

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5520433号

(P5520433)

(45) 発行日 平成26年6月11日(2014.6.11)

(24) 登録日 平成26年4月11日(2014.4.11)

(51) Int. Cl.		F I
A 6 1 K 31/506	(2006.01)	A 6 1 K 31/506
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/06	(2006.01)	A 6 1 P 31/06
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18

請求項の数 7 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-551238 (P2006-551238)
(86) (22) 出願日	平成17年1月20日 (2005.1.20)
(65) 公表番号	特表2007-518810 (P2007-518810A)
(43) 公表日	平成19年7月12日 (2007.7.12)
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/001710
(87) 国際公開番号	W02005/072826
(87) 国際公開日	平成17年8月11日 (2005.8.11)
審査請求日	平成18年8月21日 (2006.8.21)
審判番号	不服2011-2170 (P2011-2170/J1)
審判請求日	平成23年1月28日 (2011.1.28)
(31) 優先権主張番号	60/537, 960
(32) 優先日	平成16年1月21日 (2004.1.21)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	60/553, 681
(32) 優先日	平成16年3月16日 (2004.3.16)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	504391260
	エモリー ユニバーシティ
	アメリカ合衆国 ジョージア 30322
	, アトランタ, クリフトン ロード
	1599, エヌイー, 4ティーエイ
	チ フロア
(73) 特許権者	399026731
	スローン - ケタリング・インスティテ
	ュート・フォー・キャンサー・リサーチ
	アメリカ合衆国、ニューヨーク州 100
	65、ニューヨーク、ヨーク・アベニュー
	1275
(74) 代理人	100078282
	弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原体感染を処置するためのチロシンキナーゼインヒビターの組成物および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

宿主被験体の A b 1 ファミリーチロシンキナーゼを阻害し、そして、細菌感染またはウイルス感染を処置するための組成物であって、該細菌感染は、Mycobacterium tuberculosis に起因するものであり、そして、該ウイルス感染は、ポリオマウイルス、HIV またはワクシニアウイルスに起因するものであり、該組成物は、治療有効量の A b 1 ファミリーチロシンキナーゼインヒビターを含み、該組成物は該チロシンキナーゼインヒビターを必要とする被験体への投与に適しており、該 A b 1 ファミリーチロシンキナーゼインヒビターは、メシル酸イマチニブまたはメシル酸イマチニブの薬学的に受容可能な塩もしくはプロドラッグである、組成物。

【請求項2】

前記組成物が前記チロシンキナーゼインヒビターを含み、該チロシンキナーゼインヒビターは、経口投与、経鼻投与、口腔投与、舌下投与、静脈内投与、経粘膜投与、直腸投与、局所投与、経皮投与、皮下投与、吸入による投与、または髄腔内投与に適している、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記ウイルス感染は、ヒト免疫不全ウイルスに起因する、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

ヒト免疫不全ウイルスに起因するウイルス感染の処置のための組成物であって、A b 1 ファミリーチロシンキナーゼインヒビターを含み、該 A b 1 ファミリーチロシンキナーゼイ

10

20

ンヒビターは、メシル酸イマチニブまたはメシル酸イマチニブの薬学的に受容可能な塩もしくはプロドラッグである、組成物。

【請求項5】

前記A b lファミリーチロシンキナーゼインヒビターは、メシル酸イマチニブである、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

Mycobacterium tuberculosisに起因する細菌感染の処置のための組成物であって、A b lファミリーチロシンキナーゼインヒビターを含み、該A b lファミリーチロシンキナーゼインヒビターは、メシル酸イマチニブまたはメシル酸イマチニブの薬学的に受容可能な塩もしくはプロドラッグである、組成物。

10

【請求項7】

前記A b lファミリーチロシンキナーゼインヒビターは、メシル酸イマチニブである、請求項6に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(連邦政府から委託された研究または開発)

本発明は、米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)によって与えられたA I 0 5 6 0 6 7に基づく政府支援でなされた。米国政府は、本発明の一定の権利を有する。

20

(発明の分野)

本発明は、チロシンキナーゼに関する宿主細胞の相互作用に関連するか、またはそれによって引き起こされる病原体感染を処置するためにチロシンキナーゼインヒビターを使用する組成物および方法に関する。特に、本発明は、微生物病原体(例えば、細菌およびウイルス)由来の感染を処置するための、A b lファミリーチロシンキナーゼインヒビターの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

最近数十年で、世界中で致命的な病原体の襲来が目撃されてきた。広範なヒト病原体が存在し、それらとしては、細菌、原生動物、ウイルス、藻類および真菌のような種々の微生物が挙げられる。選択圧に対する先天性の能力が、微生物の進化を促進し、微生物が複雑かつ可変的な環境に適応するのを可能にしてきた。それゆえ、感染性微生物が、合成抗菌化合物または天然抗菌化合物により、感染性微生物を破壊する本発明者らの試みを回避する機構を容易に発達させたことは、おそらく驚くべきことではない。

30

【0003】

微生物が、新しい治療法の開発をはるかに超える速度で耐性を発達させるという事実は、今世紀に、途上国および先進国の両方において、単一の最も深刻な公衆衛生の脅威をおそらく間違いなく引き起こす。抗菌戦略が、前世紀にわたって華々しい成功をおさめたことは疑いようが無い。例えば、病原体内の標的に指向される抗菌薬および抗ウイルス薬は、無数の生命を救うために使用されてきた。しかし、このような成功は持続可能ではないという証拠が増えつつある。これらの薬物に対向するために、細菌およびウイルス性病原体は、これらの化合物を不活化するための洗練された機構を発達させてきた。例としては、細菌では、*Staphylococcus aureus*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*および*Mycobacterium tuberculosis*(TB)の全剤耐性(pan-drug resistant)株、ならびにウイルスでは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)が挙げられる。

40

【0004】

さらにより厄介なことに、一部の製薬会社(大規模または小規模)において新規抗菌薬

50

の開発を追及する努力が欠如している。増殖を阻害する化学ライブラリの大規模スクリーニングにより、製薬産業による新規抗生物質を開発する努力は、大部分は失敗し、そして新規テトラサイクリンアナログおよび新規スルファニルアミドアナログは、おそらく耐性を生じ、そしてすぐに無用になる。耐性の問題は、疾患の負荷を減らすためのコンプライアンス基準または公衆衛生政策を伴わない、抗生物質および抗ウイルス化合物の無差別かつ不適切な使用によりさらにこじれる。臨床試験の驚愕的なコスト（例えば、1億ドルの予想収入に対し、新規テトラサイクリンを市場に出すのに約4億ドル）、ジェネリック薬品の販売の規制の失敗、および慢性疾患に対する薬物療法からの実質的な収入を生み出す能力により、大規模な製薬会社にたとえ報奨金があったとしても新規抗生物質を開発してもわずかであり、そして、小規模なバイオテクノロジーの会社は、全く資金を有さない。

10

【0005】

現在の努力のレベルと同程度の心配の原因がある。開発中の新規薬物のうち、大半（全てではないにしても）の薬物は、販売に際して、おそらくすぐに耐性を生じる（例えば、葉酸生合成インヒビター *Icalprim*）。新規抗ウイルス化合物の探索は、HIV流行によって、幾分より成功しており、そして大きく動機付けられてきた。しかし、主としてウイルス標的に対する薬物が開発され、そしてウイルス間の変異速度は、いまだに新規開発を凌いでいる。好ましい開発の一つは、数種の細菌性疾患およびウイルス性疾患に対して有望なワクチンの開発である。しかし、ワクチンは、全ての事例（例えば、幼児において）において成功するとはいえず、適切な供給源が利用可能ではなかった。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、病原体感染の予防および処置のために有効な化合物および方法を開発する、緊急の必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

（発明の要旨）

病原体感染を処置するための組成物および方法が提供される。本発明の組成物は、病原体感染に関連するか、または病原体感染を引き起こす、病原体 - 宿主細胞の相互作用に関係するチロシンキナーゼを阻害する化合物を含む。いくつかの実施形態において、本発明は、*Ableson* (*Abl*)ファミリーチロシンキナーゼインヒビターに属するインヒビター（例えば、メシル酸イマチニブ、ピリド[2,3-d]ピリミジン、またはそれらの薬学的に受容可能な塩、鏡像異性体、アナログ、エステル、アミド、プロドラッグ、代謝産物もしくは誘導体）の使用に関連する。

30

【0008】

本発明の方法は、広範な病原体（細菌、原生動物、ウイルス、藻類および真菌のような微生物病原体が挙げられる）による感染を処置するために、上記の組成物を薬学的有効量で、この組成物を必要とする患者に投与する工程を包含する。特に、本発明は、細菌病原体およびウイルス性病原体に関連する疾患を処置するための、これらの組成物の使用に関連する。これらの細菌病原体およびウイルス性病原体としては、以下が挙げられる：病原性 *Escherichia coli* (腸病原性 *Escherichia coli* (*EPEC*))、腸出血性 *Escherichia coli* (*EHEC*)、尿路病原性 *Escherichia coli* (*UPEC*) および腸侵入性 *Escherichia coli* (*EIEC*)、*Helicobacter pylori*、*Listeria monocytogenes*、*Salmonella typhimurium*、*Shigella flexneri*、*Mycobacterium tuberculosis* (*mTB*)、ポックスウイルス（ワクシニアウイルスおよび痘瘡ウイルスが挙げられる）、ポリオーマウイルス（JCウイルスおよびBKウイルスが挙げられる）、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス (*CMV*) およびヒト免疫不全ウイルス（例えば、HIV-1）。この組成物は、病原体感染の処置のための治療有効量が送達される限り、任意の投

40

50

与方法により投与され得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

(発明の詳細な説明)

本発明は、病原体感染に関連するか、または病原体感染を引き起こす、病原体 - 宿主細胞の相互作用に関係するチロシンキナーゼを阻害する化合物の使用に関する。特に、本発明は、微生物病原体由来の感染に関連する疾患を処置または予防するための、チロシンキナーゼインヒビターの使用に関する。これらの微生物病原体としては、以下のような細菌病原体とウイルス性病原体とが挙げられる：*Escherichia coli*、*Helicobacter pylori*、*Listeria monocytogenes*、*Salmonella typhimurium*、*Shigella flexneri*、*Mycobacterium tuberculosis* (TB)、ポックスウイルス (ワクシニアウイルスおよび痘瘡ウイルスが挙げられる)、ポリオーマウイルス (JCウイルスおよびBKウイルスが挙げられる)、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス (CMV) およびヒト免疫不全ウイルス (例えば、HIV-1)。特に、本発明における使用のためのチロシンキナーゼインヒビターとしては、Ablファミリーチロシンキナーゼインヒビター (例えば、メシル酸イマチニブ、ピリド[2,3-d]ピリミジン、またはそれらの薬学的に受容可能な塩、鏡像異性体、アナログ、エステル、アミド、プロドラッグ、代謝産物もしくは誘導体) が挙げられる。

【0010】

本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターは、チロシンキナーゼ媒介性の宿主 - 病原体の相互作用に関連するか、またはそれによって引き起こされる任意の病原体感染 (特に、微生物感染、より特には、ウイルス感染および細菌感染) を処置または予防するために、本発明の方法において使用され得る。理論に拘束されなければ、本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターは、宿主細胞を標的とし、これらの宿主細胞と病原体との相互作用を可能にする細胞機構を妨害し、そしてその際に、病原体により引き起こされる病原性の影響を防止することが考えられる。病原体 - 宿主の相互作用を調節する細胞機構は顕著に保存されるため、本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターは、広範な病原体による感染に対向するために適用され得ることが考えられる。このような病原体としては、細菌、原生動物、ウイルス、藻類および真菌のような種々の微生物が挙げられる。本発明の好ましい実施形態において、これらの病原体は細菌およびウイルスである。有利なことに、本明細書に記載の治療アプローチは、抗生物質に見られるように病原体ではなく、宿主を標的とする。それゆえ、この治療アプローチは、病原体の薬剤耐性の発達の可能性を減少させる。

【0011】

一実施形態において、本発明は、細菌感染を処置または予防するチロシンキナーゼインヒビターの使用に関する。このような感染としては、以下の属および種のメンバーにより引き起こされる感染が挙げられる：*Agrobacterium tumefaciens*、*Aquaspirillum*、*Bacillus*、*Bacteroides*、*Bordetella pertussis*、*Borrelia burgdorferi*、*Brucella*、*Burkholderia*、*Campylobacter*、*Chlamydia*、*Clostridium*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Coxiella burnetii*、*Deinococcus radiourans*、*Enterococcus*、*Escherichia*、*Francisella tularensis*、*Geobacillus*、*Haemophilus influenzae*、*Helicobacter pylori*、*Lactobacillus*、*Listeria monocytogenes*、*Mycobacterium*、*Mycoplasma*、*Neisseria meningitidis*、*Pseudomonas*、*Rickettsia*、*Salmonella*、*Shigella*、*Staphylococcus*、*Streptococcus*、*Streptomyces* c

oelicolor、VibroおよびYersinia。好ましい実施形態において、このような感染としては、以下により引き起こされる感染が挙げられる：Escherichia coli、Helicobacter pylori、Listeria monocytogenes、Salmonella typhimurium、Shigella flexneri、Mycobacterium tuberculosis (TB)。他の実施形態において、このような感染は、病原性Escherichia coli株および/または下痢原性Escherichia coli株により引き起こされる感染が挙げられ、これらのEscherichia coli株としては、腸病原性Escherichia coli (EPEC)、腸出血性Escherichia coli (EHEC)、尿路病原性Escherichia coli (UPEC)および腸侵入性Escherichia coli (EIEC)が挙げられる。

10

【0012】

別の実施形態において、本発明は、ウイルス感染を処置するためのチロシンキナーゼインヒビターの使用に関する。このような感染としては、以下のウイルスファミリーのメンバーにより引き起こされる感染が挙げられる：Adenoviridae、Arenaviridae、Astroviridae、Bacteriophages、Baculoviridae、Bunyaviridae、Calciviridae; Coronaviridae、Deltavirus、Filoviridae、Flaviviridae、Geminiviridae、Hepadnaviridae、Herpesviridae、Nodaviridae、Orthomyxoviridae、Papovaviridae、Paramyxoviridae、Parvoviridae、Phycodnaviridae、Picornaviridae、Poxviridae、Reoviridae、Retroviridae、Rhabdoviridae、TobamoviridaeおよびToqaviridae。好ましい実施形態において、このような感染としては、以下により引き起こされる感染が挙げられる：ポックスウイルス(ワクシニアウイルスおよび痘瘡ウイルスが挙げられる)、ポリオーマウイルス(JCウイルスおよびBKウイルスが挙げられる)、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)およびヒト免疫不全ウイルス(例えば、HIV-1)。

20

【0013】

本発明の方法にしたがって、本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターは、互いに組み合わせて投与されても(例えば、STI-571とSTI-Xとを投与する)、他の化合物(特に、抗病原体化合物)と組み合わせて投与されてもよい。このような抗病原体化合物としては、従来の抗菌薬が挙げられる。他の実施形態において、1つ以上の本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターは、例えば、痘瘡に関連する症例において、シドホビルのような他の化合物と組み合わせて使用され得る。ここで、これらの薬剤の併用は、適用されるシドホビルの、より少ない投薬量を提供し、それにより、このヌクレオシドアナログ抗ウイルス化合物の毒性の影響を減少させる。本発明のチロシンキナーゼインヒビターが、病原体感染を処置または予防する併用治療の一部として投与される場合、それらは、いずれかの順序で同時的または連続的にさらなる化合物とともに投与され得る。

30

40

【0014】

一実施形態において、チロシンキナーゼインヒビターは、ワクチンをより有効にするように投与される。例えば、生ウイルスによる生後1か月以内の乳幼児の免疫処置は、母体の抗体がそのワクチンを中和するため、獲得免疫に寄与しないことが周知である(BotおよびBona(2002)Microbes Infect. 4:511)。一実施形態において、本発明のチロシンキナーゼインヒビターの適用は、抗体の応答を克服し、そして細胞免疫の獲得を可能にするためのより高用量のウイルスの安全な投与を可能にする。別の実施形態において、本発明のチロシンキナーゼインヒビターは、病原体の免疫クリアランスを促進する。数種の慢性的なウイルス(例えば、HIVおよびポリオーマ)については、高いウイルス負荷は、T細胞機能を損なうことが見出されている(Welsh(

50

2001) J. Exp. Med. 193: F19)。それゆえ、ウイルス負荷を低下させることは、T細胞機能の回復を可能にし得、それによってクリアランスを促進し得る。別の実施形態において、本発明のチロシンキナーゼインヒビターは、免疫無防備状態の個体へのワクチン投与を可能にする。

【0015】

本発明のチロシンキナーゼインヒビターは、生存している被験体または患者（ヒト、または研究室のサルもしくはマウスのような動物が挙げられる）における適用のためである。

【0016】

（本発明の方法における使用のためのチロシンキナーゼインヒビター化合物）

現在、多くのチロシンキナーゼファミリーが認識され、それらとしては、Abl、Fes/Fer、Syk/Zap70、Jak、Tec、Fak、Ack、SrcおよびCskが挙げられる。数種のチロシンキナーゼファミリーの活性を標的とする阻害性の化合物が、本発明の方法の特定の目的であり、これらのチロシンキナーゼファミリーとしては、チロシンキナーゼのAblファミリーおよびSrcファミリーのメンバーが挙げられるが、これらに限定されない。したがって、本発明の一実施形態において、病原体感染を処置するために使用されるチロシンキナーゼインヒビターは、少なくともチロシンキナーゼのAblファミリーのメンバー（c-Ablおよびc-Argが挙げられる）を阻害するが、他のファミリーメンバーも阻害し得ることが認識される。

【0017】

チロシンキナーゼのATP結合部位は、高度に保存されているが、X線結晶学およびキナーゼドメインの相同性に基づくコンピュータによるモデリングから得られる構造上の情報の使用は、選択的インヒビターの開発を導いてきた。AblおよびBCR-Ablに対して、STI-571（メシル酸イマチニブまたはGleevec（登録商標）とも呼ばれる；Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ；米国特許第5,521,184号（この全体が本明細書中で参考として援用される）もまた参照のこと）は、適度に高い特異性を有する、このようなインヒビターの一つである。STI-571は、慢性骨髄性白血病（CML；Drukerら（2002）Hematology 2000（Am. Soc. Hematol. Educ. Program）：711-135；Goldmanら（2001）Blood 98：2039）を処置することにおいて臨床上有用であることが証明されている。STI-571は、c-Kit（Ablと構造的に類似のATP結合部位を有するキナーゼ）の調節不全により引き起こされる間質性腫瘍を処置するために使用されている（Heinrichら（2000）Blood 96：925）。Gleevec（登録商標）は、現在、100mg～400mgのイマチニブ遊離塩基に相当するメシル酸イマチニブを含有するフィルムコーティング錠として市販されている。

【0018】

本発明の一実施形態において、細菌感染またはウイルス感染を予防または処置するための方法が提供され、この方法は、治療有効量のメシル酸イマチニブ（STI-571）を、それを必要とする被験体に投与する工程を包含する。

【0019】

STI-571は、メタンスルホン酸4-[(4-メチル-1-ピペラジニル)メチル]-N-[4-メチル-3-[[4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル]アミノ]-フェニル]ベンズアミドとして化学的に表記され、以下の構造式を有する：

【0020】

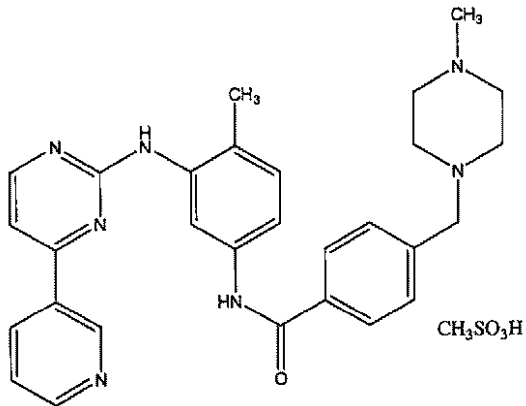
10

20

30

40

【化4】

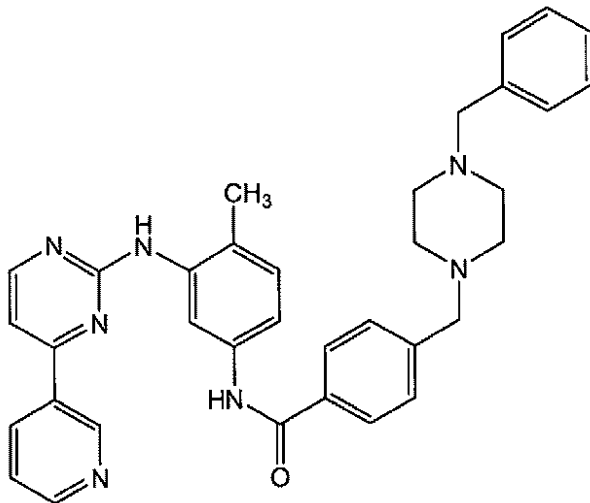


10

本発明の別の実施形態において、細菌感染またはウイルス感染を予防または処置するための方法が提供され、この方法は、治療有効量のメシル酸イマチニブのベンジル化 (benzylated) 誘導体 (STI-Xと示される) を、それを必要とする被験体に投与する工程を包含する。STI-Xは、以下の構造式を有する：

【0021】

【化5】



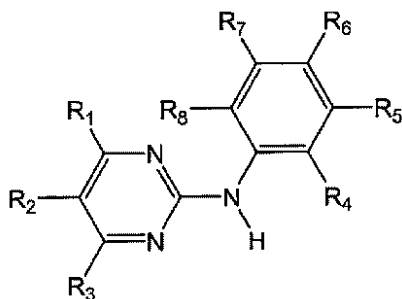
20

30

別の実施形態にしたがって、本発明は、以下の式に記載される化合物、または少なくとも1つの塩形成基を含むこのような化合物の塩を包含する：

【0022】

【化6】



40

ここで：

R₁ は、4-ピラジニル；1-メチル-1H-ピロリル；アミノ置換フェニルもしくはアミノ低級アルキル置換フェニル（各々の場合においてこのアミノ基は、遊離であるか、アルキル化されているか、またはアシル化されている）；5員環の炭素原子で結合した1H-インドリルまたは1H-イミダゾリル；あるいは環の炭素原子で結合した非置換ピリジルまたは低級アルキル置換ピリジル（この窒素原子は酸素により置換されていないか、

50

または酸素により置換されている)であり;

R_2 および R_3 は、各々独立に、別の水素または低級アルキルであり、ラジカル R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 のうちの1つまたは2つは、各々ニトロ、フルオロ置換低級アルコキシまたは以下の式のラジカル



であり、ここで:

R_9 は、水素または低級アルキルであり;

X は、オキシ、チオ、イミノ、 N -低級アルキル-イミノ、ヒドロキシイミノまたは O -低級アルキル-ヒドロキシイミノであり;

Y は、酸素または NH 基であり、

n は、0 または 1 であり;そして

R_{10} は、少なくとも5個の炭素原子を有する脂肪族ラジカル、または芳香族ラジカル、芳香族-脂肪族ラジカル、脂環式ラジカル、脂環式-脂肪族ラジカル、複素環式ラジカルまたは複素環式脂肪族ラジカルであり;

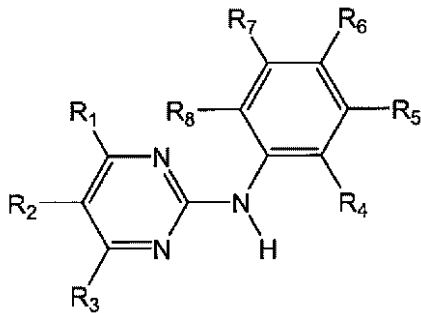
そして残りのラジカル R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 は、各々独立に、別の水素、低級アルキル(この低級アルキルは、置換されていないか、遊離もしくはアルキル化されたアミノ、ピペラジニル、ピペリジニル、ピロリジニルで置換されているか、またはモルホリニル、または低級アルカノイル、トリフルオロメチル、遊離ヒドロキシ、エーテル化ヒドロキシもしくはエステル化ヒドロキシ、遊離アミノ、アルキル化アミノもしくはアシル化アミノ、または遊離カルボキシもしくはエステル化カルボキシで置換されている)である。例えば、米国特許第5,521,184号(この全体が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

【0023】

別の実施形態にしたがって、本発明は、以下の式に記載される化合物、または少なくとも1つの塩形成基を含むこのような化合物の塩を包含する:

【0024】

【化7】



ここで

R_1 は、4-ピラジニル; 1-メチル-1H-ピロリル; アミノ置換フェニルもしくはアミノ低級アルキル置換フェニル(各々の場合においてこのアミノ基は、遊離であるか、1つもしくは2つの低級アルキルラジカルでアルキル化されているか、または低級アルカノイルもしくはベンゾイルでアシル化されている); 5員環の炭素原子で結合した1H-インドリルまたは1H-イミダゾリル;あるいは環の炭素原子で結合した非置換ピリジルまたは低級アルキル置換ピリジル(この窒素原子は酸素により置換されていないか、または酸素により置換されている)であり;

R_2 および R_3 は、各々独立に、別の水素または低級アルキルであり、ラジカル R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 のうちの1つまたは2つは、各々ニトロ、フルオロ置換低級アルコキシまたは以下の式のラジカル



であり、ここで:

R_9 は、水素または低級アルキルであり;

10

20

30

40

50

Xは、オキソ、チオ、イミノ、N - 低級アルキル - イミノ、ヒドロキシイミノまたはO - 低級アルキル - ヒドロキシイミノであり；

Yは、酸素またはNH基であり、

nは、0または1であり；そして

R₁₀は、5個～22個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素ラジカル；フェニルラジカルまたはナフチルラジカル（これらの各々は、置換されていないか、またはシアノ、低級アルキル、ヒドロキシル - 低級アルキル、アミノ - 低級アルキル、（4 - メチル - ピペラジニル） - 低級アルキル、トリフルオロメチル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、アミノ、低級アルキルアミノ、ジ低級アルキルアミノ、低級アルカノイルアミノ、ベンゾイルアミノ、カルボキシで置換されているか、または低級アルコキシカルボニルまたはフェニル低級アルキルで置換されている）（このフェニル低級アルキルで置換されたフェニルラジカルは、置換されていないか上記のように置換されている）；30個までの炭素原子を有するシクロアルキルラジカルまたはシクロアルケニルラジカル（このシクロアルキル部分またはシクロアルケニル部分のシクロアルキル低級アルキルまたはシクロアルケニル低級アルキルは各々、30個までの炭素原子を有する）；単環式ラジカル（5～6個の環構成原子、ならびに窒素、酸素および硫黄から選択される1～3個の環のヘテロ原子を有し、1つまたは2つのベンゼンラジカルがこの単環式ラジカルに融合していてもよい）；あるいはそのような単環式ラジカルで置換された低級アルキルであり；

そして残りのラジカルR₄、R₅、R₆、R₇およびR₈は、各々独立に、別の水素、低級アルキル（この低級アルキルは、置換されていないか、あるいはアミノ、低級アルキルアミノ、ジ - 低級アルキルアミノ、ピペラジニル、ピペリジニル、ピロリジニルで置換されているか、またはモルホリニルまたは低級アルカノイル、トリフルオロメチル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、アミノ、低級アルキルアミノ、ジ - 低級アルキルアミノ、低級アルカノイルアミノ、ベンゾイルアミノ、カルボキシ、または低級アルコキシカルボニルで置換されている）である。例えば、米国特許第5,521,184号（この全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

【0025】

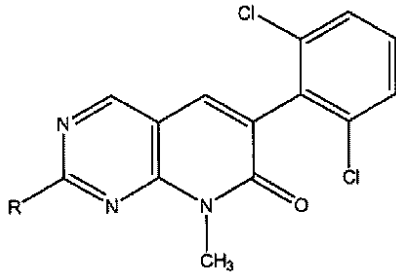
細胞増殖の阻害は強力な選択であるため、癌患者は、STI - 571への耐性を発達させる。このSTI - 571への耐性を発達させる傾向は、より強力なチロシンキナーゼインヒビター（例えば、ピリド[2,3-d]ピリミジン（PD）化合物）への探索を導いた。PDはより強い効力を示すが、基質特異性についてはSTI - 571と多少異なる。そしてPDはまた、Ablファミリーチロシンキナーゼを阻害することに加えて、Srcファミリーキナーゼ、PDGFRキナーゼおよびFGFRキナーゼも阻害し得る（Schindlerら（2000）*Science* 289（5486）：1938～1942；Wisniewskiら（2002）*Cancer Res.* 62（15）：4244～4255；Dorseyら（2000）*Cancer Res.* 60：3127；Krakerら（2000）*Biochem. Pharmacol.* 60：885）。PDは単に、これらのキナーゼが活性状態であるときに、ATPの結合を競合的に阻害する。

【0026】

本発明の一実施形態において、細菌感染またはウイルス感染を予防または処置するための方法が提供され、この方法は、治療有効量のピリド[2,3-d]ピリミジンを、それを必要とする被験体に投与する工程を包含する。本発明にしたがって使用され得るピリド[2,3-d]ピリミジンとしては、Krakerら（2000）*Biochem. Pharmacol.* 60（7）：885～898に記載される化合物ならびにKlutckora（1998）*J. Med. Chem.* 41：3276～3292およびBoschelliら（1998）*J. Med. Chem.* 41：4365～4377から導入される方法を使用して合成される化合物が挙げられる。このような化合物としては、以下の構造式により示される化合物が挙げられる：

【0027】

【化8】



ここでRは以下に相当する：

【0028】

【化9】

PD 173955		SKI DV 2-35	
PD 173952		SKI DV 2-33	
PD 173958		SKI DV 2-89	

【0029】

10

20

30

【化 1 0】

PD 173956		SKI DV 1-10	
PD 166326		SKI DV- M017	
SKI DV 1-10		SKI DV- M016	
PD 180970		SKI DV 2-43	
SKI DV 2-43		SKI DV 2-53	
SKI DV 2-47		SKI DV 2-71	
SKI DV 1-28		SKI DV 2-87	
SKI DV 2-45			

別の実施形態において、本発明にしたがった使用のために選択されるピリド[2, 3-d]ピリミジンは、以下からなる群から選択される：

a. PD 166326 (6-(2, 6-ジクロロフェニル)-2-(3-ヒドロキシメチルフェニルアミノ)-8-メチル-8H-ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-オン)；

b. PD 173952 (6-(2, 6-ジクロロフェニル)-8-メチル-2-(4-ホルホリノフェニルアミノ)-8H-ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-オン)；

c. PD 173955 (6-(2, 6-ジクロロフェニル)-8-メチル-2-(3-メチルスルファニル-フェニルアミノ)-8H-ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-オン)；

d. PD 173956 (6-(2, 6-ジクロロフェニル)-2-(4-フルオロフェ

10

20

30

40

50

ニルアミノ) - 8 - メチル - 8 H - ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 - オン) ;
 e . PM 7 3 9 5 8 (6 - (2 , 6 - ジクロロフェニル) - 2 - (4 - エトキシフェニルアミノ) - 8 - メチル - 8 H - ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 - オン) ; および
 f . PD 1 8 0 9 7 0 (6 - (2 , 6 - ジクロロフェニル) - 2 - (4 - フルオロ - 3 - メチルフェニルアミノ) - 8 - メチル - 8 H - ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 - オン) 。

【 0 0 3 0 】

BMS - 3 5 4 8 2 5 は、STI - 5 7 1 耐性の症例において有用であることが示されている別のチロシンキナーゼインヒビターである。BMS - 3 5 4 8 2 5 は、より緩い立体配座要求性で Abl に結合し、STI - 5 7 1 と比較して 2 対数高い効力で Abl チロシンファミリーキナーゼを阻害することが示されている SRC ファミリーキナーゼの合成低分子インヒビターである (Shahら (2004) Science 305 : 399 ~ 401) 。

10

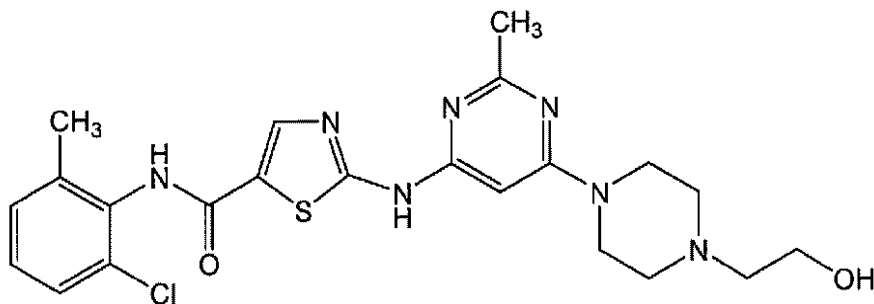
【 0 0 3 1 】

したがって、本発明の一実施形態において、細菌感染またはウイルス感染を予防または処置するための方法が提供され、この方法は、治療有効量の BMS - 3 5 4 8 2 5 ([N - (2 - クロロ - 6 - メチルフェニル) - 2 - (6 - (4 - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - 1 - イル) - 2 - メチルピリミジン (methyl pyrimidin) - 4 - イルアミノ) チアゾール - 5 - カルボキサミドとも呼ばれる) を投与する工程を包含する。BMS - 3 5 4 8 2 5 は以下の構造を有する。

20

【 0 0 3 2 】

【 化 1 1 】



30

本発明は、上記の特定の化合物の使用だけでなく、任意のその薬学的に受容可能な塩、鏡像異性体、アナログ、エステル、アミド、プロドラッグ、代謝産物または誘導体の使用もまた包含することが理解される。

【 0 0 3 3 】

(薬学的組成物)

チロシンキナーゼインヒビターは、既に薬物開発の対象であるか、または特定の癌を処置するために使用されているので、データは、これらがヒトにおいて長期間 (月) の間でさえもよく許容され、かつ毒性を示さないことを確証している。これらの薬物は、経口摂取され得、室温において安定であり、そして製造するのに簡単かつ安価である。

40

【 0 0 3 4 】

本発明の一実施形態において、病原体感染 (特に、微生物感染) を処置または予防する方法は、このような処置を必要とする生存している被験体に、この生存している被験体への投与に適切な薬学的組成物の有効量を投与する工程を包含する。この薬学的組成物は、以下を含む : (a) 少なくとも 1 種の病原体 (特に、微生物) に応答性の、この生存している被験体の宿主細胞由来の阻害可能な応答を増強するために有効な量での、少なくとも 1 種のチロシンキナーゼインヒビター ; および (b) この生存している被験体への投与に適切な薬学的に受容可能なキャリア。

【 0 0 3 5 】

別の実施形態において、本発明はまた、生存している被験体への投与に適切な薬学的組

50

成物に関し、この薬学的組成物は以下を含む：(a)少なくとも1種の細菌に応答性の、この生存している被験体の宿主細胞由来の阻害可能な応答を増強するために有効な量での、少なくとも1種のチロシンキナーゼインヒビター；および(b)この生存している被験体への投与に適切な薬学的に受容可能なキャリア。

【0036】

別の実施形態において、本発明はまた、生存している被験体への投与に適切な薬学的組成物に関し、この薬学的組成物は以下を含む：(a)少なくとも1種のウイルスに応答性の、この生存している被験体の宿主細胞由来の阻害可能な応答を増強するために有効な量での、少なくとも1種のチロシンキナーゼインヒビター；および(b)この生存している被験体への投与に適切な薬学的に受容可能なキャリア。

10

【0037】

薬学的に受容可能なキャリアは、生存している被験体への経口投与に適切であり得、そして薬学的組成物は、生存している被験体へ経口投与される。薬学的に受容可能なキャリアはまた、生存している被験体への経鼻投与に適切であり得、そして薬学的組成物は、生存している被験体へ経鼻投与される。または、薬学的に受容可能なキャリアは、生存している被験体への直腸投与に適切であり得、そして薬学的組成物は、生存している被験体へ直腸投与される。さらに、薬学的に受容可能なキャリアは、生存している被験体への静脈内投与に適切であり得、そして薬学的組成物は、生存している被験体へ静脈内投与される。その上、薬学的に受容可能なキャリアはまた、生存している被験体への接種による投与に適切であり得、そして薬学的組成物は、生存している被験体へ接種によって投与される。加えて、薬学的に受容可能なキャリアはまた、生存している被験体への皮下投与に適切であり得、そして薬学的組成物は、生存している被験体へ皮下投与される。したがって、処置または予防される病原体感染に依存して、本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターを含む薬学的組成物は、任意の適切な経路により投与され得る。この適切な経路としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：経口経路、経鼻経路、口腔経路、舌下経路、静脈内経路、経粘膜経路、直腸経路、局所経路、経皮経路、皮下経路、吸入による経路、または髄腔内経路。

20

【0038】

特に、別の実施形態において、これらの薬学的組成物は、経口投与可能な懸濁物、飲用の溶液もしくは錠剤；経鼻スプレーもしくは経鼻ドロップ；または油性(olegenu)の懸濁物もしくは油性の坐剤の形態であり得る。

30

【0039】

懸濁物として経口投与される場合、本発明の組成物は、薬学的処方物の分野において周知の技術により調製され、そして、容積を与えるための微結晶性セルロース、懸濁剤としてのアルギン酸またはアルギン酸ナトリウム、増粘剤としてのメチルセルロース、および当該分野において公知の甘味剤/矯味矯臭剤を含み得る。即時放出性の錠剤の場合、これらの組成物は、微結晶性セルロース、リン酸二カルシウム、デンプン、ステアリン酸マグネシウムおよびラクトース、ならびに/または当該分野において公知である他の賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、希釈剤および滑沢剤を含み得る。口内洗浄またはリンスの処方物中の成分としては、抗菌剤、界面活性剤、共界面活性剤(cosurfactant)、油、水および当該分野において公知の甘味剤/矯味矯臭剤のような他の添加剤が挙げられる。

40

【0040】

飲用の溶液により投与される場合、この組成物は、適切なpHに調整され、キャリアとともに飲用液体(例えば、水)に溶解された本明細書に記載の1種以上のチロシンキナーゼインヒビター化合物を含む。この飲用液体に溶解される化合物は、1nM以上のオーダーで、血流中の濃度を与えるのに十分な量であり、好ましくは、インビボで有効である有効量である。

【0041】

経鼻投与される場合、これらの組成物は、薬学的処方物の分野において周知の技術によ

50

り調製され、そして、ベンジルアルコールもしくは他の適切な保存剤、バイオアベイラビリティを増進させる吸収促進物質、および/または当該分野において公知の可溶化剤もしくは分散剤を利用して、生理食塩水の溶液として調製され得る(例えば、Anselら(1999) *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (第7版)を参照のこと)。

【0042】

好ましくは、これらの組成物および処方物は、適切な非毒性の薬学的に受容可能な成分とともに調製される。これらの成分は、経鼻投薬形態の調製における当業者にとって公知であり、そしてこれらの成分のうちの数種は、Remington's *Pharmaceutical Sciences* (第18版、Mack Publishing Company, Eaton, PA; 1990) (本分野における標準的な参考文献)に見出され得る。適切なキャリアの選択は、所望の経鼻投薬形態(例えば、溶液、懸濁物、軟膏またはゲル)の正確な性質に強く依存する。経鼻投薬形態は、一般的に、活性成分に加えて大量の水を含む。微量の他の成分(例えば、pH調整剤、乳化剤もしくは分散剤、保存剤、界面活性剤、ゼリー化剤または緩衝化剤ならびに他の安定化剤および可溶化剤)もまた、存在し得る。

【0043】

本発明の処方物は、以下を多様に含み得る：(1) pHを調整するための他の酸および塩基；(2) 他の張度付与剤(例えば、ソルビトール、グリセリンおよびブドウ糖)；(3) 他の抗菌保存剤(例えば、他のパラヒドロキシ安息香酸エステル、ソルビン酸塩、安息香酸塩、プロピオン酸塩、クロルブタノール、フェニルエチルアルコール、塩化ベンザルコニウムおよび水銀剤)；(4) 他の粘度付与剤(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールおよび他のゴム)；(5) 適切な吸収増進剤；(6) 安定化剤(例えば、重硫酸塩およびアスコルビン酸塩のような抗酸化剤)、金属キレート化剤(例えば、エデト酸(edentate)ナトリウム)および薬物溶解性増進剤(例えば、ポリエチレングリコール)。

【0044】

上記の経鼻処方物は、ドロップ、スプレーとしてか、または任意の他の鼻内投薬形態により投与され得る。必要に応じて、送達系は、単位用量の送達系であり得る。用量あたりに送達される溶液または懸濁物の容量は、5 μ L ~ 500 μ Lのどれかであり得、そして好ましくは5 μ L ~ 200 μ Lであり得る。これらの種々の投薬形態のための送達系は、点滴瓶、プラスチック製搾り出し装置、噴霧器、および単位用量包装または複数用量包装のいずれかでの同様な物であり得る。ロゼンジは、米国特許第3,439,089号(これらの目的のために本明細書で参考として援用される)にしたがって調製され得る。

【0045】

坐剤の形態で直腸投与される場合、これらの組成物は、この薬物と適切な無刺激性賦形剤(ココアバター、合成グリセリドエステルまたはポリエチレングリコール)とを混合することにより調製され得る。この賦形剤は、通常温度では固体であるが、直腸腔内において液化および/または溶解し、薬物を放出する。

【0046】

1日あたり1mg以上のオーダーでの投薬レベルが、本明細書の上記の宿主の生体中の病原体感染および関連する疾患の処置または予防において有用であり得る。本発明の一実施形態において、病原体感染の処置または予防を必要とする患者は、体重約70kgの患者に対し、本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターを1日あたり以下の量で投与される：約1mg以上、約5mg以上、約10mg以上、約20mg以上、約30mg以上、約40mg以上、約50mg以上、約60mg以上、約70mg以上、約80mg以上、約90mg以上、約100mg以上、約110mg以上、約120mg以上、約130mg以上、約140mg以上、約150mg以上、約160mg以上、約170mg以上、約180mg以上、約190mg以上、約200mg以上、約210mg以上、約220mg以上、約230mg以上、約240mg以上、約250mg以上、約260mg

10

20

30

40

50

以上、約 270 mg 以上、約 280 mg 以上、約 290 mg 以上、約 300 mg 以上、約 310 mg 以上、約 320 mg 以上、約 330 mg 以上、約 340 mg 以上、約 350 mg 以上、約 360 mg 以上、約 370 mg 以上、約 380 mg 以上、約 390 mg 以上、約 400 mg 以上、約 410 mg 以上、約 420 mg 以上、約 430 mg 以上、約 440 mg 以上、約 450 mg 以上、約 460 mg 以上、約 470 mg 以上、約 480 mg 以上、約 490 mg 以上、約 500 mg 以上、約 510 mg 以上、約 520 mg 以上、約 530 mg 以上、約 540 mg 以上、約 550 mg 以上、約 560 mg 以上、約 570 mg 以上、約 580 mg 以上、約 590 mg 以上、あるいは約 600 mg 以上。いくつかの実施形態において、投与される用量は、体重約 70 kg の患者に対し、1 日あたり約 1 mg ~ 約 1000 mg (約 10 mg、約 20 mg、約 30 mg、約 40 mg、約 50 mg、約 60 mg、約 70 mg、約 80 mg、約 90 mg、約 100 mg、約 125 mg、約 150 mg、約 175 mg、約 200 mg、約 225 mg、約 250 mg、約 275 mg、約 300 mg、約 350 mg、約 400 mg、約 450 mg、約 500 mg、約 550 mg、約 600 mg、約 650 mg、約 700 mg、約 750 mg、約 800 mg、約 850 mg、約 900 mg、約 950 mg、約 1000 mg、および約 1 mg ~ 約 1000 mg の間の他のこのような値が挙げられる) の範囲である。しかしながら、任意の特定の患者のための特定の用量レベルおよび投薬頻度は、変更し得、かつ種々の因子(使用される特定の塩または他の形態の活性、この化合物の代謝安定性および作用の長さ、年齢、体重、身体全体の健康状態、性別、食事、投与様式および投与時間、排出速度、薬物の組み合わせ、特定の状態の重症度ならびに宿主が受けている治療が挙げられる)に依存することが理解される。

10

20

【0047】

好ましいレジメンにおいて、このような投薬量は、経鼻スプレーまたは経口ロゼンジのいずれかにより、それを必要とする被験体に投与され得る。

【0048】

特定の病原体感染(特に、微生物感染)を処置または予防するための本発明の薬学的組成物を使用することの有効度は、例えば、患者の感染因子、感染の段階、感染の重症度、年齢、体重および性別などに依存して変化し得る。

【0049】

「処置」は、本明細書において、本明細書の他の部分に記載される病原体感染、病原体感染に関連する症状または病原体感染の発達への素因を有する被験体への本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターの適用または投与として定義される。この「処置」の目的は、病原体感染、病原体感染に関連する任意の症状または病原体感染の発達への素因を治療するか、治癒させるか、緩和するか、軽減するか、変更させるか、治療(remedy)するか、回復させるか、改善するかまたは、それらに影響することである。「処置」により、本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターを含む薬学的組成物の、本明細書の他の部分に記載される病原体感染、病原体感染に関連する症状または病原体感染の発達への素因を有する被験体への適用または投与もまた意図される。この「処置」の目的は、病原体感染、病原体感染に関連する任意の症状または病原体感染の発達への素因を治療するか、治癒させるか、緩和するか、軽減するか、変更させるか、治療するか、回復させるか、改善するかまたは、それらに影響することである。

30

40

【0050】

本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターは、本明細書の上記の病原体感染を処置または予防するのに有用である。本明細書に記載の様式による病原体感染の処置または予防は、病原体の発生(特に、ポリオーマウイルス(例えば、JC および BK))と病原体感染とが移植された臓器の機能を減退させる臓器移植患者(例えば、腎移植患者)に対し、特に有用である。同様な様式で、HIV 感染は、脳内の希突起神経膠細胞を破壊し得、AIDS 関連性痴呆を導く。したがって、本明細書の他の部分に記載される病原体感染を処置または予防することに加えて、本明細書に記載のチロシンキナーゼインヒビターは、HIV 陽性患者および AIDS 患者ならびに臓器移植(腎移植)を受ける患者における

50

二次感染を制御するために使用され得、そしてA I D S 関連性痴呆を制御するために使用され得る。さらに、これらのチロシンキナーゼインヒビターは、免疫無防備状態の個体（H I V 陽性患者およびA I D S 患者が挙げられる）および臓器移植を受ける患者における、感染性ビリオンの拡散（例えば、ワクシニア感染に伴う）を防止するために予防的に使用され得る。

【0051】

（実験）

以下の実験では、病原体（特に、細菌性およびウイルス性の病原体）による宿主細胞の感染に対するチロシンキナーゼインヒビターの効果を試験した。これらの実験をさらに詳細に記載する前に、研究された病原体および宿主 - 病原体相互作用の基本的な説明を提供することが有用である。

10

【0052】

腸病原性 *E. coli* (EPEC) および腸出血性 *E. coli* (EHEC) を含む病原性の *E. coli* は、水および食品備蓄を汚染し、乳児の下痢を引き起こす。EPEC および EHEC は、NIAID によってカテゴリ B 病原体として分類される。途上諸国において、EPEC は、毎年およそ 2 千万人に疾病をもたらし、500,000 人を死亡させる (Goosney ら (2000) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16:173)。「ロウハンバーガー病 (raw hamburger disease)」の原因因子である EHEC は、食品を汚染し、下痢およびしばしば致死性の結果である溶血性尿毒症症候群と関連する。EHEC は、溶血性尿毒症症候群と関連する症状を引き起こす 2 種類の志賀毒素を有する (Perma ら (2001) *Nature*, 409 (6819):529-33)。

20

【0053】

EPEC、EHEC、および *Citrobacter (C.) rodentium* (マウス EPEC) は、アクチンで充填された膜の突出（または「台座様構造 (pedestal)」) を、自己の下の上皮細胞の表面上に形成する (Knutton ら (1989) *Lancet* 2:218; McDaniel ら (1997) *Mol. Microbiol.*, 23:399)。台座様構造は、食菌作用を妨害し、宿主でのコロニー形成を可能にし、その後の疾患の発症のために必要とされる (Goosney ら (1999) *Infect. Immun.*, 67:490; Jerse ら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:7839)。台座様構造が形成される機構は、広範囲にわたって調査されている (Kalman ら (1999) *Nat. Cell Biol.*, 1:389)。台座様構造の発達および下痢の発症の両方は、Tir と称される宿主細胞中へ分泌される細菌のタンパク質をリン酸化する、宿主のチロシンキナーゼの細菌の下での活性化に決定的に依存している (Kenny ら (1997) *Cell*, 91:511; Kenny (1999) *Mol. Microbiol.*, 31:1229)。細菌のリガンドである インチミン (intimin) の結合によって、台座様構造形成をもたらす宿主のシグナル伝達カスケードが開始される。

30

【0054】

EPEC の病原における分水界での事象は、EPEC の Tir のリン酸化である (Kenny (1999) *Mol. Microbiol.*, 31:1229)。リン酸化されると、EPEC の Tir は、宿主細胞タンパク質の動員 (recruitment) および活性化を促進し、この宿主細胞タンパク質は、アクチン重合を開始し、台座様構造と接触し、台座様構造を支持する。この宿主細胞タンパク質として、Nck、N-WASP、および Arp2/3 複合体が挙げられる (Kalman ら (1999) *Nat. Cell Biol.*, 1:389; Lommel ら (2001) *EMBO Rep.*, 2:850; Gruenheid ら (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3:85619; Rohatgi ら (1999) *Cell*, 97:221)。

40

【0055】

ワクシニアウイルス (VV) および痘瘡ウイルスは、Poxviridae 科のメンバ

50

ーであり、これらのウイルスは、配列が95%同一である (Espositoら (1990) Poxviruses, Fields Virology, D.M. Knipe 編、Raven Press: New York. p. 2336; Moss (1990) Poxviridae: The Viruses and Their Replication, Fields Virology, D.M. Knipe 編、Raven Press: New York. p. 2336)。VVウェスタン・リザーブ (WR) 株は、痘瘡の原因である大痘瘡ウイルスに対する接種物質として役立つ。VVおよび痘瘡ウイルスは、哺乳動物細胞に侵入し、核外複製「工場」を確立し、エンベロープビリオン (enveloped virion) を産生する (Moss (1990) Poxviridae: The Viruses and Their Replication, Fields Virology, D.M. Knipe 編、Raven Press: New York. p. 2336)。これらのビリオンは、微小管モーターを用いて細胞表面へ移動し、アクチンを重合することによって、向かい合っている細胞に移動する (Ploubidouら (2000) EMBO J., 19 (15): p. 3932 - 44; Rietdorffら (2001) Nat. Cell Biol. 3 (11): p. 992 - 1000; WardおよびMoss (2001) J. Virol., 75 (23): p. 11651 - 63; WardおよびMoss (2001) J. Virol., 75 (10): p. 4802 - 13; Cudmoreら (1996) J. Cell Sci., 109 (Pt 7): p. 1739 - 47; Cudmoreら (1997) Trends Microbiol., 5 (4): p. 142 - 8)。そこで、これらのビリオンはアクチンを重合し、宿主細胞の細胞質を通して細胞膜へと自己を推進し、そこで細胞から出て向かい合っている細胞へ侵入する。アクチンの「コメット (comet)」の形成は、ワクシニアが細胞から細胞へと拡散するために不可欠であると考えられる。アクチンに基づく運動性に関して、ワクシニアは、粒子表面へのチロシンキナーゼを含む宿主細胞の分子の動員に依存する。最終的に、この宿主細胞は、細胞溶解反応を起こし、それによってさらなる感染性粒子を放出する。

【0056】

チロシンキナーゼおよびセリン/スレオニンキナーゼは、ウイルス感染のいくつかの局面に関して重要である。アクチンに基づく移動性は、宿主細胞のc-SrcおよびAblに関連するチロシンキナーゼの活性に依存し、複製は、少なくとも部分的に、ウイルスのチロシンキナーゼに依存するが、その正確な機構はあまりよく理解されていない (Frischkechtら (1999) Nature 401 (6756): 926 - 929; Rempelら (1992) J. Virol. 66 (7): 4413 - 4426; Traktmanら (1995) J. Virol. 69 (10): 6581 - 6587; Traktmanら (1989) J. Biol. Chem. 264 (36): 21458 - 21461)。

【0057】

ポックスウイルスの宿主細胞への侵入の後、このビリオンは、核近傍 (juxtanclear) の位置へ移動し、そこで、このビリオンは、 10^4 個まで鎖状体 (concatameric) のゲノムを複製する (Moss (1990) Poxviridae: The Viruses and Their Replication, Fields Virology, D.M. Knipe 編、Raven Press: New York, p. 2336)。この鎖状体は、エンベロープで被膜された個々の粒子 (細胞内成熟ビリオン (IMV) と称される) を最終的に形成し、その一部はさらなる膜内に包まれ細胞内エンベロープビリオン (enveloped virion) (IEV: Smithら (2003) Annu. Rev. Microbiol., pp. 323 - 342) を形成する。細胞溶解反応は、この細胞からIMVを放出する。しかし、細胞溶解反応に先立ち、IEVは、キネシン/微小管輸送系を介して宿主細胞の抹消へ向かって移動する (Carterら (2003) J. Gen. Virol., pp. 2443 - 2458; Hollinsheadら (2001) J. Cell Biol., pp. 389 - 402;

10

20

30

40

50

Rietdorffら(2001) *Nat. Cell Biol.*, pp. 992 - 1000; WardおよびMoss(2001) *J. Virol.*, pp. 11651 - 11663)。

【0058】

細胞から出るために、IEV粒子は、宿主細胞の細胞膜と融合し、細胞関連エンベロプウイルス(CEV)を形成し、その2つの外膜のうち的一方を後に残す(Smithら(2003) *Ann. Rev. Microbiol.*, pp. 323 - 342; Smithら(2002) *J. Gen. Virol.*, pp. 2915 - 2931)。CEVは、直接的に分離するか、または、アクチン重合を開始し、アクチンで充填された膜隆起の上で向かい合っている細胞へ向かってこの粒子を推進し、そして分離する(Smithら(2003) *Ann. Rev. Microbiol.*, pp. 323 - 342)。アクチンの運動性は、AblおよびSrcファミリーのキナーゼに依存するが、細胞外エンベロプウイルス(EEV)を形成するCEVの分離は、Ablファミリーのキナーゼに依存する(Smithら(2003) *Ann. Rev. Microbiol.*, pp. 323 - 342)。

10

【0059】

CEVを取り囲む膜の中に位置される、VV A36R遺伝子によってコードされるタンパク質(A36Rと称される)が、アクチン重合およびビルレンスのために必要とされることは公知である(Wolffeら(1998) *Virology* pp. 20 - 26; ParkinsonおよびSmith(1994) *Virology* pp. 376 - 390)。アクチン重合および細胞から細胞への拡散における分水界での事象は、宿主細胞のチロシンキナーゼによるA36Rのチロシン残基のリン酸化である(Newsomeら(2004) *Science* 306:124 - 128; Frischknechtら(1999) *Nature* 401(6756):926 - 929)。上記のEPEC Tirタンパク質とVVタンパク質A36Rとの間には顕著な相同性が存在し、従って、EPECと同様であるが同一ではない宿主シグナル因子を用いて、アクチンを重合し宿主細胞から出る(FrischknechtおよびWay(2001) *Trends Cell Biol.* 11(1):30 - 38)。

20

【0060】

以前の報告は、哺乳動物のチロシンキナーゼであるc-Srcがピリオンに局在することを示唆する(Frischknechtら(1999) *Nature* 401(6756):926 - 929)。さらに、微小管からのピリオンの放出およびアクチンテイル(actin tail)の形成のためのアクチンの核形成は、Srcキナーゼおよび他のキナーゼによるA36Rのリン酸化に依存する(Newsomeら(2004) *Science* 306:124 - 128; Frischknechtら(1999) *Nature* 401(6756):926 - 929; Kalmanら(1999) *Nat. Cell Biol.* 1:389 - 391)。リン酸化されると、A36Rは、キネシンの分離、ならびに宿主細胞のタンパク質の動員および活性化を促進し、この宿主細胞のタンパク質は、この粒子の下でアクチン重合を開始する。この宿主細胞のタンパク質として、Nck、Grb2、N-WASPおよびArp2/3複合体が挙げられる(FrischknechtおよびWay(2001) *Trends Cell Biol.* 11(1):30 - 38; Moreauら(2000) *Nat. Cell Biol.*, pp. 441 - 448; Scaplehornら(2002) *Curr. Biol.*, pp. 740 - 745)。実際、ワクシニアは、宿主の細胞質を通して自己を推進するために、Shigella flexneriによって用いられる機構と同様の機構を用いる。例えば、ShigellaおよびVacciniaのどちらも、アクチンを重合する手段として、N-WASPおよびArp2/3複合体を動員し活性化する(FrischknechtおよびWay(2001) *Trends Cell Biol.* 11(1):30 - 38)。

30

40

【0061】

(実験1 - SrcファミリーチロシンキナーゼおよびAblファミリーチロシンキナー

50

ぜは、V Vのアクチンの運動性および感染性ビリオンの放出に関係する)

本実験の目的は、Srcファミリー(c - Src、c - Fyn、およびc - Yes)ならびにAblファミリー(c - Ablおよびc - Arg)のメンバーを含む数種のチロシンキナーゼが、アクチンの運動性および感染性EEVの放出のために必要とされるか否かを試験することであった。これらのキナーゼの一つ以上を欠失する線維芽細胞をこれらの酵素の潜在的インヒビターと共に用いた(Garcia - Echeverriaら(2000) Med. Res. Rev., pp. 28 - 57)。

【0062】

(方法)

3T3細胞、Abl^{-/-}/Arg^{-/-}マウス由来の3T3細胞、またはSrc^{-/-}/Fyn^{-/-}/Yes^{-/-}マウス由来の3T3細胞を、カバーガラス上で血清を含むDMEM中で培養し、16時間37℃で、適切な量の感染多重度(m.o.i)でのVV(WR株)またはVV-GFP-B5Rと共にインキュベートした。いくつかの実験について、細胞を、Fugene-6(Roche)を用いたプラスミドベクターによる感染の1~2日前にトランスフェクトした。Abl-T315I、Arg1-T314I、およびSrc-T338Mを、Quick-Change部位指向性変異誘発技術を用いて構築した。PD化合物であるPD166326、SKI-DRV-1-10を、本明細書の他の場所に記載されるように合成した。これらの化合物の効果は、全てのアッセイにおいて識別不能であった。STI-571を、本明細書の他の場所に記載されるように合成した。STI-571、PD化合物、およびPP2(Calbiochem)を、100% DMSO中に溶解した。PD、PP2、またはDMSOを、いずれか感染の1時間前に細胞に加えた。「リバーサル(reversal)」実験のために、化合物またはDMSOを、VVの添加の14時間後に細胞に加え、そしてこれらの細胞をその後15分間~2時間固定した。

【0063】

免疫蛍光解析のために、細胞を2%ホルムアルデヒド中で固定し、Triton-X-100中で浸透(permeabilize)させた。VVを4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI:1μg/ml;Sigma)を用いて染色することによって認識し、アクチンテイルを、FITC-ファロイジン(1μg/ml;Molecular Probes)を用いて染色することによって認識した。本研究において用いた一次抗体および濃度は以下のものである: - WASP pAb(アフィニティ精製済、1:200希釈)、- HA mAb(3F10;0.01μg/ml、Roche)、- Nck mAb(1μg/ml;Oncogene Research)、- Abl mAb(AB3;過剰発現Ablタンパク質に対して0.5μg/ml;内因性Ablタンパク質に対して50μg/ml;8E9;0.05μg/ml;Pharmingen)、u-Src pAb(0.1μg/ml;Santa Cruz)、- Arg、- pY412、および - TW2.3 mAb(腹水、1:2000、顕微鏡法用)。外因性c-Abl-WTを発現する細胞を、より低い - Abl mAb濃度を用いて比較的高い蛍光強度によって識別した。従って、内因性c-Abl様タンパク質を検出するために用いた曝露よりも著しく短時間の曝露によって、画像を得た。二次抗体を、Jackson Immunochemicalsから入手した。

【0064】

免疫沈降実験のために、未感染細胞またはVVで感染させた細胞を、冷リン酸緩衝化生理食塩水を用いて3回リンスし、20mMのTris,pH7.2、150mMのNaCl、5mMのEDTA、1%のTriton-X-100、10%のグリセロール、1mMのオルトバナジン酸ナトリウム、およびプロテアーゼインヒビター(Complete protease inhibitor mix;Roche)中で30分間4℃で溶解した。サンプルを、20分間、10,000×gで遠心した。サンプルを、一次抗体(-YFP、-Src、または-Abl)と共に2時間4℃でインキュベートし、さらに1時間プロテインGビーズと共にインキュベートした。このビーズを、溶解緩衝液で

10

20

30

40

50

洗淨し、免疫ブロット法によって解析するか、またはインビトロキナーゼアッセイにおいて使用した。インビトロキナーゼアッセイのために、GST-Crk (AblおよびArgについての)を基質として用い、20 μ lのKinase Assay Buffer (25mMのTris、10mMのMgCl₂、1mMのDTT)中の10 μ MのATP、および、前もって細胞内ヘトランスフェクトし、-Abl抗体または-YFP抗体を用いた免疫沈降法によりアガロースビーズで単離したc-Abl、c-Abl-T315I、YFP-Arg、またはYFP-Arg-T314Iと共に、30分間23 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。サンプルをそれからSDS-PAGEに供し、PVDFメンブレンにトランスファーし、-リン酸化チロシン抗体である4G10、または-Abl mAb AB3、あるいは-YFPを用いて免疫ブロットした。

10

【0065】

63xN.A.1.4レンズ(Zeiss)を用いるZeiss 200M倒立顕微鏡に基づく多重波長の広視野三次元顕微鏡システム(Intelligent Imaging Innovations)に備え付けた科学等級の冷却型電荷結合素子(Cool-Snap HQ)を用いて、画像を得た。免疫蛍光サンプルを、室温で標準的なSedatフィルターセット(Chroma)を用いて、サンプルを通して連続する0.20 μ mの焦点面で画像化し、焦点外の光を、強制的双方向逆重畳(constrained interactive deconvolution)アルゴリズムによって除去した。

【0066】

20

ブランクアッセイのために、細胞を24-ウェルのディッシュ中に蒔き、コンフルエンスまで培養し、種々の一連の希釈率でのVV-WRと共にインキュベートした。一時間後、これらの細胞を、過剰のウイルスを除去するために洗淨し、そしてこれらの細胞をさらに3~4日間インキュベートした。細胞はそれから固定され、20%のエタノールおよび4%のクマシーブルーを用いて染色し、ブランクを可視化した。分泌されたEEVの測定のために、感染の24時間後に培地を除去し、未感染の3T3細胞の単層に加え、そしてその4日後にブランクの数を評価した。異なる細胞株が感染されたか否かを決定する(ブランク減少アッセイ)のために、細胞の単層を超音波処理して細胞内のウイルス粒子を放出させ、遠心して細胞残屑を除去した。この上清を、それから連続的に希釈し、未感染の3T3細胞の単層に加え、そして3~4日後にブランクの数を評価した。

30

【0067】

6週齢のC57/B16マウス(Jackson laboratories)を、全てのマウスが7日以内に死亡する力価である10⁴ pfu/ml VVで、鼻腔内接種法によって感染させた。マウスの実験のために、PD-166326を、30%のDMSO、30%のPEG-400、および37%の生理食塩水中に溶解し、そしてSTI-571(メチラート塩(methylate salt))を生理食塩水中に溶解した。PD-166326(30mg/kg/日)を、腹腔内注射によって、感染の2~6時間前に始めて毎日2回投与し、STI-571(100mg/kg/日)を、皮下移植された浸透ポンプから投与した。以前に記載されるようなHPLC/MSによるコントロール動物の血中の薬物レベルの定量は、PD-166326が存在することを示した。血中のSTI-571のレベルは決定されなかった。これらの薬物濃度では、非感染動物における体重の減少または他の有害な影響は観察されなかった。従って、この薬物は非毒性であると考えられた。

40

【0068】

(結果)

(Src、Fyn、Yes、Abl、およびArgは、VVのアクチンテイルに局在する)SrcおよびAbl-ファミリーチロシンキナーゼがVVのアクチンの運動性に関係するという仮説を試験するために、SrcまたはAblに似ている内因性タンパク質がアクチンテイルの先端でピリオンに局在するか否かを最初に決定した。3T3細胞を、VVに15分間曝露させ、それからSrc、Fyn、Yes、Abl、およびArgに対する

50

抗体を用いて染色した。感染させた細胞を、核外複製中心(「RC」)を認識するDAPIを用いる染色によって、または感染の初期において発現されるワクシニアのタンパク質を認識する抗体であるa-TW2.3を用いる染色によって、認識した。

【0069】

これらのピリオン自体を、DAPI染色、またはピリオンの内側の膜中に局在するGFP-B5R融合タンパク質の蛍光によって認識した。アクチンテイルは、直接的にピリオンと向かい合う強いファロイジン染色として示され得る。Ab1関連キナーゼであるArgに対する抗体によって認識される内因性タンパク質は、細胞質に比べてアクチンテイルの先端で濃縮された。同様に、-Ab1 mAb 8E9、-Src pAb、-Fyn mAb、および-Yes mAbによって認識される内因性タンパク質もまた、細胞質に比べてアクチンテイルの先端で濃縮された。

同一の結果が、他の抗体(例えば、AB3、Ab1)を用いても得られた。

【0070】

抗体は特異的であって、これらのキナーゼを欠失する細胞においては、エピトープを認識せず、Src-ファミリーキナーゼまたはAb1-ファミリーキナーゼを欠失する細胞におけるトランスフェクション実験によって判定されるように、他のファミリーメンバーと交差反応性を示さない。特に、各々のキナーゼは、アクチンテイルの小部分のみにおいて検出可能であった。例えば、c-Ab1は一部のテイルにおいて検出可能であったが、同じ細胞内の他のテイルにおいては検出不可能であった。さらに、抗体の組合せ(例えば、-Ab1 mAbと-Arg pAbとの)を用いる染色は、Ab1キナーゼおよびArgキナーゼの両方が約5%のテイルにおいて明らかであるにも関わらず、1種類のキナーゼを含むテイルは、一般的には、検出可能なレベルの別のキナーゼ型を含まないことを示した。

【0071】

抗キナーゼ抗体の多くが同様のアイソタイプであるので全ての組合せを試験することは実行可能でないが、同様の結果を他の抗キナーゼ抗体の組合せを用いて得た。図1Aは、Ab1、Arg、Ab1およびArgの両方を含む、またはAb1およびArgのどちらも含まない3T3細胞のテイルの割合を示す。大部分のテイルが一方または他の一方のキナーゼを含むが、両方を含むテイルはほとんどないことに注意されたい。加えて、図1Bは、VVのアクチンテイルにおけるSrc-ファミリーキナーゼの分布を示す。5種類のSrc-ファミリーキナーゼおよびAb1-ファミリーキナーゼのうち、c-Fynと似ているタンパク質が、アクチンテイルにおいて最も頻繁に観察されたものである。最後に、PDGFR、FGFR、Lck、FAK、Ntk、Lyn、Jak1、Csk、Tyk2、およびPyk2を含む、他のチロシンキナーゼの局在について、証拠は見出されず、このことは、局在がSrc-ファミリーキナーゼおよびAb1-ファミリーキナーゼについて特異的であることを示唆する。

【0072】

抗キナーゼ抗体が実際に特異的であることを確実にするために、次に、外因性に発現されるキナーゼの局在および分布が、内因性タンパク質に関して観察される局在および分布と同じであるか否かを決定した。これを実行するために、イエロー蛍光タンパク質標識c-Arg(YFP-c-Arg)、非標識または赤血球凝集素(haemagglutinin)A(HA)標識c-Ab1(HA-c-Ab1)がアクチンテイルにおいて局在するか否かを評価した。YFP-c-Argは、トランスフェクトされた細胞のアクチンテイルの小部分においてのみ存在し、内因性タンパク質に対する染色を用いて得られた結果と概して一致した。高レベルのYFP-c-Argを発現する細胞においてすら、YFP-c-Argを含まないテイルがあり、このことは過剰発現されたキナーゼの局在が特異的であることを示唆する。加えて、他の過剰発現されたタンパク質について、共発現は観察されなかった：他の過剰発現されたタンパク質として、グリーン蛍光タンパク質もしくはイエロー蛍光タンパク質、-Hck pAbを用いて検出されるキナーゼであるHck(データは示さず)が挙げられる。これらの結果は共に、過剰発現されたチロシンキ

ナーゼがアクチンテイルにおいて特異的に局在し得ること、および、内因性タンパク質のように、トランスフェクトされたキナーゼが全てのテイルには局在しないことを示唆する。

【0073】

(c - Ablまたはc - Argは、VVのアクチンテイルにおいて活性化される)c - Ablまたはc - ArgがVVのアクチンテイルにおいて活性であるか否かを決定するために、両方のタンパク質の活性化ループ状ドメイン(Plukら(2002)Cell, 247-259)中のリン酸化されたY412を認識する抗体の株(-PY412)を用いた。しかし、-PY412 pAbによって認識される活性化ループのエピトープは、c - Ablおよびc - Argにおいて同一であるので、この抗体は、蛍光実験においてこの二つのタンパク質を区別し得ない。-PY412を用いる染色は、テイルにおいて明らかである。さらに、-PY412 pAbを用いる染色は、c - Ablまたはc - Argに対して特異的であって、c - Ablおよびc - Argを欠失する細胞において形成されたテイルにおいては明らかでなかった。

10

【0074】

(Src - ファミリーチロシンキナーゼまたはAbl - ファミリーチロシンキナーゼを欠損する細胞株でアクチンテイルが形成する)

Srcおよび/またはAbl - ファミリーチロシンキナーゼがアクチンテイルの形成のために必要であるか否かを決定するために、c - Srcを欠失するマウス(Src^{-/-})、c - SrcおよびYesを欠失するマウス(Src^{-/-}/Yes^{-/-})、c - Fynおよびc - Yesを欠失するマウス(Fyn^{-/-}/Yes^{-/-})、もしくは、c - Src、c - Fyn、およびc - Yesを欠失するマウス(Src^{-/-}/Fyn^{-/-}/Yes^{-/-})由来の3T3細胞、または、c - Ablのみを欠失するマウス(Abl^{-/-})、c - Argのみを欠失するマウス(Arg^{-/-})、もしくはc - Ablおよびc - Argの両方を欠失するマウス(Abl^{-/-}/Arg^{-/-})由来の3T3細胞を感染させた。これらの細胞を、VVまたはGFP - VVに曝露させ、Cy3ファロイジンを用いて染色した。

20

【0075】

特に、結果は、VVがこれらの細胞株の全てにおいてアクチンテイルを形成する能力を保持することを示した。野生型マウス由来の3T3細胞と比較して、これらの細胞株においてアクチンテイルを形成する能力には相違は見られなかった。Src^{-/-}/Fyn^{-/-}/Yes^{-/-}細胞において、ArgまたはAblによって占有されるテイルの割合は、野生型細胞においてこれらのキナーゼによって占有されるテイルの割合より多少高かった。図2は、Src^{-/-}/Fyn^{-/-}/Yes^{-/-}細胞またはAbl^{-/-}/Arg^{-/-}細胞におけるVVのアクチンテイルの中のAbl - ファミリーキナーゼおよびSrc - ファミリーキナーゼの分布の定量を提供する。Abl^{-/-}/Arg^{-/-}細胞において、c - Srcによって占有されるテイルの割合は、野生型細胞において観察された割合と同様であったが、c - Fynによって占有されるテイルの割合は野生型細胞と比較してより低く、c - Yesによって占有されるテイルの割合は野生型細胞と比較してより高かった。このテイルでのキナーゼの分布の相違にも関わらず、これらの結果は、c - Abl、c - Arg、c - Src、c - Fyn、またはc - Yesのいずれも、単独ではVVのアクチンテイルの形成のために必要ではないらしいことを示唆する。さらに、これらの結果は、他のチロシンキナーゼもまたアクチンテイルに局在し得る可能性、および/または、アクチンテイルへのキナーゼの局在が一時的なプロセスまたは連続的なプロセスであり得る可能性を提起する。

30

40

【0076】

Abl - ファミリーキナーゼおよびSrc - ファミリーキナーゼがアクチンテイルにおいて局在し、Abl - ファミリーキナーゼが活性化され、しかしいずれかのファミリーのメンバーを欠失するマウス由来の細胞株でテイルが形成したという観察は、二つの選択肢を示唆する。第一に、いずれかのファミリーのメンバーはアクチンテイルの形成を触媒し

50

得るが、これらのキナーゼのいずれか一つの非存在下においては、別のSrc-ファミリーまたはAbl-ファミリーのメンバーが充足し得る（「機能的重複性（functional redundancy）」）。あるいは、Src-ファミリーキナーゼまたはAbl-ファミリーキナーゼの局在および活性化は、アクチンテイルの形成と無関係であり得る（「局在的活性化（localized activation）」）。重複するAbl-ファミリーキナーゼおよびSrc-ファミリーキナーゼがアクチンテイルの形成に関与するか否かを決定するために、(i)野生型細胞または特定のチロシンキナーゼを欠失する細胞におけるアクチンテイルの形成を遮断するチロシンキナーゼのインヒビターの同定；および(ii)そのようなインヒビターの存在する場合にそのインヒビターに対して耐性のキナーゼ変異体がアクチンテイルの形成を支持する能力に基づいて、充足性（sufficiency）の試験法を開発した。

10

【0077】

(SrcおよびAbl-ファミリーチロシンキナーゼのインヒビターは、アクチンテイルの形成を遮断する)機能的重複性を局在的活性化から区別するために、野生型細胞におけるチロシンキナーゼインヒビターの効果を第一に評価した。ピリド[2,3-d]-ピリミジン(PD)化合物は、ATPの、Abl-ファミリーキナーゼ(c-Ablおよびc-Argを含む)ならびに相同なATP結合ドメインを有するキナーゼ(c-Src、c-Fyn、およびc-Yesを含む)への結合を競合的に阻害する(Dorseyら(2000)Cancer Res., pp 3127-3131; Krakerら(2000)Biochem. Pharmacol., pp. 885-898; Wisniewskiら(2002)Cancer Res., pp. 4244-4255)。

20

【0078】

3T3細胞を、Abl-ファミリーチロシンキナーゼおよびSrc-ファミリーチロシンキナーゼのインヒビターである、PD166326(5μM)を用いて処理し、次いでVVに8時間曝露させた。感染された細胞を認識するために、細胞をDAPIおよびγ-リン酸化チロシンpAbを用いて染色し、アクチンを認識するために、FITCファロイジンを用いて染色した。この条件では、アクチンテイルは存在しなかった。同様に、10μMのPDを用いて処理され、次いでVVによって感染された細胞において、アクチンテイルは見られなかった。1μMより低い濃度のPDは、効果を有さなかった。感染の初期において発現されるVVタンパク質を認識するγ-TW2.3(Yuwenら(1993)Virology, pp. 732-744)を用いる染色は、10μMのPDを用いて処理された細胞において明らかであった。このことは、この薬物がウイルスの侵入を遮断しなかったことを示唆する。さらに、DAPI染色またはγ-リン酸化チロシンpAbを用いる染色は、10μMのPDの存在下において核外複製中心の存在を明らかにした。このことは、この薬物がウイルスの複製に対して検出可能な効果を有さなかったことを示す。アクチンテイルを有する感染された細胞の数の定量は、10μMのPDを用いる処置が、各々の時点で、VVのテイルの形成をキャリアコントロール(0.1%DMSO;図3)に比較して少なくとも50倍低下させたことを示した。PDが、残存したアクチンテイルの分解を付加的に引き起こした可能性はあるが、感染後8時間のほんの20分間の5μMのPDの添加もまた、アクチンテイルの形成の遮断をもたらした。PDに構造的に関連する化合物(例えば、SKI-DV-1-10、10μM)は、アクチンテイルの遮断についてPDと同じくらい効果的であった。これらのPDの効果は、アクチン重合の非特異的な阻害に起因しない。なぜならば、PDは、Listeria monocytogenesまたはShigella flexneriがアクチンのコメットテイルを形成する能力に対して効果を有さないからである。

30

40

【0079】

PP2および構造的に類似の化合物PP1は、Src-ファミリーキナーゼの活性を阻害し(Liuら(1999)Chem. Biol., pp. 671-678)、最近では、さらにAbl-ファミリーキナーゼを阻害することが認識されている(Tattonら(2003)J. Biol. Chem., pp. 4847-4853)。以前に報告され

50

たように、PDのように、PP2は25 μM以上の濃度でアクチンテイルを遮断する (Frischknechtら (1999) Nature, pp. 926-929)。PDまたはPP2と対照的に、Abl-ファミリーキナーゼを阻害するがSrc-ファミリーキナーゼを阻害しないSTI-571 (Schindlerら (2000) Science, pp. 1938-1942)は、25 μMの高さの濃度であっても野生型3T3細胞におけるアクチンテイルの形成を遮断しなかった。

【0080】

(PDはチロシンのリン酸化およびアクチンテイルの形成のために必要なタンパク質の局在を遮断する)次に、PDが、アクチンテイルの先端での、リン酸化チロシン染色の局在、および、Nck、N-WASP、またはArp2/3複合体の局在に影響するか否かを試験した。4G10 mAbを用いて検出されるようなリン酸化チロシン染色は、ピリオンと共局在した。同様に、-Nck mAb、-N-WASP pAb、-Grb2 pAb、および -Arp p41 pAbを用いる染色は、前に報告されるように(示さず)、粒子の周囲においてアクチンテイルの先端で明らかであった。15時間前にGFP-VVを用いて感染させた細胞に10 μMのPDを加えた場合、リン酸化チロシンのピリオンとの共局在は、4G10 mAbによっては検出されなかった。同様に、ピリオンと共局在するNck、N-WASP、またはArp2/3の局在についての証拠は見出されなかった。リン酸化チロシンに対するPDの効果は、運動型ピリオンと関連するリン酸化チロシンに対して選択的であった。なぜならば、-リン酸化チロシンpAbによって認識される複製中心における標的のリン酸化は、10 μMのPDの添加によって影響を受けなかったからである。総合して、これらの結果は、PDが、アクチンテイルの形成と関連する必須のチロシンキナーゼ活性を遮断するが、ウイルスの複製を遮断しないことを明らかにする。

【0081】

(数種類のAbl-ファミリーチロシンキナーゼおよびSrc-ファミリーチロシンキナーゼは、VVのアクチンの運動性のために十分である)次に、PD感受性のキナーゼのうちでどのAbl-ファミリーキナーゼおよびSrc-ファミリーキナーゼがVVのアクチンの運動性のために十分であることを決定した。

【0082】

上で言及されるように、STI-571は、野生型3T3細胞におけるVVのアクチンの運動性に対する識別可能(discernable)な効果を有さない。しかし、10 μMのSTI-571の添加は、c-Src、c-Yes、およびc-Fynを欠失する細胞におけるVVのアクチンの運動性を著しく限定し、細胞1個あたりのアクチンテイルの平均数を16倍減少させた(細胞1個あたり平均約3個であり、30%の細胞は0個を有した)。STI-571は、核外DAPI染色によって明示されたように、ウイルスの複製に対して効果を有さなかったか、または、細胞末梢へのGFP標識ピリオンの移動に対して効果を有さなかった。さらに、STI571のためのキャリアであるDMSOは、効果を有さなかった。総合して、これらのデータは: 1) c-Ablおよびc-Argを含む、STI-571に対して感受性のキナーゼは、VVのアクチンの運動性を支持するのに十分であること; および、2) STI-571に対して非感受性のキナーゼのうち、c-Src、c-Fyn、またはc-Yesは、3T3細胞におけるVVのアクチンの運動性を支持し得る唯一のものであり得ることを示唆する。

【0083】

Abl-ファミリーキナーゼまたはSrc-ファミリーキナーゼのうちのいずれがVVのアクチンの運動性のために十分であることを決定するために、次に、c-Abl、c-Arg、またはc-Yesが、他のSrc-ファミリーキナーゼまたはAbl-ファミリーキナーゼからの活性の非存在下においてVVのアクチンの運動性を支持し得るか否かを評価した。特に、c-Abl、c-Arg、またはc-YesのPD耐性対立遺伝子の発現が、PDの存在下においてアクチンの運動性を維持させ得るかを試験した。以前の研究は、ATP結合ポケット中の変異(c-Abl-T315I、c-Arg-T314I、お

10

20

30

40

50

よび *c - Y e s - T 3 4 8 I*) が、PDとキナーゼとの間のファン・デル・ワールス相互作用を分断し、インビトロキナーゼアッセイによって測定されるように、PDの K_i を 10 nM から $1 \text{ } \mu\text{M}$ へと増加させることを示している。

【0084】

次に、*c - A r g* または *c - A b 1* のこれらのPD耐性対立遺伝子が、 $10 \text{ } \mu\text{M}$ のPD中で培養された細胞において発現される場合にVVのアクチンテイルを支持し得るか否かを試験した。アクチンテイルは、*Y F P - c - A r g - T 3 1 4 I* を発現するPD処理細胞において明らかであったが、内因性 *c - A r g* を発現する細胞においては明らかではなかった。さらに、PDは、*c - A r g - W T* を過剰発現する細胞においてアクチンテイルの形成を阻害した。従って、PDの緩衝は、*Y F P - c - A r g - T 3 1 4 I* との低い親和力の相互作用によってですら、本実験におけるVVのアクチンテイルの運動性の説明になり得ない。全てのPD耐性のチロシンキナーゼ対立遺伝子が $10 \text{ } \mu\text{M}$ のPDの存在下においてアクチンテイルを支持し得るわけではなかった。

【0085】

c - A b 1 - T 3 1 5 I を発現する細胞において、 $10 \text{ } \mu\text{M}$ のPDの存在下でアクチンテイルは観察されなかった。これらの結果は、過剰発現されたチロシンキナーゼが、ピリオンに局在するものですら、アクチンの運動性を支持する標的の非特異的または異常なリン酸化を引き起こさないことを示唆する。PD耐性対立遺伝子である *c - Y e s - T 3 4 8 I* の発現もまた、 $10 \text{ } \mu\text{M}$ のPDの存在下でアクチンテイルを支持したが、野生型対立遺伝子は、 $10 \text{ } \mu\text{M}$ のPDの存在下でアクチンテイルを支持しなかった。総合して、これらのデータは、*c - A r g* および *c - Y e s* が、チロシンキナーゼのうちで、VVのアクチンの運動性のために十分であることを示すが、他のチロシンキナーゼもまた充足し得ることを除外しない。アクチンテイルの形成における *c - A b 1* の充足性についての証拠は見出されなかった。

【0086】

他の *S r c* - ファミリーキナーゼがVVのアクチンの運動性のために十分であるか否かを決定するために、*S r c* - ファミリーキナーゼのサブセットを欠失する細胞株に対する $10 \text{ } \mu\text{M}$ の *S T I - 5 7 1* の効果を試験した。*c - S r c* および *c - Y e s* を欠失する細胞、または *c - F y n* および *c - Y e s* を欠失する細胞は、*S T I - 5 7 1* の存在下においてなおVVのアクチンの運動性を支持した。*S T I 5 7 1* を用いる処置はまた、細胞1個あたりのアクチンテイルの数に対する検出可能な効果を有さなかった。これらの結果は、*c - A r g* および *c - Y e s* に加えて、*S r c* - ファミリーキナーゼである *c - S r c* および *c - F y n* もまた、アクチンの運動性のために十分であることを示唆する。

【0087】

(重複する *S r c* - ファミリーキナーゼおよび *A b 1* - ファミリーキナーゼはインビトロで細胞から細胞への拡散を仲介する) どのチロシンキナーゼが細胞から細胞への拡散に参与するかを決定するために、野生型3T3細胞または種々の *S r c* - ファミリーチロシンキナーゼおよび *A b 1* - ファミリーチロシンキナーゼを欠失する細胞でブランクアッセイを行った。ブランクの形態および大きさは一般に使用される細胞型である *B S C - 4 0* 細胞の感染の後で見られるブランクよりいくらか多様であり鮮明でないようだが、VVを用いる3T3細胞の単層の感染は4日以内にブランクを誘導する。しかし、本実験において形成されたブランクは、3T3細胞、*A b 1* - / - 細胞、*A r g* - / - 細胞、および *A b 1* - / - / *A r g* - / - 細胞、*S r c* - / - / *Y e s* - / - 細胞、ならびに *S r c* - / - / *F y n* - / - / *Y e s* - / - 細胞で、同等の効力を有した。

【0088】

重複するチロシンキナーゼがブランク形成を仲介するか否かを決定するために、*B S C - 4 0* 細胞を、 $10 \text{ } \mu\text{M}$ の、*A b 1* - ファミリーキナーゼおよび *S r c* - ファミリーキナーゼの両方を遮断するPDを用いて処理した。細胞から細胞への拡散のためのアクチンテイルの必要性と一致して、PDはブランクの大きさを、容易にはブランクを形成しないVV *A 3 6 R* 変異体 (*P a r k i n s o n* および *S m i t h (1 9 9 4) V i r o l o g*

10

20

30

40

50

y, pp. 376 - 390) において見られるブランクと同様の「針先」へと縮小する。3T3細胞における10 μ MのPDを用いて、同一の結果を得た。しかし、Abl-ファミリーキナーゼのみを遮断するSTI-571は、Src $^{-/-}$ /Fyn $^{-/-}$ /Yes $^{-/-}$ 細胞におけるブランク形成を阻害したにも関わらず、この化合物は、3T3細胞もしくはBSC-40細胞におけるブランクの大きさまたはブランクの数に有意な変化をもたらさなかった。ブランク減少アッセイは、10 μ MのSTI-571を用いて処理された細胞または処理されなかった細胞が、24時間後にほとんど同等の量のウイルスを産生したことを示し、このことは、この薬物がウイルスの複製に対する検出可能な効果を、たとえあったとしてもほとんど有さなかったことを示す。総合して、これらの結果は、インビトロでブランク形成によって測定されるように、アクチンテイルの形成を仲介するAbl

10

【0089】

(Abl-ファミリーキナーゼはインビトロでEEVの放出を仲介するが、Src-ファミリーキナーゼはインビトロでEEVの放出を仲介しない)インビトロでのEEV形成がチロシンキナーゼに依存的であるか否かを決定するために、野生型3T3細胞または種々のチロシンキナーゼを欠失する3T3細胞をVVを用いて感染させた。非感染細胞、VV感染野生型3T3細胞、または、c-Src/c-Fyn/c-Yes、c-Abl、c-Arg、もしくはc-Abl/c-Argを欠失する動物由来の3T3細胞から得られた上清を用いて感染させたBSC-40細胞のブランクアッセイを行った。結果は、c

20

【0090】

上清を、感染の24時間後に細胞から回収した。この時点において、この上清は、培地中に放出されている有意な量のEEV(40~50%)からなるブランク形成ユニット(PFU)、および、溶解された感染細胞からの汚染IMV放出を含む(LawおよびSmith(2001) *Virology*, pp. 132 - 142)。この上清を、次いで、BSC-40細胞を感染させるために使用し、3日後にブランク形成を評価した。

【0091】

BSC-40細胞でのブランクの分析は、野生型3T3細胞、Src $^{-/-}$ /Fyn $^{-/-}$ /Yes $^{-/-}$ 細胞、Abl $^{-/-}$ 細胞、およびArg $^{-/-}$ 細胞由来の上清の全ては、ほぼ同じPFUを含むが、Abl $^{-/-}$ /Arg $^{-/-}$ 細胞由来の上清は、5~10倍少ないPFUを含むことを示した。そのような減少は、野生型細胞に比較してより低いAbl $^{-/-}$ /Arg $^{-/-}$ 細胞の感染性によっては説明され得ない。なぜならば、野生型細胞で形成されたブランクの数と同じ数の形成されたブランク、ならびに、感染の24時間後に細胞を溶解することおよびBSC-40細胞でのブランク形成ユニットを測定することによって得られたウイルスの増殖は、野生型細胞とAbl $^{-/-}$ /Arg $^{-/-}$ 細胞との間で相違を示さなかったからである。総合して、これらの結果は、効率的なEEV放出のために、c-Ablまたはc-Argは各々が十分であり、c-Ablまたはc-

30

40

【0092】

次に、EEV形成に対するAbl-ファミリーチロシンキナーゼのインヒビターの効果を評価した。BSC-40細胞をVVを用いて感染させ、10 μ MのSTI571を用いて24時間処理した。この上清を、次いで回収し、BSC-40細胞を感染させるために使用し、3日後にブランク形成を評価した。BSC-40細胞についての結果は、この薬物で処理されなかったまたは処理された感染3T3細胞由来の上清を用いて得られた結果と同一であった。10 μ MのSTI-571の適用は、BSC-40細胞で、PFUの約2倍の減少を引き起こした。STI-571を用いる3T3細胞またはBSC-40細胞の処理は、それ自体では、ブランク形成およびブランク減少アッセイによって測定される

50

ウイルスの複製に影響を及ぼさなかった。従って、STI-571によって引き起こされるEEV数の明らかな減少は、ウイルスの侵入の遮断、細胞溶解の障害に起因し得ず、また、複製の障害に起因し得ない。感染性EEVの形成に対するSTI-571の効果と一致して、 $10\ \mu\text{M}$ のSTI-571を用いるBSC-40細胞の処置はまた、EEVと関連する現象である、プラークと向かい合う「コメット」の形成も遮断した。最後に、STI-571を用いて処理された3T3細胞において、アクチンテイルの形成またはアクチンテイルの数に明らかな差異はなかった。従って、STI-571によるEEVの数の減少は、細胞表面に到達するピリオンの数の減少に起因しなかった。 $10\ \mu\text{M}$ のPDを用いる3T3細胞の処理は、同様に、EEVの数を減少させた。

【0093】

この細胞上清のIMV汚染の可能性を考え、次に、Ab1 / Arg - 細胞におけるAb1およびArgの活性の喪失、またはSTI-571処理によるAb1およびArgの活性の喪失が、感染性EEVの減少のみをもたらし、IMVに対するさらなる効果をもたらさないことを確認した。このことを行うために、上清を、mAb 2d5と称されるIMVを中和する抗体と共にインキュベートした。mAb 2d5の上清への添加は、3T3細胞およびBSC-40細胞の両方において、プラーク数を約40%減少させた。このことは、以前の報告と一致した(LawおよびSmith(2001) *Virology*, pp. 132-142)。二番目に、 $10\ \mu\text{M}$ のSTI-571の添加は、mAb 2D5の存在下または非存在下において、プラーク数の等倍の減少を引き起こし、STI-571処理を用いる場合のプラーク数またはAb1 / Arg - 細胞におけるプラーク数の減少の割合は、mAb 2d5の添加に関わらず同様であった。総合して、これらのデータは、Ab1およびArgはIMVに対してほとんど効果を有さないこと、ならびに、c-Ab1およびc-Argはインビトロで感染細胞からのEEVの放出を仲介するが、Src-ファミリーキナーゼはインビトロで感染細胞からのEEVの放出を仲介しないことを示唆する。

【0094】

(STI-571はマウスにおいてVV負荷を低下させる)インビボでのEEV形成およびビルレンスにおけるチロシンキナーゼの役割を決定するために、VVを用いて感染させたマウスにおけるウイルス負荷に対するSTI-571の効果を試験した。STI-571($100\ \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ で、0.9%の滅菌生理食塩水中に溶解した)または生理食塩水キャリアを、皮下に配置したAzlet浸透ポンプを介してマウスに送達した。このポンプの挿入の24時間後に、一部のマウスを $10^4\ \text{p.f.u.}$ のVVを用いて腹腔内で接種した。残りのマウスを未処置のままにした。感染の4日後にマウスを屠殺し、卵巣を摘出し、リアルタイムPCRに供してウイルス負荷を評価した。卵巣は、子宮頸部組織と共に、腹腔内感染の後で最も高いレベルのウイルスを含むことが見出されているので(Ramirezら(2003) *Arch. Virol.*, pp. 827-839)、この器官を分析のために選択した。

【0095】

ウイルス負荷を、卵巣から単離されたDNA $250\ \text{ng}$ あたりのVV UDG遺伝子のコピーの数として測定した。未処理の動物または生理食塩水キャリアを含むポンプを有する動物において、有意なレベルのウイルス(約 10^7 コピー/DNA $250\ \text{ng}$)が卵巣において検出可能であった。このことは、腹腔に隣接する器官へのウイルスの拡散を示した。連続希釈によって決定されたこのアッセイの検出限界は、ウイルスゲノム10個であった。マウスの白血病モデル(WolffおよびIlarria, 2001年)において使用される濃度である $100\ \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ のSTI-571を用いる処理は、ウイルス負荷を4~5対数低下させた(図4)。この差は、フィッシャーの双方直接確立検定(Fisher's two-sided exact test)によって統計学的に有意と判定された($P < 10^{-6}$; (方法)を参照)。

【0096】

(結論)

10

20

30

40

50

上記の結果は、チロシンキナーゼが、Vacciniaウイルスの、運動性、放出、および病原性感染に関与することを明らかにする。特に、効率的なアクチンの運動性のためにAbl-ファミリーキナーゼは必要とされるが、Src-ファミリーキナーゼは必要とされず、PD化合物を含む、Abl-ファミリーキナーゼを阻害するチロシンキナーゼインヒビターは、アクチンの運動性を遮断する。PD化合物およびSTI-571は、感染性ビリオンの放出を遮断し、STI-571は、VV感染マウスにおけるウイルス負荷を低下させる。このことに関して、これらの結果は、PDおよびSTI-571のような薬物がVV感染の予防または処置のために有用であることを示す。Vacciniaおよび痘瘡ウイルスは類似であるので、これらの薬物はまた、痘瘡を引き起こすヒトにおける痘瘡ウイルス感染に対して増大した効力を有することもあり得る。

10

【0097】

(実験2-STI-XはVacciniaの複製を阻害する)

本実験は、VVの複製に影響を及ぼす化合物を同定するための、STI-571に関する化合物の小さいライブラリをスクリーニングする工程を包含する。STI-Xと称されるSTI-571の誘導体を同定し、VVの感染、複製、および運動性に対するその効果について試験した。

【0098】

(方法)

細胞培養および蛍光顕微鏡法に基づくブランクアッセイについての方法は、実験1において記載される方法と同様であった。

20

【0099】

VVの複製に影響を及ぼす化合物を同定するために、特定の機能基に対する変更をこの分子上で行うことによって、STI-571誘導体のライブラリを構築した。3T3細胞の感染を阻害するこれらの化合物の能力に基づいて、これらの化合物をスクリーニングし、EVP染色、または、核外DAPI染色によって測定されるような核外複製中心を含むGFP標識ビリオンの存在のいずれかによって評価した。

【0100】

3T3細胞を、未処理のままにするか、または1 μ MのSTI-XもしくはDMSO(キャリア)と共にインキュベートした。細胞を、次いで、感染多重度10でGFP-VVを用いて8時間感染させた。STI-Xを、感染の時点でまたは6時間後に加えた。感染の8時間後、細胞を固定し、複製中心を識別するためにDAPI-Ptyr-Cy5 pAbを用いて染色し、アクチンのコメットテイルを識別するためにCy3-ファロイジンを用いて染色した。

30

【0101】

(結果)

GFP-ビリオンの存在は感染細胞において注目され、核外複製中心は存在しなかった。Ptyr染色もまた存在せず、アクチンテイルは明らかではなかった。始めに細胞に感染したGFP-WRビリオンに対応する球状(punctate)の核外DAPI染色は明らかであった。複製中心が形成した後でSTI-Xを加えた場合、複製中心およびアクチンテイルはまだ明らかであった。

40

【0102】

EVP染色、およびDAPI染色された核外「複製工場」は、全ての未処理細胞およびDMSO処理細胞において明らかであり、これらの細胞の90%はアクチンテイルを含有した。このことは、この感染が強かったことを示す。GFP標識ビリオンおよびEVP染色もまた、全てのSTI-X処理細胞において明らかであった。このことは、STI-Xがウイルスの侵入に対して検出可能な効果をほとんど有さなかったことを示す。しかし、STI-X処理は、DMSO処理細胞または未処理の細胞と比較して、DAPI染色核外ウイルス複製工場を含む細胞の割合の著しい低下を引き起こした(STI-Xについての4%と比較して、未処理の細胞について100%;図2)。GFP-WR感染細胞において、球状核外DAPI染色はかろうじて可視され得た(例えば、図8A)。この染色はG

50

F P - W R ビリオンと共同在したので、このDNAは、始めにこの細胞に感染したビリオンに対応し得る。

【0103】

S T I - X 処理細胞はまた、おそらく複製が阻害されたために、アクチンテイルを形成し得なかった。このことを直接的に試験するために、複製中心が形成した後にS T I - Xを加えた。これらの条件下で、S T I - Xは複製中心に対して効果を有さず(D A P I染色または - P t y r p A bによって測定されるように)、アクチンの運動性に対しても効果を有さなかった。

【0104】

ブランクアッセイおよびブランク減少アッセイは、これらの顕微鏡観察を確認した。S T I - Xは感染多重度が増加された場合により効果的でない(抗ウイルス薬の一般的な特性)と判明したにも関わらず、ブランク形成はこの薬物の存在下において減少した。3日間にわたって行ったこのブランクアッセイは、この薬物がその期間にわたって(評価した最長時間である8日間までも)高い耐性を有したことを示す。ブランク減少アッセイにおいては、この細胞をS T I - Xの存在下または非存在下において24時間感染させた。次いで液体窒素溶解によってV Vを回収し、薬物の非存在下におけるブランクアッセイによってその力価を評価した。

10

【0105】

(結論)

要約すると、S T I - XはV Vの複製を遮断し、V V感染の予防または処置のために有用である。

20

【0106】

(実験3 - V VおよびV a r i o l a感染の局面に対する、S T I - X、P D、および併用処置の効果)

V VもしくはV a r i o l a感染マウスにおける病原性の軽減または最小化における、P D、S T I - X、またはこの二つの併用の効能を決定するために、この実験を設計する。C 5 7 B L / 6マウスをこれらの研究のために用いる。他のマウスの感染を防ぐために、B S L 2施設においてマウスを感染させる。

【0107】

(V Vおよび痘瘡ウイルス感染に対するS T I - XおよびP D) V Vを用いるマウスの皮内接種が、ヒトにおけるV Vワクチン接種をモデル化するために提案されている(T s c h a r k e r (1 9 9 9) J . G e n . V i r o l . , 8 0 : 2 7 5 1 - 5 ; T s c h a r k e r (2 0 0 2) J . G e n . V i r o l . , 8 3 : 1 9 7 7 - 8 6)。このモデルを使用して、V Vの株WRを用いる6週齢のC 5 7 B L / 6マウスの耳での皮内接種が8日以内に3mmの病変を生成することが、示されている。この病変は約3週間後に消失し、このことは、この動物が免疫応答を発達させて感染を取り除いたことを示す。このモデルは、 10^4 p f uを用いて皮内で耳から感染させた、メスの、6週齢と同等のC 5 7 B L / 6マウス5個体の実験群、ならびに、3週間の時間的経過にわたって毎日測定される病変の直径に基づいて開発された。本実験は、この範例に従う。

30

【0108】

V Vを用いるマウスの鼻腔内接種が、ヒトにおける痘瘡接種の正常な経路をモデル化するために提案されている。8週齢のメスのB A L B / cマウスの $10^3 \sim 10^6$ の感染多重度での鼻腔内V V感染は、劇的な体重減少、活動の低下、および、最終的には10日以内の死をもたらす(R e a d i n g r (2 0 0 3) J . I m m u n o l . , 1 7 0 : 1 4 3 5 - 1 4 4 2)。

40

【0109】

単独で投与されるP DあるいはS T I - Xの、V V W R感染マウスにおける、病変の大きさに対する効果(皮内接種に関して)または死亡率に対する効果(鼻腔内接種に関して)を評価した。マウスの半数をP DまたはS T I - Xで処置し(ポンプを介して投与された)、コントロールマウスを、P B Sまたは薬物処方物を用いて同等に処置した。初め

50

に、毒性作用なしに達成し得る最も高い用量のPDまたはSTI-Xを用いた。皮内で接種されたマウスについて、病変の大きさを毎日測定した。鼻腔内で感染されたマウスについて、体重を毎日測定した。

【0110】

10日目に、マウスを屠殺し、脳および肺を採取した。体重の30%より多くを失っているマウスは、直ちに屠殺した。組織を3回凍結および解凍し、超音波処理し、3T3細胞でのブランクアッセイによってウイルス力価を決定した(Readingら(2003) J. Immunol., 170: 1435-1442)。データを、ノンパラメトリックMann-Whitney t-検定によって統計学的に分析し、PDまたはSTIで処置されたマウスが、コントロールマウスと比較して有意に異なる($p < 0.01$)ブランク形成ユニットを保有する場合、感染されたマウスにおけるウイルス負荷に薬物が影響することを結論付ける。ウイルスの侵入および増殖が薬物処方物またはなんらかの非特異的な手段によって遮断される可能性を除外するために、この処方物単独の効果を測定する。

10

【0111】

鼻腔内で接種されるマウスの健康を評価するために、マウスの外見をマスク(blind)された観察者によって等級付けした：各々の状態に対して1点が割り当てられる：無関心、毛羽立った表毛(最高点=2；最低点(頑健な健康)=0)。加えて、体重の結果を、平均値+/-1標準誤差として表す。処置群は、少なくとも5個体のマウスを含む。統計学的分析を、Mann-Whitney t-検定によって計算し、 $p < 0.01$ を有意と考える。薬物処置群が低下した病理学的評点を生ずる場合、PD治療がVV疾患の結果に積極的に影響を及ぼすことを結論付ける。

20

【0112】

(併用投与)本研究は、共に投与されるPDおよびSTI-Xが、鼻腔内または皮内のVV感染に対して、どちらかの薬物単独よりも良い保護を提供する可能性を有するか否かを評価した。両方の薬物と匹敵する処方物を決定し、この薬物の組合せを、鼻腔内または皮内で動物を感染させるためのAlzetポンプを介して送達した。単独で投与されるどちらかの薬物または薬物なしと比較した病変の大きさまたは生存率の差異を決定し、そして上記のように分析した。組合せが毒性であると判明する場合、これらの薬物の濃度の変化が必要とされる。

30

【0113】

(VVに対する免疫の獲得の評価)本研究は、STI-XまたはPDの処置が効果的なワクチン接種を可能にするか否かを評価する。この薬物またはキャリアを、上記のように接種を介して投与した。動物が回復し、薬物送達を中断している場合、この動物を再接種する。皮内で接種を行い、続いて生じる痂皮の大きさを決定するか、またはこのウイルスに以前に曝露されていない動物にとって致死量である用量で鼻腔内で接種を行う。痂皮の大きさまたは死亡率を評価し、PDまたはSTIが免疫の獲得に干渉する場合、痂皮の大きさまたは死亡率は以前に曝露されていない動物と同様である。あるいは、公知のVVタンパク質に対する血清の力価の測定、および、合併症を避けるための注意深い薬物の用量決定が用いられ得る。

40

【0114】

(免疫不全患者における感染性の低下)本研究は、STI-XおよびPDが、免疫不全個体におけるVV疾患の制限において有用であるか否かを評価する。Rag1^{-/-}/Rag2^{-/-}マウスは、養子免疫応答を高める能力を有さず、重篤な感染を発症する。VVを用いる皮内接種が、これらの動物において、匹敵する野生型動物に比較して、さらに重篤な疾患をもたらすか否かを評価する。そうであれば、単独または併用でのSTI-XもしくはPDの投与が、この動物をさらに重篤な感染から保護するために役立つか否かを分析する。

【0115】

(実験4-腸病原性E. coliおよび腸出血性E. coliはAb1-ファミリーチ

50

ロシンキナーゼを通してアクチンの台座様構造を形成するために作用する)

(方法)

3T3細胞を、カバーガラス上で、10%のウシ胎児血清で補充されたDulbecco Modified Eagles培地(DMEM)中で培養し、WT EPEC(株2389/69)を感染多重度10で用いて、または、EHEC EDL933もしくはEHEC-LISTXを感染多重度40で用いて、6~8時間37℃でインキュベートした。いくつかの実験のために、細胞を、感染の3日前にプラスミドベクターを用いてFugene-6(Berhinger)を使用してトランスフェクトした。

【0116】

細胞を免疫蛍光解析またはWestern解析のために処理した。EPECを4'6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI; 1µg/ml; Sigma)を用いる染色によって認識し、台座様構造をFITC-ファロイジン(1µg/ml; Molecular Probes)を用いる染色によって認識した。染色の前に、数種類のpAbを前もってホルムアルデヒド中で固定されたEPECまたはEPEC-Tirと共に20分間インキュベートし、次いで遠心した。この手順は、非特異的にEPECに結合する上清夾雑物を除去した。

【0117】

本研究において使用された一次抗体および濃度は以下のものである: - WASP pAb(アフィニティ精製済、1:200希釈)、- 血球凝集素A(HA)mAb(3F10; 0.01µg/ml; Roche Diagnostics)、- Nck mAb(1µg/ml; Oncogene Science, Cambridge, MA)、- Abl mAb(AB3; 過剰発現Ablタンパク質に対して0.5µg/ml; 内因性Ablタンパク質に対して50µg/ml; 8E9; 0.05µg/ml; BD Pharmingen, San Diego, CA)、- Tir pAb(1:2000、顕微鏡法用; 1:50,000、Western解析用; Jim Kaper, University of Maryland, College Park, MDより)、および - Src pAb(0.1µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、ならびに - Abl-pY412 pAbおよび - Abl-pY245 pAb(0.1µg/ml; Cell Signaling Technology, Beverly, MA)。外因性c-Abl-WTを発現する細胞を、より低い - Abl mAb濃度での比較的高い蛍光強度によって区別した。従って、内因性c-Abl様タンパク質を検出するために使用される曝露よりも著しく短時間の曝露によって画像を得た。二次抗体を、Jackson ImmunoResearch Laboratories(West Grove, PA)より得た。

【0118】

PD化合物であるPD166326およびSKI-DRV-1-10を、本明細書中の別の場所で記載されるように合成し、これらの化合物の効果は全てのアッセイにおいて識別不能であった。PD化合物およびPP2を、100%のDMSO中に溶解した。前処理実験のために、PD、PP2、またはDMSOを、細菌による感染の一時間前に細胞に加えた。「リバーサル」実験のために、化合物またはDMSOを、細菌の添加の5時間後に細胞に加え、これらの細胞をその2時間後に固定した。

【0119】

画像を、多重波長の広視野三次元顕微鏡システム(Intelligent Imaging Innovations)に備え付けた科学等級の冷却型電荷結合素子を用いて得た。免疫蛍光サンプルを、サンプルを通して連続的な0.25µmの焦点面で画像化し、焦点外の光を、強制的双方向逆重畳アルゴリズムによって除去した。PDおよびPP2の効果を定量化するために、台座様構造がFITC-ファロイジンによってアクチンフィラメントより強く染色されたことに注意した。強度に基づいて画像をセグメント化した。台座様構造に対する最高強度のピクセルの対応を、可視的に確認した。高ピクセル強度と台座様構造とが一致し得なかった場合は、適宜調整した。最高強度のピクセルによって占

10

20

30

40

50

められる面積を、次いで計算した。各々の条件について、同じ日に平板培養され感染された細胞からデータを得た。各々の実験を5回繰り返した。平板培養の密度および感染効率の変動に起因する、最大の台座様構造面積の多少の分散は、実験の間で明らかであった。

【0120】

(結果)

(トランスフェクトされたc-AblおよびAblに類似する内因性タンパク質は、アクチンの台座様構造において局在する)EPEC Tirのリン酸化が宿主において病原性プログラムの引き金を引くので、本実験は、このプロセスに参与するチロシンキナーゼを同定することを目指す。Ablに類似する内因性タンパク質が台座様構造において局在するか否かを決定するために、3T3細胞をEPECまたはHEECに曝露し、次いで、C-末端中の未決定(undefined)のエピトープを認識する-Ablモノクローナル抗体(mAb)AB3を用いて染色した。台座様構造は、細菌に直接向かい合う強いアクチン染色として見られた。-Abl-AB3 mAbによって認識される内因性タンパク質は、細胞質に比べて台座様構造において濃縮された。EPECおよびHEECの両方の台座様構造中のキナーゼドメインのエピトープを認識する-Abl-8E9 mAbを用いて、同一の結果を得た。外因性に発現される血球凝集素A(HA)標識Abl(HA-Abl)(-HA-3F10 mAbによって認識される)もまた、EPECおよびHEECの台座様構造において局在した。Abl様タンパク質の台座様構造における局在は特異的であった:-Src pAbによって検出される内因性および外因性のSrc様タンパク質のいずれも、またグリーン蛍光タンパク質の蛍光も、EPECまたはHEECの台座様構造において細胞質に比べて濃縮されなかった。

【0121】

Ablと共通のエピトープを共有する内因性タンパク質が、台座様構造において局在するか否かを決定するために、AblおよびAbl関連キナーゼArgの両方を欠失するマウス由来の3T3細胞を感染させた。EPECおよびHEECの両方は、依然Abl- / - / Arg - / - 細胞において台座様構造を形成し得、-Abl-AB3によって認識されるが-Abl-8E9によっては認識されないタンパク質は、細菌の下で明らかであった。総合して、これらの結果は、Ablは台座様構造において局在するが、抗原性が関連する他のタンパク質もまた存在することを示唆した。

【0122】

(AblおよびAbl関連キナーゼを遮断するPD化合物は、台座様構造形成を遮断し、逆転する)次に、AblまたはAbl様タンパク質が、EPECまたはHEECによって開始される台座様構造形成のために必要とされるか否かを決定した。なぜならば、Abl- / - / Arg - / - 細胞は台座様構造を形成し得るからである。Ablおよび構造的に関連するタンパク質の両方を標的とするアプローチを選択した。ピリド[2,3-d]ピリミジン(PD)化合物は、Ablおよび相同なATP結合ドメインを有するキナーゼへのATPの結合を競合的に阻害し、異常調節されたAblによって引き起こされる癌(例えば、CML)を処置するために開発されている。PD処理を用いた場合、結合したEPECまたはHEECはほとんど明らかでなく、インキュベーションを延長した場合(8時間まで)ですら、結合した菌体の下でアクチンはほとんど明らかでないか、全く明らかでなかった。5 μMより低い濃度のPDは、効果を有さなかった。

【0123】

台座様構造の定量は、PD処理がEPECおよびHEECの台座様構造形成を50倍減少させることを示した(図6)。図6は、前処理レジメンまたはリバーサルレジメンに従って、DMSO、10 μMのPD166326、または10 μMのPP2を用いて処理されたEPECについての、最も強い強度のピクセルによって占有された領域を示す。PDのアナログ(SKI-DV-1-10[DRV-1]:10 μM)は、EPECの台座様構造形成を遮断したが、STI-571(25 μM)はEPECの台座様構造形成を遮断しなかった。EPECの増殖は、PD166326を用いる処理によって影響を及ぼされなかった。EPECを、0.1%のDMSO(X)または25 μMのPD()のいずれ

10

20

30

40

50

かを用いて培養し、示した時点でOD 600を測定した。

【0124】

PD化合物はまた、一部のSrcファミリーキナーゼを阻害するので、Srcファミリーキナーゼを阻害するがAbl関連キナーゼを阻害しないPP2の効果を試験した。100 μMまでの濃度でのPP2(試験した最高濃度)、またはキャリアであるDMSO(0.1%)は効果を有さなかった。AblとSrcまたは他のキナーゼとの間の機能的重複について試験するために、Abl^{-/-}/Arg^{-/-}細胞におけるこれらのインヒビターの効果を評価した。野生型細胞においてのように、PDは台座様構造を阻害するがPP2は台座様構造を阻害しなかったことを試験した。台座様構造が存在しないことは、PDの殺菌性効果に起因しない。なぜならば、EPECもしくはEHECの増殖または変異性に対する効果は明らかでなかったからである。PDの効果はまた、アクチン重合の非特異的な阻害にも起因しない: PDは、Listeria monocytogenesが、結合、侵入、またはアクチンのコメットテイルを形成する能力に対して効果を有さなかった。総合して、これらのデータは、Abl、またはPDに感受性である機能的に重複するキナーゼが、台座様構造形成を仲介することを示す。

10

【0125】

次に、結合したEPECおよびEHECの下での、Tir、Nck、N-WASP、またはArp2/3複合体の局在に、PDが影響を及ぼすか否かを試験した。Tirは、結合した菌体下の台座様構造において局在し、感染の3時間以上後のWestern解析によって検出可能であった。PD処理を用いた場合、台座様構造が存在しないにも関わらず、Tirタンパク質は結合したEPECまたはEHECの下で検出可能なままであった。Nck、N-WASP、およびArp2/3複合体はEPECの台座様構造形成のために必要であり、Tirのように台座様構造において局在するが、EPECの下でのNck、N-WASP、およびArp2/3複合体の動員は、PDによって遮断された。

20

【0126】

(Tirのリン酸化はPD化合物によって遮断され逆転される)台座様構造、ならびに、Nck、N-WASP、およびArp2/3複合体の動員は、Y474でリン酸化されたTirに依存するので、次に、PDがTirのリン酸化に影響を及ぼすか否かを決定した。図7に示すように、細胞をDMSOまたはPDを用いて処理し、非感染のままおく(0h)か、またはEPECを用いて、示した時間にわたって感染させた。細胞を溶解し、 α -リン酸化チロシンmAb 4G10と共にWestern解析に供し、抗体除去(strip)し、次いで α -Tir pAbを用いて再試験(reprobe)した。Tirタンパク質が3時間後に明らかであり、DMSO処理細胞においてリン酸化されていること、およびPDがTirのリン酸化を遮断することを注意されたい。逆転条件のために、細胞を非感染のままおく(レーン1)か、またはEPECを用いて6時間感染させ、示した時間にわたってPDを用いて処理し、そして解析した。Tirに対応するバンドが、PDの添加の5分以内に脱リン酸化されていることに注意されたい。

30

【0127】

これらの結果は、PDが、Tirのリン酸化を遮断することによって、ならびにその結果として、アクチンの重合のために必要とされる遠位のシグナル分子(例えば、Nck、N-WASP、およびArp2/3複合体)の動員を遮断することによって、EPECの台座様構造形成を遮断することを示唆する。PDはまた、これらの分子が局在する能力に影響を及ぼす。

40

【0128】

(Ablは、他のAbl関連キナーゼの非存在下において、Tirのリン酸化および台座様構造形成のために十分である)台座様構造内でのAblの局在は、Tirのリン酸化およびアクチンの重合における役割を示唆したが、Abl^{-/-}/Arg^{-/-}細胞が台座様構造形成を可能にするという観察、およびPDの広範囲な基質特異性は、他のキナーゼもまた関与し得ることを示唆する。次に、チロシンのリン酸化または台座様構造形成のために、PD感受性キナーゼのうちでAblキナーゼが十分であるか否かを決定した。こ

50

の研究は、CML患者によって後天的に得られる、このタンパク質をSTI-571またはPDによる阻害に対して耐性にする、BCR-Ab1(T3151)中の変異を利用する。このT3151変異を、c-Ab1(cAb1-3151)中へ操作した。PD中で培養された細胞におけるcAb1-T3151の発現は、EPECおよびEHECの台座様構造形成、ならびに、結合した菌体の下のリン酸化チロシンの局在を回復した。c-Ab1-T3151の発現もまた、台座様構造が形成された後にPDを加えた場合の、台座様構造におけるチロシンのリン酸化の喪失を妨げた。c-Ab1の過剰発現は、高レベルにおいてですら、PD中で台座様構造形成を回復させるために十分ではなく、PDによって誘導されるリン酸化の喪失の遮断するためにも十分ではなかった。このことは、c-Ab1-T3151の効果は、PDの低親和力結合および滴定ではなく、c-Ab1-T3151のキナーゼ活性に起因したことを示唆する。

10

【0129】

(Ab1またはAb1関連キナーゼの公知の基質は、EPECおよびEHECの台座様構造において局在する)EPECのTirがAb1の基質であるか否かを試験するために、単離中にTirが脱リン酸化されるようになる条件下で前もってEPECを用いて感染させた細胞から、Tirを免疫沈降した。Tirの存在を、-Tir-pAbを用いるウェスタンブロットによって評価し、リン酸化チロシンを4G10-mAbを用いて検出した。ATPならびに精製されたAb1キナーゼの、免疫沈降されたTirへの添加は、Tirのチロシンのリン酸化をもたらし、PDの添加は、Tirのリン酸化を遮断した。Tirのチロシンリン酸化部位がAb1の標的において見られるチロシンリン酸化部位と類似しているか否かもまた、評価した。CrkIIはAb1によってY221でリン酸化され、CrkIIのリン酸化されたY221を認識するpAbはまた、リン酸化されたTirも認識する。従って、Ab1はEPECのTirをインビトロで直接的にリン酸化し得、Tirのリン酸化部位は、公知のAb1の基質において見られるリン酸化部位と類似している。

20

【0130】

(結論)

総合して、これらの結果は、c-Ab1の活性は、チロシンキナーゼのうちで、EPECまたはEHECによって、およびEPECのTirのリン酸化によって開始される台座様構造形成のために十分であることを示唆する。Ab1-/-/Arg-/-細胞を用いる場合の結果は、PDに対して感受性であり、台座様構造において局在する能力およびTirまたは他の台座様構造タンパク質をリン酸化する能力をc-Ab1と共有する、他のチロシンキナーゼもまた、充足し得ることを示唆する。実際に、チロシンキナーゼの間の機能的重複は、Ab1ファミリーメンバーの間ですら、よく認識される。これらの研究は、EHECの台座様構造形成におけるチロシンのリン酸化に関する役割を同定する最初の結果、および、EPECまたはEHECのいずれかのシグナル伝達のために十分であるチロシンキナーゼの最初の記載を提供した。これらの結果は、PDまたは関連化合物が、EPECおよびEHECの感染を処置するまたは予防するために有用であり得ることを示す。

30

【0131】

(実験5-C.rodentiumはEPECの有用なモデルである)

マウスにおけるC.rodentium感染が、人におけるEPEC感染の有用なモデルであるか否かを決定するために、C.rodentiumがEPECと同じ機構によって台座様構造形成を引き起こすか否かが問題である。Tir、リン酸化チロシン、Nck、N-WASP、Ab1、およびArp2/3複合体は全てがC.rodentiumの台座様構造中に局在することを見出した。さらに、C.rodentiumは、N-WASP欠損マウス由来の線維芽細胞で台座様構造を形成し得なかった。次に、C.rodentiumの台座様構造がPDに対して感受性であるか否かを決定した。PDは、実際に、C.rodentiumの台座様構造を遮断し、「逆転」した。総合して、これらの結果は、EPECおよびC.rodentiumによって同じ機構で誘導される台座様構造

40

50

は、PDによって遮断され、逆転されることを示唆する。

【0132】

(実験6 - マウスにおける薬物の投与および検出)

本発明の化合物のマウスにおける効力を試験するために、PDおよびSTIをマウスに導入する手段、および血清中のこの化合物を検出する手段を開発した。加えて、インビボでのVVについてのLD90を決定した。

【0133】

20 μ lの10⁴ pfu/mlのVV株WRを用いる鼻腔内接種は、ほぼ100%のマウスを6日以内に殺すが、20 μ lの10³ pfu/mlは、約50%のマウスを殺し、公開された報告と概して一致している(Readingら(2003) J. Immunol., 170:1435)。100 mg/kg/日までのSTI-571を用いる腹腔内注射(生理食塩水中)または30 mg/kg/日までのPD-166326(31%のPEG400/31%のDMSO/38%の生理食塩水中)は、マウスにおいて、試験した最長期間である10日間まで、高い耐性を有した。STI-571について、用量は、ヒトにおいてCMLを処置するために使用される用量より10倍高かったが、この動物がこの化合物に対して耐性を有する能力に基づいて選択された。この動物は実際に耐性であった(Drukerら(2001) Chronic myelogenous leukemia. Hematology (Am Soc. Hematol. Educ. Program): 87; WolffおよびIlarria(2001) Blood, 98:2808)。薬物のレベルは、必要とされる最少量を決定するために容易に滴定され得る。薬物単独を用いた場合、マウスは10日の期間にわたって体重減少の徴候を示さず、剖検で顕性の病原性を有さなかった。HPLC/質量分光分析を用いて、注射された動物の血清中のPDを、30 ng/mlもの低い濃度で検出することが可能となっている。PDについての標準曲線は1000 ng/mlから30 ng/mlまでの直線である(図8A)。必要とされるサンプル容積は30 μ lである。PDを、分子量(イオン電流)に基づいて検出した。

【0134】

血漿サンプルを、PDを濃縮し血漿タンパク質を除去するために固相抽出に供し、Zorbax Stable Bond C8カラムで溶離し、MS(427でのAPCI陽性SIM)においてモニタリングした。MSの読み取り値(readout)をカラムでの保持時間の関数としてプロットする。第一のピークは内部キャリブレーション基準であり、第二のピークはPDである(図8B)。

【0135】

感染マウスにおけるウイルス負荷を定量するため、リアルタイムPCRアッセイを利用し、組織サンプル中の7コピーまで少ないVVを検出した。卵巣または脳および他の器官を、プロテアーゼKを用いて分解し、DNAを抽出し、精製した(QuiaGen)。このDNAの内容物を正規化し、等量のDNAをVV WR特異的プライマーおよびTagman/FAM色素/消光剤系と共にリアルタイムPCR(I-cycler)に供した。サンプル中のDNAの量を、公知のVVのDNA基準を用いてキャリブレーションした。この方法を用いて、STI-571で処置されたマウスにおけるウイルス負荷は、未処置のマウスにおいて見られたウイルス負荷より6桁の規模で低かった。

【0136】

(実験7 - C. elegansのスクリーニングは宿主における新規の薬物標的を定義する)

EPECおよびEHECの病因の研究は、E. coliのK12と比較して1387個の獲得および528個の欠損を含む、非常に複雑なゲノムによって、および、提案されるビルレンス要因の多くについて機能的アッセイがないことによって、制限される(Pernaら(1998) Infect. Immun. 66:3810)。ここで、EPECおよびEHECの病因が線虫C. elegansにおいて研究され得る手段が同定された：特定の発育条件下で、この細菌は線虫を殺した。この殺虫は、ヒトの疾患に関連がある。

10

20

30

40

50

なぜならば、ヒトにおいて非病原性である細菌変異体もまた、線虫を殺さないからである。

【0137】

他の微生物による殺虫に対して耐性を与えることが公知である変異体の線虫のスクリーニングにおいて、*C. elegans*の寿命を延長する*daf-2*遺伝子が、EPECおよびEHECによる殺虫に対する耐性を与えることが見出された(Dormanら(1995) *Genetics*, 141:1399; Murphyら(2003) *Nature*, 424:277)。これは、EPECまたはEHECの病因を研究するために利用可能な、最初に明らかにされた遺伝子系である。両方の生物が遺伝子的に操作され得るので、この系は、宿主および病原体の両方における変異体を同定して特徴付ける能力を提供する。この系は、EPECおよびEHECの病因の*C. elegans*における研究を可能にし、この研究は、線虫および哺乳動物の宿主において、新規の細菌のビルレンス要因およびそのような要因の標的の同一性を生じ得る。

10

【0138】

(実験8 - PDは、インビトロでポリオーマウイルスの複製をブロックする)

ポリオーマウイルスタンパク質Middle T (MT)は、このウイルスが高レベルの増殖性の感染を生じ、インビトロで細胞を形質転換し、そしてマウスの感受性系統において腫瘍を生成するために必須である。MTは、宿主細胞のキナーゼ*c-Src*、*c-Fyn*および*c-Yes*を補充し、それらに結合し、そしてそれらを活性化するII型内在性膜タンパク質である。多くのインビトロ研究およびインビボ研究は、これらのチロシンキナーゼに結合し、そして活性化させるMTの能力が、ウイルスの増殖促進機能および発癌機能のために必要であることを確証した。実質的に、全てのヒトは、2つの公知のヒトポリオーマウイルス(JCVおよびBKV)の各々に永続的に感染している。

20

【0139】

ヒトポリオーマウイルスは、MTタンパク質をコードしないが、相同的なタンパク質small T (ST)が存在する。他のウイルス(例えば、EBV)もまた、*Src*キナーゼを標的とする(Longneckerら(1991) *J. Virol.* 65:3681)。

【0140】

本実験において、3T3細胞へのポリオーマウイルスの細胞変性効果に対するPDおよびSTI-571の効果を評価した。PDおよびSTI-571の両方は、細胞変性効果を阻害した。3T3細胞の単層を、感染させないままにしたか、または5日間ポリオーマウイルスにより感染させた。感染させた群の細胞を、以下の条件に分けた: DMSO (PDのためのキャリア); 10 μM STI-571; および1 μM PD166326。ポリオーマ感染は、DMSOの群において細胞死を引き起こしたが、STI-571およびPDの添加は、死滅の程度を減少させた。したがって、これらの結果は、これらの化合物が、ポリオーマウイルス感染のインヒビターとして有用であることを示す。

30

【0141】

(実験9 - STI-571は、インビトロでHIVの複製をブロックする)

本実験では、HIVの複製に対するSTI-571の効果を調べた。培養マクロファージを、培地、HIV-Bal、種々の用量のSTI-571、またはHIV-1 Balとの組み合わせた種々の用量のSTI-571のいずれかにより感染させた。ウイルス複製(p24レベルにより測定される)は、STI-571の添加により、用量依存的な様式で1/4にまで減少した(表1)。これらの結果は、STI-571が、HIV感染のインヒビターとして有用であることを示す。

40

【0142】

【表 1】

表 1. HIV-1 Bal によるマクロファージの感染から 7 日後および 14 日後の p24 産生に対する STI-571 の効果		
培養条件	P24(pg/ml) 7 日目	P24(pg/ml) 14 日目
細胞 + 培地	< 10	< 10
細胞 + HIV-1 Bal	322 +/- 28	956 +/- 34
細胞 + STI-571 1 μM	< 10	< 10
細胞 + STI-571 5 μM	< 10	< 10
細胞 + STI-571 10 μM	< 10	< 10
細胞 + HIV-1 Bal + STI-571 1 μM	287 +/- 31	744 +/- 27
細胞 + HIV-1 Bal + STI-571 5 μM	212 +/- 44	556 +/- 28
細胞 + HIV-1 Bal + STI-571 10 μM	127 +/- 22	245 +/- 31

(実験 10 - チロシンキナーゼインヒビターの開発)

本実験では、多数の生物学的に関連するチロシンキナーゼ (A b l、P D G F R および S r c) に対する新規の強力なインヒビターを開発することを目論んだ。S T I - 5 7 1 とピリド [2 , 3 - d] ピリミジンとを誘導体化 (d e r i v i t i z e) した (G o o s n e y ら (2 0 0 0) A n n . R e v . C e l l D e v . B i o l . , 1 6 : 1 7 3 ; K n u t t o n ら (1 9 8 9) L a n c e t 2 : 2 1 8) 。これらの誘導体を、異なる所望の特徴 (可溶性の最適化、単なる薬物動態特性および薬理学特性、ならびに微生物の病因に影響するキナーゼをブロックするが、免疫クリアランスに影響するキナーゼをブロックしないことにおける特異性が挙げられる) に基づいてスクリーニングした。このようなスクリーニングに基づいて、S T I - 5 7 1 を同定した (上記実験 2 を参照のこと) 。これらの結果は、S T I - 5 7 1 とピリド [2 , 3 - d] ピリミジンとを誘導体化することが、新規の特異性または望ましいインビボ特性を有する分子をもたらし得ることを示す。

【 0 1 4 3 】

(実験 11 - インビトロでの TB の病因に対するチロシンキナーゼインヒビターの効果)

本実験は、選択されたチロシンキナーゼインヒビターが、M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s (T B) (結核の病原体) の病因に影響し得るか否かに焦点を当てた。培養されたヒトマクロファージ (株 T H P - 1) への T B の侵入を、基本的に M i l l e r および S h i n n i c k (2 0 0 1) 、B M C M i c r o b i o l . 、1 : 2 6 に記載されるように実行した。簡潔に言うと、T B 培養物を、30 分間 ~ 2 時間の間、この細胞に添加した。次に、アクチノマイシン D を、この培養物に添加し、細胞外に残るあらゆる細菌を殺した。それから、このアクチノマイシン D を洗い流し、この細胞を溶解させ、陥入した細菌を遊離させた。次に、この溶解物を、細菌用プレートにプレートし、そして回収されたコロニーの数を数えた。実験を、100 nM ~ 10 μM の範囲の濃度 (他の E P E C アッセイおよび V V アッセイにおいて有効であることが示されている濃度) の P D、S T I - 5 7 1 の添加を伴うか、または伴わないで実行した。

【 0 1 4 4 】

コロニー数は、侵入が阻害されたか否かについての指標であった。細胞増殖アッセイおよびトリパンプルー排除を使用し、マクロファージが、これらの薬物により悪影響を及ぼされていないことを確かめた。結果は、S T I - 5 7 1 が M . t u b e r c u l o s i s の細胞内の生存を増大させることを示唆した (図 9) 。これらの結果は、チロシンキナーゼインヒビターが、T B 感染を阻害することにおいて有用であることを示す。

【 0 1 4 5 】

本明細書に記載される本発明の多くの変更および他の実施形態は、本発明が属する技術分野における当業者に想到し、上記の説明および付随する図面に示される教示の利益を有

10

20

30

40

50

する。したがって、本発明は開示される特定の実施形態に限定されず、かつ変更および他の実施形態は、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図されることが理解されるべきである。本明細書において、特定の用語が使用されるが、それらは、一般的かつ記述的な意味においてのみ使用され、かつ限定の目的のためではない。さらに、本明細書および添付の実施形態において使用されるように、単数形の「a」、「an」および「the」は、文脈が明確にそうでないことを指示しない限り、複数の対象を含むことが注意されるべきである。

【0146】

本明細書で言及される全ての刊行物および特許出願は、本発明が属する技術分野における当業者のレベルを表す。全ての刊行物および特許出願は、それぞれ個々の刊行物または特許出願が、参考として援用されるために、詳細かつ個別に示されるような同一の範囲について、本明細書において参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【0147】

【図1】図1は、AblファミリーチロシンキナーゼおよびSrcファミリーチロシンキナーゼが、VVアクチンテイル(tail)に局在化することを示す。(A)3T3細胞において、Ablを含むか、Argを含むか、AblおよびArgの両方を含むか、またはAblもArgも含まないテイルのパーセンテージの定量化。(B)VVアクチンテイルにおける、Srcファミリーキナーゼの分布の定量化。

【図2】図2は、(A)Src^{-/-}/Fyn^{-/-}/Yes^{-/-}細胞；および(B)Abl^{-/-}/Arg^{-/-}細胞についての、VVアクチンテイルにおける、ABLファミリーキナーゼおよびSrcファミリーキナーゼの分布の定量化を示す。

【図3】図3は、VVへの8時間の曝露より前の、AblファミリーキナーゼとSrcファミリーキナーゼとのインヒビターPD166326による3T3細胞の処置の効果の定量化を示す。結果は、100個の感染細胞内のテイルを反映する。感染は、EVP染色により評価された。

【図4】図4は、STI-571が、マウスにおけるVV量を軽減することを示す。6週齢のC57/B6マウスを、感染させないまま(ウイルス無し)か、または 10^4 PFU/ml VVにより感染させた。感染の1日前に、PBS(キャリア)またはSTI-571(一日あたり100mg/kg)を含む連続放出性の浸透圧ポンプが、外科的に皮下移植された。各データセット内の線は、ウイルス負荷のメジアンを示す。このデータは、フィッシャーの直接確率検定により有意である($P < 10^{-6}$)。

【図5】図5は、ウイルス複製に対するSTI-Xの効果の定量化を示す。感染細胞のパーセンテージが、EVP染色か、または核外DAPI染色により測定されるように、核外複製の中心を含むGFP標識ピリオンの存在のいずれかによって評価され、プロットされる。

【図6】図6は、EPECの台座様構造の形成および維持が、PD166326および関連するキナーゼインヒビターによりブロックされることを示す。グラフは、DMSO、 $10\mu\text{M}$ PD166326または $10\mu\text{M}$ PP2による前処置レジメンまたはリバーサルレジメンにしたがって処置されたEPECについての最も強い強度の画素により占められた領域を示す。EPECは、0.1% DMSO(X)または $25\mu\text{M}$ PD()のいずれかとともに培養され、そして示される時点に、そのOD600が測定された。

【図7】図7は、PDが、EPECのTirのチロシンリン酸化をブロックするが、Tirの局在化をブロックしないことを示す。細胞は、DMSOまたはPDにより処理され、そして感染させないまま(0時間)か、または示される時間の間、EPECにより感染させた。逆転条件については、細胞は、感染させないまま(レーン1)か、また6時間、EPECにより感染させ、示される時間の間、PDにより処理され、そして分析された。

【図8】図8(A)は、PDについての標準血漿曲線が、 $1000\text{ng/ml} \sim 30\text{ng/ml}$ において直線状であることを示す。図8(B)は、マウス血漿のクロマトグラムを示す。質量分析の読み出しは、カラム内の保持時間の関数としてプロットされる。第一の

10

20

30

40

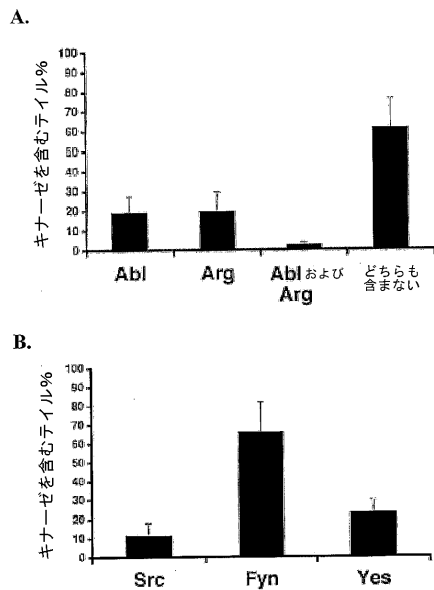
50

ピークは内部較正標準であり、第二のピークはPDである。

【図9】図9は、種々の時点における、STI-571へ曝露しなかった後のM. tuberculosisの細胞間の生存 対 STI-571への曝露後のM. tuberculosisの細胞間の生存を示す。WTは、いかなる薬物にも曝露されていない細胞を意味する。

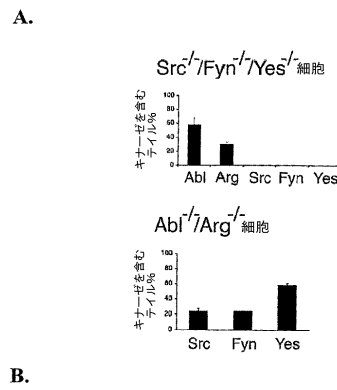
【図1】

Figure 1



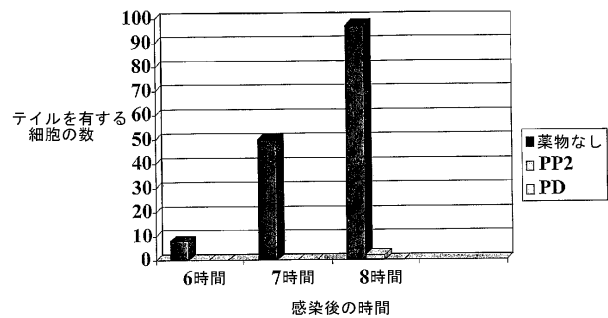
【図2】

Figure 2



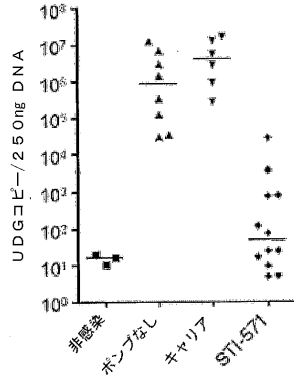
【図3】

Figure 3



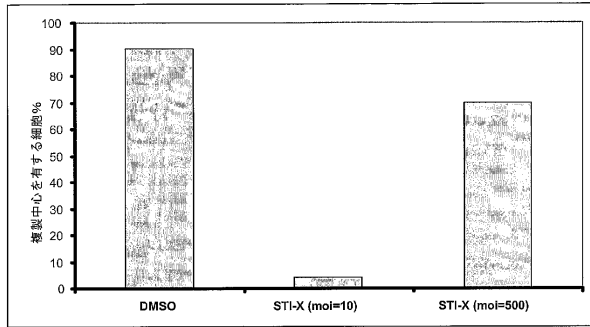
【 図 4 】

Figure 4



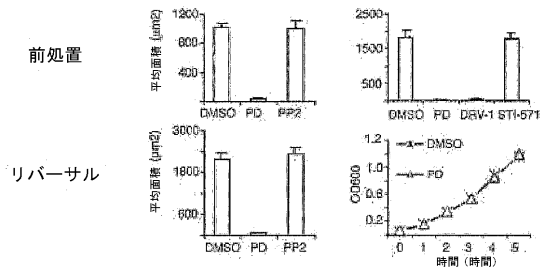
【 図 5 】

Figure 5



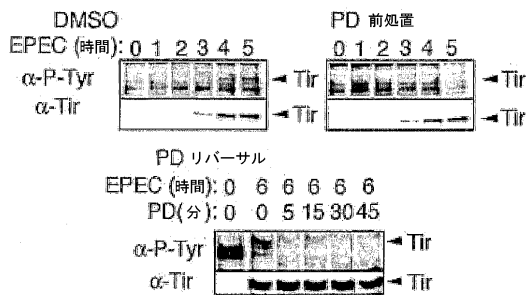
【 図 6 】

Figure 6

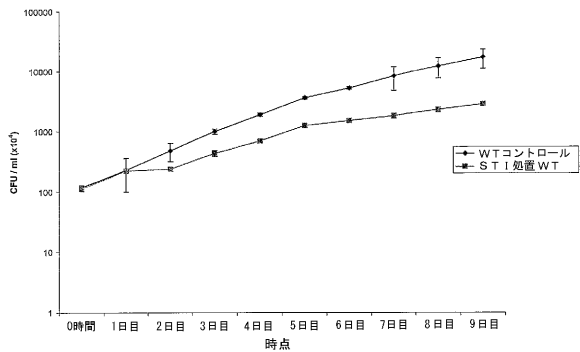


【 図 7 】

Figure 7

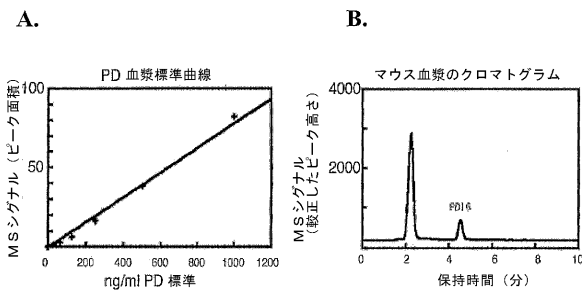


【 図 9 】



【 図 8 】

Figure 8



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/22 (2006.01) A 6 1 P 31/22

(31)優先権主張番号 60/614,203

(32)優先日 平成16年9月29日(2004.9.29)

(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

(72)発明者 カルマン, ダニエル

アメリカ合衆国 ジョージア 30341, アトランタ, ウェイク ロビン トレイル 3243

(72)発明者 ボーンマン, ウィリアム ジェラルド

アメリカ合衆国 テキサス 77459, ミズーリ シティ, ホープ ファーム ロード 66

(72)発明者 シャーマン, メラニー アン

アメリカ合衆国 ジョージア 30083, ストーン マウンテン, プリアーズ ドライブ 1419

(72)発明者 リープス, パトリック マイケル

アメリカ合衆国 ジョージア 30350, アトランタ, インズブラック ドライブ 8075

(72)発明者 スウィム, アリソン アイリーン

アメリカ合衆国 ジョージア 30033, デカター, ダンフォース レーン 2645

合議体

審判長 川上 美秀

審判官 岩下 直人

審判官 穴吹 智子

(56)参考文献 国際公開第03/035049(WO, A1)

国際公開第02/057271(WO, A1)

特表平10-509452(JP, A)

特表2003-518077(JP, A)

特表2002-512962(JP, A)

特表2002-542193(JP, A)

特開平6-87834(JP, A)

欧州特許第1201765(EP, B1)

Molecular Biology of the Cell, 1994年 4月, Vol. 5, p. 455-464

FEBS Letters, 1994年 3月14日, Vol. 341, No. 1, p. 99-103

The Journal of Cell Biology, 1998年11月16日, Vol. 143, No. 4, p. 1003-1012

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 2003年 6月, Vol. 23, No. 11, p. 3884-3896

Biochemical Pharmacology, 2000年, Vol. 60, p. 885

- 898

Oncogene, 2002年, Vol. 21, p. 8804 - 8816

Leukemia, 2002年, Vol. 16, p. 1589 - 1595

Journal of Medicinal CHEMISTRY, 1998年, Vol. 41
, No. 17, p. 3276 - 3292

Journal of Medicinal CHEMISTRY, 1998年, Vol. 41
, No. 22, p. 4365 - 4377

Oncology Research, 2003年, Vol. 14, No. 4 - 5, p. 175
- 225

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 45/00, 31/00-31/506

A61P31/00-31/22, 35/00-35/02

C07D401/00-401/04

MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CA, REGISTRY

JSTPlus, JST7580, JMEDPlus