

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和5年9月20日(2023.9.20)

【国際公開番号】WO2021/049633

【出願番号】特願2021-545626(P2021-545626)

【国際特許分類】

A 6 1 K 38/13(2006.01)

A 6 1 P 13/12(2006.01)

A 6 1 P 43/00(2006.01)

A 6 1 K 39/395(2006.01)

C 0 7 K 7/64(2006.01)

10

【F I】

A 6 1 K 38/13 Z N A

A 6 1 P 13/12

A 6 1 P 43/00 1 0 7

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 K 39/395 N

C 0 7 K 7/64

20

【手続補正書】

【提出日】令和5年9月8日(2023.9.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

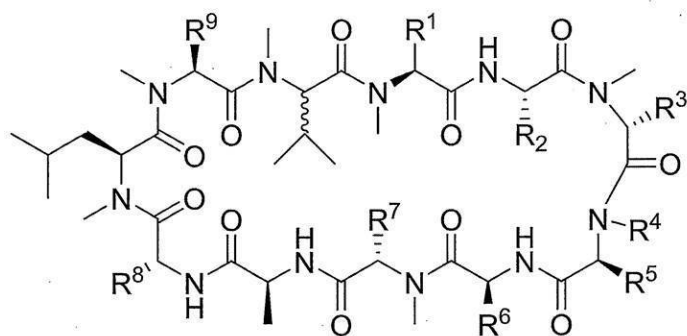
シクロフィリンD阻害剤(ただし、シクロスポリンAを除く)を有効成分として含有する、変異を有するIV型コラーゲン遺伝子を有する細胞におけるコラーゲン3量体の分泌を促進するための組成物。

30

【請求項2】

シクロフィリンD阻害剤が、下記式で表されるシクロスポリン誘導体、又はその塩、あるいはそれらの水和物又は溶媒和物である、請求項1に記載の組成物:

【化1】



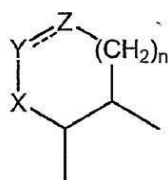
40

[式中,

R<sup>1</sup>は、水酸基で置換されたC5~9アルキル基若しくはC5~9アルケニル基;あるいは

50

下記式で表される基を表し、  
【化 2】



X は、O、又は  $\text{NR}^{11}$  を表し

$\text{R}^{11}$  は、H、又は C 1 ~ 6 アルキル基を表し、

Y は、 $\text{CR}^{12}\text{R}^{13}$ 、 $\text{CR}^{14}$  又は  $>\text{C}=\text{O}$  を表し、

$\text{R}^{12}$  は H、C 1 ~ 6 アルキル基、又は OH 基を表し、

$\text{R}^{13}$  は、H、C 1 ~ 6 アルキル基、又は OH 基を表し、

$\text{R}^{14}$  は、H 又は C 1 ~ 6 アルキル基を表し、

Z は、 $(\text{CH}_2)_m$ 、 $\text{CR}^{15}$ 、 $\text{NR}^{16}$ 、又は O であり、

$\text{R}^{15}$  は、H、又は C 1 ~ 6 アルキル基を表し、

$\text{R}^{16}$  は、H、又は C 1 ~ 6 アルキル基を表し、

m は 1 ~ 3 の整数であり、

n は 0 又は 1 を表し、

実線と破線で表された Y - Z 間の結合は、単結合又は二重結合を表し、Y - Z 間の結合が単結合の場合、Y は  $\text{CR}^{12}\text{R}^{13}$  又は  $\text{C}=\text{O}$  であり、かつ Z は  $(\text{CH}_2)_m$ 、 $\text{NR}^{16}$ 、又は O であり；Y - Z 間の結合が二重結合の場合、Y は  $\text{CR}^{14}$  であり、かつ Z は  $\text{CR}^{15}$  であり、

$\text{R}^{12}$  は、水酸基で置換されていてもよい、C 1 ~ 4 アルキル基を表し、

$\text{R}^{13}$  は、水素原子；

水酸基及び / 若しくはハロゲン原子で置換されていてもよい、C 1 ~ 6 アルキル基、C 1 ~ 6 アルコキシ基、若しくは C 1 ~ 6 アルキルチオ基；あるいは、

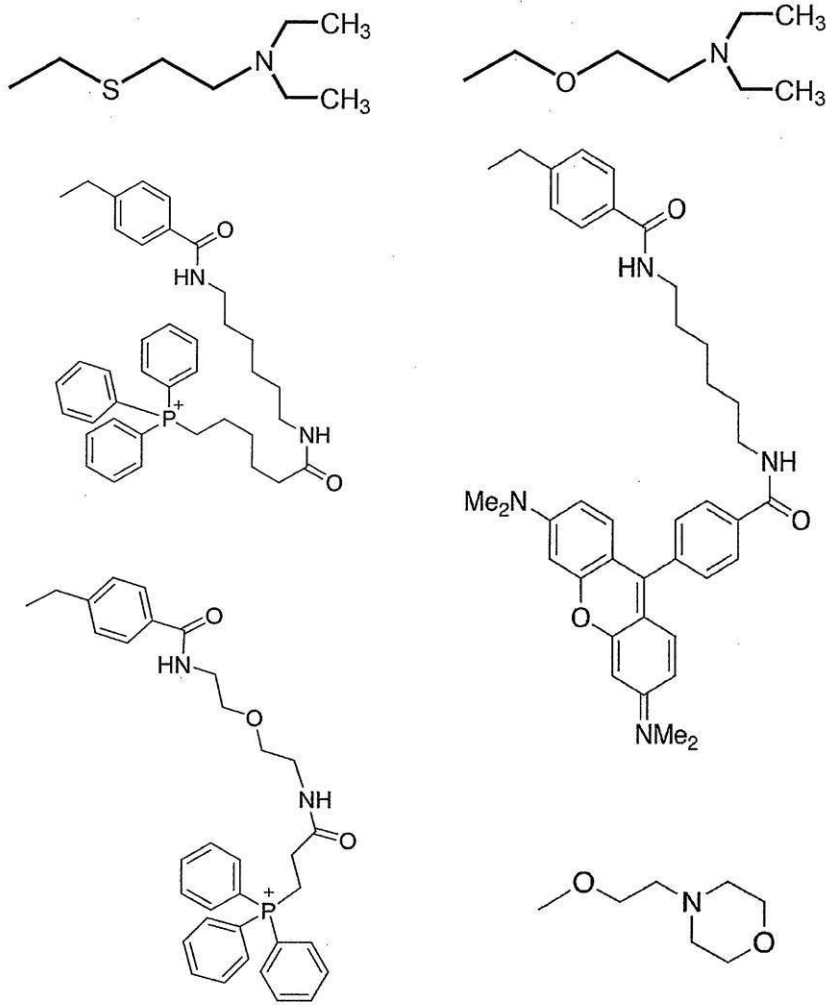
以下の式から選択される基を表し、

30

40

50

## 【化 3】



10

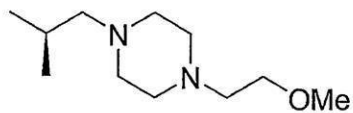
20

30

R<sup>4</sup> は、C 1 ~ 4 アルキル基を表し、

R<sup>5</sup> は、水酸基及び/若しくは C 1 ~ 6 アルコキシ基で置換されていてもよい、C 1 ~ 6 アルキル基、又は以下で表される基を表し、

## 【化 4】



40

R<sup>6</sup> は、n - プロピル基又はイソプロピル基を表し、

R<sup>7</sup> は、C 1 ~ 4 アルキル基を表し、

R<sup>8</sup> は、水酸基で置換されていてもよい、C 1 ~ 4 アルキル基を表し、

R<sup>9</sup> は、分岐状の C 3 ~ 4 アルキル基を表し、

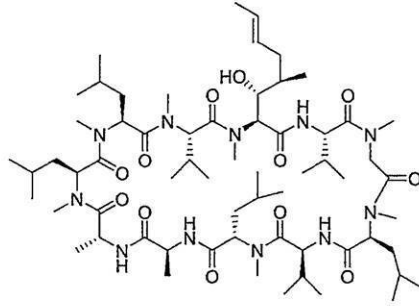
波線で表される結合は、結合するキラル炭素原子の立体構造が、R 体、S 体、又はそれらの混合物であることを表す]。

## 【請求項 3】

前記シクロスポリン誘導体が、以下から選択される化合物である、請求項 2 に記載の組成物：

50

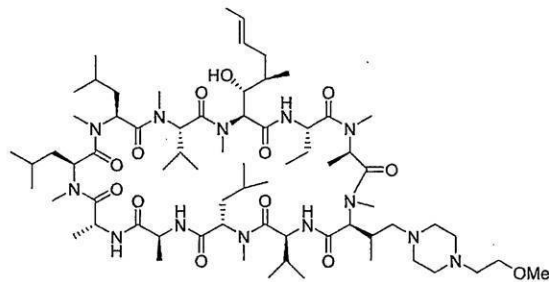
## 【化 5】



シクロスポリンD

10

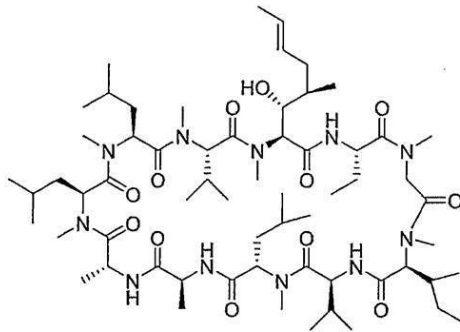
## 【化 6】



NIM258

20

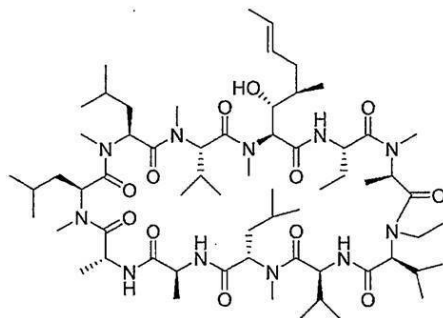
## 【化 7】



NIM811

30

## 【化 8】

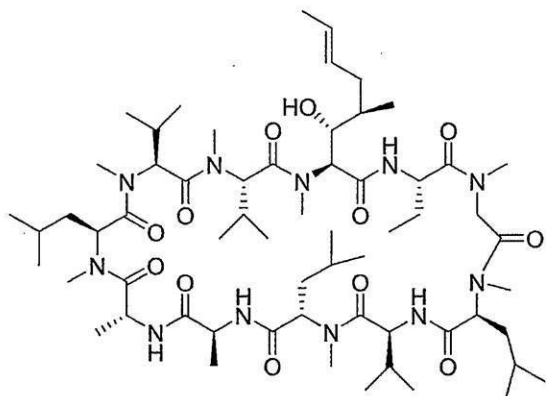


アリスポリビル

40

50

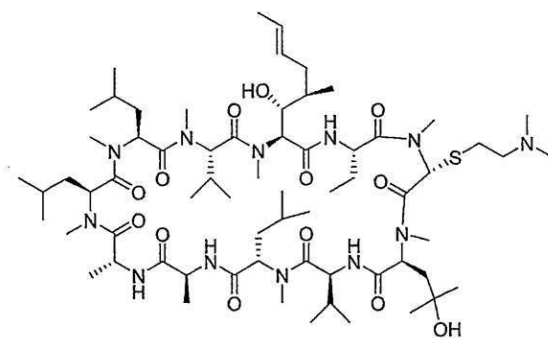
【化 9】



PKF220-384

10

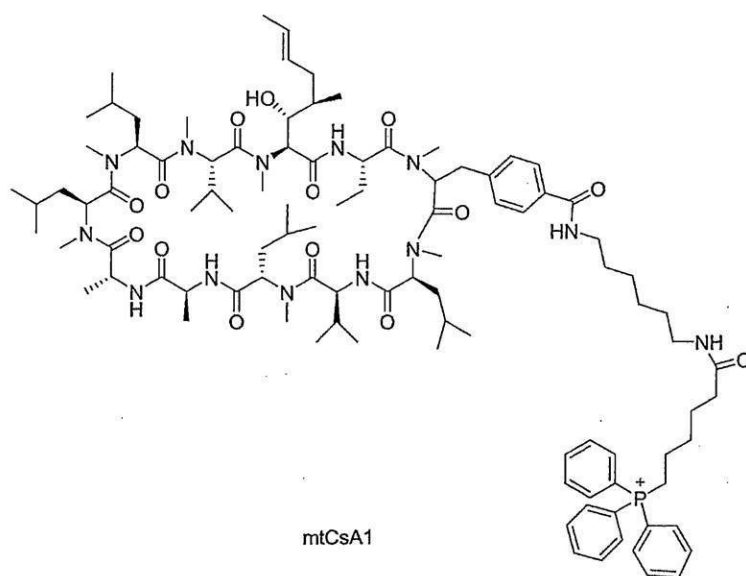
【化 1 0】



SCY-635

20

【化 1 1】



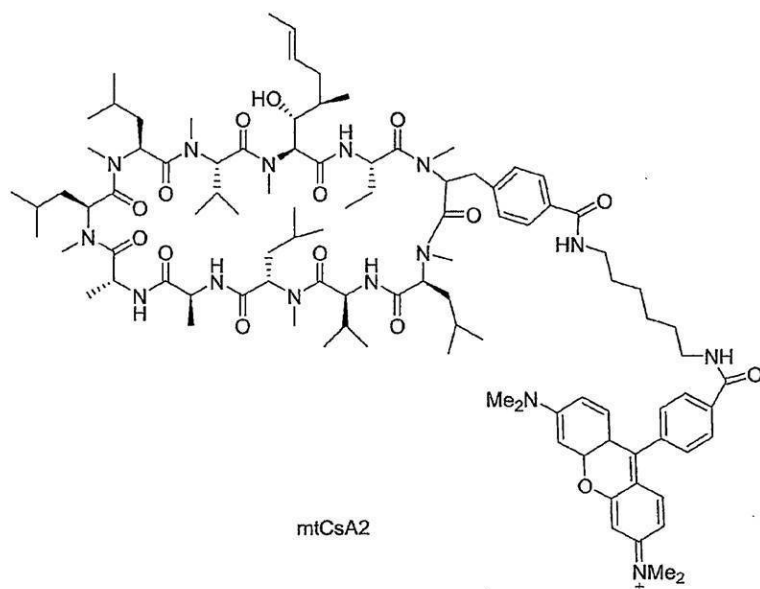
mtCsA1

30

40

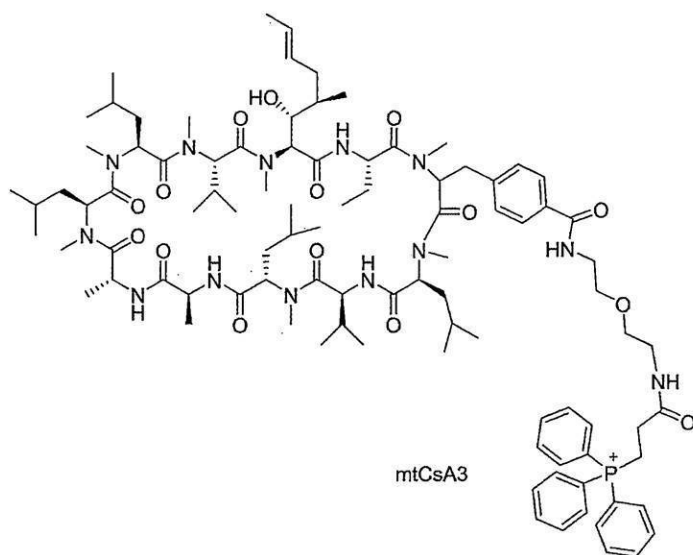
50

## 【化 1 2】



10

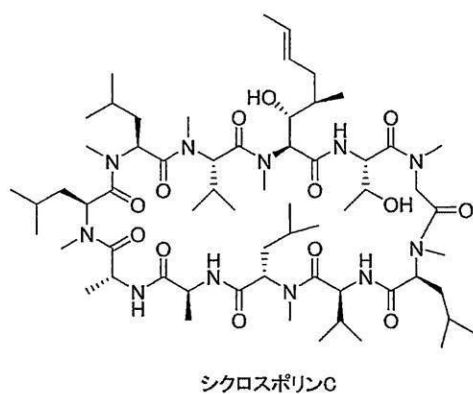
## 【化 1 3】



20

30

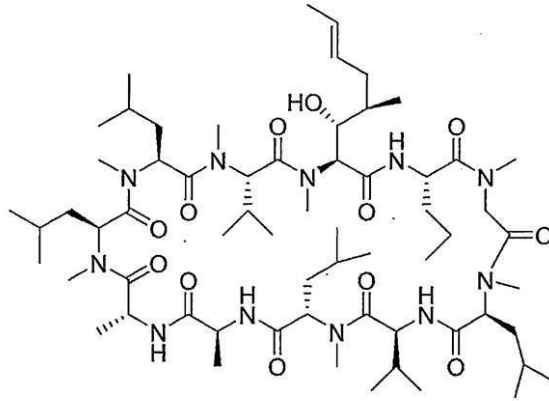
## 【化 1 4】



40

50

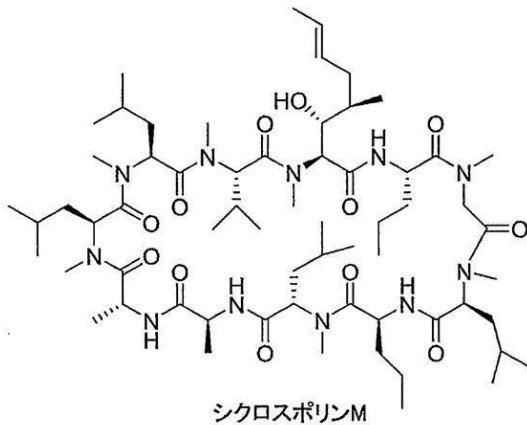
## 【化 1 5】



シクロスポリンG

10

## 【化 1 6】

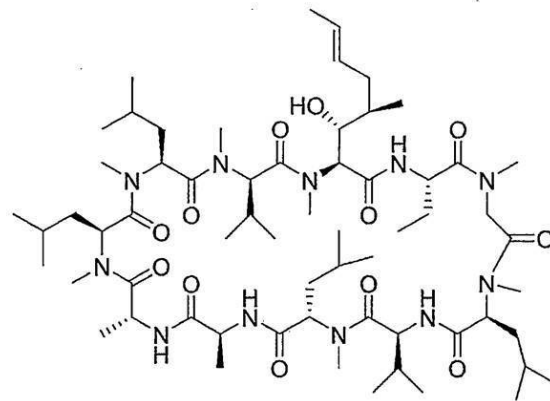


シクロスポリンM

20

30

## 【化 1 7】

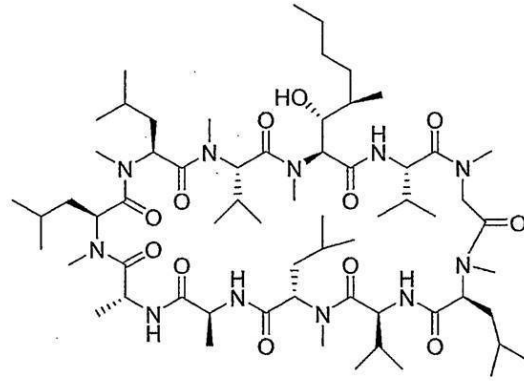


シクロスポリンH

40

50

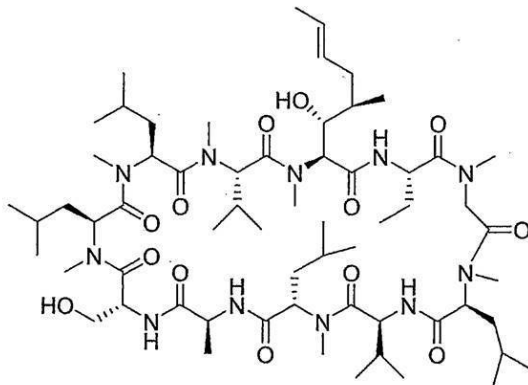
【化 1 8】



Dihydro-cyclosporin D

10

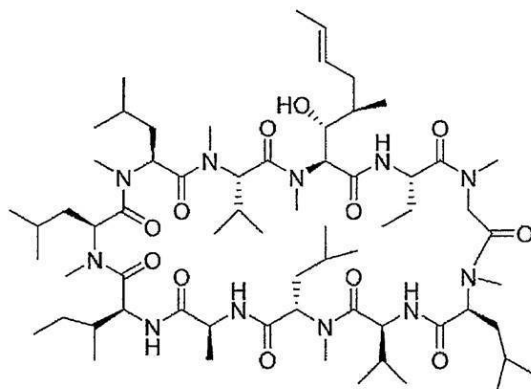
【化 1 9】



[(D)Ser]8-Cyclosporin

20

【化 2 0】



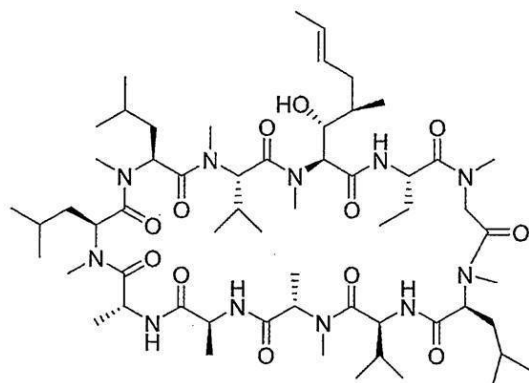
[Melle]8-Cyclosporin

30

40

50

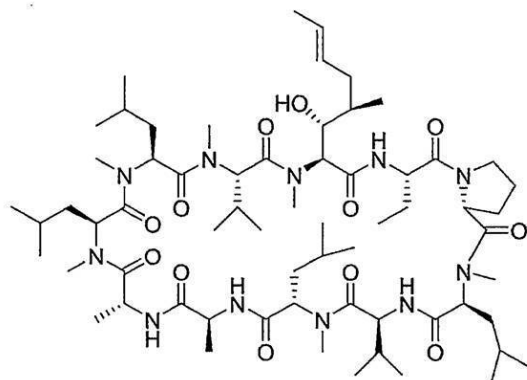
## 【化 2 1】



[MeAla]6-cyclosporin

10

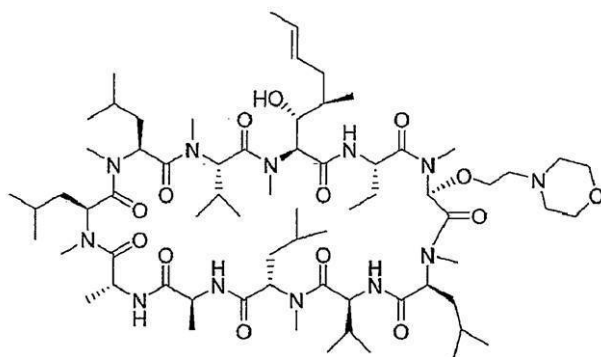
## 【化 2 2】



[(D)Pro]3-cyclosporin

20

## 【化 2 3】



SCY-641

30

40

## 【請求項 4】

シクロフィリン D 阻害剤が、カルシニューリン阻害活性を示さないことを特徴とする、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

シクロフィリン D 阻害剤が、Alisporivir 又は NIM258 である、請求項

50

1 に記載の組成物。

【請求項 6】

シクロフィリン D 阻害剤が、シクロフィリン D に対する s i R N A , s h R N A , m i R N A , 抗シクロフィリン抗体、シクロフィリン D に対するアプタマー、又はシクロフィリン D に対するアンチセンス核酸分子である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

変異を有する I V 型コラーゲン遺伝子が、C O L 4 A 3 , C O L 4 A 4 , または C O L 4 A 5 である、請求項 1 ~ 請求項 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

変異を有する I V 型コラーゲン遺伝子が、C O L 4 A 5 である、請求項 7 に記載の組成物。 10

【請求項 9】

I V 型コラーゲン遺伝子における変異が、アルポート症候群をもたらす変異である、請求項 1 ~ 請求項 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

I V 型コラーゲン遺伝子における変異が、C O L 4 A 5 における、コラーゲン 3 量体の分泌を低下させる変異である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

I V 型コラーゲン遺伝子における変異が、C O L 4 A 5 における、G 1 0 3 0 S , G 1 1 0 7 R , 又は E x o n 4 1 の領域内における変異である、請求項 8 に記載の組成物。 20

【請求項 12】

C O L 4 A 5 における E x o n 4 1 の領域内における変異が、G 1 2 2 0 D , G 1 2 4 1 C , G 1 2 4 1 V , 又は G 1 2 4 4 D である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載の組成物からなる、アルポート症候群の治療薬、予防薬、又は改善薬。

【請求項 14】

C O L 4 A 5 におけるコラーゲン 3 量体の分泌を低下させる変異を有すると判定された患者に投与するための、請求項 13 に記載の治療薬、予防薬、又は改善薬。

【請求項 15】

前記コラーゲン 3 量体の分泌を低下させる変異が C O L 4 A 5 における、G 1 0 3 0 S , G 1 1 0 7 R , 又は E x o n 4 1 の領域内における変異である、請求項 14 に記載の治療薬、予防薬、又は改善薬。 30

【請求項 16】

C O L 4 A 5 における E x o n 4 1 の領域内における変異が、G 1 2 2 0 D , G 1 2 4 1 C , G 1 2 4 1 V , 又は G 1 2 4 4 D である、請求項 15 に記載の治療薬、予防薬、又は改善薬。

【請求項 17】

C O L 4 A 5 遺伝子における E x o n 4 1 が欠損している非ヒトモデル動物。

【請求項 18】

動物がマウスである、請求項 17 に記載の非ヒトモデル動物。 40

【請求項 19】

被験薬剤のアルポート症候群の治療効果の評価方法であって、  
該被験薬剤を請求項 17 又は請求項 18 に記載の非ヒトモデル動物に投与すること、  
前記非ヒトモデル動物におけるアルポート症候群あるいはそれらの指標となるレベルを観察又は測定すること、及び、

被験薬剤の投与により前記非ヒトモデル動物におけるコラーゲン 3 量体の分泌不全に基づく症状若しくは状態あるいはそれらの指標となるレベルが改善した場合には、当該被験薬剤はアルポート症候群の治療効果があると判定することを含む方法。

【請求項 20】

前記非ヒトモデル動物におけるコラーゲン3量体の分泌不全に基づく症状若しくは状態あるいはそれらの指標となるレベルが、以下から選択される少なくとも1種類以上である、請求項19に記載の方法：

- (i) 基底膜上の5(IV)発現の消失
- (ii) 2(IV)がGBMの広範の発現
- (iii) Lamininの異所性の発現増加
- (iv) タンパク尿
- (v) 尿中アルブミンの漏出
- (vi) 血清クレアチニン値の上昇
- (vii) 進行性の腎病態。

10

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0002】

本発明は、コラーゲンの3量体分泌促進剤、特に、アルポート症候群の治療分野に関するものである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

このことから、本発明者らは、CsA、Alisporivir及びNIM258がカルシニューリン経路とは全く異なる別の新しいメカニズムに基づき、IV型コラーゲンの3量体細胞外分泌をもたらし、ASの根本治療を可能とし得ること、特に、Alisporivir及びNIM258が有するカルシニューリン経路以外の活性が、IV型コラーゲン3量体分泌促進によりAS治療効果をもたらすことを見出した。

20

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

さらに、本発明者らは、CsAやAlisporivirによりIV型コラーゲンの3量体の分泌が促進されるメカニズムについて解明を進めた結果、このメカニズムがシクロフィリンDの関与によることを見出した。具体的には、シクロフィリンDが欠損した細胞においてはCsAやAlisporivirによるIV型コラーゲンの3量体分泌促進作用が十分に発揮されないことから、CsAやAlisporivirはシクロフィリンDに作用することにより、IV型コラーゲンの3量体分泌を促進することを見出した。また、本発明者らがIV型コラーゲンの3量体分泌におけるシクロフィリンDの役割を調べたところ、シクロフィリンDのノックダウンがIV型コラーゲンの3量体分泌を促進することを見出した。

30

40

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

50

以上より、本発明者らは、Alisporivirが、ASで異常となっているIV型コラーゲン3量体の細胞外分泌を促し、ASの根治療法薬となること、CsAやAlisporivirによるIV型コラーゲンの3量体分泌の促進メカニズムがシクロフィリンDの阻害に基づくものであり、シクロフィリンDがIV型コラーゲンの3量体分泌の新たな標的となることを見出した。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

10

【0022】

一方で、本発明者らは、シクロフィリンD阻害による3量体分泌促進が効果を奏し得るIV型コラーゲンの変異についても解析を行った。その結果、COL4A5におけるExon41の領域内又はその周辺のアミノ酸変異がもたらすIV型コラーゲンの3量体分泌不全に対して特に有効であることが見出された。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

20

【0023】

本発明は、IV型コラーゲンの3量体細胞外分泌を促すことから、ASを代表とするIV型コラーゲンの3量体分泌不全に基づく疾患の根本的な治療および予防に寄与することが可能である。特に本発明は、COL4A5におけるExon41の領域内又はその周辺の変異によるIV型コラーゲンの3量体分泌不全に基づく疾患に対して有効である。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【0024】

【図1】CsA処置時のCOL4A5(G1244D)を含むコラーゲン3量体の分泌量を示すグラフである。グラフ中、横軸の数値はCsAの濃度( $\mu\text{M}$ )を、縦軸はコラーゲン3量体の分泌量をコントロール(dimethylsulfoxide(DMSO)処置群)との比(% of control)で表す。横軸における「DMSO」はDMSO処置群を表す。CsAの濃度依存的にコラーゲン3量体の分泌量が増加している。

【図2】PSC-833処置時のCOL4A5(G1244D)を含むコラーゲン3量体の分泌量を示すグラフである。グラフ中、横軸の数値はPSC-833の濃度( $\mu\text{M}$ )を、縦軸はコラーゲン3量体の分泌量をコントロール(DMSO処置群)との比で表す。横軸における「DMSO」はDMSO処置群、「CsA」はシクロスポリンA処置群( $1\mu\text{M}$ ) (陽性コントロール)を表す。PSC-833の添加量を $10\mu\text{M}$ まで増加させても、コラーゲン3量体の分泌量は増加しない。

40

【図3】Alisporivir処置時のCOL4A5(G1244D)を含むコラーゲン3量体の分泌量を示すグラフである。グラフ中、横軸の数値はAlisporivirの濃度を、縦軸はコラーゲン3量体の分泌量をコントロール(DMSO処置群)との比(% of control)で表す。横軸における「DMSO」はDMSO処置群、「CsA」はCsA処置群(陽性コントロール)を表す。Alisporivirの投与量依存的にコラーゲン3量体の分泌量が増加している。

【図4】図1及び図3の実験を、より高濃度のCsA( $5, 10\mu\text{M}$ )およびAlisporivir( $5, 10\mu\text{M}$ )処置条件下で行った結果を表すグラフである。グラフ中、

50

横軸はシクロスポリンA (CsA) および Alisporivir (ALV) 濃度を、縦軸はコラーゲン3量体の分泌量をコントロール (DMSO 処置群) との比 (% of control) で表す。横軸における「DMSO」はDMSO 処置群、「ALV」は Alisporivir 処置群、「CsA」はCsA 処置群 (陽性コントロール) を表す。高濃度では、CsAと比較して Alisporivirの方がコラーゲン3量体の分泌量が多い傾向がみられた。

【図5】野生型 (3WT / 4WT / 5WT : 上図) 及びCOL4A5にG1241Vのアミノ酸変異を有する細胞株 (3及び4は野生型) (3WT / 4WT / 5G1241V : 下図) に対して、それぞれ Alisporivirを処置したときのコラーゲン3量体の分泌量を示すグラフである。グラフ中、横軸は Alisporivirの濃度 (μM) を、縦軸はコラーゲン3量体の分泌量をコントロール (DMSO 処置群) との比 (% of control) で表す。横軸における「DMSO」はDMSO 処置群、「ALV」は Alisporivir 処置群、「CsA」はCsA 処置群 (陽性コントロール) を表す。野生型よりも変異型においてCsA及び Alisporivirによる3量体分泌促進効果が高いことが示された。

10

【図6】COL4A5にG1241Vのアミノ酸変異を有する細胞株 (3及び4は野生型) (3WT / 4WT / 5G1241V : 下図) に対して、NIM258を処置したときのコラーゲン3量体の分泌量を示すグラフである。グラフ中、横軸はNIM258の濃度 (μM) を、縦軸はコラーゲン3量体の分泌量をコントロール (DMSO 処置群) との比 (% of control) で表す。横軸における「DMSO」はDMSO 処置群、「NIM258」はNIM258 処置群を表す。NIM258による3量体分泌促進効果が示された。

20

【図7】臨床報告のある広範なAS変異体 (COL4A5のG227S, G594D, G624D, G869R, S916G, G1030S, G1107R, G1140V, G1220D, G1241C, G1241V, G1244D, P1517T, 及びR1569Q), 及びExon41 (COL4a5の1202~1263番目のアミノ酸) 欠損 (dExon41) 変異体の細胞について、CsA及び Alisporivirによる3量体分泌促進能を測定した結果を表すグラフである。縦軸はコラーゲン3量体の分泌量を各細胞のコントロール (DMSO 処置群) との比 (% of control) で表す。

5WTは野生型COL4a5を表す。横軸の「CON」はコントロール (DMSO 処置群)、「CsA」はCsA 処置群 (陽性コントロール)、「ALV」は Alisporivir 処置群を表す。G1030S, G1107R, G1220D, G1241C, G1241V, G1244D, 及びExon41欠損の細胞において、特にCsA及び Alisporivirによる3量体分泌促進効果が高いことが示された。

30

【図8】CsA及び Alisporivirによるコラーゲン3量体分泌促進メカニズムを解明するため、シクロフィリン類 (PPIA (シクロフィリンA), PPIB, PPI C, PPI D, PPI E, PPI F (シクロフィリンD), PPI G, PPI H, PPI L1, NKTR, PPWD1) をsiRNAでノックダウンしたG1244D変異導入HEK293T細胞にCsA及び Alisporivirを添加してコラーゲン3量体分泌促進効果を調べた結果を表すグラフである。縦軸はコラーゲン3量体の分泌量を各細胞のコントロール (DMSO 処置群) との比 (% of control) で表す。横軸の「CON」はコントロール (DMSO 処置群)、「CsA」はCsA 処置群 (陽性コントロール)、「ALV」は Alisporivir 処置群を表す。PPI F (シクロフィリンD) ノックダウン細胞において、特にCsAと Alisporivirによるコラーゲン3量体分泌促進能が阻害されていた。

40

【図9】にG1244D変異導入HEK293T細胞を用いて、各種シクロフィリン類 (PPIA (シクロフィリンA), PPIB, PPI C, PPI D, PPI E, PPI F (シクロフィリンD), PPI G, PPI H, PPI L1, NKTR, PPWD1) をsiRNAでノックダウンした細胞におけるコラーゲン3量体分泌能を調べた結果を表すグラフである。縦軸はコラーゲン3量体の分泌量をコントロール (siGL2 処置群) との比

50

(% of control)で表す。横軸は使用したsiRNAの種類を表す。siPPIFで処理した細胞において、特にコラーゲン3量体分泌促進が確認された。

【図10】Col4a5G1244Dマウス、及びCol4a5 Exon41マウス作成時に使用した核酸を表す模式図である。

【図11】 Exon41マウスにおけるLamininの発現を表す写真、及び細胞/基底膜lysateのウェスタンブロット(WB)写真(枠内)である。

【図12】 Exon41マウスの尿中タンパク質量を表すグラフである。縦軸は尿中タンパク質量(mg/mg Cre)、横軸は週齢(week-old)を表す。黒丸は野生型マウス、黒四角は Exon41マウスを表す。

【図13】 Exon41マウスの血清クレアチニン値を表すグラフである。縦軸は血清クレアチニン値(mg/dL)を表す。横軸のConは野生型マウスを、 Exon41は、 Exon41マウスを表す。 10

【図14】 Exon41マウスにCsAを投与した後の尿中タンパク質の変化を表すグラフである。縦軸は尿中タンパク質量(mg/mg Cre)、横軸は週齢(week-old)を表す。CsAの投与で尿中タンパク質の上昇を抑制した。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】 20

【0025】

一態様において、本発明は、シクロフィリンD阻害剤を有効成分として含有する、変異を有するIV型コラーゲン遺伝子を有する細胞におけるコラーゲン3量体の分泌を促進するための組成物、あるいはコラーゲン3量体の分泌促進剤に関する。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】 30

IV型コラーゲン遺伝子における変異は、コラーゲンの3量体の分泌に寄与する変異であれば特に限定されるものではないが、好ましくは、コラーゲン3量体の分泌を低下させる変異であり、例えば、COL4A5における、G129E、G227S、G230C、G325R、G426R、G475S、G521D、G573D、G594D、G594S、G624D、G650D、L664N、G675S、G796R、G869R、G911E、S916G、G953V、G1030S、G1107R、G1140V、G1143D、G1220D、G1241C、G1241V、G1244D、G1448R、P1517T、C1567R、R1569Q、M1607I、L1649R、及びR1683Qから選択される変異(好ましくは、G1241V及び/又はG1244D)、あるいは、Exon41におけるアミノ酸変異を挙げることができる。また、本明細書において、ASは好ましくはこのような変異を有しているASである。 40

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

「コラーゲン3量体の分泌を促進する」とは、結果的に細胞外へのコラーゲン3量体の分泌量が、当該薬剤未投与の場合と比較して増加することを意味し、コラーゲン3量体の分泌そのものを促進すること、コラーゲン遺伝子の産生量が増加すること、及びコラーゲ 50

ン3量体分泌が促進することのいずれか，2種類又は3種類の作用を含んでいてもよい。本発明の組成物は，コラーゲン3量体の分泌を促進することにより，コラーゲン3量体の分泌量が不足することを根本原因とするASの根本治療を可能とするものである。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0058】

本発明の組成物は，ASを代表とするコラーゲン3量体の分泌不全に基づく疾患又は状態の治療薬又は予防薬とすることができる。本明細書において，ASは，適宜コラーゲン3量体の分泌不全に基づく疾患又は状態と読み替えてもよい。ASは典型的には遺伝性疾患であり，その代表的な臨床症状としては，糸球体腎炎，慢性腎炎，血尿（特に，持続的血尿），タンパク尿，糸球体基底膜の広範な不規則な肥厚と緻密層の網目状変化などの腎病変；難聴，特に，感音性（神経性）難聴，高周波領域における聴力低下と進行性の増悪化などの耳病変；前部円錐水晶体，後囊下白内障，後部多形型角膜変性症，盲点網膜などの眼病変；びまん性平滑筋腫症（diffuse leiomyomatosis）の合併などを挙げることができる。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

本発明は，それを必要とする患者に有効量のシクロフィリンD阻害剤を投与することを備える，ASの治療方法，予防方法又は改善方法に関する。本発明は，それを必要とする患者に有効量のシクロフィリンD阻害剤を投与することを備える，患者におけるコラーゲン3量体の分泌不全を改善する方法あるいはコラーゲン3量体の分泌促進剤に関する。「それを必要とする患者」は，具体的には，ASに罹患した患者である。患者として，好ましくは，COL4A5におけるG1030S，G1107R，又はExon41の領域内におけるアミノ酸変異を有している患者であり，ここで，Exon41の領域内における変異は，G1220D，G1241C，G1241V，又はG1244Dであってもよい。例えば，本発明の治療方法又は予防方法は，治療又は予防しようとする患者がこのような変異を有しているかを調べるステップを含んでいてもよい。具体的には，本発明の組成物の有効量を該患者に投与することを含む，ASの治療方法又は予防方法であってもよい。該方法において，Exon41の領域内におけるアミノ酸変異は，G1220D，G1241C，G1241V，又はG1244Dであってもよい。「有効量」とは，治療，予防，又は改善しようとする症状又は状態を改善可能な量を意味する。治療，予防，又は改善しようとする症状又は状態としては，例えば，基底膜上の5（IV）発現の消失；2（IV）がGBMの広範の発現；Lamininの異所性の発現増加；タンパク尿；尿中アルブミンの漏出；血清クレアチニン値の上昇；その他の進行性の腎病態を挙げることができる。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0066

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0066】

さらに、本発明は、A Sの治療薬、予防薬、又は改善薬を製造するための、シクロフィリンD阻害剤の使用に関する。本発明は、コラーゲン3量体の分泌不全を改善する薬剤を製造するための、シクロフィリンD阻害剤の使用に関する。本発明は、コラーゲン3量体の分泌促進剤を製造するための、シクロフィリンD阻害剤の使用に関する。また、本発明は、A Sを治療、予防、又は改善するための、シクロフィリンD阻害剤に関する。本発明は、コラーゲン3量体の分泌不全を改善するための、シクロフィリンD阻害剤に関する。本発明は、コラーゲン3量体の分泌を促進させるための、シクロフィリンD阻害剤に関する。例えば、シクロフィリンD阻害剤を治療、予防、又は改善目的で使用する場合、シクロフィリンD阻害剤を有効成分として含有する医療用組成物を、経口投与形態、又は注射剤、点滴剤等の非経口投与形態で投与することができる。シクロフィリンD阻害剤を哺乳動物等に投与する場合、上述の製剤を経口投与してもよいし、又は、注射剤、点滴剤として非経口的に投与してもよい。投与量は、症状、年齢、性別、体重、投与形態等により異なるが、例えば成人に経口的に投与する場合には、通常1日量は0.1 - 1000 mgである。

10

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0067

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0067】

20

別の態様において、本発明は、COL4A5遺伝子において、G1220D変異を有する非ヒトモデル動物、又は、COL4A5遺伝子におけるExon41が欠損し又は破壊されている非ヒトモデル動物に関する。Exon41の欠損は、必ずしも全領域である必要は無く、コラーゲン3量体の分泌不全に基づく症状を呈する限り、Exon41の部分的な欠損であってもよい。あるいは、Exon41における遺伝子が破壊されていてもよい。例えば、非ヒトモデル動物は、野生型の対応する動物と比較して、以下から選択される1または複数の以下の表現型を有することにより特徴づけられてもよい：基底膜上の5(IV)発現の消失；2(IV)がGBMの広範の発現；Lamininの異所性の発現増加；タンパク尿；尿中アルブミンの漏出；血清クレアチニン値の上昇；その他の進行性の腎病態。コラーゲン3量体の分泌不全に基づく症状は、以上に列記した表現型であってもよい。

30

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0070】

本発明は、前記非ヒトモデル動物を使用した薬剤のA Sの治療効果の評価方法又はスクリーニング方法を含む。具体的には、本方法は、被験薬剤を前記非ヒトモデル動物に投与すること、前記非ヒトモデル動物におけるコラーゲン3量体の分泌不全に基づく症状若しくは状態あるいはそれらの指標となるレベル（基底膜上の5(IV)発現の消失；2(IV)がGBMの広範の発現；Lamininの異所性の発現増加；タンパク尿；尿中アルブミンの漏出；血清クレアチニン値の上昇；その他の進行性の腎病態）を観察又は測定すること、及び、被験薬剤の投与により前記非ヒトモデル動物におけるコラーゲン3量体の分泌不全に基づく症状若しくは状態あるいはそれらの指標となるレベルが改善した場合には、当該被験薬剤はA Sの治療効果があると判定することを含む方法であってもよい。「コラーゲン3量体の分泌不全に基づく症状若しくは状態あるいはそれらの指標となるレベルが改善した」とは、当該モデル動物における状態よりも、野生型における状態に近づくことを言い、完全に当該症状や状態がなくなることを意味しなくてもよい。

40

【手続補正17】

50

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0075】

(2) tert-ブチル((1S, 2S)-1-(フラン-2-イル)-2-メチル-3-オキソプロピル)カルバメート(7)の合成

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0117

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0117】

アルゴン雰囲気下、アセチル化体22(2.16g, 1.74mmol)のジクロロメタン溶液(4mL)に、トリメチルオキソニウムテトラフルオロボレート(642.6mg, 4.34mmol)を加えて室温にて20時間攪拌した。この反応溶液にアセトニトリル(4mL)、水(13.5mL)を加え、さらに48時間攪拌した後、有機層を抽出し無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去することで粗生成物を得た。得られた化合物は、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー(1~9%メタノール/ジクロロメタン)により精製し、開環体23(1.75g, 74%収率)を得た。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0146

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0146】

(実施例5)COL4A5における様々なコラーゲン変異とCsA及びAlisporivirの奏効性との関係

臨床報告のある広範なAS変異体(COL4A5のG227S, G594D, G624D, G869R, S916G, G1030S, G1107R, G1140V, G1220D, G1241C, G1241V, G1244D, P1517T, 及びR1569Q), 及びExon41(COL4a5の1202~1263番目のアミノ酸)欠損変異体について、実施例1と同様の方法によりCsA及びAlisporivirの3量体分泌促進能を測定した。コントロールとして、野生型COL4A5を使用した。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0147

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0147】

その結果、CsA及びAlisporivirによりもたらされるコラーゲン3量体分泌は、G1030S, G1107R, G1220D, G1241C, G1241V, G1244D, 及びExon41欠損の変異体において、有意な効果を奏した(図7)。特に、Exon41欠損そのものや、Exon41内に存在する変異は全て、CsA及びAlisporivirにより3量体分泌が促進されたことから、CsA及びAlisporivirによる3量体分泌促進効果はExon41内やその周辺に存在する変異に基づくコラーゲン異形成に特に有効であると考えられる。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0148

10

20

30

40

50

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0148】

(実施例6) CsA及びAlisporivirによるコラーゲン3量体分泌促進メカニズムの解明

CsA及びAlisporivirによるコラーゲン3量体分泌促進メカニズムを解明するため、CsA及びAlisporivirが結合し得るシクロフィリン類を網羅的にsiRNAでノックダウンした細胞を作成し、当該細胞におけるCsA及びAlisporivirによるコラーゲン3量体分泌促進効果を調べた。

細胞としては、これまでの実験でCsA及びAlisporivirによる効果が確認されているG1244D変異導入HEK293T細胞を用いた。 10

NanoLuc 3453量体アッセイに必要なsplit nanoluciferaseを融合した345安定発現細胞株を6well plate (Corning)に $3 \times 10^5$  cells/wellで播種し、サブコンフルエント時にリポフェクションによって表1に記載のsiRNAの導入を行った。標的遺伝子はいずれもシクロフィリンであり、表1における略称は以下の物質を示す：

PPIA: Peptidylprolyl isomerase A (シクロフィリンA)

PPIB: Peptidylprolyl isomerase B

PPI C: Peptidylprolyl isomerase C

PPI D: Peptidylprolyl isomerase D 20

PPI E: Peptidylprolyl isomerase E

PPI F: Peptidylprolyl isomerase F (シクロフィリンD)

PPI G: Peptidylprolyl isomerase G

PPI H: Peptidylprolyl isomerase H

PPI L1: Peptidylprolyl isomerase like 1

NKTR: Natural Killer Cell Triggering Receptor (Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase NKTR)

PPWD1: Peptidylprolyl Isomerase Domain and WD Repeat Containing 1 30

siRNAのトランスフェクションにはLipofectamine RNAi Maxを用い、最終siRNA濃度が15nMとなるよう調整し、標準プロトコールに従って行った。siRNA導入24時間後に細胞を剥離し、LumiNuc 96well white plate (Thermo)に $4 \times 10^4$  cells/wellで再播種した。

さらにその24時間後2-phosphate ascorbic acid (200  $\mu$ M)及び、CyclosporinA (CsA) (1  $\mu$ M)またはAlisporivir (2  $\mu$ M)を含むフェノールレッド不含有のDMEM完全培地に交換して培養し、24時間後に培養上清と細胞にそれぞれNanoGlo live cell assay (Promega)試薬の標準法に従って基質を添加し、ルミノメーターGloMax Navigator (Promega)で発光(3量体分泌の指標)を測定した。コントロール溶媒(CON)は、DMSOを用いた。 40

## 【手続補正22】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0150

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0150】

この結果、PPI F (シクロフィリンD)をノックダウンした細胞においてのみ、CsAとAlisporivirによるコラーゲン3量体分泌促進効果の低減が見られた(図8)。このことから、CsAとAlisporivirは、シクロフィリンDへの結合を 50

介してコラーゲン3量体分泌を促進していることが示された。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0151

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0151】

(実施例7) シクロフィリンDのコラーゲン3量体分泌への影響

上記実施例4の実験において、CsAとAlisporivirによるコラーゲン3量体分泌促進がシクロフィリンDを介して行われることが確認されたことから、次にシクロフィリンDのコラーゲン3量体分泌への影響を調べた。 10

実施例5と同様にG1244D変異導入HEK293T細胞を用いて、各種シクロフィリン類を網羅的にsiRNAでノックダウンした細胞におけるコラーゲン3量体分泌能を調べた。

【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0152

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0152】

その結果、シクロフィリンDノックダウン細胞において顕著なコラーゲン3量体分泌が確認された(図9)。このことから、シクロフィリンDを阻害することにより、コラーゲン3量体分泌が促進されることが確認された。 20

30

40

50