

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5715820号

(P5715820)

(45) 発行日 平成27年5月13日 (2015. 5. 13)

(24) 登録日 平成27年3月20日 (2015. 3. 20)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/4184 (2006. 01)

A 6 1 K 31/4184

A 6 1 P 31/14 (2006. 01)

A 6 1 P 31/14

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

C O 7 D 403/06 (2006. 01)

C O 7 D 403/06

請求項の数 17 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-525943 (P2010-525943)
 (86) (22) 出願日 平成20年9月18日 (2008. 9. 18)
 (65) 公表番号 特表2010-539241 (P2010-539241A)
 (43) 公表日 平成22年12月16日 (2010. 12. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/076806
 (87) 国際公開番号 W02009/039248
 (87) 国際公開日 平成21年3月26日 (2009. 3. 26)
 審査請求日 平成23年9月16日 (2011. 9. 16)
 (31) 優先権主張番号 61/092, 537
 (32) 優先日 平成20年8月28日 (2008. 8. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/973, 309
 (32) 優先日 平成19年9月18日 (2007. 9. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510074863
 スタンフォード ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 - 1 1 0 6
 カリフォルニア州 パロアルト エル カ
 ミノ リアル 1 7 0 5
 (74) 代理人 100083806
 弁理士 三好 秀和
 (74) 代理人 100095500
 弁理士 伊藤 正和
 (74) 代理人 100111235
 弁理士 原 裕子
 (72) 発明者 エイナヴ、 シリット
 アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォル
 ニア州 スタンフォード アラーディス
 ウェイ 8 9 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フラビウイルス科ファミリーのウイルスへの感染を治療する方法ならびに、フラビウイルス科ファミリーのウイルスへの感染を治療するための組成物

(57) 【特許請求の範囲】

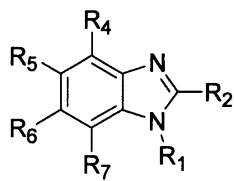
【請求項 1】

宿主におけるウイルス負荷を低減することにより、宿主におけるフラビウイルス科ファミリーのウイルスによる感染を治療するための医薬品の製造における、阻害剤の使用であって、

前記ウイルスがC型肝炎ウイルスであり、

前記阻害剤が、式

【化 1】

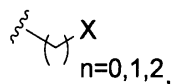


で表される化合物、またはその薬学的塩であり、

式中、R₁ は、- (CH₂)_n - アリール (n = 1 または 2) であり、

式中、R₂ は -H と

【化 4】



とからなる群から選択され、

式中、X は、－アルキル、および－OH からなる群から選択され、

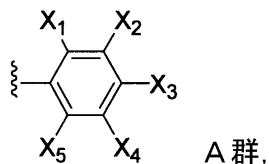
R₄～R₇ は各々、－H、および－CH₃ からなる群から独立して選択され、

前記アルキル基が、メチル基、エチル基、イソプロピル基、およびトリフルオロメチル基からなる群から独立して選択され、

前記アリール基が、独立して A 群であり、

10

【化 8】



式中、X₁～X₅ は各々、A 群の化合物に存在する場合、

－H、－アルキル、－Br、－Cl、および－F からなる群から独立して選択され、

但し、前記化合物は、

20

1-(2,6-ジフルオロベンジル)-2-イソプロピル-4-メチルベンゾイミダゾール、

1-(2,6-ジフルオロベンジル)-4-メチルベンゾイミダゾール、

1-(2,6-ジフルオロベンジル)-2-メチルベンゾイミダゾール、

1-(2,6-ジフルオロベンジル)-2-ヒドロキシメチル-4-メチルベンゾイミダゾール、および
クロルミダゾール (Chlormidazol)

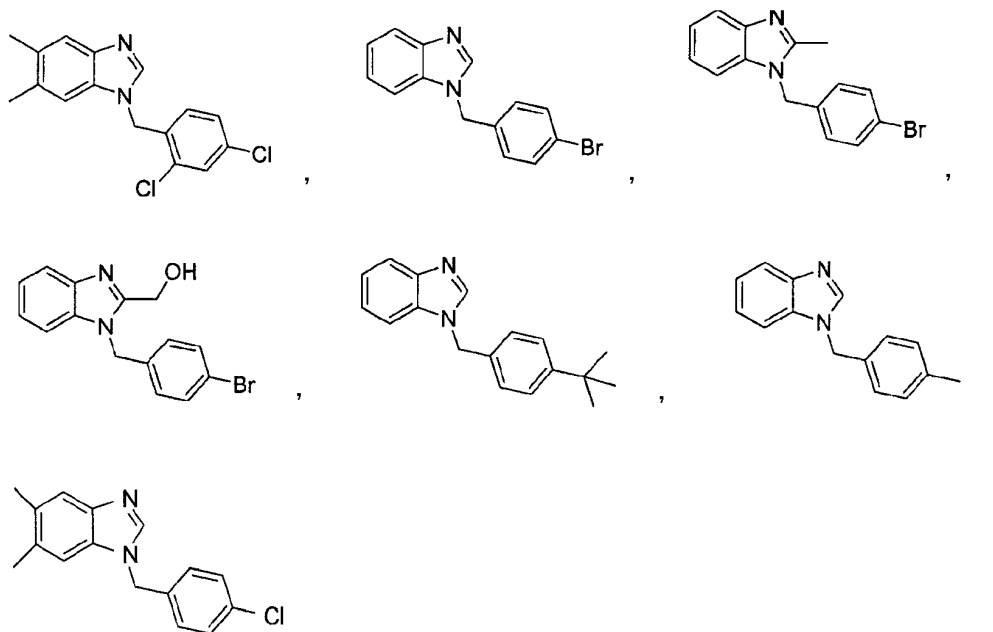
からなる群より選択される化合物ではない、
 使用。

【請求項 2】

前記阻害剤が、下記の化合物

【化 3 1】

30



40

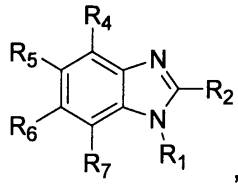
およびその薬学的塩からなる群から選択される、請求項 1 に記載の使用。

50

【請求項 3】

前記阻害剤が、式

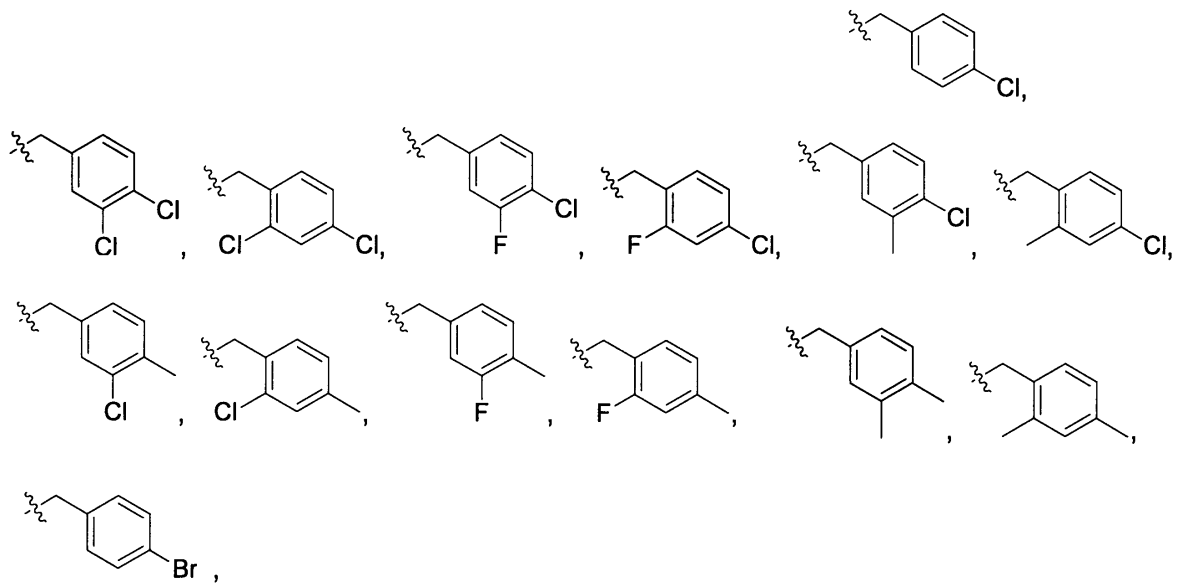
【化 1 4】



で表される化合物、またはその薬学的塩であり、

R_1 は、

【化 1 5】



$-\text{CH}_2-(\text{Ph}-p-\text{tBu})$ 、および $-\text{CH}_2-(\text{Ph}-p-\text{Me})$ からなる群から選択され、

R_2 は、 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、および CH_2OH からなる群から選択され、

R_4 は、 $-\text{H}$ であり、

R_5 および R_6 は、 $-\text{H}$ 、および $-\text{CH}_3$ からなる群から独立して選択され、

R_7 は $-\text{H}$ である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

前記阻害剤を 1 用量あたり 15 mg から 200 mg の量で、1 日 1 回以上投与する、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5】

前記阻害剤が、抗 HCV 治療薬、HCV NS3 プロテアーゼインヒビター、HCV NS5B RNA 依存性 RNA ポリメラーゼインヒビター、チアゾリド、持続放出性チアゾリド、ヌクレオシド類似体、およびインターフェロン- α からなる群から選択される少なくとも 1 種類の別の治療薬と組み合わせて投与される、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

宿主における HCV 複製の治療のための医薬品の製造における阻害剤の使用であって、前記阻害剤が、下記の化合物

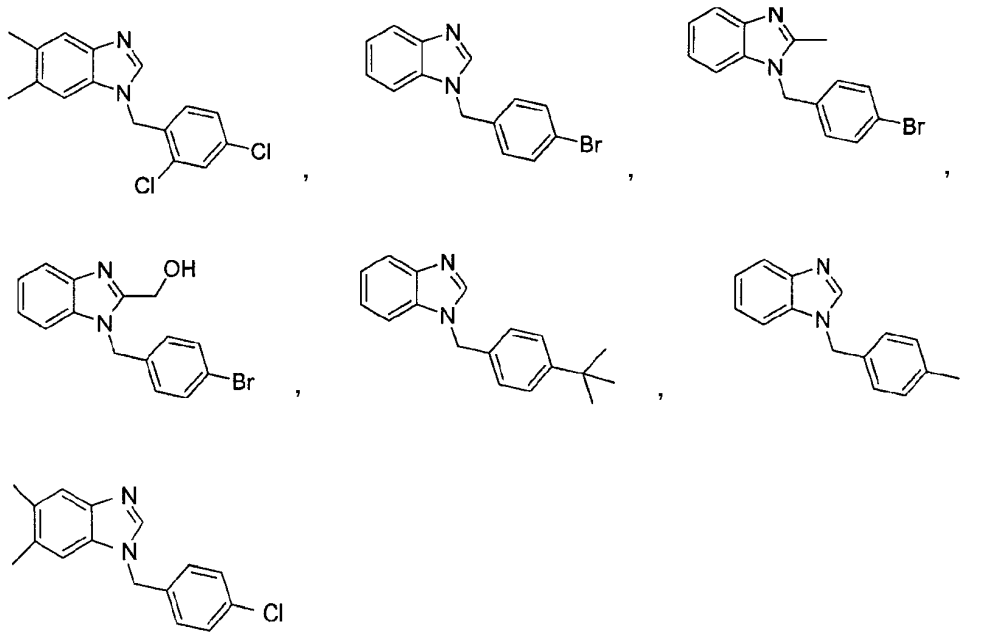
10

20

30

40

【化 3 1】



10

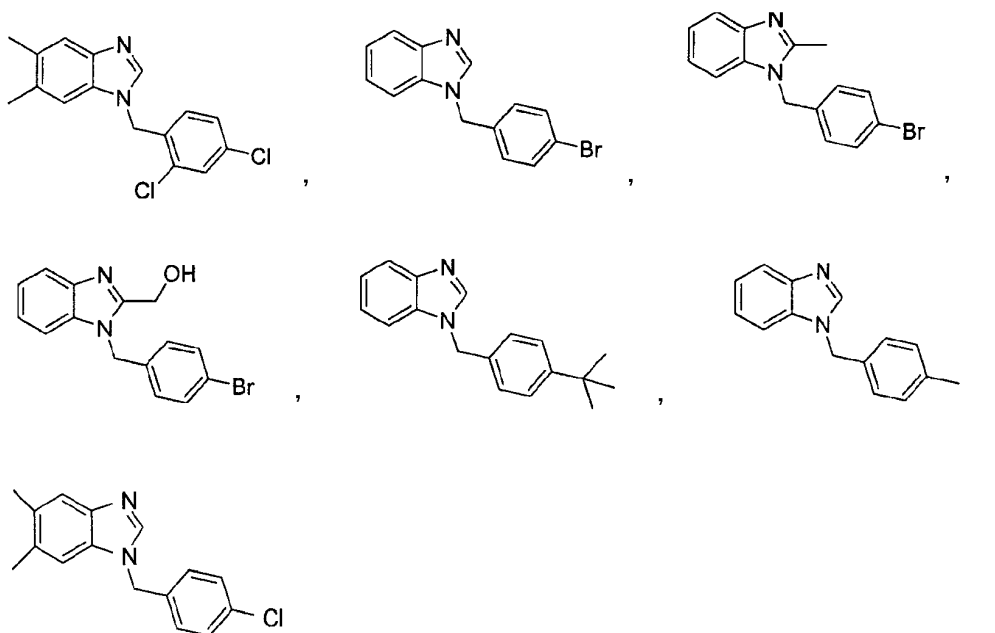
20

およびその薬学的塩からなる群から選択される、使用。

【請求項 7】

ウイルスに感染した宿主における HCV マイナス鎖 RNA の 3' UTR に対する NS4B ポリペプチドの結合の阻害のための医薬品の製造における阻害剤の使用であって、前記阻害剤が、下記の化合物

【化 3 1】



30

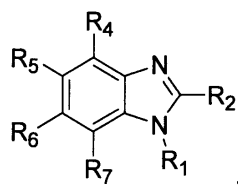
40

およびその薬学的塩からなる群から選択される、使用。

【請求項 8】

阻害剤を含む医薬組成物であって、
前記阻害剤が、式

【化 1 9】

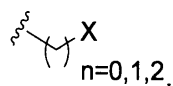


で表される化合物、またはその薬学的塩であり、

式中、 R_1 は、 $-(CH_2)_n-$ アリール ($n = 1$ または 2) であり、

式中、 R_2 は $-H$ と

【化 2 2】



とからなる群から選択され、

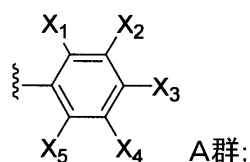
式中、 X は、 $-$ アルキル、および $-OH$ からなる群から選択され、

$R_4 \sim R_7$ は各々、 $-H$ 、および $-CH_3$ からなる群から独立して選択され、

前記アルキル基が、メチル基、エチル基、イソプロピル基、およびトリフルオロメチル基からなる群から独立して選択され、

前記アリール基が、独立して A 群であり、

【化 2 7】



式中、 $X_1 \sim X_5$ は各々、A 群の化合物に存在する場合、

$-H$ 、 $-$ アルキル、 $-Br$ 、 $-Cl$ 、および $-F$ からなる群から独立して選択され、

但し、前記化合物は、

1-(2,6-ジフルオロベンジル)-2-イソプロピル-4-メチルベンゾイミダゾール、

1-(2,6-ジフルオロベンジル)-4-メチルベンゾイミダゾール、

1-(2,6-ジフルオロベンジル)-2-メチルベンゾイミダゾール、

1-(2,6-ジフルオロベンジル)-2-ヒドロキシメチル-4-メチルベンゾイミダゾール、および
クロルミダゾール (Chlormidazol)

からなる群より選択される化合物ではない、
 医薬組成物。

【請求項 9】

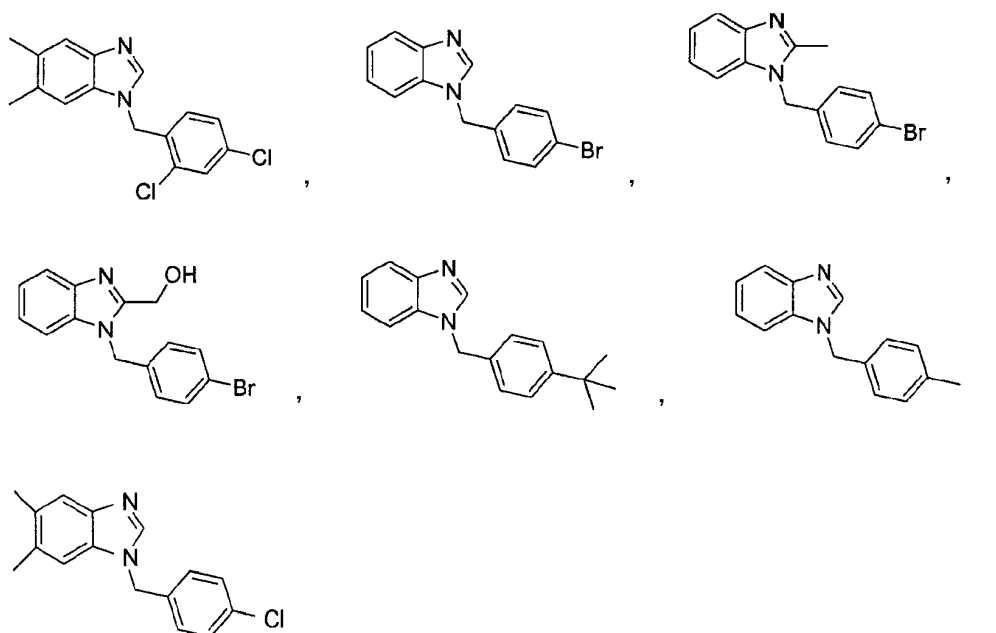
前記阻害剤が、下記の化合物

10

20

30

【化 3 1】



10

20

およびその薬学的塩からなる群から選択される、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 0】

抗 HCV 治療薬、HCV NS3 プロテアーゼインヒビター、HCV NS5B RNA 依存性 RNA ポリメラーゼインヒビター、チアゾリド、持続放出性チアゾリド、ヌクレオシド類似体、およびインターフェロン-α からなる群から選択される少なくとも 1 種類の別の治療薬をさらに含む、請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】

宿主におけるウイルス負荷を低減することにより、宿主におけるフラビウイルス科ファミリーのウイルスによる感染を治療するための医薬品の製造における、阻害剤の使用であって、

30

前記ウイルスが C 型肝炎ウイルスであり、

前記阻害剤が、クレミゾールまたはその薬学的塩である、使用。

【請求項 1 2】

前記阻害剤を 1 用量あたり 15 mg から 200 mg の量で、1 日 1 回以上投与する、請求項 1 1 に記載の使用。

【請求項 1 3】

前記阻害剤が、抗 HCV 治療薬、HCV NS3 プロテアーゼインヒビター、HCV NS5B RNA 依存性 RNA ポリメラーゼインヒビター、チアゾリド、持続放出性チアゾリド、ヌクレオシド類似体、およびインターフェロン-α からなる群から選択される少なくとも 1 種類の別の治療薬と組み合わせて投与される、請求項 1 1 または 1 2 に記載の使用。

40

【請求項 1 4】

宿主における HCV 複製の治療のための医薬品の製造における阻害剤の使用であって、前記阻害剤が、クレミゾールまたはその薬学的塩である、使用。

【請求項 1 5】

ウイルスに感染した宿主における HCV マイナス鎖 RNA の 3' UTR に対する NS4B ポリペプチドの結合の阻害のための医薬品の製造における阻害剤の使用であって、前記阻害剤が、クレミゾールまたはその薬学的塩である、使用。

【請求項 1 6】

C 型肝炎ウイルスの感染を治療するための、阻害剤を含む医薬組成物であって、

50

前記阻害剤が、クレミゾールまたはその薬学的塩である、医薬組成物。

【請求項17】

抗HCV治療薬、HCV NS3プロテアーゼインヒビター、HCV NS5B RNA依存性RNAポリメラーゼインヒビター、チアゾリド、持続放出性チアゾリド、ヌクレオシド類似体、およびインターフェロン-αからなる群から選択される少なくとも1種類の別の治療薬をさらに含む、請求項16に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

10

本出願は、発明の名称「METHODS OF TREATING HEPATITIS C VIRUS INFECTION」で2007年9月18日に出願された、米国仮特許出願第60/973309号の優先権の利益を主張するものであり、その全体を本明細書に援用する。

【0002】

また、本出願は、発明の名称「METHOD AND COMPOSITIONS FOR TREATING HEPATITIS C VIRUS INFECTION」で2008年8月14日に出願された、米国仮特許出願第61/088759号の優先権の利益を主張するものであり、その全体を本明細書に援用する。

【0003】

20

また、本出願は、発明の名称「METHODS OF TREATING A FLAVIVIRIDAE FAMILY VIRAL INFECTION, COMPOSITIONS FOR TREATING A FLAVIVIRIDAE FAMILY VIRAL INFECTION, AND SCREENING ASSAYS FOR IDENTIFYING COMPOSITIONS FOR TREATING A FLAVIVIRIDAE FAMILY VIRAL INFECTION」で2008年8月28日に出願された、米国仮特許出願第61/092537号の優先権の利益を主張するものであり、その全体を本明細書に援用する。

【0004】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

30

本発明は、National Institutes of Healthにより認められた助成番号RO1 DK066793および1RO1 HG002644-01A1のもとでなされたものである。よって、米国政府は本発明に対して一定の権利を留保する。

【背景技術】

【0005】

世界中で1億5000万人を超える人々がC型肝炎ウイルス（HCV）に感染している。残念なことに、インターフェロンとリバビリンとを併用しての治療からなる現行の治療水準では、こうした個人の多くが自らの感染をなくすことができない。さらに、この治療は顕著な副作用が付随し、多くの個人ではこれを使用することができない。よって、現行の治療法は大半の患者にとって不適切であり、HCV感染を治療するための新たな薬剤が早急に必要とされている（Annals Internal Med. 132:296～305（2000））。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

9.6kbの一本鎖のプラスRNA HCVゲノムは、タンパク質分解的に処理されて成熟ウイルスの成分である構造的タンパク質とウイルスゲノムの複製に参与する非構造的タンパク質（NS）に分けられる、3000のアミノ酸からなるポリタンパク質をコードする（Curr Top Microbiol Immunol 242, 55～84（

50

2000))。他のプラス鎖RNAウイルス(B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), Fields Virology. (Lippincott-Raven Publications, Philadelphia, Pa., 1996, in “The viruses and their replication”))と同様に、HCVは細胞内膜構造と結合して複製されるように見える。HCVの場合、その構造は脂質膜の泡(membranous web)と呼ばれ(J Virol 76, 5974~5984 (2002))、NS4Bタンパク質によって誘導されると考えられている。NS4Bは、RNA複製の見かけ上の部位において他のウイルス性NSタンパク質を集合させるのにも必要とされる(J Virol 78, 11393~11400 (2004))。ウイルス性RNA、特に子孫のゲノムの産生に必要とされるマイナス鎖テンプレートが、どのようにしてこれらの複製部位に取り込まれ、あるいはそこで維持されるのかは、いまだ分かっていない。

10

【0007】

当該技術分野においては、HCV感染を治療する作用剤ならびに、HCV感染を治療するのに適した候補作用剤を同定する方法は、依然として需要がある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

簡単に説明すると、この開示の実施形態は、化合物組成物、医薬組成物、フラビウイルス科(Flaviviridae)ファミリーのウイルスに感染した宿主を治療する方法、宿主中のHCV複製を処置する方法、宿主中でのHCVマイナス鎖RNAの3'UTRに対するNS4Bポリペプチドの結合を阻害する方法、宿主の肝線維症を治療する方法などを含む。

20

【0009】

フラビウイルス科ファミリーのウイルスのいずれかのウイルスに感染した宿主を治療する一つの例示的な方法は、とりわけ、宿主に治療有効量の阻害剤を投与して、宿主におけるウイルス負荷を低減するステップを含む。一実施形態においては、阻害剤は、クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物、これらの化合物各々の薬学的塩、これらの化合物のアイソスターからなる群から選択される。

【0010】

宿主におけるHCV複製を治療する一つの例示的な方法は、とりわけ、HCVウイルス感染のある宿主に阻害剤を投与するステップを含む。一実施形態においては、阻害剤は、クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物、これらの化合物各々の薬学的塩、これらの化合物のアイソスターからなる群から選択される。

30

【0011】

宿主中のHCVマイナス鎖RNAの3'UTRに対するNS4Bポリペプチドの結合を阻害する一つの例示的な方法は、とりわけ、ウイルス感染のある宿主に阻害剤を投与するステップを含む。一実施形態においては、阻害剤は、クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物、これらの化合物各々の薬学的塩、これらの化合物のアイソスターからなる群から選択される。

【0012】

宿主中の肝線維症を治療する一つの例示的な方法は、とりわけ、宿主に治療有効量の阻害剤を投与するステップを含む。一実施形態においては、阻害剤は、クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物、これらの化合物各々の薬学的塩、これらの化合物のアイソスターからなる群から選択される。

40

【0013】

フラビウイルス科ファミリーのウイルスについて、ウイルス感染のある宿主を治療するための一つの例示的な医薬組成物は、とりわけ、阻害剤を含む。一実施形態においては、阻害剤は、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物、これらの化合物各々の薬学的塩、これらの化合物のアイソスターからなる群から選択される。

【0014】

50

一つの例示的な組成物は、とりわけ、阻害剤を含む。一実施形態においては、阻害剤は、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物、これらの化合物各々の薬学的塩、これらの化合物のアイソスターからなる群から選択される。

【0015】

一つの例示的な医薬組成物は、とりわけ、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物、これらの化合物各々の薬学的塩、これらの化合物のアイソスターからなる群より選択される化合物を含む。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1Aおよび図1Bは、HCVは、クレミゾールおよびNS3プロテアーゼインヒビター（SCH503034）のさまざまな組み合わせの存在下における、ルシフェラーゼレポーター結合HCVゲノムを用いた複製アッセイで得られたデータを表すグラフを示す。

10

【図2】患者の血清におけるベースライン特性ならびにシリアルHCVウイルス負荷を示す。

【図3】HCVプラス鎖RNAゲノムの5'非翻訳領域、およびHCVマイナス鎖RNAの3'非翻訳領域のRNA鎖を示す。

【図4】図4Aは、5, 6-二置換クレミゾール化合物を合成する基本方法の実施形態を示す。図4Bおよび図4Cは、2つの5, 6-二置換クレミゾール化合物を合成する実施形態を示す。

20

【図5】図5a～図5dは、マイクロ流体プラットフォームで測定したタンパク質-RNA相互作用から得られる結果を示す。

【図6】図6aおよび図6bは、NS4BがHCVマイナス鎖RNAの3'末端と特異的に結合することを示す結果を示す。

【図7】図7a～図7dは、NS4B内でのRNA結合ドメインの同定と、これに関連した結果とを示す。

【図8】図8a～図8dは、小分子スクリーンが、塩酸クレミゾールが、NS4Bおよび生体内でのHCV RNA複製によってRNA結合を阻害することを明らかにすることを示す。

【図9】図9a～図9eは、クレミゾール耐性突然変異に関連する結果を示す。

30

【図10】図10a～図10cは、マイクロ流体ベースのRNA結合アッセイの概要を示す。

【図11】図11aおよび図11bは、RNA結合アッセイでのシグナル対ノイズ比を示すグラフである。

【図12】図12a～図12cは、ELAV様ファミリーであるHuR（ELAVL1）由来の別のヒトタンパク質によるRNA結合についてのマイクロ流体ベースの解析で得られた結果を示す。

【図13】図13a～図13cは、HCV RNAに対するNS4Bの結合に関連する結果を示す。

【図14】ATAがNS4Bによって用量依存的にRNA結合を阻害することを示す結果を示す。

40

【図15】クレミゾールがHCV複製を阻害することが、リアルタイムPCRアッセイによって明らかになったことを示す結果を示す。HCV複製レベルのリアルタイムPCRアッセイによって、クレミゾールが、細胞に対する測定可能な毒性のない状態で（右軸、■（上側の曲線））HCV複製を阻害する（左軸◆（下側の曲線））ことが分かる。

【図16】RRb変異は複製を約45分の1に減少させ、RRa変異のあるレプリコンではRNA複製が完全に欠けていることを示すデジタル画像である。

【図17】図17Aは、塩酸クレミゾールの化学構造を示す。図17Bは、力価と薬効を高めたクレミゾール誘導体分子の化学構造を示す。図17Cは、マイクロ流体工学（結合RNA／タンパク質比対化合物濃度（ μM ））で測定した場合のクレミゾール誘導体

50

分子（●）および親の塩酸クレミゾール化合物（□）の試験管内阻害曲線を示すグラフを示す。図17Dは、クレミゾール誘導体分子（●）および親の塩酸クレミゾール化合物（□）の濃度を次第に高めた場合のHCV複製の用量応答曲線（HCV感染細胞でのリアルタイムPCRアッセイ（相対ウイルス複製対化合物濃度（ μM ））で測定）を示すグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本開示について詳細に説明する前に、この開示がここに記載の特定の実施形態に限定されるものではなく、もちろん本発明の実施形態自体が変わってもよいことを理解されたい。また、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるものであるため、本明細書で使用する専門用語は特定の実施形態を説明することのみを目的とするものであり、何ら限定することを意図したものではない旨も理解されたい。

10

【0018】

別途定義しないかぎり、本明細書で使用する科学技術用語はいずれも、本開示が属する分野の当業者らに一般に理解されている意味と同一の意味を持つ。本明細書に記載の方法および材料と同様または等価な方法および材料を、本発明の実施または試験に用いることが可能であるが、ここでは好ましい方法および材料について説明する。

【0019】

本明細書に引用する刊行物および特許公報については、いずれも各刊行物または特許公報を具体的かつ個々に取り入れて参照したのと同程度に本明細書に援用し、当該刊行物を引用した方法および／または材料について開示および説明するために本明細書に援用するものである。いずれの刊行物の引用も本出願の出願日前の開示を示すためのものであり、先行する開示によって当該刊行物を自らの開示に対する「従来技術」とであると認めていると解釈されるべきではない。さらに、ここに記載の刊行日は実際の刊行日とは異なる可能性もあるため、個々に確認が必要な場合もあろう。

20

【0020】

本開示を読めば当業者であれば自明であろうように、本明細書で説明して図示する個々の実施形態は、本開示の範囲または主旨を逸脱することなく他のいくつかの実施形態における特徴と容易に分離または組み合わせることのできる別個の構成要素と特徴を有する。ここに述べる方法はいずれも、ここに述べた事象の順序で実施してもよいし、論理的に可能な他の任意の順序で実施しても構わないものである。

30

【0021】

本開示の実施形態では、特に明記しないかぎり、合成有機化学、生化学、生物学、分子生物学、組換えDNA技術、薬理学などの技術を利用しており、いずれも当業者らが想到する範囲内である。当該技術については、文献に十分説明されている。

【0022】

本明細書に記載の実施例は、本明細書に開示して権利請求している方法をどのように実施し、化合物をどのように使用するかについての例示的な開示および説明を当業者に与えるために出されたものである。数量（たとえば、量、温度など）に関しては正確さを期するために努力をしているが、若干の誤差や偏差も考慮に入れなければならない。特に明記しないかぎり、部は重量部、温度は $^{\circ}\text{C}$ 、圧力は大気圧またはその前後である。標準的な温度および圧力は、 20°C および1気圧と定義する。

40

【0023】

本開示の実施形態について詳細に説明する前に、特に明記しないかぎり、本開示が特定の材料、試薬、反応材料、製造工程などに限定されるものではなく、それ自体が変わり得ることを理解されたい。また、本明細書で使用する専門用語は特定の実施形態を説明することのみを目的とするものであり、何ら限定することを意図したものではない旨も理解されたい。さらに、本開示では、論理的に可能であればステップを異なる順番で実行しても構わないことも考えられる。

【0024】

50

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」「an」および「the」は、その指示対象の複数形を含む（文脈から、そうでないことが明白な場合を除く）ことに注意されたい。よって、たとえば、「化合物」といえば、複数の化合物を含むといった具合である。本明細書と、これに続く特許請求の範囲では、以下の意味を持つものとして定義する（文脈から、そうでないことが明白な場合を除く）多数の用語に言及する。

【0025】**定義**

ここに開示の主題について説明および権利請求するにあたって、下記に示す定義に基づき以下の専門用語を使用する。

10

【0026】

「フラビウイルス科ウイルス」とは、ヒトおよび非ヒト動物に感染するウイルスをはじめとして、フラビウイルス科ファミリーのウイルスを意味するものである。これらのウイルスをコードするポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は当該技術分野において周知であり、Genbank受託番号NC_004102、AB031663、D11355、D11168、AJ238800、NC_001809、NC_001437、NC_004355、NC_004119、NC_003996、NC_003690、NC_003687、NC_003675、NC_003676、NC_003218、NC_001563、NC_000943、NC_003679、NC_003678、NC_003677、NC_002657、NC_002032、NC_001461（これらのデータベースエントリの内容全体を本明細書に援用する）など、NCBIのGenbankデータベースで見いだせる。

20

【0027】

本明細書で使用する場合、「治療」、「治療して」および「治療する」という表現は、作用剤で、疾患、機能障害または症状に作用して、疾患、機能障害または症状および／またはその症候の薬理学的および／または生理学的作用を低減または寛解させるものとして定義される。本明細書で使用する場合、「治療」は、宿主（哺乳動物、一般にヒトまたは獣医学の対象となる非ヒト動物など）における疾患の治療も対象となり、（a）疾患の素因があると判断されたが、その疾患に対する感染が診断されていない被検体における疾患の発生の危険性を減らす、（b）疾患の発症を妨害する、（c）疾患を軽減すなわち疾患の退縮を引き起こすおよび／または1種類以上の疾患症候を軽減することを含む。また、「治療」は、疾患または症状が存在しない場合ですら、薬理学的作用を提供するための阻害剤の送達を包含することも意図している。たとえば、「治療」は、被検体における効果を高めるまたは被検体に望ましい効果をもたらす（たとえば、病原体負荷の低減、疾患症候の低減など）疾患阻害剤または病原体阻害剤の送達を包含する。

30

【0028】

本明細書で使用する場合、「予防的に治療する」または「予防的に治療して」という表現は、疾患またはその症候を完全にまたは部分的に予防するおよび／または疾患の部分的または完全な治癒および／または疾患に起因する有害作用に関して治療的であり得ることを示す。

40

【0029】

本明細書で使用する場合、「宿主」、「被検体」、「患者」または「生物体」という用語は、ヒトと哺乳動物（マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ウマなど）を含む。本開示の化合物を投与できる典型的な宿主は、哺乳動物、特に霊長類、とりわけヒトであろう。獣医学的な用途では、たとえば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、メウシ、ブタなどの家畜；ニワトリ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウなどの家禽類；特にイヌやネコなどのペットである飼いならされた動物といった多岐にわたる被検体が適しているであろう。診断または研究調査の用途では、齧歯類（マウス、ラット、ハムスターなど）、ウサギ、霊長類、近交系ブタなどのブタといった多岐にわたる哺乳動物が好適な被検体となろう。「生きた宿主」という表現は、上述の宿主または生きている別の生物体を示す。「生きた宿主」という

50

表現は、宿主または生物体全体を示し、生きた宿主から摘出した一部分（肝臓または他の臓器など）だけを示すものではない。

【0030】

「単離された化合物」という表現は、それが天然で生じる他の化合物に対して実質的に分離または濃縮された化合物を意味する。単離された化合物は通常、重量比で、少なくとも約80%、少なくとも90%純粋、少なくとも98%純粋または少なくとも約99%純粋である。本開示は、ジアステレオマーならびに、そのラセミおよび分解された（resolved）、エナンチオマー的に純粋な形態およびその薬学的に許容される塩を含むことを意図している。

【0031】

「単位剤形」という用語は、本明細書で使用する場合、ヒトおよび／または動物の被検体の単位薬用量として適した物理的に別個の単位を示し、各単位が、薬学的に許容される希釈剤、キャリアまたはビヒクルとの関連で所望の効果を発揮するのに十分な量で計算された、所定の量の化合物（本明細書で説明するような抗ウイルス化合物など）を含有する。単位剤形の具体的な内容は、使用する特定の化合物、投与経路および投与頻度、発揮される効果、宿主における各化合物に関連する薬物動力学によって左右される。

【0032】

「薬学的に許容される賦形剤」、「薬学的に許容される希釈剤」、「薬学的に許容されるキャリア」または「薬学的に許容されるアジュバント」は、通常は安全で無毒であり、生物学的にもそれ以外の観点からも望ましくないことがない、医薬組成物を調製するにあたって有用な賦形剤、希釈剤、キャリアおよび／またはアジュバントを意味し、獣医学的な用途および／またはヒトの製剤での用途に許容可能な賦形剤、希釈剤、キャリア、アジュバントを含む。本明細書および特許請求の範囲で使用する場合、「薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、キャリアおよび／またはアジュバント」とは、このような賦形剤、希釈剤、キャリアおよびアジュバントのうちの1種類および複数種類を含む。

【0033】

本明細書で使用する場合、「医薬組成物」は、哺乳動物、特にヒトなどの被検体への投与に適した組成物を包含することを意図したものである。通常、「医薬組成物」は滅菌され、好ましくは、被検体内で望ましくない応答を誘発できる汚染物質を含まない（医薬組成物中の化合物が製剤グレードであるなど）。医薬組成物は、これを必要とする被検体または患者に、経口、静脈内、頬側、直腸、非経口、腹腔内、皮内、気管内、筋肉内、皮下、吸入などを含む多数の異なる投与経路で投与できるように設計可能である。

【0034】

「治療有効量」という用語は、本明細書で使用する場合、治療対象となる宿主がかかっているまたは発症の危険性がある治療対象疾患すなわち感染の症候のうちの1種類以上をいくぶん軽減する、投与対象となる作用剤（化合物、阻害作用剤、および／または薬剤と呼ぶこともある）の実施形態の量および／または疾患すなわち感染の症候のうちの1種類以上を、いくぶん予防する量を示す。

【0035】

「薬学的に許容される塩」とは、生物学的有効性および任意に遊離塩基の他の特性を保持し、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸、リンゴ酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸などの無機酸または有機酸との反応によって得られる塩を示す。

【0036】

ここに開示の作用剤の実施形態が塩を形成する場合、これらの塩は本開示の範囲内である。本明細書のいずれかの式で表される作用剤に対する言及は、特に明記しないかぎり、その塩に対する言及を含むものと理解される。「塩」という用語は、本明細書で用いる場合、無機および／または有機の酸および塩基との間で形成される酸性塩および／または塩基性塩を示す。また、作用剤が塩基性部分と酸性部分の両方を含む場合、双性イオン（「分子内塩」）が形成されることがあり、これも本明細書で使用する場合の「塩」という用

10

20

30

40

50

語に含まれる。薬学的に許容される（無毒で生理学的に許容されるなど）塩が好ましいが、調製時に使用できる単離または精製のステップでは他の塩も有用である。作用剤の化合物の塩は、たとえば、塩が沈殿するものなどの媒質中で、あるいは水性媒質にて、等量などの一定量の酸または塩基と作用剤とを反応させて（水性媒質の場合はその後凍結乾燥が続く）形成できるものである。

【0037】

塩基性部分を含む作用剤の実施形態は、さまざまな有機酸および無機酸との間で塩を形成できる。例示としての酸付加塩には、酢酸塩（酢酸またはトリハロ酢酸、たとえば、トリフルオロ酢酸との間で形成されるものなど）、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ショウノウ酸塩、ショウノウスルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩（塩酸との間で形成）、臭化水素酸塩（臭化水素との間で形成）、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩（マレイン酸との間で形成）、メタンスルホン酸塩（メタンスルホン酸との間で形成）、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、シュウ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩（硫酸との間で形成されるものなど）、スルホン酸塩（本明細書に記載するものなど）、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩などのトルエンスルホン酸、ウンデカン酸塩などがある。

【0038】

酸性部分を含む作用剤の実施形態は、さまざまな有機塩基および無機塩基との間で塩を形成できる。例示としての塩基性塩には、アンモニウム塩、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、リチウム塩、カリウム塩など）、カルシウム塩およびマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、有機塩基（たとえば有機アミン）との塩、たとえばベンザチン、ジシクロヘキシルアミン、ヒドラバミン（N, N-ビス（デヒドロアビエチル）エチレンジアミンとの間で形成）、N-メチル-D-グルカミン、N-メチル-D-グルカミド（glucamide）、ト-ブチルアミンならびに、アルギニン、リジンなどのアミノ酸との塩などがある。

【0039】

塩基性窒素含有基は、ハロゲン化低級アルキル（塩化、臭化、ヨウ化のメチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、硫酸ジアルキル（硫酸ジメチル、硫酸ジエチル、硫酸ジブチル、硫酸ジアミルなど）、長鎖ハロゲン化物（塩化、臭化、ヨウ化のデシル、ラウリル、ミリスチル、ステアリルなど）、ハロゲン化アラルキル（臭化ベンジルおよび臭化フェネチルなど）などの作用剤で四級化されていてもよい。

【0040】

開示の作用剤の溶媒和物も、本明細書で企図される。

【0041】

ここに開示の活性化化合物およびその塩がその互変異性体形態で存在できるかぎりにおいて、このような互変異性体形態は、すべて本明細書にて本開示の一部として企図される。

【0042】

エナンチオマー形態（不斉炭素の非存在下であっても存在し得る）およびジアステレオマー形態をはじめとして、さまざまな置換基の不斉炭素がゆえに存在し得るものなどの作用剤のすべての立体異性体が、本開示の範囲内で企図される。この開示の化合物の個々の立体異性体は、たとえば、実質的に他の異性体を含まないものであってもよいし、たとえば、ラセミ酸塩として、あるいは他のすべての立体異性体または他の選択した立体異性体と、混合されていてもよい。本開示の化合物の立体中心は、IUPAC 1974 勧告で定義されているように、S 配置またはR 配置を取り得る。

【0043】

「プロドラッグ」という用語は、生体内で生物学的に活性な形態に変換される作用剤の不活性の前駆物質を示す。状況によっては親化合物よりも投与しやすいため、プロドラッグが有用なことが多い。親化合物が生体利用可能でないのに、プロドラッグは、たとえば経口投与によって生体利用可能なことがある。また、プロドラッグは、親化合物よりも、医薬組成物に対する溶解性が改善されていることがある。プロドラッグは、酵素処理や代謝加水分解をはじめとするさまざまな機序によって、親薬剤 (parent drug) に変換できる。Harper, NJ. (1962). Drug Latentiation in Jucker, ed. Progress in Drug Research, 4:221~294; Morozowich et al. (1977). Application of Physical Organic Principles to Prodrug Design in E. B. Roche ed. Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs, APhA; Acad. Pharm. Sci; E. B. Roche, ed. (1977). Bioreversible Carriers in Drug in Drug Design, Theory and Application, APhA; H. Bundgaard, ed. (1985) Design of Prodrugs, Elsevier; Wang et al. (1999) Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drug, Curr. Pharm. Design. 5 (4):265~287; Pauletti et al. (1997). Improvement in peptide bioavailability: Peptidomimetics and Prodrug Strategies, Adv. Drug. Delivery Rev. 27:235~256; Mizzen et al. (1998). The Use of Esters as Prodrugs for Oral Delivery of β -Lactam antibiotics, Pharm. Biotech. 11, :345~365; Gaignault et al. (1996). Designing Prodrugs and Bioprecursors I. Carrier Prodrugs, Pract. Med. Chem. 671~696; M. Asgharnejad (2000). Improving Oral Drug Transport Via Prodrugs, in G. L. Amidon, P. I. Lee and E. M. Topp, Eds., Transport Processes in Pharmaceutical Systems, Marcel Dekker, p. 185~218; Balant et al. (1990) Prodrugs for the improvement of drug absorption via different routes of administration, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetic, 15 (2): 143~53; Balimane and Sinko (1999). Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues, Adv. Drug Delivery Rev., 39 (1-3): 183~209; Browne (1997). Fosphenytoin (Cerebyx), Clin. Neuropharmacol. 20 (1): 1~12; Bundgaard (1979). Bioreversible derivatization of drugs—principle and applicability to improve the therapeutic effects of drugs, Arch. Pharm. Chemi. 86 (1): 1~39; H. Bundgaard, ed. (1985) Design of Prodrugs, New York: Elsevier; Fleisher et al. (1996). Improved

10

20

30

40

50

oral drug delivery: solubility limitations overcome by the use of prodrugs, Adv. Drug Delivery Rev. 19 (2): 115~130; Fleisher et al. (1985). Design of prodrugs for improved gastrointestinal absorption by intestinal enzyme targeting, Methods Enzymol. 112: 360~81; Farquhar D, et al. (1983). Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups, J. Pharm. Sci.; 72 (3): 324~325; Han, H. K. et al. (2000). Targeted prodrug design to optimize drug delivery, AAPS PharmSci., 2 (1): E6; Sadzuka Y. (2000). Effective prodrug liposome and conversion to active metabolite, Curr. Drug Metab., 1 (1): 31~48; D. M. Lambert (2000) Rationale and applications of lipids as prodrug carriers, Eur. J. Pharm. Sci, 11 Suppl 2: S15~27; Wang, W. et al. (1999) Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drugs. Curr. Pharm. Des., 5 (4): 265~87.

【0044】

「投与」という用語は、本開示の作用剤を宿主に導入することを示す。好ましい作用剤の一投与経路としては、経口投与がある。もうひとつの好ましい経路が静脈内投与である。しかしながら、局所、皮下、腹膜、動脈内、吸入、経膈、直腸、経鼻、脳脊髄液への導入または体内区画への点滴注入など、どのような投与経路でも使用可能である。

【0045】

「脂肪族基」という用語は、飽和または不飽和で直鎖または分岐鎖の炭化水素基を示し、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基などを包含する。

【0046】

「alk」または「アルキル」という用語は、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、i-ブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、n-オクチル、ドデシル、オクタデシル、アミル、2-エチルヘキシルなど、1~12個の炭素原子、好ましくは1~8個の炭素原子を有する、直鎖または分岐鎖の炭化水素基を示す。

「置換アルキル」という用語は、好ましくはアリール、置換アリール、ヘテロシクロ、置換ヘテロシクロ、カルボシクロ、置換カルボシクロ、ハロ、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、アルコキシ (C₁~C₇など) (置換されていてもよい)、アシル (C₁~C₇など)、アリールオキシ (C₁~C₇など) (置換されていてもよい)、アルキルエステル (置換されていてもよい)、アリールエステル (置換されていてもよい)、アルカノイル (置換されていてもよい)、アリオール (置換されていてもよい)、カルボキシ、保護カルボキシ、シアノ、ニトロ、アミノ、置換アミノ、(一置換)アミノ、(二置換)アミノ、保護アミノ、アミド、ラクタム、尿素、ウレタン、スルホニルなどから選択される、1つ以上の基で置換されたアルキル基を示す。

【0047】

「アルケニル」という用語は、エテニル (ethenyl) など、2~12個の炭素原子、好ましくは2~4個の炭素原子と、少なくとも1つの二重炭素炭素結合 (シスまたはトランスのいずれか) を有する、直鎖または分岐鎖の炭化水素基を示す。「置換アルケニル」という用語は、好ましくはアリール、置換アリール、ヘテロシクロ、置換ヘテロシクロ、カルボシクロ、置換カルボシクロ、ハロ、ヒドロキシ、アルコキシ (置換されていてもよい)、アリールオキシ (置換されていてもよい)、アルキルエステル (置換されてい

てもよい)、アリアルエステル(置換されていてもよい)、アルカノイル(置換されていてもよい)、アリオール(置換されていてもよい)、シアノ、ニトロ、アミノ、置換アミノ、アミド、ラクタム、尿素、ウレタン、スルホニルなどから選択される、1つ以上の基で置換されたアルケニル基を示す。

【0048】

「アルキニル」という用語は、エチニル(ethynyl)など、2~12個の炭素原子、好ましくは2~4個の炭素原子と、少なくとも1つの三重炭素炭素結合を有する、直鎖または分岐鎖の炭化水素基を示す。「置換アルキニル」という用語は、好ましくはアリアル、置換アリアル、ヘテロシクロ、置換ヘテロシクロ、カルボシクロ、置換カルボシクロ、ハロ、ヒドロキシ、アルコキシ(置換されていてもよい)、アリアルオキシ(置換されていてもよい)、アルキルエステル(置換されていてもよい)、アリアルエステル(置換されていてもよい)、アルカノイル(置換されていてもよい)、アリオール(置換されていてもよい)、シアノ、ニトロ、アミノ、置換アミノ、アミド、ラクタム、尿素、ウレタン、スルホニルなどから選択される、1つ以上の基で置換されたアルキニル基を示す。

10

【0049】

「アルコキシ」という用語は、酸素に結合されてR-O-となったアルキル基を示す。この機能において、Rはアルキル基を示す。一例が、メトキシ基CH₃O-であろう。

【0050】

「有機基」は、官能化されていてもよいし、そうでなければ有機基に関連した別の官能基を含むものであってもよく(カルボキシル、アミノ、ヒドロキシルなど)、これが保護されていても保護されていなくてもよい。たとえば、「アルキル基」という言い回しは、メチル、エチル、プロピル、イソブチルなどの純粋な開放鎖飽和炭化水素アルキル置換基だけでなく、ヒドロキシ、アルコキシ、アルキルスルホニル、ハロゲン原子、シアノ、ニトロ、アミノ、カルボキシルなどの当該技術分野において周知の置換基をさらに有するアルキル置換基も含むことを意図している。よって、「アルキル基」は、エーテル、エステル、ハロアルキル、ニトロアルキル、カルボキシアアルキル、ヒドロキシアアルキル、スルホアルキルなどを含む。

20

【0051】

「ハロ」および「ハロゲン」という用語は、フルオロ、クロロ、ブロモまたはヨード基を示す。同一であっても異なってもよい、1種類以上のハロゲンがあり得る。特に関心の高いハロゲンには、クロロ基とブロモ基を含む。

30

【0052】

「ハロアルキル」という用語は、1つ以上のハロゲン原子で置換された、上記にて定義したようなアルキル基を示す。ハロゲン原子は、同一であっても異なってもよい。「ジハロアルキル」という用語は、同一であっても異なってもよい2つのハロ基で置換された、上述したようなアルキル基を示す。「トリハロアルキル」という用語は、同一であっても異なってもよい3つのハロ基で置換された、上述したようなアルキル基を示す。「パーハロアルキル」という用語は、アルキル基の各水素原子がハロゲン原子で置換された、上記にて定義したようなハロアルキル基を示す。「パーフルオロアルキル」という用語は、アルキル基の各水素原子がフルオロ基で置換された、上記にて定義したようなハロアルキル基を示す。

40

【0053】

「シクロアルキル」という用語は、完全に飽和または部分的に不飽和である、飽和単環、二環または三環を示す。このような基の例として、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、アダマンチル、シクロオクチル、システデカリンまたはトランスデカリン、ビスシクロ[2.2.1]ヘプト-2-エン、シクロヘキセ-1-エニル、シクロペンテ-1-エニル、1,4-シクロオクタジエニルなどがあげられる。

【0054】

「(シクロアルキル)アルキル」という用語は、上記にて定義されたアルキル基で置換

50

された、上記にて定義されたシクロアルキル基を示す。このような基の例として、（シクロヘキシル）メチル、3-（シクロプロピル）-n-プロピル、5-（シクロペンチル）ヘキシル、6-（アダマンチル）ヘキシルなどがあげられる。

【0055】

「置換フェニル」という用語は、1つ以上の部分、場合によっては、ハロゲン、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $C_1 \sim C_7$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_7$ アシル、 $C_1 \sim C_7$ アシルオキシ、カルボキシ、オキシカルボキシ、保護カルボキシ、カルボキシメチル、保護カルボキシメチル、ヒドロキシメチル、保護ヒドロキシメチル、アミノ、保護アミノ、（一置換）アミノ、保護（一置換）アミノ、（二置換）アミノ、カルボキサミド、保護カルボキサミド、 $N-(C_1 \sim C_6$ アルキル)カルボキサミド、保護 $N-(C_1 \sim C_6$ アルキル)カルボキサミド、 N 、 N -ジ（ $C_1 \sim C_6$ アルキル）カルボキサミド、トリフルオロメチル、 $N-((C_1 \sim C_6$ アルキル)スルホニル)アミノ、 $N-($ フェニルスルホニル)アミノまたはフェニル（たとえばビフェニルまたはナフチル基が生じるような置換または非置換のもの）からなる基から選択される1つ、2つまたは3つの部分で置換されたフェニル基を示す。

【0056】

「置換フェニル」という用語の例は、2、3または4-クロロフェニル、2，6-ジクロロフェニル、2，5-ジクロロフェニル、3，4-ジクロロフェニル、2，3または4-ブロモフェニル、3，4-ジブロモフェニル、3-クロロ-4-フルオロフェニル、2，3または4-フルオロフェニルなどのモノ-またはジ（ハロ）フェニル基；2，3または4-ヒドロキシフェニル、2，4-ジヒドロキシフェニル、その保護-ヒドロキシ誘導体などのモノまたはジ（ヒドロキシ）フェニル基；2，3または4-ニトロフェニルなどのニトロフェニル基；シアノフェニル基、たとえば、2，3または4-シアノフェニル；2，3または4-メチルフェニル、2，4-ジメチルフェニル、2，3または4-（イソプロピル）フェニル、2，3または4-エチルフェニル、2，3または4-（n-プロピル）フェニルなどのモノ-またはジ（アルキル）フェニル基；モノまたはジ（アルコキシ）フェニル基、たとえば、2，6-ジメトキシフェニル、2，3または4-（イソプロポキシ）フェニル、2，3または4-（t-ブトキシ）フェニル、3-エトキシ-4-メトキシフェニルなど；2，3または4-トリフルオロメチルフェニル；2，3または4-カルボキシフェニルまたは2，4-ジ（保護カルボキシ）フェニルなどのモノ-またはジカルボキシフェニルまたは（保護カルボキシ）フェニル基；2，3または4-（保護ヒドロキシメチル）フェニルまたは3，4-ジ（ヒドロキシメチル）フェニルなどのモノ-またはジ（ヒドロキシメチル）フェニルまたは（保護ヒドロキシメチル）フェニル；2，3または4-（アミノメチル）フェニルまたは2，4-（保護アミノメチル）フェニルなどのモノ-またはジ（アミノメチル）フェニルまたは（保護アミノメチル）フェニル；または2，3または4-（ $N-($ メチルスルホニルアミノ)）フェニルなどのモノ-またはジ（ $N-($ メチルスルホニルアミノ)）フェニルを含む。また、「置換フェニル」という用語は二置換フェニル基を表し、この場合の置換基は、たとえば、3-メチル-4-ヒドロキシフェニル、3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル、2-メトキシ-4-ブロモフェニル、4-エチル-2-ヒドロキシフェニル、3-ヒドロキシ-4-ニトロフェニル、2-ヒドロキシ-4-クロロフェニルなど、異なるものである。

【0057】

「（置換フェニル）アルキル」という用語は、上述したアルキル基のうちの1つに結合された上記の置換フェニル基のうちの1つを示す。例として、2-フェニル-1-クロロエチル、2-（4'-メトキシフェニル）エチル、4-（2'，6'-ジヒドロキシフェニル）n-ヘキシル、2-（5'-シアノ-3'-メトキシフェニル）n-ペンチル、3-（2'，6'-ジメチルフェニル）n-プロピル、4-クロロ-3-アミノベンジル、6-（4'-メトキシフェニル）-3-カルボキシ（n-ヘキシル）、5-（4'-アミノメチルフェニル）-3-（アミノメチル）n-ペンチル、5-フェニル-3-オキソ-n-ペント-1-イル、（4-ヒドロキシナフト-2-イル）メチルなどの基があげられ

10

20

30

40

50

る。

【0058】

「ar」または「アリール」という用語は、フェニル、ナフチルおよびビフェニルなど、好ましくは6～12員を含む芳香族ホモ環状（すなわち炭化水素）単環含有基、二環含有基または三環含有基を示す。「置換アリール」という用語は、好ましくはアルキル、置換アルキル、アルケニル（置換されていてもよい）、アリール（置換されていてもよい）、ヘテロシクロ（置換されていてもよい）、ハロ、ヒドロキシ、アルコキシ（置換されていてもよい）、アリールオキシ（置換されていてもよい）、アルカノイル（置換されていてもよい）、アロイル、（置換されていてもよい）、アルキルエステル（置換されていてもよい）、アリールエステル（置換されていてもよい）、シアノ、ニトロ、アミノ、置換アミノ、アミド、ラクタム、尿素、ウレタン、スルホニルなどから選択される1つ以上の基で置換されたアリール基を示し、任意に置換基の1つ以上の対が、これらが結合する原子と一緒に、3員環から7員環を形成する。

10

【0059】

「ヘテロアリール」という用語は、酸素、硫黄および／または窒素原子など、特に窒素を、単独あるいは、硫黄環原子または酸素環原子との関連で1～4個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい5員環または6員環を示す。さらに、上記の置換されていてもよい5員環または6員環は、任意に、5員環または6員環の芳香族環系と縮合可能である。たとえば、環を任意に、ピリジンまたはトリアゾール系などであって、好ましくはベンゼン環である5員環または6員環の芳香族環系と縮合可能である。

20

【0060】

以下の環系が、「ヘテロアリール」という用語で示される複素環（置換または非置換のいずれか）ラジカルの例である：チエニル、フリル、ピロリル、ピロリジニル、イミダゾリル、イソキサゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、テトラゾリル、チアトリアゾリル、オキサトリアゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル、オキサジニル、トリアジニル、チアジアジニルテトラゾロ、1, 5- [b] ピリダジニルおよびプリニルならびにベンゾ縮合誘導体、たとえば、ベンゾキサゾリル、ベンズチアゾリル、ベンズイミダゾリルおよびインドリルなど。

【0061】

上記の置換されていてもよいヘテロアリール環の置換基は、1～3個のハロ、トリハロメチル、アミノ、保護アミノ、アミノ塩、一置換アミノ、二置換アミノ、カルボキシ、保護カルボキシ、カルボン酸塩、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、ヒドロキシ基の塩、低級アルコキシ、低級アルキルチオ、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、置換（シクロアルキル）アルキル、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキル、（置換フェニル）アルキルを含み得る。ヘテロアリール基の置換基は、これまでに定義したように、あるいはトリハロメチルの場合、トリフルオロメチル、トリクロロメチル、トリブロモメチルまたはトリヨードメチルであり得る。ヘテロアリール環の上記の置換基との関連で使用する場合、「低級アルコキシ」はC₁～C₄アルコキシ基を意味し、同様に、「低級アルキルチオ」はC₁～C₄アルキルチオ基を意味する。

30

40

【0062】

「複素環」、「複素環の」、「複素環基」または「ヘテロシクロ」という用語は、少なくとも1つの炭素原子含有環に、少なくとも1つのヘテロ原子を有する芳香族（「ヘテロアリール」）または非芳香族環状基（たとえば、3～13員の単環、7～17員の二環または10～20員の三環系、好ましくは合計3～10個の環原子を含有する）を含む、完全飽和または部分的に不飽和または完全に不飽和を示す。ヘテロ原子を含有する複素環基の各環は、窒素原子、酸素原子および／または硫黄原子から選択される1、2、3または4個のヘテロ原子を有するものであってもよく、この場合の窒素および硫黄ヘテロ原子は酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は四級化されていてもよい。複素環基は、環または環系の任意のヘテロ原子または炭素原子で結合されていてもよい。多環複素環の環は、

50

1つ以上のスピロ結合によって縮合、架橋および／または結合されていてもよい。

【0063】

例示としての単環複素環基には、ピロリジニル、ピロリル、ピラゾリル、オキセタニル、ピラゾリニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、オキサゾリル、オキサゾリジニル、イソキサゾリニル、イソキサゾリル、チアゾリル、チアジアゾリル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、イソチアゾリジニル、フリル、テトラヒドロフリル、チエニル、オキサジアゾリル、ピペリジニル、ピペラジニル、2-オキソピペラジニル、2-オキソピペリジニル、2-オキソピロロジニル、2-オキサゼピニル、アゼピニル、4-ピペリドニル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、トリアジニル、テトラヒドロピラニル、テトラゾイル、トリアゾリル、モルホリニル、チアモルホリニル、チアモルホリニルスルホキシド、チアモルホリニルスルホン、1, 3-ジオキサソランおよびテトラヒドロ-1, 1-ジオキサソチエニルなどがある。

10

【0064】

例示としての二環複素環基には、インドリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾキサゾリル、ベンゾチエニル、キヌクリジニル、キノリニル、テトラ-ヒドロイソキノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾピラニル、インドリジニル、ベンゾフリル、ベンゾフラニル、ジヒドロベンゾフラニル、クロモニル、クマリニル、ベンゾジオキサリル、ジヒドロベンゾジオキサリル、ベンゾジオキシニル、シンノニル、キノキサリニル、インドアゾリル、ピロロピリジニル、フロピリジニル（フロ[2, 3-c]ピリジニル、フロ[3, 2-b]ピリジニル）またはフロ[2, 3-b]ピリジニルなど）、ジヒドロイソインドリル、ジヒドロキナゾリニル（3, 4-ジヒドロ-4-オキソキナゾリニルなど）、テトラヒドロキノリニル、アザビシクロアルキル（6-アザビシクロ[3. 2. 1]オクタンなど）、アザスピロアルキル（1, 4-ジオキサ-8-アザスピロ[4. 5]デカンなど）、イミダゾピリジニル（イミダゾ[1, 5-a]ピリジン-3-イルなど）、トリアゾロピリジニル（1, 2, 4-トリアゾロ[4, 3-a]ピリジン-3-イルなど）、ヘキサヒドロイミダゾピリジニル（1, 5, 6, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロイミダゾ[1, 5-a]ピリジン-3-イルなど）などがある。

20

【0065】

例示としての三環複素環基には、カルバゾリル、ベンジドリル、フェナントロリニル、アクリジニル、フェナントリジニル、キサンテニルなどがある。

30

【0066】

「置換複素環」、「置換複素環の」、「置換複素環基」および「置換ヘテロシクロ」という用語は、好ましくはアルキル、置換アルキル、アルケニル、オキソ、アリール、置換アリール、ヘテロシクロ、置換ヘテロシクロ、カルボシクロ（置換されていてもよい）、ハロ、ヒドロキシ、アルコキシ（置換されていてもよい）、アリールオキシ（置換されていてもよい）、アルカノイル（置換されていてもよい）、アロイル（置換されていてもよい）、アルキルエステル（置換されていてもよい）、アリールエステル（置換されていてもよい）、シアノ、ニトロ、アミド、アミノ、置換アミノ、ラクタム、尿素、ウレタン、スルホニルなどから選択される1つ以上の基で置換された複素環、複素環基およびヘテロシクロ基を示し、任意に置換基の1つ以上の対が、これらが結合する原子と一緒にあって、3員環から7員環を形成する。

40

【0067】

「アルカノイル」という用語は、カルボニル基と結合されたアルキル基（すなわち—C(O)—アルキル）（上述したように置換されていてもよい）を示す。同様に、「アロイル」という用語は、カルボニル基と結合されたアリール基（すなわち—C(O)—アリール）（上述したように置換されていてもよい）を示す。

【0068】

「（一置換）アミノ」という用語は、好ましくはフェニル、置換フェニル、アルキル、置換アルキル、C₁～C₄アシル、C₂～C₇アルケニル、C₂～C₇置換アルケニル、C₂～C₇アルキニル、C₇～C₁₆アルキルアリール、C₇～C₁₆置換アルキルアリ

50

ール、ヘテロアリール基からなる群から選択される1つの置換基を有するアミノ基を示す。
（一置換）アミノはさらに、「保護（一置換）アミノ」という用語で包含されるように、アミノ保護基を有することが可能である。「（二置換）アミノ」という用語は、フェニル、置換フェニル、アルキル、置換アルキル、 $C_1 \sim C_7$ アシル、 $C_2 \sim C_7$ アルケニル、 $C_2 \sim C_7$ アルキニル、 $C_7 \sim C_{16}$ アルキルアリール、 $C_7 \sim C_{16}$ 置換アルキルアリール、ヘテロアリールからなる群から選択される2つの置換基を有するアミノ基を示す。
2つの置換基は、同一であっても異なっても構わない。

【0069】

「ヘテロアリール（アルキル）」という用語は、任意の位置で上記にて定義したようなヘテロアリール基で置換された、上記にて定義したようなアルキル基を示す。

10

【0070】

「アイソスター」は、分子式は異なるが、外殻電子配置が同様または同一であって、特性（薬理学的特性（薬物動態および薬物動力学など）など）も同様の異なる原子、分子またはイオンである。

【0071】**考察**

本開示の実施形態は、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのいずれかによるウイルス感染を治療する方法、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのメンバーによる感染を治療するための組成物（阻害剤ならびに、このような作用剤と他の抗ウイルス療法との組み合わせを含む）などを提供するものである。特に、本発明の実施形態は、C型肝炎ウイルスによって引き起こされる感染を治療する方法ならびに、C型肝炎ウイルスによって引き起こされる感染を治療するための組成物を提供するものである。

20

【0072】

本開示の実施形態は、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスによるウイルス感染を予防的に治療する方法、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのメンバによる感染を予防的に治療するための組成物（阻害剤ならびに、このような作用剤と他の抗ウイルス療法との組み合わせを含む）などを提供するものである。特に、本発明の実施形態は、C型肝炎ウイルスを予防的に処理する方法ならびに、C型肝炎ウイルスを処理するための組成物を提供するものである。

【0073】

本発明の実施形態は、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスに感染した宿主の治療に使用可能な阻害剤をはじめとする組成物（医薬組成物を含む）を提供するものである。特に、阻害剤を使用して、C型肝炎ウイルスに感染した宿主を治療することが可能である。阻害剤は、以下の基すなわちクレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物ならびに、上記の群のいずれかの化合物のアイソスターのうちの1種類以上であり得る。

30

【0074】

実施例1で説明するように、HCV NS4BがHCV RNAの3'-UTRに結合することが観察されている。この相互作用は、当該相互作用に干渉し、これがゆえにHCV感染を治療するための薬剤としての臨床開発の候補となる阻害剤の同定に用いられている。

40

【0075】

本明細書にて説明する阻害剤は、ウイルスがNS4Bコードウイルスである場合のウイルス感染の治療に有用である。NS4Bコードウイルスは、フラビウイルス科ファミリーのウイルスを含み、一例として、フラビウイルス、ペスチウイルスおよびC型肝炎ウイルスがあげられるが、これらに限定されるものではない。他のNS4Bコードウイルスとして、黄熱病ウイルス（YFV）；デング1型～4型を含むデングウイルス；日本脳炎ウイルス；マレー溪谷脳炎ウイルス；セントルイス脳炎ウイルス；ウェストナイルウイルス；ダニ媒介脳炎ウイルス；C型肝炎ウイルス（HCV）；クンジンウイルス；中央ヨーロッパ脳炎ウイルス；ロシア春夏脳炎ウイルス；ポワッサンウイルス；キャサヌール森林病

50

ウイルス；オムスク出血熱ウイルスがあげられる。一実施形態では、HCV複製の阻害とHCV感染の治療に用いられる阻害剤（抗HCV作用剤など）が、特に注目される。本開示で企図されるHCVは、どのような遺伝子型（遺伝子型1、2、3、4、5、6など）であってもよく、HCV遺伝子型のどのようなサブタイプ（1a、1b、2a、2b、3aなど）であってもよい。HCV遺伝子型1は一般に治療が最も困難であるため、HCV遺伝子型1および遺伝子型1サブタイプによる感染を治療するための本発明の方法および組成物が、特に注目される。

【0076】

以下の明細書ではHCVを取り上げるが、このような言及は分かりやすくするためのものにすぎず、以下において詳細に説明するような開示をHCVに限定することを意図したものではない。上述したように、本発明の方法および組成物は、ヌクレオチド結合NS4Bタンパク質をコードするどのようなウイルス（HCVマイナス鎖RNAの3'UTRに結合するNS4Bポリペプチドを有するフラビウイルス科のウイルスなど）にも適用可能である。

【0077】

本開示は、RNA結合タンパク質へのRNA結合を調節する作用剤（阻害剤）を同定する、試験管内での細胞を使用しない方法について説明するものである。HCVマイナス鎖RNAの3'UTRに対するNS4Bポリペプチドの結合を阻害する被験作用剤を、細胞ベースのアッセイでHCV複製を阻害する能力についてさらに試験することが可能である。たとえば、目的の被験作用剤を、HCVゲノムの全部または一部を有する哺乳類細胞と接触させることが可能であり、被験作用剤がHCV複製に対しておよぼす影響を判断する。好適な細胞としては、HCVに許容的な不死化ヒト肝細胞系など、HCV複製に許容的な哺乳類の肝臓細胞があげられる。たとえば、好適な哺乳類細胞にHuh7肝細胞またはHuh7肝細胞のサブクローン（Huh-7.5など）がある。好適な細胞系が、Bright et al. (2002) J. Virol. 76:13001; Zhang et al. (2004) J. Virol. 78:1448などに記載されている。一実施形態では、細胞のHCVゲノムが、ルシフェラーゼ、蛍光タンパク質あるいは、検出可能なシグナルが得られる他のタンパク質をコードするヌクレオチド配列などのレポーターを含み、HCV複製に対する被験作用剤による作用がある場合に、その判断が、レポーターからのシグナルの検出によって実現される。

【0078】

一実施形態では、被験作用剤が有機部分である。この実施形態では、概要が国際公開第94/24314号パンフレット（本明細書に援用する）に説明されているように、化学修飾可能な一連の基質から被験作用剤を合成する。本明細書の「化学修飾」とは、伝統的な化学反応ならびに酵素反応を含む。これらの基質は通常、アルキル基（アルカン、アルケン、アルキン、ヘテロアルキルを含む）、アリール基（アレーンおよびヘテロアリールを含む）、アルコール、エーテル、アミン、アルデヒド、ケトン、酸、エステル、アミド、環化合物、複素環化合物（プリン、ピリミジン、ベンゾジアゼピン、 β -ラクタム、テトラシリン、セファロsporin、炭水化物を含む）、ステロイド（エストロゲン、アンドロゲン、コルチゾン、エコダイソンなどを含む）、アルカロイド（麦角、ビンカ、クラレ、ピロリジン、マイトマイシンを含む）、有機金属化合物、ヘテロ原子含有化合物、アミノ酸、ヌクレオシドを含むが、これに限定されるものではない。これらの部分で化学（酵素を含む）反応を実施して、新たな基剤または候補作用剤を形成してもよく、これを本方法で試験することも可能である。

【0079】

このように、一実施形態では、目的の被験作用剤（本発明の阻害剤など）が、被験作用剤の非存在下でのHCV複製のレベルと比較して、HCV複製を、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%また

は少なくとも約90%あるいは、それよりも多く阻害する。

【0080】

特に、本発明の実施形態は、被験作用剤の非存在下でのHCVマイナス鎖RNAの3' UTRに対するNS4Bポリペプチドの結合と比較して、HCVマイナス鎖RNAの3' UTRに対するNS4Bポリペプチドの結合を、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%または少なくとも約90%あるいは、それよりも多く阻害する阻害剤を含む。

【0081】

一実施形態では、阻害剤が、50%阻害濃度(IC₅₀)約100μMから50μM、約50μMから25μM、約25μMから10μM、約10μMから5μM、約5μMから1μM、約1μMから500nM、約500nMから400nM、約400nMから300nM、約300nMから250nM、約250nMから200nM、約200nMから150nM、約150nMから100nM、約100nMから50nM、約50nMから30nM、約30nMから25nM、約25nMから20nM、約20nMから15nM、約15nMから10nM、約10nMから5nMまたは約5nM未満で、HCVマイナス鎖RNAの3' UTR（配列番号2）に対するNS4Bポリペプチドの結合を阻害するものである。

【0082】

一実施形態では、阻害剤が、マイナス鎖HCV RNAの3' UTRに対するNS4Bの結合を阻害する。一実施形態では、阻害剤が、マイナス鎖HCV RNAの3' UTRに対するNS4Bの結合を、IC₅₀約500nM未満で阻害する。たとえば、いくつかの実施形態では、阻害剤が、マイナス鎖HCV RNAの3' UTRに対するNS4Bの結合を、IC₅₀約500nMから400nM、約400nMから300nM、約300nMから250nM、約250nMから200nM、約200nMから150nM、約150nMから100nM、約100nMから50nM、約50nMから30nM、約30nMから25nM、約25nMから20nM、約20nMから15nM、約15nMから10nM、約10nMから5nMまたは約5nM未満で阻害する。

【0083】

一実施形態では、阻害剤が、HCV感染細胞（HCV感染肝臓細胞など）と接触すると、阻害剤と接触していないHCV感染細胞におけるHCV複製のレベルと比較して、細胞におけるHCV複製を、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%または少なくとも約90%あるいは、それよりも多く阻害する。

【0084】

一実施形態では、阻害剤が、HCV感染細胞（HCV感染肝臓細胞など）と接触すると、阻害剤と接触していない細胞によって産生される感染性HCVウイルス粒子の数と比較して、HCV感染細胞によって産生される感染性HCVウイルス粒子の量を、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%または少なくとも約90%あるいは、それよりも多く低減する。

【0085】

一実施形態では、HCVマイナス鎖RNAの3' UTRに対するNS4B結合阻害に対して被験作用剤がおよぼす影響を判断することに加えて、被験作用剤によって生きた真核細胞で認められることがある細胞傷害活性について、トリパンプルー色素排除法、MTT（3-（4，5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2，5-ジフェニルー2H-テトラ

10

20

30

40

50

ゾリウムブロミド) アッセイなどの周知のアッセイを用いて、被験作用剤を評価する。有意な細胞傷害活性を呈さない作用剤が、薬剤としての以後の開発に好ましい作用剤とみなされる。

【0086】

一実施形態では、1以上の用量でHCV感染個体(ヒトなど)に投与すると、阻害剤が、阻害剤で治療していない個体におけるHCVウイルス負荷と比較して、個体におけるHCVウイルス負荷を、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%または少なくとも約90%あるいは、それより多く低減する。

10

【0087】

阻害剤

本開示の実施形態は、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスに感染した宿主の治療に使用可能な阻害剤を提供するものである。特に、この阻害剤は、C型肝炎ウイルスに感染した宿主の治療に使用可能である。この阻害剤は、以下の基すなわち、クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物；これらの化合物各々の薬学的塩；上述した群のいずれかにおける化合物のアイソスターのうちの1種類以上であり得る。本発明の実施形態は、阻害剤の塩を含む。本発明の実施形態は、阻害剤のプロドラッグを含む。本発明の実施形態は、組成物に、医薬組成物、液体組成物、ゲル組成物などを含み、その各々が本明細書で同定する阻害剤を含有し、これらの組成物が各々、一実施形態では、徐放製剤または持続放出製剤の形を取り得る。一実施形態では、フラビウイルス科ファミリーのウイルス感染の治療に用いられている別の作用剤と阻害剤を併用することが可能であり、上述したように、いずれか一方の作用剤(阻害剤および他の作用剤)または両方の作用剤が徐放または持続放出の形を取り得る。場合によっては、「阻害剤」という用語は、活性な作用剤または薬剤を示すこともある。

20

【0088】

上述したように、阻害剤は、以下の基すなわち、クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物；上述した群のいずれかにおける化合物のアイソスターのうちの1種類以上であり得る。たとえば、本発明の実施形態の阻害剤は、クレミゾールと構造的に類似しており、抗ウイルス活性を呈する、H1受容体アンタゴニストを含む。

30

【0089】

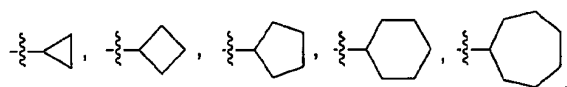
化合物についての以下の説明では、上記にて定義した用語は定義したとおりの意味を持ち、以下で述べる定義は、ここに記載の阻害剤の好ましい実施形態を説明するものである。この章で説明する好ましい実施形態の「アリール基」および／または「アルキル基」といえば、アリールおよびアルキルの好ましい実施形態の定義を示す。

【0090】

「アルキル」という用語は、メチル基、エチル基、イソプロピル基、イソブチル基、トリフルオロメチル基などの基を示す。これらの実施形態に加えて、アルキルという用語は、以下の構造のうちの1つを有する基を含む。

40

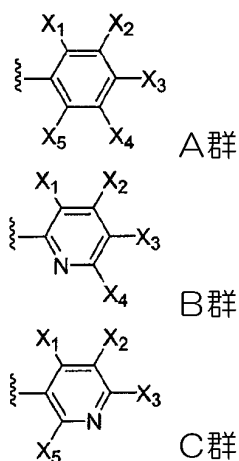
【化1】



【0091】

「アリール」という用語は、以下のグループA～Fから選択される基を示す。

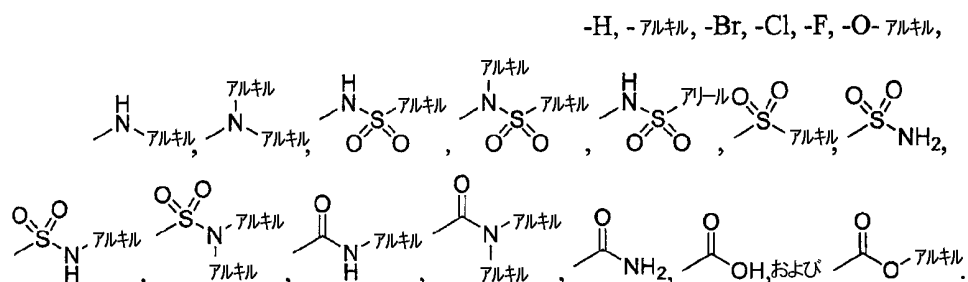
【化 2】



10

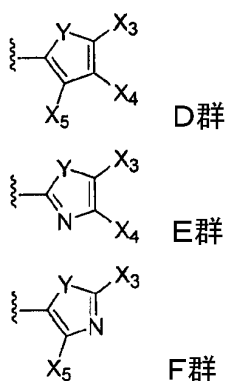
式中、 $X_1 \sim X_5$ は各々、グループ A、B、C の化合物に存在する場合、

【化 3】



からなる群から独立して選択される。一実施形態では、グループ C の少なくとも 1 つの位置 ($X_1 \sim X_4$ および X_5) が、置換 (非水素) されている。

【化 4】



30

式中、グループ D、E、F の化合物において、Y は、-O、-S、-NH、-N-アルキル、-N-アシルからなる群から選択され、 X_3 は、-H、-CH₃、-Cl、-F、CF₃、-OCH₃ からなる群から選択され、 X_4 および X_5 は、存在する場合、H および CH₃ からなる群から独立して選択される。

【0092】

上述したように、阻害剤は、クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物；上記の群のうちのいずれかの任意の化合物のアイソスターを含むが、これに限定されるものではない。

【0093】

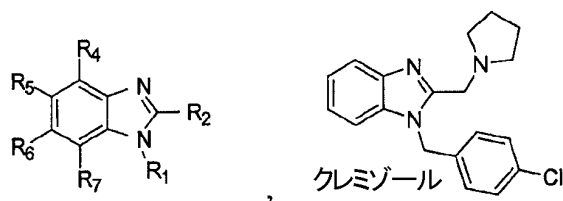
したがって、本発明の実施形態は、クレミゾールならびに、クレミゾール骨格を有する

40

50

阻害剤を含む。クレミゾールおよびクレミゾール骨格を有する化合物の構造を以下に示す（クレミゾール骨格を左に、クレミゾールを右に示す）。

【化 5】

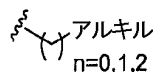


10

【0094】

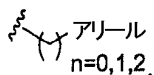
クレミゾール骨格の一実施形態では、 R_1 が、 $-H$ 、

【化 6】



および

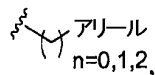
【化 7】



20

からなる群から選択される。一実施形態では、 R_1 が

【化 8】



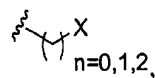
であり、アールル基（上記のグループ A～F）が X_3 で置換されている。一実施形態では、この章で説明する好ましい実施形態からアールル基とアルキル基を選択可能である。

30

【0095】

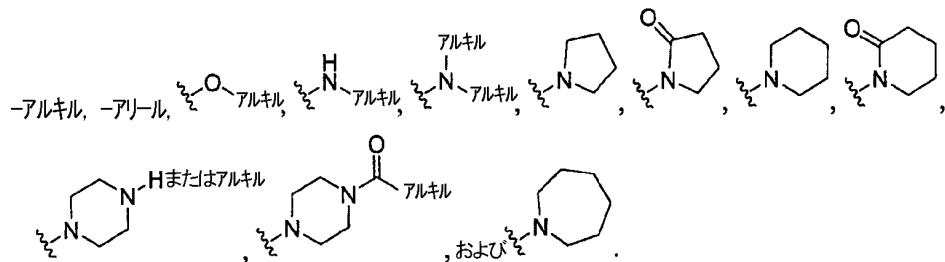
クレミゾール骨格の一実施形態では、 R_2 が、 $-H$ と

【化 9】



からなる群から選択され、式中、X は、

【化 10】



40

からなる群から選択される。一実施形態では、この章で説明する好ましい実施形態からアールル基とアルキル基を選択可能である。

50

【化 1 1】

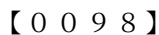


20

【化 1 2】

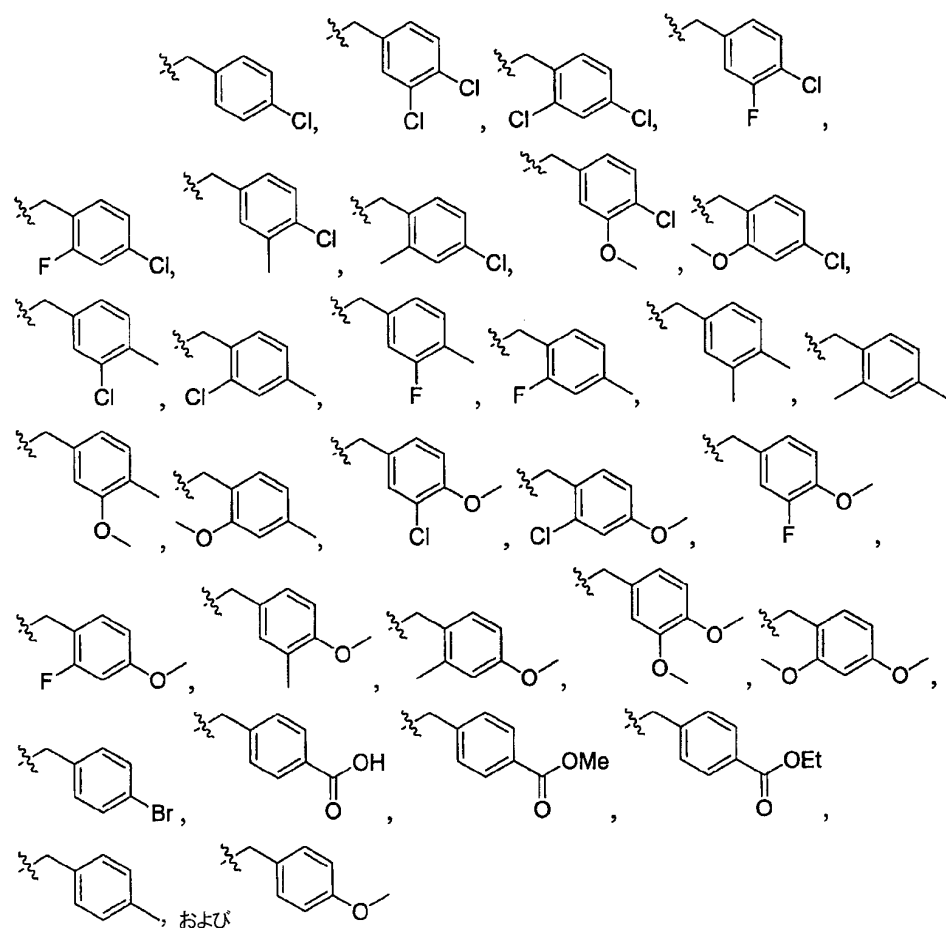


【化 1 3】



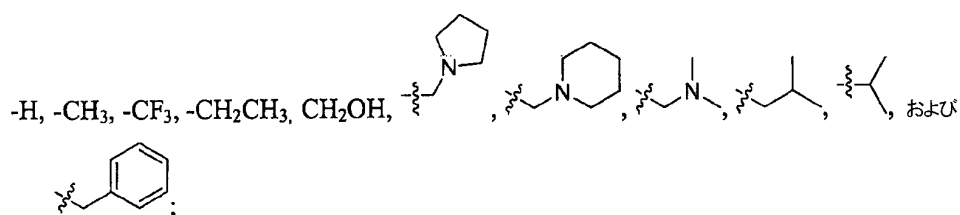
40

【化 1 4】



からなる群から選択され、 R_2 が、

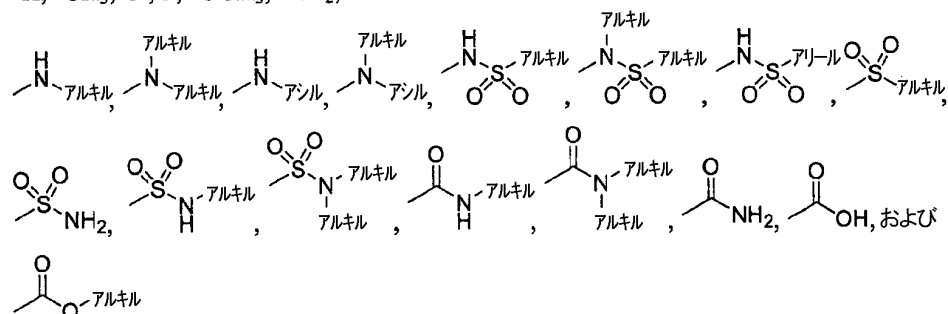
【化 1 5】



からなる群から選択され、 R_4 が、 $-H$ と $-NH_2$ からなる群から選択され、 R_5 および R_6 が、

【化 1 6】

$-H, -CH_3, Cl, F, -OCH_3, -NH_2,$



からなる群から独立して選択され、 R_7 が $-H$ である。一実施形態では、この章で説明す

10

20

30

40

50

る好ましい実施形態から、アルキル基を選択可能である。

【0099】

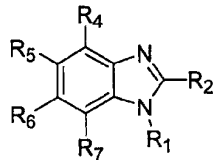
本発明による阻害剤の別の実施形態では、クレミゾールおよびクレミゾール骨格を有する化合物のアイソスターを含む。クレミゾールのベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターとしては、以下の構造で定義される化合物があげられる（参考ベンゾイミダゾールコア構造を示す；各構造において、 $R_1 \sim R_2$ および $R_4 \sim R_7$ は上記にて定義したとおりであり、 R_3 は、 $R_4 \sim R_7$ によって説明されるような基であり得る）

【0100】

以下の構造が、ベンゾイミダゾールコア構造である。

【化17】

10

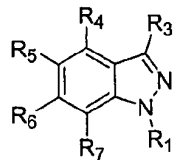


【0101】

以下の化合物が、インダゾールコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

20

【化18】

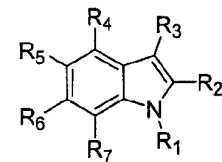


【0102】

以下の化合物が、インドールコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

30

【化19】

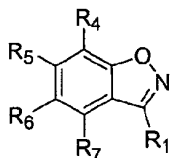


【0103】

以下の化合物が、ベンゾイソキサゾールコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

40

【化20】

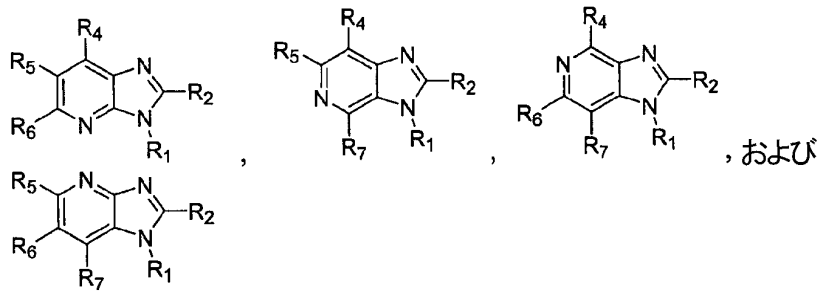


【0104】

50

以下の化合物が、イミダゾピリジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 2 1】

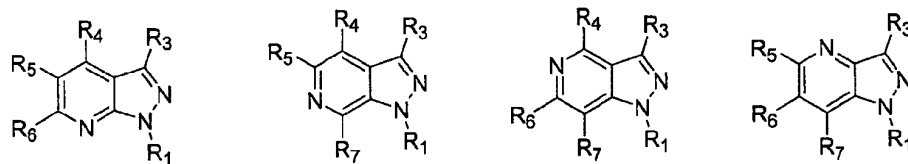


10

【0105】

以下の化合物が、ピラゾロピリジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 2 2】

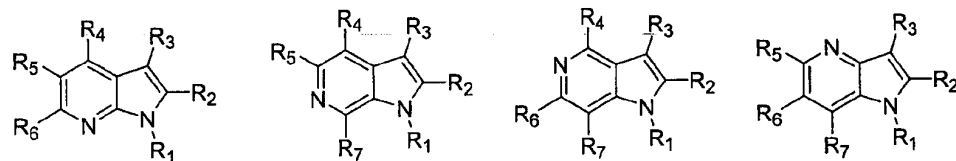


20

【0106】

以下の化合物が、ピロロピリジン（アザインドール）コア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 2 3】

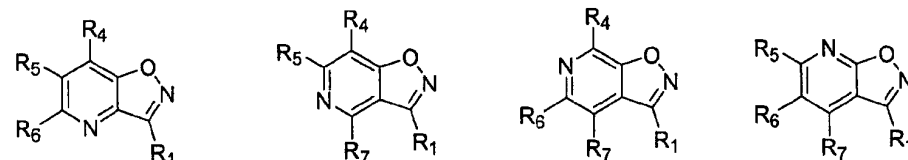


30

【0107】

以下の化合物が、イソキサゾロピリジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 2 4】

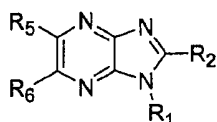


40

【0108】

以下の化合物が、イミダゾピラジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 2 5】

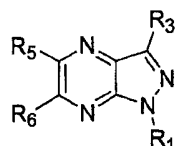


【0109】

以下の化合物が、ピラゾロピラジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 2 6】

10

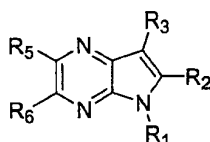


【0110】

以下の化合物が、ピロロピラジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 2 7】

20

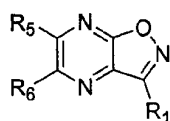


【0111】

以下の化合物が、イソキサゾロピラジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 2 8】

30

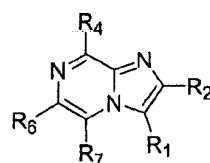


【0112】

以下の化合物が、イミダゾピラジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 2 9】

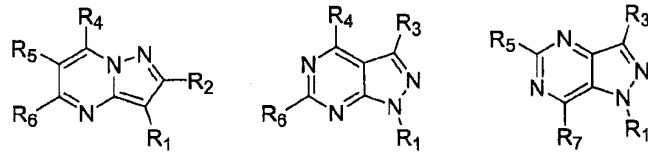
40



【0113】

以下の化合物が、ピラゾロピリミジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 3 0】

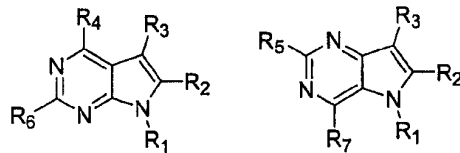


【0 1 1 4】

以下の化合物が、ピロロピリミジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

10

【化 3 1】

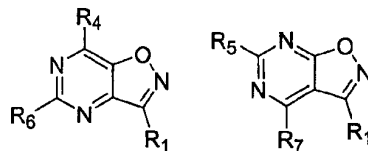


【0 1 1 5】

以下の化合物が、イソキサゾロピリミジンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

20

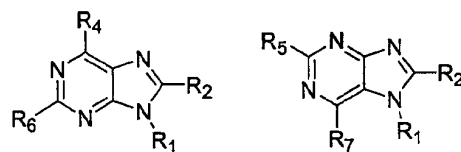
【化 3 2】



【0 1 1 6】

以下の化合物が、プリンコア構造、ベンゾイミダゾールコア構造のアイソスターである。

【化 3 3】

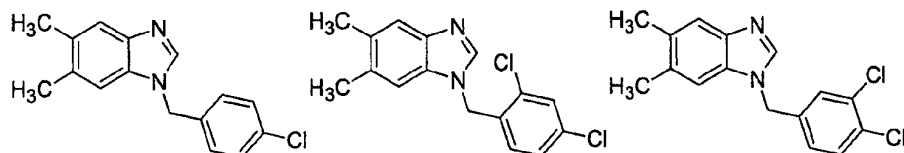


30

【0 1 1 7】

一実施形態では、阻害剤が以下の構造のうちの 1 つを有する化合物である。

【化 3 4】

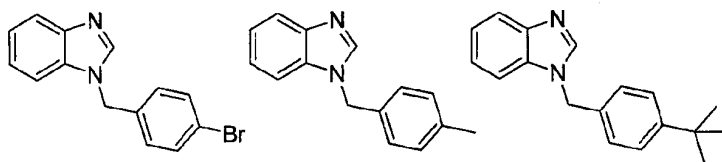


40

【0 1 1 8】

一実施形態では、阻害剤が以下の構造のうちの 1 つを有する化合物である。

【化 3 5】

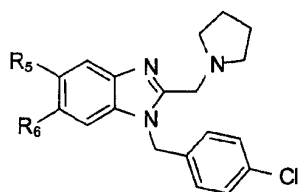


【0 1 1 9】

一実施形態では、阻害剤は、5, 6-二置換クレミゾール化合物を含む。一実施形態では、阻害剤は、新規な5, 6-二置換クレミゾール化合物を含み、この場合の置換はジェトキシ置換を含まない。一実施形態では、阻害剤が、以下の構造を有する5, 6-二置換クレミゾール化合物を含み得る。

10

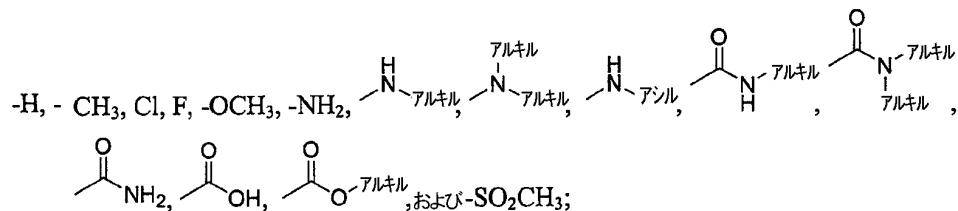
【化 3 6】



20

式中、 R_5 および R_6 は、 R_5 および R_6 について上述した基を含む。もうひとつの実施形態では、 R_5 は、

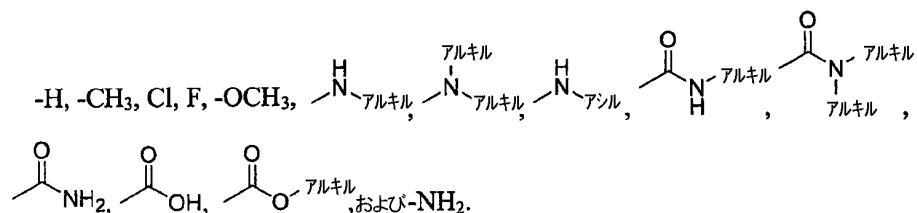
【化 3 7】



30

からなる群から選択され、 R_6 が、

【化 3 8】



からなる群から選択される。一実施形態では、この章で説明する好ましい実施形態からアルキルを選択可能である。

40

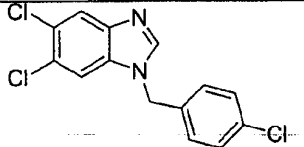
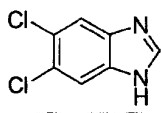
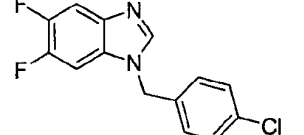
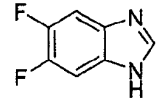
【0 1 2 0】

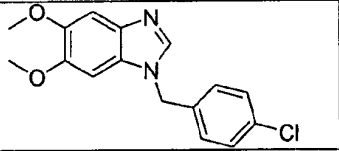
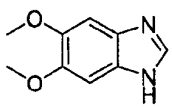
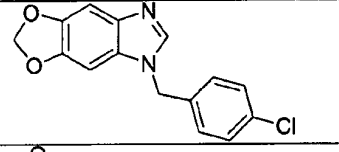
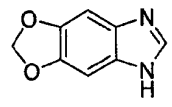
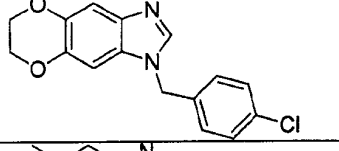
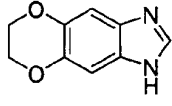
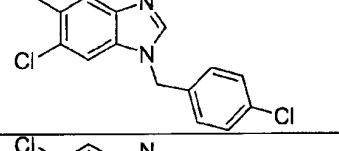
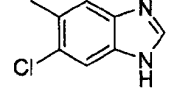
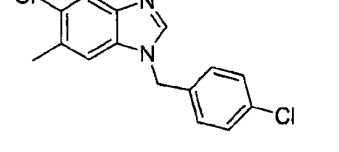
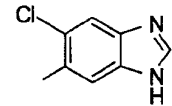
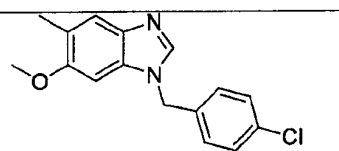
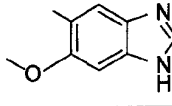
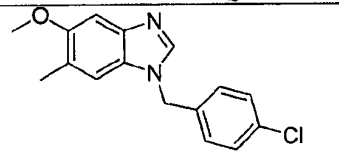
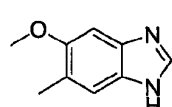
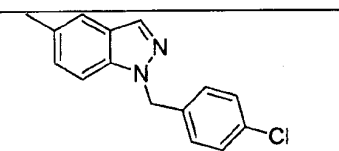
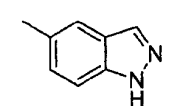
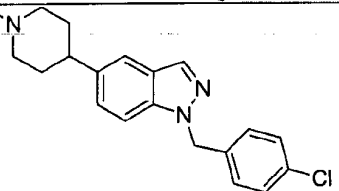
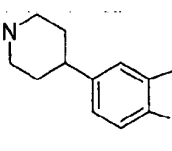
本発明による別の阻害剤の構造と、これらを調製するための一例としての開始材料を、表 1 に示す。

【0 1 2 1】

【表 1】

表1

	構 造	出発物質の実例
1		
2		

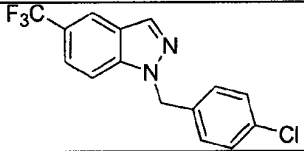
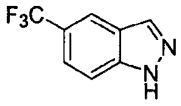
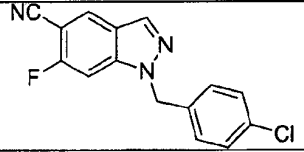
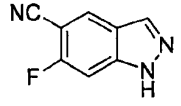
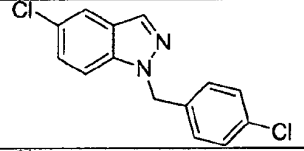
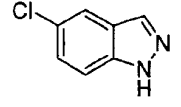
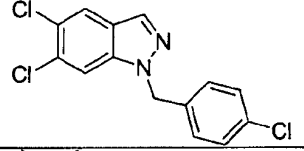
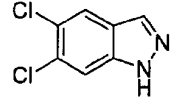
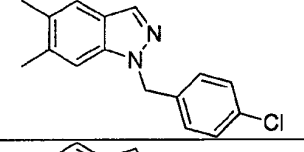
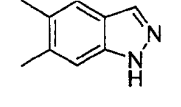
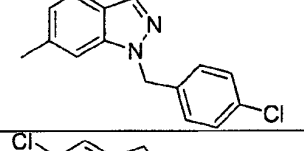
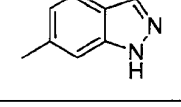
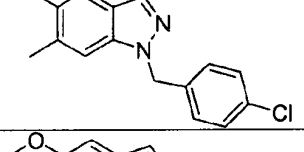
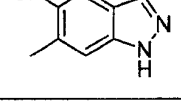
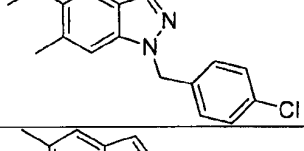
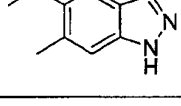
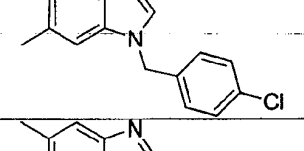
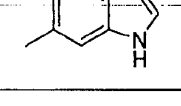
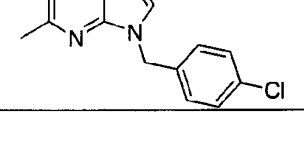
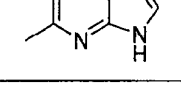
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		

10

20

30

40

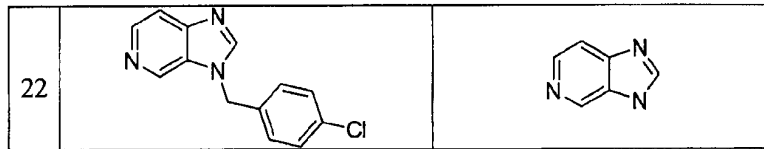
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		

10

20

30

40

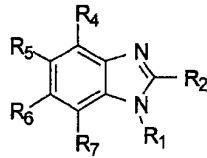


【0122】

以下の構造に基づく本発明による別の阻害剤の構造を表2に示す。

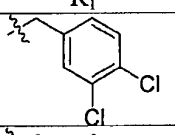
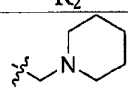
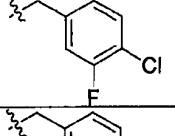
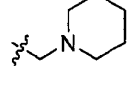
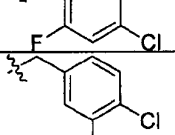
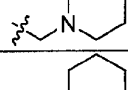
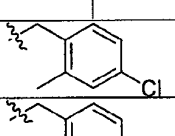
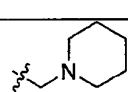
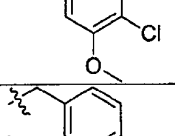
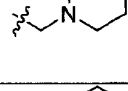
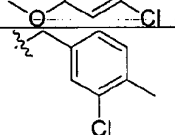
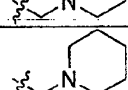
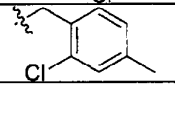
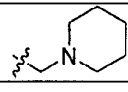
【化39】

10



【0123】

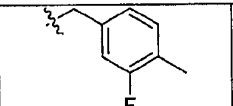
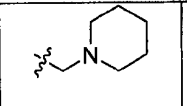
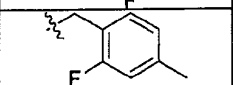
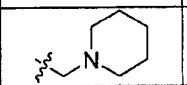
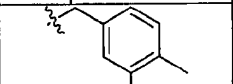
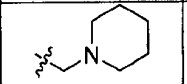
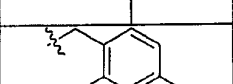
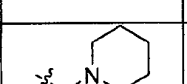
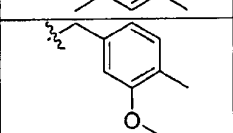
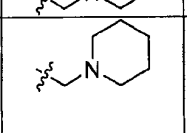
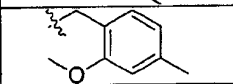
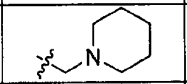
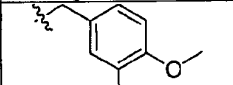
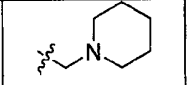
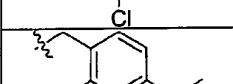
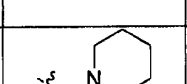
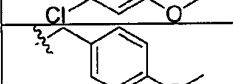
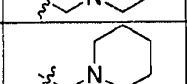
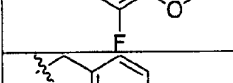
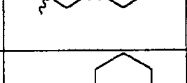
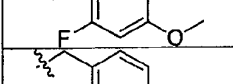
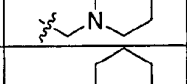
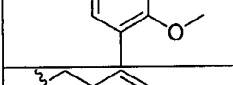
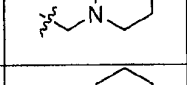
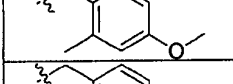
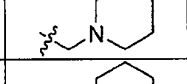
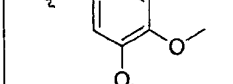
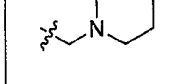
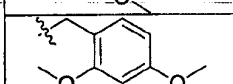
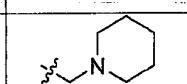
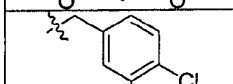
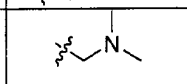
【表2】

R ₁	R ₂	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

20

30

40

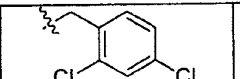
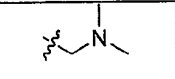
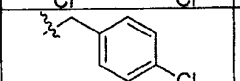
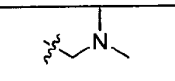
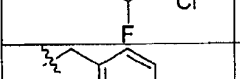
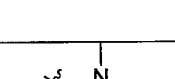
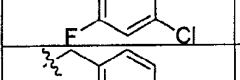
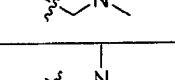
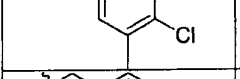
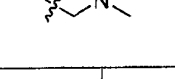
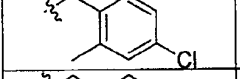
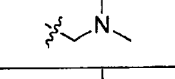
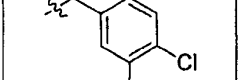
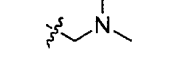
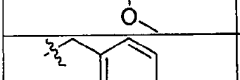
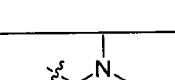
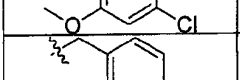
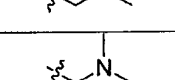
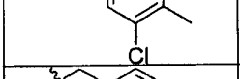
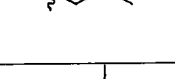
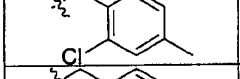
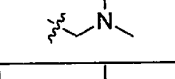
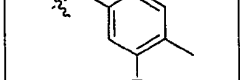
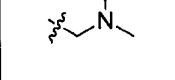
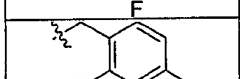
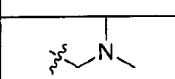
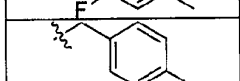
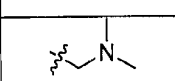
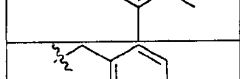
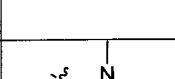
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

10

20

30

40

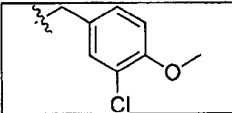
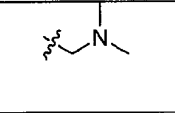
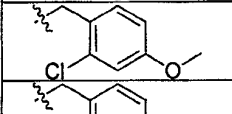
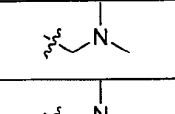
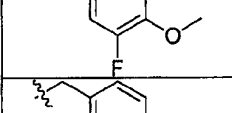
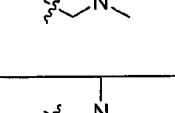
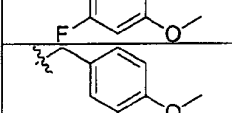
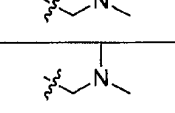
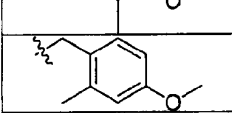
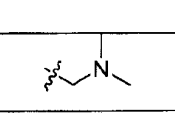
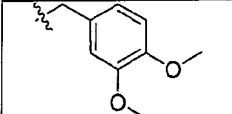
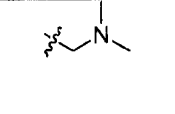
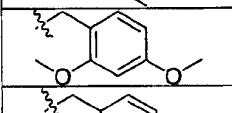
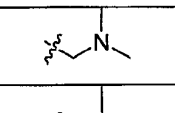
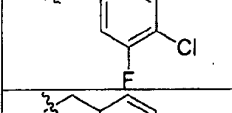
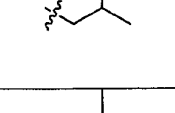
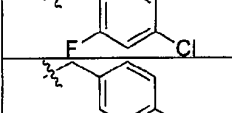
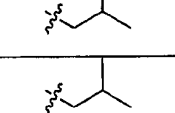
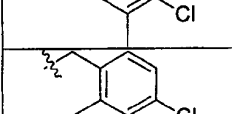
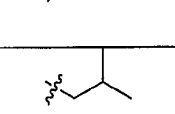
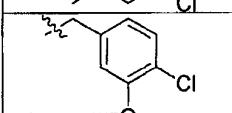
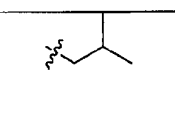
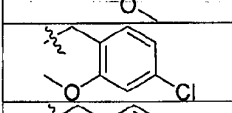
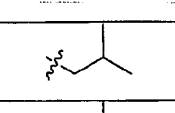
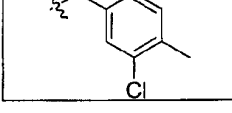
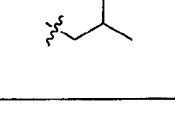
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

10

20

30

40

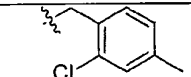
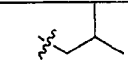
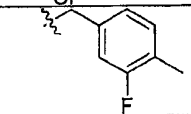
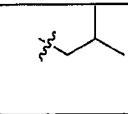
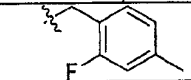
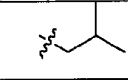
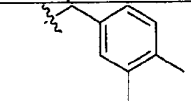
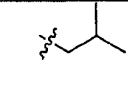
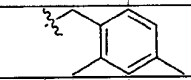
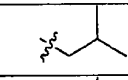
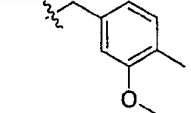
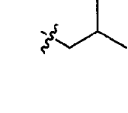
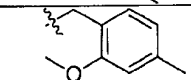
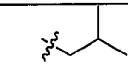
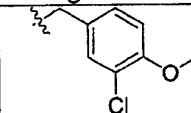
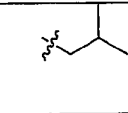
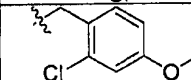
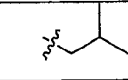
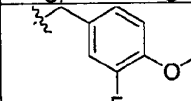
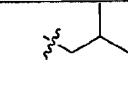
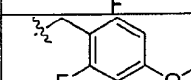
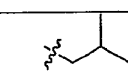
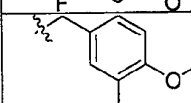
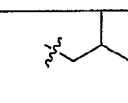
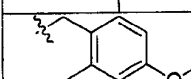
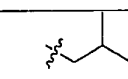
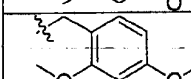
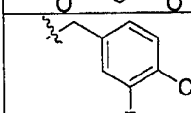
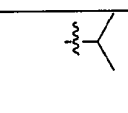
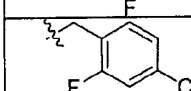
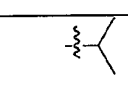
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

10

20

30

40

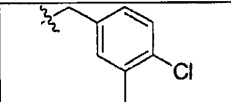
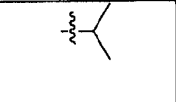
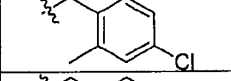
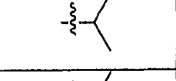
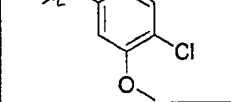
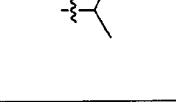
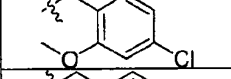
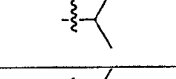
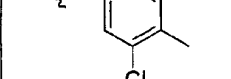
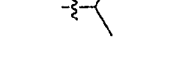
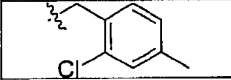
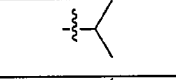
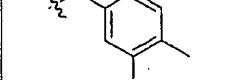
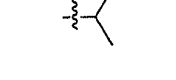
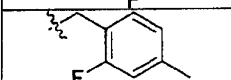
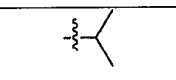
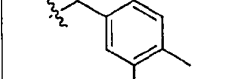
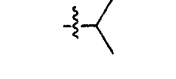
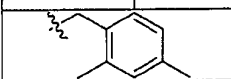
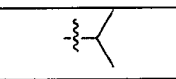
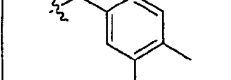
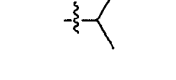
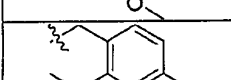
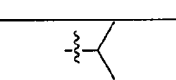
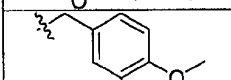
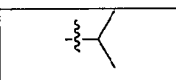
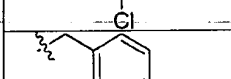
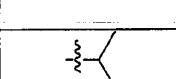
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

10

20

30

40

		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

10

20

30

40

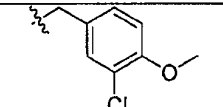
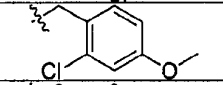
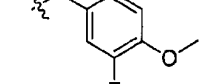
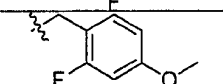
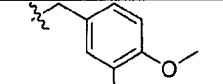
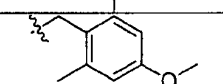
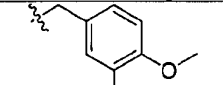
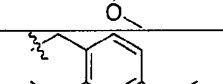
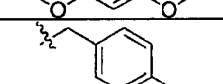
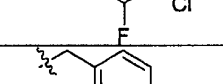
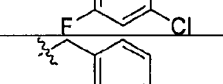
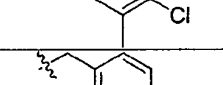
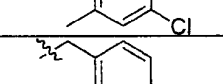
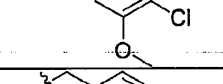
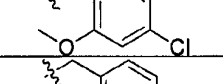
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H

10

20

30

40

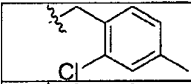
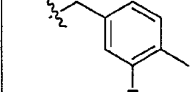
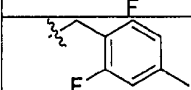
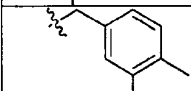
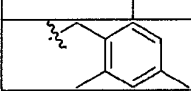
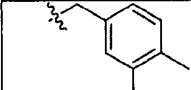
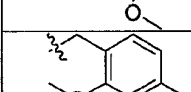
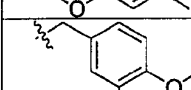
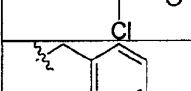
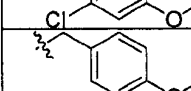
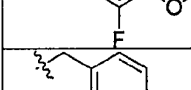
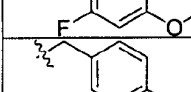
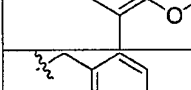
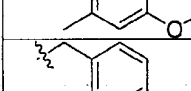
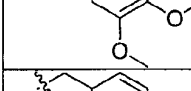
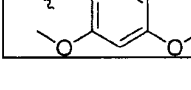
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H

10

20

30

40

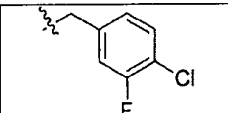
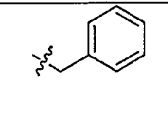
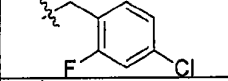
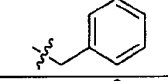
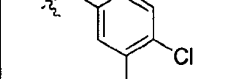
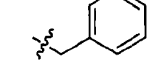
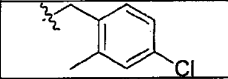
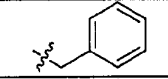
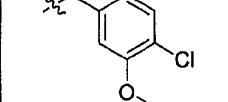
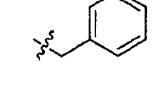
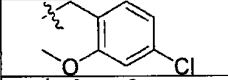
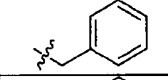
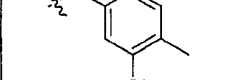
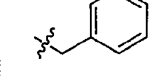
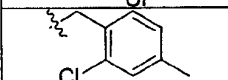
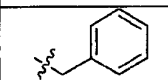
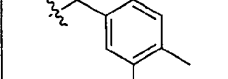
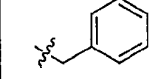
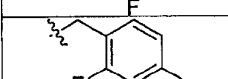
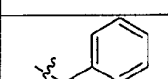
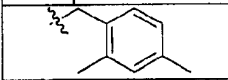
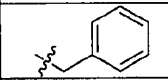
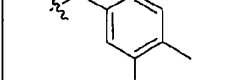
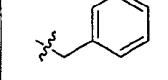
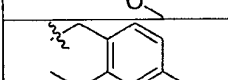
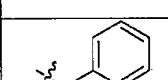
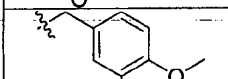
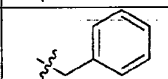
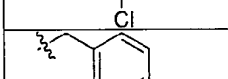
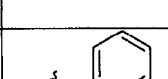
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H

10

20

30

40

		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

10

20

30

40

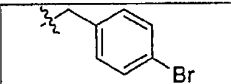
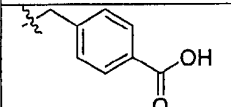
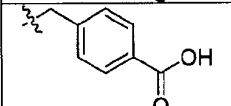
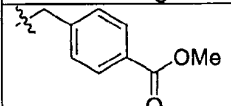
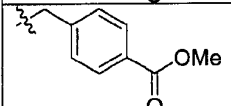
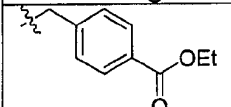
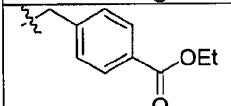
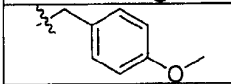
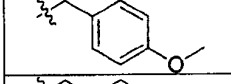
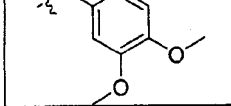
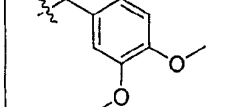
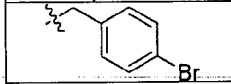
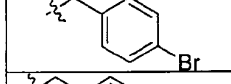
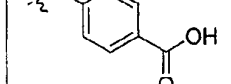
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	Cl	Cl	H

10

20

30

40

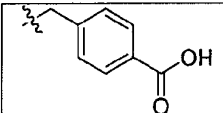
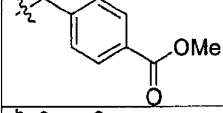
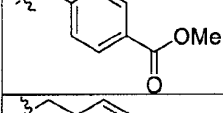
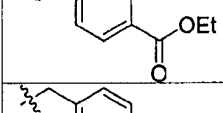
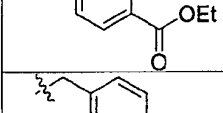
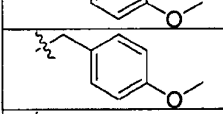
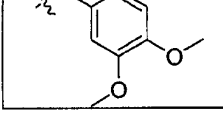
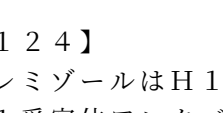
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H

10

20

30

40

	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H

【0124】

クレミゾールはH₁受容体アンタゴニストであり、クレミゾールと構造的に類似した他のH₁受容体アンタゴニストも、本発明の方法の実施形態において有用であり得る。クレミゾールと構造的に類似した一例としてのH₁受容体アンタゴニストとして、アルコールアミンとして知られるクラスの化合物（ジフェンヒドラミン、カルビノキサミン、クレマスチンなど）、エチレンジアミン（メピラミンおよびトリペレナミン（クレミゾールはこのクラスである）など）、アルキルアミン（トリプロリジンおよびクロルフェニラミンなど）、ピペラジン（メクリジンおよびホモクロルシクリジンなど）、フェノチアジン（プロメタジンなど）があげられるが、これに限定されるものではない。

【0125】

本発明の実施形態は、クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物のプロドラッグならびに、肝臓の酵素（CYP3Aによる酸化開裂反応を促進する基で置換された環状-1, 3-プロパニルエステルなど）によって活性化される、これらのアイソスターを含む。これらの修飾によって、肝臓で活性化されるまでクレミゾールを不活性にするか、あるいは活性を弱めることが可能である（Current Opinion in Investigational Drugs 2006 Vol 7 No 2, 109~117; J. Med. Chem. 2008, 51, 2328~2345; Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, 24 (5-7): 375~381, (2005)（各々、対応する説明について本明細書に援用する））。

【0126】

クレミゾールは、1952年にZierzおよびGreitherによって説明され（Artztliche Wochenschrift 7:30, 704~7, Clinical evaluation of Allercur, a new antihistamine）（Schering AG製の製品について報告されている）。Finkelstein et al. ((1960) J Am Pharm Assoc

10

20

30

40

50

Am Assoc; 49:18~22) には、塩酸クレミゾールの薬理学について報告されており、塩酸クレミゾールが、抗ヒスタミン薬活性の有効値が遷延し、抗ヒスタミン特異度が比較的高い、ヒスタミンエアロゾル気管支痙攣と拮抗する上で極めて有効であったと述べていた。報告によれば、単離したウサギ回腸の自発活性と麻酔をかけたイヌの腸運動が低下し、慢性胃瘻のイヌでヒスタミン誘導胃液分泌に有意な効果はなかったことから、H1受容体に対する選択性が示された。

【0127】

A. A. Jacques and V. H. Fuchs (1960, International record of medicine, "Clinical Evaluation of Clemizole in Allergic Rhinitis") には、クレミゾールがアレルギー性疾患の管理で臨床研究に利用できるようになっていた旨が報告されていた。著者らの報告では、クレミゾールの抗ヒスタミン活性がモルモットおよび人間で評価され、モルモットでのヒスタミン誘導喘息の予防という観点でクレミゾールのほうがアトロピンや他の抗ヒスタミン薬よりも優れていた。ヒスタミンならびに、ヒスタミンとクレミゾールとの混合物を、ヒトの被検体への皮下注射で生じる作用の点で比較した。報告によれば、ヒスタミンにクレミゾールを加えると、ヒスタミンによる膨疹が減り、注射の疼痛が軽減された。この調査では、季節性および通年性の花粉症や、さまざまな皮膚科学的症状（蕁麻疹、神経皮膚炎、湿疹、食物アレルギー、薬物アレルギーなど）に罹患した500名を超える患者で優れた臨床結果が報告されており、アレルギー症候がすみやかに軽減されて副作用の出現率が顕著に低かった過去の臨床報告に基づいて、クレミゾールが選択された。JacquesおよびFuchsがまとめているように、クレミゾールを用いる過去の臨床経験では、長期間の投与では抗ヒスタミン薬が例外的に優れた耐容性を持つことが示された。

【0128】

ZierzおよびGreitherの報告によれば、治療した患者のうち眠気が生じたのはわずか1.3パーセントであり、Dulceは日用量120mgでも特に副作用が認められなかった。24名の患者に、最大5日間にわたって90~300mgのクレミゾールを毎日投与したところ、わずかな疲労感があったのみであり、胃圧はほとんどなかった。他の抗ヒスタミン薬に対する寛容度の低い患者でも、クレミゾールに対する反応は見られなかったと報告された。子どもの場合、クレミゾールを投与しても寛容の徴候は生じなかった。アレルギー性鼻炎、喘息、血管運動性鼻炎、さまざまな併発症状に関連する症候の軽減を目的として、成人と子どもにタンニン酸クレミゾールまたは塩酸クレミゾールを与えた。症候には、アレルギー性鼻漏、くしゃみ、後鼻漏、流涙、鼻や眼のかゆみと一般に関連しているものが含まれていた。研究には3種類の剤形を用いたが、通常これらの剤形は患者の年齢や症候の重篤度に応じて採用される。成人4名に10mg(1ml)のクレミゾールを筋肉内投与のみで与えたのに対し、さらに3名の患者で10mg(1ml)用量の塩酸クレミゾールを1回筋肉内投与した後、茶匙2杯の経口懸濁液を5日間1日4回与えた。他の患者には、1週間または2週間の期間にわたって、1錠または2錠(合計用量20または40mg)の塩酸クレミゾールを1日2~4回与えた。成人1名には、1週間毎日、1錠ずつ1日6回与えた。他の患者には、茶匙1杯または2杯(合計用量20または40mgのクレミゾールを塩酸塩として)の経口懸濁液を、5~6日間にわたって毎日1日2~4回与えた。さまざまな剤形でクレミゾールを与えられた104名の被検体のうち、92名が治療に応答した。クレミゾールは、くしゃみと鼻漏の軽減に特に効果的であった。クレミゾールは副作用の出現率が顕著に低い有効な抗ヒスタミン薬であると思われるという結論に至った。この薬剤を使うことによる悪影響といえ、眠気だけであった。治療した104名の患者のうち、この副作用が明らかに認められたのはわずか2名であり、治療を中断する必要はなかった。

【0129】

B. A. Wansker (1962, Skin, "Clemizole Hydrochloride: A Clinical Evaluation of its Ant

i p r u r i t i c E f f e c t ”) は、かゆみが皮膚科学的疾患の顕著な症候である患者を無作為に選択して実施した臨床研究について報告した。有効性の判断基準は、かゆみの軽減であった。塩酸クレミゾールの薬用量を掻痒の重篤度に応じて個別化した。大半の患者には1日のうちに20mgを3回と寝る前に40mgの合計100mgを24時間のあいだに与えた。いずれも、薬用量は毎日40～160mgとした。治療期間には1週間から12週間までの幅があった。43名の患者の治療は2週間以内で、24名については2週間を超えて治療した。治療が1週間未満の患者はいなかった。77名の患者にはクレミゾール(20mgの錠剤の形)または偽薬(見た目が全く同じスターチとラクトースの錠剤)のいずれかを与えた。40～160mg/日(ほとんどが100mg)で患者を治療した。24名の患者について2週間を超えて治療し、なかには最大12週間まで治療した患者もいた。66%がすばらしいと報告し、23%でかゆみが良好に軽減された。4名の患者で穏やかな副作用(眠気が最も多い)が記録された。塩酸クレミゾールは、安全で耐受性が良好な薬剤であるという結論に至った。この化合物は、臨床的に観察可能な副作用が基本的に皆無で、かゆみを軽減する効力が通常は24～48時間という極めて短時間で作用するように見える。

10

【0130】

クレミゾールは、米国内ではJ. B. Roering and Company, Div., Chas. Pfizer & Co., Inc. の商品であるAllercur(登録商標)として販売されている。タンニン酸クレミゾールに対するJ. B. Roering & Co. Division, Chas. Pfizer & Co., Inc. の商品名はAllercur経口懸濁液、塩酸クレミゾールの場合は、Alkrcur非経口薬とAllercur錠であった。1966 PDRでは、クレミゾールの利点を耐受性が並外れて良好であることとして宣伝していた。しかしながら、この薬剤は現在、米国内で販売されていない。ただし、化合物は純粋な形態でSigma-Aldrichから容易に入手できる。

20

【0131】

本発明の一実施形態によれば、HCV感染のある患者を治療するための単純で便利な投与計画として、クレミゾールを鎮痒薬として用いると有効であることが過去に示されている計画があげられる。一実施形態では、BID投与計画を採用する。一実施形態では、投与計画は100mg po BIDである。本発明の実施形態は、25mg、50mg、75mg、100mg、125mg、150mg、200mgの単位用量形態をはじめとして、クレミゾールの新規な単位用量形態を提供するものである。一実施形態では、単位用量形態は錠剤である。別の実施形態では、単位用量形態はカプセルである。一実施形態では、クレミゾールの持続放出製剤が、本発明によって得られる錠剤およびカプセル状である。もうひとつの実施形態では、単位用量形態は液体である。

30

【0132】

HCV(遺伝子型4)に慢性感染した3名の患者を、本発明の方法の一実施形態に基づいて治療した。いずれも男性で、ベースラインのALTが上昇し、HCVウイルス負荷は290,000～730,000IU/mlの範囲の有意な値であった。いずれの患者もクレミゾール投与計画(100mg po BID)の2週目に次の測定をしたときにはHCVウイルス負荷が低下しており、4週目までには、全員のHCVレベルがほぼHCV検出限界またはそれ未満であった。仮にクレミゾール単独療法での治療のさらに数日後にウイルス負荷の測定をすれば、患者全員のHCVレベルが検出限界を下回る可能性が高い。4週間のクレミゾール単独療法に加えて、クレミゾール標準用量pegインターフェロンを用いる4週間の治療後、患者全員のHCVウイルス負荷が検出限界未満であった。

40

【0133】

本発明の方法の実施形態によれば、クレミゾールは(進化年齢とインターフェロンに対する応答の観点でHCV遺伝子型の全域にわたる)遺伝子型1、2、4に対する抗HCV活性を有することが示されているため、遺伝子型を問わず、あらゆるHCV患者の治療にクレミゾールが理想的である。

50

【0134】

本発明の方法の実施形態によるクレミゾールの有効な投薬は、150mg po BID、75mg po BID、50mg po BIDでの投薬も含む。合計日用量を複数の用量に分割することも可能であり、このようにすると1回の投与あたりの用量を抑えて十分な薬効を維持しつつ鎮静の可能性を減らすことができる。あるいは、特に治療が困難な症例では、25mg、50mg、75mg、150mgまたはさらに多い用量について、本発明の方法による頻度を増した投薬スケジュール（たとえば、TID投与あるいは、4時間ごとまたは6時間ごとの投与）を用いることも可能である。

【0135】

同様に、本発明の実施形態の持続放出製剤は、ウイルス阻害濃度をさらに長時間にわたって維持する一助となり得る。持続放出製剤の用量は、一例としての実施形態では、50、75、100、150mg po BIDであり、100、150、200、300mg po qdである。また、本発明の方法の実施形態によれば、経皮、舌下、筋肉内または直腸経路でクレミゾールを投与することも可能である。一実施形態では、HCVに罹患しているが他には抗ヒスタミン薬での治療が必要な症状がない患者に、クレミゾールを投与する。もうひとつの実施形態では、患者にはHCVに加えて抗ヒスタミン薬での治療が必要な症状があり、クレミゾールとクレミゾール以外の抗ヒスタミン薬とを併用して、患者のHCV感染と抗ヒスタミン薬での治療法が必要な症状をそれぞれ治療する。

【0136】

上述した3名の患者では、4週目でクレミゾール単独療法を停止したが、本発明の方法によれば、単独療法として最大12、24、36または48週間あるいは、それよりも長期間にわたって継続し、持続性のウイルス学的応答を得ることもできたであろうし、本発明のいくつかの実施形態では、投薬を漫然と続けるか、それ以上の治療をしても利点がないことが明らかになるまで継続する。

【0137】

HCV関連の末期肝臓疾患（ESLD）が原因で肝臓移植を受けることになっている患者の場合、移植時にウイルス血症が存在すると、新たな移植片がHCVに感染する確率がほぼ100%であることが知られている。しかしながら、移植前にHCVを効果的に治療すれば、新たな移植片でのHCV再発を低減または回避することも周知である。このため、肝臓移植前に本発明の方法によるクレミゾール単独療法での治療を実施すれば、HCVウイルス負荷を低減または回避することが可能であり、移植後のHCV再発予防の一助となり得る。さらに、ESLDのある移植前患者あるいはHCV再発の認められる移植後患者は、介護治療での標準的全用量（ペグ化インターフェロンおよびリバビリン）に耐えられないことが多い。よって、クレミゾール単独療法にするか、あるいはクレミゾールに加えてペグ化インターフェロンおよびリバビリンの用量を減らして使用し、本発明の方法でこれらの患者を治療することが可能である。同様に、クレミゾールとニタゾキサニド（または別のチアゾリド、あるいはこれらのいずれかの持続性製剤）とを併用して、これらの患者を治療することも可能であるし、クレミゾールとニタゾキサニド（または別のチアゾリド、あるいはこれらのいずれかの持続性製剤）に介護医薬品の標準を（耐容度に応じて用量を減らすか正規の用量で）併用することも可能である。

【0138】

4週間のクレミゾール単独療法に続いて、クレミゾールと標準用量のペグ化インターフェロンで4週間治療した患者を、さらにニタゾキサニドとペグ化インターフェロンとの併用療法で治療した。しかしながら、本発明の方法によれば、クレミゾールとペグ化インターフェロンとの組み合わせを合計12、24、36または48週間あるいは、さらに長い期間のインターフェロンを継続して、持続性のウイルス学的応答を促進しやすくすることも可能であろう。同様に、ペグ化インターフェロンでの治療期間に（あるいは治療開始時から）リバビリンを加え、インターフェロンでの治療時に3種類の併用療法としてもよい。あるいは、このような治療で、ペグ化インターフェロンと一緒に、あるいはペグ化インターフェロンおよびリバビリンと一緒に、ニタゾキサニドを用いてもよい。

【0139】

同様に、上述した計画でのクレミゾール単独療法の期間は、たとえば、限定することなく4週間または12週間にすることができる。また、他の実施形態では、3日、7日または2週間にすることもでき、あるいは、本発明の方法でクレミゾール併用療法をすぐに開始することも可能である（すなわち、クレミゾール単独療法での治療期がない）。

【0140】

本発明の方法の実施形態によるクレミゾールを用いる併用療法としては、たとえば、限定することなく、クレミゾールに加えてニタゾキサニドを用いる治療、クレミゾールの後にニタゾキサニドを用いる治療、クレミゾールに加えてニタゾキサニドおよびNS3プロテアーゼインヒビターを用いる治療、クレミゾールに加えてニタゾキサニドとNS3プロテアーゼインヒビター、さらにはNS5Bポリメラーゼインヒビターを用いる治療、クレミゾールに加えてNS3プロテアーゼインヒビターとNS5Bポリメラーゼインヒビターを用いる治療、クレミゾールに加えてニタゾキサニドとNS3プロテアーゼインヒビター、さらにはNS4Bの第2の両親媒性らせんインヒビターを用いる治療、クレミゾールに加えてニタゾキサニドとNS4Bの第2の両親媒性らせんインヒビターを用いる治療、クレミゾールに加えてNS3プロテアーゼインヒビターとNS4Bの第2の両親媒性らせんインヒビターを用いる治療ならびに、上記のすべてに、リバビリン、クレミゾールを加え、さらにリバビリン、クレミゾールに続いてニタゾキサニドとリバビリンを加えるものがあげられる。

【0141】

本発明の併用療法によるニタゾキサニド投与は、一例として、500mg po BIDにすることが可能であるが、これに限定されない。他の用量、他のチアゾリドまたは他のニタゾキサニド製剤または別のチアゾリド（持続放出製剤など）を本発明の併用療法に用いることも可能である。

【0142】

本発明の実施形態によって得られる他の方法および単位用量形態では、上記の治療方法および単位用量形態におけるクレミゾールに代えて、本明細書に記載のクレミゾール誘導体および類似体を使用する。

【0143】

医薬製剤と投与経路

本開示の実施形態は、本明細書にて同定される1種類以上の阻害剤を含み、1種類以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、キャリアおよび／またはアジュバントと一緒に配合される。また、本発明の実施形態は、1種類以上の薬学的に許容される補助物質と一緒に配合される阻害剤を含む。特に、1種類以上の阻害剤を1種類以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、キャリアおよび／またはアジュバントと一緒に配合して、本発明の組成物の実施形態を提供することが可能である。

【0144】

一実施形態では、阻害剤を別の抗ウイルス剤と組み合わせて、本発明の組成物を調製することが可能であり、この組成物は、1種類以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、キャリアおよび／またはアジュバントを含み得る。

【0145】

一実施形態では、HCVマイナス鎖RNAの3'UTRに対するNS4Bポリペプチドの結合を阻害する阻害剤（以下、「当該活性作用剤」または「薬剤」と呼ぶ）を、1種類以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、キャリアおよび／またはアジュバントと一緒に配合することが可能である。

【0146】

多岐にわたる薬学的に許容される賦形剤が、当該技術分野において周知である。薬学的に許容される賦形剤については、たとえば、A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th edition, Lippincott, Willi

10

20

30

40

50

ams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., eds., 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.をはじめとするさまざまな刊行物に、十分に説明されている。

【0147】

ビヒクル、アジュバント、キャリアまたは希釈剤などの薬学的に許容される賦形剤は、容易に一般利用可能である。さらに、pH調整剤および緩衝剤、浸透圧調整剤、安定剤、湿潤剤などの薬学的に許容される補助物質も、容易に一般利用可能である。

10

【0148】

本開示の一実施形態では、所望の作用（ウイルス負荷の低減、肝線維症の低減、肝機能の亢進など）につなげることでできる手段であれば、どのような手段で宿主に阻害剤を投与してもよい。このため、治療投与用のさまざまな製剤に阻害剤を取り入れることが可能である。たとえば、薬学的に許容される適当なキャリアまたは希釈剤と組み合わせることで、阻害剤を医薬組成物に配合可能であり、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、軟膏、溶液、坐剤、注射液、吸入剤、エアロゾルなどの固体、半固体、液体または気体状の調製物として配合してもよい。

【0149】

20

製剤の剤形では、阻害剤をその薬学的に許容される塩の形で投与してもよく、あるいは、当該活性作用剤を単独で使用してもよいし、適当な会合状態で使用してもよく、他の薬学的に活性化化合物との組み合わせで用いてもよい。以下の方法および賦形剤は単に一例にすぎず、何ら限定するものではない。

【0150】

経口調製物では、阻害剤を単独あるいは、錠剤、粉末、顆粒またはカプセルを作るための適当な添加剤との組み合わせで用いることが可能であり、たとえば、ラクトース、マンニトール、コーンスターチまたはポテトスターチなどの従来の添加剤との併用；結晶セルロース、セルロース誘導体、アカシア、コーンスターチまたはゼラチンなどのバインダーとの併用；コーンスターチ、ポテトスターチまたはナトリウムカルボキシメチルセルロースなどの崩壊剤との併用；タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤との併用；さらに必要があれば、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、香味料との併用も可能である。

30

【0151】

植物油や他の類似の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステルまたはプロピレングリコールなどの水性溶媒または非水性溶媒に溶解、懸濁または乳化させることによって、阻害剤の実施形態を注射用調製物に配合することも可能である（必要があれば、可溶化剤、等張剤、懸濁化剤、乳化剤、安定剤、保存剤などの従来の添加剤を併用）。

【0152】

吸入によって投与されるエアロゾル製剤に、阻害剤の実施形態を利用することも可能である。阻害剤の実施形態を、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧下の許容可能な推進剤に配合することが可能である。

40

【0153】

さらに、乳化ベースや水溶性ベースなどのさまざまな基剤と混合することで、阻害剤の実施形態を坐剤にすることも可能である。阻害剤の実施形態を坐剤によって経直腸的に投与することが可能である。坐剤は、体温で溶けるが室温では固化状態のカカオバター、カルボワックス、ポリエチレングリコールなどのビヒクルを含むことが可能である。

【0154】

シロップ剤、エリキシル剤、懸濁液などの経口投与用または直腸投与用の単位剤形を提供してもよく、茶匙1杯、大さじ一杯、錠剤または坐剤などの各薬用単位に、所定の量の

50

組成物（１種類以上の阻害剤を含有）を含ませるようにする。同様に、注射または静脈投与用の単位剤形であれば、滅菌水、通常の生理食塩水または別の薬学的に許容されるキャリアなどの溶液としての組成物中に阻害剤を含むようにすればよい。

【０１５５】

本発明によれば、阻害剤の実施形態を注射可能な組成物に配合することが可能である。一般に、注射可能な組成物は、液体の溶液または懸濁液として調製される。注射前に液体ビヒクルに加えて溶液または懸濁液にするのに適した固体の形態も調製できる。本発明によって、この調製物を乳化してもよいし、有効成分（阻害剤）をリポソームビヒクルに封入してもよい。

【０１５６】

一実施形態では、連続送達系による送達用に阻害剤を配合する。「連続送達系」という用語は、本明細書では「制御送達系」と同義に用いられ、カテーテル、注射器具など（さまざまなものが当該技術分野において周知である）との組み合わせで、連続（制御など）送達装置（ポンプなど）を包含する。

【０１５７】

機械的または電気機械的注入ポンプも、本開示との併用に適したものとなり得る。このような装置の例として、たとえば、米国特許第４６９２１４７号明細書、同第４３６００１９号明細書、同第４４８７６０３号明細書、同第４３６００１９号明細書、同第４７２５８５２号明細書、同第５８２０５８９号明細書、同第５６４３２０７号明細書、同第６１９８９６６号明細書などに記載されているものがあげられる。通常、阻害剤の送達は、詰め替え可能なさまざまなポンプ系のうちのいずれかを用いて達成可能である。ポンプを用いると、時間をかけて一定量を制御しながら放出できる。いくつかの実施形態では、阻害剤が、薬剤不浸透性リザーバ内の液体製剤であり、連続的に個体に送達される。

【０１５８】

一実施形態では、薬剤送達系が少なくとも部分的に埋め込み型装置である。埋め込み型装置は、当該技術分野において周知の方法および装置を用いて好適な移植部位に移植可能である。移植部位は、薬剤送達装置を導入して位置決めする被検体の体内部位である。移植部位としては、真皮下、皮下、筋肉内または被検体の体内の他の好適な部位があげられるが、必ずしもこれに限定されるものではない。薬剤送達装置の移植と除去の際に都合がよいことから、いくつかの実施形態では皮下の移植部位を利用する。

【０１５９】

この開示で使用するのに適している薬剤放出装置は、さまざまな動作モードのいずれに基づくものであってもよい。たとえば、拡散系、対流系または浸食可能な系（浸食ベースの系など）に基づく薬剤放出装置が可能である。たとえば、薬剤放出装置には、電気化学ポンプ、浸透ポンプ、電気浸透ポンプ、蒸気圧ポンプまたは浸透破裂マトリクスを用いることが可能であり、この場合たとえば、薬剤をポリマーに取り込んで、薬剤含浸ポリマー材料（生分解性薬剤含浸ポリマー材料など）の崩壊に伴ってポリマーから薬剤の製剤を放出する。他の実施形態では、薬剤放出装置が、電気拡散系、電解ポンプ、発泡（effervescent）ポンプ、圧電ポンプ、加水分解系などに基づくものである。

【０１６０】

機械的または電気機械的な注入ポンプに基づく薬剤放出装置も、本開示で用いるのに好適なことがある。このような装置の例として、たとえば、米国特許第４６９２１４７号明細書、同第４３６００１９号明細書、同第４４８７６０３号明細書、同第４３６００１９号明細書、同第４７２５８５２号明細書などに記載されているものがあげられる。通常、当該治療方法は、詰め替え可能な非交換式のさまざまなポンプ系を用いて達成可能である。通常は時間をかけて、より一層一貫した徐放が可能であるがゆえに、一般にポンプや他の対流系が好ましい。徐放性が一層一貫しており、なおかつ比較的小型であるという利点を兼ね備えていることから、いくつかの実施形態では浸透ポンプを使用する（ＰＣＴ国際公開第９７／２７８４０号パンフレットならびに、米国特許第５９８５３０５号および同第５７２８３９６号明細書などを参照のこと）。この開示で用いるのに適した例示として

10

20

30

40

50

の浸透圧駆動式の装置としては、米国特許第3760984号明細書、同第3845770号明細書、同第3916899号明細書、同第3923426号明細書、同第3987790号明細書、同第3995631号明細書、同第3916899号明細書、同第4016880号明細書、同第4036228号明細書、同第4111202号明細書、同第4111203号明細書、同第4203440号明細書、同第4203442号明細書、同第4210139号明細書、同第4327725号明細書、同第4627850号明細書、同第4865845号明細書、同第5057318号明細書、同第5059423号明細書、同第5112614号明細書、同第5137727号明細書、同第5234692号明細書、同第5234693号明細書、同第5728396号明細書などに記載されているものがあげられるが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

10

【0161】

いくつかの実施形態においては、薬剤送達装置は埋め込み型装置である。薬剤送達装置は、当該技術分野において周知の方法および装置を用いて好適な移植部位に移植可能である。本明細書にて記載したとおり、移植部位は、薬剤送達装置を導入して位置決めする被検体の体内部位である。移植部位としては、真皮下、皮下、筋肉内または被検体の体内の他の好適な部位があげられるが、必ずしもこれに限定されるものではない。

【0162】

いくつかの実施形態では、作用剤を投与するためのプログラム可能な系などの埋め込み型の薬剤送達系を用いて、活性作用剤を送達する。例示としてのプログラム可能な埋め込み型の系として、埋め込み型注入ポンプがあげられる。当該ポンプとの関連で有用な、例示としての埋め込み型注入ポンプまたは装置が、たとえば、米国特許第4350155号明細書、同第5443450号明細書、同第5814019号明細書、同第5976109号明細書、同第6017328号明細書、同第6171276号明細書、同第6241704号明細書、同第6464687号明細書、同第6475180号明細書、同第6512954号明細書に記載されている。本開示に適応できる例示としての別の装置に、Synchronomed注入ポンプ(Medtronic)がある。

20

【0163】

阻害剤の好適な賦形剤ビヒクルは、たとえば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどならびに、これらの組み合わせである。また、必要があれば、ビヒクルに、湿潤剤または乳化剤あるいはpH緩衝剤などの少量の補助物質を含有してもよい。このような剤形を調製するための方法は周知であるか、本開示を考慮すれば当業者らに自明であろう。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17th edition, 1985などを参照のこと。投与対象となる組成物または製剤は、いずれにしても、治療対象となる被検体の所望の状態を達成するのに適した一定量の阻害剤を含有する。

30

【0164】

本発明の組成物は、持続放出または徐放性マトリクス(matrix)を有するものを含む。また、本発明の実施形態は、持続放出製剤を用いる他の治療と併用可能なものである。本明細書で使用する場合、持続放出マトリクスは、通常は酵素的に分解可能あるいは、酸ベースの加水分解または溶解によって分解可能なポリマーである材料から作られるマトリクスである。体内に挿入されると、このマトリクスは、酵素および体液によって作用する。持続放出マトリクスは、リポソーム、ポリラクチド(ポリ乳酸)、ポリグリコリド(グリコール酸のポリマー)、ポリラクチドコグリコリド(乳酸とグリコール酸のコポリマー)、ポリ酸無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、コンドロイチン硫酸、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、フェニルアラニンなどのアミノ酸、チロシン、イソロイシン、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドン、シリコーンなどの生体適合性材料から選択されると望ましい。一例としての生分解可能なマトリックスとしては、ポリラクチドマトリクス、ポリグリコリドマトリクス、ポリラクチドコグリコリド(乳酸とグリコール酸

40

50

のコポリマー)マトリクスがあげられる。

【0165】

もうひとつの実施形態では、本開示の医薬組成物（ならびに組み合わせ組成物）を徐放系で送達する。たとえば、阻害剤の投与には、静脈点滴、埋め込み型浸透ポンプ、経皮パッチ、リボソームまたは他の投与モードを使用できる。一実施形態では、ポンプを使用すればよい（Sefton（1987）. CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al.（1980）. Surgery 88:507; Saudek et al.（1989）. N. Engl. J. Med. 321:574）。もうひとつの実施形態では、ポリマー材料を使用する。さらに別の実施形態では、徐放系を治療標的すなわち肝臓の近傍に配置するため、全身用量の一部だけが必要になる。さらに別の実施形態では、徐放系を治療標的の近傍に配置するため、全身の一部だけが必要になる。Langer（1990）. Science 249:1527～1533の概説には、他の徐放系が説明されている。

10

【0166】

もうひとつの実施形態では、本発明の組成物（ならびに組み合わせ組成物を別々にまたは一緒に）が、この組成物を送達するために、本明細書に記載の阻害剤を、縫合糸、包帯、ガーゼなどの吸収性材料に含浸させるか、あるいは手術用ステープラー、ジッパー、カテーテルなどの固相材料の表面にコーティングして形成されるものを含む。このタイプの他の送達系は、本開示を参照すれば当業者には容易に分かるであろう。

20

【0167】

治療方法

本発明の実施形態は、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスによる感染を治療する方法を含む。特に、本明細書に記載の阻害剤は、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスによる感染を治療するのに使用可能である。一実施形態では、本開示が、宿主に治療有効量の阻害剤を1以上の用量で投与し、宿主におけるウイルス負荷を低減することによって、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスに感染した宿主を治療する方法を提供するものである。一実施形態では、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスに感染した宿主を治療する方法、宿主に治療有効量の阻害剤を投与して、宿主におけるウイルス負荷を低減することを含む方法である。

30

【0168】

本発明の実施形態は、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスによる感染を予防的に治療する方法を含む。特に、本明細書に記載の阻害剤は、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスによる感染を予防的に治療するのに使用可能である。一実施形態では、本開示が、宿主に治療有効量の阻害剤を1以上の用量で投与し、宿主におけるウイルス負荷を低減することによって、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスに感染した宿主を予防的に治療する方法を提供するものである。一実施形態では、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスに感染した宿主を予防的に治療する方法、宿主に治療有効量の阻害剤を投与して、宿主におけるウイルス負荷を低減することを含む方法。クレミゾールならびに、クレミゾールの投薬についてのさらなる詳細は上述のとおりである。

40

【0169】

一実施形態では、本明細書に記載の阻害剤を別の作用剤（抗ウイルス剤など）と併用して、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスによる感染を治療する。一実施形態では、本明細書に記載の阻害剤を、別の作用剤（抗ウイルス剤など）と併用して、フラビウイルス科ファミリーのウイルスのうちのいずれかのウイルスによる感染を予防的に治療する。この方法の実施形態は、HCVマイナス鎖RNAの3'UTRに対するNS4Bポリペプチドの結合を阻害する1種類以上の阻害剤を、それを必要とする個体に投与することを含む。一実施形態では、本発明は、HCV感染などのフラビウイ

50

ルス感染を治療する方法ならびに、HCV感染の続発症として発生し得る肝線維症を低減する方法を提供するものである。

【0170】

一実施形態では、阻害剤は、上述した1種類以上の阻害剤を含む。さまざまな実施形態では、阻害剤が、クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物ならびに、これらの化合物のアイソスターである。さまざまな実施形態では、阻害剤が、塩酸クレミゾール（1-p-クロロベンジル-2-（1-ピロリジニル）メチルベンズイミダゾール塩酸塩）、類似体またはクレミゾールあるいは、その誘導体である。クレミゾールならびに、クレミゾールの投薬についてのさらなる詳細は上述のとおりである。

【0171】

一実施形態では、阻害剤の有効量とは、それを必要とする宿主（ヒトなど）に1以上の用量で投与した場合に、阻害剤で治療していない個体におけるウイルス負荷と比較して、個体におけるHCVウイルス負荷を、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%または少なくとも約90%、あるいはそれよりも多く低減する量である。

【0172】

力価または血清中のウイルスレベルを測定することで、ウイルス負荷は測定可能である。これらの方法は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および分岐DNA（bDNA）試験を含むが、これらに限定されるものではない。HCV RNAのウイルス負荷（力価）を測定するための定量的アッセイが開発されている。多くのこのようなアッセイは業務利用可能であり、一例として、定量的逆転写PCR（RT-PCR）（Amplico r HCV Monitor（商標）、Roche Molecular Systems, New Jersey）；分岐DNA（デオキシリボ核酸）シグナル増幅アッセイ（Quantiplex（商標） HCV RNAアッセイ（bDNA）、Chiron Corp., Emeryville, California）があげられる。Gretch et al.（1995）Ann. Intern. Med. 123:321~329などを参照のこと。また、Chiron Corporationから商品名Pro c l e i x（登録商標）で販売されている核酸試験（NAT）も対象となるが、このNATではHIV-1とHCVの有無を同時に試験する。Vargo et al.（2002）Transfusion 42:876~885などを参照のこと。

【0173】

いくつかの実施形態では、阻害剤の有効量とは、それを必要とする宿主（ヒトなど）に1以上の用量で投与した場合に、阻害剤で治療していない個体における肝機能と比較して、個体における肝機能を、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%または少なくとも約90%、あるいはそれよりも高める量である。

【0174】

いくつかの実施形態では、阻害剤の有効量とは、それを必要とする宿主（ヒトなど）に1以上の用量で投与した場合に、阻害剤で治療していない個体における肝線維症の度合いと比較して、宿主における肝線維症を、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%または少なくとも約90%、あるいはそれよりも多

10

20

30

40

50

く低減する量である。

【0175】

肝線維症の低減は、肝臓の生検試料サンプルを分析して判断される。肝臓の生検試料の解析は、重篤度および進行中の疾患活動性の尺度としての「グレード」で評価される壊死性炎症と、長期の疾患進行を反映している「ステージ」で評価される線維症の病変および実質または脈管再構成の2つの主要な要素の評価を含む。Brunt (2000) Hepatol. 31: 241~246; METAVIR (1994) Hepatology 20: 15~20などを参照のこと。肝臓生検試料の解析結果に基づいて、評点を割り振る。線維症の度合いと重篤度を定量的に評価する多数の標準化されたスコアリングシステムが存在する。一例として、METAVIR、Knodel 1、Scheuer、LudwigおよびIshakスコアリングシステムがあげられる。

10

【0176】

METAVIRスコアリングシステムは、線維症（門脈線維症、小葉中心性線維症、肝硬変）；壊死（漸次および小葉壊死、好酸性退縮、風船様変性）；炎症（門脈域の炎症、門脈リンパ球凝集、門脈炎症の分布）；胆管変化；Knodel 1指数（門脈周囲の壊死、小葉壊死、門脈炎症、線維症、全体的な疾患活動性のスコア）をはじめとする肝臓生検試料のさまざまな特徴の解析に基づくものである。METAVIR系における各ステージの定義は以下のとおりである：スコア0、線維症なし；スコア1、中隔形成を伴わない門脈域の星状拡大；スコア2、まれに中隔形成を伴う門脈域の拡大；スコア3、肝硬変を伴わない多数の中隔；スコア4、肝硬変。

20

【0177】

肝炎活動度指数とも呼ばれるKnodel 1スコアリングシステムでは、スコアに基づいて、検体を組織学的特徴の4つのカテゴリに分類する：I. 門脈周囲および／または架橋壊死、II. 小葉内変性および巣状壊死；III. 門脈炎症、IV. 線維症。Knodel 1のステージング系では、スコアは以下のとおりである：スコア0、線維症なし；スコア1、軽度の線維症（線維性門脈拡大）；スコア2、中程度の線維症；スコア3、重篤な線維症（架橋線維症）；スコア4、肝硬変。スコアが高いほど、肝臓組織の損傷が重い。Knodel 1 (1981) Hepatol. 1: 431。

【0178】

Scheuerスコアリングシステムでは、スコアは以下のとおりである：スコア0、線維症なし；スコア1、拡大、線維性門脈域；スコア2、構造には影響のない門脈周囲または門脈間中隔；スコア3、明らかな肝硬変を認めない、構造が変形した線維症；スコア4、肝硬変（推定または確定）。Scheuer (1991) J. Hepatol. 13: 372。

30

【0179】

Ishakスコアリングシステムは、Ishak (1995) J. Hepatol. 22: 696~699に説明されている。ステージ0、線維症なし；ステージ1、短い線維性中隔を含むか含まない一部の門脈領域の線維性拡大；ステージ2、短い線維性中隔を含むか含まない、ほとんどの門脈領域の線維性拡大；ステージ3、門脈間（P-P）架橋が時折認められる、ほとんどの門脈領域の線維性拡大；ステージ4、顕著な（P-P）ならびに門脈-中心（P-C）架橋を含む門脈領域の線維性拡大；ステージ5、時折小結節を含む顕著な架橋（P-Pおよび／またはP-C）（不完全な肝硬変）；ステージ6、肝硬変（推定または確定）。

40

【0180】

本発明によって得られる治療法の利点は、Child-Pughスコアリングシステムを用いて測定・評価することも可能であるが、このシステムは、血清ビリルビン濃度、血清アルブミン濃度、プロトロンビン時間の異常、腹水症の存在と重篤度、ならびに脳症の存在と重篤度に基づく多成分ポイントシステムを含む。これらのパラメータの異常の存在および重篤度に基づいて、臨床疾患の重篤度の高さに応じたA、BまたはCの3つのカテゴリのうちの1つに患者を分類することができる。

50

【0181】

本開示の実施形態は、ウイルス感染のある患者の治療にあたって有用な方法、阻害剤、医薬製剤を提供するものである。一実施形態では、患者は、H C Vに感染しているが、H I Vを含むが、これらに限定されるものではない、別のウイルスに感染しているかどうかは分からない。もうひとつの実施形態では、患者は、H C Vと、H I Vを含むが、これらに限定されるものではない1種類以上の別のウイルスに感染している。一実施形態では、H C V感染の治療に有用なものとして、本明細書に記載したような単一の阻害剤だけを投与することで、患者のウイルス感染を治療する。もうひとつの実施形態では、H C V感染の治療に有用なものとしての本明細書に記載の阻害剤と、ウイルス感染の治療に有用なことが分かっている1種類以上の別の作用剤とを投与することで、患者のウイルス感染を治療する。一実施形態では、1種類以上の別の作用剤が、C C R－5アンタゴニストを含まない。もうひとつの実施形態では、1種類以上の別の作用剤が、C C R－5アンタゴニストを含まず、患者がH C Vに感染しているがH I Vに感染している（または感染していない）かどうかは分からない。

10

【0182】

薬用量

阻害剤の実施形態を1以上の用量で宿主に投与することが可能である。一実施形態では、1用量あたり約10mgから1000mg、たとえば、1用量あたり約10mgから20mg、約20mgから25mg、約25mgから50mg、約50mgから75mg、約75mgから100mg、約100mgから125mg、約125mgから150mg、約150mgから175mg、約175mgから200mg、約200mgから225mg、約225mgから250mg、約250mgから300mg、約300mgから350mg、約350mgから400mg、約400mgから450mg、約450mgから500mg、約500mgから750mg、または約750mgから1000mgの量で阻害剤を投与することが可能である。

20

【0183】

一実施形態では、1用量あたりの阻害剤の量を体重基準で判断する。たとえば、一実施形態では、約0.5mg/kgから100mg/kg、たとえば、約0.5mg/kgから1mg/kg、約1mg/kgから2mg/kg、約2mg/kgから3mg/kg、約3mg/kgから5mg/kg、約5mg/kgから7mg/kg、約7mg/kgから約10mg/kg、約10mg/kgから15mg/kg、約15mg/kgから20mg/kg、約20mg/kgから25mg/kg、約25mg/kgから30mg/kg、約30mg/kgから40mg/kg、約40mg/kgから50mg/kg（1用量あたり）、約50mg/kgから60mg/kg、約60mg/kgから70mg/kg、約70mg/kgから80mg/kg、約80mg/kgから90mg/kgまたは約90mg/kgから100mg/kgあるいは、約100mg/kgを超える量で阻害剤を投与することが可能である。

30

【0184】

クレミゾールの投薬についてのさらなる詳細は上述のとおりである。

【0185】

投与する具体的な阻害剤、症候の重篤度および被検体の副作用に対する罹患性の関数として用量レベルを変更できることは、当業者であれば容易に分かるであろう。特定の化合物についての好ましい薬用量は、当業者がさまざまな手段で容易に判断可能なものである。

40

【0186】

一実施形態では、複数回用量の阻害剤を投与する。阻害剤の投与頻度は、症候の重篤度などのさまざまな要因のうちのいずれに応じて変化させてもよいものである。たとえば、一実施形態では、1ヶ月に1回、1ヶ月に2回、1ヶ月に3回、1週間おき（q o w）、1週間に1回（q w）、1週間に2回（b i w）、1週間に3回（t i w）、1週間に4回、1週間に5回、1週間に6回、1日おき（q o d）、毎日（q d）、1日2回（q i

50

d) または1日3回 (t i d)、阻害剤を投与する。上述したように、一実施形態では、阻害剤を連続的に投与する。

【0187】

阻害剤の投与期間、たとえば、阻害剤を投与する期間は、患者の応答などのさまざまな要因のうちのいずれに応じて変化させてもよいものである。たとえば、約1日から約1週間、約2週から約4週間、約1ヶ月から2ヶ月、約2ヶ月から4ヶ月、約4ヶ月から6ヶ月、約6ヶ月から8ヶ月、約8ヶ月から1年、約1年から2年または約2年から4年もしくはそれ以上の期間にわたって、阻害剤を投与することが可能である。

【0188】

投与経路

10

本発明の実施形態は、生体内および生体外での方法ならびに、全身および局所的な投与経路をはじめとして、薬剤送達に適した利用可能な任意の経路と方法で、宿主（ヒトなど）に阻害剤を投与するための方法および組成物を提供するものである。

【0189】

投与経路としては、鼻腔内、筋肉内、気管内、皮下、皮内、局所塗布、静脈内、直腸、経鼻、経口ならびに、他の経腸および非経口的な投与経路があげられる。必要があれば、投与経路を組み合わせてもよいし、作用剤および／または所望の作用に応じて調節することもできる。活性作用剤は一用量または複数回用量で投与することが可能である。

【0190】

阻害剤の実施形態は、全身または局所的な経路を含む従来の薬剤の送達に適した、利用可能な従来の経路と方法を用いて、宿主に投与可能である。通常、本開示で企図される投与経路は、経腸、非経口または吸入経路を含むが、これに限定されるものではない。

20

【0191】

吸入投与以外の非経口の投与経路としては、局所、経皮、皮下、筋肉内、眼窩内、嚢内、脊髄内、肋骨下、静脈内経路すなわち、消化管を経由する以外の任意の投与経路があげられるが、これに限定されるものではない。非経口投与は、阻害剤の全身または局所的な送達を実現するよう実施可能である。全身送達が望ましい場合、投与は一般に侵襲的であるか、医薬製剤の全身吸収される局所または粘膜投与を伴う。

【0192】

また、阻害剤を経腸投与で被検体に送達することも可能である。経腸投与経路としては、経口および直腸（坐剤を使うなど）送達があげられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0193】

皮膚または粘膜経由での阻害剤の投与方法としては、好適な医薬製剤の局所塗布、経皮浸透、注射、上皮投与があげられるが、これに限定されるものではない。経皮浸透では、吸収促進剤またはイオン泳動が好適な方法である。イオン泳動浸透は、数日の期間またはそれよりも長期にわたって、傷のない皮膚を介した電気パルスによって生成物を連続的に送達する市販の「パッチ」を用いて実現できる。

【0194】

併用療法

40

本発明の実施形態は、ウイルス感染の治療用の方法、阻害剤、医薬製剤を含む。本開示の方法に有用な阻害剤および医薬製剤の実施形態を、他の抗ウイルス剤と組み合わせて利用し、ウイルス感染を治療することが可能である。一実施形態では、本発明の方法によれば、フラビウイルス科ファミリーのウイルス感染によって感染した宿主の治療に用いられる阻害剤を、1種類以上の他の抗HCV作用剤と併用し、HCV感染を治療する。一実施形態では、本発明の方法によれば、HCV RNAの3'-UTRに対するNS4Bの結合を防止する阻害剤（本明細書では「HCV NS4Bアンタゴニスト」とも呼ぶ）を、1種類以上の他の抗HCV作用剤と併用して、HCV感染を治療することが可能である。

【0195】

HCV感染を治療するための現行の医療では一般に、インターフェロナーα単独療法ま

50

たはリバビリン (Rebetol または Copegus など) とインターフェロン- α (インターフェロン α 2b など) または Pegasys あるいは、Schering Plough から販売されている PEG-Inttron など) のいずれかとの併用療法を採用している。本開示の方法によれば、これらの標準的な治療法と阻害用の化合物とを併用し、HCV 感染を治療することが可能である。

【0196】

HCV 感染の治療用に、多数の HCV プロテアーゼインヒビターが開発中であり、本開示の方法によれば、HCV RNA の 3'-UTR に対する NS4B の結合を防止する阻害剤と、HCV プロテアーゼインヒビターとの併用投与が、HCV の治療に有効となり得る。一実施形態では、インターフェロン α および／またはリバビリンなどのヌクレオシド類似体も、この併用療法で使用される。好適な HCV プロテアーゼインヒビターとしては、テラプレビル (VX-950、Vertex)、BILN 2061 および BI12202 (Boehringer Ingelheim)、ボセプレビル (SCH 503034、Schering Plough)、ITMN191 (Roche/InterMune/Array BioPharma)、MK-7009 (Merck)、TMC435350 (Tibotec/Medivir)、ACH-1095 および ACH-806 (Achillion/Gilead)、NS3/NS4A プロテアーゼの他のインヒビター (Presidio によって開発中の化合物を含むが、これに限定されるものではない) があげられるが、これらに限定されるものではない。

【0197】

HCV 感染の治療用に、多数の HCV RNA ポリメラーゼ (NS5B) インヒビターが開発中であり、本開示の方法によれば、HCV RNA の 3'-UTR に対する NS4B の結合を防止する阻害剤と、HCV RNA ポリメラーゼインヒビターとの併用投与が、HCV の治療に有効となり得る。一実施形態では、インターフェロン α および／またはリバビリンなどのヌクレオシド類似体および／または HCV プロテアーゼインヒビターも、この併用療法で使用される。好適な HCV RNA ポリメラーゼインヒビターとしては、バロピシタビン (NM283、Idenix/Novartis)、HCV-796 (Wyeth/ViroPharma)、R1626 (Roche)、R7128 (Roche/Pharmasset)、GS-9190 (Gilead)、MK-0608 (Merck)、PSI-6130 (Pharmasset)、および PFE-868、554 (PFE) があげられるが、これに限定されるものではない。

【0198】

HCV 感染の治療用に、多数の Toll 様受容体 (TLR) アゴニストが開発中であり、本開示の方法によれば、HCV RNA の 3'-UTR に対する NS4B の結合を防止する NS4B アンタゴニストと、TLR アゴニストとの併用投与が、HCV の治療に有効となり得る。一実施形態では、インターフェロン α および／またはリバビリンなどのヌクレオシド類似体および／または HCV プロテアーゼインヒビターおよび／または HCV RNA ポリメラーゼインヒビターも、この併用療法で使用される。好適な TLR アゴニストとしては、TLR7 アゴニスト (すなわち、ANA245 および ANA975 (Amdys/Novartis)) および TLR9 アゴニスト (すなわち、Actilon (Colley) および IMO-2125 (Idera)) があげられるが、これらに限定されるものではない。

【0199】

HCV 感染の治療用に、多数のチアゾリド誘導体が開発中であり、本開示の方法によれば、HCV RNA の 3'-UTR に対する NS4B の結合を防止する NS4B アンタゴニストと、ニタゾキサニド (Alinia またはニタゾキサニドの他の持続放出製剤または他のチアゾリド、Romark Laboratories) を含むがこれに限定されるものではないチアゾリドとの併用投与が、HCV の治療に有効となり得る。一実施形態では、インターフェロン α および／またはリバビリンなどのヌクレオシド類似体および／

またはHCVプロテアーゼインヒビターおよび／またはHCV RNAポリメラーゼインヒビターおよび／またはTLRアゴニストも、この併用療法で使用される。

【0200】

本開示の方法のもうひとつの実施形態では、HCV RNAの3'-UTRに対するNS4Bの結合を防止する阻害剤と、シクロフィリンインヒビター（すなわち、NIM-811（Novartis）およびDEBIO-025（Debiopharm））および／またはα-グルコシダーゼインヒビター（すなわち、Celgosivir（Migenix））および／または本明細書にて記載の1種類以上の他のクラスのHCV治療薬からの1種類以上の作用剤の併用投与を用いて、HCV感染を治療する。さらに、NS4B内にはいくつかの標的があり、これらの他の標的と相互作用する化合物を、本開示の方法によれば、HCV RNAの3'-UTRに対するNS4Bの結合を防止するNS4Bアンタゴニストと、任意に、本明細書にて言及する1種類以上の他のクラスの阻害剤とを併用し、HCV感染を治療することが可能である。このような別のNS4B標的として、N末端両親媒性らせん（PCT国際公開第2002/089731号パンフレット（本明細書に援用））、NS4B GTPase（PCT国際公開第2005/032329号パンフレット（本明細書に援用））、第2の両親媒性らせん、NS4Bにおける第1の両親媒性らせんのPIP2結合活性（米国仮特許出願第60/057188号明細書（本明細書に援用）を参照のこと）があげられる。

【0201】

HCV RNAの3'-UTRに対するNS4Bの結合を防止する本開示の阻害剤と併用可能な他の作用剤として、(i) A-831（Arrow Therapeutics）、AZD2836（AstraZeneca）、XTL/PresidioまたはBMSによって開発中の作用剤（PCT国際公開第2006/133326号パンフレットならびに、同第2008/021928号パンフレット（本明細書に援用）を参照のこと）を含むがこれに限定されるものではない、NS5Aを標的する作用剤、(ii) TBC1D20および／またはNS5AとTBC1D20との相互作用を標的する作用剤（PCT出願公開第2007/018692号パンフレットおよび米国特許出願第11/844993号明細書（本明細書に援用）を参照のこと）、(iii) NS4BのGTPase活性を標的する作用剤（PCT国際公開第2005/032329号パンフレットおよび米国特許出願公開第2006/0199174号明細書（本明細書に援用する）を参照のこと）；(iv) NS5A、NS4BおよびNS5Bに見られるものなど、HCV両親媒性らせんによる膜会合を阻害する作用剤（PCT国際公開第2002/089731号パンフレット（上掲）を参照のこと）、(v) NS4BおよびNS5Aに見られるものなど、HCVタンパク質のPIP2またはBAAPPドメインを標的する作用剤（米国仮特許出願第60/057188号明細書（上掲）を参照のこと）；(vi) 共受容体への抗体を含むHCVのエントリ、アセンブリまたは放出を標的する作用剤；(vii) HCV NS3ヘリカーゼを標的する作用剤；(viii) HCVの配列を標的するsiRNA、shRNA、アンチセンスRNAまたは他のRNAベースの分子；(ix) microRNA122またはHCV複製を調節する他のmicroRNAを標的する作用剤；(x) PD-1、PD-L1またはPD-L2相互作用または経路を標的する作用剤（米国特許出願公開第20080118511号明細書、同第20070065427号明細書、同第20070122378号明細書（本明細書に援用）を参照のこと）；(xi) AH2インヒビターなどのHCV両親媒性らせん機能を標的する作用剤があげられる。

【0202】

本開示のもうひとつの実施形態では、HCV RNAの3'-UTRに対するNS4Bの結合を防止する阻害剤を、HIV感染を治療できる1種類以上の薬剤と併用して、HIVとHCVに同時感染した患者を治療する。本開示のもうひとつの実施形態では、HCV RNAの3'-UTRに対するNS4Bの結合を防止する阻害剤を、HBV感染を治療できる1種類以上の薬剤と併用して、HBVとHCVに同時感染した患者を治療する。一実施形態では、HCV RNAの3'-UTRに対するNS4Bの結合を防止する阻害剤

をPD-L1インヒビターと併用して、ウイルス感染を治療する。

【0203】

上述したように、本発明の実施形態は、少なくとも1つの別の治療薬との関連で本明細書にて（または本発明のスクリーニングの実施形態を用いて）同定される阻害剤を投与して、ウイルス感染を治療することを含む。好適な別の治療薬として、リバビリン；ヌクレオシド類似体（レボビリン、ピラミジンなど）；NS3インヒビター；NS5インヒビター；インターフェロン；副作用管理作用剤があげられるが、これに限定されるものではない。

【0204】

一実施形態では、少なくとも1つの別の好適な治療薬が、リバビリンを含む。リバビリンすなわち、ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, Califから入手可能な1-β-D-リボフラノシル-1H-1, 2, 4-トリアゾール-3-カルボキサミドは、Merck Indexの化合物番号8199、第11版に記載されている。その製造と製剤については、米国特許第4211771号明細書に記載されている。この開示は、リバビリンの誘導体の使用も企図している。（米国特許第6277830号明細書などを参照のこと）。

【0205】

一実施形態では、少なくとも1つの別の好適な治療薬が、レボビリンを含む。レボビリンは、リバビリンのL-エナンチオマーであり、Th2免疫応答よりもTh1免疫応答を亢進する特性を呈する。レボビリンは、ICN Pharmaceuticalsによって製造されている。

【0206】

一実施形態では、少なくとも1つの別の好適な治療薬が、ピラミジンを含む。ピラミジンは、リバビリンの3-カルボキサミジン誘導体であり、リバビリンのプロドラッグとして作用する。これは、アデノシンデアミナーゼによって効率的にリバビリンに変換される。

【0207】

併用療法で使用するのに適したヌクレオシド類似体として、リバビリン、レボビリン、ピラミジン、イサトリビン、米国特許第5559101号明細書に開示され、米国特許第5559101号明細書の式Iに包含されているようなL-リボフラノシルヌクレオシド（1-β-L-リボフラノシルウラシル、1-β-L-リボフラノシル-5-フルオロウラシル、1-β-L-リボフラノシルシトシン、9-β-L-リボフラノシルアデニン、9-β-L-リボフラノシルヒポキサンチン、9-β-L-リボフラノシルグアニン、9-β-L-リボフラノシル-6-チオグアニン、2-アミノ-α-L-リボフラニル[1', 2': 4, 5]オキサゾリン、O², O²-アンヒドロ-1-α-L-リボフラノシルウラシル、1-α-L-リボフラノシルウラシル、1-(2, 3, 5-トリ-オ-ベンゾイル-α-リボフラノシル)-4-チオウラシル、1-α-L-リボフラノシルシトシン、1-α-L-リボフラノシル-4-チオウラシル、1-α-L-リボフラノシル-5-フルオロウラシル、2-アミノ-β-L-アラビノフラノ[1', 2': 4, 5]オキサゾリン、O², O²-アンヒドロ-β-L-アラビノフラノシルウラシル、2'-デオキシ-β-L-ウリジン、3'5'-ジ-オ-ベンゾイル-2'-デオキシ-4-チオβ-L-ウリジン、2'-デオキシ-β-L-シチジン、2'-デオキシ-β-L-4-チオウリジン、2'-デオキシ-β-L-チミジン、2'-デオキシ-β-L-5-フルオロウリジン、2', 3'-ジデオキシ-β-L-ウリジン、2'-デオキシ-β-L-5-フルオロウリジン、2'-デオキシ-β-L-イノシンなど）；米国特許第6423695号明細書に開示され、米国特許第6423695号明細書の式Iに包含されているような化合物；米国特許出願公開第2002/0058635号明細書に開示され、米国特許出願公開第2002/0058635号明細書の式1に包含されているような化合物；国際公開第01/90121 A2号パンフレット（Idenix）に開示されているようなヌクレオシド類似体；国際公開第02/069903 A2号パンフレット（BioC

10

20

30

40

50

ryst Pharmaceuticals Inc.) に開示されているようなヌクレオシド類似体；国際公開第02/057287 A2号パンフレットまたは国際公開第02/057425 A2号パンフレット（いずれもMerck/Isis）に開示されているようなヌクレオシド類似体などがあげられるが、これに限定されるものではない。

【0208】

一実施形態では、少なくとも1つの別の好適な治療薬が、HCV NS3インヒビターを含み得る。好適なHCV非構造的タンパク質-3（NS3）インヒビターとしては、米国特許第6642204号明細書、同第6534523号明細書、同第6420380号明細書、同第6410531号明細書、同第6329417号明細書、同第6329379号明細書、同第6323180号明細書（Boehringer-Ingelheim）に開示されているようなトリペプチド；米国特許第6143715号明細書（Boehringer-Ingelheim）に開示されているような化合物；米国特許第6608027号明細書（Boehringer-Ingelheim）に開示されているような大環状化合物；米国特許第6617309号明細書、同第6608067号明細書、同第6265380号明細書（Vertex Pharmaceuticals）に開示されているようなNS3インヒビター；米国特許第6624290号明細書（Schering）に開示されているようなアザペプチド化合物；米国特許第5990276号明細書（Schering）に開示されているような化合物；Pause et al.（2003）J. Biol. Chem. 278：20374～20380に開示されているような化合物；NS3インヒビターBILN 2061（Boehringer-Ingelheim；Lamarre et al.（2002）Hepatology 36：301A；Lamarre et al.（Oct. 26, 2003）Nature doi：10.1038/nature02099）；NS3インヒビターVX-950（Vertex Pharmaceuticals；Kwong et al.（Oct. 24～28, 2003）54th Ann. Meeting AASLD）；NS3インヒビターSCH6（Abib et al.（October 24～28, 2003）Abstract 137. Program and Abstracts of the 54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases（AASLD）. October 24～28, 2003. Boston, MA.）；国際公開第99/07733号パンフレット、国際公開第99/07734号パンフレット、国際公開第00/09558号パンフレット、国際公開第00/09543号パンフレット、国際公開第00/59929号パンフレットまたは国際公開第02/060926号パンフレットに開示されているNS3プロテアーゼインヒビター（国際公開第02/060926号パンフレットの224～226ページの表に化合物2、3、5、6、8、10、11、18、19、29、30、31、32、33、37、38、55、59、71、91、103、104、105、112、113、114、115、116、120、122、123、124、125、126および127など）；米国特許出願公開第2003019067号明細書、同第20030187018号明細書、同第20030186895号明細書のいずれか1つに開示されているようなNS3プロテアーゼインヒビターなどがあげられるが、これに限定されるものではない。

【0209】

一実施形態では、本発明の併用療法に用いられるNS3インヒビターが、NS3セリンプロテアーゼ活性を阻害し、ヒト白血球エラスターゼ、ブタ膵エラスターゼまたはウシ膵キモトリプシンなどの他のセリンプロテアーゼあるいは、ヒト肝カテプシンBなどのシステインプロテアーゼに対して有意な阻害活性を示さないNS3インヒビターなどの特定のNS3インヒビターのクラスのメンバである。

【0210】

一実施形態では、少なくとも1つの別の好適な治療薬が、NS5Bインヒビターを含む。好適なHCV非構造的タンパク質-5（NS5；RNA依存性RNAポリメラーゼ）イ

10

20

30

40

50

ンヒビターとしては、米国特許第6, 479, 508号明細書(Boehringer-Ingelheim)に開示されているような化合物; 国際特許出願PCT/CA02/01127号パンフレット、同第PCT/CA02/01128号パンフレット、同第PCT/CA02/01129号パンフレット(いずれもBoehringer-Ingelheimによって2002年7月18日出願)のいずれかに開示されているような化合物; 米国特許第6440985号明細書(ViroPharma)に開示されているような化合物; 国際公開第01/47883号パンフレットに開示されているような化合物、たとえば、JTK-003(日本たばこ産業); Zhong et al. (2003) Antimicrob. Agents Chemother. 47:2674~2681に開示されているようなジヌクレオチド類似体; Dhanak et al. (2002) J. Biol. Chem. 277(41):38322~7に開示されているようなベンゾチアジジン化合物; 国際公開第02/100846 A1号パンフレットまたは国際公開第02/100851 A2号パンフレット(いずれもShire)に開示されているようなNS5Bインヒビター; 国際公開第01/85172 A1号パンフレットまたは国際公開第02/098424 A1号パンフレット(いずれもGlaxoSmithKline)に開示されているようなNS5Bインヒビター; 国際公開第00/06529号パンフレットまたは国際公開第02/06246 A1号パンフレット(いずれもMerck)に開示されているようなNS5Bインヒビター; 国際公開第03/000254号パンフレット(日本たばこ産業)に開示されているようなNS5Bインヒビター; EP1256628 A2号(Agouron)に開示されているようなNS5Bインヒビター; JTK-002(日本たばこ産業); JTK-109(日本たばこ産業)などがあげられるが、これに限定されるものではない。

10

20

【0211】

一実施形態では、本発明の併用療法に用いられるNS5インヒビターは、NS5 RNA依存性RNAポリメラーゼを阻害し、他のRNA依存性RNAポリメラーゼおよびDNA依存性RNAポリメラーゼに対する有意な阻害作用を欠いたNS5インヒビターなど、特定のNS5インヒビターのクラスのメンバである。

【0212】

一実施形態では、少なくとも1つの別の治療薬が、インターフェロン-α(IFN-α)などのインターフェロンである。本発明の治療方法に、周知のIFN-αを用いることが可能である。「インターフェロン-α」という用語は、本明細書で使用する場合、ウイルス複製と細胞増殖を阻害し、免疫応答を調節する関連ポリペプチドのファミリーを示す。「IFN-α」という用語は、天然に生じるIFN-α; 合成IFN-α; 誘導体化IFN-α(PEG化IFN-α、グリコシル化IFN-αなど); 天然に生じるまたは合成のIFN-αの類似体; 天然に生じるIFN-αで説明したような抗ウイルス特性を有する、基本的にあらゆるIFN-αを含む。

30

【0213】

好適なαインターフェロンとしては、天然に生じるIFN-α(天然に生じるIFN-α2a、IFN-α2bを含むが、これに限定されるものではない); Schering Corporation, Kenilworth, NJ. から入手可能なイントロンAインターフェロンなどの組換えインターフェロンα-2b; Hoffmann-La Roche, Nutley, N. J. から入手可能なRoferonインターフェロンなどの組換えインターフェロンα-2a; Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn. から入手可能なBerofor α2インターフェロンなどの組換えインターフェロンα-2C; インターフェロンα-n1、Sumitomo, Japanから入手可能なSumiferonなど、あるいはGlaxo-Wellcome Ltd., London, Great Britainから入手可能なWellferonインターフェロンα-n1(INS)などの天然αインターフェロンの精製ブレンド; インターフェロンα-n3、Interferon Sciences製でPurdue Frederick Co.,

40

50

Norwalk, Conn. から商品名 *Alferon* で入手可能な天然 α インターフェロンの混合物があげられるが、これに限定されるものではない。

【0214】

「IFN- α 」という用語は、コンセンサスIFN- α も包含する。コンセンサスIFN- α （「CIFN」および「IFN-con」および「コンセンサスインターフェロン」とも呼ばれる）は、米国特許第4695623号明細書および同第4897471号明細書に開示されているIFN-con₁、IFN-con₂、IFN-con₃で示されるアミノ酸配列；天然に生じるインターフェロン α のコンセンサス配列の決定によって定義されるようなコンセンサスインターフェロン（*Infergen*（登録商標）、*InterMune, Inc., Brisbane, Calif.* など）を包含するが、これに限定されるものではない。IFN-con₁は、*Infergen*（登録商標）アルファコン-1製品のコンセンサスインターフェロン作用剤である。*Infergen*（登録商標）コンセンサスインターフェロン製品を、本明細書ではそのブランド名（*Infergen*（登録商標））またはその一般名（インターフェロンアルファコン-1）と呼ぶ。IFN-conをコードするDNA配列は、上述した特許に記載されているようにして、あるいは他の標準的な方法で、合成できるものである。一実施形態では、少なくとも1つの別の治療薬がCIFNである。

10

【0215】

一実施形態では、IFN- α を含む融合ポリペプチドおよび異種ポリペプチドも、本発明の併用療法に使用可能である。好適なIFN- α 融合ポリペプチドとしては、*Albiferon-alpha*（商標）（ヒトアルブミンとIFN- α の融合産物；*Human Genome Sciences; Osborn et al. (2002) J. Pharmacol. Exp. Therap. 303:540~548*などを参照のこと）。また、本開示で用いるのに適しているのは、IFN- α の遺伝子シャッフルされた形態である。*Masci et al. (2003) Curr. Oncol. Rep. 5:108~113*などを参照のこと。他の好適なインターフェロンとして）、*Multiferon (Viragen)*、*Medusa Interferon (Flamel Technology)*、*Locteron (Octopus)*、*Omega Interferon (Intarcia/Boehringer Ingelheim)*があげられるが、これに限定されるものではない。

20

30

【0216】

「IFN- α 」という用語は、血清半減期などの特定の特性を変化させるよう誘導体化された（天然に生じるペプチドに比して化学的に修飾されているなど）IFN- α の誘導体も包含する。それ自体、「IFN- α 」という用語は、グリコシル化されたIFN- α ；ポリエチレングリコールで誘導体化されたIFN- α （「PEG化IFN- α 」）などを含む。PEG化IFN- α ならびに、これを製造するための方法が、米国特許第5382657号明細書、同第5981709号明細書、同第5951974号明細書などに記載されている。PEG化IFN- α は、PEGのコンジュゲートならびに、上述したIFN- α 分子を包含し、一例として、インターフェロン α -2a（*Roferon, Hoffman-La-Roche, Nutley, NJ.*）、インターフェロン α 2b（*Intron, Schering-Plough, Madison, N. J.*）、インターフェロン α -2c（*Berofor Alpha, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany*）にコンジュゲートしたPEG；天然に生じるインターフェロン α のコンセンサス配列の判断して定義されるようなコンセンサスインターフェロン（*Infergen*（登録商標）、*InterMune, Inc., Brisbane, Calif.*）があげられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0217】

一実施形態では、IFN- α ポリペプチドは、1種類以上のポリエチレングリコール部分で修飾可能すなわち、PEG化可能である。PEG化IFN- α ポリペプチドのPEG

50

分子は、IFN- α ポリペプチドの1種類以上のアミノ酸側鎖にコンジュゲートされる。一実施形態では、PEG化IFN- α が、1つのアミノ酸だけにPEG部分を含有する。もうひとつの実施形態では、PEG化IFN- α が、PEG部分を2つ以上のアミノ酸で含有し、たとえば、IFN- α が、2、3、4、5、6、7、8、9または10の異なるアミノ酸残基に結合したPEG部分を含有する。IFN- α は、アミノ基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基またはカルボキシル基によってPEGに直接カップリングされた（すなわち、架橋基なし）ものであってもよい。

【0218】

クレミゾールなどの阻害剤と他の抗HCV作用剤との最適な組み合わせを判断するには、さまざまな抗HCV作用剤のさまざまな組み合わせの存在下、HCV複製アッセイおよび／または動物研究を実施すればよい。別の作用剤の存在下で複製の阻害が（単独療法で観察されるよりも）大きくなれば、それが併用療法の潜在的な利点の証拠である。

【0219】

たとえば、さまざまな組み合わせのクレミゾールとNS3プロテアーゼインヒビター（SCH503034）の存在下でのルシフェラーゼレポーター結合HCVゲノムを用いるHCV複製アッセイを、図1Aおよび図1Bに示す。このようなアッセイでは、ルシフェラーゼ活性がHCV RNAゲノム複製と正比例する。この方法では、基本的に（Nature Biotechnology 26, 1019～1027（2008）（本明細書に援用））に記載されているようにして、野生型ルシフェラーゼレポーター結合HCVゲノムを用いてHuh7.5細胞を電気穿孔し、播種した複製をクレミゾールおよびSCH503034（SCH）の指示濃度の存在下にて72時間培養した後、細胞溶解してルシフェラーゼ活性を判断した。結果を線形またはログスケールで薬剤濃度の関数としてプロットし、複製阻害曲線を生成することができる。NS3インヒビターの阻害曲線には、クレミゾールの濃度を増すと有意に多くの阻害が認められる。特に、低マイクロモル濃度のSCH503034（1～5マイクロモルなど）では、クレミゾールを加えることでHCV複製の阻害を、最大数ログまで用量依存的に増すことが可能である。同様に、本発明の方法では、NS4Bアンタゴニストを他のNS3プロテアーゼインヒビターならびに、クレミゾールと同一の作用機序を持つNS4Bアンタゴニストとは作用機序が異なる他の抗HCV作用剤と併用投与すると、併用療法の薬効が（単独療法よりも）増えると想定される。これらの結果は、クレミゾールとSCH503034との併用療法の利点の明らかな証拠となるだけでなく、本開示によって得られるこの併用療法および同様の併用療法で生体内での治療後に薬効の改善と耐性低下の可能性が想定されることを示す。さらに、これらの結果は、本明細書の開示に鑑みて当業者がアッセイを容易に実施して、本発明の方法の実施形態において有用なNS4Bアンタゴニストおよび他の抗HCV作用剤との最適な併用療法を判断できることを示すものである。

【0220】

一実施形態では、本発明の治療方法に副作用管理作用剤を使用でき、これには疼痛管理に効果的な作用剤；胃腸の不快感を寛解させる作用剤；鎮痛薬、抗炎症薬、抗精神薬、抗神経症薬、精神安定剤、造血剤を含む。また、本発明の実施形態は、当該治療法での治療の過程で疼痛または他の副作用が生じている患者の対症療法用に化合物を使用することも企図している。例示としての対症療法剤には、アセトアミノフェン、イブプロフェン、他のNSAID、H2ブロッカーおよび制酸薬がある。

【0221】

治療に適した宿主

阻害剤の実施形態または方法の実施形態での治療に適した宿主は、フラビンウイルスに感染した宿主を含む。本明細書で使用する場合、「フラビウイルス」という用語は、デングウイルス1型、デングウイルス2型、デングウイルス3型、デングウイルス4型を含むデングウイルス（GenBank寄託番号M23027、M19197、A34774、M14931などを参照のこと）；黄熱病ウイルス；ウェストナイルウイルス；日本脳炎ウイルス；セントルイス脳炎ウイルス；ウシウイルス性下痢症ウイルス（BVDV）；C

型肝炎ウイルス（HCV）；上記のいずれかのセロタイプ、菌株、遺伝子型、サブタイプ、疑似種または単離物などであるが、これに限定されるものではない、フラビウイルス科ファミリーのメンバを含む。フラビウイルスがHCVである場合、HCVは多数の遺伝子型、サブタイプまたは疑似種のいずれであってもよく、一例として、遺伝子型1（1aおよび1b、2、3、4、6などを含む）ならびにサブタイプ（2a、2b、3a、4a、4cなど）および疑似種があげられる。

【0222】

本発明の実施形態での治療に適した宿主として、治療に失敗した患者があげられる。「治療に失敗した患者」という表現（または「治療失敗」）は、本明細書で使用する場合、通常は、HCV（「非応答者」と呼ぶ）での過去の治療法に反応しなかった、あるいは最初

10

【0223】

本開示の実施形態での治療に適した宿主は、HCVに感染していると臨床的に診断された個体を含む。血中のHCV RNAを検出および／または血清中に抗HCV抗体を有することで、HCVに感染している個体を識別することが可能である。

【0224】

HCVに感染していると臨床的に診断された個体は、ナイーブな個体（HCVを治療していない個体など）を含む。

20

【0225】

本開示の実施形態での治療に適した宿主は、HCV力価が、血清1ミリリットルあたりのHCVゲノムコピーで少なくとも約 10^5 、少なくとも約 5×10^5 または少なくとも約 10^6 の個体を含む。患者は、HCV遺伝子型（遺伝子型1、1aおよび1b、2、3、4、6などとサブタイプ（2a、2b、3aなど）を含む）、特に、HCV遺伝子型1および特定のHCVサブタイプならびに疑似種などの治療が困難な遺伝子型に感染している場合がある。

【0226】

また、慢性HCV感染がゆえに、重篤な線維症または初期の肝硬変（非代償性ではなく、チャイルド・ピュー分類のクラスA以下）またはさらに進行した硬変（非代償性、チャイルド・ピュー分類のクラスBまたはC）を呈する（上述したような）HCV陽性宿主あるいは、過去の抗ウイルス治療にもかかわらずウイルス血症のある患者、あるいは周知の抗ウイルス剤による治療法に対する禁忌のある患者も治療に適している。

30

【0227】

一実施形態では、METAVIRスコアリングシステムでステージ3または4の肝線維症のHCV陽性宿主が、本開示の方法での治療に適している。もうひとつの実施形態では、本開示の実施形態での治療に適した宿主が、臨床所見のある非代償性硬変患者（肝臓移植を待っている患者をはじめとして、肝臓の硬変がかなり進んだ患者を含む）である。さらに別の実施形態では、本開示の実施形態での治療に適した宿主は、初期の線維症（METAVIR、Ludwig、Scheuerスコアリングシステムでステージ1および2；あるいはIshakスコアリングシステムでステージ1、2または3）の患者をはじめとして、軽めの線維症のある患者を含む。

40

【0228】

本開示の一実施形態では、治療法で利点が見られる可能性の最も高い患者を最適に選択しやすくし、なおかつ治療法の薬効—特に潜在的な薬剤耐性突然変異ウイルスを前にした場合—を観察するために、本発明によって得られる適切な診断試験の使用に大きな利点があり得る。たとえば、企図した治療法に対する特定の患者で認められた特定のウイルスの感受性を評価することで、候補患者と対応する適切な治療法とのベストマッチを識別しやすくなる。クレミゾール、クレミゾール類似体、クレミゾール骨格を有する化合物または本明細書にて同定される他の阻害剤の場合、これは、特定の患者のHCV単離物からNS

50

4 B配列を単離し、患者のNS 4 Bアイソフォームによる薬剤のRNA結合阻害の薬効を求めることで実現可能である。患者由来の種菌を容易に培養できないことから、現段階では特定の患者のウイルスの薬剤感受性についての効率的な研究方法がないため、これは特に重要である。このような診断アッセイを用いて治療法の手助けとすることの価値は、H I Vにおいて広く有効となっている。

【0229】

複製アッセイのプロトコール

一実施形態では、複製アッセイのプロトコールに以下のステージを含み得る。以下の複製アッセイのプロトコールは限定的なものではなく、複製アッセイのプロトコールを示す実施形態としてあげたものにすぎない点に注意されたい。

【0230】

ステージ1：RNA転写

1) FL-J6/JFH-5' C19R luc2AUbiプラスミドをXbaIによって37℃で2時間直線化し、1%アガロースゲルに流して消化の完全性を確認する。

2) マングビーンヌクレアーゼを用いて30℃で30分間処理し、5' オーバーハングを消化する。

3) Bart79I-lucプラスミド（ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子がホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子に代わっていること以外は、Elazar et al. J. Virol. 2003, 77(10):6055~61に記載されているようなBart79Iプラスミドと類似）の直線化のために、ScaI制限エンドヌクレアーゼを使用し、続いて直線化したテンプレートDNAをゲル上で検査して切断が終了していることを確認し、続いてプロテイナーゼKで消化する。

4) プロテイナーゼKで30分間消化し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿、続いて1μg/μlで再懸濁させてテンプレートを精製する。

5) 転写反応用に、FL-J6/JFH-5' C19R luc2AUbi (Ambion, Austin, TX) ではT7 Megascriptキット、Bart79I-luc (Promega, Madison, WI) ではRiboMax (商標) キットを用いて、精製したテンプレート1μgを使用する。反応物を37℃で4時間インキュベートする。

6) DNaseを15分間加える。

7) 同容量のフェノール/クロロホルムで抽出した後、同容量のクロロホルムで抽出する。水性相を回収し、新たな試験管に移す。

8) 1容量のイソプロパノールを加えて十分に混合することで、RNAを沈殿させる。

9) 混合物を少なくとも15分間、-20℃で冷却する。4℃で15分間、最大速度で遠心処理し、RNAをペレット化する。

10) 上清溶液を慎重に取り除き、RNAをRNase/DNaseを含有しない水に1μg/μlで再懸濁させる。

11) ゲルに流し、RNA濃度を確認する。

12) アリコートを生じ、-80℃で保管する。

【0231】

ステージ2：Huh7.5細胞の電気穿孔

1) 細胞をPBSで1回洗浄し、トリプシン化する。

2) 50mlの試験管で、細胞を完全培地の10cmのプレートあたり合計容量5mlで再懸濁させる（一緒に引く）。

3) 細胞を4℃にて1000xRPMで5分間ペレット化する。上清を吸引し、10mlの氷冷RNaseフリー濾過1xPBS (BioWhittaker) に再懸濁させる。上下に約5回静かにピペットで吸い上げ、細胞凝集塊を取り除く。

4) 再度1000xRPMで前回と同様にして細胞をペレット化し、10mlの氷冷PBS (BioWhittaker) に再懸濁させる。

5) 10μlのアリコートを取り出して細胞濃度を判断する。

6) 細胞を再度ペレット化し、最終濃度を細胞 1.5×10^7 個/ml で氷冷 RNAse フリー PBS に再懸濁させる。

必要：各電気穿孔 (ep) につき 0.4 ml 中に細胞を 6×10^6 個と 5 μ g の FL-J6/JFH-5' C19RLuc2AUBi RNA または Bart791-luc RNA

7) 5 μ g の RNA アリコートのエッペンドルフ管に入れる (ep 1 回あたり 1 本)

8) 0.4 ml の細胞懸濁液を取り出し、RNA に加える。ピペットで 2 回混合する。

9) 0.4 ml を 2 mm 間隔の ep キュベットにすみやかに移す。

10) 細胞にパルスをかける：820 v、5 パルス、99 μ 秒、220 ms 間隔、単極。

10

11) 細胞を 15 分間放置する。

12) パスツールピペットを用いてキュベットパッケージ内の細胞を培地に移す。すべての試験管から共通のストックを作る。

13) 96 ウェルのプレートで 1 ウェルあたり細胞 10,000 個を播種する。

14) プレートを少し回転させ、細胞を一様に播種する。

15) 処理前に 24 時間インキュベートする。

【0232】

ステージ 3：プレートを処理する

1) 電気穿孔の約 24 時間後に、所望の濃度の薬剤を用いて培地を調製する。

2) 培地を吸引し、100 μ l の新鮮な培地と薬剤を加える。開始時には未処理のウェルを残し最後にも未処理のウェルを残す。

20

3) さらに 2 日間、毎日繰り返す。

【0233】

ステージ 4：収穫（電気穿孔から 5 日目）

1) Alamar ブルーアッセイ

a) バックグラウンド減算用（と、色の変化を容易に確認できるように）培地を含む。

b) 培地を吸引する。

c) 培地のストックに 10% Alamar ブルーを加えたものを作る。1 ウェルあたりの合計容量は 100 μ l である。

30

d) 37°C で（あるいは色が変化するまで）2～2.5 時間インキュベートする。

e) flex station でプレートを読み取る。

2) ウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼアッセイ

a) Alamar ブルーと一緒に培地を吸引する。

b) 1x PBS で洗浄する。

c) 完全に吸引する（吸引した後、傾けて残りの緩衝液を再度吸引する）。

d) どの溶解緩衝液が必要か確認する：ホタルまたはウミシイタケ (Renilla)。

e) 30 μ l の 1x 溶解緩衝液を加える（1 容量の 5x 溶解緩衝液を 4 容量の滅菌水に加える）。

40

f) プレートを 15 分間振盪する。

g) -80°C で冷凍する。この時点で、次のフェーズをやめてもよいし、継続してもよい。

【0234】

ステージ 5：ルミノメーターでの読み取り

a) プレートを解凍する。

b) 読み取りの準備が整うまで、プレートを氷の上に置いたままにする。

c) 必要な基質試薬を調製する；ウミシイタケ (Renilla) の場合：ウミシイタケ (Renilla) 緩衝液を解凍し、1 容量の 100x ウミシイタケ (Renilla) luc 基質に 100 容量の luc アッセイ緩衝液を加えたもの + プライミングルミノメ

50

ーター用に2 mlを作る。(4 mlのウミシイタケ(Renilla) luc基質で、40 ulのアッセイ緩衝液を加えるなど)。ホタルの場合；10 mlのホタル緩衝液を解凍し、ルシフェラーゼ試薬に加える。

d) 標準的なルミノメーターを用いて、製造業者の指示に従ってプレートを読み取る。

【実施例】

【0235】

以下の実施例は、本開示をどのように製造および使用するのかについて当業者に完全に開示および説明すべくまとめたものであり、本発明者らが自らの開示とみなす範囲を限定することを意図したものではない。以下の実験が実施した実験のすべてまたは唯一のものであると表すことを意図したものでもない。使用した数(量、温度など)については正確を期するよう最善を尽くしているが、若干の実験誤差や偏差を念頭におく必要がある。特に明記しないかぎり、部は重量部、分子量は重量平均分子量、温度は摂氏であり、圧力は大気圧前後である。また、塩基対にbp；キロベースにkb；ピコリットルにpl；秒にsまたはsec；分にmin；時間にhまたはhr；アミノ酸にaa；キロベースにkb；塩基対にbp；ヌクレオチドにnt；筋肉内の(に)にi.m.；腹腔内の(に)にi.p.；皮下(に)にs.c.などの標準的な略記を使用することもある。

【0236】

実施例1：

世界中で1億5000万人を超える人々がC型肝炎ウイルス(HCV)に感染している。残念なことに、インターフェロンとリバビリンとを併用しての治療からなる現行の治療水準¹では、こうした個人の多くが自らの感染をなくすことができずにいる(本実施例の最後に添付した番号付きの参考文献リストを参照のこと)。さらに、この治療は有意な副作用と関連し、多くの個人ではこれを使用することができない。よって、現行の治療法は大半の患者にとって不適切¹であり、新たなHCV薬剤に対する差し迫った必要性がある¹。

【0237】

9. 6 kbの一本鎖のプラスRNA HCVゲノムは、タンパク質分解的に処理されて成熟ウイルスの成分である構造的タンパク質とウイルスゲノムの複製に参与する非構造的タンパク質(NS)に分けられる、3,000のアミノ酸からなるポリタンパク質をコードする。他のプラス鎖RNAウイルス³と同様に、HCVは細胞内膜構造と会合して複製されるように見える。HCVの場合、その構造はmembranous web⁴と呼ばれ、NS4Bタンパク質によって誘導されると考えられている。NS4Bは、RNA複製の見かけ上の部位内での他のウイルス性NSタンパク質を構築するのに必要とされる⁵。ウイルス性RNA、特に後代のゲノムの産生に必要とされるマイナス鎖テンプレートが、どのようにしてこれらの複製部位に取り込まれ、あるいはそこで維持されるのかは、いまだ分かっていない。

【0238】

NS4BおよびHCV RNAがmembranous webと共存することが明らかになっている^{6, 7}ことから、真のウイルスRNA複製の観点で、NS4BがウイルスRNAと密に接触しているのではないかと考えられる。A型肝炎やポリオピコルナウイルスは2Cと呼ばれるタンパク質を有するが、このタンパク質は複製やRNAの結合に必要^{8, 9}であり、N末端両親媒性らせんとヌクレオチド結合モチーフを有する^{8 ~ 10}。NS4Bは同一の構造的特徴を持ち、どちらもHCVの複製に必要である^{5, 11}。本発明の方法は、ある意味では、NS4Bが同様にRNAを結合し、この相互作用がHCVの生活環に重要であり、NS4BによるRNA結合が薬理的な崩壊の影響を受けやすいという発見に端を発したものである。本発明は、複数の症状、突然変異、複製物、定量的解離定数(K_d)測定値、潜在的な薬理的インヒビターの高スループットスクリーニングについての同時解析を可能にするフォーマットの試験管内でのRNA結合アッセイを提供するものである。

【0239】

大半の薬剤標的^{1 2}と同様に、NS4Bも図7bに示すような膜タンパク質（配列番号13）である。膜タンパク質は、生化学的、特に薬学的スクリーニングに必要な量での発現とキャラクタライゼーションが困難なことで有名である。さらに、洗剤による可溶化でその天然の膜会合トポロジーが変わってしまう可能性もある。これらの問題を改善するために、本発明は、タンパク質の消費量がナノリットル単位の結合アッセイを実施するためのマイクロ流体ツールを提供するものである。これによって、試験管内での細胞可溶化物発現系を用いることができ、これにミクロソーム膜を補充して一層天然の畳み込み状態を作り、そこで現時点で得られる最高のNS4Bトポロジーデータが得られている^{1 3}。従来の発現方法に比して収率が落ちる分は、試料消費量が少ないことで相殺される。

【0240】

薬剤の相互作用を測定するための過去のマイクロ流体ツールは、蛍光基質の形成を触媒できる酵素標的に限定されている^{1 4}。本発明の一実施形態では、分子相互作用の機械的な捕捉（MITOMI）すなわち、過去に転写因子とDNAとの間の相互作用の測定に用いられているマイクロ流体親和性アッセイを利用して、結合定数を直接測定する^{1 5}。本発明の方法を用いて得られた結果から、膜タンパク質-RNA相互作用の結合定数の測定と、高スループットのスクリーニングにおける小分子によるこのような相互作用の阻害の測定の両方に、MITOMIを利用できるということが分かる。装置の製造に用いるエラストマーが化学的な相溶性に限度があることが分かっているものであっただけに、後者の特質は特に驚くべきことである^{1 6, 1 7}；ここで、本発明者らは、これが薬剤スクリーニングでのその用途を妨げるものではなく、所望の薬理学的特性を有する小分子の発見を妨げるものでもないことを示す。総合すれば、本発明のこれらの方法を用いて得られる結果は、新規なHCV標的を明らかにするとともに、マイクロ流体ツールを薬剤の発見に応用する^{1 8, 1 9}という十年以上も前からの取り組みの実現に成功したことで、マイクロ流体技術を用いて新たな製剤を発見できる旨を初めて示した例となる。

【0241】

結果

胚性致死異常視角系（ELAV）ファミリー由来の2つのヒトタンパク質（そのRNA結合活性については過去に十分特徴付けられている）を研究して、RNA結合用のマイクロ流体プラットフォームを検証した。次に、この方法論を適用し、膜貫通HCV NS4Bタンパク質とのRNA相互作用について研究した。このプラットフォームを用いて、（i）HCV NS4BがRNAを結合するという仮説を試験し、（ii）この相互作用の K_d を求め、（iii）この結合の基質特異性を研究し、（iv）RNA結合に必要なNS4B内のアミノ酸を判断し、（v）NS4B RNA結合およびHCV複製の薬理学的インヒビターについて化合物ライブラリをスクリーニングした。

【0242】

マイクロ流体アッセイ検証：RNAへのHuDの結合。HuDは、RNA結合活性が十分にキャラクタライズされたELAV様ファミリー由来の宿主細胞タンパク質である^{2 0 ~ 2 2}。これは、3つの保存RNA認識モチーフを含有する細胞質タンパク質であり、これらのモチーフを介して、サイトカインおよびプロトオンコジンをコードするものなどの遺伝子の3' UTR（未翻訳領域）のAUを豊富に含む要素（ARE）と結合する。HuD結合が損なわれる周知のAU3突然変異^{2 1, 2 2}とAU3の2つのCy3標識RNAプローブに対して結合を試験した（図5）。MITOMIを用いるRNA結合実験については、この例ではDNAではなくRNAを用いたこと以外、基本的にMaerk1およびQuake^{1 5}に説明されているようにして実施した（図10）。

【0243】

簡単に説明すると、Cy3で標識した標的RNA配列のマイクロアレイをエポキシコートスライドガラスにスポットした。これらのアレイを使用して、アレイの各スポットを装置のユニットセルと整列配置させることで、マイクロ流体装置をプログラムした。マイクロ流体装置をマイクロアレイに結合した後、各ユニットセル内で円形部分がビオチン化抗ヒスチジン抗体で覆われるように、表面パターンニングをほどこした。次に、インフレイム

でC末端V5-6ヒスチジンタグ(Hu D-V5-his)と縮合したHu Dあるいは、インフレイムでC末端6ヒスチジンタグ(Gus-his)と縮合したGusタンパク質をコードするDNAテンプレートを含有する試験管内転写／翻訳混合物を、装置にロードした。Bodipy標識したtRNA_{Lys}をタンパク質標識用に加えた。次に、マイクロメカニカルバルブを用いて各ユニットセルを単離した後にインキュベーションし、タンパク質の合成、合成後のタンパク質と表面ビオチン化抗his抗体との結合、標的RNAの溶媒和、タンパク質と標的RNAの平衡を得た。次に、溶液相の分子をすべて追い出しながら、「ボタン」膜を作動させてMITOMIを実施して表面結合複合体を捕捉した。軽く洗浄して捕捉されなかった未結合材料を除去した後、捕捉分子と発現タンパク質をアレイスキャナで検出した。データ点ごとに、bodipyのメジアンシグナルに対するCy3のメジアンシグナルを測定して結合RNAと発現タンパク質との比を求めた。

10

【0244】

図5aに示すように、このアッセイではHu DとAU3 RNAプローブとの強い結合が検出された；Gus-hisによるバックグラウンド結合は、Hu Dシグナルの7～16分の1であった。このバックグラウンドレベルは、RNAプローブ濃度によっては増加せず、すべてのチャンバから減算した(図11)。AU3プローブに対するHu Dの結合親和性は、AU3突然変異プローブに対するよりもかなり高かった：AU3結合の K_d を求めたところ、 23 ± 5 nMであり、AU3突然変異では 268 ± 95 nM(図5a)であった。これらの値は、ゲルシフトアッセイ^{21, 22}での過去の測定値と一致し、MITOMIマイクロ流体親和性アッセイをRNA-タンパク質相互作用について検証する役割を果たしている。ELA V様ファミリー由来のもうひとつのタンパク質であるHu RのRNA結合解析を図12に示す。

20

【0245】

NS4BはHCV RNAと結合、およびマイクロ流体による K_d の決定。この系を利用して、HCV NS4BがRNAに結合するか否かを試験した。NS4BはウイルスRNAの複製において重要であり、プラス鎖RNA合成はマイナス鎖RNAの3'末端から開始される可能性が高いため、3'マイナス末端と表示したプローブを用いて、この領域に対するNS4Bの結合を最初に試験した。NS5Aの両親媒性らせん(AH)とGFPのN末端との融合⁵を負の対照として利用した。このタンパク質は、膜にも結合し、GFPと抗GFPとの相互作用によってミクロソーム膜を装置表面に固着させることが可能である(図5c)。HCVマイナス鎖RNAの3'末端に対するNS4B結合の K_d を、 3.4 ± 1.0 nMで測定した(図5d)。これは、HCV NS4BがRNAに結合するという最初の証拠であるように思われる。大腸菌(E. coli)で発現された組換え形態の精製NS4Bを用いる従来のGSTプルダウンアッセイおよびRNAフィルタ結合アッセイも、この所見を裏付けた(図13)が、これらはあまり便利ではなく、本発明の方法によって提供される分析のタイプと高スループットフォーマットに影響されやすい。

30

【0246】

NS4Bは、マイナスウイルス鎖の3'末端に特異的に結合する。3種類の別のHCVプローブを用いて、観察されたNS4B-HCV RNA相互作用の基質特異性を測定した(図6a)。5'UTR posおよび3'UTR posで示すプローブが、ウイルスのプラス鎖の5'UTR配列と3'UTR配列にそれぞれ対応し、5'マイナス末端がマイナス鎖の5'末端に対応する。RNA結合実験を繰り返し、等モル濃度(3 nM)のさまざまなプローブへのNS4Bの結合を比較した。図6bから明らかなように、NS4Bは4つのHCVプローブすべてと結合するが、3'マイナス末端プローブに対するその見かけの親和性は、試験した他の3つのHCV RNA領域あるいは無関係のデルタウイルスRNAゲノム配列よりも5～12倍高い^{23, 24}(図6b参照)。これらの所見は、マイナス鎖の3'末端へのNS4B結合の特異性を決めるのがRNA配列であり、二次RNA構造の可能性が高いという結論を裏付けている。

40

【0247】

RNA結合とHCV複製には、NS4Bのアルギニンリッチ様モチーフが必須である。

50

タンパク質とRNAとの相互作用を担うさまざまな構造的モチーフが報告されている²⁵。このうちの1つが、アルギニンリッチモチーフ (ARM) である。ARMは、もともとはウイルス、バクテリオファージ、リボソームのタンパク質に見られる短い (10~20 アミノ酸) アルギニンリッチ配列として定義された (図7a)^{9, 25, 26}。アルギニン残基が優勢であること以外は、ARM配列間の同一性はほとんどない。続いて、アルギニンの含有数がそれよりも少ない、長めの配列からなるARM様モチーフが同定された^{9, 26}。NS4Bの一次配列を調べたところ、複数の正に荷電したアミノ酸があることが分かっている (図7b参照)。これらのアルギニン残基の大半が、NS4BのC末端領域の最後の71個のアミノ酸にある (図7bおよび図7c)。グリコシル化マーカーを用いる経験的トポロジー研究によれば、この領域が細胞質セグメントを形成するのではないかと予想される¹³。この領域の要素は、過去に説明されているARM様モチーフを確認するものでもある。

【0248】

一連の点変異を利用して、本発明者らは、NS4BによるRNA結合がその正に荷電した残基のいくつかによって媒介されるか否かを試験した。位置192~193におけるArg-ArgがAla-Alaに置換されたものを「RRa突然変異」と呼び、位置247~248に同様の置換があるものを「RRb突然変異」とした。図7dから明らかなように、RRb突然変異はNS4Bによる3' マイナス末端プローブへの結合を5分の1に減らしたが、RRa突然変異へのRNA結合活性は同一のプローブ濃度 (1.5 nM) で完全に消失した。これらの結果は、試験したアルギニン残基が試験管内にてNS4BによってRNA結合を媒介するという仮説を裏付けている。これらの正に荷電した残基もHCV複製に重要であるという仮説を検証するために、これらの変異を高効率のサブゲノムHCVレプリコンに導入し、これらのレプリコンを標準的なレプリコンコロニー形成アッセイでアッセイした。図16に示すように、RRb変異では複製が約45分の1に減ったが、RRa変異を持つレプリコンではRNA複製が完全に欠けていた。さらに、複製阻害の度合いは、さまざまな変異によって引き起こされるNS4B RNA結合障害の度合いと相関していた (図7d参照)。さらに、対照実験から、複製に対する劇的な作用は、発現の変化やタンパク質のミスローカリゼーションの結果ではないことが示唆された。むしろ、これらの微妙な変異は、NS4Bの鍵となる調節部位に影響しているように見える。これらの結果は、試験管内でのウイルス複製にはHCV RNAの効率的な結合が必要であるという結論を裏付けるものである。データベースにおいて現段階で入手可能な天然HCV単離物の配列のアライメントから、これらの正に荷電した残基が全HCV遺伝子型にわたって高度に保存されていることが分かる。この保存は、生体内での増殖性のウイルス感染のためにはRNA結合残基に要件があるという結論を裏付けるものである。

【0249】

阻害化合物の高スループットのスクリーニング。化合物ライブラリを、本発明の方法に従ってスクリーニングし、RNA-NS4B相互作用を阻害し得る小分子を同定した。図8aに示すように、小さな分子ライブラリの1280の化合物をエポキシコートスライドガラスにマイクロアレイとしてスポットした。上述したように、アレイを乾燥させ、整列配置してマイクロ流体装置に結合した。アッセイの残りの部分については、装置にNS4B-GFPをロードした後、Cy5-標識3' 末端マイナスRNAプローブをロードしたこと以外は、前と同じようにして実施した。一次スクリーニングでは、濃度約1 mMで化合物をスポットした。マイクロ流体装置を2つだけ用いて、ライブラリ全体を二重にスクリーニングした。1280の化合物のうち、104の化合物でNS4BによるRNA結合に対する阻害作用 (>90%阻害) が認められた。また、2つの試験した複製に有意な相違があったか、あるいは測定値のうちの1つまたは2つが技術的な理由で乱れた化合物が、110あった。

【0250】

一次スクリーニングで同定された214の化合物 (104+110) に対し、二次スクリーニングを実施した (図8a)。これは、小さめの装置を使用し、スポットした化合物

の濃度を一次スクリーニングの10分の1にして、化合物ごとに5組重複させてスポットしたこと以外は、同様に実施した。試験した214の化合物のうち、18の化合物がNS4BによってRNA結合を有意に阻害することが確認された(図8b)。同定された化合物の大半は、自己の4A標的RNA配列へのHuRタンパク質の結合を阻害せず(図12)、過去に説明されているHCVRNA標的：ウイルスのマイナス鎖の3'末端に対するHuR結合も阻害しなかった²⁷ことから、これらのヒットが特異的であると考えられた。スクリーニングの有効性を裏付けているこのデータおよび別のデータを図14にあげておく。

【0251】

HCVRNA複製のインヒビター。上記のスクリーニングで同定された阻害化合物のHCVRNA複製に対する生体内抗ウイルス作用を測定した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有する全長HCVRNAゲノムでの電気穿孔後²⁸、これらの化合物の濃度を高めながらHu h 7.5細胞を増殖させた。72時間の時点でルシフェラーゼアッセイを実施した。平行して、化合物の存在下での細胞の生存度をAlamarブルーベースのアッセイで評価した。この化合物のうちの6つで、単に細胞毒性によるものを超えた何らかの抗ウイルス作用を示した。塩酸クレミゾール(1-p-クロロベンジル-2-(1-ピロリジニル)メチルベンズイミダゾール塩酸塩)すなわちH1ヒスタミン受容体アンタゴニストが、HCVRNA複製を有意に阻害することが明らかになった。20μMの薬剤濃度でウイルス複製が10分の1に低下することが測定され、EC50は約8μM(図8c)であった。これらの濃度で、測定可能な細胞毒性はなかった(図8c)。感染性HCVクロ

10

20

【0252】

塩酸クレミゾール誘導体分子の力価および薬効の向上：本出願の本明細書に記載の方法を用いてスクリーニングを実施し、力価が高くなったクレミゾール類似体を同定した。このような一分子の例を図17に示す。この図は、以下のデータを有する。

図17A-塩酸クレミゾールの化学構造。

図17B-力価と薬効が向上したクレミゾール誘導体分子の化学構造。図17C-マイクロ流体で測定した場合のクレミゾール誘導体分子(●)および親の塩酸クレミゾール化合物(□)の*in vitro*阻害曲線。

30

図17D-HCV感染細胞のリアルタイムPCRアッセイで測定した、クレミゾール誘導体分子(●)および塩酸クレミゾール(□)の濃度を高めた場合のHCVRNA複製の用量応答曲線。

【0253】

バーは標準偏差を表す。

【0254】

見れば分かるように、この誘導体化合物では試験管内での力価が増加している(IC50が6nM、これに対しクレミゾールでは24mM)(図17C)。重要なことに、この化合物では、EC50が1μM(これに対し、クレミゾールでは8μM)の細胞でのHCVRNA複製に対する抗ウイルス活性も高くなった(図178D)。

40

【0255】

総合すれば、上記のデータを耐性突然変異の解析と組み合わせたところ、クレミゾールの作用機序についての遺伝学的、生化学的、薬理的にみて有力な証拠が得られる。さらに、これらのデータは、本発明の方法を用いれば一層強力な阻害分子を同定できる可能性があることを示している。

【0256】

クレミゾール耐性突然変異。クレミゾール耐性HCVRNA突然変異を選択することで、クレミゾールの抗ウイルス活性の作用機序をさらに立証した。樹立HCVレプリコン保持細胞

50

と、遺伝子型 1b サブゲノム HCV レプリコン (Bart 79I)³⁰ で新たに電気穿孔した Hu h 7 細胞とを、薬剤の存在下で継代し、化合物の存在下で増殖できる約 60 のコロニーを得た。11 の個々のコロニーが伸長に成功し、5~10 回継代され、細胞で複製している HCV RNA を配列解析した。また、クレミゾール耐性コロニーのプールから得た RNA を単離し、同様の解析を実施した。3 つのコロニーが、NS4B 領域にマッピングされた変異のあるレプリコンを持ち、6 つのコロニーがマイナス鎖 3' 末端 RNA 領域にマッピングされた変異のあるレプリコンを持つことが明らかになった。(図 17B のクレミゾール誘導体分子の存在下で選択された耐性変異の場所が、HCV ゲノム内の同様の場所にマッピングされたことに留意されたい)。また、NS4B とマイナス鎖 3' 末端の両方にマッピングされた変異を持つコロニーが 1 つあり、また、クレミゾールに耐性を与えている変異の場所が今のところ同定されないコロニーが 1 つあった。薬剤の非存在下で平行して継代させた 10 のレプリコンコロニーでは、このような変異は同定されなかった。

【0257】

クレミゾール耐性 NS4B 突然変異のうちの 2 つを詳細にキャラクタライズした。第 1 に、W55R を図 9a に示す。これは、細胞質的に配向された NS4B の予測セグメント内のアミノ酸 55 位でのトリプトファンに対するアルギニンの置換を伴う。この変異は、細胞でクレミゾール耐性表現型を与えるのに十分なものである：W55R 突然変異細胞から抽出された全細胞 RNA (図 9b) あるいは、この点変異と結合ルシフェラーゼレポーター遺伝子をコードする試験管内転写 J6/JFH RNA (図 9c) のいずれかでトランスフェクトされた Hu h 7. 5 細胞は、10 μ M のクレミゾールの影響を受けなかった。W55R 突然変異 J6/JFH RNA についてのクレミゾールの EC50 は約 18 μ M (野生型 RNA の EC50 の 2.25 倍) であった。NS3 プロテアーゼインヒビターに対する耐性のある他の HCV 突然変異と同様に³¹、W55R 突然変異の複製の絶対レベルは野生型ゲノムの場合よりも低かったことから、薬剤耐性変異が複製の適応度を損なうという犠牲を払って生じるものであることが分かった。

【0258】

この変異を NS4B-GFP ベクターにも導入し、得られたベクターの RNA 結合活性を、本発明の試験管内マイクロ流体アッセイで試験した。突然変異と野生型 NS4B タンパク質のどちらも 10 nM のクレミゾールの存在下で RNA 結合が約 2 分の 1 になったが、突然変異のベースライン RNA 結合が高くなるため、クレミゾールの存在下で突然変異に結合された RNA の残留量は、クレミゾールの非存在下で野生型に結合された量に匹敵した (図 9d)。さらに、図 9e から明らかなように、この突然変異は、 K_d 0.75 nM (これに対し、野生型 NS4B では 3.4 nM) でウイルス RNA に対する見かけ上の親和性が高くなっている。

【0259】

R214Q と呼ぶ第 2 のクレミゾール耐性変異を、耐性コロニーならびにプールされた耐性細胞で同定した。これは、NS4B の細胞質 C 末端セグメント内でのアミノ酸 214 位でのアルギニンに対するグルタミンの置換を伴う。この変異に対してなされた細胞解析と試験管内解析で第 1 の変異に対する同様の結果が得られ、ルシフェラーゼレポーター結合複製アッセイでの EC50 は 40.3 μ M (野生型 RNA の EC50 よりも約 5 倍高い)、試験管内結合アッセイでの K_d は 0.6 nM であった。おそらく、これらの変異は両方とも、ウイルス RNA に対する自らの親和性を高めるために NS4B のコンホメーションを変化させる。特に、試験管内での RNA 結合アッセイによって測定される K_d が、これを反映している。総合すれば、上記のデータは、クレミゾールの作用機序についての有力な遺伝学的証拠や生物学的証拠を提供するものである。

【0260】

考察

上記の結果から、HCV NS4B が RNA に結合し、この結合がウイルスゲノムのマイナス鎖の 3' 末端に特異的であるということが分かる。この相互作用の生体内での特異

10

20

30

40

50

性はいまだ定量的には判断されていないため、ここに報告した試験管内での結果の数値を外挿する際には通常の注意を払う必要がある。NS4Bのアルギニンリッチ様モチーフは、RNA結合とHCV複製に必須である。塩酸クレミゾールは、宿主細胞にとっての毒性がほとんどなく、NS4BのRNA結合の阻害によって媒介される、HCV RNA複製に対して有意な生体内抗ウイルス作用を持つことが明らかになっている。

【0261】

NS4Bは膜に関連して⁵おり、膜複製部位を誘導することが知られている⁴ため、そのRNA結合活性は、ウイルスゲノムをHCV複製コンパートメントに取り込むための機序を提供するものである。これは、膜固着マイナス鎖から新生プラス鎖を作る合成の開始を容易にすることもある。NS4Bは、複製複合体^{3 2}のNS5Bポリメラーゼまたは他の成分との相互作用によって、HCV RNAに対するポリメラーゼ複合体を呼び出して作用することもある。

【0262】

NS4BによるRNA結合に対するクレミゾールの試験管内でのIC50は、約24±1 nMであるのに対し、そのウイルス性複製のEC50は約8 μMである。細胞浸透性の低さは、NS4Bによる試験管内のRNA結合で測定されたIC50と、細胞で抗ウイルス作用について測定されたEC50との間に約400倍の差があることに起因している可能性がある。構造-活性関係(SAR)解析後の薬剤送達の改善と化合物の最適化によって、一層強力な抗ウイルス剤が得られると想定され、本発明のマイクロ流体系およびスクリーニング方法によってこのプロセスを容易にすることが可能である。

【0263】

この研究は、マイクロ流体アプローチの用途を示すものでもある。マイクロ流体親和性アッセイには、現段階で用いられている方法に比していくつかの重要な利点があり、それがゆえに、薬剤、特に膜結合標的の発見のための将来性がある汎用的なツールになる。第1に、マイクロソーム膜の存在下での哺乳類網状赤血球ライセートによるタンパク質合成のおかげで、タンパク質の畳み込みに必要な天然の状態が得られる。第2に、マイクロ流体アッセイを用いると、高レベルのタンパク質発現と精製が不要になり、現段階で用いられている方法に固有の問題がなくなる。第3に、このアッセイは、一過性かつ低親和性の相互作用^{1 5}を検出することができる。第4に、マイクロ流体装置は、多くの並列測定が可能であり、よって、高スループットのスクリーニングに使用可能である。最後に、この装置の製造に用いられるエラストマーには周知の化学的相溶性の問題があるにもかかわらず、この装置および方法を用いてうまくスクリーニングして所望の薬理学的特性を備えた小分子を発見することが可能である。

【0264】

HIVおよび結核と同様に、HCVの効果的な薬理学的制御は、独立したウイルス特異的標的に対する複数の薬剤のカクテルで最もよく実現される可能性が高い。中程度のNS4Bインヒビターと既存のおよび／または他の出現している抗HCV作用剤とを組み合わせることで、現行のウイルス学的応答速度を高めるための魅力的なパラダイムが提示される。クレミゾールよりも強力なインヒビターを得ることは可能であるが、クレミゾールはすでにヒトで広範囲にわたって用いられている（適応は異なるが）ため、抗HCV治療薬としてすぐに用途が考えられる上、本発明による次世代抗HCV戦略の重要な構成要素ともなり得るものである。

【0265】

方法

プラスミド：標準的な組換えDNA技術を用いて、すべてのプラスミドを構成および精製した。PCRで増幅された全領域を自動DNA配列決定によって解析した。大規模細菌培養からプラスミドDNAを調製し、Maxiprepキット(Marligen Biosciences)で精製した。New England Biolabsから制限酵素を購入した。

【0266】

cDNAクローンのORFeomeライブラリ (Open biosystems) から、HuRおよびHuDのオープンリーディングフレーム (ORF) を得た。ゲートウェイ技術 (Invitrogen) を用いて、C末端V5-hisタグの付加が可能になるようにこれらのORFを発現ベクターp cDNA-Dest 40 ベクター (Invitrogen) に挿入した。

【0267】

インフレームでC末端GFPに縮合された遺伝子型1aのNS4Bをコードするプラスミドp cDNA-NS4B-GFPについては、過去に説明がなされている⁵。このプラスミドに、部位特異的突然変異誘発 (QuickChangeキット (Stratagene)) を使用) によって、変異RRa、RRbおよびW55Rを導入した。過去に報告されているようにして、プラスミドNS5A (AH) GFPを構成した。Gus-hisベクターをRocheから入手した。

10

【0268】

EcoRV制限部位を含有するプライマーを用いてBart79Iプラスミド³³からの5' UTR陽性配列を増幅し、EcoRVで消化し、p cDNA3.1 (Invitrogen) の対応する部位にライゲーションすることで、ウイルスのプラス鎖の5' UTRをコードするプラスミドp cDNA3.1-5' UTR posを生成した。EcoRVフランクインサートを逆向きにライゲートしたこと以外は同様にして、マイナスRNA鎖の3' 末端領域をコードするプラスミドp cDNA3.1-3' マイナス末端を生成した。

20

【0269】

挿入した遺伝子がHindIIIおよびXhoI制限部位でフランクされたものであること以外は同様にして、プラスミドp cDNA3.1-3' UTR posおよび5' マイナス末端を生成した。

【0270】

NheIフランクHDV配列を、XbaIで切断したpSPT19ベクター (Roche Diagnostics) に挿入することで、デルタウイルスゲノムRNA配列をコードするベクターをクローニングした^{23, 24}。

【0271】

全長HCVゲノムからなり、ウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼを発現するプラスミドFL-J6/JFH-5' C19R luc2AUbiは、Charles M. Rice博士からの贈り物²⁸であった。このプラスミドに、部位特異的突然変異誘発 (QuickChangeキット (Stratagene)) を使用) によってW55R変異を導入した。

30

【0272】

試験管内 RNA転写ならびに、蛍光標識および放射性標識。ウイルスのマイナス鎖とプラス鎖の5' 末端および3' 末端領域のプラスミドDNAを、XbaIで直線化した。デルタゲノム配列のプラスミドDNAを、XbaIで直線化した。直線化後のプラスミドをプロテイナーゼKで処理した後、フェノールクロロホルム抽出し、エタノールで沈殿させた。DNAを最終濃度が1 µg/µlになるようにRNaseフリー水に再懸濁させた。4 µgのDNAを、製造業者のプロトコールに従ってT7 MEGAScript (Ambion) での転写用のテンプレートとして使用した。5UのRQ1 DNase (Ambion) を加えてテンプレートDNAを消化し、37°Cで15分間インキュベーションした。取り込まれなかったリボヌクレオチドを、Micro Bio-Spin P-30カラム (Bio-Rad) でのサイズ排除によって除去し、転写RNAをフェノールクロロホルムで抽出した後、エタノール中で沈殿させた。RNAペレットを70%エタノールで洗浄し、H₂Oに再懸濁させた。260nmでの光学密度を測定して、RNA濃度を判断した。1%アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム染色で、RNAの完全性とその濃度を確認した。

40

【0273】

50

Label ITキット (Mirus) を製造業者のプロトコールどおりに用いて Cy 5 で RNA 配列を標識した後、マイクロスピナラム (Mirus) で精製し、エタノール沈殿させた。260 nm と、Cy 5 (650 nm) の場合は λ_{MAX} で、核-染料コンジュゲートの分光光度吸光度を測定して、RNA 分子 1 つあたりの蛍光標識数を求めた。これはプローブ長に比例し、結合実験結果の調節に使用された。

【0274】

HuR および HuD による RNA 結合の研究に用いた Cy 3 - 標識 RNA プローブを IDT から購入した。

【0275】

過去に説明されているようにして ^{34}P での RNA プローブの放射性標識を実施した。

10

【0276】

装置の設計：装置の製造と設計は、基本的に説明がなされているように実施した¹⁵。簡単に説明すると、バルブを作動させるのに必要なすべてのチャンネルがある「制御」層を、制御対象となるチャンネルのネットワークを含む「フロー」層の上に配置する。生物学的アッセイならびに流体操作はすべて、フロー層で実施する。制御チャンネルがフローチャンネルと交差する部分にバルブを作製する。こうして2本のチャンネル間の結合部分に得られる薄い膜は、油圧作動によって変形可能である。多重バルブ系を用いることで、多数のエラストマーマイクロバルブで、これらの装置内での複雑な流体操作を行うことができるようになる。これらの装置への流体の導入は、シリコンに穿孔した穴に挿入されたスチールピンを介して達成される。コンピュータ制御した外部のソレノイドバルブによってマルチプレクサを作動させることができ、それによって複雑な多数のマイクロバルブの複雑なアドレス指定が可能になる。各ユニットセルは、3つのマイクロメカニカルバルブならびに「ボタン」膜 (図10) によって制御される。各ユニットセルの「ボタン膜」は、2つの「サンドイッチ」バルブ間でフローチャンネル内の円形部分をマスクする。マイクロアレイを整列配置して装置に結合すると、スポット材料 (RNA プローブまたは阻害化合物) を各ユニットセルの「RNA チャンバ」内に位置決めすることができるようになる。このようにしておけば、「ネックバルブ」を制御してフローチャンネルに対してオープンにすることができる。使用した装置は、640 ユニットセルまたは2400 ユニットセルのいずれかであった。

20

30

【0277】

RNA 結合アッセイ。使用したアプローチは、タンパク質-DNA 相互作用について過去に説明されている方法¹⁵を改変したものである (図10)。

【0278】

1. 可溶性タンパク質：A. RNA のアレイ化と装置の整列配置。まず、CMP 3B ピン (TeleChem International, Inc.) を用いる Omni Grid Micro (Gene Machines) マイクロアレイヤーによって、Cy 3 - 標識標的 RNA 配列 (IDT) の希釈系列をエポキシコートガラス基板スライド (CELL Associates) に列間と行間がそれぞれ 680 mm および 320 mm のマイクロアレイとしてスポットした。各試料溶液には、エポキシ官能基に対する標的 RNA の共有結合を防止するためならびに、整列配置時の可視化目的で、dH₂O 中に 1% BSA を含有していた。スポット後、アレイを GenePix 4000b (Molecular Devices) で品質制御した。次に、SMZ1500 (Nikon) 立体鏡にてアレイを手でマイクロ流体装置と整列配置させ、40°C に加熱したプレート上で、暗所にて一晚結合した。

40

【0279】

B. 表面化学 (図10c)。すべての装置を制御ラインでは 10 から 15 psi の間、フローラインでは 4 から 6 psi の間で駆動した。最初の表面誘導体化ステップでは、チャンババルブを閉じたままにして、スポットした RNA 標的のあるチャンバに液体が入るのを防止した。最初に、2 mg/mL の dH₂O に再懸濁させたビオチン化 BSA (Pi

50

er ce) をすべてのチャンネルに30分間流すことで、到達可能な表面部分をすべて誘導体化した後、PBSで10分間洗浄した。次に、500 µg/mLのNeutravidin (Pierce) をPBSに入れた溶液を20分間表面に流した後、PBSで10分間洗浄した。次に、「ボタン」膜を閉じ、PBS洗浄をさらに5分間継続した。続いて、ボタンでマスクした60 µmの円形部分以外の残っているすべての到達可能な表面部分を、上記と同一のビオチン化溶液で30分間不動態化した後、PBSで10分間洗浄した。最後に、ビオチン化-5-ヒスチジン抗体 (Qiagen) の2% BSA溶液をPBSに入れた1:1溶液を2~5分間ロードし、その後で「ボタン」膜を開いて流れを20分間継続し、事前にマスクした円形部分の特異的官能化を可能にした。その後、PBSで10分間洗浄し、表面誘導体化の手順を終了した。

10

【0280】

C. タンパク質合成およびMITOMI。次に、標準的な25 µLのTNT T7カップリングコムギ胚芽エキス混合物 (Promega) を調製し、1 µLのtRNA_{Lys}-bodipy-fl (Promega) および適当なタンパク質 (HuR、HuDまたはGus) をコードする2 µLのプラスミドDNAテンプレートでスパイクした。混合物をすみやかに装置にロードし、5分間フラッシュした後、チャンバのバルブを開いてチャンバの行き止まりの液溜めにコムギ胚芽エキスが充填されるようにした。チャンバのバルブを再度閉じ、さらに5分間フラッシュを続けた。次に、各ユニットセルを隔てている隔離バルブを閉じた後、チャンババルブを開いて、拡散によってユニットセルを平衡させた。温度制御した顕微鏡ステージで装置全体を30℃まで加熱し、最大90分間インキュベートしてタンパク質合成、表面結合ビオチン化-5-ヒスチジン抗体へのタンパク質の結合、標的RNAの溶媒和、タンパク質と標的RNAとの平衡を終了させた。次に、「ボタン」膜ならびにチャンババルブを閉じて、溶液相の分子をすべて追い出しながらMITOMIを実施し、表面結合複合体を捕捉できるようにした。半径方向に閉鎖することで、2つの界面間に溶媒ポケットが形成されないようにし、検出対象となる分子相互作用の平衡濃度を保ったままでゼロ不感 (zero dead) 容量を効果的に生成している。続いて5分間のPBS洗浄をして、捕捉されなかった未結合材料を除去した。次に改変したarrayWorxe (Applied Precision) マイクロアレイスキャナで装置を画像化し、タンパク質合成と捕捉された分子を検出した。

20

【0281】

D. 画像およびデータ解析。画像はいずれもGenePix 3.0 (Molecular Devices) で解析した。各実験で、MITOMIの後と最終PBS洗浄後に画像を得た。これを使って表面結合タンパク質 (FITCチャンネル) ならびに表面結合標的RNA (Cy3チャンネル) の濃度を判断した。各ユニットセルでは、Cy3のメジアンシグナルとbodipyのメジアンシグナルとの比からなる単一のデータ点を生成したため、表面結合RNA対表面結合発現タンパク質の比が表されている。複数のデータ点からのデータを平均し、その標準偏差を求めた。さらに、結果を1に正規化した。試験したプローブごとに10~20回の重複を含めた。対照タンパク質であるGus-his (Roche) を各実験に含め、同一の解析を実施した。存在する場合、Gus-hisで検出されたシグナルをバックグラウンド減算に利用した。

30

40

【0282】

2. 膜会合タンパク質の場合。NS4BによるRNA結合の検出を、以下の変更を加えた以外は上述したプロセスと同様に実施した。マイクロ流体装置にロードする前に、カップリングさせた転写/翻訳ウサギ網状赤血球系 (Promega) を用いてNS4Bを発現させた。反応混合物に2 µLのイヌミクロソーム膜 (Promega) を加えて、適当なタンパク質の量込み込みを可能にした。NS4B-GFPコンストラクトを使用したため、反応混合物にtRNA_{Lys}-bodipy-flの必要性はなかった。ビオチン化抗GFP抗体 (Abcam) を使用して、ボタンで画定されて保護された円形部分の特異的に官能化した。表面結合抗GFP抗体との相互作用によってタンパク質をチップに固着させた。表面結合タンパク質とCy5-標識HCV RNAプローブをチップにロードし、

50

50 mMのHepes KOH (pH 6.8) 緩衝液中で5～20分間インキュベートしておいた。次に、MITOMIを実施した後、Hepes KOH (pH 6.8) 緩衝液中で軽く洗浄した。次に、上述したようにして装置をスキャンし、結果を定量化した。NS4B-GFP突然変異およびNS5A(AH)-GFPを同じようにしてアッセイした。NS5A(AH)-GFPで検出されたシグナルをバックグラウンド減算に利用した。

【0283】

阻害化合物ライブラリのスクリーニング。OmniGrid Micro (GeneMachines) マイクロアレイヤーとCMP3Bピン (TeleChem International, Inc.) を用いて、ジメチルスルホキシド (DMSO) に可溶化したLopac library (Sigma) の1280の化合物をエポキシコートガラス基板スライド (CEL Associates) にマイクロアレイとしてスポットした。一次スクリーンでは、化合物を高濃度 (約1 mM) で二重にスポットした。アレイを乾燥させ、整列配置してマイクロ流体装置に結合した。一次スクリーニングには、大きな装置 (装置1台あたり2400ユニットセル) 2つを使用した。残りの手順は、上述した (RNA結合アッセイ) ものと同様に実施した。簡単に説明すると、装置に表面パターンニングをほどこして、各ユニットセル内にビオチン化抗GFP抗体で覆われた円形部分が得られるようにした。次に、マイクロソーム膜 (Promega) の存在下で、カップリングされた転写/翻訳ウサギ網状赤血球系 (Promega) を用いて、NS4B-GFP発現調製した「オフチップ」をチップにロードし、表面ビオチン化抗GFP抗体に結合させた。次に、Cy5-標識3' neg末端RNAプローブを濃度1.5 nMでロードした。各ユニットセルを単離した後、30分間インキュベーションして、タンパク質を表面ビオチン化抗GFP抗体に結合させ、ライブラリ化合物の溶媒和、タンパク質と標的RNAとの平衡を可能にした。次に、溶液相の分子をすべて追い出しながら、表面結合複合体を捕捉してMITOMIを実施した。軽く洗浄して捕捉されなかった未結合材料を除去した後、装置をスキャンして結果を解析した。各データ点ごとに、bodipyのメジアンシグナルに対するCy3のメジアンシグナルを測定して結合RNAと発現タンパク質との比を求めた。これらの結果を、阻害化合物を含まないユニットセルで測定したシグナルに対して正規化した。一次スクリーニングでは、90%を超える阻害が阻害のカットオフと定義された。このカットオフを超えた104の化合物と、結果が不明瞭だった別の110に対し、二次スクリーニングを実施した。これは、小さめの装置 (各640ユニットセル) を2つ使用し、スポットした化合物の濃度を一次スクリーニングの10分の1にして、化合物ごとに5組重複させてスポットしたこと以外は、同様に実施した。2.5倍を上回る阻害を有意とみなした。このスクリーニングで同定された18の化合物のHCV RNA複製に対する抗ウイルス作用を、さらに分析した。

【0284】

試験管内 RNA結合のIC50の判定。IC50を正確に測定するために、フローチャネル内の化合物濃度を一定に保ちながら、阻害化合物の段階希釈物を連続フローによってマイクロ流体装置にロードした。これによって、不完全な可溶化および/または不完全なPDMSへの化合物の結合が原因で想定されるスポットした化合物の減少を回避しやすくなった。この実験は基本的に、阻害化合物の存在下またはその非存在下で発現されるタンパク質とCy5-標識HCV RNAプローブを装置でインキュベートしたこと以外、膜貫通タンパク質のRNA結合アッセイで説明したようにして実施した。統計解析の章で後述するようにして、IC50を測定した。

【0285】

組換えNS4Bの発現および精製。GST-NS4BおよびGSTを大腸菌 (E. coli) BL21で発現させ、他のところで説明されている¹¹ 11のようにして精製した。NS4BをインフレームでN末端の6 his-MISTICタンパク質 (1Mタンパク質コンストラクトの翻訳用の膜組み込み配列)³⁵ と縮合させた。mistic-NS4Bプラスミドで形質転換した大腸菌 (E. coli) の一晚培養を400 mlの新鮮な培地で1:100に希釈し、37℃でOD0.8まで増殖させた。次に、イソプロピルーβ-D-

10

20

30

40

50

チオガラクトピラノシド (IPTG) (Invitrogen) を最終濃度が 0.1 mM になるように加えた。37℃で3時間増殖させた後、細胞をペレット化し、30 ml の溶解緩衝液 (50 mM の NaCl、50 mM の Tris HCl (pH 8)、100 mM のイミダゾール、10 mM のデシルマルトシド、コンプリート EDTA フリープロテアーゼインヒビター (Roche Applied Science)) に再懸濁させた。細胞を French Press で圧力 10,000 psi にて 1 分で 1 サイクル溶解させた後、12,000 g で 4℃にて 5 分間遠心処理した。上清をニッケルカラム (Amersham) にロードした。洗浄後、400 mM のイミダゾールを含有する緩衝液にタンパク質を溶出させた。グリセロールを最終濃度 20% で加え、試料を -20℃で保管した。SDS-PAGE で精製を監視した。RC-DC アッセイ (Bio-Rad) を用いてタンパク質の総濃度を測定した。6-his (Santa Cruz Biotechnology) および NS4B (Virosstat) に対するモノクローナル抗体を用いるウェスタンブロット解析で、NS4B-misic を同定した。同様にして 6-his-misic を発現させ、精製した。

【0286】

GST プルダウンアッセイ。過去に説明されている戦略³⁶と同様にして、³²P-標識試験管内転写 HCV RNA (ウイルスのマイナス鎖の 3' 末端と対応) と結合緩衝液 (10 mM の DTT、10 mM の Na HEPES (pH 7.4)、33 mM の NaCl、0.1 mM の EDTA、10 mM の MgCl₂) とを含有する反応混合物 50 µl 中に、1 µg の精製 GST-NS4B または GST を 37℃で 1 時間インキュベートした。次に、50 µl の tRNA プレコートグルタチオン-アガロースビーズ (Sigma) を加えた後、4℃で 1 時間インキュベーションして、GST をビーズに結合させた。続いて、ビーズを結合緩衝液中で 3 回洗浄し、試料アリコートの液体シンチレーションカウンタで結合 RNA を測定した。T7 RNA ポリメラーゼの非存在下で調製した RNA プロブを用いる対照インキュベーションを、バックグラウンド減算用に利用した。

【0287】

RNA フィルタ結合アッセイ。基本的には説明されているようにして³⁴アッセイを実施した。簡単に説明すると、さまざまな濃度の misic-NS4B タンパク質または misic 対照を、3.3 nM の ³²P-標識試験管内転写 HCV RNA プロブと一緒に、最終容量 40 µl の結合緩衝液 (50 mM の HEPES pH 7.0、50 mM の NaCl、1 mM の MgCl₂、10 ng/µl の tRNA、0.2 mM のデシルマルトシド) 中で、30℃で 1 時間インキュベートした。膜をあらかじめ結合緩衝液に浸し、上から下まで以下の構成となっているドットプロット装置 (Schleicher & Schull) に組み入れておいた。ニトロセルロース (Biorad)、Hybond N+ (Amersham Biosciences)、Whatman の 3 mm 濾紙。結合反応物をドットプロット装置にロードし、膜で濾過した。洗浄後、膜を空気乾燥させ、蛍光画像形成法で可視化した。結果は、ニトロセルロース膜で検出されたシグナルを、ニトロセルロースと Hybond 膜で検出されたシグナルの合計で割って求めた結合 RNA の比率を表す。

【0288】

細胞培養と電気穿孔。1% L-グルタミン (Gibco)、1% ペニシリン、1% ストレプトマイシン (Gibco)、1X 非必須アミノ酸 (Gibco)、10% ウシ胎仔血清 (Omega Scientific) を補充したダルベッコ変法基礎培地 (Gibco) に、HuH-7.5 細胞を維持した。0.05% トリプシン-0.02% EDTA で処理した後に細胞系を週に 2 回継代し、希釈率 1:5 で播種した。サブコンフルエントな HuH-7.5 細胞をトリプシン処理し、700 g で 5 分間の遠心分離によって回収した。次に、細胞を氷冷 RNase フリー PBS (BioWhittaker) で 3 回洗浄し、細胞 1.5 x 10⁷ 個/ml で PBS に再懸濁させた。T7 MEGAscript キット (Ambion) を用いて、XbaI-直線化 DNA テンプレートを試験管内転写した後、基本的には上述したようにして精製して (試験管内 RNA 転写および蛍光標識)

、電気穿孔用の野生型または突然変異FL-J6/JFH-5' C19R luc2A Ubiquitin RNAを生成した。5 μ gのRNAを2mm間隔のキュベット(BTX)で400 μ lの洗浄Hu h-7.5細胞と混合した後、BTX-830電気穿孔装置ですみやかにパルスのかけた(0.82kV、99 μ sのパルスを5回)。25℃で10分間の回復後、パルスのかけた細胞をあらかじめ温めた成長培地10mlで希釈した。何度かの電気穿孔での細胞を共通のストックにプールし、6ウェルのプレート(1ウェルあたり細胞5 $\times$ 10⁵個)に播種した。24時間後、培地を交換し、スクリーニングで同定されたさまざまな阻害化合物(Sigma)の段階希釈物の存在下にて細胞を増殖した。同定された18の化合物のうち、商業入手可能な17の化合物を分析した。未処理の細胞を、水溶性化合物の負の対照として用いた。DMSOに可溶化された化合物では、未処理の細胞を、対応する濃度の溶媒の存在下にて負の対照として増殖させた。培地を毎日交換した。処理の72時間後、細胞に対してalamarブルーベースの生存度アッセイおよびルシフェラーゼアッセイを実施した。

10

【0289】

生存度アッセイ。72時間の処理後、10%Alamarブルー試薬(TREK Diagnostic Systems)の存在下、細胞を37℃で3時間インキュベートした。次に、プレートをスキャンし、FLEXstation II 384(Molecular Devices, Inc.)を用いて蛍光を検出した。阻害化合物の溶媒が、水(DMSO中にはない他の化合物)か、またはDMSO(D042, (アリルノラボモルヒネ)、R-108、トロピカミド、サリドマイド、グリブリド、LFM-A13)かに応じて、未処理試料またはDMSOの存在下にて増殖させた試料に対して、シグナルをそれぞれ正規化した。

20

【0290】

ルシフェラーゼアッセイ。ウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼアッセイ(Promega)を用いて、ウイルスRNA複製を判断した。上述した生存度アッセイを実施した同じ試料を、このアッセイで解析した。製造業者のプロトコールに従って、細胞を氷冷PBSで洗浄し、プレートを搔爬して250 μ lの氷冷ウミシイタケ(Renilla)溶解緩衝液に入れた。次に、細胞可溶化物20 μ lを96ウェルのプレートにロードした。アッセイ基質を含有するウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼアッセイ緩衝液100 μ lを注入し、Berthold LB 96 Vルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。上記と同様に、未処理試料あるいは、対応する濃度のDMSOの存在下にて増殖させた試料に対して、シグナルを正規化した。

30

【0291】

100u/mlのインターフェロン α B2(PBL biomedical labs)で処理した試料で検出されたルシフェラーゼ活性を、72時間の処置で3つのlog低減が認められる陽性対照として使用した。実験を4回繰り返し、毎回三重にした。式 $Y = a + (b - a) / (1 + 10^{(x - c)})$ (BioDataFit, Chang Bioscience, Inc)を用いてデータを3パラメータのロジスティック曲線にフィットさせて、IC50を測定した。

【0292】

リアルタイムPCR。説明されているように²⁹、5 $\times$ 10⁴ Hu h7.5細胞に、1 $\times$ 10⁴ TCID50/mlで滴定した細胞培養増殖HCVを感染させた。感染2時間後、細胞を培養液中で3回洗浄した。次に、細胞を毎日さまざまな濃度のクレミゾールで処理した。72時間後、上述した試料の生存度アッセイを実施し、続いてTRIzol試薬(Invitrogen)を加えて、製造業者の指示どおりに全細胞RNAを3回重複して抽出した。次に、ランダムヘキサマーとSuperscript II逆転写酵素(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて逆転写を実施した。こうして得られたcDNAに対してリアルタイムPCRを実施し、各試料のHCVおよびアクチンRNAの量を(別々の反応で)定量化した。試験管内にて転写したHCV RNAおよびヒトアクチン標準(Applied Biosystems, Foster Ci

40

50

ty, CA)を用いて標準を作成した。プライマーAGAGCCATAGTGGTCT (配列番号17) およびCCAAATCTCCAGGCATTGAGC (配列番号18) とプローブ6-カルボキシフルオレセイン-CACCGGAATTGCCAGGACGACCGG-6 (配列番号19) カルボキシテトラメチルローダミンを用いてHCVを定量化した。β-アクチン対照試薬 (Applied Biosystems) を製造業者の指示どおりに用いてアクチンを定量化した。HCV RNAレベルをアクチンレベルに調節し、未処理試料に対して正規化した。

【0293】

耐性突然変異の選択。樹立HCVレプリコン保持細胞と、遺伝子型1bサブゲノムHCVレプリコン (Bart 79I) ³⁰ で新たに電気穿孔したHu h7細胞とを、ネオマイシンの存在下かつクレミゾールの濃度を高めながら (1~16 μM) 継代した。化合物の存在下で増殖できたコロニーを単離し、5~10継代ほど繁殖させた。(約60のうち) 11のコロニーが継代後も生き残り、過去に説明されているようにして配列解析を実施した¹¹。

【0294】

全細胞RNA電気穿孔。TRIzol試薬 (Invitrogen) を使用して、クレミゾール耐性レプリコンクローンおよび未処理のレプリコン細胞から全細胞RNAを抽出した。等量的全細胞RNA (50 μg) を、上述したようにしてHu h7.5細胞に電気穿孔した。クレミゾールの存在下または非存在下で3週間、細胞をG418選択下で増殖させた。固定とクリスタルバイオレットでの染色後に、Image J (NIH) を用いてコロニー数を求めた。

【0295】

統計解析。平衡結合；非線形最小二乗回帰フィッティング (BioDataFit, Chang Bioscience) によって、 $Y = a * X / (b + X)$ (aおよびbは、それぞれ最大結合と K_d を示す) を説明する式にデータをフィットさせ、解離平衡定数を求めた。式 $Y = a + (b - a) / (1 + 10^{(X - c)})$ (a、b、cはそれぞれ、最小結合、最大結合、logEC50を示す) (BioDataFit, Chang Bioscience, Inc) を用いて3パラメータのロジスティック曲線にデータをフィットさせ、IC50を測定した。

【0296】

付加情報

較正曲線：乾燥したスポットRNAプローブの適切な可溶化を確認し、溶媒の大部分が、マイクロ流体装置を構成するポリジメチルシロキサン (PDMS) に貼り付いた可能性を排除するために、較正曲線を生成した。濃度が分かっている可溶性標識RNAプローブを、連続フローによって装置にロードし、複数のユニットセルからのCy3シグナルの平均値を平均によって求めた。この曲線に基づいて、アッセイで用いた標的RNA配列の実濃度を計算した。平均で、実際のアッセイ濃度はスポットしたものの 0.55 ± 0.02 であった。ここで、典型的なプリント容量とユニットセル容量との比に基づいて、同様の係数 (0.57) を計算した。提示したデータはすべて、この係数で調整した。

【0297】

高イオン強度の緩衝液でのRNA結合実験：RNA結合実験で使用する緩衝液のイオン強度が、タンパク質-RNA相互作用に影響する場合がある。RNA結合アッセイで検出された高親和性相互作用が、低イオン強度緩衝液による静電相互作用亢進の結果ではないことを確認するために、高 (150 mM) イオン強度の条件を用いるマイクロ流体でNS4BのRNA結合実験を実施した。PBS (137 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、10 mMの Na_2HPO_4 、2 mMの KH_2PO_4) または150 mMのHepesの存在下でのNS4BによるRNA結合は、他者によるRNA結合アッセイで一般に用いられている50 mMのHepes緩衝液を用いて検出されたものと同様であった (J Biol Chem 280, 36417~36428 (2005) および J Virol 80, 9865~9875 (2006) (各々本明細書に援用する))。高イオン強度

条件でのHCVマイナス鎖RNAの3'末端に対するNS4B結合の K_d を測定したところ、 6.6 ± 3.3 nMであった（低（50 mM）イオン強度条件下での K_d 3.4 ± 1.0 nMと対比）。これらの結果から、観察されたRNA結合には、わずかな静電成分があることが示唆される。

【0298】

ATAは、NS4BによるRNA結合を用量依存的に阻害する：ライブラリをスクリーニングする前に、NS4BによるHCV RNA結合を薬理的に阻害可能であるかどうかを判断した。アウリントリカルボン酸（ATA）は、タンパク質と核酸との相互作用を阻害することが分かっている化合物である（Nucleic acids res 4, 3055~3064（1977）（本明細書に援用する））。よって、ATAはHCV RNAに対するNS4Bの結合を阻害するはずである。この仮説を検証するために、ATAの濃度を高めながらNS4B RNA結合アッセイを繰り返した。特に、ATAは、NS4BによるHCV RNAの結合を用量依存的に阻害することが明らかになり、IC50は 0.49 ± 0.01 μ M（p値-0.0003）（図14）であった。

【0299】

この結果と一致して、ATAは、LOPACライブラリのスクリーニングで同定された18の化合物のうちの1つであった。この化合物は、NS4BのRNA結合活性を阻害することがすでに分かっているため、有効性のスクリーニングでは、この化合物が有用な内部対照として機能した。

【0300】

小分子スクリーニングで同定されたヒットの特異性：小分子スクリーニングで同定されたヒットの特異性を判断するために、HuRタンパク質（本発明者らのRNA結合アッセイの検証に使用したヒトRNA結合タンパク質のうちの1つ）を選択した。興味深いことに、その標的RNA配列4A（図12）への結合以外、このタンパク質は、マイナスHCV鎖の3'末端に結合することがすでに他者によって示されていたものであった（Virology 274, 378~390（2000）（本明細書に援用する））。コンセンサス4A RNA配列へのHuRの結合を、NS4BによってRNA結合を阻害することが分かっている阻害分子の存在下にて試験した。濃度0.1 mMのクレミゾールをはじめとして、大半のヒットで、RNA結合に対する阻害作用は何ら検出されなかった。同様に、0.1 mMの同定された化合物も、マイナスHCV RNA鎖の3'末端に対するHuRの結合に阻害作用を持たなかった。他のヒットとは対照的に、タンパク質-核酸相互作用の非特異的インヒビターとして周知のATAが、マイナスHCV鎖の3'末端と4Aの両方に対するHuR結合を有意に阻害した。これらの結果は、クレミゾールをはじめとして同定されたヒットが特にNS4BによるRNA結合に対して特異的であるという結論を裏付けるものである。

【0301】

実施例1の図の説明

図4Aは、5, 6-二置換クレミゾール化合物を合成する基本方法の実施形態を示す。図4Bおよび図4Cは、2つの5, 6-二置換クレミゾール化合物を合成する実施形態を示す。

【0302】

図5a~図5dは、マイクロ流体プラットフォームで測定したタンパク質-RNA相互作用から得られる結果を示す。図5aは、RNAへのHuRの結合の研究に用いる標的RNA配列を示し、マイクロ流体親和性解析を用いて測定した K_d 値と、ゲルシフトアッセイによって過去に測定した値^{21, 22}とを比較した表である。ND=判定せず。図5bは、マイクロ流体親和性アッセイで求めた、AU3（●）およびAU3突然変異（△）RNAの濃度を増した場合のHuRの結合曲線を示す。2つの独立した実験で測定した10~20回分を正規化した平均値を各グラフに示す。エラーバーが標準偏差を示す。図5cは、マイクロ流体チップからの蛍光画像のデジタル画像である。左：NS4B-GFPおよびNS5A（AH）-GFPが、抗GFPとのその相互作用によってマイクロ流体装置表

面に対してアンカー結合されている；中央：ウイルスのマイナス鎖の3'末端領域に対応するRNAプローブをCy5で標識し、装置でタンパク質と一緒にインキュベートした。結合RNAを表すCy5シグナルが軽く洗浄した後に認められる；右：結合RNA対タンパク質比を表すCy5シグナルおよびGFPシグナルの重層。図5dは、RNAプローブの段階希釈に対するNS4Bの*in vitro*結合曲線を示すグラフである。

【0303】

図6aおよび図6bは、NS4BがHCVマイナス鎖RNAの3'末端と特異的に結合することを示す結果を示す。図6aは、本開示の実施形態のために設計された4つのHCVプローブを示す。5'UTR（非翻訳領域）*pos*および3'UTR *pos*はそれぞれ、ウイルスのプラス鎖の5'UTR配列と3'UTR配列にそれぞれ対応し、5'マイナス末端および3'マイナス末端が、マイナス鎖の5'および3'末端領域にそれぞれ対応していた。HCVオープンリーディングフレーム（ORF）に対するこれらの配列の位置を示す。図6bは、等モル濃度の4つのHCVプローブおよび非HCV RNA（デルタウイルスRNA）プローブへの分画NS4Bの結合を示すグラフである。マイナスゲノム鎖の3'末端が>5xまで好ましい。

【0304】

図7a～図7dは、NS4B内でのRNA結合ドメインの同定と、結果とを示す。図7aは、RNA結合を与えることが知られているアルギニンリッチ配列がウイルスタンパク質およびバクテリオファージタンパク質に見いだされたことを示す^{9, 25, 26}。アルギニンリッチ様モチーフと極めてうまく一致するNS4Bの末端ループの要素を一番下に示す。列挙したタンパク質は、HIV RevおよびTat²⁵；λ、φ21およびP22バクテリオファージ抗ターミネーターNタンパク質²⁵；タケモザイクウイルス（BamV）²⁶およびポリオウイルス2C⁹のトリプル遺伝子ブロックタンパク質1（TGBP1）である。図7bは、NS4B（遺伝子型1a）の一次配列内の正に荷電した、そのアミノ酸（RおよびRR、太字で下線付き）を示す。図7cは、NS4Bの予測膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを示す概略図である。NS4BのC末端セグメントにおける保存された正に荷電したアミノ酸をRまたはRRで示す。図7dは、アルギニン残基がNS4BによってRNA結合を媒介することを示すグラフである。ウイルスのマイナスRNA鎖（1.5nM）の3'末端に対する野生型NS4B-GFP、RRaおよびRRb NS4B-GFP突然変異およびNS5A（AH）-GFPの結合をマイクロ流体親和性解析で求めた。バーは標準偏差を示す。

【0305】

図8a～図8dは、小分子スクリーンが、塩酸クレミゾールが、NS4Bおよび生体内でのHCV RNA複製によってRNA結合を阻害することを明らかにする結果を示す。図8aは、1280の化合物の阻害の低ストリンジェンシーの測定を表す第1のスクリーンのデジタル画像であり、後者を高（明るい灰色）、不明瞭（黒）または阻害なし（灰色）に分類した。最初のスクリーン結果に基づいて、ストリンジェンシーを高めて重複数も増して214の化合物を再度測定し、結果が一番良かった18のインヒビターについて、生体内細胞アッセイでHCV複製を阻害する機能を試験した。図8bは、上位18の小分子によるNS4B-RNA結合の試験管内阻害を示すグラフを示す。図8cは、Alamarブルーで測定した場合（右軸、上の線□）に細胞に対して測定可能な毒性を持たずにクレミゾールがHCV複製を阻害する（左軸、下の線◆）ことを示す、生体内 HCVルシフェラーゼ結合レポーター細胞アッセイを示すグラフである。図8dは、クレミゾールの試験管内 NS4B-RNA結合：阻害曲線を示すグラフである。

【0306】

図9a～図9eは、クレミゾール耐性突然変異データに関連する結果を示す。レプリコン細胞をクレミゾールの存在下にて継代し、個々のコロニーを単離し、繁殖させ、その中にあるHCVゲノムを配列解析した。図9aは、NS4Bの予測膜貫通と細胞内セグメントを示す概略図である。保存された、正に荷電したアミノ酸をRまたはRRで示す。クレミゾール耐性変異W55RをWRで示す。図9bは、野生型またはW55R突然変異クロ

10

20

30

40

50

ーンのいずれかを持つ細胞から抽出した全細胞RNAを50 μ gで電気穿孔した後、10 μ Mのクレミゾールの非存在下（白いバー）または存在下（灰色のバー）で成長させたHu h7. 5細胞におけるHCV複製を示すグラフである。結果は、対応する各々の未処理対照と比較した場合に、得られたコロニーの相対数を示す。図9cは、10 μ Mのクレミゾールの非存在下（白いバー）または存在下（灰色のバー）で実施した、試験管内で転写したルシフェラーゼレポーター結合野生型またはW55R突然変異HCV RNAゲノムの電気穿孔によって開始されたHCV複製アッセイを示す。結果は、未処理レベルに対する各ゲノムの複製レベルを示す。図9dは、10 μ Mのクレミゾールの存在下（灰色のバー）または非存在下（白いバー）にてマイクロ流体によって試験管内で測定した場合の野生型NS4BおよびW55R NS4B突然変異のHCV RNA結合を示す。図9eは、RNAプローブの段階希釈に対するW55R NS4B突然変異（実線○）と野生型NS4B（点線▲）の試験管内結合曲線を示す。

10

【0307】

図10a～図10cは、マイクロ流体ベースのRNA結合アッセイの概要を示す。1マイクロ流体装置あたり数百／数千のうちの3つの個別のユニットセルを、このスキームに示す。図10aは、コンパートメントとマイクロメカニカルバルブを示す。バルブは制御チャンネルがフローチャンネルと交差する部分に作られている。2本のチャンネル間の結合部分で得られる薄い膜は、油圧作動によって変形可能である。多重バルブ系を用いることで、多数のエラストマーマイクロバルブで、これらの装置内での複雑な流体操作を行うことができるようになる。

20

【0308】

図10aは、実験プロトコルを示す。一番上の●はCy3標識RNAプローブを示す。下の○は表面結合body-py-標識タンパク質を示す。

【0309】

図10b（1）は、Cy3で標識された標的RNA配列をエポキシコートスライドガラスにマイクロアレイとして滴下した状態を示す。

【0310】

図10b（2）は、アレイの各スポットが装置のユニットセルと接触するように、マイクロ流体装置を整列配置させてスライドガラスに付着させた状態を示す。各ユニットセル内で円形の部分がビオチン化抗ヒスチジン抗体で覆われるように、装置に表面パターンニングをほどこした（補助的に図10cも参照のこと）。RNAチャンバからのフローチャンネルを分離している「ネックバルブ」については、このプロセスの間は閉じたままにしておいた。

30

【0311】

図10b（3）は、his-標識タンパク質をコードするDNAテンプレートを含む試験管内転写／翻訳混合物を装置にロードした状態を示す。タンパク質標識用にBody-py-標識tRNALysを加えた。

【0312】

図10b（4）は、2つの「サンドイッチ」マイクロメカニカルバルブによって各ユニットセルを単離した状態を示す。

40

【0313】

図10b（5）は、フローチャンネルコンパートメントとRNAチャンバとを結合して、「ネックバルブ」を開いて単一のコンパートメントを形成したことを示す。これに続いて、インキュベーションを実施し、タンパク質の合成、合成後のタンパク質と表面ビオチン化抗his抗体との結合、標的RNAの溶媒和、タンパク質と標的RNAの平衡を得た。

【0314】

図10b（6）は、溶液相の分子をすべて追い出しながら、「ボタン」膜を作動させてMITOMIを実施して表面結合複合体を捕捉したことを示す。

【0315】

図10b（7）は、「サンドイッチ」バルブを開いた後、軽く洗浄して捕捉されなかつ

50

た未結合材料を除去したことを示す。

【0316】

図10b(8)は、「ボタン」膜を開いて装置をアレイスキャナでスキャンしたことを示す。捕捉されたRNA分子と発現されたタンパク質とを検出した。データ点ごとに、b o d i p yのメジアンシグナルに対するC y 3のメジアンシグナルを測定して、結合RNA対発現タンパク質の比を求めた(一番下に○で示される)。

【0317】

図10cは、表面パターニングを示す。図10c(1)は、全フローチャネルにビオチン化BSA(▲)の溶液を流して、到達可能な表面部分を誘導体化したことを示す。図10c(2)は、ニュートラアビジン溶液(●)をロードしたことを示す。図10c(3)は、「ボタン」膜が活性化されたことを示す。図10c(4)は、ボタンでマスクされた60μmの円形部分以外の残りの到達可能な表面部分全体をビオチン化溶液(▲)で不動態化したことを示す。5)「ボタン」膜を開いた、6)ビオチン化抗体の溶液(●)をロードし、事前にマスクした円形部分の特異的官能化を可能にした。図10c(7)は、試験管内で発現されたタンパク質(☞)を装置にロードし、離散的な円形部分を覆っているビオチン化抗体と結合させたことを示す。ここで説明した各ステップを終えるごとに、PBSで洗浄した。

【0318】

図11a～図11bは、本発明者らのRNA結合アッセイでの信号対雑音比を示すグラフを示す。図11aは、AU3 RNAプローブの濃度を高めていった場合のHu D-h i s(●)およびGu s-h i s(□)の結合を示すグラフである。代表的な実験を示す。バーは標準偏差を表す。図11aおよび図11bは、マイナス鎖の3'末端の濃度を高めていった場合のNS4Bの結合-GFP-マイクロソーム膜(mm)(●、連続線)とNS5A(AH)-GFP-mm(■、点線)を示すグラフである。灰色の縞を入れたカラムは、信号対雑音比が最大になったプローブ濃度の範囲を示す。本発明者らが報告した実験はいずれも、この範囲内で実施した。代表的な実験を示す。バーは標準偏差を表す。

【0319】

図12a～図12cは、ELAV様ファミリーであるHu R(ELAV L1)由来の別のヒトタンパク質によるRNA結合についてのマイクロ流体ベースの解析で得られた結果を示す。図12aは、RNAに対するHu Rの結合を研究するのに用いた標的RNA配列と、従来のRNA結合方法で得られた表現型を示す(EMBO J 16, 2130～2139(1997)(本明細書に援用する))。

【0320】

図12bは、マイクロ流体によってHu RがRNAに結合することを示す。Cy3標識標的RNA配列のマイクロアレイを利用して、マイクロ流体装置をプログラムし、装置で発現されたb o d i b y標識タンパク質のRNA配列に対する結合をアッセイした。結果は、結合RNA(メジアンCy3シグナル)対発現タンパク質(メジアンb o d i p yシグナル)の比を表す。2つの独立した実験で測定した10～20回分を正規化した平均値を示す。エラーバーが標準偏差を示す。灰色のバーはHu R-h i sの結合を示し、Gu s-h i sの白いバーを負の対照として用いた。

【0321】

図12cは、HUR結合が5種類の最も活性が高い化合物に影響されないが、ATAには影響されることを示す。本発明者らは、NS4B RNA結合インヒビターの存在下と非存在下で、その4A RNA標的に対するHURの結合を試験した。データは10～20回分の平均値を表し、バーは標準偏差を表す。

【0322】

図13a～図13cは、従来の方法によるHCV RNAに対するNS4Bの結合の結果を示す。NS4Bについては、GSTまたはm i s t i c-6 h i sに縮合した大腸菌

10

20

30

40

50

(E. coli) で発現させ、精製した。図13aは、GSTプルダウンアッセイで測定した場合のウイルスのマイナス鎖の3'末端に対応する³²P-標識RNAプローブに対するGST-NS4BおよびGSTの結合活性を示す。図13bは、代表的なRNAフィルタ結合アッセイからのニトロセルロース膜を示す。10mM (左パネル) または2mM (右パネル) のmistic-NS4Bまたはmistic対照に結合した³²P-標識HCV RNAプローブを示す。図13cは、フィルタ結合アッセイで測定した場合のタンパク質濃度10mM (灰色のバー) および2mM (白いバー) でのmistic-NS4Bおよびmisticタンパク質に対する結合RNAの比率を示す。

【0323】

図14は、ATAがNS4Bによって用量依存的にRNA結合を阻害することを示す結果を示す。マイクロ流体学で測定した、ATA濃度を高めていった場合のNS4BによるRNA結合の用量応答曲線。Yカテゴリは、ATAの非存在下での結合に対する結合RNA対タンパク質比である。Xカテゴリは、ATA濃度 (μM) である。式 $Y = a + (b - a) / (1 + 10^{(x - c)})$ (BioDataFit, Chang Bioscience) を用いて3パラメータのロジスティック曲線にデータをフィットさせ、IC50を計算したところ $0.49 \pm 0.01 \mu\text{M}$ (p値=0.0003) であった。

【0324】

図15は、リアルタイムPCRアッセイによってクレミゾールがHCV複製を阻害することを示す結果を示す。クレミゾールが、細胞に対する測定可能な毒性のない状態で (右軸、■ (上側の曲線)) HCV複製を阻害する (左軸◆ (下側の曲線)) ことを示す、HCV複製レベルのリアルタイムPCRアッセイ。

【0325】

図16は、RRb変異は複製を約45分の1に減少させ、RRa変異のあるレプリコンではRNA複製が完全に欠けていることを示すデジタル画像である。

【0326】

図17Aは、塩酸クレミゾールの化学構造を示す。

【0327】

図17Bは、力価と薬効を高めたクレミゾール誘導体分子の化学構造を示す。

【0328】

図17Cは、マイクロ流体工学 (結合RNA/タンパク質比対化合物濃度 (μM)) で測定した場合のクレミゾール誘導体分子 (●) および親の塩酸クレミゾール化合物 (□) の試験管内阻害曲線を示すグラフを示す。

【0329】

図17Dは、クレミゾール誘導体分子 (●) および親の塩酸クレミゾール化合物 (□) の濃度を次第に高めた場合のHCV複製の用量応答曲線 (HCV感染細胞でのリアルタイムPCRアッセイ (相対ウイルス複製対化合物濃度 (μM)) で測定) を示すグラフを示す。

【0330】

各々を本明細書に援用する参考文献：

[文献1]

10

20

30

40

1. Liang, T.J., Rehermann, B., Seeff, L.B. & Hoofnagle, J.H. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* **132**, 296-305 (2000).
2. Reed, K.E. & Rice, C.M. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* **242**, 55-84 (2000).
3. Rice, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*. (Lippincott-Raven Publications, Philadelphia, Pa., 1996).
4. Egger, D. et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**, 5974-5984 (2002).
5. Elazar, M., Liu, P., Rice, C.M. & Glenn, J.S. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol* **78**, 11393-11400 (2004). 10
6. Gosert, R. et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**, 5487-5492 (2003).
7. El-Hage, N. & Luo, G. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J Gen Virol* **84**, 2761-2769 (2003).
8. Kusov, Y.Y., Probst, C., Jecht, M., Jost, P.D. & Gauss-Müller, V. Membrane association and RNA binding of recombinant hepatitis A virus protein 2C. *Arch Virol* **143**, 931-944 (1998).
9. Rodríguez, P.L. & Carrasco, L. Poliovirus protein 2C contains two regions involved in RNA binding activity. *J Biol Chem* **270**, 10105-10112 (1995). 20

10. Echeverri, A.C. & Dasgupta, A. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* **208**, 540-553 (1995).
11. Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. & Glenn, J.S. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* **78**, 11288-11295 (2004).
12. Overington JP, A.-L.B., Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993-996 (2006).
13. Lundin, M., Monné, M., Widell, A., Von Heijne, G. & Persson, M.A.A. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* **77**, 5428-5438 (2003). 10
14. Hadd AG, R.D., Halliwell JW, Jacobson SC, Ramsey JM. Microchip device for performing enzyme assays. *Anal Chem* **69**, 3407-3412 (1997).
15. Maerkl, S.J. & Quake, S.R. A systems approach to measuring the binding energy landscapes of transcription factors. *Science* **315**, 233-237 (2007).
16. Toepke, M.W. & Beebe, D.J. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab on a chip* **6**, 1484-1486 (2006).
17. Lee, J.N., Park, C. & Whitesides, G.M. Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Anal chem* **75**, 6544-6554 (2003).
18. Whitesides, G.M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368-373 (2006).
19. Kang, L., Chung, B.G., Langer, R. & Khademhosseini, A. Microfluidics for drug discovery and development: from target selection to product lifecycle management. *Drug discovery today* **13**, 1-13 (2008). 20
20. Myer, V.E., Fan, X.C. & Steitz, J.A. Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J* **16**, 2130-2139 (1997).
21. Park, S., Myszka, D.G., Yu, M., Littler, S.J. & Laird-Offringa, I.A. HuD RNA recognition motifs play distinct roles in the formation of a stable complex with AU-rich RNA. *Mol Cell Biol* **20**, 4765-4772 (2000).
22. Park-Lee, S., Kim, S. & Laird-Offringa, I.A. Characterization of the interaction between neuronal RNA-binding protein HuD and AU-rich RNA. *J Biol Chem* **278**, 39801-39808 (2003).
23. Glenn, J.S., Taylor, J.M. & White, J.M. In vitro-synthesized hepatitis delta virus RNA initiates genome replication in cultured cells. *J Virol* **64**, 3104-3107 (1990).
24. Glenn, J.S., Watson, J.A., Havel, C.M. & White, J.M. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science* **256**, 1331-1333 (1992). 30
25. Burd, C.G. & Dreyfuss, G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**, 615-621 (1994).
26. Wung, C.H. et al. Identification of the RNA-binding sites of the triple gene block protein 1 of bamboo mosaic potexvirus. *J Gen Virol* **80** (Pt 5), 1119-1126 (1999).
27. Spångberg, K., Wiklund, L. & Schwartz, S. HuR, a protein implicated in oncogene and growth factor mRNA decay, binds to the 3' ends of hepatitis C virus RNA of both polarities. *Virology* **274**, 378-390 (2000).
28. Tscherne, D.M. et al. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* **80**, 1734-1741 (2006).
29. Lindenbach, B.D. et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623-626 (2005).
30. Elazar, M. et al. Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **77**, 6055-6061 (2003). 40
31. Tong, X. et al. Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res* **70**, 28-38 (2006).

32. Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M.P. & Schuster, C. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* **77**, 5401-5414 (2003).
33. Blight, K.J., Kolykhalov, A.A. & Rice, C.M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**, 1972-1974 (2000).
34. Huang, L. et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* **280**, 36417-36428 (2005).
35. Roosild, T.P. et al. NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression. *Science* **307**, 1317-1321 (2005).
36. Schilders, G., Raijmakers, R., Raats, J.M.H. & Pruijn, G.J.M. MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8S rRNA maturation. *Nucleic acids res* **33**, 6795-6804 (2005).

10

【0331】

実施例 2 :

HCVに感染した患者の治療におけるクレミゾールの生体内での薬効を示すために、HCVに慢性感染した3名の患者をクレミゾール100ミリグラムp.o.で治療した。8週間のBID。クレミゾール単独療法で最初の4週間経過後、ペグ化インターフェロン（1週あたり180マイクログラムPegastus（Roche）s.q.）を加えた。その後、患者にペグ化インターフェロンとニタゾキサニド（500mg.（Remark）p.o. BID）を継続する。血清におけるシリアルHCVウイルス負荷とベースライン特性を図2に示す。クレミゾール単独での治療時にHCVウイルス負荷が大幅に低下し、治療4週間後には完全に検出不能またはほぼ検出不能となった。これらの結果から、クレミゾールがHCV感染患者の治療に効果的であることが分かる。

20

【0332】

実施例 3 :

図4Aに、5, 6-二置換クレミゾール化合物の生成に使用できる方法を示す。特に、この方法は、化合物1（5位および6位にてメチル基で二置換（図4B））と化合物2（5位および6位にてCl基で二置換（図4C））を生成できるものである。

【0333】

以下のようにして、二置換クレミゾールを合成することが可能である。4, 5-二置換-ベンゼン-1, 2-ジアミン（A）と2-クロロアセトイミド酸エチルエステル（B）との縮合によって、2-クロロメチル-5, 6-二置換-1H-ベンゾイミダゾール（C）を生成した後、1-ブロモメチル-4-クロロベンゼン（D）でアルキル化して1-（4-クロロベンジル）-2-クロロメチル-5, 6-二置換-1H-ベンゾイミダゾール（E）を得て、最後に1-（4-クロロベンジル）-2-クロロメチル-5, 6-二置換-1H-ベンゾイミダゾール（E）をピロリジンでアルキル化すると、5, 6-二置換クレミゾール（1-（4-クロロベンジル）-5, 6-二置換-2-ピロリジン-1-イルメチル-1H-ベンゾイミダゾール）（G）が得られる。

30

【0334】

実施例 4 :

本明細書にて説明したルシフェラーゼとAlamarブルーでのアッセイを用いた場合に、クレミゾール類似体がHCV RNA複製（AV）および細胞生存度（Via b）に対しておよぼす作用を、以下に示す表3にあげておく。化合物の活性を2とおりの濃度で測定し、この作用が用量依存性であるか否かを判断した。数値は、化合物での治療後に残っている正常な活性（ウイルス複製または細胞生存度のいずれか）の比率を示す。これらの値をグループ分け（binned）して、相対活性の大まかな測定値も得た。

40

【0335】

化合物ごとの薬剤なしの対照に対する阻害率を、5マイクロモルと10マイクロモルの2とおりの化合物濃度で判断し、表に記録した。また、これらの比率を以下のようにしてスコアリングシステムに変換した。「-」=残留活性90~100%（すなわち影響なし

50

）；「＋」＝残留活性 60～90%；「＋＋」＝残留活性 30～60%；「＋＋＋」＝残留活性 0～30%。よって、複製アッセイで＋＋＋のスコアのついた化合物のほうが、＋のスコアのついた化合物よりも抗ウイルス活性（A V）が高い。同様に、細胞代謝アッセイ（V i a b＝生存度）で＋スコアのついた化合物は、＋＋＋のスコアのついた化合物よりも毒性が低い。

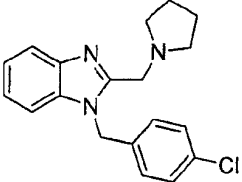
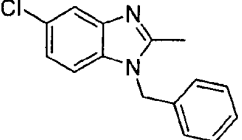
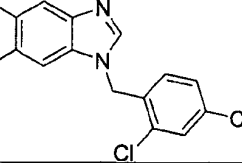
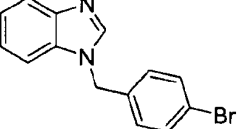
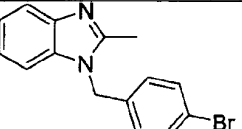
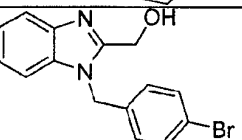
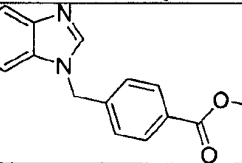
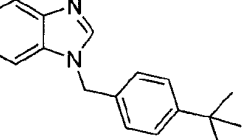
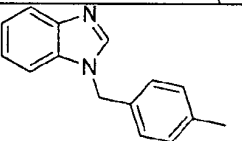
【0336】

これらの結果から、H1拮抗作用を抗ウイルス活性と分離できることが分かり、H1活性に必要な第3級アミン基のない化合物は、クレミゾールに対して認められる抗ウイルス作用が高くなることがある。さまざまな化合物が、抗ウイルス活性と細胞生存度に対する影響との間に強い分離を示し、前者の活性がNS4B／RNA結合の特異的阻害によるものであるという結論を裏付けている。また、濃度が高くなると（10 uM）HCV RNA複製の阻害が一層顕著になるため、多くの化合物が用量依存性の活性を示す。総合すれば、これらの構造と活性との関係から、本明細書に記載のクレミゾールの周知の類似体および新規な類似体でHCV複製を予防することができ、H1拮抗作用（ならびに附随するCNS作用）のない類似体は許容可能な治療比を維持することが分かる。

【0337】

【表 3】

表3

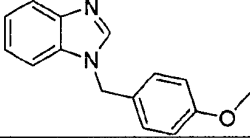
	5 uM		10 uM		5 uM		10 uM	
	AV	Viab	AV	Viab	AV	Viab	AV	Viab
	62	107	37	93	+	-	++	-
	87	99	60	94	+	-	+	-
	30	83	8	70	+++	+	+++	+
	23	81	8	68	+++	+	+++	+
	3	54	2	51	+++	++	+++	++
	50	97	28	90	++	-	+++	-
	74	101	54	96	+	-	++	-
	30	87	12	76	+++	+	+++	+
	49	99	23	84	++	-	+++	+

10

20

30

40

	70	98	58	100	+	-	++	-

キー：

－ 残留活性 90～100%（影響なし）

＋ 残留活性 60～90%

++ 残留活性 30～60%

+++ 残留活性 0～30%

【0338】

比、濃度、量および他の数値データが、本明細書で範囲の形式で表記されることがある点に注意されたい。このような範囲の形式は、便宜上用いたものであるため、範囲の限界値として明示的に示された数値を含むだけでなく、個々の数値すべてまたはその範囲に含まれる部分範囲も、それぞれの数値や部分範囲を明示的に示したのと同様に含むよう柔軟に解釈されるべきである旨を理解されたい。一例をあげると、「約0.1%から約5%」という濃度範囲は、明示的に示された濃度である約0.1wt%から約5wt%を含むことはもとより、表記の範囲内の個々の濃度（1%、2%、3%、4%など）ならびに部分範囲（0.5%、1.1%、2.2%、3.3%、4.4%など）も含むものと解釈される。「約」という用語は、±1%、±2%、±3%、±4%、±5%、±6%、±7%、±8%、±9%または±10%あるいはそれよりも多くの数値が修正されることを含み得る。また、『約「x」から「y」』という言い回しは、『約「x」から約「y」』を含む。

【0339】

本開示の上述した実施形態は単に考えられる実施の例にすぎず、開示の原理をはっきりと理解できるよう記載しただけのものである旨を強調しておく。この開示の原理および主旨から実質的に逸脱することなく開示の上述した実施形態に対して多くの変更および修正をほどこすことができる。このような修正および変更は、この開示の範囲内で本明細書に含まれるものとする。

10

20

30

【図 4 C】

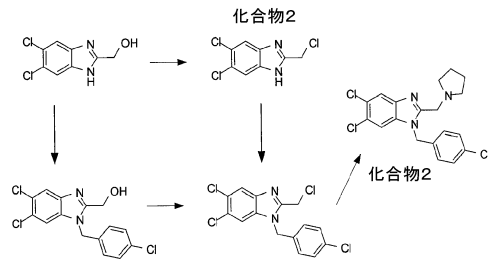


Fig. 4C

【図 6】

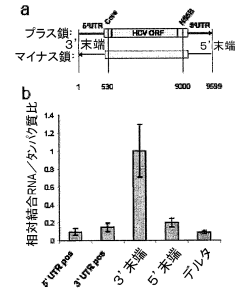


Fig. 6

【図 5】

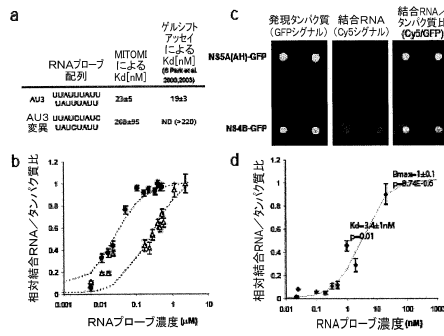


Fig. 5

【图 7】

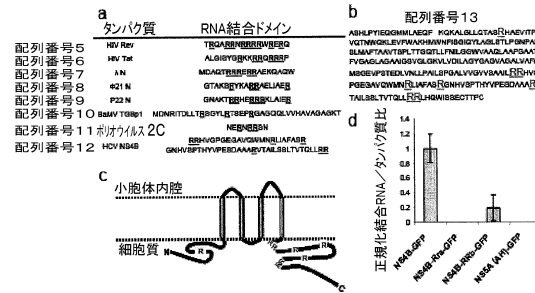


Fig. 7

【图 8】

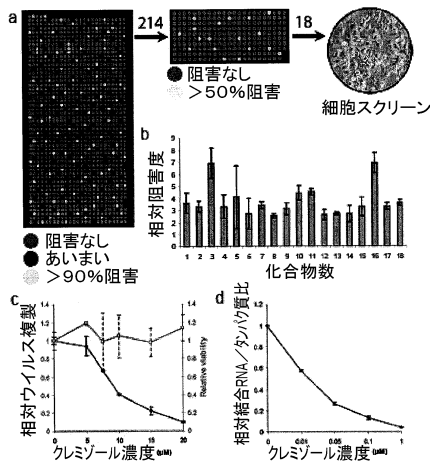


Fig. 8

【图 9】

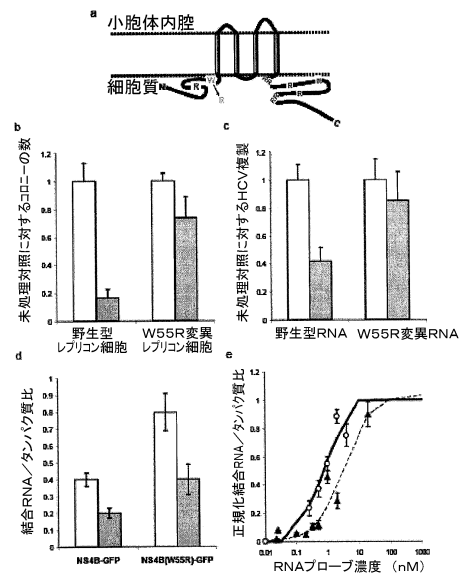


Fig. 9

【図 10】

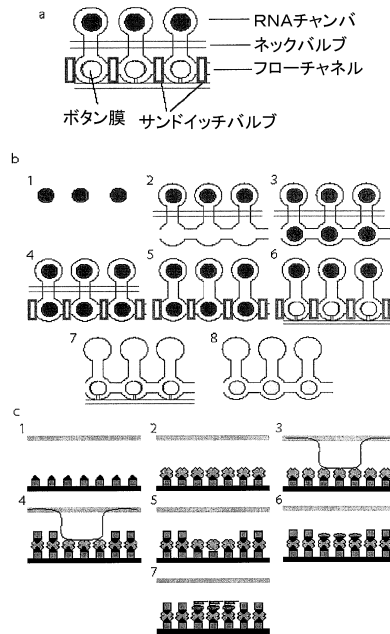


Fig. 10

【図 11】

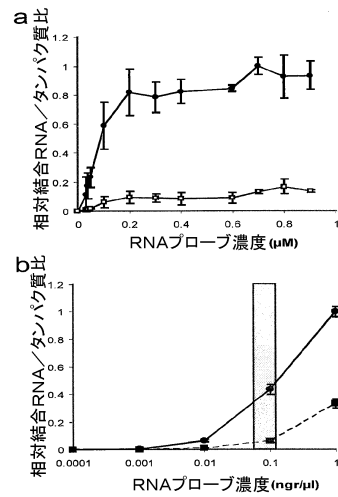


Fig. 11

【図 12】

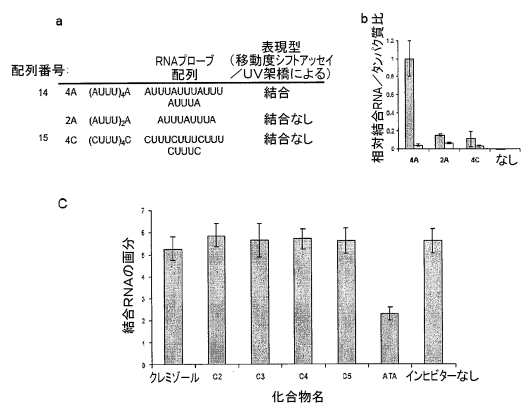


Fig. 12

【図 13】

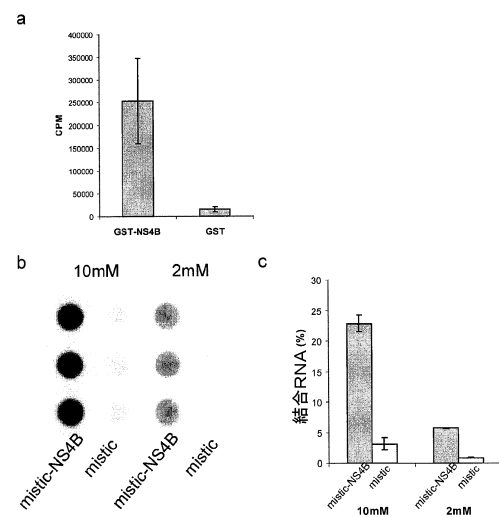


Fig. 13

【図 14】

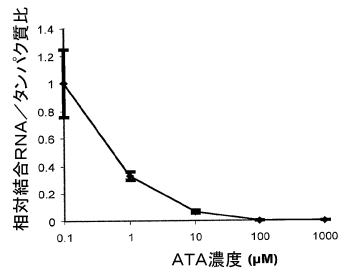


Fig. 14

【図 15】

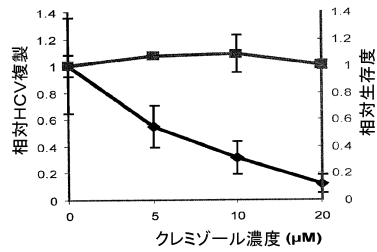


Fig. 15

【図 16】

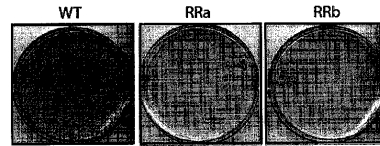


Fig. 16

【図 17】

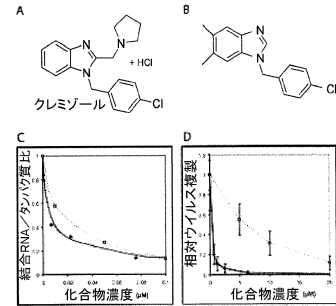


Fig. 17

【配列表】

0005715820000001.app

0005715820000002.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C O 7 D 235/08 (2006.01) C O 7 D 235/08
C O 7 D 235/12 (2006.01) C O 7 D 235/12

(31)優先権主張番号 61/088,759

(32)優先日 平成20年8月14日(2008.8.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 グレン、 ジェフリー エス.
アメリカ合衆国 9 4 3 0 4 カリフォルニア州 パロアルト ウェルチ ロード 1 1 3 0 ナ
ンバー 3 3 6

(72)発明者 マクドウェル、 ロバート
アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォルニア州 サンフランシスコ チャーチ ストリート 2
1 6 4

(72)発明者 ヤング、 ウェンジン
アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア州 フォスターシティ ボーデーガ ストリート
3 8 3

(72)発明者 ドヴォリソーソボル、 ハダス
アメリカ合衆国 9 4 0 4 0 カリフォルニア州 マウンテンビュー デル メディオ アベニュー
5 4 1 ナンバー 3 4 1

審査官 近藤 政克

(56)参考文献 米国特許第0 6 3 6 9 2 3 5 (US, B1)
国際公開第2 0 0 2 / 0 0 4 4 2 5 (WO, A1)
国際公開第2 0 0 5 / 0 3 2 3 2 9 (WO, A1)
国際公開第2 0 0 5 / 0 5 1 3 1 8 (WO, A1)
欧州特許出願公開第0 1 4 0 0 2 4 1 (EP, A1)
米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 0 9 7 4 3 8 (US, A1)
国際公開第2 0 0 6 / 1 3 1 7 3 7 (WO, A1)
米国特許出願公開第2 0 0 8 / 0 1 6 1 3 2 4 (US, A1)
JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY, 1 9 9 4 年, 30(5), p.677-698
BEAULIEU,P.L. et al, Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2 0 0 4 年, Vol.14, No.
1, p.119-24
BEAULIEU,P.L. et al, Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2 0 0 6 年, Vol.16, No.
19, p.4987-93
EINAV,S. et al, Nature biotechnology, 2 0 0 8 年, Vol.26, No.9, p.1019-27

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 4 1 8 4
A 6 1 K 4 5 / 0 0
A 6 1 P 3 1 / 1 4
A 6 1 P 4 3 / 0 0
C O 7 D 2 3 5 / 0 8
C O 7 D 2 3 5 / 1 2
C O 7 D 4 0 3 / 0 6
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)