

(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2020-506920

(P2020-506920A)

(43) 公表日 令和2年3月5日(2020.3.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/426 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/426	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	
<b>A 6 1 P 3/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/00	
<b>A 6 1 P 1/16 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/16 1 0 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-541179 (P2019-541179)	(71) 出願人	503067111 ジェンフィ GENFIT フランス エフ-59120 ロス アヴ ェニュー ウジェーヌ アヴィネ 885 パルク ユーラサンテ
(86) (22) 出願日	平成30年1月29日 (2018.1.29)	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	令和1年9月18日 (2019.9.18)	(72) 発明者	フカール, コリーヌ フランス国、59110・ラ・マドレーヌ 、リュ・サン・ピクトル・137
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/052159	(72) 発明者	ウォークザック, ロベール フランス国、59000・リール、リュ・ ドルゼンヌ・13・べ、レジダンス・パル ク・ディリー
(87) 国際公開番号	W02018/138352		
(87) 国際公開日	平成30年8月2日 (2018.8.2)		
(31) 優先権主張番号	17305094.9		
(32) 優先日	平成29年1月27日 (2017.1.27)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	17305268.9		
(32) 優先日	平成29年3月13日 (2017.3.13)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組合せ療法のための医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は、組合せ製品及び治療におけるその使用に関する。

## 【特許請求の範囲】

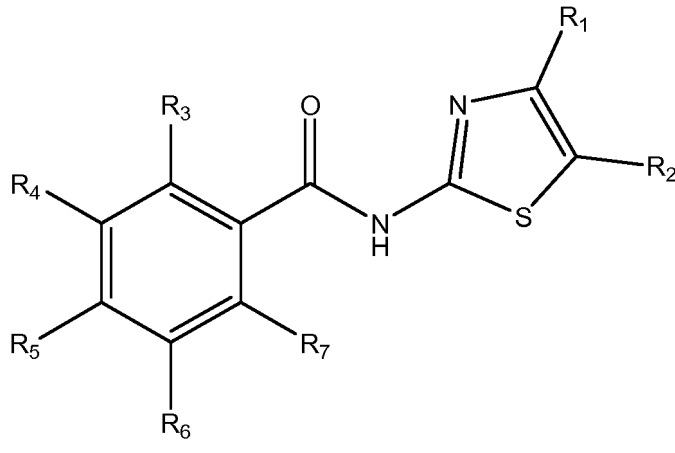
## 【請求項 1】

( i ) N T Z 及びこの類縁体から選択される化合物；並びに  
 ( i i ) 少なくとも 1 つの P P A R アゴニスト  
 を含む、組合せ物。

## 【請求項 2】

成分 ( i ) が、式 ( I ) :

## 【化 1】



10

20

[ 式中、

R 1 は、水素原子 ( H )、重水素原子 ( D )、ハロゲン原子、( C 6 ~ C 1 4 ) アリー  
 ル基、複素環基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、スル  
 ホニル基、スルホキシド基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルカルボニル基、( C 1 ~ C 6 ) アル  
 キルオキシ基、カルボキシル基、カルボキシレート基、NO<sub>2</sub> 基、NH<sub>2</sub> 基、( C 1 ~ C  
 6 ) アルキルアミノ基、アミド基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルアミド基、( C 1 ~ C 6 ) ジ  
 アルキルアミド基を表し、

R 2 は、水素原子、重水素原子、NO<sub>2</sub> 基、( C 6 ~ C 1 4 ) アリール基、複素環基、  
 ハロゲン原子、( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基、( C 2  
 ~ C 6 ) アルキニル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルオキシ基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルチオ  
 基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルカルボニル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルカルボニルアミノ  
 基、( C 6 ~ C 1 4 ) アリールカルボニルアミノ基、カルボキシル若しくはカルボキシレ  
 ート基、アミド基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルアミド基、( C 1 ~ C 6 ) ジアルキルアミド  
 基、NH<sub>2</sub> 基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルアミノ基を表し、又は、

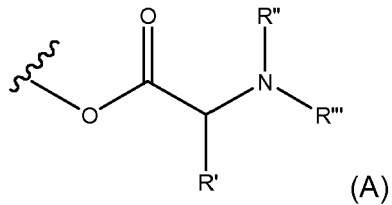
30

R 1 及び R 2 は、これらが結合している炭素原子と一緒にあって、置換若しくは非置換  
 5 ~ 8 員のシクロアルキル、複素環若しくはアリール基を形成し、

R 3 は、水素原子、重水素原子、ハロゲン原子、O - R 8 基、( C 1 ~ C 6 ) アルキル  
 カルボニル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルオキシ基、( C 1 ~  
 C 6 ) アルキルチオ基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルカルボニルオキシ基、( C 6 ~ C 1 4 )  
 アリールオキシ基、( C 6 ~ C 1 4 ) アリール基、複素環基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロア  
 ルキル基、NO<sub>2</sub>、スルホニルアミノアルキル基、NH<sub>2</sub> 基、アミノ ( C 1 ~ C 6 ) アル  
 キル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルカルボニルアミノ基、カルボキシル基、カルボキシレ  
 ート基、アミノ酸 ( ここで、該アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパ  
 ラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシ  
 ン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン  
 、トリプトファン、チロシン、バリンからなる群から選択される。 )、又は、式 ( A ) :

40

## 【化 2】



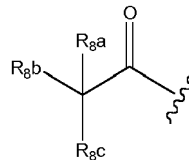
(式中、

R' は、(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 2 ~ C 6) アルケニル基、(C 2 ~ C 6) アルキニル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキルアルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル(C 2 ~ C 6) アルケニル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルケニル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルケニル(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルケニル(C 2 ~ C 6) アルケニル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルケニル(C 2 ~ C 6) アルキニル基を表し；

R'' 及び R''' は、独立して、水素原子、(C 1 ~ C 6) アルキル基又は窒素保護基を表す。)

の部分を表し、R 8 は、水素原子、重水素原子、又は

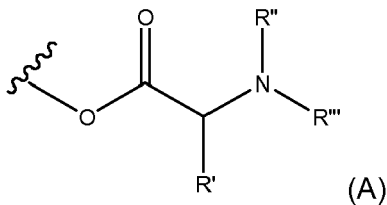
## 【化 3】



基を表し、ここで、R 8 a、R 8 b 及び R 8 c は、同一であるか又は異なって、水素原子又は重水素原子を表し、

R 4、R 5、R 6 及び R 7 は、同一であるか又は異なって、水素原子、重水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、(C 1 ~ C 6) アルキルカルボニル基、(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 1 ~ C 6) アルキルオキシ基、(C 1 ~ C 6) アルキルチオ基、(C 1 ~ C 6) アルキルカルボニルオキシ基、(C 6 ~ C 1 4) アリールオキシ基、(C 6 ~ C 1 4) アリール基、複素環基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基、NO<sub>2</sub>、スルホニルアミノ(C 1 ~ C 6) アルキル基、NH<sub>2</sub>基、アミノ(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 1 ~ C 6) アルキルカルボニルアミノ基、カルボキシル基、カルボキシレート基、アミノ酸(該アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、パリンからなる群から選択される。)、又は、式(A)：

## 【化 4】



(式中、

R' は、(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 2 ~ C 6) アルケニル基、(C 2 ~ C 6) アルキニル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル(C 1 ~ C 6) アルケニル基

、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルケニル基、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルケニル(C 1 ~ C 6)アルキル基、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルケニル(C 2 ~ C 6)アルケニル基、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルケニル(C 2 ~ C 6)アルキニル基を表し；

R''及びR'''は、独立して、水素原子、(C 1 ~ C 6)アルキル基又は窒素保護基を表す。)

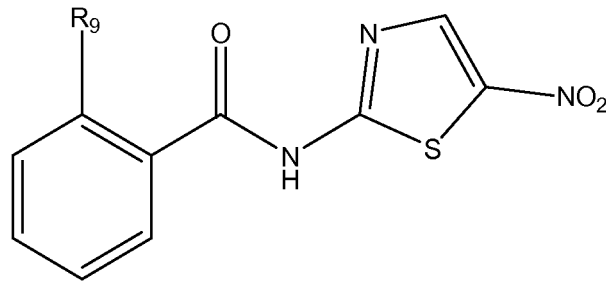
の部分を表す。]

の化合物又は薬学的に許容されるその塩である、請求項 1 に記載の組合せ物。

【請求項 3】

成分(i)が、式(II)：

【化 5】



(II)

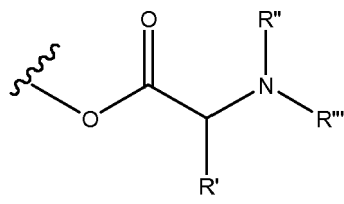
10

20

[式中、

R<sub>9</sub>は、水素原子、重水素原子、O-R<sub>8</sub>基(R<sub>8</sub>は、上で定義されているとおりである。)、アミノ酸(該アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリンからなる群から選択される。)、又は、式(A)：

【化 6】



(A)

30

(式中、

R'は、(C 1 ~ C 6)アルキル基、(C 2 ~ C 6)アルケニル基、(C 2 ~ C 6)アルキニル基、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルキル基、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルキル(C 1 ~ C 6)アルケニル基、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルケニル基、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルケニル(C 1 ~ C 6)アルキル基、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルケニル(C 2 ~ C 6)アルケニル基、(C 3 ~ C 1 4)シクロアルケニル(C 2 ~ C 6)アルキニル基を表し；

40

R''及びR'''は、独立して、水素原子、(C 1 ~ C 6)アルキル基又は窒素保護基を表す。)

の部分を表す。]

の化合物又は薬学的に許容されるその塩である、請求項 1 又は 2 に記載の組合せ物。

【請求項 4】

成分(i)が、ニタゾキサニド、チゾキサニド、[(5-ニトロ-1,3-チアゾール-2-イル)カルバモイル]フェニル(d3)エタノエート、2-[(5-ニトロ-1,3-チアゾール-2-イル)カルバモイル]フェニル(d2)エタノエート；又は2-[(5-ニトロ-1,3-チアゾール-2-イル)カルバモイル]フェニル(d1)エタノエート、(S)-2-(5-ニトロチアゾール-2-イルカルバモイル)フェニル 2

50

- アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート塩酸塩 ) 及び ( ( 2 S , 3 S ) - 2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 - メチルペンタノエート塩酸塩 ) 又は薬学的に許容されるその塩から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 5】

成分 ( i i ) が、

少なくとも 1 つの P P A R アルファアゴニスト ;

少なくとも 1 つの P P A R ガンマアゴニスト ;

少なくとも 1 つの P P A R デルタアゴニスト ;

少なくとも 1 つの P P A R アルファ / デルタ二重アゴニスト ;

少なくとも 1 つの P P A R アルファアゴニスト及び少なくとも 1 つの P P A R デルタアゴニスト ;

少なくとも 1 つの P P A R アルファ / ガンマ二重アゴニスト ;

少なくとも 1 つの P P A R アルファアゴニスト及び少なくとも 1 つの P P A R ガンマアゴニスト ;

少なくとも 1 つの P P A R ガンマ / デルタ二重アゴニスト ;

少なくとも 1 つの P P A R ガンマアゴニスト及び少なくとも 1 つの P P A R デルタアゴニスト ;

少なくとも 1 つの P P A R アルファ / ガンマ / デルタ パンアゴニスト ; 並びに

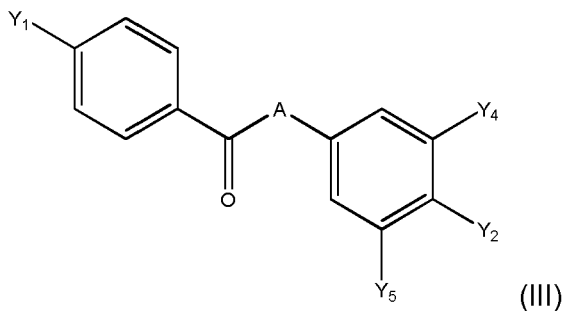
少なくとも 1 つの P P A R アルファアゴニスト、少なくとも 1 つの P P A R ガンマアゴニスト及び少なくとも 1 つの P P A R デルタアゴニスト

から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 6】

少なくとも 1 つの P P A R アゴニストが、式 ( I I I ) :

【化 7】



[ 式中、

Y 1 は、ハロゲン、R a 又は G a - R a 基を表し ;

A は、C H = C H 又は C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> 基を表し ;

Y 2 は、G b - R b 基を表し ;

G a 及び G b は、同一であるか又は異なって、酸素又は硫黄の原子を表し ;

R a は、水素原子、非置換 ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 6 ~ C 1 4 ) アリール基、又は 1 つ以上のハロゲン原子、( C 1 ~ C 6 ) アルコキシ若しくは ( C 1 ~ C 6 ) アルキルチオ基により置換されている ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキルチオ基、又は複素環基を表し ;

R b は、少なくとも - C O O R c 基により置換されている ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基を表し、ここで、R c は、水素原子、又は 1 つ以上のハロゲン原子により置換されているか若しくは置換されていない ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基、又は複素環基を表し ; 並びに

Y 4 及び Y 5 は、同一であるか又は異なって、1 つ以上のハロゲン原子により置換されているか若しくは置換されていない ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基、又は複素環基を表す。 ]

の化合物又は薬学的に許容されるその塩である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 7】

成分 ( i i ) が、エラフィブラノール、セラデルパル、サログリタザル及びラニフィブラノール、又は薬学的に許容されるその塩から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 8】

( i ) ニタゾキサニド、チゾキサニド、[ ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) カルバモイル ] フェニル ( d 3 ) エタノエート、2 - [ ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) カルバモイル ] フェニル ( d 2 ) エタノエート；又は 2 - [ ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) カルバモイル ] フェニル ( d 1 ) エタノエート、( ( S ) - 2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート塩酸塩 ) 及び ( ( 2 S , 3 S ) - 2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 - メチルペンタノエート塩酸塩 ) から；又は薬学的に許容されるその塩から選択される化合物；並びに ( i i ) エラフィブラノール若しくは薬学的に許容されるその塩を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組合せ物。

10

【請求項 9】

前記組合せ物が、成分 i ) 及び i i ) 、並びに薬学的に許容される担体を含む組成物である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組合せ物。

20

【請求項 10】

前記組合せ物が、連続、分離又は同時使用のための、成分 i ) 及び i i ) を含むキットオブパーツ ( k i t o f p a r t s ) である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 11】

ビルフェニドン、又はニンテダニブ、ソラフェニブ及び他の R T K I のような受容体チロシンキナーゼ阻害剤 ( R T K I ) 、又はアンジオテンシン I I ( A T 1 ) 受容体遮断薬、又は C T G F 阻害剤、又は M M P 2 、 M M P 9 、 T H B S 1 若しくは細胞表面インテグリンのような潜伏性 T G F 複合体の活性化剤を含む T G F 及び B M P 活性化経路を妨害しやすい任意の抗線維化化合物、T G F 受容体 I 型 ( T G F B R I ) 若しくは I I 型 ( T G F B I I ) 及び T G F 、アクチビン、インヒビン、N o d a l 、抗ミューラー管ホルモン、G D F 若しくは B M P のようなそれらのリガンド、補助共受容体 ( I I I 型受容体としても知られる ) 又は調節性若しくは阻害性 S M A D タンパク質を含む S M A D 依存性キャノニカル経路の成分、又は M A P K シグナル伝達の種々の分岐を含む S M A D 非依存性若しくは非キャノニカル経路のメンバー、T A K 1 、 R h o 様 G T P アーゼシグナル伝達経路、ホスファチジルイノシトール - 3 キナーゼ / A K T 経路、T G F 誘導 E M T プロセス、又は H h リガンド若しくは標的遺伝子を含むキャノニカル及び非キャノニカルヘッジホッグシグナル伝達経路、又は T G F に影響を与えやすい W N T 若しくは N o t c h 経路の任意のメンバーから選択される公知の抗線維化活性を有する少なくとも 1 つの治療的活性剤をさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組合せ物。

30

40

【請求項 12】

J A K / S T A T 阻害剤並びに他の抗炎症性及び / 又は免疫抑制剤から選択される少なくとも 1 つの治療的活性剤をさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 13】

治療的活性剤が、グルココルチコイド、N S A I D S 、シクロホスファミド、ニトロソウレア、葉酸類縁体、プリン類縁体、ピリミジン類縁体、メトトレキサート、アザチオプリン、メルカプトプリン、シクロスポリン、ミリオシン、タクロリムス、シロリムス、ミコフェノール酸誘導體、フィンゴリモド及び他のスフィンゴシンーリン酸受容体モジュレーター、炎症性サイトカイン及び炎症性サイトカイン受容体、T 細胞受容体並びにインテグ

50

リンのような標的に対するモノクローナル及び/又はポリクローナル抗体から選択される、請求項12に記載の組合せ物。

【請求項14】

成分(i)及び(ii)が、持効性及び/又は徐放性放出のために、注射可能な懸濁液、ジェル、オイル、ピル、錠剤、坐薬、粉末、カプセル、エアロゾル、軟膏、クリーム、パッチ、又はガレヌス形態の手段で製剤化される、請求項1～13のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項15】

薬物として使用するための、請求項1～14のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項16】

炎症性、代謝性、線維性及び胆汁うっ滞性疾患を治療するための方法において使用するための、請求項1～14のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項17】

線維性障害が、肝臓、腎臓、皮膚、表皮、内皮、筋肉、腱、軟骨、心臓、膵臓、肺、子宮、神経系、精巣、卵巣、副腎、動脈、静脈、結腸、腸(例えば、小腸)、胆道、軟部組織(例えば、縦隔又は後腹膜)、骨髄、関節及び胃線維症、特に肝臓、腸、肺、心臓、腎臓、筋肉、皮膚、軟部組織、骨髄、腸、及び関節線維症からなる群において選択される、請求項16に記載の使用のための組合せ物。

【請求項18】

疾患が、代謝性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NAFLD)、薬剤誘発性肝疾患、アルコール誘発性肝疾患、感染病原体誘発性肝疾患、炎症性肝疾患、免疫系機能障害媒介肝疾患、脂質異常症、循環器疾患、再狭窄、シンドロームX、メタボリックシンドローム、糖尿病、肥満、高血圧、原発性硬化性胆管症(PSD)及び原発性胆汁性胆管炎(PBC)のような慢性胆管症からなる群において選択される、請求項16に記載の使用のための組合せ物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療のためのPPARアゴニストと組み合わせたニタゾキサニド(NTZ)又はその誘導体の組合せに関する。

【背景技術】

【0002】

[2-[ (5-ニトロ-1,3-チアゾール-2-イル)カルバモイル]フェニル]エタノエート(又はニタゾキサニド、又はNTZ)は1975年に初めて記載され(Rossignol and Cavier, 1975年)、嫌気性原生動物、蠕虫及び嫌気性と好気性細菌の両方を含む広範囲の微生物に対して高度に効果的であることが明らかにされた(Rossignol and Maisonneuve, 1984年; Dubreuil, Houckes, 1996年; Megraud, Occhialini, 1998年; Fox and Saravolatz, 2005年; Pankuch and Appelbaum, 2006年; Finegold, Molitoris, 2009年)。ニタゾキサニドは腸管寄生条虫の処置のために人において初めて研究され(Rossignol and Maisonneuve, 1984年)、合衆国では現在、寄生原虫クリプトスポリジウム・パルバム及びジアルジア・インテスティナリスにより引き起こされる下痢の処置用に認可されている(Alinia(登録商標)、Romark Laboratories)。NTZは、ラテンアメリカ及びインドで広く商品化されており、そこではNTZは広域スペクトルの腸内寄生性感染症の処置に必要とされている(Hemphill, Mueller, 2006年)。NTZがその抗寄生虫活性を発揮する提唱されている作用機序は、嫌気性代謝に不可欠であるピルベート：フェレドキシンオキシドレダクターゼ(PFOR)酵素依存性電子移動反応の阻害を通じてである(Hoffman, Sisson, 2007年)。NTZはマイコバクテリウム・ツベル

10

20

30

40

50

कोरोシスに対する活性も示し、この菌は P F O R の相同体を持たず、したがって、別の作用機序が示唆される。実際、筆者らは、N T Z が、膜電位及び生体内部 p H 恒常性を攪乱する脱共役剤としての機能も果たすことが可能であることを明らかにした ( d e C a r v a l h o 、 D a r b y ら、2011年)。

#### 【0003】

N T Z の薬理効果はその抗寄生虫又は抗菌活性に限定されてはならず、最近、いくつかの研究により、N T Z が抗ウイルス活性も与えることが可能であることが明らかにされた ( D i S a n t o a n d E h r i s m a n 、2014年; R o s s i g n o l 、2014年)。N T Z は、赤血球凝集素 (インフルエンザ) 若しくは V P 7 (ロタウイルス) タンパク質の成熟の遮断又は自然免疫応答に關与しているタンパク質 P K R の活性化を含む多様なやり方でウイルス複製を妨げる (概論は、R o s s i g n o l 、2014年を参照)。N T Z は、極めて重要な代謝及び細胞死促進 ( p r o d e a t h ) シグナル伝達経路を妨げることにより広い抗がん特性を有することも明らかにされた ( D i S a n t o a n d E h r i s m a n 、2014年)。

10

#### 【0004】

P P A R ( 、 / (本明細書では、 後) 及び ) はホルモン活性化核内受容体ファミリーに属する。P P A R 又は「ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体」は、以下のリガンド: ステロイド / 甲状腺ホルモン / レチノイドにより活性化される転写因子のスーパーファミリーに由来する核内受容体である。現在まで、マウス及びヒトにおいて3つの P P A R アイソタイプ: P P A R 、 P P A R 及び P P A R が同定されている。ヒトにおける P P A R / 発現は遍在すると思われるが、P P A R 及び は差次的な組織分布を示す ( B r a i s s a n t O a n d W a h l i W 、1998年)。P P A R は、高脂肪酸異化活性がある細胞において及び高ペルオキシソーム活性がある細胞において発現される (肝細胞、心筋細胞、腎近位尿管、腸管粘膜)。P P A R / は大半の組織において遍在性に及び豊富に発現される。P P A R 発現に関しては、主に脂肪細胞、ある特定の免疫系細胞及び網膜に限られており、他の器官には微量にしか存在しない ( B r a i s s a n t O a n d W a h l i W 、1998年)。

20

#### 【0005】

P P A R を例にとると、その作用は脂質低下効果があるフィブラートのような化合物のクラスにより媒介される。例えば、脂肪酸、エイコサノイド (ロイコトリエン B 4 ) 及び 8 ( S ) - ヒドロキシエイコサテトラエン酸のような天然のリガンドも同定されている ( K l i e w e r S A ら、1997年)。P P A R は主に脂質及びグルコース代謝に關連付けられている。フィブラートのような P P A R 活性化因子は、P P A R の活性化を介して血漿コレステロール及びトリグリセリド濃度の調節を可能にする ( H o u r t o n D ら、2001年)。フィブラート療法により肝臓において脂肪酸酸化が増加する。フィブラートはトリグリセリドの合成も減らす ( S t a e l s B a n d A u w e r x J 、1998年)。P P A R 活性化因子は、高血糖及びインスリンレベルを修正することもできる。フィブラートは、食物摂取及びレプチン遺伝子発現とは無関係である機序を通じて脂肪組織量を低減もする ( G u e r r e - M i l l o M ら、2000年)。P P A R アゴニストの治療的関心は、2型糖尿病の処置において広く調査されてきた ( S p i e g e l m a n B M 、1998年)。P P A R アゴニストは、2型糖尿病の動物モデルでもヒトでも標的組織においてインスリン感受性を回復させ血漿グルコース、脂質及びインスリンレベルを低減することが明らかにされた ( R a m V J 、2003年)。リガンドによる P P A R 活性化は、炎症、血管新生、細胞増殖及び分化、アポトーシスのようなプロセスに關与する遺伝子の発現並びに i N O S 、 M M P アーゼ及び T I M P の活性を調節するのも役割を果たす。ケラチノサイトにおける P P A R a の活性化により、ケラチノサイトの増殖及び分化に關与する遺伝子の発現が休止する ( K o m u v e s L G ら、2000年)。P P A R は抗炎症特性を有する。なぜならば、P P A R は、N F - B のような他の転写因子又は S T A T 及び A P - 1 のような転写活性化因子を含む転写機構にネガティブに干渉するからである ( D e s v e r g n e B a n d W a h l

30

40

50



i W、1999年)。前記抗炎症及び抗増殖特性があるのでPPAR（特にPPAR）は、血管閉塞性疾患（アテローム性動脈硬化、等）、高血圧、血管新生に係る疾患（糖尿病性網膜症、等）、炎症性疾患（炎症性腸疾患、乾癬、等）及び新生物疾患（発がん、等）のような疾患の処置のための興味深い治療標的になっている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Rossignol and Cavier、1975年

【非特許文献2】Rossignol and Maisonneuve、1984年

【非特許文献3】Dubreuil、Houckes、1996年

10

【非特許文献4】Megraud、Occhialini、1998年

【非特許文献5】Fox and Saravolatz、2005年

【非特許文献6】Pankuch and Appelbaum、2006年

【非特許文献7】Finegold、Molitoris、2009年

【非特許文献8】Hemphill、Mueller、2006年

【非特許文献9】Hoffman、Sisson、2007年

【非特許文献10】de Carvalho、Darby、2011年

【非特許文献11】Di Santo and Ehrisman、2014年

【非特許文献12】Rossignol、2014年

【非特許文献13】Braisant O and Wahli W、1998年

20

【非特許文献14】Kliwer SA、1997年

【非特許文献15】Hourton D、2001年

【非特許文献16】Stael B and Auwerx J、1998年

【非特許文献17】Guerre-Millo M、2000年

【非特許文献18】Spiegelman BM、1998年

【非特許文献19】Ram VJ、2003年

【非特許文献20】Komuves LG、2000年

【非特許文献21】Desvergne B and Wahli W、1999年

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0007】

本発明は、NTZ類似体とPPARアゴニストの新規組合せ並びに治療における、特に炎症性、代謝性、線維性及び胆汁うっ滞性疾患の処置におけるその使用を説明する。

【0008】

本発明者は、NTZ、合成抗原虫薬若しくはその誘導体又はその代謝物をPPARアゴニストと組み合わせると、治療において、特に免疫、炎症性、代謝性、線維性及び胆汁うっ滞性疾患の処置に有用である治療活性を示すことを見出した。

【0009】

したがって、本発明は、

(i) NTZ及びこの類似体から選択される化合物；並びに

40

(ii) 少なくとも1つのPPARアゴニスト

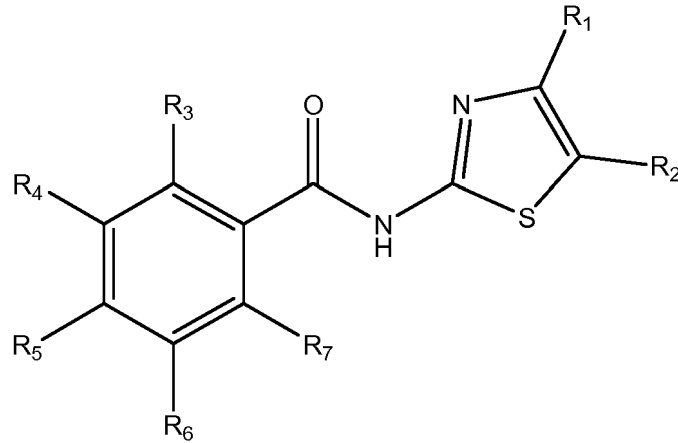
を含む組合せ物に関する。

【0010】

特定の実施形態では、組合せ製品の成分(i)の化合物は式(I)：

【0011】

## 【化 1】



10

[ 式中、

R 1 は、水素原子 ( H )、重水素原子 ( D )、ハロゲン原子、( C 6 ~ C 1 4 ) アリー  
ル基、複素環基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、スル  
ホニル基、スルホキシド基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルカルボニル基、( C 1 ~ C 6 ) アル  
キルオキシ基、カルボキシ基、カルボキシレート基、ニトロ基 ( NO<sub>2</sub> )、アミノ基 (

20

NH<sub>2</sub> )、( C 1 ~ C 6 ) アルキルアミノ基、アミド基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルアミド  
基、( C 1 ~ C 6 ) ジアルキルアミド基を表し、  
R 2 は、水素原子、重水素原子、NO<sub>2</sub> 基、( C 6 ~ C 1 4 ) アリール基、複素環基、  
ハロゲン原子、( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基、( C 2  
~ C 6 ) アルキニル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルオキシ基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルチオ  
基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルカルボニル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルカルボニルアミノ基  
、( C 6 ~ C 1 4 ) アリールカルボニルアミノ基、カルボキシ基若しくはカルボキシレ  
ート基、アミド基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルアミド基、( C 1 ~ C 6 ) ジアルキルアミド  
基、NH<sub>2</sub> 基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルアミノ基を表し、

又は

R 1 及び R 2 は、これらが結合している炭素原子と一緒に、置換若しくは非置換 5 ~ 8  
員のシクロアルキル、複素環若しくはアリール基を形成し、

30

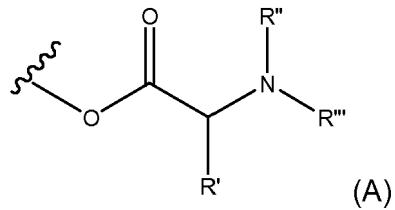
R 3、R 4、R 5、R 6 及び R 7 は、同一であるか又は異なって、水素原子、重水素原  
子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルカルボニル基、( C 1 ~ C  
6 ) アルキル基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルオキシ基、( C 1 ~ C 6 ) アルキルチオ基、( C  
1 ~ C 6 ) アルキルカルボニルオキシ基、( C 6 ~ C 1 4 ) アリールオキシ基、( C 6  
~ C 1 4 ) アリール基、複素環基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基、NO<sub>2</sub> 基、スル  
ホニルアミノアルキル基、NH<sub>2</sub> 基、アミノ ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 1 ~ C 6 )  
アルキルカルボニルアミノ基、カルボキシ基、カルボキシレート基又は R 9 基を表し；

R 9 は、O - R 8 基、又はアミノ酸 ( 該アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラ  
ギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン  
、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン  
、スレオニン、トリプトファン、チロシン、パリンからなる群から選択される。 )、又は  
式 ( A ) :

40

【 0 0 1 2 】

## 【化 2】



(式中、R' は (C1 ~ C6) アルキル基、(C2 ~ C6) アルケニル基、(C2 ~ C6) アルキニル基、(C3 ~ C14) シクロアルキル基、(C3 ~ C14) シクロアルキルアルキル基、(C3 ~ C14) シクロアルキル (C2 ~ C6) アルケニル基、(C3 ~ C14) シクロアルケニル基、(C3 ~ C14) シクロアルケニル (C1 ~ C6) アルキル基、(C3 ~ C14) シクロアルケニル (C2 ~ C6) アルケニル基、(C3 ~ C14) シクロアルケニル (C2 ~ C6) アルキニル基を表し；

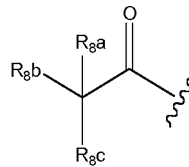
R'' 及び R''' は、独立して、水素原子、(C1 ~ C6) アルキル基又は窒素保護基を表す。)

の部分を表し、

R8 は、水素原子、重水素原子、グルクロニジル基又は

【0013】

【化 3】



基を表し、ここで、R8a、R8b 及び R8c は、同一であるか又は異なって、水素原子又は重水素原子を表す。)

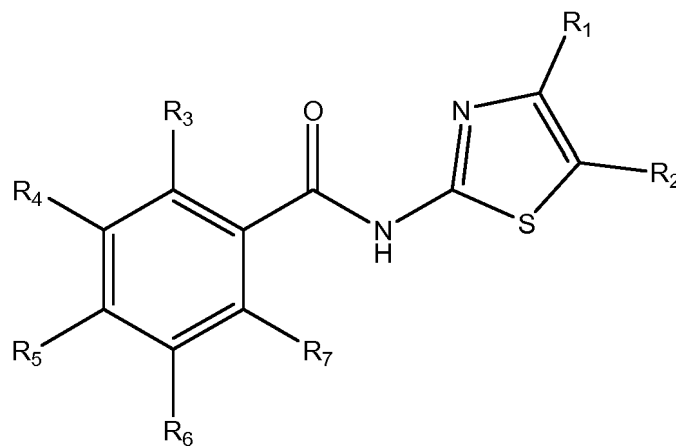
の化合物又は薬学的に許容されるその塩である。

【0014】

さらなる特定の実施形態では、組合せ物の成分 (i) の化合物は式 (I) :

【0015】

【化 4】



[ 式中、

R1 は、水素原子 (H)、重水素原子 (D)、ハロゲン原子、(C6 ~ C14) アリール基、複素環基、(C3 ~ C14) シクロアルキル基、(C1 ~ C6) アルキル基、スルホニル基、スルホキシド基、(C1 ~ C6) アルキルカルボニル基、(C1 ~ C6) アル

10

20

30

40

50

キルオキシ基、カルボキシル基、カルボキシレート基、NO<sub>2</sub>基、NH<sub>2</sub>基、(C1~C6)アルキルアミノ基、アミド基、(C1~C6)アルキルアミド基、(C1~C6)ジアルキルアミド基を表し、

R<sub>2</sub>は、水素原子、重水素原子、NO<sub>2</sub>基、(C6~C14)アリアル基、複素環基、ハロゲン原子、(C1~C6)アルキル基、(C3~C14)シクロアルキル基、(C2~C6)アルキニル基、(C1~C6)アルキルオキシ基、(C1~C6)アルキルチオ基、(C1~C6)アルキルカルボニル基、(C1~C6)アルキルカルボニルアミノ基、(C6~C14)アリアルカルボニルアミノ基、カルボキシル酸若しくはカルボキシレート基、アミド基、(C1~C6)アルキルアミド基、(C1~C6)ジアルキルアミド基、NH<sub>2</sub>基、(C1~C6)アルキルアミノ基を表し、

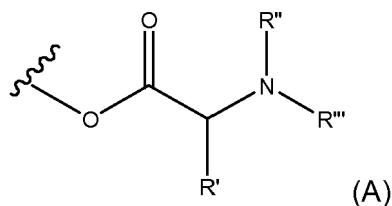
又は

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、これらが結合している炭素原子と一緒に、置換若しくは非置換5~8員のシクロアルキル、複素環若しくはアリアル基を形成し、

R<sub>3</sub>は、水素原子、重水素原子、ハロゲン原子、O-R<sub>8</sub>基、(C1~C6)アルキルカルボニル基、(C1~C6)アルキル基、(C1~C6)アルキルオキシ基、(C1~C6)アルキルチオ基、(C1~C6)アルキルカルボニルオキシ基、(C6~C14)アリアルオキシ基、(C6~C14)アリアル基、複素環基、(C3~C14)シクロアルキル基、NO<sub>2</sub>、スルホニルアミノアルキル基、NH<sub>2</sub>基、アミノ(C1~C6)アルキル基、(C1~C6)アルキルカルボニルアミノ基、カルボキシル基、カルボキシレート基、アミノ酸(該アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、パリンからなる群から選択される。)、又は式(A):

【0016】

【化5】



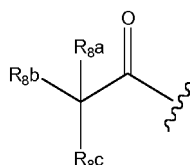
(式中、R'は、(C1~C6)アルキル基、(C2~C6)アルケニル基、(C2~C6)アルキニル基、(C3~C14)シクロアルキル基、(C3~C14)シクロアルキルアルキル基、(C3~C14)シクロアルキル(C2~C6)アルケニル基、(C3~C14)シクロアルケニル基、(C3~C14)シクロアルケニル(C1~C6)アルキル基、(C3~C14)シクロアルケニル(C2~C6)アルケニル基、(C3~C14)シクロアルケニル(C2~C6)アルキニル基を表し；

R''及びR'''は、独立して、水素原子、(C1~C6)アルキル基又は窒素保護基を表す。)

の部分を表し、R<sub>8</sub>は、水素原子、重水素原子、又は

【0017】

【化6】



基を表し、ここで、R<sub>8a</sub>、R<sub>8b</sub>及びR<sub>8c</sub>は、同一であるか又は異なって、水素原子

10

20

30

40

50

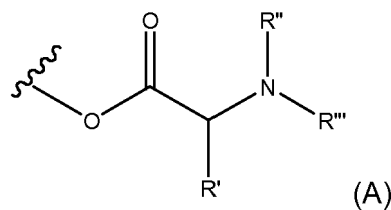
又は重水素原子を表し、

R 4、R 5、R 6 及び R 7 は、同一であるか又は異なって、水素原子、重水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、(C 1 ~ C 6) アルキルカルボニル基、(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 1 ~ C 6) アルキルオキシ基、(C 1 ~ C 6) アルキルチオ基、(C 1 ~ C 6) アルキルカルボニルオキシ基、(C 6 ~ C 1 4) アリールオキシ基、(C 6 ~ C 1 4) アリール基、複素環基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基、NO<sub>2</sub>、スルホニルアミノ(C 1 ~ C 6) アルキル基、NH<sub>2</sub>基、アミノ(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 1 ~ C 6) アルキルカルボニルアミノ基、カルボキシ基、カルボキシレート基、アミノ酸(該アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリンからなる群から選択される。)、又は式(A)：

10

【0018】

【化7】



20

(式中、R' は、(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 2 ~ C 6) アルケニル基、(C 2 ~ C 6) アルキニル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルケニル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルケニル(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルケニル(C 2 ~ C 6) アルケニル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルケニル(C 2 ~ C 6) アルキニル基を表し；R'' 及び R''' は、独立して、水素原子、(C 1 ~ C 6) アルキル基又は窒素保護基を表す。)

の部分を表す。]

の化合物又は薬学的に許容されるその塩である。

30

【0019】

特定の実施形態では、本発明の式(I)の化合物において：

(C 1 ~ C 6) アルキル基は、置換又は非置換(C 1 ~ C 6) アルキル基、特に置換又は非置換(C 1 ~ C 4) アルキル基でもよく；

(C 2 ~ C 6) アルキニル基は、置換又は非置換(C 2 ~ C 6) アルキニル基でもよく；

(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基は、置換又は非置換(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基でもよく；

(C 1 ~ C 6) アルキルオキシ基は、置換又は非置換(C 1 ~ C 4) アルキルオキシ基のような置換又は非置換でもよく；

(C 1 ~ C 6) アルキルチオ基は、置換又は非置換(C 1 ~ C 4) アルキルチオ基のような置換又は非置換でもよく；

40

(C 1 ~ C 6) アルキルアミノ基は、(C 1 ~ C 4) アルキルアミノ基でもよく；

(C 1 ~ C 6) ジアルキルアミノ基は、(C 1 ~ C 4) ジアルキルアミノ基でもよく；

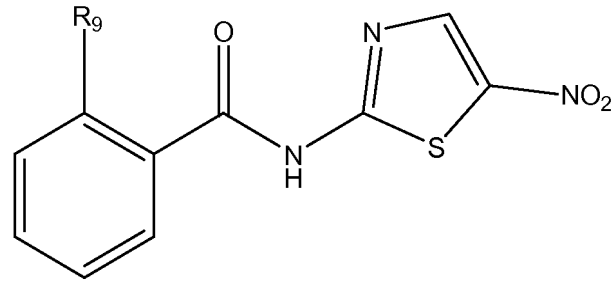
(C 6 ~ C 1 4) アリール基は、置換又は非置換(C 6 ~ C 1 4) アリール基でもよく；複素環基は、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル又はヘテロアリール基でもよい。

【0020】

特定の実施形態では、組合せ物の成分(i)の化合物は式(II)：

【0021】

【化 8】

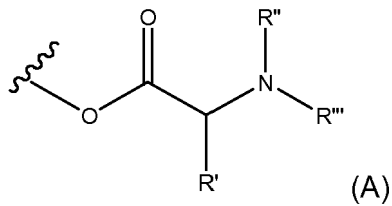


10

[ 式中、R<sub>9</sub> は、水素原子、重水素原子、O - R<sub>8</sub> 基 ( R<sub>8</sub> は上で定義されているとおりである。 )、又はアミノ酸 ( 該アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリンからなる群から選択される。 )、又は式 ( A ) :

【 0 0 2 2 】

【化 9】



20

( 式中、R' は、( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 2 ~ C 6 ) アルケニル基、( C 2 ~ C 6 ) アルキニル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル ( C 1 ~ C 6 ) アルケニル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルケニル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルケニル ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルケニル ( C 2 ~ C 6 ) アルケニル基、( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルケニル ( C 2 ~ C 6 ) アルキニル基を表し ; R'' 及び R''' は、独立して、水素原子、( C 1 ~ C 6 ) アルキル基又は窒素保護基を表す。 )

30

の部分を表す。]

の化合物である。

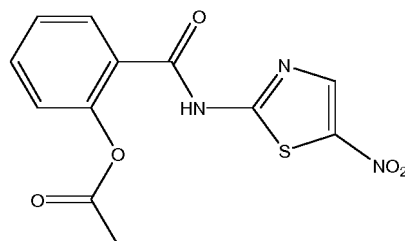
【 0 0 2 3 】

特定の実施形態では、本発明の組合せ物の成分 ( i ) は :

・ N T Z :

【 0 0 2 4 】

【化 1 0】

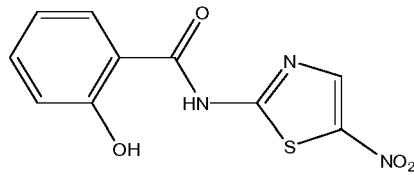


40

・ チゾキサニド :

【 0 0 2 5 】

【化 1 1】



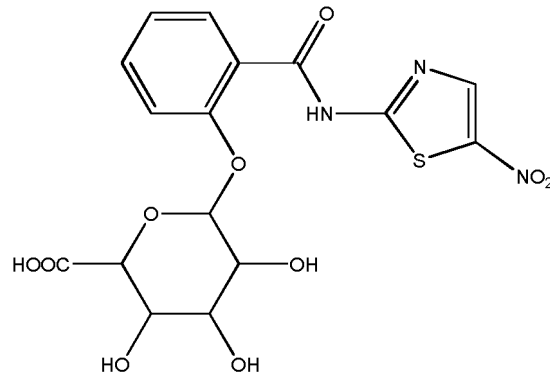
又は

・チゾキサニドグルクロニド ( T Z G ) :

10

【 0 0 2 6】

【化 1 2】



20

から選択される。

【 0 0 2 7】

別の実施形態では、組合せ物の成分 ( i ) は式 ( I ) 又は ( I I )

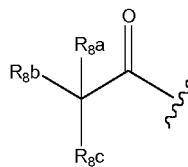
[ 式中、

R 8 は、水素原子、重水素原子若しくは

【 0 0 2 8】

30

【化 1 3】



基を表し、ここで、R 8 a、R 8 b 及び R 8 c は、同一であるか若しくは異なって、水素原子若しくは重水素原子を表し、及び / 又は

R 1、R 2、R 2 a、R 2 b、R 2 c、R 3、R 4、R 5 及び R 6 は同時に水素原子ではないという条件で、R 1、R 3、R 4、R 5 及び R 6 は、同一であるか若しくは異なって、水素原子若しくは重水素原子を表す。]

40

の化合物である。

【 0 0 2 9】

特定の実施形態では、成分 ( i ) は [ ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) カルバモイル ] フェニル ( d 3 ) エタノエート、2 - [ ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) カルバモイル ] フェニル ( d 2 ) エタノエート ; 又は 2 - [ ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) カルバモイル ] フェニル ( d 1 ) エタノエートである。

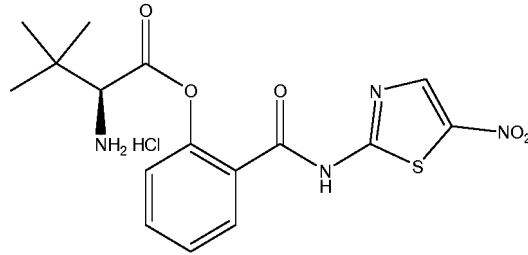
【 0 0 3 0】

50

別の特定の実施形態では、成分 (i) は、( (S) - 2 - (5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート塩酸塩 ) ( R M 5 0 6 1 ) 又は式 :

【 0 0 3 1 】

【 化 1 4 】



10

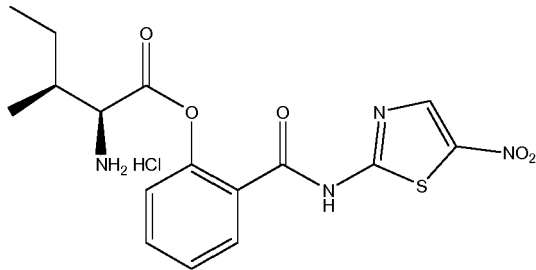
である。

【 0 0 3 2 】

別の特定の実施形態では、成分 (i) は、式 :

【 0 0 3 3 】

【 化 1 5 】



20

の ( (2S,3S) - 2 - (5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル) フェニル 2 - アミノ - 3 - メチルペンタノエート塩酸塩 ) ( R M 5 0 6 6 ) である。

【 0 0 3 4 】

さらなる特定の実施形態では、PPARアゴニストは、PPARアルファアゴニスト、PPARガンマアゴニスト、PPARデルタアゴニスト、PPARアルファ/ガンマ二重アゴニスト、PPARアルファ/デルタ二重アゴニスト、PPARガンマ/デルタ二重アゴニスト、又はPPARアルファ/ガンマ/デルタパンアゴニストである。

30

【 0 0 3 5 】

本発明に従えば、本発明の組合せに含まれるPPARアゴニスト及び成分 (i) は、本発明の組合せの前記PPARアゴニストと成分 (i) の組合せが、炎症性、代謝性、線維性及び胆汁うっ滞性疾患に対して相乗作用を提供するように、選択することができる。そのような相乗作用は、実施例に記載されているエクセスオーバープリス (EOB) 法を使用することによってのような、当技術分野で周知の方法に従って決定することができる。

【 0 0 3 6 】

40

特定の実施形態では、組合せ物の成分 (ii) は

- ・少なくとも1つのPPARアルファアゴニスト；
- ・少なくとも1つのPPARガンマアゴニスト；
- ・少なくとも1つのPPARデルタアゴニスト；
- ・少なくとも1つのPPARアルファ/デルタ二重アゴニスト；
- ・少なくとも1つのPPARアルファアゴニスト及び少なくとも1つのPPARデルタアゴニスト；
- ・少なくとも1つのPPARアルファ/ガンマ二重アゴニスト；
- ・少なくとも1つのPPARアルファアゴニスト及び少なくとも1つのPPARガンマアゴニスト；

50



・少なくとも1つのPPARガンマ/デルタ二重アゴニスト；  
 ・少なくとも1つのPPARガンマアゴニスト及び少なくとも1つのPPARデルタアゴニスト；  
 ・少なくとも1つのPPARアルファ/ガンマ/デルタパンアゴニスト；並びに  
 ・少なくとも1つのPPARアルファアゴニスト、少なくとも1つのPPARガンマアゴニスト及び少なくとも1つのPPARデルタアゴニストである。

## 【0037】

本発明に従えば、用語「PPARアゴニスト」とは、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アゴニストのことであり、これは脂質及びグルコース恒常性に中心的な役割をはたしている薬物のクラスである。PPARは主に脂肪酸代謝に影響を与え、その活性化は脂質レベルを低下させ、PPARは大部分が脂肪生成、エネルギー収支及び脂質生合成の調節に関与している。PPARは、大部分骨格筋及び心筋において脂肪酸酸化に関与しているが、血糖値及び血中コレステロール値も調節している。

10

## 【0038】

本発明に従えば、本明細書で使用される用語「PPARアルファアゴニスト」は、フェノフィブラート、シプロフィブラート、ペマフィブラート、ゲムフィプロジル、クロフィブラート、ビニフィブラート、クリノフィブラート、クロフィ布林酸、ニコフィブラート、ピリフィブラート、プラフィブリド、ロニフィブラート、テオフィブラート、トコフィブラート及びSR10171を含むが、これらに限定されない。

20

## 【0039】

本発明に従えば、本明細書で使用される用語「PPARガンマアゴニスト」は、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、重水素化ピオグリタゾン、エファツタゾン、ATx08-001、OMS-405、CHS-131、THR-0921、SER-150-DN、KDT-501、GED-0507-34-Levo、CLC-3001及びALL-4を含むが、これらに限定されない。

## 【0040】

本発明に従えば、本明細書で使用される用語「PPARデルタアゴニスト」は、GW501516（エンドウラブル又は（{4-[（{4-メチル-2-[4-（トリフルオロメチル）フェニル]-1,3-チアゾール-5-イル}メチル）スルファニル]-2-メチルフェノキシ}酢酸））、MBX8025（セラデルバル又は{2-メチル-4-[5-メチル-2-（4-トリフルオロメチル-フェニル）-2H-[1,2,3]トリアゾール-4-イルメチルスルファニル]-フェノキシ}-酢酸）、GW0742（[[[2-[3-フルオロ-4-（トリフルオロメチル）フェニル]-4-メチル-5-チアゾールイル]メチル]チオ]-2-メチルフェノキシ]酢酸）、L165041、HPP-593及びNCP-1046を含むが、これらに限定されない。

30

## 【0041】

本発明に従えば、本明細書で使用される用語「PPARアルファ/ガンマアゴニスト」（グリタザールとも名付けられる）は、サログリタザール、アレグリタザール、ムラグリタザール、テサグリタザール及びDSP-8658を含むが、これらに限定されない。

40

## 【0042】

本発明に従えば、本明細書で使用される用語「PPARアルファ/デルタアゴニスト」は、エラフィブラノール（GFT505）又はT913659を含むが、これらに限定されない。

## 【0043】

本発明に従えば、本明細書で使用される用語「PPARガンマ/デルタアゴニスト」は、コンジュゲートリノール酸（CLA）、T3D-959を含むが、これらに限定されない。

## 【0044】

本発明に従えば、本明細書で使用される用語「PPARアルファ/ガンマ/デルタアゴ

50

ニスト」は、I V A 3 3 7 (ラニフィブラノール (L a n i f i b r a n o r))、T T A (テトラデシルチオ酢酸)、パバキニン、G W 4 1 4 8、G W 9 1 3 5、ベザフィブラート、ロベグリタゾン及びC S 0 3 8を含むが、これらに限定されない。さらなる実施形態では、P P A Rアルファ/ガンマ/デルタアゴニストは、2 - (4 - (5, 6 - メチレンジオキシベンゾ [d] チアゾール - 2 - イル) - 2 - メチルフェノキシ) - 2 - メチルプロパン酸 (M H Y 2 0 1 3) である。

【0045】

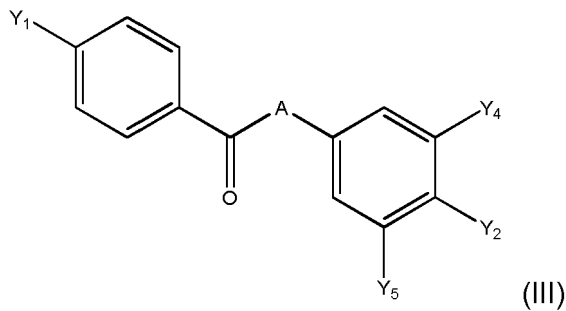
P P A Rアゴニストは、塩、水和物、溶媒和物、多形又は共結晶の形態でもよい。P P A Rアゴニストは、塩の水和物、溶媒和物、多形又は共結晶の形態でもよい。

【0046】

さらに詳細な実施形態では、P P A Rアゴニストは、式 (I I I)

【0047】

【化16】



[ 式中、Y 1 はハロゲン、R a 又は G a - R a 基を表し；

A は C H = C H 又は C H 2 - C H 2 基を表し；

Y 2 は G b - R b 基を表し；

G a 及び G b は、同一であるか又は異なって、酸素又は硫黄の原子を表し；

R a は、水素原子、非置換 (C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 6 ~ C 1 4) アリール基又は1つ以上のハロゲン原子、(C 1 ~ C 6) アルコキシ又は(C 1 ~ C 6) アルキルチオ基により置換されている(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキルチオ基又は複素環基を表し；

R b は、少なくとも - C O O R c 基により置換されている(C 1 ~ C 6) アルキル基を表し、ここで、R c は水素原子、又は1つ以上のハロゲン原子により置換されているか若しくは置換されていない(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基又は複素環基を表し；並びに

Y 4 及び Y 5 は、同一であるか又は異なって、1つ以上のハロゲン原子により置換されているか若しくは置換されていない(C 1 ~ C 6) アルキル基、(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基又は複素環基を表す。]

の化合物、又は薬学的に許容されるその塩である。

【0048】

式 (I I I) の化合物の特定の実施形態では、

Y 1 はハロゲン、R a 又は G a - R a 基を表し；

A は C H = C H 基を表し；

Y 2 は G b - R b 基を表し；

G a 及び G b は、同一であるか又は異なって、酸素又は硫黄の原子を表し；

R a は、(C 1 ~ C 6) アルキル又は(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基、特に1つ以上のハロゲン原子により置換されているか若しくは置換されていない(C 1 ~ C 7) アルキル又は(C 3 ~ C 1 4) シクロアルキル基を表し；

R b は、- C O O R c 基により置換されている(C 1 ~ C 6) アルキル基を表し、ここで、R c は水素原子又は1 ~ 4 炭素原子を有するアルキル基を表し；並びに

Y 4 及び Y 5 は、独立して ( C 1 ~ C 4 ) アルキル基を表す。

【 0 0 4 9 】

式 ( I I I ) の化合物の特定の実施形態では、

Y 1 は R a 又は G a - R a 基を表し；

A は C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> 基を表し；

Y 2 は G b - R b 基を表し；

G a は酸素又は硫黄の原子を表し、G b は酸素原子を表し；

R a は、( C 1 ~ C 6 ) アルキル又は ( C 3 ~ C 7 ) シクロアルキル基を表し；

R b は、少なくとも - C O O R c 基により置換されている ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基を表し、ここで、R c は水素原子又は ( C 1 ~ C 4 ) アルキル基を表し；並びに

Y 4 及び Y 5 は、独立して ( C 1 ~ C 4 ) アルキル基を表す。

10

【 0 0 5 0 】

式 ( I I I ) の化合物の特定の実施形態では、

Y 1 はハロゲン原子又は R a 若しくは G a - R a 基を表し；

A は C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> 基を表し；

Y 2 は G b - R b 基を表し；

G a は酸素又は硫黄の原子を表し、G b は酸素原子を表し；

R a は、1つ以上のハロゲン原子で置換されている ( C 1 ~ C 6 ) アルキル又は ( C 3 ~ C 1 4 ) シクロアルキル基を表し；

R b は、1つ以上のハロゲン原子により置換されているか又は置換されていない及び少なくとも - C O O R c 基により置換されている ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基を表し、ここで、R c は水素原子又は ( C 1 ~ C 4 ) アルキル基を表し；並びに

20

Y 4 及び Y 5 は ( C 1 ~ C 4 ) アルキル基を表す。

【 0 0 5 1 】

式 ( I I I ) の化合物の特定の実施形態では、G b は酸素原子であり R b は - C O O R c 基により置換されている ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基であり、ここで、R c は水素原子又は非置換の直鎖若しくは分岐 ( C 1 ~ C 4 ) アルキル基を表す。

【 0 0 5 2 】

式 ( I I I ) の化合物の特定の実施形態では、Y 1 は、直鎖又は分岐である ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基であって、1つ以上のハロゲン原子により置換されているか又は置換されていない ( C 1 ~ C 6 ) アルキル基を含む ( C 1 ~ C 6 ) アルキルチオ基である。

30

【 0 0 5 3 】

特定の実施形態では、式 ( I I I ) の化合物は、1 - [ 4 - メチルチオフエニル ] - 3 - [ 3 , 5 - ジメチル - 4 - カルボキシジメチルメチルオキシフェニル ] プロパ - 2 - エン - 1 - オン ( エラフィブラノール又は G F T 5 0 5 ) 、 1 - [ 4 - メチルチオフエニル ] - 3 - [ 3 , 5 - ジメチル - 4 - イソプロピルオキシカルボニルジメチルメチルオキシフェニル ] プロパ - 2 - エン - 1 - オン、1 - [ 4 - メチルチオフエニル ] - 3 - [ 3 , 5 - ジメチル - 4 - t - ブチルオキシカルボニルジメチルメチルオキシフェニル ] プロパ - 2 - エン - 1 - オン、1 - [ 4 - トリフルオロメチルフェニル ] - 3 - [ 3 , 5 - ジメチル - 4 - t - ブチルオキシカルボニルジメチルメチルオキシフェニル ] プロパ - 2 - エン - 1 - オン、1 - [ 4 - トリフルオロメチルオキシフェニル ] - 3 - [ 3 , 5 - ジメチル - 4 - カルボキシジメチルメチルオキシフェニル ] プロパ - 2 - エン - 1 - オン、1 - [ 4 - トリフルオロメチルオキシフェニル ] - 3 - [ 3 , 5 - ジメチル - 4 - t - ブチルオキシカルボニルジメチルメチルオキシフェニル ] プロパ - 2 - エン - 1 - オン、1 - [ 4 - トリフルオロメチルオキシフェニル ] - 3 - [ 3 , 5 - ジメチル - 4 - カルボキシジメチルメチルオキシフェニル ] プロパ - 2 - エン - 1 - オン、2 - [ 2 , 6 - ジメチル - 4 - [ 3 - [ 4 - ( メチルチオ ) フェニル ] - 3 - オキソ - プロピル ] フェノキシ ] - 2 - メチルプロパン酸及び 2 - [ 2 , 6 - ジメチル - 4 - [ 3 - [ 4 - ( メチルチオ ) フェニル ] - 3 - オキソ - プロピル ] フェノキシ ] - 2 - メチル - プロパン酸イソプロピルエステルからなる群において選択される。

40

50

## 【 0 0 5 4 】

さらに詳しい実施形態では、P P A Rアゴニストは、1 - [ 4 - メチルチオフェニル ] - 3 - [ 3 , 5 - ジメチル - 4 - カルボキシジメチルメチルオキシフェニル ] プロパ - 2 - エン - 1 - オン ( 又はエラフィブラノール - G F T 5 0 5 ) 又は薬学的に許容されるその塩である。

## 【 0 0 5 5 】

本発明の組合せ物の特定の実施形態では、

・成分 ( i i ) はエラフィブラノール、サログリタザル、セラデルバル及びラニフィブラノールからなる群において選択され、成分 ( i i ) はより詳細にはエラフィブラノールであり；

10

・成分 ( i ) は N T Z、T Z、2 - [ ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) カルバモイル ] フェニル ( d 3 ) エタノエート、2 - [ ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) カルバモイル ] フェニル ( d 2 ) エタノエート、2 - [ ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) カルバモイル ] フェニル ( d 1 ) エタノエート、( ( S ) - 2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート塩酸塩 ) 又は ( ( 2 S , 3 S ) - 2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 - メチルペンタノエート塩酸塩 ) から選択される。

## 【 0 0 5 6 】

さらなる実施形態では、成分 ( i ) は、T Z G、2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート ( ( S ) - 2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート又はその塩酸塩のような )、2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 - メチルペンタノエート ( ( 2 S , 3 S ) - 2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 - メチルペンタノエート又はその塩酸塩のような )、2 - ( 5 - クロロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート ( ( S ) - 2 - ( 5 - クロロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート又はその塩酸塩のような )、及び 2 - ( 5 - クロロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 - ジメチルペンタノエート ( ( 2 S , 3 S ) - 2 - ( 5 - クロロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 - メチルペンタノエート又はその塩酸塩のような ) から選択される。この実施形態のさらなる変異形では、成分 ( i i ) は、エラフィブラノール、サログリタザル、セラデルバル及びラニフィブラノールからなる群において選択され、成分 ( i i ) はより詳細にはエラフィブラノールであり；成分 ( i ) は、T Z G、2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート ( ( S ) - 2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート又はその塩酸塩のような )、2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート ( ( S ) - 2 - ( 5 - ニトロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート又はその塩酸塩のような )、2 - ( 5 - クロロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート ( ( S ) - 2 - ( 5 - クロロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノエート又はその塩酸塩のような )、及び 2 - ( 5 - クロロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 - メチルペンタノエート ( ( 2 S , 3 S ) - 2 - ( 5 - クロロチアゾール - 2 - イルカルバモイル ) フェニル 2 - アミノ - 3 - メチルペンタノエート又はその塩酸塩のような ) から選択される。

20

30

40

## 【 0 0 5 7 】

特定の実施形態では、本発明の組合せ物は、抗線維化剤、抗炎症剤又は免疫抑制剤のような少なくとも1つの他の治療的活性剤をさらに含む。

50

## 【0058】

例示的な抗線維化剤は、ピルフェニドン、又はニンテダニブ、ソラフェニブ及び他のRTKIのような受容体チロシンキナーゼ阻害剤(RTKI)、又はアンジオテンシンII(AT1)受容体遮断薬、又はCTGF阻害剤、又はMMP2、MMP9、THBS1若しくは細胞表面インテグリンのような潜伏性TGF複合体の活性化剤を含むTGF及びBMP活性化経路を妨害しやすい任意の抗線維化化合物、TGF受容体I型(TGFBRI)若しくはII型(TGFBII)及びTGF、アクチビン、インヒビン、Nodal、抗ミューラー管ホルモン、GDF若しくはBMPのようなそれらのリガンド、補助共受容体(III型受容体としても知られる)、又は調節性若しくは阻害性SMADタンパク質を含むSMAD依存性キャノニカル経路の成分、又はMAPKシグナル伝達の種々の分岐を含むSMAD非依存性若しくは非キャノニカル経路、TAK1、Rho様GTPアーゼシグナル伝達経路、ホスファチジルイノシトール-3キナーゼ/AKT経路、TGF誘導EMTプロセス、又はHhリガンド若しくは標的遺伝子を含むキャノニカル及び非キャノニカルヘッジホッグシグナル伝達経路のメンバー、又はTGFに影響を与えやすいWNT若しくはNotch経路の任意のメンバーを含む。

## 【0059】

例示的な抗炎症及び/又は免疫抑制剤は、グルココルチコイド、NSAIDs、シクロホスファミド、ニトロソウレア、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、メトトレキサート、アザチオプリン、メルカプトプリン、シクロスポリン、ミリオシン、タクロリムス、シロリムス、ミコフェノール酸誘導体、フィンゴリモド及び他のスフィンゴシン-1リン酸受容体モジュレーター、炎症性サイトカイン及び炎症性サイトカイン受容体、T細胞受容体並びにインテグリンのような標的に対するモノクローナル及び/又はポリクローナル抗体を含む。

## 【0060】

特定の実施形態では、本発明の組合せ物は、上記の成分(i)及び(ii)並びに薬学的に許容される担体を含む組成物である。

## 【0061】

特定の実施形態では、組合せ物は、連続、分離又は同時使用のための上記の成分(i)及び(ii)を含むキットオブパーツである。

## 【0062】

さらなる実施形態では、成分(i)及び(ii)は、持効性及び/又は徐放性放出のために、注射可能な懸濁液、ジェル、オイル、ピル、錠剤、坐薬、粉末、カプセル、エアロゾル、軟膏、クリーム、パッチ、又はガレヌス形態の手段で処方される。

## 【0063】

別の実施形態では、組合せ物の成分(i)及び(ii)は、上記疾患のいずれかの治療において使用される。

## 【0064】

本発明は、薬物としての使用のための本発明に従った組合せ物にも関する。

## 【0065】

本発明は、前記疾患の治療のための方法における使用のための、本明細書で開示される組合せ物にも関する。別の実施形態では、本発明は、疾患の治療のための方法であって、本明細書で開示される治療有効量の組合せ物を治療を必要とする対象に投与することを含む方法に関する。別の実施形態では、疾患の治療のための薬物の製造のための本発明に従った組合せ物の使用が提供される。

## 【0066】

特に、本発明の組合せ物は、免疫、炎症性、代謝性、線維性及び胆汁うっ滞性疾患のような疾患の治療に有用である。特定の実施形態では、疾患は、代謝性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、薬剤誘発性肝疾患、アルコール誘発性肝疾患、感染病原体誘発性肝疾患、炎症性肝疾患、免疫系機能障害媒介肝疾患、脂質異常症、循環器疾患、再狭窄、シンドロームX、メタボリックシン

ドローム、糖尿病、肥満、高血圧、原発性硬化性胆管症（PSC）、原発性胆汁性胆管炎（PBC）のような慢性胆管症、胆道閉鎖、家族性胆内胆汁うっ滞症3型（PFIC3）、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ケロイド、陳旧性心筋梗塞、強皮症/全身性硬化症、炎症性疾患、神経変性疾患、がん、肝臓がん、肝細胞癌、胃腸がん、胃がん、神経線維腫症に伴う髄膜腫、膵内分泌腫瘍、膵外内分泌腫瘍、白血病、骨髄増殖性/骨髄異形成（myelodysplastic）疾患、肥満細胞症、皮膚線維肉腫、乳がん、肺がん、甲状腺がん又は結腸直腸がんを含む固形腫瘍、前立腺がん、任意の起源の肝線維症又は硬変、代謝性疾患誘発性肝線維症又は硬変、NAFLD誘発性線維症又は硬変、NASH誘発性線維症又は硬変、アルコール誘発性肝線維症又は硬変、薬剤誘発性肝線維症又は硬変、感染病原体誘発性肝線維症又は硬変、寄生虫感染誘発性肝線維症又は硬変、細菌感染誘発性肝線維症又は硬変、ウイルス感染誘発性線維症又は硬変、HBV感染誘発性肝線維症又は硬変、HCV感染誘発性肝線維症又は硬変、HIV感染誘発性肝線維症又は硬変、二重HCV及びHIV感染誘発性肝線維症又は硬変、放射線又は化学療法誘発性線維症又は硬変、胆道線維症、任意の慢性胆汁うっ滞性疾患による肝線維症又は硬変、任意の病因の腸線維症、クローン病誘発性線維症、潰瘍性大腸炎誘発性線維症、腸（例えば、小腸）線維症、結腸線維症、胃線維症、皮膚線維症、表皮線維症、内皮線維症、強皮症/全身性硬化症による皮膚線維症、肺線維症、COPD、喘息、肺気腫、喫煙者の肺、結核、肺性線維症、特発性肺性線維症（IPF）のような慢性炎症性気道疾患に続く肺線維症、心臓線維症、腎線維症、腎性全身性線維症、筋線維症、軟部組織線維症（例えば、縦隔又は後腹膜）、骨髄線維症、関節線維症（joint fibrosis）、腱線維症、軟骨線維症、膵臓線維症、子宮線維症、神経系線維症、精巣線維症、卵巣線維症、副腎線維症、動脈線維症、静脈線維症、眼線維症、心内膜心筋線維症、縦隔線維症、骨髄線維症、後腹膜線維症、進行性塊状線維症（炭鉱夫塵肺の合併症）、増殖性線維症、腫瘍性線維形成、着床前後線維症及び石綿症、関節線維症（arthrofibrosis）、癒着性関節包炎からなる群において選択される。

10

20

30

40

50

【0067】

きわめて好ましい実施形態では、疾患は、代謝性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、薬剤誘発性肝疾患、アルコール誘発性肝疾患、感染病原体誘発性肝疾患、炎症性肝疾患、免疫系機能障害媒介肝疾患、脂質異常症、循環器疾患、再狭窄、シンドロームX、メタボリックシンドローム、糖尿病、肥満、高血圧、原発性硬化性胆管症（PSC）、原発性胆汁性胆管炎（PBC）のような慢性胆管症、胆道閉鎖、家族性胆内胆汁うっ滞症3型（PFIC3）、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、肝臓がん、肝細胞癌、胃腸がん、胃がん、結腸直腸がん、代謝性疾患誘発性肝線維症又は硬変、NAFLD誘発性線維症又は硬変、NASH誘発性線維症又は硬変、アルコール誘発性肝線維症又は硬変、薬剤誘発性肝線維症又は硬変、感染病原体誘発性肝線維症又は硬変、寄生虫感染誘発性肝線維症又は硬変、細菌感染誘発性肝線維症又は硬変、ウイルス感染誘発性線維症又は硬変、HBV感染誘発性肝線維症又は硬変、HCV感染誘発性肝線維症又は硬変、HIV感染誘発性肝線維症又は硬変、二重HCV及びHIV感染誘発性肝線維症又は硬変、放射線又は化学療法誘発性線維症又は硬変、胆道線維症、任意の慢性胆汁うっ滞性疾患による肝線維症又は硬変、任意の病因の腸線維症、クローン病誘発性線維症、潰瘍性大腸炎誘発性線維症、腸（例えば、小腸）線維症、結腸線維症、胃線維症、肺線維症、COPD、喘息、肺気腫、喫煙者の肺、結核、肺性線維症、特発性肺性線維症（IPF）のような慢性炎症性気道疾患に続く肺線維症からなる群において選択される。

【0068】

さらなる態様では、本発明はコラーゲン線維の産生の原因である及び/又は細胞外マトリックスの産生の原因である繊維芽細胞の増殖及び/又は活性化の阻害において使用するための本発明の組合せに関する。

【0069】

本発明に従えば、用語「自己免疫疾患」は、身体中に通常存在する物質及び組織に対す

る身体の異常な免疫応答から生じる状態を名付けるのに使用される。疾患はある特定の器官（例えば、I型糖尿病又は自己免疫性甲状腺炎において）に制限されるか又は異なる場所での特定の組織（例えば、グッドパスチャー病、肺及び腎臓での基底膜の疾患において）に関連してもよい。

【0070】

用語「炎症」は、細胞/組織損傷の原因はもちろん最初の損傷から生じる壊死性細胞/組織も取り除いて、修復過程を開始するのに役立つ可能性がある宿主細胞、血管及びタンパク質並びに他のメディエーターが関わる防御応答から生じる状態を名付けるのに使用される。炎症反応は、疼痛、熱、発赤、膨潤、血管膨張、血流増加及び機能喪失により現れることがある。

10

【0071】

用語「線維症」、「線維性疾患」、「線維性障害」及びこの語形変化は、器官又は組織における線維性結合組織の過剰な沈着という病的状態を意味する。さらに具体的には、線維症は、組織損傷に対する応答としての結合組織による病理過程であり、これは、持続性の線維性傷跡形成及び細胞外マトリックスの過剰産生を含む。生理的には、結合組織の沈着は、根底にある器官又は組織の構造及び機能を消し去ることが可能である。

【0072】

本発明に従えば、線維症又は線維性障害はいかなる器官又は組織線維症にも関連してよい。特定の器官線維症の例示的、非限定的例は、肝臓、腎臓、皮膚、表皮、内皮、筋肉、腱、軟骨、心臓、脾臓、肺、子宮、神経系、精巣、陰茎、卵巣、副腎、動脈、静脈、結腸、腸（例えば、小腸）、胆道、軟部組織（例えば、縦隔又は後腹膜）、骨髄、関節（例えば、膝、肩又は他の関節）又は胃線維症を含む。

20

【0073】

特定の実施形態では、線維性障害は、肝臓、腎臓、皮膚、表皮、内皮、筋肉、腱、軟骨、心臓、脾臓、肺、子宮、神経系、精巣、卵巣、副腎、動脈、静脈、結腸、腸（例えば、小腸）、胆道、軟部組織（例えば、縦隔又は後腹膜）、骨髄、関節（例えば、膝、肩又は他の関節）、目又は胃線維症からなる群において選択される。

【0074】

好ましい実施形態では、線維性障害は、肝臓、腸、肺、心臓、腎臓、筋肉、皮膚、軟部組織（例えば、縦隔又は後腹膜）、骨髄、腸、及び関節（例えば、膝、肩又は他の関節）線維症からなる群において選択される。

30

【0075】

さらに好ましい実施形態では、線維性障害は、肝臓、肺、腸、心臓、皮膚、腎臓及び腸線維症からなる群において選択される。

【0076】

別の実施形態では、線維性障害は、肝臓、肺、心臓及び腸線維症からなる群において選択される。さらに詳細な実施形態では、線維性障害は肝臓、肺、皮膚、腎臓及び腸線維症からなる群において選択される。別の実施形態では、線維性障害は肝線維症である。

【0077】

本発明のさらに好ましい実施形態では、治療された線維性障害は、線維性障害の以下の包括的ではない一覧：非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）、肺性線維症、特発性肺性線維症（IPF）、皮膚線維症、眼線維症（水晶体嚢線維症のような）、心内膜心筋線維症、縦隔線維症、骨髄線維症、後腹膜線維症、進行性塊状線維症（炭鉱夫塵肺の合併症）、増殖性線維症、腫瘍性線維形成、慢性炎症性気道疾患（COPD、喘息、肺気腫、喫煙者の肺、結核、IPF）に続く肺線維症、アルコール又は薬剤誘発性肝線維症、肝硬変、感染誘発性肝線維症、放射線又は化学療法誘発性線維症、腎性全身性線維症、クローン病、潰瘍性大腸炎、ケロイド、陳旧性心筋梗塞、強皮症/全身性硬化症、関節線維症（arthrofibrosis）、癒着性関節包炎のいくつかの形態、原発性硬化性胆管症（PSC）及び原発性胆汁性胆管炎（PBC）のような慢性線維化胆管症、胆道閉鎖、家族性胆内胆汁うっ滞症3型（PFIC3）、着床前後線維症並びに石綿症からなる群におい

40

50

て選択される。

【0078】

胆汁うっ滞は、肝細胞による分泌障害（肝細胞性胆汁うっ滞）又は肝内若しくは肝外胆管を通じた胆汁流の閉塞（閉塞性胆汁うっ滞）に起因する胆汁流の減少と定義される。診療では、胆汁うっ滞は、肝臓からの胆汁の流れが遅くなる又は遮断される任意の状態である。本発明の特定の実施形態に従えば、胆汁うっ滞性疾患は、原発性胆汁性胆管炎（PBC）、原発性硬化性胆管症（PSC）、妊娠性肝内胆汁うっ滞、進行性家族性胆内胆汁うっ滞、胆道閉鎖、胆石症、感染性胆管炎、ランゲルハンス細胞組織球症に伴う胆管症、アラジール症候群、非症候性管欠乏（Nonsyndromic ductal paucity）、薬剤誘発性胆汁うっ滞及び完全非経口栄養関連胆汁うっ滞（Total parenteral nutrition-associated cholestasis）からなる群において選択される。好ましい実施形態では、胆汁うっ滞性疾患は、PBC又はPSC、特にPBCである。

10

【0079】

炎症性疾患、線維性疾患、代謝性疾患及び胆汁うっ滞性疾患の例は、代謝性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、薬剤誘発性肝疾患、アルコール誘発性肝疾患、感染病原体誘発性肝疾患、炎症性肝疾患、免疫系機能障害媒介肝疾患、脂質異常症、循環器疾患、再狭窄、シンドロームX、メタボリックシンドローム、糖尿病、肥満、高血圧、原発性硬化性胆管症（PSC）、原発性胆汁性胆管炎（PBC）のような慢性胆管症、胆道閉鎖、家族性胆内胆汁うっ滞症3型（PFIC3）、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ケロイド、陳旧性心筋梗塞、強皮症/全身性硬化症、炎症性疾患、神経変性疾患、がん、肝臓がん、肝細胞癌、胃腸がん、胃がん、神経線維腫症に伴う髄膜腫、膵内分泌腫瘍、膵外分泌腫瘍、白血病、骨髄増殖性/骨髄異形成疾患、肥満細胞症、皮膚線維肉腫、乳がん、肺がん、甲状腺がん又は結腸直腸がんを含む固形腫瘍、前立腺がん、任意の起源の肝線維症又は硬変、代謝性疾患誘発性肝線維症又は硬変、NAFLD誘発性線維症又は硬変、NASH誘発性線維症又は硬変、アルコール誘発性肝線維症又は硬変、薬剤誘発性肝線維症又は硬変、感染病原体誘発性肝線維症又は硬変、寄生虫感染誘発性肝線維症又は硬変、細菌感染誘発性肝線維症又は硬変、ウイルス感染誘発性線維症又は硬変、HBV感染誘発性肝線維症又は硬変、HCV感染誘発性肝線維症又は硬変、HIV感染誘発性肝線維症又は硬変、二重HCV及びHIV感染誘発性肝線維症又は硬変、放射線又は化学療法誘発性線維症又は硬変、胆道線維症、任意の慢性胆汁うっ滞性疾患による肝線維症又は硬変、任意の病因の腸線維症、クローン病誘発性線維症、潰瘍性大腸炎誘発性線維症、腸（例えば、小腸）線維症、結腸線維症、胃線維症、皮膚線維症、表皮線維症、内皮線維症、強皮症/全身性硬化症による皮膚線維症、肺線維症、COPD、喘息、肺気腫、喫煙者の肺、結核、肺性線維症、特発性肺性線維症（IPF）のような慢性炎症性気道疾患に続く肺線維症、心臓線維症、腎線維症、腎性全身性線維症、筋線維症、軟部組織線維症（例えば、縦隔又は後腹膜）、骨髄線維症、関節線維症（joint fibrosis）、腱線維症、軟骨線維症、膵臓線維症、子宮線維症、神経系線維症、精巣線維症、卵巣線維症、副腎線維症、動脈線維症、静脈線維症、眼線維症、心内膜心筋線維症、縦隔線維症、骨髄線維症、後腹膜線維症、進行性塊状線維症（炭鉱夫塵肺の合併症）、増殖性線維症、腫瘍性線維形成、着床前後線維症及び石綿症、関節線維症（arthrofibrosis）、癒着性関節包炎を含む。

20

30

40

【0080】

好ましくは、疾患は、代謝性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、薬剤誘発性肝疾患、アルコール誘発性肝疾患、感染病原体誘発性肝疾患、炎症性肝疾患、免疫系機能障害媒介肝疾患、脂質異常症、循環器疾患、再狭窄、シンドロームX、メタボリックシンドローム、糖尿病、肥満、高血圧、原発性硬化性胆管症（PSC）、原発性胆汁性胆管炎（PBC）のような慢性胆管症、胆道閉鎖、家族性胆内胆汁うっ滞症3型（PFIC3）、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、肝臓がん、肝細胞癌、胃腸がん、胃がん、結腸直腸がん、代謝性疾患誘発性肝線

50



維症又は硬変、N A F L D 誘発性線維症又は硬変、N A S H 誘発性線維症又は硬変、アルコール誘発性肝線維症又は硬変、薬剤誘発性肝線維症又は硬変、感染病原体誘発性肝線維症又は硬変、寄生虫感染誘発性肝線維症又は硬変、細菌感染誘発性肝線維症又は硬変、ウイルス感染誘発性線維症又は硬変、H B V 感染誘発性肝線維症又は硬変、H C V 感染誘発性肝線維症又は硬変、H I V 感染誘発性肝線維症又は硬変、二重H C V 及びH I V 感染誘発性肝線維症又は硬変、放射線又は化学療法誘発性線維症又は硬変、胆道線維症、任意の慢性胆汁うっ滞性疾患による肝線維症又は硬変、任意の病因の腸線維症、クローン病誘発性線維症、潰瘍性大腸炎誘発性線維症、腸（例えば、小腸）線維症、結腸線維症、胃線維症、肺線維症、C O P D、喘息、肺気腫、喫煙者の肺、結核、肺性線維症、特発性肺性線維症（I P F）のような慢性炎症性気道疾患に続く肺線維症からなる群において選択される。

【0081】

用語「治療」又は「治療する」とは、治療を必要とする対象において線維性障害の治療処置又は予防処置のことである。治療は、障害を予防し、治療し、遅延させ、好転させ又はこの進行の速度を遅くし、これらによって対象の状態を改善するための、表明された障害を有する対象への、すなわち、患者への本発明の組合せの投与を含む。治療は、健康である又は線維性障害を発症するリスクがある対象にも施してよい。

【0082】

したがって、本発明に従えば、免疫、炎症性、代謝性、線維性及び胆汁うっ滞性疾患の治療は、障害を治療し、遅延させ、好転させ若しくはこの進行の速度を遅くし、このようにして患者の状態を改善するために、表明された障害を有する対象に、又は健康な対象、特にそのような疾患を発症するリスクがある対象に、例えば、組合せの成分（i）及び（i i）を含有する医薬組成物の形態で本発明の組合せを投与することを含む。

【0083】

治療は、患者の状態を治療し、遅延させ、若しくはこの進行の速度を遅くし、このようにして患者の状態を改善するために、表明された障害を有する患者に、又は健康な対象、特に炎症性、代謝性、線維性及び胆汁うっ滞性疾患を発症するリスクがある対象に、本発明の組合せを投与することを含む。

【0084】

治療する対象は哺乳動物、好ましくはヒトである。本発明に従って治療する対象は、以前の薬物処置、関連病理、遺伝子型、危険因子への曝露、ウイルス感染のような線維性疾患に関連するいくつかの基準に基づいて、並びに撮像方法及び免疫学的、生化学的、酵素的、化学的又は核酸検出方法の手段により評価することが可能な任意の適切なバイオマーカーの検出に基づいて選択することが可能である。

【0085】

本発明に従って治療する対象は、以前の薬物治療、関連病理、遺伝子型、危険因子への曝露、ウイルス感染のような炎症性、代謝性、線維性及び胆汁うっ滞性疾患に関連するいくつかの基準、並びに撮像方法及び免疫学的、生化学的、酵素的、化学的又は核酸検出方法の手段により評価することが可能な任意の他の適切なバイオマーカーに基づいて選択することが可能である。

【0086】

N T Z 又は類似体の合成は、例えば、（R o s s i g n o l a n d C a v i e r、1975年）に記載される通りに、又は当業者が知っている他の任意の合成方法により実行可能である。

【0087】

特定の実施形態では、炎症性、代謝性、線維性及び胆汁うっ滞性疾患の治療は、N T Z 及びN T Z 類似体から選択される少なくとも2つの化合物を含む組成物の投与を含んでもよい。この実施形態では、投与された少なくとも1つのP P A R アゴニストは2つの化合物と同じ組成物中で、又は異なる組成物中でのような分離した形態で提供される。

【0088】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、本発明の組合せは、治療において同時、連続又は分離した投与用であり、したがって、おそらく異なる組成物に含まれる。連続投与の場合、NTZ及び/又はNTZ類似体はPPARアゴニストに先立って投与してもよく、又はPPARアゴニストはNTZ及び/若しくはNTZ類似体に先立って投与される。

【0089】

NTZ及びNTZ類似体は、薬学的に許容される塩、特に医薬使用に適合する酸性又は塩基性塩として処方することが可能である。NTZ及びNTZ類似体の塩は、薬学的に許容される酸付加塩、薬学的に許容される塩基付加塩、薬学的に許容される金属塩、アンモニウム及びアルキル化アンモニウム塩を含む。これらの塩は、化合物の最終精製ステップ中に、又は塩をすでに精製された化合物中に組み込むことにより得ることが可能である。

10

【0090】

式(I)又は(II)の化合物と1つ以上のPPARアゴニストの組合せは、式(I)若しくは(II)の化合物又はPPARアゴニストの有機又は無機塩基又は酸から得られる薬学的に許容される非毒性塩として処方することが可能である。これらの塩は、化合物の最終精製ステップ中に、又は塩をすでに精製された化合物中に組み込むことにより得ることが可能である。

【0091】

式(I)又は(II)の化合物及び1つ以上のPPARアゴニストを含む本発明の医薬組成物は、薬学的状況内で許容される1つ又はいくつかの賦形剤又は溶媒(例えば、医薬用途に適合し当業者であれば周知の生理食塩水、生理溶液、等張液、等)も含むことが可能である。

20

【0092】

これらの組成物は、分散剤、可溶化剤、安定化剤、保存剤、等の間から選択される1つ若しくはいくつかの作用物質又は溶媒も含むことが可能である。これらの製剤に有用な作用物質又は溶媒(液体及び/又は注射液及び/又は固体)は特に、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリソルベート80、マンニトール、ゼラチン、ラクトース、植物油、アカシア、リポソーム、等である。

【0093】

これらの組成物は、最終的には持効性及び/又は徐放性放出を保證するガレヌス形態又はデバイスを用いて、注射可能な懸濁液、ゲル、オイル、軟膏、ピル、座薬、粉末、ゲルカップ、カプセル、エアゾール、等の形態で処方することが可能である。この種の製剤では、セルロース、炭酸塩又はデンプンのような作用物質を有利に使用することが可能である。

30

【0094】

式(I)又は(II)の化合物及び1つ以上のPPARアゴニストを含む本発明の医薬組成物は、異なる経路により及び異なる形態で投与してもよい。例えば、化合物は、全身的な方法を介して、経口的に、非経口的に、吸入により、鼻噴霧により、鼻滴下注入により、又は、例えば、静脈内に、筋肉内経路により、皮下経路により、経皮経路により、局所的経路により、動脈内経路により、等のような注射によって投与してもよい。

【0095】

当然のことながら、投与経路は、当業者には周知である手順に従って、1つ以上のPPARアゴニストと組み合わせたNTZ及び/又はNTZ類似体の形態に適合させる。

40

【0096】

1つ以上のPPARアゴニストと組み合わせたNTZ及び/又はNTZ類似体は治療有効量で投与される。本発明の文脈内では、用語「有効量」とは、所望の治療結果をもたらすのに十分な化合物の量のことである。

【0097】

投与に関連する回数及び/又は用量は、患者、病理、投与の形態、等の相関関係で、当業者であれば適応させることが可能である。典型的には、本発明の組合せ(医薬組成物又はキットパーツの形態のような)は、50mg/日~2000mg/日、及び特に1

50

00mg/日～1000mg/日のような0.01mg/日～4000mg/日で含まれる、式(I)又は(II)又は(III)の化合物のようなNTZ若しくはNTZ類似体又はPPARアゴニストについての用量で線維性疾患の治療のために投与することが可能である。

【0098】

前記組合せ中のPPARアゴニストの用量は、PPARアゴニストそれ自体により変動してもよい。用量はPPARアゴニストの効率に適合される。

【0099】

本発明の好ましい実施形態では、NTZは、NTZでは100mg/日～1000mg/日(1000mg/日のような)(特に20mg/日～40mg/日)及びエラフィブラノールでは80～120mg/日で含まれる用量でエラフィブラノールと組み合わせて使用される。

10

【0100】

別の好ましい実施形態では、活性成分は、経口摂取を目的とするピルの形態で1つ以上の医薬組成物として投与される。

【0101】

投与は、毎日又は必要ならば1日あたり数回でさえ実施することが可能である。

【0102】

本発明は、以下の非限定的実施例を参照してさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

20

【0103】

【図1】TGF誘発性hHSCにおけるエラフィブラノール及びニタゾキサニドの抗線維性効果。血清由来HSCは、線維形成促進性サイトカインTGF-1(1ng/ml)での活性化前にエラフィブラノール(A)又はニタゾキサニド(B)又はベザフィブラート(C)と一緒に1時間プレインキュベートした。48時間のインキュベーション後、 $\alpha$ -SMAの発現はELISAにより測定した。得られた値は、TGF-1対照に対するパーセント阻害に変換した。データは平均(3通り)±標準偏差(SD)として表示されている。カーブフィッティング及び50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)の計算はXLFitソフトウェア5.3.1.3を用いて実施した。

【図2】TGF誘発性hHSCにおいてエラフィブラノールとニタゾキサニドの組合せは $\alpha$ -SMAを相乗的に阻害する。組合せは用量応答マトリックスフォーマットにおいて試験し、エクセスオーバープリズ(EOB)アディティビズム(excess over Bliss(EOB) additivism)モデルに従って分析した。それぞれのDMSO対照を含む、エラフィブラノール(横の列)及びニタゾキサニド(縦の列)の希釈系列を調製した。得られた混合物は、線維形成促進性サイトカインTGF-1(1ng/ml)での活性化の1時間前に、血清由来HSCに添加した。(A)すべての組合せ対についてのTGF-1対照に対する $\alpha$ -SMA阻害のパーセント。データは4通りの平均として表示されている。(B)EOBスコアは材料及び方法に記載される通りに計算した。プラスのEOB値を有するいかなる化合物対も相乗的と見なした(淡い灰色から黒色まで色付けした)。すべての組合せを含む全EOBスコアも計算した。(C)相乗的組合せ対由来のデータ値は棒グラフ表示にプロットした。データは平均(4通り)±標準偏差(SD)として表示している。EOHSAモデルは、選択されたNTZ/ELA組合せ対の相乗作用を確かめるために材料及び方法のセクションに記載される通りに使用した。

30

40

【図3】TGF誘発性hHSCにおいてPPARアゴニストとニタゾキサニドの組合せは $\alpha$ -SMAを相乗的に阻害する。組合せは用量応答マトリックスフォーマットにおいて試験し、エクセスオーバープリズ(EOB)アディティビズムモデルに従って分析した。それぞれのDMSO対照を含む、サログリタザル、セラデルバル及びラニフィブラノール並びにニタゾキサニドの希釈系列を調製した。得られた混合物は、線維形成促進性サイトカインTGF-1(1ng/ml)での活性化の1時間前に、血清由来HSCに添加した。すべての組合せ対についてのTGF-1対照に対する $\alpha$ -SMA阻害のパーセントを計

50

算した。E O Bスコアは材料及び方法に記載される通りに計算した。プラスのE O B値を有するいかなる化合物対も相乗的と見なした（淡い灰色から黒色まで色付けした）。（A）サログリタザル（S A R O）（B）セラデルパル（S E L A）（C）ラニフィブラノール（L A N I）相乗的組合せ対由来のT G F 1対照に対する - S M A 阻害のパーセントは棒グラフ表示にプロットした。データは平均（4通り）±標準偏差（S D）として表示している。E O H S Aモデルは、組合せ対の相乗作用を確かめるために材料及び方法のセクションに記載される通りに使用した。

【図4】肝臓コラーゲン含有量。生後6週間のC 5 7 B L / 6マウスに、対照（C S A A）食、C D A A + 1 % C H O L（C D A A c）食、又はN T Z（12週間で30mg / kg / 日又は100mg / kg / 日）又はエラフィブラノール（1mg / kg / 日又は3mg / kg / 日）又はエラフィブラノールとN T Zの組合せ（それぞれ1 + 30mg / kg / 日、1 + 100mg / kg / 日、3 + 30mg / kg / 日及び3 + 100mg / kg / 日）を補充したC D A A c食を与えた。グラフごとに、曝露用量の正確な量を示した。屠殺後、肝臓コラーゲン含有量を決定した。

10

【図5】肝線維症パーセント。生後6週間のC 5 7 B L / 6マウスに、対照（C S A A）食、C D A A + 1 % C H O L（C D A A c）食、又はN T Z（12週間で30mg / kg / 日又は100mg / kg / 日）又はエラフィブラノール（1mg / kg / 日又は3mg / kg / 日）又はエラフィブラノールとN T Zの組合せ（それぞれ1 + 30mg / kg / 日、1 + 100mg / kg / 日、3 + 30mg / kg / 日及び3 + 100mg / kg / 日）を補充したC D A A c食を与えた。グラフごとに、曝露用量の正確な量を示した。屠殺後、肝線維症面積を決定した。

20

【図6】肝臓 S M A 遺伝子発現。

【図7】肝臓 C C R 2 遺伝子発現。

【図8】肝臓 C C R 5 遺伝子発現。

【図9】肝臓 C o l 1 a 2 遺伝子発現。

【図10】肝臓 M M P 2 遺伝子発現。

【図11】肝臓 T I M P 2 遺伝子発現。

【図12】肝臓 T G F 1 遺伝子発現。

【発明を実施するための形態】

【0104】

30

図において、表において及び本文において使用される略語

A P - 1	活性化タンパク質
A S B T i	アピカルナトリウム共依存性胆汁酸トランスポーター阻害剤
A S K 1	シグナル調節キナーゼ1
A T 1	アンジオテンシン1
C O P D	慢性閉塞性肺疾患
C T G F	結合組織成長因子
D G A T	ジアシルグリセロール - O - アシルトランスフェラーゼ
D M S O	ジメチルスルホキシド
D N A	デオキシリボ核酸
D P P 4	ジペプチジルペプチダーゼ
E L I S A	酵素結合免疫アッセイ
E O B	エクセスオーバープリス
F A B A C	脂肪酸胆汁酸コンジュゲート
F B S	ウシ胎仔血清
F G F	線維芽細胞成長因子
F X R	ファルネソイドX受容体
G D F	増殖分化因子
G L P - 1	グルカゴン様ペプチド - 1
G P C R	Gタンパク質共役型受容体

40

50

HBV	B型肝炎ウイルス	
HCV	C型肝炎ウイルス	
15-HEPE	5-ヒドロキシエイコサペンタエン酸	
HIV	ヒト免疫不全ウイルス	
HSC	肝星細胞	
IC <sub>50</sub>	50%阻害濃度	
iNOS	誘導型一酸化窒素合成酵素	
IPF	特発性肺性線維症	
LANI	ラニフィブラノール	
LBD	リガンド結合ドメイン	10
LPS	リポ多糖	
LT	ロイコトリエン	
MAPK	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ	
MMP-9	メタロプロテアーゼ9	
MMPase	メタロプロテアーゼ	
NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸	
NAFLD	非アルコール性脂肪性肝疾患	
NASH	非アルコール性脂肪性肝炎	
NF-B	核内因子カッパB	
NOX	NADPHオキシダーゼ	20
NSAIDs	非ステロイド性抗炎症剤	
NTZ	ニタゾキサニド	
PAR	プロテアーゼ活性化受容体	
PBC	原発性胆汁性胆管炎	
PDE	ホスホジエステラーゼ	
PDGF	血小板由来成長因子	
PFIC3	家族性肝内胆汁うっ滞型3	
PFOR	ピルベート：フェレドキシン酸化還元酵素	
PPAR	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体	
PPRE	PPAR応答エレメント	30
PSC	原発性硬化性胆管炎	
ROCK	Rho関連タンパク質キナーゼ	
RTK	受容体チロシンキナーゼ	
SARO	サログリタザル	
SD	標準偏差	
SELA	セラデルバル	
SGLT	ナトリウムグルコース輸送	
STAT	転写のシグナルトランスデューサー及び活性化因子	
TGF	形質転換成長因子	
TGFBRI	TGF受容体I型	40
TGFBRII	TGF受容体II型	
THBS1	トロンボスポンジン1	
THR	甲状腺受容体	
TIMP	メタロプロテアーゼの組織阻害剤	
TLR-4	Toll様受容体4	
TZ	チゾキサニド	
TZG	チゾキサニドグルクロニド	
VAP-1	血管接着タンパク質-1	
【実施例】		
【0105】		50

## 材料及び方法

化合物はジメチルスルホキシド (DMSO、Fluka カタログ番号 41640) に溶解させた。ニタゾキサニド (INTERCHIM カタログ番号 RQ550U)、チゾキサニド (INTERCHIM カタログ番号 RP253)、ラニフィブラノール (ARK PHARM カタログ番号 AK689102)、セラデルバル (ARK PHARM カタログ番号 AK689146) 及びサログリタザル (CHEMEXPRESS カタログ番号 YY-1997A) は市販のものを入手した。

## 【0106】

## hHSC 培養

ヒト始原肝星細胞 (hHSC) (innoprot) を、2% ウシ胎仔血清 (FBS、Sciencell カタログ番号 0010)、1% ペニシリン/ストربتマイシン (Sciencell カタログ番号 0503) 及び星細胞成長補助剤 (SteCGS; Sciencell カタログ番号 5352) を補充した STECM 培地 (Sciencell カタログ番号 5301) で培養した。細胞培養フラスコは、接着をよくするためにポリ-L-リジン (Sigma カタログ番号 P4707) で被覆した。

10

## 【0107】

## 組成物の調製

## 2成分組合せマトリックス (NTZ/エラフィブラノール)

これらの実験では、チェッカーボードマトリックスを作成した。NTZ 及びエラフィブラノールストックは、96 ウェルプレート又は 384 ウェルプレートの横の列 (PPAR アゴニストエラフィブラノール) の 5 ポイントシリーズで、及び縦の列 (NTZ) の 6 ポイントシリーズで DMSO に連続希釈した。その後、5 × 6 組合せマトリックスを、すべての単剤濃度の 1 対 1 混合により作成した。化合物ごとの試験濃度は、TGF- $\beta$ 1 で刺激された HSC モデルにおいて -SMA 含有量を測定することにより得られる単剤としてそれぞれの化合物のそれぞれの IC<sub>50</sub> に基づいて選んだ。

20

## 【0108】

次に、2倍及び4倍の濃度並びに2分の1及び4分の1濃度を選択した。

## 【0109】

TGF- $\beta$ 1 を用いた hHSC の活性化及び化合物処置

ヒト始原肝星細胞 (hHSC) (innoprot) を上記の通りに、標準条件下で培養した。それに続いて細胞を、ELISA による -SMA の測定のために、96 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  細胞/ウェル及び 384 ウェルプレートに 6500 細胞/ウェルの密度で蒔いた。次の日、細胞培養培地を取り除き、細胞はリン酸緩衝食塩水 (PBS) (Invitrogen カタログ番号 14190) で洗浄した。hHSC は、無血清及び SteCGS 無し培地で 24 時間欠乏させた。

30

## 【0110】

NTZ、エラフィブラノール又は他の PPAR アゴニスト及びそれぞれの NTZ/エラフィブラノール又は PPAR アゴニスト組合せを用いた処置では、血清欠乏 hHSC は化合物と一緒に 1 時間プレインキュベートし、続いて無血清及び SteCGS 無し培地において追加の 48 時間の期間、線維形成促進性刺激 TGF- $\beta$ 1 (Peprotech カタログ番号 100-21、1 ng/mL) を添加した。

40

## 【0111】

## -SMA ELISA

-SMA のレベルはサンドイッチ ELISA を使用して測定した。手短に述べれば、ELISA プレートのウェルにまず 4 $\mu$ l で一晚捕捉抗体 (マウスモノクローナル抗 ACTA2、Abnova) で被覆した。PBS + 0.2% の Tween 20 で 3 回洗浄した後、PBS + 0.2% の BSA からなるブロッキング液を添加して 1 時間置き、次にさらに洗浄サイクルにかけた。細胞可溶化物は、室温で 2 時間の期間、捕捉抗体への結合のためにウェルに移した。洗浄手順後、検出抗体 (ビオチン化マウスモノクローナル抗 ACTA2、Abnova) を室温で添加して 2 時間置き、続いて 3 回洗浄した。検出では、HR

50

P コンジュゲートストレプトアビジン ( R & R System カタログ番号 D Y 9 9 8 ) をまず室温で 3 0 分間適用させた。洗浄後、HRP 基質 TMB ( B D、番号 5 5 5 2 1 4 ) を添加し、室温暗所で 7 分間インキュベートした。酸化させると、TMB は水溶性の青色反応生成物を形成し、これは硫酸の添加で黄色になり ( 溶解停止 )、分光光度計を使用する 4 5 0 n m での強度の正確な測定が可能になる。発色は溶解物中に存在する S M A の量に正比例する。

#### 【 0 1 1 2 】

エクセスオーバープリス ( E O B ) 法による相乗作用の決定及び E O S H A ( エクセスオーバーハイエスト単剤 ) による確認

S M A E L I S A アッセイで得られた値は、まず T G F - 1 対照に対するパーセント阻害に変換した。次に、これらのパーセント阻害を使用して、E O B ( エクセスオーバープリス ) を決定して薬剤組合せの相乗効果を明確にした。予測されるプリスアディティブィズムスコア ( E ) は第一に式：

$E = ( A + B ) - ( A \times B )$  により決定し、A 及び B は所与の用量での N T Z ( A ) 及びエラフィブラノール、サログリタザル、セラデルパル又はラニフィブラノール ( B ) のパーセント阻害である。同じ用量での組合せ N T Z / エラフィブラノール、サログリタザル、セラデルパル又はラニフィブラノールのプリス予測と観測された阻害の差は「エクセスオーバープリス」スコアである。

#### 【 0 1 1 3 】

・エクセスオーバープリススコア = 0 は、組合せ処置が相加的であることを示している ( 独立した経路効果について予測される通り )

・エクセスオーバープリススコア > 0 は、相加的よりも大きな活性を示している ( 相乗的 ) ; 及び

・エクセスオーバープリススコア < 0 は、組合せが相加的よりも低いことを示している ( 拮抗的 ) 。

組合せ N T Z + エラフィブラノールでは、付加的な全プリススコアはすべての E O B の合計により計算した。

#### 【 0 1 1 4 】

E O H S A は薬剤組合せの評価のために F D A が使用する相乗作用の標準尺度であり、薬剤組合せにより生み出される効果と組み合わせた場合と同じ濃度で組合せ単剤のそれにより生み出される最大の効果の差として計算される ( B o r i s y ら、2 0 0 3 年 ) 。E O B 法により同定される相乗的組合せでは、実験 % 阻害は棒グラフでプロットされ、N T Z / E L A と単剤の間の観察される差の有意性は、一元配置分散分析及び未修正フィッシャー L S D 事後により評価した ( \* :  $p < 0 . 0 5$  ; \* \*  $p < 0 . 0 1$  ; \* \* \*  $p < 0 . 0 0 1$  ) 。

#### 【 0 1 1 5 】

線維を形成している N A S H ( 1 2 週間 ) の場合、慢性 C D A A + 1 % コレステロールモデルにおけるエラフィブラノール、ニタゾキサニド及び組合せエラフィブラノール + ニタゾキサニドの評価

##### 実験設計

コリン欠乏及び L アミノ酸限定 ( C D A A ) 食はコリンを欠き、コリンは肝臓 酸化及び極めて低密度のリポタンパク質産生に不可欠であり、肝細胞を誘導して脂肪を貯蔵させその後細胞損傷を引き起こすと考えられている。C D A A 食誘発性齧歯類モデルは比較的短期間に線維症を発症し、N A S H 病理、特に線維症の可逆性を迅速に研究するのに理想的である。

#### 【 0 1 1 6 】

N A S H のいくつかのマウスモデルではコレステロール摂取量が増加すると肝線維症が加速される。肝線維症の悪化は主に肝星細胞での遊離コレステロールの蓄積を含み、そのために形質転換成長因子 ( T G F ) に対する細胞の感受性が増し、その後肝線維症はさらに悪化する。

10

20

30

40

50

## 【0117】

本研究では、1%のコレステロールを補充されたC D A A食を与えられるC 5 7 B 1 / 6 Jマウスにおいて肝線維症に対するニタゾキサニドの効果を調べた。

## 【0118】

エラフィブラノール単独、N T Z単独及び両方の組合せの予防効果をC D A A + 1%コレステロール食を与えたマウスの線維を形成しているN A S Hモデルにおいて評価した。生後6週間のオスC 5 7 B 1 / 6 Jマウスに对照(C S A A)食、C D A A + 1%コレステロール食、又はエラフィブラノール1及び3 mg / kg / 日、N T Z 30及び100 mg / kg / 日を補充したC D A A + 1%コレステロール食、若しくは組合せ薬物(エラフィブラノール1及び3 mg / kg / 日をN T Z 30及び100 mg / kg / 日と組み合わせた)を12週間与えた。

10

## 【0119】

体重及び食糧摂取量は週ごとに2度モニターした。処置の最終日、マウスは6時間の絶食期間後屠殺した。生化学及び組織学的研究のために肝臓を速やかに切除した。

## 【0120】

すべての動物手順は、標準プロトコルに従って、並びに実験動物の適切な世話及び使用についての標準推奨通りに実施した。

## 【0121】

生後6週間のC 5 7 B L / 6 Jオスマウスに、表1に詳述される実験計画に従って12週間餌を与えた。

20

## 【0122】

## 【表1】

食餌	化合物	用量 mg/kg/日	マウスの数
CSAA			8
			12
CDAA+1%コレステロール食	エラフィブラノール	1	8
		3	8
	NTZ	30	8
		100	8
	エラフィブラノール+NTZ	1+30	8
		1+100	8
		3+30	8
	3+100	8	

30

表1:実験計画

40

## 【0123】

对照はC S A A食であった。

一部のマウスにはC D A A c食を与えた。

一部のマウスにはエラフィブラノール1又は3 mg / kg / 日を補充したC D A A c食を与えた。

一部のマウスにはN T Z 30又は100 mg / kg / 日を補充したC D A A c食を与えた。

一部のマウスにはエラフィブラノールとN T Z組合せを異なる比: 1 + 30、1 + 100

50



、3 + 30及び3 + 100 mg / kg / 日で補充したC D A A c食を与えた。

【0124】

NTZを30 mg / kgで補充したC D A A c食に対応する群は、30 mg / kg / 日の理論的用量に対応するC D A A食 + ニタゾキサニド0.02% (wt / wt) を与えられるC57Bl / 6Jマウスとも名付けられる。

【0125】

NTZを100 mg / kgで補充したC D A A c食に対応する群は、100 mg / kg / 日の理論的用量に対応するC D A A食 + ニタゾキサニド0.0667% (wt / wt) を与えられるC57Bl / 6Jマウスとも名付けられる。

【0126】

餌はSsniff (登録商標)社 (Soest, Germany) から購入した。

【0127】

ニタゾキサニド (表1の注記参照) はSsniff (登録商標) によりC D A A + 1% コレステロール食中に粉末形態で要求される用量まで組み込まれた。

【0128】

ニタゾキサニドの注記及びバッチ番号は表2にまとめられている。

【0129】

【表2】

表2:ニタゾキサニドの注記

化合物 (INN)	実験コード		供給業者	注記	バッチ
	外部ID	Genfit ID			
ニタゾキサニド	GFE 50455	GSL022597.08	Interchim	RQ550	1501

【0130】

用量ごとに、正確な用量の計算は以下の例に従って行った。これにより、それぞれのマウス群が正確に摂取したそれぞれの製品の正確な用量を計算に入れることが可能になる。

【0131】

実際の処置用量の計算：ニタゾキサニド0.02% (wt / wt) の場合の例

・ 餌摂取量は、グラム餌 / グラム動物 / 日で表される

・ 餌中0.02%のニタゾキサニド

$$0.02 \text{ g の c p d} / 100 \text{ g の 餌} = 0.2 \text{ mg の c p d} / \text{g の 餌}$$

・ c p d の実際の用量：

$$0.2 \text{ mg の c p d} / \text{グラム 餌} / \text{グラム 動物} / \text{日}$$

$$(0.2 \text{ mg の c p d} / \text{グラム 餌} / \text{グラム 動物} / \text{日}) \times 1000 = (0.2 \text{ mg}$$

$$\text{の c p d} / \text{グラム 餌} / \text{kg の 動物} / \text{日}) = 200 \text{ mg の c p d} / \text{グラム 餌} / \text{kg の 動物} / \text{日}$$

したがって、グラム餌 / グラム動物 / 日で表される餌摂取量値に200を掛ける；得られた値は、mgのNTZ / kgの動物 / 日で表される実際の投与用量に一致する。

【0132】

同じ様に、

・ NTZ0.0667% wt / wtの用量では、実際の処置用量は餌摂取量値 (グラム餌 / グラム動物 / 日) に66.7を掛けることにより得られた。

【0133】

・ NTZ0.0667% wt / wtの用量では、実際の処置用量は餌摂取量値 (グラム餌 / グラム動物 / 日) に667を掛けることにより得られた。

【0134】

計算に従えば、計算された用量対推定用量は以下の表3及び4で与えられる。

【 0 1 3 5 】

【 表 3 】

群	GFT505		NTZ	
	1mpk	3mpk	30mpk	100mpk
推定用量	1mpk	3mpk	30mpk	100mpk
計算された用量	1mpk	2.8mpk	26.3mpk	78.1mpk

表3:異なる用量での化合物ごとの推定及び計算された用量

10

【 0 1 3 6 】

【 表 4 】

群	組合せ1		組合せ2		組合せ3		組合せ4	
	GFT505	NTZ	GFT505	NTZ	GFT505	NTZ	GFT505	NTZ
推定用量	1mpk	30mpk	1mpk	100mpk	3mpk	30mpk	3mpk	100mpk
計算された 用量	0.9mpk	26.4mpk	0.9mpk	79.4mpk	2.9mpk	27.4mpk	2.8mpk	77.7mpk

20

表4:異なる用量での組合せごとの推定及び計算された用量

【 0 1 3 7 】

体重及び餌摂取量は研究中ずっと週2度記録した。

【 0 1 3 8 】

処置期間の終了時、動物はイソフルランで麻酔にかけ、血液試料は下記の通りに採取した。次に動物は頸椎脱臼により屠殺し、脳切除及び秤量のために首を切断した。肝臓も収集して秤量した。肝臓の一部は4%ホルマリンで固定してパラフィンに包埋し、組織学的分析に使用した。残りの肝臓は液体窒素で瞬間凍結させ、さらなる分析のために使用するまで-80に保った。

30

【 0 1 3 9 】

血液試料採取は6時間の絶食期間に続く屠殺時に実施した。血液試料は後眼窩穿刺 (retro orbital puncture) により麻酔下で引き出した。血液を含有するヘパリンチューブを急速に遠心分離し(4,000rpm/4で15分間)、血漿画分を収集した。血漿アリコートはさらなる分析まで-20で保存した。

【 0 1 4 0 】

血漿生化学

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)

40

ALTの血漿濃度は、Daytona automateの適切なRandoxキット (Randox、カタログ番号AL3801) を使用して決定した。手短に述べれば、血漿試料内のALTは、オキソグルタル酸及びL-アラニンをL-グルタミン酸塩及びピルベートに酵素的に変換する。NADHの存在下で、生成したピルベートは乳酸デヒドロゲナーゼにより転換されてL-乳酸塩及びNAD<sup>+</sup>を形成する。反応の動態学は研究されており、ALTの血漿レベルを計算することができる。結果はU/Lで表される。

【 0 1 4 1 】

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)

ASTの血漿濃度は、Daytona automateの適切なRandoxキット (Randox、カタログ番号AS3804) を使用して決定した。手短に述べれば、血

50

漿試料内のASTは、オキソグルタル酸塩及びL-アスパラギン酸塩をL-グルタミン酸塩及びオキサロ酢酸塩に酵素的に変換する。NADHの存在下で、生成したオキサロ酢酸塩はリンゴ酸デヒドロゲナーゼにより転換されてL-リンゴ酸塩及びNAD<sup>+</sup>を形成する。反応の動態学は研究されており、ASTの血漿レベルを計算することができる。結果はU/Lで表される。

【0142】

組織学

屠殺時、肝臓試料は組織学的分析のために処理され、以下の通りに試験した。

【0143】

組織包埋及び切片化

肝臓切片は先ずホルマリン4%液中12時間固定した。次に、肝臓片はPBSで30分間洗浄し、エタノール液(70、80、95及び100%エタノールの連続浴槽)中で脱水した。肝臓片はキシレンの3つの異なる浴槽(Sigma-Aldrich、カタログ番号534056)、続いて液体パラフィン(60)の2つの浴槽でインキュベートした。次に、肝臓片はHistowax(登録商標)で穏やかに満たされたラック中に入れ組織を完全に覆った。

10

【0144】

組織片を含有するパラフィンブロックはラックから取り除き、室温で保存した。肝臓塊は3µm薄片に切断した。

【0145】

ピクロシリウスレッド染色

肝臓切片は脱パラフィンし、再水和し、0.5%酢酸(Sigma-Aldrich、カタログ番号695092)の浴槽ですすぐ前にFast Green FCF0.04%(Sigma-Aldrich、カタログ番号F7258)の溶液中15分間インキュベートした。次に、肝臓切片は水ですすぎ、飽和水性ピクリン酸(Sigma-Aldrich、カタログ番号P6744)中Fast Green FCF0.04%~0.1%シリウスレッド(Direct Red 80、Fluka カタログ番号43665)の溶液中30分間インキュベートした。次に切片は脱水し、CV Mount 培地(Lexica、カタログ番号14046430011)を使用してマウントした。

20

【0146】

組織学的検査

それぞれの肝臓検体の供給源に盲検の専門家が組織学的検査を実施した。バーチャルスライドは、3D HistechからPannoramic 250スキャナーを使用して作成した。Quant Centerソフトウェア(Pattern Quant及びHisto Quantモジュールを含む、3D Histech)を使用して、コラーゲン染色域を定量化した。手短に述べれば、Pattern Quantを使用して組織を検出し、その表面を測定した。次に、Histo Quantを使用して、色閾値法に基づいて、染色コラーゲン含有量を検出しその表面を測定した。次に線維症域は、動物ごとの全組織に対するコラーゲン表面のパーセントとして表した。

30

【0147】

肝線維症ステージ分類は、CRN線維症基準を使用して盲検評価した。

40

【0148】

パラメータ、定量化/計数化及び検討した分野の数に関する詳細は以下の表5に提供されている。

【0149】

【表 5】

パラメータ	スコアの ポイント	記述  (全セクションを検討した)
線維症	0	線維症無し
	1	小葉中心性類洞周囲/細胞周囲線維症又は門脈/門脈周囲線維症
	2	小葉中心性類洞周囲/細胞周囲線維症及び門脈/門脈周囲線維症
	3	小葉中心性類洞周囲/細胞周囲線維症及び/又は局所的若しくは広 範な架橋線維症を伴う門脈線維症
	4	肝硬変

10

20

表5:線維症についてのCRNの基準

## 【0150】

## 統計解析

実験結果は平均 ± 標準偏差 (SD) として表され、棒グラフ又は曲線としてプロットした。統計解析は、Prismバージョン7を使用して以下の通りに実施した。屠殺後に実施した測定では、CSAA対CDA A + 1%コレステロール群を、スチューデントt検定 (# : p < 0.05 ; ## : < 0.01 ; ### : p < 0.001) により又はマンホイットニー検定 (\$ : p < 0.05 ; \$\$ : < 0.01 ; \$\$\$ : p < 0.001) により比較した。処置群は、一元配置分散分析及び未修正フィッシャーLSD事後によりCDA A + 1%コレステロール食と比較した (\* : p < 0.05 ; \*\* p < 0.01 ; \*\*\* p < 0.001)。

30

## 【0151】

## 肝臓コラーゲン含有量の測定

肝臓コラーゲン含有量は適切なQuick Zymeキット (Total collagen assay、カタログ番号QZB-totcol5) を使用して決定した。アッセイはヒドロキシプロリンの検出に基づいており、これはコラーゲンの三重螺旋体で主に見出される非タンパク質原性アミノ酸である。したがって、組織加水分解物中のヒドロキシプロリンは、組織に存在するコラーゲンの量の直接の尺度として使用することが可能である (プロコラーゲン、成熟コラーゲン及びコラーゲン分解産物の区別はない)。

40

## 【0152】

ヒドロキシプロリンの投与前には95%、6MのHClでの組織試料の完全な加水分解が必要である。アッセイにより570nmで最大吸光度を有する色素原が生成する。結果はmgコラーゲン/g肝臓として表される。

## 【0153】

## プロコラーゲンIII N末端プロペプチド (PIIINP)

PIIINPの血漿濃度は、Cloud-Clone Corp社製のELISAアッセイ (カタログ番号SEA573Ra) を製造業者の説明書に従って使用して決定した。マイクロタイタープレートにPIIINPに特異的な抗体をプレコートする。標準又は試

50

料を、P I I I N P に特異的なビオチンコンジュゲート抗体と一緒に適切なマイクロタイタープレートウェルに添加する。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) にコンジュゲートしたアビジンをそれぞれのマイクロプレートウェルに添加しインキュベートする。T M B 基質溶液を添加した後、P I I I N P、ビオチンコンジュゲート抗体及び酵素コンジュゲートアビジンを含有するウェルのみが色の変化を示す。酵素基質反応は硫酸溶液の添加により終了させ、色の変化は  $450\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$  の波長で分光光度的に測定する。次に試料中の P I I I N P の濃度は、試料の O D を標準曲線と比較することにより決定する。結果は  $\text{pg/mL}$  で表される。

**【 0 1 5 4 】**

遺伝子発現

RNA 抽出

肝臓全 RNA は、N u c l e o s p i n ( 登録商標 ) 9 6 キット ( M a c h e r e y N a g e l ) を製造業者の説明書に従って使用して単離した。1 5 0 n g の全 RNA は、R T バッファー 1 x ( I n v i t r o g e n カタログ番号 P / N Y 0 2 3 2 1 )、1 m M の D T T ( I n v i t r o g e n カタログ番号 P / N Y 0 0 1 4 7 )、0 . 5 m M の d N T P ( P r o m e g a )、2 0 0 n g p d N 6 ( R o c h e カタログ番号 1 1 0 3 4 7 3 1 0 0 1 ) 及び 4 0 U のリボヌクレアーゼ阻害剤 ( P r o m e g a カタログ番号 N 2 5 1 5 ) の存在下、M - M L V - R T ( モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 ) ( I n v i t r o g e n カタログ番号 2 8 0 2 5 ) を使用して c D N A に逆転写した。

10

20

**【 0 1 5 5 】**

次に、定量的 P C R を、C F X 9 6 T o u c h ( 商標 ) リアルタイム P C R 検出システム ( B i o r a d ) を使用して実行した。手短に述べれば、P C R 反応を、i Q S Y B R G r e e n S u p e r m i x キット ( B i o r a d カタログ番号 1 7 0 8 8 7 ) を使用して、9 6 ウェルプレートにおいて 5 x 希釈逆転写混合物の  $5\ \mu\text{l}$  で実施した。実験条件は、 $20\ \mu\text{L}$  の容積反応並びに  $0.5\ \mu\text{L}$  のそれぞれのリバーズ及びフォワードプライマー (  $10\ \text{pM}$  ) であった。

**【 0 1 5 6 】**

【表 6】

プライマー名	配列ID	配列 (5'→3')
αSMA フォワード	1	CTGACAGAGGCACCACTGAA
αSMA リバース	2	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
Col1α1 フォワード	3	AGGCGAACAAGGTGACAGAG
Col1α1 リバース	4	GCCAGGAGAACCAGCAGAG
Col1α2 フォワード	5	ATTGGAAGCCGAGGTCCCAG
Col1α2 リバース	6	TTTGCCCCCAGGTATGCCAG
TGFβ1 フォワード	7	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA
TGFβ1 リバース	8	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC
TIMP1 フォワード	9	ATTCAAGGCTGTGGGAAATG
TIMP1 リバース	10	CTCAGAGTACGCCAGGGAAC
TIMP2 フォワード	11	GCATCACCCAGAAGAAGAGC
TIMP2 リバース	12	GGGTCCTCGATGTCAAGAAA
MMP2 フォワード	13	TCCCTAAGCTCATCGCAGAC
MMP2 リバース	14	GCTTCCAAACTTCACGCTCT
MMP7 フォワード	15	TAATTGGCTTCGCAAGGAGA
MMP7 リバース	16	AAGGCATGACCTAGAGTGTTCC
CCR2 フォワード	17	TAATATGTTACCTCAGTTCATCCACGG
CCR2 リバース	18	TGCTCTTCAGCTTTTTTACAGCCTATC
CCR5 フォワード	19	ATTCTCCACACCCTGTTTCG
CCR5 リバース	20	GAATTCCTGGAAGGTGGTCA
GAPDH フォワード	21	TATGACTCCACTCACGGCAA
GAPDH リバース	22	TCCACGACATACTCAGCACC

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 7 】

発現レベルは参照として G A P D H 遺伝子の発現を使用して正規化した。

## 【 0 1 5 8 】

遺伝子ごとに、P C R 反応効率が 1 0 0 % に近付き相関係数が 1 に近づくように、最良のポイント（少なくとも 3 ポイント）を選択することにより標準曲線を描いた。発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子と標的遺伝子の両方についての標準曲線方程式を使用して決定した（それぞれの標的遺伝子の特定の P C R 効率を考慮して）。

## 【 0 1 5 9 】

結果及び結論

分化した筋線維芽細胞の異常な持続性は多くの線維性疾患の特徴である。

## 【 0 1 6 0 】

肝損傷に続いて、静止状態の H S C は、（ - S M A ）陽性筋線維芽細胞への分化を特徴とする活性化の過程を経る。

## 【 0 1 6 1 】

単剤としての N T Z は、T G F 誘発性 h H S C において抗線維化活性を与えることが

明らかにされた(図1B)。NTZはその活性な代謝物チゾキサニド(TZ)に急速に加水分解されることが知られているので(Broekhuysen、Stockisら、2000年)、この代謝物もHSCにおけるその抗線維化活性について評価した。TZは、親薬物に類似するプロファイルを示した(データは示さず)。一方、エラフィブラノールのような一部のPPARアゴニストも、TGF誘発性HSCモデルにおいて抗線維化プロファイルを有することが明らかになった(図1A)。ベザフィブラートのような他のPPARアゴニストは弱い活性を有することが明らかになった。これから、PPARアゴニストがその抗線維化プロファイルに関して等価ではないことが示唆される(図1C)。

#### 【0162】

エラフィブラノールとNTZの組合せが相乗の様式で線維症を低減することができるかどうかを評価するため、TGF誘発性HSCにおいて組合せマトリックス実験を実施した。手短に述べれば、NTZ及びエラフィブラノール溶液をエラフィブラノール/NTZ比の大きなパネルに及ぶ42の組合せマトリックスを作成するチェッカーボードフォーマットで連続希釈した。相乗作用はまずエクセスオーバーリススコアを計算することにより判定した。これらの実験により、NTZはエラフィブラノールと相乗作用して活性化HSCにおいて-SMA産生を低減することが可能であることが明らかにされた。いくつかの組合せ対は10よりも上のEOBスコアを有することが明らかになった。このスコアは相乗作用を示している(図2B)。

#### 【0163】

相乗作用を検証するため、上位EOBスコアに対応する実験値を棒グラフにプロットした(図2C)。これらのグラフは、NTZとエラフィブラノールの組合せが、最も高い単剤(NTZ又はエラフィブラノール)と比べて統計的に有意である優れた抗線維化効果を示していることを図示している。最も印象的な例は、NTZ 0.6  $\mu$ Mとエラフィブラノール 5  $\mu$ Mの組合せ対で表されている。NTZは0.6  $\mu$ Mではほぼ全く抗線維化活性を示さないが、エラフィブラノールを5  $\mu$ M添加すると-SMAの55%の強い低下が生じ、この数字は単剤単独で観察される効果よりもはるかに強い。他のPPARアゴニスト、サログリタザル、セラデルパル及びラニフィブラノールとNTZの組合せが線維症を相乗の様式で低減することが可能かどうかを評価するため、組合せマトリックス実験もTGF誘発性HSCにおいて実施し、EOBスコアを決定した。NTZのサログリタザルとの組合せを用いた相乗作用を評価するために、セラデルパル及びラニフィブラノールを抗線維化活性に関して検証した。NTZとサログリタザル、セラデルパル又はラニフィブラノールとの組合せはEOBスコア > 0 有することが明らかになった。この数字は相乗作用を示している。サログリタザル 2.5  $\mu$ MとNTZ 0.625  $\mu$ Mの組合せも-SMAの52%の強い低下が生じ、この数字は単剤単独で観察される効果よりもはるかに強い(図3A)。セラデルパル 20  $\mu$ MとNTZ 2.5  $\mu$ Mの組合せも-SMAの72%の強い低下が生じ、この数字は単剤単独で観察される効果よりもはるかに強い(図3B)。これほどではないが、ラニフィブラノール 10  $\mu$ MとNTZ 1.25  $\mu$ Mの組合せは有意( $p = 0.06$ )である傾向があり、NTZと比べて活性化HSCにおける-SMA産生を低減する(図3C)。

#### 【0164】

結論として、本出願者は、式(I)の化合物と特定のPPARアゴニストの組合せについて思いがけない抗線維化活性を発見した。これらの結果は、式(I)の化合物とPPARアゴニストの組合せが相乗的になることが可能であり、複数のタイプの線維性疾患に治療効果をもたらすことが可能であることを示唆している。

#### 【0165】

コリン欠乏及びL-アミノ酸欠乏(CDAA) + 1%コレステロール食をマウスに投与すると、ヒト非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に病理学的に類似する進行性線維化脂肪性肝炎を引き起こす。

#### 【0166】

CDAA + 1%コレステロール食は、図4に示されるように、特に肝臓コラーゲンの有

10

20

30

40

50

意な増加を誘発する。

【0167】

この図は、エラフィブラノール又はNTZ単独の投与が肝臓コラーゲン含有量を減少することも示している。コラーゲンの減少は投与されたエラフィブラノール又はNTZの用量に比例する。

【0168】

エラフィブラノールとNTZの組合せを投与した場合、産生されるコラーゲンの減少は、別々に服用したそれぞれの化合物について観察される減少よりも大きい。

【0169】

したがって、コラーゲン産生の減少に対してエラフィブラノールとNTZの組合せの相乗効果がある。言い換えると、エラフィブラノールとNTZを組み合わせると、抗線維化効果が認められる。

10

【0170】

計算された用量で表すと、エラフィブラノール2.8mpk(kgあたりのmg)とNTZ77.7mpkを含む組合せではさらに優れた効果が観察される。

【0171】

図5は組織学を用いて得られた結果、すなわち、動物ごとの全組織に対するコラーゲン表面のパーセントとして表された線維症域の決定を表している。

【0172】

CDA A + 1%コレステロール食は、特に、線維症パーセントの有意な増加を誘発する。

20

【0173】

図5は、エラフィブラノール又はNTZ単独の投与が線維症パーセントを減少することも示している。減少は投与されたエラフィブラノール又はNTZの用量に比例する。

【0174】

エラフィブラノールとNTZの組合せを投与した場合、線維症パーセントの減少は、別々に服用したそれぞれの化合物について観察される減少よりも大きい。

【0175】

したがって、線維症パーセントの減少に対してエラフィブラノールとNTZの組合せの相乗効果がある。言い換えると、エラフィブラノールとNTZを組み合わせると、抗線維化効果が認められる。

30

【0176】

計算された用量で表すと、エラフィブラノール2.8mpk(kgあたりのmg)とNTZ77.7mpkを含む組合せではさらに優れた効果が観察される。

【0177】

図6~12は、線維症の異なる肝臓マーカーの遺伝子発現を表している。すべてのマーカーで、CDA A + 1%コレステロール食は、特に、遺伝子発現の有意な増加を誘発する。

【0178】

エラフィブラノール又はNTZ単独の投与が異なる遺伝子発現のレベルを減少することも認められる。減少は投与されたエラフィブラノール又はNTZの用量に比例する。

40

【0179】

エラフィブラノールとNTZの組合せを投与した場合、遺伝子発現の減少は、別々に服用したそれぞれの化合物について観察される減少よりも大きい。

【0180】

したがって、線維症の異なる肝臓マーカーの遺伝子発現の減少に対してエラフィブラノールとNTZの組合せの相乗効果がある。言い換えると、エラフィブラノールとNTZを組み合わせると、相乗的な抗線維化効果が認められる。

【0181】

結論として、本出願者は、式(I)の化合物と特定のPPARアゴニストの組合せにつ

50



いて思いがけない相乗的な抗線維化活性を発見した。これらの結果は、式(Ⅰ)の化合物とPPARアゴニストの組合せが相乗的になることが可能であり及び/又は付加効果を有することが可能であり、複数のタイプの線維性疾患に治療効果をもたらすことも可能であることを示唆している。

【 0 1 8 2 】

## 【表 7】

## 参考文献

- Broekhuysen, J., A. Stockis, et al. (2000). "Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man." Int J Clin Pharmacol Ther **38**(8): 387-394.
- Borisy, A.A., Elliott, P.J., Hurst, N.W., Lee, M.S., Lehar, J., Price, E.R., Serbedzija, G., Zimmermann, G.R., Foley, M.A., Stockwell, B.R., Keith C.T. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):7977-82. 10
- de Carvalho, L. P. S., C. M. Darby, et al. (2011). "Nitazoxanide disrupts membrane potential and intrabacterial pH homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*." ACS Med. Chem. Lett. **2**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 849-854.
- Di Santo, N. and J. Ehrisman (2014). "A functional perspective of nitazoxanide as a potential anticancer drug." Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen. **768**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 16-21.
- Dubreuil, L., I. Houcke, et al. (1996). "In vitro evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms." Antimicrob. Agents Chemother. **40**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2266-2270. 20
- Finegold, S. M., D. Molitoris, et al. (2009). "Study of the in vitro activities of rifaximin and comparator agents against 536 anaerobic intestinal bacteria from the perspective of potential utility in pathology involving bowel flora." Antimicrob. Agents Chemother. **53**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 281-286.
- Fox, L. M. and L. D. Saravolatz (2005). "Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent." Clin. Infect. Dis. **40**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1173-1180. 30
- Hemphill, A., J. Mueller, et al. (2006). "Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections." Expert Opin. Pharmacother. **7**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 953-964.
- Hoffman, P. S., G. Sisson, et al. (2007). "Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*." Antimicrob. Agents Chemother. **51**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 868-876. 40
- Megraudd, F., A. Occhialini, et al. (1998). "Nitazoxanide, a potential drug for eradication of *Helicobacter pylori* with no cross-resistance to metronidazole." Antimicrob. Agents Chemother. **42**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2836-2840.
- Pankuch, G. A. and P. C. Appelbaum (2006). "Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic

species." *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1112-1117.

Rossignol, J.-F. (2014). "Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent." *Antiviral Res.* **110**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 94-103.

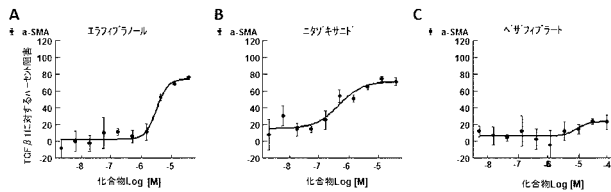
Rossignol, J. F. and R. Cavier (1975). 2-Benzamido-5-nitrothiazoles, S.P.R.L. Phavic, Belg. . 11 pp.

Rossignol, J. F. and H. Maisonneuve (1984). "Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* infections." *Am J Trop Med Hyg* **33**(Copyright (C) 2015 U.S. National Library of Medicine.): 511-512.

10

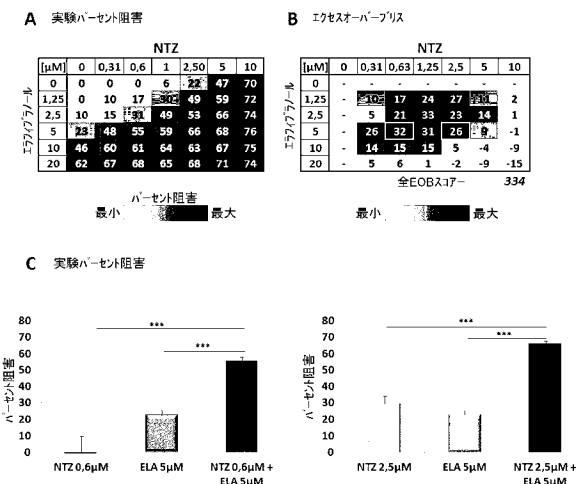
【 図 1 】

FIGURE 1



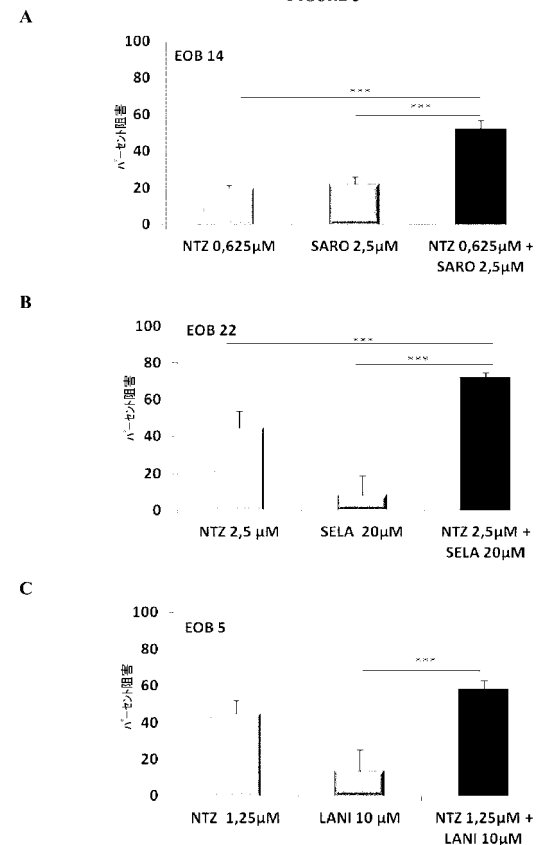
【 図 2 】

FIGURE 2



【 図 3 】

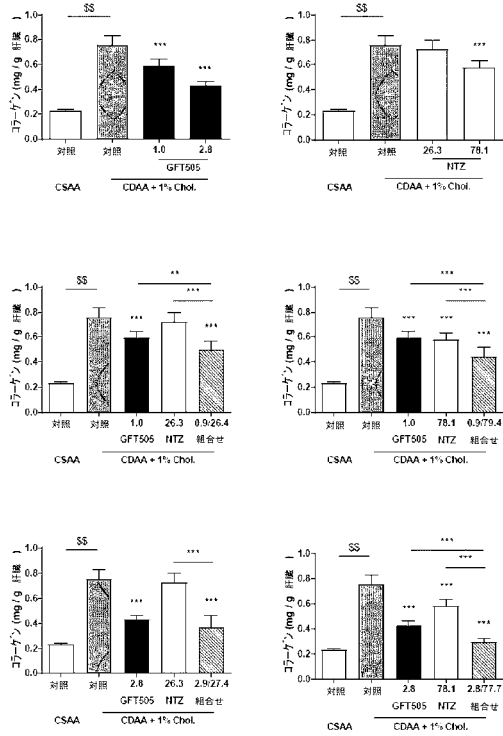
FIGURE 3



【 図 4 】

FIGURE 4

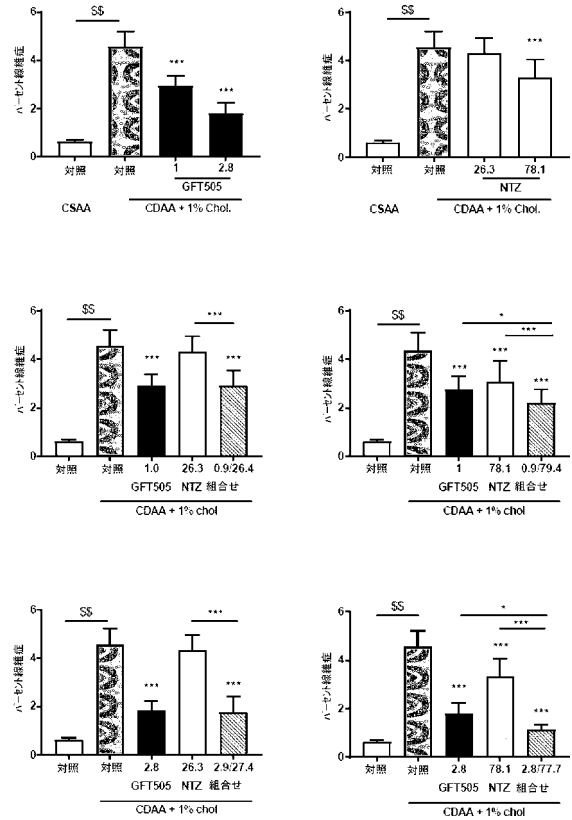
肝臓コラーゲン



【 図 5 】

FIGURE 5

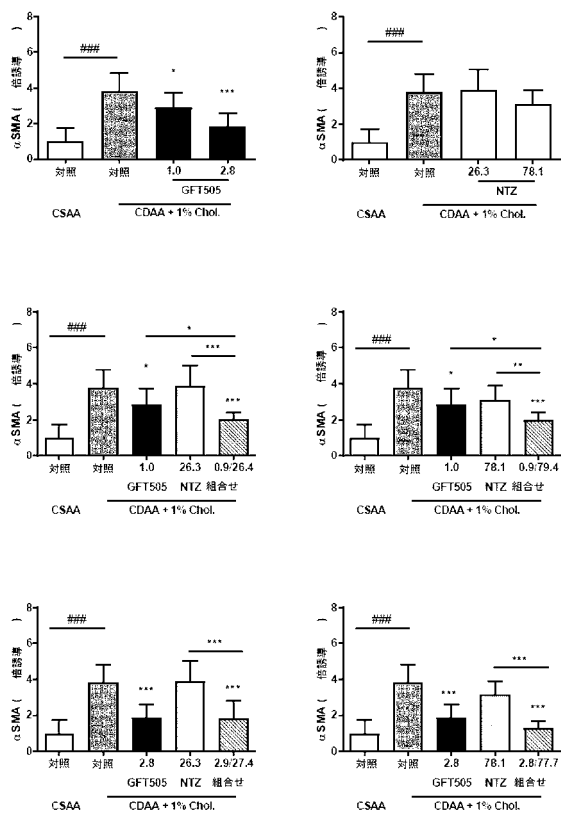
組織学



【 図 6 】

FIGURE 6

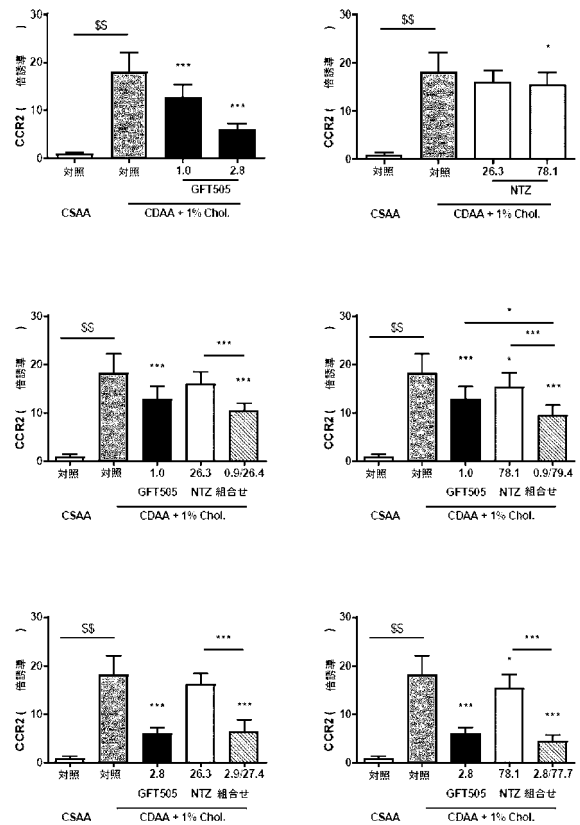
肝臓 αSMA 遺伝子発現



【 図 7 】

FIGURE 7

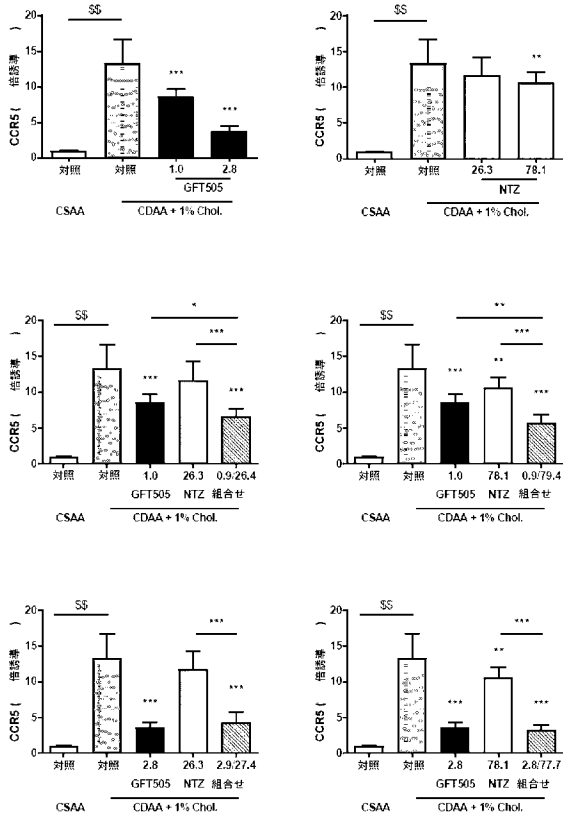
肝臓 CCR2 遺伝子発現



【 図 8 】

FIGURE 8

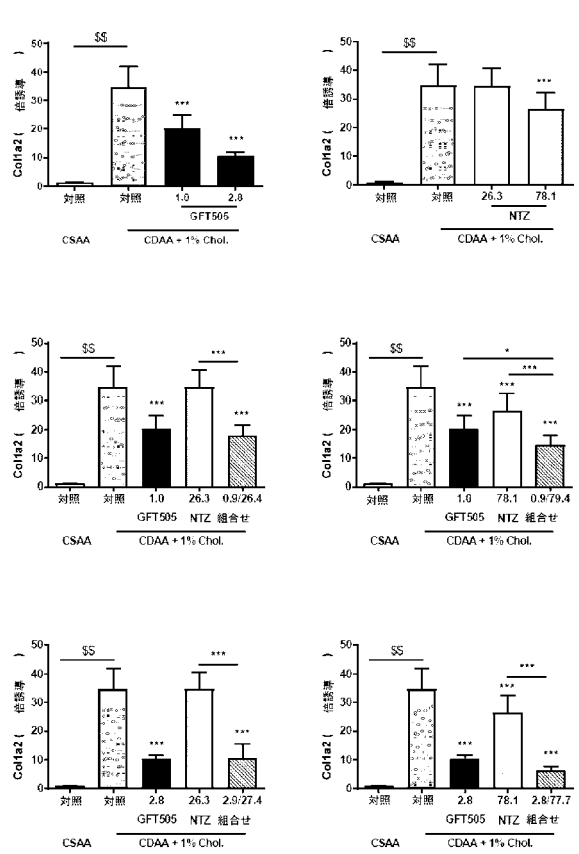
肝臓CCR5遺伝子発現



【 図 9 】

FIGURE 9

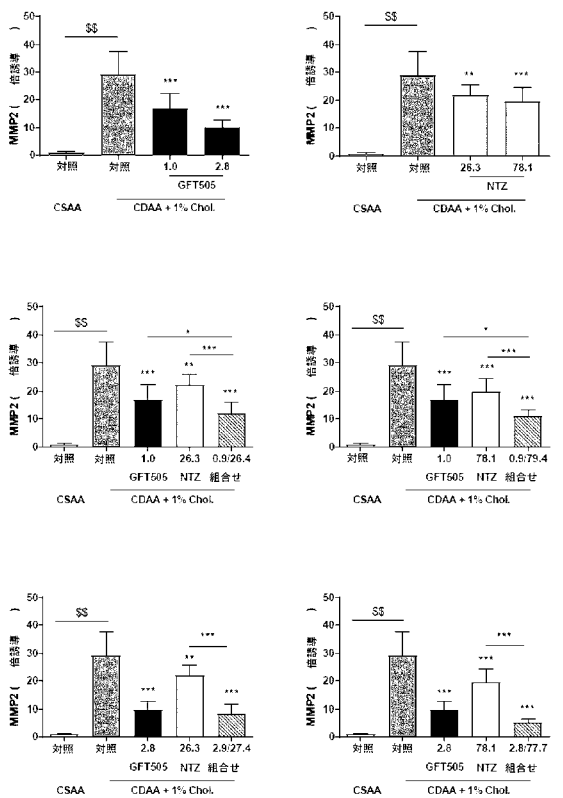
肝臓Col1a2遺伝子発現



【 図 10 】

FIGURE 10

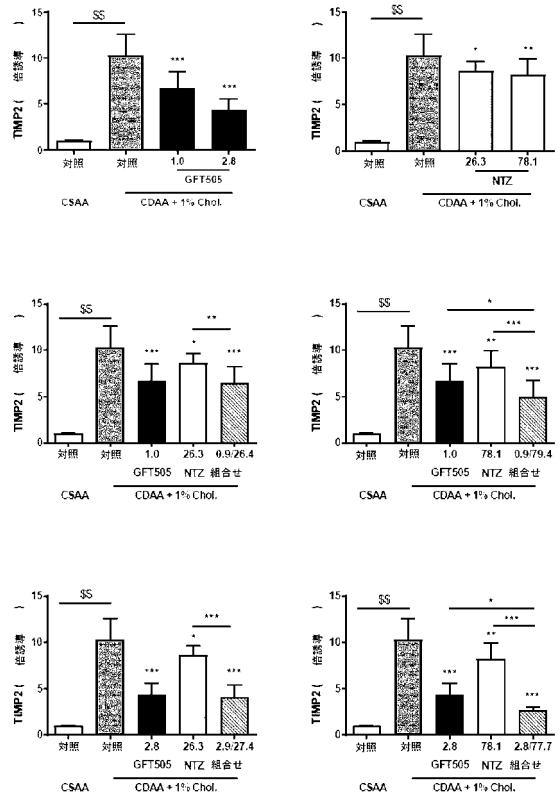
肝臓MMP2遺伝子発現



【 図 11 】

FIGURE 11

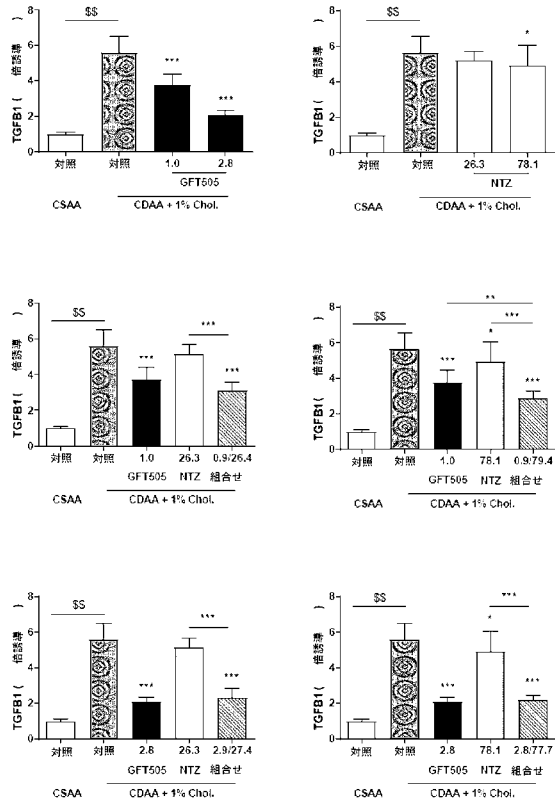
肝臓TIMP2遺伝子発現



【 図 1 2 】

FIGURE 12

肝臓TGFβ1遺伝子発現



【 配列表 】

202050692000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2018/052159

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K31/216 A61K31/192 A61K45/06 A61P3/06 A61P19/04	A61P1/00
ADD.		
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) A61K A61P		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XU TAN ET AL: "Systematic identification of synergistic drug pairs targeting HIV", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 30, no. 11, 14 October 2012 (2012-10-14), pages 1125-1130, XP055065730, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2391 page 1127 - page 1128  ----- -/--	1-5,9, 10,14,15      6-8, 11-13, 16-18
A		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent 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* 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 *X* 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 *Y* 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 *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  10 April 2018		Date of mailing of the international search report  25/04/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Trifilieff-Riolo, S

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/052159

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHOLONGITAS E ET AL: "Review article: Novel therapeutic options for chronic hepatitis C", ALIMENTARY PHARMACOLOGY &amp; THERAPEUTICS, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS LTD., CAMBRIDGE, GB</p> <p>, vol. 27, no. 10 1 May 2008 (2008-05-01), pages 866-884, XP002681940, ISSN: 0269-2813, DOI: 10.1111/J.1365-2036.2008.03644.X Retrieved from the Internet: URL:http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2036.2008.03644.x/pdf [retrieved on 2008-02-12]</p>	1-5,9-15
A	<p>page 870; table 1</p>	6-8, 16-18
A	<p>-----</p> <p>RATZIU ET AL: "ELAFIBRANOR AN AGONIST OF THE PEROXISOME PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTOR ALPHA AND DELTA, INDUCES RESOLUTION OF NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS WITHOUT FIBROSIS WORSENING", GASTROENTEROLOGY,</p> <p>, vol. 150 1 January 2016 (2016-01-01), pages 1147-1159.5, XP002771602, DOI: 10.1053/J.GASTRO.2016.01.038 Retrieved from the Internet: URL:http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085%2816%2900140-2/pdf the whole document</p> <p>-----</p>	1-18



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/04 (2006.01)	A 6 1 P	19/04	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
	A 6 1 P	43/00	1 1 1

(31) 優先権主張番号 17190723.1

(32) 優先日 平成29年9月12日(2017.9.12)

(33) 優先権主張国・地域又は機関  
欧州特許庁(EP)

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72) 発明者 ベランジェ, カロル  
フランス国、5 9 9 1 0・ボンデュ、アレ・デュ・ベルジエ・3(72) 発明者 ノエル, ブノワ  
フランス国、5 9 1 4 7・ゴンデクール、リュ・ドゥ・ラ・パール・4 0・ビス

Fターム(参考) 4C084 AA19 AA22 AA23 MA13 MA16 MA22 MA23 MA27 MA28 MA31  
MA32 MA34 MA35 MA37 MA43 MA52 MA63 NA05 NA12 NA14  
ZA361 ZA421 ZA751 ZA761 ZB111 ZC211 ZC331 ZC351 ZC412 ZC751  
ZC752  
4C086 AA01 AA02 BC82 MA02 MA04 MA13 MA16 MA22 MA23 MA27  
MA28 MA31 MA32 MA34 MA35 MA37 MA52 MA63 MA66 NA05  
NA12 NA14 ZA36 ZA75 ZA76 ZB11 ZC21 ZC33 ZC35 ZC41  
ZC75