

(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2004-537717

(P2004-537717A)

(43) 公表日 平成16年12月16日(2004.12.16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	Z 2 G O 4 5
A 6 1 K 9/12	A 6 1 K 9/12	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/55	A 6 1 K 45/00	4 C O 7 6
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 1/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 13/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-509137 (P2003-509137)	(71) 出願人	504006445 アブ サイエンス
(86) (22) 出願日	平成14年6月28日 (2002.6.28)		フランス国 パリ アヴェニュー ジョージ ファイブ 3
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月5日 (2004.1.5)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 国際出願番号	PCT/IB2002/003294	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(87) 国際公開番号	W02003/003004	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(87) 国際公開日	平成15年1月9日 (2003.1.9)	(72) 発明者	ムーシー アラン フランス国 パリ パッセージ ドーフィ ネ ビス 22
(31) 優先権主張番号	60/301, 404		
(32) 優先日	平成13年6月29日 (2001.6.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/301, 405		
(32) 優先日	平成13年6月29日 (2001.6.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/301, 406		
(32) 優先日	平成13年6月29日 (2001.6.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肥満細胞を特異的に枯渇させる化合物同定法

## (57) 【要約】

本発明は、肥満細胞を枯渇させることが可能な化合物の同定および選択を可能にするスクリーニング法に関し、ここでその化合物は、肥満細胞ではない他の造血細胞または関連した細胞もしくは細胞株、例えばSCF依存性の増殖されたヒト正常CD34+細胞などに対し重大な毒性を示さない。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

肥満細胞ではない他の造血細胞、または関連した細胞もしくは細胞株、またはそれらに由来した細胞株、例えばSCF非依存性の増殖されたヒト正常CD34+細胞などにとって無毒である化合物であり、肥満細胞を枯渇することが可能である化合物を同定する方法であって、以下の工程を含む方法：

- a) 肥満細胞をインビトロにおいて適当な培養培地で培養する工程；
- b) 該培養培地に、少なくとも1種の試験される候補化合物を添加し、該細胞を延長された期間インキュベーションする工程；
- c) 該化合物が、肥満細胞の死または破壊を促進し、肥満細胞増殖を妨害または阻害する程度を測定し、肥満細胞の枯渇が観察された化合物を選択する工程；
- d) 肥満細胞ではない他の造血細胞、または関連した細胞もしくは細胞株、またはそれらに由来した細胞株、例えばSCF非依存性の増殖されたヒト正常CD34+細胞などから選択された細胞の、有意な死を促進することができない工程c)において選択された化合物のサブセットを同定する工程。

## 【請求項2】

肥満細胞ではない他の造血細胞、または関連した細胞もしくは細胞株、またはそれらに由来した細胞株、例えばSCF非依存性の増殖されたヒト正常CD34+細胞などにとって無毒である化合物であり、肥満細胞を枯渇することが可能である化合物を同定する方法であって、以下の工程を含む方法：

- a) 肥満細胞の培養物を提供する工程であり、ここで肥満細胞は、野生型肥満細胞およびそれらに由来した細胞株、活性化された突然変異体肥満細胞株、ならびに活性化された野生型肥満細胞およびそれらに由来した細胞株から選択される工程；
- b) 該細胞の培養物を、少なくとも1種の候補化合物と、肥満細胞の増殖および/または生存を許す条件下で接触させ、候補化合物存在下での細胞死レベルを測定し；ならびに候補化合物存在下での細胞死レベルを、候補化合物非存在下での細胞死レベルと比較する工程であって、候補化合物の存在下での細胞死レベルの増加が、候補化合物の肥満細胞枯渇能の指標である工程；
- c) 肥満細胞以外の少なくとも1種の細胞の培養物を提供する工程であり、該細胞は肥満細胞ではない造血細胞、または関連した細胞もしくは細胞株、またはそれらに由来した細胞株、例えばSCF非依存性の増殖されたヒト正常CD34+細胞などから選択される工程；
- d) 該細胞の培養物を、工程b)で同定された少なくとも1種の化合物と、工程c)で説明された細胞の増殖および/または生存を許す条件下で接触し、該化合物存在下での細胞死レベルを測定し；ならびに化合物存在下での細胞死レベルを、候補化合物非存在下での細胞死レベルと比較する工程であって、該化合物存在下での細胞死レベルの有意な増加がないことは、該化合物の、少なくとも他の造血細胞に対する肥満細胞枯渇特異性の指標である工程。

## 【請求項3】

肥満細胞が、単離された肥満細胞およびそれらに由来する細胞株、BaF3、IC-2マウス細胞、HMC-1、ATCC寄託番号TIB-64で入手可能なP815、ATCC寄託番号CRL-2034で入手可能な10P2、ATCC寄託番号CRL-2036で入手可能な10P12、ATCC寄託番号CRL-2037で入手可能な11P0-1、およびそれらに由来する細胞株から選択される、請求項1または2記載の方法。

## 【請求項4】

肥満細胞ではない他の造血細胞、または関連した細胞もしくは細胞株が、SCF以外のサイトカインカクテルを含有する培養培地において増殖されたヒトTリンパ球Jurkat細胞株(ATCC番号TIB-152およびそれら由来の細胞株)、ヒトBリンパ球DaudiまたはRaji細胞株(各々、ATCC番号CCL-213およびCCL-86ならびにそれら由来の細胞株)、ヒト単球U937細胞株(ATCC番号CRL-1593.2)およびヒトHL-60細胞株(ATCC番号CCL-240)、それらに由来する細胞株(ATCC番号CRL-2258およびCRL-2392)、ならびに正常ヒトCD34+細胞からなる群より選択される、請求項1~3のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 5】

濃度10 $\mu$ M未満、好ましくは1 $\mu$ M未満で、肥満細胞の特異的な枯渇が可能である化合物が選択される、請求項1~4のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 6】

E/S比、1/1000から1/5の範囲を示す化合物が選択される、請求項1~5のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 7】

細胞死アッセイ法が、細胞増殖アッセイ法、細胞生存度アッセイ法、および/またはアポトーシスアッセイ法をさらに含む、請求項1~6のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 8】

細胞死の程度が、3Hチミジン取込み、トリパンプルー排除能法、ヨウ化プロピジウムの使用、または<sup>51</sup>Cr放出アッセイ法により測定される、請求項1~6のいずれか1項記載の方法。

10

## 【請求項 9】

細胞死の程度が、好ましくは蛍光カルセインおよびエチジウムホモダイマー1を使用する、細胞内エステラーゼ活性試験、および形質膜完全性試験により決定される、請求項1~6のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 10】

細胞死の程度が、DiOC<sub>18</sub>およびヨウ化プロピジウムを使用する生細胞と死細胞の間の識別により決定される、請求項1~6のいずれか1項記載の方法。

20

## 【請求項 11】

細胞死の程度が、蛍光顕微鏡、蛍光光度計、蛍光マイクロプレートリーダー、またはフローサイトメーターを用いる、細胞生存度および細胞毒性の蛍光光度アッセイ法により測定される、請求項1~10のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 12】

IL-3依存性細胞である肥満細胞が、IL-3を0.5~10ng/ml、好ましくは1~5ng/mlを構成する濃度で含有する培養培地において培養される、請求項1~11のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 13】

試験される化合物が、チロシンキナーゼのインヒビター、例えばAkt、c-Cbl、CRKL、Doc、p125 Fak、Fyn、Grap、Jak2、Lyn、MAPK、MATK、PI3-K、PLC-、Raf1、Ras、SHP-1、SHP2(Syp)、Tec、Vav、およびFlt-3からなる群より選択される、請求項1~12のいずれか1項記載の方法。

30

## 【請求項 14】

前記化合物が、インドリノン、ピリミジン誘導体、ピロロピリミジン誘導体、キナゾリン誘導体、キノキサリン誘導体、ピラゾール誘導体、ピス単環式、二環式またはヘテロ環式アリアル化合物、ビニレン-アザインドール誘導体およびピリジル-キノロン誘導体、スチリル化合物、スチリル置換されたピリジル化合物、セレオインドール、セレニド、三環式ポリヒドロキシ化合物、ならびにベンジルホスホン酸化合物からなる群より選択される、請求項1~12のいずれか1項記載のスクリーニング法。

## 【請求項 15】

肥満細胞を枯渇することが可能であり、他の造血細胞に対する重大な毒性を有さず、好ましくはE/S比1/1000~1/5の範囲を有する、請求項1~12のいずれか1項記載の方法により入手可能な化合物。

40

## 【請求項 16】

医薬品製造のための、請求項15記載の化合物の使用。

## 【請求項 17】

請求項1~14のいずれか1項記載の方法により入手可能な化合物を、そのような治療を必要とする哺乳類へ投与する工程を含む、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、骨量減少、腫瘍血管新生、炎症疾患、炎症性腸疾患(IBD)、間質性膀胱炎、肥満細胞症、感染症、およびCNS障害から選択された疾患を治療する方法。

50

## 【請求項 18】

請求項1～14のいずれか1項記載の方法により入手可能な化合物を、そのような治療を必要とするヒトへ投与する工程を含む、毛髪生長および毛髪色の回復を促進する方法。

## 【請求項 19】

多発性硬化症、乾癬、腸炎症疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、慢性関節リウマチおよび多発性関節炎、限局性および全身性強皮症、全身性エリスマトーデス、円板状エリスマトーデス、皮膚エリスマトーデス、皮膚筋炎、多発性筋炎、シェーグレン症候群、結節性汎動脈炎、自己免疫性腸疾患、増殖性糸球体腎炎、脈管炎、活動性慢性肝炎、および慢性疲労症候群を治療する、請求項17記載の方法。

## 【請求項 20】

腎臓、膵臓、肝臓、心臓、肺、および骨髄を含む、任意の臓器移植における移植片-対-宿主疾患または移植片拒絶反応を治療するための、請求項17記載の方法。

10

## 【請求項 21】

アフタ性潰瘍のような表皮下水疱形成障害、ならびに天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および瘢痕性類天疱瘡などのようないくつかの水疱性疾患を治療するための、請求項17記載の方法。

## 【請求項 22】

好ましくはダブソン、アザチオプリン、エリスロマイシン、プロピオニルエリスロマイシン、ネオマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、およびメクロサイクリンから選択された、少なくとも1種の抗生物質をさらに投与する工程を含む、請求項21記載の方法。

20

## 【請求項 23】

喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性副鼻腔炎、アナフィラキシー症候群、じんま疹、血管性水腫、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、結節性紅斑、多形性紅斑、皮膚壊死性細静脈炎、昆虫の咬傷による皮膚炎症、および吸血寄生生物外寄生を治療するための、請求項17記載の方法。

## 【請求項 24】

特にイヌおよびネコにおける、皮膚アレルギー性障害、例えばじんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、結節性紅斑、多形性紅斑、皮膚壊死性細静脈炎、昆虫の咬傷による皮膚炎症、および吸血寄生生物外寄生を治療するための、請求項17記載の方法。

## 【請求項 25】

化合物が、患者の気道、鼻腔内の標的領域へエアロゾル処方または局所的処方で投与される、請求項23または24項記載の方法。

30

## 【請求項 26】

ヒトにおける腫瘍血管新生を治療するための、請求項17記載の方法。

## 【請求項 27】

肥満細胞症、色素性じんま疹を含む顕著な皮膚肥満細胞症、びまん性皮膚肥満細胞症、単発性肥満細胞種および水疱、紅斑性および末梢血管拡張性肥満細胞症に関連したヒトにおける皮膚疾患を治療する、請求項17記載の方法。

## 【請求項 28】

肥満細胞性白血病を含むIV型肥満細胞症を治療するための、請求項17記載の方法。

40

## 【請求項 29】

イヌの肥満細胞腫を治療するための、請求項17記載の方法。

## 【請求項 30】

クローン病、粘膜炎、潰瘍性大腸炎、および壊死性腸炎のような、炎症性腸疾患(IBD)を治療するための、請求項17記載の方法。

## 【請求項 31】

ヒトにおける間質性膀胱炎を治療するための、請求項17記載の方法。

## 【請求項 32】

哺乳類、特にヒトにおける細菌感染症を治療するための、好ましくは再発性細菌感染症、細菌性膀胱炎のような無症候期間後に再発する感染症の治療のための、請求項17記載の方

50

法。

【請求項33】

大腸菌、肺炎桿菌、セラチア・マルチセンス、シトロバクター・フロインディー、およびネズミチフス菌を含む、グラム陰性腸内細菌のような、FimH発現性細菌感染症を治療するための、請求項17記載の方法。

【請求項34】

バシトラシン、セファロスポリン、ペニシリン、アミノグリコシド、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、およびエリスロマイシンのようなマクロライド系抗生物質；フルオロキノロン、アクチノマイシン、スルホンアミド、およびトリメトプリムから選択された、少なくとも1種の抗生物質をさらに投与する工程を含む、請求項29または30記載の方法

10

【請求項35】

閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症、および糖質コルチコイドが誘発した骨粗鬆症を含む骨粗鬆症、嚢胞性線維性骨炎、腎性骨形成異常症、骨硬化症、骨減少症、骨軟化症、骨線維形成不全症、およびページェット病のような骨量減少を治療するための、請求項17記載の方法。

【請求項36】

慢性関節リウマチ、結膜炎、リウマチ様脊椎炎、変形性関節症、痛風性関節炎、多発性関節炎、および他の関節炎の状態のような炎症疾患に加え、これらの炎症疾患に関連した疼痛を治療するための、請求項17記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肥満細胞を枯渇することが可能である化合物を同定および選択することを可能にするスクリーニング法であり、ここでその化合物は、肥満細胞ではない他の造血細胞または関連した細胞もしくは細胞株、例えばSCF非依存性の増殖されたヒト正常CD34+細胞などに重大な毒性を示さない方法に関する。

【背景技術】

【0002】

肥満細胞(MC)は、CD34、c-kitおよびCD13抗原を発現している造血幹細胞の特定のサブセットに由来した組織要素である(Kirshenbaumら、Blood、94:2333-2342(1999)；および、Ishizakaら、Curr Opin Immunol.、5:937-43(1993))。未熟なMC前駆細胞は、血流中を循環し、組織において分化する。これらの分化および増殖過程は、サイトカインの影響下であり、その中で最も重要なものは幹細胞因子(SCF)であり、その受容体はc-kitである。

30

【0003】

肥満細胞は、関連する組織の配置および構造のみではなく、機能的および組織化学的レベルでの、それらの不均一性により特徴付けられる(AldenborgおよびEnerback.、Histochem. J.、26:587-96(1994)；Braddingら、J Immunol.、155:297-307(1995)；Iraniら、J. Immunol.、147:247-53(1991)；Millerら、Curr Opin Immunol.、1:637-42(1989)；および、Welleら、J. Leukoc Biol.、61:233-45(1997))。実際、少なくとも3種の異なる肥満細胞亜型がヒトにおいて存在し、これらは、それらの形態学的外観、それらの組織配置、それらの生化学的含有物、および様々な化合物に対するそれらの反応性が異なる。これら3種の異なる肥満細胞亜型は中性プロテアーゼ含量により区別される。トリプターゼ(T)のみを含有する肥満細胞はMCTと称される一方で、トリプターゼおよびキマーゼ(C)を含有するMCはMCTCとして知られている。加えて、少数の肥満細胞は、キマーゼのみを発現し、トリプターゼは発現せず、MCCと称される(Liら、J. Immunol.、156:4839-44(1996))。それらの機能に関して、既にかなり研究された即時型過敏症に関連した細胞としてのそれらの役割に加え、最近の研究は、肥満細胞は抗原提示細胞として、および生物の抗炎症性防御に高度に関連した要素としての、ふたつの主要な生理的特性を有することを示すことができた(AbrahamおよびArock、Semin Immunol.、10:373-381(1998)；ArockおよびAbraham、Inf

40

50

ection Immunity、66:6030-4(1998) ; Galliら、Curr Opin Immunol.、11:53-59(1999))。

【0004】

より最近になって、本出願人は、肥満細胞は、これまで考えられていたものよりも遙かに大きく広がる多くの病理に関連していることを発見した。これに関し、本出願人は、米国特許第60/301,408号、第60/601,409号、第60/301,411号、第60/301,407号、第60/301,406号、第60/323,312号、第60/301,410号、第60/323,315号、第60/301,405号、第60/601,409号、および第60/301,404号を出願している。

【0005】

患者の組織に存在する肥満細胞は、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、腫瘍血管新生、炎症疾患、多発性関節炎、炎症性腸疾患(IBD)、および間質性膀胱炎のような疾患の発生に 10  
関連またはその原因となっていることが発見された。これらの疾患全てにおいて、肥満細胞が、様々なプロテアーゼおよびメディエーター類(例えばヒスタミン、プロテオグリカン、中性プロテアーゼ)、脂質由来のメディエーター類(プロスタグランジン、トロンボキサン、およびロイコトリエン)、ならびに様々なサイトカイン類(IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、TNF-、GM-CSF、MIP-1a、MIP-1b、MIP-2、およびIFN-)のカクテルの放出により組織破壊に参画していることは自明のことである。

【0006】

このような理由で、これらの疾患に寄与する肥満細胞を枯渇するためにc-kitを標的とすることが提唱されている。この方法は非常に有望であるが、本出願人は更に特異的に肥満細胞を枯渇することを進め、かつここで提唱している。実際c-kitは、他の造血細胞また 20  
は非造血細胞においても発現されている。肥満細胞枯渇に関する特異性を増強することは非常に興味深く、前記疾患治療の新規経路を開くことができるであろう。これは例えば、自己免疫疾患の治療について例証することができる。当技術分野において、免疫抑制剤のみが相対的な効能を示しているが、これらは患者の全身の健康を危険に曝し、いくつかの症例においては高い死亡率に関連している大きな副作用がある。

【0007】

本明細書で以下に定義された方法は、前記疾患の中心にある非常に特異的な免疫系の亜成分である肥満細胞を標的とするが、患者の全身の健康に影響を及ぼすことなく排泄され得るので、当技術分野において提唱されているものと比べてテーラーメイド治療を提供することができるであろう。 30

【発明の開示】

【0008】

説明

従って本発明は、肥満細胞を枯渇することが可能である化合物を同定する方法を目的とし、ここでこの化合物は、肥満細胞ではない他の造血細胞または関連した細胞もしくは細胞株またはそれらに由来した細胞株、例えばSCF非依存性の増殖されたヒト正常CD34+細胞などにとって無毒であり：

- a) 肥満細胞をインビトロにおいて適当な培養培地内で培養する工程；
- b) その培養培地に少なくとも1種の試験される候補化合物を添加し、細胞を延長された期間インキュベーションする工程； 40
- c) 化合物が肥満細胞の死または破壊を促進し、肥満細胞増殖を妨害または阻害する程度を測定し、ならびに肥満細胞の枯渇が観察された化合物を選択する工程；
- d) 肥満細胞ではない他の造血細胞または関連した細胞もしくは細胞株またはそれらに由来した細胞株、例えばSCF非依存性の増殖されたヒト正常CD34+細胞などから選択された細胞の有意な死を促進することができない、工程c)において選択された化合物のサブセットを同定する工程を含む方法である。

【0009】

別の表現をすると、本発明は、肥満細胞を枯渇することが可能である化合物を同定する方法であり、ここでその化合物は肥満細胞ではない他の造血細胞または関連した細胞もしくは細胞株またはそれらに由来した細胞株、例えばSCF非依存性の増殖されたヒト正常CD34+ 50

細胞などにとって無毒であり：

a) 肥満細胞の培養物を提供する工程であり、ここで肥満細胞は、野生型肥満細胞およびそれらに由来した細胞株、活性化された突然変異体肥満細胞株、ならびに活性化された野生型肥満細胞およびそれらに由来した細胞株から選択される工程；

b) 細胞の培養物を、少なくとも1種の候補化合物と、肥満細胞の増殖および/または生存を許す条件下で接触し、候補化合物存在下での細胞死のレベルを測定し；ならびに、候補化合物存在下での細胞死レベルを、候補化合物非存在下での細胞死レベルと比較し、ここで候補化合物の存在下での細胞死レベルの増加が、候補化合物の肥満細胞枯渇能の指標である工程；

c) 肥満細胞以外の少なくとも1種の細胞の培養物を提供する工程であり、ここでその細胞は、肥満細胞ではない造血細胞または関連した細胞もしくは細胞株またはそれらに由来した細胞株、例えばSCF非依存性の増殖されたヒト正常CD34+細胞などから選択される工程；

d) 細胞の培養物を、工程b)で同定された少なくとも1種の化合物と、工程c)で説明された細胞の増殖および/または生存を許す条件下で接触し、その化合物存在下での細胞死のレベルを測定し；ならびに、化合物存在下での細胞死レベルを、化合物非存在下での細胞死レベルと比較し、ここでこの化合物存在下での細胞死レベルに有意な増加がないことは、この化合物の少なくとも他の造血細胞に対する肥満細胞枯渇特異性の指標である工程を含む方法に関する。

【0010】

前記方法の枠内で使用することができる肥満細胞の中でも、本発明者らは以下のものを挙げることができる：

SCF依存性細胞：

a) ヒト臍帯血から得られた血液を起源とする細胞。これに関して、臍帯血由来のヘパリン処理した血液は、Ficoll勾配上で遠心され、他の血液成分から単核細胞が単離される。次にCD34+前駆細胞は、前述の単離された細胞から免疫磁気選択システムMACS(Miltenyi biotech社)を用いて精製される。その後CD34+細胞は、培地MCCM(L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  -メルカプトエタノール、20%ウシ胎仔血清、1%ウシ血清アルブミンおよび、100ng/ml組換えヒトSCFを補充した -MEM)において、濃度 $10^5$ 個細胞/ml、37℃、5%CO<sub>2</sub>大気中で、培養される。培地は、5から7日毎に交換される。この培養物中に存在する肥満細胞の割合は、May-Grunwalギムサまたはトルイジンブルー染色を用い、毎週評価される。抗トリプターゼ抗体も、培養物中の肥満細胞検出に使用することができる。10週間培養した後、純粋な肥満細胞の細胞集団(>98%)が得られる。

【0011】

b) a)において得られる細胞由来の細胞株。常法を用い、前述のように確立された細胞株をトランスフェクションするためにc-kitを発現しているベクターを調製することは可能である。ヒトc-kitのcDNAは、Yardenらの論文に説明されている(EMBO J., 6(11):3341-3351(1987))(同じく配列番号:1参照のこと)。c-kitのコード部分(3000bp)は、下記のオリゴヌクレオチドを用いてPCRにより増幅され、クローニングされる：

- 5'AAGAAGAGATGGTACCTCGAGGGGTGACCC3' (配列番号:2)センス

- 5'CTGCTTCGCGGCCGCGTAACTCTTCTCAACCA3' (配列番号:3)アンチセンス

これらのPCR産物は、NotIおよびXhoIで消化され、T4リガーゼを用いpFlag-CMVベクター(SIGMA社)へ挿入されるが、このベクターはNotIおよびXhoIにより消化されならびにCIP(Bio labs社)を用いて脱リン酸化されている。このpFlag-CMV-c-kitを用い、細菌クローンXL1-blueが形質転換される。クローンの形質転換は、下記プライマーにより証明される：

- 5'AGCTCGTTTGTGACCGTC3' (配列番号:4)センス

- 5'GTCAGACAAAATGATGCAAC3' (配列番号:5)アンチセンス

当技術分野において公知の慣習的かつ一般的手法により、関連カセットを用いて位置指定

突然変異誘発が行われる。

【0012】

ベクター-Migr-1(ABC社)を、成熟肥満細胞のトランスフェクションに使用するためのレトロウイルスベクター構築のための基本として使用することができる。このベクターは、IRESの3'末端にGFPをコードしている配列を含むので都合がよい。これらの特徴は、フルオロサイトメーターによる直接分析を用い、レトロウイルスに感染した細胞の選択を可能にする。前述のように、c-kit cDNAのN-末端は、内因性c-kitから異種を識別するのに有用であるFlag配列を導入するために修飾することができる。

【0013】

c)肥満細胞株：

野生型または突然変異型c-kitを発現している(傍細胞膜および触媒部位)BaF3マウス細胞は、Kitayamaら(Blood、88:995-1004(1996))およびTsujiuraら(Blood、93:1319-1329(1999))の論文に説明されている。この細胞株は、ペニシリン、ストレプトマイシン、L-グルタミン、10%ウシ胎仔血清(FBS)、およびIL-3を補充した、RPMI 1640培地において増殖することができる。

10

【0014】

c-kit<sup>野生型</sup>またはc-kit<sup>D814Y</sup>のいずれかを発現しているIC-2マウス細胞は、Piaoらの論文(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93:14665-14669(1996))に示されている。

【0015】

d)IL-3非依存性細胞株は以下である：

HMC-1は、肥満細胞性白血病患者由来の因子非依存性細胞株であり、構成的キナーゼ活性を有する傍細胞膜突然変異体c-kitポリペプチドを発現している(Furitsu Tら、J. Clin. Invest.、92:1736-1744(1993)；Butterfieldら、「Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia」、Leuk Res.、12:345-355(1988)；および、Nagataら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、92:10560-10564(1995))。

20

【0016】

P815細胞株(814位でc-kit突然変異を天然に発現している肥満細胞腫)は、Tsujiuraらの論文(Blood、83:2619-2626(1994))に説明されている。この細胞株は、ATCCから寄託番号TIB-64で入手可能である。

【0017】

e)ATCCから入手可能なその他の肥満細胞株：

ATCC番号	生物	名称
<u>CRL-2034</u>	Mus musculus (マウス)	10P2
<u>CRL-2036</u>	Mus musculus (マウス)	10P12
<u>CRL-2037</u>	Mus musculus (マウス)	11P0-1

30

【0018】

従って好ましい態様において、本発明は前述の方法に関し、ここで肥満細胞は単離された肥満細胞およびそれら由来の細胞株、BaF3、IC-2マウス細胞、HMC-1、ATCC寄託番号TIB-64で入手可能なP815、ATCC寄託番号CRL-2034で入手可能な10P2、ATCC寄託番号CRL-2036で入手可能な10P12、ATCC寄託番号CRL-2037で入手可能な11P0-1、ならびにそれら由来の細胞株から選択される。

40

【0019】

加えて、本発明の方法に関連して、肥満細胞は、MCC、MCTC、MCTから選択することができる。

【0020】

別の好ましい態様において、肥満細胞ではない造血細胞または関連した細胞もしくは細胞株は、下記からなる群から選択することができる：

ヒトTリンパ球Jurkat細胞株(ATCC番号TIB-152およびそれら由来の細胞株)、

50

ヒトリンパ球DaudiまたはRaji細胞株(各々、ATCC番号CCL-213およびCCL-86ならびにそれら由来の細胞株)、  
 ヒト単球U937細胞株(ATCC番号CRL-1593.2)、および  
 ヒトHL-60細胞株(ATCC番号CCL-240)、それら由来の細胞株(ATCC番号CRL-2258およびCRL-2392)。

【0021】

先に説明したように、本方法は、これらの造血細胞の1種または数種のいずれかで行うことができる。好ましい化合物は、その他の造血細胞に対する肥満細胞に関して最大の効果および特異性を明らかにする化合物である。

【0022】

更に別の好ましい態様において、対照細胞は、SCF以外のサイトカインカクテルを含有する培養培地において増殖された正常ヒトCD34+細胞から選択される。好ましい化合物は、これらのSCF非依存性CD34+細胞に対する肥満細胞に関して最大の効果および特異性を明らかにする化合物である。

【0023】

効果に関して、本発明の化合物は、濃度10 $\mu$ M未満、好ましくは5、4、2または1 $\mu$ M未満で、それらの肥満細胞枯渇能について選択される。

【0024】

最良の化合物は、先に示した化合物のサブセットであり、これは、濃度範囲1、2、3、4、5 $\mu$ Mから10 $\mu$ Mでは、肥満細胞以外の造血細胞の生存度には有意に影響しない。本発明は、これらの化合物の中でも濃度範囲10~15 $\mu$ M、15~20 $\mu$ M、または20~40 $\mu$ Mで、生存力の喪失がない化合物を特に指定している。

【0025】

効果/選択性の比は、下記式を用い、前述のデータで説明することができる：

$E/S$ 比 = 肥満細胞のIC50 / 肥満細胞以外の造血細胞のIC50

【0026】

最良の化合物は、最低のE/S比を示す化合物であり、例えばE/S比が1/1000から1/5、1/1000から1/100、1/100から1/50、1/100から1/10、1/50から1/10、1/25から1/10、または1/20から1/5の範囲の化合物である。

【0027】

細胞死アッセイ法は、細胞増殖アッセイ法、細胞生存度アッセイ法および/またはアポトーシスアッセイ法をさらに含む。

【0028】

例えば、細胞死の程度は、3Hチミジン取込み、トリパンプルー排除能法、ヨウ化プロピジウムの使用、または<sup>51</sup>Cr-放出アッセイ法により測定することができる。

【0029】

あるいは、細胞死の程度は、好ましくは蛍光カルセインおよびエチジウムホモダイマー1を使用し、細胞内エステラーゼ活性試験、および形質膜完全性試験により決定される。これらの試験は、J. Neurosci, 15:5389(1995)、J. Cell Sci., 106:685(1993)に説明されている。詳細なプロトコールは、Molecular Probes社カタログ製品番号L-3224(Live/Dead (登録商標)キット)に説明されており、これは本明細書に参照として組み入れられている。基本的に、カルセインAMは、細胞-透過性エステラーゼ基質であり、これは酵素活性により高度に蛍光性のカルセインに転換されるまでは非蛍光性である。これは、強い緑色蛍光を発している生細胞内に維持され続ける。エチジウムホモダイマー1蛍光は、核酸結合時に増強される。明るい赤色蛍光が放出される。この色素は無傷の形質膜を通過することはできないが、死細胞の中には侵入する。従って生細胞は緑色であるが、死細胞は赤色蛍光を放出する。この技術をCDDカメラおよびプレートリーダーと組合せることで、ハイスループットスクリーニングにつながる。

【0030】

別の態様において、細胞死の程度は、DiOC<sub>18</sub>およびヨウ化プロピジウムを用い、生細胞と

10

20

30

40

50

死細胞の間の識別により決定される。プロトコールは、Molecular Probes社カタログ製品番号L-7010(Live/Dead(登録商標)キット)に詳細に説明されており、これは本明細書に参照として組入れられている。

【0031】

更に別の態様において、細胞死はカスパーゼ活性試験を用い決定することができる。カスパーゼは、アポトーシス活性化において重要な役割を果たす。Molecular probe社キットE-13183(EnzCheckカスパーゼ-3アッセイキット(登録商標)、Molecular Probe社)は、特にJurkat細胞の試験に有用である。ホスファチジル曝露もこれに関して使用することができる。この方法は、Dan Sらの論文「Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase CGP 57148」(Cell Death Differ., 5:710-715(1998))において使用されている。

10

【0032】

更に別の態様において、細胞死はHL-60細胞の指示薬として有用であることが説明されている、Molecular Probe社のJC-1またはJC-9カチオン性色素を用いる、ミトコンドリア膜脱分極試験を用い決定することができる。

【0033】

細胞増殖アッセイ法については、MTSテトラゾリウム(Cell Titer96 Aqueous; Promega社、マジソン、WI)を用い行うことができる。この試験は、生細胞数を測定することができる。

20

【0034】

前述の全ての細胞死試験において、本発明は、蛍光顕微鏡、蛍光光度計、蛍光マイクロプレートリーダー、および/またはフローサイトメーターを用いる、細胞生存度および細胞毒性の蛍光光度アッセイ法を包含している。

【0035】

更に本出願人は、先に出願した米国特許第60/301,404号において、c-kitは肥満細胞枯渇に関する関心対象の標的であることを示している。ここでは、この受容体の下流のシグナル伝達経路のインヒビターを試験することがより詳細に提唱されている。実際、シグナル伝達に関連している全てのチロシンキナーゼの中で、それらの1種または数種が、肥満細胞ではない他の造血細胞に対する肥満細胞についてより特異的であるかまたはアップレギュレーションされていることがある。

30

【0036】

これに関して、試験される化合物は、チロシンキナーゼのインヒビター、例えばAkt、c-Cbl、CRKL、Doc、p125 Fak、Fyn、Grap、Jak2、Lyn、MAPK、MATK、PI3-K、PLC-、Raf1、Ras、SHP-1、SHP2(Syp)、Tec、Vav、およびFlt-3(下記表1参照)から選択することができる。

【0037】

(表1) ヒトc-kitの細胞内部分と相互作用するかおよび/またはSCFに反応して活性化される分子

分子	ヒト細胞
Akt	293, U2OS, BHX21, HeLa
c-Cbl	MO7e, TF-1
CRKL	MO7e
Doc	MO7e
p125 Fak	TF-1
Fyn	MO7e
Grap	MO7e, TF-1, K562
Jak2	MO7e, TF-1
Lyn	MO7e, 正常な前駆細胞
MAPK	メラノ 501 mel
MATK (CHK)	CMK
PI3-K	293, U2OS, BHX21, HeLa
PLC- $\gamma$	MO7e
Raf1	MO7e
Ras	MO7e
SHP-1	MO7e
SHP2 (Syp)	MO7e
Tec	MO7e
Vav	MO7e, TF-1

10

20

30

## 【0038】

関心対象の化合物は、インドリノン、ピリミジン誘導体、ピロロピリミジン誘導体、キナゾリン誘導体、キノキサリン誘導体、ピラゾール誘導体、ピス単環式、二環式、またはヘテロ環式アリアル化合物、ビニレン-アザインドール誘導体およびピリジル-キノロン誘導体、スチリル化合物、スチリル置換されたピリジル化合物、セレオインドール、セレニド、三環式ポリヒドロキシ化合物、およびベンジルホスホン酸化合物を含むが、これらに限定されるものではない。

## 【0039】

本発明はまた、前述の方法により入手可能な化合物にも関し、ここでその化合物は肥満細胞を枯渇することが可能であり、および他の造血細胞に対する重大な毒性を有さない。好ましくはこのような化合物は、E/S比の範囲が、1/1000~1/5、1/1000~1/100、1/100~1/50、1/100~1/10、1/50~1/10、1/25~1/10、または1/20~1/5である。

40

## 【0040】

本発明の別の局面は、医薬品製造のための前記化合物の使用に関する。このような医薬品は、経口投与のための薬学的組成物の形状をとることができ、これは、当技術分野において周知の薬学的に許容できる担体を用い、経口投与に適した用量で処方することができる。このような担体は、患者が服用するために、薬学的組成物を、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして処方することが可

50

能である。これらの薬学的組成物は、活性成分に加え、薬学的に使用することができる調製物への活性化合物の加工を促進する賦形剤および助剤を含む、適当な薬学的に許容できる担体を含んでも良い。処方および投与技術に関する更なる詳細については、「Remington's Pharmaceutical Sciences」最新版(Maack Publishing社、イーストン、Pa)に見ることができる。

**【0041】**

このような医薬品は、外用投与のための薬学的組成物または化粧品組成物の形をとることができる。このような本発明の組成物は、ゲル剤、貼付剤、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、水性懸濁剤、水性アルコールもしくは油性の液剤、またはローションもしくは血清型の分散剤、または無水もしくは凍結乾燥したゲル剤、または水相中に脂肪相もしくはその逆の分散により得られたミルク型の液体もしくは半固形のコンシステンシーの乳剤、またはクリームもしくはゲル型の軟質の半固形コンシステンシーの懸濁剤もしくは乳剤、あるいはマイクロエマルジョン、マイクロカプセル、微粒子、またはイオン性および/もしくは非イオン性型の小胞分散剤の形で存在することができる。これらの組成物は標準的方法に従い調製される。

10

**【0042】**

本発明の組成物は、皮膚科および化粧品において通常使用される任意の成分を含有する。これは、親水性または親油性ゲル化剤、親水性または親油性活性物質、保存剤、皮膚軟化剤、増粘性ポリマー、保湿剤、界面活性剤、保存剤、酸化防止剤、溶媒、ならびに充填剤、酸化防止剤、溶媒、香料、充填剤、スクリーニング剤、殺菌剤、消臭剤、および着色物質から選択された少なくとも1種の成分を含有することができる。

20

**【0043】**

本発明において使用することができる油分として、鉱油(流動パラフィン)、植物油(シアバターの液体画分、ヒマワリ油)、動物油、合成油、シリコーン油(シクロメチコーン)、およびフッ素化された油を意味することができる。脂肪族アルコール、脂肪酸(ステアリン酸)、およびワックス(パラフィン、カルナバ、蜜蝋)も、脂肪物質として使用することができる。

**【0044】**

本発明において使用することができる乳化剤としては、ステアリン酸グリセロール、ポリソルベート60、およびPEG-6/PEG-32/ステアリン酸グリコール混合物が企図されている。親水性ゲル化剤としては、カルボキシビニルポリマー(カルボマー)、アクリル系コポリマー、例えばアクリレート/アルキルアクリレートコポリマー、ポリアクリルアミド、多糖類、例えばヒドロキシプロピルセルロース、クレイ、および天然ゴムを挙げることができる。ならびに親油性ゲル化剤としては、改質クレイ、例えばベントン、脂肪酸の金属塩、例えばステアリン酸アルミニウム、および疎水性シリカ、あるいはエチルセルロースおよびポリエチレンを挙げることができる。

30

**【0045】**

親水性活性物質としては、タンパク質またはタンパク質の加水分解産物、アミノ酸、ポリオール、尿素、アラントイン、糖質および糖誘導体、ビタミン、デンプンおよび植物抽出物、特にアロエ抽出物、を使用することができる。

40

**【0046】**

親油性活性物質としては、レチノール(ビタミンA)およびその誘導体、トコフェノール(ビタミンE)およびその誘導体、必須脂肪酸、セラミド、ならびに精油を使用することができる。これらの物質は、使用時に余分の湿潤化または皮膚軟化の特徴が追加される。

**【0047】**

加えて、肥満細胞枯渇を可能にする化合物、例えばチロシンキナーゼインヒビター、好ましくはc-kitインヒビターのより深部への浸透を提供するために、界面活性剤をこの組成物中に含有することができる。

**【0048】**

企図された成分の中で、本発明は、例えば鉱油、水、エタノール、トリアセチン、グリセ

50

リン、およびプロピレングリコールからなる群より選択された浸透増強剤；例えばポリイソブチレン、ポリ酢酸ビニル、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される粘着剤、ならびに増粘剤を包含している。

【0049】

薬剤の外用吸収を増大する化学的方法は、当技術分野において周知である。例えば、浸透増強特性を持つ化合物は、ラウリル硫酸ナトリウム(Dugard, P. H.およびSheuplein, R. J., 「Effects of Ionic Surfactants on the Permeability of Human Epidermis: An Electrometric Study」、J. Invest. Dermatol., 60:263-69(1973))、ラウリルアミン酸化物(Johnsonら、米国特許第4,411,893号)、アゾン(Rajadhyaksha、米国特許第4,405,616号および第3,989,816号)、ならびにデシルメチルスルホキシド(Sekura, D. L.およびScala, J. ., 「The Percutaneous Absorption of Alkylmethyl Sulfides」、Pharmacology of the Skin, Advances In Biology of Skin, (Appleton-Century Craft)、12:257-69(1972))を含む。両性分子の頭部の基(head group)の極性の増加は、それらの浸透増強特性を増大するが、それらの皮膚刺激特性の増加が犠牲になっていることは認められている(Cooper, E. R.およびBerner, B., 「Interaction of Surfactants with Epidermal Tissues: Physicochemical Aspects」、Surfactant Science Series, 16巻、Reiger, M. M.編集(Marcel Dekker社)、195-210頁、1987年)。

10

【0050】

化学増強剤の第二の種類は、一般に補助溶剤と称されている。これらの物質は外用で比較的容易に吸収され、および様々な機構により、このような薬剤の浸透増強を実現する。エタノール(Galeら、米国特許第4,615,699号、ならびにCampbellら、米国特許第4,460,372号および第4,379,454号)、ジメチルスルホキシド(米国特許第3,740,420号および第3,743,727号、ならびに米国特許第4,575,515号)、およびグリセリン誘導體(米国特許第4,322,433号)は、様々な化合物の吸収を増強する能力を示す化合物のほんの数例である。

20

【0051】

本発明の薬学的組成物は、患者気道の標的領域へのエアロゾル処方での投与を意図することもできる。薬剤処方のエアロゾルの一吹き(burst)を送達する装置および方法は、米国特許第5,906,202号に開示されている。処方好ましくは液体であり、例えば水溶液、エタノール溶液、水性/エタノール性溶液、生理食塩水溶液、コロイド状懸濁液、および微晶質懸濁液などである。例えば、好ましくは柔軟な多孔質膜の形であるようなノズルを通して処方を推進する際に形成されるエアロゾル化された粒子は、前述の活性成分および担体(例えば、薬学的活性のある呼吸器系薬剤および担体)を含有する。これらの粒子は、粒子が形成された場合に、患者がこれらの粒子を患者肺へと吸入することができるような十分な時間、空気中に懸濁され続けるのに十分な小さいサイズを有する。

30

【0052】

本発明は、米国特許第5,556,611号に開示されている下記システムを包含している：  
加圧容器内の液体ガスシステム(液化ガスが、噴射剤ガス(例えば、低沸点FCHCまたはプロパン、ブタン)として使用される)

懸濁エアロゾル(活性物質粒子は液体噴射剤相中に固体形で懸濁されている)

加圧ガスシステム(窒素、二酸化炭素、一酸化二窒素、空気などの圧縮されたガスが使用される)

40

【0053】

従って本発明において、活性物質が適当な無毒の媒体中に溶解または分散され、この溶液または分散液がエアロゾルに霧状とされている、すなわち担体ガス中に極めて細かく分布されているような薬学的調製物が製造される。これは例えば、特に正確な個別用量が可能であるような、液体噴霧および固形物霧状化のための、それ自身公知のエアロゾル噴射ガスパック、ポンプ式エアロゾル、またはその他の装置の形で技術的に可能である。従って本発明は、先に定義された化合物およびそのような処方を含む、好ましくは用量計量用バルブを備えたエアロゾル装置にも関する。

【0054】

50

本発明の薬学的組成物は鼻腔内投与を意図することもできる。これに関して、鼻粘膜表面への化合物投与のための薬学的に許容できる担体は、当業者には容易に理解されるであろう。このような担体は、単に一例として、「Remington's Pharmaceutical Sciences」16版、1980年、Arthur Osol編集に明らかにされており、これは本明細書に参照として組入れられている。

【0055】

適当な担体の選択は、企図される投与の具体的種類に応じて決まる。上気道を介した投与のためには、この組成物は、溶液、例えば水または等張生理食塩水（緩衝したまたはしていないもの）、または懸濁液として、鼻腔内投与のための、液滴または噴霧剤として処方することができる。好ましくは、このような溶液または懸濁液は、鼻分泌物に対して等張、および同じpH範囲、例えば約pH4.0～約pH7.4、またはpH6.0～pH7.0である。緩衝液は、生理的に相溶性があり、単に一例としてはリン酸緩衝液である。例えば代表的鼻充血除去剤は、pHが約6.2になるように緩衝されていることが説明されている（Remington's、上記、1445頁）。当然当業者は、鼻および/または上気道投与への無害の水性担体に関し適当な生理食塩水含量およびpHを容易に決定することができる。

10

【0056】

一般的な鼻腔内の担体は、粘度が例えば約10～約3000cps、または約2500～6500cps、またはそれよりも大きい、鼻用ゲル剤、クリーム剤、パスタ剤、または軟膏剤を含み、鼻粘膜表面とのより持続的な接触を提供するために使用することもできる。このような担体の粘性処方、単に一例として、高粘性であることが当技術分野において周知である、アルキルセルロースおよび/または他の生体適合性担体を基にすることができる（例えばRemington's、上記、を参照のこと）。好ましいアルキルセルロースは、例えば濃度範囲が担体100mlあたり約5～約1000mgまたはそれよりも多いメチルセルロースである。より好ましいメチルセルロース濃度は、単に一例として、担体100mlにつき約25～約mgである。

20

【0057】

当技術分野において公知の保存剤、着色剤、滑沢剤または粘性の鉱油もしくは植物油、香料、天然もしくは合成の植物抽出物、例えば香油、ならびに湿潤剤および増粘剤（例えばグリセロールなど）のようなその他の成分も、この処方に更なる粘性、保湿性、ならびに好ましい質感および臭気を提供するために含有することができる。本発明の液剤または懸濁剤の鼻腔内投与については、液滴(drop)、小滴(droplet)、および噴霧剤を作製するために様々な装置を当技術分野において利用することができる。

30

【0058】

液滴または噴霧剤として送達するための溶液または懸濁液を含有する点滴器または噴霧装置を含む、予め測定された単位用量の分注装置は、投与される薬剤の1回または複数回用量を含むように調製され、これは本発明の別の目的である。本発明は更に、適量の水を添加することにより液剤または懸濁剤を容易に調製するために、1種または複数の単位用量の脱水された化合物を、いずれか必要な塩および/または緩衝剤、保存剤、着色剤などと共に含有するキットも含む。

【0059】

更に別の局面において、本発明は先に説明した方法により入手可能な化合物を、そのような治療を必要とする哺乳類へ投与することを含む、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、骨量減少、腫瘍血管新生、炎症疾患、炎症性腸疾患(IBD)、間質性膀胱炎、肥満細胞症、感染症、およびCNS障害から選択された疾患を治療する方法を目的としている。

40

【0060】

更なる局面において、本発明は先に説明した方法により入手可能な化合物を、そのような治療を必要とするヒトへ投与することを含む、毛髪生長および毛髪色の回復を促進する方法を企図している。

【0061】

更に別の局面において、本発明は、多発性硬化症、乾癬、腸炎症疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、慢性関節リウマチおよび多発性関節炎、限局性および全身性强皮症、全身性工

50

リスマトーデス、円板状エリスマトーデス、皮膚エリスマトーデス、皮膚筋炎、多発性筋炎、シェーグレン症候群、結節性汎動脈炎、自己免疫性腸疾患、増殖性糸球体腎炎、脈管炎、活動性慢性肝炎および慢性疲労症候群を治療するための先に定義した方法を包含している。

【0062】

更なる別の局面において、本発明は、腎臓、膵臓、肝臓、心臓、および肺を含む任意の臓器移植における、移植片-対-宿主疾患または移植片拒絶反応を治療するための先に定義した方法を包含している。

【0063】

別の局面において、本発明は、アフタ性潰瘍のような表皮下水疱形成障害、ならびに天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および癬痕性類天疱瘡などのようないくつもの水疱性疾患を治療するための先に定義された方法を包含している。この方法は更に、好ましくはダブソン、アザチオプリン、エリスロマイシン、プロピオニルエリスロマイシン、ネオマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、およびメクロサイクリン(mechlocycline)から選択された、少なくとも1種の抗生物質を含有することができる。

【0064】

本発明は同じく、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性副鼻腔炎、アナフィラキシー症候群、じんま疹、血管性水腫、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、結節性紅斑、多形性紅斑、皮膚壊死性細静脈炎、昆虫の咬傷による皮膚炎症、および吸血寄生生物外寄生を治療するための、先に説明された方法にも関連している。

【0065】

本発明は、特にイヌおよびネコにおける、皮膚アレルギー性障害、例えば、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、結節性紅斑、多形性紅斑、皮膚壊死性細静脈炎、昆虫の咬傷による皮膚炎症、および吸血寄生生物外寄生を治療するための、先に説明された方法にも関連している。

【0066】

従って、この化合物は、患者の気道、鼻腔内の標的部位へエアロゾル処方または局所的処方で投与される。

【0067】

更に別の局面において、本発明はヒトにおける腫瘍血管新生を治療するため、先に定義された方法を包含している。

【0068】

本発明は同じく、肥満細胞症、色素性じんま疹を含む顕著な皮膚肥満細胞症、びまん性皮膚肥満細胞症、単発性肥満細胞腫および水疱、紅斑性および末梢血管拡張性肥満細胞症に関連した、ヒトにおける皮膚疾患を治療するために加え、肥満細胞性白血病を含むIV型肥満細胞症を治療するための、先に説明した方法に関する。

【0069】

特定の態様は、イヌの肥満細胞腫を治療することに関する。

【0070】

更に別の局面において、本発明は、クローン病、粘膜炎、潰瘍性大腸炎、および壊死性腸炎のような、炎症性腸疾患(IBD)を治療するための、先に説明した方法を包含している。

【0071】

本発明は更に、ヒトにおける間質性膀胱炎を治療するため、哺乳類、特にヒトにおける細菌感染症を治療するため、好ましくは再発性細菌感染症、細菌性膀胱炎のような無症候期間後に再発する感染症の治療のために、先に説明した方法を企図している。

【0072】

より詳細に述べると、本発明は大腸菌、肺炎桿菌、セラチア・マルケセンス、シトロバクター・フロインディー、およびネズミチフス菌を含む、グラム陰性腸内細菌のような、Fi mH発現性細菌感染症を治療するために実践することができる。

【0073】

この細菌感染症を治療する方法においては、バシトラシン、セファロスポリン、ペニシリン、アミノグリコシド、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、およびエリスロマイシンのようなマクロライド系抗生物質；フルオロキノロン、アクチノマイシン、スルホンアミド、およびトリメトプリムからから選択された少なくとも1種の抗生物質の投与が対象となる。

【0074】

本発明はまた、閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症、および糖質コルチコイドが誘発した骨粗鬆症を含む骨粗鬆症、嚢胞性線維性骨炎、腎性骨形成異常症、骨硬化症、骨減少症、骨軟化症、骨線維形成不全症、およびページェット病のような骨量減少を治療するための、先に説明された方法を企図している。

10

【0075】

特定の態様において、本発明は、慢性関節リウマチ、結膜炎、リウマチ様脊椎炎、変形性関節症、痛風性関節炎、多発性関節炎、および他の関節炎の状態のような炎症疾患に加えこれらの炎症疾患に関連した疼痛を治療するための、先に説明された方法に関する。

【0076】

本発明の有用性は更に、以下の詳細な説明により例証されるであろう。実際c-kit野生型または突然変異されたc-kitの間には、シグナル伝達の差異が認められる。これは、肥満細胞内に特異的に存在するか、活性化されるか、もしくはアップレギュレーションされる特異的二次メッセンジャー、または肥満細胞以外の造血細胞において抑制されるか、存在しないか、もしくは失活される経路の標的化につながる可能性がある。

20

【0077】

正常なc-kitの活性化により誘導されたシグナル伝達

SCFは、インビトロ造血を誘導するために、M-CSFを除くほとんど全ての造血増殖因子に相乗作用を及ぼすので、これは造血において必須の増殖因子である(Metcalf, D., 「The cellular basis for enhancement interactions between stem cell factor and the colony stimulating factors」、Stem Cells (Dayt)、11(Suppl 2):1-11(1993))。この因子は、骨髄ストローマ細胞において産生され、その受容体であるc-kitとの相互作用を介して作用する(Ratajczak, M.Zら、「Role of the KIT protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:1710-1714(1992))。先に示されたように、c-kit受容体は、145kDaの糖タンパク質であり、III型チロシンキナーゼサブファミリーに属し、その分子の細胞外部分における5個のIg様ドメインの存在、および細胞質内ドメインをアデノシン三リン酸(ATP)結合ドメインとホスホトランスフェラーゼドメインとに分断するインターキナーゼ配列を特徴としている。c-kitは、CFU-GEMM、BFU-Eにより、ならびに肥満細胞株系の前駆細胞および成熟細胞により、強力に発現される(Katayama N.ら、「Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors」、Blood、82:2353-2360(1993))。

30

【0078】

c-kitへのリガンド結合は、触媒機能の活性化を生じ、結果的に細胞質ドメインのチロシン残基の自己リン酸化を生じる。これらのホスホチロシン残基は、SH2ドメインを含む様々な細胞質シグナル伝達分子のドッキング部位となる。c-kitは、PI3キナーゼ、ras、およびJAK2に依存性のものを含む、多くの増殖因子受容体に共通である正準のシグナル伝達経路を活性化する。インビボまたはインビトロにおいてc-kitと会合することが分かっている分子は、PI3-キナーゼのp85サブユニット、複数のSrcファミリーの一員であるLynおよびFyn、Vav、Grb2、SHP-1、SHP-2、PKC、MATK(CHK)、およびSocs1を含むと同時に、PLC、rasのGTPase活性化タンパク質(GAP)およびJAK2に関する多様なデータが存在する。以下の追加の分子は、c-kit活性化に反応して活性化またはリン酸化される：Shc、Tec、Vav GDP/GTP交換因子、raf-1、MAPK、Akt、CRKL、p120 Cbl、およびDoc。様々な細胞系において行われた最近の研究は、c-kitと会合しこれによりリン酸化される基質に関する異なる結果を生じた。これらの矛盾点は、同じリガンド/受容体システムにより媒介された個別のシグナルおよび細胞型特異的な反応の基となる、個々の細胞型の基質発現プロファ

40

50

イルにおける実験法の差異または機能的関係の変動のいずれかにおける差異を反映しているであろう。これらの理由のために、本発明者らは、様々な細胞状況におけるc-kitシグナル伝達に関して得られたデータを説明することを選択した。

【0079】

シグナル伝達の初発因子は、c-kitのリガンドが誘導した二量体化であり、これは固有のc-kitチロシンキナーゼ活性を誘導し、重要なチロシン残基においてトランスホスホリレーションを生じる。更にc-kitは、リガンド刺激に反応し、PKCによりセリン残基においてリン酸化されるように見え、このことはc-kit自己リン酸化を阻害する(Katayama, Nら、「Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors」、Blood、82:2353-2360(1993))。

10

【0080】

様々な細胞型において観察されたc-kitとの最も効率的会合のひとつは、PI3-キナーゼのp85サブユニットのSH2ドメインによってなされ(Lev, Sら、「Interkinase domain of kit contains the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:678-682(1992)、および、Rottapel, R.ら、「The Steel/W transduction pathway: kit autophosphorylation and its association with a unique subset of cytoplasmic signaling proteins is induced by the Steel factor」、Mol. Cell Biol.、11:3043-3051(1991))、リン酸化されたマウスc-kitのチロシン残基719およびヒトc-kitのチロシン721を介する(Serve, Hら、「Tyrosine residue 719 of the c-kit receptor is essential for binding of the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for c-kit-associated PI 3-kinase activity in COS-1 cells」、J. Biol. Chem.、269:6026-6030(1994))。

20

【0081】

c-kitシグナル伝達は、ヒト造血細胞、主にM07eおよびCMKのふたつの巨核球細胞株において研究されている(前記表I)。

【0082】

これらの細胞において、SCFは、主要なキナーゼ、例えばPI3キナーゼ、Srcキナーゼ(FynおよびLyn)およびJAK2、ならびに様々なアダプター分子、Grb2、Grap、Vav、CRKLの、それらのSH2ドメインを介した、活性化および/または動員を誘導する。これらの事象は、SH2、SH3、またはPHドメインを介した様々な分子会合の形成を生じ、これは次に異なる経路で活性化を開始する。Ras経路は、SCF刺激に反応して活性化されたことが示され、これはRasとRaf-1の間の相互作用につながり、その結果、MAPキナーゼカスケードを開始する(Tauchi, Tら、「The ubiquitously expressed Syp phosphatase interacts with c-kit and Grb2 in hematopoietic cells」、J. Biol. Chem.、269:25206-25211(1994))。

30

【0083】

実際アダプター分子であるGrapは、リガンド活性化されたc-kitと、そのSH2ドメインを介して相互作用し、ならびにグアニンヌクレオチド交換因子mSos1とそのSH3ドメインを介して会合され、受容体および細胞質チロシンキナーゼからのシグナルを、rasシグナル伝達経路と結合させる(Feng, G.Sら、「Grap is a novel SH3-SH2-SH3 adaptor protein that couples tyrosine kinases to the Ras pathway」、J. Biol. Chem.、271:12129-12132(1996))。別のアダプター分子は、Grap、Grb2に関連し、そのSH2ドメインを介してc-kitのリン酸化されたチロシン残基と相互作用し、これはc-CblおよびShcを動員することができる(Briizi, M.Fら、「Discrete protein interactions with the Grb2/c-Cb1 complex in SCF- and TPO-mediated myeloid cell proliferation」、Oncogene、13:2067-2076(1996))；ならびに、Wisniewski, D.、Strife, A.、Clarkson, B.、「c-kit ligand stimulates tyrosine phosphorylation of the c-Cb1 protein in human hematopoietic cells」、Leukemia、10:1436-1442(1996))。活性化後、キナーゼは、c-CblおよびCRKLと相互作用するPI3-キナーゼのようなアダプター分子の役割を果たすか(Sattler, M.ら、「Steel factor induces tyrosine phosphorylation of CRKL and binding of CRKL to a complex containing c-kit, phosphatidylinositol 3-kinase, and p120 (CBL)」、J. Biol. Chem.、

40

50

272:10248-10253(1997))、もしくはAktをリン酸化するPI3-キナーゼのようなキナーゼの役割を果たす(Blume-Jensen, Pら、「The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136」、*Curr. Biol.*、8:779-782(1998))ことができる。

【0084】

いくつかの場合において、相互作用および/または活性化が、周知のシグナル伝達経路のいずれとも結びつけられることなく説明されている。これは、Tecの場合(Tang, Bら、「Tec kinase associates with c-kit and is tyrosine phosphorylated and activated following stem cell factor binding」、*Mol. Cell. Biol.*、14:8432-8437(1994))、MATKの場合(Jhun, B.H.ら、「The MATK tyrosine kinase interacts in a specific and SH2-dependent manner with c-kit」、*J. Biol. Chem.*、270:9661-9666(1995))、Vavの場合(Alai, Mら、「Steel factor stimulates the tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product, p95vav, in human hemopoietic cells」、*J. Biol. Chem.*、267:18021-18025(1992))、およびDocの場合(Carpino, N.ら、「p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells」、*Cell*、88:197-204(1997))である。

10

20

30

【0085】

予想外のことに、c-kit活性化の期間のJAK-STAT経路についてはよく説明されていない。JAK2は、非チロシンキナーゼサイトカイン受容体スーパーファミリーシグナル伝達に必須である細胞質チロシンキナーゼであるが、これはリガンド活性化前に、c-kitとの物理的会合について説明され、SCFに反応してチロシン残基においてリン酸化されるか(Brizzi, M.ら、「Convergence of signaling by interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and mast cell growth factor on JAK2 tyrosine kinase」、*J. Biol. Chem.*、269:31680-31684(1994); Weiler, S.R.ら、「JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor」、*Blood*、87:3688-3693(1996); および Linnekin, D.ら、「JAK2 is constitutively associated with c-Kit and is phosphorylated in response to stem cell factor」、*Acta Haematol.*、95:224-228(1996))、またはc-kitと会合されない。加えて、SCFは、M07e細胞株におけるSTAT1のような細胞質転写因子を活性化する(Deberry, C.ら、「Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor」、*Biochem. J.*、327(Pt 1):73-80(1997))。

【0086】

c-kitシグナル伝達は、様々な非造血系ヒト細胞株においても試験した。Blume-Jensenらは、SCFは、Akt活性化を誘導し、PI3-キナーゼ依存的様式でBadのセリン残基136のリン酸化を媒介したことを明らかにした(Blume-Jensen, P.ら、(1998))。胚性線維芽細胞において行われたインビトロ実験は、PI3キナーゼおよびPLC-はヒトc-kitのチロシン残基721との会合について、より高い親和性を示すp85/PI3キナーゼと競合することを示している(Herbst, Rら、「Formation of signal transfer complexes between stem cell and platelet-derived growth factor receptors and SH2 domain proteins in vitro」、*Biochemistry*、34:5911-5979(1995))。H526細胞株(小細胞肺癌、SCLC)において、SCFは、SrcキナーゼのLckの活性化、およびそのc-kitの傍細胞膜ドメインとのその相互作用を誘導した(Krystal, G.W.ら、「Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1」、*Cancer Res.*、58:4660-4666(1998))。ヒトメラノーマ細胞株である501 melにおいて、Hemesathらは、SCF刺激は、MAPKの活性化を生じ、次に小眼球症転写因子(Mi)のリン酸化、p300/CBPとの相互作用によるMiトランス活性化のアップレギュレーションを生じることを説明している(*Nature*、391:298-301(1998))。

40

【0087】

興味深いことに、c-kitとインテグリンシグナル伝達経路との間の相互接続が、TF-1細胞株において観察された。SCFは、フィブロネクチン接着性TF-1細胞の広がりを誘導し、SCF

50

非存在下でのpp125 FAKのチロシンリン酸化レベルと比較した場合に、用量依存的方式でpp125 FAKのチロシンリン酸化を増強する。これらの作用は、ウォルトマンニン感受性経路、インテグリン活性化感受性経路に左右される。

【0088】

c-kit非活性化を考慮すると、ふたつの主要経路が異なる細胞の状況において説明されている。造血細胞において、ひとつの経路はチロシンリン酸化酵素であるSHP-1に関連し、おそらく569位のチロシンリン酸化された残基においてc-kitと相互作用し、これはc-kitのチロシン残基のリン酸化状態をダウンレギュレーションする(Yi, T., Ihle, J.N., 「Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand」、Mol. Cell. Biol., 13:3350-3358(1993); Lorenz, U.ら、「Genetic analysis reveals cell type-specific regulation of receptor tyrosine kinase c-Kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1」、J. Exp. Med., 184:1111-1126(1996); Paulson, R.ら、「Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1」、Nat. Genet., 13:309-315(1996); および Kozlowski, M.ら、「SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain」、Mol. Cell. Biol., 18:2089-2099(1998)。

10

【0089】

リン酸化酵素SHP-2(Syp)の役割は余り分かっていない。M07e細胞株において活性化したc-kitと会合されたSHP-2は、そのSH2ドメインを介してリン酸化され始め、Grb2と複合体形成することが示されている(Tauchi T.ら、(1994))。このGrb2との結合は、ras/MAPキナーゼ経路活性化および細胞増殖へとつながる。対照的に、c-kitを発現しているBA/F3細胞において、c-kit Y567FへのSHP-2の会合は著しく低下されることが示されている。この場合、SCFに対する過増殖反応が認められ、このことは、SHP-2は、SCFが誘導した増殖をダウンレギュレーションすることを示唆している(Kozlowski, M.ら、(1998))。

20

【0090】

ヒトc-kitの活性化および非活性化を、ブタ内皮細胞(PAE)においても研究した。PI3-キナーゼ、PLC-、およびRaf/MAPキナーゼカスケードの活性化は、ヒトc-kitでトランスフェクションしたPAE細胞において、SCFに反応することが説明された。これらの細胞において、第一の負のフィードバックループは、PI3-K、PLD、およびPKC経路であり、これはc-kitの741および746位のセリン残基でのリン酸化につながる。第二の非活性化経路は、PI3-キナーゼが誘導したPLD活性化およびホスファチジルコリン(PtdCho)特異的ホスホリパーゼD活性化(PtdCho)PLDであり、これはホスファチジル酸(PtdH)を生成し、PKCのアクチベーターおよびアラキドン酸(D4Ach)前駆体である、ジアシルグリセロール(DAG)へと代謝した(Kozawa, O.ら、「Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase in stem-cell-factor-induced phospholipase D activation and arachidonic acid release」、Eur. J. Biochem., 248:149-155(1997))。これらの執筆者は、SCFは、D4Ach生成の第二の経路である、PLA2活性化を誘導したことも示した。

30

【0091】

マウス骨髄由来の肥満細胞(BMMC)において、SCFは、i)PI3-キナーゼ活性化を誘導し、これは次にRac-1およびJnk経路を刺激すること、ならびにii)チロシン567上のSrcキナーゼのFyn(Timokhina, I.ら、「Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathway s: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation」、EMBO J., 17:6250-6262(1998))、および、Lyn(Suzuki, T.ら、「Essential roles of Lyn in fibronectin-mediated filamentous actin assembly and cell motility in mast cells」、J. Immunol., 161:3694-3701(1998))への結合およびリン酸化を誘導することが明らかにされた。Koikeらは、腹腔から単離されたラット肥満細胞において、SCFはPLD活性化を誘導し、引き続きタンパク質チロシンキナーゼ経路を介しホスホイノシチド特異的PLC-活性化を伴わずに、D4Achを放出したことを示した(Koike, T.ら、「SCF/c-kit receptor-mediated arachidonic acid liberation in rat mast cells. Involvement of PLD a

40

50

ctivation associated tyrosine phosphorylation」、Biochem. Biophys. Res. Commun.、197:1570-1577(1993)；ならびに、Koike, T.ら、「Stem cell factor-induced signal transduction in rat mast cells. Activation of phospholipase D but not phosphoinositide-specific phospholipase C in c-kit receptor stimulation」、J. Immunol.、151:359-366(1993))。これらの細胞において、Nagaiらは、SCFにおけるPI3-キナーゼ、タンパク質チロシンキナーゼ(PTK)およびミオシン軽鎖キナーゼの関与は、ヒスタミン放出を誘導することを示した(Nagai, S.ら、「Pharmacological study of stem-cell-factor-induced mast cell histamine release with kinase inhibitors」、Biochem. Biophys. Res. Commun.、208:576-581(1995))。

#### 【0092】

マウス細胞におけるc-kit非活性化に関してSCFシグナルを減少する別の方法は、c-kit発現のダウンモジュレーションである。YeeらおよびMiyazawaraらは、c-kitインターナリゼーションおよびユビキチン化が、c-kitの損なわれていないキナーゼ活性に依存することを示した(Yee, N.ら、「Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C」、J. Biol. Chem.、269:31991-31998(1994)；および Miyazawa, K.ら、「Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells」、Blood、83:137-145(1994))。

#### 【0093】

BMMCにおいて、c-kitは、PLC- $\beta$  を活性化し、PI4,5二リン酸のDAGおよびイノシトール-1,4,5三リン酸への加水分解を生じ、これは細胞内Ca<sup>++</sup>の動員を誘導する。このカルシウム流入は、c-kitインターナリゼーションにとって重要であるように見える。更にPI3-キナーゼ活性化が存在しない場合は、c-kit受容体はインターナリゼーションするが、形質膜内側の近傍に局在化し続ける。注目すべきは、c-kitインターナリゼーションは、PI3キナーゼおよびCa<sup>++</sup>流入の両方が阻害される場合は、完全に妨害されることである(Gommerman, J.L.ら、「Phosphatidylinositol 3-kinase and Ca<sup>2+</sup> influx dependence for ligand-stimulated internalization of the c-Kit receptor」、J. Biol. Chem.、272:30519-30525(1997))。

#### 【0094】

c-kit依存性有糸分裂のダウンレギュレーションの新規メディエーターは、Socs-1(サイトカインシグナル伝達のサプレッサー)であると考えられる(De Sepulveda, P.ら、「Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses Steel factor-dependent proliferation」、EMBO J.、18:904-915(1999))。SCFは、Socs-1の合成を誘導し、これはそのSH2ドメインを介してc-kitへ結合する。Socs-1活性の機構は、そのGrb2との相互作用およびVavのN末端の負の調節に関連しているように見える(Blechman, J.ら、「Structure-function analyses of the kit receptor for the steel factor」、Stem Cells、(Dayt)、11(Suppl 2):12-21(1993))。

#### 【0095】

c-kit突然変異に関連した分子機能不全

酵素機能およびc-kit突然変異

SHP-1発現は、IC2/c-kit<sup>野生型</sup>細胞とIC2/c-kit<sup>D<sup>814Y</sup></sup>細胞では異なり、これは更にマウス肥満細胞の顆粒内に存在するプロテアーゼであり、肥満細胞突然変異の様々な段階において差次的に発現されるMMCP-4およびMMCP-6のような他のタンパク質についても真実である。実際、MMCP-6転写産物は、外因性SCFの存在下IC2/c-kit<sup>野生型</sup>細胞において低レベルで発現され、このレベルはc-kit<sup>D<sup>814Y</sup></sup>発現の結果として増大した。MMCP-4転写産物は、IC2/c-kit<sup>野生型</sup>細胞におけるRT-PCRでは検出できなかったが、IC2/c-kit<sup>D<sup>814Y</sup></sup>細胞では豊富に発現された。これらの野生型と突然変異体の間で認められた差異は、SCFにより刺激されたc-kit<sup>野生型</sup>およびc-kit<sup>D<sup>814Y</sup></sup>により伝達されたシグナルは同等でないことを示唆している：突然変異c-kit<sup>D<sup>814Y</sup></sup>は、肥満細胞の増殖を変更するのみではなく、それらの突然変異の段階も変更する。

10

20

30

40

50

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
9 January 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/003004 A2

(51) International Patent Classification: G01N 33/00

CZ, DL, DK, DM, DZ, EC, FI, IS, IT, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/IB02/03294

(22) International Filing Date: 28 June 2002 (28.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/301,404	29 June 2001 (29.06.2001)	US
60/301,405	29 June 2001 (29.06.2001)	US
60/301,406	29 June 2001 (29.06.2001)	US
60/301,407	29 June 2001 (29.06.2001)	US
60/301,408	29 June 2001 (29.06.2001)	US
60/301,409	29 June 2001 (29.06.2001)	US
60/301,410	29 June 2001 (29.06.2001)	US
60/301,411	29 June 2001 (29.06.2001)	US
60/323,313	20 September 2001 (20.09.2001)	US
60/323,314	20 September 2001 (20.09.2001)	US
60/323,315	20 September 2001 (20.09.2001)	US
10/022,842	20 December 2001 (20.12.2001)	US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for all designations

## Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(71) Applicant (for all designated States except US): AB SCI-ENCE [FR/FR]; 3, avenue George V, F-75008 Paris (FR).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MOUSSY, Alain [FR/FR]; 22 bis, passage Dauphine, F-75006 Paris (FR). KINET, Jean-Pierre [FR/US]; 3 Hunt Road, Lexington, MA 02421 (US).

(74) Agents: MARTIN, Jean-Jacques et al.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

WO 03/003004 A2

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING COMPOUNDS THAT SPECIFICALLY DEplete MAST CELLS

(57) Abstract: The present invention relates to a screening method allowing the identification and selection of compounds capable of depleting mast cells, wherein said compounds do not show significant toxicity for other hematopoietic cells that are not mast cells or related cells or cell lines, such as SCF independent expanded human normal CD34+ cells.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

**Method for identifying compounds that specifically deplete mast cells**

5 The present invention relates to a screening method allowing the identification and selection of compounds capable of depleting mast cells, wherein said compounds do not show significant toxicity for other hematopoietic cells that are not mast cells or related cells or cell lines, such as SCF independent expanded human normal CD34+ cells.

10 Mast cells (MC) are tissue elements derived from a particular subset of hematopoietic stem cells that express CD34, c-kit and CD13 antigens (Kirshenbaum et al, Blood. 94: 2333-2342, 1999 and Ishizaka et al, Curr Opin Immunol. 5: 937-43, 1993). Immature MC progenitors circulate in the bloodstream and differentiate in tissues. These differentiation and proliferation processes are under the influence of cytokines, one of utmost importance being Stem Cell Factor (SCF), whose receptor is c-kit.

15

Mast cells are characterized by their heterogeneity, not only regarding tissue location and structure but also at the functional and histochemical levels (Aldenborg and Enerback., Histochem. J. 26: 587-96, 1994 ; Bradding et al. J Immunol. 155: 297-307, 1995 ; Irani et al, J Immunol. 147: 247-53, 1991 ; Miller et al, Curr Opin Immunol. 1: 637-42, 1989  
20 and Welle et al, J Leukoc Biol. 61: 233-45, 1997). Indeed, at least three different subtypes of mast cells exist in humans, that differ by their morphological appearance, their tissue location, their biochemical content and their reactivity towards various compounds. These three different subtypes of mast cells are distinguished on the basis of their content of neutral proteases. Mast cells containing only tryptase (T) are termed  
25 MCT, while MC containing tryptase and chymase (C) are known as MCTC. Additionally, a minor population of mast cells expresses only chymase, but not tryptase, and are named MCC (Li et al, J Immunol. 156: 4839-44, 1996). Concerning their functions, besides their role already largely explored as cells involved in immediate

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

2

hypersensitivity, recent studies have been able to show that mast cells possess two major physiological properties as antigen presenting cells, and as elements highly involved in the anti-infectious defense of the organism (Abraham and Arock, *Semin Immunol.* 10: 373-381, 1998 ; Arock and Abraham, *Infection Immunity* 66: 6030-4, 1998 ; Galli et al, 5 *Curr Opin Immunol.* 11: 53-59, 1999).

More recently, the Applicant has discovered that mast cells are involved in numerous pathologies extending much beyond to what one could have previously thought. In this regard, the Applicant filed US 60/301,408, US 60/601,409, US 60/301,411, US 10 60/301,407, US 60/301,406, US 60/323,312, US 60/301,410, US 60/323,315, US 60/301,405, US 60/601,409, and US 60/301,404.

It was found that mast cells present in tissues of patients are implicated in or contribute to the genesis of diseases such as autoimmune diseases, allergic diseases, tumor angiogenesis, inflammatory diseases, polyarthritis, inflammatory bowel diseases (IBD), 15 and interstitial cystitis. In all these diseases, it was postulated that mast cells participate in the destruction of tissues by releasing a cocktail of different proteases and mediators such as histamine, proteoglycans, neutral proteases, lipid-derived mediators (prostaglandins, thromboxanes and leucotrienes), and various cytokines (IL-1, IL-2, IL-3, 20 IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, MIP-1a, MIP-1b, MIP-2 and IFN- $\gamma$ ).

For this reason, it has been proposed to target c-kit to deplete the mast cells responsible for these disorders. While this approach is very promising, the Applicant goes even further and propose here to deplete specifically mast cells. Indeed, c-kit is also expressed 25 on others hematopoietic or non hematopoietic cells. Enhancing the specificity for mast cells depletion is of great interest and could open new routes for treating the above indicated diseases. This can be illustrated for example for the treatment of autoimmune

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

3

diseases. In the art, only immunosuppressive agents have shown a relative efficacy, but they have so much side effects that it jeopardizes the patients global health and it is associated with high rate of morbidity in several cases.

- 5 Here, the method defined here-below will allow to provide tailored treatments, compared to what is proposed in the art, since it will target mast cells, a very specific subcomponent of the immune system that is central to the above diseases, but which can be eliminated without affecting the global health of patients.

10 Description

Therefore, the present invention is aimed at a method for identifying compounds capable of depleting mast cells, wherein said compounds are non-toxic for other hematopoietic cells that are not mast cells or related cells or cell lines or derived cell lines thereof, such  
15 as SCF independent expanded human normal CD34+ cells, comprising the steps consisting of :

- a) culturing mast cells in vitro in a suitable culture medium,
- b) adding to said culture medium at least one candidate compound to be tested and incubating said cells for a prolonged period of time,
- 20 c) measuring the extent to which said compounds promote mast cells death or disrupt, interfere with, or inhibit mast cells growth, and selecting compounds for which mast cells depletion is observed,
- d) identifying a subset of compounds selected in step c) that are unable to promote significant death of a cell chosen from other hematopoietic cells that are not mast cells or  
25 related cells or cell lines or derived cell lines thereof, such as SCF independent expanded human normal CD34+ cells.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

4

In other words, the invention relates to a method for identifying compounds capable of depleting mast cells, wherein said compounds are non-toxic for other hematopoietic cells that are not mast cells or related cells or cell lines or derived cell lines thereof, such as SCF independent expanded human normal CD34+ cells, comprising the step consisting

5 of:

- a) providing a culture of mast cells, wherein said mast cells are selected from wild type mast cells and cell lines derived thereof, activated mutant mast cell lines, and activated wild type mast cells and cell lines derived thereof,
- b) contacting the culture of said cells with at least one candidate compound under  
10 conditions allowing growth and/or survival of mast cells, measuring the level of cell death in the presence of the candidate compound; and comparing the level of cell death in the presence of the candidate compound to the level of cell death in the absence of the candidate compound, wherein an increase in the level of cell death in the presence of the candidate compound is indicative of the mast cells depletion ability of the candidate  
15 compound,
- c) providing a culture of at least one cell other than mast cells, wherein said cell is selected from hematopoietic cells that are not mast cells or related cells or cell lines or derived cell lines thereof, such as SCF independent expanded human normal CD34+ cells,
- 20 d) contacting the culture of said cells with at least one compound identified in step b) under conditions allowing growth and/or survival of a cell depicted in step c), measuring the level of cell death in the presence of said compound; and comparing the level of cell death in the presence of the compound to the level of cell death in the absence of the compound, wherein no significant increase in the level of cell death in the presence of  
25 said compound is indicative of mast cells depletion specificity of said compound versus at least another hematopoietic cell.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

5

Among the mast cells that can be used in frame with the method depicted above, we can cite :

SCF dependant cells :

5 a) cells originating from blood obtained from human umbilical vein. In this regard, heparinated blood from umbilical vein is centrifuged on a Ficoll gradient so as to isolate mononucleated cells from other blood components. CD34+ precursor cells are then purified from the isolated cells mentioned above using the immunomagnetic selection system MACS (Miltenyi biotech). CD34+ cells are then cultured at 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere at a concentration of 10<sup>5</sup> cells per ml in the medium MCCM (α-MEM  
10 supplemented with L-glutamine, penicillin, streptomycin, 5 10<sup>-5</sup> M β-mercaptoethanol, 20 % veal fetal serum, 1 % bovine albumin serum and 100 ng/ml recombinant human SCF. The medium is changed every 5 to 7 days. The percentage of mast cells present in the culture is assessed each week, using May-Grünwal Giemsa or Toluidine blue  
15 coloration. Anti-tryptase antibodies can also be used to detect mast cells in culture. After 10 weeks of culture, a pure cellular population of mast cells (> 98 %) is obtained.

b) Cell lines derived from cells obtained in a). It is possible using standard procedures to prepare vectors expressing c-kit for transfecting the cell lines established as mentioned  
20 above. The cDNA of human c-kit has been described in Yarden et al., (1987) EMBO J.6 (11), 3341-3351 (see also SEQ ID No 1). The coding part of c-kit (3000 bp) can be amplified by PCR and cloned, using the following oligonucleotides :

- 5'AAGAAGAGATGGTACCTCGAGGGTGACCC3' (SEQ ID No2) sens
- 5'CTGCTTCGCGCCCGGTTAACTCTTCTCAACCA3' (SEQ ID No3)

25 antisens

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

6

The PCR products, digested with NotI and XhoI, has been inserted using T4 ligase in the pFlag-CMV vector (SIGMA), which vector is digested with NotI and XhoI and dephosphorylated using CIP (Biolabs). The pFlag-CMV-c-kit is used to transform bacterial clone XLI-blue. The transformation of clones is verified using the following

5 primers :

- 5'AGCTCGTTTAGTGAACCGTC3' (SEQ ID No4) sens,
- 5'GTCAGACAAAATGATGCAAC3' (SEQ ID No5) antisens.

Directed mutagenesis is performed using relevant cassettes is performed with routine and common procedure known in the art..

- 10 The vector Migr-1 (ABC) can be used as a basis for constructing retroviral vectors used for transfecting mature mast cells. This vector is advantageous because it contains the sequence coding for GFP at the 3' and of an IRES. These features allow to select cells infected by the retrovirus using direct analysis with a fluorocytometer. As mentioned above, the N-terminal sequence of c-kit c-DNA can be modified so as to introduce a Flag
- 15 sequence that will be useful to discriminating heterogeneous from endogenous c-kit.

c) Mast cell lines

- BaF3 mouse cells expressing wild-type or mutated form of c-kit (in the juxtamembrane and in the catalytic sites) are described in Kitayama et al, (1996), Blood
- 20 88, 995-1004 and Tsujimura et al, (1999), Blood 93, 1319-1329. This cell line can be grown in RPMI 1640 medium supplemented with penicillin, streptomycin, L-glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS) and IL-3.

- IC-2 mouse cells expressing either c-kit<sup>WT</sup> or c-kit<sup>D814Y</sup> are presented in Piao et al,
- 25 (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14665-14669.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

7

d) IL-3 independent cell lines are :

- HMC-1, a factor-independent cell line derived from a patient with mast cell leukemia, expresses a juxtamembrane mutant c-kit polypeptide that has constitutive kinase activity
- 5 (Furitsu T et al, J Clin Invest. 1993;92:1736-1744 ; Butterfield et al, Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. Leuk Res. 1988;12:345-355 and Nagata et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:10560-10564).
- P815 cell line (mastocytoma naturally expressing c-kit mutation at the 814 position)
- 10 has been described in Tsujimura et al, (1994), Blood 83, 2619-2626. This cell lines is available at ATCC under the accession number TIB-64 .

e) Other mast cell lines available at ATCC :

ATCC N°	Organism	Designation
15 <u>CRL-2034</u>	Mus musculus (mouse)	10P2
<u>CRL-2036</u>	Mus musculus (mouse)	10P12
<u>CRL-2037</u>	Mus musculus (mouse)	11P0-1

Therefore, in a preferred embodiment, the invention is directed to the above mentioned

20 method, wherein mast cells are chosen from isolated mast cells and cell lines derived thereof, BaF3, IC-2 mouse cells, HMC-1, P815 available at ATCC under the accession number TIB-64 , 10P2 available at ATCC under the accession number CRL-2034, 10P12 available at ATCC under the accession number CRL-2036, 11P0-1 available at ATCC under the accession number CRL-2037, and cell lines derived thereof .

25

In addition, in connection with the method according to the invention, mast cells can be selected from MCC, MCTC, MCT.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

8

In another preferred embodiment, hematopoietic cells that are not mast cells or related cells or cell lines can be selected from the group consisting of :

- 5 - human T lymphocyte Jurkat cell line (ATCC N° TIB-152 and cell lines derived thereof),
- the human B lymphocyte Daudi or Raji cell line (ATCC N° CCL-213 and CCL-86 respectively and cell lines derived thereof),
- the human monocytic U 937 cell line (ATCC N° CRL-1593.2) and,
- 10 - the human HL-60 cell line (ATCC N° CCL-240) and cell lines derived thereof ATCC N° CRL-2258 and CRL-2392.

As explicated above, the method can be conducted with either one or several of these hematopoietic cells. Preferred compounds are those who demonstrate the greatest efficacy and specificity for mast cells versus other hematopoietic cells.

15

In still another preferred embodiment, control cells are selected from normal human CD34+ cells that are expanded in a culture medium comprising a cocktail of cytokine except SCF. Preferred compounds are those who demonstrate the greatest efficacy and specificity for mast cells versus these SCF independent CD34+ cells.

20

Concerning efficacy, the compounds of the invention are selected for their ability to deplete mast cells at a concentration below 10  $\mu$ M, preferably below 5, 4, 2 or 1  $\mu$ M.

Best compounds are a subset the above indicated compounds, which do not affect significantly the viability of hematopoietic cells other than mast cells at concentration ranging from 1, 2, 3, 4, 5  $\mu$ M to 10  $\mu$ M. Among these compounds, the invention more particularly directed to the ones for which no loss of viability is observed at concentrations ranging from 10 to 15  $\mu$ M, 15 to 20  $\mu$ M or 20 to 40  $\mu$ M.

25

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

9

Ratios Efficacy / Selectivity can be addressed with the above data using the formula :

Ratios E/S = IC50 mast cells / IC50 hematopoietic cells other than mast cells.

- 5 Best compounds are those exhibiting the lowest E/S ratios, for example E/S ratios ranging from 1/1000 to 1/5, 1/1000 to 1/100, 1/100 to 1/50, 1/100 to 1/10, 1/50 to 1/10, 1/25 to 1/10, or 1/20 to 1/5.

- 10 The cell death assay can further comprise a cell proliferation assay, a cell viability assay and/or an apoptosis assay.

For example, the extent of cell death can be measured by <sup>3</sup>H thymidine incorporation, the trypan blue exclusion method, using propidium iodide or by the <sup>51</sup>Cr-release assay.

- 15 Alternatively, the extent of cell death can be determined by a test of intracellular esterase activity, and a test of plasma membrane integrity, preferably using fluorescent calcein and ethidium homodimer-1. These tests are described in J. Neurosci 15, 5389 (1995), in J. Cell Sci. 106, 685 (1993). Detailed protocols are given in the Molecular Probes Catalogue product number L-3224 (Live/Dead® Kits) incorporated herein by reference.
- 20 Basically, calcein AM is the cell-permeant esterase substrate, which is nonfluorescent until converted by enzymatic activity to highly fluorescent calcein. It remains within living cells exhibiting an intense green fluorescence. Ethidium homodimer-1 fluorescence is enhanced upon binding nucleic acids. A bright red fluorescence is emitted. This dye cannot cross intact plasma membranes but it enters into dead cells.
- 25 Thus, living cells are green, while dead cells emits a red fluorescence. This technique coupled with CDD camera and plate readers leads to high through put screening.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

10

In another embodiment, the extent of cell death is determined by discriminating between living and dead cells using DiOC<sub>18</sub> and propidium iodide. Protocols are described in details in the Molecular Probes Catalogue product number L-7010 (Live/Dead® Kits) incorporated herein by reference.

5

In still another embodiment, cell death can be determined using the Caspase activity test. Caspase is a key player in the activation of apoptosis. The Molecular probe kit E-13183 (EnzCheck Caspase-3 Assay kit®, Molecular Probe) is particularly useful for testing Jurkat cells. Phosphatidyl exposure can also be used in this regard. This method has been employed in Dan S, et al, Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase CGP 57148. *Cell Death Differ.* 1998;5:710-715.

In still another embodiment, cell death can be determined using the Mitochondrial membrane depolarization test using the JC-1 or JC-9 cationic dyes of Molecular Probe, which have been described as a useful indicator in HL-60 cells.

For cell proliferation assays, it can be performed using MTS tetrazolium (Cell Titer96 Aqueous; Promega, Madison, WI). This test allows to measure the numbers of viable cells.

20

In all the above mentioned cell death tests, the invention encompasses fluorometric assays of cell viability and cytotoxicity using a fluorescence microscope, a fluorometer, a fluorescence microplate reader and/or a flow cytometer.

25

Furthermore, the Applicant has shown in the previously filed US 60/301,404 that c-kit is a target of interest for depleting mast cells. It is now more specifically proposed to test inhibitors of the downstream signaling pathways of this receptor. Indeed, among all the

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

11

tyrosine kinases involved in transducing the signals, one or several of them may be more specific to or upregulated in mast cells versus other hematopoietic cells that are not mast cells.

In this regard, compounds to be tested can be selected from inhibitors of tyrosine kinases, such as Akt, c-Cbl, CRKL, Doc, p125 Fak, Fyn, Grap, Jak2, Lyn, MAPK, 5  
MATK, PI3-K, PLC- $\gamma$ , Raf1, Ras, SHP-1, SHP2 (Syp), Tec, Vav and Flt-3 (see Table 1 below).

**Table 1** : Molecules interacting with the intracellular portion of the human c-kit and/or  
10 activated in response to SCF.

Molecules	Human cells
Akt	293, U2OS, BHX21, HeLa
c-Cbl	MO7e, TF-1
CRKL	MO7e
Doc	MO7e
p125 Fak	TF-1
Fyn	MO7e
Grap	MO7e, TF-1, K562
Jak2	MO7e, TF-1
Lyn	MO7e, Normal progenitors
MAPK	melano 501 mel
MATK (CHK)	CMK
PI3-K	293, U2OS, BHX21, HeLa
PLC- $\gamma$	MO7e

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

12

Raf1	MO7e
Ras	MO7e
SHP-1	MO7e
SHP2 (Syp)	MO7e
Tec	MO7e
Vav	MO7e, TF-1

Compounds of interest include but are not limited to indolinone, pyrimidine derivatives, pyrrolopyrimidine derivatives, quinazoline derivatives, quinoxaline derivatives, pyrazoles derivatives, bis monocyclic, bicyclic or heterocyclic aryl compounds, vinylene-azaindole derivatives and pyridyl-quinolones derivatives, styryl compounds, styryl-substituted pyridyl compounds, , selenoindoles, selenides, tricyclic polyhydroxylic compounds and benzylphosphonic acid compounds.

10 The invention also relates to a compound obtainable by the method depicted above, wherein said compound is capable of depleting mast cells and has no significant toxicity for other hematopoietic cells. Preferably, such compounds has an E/S ratio ranging from ranging from 1/1000 to 1/5, 1/1000 to 1/100, 1/100 to 1/50, 1/100 to 1/10, 1/50 to 1/10, 1/25 to 1/10, or 1/20 to 1/5.

15

Another aspect of the invention is directed to the use of said compound to manufacture a medicament. Such medicament can take the form of a pharmaceutical composition for oral administration, which can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, 20 gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient. In addition

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

13

to the active ingredients, these pharmaceutical compositions may contain suitable pharmaceutically-acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Further details on techniques for formulation and administration may  
5 be found in the latest edition of Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Such medicament can take the form of a pharmaceutical or cosmetic composition for  
10 topical administration. Such compositions according to the invention may be presented in the form of a gel, paste, ointment, cream, lotion, liquid suspension aqueous, aqueous-alcoholic or, oily solutions, or dispersions of the lotion or serum type, or anhydrous or lipophilic gels, or emulsions of liquid or semi-solid consistency of the milk type, obtained by dispersing a fatty phase in an aqueous phase or vice versa, or of suspensions  
15 or emulsions of soft, semi-solid consistency of the cream or gel type, or alternatively of microemulsions, of microcapsules, of microparticles or of vesicular dispersions to the ionic and/or nonionic type. These compositions are prepared according to standard methods.

20 The composition according to the invention comprises any ingredient commonly used in dermatology and cosmetic. It may comprise at least one ingredient selected from hydrophilic or lipophilic gelling agents, hydrophilic or lipophilic active agents, preservatives, emollients, viscosity enhancing polymers, humectants, surfactants, preservatives, antioxidants, solvents, and fillers, antioxidants, solvents, perfumes, fillers,  
25 screening agents, bactericides, odor absorbers and coloring matter.

As oils which can be used in the invention, mineral oils (liquid paraffin), vegetable oils (liquid fraction of shea butter, sunflower oil), animal oils, synthetic oils, silicone oils

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

14

(cyclomethicone) and fluorinated oils may be mentioned. Fatty alcohols, fatty acids (stearic acid) and waxes (paraffin, carnauba, beeswax) may also be used as fatty substances.

5 As emulsifiers which can be used in the invention, glycerol stearate, polysorbate 60 and the PEG-6/PEG-32/glycol stearate mixture are contemplated.

As hydrophilic gelling agents, carboxyvinyl polymers (carbomer), acrylic copolymers such as acrylate/alkylacrylate copolymers, polyacrylamides, polysaccharides such as hydroxypropylcellulose, clays and natural gums may be mentioned, and as lipophilic  
10 gelling agents, modified clays such as bentones, metal salts of fatty acids such as aluminum stearates and hydrophobic silica, or alternatively ethylcellulose and polyethylene may be mentioned.

As hydrophilic active agents, proteins or protein hydrolysates, amino acids, polyols,  
15 urea, allantoin, sugars and sugar derivatives, vitamins, starch and plant extracts, in particular those of Aloe vera may be used.

As lipophilic active agents, retinol (vitamin A) and its derivatives, tocopherol (vitamin E) and its derivatives, essential fatty acids, ceramides and essential oils may be used.  
20 These agents add extra moisturizing or skin softening features when utilized.

In addition, a surfactant can be included in the composition so as to provide deeper penetration of the compound capable of depleting mast cells, such as a tyrosine kinase inhibitor, preferably a c-kit inhibitor.

25 Among the contemplated ingredients, the invention embraces penetration enhancing agents selected for example from the group consisting of mineral oil, water, ethanol, triacetin, glycerin and propylene glycol; cohesion agents selected for example from the

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

15

group consisting of polyisobutylene, polyvinyl acetate and polyvinyl alcohol, and thickening agents.

Chemical methods of enhancing topical absorption of drugs are well known in the art.

5 For example, compounds with penetration enhancing properties include sodium lauryl sulfate (Dugard, P. H. and Sheuplein, R. J., "Effects of Ionic Surfactants on the Permeability of Human Epidermis: An Electrometric Study," *J. Invest. Dermatol.*, V.60, pp. 263-69, 1973), lauryl amine oxide (Johnson et. al., US 4,411,893), azone (Rajadhyaksha, US 4,405,616 and 3,989,816) and decylmethyl sulfoxide (Sekura, D. L.

10 and Scala, J., "The Percutaneous Absorption of Alkylmethyl Sulfides," *Pharmacology of the Skin, Advances In Biology of Skin, (Appleton-Century Craft) V. 12, pp. 257-69, 1972*). It has been observed that increasing the polarity of the head group in amphoteric molecules increases their penetration-enhancing properties but at the expense of increasing their skin irritating properties (Cooper, E. R. and Berner, B., "Interaction of

15 Surfactants with Epidermal Tissues: Physicochemical Aspects," *Surfactant Science Series, V. 16, Reiger, M. M. ed. (Marcel Dekker, Inc.) pp. 195-210, 1987*).

A second class of chemical enhancers are generally referred to as co-solvents. These materials are absorbed topically relatively easily, and, by a variety of mechanisms,

20 achieve permeation enhancement for some drugs. Ethanol (Gale et. al., U.S. Pat. No. 4,615,699 and Campbell et. al., U.S. Pat. Nos. 4,460,372 and 4,379,454), dimethyl sulfoxide (US 3,740,420 and 3,743,727, and US 4,575,515), and glycerine derivatives (US 4,322,433) are a few examples of compounds which have shown an ability to enhance the absorption of various compounds.

25 The pharmaceutical compositions of the invention can also be intended for administration with aerosolized formulation to target areas of a patient's respiratory tract.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

16

Devices and methodologies for delivering aerosolized bursts of a formulation of a drug is disclosed in US 5,906,202. Formulations are preferably solutions, e.g. aqueous solutions, ethanoic solutions, aqueous/ethanoic solutions, saline solutions, colloidal suspensions and microcrystalline suspensions. For example aerosolized particles  
5 comprise the active ingredient mentioned above and a carrier, (e.g., a pharmaceutically active respiratory drug and carrier) which are formed upon forcing the formulation through a nozzle which nozzle is preferably in the form of a flexible porous membrane. The particles have a size which is sufficiently small such that when the particles are formed they remain suspended in the air for a sufficient amount of time such that the  
10 patient can inhale the particles into the patient's lungs.

The invention encompasses systems described in US 5,556,611:

- liquid gas systems (a liquefied gas is used as propellant gas (e.g. low-boiling FCHC or propane, butane) in a pressure container,
- suspension aerosol (the active substance particles are suspended in solid form in the  
15 liquid propellant phase),
- pressurized gas system (a compressed gas such as nitrogen, carbon dioxide, dinitrogen monoxide, air is used.

Thus, according to the invention the pharmaceutical preparation is made in that the active substance is dissolved or dispersed in a suitable nontoxic medium and said  
20 solution or dispersion atomized to an aerosol, i.e. distributed extremely finely in a carrier gas. This is technically possible for example in the form of aerosol propellant gas packs, pump aerosols or other devices known per se for liquid misting and solid atomizing which in particular permit an exact individual dosage.

Therefore, the invention is also directed to aerosol devices comprising the compound as  
25 defined above and such a formulation, preferably with metered dose valves.

The pharmaceutical compositions of the invention can also be intended for intranasal administration. In this regard, pharmaceutically acceptable carriers for administering the

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

17

compound to the nasal mucosal surfaces will be readily appreciated by the ordinary artisan. Such carriers are disclosed, simply by way of example, by Remington's Pharmaceutical Sciences" 16th edition, 1980, Ed. By Arthur Osol, the disclosure of which is incorporated herein by reference.

5

The selection of appropriate carriers depends upon the particular type of administration that is contemplated. For administration via the upper respiratory tract, the composition can be formulated into a solution, e.g., water or isotonic saline, buffered or unbuffered, or as a suspension, for intranasal administration as drops or as a spray. Preferably, such solutions or suspensions are isotonic relative to nasal secretions and of about the same pH, ranging e.g., from about pH 4.0 to about pH 7.4 or, from pH 6.0 to pH 7.0. Buffers should be physiologically compatible and include, simply by way of example, phosphate buffers. For example, a representative nasal decongestant is described as being buffered to a pH of about 6.2 (Remington's, *Id.* at page 1445). Of course, the ordinary artisan can readily determine a suitable saline content and pH for an innocuous aqueous carrier for nasal and/or upper respiratory administration.

Common intranasal carriers include nasal gels, creams, pastes or ointments with a viscosity of, e.g., from about 10 to about 3000 cps, or from about 2500 to 6500 cps, or greater, may also be used to provide a more sustained contact with the nasal mucosal surfaces. Such carrier viscous formulations may be based upon, simply by way of example, alkylcelluloses and/or other biocompatible carriers of high viscosity well known to the art (see e.g., Remington's, cited supra. A preferred alkylcellulose is, e.g., methylcellulose in a concentration ranging from about 5 to about 1000 or more mg per 100 ml of carrier. A more preferred concentration of methyl cellulose is, simply by way of example, from about 25 to about mg per 100 ml of carrier.

25

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

18

Other ingredients, such as art known preservatives, colorants, lubricating or viscous mineral or vegetable oils, perfumes, natural or synthetic plant extracts such as aromatic oils, and humectants and viscosity enhancers such as, e.g., glycerol, can also be included to provide additional viscosity, moisture retention and a pleasant texture and odor for the formulation. For nasal administration of solutions or suspensions according to the invention, various devices are available in the art for the generation of drops, droplets and sprays.

A premeasured unit dosage dispenser including a dropper or spray device containing a solution or suspension for delivery as drops or as a spray is prepared containing one or more doses of the drug to be administered and is another object of the invention. The invention also includes a kit containing one or more unit dehydrated doses of the compound, together with any required salts and/or buffer agents, preservatives, colorants and the like, ready for preparation of a solution or suspension by the addition of a suitable amount of water.

In still another aspect, the invention is aimed at a method for treating a disease selected from autoimmune diseases, allergic diseases, bone loss, tumor angiogenesis, inflammatory diseases, inflammatory bowel diseases (IBD), interstitial cystitis, mastocytosis, infections diseases, and CNS disorders comprising administering a compound obtainable from a method depicted above to a mammal in need of such treatment.

In a further aspect, the invention contemplates a method for promoting hair growth and hair color revival comprising administering a compound obtainable from a method from a method depicted above to a human need of such treatment.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

19

In a still further aspect, the invention embraces a method as defined above for treating multiple sclerosis, psoriasis, intestine inflammatory disease, ulcerative colitis, Crohn's disease, rheumatoid arthritis and polyarthritis, local and systemic scleroderma, systemic lupus erythematosus, discoid lupus erythematosus, cutaneous lupus, dermatomyositis, polymyositis, Sjogren's syndrome, nodular panarteritis, autoimmune enteropathy, proliferative glomerulonephritis, vasculitis, active chronic hepatitis and chronic fatigue syndrome.

In a still further aspect, the invention embraces a method as defined above for treating graft-versus-host disease or graft rejection in any organ transplantation including kidney, pancreas, liver, heart and lung.

In another aspect, the invention embraces a method as defined above for treating subepidermal blistering disorders such as aphthous ulcers, and several bullous diseases such as pemphigus, bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. This method can further comprise administering at least one antibiotic, preferably selected from dapsone, azathioprine, erythromycin, propionylerythromycin, neomycin, gentomycin, tobramycin, and mechlocycline.

The invention also relates to a method as described above for treating asthma, allergic rhinitis, allergic sinusitis, anaphylactic syndrome, urticaria, angioedema, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis, erythema nodosum, erythema multiforme, cutaneous necrotizing venulitis, insect bite skin inflammation and blood sucking parasitic infestation.

The invention also relates to a method as described above for treating skin allergic disorders such as urticaria, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis, erythema nodosum, erythema multiforme, cutaneous necrotizing venulitis, insect bite skin inflammation and blood sucking parasitic infestation especially in dogs and cats.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

20

Here, the compound can be administered with aerosolized formulations to target areas of a patient's respiratory tract, or with intranasal or topical formulations accordingly.

In yet another aspect, the invention embraces a method as defined above for treating  
5 tumor angiogenesis in human.

The invention also concerns the method as depicted above for treating skin disorders in human associated with mastocytosis, notably cutaneous mastocytosis including urticaria pigmentosa, diffuse cutaneous mastocytosis, solitary mastocytoma and bullous,  
10 erythrodermic and teleangiectatic mastocytosis, as well as for treating category IV mastocytosis including mast cell leukemia.

A particular embodiment is directed to the treatment of dog mastocytoma.

15 In yet another aspect, the invention embraces the method as depicted above for treating treating inflammatory bowel diseases (IBD), such as Crohn's disease, mucositis, ulcerative colitis, and necrotizing enterocolitis.

The invention also contemplates the method as depicted above for treating interstitial  
20 cystitis in human, for treating bacterial infections in mammalian, especially in human, preferably for the treatment of recurrent bacterial infections, resurging infections after asymptomatic periods such as bacterial cystitis.

More particularly, the invention can be practiced for treating FimH expressing bacteria  
25 infections such as Gram-negative enterobacteria including *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* and *Salmonella typhimurium*.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

21

In this method for treating bacterial infection, further administration of at least one antibiotic selected bacitracin, the cephalosporins, the penicillins, the aminoglycosides, the tetracyclines, the streptomycins and the macrolide antibiotics such as erythromycin; the fluoroquinolones, actinomycin, the sulfonamides and trimethoprim, is of interest.

5

The invention also contemplates the method as depicted above for treating bone loss such as osteoporosis, including post menopausal osteoporosis, senile osteoporosis, and glucocorticoid-induced osteoporosis, osteitis fibrosa cystica, renal osteodystrophy, osteosclerosis, osteopenia, osteomalacia, fibrogenesis-imperfecta ossium, and Paget's  
10 Disease.

In a particular embodiment, the invention relates to the method as depicted above for treating inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis, conjunctivitis, rheumatoid spondylitis, osteoarthritis, gouty arthritis, polyarthritis, and other arthritic conditions as  
15 well as pain associated with these inflammatory diseases.

Utility of the invention will be further illustrated with the hereinafter detailed description. Indeed, differences in signal transduction with c-kit wild or mutated c-kit has been observed. This could lead to target specific second messengers that are  
20 specifically present, activated or upregulated in mast cells or pathways that are repressed, not present or inactivated in hematopoietic cells other than mast cells.

#### **SIGNAL TRANSDUCTION INDUCED BY ACTIVATION OF NORMAL C-KIT.**

25 SCF is an essential growth factor in hematopoiesis since it synergizes with almost all the hematopoietic growth factors, except M-CSF, to induce *in vitro* hematopoiesis, Metcalf, D. (1993) The cellular basis for enhancement interactions between stem cell factor and the colony stimulating factors. Stem Cells (Dayt) 11 Suppl 2, 1-11. This factor is

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

22

produced by bone marrow stromal cells, and acts through interaction with its receptor, c-kit, Ratajczak, M.Z. et al, (1992) Role of the KIT protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1710-1714. As previously noticed, the c-kit receptor is a glycoprotein of 145 kDa and belongs to the type III tyrosine kinase subfamily, characterized by the presence of five Ig-like domains in the extracellular part of the molecule and by an interkinase sequence that splits the intracytoplasmic domain into the adenosine triphosphate (ATP)-binding domain and the phosphotransferase domain. C-kit is strongly expressed by CFU-GEMM, BFU-E and by progenitors and mature cells of the mast cell lineage, Katayama N. et al, (1993) Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors. Blood 82, 2353-2360.

Ligand binding to c-kit results in activation of the catalytic function, resulting in autophosphorylation of tyrosine residues of the cytoplasmic domain. These phosphotyrosine residues become docking sites for various cytoplasmic signaling molecules containing SH2 domain. C-kit activates canonical signal transduction pathways common to many growth factor receptors, including those depending on PI3-kinase, ras and JAK2. Molecules known to associate with c-kit *in vivo* or *in vitro* include p85 subunit of PI3-kinase, multiple Src family members, Lyn and Fyn, Vav, Grb2, SHP-1, SHP-2, PKC, MATK (CHK) and Socs1, while there are divergent data concerning PLC- $\gamma$ , GTPase activating Protein of ras (GAP) and JAK2. Additional molecules are activated or phosphorylated in response to c-kit activation : Shc, Tec, Vav GDP/GTP exchange factor, raf-1, MAPK, Akt, CRKL, p120 Cbl, and Doc. Recent studies performed in various cell systems have yielded divergent results regarding the substrates that associate with and are phosphorylated by c-kit. These discrepancies might reflect either differences in experimental methods or functionally relevant variations in substrate expression profiles of individual cell types, which could be the basis of distinct signals and cell type specific responses mediated by the same ligand/receptor system. For

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

23

these reasons, we choose to describe the data obtained regarding c-kit signaling in various cellular contexts.

5 The first initiator of signalization is the ligand induced-dimerization of c-kit, which induces intrinsic tyrosine kinase activity of c-kit, resulting in transphosphorylation at critical tyrosine residues. Moreover, in response to ligand stimulation, c-kit appears to be phosphorylated on serine residues by PKC, which inhibits c-kit autophosphorylation, Katayama, N et al, (1993) Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors. *Blood* 82, 2353-2360.

10

One of the most efficient associations with c-kit, observed in various cell types, is contracted by SH2 domain of p85 subunit of PI3-kinase, Lev, S et al. (1992) Interkinase domain of kit contains the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 678-682 and Rottapel, R. et al (1991) The Steel/W transduction pathway: kit autophosphorylation and its association with a unique subset of cytoplasmic signaling proteins is induced by the Steel factor. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3043-3051. via the phosphorylated tyrosine residue 719 of murine c-kit or tyrosine 721 of human c-kit, Serve, H et al, (1994) Tyrosine residue 719 of the c-kit receptor is essential for binding of the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for c-kit- associated PI 3-kinase activity in COS-1 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 6026-6030.

20

C-kit signalisation has been studied in human hematopoietic cells, mainly in MO7e and CMK, two megakaryocytic cell lines (Table 1 above).

25 In these cells, SCF induces activation and/or recruitment of major kinases such as PI3-kinase, Src kinases (Fyn and Lyn) and JAK2, and various adaptators molecules, Grb2, Grap, Vav, CRKL via their SH2 domain. These events result in formation of various molecular associations via SH2, SH3 or PH domains, which in turn start activation of

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

24

- different pathways. Ras pathway was showed to be activated in response to SCF stimulation, leading to interaction between Ras and Raf-1, thus initiating MAPKinase cascade, Tauchi, T et al, (1994) The ubiquitously expressed Syp phosphatase interacts with c-kit and Grb2 in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 269, 25206-25211.
- 5 Indeed, Grap, an adaptor molecule, interacts with ligand-activated c-kit through its SH2 domain and is associated with a ras guanine nucleotide exchange factor, mSos1, through its SH3 domain, coupling signals from receptor and cytoplasmic tyrosine kinase to the ras signaling pathway, Feng, G.S et al, (1996) Grap is a novel SH3-SH2-SH3 adaptor protein that couples tyrosine kinases to the Ras pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 10 12129-12132. Another adaptor molecule related to Grap, Grb2, interacting via its SH2 domain with a phosphorylated tyrosine residue of c-kit, may recruit c-Cbl and Shc, Brizzi, M.F et al, (1996) Discrete protein interactions with the Grb2/c-Cbl complex in SCF- and TPO-mediated myeloid cell proliferation. *Oncogene* 13, 2067-2076 and Wisniewski, D., Strife, A., Clarkson, B. (1996) c-kit ligand stimulates tyrosine 15 phosphorylation of the c-Cbl protein in human hematopoietic cells. *Leukemia* 10, 1436-1442. After activation, kinase may either play the role of adaptor molecule such as PI3-kinase interacting with c-Cbl and CRKL, Sattler, M.et al., (1997) Steel factor induces tyrosine phosphorylation of CRKL and binding of CRKL to a complex containing c-kit, phosphatidylinositol 3-kinase, and p120(CBL). *J. Biol. Chem.* 272, 10248-10253 or the 20 role of kinase such as PI3-kinase phosphorylating Akt, Blume-Jensen, P et al, (1998) The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.* 8, 779-782.

- In few cases, interaction and/or activation is described without connection with any 25 known signaling pathway. This is the case for Tec, Tang, B et al, (1994) Tec kinase associates with c-kit and is tyrosine phosphorylated and activated following stem cell factor binding. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8432-8437, for MATK, Jhun, B.H. et al, (1995) The MATK tyrosine kinase interacts in a specific and SH2-dependent manner with c-Kit. *J.*

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

25

Biol. Chem. 270, 9661-9666, Vav, Alai, M et al, (1992) Steel factor stimulates the tyrosine phosphorylation of the proto- oncogene product, p95vav, in human hemopoietic cells. J. Biol. Chem. 267, 18021-18025, and Doc, Carpino, N. et al, (1997) p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. Cell 88, 197-204.

Unexpectedly, JAK-STAT pathway is poorly described during c-kit activation. JAK2, a cytosolic tyrosine kinase essential for non tyrosine kinase cytokine receptor superfamily signaling, has been described physically associated with c-kit, prior to ligand activation, and phosphorylated on tyrosine residues in response to SCF, Brizzi, M. et al, (1994) Convergence of signaling by interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and mast cell growth factor on JAK2 tyrosine kinase. J. Biol. Chem. 269, 31680-31684, Weiler, S.R et al, (1996) JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. Blood 87, 3688-3693 and Linnekin, D. et al, (1996) JAK2 is constitutively associated with c-Kit and is phosphorylated in response to stem cell factor. Acta Haematol. 95, 224-228., or not associated with c-kit. In addition, SCF activates cytosolic transcription factors like STAT1 in MO7e cell line, Deberry, C. et al, (1997) Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. Biochem. J. 327 ( Pt 1), 73-80.

C-kit signalisation has been also examined in various non hematopoietic human cell lines. Blume-Jensen et al. demonstrated that SCF induced activation of Akt and mediated phosphorylation of Serine residue 136 of Bad in a PI3-kinase-dependent manner, Blume-Jensen, P. et al, (1998). *In vitro* experiments performed on embryonic fibroblasts indicate that PI3-kinase and PLC- $\gamma$  compete for association with tyrosine residue 721 of human c-kit, with p85/PI3-kinase exhibiting higher affinity, Herbst, R et al, (1995) Formation of signal transfer complexes between stem cell and platelet-derived growth factor receptors and SH2 domain proteins in vitro. Biochemistry 34,

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

26

- 5971-5979. In H526 cell line (Small cell lung carcinoma, SCLC), SCF induced activation of Src-kinase, Lck, and its interaction with the juxtamembrane domain of c-kit, Krystal, G.W et al, (1998) Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1. *Cancer Res.* 58, 4660-4666. In 501 mel, a human melanoma cell line, Hemesath et al. (1998), *Nature* 391, 298-301 described that SCF stimulation resulted in activation of MAPK which, in turn, phosphorylated transcription factor microphthalmia (Mi), upregulating Mi transactivation via interaction with p300/CBP.
- 10 Interestingly, interconnection between c-kit and integrin signaling pathways was observed in TF-1 cell line. SCF induces spreading of fibronectin-adherent TF-1 cells and enhances tyrosine phosphorylation of pp125 FAK in a dose-dependent manner, when compared to the level of tyrosine phosphorylation of pp125 FAK in the absence of SCF. These effects depend on a wortmannin-, integrin activation- sensitive pathways.
- 15 Regarding c-kit deactivation, two main pathways have been described in different cellular contexts. In hematopoietic cells, one pathway involves SHP-1, a tyrosine phosphatase, interacting with c-kit probably at 569 tyrosine phosphorylated residue, which down-regulates tyrosine residue phosphorylation state of c-kit, Yi, T., Ihle, J.N. (1993) Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3350-3358, Lorenz, U. et al, (1996) Genetic analysis reveals cell type-specific regulation of receptor tyrosine kinase c-Kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1. *J. Exp. Med.* 184, 1111-1126, Paulson, R. et al, (1996) Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. *Nat. Genet.* 13, 309-315, and Kozłowski, M et al, (1998) SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2089-2099.
- 20
- 25

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

27

The role of phosphatase SHP-2 (Syp) is less clear. It has been shown that SHP-2 associated with activated c-kit in MO7e cell line via its SH2 domain, became phosphorylated and complexed with Grb2, Tauchi T. et al, (1994). This connection to Grb2 could lead to ras/MAPkinase pathway activation and to cell proliferation. By contrast, it has been shown, in BA/F3 cells expressing c-kit, that SHP-2 association to c-kit Y567F is markedly reduced. In this case, an hyperproliferative response to SCF was observed, suggesting that SHP-2 downregulates SCF-induced proliferation, Kozlowski, M. et al, (1998).

10 Activation and deactivation of human c-kit have been also studied in porcine endothelial cells (PAE). Activation of PI3-kinase, PLC- $\gamma$  and Raf/MAPKinase cascade was described in response to SCF in PAE cells transfected with human c-kit. In these cells, a first negative feedback loop is the PI3-K, PLD and PKC pathway which leads to phosphorylation at 741 and 746 serine residues of c-kit.. A second deactivation pathway  
15 is PI3-kinase-induced PLD activation and phosphatidylcholine (PtdCho)-specific phospholipase D activation, (PtdCho)-PLD, that generated phosphatidic acid (PtdH), metabolized into diacylglycerol (DAG), an activator of PKC and a precursor of arachidonic acid (D4ACh), Kozawa, O et al, (1997) Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase in stem-cell-factor- induced phospholipase D activation and arachidonic acid  
20 release. Eur. J. Biochem. 248, 149-155. These authors also showed that SCF induced PLA2 activation, a second pathway generating D4ACh.

In murine bone marrow-derived mast cells (BMMC), it has been demonstrated that SCF induces i) PI3-kinase activation, which in turn stimulates Rac-1 and Jnk pathway and ii)  
25 binding and phosphorylation of Src kinases Fyn on tyrosine 567, Timokhina, I et al, (1998) Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. EMBO J. 17, 6250-6262 and Lyn, Suzuki, T. et al, (1998) Essential roles of Lyn in fibronectin-mediated filamentous actin

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

28

- assembly and cell motility in mast cells. *J. Immunol.* 161, 3694-3701. In rat mast cells isolated from the peritoneal cavity, Koike et al. have shown that SCF induced PLD activation and subsequent release of D4ACh through the protein tyrosine kinase pathway and without activation of the phosphoinositide-specific PLC- $\gamma$ , Koike, T. et al, (1993)
- 5 SCF/c-kit receptor-mediated arachidonic acid liberation in rat mast cells. Involvement of PLD activation associated tyrosine phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 1570-1577 and Koike, T. et al, (1993) Stem cell factor-induced signal transduction in rat mast cells. Activation of phospholipase D but not phosphoinositide-specific phospholipase C in c-kit receptor stimulation. *J. Immunol.* 151, 359-366. In these cells,
- 10 Nagai et al. have shown the involvement of PI3-kinase, protein tyrosine kinase (PTK) and myosin light chain kinase in SCF induced histamine release, Nagai, S. et al, (1995) Pharmacological study of stem-cell-factor-induced mast cell histamine release with kinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 576-581.
- Regarding c-kit deactivation in murine cells, another way to decrease SCF signal is the
- 15 down-modulation of c-kit expression. Yee et al. and Miyazawa et al. have shown that c-kit internalization and ubiquitination is dependent on intact kinase activity of c-kit, Yee, N. et al, (1994) Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269, 31991-31998 and Miyazawa, K. et al, (1994) Ligand-dependent polyubiquitination of c-
- 20 kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells. *Blood* 83, 137-145.
- In BMDC, c-kit activates PLC- $\gamma$  resulting in the hydrolysis of PI4,5 diP into DAG and inositol-1,4,5 triP inducing mobilization of intracellular  $Ca^{++}$ . This calcium influx seems to be critical for c-kit internalization. Moreover, in the absence of PI3-kinase
- 25 activation, the c-kit receptor internalizes but remains localized near the inner side of the plasma membrane. Of note, c-kit internalization is completely prevented when both PI3-kinase and  $Ca^{++}$  influx are inhibited, Gommerman, J.L. et al, (1997)

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

29

Phosphatidylinositol 3-kinase and  $Ca^{2+}$  influx dependence for ligand-stimulated internalization of the c-Kit receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 30519-30525.

A novel mediator of downregulation of c-kit-dependent mitogenesis could be Socs-1 (Suppressor of cytokine signaling), De Sepulveda, P. et al, (1999) Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses Steel factor-dependent proliferation. *EMBO J.* 18, 904-915. SCF induces synthesis of Socs-1, that binds to c-kit via its SH2 domain. The mechanism of Socs-1 activity seems to involve its interaction with Grb2 and the negative regulatory N-terminus of Vav, Blechman, J. et al, (1993) Structure-function analyses of the kit receptor for the steel factor. *Stem Cells (Dayt)* 11 Suppl 2, 12-21.

10

#### MOLECULAR DYSFUNCTIONS RELATED TO C-KIT MUTATIONS

##### *Enzymatic functions and c-kit mutations*

SHP-1 expression is different in IC2/c-kit<sup>WT</sup> and IC2/c-kit<sup>D814Y</sup> cells, and this is also the case for other proteins like MMCP-4 and MMCP-6, that are proteases present in the granules of murine mast cells and differentially expressed at various stages of mast cell maturation. Indeed, MMCP-6 transcripts are expressed at low level in IC2/c-kit<sup>WT</sup> cells in the presence of exogenous SCF, and this level increases as the result of c-kit<sup>D814Y</sup> expression. MMCP-4 transcripts are not detectable by RT-PCR in IC2/c-kit<sup>WT</sup> cells, but are abundantly expressed in IC2/c-kit<sup>D814Y</sup> cells. The differences observed between the wild form and the mutant suggest that the signals transduced by c-kit<sup>WT</sup> stimulated by SCF and by c-kit<sup>D814Y</sup> are not equivalent : the mutation c-kit<sup>D814Y</sup> alters not only the proliferation of mast cells but also their stage of maturation.

25

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

30

## CLAIMS

1. A method for identifying compounds capable of depleting mast cells, wherein said  
5 compounds are non-toxic for other hematopoietic cells that are not mast cells or related  
cells or cell lines or derived cell lines thereof, such as SCF independent expanded human  
normal CD34+ cells, comprising the steps consisting of :
- a) culturing mast cells in vitro in a suitable culture medium,
  - b) adding to said culture medium at least one candidate compound to be tested and  
10 incubating said cells for a prolonged period of time,
  - c) measuring the extent to which said compounds promote mast cells death or disrupt,  
interfere with, or inhibit mast cells growth, and selecting compounds for which mast  
cells depletion is observed,
  - d) identifying a subset of compounds selected in step c) that are unable to promote  
15 significant death of a cell chosen from other hematopoietic cells that are not mast cells or  
related cells or cell lines or derived cell lines thereof, such as SCF independent expanded  
human normal CD34+ cells.
2. A method for identifying compounds capable of depleting mast cells, wherein said  
20 compounds are non-toxic for other hematopoietic cells that are not mast cells or related  
cells or cell lines or derived cell lines thereof, such as SCF independent expanded human  
normal CD34+ cells, comprising the step consisting of :
- a) providing a culture of mast cells, wherein said mast cells are selected from wild type  
mast cells and cell lines derived thereof, activated mutant mast cell lines, and activated  
25 wild type mast cells and cell lines derived thereof,
  - b) contacting the culture of said cells with at least one candidate compound under  
conditions allowing growth and/or survival of mast cells, measuring the level of cell  
death in the presence of the candidate compound; and comparing the level of cell death

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

31

- in the presence of the candidate compound to the level of cell death in the absence of the candidate compound, wherein an increase in the level of cell death in the presence of the candidate compound is indicative of the mast cells depletion ability of the candidate compound,
- 5 c) providing a culture of at least one cell other than mast cells, wherein said cell is selected from hematopoietic cells that are not mast cells or related cells or cell lines or derived cell lines thereof, such as SCF independent expanded human normal CD34+ cells,
- d) contacting the culture of said cells with at least one compound identified in step b)
- 10 under conditions allowing growth and/or survival of the cell depicted in step c), measuring the level of cell death in the presence of said compound; and comparing the level of cell death in the presence of the compound to the level of cell death in the absence of the compound, wherein no significant increase in the level of cell death in the presence of said compound is indicative of mast cells depletion specificity of said
- 15 compound versus at least another hematopoietic cell.
3. A method according to claim 1 or 2, wherein mast cells are chosen from isolated mast cells and cell lines derived thereof, BaF3, IC-2 mouse cells, HMC-1, P815 available at ATCC under the accession number TIB-64, 10P2 available at ATCC under the
- 20 accession number CRL-2034, 10P12 available at ATCC under the accession number CRL-2036, 11P0-1 available at ATCC under the accession number CRL-2037, and cell lines derived thereof.
4. A method according to one of claims 1 to 3, wherein other hematopoietic cells that are
- 25 not mast cells or related cells or cell lines are selected from the group consisting of human T lymphocyte Jurkat cell line (ATCC N° TIB-152 and cell lines derived thereof), the human B lymphocyte Daudi or Raji cell line (ATCC N° CCL-213 and CCL-86 respectively and cell lines derived thereof), the human monocytic U 937 cell line (ATCC

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

32

N° CRL-1593.2) and the human HL-60 cell line (ATCC N° CCL-240), cell lines derived thereof ATCC N° CRL-2258 and CRL-2392) and normal human CD34+ cells that are expanded in a culture medium comprising a cocktail of cytokine except SCF.

- 5 5. A method according to one of claims 1 to 4, wherein compounds capable of depleting specifically mast cells at a concentration below 10  $\mu$ M, preferably below 1  $\mu$ M are selected.
6. A method according to one of claims 1 to 5, wherein the compounds exhibiting Ratios  
10 E/S ranging from 1/1000 to 1/5 are selected.
7. A method according to one of claims 1 to 6, wherein the cell death assay further comprises a cell proliferation assay, a cell viability assay and/or an apoptosis assay.
- 15 8. A method according to one of claims 1 to 6, wherein the extent of cell death is measured by 3H thymidine incorporation, the trypan blue exclusion method, using propidium iodide or by the  $^{51}\text{Cr}$ -release assay.
9. A method according to one of claims 1 to 6, wherein the extent of cell death is  
20 determined by a test of intracellular esterase activity, and a test of plasma membrane integrity, preferably using fluorescent calcein and ethidium homodimer-1.
10. A method according to one of claims 1 to 6, wherein the extent of cell death is  
25 determined by discriminating between living and dead cells using DiOC<sub>18</sub> and propidium iodide.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

33

11. A method according to one of claims 1 to 10, wherein the extent of cell death is measured by fluorometric assays of cell viability and cytotoxicity using a fluorescence microscope, a fluorometer, a fluorescence microplate reader or a flow cytometer.
- 5
12. A method according to one of claims 1 to 11, wherein the mast cells that are IL-3 dependent cells are cultured in a culture media comprising IL-3 at a concentration comprised between 0.5 and 10 ng/ml, preferably between 1 to 5 ng/ml.
- 10
13. A method according to one of claims 1 to 12, wherein compounds to be tested are selected from inhibitors of tyrosine kinases, such as Akt, c-Cbl, CRKL, Doc, p125 Fak, Fyn, Grap, Jak2, Lyn, MAPK, MATK, PI3-K, PLC- $\gamma$ , Raf1, Ras, SHP-1, SHP2 (Syp), Tec, Vav and Flt-3.
- 15
14. A screening method according to one of claims 1 to 12, wherein said compounds are selected from the group consisting of indolinone, pyrimidine derivatives, pyrrolopyrimidine derivatives, quinazoline derivatives, quinoxaline derivatives, pyrazoles derivatives, bis monocyclic, bicyclic or heterocyclic aryl compounds, vinylene-azaindole derivatives and pyridyl-quinolones derivatives, styryl compounds, 20 styryl-substituted pyridyl compounds, , seleoindoles, selenides, tricyclic polyhydroxylic compounds and benzylphosphonic acid compounds.
- 25
15. A compound obtainable by the method according to one of claims 1 to 12, wherein said compound is capable of depleting mast cells and has no significant toxicity for other hematopoietic cells, preferably compounds having an E/S ratio ranging 1/1000 to 1/5.
16. Use of a compound according to claim 15 to manufacture a medicament.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

34

17. A method for treating a disease selected from autoimmune diseases, allergic diseases, bone loss, tumor angiogenesis, inflammatory diseases, inflammatory bowel diseases (IBD), interstitial cystitis, mastocytosis, infectious diseases, and CNS disorders comprising administering a compound obtainable from a method according to one of  
5 claims 1 to 14 to a mammal in need of such treatment.

18. A method for promoting hair growth and hair color revival comprising administering a compound obtainable from a method according to one of claims 1 to 14 to a human  
10 need of such treatment.

19. A method according to claim 17 for treating multiple sclerosis, psoriasis, intestine  
inflammatory disease, ulcerative colitis, Crohn's disease, rheumatoid arthritis and  
polyarthritis, local and systemic scleroderma, systemic lupus erythematosus, discoid  
lupus erythematosus, cutaneous lupus, dermatomyositis, polymyositis, Sjogren's  
15 syndrome, nodular panarteritis, autoimmune enteropathy, proliferative  
glomerulonephritis, vasculitis, active chronic hepatitis and chronic fatigue syndrome.

20. A method according to claim 17 for treating graft-versus-host disease or graft  
rejection in any organ transplantation including kidney, pancreas, liver, heart, lung and  
20 bone marrow.

21. A method according to claim 17 for treating subepidermal blistering disorders such  
as aphthous ulcers, and several bullous diseases such as pemphigus, bullous pemphigoid  
and cicatricial pemphigoid.  
25

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

35

22. A method according to claim 21 comprising further administering at least one antibiotic, preferably selected from dapsone, azathioprine, erythromycin, propionylerythromycin, neomycin, gentomycin, tobramycin, and mechlocycline.
- 5 23. A method according to claim 17 for treating asthma, allergic rhinitis, allergic sinusitis, anaphylactic syndrome, urticaria, angioedema, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis, erythema nodosum, erythema multiforme, cutaneous necrotizing venulitis, insect bite skin inflammation and blood sucking parasitic infestation.
- 10 24. A method according to claim 17 for treating skin allergic disorders such as urticaria, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis, erythema nodosum, erythema multiforme, cutaneous necrotizing venulitis, insect bite skin inflammation and blood sucking parasitic infestation especially in dogs and cats.
- 15 25. A method according to one of claims 23 and 24 wherein the compound is administered with aerosolized formulations to target areas of a patient's respiratory tract, intranasal or topical formulation.
26. A method according to claim 17 for treating tumor angiogenesis in human.
- 20 27. A method according to claim 17 for treating skin disorders in human associated with mastocytosis, notably cutaneous mastocytosis including urticaria pigmentosa, diffuse cutaneous mastocytosis, solitary mastocytoma and bullous, erythrodermic and teleangiectatic mastocytosis.
- 25 28. A method according to claim 17 for treating category IV mastocytosis including mast cell leukemia.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

36

29. A method according to claim 17 for treating dog mastocytoma.
30. A method according to claim 17 for treating treating inflammatory bowel diseases  
5 (IBD), such as Crohn's disease, mucositis, ulcerative colitis, and necrotizing enterocolitis.
31. A method according to claim 17 for treating interstitial cystitis in human.
- 10 32. A method according to claim 17 for treating bacterial infections in mammalian, especially in human, preferably for the treatment of recurrent bacterial infections, resurging infections after asymptomatic periods such as bacterial cystitis.
33. A method according to claim 17 for treating FimH expressing bacteria infections  
15 such as Gram-negative enterobacteria including *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* and *Salmonella typhimurium*.
34. A method according to claim 29 or 30 comprising further administering at least one  
20 antibiotic selected bacitracin, the cephalosporins, the penicillins, the aminoglycosides, the tetracyclines, the streptomycins and the macrolide antibiotics such as erythromycin; the fluoroquinolones, actinomycin, the sulfonamides and trimethoprim.
35. A method according to claim 17 for treating bone loss such as osteoporosis,  
25 including post menopausal osteoporosis, senile osteoporosis, and glucocorticoid-induced osteoporosis, osteitis fibrosa cystica, renal osteodystrophy, osteosclerosis, osteopenia, osteomalacia, fibrogenesis-imperfecta ossium, and Paget's Disease.

WO 03/003004

PCT/IB02/03294

37

36. A method according to claim 17 for treating inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis, conjunctivitis, rheumatoid spondylitis, osteoarthritis, gouty arthritis, polyarthritis, and other arthritic conditions as well as pain associated with these inflammatory diseases.

5

WO 03/003004

1/5

PCT/IB02/03294

## SEQUENCE LISTING

<110> AB Science  
<120> Method for identifying compounds that specifically deplete mast cells  
<130> D19830 NT  
<150> US 10/022,842  
<151> 2001-12-20  
<150> US 60/301,404  
<151> 2001-06-29  
<150> US 60/301,405  
<151> 2001-06-29  
<150> US 60/301,406  
<151> 2001-06-29  
<150> US 60/301,407  
<151> 2001-06-29  
<150> US 60/301,408  
<151> 2001-06-29  
<150> US 60/301,409  
<151> 2001-06-29  
<150> US 60/301,410  
<151> 2001-06-29  
<150> US 60/301,411  
<151> 2001-06-29  
<150> US 60/323,313  
<151> 2001-09-20  
<150> US 60/323,314  
<151> 2001-09-20  
<150> US 60/323,315  
<151> 2001-09-20  
<160> 5  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 576  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<223> Human c-kit  
<400> 1  
Met Arg Gly Ala Arg Gly Ala Trp Asp Phe Leu Cys Val Leu Leu Leu  
1 5 10 15  
Leu Leu Arg Val Gln Thr Gly Ser Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly



WO 03/003004

3/5

PCT/IB02/03294

Arg Thr Phe Thr Asp Lys Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu  
 355 360 365  
 Ser Asn Ile Arg Tyr Val Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly  
 370 375 380  
 Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Asn  
 385 390 395 400  
 Ala Ala Ile Ala Phe Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu  
 405 410 415  
 Thr Tyr Asp Arg Leu Val Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly  
 420 425 430  
 Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln  
 435 440 445  
 Arg Cys Ser Ala Ser Val Leu Pro Val Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser  
 450 455 460  
 Ser Gly Pro Pro Phe Gly Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser  
 465 470 475 480  
 Ser Ala Phe Lys His Asn Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp  
 485 490 495  
 Val Gly Lys Thr Ser Ala Tyr Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Asn  
 500 505 510  
 Lys Glu Gln Ile His Pro His Thr Leu Phe Thr Pro Leu Leu Ile Gly  
 515 520 525  
 Phe Val Ile Val Ala Gly Met Met Cys Ile Ile Val Met Ile Leu Thr  
 530 535 540  
 Tyr Lys Tyr Leu Gln Lys Pro Met Tyr Glu Val Gln Trp Lys Val Val  
 545 550 555 560  
 Glu Glu Ile Asn Gly Asn Asn Tyr Val Tyr Ile Asp Pro Thr Gln Leu  
 565 570 575  
 Pro Tyr Asp His Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asn Arg Leu Ser Phe Gly  
 580 585 590  
 Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala  
 595 600 605  
 Tyr Gly Leu Ile Lys Ser Asp Ala Ala Met Thr Val Ala Val Lys Met  
 610 615 620  
 Leu Lys Pro Ser Ala His Leu Thr Glu Arg Glu Ala Leu Met Ser Glu  
 625 630 635 640  
 Leu Lys Val Leu Ser Tyr Leu Gly Asn His Met Asn Ile Val Asn Leu  
 645 650 655  
 Leu Gly Ala Cys Thr Ile Gly Gly Pro Thr Leu Val Ile Thr Glu Tyr  
 660 665 670

WO 03/003004

4/5

PCT/IB02/03294

Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Phe Leu Arg Arg Lys Arg Asp Ser  
 675 680 685  
 Phe Ile Cys Ser Lys Gln Glu Asp His Ala Glu Ala Ala Leu Tyr Lys  
 690 695 700  
 Asn Leu Leu His Ser Lys Glu Ser Ser Cys Ser Asp Ser Thr Asn Glu  
 705 710 715 720  
 Tyr Met Asp Met Lys Pro Gly Val Ser Tyr Val Val Pro Thr Lys Ala  
 725 730 735  
 Asp Lys Arg Arg Ser Val Arg Ile Gly Ser Tyr Ile Glu Arg Asp Val  
 740 745 750  
 Thr Pro Ala Ile Met Glu Asp Asp Glu Leu Ala Leu Asp Leu Glu Asp  
 755 760 765  
 Leu Leu Ser Phe Ser Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Ala Phe Leu Ala  
 770 775 780  
 Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu  
 785 790 795 800  
 Thr His Gly Arg Ile Thr Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp  
 805 810 815  
 Ile Lys Asn Asp Ser Asn Tyr Val Val Lys Gly Asn Ala Arg Leu Pro  
 820 825 830  
 Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Cys Val Tyr Thr Phe  
 835 840 845  
 Glu Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Phe Leu Trp Glu Leu Phe Ser  
 850 855 860  
 Leu Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Gly Met Pro Val Asp Ser Lys Phe Tyr  
 865 870 875 880  
 Lys Met Ile Lys Glu Gly Phe Arg Met Leu Ser Pro Glu His Ala Pro  
 885 890 895  
 Ala Glu Met Tyr Asp Ile Met Lys Thr Cys Trp Asp Ala Asp Pro Leu  
 900 905 910  
 Lys Arg Pro Thr Phe Lys Gln Ile Val Gln Leu Ile Glu Lys Gln Ile  
 915 920 925  
 Ser Glu Ser Thr Asn His Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Asn Cys Ser Pro  
 930 935 940  
 Asn Arg Gln Lys Pro Val Val Asp His Ser Val Arg Ile Asn Ser Val  
 945 950 955 960  
 Gly Ser Thr Ala Ser Ser Ser Gln Pro Leu Leu Val His Asp Asp Val  
 965 970 975

WO 03/003004

5/5

PCT/IB02/03294

<210> 2  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Primer

<400> 2  
aagaagagat ggtacctcga ggggtgaccc

30

<210> 3  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Primer

<400> 3  
ctgcttcgag gccgcgttaa ctcttctcaa cca

33

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Primer

<400> 4  
agctcgttta gtgaaccgtc

20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Primer

<400> 5  
gtcagacaaa atgatgcaac

20

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
9 January 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2003/003004 A3

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/50** GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/IB2002/003294
- (22) International Filing Date: 28 June 2002 (28.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- |            |                                |    |
|------------|--------------------------------|----|
| 60/501,404 | 29 June 2001 (29.06.2001)      | US |
| 60/501,405 | 29 June 2001 (29.06.2001)      | US |
| 60/501,406 | 29 June 2001 (29.06.2001)      | US |
| 60/501,407 | 29 June 2001 (29.06.2001)      | US |
| 60/501,408 | 29 June 2001 (29.06.2001)      | US |
| 60/501,409 | 29 June 2001 (29.06.2001)      | US |
| 60/501,410 | 29 June 2001 (29.06.2001)      | US |
| 60/501,411 | 29 June 2001 (29.06.2001)      | US |
| 60/523,313 | 20 September 2001 (20.09.2001) | US |
| 60/523,314 | 20 September 2001 (20.09.2001) | US |
| 60/523,315 | 20 September 2001 (20.09.2001) | US |
| 10/022,842 | 20 December 2001 (20.12.2001)  | US |
- (71) Applicant (for all designated States except US): AB SCIENCE [FR/FR]; 3, avenue George V, F-75008 Paris (FR).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): MOUSSY, Alain [FR/FR]; 22 bis, passage Dauphine, F-75006 Paris (FR). KINET, Jean-Pierre [FR/US]; 3 Hunt Road, Lexington, MA 02421 (US).
- (74) Agents: MARTIN, Jean-Jacques et al.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW; ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AE, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

## Published:

- with international search report

(88) Date of publication of the International search report:  
29 April 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2003/003004 A3

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING COMPOUNDS THE SPECIFICALLY DEplete MAST CELLS

(57) Abstract: The present invention relates to a screening method allowing the identification and selection of compounds capable of depleting mast cells, wherein said compounds do not show significant toxicity for other hematopoietic cells that are not mast cells or related cells or cell lines, such as SCF independent expanded human normal CD34+ cells.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: Application No. PCT/IB 02/03294
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 55152 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;TUVIM MICHAEL (US); ADACHI ROBERTO (US);) 10 December 1998 (1998-12-10) the whole document	1,2
A	WO 01 27081 A (HILBERG FRANK ;SPEVAK WALTER (AT); MEEL JACOBUS VAN (AT); TONTSCH) 19 April 2001 (2001-04-19) abstract	1,2
X	---	15,16
	--- --	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **T* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 January 2003		Date of mailing of the international search report 31/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat. Application No. PCT/IB 02/03294
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MA Y ET AL: "INDOLINONE DERIVATIVES INHIBIT CONSTITUTIVELY ACTIVATED KIT MUTANTS AND KILL NEOPLASTIC MAST CELLS" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 114, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 392-394, XP001127437 ISSN: 0022-202X	1,2
X	the whole document -----	15,16

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 15 16

Present claims 15 and 16 relate to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being capable of depleting mast cells while having no significant toxicity for other hematopoietic cells.

The claim covers all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds summarized in page 12 of the description.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/IB 02/03294	
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 17-36 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 15 16 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Internat	Application No
				PCT/IB 02/03294	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 9855152	A	10-12-1998	AU	7821398 A	21-12-1998
			WO	9855152 A1	10-12-1998
WO 0127081	A	19-04-2001	DE	19949208 A1	19-04-2001
			DE	10042696 A1	14-03-2002
			AU	1023301 A	23-04-2001
			BR	0014735 A	16-07-2002
			CZ	20021410 A3	17-07-2002
			WO	0127081 A1	19-04-2001
			EP	1224170 A1	24-07-2002
			NO	20021719 A	11-04-2002
			SK	6462002 A3	06-08-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 13/10	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 17/14	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 Q 1/04	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	A 6 1 K 37/64	

- (31)優先権主張番号 60/301,407  
(32)優先日 平成13年6月29日(2001.6.29)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/301,408  
(32)優先日 平成13年6月29日(2001.6.29)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/301,409  
(32)優先日 平成13年6月29日(2001.6.29)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/301,410  
(32)優先日 平成13年6月29日(2001.6.29)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/301,411  
(32)優先日 平成13年6月29日(2001.6.29)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/323,313  
(32)優先日 平成13年9月20日(2001.9.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/323,314  
(32)優先日 平成13年9月20日(2001.9.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/323,315  
(32)優先日 平成13年9月20日(2001.9.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 10/022,842  
(32)優先日 平成13年12月20日(2001.12.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 キネ ジャン - ピエール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン ハント ロード 3

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB20 BB50 DA13 DA36 FB02

4B063 QA18 QQ20 QQ98 QR69 QR72 QR77 QS24 QX01

4C076 AA24 BB25 BB27 BB31 CC01 CC04 CC05 CC07 CC09 CC27

FF68

4C084 AA02 AA03 BA44 DC32 MA01 MA13 MA57 MA59 MA63 NA14

ZA022 ZA662 ZA812 ZA892 ZA922 ZA942 ZA962 ZB072 ZB112 ZB132

ZB212 ZB262 ZB322

专利名称(译)	化合物鉴定方法，专门消耗肥大细胞		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004537717A</a>	公开(公告)日	2004-12-16
申请号	JP2003509137	申请日	2002-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	科技公司		
申请(专利权)人(译)	阿布科学		
[标]发明人	ムーシーアラン キネジャンピエール		
发明人	ムーシー アラン キネ ジャン-ピエール		
IPC分类号	A61K8/49 A61K9/12 A61K31/00 A61K31/015 A61K31/095 A61K31/40 A61K31/403 A61K31/404 A61K31/415 A61K31/47 A61K31/4709 A61K31/495 A61K31/498 A61K31/50 A61K31/505 A61K31/506 A61K31/517 A61K31/519 A61K31/66 A61K38/55 A61K45/00 A61K45/06 A61P1/00 A61P13/10 A61P17 /02 A61P17/14 A61P19/08 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 A61Q7/00 C12Q1/04 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K8/4953 A61K31/00 A61K31/015 A61K31/095 A61K31/40 A61K31/403 A61K31/404 A61K31/415 A61K31/47 A61K31/4709 A61K31/495 A61K31/498 A61K31/50 A61K31/505 A61K31/506 A61K31/517 A61K31/519 A61K31/66 A61K45/06 A61K2800/782 A61P1/00 A61P13/10 A61P17/02 A61P17/14 A61P19/08 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43 /00 A61Q7/00 G01N33/5047 G01N2333/5403 G01N2333/705 G01N2333/70596 G01N2333/91215 G01N2500/10 G01N2800/20 A61K2300/00		
FI分类号	G01N33/50.Z A61K9/12 A61K45/00 A61P1/00 A61P13/10 A61P17/02 A61P17/14 A61P19/08 A61P25 /00.101 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.105 C12Q1/04 G01N33 /15.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/64		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B063 /QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ98 4B063/QR69 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QX01 4C076/AA24 4C076/BB25 4C076/BB27 4C076/BB31 4C076/CC01 4C076/CC04 4C076/CC05 4C076 /CC07 4C076/CC09 4C076/CC27 4C076/FF68 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA44 4C084/DC32 4C084/MA01 4C084/MA13 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084 /ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA922 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084 /ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB322		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/301404 2001-06-29 US 60/301405 2001-06-29 US 60/301406 2001-06-29 US 60/301407 2001-06-29 US 60/301408 2001-06-29 US 60/301409 2001-06-29 US 60/301410 2001-06-29 US 60/301411 2001-06-29 US 60/323313 2001-09-20 US 60/323314 2001-09-20 US 60/323315 2001-09-20 US 10/022842 2001-12-20 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

描述了鉴定耗尽肥大细胞而不耗尽其他相关细胞的化合物的方法。本发明进一步涉及通过筛选方法鉴定的化合物及其在治疗疾病中的用途。

分子	ヒト細胞
Akt	293, U2OS, BHK21, HeLa
c-Cbl	MO7e, TF-1
CRKL	MO7e
Doc	MO7e
p125 Fak	TF-1
Fyn	MO7e
Grap	MO7e, TF-1, K562
Jak2	MO7e, TF-1
Lyn	MO7e, 正常な前駆細胞
MAPK	メラノ 501 mel
MATK (CHK)	CMK
PI3-K	293, U2OS, BHK21, HeLa
PLC-γ	MO7e
Raf1	MO7e
Ras	MO7e
SHP-1	MO7e
SHP2 (Syp)	MO7e
Tec	MO7e
Vav	MO7e, TF-1