

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6118793号
(P6118793)

(45) 発行日 平成29年4月26日(2017.4.26)

(24) 登録日 平成29年3月31日(2017.3.31)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 5/06 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

C O 7 K	5/06
A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	31/18
A 6 1 P	37/06

請求項の数 17 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-501720 (P2014-501720)
(86) (22) 出願日	平成24年3月29日 (2012.3.29)
(65) 公表番号	特表2014-514290 (P2014-514290A)
(43) 公表日	平成26年6月19日 (2014.6.19)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2012/050707
(87) 國際公開番号	W02012/131377
(87) 國際公開日	平成24年10月4日 (2012.10.4)
審査請求日	平成27年3月25日 (2015.3.25)
(31) 優先権主張番号	1105293.3
(32) 優先日	平成23年3月29日 (2011.3.29)
(33) 優先権主張國	英國 (GB)
(31) 優先権主張番号	1113629.8
(32) 優先日	平成23年8月8日 (2011.8.8)
(33) 優先権主張國	英國 (GB)

(73) 特許権者 513155596
ネウロビベ プハルマセウトイカル エー
ビー
スウェーデン国 223 81 ルンド
スチエエレバゲン 2 メトイコン ビレ
ッジ
(74) 代理人 100097456
弁理士 石川 徹
(72) 発明者 ステベン ジャAMES モスス
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21 6エーディー
ケンブリッジ ケンブリッジシティー 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

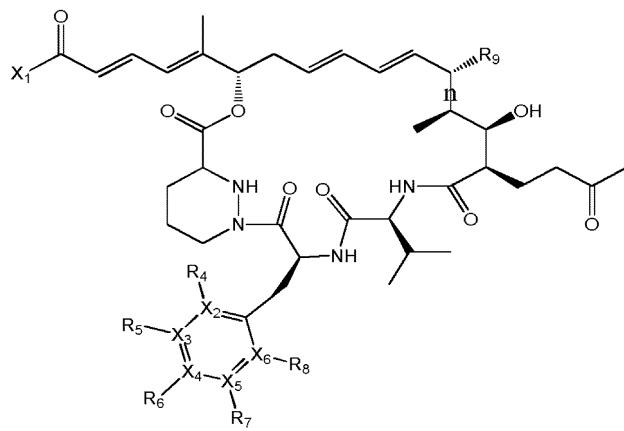
(54) 【発明の名称】マクロ環状化合物及びそれらの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(I)の化合物であって、その任意の互変異性体を含み；かつ、C-53ケト及びC-15ヒドロキシル基と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 (I)

(式中、

20

部分X₁は、-OR₁、又は-NR₁R₂を表し；

R₁、及びR₂は、独立に、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルシクロアルキル、アルキルシクロアルケニル、アルケニルシクロアルキル、アルケニルシクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルアリール、又はアルケニルヘテロアリールを表し、該基のいずれも、任意に、単環式アリール又は単環式ヘテロアリールにより置換されていてよく；アリール又はヘテロアリール基の一部でないR₁、及びR₂の1個以上の炭素原子は、O、N、及びS(O)_p（式中、pは0、1、又は2を表す）から選択されるヘテロ原子により任意に置換されており、かつ、R₁、及びR₂の1個以上の炭素原子は任意にカルボニルにより置換されており；

或いは、R₁とR₂は、NR₁R₂が特定された窒素原子を含む飽和又は不飽和の複素環式環を表し、前記環の1個以上の炭素原子が任意に、O、N、及びS(O)_p（式中、pは0、1、又は2を表す）から選択されるさらなるヘテロ原子により置換されており、前記環の1個以上の炭素原子が、任意にカルボニルにより置換されており、該複素環式環が、任意に、アリール又はヘテロアリール環に縮合し得るように結合しており；

或いは、R₁及び/又はR₂は水素を表し；

R₉は、H又はOHを表し；

（nは単結合又は二重結合を表し、nが二重結合を表す場合は、R₉がHを表し；

R₄、及びR₈はHを表し；

R₅は、H、OH、F、Cl又はBrを表し；

R₆は、H、Me又はFを表し；

R₇は、F、Cl又はBrを表し；

X₂、X₃、X₄、X₅、及びX₆は、独立にCを表し；

但し、R₄、R₆、R₇、及びR₈が全てHを表す場合、R₅はOH、-Oアルキル、又は-O(CO)アルキルを表すことはできないことを条件とする）。

【請求項2】

nが単結合を表す、請求項1記載の化合物。

【請求項3】

R₉がOHを表す、請求項1又は請求項2記載の化合物。

【請求項4】

R₅がOHを表す、請求項1～3のいずれか一項記載の化合物。

【請求項5】

R₇がH又はFを表す、請求項1～4のいずれか一項記載の化合物。

【請求項6】

R₆及び/又はR₇がFを表す、請求項1～5のいずれか一項記載の化合物。

【請求項7】

X₁がNR₁R₂を表す、請求項1～6のいずれか一項記載の化合物。

【請求項8】

R₁が、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルシクロアルキル、アルキルシクロアルケニル、アルケニルシクロアルキル、アルケニルシクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルアリール、又はアルケニルヘテロアリールを表し、かつR₂が、H、アルキル、アルケニル、又は-Oアルキルを表す、請求項7記載の化合物。

【請求項9】

NR₁R₂がモルホリニル、オキサジナン、又は下記の表に開示された基の1つである、請求項7に記載の化合物：

10

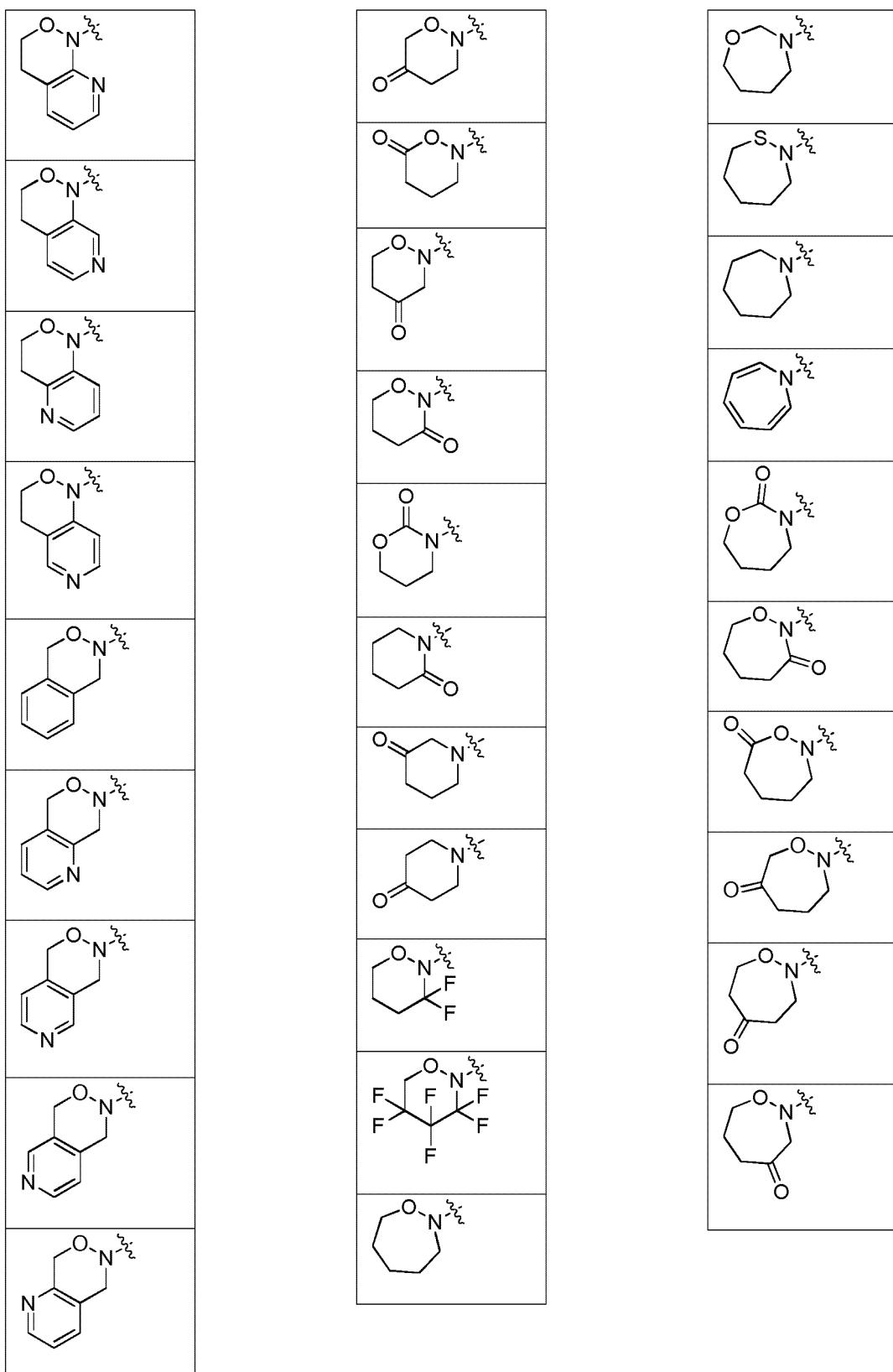
20

30

40

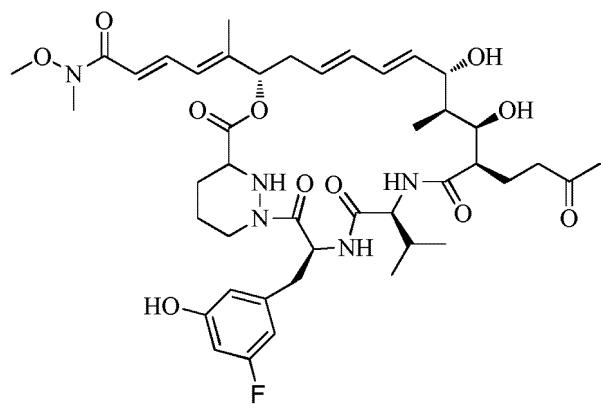
【表 1】

			10
			20
			30
			40

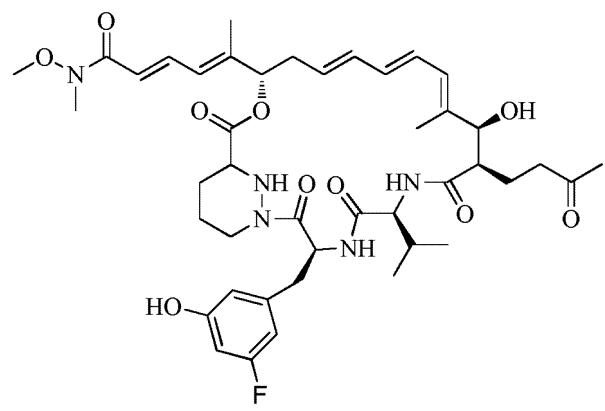


が形成されているそのメタノール付加物を含む、前記化合物、又はそれらの医薬として許容し得る塩：

【化 2】

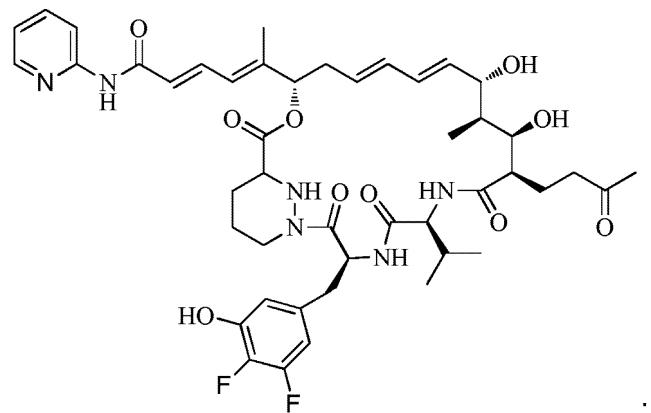
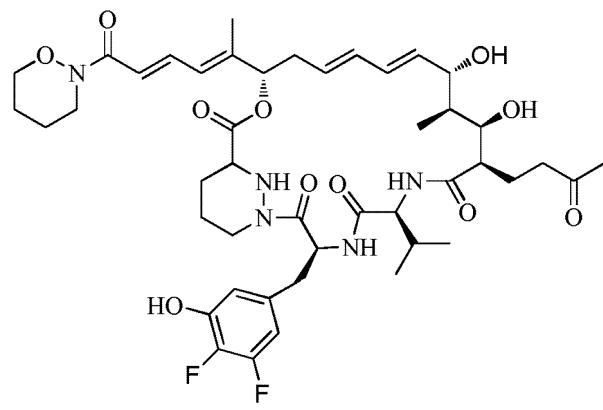
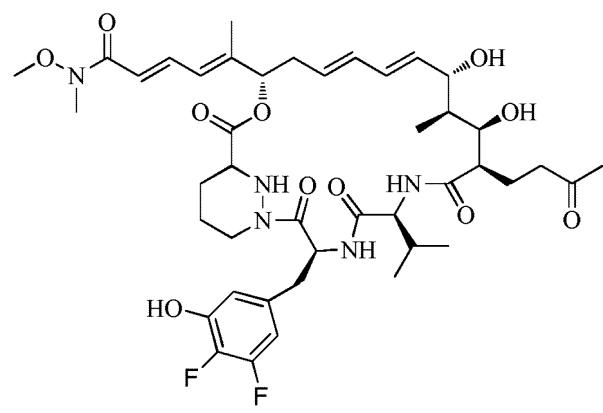
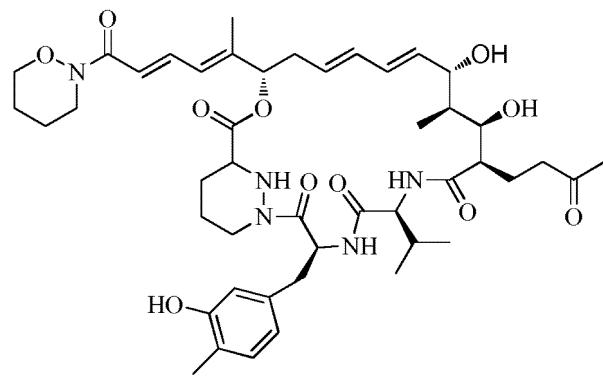


10



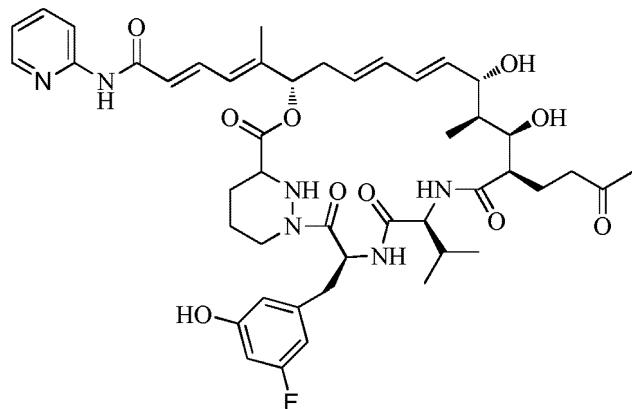
20

【化3】



；及び

【化4】



10

。

【請求項11】

医薬として使用するための、請求項1～10のいずれか一項記載の化合物。

【請求項12】

HCV若しくはHIV感染などのウイルス感染症を治療するための医薬として使用するための、又は免疫抑制剤若しくは抗炎症剤として使用するための、請求項1～10のいずれか一項記載の化合物。 20

【請求項13】

請求項1～10のいずれか一項記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項14】

請求項1～10のいずれか一項記載の化合物を含み、さらに第2の又は二次の有効成分を含む、医薬組成物。

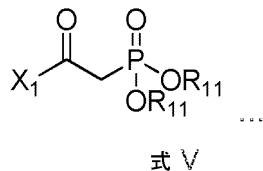
【請求項15】

HCV若しくはHIV感染などのウイルス感染症の治療のための、又は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組成物であって、治療的に有効な量の請求項1～10のいずれか一項記載の化合物を含む、前記医薬組成物。 30

【請求項16】

請求項1～10のいずれか一項記載の化合物を製造する方法であって、式Vの化合物：

【化5】

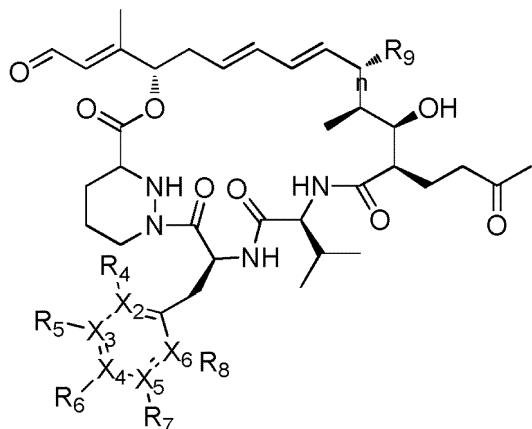


30

(式中、 X_1 は請求項1～10のいずれか一項に定義されたとおりであり、各 R_{11} は、独立に、 $\text{C}_{1\sim 4}$ アルキル又はベンジルである)
を、アルデヒド性マクロ環(式VIの化合物):

40

【化6】



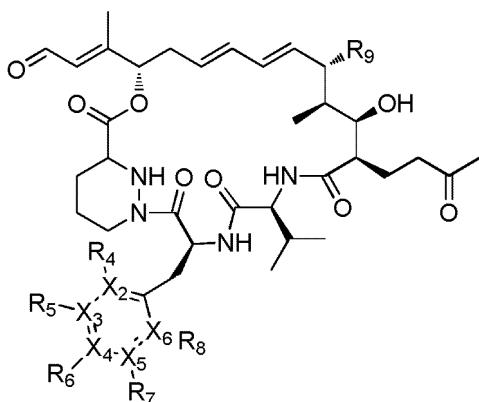
(式中、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、及び n は、請求項1～10のいずれか一項に定義されたとおりである)

と反応させる工程を含む、前記方法。

【請求項17】

式(VI)の化合物:

【化7】



(式中、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、及び R_9 は、請求項1～10のいずれか一項に定義されたとおりである)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(序論)

本発明は、例えば、C型肝炎ウイルス(HCV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、及びヒト免疫不全症ウイルス(HIV)などのウイルスによるウイルス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、及び、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又はHIV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これらの使用方法、筋ジストロフィーなどのミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)の阻害が有用である疾患におけるこれらの使用方法、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これらの使用方法も提供する。

【背景技術】

【0002】

30

40

50

(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】

10

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る、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内臓損傷などの、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(pIFN)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)。

20

【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、過去の顕著なうつ病の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。治療の中止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)。

30

【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】

40

直接作用型抗ウイルス(DAA)薬としても知られている、C型肝炎の新規の特異的標的抗ウイルス療法(STAT-C)薬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)。

【0008】

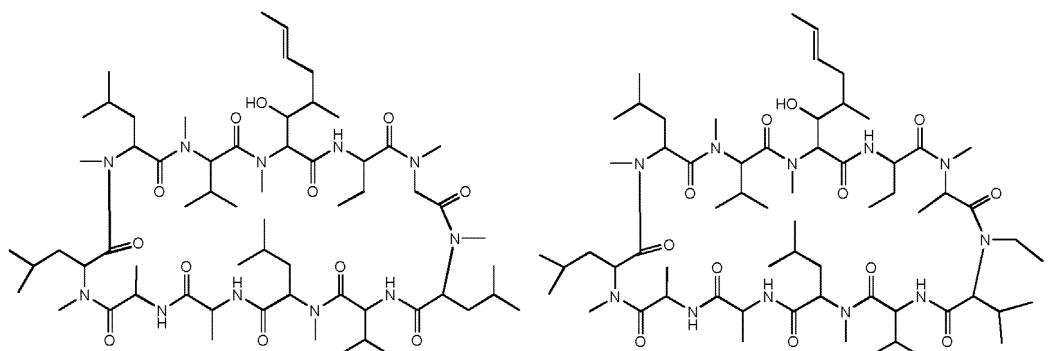
(シクロフィリン阻害剤)

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

50

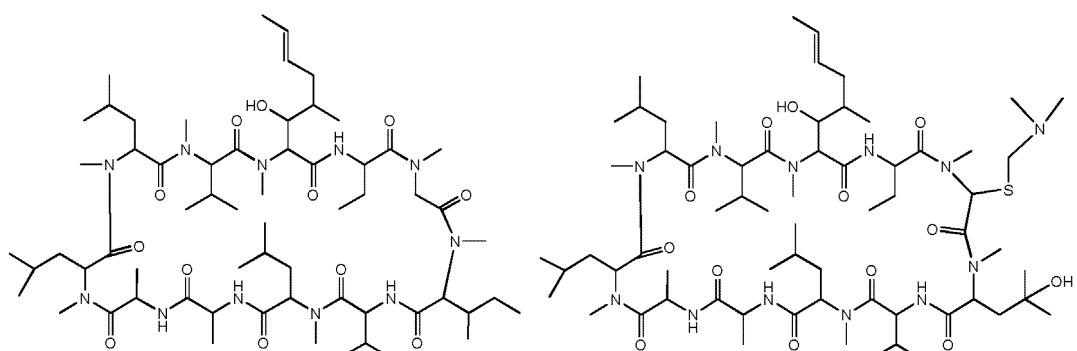
リーである。CyPは、転写調節、免疫応答、タンパク質分泌、及びミトコンドリア機能などの細胞プロセスに関与している。HCVウイルスは、ヒトの感染の間その生活環のためにCyPをリクルートする。元々は、CyPが、RNA複製を促進するHCV非構造的タンパク質NS5B RNAポリメラーゼのRNA結合活性を刺激すると考えられていたが、CyP PPIアーゼ活性の要求を含む、代わりの仮説もいくつか提案されてきた。A及びBを含むCyPの種々のアイソフォームが、HCVの生活環に関与していると考えられている(Yangら、2008; Appelら、2006; Chatterjiら、2009; Gaitherら、2010)。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)、ニューロスボラ(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。

【化1】



シクロスボリンA, 1

DEBIO-025, 2



NIM-811, 3

SCY-635, 4

【0009】

シクロスボリン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)。CsAに関する早期の耐性研究は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

10

20

30

40

50

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 】

シクロスボリンアナログの抗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。DEB10-025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オの効力を示した。耐性研究は、DEB10-025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、DEB10-025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)。10

【 0 0 1 1 】

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が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 】

DEB10-025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、DEB10-025と組み合わせれば重大な臨床上の問題となるだろう。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)。DEB10-025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、CsA系シクロフィリン阻害剤による後の試験のいくつかは、単独療法として投与された場合、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)。DEB10-025及びシクロスボリンAは、胆汁酸塩排出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OAT1B1/OAT1B3/MRP2/MRP3/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、DEB10-025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)。P糖タンパク質(Pgp/MDR1)、BSEP、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、HIVなどの共感染の治療を受ける患者の一部における特定の組み合わせ及び使用を潜在的に制限している(Sedenら、2010)。30

【 0 0 1 3 】

さらに、DEB10-025及びシクロスボリン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)。シクロスボリン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的治療を受けている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4050

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。

【0014】

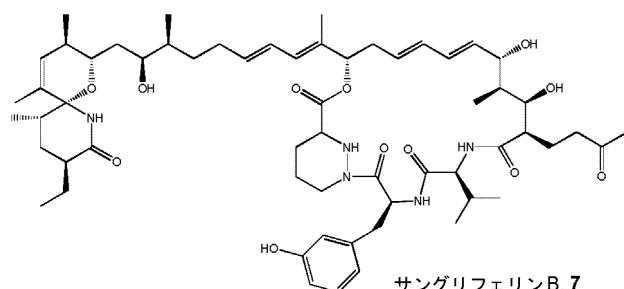
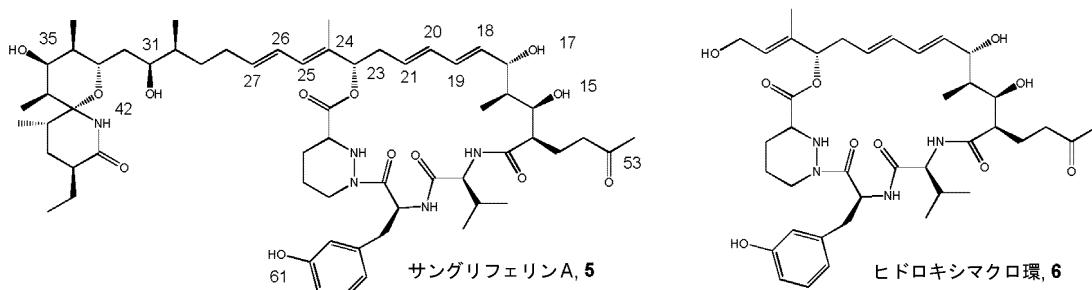
シクロフィリンの阻害がHCVの治療に対する有望な新しい手法を表すことを考慮すると、HCV感染に対する併用療法において使用するための、より強力で安全なCyP阻害剤を発見し、かつ開発する必要がある。

【0015】

(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)により產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】



【0016】

(サングリフェリンの生合成)

サングリフェリンは、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テターゼ(NRPS)によって生合成される(国際公開第2010/034243号参照)。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。

【0017】

(サング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、及びラバ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(Steinschul

10

20

30

40

50

te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。

【 0 0 1 8 】

SfAの分子構造は複雑であり、CyPAとの相互作用は、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。10

【 0 0 1 9 】

これとは逆に、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、セリアック病を含むがこれらに限定されない、移植拒絶反応、自己免疫疾患、炎症性疾患、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、低毒性の免疫抑制剤を開発する機会もある。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、シクロスボリンA、ラバマイシン、及びFK 506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。サングリフェリンAは効力がシクロスボリンAの10分の1であることも示されているので、理想的な新規の薬剤ならば、向上した効力及び/又は治療域を有するだろう。20

【 0 0 2 0 】

(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)。30

【 0 0 2 1 】

(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種の非-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。40

【 0 0 2 2 】

(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を発表し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 μM)を記載したが、Xieら(2007)はHBVに対するCsAのいくらかの活性($IC_{50} > 1.3 \mu g/mL$)50

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ーラーの抗ウイルス活性の報告が多数ある。

【 0 0 2 3 】

(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；インターフェロンアルファ及びペグ化インターフェロンアルファ、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リル)。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)。

10

【 0 0 2 4 】

(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の膜透過性遷移孔の開口は、ミトコンドリア透過性遷移(MPT)のオンセットを開始する。これは原因として作用する事象であり、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開口が原因である適応症において有用になり得る。

20

【 0 0 2 5 】

(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(KauIら、2009)、黄熱病ウイルス(Qingら、2009)、西ナイルウイルス(Qingら、2009)、西部馬腦炎ウイルス(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症の治療において潜在的な活性を有する。

30

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)。

【 0 0 2 6 】

(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。

40

【 0 0 2 7 】

したがって、特にHCV感染の治療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、免疫抑制若しくは抗炎症効果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

50

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、DEB10-025)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)指數。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(mutasyntetic)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、例えば、増大したミクロソーム半減期により示されるとおりP450による代謝又はグルクロン酸抱合が低減されており、かつ/又は、例えば、低いレブリコンEC₅₀により示されるとおりHCVに対する向上した低減した効力を有すると予測される。

【0028】

さらに、移植拒絶反応の予防において、又は自己免疫疾患、炎症性疾患、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、以下の性質の1つ以上を含む、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、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、例えば、増大したミクロソーム半減期により示されるとおりP450による代謝又はグルクロン酸抱合が低減されており、かつ/又は、例えば、低いT細胞増殖IC₅₀により示されるとおり向上した免疫抑制効力を有する新規の誘導体を開示する。

【0029】

したがって、実施例から分かるとおり、本発明の化合物は、下記の好ましい治療上関連ある性質を有する:

- 従来技術のシクロフィリン阻害剤、シクロスボリンA、DEB10-025(アリスポリビル)、及びサングリフェリンAと比較して、HCV及びHIVに対する向上した抗ウイルス効力;
- 従来技術の化合物サングリフェリンAと比べて、低下したクリアランス及び増加した経口曝露(oral expose);
- 従来技術のシクロフィリン阻害剤、シクロスボリンA、DEB10-025(アリスポリビル)、及びサングリフェリンAと比べて、CypA PPIアーゼ活性のより効力の高い阻害;
- ビリルビントランスポーター(OATP-1B1、OATP-1B3、MRP2、及びMRP3)の阻害低減及び生体異物トランスポーター(Pgp及びBSEP)の阻害低減により示される、向上した副作用プロファイル及び低減した薬物-薬物相互作用。

【発明の概要】

【0030】

本発明は、変異合成サングリフェリンの半合成修飾により生成した新規のマクロ環状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、式IIA及び式IIBに記載されるものなどの変異合成サングリフェリンのジヒドロキシ化、それに続く開裂によるアルデヒド性マクロ環の生成、それに続くさらなる化学作用、例えば、アルデヒドを置換する種々の置換基を持つ分子を生成させるホルナー・エモンズタイプ反応及びアルデヒドを含む他のカップリング反応により生成することができる。その結果、本発明は、マクロサイリック(macrocylic)サングリフェリンアナログ、これらの化合物の製造方法、これらの化合物の医薬における使用方法、又はさらなる化合物の製造における中間体としての使用方法を提供する。

10

20

30

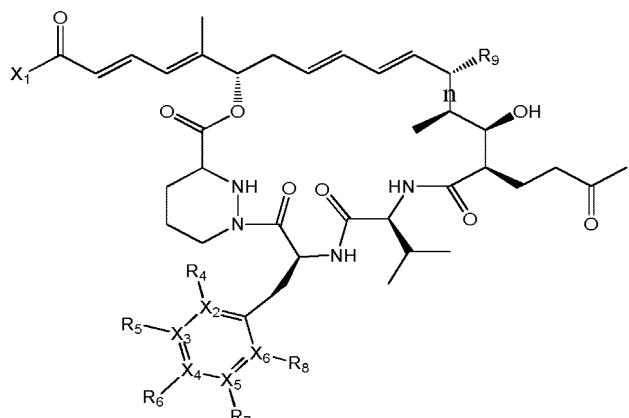
40

50

【0031】

したがって、第1の態様において、本発明は、下記の式(I)のマクロ環状サングリフェリンアナログ及びその誘導体、又はその医薬として許容し得る塩：

【化3】



式(I)

(式中、

部分X₁は、-OR₁、-NR₁R₂、又はR₃を表し；

R₁、R₂、及びR₃は、独立に、水素、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルシクロアルキル、アルキルシクロアルケニル、アルケニルシクロアルキル、アルケニルシクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルアリール、又はアルケニルヘテロアリールを表し、該基のいずれも、任意に、単環式(monocyclic)アリール又は単環式ヘテロアリールにより置換されていてよく；

アリール又はヘテロアリール基の一部でないR₁、R₂、及びR₃の1個以上の炭素原子は、O、N、及びS(O)_p（式中、pは0、1、又は2を表す）から選択されるヘテロ原子により任意に置換されており、かつR₁、R₂、及びR₃の1個以上の炭素原子は任意にカルボニルにより置換されており；

或いは、R₁とR₂は、NR₁R₂が明示された窒素原子を含む飽和又は不飽和の複素環式環を表し、前記環の1個以上の炭素原子が任意に、O、N、及びS(O)_p（式中、pは0、1、又は2を表す）から選択されるさらなるヘテロ原子により置換されており、前記環の1個以上の炭素原子が、任意にカルボニルにより置換されており、該複素環式環が、任意に、アリール又はヘテロアリール環に縮合し得るように結合しており；

かつ、R₁、R₂、及びR₃基の1個以上の炭素原子は、任意に1個以上のハロゲン原子により置換されていてよく；

或いは、R₁及び/又はR₂は水素を表し；

R₉は、H又はOHを表し；

nが二重結合を表す時にR₉がHを表す場合を除き、nは単結合又は二重結合を表し；

R₄、R₅、R₆、R₇、及びR₈は、独立に、H、F、Cl、Br、アルケニル、又はアルキルを表し、式中、前記アルキル基の1個以上の炭素原子は、任意に、O、N、及びS(O)_p（式中、pは0、1、又は2を表す）から選択されるヘテロ原子により置換されており、前記アルキル基の1個以上の炭素原子は、任意にカルボニルにより置換されており、該アルキル基は、任意に、1個以上のハロゲン原子により置換されていてよく；

X₂、X₃、X₄、X₅、及びX₆は、独立にC又はNを表し、これらの基のいずれかがNを表す場合、結合した置換基は存在せず；

但し、R₄、R₆、R₇、及びR₈が全てHを表し、かつX₂、X₃、X₄、X₅、及びX₆が全てCを表す場合、R₅はOH、-Oアルキル、又は-O(CO)アルキルを表すことはできないことを条件とする）を、その任意の互変異性体；及びC-53ケト及びC-15ヒドロキシル基と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、そのメタノール付加物を含めて、提供する。

10

20

30

40

50

【0032】

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。

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。番号付けは全て、親サングリフェリンA構造の体系を使用する。

式(I)の化合物又はその医薬として許容し得る塩は、任意に、水和物などの医薬として許容し得る溶媒和物の形態で存在し得る。

10

【0033】

(定義)

冠詞「a」及び「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明細書において使用される。例としては、「アナログ(an analogue)」は、1つのアナログ又は2つ以上のアナログを意味する。

本明細書では、用語「アナログ（複数可）(analogue(s))」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。

【0034】

本明細書では、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。

20

【0035】

本明細書では、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-チロシンアナログが供給されている、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。

30

【0036】

本明細書では、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。

【0037】

本明細書では、用語「マクロ環状アナログ」、「マクロ環状サングリフェリンアナログ」、又は「マクロ環状サングリフェリン」は、最も広い態様で本発明を表すと先に称された化合物、例えば、上記式(I)の化合物、又はその医薬として許容し得る塩を意味する。これらの化合物は、「本発明の化合物」又は「サングリフェリンの誘導体」、又は「サングリフェリンアナログ」とも呼ばれ、これらの用語は本願において互換的に使用される。

40

【0038】

本明細書では、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。

【0039】

本明細書では、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

50

試験は本明細書に記載される(Egorinら、2002も参照されたい)。

【0040】

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。

【0041】

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、ヒドロキシナフト工酸、ヨウ化水素酸、リンゴ酸、ステロノ酸(steroic)、タンニン酸の塩などがある。塩酸塩は特に興味深い。シユ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。以下の本発明の化合物への言及は、式(I)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。
10

【0042】

本明細書では、用語「アルキル」は、典型的には1~10個の炭素原子を含む直鎖又は分枝鎖のアルキル基を表し、例えばC_{1~6}アルキル基である。「アルケニル」は、1個以上の二重結合を有し不飽和である、2個以上の炭素を含むアルキル基(例えば、2~10個の炭素、例えば、C_{2~6}アルケニル基)を意味する。

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=CH₂及び-CH₂CH=CH₂などのC_{2~4}アルケニル基がある。

【0043】

本明細書では、用語「シクロアルキル」は、任意に分岐状の、典型的には3~10個の炭素原子を含む環式アルキル基を表し、例えば、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシリ、又はシクロヘプチルである。分岐状の例は2-メチルシクロペンチルである。「シクロアルケニル」は、典型的には5~10個の炭素原子を含む環式アルケニル基を意味し、例えば、シクロペンチル、シクロヘキセニル、又はシクロヘプテニルがある。シクロアルキル及びシクロアルケニル基は、例えば、単環式又は二環式(スピロ環式を含む)であり得るが、好適には単環式である。
30

【0044】

本明細書では、用語「シクロアルキル」は、任意に分岐状の、典型的には3~10個の炭素原子を含む環式アルキル基を表し、例えば、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシリ、又はシクロヘプチルである。分岐状の例は2-メチルシクロペンチルである。「シクロアルケニル」は、典型的には5~10個の炭素原子を含む環式アルケニル基を意味し、例えば、シクロペンチル、シクロヘキセニル、又はシクロヘプテニルがある。シクロアルキル及びシクロアルケニル基は、例えば、単環式又は二環式(スピロ環式を含む)であり得るが、好適には単環式である。
40

【0045】

本明細書では、用語「ヘテロシクリル」は、1個以上の環炭素原子(例えば、1又は2個の、例えば、1個などの、1、2、又は3個の環炭素原子)がO、N、及びSから選択されるヘテロ原子により置換されているシクロアルキル基を表す。例には、モルホリニル、ピペリジニル、ピロリジニル、ピペラジニル、及びN-メチルピペラジニルがある。
50

本明細書では、用語「ヘテロシクレニル」は、1個以上の環炭素原子(例えば、1又は2個の、例えば、1個などの、1、2、又は3個の環炭素原子)がO、N、及びSから選択されるヘテロ原子により置換されているシクロアルケニル基を表す。

【0046】

アリール基の例には、(指定される場合を除き)芳香族又は(二環式環の場合、少なくとも1個の芳香族環を含む)である単環式基、すなわちフェニル及び二環式環(例えば、9員環及び10員環)がある。例えば、二環式環は、全芳香族、例えば、ナフチルでも、テトラリン、インデン、又はインダンなどの半芳香族(例えば、1個の芳香族環を含む)でもよい。好ましいアリールはフェニルである。アリール基は、例えば、アルキル(例えばC₁₋₄アルキル)、ヒドロキシル、CF₃、ハロゲン、アルコキシ(例えば、C₁₋₄アルコキシ)、ニトロ、-SO₂Me、シアノ、及び-CO NH₂から選択される1個以上の(例えば、1、2、又は3個の)置換基により任意に置換されていてよい。10

【0047】

ヘテロアリール基の例には、(指定される場合を除き)芳香族又は(二環式環の場合、少なくとも1個の芳香族環を含む)であって、1個以上のヘテロ原子(例えば、1、2、3、又は4個の)N、O、及びSから選択されるヘテロ原子を含む単環式基(例えば、5員環及び6員環)及び二環式環(例えば、9員環及び10員環)がある。5員ヘテロアリール環の例には、ピロール、フラン、チオフェン、オキサゾール、オキサジアゾール、チアゾール、及びトリアゾールがある。6員ヘテロアリール環の例には、ピリジン、ピリミジン、及びピラジンがある。二環式環の例には、キノリン、キナゾリン、イソキノリン、インドール、シンノリン、ベンズチアゾール(benzthiazole)、ベンゾイミダゾール、プリン、及びキノキサリンなどの全芳香族環並びにクロメン、クロマン、テトラヒドロキノリン、ジヒドロキノリン、イソインドリン、及びインドリンなどの半芳香族環がある。単環式ヘテロアリール基が好ましい。上述のヘテロアリール基は、任意に、アリール基について先に記載のとおり置換されていてよい。20

【0048】

二環式アリール及びヘテロアリール基が半芳香族である場合、分子の残りの部分への結合は、芳香族部分によっても、非芳香族部分によってもよい。

用語「治療」には、予防的処置並びに治療的処置が含まれる。

用語「式II」は、式IIA及び式IIBをまとめて意味する。30

【図面の簡単な説明】

【0049】

(図の説明)

【図1】化合物23の¹H NMR

【図2】化合物24の¹H NMR

【図3】化合物25の¹H NMR

【図4】化合物26の¹H NMR

【図5】化合物27の¹H NMR

【図6】化合物28の¹H NMR

【図7】化合物29の¹H NMR

【図8】化合物30の¹H NMR

【発明を実施するための形態】

【0050】

(発明の説明)

本発明は、先に述べられたマクロ環状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ヒドロキシル基とメタノールの組み合わせによりヘミケタールが形成されている、そ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。

【0051】

10

20

30

40

50

(変数n、 $X_2 \sim X_6$ 、及び $R_4 \sim R_9$)

好適には、nは単結合を表す。

好適には、 R_9 はOHを表す。

好適には、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 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、式中、前記アルキル基の1個以上の炭素原子は、任意に、O、N、及びS(O)_p（式中、pは0、1、又は2を表す）から選択されるヘテロ原子により置換されており、かつ、前記アルキル基の1個以上の炭素原子は、任意にカルボニルにより置換されており、かつ、該アルキル基は任意に1個以上のハロゲン原子により置換されていてよい。

【0052】

特定の実施態様において、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上が表し得る 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り置換される。 10

-CH₃がNにより置換される場合、形成される該基は-NH₂である。-CH₂₋がNにより置換される場合、形成される該基は-NH-である。-CHR-がNにより置換される場合、形成される該基は-NR-である。このように、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、又は R_8 基内の窒素原子は、一級、二級、又は三級窒素原子になり得る。

-CH₃がOにより置換される場合、形成される該基は-OHである。

【0053】

R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上が表し得る C_{1-10} アルキル基(例えば、 C_{1-6} アルキル基)の炭素原子がヘテロ原子により置換されている場合、それは、好適には、O、S、又はNにより、特にN又はOにより、とりわけOにより置換される。 20

R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 のいずれか1個が基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。他の実施態様において、pは1を表す。他の実施態様において、pは2を表す。

R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上が表し得る C_{1-10} アルキル基(例えば、 C_{1-6} アルキル基)が2個以上のヘテロ原子を含む場合、それらは、典型的には2個以上の炭素原子により分離され得る。

【0054】

好適には、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上が表し得る 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り全く置換されていない。

R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上が表し得る C_{1-10} アルキル基(例えば、 C_{1-6} アルキル基)の炭素原子がカルボニルにより置換されている場合、該カルボニルは、好適には、他の炭素原子又は窒素原子に隣接して位置する。好適には、カルボニル基は、硫黄又は酸素原子に隣接して位置しない。 30

例えば、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上は-COC₁₋₃アルキル、例えば-COMeを表し得る。

好適には、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上が表し得る 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、カルボニルにより置換されていない。

【0055】

R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上が表し得る C_{1-10} アルキル基(例えば、 C_{1-6} アルキル基)は、1個以上のハロゲン原子により置換されていてよい。例えば、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上は-CF₃を表し得る。或いは、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上は、1個以上の(例えば1個の)Cl又はF原子により置換された C_{1-10} アルキル(例えば、 C_{1-6} アルキル)(例えば、-CH₂CH₂Cl)を表し得る。 40

好適には、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 が表し得る C_{1-10} アルキル基(例えば、 C_{1-6} アルキル基)は、ハロゲンにより置換されていない。

【0056】

R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 基(複数可)の1個以上が C_{1-10} アルキル基(例えば、 C_{1-6} アルキル基)を表す場合、好適には、該基(複数可)は C_{1-4} アルキル(例えば、メチルなどの C_{1-2} アルキル)を表す。

一実施態様において、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 の1個以上は、 C_{1-6} アルキル(C_{1-2} アルキ

50

ルなど)又はC₂₋₃アルケニルを表し、例えば、R₄、R₅、R₆、R₇、及びR₈の1個以上はメチルを表す。

【0057】

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、特にHを表す。

好適には、R₅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、R₅は、H、F、OH、又はNH₂、特にOHを表す。

好適には、R₆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、R₆は、H、Me、又はFを表す。

好適には、R₇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、R₇は、H又はFを表す。

10

【0058】

好適には、R₈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、R₈は、H又はF、特にHを表す。

好適には、R₄、R₅、R₆、R₇、及びR₈の1個以上、より好適には、2個以上(例えば、3個以上)はHを表さない。

好適には、R₄、R₅、R₆、R₇、及びR₈の1個以上、例えば2個以上はFを表す。

好適には、R₆及び/又はR₇はFを表す。

【0059】

好適には、X₂、X₃、X₄、X₅、及びX₆の少なくとも2個はCを表す;より好適には、少なくとも3個、より好適には、少なくとも4個、最も好適には、5個全てがCを表す。

20

一実施態様において、X₂はNを表す(したがって、R₄は存在しない)。他のより好ましい実施態様において、X₂はCを表す。

好適には、X₃はCを表す。

好適には、X₄はCを表す。

好適には、X₅はCを表す。

好適には、X₆はCを表す。

【0060】

一実施態様において、X₂、X₃、X₄、X₅、及びX₆はそれぞれCを表し、R₄はHを表し、R₅はOHを表し、R₆はHを表し、R₇はFを表し、かつR₈はHを表す。

30

一実施態様において、X₂、X₃、X₄、X₅、及びX₆はそれぞれCを表し、R₄はHを表し、R₅はOHを表し、R₆はMeを表し、R₇はHを表し、かつR₈はHを表す。

一実施態様において、X₂、X₃、X₄、X₅、及びX₆はそれぞれCを表し、R₄はHを表し、R₅はOHを表し、R₆はFを表し、R₇はFを表し、かつR₈はHを表す。

【0061】

(変数X₁)

一実施態様において、X₁は-R₃を表す。一実施態様において、X₁は-NR₁R₂を表す。一実施態様において、X₁は、-OR₁を表す。

特定の実施態様において、R₁及び/又はR₂及び/又はR₃の炭素原子はヘテロ原子により置換されている。

40

-CH₃がNにより置換される場合、形成される該基は-NH₂である。-CH₂-がNにより置換される場合、形成される該基は-NH-である。-CHR-がNにより置換される場合、形成される該基は-NR-である。このように、R₁、R₂、R₃基内の窒素原子は、一級、二級、又は三級窒素原子になり得る。

-CH₃がOにより置換される場合、形成される該基は-OHである。

【0062】

R₁及び/又はR₂及び/又はR₃の炭素原子がヘテロ原子により置換される場合、それは、好適には、O又はN、特にOにより置換される。

R₁及び/又はR₂及び/又はR₃の炭素原子が基S(O)_pにより置換される場合、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を表し、他の実施態様において、pは1を

50

表す。他の実施態様において、pは2を表す。

R_1 及び/又は R_2 及び/又は R_3 が2個以上のヘテロ原子を含む場合、それらは、例えば、2個以上の炭素原子により分離され得る。

好適には、 R_1 、 R_2 、及び R_3 の炭素原子はヘテロ原子により全く置換されていない。

【0063】

R_1 及び/又は R_2 及び/又は R_3 の炭素原子がカルボニルにより置換されている場合、該カルボニルは、好適には、他の炭素原子又は窒素原子に隣接して位置する。好適には、カルボニル基は、硫黄又は酸素原子に隣接して位置しない。

例えば、 R_1 及び/又は R_2 及び/又は R_3 は、 $-COC_{1-4}$ アルキル、例えば $-COMe$ を表し得る。

好適には、 R_1 の炭素原子はカルボニルにより置換されていない。

好適には、 R_2 の炭素原子はカルボニルにより置換されていない。

好適には、 R_3 の炭素原子はカルボニルにより置換されていない。

【0064】

R_1 及び/又は R_2 及び/又は R_3 基の1個以上の炭素原子が1個以上のハロゲン原子により置換されている場合、例示的なハロゲン原子は、F、Cl、及びBr、特にF及びCl、とりわけFである。例示的なハロゲン化された R_1 及び/又は R_2 及び/又は R_3 部分は $-CF_3$ である。

例えば、 R_1 、 R_2 、及び R_3 の1個以上は、1個以上の(例えば、1個の)Cl又はF原子により置換された C_{1-10} アルキル(例えば、 C_{1-6} アルキル)(例えば、 $-CH_2CH_2Cl$)を表し得る。

好適には、 R_1 、 R_2 、及び R_3 の炭素原子はハロゲンにより置換されていない。

R_1 、 R_2 、及び R_3 基の1個以上が C_{1-10} アルキル基(例えば、 C_{1-6} アルキル基)を表す場合、好適には、該基は、 C_{1-4} アルキル(例えば、メチルなどの C_{1-2} アルキル)を表す。

【0065】

R_1 及び/又は R_2 及び/又は R_3 が-アルキルアリールを表す場合、例には C_{1-2} アルキルアリール、例えば、ベンジルがある。

R_1 及び/又は R_2 及び/又は R_3 が-アルケニルアリールを表す場合、例には C_{2-3} アルケニルアリール、例えば-エテニルフェニルがある。

R_1 及び/又は R_2 及び/又は R_3 が-アルキルヘテロアリールを表す場合、例には C_{1-2} アルキルヘテロアリール、例えば-メチルピリジニルがある。

R_1 及び/又は R_2 及び/又は R_3 が-アルケニルヘテロアリールを表す場合、例には C_{2-3} アルケニルヘテロアリール、例えば-エテニルピリジニルがある。

【0066】

好適には、 R_1 は水素を表さない。

好適には、 R_1 と R_2 の両方が水素を表すことはない。

好適には、 R_2 の炭素原子はヘテロ原子により置換されていない。

【0067】

(X_1 が NR_1R_2 を表す場合)

X_1 が NR_1R_2 を表す場合、 R_1 は、例えば、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルシクロアルキル、アルキルシクロアルケニル、アルケニルシクロアルキル、アルケニルシクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルアリール、又はアルケニルヘテロアリールを表し得る。

R_2 は、例えば、H、アルキル(例えば、 C_{1-4} アルキル)、アルケニル(例えば、 C_{2-4} アルケニル)、又は-Oアルキル(例えば、 $-OC_{1-4}$ アルキル)、特にH又はアルキルを表し得る。

【0068】

例示的な R_1 基には、単環式アリール若しくは単環式ヘテロアリールにより置換されたアリール若しくはヘテロアリール、 $-C_{1-4}$ アルキル、 $-OC_{1-4}$ アルキル、 $-COC_{1-4}$ アルキル、又は $-C_{2-4}$ アルケニルがあり、或いは、 R_1 は、アルキル又は-Oアルキルを表し得る。上述の例示的な基は、例えば、H又はアルキルを表す R_2 と一緒に得る。

さらなる例示的な R_1 基には、メチル、 $-CF_3$ 、エチル、イソプロピル、 $-CH_2CH=CH$ 、イソブチル、シクロヘキシリルがある。上述の例示的な基は、例えば、H又はMeを表す R_2 と一緒に得る。

10

20

30

40

50

になり得る。

さらなる例示的なR₁基には、任意に置換されたピリジニル又はフェニル、例えば、フェニルにより置換されたフェニルがある。上述の例示的な基は、例えば、H、Me、又は-OMeを表すR₂と一緒になり得る。

【0069】

さらなる例示的なR₁基には、-OMe、-OCF₃、-Oエチル、O-イソプロピル、-SMe、O-n-ブロピル、-O-n-ブチル、-O-t-ブチル、O-イソブチル、O-CH₂C(Me)₃がある。上述の例示的な基は、例えば、H、Me、エチル、イソプロピル、又はtert-ブチルを表すR₂と一緒になり得る。

さらなる例示的なR₁基には、-O-(任意に置換されたフェニル)がある。上述の例示的な基は、例えば、H又はMeを表すR₂と一緒になり得る。

或いは、R₁とR₂は、NR₁R₂が、示される特定の窒素原子を含む飽和又は不飽和の複素環式環を表すように結合し得る。

【0070】

NR₁R₂が表し得る複素環式環は、典型的には、4~8個の環原子、例えば、5~7個の環原子、特に5又は6個の環原子を含む。

例えば、NR₁R₂が表し得る複素環式環は、典型的には明示される窒素原子のみを含むか(例えば、それはピロリジン又はピペリジンを表す)、又は1若しくは2個(例えば、1個)の追加のヘテロ原子、特に窒素又は酸素原子を含む。

例えば、NR₁R₂が表し得る複素環式環は、モルホリニル又は1,2-オキサジナン(Nに隣接してOを含む6員の飽和環)であり得る。

【0071】

NR₁R₂が、明示された窒素原子を含む飽和又は不飽和複素環式環を表し、前記環の1個以上の炭素原子が、O、N、及びS(O)_p(式中、pは、0、1、又は2を表す)から選択されるヘテロ原子により任意に置換されており、前記環の1個以上の炭素原子がカルボニルにより任意に置換されており、該複素環式環がアリール又はヘテロアリール環に縮合している場合、一例はテトラヒドロキノリニルである。

或いは、好適には、NR₁R₂は、ピロリジン、ピペリジン、モルホリン、又は4-窒素がC_{1~4}アルキルにより任意に置換されているピペラジン環などの5~7員の複素環式環を表す。

他の実施態様において、好適には、NR₁R₂は、ピロリジン、ピペリジン、モルホリン、又は4-窒素がC_{1~4}アルキルにより任意に置換されており、環内の窒素原子に隣接する炭素原子がカルボニルにより置換されているピペラジン環などの5~7員の複素環式環を表す。このように、例えば、R₁とR₂は、それらが結合している窒素と共にピペリジノンを表す。

【0072】

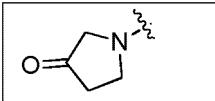
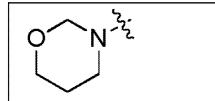
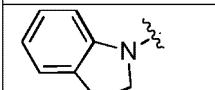
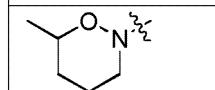
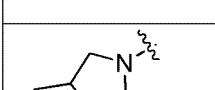
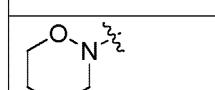
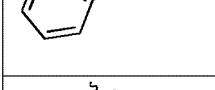
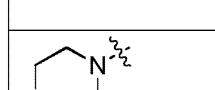
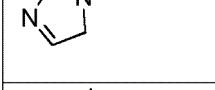
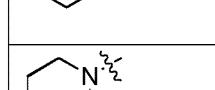
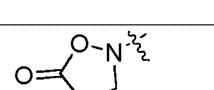
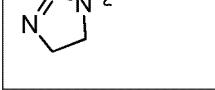
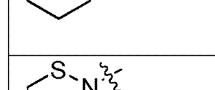
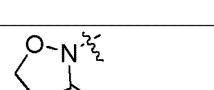
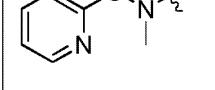
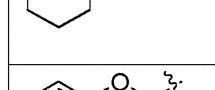
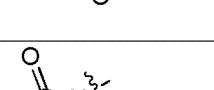
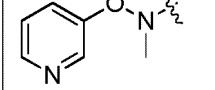
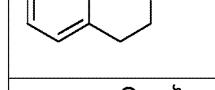
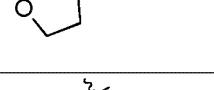
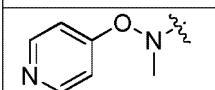
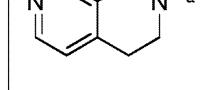
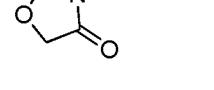
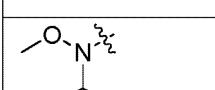
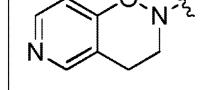
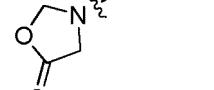
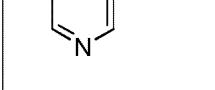
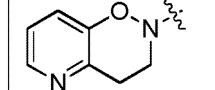
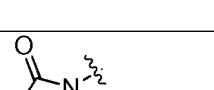
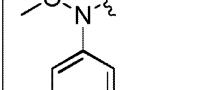
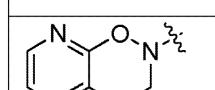
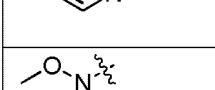
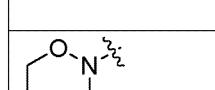
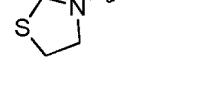
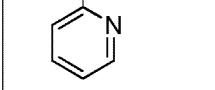
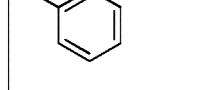
他の実施態様において、酸素原子が、R₁とR₂が結合している窒素原子に隣接する。例えば、R₁は、R₁が結合している窒素原子に隣接しているメチレンがOにより置換されたアルキル又はアルケニルを表し得る。例えば、R₁は、-OC_{1~4}アルキル、例えば、OMeを表し得る。或いは、R₁とR₂は結合し、R₁が結合している窒素原子に隣接した炭素原子がOにより置換されて、例えば、1,2-オキサジナン環又は1,2-イソオキサゾリジンを形成する。

他の実施態様において、R₁とR₂は、NR₁R₂が、明示された窒素原子を含む飽和又は不飽和の複素環式環を表し、前記環の1個以上の炭素原子が、O、N、及びS(O)_p(式中、pは、0、1、又は2を表す)から選択されるさらなるヘテロ原子により任意に置換されており、前記環の1個以上の炭素原子が、カルボニルにより任意に置換されており、該複素環式環がアリール又はヘテロアリール環に縮合する(例えば、フェニル又はピリジニル環に縮合する)ように結合する。

【0073】

NR₁R₂が共に形成し得る例示的な部分には、モルホリニル、オキサジナン(例えば、1,2-オキサジナン)、及び以下の表に開示される部分がある。

【表 1】

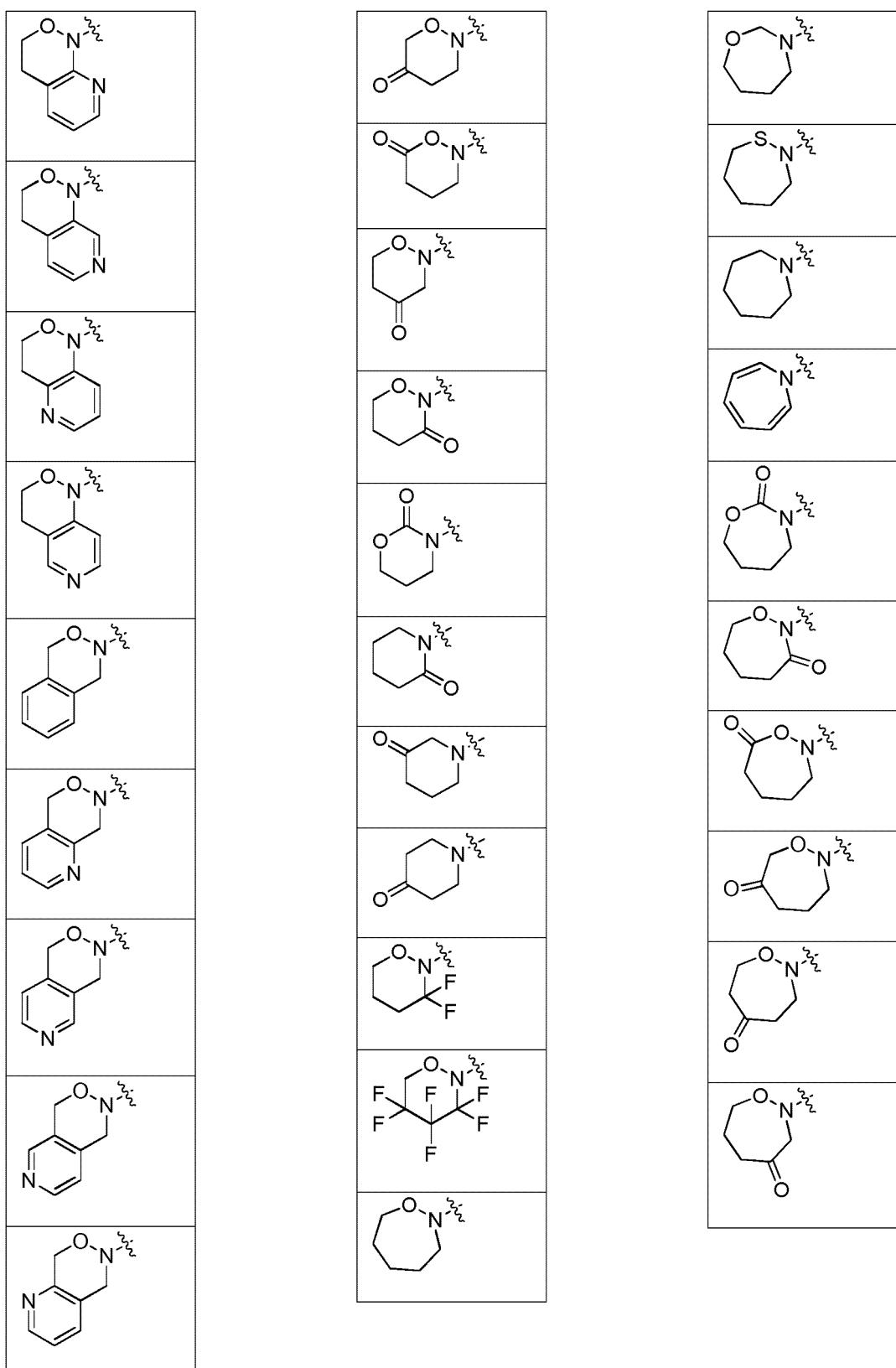
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		

10

20

30

40



【0074】

アリール又はヘテロアリール基を含む上述の-NR₁R₂部分は、前記基に、1個以上の(例えば、1又は2個の、1個などの)環置換基、例えば、C_{1~4}アルキル(例えば、メチル)、ハロゲン(例えば、Cl又はF)、C_{1~4}アルコキシ(例えば、メトキシ)、ヒドロキシリ、CF₃、シアノ、ニトロ、SO₂Me、及びCONH₂から選択された基を任意に有し得る。

上述の-NR₁R₂部分は、1個以上の(例えば、1又は2個の)ハロゲン(例えば、F又はCl)原子

10

20

30

40

50

により任意に置換されていてよい。

【0075】

(X_1 がOR₁を表す場合)

X_1 がOR₁を表す場合、R₁は、例えば、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルシクロアルキル、アルキルシクロアルケニル、アルケニルシクロアルキル、アルケニルシクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルアリール、又はアルケニルヘテロアリールを表す。

一実施態様において、R₁は、単環式アリール又は单環式ヘテロアリールにより任意に置換されているアリール又はヘテロアリールを表す。R₁は、例えば、フェニル環のいずれかが任意に置換されている4-ビフェニリルを表す。

10

【0076】

一実施態様において、R₁は、単環式アリール若しくは单環式ヘテロアリールにより置換されたアリール若しくはヘテロアリール、-C₁₋₄アルキル、-OC₁₋₄アルキル、-COC₁₋₄アルキル、又は-C₂₋₄アルケニルを表し得る。

一実施態様において、R₁は、C₁₋₆アルキル(C₄₋₆アルキルなど)、C₂₋₆アルケニル、C₁₋₄アルキルC₄₋₇シクロアルキル、又はC₁₋₄アルキルC₅₋₇シクロアルケニルを表す。

好適には、R₁は、C₂₋₁₀アルキル(例えば、C₄₋₆アルキルなどのC₂₋₆アルキル)、C₂₋₁₀アルケニル(例えば、C₄₋₆アルケニルなどのC₂₋₆アルケニル)、ヘテロアリール、及びアリールから選択される。

20

【0077】

このように、一実施態様において、R₁は、C₄₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、ヘテロアリール、及びアリールから選択される。

一実施態様において、R₁は、C₄₋₇シクロアルキル、C₁₋₂アルキルアリール、及びC₁₋₂アルキルヘテロアリールから選択される。

【0078】

例示的なR₁基には、シクロヘキシリル、-メチルシクロペンチル、-CH₂CH=CH₂、エチル、n-プロピル、n-ブチル、t-ブチル、i-ブチル、-CH₂C(Me)₃、n-ペンチル、-CH₂CH₂C(Me)₃、n-ヘキシリル、n-ヘプチル、-シクロペンチル、-メチルシクロヘキシリル、フェニル、-メチルフェニル、-メチルピリジニル、チアゾール、トリアゾール、イミダゾール、オキサゾール、フラン、チオフェン、及びテトラゾールがあり、例えば、-CH₂CH=CH₂、n-ブチル、t-ブチル、i-ブチル、-CH₂C(Me)₃、n-ペンチル、-CH₂CH₂C(Me)₃、n-ヘキシリル、n-ヘプチル、-シクロペンチル、-メチルシクロヘキシリル、フェニル、-メチルフェニル、-メチルピリジニル、チアゾール、トリアゾール、イミダゾール、オキサゾール、フラン、チオフェン、及びテトラゾールから選択される。

30

さらなる例示的なR₁基には、アリール又はヘテロアリール基が置換されている、直前に言及されたアリール又はヘテロアリール基がある。

【0079】

(X_1 がR₃を表す場合)

X_1 がR₃を表す場合、R₃は、例えば、いずれの基もモノサイリックアリール又は单環式ヘテロアリールにより任意に置換されていてよいアルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルシクロアルキル、アルキルシクロアルケニル、アルケニルシクロアルキル、アルケニルシクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルアリール、又はアルケニルヘテロアリールであって；R₃が結合しているカルボニル基に隣接する原子がO又はNでもない場合を除いて、アリール又はヘテロアリール基の一部でないR₃の1個以上の炭素原子が、O、N、及びS(O)_p(式中、pは0、1、又は2を表す)から選択されるヘテロ原子により任意に置換されており、R₃の1個以上の炭素原子がカルボニルにより任意に置換されているものを表し得る。

40

【0080】

好適には、R₃は、例えば、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルシクロアルキル、アルキルシクロアルケニル、アルケニルシクロアルキル、ア

50

ルケニルシクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルアリール、又はアルケニルヘテロアリールを表し得る。

好適には、R₃は、C_{1~6}アルキル、C_{2~6}アルケニル、C_{1~4}アルキルC_{4~7}シクロアルキル、又はC_{1~4}アルキルC_{5~7}シクロアルケニルを表す。

【0081】

例示的なR₃基には、-メチルシクロペンチル、-エチルシクロペンチル、n-プロピル、-CH(Me)(エチル)、t-ブチル、-CH(エチル)₂、-CH(エチル)(i-プロピル)、-CH(Me)(i-ブチル)、CH(Me)(n-プロピル)、-CH(Me)(n-ブチル)、-CH(メチル)(n-ペンチル)、-CH(エチル)(n-プロピル)、シクロペンチル、テトラヒドロフラン、シクロヘキシル、シクロヘプチル、ヘキサヒドロオキセピン、-メチルシクロヘキシル、-エチルシクロヘキシル、-CH(Me)(Oエチル)、-CH(Me)(O-イソプロピル)、-CH(OMe)(エチル)、-CH(Me)(Oエチル)、-CH(OMe)(i-プロピル)、-CH(Me)(OMe)、-CH(Me)(O-n-プロピル)、-CH(Me)(O-n-ブチル)、-CH(エチル)(Oエチル)、-CH₂C(Me)₃、-CH₂CH₂C(Me)₃、チアゾール、イミダゾール、トリアゾール、テトラゾール、オキサゾール、フラン、ピリジン、及びフェニルがある。
10

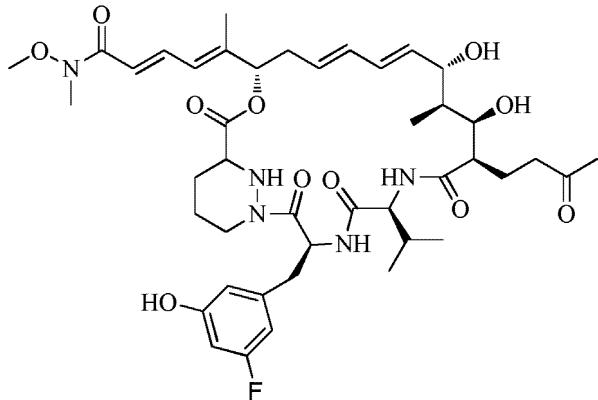
さらなる例示的なR₁基には、アリール又はヘテロアリール基が置換されている、直前に言及されたアリール又はヘテロアリール基がある。

【0082】

(さらなる好適な実施態様)

本発明の好適な実施態様において、以下の構造に表されるとおり、X₁はNMe(OMe)を表し、R₄はHを表し、R₅はOHを表し、R₆はHを表し、R₇はFを表し、R₈はHを表し、X₂はCを表し、X₃はCを表し、X₄はCを表し、X₅はCを表し、X₆はCを表し、nは単結合を表し、かつR₉はOを表す：
20

【化4】



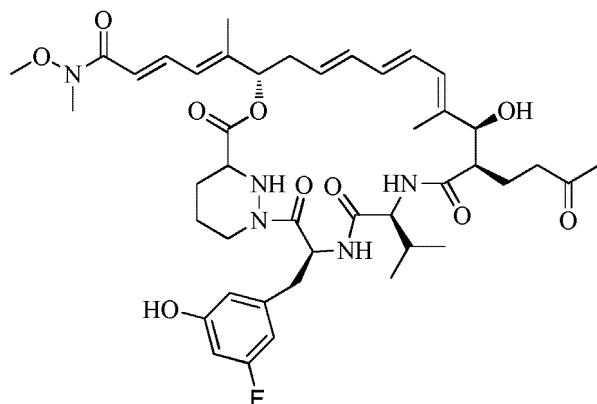
30

。

【0083】

本発明の他の好適な実施態様において、以下の構造により表されるとおり、X₁はNMe(OMe)を表し、R₄はHを表し、R₅はOHを表し、R₆はHを表し、R₇はFを表し、R₈はHを表し、X₂はCを表し、X₃はCを表し、X₄はCを表し、X₅はCを表し、X₆はCを表し、nは二重結合を表し、かつR₉はHを表す：
40

【化5】



10

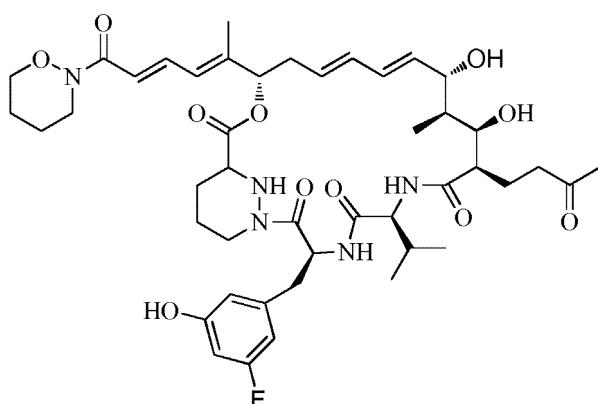
。

【0084】

本発明の他の好適な実施態様において、以下の構造により表されるとおり、 X_1 は、 R_1 と R_2 が共に、結合して複素環を形成する $CH_2CH_2CH_2CH_2O$ を表す NR_1R_2 を表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はOHを表し、 R_6 はHを表し、 R_7 はFを表し、 R_8 はHを表し、 X_2 はCを表し、 X_3 はCを表し、 X_4 はCを表し、 X_5 はCを表し、 X_6 はCを表し、nは単結合を表し、かつ R_9 はOHを表す：

20

【化6】



30

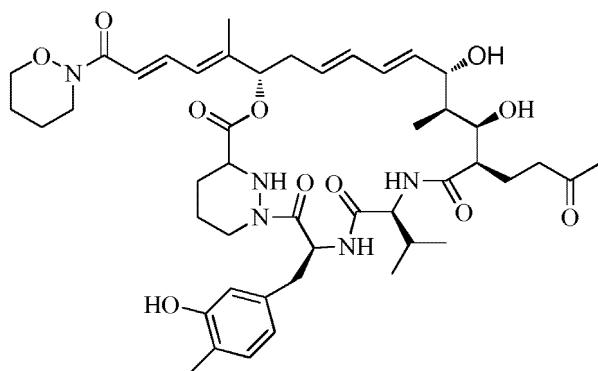
。

【0085】

本発明の他の好適な実施態様において、以下の構造により表されるとおり、 X_1 は、 R_1 と R_2 が共に、結合して複素環を形成する $CH_2CH_2CH_2CH_2O$ を表す NR_1R_2 を表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はOHを表し、 R_6 はMeを表し、 R_7 はHを表し、 R_8 はHを表し、 X_2 はCを表し、 X_3 はCを表し、 X_4 はCを表し、 X_5 はCを表し、 X_6 はCを表し、nは単結合を表し、かつ R_9 はOHを表す：

【化7】

40



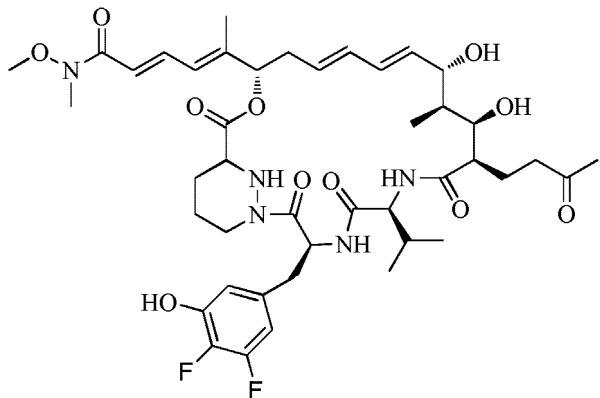
50

。

【0086】

本発明の他の好適な実施態様において、以下の構造により表されるとおり、 X_1 は $\text{NMe}(\text{OMe})$ を表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はOHを表し、 R_6 はFを表し、 R_7 はFを表し、 R_8 はHを表し、 X_2 はCを表し、 X_3 はCを表し、 X_4 はCを表し、 X_5 はCを表し、 X_6 はCを表し、nは単結合を表し、かつ R_9 はOHを表す：

【化8】



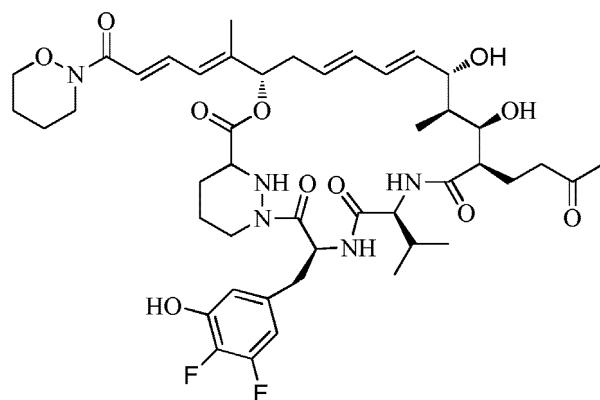
10

。

【0087】

本発明の他の好適な実施態様において、以下の構造により表されるとおり、 X_1 は、 R_1 と R_2 が共に、結合して複素環を形成する $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ を表す NR_1R_2 を表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はOHを表し、 R_6 はFを表し、 R_7 はFを表し、 R_8 はHを表し、 X_2 はCを表し、 X_3 はCを表し、 X_4 はCを表し、 X_5 はCを表し、 X_6 はCを表し、nは単結合を表し、かつ R_9 はOHを表す：

【化9】



30

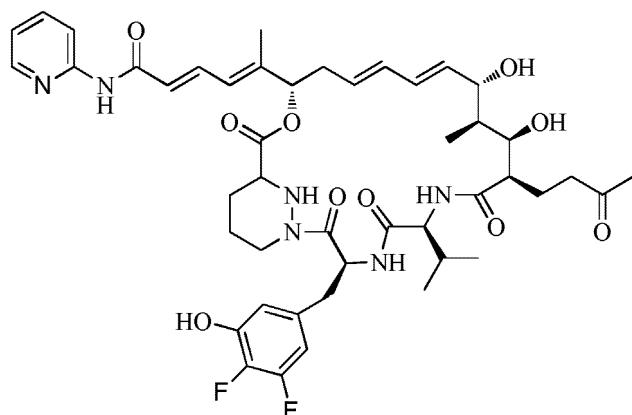
。

【0088】

本発明の他の好適な実施態様において、以下の構造により表されるとおり、 X_1 は $\text{NH}(2\text{-ピリジニル})$ を表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はOHを表し、 R_6 はFを表し、 R_7 はFを表し、 R_8 はHを表し、 X_2 はCを表し、 X_3 はCを表し、 X_4 はCを表し、 X_5 はCを表し、 X_6 はCを表し、nは単結合を表し、かつ R_9 はOHを表す：

40

【化10】



10

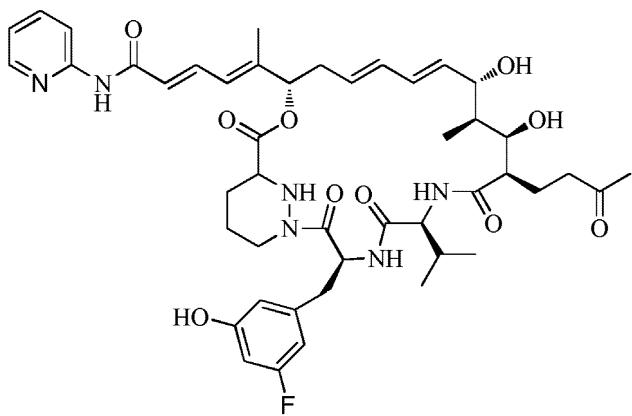
。

【0089】

本発明の他の好適な実施態様において、以下の構造により表されるとおり、 X_1 はNH(2-ピリジニル)を表し、 R_4 はHを表し、 R_5 はOHを表し、 R_6 はFを表し、 R_7 はHを表し、 R_8 はHを表し、 X_2 はCを表し、 X_3 はCを表し、 X_4 はCを表し、 X_5 はCを表し、 X_6 はCを表し、nは単結合を表し、かつ R_9 はOHを表す：

20

【化11】



30

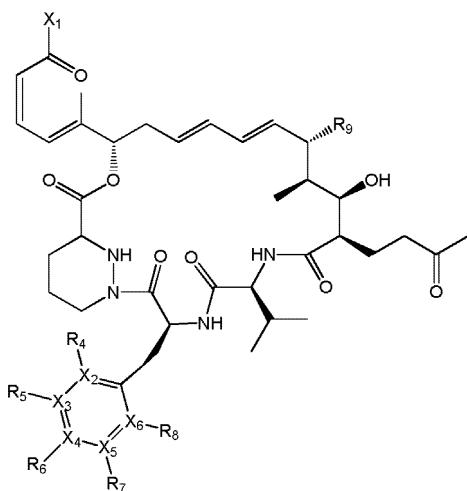
。

【0090】

いくつかの実施態様において、C26、27位での二重結合(サングリフェリンAの構造参照)は、トランス形の代わりにシス形であり得る。

本発明の好適な実施態様において、C26、27位での二重結合は、下記式により表されるとおりシス形である：

【化12】

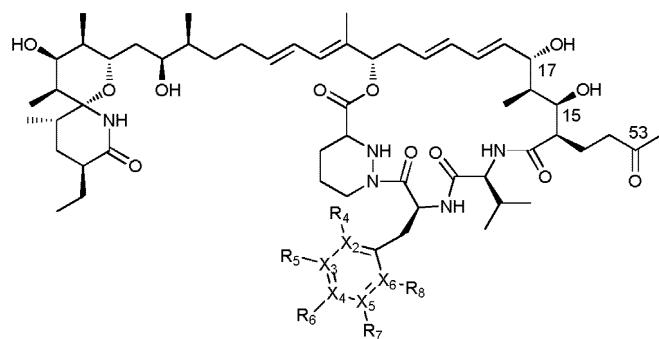


【0091】

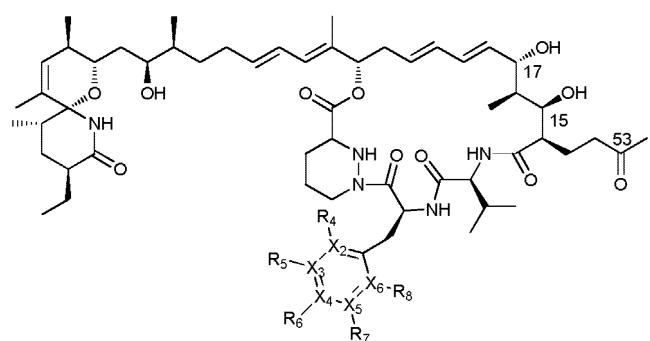
そのような化合物は、化学合成の間に製造することができる。

一般に、本発明の化合物は、変異合成による式(II)の化合物の生成、それに続く半合成により製造される。

【化13】



式 (IIA)



式 (IIB)

式(II)における好適な X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 基は、式(I)の化合物に対して定義されたとおりである。

【0092】

一般に、式(I)の化合物又はその医薬として許容し得る塩の前駆体を製造する方法は下記を含む：

- ・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、メタ-チロシンアナログ（式(III)で示されるとおり）を供給すること

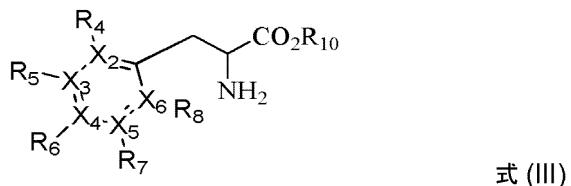
50

- ・式IIA及び式IIBの化合物が產生されるまで、発酵を継続させること
 - ・式IIA及び式IIBの化合物を抽出及び単離すること
 - ・式IIA及び式IIBの化合物を半合成誘導体化して、式Iの化合物を生成させること。

【 0 0 9 3 】

式(111)の化合物は以下のように定義される:

【化 1 4】



10

(式中、R₁₀は、H又はアルキル基などのエステル形成基、例えばMeなどのC₁₋₆アルキルを表す)。

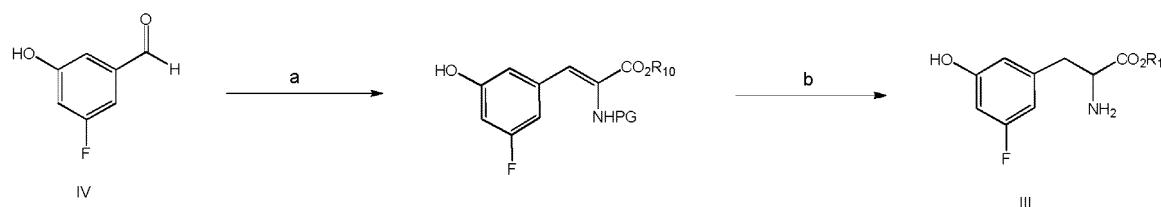
式(III)における好適な X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、及び R_8 基は、式(I)の化合物に対して定義されたとおりである。

[0 0 9 4]

前記供給材料は、式(111)の化合物のラセミ形態又はL-形態であることができる。

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：

【化 1.5】



30

スキーム1：a)式(IV)とアルデヒドの好適なフラグメント、例えば、 $(R_{11}O)_2P(O)CH(NHPG)CO_2R_{10}$ とのカップリング、及びb)必要に応じて、水素化及び脱保護。PG=保護基。

[0 0 9 5]

式(IV)のアルデヒドは市販され得るか、又は当業者によって容易に合成され得る。式(V)の化合物から式(III)の化合物を生成させる際に、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。

[0 0 9 6]

式(IIA)及び式(IIB)の化合物の生成の後、本発明の化合物は、半合成誘導体化により製造される。サングリフェリンマクロサイリックアルデヒドを生成させる半合成法は、US6,124,453、Metternichら、1999、Banteliら、2001、及びSedraniら、2003に記載されている。

【 0 0 9 7 】

一般に、サングリフェリン変異合成アナログから式(1)の特定の化合物又はその医薬として許容し得る塩を製造する半合成法は、下記を含む：

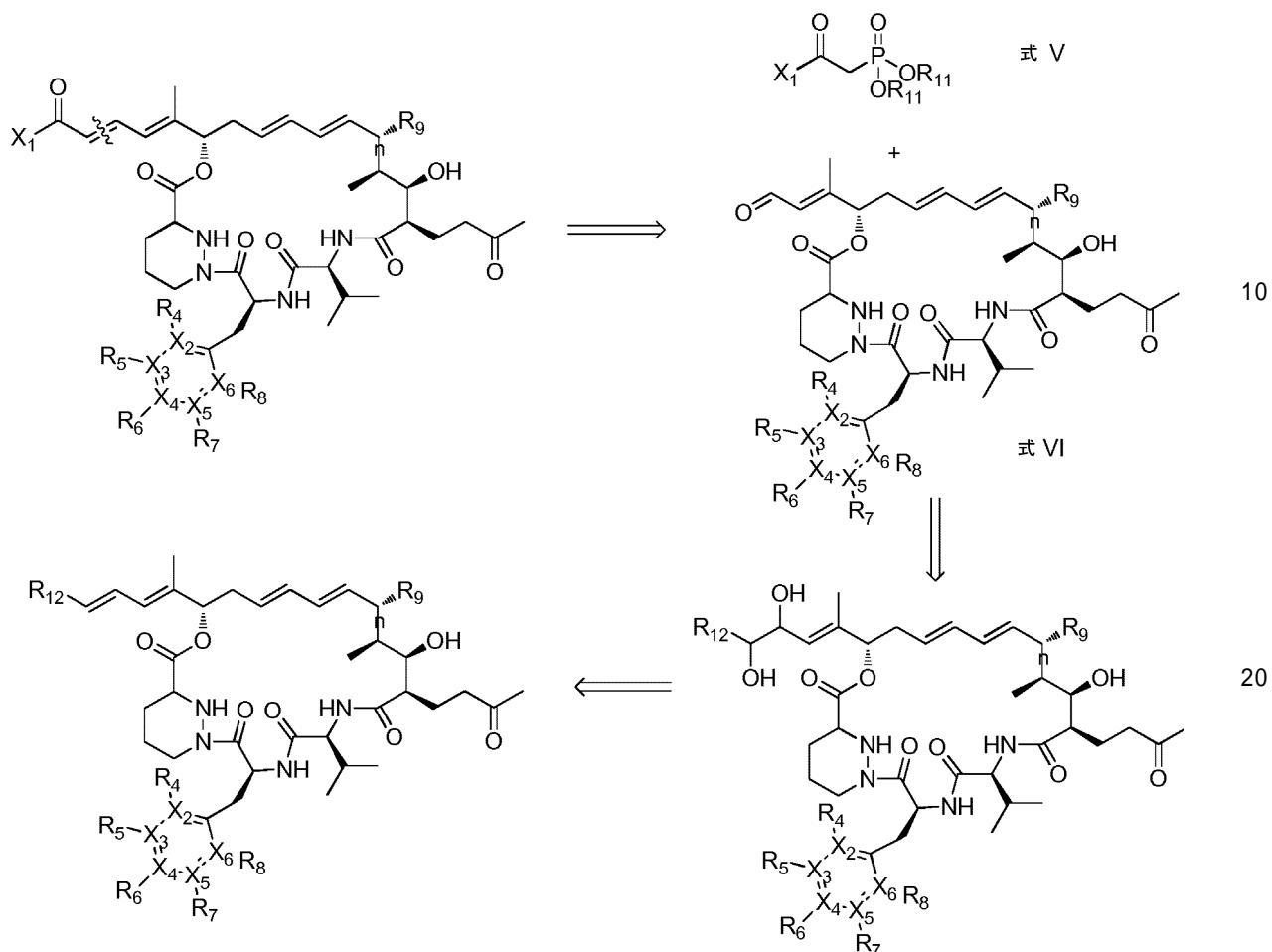
- (a) サングリフェリンアナログのジヒドロキシ化;
 (b) 該1,2-ジオールの酸化開裂によるアルデヒドの生成; 及び
 (c) 式Vの化合物を用いる、ホスホナートカルバニオンなどの安定化されたカルバニオン(又はその限界構造)と前記アルデヒドとのカップリング。

40

50

これは、逆合成の形式で下記に示される：

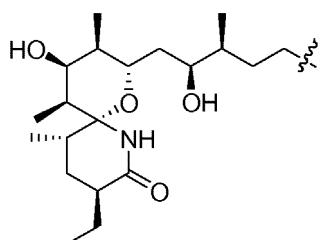
【化16】



(式中、サングリフェリンA変異合成アナログでは、R₁₂は

【化17】

30



である)。

40

【0098】

R₁₁基は、同じでも異なっていてもよいが、独立に、アルキル(例えば、C₁₋₄アルキル)又はベンジルを表す。

したがって、本発明の化合物を製造する方法は、式(V)の化合物をアルデヒド性マクロ環(式(VI)の化合物)と反応させることを含む。

【0099】

式(VI)の化合物の製造は、サングリフェリンAのその対応するアルデヒド性マクロ環への転化に関する既報の方法(Metternichら、1999)に類似の方法により実施できる。簡単に述べると、式(VI)の化合物は、変更されたシャープレス条件(触媒性四酸化オスミウム)を利用してジヒドロキシ化される。キラルリガンドの使用により、選択性の増大が助けられ

50

る。次いで、生じたジオールを、例えば過ヨウ素酸ナトリウムを使用して、酸化開裂できる。次いで、生じた式VIの化合物を、ホモログ化されたアミド、エステル、又はケトンへの誘導体化の基質として使用できる。典型的には、式(V)の化合物は、非プロトン性溶媒に溶解され、冷却され、塩基、例えば水素化ナトリウムにより処理される。次いで、式(VI)の化合物が加えられ、反応物は温められる。好適な期間の後、反応は停止され、式Iの化合物は標準条件(例えば、分取HPLC、分取TLCなど、順相フラッシュクロマトグラフィー)により精製される。

【0100】

基R₉及びnへの変化を導入する誘導体化は、式VIの化合物の生成前又はホモログ化アミドを形成する反応後に実施できる。簡単に述べると、R₉でのヒドロキシルは、共役トリエニンを生成するために、酸性条件中で好適な基質の処理により除去できる。

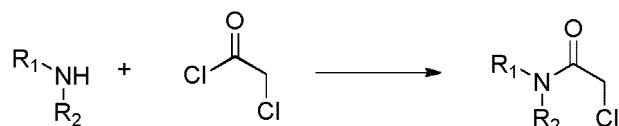
10

【0101】

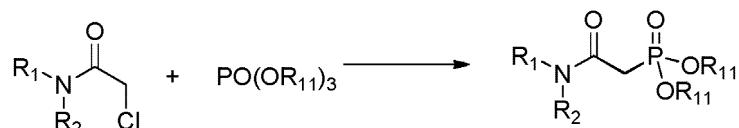
式(V)の化合物は公知であり得るか、又は公知の方法により製造できる。

例えば、X₁がNR₁R₂を表す式(V)の化合物は、利用可能なアミン(例えば、R₁R₂NH)から容易に合成できる。スキーム1(下記)に示されるとおり、アミンを使用して、クロロアセチルクロリド又は類似物を処理して、-クロロアミドを形成できる。次いで、-クロロアミドをアルブゾフ反応で処理して、式Vの化合物を生成させる。式Vの化合物に至る別な経路は当業者には明らかであろう。

【化18】



20



【0102】

30

(スキーム1)

X₁がR₃を表す式(V)のさらなる化合物は公知であり得るか、又は入手可能なカルボン酸誘導体(例えば、R₃COX)から容易に合成できる。スキーム2(下記)に示されるとおり、カルボン酸誘導体は、メチルホスホナートが塩基により処理された後、該ホスホナートにカップリングできる。これにより式(V)の化合物が生じるが、式Vの化合物に至る他の経路は当業者に明らかであろう。

【化19】



40

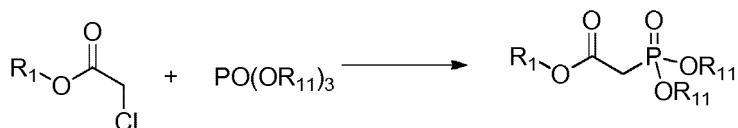
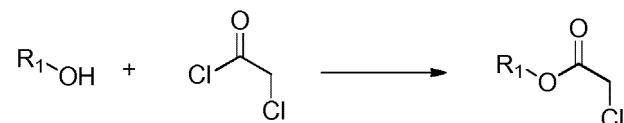
X = Cl 又は O-アルキル

【0103】

(スキーム2)

X₁がOR₁を表す式(V)のさらなる化合物は公知であり得るか、又は利用可能なアルコール(例えば、R₁OH)から容易に合成できる。スキーム3(下記)に示されるとおり、アルコールを利用して、クロロアセチルクロリドなどを処理し、-クロロエステルを形成できる。次いで、該-クロロエステルをアルブゾフ反応で処理すると、式IIの化合物が生成する。式IIの化合物に至る他の経路は当業者に明らかであろう。

【化20】



10

【0104】

(スキーム3)

望まれる場合又は必要な場合、T. W. Green及びP. G. M. Wutsの文献、「有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)」Wiley-Interscience, New York, 1999に記載のとおり、保護基を利用して、アルデヒド性マクロ環、マクロ環、アルコール(R_1OH)、カルボン酸誘導体($\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{COX}$)若しくはアミン($\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$)又は式Vの化合物の官能基を保護することができる。

【0105】

本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、合成法に関する、「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

【0106】

本発明の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、したがってより高いSVRをもたらし、かつ耐性の低減をもたらすことができる。

【0107】

30

したがって、一実施態様において、該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種以上の治療剤(複数可)と共に投与される。これは、インターフェロン(例えば、pIFN 及び/又はリバビリン)でもよい。

【0108】

別の実施態様において、本発明のサングリフェリンマクロ環は、STAT-C(HCVの治療を特異的に対象とした薬剤)又はDAA(直接作用型抗ウイルス剤)などの1種以上の他の抗ウイルス剤と共に投与されるが、該抗ウイルス剤は以下の1つ以上であってよい: 非-ヌクレオシドポリメラーゼ阻害剤(例えば、ABT-333、ABT-072、BMS 791325、IDX375、VCH-222、BI 207127、ANA598、VCH-916、GS 9190、PF-00868554(フィリブビル)、又はVX-759)、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-メチルシチシン、2'-C-メチルアデノシン、R1479、PSI-6130、R7128、R1626、PSI 7977、又はIDX 184)、プロテアーゼ阻害剤(例えば、ABT-450、ACH-1625、BI 201355、BILN-2061、BMS-650032、CTS 1027、ダノブレビル、GS 9256、GS 9451、MK 5172、IDX 320、VX-950(テラブレビル)、SCH5 03034(ボセブレビル)、TMC435350、MK-7009(バネブリビル(Vaneprevir))、R7227/ITMN-191、EA-058、EA-063、又はVX 985)、NS5A阻害剤(例えば、A-831、BMS 790052、BMS 824393、CY-102、又はPPI-461)、シリマリン、NS4b阻害剤、セリンC-パルミトイльтランスクエラーゼ阻害剤、ニタゾキサニド、又はウイルス侵入阻害剤(例えば、PRO 206)。

40

【0109】

代わりの実施態様において、本発明のサングリフェリンマクロ環は、HIVの治療のために、1種以上の他の抗ウイルス剤(高活性抗レトロウイルス療法(HAART)など)と共に投与され

50

るが、該抗ウイルス剤は以下の1つ以上であってよい：ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(N RTI)(例えば、エムトリシタビン又はテノホビル)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(N NRTI)(例えば、リリピビリン(Rilipivirine)又はエファビレンツ)、プロテアーゼ阻害剤(PI)(例えば、リトナビル又はロピナビル)、融合阻害剤(例えば、マラビロク又はエンフビルチド)、CCR5阻害剤(例えば、アプラビロク又はビクリビロク)、成熟阻害剤(例えば、ベビリマット)、CD4モノクローナル抗体(例えば、イバリズマブ)、及びインテグラーゼ阻害剤(例えば、エルチエグラビル(Eltiegravir))。

【 0 1 1 0 】

代わりの実施態様において、本発明のサングリフェリンマクロ環は、HBVの治療のために1種以上の他の抗ウイルス剤と共に投与されるが、該抗ウイルス剤は以下の1つ以上であってよい：インターフェロン(例えば、インターフェロンアルファ又はペグ化インターフェロンアルファ)、ヌクレオシド又はヌクレオチドアナログ(例えば、ラミブジン、エンテカビル、アデホビルジビボキシリル、又はテルビブジン)、他の免疫調節剤(例えば、サイモシンアルファ、CYT107、又はDV-601)、又はHMG CoA還元酵素阻害剤(例えば、シンバスタチン)。

10

【 0 1 1 1 】

製剤は、簡便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つ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。

20

【 0 1 1 2 】

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。治療すべき疾患及び患者、並びに投与経路によって、組成物は種々の投与量で投与され得る。

【 0 1 1 3 】

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)、エリキシリル剤、液剤又は懸濁剤の形態で、経口的に、頬側的に又は舌下的に投与することができる。

30

【 0 1 1 4 】

そのような錠剤は、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)、デンブ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、並びにポリビニルビロリドン、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を含み得る。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、グリセリルベヘネット及びタルクなどの滑沢剤が含まれ得る。

40

【 0 1 1 5 】

類似の種類の固体組成物は、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/又はエリキシリル剤では、本発明の化合物は、様々な甘味剤若しくは着香剤、着色物質又は色素と、乳化剤及び/又は懸濁化剤と、水、エタノール、プロピレングリコール及びグリセリンなどの希釈剤と、並びにそれらの組み合わせと組み合わせることができる。

【 0 1 1 6 】

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、デンブングリコール酸ナトリ

50

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。

【0117】

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ション若しくは油中水型液体エマルションとして提供することができる。有効成分は、ボーラス、舐剤、又はペースト剤として提供することもできる。10

【0118】

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。

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。20

【0119】

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、及び疾病的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。

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。

【0120】

本発明の化合物の個別の用量の最適量及び間隔が、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。30

【0121】

(本発明のさらなる態様は、下記を含む：)

-医薬として使用するための、本発明の化合物

-HCV若しくはHIV感染などのウイルス感染症(特にRNAウイルス感染症)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共に含む、医薬組成物40

-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共に含み、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症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症(特にRNAウイルス感染症)の治療方法、抗炎症薬としての使用の方法、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症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。50

【 0 1 2 2 】

(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產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BIOT-45 85などのその誘導体を、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。

【 0 1 2 3 】

BIOT-4585(構築方法論用、実施例1参照)を、オートミール寒天上で、28 で7~10日間 増殖させた。寒天板の表面の胞子を、蒸留の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。凍結胞子ストックを、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2.5cmの行程で200~300rpm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2.5cmの行程で200~300rpm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。

10

【 0 1 2 4 】

(メタ-チロシンアナログ)

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。

20

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 1 2 5 】

(S)-メチル2-アミノ-3-(3-フルオロ-5-ヒドロキシフェニル)プロパノアートをNetChem 社(米国)から購入した。(3-ブロモ-5-フルオロアニソール(9-1)をAccela ChemBio社(上海、中国)から購入したが、Amfinecom社(米国)又はApollo Scientific社(英国)からも購入 可能である)。

30

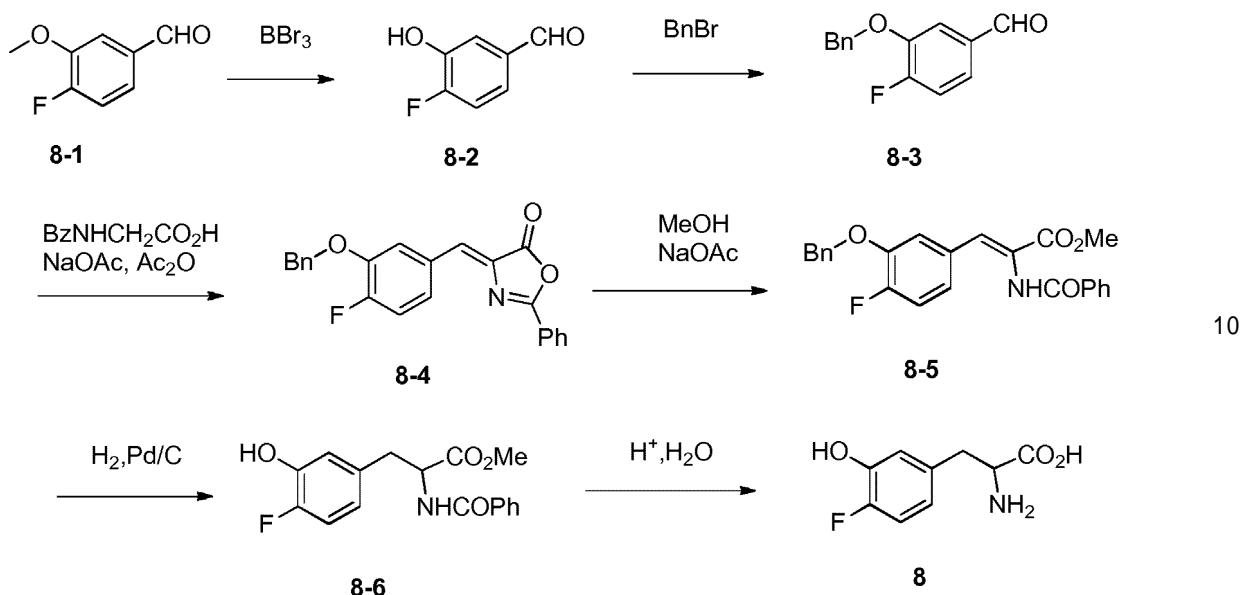
【 0 1 2 6 】

DL-5-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)を以下のとおり合成した。

【 0 1 2 7 】

(DL-4-フルオロ-メタ-チロシン(8))

【化21】



8-1(3g、19.5mmol)の乾燥DCM(150mL)溶液に、-70℃のBBr₃(DCM中4M、14.6mL、58.5mmol)を滴加した。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。有機層を水及びブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカのフラッシュクロマトグラフィーにかけて精製すると、所望の化合物8-2を与えた。

【0128】

8-2(0.9g、6.4mmol)のアセトン(40mL)溶液に、K₂CO₃(2.2g、16mmol)を室温で加えた。該反応混合物を室温で一晩攪拌した。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、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカのフラッシュクロマトグラフィーにかけて精製すると、所望の化合物8-3を与えた。

【0129】

8-3(1g、4.34mmol)、馬尿酸(860mg、4.80mmol)、NaOAc(400mg)、及びAc₂O(2.2mL)の混合物を80℃で2時間攪拌した。該黄色反応混合物を冷却し、冷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、冷却し、生成物を濾過により回収した。固体を真空中で乾燥させると、8-4を与えた。

【0130】

8-4(300mg、0.8mmol)及びNaOAc(71mg、0.87mmol)のMeOH(50mL)溶液を室温で一晩攪拌した。溶媒をロータリーエバボレーションにより除去し、残渣を50mLのEtOAcに溶解させ、該EtOAc溶液を水で2回洗浄し、濃縮すると8-5を与えた。

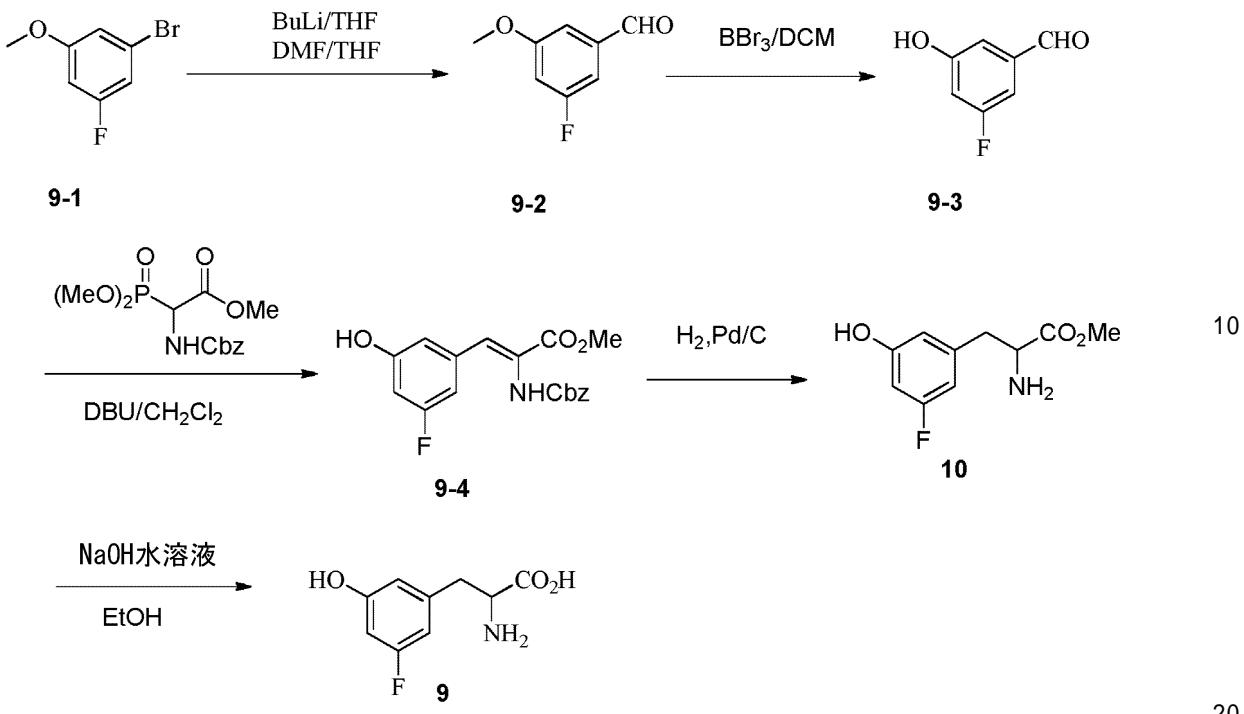
8-5(360mg、0.89mmol)のMeOH(50mL)溶液を、10%Pd/C(77mg)上で常圧で20時間水素化した。濾過により触媒を除いた後、溶媒を蒸発させると、生成物8-6を与えた。

8-6(210mg)の3N HCl(10mL)溶液を24時間還流した。該溶液を濃縮乾固させ、残渣を逆相コンビフラッシュ(reverse-combi flash)により精製すると、目的生成物8を与えた。

【0131】

(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22】



【0132】

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分間攪拌し、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分間攪拌し、冷浴を外した。1時間後、該反応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、乾燥させ(硫酸ナトリウム)、濾過して、濃縮した。該残渣をシリカのクロマトグラフィーにより精製すると、9-2を与えた。

【0133】

9-2(6g、38.9mmol)の乾燥DCM(200mL)溶液に、BBr₃(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、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮した。該残渣をシリカのフラッシュクロマトグラフィーにより精製すると、所望の化合物9-3を与えた。

【0134】

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、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮した。該残渣をシリカのフラッシュクロマトグラフィーにより精製すると、9-4を与えた。

【0135】

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。触媒を濾去した後、該溶媒を蒸発させると、10を与えた。

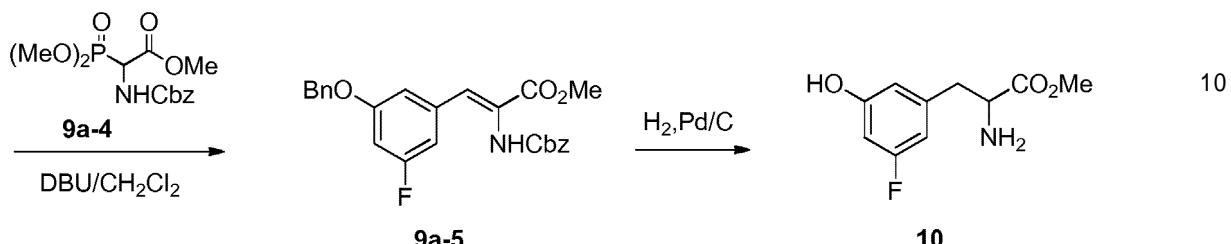
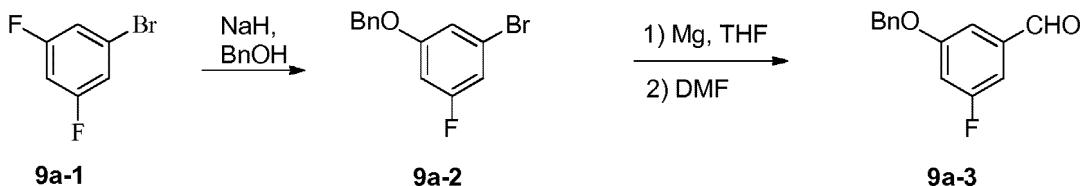
10(300mg、1.4mmol)のEtOH(30mL)溶液に、NaOH水溶液(2N、4mL)を加え、該反応物を室温で30分間攪拌した。該溶媒を除去し、該残渣を2N HClでpH=6に中和し、形成された白色結晶を濾過により回収すると、対象化合物9を与えた。

【0136】

(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)に至る代替経路)

(3,5-ジフルオロプロモベンゼン(9a-1)をDarui Fine Chemicals社(上海、中国)から購入したが、Alfa Aesar社又はSigma Aldrich社からも購入可能である)。

【化23】



【0137】

(9a-2の製造)

BnOH(1.61mL、15.54mmol)のDMF(30mL)溶液に、0 のNaH(622mg、鉱油中60%の分散液、15.54mmol)を加えた。攪拌を室温で0.5時間続けると、透明な溶液を与えた。9a-1(1.79mL、15.54mmol)を、温度を40 未満に保つような速度で加えた。該混合物を室温で一晩攪拌すると、黄色の溶液を与えた。該反応を水でクエンチし、石油エーテル(35mL×4)で抽出した。合わせた有機層を濃縮した。そして、残渣を、石油エーテルで溶出させるシリカゲルクロマトグラフィーにより精製すると、9a-2(2.544g)を無色の油として与えた。

20

【0138】

(9a-3の製造)

乾燥した三つ口フラスコ(three flask)に、Mg(170.1mg、7.10mmol)、無水THF(10mL)、及び少量のヨウ素を窒素下で加えた。THF(2mL)中の9a-2(1.664g、5.9192mmol)の1/3を加えた。該混合物を還流まで加熱した。この時間の間、黄色混合物は次第に明るい黄色になった。次いで、9a-2の残りの2/3を滴加し、該反応混合物をさらに0.5時間還流した。

30

【0139】

上記混合物に、DMF(0.504mL、6.51mmol)を0 でゆっくりと加えた。攪拌を室温で0.5時間続けた。HCl(2M、10mL)を加え、THFを蒸発させた。残渣を酢酸エチル(25mL×3)で抽出した。そして、合わせた有機層をブラインで洗浄し、真空中で濃縮した。残渣を、石油エーテルから石油エーテル/酢酸エチル=20/1で溶出させるシリカゲルクロマトグラフィーにより精製すると、9a-3(694mg)を無色の油として与えた。

30

【0140】

(9a-5の製造)

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)アセタート、9a-4(993mg、3.00mmol)のDCM(30mL)溶液に、DBU(832 μL、5.57mmol)を室温で加えた。10分後、9a-3(694mg、3.01mmol)を加え、生じた混合物を室温で1時間攪拌した。該溶液をHCl(1M、10mL)で洗浄し、合わせた有機層を乾燥させ、真空中で濃縮した。残渣を、シリカのフラッシュクロマトグラフィー(ジクロロメタン/酢酸エチル=10/1で溶出)により精製すると、9a-5(1.11g)を与えた。

40

【0141】

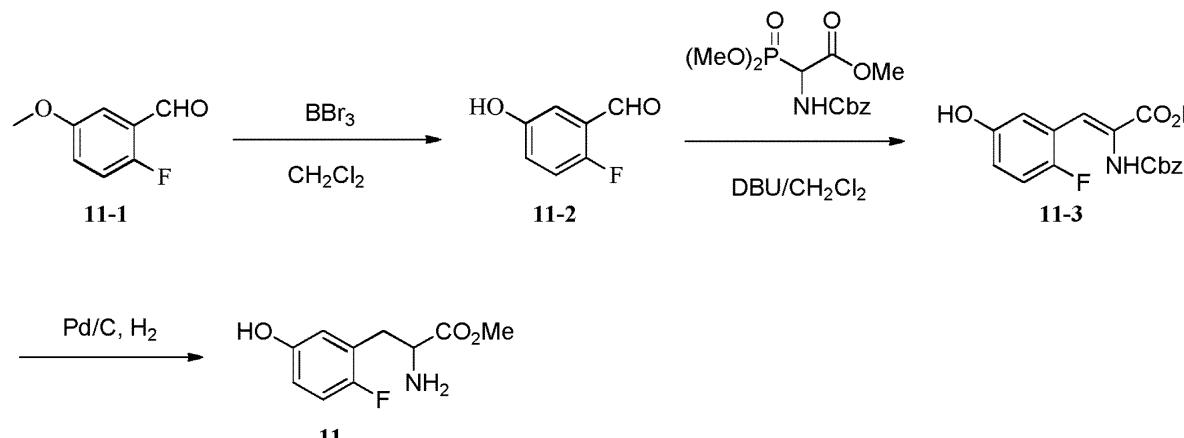
(10の製造)

9a-5(100mg)のMeOH(50mL)溶液を、20mgの10%Pd/C上で、常圧で2時間水素化した。触媒を濾去した後、溶媒を蒸発させると、10(33mg)を与えた。

【0142】

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

【化24】



【0143】

化合物11-1(1.4g、9mmol)の50mLのDCM中の溶液に、 BBr_3 (DCM中4M、3.6mL、13.5mmol)を-78°で滴加した。添加の後、該反応物を-20°で4時間攪拌した。次いで、氷/水をゆっくりと加え、層を分離し、有機層を水及びブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を、さらに精製せずに次の工程に使用した。

【0144】

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のDCM中の溶液に、DBU(2.8g、18mmol)を室温で加え、10分後、化合物11-2(すぐ前の工程の粗製化合物)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 で乾燥させ、蒸発乾固させた。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)により精製すると、11-3を与えた。

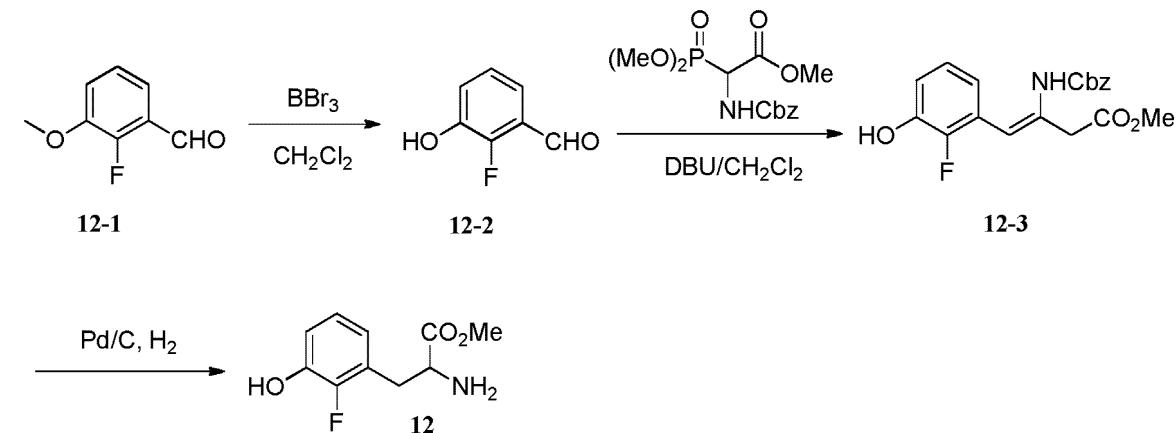
【0145】

化合物11-3(500mg、1.5mmol)のMeOH(20mL)中の混合物を、50mgの10%Pd/C上で、常圧で一晩水素化した。触媒を濾去し、溶媒を蒸発させると粗生成物を得たが、これを逆相コンビフラッシュにより精製すると、11を白色固体として得た。

【0146】

(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25】



【0147】

化合物12-1(1.4g、9mmol)の50mLのDCM中の溶液に、 BBr_3 (DCM中4M、3.6mL、13.5mmol)を-78°で滴加した。添加後、該反応物を-20°で4時間攪拌した。氷/水をゆっくりと加えた後、層を分離し、有機層を水及びブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を、さらに精製せずに次の工程に使用した。

50

〔 0 1 4 8 〕

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のDCM中の溶液に、DBU(2.7mL、18mmol)を室温で加え、10分後、化合物12-2(すぐ前の工程の粗製化合物)を加え、室温で2時間攪拌した。次いで、該溶液をDCM(100mL)で希釈し、1N HCl(30mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させた。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)により精製すると、12-3を与えた。

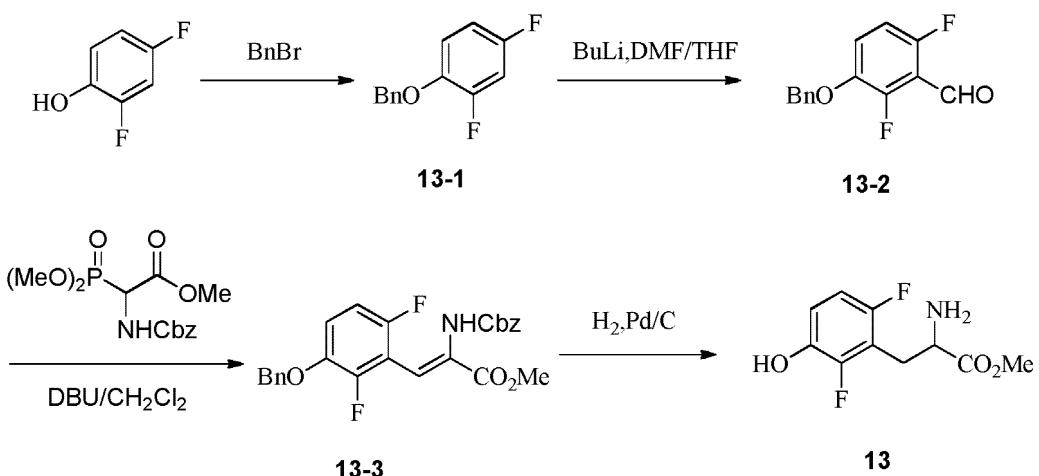
【 0 1 4 9 】

化合物12-3(500mg、1.44mmol)のMeOH(10mL)中の混合物を、100mgの10%Pd/C上で、常圧で一晩水素化した。触媒を濾去した後、溶媒を蒸発させると粗生成物を得たが、これを逆相コンビフラッシュにより精製すると、所望の化合物12を白色固体として得た。

[0 1 5 0]

(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 2 6】



【 0 1 5 1 】

2,4-ジフルオロフェノール(2g、15.4mmol)の50mLのDMF中の溶液に、 K_2CO_3 (3.2g、23.1mmol)及びBnBr(2.2mL、18.5mmol)を0℃で加えた。該反応物を室温で2時間攪拌した。水(100mL)及びEA(200mL)を加え、有機層を水(50mL)及びブライン(50mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、蒸発乾固させた。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)により精製すると、粗製の13-1を与えた。

【 0 1 5 2 】

化合物13-1(2g、9mmol)の10mLのTHF中の溶液に、-78 °Cのn-BuLi(4mL、2.5M)を滴加し、30分間攪拌した。DMF(1.3g、0.018mmol)を加え、再び30分間攪拌した。次いで、冷浴を外し、該反応混合物を室温で1時間攪拌してから、水でクエンチした。それを酢酸エチル(20 mL × 3)で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、蒸発乾固させた。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)により精製すると、黄色の固体として13-2を与えた。

〔 0 1 5 3 〕

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(72.8mg、2.2mmol)の20mLのDCM中の溶液に、DBU(319mg、2.1mmol)を室温で加えた。10分後、化合物13-2(500mg、2mmol)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 で乾燥させ、蒸発乾固させた。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)により精製すると、13-3を黄色の油として与えた。

[0 1 5 4]

MeOH(20mL)中の化合物13-3(600mg、1.32mmol)を、60mgの10%Pd/C上で、常圧で一晩水素化した。触媒を濾去した後、溶媒を蒸発させると粗生成物を得たが、これを逆相コンビフ

ラッシュにより精製すると、所望の化合物13を白色固体として与えた。

【0155】

(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。

【0156】

【表2】

SGS 種培地

成分(及び供給業者)	処方	10
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	
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	20
きな粉 Nutrisoy (ADM, 063160)	2.50 g	
L-アスパラギン(Sigma, A0884)	1.00 g	
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	30
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sigma, M7774)	0.10 g	
微量元素溶液B	1.00 mL	
寒天	1.00 g	
SAG471 消泡剤 (GE Silicones, SAG471)	* 0.20 mL	
RO H ₂ O	右記の最終体積にする ** 1.00 L	

滅菌前のpHは、10M NaOH/10M H₂SO₄によりpH7.0

に調整した121°Cで20~30分加熱により滅菌
(オートクレーブ処理)

40

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

微量元素溶液B

成分	処方		10
FeSO ₄ .7H ₂ O (Sigma, F8633)	5.00	g	
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	20
CoCl ₂ .6H ₂ O (Sigma, C2644)	0.10	g	
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 右記の最終体積にする	1.00	L	

SGP2產生培地

成分	処方	
きな粉 (Nutrisoy) (ADM, 063-160)	20.00	g
グリセロール(Fisher scientific, G/0650/25)	40.00	g
MES 緩衝液 (Acros, 172595000)	19.52	g
SAG471 Antifoam (GE Silicones, SAG471)	*0.20	mL
RO H ₂ O	右記の最終体積にする	**1.00 L

滅菌前のpHは、10M NaOHによりpH6.8に調整した
121°Cで20~30分加熱により滅菌(オートクレーブ処理)

備考

- * 最終体積を適宜調整してシード体積とする
- * * 消泡剤はフラスコでなくシードファーメンターにのみ使用

20

SM25-3培地(SM25とも呼ばれる)

成分

グリセロール(Fisher scientific, G/0650/25)	40g	30
大豆ペプトンA3 SC (Organotechnie)	10g	
麦芽エキス(Difco)	21g	
右記の最終体積にする	1L	

滅菌前のpHは調整せず(すなわちpH7.0)

ISP4培地

成分

可溶性デンプン (Difco)	10g	
K2HPO4	1g	
MgSO4.7H2O	1g	
NaCl	1g	10
(NH4)2SO4	2g	
CaCO3	2g	
ISP微量塩類溶液	1mL	
寒天	20g	
右記の最終体積にする	1L	
少量の冷水中でデンプンによりペーストを作り、 体積を500mlにする。		20
他の成分を500mlの水中の溶液IIに加える。pHは pH7.0～pH7.4のはずである(pH7.3)。2つの溶液を 混合し、寒天を加える。		

ISP微量塩類

成分

FeSO4.7H2O	1g	
MnCl2.4H2O	1g	
ZnSO4.7H2O	1g	
右記の最終体積にする	1L	
4°Cで保存		

オートミール寒天 (ISP3)

成分	処方	
オートミール	20.00	g
ISP微量元素溶液	1.00	mL
Bacto Agar (Becton Dickinson)	18.00	g
RO H ₂ O	右記の最終体積にする	1.00 L
		10

20gのオートミールを、ホットプレート上で（又は電子レンジ中で）1Lの水中で20分間加熱調理する。加熱調理した混合物を、モスリン/チーズクロスに通して濾過し、pH7.2にして、1Lにする。1mLのISP微量元素溶液を加える。次いで、滅菌前に寒天1L当たり18gを加える。

20

MAM寒天

成分	処方	
小麦デンプン (Sigma)	10.00	g
コーンスティーピパウダー (Roquette)	2.50	g
酵母エキス (Becton Dickinson)	3.00	g
CaCO ₃ (Calcitec)	3.00	g
FeSO ₄ (Sigma)	0.300	g
Bacto Agar (Becton Dickinson)	20.00	g
RO H ₂ O	右記の最終体積にする	1.00 L
オートクレーブ処理前にpH5.8		

BT6產生培地

成分	処方	
グルコース (Sigma)	50.00 g	
Nutrisoy (ADM)	30.00 g	
NaCl (Fisher)	5.00 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sigma)	3.00 g	10
CaCO ₃ (Calcitec)	6.00 g	
RO H ₂ O 右記の最終体積にする	1.00 L	

pH7.0に調整し、次いでCaCO₃を加える

ISP2寒天

20

成分	処方	
酵母エキス(Becton Dickinson)	4.00 g	
麦芽エキス (Becton Dickinson)	10.0 g	
デキストロース (Sigma)	4.00 g	
Bacto Agar (Becton Dickinson)	20.0 g	
RO H ₂ O 右記の最終体積にする	1.00 L	

30

寒天の添加及び滅菌の前にpH7.3に調整する

【0157】

(全般的な発酵方法)

BIOT-4585(構築方法論用、実施例1参照)の凍結保存胞子ストックを室温で解凍した。増殖性培養(種培養)は、胞子ストック4.0mL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中のSM25培地400mL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のエルレンマイヤーフラスコ中の250mLの產生培地SGP2+5%HP20に移した。24、250rpm(2.5cm行程)での24時間の培養の後、各產生フラスコに、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。1Mの塩酸の代わりに、DMSOを任意に使用できる。DL-ピペラジン酸を任意に省略できる。24、250rpm(2.5cm行程)で、さらに4日間、培養を続けた。

40

【0158】

(LC-UV及びLC-UV-MSによる培養プロスの分析)

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

HPLC条件 :

50

C18 Hyperclone BDS C18 カラム 3μ 、 $4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$
 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

【 0 1 5 9 】

溶媒勾配 :

0分 : 55% B

1.0分 : 55% B

10

6.5分 : 100% B

10.0分 : 100% B

10.05分 : 55% B

13.0分 : 55% B

【 0 1 6 0 】

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。

【 0 1 6 1 】

20

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 6 2 】

(QC LC-MS法)

(HPLC条件)

C18 Hyperclone BDS C18カラム 3μ 、 $4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$

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

カラム温度50

流速1 mL/分

30

210、240、及び254 nmで紫外モニター

【 0 1 6 3 】

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。

40

溶媒Bは、アセトニトリル+0.1% ギ酸である。

【 0 1 6 4 】

(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 6 5 】

(HCV抗ウイルス活性の評価のためのインピ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能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、 75cm^2 の組織培養フラスコ(Techno Plastic Products社製)で、細胞増殖培地[10% FCS

50

、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%ジエネティシン(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℃、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。

【0166】

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℃、5%CO₂、相対湿度95～99%)インキュベートする。10

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℃、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。

【0167】

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。20

【0168】

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。

【0169】

ある濃度の化合物は、その特定の濃度で抗レブ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レブ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。30

【0170】

(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ブリコンアッセイ)

レブリコン細胞(遺伝子型1a(H77)及び2a(JFH-1)のサブゲノムレブリコン)を、ダルベッコ変法必須培地(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℃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。40

【0171】

該レブ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レブ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レブ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℃、72時間のインキュベーションの後、該細胞をプロセシングする。各ウェルからの細胞内RNAを、RNeasy⁹6キット(Qiagen社)を用いて抽出する。HCV RNAのレベルを、既報のとおり(Vrolijkら、2003)、TaqMan(登録商標)One-Step RT-PCR Master Mix Reagents(Applied Biosystems社50

、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、逆転写酵素-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。

【0172】

(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分間プ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分で抜き取り、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。

【0173】

(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 °C の振盪水浴に2分 ± 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 × 10⁶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 μM添加溶液:DMSO 980 μLに基質ストック溶液(10mM)20 μL、2X投薬溶液:KHB 990 μLに200 μM添加溶液10 μL(希釈後2 μM))。

【0174】

予め温めておいた2X投薬溶液50 μLをウェルに添加し、予め温めておいた肝細胞溶液(2 × 10⁶細胞/mL)50 μLを添加して、計時を開始する。次いで、プレートを37 °C 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 μL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、穏やかに混合し、予め温めておいた肝細胞溶液50 μLを添加する(2 × 10⁶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 °C、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。

【0175】

(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のアリコートを、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。

【0176】

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 μM、16 μM、4 μM、1.6 μM、0.4 μM、0.16 μM、0.04 μM、及び0.002 μM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

10

20

30

40

50

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。

【0177】

【表3】

	溶液(μL)	MeOH/ H ₂ O(1:1) (μL)		検量線 用溶液 (μM)	溶液(μL)	MeOH/緩衝液 (1:1) (μL)		最終 濃度(nM)
10mM	10	240	→	400				
400μM	50	450	→	40	20	380	→	2000
	20	480	→	16	20	380	→	800
40μM	50	450	→	4	20	380	→	200
16μM	50	450	→	1.6	20	380	→	80
4μM	50	450	→	0.4	20	380	→	20
1.6μM	50	450	→	0.16	20	380	→	8
0.4μM	50	450	→	0.04	20	380	→	2
0.04μM	50	950	→	0.002	20	380	→	1

【0178】

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。

【0179】

(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ーイエローも含めて、膜完全性をモニターする。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ブトロールなど)の両方のレベルを定量化する。

【0180】

(薬物動態のインビオ評価)

インビオ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共に変動する

10

20

30

40

50

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。

【0181】

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され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、2002、及び該文献の引用文献を参照されたい。10

【0182】

(経口及び静脈内薬物動態のインピボ評価(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マウスの群に、1mg/kg i.v.又は5若しくは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と共に加え、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に注入する。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PKパラメーターを得る。20

【0183】

(細胞傷害性のインピトロ評価)

ATCCから入手したHuh-7及びHepG2細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)、1%ペニシリント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変法必須培地(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。層状になったPBMCを生じた界面から穏やかに吸引し、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 × 10⁷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ペニシリント、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。40

【0184】

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(half-log concentration)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(50

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シングする。

【0185】

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 μL 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シングする。

10

【0186】

細胞傷害性は、CytoTox-ONE (商標) 均質膜完全性アッセイキット(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。発生する蛍光の量は、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。

【0187】

(MDR1及びMRP2トランスポーターの阻害のインビトロ評価)

20

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、Solvio Biotechnology社のインビトロATPアーゼアッセイが利用できる(Glavinisら、2003)。化合物(0.1、1、10、及び100 μM)を、バ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、無機の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アーゼ活性のバ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。

【0188】

(MDCK細胞を使用するPgpトランスポーターの阻害のインビトロ評価)

30

P糖タンパク質(Pgp/MDR1)トランスポーターの阻害を評価するために、Cyprotex社のインビトロATPアーゼアッセイを使用した。NIH (ロックビル、メリーランド州、米国)から入手したMDR1-MDCK細胞を使用した。培養後、基底面と頂端側の表面のどちらも、pH 7.4で37 の緩衝液で2回すすぐことにより、単層を調製した。次いで、頂端側及び基底面のコンパートメントにおいて、細胞をpH 7.4の緩衝液と共に37 で相対湿度95%、5%CO₂で40分間インキュベートし、生理学的パラメーターを安定化させた。頂端側から基底面への試験(A-B)では、pH 7.4の緩衝液を頂端側コンパートメントから除去し、「コンパニオン」プレートに置く前にロペラミド投薬溶液に替えた。該溶液は、ロペラミドをDMSOに緩衝液と共に希釈して調製し、5 μM の最終ロペラミド濃度を与えた(最終DMSO濃度を1%に調整した)。蛍光完全性マーカルシファーイエローも投薬溶液に含めた。被験化合物の存在下又は非存在下で実験を実施した(頂端側及び基底面の両コンパートメントに適用した)。基底面から頂端側への(B-A)試験では、P糖タンパク質基質、ロペラミド(最終濃度=5 μM)を基底面コンパートメントに配置した。被験化合物の存在下又は非存在下で実験を実施した(頂端側及び基底面の両コンパートメントに適用した)。インキュベーションは、5%CO₂を含み相対湿度95%の37 の雰囲気中で60分間実施した。インキュベーション期間後、コンパニオンプレートを除去し、頂端側及び基底面の試料をLC-MS/MSによる分析のために希釈した。各被験化合物の濃度の1回の測定を実施した。各プレート上で、陽性対照阻害剤もスクリーニングした。被験化合物を、0.1、0.3、1、3、10、30、及び50 μM で評価した。実験全体にわたる単層の完全性を、蛍光定量的分析を利用するルシファーイエロー透過の

40

50

モニタリングにより確認した。分析後、 IC_{50} を計算した(すなわち、最大阻害効果の半分を達成する阻害剤濃度(被験薬))。

【0189】

(取り込みトランスポーターの阻害のインピトロ評価)

OAT1B1及びOAT1B3取り込みトランスポーターの阻害を評価するために、Solvo Biotechnology社のインピトロ取り込みトランスポーター・アッセイを利用した。0.068、0.2、0.62、1.8、5.5、16.7、及び50 μMの被験物質(Test Article)(TA)による取り込み実験を、ヒトSLCトランスポーターOATP1B1及びOATP1B3を安定に発現しているCHO細胞に対して実施した。親細胞系CHO-Kを陰性対照として使用した。細胞(5 mM 酪酸ナトリウムを補ったダルベッコ変法イーグル培地とHam's F-12 DMEM(F-12、Lonza、ニュージャージー州、米国)の1:1混合物200 μl中に 1×10^5)を標準の96-ウェル培養プレートに播種し、実験24時間前に、37 °Cで、5%CO₂及び95%空気の雰囲気中でインキュベートした。実験前に、培地を真空吸引によりアスピレートし、細胞を2 × 100 μlのpH7.3のKrebs-Henseleit緩衝液(Sigma chemicals、Sigma-Aldrich社、セントルイス、ミズーリ州)で洗浄した。取り込み実験は、37 °Cで、プローブ基質及びTA又は溶媒をそれぞれ含むKrebs-Henseleit緩衝液(pH 7.3)50 μl中で実施した。有機溶媒濃度は各ウェルで等しく、1% v/v以下であった。OATP1B1アッセイのプローブ基質はE3S(0.1 μM)であり、OATP1B3アッセイではFluo-3(10 μM)であった。プローブ基質のトランスロケートされた量はcpmで各ウェルに対して決定した。相対活性は、以下の式から計算した:

$$\text{活性\%} = (A-B)/(C-D) \times 100$$

(式中、A=TAの存在下でのトランسفェクトされた細胞上の基質のトランスロケートされた量、B= TAの存在下での親細胞上の基質のトランスロケートされた量、C=溶媒の存在下でのトランسفェクトされた細胞上の基質のトランスロケートされた量、及びD=溶媒の存在下での親細胞上の基質のトランスロケートされた量)。 IC_{50} は、プローブ基質の輸送を50%阻害するのに必要なTA濃度と定義した。 IC_{50} は、3パラメータロジスティック方程式(three-parameter logistic equation);非線形回帰により、相対活性対TA濃度プロットに適合させた曲線から誘導した。

【0190】

(排出トランスポーターの阻害のインピトロ評価)

MRP2、MRP3、及びBSEP排出トランスポーターの阻害を評価するために、Solvo Biotechnology社のインピトロ小胞トランスポーター・アッセイを使用した。被験物質(TA)(0.068、0.2、0.62、1.8、5.5、16.7、及び50 μM)を、排出トランスポーター膜小胞(Solvo Biotechnology社)と共に、4mMのATPの存在下又は非存在下の両方でインキュベートし、トランスポーターが媒介する取り込みと小胞へのTAの受動拡散との間を区別した。MRP2及びMRP3の場合、トランスポーター反応は、2 mMのグルタチオンの存在下で実施した。反応混合物を37 °Cで10分間プレインキュベートした。25 μlの12mM MgATP(アッセイ中の最終濃度4 mM)又はバックグラウンド制御用のアッセイ緩衝液の添加により反応を開始した。200 μlの氷冷洗浄緩衝液を加えて反応を停止し、すぐに96-ウェルフォーマット(フィルタープレート)中でガラス纖維フィルターで濾過した。シンチレーション緩衝液を、洗浄及び乾燥したフィルタープレートに加え、その後シンチレーションをカウントした。プローブ基質は、BSEP小胞にはタウロコール酸塩(2 μM)であり、MRP2及びMRP3小胞にはE₂17 G(1 μM)であった。全てのウェルで、プローブ基質のトランスロケートされた量を、cpm単位で決定した。相対活性は、以下の式により計算した:

$$\text{活性\%} = (A-B)/(C-D) \times 100$$

(式中、A=TA及びATPの存在下での基質のトランスロケートされた量、B=TAの存在下での基質のトランスロケートされた量、C=溶媒及びATPの存在下での基質のトランスロケートされた量、及びD=溶媒の存在下での基質のトランスロケートされた量)。 IC_{50} は、プローブ基質の輸送を50%阻害するのに必要なTA濃度と定義した。 IC_{50} は、3パラメータロジスティック方程式;非線形回帰により、相対活性対TA濃度プロットに適合させた曲線から誘導した。

50

【0191】

(HIV抗ウイルス活性の評価のためのインビトロアッセイ)

HIVに対する抗ウイルス効能を下記のとおり試験できる：血液由来CD4+T-リンパ球及びマクロファージを既報のとおり単離する(Bobardtら、2008)。簡単に述べると、ヒトのPBMCを、フィコール・ハイパック上で層状にする(30分、800g、25℃)ことにより鮮血から精製した。一次ヒトCD4+ T細胞を、抗-CD4ダイナビーズによるポジティブ選択及びその後のデタッチャビーズを使用する放出によりPBMCから精製した。10% FCS、MEMアミノ酸、L-グルタミン、MEMビタミン、ピルビン酸ナトリウム、及びペニシリンプラスストレプトマイシンを補った RPMI培地1640(Invitrogen社)中で細胞を培養し、その後、細菌性スーパー抗原ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB; 100 ng/ml)及び他のドナーから得たマイトイシンCにより殺傷されたPBMC(10:1 PBMC:CD4細胞比)により活性化させた。刺激の3日後、細胞を、IL-2(200 単位/ml 最終濃度)を含む培地中で1:2に分けた。次いで、培養物をIL-2培地中で2日ごとに1:2に分け、刺激後7日にHIVに感染させた。初代ヒトマクロファージを生成させるために、単球をネガティブ選択によりヒトPBMCから精製し、10% FCS、MEMアミノ酸、L-グルタミン、MEMビタミン、ピルビン酸ナトリウム、及びペニシリン(100単位/ml)、ストレプトマイシン(100 mg/ml)、並びに50 ng/mlのリコンビナントヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を補ったDMEM中で106/mlの細胞濃度で活性化及び培養し、5%CO₂を補った加湿雰囲気中で37℃に維持した。単球誘導マクロファージを得るために、細胞をプラスチックに付着させ、6日間培養して分化させた。

【0192】

CD4+ HeLa細胞、Jurkat細胞、活性化CD4+ 末梢血T-リンパ球、及びマクロファージ(500,000 細胞/100 μL)を、濃度を上げた被験物質の存在下でpNL4.3-GFP(X4ウイルス)又はpNL4.3-BaL-GFP(R5ウイルス)(100 ngのp24)と共にインキュベートした。48時間後、FACSによりGFP陽性細胞のパーセンテージを分析して感染を点数化し、EC₅₀を計算した。

【0193】

(HBV抗ウイルス活性の評価のためのインビトロアッセイ)

HBVに対する抗ウイルス効能を下記のように試験できる：HepG2 2.2.15細胞を96-ウェルマイクロタイプレートに播種する。16~24時間後、HepG2 2.2.15細胞のコンフルエントな单層を洗浄し、三連で種々の濃度の被験化合物（例えば、6回のハーフログ濃度）を含む完全培地と替える。3日後、培地を、適切に希釈された被験化合物を含む新鮮な培地に替える。被験物質の最初の投与の6日後、細胞培養物上清を回収し、プロナーゼで処理し、次いで、リアルタイム定量的TaqMan qPCRアッセイに使用する。増幅されたHBV DNAにハイブリダイズするクエンチされた蛍光プローブ分子のエキソヌクレアーゼ分解から生じる蛍光シグナルの増加をモニタリングすることにより、PCR増幅されたHBV DNAをリアルタイムに検出する。各PCR増幅に対して、精製されたHBV DNAの希釈物を使用して、検量線が同時に生成される。抗ウイルス活性を、HBV DNAレベルの低下から計算する(IC₅₀)。次いで、色素取り込みアッセイを利用して、細胞生存率を測定し、それを利用して毒性(TC₅₀)を計算する。治療指数(TI)をTC₅₀/IC₅₀として計算する。

【0194】

(免疫抑制活性の評価のためのインビトロ混合リンパ球(MLR)アッセイ)

免疫抑制活性を下記のとおり試験した：末梢血単核細胞(PBMC)集団を、ヒストパック上の遠心分離を利用して、2名の正常な関連性のないボランティアドナー(A及びB)の血液から精製した。細胞を計数し、補助剤及び2%ヒトAB血清を含むRPMI培地中で、96ウェルプレート中で1×10⁵細胞/ウェルで播種した。

培養条件は下記のとおりであった：それぞれ6種の異なる濃度での被験物質の存在下又は非存在下の、細胞集団A及びBのみ並びに細胞A及びBの混合集団。化合物を、1-logの増加分で10 μM~0.0001 μMの範囲の投与量で試験した。対照ウェルは、被験化合物ウェルに存在するものに相当する濃度のビヒクリ(0.5% DMSO)を含んでいた。培養物を三連で96ウェルプレートに確立し、加湿雰囲気中で5% CO₂中37℃でインキュベートした。3H-チミジンをアッセイセットアップの6日後に加え、24時間後に採取した。次いで、異なる培養条

件の間の増殖のレベルを比較した。

被験化合物の各希釈物がMLR中の増殖を阻害する能力を、阻害パーセンテージとして計算した。これにより、IC₅₀(1分あたりのカウントの50%低減をもたらした被験化合物の濃度)の評価ができた。IC₅₀を計算するために、X軸を対数スケールに変換した。非線形回帰を利用して、平均のデータポイントに適合させた。S状の可変の傾きを選択した。

【0195】

(Cyp-NS5A相互作用のELISA分析)

このアッセイを利用してCyp-NS5A複合体の分裂を測定したが、これはシクロフィリンDとの相互作用の効力を示すのに使用できる。簡単に述べると、リコンビナントGST、GST-CypD、及びCon1 NS5A-Hisタンパク質の産生及び精製を既報のとおり実施した(Chatterjiら、2010)。Nunc MaxiSorb 8-ウェルストリッププレートをGST又はGST-CypDにより4で16時間コーティングし、ロックした。リコンビナントNS5A-His(1 ng/mL)を、50 μLの結合緩衝液(20 mM Tris pH 7.9、0.5 M NaCl、10% グリセロール、10 mM DTT、及び1% NP-40)中4で16時間ウェルに加えた。次いで、捕捉されたNS5A-Hisを、マウス抗His抗体(1 μg/mL)(抗-6xHis、Clontech社製)及びウサギ抗マウスホースラディッシュペルオキシダーゼホスファターゼ(HRP)抗体(1:1000希釈)を使用して検出した。実験は全て、2つの異なるバッチのリコンビナントCypD及びNS5Aタンパク質を使用して2回行った。

【0196】

(シクロフィリン阻害の抗PPIアーゼ分析)

シクロフィリンとの相互作用を分析するための別な方法論が下記のとおり記載される: GST-CypA又はDのトロンビン開裂により生じるリコンビナントCypA又はDのPPIアーゼ活性を、キモトリプシンによるN-スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-p-ニトロアニリドの加水分解速度を追跡することにより決定した。キモトリプシンはトランス型のペプチドのみを加水分解し、シス型は、その濃度が470 mM LiClを含むトリフルオロエタノールに溶解しているストックを用いることにより最大になるが、その加水分解はシストラנס異性化の速度により限定されている。CypA又はDを、0.1~20 nMの薬物濃度範囲を利用して5で1時間選択された被験物質と平衡化させた。ペプチドの添加により反応を開始させ、吸光度の変化を1秒あたり10データポイントで分光測定によりモニターした。加水分解のブランク速度(CypA又はDの非存在下)を、CypA又はDの存在下での速度から引いた。酵素反応の初期速度を、吸光度変化の経時変化の一次回帰分析により分析した。

【実施例】

【0197】

(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、エビ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。

【0198】

【化27】

(配列番号1) SfaA17161f 5'-

CGCTCTGTGGCGCCTGGTTCCAAGCGGCTCGCGGACCGGCACCGGCACATGCATAATT
ACCCTCACTAAAGGGCG-3'

(配列番号2) SfaA17825r 5'-

TGGATGTATCGTCGCAGGACGCCAGAACCTCACCGTGCACGTCCAGATGCATTAATAC
GAECTCACTATAGGGCTC-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ーを増幅した。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レジンにより該ゲルから精製した。 10

【0199】

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、アプラマイシン(50 μg/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、基本的に前記Gene Bridges社のキットのプロトコルに従って行った。單一コロニーを2TYアプラマイシン(50 μg/ml)中で一晩増殖させ、pRedET(tet)プラスミドで形質転換し、30℃でアプラマイシン(50 μg/ml)及びテトラサイクリン(3 μg/ml)で選別した。單一コロニーを使用して、この株の一晩培養物を、3mlの2TYアプラマイシン(50 μg/ml)及びテトラサイクリン(3 μg/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アプラマイシン(50 μg/ml)及びテトラサイクリン(3 μg/ml)に30℃で接種し、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 μL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回洗浄したが、毎回、再懸濁し、遠心分離して細胞をペレット化した。得られたペレットを約30~40 μl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、得られた時定数~4ms)、2TY 1ml(抗生素質不含)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、アプラマイシン(50 μg/ml)及びカナマイシン(25 μg/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 μg/mlのカナマイシンを含む2TYプレート上に画線培養して精製し、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ー・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。 30

【0200】

(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) 40

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、アプラマイシン(50 μg/ml)、カナマイシン(25 μg/ml)及びクロロアムフェニコール(chloroamphenicol)(10 μg/ml)を含む2TYプレート上で選別した。得られた株を、アプラマイシン(50 μg/ml)、カナマイシン(25 μg/ml)及びクロロアムフェニコール(10 μg/ml)を含む3mlの液体2TYに接種し、37℃、250rpmで、一晩インキュベートした。この培養液0.8mlを使用して、アプラマイシン(50 μg/ml)、カナマイシン(25 μg/ml)及びクロロアムフェニコール(10 μg/ml)を含む、50mlのファルコンチューブ中の液体2TY 10mlに接種し、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 50

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、使用に先立つて氷上に保持した。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胞子の調製の完了に合わせた。

【0201】

ストレプトマイセス属sp.A92-308110(DSM9954)(Biot-4370)の胞子は、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。胞子を遠心分離し(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。

10

【0202】

調製した大腸菌ET12567 pUZ8002 pSGK271及びBiot-4370を、1:1(各株250μL)及び1:3(大腸菌100μL)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25μg/Lとした。プレートを37℃のインキュベーターに一晩戻し、その後、ア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20~25μg/Lとした。~4~7日後に現れる接合完了体コロニーを、アラマイシン(25μg/L)及びナリジクス酸(25μg/L)を含むISP4培地にパッチし、37℃でインキュベートした。十分な菌糸成長が観察されたら、菌株を、アラマイシン(25μg/L)を含むISP4培地に37℃で再パッチし、胞子形成させた。次いで、ISP4(抗生素質不含)にパッチして、37℃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℃でインキュベートして十分に胞子形成させた(5~7日)。胞子を回収し、28℃のISP4プレート上に連続希釈して、單一コロニーの選別を可能にした。胞子形成した單一コロニーを、アラマイシン(25μg/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。

20

【0203】

(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)

よく胞子形成した菌株の、單一の~7mmの寒天プラグを使用して、滅菌SM25-3培地7mlに接種し、2インチ行程振盪機において、27℃、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樹脂と共に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℃、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、等分の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しながら、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15μL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170μLをHPLCバイアルに移して、HPLCにより分析した。

30

【0204】

(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を产生する菌株は、野生型に復帰しているので、それ以上分析しなかった。サングリフェリンA及びB产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。

40

【0205】

サングリフェリン(sanglifeherin)产生の欠如を示す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产生培地に移した。さらに24時間増殖させた後、供給無しの株を対照として

50

使用しながら、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。

【0206】

(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。10

【0207】

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28】

15209F 5'-CAGAGAATT CGCGGTACGGGGCGGACGACAAGGTGTC-3' (配列番号4) 及び

17219R 5'-GCGCATGCAT GTGCCGGTGCCGGTCCGCGAGCCGCTTGG-3' (配列番号5)

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、エビ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。20

第2の系列のオリゴヌクレオチド:

【化29】

17766F 5'-CCTCATGCATCTGGAGGACGTCGCAGGTGAATTCTGGCG-3' (配列番号
6) 30

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、エビ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。40

【0208】

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。この購入したコンストラクトを、BamHI及びXbaIを使用して消化し、対象とする配列を切り取り、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p50

KC1139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共にライゲートして、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1.2に記載の方法を使用して、接合及び二次交差(secondary cross)の選択によりストレプトマイセス属sp.A92-308110(DSM 9954)に導入する。このように構築した菌株の増殖及び分析も、実施例1.2に記載の方法に従う。

【 0 2 0 9 】

(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)の胞子ストックを、MAM、ISP4、ISP 10 3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、胞子ストック(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に接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の產生培地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產生のために、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、各チューブに接種後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。

【 0 2 1 0 】

全プロスの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、試料を抽出した。アセトニトリル0.8mLを、ギ酸0.015mLと共に加えた。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 2 1 1 】

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、及び保持時間と共に示す。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。全ての場合において、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)。

【 0 2 1 2 】

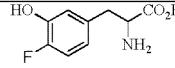
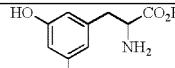
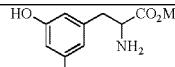
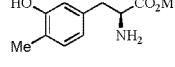
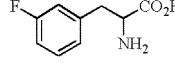
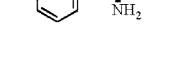
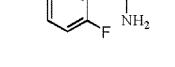
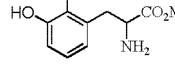
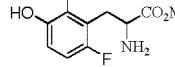
10

20

30

【表4】

表1

供給された変異 シントン	変異シントン名称	[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)プロピオン酸	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)プロピオン酸	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)プロピオナート	1106.4	1130.4	1107.4	5.7
	メチル(S)-2-アミノ-3-(3-ヒドロキシ-4-メチルフェニル)プロピオナート	1102.5	1126.7	1103.5	6.0
	2-アミノ-3-(3-フルオロフェニル)プロピオン酸	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))プロピオナート	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)プロピオナート	1106.5	1130.6	1107.5	5.5
	メチル2-アミノ-3-(2-フルオロ-3-ヒドロキシフェニル)プロピオナート	1106.5	1130.6	1107.5	5.1
	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)プロピオナート	1124.4	1148.5	1125.5	5.1

【0213】

(実施例4: 63-フルオロサングリフェリンA、中間体化合物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、どちらも26時間で加え、全般的方法に記載のとおり実施した。

【0214】

回収後、該培養プロスをプールし、ギ酸でおよそpH3に調整し、25分間遠心分離(3300g)

10

20

30

40

50

して、清澄化したプロスから細胞及び樹脂を分離した。該清澄化プロスを、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、減圧下で残留水性体積(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ると、最終粗製物(1.3g)を与えた。

【0215】

該粗抽出物(1.3g)を酢酸エチル(2ml)に溶解させ、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(10×2cm)上に置いた。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%など)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)に溶解させ、分取HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm×250mm)を、21mL/分でポンプで送られる溶媒と共に使用した。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、注入後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ると、対象化合物を灰白色の非晶質固体として得た(20mg)。

【0216】

(実施例5：-62,63-フルオロサングリフェリンA、中間体化合物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使用し、どちらも26時間で加え、全般的方法に記載のとおり実施した。

【0217】

回収後、培養プロスをプールし、ギ酸によりおよそpH 3に調整し、25分間遠心分離して(3300g)、清澄化されたプロスから細胞及び樹脂を分離した。アッセイにより目的化合物の存在が5%未満であると確認された後で、清澄化されたプロスを廃棄した。細胞及び樹脂を2体積のアセトニトリルと共に、マグネチックスターラーを使用して1時間攪拌した。アセトニトリル抽出物を、遠心分離又は重力下で沈降させることにより回収した。次いで、細胞及び樹脂の第2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、減圧下で残存水性体積に濃縮し、次いでpH 6に調整した。これを酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機物を減圧下で乾燥させると、最終粗製物(1.6g)を与えた。

【0218】

粗製抽出物(1.6g)を2mlの酢酸エチルに溶解させ、500mlの酢酸エチルでコンディショニングしたシリカゲルカラム(10×2cm)上に置いた。カラムを、酢酸エチルで、次いで段階的なアセトンの増加(酢酸エチル中10%、20%、30%など)により溶出させた。およそ250mLのフラクションを回収し、目的化合物を分析LCにより同定し、合わせて乾燥させた。この物質(188mg)を1.8mlのメタノールに溶解させ、分取HPLCにより精製した。Waters Xterra MS C18カラム(10ミクロン、19cm×250mm)を、21mL/分でポンプで送られる溶媒と共に使用した。溶媒Aは水であり、溶媒Bはアセトニトリルであった。カラムを、注入後6分間均一濃度50%Bで流し、それに続いて30分で100%Bへの勾配で流した。これらのフラクションを減圧下で乾燥させると、目的化合物を灰白色の非晶質固体(15mg)として与えた。

【0219】

(実施例6：62-フルオロサングリフェリンA、中間体化合物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時間で加えた点以外、全般的方法に従って実施した。

回収後、培養プロスをプールし、ギ酸によりおよそpH 3に調整し、25分間遠心分離して(3300g)、清澄化されたプロスから細胞及び樹脂を分離した。アッセイにより目的化合物

10

20

30

40

50

の存在が5%未満であると確認された後で、清澄化されたプロスを廃棄した。細胞及び樹脂を2体積のアセトニトリルと共に、マグネチックスターラーを使用して1時間攪拌した。アセトニトリル抽出物を、遠心分離又は重力下で沈降させることにより回収した。次いで、細胞及び樹脂の第2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、減圧下で残存水性体積に濃縮し、次いでpH 6に調整した。これを酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機物を減圧下で乾燥させると、最終的な油状の粗製物(4.2g)を与えた。

【0220】

粗製抽出物(4.2g)を4mlの酢酸エチルに溶解させ、500mlの酢酸エチルでコンディショニングしたシリカゲルカラム($15 \times 2\text{cm}$)上に置いた。カラムを、酢酸エチルで、次いで段階的なアセトンの増加(酢酸エチル中10%、20%、30%など)により溶出させた。およそ250mLのフラクションを回収し、目的化合物を分析LCにより同定し、合わせて乾燥させた。この物質(390mg)を2.4mlのメタノールに溶解させ、分取HPLCにより精製した。Waters Xterra MS C18カラム(10ミクリン、 $19\text{cm} \times 250\text{mm}$)を、21mL/分でポンプで送られる溶媒と共に使用した。溶媒Aは水であり、溶媒Bはアセトニトリルであった。カラムを、注入後6分間均一濃度50%Bで流し、それに続いて30分で100%Bへの勾配で流した。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ると、目的化合物を灰白色の非晶質固体(38mg)として与えた。

【0221】

(実施例7：62-メチルサングリフェリンA、中間体化合物17の単離)

低温保存されたBIOT-4585の胞子ストックを室温で解凍した。増殖性培養(種培養)は、胞子ストック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中のSM25培地400mLに移すことによって調製した。培養は、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中の400mLの產生培地SGP2+5%HP20に移した。24℃、250rpm(2.5cm行程)での24時間の培養の後、各產生フラスコに、1Mの塩酸中の200mMメチル(S)-2-アミノ-3-(3-ヒドロキシ-4-メチルフェニル)プロパノアート溶液2mL及び400mM DL-ピペラジン酸メタノール溶液2mLを加えて、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。

【0222】

培養プロスをプールし、ギ酸によりおよそpH 3に調整し、25分間遠心分離して(3300g)、清澄化されたプロスから細胞及び樹脂を分離した。アッセイにより目的化合物の存在が5%未満であると確認された後で、清澄化されたプロスを廃棄した。オーバーヘッドパドル攪拌器を使用して、細胞及び樹脂を2体積のアセトニトリルと1時間攪拌した。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、細胞及び樹脂の第2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、減圧下で残存水性体積に濃縮し、次いでpH 6に調整した。これを酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機物を減圧下で乾燥させると、最終的な粗製物(7.6g)を与えた。

【0223】

粗製抽出物(7.6g)を5mlの酢酸エチルに溶解させ、500mlの酢酸エチルでコンディショニングしたシリカゲルカラム($15 \times 2\text{cm}$)上に置いた。カラムを、酢酸エチルで、次いで段階的なアセトンの増加(酢酸エチル中10%、20%、30%など)により溶出させた。およそ250mLのフラクションを回収し、目的化合物を分析LCにより同定し、合わせて乾燥させた。この物質(319mg)を2.4mlのメタノールに溶解させ、分取HPLCにより精製した。Waters Xterra MS C18カラム(10ミクリン、 $19\text{cm} \times 250\text{mm}$)を、21mL/分でポンプで送られる溶媒と共に使用した。溶媒Aは水であり、溶媒Bはアセトニトリルであった。カラムを、注入後6分間均一濃度50%Bで流し、それに続いて30分で100%Bへの勾配で流した。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ると、目的化合物を灰白色の非晶質固体(14.9mg)として与えた。

【0224】

10

20

30

40

50

(実施例8：61-デスヒドロキサンクリフェリンA、中間体化合物18の単離)

低温保存されたBIOT-4585の胞子ストックを室温で解凍した。増殖性培養(種培養)は、胞子ストック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中のSM25培地400mLに移すことによって調製した。培養は、27℃、250rpm(2.5cm行程)で48時間行った。該種培養から、500mLを、7L Applikon発酵器中の4.5Lの產生培地SGP2+5%HP20に移し、24℃、400rpm(カスケードDOT制御)、2.5L/分の空気流、及び30%DOT(カスケード搅拌制御)で培養した。24時間の培養後、発酵器に1M塩酸中の667mMの(S)-2-アミノ-3-フェニルプロパン酸溶液7.5mLを加えると、前駆体の最終濃度を1mMとした。24℃、400rpm(カスケードDOT制御)、2.5L/分の空気流、及び30%DOT(カスケード搅拌制御)で、培養をさらに4日間続けた。

10

【0225】

培養プロスをプールし、ギ酸によりおよそpH 3に調整し、25分間遠心分離して(3300g)、清澄化されたプロスから細胞及び樹脂を分離した。アッセイにより目的化合物の存在が5%未満であると確認された後で、清澄化されたプロスを廃棄した。オーバーヘッドパドル搅拌器を使用して、細胞及び樹脂を2体積のアセトニトリルと1時間搅拌した。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、細胞及び樹脂の第2のアセトニトリル抽出を同じ条件下で実施したが、第2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、減圧下で残存水性体積に濃縮し、次いでpH 6に調整した。これを酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機物を減圧下で乾燥させると、最終的な粗製物(55g)を与えた。

20

【0226】

粗製抽出物(55g)を水中80%メタノールに懸濁させ、300mLのヘキサンで2回抽出した。目的化合物はメタノール/水部に存在し、それを乾燥させた。この乾燥抽出物(48g)を30mLの酢酸エチルに溶解させ、1Lの酢酸エチルでコンディショニングしたシリカゲルカラム(20×5cm)上に置いた。カラムを、酢酸エチルで、次いで段階的なアセトンの増加(酢酸エチル中10%、20%、30%など)により溶出させた。およそ250mLのフラクションを回収し、目的化合物を分析LCにより同定し、合わせて乾燥させた。この物質(813mg)をメタノールに溶解させ、分取HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm×250mm)を、21mL/分でポンプで送られる溶媒と共に使用した。溶媒Aは水であり、溶媒Bはアセトニトリルであった。カラムを、注入後6分間均一濃度50%Bで流し、それに続いて30分で100%Bへの勾配で流した。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ると、目的化合物を灰白色の非晶質固体(34mg)として与えた。

30

【0227】

(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))-サンクリフェリンA、中間体化合物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)培養の間のインキュベーターの行程が2.5cmであったこと以外、全般的方法に従って実施した。

培養プロスをプールし、ギ酸によりおよそpH 3に調整し、25分間遠心分離して(3300g)、清澄化されたプロスから細胞及び樹脂を分離した。アッセイにより目的化合物の存在が5%未満であると確認された後で、清澄化されたプロスを廃棄した。オーバーヘッドパドル搅拌器を使用して、細胞及び樹脂を2体積のアセトニトリルと1時間搅拌した。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、細胞及び樹脂の第2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、減圧下で残存水性体積に濃縮し、次いでpH 6に調整した。これを酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機物を減圧下で乾燥させると、最終的な粗製物(7g)を与えた。

40

【0228】

粗製抽出物(7g)を4mLの酢酸エチルに溶解させ、500mLの酢酸エチルによりコンディショニングしたシリカゲルカラム(15×2cm)上に置いた。カラムを、酢酸エチルで、次いで段

50

階的なアセトンの増加(酢酸エチル中10%、20%、30%などから100%アセトンへ、次いで1%メタノールから段階的なアセトン中5%メタノールへ)により溶出させた。およそ250mLのフラクションを回収し、目的化合物を分析LCにより同定し、合わせて乾燥させた。この物質(204mg)をメタノールに溶解させ、分取HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm × 250mm)を、21mL/分でポンプで送られる溶媒と共に使用した。溶媒Aは水であり、溶媒Bはアセトニトリルであった。カラムを、注入後6分間均一濃度50%Bで流し、それに続いて30分で100%Bへの勾配で流した。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ると、目的化合物を灰白色の非晶質固体(4mg)として与えた。

【0229】

10

(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、中間体化合物20の単離)

低温保存されたBIOT-4585の胞子ストックを室温で解凍した。増殖性培養(種培養)は、胞子ストック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中のSM25培地400mLに移すことによって調製した。培養は、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中の400mLの產生培地SGP2+5%HP20に移した。24℃、250rpm(2.5cm行程)での24時間の培養の後、各產生フラスコに、1Mの塩酸中の400mMの2-アミノ-3-(3-フルオロフェニル)プロパン酸溶液2mL及び400mMのDL-ピペラジン酸メタノール溶液2mLを加えて、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

【0230】

培養プロスをプールし、ギ酸によりおよそpH 3に調整し、25分間遠心分離して(3300g)、清澄化されたプロスから細胞及び樹脂を分離した。アッセイにより目的化合物の存在が5%未満であると確認された後で、清澄化されたプロスを廃棄した。オーバーヘッドパドル搅拌器を使用して、細胞及び樹脂を2体積のアセトニトリルと1時間搅拌した。アセトニトリル抽出物を、重力下で沈降することにより回収した。次いで、細胞及び樹脂の第2のアセトニトリル抽出を同じ条件下で実施した。第3の抽出物は、残った細胞と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、減圧下で残存水性体積に濃縮し、次いでpH 6に調整した。これを酢酸エチルで2回抽出し、合わせた有機物を減圧下で乾燥させると、最終的な粗製物(10.5g)を与えた。

30

【0231】

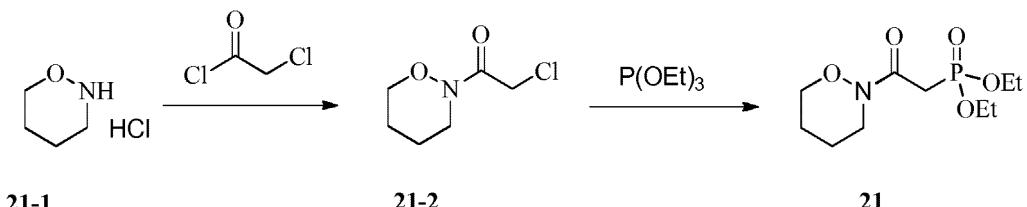
粗製抽出物(10.5g)を7mlの酢酸エチルに溶解させ、500mlの酢酸エチルによりコンディショニングしたシリカゲルカラム(15 × 2cm)上に置いた。カラムを、酢酸エチルで、次いで段階的なアセトンの増加(酢酸エチル中10%、20%、30%など)により溶出させた。およそ250mLのフラクションを回収し、目的化合物を分析LCにより同定し、合わせて乾燥させた。この物質(342mg)をメタノールに溶解させ、分取HPLCにより精製した。Waters Xterra MSC18カラム(10ミクロン、19cm × 250mm)を、21mL/分でポンプで送られる溶媒と共に使用した。溶媒Aは水であり、溶媒Bはアセトニトリルであった。カラムを、注入後30分間均一濃度53%B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ると、目的化合物を灰白色の非晶質固体(6mg)として与えた。

40

【0232】

(実施例11：ジエチル(2-(1,2-オキサジナン-2-イル)-2-オキソエチル)ホスホナートの合成)

【化 3 0】



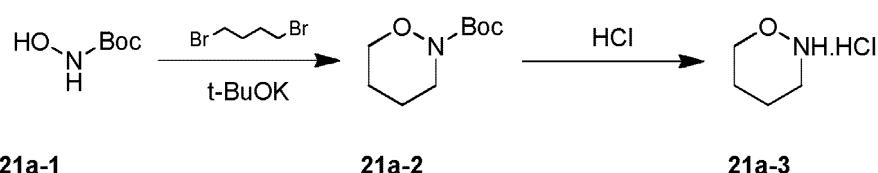
21-1(ChemCollect社、ドイツ)(100mg、0.81mmol)、Et₃N(246mg、2.43mmol)の乾燥DCM(5mL)溶液に、クロロアセチルクロリド(138mg、1.22mmol)を滴加した。該反応混合物を室温で3時間攪拌し、氷水に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。残渣(21-2)を、さらに精製せずに次の工程に使用した(123mg、収率90%)。

21-2(123mg、0.75mmol)と亜リン酸トリエチル(250mg、1.50mmol)の混合物を140℃で6時間攪拌した。該反応混合物を室温に冷却し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製すると21を与えた。

[0 2 3 3]

(ジエチル(2-(1,2-オキサジナン-2-イル)-2-オキソエチル)ホスホナート、21の合成の代替合成)

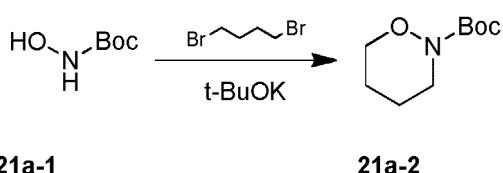
【化 3 1】



[0 2 3 4]

(21a-2の製造の全般的手順)

【化 3 2】

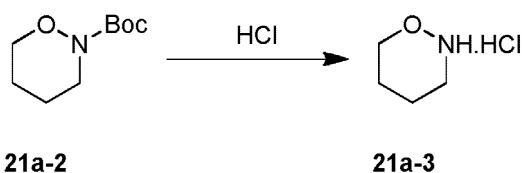


t-BuOK(84.0g、0.75mol)のテトラヒドロフラン(2.0L)溶液に、21a-1(50.0g、0.38mol)を室温で少量ずつ加え、該混合物を室温で1時間攪拌した。1,4-ジブロモブタン(81.2g、0.38mol)を室温で滴加した。次いで、該混合物を80℃で16時間攪拌した。冷却後、水(2000mL)を加え、該混合物を酢酸エチルで抽出した(2×1000mL)。合わせた有機レイター(later)を無水Na₂SO₄で16時間乾燥させ、濾過及び濃縮後、残渣を、シリカ-ゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:石油エーテル:酢酸エチル=100:1から10:1)により精製すると、21a-2(57g)を無色の油として与えた。

【 0 2 3 5 】

(21a-3 製造の全般的手順)

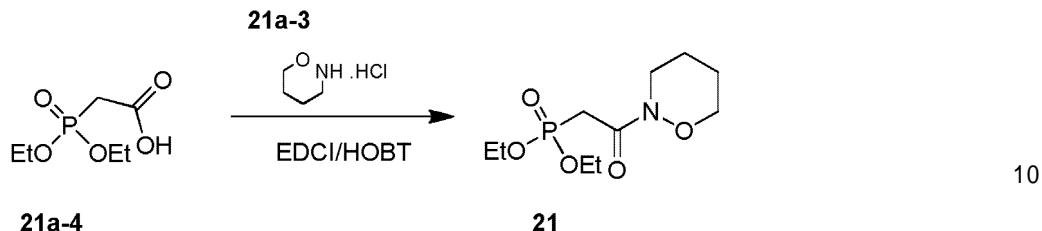
【化 3 3】



21a-2(55g、0.29mol)のtert-ブチルメチルエーテル、TBME(80mL)溶液に、4N HCl(600mL、TBME中)を室温で加え、該混合物を室温で3時間攪拌した。沈殿した固体を濾過し、TBME(50mL)で洗浄すると、21a-3(30g)を白色固体として与えた。

(21 の 製 造 の 全 般 的 手 順)

【化 3 4】

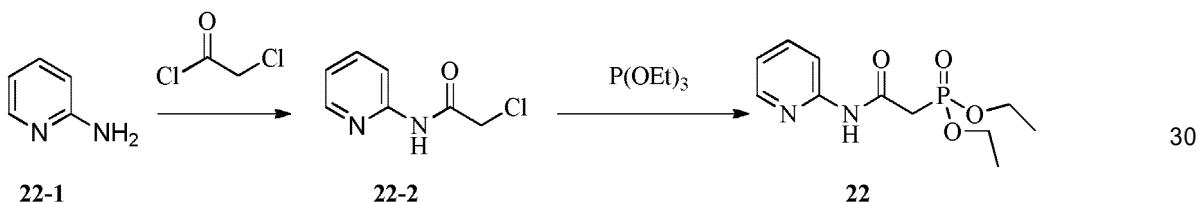


21a-4(35g、0.18mol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)(29g、0.21mol)、及びEt₃N(71mL、0.51mol)の無水ジクロロメタン(550mL)中の攪拌溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCI)(41g、0.21mol)を0℃で少しづつ加えた。該反応混合物を0℃で0.5時間攪拌し、次いで21a-3(24g、0.20mol)を0℃で加え、16時間攪拌した。そうすると、TLC(石油エーテル/酢酸エチル:3/1)は、反応が完了したことを示した。この時間に、該反応混合物を激しく攪拌しながらゆっくりと水(500mL)に注いだ。該混合物をジクロロメタン(2×200mL)で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し(2×100mL)、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過及び濃縮すると、粗生成物を与えた。クロマトグラフィー(石油エーテル/酢酸エチル、100:1から10:1)により、21(38g)を黄色の油として与えた。

〔 0 2 3 6 〕

(実施例12：ジエチル(2-オキソ-2-(ピリジン-2-イルアミノ)エチル)ホスホナートの合成)

【化 3 5】



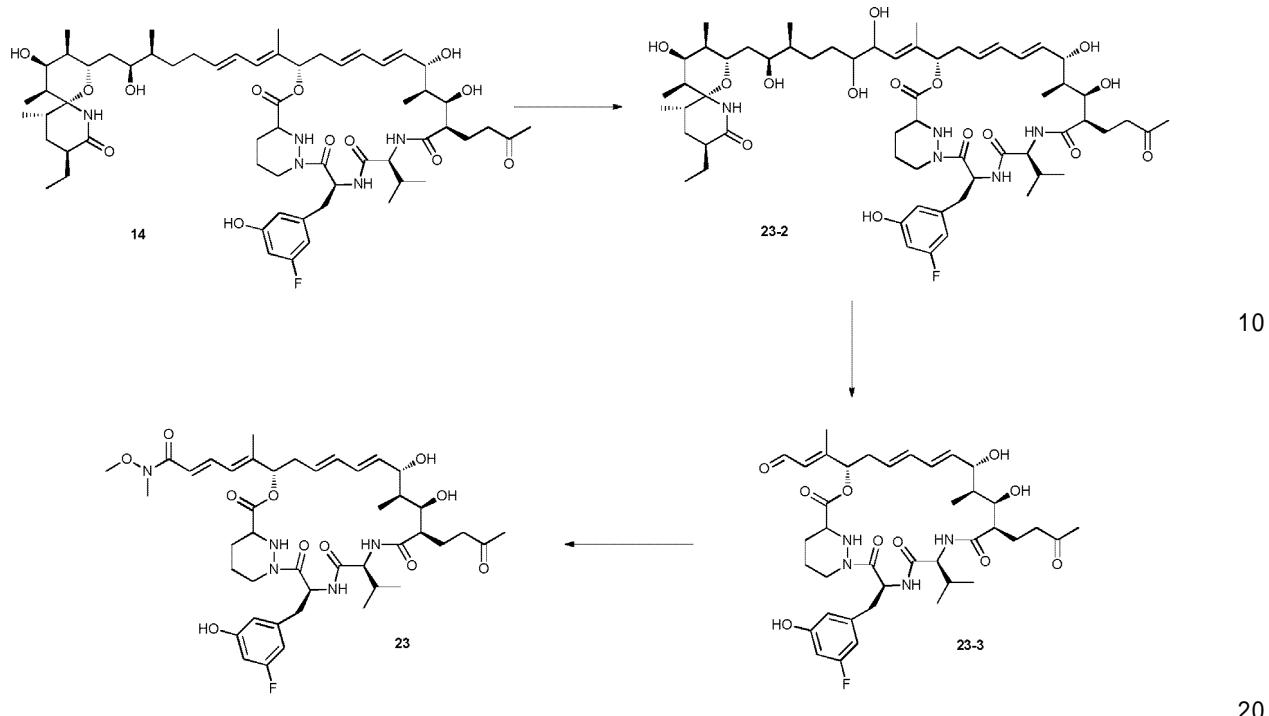
22-1(1g、10.6mmol)、Et₃N(1.075g、10.6mmol)の乾燥塩化メチレン(50mL)溶液に、クロアセチルクロリド(1.2g、10.6mmol)を滴加した。該反応混合物を室温で3時間攪拌し、氷水に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。残渣を逆相コンビフラッシュにより精製すると、22-2を与えた。

22-2(170mg、1.00mmol)及び亜リン酸トリエチル(332mg、2.00mmol)の混合物を140℃で6時間攪拌した。該反応混合物を室温に冷却し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製すると、22を与えた。

[0 2 3 7]

(実施例13 : 化合物23の製造)

【化 3 6】



14(430mg、0.38mmol)、 $(DHQ)_2PHAL$ (18.6mg、0.024mmol)、四酸化オスミウム(0.156mL、0.012mmol)のtert-ブチルアルコール(2.5wt%、0.079mmol/mL)中の搅拌溶液及び20mLのtert-ブチルアルコール中のメタンスルホンアミド(74mg、0.77mmol)に、室温で、フェリシアン化カリウム(382mg、1.16mmol)及び炭酸カリウム(160mg、1.16mmol)の20mLの水中の溶液を加えると、茶色のエマルションが生じた。2時間後、亜硫酸ナトリウムの溶液を加え、搅拌を20分間続けた。生じた混合物を酢酸エチルで抽出した(3×50mL)。合わせた有機層をブラインで洗净し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、逆相フラッシュクロマトグラフィーにより精製すると、23-2を白色固体として与えた。

〔 0 2 3 8 〕

23-2(240mg、0.21mmol)の24mLのTHFと水の2:1混合物中の攪拌溶液に、過ヨウ素酸ナトリウム(91mg、0.42mmol)を加えた。生じた混合物を室温で3時間攪拌し、次いで、飽和重炭酸ナトリウム水溶液を加えた。この混合物を、3回分の酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を、1回分の水及び2回分の飽和ブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣を、逆相フラッシュクロマトグラフィーにより精製すると、23-3を与えた。

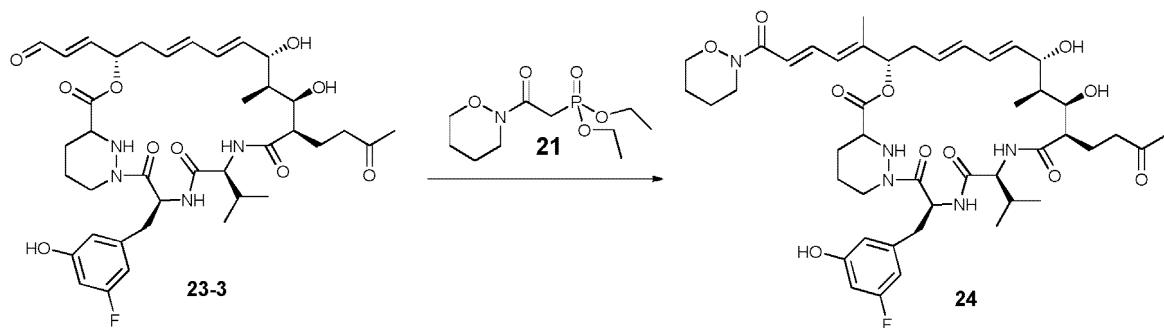
【 0 2 3 9 】

ジエチル(2-(メトキシ(メチル)アミノ)-2-オキソエチル)ホスホナート(91mg、0.368mmol)のTHF(5.0mL)溶液に、0 °C の無水THF(0.2mL)中のNaH(2.8mg、0.1104mmol)を攪拌しながら加えた。次いで、該溶液を、透明になるまで20 °C で攪拌した。次いで、23-3(70mg、0.092mmol)を、該透明溶液に加え、該混合物を20 °C で2時間攪拌した。該混合物を水(10mL)でクエンチし、酢酸エチル(3 × 30mL)で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、真空中で縮小した(reduced)。残渣を分取HPLCにより精製すると、23を白色固体として得た。

【 0 2 4 0 】

(実施例14 : 化合物24の製造)

【化37】

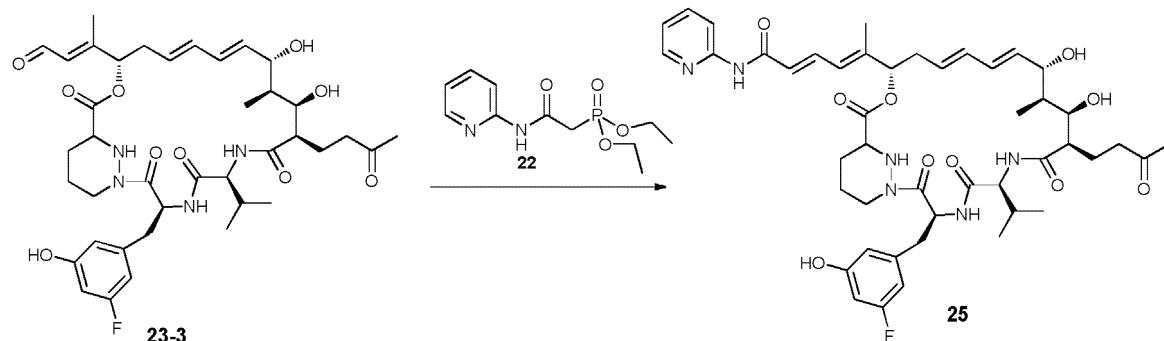


21(42mg、0.168mmol)のTHF(2.0mL)溶液に、0 の無水THF(0.2mL)中のNaH(1.2mg、0.05mmol)を攪拌しながら加えた。次いで、該溶液を、透明になるまで20 で攪拌した。次いで、23-3(30mg、0.042mmol)を、該透明溶液に加え、該混合物を20 で2時間攪拌した。該混合物を水(10mL)でクエンチし、酢酸エチルで抽出した(3×20mL)。有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、真空中で縮小させた。残渣を分取HPLCにより精製すると、24を白色固体として得た。

【0241】

(実施例15：化合物25の製造)

【化38】



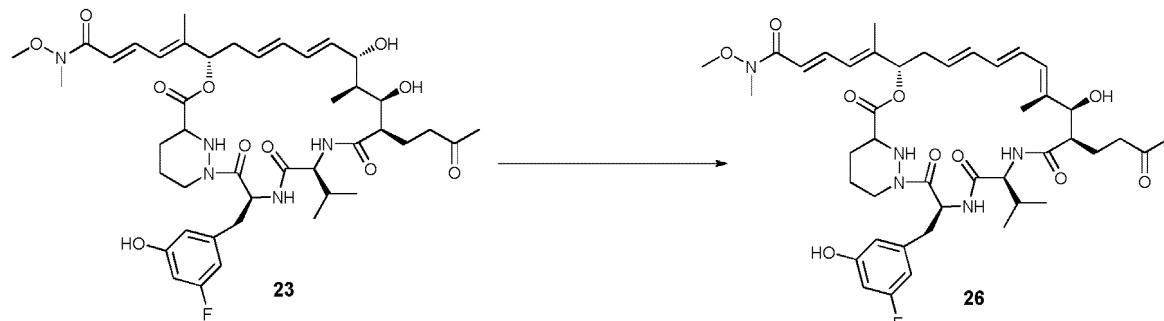
【0242】

22(48mg、0.168mmol)のTHF(2.0mL)溶液に、0 の無水THF(0.2mL)中のNaH(1.2mg、0.05mmol)を攪拌しながら加えた。次いで、該溶液を、透明になるまで20 で攪拌した。次いで、23-3(30mg、0.042mmol)を該透明溶液に加え、該混合物を20 で2時間攪拌した。該混合物を水(10mL)でクエンチし、酢酸エチル(3×20mL)で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、真空中で縮小した。残渣を分取HPLCにより精製すると、25を白色固体として得た。

【0243】

(実施例16：化合物26の製造)

【化39】



【0244】

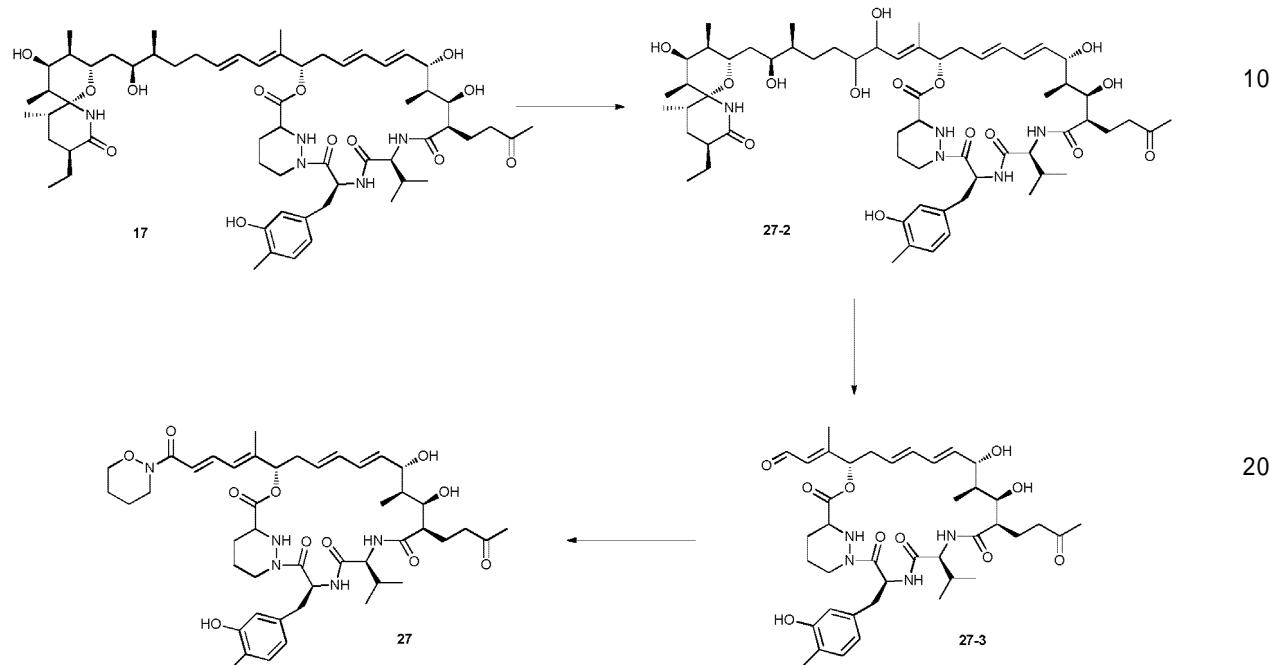
50

ジオキサン(1mL)に溶解させた23(13mg、0.015mmol)の溶液に、HCl水溶液(2M、0.080mL、0.16mmol)を加えた。該反応物を20℃で24時間攪拌し、該反応を水でクエンチし、酢酸エチル(3×10mL)で抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、蒸発させた。残渣を分取HPLCにより精製すると、26を白色固体として与えた。

【0245】

(実施例17：化合物27の製造)

【化40】



【0246】

17(99mg、0.09mmol)、 $(DHQ)_2PHAL$ (4.2mg、0.0054mmol)、四酸化オスミウム(0.034mL、0.0027mmol)のtert-ブチルアルコール(2.5wt%、0.079mmol/mL)中の攪拌溶液及び5mLのtert-ブチルアルコール中のメタンスルホンアミド(18mg、0.18mmol)に、室温で、5mLの水中のフェリシアン化カリウム(90mg、0.27mmol)及び炭酸カリウム(37mg、0.27mmol)の溶液を加えると、茶色のエマルションが生じた。2時間後、亜硫酸ナトリウムの溶液を加え、攪拌を20分間続けた。得られた混合物を酢酸エチル(3×20mL)で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、逆相フラッシュクロマトグラフィーにより精製すると、27-2を白色固体として与えた。

【0247】

THFと水の2:1混合物3mL中の27-2(40mg、0.035mmol)の攪拌溶液に、過ヨウ素酸ナトリウム(15mg、0.07mmol)を加えた。得られた混合物を室温で3時間攪拌し、次いで飽和重炭酸ナトリウム水溶液を加えた。この混合物を3回分の酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を1回分の水及び2回分の飽和ブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣を、逆相フラッシュクロマトグラフィーにより精製すると、27-3を白色固体として与えた。

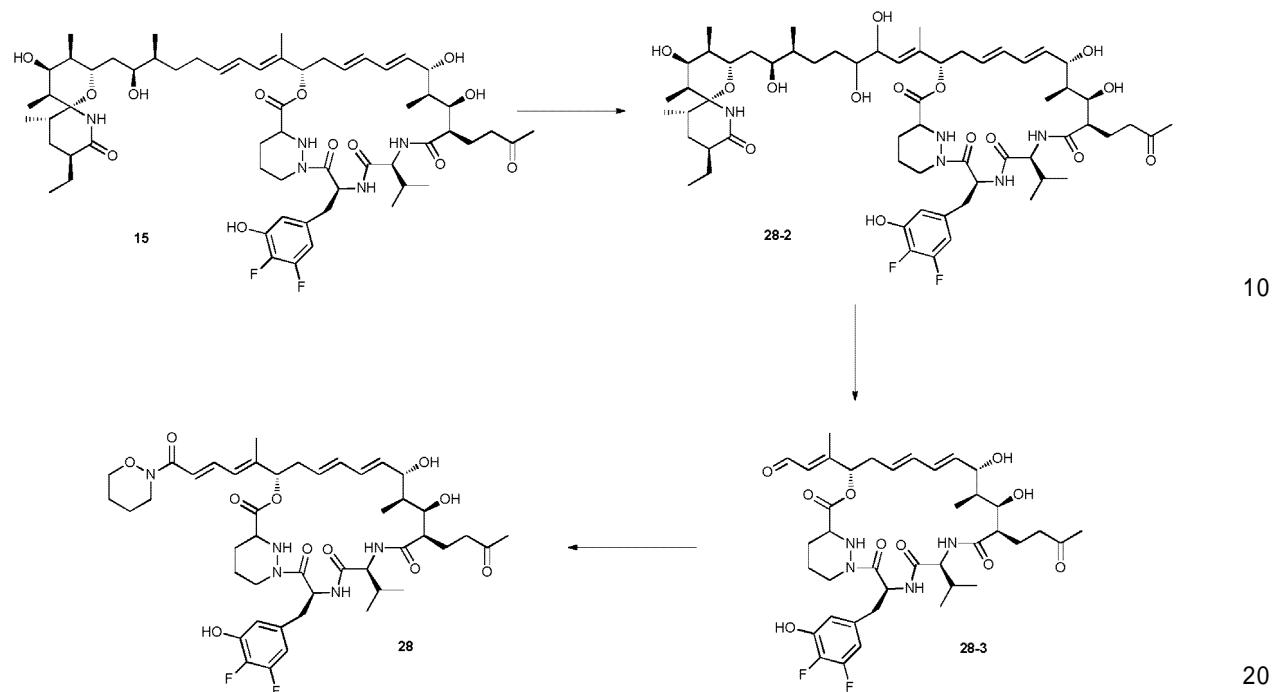
【0248】

21(28mg、0.104mmol)のTHF(2.0mL)溶液に、0.75mgの無水THF(0.2mL)中のNaH(0.75mg、0.03mmol)を攪拌しながら加えた。次いで、該溶液を、透明になるまで20℃で攪拌した。次いで、27-3(19.6mg、0.026mmol)を該透明溶液に加え、該混合物を20℃で2時間攪拌した。該混合物を水(10mL)でクエンチし、酢酸エチル(3×10mL)で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣を分取HPLCにより精製すると、27を白色固体として与えた。

【0249】

(実施例18：化合物28の製造)

【化41】



【0250】

15(349mg、0.31mmol)、 $(DHQ)_2PHAL$ (14mg、0.0186mmol)、四酸化オスミウム(0.117mL、0.0093mmol)のtert-ブチルアルコール(2.5wt%、0.079mmol/ml)中の攪拌溶液及び15mLのtert-ブチルアルコール中のメタンスルホンアミド(59mg、0.62mmol)に、室温で、15mLの水中的フェリシアン化カリウム(128mg、0.93mmol)及び炭酸カリウム(306mg、0.93mmol)の溶液を加えると、茶色のエマルションが生じた。2時間後、亜硫酸ナトリウムの溶液を加え、攪拌を20分間続けた。得られた混合物を酢酸エチル($3 \times 50\text{mL}$)で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、逆相フラッショクロマトグラフィーにより精製すると、28-2を白色固体として与えた。

【0251】

THFと水の2:1混合物15mL中の28-2(170mg、0.1466mmol)の攪拌溶液に、過ヨウ素酸ナトリウム(62mg、0.2931mmol)を加えた。得られた混合物を室温で3時間攪拌し、次いで、飽和重炭酸ナトリウム水溶液を加えた。この混合物を3回分の酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を、1回分の水及び2回分の飽和ブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣を逆相フラッショクロマトグラフィーにより精製すると28-3を白色固体として与えた。

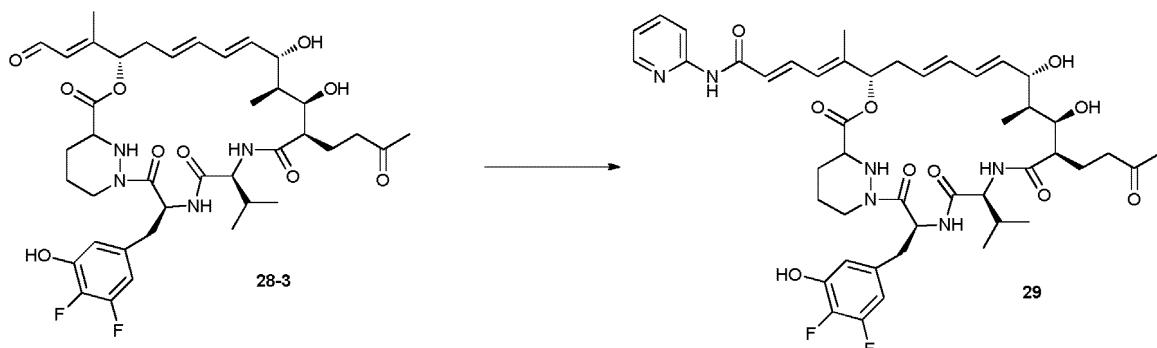
【0252】

21(41mg、0.155mmol)のTHF(1.0mL)溶液に、0 の無水THF(0.2mL)中のNaH(2.3mg、0.057mmol)を攪拌しながら加えた。次いで、該溶液を、透明になるまで20 で攪拌した。次いで、28-3(30mg、0.0387mmol)を該透明溶液に加え、該混合物を20 で2時間攪拌した。該混合物を水(10mL)でクエンチし、酢酸エチル($3 \times 20\text{mL}$)で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。残渣を、分取HPLCにより精製すると、28を白色固体として与えた。

【0253】

(実施例19：化合物29の製造)

【化42】



【0254】

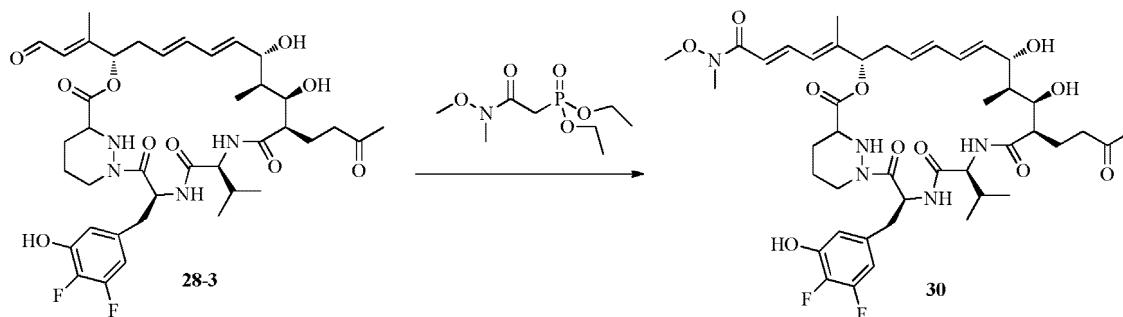
22(42mg、0.155mmol)のTHF(1.0mL)溶液に、0 の無水THF(0.2mL)中のNaH(2.3mg、0.057mmol)を攪拌しながら加えた。次いで、該溶液を、透明になるまで20 で攪拌した。次いで、28-3(30mg、0.0387mmol)を該透明溶液に加え、該混合物を20 で2時間攪拌した。該混合物を水(10mL)でクエンチし、酢酸エチル(3×20mL)で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。残渣を分取HPLCにより精製すると、29を白色固体として与えた。

【0255】

(実施例20：化合物30の製造)

20

【化43】



【0256】

ジエチル(2-(メトキシ(メチル)アミノ)-2-オキソエチル)ホスホナート(37mg、0.155mmol)のTHF(1.0mL)溶液に、0 の無水THF(0.2mL)中のNaH(2.3mg、0.0575mmol)を、攪拌しながら加えた。次いで、該溶液を、透明になるまで20 で攪拌した。次いで、28-3(30mg、0.0387mmol)が該透明溶液に加え、該混合物を20 で2時間攪拌した。該混合物を水(10mL)でクエンチし、酢酸エチル(3×20mL)で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。残渣を分取HPLCにより精製すると、30を白色固体として与えた。

【0257】

(実施例21：生物学的データ-HCVレプリコン及び分析)

40

化合物を、全般的方法に記載のとおり、Huh5.2細胞を用いる遺伝子型1bレプリコンアッセイで分析した。シクロスボリンA、1、DEB10-025、2、サングリフェリンA、5、及びヒドロキシマクロ環、6を比較として含めた。

【0258】

【表5】

化合物	EC50 (μM)	CC50 (μM)	選択指数 (CC50/EC50)	
シクロスボリンA, 1	0.62	28	52	
DEBIO-025, 2	0.096	11.2	111	
サングリフェリンA, 5	0.318	9.1	28.7	10
ヒドロキシマクロ環, 6	8.4	83.6	9.9	
23	0.067	>100	>1493	
24	0.033	>100	>3030	
25	0.066	>100	>1515	
26	0.1	>100	>1000	
27	0.121	>100	>826	20

【0259】

分かるとおり、本発明の化合物、23、24、25、26、及び27は全て、CsA、Debio-025、SfA、及びヒドロキシマクロ環に比べて、該Huh5.2レプリコンアッセイにおいて著しく強力であり(低いEC₅₀によって示される)、該細胞系に対する著しく優れた選択性を有する(高い選択指数によって示される)。

【0260】

(実施例22：生物学的データ-HIVに対する活性)

化合物を、全般的方法に記載されたとおりHeLa細胞を利用してHIV抗ウイルスアッセイにおいて分析した。シクロスボリンA、1、DEBIO-025、2、HIV抗ウイルス剤エムトリシタビン及びテノホビルを比較として含めた。

【表6】

化合物	HeLa細胞 EC ₅₀ (μM)	
シクロスボリンA, 1	5.3	
DEBIO-025, 2	1.5	
エムトリシタビン	0.4	
テノホビル	1.05	
24	0.13	40

【0261】

分かるとおり、本発明の化合物24は、このアッセイにおけるHIV感染の阻害でCsA、DEBIO-025、エムトリシタビン、及びテノホビルよりも著しく強力である。

30

40

50

【0262】

(実施例23：生物学的データ-マウスのインビボ経口及びiv PK)

インビボの状況における化合物の薬物動態を評価するために、化合物を、poで10又は5mg/kgで、ivで1mg/kgでCD1マウスの群に投薬した。薬物動態分析は、全般的方法に記載のとおり実施した。PKパラメーターを以下に示す。

【表7】

化合物	投与量レベル (mg/kg)	クリアランス (L/hr/kg)	po AUC _{last} (ng*hr/mL)
サングリフェリンA, 5	10	0.054	2332
23	5	0.039	2760
24	5	0.017	8223

10

【0263】

分かるとおり、化合物23及び24は、サングリフェリンAに比べて、低下したクリアランス及び増加した経口曝露(高いpo AUC_{last}により示される)を有する。

【0264】

20

(実施例24：生物学的データ-CypA PPIアーゼ活性の阻害)

CypA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)活性の直接阻害を評価するために、全般的方法に記載の方法を利用した。シクロスボリンA、1、DEBIO-025、2、及びサングリフェリンA、5を対照として含めた。

【表8】

化合物	CypA PPIアーゼ IC ₅₀ (nM)
シクロスボリンA, 1	9.7
DEBIO-025, 2	0.8
サングリフェリンA, 5	2.4
23	0.33
24	0.31
25	1.15
27	0.35

30

40

【0265】

分かるとおり、本発明の化合物、23、24、25、及び27は全て、サングリフェリンA、DEBIO-025、及びシクロスボリンAよりも強力にCypA PPIアーゼ活性を阻害した。

【0266】

(実施例25：生物学的データ-ビリルビントランスポーターの阻害)

DEBIO-025に見られる用量制限的高ビリルビン血症の原因と考えられるビリルビントランスポーターのオフターゲット阻害の可能性を評価するために、トランスポーター阻害のインピトロ分析を、全般的方法に記載のとおり実施した。

【表9】

化合物	OATP1B1 IC ₅₀ (μM)	OATP1B3 IC ₅₀ (μM)	MRP2 IC ₅₀ (μM)	MRP3 IC ₅₀ (μM)
シクロスボリンA, 1	0.85	0.13	4.1	3.1
DEBIO-025, 2	0.45	0.19	16.0	>50
24	4.3	1.8	>50	>50

10

【0267】

分かるとおり、本発明の化合物、24は、DEBIO-025及びシクロスボリンAに比べ、抱合及び非抱合ビリルビントransポーターのはるかに低い阻害を示す。

【0268】

(実施例26：生物学的データ-生体異物トランスポーターの阻害)

生体異物トランスポーターの阻害による薬物薬物相互作用(DDI)の可能性を評価するために、P糖タンパク質(Pgp/MDR1)及び胆汁酸塩排出ポンプ(BSEP)阻害のインビトロ分析を、全般的方法に記載のとおり実施した。

【表10】

20

化合物	Pgp IC ₅₀ (μM)	BSEP IC ₅₀ (μM)
シクロスボリンA, 1	0.73	0.46
DEBIO-025, 2	0.72	0.18
24	>50	12.3

【0269】

30

分かるとおり、本発明の化合物、24は、DEBIO-025及びシクロスボリンAに比べて、薬物-薬物相互作用に関与している可能性がある生体異物トランスポーターのはるかに低い阻害を示す。

【0270】

(参考文献)

【化44】

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

Banteli, R., J. Wagner, et al. (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.

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

10

Colgan, J., M. Asmal, et al. (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, et al. (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.

Dolinski, K., S. Muir, et al. (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.

20

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

Egorin, M. J., T. F. Lagattuta, et al. (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.

30

Fehr, T., J. Kallen, et al. (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.

Flisiak, R., A. Horban, et al. (2008). "The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfected 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. et al., (2010). "Multiple cyclophilins involved in different cellular pathways mediate HCV replication" Virology **397**: 43-55

10

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, et al. (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.

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

20

Hanoulle, X., Badillo A, Wieruszkeski 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, et al. (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.

Herrler, M., H. Bang, et al. (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.

30

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, et al. (2011). "The Cyclophilin-Binding Agent Sanglifehrin A Is a Dendritic Cell Chemokine and Migration Inhibitor." PLOS one **6**(3):e18406

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

40

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

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

Ke, J., 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.

10

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

Kallen, J., R. Sedrani, et al. (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, et al. (2007). "Cyclosporine inhibits mouse cytomegalovirus infection via a cyclophilin-dependent pathway specifically in neural stem/progenitor cells." J Virol **81**(17): 9013-23.

20

Konig, J. H., Glaeser, M. Keiser, K. Mandery, U. Klotz and 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.

Martin Cabrejas, L. M., S. Rohrbach, et al. (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.

30

Mathy, J. E., S. Ma, et al. (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.

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

40

Nelson, D. R., Ghalib, R.H., Sulkowski, M., Schiff, E., Rustgi, V., Pockros, P.J., Wang, C., Decosterd Kerhuel, D., and P. Grosgeurin, 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.

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. 10

Paeshuyse, J., A. Kaul, et al. (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, et al. (2007). "Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus." World J Gastroenterol **13**(43): 5673-81.

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. 20

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

Pemberton, T. J. and 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. 30

Ptak, R. G., P. A. Gallay, et al. (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. et al., (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, et al. (2007). "Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro." J Virol **81**(11): 5829-40. 40

Hopkins, S. D. H., E. Gavis, J. Lalezari, E. Glutzer, B. DiMassimo, P. Rusnak, S. Wring, C. Smitley, Y. and 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, et al. (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.

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

10

Sedrani, R., J. Kallen, et al. (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 and 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.

Steinschulte, C., T. Taner, et al. (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.

20

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

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

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

30

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

Yang, F., J. M. Robotham, et al. (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, et al. (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action." J Immunol **166**(12): 7165-71.

40

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

Zhang, L. H. and 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.

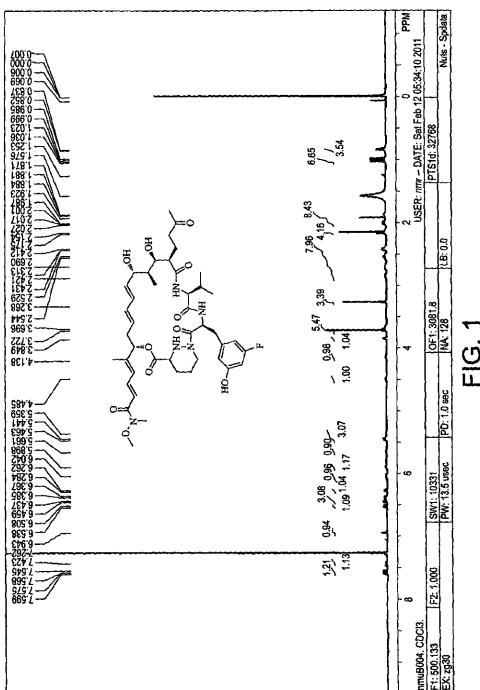
50

【 0 2 7 1 】

本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。

【 図 1 】



1
FIG.

【 図 2 】

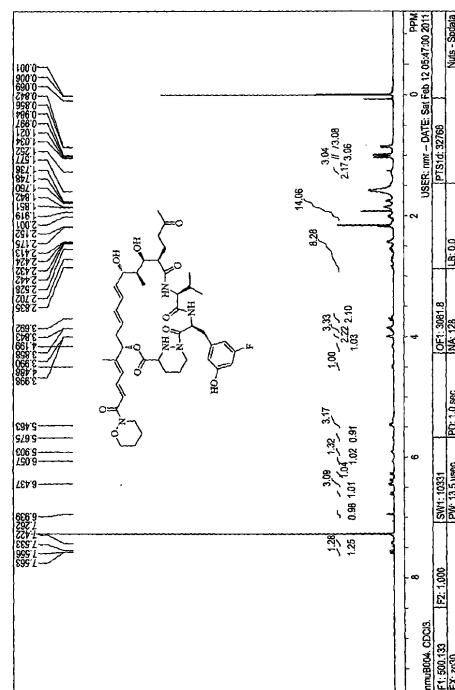


FIG. 2

【図3】

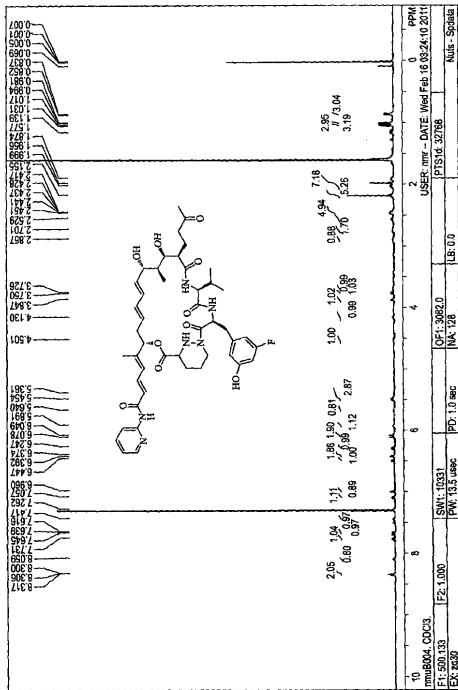


FIG. 3

【図4】

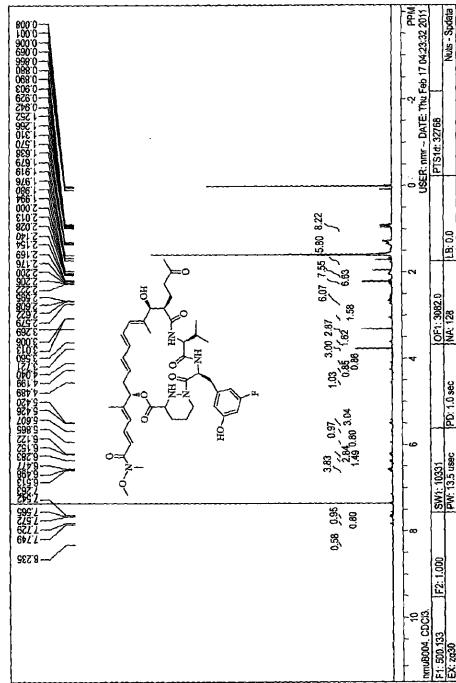


FIG. 4

【図5】

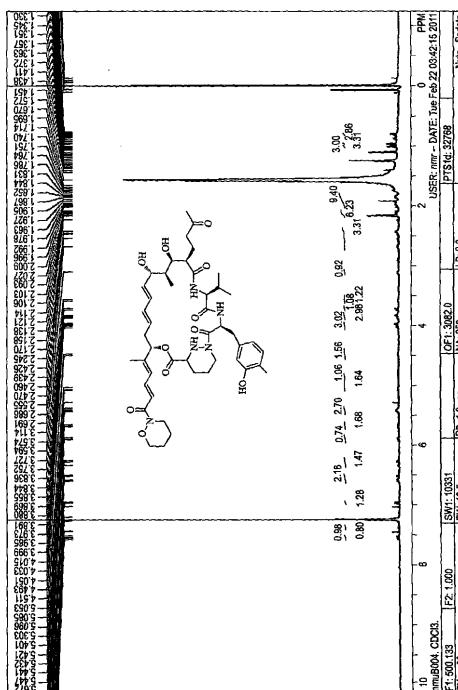


FIG. 5

【図6】

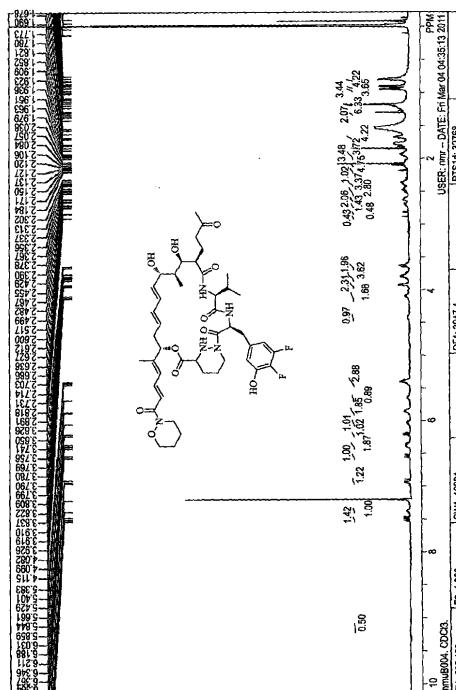


FIG. 6

【図7】

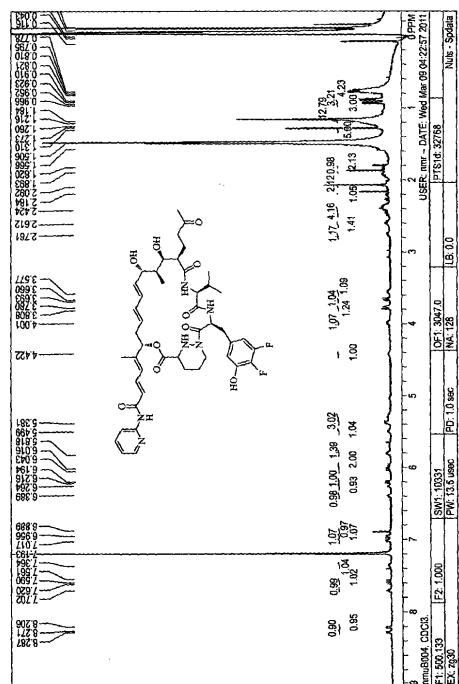
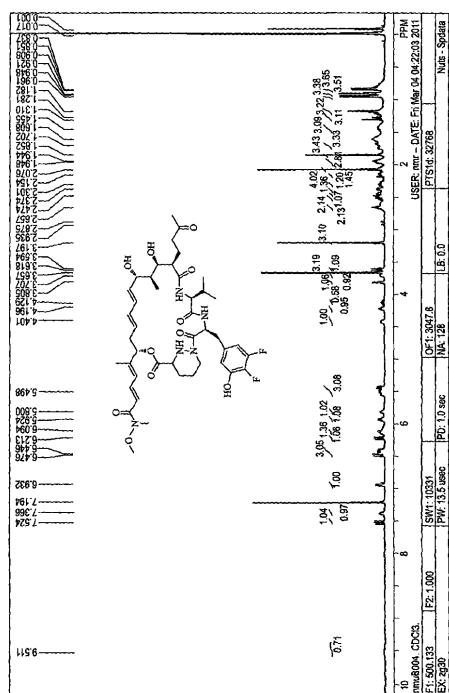


FIG. 7

【図8】



正 8

【配列表】

000611879300001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
A 61 P 29/00 (2006.01) A 61 P 29/00

(31) 優先権主張番号 1202060.8
(32) 優先日 平成24年2月7日(2012.2.7)
(33) 優先権主張国 英国(GB)

(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21 6エーディー ケンブリッジ
ケンブリッジシティー 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21 6エーディー ケンブリッジ
ケンブリッジシティー 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

審査官 星 浩臣

(56) 参考文献 特表2014-510746 (JP, A)
特表2008-546708 (JP, A)
特表2013-518923 (JP, A)
国際公開第2011/098805 (WO, A1)
国際公開第2011/098808 (WO, A1)
RICHARD SEDRANI, SANGLIFEHRIN-CYCLOPHILIN INTERACTION: DEGRADATION WORK, 以下備考, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 米国, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2003年4月 2日, V125, P3849-3859, SYNTHETIC MACROCYCLIC ANALOGUES, X-RAY CRYSTAL STRUCTURE AND BINDING DATA
Chem. Biol., 2015, Vol.22, No.2, pp.285-292

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 07 K 1/00 - 19/00
J ST P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)