

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6672173号  
(P6672173)

(45) 発行日 令和2年3月25日(2020.3.25)

(24) 登録日 令和2年3月6日(2020.3.6)

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| (51) Int.Cl.             | F 1            |
| A 6 1 K 31/192 (2006.01) | A 6 1 K 31/192 |
| A 6 1 K 31/10 (2006.01)  | A 6 1 K 31/10  |
| A 6 1 P 1/16 (2006.01)   | A 6 1 P 1/16   |
| A 6 1 K 9/08 (2006.01)   | A 6 1 K 9/08   |
| A 6 1 K 9/20 (2006.01)   | A 6 1 K 9/20   |

請求項の数 13 (全 30 頁) 最終頁に続く

|                    |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2016-566226 (P2016-566226)  |
| (86) (22) 出願日      | 平成27年5月6日(2015.5.6)           |
| (65) 公表番号          | 特表2017-518967 (P2017-518967A) |
| (43) 公表日           | 平成29年7月13日(2017.7.13)         |
| (86) 國際出願番号        | PCT/US2015/029457             |
| (87) 國際公開番号        | W02015/171755                 |
| (87) 國際公開日         | 平成27年11月12日(2015.11.12)       |
| 審査請求日              | 平成30年5月7日(2018.5.7)           |
| (31) 優先権主張番号       | 61/990,606                    |
| (32) 優先日           | 平成26年5月8日(2014.5.8)           |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                        |
| (31) 優先権主張番号       | 62/042,072                    |
| (32) 優先日           | 平成26年8月26日(2014.8.26)         |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                        |

|           |  |
|-----------|--|
| (73) 特許権者 | 516020271<br>メディシノバ・インコーポレイテッド<br>Medicinova, Inc.<br>アメリカ合衆国、92037 カリフォルニア州、ラ・ホヤ、エグゼクティブ・スクエア 4275、スイート・300 |
| (74) 代理人  | 100101890<br>弁理士 押野 宏  |
| (74) 代理人  | 100098268<br>弁理士 永田 豊  |
| (72) 発明者  | 松田 和子<br>アメリカ合衆国、90210 カリフォルニア州、ビバリー・ヒルズ、エヌ・オークハースト・ドライブ 336、ナンバー・エイ   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】進行した非アルコール性脂肪性肝炎の治療方法

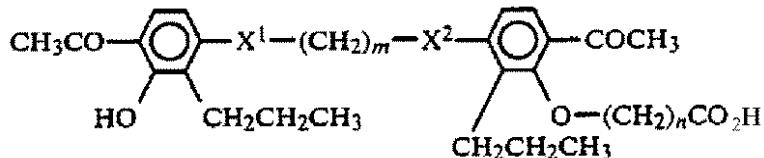
## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

進行した非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)と診断された患者の治療をするために使用される組成物であって、

前記組成物は、式(I)の化合物、前記式(I)の化合物の代謝産物、及び前記したもののそれぞれの薬学的に許容される塩からなる群から選択された化合物を含み、

## 【化1】



10

(I)

(式中、mは2から5の整数であり、nは3から8の整数であり、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、各自独立的に硫黄、酸素、スルフィニル基、又は、スルホニル基を示し、但し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、同時に酸素ではない)

前記代謝産物は、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H部を含有するフェニル基に結合している前記式(I)の化合物の-COCH<sub>3</sub>基が1-ヒドロキシエチル(-CH(OH)Me)

20

基に代謝された化合物であり、

前記治療は、進行したNASHに罹患している患者における肝線維症を減少させるためのものである、組成物。

**【請求項2】**

前記進行したNASHと診断された患者は、肝線維症、クモ状血管腫、腹水症、脾腫、丈夫な肝臓の境界、手掌紅斑、アステリクシス、又は、門脈圧亢進症のうちの1つ以上を示す、請求項1に記載の組成物。

**【請求項3】**

前記進行したNASHと診断された患者は、肝臓の瘢痕化、肝硬変、又は、肝細胞癌(HCC)のうちの1つ以上を示す、請求項1又は2に記載の組成物。

10

**【請求項4】**

前記治療は前記進行したNASHに罹患している患者における肝臓の瘢痕化を減少させるためのものである、請求項3に記載の組成物。

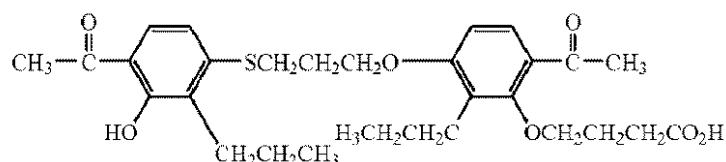
**【請求項5】**

前記患者は、小児患者である、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

**【請求項6】**

前記式(I)の化合物は、式(IA)の化合物である、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

**【化2】**



20

(IA).

**【請求項7】**

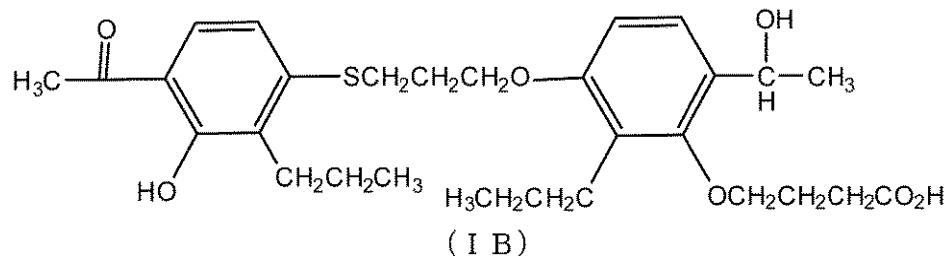
前記化合物は、斜方晶系結晶形で存在する、請求項6に記載の組成物。

**【請求項8】**

前記式(I)の化合物の代謝産物は、式(IB)の化合物である、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

30

**【化3】**



40

**【請求項9】**

前記化合物は、1つ以上の薬学的に許容される成分を有する治療組成物に形成される、請求項1～8のいずれか1項に記載の組成物。

**【請求項10】**

前記化合物が経口投与される、請求項1～9のいずれか1項に記載の組成物。

**【請求項11】**

前記化合物は、錠剤又はカプセルとして投与される、請求項10に記載の組成物。

**【請求項12】**

前記化合物は、液体剤形として投与される、請求項1～10のいずれか1項に記載の組

50

成物。

**【請求項 1 3】**

前記化合物は、1 0 0 m g / 日から 4 、 0 0 0 m g / 日の範囲の量を 1 回、 2 回、 又は 3 回に分けて投与される、 請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

**[関連出願の相互参照]**

本出願は、 2 0 1 4 年 5 月 8 日に出願された米国仮出願第 6 1 / 9 9 0 , 6 0 6 号、 2 0 1 4 年 8 月 2 6 日に出願された米国仮出願第 6 2 / 0 4 2 , 0 7 2 号、 2 0 1 4 年 9 月 1 8 日に出願された米国出願第 1 4 / 4 9 0 , 6 1 8 号の優先権を主張し、 その全体の内 10 容は、 本明細書に参照として含まれる。

**【0 0 0 2】**

本技術は、 フェノキシアルキルカルボン酸、 例えば、 MN - 0 0 1 及び MN - 0 0 2 を投与することによって、 進行した非アルコール性脂肪性肝炎、 これを引き起こす又はこれに起因する病態、 及び / 又はこれらそれぞれの否定的な影響を抑制又は治療する方法に関する。

**【背景技術】**

**【0 0 0 3】**

非アルコール性脂肪性肝炎又は N A S H は、 一般的な肝臓疾患として、 アルコール性肝臓疾患と似ているが、 アルコールを少量飲むか又は全く飲まない人々の間で発生する疾患である。 N A S H の主要な特性は、 炎症及び損傷に伴う肝臓における脂肪である。 N A S H は進行した N A S H になり、 特に肝線維症を特徴とする。 進行した N A S H 及び進行した N A S H を引き起こす又はこれに起因する病態は、 全世界的に増加する問題として、 全ての年齢の人々に影響を及ぼしている。 20

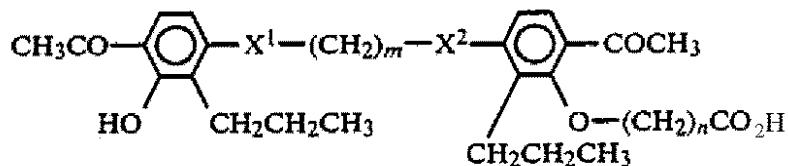
**【発明の概要】**

**【課題を解決するための手段】**

**【0 0 0 4】**

本開示は、 進行した非アルコール性脂肪性肝炎( N A S H )と診断された患者を治療する方法を提供し、 前記方法は、 式( I )の化合物、 式( I )の化合物の代謝産物、 式( I )の化合物のエステル、 又は、 式( I )の化合物のエステルの代謝産物、 又は、 前記したものそれぞれの薬学的に許容される塩の有効量を患者に投与することを含む。 30

**【化 1】**



(I)

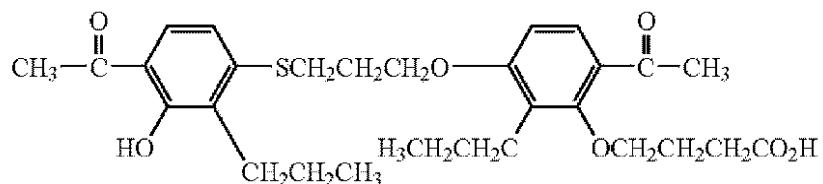
**【0 0 0 5】**

(式中、 m は 2 から 5 の整数であり、 n は 3 から 8 の整数であり、 X <sup>1</sup> 及び X <sup>2</sup> は、 各々独立的に硫黄、 酸素、 スルフィニル基( - S ( O ) - )、 又は、 スルホニル基( - S ( O ) <sub>2</sub> - )を示し、 但し、 X <sup>1</sup> 及び X <sup>2</sup> は、 同時に酸素ではない。 )

**【0 0 0 6】**

特定の実施形態において、 式( I )の化合物は、 式( I A )である。

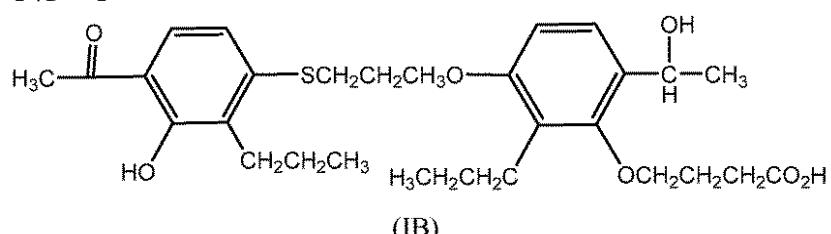
## 【化2】



## 【0007】

また別の実施形態において、前記式(I)の化合物の代謝産物は、式(IA)の化合物 10  
である。

## 【化3】



## 【0008】

20

好ましくは、前記化合物は、固体剤形、例えば、錠剤又はカプセルとして経口投与されてもよく、好ましくは、前記化合物は、斜方晶系結晶形で存在する。前記化合物は、液体剤形として投与されてもよい。前記化合物は約100mg/日から約4,000mg/日の範囲の量を1回、2回、又は3回に分けて投与され得る。

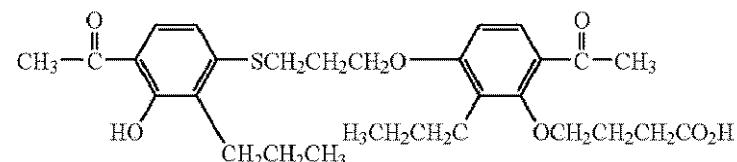
## 【0009】

また別の実施形態において、進行したNASHと診断された患者は、肝線維症、クモ状血管腫、腹水症(ascites)、脾腫、丈夫な肝臓の境界(hard liver border)、手掌紅斑、アステリクシス、又は、門脈圧亢進症のうちの1つ以上を示す。患者は、また、肝臓の瘢痕化、肝硬変、又は、肝細胞癌(HCC)のうちの1つ以上を示す。一部の例では、患者の肝線維症が減少する。また他の例では、患者の肝臓の瘢痕化が減少する。患者はまた、小児患者、青少年患者、又は成人患者であってもよい。 30

## 【0010】

本開示は、進行したNASHと診断された患者を治療する方法を提供し、前記方法は、式(IA)の化合物、式(IA)の化合物の代謝産物、式(IA)の化合物のエステル、又は、式(IA)の化合物のエステルの代謝産物、又は、前記したものそれぞれの薬学的に許容される塩の有効量を患者に投与することを含む。

## 【化4】



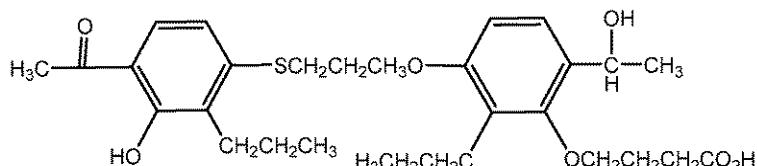
(IA)

## 【0011】

進行したNASHと診断された患者を治療するまた他の方法を提供し、前記方法は、式(IA)の化合物、式(IA)の化合物のエステル、又は、前記したものそれぞれの薬学的に許容される塩の有効量を患者に投与することを含む。

40

## 【化5】

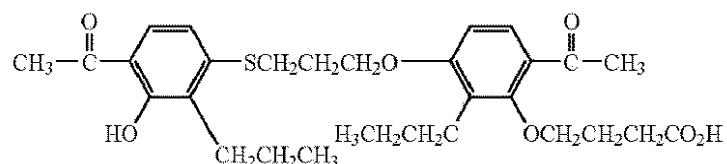


(IB)

## 【0012】

進行したNASHと診断された患者を治療するまた他の方法を提供し、前記方法は、式(IA)の化合物、式(IA)の化合物の代謝産物、式(IA)の化合物のエステル、式(IA)の化合物のエステルの代謝産物、又は、前記したものそれぞれの薬学的に許容される塩の有効量を患者に投与することを含み、前記したものの各々は、斜方晶系結晶を含む固体剤形として提供される。

## 【化6】



10

20

(IA)

## 【0013】

また別の形態において、本発明の方法は、進行したNASHに罹患している患者、特に肝臓の瘢痕化を示す患者における肝硬変又は肝細胞癌(HCC)の可能性を減らすことができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0014】

【図1A】治療マウス及び未治療マウスのHE染色された肝切片の顕微鏡写真を示す。

30

【図1B】治療マウス及び未治療マウスのHE染色された肝切片の顕微鏡写真を示す。

【図2】治療マウス及び未治療マウスにおけるNAFLD活性点数(NAS)をグラフに示す。

【図3】治療マウス及び未治療マウスにおける脂肪症点数をグラフに示す。

【図4】治療マウス及び未治療マウスにおける小葉の炎症点数をグラフに示す。

【図5】治療マウス及び未治療マウスにおける肝細胞の風船化点数をグラフに示す。

【図6A】治療マウス及び未治療マウスのシリウス赤色染色された肝切片の顕微鏡写真を示す。

【図6B】治療マウス及び未治療マウスのシリウス赤色染色された肝切片の顕微鏡写真を示す。

40

【図7】治療マウス及び未治療マウスにおける線維症領域の比率をグラフに示す。

【図8】治療マウス及び未治療マウスにおける炎症領域をグラフに示す。

【図9A】治療マウス及び未治療マウスの-SMA免疫染色された肝切片の顕微鏡写真を示す。

【図9B】治療マウス及び未治療マウスの-SMA免疫染色された肝切片の顕微鏡写真を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0015】

以下、様々な実施形態が記載される。特定の実施形態は、包括的な説明、又は本明細書で検討する広い側面に対する限定として意図されないことに留意されたい。特定の実施形

50

態に関連して説明した一様は、必ずしもその実施形態に限定されるものではなく、任意の他の実施形態を用いて実施することができる。

**【0016】**

**[定義]**

本明細書及び特許請求の範囲で使用される、単数形「a」、「a n」、及び「t h e」は、特別に明確に指示されない限り複数の参照を含む。

**【0017】**

患者に薬物を「投与すること」又は「投与」(及びこのような語句の文法上の等価物)とは、自己投与を含む直接的投与、及び薬物を処方する行為を含む間接的投与を含む。例えば、本明細書で使用されるように、医師が患者に薬物の自己投与を指示、及び/又は患者に薬物の処方箋を提供することが患者に薬物を投与することである。10

**【0018】**

「進行したN A S H」は、クモ状血管腫、腹水症、脾腫、丈夫な肝臓の境界、手掌紅斑、アステリクシス、肝線維症及び肝細胞癌のような1つ以上の症状を引起こすN A S Hの進行を意味する。進行したN A S Hはまた、肝硬変及び肝不全のような症状、及び肝移植に関連する。

**【0019】**

群の前にある「C<sub>x</sub>」は、この群の炭素原子の数がXであることを意味する。

**【0020】**

「アルキル」は、1から12個の炭素原子を有する一価の非環式ヒドロカルビル基を意味する。アルキルの非限定例は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、第三級ブチル、ペンチル、ヘキシルなどを含む。20

**【0021】**

「アリール」は、10個以下の炭素原子を有する一価の芳香族ヒドロカルビル基を意味する。アリールの非限定例は、フェニル及びナフチルを含む。

**【0022】**

「ヘテロアリール」は、芳香族環内で酸素、窒素、硫黄からなる群から選択された1から4個のヘテロ原子及び1から10個の炭素原子の芳香族基を意味し、ヘテロアリールの窒素原子及び/又は硫黄原子は、任意に酸化される(例えば、N-酸化物、-S(O)-又は-S(O)<sub>2</sub>-)。このようなヘテロアリール基は、単環(例えば、ピリジル又はフリル)又は複数の縮合環(例えば、インドリジニル又はベンゾチエニル)を有することができ、縮合環は、芳香族であってもなくてもよく、及び/又は、ヘテロ原子を含んでも含まなくてもよく、但し芳香族ヘテロアリール基の原子を介して付着する。ヘテロアリールの非限定例は、ピリジル、ピロリル、インドリル、チオフェニル、及びフリルを含む。30

**【0023】**

「シクロアルキル」は、3から12個の炭素原子を有する一価の非芳香族環状ヒドロカルビル基を意味する。シクロアルキルの非限定例は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどを含む。

**【0024】**

「ヘテロシクリル」は、環内に酸素、窒素、硫黄からなる群から選択される1から4個のヘテロ原子、及び1から10個の炭素原子の一価の非芳香族環状基を指し、ヘテロアリールの窒素原子及び/又は硫黄原子は、任意に酸化される(例えば、N-酸化物、-S(O)-又は-S(O)<sub>2</sub>-)。このようなヘテロアリール基は、単環(例えば、ピペリジニル又はテトラヒドロフラニル)又は複数の縮合環を有することができ、縮合環は、芳香族であってもなくてもよく、及び/又はヘテロ原子を含んでも含まなくてもよく、但し非芳香族ヘテロシクリル基の原子を介して付着する。ヘテロシクリルの非限定例は、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニルなどを含む。40

**【0025】**

「アミノ」は、-NH<sub>2</sub>を意味する。

**【0026】**

10

20

30

40

50

「アルキルアミノ」は、-NHR<sub>B</sub>を意味し、R<sub>B</sub>は、任意に1から3個のアリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、又はヘテロシクリル基で置換されるC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルである。

#### 【0027】

「ジアルキルアミノ」は、-N(R<sub>B</sub>)<sub>2</sub>を意味し、R<sub>B</sub>は、上記のように定義される。

#### 【0028】

「含む」は、方法及び組成物が引用された要素を含むが、その他のものが排除されないことを意味する。方法及び組成物を定義するために使用される「本質的に～からなる」は、記載された目的のための組合せに対して任意の本質的に重要なものの以外の要素が排除されることを意味する。従って、本質的に本明細書で定義される要素からなる組成物は、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、保存料などの薬学的に許容される担体、及び単離及び精製法からの微量混入物を除外しない。「からなる」は、その他の成分の微量元素(trace element)及び本発明の組成物を投与するための実質的な方法の段階又は意図した結果を達成したり組成物を生成するための工程の段階以外のものが排除されることを意味する。このようなつなぎの用語及び語句の各々によって定義される実施形態は、本発明の範囲にある。

10

#### 【0029】

本明細書で使用する化合物の「有効量」は、本明細書に記載した治療される患者に投与される場合、患者内の医学疾患のうちの1つ以上の発現に対して意図した治療効果(例えば、緩和、改善、軽減、又は、除去)を有し得る量である。十分な治療効果が、必ず1つの投与量(又は投薬量)の投与によって発生するものでなく、一連の用量の投与後に発生することもあり得る。従って、有効量は、1回以上の投与量によって投与されてもよい。

20

#### 【0030】

「非アルコール性脂肪性肝炎」又はNASHは、一般的な肝臓疾患として、アルコール性肝臓疾患と似ているが、アルコールを少量飲むか又は全く飲まない人々の間で発生する疾患である。NASHの主な特性は、炎症及び損傷に伴う肝臓における脂肪である。NASHは、肝臓が損傷して瘢痕化し、もはや適切に動作できない状態で肝硬変になり得る。NASHは、米国人口の2~5%に影響を及ぼす。現在、NASHに対する特定の治療法は存在しない。アメリカ人の追加10~20%は、肝臓に脂肪を有するが、実質的に肝臓の炎症又は損傷はなく、「非アルコール性脂肪肝疾患」(NAFLD)と呼ばれる病態である。肝臓に脂肪を有することは正常ではないが、それ自体は、おそらく害や恒久的な損傷をほとんど引き起こすことはない。肝検査又は血液検査の結果に応じて脂肪が疑われる場合、この問題は、NAFLDと呼ばれる。この場合、肝生検を実施すると、一部の人々はNASHを有し、他の人々はNAFLDを有することを示す。

30

#### 【0031】

NASHは、通常、定期的な血液検査パネルに含まれている肝検査において、アラニンアミノ基転移酵素(ALT)又はアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)の上昇を示す人で最初に疑われる。さらなる評価では、(例えば、薬、ウイルス性肝炎、又は、過剰なアルコール消費など)肝臓疾患の明確な理由が示されず、肝臓のX線又は画像診断によって脂肪が示された場合、NASHが疑われる。NASHは、肝生検によって診断され、NAFLDと区別される。肝生検のために、皮膚を介して針を挿入し、肝臓の小片を除去する。顕微鏡による組織検査において、肝細胞の炎症又は損傷と共に脂肪を示す場合、NASHと診断される。生検によって肝臓に発症する瘢痕組織に関する情報が提供され得る。

40

#### 【0032】

NASHが常にではないが徐々に悪化して、進行したNASHが発症し、瘢痕化又は線維症が肝臓に現れて蓄積する原因となり得る。線維症が悪化すれば、肝硬変が発症する場合があり、肝臓がひどく瘢痕化して硬化し、正常に機能しなくなる。重度の瘢痕化又は肝硬変が存在する場合、進行を止めることのできる治療法はほとんどない。肝硬変を有する

50

人は、体液貯留、筋消耗、腸からの出血及び肝不全が発生する可能性がある。肝移植は、肝不全を含む進行した肝硬変の唯一の治療法であり、進行したNASHを有する人々に移植はますます行われている。例えば、NASHは、米国で肝硬変の主な原因の1つとしてC型肝炎及びアルコール性肝臓疾患と共にランクされている。

#### 【0033】

全体の罹患率及び死亡率は、一般的な集団に比べてNASH患者に有意に高く現れた。NASH患者の最も一般的な死因は、冠動脈疾患及び悪性腫瘍とそれに続く肝臓関連死亡率である。NASHにかかった児童は、一般集団の人々に比べて生存期間が有意に短い。

#### 【0034】

進行したNASHにかかった患者のうち、15%から25%は、10から20年にわたり肝硬変及びその合併症に進行する。初期生検時に、NASH患者の1/3は、進行した肝線維症を有する一方で、10%から15%は、よく安定した肝硬変を有する。原因不明肝硬変にかかった患者の大部分は、NASHに対する薬の効果がなくなることにより(burned-out NASH)、脂肪症又は脂肪性肝炎の組織学的特性が無菌性肝硬変(bland cirrhosis)に置換えられるものと認識される。

#### 【0035】

肝硬変が現れると、慢性肝臓疾患の徴候、例えば、クモ状血管腫、腹水症、脾腫、丈夫な肝臓の境界、手掌紅斑、又は、アステリクシスが存在する可能性がある。患者は、黄疸又はかゆみを訴えたり、門脈圧亢進症(例えば、腹水症、静脈瘤出血、又は脳症(encephalopathy))の合併症を呈し得る。

#### 【0036】

進行したNASHにおける肝硬変は、肝細胞癌(HCC)の発症の危険因子である。20年間のNASH患者で最大2.8%のHCCの有病率が報告されている。日本人の患者のデータによれば、5年のHCCの累積率は、15%程高いことがあると報告されている。進行したNASH関連の肝硬変は、肝移植の、増加する適応症である。

#### 【0037】

「薬学的に許容される」は、ヒト患者を含む患者への投与に適し、非毒性であることを意味する。

#### 【0038】

「薬学的に許容される塩」は、患者への投与に適し、非毒性である塩を意味する。非限定例は、アルカリ金属、アルカリ土類金属、及び様々な第1、第2、第3アンモニウム塩を含む。式(I)の化合物のエステルがカチオン性の部分を含む場合、例えば、エステルがアミノ酸エステルを含む場合、その塩は、様々なカルボン酸、スルホン酸、及び鉱酸塩を含んでもよい。塩の特定の非限定例は、ナトリウム塩、カリウム塩、及びカルシウム塩を含む。

#### 【0039】

「保護基」は、周知の官能基を指し、官能基に結合すれば、化合物のその他の部分で実行される反応及び対応する反応条件で不活性の保護された官能基が得られ、脱保護条件下で反応させて固有の官能基を再生できることを意味する。保護基は、分子の残りと適合するように選択される。「カルボン酸保護基」は、これらの合成中にフェノキシアルキルカルボン酸のカルボン酸官能基を保護する。カルボン酸保護基の非限定例は、ベンジル、p-メトキシベンジル、p-ニトロベンジル、アリル、ベンズヒドリル、及びトリチルを含む。カルボン酸保護基の追加の例は、Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis., 2d Ed., 1991, John Wiley & Sons, and McOmie Protective Groups in Organic Chemistry, 1975, Plenum Pressのような標準リファレンス作業で発見された。本明細書に開示されたカルボン酸を保護して脱保護するための方法は、当技術分野、特に上記のGreene and Wutsで発見され、本明細書に参照として引用される。

#### 【0040】

医学疾患又は患者を「治療すること」は、臨床結果を含む有益な又は所望の結果を得る

10

20

30

40

50

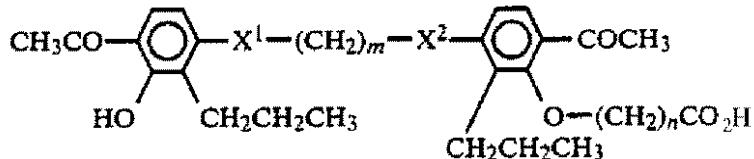
ための措置を取ることを意味する。本発明の様々な態様及び実施形態の目的において、有益な又は望ましい臨床結果は、進行したN A S H の 1 つ以上の症状又はその負の影響の減少、緩和又は改善、1 つ以上の臨床的な結果の改善、進行したN A S H の程度の減少、進行したN A S H 進行の遅延又は減速、線維症の状態の改善、軽減、又は、安定化、及び本明細書に記載したその他の有益な結果が挙げられるが、それらに限定されない。

## 【0041】

式( I )の化合物、又は、その代謝産物、又は、式( I )の化合物のエステル、又は、その代謝産物、又は、それらのそれぞれの薬学的に許容される塩の有効量を投与する方法が提供され、変数は本明細書で定義される。

## 【化7】

10



(I)

## 【0042】

20

本明細書で使用する「その代謝産物」は、式( I )の化合物と実質的に同様の治療活性を示す代謝産物を意味する。このような代謝産物の非限定例は、- O - ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> C O <sub>2</sub> H 部を含有するフェニル基に結合している式( I )の化合物の-C O C H <sub>3</sub> 基が1-ヒドロキシエチル(- C H ( O H ) M e)基に代謝される化合物を含む。

## 【0043】

このような1-ヒドロキシエチル基を含有する代謝産物は、1-ヒドロキシエチル基の1位置に非対称中心を含む。ラセミ混合物を含む対応する鏡像異性体及び混合物は、本明細書で使用する式( I )の化合物の代謝産物内に含まれる。

## 【0044】

30

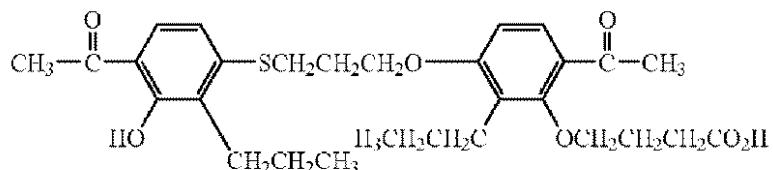
本明細書で使用される「そのエステル」は、式( I )の化合物に表示されるカルボン酸のエステル及び/又はフェノール性水酸基のエステル、及び式( I )の化合物の代謝産物の1-ヒドロキシエチル基(脂肪族ヒドロキシ基)のエステルを意味する。フェノール性及び/又は脂肪族ヒドロキシ基のエステルは、制限なく対応する酸としてカルボン酸R<sub>A</sub>-C O<sub>2</sub> Hを含んでもよく、R<sub>A</sub>は、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、アリール、ヘテロアリール、C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>シクロアルキル、又は、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>ヘテロシクリルであり、アルキル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、又はヘテロシクリルは、任意に1から4つのC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、アリール、C O<sub>2</sub> H、アミノ、アルキルアミノ、又は、ジアルキルアミノ基で置換される。また、1価、2価、又は3価のリン酸のようなその他の酸が考慮される。カルボン酸のエステルは、対応するアルコールとして制限なしに式R<sub>A</sub>-O Hの化合物を含んでもよく、R<sub>A</sub>は上記のように定義される。一実施形態において、式( I )のカルボン酸だけがエステル化される。また別の実施形態において、式( I )のフェノール性水酸基だけがエステル化される。また別の実施形態において、R<sub>A</sub>は、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルである。当業者には明らかなように、このようなエステルは、式( I )の化合物又はその塩を放出するために生体内で加水分解されるプロドラッグとして作用する。

40

## 【0045】

一実施形態において、式( I )の化合物は、式( I A )の化合物である。

## 【化 8】



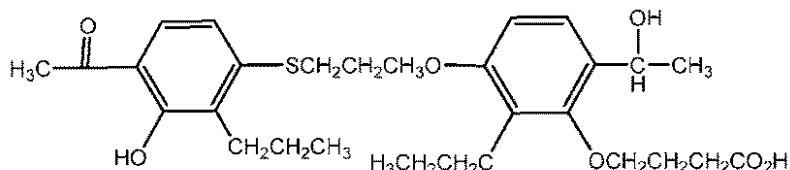
(IA).

## 【0046】

10

また別の実施形態において、式(Ⅰ)及び(ⅠA)の化合物の代謝産物は、式(ⅠB)の化合物である。

## 【化 9】



(IB).

20

## 【0047】

また別の実施形態において、化合物が経口投与される。また別の実施形態において、化合物が錠剤又はカプセル剤として投与される。別の実施形態において、式(ⅠA)の化合物がその他の多形体を実質的に含まない多形体Aで存在する。また別の実施形態において、化合物は、液体剤形として投与される。また別の実施形態において、化合物は、約100から約4,000mg/日の範囲の量を1回、2回、又は3回に分けて投与される。

## 【0048】

本明細書で使用する化合物の効能は、例えば、進行したNASH及び関連する肝臓病のストレプトゾシン誘発モデルにおいて、当業者に周知の方法によって試験することができる。

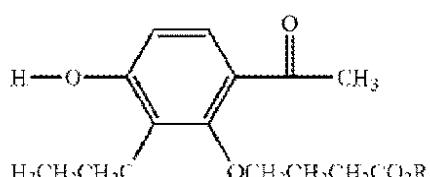
30

## 【0049】

## [合成]

式(Ⅰ)の化合物の合成及び特定の生物学的活性は、本明細書に参照として含まれる米国特許第4,985,585号に記載されている。例えば、式(ⅠA)の化合物は、式(ⅠI)のフェノールを式(ⅠII)の化合物と反応させて式(ⅠC)の化合物を提供することによって製造される。

## 【化 10】

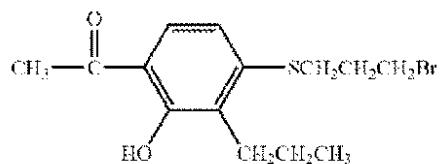


40

(II)

(Rは、カルボン酸保護基である)

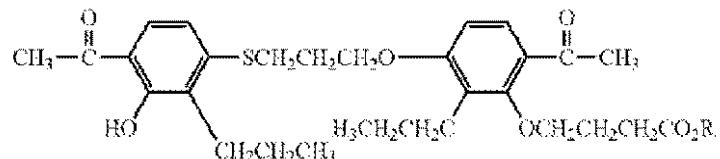
## 【化11】



(III)

## 【化12】

10



(IC).

## 【0050】

20

酸保護基又はR基の非限定例は、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、ベンジル、ベンズヒドリル及びトリチルを含み、ベンジル、ベンズヒドリル、又は、トリチル基は、任意に1から6つのC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、ハロ、及び/又はC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ基で置換される。式(IIC)のプロモ基以外の脱離基を使用できることは当業者に明らかであろう。このような他の脱離基の非限定例は、クロロ又はトシラートを含む。

## 【0051】

式(IIC)の保護されたカルボン酸を脱保護すると、式(IA)の化合物が提供される。本開示の内容に基づいて明らかなように、式(IIC)の化合物は、一部の実施形態では、本発明に従って有用である。脱保護方法の非限定例は、Pd/C又はPt/Cのような触媒及びH<sub>2</sub>下でのアルカリ加水分解及び水素化分解を含む。

## 【0052】

30

反応は、不活性有機溶媒で実行され、不活性有機溶媒は、例えば、制限なくアセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトン、又は、ジメチルホルムアミドを含む。求核置換反応は、無機塩基、例えば、炭酸カリウム、又は、炭酸ナトリウム、任意にヨウ化カリウムの存在下で室温未満の温度で溶媒の還流温度まで実行されてもよい。反応は、薄層クロマトグラフィー及び<sup>1</sup>H-NMRのような周知の方法によって決定されるような、実質的な生成物を提供するのに十分な時間で実施される。本明細書で使用されるその他の化合物は、出発物質の適切な置換時に本明細書に記載した手続に従って及び/又は当業者に周知の方法に従って製造される。米国特許第5,290,812号参照(本明細書に参照として含まれる)

## 【0053】

40

式(IA)の化合物は、必須的に純粋な斜方晶系多形体(A型結晶という)を提供するための制御された条件下で再結晶される(例えば、90%以上、好ましくは少なくとも95%のA型)。多形体A型及びその製造工程は、米国特許第7,060,854号、及び同第7,064,146号に記載されており、本明細書に全体参照として含まれる。式(I)の化合物の全ての多形体形態は活性であるが、多形体A型が好ましい。特定条件下では、このような多形体の溶解度及び生体利用率は、その他の多形体に比べて優れており、A型は、改善された固体製剤又は固体剤形を提供してもよい。

## 【0054】

黄色から橙色の溶液を提供するために、25から40でエタノール5から10重量部中に式(IA)の化合物を溶解させることにより、A型結晶を得ることができる。エタ

50

ノール溶液に1から10部の水を注入して、20から25で約15から60分間攪拌した後、5から10でさらに1から4時間、好ましくは2.0から3.0時間攪拌して灰白色懸濁液が得られる。この懸濁液に5から15部の水を添加して、混合物を5から10で追加の1から4時間、好ましくは1.5から2.0時間攪拌する。固体の、白色から灰白色の生成物は、真空濾過によって分離して濾過ケーキを水で洗浄して25から40で12から24時間真空乾燥する。

#### 【0055】

鏡像異性体形態で存在する本明細書で使用される化合物、例えば、式(I)の化合物の特定の代謝産物(例えば、式IBの化合物)に関して、2つの鏡像異性体を光学的に分解することができる。このような分解は、例えば、制限なく(S)-(−)-1-(1-ナフチル)エチルアミンのような塩基と対応するカルボン酸化合物のジアステレオマー塩を形成したり、キラルカラムクロマトグラフィーを使用して鏡像異性体を分離することによって実行される。鏡像異性体形態で存在するこのような化合物に対する中間体は、同様に分解することができる。10

#### 【0056】

##### [投与及び製剤]

本明細書で使用する化合物は、経口、又は静脈内、筋肉内、及び皮下注射又は経皮的方法によって投与することができる。効果的な投与量レベルは、例えば、1日あたり約100から約4000mgで多様に変化してもよい。一実施形態では、1日投与量範囲は、250から2,000mgであり、1回、2回、又は3回に分けて提供される。一実施形態では、1日投与量の範囲は、100から500mgであり、例えば、100、200、300、400、又は500mgであり、1回、2回、又は3回に分けて提供される。一実施形態では、1日投与量範囲は、250から2,000mgであり、例えば、250、500、750、1,000、1,250、1,500、1,750、又は2,000mgであり、1回、2回、又は3回に分けて提供される。一実施形態では、1日投与量範囲は、1000から4,000mgであり、例えば、1,000、2,000、3,000、又は4,000mgであり、1回、2回、又は3回に分けて提供される。また別の実施形態において、投与量は、1000mgで1日2回提供される。その別の実施形態において、適切な投与量は、1000mg qd、1000mg bid、及び750mg tidを含む。20

#### 【0057】

実際の量は、治療される患者の環境により異なり得る。当業者が認識するように、活性物質の作用を変更する様々な因子は、治療する医師によって考慮され、例えば、年齢、体重、性別、食事療法、及び患者の状態、投与時期、投与速度、及び投与経路である。所定の条件に対する最適な投与量は、従来の投与量決定試験を用いて当業者によって認知されてもよい。30

#### 【0058】

本明細書で使用される化合物は、液体、粉末、クリーム、乳剤、丸剤、トローチ(trōchē)、坐薬、懸濁液、溶液などを含む、任意の薬学的に許容される形態で形成されてもよい。本明細書で使用されるこのような化合物を含有する治療組成物は、既知の確立された実施に従って一般的に1つ以上の薬学的に許容される成分で形成される。一般に、錠剤(tablet)は、担体(例えば、改質デンプン)を、単独で又はカルボキシメチルセルロース(商品名:Avicel)と共に、例えば、約10重量%用いて形成される。製剤は、錠剤成形工程で1,000から3,000ポンドの圧力で圧縮される。錠剤は、好ましくは約1.5から8.0kp/cm<sup>2</sup>、好ましくは5.0から7.5kp/cm<sup>2</sup>の平均硬度を示す。分解時間は、約30秒から約15又は20分まで変化する。40

#### 【0059】

経口用製剤は、本明細書で使用される治療活性がある化合物が不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、又はカオリンと混合した硬ゼラチンカプセルとして提供されたり、前記化合物が油性媒体、例えば、液体パラフィン又はオリーブ油と混50

合した軟ゼラチンカプセルとして提供されてもよい。適切な担体は、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、低融点ワックス、ココアバターなどを含む。

#### 【0060】

本明細書で使用する化合物は、水性懸濁液として、薬学的に許容される賦形剤、例えば、懸濁剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガントゴム、及びアカシアゴム；分散又は湿潤製剤、例えば、天然発生リン脂質、例えば、レシチン又は脂肪酸とアルカリ性酸化物の縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンステアレート、又は、長鎖脂肪族アルコールとエチレン酸化物の縮合生成物、例えば、ヘブタデカエチレンオキシセタノール、又は、脂肪酸及びヘキシトールに由来する部分エステルとエチレン酸化物の縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート又は脂肪酸及びヘキシトール無水物に由来する部分エステルとエチレン酸化物の縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートと混合して製造されてもよい。このような水性懸濁液は、1つ以上の保存剤、例えば、エチル-又はn-プロピル-p-ヒドロキシベンゾエート、1つ以上の着色剤、1つ以上の香味剤、及び1つ以上の甘味剤、例えば、グリセロール、ソルビトール、スクロース、サッカリン又はナトリウム又はカルシウムシクラメートを含んでもよい。

#### 【0061】

適切な製剤は、米国特許第4,788,055号、同第4,816,264号、同第4,828,836号、同第4,834,965号、同第4,834,985号、同第4,996,047号、同第5,071,646号、及び同第5,133,974号に記載された徐放性剤形を含み、本明細書に参照として含まれる。

#### 【0062】

経口投与に適切なその他の形態は、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤(elixir)、水性溶液を含む液状製剤、又は使用する直前に液状製剤に変換される固体製剤を含む。乳剤は、溶液、例えば、水性プロピレングリコール溶液で製造されるか、乳化剤、例えば、レシチン、ソルビタンモノオレエート又はアカシアを含有してもよい。水性溶液は、活性成分を水に溶解して適切な着色剤、香味剤、安定剤、及び増粘剤を添加して製造されてもよい。固体製剤は、活性成分と共に、着色剤、香味剤、安定剤、緩衝剤、人工及び天然甘味剤、分散剤、増粘剤、可溶化剤などを含有してもよい。

#### 【0063】

本明細書で使用する化合物は、非経口投与(例、注射、例えば、ボーラス注入又は持続注入)のために製造され、アンプル、プレフィルドシリンジ(pre-filled syringe)、小容量注入において、単位剤形又は追加された保存剤を含む複数用量容器で提供されてもよい。組成物は、油性又は水性ピークル中の懸濁液、溶液、又は乳剤、例えば、ポリエチレングリコール水溶液中の溶液のような形態であってもよい。油性又は非水性の担体、希釈剤、溶媒又はピークルの例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物性オイル(例えば、オリーブ油)及び注射可能な有機エステル(例えば、オレイン酸エチル)を含み、形成製剤、例えば、保存剤、湿潤剤、乳化剤、又は懸濁剤、安定剤及び/又は分散剤を含有してもよい。また、活性成分は、滅菌固体の無菌分離、又は適切なピークルと使用する前に構成する溶液、例えば、発熱物質を含まない滅菌水から凍結乾燥によって得られた粉末形態であってもよい。

#### 【0064】

本明細書で使用する化合物は、経鼻投与用に製造されてもよい。溶液又は懸濁液が、従来の手段、例えば、点滴器(dropper)、ピペット、又は、スプレーによって鼻腔に直接適用される。製剤は、単回又は複数回投与の形態で提供されてもよい。患者は、点滴器又はピペットを介して溶液又は懸濁液の適切な所定量を投与してもよい。スプレーは、例えば、計量された霧化式スプレーポンプによって投与されてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0065】

本明細書で使用する化合物は、経鼻投与を含む、特に気道へのエアゾール投与のために製造されてもよい。化合物は、例えば、約5ミクロン以下の小さい粒子サイズを有する。このような粒子サイズは、当技術分野で周知の手段、例えば、微細化によって得ることができる。活性成分は、適切な推進剤、例えば、クロロフルオロカーボン(CFC)(例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、又は、ジクロロテトラフルオロエタン)、二酸化炭素又はその他の適切な気体で加圧パック内に提供される。エアゾールは、レシチンのような界面活性剤を含有してもよい。薬物の投与量は、計量バルブによって調節されてもよい。また、活性成分は、乾燥粉末、例えば、適切な粉末ベース、例えば、ラクトース、デンプン、デンプン誘導体、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びポリビニルピロリジン中の前記化合物の粉末混合物の形態で提供されてもよい。粉末担体は、鼻腔内にゲルを形成する。粉末組成物は、例えば、粉末が吸引器によって投与されることができるゼラチン又はプリスター・パックのカプセル又はカートリッジ内で単位剤形で提供されてもよい。

## 【0066】

本明細書で使用される化合物は、軟膏、クリーム又はローション、又は、経皮性パッチとして表皮に局所投与するために製造されてもよい。軟膏及びクリームは、例えば、水性又は油性ベースで製造され、適切な増粘剤及び/又はゲル化剤が添加される。ローションは、水性又は油性ベースで製造されてもよく、一般的に1つ以上の乳化剤、安定剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、又は、着色剤を含有する。口内へ局所投与するのに適切な製剤は、通常はスクロース及びアカシア又はトラガントである香味付けされた基剤に活性剤を含むロゼンジ(ロゼンジ)；ゼラチン及びグリセリン又はスクロース及びアカシアなどの不活性基剤に活性成分を含むパステル剤(パステル)；及び適切な液体担体内に活性成分を含む洗口剤(マウスウォッシュ)を含む。

## 【0067】

本明細書で使用する化合物は、坐薬として投与するために製造されてもよい。このような製剤において、低融点ワックス、例えば、脂肪酸グリセリド又はココアバターの混合物がまず溶解し、活性成分が、例えば、攪拌によって均一に分散する。溶解した均一な混合物が便利なサイズのモールドに注入された後に冷却されて固体化する。

## 【0068】

本明細書で使用する化合物は、腔内投与用に製造されてもよい。活性成分と共に担体を含む腔坐剤、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム、又はスプレーが当該分野で適切であることが知られている。

## 【0069】

必要に応じて、製剤は、活性成分の持続放出投与又は制御放出投与のために変形された腸溶コーティングによって製造されてもよい。本発明の目的のために使用することができる一般的な形態の制御放出形態は、不活性コア、例えば、シュガースフィア(sugarsphere)、内部の薬物含有第2層がコーティングされた第1層、及び内層から薬物放出を調節するための第3層又は外部の膜を含む。

## 【0070】

コアは、水溶性又は膨張性物質であることが好ましく、従来コアとして使用されている任意の物質又はビーズ又はペレットへと製造された任意の他の薬学的に許容される水溶性又は水膨潤性物質であってもよい。コアは、スクロース/デンプン(Sugarspheres NF)、スクロース結晶などの物質の球体、又は、一般的に賦形剤、例えば、微結晶性セルロース及びラクトースで構成された、圧出して乾燥した球体であってもよい。

## 【0071】

第1層内で実質的に水不溶性物質は、一般的に(溶媒内に分散又は溶解した)「G I不溶性」又は「G I部分的に不溶性」フィルム形成ポリマーである。例としては、エチルセルロース、酢酸セルロース、酢酸セルロース酪酸塩、ポリメタクリレート、例えば、エチ

10

20

30

40

50

ルアクリレート / メチルメタクリレート共重合体 (Eudragit NE - 30 - D) 及びアンモニオメタクリレート共重合体タイプ A 及び B (Eudragit RL 30 D 及び RS 30 D)、及びシリコーンエラストマが列挙されてもよい。通常、ポリマーと共に可塑剤が使用される。例示の可塑剤は、セバシン酸ジブチル、プロピレングリコール、クエン酸トリエチル、クエン酸トリブチル、ヒマシ油、アセチル化モノグリセリド、アセチルクエン酸トリエチル、アセチルクエン酸ブチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、トリアセチン、椰子油（中鎖脂肪酸）を含む。

#### 【0072】

活性成分を含有する第2層は、結合剤としてポリマーを含む又は含まない活性成分（薬物）で構成されてもよい。結合剤が使用される場合、結合剤は、通常は親水性であるが、水溶性又は水不溶性であってもよい。活性薬物を含有する第2層で使用される例示のポリマーは、親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン、ポリアルキレングリコール、例えば、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ポリビニルアルコール、デンプン及びその誘導体、セルロース誘導体、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、カルボキシメチルヒドロキシエチルセルロース、アクリル酸ポリマー、ポリメタクリレート、又は、任意のその他の薬学的に許容されるポリマーを含む。第2層内の薬物対親水性ポリマーの比は、通常は 1 : 100 から 100 : 1 (w/w) の範囲である。

#### 【0073】

薬物放出を制御するための、第3層又は膜で使用するのに適したポリマーは、水不溶性ポリマー又は pH 依存性溶解度を有するポリマー、例えば、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、酢酸セルロースフタレート、トリメリト酸酢酸セルロース、ポリメタクリレート、又は、これらの混合物から選択することができ、任意に可塑剤（例えば、上述したもの）と結合される。

#### 【0074】

任意に、制御された放出層は、制御された放出層の浸透性及び放出速度を調節するために、前記ポリマーと共に異なる溶解性を有するまた他の物質を含む。例えば、エチルセルロースと共に改質剤として使用することができる例示のポリマーは、HPMC、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリビニルアルコール、pH 依存溶解性を有するポリマー、例えば、酢酸セルロースフタレート又はアンモニオメタクリレート共重合体及びメタクリル酸共重合体又はこれらの混合物を含む。添加剤、例えば、スクロース、ラクトース、及び薬学的等級界面活性剤は、必要に応じて制御された放出層内に含まれてもよい。

#### 【0075】

また、単位剤形の製剤が本明細書に提供される。このような形態で、製剤は、活性成分（例えば、限定されないが、式(I)の化合物又はそのエステル、又は、それらそれぞれの塩）の適量を含有する単位投与量に再分割される。単位剤形は、パッケージ化された製剤であってもよく、製剤の別個の量を含有するパッケージは、例えば、バイアル又はアンプル内にパッケージ化された錠剤、カプセル及び粉末であってもよい。また、単位剤形は、カプセル、錠剤、カシェ剤（cachet）又はトローチ剤であってもよく、パッケージ化された形態内のこれらのいずれか 1 つの適切な数であってもよい。

#### 【0076】

その他の適切な薬学的担体及びこれらの製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, edited by E.W.Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pa に記載されている。

#### 【0077】

このようにして一般的に記載された本発明は、次の実施形態を参照してさらに容易に理解され、これは、説明するために提供されるものであり、本発明を限定するものではない

10

20

30

40

50

。

**【実施例】****【0078】**

実施形態及び本明細書中のその他の部分で次の略語が実施形態で使用される。

C C R : C C ケモカイン受容体

H E : ヘマトキシリン・エオジン

H F D : 高脂肪食

M C P : 単球走化性タンパク質

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

N A F L D : 非アルコール性脂肪肝疾患

10

N A S : N A F L D 活性点数

N A S H : 非アルコール性脂肪性肝炎

S D : 標準偏差

S M A : 平滑筋アクチン

S P F : 特定の病原体を含まない

S T A M : ステリック動物モデル (S t e l i c A n i m a l M o d e l )

S T Z : ストレプトゾトシン

T I M P : メタロプロテイナーゼの組織阻害剤

F L A P : 5 - リポキシゲナーゼ活性化タンパク質

L T C 4 : ロイコトリエン C 4

20

**【0079】****[実施例1] 進行したN A S H の治療**

病原菌がない15日妊娠したC 57 B L / 6 マウスは、日本エスエルシー社から購入する。雄マウスには、生後にS T Z (シグマ社 (Sigma) 、米国) を単回皮下注射して、生後4週 (28 ± 2日) 後に高脂肪食 (H F D ; 日本クレア社、日本) を自由に摂食させて、N A S H が形成される。生後8週 (63 ± 2日) のマウスを、治療開始前日に10匹の6群にランダム抽出する。個々の体重は、治療期間中に毎日測定し、マウスの生存率、臨床徵候、及び拳動は、毎日監視する。

次の試験群が使用される

**【0080】**

30

群1 (正常) : 10匹の正常マウスは、任意の治療をせずに生後12週まで通常の食餌を自由に摂取させる。

群2 (ビークル) : 10匹のN A S H マウスは、生後8週から12週までビークル (0 . 3 % カルボキシメチルセルロース (C M C) ) を10mL / kg の体積で1日1回経口投与する。

群3 (M N - 0 0 1 - 低投与量) : 10匹のN A S H マウスは、生後8から12週にM N - 0 0 1 を補充したビークルを10mg / kg の投与量で1日1回経口投与する。

群4 (M N - 0 0 1 - 中投与量) : 10匹のN A S H マウスは、生後8から12週にM N - 0 0 1 を補充したビークルを30mg / kg の投与量で1日1回経口投与する。

群5 (M N - 0 0 1 - 高投与量) : 10匹のN A S H マウスは、生後8から12週にM N - 0 0 1 を補充したビークルを100mg / kg の投与量で1日1回経口投与する。

40

群6 (テルミサルタン) : 10匹のN A S H マウスは、生後8から12週にテルミサルタンを補充した純水を10mg / kg の投与量で1日1回経口投与する。

**【0081】**

次の分析のために、全ての群のマウスは、生後12週に犠牲になる。個々の肝重量を測定して、肝臓対体重比が算出される。肝臓のヒドロキシプロリンは、加水分解法によって定量化される。(N A F L D 活性点数の評価のための) H E 染色、(線維症領域の比率評価のための) シリウス赤色染色、(炎症領域の比率評価のための) F 4 / 8 0 免疫染色、(-S M A 陽性領域の比率評価のための) -S M A 免疫染色の肝切片の病理組織学的分析を(一般的な方法に従って) 行う。肝臓リアルタイムR T - P C R 分析から全体R N

50

Aを用いる遺伝子発現分析は、T I M P - 1に対して実行され、コラーゲン1型、-SMA、5-リポキシゲナーゼ、F L A P、及びL T C 4シンターゼも実行される。統計的試験は、ボンフェローニ多重比較試験(Bonferroni Multiple Comparison Test)を用いて行う。P値が0.05未満であれば、統計的に有意とみなされる。

#### 【0082】

##### [実施例2] 人間の進行したN A S H の治療

進行した非アルコール性脂肪性肝炎に関する症状を有する成人250人は、最大6ヶ月の間500mgの1日投与量でMN-001又はMN-002又は偽薬を、各々ランダムに投与する。一次結果は、非アルコール性脂肪性肝炎の組織学的特性の改善であり、これは、脂肪症、小葉の炎症、肝細胞の風船化、肝硬変、及び線維症のうち1つ以上の標準化点数の合成を用いて評価される。結果は、当業者に周知の方法によって分析される。

10

#### 【0083】

[実施例3] 進行した非アルコール性脂肪性肝炎のS T A M モデルでMN-001の治療に有益な効果

S T A M (商標)は、進行した非アルコール性脂肪性肝炎(進行したN A S H )、その徵候及び関連する肝臓障害の有用なモデルであり、C 5 7 B L / 6 マウスの化学的介入及び食事介入の組み合せによって形成される。実施例3において、N A S H を誘導した後、進行した段階に到達し、マウスは8~12週で治療された。テルミサルタンは、S T A M マウスにおいて抗N A S H 、抗線維症及び抗炎症効果を有することが示され、従って本試験で陽性対照群として用いられた。この試験によると、以下に記載されるように、テルミサルタン治療は、報告されたデータと一致するビークル群と比較して肝重量、N A S 、線維症領域及び炎症領域を有意に減少させ、本発明で使用される化合物の有用性を立証するために、本明細書で用いられたS T A M マウスモデルに対する有用性の証拠を提供した。

20

#### 【0084】

M N - 0 0 1 の高投与量及び中投与量の治療は、N A F L D 活性点数(N A S )を有意に減少させた。N A S の改善は、小葉の炎症及び肝臓の風船化の減少に起因するものであった。特に、N M - 0 0 1 の高投与量及び中投与量は、風船化点数を有意に減少させた。このような結果は、例えば、限定されないが、肝臓の損傷及び風船化を抑制することによって、M N - 0 0 1 が進行したN A S H の病状を改善できることを立証する。このように、M N - 0 0 1 は、進行したN A S H の病期で抗N A S H 及び抗線維症効果を示した。

30

#### 【0085】

##### [材料及び方法]

##### [試験物質]

投与溶液を準備するために、M N - 0 0 1 を計量し、0.3% C M C (ビークル)に溶解した。テルミサルタン(M I C A R D I S (登録商標))は、ベーリンガーインゲルハイム社(Boehringer Ingelheim GmbH、ドイツ)から購入して純水に溶解した。

#### 【0086】

##### [N A S H の誘導]

40

50匹の雄マウスで生後2日に200μgのストレプトゾトシン(S T Z、シグマアルドリッヂ社(S i g m a - A l d r i c h )、米国)溶液を単回皮下注射して生後4週後に高脂肪食(H F D、57kcal%の脂肪、c a t # : H F D 3 2 、日本クレア社、日本)を供給することによってN A S H が誘導された。

#### 【0087】

##### [薬物投与経路]

ビークル、M N - 0 0 1 及びテルミサルタンは、10mL/kgの体積で経口経路によって投与した。

#### 【0088】

##### [治療投与量]

50

MN-001は、10、30及び100mg/kgの投与量で1日1回投与した。テルミサルタンは、10mg/kgの投与量で1日1回投与した。

#### 【0089】

##### [動物]

C57BL/6マウス(15日妊娠中の雌)が本試験に用いられた。

#### 【0090】

##### [環境]

動物は、温度( $23 \pm 2$ )、湿度( $45 \pm 10\%$ )、照明(12時間の人工光と闇のサイクル；8時から20時までの光)、空気交換の制御された条件下のSPF施設で保持された。施設の汚染を防止するために試験室で高圧を保持した。

10

#### 【0091】

##### [動物飼育]

動物は、ケージあたり最大4匹のポリカーボネット製のケージKN-600(夏目製作所社、日本)で飼育した。滅菌されたペーパークリーン(Paper-Clean、日本エスエルシー社)は、動物の寝具に使用されて一週間に一度交換した。

#### 【0092】

##### [食べ物及び飲み物]

滅菌固体HFDは、ケージ上部の金属蓋に配置して自由に与えた。純水は、ゴム栓及び給水先管を備えた給水ボトルから自由に提供された。給水ボトルは、一週間に一度交換し、洗浄して、オートクレーブで滅菌し、再利用された。

20

#### 【0093】

##### [動物及びケージ識別]

マウスは、イヤリングに彫られた数字で識別された。それぞれのケージは、特定の識別コードが付された。

#### 【0094】

##### [肝臓生化学の測定]

##### [肝臓のヒドロキシプロリン含量測定]

次のように、肝臓のヒドロキシプロリンの含量を定量化するために凍結肝臓サンプル(32~40mg)をアルカリ酸加水分解法によって処理した。肝臓サンプルは、100%

30

アセトンで脱脂し、空気で乾燥させ、65度で2NのNaOHに溶解し、121度で20分間オートクレーブした。溶解したサンプル(400μL)は、20分間121度6N

HClの400μLで酸加水分解し、10mg/mlの活性炭を含む4N NaOHの400μLで中和した。AC緩衝剤(2.2M酢酸/0.48Mクエン酸、400μL)は、サンプルに添加した後、遠心分離して上澄液を収集した。ヒドロキシプロリンの標準曲線は、16μg/mLで開始するトランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン(シグマアルドリッヂ社、米国)を連続的に薄めて製造した。準備されたサンプル及び標準(各400μL)は、400μLクロラミンT溶液(和光純薬工業社、日本)と混合して室温で25分間培養した。発色のために、サンプルをエールリヒ(Ehrlich')溶液(400μL)と混合して65度20分間加熱した。サンプルを氷で冷却して遠心分離して沈殿物を除去した後、各々上澄液の光学密度を560nmで測定した。ヒドロキシプロリンの濃度は、ヒドロキシプロリン標準曲線から算出した。

30

BCAタンパク質定量キット(サーモフィッシュサイエンティフィック社(Thermo Fisher Scientific)、米国)を使用して肝臓サンプルのタンパク質濃度を決定し、これを使用して算出されたヒドロキシプロリン値を正規化した。肝臓のヒドロキシプロリン水準は、タンパク質1mgあたりμgで表した。

40

#### 【0095】

##### [病理組織学的分析]

HE染色のために、Bouin溶液中に予め固定された肝臓組織のパラフィンブロックから切片を切断し、リリーマイヤーのヘマトキシリントン(武藤化学社、日本)及びエオシン溶液(和光純薬工業社)で染めた。NAFLD活性点数(NAS)は、Kleiner基

50

準により算出した (Kleiner - DEなど、Hepatology 2005; 41: 1313)。コラーゲン沈着を可視化するために、ブアン固定 (Bouin's fixed) による肝切片は、ピクロシリウス赤色溶液 (ヴァルデック社 (Waldecker))、ドイツ) を使用して染色した。

#### 【0096】

免疫組織化学のためにTissue - Tek O.C.T. 化合物に含まれた凍結肝臓組織から切片を切断して、アセトンで固定した。内因性ペルオキシダーゼ活性を0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を使用して5分間遮断した後、ロックエース(大日本住友製薬社、日本)で10分間培養した。その切片は、抗 - SMA (エピトミクス社 (Epitomics)、米国) 又は抗F4/80抗体 (BMAバイオメディカルズ社 (BMA Biomedicals)、スイス) の200倍の希釈液にて室温で1時間の間培養した。二次抗体 (HRPヤギ抗ラット (HRP - Goat anti - rat) 抗体、インビトロジエン社 (Invitrogen)、米国) で培養した後、酵素基質反応を3,3' - ディアミノベンジジン / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液 (ニチレイ社 (Nichirei)、日本) を使用して行った。

#### 【0097】

線維症領域、炎症領域の定量分析、及び - SMAの半定量 (semi - quantification) のためにシリウス赤色染色された切片 F4/80免疫染色された切片及び - SMA免疫染色された切片の明視野 (bright field) 画像は、デジタルカメラ (DFC280; ライカマイクロシステムズ社 (Leica Microsystems)、ドイツ) を使用して200倍の倍率で中心静脈の周辺をキャプチャーし、ImageJソフトウェア (国立衛生研究所 (National Institute of Health)、米国) を使用して1個の切片あたり5つの視野で陽性領域を測定した。

#### 【0098】

##### [定量的RT - PCR]

全体RNAを製造者の指示により、RNAiso (タカラバイオ社、日本) を使用して肝臓サンプルから抽出した。1 μgのRNAは、4.4 mMのMgCl<sub>2</sub> (エフ・ホフマン・ラ・ロシュ社 (F. Hoffmann - La Roche)、スイス)、40UのRNase阻害剤 (東洋紡社、日本)、0.5 mMのdNTP (プロメガ社 (Promega)、米国)、6.28 μMのランダムヘキサマー (プロメガ社)、5 × 最初の順序緩衝剤 (プロメガ社)、10 mMのジチオスレイトール (インビトロジエン社、米国) 及び200U MMLV - RT (インビトロジエン社) を含有する反応混合物を20 μLの最終ボリュームで用いて逆転写した。反応を37 °C で1時間、続いて99 °C で5分間実施した。リアルタイムPCRをリアルタイムPCR DICE及びSYBR Premix Taq (タカラバイオ社) を使用して行った。相対的なmRNAの発現レベルを算出するために各遺伝子の発現は、参照遺伝子36B4 (遺伝子記号: Rplp0) のそれに標準化した。PCRプライマーセット情報は、表1に記載した。

#### 【0099】

## 【表1】

表1. PCR プライマー情報（シーケンス ID NO:1-14 は掲載順）

| 遺伝子           | 設定 ID    |    | シーケンス  |
|---------------|----------|----|--|
| 36B4          | MA057856 | 前方 | 5'-TTCCAGGCTTGGGCATCA-3' (シーケンス ID NO: 1)        |
|               |          | 後方 | 5'-ATGTTCAGCATGTTCAGCAGTGTG-3' (シーケンス ID NO: 2)  |
| TIMP-1        | MA098519 | 前方 | 5'-TGAGCCCTGCTCAGCAAAGA-3' (シーケンス ID NO: 3)      |
|               |          | 後方 | 5'-GAGGACCTGATCCGTCCACAA-3' (シーケンス ID NO: 4)     |
| コラーゲン1型 s     | MA075477 | 前方 | 5'-CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGAG-3' (シーケンス ID NO: 5)  |
|               |          | 後方 | 5'-GCAATGCTGTTCTGCAGTGGTA-3' (シーケンス ID NO: 6)    |
| $\alpha$ -SMA | MA057911 | 前方 | 5'-AAGAGCATCCGACACTGCTGAC-3' (シーケンス ID NO: 7)    |
|               |          | 後方 | 5'-AGCACAGCCTGAATAGCCACATAC-3' (シーケンス ID NO: 8)  |
| 5-リポキシゲナーゼ    | MA148345 | 前方 | 5'-TTGGCATCTAGGTGCAGTGTG-3' (シーケンス ID NO: 9)     |
|               |          | 後方 | 5'-TGCGGAATCGGATCATGG-3' (シーケンス ID NO: 10)       |
| FLAP          | MA159311 | 前方 | 5'-CGGACTGATGTACCTGTTGTGAG-3' (シーケンス ID NO: 11)  |
|               |          | 後方 | 5'-ATCCGCTTGCCGAAGATGTAG-3' (シーケンス ID NO: 12)    |
| LTCC4 シンターゼ   | MA085965 | 前方 | 5'-CTGTGGCTGGAACATGAAG-3' (シーケンス ID NO: 13)      |
|               |          | 後方 | 5'-CCTTCGTGCAGAGATCACCTGTAG-3' (シーケンス ID NO: 14) |

## 【0100】

## [統計的試験]

統計分析は、GraphPad Prism 4 に対してボンフェローニ多重比較試験を使用して行った（グラフパッドソフトウェア社（GraphPad Software）、米国）。P 値が 0.05 未満であれば、統計的に有意であると考えられた。片側 t 検定が P 値 0.10 未満に戻る傾向が仮定された。結果を平均  $\pm$  SD として表した。

## 【0101】

## [試験設計及び治療]

## [試験群]

## 群1：正常

10匹の正常マウスは、任意の治療をせずに生後12週まで通常の食餌を自由に摂取させる。

## 群2：ビーグル

10匹のNASHマウスは、生後8から12週の間、ビーグルを10ml/kg の体積で1日1回経口投与した。

## 群3：MN-001 - 低投与量

10匹のNASHマウスは、生後8から12週の間、MN-001を補充したビーグルを10mg/kg の投与量で1日1回経口投与した。

## 群4：MN-001 - 中投与量

10匹のNASHマウスは、生後8から12週の間、MN-001を補充したビーグルを30mg/kg の投与量で1日1回経口投与した。

## 群5：MN-001 - 高投与量

10匹のNASHマウスは、生後8から12週の間、MN-001を補充したビーグルを100mg/kg の投与量で1日1回経口投与した。

10

20

30

40

50

**群 6 : テルミサルタン**

10匹のN A S Hマウスは、生後8から12週の間、テルミサルタンを補充した純水を、10mg/kgの投与量で1日1回経口投与した。

**【 0 1 0 2 】**

表2は、治療スケジュールを整理したものである。

**【 0 1 0 3 】**

**【表2】**

表2. 治療スケジュール

| 群 | マウスの数 | マウス  | 試験物質    | 投与量(mg/kg) | 容量(mL/kg) | 治療計画           | 犠牲(週) |
|---|-------|------|---------|------------|-----------|----------------|-------|
| 1 | 10    | 正常   | -       | -          | -         | -              | 12    |
| 2 | 10    | STAM | ピークル    | -          | 10        | 経口、1日1回、8週～12週 | 12    |
| 3 | 10    | STAM | MN-001  | 10         | 10        | 経口、1日1回、8週～12週 | 12    |
| 4 | 10    | STAM | MN-001  | 30         | 10        | 経口、1日1回、8週～12週 | 12    |
| 5 | 10    | STAM | MN-001  | 100        | 10        | 経口、1日1回、8週～12週 | 12    |
| 6 | 10    | STAM | テルミサルタン | 10         | 10        | 経口、1日1回、8週～12週 | 12    |

10

20

30

40

**【 0 1 0 4 】**

**[ 動物のモニタリング及び犠牲 ]**

生存率、臨床徵候、及び挙動は、毎日モニタリングした。体重は、治療前に記録した。マウスに各々を投与して約60分後に毒性、瀕死、及び死亡率の有意な臨床徵候について観察した。動物は、エーテル麻酔（和光純薬工業社）下で心臓を直接穿刺することによって、放血により犠牲にした。

**【 0 1 0 5 】**

**[ 結果 ]**

**[ 組織学的分析 ]**

**[ H E 染色及びN A F L D 活性点数 ( N A S ) ]**

N A F L D 活性点数 ( N A S ) は、例えば、進行したN A S Hに罹患している対象の肝臓の損傷の程度、及び損傷した肝臓の治療に対する反応の尺度である。H E 染色切片の代表的な顕微鏡写真は、図1に示される。ピークル群からの肝切片は、深刻なマイクロ及びマクロ脂肪沈着、肝細胞の風船化及び炎症性細胞浸潤を示した。これらの観察と一致して、N A S は、正常群と比較してピークル群で有意に増加した。M N - 0 0 1 治療群の全ての投与量は、肝細胞の風船化及び炎症性細胞浸潤の有意な改善を示した。N A S は、ピークル群に比べてM N - 0 0 1 治療群の全ての投与量において、有意に減少した。表3及び表4、及び図2～図5を参照。

**【 0 1 0 6 】**

## 【表3】

表3. MN-001によるNAS及びNAS成分の改善

| 群        | n  | 点数  |   |       |   |        | NAS |   |         |   |         |
|----------|----|-----|---|-------|---|--------|-----|---|---------|---|---------|
|          |    | 脂肪症 |   | 小葉の炎症 |   | 肝細胞風船化 |     |   |         |   |         |
|          |    | 0   | 1 | 2     | 3 | 0      | 1   | 2 |         |   |         |
| 正常       | 10 | 10  | - | -     | - | 1      | -   | - | 0.0±0.0 |   |         |
| ビークル     | 10 | -   | 6 | 4     | - | -      | 4   | 5 | 1       | - | 5.1±0.7 |
| MN-001-低 | 10 | 3   | 6 | 1     | - | 2      | 2   | 6 | -       | - | 3.6±1.4 |
| MN-001-中 | 10 | -   | 7 | 3     | - | 1      | 6   | 3 | -       | - | 4.0±0.9 |
| MN-001-高 | 10 | -   | 9 | 1     | - | 4      | 5   | 1 | -       | - | 3.1±0.7 |
| テルミサルタン  | 9  | 2   | 7 | -     | - | 2      | 5   | 2 | -       | - | 2.8±0.8 |

【0107】

## 【表4】

表4. NAS成分の定義

| 項目      | 点数 | 程度           |
|---------|----|--------------|
| 脂肪症     | 0  | <5%          |
|         | 1  | 3-33%        |
|         | 2  | >33-66%      |
|         | 3  | >66%         |
| 肝細胞の風船化 | 0  | なし           |
|         | 1  | 少しの風船細胞      |
|         | 2  | 多くの細胞/顕著な風船化 |
| 小葉の炎症   | 0  | 病巣なし         |
|         | 1  | <2 病巣/200x   |
|         | 2  | 2-4 病巣/200x  |
|         | 3  | >4 病巣/200x   |

【0108】

## 【シリウス赤色染色】

肝臓のシリウス赤色染色された切片の代表的な顕微鏡写真は、図6に示される。ビークル群で肝切片は、正常群に比べて肝小葉の周辺領域でコラーゲン沈着の増加を示した。線維症領域（シリウス赤色陽性領域）の比率が正常群と比較してビークル群で有意に増加した。線維症領域は、ビークル群に比べて、テルミサルタン群、MN-001-低及びMN-001高群で有意に減少した。線維症領域は、ビークル群に比べて、MN-001中投与量群において減少する傾向がある。表5及び図7を参照。

【0109】

## [F4/80免疫染色]

ビークル群からの肝切片は、正常群に比べて肝小葉内で増加したF4/80陽性細胞の数と大きさを示した。炎症領域（F4/80陽性領域）の比率が正常群と比較してビーク

10

20

30

40

50

ル群で有意に増加した。炎症領域がテルミサルタン群で減少する傾向がある。ビークル群と任意の投与量のMN-001治療群との間で炎症領域の有意な差はないが、図8から改善が観察される。さらに表5を参照。

#### 【0110】

##### [ -SMA免疫染色 ]

-SMA免疫染色された切片の代表的な顕微鏡写真は、図9に示される。ビークル群からの肝切片は、正常群に比べて肝小葉内で増加した-SMA陽性細胞の数を示した。

-SMA陽性領域の比率が正常群と比較してビークル群で有意に増加した。-SMA陽性領域は、ビークル群と比較してテルミサルタン、MN-001-低及びMN-001-高群で有意に減少した。ビークル群とMN-001-中群との間で-SMA陽性領域の有意な差はなかった。表5及び図9を参照。

#### 【0111】

##### 【表5】

表5. 組織学的分析

| パラメータ          | 正常          | ビークル        | MN-001-低    | MN-001-中    | MN-001-高    | テルミサルタン     |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| (平均±SD)        | (n=10)      | (n=10)      | (n=10)      | (n=10)      | (n=10)      | (n=9)       |
| シリウス赤色-陽性領域(%) | 0.29 ± 0.13 | 1.21 ± 0.44 | 0.75 ± 0.40 | 0.95 ± 0.37 | 0.65 ± 0.28 | 0.49 ± 0.19 |
| F4/80-陽性領域(%)  | 2.92 ± 0.70 | 5.76 ± 1.60 | 6.47 ± 2.67 | 6.36 ± 1.59 | 5.14 ± 0.89 | 3.79 ± 1.60 |
| α-SMA-陽性領域(%)  | 0.49 ± 0.12 | 0.85 ± 0.35 | 0.45 ± 0.11 | 0.76 ± 0.19 | 0.48 ± 0.21 | 0.35 ± 0.14 |

#### 【0112】

##### [遺伝子発現分析]

##### 【TIMP-1】

TIMP-1 mRNAの発現レベルは、正常群と比較してビークル群で有意にアップレギュレートされた。TIMP-1 mRNAの発現レベルは、ビークル群と比較してMN-001-低及びテルミサルタン群で有意にダウンレギュレートされた。ビークル群と任意の他の群との間にTIMP-1のmRNAの発現レベルの有意な差はなかった。

#### 【0113】

##### [コラーゲン1型]

コラーゲン1型mRNAの発現レベルは、正常群と比較してビークル群で有意にアップレギュレートされた。コラーゲン1型mRNAの発現レベルは、ビークル群と比較してテルミサルタン群で有意にダウンレギュレートされた。MN-001-高群は、ビークル群と比較してコラーゲン1型mRNAの発現レベルが減少する傾向があった。ビークル群と任意の他の群との間でコラーゲン1型mRNAの発現レベルの有意な差はなかった。

#### 【0114】

##### [-SMA]

-SMA mRNAの発現レベルは、正常群と比較してビークル群で有意にアップレギュレートされた。-SMA mRNAの発現レベルは、ビークル群と比較してテルミサルタン群で有意にダウンレギュレートされた。ビークル群と任意の投与量のMN-001治療群との間で-SMA mRNAの発現レベルの有意な差はなかった。

#### 【0115】

##### [5-リポキシゲナーゼ]

5-リポキシゲナーゼのmRNAの発現レベルは、正常群と比較してビークル群で増加する傾向があった。MN-001高及びテルミサルタン群で5-リポキシゲナーゼmRN

10

20

30

40

50

Aの発現レベルは、ピークル群に比べて減少する傾向があった。ピークル群とMN-001低及びMN-001中群との間で5-リポキシゲナーゼのmRNAの発現レベルの有意な差はなかった。

【0116】

[FLAP]

FLAP mRNAの発現レベルは、正常群と比較してピークル群で有意にアップレギュレートされた。MN-001高群におけるFLAP mRNAの発現レベルは、ピークル群と比較して増加する傾向があった。ピークル群と任意の他の群との間にFLAP mRNAの発現レベルの有意な差はなかった。

【0117】

10

[LTC4シンターゼ]

テルミサルタン群において、LTC4シンターゼRNAの発現レベルは、ピークル群と比較して減少する傾向があった。ピークル群と任意の他の群との間にLTC4シンターゼmRNAの発現レベルの有意な差はなかった。

【0118】

[体重変化及び一般的な条件]

体重は、テルミサルタン群を除いた全ての群で治療期間の間、徐々に増加した。ピークル群の平均体重は、治療期間ずっと正常群より低かった。テルミサルタン群の平均体重は、8日から28日間ピークル群より有意に低かった。治療期間の間、ピークル群と任意の投与量のMN-001治療群との間で平均体重の有意な差はなかった。テルミサルタン群のうちの1つは、24日に死亡することが発見された。一般的な条件で動物は悪化しなかった。

20

【0119】

[犠牲日の体重]

ピークル群は、正常群に比べて犠牲日に平均体重の有意な減少を示した。テルミサルタン群は、ピークル群に比べて犠牲日に平均体重の有意な減少を示した。ピークル群と任意の投与量のMN-001治療群との間で犠牲日に平均体重の有意な差はなかった。

【0120】

[肝重量及び肝重量対体重比]

ピークル群は、正常群に比べて平均体重の有意な増加を示した。テルミサルタン群は、ピークル群に比べて平均肝重量の有意な減少を示した。ピークル群と任意の投与量のMN-001治療群との間で平均体重の有意な差はなかった。

30

【0121】

ピークル群は、正常群に比べて平均肝重量対体重比の有意な増加を示した。テルミサルタン群は、ピークル群に比べて平均肝重量対体重比の有意な減少を示した。ピークル群と任意の投与量のMN-001治療群との間で平均肝重量対体重比の有意な差はなかった。

【0122】

[肝臓生化学]

[肝臓のヒドロキシプロリン含量]

ピークル群は、正常群に比べて肝臓のヒドロキシプロリン含量が増加する傾向があった。ピークル群と任意の他の群との間で肝臓のヒドロキシプロリン含量の有意な差はなかった。

40

【0123】

特定の実施形態が説明されて記載されるが、当技術分野の通常技術によって、本明細書で以下の請求の範囲に定義された広い形態の技術から逸脱することなく変更できることを理解されたい。

本明細書に例示的に記載された実施形態は、具体的に本明細書に開示されていない任意の要素など、限定されることなく適切に実施することができる。従って、例えば、「含む」、「含有する」などの用語は、広範かつ制限のないものと理解され得る。また、本明細書で使用される用語及び表現は、説明のために用いられたもので、これらに制限されるこ

50

ではなく、このような用語及び表現の使用が、図示及び記載された特徴又はその一部の任意の等価物を排除する意図はなく、請求する技術の範囲内で様々な変更が可能であることを認識されたい。さらに、「本質的に～からなる」というフレーズは、具体的に言及した要素及び実質的に請求した技術の基本的な新規の特性に影響を及ぼさない追加の要素を含むことが理解される。「からなる」というフレーズは、指定されていない要素を排除する。

#### 【0124】

本開示は、本出願に記載された特定の実施形態に限定されるものではない。当業者に明らかであるように、思想及び範囲から逸脱することなく、様々な修正及び変更を行うことができる。本明細書に列挙したものに加えて、本開示の範囲内の機能的に等価な方法及び組成物は、上記の説明から当業者には明らかであろう。このような変更は、特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。本開示は、特許請求の範囲、及びその請求の範囲が与えられる等価物の全範囲によってのみ限定されるものである。この開示の内容は、変更することができる具体的な方法、試薬、化合物、組成物、又は生物学的システムに限定されないことを理解しなければならない。また、本明細書で使用する用語は、単に特定の実施形態を説明するためのものであり、限定することを意図するものではないことを理解されたい。10

#### 【0125】

さらに、本開示の特徴又は態様がマーカッシュ群について記載されている場合、当業者は、本開示がマーカッシュ群の部材の任意の個々の部材及びその下位群の点から記載されるものと認識されるであろう。20

#### 【0126】

当業者に理解されるように、任意の目的及び全ての目的のために、特に記載する説明を提供する観点から、本明細書に開示された全ての範囲は、その可能な下位範囲及びその下位範囲の組合せを含む。任意の列挙された範囲は、十分に記載されており、同一の範囲を少なくとも2等分、3等分、4等分、5等分、10等分などに分けることができるが容易に認識され得る。非限定的な例として、本明細書に記載した各範囲は、下位1/3、中位1/3、上位1/3に容易に分割することができる。当業者によって理解されるよう、「最大」、「最小」、「より大きい」、「より小さい」などの用語は、全て記載された数値を含み、さらに上述したように下位範囲に分割可能な範囲を意味する。最後に、当業者に理解されるように、範囲は、各個々の数値を含む。30

#### 【0127】

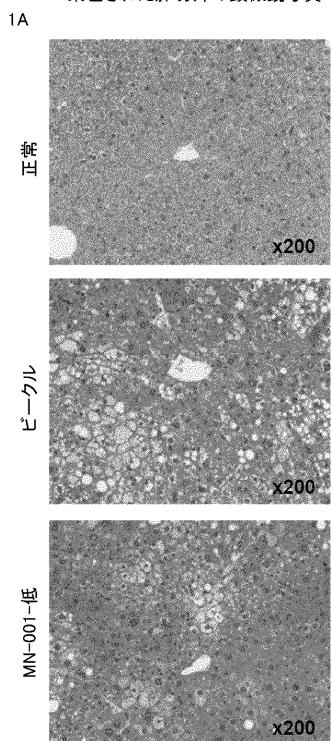
本明細書に記載した、全ての公報、特許出願、登録特許、及びその他文献は、それぞれの個別公報、特許出願、登録特許、又は、他の文献が参照により全体として本明細書に含まれることが具体的かつ個別に示されたかのように、本明細書に参照として含まれる。参照として組み込まれた本文に含まれる定義は、本開示における定義に矛盾する限りにおいて除外される。

#### 【0128】

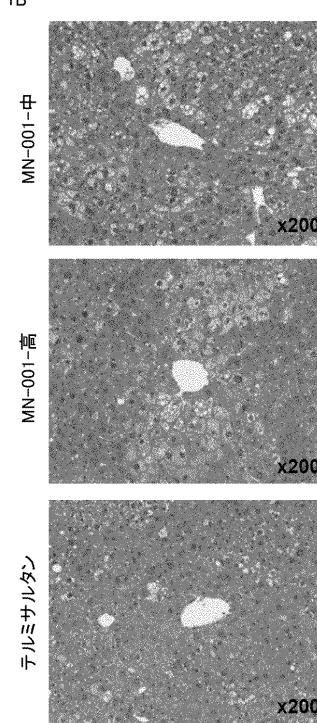
その他の実施形態は、特許請求の範囲に記載される。

【図1A】

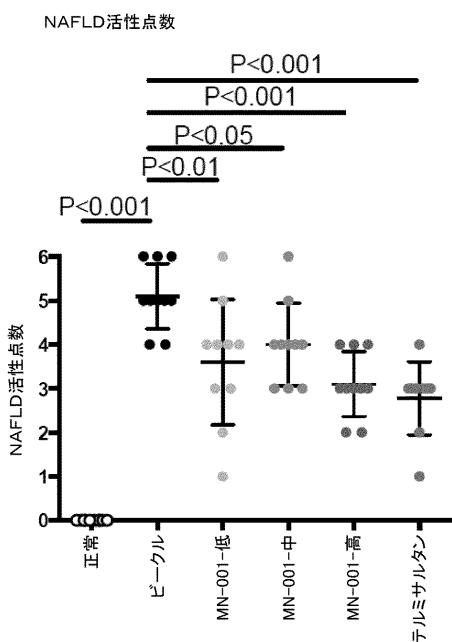
HE染色された肝切片の顕微鏡写真



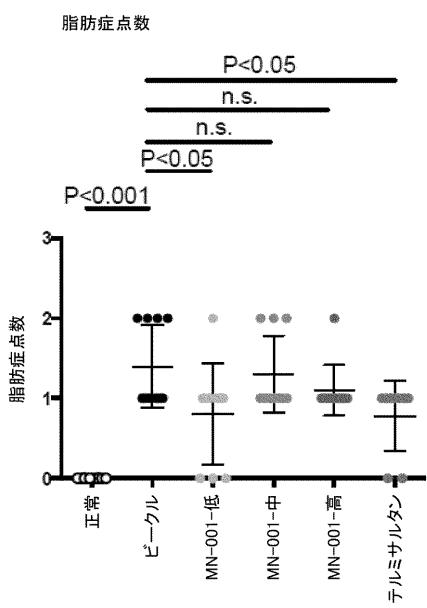
【図1B】



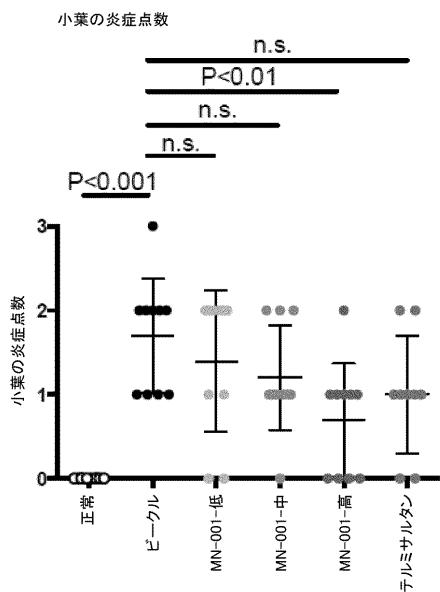
【図2】



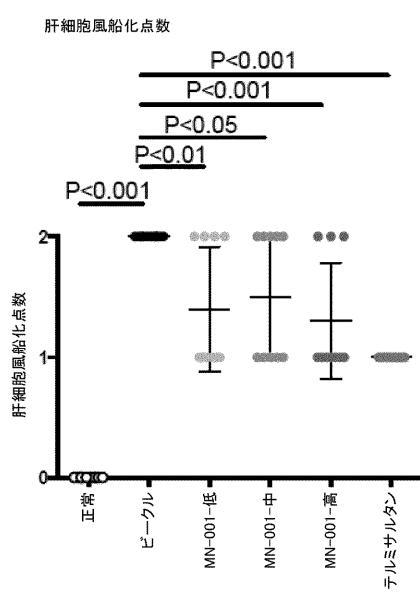
【図3】



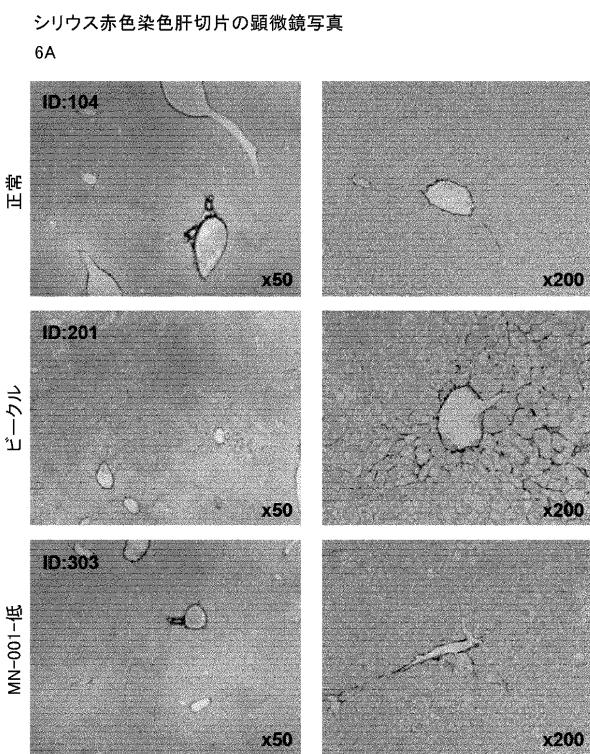
【図4】



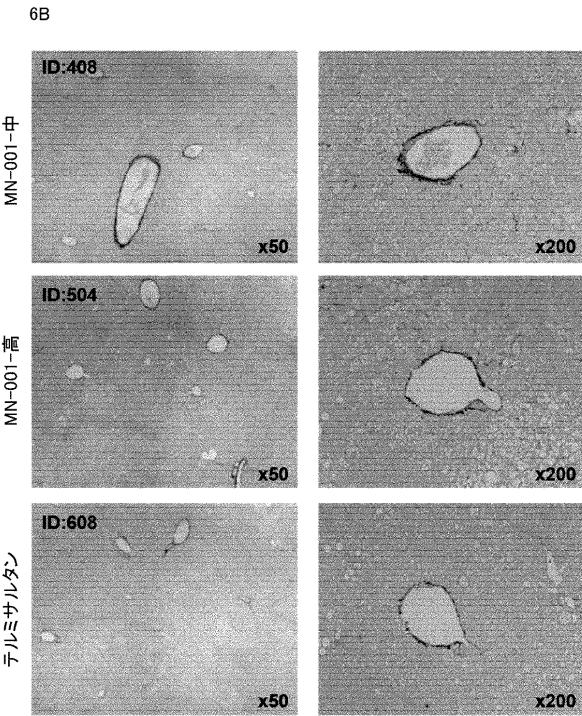
【図5】



【図6 A】

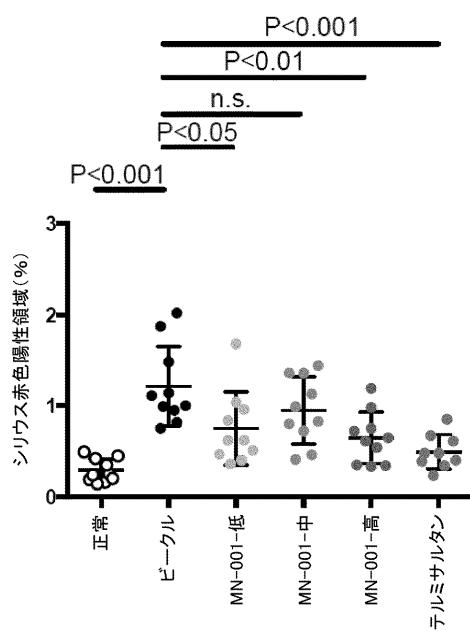


【図6 B】



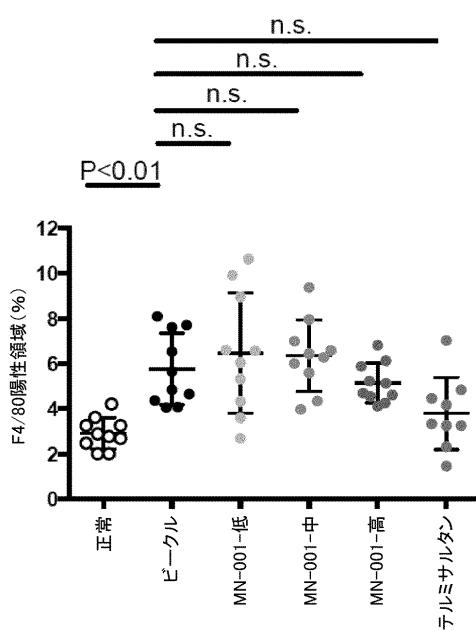
【図7】

線維症領域



【図8】

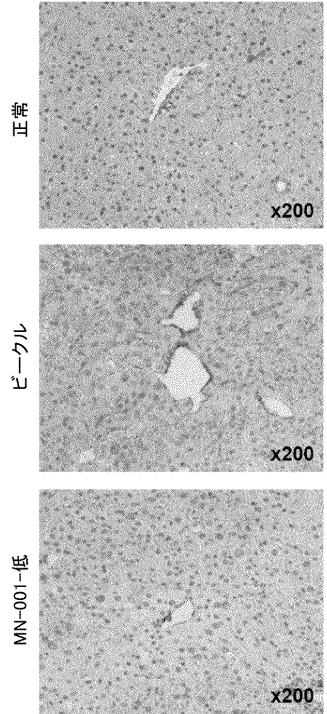
治療された肝臓の炎症領域



【図9A】

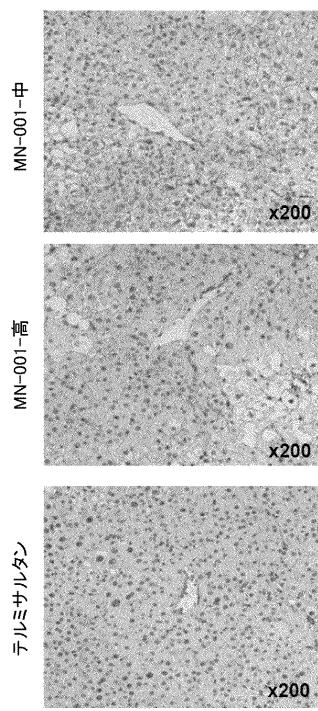
 $\alpha$ -SMA-免疫染色肝切片の顕微鏡写真

9A



【図9B】

9B



【配列表】

0006672173000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 K 9/48 (2006.01) A 6 1 K 9/48

(31)優先権主張番号 14/490,618  
(32)優先日 平成26年9月18日(2014.9.18)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(72)発明者 岩城 裕一  
アメリカ合衆国、92037 カリフォルニア州、ラ・ホヤ、ウエスト・ミュアランズ・ドライブ  
1110

審査官 横山 敏志

(56)参考文献 特開2013-119550 (JP, A)  
特表2007-526229 (JP, A)  
特開2013-056834 (JP, A)  
国際公開第2009/109525 (WO, A1)  
Drugs R D, 2007, Vol.8, No.6, pp.400-402  
J. Lipid Res., 2008, Vol.49, No.12, pp.2513-2523  
Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care., 2011, Vol.14, No.4, pp.347-353

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 31 / 00 - 33 / 44  
A 6 1 K 47 / 00 - 47 / 69  
A 6 1 K 9 / 00 - 9 / 72  
A 6 1 P 1 / 00 - 43 / 00  
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I )