

(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2021-510175

(P2021-510175A)

(43) 公表日 令和3年4月15日 (2021.4.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/472 (2006.01)	A 6 1 K 31/472	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/16 (2006.01)	A 6 1 K 31/16	4 C 2 0 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-557142 (P2020-557142)	(71) 出願人	508298488
(86) (22) 出願日	平成31年1月9日 (2019.1.9)		コーネル ユニヴァーシティー
(85) 翻訳文提出日	令和2年8月25日 (2020.8.25)		アメリカ合衆国ニューヨーク州14850
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/012856		, イサカ, パイン ツリー ロード
(87) 国際公開番号	W02019/139956		395, スイート 310, センター
(87) 国際公開日	令和1年7月18日 (2019.7.18)		フォー テクノロジー ライセンシング
(31) 優先権主張番号	62/615, 170		, アット コーネル ユニヴァーシティー
(32) 優先日	平成30年1月9日 (2018.1.9)	(74) 代理人	100127926
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 結田 純次
(31) 優先権主張番号	62/699, 424	(74) 代理人	100140132
(32) 優先日	平成30年7月17日 (2018.7.17)		弁理士 竹林 則幸
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 臓器線維症の予防と治療

(57) 【要約】

本開示は、臓器における線維症に罹患している患者に c-P4H 阻害剤を投与して、病的な線維症を解消することを含む、臓器の線維症を治療する方法を提供する。c-P4H 阻害剤は、エアロゾル状態におけるネブライザー、静脈内、腹腔内または皮下注射を使用することを含む、様々な経路で投与される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

そのような治療を必要とする患者における臓器の線維症を治療する方法であって、有効量のコラーゲンプロリル-4-ヒドロキシラーゼ（c-P4H）阻害剤を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2】

臓器は、肺、腎臓および肝臓からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

c-P4H 阻害剤は、断続的に投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

c-P4H 阻害剤は、1 日おき、3 日ごと、5 日ごと、または週 1 回投与される、請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 5】

c-P4H 阻害剤は、1 時間ごと、2 時間ごと、3 時間ごと、6 時間ごと、または 12 時間ごとに投与される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

c-P4H 阻害剤は、静脈内（i. v.）注射、腹腔内（i. p.）注射、皮下（s. c.）注射、またはエアロゾル化送達によって投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

c-P4H 阻害剤は、小分子阻害剤である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

c-P4H の小分子阻害剤は、プロリルヒドロキシラーゼドメイン（PHD）阻害剤である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

PHD 阻害剤は、c-P4H の活性を特異的に阻害する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

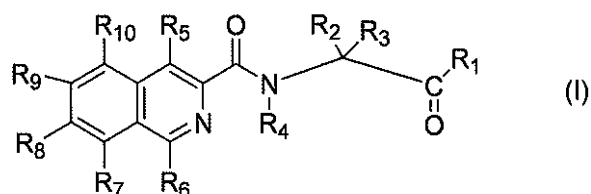
PHD 阻害剤は、ロキサデュスタット（RXD）（FG-4592）、バダダスタット（AKB-6548）、ダプロダスタット（GSK-1278863）、およびモリダスタット（BAY 85-3934）からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

PHD 阻害剤は、以下の化学構造：

30

【化 1】



（式中、R1 は、ヒドロキシル、アルコキシ、置換アルコキシ、アリールオキシ、および置換アリールオキシからなる群から選択され；

40

R2 および R3 は、水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、および置換ヘテロアリールからなる群から独立して選択されるか；または R2 および R3 は、それらが結合している炭素原子と一緒に、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、または置換ヘテロシクロアルキルを形成し；

R4 は、水素、アルキル、および置換アルキルからなる群から選択され；

R5 は、ヒドロキシル、アルコキシ、および置換アルコキシからなる群から選択され；

R6 は、水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シアノ、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、置換アルコキシ、アミノ、置換アミノ、アリールオ

50

キシ、置換アリールオキシ、アミノアシル、置換アミノアシル、シクロアルコキシ、置換シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、アリールオキシ、置換アリールオキシ、ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリールオキシ、置換ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリール、および置換ヘテロアリールからなる群から選択され；
R 7、R 8、R 9 および R 10 は、水素、ハロ、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アルコキシ、置換アルコキシ、アリールオキシ、および置換アリールオキシからなる群から独立して選択される）を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

R 6 はアルキルである、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 13】

前記アルキルはメチルである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

R 5 はヒドロキシルである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

R 8 はアリールオキシである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

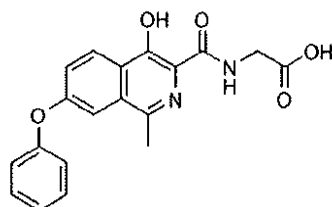
R 6 はメチルであり、R 5 はヒドロキシルである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 PHD 阻害剤は、FG-4592 であり、該 FG-4592 は、化学名 N-[(4-ヒドロキシ-1-メチル-7-フェノキシイソキノリン-3-イル)カルボニル]グリシンおよび以下の化学構造：

20

【化 2】



ロキサデュスタット (FG-4592)

30

を有する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 18】

PHD 阻害剤は、0.2 mg/kg から 20 mg/kg の間の量で投与される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 19】

PHD 阻害剤は、50 mg/kg から 200 mg/kg の間の量で投与される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 20】

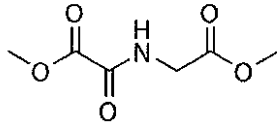
PHD 阻害剤は、2-オキシグルタル酸アナログである、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 21】

2-オキシグルタル酸アナログは、ジメチルオキサリルグリシン (DMOG) であり、該 DMOG は、化学名 N-(2-メトキシ-2-オキサオアセチル)グリシンメチルエステルおよび以下の化学構造：

【化 3】



ジメチルオキサリルグリシン (DMOG)

を有する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

10

前記 DMOG は、50 mg / kg から 200 mg / kg の間の量で投与される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

c-P4H 酵素の活性の阻害は、核酸阻害剤、CRISPR / Cas システム、Cre / Lox システム、TALEN システム、および相同組換えの導入からなる群から選択される方法によって達成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

核酸阻害剤は、アンチセンス RNA、低分子干渉 RNA、RNA i マイクロ RNA、人工マイクロ RNA、およびリボザイムからなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

20

【請求項 25】

細胞内で機能する調節領域に動作可能に連結された、c-P4H 遺伝子の発現の核酸阻害剤に転写されるヌクレオチド配列を含む発現ベクターであって、核酸は、アンチセンス RNA、低分子干渉 RNA、RNA i マイクロ RNA、人工マイクロ RNA、およびリボザイムからなる群から選択される、前記発現ベクター。

【請求項 26】

調節領域は、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーターまたは臓器特異的プロモーターを含む、請求項 25 に記載の発現ベクター。

【請求項 27】

臓器特異的プロモーターは肺特異的プロモーター、腎臓特異的プロモーター、および肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される、請求項 26 に記載の発現ベクター。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018 年 1 月 9 日に提出された米国仮出願第 62 / 615, 170 号、および 2018 年 7 月 17 日に提出された米国仮出願第 62 / 699, 424 号の優先権の利益を主張し、その全ての内容は参照によって本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

40

線維症は先進国における死亡のおよそ 45 % に寄与すると推定されている。細胞外マトリックス、特に線維性コラーゲンの異常または過剰な蓄積として定義される線維症は、特発性肺線維症、肝疾患、腎疾患を含む多くの炎症性および代謝性疾患における進行性臓器機能障害の主要な駆動力である。これらの状態の治療は不十分のままである。効果的な治療法はほとんどなく、線維形成を特異的に標的とする治療法はさらにはない。これは、線維形成の病因のより深い理解の必要性、および新規治療へのこの知識の翻訳の必要性を強調する。

【0003】

肺線維症は、肺組織の瘢痕であり、200 種を超える肺疾患の大きなグループに属する特発性肺線維症 (IPF) は、肺間質の関与を特徴とし、高齢者に発生する原因不明の慢

50

性で進行性の不可逆的線維化性間質性肺炎の特定の形態として定義される。米国では、10万人が特発性肺線維症と共に生活しており、65歳以上の42000人を超える人々が毎年IPFと診断されている。呼吸困難および肺機能の進行性悪化として臨床経過が記載され、予後不良と関連している。治療選択肢は、疾患の進行の停止と症状および臓器機能を改善するための酸素補給に限定されている。IPFの臨床経過には、しばしば入院を伴う急性増悪が含まれる。

【0004】

炎症は、肺における線維症の発症の中心であり、マスト細胞を含む炎症細胞は、肺線維症に豊富に見られる。臨床的には、肺線維症の重症度とマスト細胞数との相関関係は十分に立証されている。肺線維症のマウスモデルにおける以前の研究では、マスト細胞は病理学的コラーゲン沈着に重要な寄与を果たすことが示されている。肺においては、マスト細胞は、コラーゲンの合成と分泌に関与する細胞である線維芽細胞に密接に並置されるように見出される。マスト細胞メディエーターは線維形成性であり、ヒト肺線維芽細胞のコラーゲン合成を刺激する。

【0005】

コラーゲンの成熟した三重らせん型へのアセンブリには、プロコラーゲンにおけるプロリン残基のヒドロキシプロリンへの変換であるプロリルヒドロキシル化が必要である。コラーゲンプロリル-4-ヒドロキシラーゼ (c-P4Hs) は、プロリルヒドロキシル化に関与する酵素である。C-P4H酵素は、活性部位にFe (II) 原子を有し、共基質として酸素と2-OGを必要とする2-オキシグルタル酸 (2-OG) 依存性ジオキシゲナーゼのスーパーファミリーのメンバーである。c-P4H酵素の触媒活性型は、コラーゲンにおけるヒドロキシプロリンの翻訳後形成を触媒する α -2 β -2 四量体である。

【0006】

プロリル-4-ヒドロキシラーゼの別のグループは、低酸素誘導因子 (HIF) に関連するプロリルヒドロキシラーゼドメイン (PHD) 酵素である。HIF PHD酵素はc-P4Hと構造的に関連しており、2-OG依存性ジオキシゲナーゼのスーパーファミリーにも属している。2-OGと構造的に類似している競合阻害剤として機能するHIF PHD拮抗薬の複数の例がある。これらの阻害剤は、2番目の酸素がトランス-4-ヒドロキシプロリンを形成する際に、分子状の2個の酸素から1個の酸素を受け入れてコハク酸になる補因子である2-OGの競合的拮抗薬として働く。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

一態様では、本開示は、有効量のコラーゲンプロリル-4-ヒドロキシラーゼ (c-P4H) 阻害剤を患者に投与することを含む、そのような治療を必要とする患者の臓器の線維症を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、臓器は、肺、腎臓および肝臓からなる群から選択される。

【課題を解決するための手段】

【0008】

いくつかの実施形態では、c-P4H阻害剤は、断続的に投与される。

【0009】

いくつかの実施形態では、c-P4H阻害剤は、1日おき、3日ごと、5日ごと、または週1回投与される。いくつかの実施形態では、c-P4H阻害剤は、1時間ごと、2時間ごと、3時間ごと、6時間ごと、または12時間ごとに投与される。

【0010】

いくつかの実施形態では、c-P4H阻害剤は、静脈内 (i. v.) 注射、腹腔内 (i. p.) 注射、皮下 (s. c.) 注射、またはエアロゾル化送達によって投与される。

【0011】

いくつかの実施形態では、c-P4H阻害剤は、小分子阻害剤である。いくつかの実施形態では、c-P4Hの小分子阻害剤は、プロリルヒドロキシラーゼドメイン (PHD)

10

20

30

40

50

阻害剤である。いくつかの実施形態では、PHD阻害剤は、c-P4Hの活性を特異的に阻害する。

【0012】

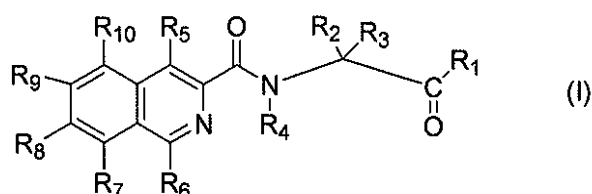
いくつかの実施形態では、PHD阻害剤は、ロキサデュスタット (Roxadustat) (RXD) (FG-4592)、バダダスタット (Vadadustat) (AKB-6548)、ダプロダスタット (Daprodustat) (GSK-1278863)、およびモリダスタット (Molidustat) (BAY 85-3934) からなる群から選択される。

【0013】

いくつかの実施形態では、PHD阻害剤は、以下の化学構造を有する：

10

【化1】



式中：R1は、ヒドロキシル、アルコキシ、置換アルコキシ、アリールオキシ、および置換アリールオキシからなる群から選択され；

20

R2およびR3は、水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、および置換ヘテロアリールからなる群から独立して選択されるか；またはR2およびR3は、それらが結合している炭素原子と一緒に、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、または置換ヘテロシクロアルキルを形成し；

R4は、水素、アルキル、および置換アルキルからなる群から選択され；

R5は、ヒドロキシル、アルコキシ、および置換アルコキシからなる群から選択され；

R6は、水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シアノ、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、置換アルコキシ、アミノ、置換アミノ、アリールオキシ (aryloxy)、置換アリールオキシ (aryloxy)、アミノアシル、置換アミノアシル、シクロアルコキシ、置換シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、アリールオキシ、置換アリールオキシ、ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリールオキシ、置換ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリール、および置換ヘテロアリールからなる群から選択され；

30

R7、R8、R9およびR10は、水素、ハロ、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アルコキシ、置換アルコキシ、アリールオキシ、および置換アリールオキシからなる群から独立して選択される。

【0014】

いくつかの実施形態では、R6はアルキルである。別の実施形態では、R6のアルキルはメチルである。

40

【0015】

いくつかの実施形態では、R5はヒドロキシルである。

【0016】

いくつかの実施形態では、R8はアリールオキシである。

【0017】

いくつかの実施形態では、R6はメチルであり、R5はヒドロキシルである。

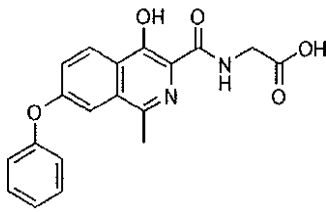
【0018】

特定の実施形態では、PHD阻害剤は、FG-4592であり、FG-4592は、化学名N-[(4-ヒドロキシ-1-メチル-7-フェノキシイソキノリン-3-イル)カ

50

ルボニル] グリシン)] および以下の化学構造：

【化 2】



ロキサデュスタット (FG-4592)

10

を有する。

【0019】

いくつかの実施形態では、PHD阻害剤は、0.2 mg/kg から 20 mg/kg の間の量で投与される。いくつかの実施形態では、PHD阻害剤は、50 mg/kg から 200 mg/kg の間の量で投与される。

【0020】

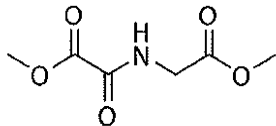
いくつかの実施形態では、PHD阻害剤は、2-オキシグルタル酸アナログである。

【0021】

特定の実施形態では、2-オキシグルタル酸アナログは、ジメチルオキサリルグリシン (DMOG) であり、前記 DMOG は、化学名 N-(2-メトキシ-2-オキサオアセチル) グリシンメチルエステル) および以下の化学構造を有する：

20

【化 3】



ジメチルオキサリルグリシン (DMOG)

30

【0022】

いくつかの実施形態では、DMOG は、50 mg/kg から 200 mg/kg の間の量で投与される。

【0023】

いくつかの実施形態では、c-P4H 酵素の活性の阻害は、核酸阻害剤、CRISPR/Cas システム、Cre/Lox システム、TALEN システム、および相同組換えの導入からなる群から選択される方法によって達成される。

【0024】

いくつかの実施形態では、核酸阻害剤は、アンチセンス RNA、低分子干渉 RNA、RNA i マイクロ RNA、人工マイクロ RNA、およびリボザイムからなる群から選択される。

40

【0025】

本発明の別の態様は、細胞内で機能する調節領域に動作可能に連結された、c-P4H 遺伝子の発現の核酸阻害剤に転写されるヌクレオチド配列を含む発現ベクターを対象とし、核酸は、アンチセンス RNA、低分子干渉 RNA、RNA i マイクロ RNA、人工マイクロ RNA、およびリボザイムからなる群から選択される。

【0026】

いくつかの実施形態では、調節領域は、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーターまたは臓器特異的プロモーターを含む。

【0027】

50

いくつかの実施形態では、臓器特異的プロモーターは、肺特異的プロモーター、腎臓特異的プロモーター、および肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

【0028】

特許または出願書面は、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含むこの特許または特許出願刊行物のコピーは、請求書および必要な手数料の納付に応じて官庁から提供される。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】A. ヒト肺線維芽細胞は、蛍光色素で標識されたマスト細胞エキソソームを取り込むことを示す図である。線維芽細胞の核は蛍光DAPIで標識されている。蛍光シグナルを重ね合わせた透過光の下での60倍像。B. 線維芽細胞に近接したマスト細胞を示す図である。マスト細胞(MC)、線維芽細胞(FB)、コラーゲン(col)、血管(bv)間の関係を示す電子顕微鏡写真。7500倍。C. エキソソーム(EXO)は、ヒト肺線維芽細胞(HLF)コラーゲン合成と分泌を誘導することを示す図である。HLF細胞をEXO(40ug/ml)と共培養し、新たに分泌されたコラーゲンを測定するために、24、48、および72時間後に上清を回収した。正規化のため、細胞溶解物を使用して総タンパク質/ウェルを定量した。データは、3つの別々の実験(n=3)の平均±SEMであり、各点は三重試行された。*P<0.05、**P<0.01、***p<0.001。

10

【図2-1】A. TGF-β1(10ng/ml)がヒト肺線維芽細胞(HLF)コラーゲン分泌に及ぼす影響を示す図である。24、48、72時間後のTGFβR1阻害剤SB543554(1uM)を使用した併用治療土。正規化のため、細胞溶解物を使用して総タンパク質/ウェルを定量した。データは、3つの別々の実験(n=3)の平均±SEMであり、各点は三重試行された。*P<0.05。B. TGF-β1(10ng/ml)またはエキソソーム(EXO)(40ug/ml)との併用治療の効果を示す図である。±TGF-βR1阻害。正規化のため、細胞溶解物を使用して総タンパク質/ウェルを定量した。データは、3つの別々の実験(n=3)の平均±SEMであり、各点は三重試行された。*P<0.05、**P<0.01。C. リン酸化および非リン酸化Smad2およびSmad3、標準的なTGF-βシグナル伝達メディエーターをプローブとしたヒト肺線維芽細胞(HLF)ホモジネートのウェスタンブロットを示す図である。TGFβ1(10ng/ml)またはエキソソーム(EXO)(40ug/ml)のいずれかで24時間処理した後、細胞溶解物を調製した。GAPDHはハウスキーピング遺伝子として使用された。

20

30

【図2-2】図2-1の続き。

【図3-1】A. HIF1α阻害剤であるロキサデュスタット(RXD)は、ヒト肺線維芽細胞における、構成的なTGF-βおよびエキソソーム(EXO)誘導ヒト肺線維芽細胞のコラーゲン分泌を減少させることを示す図である。ヒト肺線維芽細胞をTGF-β(10ng/ml)に曝露するか、EXO(40ug/ml)と共培養し、新たに分泌されたコラーゲンの測定のために上清を収集した。RXDは10ug/mlで使用した。正規化のため、細胞溶解物を使用して総タンパク質/ウェルを定量した。データは、3つの別々の実験(n=3)の平均±SEMであり、各点は三重試行された。*P<0.05、***P<0.001、***P<0.0001。B. -E. RXDは、TGF-βで観察される線維芽細胞の移動/蓄積/病巣を防止することを示す図である。未処理(Con)(B)、+TGF-β(10ng/ml)(C)、または+TGF-β+RXD(10mg/ml)(D)&(E)トランスウェルプレート内のヒト肺線維芽細胞の低倍率の代表的画像。RXDは、ヒト肺線維芽細胞における平滑筋アクチン(SMA)の存在量を減少させる。

40

【図3-2】図3-1の続き。

【図4】RXDは、コラーゲンP4Hの触媒活性型であるc-P4H四量体の相対発現を減少させることを示す図である。ヒト肺線維芽細胞ホモジネートについて、抗αサブユニ

50

ット単量体（60 kD）をプローブとして、非変性条件下、勾配ゲルでウェスタンブロッティングを行った。四量体は矢印の240 kDに見られる。RXDは、 α サブユニット単量体の存在量を全ての場合で増加させた（60 kDバンド）。RXDは10 mg/mlで使用した。

【図5-1】RXDは、インビトロでマスト細胞の酸素補給に応答した脱顆粒を減少させ、その後、室内の空気では回復することを示す図である。72時間の時点、時間制御（室内空気（RA））で、A. β -ヘキソサミナーゼ（hexosaminidase）（ β -hex）およびB. マスト細胞トリプターゼを、マスト細胞上清中で測定した。HORECは、2日間の室内空気、その後、1日間の高酸素での回復と定義され、HOREC + RXDは、細胞を浸す培地中にPHD阻害剤を添加。RXDは10 mg/mlで使用した。
* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 、 $n = 3$ 実験。C. インビボで肺線維症に見られるマスト細胞の数の増加は、実験的なブレオマイシン（bleo）マウスモデルにおいてRXDで減少する。*** $P < 0.001$ 、生理食塩水対ブレオマイシン処理；* $P < 0.05$ 、bleo vs bleo + RXD。NS = 顕著ではない。

【図5-2】図5-1の続き。

【図6】線維芽細胞（FB）のマスト細胞依存性活性化のモードを描いた図である。

【図7】コラーゲン合成のダイアグラムを示す図である。この図は古典的なリガンド受容体を介した線維形成経路、および本出願で開示される追加の線維形成経路を図示する。トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF- β ）経路は、事実上全ての種類の線維症において重要である。これらの経路は、線維性遺伝子の核転写をもたらし、その後、小胞体（ER）におけるプレプロコラーゲンの翻訳後修飾が続く。核転写をバイパスし、ERを直接標的とする可能性がある追加の線維形成経路には、本出願で実証されているマスト細胞エキソソームが含まれる。C-P4Hによるプレプロコラーゲンの翻訳後修飾は、コラーゲンの前駆体であるプロコラーゲンを生成する際の律速段階である。

【図8】ヒト線維芽細胞を刺激すると、C-P4Hの存在量が増加することを示す図である。A. 未処理、B. +TGF- β 、およびC. +マスト細胞エキソソーム（EXO）として示される、ヒト線維芽細胞における、コラーゲン合成の主要酵素、P4Hの免疫発現。DAPIで染色された核（青）。スケールバー = 10 μ m。

【図9】ロキサデュスタットが刺激されたヒト線維芽細胞のC-P4Hの増加を阻害することを示す図である。プロリル-4-ヒドロキシラーゼ（P4H）の免疫発現。P4H免疫蛍光（緑）の相対的取得ピクセル強度は、未処理のヒト線維芽細胞と比較して、TGF- β またはマスト細胞エキソソーム（EXO）に曝露されたHLFで有意に高かった。
*** $P < 0.001$ 。

【図10】ロキサデュスタット（RXD）は線維芽細胞コラーゲン遺伝子転写物に影響しないことを示す図である。ロキサデュスタットのようなHIFプロリルヒドロキシラーゼドメイン阻害剤は、転写レベルではなく、翻訳後修飾のレベルで作用する。したがって、ロキサデュスタットは、TGF- β 阻害で起こるような線維性遺伝子転写物の増加を変化させなかった。A. 列挙された条件下でのコラーゲン3の相対遺伝子発現。B. 列挙された条件下でのコラーゲン1の相対遺伝子発現。

【図11】肺線維症のインビボマウスモデル。ブレオマイシン誘導性肺線維症は、ロキサデュスタット処理で軽減される。14 d時点からのブレオマイシン処理マウスのマッソンのトリクローム染色された肺の代表的顕微鏡写真。ロキサデュスタットは線維症を減少させた。

【図12】ブレオマイシンによって誘導された肺コンプライアンスの減少がロキサデュスタットにより正常にされることを示す図である。肺機能検査は、ロキサデュスタット（RXD）による処理がブレオマイシン（bleo）に関連する肺コンプライアンスの減少を軽減することを示している。Sal = 生理食塩水溶解。

【図13】ロキサデュスタット（RXD）は肺コラーゲン遺伝子転写物に影響しないことを示す図である。ロキサデュスタットは、肺をブレオマイシンに曝すことで生じる線維性遺伝子転写物の増加を変化させなかった。A. 列挙された条件下でのコラーゲン1の相対

10

20

30

40

50

遺伝子発現。B. 列挙された条件下でのコラーゲン3の相対遺伝子発現。

【図14】コラーゲン合成の新薬開発標的としてのC-P4Hのダイアグラムを示す図である。ロキサデュスタットのようなHIF-PHD阻害剤を使用すると、プレプロコラーゲンペプチドのプロリンのヒドロキシル化を防止することにより、ERにおけるプレプロコラーゲンの翻訳後修飾が中断される。不十分にヒドロキシル化された鎖は体温で安定な三重らせんドメインを形成せず、したがって分解を受ける。

【図15】ロキサデュスタットと腎臓の片側尿管閉塞(UUO)。全ての腎臓切片はマッソンのトリクロームで染色された。A. 片側尿管閉塞の14日目の未処理腎臓(RXD-)の皮質染色。B. 片側尿管閉塞の14日目の未処理腎臓(RXD-)の髓質染色。C. 片側尿管閉塞の14日目にロキサデュスタットで処理(RXD+)した腎臓の皮質染色。D. 片側尿管閉塞の14日目にロキサデュスタットで処理(RXD+)した腎臓の髓質染色。

【図16】RXD処理はUUOの腎線維症を減少させることを示す図である。マッソンのトリクロームで染色した、対照、UUO、およびUUO+RXD腎臓の(同じ腎臓からの)代表的な対になった皮質および髓質切片。コラーゲンは青く染まる。A. 対照腎皮質のコラーゲン染色。B. UUO腎皮質のコラーゲン染色。C. RXDで処理したUUO腎髓質のコラーゲン染色。D. 対照腎髓質のコラーゲン染色。E. UUO腎髓質のコラーゲン染色。F. RXDで処理したUUO腎髓質のコラーゲン染色。対照の腎臓切片(AおよびD)と比較して、UUO腎臓(皮質および髓質)(BおよびE)ではコラーゲン染色が豊富であった。UUO腎皮質および髓質(CおよびF)に見られるように、RXDでの処理により線維症が軽減した。

【図17】RXDはUUO腎臓の線維症を低減することを示す図である。コラーゲン(青)染色は、複数の高強度視野でマッソンのトリクローム染色固定腎臓切片でピクセルごとに定量化された。 $****P<0.0001$ 皮質UUOおよび皮質UUO+RXD間；ならびに髓質UUOおよび髓質UUO+RXD間。RXDの有無で対照の皮質と髓質コラーゲン染色の間に有意差はなかった。 $N=4$ マウス/群。

【図18】HLFによるMC-EXOの取り込みがSmad非依存性経路によるコラーゲン合成を刺激することを示す図である。A. PKH-67(緑)で標識したMC-EXOのHLF取り込み。核はDAPI(青)で標識される。倒立落射蛍光顕微鏡で観察。スケールバー=15 μ m。B. 共焦点画像：I. 標識MC-EXO(CellVue-Claret-Far-Red)、II. ERの蛍光マーカー、mNeonGreen-KDELで一過性にトランスフェクトされたHLF、III. 核を示すDAPI標識HLF、IV. HLF-ERにおけるMC-EXOの取り込みを示す重ね合わせ画像(I, II, III)。C. EXO(40 μ g)、およびTGF- β (10 ng/ml)で処理したHLFからの溶解物を処理の72時間後に回収し、RT-qPCRをGAPDHで正規化したコラーゲンIおよびコラーゲン3の相対遺伝子発現に対して行った。D. MC-EXO(40 μ g)またはTGF- β (10 ng/ml)とインキュベートしたHLFからの溶解物のヒドロキシプロリン含有量。E. HLF、HLF+MC-EXO(40 μ l)、TGF- β (10 ng/ml)、およびHLF+EP1-EXOの上清中の分泌コラーゲンを測定した。コラーゲンは、Sircolアッセイで測定した。全てのアッセイは三重に行った。 $**P<0.01$ ； $***P<0.001$ 対HLF。

【図19】HLFにおいて、RXDはプロリンのヒドロキシル化、ヒドロキシプロリン、C-P4Hの存在量、および分泌コラーゲンを阻害することを示す図である。A. HLF抽出タンパク質のLC-MC分析により、RXDがコラーゲン1および3のプロリンヒドロキシル化を妨げたことが示される。B. RXDはHLFのヒドロキシプロリンのTGF- β により誘導される増加を阻害した。C. RXDは、ウェスタンブロットでHLF溶解物+MC-EXOおよび+TGF- β のC-P4H存在量を減少させた。ローディング対照としてアクチンを泳動させた。D. RXDは、HLF+MC-EXOおよびHLF+TGF- β で測定されるC-P4H蛍光強度の増加を阻害した。E. 分泌コラーゲン(Sircol)は、+MC-EXOおよび+TGF- β で未処理および処理されたHLFからの

H L F 溶解物中の R X D で遮断された。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 対 H L F 。全てのアッセイを三重に行った。

【図 20】R X D は、マウス肺のブレオマイシン誘導性線維症を阻害することを示す図である。A. R X D 処理ブレオマイシンマウスでは、肺のヒドロキシプロリン含有量が顕著に減少している。B. - E. コラーゲン沈着についてのマッソンのトリクローム染色肺切片：B = 生理食塩水注入対照マウス、C = R X D 処理生理食塩水注入対照マウス、D = ブレオマイシン注入マウス、E = R X D + ブレオマイシン注入マウス。* $P < 0.01$ 、B l e o 対 B l e o + R X D 。N S = 顕著ではない。N = 5 マウス / 群。スケールバー = 250 μ m。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本開示の一態様は、臓器における線維症の予防、寛解および／または減弱の治療目的のためのコラーゲンプロリル-4-ヒドロキシラーゼ (c-P4H) 経路の調節に少なくとも部分的に含意する。本明細書で使用される「予防」という用語は、線維症の発症を遅延もしくは排除すること、または患者集団間の線維症の発生を減少させることを意味する。本開示は、c-P4H 酵素の阻害が、既存のコラーゲンに影響を与えることなく、新たに合成されたコラーゲンの生成を防止する有効な抗線維化法であるという発見に基づく。

【0031】

いくつかの実施形態では、患者は、肺 (肺線維症)、腎臓 (腎臓線維症) または肝臓 (肝臓線維症) の線維症に罹患している。

【0032】

いくつかの実施形態では、c-P4H の阻害は、c-P4H 阻害剤によって達成される。

【0033】

一実施形態では、C-P4H 阻害剤は、対象に継続的に投与されない；むしろ、断続的に投与される。特定の実施形態では、断続的な C-P4H 阻害剤投与は、1 日おき、3 日ごと、4 日ごと、5 日ごとに 1 回、または週 1 回行われる。別の特定の実施形態では、断続的な C-P4H 阻害剤投与は、1 時間ごと、2 時間ごと、3 時間ごと、6 時間ごと、10 時間ごと、または 12 時間ごとに 1 回、行われる。

【0034】

いくつかの実施形態では、C-P4H 阻害剤の有効量は、約 0.2 mg/kg ~ 100 mg/kg である。他の実施形態では、C-P4H 阻害剤の有効量は、約 0.2 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、8 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg、50 mg/kg、60 mg/kg、70 mg/kg、80 mg/kg、90 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg、175 mg/kg または 200 mg/kg の C-P4H 阻害剤である。

【0035】

いくつかの実施形態では、C-P4H 阻害剤は、C-P4H ヒドロキシラーゼ活性を阻害する薬剤である。C-P4H ヒドロキシラーゼ活性を阻害する薬剤は、C-P4H ヒドロキシラーゼ酵素の活性を低下させるか、さもなければ調節する任意の薬剤である。

【0036】

いくつかの実施形態では、c-P4H 阻害剤は小分子化合物である。本明細書における「小分子化合物」という用語は、一般に、2000 ダルトン、1500 ダルトン、1000 ダルトン、800 ダルトン、または 600 ダルトン未満の分子量を有する小さな有機化合物を指す。

【0037】

いくつかの実施形態では、c-P4H 阻害剤は、c-P4H (PHD 阻害剤) のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (PHD) を阻害する。

【0038】

特定の実施形態では、PHD 阻害剤は、c-P4H を特異的に阻害する。「特異的 c-

10

20

30

40

50

P 4 H阻害剤」または「選択的 c - P 4 H阻害剤」という用語は、2 - オキシグルタル酸 (2 - O G) 依存性ジオキシゲナーゼスーパーファミリーの他のメンバーよりも c - P 4 Hを選択的に阻害する化合物または化合物の混合物を指す。

【0039】

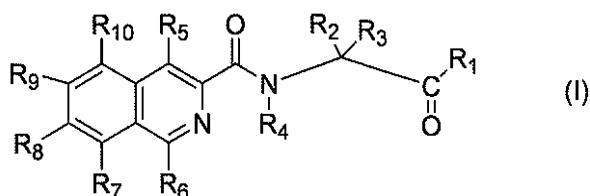
本発明の特定の実施形態では、c - P 4 Hヒドロキシラーゼ活性を阻害する薬剤は、2 - オキシグルタル酸の構造模倣物である。そのような化合物は、標的の2 - オキシグルタル酸ジオキシゲナーゼ酵素ファミリーメンバーを競合的に阻害する可能性がある。

【0040】

本発明で使用するためのH I Fヒドロキシラーゼ阻害剤の一般構造は、

【化4】

10



式中：

R 1 は、ヒドロキシル、アルコキシ、置換アルコキシ、アリールオキシ、および置換アリールオキシからなる群から選択され；

20

R 2 および R 3 は、水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、および置換ヘテロアリールからなる群から独立して選択されるか；または R 2 および R 3 は、それらが結合している炭素原子と一緒に、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、または置換ヘテロシクロアルキルを形成し；

R 4 は、水素、アルキル、および置換アルキルからなる群から選択され；

R 5 は、ヒドロキシル、アルコキシ、および置換アルコキシからなる群から選択され；

R 6 は、水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シアノ、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、置換アルコキシ、アミノ、置換アミノ、アリールオキシ (a r y l o z y)、置換アリールオキシ (a r y l o z y)、アミノアシル、置換アミノアシル、シクロアルコキシ、置換シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、アリールオキシ、置換アリールオキシ、ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリールオキシ、置換ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリール、および置換ヘテロアリールからなる群から選択され；

30

R 7、R 8、R 9 および R 10 は、水素、ハロ、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アルコキシ、置換アルコキシ、アリールオキシ、および置換アリールオキシからなる群から独立して選択される。

【0041】

いくつかの実施形態では、R 6 はアルキルである。別の実施形態では、R 6 のアルキルはメチルである。

40

【0042】

いくつかの実施形態では、R 5 はヒドロキシルである。

【0043】

いくつかの実施形態では、R 8 はアリールオキシである。

【0044】

いくつかの実施形態では、R 6 はメチルであり、R 5 はヒドロキシルである。

【0045】

本明細書で使用する場合、「アルキル」という用語は、1 ~ 10 個の炭素原子、より具体的には 1 ~ 5 個の炭素原子、さらにより具体的には 1 ~ 3 個の炭素原子を有する直鎖ま

50

たは分岐鎖飽和炭化水素基を指す。代表的なアルキル基には、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*so-プロピル、*n*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチルなどが含まれる。

【0046】

「置換アルキル」という用語は、1～5個の置換基、好ましくは1～3個の置換基を有する、1～10個の炭素原子、より具体的には1～5個の炭素原子のアルキル基を指し、各置換基は独立して、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アミノカルボニルアミノ、アミノチオカルボニルアミノ、アミノカルボニルオキシ、アリール、置換アリール、アリールオキシ、置換アリールオキシ、アリールオキシアリール、置換アリールオキシアリール、シアノ、ハログゲン、ヒドロキシル、ニトロ、オキソ、チオキソ、カルボキシル、カルボキシルエステル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、チオ、アルキルチオ、置換アルキルチオ、アリールチオ、置換アリールチオ、シクロアルキルチオ、置換シクロアルキルチオ、ヘテロアリールチオ、置換ヘテロアリールチオ、複素環チオ、置換複素環チオ、スルホニル、置換スルホニル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、置換複素環、シクロアルコキシ、置換シクロアルコキシ、ヘテロアリールオキシ、置換ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリルオキシ、置換ヘテロシクリルオキシ、オキシカルボニルアミノ、オキシチオカルボニルアミノ、 $-OS(O)_2$ -アルキル、 $-OS(O)_2$ -置換アルキル、 $-OS(O)_2$ -アリール、 $-OS(O)_2$ -置換アリール、 $-OS(O)_2$ -ヘテロアリール、 $-OS(O)_2$ -置換ヘテロアリール、 $-OS(O)_2$ -複素環、 $-OS(O)_2$ -置換複素環、および $-OSO_2-NR_{11}R_{11}$ 、 $-NR_{11}S(O)_2-NR_{11}$ -アルキル、 $-NR_{11}S(O)_2-NR_{11}$ -置換アルキル、 $-NR_{11}S(O)_2-NR_{11}$ -アリール、 $-NR_{11}S(O)_2-NR_{11}$ -置換アリール、 $-NR_{11}S(O)_2-NR_{11}$ -ヘテロアリール、 $-NR_{11}S(O)_2-NR_{11}$ -置換ヘテロアリール、 $-NR_{11}S(O)_2-NR_{11}$ -複素環、および $-NR_{11}S(O)_2-NR_{11}$ -置換複素環からなる群から選択され、ここで、各 R_{11} は独立して水素またはアルキルから選択される。代表的な置換アルキル基には、トリフルオロメチル、ベンジル、ピラゾール-1-イルメチルなどが含まれる。

10

20

【0047】

「アルコキシ」という用語は、「アルキル-O-」基を指し、これには、例として、メトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、*i*so-プロポキシ、*n*-ブトキシ、*t*-ブトキシ、sec-ブトキシ、*n*-ペントキシなどが含まれる。

30

【0048】

「置換アルコキシ」という用語は、「置換アルキル-O-」基を指す。

【0049】

「アシル」という用語は、 $H-C(O)-$ 、 $アルキル-C(O)-$ 、置換 $アルキル-C(O)-$ 、 $アルケニル-C(O)-$ 、置換 $アルケニル-C(O)-$ 、 $アルキニル-C(O)-$ 、置換 $アルキニル-C(O)-$ 、シクロアルキル- $C(O)-$ 、置換シクロアルキル- $C(O)-$ 、アリール- $C(O)-$ 、置換アリール- $C(O)-$ 、ヘテロアリール- $C(O)-$ 、置換ヘテロアリール- $C(O)-$ 、複素環- $C(O)-$ 、および置換複素環- $C(O)-$ 基を指し、ただし、複素環または置換複素環の窒素原子は $-C(O)-$ 基に結合せず、ここで、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環は、本明細書に定義した通りである。

40

【0050】

「アミノアシル」または「アミド」という用語、または接頭辞「カルバモイル」、「カルボキサミド」、「置換カルバモイル」もしくは「置換カルボキサミド」は、 $-C(O)NR_{12}R_{12}$ 基を指し、ここで各 R_{12} は独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、

50

および置換複素環からなる群から選択され；または、各 R 1 2 が結合して、窒素原子と共に複素環または置換複素環を形成し、ここで、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環は、本明細書に定義した通りである。

【0051】

「アシルオキシ」という用語は、アルキル-C(O)O-、置換アルキル-C(O)O-、アルケニル-C(O)O-、置換アルケニル-C(O)O-、アルキニル-C(O)O-、置換アルキニル-C(O)O-、アリール-C(O)O-、置換アリール-C(O)O-、シクロアルキル-C(O)O-、置換シクロアルキル-C(O)O-、ヘテロアリール-C(O)O-、置換ヘテロアリール-C(O)O-、複素環-C(O)O-、および置換複素環-C(O)O-基を指し、ここでアルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環は、本明細書に定義した通りである。

10

【0052】

「アルケニル」という用語は、2～6個の炭素原子、好ましくは2～4個の炭素原子を有するビニル不飽和一価ヒドロカルビル基を指し、少なくとも1個、好ましくは1～2個のビニル(>C=C<)不飽和部位を有する。代表的なアルケニル基には、ビニル(エテン-1-イル)、アリル、ブター-3-エニルなどが含まれる。

20

【0053】

「置換アルケニル」という用語は、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アリール、置換アリール、アリールオキシ、置換アリールオキシ、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、ニトロ、カルボキシル、カルボキシルエステル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環からなる群から選択される、1～3個の置換基、好ましくは1～2個の置換基を有するアルケニル基を指す。この用語には、必要に応じてE(トランス)異性体およびZ(シス)異性体の両方が含まれる。EおよびZ成分の両方の混合物もまた含まれる。

【0054】

「アルキニル」という用語は、2～6個の炭素原子、好ましくは2～3個の炭素原子を有するアセチレン不飽和一価ヒドロカルビル基を指し、少なくとも1個、好ましくは1～2個のアセチレン(-C≡C-)不飽和部位を有する。代表的なアルキニル基には、エチン-1-イル、プロピン-1-イル、プロピン-2-イルなどが含まれる。

30

【0055】

「アミノ」という用語は、-NH₂基を指す。

【0056】

「置換アミノ」という用語は、基-NR₁3R₁3を指し、各R₁3は独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、置換複素環、スルホニル、および置換スルホニルからなる群から選択され、ただし、両方のR₁3基は水素ではない；または、R₁3基は、窒素原子と一緒に結合して、複素環または置換複素環式環を形成することができる。代表的な置換アミノ基には、フェニルアミノ、メチルフェニルアミノなどが含まれる。代表的な置換アミノ基には、(エタン酸(ethanoic acid)-2-イル)アミノなどが含まれる。

40

【0057】

用語「アシルアミノ」は、-NR₁4C(O)アルキル、-NR₁4C(O)置換アルキル、-NR₁4C(O)シクロアルキル、-NR₁4C(O)置換シクロアルキル、-NR₁4C(O)アルケニル、-NR₁4C(O)置換アルケニル、-NR₁4C(O)

50

アルキニル、 $-NR14C(O)$ 置換アルキニル、 $-NR14C(O)$ アリール、 $-NR14C(O)$ 置換アリール、 $-NR14C(O)$ ヘテロアリール、 $-NR14C(O)$ 置換ヘテロアリール、 $-NR14C(O)$ 複素環、および $-NR14C(O)$ 置換複素環基を指し、ここでR14は水素またはアルキルであり、ならびにここでアルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環は、本明細書に定義されている。

【0058】

「オキシカルボニルアミノ」という用語は、 $-NR15C(O)O$ アルキル、 $-NR15C(O)O$ 置換アルキル、 $-NR15C(O)O$ アルケニル、 $-NR15C(O)O$ 置換アルケニル、 $-NR15C(O)O$ アルキニル、 $-NR15C(O)O$ 置換アルキニル、 $-NR15C(O)O$ シクロアルキル、 $-NR15C(O)O$ 置換シクロアルキル、 $-NR15C(O)O$ アリール、 $-NR15C(O)O$ 置換アリール、 $-NR15C(O)O$ ヘテロアリール、 $-NR15C(O)O$ 置換ヘテロアリール、 $-NR15C(O)O$ 複素環、および $-NR15C(O)O$ 置換複素環基を指し、ここでR15は水素またはアルキルであり、ならびにここでアルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環は、本明細書に定義した通りである。

【0059】

「オキシチオカルボニルアミノ」という用語は、 $-NR16C(S)O$ アルキル、 $-NR16C(S)O$ 置換アルキル、 $-NR16C(S)O$ アルケニル、 $-NR16C(S)O$ 置換アルケニル、 $-NR16C(S)O$ アルキニル、 $-NR16C(S)O$ 置換アルキニル、 $-NR16C(S)O$ シクロアルキル、 $-NR16C(S)O$ 置換シクロアルキル、 $-NR16C(S)O$ アリール、 $-NR16C(S)O$ 置換アリール、 $-NR16C(S)O$ ヘテロアリール、 $-NR16C(S)O$ 置換ヘテロアリール、 $-NR16C(S)O$ 複素環、および $-NR16C(S)O$ 置換複素環基を指し、ここでR16は水素またはアルキルであり、ならびにここでアルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環は、本明細書に定義した通りである。

【0060】

「アミノカルボニルオキシ」という用語または「カルバモイルオキシ」または「置換カルバモイルオキシ」という接頭辞は、 $-OC(O)NR17R17$ 基を指し、ここで各R17は独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環からなる群から選択され；または、ここで各R17が結合して、窒素原子と共に、複素環または置換複素環を形成し、ならびにここでアルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環は、本明細書に定義した通りである。

【0061】

「アミノカルボニルアミノ」という用語は、 $-NR18C(O)-NR18R18$ 基を指し、ここで各R18は独立して、水素およびアルキルからなる群から選択される。

【0062】

「アミノチオカルボニルアミノ」という用語は、 $-NR19C(S)-NR19R19$ 基を指し、ここで各R19は独立して、水素およびアルキルからなる群から選択される。

【0063】

「アリール」という用語は、単環（例えば、フェニル）または複数の縮合環（例えば、

10

20

30

40

50

ナフチルまたはアントリル)を有する6～14個の炭素原子の一価の芳香族炭素環式基を指し、結合点のアリール基であるならば、縮合環は芳香族(例えば、2-ベンゾオキサゾリノン、2H-1,4-ベンゾオキサジン-3(4H)-オン-7-イルなど)であっても、なくてもよい。好ましいアリールには、フェニルおよびナフチルが含まれる。

【0064】

「置換アリール」という用語は、ヒドロキシル、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アミジノ(—C(=NH)—アミノまたは置換アミノ)、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アミノカルボニルオキシ、アミノカルボニルアミノ、アミノチオカルボニルアミノ、アリール、置換アリール、アリールオキシ、置換アリールオキシ、シクロアルコキシ、置換シクロアルコキシ、ヘテロアリールオキシ、置換ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリルオキシ、置換ヘテロシクリルオキシ、カルボキシル、カルボキシルエステル、シアノ、チオ、アルキルチオ、置換アルキルチオ、アリールチオ、置換アリールチオ、ヘテロアリールチオ、置換ヘテロアリールチオ、シクロアルキルチオ、置換シクロアルキルチオ、複素環チオ、置換複素環チオ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、グアニジノ(—NH—C(=NH)—アミノまたは置換アミノ)、ハロ、ニトロ、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、置換複素環、オキシカルボニルアミノ、オキシチオカルボニルアミノ、スルホニル、置換スルホニル、—OS(O)₂—アルキル、—OS(O)₂—置換アルキル、—OS(O)₂—アリール、—OS(O)₂—置換アリール、—OS(O)₂—ヘテロアリール、—OS(O)₂—置換ヘテロアリール、—OS(O)₂—複素環、—OS(O)₂—置換複素環、および—OSO₂—NR₂OR₂O、—NR₂OR₂OS(O)₂—NR₂O—アルキル、—NR₂OR₂OS(O)₂—NR₂O—置換アルキル、—NR₂OR₂OS(O)₂—NR₂O—アリール、—NR₂OR₂OS(O)₂—NR₂O—置換アリール、—NR₂OR₂OS(O)₂—NR₂O—ヘテロアリール、—NR₂OR₂OS(O)₂—NR₂O—置換ヘテロアリール、—NR₂OR₂OS(O)₂—NR₂O—複素環、—NR₂OR₂OS(O)₂—NR₂O—置換複素環、からなる群から選択される1～4個、特に1～3個の置換基で置換された、本明細書で定義されるアリール基を指し、ここで各R₂Oは独立して水素またはアルキルから選択され、各々の用語は本明細書に定義した通りである。代表的な置換アリール基には、4-フルオロフェニル、3-メトキシフェニル、4-tert-ブチルフェニル、4-トリフルオロメチルフェニル、2-トリフルオロメトキシフェニル、3-トリフルオロメトキシフェニル、4-トリフルオロメトキシフェニル、2-クロロフェニル、3-クロロフェニル、4-クロロフェニル、2-クロロ-6-フルオロフェニル、2,4-ジクロロフェニル、4-メトキシフェニル、3-シアノフェニル、4-シアノフェニル、4-フェノキシフェニル、4-メタンスルホニルフェニル、ビフェニル-4-イルなどが含まれる。

【0065】

「アリールオキシ」という用語は、例として、フェノキシ、ナフトキシなどを含む、アリール—O—基を指す。

【0066】

「置換アリールオキシ」という用語は、置換アリール—O—基を指す。

【0067】

用語「アリールオキシアリール」は、—アリール—O—アリール基を指す。

【0068】

「置換アリールオキシアリール」という用語は、置換アリールについて上で定義したように、いずれかまたは両方のアリール環上で1～3個の置換基で置換されたアリールオキシアリール基を指す。

【0069】

「カルボキシル」という用語は、—COOHまたはその塩を指す。

【0070】

「カルボキシルエステル」という用語は、—C(O)O—アルキル、—C(O)O—置

10

20

30

40

50

換アルキル、 $-C(O)O$ -アルケニル、 $-C(O)O$ -置換アルケニル、 $-C(O)O$ -アルキニル、 $-C(O)O$ -置換アルキニル、 $-C(O)\beta$ -シクロアルキル、 $-C(O)O$ -置換シクロアルキル、 $-C(O)O$ -アリール、 $-C(O)O$ -置換アリール、 $-C(O)O$ -ヘテロアリール、 $-C(O)O$ -置換ヘテロアリール、 $-C(O)O$ -複素環、および $-C(O)O$ -置換複素環基を指す。

【0071】

「シアノ」という用語は、 $-CN$ 基を指す。

【0072】

「シクロアルキル」という用語は、例として、アダマンチル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロオクチル、シクロヘキセニルなどを含む、単一または複数の環状環を有する、3～10、3～8または3～6個の炭素原子の飽和または不飽和であるが非芳香族の環状アルキル基を指す。

10

【0073】

「置換シクロアルキル」という用語は、オキシ(=O)、チオキシ(=S)、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アリール、置換アリール、アリールオキシ、置換アリールオキシ、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、カルボキシル、カルボキシルエステル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環、および置換複素環からなる群から選択される1～5個の置換基を有するシクロアルキル基を指す。

20

【0074】

「シクロアルキレン」および「置換シクロアルキレン」という用語は、上で定義したような二価のシクロアルキルおよび置換シクロアルキル基を指す。

【0075】

「シクロアルコキシ」という用語は、 $-O$ -シクロアルキル基を指す。

【0076】

「置換シクロアルコキシ」という用語は、 $-O$ -置換シクロアルキル基を指す。

【0077】

「ハロ」または「ハロゲン」という用語は、フルオロ、クロロ、ブロモ、およびヨードを指す。

30

【0078】

「ヒドロキシ」または「ヒドロキシル」という用語は、 $-OH$ 基を指す。

【0079】

「ヘテロアリール」という用語は、1～15個の炭素原子、好ましくは1～10個の炭素原子、ならびに酸素、窒素、および硫黄からなる群から選択される環内の1～4個のヘテロ原子の芳香環を指す。そのようなヘテロアリール基は、結合点がヘテロ原子を含む環を介していて、その環が芳香族である場合、単環（例えば、ピリジニル、フリル、またはチエニル）または複数の縮合環（例えば、インドリジニルまたはベンゾチエニル）を持つことができる。窒素環原子および／または硫黄環原子は、場合により酸化されて、 N -オキシドまたはスルホキシド、およびスルホン誘導体を提供する。代表的なヘテロアリール基には、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリル、ピラゾリル、インドリル、チオフェニル、チエニル、フリルなどが含まれる。

40

【0080】

「置換ヘテロアリール」という用語は、置換アリールについて定義された同じ置換基群から選択される1～3個の置換基で置換されているヘテロアリール基を指す。代表的な置換ヘテロアリール基には、5-フルオロ-ピリジン-3-イル、1-ベンジル-1H-[1, 2, 3]トリアゾール-4-イル、5-ブロモ-フラン-2-イル、トリフルオロメチル-2H-ピラゾール-3-イルなどが含まれる。

【0081】

「ヘテロアリールオキシ」という用語は、 $-O$ -ヘテロアリール基を指し、「置換ヘテ

50

ロアリアルオキシ」は、 $-O-$ 置換ヘテロアリアル基を指す。

【0082】

「ヘテロシクリル」または「複素環」という用語は、単環または複数の縮合環、環内に1～10個の炭素原子、および窒素、硫黄または酸素からなる群から選択される1～4個のヘテロ原子を有する飽和または不飽和（しかし芳香族ではない）の基を指し、縮合環系では、結合点が複素環にある場合、1つまたはそれ以上の環はアリアルまたはヘテロアリアルであり得る。窒素環原子および／または硫黄環原子は、場合により酸化されて、N-オキシドまたはスルホキシド、およびスルホン誘導体を提供する。

【0083】

「置換ヘテロシクリル」または「置換複素環」という用語は、置換シクロアルキルについて定義されたものと同じ1～3個の置換基で置換されている複素環基を指す。

10

【0084】

複素環およびヘテロアリアル例には、アゼチジン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドリジン、イソインドール、インドール、ジヒドロインドール、インダゾール、プリン、キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチルピリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、プテリジン、カルバゾール、カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナントロリン、イソチアゾール、フェナジン、イソキサゾール、フェノキサジン、フェノチアジン、イミダゾリジン、イミダゾリン、ペペリジン、ペペラジン、インドリン、フタルイミド、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン、4, 5, 6, 7-テトラヒドロベンゾ [b]

20

チオフエン、チアゾール、チアゾリジン、チオフエン、ベンゾ [b] チオフエン、モルホリニル、チオモルホリニル（チアモルホリニルとも呼ばれる）、ペペリジニル、ピロリジン、テトラヒドロフラニルなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0085】

「ニトロ」という用語は、 $-NO_2$ 基を指す。

【0086】

「オキシ」という用語は、原子（ $=O$ ）または原子（ $-O-$ ）を指す。

【0087】

「スルホニル」という用語は、 $-S(O)_2H$ 基を指す。

【0088】

30

「置換スルホニル」という用語は、 $-SO_2-$ アルキル、 $-SO_2-$ 置換アルキル、 $-SO_2-$ アルケニル、 $-SO_2-$ 置換アルケニル、 $-SO_2-$ アルキニル、 $-SO_2-$ 置換アルキニル、 $-SO_2-$ シクロアルキル、 $-SO_2-$ 置換シクロアルキル、 $-SO_2-$ シクロアルケニル、 $-SO_2-$ 置換シクロアルケニル、 $-SO_2-$ アリアル、 $-SO_2-$ 置換アリアル、 $-SO_2-$ ヘテロアリアル、 $-SO_2-$ 置換ヘテロアリアル、 $-SO_2-$ 複素環、 $-SO_2-$ 置換複素環基を指し、ここで、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、置換ヘテロアリアル、複素環および置換複素環は、本明細書に定義される通りである。代表的なスルホニル基には、メチル $-SO_2-$ 、フェニル $-SO_2-$ 、4-メチルフェニル $-SO_2-$ などが含まれる。

40

【0089】

「ヘテロシクリルオキシ」という用語は、 $-O-$ 複素環基を指し、「置換ヘテロシクリルオキシ」は、 $-O-$ 置換複素環基を指す。

【0090】

「チオ」という用語は、 $-SH$ 基を指す。

【0091】

「アルキルスルファニル」、「アルキルチオ」、または「チオエーテル」という用語は、 $-S-$ アルキル基を指し、ここで、アルキルは上に定義した通りである。

【0092】

50

「置換アルキルチオ」、「置換アルキルスルファニル」、または「置換アルキルチオ」という用語は、－S－置換アルキル基を指し、ここで置換アルキルは上に定義した通りである。

【0093】

「シクロアルキルチオ」または「シクロアルキルスルファニル」という用語は、－S－シクロアルキル基を指し、ここでシクロアルキルは上に定義した通りである。

【0094】

「置換シクロアルキルチオ」という用語は、－S－置換シクロアルキル基を指し、ここで置換シクロアルキルは上に定義した通りである。

【0095】

「アリールチオ」または「アリールスルファニル」という用語は、－S－アリール基を指し、「置換アリールチオ」は、－S－置換アリール基を指し、ここでアリールおよび置換アリールは、上に定義した通りである。

【0096】

「ヘテロアリールチオ」または「ヘテロアリールスルファニル」という用語は、－S－ヘテロアリール基を指し、「置換ヘテロアリールチオ」は、－S－置換ヘテロアリール基を指し、ここでヘテロアリールおよび置換ヘテロアリールは、上に定義した通りである。

【0097】

「複素環チオ」または「複素環スルファニル」という用語は、－S－複素環基を指し、「置換複素環チオ」は、－S－置換複素環基を指し、ここで複素環および置換複素環は、上に定義した通りである。

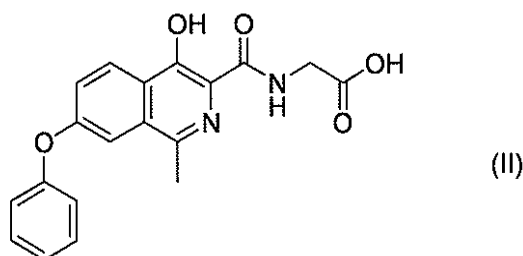
【0098】

「エステル」という用語は、－C(O)OR₂₁基を指し、ここでR₂₁は、アルキル、置換アルキル、アリール、または置換アリールである。

【0099】

一実施形態では、式(I)において、R₁およびR₅は、ヒドロキシルであり；R₂、R₃、R₄、R₇、R₉、およびR₁₀は水素であり；R₆はメチルであり；R₈はフェノキシ(phenox)であり、化合物は下の式(II)に示される構造を有する。この分子はFG-4592(別名ロキサデュスタット)とも知られ、化学名N-[(4-ヒドロキシ-1-メチル-7-フェノキシイソキノリン-3-イル)カルボニル]グリシン]を持つイソキノロンである。

【化5】



【0100】

FG-4592(ロキサデュスタット)は、慢性腎臓病における貧血の治療のための第3相臨床試験中であり、有害な影響は報告されていない。

【0101】

特定の実施形態では、FG-4592(ロキサデュスタット)は、0.2mg/kgから20mg/kgの間の量で投与される。別の実施形態では、FG-4592(ロキサデュスタット)の投与量は、0.2mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、18mg/kg、または20mg/kgである。

【0102】

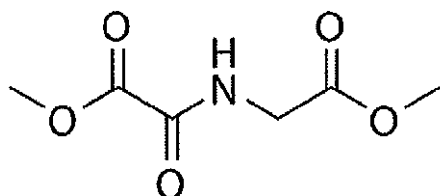
いくつかの実施形態では、FG-4592（ロキサデュスタット）アナログが使用される。FG-4592アナログは、米国特許第9,701,647号；第9,439,888号；第7,863,292号；ならびに米国特許出願番号第13/186351号および第11/549571号に記載されており、これらは全てそれらの全体が参照により組み入れられる。

【0103】

別の特定の実施形態では、C-P4H阻害剤は、ジメチルオキサリルグリシン（DMOG、隣接メチル基を有するアミノジカルボン酸；化学名N-（2-メトキシ-2-オキサオアセチル）グリシンメチルエステル）である。DMOGは以下の化学構造を有する：

10

【化6】



ジメチルオキサリルグリシン (DMOG)

20

【0104】

特定の実施形態では、DMOGは、50mg/kgから200mg/kgの間の量で投与される。別の実施形態では、DMOGの投与量は、50mg/kg、55mg/kg、60mg/kg、65mg/kg、70mg/kg、75mg/kg、80mg/kg、85mg/kg、90mg/kg、95mg/kg、100mg/kg、105mg/kg、110mg/kg、115mg/kg、120mg/kg、125mg/kg、130mg/kg、135mg/kg、140mg/kg、145mg/kg、150mg/kg、155mg/kg、160mg/kg、165mg/kg、170mg/kg、175mg/kg、180mg/kg、185mg/kg、190mg/kg、195mg/kg、または200mg/kgである。

30

【0105】

一実施形態では、C-P4H阻害剤は、投与前に薬学的に許容される担体と組み合わせることができる。この開示の目的のために、「薬学的に許容される担体」は、任意の標準的な薬学的担体を意味する。適した担体の例は当技術分野で周知であり、リン酸緩衝生理食塩水および様々な湿潤剤のような任意の標準的な薬学的担体を含んでもよいが、これらに限定されない。他の担体には、錠剤、顆粒およびカプセルなどで使用される添加剤が含まれてもよい。典型的には、そのような担体には、デンプン、牛乳、砂糖、ある種の粘土、ゼラチン、ステアリン酸またはその塩、ステアリン酸マグネシウムまたはカルシウム、タルク、植物性脂肪または油、ガム、グリコールまたは他の既知の賦形剤のような賦形剤が含まれる。そのような担体にはまた、フレーバーおよび着色添加剤または他の成分が含まれてもよい。そのような担体を含む組成物は、周知の従来法によって製剤化される。

40

【0106】

C-P4H阻害剤は、薬学的に許容される担体と混合して、とりわけ、錠剤、カプセル（例えば、ハードまたはソフトゼラチンカプセル）、丸剤、カシェ、粉末、顆粒などのような固体形態；溶液、懸濁液のような液体形態；または微粉化粉末、スプレー、エアロゾルなどを含む任意の従来の形態の薬学的製剤を作製することができる。

【0107】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、経口、経口腔鼻、または非経口経路のような異なる投与経路によって投与することができる。

50

【0108】

「経口」または「経口的な」投与は、口を経由して、または口を介して対象の体内に物質を導入することを指し、嚥下もしくは口腔粘膜を経由した輸送（例えば、舌下または口腔吸収）またはその両方を含む。

【0109】

「経口腔鼻」投与は、例えば、鼻に1つまたはそれ以上の液滴を配置することによって起こるように、鼻および口を経由して、または鼻および口を介して対象の体内に物質を導入することを指す。経口腔鼻投与には、経口および鼻腔内投与に関連する輸送プロセスが含まれる。

【0110】

「非経口投与」は、消化管を含まない経路を経由する、または介する対象の体内への物質の導入を指す。非経口投与には、皮下投与、筋肉内投与、経皮投与、皮内投与、腹腔内投与、眼内投与、および静脈内投与が含まれる。

【0111】

いくつかの実施形態では、C-P4H阻害剤を含む組成物は、エアロゾルによって投与することができる。例えば、C-P4H阻害剤調製物を含む組成物を含有する水性エアロゾル、リポソーム調製物または固体粒子を調製することによって、このことを達成することができる。非水性（例えば、フルオロカーボン噴霧剤）懸濁液を使用することができる。ソニックネブライザーもまた使用することができる。水性エアロゾルは、薬剤の水溶液または懸濁液を従来の薬学的に許容される担体および安定剤と共に製剤化することによって作製される。担体および安定剤は、特定の化合物の必要性によって異なる。

【0112】

本開示の別の態様では、C-P4H阻害剤は、早期新生児のCLDを予防する方法で使用される。特定の実施形態では、C-P4H阻害剤は、使用されるC-P4H阻害剤および選択された投与経路に依存して、0.2mg/kgから200mg/kgの間の用量で早産児に投与される。他の実施形態では、C-P4H阻害剤は、C-P4H阻害剤約0.2mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、55mg/kg、60mg/kg、65mg/kg、70mg/kg、75mg/kg、80mg/kg、85mg/kg、90mg/kg、95mg/kg、100mg/kg、105mg/kg、110mg/kg、115mg/kg、120mg/kg、125mg/kg、130mg/kg、135mg/kg、140mg/kg、145mg/kg、150mg/kg、155mg/kg、160mg/kg、165mg/kg、170mg/kg、175mg/kg、180mg/kg、185mg/kg、190mg/kg、195mg/kg、または200mg/kgの用量で投与される。

【0113】

さらに別の実施形態では、C-P4H阻害剤は、それを必要とする患者に毎日投与される。別の実施形態では、C-P4H阻害剤は、2日ごとまたは3日ごとに断続的に投与される。さらに別の実施形態では、C-P4H阻害剤は、酸素補給セッション中に投与される。C-P4H阻害剤の投与は、新生児がもはや補助酸素を摂取しなくなったら停止される。特定の実施形態では、C-P4H阻害剤は週に1回投与される。C-P4H阻害剤の投与は、新生児が室内の空気を自力で呼吸できるようになるまで続けることができる。

【0114】

いくつかの実施形態では、PHD阻害剤は、ロキサデュスタット（RXD）（FG-4592）、パダダスタット（AKB-6548）、ダプロダスタット（GSK-1278863）、およびモリダスタット（BAY 85-3934）からなる群から選択される。

【0115】

いくつかの実施形態では、c-P4H阻害剤は、核酸阻害剤、CRISPR/Casシ

10

20

30

40

50

システム、Cre/Loxシステム、TALENシステム、および相同組換えを導入することからなる群から選択される阻害剤である。

【0116】

いくつかの実施形態では、c-P4Hの核酸阻害剤は、cOP4H遺伝子の発現を阻害する。特定の実施形態では、c-P4Hの核酸阻害剤は、アンチセンスRNA、低分子干渉RNA、RNAiマイクロRNA、人工マイクロRNA、およびリボザイムからなる群から選択される。

【0117】

本開示の別の態様は、細胞内で機能する調節領域に動作可能に連結された、c-P4H遺伝子の発現の核酸阻害剤に転写されるヌクレオチド配列を含む発現ベクターに関し、核酸は、アンチセンスRNA、低分子干渉RNA、RNAiマイクロRNA、人工マイクロRNA、およびリボザイムからなる群から選択される。

【0118】

いくつかの実施形態では、調節領域は、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーターまたは臓器特異的プロモーターを含む。特定の実施形態では、臓器特異的プロモーターは、肺特異的プロモーター、腎臓特異的プロモーター、および肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

【0119】

他に定義されることがない限り、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと同様または同等の任意の方法および材料も本発明の実践または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料がここで記載されている。本明細書で言及される全ての刊行物は、刊行物が引用する関連の方法および／または材料を開示および説明するために、参照により本明細書に組み入れられる。

【0120】

以下に列挙する特定の例は、例示のみのためであり、限定するものでは決していない。

【実施例】

【0121】

実施例1：肺線維芽細胞によって取り込まれたマスト細胞エキソソームは、コラーゲンの合成および分泌を刺激する：線維芽細胞活性化の新規手段

【0122】

線維芽細胞およびマスト細胞は、組織のすぐ傍に見られる（図1B）。マスト細胞は粒子、エキソソームを放出し、そのサイズ範囲は20～100nmで、RNAおよびタンパク質を含む。質量分析によるマスト細胞エキソソームタンパク質含有量の分析により、マスト細胞エキソソームが、線維形成に関与するアネキシン2やc-P4Hのβサブユニットなどのタンパク質を含むことが明らかになった。マスト細胞エキソソームと共にインキュベートした線維芽細胞は、図1Aに示されるようにエキソソームを内部移行する。透過および蛍光の重ね合わせ画像の代表的な顕微鏡写真（図1A）は、マスト細胞エキソソーム（緑色の点）が線維芽細胞（透過光）によって内部移行されることを示している。内部移行後、エキソソームは線維芽細胞を活性化して、新しく形成されたコラーゲンを分泌する（図1C）。早くて24時間（ $P < 0.01$ ）で活性化が起き、48時間（ $P < 0.05$ ）から72時間（ $P < 0.001$ ）までヒト肺線維芽細胞コラーゲンの産生と分泌を刺激し続けた（図1C）。

【0123】

実施例2：マスト細胞エキソソームおよびTGF-βによる肺線維芽細胞の活性化は、異なる経路を介して相加的である。

【0124】

ヒト肺線維芽細胞のエキソソーム活性化を、ヒト肺線維芽細胞の古典的なTGF-β1刺激と比較した。ヒト肺線維芽細胞コラーゲン分泌のTGF-β1刺激は、48時間のタイムラグで、エキソソーム誘導性コラーゲン分泌とは異なる時間経過をたどる。TGF-

10

20

30

40

50

$\beta 1$ の外因性添加は、72時間の時点でヒト肺線維芽細胞による顕著なコラーゲン分泌を引き起こした ($P < 0.05$) (図2A対図1B)。

【0125】

ヒト肺線維芽細胞をエキソソームおよびTGF- $\beta 1$ とインキュベートすることは相加的であり、コラーゲン分泌は、それぞれTGF- $\beta 1$ 単独 ($P < 0.05$) またはエキソソーム単独 ($P < 0.01$) と比較して、エキソソームおよびTGF- $\beta 1$ の両方に曝露されたヒト肺線維芽細胞において顕著に多い (図2B)。

【0126】

TGF- $\beta 1$ およびエキソソームが、ヒト肺線維芽細胞のコラーゲン分泌を刺激するために同じシグナル伝達経路を利用するか否かを決定するために、ヒト肺線維芽細胞ホモジネートでウエスタンブロッティングを行った。期待通り、ヒト肺線維芽細胞をTGF- $\beta 1$ に曝露すると、SMADのリン酸化が起きた。これは、エキソソームに曝露されたヒト肺線維芽細胞では観察されなかった (図2C)。これらの結果は、エキソソームが、時間的経過が異なるものの、TGF- $\beta 1$ と同様にヒト肺線維芽細胞において新たに合成されるコラーゲンの分泌を刺激できることを示している。これは、ヒト肺線維芽細胞においてコラーゲン合成を活性化するための様々な細胞内メカニズムの関与を示唆しており、SMADの結果によって確認された。

【0127】

図1および図2の結果は、肺でマスト細胞と線維芽細胞が連絡している新規の線維形成経路を示しており、肺線維症を遮断するためのさらなる治療標的を提示する。

【0128】

実施例3：HIF PHD酵素阻害剤はヒト肺線維芽細胞活性を遮断する：コラーゲンの合成および分泌、増殖および移動。

【0129】

HIF PHDおよびc-P4H酵素の両方が構造的に類似しており、2-オキソグルタル酸 (2-OG) 依存性ジオキシゲナーゼスーパーファミリーに属するため、分子状二酸素から1つの酸素を受け入れてコハク酸となり、2番目の酸素がトランス-4-ヒドロキシプロリンを形成する補因子、2-OGのアナログとして機能するHIF PHDアンタゴニストは、c-P4H酵素活性も遮断することができると推論された。C-P4Hは新たに形成されるコラーゲンのアセンブリに必要である。

【0130】

RXDおよびコラーゲン分泌：ヒト肺線維芽細胞を用いたインビトロ実験は、RXDが、未処理の線維芽細胞、マスト細胞エキソソームと共培養された線維芽細胞、およびコラーゲン合成の古典的な誘導因子である外因性TGF- $\beta 1$ に曝された線維芽細胞におけるコラーゲン分泌を阻害することを示す (図3A)。提示される全ての値は、総タンパク質に対して正規化されている。

【0131】

RXDおよび線維芽細胞増殖：図3B~3Dのデータは、線維芽細胞溶解物の総タンパク質含有量によって決定されるように、RXDもTGF- β 線維芽細胞増殖を遮断することを示す：対照-0.800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /ウェル (図3B) 対+TGF- β 1.138 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /ウェル (図3C) 対+RXD+TGF- β 0.828 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /ウェル (図3D)。

【0132】

RXDおよび線維芽細胞の移動/蓄積/病巣形成および平滑筋アクチン (SMA) を介した線維芽細胞の活性化：定性的データはまた、RXD処理が線維芽細胞の移動、蓄積、および病巣形成を妨げることを示す (図3B~図3Dを比較)。ウエスタンブロットは、SMA存在量が肺線維芽細胞においてRXDでも減少することを示す (図3E)。

【0133】

実施例4：HLFによるMC-EXOの取り込みは、Smad非依存性経路によるコラーゲン合成を刺激する

10

20

30

40

50

【0134】

正常の廃棄組織標本から新たに単離されたHLF、およびヒトマスト細胞腫細胞（HMC-1）上清から収獲されたMC-EXOを使用したインビトロ実験では、色素、PHK-67（フルオレセイングリーン）で標識されたMC-EXOがHLFに取り込まれることが、倒立落射蛍光顕微鏡での可視化により実証された（図18A）。この取り込みは共焦点イメージングで確認され（図18B）、Lipofectamine 2000を使用してERの蛍光マーカーであるmNeonGreen-KDELと共に一過性にトランスフェクトされたHLFの小胞体（ER）に局在する標識MC-EXO（CellVue Claret Far Red）が示された（図18B-II）。一過性のトランスフェクションの24時間後、細胞を標識MC-EXOに60分間曝露し、Zeiss Observer SD回転ディスク共焦点顕微鏡で画像化した。代表的画像のように、MC-EXOの取り込み（赤）はHLFに強く（図18B-I、IV）、正しくトランスフェクトされたHLFには、ERに現れた。HLFの核はDAPIで染色されている（図18B-II）。

10

【0135】

HLFによるMC-EXOの取り込みは、TGF- β で観察されるものとは異なり、Smadのリン酸化（図2C）またはコラーゲン1もしくはコラーゲン3遺伝子発現の刺激（図18C）をもたらさなかった。しかしながら、MC-EXOならびにTGF- β は、ヒドロキシプロリン含有量（図18D）およびコラーゲン分泌（図18E）（72時間の時点）のHLF産生の増加をもたらした。並行実験において、肺上皮細胞（EPI）EXOとインキュベートしたHLFはコラーゲン分泌が増加せず（図1E赤いバー72時間の時点）、HLFでのEXOの取り込みおよびコラーゲン合成の刺激は一般的現象ではないことを示唆している。これらの所見は、HLFへのMC-EXOの取り込みとマスト細胞のエキソソームカーゴの放出が、TGF- β -Smad転写軸を迂回してコラーゲン合成に影響を与えることを示唆している。

20

【0136】

IPFの薬物療法の以前の大規模臨床研究は、主にTGF- β および線維芽細胞の増殖および活性化に関連するシグナル伝達経路に焦点を合わせてきたため、今日までの臨床試験の証拠の多数は、IPFの薬物療法が部分的にのみ有益であることを示唆している。これらの療法の正確な作用機序については、極めて情報が不足している。本明細書に開示された結果は、線維性遺伝子の転写を迂回するERにおけるコラーゲン合成を誘発できるMC-EXOカーゴからHLFへの細胞交換のような他の経路が存在することを示している（図18C）。ER内のコラーゲン合成の細胞内事象は、新たに合成されるコラーゲン性ポリペプチド鎖のプロリン残基の翻訳後修飾からなる。この必須なプロリンヒドロキシ化反応は、律速酵素コラーゲンプロリル4-ヒドロキシラーゼ（C-P4H）によって触媒される。

30

【0137】

実施例5：RXDは、触媒活性形態のコラーゲンP4Hであるc-P4H四量体、新たに形成されたコラーゲンの合成におけるプロリルヒドロキシ化に関与する酵素の相対発現を減少させる。

40

【0138】

RXDがコラーゲン形成を阻害する潜在的な手段は、触媒的活性なc-P4H四量体の存在量を減少させることによると仮定されている。本発明者らは、ヒト肺線維芽細胞におけるc-P4Hの相対的存在量を、単独、マスト細胞エキソソームと共培養、または外因性TGF- β ±RXDの添加の条件で、c-P4H α サブユニットをプローブにしたウェスタンブロットにより推定した（図4）。

【0139】

RXDは、c-P4H四量体の相対発現（矢印 - 240 kD）を約5%（Con対RXD）；約55%（+エキソソーム（EXO）対EXO+RXD）；約75%（+TGF- β 対TGF- β +RXD）減少させることが観察された。これらの結果は、RXDの

50

作用の1つの側面は、c-P4H四量体形成に干渉し、それによりプロトコラーゲンのプロリンヒドロキシル化を妨害し、新たなコラーゲン形成を妨げることを示唆している。

【0140】

実施例6：RXDはマスト細胞安定剤として機能する。

【0141】

RXDは、24時間の高酸素への曝露（80%）、続いて2日間の室内空気中での回復の後、上清に浸したマスト細胞（ヒトマスト細胞腫細胞）に加えられた（高酸素回復（HOREC）および高酸素回復+RXD（HOREC+RXD））。マスト細胞脱顆粒は、マスト細胞脱顆粒の古典的な指標であるβ-ヘキソサミナーゼ（β-hex）（図5A）およびトリプターゼ（図5B）の放出を測定することにより評価した。RXDはマスト細胞を安定化させ、線維形成トリプターゼのような肺損傷を引き起こす可能性のある有害なマスト細胞産物の放出を防ぐことができる。このプロトコルは、急性増悪で入院したIPF患者に高酸素を投与し、その後室内空気に戻す臨床プロトコルを模倣するように設計された。

【0142】

実施例7：線維芽細胞（FB）のマスト細胞依存性活性化のモード。

【0143】

図6は、線維芽細胞のコラーゲン合成および分泌に対するマスト細胞の寄与を示す。図の左側は、ヒスタミン、トリプターゼ、レニン/ANG II、TGF-βなどのプロ線維形成性マスト細胞メディエーターが、例えば、どのように受容体活性化およびSMADシグナル伝達経路を介してFBを活性化するかを示している。受容体を介したFBの活性化は、それらの増殖、移動、コラーゲン合成および分泌の活性化をもたらす。他の側は、本出願において開示された新規な経路を表しており、プロ線維性タンパク質を含むマスト細胞のエキソソームが隣接するFBに取り込まれ、非SMAD経路を介してコラーゲンの合成および分泌を刺激できることを示す。FB活性化における受容体媒介性およびエキソソーム性の経路は、RXDのようなHIF-1PHD阻害剤で遮断される（赤いバー）。

【0144】

実施例8：肺線維症のブレオマイシン実験モデルにおけるRXDの効果。

【0145】

8週齢のマウス（C57BL/6J）を使用して、RXDがブレオマイシン誘導性肺線維症の発症を阻害するか否かを検討した。中咽頭へのブレオマイシンの単回投与の後、線維増殖の期間および線維症の確立を表す7、9、11、13、15、17、および19日目にRXD（10mg/kg）を治療的に送達させた。21日目にマウスを犠牲にした。ブレオマイシンは肺ヒドロキシプロリン含有量の増加を引き起こしたが、それはRXDで顕著に減少した（図20A）。マッソンのトリクローム染色された肺の組織学的評価は、RXDがブレオマイシンによる線維症の重症度を軽減したことを示した（図20E対図20Dを比較）。

【0146】

実施例9：RXDを用いた処理は、UUOにおける腎線維症を減少させる。インビボ片側尿管閉塞（UUO）モデル

【0147】

全ての動物の処置および実験は、ワイルコーネル医科大学の施設内動物管理および使用委員会によって承認された。ケタミン（ketamine）（90mg/kg）およびキシラジン（xylazine）（4mg/kg）のカクテルでマウスを腹腔内麻酔した。マウス（C57BL/6J）は、無菌条件下で腹部正中切開を通して4-0シルク縫合糸で右片側尿管結紮術を受けた。模擬操作対照（CON）動物は、右尿管のマニピュレーションのみで、同じ操作を受けた。0、2、4、6、8日目のロキサデュスタット（10mg/kg）の送達は、IP投与でされた。14日目にマウスを犠牲にした。

【0148】

腎臓を採取し、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、続いてパラフィンに包埋した。切片(5μm)を収集し、マッソンのトリクローム染色をキット(Richard-Allen Scientific)を使用して行い、コラーゲン(青染色)を検出した。パラフィン処理した組織切片のスライドを脱パラフィンし、再水和して、蒸留水で洗浄した。その後、トリクロームキットの構成物を使用して、製造業者のプロトコルに従って切片を染色した。キシレンで脱水および清掃後、切片をVectamount(Vector Laboratories)のカバーガラスにマウントした。組織切片を、SPOT Insight 2メガピクセルカラーカメラ(Diagnostic Instruments)を取り付けた倒立落射蛍光顕微鏡(Nikon Eclipse TE 2000-U)を用いて調査した。

10

【0149】

結果

【0150】

RXDでの処理は、UUOにおける腎線維症を減少させる。対照の腎臓切片(図16Aおよび16D)と比較して、UUO腎臓(皮質および髄質)(図15A、15B、16Bおよび16E)ではコラーゲン染色(青)が豊富であった。RXDでの処理は、UUO腎臓皮質および髄質に見られるように線維症を軽減した(図15C、15D、16Cおよび16F)。

【0151】

さらに、コラーゲン(青)染色は、マッソンのトリクローム染色された固定腎臓切片において、複数の高強度視野のピクセルごとに定量化した。**** $P < 0.0001$ 皮質UUOおよび皮質UUO+RXD間；ならびに髄質UUOおよび髄質UUO+RXD。RXDの有無で対照の皮質および髄質コラーゲン染色の間に有意差は無かった。 $N = 4$ マウス/群。図17を参照されたい。

20

【図1】

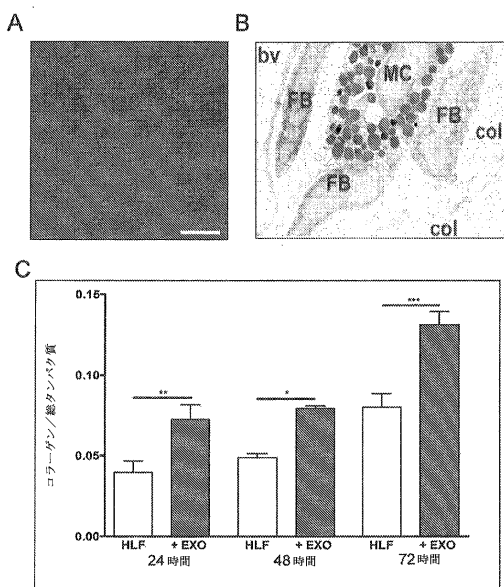


FIG. 1A-1C

【図2-1】

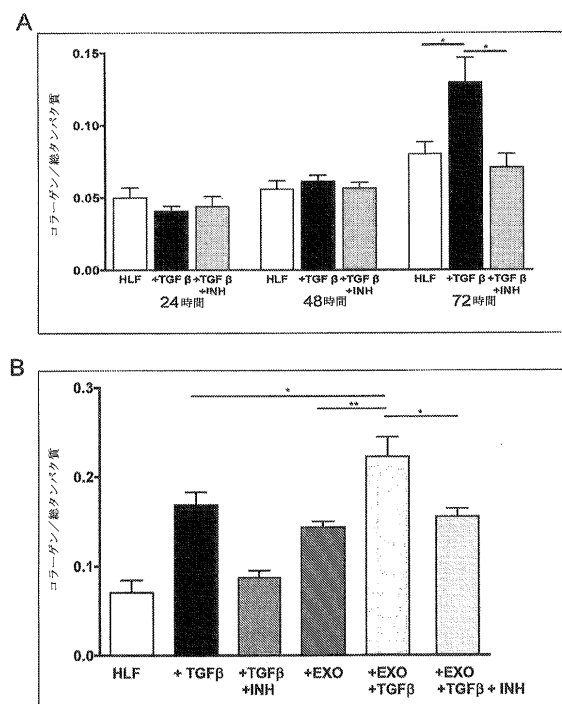


FIG. 2A-2B

【 図 2 - 2 】

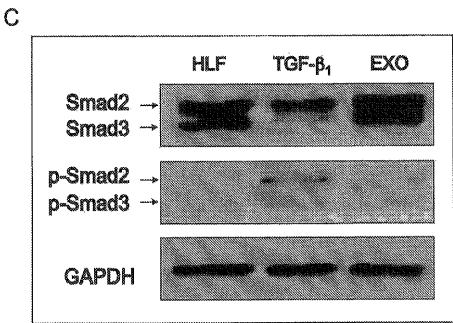


FIG. 2C

【 図 3 - 1 】

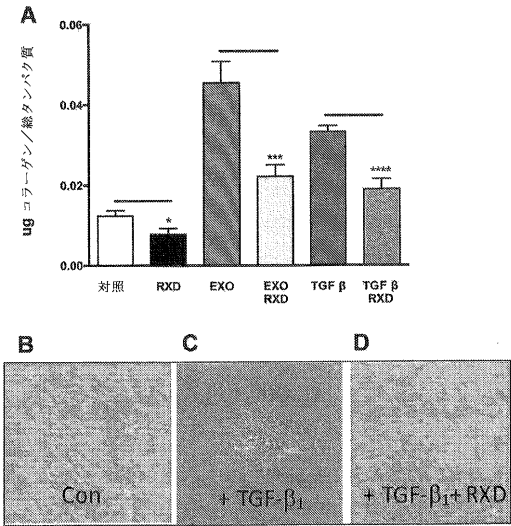


FIG. 3A - 3D

【 図 3 - 2 】

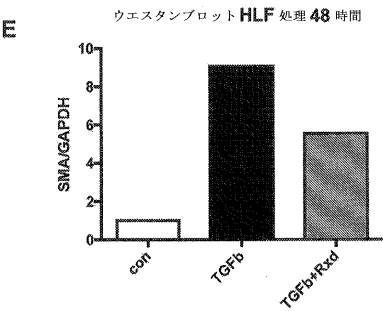


FIG. 3E

【 図 4 】

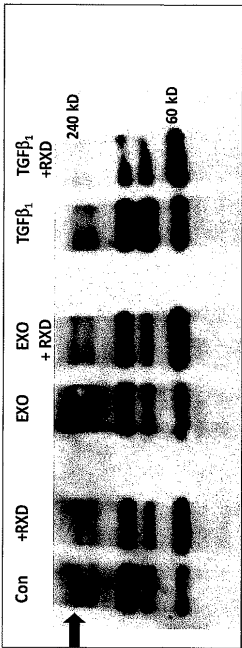


FIG. 4

【図 5 - 1】

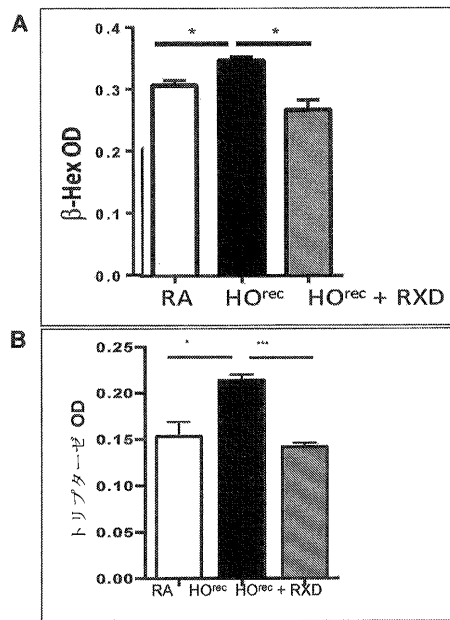


FIG. 5A - 5B

【図 5 - 2】

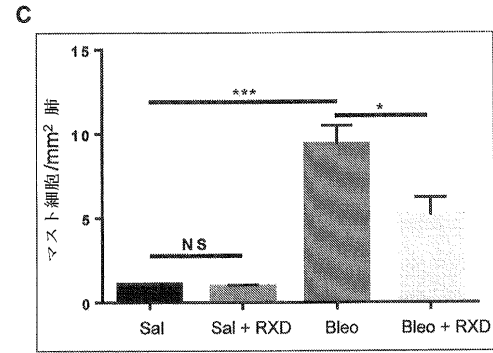


FIG. 5C

【図 6】

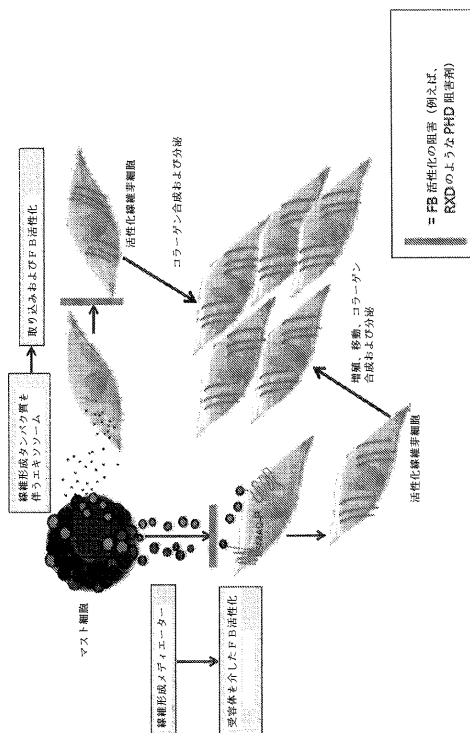


FIG. 6

【図 7】

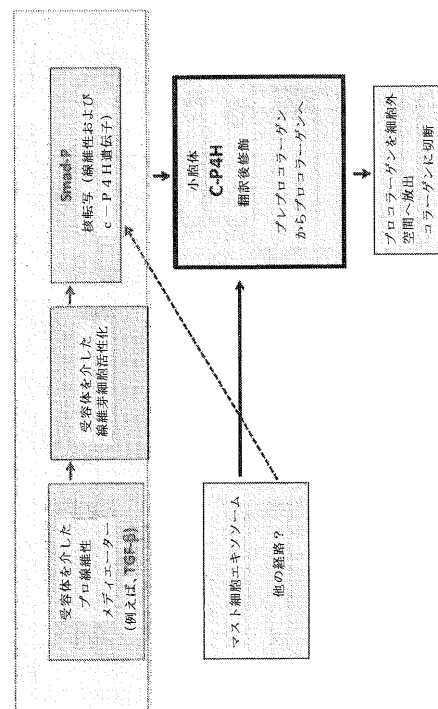


FIG. 7

【 図 8 】

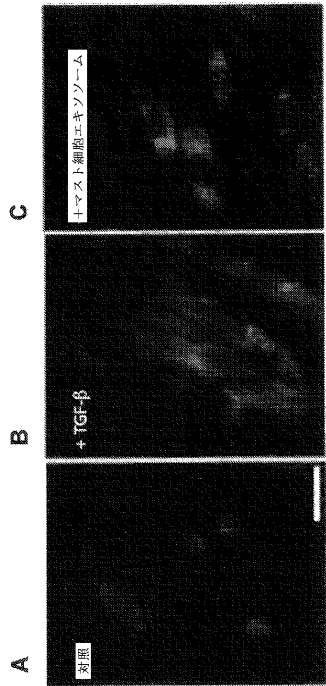


FIG. 8A - 8C

【 図 9 】

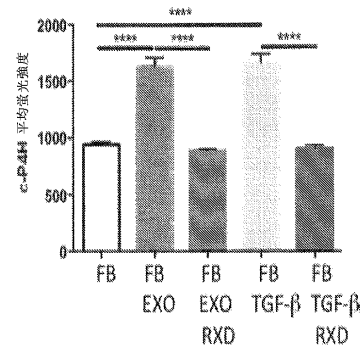


FIG. 9

【 図 10 】

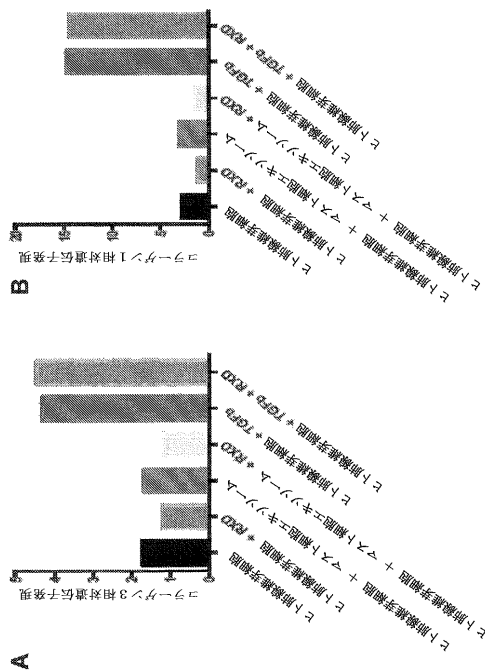


FIG. 10A - 10B

【 図 11 】

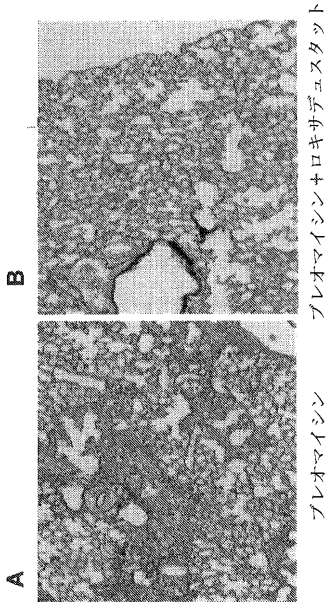


FIG. 11A - 11B

【図 12】

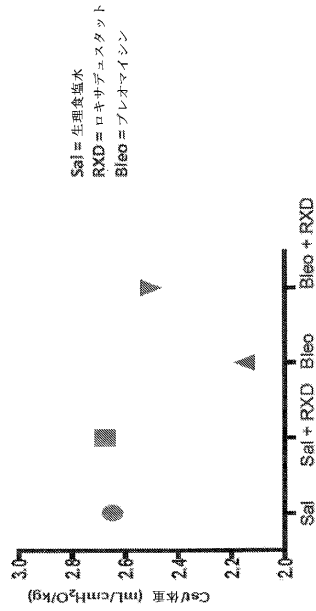


FIG. 12

【図 13】

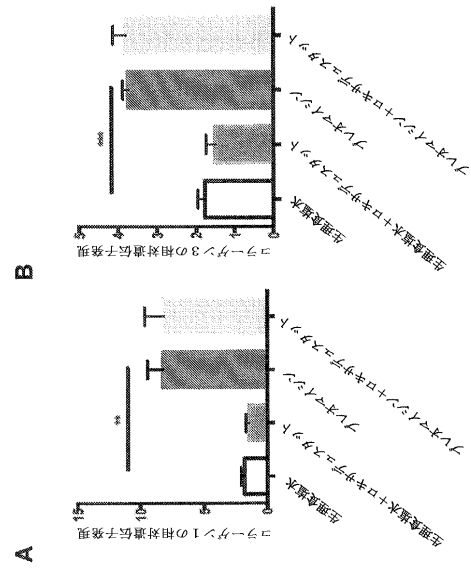


FIG. 13A-13B

【図 14】

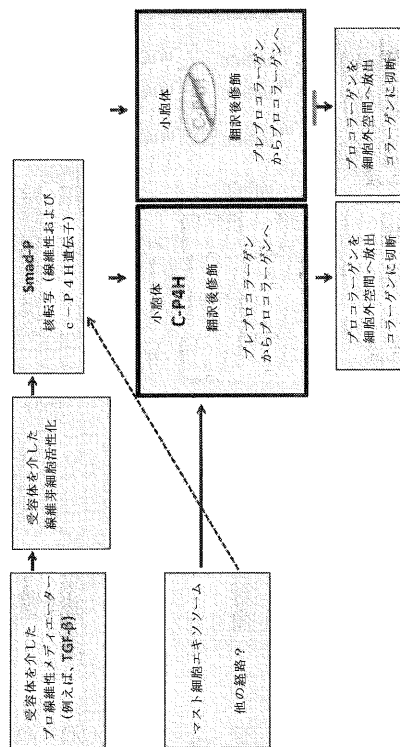


FIG. 14

【図 15】

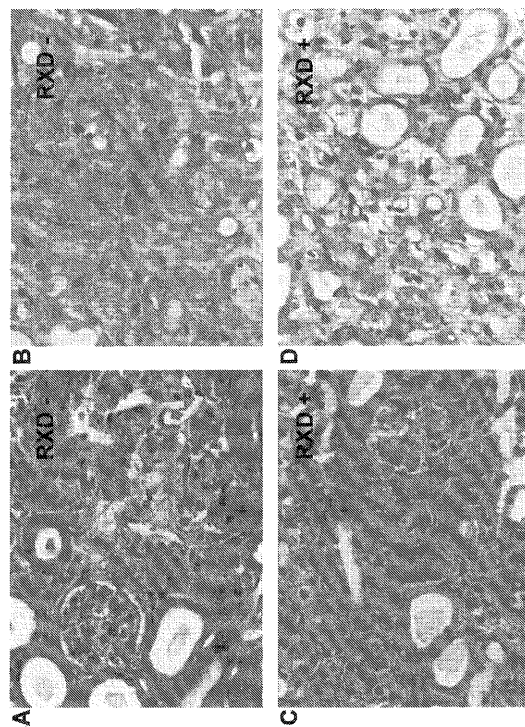


FIG. 15A-15D

【図 17】

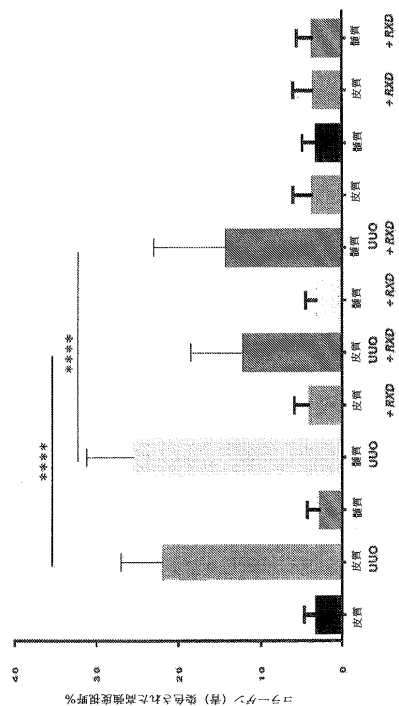


FIG. 17

FIG. 16A – 16F

【図 19】

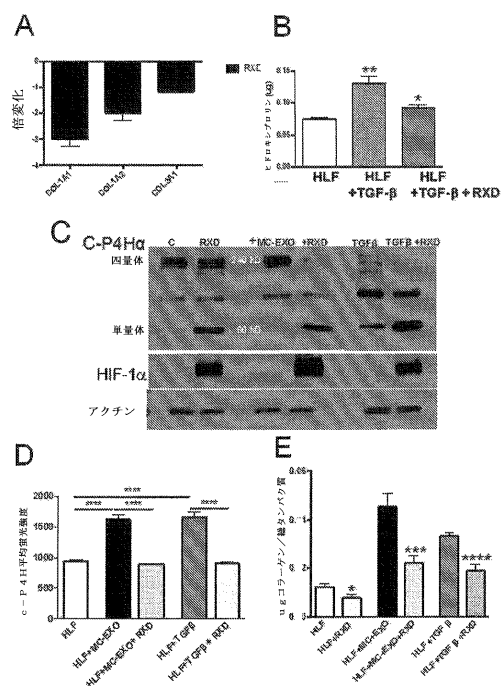
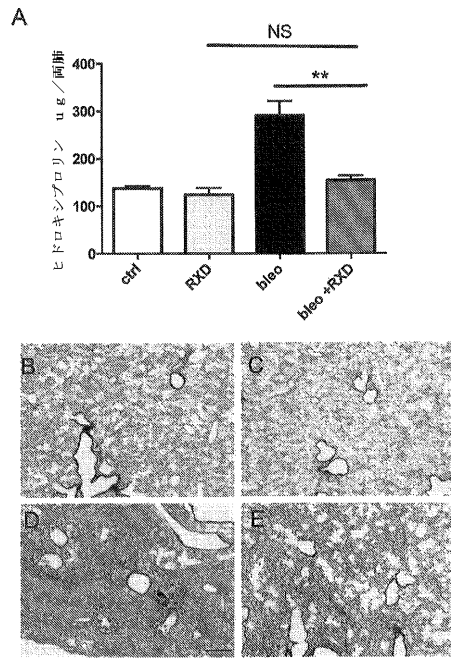


FIG. 18A-18E

FIG. 19A – 19E

【図 20】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 19/12856
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/505, C12N 15/82, C12N 9/02 (2019.01) CPC - A61K 38/00, C07K 14/415, C07K 14/505		
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)		
See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,093,730 A (Weidmann et al.) 25 July 2000 (25.07.2000); col 2, ln 5-15, col 4, ln 23-25, col 9, ln 61-64, col 10, ln 5-8, 19-20, 25-35, col 12, ln 15-17	1-7
Y		8-27
Y	Kiriakidis et al. "Complement C1q is hydroxylated by collagen prolyl 4 hydroxylase and is sensitive to off-target inhibition by prolyl hydroxylase domain inhibitors that stabilize hypoxia-inducible factor" <i>Kidney International</i> . 03 June 2017 (03.06.2017) vol 92, pg. 900-908; pg. 900, right col, para 1-2, pg. 901, left col, para 3-4	8-22
Y	US 6,566,088 B1 (McKnight et al.) 20 May 2003 (20.05.2003); col 5, ln 6-10, col 6, ln 32-42	23-27
A	Encyclopaedia Britannica. "Double-stranded RNA" 08 September 2015 (08.09.2015), < https://web.archive.org/web/20150908064728/https://www.britannica.com/science/double-stranded-RNA >; pg. 1, para 1	1-27
A	US 9,809,586 B2 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 07 November 2017 (07.11.2017); entire document	1-27
A	Kant et al. "Prolyl 4 Hydroxylase: A Critical Target in the Pathophysiology of Diseases" <i>Korean J Physiol Pharmacol</i> . 10 April 2013 (10.04.2013), vol 17, pg. 111-120; entire document	1-27
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 12 March 2019		Date of mailing of the international search report 23 APR 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 13/12	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)		A 6 1 K 31/7105	

(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

(72)発明者 ランディ・シルバー
 アメリカ合衆国ニューヨーク州14850. イサカ. パイン・ツリー・ロード395. スイート310. センター・フォー・テクノロジー・ライセンシング・アット・コーネル・ユニヴァーシティー (シーティーエル)

Fターム(参考) 4C084 AA17 MA13 MA66 NA14 ZA59 ZA75 ZA81 ZC20 ZC51
 4C086 AA01 AA02 BC30 EA16 MA13 MA66 ZA59 ZA75 ZA81 ZC20
 ZC41
 4C206 AA01 AA02 GA01 GA25 MA01 MA04 MA33 MA86 ZA59 ZA75
 ZA81 ZC20 ZC41