

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6431478号
(P6431478)

(45) 発行日 平成30年11月28日 (2018.11.28)

(24) 登録日 平成30年11月9日 (2018.11.9)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 31/16 (2006.01)	A 6 1 K 31/16	
A 6 1 K 31/165 (2006.01)	A 6 1 K 31/165	
請求項の数 12 (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-515256 (P2015-515256)	(73) 特許権者	515015252
(86) (22) 出願日	平成25年5月31日 (2013.5.31)		ドレクセル ユニバーシティ
(65) 公表番号	特表2015-518055 (P2015-518055A)		アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 フィ
(43) 公表日	平成27年6月25日 (2015.6.25)		ラデルフィア チェスナット ストリート
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/043691		3 1 4 1
(87) 国際公開番号	W02013/181584		
(87) 国際公開日	平成25年12月5日 (2013.12.5)		
審査請求日	平成28年5月18日 (2016.5.18)		
(31) 優先権主張番号	61/654,374		
(32) 優先日	平成24年6月1日 (2012.6.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 B型肝炎ウイルスのC C C D N A の転写の調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B型肝炎ウイルスの共有結合閉環状DNA (cccDNA) の転写の抑制における使用のための、クラスⅠヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤を含む組成物。

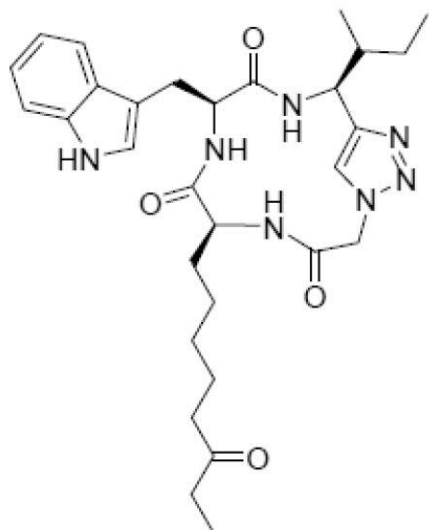
【請求項 2】

B型肝炎を処置するための、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

クラスⅠヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤が、トリコスタチンA、スベロイルビスヒドロキサム酸、4 - (ジメチルアミノ) - N - [7 - (ヒドロキシアミノ) - 7 - オキソヘプチル] ベンズアミド、アピシジン、

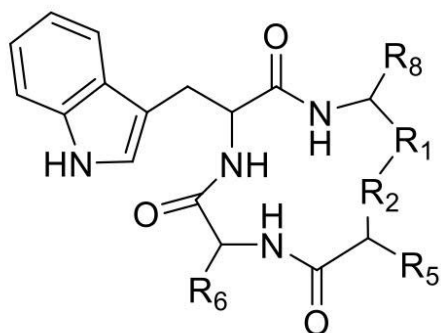
【化 1】



10

、または式：

【化 2】



20

式中、

 R_1 は、 $-(CH_2)_n-$ であり；

30

 R_2 は、3, 5 - トリアゾリルまたは $-C(Z)N(R_4)-$ であり； R_4 は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、またはカルボキシアルキルであり； R_5 は、水素、 $-CH_3$ 、または アミノ酸の側鎖基であり； R_6 は、 $-(CH_2)_mC(X)Y$ 、 $-(CH_2)_2CH_3$ 、または $-(CH_2)_q$ - フェニル $-(CH_2)_mC(=O)NHOH$ であり； X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、または $=N-NH-C(=O)NH_2$ であり； Y は、 $NHOH$ または $-CH_2CH_3$ であり； Z は、 H_2 または O であり； R_8 は、アルキルまたはカルボキシアルキルであり；

40

 n は、0 ~ 2 から選択される整数であり； m は、0 ~ 6 から選択される整数であり； q は、0 ~ 3 から選択される整数である、

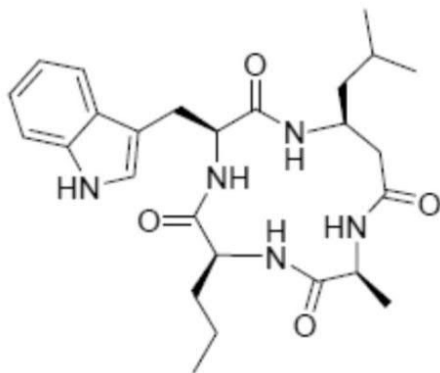
で示される化合物、

またはその立体異性体もしくは薬学的に許容可能なその塩である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

クラス I ヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤が、アピシジン、

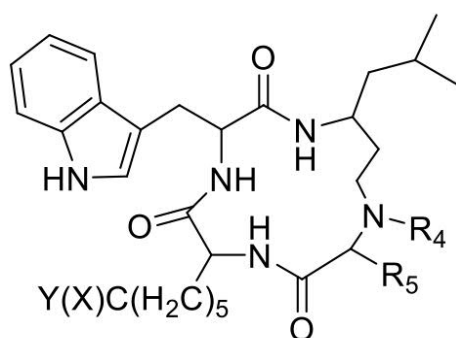
【化 3】



10

、または式

【化 4】



20

式中、

R_4 は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、またはカルボキシアルキルであり；

R_5 は、水素、 $-CH_3$ 、または アミノ酸の側鎖基であり；

X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、または $=N-NH-C(=O)NH_2$ であり；

Y は、 $NHOH$ または $-CH_2CH_3$ である、

30

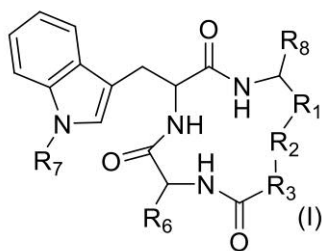
で示される化合物、

またはその立体異性体もしくは薬学的に許容可能なその塩である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

クラス I ヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤が、式 (I)：

【化 5】



40

式中、

R_1 は、 $-(CH_2)_n-$ または $-C(=O)-$ であり；

R_2 および R_3 は、次のように選択され：(a) R_2 が 3, 5 - トリアゾリルまたは $-C(Z)N(R_4)-$ であり、 R_3 が $-CH(R_5)-$ であるか、または (b) R_2 が窒素であり、 R_3 が $-CH-$ であり、 R_2 および R_3 が共にピペリジニルを形成する；

R_4 は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、または

50

カルボキシアルキルであり；

R_5 は、水素、 $-CH_3$ 、または アミノ酸の側鎖基であり；

R_6 は、 $-(CH_2)_m C(X)Y$ 、 $-(CH_2)_2 CH_3$ 、または $-(CH_2)_q$ - フェニル $-(CH_2)_m C(=O)NHOH$ であり；

X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、または $=N-NH-C(=O)NH_2$ であり；

Y は、 $NHOH$ または $-CH_2CH_3$ であり；

Z は、 H_2 または O であり；

R_7 は、水素またはアルコキシであり；

R_8 は、アルキルまたはカルボキシアルキルであり；

n は、0 ~ 2 から選択される整数であり；

m は、0 ~ 6 から選択される整数であり；

q は、0 ~ 3 から選択される整数である、

で示される化合物

またはその立体異性体もしくは薬学的に許容可能なその塩である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 6】

B 型肝炎ウイルスを調節する更なる剤の治療有効量を更に含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

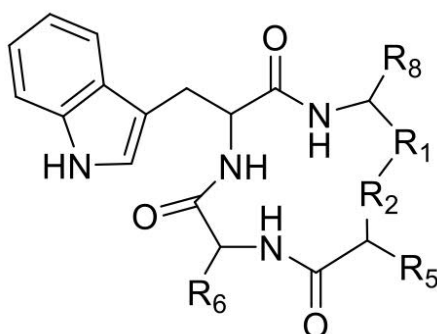
【請求項 7】

生体外系において B 型肝炎ウイルスの共有結合閉環状 DNA を抑制する方法であって、
クラス I ヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤を、B 型肝炎ウイルスに接触させること
を含む、前記方法。

【請求項 8】

前記クラス I ヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤は、トリコスタチン A、スベロイル
ビスヒドロキサム酸、4 - (ジメチルアミノ) - N - [7 - (ヒドロキシアミノ) - 7
- オキソヘプチル] ベンズアミド、アピシジン、または式：

【化 6】



式中、

R_1 は、 $-(CH_2)_n$ - であり；

R_2 は、3, 5 - トリアゾリル、または $-C(Z)N(R_4)-$ であり；

R_4 は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、またはカルボキシアルキルであり；

R_5 は、水素、 $-CH_3$ 、または アミノ酸の側鎖基であり；

R_6 は、 $-(CH_2)_m C(X)Y$ 、 $-(CH_2)_2 CH_3$ 、または $-(CH_2)_q$ - フェニル $-(CH_2)_m C(=O)NHOH$ であり；

X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、または $=N-NH-C(=O)NH_2$ であり；

Y は、 $NHOH$ または $-CH_2CH_3$ であり；

Z は、 H_2 または O であり；

R_8 は、アルキルまたはカルボキシアルキルであり；

n は、0 ~ 2 から選択される整数であり；

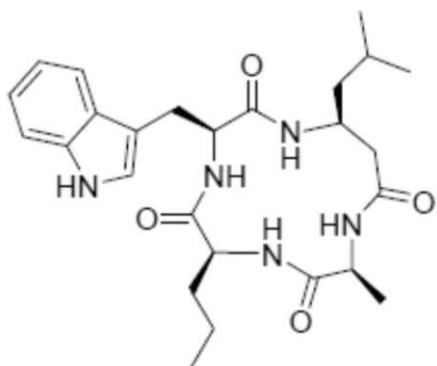
m は、0 ~ 6 から選択される整数であり；
q は、0 ~ 3 から選択される整数である、
で示される化合物、

またはその立体異性体もしくは薬学的に許容可能なその塩である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 クラス I ヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤は、アピシジン、

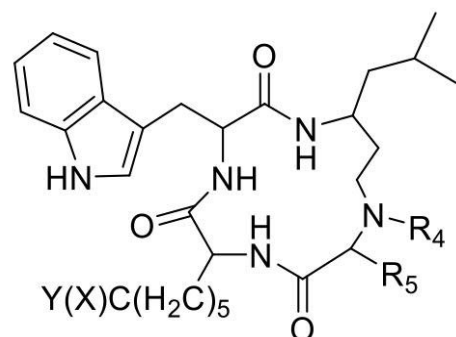
【化 7】



10

、または式

【化 8】



20

式中、

R_4 は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、またはカルボキシアルキルであり；

R_5 は、水素、 $-CH_3$ 、または アミノ酸の側鎖基であり；

X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、または $=N-NH-C(=O)NH_2$ であり；

Y は、 $NHOH$ または $-CH_2CH_3$ である、

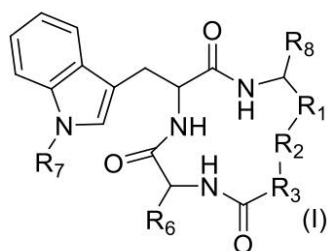
で示される化合物、

またはその立体異性体もしくは薬学的に許容可能なその塩である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 クラス I ヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤は、式 (I)：

【化 9】



30

40

式中、

50

R_1 は、 $-(CH_2)_n-$ または $-C(=O)-$ であり；

R_2 および R_3 は、次のように選択され：(a) R_2 が 3, 5 - トリアゾリルまたは $-C(Z)N(R_4)-$ であり、 R_3 が $-CH(R_5)-$ であるか、または (b) R_2 が窒素であり、 R_3 が $-CH-$ であり、 R_2 および R_3 が共にピペリジニルを形成する；

R_4 は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、またはカルボキシアルキルであり；

R_5 は、水素、 $-CH_3$ 、または アミノ酸の側鎖基であり；

R_6 は、 $-(CH_2)_mC(X)Y$ 、 $-(CH_2)_2CH_3$ 、または $-(CH_2)_q$ - フェニル $-(CH_2)_mC(=O)NH_2$ であり；

X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、または $=N-NH-C(=O)NH_2$ であり；

Y は、 NH_2 または $-CH_2CH_3$ であり；

Z は、 H_2 または O であり；

R_7 は、水素またはアルコキシであり；

R_8 は、アルキルまたはカルボキシアルキルであり；

n は、0 ~ 2 から選択される整数であり；

m は、0 ~ 6 から選択される整数であり；

q は、0 ~ 3 から選択される整数である、

で示される化合物、

またはその立体異性体もしくは薬学的に許容可能なその塩である、請求項 7 に記載の方法。

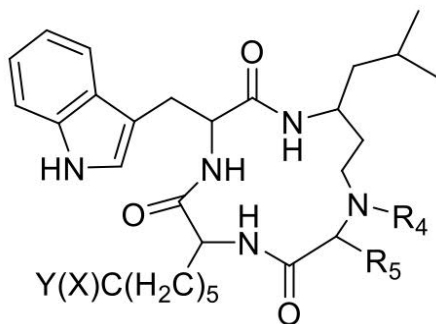
【請求項 11】

B 型肝炎ウイルスを調節する更なる剤を B 型肝炎ウイルスに接触させることを更に含む、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

式 (ii)

【化 10】



式中、

R_4 は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、またはカルボキシアルキルであり；

R_5 は、水素、 $-CH_3$ 、または アミノ酸の側鎖基であり；

X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、または $=N-NH-C(=O)NH_2$ であり；

Y は、 NH_2 または $-CH_2CH_3$ である、

で示される化合物、またはその立体異性体もしくは薬学的に許容可能なその塩。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年6月1日に出願された米国仮特許出願第61/654374号に基づく優先権を主張するものであり、その全内容は参照により本明細書に援用される。

【0002】

本開示は、B型肝炎ウイルスの共有結合閉環状DNAの調節ならびにB型肝炎の予防ま

10

20

30

40

50

たは処置のための薬剤、好ましくはヒストン脱アセチル化酵素活性を有する薬剤の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

現在、慢性のB型肝炎の取り扱いにはアメリカ食品医薬品局（FDA）に認可された7つの薬物治療があり、2種類のうちの1つにクラスされている：インターフェロン（IFN）およびポリメラーゼ阻害剤（Lok、A.S.、およびB.J. McMahon、2007、慢性B型肝炎の肝臓学45：507-539）。これらは3億5000万人以上の感染人口のおおよそ50%またはそれ以下の使用に推奨されている。このことは最も高いリスクのある人数であるが、処置のガイドラインから漏れた人々は肝臓の病気のリスクが著しく上昇するために、介在によって利益をももたらされ得る。インターフェロンは著しい副作用により制限される。ポリメラーゼ阻害剤は同じウイルスの生活環のステップを標的としており、従って、エイズウイルス（HIV）の防壁および治療的HCVセラピーとの併用療法の価値は限られている。これらは一生の使用を必要としており、エイズウイルス（HIV）の長期間に及ぶ薬物治療の使用、および薬品の抵抗力のある突然変異体の出現に見られるように、最終的な、使用を限定する毒性にさらされている。したがって、現在の薬物治療のポートフォリオに対する代案および補足が求められている。

10

【0004】

「治療」、または少なくとも持続したHBVの薬によらない制御は、ウイルスの核のゲノム、すなわち共有結合閉環状DNA（cccDNA）を制御する薬を必要とし、または少なくともこれから利益を享受するであろうという、増大する確信がある。2010 Institute of Medicine 報告により補強された2006 NIDDK Liver Action Planは全て、HBV薬開発における優先事項としてcccDNA阻害を必要としている。

20

【0005】

しかしながら、HBV cccDNAの阻害剤のスクリーニングは技術的な理由で難しい。HBV cccDNAは、都合よく検出できる量よりも少量生成され、および培養物中の、従来法によりトランスフェクトされた細胞内のほとんどのウイルスの遺伝子産物は、cccDNAではなく、ウイルスのゲノムの導入遺伝子から得られる。本願発明者らは、HBeAgのようなHBV遺伝子産物が、組み込まれたウイルス導入遺伝子からではなく、cccDNAのみから、強く検出できる量で生産される細胞株を創製し、スクリーニングを実現した。（Cai, D., et al., 2012. Identification of the Disubstituted Sulfonamide Compounds as Specific Inhibitors of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Formation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: In Press; Zhou, T., et al., 2006. Hepatitis B virus e antigen production is dependent upon covalently closed circular (ccc) DNA in HepAD38 cell cultures and may serve as a cccDNA surrogate in antiviral screening assays. Antiviral Research 72:116-124）

30

40

【0006】

このような挑戦から考えると、HBV cccDNAを標的にした、使用されているHBV治療が存在しないことに驚きはなく、cccDNAの阻害剤をスクリーニングしたり開発したりする計画は、もしあったとしても、ほとんどない。これは多くは技術的な困難に起因するものである（Block, T. M., et al. 2003. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. Oncogene 22:5093-5107; Locar

50

nini, S. 2005. Therapies for hepatitis B : where to from here? Gastroenterology 128:789-792; Lok, A. S. 2011. Does antiviral therapy for hepatitis B and C prevent hepatocellular carcinoma? J Gastroenterol Hepatol 26:221-227を参照)。さらに、HBV cccDNAの転写および安定性を制御する宿主機能の役割は、ほとんどわかっておらず、このことが、治療の開発に更なる挫折をもたらしている。したがって、この分野のあらゆる研究は、革新的で、B型肝炎のウイルスの核ゲノムを制御し、さもなければHBV感染の処置を提供する薬に対する、未解決の長く感じられた必要性に応じるものであろう。

10

【発明の概要】

【0007】

提供されるものは、対象中のB型肝炎のcccDNAの転写を調節する方法であって、cccDNAのエピジェネティック修飾を与える剤、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤を前記対象に投与することを含む、前記方法である。例えば、エピジェネティック修飾剤、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤は、小分子などの薬理的なものであってよい。

【0008】

ヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤を対象に投与することを含む、対象におけるB型肝炎を処置する方法もまた提供される。

20

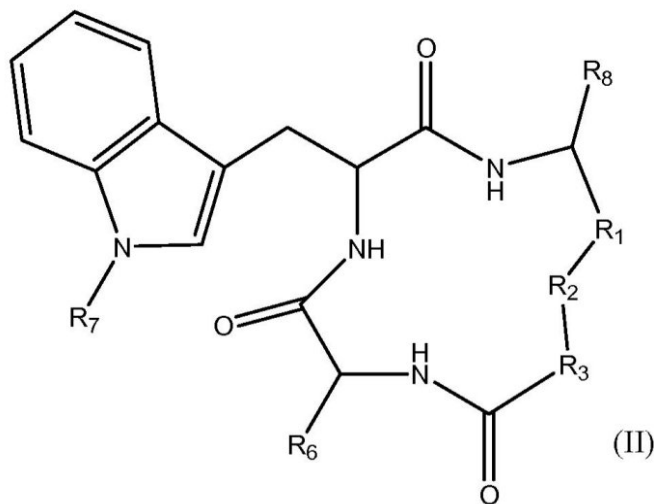
【0009】

本開示はまた、B型肝炎ウイルスとヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤とを接触させることを含む、B型肝炎ウイルスの共有結合閉環状DNAを調節する方法に関する。

【0010】

式IIで表される化合物もまた開示される。

【化1】



30

40

ここで、R₁ - R₈ は本明細書に記載するように定義される。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、HBV cccDNAがdstet5の細胞内において効率的に形成され、転写的に活性的であることを実証しているデータを提供している。

【図2】図2は、cccDNAがIFN-aによって阻害され得ることを実証している実験に関する。

【図3】図3は、アピシジン (Apicidin) およびTSAがcccDNAの転写を抑えるという、本知見に関する。

50

【図 4】図 4 は、H D A C 阻害剤が、宿主細胞染色体中に組み込まれた導入遺伝子からの D H B V p g R N A 合成を用量依存的に刺激する発見に関する。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、本開示の一部を形成する、付随する図および実施例に関する次の詳細な説明への言及によって、より容易に理解され得る。本発明は、本明細書に記載されるおよび／または示される特定の産物、方法、状況またはパラメータに限定されず、本明細書で使用される用語はほんの一例として特定の形態を記載するためにあり、特許請求された発明を限定する意図はないことを理解すべきである。

【0013】

本明細書に引用または記載される各特許、特許出願、および出版物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0014】

開示上、およびその開示の全体に渡って使用される場合、別段の定めがない限り、次の用語および略語は、次の意味に解釈する。

【0015】

本開示において、明白に文脈において別段に解すべきでない限り、単数形の「a」、「an」、および「the」は複数の言及を含み、特定の数値への言及は、少なくともその特定の値を含む。したがって、例えば、「化合物」への言及は、当業者等に公知の 1 つ以上のそのような化合物およびその等価物への言及である。さらに、特定の化学部分が X、Y、または Z「であり得る」ことを示す場合、そのような使用法により、部分に対する他の選択肢を全ての例において除外するものであることを意図しない；例えば、R₁ は「アルキル、アリール、またはアミノであり得る」という効果に対する記載は、ハロ、アラールキル等のような R₁ に対する他の選択肢を必ずしも除外しない。

【0016】

値が近似として表現される場合、先行の「約」の使用により、特定の値は他の形態を形成することが理解されるであろう。本明細書で使用される場合、「約 X」（X は数値）は、好ましくは記載の値の ± 10 %（両端を含む）を指す。例えば、「約 8」という表現は、7.2 から 8.8 の値（両端を含む）を指し；別の例として、「約 8 %」という表現は、7.2 % から 8.8 % の値（両端を含む）を指す。現在のところ、範囲はすべて包括的および組み合わせが可能である。例えば、「1 から 5」の範囲が記載される場合、記載された範囲は、「1 から 4」、「1 から 3」、「1 から 2」、「1 から 2 および 4 から 5」、「1 から 3 および 5」などの範囲を含むものとして解釈されるべきである。さらに、選択肢のリストが確実に提供される場合、かかるリストは、例えば請求項中の否定的限定によって、選択肢のうちのいずれもが除外され得ることを意味すると解釈され得る。例えば、「1 から 5」の範囲が記載される場合、記載された範囲は 1、2、3、4、または 5 のいずれもが否定的に除外される状況を含むものとして解釈され得る；したがって、「1 から 5」という記載は「2 ではなく、1 および 3 から 5」、または単純に「そこでは 2 は含まれない」ものとして解釈され得る。別の例において、「水素、アルキル、およびアリール」または「水素、アルキル、またはアリール」を含む可能な置換基の一覧が提供される場合、記載の一覧は、「水素、アルキル、およびアリール」または「水素、アルキル、またはアリール」のいずれも否定的に除外される状況を含むものとして解釈されるべきである；したがって、「水素、アルキル、およびアリール」または「水素、アルキル、およびアリール」という記載は、「アルキルではなく、水素および／またはアリール」、または単純に「そこでは置換基はアルキルではない」ものとして解釈され得る。

【0017】

本明細書で使用される場合、「成分」、「化合物の組成」、「化合物」、「薬品」、「薬理活性剤」、「活性剤」、「療法の」、「療法」、「処置」、もしくは「医薬」という用語は、対象（ヒトまたは動物）に投与される場合に、局所および／または全身作用による所望の薬理的および／または生理的效果を誘導する化合物または化合物（複数可）また

10

20

30

40

50

は組成物を指すために、本明細書において同じ意味で用いられる。

【0018】

本明細書中の略語は、測定単位、技術、特性、または化合物に以下の通り相当する；「min」は分、「g」はグラム、「mg」はミリグラム、「μg」はマイクログラム、「eq」は等量、「h」は時間、「μL」はマイクロリットル、「mL」はミリリットル、「mM」はミリモラー、「M」はモラー、「mmol」または「mmole」はミリモル、「cm」はセンチメートル、「SEM」は平均値の標準誤差、および「IU」は国際単位を意味する。「IC₅₀値」または「IC₅₀」は、観察された状態または効力の50%の緩和あるいは抑制をもたらす化合物の投与量を意味する。

【0019】

「アピシジン」は、フザリウム種真菌代謝物由来の化合物である。それは、シクロ(N-O-メチル-L-トリプトファン-L-イソロイシニル-D-ピペコリニル-L-2-アミノ-8-オキソデカノイル)という構造を有する。

【0020】

「アピシジンの自然類似体」は、フザリウム・パリドロセウム種ATCC74322およびATCC47289(JOC 67, 815 (2002)およびTet Lett, 37, 8077 (1996))、およびWO 1996/9603428に記載される、アピシジンA、B、C、D1、D2、D3)の発酵において産出されるアピシジンの類似体を指す。

【0021】

本明細書で使用される場合、「アルキル」は、飽和直鎖または分枝の、約1から約20の炭素原子(および、その炭素原子の範囲および特定数の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)を有する炭化水素基を指す。適当な場合、「アルキル」は「アルキレン」を意味し得る；例えば、Xが-R₁R₂で、R₁が「アルキルである」といわれる場合、「アルキル」は「アルキレン」を意味するように正しく解釈され得る。

【0022】

「アミノ」は-NH₂を指し、1つ以上の水素に代わる置換基を含み得る。「アミノ」はアミンと同じ意味で用いられ、いずれの薬学的に許容可能なアミン塩をも含むように意図される。例えば、アミノは、XおよびYは好ましくはおよび独立して水素またはアルキル(ここではアルキルは1つ以上のハロ置換を含んでもよい)である、-NH⁺(X)(Y)Cl⁻を指し得る。

【0023】

例えば、本明細書で使用される場合、「アリール」、「アレーン」、および「芳香族」はそれぞれ、約3から約50の環員(および、その炭素原子の範囲および特定数の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)を有し、好ましくは約5から約10の環員原子を有する、任意に置換された、飽和または不飽和の、単環の、多環の、または他のホモ-、カルボ-または複素環芳香族環系を指す。そのような部分は、以下に定義するような「ヘテロアリール」および「ヘテロアレーン」を包含する(含む)。適当な場合、「アリール」は「アレーン」を意味し得る；例えば、Xが-R₁R₂で、R₁が「アリールである」といわれる場合、「アリール」は「アレーン」を意味するように正しく解釈され得る。

【0024】

本明細書で使用される場合、「アルケニル」は、約2から約20個の炭素原子および1つ以上の二重結合(および、その炭素原子の範囲および特定数の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)を有するアルキル基を指し、ここではアルキルはあらかじめ定義した通りである。いくつかの実施形態において、アルケニル基は約2から約6個の炭素原子を有することが好ましい。アルケニル基は任意に置換されてもよい。

【0025】

本明細書で使用される場合、「アラルキル」は1つ以上のアリール置換基を有し、約4から約50個の炭素原子(および、その炭素原子の範囲および特定数の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)を有するアルキル基を指し、ここではアリールとアルキルはあ

10

20

30

40

50

らから始め定義した通りである。いくつかの好ましい実施形態において、アラルキル基のアラルキル部位は約 1 から約 4 個の炭素原子を有する。他の好ましい実施形態において、アラルキル部位は約 1 から約 3 個の炭素原子を有する。アラルキル基は任意に置換されてもよい。

【0026】

「アラルキルアミノ」は、アラルキルはあらかじめ定義された通りであり、NH は提供されるアミノの定義に従って定義される、アラルキル - (NH) - を示す。「アリールアミノ」は、アリールはあらかじめ定義された通りであり、NH は提供されるアミノの定義に従って定義される、アリール - (NH) - を表す。同様に、「アラルキルアミノ」は、アラルキルはあらかじめ定義された通りであり、NH は提供されるアミノの定義に従って定義される、アラルキル - (NH) - を意味するために使用される。「アラルキルアミド」はアラルキルがあらかじめ記載したとおりである、アラルキル - CH(=O)NH - を指す。本明細書で使用される「アルコキシ」は、R がアラルキル基であり、アラルキルはあらかじめ記載したとおりである、R - O - 基を指す。「アラルコキシ」は、R があらかじめ定義したようなアラルキル基である R - O - を表す。「アラルキルスルホニル」は、アラルキルがあらかじめ定義した通りである、アラルキル - SO₂ - を意味する。本明細書で使用される「アミノオキシ」は、アミノは上記で定義した通りである、アミノ - O - 基を指す。本明細書で使用される「アラルキルアミノオキシ」は、アリール、アラルキル、およびアミノオキシがそれぞれあらかじめ提供された通りに定義される、アリール - アラルキル - アミノオキシ - を表すために使用される。

【0027】

本明細書で使用される場合、「アルキレン」は、一般式 - (CH₂)_n - (式中、n は 1 から 10 である) を有する、任意に分枝または置換された 2 価のアラルキル基を指す。非限定的な例は、メチレン、トリメチレン、ペンタメチレンおよびヘキサメチレンを含む。

【0028】

「アルキレンアミノ」は、- (CH₂)_n - NH - (n は 1 から 10 であり、2 価のアラルキル基は任意に分枝または置換され得、およびアミノ基は、水素に代わる 1 つ以上の置換基を含み得る) を指す。

【0029】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール」または「ヘテロアレーン」は、少なくとも 1 つの環において、1 つ以上の炭素原子環員が S、O、N および NH から成る群から選択されたヘテロ原子基と独立して代えられ得、そこではアリールはあらかじめ定義した通りであるアリール基を指す。合計約 3 から約 14 個の炭素原子環員およびヘテロ原子環員を有するヘテロアリール/ヘテロアレーン基が好ましい。同様に、「複素環」は、1 つ以上の炭素原子環員が、S、O、N および NH から成る群から選択されたヘテロ原子基と独立して代えられ得る(しかし必ずではない)アリール基である。合計約 3 から 14 の環員およびヘテロ原子環員を有する複素環が好ましいが、必ずしも存在する必要はない; 例えば、「ヘテロシクロヘキシル」は、ヘテロ原子基を有するまたは有さない 6 員アリール基であり得る。

【0030】

「ハロ」および「ハロゲン」はそれぞれ、フルオロ、クロロ、プロモまたはヨード部分、好ましくは、フルオロ、クロロ、またはプロモを指す。

【0031】

「ハロアラルキル」は、アラルキルおよびハロがそれぞれ前述したとおりである、ハロ - アラルキル - を意味する。

【0032】

「部分が存在しない」という表現は、部分に結合されている置換基が互いに直接結合されていることを意味し得る。

【0033】

典型的に、置換された化学部分は水素に代わる 1 つ以上の置換基を含む。例示的な置換

10

20

30

40

50

基は、例えば、ハロ（例えばF、Cl、Br、I）、アルキル、シクロアルキル、アルキルシクロアルキル、シクロアルキルアルキル、アルケニル、アルキニル、アラルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、スピロアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヒドロキシ（ $-OH$ ）、ニトロ（ $-NO_2$ ）、シアノ（ CN ）、アミノ（ $-NH_2$ ）、 $-N-$ 置換アミノ（ $-NHR''$ ）、 $-N,N-2$ 置換アミノ（ $-N(R'')R''$ ）、オキソ（ $=O$ ）、カルボキシ（ $-COOH$ ）、 $-O-C(=O)R''$ 、 $-C(=O)R''$ 、 $-OR''$ 、 $-C(=O)OR''$ 、 $-(アルキレン)-C(=O)-OR''$ 、 $-NHC(=O)R''$ 、アミノカルボニル（ $-C(=O)NH_2$ ）、 $-N-$ 置換アミノカルボニル（ $-C(=O)NHR''$ ）、 $-N,N-2$ 置換アミノカルボニル（ $-C(=O)N(R'')R''$ ）、チオール、チオラート（ $-SR''$ ）、スルホン酸（ $-SO_3H$ ）、ホスホン酸（ $-PO_3H$ ）、 $-P(=O)(OR'')OR''$ 、 $-S(=O)R''$ 、 $-S(=O)_2R''$ 、 $-S(=O)_2NH_2$ 、 $-S(=O)_2NHR''$ 、 $-S(=O)_2NR''R''$ 、 $-NHS(=O)_2R''$ 、 $-NR''S(=O)_2R''$ 、 $-CF_3$ 、 $-CF_2CF_3$ 、 $-NHC(=O)NHR''$ 、 $-NHC(=O)NR''R''$ 、 $-NR''C(=O)NHR''$ 、 $-NR''C(=O)NR''R''$ 、 $-NR''C(=O)R''$ 等を含む。前記置換基に関して、各 R'' 部分は、独立して、例えば、H、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、またはヘテロシクロアルキルのいずれかであり得る。

【0034】

本明細書で使用される場合、「処置」または「療法」という用語（ならびにその異なる語形）は、防止的（例えば予防的）、治癒的または緩和的処置を含む。

【0035】

本開示上および開示全体にわたって使用される場合、「有効量」という用語は、関連した病気、症状、または副作用の処置に関して所望の結果を得るために、投薬および所要期間で有効な量を指す。本発明の化合物の有効量は、担当医師の裁量による、最終的に適切な容量と共に、特定の化合物、選択された成分または組成物、投与経路、および成分が個体において所望の応答を誘発する能力だけではなく、緩和される疾患状態または状態の重症度、ホルモンレベル、年齢、性別、個体の体重、患者のある状態、および治療されている症状の重症度、特定の患者により続く併用薬物治療または特別食等の要因、および当業者が認識する他の要因によって患者毎に異なることが認識されるであろう。投与計画は改善された治療的応答を提供するために調節され得る。有効量はまた、治療上有益な影響が成分のいずれの中毒性または有害な影響よりも上回るものである。一例として、処置の開始前との活性レベルと比較して、血小板の活性化および接着活性レベルが低下されるような投薬量および時間で本発明の方法に有用である化合物を投与する。

【0036】

「薬学的に許容可能な」は、的確な医学的判定の範囲内で、過度の毒性、炎症、アレルギー反応、もしくは合理的な受益度/危険度の割合と相応の他の複雑な問題のない人間および動物の組織との接触に適したそれらの化合物、物質、組成、および/または剤形を指す。

【0037】

本発明において、開示された化合物は薬学的に許容可能な塩の形態で製造され得る。「薬学的に許容可能な塩」は、親化合物はその酸または塩基塩を作ることにより修飾される、開示された化合物の誘導体を指す。薬学的に許容可能な塩の例は、アミン等の塩基性残基の鉱物または有機酸塩；カルボン酸等の酸性残基のアルカリまたは有機塩；など；を含むが、これらに限定されない。薬学的に許容可能な塩は、無毒の無機または有機酸から形成される親化合物の従来の無毒の塩または第4級アンモニウム塩を含む。例えば、そのような従来の無毒の塩は塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸などのような無機酸由来のもの；および酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パモ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタ

ンジスルホニン酸、シュウ酸、イセチオン酸等のような有機酸から製造された塩を含む。これらの生理学的に許容可能な塩は、例えば、水性アルコール中において過剰量の酸で遊離アミン塩基を溶解する、または水酸化物のようなアルカリ金属塩基、もしくはアミンによって遊離カルボン酸を中和するといった当業者に周知の方法により調製される。

【0038】

本明細書中に記載される化合物は、別の形態で使用または製造され得る。例えば、多くのアミノ含有化合物は、酸追加塩として使用または製造され得る。しばしば、そのような塩は、化合物の分離および取り扱い性を改善する。例えば、試薬、反応条件等により、本明細書に記載の化合物は、例えば、それらの塩酸塩またはトシル酸塩として使用または製造され得る。同形の結晶形、全てのキラルおよびラセミ体形態、N - オキシド、水和物、溶媒和物、および酸性塩水和物も、本発明の範囲内であると考えられる。

10

【0039】

本発明のある酸性または塩基性の化合物は、両性イオンとして存在し得る。遊離酸、遊離塩基および両性イオンを含む化合物の全ての形態は、本発明の範囲内であると考えられる。アミノおよびカルボキシ基の両方を含む化合物がしばしば平衡状態で両性イオンの形態で存在することは、当業者に周知である。したがって、本明細書に記載の、例えばアミノおよびカルボキシ基の両方を含むいずれの化合物も、それらの対応する両性イオンへの言及を含む。

【0040】

「水和物」は、分子形態の水（つまり、H - OH結合は開裂しない）に関連しており、例えば式 $R \cdot H_2O$ （式中、Rは本発明の化合物である）によって表わされ得る本発明の化合物を指す。所与の化合物は例えば、1水和物（ $R \cdot H_2O$ ）、または例えば2水和物（ $R \cdot 2H_2O$ ）、3水和物（ $R \cdot 3H_2O$ ）等を含むポリ水和物（nが1より大きい整数である $R \cdot nH_2O$ ）、または例えば $R \cdot n/2 H_2O$ 、 $R \cdot n/3 H_2O$ 、 $R \cdot n/4 H_2O$ 等（nは整数である）の半水和物を含む1つ以上の水和物を形成し得る。

20

【0041】

「溶媒和物」は、分子形態、つまり溶媒が配位的に結合された分子形態、に関連しており、例えば式 $R \cdot (\text{溶媒})$ によって表わされ得る（式中、Rは本発明の化合物である）本発明の化合物を指す。所与の化合物は例えば、1溶媒和物（ $R \cdot (\text{溶媒})$ ）、または例えば2溶媒和物（ $R \cdot 2(\text{溶媒})$ ）、3溶媒和物（ $R \cdot 3(\text{溶媒})$ ）等を含むポリ溶媒和物（nが1より大きい整数である $R \cdot n(\text{溶媒})$ ）、または例えば $R \cdot n/2(\text{溶媒})$ 、 $R \cdot n/3(\text{溶媒})$ 、 $R \cdot n/4(\text{溶媒})$ 等（nは整数である）の半溶媒和物を含む1つ以上の溶媒和物を形成し得る。本発明の溶媒は例えばメタノール/水といった混合溶媒を含み、したがって、溶媒和物は、溶媒和物内に1つ以上の溶媒を組み込み得る。

30

【0042】

「酸水和物」は、1つ以上の酸部分を有する少なくとも1つの化合物と1つ以上の塩基部分を有する化合物との会合または1つ以上の塩基部分を有する少なくとも1つの化合物と1つ以上の酸部分を有する化合物との会合によって形成され得る複合体を指し、前記複合体は水分子とさらに会合し水和物を形成する（前述の水和物はあらかじめ定義されたものであり、Rは、本明細書で上述した複合体を表す）。

40

【0043】

「立体異性体」という用語は、同一の化学構造を有するが、空間における原子または基の配置については異なる化合物を指す。

【0044】

「ラセミ」は対立する光学活性の形態に分割する能力があることを意味する。

【0045】

本明細書で使用される場合、「部分立体異性体」という用語は、キラル中心の少なくとも1つが定義された立体化学（つまりRまたはS）を有し、少なくとも1つが定義されていない立体化学（つまりRまたはS）を有する、2つ以上のキラル中心を有する立体異性体を指す。本明細書で「その部分立体異性体」という用語が使用される場合、それは、定

50

義された立体化学中心を有するキラル中心における立体配置が維持される記述された属の任意の化合物を指し、個々の定義されていないキラル中心の立体配置はRまたはSから独立して選択される。例えば、立体異性体が3つのキラル中心を有し、最初の中心の立体化学の立体配置は「S」立体化学を有するものとして定義される場合、「またはその部分立体異性体」という用語は、3つのキラル中心でSRR、SR S、SSRまたはSSSの立体配置を有する立体異性体およびその混合物を指す。

【0046】

「同位体的に置換された類似体」は、1つ以上の原子がその原子の同位体で置換された本開示の化合物である。例えば、水素（プロチウム）は重水素またはトリチウムで置換され得る。その同位体的に置換された類似体を形成するためにその同位体で置換され得る他の原子は、例えば、炭素（ C^{13} で置換された）、窒素（ N^{15} で置換された）、ヨウ素（ I^{131} で置換された）、フッ素（ F^{18} で置換された）、または硫黄（ S^{32} で置換された）を含む。いずれの利用可能な同位体は、その同位体的に置換された類似体を形成するために使用され得、当業者は所与の化合物からそのような類似体を形成するために利用可能な技術を認識するであろう。

【0047】

「プロドラッグ」は、所望の活性にそれら自体不活性または最小活性であるが、生体内変換によって生理活性代謝産物に変換することができる化合物を指す。例えば、本発明のプロドラッグは、とりわけ、代謝手段により生体内で、本開示に請求または記載されるあらゆる化合物へ変換できるあらゆる化合物を含むだろう。

【0048】

「N - オキシド」とは、ヘテロ芳香環または第3級アミンのいずれかである塩基性窒素原子が酸化して、正の形式電荷を有する第4級窒素、および負の形式電荷を有する結合した酸素原子を得る化合物である。

【0049】

ある変異がいずれかの成分または、式において1回以上起こる場合、1回ごとのその定義は、他の変異における定義から独立している。そのような組み合わせの結果が安定した化合物である場合のみ、置換基、および/または、変異の組み合わせは、許容可能である。

【0050】

「投与する（administering）」という用語は、本発明の化合物もしくは組成物を直接投与する、または、体内で活性化合物もしくは活性物質と同等量となるプロドラッグ、誘導体もしくは類似体を投与するという意味である。

【0051】

「投薬単位」とは、ある特定の治療対象の個体に対して、単一の投薬量として適した、物理的に個別の単位を指す。各単位には、必要な薬理学的担体と関連して所望の治療効果を生むように計算された、一定量の活性化合物が含まれ得る。本発明の投薬単位の形態に関して、（a）活性化合物の特有の性質ならびに特定の達成すべき治療効果、および（b）活性化合物などの調剤技術による制約、により詳述され得る。

【0052】

「対象」もしくは「患者」とは、本発明の組成物、および/または、方法により処置可能であるヒトを含む胎児、幼若、もしくは成体動物を指す。

【0053】

感染細胞の核に存在し、「エピソーム」として発現するB型肝炎ウイルス共有結合閉環状DNA（cccDNA）は、宿主染色体に統合されたB型肝炎ウイルスDNAとは異なって調節され、かつ、他の遺伝子と比べるとB型肝炎ウイルスcccDNAのRNAの発現を薬理学的にかつ選択的に抑制することができることが現在では分かっている（本明細書中に詳細を記載）。実際、本発明者らは、B型肝炎ウイルスcccDNA転写を阻害する数多くの化合物を再現可能、かつ確実な方法によって特定し、それは、低濃度かつ明白な毒性がない条件で見られる。これらの結果は、設計された小分子により、選択的な薬理

10

20

30

40

50

学的抑制が初めて達成されたことを示している。B型肝炎ウイルスcccDNAからの遺伝子発現は、宿主染色体に統合された同一もしくは類似するDNAとは異なって調節されもしくははという本結果は、宿主染色体DNAを抑制、または宿主染色体DNAに影響を及ぼすことなく、選択的にcccDNAを抑制する（例えば、統合B型肝炎ウイルスDNAと比較した場合）治療を行うことができる点において驚くべきことであり、かつ非常に有益な観察である。B型肝炎ウイルスcccDNAは薬理的に抑制可能である、というこの発見は現在まで知られていなかったが、前文の有益な概念の証拠を提供し、そのような薬理的な抑制は可能であることを示す。

【0054】

すなわち、本開示は、とりわけ、cccDNAのエピジェネティック修飾を提供する剤、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤を対象に投与することを含む、対象中のB型肝炎のcccDNA転写を調節する方法を提供する。例えば、エピジェネティック修飾剤、ヒストン修飾剤、または、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、小分子などの薬理的なものであってよい。前記エピジェネティック修飾剤、ヒストン修飾剤、または、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、統合B型肝炎ウイルスDNAと比較して、および/または、細胞宿主DNAと比較して、cccDNAの阻害に対して選択的であり得、すなわちこの場合、統合B型肝炎ウイルスDNAを阻害せず、細胞宿主DNAを阻害しない。ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、複数のクラスのヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤となり得、または、ある特定のクラスのヒストン脱アセチル化酵素に対して選択的であり得る。例えば、前記阻害剤は、クラスIヒストン脱アセチル化酵素活性、クラスIIヒストン脱アセチル化酵素活性、または、その両方の阻害剤になり得る。好ましくは、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、クラスIヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤である。ヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤は、数多く知られているが、本方法に基づき、そのようなヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のいずれかを使用してもよい。

【0055】

B型肝炎のcccDNA転写を調節する本方法には、cccDNAのエピジェネティック修飾を提供する剤、ヒストン修飾剤、もしくはヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤を対象に投与することに加え、B型肝炎ウイルスを調節する更なる剤の治療有効量を対象に投与することが含まれる。cccDNAのエピジェネティック修飾を提供する剤、ヒストン修飾剤、もしくはヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤などの更なる剤を同時に、または、一般的な同投与計画の一部としてそのまま投与してもよい。更なる剤は、B型肝炎ウイルスの調節に現在使用されるいずれの物質でもよく、その多くの種類が当業者にとって公知である。例えば、B型肝炎ウイルスを調節する既存の薬には、インターフェロン（例えば、インターフェロンアルファ、ペグインターフェロン）、ヌクレオシド類似体（例えば、ラミブジン、アデホビルジピボキシル、エンテカビル、テルビブジン、テノホビル、クレブジン、アムドキシビル）、非ヌクレオシド抗ウイルス薬（例えば、BAM 205、ANA380、myrcludex B、HAP Compound Bay 41-4109、REP 9AC、ニタゾキサニド、dd-RNAi化合物、ARC-520、NVR-1221）、非インターフェロン免疫増強剤（例えば、サイモシナルファ-1、インターロイキン-7、DV-601、B型肝炎ウイルスコア抗原ワクチン、GS-9620、G113000）、および暴露後および/または肝臓移植処置後の薬（例えば、hyperHEP S/D、Nabi-GB、Hepa Gam B）が含まれる。

【0056】

特に、更なる剤は、他の直接作用型抗ウイルス抗B型肝炎薬（例えば、ポリメラーゼ阻害剤バラクルード、テノホビル、ラミブジン、テルビブジン、およびアデフォビル）および/または、ウイルスの生活環内で、cccDNA転写を阻害する以外の段階で作用する、他の直接作用型抗ウイルス薬、例えば、カプシド阻害剤、分泌阻害剤、または、侵入阻害剤である。更なる剤は、他の非直接作用型抗ウイルス薬、例えば、インターフェロン、または、他の免疫調節薬であってもよい。

【0057】

10

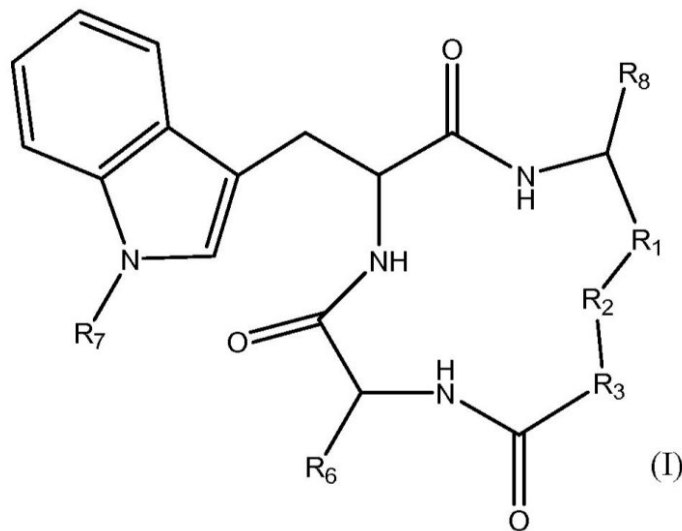
20

30

40

50

B型肝炎のcccDNA転写を調節する本方法によれば、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、例えば、トリコスタチンA、スベロイルビスヒドロキサム酸、ジメチルアミノヒドロキシベンズアミド、アピシジン、アピシジン類似体（例えば、アピシジンの自然類似体、もしくは新規に合成された類似体）、または、式（I）による化合物であり、
【化2】



式中、

R₁ は、 $-(CH_2)_n-$ 、もしくは、 $-C(=O)-$ 、
R₂ は、 $-C(=O)-$ 、3, 5-トリアゾリル、もしくは、 $-C(Z)N(R_4)-$ 、
R₄ は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、もしくは、カルボキシアルキル、
R₃ は、 $-CH(R_5)-$ 、もしくは、R₂ は、窒素、および R₃ は、 $-CH-$ であり、
R₂ および R₃ が共にピペリジニルを形成し、
R₅ は、水素、 $-CH_3$ 、もしくは、アミノ酸 R 基、
R₆ は、 $-(CH_2)_mC(X)Y$ 、 $-(CH_2)_2CH_3$ 、もしくは、 $-(CH_2)_q$ - フェニル - $-(CH_2)_mC(=O)NHOH$ 、
X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、もしくは、 $=N-NH-C(=O)NH_2$ 、
Y は、 $NHOH$ 、もしくは、 $-CH_2CH_3$ 、
Z は、 H_2 、もしくは、 O 、
R₇ は、水素、もしくは、アルコキシ、
R₈ は、アルキル、もしくは、カルボキシアルキル、
n は、0 - 2、
m は、0 - 6、および、
q は、0 - 3、
または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩である。

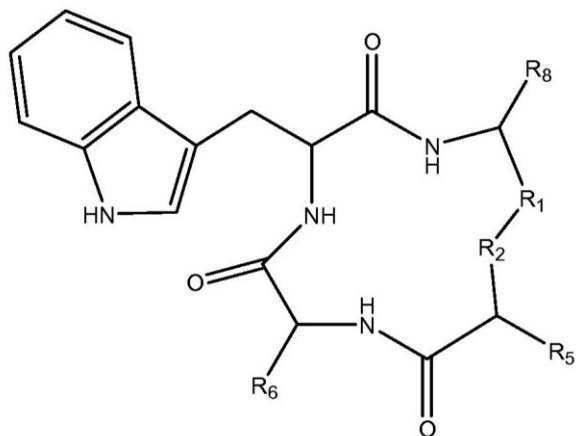
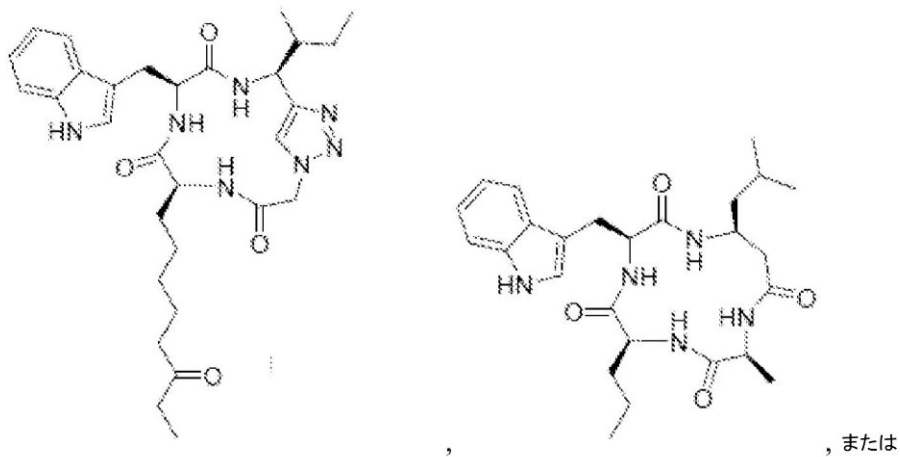
【0058】

本明細書中で使用される用語「アミノ酸 R 基」とは、天然または非天然アミノ酸の側鎖基である。

【0059】

ある実施形態において、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、アピシジンであり、

【化 3】



式中、

R_1 は、 $-(CH_2)-$ 、

および、

R_2 は、 $-C(Z)N(R_4)-$ 、

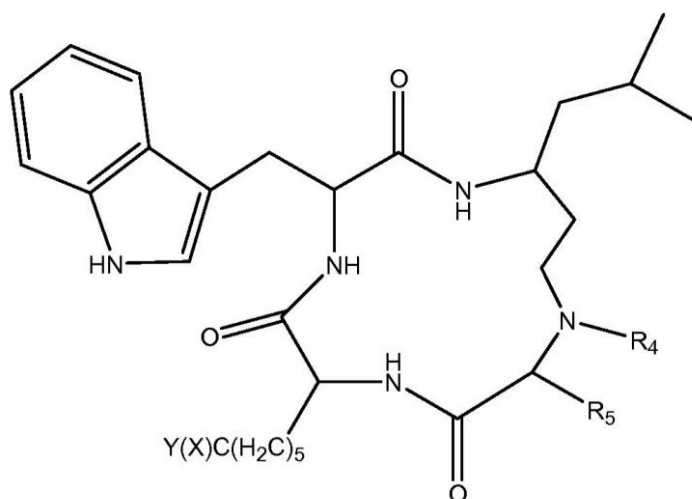
または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩である。

30

【0060】

ある実施形態において、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、下記式であり、

【化 4】



または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩である。

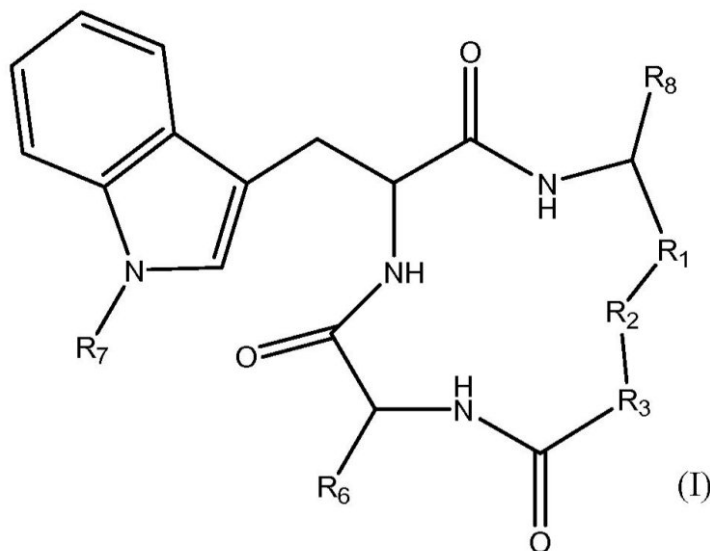
【0061】

本開示は、対象のＢ型肝炎を処置する方法に関連し、対象にcccDNAのエピジェネティック修飾を提供する剤、ヒストン修飾剤、もしくはヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤を投与することを含む方法に関する。例えば、エピジェネティック修飾剤、ヒストン修飾剤、または、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、小分子などの薬理学的なものであってよい。前記エピジェネティック修飾剤、ヒストン修飾剤、または、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、統合Ｂ型肝炎ウイルスDNAと比較して、および／または、細胞宿主DNAと比較して、cccDNAの阻害に対して選択的であり得、すなわちこの場合、統合Ｂ型肝炎ウイルスDNAを阻害せず、細胞宿主DNAを阻害しない。ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、複数のクラスのヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤となり得、または、ある特定のクラスのヒストン脱アセチル化酵素に対して選択的であり得る。例えば、前記阻害剤は、クラスⅠヒストン脱アセチル化酵素活性、クラスⅡヒストン脱アセチル化酵素活性、または、その両方の阻害剤になり得る。好ましくは、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、クラスⅠヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤である。ヒストン脱アセチル化酵素活性の数多くの阻害剤は、公知であるが、本方法に基づき、そのようなヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のいずれかを使用してもよい。

【0062】

本方法による対象のＢ型肝炎の処置方法によれば、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、例えば、トリコスタチンA、スベロイルビスヒドロキサム酸、ジメチルアミノヒドロキシベンズアミド、アピシジン、アピシジン類似体（例えば、アピシジンの自然類似体、もしくは新規に合成された類似体）または、式（Ⅰ）による化合物であり、

【化5】



式中、

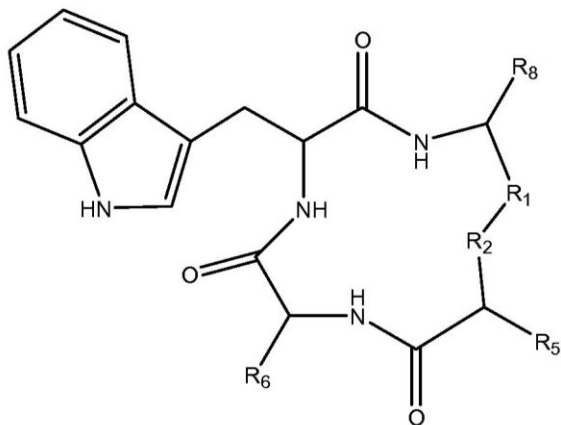
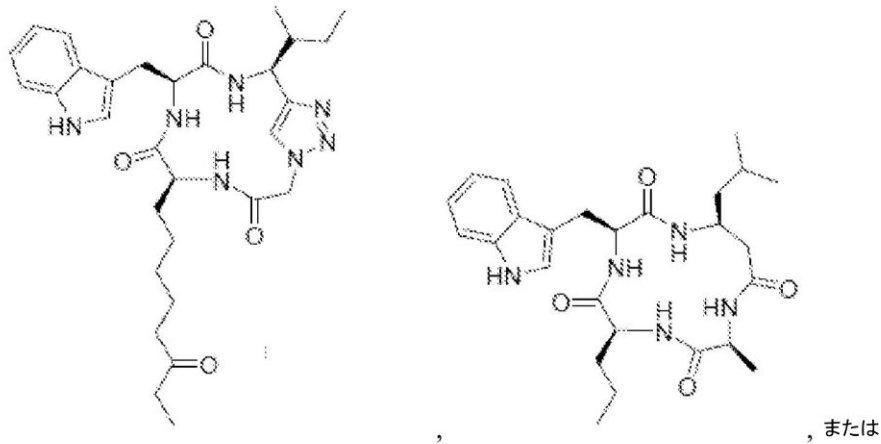
- R_1 は、 $-(CH_2)_n-$ 、もしくは、 $-C(=O)-$ 、
 R_2 は、 $-C(=O)-$ 、3,5-トリアゾリル、もしくは、 $-C(Z)N(R_4)-$ 、
 R_4 は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、もしくは、カルボキシアルキル、
 R_3 は、 $-CH(R_5)-$ 、もしくは、 R_2 は、窒素、および R_3 は、 $-CH-$ であり、
 R_2 および R_3 が共にピペリジニルを形成し、
 R_5 は、水素、 $-CH_3$ 、もしくは、アミノ酸 R 基、
 R_6 は、 $-(CH_2)_mC(X)Y$ 、 $-(CH_2)_2CH_3$ 、もしくは、 $-(CH_2)_q$ -フェニル- $-(CH_2)_mC(=O)NHOH$ 、
 X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、もしくは、 $=N-NH-C(=O)NH_2$ 、
 Y は、 $NHOH$ 、もしくは、 $-CH_2CH_3$ 、
 Z は、 H_2 、もしくは、 O 、

R_7 は、水素、もしくは、アルコキシ、
 R_8 は、アルキル、もしくは、カルボキシアルキル、
 n は、0 - 2、
 m は、0 - 6、および、
 q は、0 - 3、
 または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩である。

【0063】

ある実施形態において、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、アピシジンであり、
 【化6】

10



式中、

R_1 は、 $-(CH_2)-$ 、

および

R_2 は、 $-C(Z)N(R_4)-$ 、

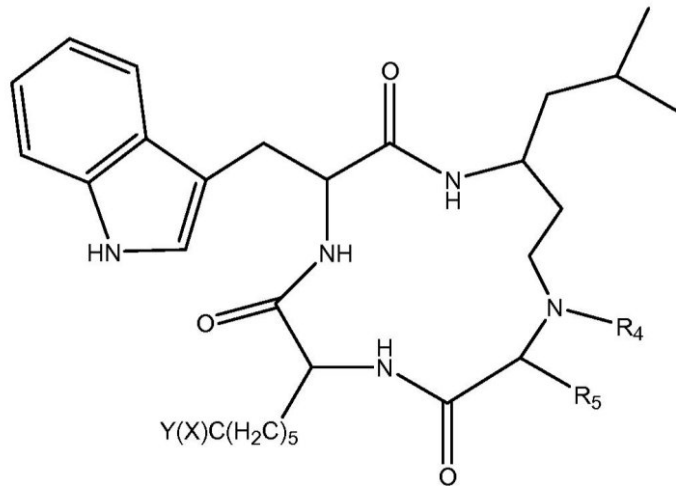
または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩である。

【0064】

ある実施形態において、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、下記式であり、

40

【化 7】



10

または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩である。

【 0 0 6 5 】

対象の B 型肝炎を処置する本方法には、cccDNA のエピジェネティック修飾を提供する剤、ヒストン修飾剤、もしくはヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤を対象に投与することに加え、B 型肝炎ウイルスを調節する更なる剤の治療有効量を対象に投与することが含まれる。cccDNA のエピジェネティック修飾を提供する剤、ヒストン修飾剤、もしくはヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤などの更なる剤を同時に、または、一般的な同投与計画の一部としてそのまま投与してもよい。更なる剤は、B 型肝炎ウイルスの調節に現在使用されるいずれの物質でもよく、その多くの種類が当業者にとって公知である。例えば、B 型肝炎ウイルスを調節する既存の薬には、インターフェロン（例えば、インターフェロンアルファ、ペグインターフェロン）、ヌクレオシド類似体（例えば、ラミブジン、アデホビルジピボキシル、エンテカビル、テルビブジン、テノホビル、クレブジン、アムドキシビル）、非ヌクレオシド抗ウイルス薬（例えば、BAM 205、ANA380、myrcludex B、HAP Compound Bay 41-4109、REP 9AC、ニタゾキサニド、dd-RNAi 化合物、ARC-520、N VR-1221）、非インターフェロン免疫増強剤（例えば、サイモシナルファ - 1、インターロイキン - 7、DV-601、B 型肝炎ウイルスコア抗原ワクチン、GS-9620、GI13000）、および暴露後および / または肝臓移植処置後の薬（例えば、hyperHEP S/D、Nabi-GB、Hepa Gam B）が含まれる。

20

30

【 0 0 6 6 】

特に、更なる剤は、他の直接作用型抗ウイルス抗 B 型肝炎薬（例えば、ポリメラーゼ阻害剤バラクルード、テノホビル、ラミブジン、テルビブジン、およびアデフォビル）および / または、ウイルスの生活環内で、cccDNA 転写を抑制する以外の段階で作用する、他の直接作用型抗ウイルス薬、例えば、カプシド阻害剤、分泌阻害剤、または、侵入阻害剤である。更なる剤は、他の非直接作用型抗ウイルス薬、例えば、インターフェロン、または、他の免疫調節薬であってもよい。

40

【 0 0 6 7 】

cccDNA のエピジェネティック修飾を提供する剤、ヒストン修飾剤、もしくはヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤に、B 型肝炎ウイルスを接触させることを含む、B 型肝炎ウイルス共有結合閉環状 DNA を修飾する方法を開示する。例えば、エピジェネティック修飾剤、ヒストン修飾剤、または、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、小分子などの薬理的なものであってよい。前記エピジェネティック修飾剤、ヒストン修飾剤、または、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、統合 B 型肝炎ウイルス DNA と比較して、および / または、細胞宿主 DNA と比較して、cccDNA の阻害に対して選択的であり得、すなわちこの場合、統合 B 型肝炎ウイルス DNA を阻害せず、細胞宿主 DNA を阻害しない。ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、複数のクラスのヒストン脱アセチル

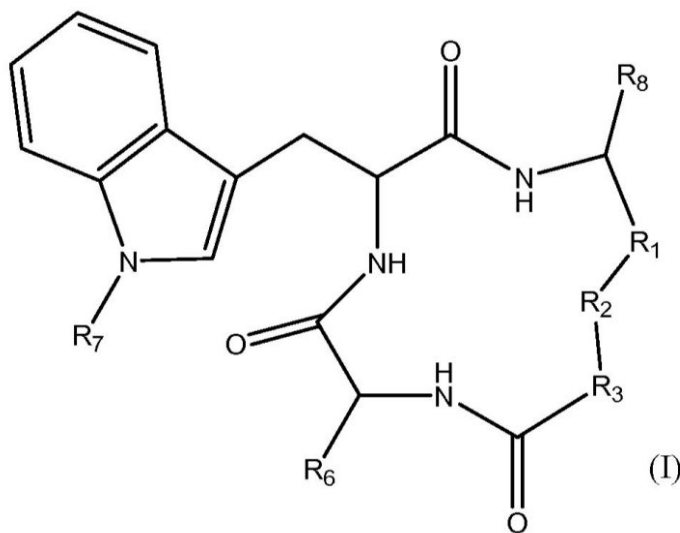
50

化酵素の阻害剤となり得、または、ある特定のクラスのヒストン脱アセチル化酵素に対して選択的であり得る。例えば、前記阻害剤は、クラスⅠヒストン脱アセチル化酵素活性、クラスⅡヒストン脱アセチル化酵素活性、または、その両方の阻害剤になり得る。好ましくは、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、クラスⅠヒストン脱アセチル化酵素活性の阻害剤である。ヒストン脱アセチル化酵素活性の数多くの阻害剤は、公知であるが、本方法に基づき、そのようなヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のいずれかを使用してよい。

【 0 0 6 8 】

B型肝炎ウイルス共有結合閉環状DNAを調節する本方法によれば、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、例えば、トリコスタチンA、スベロイルビスヒドロキサム酸、ジメチルアミノヒドロキシベンズアミド、アピシジン、アピシジン類似体（例えば、アピシジンの自然類似体、もしくは新規に合成された類似体）または、式（Ⅰ）による化合物であり、

【 化 8 】



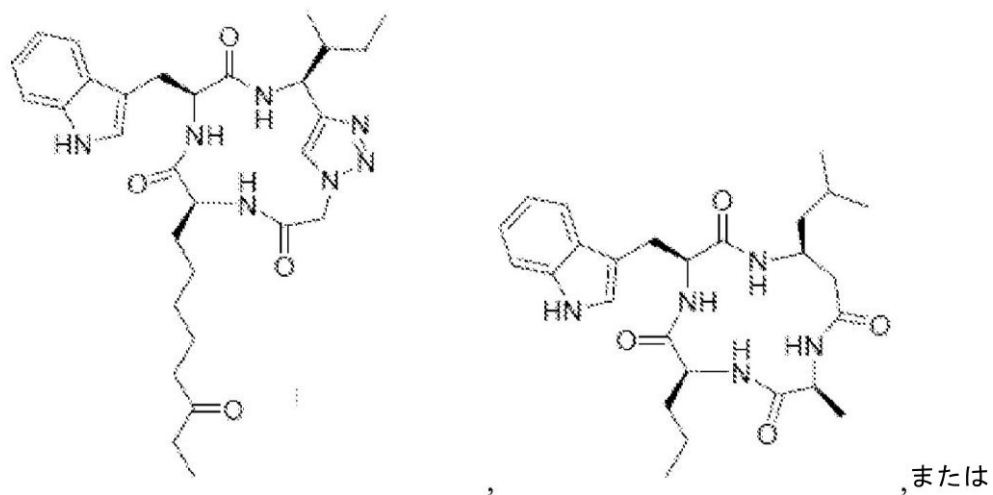
式中、

R_1 は、 $-(CH_2)_n-$ 、もしくは、 $-C(=O)-$ 、
 R_2 は、 $-C(=O)-$ 、3, 5-トリアゾリル、もしくは、 $-C(Z)N(R_4)-$ 、
 R_4 は、水素、アルキル、アリール、アラキル、ジアルキルアミノアルキル、もしくは、カルボキシアリル、
 R_3 は、 $-CH(R_5)-$ 、もしくは、 R_2 は、窒素、および R_3 は、 $-CH-$ であり、
 R_2 および R_3 が共にピペリジニルを形成し、
 R_5 は、水素、 $-CH_3$ 、もしくは、アミノ酸 R 基、
 R_6 は、 $-(CH_2)_mC(X)Y$ 、 $-(CH_2)_2CH_3$ 、もしくは、 $-(CH_2)_q$ -フェニル- $-(CH_2)_mC(=O)NHOH$ 、
 X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、もしくは、 $=N-NH-C(=O)NH_2$ 、
 Y は、 $NHOH$ 、もしくは、 $-CH_2CH_3$ 、
 Z は、 H_2 、もしくは、 O 、
 R_7 は、水素、もしくは、アルコキシ、
 R_8 は、アルキル、もしくは、カルボキシアリル、
 n は、0 - 2、
 m は、0 - 6、および、
 q は、0 - 3、
 または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩である。

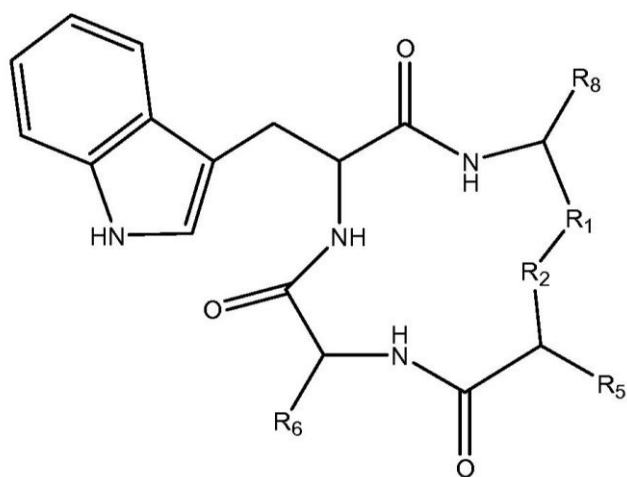
【 0 0 6 9 】

ある実施形態において、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、アピシジンであり、

【化 9】



10



20

式中、

R₁ は、- (CH₂) -、

および、

R₂ は、- C (Z) N (R₄) - である

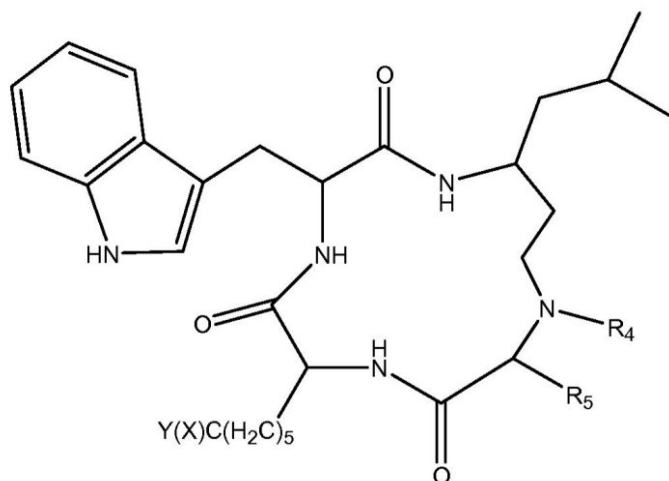
または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩である。

30

【0070】

ある実施形態において、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤は、下記式であり、

【化 10】



40

または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩である。

50

【 0 0 7 1 】

B型肝炎ウイルス共有結合閉環状DNAを調節する本方法には、cccDNAのエピジェネティック修飾を提供する剤、ヒストン修飾剤、もしくはヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤を、B型肝炎ウイルスに接触させることに加え、B型肝炎ウイルスにB型肝炎ウイルスを調節する剤の治療有効量を接触させることを含んでもよい。前工程には、cccDNAのエピジェネティック修飾を提供する剤、ヒストン修飾剤、もしくはヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤を、B型肝炎ウイルスと接触させることが含まれるが、同工程と同時に、または、同工程の一部として、更なる剤をB型肝炎ウイルスと接触させてもよい。更なる剤は、B型肝炎ウイルスの調節に現在使用されるいずれの物質でもよく、その多くの種類が当業者にとって公知である。例えば、B型肝炎ウイルスを調節する既存の薬には、インターフェロン（例えば、インターフェロンアルファ、ペグインターフェロン）、ヌクレオシド類似体（例えば、ラミブジン、アデホビルジピボキシル、エンテカビル、テルビブジン、テノホビル、クレブジン、アムドキシビル）、非ヌクレオシド抗ウイルス薬（例えば、BAM 205、ANA380、myrcludex B、HAP Compound Bay 41-4109、REP 9AC、ニタゾキサニド、dd-RNAi化合物、ARC-520、NVR-1221）、非インターフェロン免疫増強剤（例えば、サイモシナルファ-1、インターロイキン-7、DV-601、B型肝炎ウイルスコア抗原ワクチン、GS-9620、GI13000）、および暴露後および/または肝臓移植処置後の薬（例えば、hyperHEP S/D、Nabi-GB、Hepa Gam B）が含まれる。

10

【 0 0 7 2 】

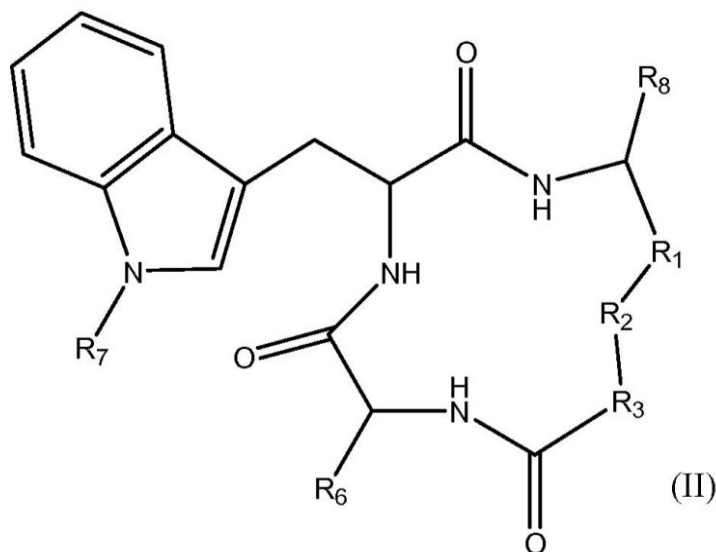
特に、更なる剤は、他の直接作用型抗ウイルス抗B型肝炎薬（例えば、ポリメラーゼ阻害剤バラクルード、テノホビル、ラミブジン、テルビブジン、およびアデフォビル）および/または、ウイルスの生活環内で、cccDNA転写を抑制する以外の段階で作用する、他の直接作用型抗ウイルス薬、例えば、カプシド阻害剤、分泌阻害剤、または、侵入阻害剤である。更なる剤は、他の非直接作用型抗ウイルス薬、例えば、インターフェロン、または、他の免疫調節薬であってもよい。

20

【 0 0 7 3 】

本開示は、式IIによる化合物にも関する。

【 化 1 1 】



30

40

式中、

R₁ は、- (CH₂)_n -、もしくは、- C (= O) -、

R₂ は、- C (= O) -、もしくは、- C (Z) N (R₄) -、

R₄ は、水素、アルキル、アリール、アラルキル、ジアルキルアミノアルキル、もしくは、カルボキシアルキル、

R₃ は、- CH (R₅) -、

R₅ は、水素、- CH₃、もしくは、アミノ酸 R 基、

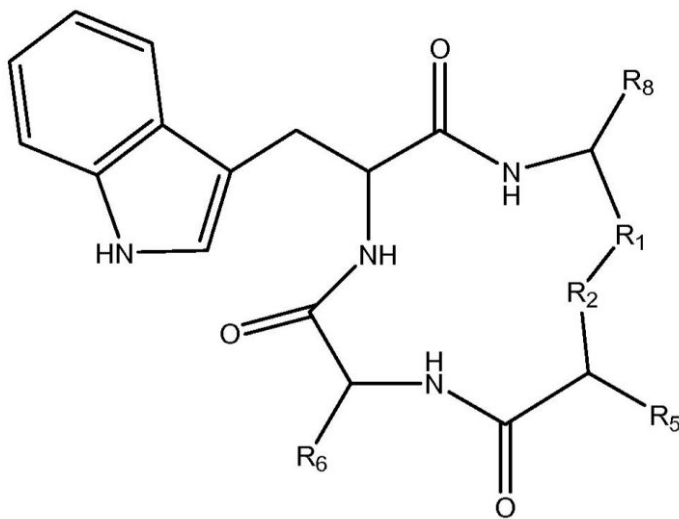
50

R_6 は、 $-(CH_2)_m C(X)Y$ 、 $-(CH_2)_2 CH_3$ 、もしくは、 $-(CH_2)_q$
 $-$ フェニル $-(CH_2)_m C(=O)NHOH$ 、
 X は、 $=O$ 、 H_2 、 $=N-NH_2$ 、もしくは、 $=N-NH-C(=O)NH_2$ 、
 Y は、 $NHOH$ 、もしくは、 $-CH_2CH_3$ 、
 Z は、 H_2 、もしくは、 O 、
 R_7 は、水素、もしくは、アルコキシ、
 R_8 は、アルキル、もしくは、カルボキシアルキル、
 n は、 $0-2$ 、
 m は、 $0-6$ 、および、
 q は、 $0-3$ 、
 または、立体異性体、もしくは、その薬理学的に許容可能な塩。

【0074】

例えば、下記の化合物であってもよい。

【化12】



式中、

R_1 は、 $-(CH_2)-$ 、

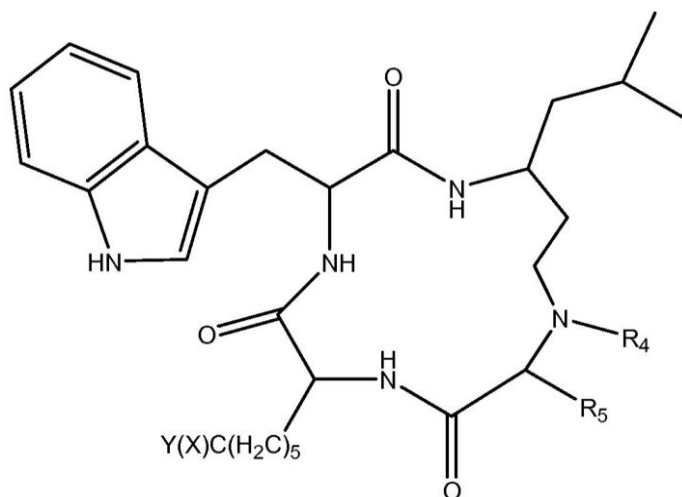
および

R_2 は、 $-C(Z)N(R_4)-$ である。

【0075】

別の実施形態において、下記式の化合物であってもよい。

【化13】



10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

容易に理解される通り、存在する官能基は、合成の過程で保護基を含んでもよい。保護基は、選択的にヒドロキシル基、およびカルボキシル基などの官能基に付着したり、離れたりする化学的官能基として、それ自体は公知である。これらの基は、化学化合物に存在し、化合物がさらされる、室温の化学反応条件下において、そのような官能性を与える。本発明にはどのような種類の保護基を用いてもよい。本発明による保護基は、Greene, T. W. and Wuts, P.G.M., Protective Groups in Organic Synthesis 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991.の記載に基づき用いても良い。

【 0 0 7 7 】

更なる側面において、本開示は、式 (I) もしくは (II) による化合物を含む薬理的組成物、または、薬理的に許容可能な塩、同位体置換された類似体、もしくは、その立体異性体、および、薬理的に許容可能な担体、希釈液、または、賦形剤に関する。適用可能な担体、希釈液、または、賦形剤は、選んだ投与経路に基づき選択してもよく、および、記載された標準的な薬理的慣習に基づき、選択されてもよい。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1985)、その開示内容は、全体として本明細書に援用される。前記薬理的組成物は、B型肝炎ウイルスを調節する更なる剤の治療有効量をさらに含んでもよい。ウイルスを調節する前記剤は、例えば、公知の抗ウイルス薬などでもよい。ある実施形態において、本組成物は、式 (I) もしくは (II) による化合物の治療有効量が含まれ、予防接種またはワクチンと併用して投与され、B型肝炎ウイルスの症状を予防または弱める。例えば、抗体、免疫抑制剤、抗炎症薬、等が含まれる。

【 0 0 7 8 】

本明細書中で使用される「接触 (“ contacting ”) させる」という用語は、生体外系、または生体内系において、示された部分の物理的または化学的なやりとりにまとめることを指す。例えば、B型肝炎ウイルスを、本発明の化合物に接触 (“ contacting ”) させる」ことには、本発明の化合物を、個体または患者、例えば、B型肝炎ウイルス感染しているヒト、に投与することに加えて、例えば、本発明の化合物を、cccDNAを含む細胞または精製試料に導入することを含んでもよい。

【 0 0 7 9 】

本明細書中で、同じ意味で使用される「個体」または「患者」という用語は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、他の齧歯動物、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、または、ヒトなどの霊長類を含むあらゆる動物を指す。

【 0 0 8 0 】

本明細書中で使用される「治療有効量」という語は、研究者、獣医、医師、または他の臨床家が、組織、システム、動物、個体またはヒトに求める生物学的もしくは医薬的な反応を引き出す活性化合物または医薬剤の量であり、以下を1以上含む。

(1) 病気の予防 ; 例えば、病気、病状もしくは疾患にかかりやすい可能性があるものの、病気の病変もしくは兆候をまだ経験したり示さない個体において、その病気、病状もしくは疾患を予防する。

(2) 病気の抑制 ; 例えば、病気、病状もしくは疾患による病変もしくは兆候を経験したり示している個体において、病気、病状または疾患を抑制する (すなわち、病変および / または兆候の発症の進行を阻止することを含む) 。

(3) 病気の改善 ; 例えば、病気、病状もしくは疾患による病変もしくは兆候を経験したり示している個体において、病気、病状または疾患を改善する (すなわち、病変および / または兆候を阻止することを含む) 。

【 0 0 8 1 】

治療上の化合物を投与することが、病気または疾患に対して効果的な治療上の計画である対象、または患者は、ヒトであることが好ましいが、臨床実験やスクリーニングや実験活動における実験動物を含むあらゆる動物でもよい。したがって、当業者には、容易に理解されるように、本発明の方法、化合物および組成物は、あらゆる動物、特に哺乳動物に

対する投与が特に適している。これには、ヒトが含まれるが、当然限定されるものではなく、ネコやイヌなどを対象とした室内動物、限定されないがウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、およびブタなどの対象である家畜、野生動物（野生または動物園を問わない）、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコなどの研究動物、ニワトリ、シチメンチョウ、鳴禽類などの鳥類が、動物治療用に適している。

【0082】

本発明の化合物は、経口または非経口で、そのまままたは、従来の薬理学的担体、希釈液、または、賦形剤と併用して投与されてもよく、賦形剤は、液体でも固体でもよい。適用可能固体担体、希釈液、または、賦形剤は、数ある中でも、結合材、崩壊剤、充填剤、潤滑剤、流動促進剤、圧縮助剤、加工助剤、着色料、甘味料、防腐剤、沈殿防止/分散剤、錠剤崩壊剤、カプセル封じ材料、被膜形成剤もしくは被膜剤、香料、または、印刷インクとして機能する。当然、投薬単位形態の調製の際に使用される材料は、いずれも、薬理学的に純粋で、使用される量では実質的に無毒なものが好ましい。更に、活性化合物は、徐放性製剤または配合組成に取り入れられてもよい。この点において、非経口投与には、特に以下の経路、静脈内、筋肉内、皮下、眼球内、滑液嚢内、経皮、眼、舌下および頬を含む経上皮、局所的なものには、眼、経皮、眼球、ガス注入を通じた経鼻吸入、エアロゾル、および直腸全身性による投与が含まれる。

10

【0083】

粉薬においては、担体、希釈液、もしくは、賦形剤は、精密に分割された活性成分との混合物であり、精密に分割された固体であり得る。錠剤において、その活性成分は、必要とされる圧縮機能を適切な割合で有し、および所望の形状に成形された担体、希釈液、もしくは、賦形剤と混合される。経口治療上投与では、活性化合物は、担体、希釈液、または、賦形剤と併用してもよく、摂取可能な錠剤、パッカレット錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハー状の薬、等の形態で使用される。そのような治療上有効な組成物における、活性化合物の量は、適切な投薬量が得られることが好ましい。治療上の組成物は、99%程度まで活性成分を含むことが望ましい。

20

【0084】

液体担体、希釈液、または、賦形剤は、溶液、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エリキシル等の調製に使用されても良い。本発明の活性成分は、水、有機溶媒、両方の混合物などの薬理学的に許容可能な液体、または、薬理学的に許容可能な油もしくは油脂に溶解、または懸濁される。液体担体、賦形剤または、希釈液は、可溶化剤、乳化剤、緩衝材、防腐剤、甘味料、香味剤、懸濁化剤、増粘剤、着色料、粘性調節剤、安定剤、または浸透圧調節剤、などの他の適切な医薬品添加物を含むことができる。

30

【0085】

適切な固体担体、希釈液、または、賦形剤は、例えば、リン酸カルシウム、二酸化ケイ素、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖類、乳糖、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリジン、低融ワックス、イオン交換樹脂、クロスカルメロースカーボン、アカシア、ゼラチン化前のデンプン、クロスポビドン、HPMC、ポビドン、二酸化チタン、多結晶セルロース、アルミニウムメタ水酸化物 (methahydroxide)、寒天、トラガカント、またはその混合物を含んでもよい。

40

【0086】

経口および非経口投与に適した液体担体、希釈液、または、賦形剤の適切な例としては、水、（特に、上記の添加物、例えば、セルロース誘導体、好ましくは、ナトリウムカルボキシメチルセルロース溶液を含む）、アルコール（一価アルコール、もしくは、例えば、グリコールなどの多価アルコールを含む）ならびにそれらの誘導体、および、油（例えば、分画したココナッツ油ならびにラッカセイ油）または、それらの混合物である。

【0087】

非経口投与には、担体、希釈液、または、賦形剤は、エチルオレエートおよびイソプロピルミリスレートなどの油状のエステルでもよい。また、滅菌された液体担体、希釈液、

50

または、賦形剤でもよく、これらは、非経口投与用に滅菌された液体状組成物である。活性化合物を遊離塩基とする溶液、または、薬理学的に許容可能な塩は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と共に適切に混合させて調製することができる。分散剤は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、ならびにそれらの混合体内、および油内で調製される。通常の保管および使用条件下で、これらの調製には、微生物の増殖を抑える防腐剤が含まれてもよい。

【0088】

注入用途に適した薬理学的な形態は、例えば、滅菌された水溶液または分散剤、および滅菌された粉薬が含まれ、滅菌された注入可能な溶液または分散剤が即時に調製できる。あらゆる場合において、注射での注入を容易にするために、滅菌され液体形状であることが望ましい。安定した条件で、製造および保管することが好ましく、細菌および真菌などの微生物の活動による汚染を抑えるように保存することが望ましい。担体、希釈液、または、賦形剤は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、適切なそれらの混合物、および植物油を含む溶媒または分散剤媒体であってよい。適切な流動性を保つには、例えば、レシチン等の膜を用いる、分散剤の場合には所要の粒径を維持する、および界面活性剤を使用することにより可能である。微生物の活動を防ぐ方法は、数多くの抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等により可能である。多くの場合、例えば、糖類または塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが好ましい。注入可能な組成物の持続的吸収は、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなど吸収を遅延させる剤を使用して実現される。

【0089】

滅菌され注入可能な水溶液は、活性化合物を必要量、適切な溶媒を、上記に列挙した他の成分と共に取り込むことにより調製され、必要に応じて、ろ過滅菌する。一般的に、分散剤は、滅菌した活性成分を、基本的な分散用媒体および上記に列挙した必要とされる他の成分を含む滅菌賦形剤に取り込んで調製されてもよい。滅菌された粉薬の場合には、滅菌された注入可能な溶液を調製するために、調製の好ましい方法には、活性成分もしくは成分の粉を作る真空乾燥および凍結乾燥に加え、前述の滅菌ろ過された溶液からの所望の成分を調製することが更に含まれる。

【0090】

本発明の化合物は、医療分野において、従来確立された技術により、効果的な量を投与されてもよい。本発明の方法で採用される、式（I）または（II）の化合物を含む化合物は、活性剤を、患者の体内の剤の部位（the agents' site）または作用部位に接触させる結果を得られれば、どのような手段で投与されてもよい。化合物は、従来の利用可能である、いかなる方法によって投与されてもよい。

【0091】

医薬組成物は、個別の投薬形態であることが好ましく、例えば、錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル、粉薬、溶液、懸濁液、エマルジョン、シロップ、ウエハー状の薬、顆粒、坐薬などである。そのような形態において、組成物は、適切な活性成分量を含む個別の投薬量にサブ分割され、個別の投薬形態は、パッケージ化された組成物であり、例えば、小分けされた粉薬、小瓶、アンプル、充填済みシリンジまたは液体入りの小袋などである。個別の投薬形態は、例えば、カプセルもしくは錠剤単独、またはそのようなパッケージ化された組成物を適切な数だけ用いてよい。更に、本発明の投薬形態は、活性成分が錠剤内に圧縮されたカプセル状もしくは複数の微少錠剤、粒子状、顆粒またはノンベリル(non-perils)でもよい。これらの微少錠剤、粒子状、顆粒もしくはノンベリル(non-perils)は、可能であれば、別の活性成分の顆粒と共にカプセル内に入れる、または、カプセル内に圧縮する。

【0092】

予防または処置に最も適した本発明の化合物の投薬量は、投与形態、選択した特定の化合物および処置中の特定の患者の生理的な特徴により異なる。一般的に、始めは少量の投

10

20

30

40

50

薬量でもよく、必要な場合は、ある状況下で所望の効果が達成されるまで、少しずつ増加させる。一般的に、経口投与は、多くの投薬量を必要とする。

【0093】

望ましい投薬量は、都合良く、1回または適切な間隔で、例えば、1日当たり2回、3回、4回、またはそれ以上、更に分割して投与してよい。分割した物自体を更に分割してもよく、例えば、大まかに時間を空けて複数回投与してもよい。投薬は、当業者に公知の技術により、化合物の放出制御により行われてもよい。

【0094】

本発明による組成物の投与および配合組成のための本発明の化合物の製造に関する、異なる内容は以下に記載される。

10

【0095】

本発明による方法において有用な化合物は、当業者に公知の多くの方法により製造されてもよい。前記化合物は、例えば、下記に示した方法、または、当業者が理解するその変形例により合成される。本発明の化合物の製造に使用される試薬は、商業的に入手可能である、または、文献に記載される標準的な工程により調製可能である。本発明に関連して開示される全ての工程は、ミリグラム、グラム、マルチグラム、キログラム、マルチキログラム、または、商業工業用スケールを含む任意のスケールで実施することを想定している。

【0096】

本明細書中の化合物とは、1以上の変異が見られ、それぞれの変異は変異を定義するマーカッシュ群から選択される異なる成分である。例えば、2つのR基を有するある構造体が、同一の化合物に同時に存在する場合、2つのR基は、Rを定義するマーカッシュ群から選択される異なる成分を示す。

20

【0097】

明確性のために、別の実施形態との関係で記載される本発明の複数の特徴もまた1つの実施形態の中で、組み合わせて記載されることを理解されるべきである。その逆に、簡潔性のために本発明の多くの特徴が、1つの実施形態の関係において記載されるものの、別々に記載されたり、適切な部分的組み合わせで実施されることができる。

【0098】

本発明は、以下の実施例に詳細に記載される。本発明の好適な実施例を示す一方、記載される実施例は、図のみにより示されることがあり、添付された請求の範囲を制限するものとして解釈されるべきではないことを理解するべきである。上記の説明およびこれらの実施例から、当業者は、本発明に不可欠な特徴を理解し、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な変更や修正を行い、様々な用途や条件に適用させることができる。

30

【0099】

実施例

H B V c c c D N A の調節

D H B V c c c D N A は、L M H で誘導された d s t e t 5 細胞中で効率的に生産され、転写的に活性を有する。H B V を生産するほとんどの細胞株は、宿主染色体に統合された H B V の導入遺伝子から H B V の遺伝子産物を生産しており、したがって c c c D N A は主なウイルス産物の源ではない。これは c c c D N A を標的とする薬のスクリーニングを困難にする。ウイルス性遺伝子産物が c c c D N A に依存する細胞株が生産された。テトラサイクリン (t e t) で制御された H B V / D H B V で、この目的のために、ヒト H e p G 2 およびチキン肝癌 (L M H) に安定な細胞株を樹立した。図1で示されているように、t e t の非存在下およびウイルスの逆転写を防止するためのホスカルネット (P F A) の 2 m M の存在下での培養の後に、D H B V の R N A が蓄積し、しかし D H B V の複製はヌクレオカプシドを含む p g R N A 含有ヌクレオカプシドの段階で静止される (レーン 0) 。 t e t を媒体に戻して導入遺伝子の転写をブロックし、P F A を除去して p g R N A 含有カプシド中のウイルス D N A 合成を続行すると、ウイルス性の R N A の急激

40

50

な低下があり（１日目および２日目）、３日目以降にcccDNAが生産された場合高レベルに最後の上昇がある。

【0100】

これらの結果はcccDNAが効率的に形成され、そして転写的にdstet5の細胞内で機能的であることを暗示している。これらの結果はさらに図2において完全に実証されている。すなわち、導入遺伝子の転写がtetにブロックされ、新しいHBV RNAの出現がcccDNAの出現と密接な関連性があり（図2グループII、コアDNA参照）、一方、ウイルスの転写物は、cccDNAの合成および新しい導入遺伝子の転写の両方がブロックされている（図2、グループI）細胞内において急速に分解される（1/2 ライフ～3 hrs）

10

【0101】

強力にDHBVのcccDNAの転写を抑制する化合物の同定

ウイルスの転写がcccDNA依存的方法（図1、2B）で生産される系および条件で、本願発明者らの社内の小さな化合物のライブラリーから得られた化合物を含む、おおよそ100の化合物がスクリーニングされ、それらは本願発明者らの天然の生産物コレクション(Natural Products collection)に示している。選択された化合物は、細胞のエピジェネティック修飾酵素の阻害剤を含み、HDAC、HAT、サーチュイン、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、およびDNAメチルトランスフェラーゼを含む。表1で示された4つの化合物を含む多数の化合物は、cccDNAに由来するDHBVのpgRNAの量を著しく減らした。すべてはHDACのクラスI阻害活性を有している。

20

【表 1】

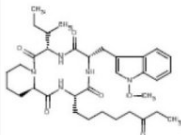
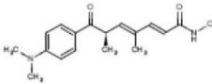
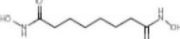
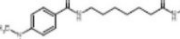
表 1 : HBV cccDNA機能を抑制する化合物およびHDAC ¹ に対するその活性				
ヒット	アピシジン	トリコスタチンA (TSA)	スベロリルビス ヒドロキサム酸 (SBHA)	ジメチルアミノヒド ロキシベンズアミド (M344) ⁵
構造				
HBV cccDNA A (EC50, μM)	0.183	0.480	2.50	6.25
毒性 (CC50, μM) ²	>20.00	>20.00	>40.00	>100.00
選択指数(SI) ³	>100	>40	>16	>16
HDAC-I 阻害剤?	はい ^{4,5}	はい ^{5,6,9}	はい ^{4,6,7,10}	はい ^{4,7}
HDAC-II 阻害剤?	いいえ ^{3,7}	はい ^{4,5,6,9}	はい、および HDAC III ¹¹	はい、および HDAC III ^{7,11}
¹ 図2に示すように、Prelim Evid.に記載された、dstet5系中でHBV cccDNA機能を抑制することがわかった化合物。 ² 本文に記載した、dstet5細胞での我々のアッセイからの毒性。選択指数(SI)は、毒性CC50を有効性EC50で除したものである。本文参照。 ³ 選択指数(SI)は、細胞生存率を50%低下させる濃度(CC ₅₀)をHBV特異的シグナル(RNAおよび/またはHBeAg)を50%低下させる濃度(EC ₅₀)で除したものである。 ⁴ (7); ⁶ (15)(26); ⁶ (45); ⁷ Reaction Biology Monograph; ⁸ (33); ⁹ (13); ¹⁰ (14); ¹¹ (38)				

図3に示されたとおり、アピシジンが強力にcccDNAを阻害しており(EC50~180nM)、5日間で20μMまで毒性はなく、クラスIIのHDACではなく、クラスIに対するナノモラーの活性を有しており、HDACIIの阻害は、この系ではHBVを抑制するために必要ではないように見える。

【0102】

アピシジンとTSAがHBV cccDNAの転写を抑制する。図3は、アピシジンとTSAがcccDNAの転写をDstet5の細胞で抑制していることを示す。これらの化合物もまたHBVのcccDNAの転写をHepG2細胞で抑制している実証も得た。対照的に、アピシジンとTSAが、宿主細胞の染色体で統合された導入遺伝子から得られたDHBVのpgRNAの転写を用量依存的に刺激することが観察された(図4)。これはHDAC阻害に対する細胞の遺伝子のより典型的な反応であって、染色体のDNAではなく、cccDNAの「ミニ染色体」からの転写は異なって制御されていることを示唆している。さらに、cccDNAレベルは減少しているという証拠さえあり、アヒルの系でわかるように、転写的な抑制の次に不安定化が起きることを示している。

【0103】

ヒト肝癌細胞のHBVのcccDNAの転写における化合物の効果

HepDE19の細胞を6ウェルプレートに播種し、コンフルエントになるまでテトラサイクリンの存在下で培養する。Tetを培地から除去し、pgRNAの転写、DNAの合成およびcccDNAの形成を生じさせる。Tetを培地に加え、導入遺伝子の転写を遮断する。3日後、異なるウェルの細胞をそれぞれ多様な濃度（すなわち0.1から10.0 μM）の「試験」化合物（表1の4つの「ヒット」および~20の類似体）で2日間処置するか、または処置をしないで静置する。細胞内のHBVのcccDNA、ウイルス性RNAおよび核のDNAを上述のように、および知られた手順でサザン/ノーザンブロットハイブリダイゼーションアッセイによって定量する。細胞内の全長のHBsAgの前駆体および分泌HBsAgをそれぞれウェスタンブロットおよびELISAアッセイで定量する。すべてのHBVの発現はこれらの細胞では主としてHBVの導入遺伝子からのものであるからであることから、HepG2.2.15細胞をコントロールとして使用する。cccDNAの転写を阻害することが示されているインターフェロナルファ、およびcccDNA形成を阻害する（我々のスクリーニング、Guo 2012から）二置換スルホンアミド（DSS）CCC-0975は、陽性薬品コントロールとして含まれるであろう。いくつかの実験で、培地から「試験」薬品の除去の後、多様な時間（日数）、培養は維持し、薬品により誘導されたあらゆるHBV cccDNAの抑制の耐久性を決定する。cccDNAの転写に対する試験化合物の選択性を決定するために、アルファ1アンチトリプシン、アルブミンを包含するがこれらに限定されない細胞遺伝子のパネルの発現に対する試験化合物の効果もまた定量RT-PCRまたはノーザンブロットハイブリダイゼーションによって測定する。化合物の細胞毒性は並行する培養物のMTTアッセイによって決定する。

【0104】

HBsAgおよびHBVの転写物の減少の量（0-100%）は、HBV cccDNAの転写的な抑制のものさしとみなされている。HBV cccDNAの減少の量（0-100%）は、HBV cccDNAの不安定化および分解のものさしとしてみなされている。A1ATの抑制および/またはアルブミンmRNAの減少の量（0-100%）は、特異性の決定における細胞の機能抑制のものさしとしてみなされている。MTT（0-100%）活性の量は、細胞の生存率のものさしおよび細胞毒性（CC）の根拠としてみなされている。選択指数（SI）は表1脚注にあるとおりである。

【0105】

一次ウッドチャック肝細胞におけるWHV cccDNA転写に対する化合物の効果

ウッドチャック肝炎ウイルス（WHV）はHBVに対する治療を評価することに役立つモデルである。したがって、リード化合物がWHVに対して活性的であるかどうかを知ることが、計画を立てるのに有益である。一次ウッドチャック肝細胞の培養物（PWHC）は、WHVを含む肝細胞の50-90%がWHVを有する条件下で、慢性的に感染したウッドチャックから得られた少区分の生検より得られた、コラゲナーゼ処理組織を播種することによって調製されるものであって、培養物（90%またはそれ以上）は肝細胞であり、少なくとも2か月は培養物で維持することができ、これは以前に行われたとおりである（Fletcher SP, et al. 2012. Transcriptional analysis of the woodchuck model of chronic hepatitis B. *Hepatology: In press*を参照）。播種の7日以内に、培養物を試験化合物の非存在下または存在下でインキュベートし、培地内（WHVピリオン関連DNA；WHs）および細胞内（WHV DNA、WHV RNA転写物）のWHV遺伝子産物の量は、以前に使用され開示されたもの（Guo, H., et al. 2010. Production and function of the cytoplasmic deproteinized relaxed circular DNA of hepadnaviruses. *J Virol* 84:387-396; Guo, et al. 2011. Alkylated porphyrins have broad antiviral activity against hep

adnaviruses、flaviviruses、filoviruses、and arenaviruses. Antimicrob Agents Chemother 55:478-486)と同様な方法を使って決定する。

【0106】

WHVは、鳥類およびヒト系におけるものと同様なSIのものでアピシジンおよび他の候補のcccDNA阻害剤に感受性(疑わしいように)であり、次に慢性的に感染したウッドチャックは生体内での有効性試験の証拠に使用する。

【0107】

阻害剤は、(i)細胞の生存率、次いで細胞機能に対して、HBV cccDNA転写の阻害において最も選択的であり、最も魅力的である、それらの選択指数(SI)によって；(ii)cccDNA転写(もっとも低いEC50)を阻害するそれらの有効性によって、最後に、(iii)「臨界的な化学(critical chemistry)」(拡張性のある型/配合組成)の問題によってランクづけられている。EC₅₀(cccDNAから転写したRNAを50%阻害する濃度)の最も低い値および最も高いSIを有する化合物は最も魅力的である。

【0108】

HDACアイソフォームの同定

一次的なスクリーニングで同定されたそれぞれの化合物は、HDACの阻害活性(例えば、表1を参照)を有するという性質を共有する。おそらくHDACの阻害は、これらの化合物のHBVに対する抗ウイルス性の作用のメカニズムの一部、または中心のいずれかである。化合物のメカニズムを正確に知ることは必要ではないが、この情報は修飾化合物の選択または設計、ならびに潜在的な生体内毒性の予想および低減、ならびに臨床研究の設計に役立つであろう。また多くのHDACの結晶構造が入手可能であるため、将来的な薬品の設計が補助され得る。まとめると、研究においてならびに人々において、HDACの阻害剤の増大する経験は、現在の臨床の設計および将来の計画に方向性を提供し得るものである。

【0109】

HDACはポリペプチド(すなわちヒストン)を脱アセチル化し、機能とDNAの配列の相同性に基づいた4つのカテゴリーに分類される。クラスIとIIのHDACはトリコスタチンA(TSA)によって阻害される。アピシジンは効率的にクラスIIのHDACではなく、クラスIを阻害する。サーチュインと呼ばれているクラスIIIのHDACは、TSAによって影響されないNAD⁺依存性タンパク質のファミリーである。クラスIVはDNA配列に基づき、非典型的なカテゴリーと考えられる。アピシジンおよびTSAは強力にcccDNA転写を阻害するため、クラスIおよびIIのHDACのアイソザイムは最も関連性がある。しかしながら、アピシジンがクラスIのみを阻害するため、初期の焦点は唯一このクラスのみである。

【0110】

実験の詳細：shRNAによるHDACのアイソザイム転写のサイレンシングおよびHBV cccDNAの機能に対する影響。レンチウイルス形質導入ベクターから発現されたショートヘアピン型RNA(shRNA)は、今日shRNAが相同的な転写物の翻訳を抑制する標準的な手段である。焦点はクラスIのHDACアイソザイムに置かれている。したがって、cccDNA依存性的に(上記記載のとおり、tet抑制の後)HBV遺伝子産物を発現するHepDE19細胞のコンフルエントな単層は、形質導入混合物中の100ulのレンチウイルス(〜5×10⁷/ml)で形質導入され、細胞の少なくとも95%がshRNAを受け取り、発現する条件下でクラスI-1、2、3または8のアイソザイムに対して選択的なshRNAを発現する。これはレトロウイルスの導入遺伝子からのレポーターの発現によって決定される。shRNAレンチウイルスの発現ベクターは、形質導入可能なベクターとして販売業者によって提供されており、それぞれのベクターはサブクラスIの異なるHDACを標的にする。それらは販売業者から購入され(例えば、Santa Cruz Bio、OpenBio)、標的にするそれぞれのHDACア

10

20

30

40

50

イソザイム転写物に相同な 19 - 25 nt のショートヘアピンを発現する。例えば、1 つの HDAC 1 特異的な shRNA は 5' - GAT CCC CGC AGA . . . ATC TGC TTT TTG GAA A - 3' を含み、および他のものは販売業者によって提供されているように、ならびに以前の研究から、同様に設計されているがその他の shRNA に対して特異的である。それぞれの HDAC アイソザイムに対して 4 および 5 倍の被覆度がある。コントロールベクターはスクランブル化された配列を含み、陰性コントロールとして使用される。shRNA のレンチウイルス形質導入の 5 日後、特異的な HDAC の抑制を (HDAC 特異的なプローブおよび販売業者によって提供されるモノクローナル抗体による) RNA の分析およびウェスタンブロットによって定量し、HBV cccDNA および cccDNA 依存的転写物および HBeAg の量を、前述で行ったように測定する。一過性の形質導入のアプローチが不十分であるところ場合、選択可能なマーカーを有する shRNA の構築物を使用されているため、少し複雑ではあるが、安定した形質導入が使用される。細胞の遺伝子発現 (A1AT およびアルブミン mRNA) の量もまた前述のとおり特異性コントロールとして定量する。陽性コントロールは、HBV cccDNA を抑制する (および HepDE19 について実証されるだろう) 濃度、1000 nM のアピシジンで HepDE19 細胞をインキュベートすることを含む。それぞれの異なる HDAC は、所望ならば、成功したサブクラス阻害の HDAC の証拠として定量した特異的な細胞の機能と関連している (すなわち 1、p53 のアップレギュレーション、2 および 3 p21、8、H4 の脱アセチル化)。

【0111】

アピシジンの有効性を考えると、クラス I の HDAC の少なくとも 1 つをサイレンシングすることは HBV cccDNA の機能の著しい抑制をもたらすだろうと予想される。複数の HDAC に作用する HDAC 阻害剤は、単一の HDAC 転写物のノックダウンによってなしえ得る以上に大きな効果を有し得ることが認められている。しかしながら、ノックダウンの実験もまたすべてのクラス I の酵素を網羅したレンチウイルスの組み合わせを使用して行う。これは、クラス I の酵素が関わっている場合、これが HBV cccDNA を抑制するはずであるためである (アピシジンが示しているように)。しかし、複数の酵素を HBV cccDNA の阻害を検出するために抑制しなければならない。

【0112】

特定のまたは一群の HDAC 転写物をサイレンシングすることが HBV cccDNA の機能の抑制をもたらす場合、これは HBV 抗ウイルス作用の標的として認められ、また同定された化合物の抗 HBV cccDNA 作用のメカニズムが HDAC 阻害に関与しているという知見を実証する。もちろん、化合物は HBV cccDNA の抑制の他のメカニズムを使用するかもしれないが、HDAC の阻害は HBV cccDNA を抑制し、ならびに今日では HBV の治療上の戦略のこの新しいクラスに対して扉が開かれているということは、少なくとも知られるだろう。

【0113】

同定された化合物のいずれが HBV cccDNA の抑制に関与する HDAC アイソザイムに最大の阻害効果を有するかの決定

HBV cccDNA の制御に関与する特定の HDAC アイソザイムを同定したので、HBV cccDNA を制御するアイソザイムの阻害に対して最大の選択性を有する化合物を同定することは有益である。このことは最大の選択性のある化合物の発展を可能にし、ならびに HBV cccDNA の制御に関与していない HDAC アイソザイムを不必要に阻害することからもたらされるオフターゲット効果を回避するのに役立つ。上記表 1 に表示している 4 つの化合物のそれ、すなわちアピシジンは最高の選択指数を有しており、ならびにまた最も狭い HDAC の阻害プロファイル (HDAC クラス I に選択的) を有するものである。したがって、広範な HDAC 阻害剤を避けること、および HBV cccDNA を抑制するのに十分な特定の HDAC サブアイソザイムに注目することによって、より高い選択性を達成することが可能である。

【0114】

それぞれのHDACクラスI(1, 2, 3, 8)アイソザイムの酵素アッセイは、陽性および陰性の競合的な阻害剤コントロールを有する市販のキットとして利用可能である。キットはBioTeK、BPS Bioscience、または他の利用可能な供給者から前記の関連あるアイソザイムに対応して購入する。手短に言えば、BioTeK系で、脱アセチル化後に検出される蛍光性の基質、事前混合反応での展開液を含む、精製したサブクラスの特異的HDAC酵素(組換え型、~10-50ng/容器)が提供されている。HBVcccDNA阻害に関与することがサイレンシングにより示された酵素を購入する。異なる量のコントロールまたはそれぞれの実験化合物を、酵素反応混合物とともにインキュベートする。

【0115】

アッセイの読み取りは時間および酵素濃度の両方の関数として直線的になるように最適化される。HDACアイソフォームの脱アセチル化酵素活性の50%を阻害するのに必要な試験化合物の濃度(すなわち、IC50)からのキットは、SigmaPlotソフトウェア(Systat Software, Inc., San Jose, カリフォルニア州)を使用する回帰分析によって計算する。

【0116】

理想的に、および最も論理的には、前記手順に従って活性であることが見出された化合物は、HBVcccDNAの制御に最も関与することが見出されたHDACに対して活性的であって、これらは好ましい化合物を示す。活性であるが、HBVcccDNAの制御とは無関係なものが存在することが見出されているHDACを広範に阻害する化合物は、不必要な副作用をもたらす得るために、幾分かより好ましくない。一方、分離(disconnect)があり、前述のアッセイにおいて活性な化合物が、HBVcccDNAの制御に最も重要であるとして見出されているHDACを阻害しない場合には、該化合物はHDAC阻害のランクではなく、HBVcccDNAの抑制活性に基づいて発展させられる。

【0117】

HBV生産細胞および非生産細胞における、生体外での吸収、分布、代謝、および毒性(ADMET)性質に対するリード化合物の評価

序論および原理 生体内実験は高価であり、倫理的に制限されるものである。動物で実験する前に、生体内での性能を可能な範囲で予測する、潜在的な毒性および他の細胞-血清相互作用的な性質について、化合物を最初に特性評価することは賢明である。これらの研究はこの分野では標準になっている。細胞複製に対する毒性も、毒性に関して化合物をランキングするのに良い方法であることが見出されている。最後に、生体内での作業に移る前に、異なる配合組成もまた通常必要である。なぜなら、組織培養セッティングに使用する溶媒が常に生体内での投与と適合性のあるものとは限らないからである。これらは以下のとおり使用されている。通例のADMETに加えて、現在認可されている抗ウイルス治療の存在下で、HBV生産細胞で特性評価が行われている、生体外での「ADMET」における革新が提案されている。

【0118】

新たな抗HBV薬は、現在使用されている、その他のHBV抗ウイルス薬と組み合わせて使用されることになるであろう。併用療法は、HIVおよびHCVならびに他の感染症において標準的である。HBVを処置する新しい薬品が、現在の標準的な治療の下において、毒性または他の変更された特性を有するかどうかを知ることは重要である。なぜなら、併用がなければ十分に許容可能な薬物治療が、慢性的に感染された個体において、毒性を有するという多くの証拠があるからである。HBV生産細胞は、非生産細胞よりもいくつかの薬物治療に対してより感受性になっているかもしれない(Block, 進行中)。したがって、下記のような毒性実験は、いくつかの場合において、HBVポリメラーゼ阻害剤および、ある場合には、インターフェロナルファ(IFNa)の存在下および非存在下で行われる。

【0119】

本リード化合物の中には既に動物に使用されている可能性があり(他者によって)、利

10

20

30

40

50

用可能な十分な情報があるかもしれない。一方、リードの中には動物データの無い新しい化合物があるかもしれない。化合物の特性もまた上記に述べた理由でHBV感染と関連して調べられる。

【0120】

最後に、野生型のHBVcccDNAの機能を阻害し、ならびに生体外で十分に許容された化合物を、HBVポリメラーゼ阻害剤に抵抗性のあるHBVからのcccDNAを抑制する能力を試験する。前述の研究の結果次第で、ヒトおよび/またはアヒルHBV遺伝子導入（およびアヒルには、感染）系を使用する。

【0121】

下記に記述したすべての実験には、既知の毒性、代謝、タンパク質の透過性、膜輸送、および明確化された配合組成の性質を有するコントロールが含まれている。例えば、バラクルードおよびFIAUは、それぞれHBV生産細胞において検出できる毒性を有していない、および有している化合物のコントロールとして含まれており、比較可能なPKとTK特性を報告している。

【0122】

実験の詳細：生体外での「投薬、分布、代謝、『除去』、および毒性」(ADMET)試験 これらの実験のいくつかは、販売業者（すなわち、Absorption Systems）との契約のもとで行い、他については、特にHBV生産細胞および材料が使用される場合は、発明者らによって下記に示すとおり行われる。

【0123】

標準的な細胞毒性アッセイ：ヒト肝癌（HepG2、Huh7、HepRG）ならびに構成的な（HepG2.2.15）およびテトラサイクリン誘発性のHBVの複製（HepDE19およびHepDES19）を支持する、HepG2由来細胞株を、1ウェルにつき 2×10^4 細胞の密度で96ウェルプレートに播種する。細胞は試験化合物の段階希釈で処置する。培地は1日おきに交換する。MTTアッセイを処置から2、4、6、8および10日に行う。

【0124】

細胞複製に対する毒性：異なる濃度のリード化合物を、HBV生産性および非生産性条件下において、低密度（32mmディッシュの1ウェルにつき100細胞）で播種したHepRG細胞と共に、培地を3日ごとに交換して10日間培養する。

【0125】

ヒトおよびマウスの肝ミクロソームにおける代謝的安定性：化合物をNADPHの存在下で、HBV生産および非生産細胞（組織培養の供給源は上記のとおり）からのヒトおよびマウスの肝ミクロソームと共に培養する。加えて、化合物の安定性は、ヒト擬似胃液および擬似腸液の存在下で評価される。実験のこのセットの目的はまた、化合物が消化酵素によって代謝されるかどうかを決定するものである。経口で利用可能な化合物が探究されるため、もしあれば、どのような代謝物が胃腸管で生産され得るのかを見出すことは重要である。

【0126】

毒性および代謝安定性試験は、等濃度および倍数の濃度のラミブジン、バラクルード、テルビブジン、テノフォビル、および/またはアデフォビル（バラクルードでは約0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ラミブジンでは10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで）またはヒトにおいて典型的に達成される血清レベルのインターフェロンアルファ（IFN α ）の非存在下および存在下で行われる。cccDNA抑制的試験化合物は、上記のアッセイで決定した、それらのIC50の10倍で使用される。コントロール化合物（確立された毒性および確立された代謝特性を有する）もまたそれぞれの試験のパネルに含まれている（すなわちFIAU、スタチン等）。

【0127】

血漿タンパク質結合：平衡透析をヒト血漿タンパク質（販売業者による）に結合する化合物のパーセンテージを決定するために本アッセイで使用する。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 8 】

双方向的な透過性：このアッセイは頂端部から側底部方向へ、および側底部から頂端部方向へのCaco-2細胞の単層を介する化合物の透過性を決定するために使用する。

【 0 1 2 9 】

インターフェロン（IFN）の存在下でのリード化合物の抗ウイルス活性。感染していない細胞においてポリメラーゼ阻害剤またはインターフェロンの組み合わせで使った場合に、上記の実験はリード化合物の生体外のADMETを探索する。リード化合物が確立された抗ウイルス剤の抗ウイルス特性に対して衝撃を与えるかどうかを決定することもまた重要である。ポリメラーゼ阻害剤と比較すると、IFNアルファ（ α ）は、HBVを扱うために頻繁には使用しない。使用する場合、何年間も使用し、cccDNA阻害剤と同時投与する可能性が高いポリメラーゼ阻害剤とは違い、数か月間のみである。しかしながら、IFN α の抗ウイルス活性のメカニズムおよび毒性にHDACが関与し得るとすれば、生体外で評価可能な範囲内で、IFN α との相互作用の特性について、ここで開示するcccDNA阻害剤を評価することは意味がある。したがって、クローニング密度（増殖試験のために）およびセミコンフルエント（抗ウイルス/cccDNA転写物試験のために）で播種した、HBVcccDNAからの転写物を生産するようにプログラムされたdSET細胞およびAD38細胞（予備証拠およびCai 2012のように）を、異なる濃度のcccDNA阻害剤候補の存在下および非存在下、ならびに、生体外でHBVを抑制することが知られている量のトリIFNまたはヒトIFN α の存在下および非存在下でインキュベートする。細胞の生存率およびHBVcccDNA由来の遺伝子産物（転写物）の量を、前述の文献公知の手順により測定する。

10

20

【 0 1 3 0 】

化合物はまた、現在使用されているポリメラーゼ阻害剤の存在下において、生体外での活性を試験する。問題は、使用するポリメラーゼ阻害剤により異なるが、HBVポリメラーゼのヌクレオシド/チド阻害剤に抵抗力のある突然変異体ウイルスの出現は、慢性的な感染の管理において問題である。したがって、野生型HBVcccDNAの機能を抑制する化合物を、HBVポリメラーゼ阻害剤に抵抗力のあるHBVからのcccDNAを阻害するそれらの能力について試験する。必要な突然変異体ウイルスのすべて（DHBVおよびWHV）は利用可能である。ヒトおよび/またはアヒルHBVトランスフェクション（アヒルについては感染）系を使用する。作用の別個のメカニズムからすると、本化合物は抗ウイルス活性を保持する。

30

【 0 1 3 1 】

配合組成の最適化：選択された化合物について、経口の経管栄養に好適な投薬賦形剤展開（dosing vehicle development）の進歩を評価する。試験賦形剤は、1）pH操作、2）共溶媒（グリシン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノールなど）、3）界面活性剤（ポリソルベート、ポロキサマー、ポリオキシシルヒマシ油、グリセリルおよびPEGエステルなど）、4）非水系（ゴマ油、中間鎖トリグリセリド、ダイズ油、オレイン酸など）、5）複合化剤（シクロデキストリンなど）を包含する。

【 0 1 3 2 】

ADMETの見込みから、許容性に関してバラクードに類似した性質を有する化合物が好ましい。またHBVポリメラーゼ阻害剤（ラミブジン、バラクード、インターフェロンなど）の存在下のように、非存在下においても同じ毒性および代謝安定性の特性を有する化合物が好ましい。HBV生産細胞に対して選択的な毒性を有する化合物は好まれず、失格であり、または特別に慎重に進歩させる。現在のHBV抗ウイルスの毒性を高めたもしくは高める、またはこれらの抗ウイルス活性に拮抗する化合物は、さらに進歩しているが、併用によって毒性が高められる可能性に注意し、生体内実験で試験されている。cccDNA活性化化合物は、併用では用いない（または注意して用いるのみ）ことを提案することも可能である。

40

生体外での有利特性を有するリード化合物をスケールアップし、生体内での毒性、薬物動態（PK）および有効性を試験する。

50

【 0 1 3 3 】

薬物動態、毒物動態 (T K) および投薬量範囲調査試験。高価で、倫理的に制約され、大量の化合物を消費する、生体内での効果試験を行う前に、未感染の動物の生体内で、候補となる薬の最大許容投薬量 (M T D)、薬物動態学的特性 (P K) を決定する必要がある。これによって進歩させる価値がある化合物の同定を可能にし、適切な投薬および投与経路を確立する。これらは確立された予測可能な動物モデルであるため、化合物を、慢性ヘパドナウイルス感染のアヒルおよび/またはウッドチャックモデルのいずれか (または両方) における有効性について試験する。ウッドチャックをアヒルと比較することの根拠について説明する。アピシジンそれ自体に関して、すでにマウスに使用されているため、動物での P K / T K についてのかなりのことがすでに知られるようになるであろう。しかしながら、アピシジンについてさえ、そしてあらゆる他の現在の化合物については確実に、アヒルおよびウッドチャックに対する新しい P K、T K の研究が必要とされている。したがって、マウスおよびラットの P K および T K についての、次のような一連の研究が行われている。

10

【 0 1 3 4 】

実験の詳細 - マウス、アヒル、および必要ならばウッドチャックの、単一投薬の薬物動態試験。本試験の目的は、分布の量、全身性のクリアランス、半減期 (T 1 / 2)、最大血漿濃度 (C m a x) および生物学的利用性を得ることである。これらのパラメータはそれぞれのイミノ糖のクリアランスおよび生物学的利用性を評価するために使用するため、化合物を血漿濃度を維持する能力によってランクづけすることができる。一般に、化合物を進歩させるため、50%を超える生物学的利用性が好ましい。

20

【 0 1 3 5 】

上述したように、候補を、マウス (生後6週間、B a l b / c ; 6マウス/グループ) ; 北京ダック (生後6週間) またはウッドチャック (グループ毎に3匹) に対して、静脈注射 (5 m g / k g) を介して投与し、または経口で (2 5 m g / k g) と与える。臨床観察を、投薬後に数回の間隔で記録する。薬物動態のための血液および尿の試料を、投薬前に、および投薬後5、15ならびに30分、1、2、4、8、16ならびに24時間に採取する。試料を、投与された薬 (薬またはプロドラッグ) の存在および量について、および投与されたプロドラッグの場合には「薬」代謝物の総量についても同様に、分析する。試料を、我々の他の化合物のためのマウス血漿アッセイを確立した、吸収系によって分析する。

30

【 0 1 3 6 】

組織分布 (マウス)。組織を、経口または静脈内への化合物の投与後の色々な時点で、単回の投与を受けたマウス (投薬グループ毎に3匹) から採取する。化合物の組織分布の知識は、成功した薬候補としての可能性を評価することを著しく助けることができる。血漿タンパク質結合および分布量のような他の生体外でのパラメータは血管外組織への分布の割合および広がりに対する予測値を有するが、薬の肝臓組織濃度は、おそらく効果に最も関連がある。焦点は、マウスへの腹腔内および経口経路による化合物の単回投与の後にエンドポイント試料を使用した候補の組織濃度について、血清、腎臓、腹部脂肪組織 / リンパ節よりも、肝臓に保持される。一つの関心のある点は、活性化合物が、組織において効果的な半減期に関する洞察を提供する、主要な組織の中で、蓄積するか否かである。これは、薬の血清半減期は約2時間ではあるが、それはこの数倍の組織半減期を有することができるものであり、予期された有効性 (所与の投薬計画について) より大きく、または予期された毒性よりも大きいことを説明する。

40

【 0 1 3 7 】

投薬量 - 最大許容投薬量 (M T D) の発見の試験。化合物は抗ウイルス活性として評価されるため、マウスにおける化合物の許容性を知ることは重要である。B a l b / c マウス (生後6週間、グループ毎に6匹) ; アヒル (生後6週間、グループ毎に3羽) は、経口の経管栄養 (我々は経口で利用可能な化合物を追求しているため) により、「賦形剤」単体か化合物が溶解した賦形剤のどちらかが投薬されるであろう。以前の経験から、投与

50

される化合物の範囲は、投薬グループあたり5匹のマウスに、100mg/kgから500mg/kgの間の可能性がある。動物は、体重および生存性のエンドポイントの毎日の記録とともに、最大14日観察される。日常的な組織学および臨床科学の研究が行われている。いかなる死亡性/毒性の結果にもならない、化合物の最も高い投薬量は、MTDであると考えられる。ウッドチャックを、このMTD試験のために用いることができない；PKウッドチャックの試験と組み合わせたマウスの試験からの推定が必要であろう。

【0138】

化合物は、それらの経口生物学的利用性、許容性および半減期のためにランクづけられる。理想的な化合物は、水溶性、経口、一日の投薬とともに、少なくとも組織培養IC50濃度の10倍の血清または肝臓組織レベルに到達して維持することが可能であり、組織培養IC50の100倍以上のMTDを有することが可能である。化合物はこれらの質に関してランクづけされ、最も良いものおよび二番目に良いものを進歩させるであろう。

【0139】

リード化合物は生体内で慢性的に感染した動物モデルに有効か？

生体外での有効性を実証し、生体内での働きのために投薬することの安全性および理論的根拠を決定した後、リード化合物が慢性HBVの検証動物モデルにおいてウイルスのレベルを制御できるかどうかを知ることは重要である。これは、cccDNAを標的とする小分子薬が動物において試験されているであろう最初の機会を表す。安全で、選択的で、かつcccDNA標的化剤とする一致した結果が重要である。有効なエンドポイントは、ウイルス血症、抗原血症における、肝臓内(intra-liver)cccDNAおよびcccDNAの抑制の指標となる複製型の総量と同様の、急速でかつ協調的な減少を含む。これらの標的は、用いられた動物モデル、および試験された処置の長さを必要とする。

【0140】

慢性HBV感染の色々な動物モデルが存在し、それぞれが長所と同様に欠点を有する。アヒルおよびウッドチャックを、それぞれ、実験的に慢性的にアヒルおよびウッドチャックヘパドナウイルスに感染させることができる。色々なマウスのモデルが存在するが、cccDNA標的化合物を試験するために、HBV遺伝子を有するトランスジェニックマウスは、cccDNAテンプレートからHBVを生産せず、uPAマウスのようにヒト肝細胞を有するキメラのマウスが必要である。実用的な考察は、選択を必要とする。化合物が培養物中のトリ細胞におけるアヒルウイルスに対して活性であるため、実験を慢性HBVアヒルモデルにおける評価のために設計する。これはHBV治療を試験するための確立されたモデルであり、自然な感染であるため、慢性的に感染したウッドチャックにおける試験もまた用意する。ウッドチャックが薬に対して敏感でなく、ヒトHBVに敏感である場合、uPAマウスは非常に高価となる。

【0141】

したがって、好ましい化合物は、以下に定義されるように、以下のアヒルおよび適切な場合にはウッドチャックにおいて必要な量までスケールアップし、有効性について試験する。

【0142】

実験の詳細 - 好ましい化合物のスケールアップ生産。アピシジンは、フザリウム(すなわちsp.ATCC74322)による発酵で生産されている。その系統は、220rpmの撹拌で、制御された湿度雰囲気下で12-16日間、MED5と呼ばれる栄養培地に播種される。採取時に、すべての培養液をメチルエチルケトンで抽出し、抽出物を、RP-HPLCによって最終精製されたセファデックスゲル濾過により分画する。収率は、おおよそ250mg/Lであるため、グラム量までのスケールアップは日常的である。

【0143】

アヒルヘパドナウイルスの有効性の試験。アピシジンがDHBVに対して高活性であることが知られているため、培養物中では、慢性的に感染したアヒルで試験をする。この試験の目的は、好ましい化合物の抗ウイルスの可能性を決定することである。血清学および組織学は二次的である。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 4 】

慢性的に D H B V 1 6 型 (アルパータ株) に感染した生後 6 週間の北京アヒルを用いる。6 週目では、アヒルのウイルス血症および肝臓質量が安定している傾向にある。アヒルは、筋肉内および経口の経管栄養 (A i m 4 P K / T K の結果に依存して) により、試験化合物を (3 投薬グループ、P K 結果に依存する投薬量および頻度で、組織培養 I C 5 0 の少なくとも 1 0 倍安定した血清レベルに到達することを目指して) 与える。これらは、1 投薬グループあたりに 5 - 6 匹の動物がいる 3 つの投薬グループである。コントロール投薬グループ (各グループに 6 匹の動物) は、偽薬を処置した動物および他のバラクルード (1 m g / k g) またはラミブジン (4 0 m g / k g) を 1 日あたりに処置した動物を含む。すべての投薬グループのうち少なくとも 3 匹の動物は、肝生検の少なくとも 1 つの前処置および 1 つの後処置に寄与する。これはラミブジンが、検出可能なレベルとなりかつアヒルにおいて報告された c c c D N A の半減期を下回るためにラミブジンがウイルス血症を抑制する時間を超えているため、処置は 1 0 週間である。アヒルは、薬の中止の後、追加の 4 週間で、毎週血清の収集を続ける。血清は毎週収集する。

10

【 0 1 4 5 】

毎週血清は、標準的な「実験室の値」(循環中の血液、アルブミン、A S T、A L T s、D H B V ウイルス D N A の量、s A g、s A b が決定される。生検から得られる肝組織 (同じ動物からのいくつかの前処置および処置の終了) は、D H B V D N A (c c c D N A、複製型) および D H B V コア (免疫染色された) の試験を受ける。

20

【 0 1 4 6 】

W H V - 感染されたウッドチャックの試験。この試験では、1 グループあたり 5 匹の動物とし、1 0 週間の薬停止の後に薬処置を 1 0 週間行うものとし (影響の耐久性の試験のため)、1 0 グループを用いる。ウイルス血症および抗原血症のレベルの変動のため、動物は、試験開始の 7 日前に決定された W H V ウイルス血症および抗原血症レベルによってグループに層別されるため、両方のウイルスマーカーの平均レベルは、すべての動物のグループの間で均等に分散される。異常に低い W H V s A g レベルを有する動物は、この試験では用いない。化合物は、げっ歯類における生物学的利用性の試験の後に最終決定された経路および頻度により、毎日投与される。この試験で投与の初日は、試験日 1 である。試験日 1 の投与レベルは試験前の体重に基づいて計算され、体重は投薬量投与のために毎週取得する。投薬範囲は、マウス試験に関しては、参照化合物 (テナント) としてバラクルードで処置したグループ 1 0 と共に、4 回の投薬である。

30

【 0 1 4 7 】

主要なエンドポイントは、薬停止の減少に対する耐久性を達成するために薬投与および停止を行う場合の、ウイルス血症および抗原血症における用量依存的な減少である。

【 0 1 4 8 】

生存率と動物の健康。臨床観察は、罹患率および死亡率のため、1 日 1 回行い、記録する。さらに毒物学は、血液学、血清科学、および組織学の検査を経由して取り込まれる。ウイルス血症もしくは抗原血症または他の推定される有益な成果の減少が二次的な結果のプロトコル (化合物) の毒性ではないことを保障するために、一般的な動物の健康の前後関係においてすべての生化学的および免疫学的なエンドポイントを考慮することは重要である。全般的な物理的特性 (重量、尿および便の出力ならびに特性評価は毎週決定する。加えて、肝機能検査 (毎月採取した試料で行う)、血液学および化学 (処置の前、処置中および処置後の試料で、選択された動物に対して (投薬前、投薬中および処置終了時) 行う (表を参照)、肝臓切片から得られるパンチ生検の組織学はまた、有効性と同様に毒性の評価のために実行される。

40

【 0 1 4 9 】

肝機能検査は、肝臓の生存能力のマーカーとして、毎月の試料における商業サービスによって決定する。

【 0 1 5 0 】

体液性の応答性の証拠。W H s A g を認識する抗体の存在は、E L I S A によって決定

50

する。このアッセイは、抗原と複合される W H s A b s でさえ検出されるようなものである。

【 0 1 5 1 】

毒物学。慎重な毒物学は、マウス試験で記述されるように、血液学および血清科学を紹介して行う。加えて、肝臓のパンチ生検の組織学的な検査は、炎症、胆管増殖、およびポータルならびに小葉肝炎を含み、行われる。

【 0 1 5 2 】

血清中の W H V ウイルスレベル。評価は、毎週（スロットプロットハイブリダイゼーションおよび P C R としてまたは隔月で（サザンプロット）行う。

【 0 1 5 3 】

生検。肝生検は、処置の開始前、途中、終了時、および試験の終了時に収集され、組織学および細胞内 W H V D N A の検査に用いられる。複製型および肝臓内の共有結合的に閉じた円形 W H V D N A (W H V c c c D N A) のレベルは、ハート(Hirt)抽出に基づいて定量的に決定される。免疫染色のため、別の組織が用いられ、未処置の動物に対して処置された動物において、コアおよび W H s A g の蓄積が決定されるであろう。

【 0 1 5 4 】

アヒルおよびウッドチャックの両方の試験にとって、これらの試験はかなり日常的であり、すべての方法および評価に必要な手持ちの試薬があるため、技術的困難は予期されない。アヒルでの 1 つの可能性のある問題は、薬なしで起こるウイルス血症 / 抗原血症の変化である。これは、ウイルス学的に普段安定している生後 6 週間のアヒルを用いることにより、軽減される。

【 0 1 5 5 】

積極的な活性のベンチマークは、L F M A U 処置動物である。これらの動物は、アヒルおよびウッドチャックにおいて、それぞれ、前処置および未処置のグループに比べて、H B V 感染した肝細胞の数が大幅に減少し、3 および 10 週間の処置により、H B V ウイルス血症および抗原血症ですら一様に失ってしまっていることが予想される。

【 0 1 5 6 】

c c c D N A の転写（および安定性）の阻害は、細胞内および細胞外のすべてのウイルス遺伝子産物（それらの血清半減期によって影響する速度で）の量を減少させるはずであり、以前にも H B V に感染した細胞の数の減少がある（場合によっては、H B V の数に比例した感染細胞の喪失）。現実的には、我々の新たな化合物の有効性の明確な証拠は、時間および H B V D N A ウイルス血症および s A g 抗原血症において用量依存的で有意に重要な減少である。本発明の化合物の有効性を考えると、生体外において、一方または両方のモデルにおける血清表面抗原の少なくとも 10 倍の減少が予想される。

【 0 1 5 7 】

D H B s A g W H s A b のレベルもまた計測される。コントロール、すなわち、慢性的に感染した動物は抗原（A g）を検出することがない（またはほとんど検出することがない）と予測される。慢性的に感染した人々（およびウッドチャック）は、s A b を作ることができ、作るという証拠が増大しつつあるが、循環 s A g により阻害されまたはこれに結合する。したがって、A g が低下する場合、および低下するので、s A b 自体を公表することが可能である。

【 0 1 5 8 】

処置の前後に、生体組織検査の分析が、マウントした肝臓組織および抽出物を使用し、免疫染色した H B V コア、s A g について行われ、H B V の核酸の量を調べる。理想的には、感染した細胞の数が薬処置の関数として減少するであろう。有益な情報は、増大する肝炎（細胞の浸潤）の設定で生じるかどうかを含んでいる。

【 0 1 5 9 】

10 および 4 週の動物の血清（ウッドチャックおよびアヒルそれぞれ）もまた薬処置が止めた後で評価する。s A b s の出現を伴う、安定した、薬のない、抗原血症、ウイルス血症の抑制は、すべての主な目的を達成したもの考えられる。あらゆる不利な応答または

10

20

30

40

50

発症のない、偽薬を超える量によるウイルス血症および抗原血症の薬抑制は、薬特異的な効果の証拠と考える。

【0160】

上述のアウトラインの動物試験は、化合物が生体内で抗原血症を減少させることに効果があるかどうかについて決定的な結論を可能にする。

【0161】

H D A C 阻害が、H B V c c c D N A の転写を阻害することが決定された場合、H D A C 阻害は一般的に宿主染色体に統合された H B V D N A を含む遺伝子の活性化と関連があるため、結果は驚くべきほど有益である。結果は大半の細胞遺伝子とは異なる、H B V c c c D N A の抑制がどのように異なるかという例を示すかもしれない、ならびにこ

10

【0162】

まとめると、本研究は2つの重要な答えを提供する。第一に、それは、ヒトおよびウッドチャックの培養物における H B V c c c D N A の機能の選択的な抑制を示す。第二に、それは、どの H D A C (アピシジンの標的) が H B V c c c D N A を制御するのかを示す。我々は、H B V 感染者における H D A C の阻害を慎重に進めなければならない、この作業が革命的な新しい治療戦略をどのように進めるのかに関する方向を示している、という

20

【0163】

一般的合成

本発明の化合物は後述する一般的な方法および手順を使用する、容易に手に入る出発物質から製造することができる。典型的または適切なプロセスの条件(例えば、反応の温度、時間、反応物のモル比、溶媒、圧力など)が挙げられ、他のプロセスの条件も特に明記しない限りは使用することができる。最適な反応の条件は特定の反応物または用いられる溶媒により異なるかもしれないが、このような条件は当業者の日常的な最適化手順によって決定することができる。

【0164】

ここで記載されるプロセスは当業者に知られている任意の適切な方法によって測定することができる。例えば、生産物の形成は分光学的な手段、例えば、核磁気共鳴分光法(例えば、 ^1H または ^{13}C NMR)、赤外線分光法(IR)、分光光度法(例えば、紫外可視)、または質量分析法、または高速液体クロマトグラフィーまたは薄層クロマトグラフィー(HPLC)などのクロマトグラフィーによって測定することができる。

30

【0165】

化合物の製法は、種々の化学的な基の保護および脱保護を含み得る。保護および脱保護の必要性、および適切な保護する基の選択は当業者によって容易に判別され得る。保護基の化学は、例えば、P. G. M. Wuts と T. Greene、Greene's Protective Groups in Organic Synthesis、4th. Ed.、Wiley & Sons、2006に見出される。この文献は、その全体を参照することによりここに組み入れられる。

40

【0166】

ここで記述されるプロセスの反応は、有機合成の当業者が容易に選択できる好適な溶媒で行うことができる。好適な溶媒は、反応が進む温度、すなわち、溶媒の凍り出す温度から溶媒の沸騰する温度の幅では、出発物質(反応物)、中間体、または生産物には実質的に無反応となり得る。このような反応は1つの溶媒でまたは1つの溶媒以上の混合物で進み得る。特定の反応の段階次第では、特異性のある反応の段階に適切な溶媒を選択することができる。発明の化合物は例えば下記に記載する反応の経路および技術を使用することで製造することができる。

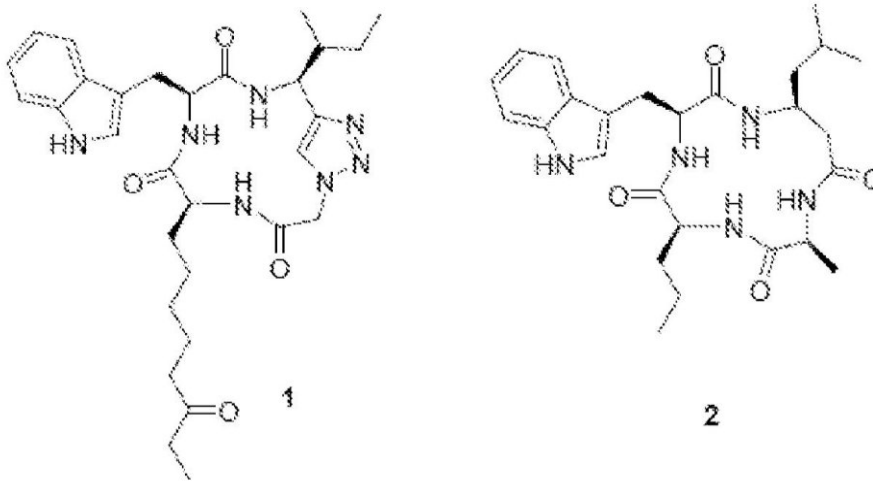
【0167】

50

化合物の合成

アピシジンは誘導化され、最近の類似体 1 および 2

【化 1 4】



10

(Horne, W. S., C. A. Olsen, J. M. Beierle, A. Montero, and M. R. Ghadiri. 2009. Probing the bioactive conformation of an archetypal natural product HDAC inhibitor with conformationally homogeneous triazole-modified cyclic tetrapeptides. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 4718 - 4724; Vickers, C. J., C. A. Olsen, L. J. Leman, and M. R. Ghadiri. 2012. Discovery of HDAC Inhibitors That Lack an Active Site Zn^{2+} -Binding Functional Group. *ACS Medical Chemistry Letters* を参照) は、アピシジンの構造を、抗 HDAC の有効性を損なうことなく修飾できることを実証している。

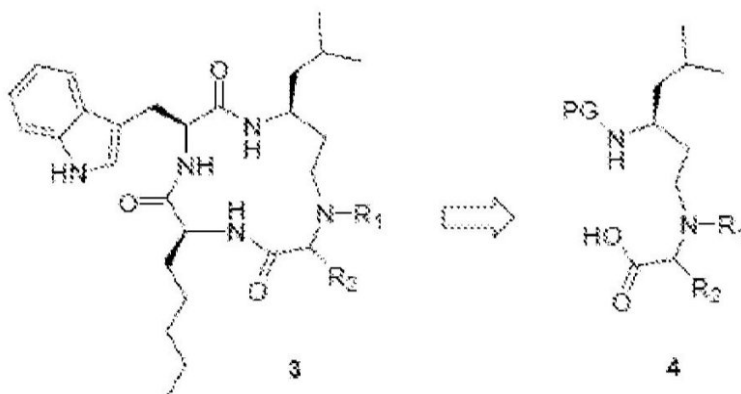
20

【0168】

30

更なる類似体は、極めて低い水溶解度、経口生物学的利用率、および生体内での半減期を有するアピシジンと比較して医薬の性質を改善することに焦点を当てて製造された。アピシジンの誘導体は特に標準的な固相および溶液相の方法によって製造された。ある実施例では、減少したベータ-イソロイシンアミノ酸由来の断片 4

【化 1 5】

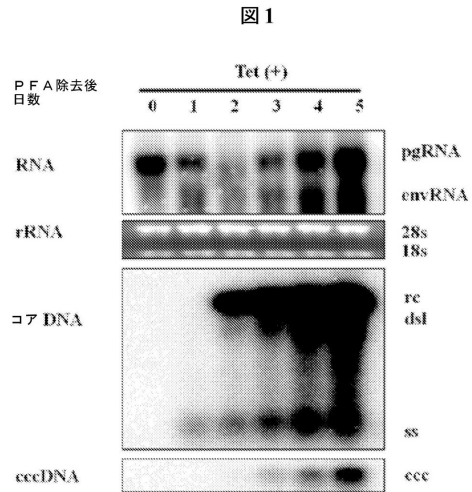


40

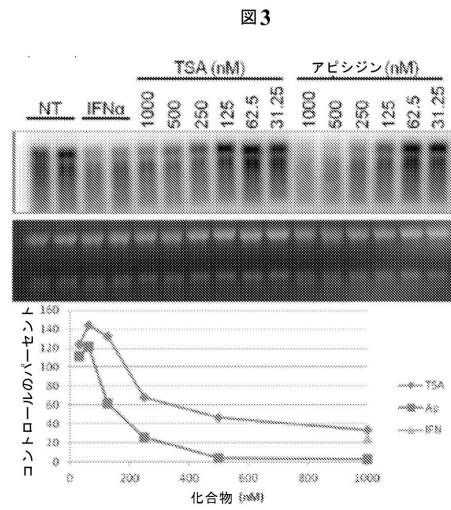
は、溶液相の方法で好適に保護された形態 (PG = Fmoc または Boc のような適切な保護グループ) で製造され、溶液相または固相の手段によってアミノ酸の配列に導入され、次いで、確立された方法を用いて環化を行った。

50

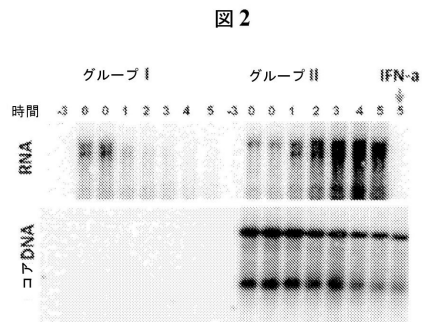
【 図 1 】



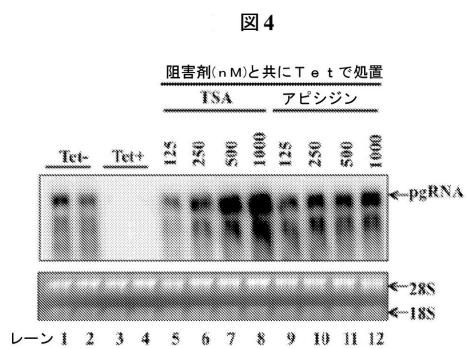
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 38/12 (2006.01) A 6 1 K 38/12
 A 6 1 K 38/07 (2006.01) A 6 1 K 38/07
 C 0 7 K 5/12 (2006.01) C 0 7 K 5/12

(73)特許権者 514306272

バルーク エス.ブルームバーグ インスティテュート
 Baruch S. Blumberg Institute
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 18902、ドイルスタウン、オールド イーストン ロード 3805
 3805 Old Easton Road, Doylestown, Pennsylvania
 18902 U.S.A.

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 グオ, ジュ - タオ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19446、ランズデール、オックスフォード サークル 1426

(72)発明者 チャン, ジンホン

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 18914、チャルフォント、パーベリー コート 101

(72)発明者 ブロック, ティモシー エム.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 18902、ドイルスタウン、フォックスクロフト ドライヴ 90

(72)発明者 キニー, ウィリアム エー.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 18940、ニュータウン、トンブソン ミル ロード 16

(72)発明者 アルモンド, ハロルド, アール.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19002、メーブル グレン、ハノーバー プレイス 1330

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 ACS Medicinal Chemistry Letters, 2011年, Vol.2, p.703-707

ACS Medicinal Chemistry Letters, 2012年, Vol.3, p.505-508

Journal of Medicinal Chemistry, 2009年, Vol.52, No.23, p.7836-7846

Angew. Chem. Int. Ed., 2009年, Vol.48, p.4718-4724

Journal of Medicinal Chemistry, 2009年, Vol.52, p.7836-7846

Gastroenterology, 2006年, Vol.130, p.823-837

Cancer Letters, 2009年, Vol.280, p.211-221

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 45/00

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)