

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-518359

(P2016-518359A)

(43) 公表日 平成28年6月23日 (2016. 6. 23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 H 19/10 (2006.01)	C 0 7 H 19/10 C S P	4 C 0 5 7
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7072 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7072	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-507702 (P2016-507702)
 (86) (22) 出願日 平成26年4月14日 (2014. 4. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年12月8日 (2015. 12. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/034018
 (87) 国際公開番号 W02014/169278
 (87) 国際公開日 平成26年10月16日 (2014. 10. 16)
 (31) 優先権主張番号 61/811, 464
 (32) 優先日 平成25年4月12日 (2013. 4. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

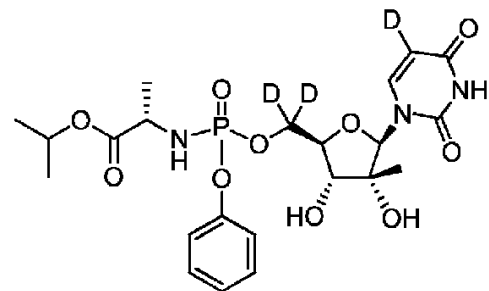
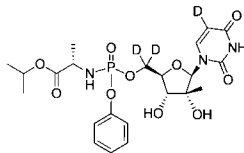
(71) 出願人 504378685
 アキリオン ファーマシューティカルズ、
 インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 0651-6624 コ
 ネティカット州、ニュー ヘイブン、ジョ
 ージ ストリート 300
 (74) 代理人 100117787
 弁理士 勝沼 宏仁
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100120617
 弁理士 浅野 真理
 (74) 代理人 100126099
 弁理士 反町 洋

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCVを治療するための高活性のヌクレオシド誘導体

(57) 【要約】

下式の重水素化されたヌクレオシドアナログ



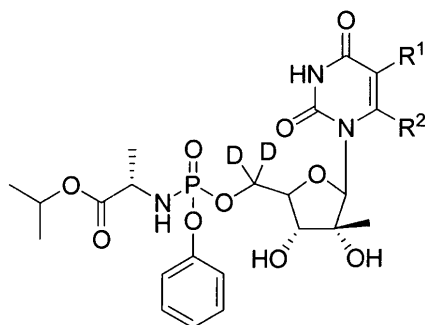
およびその薬学的に許容可能な塩が、本開示によって提供される。本開示は、この式の化合物または塩と担体とを含む医薬組成物も含む。この式の化合物および塩は、HCV感染を含め、ウイルス感染を治療するのに有用である。ヌクレオシドまたはヌクレオチドの5'位に、少なくとも50%の濃縮度を有する重水素を含む有効な治療量のヌクレオシドまたはヌクレオチドを投与することを含む、C型肝炎または他の障害に罹患した宿主を治療するための方法も提示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I が下記である、式 I の化合物またはその薬学的に許容可能な塩：

【化 1】



10

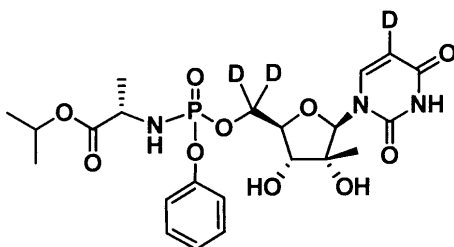
式 I

(式中、 R^1 および R^2 は、それぞれ水素または D であり；D として表されるそれぞれの位置は、少なくとも 50% の重水素濃縮を有する)。

【請求項 2】

下記式の請求項 1 に記載の化合物または塩：

【化 2】

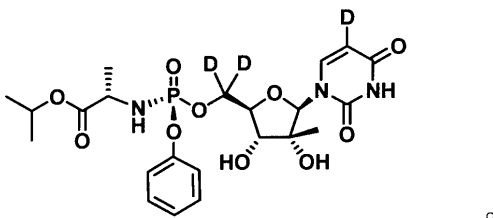


20

【請求項 3】

下記式の請求項 2 に記載の化合物または塩：

【化 3】

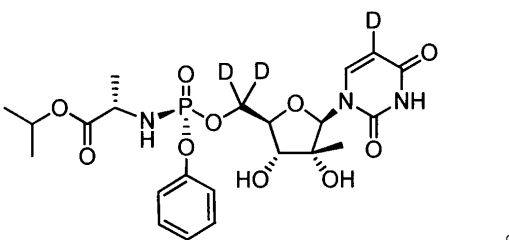


30

【請求項 4】

下記式の請求項 2 に記載の化合物または塩：

【化 4】



40

【請求項 5】

50

Dとして表されるそれぞれの位置が、少なくとも90%の重水素濃縮を有する、請求項2に記載の化合物または塩。

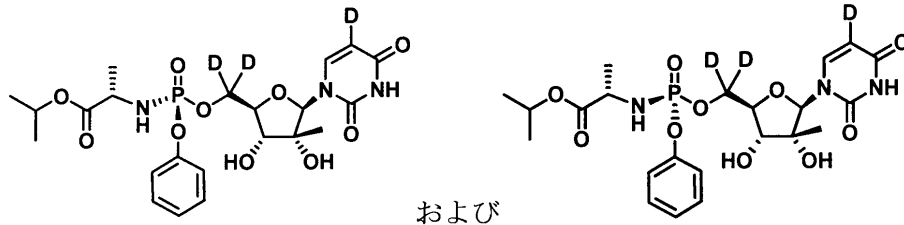
【請求項6】

Dとして表されるそれぞれの位置が、少なくとも95%の重水素濃縮を有する、請求項2に記載の化合物または塩。

【請求項7】

混合物が下記を含む、請求項2の化合物の立体異性体の50/50混合物：

【化5】



10

【請求項8】

請求項2に記載の化合物または塩である活性薬剤を含み、さらに、薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項9】

1つ以上のさらなる活性薬剤を含む、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項10】

1つ以上のさらなる活性薬剤が、HCV NS3プロテアーゼ阻害剤、HCV NS5A阻害剤、HCV NS5B阻害剤、または前記の組み合わせである、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

1つ以上のさらなる活性薬剤が、NS5A阻害剤、ならびに、ソバプレビルおよびACH-2684の少なくとも1つである、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項12】

治療に有効な量の請求項2に記載の化合物または塩を患者に投与することを含む、患者のHCV感染を治療する方法。

30

【請求項13】

治療に有効な量の請求項8に記載の医薬組成物を患者に投与することを含む、患者のHCV感染を治療する方法。

【請求項14】

治療に有効な量の第1の活性薬剤および治療に有効な量の1つ以上のさらなる活性薬剤を患者に投与することを含む、第1の活性薬剤が、請求項1に記載の化合物または塩であり、1つ以上のさらなる活性薬剤が、NS3阻害剤およびNS5A阻害剤から選択される、患者のHCV感染を治療する方法。

【請求項15】

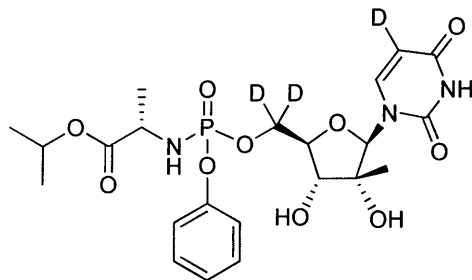
治療に有効な量の請求項2に記載の化合物または塩を患者に投与することを含む、患者のFlaviviridaeウイルス感染を治療する方法であって、Flaviviridaeウイルス感染は、デング熱、ウエストナイルウイルス感染、黄熱、または牛ウイルス性下痢ウイルス感染から選択される、方法。

40

【請求項16】

下記式の化合物の製造方法であって、

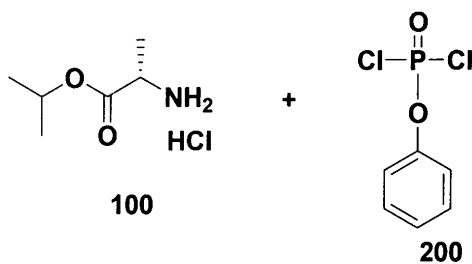
【化 6】



10

(i) L - アラニンイソプロピルエステルであるアミノエステル (1 0 0) と、ジクロロホスフェート (2 0 0)

【化 7】

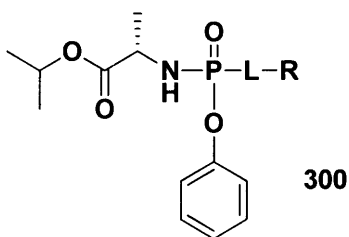


20

とを反応させて反応混合物を形成すること、

(i i) (i) の反応混合物に、R - L H (式中、L は、S または O であり、R は、置換されていてもよいアリール基、ヘテロアリール基またはヘテロシクロアルキル基である)、または R - L H (R - L H は、N - ヒドロキシイミドである) を加え、中間体 (3 0 0) :

【化 8】

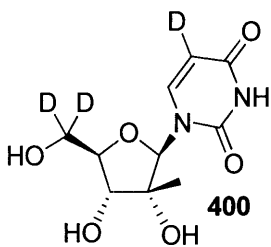


30

を形成すること、かつ

(i i i) 中間体 (3 0 0) とヌクレオシド (4 0 0)

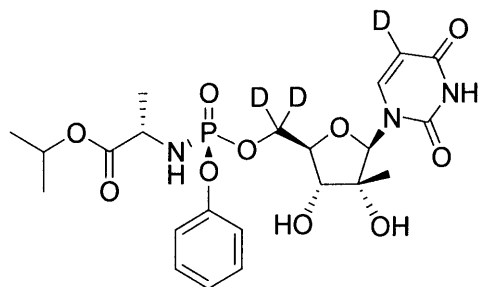
【化 9】



40

とを反応させ、

【化 1 0】



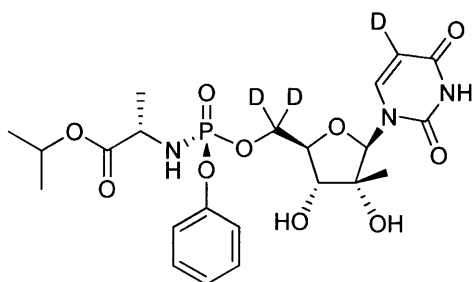
10

を形成することを含み、ここで、Dとして表されるそれぞれのD位置は、少なくとも50%の重水素濃縮を有する、方法。

【請求項 1 7】

下記式の化合物を製造するための請求項 1 6 に記載の方法であって、

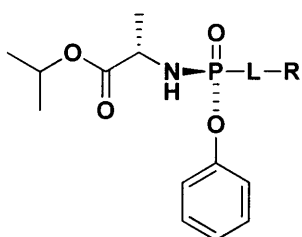
【化 1 1】



20

中間体 3 0 0 は、以下の構造

【化 1 2】



30

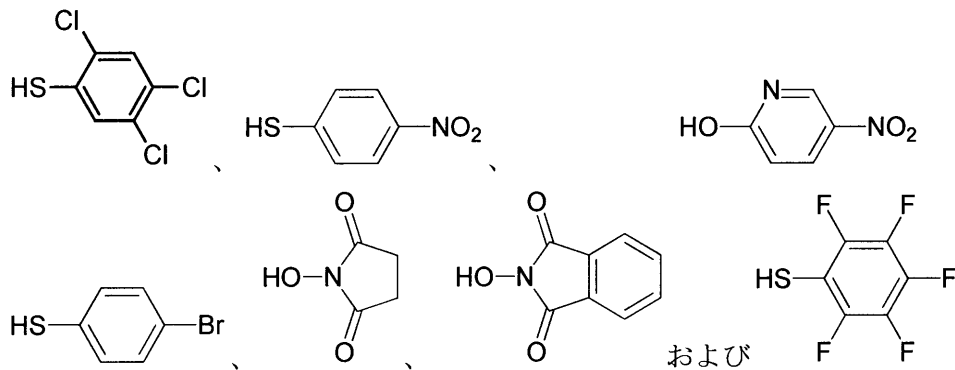
を有する、方法。

【請求項 1 8】

アミノエステル (1 0 0) と、ジクロロホスフェート (2 0 0) とを - 2 0 未満の温度で混合し、

R - L H は下記から選択される、

【化 1 3】



10

請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

アミノエステル (100) と、ジクロロホスフェート (200) とを -40 ~ 約 -60 の温度で混合する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

アミノエステル (100) とジクロロホスフェート (200) との混合物に塩基を加える、請求項 18 に記載の方法。

20

【請求項 21】

塩基がトリエチルアミンであり、混合物への塩基の添加が、ジクロロメタン、2-メチルテトラヒドロフラン、またはテトラヒドロフランから選択される有機溶媒中で行われる、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2013年4月12日に出願された米国仮出願第61/811,464号の利益を主張するものであり、この出願の全開示内容は引用することにより本願明細書の開示の一部とされる。

30

【発明の背景】

【0002】

概算で世界の人口の3%がC型肝炎ウイルスに感染している。世界保健機関は、世界中で1億5千万人が慢性的に感染していると概算している。HCVに曝露しているものの中で、80%~85%は、慢性的に感染するようになり、少なくとも30%に肝硬変が進行し、1~4%に肝細胞癌が進行する。C型肝炎ウイルス(HCV)は、米国における慢性肝疾患の最も多い原因の1つであり、報告によると、急性ウイルス性肝炎の約15%、慢性肝炎の60~70%、肝硬変、末期の肝疾患および肝癌の50%までを占めている。慢性HCV感染は、米国、オーストラリアおよび欧州の大部分における肝臓移植の最も一般的な原因である。C型肝炎は、米国において1年に10,000~12,000人が死亡すると概算される。HCV感染の急性段階は、通常は、穏やかな症状に関係があるが、いくつかの証拠は、感染した人々の約15~20%しか、自然にHCVを排泄しないことを示唆している。

40

【0003】

HCVは、エンベロープを有する一本鎖RNAウイルスである。HCVは、Flaviviridae科のHepacivirus属として分類される。HCVの少なくとも4種類の株GT-1~GT-4が特性決定されている。HCVの生活環は、宿主細胞への侵入；HCVゲノムの翻訳、ポリタンパク質の処理およびレプリカゼ複合体の集合；RNAの複製；ビリオンの集合および放出を含む。RNA複製プロセスにおいて、ゲノムRNA

50

Aの相補性のネガティブ鎖コピーが作られる。ネガティブ鎖コピーは、さらなるポジティブ鎖ゲノムRNAを合成するためのテンプレートとして使用され、ポジティブ鎖ゲノムRNAは、翻訳、複製、パッケージング、またはこれらの組み合わせに関与し、前駆体ウイルスを生成する可能性がある。

【0004】

C型肝炎には、薬物治療の標的とされてきたいくつかのタンパク質が存在する。NS5Aは、亜鉛結合性のプロリンが豊富な親水性ホスホタンパク質であり、固有の酵素活性を有さず、特定の非ヌクレオチド化合物を用いて阻害することができる。NS5Bは、テンプレートとしてウイルス性ポジティブRNA鎖を用いてHCVウイルス性RNAを複製するときに主要な役割を果たす鍵となる酵素であり、合成ヌクレオシド誘導体を用いて阻害されてきた。NS2-3プロテアーゼは、非構造的なタンパク質であるNS2とNS3のタンパク質分解性開裂を担う酵素である。NS3プロテアーゼは、下流にある非構造的なタンパク質の開裂を担う。RNAヘリカーゼは、ATP加水分解によってRNAをほどく。

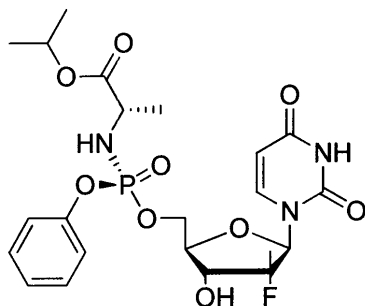
10

【0005】

ソホスブビル（ソバルディ、以下の構造を参照）は、ヌクレオシドホスホルアミデートNS5B阻害剤であり、HCV治療について2013年12月に承認されている。承認されたラベリングは、以下の用法を推奨している。（i）遺伝子型2および3に対して、リバビリンと組み合わせて、1日に1回、400mgの経口錠剤、（ii）遺伝子型1および4に対して、リバビリンおよびペグ化インターフェロンと共に、1日に1回、400mgの経口錠剤（三重の組み合わせ治療）。ソホスブビルによる治療は、遺伝子型1、2および4では12週間続き、遺伝子型3では24週間続く。肝臓移植を待つ肝細胞癌を有する慢性C型肝炎患者の治療に対し、ソホスブビルをリバビリンと共に48週まで、または移植後HCV感染を防ぐための肝臓移植まで使用することもできる。FDAは、試験参加者の50～90%において、12週間のウイルス持続陰性化（SVR）を示すいくつかの大きな臨床試験からのデータに基づき、ソバルディ優先審査および画期的な治療の指定が付与された。「SVR12」を達成する患者は、通常、治癒したとみなされる。

20

【化1】



ソホスブビル

30

【0006】

Alios BioPharma, Inc. は、2011年6月に、Vertex Pharmaceuticals Inc. に対し、C型肝炎治療のためのALS-2200のライセンスを付与した。ALS-2200は、キラルリン立体中心でのジアステレオマー混合物である。1種類のジアステレオマーVX-135は、Vertexによって開発され、現在、第II相の臨床試験中である。この企業は、VX-135の化学構造を開示していないが、ウリジンヌクレオチドアナログプロドラッグおよびNS5B阻害剤であると言われている。2013年に、FDAは、高用量のVX-135を摂取した3人の患者が肝毒性を示した後、VX-135を部分臨床差し止めとした。毒性を避けるためにヌクレオチド阻害剤の用量を下げると、効能を損なうか、または効能が下がることもある。Vertexは、2014年1月に、ダクラスタビル（Bristol-Myers S

40

50

quibb NS5A阻害剤)と組み合わせたVX-135が第2a相の治験を終了したことを発表した。intent-to-treat分析において、ダクラタビルと組み合わせて200mgのVX-135を摂取した、治療ナীবの遺伝子型1に感染した個人において、治療終了から4週間のウイルス持続陰性化(SVR4)は、83%であった(12人のうち10人)。1人の患者は、嘔吐/吐き気の重篤な有害事象を示した。残りの11人の患者は、12週間の治療を終了し、治療終了率(SVR4)は、91%であった。

【0007】

Idenix Pharmaceuticals Inc.は、ウリジンヌクレオチドプロドラッグNS5B阻害剤であるC型肝炎治療のためのIDX21437を開発中である。化学構造の詳細は、今日まで発表されていない。2014年4月には、Idenixは、1日に1回、300mgのIDX21437を7日間投与することによって、18人の遺伝子型1、2または3の治療ナীবの患者において、 $4.2 \sim 4.3 \log_{10}$ IU/mLのウイルス負荷の平均最大減少をもたらすことを発表した。

10

【0008】

C型肝炎治療の領域の進行にかかわらず、多くの困難な失敗が生じてきた。BMS-986094(C型肝炎のためのグアノシン系ホスホルアミデート)は、2012年8月に心不全に起因する患者の死後、臨床試験から除外された。その後、BMSは、2013年に、C型肝炎の研究分野から撤退することを発表した。BMSの断薬後、Idenix Pharmaceuticalsの同様のNS5B阻害剤IDX19368は、同じ活性代謝物BMS-986094を共有し、臨床中断され、最終的に中止された。この結果は、同じ適応症のためのヌクレオチドプロドラッグIDX184の開発の以前の臨床中断および中止と同じであった。

20

【0009】

C型肝炎に対する有効な治療は、単薬治療中のウイルス耐性の発生に起因して、組み合わせ治療を含むことが知られている。開発中の最適なC型肝炎薬剤の示されている課題と、複数の最適な薬剤が効果的な治療に必要であるという事実から、さらなるC型肝炎のための強い必要性が存在する。

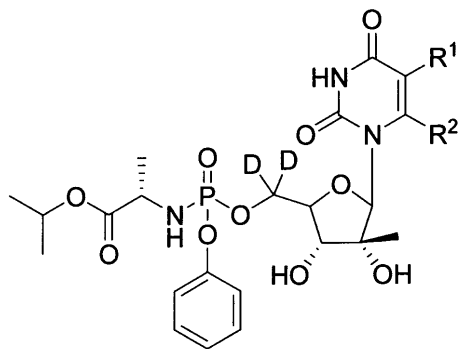
【発明の概要】

【0010】

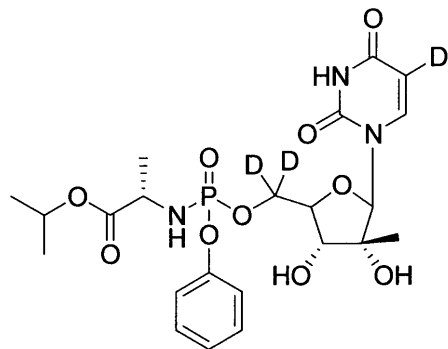
驚くべきことに、水素に対する重水素の濃縮が少なくとも90%であり、 R^1 および R^2 が、独立して、重水素または水素である、式Iの2'-メチル-5'-重水素化されたウリジンホスホルアミデート(式II、式IIA、式IIB、式IIIAまたは式IIBを含む)、またはその薬学的に許容可能な塩が、C型肝炎の治療のための優れたNS5B阻害剤であることが発見された。一実施態様において、 R^1 は重水素であり、 R^2 は水素である。

30

【化 2】

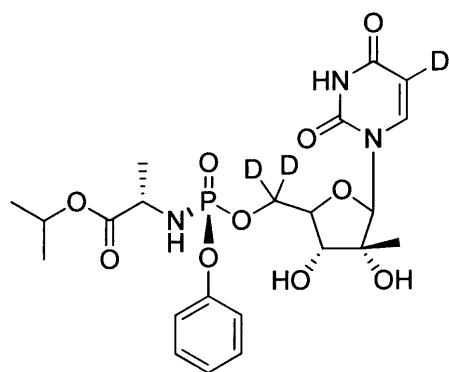


式 I

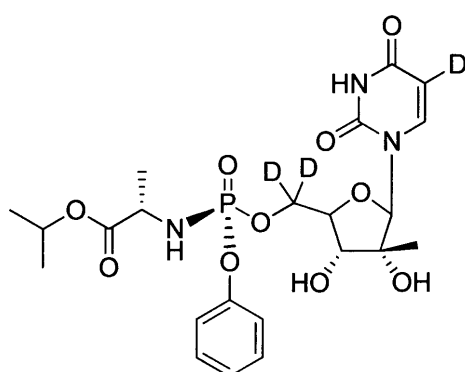


式 II

10

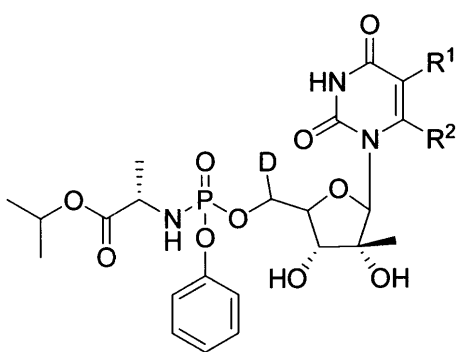


式 IIIA

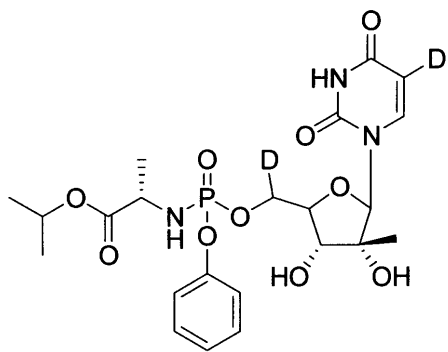


式 IIIB

20



式 IIIA



式 IIIB

30

【0011】

40

従って、一実施態様において、有効な量の式 I または式 II の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を、場合により薬学的に許容可能な担体で投与することを含む、C 型肝炎または本明細書に記載する別の障害に感染した宿主を治療するための方法が提供される。

【0012】

別の実施態様において、式 I、II、IIIA または IIIB のヌクレオシド誘導体は、リンの R 立体異性体または S 立体異性体として投与され、少なくとも 90% が純粋な形態であり、典型的には、95、98 または 99% が純粋な形態である。

【0013】

一実施態様は、リンの R 立体異性体または S 立体異性体の混合物、例えば、50 / 50

50

混合物として投与される、式 I、II、IIIA または IIIB のヌクレオシド誘導体も含む。例えば、式 IIIA および IIIB の混合物（例えば、50 / 50 混合物）を投与してもよい。

【0014】

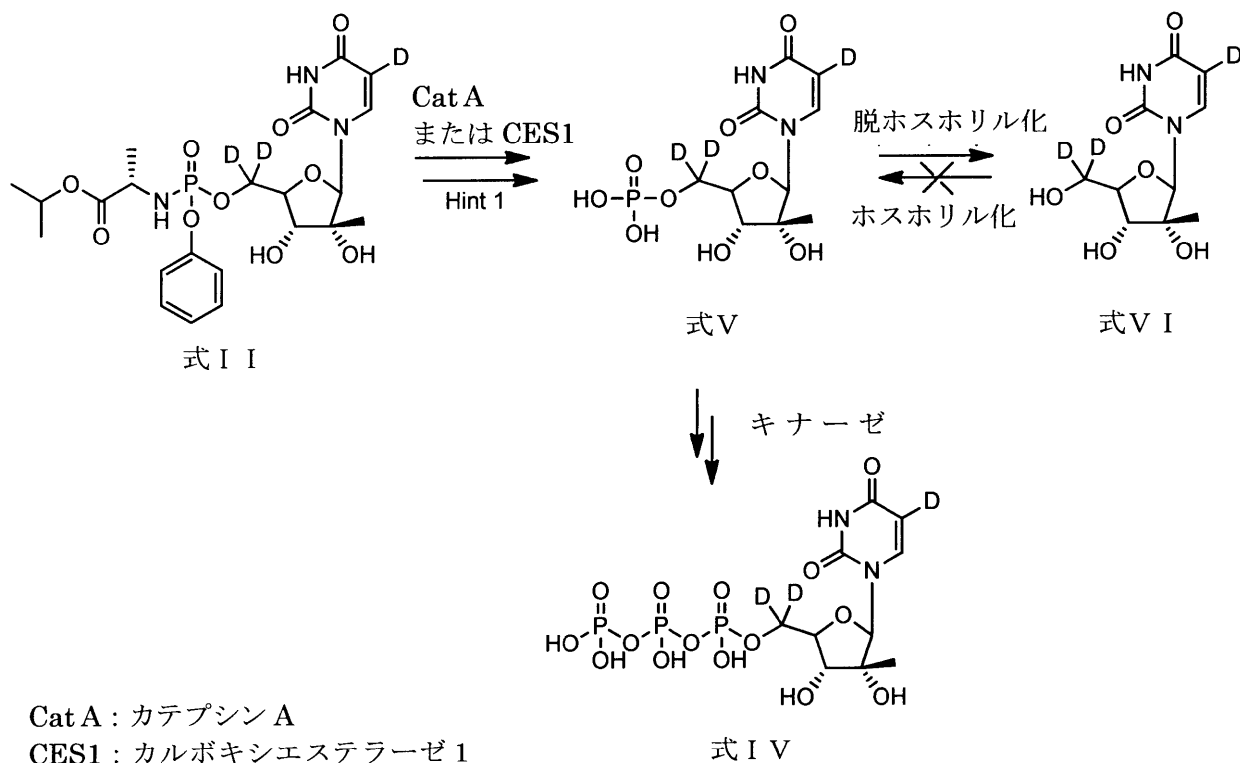
別の実施態様において、有効な量の式 IIIA または IIIB の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩は、場合により、薬学的に許容可能な担体で、C 型肝炎治療が必要な宿主に提供される。

【0015】

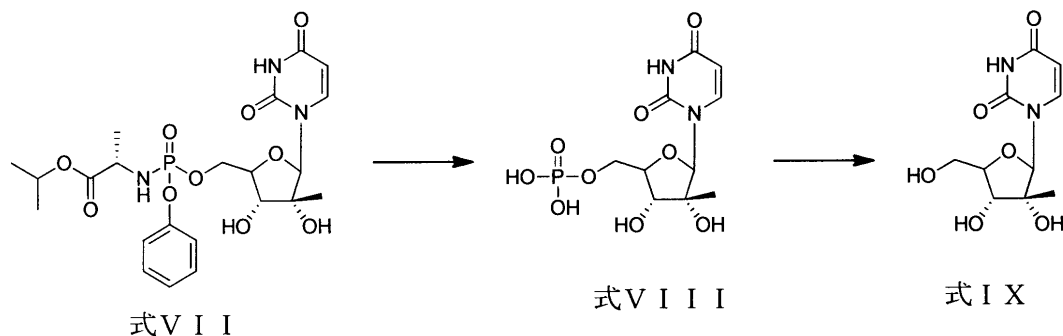
宿主に投与すると、例えば、式 II のホスホルアミデートは、一連の酵素工程によって、5' - OH, 5' - D, D - モノホスフェート（式 V）に代謝される。

10

【化 3】



【化 4】



10

【0018】

驚くべきことに、ヌクレオシドの5'位の重水素が、ヌクレオシド誘導体を望ましくない5'-OH、5'-重水素化された-ヌクレオシドへの脱ホスホリル化から安定化されることを発見した。このことは、重水素原子は、脱ホスホリル化中に開裂せず、脱ホスホリル化中に開裂した原子に結合しないため、驚くべきことである。本開示は、ありそうになく予想外に重要な第2の重水素同位体効果によって、代謝および効能に対する顕著な効果を生じさせるための5'-重水素の使用を含む。5'位の脱モノホスフェート化に対するこのような重要な第2の重水素同位体効果は、以前に報告されていない。脱ホスホリル化に対するヌクレオシドの5'-モノホスフェートの安定性を高めることによって、ヌクレオシドの活性な5'-トリホスフェート保持量の増加を達成することができ、臨床において、所与の経口投薬量で効能を増加させることができるか、または低用量のヌクレオシドを用いて等しい効能を得ることができる。この薬物の半減期、従って、薬物動態に対する顕著な効果も有しているだろう。

20

【0019】

従って、別の実施態様において、本開示は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドで治療可能な障害に罹患した宿主を治療するための方法を含み、改良点は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの5'位の水素の片方または両方を重水素で置換することを含み、プロチウムと比べ、濃縮が少なくとも90%である（すなわち、¹H水素が10%未満）（および他の実施態様において、50、95、98または99%の濃縮）。活性代謝物が、ヌクレオシドの5'重水素化によるヌクレオシドのモノホスフェート、ジホスフェートまたはトリホスフェートである場合、5'重水素化によって、ヌクレオシドモノホスフェートの保持量が増えるため、任意のヌクレオチドまたはヌクレオシドの治療効果を向上させることができる。ヌクレオシドモノホスフェートは、対応するヌクレオシドジホスフェートキナーゼ、次いでヌクレオシドトリホスフェートキナーゼを用い、そのジホスフェート体および/またはトリホスフェート体に代謝される。この方法は、特に、簡単にモノホスホリル化されず、従って、脱ホスホリル化されたときにかなりの活性を失い、ヌクレオシドモノホスフェートキナーゼの作用によって簡単に回収することができないヌクレオシドに有用である。

30

40

【0020】

一実施態様において、障害は、ウイルス性疾患である。別の実施態様において、障害は、B型肝炎またはC型肝炎である。さらに別の実施態様において、障害は、HIVである。別の実施態様において、障害は、異常な細胞増殖である。さらに別の実施態様において、障害は、腫瘍または癌である。この改良された方法で使用されるヌクレオシド誘導体は、例えば、ホスホルアミデート、または5'-モノホスフェートに代謝される他の安定化されたヌクレオチドプロドラッグであってもよく、または5'-モノホスフェート自体であってもよい。一実施態様において、ヌクレオシド誘導体は、2'-メチル、2'-ヒドロキシヌクレオシドを含む。さらに別の実施態様において、ヌクレオシド誘導体は、2'-メチル、2'-フルオロヌクレオシドを含む。任意の実施態様では、

50

メチル基は、1つ以上のハロゲン、例えば、フッ素であってもよい。

【0021】

ヌクレオシドトリホスフェート（NTP）は、肝細胞におけるウイルス複製を阻害する活性種であり、そのレベルと固有の有効性によって、治療の有効性が引き起こされる。

【0022】

5'重水素化の使用によって生じる臨界的なヌクレオシドトリホスフェートレベルの増加を示すことを、以下の実施例13で提供する。この実施例では、式IIの化合物および対応する重水素化されていない化合物（式VII）を、新鮮な肝細胞中で24時間インキュベートした。このデータは、重水素化されていないホスホルアミデートと共にインキュベートしたサンプル中に、5'-重水素化されたホスホルアミデートを用いた場合よりも多くの脱ホスホリル化されたヌクレオチド（すなわち、望ましくない5'-OHヌクレオチド）が存在することを示す。具体的には、20 μ Mの式IIまたはその重水素化されていない対応物である式VIIを用いると（0.67百万の細胞/ウェルで24時間接種した肝細胞を含む12ウェルプレート（1ml））、5'-重水素化された形態（式VI）から得られるものと比較して、1.9倍（培地、すなわち、細胞外濃度）および2.9倍（細胞抽出物、すなわち、細胞内）高い濃度の重水素化されていない脱ホスホリル化された2'-メチルウリジン（式IX）が得られる。20 μ Mの式IIまたはその重水素化されていない対応物（式VII）のインキュベーションの結果（1.7百万の細胞/ウェルで24時間接種した肝細胞を含む6ウェルプレート（2ml））は、5'-重水素化された形態（式VI）から得られるものと比較して、1.5倍（細胞抽出物、すなわち、細胞内濃度）および2.8倍（細胞抽出物、すなわち、細胞内）高い濃度の重水素化されていない脱ホスホリル化された2'-メチルウリジン（式IX）が得られる。従って、平均で、肝細胞の脱ホスホリル化によって、5'-位置が重水素化されていない場合、ほぼ2倍の5'-OH-ヌクレオチドが生成する。5'-重水素化されたホスホルアミデートが使用される場合、トリホスフェートに対する活性化に利用可能な5'-モノホスフェート保持量のこの違い（例えば、重水素化されていない態様について式VIIII）は、薬物の効能、投薬量、毒性および/または薬物動態に顕著な効果を有するだろう。

【0023】

実施例14および図3にさらに記載されるような臨床試験候補物質との比較として、Alios（EASL 2013）によって提示される広告（poster）は、50 μ MのVX-135と共に24時間インキュベートした後のヒト肝細胞で測定されたVX-135トリホスフェートのレベルは、1174 pmol/細胞100万個であることを示す。対照的に、5 μ M（すなわち、低い方の濃度の10倍）の式IIと共にヒト肝細胞を25時間インキュベートした後の式IVのレベルは、486 pmol/細胞100万個である。従って、式IIのインキュベートによって作られるトリホスフェートの量は、VX-135によって作られるトリホスフェートの量よりも4倍大きい（用量が正規化された）。VX-135の正確な構造は現時点で知られていないが、ウリジンヌクレオチドアナログプロドラッグNS5B阻害剤である。

【0024】

それに加え、初代肝細胞において、50 nMの式IIを24時間インキュベートした後、式IVのレベルは、9.2~16.2 pmol/細胞100万個の範囲であった。これらの濃度は、Huh-1uc/neo細胞を50 nMでインキュベートしたときに得られた値より5~8倍大きい。式IVが、Huh-1uc/neo細胞中のHCVレプリコンの複製を阻害する活性種であるため、HCVレプリコンが初代肝細胞で成長する場合、初代ヒト肝細胞中の式IIの予想されたEC₅₀は、6.25~10 nMであると思われ、式IIと式IVの間に図4で得られる線形の関係がもっと低い濃度で続くことを推定している。

【0025】

実施例14および図5に詳細に示されるように、式IVの半減期は、4種類の種からの肝細胞のソバルディトリホスフェートの半減期より大きい。最も長い半減期は、ヒト肝細胞

10

20

30

40

50

胞であり、その後、イヌ、次いで、サル、次いで、ラットであった。半減期は、式ⅠⅤについて10～30時間の範囲であり、ソバルディトリホスフェートについて8～23時間の範囲であった。

【0026】

さらに、実施例17および図6および7に記載されるように、48時間、ヒト肝細胞で測定される場合、対応するソバルディトリホスフェート(GS-7977)への細胞内での変換は、式ⅠⅠ(すなわち、式ⅠⅤ)から誘導されるトリホスフェートの変換よりも2倍大きい。式ⅠⅤの濃度は、48時間目でもまだ増加しており、一方、ソバルディトリホスフェート代謝物は、24時間から48時間まで減少する。式ⅠⅤの濃度が増加すると、その半減期が24時間を超えることと合わせて、繰り返し投薬で肝細胞中の式ⅠⅤ(式ⅠⅠのトリホスフェート)レベルの蓄積を示唆する。この傾向は、*in vivo*での初期投薬から馴化まで量を上げていった後、ソバルディトリホスフェートよりも式ⅠⅠから誘導されるトリホスフェートについて、*in vivo*で式ⅠⅤの高い濃度での一定状態を生じさせることができる。それに加え、式ⅠⅤ(式ⅠⅠのトリホスフェート)の固有の有効性(NS5BのRdRp活性に対する阻害効果)は、ソバルディトリホスフェートの固有な有効性より1.5倍高い。

10

【0027】

本開示は、治療に有効な量の1つ以上の本明細書に記載される活性化合物を、場合により、患者に相加的または相乗的な効果を有する1つ以上の他の抗-HCV活性薬剤または他の医学的治療との組み合わせまたは交互投与で与えることを含む、患者のHCV感染または関連する障害を治療する方法も含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、ヒト肝細胞培地、および20 μMの式ⅤⅠⅠまたは式ⅠⅠと共にインキュベートした後の細胞抽出物における式ⅠⅩ(重水素化されていない5'-OH-2'-メチルウリジン)および式ⅤⅠ(5'-重水素化された-5'-OH-2'-メチルウリジン)の濃度を示す表である。具体的には、実施例13に記載されるように、20 μMの式ⅠⅠまたはその重水素化されていない式ⅤⅠⅠの対応物(24時間、0.67百万細胞/ウェルで接種した肝細胞を含む12ウェルプレート(1 ml))によって、5'-重水素化された形態(式ⅤⅠ)から得られるものと比較して、1.9倍(培地、すなわち、細胞外濃度)および2.9倍(細胞抽出物、すなわち、細胞内)高い濃度の重水素化されていない脱ホスホリル化2'-メチルウリジン(式ⅠⅩ)が得られる。

30

【図2】図2は、ヒト肝細胞培地、および20 μMの式ⅤⅠⅠまたは式ⅠⅠと共にインキュベートした後の細胞抽出物における式ⅠⅩ(重水素化されていない5'-OH-2'-メチルウリジン)および式ⅤⅠ(5'-重水素化された-5'-OH-2'-メチルウリジン)の濃度を示す表である。実施例13に記載されるように、20 μMの式ⅠⅠまたはその重水素化されていない式ⅤⅠⅠの対応物(24時間、1.7百万細胞/ウェルで接種した肝細胞を含む6ウェルプレート(2 ml))によって、5'-重水素化された形態(式ⅤⅠ)から得られるものと比較して、1.5倍(細胞抽出物、すなわち、細胞内濃度)および2.8倍(細胞抽出物、すなわち、細胞内)高い濃度の重水素化されていない脱ホスホリル化2'-メチルウリジン(式ⅠⅩ)が得られる。

40

【図3】図3は、5 μMの式ⅠⅠと共にインキュベートしてから2、4、8、25または48時間目に、ヒト肝細胞で作られる式ⅠⅤ(式ⅠⅠの活性な重水素化されたトリホスフェート代謝物)の濃度(pmol 式ⅠⅤ/細胞100万個)を示す表である。それぞれの時間点について決定された平均および標準偏差と共に、3つの実験の結果が示される。式ⅠⅤのピークレベルは、ヒト肝細胞で48時間を超えて得られた。VX-135から作られたVX-135-TP(活性なトリホスフェート代謝物)の濃度は、24時間目に示される。実施例14に記載されるように、式ⅠⅠから作られるトリホスフェート(式ⅠⅤ)のレベルは、VX-135から作られるトリホスフェート(VX-135-TP)のレベルより4倍大きく、このことは、VX-135は、式ⅠⅠよりも効力が低いことを示唆

50

している。

【図4】図4は、ヒト肝細胞における式I Vの濃度 (ng/ml) 対 式I Iの濃度 (μM) のグラフである。ヒト肝細胞における式I Vの濃度は、0.15、0.45および1.35 μMの式I Iと共にインキュベートしてから24時間後に決定された。

【図5】図5は、ヒト、イヌ、サルおよびラット肝細胞における活性なトリホスフェート (式I VまたはGS-7977-TP) の半減期を示す表である。式I IまたはGS-7977 (ソバルディ) を、選択した濃度で肝細胞 (ヒト、イヌ、サルおよびラット) に加え、37 でインキュベートした。式I VまたはGS-7977-TP (活性なトリホスフェート代謝物) の上澄み細胞抽出物を、タンデム質量分光検出を備える高速液体クロマトグラフィー (LC-MS/MS) によって測定した。実施例15に記載されるように、トリホスフェートの半減期の値は、8~30時間の範囲であり、式I Vは、一般的に、試験したすべての種でGS-7977-TPより長い半減期を有していた。(a-カッコ内の値=95%信頼区間)。

【図6】図6は、5 μMの式I Iと共に48時間インキュベートしている間のヒト肝細胞に作られた式I Vの濃度 (式I Iの活性な重水素化されたトリホスフェート代謝物) のグラフである (pmol 式I V/細胞100万個)。濃度を所定の時間に測定し、AUCは、Graphpad Prism 5ソフトウェアを用いて計算された。実施例16に記載されるように、式I Vのピークレベルは、ヒト肝細胞において、24時間目に得られた。

【図7】図7は、5 μMのGS-7977 (ソバルディ) と共に48時間インキュベートしている間のヒト肝細胞に作られたGS-7977-TP (ソバルディの活性なトリホスフェート代謝物) の濃度のグラフである (pmol GS-7977-TP/細胞100万個)。濃度を所定の時間に測定し、AUCは、Graphpad Prism 5ソフトウェアを用いて計算された。実施例16に記載されるように、GS-7977 (ソバルディの活性なトリホスフェート代謝物) のピークレベルは、ヒト肝細胞において、48時間を超えて得られた。

【発明の具体的説明】

【0029】

(化学的記載および用語)

化合物は、標準的な命名法を用いて記載される。特に定義されない限り、本明細書で用いられるすべての科学用語および技術用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0030】

用語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、量の限定を意味するものではなく、少なくとも1つの参照物の存在を示す。用語「または」は、「および/または」を意味する。オープンエンドの遷移句である「~を含む (comprising)」は、その中間的な遷移句「~から本質的になる (consisting essentially of)」およびクローズドエンドの句である「~からなる (consisting of)」を包含する。値の範囲の引用は、本明細書で特に示されない限り、単に、その範囲内に含まれるそれぞれの別個の値を個々に言及する短い方法として用いることを意図しており、それぞれの別個の値は、まるで本明細書に個々に引用されているように、引用することにより本明細書の開示の範囲とされる。すべての範囲の終点は、その範囲内に含まれ、独立して組み合わせ可能である。特に本明細書に別段の記載がない限り、または、本文と明確に矛盾しない限り、本明細書に記載されるすべての方法は、適切な順序で行うことができる。任意の例およびすべての例、または例示的な語句 (例えば、「例えば」) の使用は、単に説明を意図しており、特に請求されていない限り、本発明の範囲に限定を与えない。明細書中のいかなる語句も、請求されていない要素が本発明の実施に不可欠な要素であることを示唆するものとして解釈されるべきではない。

【0031】

式Iの化合物は、式Iの範囲内である本明細書に開示される他の式を含む。これらとし

ては、例えば、式 I I、I I A、I I B および化合物 2 2 の化合物が挙げられる。

【0032】

式 I の化合物としては、任意の位置に同位体置換を有する、上記式の化合物が挙げられる。同位体としては、同じ原子数を有するが、異なる質量数を有する原子が挙げられる。一般的な例として、限定されないが、水素の同位体としては、トリチウムおよび重水素が挙げられ、炭素の同位体としては、 ^{13}C 、 ^{14}C および ^{12}C が挙げられる。式 I の化合物は、同定された位置での重水素の濃縮も必要とする（水素原子を重水素と置換）。

【0033】

「活性薬剤」は、患者に単独で、または別の化合物、元素または混合物と組み合わせて投与される場合、直接的または間接的に、患者に対する生理学的効果を与える化合物（本明細書に開示される化合物を含む）、元素または混合物である。間接的な生理学的効果は、代謝物または他の間接的な機構によって行われてもよい。

10

【0034】

用語「置換された」は、本明細書で使用される場合、示されている原子の通常の価数を超えない限り、示されている原子または基の任意の 1 つ以上の水素を、所定の群からの選択枝と置き換えることを意味する。

【0035】

「重水素化」および「重水素化された」は、特定の位置での水素が重水素と置き換わっていることを意味する。ある位置が重水素化された式 I の化合物のサンプルにおいて、式 I の化合物のある別個の分子は、所定の位置に重水素ではなく水素を有するようである。しかし、サンプル中、所定の位置に重水素を有する式 I の化合物の分子の割合は、天然に存在するよりもかなり多いだろう。重水素化された位置で、重水素が濃縮される。「濃縮された(enriched)」という用語は、本明細書で使用される場合、その位置での重水素種と他の水素種との割合を指す。一例として、式 I の化合物のある位置が、50%の重水素濃縮(deuterium enrichment)を含むと言われる場合、所定の位置で水素以外の重水素含有量が50%であることを意味する。明確さのために、「濃縮された(enriched)」という用語は、本明細書で使用される場合、割合が、天然存在量よりも濃縮されていることを意味しないことを確認する。一実施態様において、式 I の重水素化された化合物は、任意の重水素化された位置で少なくとも10%の重水素濃縮を有するだろう。他の実施態様において、特定の重水素化された1つ以上の位置で、少なくとも50%、少なくとも90%、または少なくとも95%の重水素濃縮を有するだろう。「重水素化された置換基」は、特定の割合の濃縮で少なくとも1つの水素が重水素と置き換わった置換基である。「重水素化されていてもよい(optionally deuterated)」は、その位置が、水素であってもよく、その位置の重水素の量が、天然に存在する重水素のレベルしかないか、または、その位置が、天然に存在する重水素のレベルよりも多くなるように重水素が濃縮されていることを意味する。

20

30

【0036】

「投薬形態」は、活性薬剤の投与単位を意味する。投薬形態の非限定的な例としては、錠剤、カプセル、注射、懸濁物、液体、静脈用液、エマルション、クリーム、軟膏、坐剤、吸入可能な形態、経皮形態などが挙げられる。

40

【0037】

「アリール」は、1つ以上の芳香族環に炭素のみを含む芳香族基を示す。アリール基としては、例えば、フェニルおよびナフチル（1-ナフチルおよび2-ナフチルを含む）が挙げられる。

【0038】

「ヘテロアリール」は、所定の数の環原子を有し、1~3個、またはある実施態様では、1~2個のN、OおよびSから選択されるヘテロ原子を含み、残りの環原子が、炭素である安定な単環芳香族環、または1~3個、またはある実施態様では、1~2個のN、OおよびSから選択されるヘテロ原子を含み、残りの環原子が、炭素である少なくとも1つの5員環~7員環の芳香族環を含む安定な二環系または三環系を示す。単環ヘテロアリー

50

ル基は、典型的には、5～7個の環原子である。ある実施態様では、二環ヘテロアリール基は、9員環～10員環のヘテロアリール基である。ヘテロアリール基のS原子およびO原子の合計数は、2以下であることが好ましい。ヘテロアリール基の例としては、チエニル、ピリジル、ピリミジニルおよびピローリルが挙げられる。

【0039】

「ヘテロシクロアルキル」は、1、2、3または4個のN、OおよびSから独立して選択されるヘテロ原子を有し、残りの環原子が炭素である飽和環基である。単環ヘテロシクロアルキル基は、典型的には、4～6個の環原子を有する。ヘテロシクロアルキル基の例としては、モルホリニル、ピペラジニル、ピペリジニルおよびピロリニルが挙げられる。

【0040】

「医薬組成物」は、少なくとも1つの活性薬剤、例えば、本明細書に開示される活性化化合物の化合物または塩と、少なくとも1つの他の物質、例えば、担体とを含む組成物である。医薬組成物は、1つ以上のさらなる活性薬剤を含んでもよい。「医薬の組み合わせ」または「組み合わせ治療」は、場合により、活性薬剤を、障害、例えば、C型肝炎、またはC型肝炎に関連する障害、または本明細書に記載される別のウイルス感染を治療するために一緒に用いられる指示と共に、1つの投薬形態で合わせてもよく、または別個の投薬形態で一緒に与えられてもよい、少なくとも2つの活性薬剤の投与を指す。

【0041】

「薬学的に許容可能な塩」は、元々の化合物が、その無機および有機の非毒性の酸付加塩または塩基付加塩を製造することによって改質される、開示された化合物の誘導体を含む。従来の化学方法によって、塩基性部分または酸性部分を含む元々の化合物から、元々の化合物の塩を合成することができる。一般的に、これらの化合物の遊離酸形態と、化学量論量の適切な塩基（例えば、Na、Ca、MgまたはKの水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩など）とを反応させることによって、またはこれらの化合物の遊離塩基形態と、化学量論量の適切な酸とを反応させることによって、このような塩を製造することができる。このような反応は、典型的には、水中または有機溶媒中、または2種類の混合物中で行われる。薬学的に許容可能な塩は、純粋な結晶または単一の多型形態であってもよく、または非結晶性またはアモルファス製、ガラス状、または硝子質形態、またはこれらの混合物で使用してもよい。代替的な実施態様において、活性化化合物は、溶媒和物の形態で与えられてもよい。

【0042】

薬学的に許容可能な塩の例としては、限定されないが、塩基残基（例えば、アミン）の鉱物酸または有機酸の塩；酸性残基（例えば、カルボン酸）のアルカリ塩または有機塩などが挙げられる。薬学的に許容可能な塩としては、生成した元々の化合物の従来の非毒性の塩および四級アンモニウム塩、例えば、非毒性の無機酸または有機酸からの塩が挙げられる。例えば、従来の非毒性の酸塩としては、無機酸から誘導されるもの、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、スルファミン酸塩、リン酸塩、硝酸塩など；および有機酸から製造された塩、例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、グリコール酸塩、ステアリン酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、パモ酸塩、マレイン酸塩、ヒドロキシマレイン酸塩、フェニル酢酸塩、グルタミン酸塩、安息香酸塩、サリチル酸塩、メシル酸塩、エシル酸塩、ベシル酸塩、スルファニル酸塩、2-アセトキシ安息香酸塩、フマル酸塩、トルエンスルホン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンジスルホン酸塩、シュウ酸塩、イセチオン酸塩、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ （ n が0～4である）などが挙げられる。さらなる適切な塩のリストは、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., p. 1418 (1985) 中に見つかるだろう。

【0043】

医薬組成物/組み合わせに適用される用語「担体」は、活性化化合物が提供される希釈剤、賦形剤または補形薬（ビークル(vehicle)）を意味する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

「薬学的に許容可能な賦形剤」は、一般的に安全であり、十分に非毒性であり、生理学的に、または他の様式で望ましくないわけではない医薬組成物／組み合わせを製造するときに有用な賦形剤を意味する。「薬学的に許容可能な賦形剤」は、本出願で使用される場合、このような１種類の賦形剤および１種類より多い賦形剤の両方を含む。

【 0 0 4 5 】

本発明の医薬組成物／組み合わせの「治療に有効な量」は、患者に投与される場合、医療の利益（例えば、症状の改善）を与えるのに有効な量、例えば、Ｃ型肝炎感染の症状を減らすのに有効な量を意味する。例えば、Ｃ型肝炎ウイルスに感染した患者は、ＡＳＴおよびＡＬＴを含め、特定の高レベルの肝臓酵素が存在する場合がある。特定の実施態様において、従って、治療に有効な量は、増加したＡＳＴおよびＡＬＴのレベルの顕著な低下を与えるのに十分な量、またはＡＳＴおよびＡＬＴのレベルを正常な範囲内に戻すのに十分な量である。または、治療に有効な量は、患者の血液、血清または組織のウイルスまたはウイルス抗体の検出可能なレベルを顕著に増やすか、または顕著に減らすことを防ぐのに十分な量でもある。治療の効能を決定する１つの方法は、ウイルスＲＮＡレベルを決定するための従来の方法（例えば、Ｒｏｃｈｅ ＴａｑＭａｎアッセイ）によってＨＣＶ ＲＮＡレベルを測定することを含む。特定の好ましい実施態様では、治療は、ＨＣＶ ＲＮＡレベルを、定量限界未満まで下げる（Ｒｏｃｈｅ ＴａｑＭａｎ（Ｒ）アッセイで測定される場合、３０ ＩＵ／ｍＬ）か、またはより好ましくは、検出限界まで下げる（１０ ＩＵ／ｍＬ、Ｒｏｃｈｅ ＴａｑＭａｎ）。 10

【 0 0 4 6 】

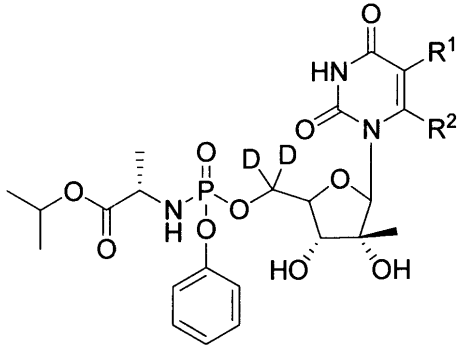
「患者」または「宿主」は、医学的処置が必要なヒトまたは非ヒト動物である。医学的処置としては、既存の状態、例えば、疾患または障害の処置、予防的または抑止的な処置、または診断的処置が挙げられるだろう。特に述べられていない限り、患者または宿主は、ヒト患者である。 20

【 0 0 4 7 】

（高活性のヌクレオシド誘導体）

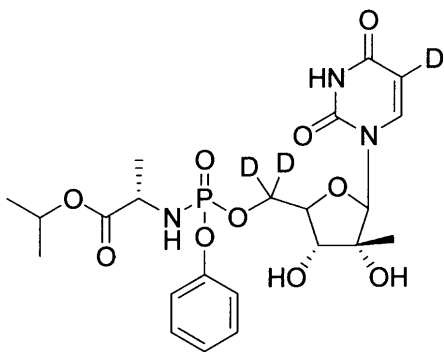
驚くべきことに、水素に対する重水素の濃縮が少なくとも９０％であり（すなわち、 H^1 水素が１０％未満）、 R^1 および R^2 が、独立して、重水素または水素である、式Ⅰの 2'-メチル 5'-重水素化されたウリジンホスホルアミデート（式ⅠⅠ、式ⅠⅠＡ、式ⅠⅠＢ、式ⅠⅠⅠＡまたは式ⅠⅠⅠＢを含む）、またはその薬学的に許容可能な塩が、Ｃ型肝炎または本明細書に開示される他の障害の治療のための優れた ＮＳ５Ｂ阻害剤であることが発見された。一実施態様において、 R^1 は重水素であり、 R^2 は水素である。 30

【化 5】



式 I

10



式 II

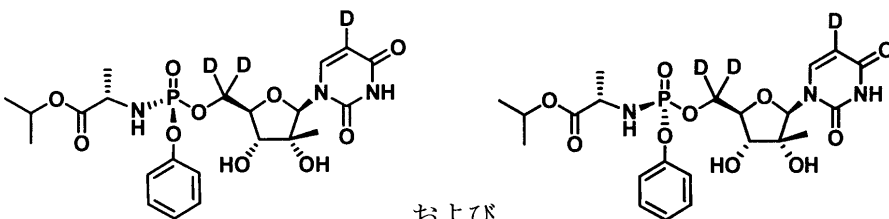
20

【0048】

式 II は、立体異性体の混合物を含む。例えば、式 II は、式 II の立体異性体の 50 / 50 混合物を含み、混合物は、

【化 6】

30



および

を含む。

【0049】

40

従って、一実施態様において、有効な量の式 I または式 II の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を、場合により薬学的に許容可能な担体で (in a pharmaceutically acceptable carrier) 投与することを含む、C 型肝炎または本明細書に記載する関連する障害に感染した宿主を治療するための方法が提供される。

【0050】

代替的な実施態様において、5' - 重水素の一方または両方は、独立して、少なくとも 50 % の濃縮を表す。別の実施態様において、濃縮は、独立して、少なくとも 75 % または 80 % である。別の実施態様において、5' - 重水素の片方または両方は、独立して、少なくとも 90 %、95 % または 98 % の濃縮を表す。

【0051】

50

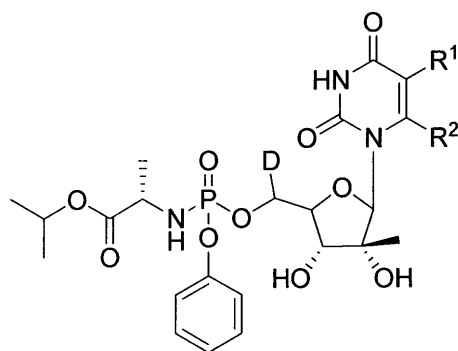
別の実施態様において、式 I または I I のヌクレオシド誘導体は、リンの R 立体異性体または S 立体異性体として投与され、少なくとも 90 % が純粋な形態であり、典型的には、95、98 または 99 % が純粋な形態であるか、または、リンキラル中心立体異性体の混合物（例えば、リンキラル中心立体異性体の 50 / 50 混合物、またはリンキラル中心での R と S の立体異性体の比率が 10 : 90 ~ 90 : 10 または 30 : 70 ~ 70 : 30 の混合物）として投与される。

【0052】

別の実施態様において、有効な量の式 I I I A または I I I B の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩は、場合により薬学的に許容可能な担体で、C 型肝炎の治療、または本明細書に開示されるような別の治療を必要とする宿主に提供される。

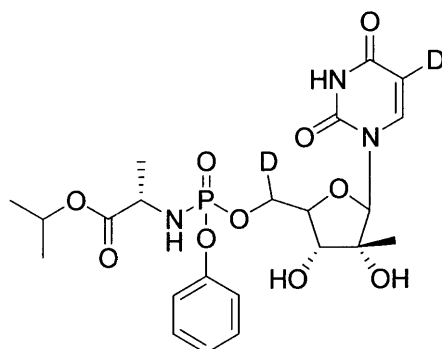
10

【化 7】



20

式 I I I A



30

式 I I I B

【0053】

驚くべきことに、ヌクレオシドの 5' 位の重水素が、ヌクレオシド誘導体を望ましくない 5' - OH、5' - 重水素化された - ヌクレオシドへの脱ホスホリル化から安定化させることを発見した。このことは、重水素原子は、脱ホスホリル化中に開裂せず、脱ホスホリル化中に開裂した原子に結合しないため、驚くべきことである。従って、5' - 重水素は、離れた予想外の重要な第 2 の重水素同位体効果によって、代謝および効能に対する顕著な効果を与えることができる。5' 位の脱モノホスフェート化に対するこのような重要な第 2 の重水素同位体効果は、以前に文献で報告されていない。脱ホスホリル化に対するヌクレオシドの 5' - モノホスフェートの安定性を高めることによって、ヌクレオシドの活性な 5' - トリホスフェート保持量の増加が達成され、所与の経口投薬量で効能を増加させることができるか、または低用量のヌクレオシドを用いて等しい効能を得ることができる。この薬物の半減期、従って、薬物動態に対する顕著な効果も有しているだろう。

40

【0054】

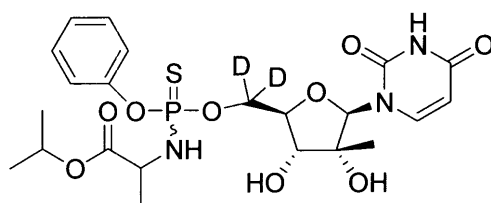
本開示は、ウイルス性疾患を治療するためのホスホロチオアミデートヌクレオシドを記

50

載する、2012年3月22日に公開され、Alios BioPharma, Inc. に属する米国特許出願公開第2012/0071434号; U.S.S.N. 13/36, 435) に開示される化合物と比較して、顕著な向上を与える。ヌクレオシド 5'-ホスフェートにおいて、酸素を硫黄と置き換えると、ヌクレオチダーゼまたは他の加水分解作用に対してホスフェートを安定化させることが知られており、このことは、1980年代に開発されたアンチセンスおよびアプタマーの安定化化学におけるホスホロチオエートおよび他のチオホスフェート誘導体の使用の基礎を成す。一般的に、他の参考文献の中で、Pearson、*「Characterization of ectonucleotidases on vascular smooth-muscle cells」*、*Biochem J.* (1985)、230、503-507を参照。アリオス(Alios)によって開示される化合物の1つは、以下である。

10

【化8】



アリオス6037

20

【0055】

ホスホロチオアミデート6037の開裂から生じるモノチオホスフェート代謝物は、安定化する非天然の硫黄原子の存在に起因して、*in vivo*で、さらに、遊離5'-ヒドロキシヌクレオシドへの酵素による分解から安定化されるだろう。従って、5'位での重水素の安定化効果は、硫黄によって隠される。さらに、Hint 1酵素(モノホスフェート式Vおよびモノチオホスフェートの、それぞれのプロドラッグからの生成も担う酵素)によって、ヌクレオシドモノチオホスフェートをヌクレオシドモノホスフェートに加水分解し、 H_2S を放出することも知られており、生理学的効果および病的な効果を生じ得る(Ozgar, *J. Biol. Chem.* 2010、285、40809を参照)。

【0056】

30

本発明によって提供される顕著な改良は、驚くべきことに、毒性を最低限にし、天然の化合物をもっと密接に模倣する様式で、もっと多くの天然ホスホルアミデートを用い、すなわち、硫黄を用いずに5'重水素化すると、モノホスフェートから遊離ヒドロキシル基にさらに分解されるのを防止するという発見である。これが自明でない発明であるという事実は、ゾバルディを開発した企業であるPharmasset, Inc. に属する米国公開第2011/0251152号(U.S.S.N. 13/076, 552)のレビューに顕著に強調されている。この刊行物の16ページに、このヌクレオシドに対する経験を積んだ企業が、ゾバルディの6種類の異なる種の重水素化の使用を記載しているが、現在、最も重要な位置であると決定された5'位に重水素を配置することは考えていなかった。

40

【0057】

(治療方法)

本開示は、薬学的に許容可能な塩として、有効な量の式Iの高活性のヌクレオシド誘導体の1つを、場合により薬学的に許容可能な塩として、場合により薬学的に許容可能な担体中に含む、C型肝炎または本明細書に記載される別の障害に感染した宿主(典型的には、ヒト)を治療する方法を提供する。

【0058】

別の実施態様において、場合により薬学的に許容可能な塩として、場合により薬学的に許容可能な担体中の有効な量の本明細書に記載される高活性のヌクレオシド誘導体の1つを使用し、限定されないが、(i)~(viii)に以下に記載される障害を含め、C型

50

肝炎と関連する二次的な状態を有する宿主（典型的には、ヒト）を治療してもよい。

【0059】

本開示は、有効な量の式 I の化合物または薬学的に許容可能な塩を C 型肝炎ウイルスに感染した患者に与えることによる、C 型肝炎感染を含め、患者のウイルス感染を治療する方法を提供する。式 I の化合物または塩を唯一の活性薬剤として与えてもよく、または、1 つ以上の別の活性薬剤と一緒に与えてもよい。特定の実施態様において、式 I の化合物または塩を、NS3 プロテアーゼ阻害剤、NS5A 阻害剤、NS5B 阻害剤、または上の組み合わせと一緒に投与される。

【0060】

有効な量の本開示の医薬組成物 / 組み合わせは、(a) C 型肝炎の進行を阻害し；(b) C 型肝炎感染を回復させ；または (c) HCV ウイルスまたは HCV 抗体が、以前に感染した患者の血液または血漿において検出することができないように、C 型肝炎感染を治癒させるのに十分な量であってもよい。C 型肝炎の進行を阻害するか、または回復させるのに有効な医薬組成物 / 組み合わせの量は、C 型肝炎の症状の悪化を止め、または C 型肝炎ウイルスに感染した患者が経験した症状を減らすのに有効な量を含む。または、C 型肝炎の進行を止めるか、または回復することは、この疾患のいくつかのマーカーのいずれかによって示されるだろう。例えば、C 型肝炎のウイルス負荷の増加または減少がないこと、または患者の血液中に循環する HCV 抗体の数の増加または減少がないことは、C 型肝炎感染の進行を止めるか、または回復するマーカーである。他の C 型肝炎疾患マーカーとしては、アミノトランスフェラーゼレベル、特に、肝臓酵素の AST および ALT のレベルが挙げられる。AST の正常なレベルは、5 ~ 40 単位 / 血清（血液の液体部分）のリットル数であり、ALT の正常なレベルは、7 ~ 56 単位 / 血清のリットル数である。これらのレベルは、典型的には、HCV 感染患者では高いだろう。疾患の回復は、通常は、AST および ALT のレベルが正常な範囲に戻るによって示される。

10

20

【0061】

さらに別の実施態様において、有効な量の本明細書に記載される高活性のヌクレオシド誘導体の 1 つを、場合により薬学的に許容可能な塩として、場合により薬学的に許容可能な担体中で、C 型肝炎と関連する二次的な状態をもたらす C 型肝炎感染を有する宿主（典型的にはヒト）を撃退するか、または予防するための予防法として使用してもよい。代替的な実施態様において、場合により薬学的に許容可能な担体中にある、有効な量の本明細書に記載される高活性のヌクレオシド誘導体の 1 つを、場合により薬学的に許容可能な塩として、限定されないが、以下の (i) ~ (viii) に記載される障害を含め、C 型肝炎と関連する二次的な状態を治療するために使用してもよい。

30

【0062】

(i) リンパ球の C 型肝炎ウイルスの刺激に起因する、異常な抗体（低温型グロブリンと呼ばれる）を産生する低温型グロブリン血症。これらの抗体は、小さな血管に堆積し、皮膚、関節および腎臓（糸球体腎炎）を含む体中の組織の血管の炎症（脈管炎）を引き起こす場合がある。

【0063】

(ii) C 型肝炎と関連する B 細胞非ホジキンリンパ腫、B リンパ球の C 型肝炎ウイルスによる過剰な刺激によって引き起こされると考えられ、リンパ球の異常な再生を生じる。

40

【0064】

(iii) 皮膚の状態、例えば、扁平苔癬および晩発性皮膚ポルフィリン症は、C 型肝炎感染と関係がある。

【0065】

(iv) 正常な肝細胞が、瘢痕または異常な組織と置き換わる疾患である硬変。C 型肝炎は、肝硬変の最も一般的な原因の 1 つである。

【0066】

(v) 一般的に肝硬変によって引き起こされる腹腔内の流体の蓄積である腹水症であり

50

、C型肝炎感染によって引き起こされることがある。

【0067】

(v i) 肝細胞癌、米国の症例の50%が、現在、慢性C型肝炎感染によって引き起こされる。

【0068】

(v i i) C型肝炎に関連する黄疸、増加したビリルビンによって引き起こされる黄変である。

【0069】

(v i i i) 血小板減少症は、多くは、C型肝炎患者でみられ、骨髄の阻害、肝臓トロポボエチン産生の減少および/または自己免疫機構の結果であろう。多くの患者において、C型肝炎が進行するにつれて、血小板数が低下し、骨髄のウイルス阻害および抗血小板抗体の増加が起こる。有効な量の本開示の医薬組成物/組み合わせによって治療可能なC型肝炎に関連する他の症状および障害としては、肝機能の低下、疲労、流感様の症状、熱、寒気、筋肉の痛み、関節痛および頭痛、吐き気、特定の食物に対する嫌悪感、説明できない体重減少、鬱病を含む精神障害、および腹部の圧痛が挙げられる。

10

【0070】

本明細書に提示される活性化化合物を使用し、例えば、C型肝炎に一般的に関連する肝機能を高めることもできる。合成機能としては、例えば、血清タンパク質(例えば、アルブミン、凝固因子、アルカリホスファターゼ、アミノトランスフェラーゼ(例えば、アラニントランスアミナーゼ、アスパルテートトランスアミナーゼ)、5'-ヌクレオシダーゼ、グルタミニルトランスペプチダーゼなど)のタンパク質の合成、ビリルビンの合成、コレステロールの合成および胆汁酸の合成;炭水化物の代謝、アミノ酸およびアンモニアの代謝、ホルモン代謝および脂質代謝を含む、肝臓の代謝活性;外因性薬物の解毒;および内臓および門脈の血行を含む、血行機能が挙げられる。

20

【0071】

本明細書に開示される医薬組成物/組み合わせは、患者のC型肝炎感染以外のウイルス感染を治療するのにも有用である。代替的な実施態様において、感染は、RNAウイルス感染、例えば、*Togaviridae*、*Picornaviridae*、*Coronaviridae*、または*Flaviviridae*ウイルス感染であってもよい。本開示は、有効な量の本明細書に開示される活性化化合物の1つを、トガウイルス、ピコルナウイルス、コロナウイルスまたはフラビウイルスに感染した被検体に投与することによる、*Togaviridae*、*Picornaviridae*、*Coronaviridae*、または*Flaviviridae*のウイルス感染を治療する方法を含む。*Flaviviridae*ウイルス感染としては、*Flavivirus*、*Pestivirus*および*Hepacivirus*属のウイルスによる感染が挙げられる。*Flavivirus*感染としては、黄熱、デング熱、ウエストナイルウイルス、脳炎(セントルイス脳炎、日本B脳炎、カリフォルニア脳炎、中央ヨーロッパ脳炎、ロシア春夏脳炎およびMurray Valley脳炎、Wesselsbron疾患およびPowassan疾患が挙げられる。

30

*Pestivirus*感染としては、主に、家畜の疾患が挙げられ、ブタのブタ熱、ウシのBVDV(牛ウイルス性下痢ウイルス)およびBorder疾患ウイルス感染を含む。*Hepacivirus*感染としては、C型肝炎およびイヌ*Hepacivirus*が挙げられる。トガウイルス感染としては、*Sindbis*ウイルス、*Eastern equine*脳炎ウイルス、*Western equine*脳炎ウイルス、*Venezuelan equine*脳炎ウイルス、*Ross River*ウイルス、*O'nyong'nyong*ウイルス、*Chikungunya*ウイルス、*Semliki Forest*ウイルスおよび*Rubella*ウイルスが挙げられる。ピコルナウイルス感染としては、*Aphthovirus*、*Aquamavirus*、*Avihepatovirus*、*Cardiovirus*、*Cosavirus*、*Dicipivirus*、*Enterovirus*、*Erbovirus*、*Hepatovirus*、*Kobuvirus*、*Megrivirus*、*Parechovirus*、*Salivirus*、*Sapelov*

40

50

irus、Senecavirus、TeschovirusおよびTremovirus属のウイルスでの感染が挙げられる。コロナウイルス感染としては、Alphaコロナウイルス、Betaコロナウイルス（重篤な急性呼吸器コロナウイルス（SARS）を含む）、GammaコロナウイルスおよびDeltaコロナウイルス属のウイルスによる感染が挙げられる。本開示は、特に、デング熱、ウェストナイル熱、黄熱またはBVDV（牛ウイルス性下痢ウイルス）を治療するのに有用な本開示の化合物を含む組成物、およびウイルスに感染した患者に化合物を投与することによる、これらの感染を治療する方法を含む。

【0072】

本開示は、以下の処置方法も含む。(i)有効な治療量のヌクレオシドまたはヌクレオチドの5'位で少なくとも50%濃縮された重水素を含むヌクレオシドまたはヌクレオチドを投与することを含む、C型肝炎に罹患した宿主を治療するための方法。(ii)ヌクレオチドが、チオホスフェートまたはチオホスフェートプロドラッグでない、方法(i)のような治療方法。(iii)改良点は、5'-重水素化されたヌクレオシドまたはヌクレオチドとしてヌクレオシドまたはヌクレオチドを投与することを含む、有効な量のヌクレオシドまたはヌクレオチドで治療可能な、障害に罹患した宿主の治療のための方法。(iv)ヌクレオチドが、チオホスフェートまたはチオホスフェートプロドラッグではない、(i)の治療方法。(v)濃縮が少なくとも90%である、(i)の治療方法。(vi)5'位に2個の重水素が存在する、(i)の治療方法。(vii)ヌクレオチドが、チオホスフェートまたはチオホスフェートプロドラッグではない、(iii)の治療方法。(viii)濃縮が少なくとも90%である、(iii)の治療方法。(viii)5'位に2個の重水素が存在する、請求項23に記載の方法。

【0073】

(組み合わせ治療)

本開示は、本明細書に記載される活性化化合物と、少なくともさらなる活性薬剤とを含む医薬組成物および組み合わせ、およびC型肝炎または本明細書に記載される別の障害に感染した患者にこのような組成物を投与することを含む、治療法も含む。特定の実施態様において、さらなる活性薬剤は、HCV NS3プロテアーゼ阻害剤またはHCV NS5Aまたは別のNS5B阻害剤である。

【0074】

非限定的な実施態様において、本開示の活性化HCV化合物を、カスパーゼ阻害剤、シクロフィリン阻害剤、チトクロムP450モノオキシゲナーゼ阻害剤、エントリー阻害剤、グルココルチコイド、HCVプロテアーゼ阻害剤、ヘマトポエチン、ホメオパシー治療、免疫調整化合物、免疫抑制剤、インターロイキン、インターフェロンまたはインターフェロンエンハンサー、IRES阻害剤、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、ヌクレオシドまたはヌクレオチドアナログ、またはプロドラッグ、非ヌクレオシド阻害剤、NS4B阻害剤、NS5A阻害剤、NS5B阻害剤、P7タンパク質阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、RNAi化合物、治療ワクチン、TNFアゴニスト、チューブリン阻害剤、スフィンゴシン-1-ホスフェート受容体モジュレーター、またはTLRアゴニストである活性化化合物の1つ以上と組み合わせ、またはこれらと交互に投与してもよい。

【0075】

これらのカテゴリーの活性薬剤の非限定的な例は、以下のとおりである。

カスパーゼ阻害剤：IDN-6556 (Idun Pharmaceuticals)

。

【0076】

シクロフィリン阻害剤：例えば、NIM811 (Novartis)、SCY-635 (Scynexis)およびDEBIO-025 (Debiopharm)。

【0077】

チトクロムP450モノオキシゲナーゼ阻害剤：リトナビル、ケトコナゾール、トロレアンドマイシン、4-メチルピラゾール、シクロスポリン、クロメチアゾール、シメチジ

ン、イトラコナゾール、フルコナゾール、ミコナゾール、フルボキサミン、フルオキセチン、ネファドゾン、セルトラリン、インジナビル、ネルフィナビル、アンブレナビル、ホスアンブレナビル、サクイナビル、ロピナビル、デラビルジン、エリスロマイシンおよび VX - 497 (Merimebodi b)。好ましい CYP 阻害剤としては、リトナビル、ケトコナゾール、トロレアンドマイシン、4 - メチルピラゾール、シクロスポリンおよびクロメチアゾールが挙げられる。

【0078】

エンتریー阻害剤：ITX - 5061 (iTherX)。

【0079】

グルココルチコイド：ヒドロコルチゾン、コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、パラメタゾン、ベタメタゾンおよびデキサメタゾン。

10

【0080】

HCV プロテアーゼ阻害剤：例えば、ソバプレビルおよび ACH - 2684。ABT - 450 (Abbott)、ACL - 181 および AVL - 192 (Avila)、BMS - 032 (Bristol Myers Squibb)、Boceprevir (Merck)、ダノプレビル (Hoffman - La Roche and Genentech)、GS - 9256 (Gilead)、GS - 9451 (Gilead)、Telaprevir (VX - 950、Vertex)、VX - 985 (Vertex)、Simprevir (TMC435、Tibotec)、Fosamprenavir (アンブレナビルのプロドラッグ、Glaxo / Vertex)、インジナビル (CRXIV AN、Merck)、TMC435350 (Tibotec / Medivir)、Faldaprevir (BI 201335、Boehringer Ingelheim)、PHX - 1766 (Phenomix)、Vaniprevir (MK - 7009、Merck)、ナラプレビル (SCH900518、Schering)、MK - 5172 (Merck)。

20

【0081】

ヘマトポエチン：ヘマトポエチン - 1 およびヘマトポエチン - 2。ヘマトポエチンスーパーファミリーの他のメンバー、例えば、種々のコロニー刺激因子 (例えば、G - CSF、GM - CSF、M - CSF)、Epo および SCF (幹細胞因子)。

30

【0082】

ホメオパシー治療：ミルクシスル、シリビニン、チョウセンニンジン、グリチルリチン、カンゾウ根、マツブサ、ビタミンC、ビタミンE、カロチンおよびセレン。

【0083】

免疫調節化合物：サリドマイド、IL - 2、ヘマトポエチン、IMPDH 阻害剤、例えば、Merimepodib (Vertex Pharmaceuticals Inc.)、インターフェロン (天然インターフェロン (例えば、OMNIFERON、Viragen および SUMIFERON、Sumitomo、天然インターフェロンのブレンド)、天然インターフェロン (ALFERON、Hemispherx Biopharma, Inc.)、リンパ芽球細胞Bのインターフェロン - n1 (WELLFERON、Glaxo Wellcome)、経口インターフェロン、Peg - インターフェロン、Peg - インターフェロン 2a (PEGASY S、Roche)、組み換えインターフェロン 2a (ROFERON、Roche)、吸入されるインターフェロン 2b (AERX、Aradigm)、Peg - インターフェロン 2b (ALBUFERON、Human Genome Sciences / Novartis、PEGINTRON、Schering)、組み換えインターフェロン 2b (INTRON A、Schering)、ペグ化インターフェロン 2b (PEG - INTRON、Schering、VIRAFERONPEG、Schering)、インターフェロン - 1a (REBIF、Ares - Sero no, Inc. および Pfizer)、コンセンサスインターフェロン (INFERGEN、Intermune)、インターフェロン - 1b

40

50

(ACTIMMUNE、Intermune, Inc.)、ペグ化されていないインターフェロン、インターフェロンおよびそのアナログおよび合成チモシン 1 (ZADAXIN、SciClone Pharmaceuticals Inc.) および インターフェロン (BMS)。

【0084】

免疫抑制剤：シロリムス (RAPAMUNE、Wyeth)。

【0085】

インターロイキン：(IL - 1、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 10、IL - 11、IL - 12)、LIF、TGF - 、TNF -) および他の低分子量因子 (例えば、AcSDKP、pEEDCK、胸腺ホルモンおよびミニサイトカイン)。

10

【0086】

インターフェロンエンハンサー：EMZ702 (Transition Therapeutics)。

【0087】

IRES 阻害剤：VGX - 410C (VGX Pharma)。

【0088】

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体：XTL - 6865 (HEPX - C、XTL)、HuMax - HepC (Genmab)、C型肝炎免疫グロブリン (ヒト) (CIVACIR、Nabi Biopharmaceuticals)、XTL - 002 (XTL)、リツキシマブ (RITUXAN、Genentech / IDEC)、GS - 6624 (Gilead)。

20

【0089】

ヌクレオシドアナログ：ソホスブビル (PSI - 7977、Pharmasset and Gilead)、PSI - 7851 (Pharmasset)、PSI - 7977 (Pharmasset)、R7128 (メリシタピン、Roche)、R7348 (Roche)、NM283 (パロピシタピン、Idenix)、GS - 6620 (Gilead)、TMC - 649 (Tibotec)、VX - 135 (Vertex、Alios)、ALS - 2200 (Alios)、IDX184 (Idenix)、IDX21437 (Idenix)、IDX21459 (Idenix)、Lamivudine (EPIVIR、3TC、GlaxoSmithKline)、MK - 0608 (Merck)、ザルシタピン (HIVID、Roche US Pharmaceuticals)、リバビリン (COPEGUS (Roche)、REBETOL (Schering)、VILONA (ICN Pharmaceuticals および VIRAZOLE (ICN Pharmaceuticals を含む)、イサトリピン (Anadys Pharmaceuticals)、ANA245 (Anadys Pharmaceuticals) およびピラミジン (ICN)、リバビリンのアミジンプロドラッグ。ヌクレオシドアナログの組み合わせを使用してもよい。

30

【0090】

非ヌクレオシド阻害剤：PSI - 6130 (Roche / Pharmasset)、ABT - 333 および ABT - 072 (Abbott)、デラビルジン (RESCRIPTOR、Pfizer)、PF - 868554 (Pfizer)、GSK - 852 (GlaxoSmithKline)、セトロブビル (ANA - 598、Anadys)、VX - 222 (Vertex)、BI - 127 (Boehringer Ingelheim) および BMS - 325 (Bristol Meyers)。

40

【0091】

NS4B 阻害剤：クレミゾール (Eiger BioPharmaceuticals, Inc.)。

【0092】

NS5A 阻害剤：ダクラタスビル (BMS - 790052、BMS)、AZD - 729 (Astra Zeneca)、PPI - 461 (Presidio)、PPI - 688

50

(Presidio)、サマタスビル(IDX719、Idenix)、レジパスビル(GS-5885、Gilead)、GS-5816(Gilead)、オムビタスビル(ABT-267、AbbVie)、GSK2336805(GlaxoSmithKline)およびエルパスビル(MK-8742、Merck)。

【0093】

NS5B阻害剤：MBX-700(Microbotix/Merck)、RG-9190、VX-222(Vertex)およびBMS-791325(Bristol Meyers Squibb)。

【0094】

P7タンパク質阻害剤：アマンタジン(SYMMETREL、Endo Pharmaceuticals, Inc.)。

10

【0095】

ポリメラーゼ阻害剤：ANA598(Anadys)、Tegobuvir(GS 9190、Gilead)。

【0096】

RNA干渉：SIRNA-034 RNA(Sirna Therapeutics)。

【0097】

治療ワクチン：IC41(Intercell)、GI 5005(Globeimmune)、Chronvac-C(Tripep/ Inovio)。

20

【0098】

TNFアゴニスト：アダリムマブ(HUMIRA、Abbott)、エタネルセプト(ENBREL、Amgen and Wyeth)、インフリキシマブ(REMICADE、Centocor, Inc.)。

【0099】

チューブリン阻害剤：コルヒチン。

【0100】

スフィンゴシン-1-ホスフェート受容体調節剤：FTY720(Novartis)。

【0101】

30

TLR アゴニスト：TLR7アゴニスト(Anadys Pharmaceuticals)、CPG10101(Coley)、およびCPG 7909(Coley)を含むTLR9アゴニスト。

【0102】

ワクチン：HCV/MF59(Chiron)、IC41(Intercell)。

【0103】

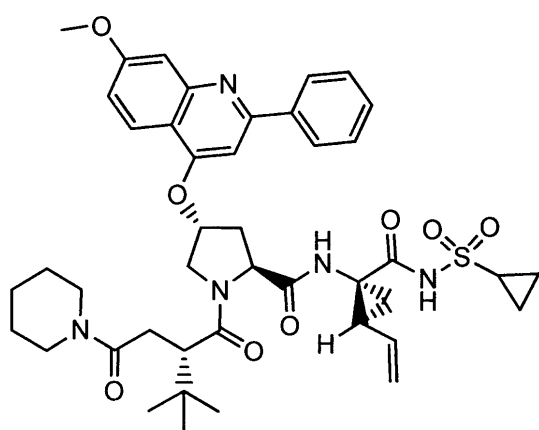
例えば、ある実施態様において、さらなる活性薬剤は、ソバブレビルまたはACH-2684(HCV NS3プロテアーゼ阻害剤)および/またはNS5A阻害剤である。

【0104】

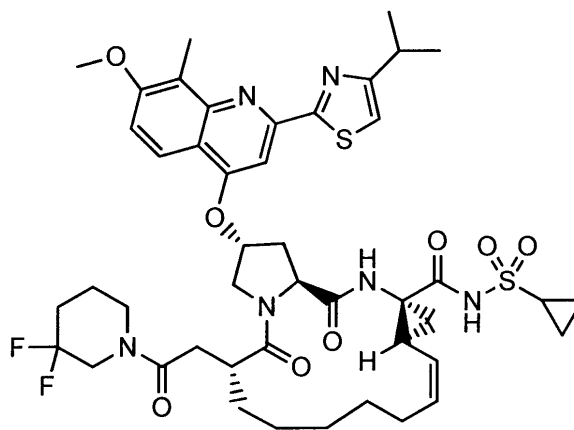
本開示は、さらなる活性薬剤が

40

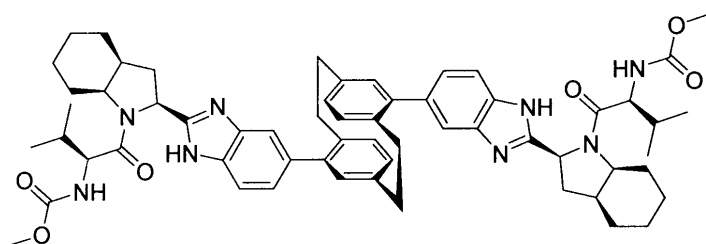
【化 9】



ソバプレビル



ACH-2684



NS5A阻害剤

10

20

30

40

50

である組成物を含む。

【0105】

本明細書に記載される医薬組成物および組み合わせに有用なNS3プロテアーゼ阻害剤は、例えば、2011年3月15日に発行された米国特許第7,906,619号にすでに開示されており、4-アミノ-4-オキソブタノイルペプチドに関する教示について、その全体が引用することにより本願明細書の開示の一部とされる。619号特許は、本明細書に記載される式Iの化合物との組成物/組み合わせに有用な化合物を開示する、第50欄に始まり、第85欄に続く実施例の章が特に引用することにより本願明細書の開示の一部とされる。

【0106】

2010年8月26日に公開された米国特許出願第2010-0216725号は、4-アミノ-4-オキソブタノイルペプチドに関する教示について、その全体が引用することにより本願明細書の開示の一部とされる。725号出願は、本明細書に記載される式Iの化合物との組成物/組み合わせに有用な化合物を開示する、22ページに始まり、100ページに続く実施例の章が特に引用することにより本願明細書の開示の一部とされる。

【0107】

2010年6月17日に公開された、公開された米国特許出願第2010-0152103号は、4-アミノ-4-オキソブタノイルペプチドの環状アナログに関する教示について、その全体が引用することにより本願明細書の開示の一部とされる。103号出願は、本明細書に記載される式Iおよび式IIの化合物との組成物/組み合わせに有用な化合物を開示する、19ページに始まり、60ページに続く実施例の章が特に引用することにより本願明細書の開示の一部とされる。特に、本明細書に開示される式Iおよび式IIの化合物を、以下に示す式のNS3プロテアーゼ阻害剤との組み合わせで使用してもよい。

【0108】

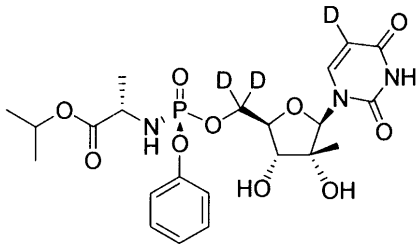
本明細書に記載される医薬組成物および組み合わせに有用なNS5A阻害剤は、すでに開示されている。2012年11月29日に公開された米国特許公開第US-2012-0302528号は、NS5A阻害剤に関する教示について、その全体が引用することに

より本願明細書の開示の一部とされる。

【 0 1 0 9 】

特定の実施態様において、重水素化されたヌクレオシドプロドラッグは、

【 化 1 0 】



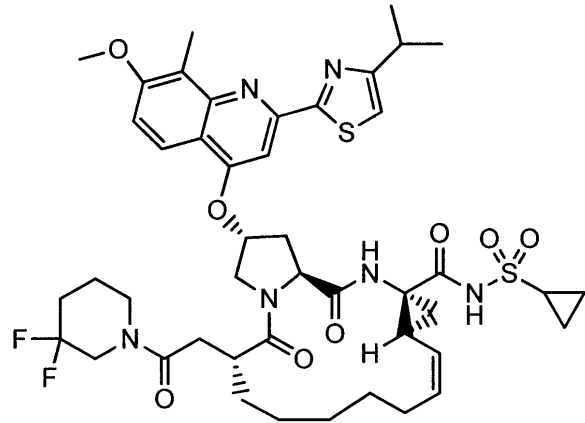
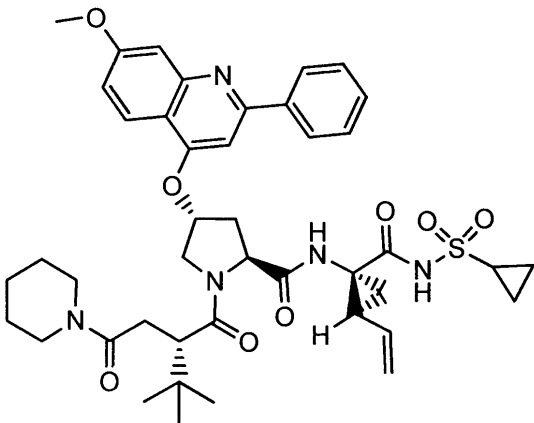
10

である。

【 0 1 1 0 】

NS3プロテアーゼ阻害剤は、以下

【 化 1 1 】



20

および

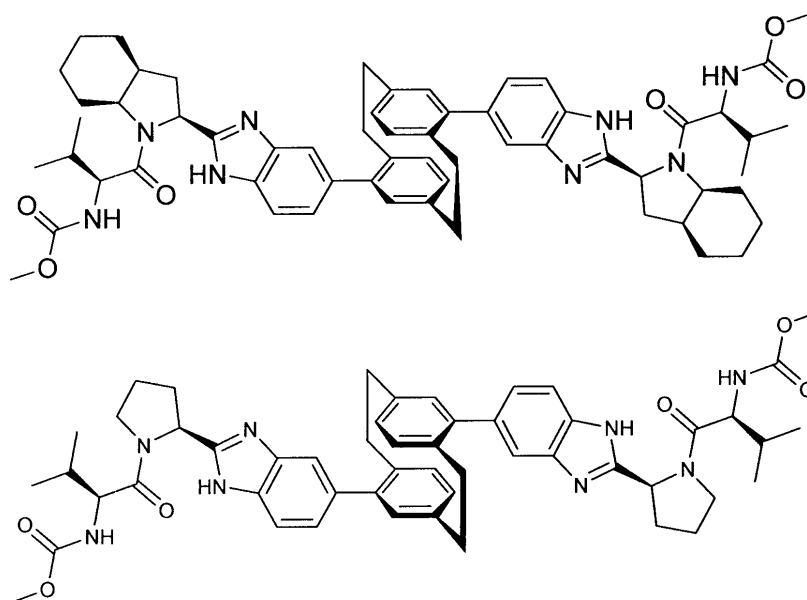
から選択される。

【 0 1 1 1 】

NS5A阻害剤は、以下

30

【化 1 2】



および

10

から選択される。

20

【0 1 1 2】

(医 薬 組 成 物)

本明細書に開示される化合物を、未希釈の化学物質として投与してもよいが、好ましくは、医薬組成物として投与される。従って、本開示は、本明細書に記載される活性化合物の化合物または薬学的に許容可能な塩を、少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体と共に含む医薬組成物を提供する。医薬組成物 / 組み合わせは、本明細書に記載される任意の活性化合物の化合物または塩を唯一の活性薬剤として含んでいてもよいが、別の実施態様では、少なくとも1つのさらなる活性薬剤も含んでいてもよい。特定の実施態様において、さらなる活性薬剤がNS3プロテアーゼ阻害剤またはNS5AまたはNS5B阻害剤であることが好ましい。特定の実施態様において、医薬組成物は、投薬形態に、約0.1mg ~ 約2000mg、約10mg ~ 約1000mg、約100mg ~ 約800mg、または約200mg ~ 約600mgの式Iの化合物と、場合により、約0.1mg ~ 約2000mg、約10mg ~ 約1000mg、約100mg ~ 約800mg、または約200mg ~ 約600mgのさらなる活性薬剤を単位投薬形態で含む。特定の実施態様において、活性化合物は、有効な量、ある実施態様では、少なくとも10、25、50、100、150、200、250、300、350または400mgであってもよい経口投薬形態（例えば、丸薬、錠剤またはカプセル）で送達される。医薬組成物は、所定のモル比の式Iの化合物とさらなる活性薬剤を含んでいてもよい。例えば、医薬組成物は、モル比が約0.5 : 1、約1 : 1、約2 : 1、約3 : 1または約1.5 : 1 ~ 約4 : 1であってもよく、他の活性薬剤は、例えば、NS3プロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤または別のNS5B阻害剤であってもよい。

30

40

【0 1 1 3】

本明細書に開示する化合物を、経口、局所、非経口、吸入またはスプレーによる、舌下、経皮、口腔または経粘膜投与による、直腸、眼用溶液として、注射、他の手段によって、従来の薬学的に許容可能な担体を含む単位投薬製剤で、任意の適切な手段で投与してもよい。医薬組成物は、任意の医薬的に有用な形態として、例えば、エアロゾル、クリーム、ゲル、丸薬、カプセル、錠剤、シロップ、経皮パッチまたは眼用溶液として、配合されてもよい。ある投薬形態（例えば、錠剤およびカプセル）は、適切な量（例えば、望ましい目的を達成するのに有効な量）の活性な要素を含む適切な大きさの単位投薬量に分けられる。

50

【0114】

担体としては、賦形剤および希釈剤が挙げられ、治療される患者に投与するのに適するように十分に高い純度であり、十分に低い毒性であるべきである。担体は、不活性であってもよく、それ自体医薬的利点を与えることができる。化合物と組み合わせて使用される担体の量は、化合物の単位投薬量あたり、投与するための現実的な量の物質を与えるのに十分な量である。

【0115】

担体の種類としては、限定されないが、バインダー、緩衝剤、着色剤、希釈剤、崩壊剤、乳化剤、香味剤、滑剤、潤滑剤、防腐剤、安定化剤、界面活性剤、錠剤化剤および湿潤剤が挙げられる。ある担体は、1種類より多い分類に列挙されていてもよく、例えば、植物油を、ある製剤で潤滑剤として使用されてもよく、他の製剤で希釈剤として使用されてもよい。例示的な薬学的に許容可能な担体としては、糖、デンプン、セルロース、粉末状トラガカント、モルト、ゼラチン、タルクおよび植物油が挙げられる。任意要素の活性薬剤は、医薬組成物に含まれていてもよく、本開示の化合物の活性を実質的に妨害しない。

10

【0116】

医薬組成物/組み合わせを経口投与のために配合してもよい。これらの組成物は、0.1~99重量%(wt.%)の式Iの化合物、通常は、少なくとも約5wt.%の式の化合物を含む。ある実施態様は、約25wt.%~約50wt.%、または約5wt.%~約75wt.%の式の化合物を含む。

20

【0117】

有効な量の本開示の医薬組成物/組み合わせは、(a)C型肝炎の進行を阻害し；(b)C型肝炎感染を回復させ；または(c)HCVウイルスまたはHCV抗体が、以前に感染した患者の血液または血漿において検出することができないように、C型肝炎感染を治癒させ、または(d)HCVに関連する障害を治療するのに十分な量であってもよい。C型肝炎の進行を阻害するか、または回復させるのに有効な医薬組成物/組み合わせの量は、C型肝炎の症状の悪化を止め、またはC型肝炎ウイルスに感染した患者が経験した症状を減らすのに有効な量を含む。または、C型肝炎の進行を止めるか、または回復することは、この疾患のいくつかのマーカーのいずれかによって示されるだろう。例えば、C型肝炎のウイルス負荷の増加または減少がないこと、または患者の血液中に循環するHCV抗体の数の増加または減少がないことは、C型肝炎感染の進行を止めるか、または回復するマーカーである。他のC型肝炎疾患マーカーとしては、アミノトランスフェラーゼレベル、特に、肝臓酵素のASTおよびALTのレベルが挙げられる。これらのレベルは、典型的には、HCV感染患者では高いだろう。疾患の回復は、通常は、ASTおよびALTのレベルが正常な範囲に戻るによって示される。

30

【0118】

式Iの化合物または薬学的に許容可能な塩と、少なくとも1つのさらなる活性薬剤は、(1)一緒に配合され、投与されるか、または組み合わせられた製剤で同時に送達されてもよく、(2)別個の製剤として交互に、または並行して送達されてもよく、または(3)当該技術分野で既知の任意の他の組み合わせ治療用法によってもよい。交互投与治療で送達される場合、本開示の方法は、例えば、別個の溶液、エマルション、懸濁物、錠剤、丸薬またはカプセルによって、または別個のシリンジでの異なる注射によって、本明細書に記載される任意の活性化合物の化合物または塩と、さらなる活性薬剤とを逐次的に投与または送達してもよい。一般的に、交互投与治療中に、有効な量のそれぞれの活性成分を、逐次的に、すなわち、順次投与し、一方、同時治療において、2つ以上の活性成分の有効な投薬量を一緒に投与する。間欠的な組み合わせ治療の種々のシーケンスを使用してもよい。

40

【0119】

投薬頻度は、使用される化合物および治療される特定の疾患に依存して、さまざまであってもよい。しかし、最も感染性の高い障害の治療のために、1日に4回以下の投薬用法が好ましく、1日に1回または2回の投薬用法が特に好ましい。

50

【 0 1 2 0 】

しかし、任意の特定の患者のための特定の投薬レベルは、使用する特定の化合物の活性、年齢、体重、全体的な健康、性別、食事、投与時間、投与経路、排泄速度、薬物の組み合わせおよび治療を受ける患者の特定の疾患の重篤度を含め、種々の因子によって変わり得ることが理解されるだろう。

【 0 1 2 1 】

医薬品パッケージは、容器中に、本明細書に記載されるような活性化合物または塩を含んでいてもよく、C型肝炎感染を患う患者を治療するために化合物を用いるための指示がその中に含まれる。

【 0 1 2 2 】

パッケージ化された医薬組成物 / 組み合わせも本発明に含まれる。このようなパッケージ化された組み合わせは、患者のウイルス感染（例えば、C型肝炎感染）を治療または予防するために、組み合わせを用いるための指示と共に、容器中に本明細書に記載される任意の活性化合物を含む。

【 0 1 2 3 】

パッケージ化された医薬組成物 / 組み合わせは、1つ以上のさらなる活性薬剤を含んでいてもよい。特定の実施態様において、さらなる活性薬剤は、NS3プロテアーゼ阻害剤、NS5Aまたは別のNS5B阻害剤である。

【 0 1 2 4 】

パッケージ化された医薬の組み合わせは、本明細書に記載される両方の活性化合物と、さらなる活性薬剤が、患者の血流の中にある、単一の投与形態で同時に、別個の投与形態で同時に与えられるさらなる活性薬剤、または時間内に同じ時間によって分割される投与の別個の投薬形態で与えられる、本明細書に記載される活性化合物または本明細書に記載される活性化合物の薬学的に許容可能な塩を含んでいてもよい。

【 0 1 2 5 】

パッケージ化された医薬の組み合わせは、患者のHCV感染を治療するための組み合わせを用いるための指示と共に、同じ容器または別個の容器に与えられるさらなる活性薬剤と共に容器内に提供される、本明細書に記載される活性化合物、または本明細書に記載される活性化合物の薬学的に許容可能な塩を含んでいてもよい。

【 0 1 2 6 】

（省略語）

以下の省略語を、化学工程および実施例で使用する。

A c ₂ O	無水酢酸
A c O D	重水素化された酢酸
A q .	水溶液
B u O H	ブタノール
D C M	ジクロロメタン
E t O A c	酢酸エチル
I B X	2 - ヨードキシ安息香酸
M e O H	メタノール
M T B E	メチル t e r t - ブチルエーテル
P B S	リン酸緩衝生理食塩水
P D C	重クロム酸ピリジニウム
T E A	トリエチルアミン
T H F	テトラヒドロフラン
^t B u M g C l	t e r t - ブチルマグネシウムクロリド

【 0 1 2 7 】

（高活性のヌクレオシド誘導体の製造）

本明細書に開示される活性化合物を製造するための方法が提供される。一例として、式 I I

10

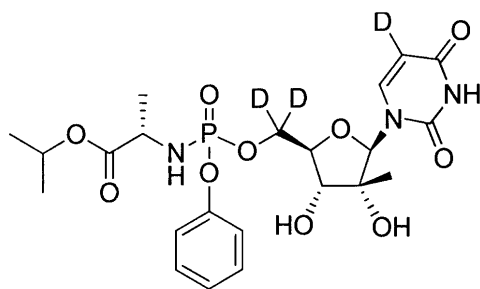
20

30

40

50

【化 1 3】

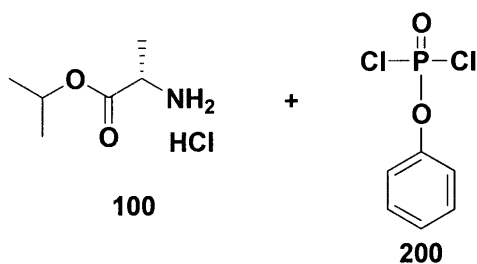


10

の化合物を、

(i) L - アラニンイソプロピルエステルであるアミノエステル (1 0 0) と、フェノキシジクロロホスフェートであるジクロロホスフェート (2 0 0)

【化 1 4】



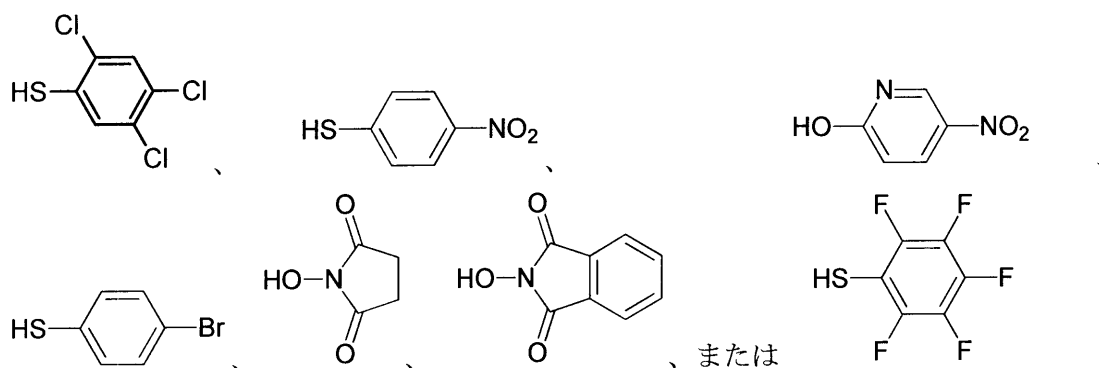
20

とを反応させて反応混合物を形成することと、

(i i) (i) の反応混合物に、アリーールヒドロキシルまたはアリーールスルフィド、R - L H (式中、L は、S または O であり、R は、置換されていてもよいアリーール、ヘテロアリーールまたはヘテロシクロアルキル基、例えば、フェニル、ピロール、ピリジル、ピリジニルまたはインドールであるか、または、R - L H は、N - ヒドロキシイミド、例えば、N - ヒドロキシスクシンイミドまたは N - ヒドロキシフタルイミドであり、特定の

30

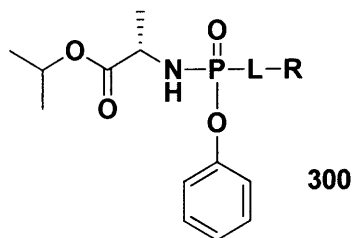
【化 1 5】



40

である) を加え、中間体 (3 0 0)

【化 1 6】

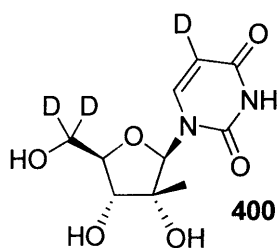


を形成することと、

10

(i i i) 中間体 (3 0 0) とヌクレオシド (4 0 0)

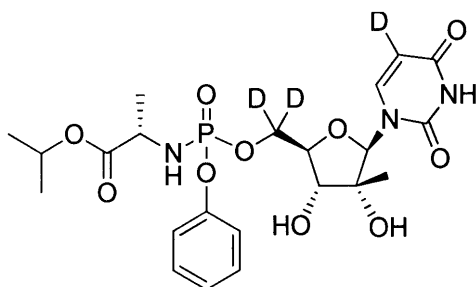
【化 1 7】



20

とを反応させ、

【化 1 8】



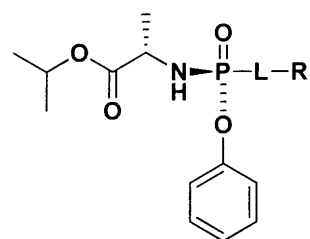
30

を生成することを含む方法によって製造することができる。

【 0 1 2 8】

特定の実施態様において、中間体 (3 0 0) は、以下の立体化学

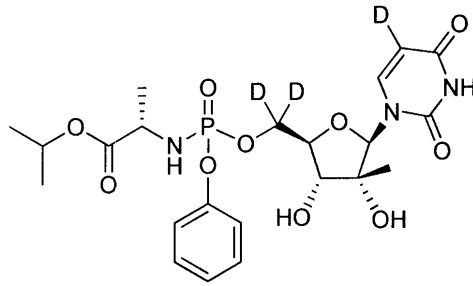
【化 1 9】



40

を有し、式 I I A の生成物が作られる。

【化 20】



(式 I I A)

10

【0129】

特定の実施態様において、アミノエステル(100)とジクロロホスフェート(200)とを-20未満の温度、さらに好ましくは、約-40～約-60の温度で混合される。

【0130】

特定の実施態様において、トリエチルアミンまたは他の塩基を、アミノエステル(100)およびジクロロホスフェート(200)の混合物に添加する。特定の実施態様において、この添加は、有機溶媒(例えば、ジクロロメタン)または他の有機溶媒(例えば、2-メチルテトラヒドロフランまたはテトラヒドロフラン)中で起こる。

20

【0131】

アリールヒドロキシルまたはアリールスルフヒドリルを、アミノエステル(100)およびジクロロホスフェート(200)の組み合わせによって作られる反応混合物に加える。特定の実施態様において、アリールヒドロキシルまたはアリールスルフヒドリルは、トリクロロチオフェノールであるが、ニトロチオフェノール、プロモチオフェノール、N-ヒドロキシコハク酸アミド、N-ヒドロキシフタルイミド、ニトロヒドロキシピリジンのような他の基と置き換えてもよい。特定の実施態様において、アリールヒドロキシルまたはアリールスルフヒドリルを、ジクロロメタン溶液として、または他の有機溶媒(例えば、1-プロパノール、2-メチルテトラヒドロフランまたはテトラヒドロフラン)の溶液として加える。特定の実施態様において、アリールヒドロキシルまたはアリールスルフヒドリルを含む溶液は、トリエチルアミンまたは他の塩基も含む。アリールヒドロキシルまたはアリールスルフヒドリルを、アミノエステル(100)およびジクロロホスフェート(200)の組み合わせによって作られる反応混合物に加えた後、得られた溶液を、0より高い、15より高い、好ましくは、約20～約35の温度まで加温してもよく、この温度で、約5時間～約30時間、さらに好ましくは、約10時間～約20時間、または約15時間の所定時間攪拌してもよい。

30

【0132】

アミノエステル(100)およびジクロロホスフェート(200)にアリールヒドロキシルまたはアリールスルフヒドリルを加えることによって作られる反応混合物を水で抽出してもよく、場合により、炭酸水素ナトリウムまたは硫酸アンモニウムのような塩で飽和されていてもよい。有機フラクションを乾燥させることによって得られる未精製中間体(300)を、カラムクロマトグラフィー、再結晶化、または他の適切な精製方法によって精製してもよい。中間体を、好ましくは精製後に、酢酸エチル/ヘプタンまたは他の非極性/極性非プロトン性溶媒の混合物、例えば、ヘプタン、シクロヘキサン、ベンゼン(非極性溶媒)およびTHF、DMFまたはDCM(極性非プロトン性溶媒)の混合物に溶解し、この溶液に、少量の中間体(300)の望ましい異性体を接種することによって、中間体(300)の望ましい異性体を得てもよい(この接種の量の(300)は、別の方法によって得られてもよい)。

40

【0133】

ヌクレオシド(400)を、溶媒、好ましくは、非極性非プロトン性溶媒、例えば、T

50

H F、D C MまたはD M Fに懸濁させてもよい。ヌクレオシド(400)の溶媒の懸濁物を0 未満まで、好ましくは、- 10 未満から約 - 40 まで、好ましくは、約 - 20 まで冷却してもよい。ヌクレオシド400は、式V Iと示されており、明細書の他の箇所で化合物9と示されていることを注記しておく。簡便化のために、100 ~ 400を合成方法のこの記載で使用する。

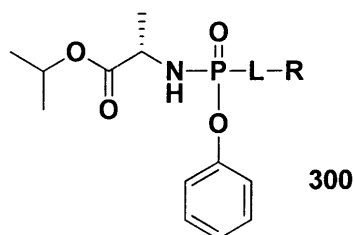
【0134】

ヌクレオシド(400)の溶媒の懸濁物を、塩基、例えば、G r i g n a r d 試薬、例えば、t e r t - ブチルM g C l、または他のハロゲン化アルキル金属に、0 未満の温度で、好ましくは、- 10 未満から約 - 40 まで、好ましくは、約 - 20 までの温度で加えてもよい。溶媒中のヌクレオシド(400)と塩基の反応混合物を、0 より高い温度まで、好ましくは、約20 ~ 約30 まで加熱し、約1 ~ 約5時間、または好ましくは、約2 ~ 約3時間攪拌する。次いで、反応混合物を、0 より低い温度まで、好ましくは、- 5 未満から約 - 20 まで、好ましくは、約 - 10 の温度まで再び冷却してもよい。中間体(300)(場合により光学的に純粋であってもよい)を、ヌクレオシド(400)を含有する反応混合物に加える。中間体(300)とヌクレオシド(400)の反応混合物を、約0 より高い温度まで、好ましくは、約20 ~ 約30 まで加熱し、少なくとも5時間、好ましくは、約10 ~ 約20時間、または好ましくは約15時間攪拌する。反応物を0 まで冷却し、塩化アンモニウムまたは酸(例えば、H C lまたはp Hを約1 ~ 3、好ましくは、約2にすることができる他の酸)でクエンチしてもよい。次いで、得られる生成物である式Iの化合物を、有機相抽出、カラムクロマトグラフィー、H P L C、結晶化または任意の他の適切な精製方法によって精製してもよい。

【0135】

本開示の化合物を製造する方法に加え、本開示は、式Iの化合物を製造するのに有用な中間体(300)も与え、

【化21】

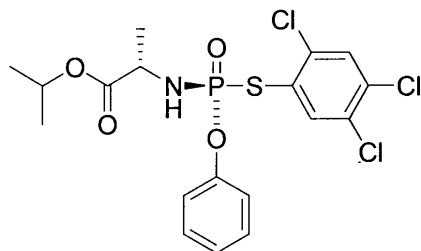


式中、- L - Rは、上に定義される。

【0136】

特定の実施態様において、中間体は、

【化22】

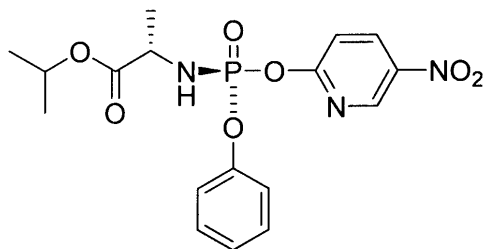


である。

【0137】

他の実施態様において、中間体は、

【化 2 3】



10

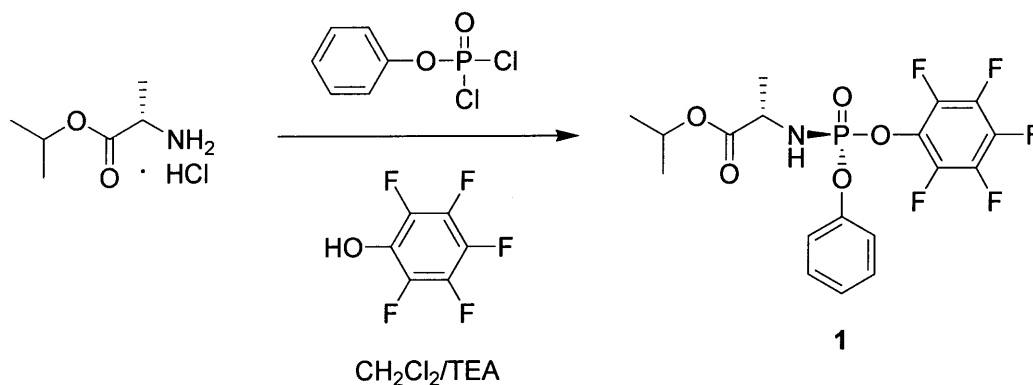
である。

【実施例】

【0138】

(実施例 1. (S)-イソプロピル 2-((S)-((4-nitrophenyl)oxy)(phenyl)phosphoryl)propanoate (化合物 1))

【化 2 4】



20

【0139】

30

5 L の 4 ッロフラスコにメカニカルスターラー、サーモメータおよび滴下漏斗を取り付け、これに L-アラニンイソプロピルエステル HCl 塩 (160 g) を投入する。このフラスコに、ジクロロメタン (1 L) を加え、懸濁物を -70 まで冷却し、その後、トリエチルアミン (200 g、276 mL) を 45 分かけて加える。この混合物に、フェニルジクロロホスフェート (200 g) のジクロロメタン (1 L) 溶液を 2.5 時間かけて加える。反応混合物をこの温度でさらに 90 分間攪拌し、次いで、2 時間かけて 0 まで加温し、0 で 2 時間攪拌する。この混合物に、2,3,4,5,6-ペンタフルオロフェノール (174.4 g) のジクロロメタン 400 mL 溶液と、トリエチルアミン (105.4 g) のジクロロメタン 200 mL 溶液とを 1.2 時間かけて同時に滴下する。この混合物を室温まで加温し、一晚加熱する。固体のトリエチルアミン HCl 塩を濾別し、ケーキをジクロロメタンで洗浄する (150 mL × 3 回)。濾液を減圧下で濃縮し、残渣を MTBE (3.0 L) で磨砕する。濾過によって白色固体を除去する。ケーキを MTBE で洗浄する (150 mL × 3 回)。濾液を濃縮し、得られた未精製固体をヘキサン中の 20% 酢酸エチル (2.0 L) を用いて磨砕する。濾過によって固体を集め、水相が pH 7 に達するまで 10% NaHCO₃ で洗浄し、次いで、固体を水で洗浄し、減圧下 (55) で 28 時間乾燥させる。乾燥した固体をヘプタン-EtOAc (5:1) 500 mL と混合し、1 時間攪拌する。濾過によって固体を集め、ヘプタン-EtOAc で洗浄し (5:1、80 mL × 2 回)、99% を超える単一の異性体を得る。固体を乾燥させ、化合物 1 を得る。

40

【0140】

50

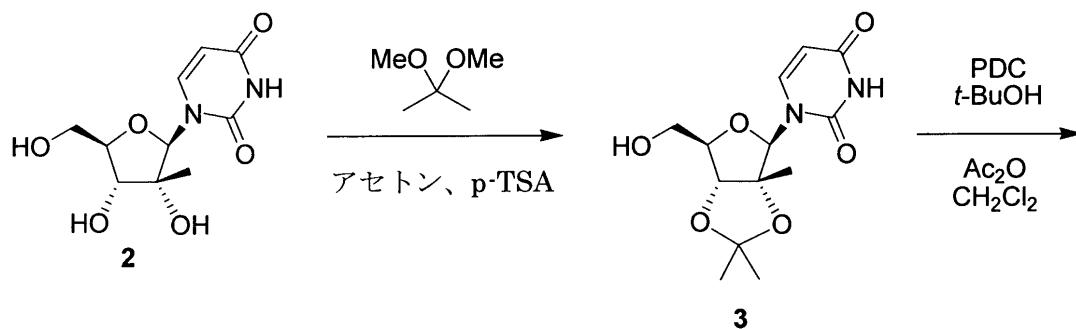
代替的な作業手順において、反応混合物を濾過し、DCM層を0.1N NaOH水溶液、次いで、水で洗浄し、乾燥させ、乾燥するまで蒸発させる。残渣をヘプタン/EtOAc(5:1)に懸濁させ、固体を濾過する。固体をヘプタン/トルエン(85:15)に再び懸濁させ、純粋な1種類の異性体を単離する。

【0141】

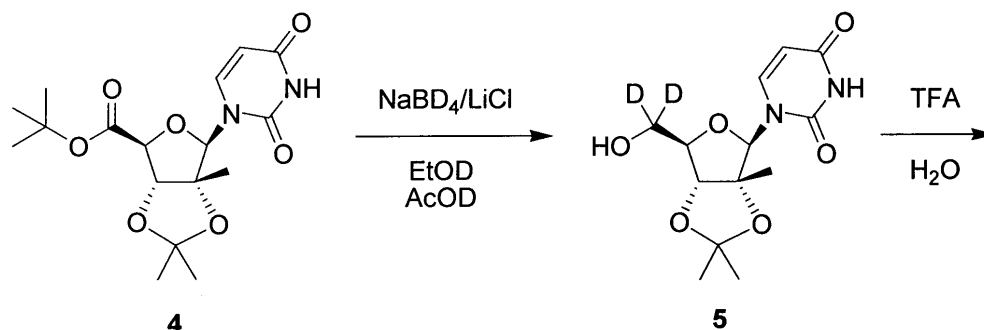
(実施例2. (S)-イソプロピル 2-((R)-((2S, 3R, 4R, 5R)-5-(2, 4-ジオキソ-3, 4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-3, 4-ジヒドロキシ-4-メチルテトラヒドロフラン-2-イル)ジ重水素化メトキシ)(フェノキシ)ホスホリル)アミノ)プロパノエート(化合物7)の製造)

【化25】

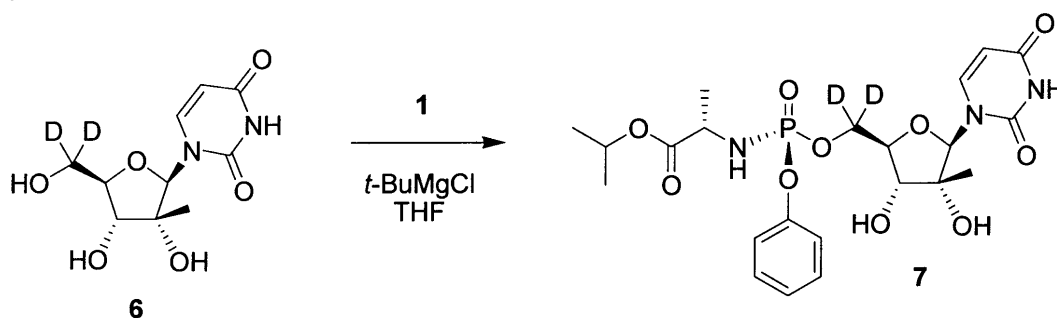
10



20



30



【0142】

アセトン(700mL)中、2, 2-ジメチルプロパン(140mL)を2'-C-メチルウリジン2(100g)に加える。得られた混合物を氷浴で30分間冷却し、次いで、p-トルエンスルホン酸(11g)を加え、反応混合物を室温で24時間攪拌する。反応が終了した後(HPLCによって監視される)、反応混合物を氷浴で30分間冷却し、低温の炭酸カリウム(水13mL中12g、pH7~8)を用いて中和する。溶媒を減圧下で乾燥するまで除去する。THF(約500mL)を残渣に加え、固体を濾過によって除去する。濾液をシリカゲルと一緒に蒸発させ、シリカゲルクロマトグラフィーによって精製し(CHCl3中、5~15% MeOH)、化合物3を得る。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, 300K): 1.22(s, 3H), 1.34(s, 3H), 1.49(s, 3H), 3.63(dd, J=12.0Hz, 2.8Hz, 1H), 3.69(dd, J=12.0Hz, 3.1Hz, 1H), 4.15(m, 1H), 4

40

50

．47 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.25 (br s, 1H), 5.63 (dd, J = 8.2 Hz, 2.3 Hz), 6.01 (s, 1H), 7.85 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 11.37 (s, 1H); LC-MS: 299 amu (M + 1)。

【0143】

化合物4を、Coreyら(J. Org. Chem. 1984、49、4735)によって報告される手順に従って、以下に記載されるように改変しつつ製造する。CH₂Cl₂ (1 L) 中のアセトニド3 (50 g) に、室温でPDC (126.1 g) を加え、その後、Ac₂O (171 g) および t-BuOH (248 g) を加える。試薬を加えている間、反応温度を35 未満に維持し、次いで、室温で5時間攪拌する。反応混合物をK₂CO₃ 水溶液 (600 mL H₂O 中、250 g) に注ぎ、有機層をCuSO₄ で洗浄する (1 L H₂O 中、100 g)。活性炭 (10 g) およびシリカゲル (100 g) を有機層に加え、30分間攪拌し、濾過する。濾液を蒸発させ、シリカゲルクロマトグラフィーによって精製し (CHCl₃ 中、0 ~ 50% EtOAc)、4を得る。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 300 K): 1.25 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.48 (s, 3H), 3.31 (s, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.79 (s, 1H), 5.70 (dd, J = 8.1 Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.93 (br s, 1H), 7.97 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 11.41 (s, 1H); LC-MS: 369 amu (M + 1)。

10

【0144】

EtOD 中、塩化リチウム (1.76 g) をNaBD₄ (1.58 g) と共に1時間攪拌する。化合物4 (2.97 g) をこの溶液に加え、室温で3時間攪拌し、酢酸-dでクエンチし、酢酸エチルで希釈し、食塩水を用いて洗浄し、乾燥するまで蒸発させる。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、5'-ジ重水素化された化合物5を得る。

20

【0145】

水存在下、化合物5 (2.1 g) をトリフルオロ酢酸で処理し、5'-ジ重水素化されたヌクレオシド6を得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K): 1.16 (s, 3H), 3.84 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.91 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.67 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 8.14 (d, J = 8.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, 300 K): 20.2, 73.4, 80.0, 83.8, 93.2, 102.3, 142.5, 152.5, 166.0 (リボースC-5'は観察されない)。

30

【0146】

Rossら(J. Org. Chem. 2011、76、8311)に記載される手順に従って、化合物6 (1.0 g) をホスホルアミデート誘導体7に変換した。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K): 1.15 (s, 3H), 1.21 (2x d, J = 6.3 Hz, 6H), 1.35 (dd, J = 7.2 Hz, J_{H, P} = 0.9 Hz, 3H), 3.79 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.91 (dq, J_{H, P} = 10.0 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 4.08 (dd, J = 9.2 Hz, J_{H, P} = 2.2 Hz, 1H), 4.96 (7重線, J = 6.3 Hz, 1H), 5.60 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.67 (d, J = 8.1 Hz, 1H); ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD, 300 K): 3.8; LC-MS: 530 amu (M + 1)。

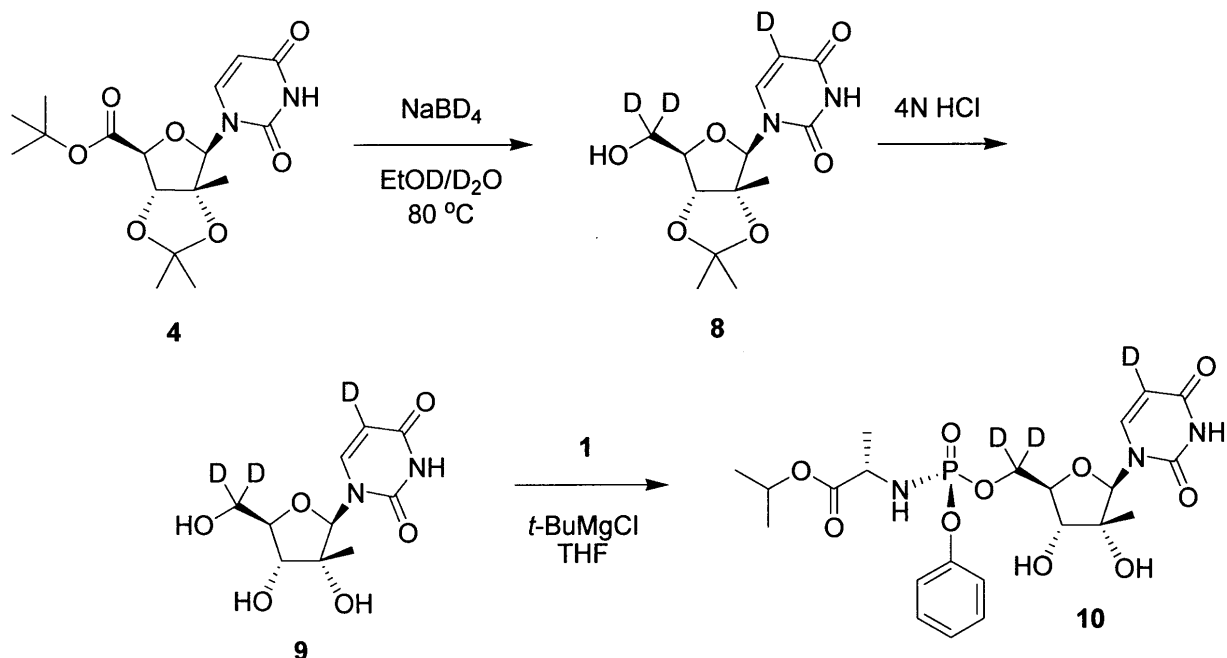
40

【0147】

(実施例3・(S)-イソプロピル 2-(((S)-(((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(5-重水素-2, 4-ジオキソ-3, 4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-3, 4-ジヒドロキシ-4-メチルテトラヒドロフラン-2-イル)ジ重水素化メトキシ)(フェノキシ)ホスホリル)アミノ)プロパノエート(式IIA、化合物10)の製造)

50

【化 2 6】



10

20

【0148】

1 L フラスコ中、EtOD/D₂O (350 mL、99% D) の冷却した (5) 7 0 : 3 0 (v/v) 混合物に NaBD₄ (7.96 g) を何回かに分けて加え、次いで、アセトニドエステル 4 (35 g) を何回かに分けて加える (ゆっくりと泡立つ)。得られた反応混合物を室温で 3 時間攪拌し、次いで、80 で 1 日間加熱する (¹H NMR 分光分析は、5 - ウラシル位置への 85 % を超える重水素の組み込みを示す)。反応混合物を濾過して固体を除去し、減圧下で濃縮し、EtOD を除去する。さらなる D₂O を加え、得られた混合物を 95 で再び加熱し、5 位置での重水素組み込みが 98 % より大きな値まで増加する (¹H NMR 分光法によって監視される D 組み込み)。反応が終了した後、溶媒の半分を減圧下で除去し、混合物を氷浴で冷却し、AcOD (59 g) を加え、得られた混合物を 15 ~ 20 分間攪拌する。EtOAc (300 mL) および塩水 (100 mL) を加え、有機層を分離し、水層を再び EtOAc (150 mL) で抽出し、その後、THF (150 mL) によって抽出する。混合した有機層を濃縮し、得られた残渣を 10 % MeOH および CHCl₃ (300 mL) に溶解し、濾過し、濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーによって精製し (ISCO、溶出液 DCM/MeOH)、重水素化されたアセトニド 8 を得る。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 300 K) : 1.22 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 3.31 (s, 2H), 4.14 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 11.36 (s, 1H); LC-MS: 302 amu (M+1)。

30

40

【0149】

重水素化されたアセトニド 8 (50 g) を、冷却した (5) 4 N HCl (250 mL) 溶液に加え、室温で 3 時間攪拌し、この間に白色沈殿が生成する。溶媒を乾燥するまで蒸発させ、残渣に水 (100 mL) を加え、攪拌する。懸濁物を 5 まで冷却し、1 時間攪拌し、白色沈殿を濾過によって集める。固体を冷水 (75 mL) で洗浄し、乾燥させ、重水素化されたヌクレオシド 9 を得る。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K) : 1.15 (s, 3H), 3.84 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.91 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 8.14 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, 300 K) : 20.2, 73.4, 80.0, 83.8, 93.2, 142.4, 152.5, 166.0 (リボース C-5' およ

50

【 0 1 5 0 】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.15 (s, 3H), 1.21 (2x d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.35 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J_{\text{H}, \text{P}} = 0.9$ Hz, 3H), 3.79 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.91 (dq, $J_{\text{H}, \text{P}} = 10.0$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.08 (dd, $J = 9.2$ Hz, $J_{\text{H}, \text{P}} = 2.3$ Hz, 1H), 4.96 (7重線, $J = 6.3$ Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.67 (s, 1H); ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD , 300 K): 3.8; LC-MS: 531 amu ($M + 1$)。

【 0 1 5 1 】

【化 2 7】



【 0 1 5 2 】

50

持する。反応混合物を室温までゆっくりと加温し、2時間攪拌し、 -50°C まで再び冷却する。トリエチルアミン(9.1 mL)を含む CH_2Cl_2 (20 mL)に2, 4, 5-トリクロロチオフェノール(12.74 g)を溶かした溶液を加える。反応物を室温まで加温し、15時間攪拌する。反応混合物を水(約300 mL)で洗浄し、その後、飽和水 NaHCO_3 溶液(約300 mL)で洗浄する。有機層を分離し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧下、乾燥するまで蒸発させる。未精製物質を短いシリカカラム(CH_2Cl_2 / EtOAc 0 : 1 (v / v) ~ 1 : 4 (v / v))に通し、溶媒を蒸発させた後に生成物を集める。生成物を、ヘプタン中の2.5%の EtOAc 100 mLに溶解し、この溶液に化合物11(約10 mg)を接種し、室温で1時間攪拌する。沈殿を濾過によって集め、少量の上の EtOAc / ヘプタン溶媒混合物で洗浄し、乾燥させ、11を単一の異性体として得る。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 300 K): 1.24 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.26 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.41 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 3.99 - 4.21 (m, 2H), 5.02 (7重線, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.17 - 7.24 (m, 3H), 7.34 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.73 (d, $J_{\text{H}, \text{P}} = 2.2$ Hz, 1H); ^3P NMR (162 MHz, CDCl_3 , 300 K): 21.1。

10

【0153】

9 (1.0 g) の THF 懸濁物を -20°C まで冷却し、混合物の温度を -20°C 未満に維持しつつ、 $t\text{-BuMgCl}$ (11.6 mL、THF 中 1 M) をゆっくりと加える。反応混合物を室温までゆっくりと加温し(約2時間)、2時間攪拌し、次いで、 -10°C まで冷却する。化合物11(3.74 g)を加え、反応混合物を室温まで加温し、攪拌する。15時間後、反応混合物を0 $^{\circ}\text{C}$ まで冷却し、2N HCl 水溶液を加え(pH約2になるまで)、溶液を0 $^{\circ}\text{C}$ で30分間攪拌する。 NaHCO_3 水溶液を加え(pHが約8になるまで)、その後、 NaCl (約3 g)を加え、混合物を30分間攪拌する。有機層を分離し、乾燥させ、減圧下で蒸発させる。未精製物質をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し(CH_2Cl_2 中、5% MeOH)、純粋な10を得る。

20

【0154】

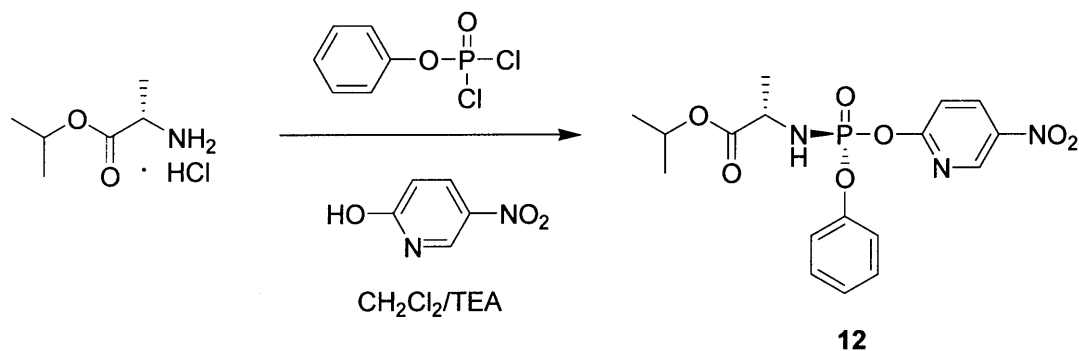
化合物11を濾過によって単離した後、リンについての他の立体異性体が濃縮された濾液を濃縮し、クロマトグラフィー技術によって精製してもよい。この11の立体異性体をヌクレオシド9で処理し、実施例12に記載される化合物31を得る。

30

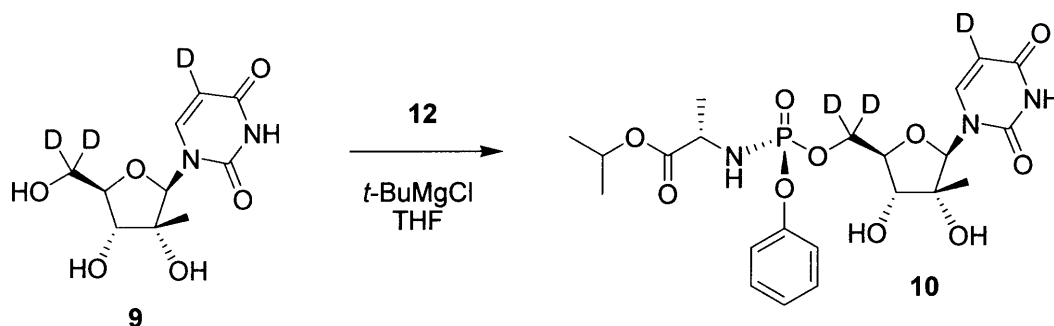
【0155】

(実施例5. 式II(化合物10)の代替的な製造)

【化 2 8】



10



20

【0156】

化合物 12 を、化合物 11 について実施例 4 で上に記載したのと類似の様式で製造する。
 12 の分光データ：¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K)： 1.19 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.22 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.39 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 4.25 - 4.38 (m, 2H), 4.96 (7 重線, J = 6.3 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.19 (m, 1H), 7.25 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 8.50 (dd, J = 9.0 Hz, J = 2.9 Hz, 1H), 9.15 (d, J = 2.9 Hz, 1H)；³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃, 300 K)： -3.4。

30

【0157】

実施例 3 に記載されるのと類似の様式で、ヌクレオシド 9 を化合物 12 で処理し、化合物 10 を与える。

【0158】

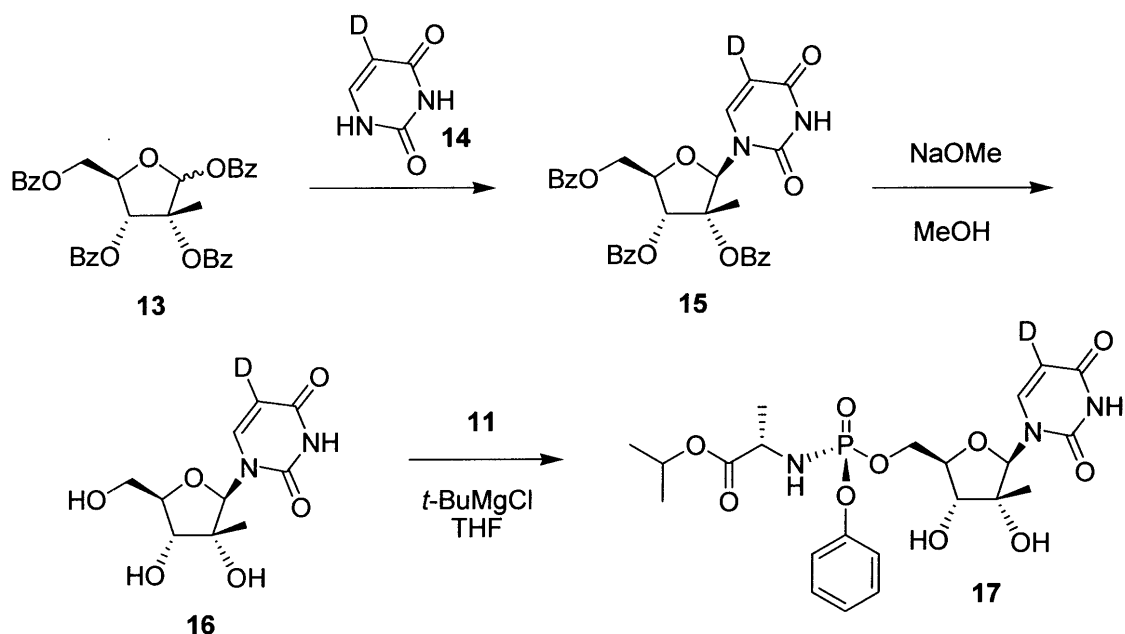
実施例 4 に記載されるのと類似の様式で、化合物 12 の他の立体異性体を用い、実施例 12 に記載される化合物 31 を製造することができる。

【0159】

(実施例 6. (S)-イソプロピル 2-(((S)-((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(5-重水素-2, 4-ジオキソ-3, 4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-3, 4-ジヒドロキシ-4-メチルテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(フェノキシ)ホスホリル)アミノ)プロパノエート(化合物 17)の製造)

40

【化 29】



10

【0160】

20

Harry - O'kuruら、(J. Org. Chem. 1997、62、1754)に記載される手順に従って、重水素化されていないウラシルを用い、1, 2, 3, 5 - テトラ - O - ベンゾイル - 2 - C - メチル - D - リボフラノース 13 (2.44 g) をウラシル - 5 - d₁ 14 (1.0 g) で処理し、保護されたヌクレオシド 15 を与える。化合物 15 を MeOH 中の NaOMe で処理し、2' - C - メチルウリジン - 5 - d₁ (16) を与える。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K): 1.16 (s, 3H), 3.78 (dd, J = 12.5 Hz, 2.6 Hz, 1H), 3.84 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.92 (app t の d, J = 9.2 Hz, 2.4 Hz, 1H), 3.98 (dd, J = 12.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 8.14 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, 300 K): 20.2, 60.5, 73.4, 80.0, 83.9, 93.1, 142.4, 152.5, 166.0 (ウラシル C - 5 は観察されない)。

30

【0161】

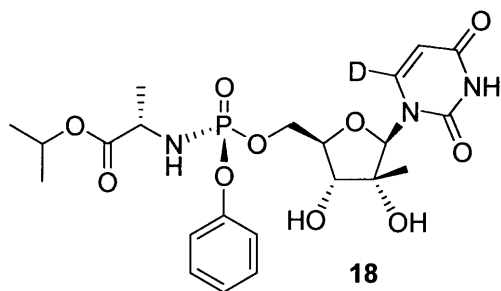
実施例 3 に記載されるのと類似の様式で、化合物 16 (0.7 g) をホスホルアミデート誘導体 17 に変換した。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K): 1.15 (s, 3H), 1.21 (2 × d, J = 6.3 Hz, 6H), 1.35 (dd, J = 7.2 Hz, J_{H, P} = 0.9 Hz, 3H), 3.79 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.91 (dq, J_{H, P} = 10.0 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 4.08 (m, 1H), 4.37 (ddd, J = 11.8 Hz, J_{H, P} = 5.9 Hz, J = 3.7 Hz, 1H), 4.50 (ddd, J = 11.8 Hz, J_{H, P} = 5.9 Hz, J = 2.0 Hz, 1H), 4.96 (7 重線, J = 6.3 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.67 (s, 1H); ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD, 300 K): 3.8; LC - MS: 529 amu (M + 1)。

40

【0162】

(実施例 7. (S) - イソプロピル 2 - ((S) - ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (6 - 重水素 - 2, 4 - ジオキソ - 3, 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2H) - イル) - 3, 4 - ジヒドロキシ - 4 - メチルテトラヒドロフラン - 2 - イル) メトキシ) (フェノキシ) ホスホリル) アミノ) プロパノエート (化合物 18) の製造)

【化 3 0】



【0163】

10

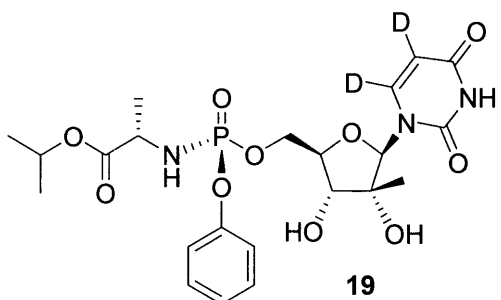
化合物 18 を、化合物 17 について実施例 6 で上に記載したのと類似の様式で、ウラシル - 6 - d₁ を用いて製造した。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K) : 1.15 (s, 3H), 1.21 (2x d, J = 6.3 Hz, 6H), 1.35 (dd, J = 7.2 Hz, J_{H, P} = 0.9 Hz, 3H), 3.79 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.91 (dq, J_{H, P} = 10.0 Hz, J = 7.1 Hz, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.37 (ddd, J = 11.8 Hz, J_{H, P} = 5.9 Hz, J = 3.7 Hz, 1H), 4.50 (ddd, J = 11.8 Hz, J_{H, P} = 5.9 Hz, J = 2.0 Hz, 1H), 4.96 (7 重線, J = 6.3 Hz, 1H), 5.60 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.37 (m, 2H); ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD, 300 K) : 3.8; LC-MS : 529 amu (M + 1)。

20

【0164】

(実施例 8. (S) - イソプロピル 2 - ((S) - ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (5, 6 - ジ重水素化 - 2, 4 - ジオキソ - 3, 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2H) - イル) - 3, 4 - ジヒドロキシ - 4 - メチルテトラヒドロフラン - 2 - イル) メトキシ) (フェノキシ) ホスホリル) アミノ) プロパノエート (化合物 19) の製造)

【化 3 1】



30

【0165】

化合物 19 を、化合物 17 について実施例 6 で上に記載したのと類似の様式で、ウラシル - 5, 6 - d₂ を用いて製造した。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K) : 1.15 (s, 3H), 1.21 (2x d, J = 6.3 Hz, 6H), 1.35 (dd, J = 7.2 Hz, J_{H, P} = 0.9 Hz, 3H), 3.79 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.91 (dq, J_{H, P} = 10.0 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.37 (ddd, J = 11.8 Hz, J_{H, P} = 5.9 Hz, J = 3.7 Hz, 1H), 4.50 (ddd, J = 11.8 Hz, J_{H, P} = 5.9 Hz, J = 2.0 Hz, 1H), 4.96 (7 重線, J = 6.3 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.37 (m, 2H); ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD, 300 K) : 3.8; LC-MS : 530 amu (M + 1)。

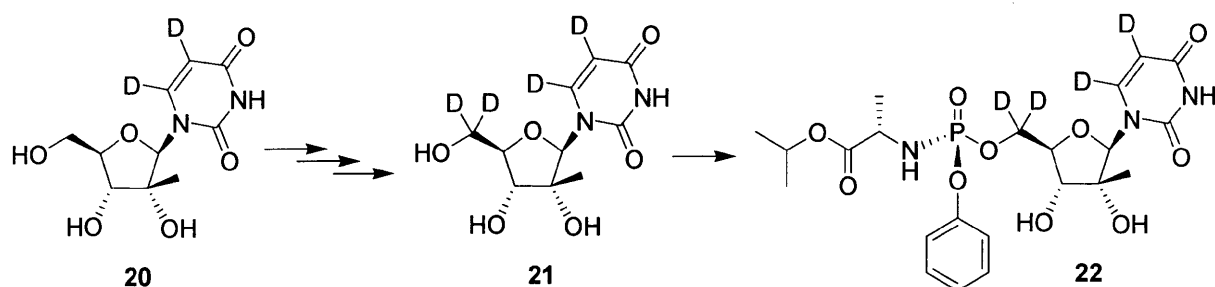
40

【0166】

50

(実施例 9. (S)-イソプロピル 2-(((S)-(((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(5, 6-ジ重水素化-2, 4-ジオキソ-3, 4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-3, 4-ジヒドロキシ-4-メチルテトラヒドロフラン-2-イル)ジ重水素化メトキシ)(フェノキシ)ホスホリル)アミノ)プロパノエート(式 I、化合物 22)の製造)

【化 3 2】



10

【0167】

ヌクレオシド 20 を、化合物 16 について実施例 6 で上に記載したのと類似の様式で、ウラシル-5, 6-d₂ を用いて製造した。実施例 2 および 3 の化合物 8 について記載されたのと類似の様式で、ヌクレオシド 20 を、重水素化されたヌクレオシド 21 に変換した。21 の分光データ：¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K) : 1.15 (s, 3H), 3.84 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.91 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.95 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, 300 K) : 20.2, 73.4, 80.0, 83.8, 93.1, 152.5, 166.0 (リボース C-5', ウラシル C-5 および ウラシル C-6 は、観察されない)。ヌクレオシド 21 を、実施例 3 に記載されたのと類似の様式でホスホルアミデート誘導体 22 に変換した。22 の分光データ：¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K) : 1.15 (s, 3H), 1.21 (2x d, J = 6.3 Hz, 6H), 1.35 (dd, J = 7.2 Hz, J_{H, P} = 0.9 Hz, 3H), 3.79 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.91 (dq, J_{H, P} = 10.0 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 4.08 (dd, J = 9.2 Hz, J_{H, P} = 2.2 Hz, 1H), 4.96 (7 重線, J = 6.3 Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.37 (m, 2H); ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD, 300 K) : 3.8; LC-MS : 532 amu (M+1)。

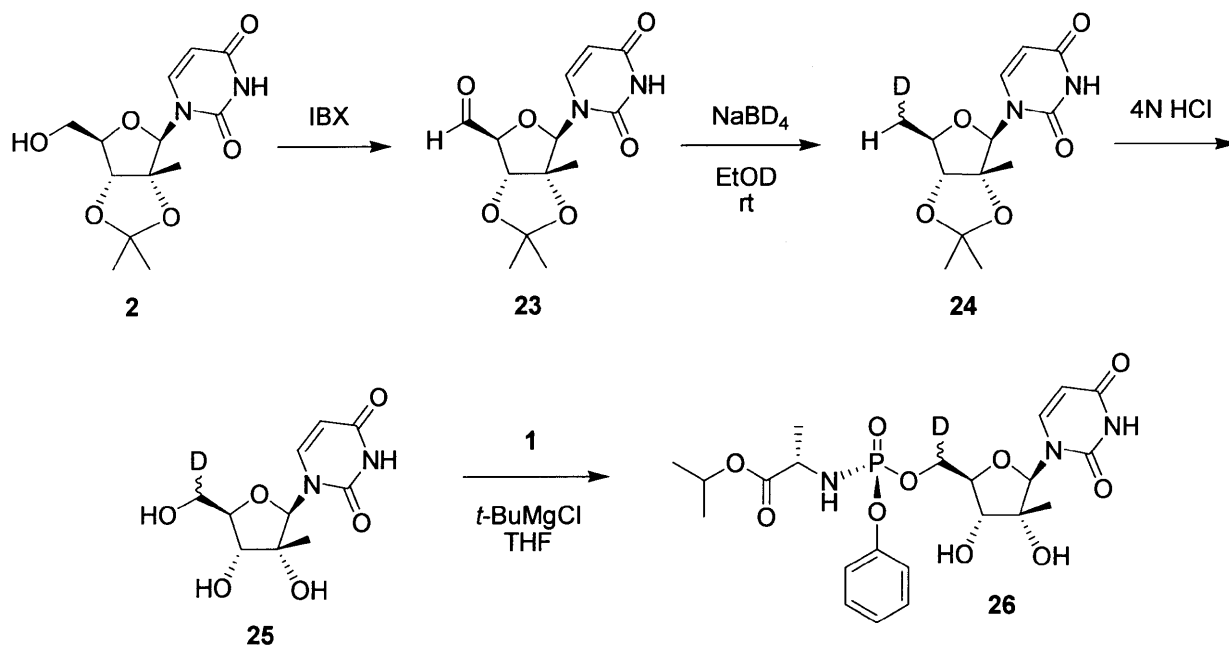
20

30

【0168】

(実施例 10. (S)-イソプロピル 2-(((S)-(((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(2, 4-ジオキソ-3, 4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-3, 4-ジヒドロキシ-4-メチルテトラヒドロフラン-2-イル)重水素化メトキシ)(フェノキシ)ホスホリル)アミノ)プロパノエート(式 III、化合物 26)の製造)

【化 3 3】



10

20

【0169】

市販の2-ヨードオキソ安息香酸 (IBX、3.54 g) をアセトニトリル (30 mL × 2 回)、アセトン (20 mL × 2 回) および Et₂O (10 mL) で連続して洗浄し、次いで、使用前に減圧下で十分に乾燥させる。2 (0.894 g) および洗浄した IBX (2.52 g) の無水アセトニトリル (90 mL) 中の混合物を2時間再び還流させる。混合物を冷却し、濾過して固体を除去する。濾液を濃縮し、CH₂Cl₂ で処理する。固体を濾過によって再び除去し、濾液を減圧下で濃縮し、23 を無色泡状物として得る。

【0170】

化合物 23 (1.19 g) を EtOD (15 mL) に溶解し、この濁った溶液に、0 で、攪拌しつつ、NaBD₄ (0.168 g) を 0 で何回かにわけて加える。反応混合物を室温で2時間攪拌し、次いで、飽和水 NH₄Cl 溶液 (1 mL) を加える前に 0 まで冷却し、反応をクエンチする。塩水 (30 mL) を加え、混合物を EtOAc で抽出する (30 mL × 5 回)。混合した有機抽出物を無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、減圧下で乾燥するまで蒸発させる。未精製物質をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し (溶出液として CH₂Cl₂ 中の 10% MeOH)、24 を得る。

30

【0171】

化合物 25 を、実施例 2 および 3 の化合物 8 について記載したのと類似の様式で製造する。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K): 1.16 (s, 6 H), 3.76 (br d, 2.6 Hz, 1 H), 3.84 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 3.92 (d of d, J = 9.2 Hz, 2.4 Hz, 2 H), 3.96 (br d, J = 2.2 Hz, 1 H), 5.67 (d, J = 8.1 Hz, 2 H), 5.96 (s, 2 H), 8.14 (2 × d, J = 8.1 Hz, 2 H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, 300 K): 20.2, 60.2 (t, J_{H, D} = 21.3 Hz), 73.4, 80.0, 83.8, 93.1, 102.3, 142.5, 152.5, 166.0。

40

【0172】

ホスホルアミデート 26 を、化合物 10 について実施例 3 で上に記載したのと類似の様式で製造する。

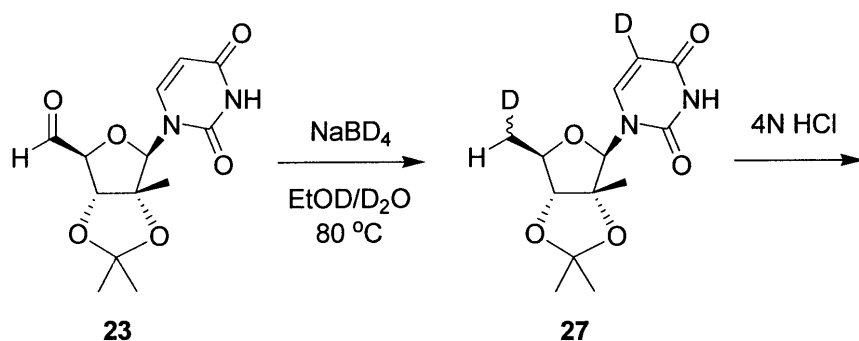
【0173】

(実施例 11. (S) - イソプロピル 2 - ((S) - ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (5 - 重水素 - 2, 4 - ジオキソ - 3, 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H

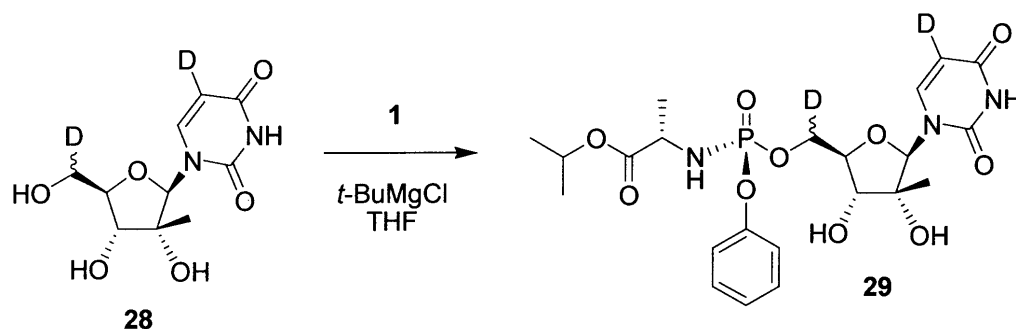
50

)-イル)-3,4-ジヒドロキシ-4-メチルテトラヒドロフラン-2-イル)重水素化メトキシ)(フェノキシ)ホスホリル)アミノ)プロパノエート(式III、化合物29)の製造)

【化34】



10



20

【0174】

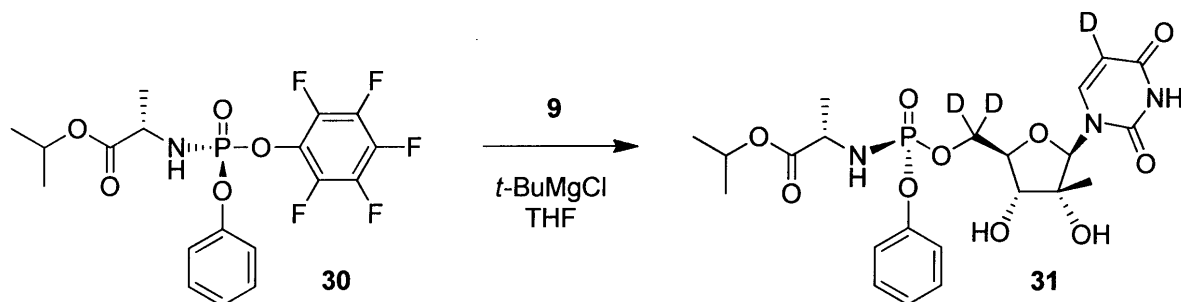
化合物27、28および29を、実施例3に記載したのと類似の方法を用いて製造する。29の分光データ：¹H NMR(400MHz, CD₃OD, 300K): 1.16(s, 6H), 3.76(br d, 2.6Hz, 1H), 3.84(d, J=9.2Hz, 2H), 3.92(d of d, J=9.2Hz, 2.4Hz, 2H), 3.96(br d, J=2.2Hz, 1H), 5.96(s, 2H), 8.14(2xs, 2H); ¹³C NMR(100MHz, CD₃OD, 300K): 20.2, 60.2(t, J_{H,D}=21.4Hz), 73.4, 80.0, 83.8, 93.1, 142.4, 152.5, 166.0(ウラシルC-5は観察されない)。

30

【0175】

(実施例12. (S)-イソプロピル 2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(5-重水素-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-3,4-ジヒドロキシ-4-メチルテトラヒドロフラン-2-イル)ジ重水素化メトキシ)(フェノキシ)ホスホリル)アミノ)プロパノエート(化合物31)の製造)

【化35】



40

50

【0176】

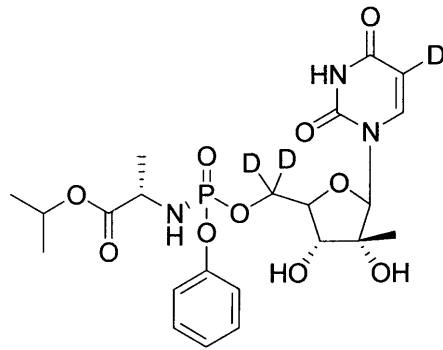
実施例1の化合物1の合成からの混合したMTBEおよびEtOAc/ヘキサン洗浄液を減圧下で濃縮し、30と1の混合物を得る。実施例3に記載したのと同様の様式で、ヌクレオシド9をこの混合物で処理し、ホスホルアミデート誘導体31および10を得る。純粋な31は、分取HPLCによって単離される。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 300 K): 1.15 (s, 3H), 1.24 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.25 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.34 (dd, J = 7.2 Hz, J_{H, P} = 1.0 Hz, 3H), 3.80 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.92 (dq, J_{H, P} = 9.0 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 4.12 (dd, J = 9.2 Hz, J_{H, P} = 2.7 Hz, 1H), 5.00 (7重線, J = 6.3 Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 7.22 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.72 (s, 1H); ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD, 300 K): 3.9; LC-MS: 531 amu (M + 1)。

10

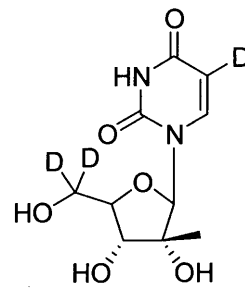
【0177】

(実施例13. ヒト肝細胞におけるヌクレオシド濃度の決定)
参照を容易にするために、この実施例で以下の式が参照される。

【化 3 6】

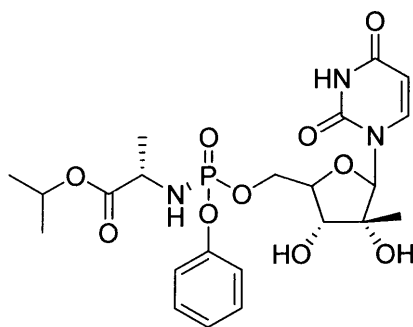


式 I I

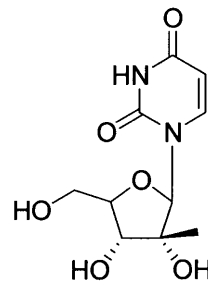


式 V I

10

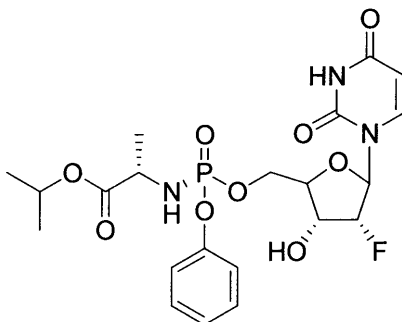


式 V I I



式 I X

20



式 X

30

【 0 1 7 8 】

(肝細胞の調製)

12ウェルフォーマットまたは6ウェルフォーマットに接種した新鮮な肝細胞を受領した(Life Technologies、カタログ番号HMFN12およびHMNF06)。受領したとき、運搬時の培地をすぐに除去し、1mLまたは2mLのあらかじめ加温した培地(改質されたChee培地を追加; Xenotech LLC、カタログ番号K2300)をそれぞれ12ウェルフォーマットおよび6ウェルフォーマットのために置き換えた。37℃、5%CO₂雰囲気下、細胞を一晩慣れさせた。12ウェルフォーマットおよび6ウェルフォーマットから培地を吸引し、それぞれ、20μMの式II、20μMの式VII、または溶媒コントロール(0.05% DMSO)のいずれかを含む新鮮な培地1mLまたは2mLと交換した。サンプルを、それぞれのウェルフォーマットにおいて、式IIについて2個ずつ、式VIIについて1個ずつ、37℃、5%CO₂雰囲気下でインキュベートした。細胞が存在しない状態での化合物の安定性もアッセイした。

40

50

時間で、培地を除去し、凍結させた。細胞を低温のPBSで2回洗浄した。内部標準として式Xを含む70%の低温のメタノール（それぞれ12ウェルフォーマットおよび6ウェルフォーマットについて、0.75 mLまたは1.5 mL）をそれぞれのウェルに加え、プレートから掻き取ることによって穏やかに除去した。回収された細胞をメタノール溶液に懸濁させ、これをバイアルに吸引し、-80 で凍結させた。

【0179】

（肝細胞の抽出およびLC-MS/MS分析）

70%メタノール中、細胞溶液を-80で一晩抽出し、冷凍庫から取り出し、解凍し、ボルテックスで攪拌した。4、3000 rpmで15分間、管を遠心分離処理した。上澄みを除去し、LC-MS/MSによって分析した。6種類の濃度の式II、式VII、式VIまたは式IXを、DMSOで3倍連続希釈することによって製造した。特定の濃度の化合物の小分け分を、内部標準が入った70%メタノールに入れた。化合物が存在しない状態でインキュベートした実験からの細胞溶液にも2種類の濃度を添加した。サンプルを-80で一晩凍結させ、次いで、解凍し、ボルテックスで攪拌した。3000 rpmで15分間、サンプルを遠心分離処理した。上澄みを除去し、LC-MS/MSによって分析した。校正濃度は、5、1.67、0.556、0.185、0.0617および0.0206 μ Mであった。装置応答を用いた校正標準値の線形回帰を用い、検体を定量した。使用した許容基準および校正標準濃度は、見かけ濃度の $\pm 30\%$ であった。特定の基準を満たさなかった校正標準は、校正曲線に使用しなかった。操作中の標準濃度の少なくとも66%が見かけ値の30%以内である場合、サンプル値を許容した。操作の許容に必要な「r」値は、0.98より大きかった。細胞からの内部標準の抽出効率がわずか81%であることに起因して、内部標準を用いずに、細胞サンプルを分析し、一方、細胞を用いずに校正を行い、もっと正確な濃度の決定を得た。

10

20

【0180】

（肝細胞培地の抽出およびLC-MS/MS分析）

肝細胞培地をインキュベートし、これを冷凍庫から取り出し、解凍し、ボルテックスで攪拌した。2部の肝細胞培地を、1部のアセトニトリルを含有する内部標準に対してインキュベートし、これを混合し、次いで、3000 rpm、4で15分間遠心分離処理した。上澄みを除去し、LC-MS/MSによって分析した。6種類の濃度の式II、式VII、式VIまたは式IXを、DMSOで3倍連続希釈することによって製造した。化合物の小分け分を新鮮な肝細胞培地に入れ、5、1.67、0.556、0.185、0.0617および0.0206 μ Mの校正培地の濃度を得た。2部の校正培地を1部のアセトニトリルを含有する内部標準と混合し、4、3000 rpmで15分間遠心分離処理した。上澄みを除去し、LC-MS/MSによって分析した。装置応答を用いた校正標準値の線形回帰を用い、サンプル中の検体濃度を定量した。使用した許容基準および校正標準濃度は、見かけ濃度の $\pm 30\%$ であった。特定の基準を満たさなかった校正標準は、校正曲線に使用しなかった。操作中の標準濃度の少なくとも66%が見かけ値の30%以内である場合、サンプル値を許容した。操作の許容に必要な「r」値は、0.98より大きかった。

30

40

【0181】

データを図1および図2に示す場合、重水素化されていないホスホルアミデートと共にインキュベートしたサンプル中に、5'-重水素化されたホスホルアミデートを用いた場合よりも多くの脱ホスホリル化されたヌクレオチド（すなわち、望ましくない5'-OHヌクレオシド）が存在する。具体的には、20 μ Mの式IIまたはその重水素化されていない対応物である式VIIを用いると（0.67百万の細胞/ウェルで24時間接種した肝細胞を含む12ウェルプレート（1 mL））、5'-重水素化された形態（式VI）から得られるものと比較して、1.9倍（培地、すなわち、細胞外濃度）および2.9倍（細胞抽出物、すなわち、細胞内）高い濃度の重水素化されていない脱ホスホリル化された2'-メチルウリジン（式IX）が得られる。20 μ Mの式IIまたはその重水素化されていない対応物（式VII）のインキュベーションの結果（1.7百万の細胞/ウェルで

50

24時間接種した肝細胞を含む6ウェルプレート(2ml))は、5'-重水素化された形態(式VI)から得られるものと比較して、1.5倍(細胞抽出物、すなわち、細胞内濃度)および2.8倍(細胞抽出物、すなわち、細胞内)高い濃度の重水素化されていない脱ホスホリル化された2'-メチルウリジン(式IV)が得られる。従って、平均で、肝細胞のヌクレオチダーゼ活性によって、5'-位置が重水素化されていない場合、ほぼ2倍の5'-OH-ヌクレオシドが生成する。5'-重水素化されたホスホリアミデートが使用される場合、トリホスフェートに対する活性化に利用可能な5'-モノホスフェート保持量のこの違いは、薬物の効能、投薬量、毒性および/または薬物動態に顕著な効果を有するだろう。

【0182】

(実施例14. VX-135-TPのトリホスフェートのレベルと比較した、トリホスフェートのレベル(式IV))

VX-135トリホスフェートのレベルに対し、式IVのトリホスフェートのレベルを比較した3つの実験の結果をこの実施例に記載する。実施例13に記載した一般的な方法に従って、ヒト肝細胞を使用した。ヒト肝細胞で作られる式IVの濃度(pmol/細胞100万個)を、5μMの式IIと共にインキュベートして2、4、8、25または48時間目に決定した。

【0183】

実施例14および図3にさらに記載されるように臨床試験の候補物質の比較として、Alios(EASL 2013)によって示される広告は、50μMのVX-135と共にインキュベートして24時間後のヒト肝細胞で測定したVX-135トリホスフェートのレベルが、1174pmol/細胞100万個であることを示す。対照的に、5μM(すなわち、低い方の濃度の10倍)の式IIと共にヒト肝細胞を25時間インキュベートした後の式IVのレベルは、486pmol/細胞100万個である。従って、式IIのインキュベートによって作られるトリホスフェートの量は、VX-135によって作られるトリホスフェートの量よりも4倍大きい(用量が正規化された)。VX-135の正確な構造は現時点で知られていないが、ウリジンヌクレオチドアナログプロドラッグNS5B阻害剤である。

【0184】

(実施例15. 式IIの投薬からの式IV濃度の決定)

ヒト肝細胞における式II(μM)の濃度の結果として、式IVの濃度(ng/ml)の関係を決定した。実施例13の一般的な方法を使用し、化合物の濃度を決定した。0.15、0.45および1.35μMの式IIと共にインキュベートして24時間後に、ヒト肝細胞の式IVの濃度を決定した。結果をプロットし、Microsoft Excelを用いて線形回帰を計算した。図4に示されるように、式IIの投薬量について試験された濃度と、活性なトリホスフェート化合物(式IV)の得られた濃度に線形の関係が存在する。

【0185】

さらに、初代肝細胞において、50nMの式IIを24時間インキュベートした後、式IVのレベルは、9.2~16.2pmol/細胞100万個の範囲であった。これらの濃度は、Huh-1uc/neo細胞を50nMの式IIでインキュベートしたときに得られた値より5~8倍大きい。式IVが、Huh-1uc/neo細胞中のHCVレプリコンの複製を阻害する活性種であるため、初代ヒト肝細胞中の式IIの予想されたEC₅₀は、6.25~10nMであると思われる(初代肝細胞における推定HCVに対する)、式IIと式IVの間に図4で得られる線形の関係がもっと低い濃度で続くことを推定している。

【0186】

(実施例16. 式IVおよびGS-7977-TPの半減期の決定)

この実施例では、実施例13の一般的な方法を用い、ヒト、イヌ、サルおよびラット肝細胞における活性なトリホスフェート(式IVまたはGS-7977-TP)の半減期を

10

20

30

40

50

決定した。簡単にいうと、式ⅠⅠまたはGS-7977（ソバルディ）を選択した濃度で肝細胞（ヒト、イヌ、サルおよびラット）に加え、37℃でインキュベートした。式ⅠⅤまたはGS-7977-TP（活性なトリホスフェート代謝物）の上澄み細胞抽出物を、タンデム質量分光検出を備える高速液体クロマトグラフィー（LC-MS/MS）によって測定した。半減期決定のために使用したヒト肝細胞は、ヒト肝細胞12ウェルフォーマットの細胞であり、これを0.67百万個の細胞/ウェルになるように接種した。半減期決定のために使用したイヌ肝細胞は、ビーグル犬肝臓の12ウェルフォーマット細胞であり、これを0.67百万個の細胞/ウェルになるように接種した。半減期決定のために使用したサル肝細胞は、カニクイザル肝細胞の12ウェルフォーマット細胞であり、これを0.9百万個の細胞/ウェルになるように接種した。半減期決定のためのラット肝細胞は、Sprague-Dawley（SD）ラット肝細胞の細胞であり、これを0.67百万個の細胞/ウェルになるように接種した。すべての細胞をLife Technologiesから得た。

10

【0187】

図5に示されるように、すべての4種からの肝細胞において、式ⅠⅤの半減期は、ソバルディのトリホスフェートの半減期より長い。最も長い半減期は、ヒト肝細胞であり、その後、イヌ、次いで、サル、次いで、ラットであった。半減期は、式ⅠⅤについて10～30時間の範囲であり、ソバルディトリホスフェートについて8～23時間の範囲であった。

20

【0188】

（実施例17．ヒト肝細胞におけるトリホスフェートのレベル（式ⅠⅤおよびGS-7977-TP））

この実施例では、式ⅠⅤおよびGS-7977-TPのトリホスフェートのレベルを、実施例13に記載されるような一般的な方法を用いて決定した。図3の表に記載されるような式ⅠⅤのトリホスフェートのレベルを決定する3つの実験の結果を、図6にグラフによってプロットする。ソバルディ（GS-7977）の対応するトリホスフェートのレベルも、比較のために決定し、図7に示される。簡単にいうと、5μMの式ⅠⅠまたはGS-7977（ソバルディ）と共にインキュベートしてからそれぞれ2、4、8、25または48時間目に、ヒト肝細胞で作られる式ⅠⅤまたはGS-7977-TPの濃度（pmol/細胞100万個）を決定した。

30

【0189】

さらに、実施例17および図6および7に記載されるように、48時間、ヒト肝細胞で測定される場合、対応するソバルディトリホスフェート（GS-7977）への細胞内での変換は、式ⅠⅠ（すなわち、式ⅠⅤ）から誘導されるトリホスフェートの変換よりも2倍大きい。式ⅠⅤの濃度は、48時間目でもまだ増加しており、一方、ソバルディトリホスフェート代謝物の濃度は、24時間から48時間まで減少する。式ⅠⅤの濃度が増加すると、その半減期が24時間を超えることと合わせて、繰り返し投薬で肝細胞中の式ⅠⅤ（式ⅠⅠのトリホスフェート）のレベルの蓄積を示唆する。この傾向は、in vivoでの初期投薬から馴化まで量を上げていった後、ソバルディトリホスフェートよりも式ⅠⅠから誘導されるトリホスフェートについて、in vivoで式ⅠⅤの高い濃度での一定状態を生じさせることができる。それに加え、式ⅠⅤ（式ⅠⅠのトリホスフェート）の固有の有効性（NS5BのRdRp活性に対する阻害効果）は、ソバルディトリホスフェートの固有な有効性より1.5倍高い。

40

【0190】

（実施例18．NS5B RNAポリメラーゼIC₅₀の決定）

初期のRNAへの[³²P]-CTPの組み込みによって、HCV 5'非翻訳領域（NTR）から誘導され、内部リボソームエンタリー部位（IRES）を含むネガティブ鎖RNAテンプレートから合成されるNS5B RNAポリメラーゼ反応を監視した。

【0191】

ネガティブ鎖IRES RNAテンプレートを作成するために、プライマー5'-NT

50

R - 1 - 2 1 (G C C A G C C C C C T G A T G G G G G C G A C A C T C C A C) およ
び T 7 - 5 N T R - 3 4 1 - 3 1 7 (G A A A T T A A T A C G A C T C A C T A T A G
G G G G T G C A C G G T C T A C G A G A C C T C C 、下線部は T 7 プロモーター配列
) を用い、二本鎖 DNA (N T R 塩基 1 - 3 4 1) を、H C V p F K - I _{3 4 1} P I -
L u c / N S 3 - 3 ' / E T プラスミドから増幅させた。ネガティブ鎖 RNA は、T 7
RNA ポリメラーゼ (M E G A s c r i p t T 7 T r a n s c r i p t i o n K i
t 、L i f e T e c h n o l o g i e s) を用い、この二本鎖 DNA から転写された。
RNA は、反応要素 (M E G A c l e a r 、L i f e T e c h n o l o g i e s) から
精製され、アガロースゲル電気泳動および光吸収から、その収率および純度を評価する。

【 0 1 9 2 】

I C ₅₀ 決定のための N S 5 B RNA ポリメラーゼ反応を、アッセイバッファー (5
0 m M N a ⁺ H E P E S 、1 m M M g C l ₂ 、0 . 7 5 m M M n C l ₂ 、2 m M
D T T 、p H 7 . 5) 、1 U / μ L S U P E R a s e \cdot I n (L i f e T e c h n
o l o g i e s) 、2 0 n g / μ L I R E S RNA テンプレート、最終的な比活性が
5 0 C i / m m o l (P e r k i n E l m e r) で [- ^{3 2} P] - C T P を含む 1 μ M
のそれぞれの A T P 、C T P 、G T P および U T P (L i f e T e c h n o l o g i e
s) 、1 0 点の一連の半 l o g 希釈での試験化合物および N S 5 B ポリメラーゼを含む 2
0 μ L 反応物中、9 6 ウェルマイクロタイタープレートで行った。反応を 2 7 ° で 6 0 分
間インキュベートし、1 \times 停止溶液 (最終濃度 1 4 4 m M クエン酸 N a ⁺ 、1 . 4 4 M
N a C l 、1 0 m M E D T A 、p H 7 . 0) 中、1 0 0 μ L まで希釈することによっ
て停止させた。8 0 μ L の停止したサンプルを減圧によってナイロン膜フィルターマッ
(P e r k i n E l m e r) に適用し、6 0 m M クエン酸 N a ⁺ で 4 回洗浄し、6 0 0
m M N a C l (p H 7 . 0) で洗浄し、続けて、H ₂ O および E t O H で洗浄し、乾燥
させ、シンチレーターカセット (P e r k i n E l m e r) を備える M i c r o B e t a
2 計測器で計算した。N S 5 B ポリメラーゼ活性は、並行反応で線形範囲にあることが示
された。化合物活性を、非線形回帰分析を用いた S 字形のカーブフィッティング (P r i
s m ソフトウェア、G r a p h P a d 、L a J o l l a 、C A) によって、5 0 % (I
C ₅₀) まで放射線標識組み込みが減少した濃度として表した。

【 0 1 9 3 】

野生型 N S 5 B ポリメラーゼに対するヌクレオシドトリホスフェート化合物 (式 I V お
よび G S - 7 9 7 7 - トリホスフェート) の阻害活性を表 I に示す。I C ₅₀ 値は、野生
型 (W T) N S 5 B ポリメラーゼに対する化合物の N 個の独立した実験から平均 \pm 標準偏
差として表される。

【 表 1 】

表 I 化合物	G T - 1 b W T ^a	
	I C ₅₀ (μ M)	N
式 I V	1 . 4 \pm 0 . 1	4
G S - 7 9 7 7 - T P	2 . 1 \pm 0 . 3	4

【 0 1 9 4 】

本明細書は、添付の実施例によって示される実施態様を参照しつつ記載されてきた。し
かし、本発明は、異なる形態で具現化することができ、本明細書に記載する実施態様に限
定されるものと解釈すべきではない。本明細書の教示によれば、当業者は、望ましい目的
のために本発明を変えることができ、このような変形は、本開示の範囲内であると考えら
れる。

【 図 1 】

元々の化合物 式ⅠⅠ	肝細胞培養地		培養地の体積に調整された肝細胞抽出物	
	T 24時間で の元々の化合物 物の残存率%	37℃、T 24時間 での元々の化合物の バックワー安定性	スクレオノンド (式Ⅰ X また は式ⅠⅠ)	
			濃度 (μM)	% 20μM 投薬量
式ⅠⅠ	0.82	97	8.4	42
式ⅠⅠ	0.41	97	4.4	22
			濃度 (μM)	% 20μM 投薬量
			<0.02	0.044
			<0.02	0.015
				0.22
				0.08

【 図 2 】

元々の化合物 式ⅠⅠ	肝細胞培養地		培養地の体積に調整された肝細胞抽出物	
	T 24時間で の元々の化合物 物の残存率%	37℃、T 24時間 での元々の化合物の バックワー安定性	スクレオノンド (式Ⅰ X また は式ⅠⅠ)	
			濃度 (μM)	% 20μM 投薬量
式ⅠⅠ	4.9	97	5.2	26
式ⅠⅠ	3.9	97	3.4	17
			濃度 (μM)	% 20μM 投薬量
			<0.02	0.057
			<0.02	0.020
				0.28
				0.10

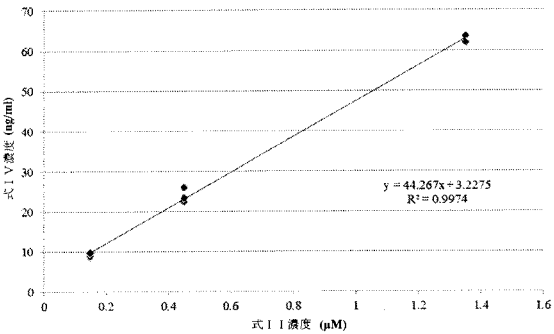
【 図 3 】

時間 (hr)	式ⅠⅠ (p m o l /細胞 100 万個)				VX-135-TP (p m o l /細胞 100 万個)
	rep1	rep2	rep3	平均±標準偏差	
2	72.1	71.5	67.9	70.5±2.25	
4	130	129	129	129±0.62	
8	218	217	236	224±10.6	
25	506	465	488	486±20.9	117.4 (正規化された投薬量)
48	619	581	575	592±24.3	

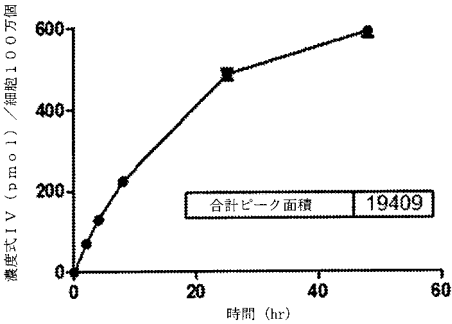
【 図 5 】

種	式ⅠⅠ t _{1/2} (hr)	GS-7977-TP t _{1/2} (hr)
ヒト	27.6 (26.0-29.4) ^a	22.6 (21.5-23.9)
イヌ	29.6 (22.0-45.4)	17.7 (15.0-21.5)
サル	14.5 (11.8-18.9)	9.3 (7.9-11.4)
ラット	10.2 (8.6-12.5)	7.6 (6.4-9.3)

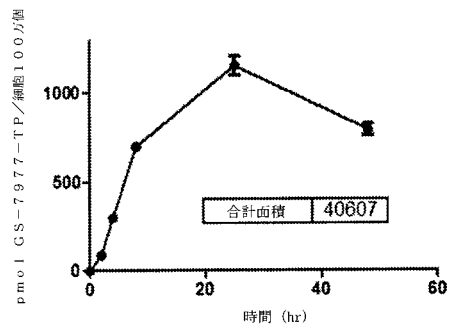
【 図 4 】



【 図 6 】



【図 7】



【配列表】

2016518359000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/034018

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07H19/067 A61K31/7072 A61P31/14 C07B59/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H A61K A61P C07B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/135569 A1 (PHARMASSET INC [US]; ROSS BRUCE S [US]; SOFIA MICHAEL JOSEPH [US]; PAM) 25 November 2010 (2010-11-25) the whole document	1-21
A	WO 2012/142523 A2 (GILEAD SCIENCES INC [US]; CHO AESOP [US]; KIM CHOUNG U [US]; KIRSCHBER) 18 October 2012 (2012-10-18) the whole document ----- -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 June 2014		27/06/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Klein, Didier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/034018

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>THOMAS J. TOLBERT ET AL: "Preparation of Specifically Deuterated and ¹³ C-Labeled RNA for NMR Studies Using Enzymatic Synthesis +", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 119, no. 50, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 12100-12108, XP055122761, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja9725054 the whole document -----</p>	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/034018

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010135569 A1	25-11-2010	AR 082937 A1	23-01-2013
		AU 2010249481 A1	15-12-2011
		CA 2763151 A1	25-11-2010
		CA 2819700 A1	25-11-2010
		CN 102459299 A	16-05-2012
		CO 6470789 A2	29-06-2012
		EA 201171417 A1	30-05-2012
		EP 2432792 A1	28-03-2012
		EP 2610264 A2	03-07-2013
		JP 2012527477 A	08-11-2012
		KR 20120034662 A	12-04-2012
		NZ 596635 A	30-05-2014
		SG 176197 A1	29-12-2011
		TW 201107341 A	01-03-2011
		US 2010298257 A1	25-11-2010
		US 2013137654 A1	30-05-2013
		US 2013165401 A1	27-06-2013
		US 2013165644 A1	27-06-2013
		US 2014121366 A1	01-05-2014
		WO 2010135569 A1	25-11-2010

WO 2012142523 A2	18-10-2012	AU 2012242517 A1	03-10-2013
		CA 2830689 A1	18-10-2012
		CN 103476783 A	25-12-2013
		EA 201391264 A1	31-03-2014
		EP 2697241 A2	19-02-2014
		KR 20140019832 A	17-02-2014
		US 2012263678 A1	18-10-2012
		WO 2012142523 A2	18-10-2012

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/4709 (2006.01)		A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 K	31/4709	
		A 6 1 P	31/12	Z N A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100188651

弁理士 遠藤 広介

(72)発明者 ミリンド、デシュパンデ

アメリカ合衆国コネチカット州、マディソン、フィールド、ブルック、ロード、44

(72)発明者 ジェイソン、アラン、ワイルス

アメリカ合衆国コネチカット州、マディソン、プリンシェッド、ロード、116

(72)発明者 橋本 彰宏

アメリカ合衆国コネチカット州、ブランフォード、ローレル、ストリート、47

(72)発明者 アピナッシュ、パドケー

アメリカ合衆国コネチカット州、ブランフォード、ギルバート、レーン、51

Fターム(参考) 4C057 AA22 BB02 CC03 DD01 LL10 LL18 LL23

4C084 AA19 MA02 NA05 ZA75 ZB33 ZC20 ZC41 ZC75

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BC28 EA17 GA07 GA12 GA16 NA14

NA15 ZB33 ZC20 ZC41 ZC75