胞接着及び遊走
JAKファミリー:		
JAK1	遍在性	サイトカインシグナリング
JAK2	遍在性	ホルモン様サイトカインシグナリング
JAK3	T細胞、B細胞、NK細胞、骨髓様細胞	共通ガンマ鎖サイトカインシグナリング
TYK2	遍在性	サイトカインシグナリング
SRC-Aファミリー:		
FGR	骨髓様細胞(単球、マクロファージ、顆粒球)	終末分化
FYN	遍在性	細胞成長;T細胞受容体、脳機能の調節、及び、接着媒介シグナリング
SRC	遍在性	細胞の発生、成長、複製、接着、運動性
YES	遍在性	密接の維持、上皮細胞を通過するIgAの遊出
SRC-Bファミリー:		
BLK	B細胞、胸腺細胞	B細胞の増殖及び分化;胸腺産生
HCK	骨髓様細胞、リンパ様細胞	増殖、分化、遊走
LCK	T細胞、NK細胞	T細胞活性化;KIR活性化
LYN	骨髓様細胞、B細胞、肥満細胞	BCRシグナリング;FceR1シグナリング
SYKファミリー:		
SYK	遍在性	増殖、分化、食食作用;腫瘍抑制物質
ZAP70	T細胞、NK細胞	T細胞活性化;KIR活性化

10

20

30

2. 細胞質 / 非受容体チロシンキナーゼ

30 超の細胞質性チロシンキナーゼがヒトにおいて報告されている(表1)。発見された最初の細胞質性のチロシンキナーゼはウィルス性のSrc(v-Src)であり、これは正常細胞を癌細胞に形質転換することができる哺乳類のSrcの突然変異した構造的に活性な形態を示す。SRCファミリーメンバーは多くの細胞プロセスを調節することが分かっている。例えば、T細胞抗原受容体はSrcと構造的に同様である2つの蛋白Lck及びFynの活性化により細胞内シグナリングをもたらす。Abl(又はc-Abl)は非受容体チロシンキナーゼのABLファミリーのメンバーであり、細胞の増殖、生存、接着及び遊走を媒介する。Bcr-Abl染色体転座(フィラデルフィア染色体)はAblの過剰発現を誘発し、これは未制御の細胞成長及び慢性骨髄性白血病(CML)の発症をもたらす。

40

【0012】

B. 癌を治療するための小分子キナーゼ阻害剤の開発

小分子チロシンキナーゼ阻害剤は癌の治療のために開発されている。例えばイマチニブメシレート(GLEEVEC)はフィラデルフィア染色体Bcr-Abl転座に関連する慢性骨髄性白血病の治療のためにAblを抑制するために開発されている。癌の治療のための小分子チロシンキナーゼ阻害剤を表2に列挙する。

【0013】

【表 2】

化合物	商標名	企業名	認可日	FDA認可用途
イマチニブ	GLEEVEC	Novartis	05-2001	慢性骨髄性白血病、胃腸の支質性腫瘍
ゲフィチニブ	IRESSA	AstraZeneca	05-2003	非小細胞肺癌
エルロチニブ	TARCEVA	OSI Pharms	11-2004	非小細胞肺癌
ソラフェニブ	NEXAVAR	Bayer	12-2005	進行腎細胞癌、胃腸の支質性腫瘍、進行腎細胞癌
スニチニブ	SUTENT	Pfizer	01-2006	慢性骨髄性白血病、Ph ⁺ 急性
ダサチニブ	SPRYCEL	Bristol Myers	06-2006	リンパ芽球性白血病
ラパチニブ	TYKERB	GlaxoSmithKline	03-2007	HER2-陽性乳癌

10

医薬品及び生化学産業の主要な目的は「オフターゲット」作用に起因する副作用及び毒性を最小限とするための所望の標的蛋白又は細胞に対して高度に特異的である薬物の開発である。表2に記載された癌はキナーゼにおける遺伝子的な突然変異（又はキナーゼ遺伝子の過剰発現をもたらす突然変異）により媒介され、そしてそのような癌の治療のためには、毒性と相対比較した場合に薬効を最大限とするための高度に特異的なチロシンキナーゼ阻害剤を利用することが最も望ましい。その結果として、単一のTKに結合するのみである化合物を発見するために多大な努力がはらわれてきた。

【0014】

イマチニブはAblを抑制するために開発され、FDAより認可されている（Bcr-Abl転座遺伝子型の場合）。イマチニブは後にKitを抑制することも判明し、そしてKit発現胃腸支質性腫瘍（GIST）の治療に関してFDAより認可される。より最近では、イマチニブはFms及びPDGFRも抑制することが観察されている。5年間に渡りイマチニブ1日当たり400mgで治療されたCML患者の最近の研究では、患者の>40%が浮腫、悪心、筋肉痙攣、筋骨格の疼痛、及び発疹を経験している（Druker BJ等（2006）N. Engl. J. Med. 355: 2408-17）。イマチニブ投与患者のかなりの比率がやはり骨髄抑制を発症しており、患者の17%が好中球減少症、9%が血小板減少症、そして4%が貧血を呈している（Druker BJ等（2006）N. Engl. J. Med. 355: 2408-2417）。心臓毒性も又イマチニブ投与患者で報告されており、Ablの抑制に二次的なミトコンドリア及び筋小胞体の機能不全に起因する可能性があるとされている（Kerkele R等（2006）Nat. Med. 12: 908-16）。

【0015】

TKのATP結合部位における僅かな構造的相違は、特定のチロシンキナーゼに関しては小分子阻害剤に対するある程度の特異性をもたらすが、他のものに対してはもたらさない。Abl活性をブロックするイマチニブの例においては、イマチニブは裂溝の内部及び裂溝の外部の両方においてペプチドセグメントとの広範な接触を呈する（Hubbard, S.（2002）Curr. Opin. Struct. Biol. 12: 735-41）。

【0016】

C. 自己免疫疾患

慢性関節リウマチ：慢性関節リウマチ（RA）においては、滑膜を有する（管壁を有する）関節が適応免疫系により攻撃され、そして患者が関節炎を呈する。異常な宿主免疫及び組織細胞応答が発症において中枢的役割を果たしており、慢性自己免疫性炎症を伴い、滑膜中への多数の好中球、マクロファージ及びリンパ球の流入をもたらす、これにより（i）これらの浸潤性免疫細胞の活性化によるTNF及びIL-6を包含するプロ炎症性サイトカインの生産、（ii）マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）及び関節組織を分解して破壊する他の酵素を包含する分解性酵素の生成、放出及び活性化、（iii）滑膜管壁の炎症誘導性の増殖及び過形成性成長による隣接関節組織の侵襲及び破壊をも

20

30

40

50

たらず。慢性関節リウマチの病因は不明であるが、マクロファージ、好中球、肥満細胞、T及びB細胞、及び線維芽細胞様滑膜細胞（FLS）が活性化され、そして滑膜炎及び関節破壊に寄与している。

【0017】

RAにおいては、単球は滑膜に浸潤して、TNF及び炎症を強化する別のプロ炎症性サイトカインを分泌するマクロファージ（Burmesgter, G. R.等（1997）Arthritis Rheum 40: 5-18; Kinne, R. W.等（2000）Arthritis Res 2: 189-202）及び骨を腐食させる破骨細胞に分化する。TNFはマウス関節炎における滑膜炎及び関節破壊（Kontoyiannis, D.等（1999）Immunity 10: 387-398）及びヒト慢性関節リウマチ（Weinblatt, M. E.等（1999）N. Engl. J. Med. 30: 253-259）において中枢的役割を果たしている。

10

【0018】

多発性硬化症：多発性硬化症（MS）は中枢神経系の脱髄を特徴とする消耗性の炎症性の神経学的な病気である。疾患は主に青年成人において起こり、女性の発生率がより高値である。疾患の症状は疲労、麻痺、振せん、刺痛、知覚不全、視覚攪乱、眩暈、認知障害、泌尿器機能不全、運動性低下、及び抑鬱を包含する。疾患の臨床パターンは4つの型、即ち回帰-弛張、二次進行、一次進行及び進行-回帰に分類される（S. L. Hauser and D. E. Goodkin, Multiple Sclerosis and Other Demyelinating Diseases in Harrison's Principles of Internal Medicine, 第14版、2巻、McGraw-Hill, 1998, pp. 2409-19）。

20

【0019】

全身性硬化症：全身性硬化症（SSc、又は硬皮症）は皮膚及び内部臓器の線維症及び広範な血管症を特徴とする自己免疫疾患である。SScを有する患者は皮膚の硬化症の範囲に従って分類され、限定されたSScを有する患者は、顔面、頸部、及び遠位の四肢の皮膚の硬化を有するのに対し、びまん性のSScを有する者では胴体、腹部、及び近位の四肢も同様に関与している。内部臓器の関与は限定された疾患と比較してびまん性である患者において疾患の過程のより早期に起こる傾向がある（Lainig等（1997）Arthritis Rheum. 40: 734-42）。重度の内部臓器の関与を発症しているびまん性SScを有する患者の大部分は、皮膚が進行性に線維症化するのと同時に、診断後の最初の3年以内にそのようになる（Steen and Medsger（2000）Arthritis Rheum. 43: 2437-44）。かなりの罹患率及び死亡率の原因となるびまん性SScの共通の現れ方は間質性肺疾患（ILD）、レイノー現象、及び指の潰瘍、肺動脈高血圧（PAH）（Trad等（2006）Arthritis Rheum. 54: 184-91）、筋骨格症状及び心臓及び腎臓の関与（Ostojic and Damjanov（2006）Clin. Rheumatol. 25: 453-7）を包含する。現在の治療は特定の症状の治療に着目しているが、伏在する病因をターゲティングする疾患変更剤は欠如している。

30

【0020】

乾癬：乾癬は鱗屑化及び炎症を特徴とする慢性皮膚疾患である。乾癬は合衆国の1.5～2パーセント、或いは概ね500万人が罹患している。全ての年齢層において、そして男性及び女性で概ね等しく起こっている。乾癬を有する者は関節の不快な制限された運動性、及び情緒的窮迫という困難を有する。乾癬が発症する場合、皮膚の斑紋が肥厚化、赤色化し、そしてプラークと称される銀色鱗屑により被覆される。乾癬は肘、膝、頭皮、下部背部、顔面、足底、及び足底に起こる場合が最も多い。疾患は又手の爪、足の爪、及び口腔及び生殖器の内部の軟組織において起こる場合もある。乾癬を有する者の約10パーセントが関節炎の症状をもたらす関節の炎症を有している。

40

【0021】

皮膚が創傷を有する場合、再生成熟化としても知られる創傷治癒プログラムがトリガー

50

される。疾患性の乾癬はこの交代性の成長プログラムにおける細胞成長を特徴とする。多くの態様において、乾癬皮膚は創傷から治癒している、又は、刺激に対して反応している皮膚、例えばケラチノサイトが正常な生長プログラムから再生成熟化に切り替えている感染症の場合と同様である。2～4日間以内もの短期間のうちに細胞が創生されて表面まで押し出され、そして皮膚は十分迅速に細胞を脱落させることができない。過剰な皮膚細胞が集結し、そして隆起した鱗屑性の患部を形成する。通常患部を被覆している白色の鱗屑（「ブランク」と称される）は死滅した皮膚細胞より構成され、そして患部の赤熱状態は急速に分裂している皮膚細胞の領域への増大した血流供給により生じる。

【0022】

ヒトにおける乾癬の厳密な原因は不明であるが、遺伝的要素を有していることは一般的に受け入れられており、そして最近の研究では自己免疫の要素を有することも明らかにされた。ある者が実際に乾癬を発症するかどうかはその出現を「トリガー」する何かに依存しているという仮説がある。潜在的な「トリガー因子」の例は全身の感染症、皮膚の傷害（Koeber現象）、ワクチン接種、特定の薬物療法、及び筋肉内注射又は経口ステロイド薬物療法を包含する。乾癬の慢性皮膚炎症は過形成の表皮ケラチノサイト及び浸潤性の単核細胞、例えばCD4+メモリーT細胞、好中球及びマクロファージを伴っている。TNFを生産するマクロファージは乾癬における炎症の駆動及び発症において重要な役割を果たしていると考えられる。

10

【0023】

全身エリテマトーデス（SLE）：SLEは種々の抗蛋白及び非蛋白の自己抗体をもたらすポリクローナルB細胞活性化を特徴とする自己免疫疾患である（疾患の考察に関しては例えばKotzin等（1996）Cell 85：303-06参照）。これらの自己抗体は組織損傷をもたらす多数の臓器系に沈着する免疫複合体を形成する。SLEは悪化及び弛張を特徴とする可変の経過を有し、そして研究することが困難である。例えば、一部の患者は主に皮膚発疹及び関節痛を示し、自発的な弛張を呈し、そして薬物療法をほとんど必要としない場合がある。スペクトルのもう一方の末端は、高用量のステロイド及び細胞毒性剤、例えばシクロホスファミドにより治療を必要とする重度で進行性の腎臓への影響（糸球体腎炎及び脳炎）を示す患者を包含する。

20

【0024】

炎症性腸疾患：炎症性腸疾患はクローン病及び潰瘍性結腸炎を包含し、腸の自己免疫攻撃が関与している。これらの疾患は頻繁には出血性である慢性の下痢、並びに結腸機能不全の症状を誘発する。

30

【0025】

自己免疫性糖尿病：インスリン依存性真性糖尿病及びI型糖尿病としても知られている自己免疫性糖尿病においては、免疫系が膵臓のベータ細胞を攻撃して破壊する。ベータ細胞はインスリンを生産し、その結果、患者はインスリン不全となり、多尿、多渴症、及び多食を包含する糖尿病の臨床症状を顕在化させる。自己免疫性糖尿病を有する患者はインスリン注射で治療され、そしてインスリンの投与無くしては生存できない。

【0026】

自己免疫疾患のその他の例は甲状腺（グレース病及び橋本甲状腺炎）、末梢神経（ギャンバレー症候群及び他の自己免疫性の末梢神経障害）、CNS（急性播種性脳脊髄炎ADEM）、皮膚（類天疱瘡（水疱性）、落葉状天疱瘡、尋常天疱瘡、セリアックスブルー皮膚炎、白斑）、肝臓及び胃腸系（原発性胆汁性肝硬変、悪性貧血、自己免疫性肝炎）、及び眼（自己免疫性ブドウ膜炎）が関与するものを包含する。更に又、多数の「自己免疫性リウマチ性疾患」（シェーグレン症候群、円板状エリテマトーデス、抗リン脂質症候群、CREST、混合型結合組織疾患（MCTD）、多発性筋炎、及び皮膚筋炎、及びウエーゲナー肉芽腫症）も挙げられる。

40

【0027】

免疫及び宿主細胞の応答をモジュレートする化合物は上記及び炎症に関連する他の疾患を治療する場合に有用であることができる。本発明の組成物及び方法はチロシンキナーゼ

50

阻害剤を用いた自己免疫性及び炎症性の疾患を治療するための新しい方策を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0028】

(簡単な要旨)

後述する以下の特徴及びその実施形態は例示及び説明であり、範囲の制限を意味するものではない。

【0029】

1つの特徴において、少なくとも1つのチロシンキナーゼの活性を抑制する為に十分な量において炎症性疾患に罹患している対象にチロシンキナーゼ阻害剤を経口投与することを含む炎症性疾患を治療するための方法が提供される。

10

【0030】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤はイマチニブ、CGP53716、SU9518、PD166326及びGW2580から選択される。

【0031】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤はイマチニブであり、そしてチロシンキナーゼはc-Fms、c-Kit、PDGFR、PDGFR、及びAblから選択される。

【0032】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤はCGP53716であり、そしてチロシンキナーゼはPDGFR (PDGFR 及びPDGFR)、FGFR及びc-Kitから選択される。

20

【0033】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤はGW2580であり、そしてチロシンキナーゼはc-Fms及びPDGFRから選択される。

【0034】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤はPD166326であり、そしてチロシンキナーゼはc-Kit及びAblから選択される。

【0035】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤はSU9518であり、そしてチロシンキナーゼはPDGFR及びFGFRである。

30

【0036】

一部の実施形態においては、炎症性疾患は自己免疫疾患である。特定の実施形態においては、炎症性疾患は慢性関節リウマチである。他の特定の実施形態においては、炎症性疾患は全身性硬化症である。更に別の特定の実施形態においては、炎症性疾患は多発性硬化症である。更に別の特定の実施形態においては、炎症性疾患は乾癬、乾癬性関節炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、及び肺線維症から選択される。

【0037】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は約0.2マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は約1マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は約5マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は一日当たり約1回経口投与される。

40

【0038】

別の特徴においては、炎症性疾患に罹患した対象にチロシンキナーゼ阻害剤をキナーゼ2つ以上を阻害するために十分な量において経口投与することにより炎症性疾患を治療することを含む炎症性疾患を治療するための方法が提供される。

【0039】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は単一の化合物である。

50

【 0 0 4 0 】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は P D G F R を抑制する。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は c - K i t を抑制する。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は c - F m s を抑制する。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は c - A b l (A b l) を抑制する。

【 0 0 4 1 】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は P D G F R 及び c - F m s を抑制する単一の化合物である。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は P D G F R 及び c - A b l を抑制する単一の化合物である。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は P D G F R 及び c - K i t を抑制する単一の化合物である。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は c - F m s 及び c - A b l を抑制する単一の化合物である。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は c - F m s 及び c - K i t を抑制する単一の化合物である。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は F G F R 及び P D G F R を抑制する単一の化合物である。

10

【 0 0 4 2 】

一部の実施形態においては、炎症性疾患は自己免疫疾患である。

【 0 0 4 3 】

特定の実施形態においては、炎症性疾患は慢性関節リウマチである。別の特定の実施形態においては、炎症性疾患は全身性硬化症である。一部の特定の実施形態においては、炎症性疾患は多発性硬化症である。

20

【 0 0 4 4 】

更に別の特定の実施形態において、炎症性疾患は乾癬、乾癬性関節炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、及び肺線維症から選択される。

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は約 0 . 2 マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は約 1 マイクロモルの血中レベルを達成する用量において経口投与される。一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は約 5 マイクロモルの血中濃度を達成する用量において経口投与される。特定の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は一日当たり約 1 回経口投与される。

30

【 0 0 4 6 】

一部の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤はイマチニブ、C G P 5 3 7 1 6、S U 9 5 1 8、P D 1 6 6 3 2 6 及び G W 2 5 8 0 から選択される。

【 0 0 4 7 】

上記した例示される特徴及び実施形態に加えて、その他の特徴及び実施形態は図面を参照することにより、そして以下の説明を検討することにより自明となるはずである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 8 】

【 図 1 】 図 1 A ~ 1 D は 3 3 m g / k g (四角) 又は 1 0 0 m g / k g (菱形) の用量におけるチロシンキナーゼ阻害剤イマチニブの投与によるマウスにおけるコラーゲン誘導関節炎 (C I A) の防止を示すグラフであり、ここでは 1 日 2 回の経口投与を C I A の誘導の前 1 日に開始した。対照マウスにはリン酸塩緩衝食塩水 (P B S、丸) を投与した。図 1 A は一次免疫化後の日程における目視関節炎採点システムを用いて評価した場合の平均関節炎評点を示す。図 1 B は一次免疫化の後の日程における m m 単位の足底厚みを示す。図 1 C は試験の終了時における関節炎の発生率を示す。図 1 D は各群のマウスの平均体重を示す。

40

【 図 2 】 図 2 A 及び 2 B は 1 日 2 回経口投与した 3 3 m g / k g (四角) 又は 1 0 0 m g / k g (菱形) の用量におけるチロシンキナーゼ阻害剤イマチニブで治療した場合の樹立された C I A を有するマウスにおける関節炎 (平均目視関節炎評点 4) の治療を説明するグラフである。対照マウスにはリン酸塩緩衝食塩水 (P B S、丸) を投与した。図 2 A は

50

一次免疫化後の日程における目視関節炎採点システムを用いて評価した場合の平均関節炎評点を示す。図 2 B は一次免疫化の後の日程における mm 単位の足底厚みを示す。

【図 3】図 3 A ~ 3 I は C I A において滑膜炎、パンヌス形成、及び関節の腐食をイマチニブが低減することを明らかにした実験の結果を示す。図 3 A ~ 3 C は図 1 A ~ 1 D に記載した試験において治療されたマウスに由来する代表的な H & E 染色関節組織切片である。図 3 D ~ 3 I はそれぞれ図 1 A ~ 1 D 及び図 2 A ~ B の防止 (図 3 D ~ 3 F) 及び治療 (図 3 G ~ 3 I) の試験における C I A に関して誘導されたマウスにおける炎症、パンヌス、及び骨及び軟骨の腐食の組織学的評点を示す棒グラフである。

【図 4】図 4 A は C I A を有するマウスに由来する代表的な関節切片の写真であり、関節切片はトルイジンブルーで染色した。緻密に炎症を起こした C I A 滑膜組織中に存在する肥満細胞は矢印で示す。B = 骨、J S = 関節の空間。オリジナル倍率 200 X。図 4 B ~ 4 D は肥満細胞の c - K i t 活性化及びプロ炎症性サイトカイン生産をイマチニブが抑制することを示す棒グラフである。図 4 B ~ 4 D は 1 μ M 及び 5 μ M のイマチニブの存在下で幹細胞因子により 48 時間刺激した後の肥満細胞における T N F (図 4 B)、G M - C S F (図 4 C) 及び I L - 6 (図 4 D) の濃度を示す。図 4 E ~ 4 F はイマチニブと共に予備インキュベートし、そしてイマチニブの存在下又は非存在下で 10 分間幹細胞因子で刺激した血清枯渴肥満細胞から形成した溶解物の免疫プロットである。免疫プロットはホスホ (p) - c - K i t、及び全 c - K i t (図 4 E) 及び p - A k t (S e r 4 7 3) 及び全 A k t (図 4 F) に特異的な抗体でプローブした。図 4 G は図 4 E ~ 4 F に関して記載した刺激条件を用いながら形成した肥満細胞溶解物の逆相蛋白 (R P P) アレイである。R P P アレイはホスホリル化 (活性化) 蛋白チロシンキナーゼに対して特異的な種々の抗体でプローブし、そしてシグナルレベルを見刺激細胞におけるものに対して規格化した。黄色は抗蛋白チロシンキナーゼ抗体の反応性を示し、青色は反応性の欠如を示す。

【図 5】図 5 A ~ 5 C はイマチニブによるマクロファージ c - F m s 及び下流の M A P K 経路の抑制を示す実験の結果である。図 5 A ~ 5 B は単離されたレジデント腹膜マクロファージから製造し、血清枯渴させ、そしてイマチニブと共に予備インキュベートし、そして次にイマチニブの存在下に 10 分間 M - C S F で刺激した溶解物の免疫プロットである。免疫プロットは p - c - F m s、及び全 F m s (図 5 A) 又は p - A k t (S e r 4 7 3) 及び全 A k t (図 5 B) に特異的な抗体でプローブした。図 5 C は同じ刺激条件を用いながら形成した腹膜マクロファージ溶解物の R P P アレイである。R P P アレイは M A P K 経路及び他の蛋白チロシンキナーゼに対して特異的な種々の抗体でプローブし、そして規格化したキナーゼレベルをヒートマップとして表示した。図 5 D ~ 5 F はマクロファージへの単球の分化をイマチニブが抑制することを示す細胞の画像である。図 5 D は未処理のまま 72 時間培養され、そして単球の古典的な丸型の形態を示している滑液単球を示す。図 5 E は 100 n g / m l M - C S F と共に 72 時間培養された滑液単球を示す。図 5 E における細胞は多極性の突起の伸長、不均質な細胞質の空胞及び封入体を包含するマクロファージの形態を明確に示している。図 5 F はマクロファージへの単球の M - C S F 誘導分化をイマチニブがブロックすることを示している。

【図 6】図 6 A ~ 6 E は B 細胞機能およびエピトープ拡張をイマチニブが抑制することを明らかにした実験の結果を示す。図 6 A は B 細胞を M A C S ビーズ (M i l t e n y i B i o t e c) を用いた陰性選択によりナイーブの D B A / 1 マウス脾臓から単離し、そしてフローサイトメトリーにより高度に精製したことを示す 3 次元のグラフである。単離された B 細胞を 50 μ g / m l の μ 特異的抗 I g M (F a b ') ₂ 又は 5 n g / m l の L P S で 72 時間刺激した。図 6 B 及び 6 C は抗 I g M 又は L P S 刺激 B 細胞増殖をイマチニブがブロックすることを示す棒グラフである。図 6 D は I g M の L P S 刺激 B 細胞生産もイマチニブがブロックすることを示す棒グラフである。図 6 E は食塩水又は 100 m g / k g のイマチニブを投与した C I A を有するマウスから誘導した血清自己抗体の滑膜 R P P アレイプロファイルを示す。抗体の反応性はヒートマップとして示し、イマチニブ投与マウス由来の試料は右側に集合しており、多数の関節抗原に対して抗体反応性が低減していることを示している。

10

20

30

40

50

【図7】図7A～7EはT細胞応答をイマチニブが抑制することを示すグラフである。図7AはCII特異的TCRをコードするトランスジーンを発現するマウスから誘導され、そして0～10 μ Mイマチニブの存在下に0～40 μ g/mLの熱変性全CIIで刺激された脾細胞における、CII特異的T細胞の増殖の尺度としての、³H-チミジンの取り込みを示すX-Yグラフである。図7B～7Eは図7Aの20 μ g/mL CIIで刺激した抗CII TCRトランスジェニック脾細胞の上澄みにおけるサイトカインインターフェロン- γ （図7B）、IL-4（図7C）、TNF α （図7D）及びIL-2（図7E）の濃度を示す棒グラフである。早期のアポトーシス（PI⁻ Annexin V⁻）並びに後期のアポトーシス又は細胞死（PI⁺ Annexin V⁺）を測定するためにヨウ化プロピジウム及びAnnexin Vで染色したイマチニブ投与細胞のフローサイトメトリーによれば、イマチニブはこれらの細胞においてアポトーシス又は死滅を誘導しないことがわかった。

10

【図8】図8A～8EはRA体外移植組織におけるサイトカイン生産及び線維芽細胞PDGFRの抑制を明らかにした実験の結果を示す。図8A～8Cは人RA患者から誘導し0～8 μ Mイマチニブの存在下に48時間100ng/mLのLPSで刺激した滑液単核細胞におけるサイトカイン濃度、TNF α （図8A）、IL-2（p40）（図8B）、及びIL-1 β （図8C）を示す棒グラフである。図8D～8EはヒトRA患者から誘導した線維芽細胞様滑膜細胞におけるPDGFR活性化をイマチニブが抑制することを示す免疫プロットを示す。培養した線維芽細胞様滑膜細胞はイマチニブと共に予備インキュベートした後に10分間25ng/mLのPDGF-BBで刺激した。溶解物を作成し、p-PDGFR及び全PDGFR（図8D）及びp-Akt及び全Akt（図8E）に対して特異的な抗体でプローブした。

20

【図9】図9A～9CはPDGF-BB及びTGF- β に反応した線維芽細胞の増殖をイマチニブが抑制することを示すグラフである。図9Aは0～6 μ Mイマチニブ存在下のヒト慢性関節リウマチ患者から誘導した線維芽細胞様滑膜細胞（FLS）の³H-チミジン取り込みにより測定した場合のPDGF-BB誘導増殖を示す棒グラフである。図9Bは抗CD68抗体を用いたフローサイトメトリー分析によるFLS細胞培養物中の夾雑マクロファージの非存在を示すグラフである（図9B、腹膜細胞=CD68がシステムマーカーである腹膜マクロファージ）。図9CはTGF- β 駆動線維芽細胞増殖をイマチニブがブロックすることを示す棒グラフである。NIH-3T3線維芽細胞を0～2 μ Mイマチニブ存在下に10ng/mLのTGF- β で刺激した。TGF- β 刺激後には頑健な増殖が観察され、そして増殖は0.15 μ M以上の濃度のイマチニブの添加により未刺激細胞のレベルにまで顕著に下げ戻った。

30

【図10】図10AはイマチニブがマウスEAE（多発性硬化症のモデル）の発症を遅延させ重症度を低減することを示すグラフである。対照（食塩水投与）及びイマチニブ（100mg/kg）投与EAEマウスの平均のEAE評点をEAE誘導後の日程において示す。

【図11】図11A及び11Bはチロシンキナーゼc-Kit及びPDGFRに関するCGP53716、イマチニブ（Gleevec）、及びGW2580のIC₅₀を示すグラフである。図11Aはc-Kitに関するCGP53716（0.002 μ M）、イマチニブ（0.09 μ M）、及びGW2580（74 μ M）のIC₅₀を測定するためのインビトロのc-Kitホスホリル化試験の結果を示すグラフである。組み換えc-Kitを記載した小分子阻害剤と共に予備インキュベートし、ATP及び基質を添加することによりホスホリル化反応を開始し、30分後に反応を停止し、抗ホスホチロシン染色を実施することによりホスホ-c-Kitを検出し、そして時間分解蛍光を使用することによりc-Kitホスホリル化を定量した（HTScan-c-Kitキナーゼ試験、Cell Signaling）。図11AはCGP53716及びイマチニブの両方がc-Kitを強力に抑制し、そしてGW2580が臨床的に該当する濃度（5 μ M未満）ではc-Kitを抑制しないことを示している。図11BはPDGFbb誘導増殖に関するCGP53716（0.011 μ M）、イマチニブ（0.147 μ M）、及びGW2580（4

40

50

・ $35 \mu\text{M}$)の IC_{50} を測定するためのインビトロの線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)増殖試験の結果を示す。ヒトRA患者から誘導したFLS(第4~6継代)をある範囲の濃度の特異的阻害剤と共に予備インキュベートし、PDGFR α 及びPDGFR β の両方に結合する)で刺激し、そして ^3H -チミジンの取り込みにより増殖を測定した。図11BはCGP53716、イマチニブ、及びGW2580の全てが標準的なマウス投薬用法により達成される血漿中濃度においてPDGFRを抑制することを示している。 IC_{50} はキナーゼ活性(図11A)又はその相当する細胞応答(図11B)の50%が抑制される小分子キナーゼ阻害剤の濃度である。

【図12】図12A~12Eは慢性関節リウマチに関するげっ歯類のモデルにおいてFms及びPDGFR阻害剤GW2580は樹立されたCIAを治療することを示す実験の結果を示す。図12A及び12Bは50mg/kgで5日間CIAマウスを治療したところ、平均の目視による関節炎評点(図12A)及び足底厚み計測(図12B)に基づけば、ビヒクル投与対照マウスと比較して関節炎の重症度が低下したことを示すグラフである。エラーバーは平均の標準誤差を示し(A、B)、そしてアスタリスクはMann-Whitney統計分析により $p < 0.05$ であることを示す(B)。図12CはGW2580又はイマチニブのようなc-Fmsの小分子阻害剤が機能すると考えられる経路における種々の点を示す単球系統の細胞の分化及び機能の模式図である。図12D~12Eにおいて、単球はヒト慢性関節リウマチ患者から単離し、そしてある範囲の濃度のイマチニブ又はGW2580の存在下又は非存在下においてマクロファージへの分化を増進するために9日間M-CSF(10ng/mL)で刺激した。図12Dはイマチニブ及びGW2580の両方がヒト血液単球からマクロファージへのM-CSF誘導分化をブロックすることを示している。マクロファージは形態学的特徴、例えば、細胞質の封入体、多極性の突起物の伸長、及び不均質な細胞質の空胞に基づいて計数した(%マクロファージはマクロファージに特徴的な形態学的特徴を有する全細胞の%を示す)。図12Eはイマチニブ(0.97 μM)、及びGW2580(0.01 μM)に関して IC_{50} データを求めた阻害曲線を示しており、Fmsに対してはGW2580はイマチニブよりも約100倍強力に、マクロファージへの単球のM-CSF誘導分化を抑制した。

【図13】図13A~13DはPDGFR、FGFR及びKit阻害剤CGP53716がCIAを防止することを示すグラフである。15匹の雄性DBA/1マウスの群をCIA中に乳化したII型コラーゲン(CII、200mg/匹)でCIA誘導し、そして第21日にIFA中に乳化したCIIでブーストした。CGP53716はCIA誘導の前1日に開始した毎日腹腔内投与により送達した。図13Aは一次免疫化の後の日程において目視関節炎採点システムを用いながら評価した低及び高用量のCGP53716を投与したマウスの平均関節炎評点を示す。図13Bは一次免疫化の後の日程における低及び高用量のCGP53716を投与したマウスのmm単位における足底厚みを示す。図13C(評点)及び図13D(足底計測)はイマチニブ及びCGP53716のCIA薬効を直接比較する試験の結果を示す。CGP53716およびイマチニブの両方は、CIAの程度を統計的に大幅に軽減する結果となった。1つのアスタリスクはMann-Whitney検定による $p < 0.05$ のCGP53716対ビヒクル対照の差を示し、2つのアスタリスクは $p < 0.01$ を示す。

【図14】図14A~14FはヒトRA滑膜におけるc-Fms(CSF-1R)、PDGFR、及びPDGFRの示差的発現を示す免疫組織化学的特徴(400x倍率)の結果を示す。膝置換時に慢性RAを有する患者から得た滑膜を固定し、パラフィン包埋し、そして切片をそれぞれc-Fms(図14B)、PDGFR(図14D)、及びPDGFR(図14F)又は相当するアイソタイプ対照抗体(図14A、C、E)に特異的なモノクローナル又はポリクローナル抗体で染色し、その後HRP系の検出に付した(Vector Labs)。図14Bは抗c-Fms抗体(Santa Cruz, sc-13949)が滑膜管壁を強力に染色したことを、伏在組織の低強度の染色を付随させながら示したものである。図14Dは抗PDGFR抗体(Santa Cruz, sc-338)がRA滑膜組織においてより高深度で細胞を染色したことを、滑膜管壁近傍の細

10

20

30

40

50

胞を付随させながら示したものである。図14Fは滑膜管壁に伏在する細胞のサブセットを抗PDGFR抗体が強力に染色したことを示している (Cell Signaling, #3169)。

【図15】図15A~15EはヒトRA滑膜組織から誘導した肥満細胞、線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS)、及び滑膜マクロファージの集団のフローサイトメトリーによる識別を示すグラフである。レムナントヒト膝滑膜を関節形成術時にRA患者から入手し、そして単細胞懸濁液をIV型コラゲナーゼによる酵素的消化により作成した。得られた細胞懸濁液を、造血細胞 (CD45) (図15B)、FLS (CD90) (図15C)、肥満細胞 (c-Kit) (図15D)、及び滑膜マクロファージ (CD14) (図15E)の細胞表面マーカーに対して特異的な蛍光色素コンジュゲート抗体で染色し、アイソタイプマツチの対照 (図15A) 及び抗MHCクラスI抗体で同時平行に染色した。表示したプロットはMHCクラスI陽性細胞集団を示す。

【図16】図16A~16Eは低用量のイマチニブと低用量のアトルバスタチン、ロシグリタゾン、又はエノキサパリンの間の薬物の組み合わせがコラーゲン誘導関節炎の臨床的重症度を低減するために相乗作用的に作用する場合があることを示すグラフである。図16AはCIA誘導し、そしてイマチニブ滴定 (60 mg/kg、15 mg/kg、3.75 mg/kg、0 mg/kg [ビヒクル対照]) により第1日から投与開始したマウスの群で得られた評点を示しており、これによりイマチニブの薬効の下限が判明し、それは15 mg/kgの投薬用法であった。図16Bはアトロバスタチン単独では使用した何れの濃度 (0~20 mg/kg) においてもCIAの防止に有効ではなかったことを示している。図16Cは何れも単独ではCIAを防止しなかった15 mg/kgのイマチニブ及び5 mg/kgのアトロバスタチンが組み合わせて使用された場合にはCIAの防止において高度に有効であったことを示している。図16Dは15 mg/kgの低用量のイマチニブ及び15 mg/kgの低用量のロシグリタゾンはCIAを防止したことを示している。図16Eは15 mg/kgの低用量のイマチニブ及び5 mg/kgの低用量のエノキサパリンはCIAを防止したことを示している。

【図17】図17A~17Bは欠損性のc-Kitシグナリングを示すC57BL/6-Kit^{W^{sh}/W^{sh}} (W^{sh}) マウスが有意に減少した肥満細胞を有し、コラーゲン抗体誘導関節炎に対して部分的に抵抗性であることを示すグラフである。W^{sh}マウス (丸) 及び対照C57BL/6 (C57、菱形) 同腹仔を1 mgコラーゲン抗体でコラーゲン抗体誘導関節炎に関して誘導し、そして第3日に50 µg LPSを腹腔内投与することにより関節炎を誘導した。図17AはW^{sh}マウスが低減した平均関節炎評点を呈し、そして図18が足底厚みにおいて低減した変化を呈したことを、C57対照マウスとの比較において示している。これらの結果はKit及び肥満細胞が自己免疫性関節炎の病因に寄与していることを示唆している。

【図18】図18A~18Fはイマチニブが全身性硬化症 (SSc、硬皮症) を治療することを示す画像である。全身性硬化症を有する24歳の患者において、イマチニブは指の潰瘍の治癒、間質性肺疾患の消散、及び皮膚コラーゲン構造の再生を可能にした。イマチニブ療法前の左第4近位指節間関節上に位置した指潰瘍 (図18A) はイマチニブ療法3か月の後に有意な治癒を示している (図18B)。イマチニブ療法前の胸部の高解像度のコンピューター断層撮影 (HRC T) スキャンは、両側性の下葉におけるすりガラス不透明性を伴った斑紋状の浸潤を示しており (図18C)、イマチニブ療法3ヶ月後にはすりガラス不透明性は消散している (図18D)。イマチニブ療法前の右腕のヘマトキシリンエオシン染色皮膚生検は、平均の皮膚厚み2.81 mm (倍率100x) (図18E) の乳頭細網状の真皮の稠密な好酸球性の堅固に充填されたコラーゲン束を示しているのに対し、初回生検の1 cm以内においてとったイマチニブ3か月後の反復皮膚生検は、コラーゲン束の緩慢な間隔及び薄束化、及び平均皮膚厚み2.31 mmを有するコラーゲン構造の正常化を示している (図18F)。

【図19】図19は小分子チロシンキナーゼ阻害剤SU9518、CGP53716、PD166326、及びGW2580の構造を示す。CGP53716はPDGFR、FG

10

20

30

40

50

F R 及び K i t を抑制し、そして R A に関するコラーゲン誘導関節炎モデルにおいて利益を供する（例えば図 1 3 参照）。G W 2 5 8 0 は高度に強力な F m s 阻害剤であり、そして P D G F R も抑制し（例えば図 1 1 B 及び図 1 2 E ）、そして樹立されたコラーゲン誘導関節炎を治療している（例えば図 1 2 ）。

【図 2 0】図 2 0 は種々の悪性疾患の治療に関して F D A 認可された小分子チロシンキナーゼ阻害剤の構造を示す。これらのチロシンキナーゼはイマチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、ダサチニブ、及びラパチニブを包含する。

【発明を実施するための形態】

【0049】

（詳細な説明）

10

I . 定義

「治療する」又は「治療すること」とは何れかの治療、例えば限定しないが疾患、障害、又は状態の症状の軽減、疾患、障害又は状態の原因の排除を一時的又は永久的に行うこと；又は進行中の病理学的プロセスの緩徐化、低減又は抑制を無症候性の個体において行うこと包含する。そのような無症候性の個体においては、病理学的プロセスは最終的には症状を誘発する場合が多い。病理学的プロセスの例は限定しないが自己免疫、炎症、又は変性のプロセス、状態、又は障害を包含する。

【0050】

「防止すること」とは最終的には症状の発生をもたらす病理学的プロセスが絶対に発生しないように病理学的プロセスの初回開始を抑制すること（即ち予防的な態様において疾患、障害又は状態の発生を防止すること）を指す。

20

【0051】

「治療有効量」とは特定の障害又は状態を治療又は防止する場合に有効である化合物の量を意味する。

【0052】

「製薬上許容しうる担体」とは医薬組成物、即ち対象又は患者に投与できる剤型の製剤において使用されている非毒性の溶媒、分散剤、賦形剤、又は他の物質である。

【0053】

「チロシンキナーゼ」は「T K」等と略記してよい。

【0054】

「チロシン受容体キナーゼ」は「受容体キナーゼ」と称してよく、或いは「R T K」、 「T R K」等と略記される。

30

【0055】

受容体の名称は当該分野においては例えば「c - F m s」と略記され、そして「c - K i t」は「F m s」及び「K i t」等と称してよい。

【0056】

本明細書においては、「自己免疫疾患」は炎症応答の少なくとも一部分が自己抗原に指向される「炎症性疾患」のサブセットである。自己免疫疾患は固有には炎症性疾患であるが、逆の関係は必ずしも真ではない。これらの疾患の多くの例を本文、図面及び表中に示す。本発明の組成物及び方法は一部が自己免疫疾患である炎症性疾患の治療及び/又は防止のために有用である。

40

【0057】

本明細書においては、「単一の化合物」とは活性化合物を指し、そして対応するプロドラッグ（存在する場合）、活性な薬物、及び活性な代謝産物（存在する場合）を包含する。

【0058】

I I . 治療方法

A . 概要

種々の特徴において、炎症性疾患を治療および防止するための方法を記載する。そのような方法は、T リンパ球及び/又はB リンパ球の機能の抑制、線維芽細胞増殖の抑制、肥

50

満細胞に関連する炎症性疾患の抑制、活性化マクロファージの関与する炎症性疾患の抑制、及び破骨細胞の関与する炎症性疾患の抑制のためのものを包含する。方法は標的キナーゼ受容体を抑制するために十分な用量においてチロシンキナーゼの阻害剤を投与することによりキナーゼ受容体の下流のシグナリング作用をモジュレートし、これにより対象/患者に対して有利な治療上の影響をもたらすこと。一部の実施形態においては、方法及び組成物は少なくとも2つの受容体を抑制するためのものである。

【0059】

1つの実施形態において、チロシンキナーゼ阻害剤はイマチニブである。イマチニブは慢性骨髄性白血病(CML)を有するヒト対象において観察されるPhiladelphia染色体Bcr/Abl転座の遺伝子産物をターゲティングすることがわかっている小分子蛋白チロシンキナーゼ阻害剤である。イマチニブはBcr/Abl陽性CMLの治療に関して、そして、c-Kit発現胃腸支質腫瘍(GIST)に関して、認可されている(Druker, B. J.等、N Engl J Med 344:1031-1037(2001); Demetri, G. D.等、N Engl J Med 347:472-480(2002))。Abl及びAbl関連キナーゼをマイクロモル濃度未満で阻害することのほかに、イマチニブはc-Fms ($IC_{50} = 1.4 \mu M$)、c-Kit ($IC_{50} = 0.1 \mu M$)、及びPDGFR / ($IC_{50} = 0.1 \mu M$)を包含する他のチロシンキナーゼのスペクトルも特異的及び強力に抑制する(Buchdunger, E.等、Biochim Biophys Acta 1551:M11-18(2001); Dewar, A. L.等、Blood 105:3127-3132(2005); Fabian, M. A.等、Nat Biotechnol 23:329-336(2005))。

【0060】

他の実施形態において、チロシンキナーゼ阻害剤はPDGFR及び/又はc-Kitに対して力価を有する。例えば、CGP53716はc-Kit ($IC_{50} = 0.002 \mu M$ 、図11A)、PDGFR ($IC_{50} = 0.011 \mu M$ 、図11B)、FGFR ($IC_{50} = 1.1 \mu M$)、及びAbl ($IC_{50} = 0.6 \mu M$)を抑制するチロシンキナーゼ阻害剤であるが、EGFR、FGFR、インスリン受容体、Src、Lyn、PKA及びPKCを包含する他のキナーゼを臨床的に該当する濃度では抑制しない(Buchdunger, E.等、Proc Natl Acad Sci USA 92:2558-2562(1995); Kallio, E.等、Am J Resp Crit Care Med 160:1324-1332(1999))。100mg/kg CGP53716のIP投与は投与後8時間及び24時間においてそれぞれ1.6及び1.9 μM の血漿中濃度をもたらした(Myllarniemi, M.等、FASEB J 11:1119-1126(1997))。

【0061】

PD166326はc-Kit ($IC_{50} = 0.012 \mu M$)及びAbl ($IC_{50} = 0.002 \mu M$)に対する力価を有する小分子チロシンキナーゼ阻害剤である(Wolff, N.等、Blood 105:3995-4003(2005))。マウスにおいて25及び50mg/kgで投与したPD166326は0.026及び0.098 μM のピーク血漿中レベル、及び約0.005及び0.018 μM の定常レベル(投与後15時間)をもたらした(Wolff, N.等、Blood 105:3995-4003(2005))。

【0062】

SU9518はPDGFR ($IC_{50} = 0.053 \mu M$)及びFGFR ($IC_{50} = 4.4$)に対する力価を有する小分子チロシンキナーゼ阻害剤である(Yamasaki, Y.等、Circ Res 88:630-636(2001); Abdollahi, A.等、J Exp Med 201:925-935(2005))。ラットにおいて50mg/kgのSU9518を経口投与した後、血漿中レベルは1.76 μM においてピーク値となり、投与後8時間においてもレベルはなお1 μM 超であった(Yamasaki

10

20

30

40

50

i, Y. 等、Circ Res 88:630-636(2001)。

【0063】

他の実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤はFms及び/又はPDGFRを抑制することに関しても力価を有している。例えばGW2580はFms($IC_{50} = 0.01 \mu M$ 、図12E)(Conway, J. 等、Proc Natl Acad Sci USA 102:16078-16083(2005))及びPDGFR($IC_{50} = 4.3 \mu M$)(図11B)を抑制する小分子である。80mg/kgの用量でマウスに投与したGW2580は5.6 μM のピーク血漿中濃度をもたらした(Conway, J. 等、Proc Natl Acad Sci USA 102:16078-16083(2005))。

10

【0064】

これら及び他の小分子チロシンキナーゼ阻害剤の阻害プロファイルは旺盛に特性化及び定義されつつある。今日まで、大多数のキナーゼ(表1)及び小分子阻害剤(表2に示すFDA認可阻害剤を包含)に関して、厳格なインビトロのキナーゼ基質ホスホリル化試験(例えば図11Aに示すもの)及びインビトロの細胞応答試験(例えば図11Bに示すもの)は実施されていない。その結果、示した抑制及び IC_{50} のデータは現時点での当該分野における知識を示すものであり、そして今後の研究により、多数の新しい未報告のチロシンキナーゼ阻害剤の活性が、本出願に記載した小分子阻害剤に関して発見されることが期待される。更に又、これらの新しい抑制特異性は自己免疫性及び他の炎症性疾患において観察される薬効に寄与すると考えられる。

20

【0065】

B. 慢性関節リウマチを治療するためのイマチニブ

本明細書に記載した試験において、イマチニブは炎症性疾患の病因において中枢となるシグナルトランスダクション経路のスペクトルを選択的に抑制することにより炎症性疾患を防止及び治療することが示されている。例示される炎症性疾患である慢性関節リウマチ(RA)のマウスにおけるコラーゲン誘導関節炎(CIA)を用いた場合、マウスへのイマチニブの経口投与はCIAの発症及び進行を防止するために有効であることがわかった(例えば実施例1及び図1A~1D)。イマチニブは又、樹立された臨床的関節炎を有するマウスにおいても炎症性疾患CIAを治療する場合において有効であった(例えば実施例2及び図2A~2B)。イマチニブで治療されたCIAマウスの後足底に対する組織病理学的な分析によれば、阻害剤はCIAの防止及びCIAの治療において滑膜炎、パンヌス、及び腐食の評点を低減することを示している(図3A~3I)。

30

【0066】

インビボ及びインビトロのデータは、イマチニブが慢性関節リウマチにおける滑膜炎、パンヌス形成及び関節破壊の駆動において役割を果たす多様な細胞応答を強力に抑制することを示している。例えばイマチニブはヒトRA患者線維芽細胞様滑膜細胞におけるPDGFRシグナリング、線維芽細胞におけるTGF- β 媒介Ab1シグナリング、肥満細胞によるc-Kit活性化及びプロ炎症性サイトカインの生産、滑液マクロファージによるLPS誘導TNF α 生産、及びT及びBリンパ球の機能を停止させる。

40

【0067】

実施例3において詳述する通り、滑膜組織中の肥満細胞の存在を確認した後(図4A)、肥満細胞をイマチニブの非存在下又は存在下に幹細胞因子(SCF)で刺激し、そしてサイトカイン分析を培養上澄みに対して実施した。図4B~4Dに示す通り、イマチニブの存在はTNF α 、GM-CSF及びIL-6の肥満細胞生産を低減している。

【0068】

免疫プロッティング及び逆相蛋白(RPP)溶解物アレイ分析を肥満細胞系統に対して実施することによりイマチニブにより調節されたチロシンキナーゼ活性化状態及びシグナルトランスダクション経路を特性化した。免疫プロッティング結果はイマチニブがc-Kitの幹細胞因子誘導ホスホリル化を抑制し(図4E)、下流Aktのホスホリル化の相当する低減も伴っていた(図4F)ことを示している。図4Gに示される通り、イマチニ

50

ブはシグナリング分子Akt（例えばSer473及びThr308において）、P70S6K及びRafのホスホリル化を防止している。

【0069】

免疫プロッティング及びRPPアレイ技術による実験は、イマチニブは肥満細胞においてSCF誘導c-Kitホスホリル化及びMAPK経路の下流の活性化を抑制することを示している。更に又、イマチニブは炎症性サイトカインTNF、IL-6及びGM-CSFのSCF誘導肥満細胞生産を抑制している。これらのデータは肥満細胞活性化のイマチニブ媒介抑制がCIA及び潜在的にはヒトRAにおいてもその薬効に寄与できることを示唆している。

【0070】

総括すれば、イマチニブは、おそらくは(i)滑膜線維芽細胞のPDGFR及びc-Ab1媒介増殖、(ii)TNF産生マクロファージ及び骨破壊破骨細胞へのc-Fms媒介単球成熟化、(iii)肥満細胞によるTNFのc-Kit媒介放出、及び(iv)B及びT細胞のc-Ab1及びLck媒介活性化を包含するRAの病因に寄与している多数のチロシンキナーゼ及び細胞応答を同時に抑制することによりCIAにおける薬効を与えている。

【0071】

C. c-Fmsに関連する疾患を治療するためのイマチニブ

c-Fmsは単球系統の細胞上に主に発現され、そしてマクロファージ及び破骨細胞への単球の分化を刺激する。Fmsは又、マクロファージの増殖、分化、及び生存を調節する(Dewar, 2005; Pixley, F. J., and Stanley, E. R., Trends Cell Biol 14: 628-638 (2004))。

【0072】

本発明の組成物及び方法を用いて実施した実験において、実施例5に記載する通り、レジデントの腹膜マクロファージ細胞をマウスから単離し、イマチニブを予備投与し、そしてM-CSFにより刺激した。免疫プロッティング及びRPPアレイによる分析のために溶解物を作成した。図5A及び5Bの免疫プロットはイマチニブがc-FmsのM-CSF誘導ホスホリル化を抑制したが、総c-Fmsのレベルは全試料において同様であったことを示している(図5A)。下流のシグナリング分子Akt(Ser473)もまた図5Bに示す通りイマチニブを予備投与されたマクロファージにおいて低減されたホスホリル化を示している。M-CSF刺激マクロファージ溶解物のRPPアレイ分析(図5C)はイマチニブがMAPKファミリー及びAkt(Ser473及びThr308)、ERK、STAT3、JNK、P79S6K及びp38を包含するc-Fmsの下流の他の経路における蛋白チロシンキナーゼのホスホリル化をブロックしたことを示している。免疫プロット及びRPPアレイデータはイマチニブがc-Fmsを介したM-CSF誘導マクロファージ活性化を強力に抑制することを示している。

【0073】

これらの結果はTNFを生産することが知られているプロセスであるマクロファージへの単球の分化を抑制することが、慢性関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、クローン病、強直性脊椎炎、及び全身性エリテマトーデス(SLE)のような炎症性疾患をモジュレート、治療、又は防止するために使用できることを示唆している。破骨細胞への単球の分化のイマチニブ媒介抑制もまた、RA、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、及び他の炎症性の関節炎における破骨細胞媒介骨破壊を防止すると考えられる。

【0074】

D. B細胞及びT細胞のTKが関与する疾患を治療するためのイマチニブ

イマチニブは又、B細胞において発現されるc-Ab1及びT細胞において発現されるLckを抑制し、そしてこれにより、慢性関節リウマチのような疾患における適応自己免疫応答を減衰させることができる。慢性関節リウマチにおける抗シトルリン抗体の存在、関節炎のげっ歯類モデルにおける破壊的関節炎への抗シトルリン抗体の寄与、及び抗CD20療法の薬効は全て、慢性関節リウマチの病因におけるB細胞の重要な役割を示唆して

10

20

30

40

50

いる (Firestein, G. S., Nature 423:356-361 (2003); Kuhn, K. A. 等、J. Clinical Investigation)。

【0075】

本発明の試験において、抗滑膜B細胞応答のエピトープ拡張はイマチニブ投与CIAマウスにおいて低減されている(実施例5及び図6A~6E)。この相違はc-Ab1に対するイマチニブの作用であった可能性がある。c-Ab1はB細胞抗原受容体(BCR)の刺激後にB細胞表面上でCD19をホスホリル化して共局在化し、そしてc-Ab1不全マウスは欠損性のBCRシグナリングを有する(Zipfel, P. A. 等、J Immunol 165:6872-6879, (2000))。イマチニブはマイクロモル未満の濃度でc-Ab1キナーゼ活性をブロックするため(Buchdunger, 2001; Dewar, 2005; Fabian, 2005)、イマチニブがBCRシグナリングを抑制することによりCIAにおける自己反応性B細胞応答の拡大を低減する可能性がある。

10

【0076】

RAにおける自己反応性T細胞の役割はリウマチ様の滑膜炎におけるT細胞浸潤の存在、RAとの共有エピトープHLA-DR4多形の関連、及びCTLA4-Igの薬効により裏付けられている(Firestein, 2003; Genovese, M. C. 等、N Engl J Med 353:1114-1123 (2005))。インビトロ試験はイマチニブがTCR-関連チロシンキナーゼLckの抑制を介してT細胞の活性化を減衰させることを示唆している(Dietz, A. B. 等、Blood 104:1094-1099 (2004))。本明細書に記載したインビトロの試験(実施例6)は試験した最高濃度である10 μ Mにおいて抗CIA T細胞の増殖をイマチニブが抑制したことを示している。

20

【0077】

E. Fms及びPDGFRの関与する疾患を治療するためのGW2580

別の実施形態においてFmsに対して高度に強力であり、そしてPDGFRも抑制する小分子チロシンキナーゼ阻害剤はRAに関するコラーゲン誘導関節炎(CIA)モデルを治療する場合に薬効を呈する。図12に示し、そして実施例9において説明したデータはFms及びPDGFR阻害剤であるGW2580は樹立されたコラーゲン誘導関節炎を治療することを示している。更に又、この阻害剤はTNF及び他のプロ炎症性サイトカインを生産することができるマクロファージへの単球の分化をブロックすることが明らかにされている。免疫組織化学実験はFms及びPDGFRが滑膜管壁において高レベルで、そしてRA患者から誘導した滑膜のより深部において中等度のレベルで発現されることを示している(図14及び実施例11)。GW2580は又、CIA及びRAにおいて骨を代謝して破壊する破骨細胞のFms媒介分化および活性化を抑制することによっても利益を与えると考えられる。PDGFRのGW2580の抑制は又、侵襲性のパンヌス組織を形成する滑膜線維芽細胞の増殖を抑制することによりCIAにおけるその薬効に寄与していると考えられる。

30

【0078】

F. PDGFR、FGFR及びKitの関与する疾患を治療するためのCGP5371

6

更に別の実施形態において、PDGFR、FGFR及びKitを抑制する小分子チロシンキナーゼ阻害剤はRAの誘導の防止において薬効を与える。図13に示し、そして実施例10において説明する通り、PDGFR、FGFR及びKit阻害剤であるCGP53716はマウスがCIAを発症することを防止している。PDGFR及びFGFRは滑膜線維芽細胞の増殖を媒介し、そしてCGP53716は隣接する軟骨及び軟組織を侵襲するパンヌス組織を形成する滑膜管壁線維芽細胞の過形成を防止することにより利益を与えると考えられる。更に又、Kitを抑制することにより、CGP53716は肥満細胞活性化及び炎症メディエーターの放出をブロックする。免疫組織化学的検討によれば、PDGFR及びFGFRは両方ともRAを有する患者から誘導した滑膜において発現さ

40

50

れる（図14及び実施例11）。

【0079】

G. 多発性硬化症を治療するためのイマチニブ

本発明の組成物及び方法を使用しながら実施した別の実験において、別の例示される炎症性の状態である実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）を治療及び/又は防止するイマチニブの能力を評価した。EAEは多発性硬化症（MS）に関する広範に使用されている動物モデルである。

【0080】

EAEマウスに1日2回イマチニブを投与し、そして疾患の重症度を実施例8に記載した標準的採点システムを用いて測定した。結果を図10に示す。イマチニブを投与した動物は対照マウスと比較してEAEの遅延した発症及び低減された重症度を示した。イマチニブは(i)マクロファージへのFms媒介単球分化を抑制すること；(ii)Kit媒介肥満細胞炎症メディエーター放出を抑制すること；(iii)T及びB細胞の機能をそれぞれLck及びAb1を介して抑制すること；(iv)PDGFR及びAb1により媒介されると考えられる神経膠症を抑制すること；及び/又は(v)これらの作用の組み合わせにより有益な治療効果を与えている。多数のチロシンキナーゼの同時阻害は本発明の組成物及び方法の作用機序のために重要であると考えられる。

10

【0081】

H. 全身性硬化症を治療するためのイマチニブ

全身性硬化症（SSc、硬皮症）の病因には線維症、血管症、炎症及び自己免疫が関与している。SScにおける前線維性の経路の活性化にはサイトカイン形質転換成長因子（TGF）-ベータ（TGF-β）及び血小板誘導成長因子（PDGF）の過剰発現が関与している。PDGF受容体はSScを有する患者の皮膚及び気管支肺胞洗浄液においてアップレギュレートされ、そして、活性化された場合には、線維芽細胞及び筋線維芽細胞の増殖をもたらす（Yamakage, A.等（1992）J. Exp. Med. 175: 1227-1234；Ludwicka, A.等（1995）J. Rheumatology 22: 1876-83）。更に又、PDGFRは単球化学誘引物質蛋白1（MCP-1）の生産を刺激することを介して、SScにおける炎症応答の開始における関与が示唆されている（Distler, O.等（2001）、Arthritis Rheum. 44: 2665-78）。最近の報告は、SSc患者が疾患の血管症及び線維症の特徴と合致して、反応性酸素物質種の生産及びI型コラーゲンの発現を刺激するPDGFRに対抗する自己抗体を有することを示している（Baroni, S.（2006）N. Engl. J. Med. 354: 2667-76）。

20

30

【0082】

TGF-βシグナリングは全身性硬化症における重要な前線維性の経路である（Distler, J.等、Arthritis Rheum 56: 311-333（2007））。線維芽細胞におけるTGF-β刺激はc-Ab1を介してシグナルされ（Wang, S.等、FASEB J 19: 1-11（2005））、そしてAb1を介したシグナリングは恐らくは全身性硬化症における皮膚、肺、腎臓及び他の臓器の線維症に多大に寄与していると考えられる。

40

【0083】

早期のびまん性のSScを有する患者はイマチニブメシレート（GleevecTM、Novartis、East Hanover, New Jersey）療法による治療に応答した自身の疾患の皮膚、肺、及び筋肉骨格における病態の改善を経験している（実施例15及び図18A、C、E（治療前）、及び18B、D、F（治療後））。イマチニブは(i)皮膚、肺及び他の組織のPDGFR及び/又はAb1媒介増殖を抑制すること；(ii)マクロファージへのFms媒介単球分化及びTNF-αを生産するためのマクロファージのプライミングを抑制すること；(iii)Kit媒介肥満細胞炎症メディエーター放出を抑制すること；(iv)T及びB細胞の機能をそれぞれLck及びAb1を介して抑制すること；及び/又は(v)これらの作用の組み合わせにより有益な治療効果

50

を与えている。多数のチロシンキナーゼ及びそれらが媒介する病原性の細胞応答の同時阻害も全身性硬化症を治療する場合のイマチニブの薬効のために重要である。

【0084】

G. 結論

上記に基づけばイマチニブ、GW2580、SU9518、PD166326、及びCGP53716により例示されるチロシンキナーゼ阻害剤の投与は多くの炎症性疾患を有する患者の防止及び治療を意図していることがわかる。

【0085】

1つの実施形態において、疾患は重度のRA、特にメトトレキサート、TNF拮抗剤、又は他の疾患変更抗リウマチ薬による治療に対して難治性のRAである。本明細書に記載した試験において、イマチニブはCIAを効果的に治療し、そして慢性関節リウマチにおける病原性細胞応答を駆動する多数のシグナルトランスダクション経路を抑制している。他の実施形態においては、炎症性疾患は自己免疫疾患、例えば限定しないが、乾癬、乾癬性関節炎、腎炎、糸球体腎炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患、全身エリテマトーデス、自己免疫性糖尿病、硬皮症、クローン病等である。

10

【0086】

マクロファージ成熟化及びTNF生産、肥満細胞活性化及びTNF放出、及び自己反応性B及びTリンパ球の活性化のイマチニブ媒介抑制は多くの自己免疫疾患において治療上の利益を与えるが、PDGFR及びAb1を抑制するイマチニブの能力のために特にそれは慢性関節リウマチ、硬皮症及び病因に線維症のプロセスが役割を果たしている他の疾患の治療のために適するものとなっている。

20

【0087】

理論に制約されないが、本発明の組成物及び方法は炎症性疾患の病因に關与している特定のTKを阻害することにより有益な作用をもたらすと考えられる。そのようなTKは炎症応答に直接關与、及び/又は炎症に対する宿主細胞の応答に關与していると考えられる。

【0088】

自己免疫及び炎症応答に直接關与しているチロシンキナーゼの例は(i)c-Fms媒介単球突然変異及びマクロファージプライミングによるTNFの生産；(ii)c-Kit媒介肥満細胞活性化及びプロ炎症メディエーター放出；及び(iii)Ab1及びLck媒介リンパ球活性化を包含する。これらのキナーゼは臓器、組織又は細胞の傷害又は炎症を誘発する自己免疫性又は炎症性の応答に直接寄与している。

30

【0089】

宿主細胞応答の場合、自己免疫性及び他の炎症性の疾患の臨床上的表現型に寄与する炎症及び組織傷害に対する異常な宿主細胞応答が多種存在する。そのような宿主細胞応答には、RAにおけるパンヌス形成又は硬皮症における皮膚の堅固化において観察されるようなPDGFR媒介、FGFR媒介、及びAb1媒介の線維芽細胞増殖が包含される。線維症様の応答を包含する場合がある調節不全の宿主細胞応答は多くの他の自己免疫性及び炎症性の疾患、例えば損傷を受けた白質において神経膠症が生じる多発性硬化症；損傷を受けた糸球体において糸球体硬化症が生じる全身エリテマトーデス；顕著な肝臓及び短観の線維症が観察される自己免疫性の肝炎及び原発性胆汁性肝硬変；肺の線維症を特徴とする特発性肺線維症；及び腸壁及び腸間膜の線維症が生じるクローン病において観察される。

40

【0090】

高度に選択的なチロシンキナーゼ阻害剤のほかに、炎症性疾患の病因に關与するキナーゼの選択されたサブセットを阻害するチロシンキナーゼ阻害剤がより顕著な利益をもたらすことになると期待される。

【0091】

自己免疫性及び炎症性の疾患の病因に關与する多数のチロシンキナーゼを阻害する阻害剤の例は、Fms、Kt、PDGFR、PDGFR、及びAb1を抑制するイマチニブ；PDGFR、FGFR及びc-Kitを抑制するCGP53716；及びFms及び

50

P D G F R を抑制する G W 2 5 8 0 を包含する。

【 0 0 9 2 】

単一のチロシンキナーゼの阻害は、慢性関節リウマチ、乾癬、クローン病及び他の自己免疫疾患を治療する場合に中程度で限定された薬効を与えるのみである場合があると考えられる。このことはイマチニブ及び他の T K 阻害剤が作用する個々のチロシンキナーゼ（又は他の同族体リガンド）における遺伝子不全は中程度に自己免疫性関節炎を低減するのみであるという観察結果により裏付けられる。例えば、欠損性 c - K i t シグナリングを示す C 5 7 B L / 6 - K i t ^{W - s h / W - s h} (W s h) マウスは関節炎の重症度において軽度の低減を示すのみである（図 1 7）。更に又、C 5 7 B L / 6 x C 3 H e B / F e J バックグラウンド上の骨粗鬆症（o p / o p）マウスは F m s - リガンド M - C S F に関して不全であり、そして自己免疫性関節炎に対して中程度の抵抗性を示すのみである（C a m p b e l l , I 等、J L e u k B i o l 6 8 : 1 4 4 - 1 5 0 (2 0 0 0)）。これらのデータは自己免疫性関節炎に対抗してマウスを完全に保護するには c - K i t オア F m s - リガンド M - C S F における遺伝子的突然変異は不十分であること、そしてこのため、個々のチロシンキナーゼの阻害も同様に自己免疫性関節炎及び他の自己免疫疾患を治療するには不十分となることを示唆している。

10

【 0 0 9 3 】

単一のチロシンキナーゼの阻害が慢性関節リウマチ、乾癬、クローン病及び他の自己免疫疾患を治療する場合に中程度で限定された薬効を与えるのみであるという可能性は、薬物の組み合わせがこれらの自己免疫疾患を十分治療するためには必要となることが頻繁である現在の臨床慣行における観察結果によっても裏付けられる。R A の場合、ヒドロキシコロキンがメトトレキセートと組み合わせて頻繁に使用されている。抗 T N F 剤（アダリムマブ、エタネルセプト又はインフリキシマブ）は患者がメトトレキセートと組み合わせたヒドロキシコロキンに十分応答しない場合に追加される。同様の複合療法の方策が他の疾患を治療するために使用されている。例えば、クローン病においてはスルファサラジン及び抗 T N F 剤が頻繁に組み合わせて使用されている。S L E 及び他のリウマチ疾患においては、プレドニゾンがイムラン、シトキサン又はミコフェノレートモフェチルと組み合わせて使用されている。本明細書に記載した結果と組み合わせた従来療法に関連する上記観察結果に部分的に基づけば、病因に關与する多数のチロシンキナーゼを阻害する化合物は多大な臨床薬効を与えることが期待される。

20

30

【 0 0 9 4 】

チロシンキナーゼの A T P 結合部位の間で共有されている構造的特徴に基づけば、A T P 結合部位と直接相互作用する多くの小分子チロシンキナーゼ阻害剤は数種のチロシンキナーゼを交差阻害すると考えられる（表 1）。その結果、最も適切な阻害プロファイルを有する小分子チロシンキナーゼ阻害剤を特定のチロシンキナーゼの異常な発現又は活性を特徴とする疾患の治療のために選択できる。理想的にはそのようなチロシンキナーゼ阻害剤は該当する、そして病因駆動のキナーゼを交差阻害する単一の活性化化合物である。

【 0 0 9 5 】

例示される阻害剤はイマチニブ（c - F m s、c - K i t、P D G F R、P D G F R、及び A b l を抑制する）、S U 9 5 1 8（P D G F R 及び F G F R を抑制）、G W 2 5 8 0（F m s 及び P D G F R を抑制）、C G P 5 3 7 1 6（P D G F R、F G F R 及び K i t を抑制）及び P D 1 6 6 3 2 6（K i t 及び A b l を抑制）である。これらの化合物の構造を図 1 9 に示す。これらの化合物に関する更に別の情報は表 5 に示す。

40

【 0 0 9 6 】

図 2 0 は小分子イチロシンキナーゼ阻害剤を阻害することが知られており、本発明の組成物及び方法において機能すると考えられる追加的化合物の構造を示す。これらの化合物に関する更に別の情報は表 6 及び 7 に示す。

【 0 0 9 7 】

ヒト自己免疫疾患を治療又は防止する場合に薬効をもたらすと考えられる追加的なチロシンキナーゼ阻害剤は例えば下記：

50

(i) 特定の自己免疫性又は他の炎症性疾患の病因に關与しているチロシンキナーゼ 1 つ、好ましくは少なくとも 2 つを阻害することが明らかにされているチロシンキナーゼ阻害剤化合物の合理的選択、及び、

(i i) 自己免疫性又は他の炎症性疾患に該当するげっ歯類モデルにおける樹立された疾患をチロシンキナーゼ阻害剤化合物が治療できることを明らかにすること、により発見することができる。

【 0 0 9 8 】

ヒト炎症性疾患を媒介することが分かっている機序は特定の自己免疫性又は他の炎症性疾患において薬効を与えると考えらエルチロシンキナーゼ阻害剤の選択の指針となり参考となりえるものであり、例えば下記の例、即ち：

(i) 慢性関節リウマチ、乾癬及びクローン病における T N F の顕著な役割を知るとは、(a) T N F 産生マクロファージへの単球細胞の分化を抑制する F m s 阻害剤及び他の阻害剤（例えば図 1 2 参照）、及び(b) 肥満細胞生産及び T N F 及び他のプロ炎症メディエーターの放出（例えば図 4 参照）をブロックする K i t 阻害剤は特定の疾患を治療する場合に有効であると考えられることを示唆しており；

(i i) 臨床表現型における線維芽細胞増殖又は線維症様宿主細胞応答の顕著な役割を知ることであって、そのような線維症様の応答は R A（線維芽細胞様滑膜細胞の増殖による侵襲性のパヌスの形成、図 8 参照）、硬皮症（皮膚線維芽細胞の増殖による堅固な皮膚の形成）、特発性肺線維症（肺機能不全を誘発する線維症）、クローン病（腸の線維症が症状に寄与）、多発性硬化症（神経膠症及び損傷白質の瘢痕形成を特徴とする）、及び全身狼瘡（糸球体硬化症及び腎臓の瘢痕形成が起こる）において観察され、そして P D G F R、F G F R 及び A b l 阻害剤が特定の疾患を治療する場合に有効であることを示唆しており；及び(i i i) 炎症性疾患における自己免疫性の B 及び T 細胞の關与を知るとは、それぞれ B 及び T 細胞を媒介する A b l 及び L c k 阻害剤は特定の疾患を治療する場合に有効であること（例えば図 6 及び 7 参照）が挙げられる。

【 0 0 9 9 】

同様に、例示されるチロシンキナーゼ標的は P D G F R、F G F R、F m s、K i t 及び A b l であるが、他のチロシンキナーゼをターゲティングすることが望ましい場合もある。当業者の知る通り、活性化化合物は本明細書に記載したキナーゼ阻害を媒介する活性化薬物、前薬剤（存在する場合）、又は活性化代謝産物（存在する場合）であってよい。或いは、各々が病因に關与するチロシンキナーゼに特異的な数種の T K 阻害剤を組み合わせることで投与できる。

【 0 1 0 0 】

I V . 送達及び製剤

C M L、G I S T 及び他の悪性疾患を治療するために必要なチロシンキナーゼ阻害剤の用量と比較して、自己免疫疾患においてはより低用量のイマチニブ及び他の小分子チロシンキナーゼ阻害剤が利益を与える場合がある。C M L 及び G I S T は A b l 及び K i t における一次突然変異から生じ、そしてこのため、悪性細胞の増殖を抑制するためには比較的高用量のイマチニブを必要とする。これとは対照的に、炎症性疾患は一般的にこれらのキナーゼにおける突然変異とは一般的に關連しておらず、そして野生型キナーゼが炎症、組織傷害、及び異常な宿主細胞応答を媒介する調節不全の細胞応答に關与している。野生型キナーゼに対するイマチニブ及び他のチロシンキナーゼ阻害剤の I C ₅₀ は悪性疾患に關連する突然変異したキナーゼのものよりも低値であり、そしてより低用量の投薬用法が自己免疫性及び他の炎症性の疾患において利益を与える場合があることが期待される。

【 0 1 0 1 】

イマチニブ、G W 2 5 8 0、S U 9 5 1 8、P D 1 6 6 3 2 6、C G P 5 3 7 1 6、又は他のチロシンキナーゼ阻害剤の用量は、当該分野で知られた手段、例えば限定しないが、治療すべき疾患、疾患の重症度、及び患者の状態に応じて担当の医療従事者により選択される。1 つの実施形態において、イマチニブは少なくとも 1 日 1 回、より好ましくは少なくとも 1 日 2 回投与される。1 日当たり 2 0 0 m g 1 回、より好ましくは 1 日当たり 4

10

20

30

40

50

00mg 1回、更には1日当たり600mg 1回が意図される。1つの実施形態において、RAのような特定の炎症性疾患の治療のためのイマチニブの用量は、現在認可されている用量よりも低値の用量において投与される。特に、100mg/日以下、50mg/日以下、又は25mg/日以下の用量が考えられる。

【0102】

毎日より少ない投与、例えば1日おき、又は週に数回の投与もまた意図される。更に又、イマチニブ又は他のチロシンキナーゼ阻害剤を用いた療法の間欠的日程、例えば1週間投与、次に1週間休薬、又は1週間投与、次に3週間休薬、又は疾患が再燃している期間のみの投与も意図される。

【0103】

好ましい実施形態においては、チロシンキナーゼ阻害剤は経口投与される。経口投与のための固体剤型はカプセル、錠剤、丸薬、粉末、及び顆粒を包含する。そのような固体剤型において、活性化合物は少なくとも1つの不活性の製薬上許容しうる賦形剤又は担体、例えばクエン酸ナトリウム又はリン酸2カルシウム、及び/又は(a)充填剤又は膨張剤、例えば澱粉、乳糖、スクロース、グルコース、マンニトール、及びケイ酸、(b)結合剤、例えばカルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、及びアカシア、(c)湿潤剤、例えばグリセロール、(d)錠剤崩壊剤、例えば寒天、炭酸カルシウム、パレイショ又はタピオカの澱粉、アルギン酸、特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウム、(e)溶解遅延剤、例えばパラフィン、(f)吸収加速剤、例えば第4アンモニウム化合物、(g)水和剤、例えばセチルアルコール及びグリセロールモノステアレート、(h)吸収剤、例えばカオリン及びベントナイト粘土、及び(i)潤滑剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、及びこれらの混合物と混合される。カプセル、錠剤及び丸薬の場合は、剤型は又緩衝剤を含んでよい。

【0104】

同様の型の固体組成物は又、乳糖又はミルクシュガー並びに高分子量ポリエチレングリコール等のような賦形剤を用いたソフト及びハード充填ゼラチンカプセルにおける充填剤としても使用してよい。

【0105】

錠剤、ドラジェ剤、カプセル、丸薬、及び顆粒の固体剤型はコーティング及びシェル、例えば腸溶性コーティング及び医薬品製剤分野でよく知られた他のコーティングと共に製造してよい。それらは場合により不透明化剤を含有してよく、そして活性成分のみを、又はそれを優先的に、腸管の特定部位において、場合により遅延化された態様において、放出するような組成物であることができる。使用できる包埋用組成物の例は、重合体物質及びワックスを包含する。活性化合物は又適切には上記賦形剤1つ以上を用いたマイクロカプセル形態において存在できる。

【0106】

経口投与用の液体剤型は製薬上許容しうる乳液、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルを包含する。活性化合物に加えて液体剤型は当該分野で一般的に使用されている不活性希釈剤、例えば水又は他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムミド、油脂類(特に綿実油、ピーナツ油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、及びゴマ油)、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、及びこれらの混合物を含有してよい。

【0107】

不活性希釈剤の他に、経口用組成物は補助剤、例えば水和剤、乳化及び懸濁剤、甘味料、フレーバー、及び香料を含むことができる。懸濁液は活性化合物の他に、懸濁剤、例えばエトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天、及び

10

20

30

40

50

トラガカント、及びこれらの混合物を含有してよい。

【0108】

上記から、本発明の組成物方法の種々の追加的な特徴及び実施形態が明らかになるはずである。以下の実施例は組成物及び方法を説明するために提示するものであり、限定を意図していない。

【実施例】

【0109】

V. 実施例

以下の実施例は本質的に説明であって、限定を全く意図しない。

【0110】

方法

A. 細胞系統及び抗体。マウス肥満細胞系統 C1. MC / 57. 1 は Dr. S. Galli (Young, J. D. 等、Proc Natl Acad Sci USA 84 : 9175 - 9179 (1987); Tsai, M. 等、FASEB J. 10 : A1253 (1996)) により提供された。抗体の原料：抗 c-Fms 及び PDGFR (Santa Cruz Biotechnology); 抗 アクチン (Sigma) 及び他の抗体 (Cell Signaling Technology)。

【0111】

B. 動物。6 ~ 8 週齢の雄性 DBA / 1 マウス (Jackson Laboratory) は Stanford University Committee of Animal Research により認可されたプロトコルにおいて、そして National Institutes of Health (NIH) のガイドラインに従って使用した。CIA に対して特異的な TCR を発現するマウスは Dr. W. Ladiges (University of Washington) (Osman, G. E. 等、Int Immunol 10 : 1613 - 1622 (1998)) により提供された。C57 バックグラウンド上の Wsh マウス及び野生型の C57 マウスは Dr. S. Galli (Stanford University) により提供された。

【0112】

C. ヒト RA 滑液及び組織の試料。ヒト滑液及び組織の試料は Stanford University Institutional Review Board 認可プロトコルの下、そして American College of Rheumatology の改定基準に基づいた RA 診断を有する患者のインフォームドコンセントが提出された後に収集した。

【0113】

D. コラーゲン誘導関節炎試験。DBA / 1 マウスにおける CIA を誘導し、そして文献記載の通り採点した (Coligan, J. E. 等、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Hoboken, New Jersey, John Wiley and Sons, Inc. 15. 15. 11 - 15. 15. 24 (1994))。イマチニブの錠剤 (Stanford Hospital Central Pharmacy より購入) を粉碎し、PBS 中に希釈し、33 mg / kg または 100 mg / kg を胃管栄養法により 1 日 2 回、防止実験では CIA 誘導の前日から、そして投与実験では臨床関節炎発症後に送達した。CGP 53716 は Dr. Darren Veach (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) により合成され、提供された。GW2580 は Calbiochem (Catalog # 344036) より購入した。

【0114】

E. 組織病理学的試験。後肢を固定し、CalExII (Fischer Scientific) で脱カルシウム処理し、パラフィン包埋し、そして H & E 染色切片を、滑膜炎、パンヌス、及び骨及び / 又は軟骨の破壊に関して採点した (Deng, G. M. 等、Nat Med 11 : 1066 - 1072 (2005))。

10

20

30

40

50

【0115】

F. RA滑膜細胞の単離及び刺激。RA滑液単核細胞をFicoll-Hypaque密度購買を用いて単離し、プラスチックへの接着により選択し、そして48時間100ng/mlのLPSで刺激した。RA線維芽細胞様滑膜細胞は膝関節形成術において得られたレムナントパヌスから単離した。パヌスを粉碎し、37℃で75分間1mg/mlのコラゲナーゼI、0.1mg/mlのDNase、及び0.015mg/mlのヒアルロニダーゼで消化し、RPMI中に成長させ、そして4~8継代の後、コンフルエントまで成長させ、そして10分間25ng/mlのPDGF-BB(Sigma)で刺激した。

【0116】

G. 肥満細胞刺激。免疫プロッティング分析のため、C1.MC/57.1肥満細胞を6~8時間血清枯渇させ、2時間イマチニブと共に予備インキュベートし、そして10分間100ng/mlの幹細胞因子(SCF、Peprotech)で刺激し、そして溶解物を作成した。サイトカイン分析のため、C1.MC/57.1細胞をイマチニブと共に予備インキュベートし、100ng/mlのSCFで96時間刺激し、そして上澄みをサイトカイン分析用に採取した。

10

【0117】

H. マクロファージの単離及び刺激。レジデントの腹膜マクロファージは、DBA/1マウスから、腹腔内注射及びRPMI培地からの5~7mlの採取により単離し、接着したマクロファージを一夜培養し、イマチニブを2時間予備投与し、100ng/mlのM-CSF(Chemicon International)で10分間刺激し、そして溶解物を作成した。形態学的検討のため、マクロファージを72時間100ng/mlのM-CSF及びイマチニブの存在下又は非存在下に刺激した。

20

【0118】

I. B細胞の単離及び刺激。B細胞をナイーブのDBA/1マウス脾臓からMACSビーズの陰性選択により単離した(Miltenyi Biotec)。B細胞はB細胞マーカーCD19による染色及びフローサイトメトリーによる分析により純粋であることがわかった。単離されたB細胞をμ-特異的抗IgM(αb')₂(50μg/ml; MP Biomedicals)又はLPS(5μg/ml; Sigma-Aldrich)で72時間刺激した。B細胞の増殖を計測するために、B細胞を1μCi [³H]チミジン(ICN Pharmaceuticals)で刺激の最後18時間パルス処理し、そしてベータプレートシンチレーションカウンター(Perkin Elmer)を用いて取り込まれた放射能を定量した。

30

【0119】

J. T細胞刺激。抗CIITCRトランスジェニックマウスに由来する脾細胞を0~40μg/mlのCII(Chondrex)で72時間刺激し、そして[³H]TdR(ICN Pharmaceuticals)を培養の最後18時間添加し;上澄み中のサイトカインを分析した。

【0120】

K. 免疫プロッティング。溶解物は刺激した腹膜マクロファージ、C1.MC/57.1肥満細胞、又は線維芽細胞様滑膜細胞から作成した(溶解緩衝液:1%NP-40、0.1%SDS、0.5%SDS、10mMEDTA、Haltプロテアーゼ阻害剤カクテル(Pierce)及びホスファターゼ阻害剤カクテル2(Sigma))。溶解物は7.5%SDS-PAGEゲル(Bio-Rad)上で分離し、PVDF膜に転移させ、一次及び二次抗体でプローブし、そしてシグナルをSuperSignal Westピコケミルミネセント基質(Pierce)で検出した。

40

【0121】

L. 逆相蛋白溶解物アレイ。C1.MC/57.1肥満細胞を6時間血清枯渇させ、刺激し、そして等容量の2X溶解緩衝液(100mMTris-HClpH6.8、10mMEDTA、4%SDS、10%グリセロール、2%2-メルカプトエタノール、2%ホ

50

スファターゼ阻害剤カクテル2 (Sigma)、及びプロテアーゼ阻害剤カクテル (Pierce)) 中で溶解した。刺激された腹膜マクロファージ及び線維芽細胞様滑膜細胞を上記した通り溶解した。以前に報告されている通り (Chan, S. M. 等、Nat Med 10:1390-1396 (2004))、溶解物をFASTスライド (Schleicher & Schuell) 上に印刷し、アレイをホスホ特異的抗体、次にセイヨウワサビパーオキシダーゼコンジュゲート抗ウサギIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch)、次にBio-Rad増幅試薬及びOpti-4CN基質 (Bio-Rad) でプローブし、結合したビオチンをCy3-ストレプトアビジンで検出し、スライドをGenePix 4000Bマイクロアレイスキャナー (Molecular Devices) でスキャンし、そしてフィーチャー蛍光強度をGenePix 5.0 Proを用いて定量した。提示した値 (図4G及び図5C) は未刺激細胞におけるレベルに対して規格化した抗蛋白チロシンキナーゼ抗体シグナル (Cy3) を示す。

10

【0122】

M. 滑膜アレイ分析。報告されている通り (Robinson, W. H. 等、Nat Med 8:295-301 (2002); Hueber, W. 等、Arthritis Rheum 52:2645-2655 (2005))、自己抗原を提示する500+ペプチド及び蛋白をSuperEpoxyスライド (TeleChem) 上に印刷し、アレイを1:150希釈のマウス血清、次いでCy3標識抗マウスIgG/M抗体 (Jackson ImmunoResearch) と共にインキュベートし、そしてGenePix 4000Bスキャナーを用いてスキャンした。各抗原につきメジアンの特徴から計算した。

20

【0123】

N. インビトロク-c-Kitホスホリル化試験。組み換えc-Kitを種々の濃度の小分子阻害剤と共に予備インキュベートし、ATP及び基質を添加することによりホスホリル化反応を開始させ、30分後に反応を停止し、抗ホスホチロシン染色を実施することによりホスホc-Kitを検出し、そして時間分解蛍光を使用することによりc-Kitホスホリル化を定量した (HTScan-c-Kitキナーゼ試験、Cell Signaling)。

【0124】

O. 慢性関節リウマチ滑膜の免疫組織化学的検討。膝置換時に慢性RAを有する患者から得た滑膜を固定し、パラフィン包埋し、そして切片をそれぞれc-Fms、PDGFR、及びPDGFR、又は相当するアイソタイプ対照抗体に特異的なモノクローナル又はポリクローナル抗体で染色し、その後HRP系の検出に付した (Vector Labs)。

30

【0125】

P. 肥満細胞、線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS)、及びヒトRA滑膜組織から誘導した滑膜マクロファージ集団のフローサイトメトリーによる同定。レムナントヒト膝滑膜を関節形成術時にRA患者から入手し、そして単細胞懸濁液をIV型コラゲナーゼによる酵素的消化により作成した。得られた細胞懸濁液を、造血細胞 (CD45)、FLS (CD90)、肥満細胞 (c-Kit)、及び滑膜マクロファージ (CD14) の細胞表面マーカーに対して特異的な蛍光色素コンジュゲート抗体で染色し、アイソタイプマッチの対照及び抗MHCクラスI抗体で同時平行に染色した。表示したプロットはMHCクラスI陽性細胞集団を示す。

40

【0126】

Q. サイトカイン分析。サイトカイン分析はBeadlyte (登録商標) ヒト又はマウスマルチサイトカイン検出システム (Chemicon International) 及びLuminex 100システム (Luminex Corporation) を用いて実施した。

【0127】

R. 統計学的分析。目視による関節炎評点、足底厚み及び組織学的評点をGraphP

50

ad InStatバージョン3.0 (GraphPad) を用いながら Mann-Whitney の U 検定により比較した。CIA における差を Excel (Microsoft) 用の Analyse-it プラグイン (Analyse-it ソフトウェア) を用いながら Fisher の検定により調べた。サイトカインレベルの比較は非対 T 検定を用いて実施した (GraphPad)。マイクロアレイ有意性分析 (SAM; Tusher, V. G. 等、Proc Natl Acad Sci USA 98: 5116-5121 (2001)) 及び Cluster and TreeView software (Eisen, M. B. 等、Proc Natl Acad Sci USA 95: 14863-14868 (1998)) を用いてアレイデータを分析してディスプレイした。

【0128】

10

実施例 1: イマチニブによるコラーゲン誘導関節炎の防止

コラーゲン誘導関節炎 (CIA) モデルにおける自己免疫性関節炎は以下の通り評価した; 即ち、CFA 中に乳化したウシ II 型コラーゲン (CII) を DBA/1 マウスに注射し、その後不完全フロイントアジュバント (IFA) 中に乳化した CII で 21 日後にブーストすることにより CIA を誘導した。

【0129】

DBA/1 マウス (Jackson Laboratory) にリン酸塩緩衝食塩水 (n = 15)、33 mg/ml イマチニブ (n = 15)、又は 100 mg/ml イマチニブ (n = 14) を経口で 1 日 2 回、CIA 誘導の前 1 日から、マウス及びヒトに置いえるイマチニブ代謝の公開された薬物動態プロファイルに基づいて投与した (Druker, 2001; Buchdunger, 2001; Wolff, N. C. 等、Clin Cancer Res 10: 3528-3534 (2004))。イマチニブはヒトよりもマウスにおいてより急速に代謝され、そして 100 mg/kg イマチニブのマウスへの 1 日 2 回経口投与はヒトにおける 400 mg 1 日 1 回の中等範囲の用量と同様の薬物動態プロファイルを呈する。マウス及びヒトに関するこの投薬用法は、それぞれ 4.6 ~ 6 µM 及び 1 ~ 1.5 µM の平均のピーク及び定常状態の血漿中レベルをもたらす (Druker, 2001; Wolff, 2004)。

20

【0130】

CIA 防止試験に関しては、イマチニブの経口投与は CIA の誘導前 1 日に開始した。33 又は 100 mg/kg のイマチニブの何れかを投与したマウスは図 1A に示す通り平均の目視による関節炎評点により評価した場合の低減した足底の浮腫、紅斑及び関節の剛性に基づいた CIA の重症度における有意な低減、及び図 1B に示す通りカリパス計測に基づいた低減された平均の足底厚みを示していた (一次免疫化後の第 38 日以降の 33 及び 100 mg/kg の両方に関する Mann-Whitney により $p < 0.01$)。

30

【0131】

実験終了時 (第 49 日) の関節炎発生率及びマウス平均体重も各群において計測し、そして結果を図 1C 及び 1D に示した。イマチニブは又図 1C にも示される通り CIA の発生率を低減している。イマチニブの治療効果は用量依存性の傾向を示した (図 1A ~ 1C)。これらの結果は 3 つの独立した実験の代表例である。図 1D に示される通り、イマチニブを投与されているマウスにおいて顕著な毒性又は体重減少は観察されなかった。

40

【0132】

実施例 2: イマチニブによるコラーゲン誘導関節炎の治療

コラーゲン誘導関節炎 (CIA) モデルにおける樹立された自己免疫性関節炎を治療するイマチニブの能力を以下の通り評価した。樹立された臨床的関節炎を有する DBA/1 (平均の目視評点 4、実施例 1 に記載した CIA モデル) を無作為割り付けし、33 又は 100 mg/kg のイマチニブ又は PBS を投与した。樹立された関節炎の進行は目視採点システム及びカリパス計測に基づく平均足底厚みの両方により評価した。図 2A ~ 2B に示す結果はイマチニブの 33 又は 100 mg/kg の用量レベルの両方とも目視採点システム及びカリパス計測に基づく平均足底厚みの両方により評価した場合に樹立された関節炎の進行を抑制していた (治療開始後 10 日の後に $p < 0.05$; 値は平均 ± SEM)。

50

PBS投与マウスと比較して * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

【0133】

防止(実施例1)及び治療試験においてイマチニブ又はPBSを投与されたCIAを有するマウスから採取した後肢足底に対して組織病理学的分析を実施した。CIA防止試験におけるイマチニブ及びPBS投与マウスに由来するH&E染色関節組織切片の代表的な画像を図3A~3Cに示す。投与群に関して盲検とした検査者による組織病理学的評価によれば、図3D~3Fに示す通りCIA防止試験(滑膜炎及び腐食の評点に関するMann-Whitneyによれば $p < 0.01$ 、パンヌス評点に関しては $p < 0.05$; PBSは $n = 8$ 、イマチニブ33mg/kgは $n = 8$ 、イマチニブ100mg/kgは $n = 8$)及び図3G~3Iに示す通り樹立されたCIAの治療に着目した試験(滑膜炎、パンヌス予備腐食の評点に関しては $p < 0.05$; PBSは $n = 8$ 、イマチニブ33mg/kgは $n = 8$ 、イマチニブ100mg/kgは $n = 8$)の両方において、滑膜炎、パンヌス、及び腐食の評点における統計学的に有意な低減をイマチニブがもたらしめていることが分かる。即ち、イマチニブは臨床的及び組織病理学的な分析に基づけば樹立されたCIAの防止及び治療の両方において有効であった。

10

【0134】

実施例3：肥満細胞のサイトカイン生産及びシグナリングに対するイマチニブの作用

A. 炎症CIA滑膜組織における肥満細胞の存在

CIAを有するマウスから誘導した間接に肥満細胞が存在するという以前の観察結果(Kakizoe, E.等、Inflamm Res 48:318-324(1999))を確認するために、CIA関節の切片をトルイジンブルーで染色した。トルイジンブルーは肥満細胞下流の高度にスルフェート化された酸ムコ多糖類(ヘパリン)成分を染色する異染性の染料である。トルイジンブルー染色により図4Aに示す通り炎症CIA滑膜組織において顕著な数量の肥満細胞が判明した。緊密に炎症したCIA滑膜組織中に存在する肥満細胞は、図4Aにおいて矢印で示す(B=骨、JS=関節空間。元倍率200x)。

20

【0135】

B. イマチニブによるプロ炎症性サイトカインの肥満細胞生産の抑制

クローニングされたマウス肥満細胞系統C1.MC/57.1(Young, D.J.等、Proc Natl Acad Sci USA 84:9175-9179(1987))の活性化に対するイマチニブの作用を以下の通り評価した。C1.MC/57.1肥満細胞は成長因子非依存性の態様において増殖し、そして成長は幹細胞因子(SCF)に依存していないが、C1.MC/57.1肥満細胞はサイトカインを分泌することによりSCFに応答する(Furuta, G.T.等、Blood 92:1055-1061(1998); Tsai, M.等、FASEB J. 10:A1253(1996))。C1.MC/57.1肥満細胞を0~5 μ Mイマチニブの存在下48時間100ng/mL SCFで刺激し、そしてサイトカイン分析をビーズ系サイトカイン試験を用いて培養上澄みに対して実施した。図4B~4Dに示される通りイマチニブは1 μ M及び5 μ MにおいてTNF、GM-CSF、及びIL-6の肥満細胞生産を未刺激細胞集団におけるものと同様のレベルにまで劇的に低減している。値は平均 \pm SEMであり、イマチニブを用いない場合の刺激細胞と比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

30

40

【0136】

C. イマチニブを用いた幹細胞因子による肥満細胞シグナリングの抑制

イマチニブによりモジュレートされるチロシンキナーゼ活性化状態及びシグナルトランスダクション経路を特性化するために、免疫プロット及び逆相蛋白(RPP)溶解物アレイ(Chan, S.M.等、Nat Med 10:1390-1396(2004))分析を実施した。肥満細胞に0~5 μ Mイマチニブを予備投与し、10分間SCFで刺激した。溶解物を免疫プロットング及びRPP溶解物アレイ用に作成した。図4E~4Fからわかるとおり、免疫プロットングはイマチニブがc-KitのSCF誘導ホスホリル化を強力に抑制したことを示しており(図4E)、下流のAkt(Ser473)のホ

50

スホリル化の相当する低減を伴っていた(図4F)。

【0137】

RPPアレイを作成するためにニトロセルロースコーティング顕微鏡スライド上に細胞溶解物を印刷し、その後ホスホ特異的抗体と共にインキュベートし、そして抗体結合の蛍光系検出を行うことによりMAPKファミリー及び他の経路における蛋白チロシンキナーゼの活性化を確認した。図4Gに示す通り、RPPアレイ分析は1及び5 μ MイマチニブがERK、JNK及びp38を包含するMAPK経路のメンバーを包含するc-Kitの下流の多様な蛋白チロシンキナーゼのSCF誘導活性化を抑制したことを明らかにした。イマチニブは又シグナリング分子Akt(Ser473及びThr308)、p70S6K、及びRafのホスホリル化も防止している(図4G)。c-Kit及びAkt(Ser473)のホスホリル化のイマチニブ媒介抑制は免疫プロッティング分析においても観察され(図4E)、これはRPPアレイの結果を確認するものであった。総括すれば、免疫プロッティング及びRPPアレイのデータはイマチニブがMAPK及び肥満細胞活性化及びプロ炎症性サイトカイン生産を媒介する他の経路のSCF誘導活性化を強力に抑制することを明らかにしている。

10

【0138】

肥満細胞は生得及び適応免疫の両方に影響し(Galli, S. J. 等、Nat Immunol 6:135-142, 2005)、リウマチ様滑膜組織に存在し、そしてRAの病因において重要な役割を果たすと考えられる(Woolley, D. E., 2003, N Engl J Med 348:1709-1711; Woolley, D. E. 等、2000, Arthritis Res 2:65-74; Benoit, C. 等、Nature 420:875-878; Lee, D. M. 等、2002, Science 297:1689-1692)。肥満細胞は慢性関節リウマチにおいて過形成滑膜管壁(パンヌス組織として知られている)における全細胞の約5%を構成し、そして肥満細胞は又、乾癬皮膚患部、多発性硬化症脳プラーク、及びクローン病炎症腸組織にも存在する。肥満細胞顆粒は大量のTNF、IL-6、ブラジキニン、及び種々のプロテアーゼ及び他の炎症性及び血管透過性メディエーターを含有する(Juurikivi, A. 等、2005, Ann Rheum Dis 64:1126-1131)。c-Kitは幹細胞因子(SCF)がリガンドとなる受容体チロシンキナーゼである。SCF結合は間瀬におけるc-Kitのホスホリル化及びMAPK経路の下流の活性化を誘導し、TNF、IL-6、及び多くの他の炎症メディエーターの放出及び生産をもたらす。更に又、肥満細胞不全マウスはRAのモデルにおいて重症度が低下した関節炎及び多発性硬化症のモデルにおいて重症度が低下した脱髄を示す。これらのデータを総括すれば、TNF、IL-6、及び血管透過性及び炎症を増進する他のメディエーターの肥満細胞の生産及び放出は慢性関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、乾癬及び種々の他の炎症性及び自己免疫性の状態の病因に寄与していることが示唆される。即ち、肥満細胞の活性化及びプロ炎症性メディエーターの放出のイマチニブ又はc-Kitを抑制する他のチロシンキナーゼ阻害剤による抑制はRA及び他の炎症性疾患において利益を与える。

20

30

【0139】

実施例4：単球系統の細胞の分化及び機能に対するイマチニブの作用

40

受容体チロシンキナーゼFmsを介した結合およびシグナリングを示すM-CSFはRA滑膜組織中に存在し、そしてCIAを悪化させることが分かっている(Campbell, I. K. 等、J Leukoc Biol 68:144-150(2000))。イマチニブがマクロファージにおけるM-CSF媒介シグナルトランスダクションに影響するかどうかを調べるために、免疫プロッティング及びRPPアレイを適用することによりレジデント腹膜マクロファージから作成した溶解物を特性化した。レジデント腹膜マクロファージはDBA/1マウスから単離し、イマチニブを予備投与し、そして100ng/mLのM-CSFで10分間刺激し、そして分析用に溶解物を作成した。免疫プロットによれば1及び5 μ Mのイマチニブはc-FmsのM-CSF誘導ホスホリル化を抑制したが、総c-Fmsのレベルは図5Aに示す通り全ての試料において同様であった。下流

50

のシグナリング分子Akt (Ser 473) もまた図5Bに示す通りイマチニブ予備投与マクロファージにおいて低減されたホスホリル化を示した。

【0140】

M-CSF刺激マクロファージ溶解物のRPPアレイ分析は、図5Cに示す通り、イマチニブがMAPKファミリー及びAkt (Ser 473及びThr 308)、ERK、STAT3、JNK、P79S6K及びp38を包含するc-Fmsの下流の他の経路における蛋白チロシンキナーゼのホスホリル化をブロックしたことを示している。即ち、免疫プロット及びRPPアレイデータはイマチニブがc-Fmsを介したM-CSF誘導マクロファージ活性化を強力に抑制することを示している。

【0141】

図5Dに示す通りプラスチックに付着したRA雄郎滑液単核細胞は72時間単独で培地中で培養した場合には単球の形態を呈した。72時間M-CSFで刺激した後、これらの細胞はマクロファージに分化し、図5Eに示す通り、多極性の突起の伸長、不均質な細胞質の空胞及び封入体を包含する古典的なマクロファージの形態学的特徴を有していた。5 μ Mイマチニブ及びM-CSFと共に同時インキュベートした細胞は、図5Fに示す通り、未刺激の細胞と同様の形態を示した。即ち、イマチニブはマクロファージへのヒトRA患者由来の滑液単球の分化をブロックした。

【0142】

実施例5：B細胞応答に対するイマチニブの作用

A. イマチニブはB細胞増殖及び免疫グロブリン生産を抑制する。

【0143】

DBA/1マウス由来のB細胞を全脾細胞から単離し、その純度を図6Aに示すフローサイトメトリーにより確認した。単離後のB細胞を1~10 μ Mイマチニブの存在下又は非存在下において抗IgM (50 μ g/ml)又はLPS (5 μ g/ml)で72時間刺激した。抗IgMによるB細胞増殖は図5Bに示す通り5 μ M ($p < 0.001$)もの低値のイマチニブ濃度により抑制された。LPS刺激B細胞は図5Cに示す通り用量依存的な態様において低減された増殖を示した (1 μ M以上の濃度で $p < 0.001$)。更に又、図5Dに示す通り、LPS刺激B細胞によるIgM生産は1 μ Mの濃度のイマチニブにより軽度に低減され、そして10 μ Mにおいて最も顕著な低減を示した。

【0144】

B. イマチニブは自己反応性B細胞応答のエピトープ拡張を低減する。

【0145】

PBS ($n = 7$)又は100mg/kgのイマチニブ ($n = 7$)を投与したCIAを有するマウスから誘導した血清自己抗体の滑膜アレイプロファイリングを実施した (第49日)。ロボット式のマイクロアレイを用いてRA及びCIAにおける候補自己抗原を提示する蛋白及びペプチドのスペクトルを含有する滑膜アレイを作成した (Robinson, W.H.等、Nat Med 8:295-301 (2002); Hueber, W.等、Arthritis Rheum 52:2645-2655 (2005))。アレイを1:150希釈血清と共にインキュベートし、自己抗体の結合をCy3-標識抗マウスIgG/Mを用いて検出し、そしてアレイをスキャンして各抗原につきメジアン蛍光を測定した。滑膜アレイ分析によれば、図6Eに示す通り、イマチニブのCIAマウスへのインピボの投与は糖蛋白39 (gp39)、クラスτεリン、ヒストン2B (H2B)、hnRNP B1及びビメンチンを提示するネイティブのエピトープに対する、並びに、フィラギン (cys-フィラギン、cfc8及びCCPcycAla-12)及びクラスτεリンから誘導したシトルリン化エピトープに対する自己反応性B細胞応答の拡大を低減したことを明らかにしている。図6Eにおいて、マイクロアレイの有意性の分析 (SAM)を適用することによりイマチニブ投与マウスと比較してPBS中において統計学的に増大した反応性を有する抗原の特徴を発見した (疑似発見率 (FDR) = 0.06)。クラスター及びツリービューソフトウェアを順次適用し、そしてヒートマップとしてアレイの反応性を標示した。ビヒクル (リン酸塩緩衝食塩水、PBS)投与対照マウス由来の試料は

10

20

30

40

50

ヒートマップの左側にクラスタリングし、そして多数の滑膜蛋白に対する高い抗体反応性を呈したのに対し、イマチニブ投与マウスは右側にクラスタリングし、そして低減された自己抗体力価を呈した。

【0146】

実施例6：T細胞応答に対するイマチニブの作用

C I I ペプチド 257 - 72 に対して特異的なトランスジェニック T C R を発現する T 細胞に対するイマチニブの影響を検討した (O s m a n , G . E . 等、 I n t I m m u n o l 10 : 1613 - 1622 (1998)) 。 C I I 特異的 T C R をコードするトランスジーンを発現するマウスから誘導した脾細胞を 0 ~ 10 μ M イマチニブ存在下に 0 ~ 40 μ g / m L の熱変性全 C I I で刺激した。 ³ H - チミジン取り込みを用いて C I I 特異的 T 細胞の増殖を測定した。 1 μ M 又は 3 . 3 μ M のイマチニブの存在下に刺激した場合、 C I I 特異的 T 細胞は頑健に増殖して熱変性全 C I I となったが、 10 μ M イマチニブ (中程度の範囲のヒト用量により達成される 1 ~ 4 . 6 μ M の血中レベルを超過) (D r u k e r , 2001 : D e m e t r i 2002) は図 7 A に示す通り増殖を強力に抑制した。

10

【0147】

C I I 刺激 (20 μ g / m L) T C R トランスジェニック T 細胞によるプロ炎症性の I F N - γ 及び T N F α の生産の中等度の低減が 3 . 3 μ M イマチニブにおいて観察されたが、治療水準超過の 10 μ M イマチニブは図 7 B ~ 7 D に示す通り免疫調節サイトカイン I F N - γ 、 I L - 4 及び T N F α の生産を更に低減した。 C I I に応答した I L - 2 の抗 C I I T 細胞生産は試験したイマチニブ濃度の何れにおいても有意に低減されなかった (図 7 E) 。 値は平均 \pm S E M である。 イマチニブを用いない場合の刺激細胞と比較して * P < 0 . 05、 * * P < 0 . 01。 これらの実験において T 細胞は生存性であるように観察され、そして 10 μ M のイマチニブはインキュベーション 5 時間 (表 3) 又は 24 時間 (表 4) の後のフローサイトメトリーによれば早期又は後期のアポトーシスマーカーである A n n e x i n V 又はヨウ化プロピジウムをアップレギュレートしなかった。 表 3 は C I I で刺激し、そして次に汎用の T 細胞マーカー C D 3、ヨウ化プロピジウム、及び A n n e x i n V に対する m A b で 5 時間後に染色することによりフローサイトメトリーを用いながら早期のアポトーシス (P I ⁻ A n n e x i n V ⁺) 並びに後期のアポトーシス又は細胞死 (P I ⁺ A n n e x i n V ⁺) を測定した抗 C I I T C R トランスジェニックマウス由来の脾細胞の分析の結果を示している。 表 4 は抗 C D 4 抗体、ヨウ化プロピジウム、及び A n n e x i n V で 24 時間後に染色し、その後フローサイトメトリーを実施した C I I 刺激脾細胞を示す。 表 3 及び 4 に示したデータは、イマチニブ投与が A n n e x i n V (早期アポトーシス細胞のみ染色) 又はヨウ化プロピジウム (死滅細胞を染色) によるこれらの T 細胞の染色を有意に改変しないことをフローサイトメトリーに基づいて示しており、イマチニブがこれらの細胞におけるアポトーシス又は死滅を誘導しないことを明らかにしている。 総括すればこれらのデータはイマチニブが L c k の抑制を介して T 細胞応答を抑制することを示唆している。

20

30

【0148】

【表 3】

表3. 5時間後の抗CIIT細胞のアポトーシス又は死滅をイマチニブは誘発しなかった					
イマチニブ	(μ M)	CII (μ g/ml)	生細胞	早期アポトーシス	後期アポトーシス
			(PI- AnnV-)	(PI- AnnV+)	(PI+ AnnV+)
0	0	0	93.1%	5.6%	1.2%
1	0	0	93.8%	5.2%	0.9%
2.5	0	0	93.3%	5.2%	1.3%
5	0	0	92.0%	7.0%	1.0%
10	0	0	92.7%	6.3%	0.9%
0	10	10	94.0%	5.1%	0.9%
1	10	10	92.7%	6.4%	0.8%
2.5	10	10	91.2%	7.7%	1.0%
5	10	10	90.5%	8.5%	0.9%
10	10	10	91.0%	7.8%	1.1%
0	40	40	94.0%	5.2%	0.7%
1	40	40	92.9%	6.3%	0.7%
2.5	40	40	92.3%	7.0%	0.7%
5	40	40	91.8%	6.9%	1.3%
10	40	40	91.6%	7.3%	0.9%

【 0 1 4 9 】

【表 4】

表4. 24時間後の抗CIIT細胞のアポトーシス又は死滅をイマチニブは誘発しなかった					
イマチニブ	(μ M)	CII (μ g/ml)	生細胞	早期アポトーシス	後期アポトーシス
			(PI- AnnV-)	(PI- AnnV+)	(PI+ AnnV+)
0	0	0	95.0%	4.3%	0.7%
1	0	0	95.5%	3.8%	0.6%
2.5	0	0	94.6%	4.3%	1.0%
5	0	0	93.3%	5.9%	0.8%
10	0	0	92.9%	6.1%	0.9%
0	10	10	96.2%	3.4%	0.4%
1	10	10	96.1%	3.4%	0.5%
2.5	10	10	94.7%	4.7%	0.5%
5	10	10	94.0%	5.3%	0.7%
10	10	10	92.4%	6.6%	0.9%
0	40	40	96.0%	3.2%	0.7%
1	40	40	94.3%	4.6%	1.1%
2.5	40	40	94.2%	4.9%	0.9%
5	40	40	93.6%	5.2%	1.2%
10	40	40	93.7%	6.2%	0.9%

実施例 7 : R A 体外移植組織におけるサイトカイン生産及び線維芽細胞 P D G F R に対するイマチニブの作用

単核細胞を R A 患者から誘導した滑液から単離した。M - C S F は単核細胞成熟は誘導するが T N F 生産は誘導しないため (P i x l e y , F . J . a n d S t a n l e y , E . R . , T r e n d s C e l l B i o l 1 4 : 6 2 8 - 6 3 8 (2 0 0 4))、L P S を用いて滑液単核細胞を刺激することにより R A における原型のプロ炎症性サイトカインである T N F (W o l f , A . M . 等、P r o c N a t l A c a d S c i U S A 1 0 2 : 1 3 6 2 2 - 1 3 6 2 7 (2 0 0 5) ; D e w a r , A . L . 等、I m m u n o l C e l l B i o l 8 3 : 4 8 - 5 6 (2 0 0 5)) を生成した。滑液単核細胞を単離し、0 ~ 8 μ M イマチニブの存在下 4 8 時間 1 0 0 n g / m L の L P S でインビトロで刺激した。単核細胞の上澄みを採取し、ビーズ系のサイトカイン試験を用いて T N F、I L - 1 2 (p 4 0) 及び I L - 1 を定量した。図 8 A ~ 8 C に示す通り、培養上澄みのビーズ系のサイトカイン分析は T N F (図 8 A)、及び、程度はより低くなるが I L - 1 2 (図 8 B) を包含するプロ炎症性サイトカインの生産の低減を示していた。イマチニブは I L - 1 の L P S 誘導生産を抑制せず、イマチニブが滑液単核細胞の生存性に影響しなかったことを示していた (図 8 C))。 (値は平均 \pm S E M であ

10

20

30

40

50

る。イマチニブを用いない場合の刺激細胞と比較して * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

【0150】

線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) を膝関節形成術においてヒト RA 患者から誘導したパ
ンヌスから単離した。培養した FLS を $0 \sim 5 \mu\text{M}$ イマチニブと共に予備インキュベート
し、その後 10 分間 25 ng/ml の PDGF - BB で刺激した。溶解物を形成し、p -
PDGFR 及び全 PDGFR に対する、そして、p - Akt 及び全 Akt に対しする
免疫ブロッティングによりプローブした。図 8 D 及び 8 E に示す通り、イマチニブは 0.5
及び $5 \mu\text{M}$ で PDGFR のホスホリル化、並びに下流のシグナリング分子 Akt を強
力に抑制した。

10

【0151】

NIH - 3T3 線維芽細胞を $0 \sim 8 \mu\text{M}$ 井町の存在下に NIH - 3T3 細胞 (Osman,
1998) の増殖を誘導することが以前に示されている刺激物質である PDGF - B
B 20 ng/ml で刺激し、そして増殖を ^3H - チミジン取り込みにより測定した。増殖
は ^3H - チミジン取り込みにより測定した。図 9 A に示す通り、 $0.25 \mu\text{M}$ もの低値の
イマチニブ濃度でヒト RA 患者から誘導した線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) の PDGF
- BB 誘導増殖が抑制された ($p < 0.01$)。値は平均 \pm SEM である。イマチニブを
用いない場合の刺激細胞と比較して ** $P < 0.01$ 。これらの結果は 4 人の異なる慢性
関節リウマチ患者から誘導された FLS から得られた結果の代表例である。図 9 B に示す
データは抗 CD68 抗体を用いたフローサイトメトリー分析により夾雑マクロファージの
非存在確認している (腹膜細胞 = CD68 が系統マーカーである腹膜マクロファージ)。

20

【0152】

更に又、RA において、滑膜線維芽細胞は血小板誘導成長因子受容体 (PDGFR、P
DGFR 及び PDGFR を総称するもの) を発現し、そして種々の血小板誘導成長因
子 (PDGF) リガンドに应答して増殖する。PDGFR 及びそのリガンドは共に慢性関
節リウマチ滑膜組織において過剰発現され、そして PDGF は滑膜線維芽細胞増殖の強力
な刺激物質である (Cheon, H. 等、Scand J Immunol 60: 455
- 462 (2004); Watanabe, N. 等、Biochem Biophys
Res Commun 294: 1121 - 1129 (2002); Remmers, E
.F. 等、J Rheumatol 18: 7 - 13 (1991))。更に又、マクロフ
ァージは慢性関節リウマチにおける TNF のようなプロ炎症性サイトカインの生産にお
いて中枢的役割を果たしていると考えられている。

30

【0153】

TGF - は重要な前線維性の経路である (Distler, J. 等、Arthritis
Rheum 56: 311 - 333 (2007))。線維芽細胞における TGF -
刺激は c - Abl を介してシグナルされ (Wang, S. 等、FASEB J 19:
1 - 11 (2005))、そして図 9 C は c - Abl のイマチニブ抑制は線維芽細胞増殖
を強力にブロックすることを示している。即ち、イマチニブ及び c - Abl を抑制する他
のチロシンキナーゼ阻害剤は RA における滑膜線維芽細胞 (線維芽細胞様滑膜細胞、FL
S としても知られている) の増殖も抑制すると考えられる。イマチニブ又は他のチロシ
ンキナーゼ阻害剤による PDGFR と Abl の両方の同時抑制は相乗作用して滑膜線維芽細
胞の増殖又は自己免疫疾患における他の異常な細胞応答を抑制すると考えられる。

40

【0154】

線維症様の応答を包含することができる調節不全の応答が多くの自己免疫性及び炎症性
の疾患の病因において生じ、それに寄与しているというかなりの証拠が存在している。多
発性硬化症においては、損傷を受けた白質の区域において反応性の神経膠症 (瘢痕形成)
が存在する。サイトカイン IL - 6 は神経膠症において重要な役割を果たしている (Wo
iciechowsky, C. 等 (2004) Med Sci Monit. 10: BR
325 - 30)。更に又、線維芽細胞成長因子受容体 (FGFR) 及び PDGFR は星状
細胞において発現され、そして星状細胞の分化及び増殖を媒介することにより自己免疫性

50

脱髄における神経膠症及び癍痕形成を誘発する (Cassina, P. 等 (2005) Neurochem. 93: 38 - 46; Takamiya, Y. 等 (1986) Brain Res. 383: 305 - 9; Yamada, H. 等 (2000) Am. J. Pathol. 156: 477 - 87)。全身エリテマトーデスにおいては、糸球体腎炎及び腎臓の損傷は重度の疾患における糸球体硬化症を特徴とする (Kraft, S. W. 等 (2005) J. Am. Soc. Nephrol. 16: 175 - 179)。自己免疫性の肝炎及び原発性胆汁性肝硬変は肝臓実質及び胆管樹枝の線維症をそれぞれ特徴とする (Washington, M. K. (2007) Mod Pathol. 20 Suppl 1: S15 - 30)。特発性肺線維症は肺の線維性疾患であり、そしてTGF- 媒介線維症がこの疾患の病理における中枢的役割を果たす (Ask, K. (2006) Proc. Am. Thorac. Soc. 3: 389 - 93)。クローン病は腸壁及び腸間膜の線維症を特徴とし、そして線維症によりこの疾患の特徴である腸の狭窄が起こる (Sorrentino, D. (2007) Digestion. 75: 22 - 4)。

【0155】

即ち、イマチニブ及びPDGFR又はAblを抑制する他のチロシンキナーゼ阻害剤は滑膜線維芽細胞の増殖及びRA、全身性硬化症、クローン病、多発性硬化症、自己免疫性肝炎及びそのような応答が病因に寄与している他の炎症性疾患の病因に寄与する他の線維芽細胞様細胞の増殖を抑制できると考えられる。

【0156】

実施例 8: 多発性硬化症に対するイマチニブの作用

多発性硬化症 (MS) のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を防止して治療するイマチニブメシレート (イマチニブ) の能力を調べるために試験を実施した。EAEは2mg/mlの熱殺菌された結核菌H37Ra (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) を含有する完全フロイントアジュバント (CFA) 中に乳化した100µg/マウスのミエリン稀突起神経膠細胞糖蛋白 (MOG) ペプチド35~55を用いた皮下免疫化によりC57B/6マウスにおいて誘導した。誘導プロトコルの一部分として、マウスには、4µg/mL百日咳菌毒素0.1mlを免疫化の当日及び48時間後に静脈内注射した。EAEの重症度は標準的な採点システム、即ち: 1、尾部の脆弱性又は麻痺; 2、後足の脆弱性; 3、後肢の麻痺; 4、前肢の脆弱性又は麻痺; 及び5、瀕死状態の動物又は死亡、に基づいて毎日測定した。1日2回100mg/kgのイマチニブを投与されたマウスは、図10に示す通りPBSピヒクル対照マウスと比較してEAEの発症の遅延及び低減された重症度を示した (値は平均±SEM)。これらのデータはイマチニブが多発性硬化症のげっ歯類モデルを治療する場合も有効であることを示している。

【0157】

実施例 9: 慢性関節リウマチを治療するためのFms及びPDGFR阻害剤GW2580

上記した通り、イマチニブはCIAの発症及び重症度を有意に防止する。イマチニブが薬効を示すと考えられる1つの可能な機序は単球系統の細胞上のc-Fmsを抑制することによるものである。GW2580はCalbiochem (カタログ#344036) から購入した。GW2580はc-Fmsに対して高度な力価を有し、そしてインビトロのFLS増殖試験によればGW2580は標準的なマウスの投薬用法により達成されるレベルにおいてPDGFRも抑制することが示されている (IC₅₀ 4.3mM; 図11B) (Conway, J. 等、Proc Natl Acad Sci USA 102: 16078 - 16083 (2005))。インビトロのc-Kitホスホリル化試験では、GW2580は標準的なマウスの投薬用法により達成される濃度においてc-Kitは抑制しなかったことが示されている (IC₅₀ 73.5µM) (Conway, J. 等、Proc Natl Acad Sci USA 102: 16078 - 16083 (2005))。図12A及び12Bに示す通り、c-Fms特異的小細胞チロシンキナーゼ阻害剤GW2580は平均関節炎評点 (A) 及び足底厚み (B) の両方により評価した場

合、RAのげっ歯類モデルであるマウスにおける樹立されたコラーゲン誘導関節炎の治療において高度に有効であった。Fmsはマクロファージ及び破骨細胞への未成熟単球の分化において、並びに、TNF及び他のサイトカインを生産するマクロファージのプライミング及び破骨細胞の活性化において中枢的役割を果たしている(C)。単球分化試験を実施することによりGW2580及びイマチニブがマクロファージへの単球の分化を抑制する能力を更に評価した。ヒト末梢血単球をCSF-1で刺激することによりマクロファージへの分化を誘導し、そして細胞を種々の濃度のイマチニブ又はGW2580と共に同時インキュベートした。イマチニブ及びGW2580の両方ともマクロファージへのヒト血液中単球のM-CSF誘導分化をブロックした(図12D)。マクロファージは細胞質の封入体、多極性の突起の伸長、及び不均質な細胞質の空胞を包含する形態学的特徴に基づいて計数した(%マクロファージはマクロファージに特徴的な形態学的特徴を有する総細胞の%を示す)。IC₅₀データをFmsの抑制に関してイマチニブ(0.97 μM)及びGW2580(0.01 μM)について求めたところ、GW2580はイマチニブより約100倍強力にマクロファージへの単球のM-CSF誘導分化を抑制していた(図12E)。即ち、Fmsに対して高度な力価を有し、そしてPDGFRも抑制するGW2580チロシンキナーゼ阻害剤は樹立されたコラーゲン誘導関節炎を治療する場合に高度に有効であった。

【0158】

Fms及びPDGFR阻害剤が自己免疫性の関節炎を治療する能力は予測さなかったものであり、そしてRAに伏在する病因機序に関する新しい知見を与えるものである。c-Fms(コロニー刺激因子-1受容体(CSF-1R))は単球系統の細胞上で発現され、そしてマクロファージ及び破骨細胞への単球の分化を媒介する。Fmsは又マクロファージをプライミングして活性化することにより他の炎症性サイトカインであるTNFを生産し、そして他のマクロファージ機能を実施する。マクロファージは専従的な抗原提示細胞であり、そして活性化されればTNFを分泌するエフェクター細胞でもある。TNFはヒト慢性関節リウマチ(RA)における滑膜炎及び関節の破壊、乾癬、乾癬性関節炎、炎症性腸疾患、例えばクローン病、強直性脊椎炎、及び他の自己免疫疾患において中枢的役割を果たしている。マクロファージはこれらの自己免疫疾患におけるTNF生産の主要な原料と考えら得ている。更に又、TNFを抑制する3種の生物学的薬剤が合衆国食品医薬品局によりRA、クローン病及び乾癬の治療に関して認可されており、そして乾癬性関節炎および強直性脊椎炎の治療において薬効を示している。破骨細胞はRAにおける骨の腐食及び破壊をもたらす骨の崩壊において、そして他の炎症性の関節炎、例えば乾癬性関節炎および強直性脊椎炎において中枢的役割を果たしている。

【0159】

Fmsは破骨細胞の活性化において中枢的役割を果たすことにより、これらの炎症性関節炎における骨の腐食及び破壊を媒介する。破骨細胞は慢性関節リウマチにおける骨の腐食及び破壊において主要な役割を果たしている。破骨細胞は主要機能が骨再吸収である骨髄様経路の多核細胞である。慢性関節リウマチ及びコラーゲン誘導関節炎において、破骨細胞は骨内部及び骨に隣接する部位における滑膜組織内部の両方に観察されている(Schett, G. (2007) *Arthritis Res Ther* 9:203)。破骨細胞は酵素及びプロトンポンプを利用することにより、それぞれ骨マトリックスを破壊と呼びCa⁺⁺を吸収する(Teitelbaum等(2000) *Science* 289:1504-1508)。c-FmsおよびRANKLを介した骨髄様前駆体の刺激は破骨細胞への骨髄様前駆体の分化を誘導する(Theill等(2002) *Annu. Rev. Immunol.* 20:795-823)。RA滑膜は破骨細胞形成を刺激するシグナル(CSF-1、RANKL、IL-17)を与える細胞と組み合わせられた単球及び他の骨髄様破骨細胞前駆体の存在に基づいて破骨細胞を蓄積させると考えられている(Schett, G. (2007) *Arthritis Res Ther.* 9:203)。c-Fmsの抑制はマクロファージ及び破骨細胞への骨髄様前駆体の分化を抑制することにより、並びに、マクロファージ及び破骨細胞のプライミング及び活性化を抑制するこ

10

20

30

40

50

とにより、自己免疫性の関節炎および他の自己免疫疾患を緩解すると考えられる。

【0160】

マウスの投薬用法により達成される濃度においてPDGFRも抑制する高度な力価を有するFms阻害剤であるGW2580で観察された利益は、(i)マクロファージ及び骨腐食性破骨細胞を生産するTNFへの骨髄様系統の分化、及び(ii)滑膜線維芽細胞増殖による侵襲性のパンヌス組織の形成の調和した抑制に起因していると考えられる。これらのデータは、Fms及び/又はPDGFRを抑制するチロシンキナーゼ阻害剤はヒトRAにおいて薬効を与えることができることを示唆している。

【0161】

実施例10：PDGFR、FGFR及びc-Kit阻害剤CGP53716は自己免疫性関節炎を抑制する。

10

【0162】

インビトロのc-Kitホスホリル化試験(図11A)及びFLS増殖試験(図11B)は小分子チロシンキナーゼ阻害剤CGP53716がインビトロキナーゼ試験におけるc-Kitの活性及びPDGFR誘導FLS増殖の両方を強力に抑制することを明らかにしている。PDGFR、FGFR及びc-Kitの特異的阻害剤はCIAの発症の防止及び重症度の低減において高度に有効であった(図13A~13B)。PDGFRに加えて、FGFRは滑膜線維芽細胞の増殖を媒介することが明らかにされている(Mallemud, C. J. (2007) Clin Chim Acta. 375: (1-2): 10-9)。CGP53716でPDGFR、FGFR及びc-KitをブロックすることはCIAの防止及び治療においてイマチニブとほぼ同様に有効であった(図13C~13D)。

20

【0163】

実施例11：ヒト慢性関節リウマチ滑膜におけるPDGFR、PDGFR及びc-Fmsの発現

免疫組織化学的検討を行うことによりRA滑膜(パンヌス)におけるFms及びPDGFRの発現を特性化した。高レベルのc-Fms蛋白がリウマチ様滑膜の表面に(図14A~14B)、そして伏在する滑膜組織にはより低いレベルで存在していた。PDGFRは滑膜組織中より深部において優先的に発現される(図14Cおよび14D)のに対し、PDGFRは滑膜管壁の近傍の細胞のサブセットにより集中的に発現されていた(図14E及び14F)。これらの結果は更にRAの病因におけるこれらのチロシンキナーゼの関与を示唆している。

30

【0164】

実施例12：ヒト慢性関節リウマチ滑膜組織におけるマクロファージ、線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)、及び滑膜マクロファージの集団

図15はRA滑膜組織から直接単離した新鮮未培養細胞のフローサイトメトリー分析の結果を示す。個々の染色は抗CD45による染色に基づいた造血細胞、抗CD90による染色によるFLS。抗c-Kitによる染色による肥満細胞、及び抗CD14による染色による滑膜マクロファージの検出を示している。フローサイトメトリー分析はヒトRA滑膜組織における線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)、肥満細胞、及び滑膜マクロファージの異なる増殖を示している。これらの結果はRAの病因におけるこれらの細胞片の関与を更に示唆している。

40

【0165】

実施例13：げっ歯類モデルにおける低用量のアトロバスタチン、ロシグリタゾン又はエノキサパリンと組み合わせた低用量イマチニブ

図16Aはイマチニブの異なる濃度のCIA薬効滴定曲線を示す。15mg/kgのイマチニブはPBSビヒクル対照と比較して相対的に小さい薬効を示したことが観察された。慢性関節リウマチ患者は心臓血管疾患を発症する危険性が上昇しており、そしてアトロバスタチンのようなスタチン剤の投与の適応症となる場合が多い。1.25~20mg/kgにおけるアトロバスタチン単独ではCIAの臨床評点を低下させるには有効ではなか

50

った(図16B)。しかしながら、CIAマウスに15mg/kgイマチニブ及び5mg/kgアトロバスタチンの組み合わせを投与した場合、これらのマウスはビヒクル単独よりも有意に低い重症度の疾患を発症した(図16C)。

【0166】

更に又、低用量のロシグリタゾン又は低用量のエノキサバリンと組み合わせた15mg/kgの低用量イマチニブは図16D及び16Eに示す通りCIAの発症及び重症度の防止において有効であった。これらの結果はイマチニブ及び他のチロシンキナーゼ阻害剤と非チロシンキナーゼ阻害剤治療薬の複合療法が増大した利益をもたらすことを示唆している。既存及び新規の非チロシンキナーゼ治療薬の例は、本実施例において試験した治療薬；小分子抗増殖治療薬(メトトレキサート、ミコフェノレートモフェチル、イムラン)；抗サイトカイン治療薬(抗TNF、抗IL-6、抗IL-1)；免疫細胞流出入の阻害剤(抗VLA4(Tysabri))；及び抗B細胞治療薬(リツキシマブ(抗CD20)、抗CD19)；抗原特異的トレライジング治療薬を包含する。

10

【0167】

実施例14：c - K i t突然変異体マウスは野生型マウスよりも低い重症度の抗体転移関節炎を発症する。

【0168】

Wshマウスを遺伝子的に変更することによりc - K i tシグナリングに干渉する突然変異を有するにすると、これらのマウスは肥満細胞不全となる。図17A~17Bに示す通り、c - K i t突然変異体マウスは正常なc - K i t機能を有する野生型対照マウスと比較して、コラーゲン抗体誘導関節炎モデルにおいて関節炎を発症することに対して部分的に抵抗性であった。これらの観察結果は、RA及び他の自己免疫疾患における治療方策としてのc - K i tの抑制を更に裏付けるものであるが、K i t単独の抑制では自己免疫性関節炎又は他の自己免疫疾患の治療には不十分であることを示唆している。

20

【0169】

実施例15：全身性硬化症の治療のためのイマチニブ

SSc病歴3年の24歳女性が急速に進行する皮膚硬化症、多数の手指潰瘍(図18A)及び半ブロックのみ歩行可能の段階まで増大した息切れを伴って来院した。肺機能試験によれば予測値48%までのFVCの進行性の減少が示され、予測値62%の安定な拡散容量を伴っていた。胸部HRCTスキャンによれば増大した両側基底部のすりガラス不透明性を示していた(図18C)。経胸壁超音波心臓検査図(TTE)によれば正常な左右心室機能、右心室収縮期血圧(RVSP)21、及び僅かな心内膜液浸出が示されていた。患者は自身のILDのためにシクロホスファミド療法を辞退しており、そして別の治療選択肢を求めて当院に来ていた。

30

【0170】

患者はイマチニブメシレートの治験に合意した。書面によるインフォームドコンセントを得ることにより写真及びアンケート並びに分子分析用の皮膚及び血液試料の形態で臨床情報を収集した。この試験は地域の研究所の評議委員会による認可を受けている。治療を開始する前において、患者の改良Rodnan皮膚厚み評点(mRSS)は36(スケール0~51)であった。患者の口腔開口部は1.0cmであり、手の拡張幅は左13.0cm、右10.2cmであった。9か所の手指潰瘍、及び肘と左第4指に拘縮を有していた。全ての血球数、包括的な代謝パネル、クレアチンキナーゼ、及び尿検査は正常範囲内であった。C反応性蛋白(CRP)レベルは2.8mg/dL(正常<0.5mg/dL)であった。皮膚生検によれば平均皮膚厚み2.81mmを有する肥厚化した緻密に充填されたコラーゲン束が明らかになった(図18E)。

40

【0171】

1日2回100mgイマチニブメシレート3か月の後、患者は自身の皮膚の軟化、関節運動性の増大、及び息切れの低下を報告している。身体検査によればmRSSは21及び4手指潰瘍が判明し、手指潰瘍の5か所は有意に治癒していた。(図18B)。CRPは0.2mg/dLまで正常化しており、患者は自身のプレドニソロンを1日当たり5mg

50

まで調節することができていた。H R C Tは間質変化(図18D)の消散を示しており、そして反復したT T Eは心内膜液浸出の兆候を示していなかった。再度皮膚生検を行ったところ、より広く拡張された、より薄片化したコラーゲン束が観察され、平均の皮膚厚みは2.31mmであった(図18F)。

【0172】

患者はその後、4週毎に50mg/kgずつイマチニブの用量を350mg/日まで増量した。イマチニブ療法6か月の後、患者は職場復帰することができ、軽度の呼吸困難を伴うのみで4マイル歩行したことを報告している。患者の健康評価アンケートの障害指数(HAQ-DI)及び硬皮症特異的黙示アナログスケール評点は両方とも治療6ヶ月後には有意に改善されていた。自身のプレドニソロンを調節し、そして関節痛のかなりの改善を報告している。身体検査によれば、mRSSは18であり、右手の拡張幅は14.5cmまで改善していた。口腔開口部は1.5cmまで増大し、手指潰瘍は2個残存するのみであった。

10

【0173】

イマチニブは(i)皮膚線維芽細胞によるPDGFR媒介及びAb1媒介の増殖及びコラーゲン生産；(ii)マクロファージへのFms媒介単球分化、及びマクロファージをプライミングすることによるTNF及び他の炎症性サイトカインの生産；(iii)恐らくはKit媒介の肥満細胞炎症メディエーター放出；及び(iv)恐らくはLckおよびAb1をそれぞれ介したT及びB細胞の機能、を抑制することにより全身性硬化症を有するこの患者において利益をもたらしたと考えられる。即ち、多数のチロシンキナーゼ、及びそれらが媒介する病原的な細胞応答の同時障害が全身性硬化症を有するこの患者で観察されたイマチニブの薬効の中心であると考えられる。

20

【0174】

実施例16：小分子チロシンキナーゼ阻害剤及び炎症性及び自己免疫性の疾患に関する臨床開発のための候補の選択

小分子チロシンキナーゼ阻害剤の化学構造を図19及び20に示す。図19はSU9518(PDGFR及びFGFRを抑制)、GW2580(Fms及びPDGFRを抑制)、CGP53716(PDGFR, FGFR及びKitを抑制)、及びPD166326(Kit及びAb1)の化学構造を示す(表5)。図20はFDA認可チロシンキナーゼ阻害剤(表6)の化学構造を示し、これらは全てチロシンキナーゼにおける突然変異に起因する悪性疾患の治療に関してFDA認可されている。表7は自己免疫性及び他の炎症性の状態において利益を与える潜在性を有する、主に悪性疾患を治療するために臨床開発されている追加的なチロシンキナーゼ阻害剤のリストを示す。IC₅₀はキナーゼ活性の50%が阻害されるキナーゼ阻害剤の濃度である。追加的チロシンキナーゼ阻害剤は前臨床開発中であるか、又は今後発見されるべきものである。

30

【0175】

【表 5】

表5. 炎症性及び自己免疫性の疾患のげっ歯類モデルにおいて調査中の初期小分子チロシンキナーゼ阻害剤

阻害剤	阻害プロファイル (IC50, μM)						マウス投薬量	参考文献
	PDGFR	FGFR	Kit	Fms	Lck	Abl		
イマチニブ	0.1		0.1	1.4	1-10	0.25	100mg/kg/2x/d 経口	Buchdinger, 2004. <i>Clin Cancer Res</i> 10:3528-3534.
SU9518	0.05						100mg/kg/wk SQ または 50mg/kg/d 経口	Abdollahi, 2005. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. <i>J Exp Med</i> 201:925-935.
GW2580	4.3		>10	0.03	>10		80 mg/kg/d (40)	58; Yamasaki, 2001. <i>Circ Res</i> 88:630-636.
PD166326			0.025			0.01	50 mg/kg/2x/d 経口	Conway, 2005. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 102:16078-16083; Fig. 11
CGP53716	<1		1.1				50 mg/kg/d 経口	Wolf, 2005 <i>Blood</i> 105:3995-4003.

【 0 1 7 6 】

表6. FDA 認可チロシンキナーゼ阻害剤の阻害プロファイル

化合物	阻害プロファイル (IC50があれば併記)														
	Fms	PDGFR	Kit	Abl	Lck	Src	VEGF R1	VEGF R2	VEGF R3	FGFR	EGFR	HER2	c-Raf	b-Raf	
イマチニブ	1	0.1	0.1	0.25	10										
ゲフィチニブ															強力
エルロチニブ															強力
ソラフェニブ	強力	強力	強力												強力
スニチニブ	0.01	0.01	0.01	0.8			0.01	0.01	0.05					0.9	強力
タサチニブ	強力	強力	強力	強力											強力
ラパチニブ															強力

【表 6】

化合物名	他の名称	企業名	阻害プロファイル (IC50があれば併記)													
			C-Fms	PDGFR	c-Kit	Abi	VEGFR1 (Flk1)	VEGFR2 (KDR)	VEGFR3 (Flk4)	Flt3	Src	EGFR				
パソパニブ		GlaxoSmith Kline		強力	強力			強力	強力							
パタラニブ		Novartis	1.2	0.2	0.4			強力	0.3	強力						
ハンデタニブ		AstraZeneca							強力							強力
セゾラニブ		AstraZeneca		強力?	強力?			強力	強力	強力						
セマキシニブ		Pfizer			0.03			1	1				0.25			
アキシチニブ		Pfizer	強力	強力	強力	強力	強力	強力	強力	強力	強力	強力				
AMG 706		Amgen		強力	強力	強力		強力	強力	強力	強力	強力				
ニトチニブ		Novartis		0.001	0.03	0.001										
CP-690		Pfizer														
レスタウチニブ		Cephalon											強力			
PKC412		Novartis		強力	0.03				強力				強力			
AZD0530		AstraZeneca					強力							強力		
タンツチニブ		Millennium Pharma.		0.2	0.2	0.1		0.2					強力			
EKB-569		Wyeth														強力
SKI-606		Wyeth				強力								強力		
PKI-166		Novartis														強力
CHIR258		Novartis	0.03			3			0.05							
SU6668		Pfizer		0.01	0.3				2							1

表7. 炎症性及び他の自己免疫性の疾患に関する潜在的治療薬を示す臨床開発中の小分子チロシンキナーゼ阻害剤の例

10

20

30

多くの例示される特徴及び実施形態を上記の通り考察したが、特定の変更、並べ替え、追加、及びそれらの準複合化は当業者の知る通りである。従って、以下の添付請求項および後述する請求項は全てのそのような変更、並べ替え、追加、及び準複合化をそれらの真の精神及び範囲内にあるものとして包含するものと解釈する。

40

【 図 1 】

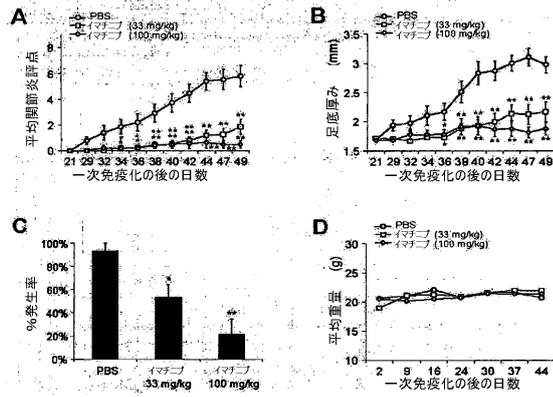


Figure 1

【 図 2 】

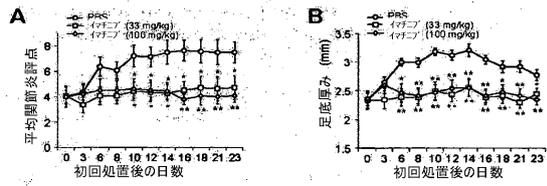


Figure 2

【 図 3 】

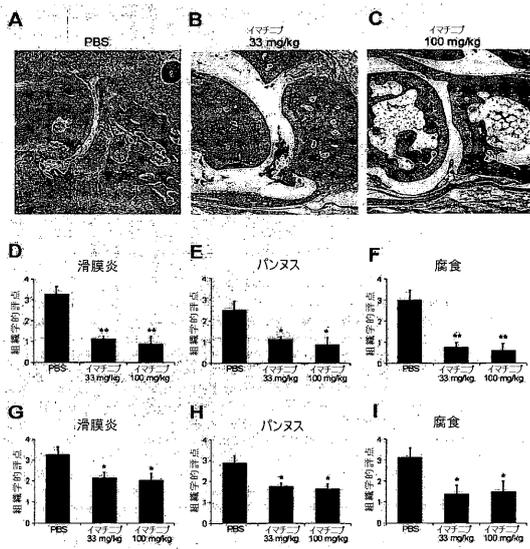


Figure 3

【 図 4 】

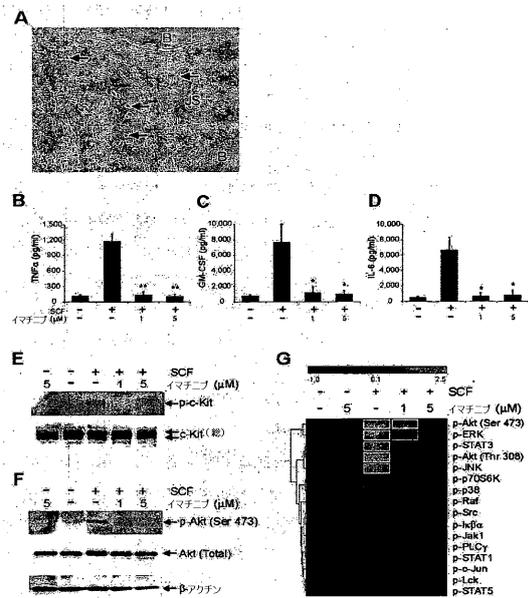


Figure 4

【 図 5 】

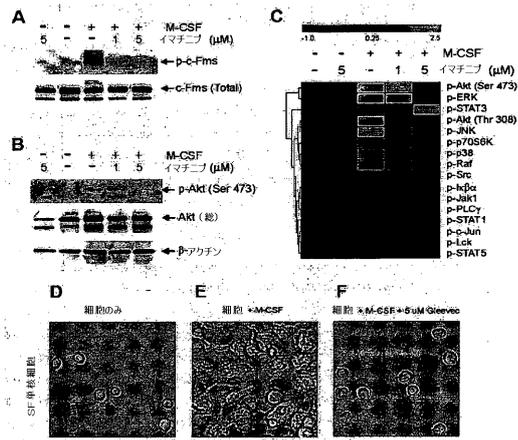


Figure 5

【 図 6 】

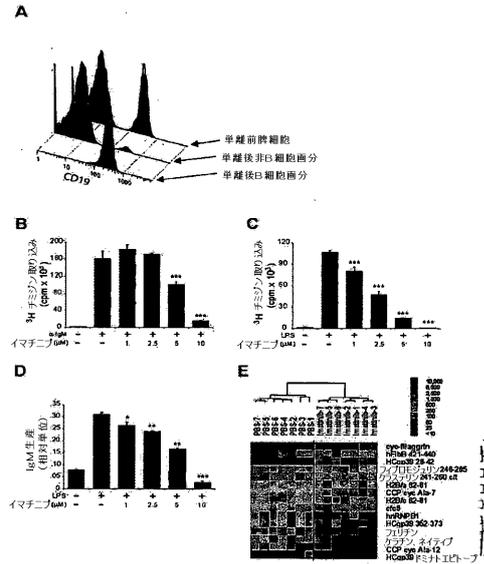


Figure 6

【 図 7 】

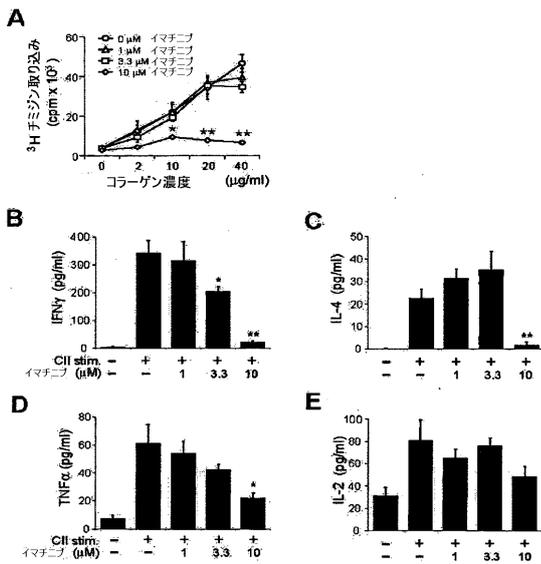


Figure 7

【 図 8 】

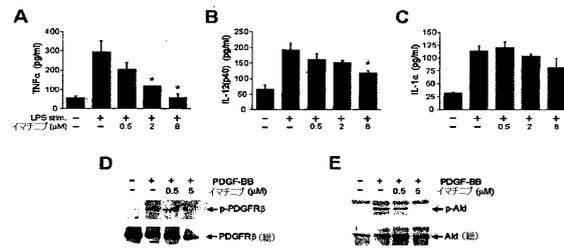


Figure 8

【 図 9 】

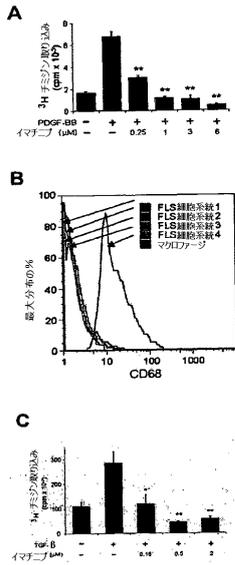


Figure 9

【 図 10 】

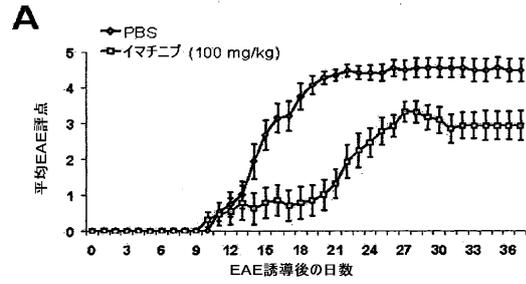


Figure 10

【 図 11 】

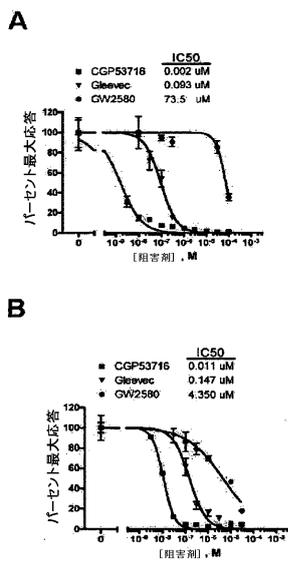


Figure 11

【 図 12 】

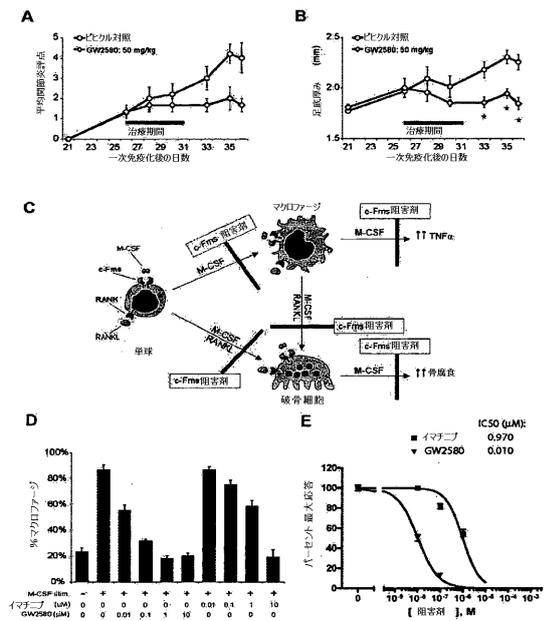


Figure 12

【 図 1 3 】

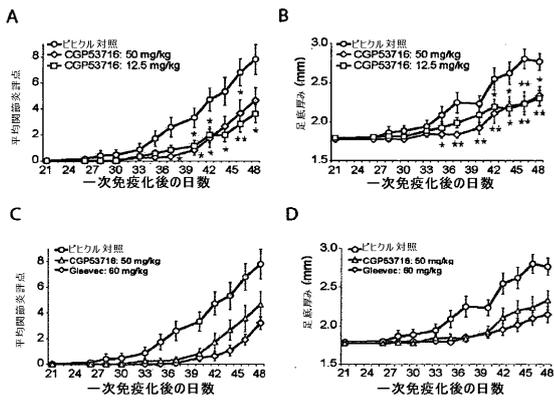


Figure 13

【 図 1 4 】

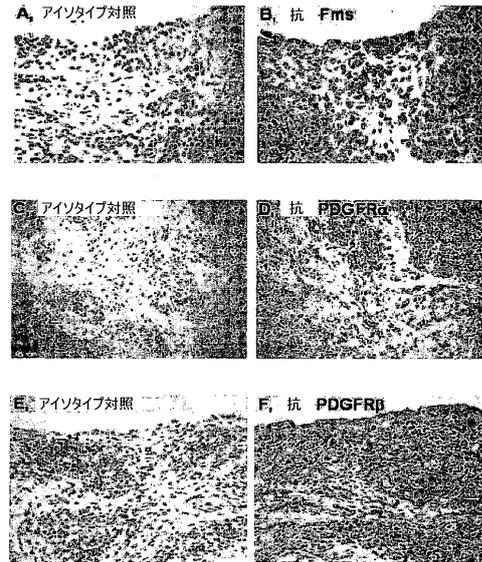


Figure 14

【 図 1 5 】

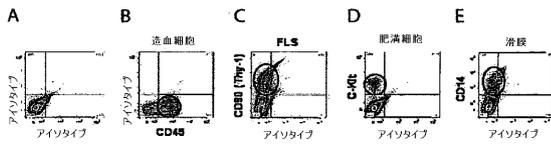


Figure 15

【 図 1 6 】

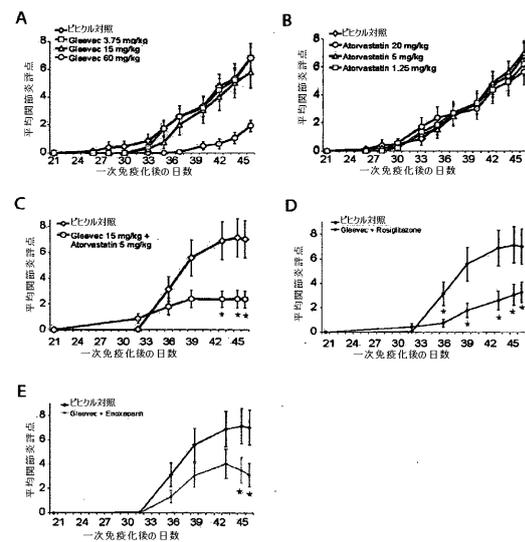


Figure 16

【 図 17 】

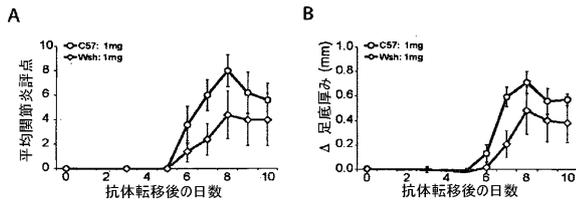


Figure 17

【 図 18 】

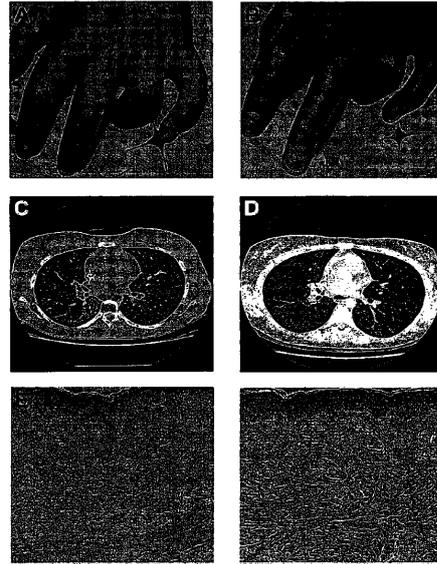


Figure 18

【 図 19 】

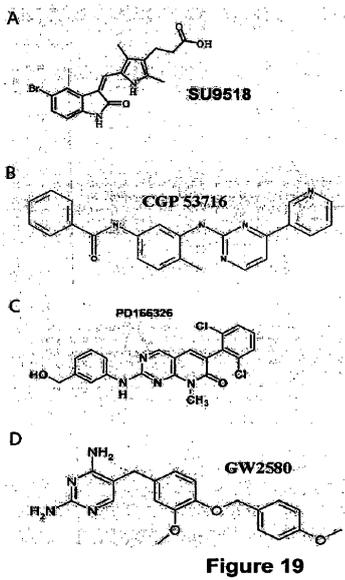


Figure 19

【 図 20 】

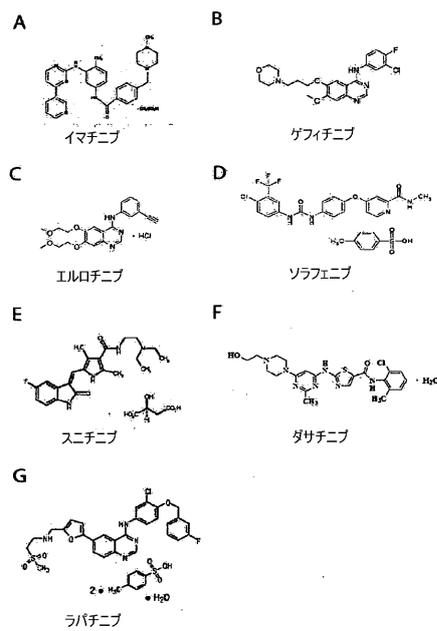


Figure 20

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 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 31/505	(2006.01)	A 6 1 K 31/505	
A 6 1 K 31/404	(2006.01)	A 6 1 K 31/404	
C 0 7 D 401/04	(2006.01)	C 0 7 D 401/04	
C 0 7 D 471/04	(2006.01)	C 0 7 D 471/04	1 1 8 Z
C 0 7 D 239/49	(2006.01)	C 0 7 D 239/49	
C 0 7 D 403/06	(2006.01)	C 0 7 D 403/06	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ロビンソン, ウィリアム エイチ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 1, パロ アルト, カウパー ストリート 2 2 8

(72)発明者 パニアグア, リカルド ティー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 2, ロス アルトス, ケスタ ドライブ 2 0 1, アパートメント 7

Fターム(参考) 4C063 AA01 BB01 BB03 CC06 CC29 DD04 DD12 EE01
 4C065 AA04 BB10 CC01 DD03 EE02 HH03 HH09 JJ04 KK01 LL07
 PP03
 4C084 AA17 NA14 ZA022 ZA202 ZA332 ZA362 ZA552 ZA592 ZA662 ZA682
 ZA752 ZA892 ZA962 ZB072 ZB152 ZC202 ZC352
 4C086 AA01 AA02 BC13 BC42 BC50 CB09 GA07 GA08 GA12 MA01
 MA04 NA14 ZA02 ZA20 ZA33 ZA36 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68
 ZA75 ZA89 ZA96 ZB07 ZB15 ZC20 ZC35