

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4060801号  
(P4060801)

(45) 発行日 平成20年3月12日(2008.3.12)

(24) 登録日 平成19年12月28日(2007.12.28)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C07K</b> 5/083 (2006.01)	<b>C07K</b> 5/083
<b>A61K</b> 31/7056 (2006.01)	<b>A61K</b> 31/7056
<b>A61K</b> 38/00 (2006.01)	<b>A61K</b> 37/02 ZNA
<b>A61K</b> 38/21 (2006.01)	<b>A61K</b> 37/66 G
<b>A61K</b> 38/43 (2006.01)	<b>A61K</b> 37/48

請求項の数 18 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-564076 (P2003-564076)  
 (86) (22) 出願日 平成15年1月24日(2003.1.24)  
 (65) 公表番号 特表2005-530688 (P2005-530688A)  
 (43) 公表日 平成17年10月13日(2005.10.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2003/000090  
 (87) 国際公開番号 W02003/064456  
 (87) 国際公開日 平成15年8月7日(2003.8.7)  
 審査請求日 平成16年9月30日(2004.9.30)  
 (31) 優先権主張番号 2,370,396  
 (32) 優先日 平成14年2月1日(2002.2.1)  
 (33) 優先権主張国 カナダ(CA)

(73) 特許権者 503385923  
 ベーリンガー インゲルハイム インター  
 ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ  
 シュレンクテル ハフツング  
 ドイツ連邦共和国 55216 インゲル  
 ハイム ビンガー シュトラーセ 173  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男  
 (74) 代理人 100084009  
 弁理士 小川 信夫  
 (74) 代理人 100084663  
 弁理士 箱田 篤  
 (74) 代理人 100093300  
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

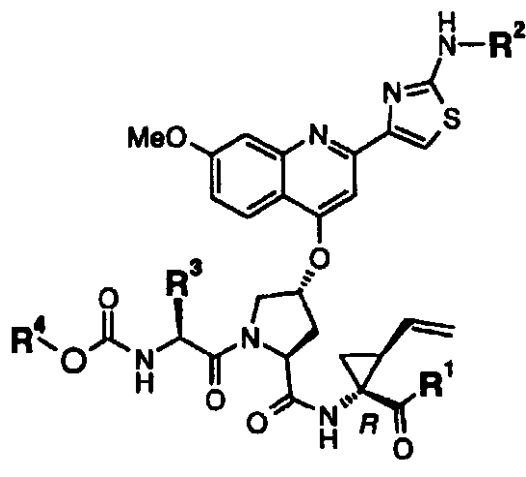
(54) 【発明の名称】 NS3 (C型肝炎) の抑制のための置換キノリンのヒドロキシプロリンエーテルを有するトリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I):

【化1】



(I)

(式中、R<sup>1</sup>はヒドロキシ又はNHSO<sub>2</sub>R<sup>1A</sup>(式中、R<sup>1A</sup>は(C<sub>1-8</sub>)アルキル、(C<sub>3-7</sub>)シクロアルキル又は{(C<sub>1-6</sub>)アルキル-(C<sub>3-7</sub>)シクロアルキル}であり、これらは全て必要により八

口、シアノ、ニトロ、 $O-(C_{1-6})$ アルキル、アミド、アミノもしくはフェニルで1～3回置換されていてもよく、又は $R^{1A}$ は $C_6$ 又は $C_{10}$ アリールであり、これは必要により口、シアノ、ニトロ、 $(C_{1-6})$ アルキル、 $O-(C_{1-6})$ アルキル、アミド、アミノもしくはフェニルで1～3回置換されていてもよい)であり、 $R^2$ は $(C_{4-6})$ シクロアルキルであり、 $R^3$ は $t$ -ブチル又は $(C_{5-6})$ シクロアルキルであり、かつ $R^4$ は $(C_{4-6})$ シクロアルキルである)の化合物、又はその医薬上許される塩。

【請求項2】

$R^1$ がヒドロキシ、 $NHSO_2Me$ 、 $NHSO_2$ シクロプロピル又は $NHSO_2Ph$ である、請求項1記載の式Iの化合物。

【請求項3】

$R^1$ が $NHSO_2$ シクロプロピル又は $NHSO_2Ph$ である、請求項2記載の式Iの化合物。

【請求項4】

$R^1$ がヒドロキシである、請求項2記載の式Iの化合物。

【請求項5】

$R^2$ がシクロペンチル又はシクロヘキシルである、請求項1から4のいずれか1項記載の式Iの化合物。

【請求項6】

$R^2$ がシクロペンチルである、請求項5記載の式Iの化合物。

【請求項7】

$R^3$ が $t$ -ブチル又はシクロヘキシルである、請求項1から6のいずれか1項記載の式Iの化合物。

【請求項8】

$R^3$ が $t$ -ブチルである、請求項7記載の式Iの化合物。

【請求項9】

$R^4$ がシクロブチル又はシクロペンチルである、請求項1から8のいずれか1項記載の式Iの化合物。

【請求項10】

$R^4$ がシクロペンチルである、請求項9記載の式Iの化合物。

【請求項11】

$R^1$ がヒドロキシであり、 $R^2$ 及び $R^4$ が夫々シクロペンチルであり、かつ $R^3$ が $t$ -ブチルである、請求項1記載の式Iの化合物。

【請求項12】

$R^1$ がヒドロキシであり、 $R^2$ がシクロブチルであり、 $R^3$ が $t$ -ブチルであり、かつ $R^4$ がシクロペンチルである、請求項1記載の式Iの化合物。

【請求項13】

$R^1$ がヒドロキシであり、 $R^2$ がシクロヘキシルであり、 $R^3$ が $t$ -ブチルであり、かつ $R^4$ がシクロペンチルである、請求項1記載の式Iの化合物。

【請求項14】

$R^1$ が $NHSO_2Ph$ であり、 $R^2$ 及び $R^4$ が夫々シクロペンチルであり、かつ $R^3$ が $t$ -ブチルである、請求項1記載の式Iの化合物。

【請求項15】

$R^1$ がヒドロキシであり、 $R^2$ がシクロペンチルであり、 $R^3$ が $t$ -ブチルであり、かつ $R^4$ がシクロブチルである、請求項1記載の式Iの化合物。

【請求項16】

$R^1$ がヒドロキシであり、 $R^2$ がシクロペンチルであり、 $R^3$ が $t$ -ブチルであり、かつ $R^4$ がシクロヘキシルである、請求項1記載の式Iの化合物。

【請求項17】

$R^1$ がヒドロキシであり、 $R^2$ 及び $R^4$ が夫々シクロペンチルであり、かつ $R^3$ がシクロヘキシルである、請求項1記載の式Iの化合物。

【請求項18】

10

20

30

40

50

R<sup>1</sup>がヒドロキシであり、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>が夫々シクロペンチルである、請求項1記載の式Iの化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はC型肝炎ウイルス(HCV)感染症の治療のための化合物、それらの合成方法、組成物及び治療方法に関する。特に、本発明は新規ペプチド類似体、このような類似体を含む医薬組成物及びHCV感染症の治療におけるこれらの類似体の使用方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

C型肝炎ウイルス(HCV)は世界中の輸血後及び集団獲得性の非A非B肝炎の主要な病因物質である。世界中の2億人を超える人々がそのウイルスにより冒されていると推定される。高比率のキャリアーが慢性感染されるようになり、多くが慢性肝臓疾患、所謂慢性C型肝炎に進行する。このグループは順に重度の肝臓疾患、例えば、肝硬変、肝細胞性癌腫及び死をもたらす終末肝臓疾患のおそれが高い。

HCVがウイルス持続性を樹立し、高率の慢性肝臓疾患を生じるメカニズムは十分に解明されていなかった。HCVが宿主免疫系と相互作用し、侵食する方法は知られていない。加えて、HCV感染症及び疾患に対する保護における細胞性免疫応答及び体液性免疫応答の役割が未だ証明される必要がある。免疫グロブリンが輸血関連ウイルス性肝炎の予防について報告されていたが、疾患防除センターは現在この目的のために免疫グロブリン治療を推奨していない。有効な保護免疫応答の欠如はワクチン又は適切な暴露後の予防手段の開発を妨げており、こうして近い期間では、希望が抗ウイルス介入にしっかりと留められる。

種々の臨床研究が慢性C型肝炎で冒された患者でHCV感染症を有効に治療し得る医薬物質を同定する目標で行なわれていた。これらの研究は単独そしてその他の抗ウイルス薬剤との組み合わせの、インターフェロン- の使用を伴った。このような研究はかなりの数の参加者がこれらの治療に应答しないことを示し、また有利に应答するもののうちの、大部分が治療の停止後に再発することがわかった。

【0003】

最近まで、インターフェロン(IFN)が慢性C型肝炎の患者について臨床で認められる有益と判明した唯一の利用できる治療であった。しかしながら、持続応答速度が低く、またインターフェロン治療は治療患者の寿命の性質を低下する重度の副作用(即ち、網膜症、甲状腺炎、急性膵炎、鬱病)を誘発する。最近、リバビリンと組み合わせたインターフェロンがIFN単独に非応答性の患者について認可されていた。しかしながら、IFNにより生じる副作用はこの組み合わせ療法では軽減されない。インターフェロンのペギル化(pegylated)形態、例えば、PEG-イントロン(登録商標)及びペガシス(登録商標)がこれらの有害な副作用に明らかに部分的に取り組み得るが、抗ウイルス薬が依然としてHCVの経口治療のための特別な手がかりのままである。

それ故、既存の医薬療法を制限を解消するHCV感染症の治療に有効な抗ウイルス薬剤の開発に対する要望が存する。

HCVはフラビウイルス科のエンベロープ陽性ストランドRNAウイルスである。一本鎖HCV RNAゲノムは約9500ヌクレオチドの長さであり、約3000アミノ酸の単一の大きいポリタンパク質をコードする単一オープンリーディングフレーム(ORF)を有する。感染細胞では、このポリタンパク質が多くの部位で細胞性プロテアーゼ及びウイルスプロテアーゼにより開裂されて構造タンパク質及び非構造(NS)タンパク質を生成する。HCVの場合、成熟非構造タンパク質(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、及びNS5B)の生成が2種のウイルスプロテアーゼにより行なわれる。未だに不十分に特性決定された、第一のものがNS2-NS3結合部で開裂し(以下、NS2/3プロテアーゼと称される)、第二のものはNS3のN末端領域内に含まれたセリンプロテアーゼ(NS3プロテアーゼ)であり、NS3-NS4A開裂部位でシス、また残りのNS4A-NS4B部位、NS4B-NS5A部位、NS5A-NS5B部位についてトランスの両方で、NS3の下流の全てのその後の開裂を媒介する。NS4Aタンパク質は多くの機能を利用でき、NS3プ

10

20

30

40

50

ロテアーゼのコファクターとして作用し、おそらくNS3及びその他のウイルスレプリカーゼ成分の膜局在化を助けることが明らかである。NS4AとのNS3プロテアーゼの複合体形成が部位の全てでタンパク質分解効率を高める、プロセッシングイベントに必要と考えられる。NS3タンパク質はまたヌクレオシドトリホスファターゼ活性及びRNAヘリカーゼ活性を示す。NS5BはHCVの複製に関するRNA依存性RNAポリメラーゼである。

【0004】

抗ウイルス薬剤の開発のための一般戦略はウイルスの複製に必須であるウイルスコードされた酵素を不活化することである。

以下のものは本発明の化合物とは構造上異なるHCV NS3プロテアーゼインヒビターペプチド類似体を開示する過去数年に公表された特許出願のリストである：

GB 2,337,262; JP10298151; JP 11126861; JP 11292840; JP 2001-103993; US 6,159,938; US 6,187,905; WO 97/43310; WO 98/17679; WO 98/22496; WO 98/46597; WO 98/46630; WO 99/38888; WO 99/50230; WO 99/64442; WO 99/07733; WO 99/07734; WO 00/09543; WO 00/09558; WO 00/20400; WO 00/59929; WO 00/31129; WO 01/02424; WO 01/07407; WO 01/16357; WO 01/32691; WO 01/40262; WO 01/58929; WO 01/64678; WO 01/74768; WO 01/77113; WO 01/81325; WO 02/08187; WO 02/08198; WO 02/08244; WO 02/08251; WO 02/8256; WO 02/18369; WO 02/60926 及び WO 02/79234。

本発明の一つの利点はそれがC型肝炎ウイルスの複製に必須の酵素である、NS3プロテアーゼに抑制性であるトリペプチド化合物を提供することである。更に、これらの化合物はレプリコン細胞モデルでHCV RNA複製を抑制し得る。

本発明の一局面の更なる利点はこれらの化合物がNS3プロテアーゼを特異的に抑制し、その他のセリンプロテアーゼ、例えば、ヒト白血球エラスターゼ(HLE)、ブタ膵臓エラスターゼ(PPE)、もしくはウシ膵臓キモトリプシン、又はシステインプロテアーゼ、例えば、ヒト肝臓カテプシン B (Cat B) に対する有意な抑制活性を示さないという事実にある。

【発明の開示】

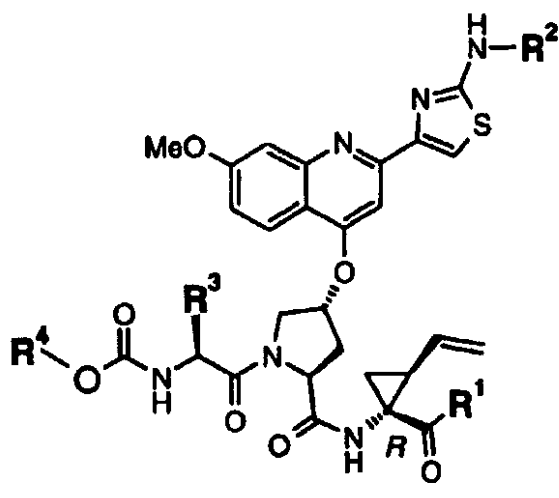
【課題を解決するための手段】

【0005】

式(1)：

【0006】

【化1】



【0007】

(式中、R<sup>1</sup>はヒドロキシ又はNHSO<sub>2</sub>R<sup>1A</sup> (式中、R<sup>1A</sup>は(C<sub>1-8</sub>)アルキル、(C<sub>3-7</sub>)シクロアルキル又は{(C<sub>1-6</sub>)アルキル-(C<sub>3-7</sub>)シクロアルキル}であり、これらは全て必要によりハロ、シアノ、ニトロ、O-(C<sub>1-6</sub>)アルキル、アミド、アミノもしくはフェニルで1~3回置換されていてもよく、又はR<sup>1A</sup>はC<sub>6</sub>又はC<sub>10</sub>アリールであり、これは必要によりハロ、シアノ、ニトロ、(C<sub>1-6</sub>)アルキル、O-(C<sub>1-6</sub>)アルキル、アミド、アミノもしくはフェニルで1

～ 3 回置換されていてもよい) であり、 $R^2$  は  $(C_{4-6})$  シクロアルキルであり、 $R^3$  は *t*-ブチル又は  $(C_{5-6})$  シクロアルキルであり、かつ  $R^4$  は  $(C_{4-6})$  シクロアルキルである) の化合物、又はその医薬上許される塩が本発明の範囲内に含まれる。

医薬上許される担体媒体又は補助薬剤と混合して、抗 C 型肝炎ウイルス有効量の式 I の化合物、又はその治療上許される塩を含むことを特徴とする医薬組成物が本発明の範囲内に含まれる。

一実施態様によれば、本発明の医薬組成物はインターフェロン (ペギル化され、又はペギル化されていない)、もしくはリバビリン、又は一種以上のその他の抗 HCV 薬剤、或いは上記のあらゆる組み合わせを更に含む。

本発明の別の重要な局面は、単独又は一緒に、もしくは別々に投与される、一種以上のインターフェロン (ペギル化され、又はペギル化されていない)、もしくはリバビリン、又は一種以上のその他の抗 HCV 薬剤と組み合わせたの、抗 C 型肝炎ウイルス有効量の式 I の化合物、その医薬上許される塩、又は上記組成物を哺乳類に投与することによる哺乳類の C 型肝炎ウイルス感染症の治療方法に関する。

本発明の別の重要な局面は単独又は一種以上のインターフェロン (ペギル化され、又はペギル化されていない)、もしくはリバビリン、又は一種以上のその他の抗 HCV 薬剤 (これらの全てが一緒に、又は別々に投与される) と組み合わせたの、抗 C 型肝炎ウイルス有効量の式 I の化合物、その医薬上許される塩、又は上記組成物を哺乳類に投与することによる哺乳類の C 型肝炎ウイルス感染症の予防方法に関する。

また、C 型肝炎ウイルス感染症の治療又は予防のための薬物の製造のための、本明細書に記載された、式 I の化合物の使用が本発明の範囲内にある。

本記載は幾つかの書類を参照し、これらの内容が参考として本明細書に含まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

定義

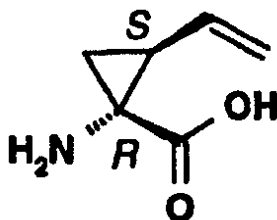
本明細書に使用される、以下の定義が特にことわらない限り適用される。(R) 又は (S) が式 1 の化合物の置換基又は非対称中心の絶対配置を表すのに使用される場合に関して、その表示は全体の化合物の状況で行なわれ、置換基又は非対称中心単独の状況で行なわれるのではない。

本明細書に使用される表示 “P1、P2、及び P3” はペプチド類似体の C 末端から開始し、N 末端に向かって延びるアミノ酸残基の位置を表す (即ち、P1 は C 末端からの位置 1 を表し、P2 は C 末端からの第二位置を表す、等) (Berger A. & Schechter I., Transactions of the Royal Society London series B257, 249-264 (1970) を参照のこと)。

本明細書に使用される “ビニル-ACCA” という用語は式：

【0009】

【化 2】



【0010】

の化合物、即ち、(1R,2S)-1-アミノ-2-エテニルシクロプロピルカルボン酸を表す。

単独で、又は別の置換基と組み合わせて本明細書に使用される “ $(C_{1-8})$  アルキル” という用語は、1～8 個の炭素原子を含む非環式直鎖又は分岐アルキル置換基を意味し、例えば、メチル、エチル、2-メチルヘキシル、1,1-ジメチルヘキシル (又は *t*-ブチル) 及びオクチルを含む。

単独で、又は別の置換基と組み合わせて本明細書に使用される “ $(C_{3-7})$  シクロアルキル

”という用語は、3～7個の炭素原子を含むシクロアルキル置換基を意味し、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル及びシクロヘプチルを含む。

本明細書に使用される“{(C<sub>1-6</sub>)アルキル-(C<sub>3-6</sub>)シクロアルキル}”という用語は1～6個の炭素原子を含むアルキレン基に直接結合された3～6個の炭素原子を含むシクロアルキル基、例えば、シクロプロピルメチル、シクロペンチルエチル、シクロヘキシルメチル、及びシクロヘキシルエチルを意味する。R<sup>1A</sup>が{(C<sub>1-6</sub>)アルキル-(C<sub>3-6</sub>)シクロアルキル}である場合、この基は(C<sub>1-6</sub>)アルキル(即ち、アルキレン部分)を介してSO<sub>2</sub>基に結合される。

単独で、又は別の基と組み合わせて本明細書に使用される“C<sub>6</sub>又はC<sub>10</sub>アリアル”という用語は、6個の炭素原子を含む芳香族単環式基又は10個の炭素原子を含む芳香族二環式基を意味する。例えば、アリアルとして、フェニル、1-ナフチル又は2-ナフチルが挙げられる。

単独で、又は別の基と組み合わせて本明細書に使用される“O-(C<sub>1-6</sub>)アルキル”という用語は、6個までの炭素原子を含む基-O-(C<sub>1-6</sub>)アルキル(アルキルは先に定義されたとおりである)を意味し、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、1-メチルエトキシ、ブトキシ及び1,1-ジメチルエトキシを含む。後者の基はtert-ブトキシとして普通知られている。

本明細書に使用される“ハロ”という用語はプロモ、クロロ、フルオロ又はヨードから選ばれたハロゲン置換基を意味する。

“医薬上許される塩”という用語は、ゾンデ医療判断の範囲内で、不当な毒性、刺激、アレルギー反応等を生じないでヒト及び下等動物の組織と接触しての使用に適しており、  
20 妥当な利益/リスク比に相応し、一般に水溶性もしくは油溶性又は水分散性もしくは油分散性であり、それらの意図される使用に有効である式(1)の化合物の塩を意味する。その用語は医薬上許される酸付加塩及び医薬上許される塩基付加塩を含む。好適な塩のリストが、例えば、S.M. Birgeら, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19頁に見られ、これが参考として本明細書にそのまま含まれる。

#### 【0011】

“医薬上許される酸付加塩”という用語は遊離塩基の生物学的有効性及び性質を保持し、しかも生物学的又はそれ以外に望ましくないことがなく、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、スルファミン酸、硝酸、リン酸等、及び有機酸、例えば、  
30 酢酸、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、酪酸、ショウノウ酸、ショウノウスルホン酸、ケイ皮酸、クエン酸、ジグルコン酸、エタンスルホン酸、グルタミン酸、グリコール酸、グリセロリン酸、ヘミスルフィック酸(hemisulfic acid)、ヘプタン酸、ヘキサ酸、ギ酸、フマル酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸(イセチオン酸)、乳酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メシチレンスルホン酸、メタンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、ニコチン酸、2-ナフタレンスルホン酸、シュウ酸、パモ酸、ペクチン酸、フェニル酢酸、3-フェニルプロピオン酸、ピクリン酸、ピバル酸、プロピオン酸、ピルピン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、スルファニル酸、酒石酸、p-トルエンスルホン酸、ウンデカン酸等で生成されるこれらの塩を意味する。  
40

“医薬上許される塩基付加塩”という用語は遊離酸の生物学的有効性及び性質を保持し、かつ生物学的又はそれ以外に望ましくないことがなく、無機塩基、例えば、アンモニウム又はアンモニウムもしくは金属陽イオン、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム等の水酸化物、炭酸塩、もしくは重炭酸塩で生成されるこれらの塩を意味する。アンモニウム塩、カリウム塩、  
40 ナトリウム塩、カルシウム塩、及びマグネシウム塩が特に好ましい。医薬上許される有機無毒性塩基から誘導された塩として、一級アミン、二級アミン、及び三級アミン、四級アミン化合物、天然産置換アミンを含む置換アミン、環状アミン及び塩基性イオン交換樹脂、例えば、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、イソプロピルアミン、トリプロピルアミン、トリブチルアミ  
50

ン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオプロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N-エチルピペリジン、テトラメチルアンモニウム化合物、テトラエチルアンモニウム化合物、ピリジン、N,N-ジメチルアニリン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルホリン、ジシクロヘキシルアミン、ジベンジルアミン、N,N-ジベンジルフェネチルアミン、1-エフェナミン、N,N'-ジベンジリエチレンジアミン、ポリアミン樹脂等の塩が挙げられる。特に好ましい有機無毒性塩基はイソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、コリン、及びカフェインである。

10

## 【0012】

本明細書に使用される“抗ウイルス薬剤”という用語は哺乳類中のウイルスの生成及び/又は複製を抑制するのに有効である薬剤（化合物又は生物学的薬剤）を意味する。これは哺乳類中のウイルスの生成及び/又は複製に必要な宿主又はウイルスのメカニズムと干渉する薬剤を含む。抗ウイルス薬剤として、例えば、リバビリン、アマンタジン、VX-497（メリメボジブ、ベルテックス・ファーマシューティカルズ）、VX-498（ベルテックス・ファーマシューティカルズ）、レボピリン、ピラミジン、セブレン（マキサミン）、XTL-001及びXTL-002（XTLバイオファーマシューティカルズ）が挙げられる。

本明細書に使用されるその他の抗HCV薬剤という用語は疾患のC型肝炎関連症候の進行を低下又は防止するのに有効であるこれらの薬剤を意味する。このような薬剤は抗ウイルス薬剤、免疫調節薬剤、HCV NS3プロテアーゼのインヒビター、HCVポリメラーゼのインヒビター又はHCVライフサイクル中の別の標的のインヒビターから選ばれる。

20

本明細書に使用される“免疫調節薬剤”という用語は哺乳類中の免疫系応答を増進又は強化するのに有効であるこれらの薬剤（化合物又は生物学的薬剤）を意味する。免疫調節薬剤として、例えば、クラスIインターフェロン（例えば、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン及びオメガインターフェロン、タウ-インターフェロン、コンセンサスイインターフェロン及びアジアロ-インターフェロン）、クラスIIインターフェロン（例えば、 $\gamma$ -インターフェロン）及びペギル化インターフェロンが挙げられる。

## 【0013】

本明細書に使用される“HCV NS3プロテアーゼのインヒビター”という用語は哺乳類中のHCV NS3プロテアーゼの機能を抑制するのに有効である薬剤（化合物又は生物学的薬剤）を意味する。HCV NS3プロテアーゼのインヒビターとして、例えば、WO 99/07733、WO 99/07734、WO 00/09558、WO 00/09543、WO 00/59929又はWO 02/060926に記載されたこれらの化合物、BILN 2061として同定されたベーリンガー・インゲルハイム臨床候補及びVX-950又はLY-570310として同定されたベルテックス/エリ・リレイ予備開発候補が挙げられる。特に、WO 02/060926中の224-226頁の表に開示された化合物# 2、3、5、6、8、10、11、18、19、29、30、31、32、33、37、38、55、59、71、91、103、104、105、112、113、114、115、116、120、122、123、124、125、126及び127が、本発明の化合物と組み合わせ使用し得る。

30

本明細書に使用される“HCVポリメラーゼのインヒビター”という用語は哺乳類中のHCVポリメラーゼの機能を抑制するのに有効である薬剤（化合物又は生物学的薬剤）を意味する。これは、例えば、HCV NS5Bポリメラーゼのインヒビターを含む。HCVポリメラーゼのインヒビターとして、非ヌクレオシド、例えば、

40

- 米国特許出願第10/198,680号（これはPCT/CA02/01127に相当する；両方とも2002年7月18日に出願）（ベーリンガー・インゲルハイム）、

- 米国特許出願第10/198,384号（これはPCT/CA02/01128に相当する；両方とも2002年7月18日に出願）（ベーリンガー・インゲルハイム）、

- 米国特許出願第10/198,259号（これはPCT/CA02/01129に相当する；両方とも2002年7月18日に出願）（ベーリンガー・インゲルハイム）、

- WO 02/100846 A1及びWO 02/100851 A2（両方ともシャイアー）、

50

- WO 01/85172 A1及びWO 02/098424 A1 (両方ともGSK)、
- WO 00/06529及びWO 02/06246 A1 (両方ともメルク)、
- WO 01/47883及びWO 03/000254 (両方ともJT)並びに
- EP 1 256 628 A2 (アゴウロン)

に記載されたこれらの化合物が挙げられる。

【 0 0 1 4 】

また、HCVポリメラーゼの更に別のインヒビターとして、ヌクレオシド類似体、例えば

- WO 01/90121 A2 (イデニックス)、
- WO 02/069903 A2 (バイオクリスト・ファーマシューティカルズ社)、並びに
- WO 02/057287 A2及びWO 02/057425 A2 (両方ともメルク/イシス)

に記載されたこれらの化合物が挙げられる。

HCVポリメラーゼのインヒビターの特別な例として、JTK-002、JTK-003及びJTK-109 (JT) が挙げられる。

本明細書に使用される“HCVライフサイクル中の別の標的のインヒビター”という用語はHCV NS3プロテアーゼの機能を抑制することによるのではなく、哺乳類中のHCVの生成及び/又は複製を抑制するのに有効である薬剤(化合物又は生物学的薬剤)を意味する。これは哺乳類中のHCVの生成及び/又は複製に必要な宿主又はHCVウイルスメカニズムに干渉する薬剤を含む。HCVライフサイクル中の別の標的のインヒビターとして、例えば、ヘリカーゼ、HCV NS2/3プロテアーゼから選ばれた標的を抑制する薬剤及び内部リボソーム侵入部位(IRES)のインヒビターが挙げられる。HCVライフサイクル中の別の標的のインヒビターの特別な例として、ISIS-14803 (ISISファーマシューティカルズ) が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

本明細書に使用される“HIVインヒビター”という用語は哺乳類中のHIVの生成及び/又は複製を抑制するのに有効である薬剤(化合物又は生物学的薬剤)を意味する。これは哺乳類中のHIVの生成及び/又は複製に必要な宿主又はウイルスのメカニズムに干渉する薬剤を含む。HIVインヒビターとして、例えば、ヌクレオシドインヒビター、非ヌクレオシドインヒビター、プロテアーゼインヒビター、融合インヒビター及びインテグラーゼインヒビターが挙げられる。

本明細書に使用される“HAVインヒビター”という用語は哺乳類中のHAVの生成及び/又は複製を抑制するのに有効である薬剤(化合物又は生物学的薬剤)を意味する。これは哺乳類中のHAVの生成及び/又は複製に必要な宿主又はウイルスのメカニズムに干渉する薬剤を含む。HAVインヒビターとして、例えば、A型肝炎ワクチン、例えば、ハブリックス(登録商標)(グラクソスミスクライン)、VAQTA(登録商標)(メルク)及びアバキシム(登録商標)(アベンシス・パスチュール)が挙げられる。

本明細書に使用される“HBVインヒビター”という用語は哺乳類中のHBVの生成及び/又は複製を抑制するのに有効である薬剤(化合物又は生物学的薬剤)を意味する。これは哺乳類中のHBVの生成及び/又は複製に必要な宿主又はウイルスのメカニズムに干渉する薬剤を含む。HBVインヒビターとして、例えば、HBVウイルスDNAポリメラーゼを抑制する薬剤又はHBVワクチンが挙げられる。HBVインヒビターの特別な例として、例えば、ラミブジン(エピバー-HBV(登録商標))、アデフォバー・ジピボキシル、エンテカバー、FTC(コピラシル(登録商標))、DAPD(DXG)、L-FMAU(クレブジン(登録商標))、AM365(アムラド)、Ldt(テルビブジン)、モノバル-LdC(バルトルシタピン)、ACH-126,443(L-Fd4C)(アチリオン)、MCC478(エリ・リリイ)、ラシバー(RCV)、フルオロ-L及びDヌクレオシド、ロブスタフラボン、ICN2001-3(ICN)、Bam205(ノベロス)、XTL-001(XTL)、イミノ-シュガーズ(ノニル-DNJ)(サイナージイ)、HepBzyme、並びに免疫調節薬製品、例えば、インターフェロンアルファ2b、HE2000(ホリス-エデン)、テラダイム(エピムン)、EHT899(エンゾ・バイオケム)、チモシンアルファ-1(ザダキシン(登録商標))、HBV DNAワクチン(パウダー・ジェクト)、HBV DNAワクチン(ジェフェロン・センター)、HBV抗原(OraGen)、BayHep B(登録商標)(バイエル)、Nabi-HB(登録商標)(

10

20

30

40

50

Nabi) 及び抗 B 型肝炎 (Cangene)、並びに HBV ワクチン製品、例えば、エンゲリックス B、レコンビバクス HB、GenHevac B、ヘパケアー、Bio-Hep B、TwinRix、コムバクス、ヘキサバクが挙げられる。

【0016】

本明細書に使用される“クラス I インターフェロン”という用語は全て受容体型 I に結合するインターフェロンのグループから選ばれたインターフェロンを意味する。これは天然産及び合成により生成されたクラス I インターフェロンの両方を含む。クラス I インターフェロンの例として、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、オメガインターフェロン、タウ-インターフェロン、コンセンサスインターフェロン、アジアロ-インターフェロンが挙げられる。

10

本明細書に使用される“クラス II インターフェロン”という用語は全て受容体型 II に結合するインターフェロンのグループから選ばれたインターフェロンを意味する。クラス II インターフェロンの例として、 $\gamma$ -インターフェロンが挙げられる。

本発明の医薬組成物は、例えば、抗ウイルス薬剤、免疫調節薬剤、HCV NS3 プロテアーゼのその他のインヒビター、HCV ポリメラーゼのインヒビター、HCV ライフサイクル中の別の標的のインヒビター、HIV インヒビター、HAV インヒビター及び HBV インヒビターから選ばれた一種以上の付加的な活性薬剤を含んでもよい。このような薬剤の例が上記の定義の節に示される。

これらの薬剤の幾つかの特別な好ましい例が以下にリストされる。

- ・抗ウイルス薬剤：リバビリン及びアマンタジン、
- ・免疫調節薬剤：クラス I インターフェロン、クラス II インターフェロン及びペギル化インターフェロン、
- ・NS3 ヘリカーゼ、HCV NS2/3 プロテアーゼ又は内部リボソーム侵入部位 (IRES) から選ばれた標的を抑制する HCV ライフサイクル中の別の標的のインヒビター、
- ・HIV インヒビター：ヌクレオシドインヒビター、非ヌクレオシドインヒビター、プロテアーゼインヒビター、融合インヒビター及びインテグラーゼインヒビター、又は
- ・HBV インヒビター：HBV ウイルス DNA ポリメラーゼを抑制し、又は HBV ワクチンである薬剤。

20

【0017】

先に説明したように、組み合わせ療法が意図されており、式 (1) の化合物、又はその医薬上許される塩が抗ウイルス薬剤、免疫調節薬剤、HCV NS3 プロテアーゼの別のインヒビター、HCV ポリメラーゼのインヒビター、HCV ライフサイクル中の別の標的のインヒビター、HIV インヒビター、HAV インヒビター及び HBV インヒビターから選ばれた少なくとも一種の付加的な薬剤と同時に投与される。このような薬剤の例が先の定義の節に示される。これらの付加的な薬剤は本発明の化合物と組み合わせられて単一医薬投薬形態を生じ得る。また、これらの付加的な薬剤は、例えば、キットを使用して、多投薬形態の一部として患者に別々に投与されてもよい。このような付加的な薬剤は式 (1) の化合物、又はその医薬上許される塩の投与の前、それと同時に、又はその後患者に投与されてもよい。

30

本明細書に使用される“治療”という用語は C 型肝炎疾患の症候を軽減又は排除し、かつ/又は患者中のウイルス負荷を低減するための本発明の化合物又は組成物の投与を意味する。

40

本明細書に使用される“予防”という用語はウイルスへの個体の暴露後であるが、疾患の症候の出現の前、かつ/又は血液中のウイルスの検出の前の本発明の化合物又は組成物の投与を意味する。

【0018】

好ましい実施態様

$R^1$  がヒドロキシ、 $\text{NHSO}_2\text{Me}$ 、 $\text{NHSO}_2$  シクロプロピル又は  $\text{NHSO}_2\text{Ph}$  である先に定義された式 1 の化合物が好ましい。 $R^1$  が  $\text{NHSO}_2$  シクロプロピル又は  $\text{NHSO}_2\text{Ph}$  であることが更に好ましい。また、 $R^1$  がヒドロキシであることが最も好ましい。

$R^2$  がシクロペンチル又はシクロヘキシルである、先に定義された式 1 の化合物が好まし

50

い。R<sup>2</sup>がシクロペンチルであることが最も好ましい。

R<sup>3</sup>がt-ブチル又はシクロヘキシルであることが好ましい。R<sup>3</sup>がt-ブチルであることが最も好ましい。

R<sup>4</sup>がシクロブチル又はシクロペンチルである、先に定義された式1の化合物が好ましい。R<sup>4</sup>がシクロペンチルであることが最も好ましい。

R<sup>1</sup>がヒドロキシであり、R<sup>2</sup>及びR<sup>4</sup>が夫々シクロペンチルであり、かつR<sup>3</sup>がt-ブチルである、先に定義された式1の化合物が更に好ましい。

R<sup>1</sup>がヒドロキシであり、R<sup>2</sup>がシクロブチルであり、R<sup>3</sup>がt-ブチルであり、かつR<sup>4</sup>がシクロペンチルである、式1の化合物が更に好ましい。

R<sup>1</sup>がヒドロキシであり、R<sup>2</sup>がシクロヘキシルであり、R<sup>3</sup>がt-ブチルであり、かつR<sup>4</sup>がシクロペンチルである、式1の化合物が更に好ましい。

R<sup>1</sup>がNHSO<sub>2</sub>Phであり、R<sup>2</sup>及びR<sup>4</sup>が夫々シクロペンチルであり、かつR<sup>3</sup>がt-ブチルであることが更に好ましい。

R<sup>1</sup>がヒドロキシであり、R<sup>2</sup>がシクロペンチルであり、R<sup>3</sup>がt-ブチルであり、かつR<sup>4</sup>がシクロブチルである、式1の化合物が更に好ましい。

R<sup>1</sup>がヒドロキシであり、R<sup>2</sup>がシクロペンチルであり、R<sup>3</sup>がt-ブチルであり、かつR<sup>4</sup>がシクロヘキシルである、式1の化合物が更に好ましい。

R<sup>1</sup>がヒドロキシであり、R<sup>2</sup>及びR<sup>4</sup>が夫々シクロペンチルであり、かつR<sup>3</sup>がシクロヘキシルである、式1の化合物が更に好ましい。

R<sup>1</sup>がヒドロキシであり、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>が夫々シクロペンチルである、式1の化合物が更に好ましい。

#### 【0019】

別の実施態様によれば、本発明の医薬組成物は別の抗HCV薬剤を更に含んでもよい。抗HCV薬剤の例として、 $\alpha$ -（アルファ）、 $\beta$ -（ベータ）、 $\delta$ -（デルタ）、 $\gamma$ -（ガンマ）又は $\omega$ -（オメガ）インターフェロン、リバビリン及びアマンタジンが挙げられる。

別の実施態様によれば、本発明の医薬組成物はHCV NS3プロテアーゼの別のインヒビターを更に含んでもよい。

別の実施態様によれば、本発明の医薬組成物はHCVポリメラーゼのインヒビターを更に含んでもよい。

更に別の実施態様によれば、本発明の医薬組成物は、ヘリカーゼ、NS2/3プロテアーゼ又は内部リボソーム侵入部位(IRES)を含むが、これらに限定されない、HCVライフサイクル中の別の標的のインヒビターを更に含んでもよい。

本発明の医薬組成物は経口、非経口又は移植溜めにより投与されてもよい。経口投与又は注射による投与が好ましい。本発明の医薬組成物はあらゆる通常の無毒性の医薬上許される担体、アジュバント又はビヒクルを含んでもよい。或る場合には、製剤のpHが医薬上許される酸、塩基又は緩衝剤で調節されて製剤化合物又はその送出形態の安定性を高めてもよい。本明細書に使用される非経口という用語は皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、滑液包内、胸骨内、鞘内、及び病巣内の注射技術又は注入技術を含む。

医薬組成物は無菌の注射製剤の形態、例えば、無菌の注射可能な水性又は油性懸濁液であってもよい。この懸濁液は好適な分散剤又は湿潤剤（例えば、トゥイーン80）及び懸濁剤を使用して当業界で知られている技術に従って製剤化されてもよい。

#### 【0020】

本発明の医薬組成物はカプセル、錠剤、並びに水性懸濁液及び水溶液を含むが、これらに限定されない、あらゆる経口上許される投薬形態で経口投与されてもよい。経口用の錠剤の場合、普通に使用される担体はラクトース及びトウモロコシ澱粉を含む。滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムがまた典型的に添加される。カプセル形態の経口投与のために、有益な希釈剤はラクトース及び乾燥トウモロコシ澱粉を含む。水性懸濁液が経口投与される場合、活性成分が乳化剤及び懸濁剤と合わされる。所望により、或る種の甘味料及び/又は風味料及び/又は着色剤が添加されてもよい。

上記製剤及び組成物のためのその他の好適なビヒクル又は担体が通常の医薬書籍、例え

10

20

30

40

50



物はまた代理細胞をベースとするアッセイ又はin vitroもしくはin vivoのウイルス複製アッセイを実証するための陽性対照として使用されてもよい。

本発明の更なる詳細が下記の実施例（これらは特許請求の範囲に関して非限定的であると理解される）で説明される。

#### 方法

一般に、式1の化合物、ひいては中間体は、反応体に適していることが知られている反応条件を使用して既知の方法により調製される。幾つかのこのような方法が参考として本明細書に含まれるWO 00/09543、WO 00/09558及び米国特許第6,323,180号に開示されている。

本明細書に定義された、 $R^1$ が $\text{NHSO}_2R^{1A}$ である式Iの化合物は式Iの相当する酸（即ち、 $R^1$ がヒドロキシである）を通常の条件下でカップリング剤の存在下で式 $R^{1A}\text{SO}_2\text{NH}_2$ の適当なスルホンアミドとカップリングすることにより調製される。幾つかの普通に使用されるカップリング剤が使用し得るが、TBTU及びHATUが実用的であるとわかった。スルホンアミドは市販されており、又は既知の方法により調製し得る。

下記のスキームは $R^1$ がOHである場合の式1の化合物を調製するための既知の方法を使用する二つの便法を示す。

10

20

30

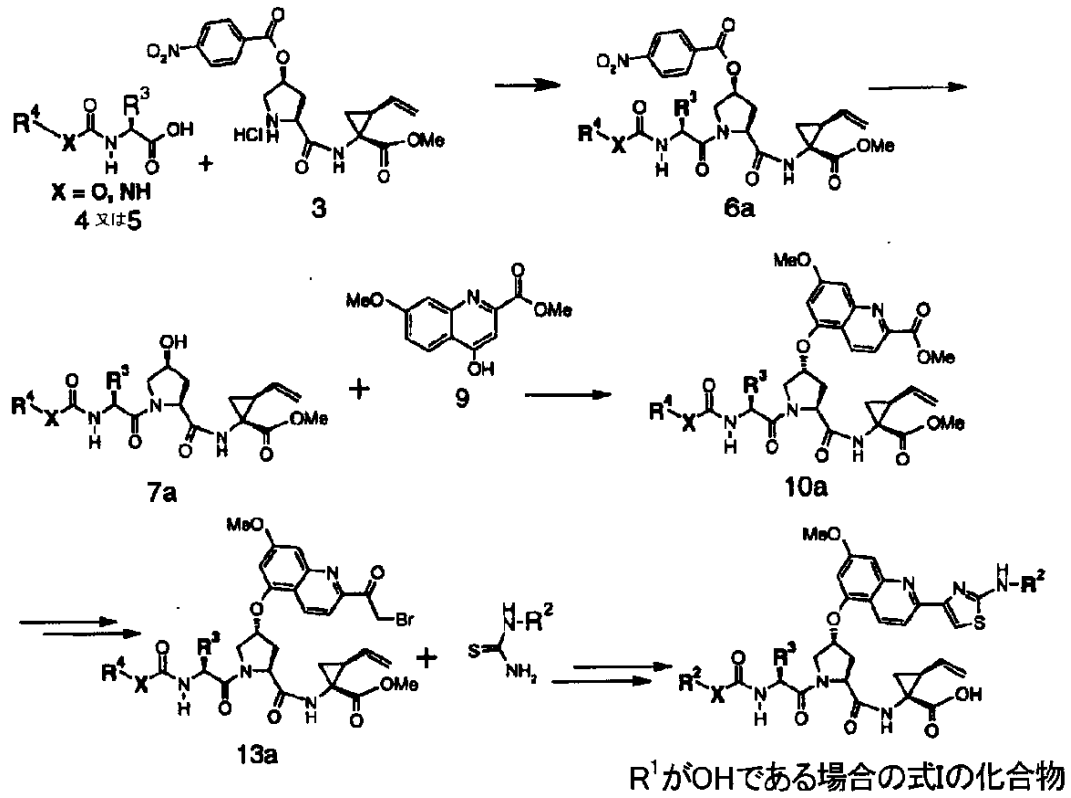
40

50

【 0 0 2 3 】

【 化 3 】

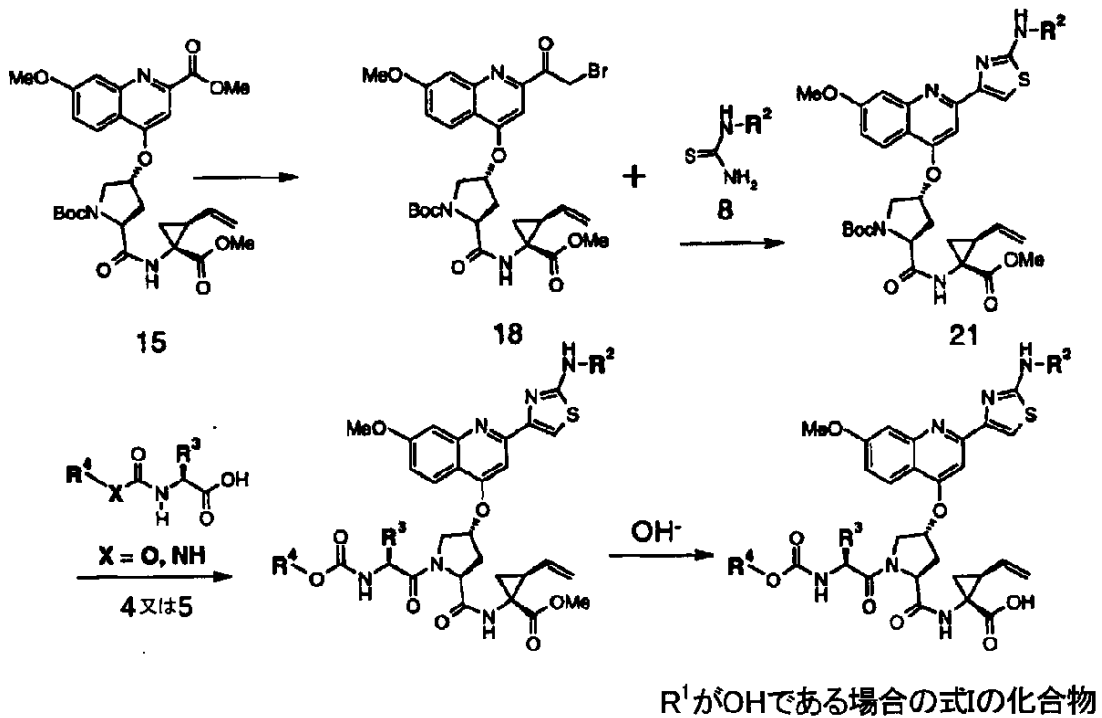
スキーム 1:



10

20

スキーム 2:



30

40

【 実施例 】

【 0 0 2 4 】

温度を で示す。特にことわらない限り、溶液%は重量対容積関係を表し、溶液比は容

50

積対容積関係を表す。核磁気共鳴(NMR)スペクトルをブルカー400MHzスペクトロメーターで記録した。化学シフト( )をppmで報告する。フラッシュクロマトグラフィーをスチールのフラッシュクロマトグラフィー技術(W.C. Stillら, J. Org. Chem., (1978), 43, 2923)に従ってシリカゲル(SiO<sub>2</sub>)で行なった。

実施例に使用した略号として、

DBU: 1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン; DCM: ジクロロメタン; DIAD: ジイソプロピルアゾジカルボキシレート; DIEA: ジイソプロピルエチルアミン; DIPEA: ジイソプロピルエチルアミン; DMF: N,N-ジメチルホルムアミド; DMAP: 4-(ジメチルアミノ)ピリジン; EtOAc: 酢酸エチル; HATU: [0-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル]-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート; HPLC: 高性能液体クロマトグラフィー; MS: 質量分析法(MALDI-TOF: マトリックス補助レーザー吐き出しイオン化-飛行の時間, FAB: 迅速原子衝撃); Me: メチル; MeOH: メタノール; Ph: フェニル; R.T.: 室温(18~22 ); tert-ブチル又はt-ブチル: 1,1-ジメチルエチル; Tbg: tert-ブチルグリシン: tert-ロイシン; TBTU: 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート; TFA: トリフルオロ酢酸; 及びTHF: テトラヒドロフランが挙げられる。

10

式(1)の化合物の合成:

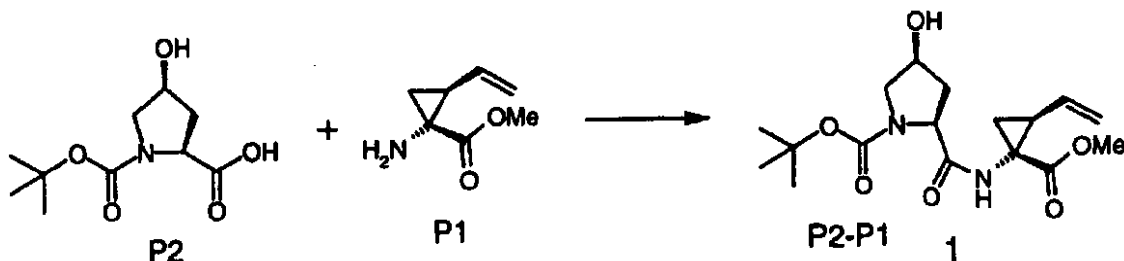
ジペプチド中間体15(スキーム2)及び2-カルボメトキシ-4-ヒドロキシ-7-メトキシキノリン9(スキーム1)をWO 00/09543に記載された方法に従って合成した。

ジペプチド1の合成

20

【0025】

【化4】



30

【0026】

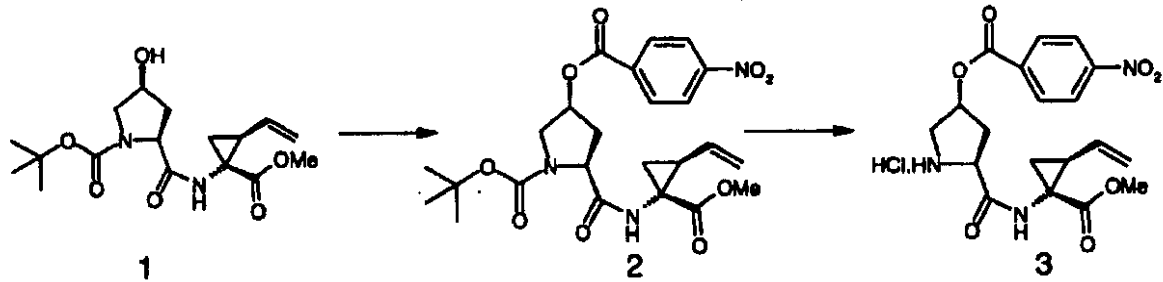
DMF(800mL)中のBoc-ヒドロキシプロリン(50.0g、216ミリモル)、ビニル-ACCAメチルエステル(42.25g、238ミリモル、1.1当量)、TBTU(76.36g、238ミリモル、1.1当量)及びDIPEA(113mL、649ミリモル、3当量)の混合物を窒素雰囲気下でR.T.で撹拌した。3.5時間後に、溶媒を蒸発させ、残渣をEtOAcで抽出した。抽出液を塩酸(10%)、飽和重炭酸ナトリウム及び食塩水で洗浄した。次いで有機相を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、蒸発させて油を得た。高真空下で一夜乾燥させた後、ジペプチド1を黄色のフォームとして得た(72.0g、94%、純度>95%、HPLCによる)。

40

ジペプチド3の調製

【0027】

## 【化5】



## 【0028】

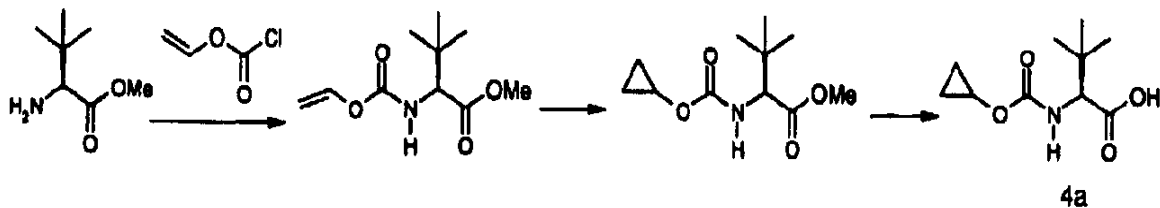
ジペプチド1 (72.0g、203ミリモル)、トリフェニルホスフィン (63.94g、243.8ミリモル、1.2当量) 及び4-ニトロ安息香酸 (41.08g、245.8ミリモル、1.2当量) を乾燥THF (1.4L) に溶解した。その攪拌溶液を窒素雰囲気下で0℃に冷却した。次いでジエチルアゾジカルボキシレート (38.4mL、244ミリモル、1.2当量) を45分間にわたって滴下して添加し、その反応液をR.T.に温めた。4時間後、溶媒を蒸発させた。残渣を四つの部分に分けた。2:1のヘキサン/EtOAc ~ 1:1のヘキサン/EtOAc ~ 純粋なEtOAcの勾配を使用して、これらの夫々を微細なシリカゲルによるクロマトグラフィー (10-40µmメッシュ、カラム直径12cm、カラム長さ16cm) により精製した。この様式で、Boc-ジペプチドエステル2を溶媒の蒸発及び70℃で1時間の高真空下の残渣の乾燥後に無定形の白色の固体として得た (108.1g、定量的-105%)。ジオキサン中の4N塩化水素の溶液をBoc-ジペプチドエステル2 (108g、243ミリモル) に添加して無色の溶液を得た。その溶液をR.T.で1時間攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣を3時間にわたって高真空下に置いて化合物3の塩酸塩を無定形の固体として得た。その固体をそのまま使用した。

カルバメート4の合成

カルバメート4aの調製：

## 【0029】

## 【化6】



## 【0030】

0 で、THF (8mL) 中のtert-ブチルグリシンメチルエステル (590mg、3.25ミリモル) の溶液に、ビニルクロロホルメート (0.55mL、6.47ミリモル) 及びトリエチルアミン (1.15mL、8.25ミリモル) を添加した。その温度をR.T.に上昇させた。その溶液を16時間攪拌した。その溶液を濃縮し、残渣をEtOAcに溶解した。そのEtOAc溶液をクエン酸の10%水溶液 (2x)、NaHCO<sub>3</sub>の飽和水溶液 (2x) 及び食塩水で洗浄し、乾燥させ、濃縮して相当するビニルカルバメート (608mg) を無色の油として得た。その油をDCM (4mL) に溶解し、0℃に冷却し、ジヨードメタン (0.15mL、1.86ミリモル) 及びジエチル亜鉛 (95µL、0.93ミリモル) を添加した。白色の固体が最初に現れたが、しばらくして溶解した (約1時間)。その懸濁液/溶液をR.T.で5時間攪拌した。塩化アンモニウム飽和溶液を添加し、その溶液をEtOAc (2x) で抽出した。有機抽出物を乾燥させ (MgSO<sub>4</sub>)、濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。ヘキサン : EtOAc 95 : 5 で溶離して相当するメチルエステルを無色の油として得た (96mg、収率90%)。

THF (5mL) 中のそのメチルエステル (93mg、0.41ミリモル) の溶液、MeOH (1mL) 及び水 (2mL) 中のLiOH (45mg、1.81ミリモル) の溶液を4時間攪拌した。その溶液を水で希釈し、EtOAc (2x) で抽出した。その水溶液を1N HClの添加により酸性にし、その酸性溶液をEtOAc (2x) で抽出した。合わせた有機抽出液を乾燥させ (MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させて所望の力

10

20

30

40

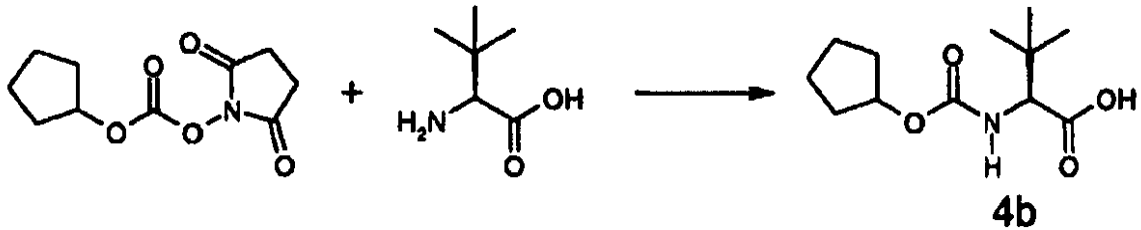
50

ルバメート4aを白色の固体として得た（53mg、収率60%）。

カルバメート4bの調製

【0031】

【化7】



10

【0032】

THF(350mL)を炭酸シクロペンチルエステル2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル(9.00g、39.6ミリモル)及びtert-ブチルグリシン(6.24g、47.5ミリモル)を含むフラスコに添加して懸濁液を得た。蒸留水(100mL)を激しく攪拌しながら添加した。少量の固体が溶解されないで残った。次いでトリエチルアミン(16.6mL、119ミリモル)を添加して均一な溶液を得、これをR.T.で攪拌した。2.5時間後、THFを蒸発させ、水性残渣を水(100mL)で希釈した。その反応液を1N NaOH(25mL-最終pH>10)の添加により塩基性にした。その溶液をEtOAc(2x200mL)で洗浄し、水相を1N HCl(約70mL-最終pH<2)で酸性にした。その濁った溶液をEtOAc(200+150mL)で抽出した。抽出液を乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、蒸発させて

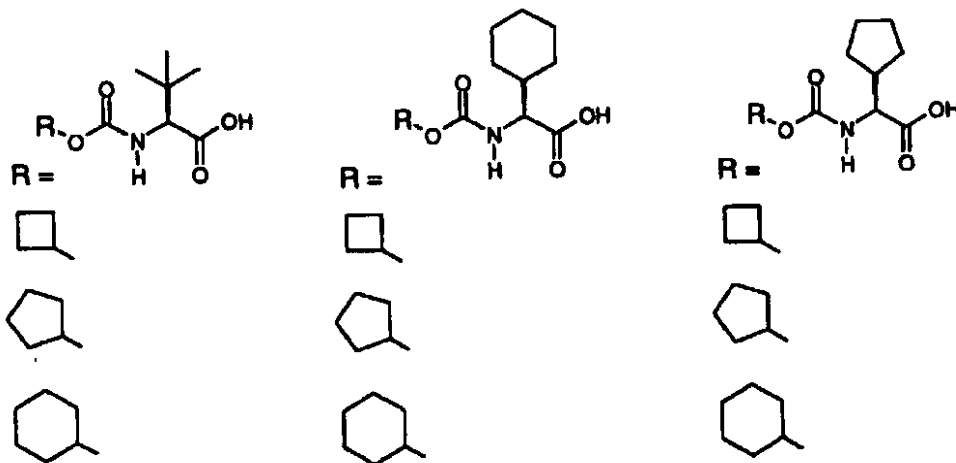
20

その他のカルバメートの調製

上記操作を使用し、tert-ブチルグリシン、シクロペンチルグリシン、又はシクロヘキシルグリシン及び炭酸シクロブチル、シクロペンチル、又はシクロヘキシルエステル2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステルを使用して、下記の式のカルバメートを調製した。

【0033】

【化8】



30

40

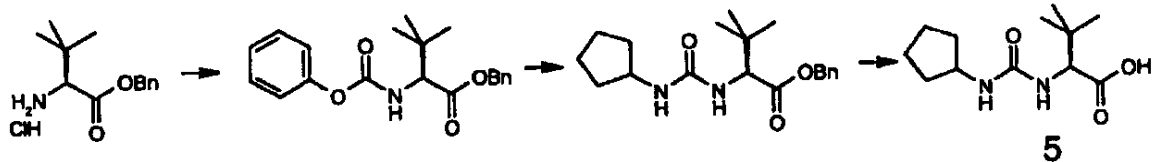
【0034】

尿素5の調製

【0035】

50

## 【化9】



## 【0036】

THF(20mL)及びピリジン(2.0mL、24.73ミリモル)中のtert-ブチルグリシンベンジルエステル塩酸塩(2.55g、9.89ミリモル)の溶液を0℃に冷却した。フェニルクロロホルメート(1.30mL、10.19ミリモル)をその冷却溶液に滴下して添加した。得られる懸濁液を0℃で5分間、次いでR.T.で1.5時間撹拌した。その反応混合物をEtOAcで希釈し、10%のクエン酸(2x)、水(2x)、飽和NaHCO<sub>3</sub>(2x)、水(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させて粗化合物をほぼ無色の油(3.73g、>100%、9.98ミリモルと推定)を得た。その粗生成物(1.01g、2.97ミリモル)をDMSO(6.5mL)に溶解し、シクロペンチルアミンを滴下して添加した。その反応混合物をR.T.で45分間撹拌した。その反応混合物をEtOAcで希釈した。有機相を10%のクエン酸(2x)、水(2x)、飽和NaHCO<sub>3</sub>(2x)、水(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させて粗シクロペンチル尿素-Tbg-OBn生成物をほぼ無色の油として得た。ヘキサン:EtOAc 9:1を使用して、粗物質をシリカによるフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して極性ではない不純物を除去し、7:3で精製して精製生成物を濃厚な無色の油(936mg、95%)として溶離した。そのエステルベンジルエステル生成物(936mg、2.82ミリモル)をR.T.で無水エタノール(15mL)中で水素充填気球中でその溶液を10%のPd/C(93.6mg)とともに5.5時間撹拌することにより脱保護した。その反応混合物を0.45ミクロンのフィルターで濾過し、蒸発、乾燥させて尿素5を白色の固体(668.8mg、98%)として得た。

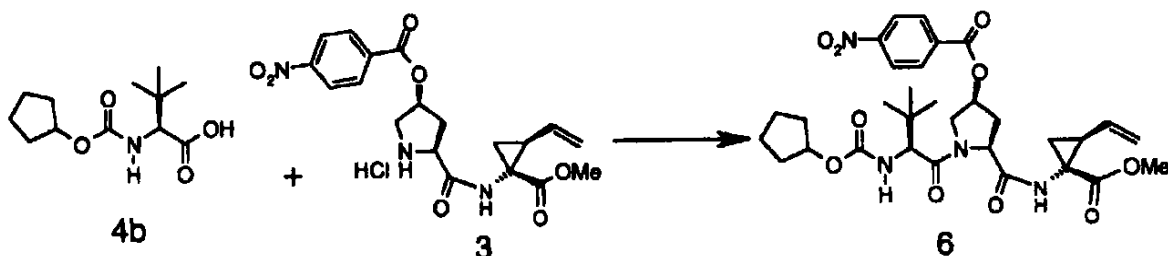
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 12.39 (s, 1H), 6.09 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 5.93 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 3.90 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 3.87-3.77 (m, 1H), 1.84-1.72 (m, 2H), 1.63-1.42 (m, 4H), 1.30-1.19 (m, 2H), 0.89 (s, 9H).

M.S. (電子噴霧): 241.0 (M-H)<sup>-</sup> 243.0 (M+H)<sup>+</sup>. 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 99%.

## トリペプチド6の合成

## 【0037】

## 【化10】



## 【0038】

カルバメート4b(6.15g、22.5ミリモル)及びTBTU(7.72g、24.7ミリモル)をDCM中で懸濁させ、その懸濁液を迅速に撹拌した。DIPEA(3.92mL、22.5ミリモル)をR.T.で添加し、10分後に、その反応はほぼ均一であった。次いでDIPEA(4.11mL、23.62ミリモル)を含む無水DCM(100mL)中のジペプチド3(10.39g、23.6ミリモル)の溶液をその反応液に注いだ。得られる黄色の溶液を14時間撹拌した。次いで溶媒を蒸発させて黄色のシロップを得、これをEtOAc(300+150mL)で抽出し、0.05N HCl(2x200mL)、飽和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(300mL)及び食塩水(150mL)で洗浄した。合わせた抽出液をMgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、蒸発させてトリペプチド6を淡黄色のフォーム(15.68g、定量的)として得た。

## トリペプチド7の合成

10

20

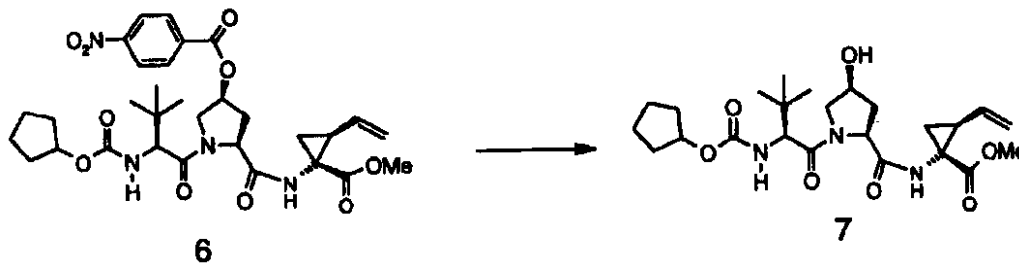
30

40

50

【 0 0 3 9 】

【 化 1 1 】



10

【 0 0 4 0 】

トリペプチド 6 (15.68g) を THF (200mL) に溶解し、水 (30mL) を添加した。得られる溶液を 0 に冷却し、水酸化リチウム一水和物 (1.18g、28.12ミリモル) の溶液を激しく撹拌しながら 3 分間にわたって添加した。0 で 3 時間後、過剰の塩基を 1N HCl (最終 pH 約 6) で中和し、THF を蒸発させて、水性懸濁液 (黄色のガム) を得た。その混合物を EtOAc (2 x 200mL) で抽出し、飽和 NaHCO<sub>3</sub> (2 x 300mL) で洗浄した。合わせた抽出液を MgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、蒸発させて淡黄色のフォームを得た。溶離剤として EtOAc を使用してフォームをシリカゲルでフラッシュクロマトグラフィーにかけて 7 を白色の無定形固体 (9.77g、91%) として得た。

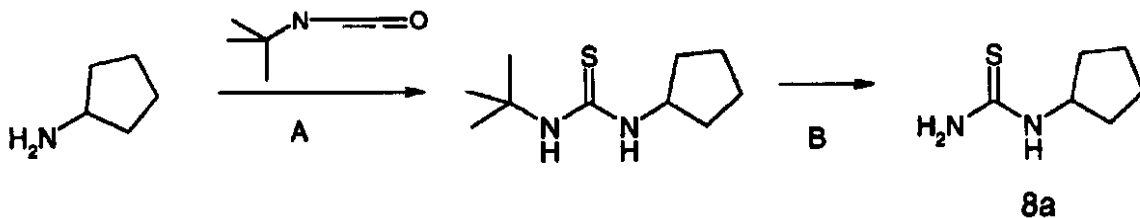
チオ尿素 8 の調製

20

チオ尿素 8a の合成

【 0 0 4 1 】

【 化 1 2 】



30

【 0 0 4 2 】

DCM (200mL) 中の tert-ブチルイソチオシアネート (5.0mL、39.4ミリモル) の溶液に、シクロペンチルアミン (4.67mL、47.3ミリモル)、続いて DIEA を添加し、その反応混合物を R.T. で 2 時間撹拌した。その混合物を EtOAc で希釈し、クエン酸の 10% 水溶液 (2x)、飽和 NaHCO<sub>3</sub> (2x)、H<sub>2</sub>O (2x) 及び食塩水 (1x) で洗浄した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、蒸発させて N-tert-ブチル-N'-シクロペンチルチオ尿素を白色の固体 (3.70g、収率 47%) として得た。その N-tert-ブチル-N'-シクロペンチルチオ尿素 (3.70g) を濃 HCl (46mL) に溶解した。その暗黄色の溶液を穏やかに還流して加熱した。40 分後、その反応混合物を R.T. に冷却し、その後に氷中で冷却し、NaHCO<sub>3</sub> の固体及び飽和水溶液で pH 9.5 に塩基性にした。生成物を EtOAc (3x) で抽出した。合わせた EtOAc 抽出液を H<sub>2</sub>O (2x) 及び食塩水 (1x) で洗

40

浄した。有機層を乾燥させ (MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、濃縮してベージュ色の固体 (2.46g、粗生成物) を得た。粗物質をヘキサン/EtOAc 95/5 中ですり碎いて、濾過後に、N-シクロペンチルチオ尿素 8a を白色の固体 (2.38g、収率 90%) として得た。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7.58 (bs, 1H), 7.19 (bs, 1H), 6.76 (bs, 1H), 4.34 (bs, 1H), 1.92-1.79 (m, 2H), 1.66-1.55 (m, 2H), 1.55-1.30 (m, 4H). MS; es<sup>+</sup> 144.9 (M + H)<sup>+</sup>, es<sup>-</sup>: 142.8 (M - H)<sup>-</sup>.

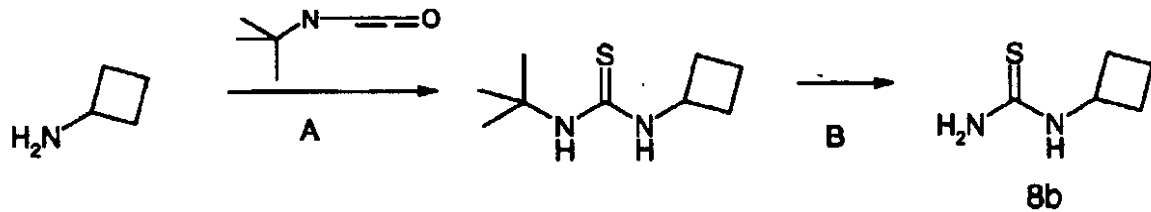
チオ尿素 8b の調製

上記操作を使用し、シクロペンチルアミンに代えて市販のシクロブチルアミンを使用してチオ尿素 8b を得た。

【 0 0 4 3 】

50

## 【化13】



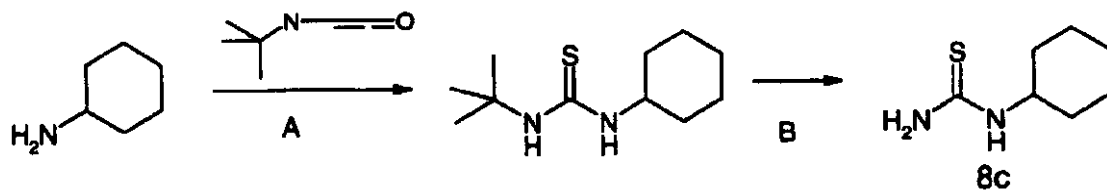
## 【0044】

## チオ尿素8cの調製

上記操作を使用し、シクロペンチルアミンに代えて市販のシクロヘキシルアミンを使用してチオ尿素8cを得た。

## 【0045】

## 【化14】

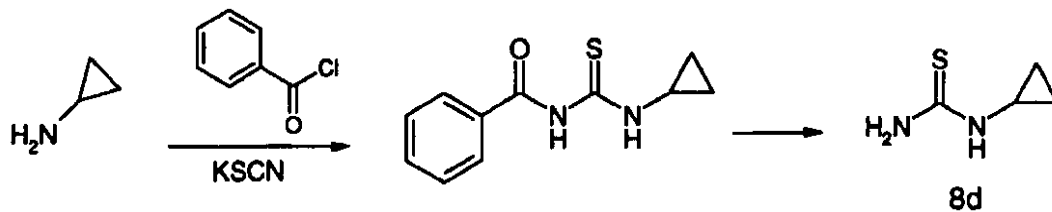


## 【0046】

## チオ尿素8dの調製

## 【0047】

## 【化15】



## 【0048】

アセトン(35mL)中のKSCN(4.60g、47.33ミリモル)の溶液に、0 で、塩化ベンゾイル(5.0mL、43.03ミリモル)を滴下して添加した。その乳白色の溶液を氷浴中で1.5時間攪拌し、シクロプロピルアミン(3.2mL、46.0ミリモル)を滴下して添加した。その反応混合物を0 で1.5時間攪拌し、次いで更にシクロプロピルアミン(0.50mL、7.22ミリモル)を添加し、その反応混合物をR.T.で更に30分間攪拌した。その反応混合物を氷/H<sub>2</sub>O(300mL)に注ぎ、5分間攪拌し、明黄色の固体を濾過し、H<sub>2</sub>Oで数回洗浄し、乾燥させてN-ベンゾイルオキシ-N'-シクロプロピルチオ尿素(6.62g)を得た。このチオ尿素を2N NaOH(50mL)の溶液中で懸濁させ、15分間にわたって加熱、還流した。その溶液をR.T.に冷却し、固体NaClで飽和させ、EtOAc(3x)で抽出した。合わせたEtOAc抽出液をH<sub>2</sub>O(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させて粗生成物をオフホワイトの固体として得た。その固体をヘキサン/EtOAc 5/5中ですり碎いてN-シクロプロピルチオ尿素8dを白色の結晶性固体(2.5g、収率50%)として得た。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7.92 (bs, 1H), 7.61 (bs, 1H), 7.13 (bs, 1H), 2.39 (bs, 1H), 0.67-0.63 (m, 2H), 0.51-0.44 (m, 2H).

MS; es<sup>+</sup> 116.9 (M + H)<sup>+</sup>, es<sup>-</sup>: 114.8 (M - H)<sup>-</sup>

## 実施例1

## 化合物100の調製

## 工程1：トリペプチド10の合成

10

20

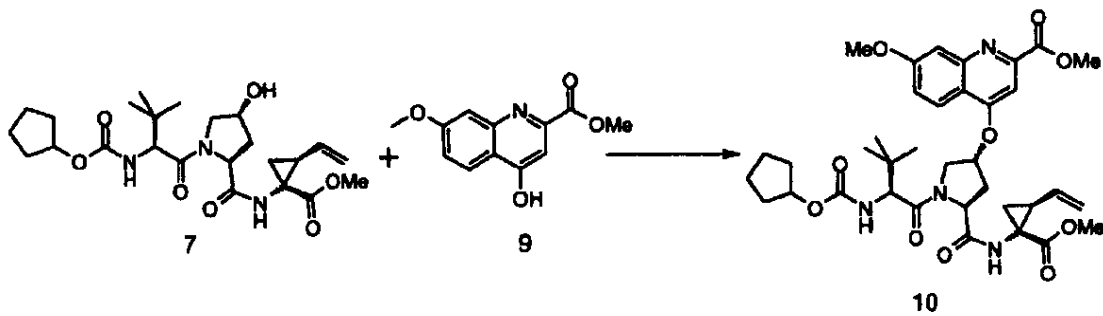
30

40

50

【 0 0 4 9 】

【 化 1 6 】



10

【 0 0 5 0 】

THF(35mL)に溶解したトリペプチド1(1.0g、2.09ミリモル)に、ヒドロキシキノリン9(729mg、3.13ミリモル)及びトリフェニルホスフィン(1.1g、4.2ミリモル)を添加した。その黄色の懸濁液を氷浴中で冷却し、DIAD(821 $\mu$ L、4.2ミリモル)を滴下して添加した。その溶液を氷浴温度で30分間、そしてR.T.で16時間攪拌した。その溶液を蒸発、乾燥させ、残渣をEtOAcに溶解し、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2x)、水(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させて黄色の油を得、これは放置すると沈殿した。その粗固体をDCM中で懸濁させ、不溶性物質を濾別した。その溶液を濃縮し、残渣をヘキサン:EtOAc 5:5中でフラッシュクロマトグラフィーにより精製して全ての極性のない不純物を除去し、全てのPh<sub>3</sub>P=Oが溶離するまでCHCl<sub>3</sub>:EtOAc 80:20中で精製した。所望の化合物を白色の固体(1g、収率70%)としてCHCl<sub>3</sub>:EtOAc 65:35で溶離した。

20

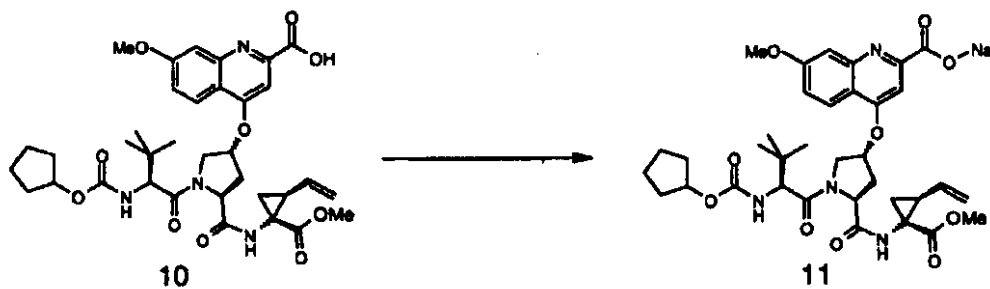
M.S.(電子噴霧): 693.3 (M-H)<sup>-</sup> 695.4 (M+H)<sup>+</sup> 717.4 (M+Na)<sup>+</sup> .

逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 99%.

工程2: エステル10の選択的モノ加水分解

【 0 0 5 1 】

【 化 1 7 】



30

【 0 0 5 2 】

トリペプチド10(1g、1.44ミリモル)をTHF(10mL)に溶解し、MeOH(5mL)、水(5mL)及び1N NaOH水溶液(1.5mL)を添加し、その溶液をR.T.で2時間攪拌した。その混合物を蒸発、乾燥させ、次いでMeOH:トルエン(1:1、4x)、トルエン(2x)及びジエチルエーテル(2x)と同時蒸発させて生成物(無水)を白色のフレーク状固体(1.04g、収率100%)として得た。

40

M.S.(電子噴霧): 679.3 (M-H)<sup>-</sup> 681.3 (M+H)<sup>+</sup> 703.3 (M+Na)<sup>+</sup> .

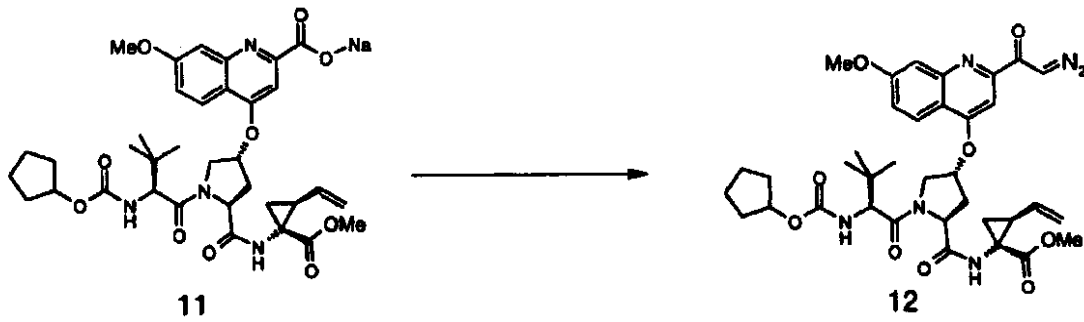
逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 95%.

工程3: ジアゾケトン12の合成

50

【 0 0 5 3 】

【 化 1 8 】



10

【 0 0 5 4 】

ナトリウム塩11 (1.44ミリモルと推定) をTHF(16mL)に溶解し、トリエチルアミン (301  $\mu$ L、2.16ミリモル) を添加し、その溶液を0  $^{\circ}$ Cに冷却した。イソブチルククロホルメート (280  $\mu$ L、2.16ミリモル) を滴下して添加し、その白色の懸濁液を0  $^{\circ}$ Cで75分間攪拌し、続いてジアゾメタンの溶液 (ジエチルエーテル中0.67M、13mL、8.64ミリモル) を添加した。その反応混合物を0  $^{\circ}$ Cで1時間、R.T.で45分間攪拌し、蒸発させて濃厚な懸濁液を得た。この懸濁液をEtOAc及び水に溶解した。その有機溶液を飽和NaHCO<sub>3</sub> (2x)、水 (2x) 及び食塩水 (1x) で洗浄し、乾燥させ (MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させてジアゾケトン生成物を象牙色の固体 (次の工程に使用される粗物質、1.44ミリモルと推定) として得た。

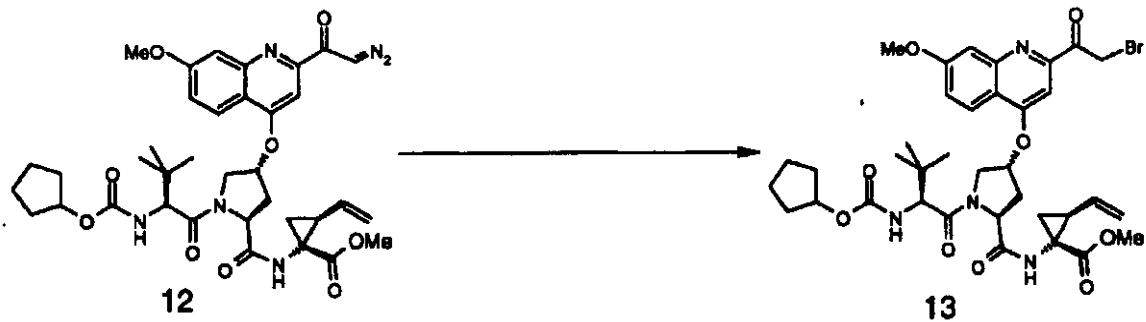
20

M.S. (電子噴霧) : 703.3 (M-H)<sup>-</sup> 705.3 (M+H)<sup>+</sup> . 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 91%.

#### 工程 4 : プロモケトン13の合成

【 0 0 5 5 】

【 化 1 9 】



30

【 0 0 5 6 】

0  $^{\circ}$ Cで、THF(24mL)中のジアゾケトン12 (1.44ミリモル) の溶液に、HBr溶液 (1.0mL) を滴下して添加し、その混合物を1時間攪拌した。その溶液をEtOAcで希釈し、飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液 (2x)、水 (2x) 及び食塩水 (1x) で洗浄し、乾燥させ (MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させて所望のプロモケトン13を象牙ページュ色の固体 (1.1g、1.44ミリモルと推定) を得た。

40

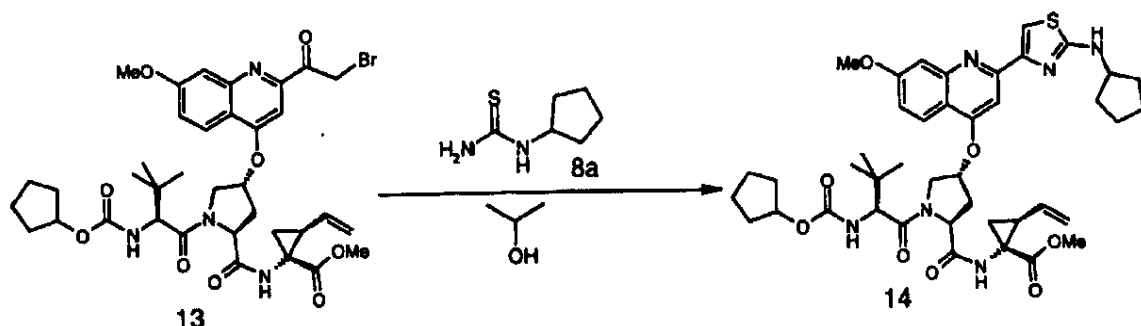
M.S. (電子噴霧) : 757.3 (M) 759.3 (M+2)

50

## 工程 5 : チアゾリルトリペプチド14の合成

【 0 0 5 7 】

【 化 2 0 】



10

【 0 0 5 8 】

-プロモケトン13 (0.40ミリモル) 及びN-シクロペンチルチオ尿素 (68.5mg、0.48ミリモル) をイソプロパノール(15mL)に溶解し、その黄色の溶液を70 °Cで75分間加熱した。その溶液をR.T.に冷却し、蒸発、乾燥させた。残渣をEtOAcに溶解した。その溶液を飽和NaHCO<sub>3</sub>(2x)、水(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、濃縮して生成物をオレンジ-褐色のフォームとして得た。ヘキサン:EtOAc 7:3中でフラッシュカラムクロマトグラフィーにかけて極性のない不純物を除去し、6:4で精製して所望の化合物を明黄色のフォーム (218mg、69%) として回収した。

20

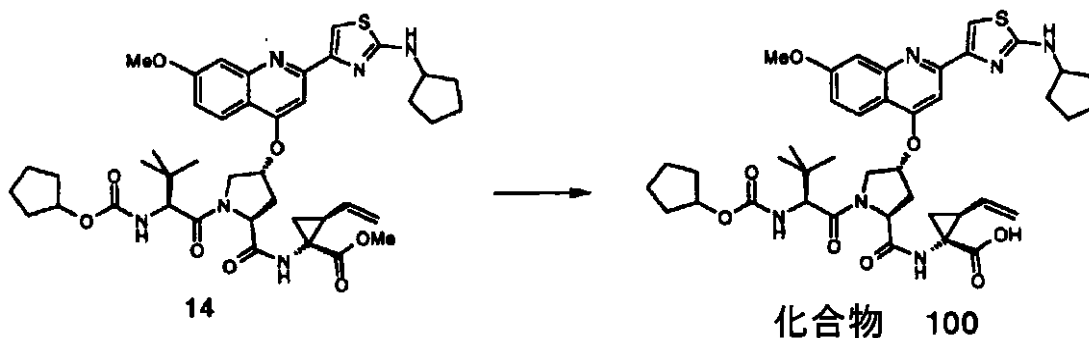
M.S. (電子噴霧) : 801.4 (M-H)<sup>-</sup> 803.4 (M+H)<sup>+</sup> 825 (M+Na)<sup>+</sup> .

逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 99%.

## 工程 6 : エステル14の加水分解

【 0 0 5 9 】

【 化 2 1 】



30

【 0 0 6 0 】

THF(3mL)中のメチルエステル14 (145mg、0.181ミリモル) の溶液、MeOH(1.5mL)及び水(1.5mL)中のLiOH (75.8mg、1.81ミリモル) の溶液を18時間攪拌した。その有機溶液を濃縮してオフホワイトの懸濁液を得、これをEtOAc及び食塩水で希釈して全溶液を得た。そのpHを1N HClの添加により6に調節し、有機層をEtOAc(2x)で更に抽出した。合わせた有機抽出液を水(2x)、食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させて所望の化合物を黄色の固体 (138.2mg、収率97%) として得た。

40

## Na塩への変換

化合物100 (138.2mg、0.175ミリモル) をMeOH(30mL)に溶解し、1当量の0.01N NaOH(17.5mL)を添加した。その透明な黄色の溶液を濃縮してMeOHを除去し、水で希釈し、冷凍し、凍結乾燥して生成物(Na塩)を黄色の無定形固体 (139mg、理論的収量 : 142mg ; Na塩のMW : 810.95) として得た。

M.S. (電子噴霧) : 787.2 (M-H)<sup>-</sup> 789.3 (M+H)<sup>+</sup> 811.3 (M+Na)<sup>+</sup> . 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 98%.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 回転異性体の約5:1 混合物; 8.14 (bs, 1H), 8.02 (d, 50

J = 9.2 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 7.49-7.36 (m, 2H), 7.27 (bs, 1H), 7.06-6.96 (m, 2H), 6.10-5.90 (m, 1H), 5.33 (s, 1H), 5.01 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 4.84 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 4.79-4.65 (m, 1H), 4.47-4.40 (m, 1H), 4.30 (d, J = 11.5 Hz, 1H), ), 4.15 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.00-3.85 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.37-2.26 (m, 1H), 2.15-1.91 (m, 2H), 1.80-1.23 (m, 18H), 0.96 及び 0.86 (2x s, 9H).

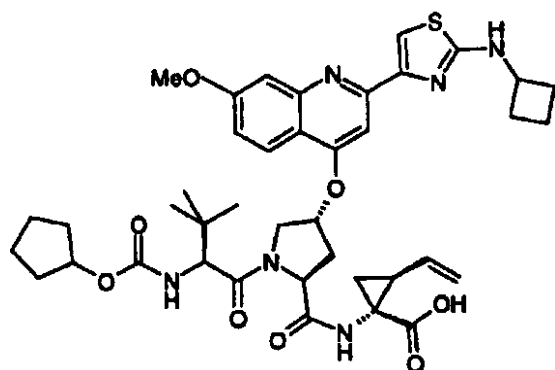
### 実施例 2

#### 化合物101の調製

実施例 1 に記載されたのと同じ操作を使用し、工程 5 でN-シクロペンチルチオ尿素8aを使用する代わりにN-シクロブチルチオ尿素8bを使用して、化合物101をTFA塩として得た。

【 0 0 6 1 】

【 化 2 2 】



化合物 101

【 0 0 6 2 】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 回転異性体の約90:10 混合物、主要異性体の記載; 8.59 (s, 1H), 8.45-8.39 (m, 1H), 8.25 (bs, 1H), 8.20 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.84 (bs, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.32-7.26 (m, 1H), 7.01 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.78-5.66 (m, 2H), 5.20 (dd, J = 17.0, 1.6 Hz, 1H), 5.09-5.04 (m, 1H), 4.53-4.36 (m, 4H), 4.05-3.92 (m, 2H), 3.97 (s, 3H), 2.63-2.55 (m, 1H), 2.44-2.29 (m, 3H), 2.07-1.95 (m, 3H), 1.79-1.23 (m, 12H), 0.96 (s, 9H).

M.S. (電子噴霧) : 773.4 (M-H)<sup>-</sup> 775.4 (M+H)<sup>+</sup> . 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 98%

### 実施例 3

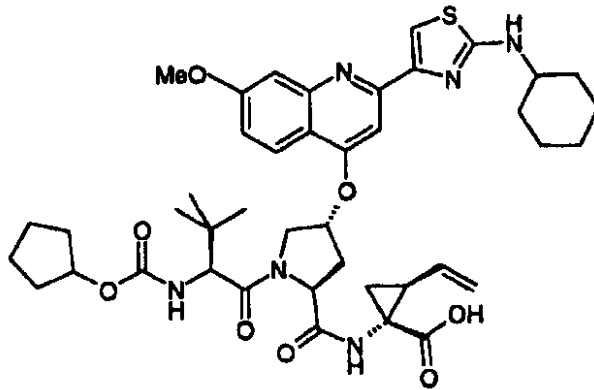
#### 化合物102の調製

実施例 1 に記載されたのと同じ操作を使用し、工程 5 でN-シクロペンチルチオ尿素8aを使用する代わりにN-シクロヘキシルチオ尿素8cを使用して、化合物102をTFA塩として得た。

。

【 0 0 6 3 】

【化23】



化合物 102

10

【0064】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 回転異性体の約90:10 混合物、主要異性体の記載; 8.61 (s, 1H), 8.26-8.17 (m, 2H), 8.13-8.04 (m, 1H), 7.81 (bs, 1H), 7.73 (bs, 1H), 7.32-7.24 (m, 1H), 7.07 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 5.78-5.65 (m, 2H), 5.23-5.15 (m, 1H), 5.09-5.03 (m, 1H), 4.51-4.43 (m, 3H), 4.05-3.77 (m, 3H), 3.97 (s, 3H), 2.64-2.55 (m, 1H), 2.38-2.27 (m, 1H), 2.05-1.95 (m, 3H), 1.79-1.71 (m, 2H), 1.66-1.19 (m, 16H), 0.96 (s, 9H).

20

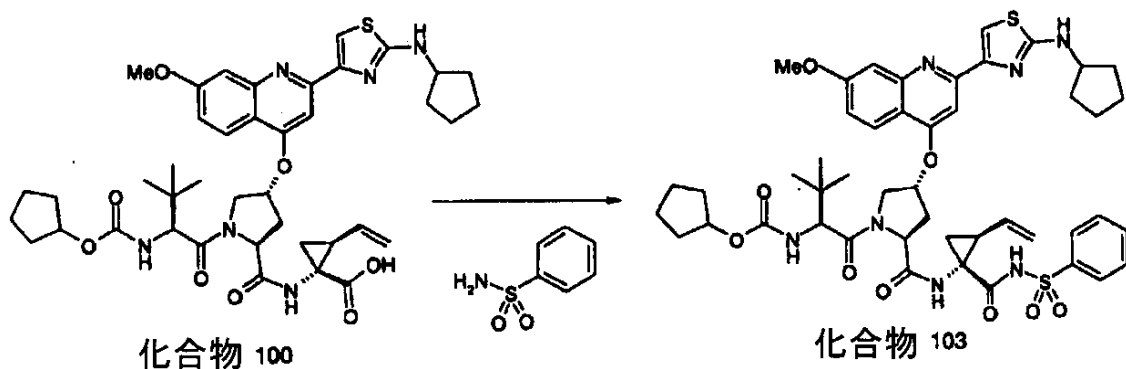
M.S. (電子噴霧): 801.4 (M-H)<sup>-</sup> 803.4 (M+H)<sup>+</sup>. 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 99%

実施例 4

化合物103の調製

【0065】

【化24】



化合物 100

化合物 103

30

【0066】

化合物100 (30mg、0.038ミリモル) をHATU (17mg、0.045ミリモル) と合わせ、無水DMF (4mL) に溶解した。その溶液をR.T. で攪拌し、その後にDIPEA (26  $\mu$ L、0.15ミリモル) を約1分間にわたって滴下して添加した。その混合物をR.T. で60分間攪拌し、活性化エステルの生成について分析HPLCにより分析した。この後に、DMF (1mL) 中のベンゼンスルホンアミド (23mg、0.15ミリモル)、DMAP (17mg、0.14ミリモル) 及びDBU (22  $\mu$ L、0.15ミリモル) を添加した。その反応混合物をR.T. で24時間攪拌し、その後にEtOAc (50mL) に注ぎ、飽和NaHCO<sub>3</sub> 溶液及び飽和食塩水溶液で洗浄した。有機相をMgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をDMSO中で再生し、分取HPLCにより精製した。凍結乾燥して最終生成物 (17mg、48%) を淡黄色の無定形固体として得た。

40

$^1\text{H}$ -NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ), 10.89 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.20 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 8.18-8.08 (m, 2H), 7.89 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.70 (dd,  $J = 7.6, 7.6$  Hz, 2H),

50

7.58 (dd, J = 7.7, 7.7 Hz, 2H), 7.28 (bs, 1H), 7.11 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 5.75 (bs, 1H), 5.37-5.25 (m, 1H), 5.12 (d, J = 17 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 12 Hz, 1H), 4.58-4.42 (m, 3H), 4.24 (bs, 1H), 4.05 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.93 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 2.69-2.61 (m, 1H), 2.35-2.21 (m, 1H), 2.13-1.98 (m, 3H), 1.78-1.68 (m, 4H), 1.68-1.51 (m, 8H), 1.50-1.41 (m, 4H), 1.29-1.22 (m, 1H), 0.99 (s, 9H).

MS (電子噴霧): 928.5 (M + H)<sup>+</sup>, 及び 926.5 (M - H)<sup>-</sup>.

RP-HPLC: Rt = 7.3 分 (均一性 = 99%).

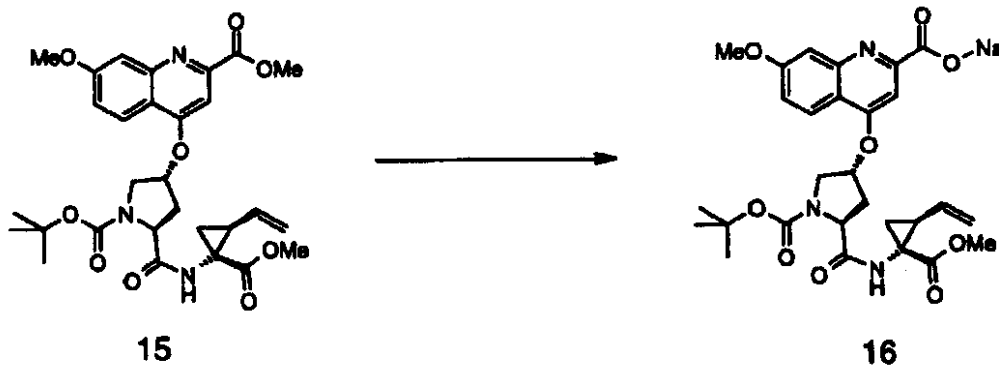
スキーム 2 に示された合成シーケンスを使用して、下記の化合物を調製した。

実施例 5

工程 1 : ジペプチド16の合成

【 0 0 6 7 】

【 化 2 5 】



【 0 0 6 8 】

ジペプチド15 (4.0g、7.02ミリモル) をTHF(20mL) に溶解し、MeOH(10mL)、水(10mL) 及び1N NaOH水溶液 (1.05当量、7.4mL) を添加した。その溶液をR.T. で2.75時間攪拌した。その混合物を蒸発、乾燥させた。残渣を水で希釈し、冷凍し、凍結乾燥してナトリウム塩16を白色の無定形固体(4.28g)として得た。

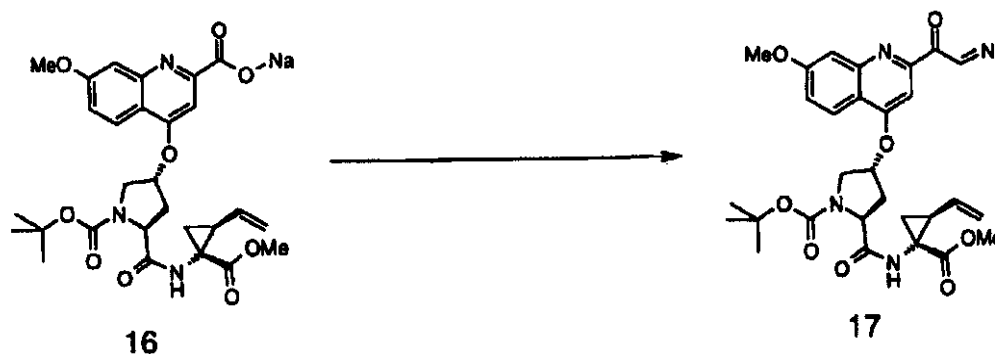
M.S. (電子噴霧) : 554.2 (M-H)<sup>-</sup> 556.3 (M+H)<sup>+</sup> 578.2 (M+Na)<sup>+</sup> .

逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 96%.

工程 2 : ジペプチドジアゾケトン17の合成

【 0 0 6 9 】

【 化 2 6 】



【 0 0 7 0 】

ナトリウム塩16 (7.02ミリモルと推定) をTHF(78mL) に溶解し、トリエチルアミン(1.37 mL、9.83ミリモル) を添加し、その溶液を0 °C に冷却した。イソブチルクロロホルメート (1.28mL、9.83ミリモル) を滴下して添加し、その白色の懸濁液を0 °C で2時間攪拌し、続いてジアゾメタンの溶液 (ジエチルエーテル中0.67M、63mL、42.13ミリモル) を添加した。その反応混合物を0 °C で1時間、R.T. で1.25時間攪拌し、蒸発させて濃厚な懸濁液を

10

20

30

40

50

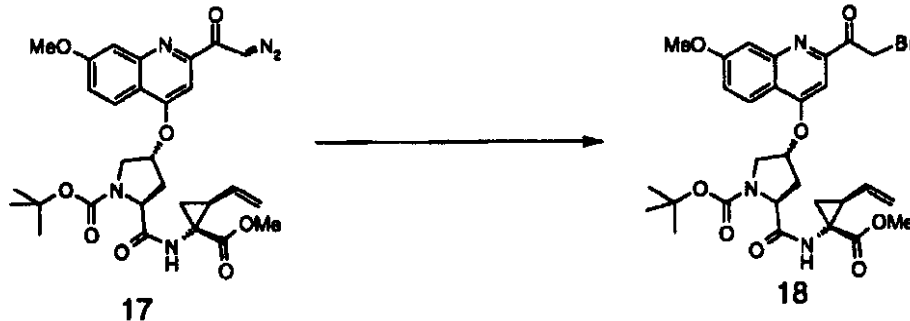
得た。この懸濁液をEtOAc及び水に溶解した。その有機溶液を飽和NaHCO<sub>3</sub>(2x)、水(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させてジアゾケトン17をベージュ色の固体(次の工程に使用される粗物質、7.02ミリモルと推定)を得た。

M.S.(電子噴霧) : 578.2 (M-H)<sup>-</sup> 580.3 (M+H)<sup>+</sup> . 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 90%.

工程3 : ジペプチドプロモケトン18の合成

【0071】

【化27】



10

【0072】

0 で、THF(116mL)中のジアゾケトン(1.44ミリモルと推定)の溶液に、48%のHBr水溶液(5.1mL)を滴下して添加し、その混合物を2時間撹拌した。その溶液をEtOAcで希釈し、飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(2x)、水(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させて所望のプロモケトン(4.25g、6.72ミリモル)として得た。

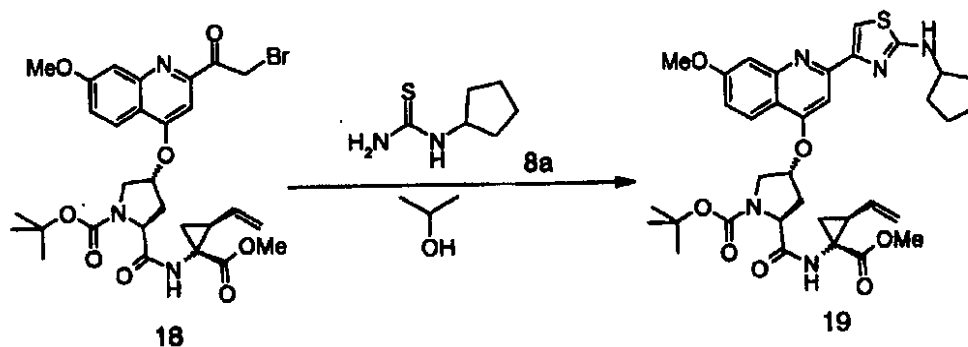
20

M.S.(電子噴霧) : 632 (M) 634.2 (M+2)

工程4 : ジペプチド19の合成

【0073】

【化28】



30

【0074】

-プロモケトン18(512mg、0.81ミリモル)及びN-シクロペンチルチオ尿素(128.4mg、0.89ミリモル)をイソプロパノール(20mL)に溶解した。得られる黄色の溶液を70 で1.5時間加熱した。その溶液をR.T.に冷却し、蒸発、乾燥させた。残渣をEtOAcで希釈した。そのEtOAc溶液を飽和NaHCO<sub>3</sub>(2x)、水(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、濃縮して生成物をオレンジ-褐色のフォームとして得た。ヘキサン:EtOAc 7:3中でフラッシュカラムクロマトグラフィーにかけて極性のない不純物を除去し、6:4で所望の化合物を明黄色の固体(411.5mg、75%)として回収した。

40

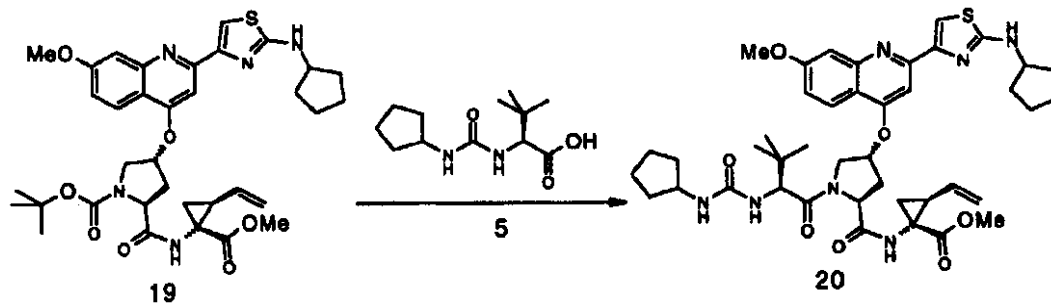
M.S.(電子噴霧) : 676.3 (M-H)<sup>-</sup> 678.3 (M+H)<sup>+</sup>  
逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 99%.

50

## 工程 5 : トリペプチド20の合成

【 0 0 7 5 】

【 化 2 9 】



10

【 0 0 7 6 】

Boc-ジペプチド (32.6g、0.048ミリモル) を4N HCl/ジオキサン(3mL)に溶解し、R.T.で攪拌した。2時間後、その反応混合物を蒸発、乾燥させることにより処理した。こうしてHCl塩をオフホワイトの固体として得た。そのHCl塩を30分間にわたって高真空に暴露した。DCM(2mL)及びDIEA (33  $\mu$ L、0.192ミリモル)中のそのHCl塩の溶液に、尿素5 (13.96mg、0.058ミリモル)、続いてHATUカップリング剤 (21.90mg、0.058ミリモル)を添加した。その反応混合物をR.T.で3時間攪拌した。その反応混合物をEtOAcで希釈し、飽和NaHCO<sub>3</sub>(2x)、水(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発させて粗生成物を濃厚な黄色の油(0.048ミリモルと推定)として得た。

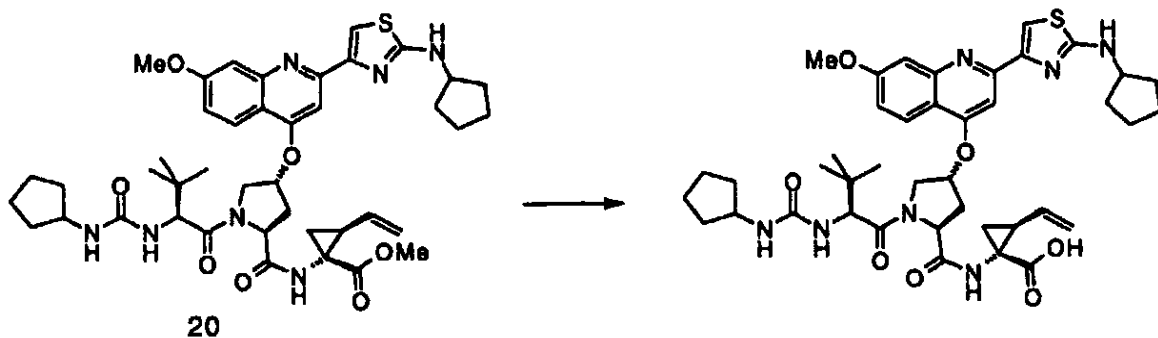
20

M.S. (電子噴霧) : 800.4 (M-H)<sup>-</sup> 802.4 (M+H)<sup>+</sup> . 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 95%.

## 工程 6 : トリペプチドメチルエステル20の加水分解

【 0 0 7 7 】

【 化 3 0 】



30

【 0 0 7 8 】

THF(2mL)中のメチルエステル20 (77.80mg、0.097ミリモル)の溶液、及びMeOH(1mL)、並びに水(1mL)中のLiOH (40.7mg、0.97ミリモル)の水溶液を16時間攪拌した。その有機溶液を濃縮してオフホワイトの懸濁液を得た。線形勾配及び0.06% TFA/CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>Oを使用して、その粗物質を分取HPLC (YMCコンビスクリーンODS-AQ、50x20mm ID S-5ミクロン、120A ;  $\lambda$ =220nm)により精製した。純粋な画分を合わせ、濃縮し、そのナトリウム塩に変換した。

40

## Na塩への変換

濃縮画分をEtOAc及び数mlの食塩水で希釈した(5N NaOHでpH約13に塩基性にし、次いで、1N HClでpH 5.5-6.0に中和した)。生成物をEtOAc(3x)で抽出し、水(2x)及び食塩水(1x)で洗浄し、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、蒸発、乾燥させて中性生成物を黄色の固体(52.7mg、70%)として得た。その中性生成物(49.4mg、0.0627ミリモル)をMeOH(10mL)に溶

50

解し、1当量の0.01N NaOH (6.27mL)を添加した。その透明な黄色の溶液を濃縮してMeOHを除去し、水で希釈し、冷凍し、凍結乾燥して生成物 (Na塩) を黄色の無定形固体 (50.8 mg、理論的収量 : 50.8mg、Na塩のMW : 809.75) として得た。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 回転異性体の約8:1混合物; 8.20 (bs, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.86 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 7.51-7.47 (m, 2H), 7.26 (s, 1H), 6.97 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.19-6.02 (m, 1H), 5.33 (bs, 1H), 4.99 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 4.77 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 4.52-4.41 (m, 2H), 4.34 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.04-3.96 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.79-3.68 (m, 1H), 3.68-3.15 (水ピークの下, 2H), 2.45-2.36 (m, 1H), 2.05-1.92 (m, 2H), 1.82-1.35 (m, 16H), 1.35-1.12 (m, 2H), 0.91 及び 0.84 (2x s, 9H).

M.S. (電子噴霧) : 786.4 (M-H)<sup>-</sup> 788.3 (M+H)<sup>+</sup> 810 (M+Na)<sup>+</sup> . 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA ; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 99%.

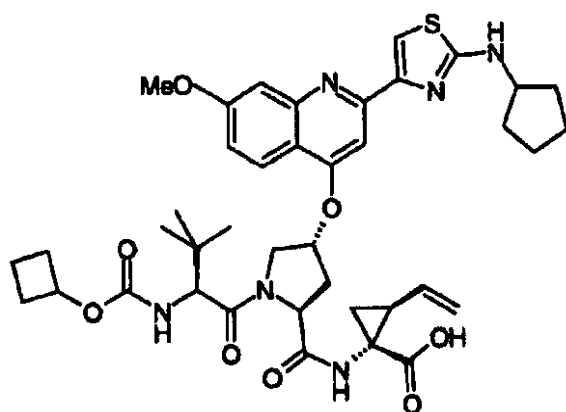
#### 実施例 6

#### 化合物104

実施例 6 に記載されたのと同じ操作を使用し、尿素 5 に代えて工程 5 でtert-ブチルグリシンのシクロブチルカルバメートを使用し工程 6 後に粗カルボン酸を分取HPLCにより精製して標題化合物をTFA塩として得た。

【 0 0 7 9 】

【 化 3 1 】



化合物 104

【 0 0 8 0 】

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 回転異性体の約7:1混合物; 8.09 (bs, 1H), 8.02 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.88 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.28 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.16-7.08 (m, 1H), 7.07-7.00 (m, 1H), 6.10-5.95 (m, 1H), 5.32 (bs, 1H), 5.00 (d,  $J = 17.2$  Hz, 1H), 4.82 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 4.64-4.52 (m, 1H), 4.48-4.41 (m, 1H), 4.29 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H), 4.12 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 3.97-3.85 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.36-2.27 (m, 1H), 2.18-2.04 (m, 2H), 2.03-1.81 (m, 6H), 1.77-1.43 (m, 9H), 1.41-1.34 (m, 1H), 0.96 及び 0.85 (2x s, 9H).

M.S. (電子噴霧) : 773.3 (M-H)<sup>-</sup> 775.4 (M+H)<sup>+</sup> . 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA; CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) : 99%.

#### 実施例 7

#### 化合物105

実施例 6 に記載されたのと同じ操作を使用し、尿素 5 に代えて工程 5 でtert-ブチルグリシンのシクロヘキシルカルバメートを使用して標題化合物をナトリウム塩として得た。

10

20

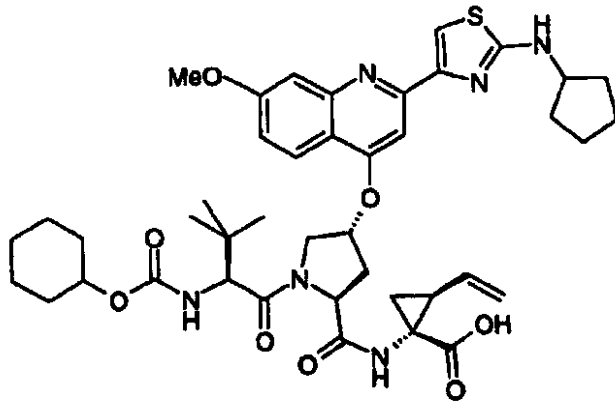
30

40

50

【 0 0 8 1 】

【 化 3 2 】



化合物 105

10

【 0 0 8 2 】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 回転異性体の約5:1混合物; 8.29 (bs, 1H), 8.02 (d,  $J = 9.0\text{ Hz}$ , 1H), 7.89 (d,  $J = 6.5\text{ Hz}$ , 1H), 7.45 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.27 (d,  $J = 2.2\text{ Hz}$ , 1H), 7.05 (d,  $J = 8.6\text{ Hz}$ , 1H), 7.00 (dd,  $J = 2.0, 9.0\text{ Hz}$ , 1H), 5.89 (bs, 1H), 5.34 (s, 1H), 5.08 (d,  $J = 17.0\text{ Hz}$ , 1H), 4.91 (d,  $J = 9.4\text{ Hz}$ , 1H), 4.43 (dd,  $J = 8.4, 16.8\text{ Hz}$ , 1H), 4.36-4.24 (m, 1H), 4.14 (d,  $J = 8.6\text{ Hz}$ , 1H), 4.00-3.86 (m, 3H), 3.89 (s, 3H), 2.35-2.23 (m, 1H), 2.04-1.91 (m, 5H), 1.79-1.41 (m, 10H), 1.39-1.08 (m, 7H), 0.97 及び 0.86 (2x s, 9H).

M.S. (電子噴霧): 801.4 (M-H)<sup>-</sup> 803.4 (M+H)<sup>+</sup>. 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA;  $\text{CH}_3\text{CN}$ :  $\text{H}_2\text{O}$ ): 98%.

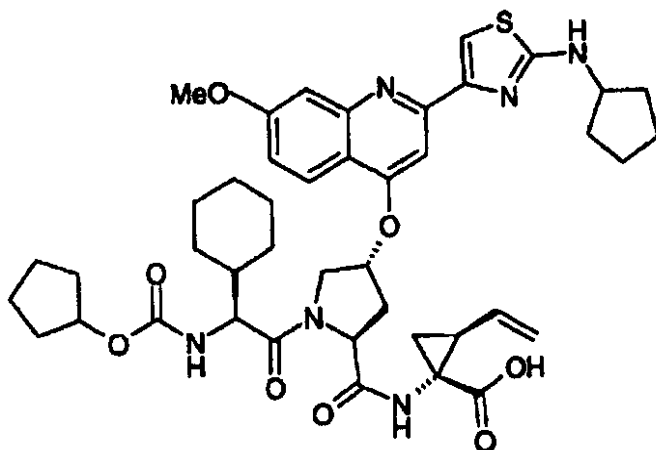
20

実施例 8

化合物106

【 0 0 8 3 】

【 化 3 3 】



30

40

【 0 0 8 4 】

実施例 6 に記載されたのと同じ操作を使用し、尿素 5 に代えて工程 5 でシクロヘキシルグリシンのシクロペンチルカルバメートを使用して標題化合物をナトリウム塩として得た。

50

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 回転異性体の約1:4混合物; 8.22 及び 8.04 (2xs, 1H), 8.00 (d, J = 9.2Hz, 1H), 7.91 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.27 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.01 (dd, J = 2.4, 9.0 Hz, 1H), 6.09-5.98 (m, 1H), 5.34 (s, 1H), 4.98 (dd, J = 1.6, 17.4 Hz, 1H), 4.80 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.73-4.67 (m, 1H), 4.43-4.31 (m, 2H), 4.05-3.95 (m, 2H), 3.95-3.84 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.38-2.29 (m, 1H), 2.03-1.92 (m, 2H), 1.83-1.21 (m, 24H), 1.21-0.83 (m, 5H)

M.S. (電子噴霧): 813.4 (M-H)- 815.4 (M+H)+ . 逆相HPLC均一性 (0.06% TFA;  $\text{CH}_3\text{CN}$ :  $\text{H}_2\text{O}$ ): 99%.

実施例 9

10

化合物107

実施例 6 に記載されたのと同じ操作を使用し、工程 5 で尿素 5 に代えてシクロペンチルグリシンのシクロペンチルカルバメートを使用して、標題化合物を得、これをその相当するNa塩に変換した。

実施例10

NS3-NS4Aプロテアーゼアッセイ

本化合物を評価するのに使用した酵素アッセイがWO 00/09543及びWO 00/59929に記載されている。

【 0 0 8 5 】

実施例11

20

細胞をベースとするHCV RNA複製アッセイ

細胞培養

サブゲノムHCVレプリコンを安定に維持するHuh7細胞を既に記載されたようにして樹立し (Lohmanら, 1999 Science 285: 110-113)、S22.3細胞系と称した。S22.3細胞を10%のFBS及び1mg/mlのネオマイシンを補給されたダルベッコ改良アール培地(DMEM) (標準培地) 中で管理する。アッセイ中、10%FBSを補給され、0.5%のDMSOを含み、ネオマイシンを欠いているDMEM培地を使用した (アッセイ培地)。化合物添加の16時間前に、S22.3細胞をトリプシン処理し、標準培地中50000細胞/mlまで希釈する。200  $\mu\text{L}$  (10000の細胞) を96ウェルプレートの夫々のウェルに分配する。次いでプレートを翌日まで37 で5%の $\text{CO}_2$ とともにインキュベートした。

30

試薬及び物質:

【 0 0 8 6 】

【表 1】

製品	会社名	カタログ#	貯蔵
DMEM	ウイセント社	10013CV	4 °C
DMSO	シグマ	D-2650	室温
ダルベッコPBS	ギブコ-BRL	14190-136	室温
ウシ胎児血清	バイオ-ウィッテーカー	14-901F	-20°C / 4 °C
ネオマイシン (G418)	ギブコ-BRL	10131-027	-20°C / 4 °C
トリプシン-EDTA	ギブコ-BRL	25300-054	-20°C / 4 °C
96ウェルプレート	コスター	3997	室温
PVDF0.22 $\mu\text{m}$ フィルターユニット	ミリポア	SLGV025LS	室温
ディープ-ウェルタイタプレート ポリプロピレン	ベックマン	267007	室温

40

【 0 0 8 7 】

試験化合物の調製

試験化合物 (100%のDMSO中) 10  $\mu\text{L}$ を0.5%の最終DMSO濃度のためにアッセイ培地2mlに

50

添加し、その溶液を15分間にわたって音波処理し、0.22  $\mu$ Mミリポアフィルターユニットで濾過した。900  $\mu$ lをポリプロピレンディープ-ウェルタイタプレートの列Aに移した。列B～Hはアッセイ媒体（0.5%のDMSOを含む）の400  $\mu$ lのアリコートを含み、400  $\mu$ lを列から列へと移すことにより連続希釈(1/2)を調製するのに使用される（化合物は列Hに含まれなかった）。

#### 細胞への試験化合物の適用

細胞培地をS22.3細胞を含む96ウェルプレートから吸引した。試験化合物の適当な希釈を含むアッセイ培地175  $\mu$ Lを化合物プレートの夫々のウェルから細胞培養プレートの相当するウェルに移した（列Hを“無抑制対照”として使用した）。細胞培養プレートを37

10

【0088】

#### 全細胞RNAの抽出

72時間のインキュベーション期間後に、RNeasy96キット（キアゲン（登録商標）、RNeasy Handbook, 1999）を使用して、全細胞RNAを96ウェルプレートのS22.3細胞から抽出した。簡単に言えば、アッセイ培地を細胞から完全に除去し、143mMの  $\beta$ -メルカプトエタノールを含むRLT緩衝液（キアゲン（登録商標））100  $\mu$ Lを96ウェル細胞培養プレートの夫々のウェルに添加した。そのマイクロプレートを20秒間にわたって穏やかに振とうした。次いで70%のエタノール100  $\mu$ Lを夫々のマイクロプレートウェルに添加し、ピペット操作により混合した。溶解産物を除去し、キアゲン（登録商標）スクウェア-ウェルブロックの上に置かれたRNeasy96（キアゲン（登録商標））プレートのウェルに適用した。RNeasy96プレートをテープでシールし、RNeasy96プレートを含むスクウェア-ウェルブロックをホルダーに装填し、4K15C遠心分離機のローターバケットに入れた。サンプルを4分間にわたって室温で6000rpm（約5600xg）で遠心分離した。テープをプレートから除去し、緩衝液RW1（キアゲン（登録商標）RNeasy96キット）0.8mlをRNeasy96プレートの夫々のウェルに添加した。RNeasy96プレートをテープの新しい片でシールし、4分間にわたって室温で6000rpmで遠心分離した。RNeasy96プレートを別のきれいなスクウェア-ウェルブロックの上に置き、テープを除去し、緩衝液RPE（キアゲン（登録商標）RNeasy96キット）0.8mlをRNeasy96プレートの夫々のウェルに添加した。RNeasy96プレートをテープの新しい片でシールし、4分間にわたって室温で6000rpmで遠心分離した。テープを除去し、緩衝液RPE（キアゲン（登録商標）RNeasy96キット）更に0.8mlをRNeasy96プレートの夫々のウェルに添加した。RNeasy96プレートをテープの新しい片でシールし、10分間にわたって室温で6000rpmで遠心分離した。テープを除去し、RNeasy96プレートを1.2mlの収集微小管を含むラックの上に置いた。RNaseを含まない水50  $\mu$ Lを夫々のウェルに添加し、プレートをテープの新しい片でシールすることによりRNAを溶離し、室温で1分間インキュベートした。次いでプレートを4分間にわたって室温で6000rpmで遠心分離した。溶離工程を50  $\mu$ lの第二容積のRNaseを含まない水で繰り返した。全細胞RNAを含む微小管を-70 で貯蔵する。

20

30

【0089】

#### 全細胞RNAの定量

リボグリーン（登録商標）RNA定量キット（モレキュラー・プローブズ（登録商標））を使用して、RNAをストーム（登録商標）系（モレキュラー・ダイナミクス（登録商標））で定量した。簡単に言えば、リボグリーン試薬をTE（10mMのトリス-HCl pH=7.5、1mMのEDTA）中で200倍に希釈した。一般に、試薬50  $\mu$ LをTE10ml中で希釈した。リボソームRNAの標準曲線をTE中で2  $\mu$ g/mlに希釈し、次いで前もって決めた量（100、50、40、20、10、5、2及び0  $\mu$ L）のリボソームRNA溶液を新しい96ウェルプレート（コスター#3997）に移し、その容積をTEで100  $\mu$ Lまで補足した。一般に、96ウェルプレートのカラム1を標準曲線のために使用し、別のウェルを定量すべきRNAサンプルのために使用する。定量すべきである夫々のRNAサンプル10  $\mu$ Lを96ウェルプレートの相当するウェルに移し、TE90  $\mu$ Lを添加した。或る容積（100  $\mu$ L）の希釈されたリボグリーン試薬を96ウェルプレートの夫々のウェルに添加し、室温で2～5分間インキュベートし、光から保護した（200  $\mu$ Lの最終容積中の10  $\mu$ LのRNAサンプルは20倍の希釈を生じる）。夫々のウェルの蛍光強さをス

40

50

トーム（登録商標）系（モレキュラー・ダイナミクス（登録商標））で測定した。標準曲線を既知の量のリボソームRNA及び得られる蛍光強さに基づいてつくった。実験サンプル中のRNA濃度を標準曲線から測定し、20倍希釈について修正した。

試薬及び物質：

【0090】

【表2】

製品	会社名	カタログ#	貯蔵
DEPC	シグマ	D5758	4℃
EDTA	シグマ	E5134	室温
トリズマ-塩基	シグマ	T8524	室温
トリズマ-HCl	シグマ	T7149	室温
収集管ストリップ	キアゲン	19562	室温
リボグリーンRNA定量キット	モレキュラー・プローブ	R11490	-20℃
RNeasy96キット	キアゲン	74183	室温
スクウェア-ウェルブロック	キアゲン	19573	室温

10

20

【0091】

実時間RT-PCR

タクマンEZ RT-PCRキット（パーキン-エルマー・アプライド・バイオシステムズ（登録商標）から）を使用して、実時間RT-PCRをABIプリズム7700配列検出系で行なった。既に記載された技術（Martelliら, 1999. J. Clin. Microbiol. 37: 327-332）と同様のタクマン技術（ロシェ・モレキュラー・ダイアグノスチクス・システムズ）を使用することにより、RT-PCRをHCV RNAの5' IRESの定量について最適化した。その系はアンプリタクDNAポリメラーゼの5'-3'核分解(nucleolytic)活性を利用する。簡単に言えば、その方法はPCRプライマー（プライマー-8125及び7028）間の鋳型に特異的にアニールする二重標識蛍光原ハイブリダイゼーションプローブ（PUTRプローブ）を利用する。プローブの5'末端は蛍光リポーター（6-カルボキシフルオレセイン〔FAM〕）を含み、3'末端は蛍光クエンチャー（6-カルボキシテトラメチルローダミン〔TAMRA〕）を含む。FAMリポーターの発光スペクトルは無傷のハイブリダイゼーションプローブのクエンチャーにより抑制された。ハイブリダイゼーションプローブのヌクレアーゼ分解がリポーターを放出し、蛍光放出の増大をもたらす。ABIプリズム7700配列検出器はPCR増幅中の蛍光放出の増大を連続的に測定し、その結果、増幅産物がシグナルに直接比例した。増幅プロットを産物蓄積の対数期に相当する時点で反応中早期に分析した。配列検出器に関するPCR産物の指数的成長と関連する蛍光シグナルの増大の特定検出閾値に相当する点をサイクル閾値( $C_T$ )と定義した。 $C_T$ 値はインプットHCV RNAの量に反比例する。その結果、同じPCR条件下では、HCV RNAの出発濃度が大きい程、 $C_T$ は低い。 $C_T$ を既知のHCV RNA濃度の夫々の標準希釈に対しプロットすることにより、標準曲線をABIプリズム7700検出系により自動的につくった。標準曲線用の基準サンプルを夫々のRT-PCRプレートに入れる。HCVレプリコンRNAをin vitro合成し（T7転写による）、精製し、 $OD_{260}$ により定量した。このRNA  $1 \mu\text{g} = 2.15 \times 10^{11}$  RNAコピーであることを考慮して、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 又は $10^2$ ゲノムRNAコピー/5  $\mu\text{L}$ を有するために希釈を行なう。また、全細胞Huh-7RNAを夫々の希釈（50ng/5  $\mu\text{L}$ ）によりとり込んだ。夫々の基準標準（HCVレプリコン + Huh-7RNA）5  $\mu\text{L}$ を試薬ミックス45  $\mu\text{L}$ と合わせ、実時間RT-PCR反応に使用した。

30

40

実時間RT-PCR反応を、夫々の全細胞RNAサンプル5  $\mu\text{L}$ を試薬ミックス45  $\mu\text{L}$ と合わせる

50

ことによりRNeasy96ウェルプレートで精製された実験サンプルについてセットアップした。

### 試薬及び物質

【0092】

【表3】

製品	会社名	カタログ#	貯蔵
タクマンEZ RT-PCRキット	PEアプライド・バイオシステムズ	N808-0236	-20℃
マイクロアンプ・オプチカル・キャップス	PEアプライド・バイオシステムズ	N801-0935	室温
マイクロアンプ・オプチカル96ウェル反応プレート	PEアプライド・バイオシステムズ	N801-0560	室温

10

【0093】

試薬ミックス調製：

【表4】

成分	1サンプルに関する容積(μL)	1プレートに関する容積(μL) (91サンプル+死容積)	最終濃度
RNaseを含まない水	16.5	1617	
5XタクマンEZ緩衝液	10	980	1X
Mn(OAc) <sub>2</sub> (25mM)	6	588	3mM
dATP (10mM)	1.5	147	300 μM
dCTP (10mM)	1.5	147	300 μM
dGTP (10mM)	1.5	147	300 μM
dUTP (10mM)	1.5	147	600 μM
フォワードプライマー (10 μM)	1	98	200nM
リバースプライマー (10 μM)	1	98	200nM
PUTRプローブ (5 μM)	2	196	200nM
rTth DNAポリメラーゼ (2.5 U/μL)	2	196	0.1 U/μL
アンピレースUNG (1U/μL)	0.5	49	0.01 U/μL
合計容積	45	4410	

20

30

40

【0094】

フォワードプライマー配列 (配列番号1) : 5'-ACG CAG AAA GCG TCT AGC CAT GGC GTT A GT-3'

リバースプライマー配列 (配列番号2) : 5'-TCC CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC AGG -3'

注：これらのプライマーはHCVの5'未翻訳領域内に存在する256-ntの領域を増幅する。

PUTRプローブ配列 (配列番号3) :

**6FAM** - TGG TCT GCG GAA CCG GTG AGT ACA CC - **TAMRA**

50

無鑄型対照 (NTC) : 夫々のプレートで、4 ウェルを “ NTC ” として使用する。これらの対照について、水 5  $\mu$  l を RNA に代えてウェルに添加する。

熱サイクル条件 :

50 2 分  
60 30 分  
95 5 分  
95 15 秒 ( 直下の工程とともに 2 サイクル )  
60 1 分  
90 15 秒 ( 直下の工程とともに 40 サイクル )  
60 1 分

10

#### 【 0 0 9 5 】

RT-PCR 反応の終止後に、データ分析は PCR プレートに関する閾値蛍光シグナルのセッティングを必要とし、Ct 値を夫々の基準反応に使用された RNA コピー数に対しプロットすることにより標準曲線をつくった。アッセイサンプルについて得られた Ct 値を使用して標準曲線に基づいて RNA コピー数を内挿する。

最後に、RNA コピー数を基準化し ( 細胞培養ウェルから抽出された全 RNA のリボグリーン RNA 定量に基づいて )、全 RNA 1  $\mu$  g 当りのゲノム均等物 [ ge /  $\mu$  g ] として表す。

細胞培養プレートの夫々のウェルからの RNA コピー数 [ g.e. /  $\mu$  g ] は種々の濃度のインヒビターの存在下の複製 HCV RNA の量の目安であった。抑制 % を下記の式により計算した

20

$$100 - [ (g.e. / \mu g \text{インヒビター}) / (g.e. / \mu g \text{対照}) \times 100 ]$$

ヒルモデルによる非線形曲線フィットを抑制-濃度データに適用し、50% 有効濃度 (EC<sub>50</sub>) を SAS ソフトウェア ( 統計ソフトウェアシステム ; SAS インスティテュート社 ( Cary, N.C. ) ) の使用により計算した。

本発明の化合物を先の酵素アッセイ及び細胞をベースとするアッセイで評価した場合、これらの化合物は高度に活性であることがわかった。更に詳しくは、これらの化合物は NS 3-NS4A プロテアーゼアッセイで 0.1  $\mu$  M 以下の IC<sub>50</sub>、及び細胞をベースとする HCV RNA 複製アッセイで 0.5  $\mu$  M 以下の EC<sub>50</sub> を有していた。

#### 【 0 0 9 6 】

##### 実施例 12

30

##### 特異性アッセイ

この化合物の選択性を評価するのに使用した特異性アッセイは WO 00/09543 に記載されている。

これらの化合物を特異性アッセイで評価した場合、式 1 の化合物はそれらがヒト白血球エラスターゼアッセイ及びカテプシン B アッセイで有意な抑制を示さない点で選択的であることがわかった。

##### 実施例 13

##### 薬物速度論的性質

本化合物はまた良好な薬物速度論的性質、例えば、5mg/kg の経口用量で 1 時間後及び 2 時間後にラットで有意な血漿レベルを示す。

40

更に明らかに、下記のアッセイ、in vivo 経口吸収スクリーンを使用して経口投与後にラット中の試験化合物の血漿レベルを測定した。

##### 物質及び方法

##### 1. 化合物をプールするのに使用した方法 ( “ カセット選択 ” )

“ カセット ” にプールすべき化合物の選択はそれらの構造類似性及び物理化学的性質に基づいていた。全ての選択された化合物に適用し得る固相抽出方法を確立した。夫々の化合物がラット血漿に加えられ、0.5  $\mu$  M の濃度で HPLC 又は HPLC/MS に流入される初期の試験に基づいて、保持時間、イオン質量、並びに HPLC 及び / 又は HPLC/MS による化合物間の可能な分離を 3-4 種の化合物を一つの “ カセット ” にプールするための基礎として使用した

50

## 【 0 0 9 7 】

## 2. 経口ビヒクル及び化合物調製

夫々の“カセット”は夫々の化合物について5又は4 mg/kgの3-4種の化合物を含む。カセットを0.5%のメチルセルロース水溶液及び0.3%のポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート(トウイーン-80)中の経口懸濁液として調製した。投薬容積は経口強制食により10ml/kgであった。

## 3. 投薬及び血漿サンプリング

雄のSDラットを個々のケージ中で10%デキストロース水溶液に接近させて一夜断食させた。2匹のラットに夫々の“カセット”を投薬した。血漿サンプル(約1ml)を投薬後1時間及び2時間で2匹のラットから集め、抽出及び分析のためにプールした。

10

## 4. 化合物抽出及び分析

夫々のカセットから、1時間及び2時間における血漿サンプル、ブランク血漿、夫々0.5 µMの全ての化合物を加えられたブランク血漿を、固相抽出方法により抽出する。サンプルを比較目的のためにHPLC及びHPLC/MSにより分析した。血漿濃度を0.5 µMの標準の単一濃度に基づいて推定する。

先のスクリーンでアッセイされた場合、本発明の実施例1~9の化合物は経口投与後の1時間及び2時間の間隔で血漿中に有意なレベルで存在することがわかり、平均血液血漿レベルは夫々1.23 µM及び1.16 µMであった。本発明の化合物に関する有意なin vivo経口吸収のこの実証は、このクラスのペプチドに一般に特有の一層低い経口吸収に鑑みて予期されない。直ぐの経口吸収はこれらの化合物をHCV感染症の治療に有益にする。

20

下記の表は本発明の代表的な化合物をリストする。更に本開示に一致して、全ての化合物はNS3-NS4Aプロテアーゼアッセイで0.1 µM以下のIC<sub>50</sub>、及び細胞をベースとするHCV RNA複製アッセイで0.5 µM以下のEC<sub>50</sub>を有していた。

30

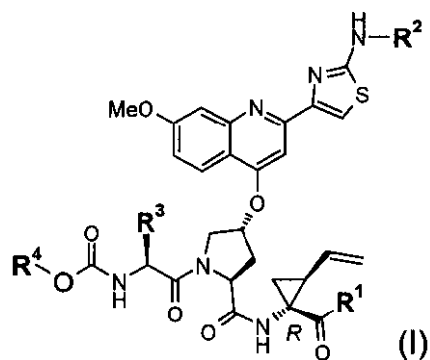
40

50

【 0 0 9 8 】

【表 5】

表 1



化合物 番号	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	m/z (MH) <sup>+</sup>
100	OH		tert-ブチル		789.3
101	OH		tert-ブチル		775.4
102	OH		tert-ブチル		803.4
103			tert-ブチル		928.5
104	OH		tert-ブチル		775.4
105	OH		tert-ブチル		803.4
106	OH				815.4
107	OH				801.4

【配列表】

10

20

30

40

## SEQUENCE LISTING

<110> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH  
 <120> HEPATITIS C INHIBITOR TRI-PEPTIDES  
  
 <130> 13/106  
 <150> 2,370,396  
 <151> 2002-08-01  
  
 <160> 3 10  
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
  
 <210> 1  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Forward primer  
  
 <400> 1  
 acgcagaaag cgtctagcca tggcgtagt 30  
  
 <210> 2 20  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Reverse Primer  
  
 <400> 2  
 tcccggggca ctcgcaagca ccctatcagg 30  
  
 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220> 30  
 <223> PUTR probe  
  
 <400> 3  
 tggctcgcgg aaccggtgag tacacc 26

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	38/55 (2006.01)	A 6 1 K	37/64
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
C 0 7 K	5/087 (2006.01)	C 0 7 K	5/087

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 リナス ブルネット モンツェ

カナダ ケベック エイチ7エス 2ジ-5 ラヴァル キュナール ストリート 2 1 0 0

(72)発明者 ゴリス ヴィダ ジェイ

カナダ ケベック エイチ7エス 2ジ-5 ラヴァル キュナール ストリート 2 1 0 0

審査官 内藤 伸一

(56)参考文献 国際公開第00/009543(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 5/083

C07K 5/087

A61K 38/00