

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-81925

(P2017-81925A)

(43) 公開日 平成29年5月18日(2017.5.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 5/08 (2006.01)	C 0 7 K 5/08 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 13/04 (2006.01)	C 1 2 P 13/04	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	4 H 0 4 5
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	

審査請求 有 請求項の数 14 O L 外国語出願 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-225660 (P2016-225660)	(71) 出願人	513155596
(22) 出願日	平成28年11月21日 (2016.11.21)		ネウロビベ プハルマセウトイカル エー
(62) 分割の表示	特願2013-545497 (P2013-545497)		ビー
原出願日	平成23年12月20日 (2011.12.20)		スウェーデン国 2 2 3 8 1 ルンド
(31) 優先権主張番号	1021522.6		スチエエレバゲン 2 メドイコン ビレ
(32) 優先日	平成22年12月20日 (2010.12.20)	(74) 代理人	100097456
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 石川 徹
(31) 優先権主張番号	1113626.4	(72) 発明者	ステベン ジャメス モスス
(32) 優先日	平成23年8月8日 (2011.8.8)		グレート・ブリテン及び北部アイルランド
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		連合王国 シービー 2 1 6 エーディー
			ケンブリッジ ケンブリッジシアー グレ
			ート アビングトン グランタ パーク
			スイート 5 リバーサイド 3 バイオ
			チカ テクノロジー リミテッド
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サングリフェリン誘導体及びそれらの製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 C型肝炎ウイルス(HCV)及びHIVなどのRNAウイルスによる感染症の治療におけるシクロフィリン阻害剤として、並びにノ又は、例えば、移植拒絶反応の予防において使用するための免疫抑制剤として、並びに、例えば、炎症性障害において使用するための抗炎症剤と、その使用法の提供。

【解決手段】 医薬として許容し得る塩であって、それらの任意の互変異性体、又は、トランスとして示されているC26、27のC=C結合がシスである、それらの異性体を含み、かつ、C-53ケト及びC-15ヒドロキシル基及びメタノールの組み合わせによりケタールが形成されている、それらのメタノール付加物を含む、前記化合物、又は、それらの医薬として許容し得る塩。

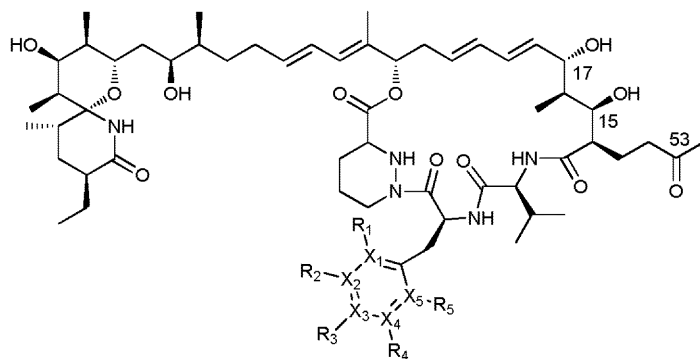
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

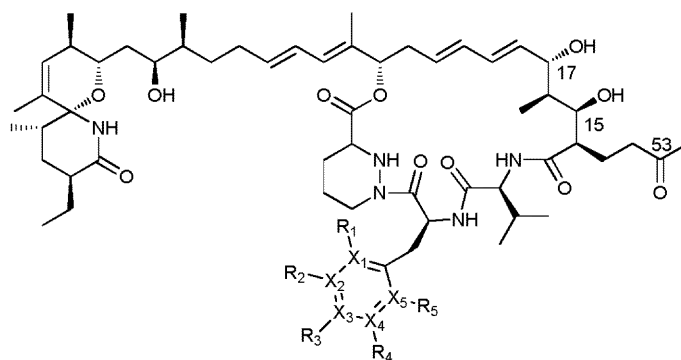
【請求項 1】

下記式(I)若しくは式(II)の化合物、又は、それらの医薬として許容し得る塩であって、それらの任意の互変異性体、又は、トランスとして示されているC26、27のC=C結合がシスである、それらの異性体を含み、かつ、C-53ケト及びC-15ヒドロキシル基及びメタノールの組み合わせによりケタールが形成されている、それらのメタノール付加物を含む、前記化合物、又は、それらの医薬として許容し得る塩：

【化 1】



10



20

(式中、

30

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、独立に、H、F、Cl、Br、 C_{2-6} アルケニル又は C_{1-10} アルキルを表し、ここで、該アルキル基の1以上の炭素原子は、O、N及びS(O)_p (pは0、1又は2を表す。)から選択されるヘテロ原子によって任意に置き換えられており、かつここで、該アルキル基の1以上の炭素原子は、カルボニルによって任意に置き換えられており、かつ該アルキル基は、1以上のハロゲン原子によって任意に置換されていてもよく；

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 は、独立に、C又はNを表し、かつこれらの基のうちNを表すものについては、結合される置換基が存在せず；

ただし、 R_1 、 R_3 、 R_4 及び R_5 が全てHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 が全てCを表す場合、 R_2 はOHを表すことができない。)。

40

【請求項 2】

X_1 がCを表す、請求項1記載の式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩。

【請求項 3】

X_2 がCを表す、請求項1記載の式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩。

【請求項 4】

X_3 がCを表す、請求項1記載の式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩。

【請求項 5】

X_4 がCを表す、請求項1記載の式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として

50

許容し得る塩。

【請求項 6】

X_5 がCを表す、請求項1記載の式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩。

【請求項 7】

R_1 、 R_3 、 R_4 及び R_5 が、独立に、H、F、Cl、 CF_3 、OH及び C_{1-6} アルキルから選択される、請求項1～6のいずれか1項記載の式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩。

【請求項 8】

R_2 が、H、F、Cl、 CF_3 、OH、 NH_2 及び C_{1-6} アルキルから選択される、請求項1～7のいずれか1項記載の式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩。

10

【請求項 9】

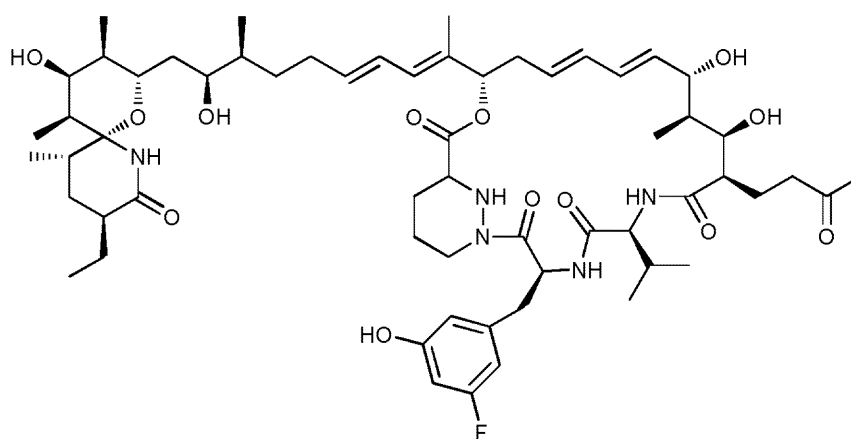
R_2 がOHを表す、請求項8記載の式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩。

【請求項 10】

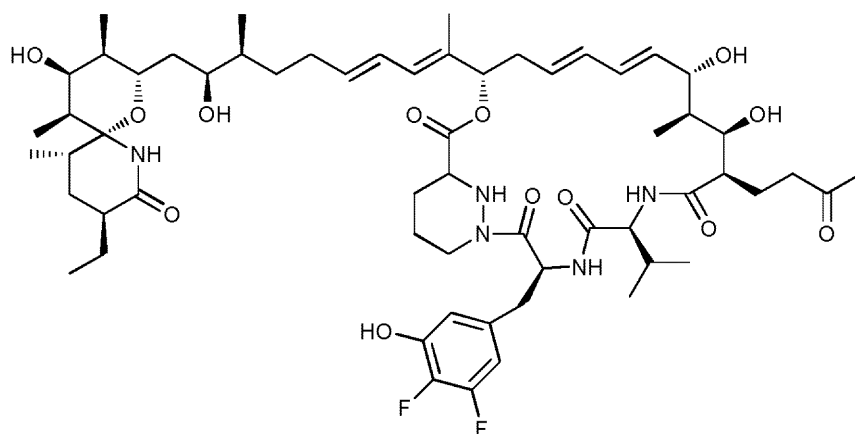
以下から選択される、請求項1記載の式(I)若しくは式(II)の化合物であって、それらの任意の互変異性体、又は、トランスとして示されているC26、27のC=C結合がシスである、それらの異性体を含み、かつ、C-53ケト及びC-15ヒドロキシル基及びメタノールの組み合わせによりケタールが形成されている、それらのメタノール付加物を含む、前記化合物、又は、それらの医薬として許容し得る塩：

20

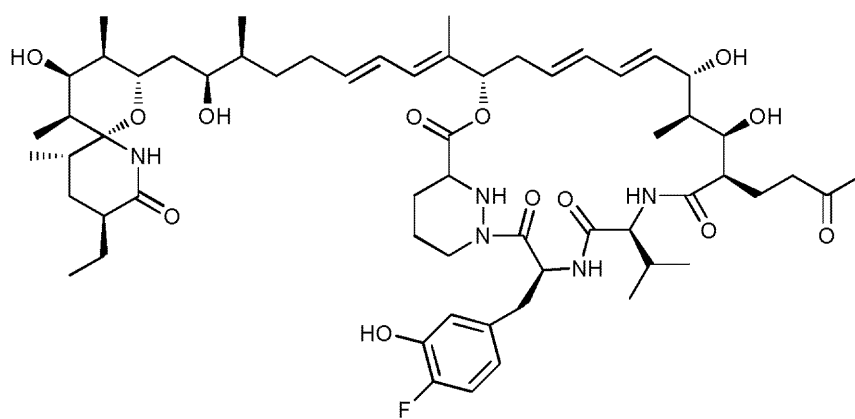
【化 2】



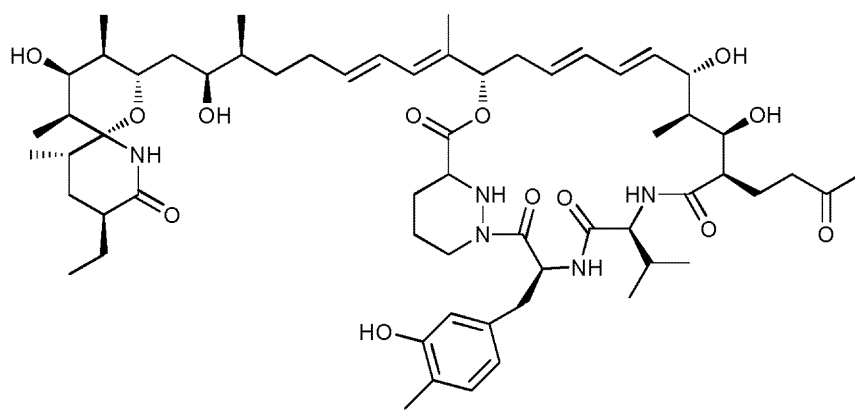
30



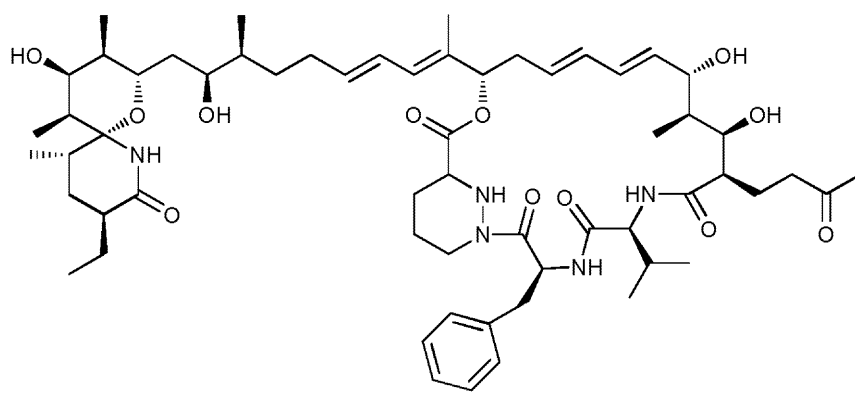
10



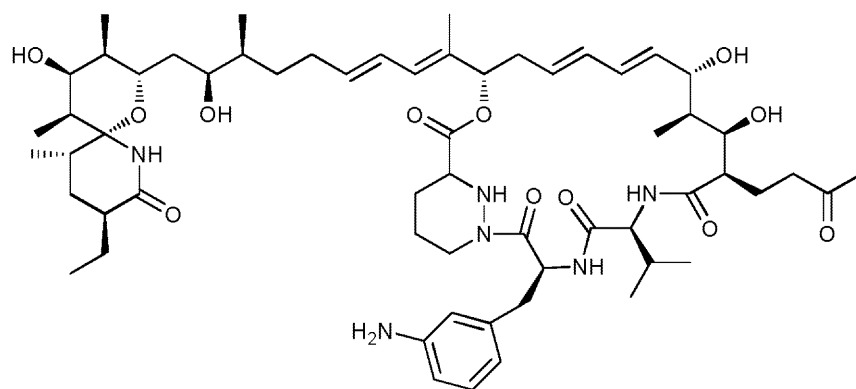
20



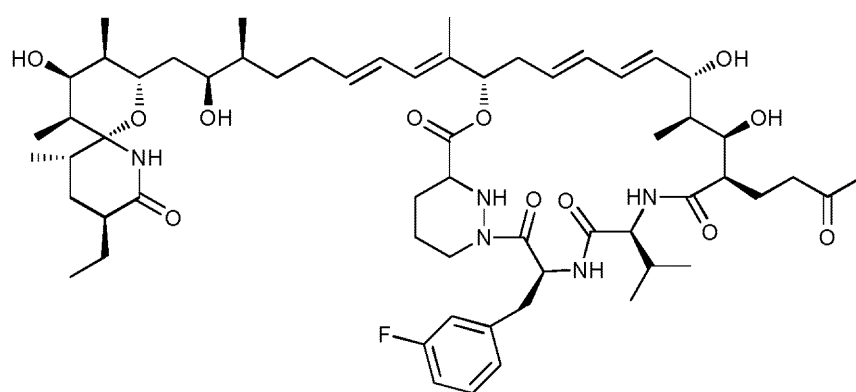
30



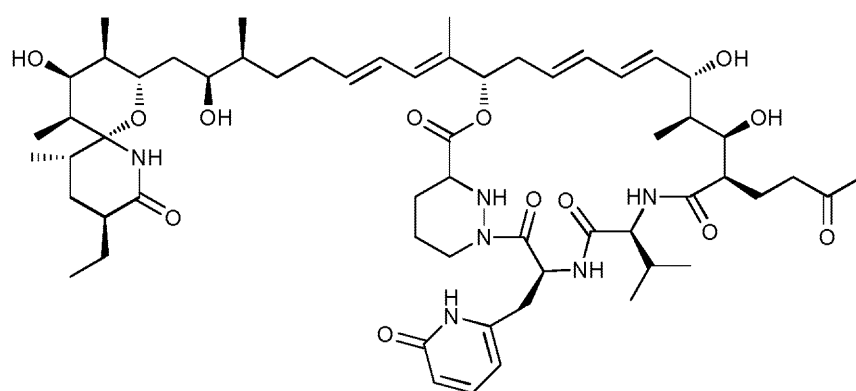
40



10



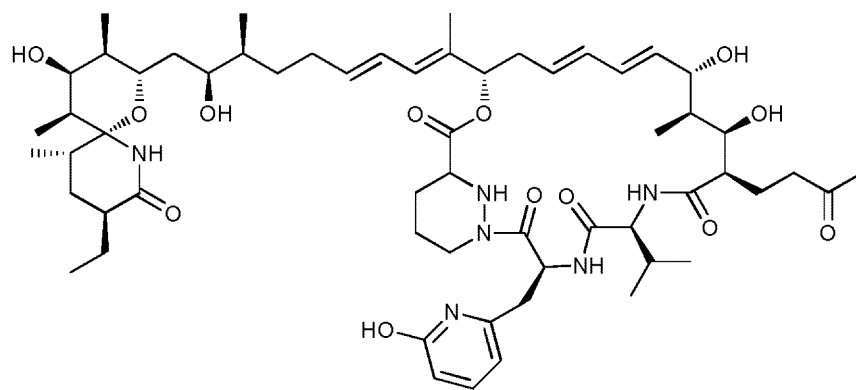
20



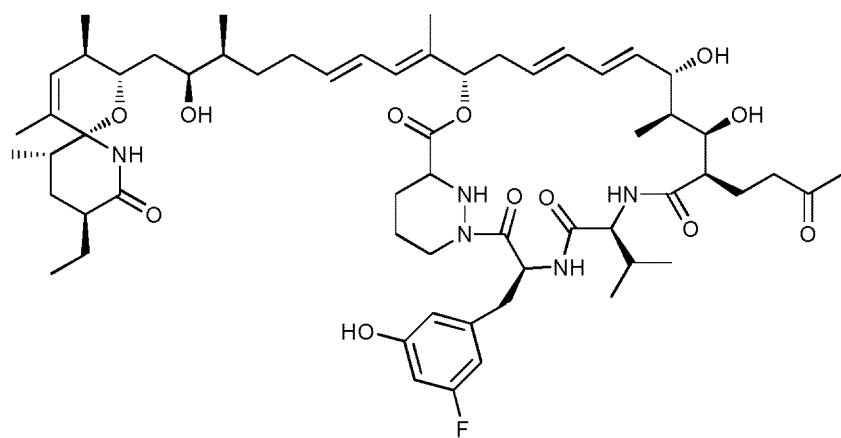
30

(上記式は以下のように表すこともできる。)

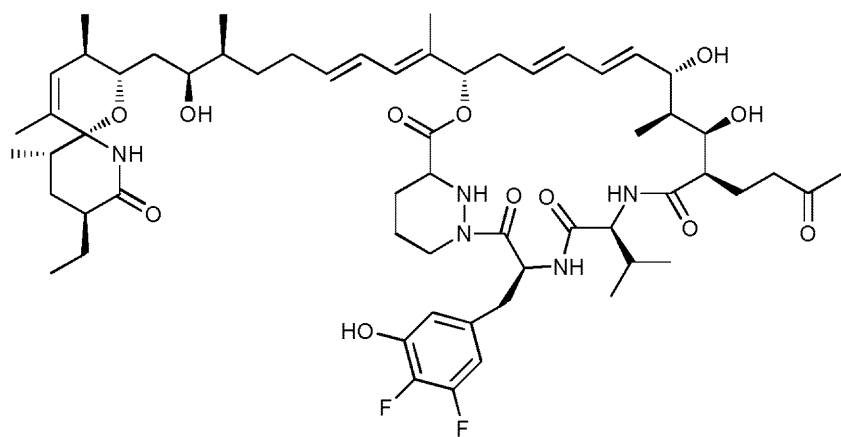
【化 3】



10

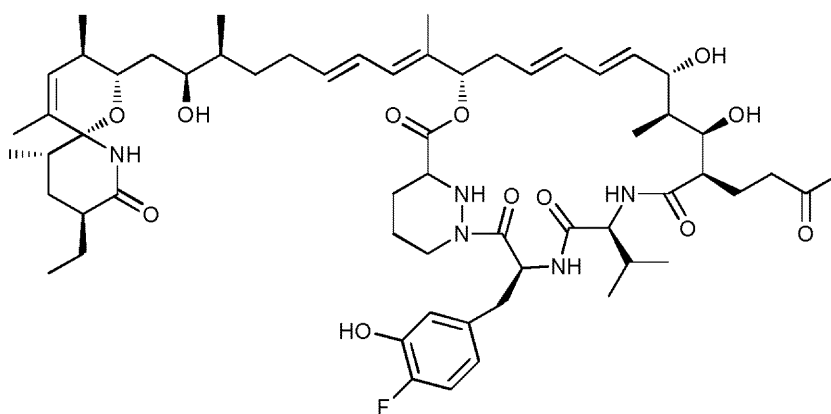


20

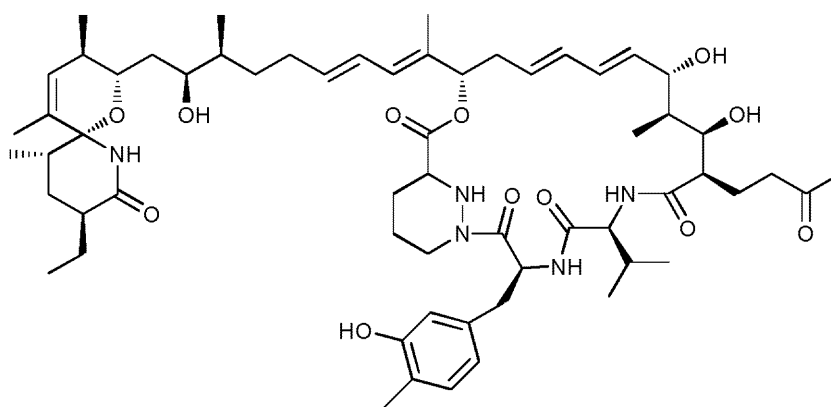


30

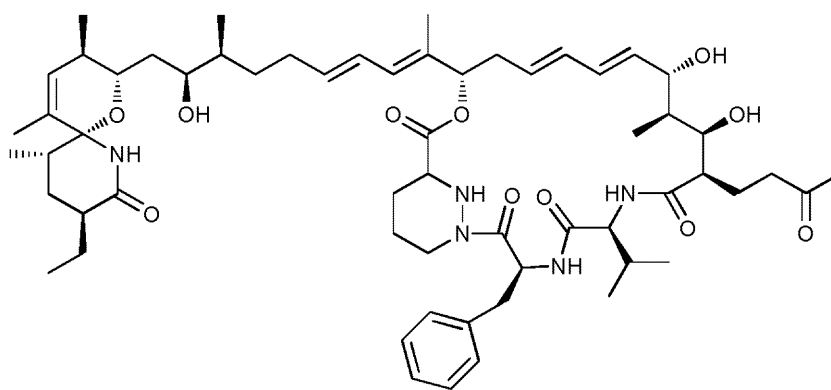
40



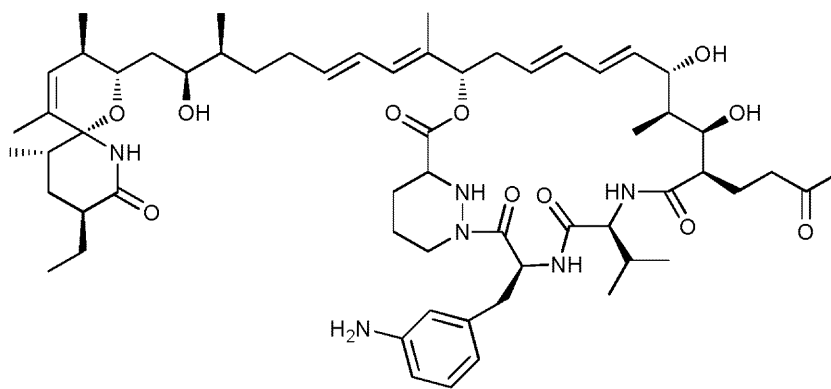
10



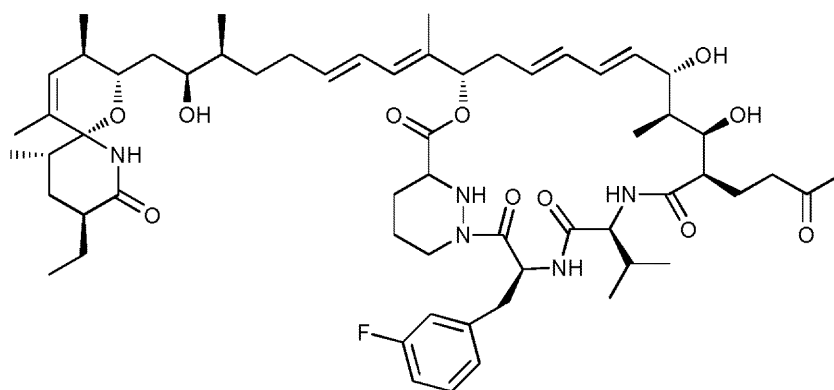
20



30

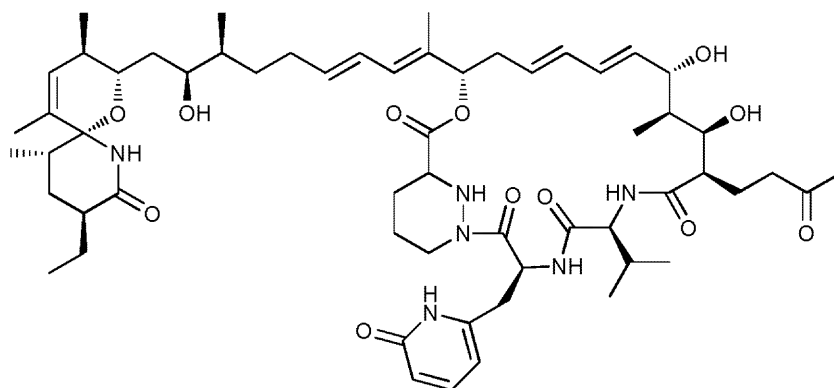


40



10

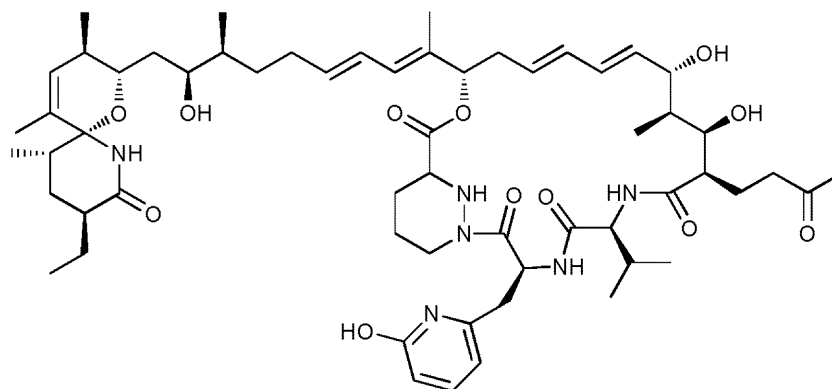
, 及び



20

(上記式は以下のように表すこともできる。)

【化 4】



30

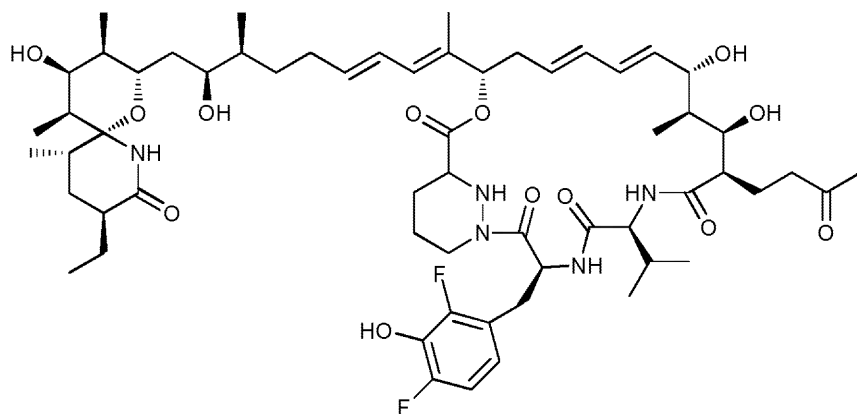
。

【請求項 11】

以下から選択される、請求項1記載の式(I)若しくは式(II)の化合物であって、それらの任意の互変異性体、又は、トランスとして示されているC26、27のC=C結合がシスである、それらの異性体を含み、かつ、C-53ケト及びC-15ヒドロキシル基及びメタノールの組み合わせによりケタールが形成されている、それらのメタノール付加物を含む、前記化合物、又は、それらの医薬として許容し得る塩：

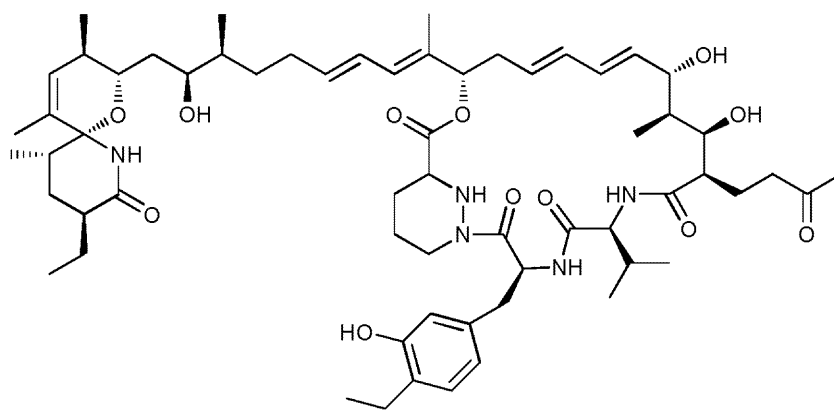
40

【化 5】



10

及び



20

。

【請求項 1 2】

医薬として使用するための、請求項1～11のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 1 3】

HCV若しくはHIV感染などのウイルス感染症、又は、筋ジストロフィーを治療するための医薬として使用するための、請求項1～11のいずれか1項記載の化合物。

30

【請求項 1 4】

請求項1～11のいずれか1項記載の化合物を、医薬として許容し得る希釈剤又は担体とともに含む、医薬組成物。

【請求項 1 5】

請求項1～11のいずれか1項記載の化合物を、医薬として許容し得る希釈剤又は担体とともに含み、さらに第2の又は二次の有効成分を含む、医薬組成物。

【請求項 1 6】

治療有効量の請求項1～11のいずれか1項記載の化合物を対象に投与することを含む、HCV若しくはHIV感染などのウイルス感染症、又は、筋ジストロフィーの治療方法。

【請求項 1 7】

治療有効量の請求項1～11のいずれか1項記載の化合物を対象に投与することを含む、炎症性障害の治療方法。

40

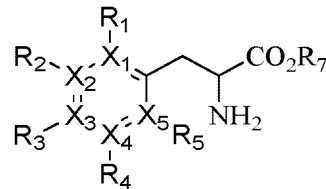
【請求項 1 8】

炎症性障害を治療するための医薬として使用するための、請求項1～11のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 1 9】

ストレプトマイセス属種などのサングリフェリン産生細菌に、式(III)の化合物：

【化 6】



式 (III)

(式中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、請求項1～11のいずれか1項において定義したとおりであり、かつ R_7 は、H又はエステル形成基を表す。)又はそれらの塩を供給する工程、及び、変異合成サングリフェリンが産生されるように該細菌を培養する工程を含む、変異合成サングリフェリンの製造方法。

10

【請求項 20】

前記サングリフェリン産生細菌が、sfaA遺伝子又はsfaA遺伝子のホモログが不活化されているか又は欠失しているストレプトマイセス属種である、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

前記変異合成サングリフェリンを単離する工程をさらに含む、請求項19又は20記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

(序論)

本発明は、例えば、ウイルス感染症、特に、C型肝炎ウイルス(HCV)及びHIVなどのRNAウイルスによる感染症の治療におけるシクロフィリン阻害剤として、並びに/又は、例えば、移植拒絶反応の予防において使用するための免疫抑制剤として、並びに、例えば、炎症性障害において使用するための抗炎症剤として有用である、サングリフェリンアナログに関する。本発明は、医薬、特にHCV感染症を治療するための医薬、及び、免疫抑制剤若しくは抗炎症剤として使用するための医薬における、それらの使用方法、又は、医薬として有用なさらなる化合物の生成における中間体としてのそれらの使用方法も提供する。

【背景技術】

【0002】

30

(発明の背景)

(C型肝炎)

C型肝炎ウイルス(HCV)はプラス鎖のRNAウイルスであり、感染は輸血後肝炎の主な原因である。HCVは最もよく見られる慢性の血液由来の感染であり、米国における肝臓疾患による死亡の主な原因である。世界保健機関は、1億7千万人を超えるHCV感染の慢性キャリアがいると推定しており、これは世界の人口の約3%である。治療していないHCV感染患者のうち、約70%～85%は慢性HCV感染を起こし、そのため肝硬変及び肝細胞癌を起こすリスクが高い。先進国では、肝臓癌の全症例の50～76%及び全肝臓移植の3分の2は慢性HCV感染によるものである(Mannsら、2007)。

【0003】

40

肝疾患に加え、慢性感染患者は、他の慢性HCV関連疾患も起こすことがあり、また他者への伝染の源となる。HCV感染は、関節痛(関節の疼痛)、皮膚の発疹、及び主として腎臓に対する臓器損傷などの、非肝臓合併症を起こす。HCV感染は重大な世界的な医療の負担であり、現在C型肝炎に利用できるワクチンはない(Straderら、2004; Jacobsonら、2007; Mannsら、2007; Pawlotsky、2005; Zeuzem及びHermann、2002)。

【0004】

(HCVの治療)

現在の標準治療(SoC)は、24～48週間のペグ化インターフェロン α (pIFN α)の皮下注射及び抗ウイルス薬リバビリンの経口投薬である。治療の成功は持続性ウイルス陰性化(SVR)により定義されるが、これは治療期間の最後及び6ヶ月後に血清中にHCV RNAが存在し

50

ないことにより定義される。SoCに対する全奏効率は、主に遺伝子型及び治療前HCV RNAレベルによる。遺伝子型2及び3の患者は、遺伝子型1に感染している患者よりもSoCに対して、より反応しそうである(Melnikova, 2008; Jacobsonら、2007)。

【0005】

相当数のHCV患者はSoC治療に十分に反応しないか、又は副作用のために療法に耐えることができず、フルコースの完了に関する頻発する問題につながる。SoCの全臨床SVR率(overall clinical SVR rate)はわずか50%ほどである(Melnikova, 2008)。耐性の発生は、治療の失敗の潜在的なもう1つの因子である(Jacobsonら、2007)。SoCは、うつ病の過去の顕著なエピソード又は心臓病を持つ患者など、治療の候補と考えられないいくらかの患者においても禁忌である。治療の中断につながることの多いSoCの副作用には、インフルエンザ様疾病、発熱、疲労、血液疾患、貧血、白血球減少(leucopaenia)、血小板減少(thrombocytopaenia)、脱毛症、及びうつ病がある(Mannsら、2007)。

10

【0006】

SoCを利用する長い治療に関連する副作用、耐性の発生、及び最適以下の全成功率を考慮すると、より安全で効き目のある新しい治療が、HCV感染の治療に切実に求められている。新しい治療の目的は、向上した効力、向上した毒性プロファイル、向上した耐性プロファイル、向上した生活の質、及びその結果得られる患者のコンプライアンスの向上を含む。HCVは生活環が短く、そのため、薬物療法の間の薬物耐性の発生はよく見られる。

【0007】

C型肝炎の新規の特異的標的抗ウイルス療法(STAT-C)薬(直接作用型抗ウイルス(DAA)薬としても知られている)が開発されつつあり、これはウイルスRNAポリメラーゼNS5B又はウイルスプロテアーゼNS3などのウイルスタンパク質を標的とするものである(Jacobsonら、2007; Parfieniukら、2007)。さらに、ウイルスの標的でなくヒトのタンパク質(例えば、シクロフィリン)を標的とする新規の化合物も開発されつつあり、薬物療法の間の耐性の発生率低減につながると期待されている(Mannsら、2007; Pockros, 2008; Pawlotsky J-M, 2005)。

20

【0008】

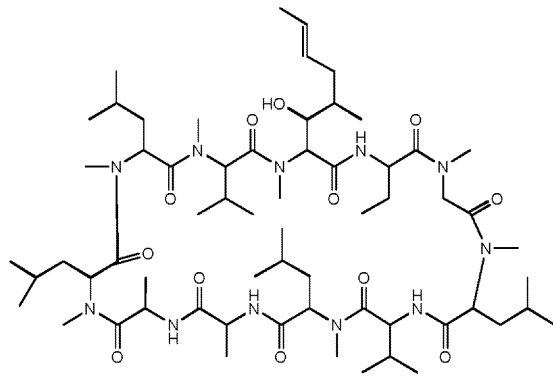
(シクロフィリン阻害剤)

シクロフィリン(CyP)は、タンパク質のコンフォメーション変化と折りたたみを容易にするペプチジル-プロリルシス-トランスイソメラーゼ活性を示す細胞タンパク質のファミリーである。CyPは、転写調節、免疫応答、タンパク質分泌、及びミトコンドリア機能などの細胞プロセスに関与している。HCVウイルスは、ヒトの感染の間その生活環のためにCyPをリクルートする。元々は、CyPが、RNA複製を促進するHCV非構造的タンパク質NS5B RNAポリメラーゼのRNA結合活性を刺激すると考えられていたが、CyP PPIアーゼ活性の要求を含む、代替の仮説もいくつか提案されてきた。A及びBを含むCyPの種々のアイソフォームが、HCVの生活環に関与していると考えられている(Yangら、2008; Appelら、2006; Chatterjiら、2009; Gaitherら、2010)。マウス(Colganら、2000)及びヒトT細胞(Braaten及びLuban、2001)においてノックアウトを発生させる能力は、CyPAが細胞の成長及び生存にとって任意であることを示している。類似の結果が、細菌(Herrlerら、1994)、ニューロスポラ(Neurospora)(Tropschugら、1989)、及びサッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)(Dolinskiら、1997)におけるCyPAホモログの分裂により観察された。したがって、CyPの阻害は、HCV感染を治療するための新規で魅力的な宿主標的であり、SVRを高め、耐性の出現を防止し、治療の副作用を低減する目的で、現行のSoC又はSTAT-C/DAA薬に対する新しい潜在的な追加物である。

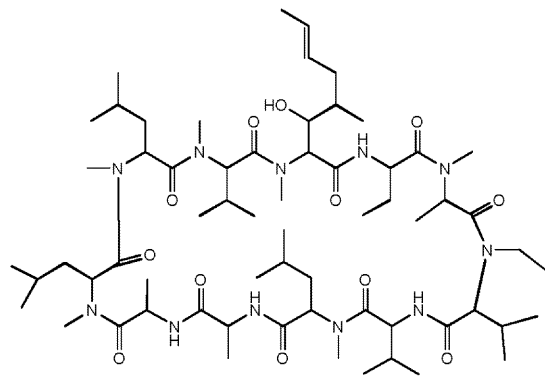
30

40

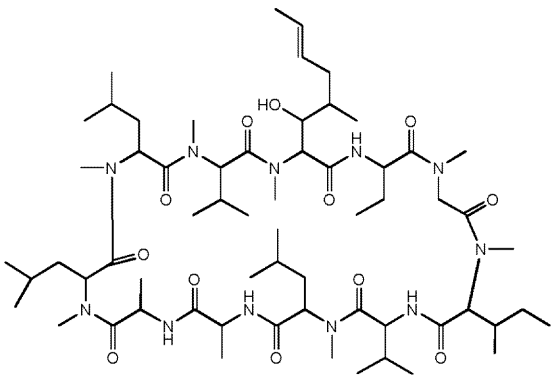
【化 1】



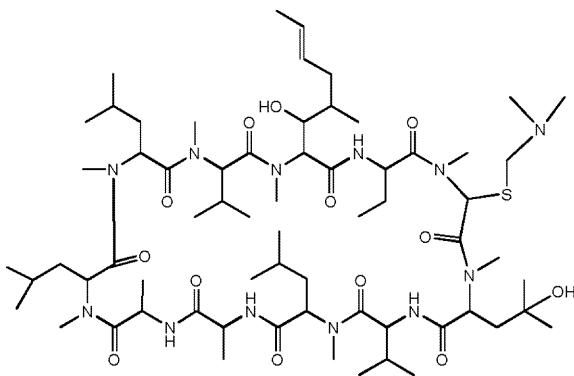
シクロスポリンA, 1



DEBIO-025, 2



NIM-811, 3



SCY-635, 4

【 0 0 0 9 】

シクロスポリンA(Inoueら、2003)(「CsA」)及び構造が密接に関連しているその非免疫抑制臨床アナログDEBIO-025(Paeshuyseら、2006; Flisiakら、2008)、NIM811(Mathyら、2008)、及びSCY-635(Hopkinsら、2009)はシクロフィリンに結合することが知られており、シクロフィリン阻害剤としてHCV感染の治療におけるインビトロ及び臨床的な効能を示した(Crabbeら、2009; Flisiakら、2008; Mathyら、2008; Inoueら、2007; Ishiiら、2006; Paeshuyseら、2006)。早期のCsAに関する耐性研究はHCV NS5B RNAポリメラーゼにおける変異を示し、シクロフィリンBのみがHCV複製プロセスに関与するだろうということを示唆したが(Robidaら、2007)、最近の研究はHCV複製におけるシクロフィリンAの欠くことのできない役割を示唆した(Chatterjiら、2009; Yangら、2008)。NS5Aウイルスタンパク質における変異がCsA耐性にも関連し、NS5AがCyPA及びCypBの両方とそれらの特異的ペプチジル-プロリルシス/トランスイソメラーゼ(PPIアーゼ)活性に関して相互作用することを考慮すると、ウイルスの生活環における両シクロフィリンの役割がさらに示唆される(Hanouilleら、2009)。

【 0 0 1 0 】

シクロスポリンアナログの抗HCV効果は免疫抑制性に依存せず、免疫抑制性はカルシニューリンに依存する。これは、HCV活性に必須な要件がCyP結合であり、カルシニューリン結合は必要でないことを示した。DEBIO-025は、HCV治療用の臨床的に最も進んだシクロフィリン阻害剤であり、最も優勢な4種のHCV遺伝子型(遺伝子型1、2、3、及び4)に対してインビトロ及びインビボの効力を示した。耐性研究は、DEBIO-025に対する耐性を与える変異がポリメラーゼ及びプロテアーゼの阻害剤に関して報告されていたものとは異なり、STAT-C/DAA耐性ウイルスレプリコンとは交叉耐性が全くないことを示した。より重要であるが、DEBIO-025は、プロテアーゼ及びポリメラーゼの両方の阻害剤に対する耐性を与えるエスケープ変異の発生も防止した(Crabbeら、2009)。

【 0 0 1 1 】

10

20

30

40

50

しかし、臨床開発中のCsA系シクロフィリン阻害剤には、それらの共通の構造クラスに関連すると思われるいくつかの問題があり、例えば、療法の中止につながることもあり臨床の投与レベルを限定してきた特定の有害事象；可変的な効能を生み出し得る可変的な薬物動態；及び投薬問題を生み出し得る薬物-薬物相互作用の増大したリスクがある。

【 0 0 1 2 】

DEBIO-025を服用する患者に最も頻繁に起こる有害事象(AE)には、黄疸、腹痛、嘔吐、疲労、及び発熱があった。臨床的に最も重要なAEは、高ビリルビン血症及び血小板数の減少(血小板減少)であった。ペグ-IFNは重度の血小板減少を起こすことがあり、DEBIO-025と組み合わせれば重大な臨床上的問題となるだろう。ビリルビンの増加及び血小板の減少は両方とも、NIM-811による早期の臨床試験において記載されてきた(Keら、2009)。DEBIO-025臨床試験の間に観察された高ビリルビン血症は治療の中止の後で逆転したが、それは16人の患者のうち4人の治療中断の原因であり、将来の試験のための投与レベルの低下の原因であった。HCVにおけるシクロフィリン阻害剤の抗ウイルス効果は投与量に関連するので、投与量の低下は抗ウイルス効果の低下につながり、単独療法として投与された場合、CsA系シクロフィリン阻害剤の後のいくつかの試験は、HCVウイルス量の低下が全くないか、又はあまり低下しないことを示した(Lawitzら、2009; Hopkinsら、2009; Nelsonら、2009)。DEBIO-025及びシクロスポリンAは、胆汁酸塩輸送ポンプなどの胆汁トランスポーター及び他の肝トランスポーター(特にMRP2/cMOAT/ABCC2)の阻害剤であることが知られている(Crabbeら、2009)。胆汁トランスポーター、特にMRP2との相互作用が、DEBIO-025の高投与レベルで見られる高ビリルビン血症の原因であり得ることが示唆された(Nelsonら、2009、Wringら、2010)。OAT1B1及びOAT1B3(Konigら、2010)などの他の薬物トランスポーターの阻害を介するCsAクラス関連の薬物-薬物相互作用(DDI)も1つの懸念となる可能性があり、特定の組み合わせ、及びHIVなどの共感染の治療を受けるいくつかの患者における使用を潜在的に制限している(Sedenら、2010)。

【 0 0 1 3 】

さらに、DEBIO-025及びシクロスポリンAはチトクロムP450(特にCYP3A4)による代謝の基質であり、ヒトP糖タンパク質(MDR1)の基質及び阻害剤であることが知られている(Crabbeら、2009)。シクロスポリンAは、インビトロでCYP3A4の阻害剤であることも示された(Niwaら、2007)。これは、例えば、ケトコナゾール、シメチジン、及びリファンピシンなど、CYP3A4の基質、誘導剤、又は阻害剤である他の薬物との薬物-薬物相互作用の増大したリスクがあり得ることを示している。さらに、P糖タンパク質による輸送を受けやすい薬物(例えば、ジゴキシン)との相互作用も予想され、これは付随する他の疾病の治療を受けているHCV患者に重症の薬物-薬物相互作用を起こし得る(Crabbeら、2009)。CsAは非常に変わりやすい薬物動態を持つことも知られており、初期の製剤は1~89%の経口バイオアベイラビリティを示した(Kapurtzakら、2004)。費用のかかる患者の血中濃度のモニタリングがないと、これは、血漿中濃度上昇による副作用の出現率の上昇をもたらすことがあり、或いは血漿中濃度低下による臨床反応の低下をもたらすことがある。

【 0 0 1 4 】

シクロフィリンの阻害がHCVの治療に対する有望な新しい手法を表すことを考慮すると、HCV感染に対する併用療法において使用するための、より強力で安全なCyP阻害剤を発見し、かつ開発する必要がある。

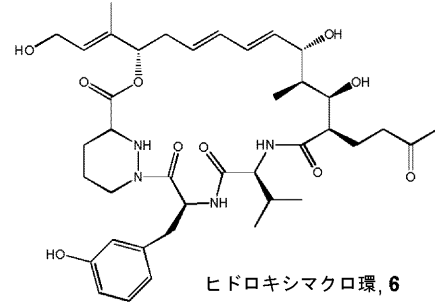
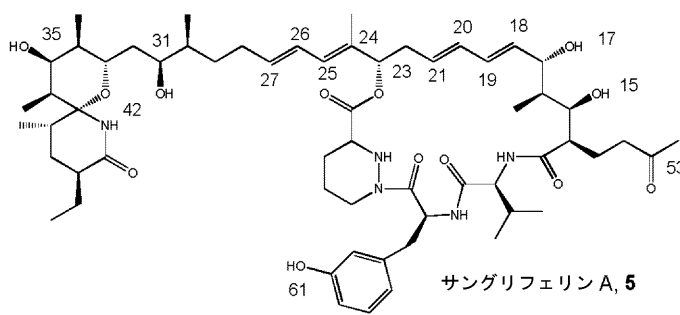
【 0 0 1 5 】

(サングリフェリン)

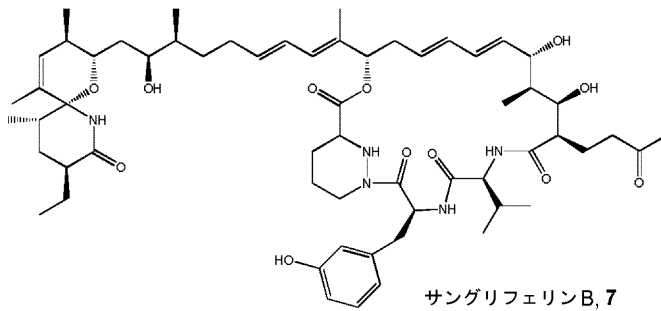
サングリフェリンA(SfA)及びその天然の同族体は、ストレプトマイセス属(*Streptomyces*) sp.A92-308110(DSM 9954としても知られる)(国際公開第97/02285号参照)により産生される混合非リボソームペプチド/ポリケチドのクラスに属し、シクロフィリンA(CyPA)に対するそれらの高い親和性に基づいて元々発見された。SfAは、発酵プロセス中に最も豊富にある成分であり、CsAに比べてCyPAに対しておよそ20倍高い親和性を示す。これは、サングリフェリンがHCVの治療に有用になり得るという示唆をもたらした(国際公開第2006/138507号)。サングリフェリンは、インビトロで試験される場合、CsAよりも低い免疫抑制活

性を示すことも示された(Sanglierら、1999; Fehrら、1999)。SfAは、CyPAのCsA結合部位に高い親和性で結合する(Kallenら、2005)。

【化 2】



10



20

【0016】

(サンゲリフェリンの生合成)

サンゲリフェリンは、混合型ポリケチドシンターゼ(PKS)/非リボソームペプチドシンターゼ(NRPS)によって生合成される(国際公開第2010/034243号、Quら、2011参照)。その22員のマクロライド骨格は、ポリケチド炭素鎖及びトリペプチド鎖からなる。該ペプチド鎖は、アミド結合によって連結された、1つの天然アミノ酸、バリン、並びに、2つの非天然アミノ酸、(S)-メタ-チロシン及び(S)-ピペラジン酸からなる。(S)-メタ-チロシンを生成するフェニルアラニンのヒドロキシル化は(NRPS上でin situで、又は、生合成前に)、sfaAの遺伝子産物を介して起こると考えられている。

30

【0017】

(サンゲリフェリンの免疫抑制作用)

SfAの免疫抑制作用機序は、CsA、FK506、及びラパマイシンなどの他の公知のイムノフィリン-結合性免疫抑制薬のものとは異なる。SfAは、CsAの標的であるカルシニューリンのホスファターゼ活性を阻害せず(Zenkeら、2001)、その代わりに、その免疫抑制活性は、インターロイキン-6の阻害(Hartelら、2005)、インターロイキン-12の阻害(Steinschulteら、2003)、及びインターロイキン-2-依存性T細胞増殖の阻害(Zhang及びLiu、2001)によるものとされてきた。しかし、SfAがその免疫抑制効果を発揮する分子標的及び機構は今のところ未知である。

40

【0018】

SfAの分子構造は複雑であり、CyPAとのその相互作用は、主に該分子のマクロ環部分により媒介されていると考えられている。実際、SfAの酸化開裂から誘導されたマクロ環化合物(ヒドロキシマクロ環)はCyPAに対して強い親和性を示した(Sedraniら、2003)。X線結晶構造データは、ヒドロキシマクロ環がCsAと同じCyPAの活性部位に結合することを示した。SfAのマクロ環部分に基づくアナログは免疫抑制性が欠けていることも先に示されており(Sedraniら、2003)、HCV療法における潜在的な使用のための非免疫抑制CyP阻害剤の設計の機会を与える。

【0019】

これとは逆に、以下を含むがこれらに限定されない、移植拒絶反応、自己免疫障害、炎

50

症性障害、及び、呼吸器疾患の予防のような分野において使用するための、低毒性の免疫抑制薬を開発する機会もある：クローン病、ベーチェット病、ブドウ膜炎、乾癬、アトピー性皮膚炎、関節リュウマチ、腎炎症候群、再生不良性貧血、胆汁性肝硬変、喘息、肺線維症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、及び、セリアック病。サングリフェリンは、免疫抑制活性の新規の機構を有し (Zenkeら、2001)、樹状細胞ケモカインを介して作用する可能性があることが示されており (Immeckeら、2011)、したがって、シクロスポリンA、ラパマイシン、及びFK506などの現在の臨床薬とは異なる作用機序を有する薬剤を開発する機会がある。

【0020】

(シクロフィリン阻害剤の他の治療的使用)

(ヒト免疫不全ウイルス(HIV))

CsA及びDEBIO-025などのシクロフィリン阻害剤は、HIV複製の阻害にも潜在的な効用を示した。シクロフィリン阻害剤は、HIV逆転写の進行/完了の間のCyPAの機能と干渉すると考えられている (Ptakら、2008)。しかし、臨床試験では、DEBIO-025は、それぞれ9名及び2名の患者でHIV-1 RNAレベルを 0.5 及び $>1 \log_{10}$ コピー/mLに低減しただけであり、治療された患者のうち27名はHIV-1 RNAレベルの低下を全く示さなかった (Steynら、2006)。この後で、DEBIO-025はHCV/HIV共感染患者で試験され、HCVに対してより良い効能を示し、HIV臨床試験は中止された (Watashiら、2010参照)。

【0021】

(HIVの治療)

世界中で3000万人を超える人々がHIV-1に感染しており、毎年300万の新しい症例がある。治療選択は、高活性抗レトロウイルス療法(HAART)の導入と共に劇的に向上した (Schopmanら、2010)。2008年までに、およそ25種の抗レトロウイルス薬がHIV-1の治療用に認可され、9種のヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(NRTI)、4種の新規-ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(NNRTI)、9種のプロテアーゼ阻害剤(PI)、1種の融合阻害剤、1種のCCR5阻害剤、及び1種のインテグラーゼ阻害剤 (Shafer及びSchapiro、2008)が含まれる。しかし、これらの現行のレジメンはいずれも、完全なウイルス排除はもたらさず、それらは重症の副作用をもたらすことがあり、抗ウイルス耐性も未だ大きな懸念である。したがって、特に、シクロフィリン阻害剤の場合のように、認可された薬物がない作用機序クラスにおいて、新しい抗ウイルス療法の必要が未だ存在する。

【0022】

(B型肝炎ウイルス)

B型肝炎はヘパドナウイルス科のDNAウイルスであり、B型肝炎の原因因子である。HCV及びHIVの場合とは異なり、B型肝炎ウイルスに対するシクロフィリン阻害剤の活性の発表された記述は非常に少なかった。Ptakら (2008) は、HBVに対するDebio-025の弱い活性 (IC_{50} は $4.1 \mu M$) を記載したが、Xieら (2007) はHBVに対するCsAのいくつかの活性 ($IC_{50} > 1.3 \mu g/mL$) を記載した。これはHIV及びHCVとは対照的であり、HIV及びHCVではシクロフィリン阻害剤のナノモラーの抗ウイルス活性の報告が多数ある。

【0023】

(HBVの治療)

HBVは世界中で最大4億人を感染させており、ウイルス性慢性肝炎及び肝細胞癌の主な原因である。2008年現在、HBVの治療に認可された薬物が6種ある；インターフェロナルファ及びペグ化インターフェロナルファ、3種のヌクレオシドアナログ (ラミブジン、エンテカビル、及びテルビブジン)、及び1種のヌクレオチドアナログ (アデホビルジピボキシル)。しかし、耐性の率の高さ、許容性の低さ、及び起こり得る副作用のため、新しい治療選択が必要とされている (Ferirら、2008)。

【0024】

(ミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)の阻害)

ミトコンドリアの高コンダクタンス透過性遷移孔 (high conductance permeability transition pores) の開口は、ミトコンドリア透過性遷移 (MPT) のオンセットを開始する。こ

10

20

30

40

50

れは原因となる事象であり、酸化ストレス、 Ca^{2+} 毒性、及び虚血/再灌流後の肝細胞における壊死及びアポトーシスをもたらす。シクロフィリン阻害剤によるシクロフィリンD(シクロフィリンFとしても知られる)の阻害は、透過性遷移孔の開口を遮断することが示されており、これらのストレスの後の細胞死を保護する。したがって、シクロフィリンD阻害剤は、筋ジストロフィー、特にウールリッヒ型先天性筋ジストロフィー及びベスレムミオパチー(Millayら、2008、国際公開第2008/084368号、Palmaら、2009)、多発性硬化症(Forteら、2009)、糖尿病(Fujimotoら、2010)、筋萎縮性側索硬化症(Martin 2009)、双極性障害(Kubotaら、2010)、アルツハイマー病(Du及びYan、2010)、ハンチントン病(Perryら、2010)、心筋梗塞後の回復(Gomezら、2007)、及び慢性のアルコール消費(Kingら、2010)など、mPTP開口が関与するとされてきた適応症において有用になり得る。

10

【0025】

(さらなる治療用途)

シクロフィリン阻害剤は、水痘帯状疱疹ウイルス(Ptakら、2008)、A型インフルエンザウイルス(Liuら、2009)、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス並びに他のヒト及びネココロナウイルス(Chenら、2005、Ptakら、2008)、デングウイルス(Kaulら、2009)、黄熱病ウイルス(Qingら、2009)、西ナイルウイルス(Qingら、2009)、西部馬脳炎ウイルス(Qingら、2009)、サイトメガロウイルス(Kawasakiら、2007)、及びワクシニアウイルス(Castroら、2003)などの他のウイルスに対して潜在的な活性を有し、そのためこれらのウイルス感染の治療において潜在的な活性を有する。

癌など、他の治療分野におけるシクロフィリン阻害剤及びシクロフィリン阻害の効用についても報告がある(Hanら、2009)。

20

【0026】

(サングリフェリンについての一般的な説明)

サングリフェリンなどの化合物の薬物開発における問題の1つは、経口バイオアベイラビリティの低下をもたらす、急速な代謝及びグルクロン酸抱合である。これが、食物による影響の可能性を高め、剤形からの不完全放出をより頻繁にし、患者間のばらつきを大きくする可能性がある。

【0027】

したがって、特にHCV感染の治療及び抗炎症性状態に効用を持ち得るが、HIV感染、筋ジストロフィー、若しくは心筋梗塞後の回復の促進などの、シクロフィリンの阻害が有用になり得る他の疾病分野、又は、免疫抑制が有用である他の疾病分野の治療においても効用を持ち得る、新規のシクロフィリン阻害剤及び抗炎症薬を特定する必要が未だ存在する。好ましくは、そのようなシクロフィリン阻害剤は、下記の性質の1つ以上を含む、現在利用可能なシクロフィリン阻害剤よりも向上した性質を有する：おそらくはP450代謝の低減及び/又はグルクロン酸抱合の低減による、より長い半減期若しくは増大した経口バイオアベイラビリティ、向上した水への溶解度、HCVに対する向上した効力、低減された毒性(肝毒性を含む)、標的臓器(例えば、HCVの場合は肝臓)に対する高い曝露及び/若しくは長い半減期(投薬頻度の減少を可能にする)などの向上した薬理プロファイル、低減されたレベルのCYP3A4の代謝及び阻害並びに低減された(Pgp)阻害(より容易な多剤組み合わせを可能にする)によるなどの低減された薬物-薬物相互作用、高ビリルビン血症の機会低下をもたらす、MRP2への低い結合などの、向上した副作用プロファイル、より低い免疫抑制効果、耐性ウイルス種、特にCsA及びCsAアナログ(例えば、DEBIO-025)耐性ウイルス種に対する向上した活性、及びより高い治療(及び/又は選択性)指数。本発明は、上記の性質の1つ以上を有し得る新規のサングリフェリンアナログを開示する。特に、本発明は、新規の変異合成(mutasynthetic)サングリフェリンアナログを開示し、該サングリフェリンアナログは、少なくともいくつかの実施態様において、例えば、増大したミクロソーム半減期及び/又はHCVに対する向上した効力によって示されるように、例えば、低いレプリコン EC_{50} 及び/又は増大した選択性指数によって示されるように、P450による代謝又はグルクロン酸抱合が低減されている。

30

40

【0028】

50

移植拒絶反応の予防において、又は、自己免疫障害、炎症性障害、及び、呼吸器疾患の治療において効用を有し得る、新規の免疫抑制剤を開発する必要もある。好ましくは、そのような免疫抑制剤は、公知の天然のサングリフェリンよりも向上した性質を有し、該性質には以下の1以上が含まれる：おそらくはP450代謝の低減及び/又はグルクロン酸抱合の低減による、より長い半減期若しくは増大した経口バイオアベイラビリティ、向上した水への溶解度、T細胞増殖アッセイで見られるような免疫抑制活性の向上した効力、低減された毒性(肝毒性を含む)、標的臓器に対する高い曝露及び/若しくは長い半減期(投薬頻度の減少を可能にする)などの向上した薬理プロファイル、低減されたレベルのCYP3A4の代謝及び阻害並びに低減された(Pgp)阻害(より容易な多剤組み合わせを可能にする)によるなどの低減された薬物-薬物相互作用、並びに向上した副作用プロファイル。本発明は、上記の性質の1つ以上を有し得る、新規のサングリフェリンアナログを開示する。特に、本発明は、少なくともいくつかの実施態様において、例えば、増大したミクロソーム半減期によって示されるように、P450による代謝又はグルクロン酸抱合が低減されており、例えば、低いT細胞増殖IC₅₀によって示されるように、向上した免疫抑制効力を有し得る、新規のサングリフェリンアナログを開示する。

10

【発明の概要】

【0029】

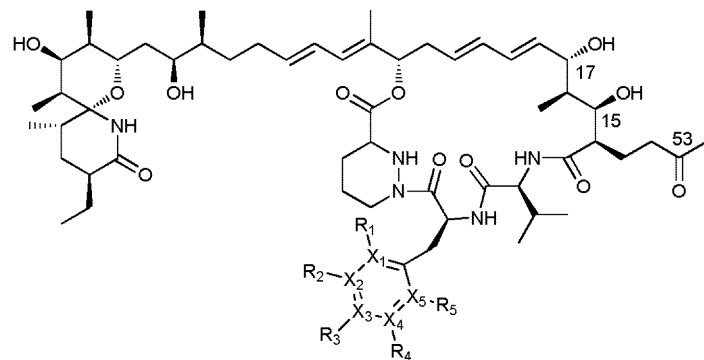
本発明は、変異合成(mutasynthesis)により生成された、新規のサングリフェリンアナログを提供する。これらのアナログは、ストレプトマイセス属sp.A92-308110(DSM 9954としても知られている)などのサングリフェリン産生生物に、メタ-チロシンのアナログを供給することによって、或いは、より優先的には、sfaA又はsfaAのホモログが不活化されているか又は欠失している、サングリフェリン産生生物の遺伝子改変誘導体にメタ-チロシンアナログを供給することによって、生成することができる。この結果、本発明は、変異合成サングリフェリンアナログ、これらの化合物の製造方法、及び、医薬におけるこれらの化合物の使用法、又は、さらなる化合物の製造における中間体としての、これらの化合物の使用法を提供する。

20

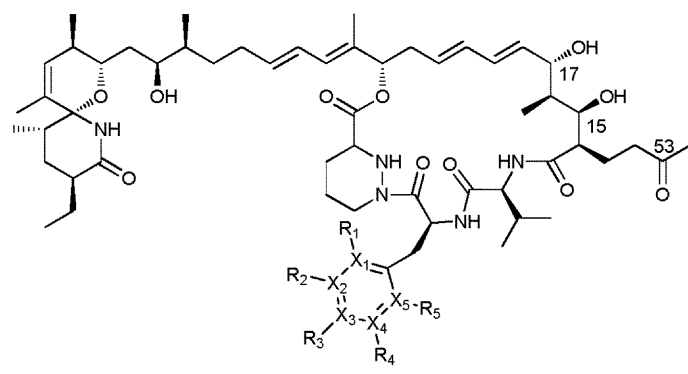
【0030】

したがって、第1の態様において、本発明は、以下の式(I)若しくは式(II)の変異合成サングリフェリンアナログ及びそれらの誘導体、又はそれらの医薬として許容し得る塩：

【化 3】



10



20

(式中、

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、独立に、H、F、Cl、Br、 C_{2-6} アルケニル又は C_{1-10} アルキルを表し、ここで、前記アルキル基の1以上の炭素原子は、O、N及びS(O)_p (pは0、1又は2を表す。)から選択されるヘテロ原子によって任意に置き換えられており、かつここで、前記アルキル基の1以上の炭素原子は、カルボニルによって任意に置き換えられており、かつ該アルキル基は、1以上のハロゲン原子によって任意に置換されていてもよく;

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 は、独立に、C又はNを表し、かつ、これらの基のうちNを表すものについては、結合される置換基が存在せず;

30

ただし、 R_1 、 R_3 、 R_4 及び R_5 が全てHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 が全てCを表す場合、 R_2 はOHを表すことができない。))

を、それらの任意の互変異性体、又はトランスとして示されているC26、27位のC=C (サングリフェリンAの構造を参照) のC=C結合がシスである、それらの異性体を含めて、並びに

C-53ケト及びC-15ヒドロキシル基及びメタノールの組み合わせによりケタールが形成されている、それらのメタノール付加物を含めて、提供する。

【0031】

上記の構造は代表的な互変異性体を示すものであり、本発明は、式(I)の化合物の全ての互変異性体を包含し、例えば、エノール化合物が図示されている場合には、ケト化合物を包含しており、その逆もまた同様である。

40

式(I)の定義に含められる具体的な互変異性体は、(i) C-53ケト基がC-15ヒドロキシルとヘミケタールを形成するもの、又は(ii) C-15及びC-17ヒドロキシルがC-53ケトと結合してケタールを形成できるもの、である。全ての番号付けは、親サングリフェリンA構造の体系を使用する。

【0032】

(定義)

冠詞「1つの(a)」及び「1つの(an)」は、1つ又は2つ以上(すなわち、少なくとも1つ)の該冠詞の文法的な対象を意味するように本願明細書において使用される。例としては

50

、「1つのアナログ」は、1つのアナログ又は2つ以上のアナログを意味する。

本願明細書では、用語「アナログ(複数可)」は、互いに構造的に類似しているが組成がわずかに異なる(1つの原子を他の原子で置き換える、又は特定の官能基の有無など)化合物を意味する。

本願明細書では、用語「炎症性障害」は、炎症により引き起こされる障害のリストを意味し、限定されないが、以下のものを含む：尋常性ざ瘡、アテローム性動脈硬化症、喘息、自己免疫疾患(Automimmune disease)(急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、アジソン病、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群(APS)、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、水疱性類天疱瘡、セリアック病、シャーガス病、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、クローン病、皮膚筋炎、1型糖尿病、子宮内膜症、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、化膿性汗腺炎、川崎病、IgA腎症、特発性血小板減少性紫斑病、間質性膀胱炎、エリテマトーデス、混合性結合組織病、モルフェア、多発性硬化症(MS)、重症筋無力症、ナルコレプシー、神経性筋強直症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、乾癬、乾癬性関節炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、関節リュウマチ、統合失調症、強皮症、シェーグレン症候群、全身硬直症候群、側頭動脈炎、潰瘍性大腸炎、血管炎、白斑、ウェゲナー肉芽腫症など)、炎症性腸疾患、骨盤内炎症性疾患、関節リュウマチ、及び移植拒絶反応。

【0033】

本願明細書では、用語「サングリフェリン(複数可)」は、サングリフェリンAに構造的に類似しているが組成がわずかに異なる(1つの原子を他の原子で置き換える、又は特定の官能基の有無など)化合物、特にストレプトマイセス属sp.A92-308110の発酵により生成したものを意味する。例には、サングリフェリンBなど、国際公開第97/02285号及び国際公開第98/07743号で議論されているサングリフェリン様化合物がある。

【0034】

本願明細書では、用語「変異合成サングリフェリン(複数可)」又は「変異合成サングリフェリンアナログ(複数可)」は、サングリフェリンA、B、C又はDに構造的に類似しているが組成がわずかに異なる(1つ以上の原子を他の原子で置き換える、又は特定の官能基の有無など)化合物、特に、培養物にメタ-チロシンアナログを供給する、ストレプトマイセス属sp.A92-308110又はその変異体の発酵により生成したものを意味する。

【0035】

本願明細書では、用語「メタ-チロシンアナログ(複数可)」は、メタ-チロシンに構造的に類似しているが組成がわずかに異なる(1つ以上の原子を他の原子で置き換える、又は特定の官能基の有無など)化合物、特に、式(III)に記載のものを意味する。

【0036】

本願明細書では、用語「HCV」は、C型肝炎ウイルス、フラビウイルス科の一本鎖のRNAエンベロープウイルスを意味する。

本願明細書では、用語「HIV」は、ヒト免疫不全ウイルス、ヒト後天性免疫不全症候群の原因因子を意味する。

【0037】

本願明細書では、用語「バイオアベイラビリティ」は、薬物又は他の物質が、投与後に吸収されるか、又は生物活性部位で利用可能になる程度又は速度を意味する。この性質は、化合物の溶解度、消化管中の吸収速度、タンパク結合及び代謝の程度などを含むいくつかの因子に依存する。当業者によく知られているであろうバイオアベイラビリティの種々の試験が本願明細書に記載される(Egorinら、2002も参照されたい)。

【0038】

本願で使用される用語「水への溶解度」は、水性媒体、例えば、pH7.4のリン酸緩衝食塩水(PBS)又は5%グルコース溶液への溶解度を意味する。水への溶解度の試験は、以下に、「水への溶解度アッセイ」として実施例に与えられている。

【0039】

式(I)の化合物などの本発明の化合物の医薬として許容し得る塩は、医薬として許容し

10

20

30

40

50

得る無機又は有機の酸又は塩基から形成される従来の塩並びに四級アンモニウム酸付加塩を含む。好適な酸性塩のより具体的な例には、塩化水素酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ギ酸、乳酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、パルモン酸(palmoic)、マロン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ヒドロキシナフトエ酸、ヨウ化水素酸、リンゴ酸、ステロン酸(steroidic)、タンニン酸の塩などがある。塩酸塩は特に興味深い。シュウ酸などの他の酸は、それ自体医薬として許容し得るものではないが、本発明の化合物及びその医薬として許容し得る塩を得る際に中間体として有用な塩の製造に有用になり得る。好適な塩基性塩のより具体的な例には、ナトリウム、リチウム、カリウム、マグネシウム、アルミニウム、カルシウム、亜鉛、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン及びプロカインの塩がある。以下での本発明の化合物への言及は、式(1)の化合物とそれらの医薬として許容し得る塩の両方を含む。

【0040】

本願明細書では、用語「アルキル」は、直鎖又は分枝のアルキル基を表す。例示的なアルキルは、 C_{1-6} アルキル、例えば C_{1-4} アルキルである。

「アルケニル」は、2個以上の炭素を含むアルキル基であって、1個以上の二重結合を有し、不飽和であるものを意味する。

【0041】

アルキル基の例には、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、及びn-ブチルなどの C_{1-4} アルキル基がある。アルケニル基の例には、 $-CH=CH_2$ 及び $-CH_2CH=CH_2$ などの C_{2-4} アルケニル基がある。

用語「治療」には、予防的処置並びに治療的処置が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0042】

(図の説明)

【図1】化合物の構造及びサングリフェリンAの番号付け体系である。

【図2】化合物14の 1H NMRである。

【図3】化合物15の 1H NMRである。

【図4】化合物16の 1H NMRである。

【図5】化合物17の 1H NMRである。

【図6】化合物18の 1H NMRである。

【図7】化合物19の 1H NMRである。

【図8】化合物20の 1H NMRである。

【発明を実施するための形態】

【0043】

(発明の説明)

本発明は、先に説明した変異合成サングリフェリンアナログ、これらの化合物の製造方法、及び医薬におけるこれらの化合物の使用方法を提供する。

一実施態様において、該化合物は、C-53ケト及びC-15ヒドロキシル基及びメタノールの組み合わせによりケタールが形成されている、それらのメタノール付加物である。別の実施態様において、それはメタノール付加物ではない。

【0044】

いくつかの実施態様において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 の1以上が表すことができる C_{1-10} アルキル基(例えば C_{1-6} アルキル基)の炭素原子は、ヘテロ原子によって置き換えられている。

$-CH_3$ がNによって置き換えられている場合、形成される基は $-NH_2$ である。 $-CH_2-$ がNによって置き換えられている場合、形成される基は $-NH-$ である。 $-CHR-$ がNによって置き換えられている場合、形成される基は $-NR-$ である。したがって、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 内の窒素

原子は第一級、第二級又は第三級の窒素原子であることができる。

-CH₃がOによって置き換えられている場合、形成される基は-OHである。

【0045】

R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上が表すことができるC₁₋₁₀アルキル基(例えばC₁₋₆アルキル基)の炭素原子がヘテロ原子によって置き換えられている場合、それは好適には、O、S又はN、特にN又はO、とりわけOによって置き換えられている。

R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅のいずれか1つが、基S(O)_pを含む場合、変数pは、好適には0又は1を表す。一実施態様において、pは0を表す。別の実施態様において、pは1を表す。別の実施態様において、pは2を表す。

【0046】

R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上が表すことができるC₁₋₁₀アルキル基(例えば、C₁₋₆アルキル基)が2個以上のヘテロ原子を含む場合、これらは典型的には、2個以上の炭素原子によって隔てられるべきである。

好適には、R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上が表すことができるC₁₋₁₀アルキル基(例えば、C₁₋₆アルキル基)の炭素原子は、ヘテロ原子によって置き換えられていないか、そうでなければ、OH又はNH₂を表す。

【0047】

R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上が表すことができるC₁₋₁₀アルキル基(例えば、C₁₋₆アルキル基)の炭素原子がカルボニルによって置き換えられている場合、該カルボニルは、好適には別の炭素原子又は窒素原子に隣接して配置される。好適には、カルボニル基は硫黄原子又は酸素原子に隣接して配置されない。

例えば、R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上が、-COC₁₋₃アルキル、例えば、-COMeを表すことができる。

【0048】

好適には、R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上が表すことができるC₁₋₁₀アルキル(例えば、C₁₋₆アルキル)基の炭素原子は、カルボニルによって置き換えられていない。

R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上が表すことができるC₁₋₁₀アルキル基(例えば、C₁₋₆アルキル基)は、1以上のハロゲン原子によって置換されることができる。例えば、R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上が、-CF₃を表すことができる。或いは、1以上のR₁、R₂、R₃、R₄及びR₅が、1以上の(例えば、1)Cl又はF原子によって置換されたC₁₋₁₀アルキル(例えば、C₁₋₆アルキル)を表すことができる(例えば、-CH₂CH₂Cl)。

【0049】

好適には、R₁、R₂、R₃、R₄又はR₅のC₁₋₁₀アルキル基(例えば、C₁₋₆アルキル基)は、ハロゲンによって置換されていない。

1以上のR₁、R₂、R₃、R₄及びR₅基(複数可)がC₁₋₁₀アルキル基(例えば、C₁₋₆アルキル基)を表す場合、好適には、該基(複数可)はC₁₋₄アルキル(例えば、メチルなどのC₁₋₂アルキル)を表す。

一実施態様において、R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上は、C₁₋₆アルキル(C₁₋₂アルキルなど)又はC₂₋₃アルケニルを表し、例えば、R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅の1以上はメチルを表す。

【0050】

好適には、R₁は、H、F、Cl、CF₃、OH又はC₁₋₆アルキル(例えば、メチル)を表す。最も好適には、R₁は、H又はF、特にHを表す。

好適には、R₂は、H、F、Cl、CF₃、OH、NH₂又はC₁₋₆アルキル(例えば、メチル)を表す。より好適には、R₂は、H、F、OH又はNH₂、特にOHを表す。

好適には、R₃は、H、F、Cl、CF₃、OH又はC₁₋₆アルキル(例えば、メチル)を表す。より好適には、R₃は、H、Me又はFを表す。R₃は、エチルを表すこともできる。

【0051】

好適には、R₄は、H、F、Cl、CF₃、OH又はC₁₋₆アルキル(例えば、メチル)を表す。より好適には、R₄は、H又はFを表す。

10

20

30

40

50

好適には、 R_5 は、H、F、Cl、 CF_3 、OH又は C_{1-6} アルキル(例えば、メチル)を表す。より好適には、 R_5 は、H又はFを表す。

好適には、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 又は R_5 の1以上、より好適には、2以上(例えば、3以上)は、Hを表さない。

【0052】

好適には、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 又は R_5 の1以上、例えば、2以上は、Fを表す。

好適には、 R_3 若しくは R_4 又は R_3 及び R_4 は、Fを表す。別の実施態様において、 R_1 及び R_3 は、Fを表す。

一実施態様において、 X_1 はNを表す(したがって、 R_1 は存在しない)。別のより好ましい実施態様において、 X_1 はCを表す。

10

【0053】

好適には、 X_2 はCを表す。

好適には、 X_3 はCを表す。

好適には、 X_4 はCを表す。

好適には、 X_5 はCを表す。

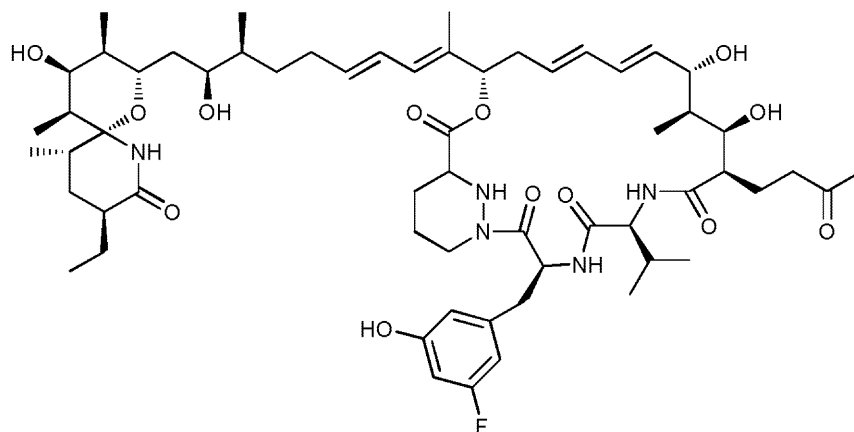
【0054】

一実施態様において、前記化合物は、式(I)の化合物である。別の実施態様において、前記化合物は、式(II)の化合物である。

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はFを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

20

【化4】



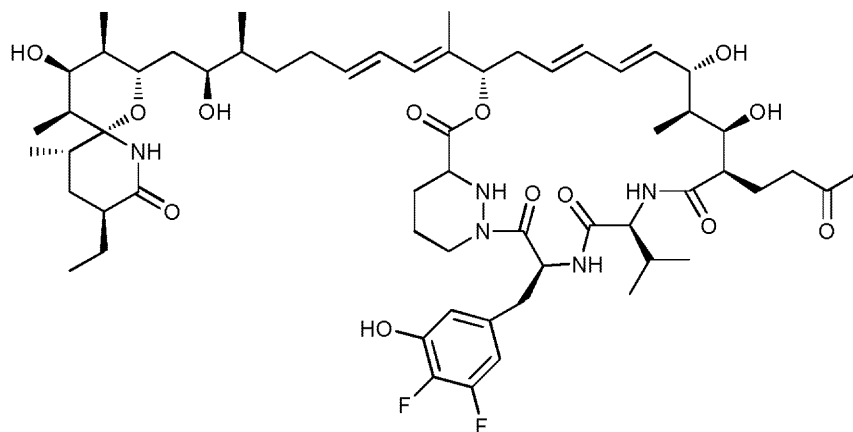
30

【0055】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はFを表し、 R_4 はFを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

40

【化 5】



10

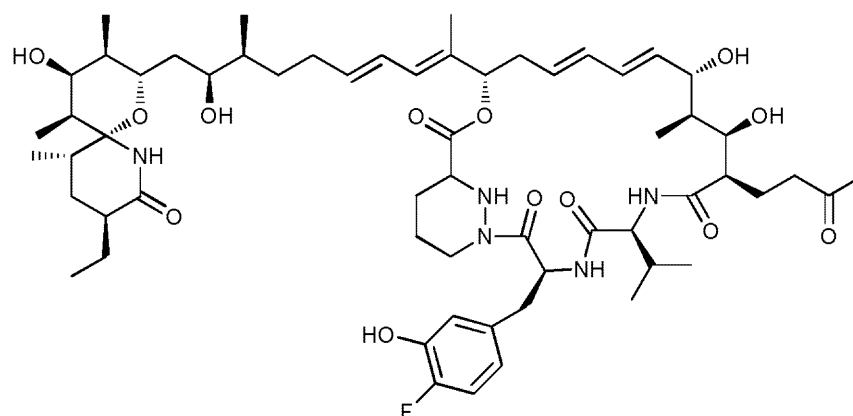
。

【 0 0 5 6 】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はFを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 6】

20



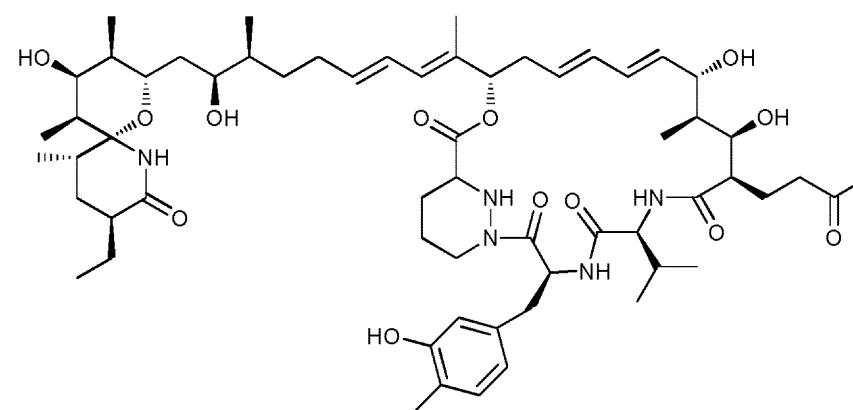
30

。

【 0 0 5 7 】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はMeを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 7】



40

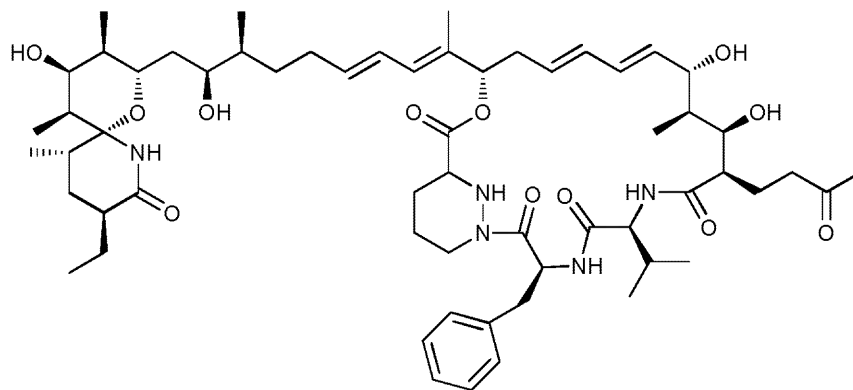
50

。

【 0 0 5 8 】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【 化 8 】



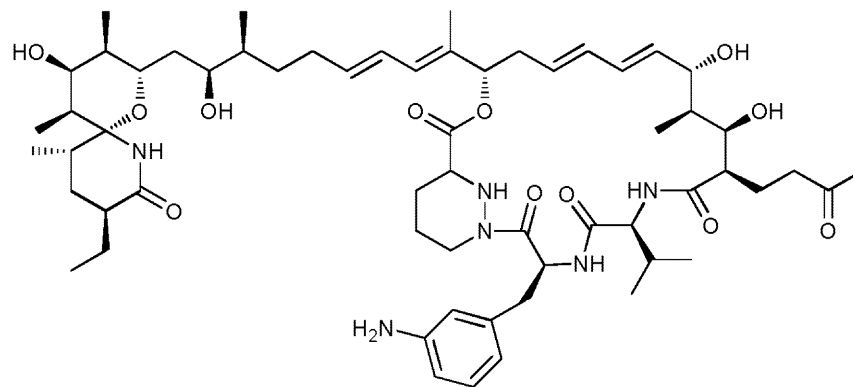
10

。

【 0 0 5 9 】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 は NH_2 を表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【 化 9 】



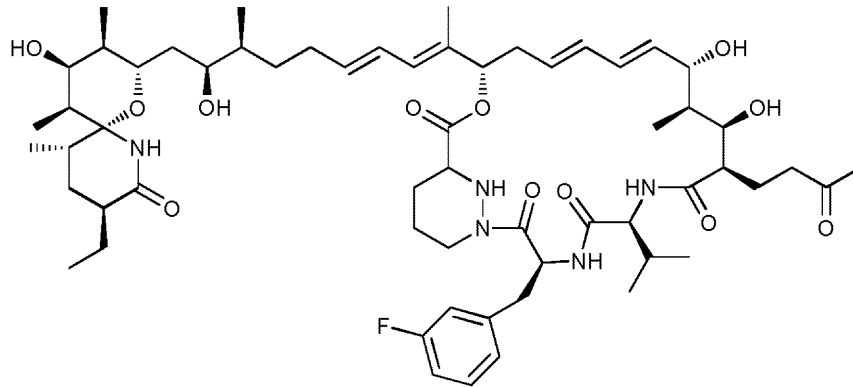
30

。

【 0 0 6 0 】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はFを表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 1 0】



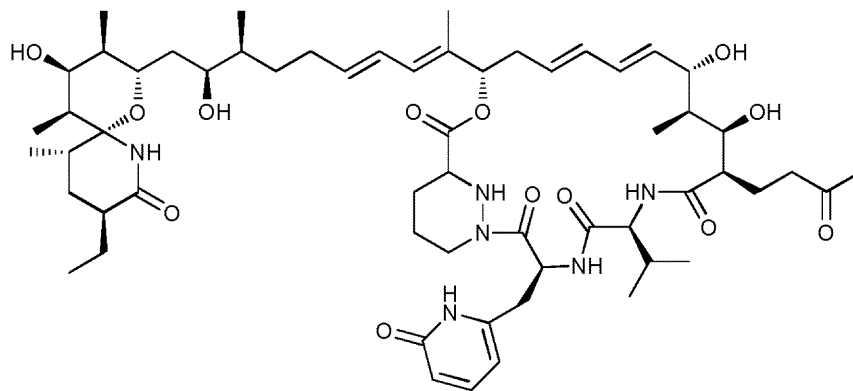
10

。

【 0 0 6 1】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はFを表し、 R_5 はHを表し、 X_1 はNを表し、かつ X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表し：

【化 1 1】

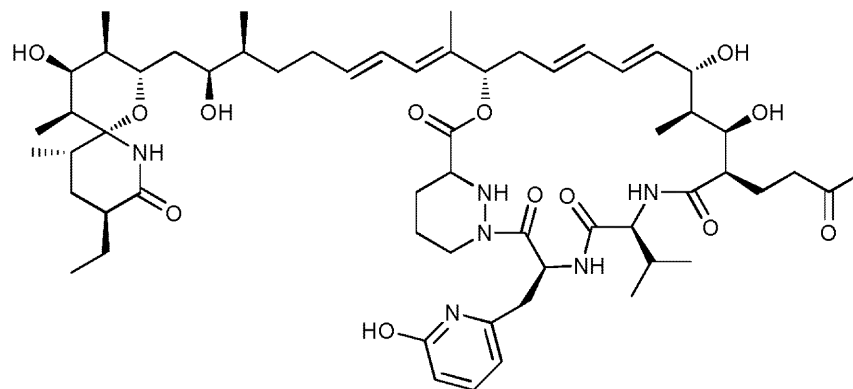


20

30

上記構造は、以下のように表すこともできる：

【化 1 2】



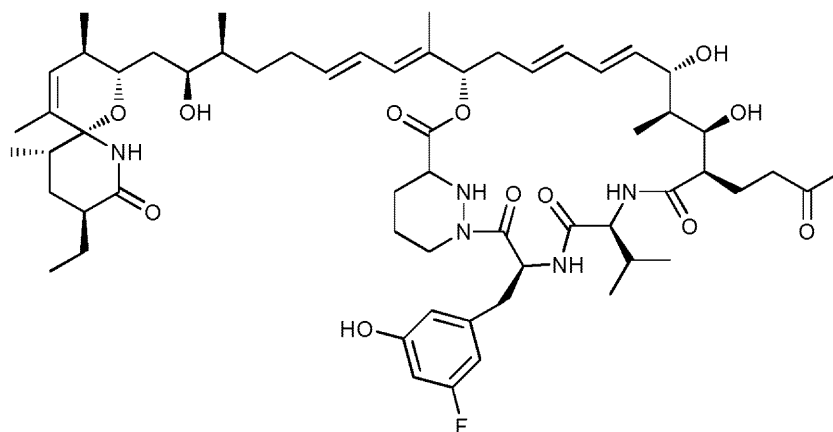
40

。

【 0 0 6 2】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はFを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 1 3】



10

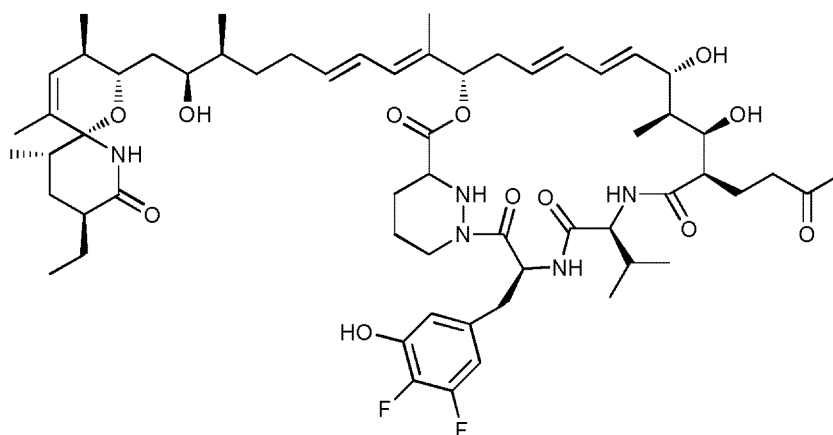
。

【 0 0 6 3】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はFを表し、 R_4 はFを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 1 4】

20



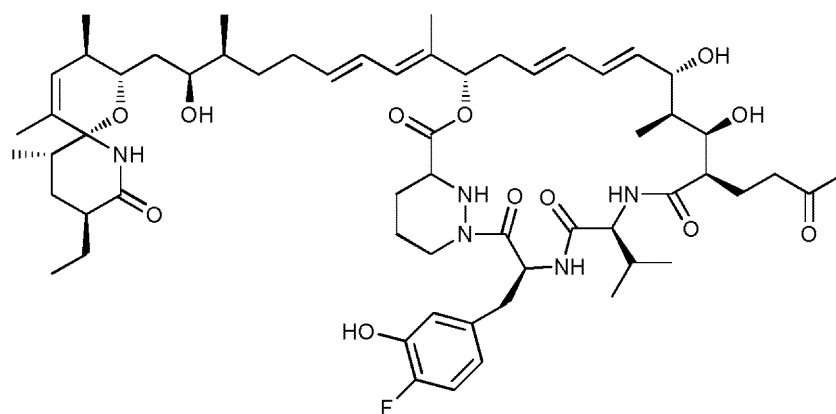
30

。

【 0 0 6 4】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はFを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 1 5】

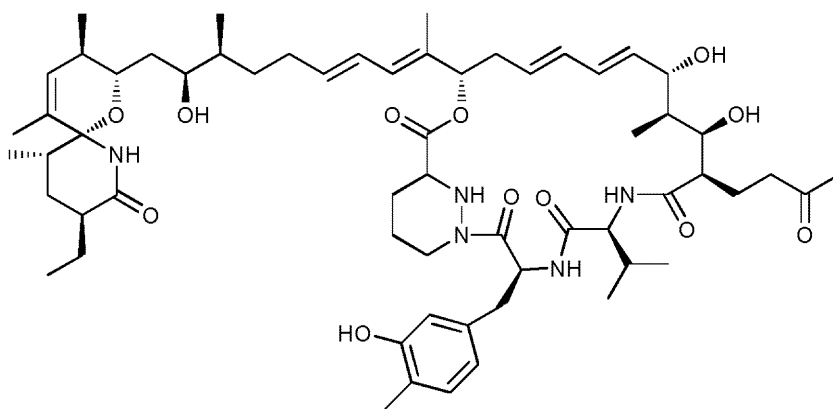


10

【 0 0 6 5】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はMeを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 1 6】



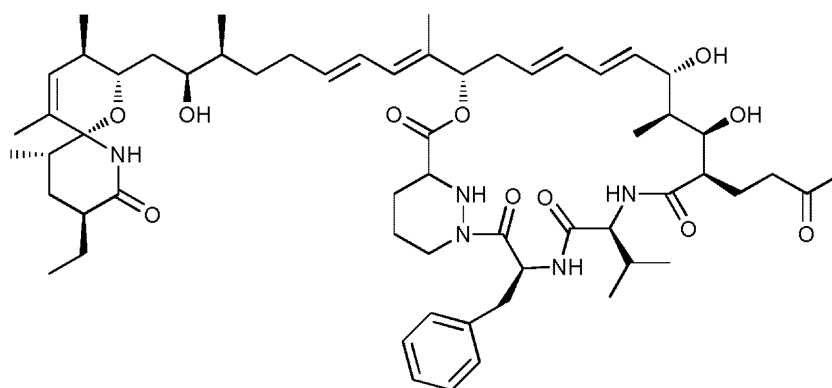
20

30

【 0 0 6 6】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はHを表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 1 7】



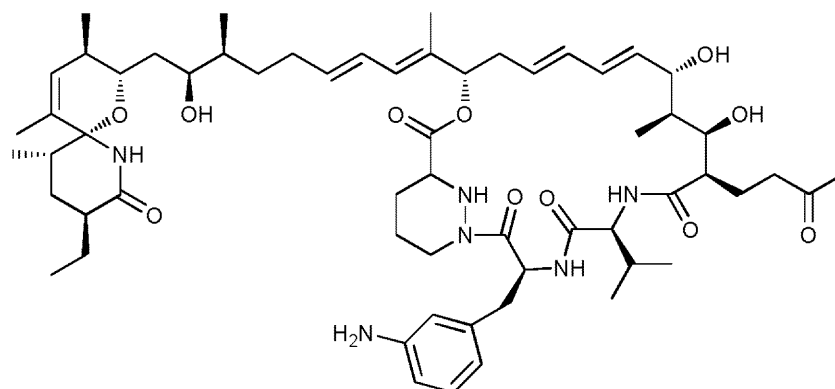
40

50

【 0 0 6 7 】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 は NH_2 を表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【 化 1 8 】



10

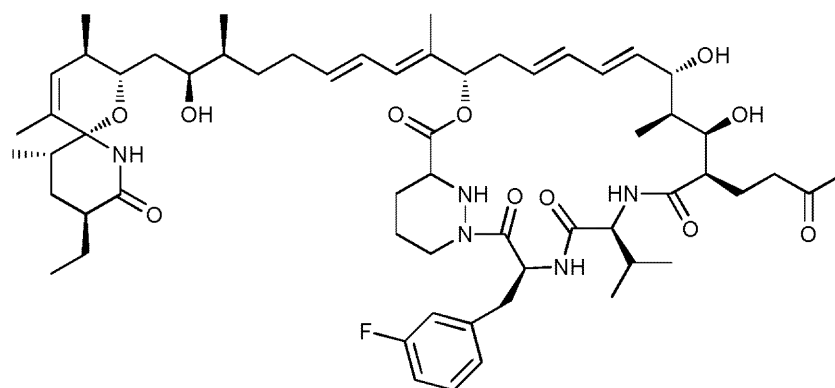
。

【 0 0 6 8 】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はFを表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

20

【 化 1 9 】



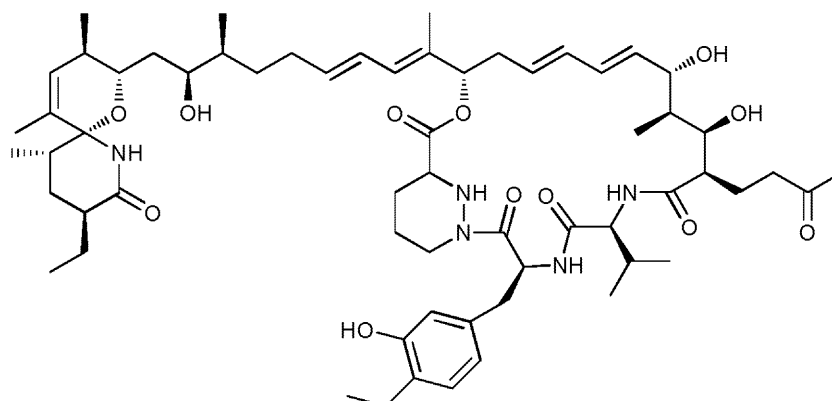
30

。

【 0 0 6 9 】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はEtを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 2 0】



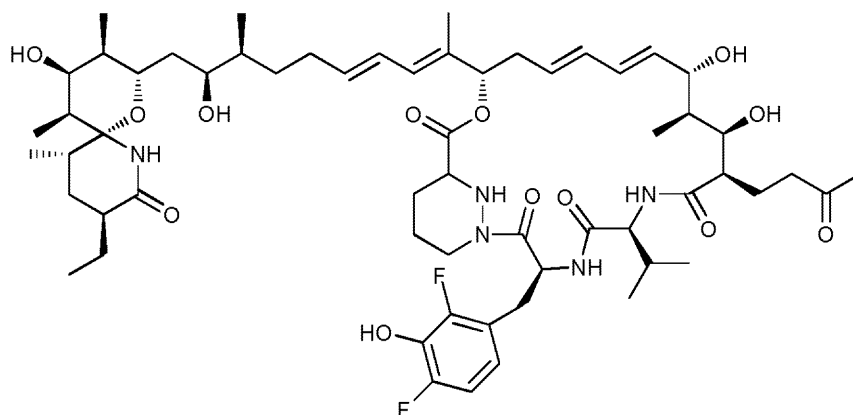
10

。

【 0 0 7 0】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はFを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はFを表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表す：

【化 2 1】



20

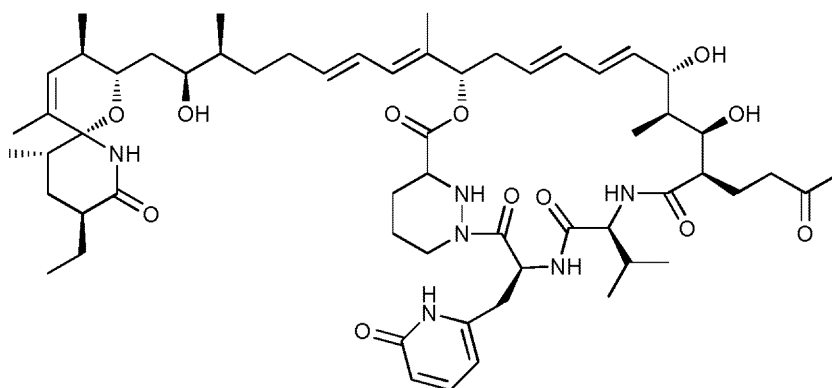
30

。

【 0 0 7 1】

下記の構造によって表されるように、本発明の好適な実施態様において、 R_1 はHを表し、 R_2 はOHを表し、 R_3 はHを表し、 R_4 はFを表し、 R_5 はHを表し、 X_1 はNを表し、かつ X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 はCを表し：

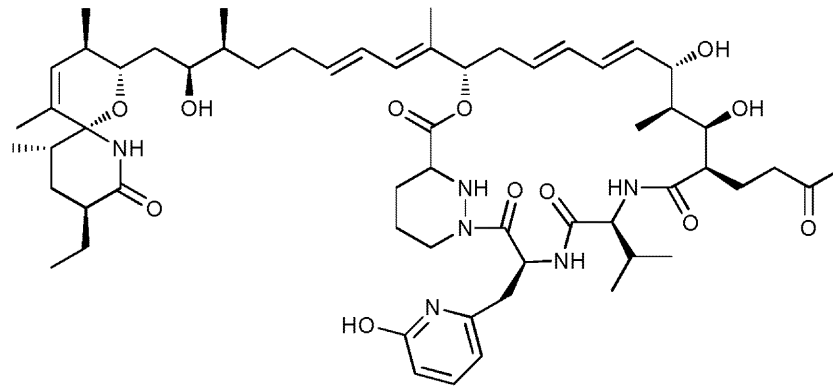
【化 2 2】



40

上記構造は、以下のように表すこともできる：

【化 2 3】



10

。

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施態様において、C26、27位の二重結合（サングリフェリンAの構造を参照）は、トランス形態ではなく、シス形態であってもよい。

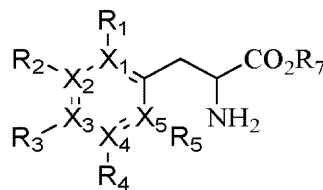
一般に、本発明の化合物は、変異合成によって製造される。

一般に、式(I)若しくは(II)のいくつかの化合物、又は医薬として許容し得るそれらの塩の製造方法は、以下を含む：

- ・サングリフェリン産生株（ストレプトマイセス属sp.A92-308110(DSM 9954としても知られる)など）の培養物、又は、より好ましくは、sfaA遺伝子又はsfaA遺伝子のホモログが不活化されているか又は欠失しているサングリフェリン産生株の培養物を、発酵プロセスに接種すること
- ・該発酵プロセスに、（式(III)で示される）メタ-チロシナナログを供給すること
- ・サングリフェリンアナログが産生されるまで、発酵を継続させること
- ・サングリフェリンアナログを抽出及び単離すること

20

【化 2 4】



式 (III)

30

（式中、 R_7 は、H又はアルキル基（例えば、Meなどの C_{1-6} アルキル）などのエステル形成基を表す。）。

【 0 0 7 3 】

式(III)における、好適な X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 基は、式(I)及び(II)の化合物について定義したとおりである。

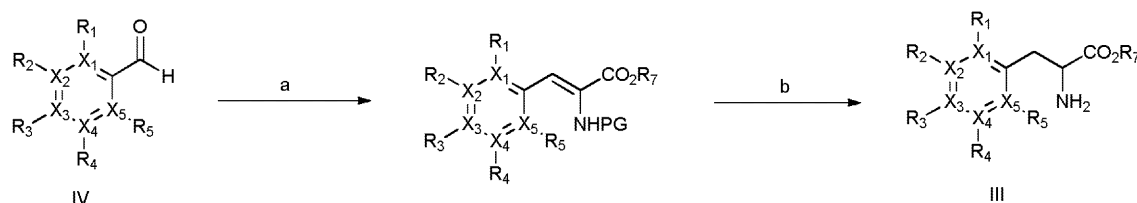
前記供給材料は、式(III)の化合物のラセミ形態又はL-形態であることができる。

【 0 0 7 4 】

式(III)の化合物は、市販されているか、又は、標準的な有機合成化学技術によって製造される。式(III)の化合物に至る1つの一般的な経路は、以下のスキーム1に示されるとおりである：

40

【化 2 5】



スキーム1：a)式(IV)のアルデヒドの好適なフラグメント（例えば、 $(\text{R}_7\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}(\text{NHPG})\text{CO}_2\text{R}_7$ ）とのカップリング、b)必要に応じて、水素化及び脱保護。PG=保護基。

10

【0075】

式(IV)のアルデヒドは、市販されているか、又は、当業者によって容易に合成され得る。式(IV)の化合物から式(III)の化合物を生成する際に、保護及び脱保護化学の利用を要する可能性がある。これらの技術は当業者に公知であり、好適な保護基は、「グリーンの有機合成における保護基 (Greene's Protective Groups in Organic Synthesis)」(Wuts及びGreene、第4版、2007)に記載されている。

【0076】

本願明細書において提供される具体的な方法及び参考文献に加えて、当業者は、合成法に関して、「ボーゲルの実用有機化学の教科書 (Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry)」(Furnissら、1989)及び「マーチの先端有機化学 (March's Advanced Organic Chemistry)」(Smith及びMarch、2001)を含むが、これらに限定されない標準的な教科書を調べることもできる。

20

【0077】

本発明の変異合成サングリフェリンアナログは、単独又は他の治療剤と組み合わせて投与できる。2種（又は、それより多い）の薬剤の共投与は、使用されるそれぞれの投与量を低減させ、それにより副作用を低減させる可能性があり、効力の向上をもたらすことができる。そのため、より高いSVR、及び耐性の低減をもたらすことができる。

【0078】

したがって、一実施態様において、前記変異合成サングリフェリンアナログは、標準治療から採用されるHCV感染の治療のための1以上の治療薬（複数可）とともに共投与される。これは、インターフェロン（例えば、 $\text{pIFN}\alpha$ 及び / 又はリバビリン）でもよい。

30

【0079】

別の実施態様において、変異合成サングリフェリンアナログは、STAT-C/DAA（特にHCVの治療を対象とした薬剤）などの1以上の他の抗ウイルス薬とともに共投与され、該抗ウイルス薬は以下の1以上であってよい：非-ヌクレオシドポリメラーゼ阻害剤（例えば、IDX375、VCH-222、BI207127、ANA598、VCH-916）、ヌクレオシド若しくはヌクレオチドポリメラーゼ阻害剤（例えば、2'-C-メチルシチジン、2'-C-メチルアデノシン、R1479、PSI-6130、R7128、R1626）、プロテアーゼ阻害剤（例えば、BILN-2061、VX-950 (Telaprevir)、SCH503034 (Boceprevir)、TMC435350、MK-7009、R7227/ITMN-191、EA-058、EA-063) 又はウイルス侵入阻害剤（例えば、PRO 206）。

40

【0080】

製剤は、都合のよいことには、単位剤形で提供することができ、薬学分野で周知の方法のいずれかによって製造することができる。そのような方法は、有効成分（本発明の化合物）を、1種以上の副成分を構成する担体と混合する工程を含む。一般的に、製剤は、有効成分を、液体担体又は微粉碎固体担体又は両方と均一かつ密接に混合し、次いで、必要な場合、生成物を成形することにより製造される。

【0081】

本発明の化合物は、通常、医薬として許容し得る剤形で、任意に非毒性の有機又は無機の酸、又は塩基、付加塩の形態にある有効成分を含む、医薬製剤の形態で経口投与されるだろう。治療すべき障害及び患者、並びに投与経路によって、組成物は種々の投与量で投

50

与され得る。

【0082】

例えば、本発明の化合物は、即放、遅延放出、又は制御放出用途のために、着香剤又は着色剤を含んでいてもよい、錠剤、カプセル剤、オビュール剤 (ovules)、エリキシル剤、液剤又は懸濁剤の形態で、経口的に、頬側の又は舌下の投与することができる。

【0083】

そのような錠剤は、以下のものを含み得る：微結晶性セルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム及びグリシンなどの賦形剤、デンプン(好ましくは、トウモロコシ、ジャガイモ又はタピオカデンプン)、デンプングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム及び特定の複合シリケートなどの崩壊剤、及びポリビニルピロリドン、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 (HPC)、スクロース、ゼラチン及びアカシアなどの造粒結合剤。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、グリセリルベヘネート及びタルクなどの滑沢剤が含まれ得る。

10

【0084】

類似の種類の実体組成物は、ゼラチンカプセル中の充填剤として利用することもできる。この点において好ましい賦形剤には、ラクトース、デンプン、セルロース、乳糖又は高分子量ポリエチレングリコールがある。水性懸濁剤及び/又はエリキシル剤では、本発明の化合物は、乳化剤及び/又は懸濁化剤とともに、並びに、水、エタノール、プロピレングリコール及びグリセリン、並びにそれらの組み合わせなどの希釈剤とともに、様々な甘味剤若しくは着香剤、着色物質又は色素と組み合わせることができる。

20

【0085】

錠剤は、任意に1種以上の副成分と共に圧縮又は成型により製造できる。圧縮錠は、好適な機械中で、結合剤(例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース)、滑沢剤、不活性な希釈剤、保存剤、崩壊剤(例えば、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋ポビドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム)、界面活性剤又は分散剤と任意に混合された、粉末又は顆粒などの自由流動形態にある有効成分を圧縮することにより製造できる。湿製錠剤は、好適な機械中で、不活性な液体希釈剤により湿らせた粉末状化合物の混合物を成型することにより製造できる。錠剤は任意にコーティング又は溝をつけてもよく、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロースを種々の比率で利用して有効成分の緩徐放出又は制御放出を与えて所望の放出プロファイルを与えるように製剤できる。

30

【0086】

経口投与に好適な本発明による製剤は、それぞれ所定量の有効成分を含む、カプセル剤、カシェ剤、若しくは錠剤などの分離した単位として；散剤若しくは顆粒剤として；水性液体若しくは非水性液体の液剤又は懸濁剤として；又は水中油型液体エマルジョン若しくは油中水型液体エマルジョンとして提供することができる。有効成分は、ポーラス、舐剤、又はペースト剤として提供することもできる。

【0087】

上記に詳細に言及された成分に加えて、本発明の製剤は、問題とする製剤の種類に関する分野に従来ある他の薬剤を含んでよく、例えば、経口投与に好適なものは着香剤を含んでよいことを理解されたい。

40

好都合なことに、保存剤及び緩衝剤などの薬剤はビヒクル中に溶かすことができる。安定性を増すために、組成物を、バイアルに充填した後に凍結でき、真空下で水が除去される。次いで、凍結乾燥された乾燥散剤をバイアルに密封し、付随する注射用の水のバイアルを供給して、使用前に液体を再構成できる。

【0088】

本発明の化合物の投与すべき用量は、特定の化合物、関与する疾病、対象、及び疾病の性質及び重症度並びに対象の肉体的状態、選択された投与経路により変わるだろう。適切な用量は当業者により容易に決定できる。

50

組成物は、投与の方法により、0.1重量%から、好ましくは5～60%、より好ましくは10～30重量%の本発明の化合物を含み得る。

【0089】

本発明の化合物の個別の用量の最適化及び間隔が、治療すべき病態の性質及び程度、投与の形態、経路、及び部位、並びに治療される特定の対象の年齢及び病態により決定され、最終的には利用すべき適切な用量を医師が決定するだろうことを当業者は認識するだろう。この用量は、適切なだけ頻繁に繰り返すことができる。副作用が現れた場合、用量の量及び/又は頻度を、通常の診療に従って、変更又は低減できる。

【0090】

本発明のさらなる態様は、以下を含む：

- 医薬として使用するための、本発明の化合物

- HCV又はHIV感染などのウイルス感染(特にRNAウイルス感染)を治療するための医薬として使用するための、抗炎症薬として使用するための、又は、臓器移植拒絶反応の予防のための、本発明の化合物

- 本発明の化合物を、医薬として許容し得る希釈剤又は担体とともに含む、医薬組成物

- 本発明の化合物を、医薬として許容し得る希釈剤又は担体とともに含む、第2の又は二次の有効成分、特にHCV若しくはHIV感染などのウイルス感染の治療に適応される有効成分、抗炎症薬として使用するための有効成分、又は、臓器移植拒絶反応の予防のための有効成分をさらに含む、医薬組成物

- 治療有効量の本発明の化合物を対象に投与することを含む、HCV若しくはHIV感染などのウイルス感染(特にRNAウイルス感染)の治療方法、抗炎症薬としての使用のための方法、又は、臓器移植拒絶反応の予防方法

- HCV若しくはHIV感染などのウイルス感染の治療のための医薬、抗炎症薬として使用するための医薬、又は、臓器移植拒絶反応の予防のための医薬の製造のための、本発明の化合物の使用

- サングリフェリン産生細菌(ストレプトマイセス属種(例えば、A92-308110)など)に、式(III)の化合物又はそれらの塩を供給すること、及び、変異合成サングリフェリンが産生されるように該細菌を培養することを含む、変異合成サングリフェリン(式(I)又は(II)の化合物など)の製造方法

- 前記サングリフェリン産生細菌が、sfaA遺伝子又はsfaA遺伝子ホモログが不活化されているか又は欠失しているストレプトマイセス属種である、前項に記載の方法

- 変異合成サングリフェリンを単離する工程をさらに含む、前二項に記載の方法。

【0091】

式(III)の新規化合物(表1に列記されているもの、及び、表1に列記されている式(III)の化合物のうちのいずれかの酸及びエステルなど)、並びに式(IV)の新規化合物も、それらの塩及びエステルを含めて、本発明の態様を形成する。

【0092】

(全般的方法)

(材料及び方法)

(菌株及び増殖条件)

BIOT-4253及びBIOT-4370とも称されるサングリフェリン産生株ストレプトマイセス属種A92-308110(DSM no 9954、ドイツ、ブラウンシュヴァイクのDSMZから購入)、又はその誘導体(BIOT-4585など)を、オートミール寒天培地、MAM、ISP4、又はISP2(下記参照)上で28℃で維持する。

【0093】

標準的なストレプトマイセス-大腸菌(Ecoli)シャトルプラスミドpKC1139は、英国のJohn Innes Centreから入手したものであり、Biermanらの文献(1992)及びKieserらの文献(2000)に記載されている。

【0094】

BIOT-4585を、オートミール寒天上で、28℃で7～10日間増殖させた。寒天板の表面の胞

10

20

30

40

50

子を、蒸留水中の20%w/v滅菌グリセロールに回収し、0.5mlのアリコートで-80 で保存した。凍結孢子ストックを、シード培地SGS又はSM25-3の接種に使用した。接種されたシード培地を、5.0又は2.5 cmの行程で200~300 rpmで振盪しながら、27 で24時間インキュベートした。発酵培地SGP-2又はBT6を2.5%~10%のシード培養物により接種し、5又は2.5 cmの行程で200~300 rpmで振盪しながら、24 で4~5日間インキュベートした。次いで、培養物を抽出のために回収した。

【 0 0 9 5 】

(メタ-チロシナナログ)

メチル(2S)-2-アミノ-3-(6-ヒドロキシ(2-ピリジル))プロパノアート、L-3-アミノフェニルアラニンメチルエステル、L-4-メチル-メタ-チロシンメチルエステル、L-4-フルオロ-メタ-チロシンメチルエステル及びL-4,5-ジフルオロ-メタ-チロシンメチルエステルは、Netchem社(米国)から購入した。

10

DL-3-フルオロフェニルアラニン及びL-フェニルアラニンは、Sigma社(英国)から購入した。

DL-メタ-チロシンは、Fluorochem社(英国)から購入した。

L-メタ-チロシンは、Alfa Aesar社(英国)から購入した。

【 0 0 9 6 】

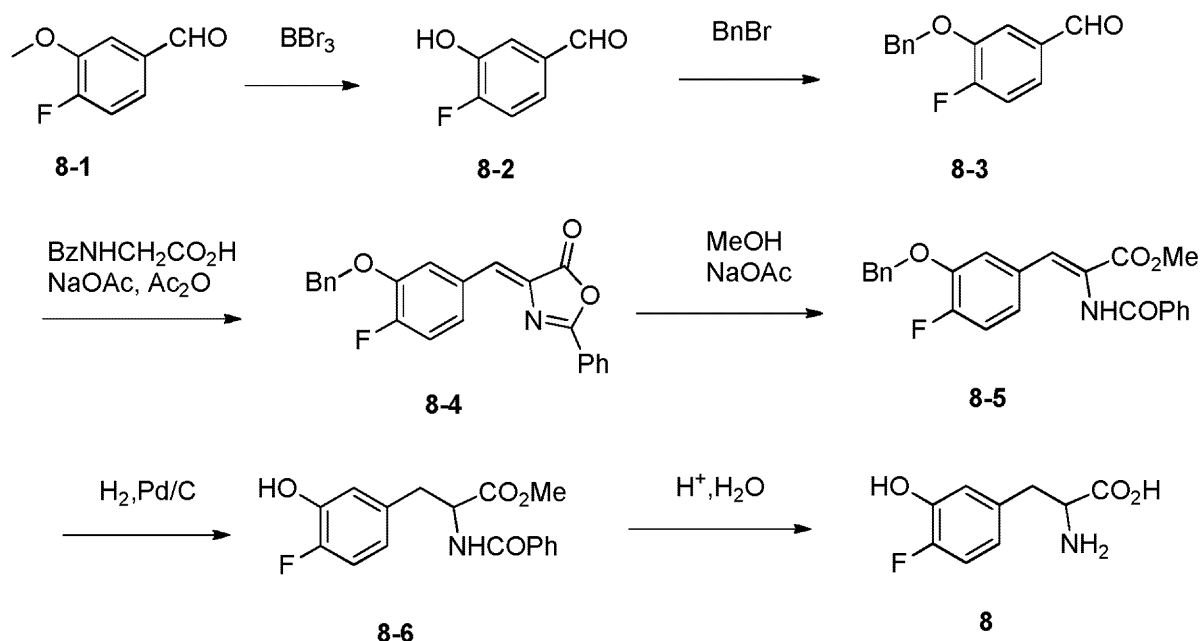
DL-4-フルオロメタ-チロシン(8)、DL-5-フルオロメタ-チロシン(9)、メチル2-アミノ-3-(3-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパノアート(10)、メチル2-アミノ-3-(2-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパノアート(11)、メチル2-アミノ-3-(2-フルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート(12)及びメチル2-アミノ-3-(2,6-ジフルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート(13)は、以下のように合成した。

20

【 0 0 9 7 】

DL-4-フルオロメタ-チロシン(8)

【 化 2 6 】



30

40

【 0 0 9 8 】

8-1(3g、19.5mmol)の乾燥DCM(150mL)溶液に、 BBr_3 (DCM中4M、14.6ml、58.5mmol)を-70 で滴加した。該添加の後、該反応混合物を-20 で3時間攪拌し、氷水を注意深く加え、DCMで抽出した。該有機層を水及びブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過して、濃縮した。該残渣をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、所望の化合物8-2を与えた。

【 0 0 9 9 】

50

8-2(0.9g、6.4mmol)のアセトン(40mL)溶液に、 K_2CO_3 (2.2g、16mmol)を室温で加えた。該反応混合物を室温で一晩撹拌した。水を加え、アセトンを真空下で除去し、次いでEtOAcで抽出し、該有機層を水及びブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過して、濃縮した。該残渣をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、所望の化合物8-3を与えた。

【0100】

8-3(1g、4.34mmol)、馬尿酸(860mg、4.80mmol)、NaOAc(400mg)及び Ac_2O (2.2mL)の混合物を80℃で2時間撹拌した。該黄色の反応混合物を冷却し、冷やしたEtOH(10mL)を加え、該混合物を氷浴中で15分間冷却し、次いで30mLの氷水に注ぎ入れ、冷却し、該生成物を濾過により回収した。該固体を真空中で乾燥し、8-4を得た。

10

【0101】

8-4(300mg、0.8mmol)及びNaOAc(71mg、0.87mmol)のMeOH(50mL)溶液を室温で一晩撹拌した。該溶媒を回転蒸発により除去し、該残渣をEtOAc 50mL中に溶解し、該EtOAc溶液を水で2回洗浄し、濃縮して8-5を与えた。

【0102】

8-5(360mg、0.89mmol)のMeOH(50mL)溶液を、常圧で20時間、10%Pd/C(77mg)上で水素化した。濾過により触媒を除去した後、該溶媒を蒸発させて生成物8-6を与えた。

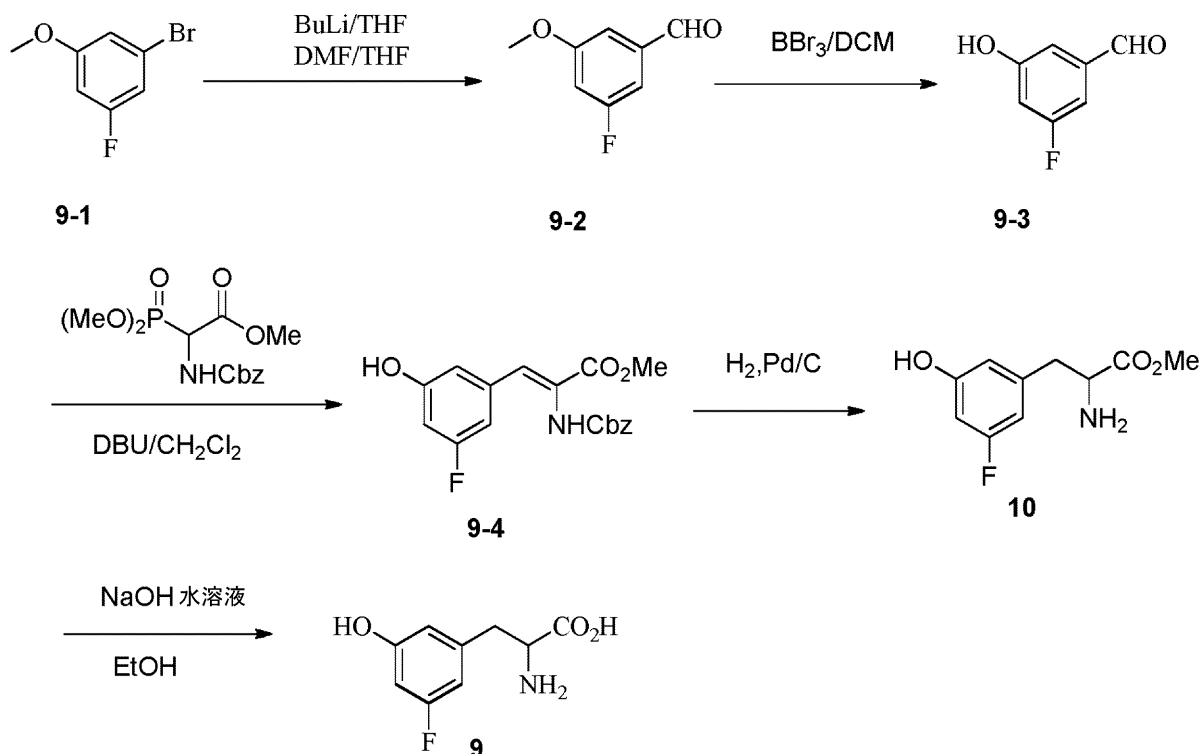
8-6(210mg)の3N HCl(10mL)溶液を24時間還流した。該溶液を濃縮して乾燥させ、該残渣を逆-コンピフラッシュにより精製して対象生成物8を与えた。

20

【0103】

DL-5-フルオロメタ-チロシン(9)及びメチル2-アミノ-3-(3-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパノアート(10)

【化27】



30

40

【0104】

9-1(20g、97.55mmol)のテトラヒドロフラン(100mL)溶液に、n-ブチルリチウム(43mL、2.5M、107.3mmol)を-78℃で滴加した。それを30分間撹拌し、N,N-ジメチルホルムアミド(15.1mL、195.1mmol)をこの温度で加えた。それをさらに30分間撹拌し、冷浴を外した。1時間後、該反応物を飽和塩化アンモニウム水溶液でクエンチした。該有機層を水及び飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥し(硫酸ナトリウム)、濾過して、濃縮した。該残渣を

50

シリカ上のクロマトグラフィーにより精製し9-2を与えた。

【0105】

9-2(6g、38.9mmol)の乾燥DCM(200mL)溶液に、 BBr_3 (DCM中4M、30mL、116.8mmol)を-70で滴加した。該添加の後、該反応混合物を-20で3時間攪拌し、氷水を注意深く加え、DCMで抽出した。該有機層を水及びブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過して、濃縮した。該残渣をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、所望の化合物9-3を与えた。

【0106】

メチル2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-(ジメトキシホスホリル)アセテート(4.64g、14mmol)のDCM(150mL)溶液に、室温でDBU(4.26g、28mmol)を加えた。10分後、9-3(1.95g、14mmol)を加え、得られた混合物を室温で一晩攪拌した。該溶液をEtOAc(150mL)で希釈し、分離して該有機層を1N HClで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過して、濃縮した。該残渣をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、9-4を与えた。

10

【0107】

9-4(1g)のMeOH(20mL)溶液を、常圧で一晩、200mgの10%Pd/C上で水素化した。濾過により触媒を除去した後、該溶媒を蒸発させて、10を与えた。

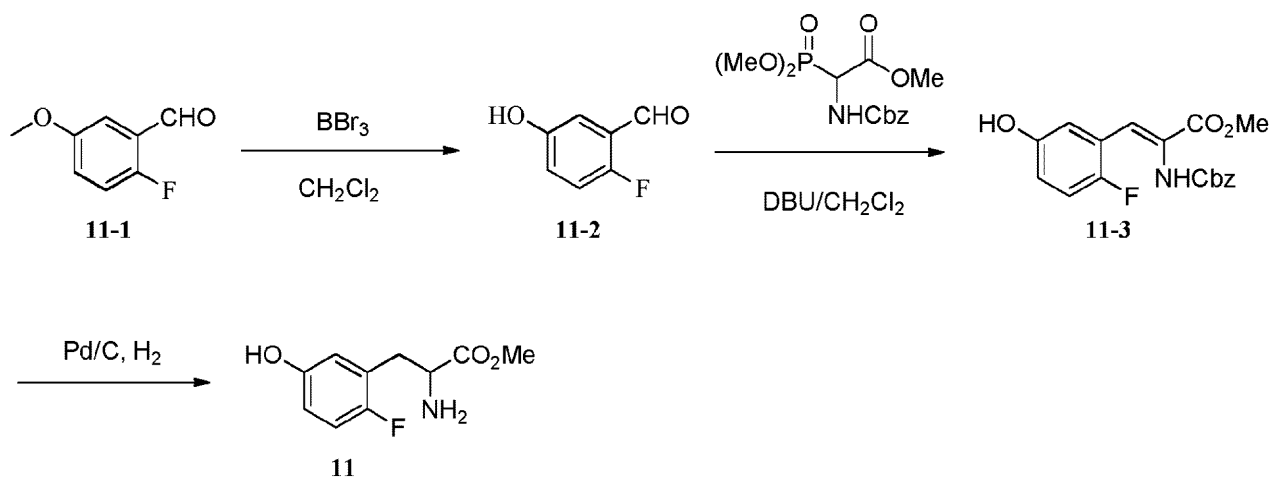
10(300mg、1.4mmol)のEtOH(30mL)溶液に、NaOH水溶液(2N、4mL)を加え、該反応物を室温で30分間攪拌した。該溶媒を除去し、該残渣を2N HClでpH=6に中和し、形成された白色結晶を濾過により回収し、対象化合物9を与えた。

20

【0108】

メチル2-アミノ-3-(2-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパノアート(11)

【化28】



30

【0109】

化合物11-1(1.4g、9mmol)の50mL DCM溶液に、 BBr_3 (DCM中4M、3.6mL、13.5mmol)を-78で滴加した。該添加の後、該反応物を-20で4時間攪拌した。次いで、氷/水をゆっくり添加し、該層を分離し、該有機層を水及びブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、蒸発乾固させた。該残渣を、さらに精製することなく次の工程に使用した。

40

【0110】

メチル2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-(ジメトキシホスホリル)アセテート(3g、9mmol)の100mL DCM溶液に、DBU(2.8g、18mmol)を室温に加え、10分後、化合物11-2(前工程からの粗製化合物)を加え、室温で2時間攪拌した。次いで、該溶液をDCM(50mL)で希釈し、1N HCl(20mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、蒸発乾固させた。該残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(石油エーテル/酢酸エチル=5/1)により精製し、11-3を与えた。

【0111】

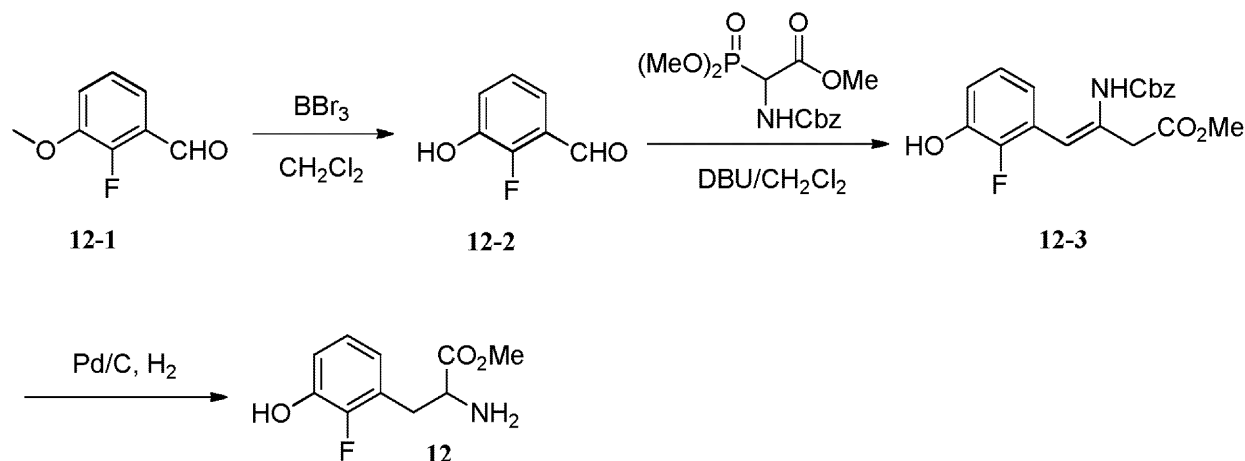
化合物11-3(500mg、1.5mmol)のMeOH(20mL)中の混合物を、常圧で一晩、50mgの10%Pd/C上で水素化した。濾過により触媒を除去した後、該溶媒を蒸発させて粗生成物を得て、これを逆-コンピフラッシュにより精製し、11を白色固体として得た。

50

【 0 1 1 2 】

メチル2-アミノ-3-(2-フルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート(12)

【 化 2 9 】



10

【 0 1 1 3 】

化合物12-1(1.4g、9mmol)の50mL DCM溶液に、 BBr_3 (DCM中4M、3.6mL、13.5mmol)を-78で滴加した。該添加の後、該反応物を-20で4時間撹拌した。氷/水をゆっくり添加した後、該層を分離し、該有機層を水及びブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、蒸発乾固させた。該残渣を、さらに精製することなく次の工程に使用した。

20

【 0 1 1 4 】

メチル2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-(ジメトキシホスホリル)アセテート(3g、9mmol)の100mL DCM溶液に、DBU(2.7mL、18mmol)を室温に加え、10分後、化合物12-2(前工程からの粗製化合物)を加え、室温で2時間撹拌した。次いで、該溶液をDCM(100mL)で希釈し、1N HCl(30mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、蒸発乾固させた。該残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(石油エーテル/酢酸エチル=5/1)により精製し、12-3を与えた。

【 0 1 1 5 】

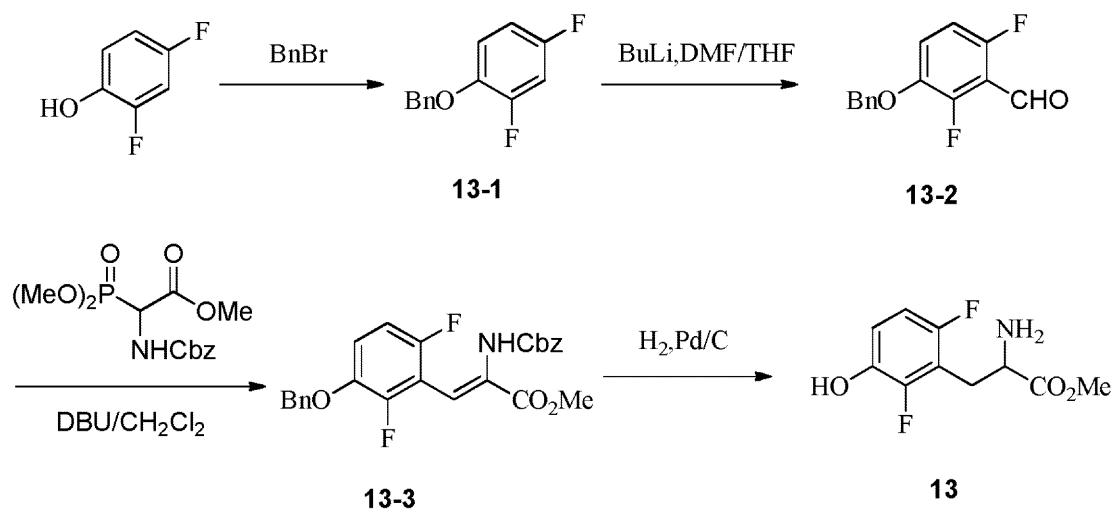
化合物12-3(500mg、1.44mmol)のMeOH(10mL)中の混合物を、常圧で一晩、100mgの10%Pd/C上で水素化した。濾過により触媒を除去した後、該溶媒を蒸発させて粗生成物を得て、これを逆-コンピフラッシュにより精製し、所望の化合物12を白色固体として得た。

30

【 0 1 1 6 】

メチル2-アミノ-3-(2,6-ジフルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート(13)

【 化 3 0 】



40

【 0 1 1 7 】

2,4-ジフルオロフェノール(2g、15.4mmol)の50mL DMF溶液に、 K_2CO_3 (3.2g、23.1mmol)

50

及びBnBr(2.2mL、18.5mmol)を0 で加えた。該反応物を室温で2時間撹拌した。水(100mL)及びEA(200mL)を加え、該有機層を、水(50mL)及びブライン(50mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発乾固させた。該残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(石油エーテル/酢酸エチル=10/1)により精製し、粗製の13-1を与えた。

【0118】

化合物13-1(2g、9mmol)の10mL THF溶液に、n-BuLi(4mL、2.5M)を-78 で滴加し、30分間撹拌した。DMF(1.3g、0.018mmol)を加え、再度30分間撹拌した。次いで、冷浴を外し、該反応混合物を室温で1時間撹拌し、その後、水でクエンチした。それを酢酸エチル(20mL、3回)で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発乾固させた。該残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(石油エーテル/酢酸エチル=10/1)により精製し、13-2を黄色の固体として与えた。

10

【0119】

メチル2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-(ジメトキシホスホリル)アセテート(728mg、2.2mmol)の20mL DCM溶液に、DBU(319mg、2.1mmol)を室温に加えた。10分後、化合物13-2(500mg、2mmol)を加え、室温で2時間撹拌した。次いで、該溶液をDCM(50mL)で希釈し、1N HCl(20mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発乾固させた。該残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(石油エーテル/酢酸エチル=5/1)により精製し、13-3を黄色の油として与えた。

【0120】

MeOH(20mL)中の化合物13-3(600mg、1.32mmol)を、常圧で一晩、60mgの10%Pd/C上で水素化した。濾過により触媒を除去した後、該溶媒を蒸発させて粗生成物を得て、これを逆-

20

【0121】

(培地処方)

培地の調製に使用した水は、Millipore Elix Analytical Grade Water Purification Systemを使用して調製した。

【0122】

【表 1】

SGS 種培地

成分（及び 供給業者）	処方		
グルコース(Sigma, G7021)	7.50	g	
グリセロール(Fisher scientific, G/0650/25)	7.50	g	
酵母エキス(Becton Dickinson, 212770)	1.35	g	10
麦芽エキス(Becton Dickinson, 218630)	3.75	g	
ジャガイモ デンプン(可溶性)(Sigma, S2004)	7.50	g	
NZ-アミンA (Sigma, C0626)	2.50	g	
きな粉 Nutrisoy (ADM, 063-160)	2.50	g	
L-アスパラギン(Sigma, A0884)	1.00	g	20
CaCO ₃ (Calcitec, V/40S)	0.05	g	
NaCl (Fisher scientific, S/3160/65)	0.05	g	
KH ₂ PO ₄ (Sigma, P3786)	0.25	g	
K ₂ HPO ₄ (Sigma, P5379)	0.50	g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, M7774)	0.10	g	
微量成分 溶液B	1.00	mL	30
寒天	1.00	g	
SAG471 消泡剤 (GE Silicones, SAG471)	* 0.20	mL	
RO H ₂ O	右記の最終体積に	** 1.00	L
滅菌前のpH は、10M NaOH/10M H ₂ SO ₄ でpH 7.0に調整した			
121℃、20～30分加熱により滅菌（オートクレーブ処理）			

備考

*消泡剤はシードファーメンターにのみ使用、シードフラスコには使用せず

**最終体積を適宜調整してシード体積とする

【表 2】

微量成分 溶液B

成分	処方		
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, F8633)	5.00	g	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, Z0251)	4.00	g	
MnCl ₂ ·4H ₂ O (Sigma, M8530)	2.00	g	
CuSO ₄ ·5H ₂ O (Aldrich, 20,919-8)	0.20	g	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (Fisher scientific, A/5720/48)	0.20	g	
CoCl ₂ ·6H ₂ O (Sigma, C2644)	0.10	g	20
H ₃ BO ₃ (Sigma, B6768)	0.10	g	
KI (Alfa Aesar, A12704)	0.05	g	
H ₂ SO ₄ (95%) (Fluka, 84720)	1.00	mL	
RO H ₂ O	右記の最終体積に	1.00	L

【 0 1 2 4 】

【表 3】

SGP2 産生培地

成分	処方			
きな粉 (Nutrisoy) (ADM, 063-160)	20.00	g		30
グリセロール (Fisher scientific, G/0650/25)	40.00	g		
MES 緩衝液 (Acros, 172595000)	19.52	g		
SAG471 消泡剤 (GE Silicones, SAG471)	*0.20	mL		
RO H ₂ O	右記の最終体積に	**1.00	L	
滅菌前のpHは、10M NaOHでpH 6.8に調整 121℃、20～30分加熱により滅菌 (オートクレーブ処理)				40

備考

*最終体積を適宜調整してシード体積とする

**消泡剤はファーマンターにのみ使用し、フラスコには使用しなかった

【 0 1 2 5 】

【 表 4 】

SM25-3 培地

成分

グリセロール(Fisher scientific, G/0650/25) 40g

大豆ペプトン A3 SC (Organotechnie) 10g

麦芽エキス (Difco) 21g

10

1Lの最終体積に

滅菌前のpHは調整せず (即ち pH 7.0)

【 0 1 2 6 】

【 表 5 】

ISP4 培地

成分

可溶性 デンプン (Difco) 10g

K₂HPO₄ 1gMgSO₄·7H₂O 1g

NaCl 1g

(NH₄)₂SO₄ 2gCaCO₃ 2g

ISP 微量 塩 溶液 1mL

寒天 20g

1Lの最終体積に

少量の冷水中でデンプンによりペースト化し、500mlの体積にする

水500ml中の第2溶液に他の成分を加え、pHはpH 7.0～

pH 7.4 (pH 7.3)のはずであり、2つの溶液を一緒に混合し、寒天を加える

40

【 0 1 2 7 】

【表 6】

ISP 微量 塩

成分

FeSO ₄ ·7H ₂ O	1g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1g

1Lの最終体積に

10

4℃で保管

【0128】

(全般的な発酵方法)

BIOT-4585の凍結保存孢子ストックを室温で解凍した。増殖性培養(種培養)は、孢子ストック4.0mLを、フォームプラグを備えた2Lのエrlenマイヤーフラスコ中のSM25培地400 mLに移すことによって調製した。培養は、27℃、250rpm(5.0cm行程)で48時間行った。該種培養から、25mLを、フォームプラグを備えた2Lのエrlenマイヤーフラスコ中の250mLの産生培地SGP2+5%HP20に移した。24℃、250rpm(2.5cm行程)での24時間の培養の後、各産生フラスコに、1Mの塩酸中の、所望の前駆体の250mMのラセミ溶液又は125mMの鏡像異性的に純粋な溶液を2mL、及び、250mMのDL-ピペラジン酸のメタノール溶液を2mL加えて、前駆体のそれぞれの鏡像異性体の最終濃度を1mMとした。24℃、250rpm(2.5cm行程)で、さらに4日間、培養を続けた。

20

【0129】

(LC-UV及びLC-UV-MSによる培養プロスの分析)

培養プロス(1 mL)及び酢酸エチル(1 mL)を加え、15～30分間混合し、次いで10分間遠心分離する。0.4 mLの有機層を回収し、蒸発乾固させ、次いで0.20 mLのアセトニトリルに再溶解させる。

HPLC条件：

30

C18 Hyperclone BDS C18 カラム 3μ, 4.6 mm×150 mm

Phenomenex Analytical C18 Security Guard Cartridge(KJ0-4282)を備える

カラム温度50

流速1 mL/分

240 nmで紫外モニター

20 μLアリコートを注入

【0130】

溶媒勾配：

0分：55% B

1.0分：55% B

6.5分：100% B

10.0分：100% B

10.05分：55% B

13.0分：55% B

40

【0131】

溶媒Aは、水+0.1%ギ酸である。

溶媒Bは、アセトニトリル+0.1%ギ酸である。

これらの条件下でSfAは5.5分に溶離する。

これらの条件下でSfBは6.5分に溶離する。

【0132】

50

LCMSは、上述のクロマトグラフィー及び溶媒を利用する、ポジティブイオンモードで運転しているBruker Daltonics Esquire 3000+ エレクトロスプレー質量分析器と組み合わせた一体型Agilent HP1100 HPLCシステムで実施する。

【 0 1 3 3 】

(QC LC-MS法)

(HPLC条件)

C18 Hyperclone BDS C18カラム3 μ , 4.6 mm $\times$ 150 mm

Phenomenex Analytical C18 Security Guard Cartridge (KJ0-4282)を備える

カラム温度50

流速1 mL/分

210、240、及び254 nmで紫外モニター

【 0 1 3 4 】

溶媒勾配 :

0分 : 10% B

2.0分 : 10% B

15分 : 100% B

17分 : 100% B

17.05分 : 10% B

20分 : 10% B

溶媒Aは、水+0.1% ギ酸である。

溶媒Bは、アセトニトリル+0.1% ギ酸である。

【 0 1 3 5 】

(MS条件)

MSは、150 ~ 1500amuをスキャンする、スイッチングモード(ポジティブとネガティブの間をスイッチング)で運転する。

【 0 1 3 6 】

(インピトロ分析LC-MS法(例えば、ミクロソーム安定性試験用))

API-2000、API-4000又はUPLC装置を使用

HPLC条件 :

15用 : ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 $\times$ 50 mm, 1.7 μ m)

化合物5、14、16、17、18、19用 Ultimate XB-C18 (2.1 $\times$ 50 mm, 5 μ m) カラム温度50

流速0.6 mL/分

【 0 1 3 7 】

溶媒勾配A1 (例えば、化合物15用):

0.2 分 : 20% B

0.6 分 : 95% B

1.1 分 : 95% B

1.15 分 : 20% B

1.5 分 : 停止

溶媒Aは、H₂O-0.025% FA-1mM NH₄OACである。

溶媒Bは、ACN-0.025% FA-1mM NH₄OACである。

【 0 1 3 8 】

溶媒勾配A2 (例えば、化合物5、14、16、17、18、19用):

0.3 分 : 10% B

0.8 分 : 95% B

2.3 分 : 95% B

2.31 分 : 10% B

3.5 分 : 停止

溶媒Aは、H₂O-0.1% FAである。

溶媒Bは、MeOH-0.1% FAである。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 9 】

ネガティブスキャンモード:

【 表 7 】

MRM セットアップ:

トランジション[Da]

21 1089.7 → 504.2

【 0 1 4 0 】

ポジティブスキャンモード:

【 表 8 】

MRM セットアップ:

トランジション[Da]

5 1090.6 → 1054.6

14 1108.9 → 1072.5

15 1126.7 → 1090.0

16 1108.8 → 1072.3

17 1104.5 → 1068.5

18 1074.6 → 1038.8

【 0 1 4 1 】

(HCV抗ウイルス活性の評価のためのインビトロレプリコンアッセイ)

遺伝子型1HCVに対する抗ウイルス効果を下記のように試験できる: 試験物質の添加の1日前に、HCV遺伝子型1b 1389luc-ubi-neo/NS3-3'/5.1レプリコン(Vrolijkら、2003)を含み、細胞増殖培地[10% FCS、1%非必須アミノ酸(11140035)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン(15140148)、及び2%ジェネティシン(10131027)を補ったDMEM(カタログ番号41965039) Invitrogen社製]中で1.3~1.4の比で継代し、3~4日間75mLの組織培養フラスコ(Techno Plastic Products社製)で増殖させたHuh5.2細胞を回収し、6500細胞/ウェル(100 µL/ウェル)の密度で96-ウェル組織培養マイクロタイタープレート(抗代謝効果の評価にはFalcon、Beckton Dickinson社製、抗ウイルス効果の評価にはCulturPlate、Perkin Elmer社製)中で、アッセイ培地(DMEM、10% FCS、1%非必須アミノ酸、1%ペニシリン/ストレプトマイシン)に播種した。マイクロタイタープレートを一晩インキュベートすると(37 °C、5% CO₂、相対湿度95~99%)、非コンフルエントな細胞単層を生じる。希釈系列を準備する; 各希釈系列を少なくとも二連で実施する。アッセイのセットアップ後に、マイクロタイタープレートを72時間(37 °C、5% CO₂、相対湿度95~99%)インキュベートする。

【 0 1 4 2 】

抗代謝効果の評価のために、アッセイ培地を吸引し、フェノールレッド不含培地中の75 µLの5% MTS(Promega社製)溶液と替え、1.5時間(37 °C、5% CO₂、相対湿度95~99%)インキュベートする。吸光度を498nmの波長で測定し(Safire²、Tecan社製)、光学濃度(OD値)を、非処理対照のパーセンテージに変換する。

【 0 1 4 3 】

抗ウイルス効果の評価には、アッセイ培地を吸引し、細胞単層をPBSにより洗浄する。洗浄バッファを吸引し、25 µLのGlo Lysis Buffer(カタログ番号E2661、Promega社製)を加え、その後室温で5分間溶解を進行させる。その後、50 µLのLuciferase Assay System(カタログ番号E1501、Promega社製)を加え、ルシフェラーゼ発光シグナルを直ちに定量化

10

20

30

40

50

する(1000ms積分時間/ウェル、Safire²、Tecan社製)。相対発光単位を非処理対照のパーセンテージに変換する。

【0144】

EC₅₀及びEC₉₀(用量-反応曲線から得られる値)は、それぞれ、ウイルス複製の50%及び90%の阻害が観察される濃度を表す。CC50(用量-反応曲線から得られる値)は、細胞の代謝活性が非処理細胞の代謝活性の50%に低下する濃度を表す。選択指数(SI)は、化合物の治療域を表すものであるが、CC₅₀/EC₅₀として計算する。

【0145】

ある濃度の化合物は、その特定の濃度で抗レプリコン効果が閾値の70%を超え、代謝活性の30%以下の低減が見られる場合に、HCVレプリコン系における真の抗ウイルス効果を惹起すると考えられる。

10

結果については、実施例12を参照されたい。

【0146】

(遺伝子型1a及び2aにおけるHCV抗ウイルス活性の評価のためのインビトロレプリコンアッセイ)

レプリコン細胞(遺伝子型1a(H77)及び2a(JFH-1)のサブゲノムレプリコン)を、ダルベッコ改変基本培地(DMEM)、10%ウシ胎仔血清(FBS)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(pen-strep)、1%グルタミン、1%非必須アミノ酸、250 µg/ml G418で、5%CO₂のインキュベーターにおいて37 °Cで増殖させる。すべての細胞培養試薬は、Mediatech社(ハーンドン、VA)から購入できる。

20

【0147】

該レプリコン細胞をトリプシン処理し、G418を含まない上記培地を備えた96-ウェルプレートに、5×10³細胞/ウェルで、播種する。その翌日に、前記培地を、5%FBSの存在下で連続希釈された化合物を含むDMEMに替える。HCVレプリコン抗ウイルスアッセイは、段階的な化合物希釈液において、化合物の効果を試験する。簡単に言うと、HCVレプリコンを含む細胞を、96-ウェルプレートに播種する。試験物質をDMEM+5%FBSで連続的に希釈する。該希釈された化合物を、前記プレートの適切なウェルに適用する。37 °C、72時間のインキュベーションの後、該細胞をプロセッシングする。各ウェルからの細胞内RNAを、RNeasy 96キット(Qiagen社)を用いて抽出する。HCV RNAのレベルを、先に説明されたように(Vrolijkら、2003)、TaqMan (登録商標) One-Step RT-PCR Master Mix Reagents(Applied Biosystems社、フォスターシティ、CA)及びABI Prism 7900配列検出システム(Applied Biosystems社)を用いる、逆転写-リアルタイムPCRアッセイにより測定する。細胞傷害性効果は、TaqMan (登録商標) Ribosomal RNA Control Reagents(Applied Biosystems社)を用いて、細胞数の示度として測定する。次いで、HCV RNA及びリボソームRNAの量を利用して、該当するIC₅₀値(レプリコン複製を50%阻害する濃度)を得る。

30

【0148】

(ミクロソーム代謝の評価(ミクロソーム安定性試験))

ミクロソームにおける代謝率は、以下のように分析できる:

マウス又はヒト肝臓ミクロソームを、緩衝液C(0.1Mリン酸カリウム緩衝液、1.0mM EDTA、pH7.4)で、2.5mg/mLの濃度まで希釈した。次いで、5 µMの化合物添加溶液(ACN9.5 µL中の10mM DMSOストック溶液0.5 µLが、緩衝液C 990 µLに加えられる。)50 µLを、ミクロソーム溶液(2.5mg/mL)50 µL、緩衝液C 110 µLに加えることによってミクロソーム安定性試料を調製し、よく混合した。全ての試料を、37 °Cでおよそ15分間ブレインキュベートした。この後、NADPH溶液(12.5mM)40 µLを、穏やかにかき混ぜながら加えることにより、反応を開始した。アリコート(40 µL)を、0、15、30、45及び60分で移し、内部標準を含むACN(120 µL)でクエンチした。タンパク質を遠心分離(4000rpm、15分)により除去し、LC-MS/MSにより、試料プレートを化合物濃度について分析した。次いで、分析物の濃度を元々存在していた量と比較する標準法により、半減期を計算した。

40

結果については、実施例13を参照されたい。

【0149】

50

(肝細胞安定性評価)

予め液体窒素中に保存しておいた凍結保存肝細胞を、 37 ± 1 の振盪水浴に2分 $\pm$ 15秒間置く。次いで、該肝細胞を、10X体積の予め温めておいたKrebs-Henseleit重炭酸塩(KHB)緩衝液(2000mg/Lグルコース。炭酸カルシウム及び炭酸水素ナトリウム不含。Sigma社)に加え、穏やかにかき混ぜ、500rpmで3分間遠心分離する。遠心分離後、該上清を注意深く除去し、10X体積の予め温めておいたKHB緩衝液を加えて細胞ペレットを再懸濁する。これを穏やかにかき混ぜて、500rpmで3分間遠心分離する。次いで、該上清を除去し、廃棄する。次いで、細胞生存率及び収率を、細胞数により決定し、これらの値を利用してヒト肝細胞懸濁液を作成し適切な播種密度(生存細胞密度= 2×10^6 細胞/mL)にする。2Xの投薬溶液を、予め温めておいたKHB(1%DMSO)中で調製する(200 μ M添加溶液:DMSO 980 μ Lに基質ストック溶液(10mM)20 μ L、2X投薬溶液:KHB 990 μ Lに200 μ M添加溶液10 μ L(希釈後2 μ M))。 10

【0150】

予め温めておいた2X投薬溶液50 μ Lをウェルに添加し、予め温めておいた肝細胞溶液(2×10^6 細胞/mL)50 μ Lを添加して、計時を開始する。次いで、プレートを37 でインキュベートする。内部標準を含むアセトニトリル100 μ Lを、インキュベーション時間(0、15、30、60及び120分)の終了後に各ウェルに添加し、穏やかにかき混ぜ、予め温めておいた肝細胞溶液50 μ Lを添加する(2×10^6 細胞/mL)。インキュベーション終了時に、細胞生存率を測定する。試料を、4、4000rpmで15分間遠心分離し、上清を超純水で2倍に希釈し、化合物レベルをLC-MS/MSにより分析する。 20

【0151】

(水への溶解度の評価)

水への溶解度を下記のように試験できる：サングリフェリンアナログの10 mMストック溶液を室温で100% DMSOにおいて調製する。三連の0.01 mLのアリコート、アンバーバイアル中で、pH 7.3の0.1 M PBS溶液又は100% DMSOにより0.5mLにする。得られた0.2 mM溶液を、IKA (登録商標) vibrax VXRシェーカーで、室温で6時間振盪し、次いで得られた溶液又は懸濁液を2 mLエッペンドルフチューブに移し、13200 rpmで30分間遠心分離する。次いで、上清液体のアリコートを上述のLCMS法により分析する。

【0152】

或いは、pH7.4のPBSへの溶解度を下記のように試験できる：被験化合物及び対照化合物を、50%MeOH水溶液により40 μ M、16 μ M、4 μ M、1.6 μ M、0.4 μ M、0.16 μ M、0.04 μ M、及び0.002 μ Mに希釈することにより、検量線を作成する。次いで、基準点をMeOH:PBS 1:1により1:20にさらに希釈する。1:20希釈後の最終濃度は、2000nM、800nM、200nM、80nM、20nM、8nM、2nM、及び1nMである。次いで、基準を、内部標準(ヒドロキシマクロ環、6)を含む同体積(1:1)のACNと混合する。試料を遠心分離し(5分間、12000rpm)、次いでLC/MSにより分析する。 30

【0153】

【表 9】

	溶液 (uL)	MeOH/ H ₂ O(1:1) (uL)		検量線用 溶液 (uM)	溶液 (uL)	MeOH/緩衝 液 (1:1) (uL)		最終溶液 (nM)
10mM	10	240	→	400				
400uM	50	450	→	40	20	380	→	2000
	20	480	→	16	20	380	→	800
40uM	50	450	→	4	20	380	→	200
16uM	50	450	→	1.6	20	380	→	80
4uM	50	450	→	0.4	20	380	→	20
1.6uM	50	450	→	0.16	20	380	→	8
0.4uM	50	450	→	0.04	20	380	→	2
0.04uM	50	950	→	0.002	20	380	→	1

10

20

【 0 1 5 4 】

被験化合物を、10mMの濃度でDMSO中のストック溶液として調製する。ストック溶液を、二連で、1.5mLエッペンドルフチューブ中でpH7.4のPBSに希釈して、最終DMSO濃度1%で100 μMの標的濃度にする(例えば、4 μLの10mM DMSOストック溶液を396 μLの100mMリン酸緩衝液に入れる)。次いで、試料チューブを室温で穏やかに4時間振盪する。試料を遠心分離し(10分間、15000rpm)、未溶解の粒子を沈殿させる。上清を新しいチューブに移し、PBSで希釈する(各被験物質の希釈率は、利用される分析装置での化合物のシグナルレベルにより確認する)。次いで、希釈した試料を、同体積(1:1)のMeOHと混合する。最後に、試料を、LC-MS/MS分析用の内部標準(ヒドロキシマクロ環、6)を含む同体積(1:1)のACNと混合する。

30

【 0 1 5 5 】

(細胞透過性の評価)

細胞透過性を下記のように試験できる：被験化合物をDMSOに溶かして10mMにし、次いで緩衝液にさらに希釈して、最終10 μM投薬濃度を与える。蛍光マーカールシファニーエロームも含めて、膜統合性をモニターする。次いで、被験化合物をCaco-2細胞単層の頂端膜側にアプライし、基底面コンパートメントへの化合物透過を測定する。これを逆方向に実施し(基底面から頂端へ)、能動輸送を調べる。LC-MS/MSを利用して、被験化合物及び標準対照化合物(プロパノロール及びアセプトロールなど)の両方のレベルを定量化する。

40

【 0 1 5 6 】

(薬物動態のインビボ評価)

インビボアッセイを利用して、化合物のバイオアベイラビリティを測定することもできる。一般的に、化合物を、静脈内(i.v.)及び経口的(p.o.)の両方で試験動物(例えば、マウス又はラット)に投与し、一定間隔で採血して、薬物の血漿濃度が時間とともに変動する様子を調査する。経時的な血漿濃度の経時変化を利用して、標準モデルを利用して化合物の絶対的なバイオアベイラビリティをパーセンテージとして計算できる。典型的なプロトコルの例を以下に記載する。

【 0 1 5 7 】

50

マウスに、1、10、又は100 mg/kgの本発明の化合物又は親化合物を、i.v.又はp.o.で投薬する。5分、10分、15分、30分、45分、60分、90分、120分、180分、240分、360分、420分、及び2880分に採血し、試料中の本発明の化合物又は親化合物の濃度をHPLCにより決定する。次いで、血漿濃度の経時変化を利用して、血漿濃度-時間曲線下面積(AUC-体循環に達する未変化の薬物の総量に正比例する)、最大(ピーク)血漿中薬物濃度、最大血漿中薬物濃度が起こる時間(ピーク時間)などのキーパラメーターを得ることができるが、バイオアベイラビリティの正確な決定に利用できる追加の因子には下記がある：化合物の終末半減期、全身クリアランス、定常状態分布容積、及びF%。次いで、これらのパラメーターを、非コンパートメント法又はコンパートメント法により分析して、計算されたバイオアベイラビリティのパーセンテージを与えるが、この種類の方法の例に関しては、Egorinら

10

【0158】

(経口及び静脈内薬物動態のインビボ評価(具体的な方法))

サングリフェリンアナログについて、全血を分析する。p.o.投与及びi.v.投与の両方のために、化合物を5%エタノール/5%クレモフォールEL/90%食塩水に配合する。3匹の雄CD1マウスのグループに、1mg/kg i.v.又は10mg/kg p.o.で投薬する。血液試料(40 µL)を、投薬前、及び0.25、0.5、2、8、及び24時間で、伏在静脈を介して採取し、等量のdH₂Oで希釈し、直ちにドライアイス上に置く。試料は、分析まで-70 °Cで保管する。試料中の本発明の化合物又は親化合物の濃度を、LCMSにより、以下のように測定する：20 µLの血液:H₂O (1:1、v/v)/PK試料を、100ng/mLの内部標準(ヒドロキシルマクロ環、6)20 µL、標準溶液/MeOH 20 µL及びACN 150 µLとともに加え、1500rpmで1分間ボルテックスし、12000rpmで5分間遠心分離する。次いで、該上清をLC-MS/MSにインジェクトする。血中濃度の経時変化をプロットし、それを利用して、全血中濃度-時間曲線下面積(AUC-体循環に達する未変化の薬物の総量に正比例する)を得る。可能な場合には、これらの値を利用して、経口バイオアベイラビリティ(F%)及び他のPKパラメータを得る。

20

【0159】

(細胞傷害性のインビトロ評価)

ATCCから入手したHuh-7及びHepG2細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(pen-strep)及び1%グルタミンを含むダルベッコ改変基本培地(DMEM)で増殖させ；一方、CEM細胞(ATCCから入手したヒトT-細胞白血病細胞)を、10%FBS、1%pen-strep及び1%グルタミンを含むRPMI 1640培地で増殖させる。新鮮なヒトPBMCを、少なくとも2人の正常な選別ドナーから入手した全血から単離する。簡単に言うと、末梢血細胞を、低速遠心分離及びPBS中での再懸濁により、2~3回ペレット化/洗浄し、混入している血小板を除去する。次いで、該洗浄した血液細胞を、ダルベッコリン酸塩緩衝化食塩水(D-PBS)で1:1に希釈し、50mLの遠心チューブ内のリンパ球分離培地(LSM; Mediatech社のcellgrow; 密度1.078+/-0.002g/mL; カタログ番号85-072-CL)14mL上に層状に重ね、600Xgで30分間遠心分離する。生じた界面からバンド化したPBMCを穏やかに吸引し、その後、低速遠心分離によりPBSで2回洗浄する。最後の洗浄の後、トリパンブルー排除により細胞を計数し、15%ウシ胎仔血清(FBS)、2mM L-グルタミン、4 µg/mL PHA-Pを補ったRPMI 1640中に、 1×10^7 細胞/mLで再懸濁する。該細胞を、37 °Cで48~72時間インキュベートする。インキュベート後、PBMCを遠心分離し、15%FBS、2mM L-グルタミン、100U/mLペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシン、10 µg/mLゲンタマイシン、及び20U/mLリコンビナントヒトIL-2を含むRPMI 1640に再懸濁する。

30

40

【0160】

化合物の細胞傷害性は、上記の細胞に対して、ハーフログ濃度の各化合物を3連で試験することによって評価する。培地のみを含む細胞は、細胞対照(CC)となる。Huh-7及びHepG2細胞を、 5×10^3 細胞/ウェルの濃度で96-ウェルプレートに播種する。翌日に、培地を吸引し、5%FBSを含む、対応培地100 µLを加える。試験薬物の希釈液を、2X濃度でマイクロタイターチューブ内に調製し、各濃度の100 µLを、標準的なフォーマットで適切なウェルに配置する。72時間後、細胞を細胞傷害性評価のためにプロセッシングする。

50

【0161】

PBMCを新鮮な培地中で希釈し、96ウェル丸底マイクロプレートの内側ウェルに、 5×10^4 細胞/ウェルで、100Lの体積で蒔く。同様に、CEM細胞を 1×10^4 細胞/ウェルで蒔く。次いで、試験薬物の2X調製物100 μ Lを、標準的なフォーマットで適切なウェルに添加する。培養を6~7日間維持し、次いで、細胞傷害性測定のためにプロセッシングする。

【0162】

細胞傷害性は、CytoTox-ONE (商標) 均質膜統合性アッセイキット (Promega社) を利用して測定する。該アッセイは、損傷した膜を有する細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ (dehydrogenase) (LDH) の放出を、蛍光定量的かつ均質なフォーマットで測定する。培地に放出されるLDHは、レサズリンを蛍光性レゾルフィン生成物に変換する共役酵素アッセイを利用して測定される。生成される蛍光の量は、溶解した細胞の数に比例する。6つの段階希釈濃度の各化合物を該細胞に適用し、適切な場合には、TC50 (細胞生存率を50%減少させる、薬物の毒性濃度) 及びTC90 (細胞生存率を90%減少させる、薬物の毒性濃度) 値を得る。

【0163】

(MDR1及びMRP2トランスポーターの阻害のインビトロ評価)

MDR1 (P糖タンパク質1) 及びMRP2トランスポーターの阻害及び活性化の評価には、Solvo Biotechnology社のインビトロATPアーゼアッセイ (Glavinasら、2003) が利用できる。化合物 (0.1、1、10、及び100 μ M) を、パナジン酸塩の非存在下と存在下の両方で、MDR1又はMRP2膜小胞と共にインキュベートし、潜在的なATPアーゼ活性化を試験する。さらに、トランスポーターATPアーゼ活性の起こりうる阻害を検出するために、ベラパミル/スルファサラジンの存在下で類似のインキュベーションを実施する。ATPアーゼ活性は、無機リン酸塩を分光測定により定量化して測定する。活性化は、ATPアーゼ活性のパナジン酸感受性増加から計算する。阻害は、ベラパミル/スルファサラジンに媒介されるATPアーゼ活性の低下から決定する。

【実施例】

【0164】

(実施例1: ストレプトマイセス属sp. A92-308110 (DSM9954) のsfaA欠失変異体の構築)

(1.1 sfaA欠失コンストラクトの構築)

sfaA (ヌクレオチド位置14396~21362、NCBI配列受入番号FJ809786) を含むコスミドTL3006 (配列番号3) の~7kbのEcoRV-StuIフラグメントを、EcoRV及びStuIによる消化によって切り取り、得られた単離フラグメントを、予めEcoRVで消化され、エピアルカリホスファターゼ (Roche社) で処理されたpKC1139に直接ライゲートした。このプラスミドをpSGK268と命名した。

このクローンに含まれるsfaA遺伝子のインフレーム欠失は、Gene Bridges社により供給されるRed/ET組換えキット (カタログ番号K006) を使用して行った。

【0165】

【化31】

(配列番号1) SfaA17161f 5'-

CGCTCTGTGGCGCCTGGTTTCCAAGCGGCTCGCGGACCGGCACCGGCACATGCATAATTA
ACCCTCACTAAAGGGCG-3'

(配列番号2) SfaA17825r 5'-

TGGATGTATCGTCGCAGGACGCCCAGAATTCACCTGCGACGTCCTCCAGATGCATTAATAC
GACTCACTATAGGGCTC-3'

2つのオリゴヌクレオチド、SfaA17161f及びSfaA17825rを使用して、KOD DNAポリメラーゼを使用するキットで供給されるFRT-PGK-gb2-neo-FRTテンプレートDNAから、ネオマイシンマーカを増幅した。得られた~1.7kbの増幅産物を、ゲル電気泳動によって単離し、QiaEXレジンで該ゲルから精製した。

10

20

30

40

50

【0166】

プラスミドpSGK268を、標準技術を用いて大腸菌DH10Bに形質転換し、アブラマイシン(50 μ g/ml)を含むプレート上で選別した。該欠失コンストラクトの導入は、本質的に前記Gene Bridges社のキットのプロトコルに従って行った。単一コロニーを2TY(アブラマイシン(50 μ g/ml))中で一晚増殖させ、pRedET(tet)プラスミドで形質転換し、30℃でアブラマイシン(50 μ g/ml)及びテトラサイクリン(3 μ g/ml)で選別した。単一コロニーを使用して、この株の一晚培養物を、3mlの2TY(アブラマイシン(50 μ g/ml)及びテトラサイクリン(3 μ g/ml))において30℃で調製した。この培養物0.5mlを使用して、10mlの2TY(アブラマイシン(50 μ g/ml)及びテトラサイクリン(3 μ g/ml))に30℃で播種し、OD_{600nm} ~ 0.5まで増殖させた。この培養物1.4mlを、2つのエッペンドルフチューブの各々に移し、10%アラビノース50 μ Lを一方のチューブに加えて、Red/ET組換えタンパク質の発現を誘導した。チューブを37℃で~1時間振盪した。誘導細胞及び非誘導細胞をベンチトップ遠心機でペレット化し、冷却滅菌水で2回洗浄した(毎回、再懸濁し、遠心分離して細胞をペレット化する)。得られたペレットを約30~40 μ Lの水に懸濁し、氷上に保持した。氷上で、先に単離した1.7kbの分断フラグメントを前記誘導及び非誘導チューブに加え、1mmのBiorad社製エレクトロキュベットに移した。該試料を電気穿孔し(Biorad Micropulser、1.8kV、時定数~4ms)、2TY 1ml(抗生物質不含)を加えて混合し、細胞を該キュベットから移した。細胞を、37℃で~3時間、振盪しながら(1100rpm、エッペンドルフサーモミキサーコンパクト)インキュベートし、その後、アブラマイシン(50 μ g/ml)及びカナマイシン(25 μ g/ml)を含む2TYプレート上に蒔き、37℃で一晚インキュベートした。誘導試料プレート由来のコロニーを、50 μ g/mlのカナマイシンを含む2TYプレート上に画線して純化し、カナマイシン耐性カセットの導入を確認した。それぞれの細菌コロニーについてのPCRを利用して該カセットの導入を確認した。これらの培養物からプラスミドを調製し、消化して、期待されるプラスミドpSGK270を確認した。次いで、プラスミドをNsiIで消化して前記マーカフラグメントを除去し、残部を再ライゲートして、sfaAインフレーム欠失コンストラクト、pSGK271を作製した。

10

20

【0167】

(1.2 ストレプトマイセス属sp.A92-308110(DSM9954)の接合、及び、sfaA欠失の導入)

プラスミドpSGK271を、標準技術を使用して大腸菌ET12567 pUZ8002に形質転換し、アブラマイシン(50 μ g/ml)、カナマイシン(25 μ g/ml)及びクロラムフェニコール(chloroampenicol)(10 μ g/ml)を含む2TYプレート上で選別した。得られた株を、アブラマイシン(50 μ g/ml)、カナマイシン(25 μ g/ml)及びクロラムフェニコール(10 μ g/ml)を含む3mlの液体2TYに播種し、37℃、250rpmで、一晚インキュベートした。この培養液0.8mlを使用して、アブラマイシン(50 μ g/ml)、カナマイシン(25 μ g/ml)及びクロラムフェニコール(10 μ g/ml)を含む、50mlのファルコンチューブ中の液体2TY 10mlに播種し、OD_{600nm}が~0.5に達するまで、37℃、250rpmでインキュベートした。得られた培養物を、4℃、3500rpmで10分間遠心分離し、2TY培地10mlによる洗浄を、各洗浄の後に遠心分離によって細胞をペレット化しつつ、2回行った。得られたペレットを、2TY 0.5mlに再懸濁し、使用に先立って氷上に保持した。このプロセスのタイミングは、以下に記載のストレプトマイセス孢子の調製の完了に合わせた。

30

40

【0168】

ストレプトマイセス属sp.A92-308110(DSM9954)(Biot-4370)の孢子は、1~2週経ったコンフルエントなプレートから、20%グリセロール~3mlに再懸濁することにより回収した。孢子を遠心分離し(5000rpm、10分、室温)、50mM TES緩衝液で2回洗浄し、その後、50mM TES緩衝液1mlに再懸濁し、2つのエッペンドルフチューブ間で分配した。これらのチューブに、50℃で10分間、水浴中でヒートショックを施し、その後、2TY 0.5mlを加え、エッペンドルフサーモミキサーコンパクトにおいて、37℃で4~5時間インキュベートした。

【0169】

調製した大腸菌ET12567 pUZ8002 pSGK271及びBiot-4370を、1:1(各株250 μ L)及び1:3(大腸菌100 μ L)の比で混合し、直ちにR6プレート上に拡げ、37℃のインキュベーターに移

50

した。およそ2時間のインキュベーションの後、これらのプレートを、ナリジクス酸を含む滅菌水2mlで覆い、最終プレート内濃度を25 µg/Lとした。プレートを37 °Cのインキュベーターに一晩戻し、その後、アブラマイシンを含む滅菌水2mlで覆い、最終プレート内濃度を20 ~ 25 µg/Lとした。~4~7日後に現れる接合完了体コロニーを、アブラマイシン(25 µg/L)及びナリジクス酸(25 µg/L)を含むISP4培地にパッチし、37 °Cでインキュベートした。十分な菌系成長が観察されたら、菌株を、アブラマイシン(25 µg/L)を含むISP4培地に37 °Cで再パッチし、孢子形成させた。次いで、ISP4(抗生物質不含)にパッチして、37 °Cで3~4日間インキュベートすることにより、菌株を(温度感受性プラスミドの除去を促進するために)3回継代した。最終的に、菌株をISP4にパッチし、28 °Cでインキュベートして十分に孢子形成させた(5~7日)。孢子を回収し、28 °CのISP4プレート上に連続希釈して、単一コロニーの選別を可能にした。孢子形成した単一コロニーを、アブラマイシン(25 µg/L)を含む、又は含まないISP4プレートに二重にパッチして、プラスミドの喪失を確認し、サングリフェリン産生に関する試験の前に、~7日増殖させた。

10

20

30

40

50

【0170】

(1.3ファルコンチューブにおけるサングリフェリン産生株のスクリーニング)

よく孢子形成した菌株の、単一の~7mmの寒天プラグを使用して、滅菌SM25-3培地7mlに播種し、2インチ行程振盪機において、27 °C、200rpmでインキュベートした。48時間の増殖の後、この培養物0.7mlを、5%のHP20樹脂とともにSGP2培地7mlを含む滅菌ファルコンチューブに移した。回収前に、1インチ行程の振盪インキュベーターで、24 °C、300rpmで5日間、培養物を増殖させた。細菌培養物0.8mlを取り出し、等分する前に、培養物全体にわたって樹脂を十分に分散させることを確実に行って、2mlのエッペンドルフチューブに等分した。アセトニトリル0.8ml及びギ酸15 µLを加え、該チューブを約30分間混合した。該混合物を遠心分離によって清澄化し、該抽出物170 µLをHPLCバイアルに移して、HPLCにより分析した。

【0171】

(1.4野生型への復帰株又はsfaAフェノタイプ菌株の分析)

菌株の抽出物をHPLCにより分析した。サングリフェリンA及びBを産生する菌株は、野生型に復帰しているもので、それ以上分析しなかった。サングリフェリンA及びB産生が欠如している菌株は、サングリフェリン様発色団を表す、保持時間6.5分の低レベル(~1~2mg/L)のピークを示した。LCMSによる分析によって、このピークは、サングリフェリンの期待されるm/z値から-16単位の、m/z値1073を有することが示された。このピークは、メタ-ヒドロキシチロシン不存在下でのフェニルアラニンの取り込みによるものと推論した。

【0172】

サングリフェリン(sanglifeherin)産生の欠如を示す8菌株を引き続き再増殖させ、潜在的なsfaA変異を化学的に補完して、新規のサングリフェリン類に至る変異合成プロセスを可能にできるかどうかを評価した。菌株をSM25-3種培地で48時間増殖させ、その後、5%樹脂を含むSGP2産生培地に移した。さらに24時間増殖させた後、対照として使用する供給無しの株を伴って、菌株に、2mM DLメタ-ヒドロキシチロシン(1M HCL中の0.16M溶液の100 µLの添加)又は2mM L-フェニルアラニンを、3連で供給した。菌株にピペコリン酸(メタノール中2mM)も供給し、生成物の収率を高めた。さらに4日増殖させた後、菌株を回収し、抽出してHPLCにより分析した。メタ-ヒドロキシチロシンが前記sfaA変異を完全に補完することが示され、L-フェニルアラニンの添加は、前記の-16 amuの化合物のレベルを高めた。さらなる調査のために、sfaA欠失変異体として菌株Biot-4585を選択した。

【0173】

(実施例2：sfaA欠失コンストラクトの構築のための他の方法)

他の方法を使用して、sfaA欠失変異体を作製することができる。例としては、sfaA挿入不活化変異体(WO2010/034243(その内容の全体が、引用により本願明細書に組み込まれている))の実施例12など)が挙げられる。この菌株を、WO2010/034243に記載されているように作製し、菌株名BIOT-4452を与えた。

【0174】

sfaAの欠失を起こす別の手順において、2つのオリゴヌクレオチド：

【化 3 2】

15209F 5'-

CAGAGAATTCGCGGTACGGGGCGGACGACAAGGTGTC-3'

(配列番号4)及び17219R 5'-

GCGCATGCATGTGCCGGTGCCGGTCCGCGAGCCGCTTGG-3'

(配列番号5)

10

を利用し、テンプレートとしてのコスミドTL3006(配列番号3)及びKOD DNAポリメラーゼを使用して、ホモロジーの上流領域を増幅する。該増幅産物をT4ポリヌクレオチドキナーゼ(NEB)で処理し、エピアルカリホスファターゼ(Roche社)で処理することにより脱リン酸化してあるpUC18にクローン化する。得られるコンストラクトを制限消化によりチェックし、完全に配列決定して、所望の配列が生成されており、かつポリメラーゼ増幅の間にエラーが導入されていないことを確実にする。このコンストラクトをEcoRI及びNsiIで消化し、該生成物をゲル電気泳動によって分析する。所望の配列を含むバンド(即ち、上流ホモロジー~2kb)を該ゲルから切り取り、標準的な手順(QiaEXレジン)を使用して精製する。第2の系列のオリゴヌクレオチド：

20

【化 3 3】

(配列番号6)

17766F 5'-CCTCATGCATCTGGAGGACGTCGCAGGTGAATTCTGGGCG-3'

及び19763R 5'-GGGCAAGCTTCTCCTGGCTGAGCTTGAACATCG-3'

(配列番号7)

を利用して、テンプレートとしてのコスミドTL3006(配列番号3)及びKOD DNAポリメラーゼを使用して、ホモロジーの下流領域を増幅する。該増幅産物をT4ポリヌクレオチドキナーゼ(NEB)で処理し、エピアルカリホスファターゼ(Roche社)で処理することによって脱リン酸化してあるpUC18にクローン化する。得られるコンストラクトを制限消化により分析し、完全に配列決定して、所望の配列が生成されており、かつポリメラーゼ増幅の間にエラーが導入されていないことを確実にする。このコンストラクトをHindIII及びNsiIで消化し、該生成物をゲル電気泳動により分析する。所望の配列を含むバンド(即ち下流ホモロジー~2kb)を該ゲルから切り取り、標準的な手順(QiaEXレジン)を使用して精製する。ベクターpKC1139をEcoRI及びHindIIIで消化して、該大きいベクターフラグメントをゲル電気泳動により単離し、標準的な方法(QiaEXレジン)により精製する。次いで、単離された上流及び下流のホモロジーフラグメントを、このpKC1139のフラグメントにスリーウェイライゲーションでクローン化して所望のsfaA欠失コンストラクトを作製する。

30

【0 1 7 5】

40

sfaA欠失コンストラクトを作製するためのさらに別の手順において、商業的な遺伝子合成(即ち、Genscript社又は他のベンダー)を使用して、所望の配列(配列番号8)を含むコンストラクトを作製する。この購入されるコンストラクトをBamHI及びXbaIを使用して消化し、関心対象の配列を切り取り、該生成物をゲル電気泳動により分析する。所望の配列を含むバンド(~4kb)を該ゲルから切り取り、標準的な手順を使用して精製する。ベクターpKC1139をBamHI及びXbaIで消化し、該大きいフラグメントをゲル電気泳動により単離して、標準的な方法により精製する。次いで、該2つの単離フラグメントを、ともにライゲートして、所望のsfaA欠失コンストラクトを作製する。

これらの代替的なsfaA欠失コンストラクトを、実施例セクション1.2の方法を使用して、接合によりストレプトマイセス属sp.A92-308110(DSM9954)に導入する。

50

【 0 1 7 6 】

(実施例3 : sfaA欠失変異体のアレイフィード)

sfaAが破壊された変異体(BIOT-4452又はBIOT-4585)の孢子ストックを、MAM、ISP4、ISP3又はISP2培地での増殖後に調製し、蒸留水中の20%w/vグリセロールに保存して、-80 で保管した。増殖性培養(種培養)は、孢子ストック(1%v/v)を、フォームプラグを備えた50mLの遠心チューブ内の種培地(SM25培地)7mLに播種することにより調製した。該培養チューブを、27 、250rpm(5cm行程)で48時間インキュベートした。該種培養から、10%(v/v)を、フォームプラグを備えた50mLの遠心チューブ内の7mLの産生培地SGP-2に移した。培養を、24 、300rpm(2.5cm行程)で実施した。サングリフェリン変異合成アナログの産生のために、フィード化合物(変異シントン(mutasynthon))の0.32M溶液(1N HCl溶液)0.05mLを、各チューブに播種後24時間で加え、最終濃度を2mMとした。さらに、ピペラジン酸(メタノール溶液)の0.32M溶液0.05mLを、各チューブに24時間で加え、最終濃度を2mMとした。培養を、フィード後さらに4日間続けた。

10

【 0 1 7 7 】

試料は、全ブロスの0.8mLを2mLのキャッピングされたエッペンドルフチューブに移すことによって抽出した。アセトニトリル0.8mLを、ギ酸0.015mLとともに加えた。次いで、該混合物を、Vibrax上で30分間振盪した。次いで、該チューブを、13000rpmで10分間遠心分離し、上清0.15mLを、分析用に取り出した。抽出物を、全般的方法に記載したように分析した。

【 0 1 7 8 】

表1は、このように供給された変異シントンを、観察されたサングリフェリン変異合成生成物の、LCMS H⁺及びNa⁺アダクト、予想される分子量、及び保持時間とともに示す。サングリフェリンAアナログに関連する主要なピークが示される。全てのケースにおいて、LCMSピークはサングリフェリンBアナログについても見られた(Mass-18)。

20

【 0 1 7 9 】

【表 10】

表 1

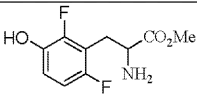
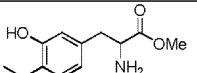
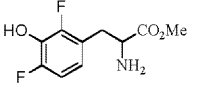
供給された 変異シントン	変異シントンの名称	[M-H] ⁻ 実測 (m/z)	[M+Na] ⁺ 実測 (m/z)	分子量 (amu)	保持時間 (分)
	2-アミノ-3-(4-フルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパン酸	1106.4	1130.4	1107.4	5.5
	2-アミノ-3-(3-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパン酸	1106.4	1130.4	1107.4	5.7
	メチル 2-アミノ-3-(3-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロプリオネート (propionate)	1106.4	1130.4	1107.4	5.7
	(S)-メチル 2-アミノ-3-(3-ヒドロキシ-4-メチルフェニル)プロパノアート	1102.5	1126.7	1103.5	6.0
	2-アミノ-3-(3-フルオロフェニル)プロパン酸	1090.4	1114.5	1091	6.1
	メチル (2S)-2-アミノ-3-(3-ヒドロキシ(2-ピリジル))プロパノアート	1089.5	1113.7	1090.5	4.4
	メチル 2-アミノ-3-(2-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパノアート	1106.5	1130.6	1107.5	5.5
	メチル 2-アミノ-3-(2-フルオ	1106.5	1130.6	1107.5	5.1

10

20

30

40

	ロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート				
	メチル 2-アミノ-3-(2,6-ジフルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート	1124.4	1148.5	1125.5	5.1
	メチル 2-アミノ-3-(4-エチル-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート	1116.7	1141.0	1117.7	7.2
	メチル 2-アミノ-3-(2,4-ジフルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート	1124.7	1148.8	1125.7	6.0

10

【 0 1 8 0 】

(実施例4：63-フルオロサングリフェリンA(化合物14)の単離)

発酵は、メチル2-アミノ-3-(3-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパノアート及びDL-ピペラジン酸を前駆体として利用して、全般的方法に記載したように行い、前駆体は両方とも26時間で加えた。

20

【 0 1 8 1 】

回収後、該培養ブロスをプールし、ギ酸でおよそpH3に調整し、25分間遠心分離(3300g)して、清澄化したブロスから細胞及び樹脂を分離した。該清澄化ブロスを、対象化合物の存在量が5%未満であることを確認したアッセイの後で廃棄した。該細胞及び樹脂を、マグネチックスターラーを使用して、2倍体積のアセトニトリルで1時間攪拌した。該アセトニトリル抽出物を、遠心分離により、又は重力下で沈降させることにより回収した。次いで、該細胞及び樹脂の2回目のアセトニトリル抽出を、同じ条件下で実施した。合わせたアセトニトリル抽出物を、減圧下で残留水性ボリューム(residual aqueous volume)まで濃縮し、次いで、pH6に調整した。これを、酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機化合物を減圧下で乾燥させ、最終粗製物(1.3g)を与えた。

30

【 0 1 8 2 】

該粗抽出物(1.3g)を酢酸エチル(2ml)に溶解し、酢酸エチル(500ml)でコンディショニングしたシリカゲルカラム(10x2cm)上にロードした。該カラムを、酢酸エチルで、次いで、アセトンの段階的な増加(酢酸エチル中10%、20%、30%、等)で溶出させた。およそ250mLのフラクションを集め、分析用LCにより対象化合物を同定し、合わせて乾燥させた。この物質(278mg)をメタノール(1.8ml)に溶解し、調製用HPLCにより精製した。Waters Xterra MS C18カラム(10ミクロン、19cm x 250mm)を使用し、溶媒を21mL/分でポンプ送りした。溶媒Aは水、溶媒Bはアセトニトリルであった。該カラムを、インジェクション後6分間、50%Bで均一濃度で流し、その後、30分で100%Bとなる勾配で流した。純粋なフラクションをHPLC-UVにより同定し、合わせた。これらのフラクションを減圧下で乾燥させ、対象化合物をオフホワイトの非晶質固体として得た(20mg)。

40

【 0 1 8 3 】

(実施例5：62,63-フルオロサングリフェリンA(化合物15)の単離)

発酵は、メチル(S)-2-アミノ-3-(3,4-ジフルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパノアート及びDL-ピペラジン酸を前駆体として利用して、全般的方法に記載したように行い、前駆体は両方とも26時間で加えた。

【 0 1 8 4 】

回収後、該培養ブロスをプールし、ギ酸でおよそpH3に調整し、25分間遠心分離(3300g)して、清澄化したブロスから該細胞及び樹脂を分離した。該清澄化ブロスを、対象化合物

50

の存在量が5%未満であることを確認したアッセイの後で廃棄した。該細胞及び樹脂を、マグネチックスターラーを使用して、2倍体積のアセトニトリルで1時間攪拌した。該アセトニトリル抽出物を、遠心分離により、又は重力下で沈降させることにより回収した。次いで、該細胞及び樹脂の2回目のアセトニトリル抽出を、同じ条件下で実施した。合わせたアセトニトリル抽出物を、減圧下で残留水性ポリウムまで濃縮し、次いでpH6に調整した。これを、酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機化合物を減圧下で乾燥させ、最終粗製物(1.6g)を与えた。

【0185】

該粗抽出物(1.6g)を酢酸エチル2mlに溶解し、酢酸エチル500mlでコンディショニングしたシリカゲルカラム(10x2cm)上にロードした。該カラムを、酢酸エチルで、次いで、アセトンの段階的な増加(酢酸エチル中10%、20%、30%、等)で溶出させた。およそ250mLのフラクションを集め、分析用LCにより対象化合物を同定し、合わせて乾燥させた。この物質(188mg)をメタノール1.8mlに溶解し、調製用HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm x 250mm)を使用し、溶媒を21mL/分でポンプ送りした。溶媒Aは水、溶媒Bはアセトニトリルであった。該カラムを、インジェクション後6分間、50%Bで均一濃度で流し、次いで、30分で100%Bとなる勾配で流した。これらのフラクションを減圧下で乾燥させ、対象化合物をオフホワイトの非晶質固体として得た(15mg)。

10

【0186】

(実施例6: 62-フルオロサングリフェリンA(化合物16)の単離)

メチル(S)-2-アミノ-3-(4-フルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート及びDL-ピペラジン酸前駆体を使用した。前駆体を27時間で加えたことを除き、全般的方法に従って行った。

20

【0187】

回収後、該培養ブrossをプールし、ギ酸でおよそpH3に調整し、25分間遠心分離(3300g)して、該清澄化ブrossから該細胞及び樹脂を分離した。該清澄化ブrossを、対象化合物の存在量が5%未満であることを確認したアッセイの後で廃棄した。該細胞及び樹脂を、マグネチックスターラーを使用して、2倍体積のアセトニトリルで1時間攪拌した。該アセトニトリル抽出物を、遠心分離により、又は重力下で沈降させることにより回収した。次いで、該細胞及び樹脂の2回目のアセトニトリル抽出を、同じ条件下で実施した。

【0188】

合わせたアセトニトリル抽出物を、減圧下で残留水性ポリウムまで濃縮し、次いで、pH6に調整した。これを、酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機化合物を減圧下で乾燥させて、最終の油状粗製物を与えた(4.2g)。

30

【0189】

該粗抽出物(4.2g)を酢酸エチル4mlに溶解し、酢酸エチル500mlでコンディショニングしたシリカゲルカラム(15x2cm)上にロードした。該カラムを、酢酸エチルで、次いで、アセトンの段階的な増加(酢酸エチル中10%、20%、30%、等)で溶出させた。およそ250mLのフラクションを集め、分析用LCにより対象化合物を同定し、合わせて乾燥させた。この物質(390mg)をメタノール2.4mlに溶解し、調製用HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm x 250mm)を使用し、溶媒を21mL/分でポンプ送りした。溶媒Aは水、溶媒Bはアセトニトリルであった。該カラムを、インジェクション後6分間、50%Bで均一濃度で流し、次いで、30分で100%Bとなる勾配で流した。純粋なフラクションをHPLC-UVにより同定し、合わせた。これらのフラクションを、減圧下で乾燥させ、対象化合物をオフホワイトの非晶質固体として得た(38mg)。

40

【0190】

(実施例7: 62-メチルサングリフェリンA(化合物17)の単離)

BIOT-4585の凍結保存された孢子ストックを、室温で解凍した。増殖性培養(種培養)は、孢子ストック0.4mLを、フォームプラグを備えた2Lのエrlenマイヤーフラスコ内のSM25培地400mLに移すことにより調製した。培養を、27℃、250rpm(2.5cm行程)で、48時間行った。該種培養から、20mLを、フォームプラグを備えた2Lのエrlenマイヤーフラスコ内

50

の400mLの産生培地SGP2+5%HP20に移した。24、250rpm(2.5cm行程)での24時間の培養の後、1M塩酸中のメチル(S)-2-アミノ-3-(3-ヒドロキシ-4-メチルフェニル)プロパノアートの200mM溶液2mL及びDL-ピペラジン酸の400mMメタノール溶液2mLを、各産生フラスコに加え、前駆体のそれぞれの鏡像異性体の最終濃度を1mMとした。培養を、24、250rpm(2.5cm行程)でさらに4日間続けた。

【0191】

該培養ブロスをプールし、ギ酸でおよそpH3に調整し、25分間遠心分離(3300g)して、該細胞及び樹脂を清澄化ブロスから分離した。該清澄化ブロスを、対象化合物の存在量が5%未満であることを確認したアッセイの後で廃棄した。該細胞及び樹脂を、オーバーヘッドパドルスターラーを使用して、2倍体積のアセトニトリルで1時間攪拌した。該アセトニトリル抽出物を、重力下で沈降させることにより回収した。次いで、該細胞及び樹脂の2回目のアセトニトリル抽出を、同じ条件下で実施した。合わせたアセトニトリル抽出物を、減圧下で残留水性ポリウムまで濃縮し、次いで、pH6に調整した。これを、酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機化合物を減圧下で乾燥させ、最終粗抽出物を与えた(7.6g)。

10

【0192】

該粗抽出物(7.6g)を酢酸エチル5mLに溶解し、酢酸エチル500mLでコンディショニングしたシリカゲルカラム(15x2cm)上にロードした。該カラムを、酢酸エチルで、次いで、アセトンの段階的な増加(酢酸エチル中10%、20%、30%、等)で溶出させた。およそ250mLのフラクションを集め、分析用LCにより対象化合物を同定し、合わせて乾燥させた。この物質(319mg)をメタノール2.4mLに溶解し、調製用HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm x 250mm)を使用し、溶媒を21mL/分でポンプ送りした。溶媒Aは水、溶媒Bはアセトニトリルであった。該カラムを、インジェクション後6分間、50%Bで均一濃度で流し、次いで、30分で100%Bとなる勾配で流した。純粋なフラクションを、HPLC-UVにより同定し、合わせた。これらのフラクションを減圧下で乾燥させ、対象化合物をオフホワイトの非晶質固体として得た(14.9mg)。

20

【0193】

(実施例8: 61-デスヒドロキシサングリフェリンA(化合物18)の単離)

BIOT-4585の凍結保存された孢子ストックを、室温で解凍した。増殖性培養(種培養)は、孢子ストック0.4mLを、フォームプラグを備えた2Lのエルレンマイヤーフラスコ内のSM25培地400mLに移すことにより調製した。培養を、27、250rpm(2.5cm行程)で48時間行った。該種培養から、500mLを、7LのApplikonファーマンター内の4.5Lの産生培地SGP2+5%HP20に移し、24、400rpm(カスケードDOTコントロール(cascade DOT control))、通気2.5L/分及び30%DOT(カスケード攪拌コントロール(cascade agitation control))で培養した。24時間の培養の後、1M塩酸中の(S)-2-アミノ-3-フェニルプロパン酸の667mM溶液7.5mLを、該ファーマンターに加え、該前駆体の最終濃度を1mMとした。培養を、24、400rpm(カスケードDOTコントロール)、通気2.5L/分及び30%DOT(カスケード攪拌コントロール)で、さらに4日間続けた。

30

【0194】

該培養ブロスをプールし、ギ酸でおよそpH3に調整し、25分間遠心分離(3300g)して、該清澄化ブロスから該細胞及び樹脂を分離した。該清澄化ブロスを、対象化合物の存在量が5%未満であることを確認したアッセイの後で廃棄した。該細胞及び樹脂を、オーバーヘッドパドルスターラーを使用して、2倍体積のアセトニトリルで1時間攪拌した。該アセトニトリル抽出物を、重力下で沈降させることにより回収した。次いで、該細胞及び樹脂の2回目のアセトニトリル抽出を、同じ条件下で実施したが、該2回目の抽出物は、遠心分離により回収した。合わせたアセトニトリル抽出物を、減圧下で残留水性ポリウムまで濃縮し、次いで、pH6に調整した。これを、酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機化合物を減圧下で乾燥させ、最終粗製物を与えた(55g)。

40

【0195】

該粗抽出物(55g)を、水中の80%メタノールに懸濁し、ヘキサン300mLで2回抽出した。対象化合物はメタノール/水部分に認められ、これを乾燥させた。この乾燥抽出物(48g)を酢

50

酸エチル30mlに溶解し、酢酸エチル1Lでコンディショニングしたシリカゲルカラム(20x5cm)上にロードした。該カラムを、酢酸エチルで、次いで、アセトンの段階的な増加(酢酸エチル中10%、20%、30%、等)で溶出させた。およそ250mLのフラクションを集め、分析用LCにより対象化合物を同定し、合わせて乾燥させた。この物質(813mg)をメタノールに溶解し、調製用HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm x 250mm)を使用し、溶媒を21mL/分でポンプ送りした。溶媒Aは水、溶媒Bはアセトニトリルであった。該カラムを、インジェクション後6分間、50%Bで均一濃度で流し、次いで、30分で100%Bとなる勾配で流した。純粋なフラクションをHPLC-UVにより同定し、合わせた。これらのフラクションを減圧下で乾燥させ、対象化合物をオフホワイトの非晶質固体として得た(34mg)。

10

【0196】

(実施例9: 58-デス(3-ヒドロキシフェニル)-58-(3-ヒドロキシ(2-ピリジル)-サングリフェリンA(化合物19)の単離)

メチル(2S)-2-アミノ-3-(3-ヒドロキシ(2-ピリジル))プロパノアート及びDL-ピペラジン酸前駆体を使用した。増殖性(種)培養の間の前記インキュベーターの行程が2.5cmであったことを除き、全般的方法に従って行った。

【0197】

該培養ブロスをプールし、ギ酸でおよそpH3に調整し、25分間遠心分離(3300g)して、該清澄化ブロスから該細胞及び樹脂を分離した。該清澄化ブロスを、対象化合物の存在量が5%未満であることを確認したアッセイの後廃棄した。該細胞及び樹脂を、オーバーヘッドパドルスターラーを使用して、2倍体積のアセトニトリルで1時間攪拌した。該アセトニトリル抽出物を、重力下で沈降させることにより回収した。次いで、該細胞及び樹脂の2回目のアセトニトリル抽出を、同じ条件下で実施した。合わせたアセトニトリル抽出物を、減圧下で残留水性ポリウムまで濃縮し、次いで、pH6に調整した。これを、酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機化合物を減圧下で乾燥させ、最終粗抽出物を与えた(7g)。

20

【0198】

該粗抽出物(7g)を酢酸エチル4mlに溶解し、酢酸エチル500mlでコンディショニングしたシリカゲルカラム(15x2cm)上にロードした。該カラムを、酢酸エチルで、次いで、アセトンの段階的な増加(酢酸エチル中10%、20%、30%、等から100%アセトンへ、次いで、アセトン中で、1%メタノールから段階的に5%メタノールへ)で溶出させた。およそ250mLのフラクションを集め、分析用LCにより対象化合物を同定し、合わせて乾燥させた。この物質(204mg)をメタノールに溶解し、調製用HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm x 250mm)を使用し、溶媒を21mL/分でポンプ送りした。溶媒Aは水、溶媒Bはアセトニトリルであった。該カラムを、インジェクション後6分間、50%Bで均一濃度で流し、次いで、30分で100%Bとなる勾配で流した。純粋なフラクションをHPLC-UVにより同定し、合わせた。これらのフラクションを減圧下で乾燥させ、対象化合物をオフホワイトの非晶質固体として得た(4mg)。

30

【0199】

(実施例10: 61-デスヒドロキシ-61-フルオロサングリフェリンA(化合物20)の単離)

BIOT-4585の凍結保存された孢子ストックを、室温で解凍した。増殖性培養(種培養)は、孢子ストック0.4mLを、フォームプラグを備えた2Lのエrlenmeyerフラスコ内のSM25培地400mLに移すことにより調製した。培養を、27℃、250rpm(2.5cm行程)で、48時間行った。該種培養から、20mLを、フォームプラグを備えた2Lのエrlenmeyerフラスコ内の400mLの産生培地SGP2+5%HP20に移した。24℃、250rpm(2.5cm行程)で24時間培養した後、1M塩酸中の2-アミノ-3-(3-フルオロフェニル)プロパン酸の400mM溶液2mL及びDL-ピペラジン酸の400mMメタノール溶液2mLを各産生フラスコに加え、該前駆体のそれぞれの鏡像異性体の最終濃度を1mMとした。培養を、24℃、250rpm(2.5cm行程)で、さらに4日間続けた。

40

【0200】

該培養ブロスをプールし、ギ酸でおよそpH3に調整し、25分間遠心分離(3300g)して、該

50

清澄化ブロスから該細胞及び樹脂を分離した。該清澄化ブロスを、対象化合物の存在量が5%未満であることを確認したアッセイの後廃棄した。該細胞及び樹脂を、オーバーヘッドパドルスターラーを使用して、2倍体積のアセトニトリルで1時間撹拌した。該アセトニトリル抽出物を、重力下で沈降させることにより回収した。次いで、該細胞及び樹脂の2回目のアセトニトリル抽出を、同じ条件下で実施した。3回目の抽出物を、残りの細胞及び樹脂の混合物の遠心分離により得た。合わせたアセトニトリル抽出物を、減圧下で残留水性ポリウムまで濃縮し、次いで、pH6に調整した。これを酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機化合物を減圧下で乾燥させ、最終粗抽出物を与えた(10.5g)。

【0201】

該粗抽出物(10.5g)を酢酸エチル7mlに溶解し、酢酸エチル500mlでコンディショニングしたシリカゲルカラム(15x2cm)上にロードした。該カラムを、酢酸エチルで、次いで、アセトンの段階的な増加(酢酸エチル中10%、20%、30%、等)で溶出させた。およそ250mLのフラクションを集め、分析用LCにより対象化合物を同定し、合わせて乾燥させた。この物質(342mg)をメタノールに溶解し、調製用HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm x 250mm)を使用し、溶媒を21mL/分でポンプ送りした。溶媒Aは水、溶媒Bはアセトニトリルであった。該カラムを、インジェクション後30分間、53%Bで均一濃度で流した。純粋なフラクションをHPLC-UVにより同定し、合わせた。これらのフラクションを減圧下で乾燥させ、対象化合物をオフホワイトの非晶質固体として得た(6mg)。

【0202】

(実施例11: 61-デスヒドロキシ-61-アミノサングリフェリンA(化合物21)の単離)

BIOT-4585の凍結保存された孢子ストックを、室温で解凍した。増殖性培養(種培養)は、孢子ストック0.4mLを、フォームプラグを備えた2Lのエルレンマイヤーフラスコ内のSM25培地400mLに移すことにより調製した。培養を、27℃、250rpm(2.5cm行程)で、48時間行った。該種培養から、20mLを、フォームプラグを備えた2Lのエルレンマイヤーフラスコ内の400mLの産生培地SGP2+5%HP20に移した。24℃、250rpm(2.5cm行程)で24時間培養した後、1M塩酸中のメチル(S)-2-アミノ-3-(3-アミノフェニル)プロパノエートの200mM溶液2mLを、各産生フラスコに加え、該前駆体の最終濃度を1mMとした。培養を、24℃、250rpm(2.5cm行程)で、さらに4日間続けた。

【0203】

該培養ブロスをプールし、ギ酸でおよそpH3に調整し、25分間遠心分離(3300g)して、該清澄化ブロスから該細胞及び樹脂を分離した。該清澄化ブロスを、対象化合物の存在量が5%未満であることを確認したアッセイの後廃棄した。該細胞及び樹脂を、オーバーヘッドパドルスターラーを使用して、2倍体積のアセトニトリルで1時間撹拌した。該アセトニトリル抽出物を、重力下で沈降させることにより回収した。次いで、該細胞及び樹脂の2回目のアセトニトリル抽出を、同じ条件下で実施した。3回目の抽出物を、残りの細胞及び樹脂の混合物の遠心分離により得た。

【0204】

合わせたアセトニトリル抽出物を、減圧下で残留水性ポリウムまで濃縮し、次いで、pH6に調整した。これを酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機化合物を減圧下で乾燥させ、最終粗製物を与えた。

【0205】

該粗抽出物を酢酸エチルに溶解し、(酢酸エチルでコンディショニングされている)シリカゲルカラム上にロードする。該カラムを、有機溶媒で、極性を増大させながら溶出させる。およそ250mLのフラクションを集め、分析用LCにより対象化合物を同定し、合わせて乾燥させる。この物質をメタノールに溶解し、調製用HPLCにより精製する。純粋なフラクションをHPLC-UVにより同定し、合わせる。これらのフラクションを減圧下で乾燥させ、対象化合物をオフホワイトの非晶質固体として得る。

【0206】

(実施例12: 生物学的データ-レプリコン系におけるHCV抗ウイルス活性のインビトロ評価)

10

20

30

40

50

全般的方法に記載したように、Huh5.2細胞を用いるレプリコンアッセイで、化合物を分析した。シクロスポリンA(1)、サングリフェリンA(5)、及びヒドロキシマクロ環(6)を、対照として含めた。

【 0 2 0 7 】

【表 1 1】

名称	EC50 (μM)	CC50 (μM)	選択指数 (CC50/EC50)
シクロスポリンA, 1	0.2	4.3	21.5
サングリフェリンA, 5	0.318	9.1	28.7
ヒドロキシマクロ環, 6	8.4	83.6	9.9
14	0.135	12.8	121
15	0.195	16.6	88
16	0.89	29.7	32
17	0.083	11.6	143
18	3.4	11.7	3.5
19	24.3	48.1	3.5

10

20

【 0 2 0 8 】

わかるとおり、14、15、16及び17は全て、該Huh5.2レプリコンアッセイにおいて非常に強力であり(低いEC50によって示される)、該株化細胞に対する優れた選択性を有する(高い選択指数によって示される)。先に記載されたサングリフェリンA(5)は、HCV阻害において14、15及び17よりも効力が低く、シクロスポリンA(1)は、効力が低く、1及び5は両方とも、選択指数が乏しい。

30

【 0 2 0 9 】

(実施例13：ミクロソーム安定性)

ヒト及びマウスの肝臓ミクロソームにおける化合物の安定性を、全般的方法に記載したように分析した。サングリフェリンA(5)を対照として含めた。

【 0 2 1 0 】

40

【表 1 2】

名称	ヒト 肝臓 ミクロソーム 半減期 (分)	マウス肝臓 ミクロソーム 半減期 (分)
サングリフェリン A, 5	6.38	6.15
14	9.32	9.78
15	10.81	9.22
16	6.61	5.48
17	9.50	9.67
18	7.64	3.46
19	10.37	4.71

10

20

【0 2 1 1】

わかるように、本発明の化合物14、15、16、17、18及び19は全て、ヒト肝臓ミクロソームにおける安定性が、サングリフェリンA(5)に比べて高く、また、14、15及び17は全て、マウス肝臓ミクロソームにおいて、より安定である。

【0 2 1 2】

(参考文献)

【化 3 4】

Appel, N., T. Schallerらの文献 (2006). "From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication." J Biol Chem **281**(15): 9833-6.

Banteli, R., J. Wagnerらの文献 (2001). "Synthesis of derivatives of the novel cyclophilin-binding immunosuppressant sanglifehrin A with reduced numbers of polar functions." Bioorg Med Chem Lett **11**(12): 1609-12.

Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagaraja Rao, R. 及び Schoner, B.E. (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. Gene **116**: 43-49.

10

Chatterji, U., M. Bobardtらの文献 (2009). "The isomerase active site of cyclophilin a is critical for HCV replication." J Biol Chem.

Colgan, J., M. Asmalらの文献 (2000). "Isolation, characterization and targeted disruption of mouse ppia: cyclophilin A is not essential for mammalian cell viability." Genomics **68**(2): 167-78.

Crabbe, R., G. Vuagniauxらの文献 (2009). "An evaluation of the cyclophilin inhibitor Debio 025 and its potential as a treatment for chronic hepatitis C." Expert Opin Investig Drugs **18**(2): 211-20.

20

Dolinski, K., S. Muirらの文献 (1997). "All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13093-8.

E. Lawitz, R. R., T. Nguyen, M. Huang, J. Ke, J. Praestgaard, D. Serra, M. Koziel, T. Evans (2009). "Safety And Antiviral Efficacy Of 14 Days Of The Cycophilin Inhibitor Nim811 In

30

Combination With Pegylated Interferon .2a In Relapsed Genotype 1 Hcv Infected Patients." Journal of Hepatology **50**(S1): S379.

Egorin, M. J., T. F. Lagattutaらの文献 (2002). "Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats." Cancer Chemother Pharmacol **49**(1): 7-19.

Fehr, T., J. Kallenらの文献 (1999). "Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. II. Structure elucidation, stereochemistry and physico-chemical properties." J Antibiot (Tokyo) **52**(5): 474-9.

10

Flisiak, R., A. Horbanらの文献 (2008). "The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfectd with hepatitis C and human immunodeficiency virus." Hepatology **47**(3): 817-26.

Furniss, B. S., Furniss, A.I., Vogel, A.I., Ed. (1989). Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, Prentice Hall.

Gaither, L. A., Borawski, J., Anderson, L. J., Balabanis, K. A.らの文献 (2010). "Multiple cyclophilins involved in different cellular pathways mediate HCV replication" Virology 397: 43-55

20

Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., Sarkadi, B. (2004). "The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity." Curr. Drug. Deliv. **1**(1): 27-42.

Gomez, L., H. Thibaultらの文献 (2007). "Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(3): H1654-61.

30

Goto, K., Watashi, K., Inoue, D., Hijikata, M., Shimotohno, K. (2009) "Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor" Cancer Science 100(10): 1943-1950

Hanoulle, X., Badillo A, Wieruszeski JM, Verdegem D, Landrieu I, Bartenschlager R, Penin F, Lippens G (2009). "Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the Peptidyl-Prolyl cis/trans isomerase activity of Cyclophilins A and B." J Biol Chem.

Hartel, C., P. Iblherらの文献 (2006). "Immunosuppressive activity of the immunophilin-binding drug Sanglifehrin A in human whole blood: potent inhibition of interleukin-6 produced by lymphocytes and monocytes." Scand J Immunol **63**(1): 26-34.

40

Herrler, M., H. Bangらの文献 (1994). "Cloning and characterization of ppiB, a *Bacillus subtilis* gene which encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase." Mol Microbiol **11**(6): 1073-83.

Hite, M., Turner, S., Federici, C. (2003). "Part 1: Oral delivery of poorly soluble drugs".
Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer. Summer 2003 issue.

Immecke, S.N., Baal., Nらの文献 (2011). "The Cyclophilin-Binding Agent Sanglifehrin A Is a
Dendritic Cell Chemokine and Migration Inhibitor." PLOS one **6**(3):e18406

Inoue, K., K. Sekiyamaらの文献 (2003). "Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the
treatment of chronic hepatitis C: controlled trial." J Gastroenterol **38**(6): 567-72.

Inoue, K., T. Umeharaらの文献 (2007). "Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-
infected chimeric mice in vivo." Hepatology **45**(4): 921-8.

10

Ishii, N., K. Watashiらの文献 (2006). "Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain
replication." J Virol **80**(9): 4510-20.

J. Ke, E. L., R. Rozier, T. Marbury, N. Nguyen, D. Serra, K. Dole, J. Praestgaard, M. Huang, T.
Evans (2009). "Safety, And Tolerability Of Nim811, A Novel Cyclophilin Inhibitor For Hcv,
Following Single And Multiple Ascending Doses In Healthy Volunteers And Hcv-Infected
Patients." Journal of Hepatology **50**(S1): S229.

20

Jacobson, I., McHutchison, JG, Sulkowski, M. (2007). Gastroenterol & Hepatol **3**(S34): 1-10.

Illing, G.T., Normansell, I.D. 及び Peberdy J.F. (1989) "Protoplast Isolation and Regeneration in
Streptomyces clavuligerus." J. Gen. Microbiol **135**, 2289-2297

Kallen, J., R. Sedraniらの文献 (2005). "Structure of human cyclophilin A in complex with the novel
immunosuppressant sanglifehrin A at 1.6 Å resolution." J Biol Chem **280**(23): 21965-71.

Kawasaki, H., E. S. Mocarskiらの文献 (2007). "Cyclosporine inhibits mouse cytomegalovirus
infection via a cyclophilin-dependent pathway specifically in neural stem/progenitor cells." J Virol
81(17): 9013-23.

30

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. 及び Hopwood, D.A. (2000) Practical
Streptomyces Genetics, John Innes Foundation, Norwich.

Konig, J. H., Glaeser, M. Keiser, K. Mandery, U. Klotz 及び M. F. Fromm (2010), Drug Metab
Dispos, 39, 1097-1102. Manns, M. P., G. R. Foster, et al. (2007). "The way forward in HCV
treatment--finding the right path." Nat Rev Drug Discov **6**(12): 991-1000.

40

Martin Cabrejas, L. M., S. Rohrbachらの文献 (1999). "Macrolide Analogues of the Novel
Immunosuppressant Sanglifehrin: New Application of the Ring-Closing Metathesis Reaction."
Angew Chem Int Ed Engl **38**(16): 2443-2446.

Mathy, J. E., S. Maらの文献 (2008). "Combinations of cyclophilin inhibitor NIM811 with hepatitis C Virus NS3-4A Protease or NS5B polymerase inhibitors enhance antiviral activity and suppress the emergence of resistance." Antimicrob Agents Chemother **52**(9): 3267-75.

Melnikova, I. (2008). "Hepatitis C therapies." Nature Rev Drug Disc **7**: 799-800.

Metternich, R., Denni, D., Thai, B, Sedrani, R. (1999). "Toward a Total Synthesis of the Immunosuppressant Sanglifehrin A. Preparation of Two Relay Compounds by Degradation and Their Use in the Reassembly of the Natural Product." J. Org. Chem. **64**: 9632-9639. 10

Millay, D. P., M. A. Sargentらの文献 (2008). "Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy." Nat Med **14**(4): 442-7.

Nelson, D. R., Ghalib, R.H., Sulkowski, M., Schiff, E., Rustgi, V., Pockros, P.J., Wang, C., Decosterd Kerhuel, D. 及び P. Groscurin, Porchet, H., Crabbe, R. (2009). "Efficacy And Safety Of The Cyclophilin Inhibitor Debio 025 In Combination With Pegylated Interferon Alpha-2a And Ribavirin In Previously Null-Responder Genotype 1 Hcv Patients." Journal of Hepatology **50**(S1): S40. 20

Niwa, T., Yamamoto, S, Saito, M, Shiraga, T, Takagi, A. (2007). "Effect of Cyclosporine and Tacrolimus on Cytochrome P450 Activities in Human Liver Microsomes." Yakugaku Zasshi **127**(1): 209--216.

Paeshuyse, J., A. Kaulらの文献 (2006). "The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro." Hepatology **43**(4): 761-70.

Parfieniuk, A., J. Jaroszewiczらの文献 (2007). "Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus." World J Gastroenterol **13**(43): 5673-81. 30

Pawlotsky, J. M. (2000). "Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy." Hepatology **32**(5): 889-96.

Pawlotsky, J. M. (2005). "Current and future concepts in hepatitis C therapy." Semin Liver Dis **25**(1): 72-83.

Pawlotsky, J. M. (2006). "Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets." J Hepatol **44**(1 Suppl): S10-3. 40

Pemberton, T. J. 及び J. E. Kay (2003). "Cyclophilin sensitivity to sanglifehrin A can be correlated to the same specific tryptophan residue as cyclosporin A." FEBS Lett **555**(2): 335-40.

Pockros, P. (2008). "Emerging Therapies for Chronic Hepatitis C Virus." Gastroenterol and Hepatology **4**(10): 729-734.

Ptak, R. G., P. A. Gallay らの文献 (2008). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells by Debio-025, a novel cyclophilin binding agent." Antimicrob Agents Chemother **52**(4): 1302-17.

Qu, X., Jiang, N. らの文献 (2011). "Cloning, sequencing and characterization of the biosynthetic gene cluster of sanglifehrin A, a potent cyclophilin inhibitor." Mol. Biosyst. **7**:852-861

Robida, J. M., H. B. Nelson らの文献 (2007). "Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro." J Virol **81**(11): 5829-40.

10

Hopkins, S. D. H., E. Gavis, J. Lalezari, E. Glutzer, B. DiMassimo, P. Rusnak, S. Wring, C. Smitley, Y 及び Ribeill (2009). "Safety, plasma pharmacokinetics, and anti-viral activity of SCY-635 in adult patients with chronic hepatitis C virus infection." Journal of Hepatology **50**(S1): S36.

Sanglier, J. J., V. Quesniaux らの文献 (1999). "Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity." J Antibiot (Tokyo) **52**(5): 466-73.

20

Schneider, M. D. (2005). "Cyclophilin D: knocking on death's door." Sci STKE **2005**(287): pe26.

Sedrani, R., J. Kallen らの文献 (2003). "Sanglifehrin-cyclophilin interaction: degradation work, synthetic macrocyclic analogues, X-ray crystal structure, and binding data." J Am Chem Soc **125**(13): 3849-59.

Seden, K. D. Back 及び S. Khoo (2010), J Antimicrob Chemother, **65**, 1079-1085.

Smith, M. B. a. M., J. , Ed. (2001). March's advanced organic chemistry, John Wiley and Sons Inc., UK.

30

Steinschulte, C., T. Taner らの文献 (2003). "Cutting edge: sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells." J Immunol **171**(2): 542-6.

Strader, D. B., T. Wright らの文献 (2004). "Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C." Hepatology **39**(4): 1147-71.

Tropschug, M., I. B. Barthelmess らの文献 (1989). "Sensitivity to cyclosporin A is mediated by cyclophilin in *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*." Nature **342**(6252): 953-5.

40

Vrolijk, J. M., A. Kaul らの文献 (2003). "A replicon-based bioassay for the measurement of interferons in patients with chronic hepatitis C." J Virol Methods **110**(2): 201-9.

Wring, S. , C. Wille, C. Rewerts, R. Randolph, A. Scribner 及び S. Hopkins (2010), Journal of Hepatology, **52**, S263.

Yang, F., J. M. Robothamらの文献 (2008). "Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro." J Virol **82**(11): 5269-78.

Zenke, G., U. Strittmatterらの文献 (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action." J Immunol **166**(12): 7165-71.

Zeuzem, S. 及び E. Herrmann (2002). "Dynamics of hepatitis C virus infection." Ann Hepatol **1**(2): 56-63.

10

Zhang, L. H. 及び J. O. Liu (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle." J Immunol **166**(9): 5611-8.

【 0 2 1 3 】

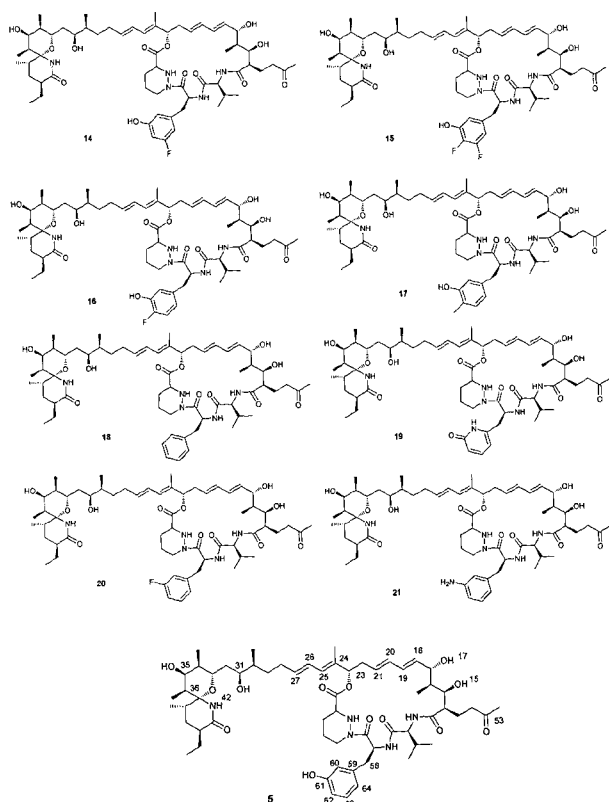
本出願において言及される特許及び特許出願を含む全ての参考文献が、引用により最大限に本願明細書に組み込まれる。

明細書及び以下の請求項の全体にわたって、文脈から反対の意味が要求されない限り、「含む(comprise)」という言葉並びに「含む(comprises)」及び「含む(comprising)」などの変形体は、述べられた整数若しくは工程又は整数の群の包含を意味するが、他の整数若しくは工程又は整数若しくは工程の群の排除を意味しないと理解されるだろう。

20

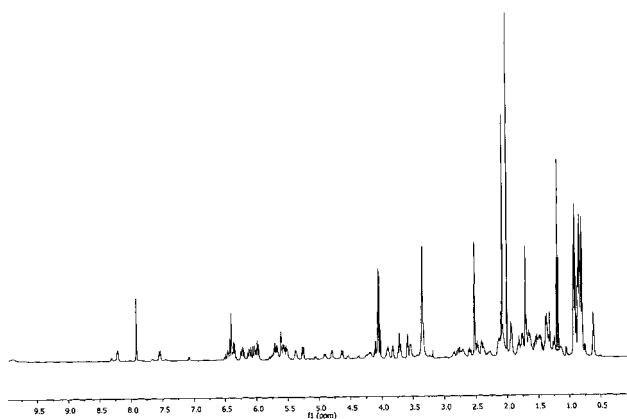
【 図 1 】

図1



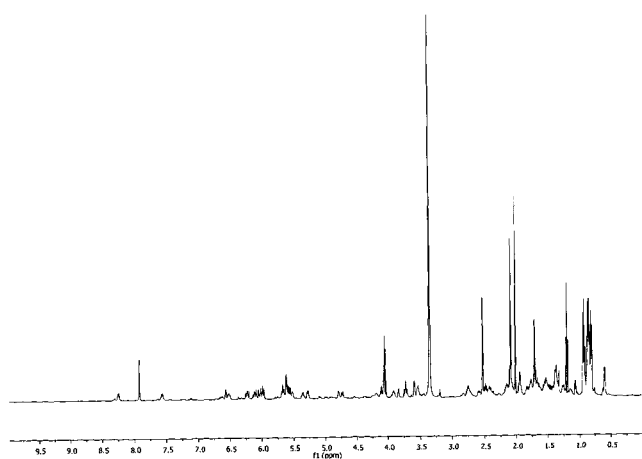
【 図 2 】

図2



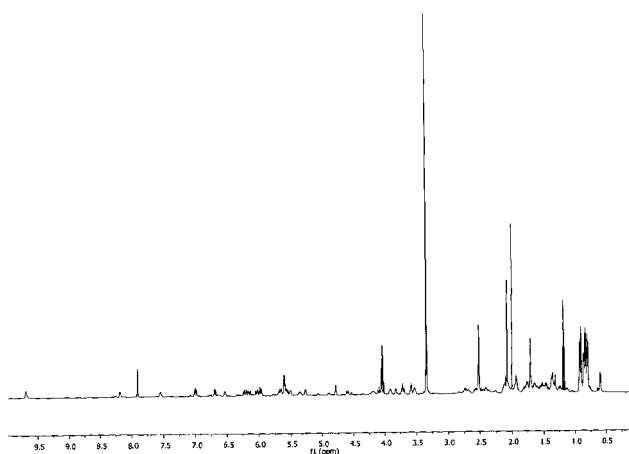
【 図 3 】

図3



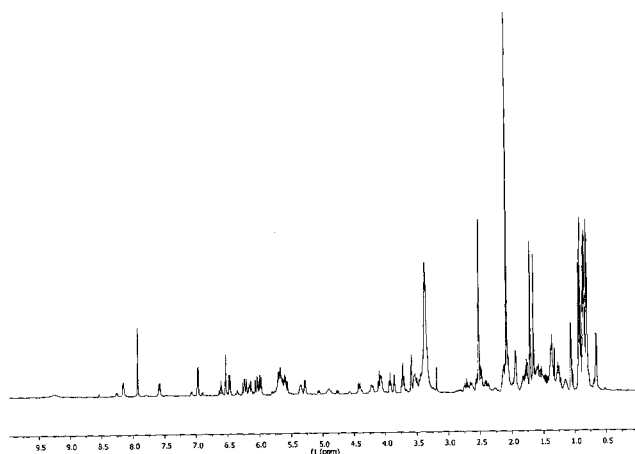
【 図 4 】

図4



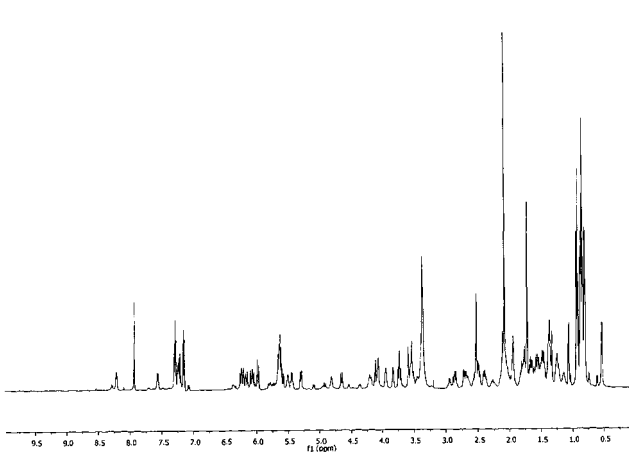
【 図 5 】

図5



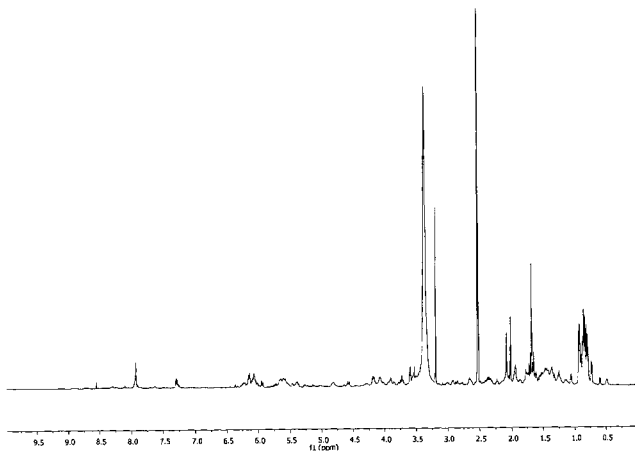
【 図 6 】

図6



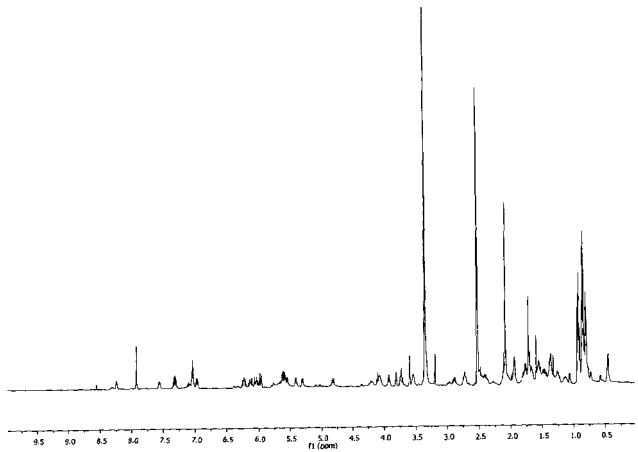
【図 7】

図7



【図 8】

図8



【配列表】

2017081925000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年12月14日(2016.12.14)

【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

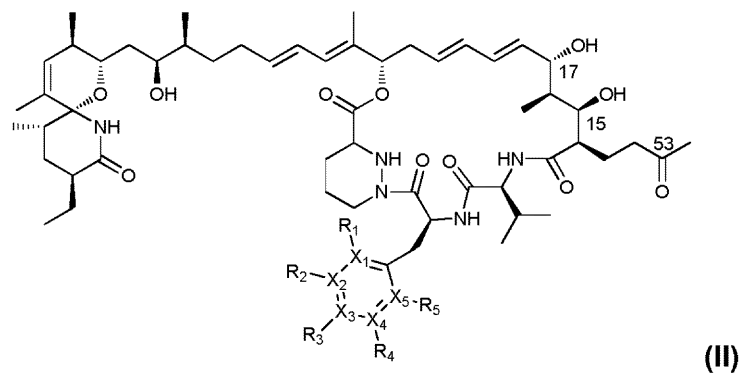
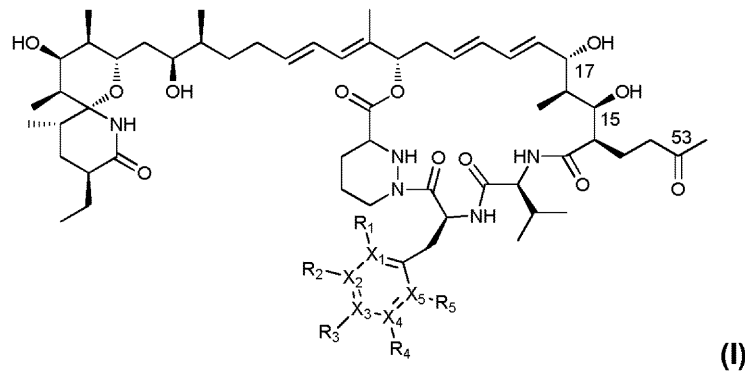
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(I)若しくは式(II)の化合物、又は、それらの医薬として許容し得る塩であって、それらの任意の互変異性体、又は、トランスとして示されているC26、27のC=C結合がシスである、それらの異性体を含み、かつ、C-53ケト及びC-15ヒドロキシル基及びメタノールの組み合わせによりケタールが形成されている、それらのメタノール付加物を含む、前記化合物、又は、それらの医薬として許容し得る塩：

【化 1】



(式中、

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、独立に、H、F、Cl、Br、 C_{2-6} アルケニル又は C_{1-10} アルキルを表し、ここで、該アルキル基の1以上の炭素原子は、O、N及び $S(O)_p$ (p は0、1又は2を表す。)から選択されるヘテロ原子によって任意に置き換えられており、かつここで、該アルキル基の1以上の炭素原子は、カルボニルによって任意に置き換えられており、かつ該アルキル基は、1以上のハロゲン原子によって任意に置換されていてもよく;

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 は、独立に、C又はNを表し、かつこれらの基のうちNを表すものについては、結合される置換基が存在せず;

ただし、 R_1 、 R_3 、 R_4 及び R_5 が全てHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 が全てCを表す場合、 R_2 はOHを表すことができない。)。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 4 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 4 9】

(肝細胞安定性評価)

予め液体窒素中に保存しておいた凍結保存肝細胞を、 37 ± 1 の振盪水浴に2分 $\pm$ 15秒間置く。次いで、該肝細胞を、10X体積の予め温めておいたKrebs-Henseleit重炭酸塩(KHB)緩衝液(2000mg/Lグルコース。炭酸カルシウム及び炭酸水素ナトリウム不含。Sigma社)に加え、穏やかにかき混ぜ、500rpmで3分間遠心分離する。遠心分離後、該上清を注意深く除去し、10X体積の予め温めておいたKHB緩衝液を加えて細胞ペレットを再懸濁する。これを穏やかにかき混ぜて、500rpmで3分間遠心分離する。次いで、該上清を除去し、廃棄する。次いで、細胞生存率及び収率を、細胞数により決定し、これらの値を利用してヒト肝細胞懸濁液を作成し適切な播種密度(生存細胞密度 $=2 \times 10^6$ 細胞/mL)にする。2Xの投薬溶液を、予め温めておいたKHB(1%DMSO)中で調製する(200 μ M添加溶液:DMSO 980 μ Lに基質ストック溶液(10mM)20 μ L、2X投薬溶液:KHB 990 μ Lに200 μ M添加溶液10 μ L(希釈後2 μ M))。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 0】

予め温めておいた2X投薬溶液50 μ Lをウェルに添加し、予め温めておいた肝細胞溶液(2×10^6 細胞/mL)50 μ Lを添加して、計時を開始する。次いで、プレートを37℃でインキュベートする。内部標準を含むアセトニトリル100 μ Lを、インキュベーション時間(0、15、30、60及び120分)の終了後に各ウェルに添加し、穏やかにかき混ぜ、予め温めておいた肝細胞溶液50 μ Lを添加する(2×10^6 細胞/mL)。インキュベーション終了時に、細胞生存率を測定する。試料を、4℃、4000rpmで15分間遠心分離し、上清を超純水で2倍に希釈し、化合物レベルをLC-MS/MSにより分析する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 6 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 6 6】

プラスミドpSGK268を、標準技術を用いて大腸菌DH10Bに形質転換し、アブラマイシン(50 μ g/ml)を含むプレート上で選別した。該欠失コンストラクトの導入は、本質的に前記Gene Bridges社のキットのプロトコルに従って行った。単一コロニーを2TY(アブラマイシン(50 μ g/ml))中で一晩増殖させ、pRedET(tet)プラスミドで形質転換し、30℃でアブラマイシン(50 μ g/ml)及びテトラサイクリン(3 μ g/ml)で選別した。単一コロニーを使用して、この株の一晩培養物を、3mlの2TY(アブラマイシン(50 μ g/ml)及びテトラサイクリン(3 μ g/ml))において30℃で調製した。この培養物0.5mlを使用して、10mlの2TY(アブラマイシン(50 μ g/ml)及びテトラサイクリン(3 μ g/ml))に30℃で播種し、OD600nm $\sim$ 0.5まで増殖させた。この培養物1.4mlを、2つのエッペンドルフチューブの各々に移し、10%アラビノース50 μ Lを一方のチューブに加えて、Red/ET組換えタンパク質の発現を誘導した。チューブを37℃で $\sim$ 1時間振盪した。誘導細胞及び非誘導細胞をベンチトップ遠心機でペレット化し、冷却滅菌水で2回洗浄した(毎回、再懸濁し、遠心分離して細胞をペレット化する)。得られたペレットを約30 $\sim$ 40 μ Lの水に懸濁し、氷上に保持した。氷上で、先に単離した1.7kbの分断フラグメントを前記誘導及び非誘導チューブに加え、1mmのBiorad社製エレクトロキュベットに移した。該試料を電気穿孔し(Biorad Micropulser、1.8kV、時定数 $\sim$ 4ms)、2TY 1ml(抗生物質不含)を加えて混合し、細胞を該キュベットから移した。細胞を、37℃で $\sim$ 3時間、振盪しながら(1100rpm、エッペンドルフサーモミキサーコンパクト)インキュベートし、その後、アブラマイシン(50 μ g/ml)及びカナマイシン(25 μ g/ml)を含む2TYプレート上に蒔き、37℃で一晩インキュベートした。誘導試料プレート由来のコロニーを、50 μ g/mlのカナマイシンを含む2TYプレート上に画線して純化し、カナマイシン耐性カセットの導入を確認した。それぞれの細菌コロニーについてのPCRを利用して該カセットの導入を確認した。これらの培養物からプラスミドを調製し、消化して、期待されるプラスミドpSGK270を確認した。次いで、プラスミドをNsiIで消化して前記マーカフラグメントを除去し、残部を再ライゲートして、sfaAインフレーム欠失コンストラクト、pSGK271を作製した。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 9】

【表 10】

表 1

供給された 変異シントン	変異シントンの名称	[M-H] ⁻ 実測 (m/z)	[M+Na] ⁺ 実測 (m/z)	分子量 (amu)	保持時間 (分)
	2-アミノ-3-(4-フルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパン酸	1106.4	1130.4	1107.4	5.5
	2-アミノ-3-(3-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパン酸	1106.4	1130.4	1107.4	5.7
	メチル 2-アミノ-3-(3-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロピオネート	1106.4	1130.4	1107.4	5.7
	(S)-メチル 2-アミノ-3-(3-ヒドロキシ-4-メチルフェニル)プロパノアート	1102.5	1126.7	1103.5	6.0
	2-アミノ-3-(3-フルオロフェニル)プロパン酸	1090.4	1114.5	1091	6.1
	メチル (2S)-2-アミノ-3-(3-ヒドロキシ(2-ピリジル))プロパノアート	1089.5	1113.7	1090.5	4.4
	メチル 2-アミノ-3-(2-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパノアート	1106.5	1130.6	1107.5	5.5
	メチル 2-アミノ-3-(2-フルオ	1106.5	1130.6	1107.5	5.1

	ロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート				
	メチル 2-アミノ-3-(2,6-ジフルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート	1124.4	1148.5	1125.5	5.1
	メチル 2-アミノ-3-(4-エチル-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート	1116.7	1141.0	1117.7	7.2
	メチル 2-アミノ-3-(2,4-ジフルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロパノアート	1124.7	1148.8	1125.7	6.0

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月27日(2017.3.27)

【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

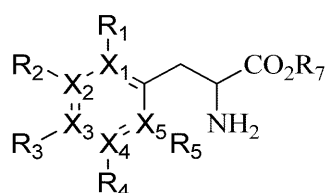
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

sfaA遺伝子又はsfaA遺伝子のホモログが不活化されているか又は欠失しているストレプトマイセス属種であるサングリフェリン産生細菌に、式(III)の化合物：

【化 1】



式 (III)

(式中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、次のように定義される：

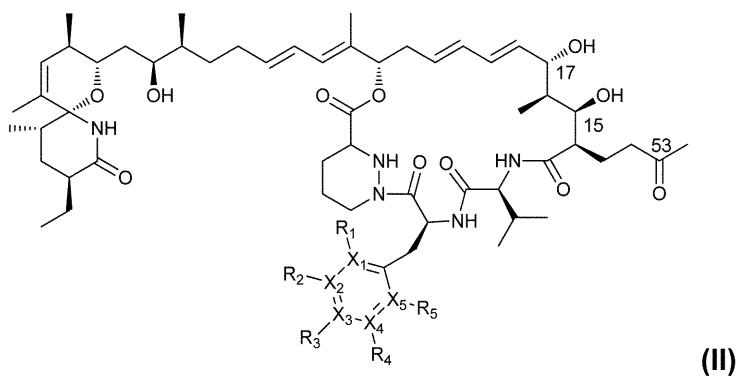
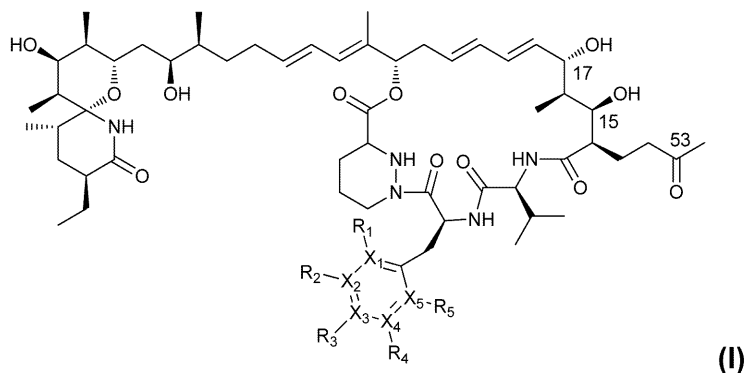
R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、独立に、H、F、Cl、Br、 C_{2-6} アルケニル又は C_{1-10} アルキルを表し、ここで、該アルキル基の1以上の炭素原子は、O、N及びS(O)_p (pは0、1又は2を表す。)から選択されるヘテロ原子によって任意に置き換えられており、かつここで、該アルキル基の1以上の炭素原子は、カルボニルによって任意に置き換えられており、かつ該アルキル基は、1以上のハロゲン原子によって任意に置換されていてもよく；

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 は、独立に、C又はNを表し、かつこれらの基のうちNを表すものについては、結合される置換基が存在せず；

ただし、 R_1 、 R_3 、 R_4 及び R_5 が全てHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 が全てCを表す場合、 R_2 はOHを表すことができず；

かつ、 R_7 は、H又はエステル形成基を表す。)又はそれらの塩を供給する工程、及び該細菌を培養して、以下の式(I)若しくは式(II)のサングリフェリン化合物：

【化 2】



(式中、

R_1 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、独立に、H、F、Cl、Br、 C_{2-6} アルケニル又は C_{1-10} アルキルを表し、ここで、該アルキル基の1以上の炭素原子は、O、N及びS(O)_p (pは0、1又は2を表す。)から選択されるヘテロ原子によって任意に置き換えられており、かつここで、該アルキル基は、1以上のハロゲン原子によって任意に置換されていてもよく;

かつ、 R_2 は、H、F、Cl、 CF_3 、OH、 NH_2 及び C_{1-6} アルキルから選択され;

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 は、独立に、C又はNを表し、かつこれらの基のうちNを表すものについては、結合される置換基が存在せず;

ただし、 R_1 、 R_3 、 R_4 及び R_5 が全てHを表し、かつ X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及び X_5 が全てCを表す場合、 R_2 はOHを表すことができない。)又はそれらの医薬として許容し得る塩を製造する工程を含む、変異合成サングリフェリンの製造方法。

【請求項 2】

前記変異合成サングリフェリンを単離する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

X_1 がCを表す、式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩の調製のための、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 4】

X_2 がCを表す、式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩の調製のための、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 5】

X_3 がCを表す、式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩の調製のための、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 6】

X_4 がCを表す、式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩の調製のための、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 7】

X_5 がCを表す、式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩の

調製のための、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 8】

R_1 、 R_3 、 R_4 及び R_5 が、独立に、H、F、Cl、 CF_3 、OH及び C_{1-6} アルキルから選択される、請求項3～7のいずれか1項において定義されている式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩の調製のための、請求項1又は2記載の方法。

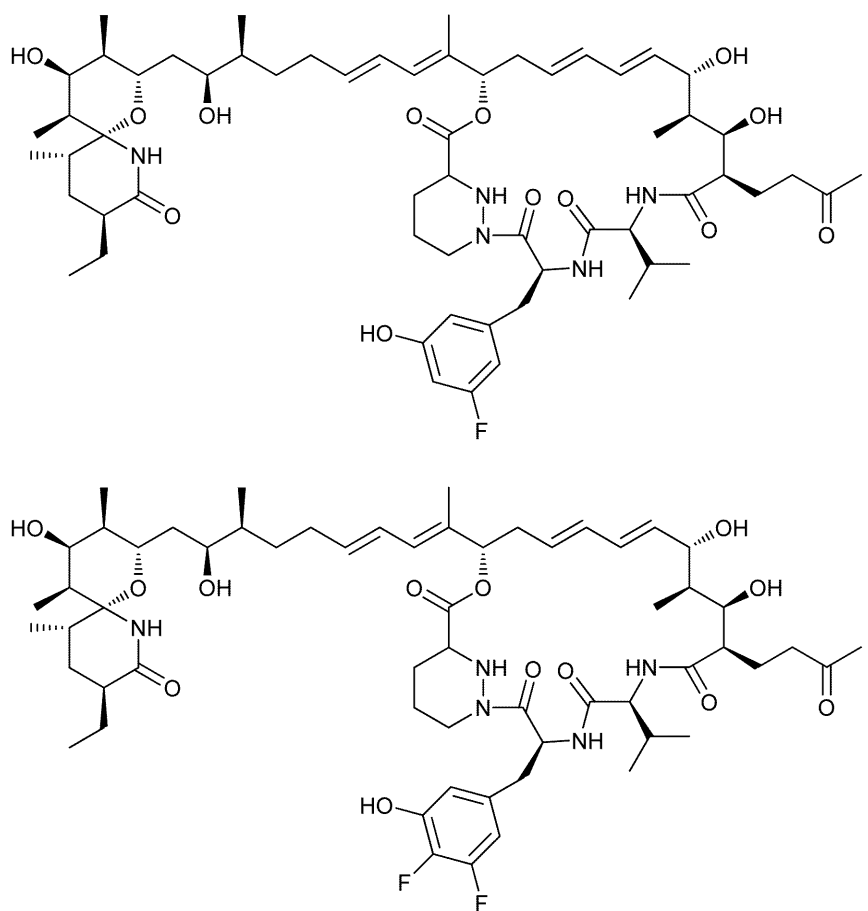
【請求項 9】

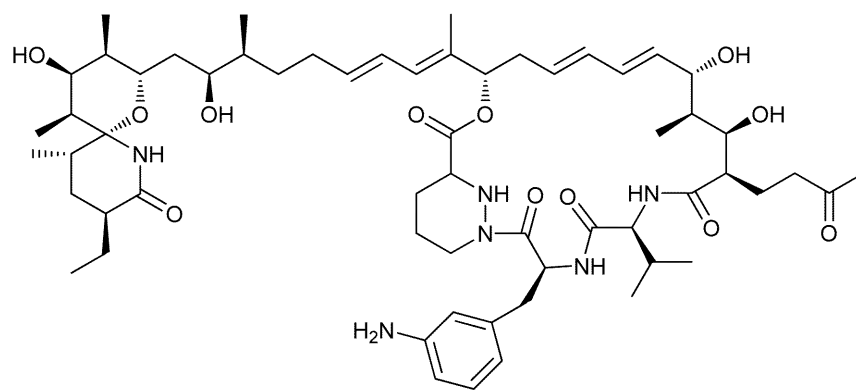
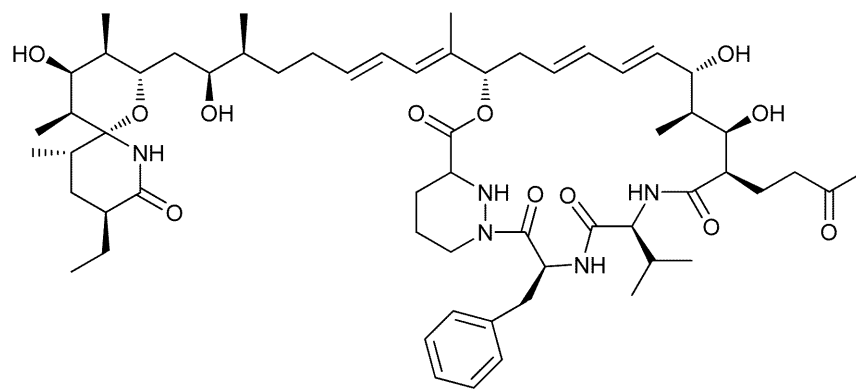
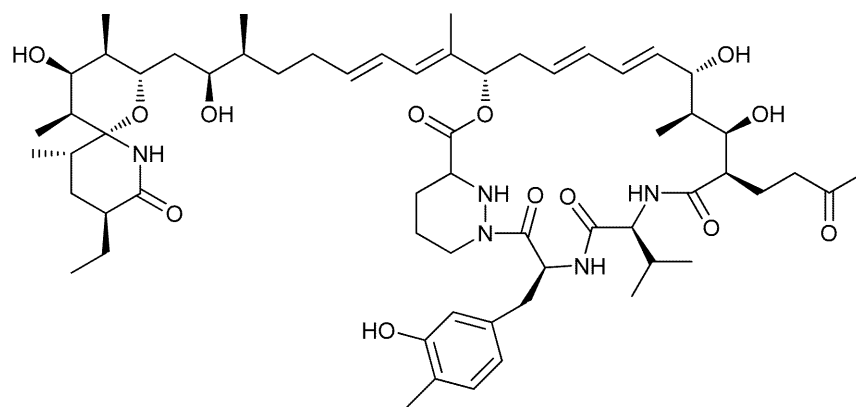
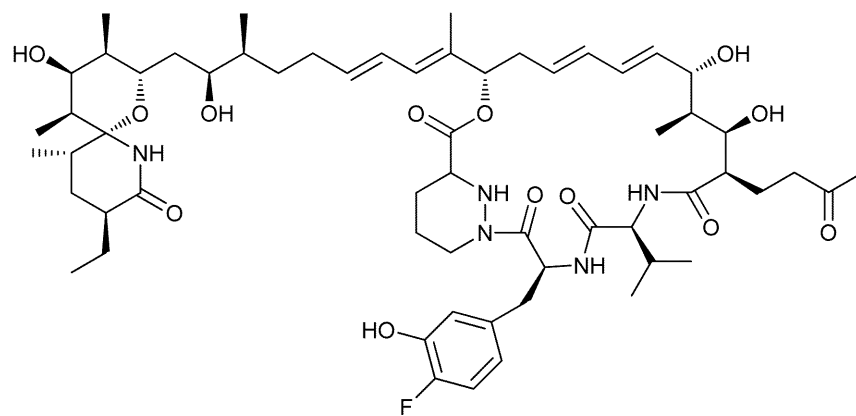
R_2 がOHを表す、請求項8において定義されている式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩の調製のための、請求項1又は2記載の方法。

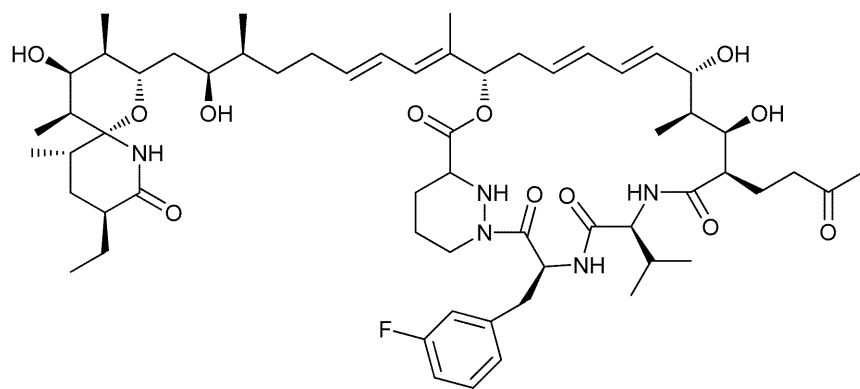
【請求項 10】

以下から選択される式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩の調製のための、請求項1又は2記載の方法：

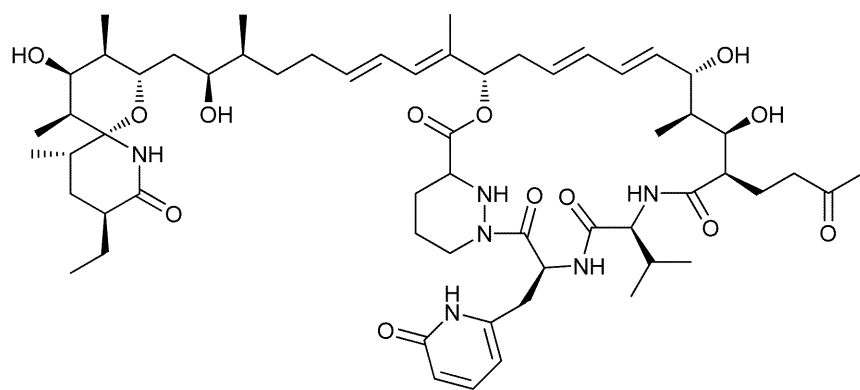
【化 3】



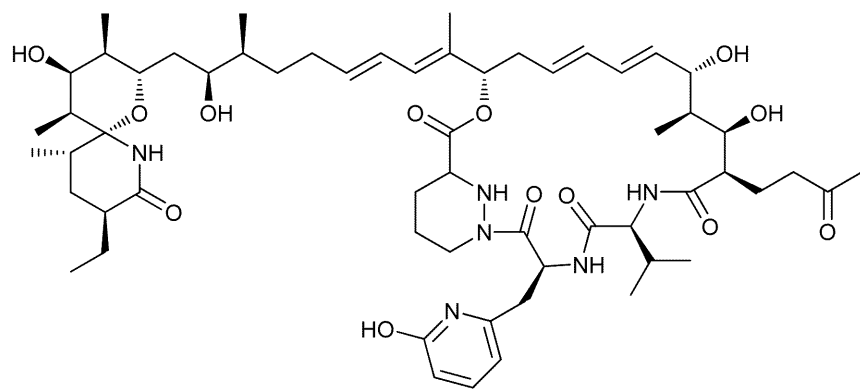




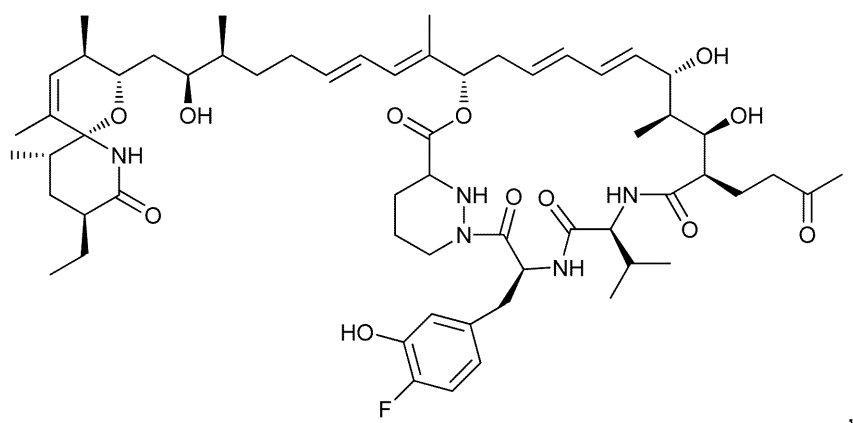
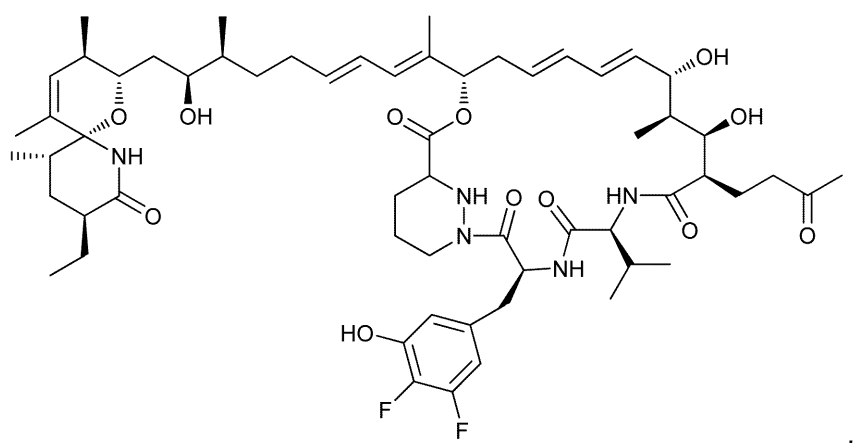
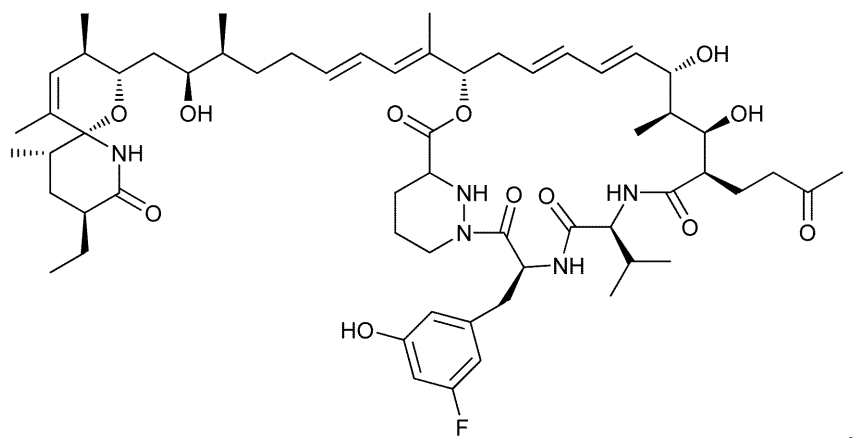
1

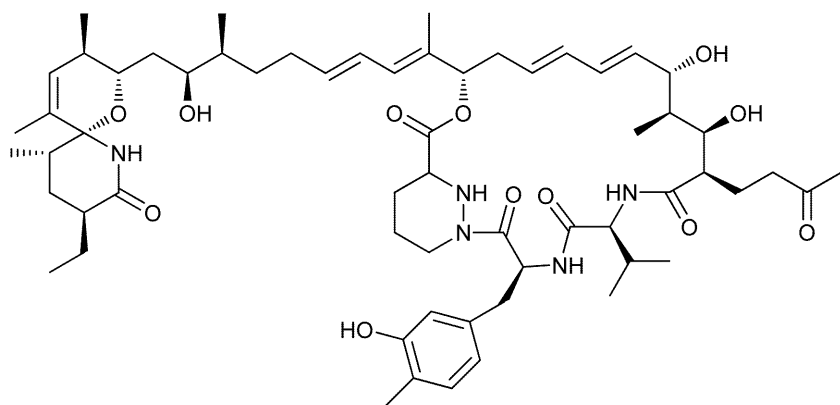


(上記式は以下のように表すこともできる。)

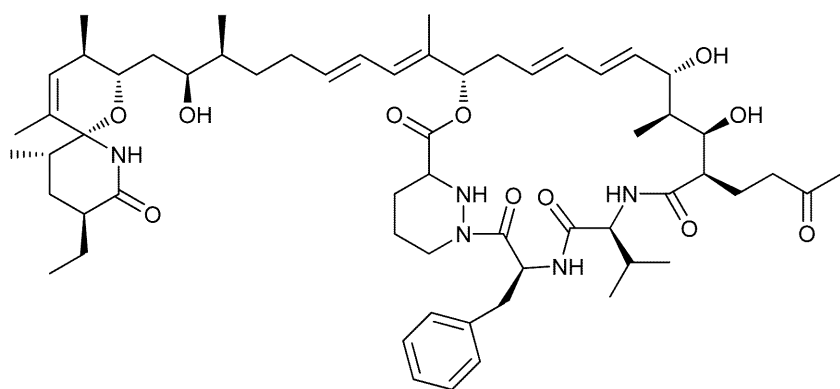


1

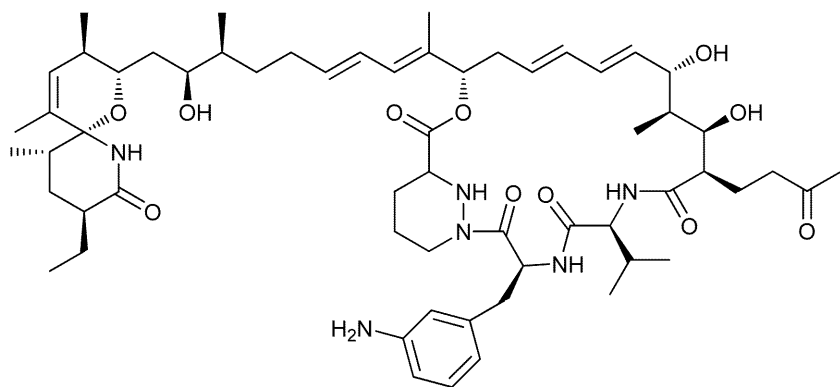




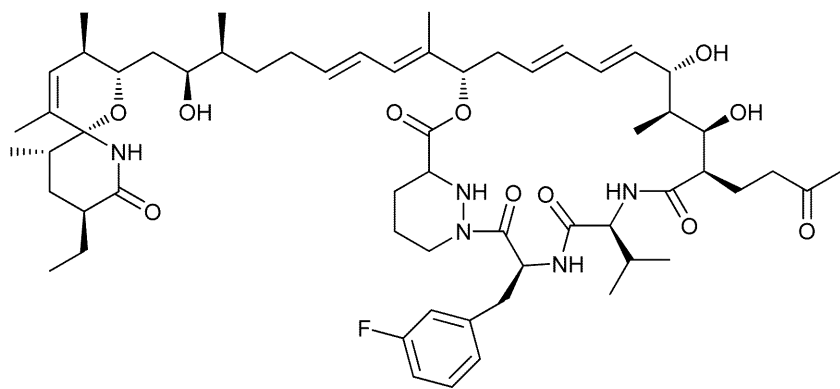
,



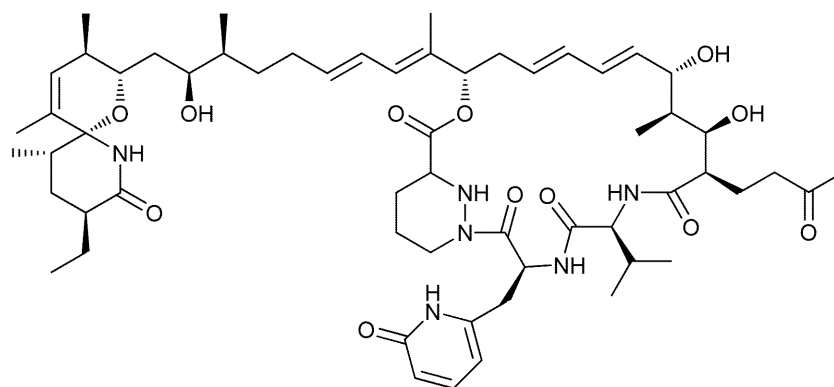
,



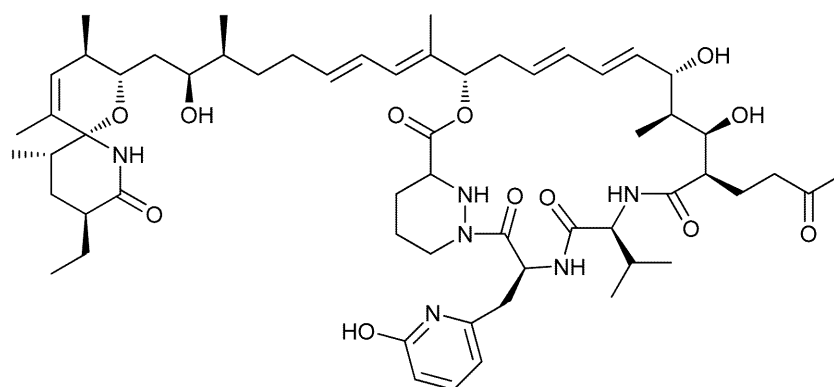
,



, 及び



(上記式は以下のように表すこともできる。)

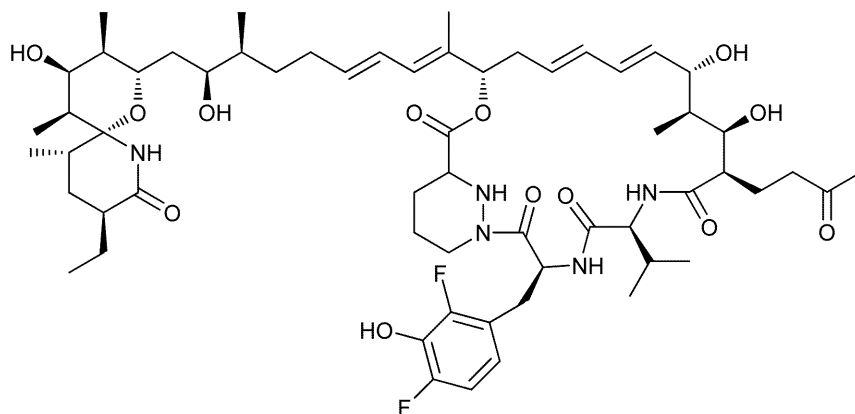


。

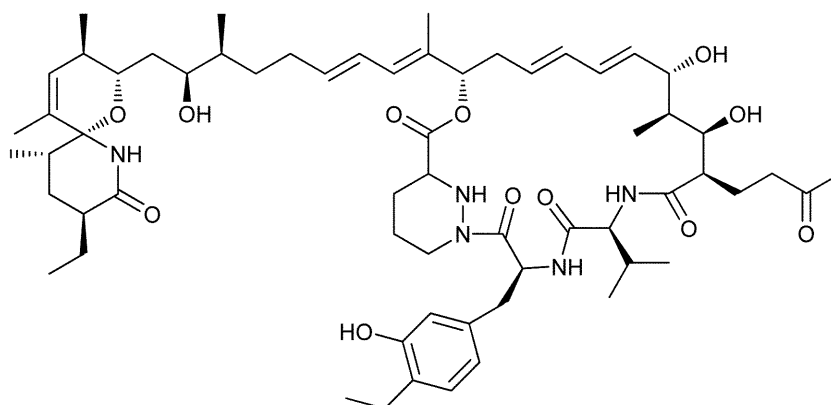
【請求項 1 1】

以下から選択される式(I)若しくは式(II)の化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩の調製のための、請求項1又は2記載の方法：

【化 4】



及び



。

【請求項 1 2】

医薬として使用するためのものである、請求項4～13のいずれか1項において定義されている化合物の調製のための、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】

HCV若しくはHIV感染などのウイルス感染症、又は、筋ジストロフィーの治療のための医薬として使用するためのものである、請求項4～13のいずれか1項において定義されている化合物の調製のための、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4】

炎症性障害の治療のための医薬として使用するためのものである、請求項4～13のいずれか1項において定義されている化合物の調製のための、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

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	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 K	35/74	(2015.01)	A 6 1 K	35/74
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00

(72)発明者 マトトヘウ アラン グレゴリ
 グレート・ブリテン及び北部アイルランド連合王国 シービー 2 1 6 エーディー ケンブリッジ
 ケンブリッジシャー グレート アビングトン グランタ パーク スイート 5 リバーサイ
 ド 3 バイオチカ テクノロジー リミテッド

(72)発明者 バルリエ ウイルキンソン
 グレート・ブリテン及び北部アイルランド連合王国 シービー 2 1 6 エーディー ケンブリッジ
 ケンブリッジシャー グレート アビングトン グランタ パーク スイート 5 リバーサイ
 ド 3 バイオチカ テクノロジー リミテッド

(72)発明者 ステベン ガリ ケンドレウ
 グレート・ブリテン及び北部アイルランド連合王国 シービー 2 1 6 エーディー ケンブリッジ
 ケンブリッジシャー グレート アビングトン グランタ パーク スイート 5 リバーサイ
 ド 3 バイオチカ テクノロジー リミテッド

(72)発明者 クフリストイネ ジャネット マルトイン
 グレート・ブリテン及び北部アイルランド連合王国 シービー 2 1 6 エーディー ケンブリッジ
 ケンブリッジシャー グレート アビングトン グランタ パーク スイート 5 リバーサイ
 ド 3 バイオチカ テクノロジー リミテッド

F ターム(参考) 4B064 AG01 CA19 DA01
 4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA14 BA32 BA36 CA59 NA14 ZA94
 ZB11 ZB33
 4C087 AA01 AA02 AA04 BC22 CA46 NA14 ZA94 ZB11 ZB33
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA12 CA11 EA20 EA22 EA27 EA28 EA29
 FA74

【外国語明細書】
2017081925000001.pdf