

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4771468号  
(P4771468)

(45) 発行日 平成23年9月14日(2011.9.14)

(24) 登録日 平成23年7月1日(2011.7.1)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/4523 (2006.01)	A 6 1 K 31/4523
A 6 1 K 31/55 (2006.01)	A 6 1 K 31/55
A 6 1 K 31/4406 (2006.01)	A 6 1 K 31/4406
A 6 1 K 31/4409 (2006.01)	A 6 1 K 31/4409
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12

請求項の数 6 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-516655 (P2005-516655)  
 (86) (22) 出願日 平成16年12月24日(2004.12.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2004/019393  
 (87) 国際公開番号 W02005/063293  
 (87) 国際公開日 平成17年7月14日(2005.7.14)  
 審査請求日 平成19年12月18日(2007.12.18)  
 (31) 優先権主張番号 特願2003-435085 (P2003-435085)  
 (32) 優先日 平成15年12月26日(2003.12.26)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 506180969  
 萩原 正敏  
 千葉県千葉市花見川区浪花町912-8  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一  
 (72) 発明者 萩原 正敏  
 千葉県千葉市花見川区浪花町912-8  
 (72) 発明者 福原 武志  
 東京都文京区西片2-7-1-25  
 (72) 発明者 鈴木 正昭  
 愛知県名古屋市東区徳川町1010-1202

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SR蛋白質のリン酸化制御方法、および、SR蛋白質の活性制御剤を有効成分とする抗ウイルス剤

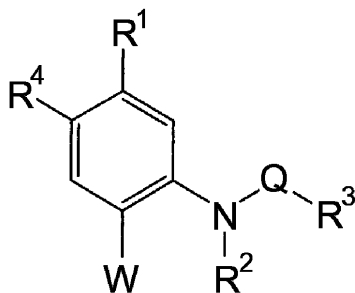
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(I)であらわされるアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物を有効成分として含有する、抗ウイルス剤。

(I)

(式中、R<sup>1</sup>は、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、またはハロゲン原子を示し；



R<sup>2</sup>は、水素原子を示し；

R<sup>3</sup>は、置換基を有していてもよいC<sub>6-10</sub>アリール基、置換基を有していてもよい含窒素6員芳香族複素環を示し；

R<sup>4</sup>は、水素原子を示し；

Qは、-C(O)-、-C(S)-、-SO<sub>2</sub>-、-C(S)NHC(O)-、-C(

O)  $\text{NHC}(\text{O})-$ 、または  $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}(\text{S})-$  を示し；

Wは、置換基を有していてもよい1-ピペリジル基、または置換基を有していてもよいパーヒドロアゼピン基を示すが、

ただし、 $\text{R}^1$ がトリフルオロメチル基であり、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^4$ が水素原子であり、 $\text{R}^3$ がフェニル基であり、Qが $-\text{C}(\text{O})-$ であり、かつWが1-ピペリジル基である化合物は除く。）

【請求項2】

前記 $\text{R}^1$ が、メチル基、トリフルオロメチル基、フッ素原子、または塩素原子である、請求項1に記載の抗ウイルス剤。

【請求項3】

前記 $\text{R}^3$ が、置換基を有していてもよい2-ピリジル基、置換基を有していてもよい3-ピリジル基、置換基を有していてもよい4-ピリジル基、または置換基を有していてもよいフェニル基である、請求項1～2のいずれか1項に記載の抗ウイルス剤。

【請求項4】

前記 $\text{R}^3$ が、3-ピリジル基または4-ピリジル基である、請求項3に記載の抗ウイルス剤。

【請求項5】

前記Wが、1-ピペリジル基、2-メチル-1-ピペリジル基、またはパーヒドロアゼピン基である、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗ウイルス剤。

【請求項6】

ウイルスが、(1)ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、重症急性呼吸器症候群(SARS)、ポリオウイルス、ヒトライノウイルス、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-I)、A型、C型、D型又はE型肝炎ウイルス、ワクシニアウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ヒトコロナウイルス、エボラ出血熱ウイルス、インフルエンザウイルス、若しくはシンドビスウイルスのいずれかのRNA型ウイルス、又は(2)単純ヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルスを含め、B型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、ポリオーマウイルス、若しくはヒトパピローマウイルスのいずれかのDNA型ウイルスである、請求項1～5いずれか1項記載の抗ウイルス剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子発現過程におけるスプライシング反応に関与しているSR蛋白質のリン酸化制御に関する。さらにウイルス等の感染による慢性および急性疾患の治療及び予防に有用なSR蛋白質の活性制御、発現制御および安定化制御方法並びにSR蛋白質の活性制御剤を有効成分とする抗ウイルス剤に関する。さらに本発明は、SR蛋白質の活性制御および抗ウイルス療法に有用な化合物およびそれらの利用に関する。

【背景技術】

【0002】

これまでウイルスの複製を阻害すると報告されている数多くの抗ウイルス剤は、ウイルスプロテアーゼやウイルスの持つ逆転写酵素などを標的としたものであった。

【0003】

例えば、HIVウイルスについて言えば、HIVのゲノムの特性をターゲットにする手法が用いられている。HIVは、逆転写酵素によりHIVのRNAゲノムがDNA(プロウイルス)に変換されて宿主染色体に組み込まれ、次に、プロウイルスDNAから宿主細胞の転写、翻訳機構によりウイルスのタンパク質が生産され、これらのタンパク質は大きなポリプロテイン前駆体として発現され、プロテアーゼにより蛋白分解されてはじめて、ウイルスが再構成され、成熟する。そこでHIVの阻害剤については、このようなHIVの成熟過程のそれぞれをターゲットに、(1)レトロウイルス特有の逆転写酵素をターゲットとするAZT等(非特許文献1)、(2)プロテアーゼを阻害するプロテアーゼ阻害剤

10

20

30

40

50

(非特許文献2)が研究開発されてきた。

【0004】

しかしながら、いずれも種々のウイルスの増殖過程を特異的に攻撃する個別的に対応の抗ウイルス剤であった。

【0005】

【非特許文献1】Proc Natl Acad Sci USA Vol.83, No.21, pp.8333-7

【非特許文献2】Antimicrob Agents Chemother. 1995 Jul;39(7):1559-64

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ウイルス特にRNAウイルスは、突然変異速度が速いため、これまで開発されたウイルスプロテアーゼやウイルスの持つ逆転写酵素などを標的とした抗ウイルス剤は、有効性が失われることも早く、更なる、効果的な抗ウイルス剤の開発が望まれてきた。

【0007】

特に、最近、SARSをはじめ、種々の新規なウイルスの出現に伴い、新規なウイルスにも対応できる、適用性が広く、しかも、持続性の高い抗ウイルス剤の開発を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、従来から、遺伝子発現系に關与するSRタンパク質のリン酸化に関する研究を行ってきた。特にSRタンパク質をリン酸化する酵素である、SRPK2 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 357-364)、線虫のSRPK相同分子であるSPK1 (Mech. Dev. 99, 51-64)、hPRP4 (J. Biol. Chem. 277, 44220-44228)、およびSRタンパク質リン酸化酵素Clk4の制御因子CLASP (J. Biol. Chem. 276, 32247-32256)は本発明者が世界で初めてクローニングしたものである。

【0009】

SR蛋白質は、SerineとArginineに富むRNA結合蛋白質で、通常1ないし2ヶ所のRNA認識モチーフ(RNA-recognition motifs; RRM)とRSの連続配列に富むRS(Arginine/Serine-rich)ドメインを共通に持ち、真核生物におけるRNAプロセッシング、特に、pre-mRNAのスプライシングに重要な役割を果たしている。

【0010】

哺乳類のSR蛋白ファミリーとして、X16/SRp20, SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, 9G8, HRS/SRp40, SRp46, SRp55, SRp75, p54の10種類のRNA結合蛋白が報告されている。SRタンパク質の多くが細胞内でリン酸化を受けていることが示されており、特にSRタンパク質のひとつであるSF2/ASFは、ペプチドマッピングによる解析から、RSドメイン内の複数の部位でリン酸化されている(J. Cell. Biol. (1991) 115: 587-596)ことが確認されている。またSF2/ASFのU1snRNPへの選択的結合能は、リン酸化によって高まる(Genes & Dev. (1997) 11: 334-344)ことが知られている。RSドメインのリン酸化と脱リン酸化が、スプライソゾームの形成と組み換えに必要で、これを阻害すると、mRNAのプロセッシングに異常を来す。上述したように、RSドメインはRNA結合蛋白のみならず、核内で機能すると目される様々な機能蛋白に見い出され、それらはSR関連蛋白ファミリー(SR-related protein family)と名付けられている(Biochem. Cell Biol. (1999) 77: 277-291)。

【0011】

本発明者らは、ウイルスに感染した細胞中のSRファミリータンパク質のリン酸化状態を研究中に偶然にも、ウイルス感染した細胞中ではSRタンパク質のリン酸化が抑えられ、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して分解されることを発見した。逆に、SRp40又はSRp75などのSRタンパク質、又はSRタンパク質リン酸化酵素のSRPK1又はSRPK2を強制的に発現させたところ、SRタンパク質が安定化されウイルス産生が増加するという現象を見出した。このことは、SRタンパク質がウイルス複製に重要な役割を担ってお

10

20

30

40

50

り、SRタンパク質の脱リン酸化は、生体内のウイルス侵入に対する防御システムであることを示している。

【0012】

SR蛋白はU1snRNPやU2AFと結合しスプライソゾームの形成に必要なだが、その蛋白間相互作用にRSドメインが大きな役割を果たしていると考えられている。また、SR蛋白（はスプライス部位の選択に影響を与え、イントロンに近位の3'スプライス部位の選択を促進するのに対し、逆にhnRNP A1、A2、B1などのheteronuclear ribonucleoproteins (hnRNPs)は遠位の3'スプライス部位の選択を促す。従って細胞内のSR蛋白とhnRNP蛋白の量比によって、スプライス部位が決められている可能性がある。

【0013】

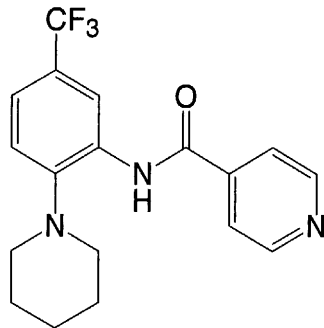
そこで、本発明者らは、ウイルスの複製に重要な役割を果たしていることが分かったSRタンパク質を対象とした抗ウイルス剤を開発し、提供したものである。

【0014】

具体的には、まず、SR蛋白質のリン酸化酵素を阻害することによるSR蛋白質の阻害を試みた。

これまでSRPKの活性を阻害する低分子量化合物は知られていなかったところ、SRPKを標的とした低分子量化合物のスクリーニングを行い、結果として下記の式で表されるSRPIN-1 (SR protein phosphorylation inhibitor 1) (化合物番号340とも表す) がリン酸化酵素SRPKの阻害活性を有することを見出した。

【0015】



(IV)

【0016】

そこで、SRPIN-1を用いてSRPKの酵素活性を阻害することで、SR蛋白質のリン酸化を阻害し、結果としてHIVのウイルス複製を阻害できると推測した。MT-4細胞とHIVウイルスを用いた感染実験において、SRPIN-1の濃度を変えてウイルス複製を抑制できるか検討したところ、SRPIN-1は顕著にHIVウイルスの複製を抑制することを見出した。

【0017】

さらに本発明者らは、複数のSRPIN-1類縁体を合成し、その効果を調べたところ、SRPIN-1と同様にSRPK阻害活性および抗ウイルス作用を示すことが示された。従って、SRPIN-1およびそれらの類縁体はSRPK阻害剤として有用であり、さらに抗ウイルス剤として用いることができる。

【0018】

すなわち本発明は、SR蛋白質の活性を制御するSR活性制御剤を有効成分として含有する抗ウイルス剤、抗ウイルス剤のスクリーニング方法、およびSRPKを阻害する活性を有する化合物、およびその利用などに関し、より具体的には請求項の各項に記載の発明に関する。すなわち本発明は、

〔1〕SR蛋白質の活性を制御するSR活性制御剤を有効成分として含有する抗ウイルス剤、

〔2〕SR蛋白質が、SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, HRS/SRp40, SRp46, 又はSRp75のいずれかである、前記〔1〕に記載の抗ウイルス剤、

〔3〕SR活性制御剤がSR蛋白質の脱リン酸化を促進する物質又は組成物である、前記

10

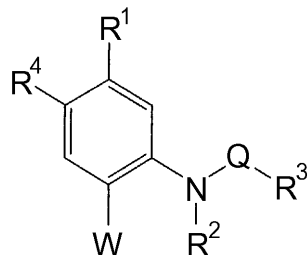
20

30

40

50

- 〔 1 〕又は〔 2 〕に記載の抗ウイルス剤、
- 〔 4 〕フォスファターゼ 2 A (Phosphatase 2A) を活性化する活性化剤である、前記〔 3 〕に記載の抗ウイルス剤、
- 〔 5 〕HIVのtat遺伝子又はアデノウイルスのE4-ORF4遺伝子又はワクシニアウイルスのV H 1 遺伝子 を 載 せ た 遺 伝 子 治 療 用 の 発 現 ベ ク タ ー である、前記〔 4 〕に記載の抗ウイルス剤、
- 〔 6 〕SR 活性制御剤がSRPKを阻害する物質である、前記〔 1 〕又は〔 2 〕に記載の抗ウイルス剤、
- 〔 7 〕SRPKがSRPK1またはSRPK2である、前記〔 6 〕に記載の抗ウイルス剤、
- 〔 8 〕SR 活性制御剤がSRPK 遺伝子の発現阻害剤である、前記〔 1 〕又は〔 2 〕に記載の抗ウイルス剤、
- 〔 9 〕SRPK 遺伝子の発現阻害剤が、SRPK に対するmiRNA又はsiRNA又はモルフォリノオリゴ、あるいは該miRNAまたはsiRNAの発現ベクターである、前記〔 8 〕に記載の抗ウイルス剤、
- 〔 10 〕SR 活性制御剤がSR蛋白質の活性と逆の活性を有する物質である、前記〔 1 〕又は〔 2 〕に記載の抗ウイルス剤、
- 〔 11 〕SR蛋白質の活性と逆の活性を有する物質がhnRNPA1発現ベクターである、前記〔 10 〕に記載の抗ウイルス剤、
- 〔 12 〕ウイルスが、( 1 ) ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、重症急性呼吸器症候群 (SARS)、ポリオウイルス、ヒトライノウイルス、成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I)、A 型、C 型、D 型又はE 型肝炎ウイルス、ワクシニアウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ヒトコロナウイルス、エボラ出血熱ウイルス、インフルエンザウイルス、若しくはシンドビスウイルスのいずれかのRNA型ウイルス、又は( 2 ) 単純ヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルスを含め、B型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、ポリオーマウイルス、若しくはヒトパピローマウイルスのいずれかのDNA型ウイルスである、前記〔 1 〕～〔 11 〕のいずれかに記載の抗ウイルス剤、
- 〔 13 〕試験化合物をSRPKに作用させる工程、及びSRPKのSR蛋白質をリン酸化する能力を検定する工程、および該能力を阻害する化合物を選抜することを含む、抗ウイルス剤のスクリーニング方法、
- 〔 14 〕SR タンパク質又はArg-Ser (RS) 若しくはSer-Arg (SR) の2回以上連続するペプチドをSRPKの基質としてSR蛋白質をリン酸化する能力を検定する工程を含む、前記〔 13 〕に記載のスクリーニング方法、
- 〔 15 〕前記〔 13 〕又は〔 14 〕の方法により得られた化合物を製剤化する工程を含む、抗ウイルス剤の製造方法、
- 〔 16 〕下記一般式 ( I )



( I )

( 式 中 、 R<sup>1</sup> は 、 水 素 原 子 、 置 換 基 を 有 し て い て も よ い C<sub>1-6</sub> ア ル キ ル 基 、 置 換 基 を 有 し て い て も よ い C<sub>2-6</sub> ア ル ケ ニ ル 基 、 置 換 基 を 有 し て い て も よ い C<sub>2-6</sub> ア ル キ ニ ル 基 、 置 換 基 を 有 し て い て も よ い C<sub>6-10</sub> ア リ ー ル 基 、 ハ ロ ゲ ン 原 子 、 ニ ト ロ 基 、 シ ア ノ 基 、 ア ジ ド 基 、 ヒ ド ロ キ シ 基 、 置 換 基 を 有 し て い て も よ い C<sub>1-6</sub> ア ル コ キ シ 基 、 置 換 基 を 有 し て い て も よ い

10

20

30

40

50

C<sub>1-6</sub>アルキルチオ基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキルスルホニル基、カルボキシル基、ホルミル基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシカルボニル基、アシル基、アシルアミノ基、またはスルファモイル基を示し；

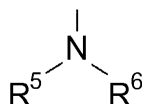
R<sup>2</sup>は、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、または置換基を有していてもよいアリール基を示し；

R<sup>3</sup>は、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、置換基を有していてもよいC<sub>2-6</sub>アルケニル基、置換基を有していてもよいC<sub>6-10</sub>アリール基、置換基を有していてもよい含窒素複素環、または置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環を示し；

R<sup>4</sup>は、水素原子又はハロゲン原子を示し；

Qは、-C(O)-、-C(S)-、-SO<sub>2</sub>-、-C(S)NHC(O)-、-C(O)NHC(O)-、または-C(O)NHC(S)-を示し；

Wは、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、置換基を有していてもよいC<sub>6-10</sub>アリール基、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキルチオ基、置換基を有していてもよい含窒素複素環、置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環、または下記一般式(I I)



( I I )

(式中、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、互いに同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、置換基を有していてもよい含窒素複素環、置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環、アシル基、もしくはアシルアミノ基を示し；または、

前記R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、隣接する窒素原子と一緒にあって、置換基を有していてもよい複素環を形成していてもよく、該複素環は、置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環であってもよく；

前記R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、置換基を有していてもよいシクロアルキリデンアミノ基または置換基を有していてもよい芳香族環縮合シクロアルキリデン基であってもよい、)で表されるアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物、

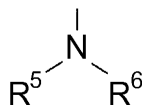
[ 17 ] 前記R<sup>1</sup>が、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、またはハロゲン原子である、前記[ 16 ]に記載のアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物、

[ 18 ] 前記R<sup>2</sup>が、水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基である、前記[ 16 ]または[ 17 ]に記載のアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物、

[ 19 ] 前記R<sup>3</sup>が、置換基を有していてもよいC<sub>6-10</sub>アリール基、または置換基を有していてもよい5 ~ 10員含窒素ヘテロアリール基である、前記[ 16 ] ~ [ 18 ]のいずれかに記載のアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物、

[ 20 ] 前記R<sup>4</sup>が、水素原子である、前記[ 16 ] ~ [ 19 ]のいずれかに記載のアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物、

[ 21 ] 前記Wが、水素原子、ハロゲン原子、または下記一般式( I I )



( I I )

(式中、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、互いに同一又は異なって、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基を示し；または、

前記R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、隣接する窒素原子と一緒にあって、置換基を有していてもよいへ

テロ環式基を形成していてもよく、該ヘテロ環式基は、置換基を有していてもよい縮合芳香族ヘテロ環式基であってもよい、)で表される、前記〔16〕～〔20〕のいずれかに記載のアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物、〔22〕前記〔16〕～〔21〕のいずれかに記載のアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物を有効成分として含有する、SRPK阻害剤、〔23〕前記〔16〕～〔21〕のいずれかに記載のアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物を有効成分として含有する、抗ウイルス剤、に関する。なお同一の請求項を引用する請求項に記載の発明の1つまたは複数の組み合わせからなる発明は、それらの請求項に記載の発現に既に意図されている。

#### 【0019】

以下に、本明細書において記載する用語、記号等の意義を説明し、本発明を詳細に説明する。

本明細書における「C<sub>1-6</sub>アルキル基」とは、炭素数1～6個の脂肪族炭化水素から任意の水素原子を1個除いて誘導される一価の基である、炭素数1～6個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル基を意味し、具体的には例えば、メチル基、エチル基、1-プロピル基、2-プロピル基、2-メチル-1-プロピル基、2-メチル-2-プロピル基、1-ブチル基、2-ブチル基、1-ペンチル基、2-ペンチル基、3-ペンチル基、2-メチル-1-ブチル基、3-メチル-1-ブチル基、2-メチル-2-ブチル基、3-メチル-2-ブチル基、2,2-ジメチル-1-プロピル基、1-ヘキシル基、2-ヘキシル基、3-ヘキシル基、2-メチル-1-ペンチル基、3-メチル-1-ペンチル基、4-メチル-1-ペンチル基、2-メチル-2-ペンチル基、3-メチル-2-ペンチル基、4-メチル-2-ペンチル基、2-メチル-3-ペンチル基、3-メチル-3-ペンチル基、2,3-ジメチル-1-ブチル基、3,3-ジメチル-1-ブチル基、2,2-ジメチル-1-ブチル基、2-エチル-1-ブチル基、3,3-ジメチル-2-ブチル基、2,3-ジメチル-2-ブチル基等があげられる。

#### 【0020】

本明細書における「C<sub>2-6</sub>アルケニル基」とは、炭素数2～6個の直鎖状または分枝鎖状のアルケニル基を意味し、具体的には例えば、ビニル基、アリル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、3-ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基等があげられる。

#### 【0021】

本明細書における「C<sub>2-6</sub>アルキニル基」とは、炭素数2～6個の直鎖状または分枝鎖状のアルキニル基を意味し、具体的には例えば、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基等があげられる。

#### 【0022】

本明細書における「C<sub>1-6</sub>アルコキシ基」とは前記定義の「C<sub>1-6</sub>アルキル基」が結合したオキシ基であることを意味し、具体的には例えば、メトキシ基、エトキシ基、1-プロピルオキシ基、2-プロピルオキシ基、2-メチル-1-プロピルオキシ基、2-メチル-2-プロピルオキシ基、1-ブチルオキシ基、2-ブチルオキシ基、1-ペンチルオキシ基、2-ペンチルオキシ基、3-ペンチルオキシ基、2-メチル-1-ブチルオキシ基、3-メチル-1-ブチルオキシ基、2-メチル-2-ブチルオキシ基、3-メチル-2-ブチルオキシ基、2,2-ジメチル-1-プロピルオキシ基、1-ヘキシルオキシ基、2-ヘキシルオキシ基、3-ヘキシルオキシ基、2-メチル-1-ペンチルオキシ基、3-メチル-1-ペンチルオキシ基、4-メチル-1-ペンチルオキシ基、2-メチル-2-ペンチルオキシ基、3-メチル-2-ペンチルオキシ基、4-メチル-2-ペンチルオキシ基、2-メチル-3-ペンチルオキシ基、3-メチル-3-ペンチルオキシ基、2,3-ジメチル-1-ブチルオキシ基、3,3-ジメチル-1-ブチルオキシ基、2,2-ジメチル-1-ブチルオキシ基、2-エチル-1-ブチルオキシ基、3,3-ジメチル-2-ブチルオキシ基、2,3-ジメチル-2-ブチルオキシ基等があげられる。

#### 【0023】

10

20

30

40

50

本明細書における「 $C_{1-6}$ アルキルチオ基」とは前記定義の「 $C_{1-6}$ アルキル基」が結合したチオ基であることを意味し、具体的には例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、1-プロピルチオ基、2-プロピルチオ基、ブチルチオ基、ペンチルチオ基等があげられる。

【0024】

本明細書における「 $C_{1-6}$ アルコキシカルボニル基」とは前記定義の「 $C_{1-6}$ アルコキシ基」が結合したカルボニル基であることを意味し、具体的には例えば、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、1-プロピルオキシカルボニル基、2-プロピルオキシカルボニル基等があげられる。

【0025】

本明細書における「 $C_{1-6}$ アルキルスルホニル基」とは前記定義の「 $C_{1-6}$ アルキル基」が結合したスルホニル基であることを意味し、具体的には例えば、メチルスルホニル基、エチルスルホニル基、1-プロピルスルホニル基、2-プロピルスルホニル基等があげられる。

【0026】

本明細書における「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子を意味する。

【0027】

本明細書中における「 $C_{6-10}$ アリール基」とは、炭素数6~10の芳香族性の炭化水素環式基をいい、具体的には例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基などが挙げられる。

【0028】

本明細書中における「複素環」とは、環を構成する原子中に1~2個のヘテロ原子を含有し、環中に二重結合を含んでいてもよく、非芳香族性の環または芳香族性の環を意味する。

【0029】

本明細書中における「含窒素複素環」とは、環を構成する原子中に1~2個の窒素原子を含有し、環中に二重結合を含んでいてもよく、非芳香族性の環または芳香族性の環を意味する。

【0030】

本明細書における「ヘテロ原子」とは、硫黄原子、酸素原子または窒素原子を意味する。

【0031】

本明細書における「5~10員含窒素ヘテロアリール環」とは、環を構成する原子の数が5ないし10であり、環を構成する原子中に少なくとも1個の窒素原子を含み、さらに1または複数個の窒素原子以外のヘテロ原子を含有してもよい、芳香族性の環を意味する。

【0032】

具体的には例えば、ピリジン環、ピロール環、オキサゾール環、イソオキサゾール環、チアゾール環、イソチアゾール環、インドール環、イソインドール環、イミダゾール環、トリアゾール環、ピラゾール環、ピリダジン環、プリミジン環、ピラジン環、キノリン環、イソキノリン環、ベンズイミダゾール環などがあげられる。

【0033】

当該「5~10員ヘテロアリール環」において好ましくは、ピリジン環、ピロール環、イミダゾール環をあげることができ、より好ましくはピリジン環をあげることができる。

【0034】

本明細書における「5~10員含窒素ヘテロアリール基」とは、前記「5~10員ヘテロアリール環」から任意の位置の水素原子を1または2個除いて誘導される一価または二価の基を意味する。具体的には、ピリジル基、ピロリル基、オキサゾリル基、イソオキサゾリル基、チアゾリル基、イソチアゾリル基、インドリル基、イソインドリル基、イミダ

10

20

30

40

50

ゾリル基、トリアゾリル基、ピラゾリル基、ピリダジニル基、ピリミジニル基、ピラジニル基、キノリル基、イソキノリル基、ベンズイミダゾリル基が挙げられる。

【0035】

本明細書における「4～8員ヘテロ環」とは、

1. 環を構成する原子の数が4ないし8であり、
2. 環を構成する原子中に1～2個のヘテロ原子を含有し、
3. 環中に二重結合を1～2個含んでいてもよく、
4. 環中にカルボニル基を1～3個含んでいてもよい、
5. 単環式である非芳香族性の環を意味する。

4～8員ヘテロ環としては、ヘテロ原子として窒素原子を含有する4～8員含窒素ヘテロ環が好ましい。

10

【0036】

4～8員ヘテロ環として具体的には例えば、アゼチジン環、ピロリジン環、ピペリジン環、アゼパン環、アゾカン環、テトラヒドロピラン環、モルホリン環、チオモルホリン環、ピペラジン環、チアゾリジン環、ジオキサソリン環、チアゾリン環などが挙げられる。当該「4～8員ヘテロ環」において好ましくは、ピロリジン環、ピペリジン環、モルホリン環、ピペラジン環が挙げられる。

【0037】

本明細書における「4～8員ヘテロ環式基」とは、前記「4～8員ヘテロ環」から任意の位置の水素原子を1または2個除いて誘導される一価または二価の基を意味する。4～8員ヘテロ環式基としては、具体的には例えば、アゼチジニル基、ピロリジニル基、ピペリジニル基、アゼパニル基、アゾカニル基、テトラヒドロピラニル基、モルホリニル基、チオモルホリニル基、ピペラジニル基、チアゾリジニル基、ジオキサニル基、イミダゾリル基、チアゾリル基などが挙げられる。

20

【0038】

本明細書における「縮合芳香族複素環」とは、その複素環部がベンゼン環などの芳香族環とオルソ縮合している環状構造を意味し、複素環部は上記定義の複素環である。

【0039】

本明細書における「縮合芳香族ヘテロ環式基」とは、そのヘテロ環式部がベンゼン環などの芳香族環とオルソ縮合している環状構造を意味し、ヘテロ環式部は上記定義のヘテロ環式基である。

30

たとえば、インドリニル基、イソインドリニル基、1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリンなどが挙げられる。

【0040】

本明細書における「ハロゲン化 $C_{1-6}$ アルキル基」とは前記定義「 $C_{1-6}$ アルキル基」中の任意の少なくとも1つの水素原子を、前記定義「ハロゲン原子」で置換した基を意味する。たとえば、トリフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、モノフルオロメチル基などが挙げられる。

【0041】

本明細書における「置換基を有していてもよい」とは、置換可能な部位に、任意に組み合わせる1または複数個の置換基を有していてもよいことを意味する。当該置換基とは具体的には例えば、以下の置換基A群から選ばれる基をあげることができる。

40

[置換基A群]

ハロゲン原子、水酸基、メルカプト基、ニトロ基、シアノ基、ホルミル基、カルボキシル基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、アミノ基、オキソ基、イミノ基、 $C_{1-6}$ アルキル基、 $C_{1-6}$ アルコキシ基

【0042】

本明細書における「塩」とは、本発明に係る化合物と塩を形成し、かつ薬理的に許容されるものであれば特に限定されず、例えば、無機酸塩、有機酸塩、無機塩基塩、有機塩基塩、酸性または塩基性アミノ酸塩などがあげられる。

50

## 【 0 0 4 3 】

無機酸塩の好ましい例としては、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などがあげられ、有機酸塩の好ましい例としては、例えば酢酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、ステアリン酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩などがあげられる。

## 【 0 0 4 4 】

無機塩基塩の好ましい例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられ、有機塩基塩の好ましい例としては、例えばジエチルアミン塩、ジエタノールアミン塩、メグルミン塩、N , N ' - ジベンジルエチレンジアミン塩などがあげられる。

10

## 【 0 0 4 5 】

酸性アミノ酸塩の好ましい例としては、例えばアスパラギン酸塩、グルタミン酸塩などが挙げられ、塩基性アミノ酸塩の好ましい例としては、例えばアルギニン塩、リジン塩、オルニチン塩などがあげられる。

## 【 0 0 4 6 】

また、本発明の化合物は、大気中に放置しておくことにより、水分を吸収し、吸着水が付いたり、水和物となったりする場合があります、そのような水和物も本発明に包含される。

さらに、本発明の化合物は、他のある種の溶媒を吸収し、溶媒和物となる場合があるが、そのような塩も本発明に包含される。

20

## 【 0 0 4 7 】

また本発明において「遺伝子」とは、転写単位をセンスまたはアンチセンスにコードするDNAまたはRNAを言う。転写単位とは、一続きに転写される配列を言う。ある蛋白質をコードする核酸（DNAまたはRNA）は、本発明においてその蛋白質の遺伝子とも言う。

## 【 0 0 4 8 】

また、本明細書において、「または」という用語は非排他的に用いられる。例えば「A、B、またはC」は、A、B、またはCのいずれかの要素を少なくとも含むことを意味しているに過ぎず、A、B、およびCの2つ以上または3つ全てを含むもの、およびそれ以外の要素を含むものも含まれる。

## 【 0 0 4 9 】

また本明細書において表 1 から表 3 に示した化合物は、化合物番号で表わす場合もある。これらの化合物は、化合物番号を引用して「GIF-」として表記されることもある。

30

## 【発明の効果】

## 【 0 0 5 0 】

本発明により、SRPIN-1 (SR protein phosphorylation inhibitor 1) およびその類縁体がリン酸化酵素SRPKの阻害活性を有することが明らかにされた。SR蛋白質はSRPKによるリン酸化によって細胞中で安定に存在しているが、SRPIN-1またはその類縁体等によってSRPKの酵素活性を阻害すると、SR蛋白質のリン酸化が阻害され、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して分解されることを見出した。そこでSRPIN-1およびその類縁体を添加してSRPKの阻害を試みたところ、HIV感染実験ではこれらの化合物にウイルス複製を抑制する抗ウイルス作用を有することを見出した。

40

## 【 0 0 5 1 】

更に、本発明は、SR蛋白質の活性を制御することにより、同一のメカニズムで、広範囲なウイルスに対して有効な抗ウイルス剤を提供するという効果を奏するものである。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 5 2 】

【図 1 A】「HIV感染細胞におけるSR蛋白質のリン酸化」 pNL4 - 3ゲノムを遺伝子導入したFlp-In-293細胞中のリン酸化SR蛋白質を、抗リン酸化SR蛋白質マウスモノクローナル抗体 (Mab104)、抗SC35マウス抗体、及び抗SF2マウス抗体を用いたウエスタン解析より調べた。

50

【図1B】「SR蛋白質の分解」 Flp-In-293細胞に、HAタグを融合したSRp75, SRp55, SRp40遺伝子のプラスミド遺伝子導入し、MG132(474790; CALBIOCHEMより購入)を終濃度(10  $\mu$ M)で加えた。細胞を溶解して熱変性を行い、蛋白質サンプルとしSDS-PAGEを行い、ウサギ抗HA抗体を一次抗体、ロバ抗ウサギIgG抗体を二次抗体としてウエスタン解析した。

【図2A】「SRPK2安定的発現細胞におけるSR蛋白質のリン酸化」 Flp-In-293細胞にマウスSRPK2遺伝子を導入したSRPK2安定的発現細胞(SRPK2-2)及び親株Flp-In293(mock)の2つの細胞にpNL4-3を遺伝子導入して、4日後にHIV感染における内在性SR蛋白質の動態を図1Aと同様にウエスタン解析により調べた。

【図2B】「SRPK2安定的発現細胞におけるSR蛋白質の存在」 図2Aと同じmockとSRPK2-2細胞に、HIVpNL4-3ゲノムと、HAタグを融合したSRp75, SRp55, SRp40遺伝子のプラスミドを遺伝子導入し、36時間後にサンプルを回収して、ウエスタン解析を行った。

【図2C】「HIVの産生量を測定」 上記図2Aの場合の培養上清を回収してHIVの産生量を測定した。

【図3A】「in vivoでのHIVの産生に寄与するSR蛋白質の検討」 Mock、SC35、SF2、SRp40、SRp55、SRp75発現プラスミドを各々Flp-In293細胞に遺伝子導入し、36時間後に培養上清を回収し、ルミパルスELISAシステムを用いてHIVp24の量を測定した。

【図3B】「hnRNPA1を用いた、in vivoにおけるHIV産生への効果の検討」 一定量(500ng)のSRp40、SRp75発現プラスミドに加えて、hnRNPA1発現プラスミドの量を段階的に増やしてFlp-In293細胞へ遺伝子導入を行った。36時間後に培養上清を回収し、ルミパルスELISAシステムを用いてHIVp24の量を測定した。

【図4A】「細胞内SR蛋白質のリン酸化を阻害するための、SRPKの阻害剤の探索」 SRPIN-1(SRPk Inhibitor-1)の構造式

【図4B】「SRPIN-1を用いたSRPK1のリン酸化活性の阻害の検討」 SF2のRSドメインに相当するRSペプチドを、10mM Tris-HCl(pH 7.5)で1mg/mlになるように溶解した。SRPK1蛋白質を1  $\mu$ g用いて、反応バッファー(250  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 0.25mM ATP、1 mCi [ <sup>-32</sup>P] ATP、SRPIN-1終濃度0.1、0.3、1.0、3.0、10.0  $\mu$ M)中で30分の湯浴で10分間インキュベートし、反応液をP81フォスフォセルロースメンブレン(P81; Whatman)に滴下し、5%リン酸溶液で洗浄した。洗浄後、P81メンブレンの<sup>32</sup>Pについての放射活性を液体シンチレーションカウンターによって測定した。

【図4C】「SRPIN-1を用いたin vivoにおけるSR蛋白質のリン酸化阻害と、それに伴うSR蛋白質分解の誘導の検討」 Flp-In293細胞にHA-SRp75プラスミドを遺伝子導入して、36時間後にMG132(終濃度10  $\mu$ M)、SRPIN-1(10、20、50  $\mu$ M)をそれぞれ添加して15時間インキュベートした。その後、細胞を溶解して、SDS-PAGEして、抗HA抗体を用いたウエスタン解析を行った。また蛋白質量のコントロールとして抗  $\alpha$ -アクトチン抗体を用いてウエスタン解析を行った。

【図4D】「SRPIN-1の添加による、HIV感染の阻害の検討」 MT-4細胞に、293T細胞で調製したHIVビリオンを添加すると同時に、SRPIN-1(終濃度0.5、10、20  $\mu$ M)を添加した。2時間後37% CO<sub>2</sub>の培養条件下でインキュベートした後、細胞を遠心して培養液に交換後、48時間後に培養上清を回収してルミパルスELISAシステムによってHIVp24の量を測定した。

【図5A】「SRPIN-1およびその類縁体によるSRPK阻害活性の検討」 SRPIN-1(化合物番号340)およびその類縁体(化合物番号341~349、608~626)のSRPK1およびSRPK2のリン酸化活性に対する阻害効果を定量した。

【図5B】「SRPIN-1およびその類縁体によるHIV複製の抑制効果」 HIV複製に対するSRPIN-1およびその類縁体の抑制効果を、MT-4細胞でアッセイした結果を示す。

【図5C】「SRPIN-1およびその類縁体によるHIV複製の抑制効果」 Jurkat細胞を用いて、図5Bと同様にHIV複製に対するSRPIN-1およびその類縁体の抑制効果を測定した結果を示す。

【図6A】「シンドビスウイルスに対するSRPIN-1の抗ウイルス作用」 シンドビスウイルスを感染させた細胞の位相差顕微鏡像を示した。SRPIN-1非投与の細胞では、シンドビ

10

20

30

40

50

スウイルスの増殖による細胞傷害が顕著に認められたが、SRPIN-1の投与により細胞傷害は劇的に抑制された。

【図6B】「シンドビスウイルスに対するSRPIN-1の抗ウイルス作用」 シンドビスウイルスを感染させた細胞のプラークアッセイの結果を示した。5 $\mu$ M以上のSRPIN-1はシンドビスウイルスの増殖を有意かつ濃度依存的に抑制した。

【図7】「サイトメガロウイルスに対するSRPIN-1およびその類縁体の抗ウイルス作用」 サイトメガロウイルスを感染させた細胞の位相差顕微鏡像を示した。対照群の細胞(図中の1および2)はサイトメガロウイルス感染に特有の形態変化と細胞死が高率に観察されたのに対し、SRPIN-1またはその類縁体(化合物番号349)を添加(20 $\mu$ l)した細胞(図中の3および5)においては、サイトメガロウイルス感染による異常な形態変化や細胞死は抑制された。

10

【図8】「SARSウイルスに対するSRPIN-1およびその類縁体の抗ウイルス作用」 SARSウイルスを感染させた細胞のプラークアッセイの結果を示した。SARSウイルスの感染により細胞死したプラーク数をカウントし、SRPIN-1およびその類縁体の抗ウイルス作用を検討した(プラークアッセイ)。その結果、図8Aに示したように、40 $\mu$ MのSRPIN-1およびその類縁化合物(化合物番号349)はSARSウイルスの増殖を有意に抑制した。また図8Bに示したように、SRPIN-1は1 $\mu$ Mから40 $\mu$ Mの濃度範囲において濃度依存的にSARSウイルスの増殖を抑制することが判明した。

【発明を実施するための最良の形態】

【0053】

20

本願発明者等は、SR蛋白質をリン酸化するSRPK酵素を阻害することにより、HIVの複製を阻害することができることから、この現象を広く応用することにより、広範なウイルスに対して、抗ウイルス剤を提供できるかを検討した。

【0054】

I. SR蛋白質 活性の低減：分解と安定化

(1)本願発明者等は、細胞のHIVウイルスによる感染とSR蛋白質のリン酸化状態及びSR蛋白質の細胞での存在の有無の関係について調べた。具体的には、NL4-3タイプのHIVウイルスを293細胞に感染させた後、SR蛋白質に対する抗体及びリン酸化されたSR蛋白質に対する抗体によって、細胞中のリン酸化された蛋白質と細胞中でのSR蛋白質(全量)を調べた。

30

【0055】

また、SR蛋白質をリン酸化するSRPKを強制的に発現させた細胞へのHIVウイルスによる感染と同細胞内のSR蛋白質のリン酸化状態及びSR蛋白質の細胞での存在の有無の関係についても調べた。具体的には、上記と同様に、NL4-3タイプのHIVウイルスをSRPK-2を強制的に発現させた293細胞に感染させた後、SR蛋白質に対する抗体及びリン酸化されたSR蛋白質に対する抗体によって、同細胞中のリン酸化された蛋白質と細胞中でのSR蛋白質(全量)を調べた。

【0056】

上記の結果から、SR蛋白質はリン酸化されることで細胞中で安定化するが、逆に、SR蛋白質を脱リン酸化させることにより、SR蛋白質を分解させることができることが分かった。

40

【0057】

さらに、検証のため、本願発明者等は、SR-HA融合蛋白質を293細胞内に発現させ、ユビキチン・プロテアソーム阻害剤であるMG132の添加の有無により、抗HA-抗体に反応する融合SR-HAのシグナル強度を測定したところ、MG132により、蛋白質分解が抑制されていることが見られたので、SR蛋白質は、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して分解されることがわかった。

【0058】

すなわちウイルス感染に応答して、宿主は防御機構としてSR蛋白質の分解を行うと推測された。しかしSR蛋白質のリン酸化酵素を強制発現した状態では、SR蛋白質はリン酸化さ

50

れることで分解されずに安定化され、防御機構を破綻してウイルス産生の昂進に寄与することを見出した。

【0059】

つまり、SR蛋白質は、脱リン酸化されることで、ユビキチン・プロテアソーム経路で分解されてしまうことが分かった。SR蛋白質は、遺伝子転写に必須であるから、SR蛋白質を脱リン酸化することにより、ウイルスの増殖阻害ができることが分かった。

【0060】

(2) 次に、SR蛋白質のリン酸化酵素の阻害を検討した。SR蛋白質のリン酸化を担うリン酸化酵素としてはSRPK1/2、Clk/Sty family kinase、PRP4、DNA topoisomerase Iなどが候補と考えられているが、スプライシングにおける各々の機能差については不明な点が多い。そこで、本願発明者等は、SRPKを阻害することによる、ウイルス感染細胞からのウイルス産生状態を、SRPK阻害剤であるSRPIN-1を用いて調べた。

【0061】

すると、SRPIN-1によるSRPKの阻害が、積極的なSR蛋白質の分解を引き起こすことを見出した。

【0062】

(3) 更に、またHIVの感染と同時に、スプライシングを促進するSR蛋白質と、*in vitro*では拮抗して働くことが知られているhnRNPA1を細胞に強制発現させたところ、SRp40とSRp75はHIV産生を更に昂進させ、hnRNPA1の量依存的にHIV産生を抑制することを初めて*in vivo*で見出した。

【0063】

以上のように、SR蛋白質の脱リン酸化は、生体(人体)のウイルスに対する防御反応であり、既に、アデノウイルス及びワクシニアウイルスについては、動物細胞に感染後、当該動物細胞内でのSR蛋白質が脱リン酸化されることは確かめられており(Nature Vol.393, pp.185-187, EMBO Rep Vol.3, pp.1088-1093)、上記のように脱リン酸化されると、SR蛋白質は速やかに分解され、ウイルスの遺伝子の発現に利用できなくなり、結局これらのウイルスも、増殖できないものと考えられる。

【0064】

本発明者らは、HIVとは異なるウイルスであるシンドビスウイルス、サイトメガロウイルス、およびSARSコロナウイルスにおいても、SRPK阻害剤によるSR蛋白質の活性抑制が、HIVと同様にウイルス増殖を抑制することを確認した。従って、SR蛋白質の活性を制御することによる抗ウイルス作用は、広範なウイルスに対して有効であるといえる。

【0065】

II.本願発明には、SR蛋白質の活性を制御することによる、抗ウイルス剤、ウイルス産生阻害方法、及びウイルス病治療方法が包含される。本願発明には、SR蛋白質活性抑制剤を有効成分として含む抗ウイルス剤が包含される。ここで、SR蛋白質の活性の制御には、発現制御および安定化制御も含まれる。例えば、SR蛋白質の転写または翻訳を抑制したり、あるいはSR蛋白質をコードするmRNAの安定性またはSR蛋白質の安定性を低下させることにより、SR蛋白質の活性を低下させることができる。好ましくは、本発明におけるSR蛋白質の活性の制御においては、SR蛋白質の活性または発現量を直接または間接に低下させるSR蛋白質の活性抑制剤が用いられる。SR蛋白質の活性または発現量を低下させるためには、SR蛋白質を直接標的とする以外に、例えばSRPKによるSR蛋白質のリン酸化を抑制および/または脱リン酸化を促進することも好ましい。例えばプロテインフォスファターゼ2A(フォスファターゼ2Aとも記す)を活性化することにより、SR蛋白質の脱リン酸化が促進される。従って、プロテインフォスファターゼ2Aの発現および/または活性を上昇させる化合物を用いてウイルスの増殖を抑制することができる。また、SRPKの発現および/または活性を阻害することにより、SR蛋白質のリン酸化を阻害することができる。従ってSRPKの阻害剤は、本発明における好適な抗ウイルス剤となる。

【0066】

[制御対象SR蛋白質]

なお、本願発明で活性を低減又は阻害させるべきSR蛋白質は、任意のSR蛋白質、すなわち、X16/SRp20, SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, 9G8, HRS/SRp40, SRp46, SRp55, SRp75, 及びp54が含まれるが、好適には、SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, HRS/SRp40, SRp46, 及びSRp75,であり、特に好適には、SRp40及びSRp75である。以下でSR蛋白質というときは、SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, HRS/SRp40, SRp46, 又はSRp75を意味する。

【0067】

X16/SRp20をコードする遺伝子配列は、例えば Accession number L10838 の1-492に示されている。またX16/SRp20のアミノ酸配列は、Accession number NP\_003008、AAA36648に示されている (Zahler, A. et al., 1992, SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors, Genes Dev. 6:837-847)。SF2/ASF/SRp30aをコードする遺伝子配列は、例えば Accession number NM\_006924 の91-834に示されている。またSF2/ASF/SRp30aのアミノ酸配列は、Accession number NP\_008855、Q07955 に示されている (Ge, H. et al., Cell 66, 373-382 (1991))。SC35/PR264/SRp30bをコードする遺伝子配列は、例えば Accession number M90104 の156-818に示されている。またSC35/PR264/SRp30bのアミノ酸配列は、Accession number AAA60306、Q01130 に示されている (Fu, X.D. and Maniatis, T. Science 256, 535-538 (1992))。SRp30cをコードする遺伝子配列は、例えば Accession number U30825 の53-715、NM\_003769の147-809に示されている。またSRp30cのアミノ酸配列は、Accession number AAA93069、Q13242、NP\_003760 に示されている (Screaton, G. R. et al., EMBO J. 14, 4336-4349 (1995))。9G8をコードする遺伝子配列は、例えば Accession number NM\_006276の54-464に示されている。また9G8のアミノ酸配列は、Accession number NP\_006267、Q16629等に示されている (Lejeune, F. et al., J. Biol. Chem. 276, 7850-7858 (2001); Popielarz, M. et al., J. Biol. Chem. 270, 17830-17835 (1995); Cavaloc, Y. et al., EMBO J. 13, 2639-2649 (1994))。HRS/SRp40をコードする遺伝子配列は、例えば Accession number AF020307 (join(2406-2531, 2864-2925, 3049-3147, 3433-3503, 4740-4812, 5269-5382, 5472-5492))、アミノ酸配列は、Accession number AAC39543、Q13243等に示されている (Du, K. and Taub, R., Gene 204 (1-2), 243-249 (1997); Screaton, G.R. et al., EMBO J. 14, 4336-4349 (1995))。SRp46をコードする遺伝子配列は、例えば Accession number AF031166の1-816に示されている。またSRp46のアミノ酸配列は、Accession number AAK54351等に示されている (Soret, J. et al., Mol. Cell. Biol. 18, 4924-4934 (1998))。SRp55をコードする遺伝子配列は、例えば Accession number U30883の106-1137に示されている。またSRp55のアミノ酸配列は、Accession number AAA93073, Q13247等に示されている (Screaton, G.R. et al., EMBO J. 14, 4336-4349 (1995); Zahler, A.M. et al., Genes Dev. 6, 837-847 (1992); Barnard, D.C. and Patton, J.G., Mol. Cell. Biol. 20, 3049-3057 (2000))。SRp75をコードする遺伝子配列は、例えば Accession number BC002781の98-1579、NM\_005626の98-1579に示されている。またSRp75のアミノ酸配列は、Accession number AAH02781、NP\_005617、Q08170等に示されている (Zahler, A.M. et al., Mol. Cell. Biol. 13, 4023-4028 (1993))。p54をコードする遺伝子配列は、例えば Accession number M74002の84-1535に示されている。またp54のアミノ酸配列は、Accession number AAA35554、Q05519等に示されている (Chaudhary, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 8189-8193 (1991))。

【0068】

[対象ウイルス]

本発明の抗ウイルス剤は、特にHIVの増殖阻害に好適であるが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に限らず、RNA型ウイルスに属する重症急性呼吸器症候群 (SARS)、ポリオウイルス、ヒトライノウイルス、成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I)、A型、C型、D型又はE型等のB型以外の肝炎ウイルス、ワクシニアウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ヒトコロナウイルス、エボラ出血熱ウイルス、インフルエンザウイルス、シンドビスウイルスを含めたウイルスについても、同様の効果を有する。なお、ヒトコロナウ

10

20

30

40

50

ルスには、SARSコロナウイルス（SARS-associated coronavirusまたはSARSウイルスとも言う）が含まれる。

【0069】

またDNA型ウイルスである単純ヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルスについても感染にともなう宿主の防御機構としてSR蛋白質の脱リン酸化が報告されていることから、SRPIN-1の効果は単純ヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルスを含め、B型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、ポリオーマウイルス、ヒトパピローマウイルスについても、同様の抗ウイルス活性を有する。

【0070】

本発明において、特に好適な標的となるウイルスとしては、レトロウイルス科ウイルス（Retroviridae；レンチウイルス属ウイルスを含む）、トガウイルス科ウイルス（Togaviridae；アルファウイルス属ウイルスを含む）、ヘルペスウイルス科ウイルス（Herpesviridae；サイトメガロウイルスを含む）、コロナウイルス科ウイルス（Coronaviridae；コロナウイルス属ウイルスを含む）が挙げられる。

【0071】

[抗ウイルス剤]

本願発明には、(1)SR蛋白質の活性を低減又は阻害することによる抗ウイルス剤、より具体的には、(i)SR蛋白質の脱リン酸化を促進させることによる抗ウイルス剤、及び(ii)SR蛋白質をリン酸化させる蛋白質を阻害することによる抗ウイルス剤が包含される。

【0072】

更に、本願発明には、(2)SR蛋白質の発現を阻害することによる抗ウイルス剤、並びに、(3)SR蛋白質と逆の機能をする蛋白質を活性化することによる抗ウイルス剤が包含される。

【0073】

特に本発明は、SRPKの活性および/または発現を阻害する化合物を含む抗ウイルス剤に関する。SRPKを活性および/または発現を阻害することにより、SR蛋白質の安定化に貢献するリン酸化を抑制し、結果としてSR蛋白質の分解を促進してSR蛋白質の活性を低下させる。従って、SRPK（SRPK1および/またはSRPK2）は、本発明において特に好適な阻害の標的である。

【0074】

[ウイルス産生阻害方法]

また、本願発明には、(1)SR蛋白質の活性を低減又は阻害することによるウイルスの産生阻害方法、より具体的には、(i)SR蛋白質の脱リン酸化を促進させることによるウイルスの産生阻害方法、及び(ii)SR蛋白質をリン酸化させる蛋白質を阻害することによるウイルスの産生阻害方法が包含される。特に本発明は、SRPKの活性および/または発現を阻害する工程を含むウイルスの産生阻害方法に関する。SRPKを阻害することにより、SR蛋白質のリン酸化が阻害され、SR蛋白質レベルが低下しSR蛋白質の活性は低下する。

【0075】

更に、本願発明には、(2)SR蛋白質の発現を阻害することによるウイルスの産生阻害方法、並びに、(3)SR蛋白質と逆の機能をする蛋白質を活性化することによるウイルスの産生阻害方法が包含される。

【0076】

すなわち本発明は、以下の発明も包含する。

〔M1〕SR蛋白質の活性または発現量を低下させる工程を含む、ウイルス増殖を抑制する方法。

〔M2〕SR蛋白質が、SF2/ASF/SRp30a、SC35/PR264/SRp30b、SRp30c、HRS/SRp40、SRp46、またはSRp75である、〔M1〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔M3〕SR蛋白質の活性または発現量の低下させる工程が、SR蛋白質のリン酸化を抑制または脱リン酸化を促進する工程である、〔M1〕または〔M2〕に記載の方法。

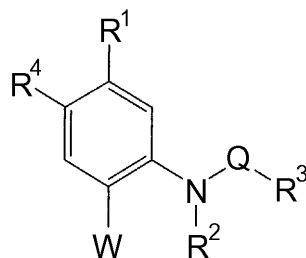
〔M4〕SR蛋白質のリン酸化を抑制または脱リン酸化を促進する工程が、プロテインフォスファターゼ2A (Protein Phosphatase 2A) の活性を上昇させる工程である、〔M3〕に記載の方法。

〔M5〕プロテインフォスファターゼ2A (Protein Phosphatase 2A) の活性を上昇させる工程が、HIVのtat遺伝子、アデノウイルスのE4-ORF4遺伝子、およびワクシニアウイルスのVH1遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子を発現するベクターを導入する工程である〔M4〕に記載の方法。

〔M6〕SR蛋白質のリン酸化を抑制または脱リン酸化を促進する工程が、SRPKの発現または活性を阻害する工程である、〔M3〕に記載の方法。

〔M7〕SRPKがSRPK1またはSRPK2である、〔M6〕に記載の方法。

〔M8〕SRPKの発現または活性を阻害する工程が、下記一般式で表されるアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物を投与する工程である、〔M6〕または〔M7〕に記載の方法。



( I )

上記式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{Q}$ 、および $\text{W}$ は、本明細書上記〔16〕の通りである。

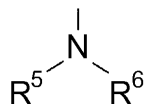
〔M9〕前記 $\text{R}^1$ が、水素原子、置換基を有していてもよい $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、またはハロゲン原子である、〔M8〕に記載の方法。

〔M10〕前記 $\text{R}^2$ が、水素原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基である、〔M8〕または〔M9〕に記載の方法。

〔M11〕前記 $\text{R}^3$ が、置換基を有していてもよい $\text{C}_{6-10}$ アリール基、または置換基を有していてもよい5～10員含窒素ヘテロアリール基である、〔M8〕から〔M10〕のいずれかに記載の方法。

〔M12〕前記 $\text{R}^4$ が、水素原子である、〔M8〕から〔M11〕のいずれかに記載の方法。

〔M13〕前記 $\text{W}$ が、水素原子、ハロゲン原子、または下記一般式 ( I I )



( I I )

( 式中、 $\text{R}^5$ および $\text{R}^6$ は、上記の通り ) で表される、〔M8〕から〔M12〕のいずれかに記載の方法。

〔M14〕〔M8〕に記載のアニリン誘導体が、本明細書に記載の化合物番号340、348、613、616、618、622、624からなる群より選択される、〔M8〕に記載の方法。

〔M15〕SRPKの発現または活性を阻害する工程が、SRPKに対するmiRNA、siRNA、モルフォリノオリゴ、または該miRNAまたはsiRNAの発現ベクターを導入する工程である、〔M6〕に記載の方法。

〔M16〕SR蛋白質の活性または発現量を低下させる工程が、SR蛋白質と逆の活性を有する物質を投与する工程である、〔M1〕または〔M2〕に記載の方法。

〔M17〕SR蛋白質の活性と逆の活性を有する物質が、hnRNP A1発現ベクターである、〔M16〕

10

20

30

40

50

〕に記載の方法。

〔M18〕ウイルスが、(1) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、重症急性呼吸器症候群(SARS)、ポリオウイルス、ヒトライノウイルス、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-I)、A型、C型、D型又はE型肝炎ウイルス、ワクシニアウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ヒトコロナウイルス、エボラ出血熱ウイルス、インフルエンザウイルス、若しくはシンドビスウイルスのいずれかのRNA型ウイルス、又は(2) 単純ヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルスを含め、B型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、ポリオーマウイルス、若しくはヒトパピローマウイルスのいずれかのDNA型ウイルスである、〔M1〕から〔M17〕のいずれかに記載の方法。

10

〔M19〕〔M8〕に記載のアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物を投与する工程を含む、SRPKを阻害する方法。

〔M20〕SRPKがSRPK1またはSRPK2である、〔M19〕に記載の方法。

〔M21〕前記R<sup>1</sup>が、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、またはハロゲン原子である、〔M19〕または〔M20〕に記載の方法。

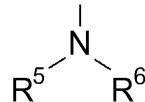
〔M22〕前記R<sup>2</sup>が、水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基である、〔M19〕から〔M21〕のいずれかに記載の方法。

〔M23〕前記R<sup>3</sup>が、置換基を有していてもよいC<sub>6-10</sub>アリール基、または置換基を有していてもよい5~10員含窒素ヘテロアリール基である、〔M19〕から〔M22〕のいずれかに記載の方法。

20

〔M24〕前記R<sup>4</sup>が、水素原子である、〔M19〕から〔M23〕のいずれかに記載の方法。

〔M25〕前記Wが、水素原子、ハロゲン原子、または下記一般式(II)



(II)

(式中、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、上記の通り)で表される、〔M19〕から〔M24〕のいずれかに記載の方法。

〔M26〕〔M8〕に記載のアニリン誘導体が、本明細書に記載の化合物番号340、348、613、616、618、622、624からなる群より選択される化合物、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物である、〔M19〕に記載の方法。

30

【0077】

さらに本発明は、SR蛋白質の発現および/または活性を低下させる化合物の、ウイルス増殖の阻害のための使用、および抗ウイルス剤(ウイルス増殖を抑制するための試薬および/または医薬)の製造における使用にも関する。具体的には本発明は、以下の発明にも関する。

〔U1〕SR蛋白質の活性または発現量を低下させる化合物の、ウイルス増殖を抑制するための使用、または抗ウイルス剤の製造における使用。

〔U2〕SR蛋白質が、SF2/ASF/SRp30a、SC35/PR264/SRp30b、SRp30c、HRS/SRp40、SRp46、またはSRp75である、〔U1〕に記載の使用。

40

〔U3〕SR蛋白質の活性または発現量の低下させる化合物が、SR蛋白質のリン酸化を抑制または脱リン酸化を促進する化合物である、〔U1〕または〔U2〕に記載の使用。

〔U4〕SR蛋白質のリン酸化を抑制または脱リン酸化を促進する化合物が、プロテインフォスファターゼ2A(Protein Phosphatase 2A)の活性を上昇させる化合物である、〔U3〕に記載の使用。

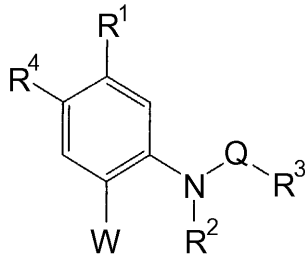
〔U5〕プロテインフォスファターゼ2A(Protein Phosphatase 2A)の活性を上昇させる化合物が、HIVのtat遺伝子、アデノウイルスのE4-ORF4遺伝子、およびワクシニアウイルスのVH1遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子を発現するベクターである、〔U4〕に記載の使用。

50

〔U6〕SR蛋白質のリン酸化を抑制または脱リン酸化を促進する化合物が、SRPKの発現または活性を阻害する化合物である、〔U3〕に記載の使用。

〔U7〕SRPKがSRPK1またはSRPK2である、〔U6〕に記載の使用。

〔U8〕SRPKの発現または活性を阻害する化合物が、下記一般式で表されるアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物である、〔U6〕に記載の使用。



10

( I )

上記式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、Q、およびWは、本明細書上記〔16〕の通りである。

〔U9〕前記 $R^1$ が、水素原子、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルキル基、またはハロゲン原子である、〔U8〕に記載の使用。

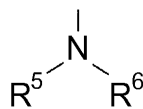
〔U10〕前記 $R^2$ が、水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基である、〔U8〕または〔U9〕に記載の使用。

20

〔U11〕前記 $R^3$ が、置換基を有していてもよい $C_{6-10}$ アリール基、または置換基を有していてもよい5～10員含窒素ヘテロアリール基である、〔U8〕から〔U10〕のいずれかに記載の使用。

〔U12〕前記 $R^4$ が、水素原子である、〔U8〕から〔U11〕のいずれかに記載の使用。

〔U13〕前記Wが、水素原子、ハロゲン原子、または下記一般式(II)



( II )

(式中、 $R^5$ および $R^6$ は、上記の通り)で表される、〔U8〕から〔U12〕のいずれかに記載の使用。

30

〔U14〕〔U8〕に記載のアニリン誘導体が、本明細書に記載の化合物番号340、348、613、616、618、622、624からなる群より選択される、〔U8〕に記載の使用。

〔U15〕SRPKの発現または活性を阻害する化合物が、SRPKに対するmiRNA、siRNA、モルフォリノオリゴ、または該miRNAまたはsiRNAの発現ベクターである、〔U6〕に記載の使用。

〔U16〕SR蛋白質の活性または発現量を低下させる化合物が、SR蛋白質と逆の活性を有する物質である、〔U1〕または〔U2〕に記載の使用。

〔U17〕SR蛋白質の活性と逆の活性を有する物質が、hnRNP A1発現ベクターである、〔U16〕に記載の使用。

40

〔U18〕ウイルスが、(1)ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、重症急性呼吸器症候群(SARS)、ポリオウイルス、ヒトライノウイルス、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-1)、A型、C型、D型又はE型肝炎ウイルス、ワクシニアウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ヒトコロナウイルス、エボラ出血熱ウイルス、インフルエンザウイルス、若しくはシンドビスウイルスのいずれかのRNA型ウイルス、又は(2)単純ヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルスを含め、B型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、ポリオーマウイルス、若しくはヒトパピローマウイルスのいずれかのDNA型ウイルスである、〔U1〕～〔U17〕のいずれかに記載の使用。

50

〔U19〕〔U8〕に記載のアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物の、SRPKを阻害するための使用、またはSRPK阻害剤の製造における使用。

〔U20〕SRPKがSRPK1またはSRPK2である、〔U19〕に記載の使用。

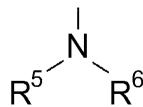
〔U21〕前記R<sup>1</sup>が、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、またはハロゲン原子である、〔U19〕または〔U20〕に記載の使用。

〔U22〕前記R<sup>2</sup>が、水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基である、〔U19〕から〔U21〕のいずれかに記載の使用。

〔U23〕前記R<sup>3</sup>が、置換基を有していてもよいC<sub>6-10</sub>アリール基、または置換基を有していてもよい5～10員含窒素ヘテロアリール基である、〔U19〕から〔U22〕のいずれかに記載の使用。

〔U24〕前記R<sup>4</sup>が、水素原子である、〔U19〕から〔U23〕のいずれかに記載の使用。

〔U25〕前記Wが、水素原子、ハロゲン原子、または下記一般式(II)



(II)

(式中、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、上記の通り)で表される、〔U19〕から〔U24〕のいずれかに記載の使用。

〔U26〕〔U8〕に記載のアニリン誘導体が、本明細書に記載の化合物番号340、348、613、616、618、622、624からなる群より選択される化合物、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物である、〔U19〕に記載の方法。

【0078】

[治療方法]

本願発明には、(1)SR蛋白質の活性を低減又は阻害することによるウイルス病の治療又は予防方法、より具体的には、(i)SR蛋白質を脱リン酸化させることによるウイルス病の治療又は予防方法、及び(ii)SR蛋白質をリン酸化させる蛋白質を阻害することによるウイルス病の治療方法が包含される。特に本発明は、SRPKの活性および/または発現を阻害する工程を含むウイルス病の治療又は予防方法に関する。SRPKを阻害することにより、SR蛋白質のリン酸化が阻害され、SR蛋白質レベルが低下することによりウイルス増殖が抑制される。

更に、本願発明には、(2)SR蛋白質の発現を阻害することによるウイルス病治療又は予防方法、並びに、(3)SR蛋白質と逆の機能をする蛋白質を活性化することによるウイルス病治療又は予防方法が包含される。

【0079】

III.更に本願発明には、抗ウイルス剤のスクリーニング方法、並びにSRPK酵素阻害剤の利用が含まれる。

【0080】

[抗ウイルス剤のスクリーニング方法]

更に本願発明には、(1)SRタンパク質若しくはRS又はSRの2回以上連続するペプチドをSRPKの基質としてSRPK阻害剤をスクリーニングする方法が包含される。

【0081】

[SRPK酵素阻害剤及びその利用]

更に、本願発明には、(1)SRPIN-1またはその類縁体を有効成分として含むSRPK酵素阻害剤、(2)SRPIN-1またはその類縁体を有効成分として含むウイルス増殖阻害剤、及び(3)SRPIN-1またはその類縁体を有効成分として含む抗ウイルス治療薬が包含される。

【0082】

IV.本願発明の具体的開示

(1)SR蛋白質の活性を低減又は阻害する抗ウイルス剤

10

20

30

40

50

(i) S R 蛋白質を脱リン酸化させることによる抗ウイルス剤

S R 蛋白質を脱リン酸化させることによる抗ウイルス剤としては、Phosphatase 2A (Mumb y, M.C. and Walter, G. (1993) *Physiol. Rev.* 73, 673-680; Lechward, K., Awotunde, O. S., Swiatek, W. and Muszynska, G. (2001) *Acta Biochim. Pol.* 48, 921-933; Coh en, P. (1989) *The structure and regulation of protein phosphatases. Annu. Rev. B iochem.* 58, 453-508; Janssens, V. and Goris, J. (2001) *Biochem. J.* 353, 417-39) を活性化する活性化剤が含まれ、具体的には、HIVのtat遺伝子がコードするポリペプチド (例えば、Accession number AAK08486)、又はアデノウイルスのE4-ORF4がコードするポリペプチド (例えば、Accession number AAB37507)、又はワクシニアウイルスのV H 1 がコードするポリペプチド (例えば、Accession number AAV38329) が含まれる。さらに、HIVのtat遺伝子又アデノウイルスのE4-ORF4遺伝子又はワクシニアウイルスのV H 1 遺伝子を載せた遺伝子治療用の発現ベクターが含まれる。tat遺伝子としては、Accession number AF324493のCDS (5830-6044 プラス 8369-8411)、E4-ORF4としては、Accession number S82508のCDS (1634-1993)、ワクシニアウイルスVH1としては、Accession number BT 019522のCDS (1-555) が例示できる。

10

【 0 0 8 3 】

(ii) S R 蛋白質のリン酸化酵素阻害剤

(ii - 1) S R 蛋白質をリン酸化する酵素としては、既に種々のリン酸化酵素が知られているが、これらの酵素は、R S ドメインのリン酸化部位が異なると考えられており、これら R S リン酸化酵素のうち、S R 蛋白質の安定化に寄与する特定のリン酸化を行う酵素としては、S R P Kのみであることを本発明者らは発見した。そこで、S R 蛋白質のリン酸化による安定化を防ぐために、標的とするS R 蛋白質をリン酸化する酵素としては、S R 蛋白質のリン酸化酵素の内、特に、S R P Kがあげられ、S R P Kとしては、S R P K 1 (Nature(1994) Vol.369,pp.678-682) 及びS R P K 2 (Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998) Vol.242:pp.357-364; Wang, H.Y. et al., J. Cell. Biol. 1998, 140:737-750)の両者を挙げる事ができる。SRPK1遺伝子の塩基配列は、Accession number NM\_003137の124-2088、U09564の109-2073、AJ318054の10-2487、NM\_016795の43-1986等を、アミノ酸配列はNP\_003128、AAA20530、CAC39299、CAA11833、NP\_058075等を参照することができる。またSRPK2遺伝子の塩基配列は、Accession number U88666の188-2245、NM\_009274の208-2253等を、アミノ酸配列はAAC05299、NP\_033300等を参照することができる (Nikol akaki,E. et al., J. Biol. Chem. 276, 40175-40182 (2001); Papoutsopoulou,S., et al., Nucleic Acids Res. 27, 2972-2980 (1999); Wang,H.Y. et al., Genomics 57, 310-315 (1999); Gui,J.F. et al., Nature 369, 678-682 (1994); Wang,H.Y. et al., J. Cell Biol. 140, 737-750 (1998); Papoutsopoulou,S. et al., Nucleic Acids Res. 27, 2972-2980 (1999); Kuroyanagi,N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 357-364 (1998); Bedford,M.T. et al., EMBO J. 16, 2376-2383 (1997) )。SRPK1には、SRPK1aと表記されるものも含む。

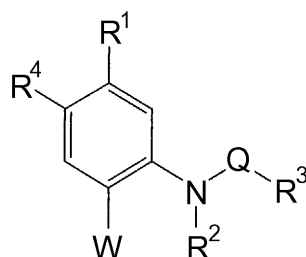
20

30

【 0 0 8 4 】

本願発明の方法で用いるリン酸化酵素 ( S R P K ) を阻害する機能を有する物質としては、次の一般式で示される化合物 ( S R P I N - 1 及びその類縁体を含む )、およびそれらの医薬上許容される塩および水和物を用いることができる。

40



( I )

50

(式中、 $R^1$ は、水素原子、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルキル基、置換基を有していてもよい $C_{2-6}$ アルケニル基、置換基を有していてもよい $C_{2-6}$ アルキニル基、置換基を有していてもよい $C_{6-10}$ アリール基、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、アジド基、ヒドロキシ基、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルコキシ基、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルキルチオ基、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルキルスルホニル基、カルボキシ基、ホルミル基、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルコキシカルボニル基、アシル基、アシルアミノ基、またはスルファモイル基を示し；

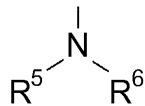
$R^2$ は、水素原子、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルキル基、または置換基を有していてもよいアリール基を示し；

$R^3$ は、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルキル基、置換基を有していてもよい $C_{2-6}$ アルケニル基、置換基を有していてもよい $C_{6-10}$ アリール基、置換基を有していてもよい含窒素複素環、または置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環を示し；

$R^4$ は、水素原子又はハロゲン原子を示し；

Qは、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-C(S)NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHC(O)-$ 、または $-C(O)NHC(S)-$ を示し；

Wは、水素原子、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルキル基、置換基を有していてもよい $C_{6-10}$ アリール基、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルコキシ基、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルキルチオ基、置換基を有していてもよい含窒素複素環、置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環、または下記一般式 ( I I )



( I I )

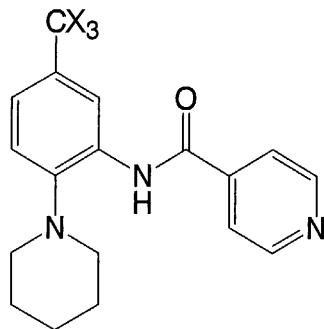
(式中、 $R^5$ および $R^6$ は、互いに同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよい $C_{1-6}$ アルキル基、置換基を有していてもよい含窒素複素環、置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環、アシル基、もしくはアシルアミノ基を示し；または、

前記 $R^5$ および $R^6$ は、隣接する窒素原子と一緒に、置換基を有していてもよい複素環を形成していてもよく、該複素環は、置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環であってもよく；

前記 $R^5$ および $R^6$ は、置換基を有していてもよいシクロアルキリデンアミノ基または置換基を有していてもよい芳香族環縮合シクロアルキリデン基であってもよい。 )。

【 0 0 8 5 】

上記化合物の一例としては、以下の化合物が例示できる。



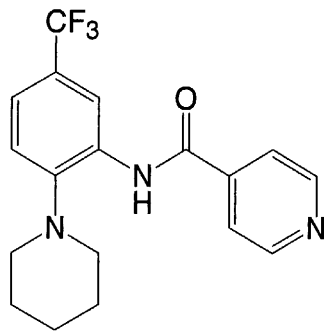
( I I I )

【 0 0 8 6 】

Xとしては、F、Cl、Br、I又はAtを挙げることができる。

具体的には、下記のSRPIN-1を挙げることができる。

【 0 0 8 7 】



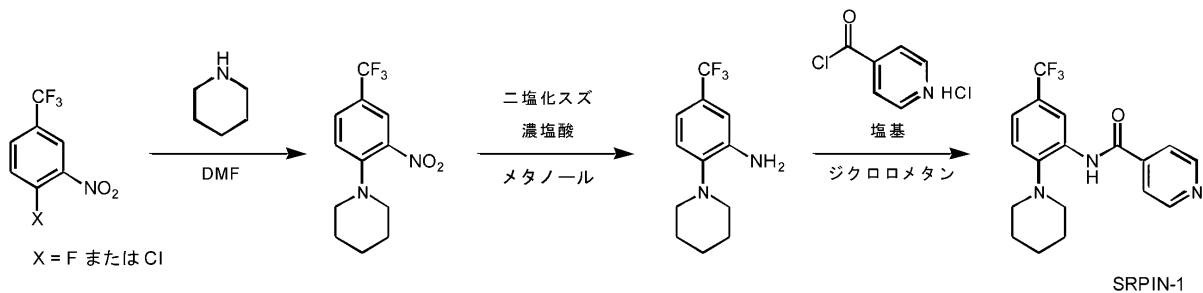
( I V )

10

【 0 0 8 8 】

本発明のSRPIN-1は、Maybridge社 (Trevillet, Tintagel, Cornwall PL34 OHW, England) およびAmbinter社 (46 quai Louis Bleriot, Paris, F-75016 France) より入手できるが、概略次のように化学合成することができる。

【 0 0 8 9 】



20

【 0 0 9 0 】

( ii - 2 ) S R P K 1 遺伝子及び S R P K 2 遺伝子に対するRNA i を利用する抗ウイルス剤

細胞内での S R P K 1 をコードする遺伝子及び S R P K 2 をコードする遺伝子の発現を低下させるために、siRNA、モルフォリノオリゴ、又はmiRNAを用いることができる。

【 0 0 9 1 】

siRNA の設計には、周知の方法を用いることができるが、例えば、次のような方法で設計することができる。

30

【 0 0 9 2 】

( ii - 2 - 1 ) siRNA のターゲット配列としては、5'側や3'側のUTR (非翻訳領域) やスタートコドン付近を避け、スタートコドンより50塩基以上下流であって、ORF中で、AAから始まる又はNAから始まる19~21塩基 (19塩基が最も一般的) でCG含量が50%前後で、可能な限り5'や3'への偏りや繰り返し配列が少ない配列を用いることができる。

【 0 0 9 3 】

siRNAは、AAから始まる場合は、dTdTまたはUU2塩基のオーバーハング、NAから始まるターゲット配列の場合にはdTdN、dTdT、またはUUをつけて調製することができる。

【 0 0 9 4 】

40

なお、目的とするターゲット配列以外と交差反応を起こし、目的以外のタンパク質の発現に影響を及ぼすことを防ぐため、選び出した配列はBLASTサーチ等を用いて他のRNA配列との類似性を確認する。

【 0 0 9 5 】

なお設計されたsiRNAを細胞内で発現するように調製した、siRNA発現ベクターを用いる態様も本発明に含まれる。

【 0 0 9 6 】

モルフォリノオリゴとは、塩基を有するモルフォリノサブユニットが鎖状に複数つながった化合物であり、モルフォリン環および非イオン性ホスホロジアミデート (phosphorodiamidate) のサブユニット間結合構造を含む (US Patents 5,142,047, 5,185,444)

50

。細胞内の安定性が高く、mRNAに対して高い親和性を有することから、モルフォリノアンチセンスオリゴは標的遺伝子の発現抑制のために好適に使用できる (Summerton JE., *Ann NY Acad Sci* 2003; 1002: 189)。効果的なモルフォリノオリゴの設計方法は既に知られている (Summerton, 1989, In: *Discoveries in Antisense Nucleic Acids*; Ed.: C. Brakel; Pub.: The Portfolio Publishing Co., Woodlands, Texas; pages 71-80; Summerton & Weller, 1997, *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.* 7, 187; およびGene Tools社のウェブサイト参照)。モルフォリノオリゴは、Gene Tools社 (Gene Tools, LLC, Philomath, OR) において入手することができる。

【 0 0 9 7 】

( 2 ) S R 蛋白質をコードする遺伝子の発現を阻害することによる抗ウイルス剤には、例えば、siRNA、モルフォリノオリゴ、又はmiRNAが包含される。

10

( 2 - 1 ) siRNA、

siRNAの設計には、上記(ii-2)の方法を用いることができる。

【 0 0 9 8 】

( 3 ) S R 蛋白質と逆の機能をする蛋白質又は該蛋白質を活性化することによる抗ウイルス剤

( 3 - 1 ) SR蛋白質と逆の機能とは、例えばスプライシングにおいて、イントロンに遠位の3'スプライス部位の選択を促進する機能を言う。すなわち、イントロンに近位の3'スプライス部位の選択を促進するSR蛋白質とは逆のスプライシング調節因子を用いて、SR蛋白質の活性をキャンセルすることができる。具体的には、S R 蛋白質と逆の機能をする蛋白質としては、hnRNP A1、A2、及びB1などのheteronuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) を挙げることができるが、好適には、hnRNP A1を挙げることができる。更に好適には、hnRNP A1をコードする遺伝子を遺伝子治療用発現ベクターに載せた抗ウイルス剤が挙げられる。hnRNP A1をコードする遺伝子配列は、例えば Accession number NM\_002136 の105-1064、NM\_031157の105-1220に示されている。またhnRNP A1のアミノ酸配列は、Accession number NP\_002127、NP\_112420等に示されている (Expert-Bezan, Sureau, A. et al., *J. Biol. Chem.* 279, 38249-38259 (2004); Zahler, A.M. et al., *J. Biol. Chem.* 279, 10077-10084 (2004); Marchand, V. et al., *J. Mol. Biol.* 323, 629-652 (2002); Buvoli, M. et al., *EMBO J.* 9, 1229-1235 (1990); Biamonti, G. et al., *J. Mol. Biol.* 207, 491-503 (1989); Buvoli, M. et al., *Nucleic Acids Res.* 16, 3751-3770 (1988); Michael, W.M. et al., *Cell* 83, 415-422 (1995) )。hnRNP A2/B1をコードする遺伝子配列は、例えば Accession number NM\_002137 の170-1192、NM\_031243の170-1228に示されている。またhnRNP A2/B1のアミノ酸配列は、Accession number NP\_002128、NP\_112533等に示されている (Kozu, T., et al., *Genomics* 25, 365-371 (1995); Biamonti, G. et al., *Nucleic Acids Res.* 22, 1996-2002 (1994); Burd, C.G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9788-9792 (1989); Kumar, A. et al., *J. Biol. Chem.* 261, 11266-11273 (1986) )。

20

30

【 0 0 9 9 】

( 4 ) S R P K を阻害する物質をスクリーニングすることによる抗ウイルス剤のスクリーニング方法。

40

本発明の抗ウイルス剤のスクリーニング方法は、例えば、試験化合物をSRPKに作用させる工程、及びSRPKのSR蛋白質をリン酸化する能力を検定する工程を含むSRPK阻害剤を選抜することを含む方法である。該能力を低下させる化合物 (SRPK阻害剤) は、抗ウイルス剤として有用である。特に本願発明には、S R P K 1若しくはS R P K 2をターゲットとする種々の化合物を、SR タンパク質若しくはRS又はSRの2回以上連続するペプチドをSRPKの基質としてSRPK阻害剤をスクリーニングすることを含む抗ウイルス剤のスクリーニング方法も包含する。Arg-Ser (RS) 若しくはSer-Arg (SR) の2回以上連続するペプチドをSRPKの基質として利用し、この基質をリン酸化する能力を低下させる化合物 (SRPK阻害剤) を選抜することで、効率的にSRPKのSR蛋白質リン酸化活性を阻害する化合物を選択することができる。

50

より具体的には、本発明のスクリーニングは以下の工程を含む。

- ( a ) 被験化合物の存在下で、SRPKとその基質を接触させる工程、
- ( b ) 該基質のリン酸化を検出する工程、
- ( c ) 被験化合物の非存在下または低用量の存在下に比べ、該リン酸化を低下させる化合物を選択する工程。

基質としては、上記のようにSR蛋白質、RSドメインを含むその部分ポリペプチド、あるいはRSまたはSRが2回以上連続して繰り返したポリペプチドを用いることができる(実施例参照)。SRPKとしては、野生型SRPK1またはSRPK2、あるいはリン酸化活性を維持する限り、タグペプチドが付加された融合蛋白質やその他の改変蛋白質であってもよい。本発明においては、SR蛋白質に対するリン酸化活性を維持する限り、変異を有するSRPKなどもSRPKと呼ぶ。

10

#### 【 0 1 0 0 】

より具体的には、本発明においてSRPK1とは、( a ) Accession number NP\_003128、AAA20530、CAC39299、CAA11833、または NP\_058075 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、( b ) 該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%、さらに好ましくは90%、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む蛋白質であってリン酸化活性を有する蛋白質、( c ) Accession number NM\_003137の124-2088、U09564の109-2073、AJ318054の10-2487、または NM\_016795の43-1986の一部または全部を含む核酸の相補鎖とストリンジントな条件でハイブリダイズする核酸がコードする蛋白質であってリン酸化活性を有する蛋白質が含まれる。また本発明においてSRPK2とは、( a ) Accession number AAC05299または NP\_033300に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、( b ) 該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%、さらに好ましくは90%、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む蛋白質であってリン酸化活性を有する蛋白質、( c ) Accession number U88666の188-2245、またはNM\_009274の208-2253の一部または全部を含む核酸の相補鎖とストリンジントな条件でハイブリダイズする核酸がコードする蛋白質であってリン酸化活性を有する蛋白質が含まれる。ここで一部とは、例えば連続する20塩基以上、好ましくは25塩基以上、より好ましくは30塩基以上、40塩基以上、45塩基以上、50塩基以上を言う。

20

#### 【 0 1 0 1 】

アミノ酸配列の同一性は、例えばBLASTPプログラム(Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410)を用いて決定することができる。例えばNCBI(National Center for Biotechnology Information)のBLASTのウェブページにおいてLow complexityを含むフィルターは全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて検索を行う(Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7:649-656)。パラメータの設定は、例えばopen gapのコストは11、extend gapのコストは1、wordsizeは2、Dropoff (X) for blast extensions in bitsは7、X dropoff value for gapped alignment (in bits)は15、final X dropoff value for gapped alignment (in bits)は25にする。スコアのためのマトリックスとしてBLOSUM62を用いる。例えば2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム(Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、上記のAccession numberで示した野生型蛋白質のアミノ酸配列全体(例えば配列番号:2または4の全長)に対する同一性の値を計算する。アライメントにおける野生型蛋白質のアミノ酸配列の外側のギャップは無視して同一性の値を計算すればよい。また、ハイブリダイゼーションにおいては、野生型蛋白質のコード配列(例えば配列番号:1または3)を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5xSSC (1xSSCは150 mM NaCl, 15 mM sodium citrateを含む)、7%(W/V) SDS、10 µg/ml 変性サケ精子DNA、5xデンハルト液(1xデンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%

30

40

50

牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む)を含む溶液中、48℃、好ましくは50℃、より好ましくは52℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度、より好ましくは60℃、さらにこの好ましくは65℃、最も好ましくは68℃で2xSSC中、好ましくは1xSSC中、より好ましくは0.5xSSC中、より好ましくは0.1xSSC中で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

【0102】

SRPKのリン酸化活性は、例えば標識したATPを用いてSRPKと基質との反応を行い、標識された基質を定量することにより検出することが可能である。具体的には、実施例4Bに記載の方法に従えばよい。

【0103】

得られた化合物は、さらに以下の工程により抗ウイルス作用を検出し、顕著な抗ウイルス作用を示すものをさらに選別してもよい。

(d) 選択された被験化合物の存在下で、ウイルス増殖またはウイルス遺伝子の発現を検出する工程、

(e) 該化合物の非存在下または低用量の存在下に比べ、該ウイルス増殖またはウイルス遺伝子の発現を低下させる化合物を選択する工程。

ウイルス増殖またはウイルス遺伝子の発現は、実施例に例示したように、ウイルスゲノムを導入した細胞におけるウイルス蛋白質の産生を検出することなどにより測定することができる。

【0104】

また本発明は、本発明の上記スクリーニング方法により選択された化合物を含むSRPK阻害剤および抗ウイルス剤に関する。また本発明は、本発明の上記スクリーニング方法により得られた化合物の、SRPK阻害剤および/または抗ウイルス剤の製造のための使用、ならびにSRPK阻害および/または抗ウイルス処置のための使用に関する。例えば、CAS Registry Nos. 218156-96-8、674360-18-0、494830-83-0、672919-05-0、54231-51-5、10338-55-3、1692-79-1、1496-40-81、496012-09-0、445406-05-3、445412-62-4、および388071-30-5からなる群より選択される化合物は、SRPK阻害剤および/または抗ウイルス剤として有用である。

【0105】

更に、本願発明には、上記抗ウイルス剤をウイルス増殖阻害剤又は抗ウイルス治療薬として用いることも包含される。例えば、抗ウイルス剤としてSRPIN-1を用いる場合、SRPIN-1以外に周知の製薬助剤を添加することができ、例えば、AZTやプロテアーゼ阻害剤を添加することができる。

【0106】

本発明のウイルス増殖阻害剤又は抗ウイルス治療薬は、例えば、体内濃度が100nM-1mMの間にいずれかになるように、間歇的若しくは持続的に、経口、経皮、粘膜下、皮下、筋肉内、血管内、脳内、又は腹腔内に投与することができる。

【0107】

本発明のSRPIN-1類縁体化合物について、以下にさらに詳細に記載する。本発明は、以下の構造を有する化合物およびその利用に関する。

【0108】

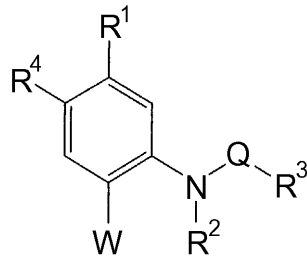
本発明に係る化合物は、下記一般式(I)で表されるアニリン誘導体、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物である。

10

20

30

40



( I )

(式中、R<sup>1</sup>は、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、置換基を有していてもよいC<sub>2-6</sub>アルケニル基、置換基を有していてもよいC<sub>2-6</sub>アルキニル基、置換基を有していてもよいC<sub>6-10</sub>アリール基、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、アジド基、ヒドロキシ基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキルチオ基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキルスルホニル基、カルボキシル基、ホルミル基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシカルボニル基、アシル基、アシルアミノ基、またはスルファモイル基を示し；

10

R<sup>2</sup>は、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、または置換基を有していてもよいアリール基を示し；

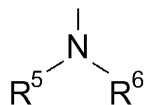
R<sup>3</sup>は、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、置換基を有していてもよいC<sub>2-6</sub>アルケニル基、置換基を有していてもよいC<sub>6-10</sub>アリール基、置換基を有していてもよい含窒素複素環、または置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環を示し；

20

R<sup>4</sup>は、水素原子又はハロゲン原子を示し；

Qは、-C(O)-、-C(S)-、-SO<sub>2</sub>-、-C(S)NHC(O)-、-C(O)NHC(O)-、または-C(O)NHC(S)-を示し；

Wは、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、置換基を有していてもよいC<sub>6-10</sub>アリール基、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキルチオ基、置換基を有していてもよい含窒素複素環、置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環、または下記一般式( I I )



30

( I I )

(式中、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、互いに同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、置換基を有していてもよい含窒素複素環、置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環、アシル基、もしくはアシルアミノ基を示し；または、

前記R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、隣接する窒素原子と一緒に、置換基を有していてもよい複素環を形成していてもよく、該複素環は、置換基を有していてもよい縮合芳香族複素環であってもよく；

40

前記R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、置換基を有していてもよいシクロアルキリデンアミノ基または置換基を有していてもよい芳香族環縮合シクロアルキリデン基であってもよい。)

【 0 1 0 9 】

このような一般式( I )で表される化合物のうち、好ましい化合物としては、たとえば、下記の化合物が挙げられる。

【 0 1 1 0 】

( 1 ) 前記R<sup>1</sup>が、水素原子、置換基を有していてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、またはハロゲン原子である化合物。

( 2 ) 前記R<sup>1</sup>が、水素原子、C<sub>1-6</sub>アルキル基、ハロゲン化C<sub>1-6</sub>アルキル基またはハロゲン原子である化合物。

50

(3) 前記 R<sup>1</sup>が、水素原子、メチル基、トリフルオロメチル基、塩素原子またはフッ素原子である化合物。

(4) 前記 R<sup>1</sup>が、水素原子またはトリフルオロメチル基である化合物。

【0111】

(5) 前記 R<sup>2</sup>が、水素原子または C<sub>1-6</sub>アルキル基である化合物。

(6) 前記 R<sup>2</sup>が、水素原子またはメチル基である化合物。

(7) 前記 R<sup>2</sup>が、水素原子である化合物。

【0112】

(8) 前記 R<sup>3</sup>が、置換基を有していてもよい C<sub>6-10</sub>アリール基、または置換基を有していてもよい 5 ~ 10 員含窒素ヘテロアリール環である化合物。

10

(9) 前記 R<sup>3</sup>が、フェニル基； C<sub>1-6</sub>アルキル基、 C<sub>1-6</sub>アルコキシ基またはニトロ基を置換基に有する C<sub>6-10</sub>アリール基；または 5 ~ 10 員含窒素ヘテロアリール基である化合物。

(10) 前記 R<sup>3</sup>が、フェニル基； C<sub>1-6</sub>アルキル基、 C<sub>1-6</sub>アルコキシ基、またはニトロ基を置換基に有しているフェニル基；またはピリジル基である化合物。

(11) 前記 R<sup>3</sup>が、フェニル基、トリル基、メトキシフェニル基、またはニトロフェニル基、またはピリジル基である化合物。

(12) 前記 R<sup>3</sup>が、トリル基またはピリジル基である化合物。

(13) 前記 R<sup>3</sup>が、4 - ピリジル基である化合物。

【0113】

20

(14) 前記 R<sup>4</sup>が、水素原子である化合物。

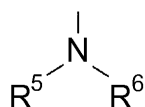
【0114】

(15) 前記 Qが、 - C ( O ) - または - C ( O ) N H C ( S ) - である化合物。ここで、 C ( O ) とは、炭素原子に酸素原子が二重結合で結合していることを意味し、 C ( S ) とは炭素原子に硫黄原子が二重結合で結合していることを意味する。

(16) 前記 Qが、 - C ( O ) - である化合物。

【0115】

(17) 前記 Wが、水素原子、ハロゲン原子、または下記一般式 ( I I )



30

( I I )

(式中、 R<sup>5</sup>および R<sup>6</sup>は、互いに同一又は異なって、置換基を有していてもよい C<sub>1-6</sub>アルキル基を示し；または、

前記 R<sup>5</sup>および R<sup>6</sup>は、隣接する窒素原子と一緒に、置換基を有していてもよいヘテロ環式基を形成していてもよく、該ヘテロ環式基は、置換基を有していてもよい縮合芳香族ヘテロ環式基であってもよい。) で表される化合物。

【0116】

(18) 前記 Wが、 C<sub>1-6</sub>アルキル基を置換基に有していてもよい 1 の窒素原子を含有する 4 ~ 8 員ヘテロ環式基、 C<sub>1-6</sub>アルキル基を置換基に有していてもよい 1 の窒素原子および 1 の酸素原子を含有する 4 ~ 8 員ヘテロ環式基、フェニル基が縮合した 1 の窒素原子を含有する 4 ~ 8 員ヘテロ環式基である化合物。

40

(19) 前記 Wが、 C<sub>1-6</sub>アルキル基を置換基に有していてもよい 1 の窒素原子を含有する 4 ~ 8 員ヘテロ環式基である化合物。

(20) 前記 Wが、 C<sub>1-6</sub>アルキル基を置換基に有していてもよいピペリジニル基またはパーヒドロアゼピン基である化合物。

(21) 前記 Wは、水素原子、ハロゲン原子、ジエチルアミノ基、ピロリジニル基、ピペリジニル基、2 - メチルピペリジニル基、パーヒドロアゼピン基、インドリニル基、イソインドリニル基、または 1,2,3,4 - テトラヒドロキノリル基である化合物であってもよい。

50

## 【0117】

このうち、 $R^1$ に関しては、(1)～(4)の順で、(4)がより好ましい。 $R^2$ に関しては、(5)～(7)の順で、(7)がより好ましい。 $R^3$ に関しては、(8)～(13)の順で、(13)がより好ましい。Qに関しては、(15)～(16)の順で、(16)がより好ましい。Wに関しては、(17)～(20)の順で、(20)がより好ましい。また(21)も好ましい。

## 【0118】

前記一般式(I)で表される化合物について、(1)～(4)、(5)～(7)、(8)～(13)、(14)、(15)～(16)、(17)～(21)からなる群から、それぞれの置換基における好ましい態様を選択し、それらを任意に組み合わせた化合物はより好ましい。

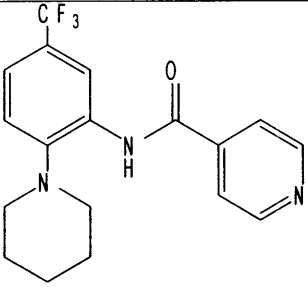
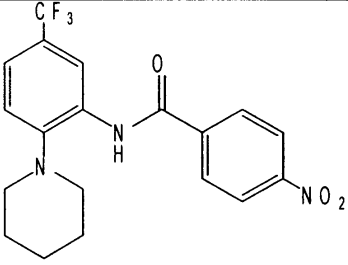
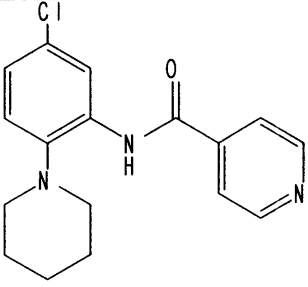
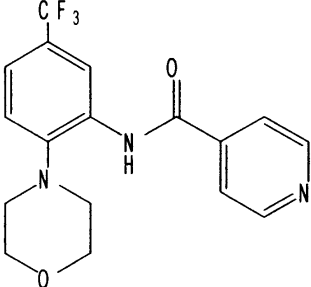
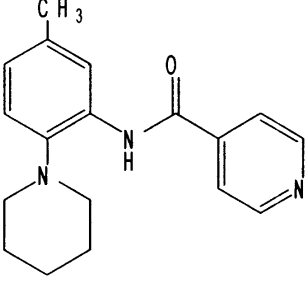
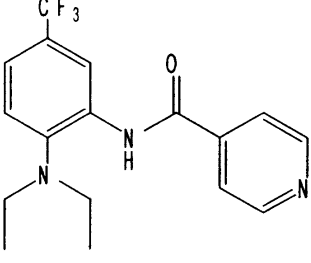
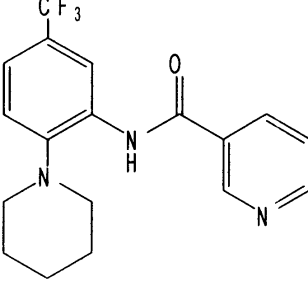
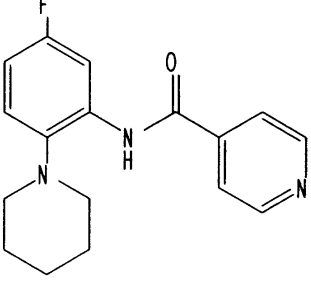
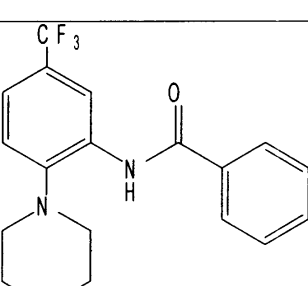
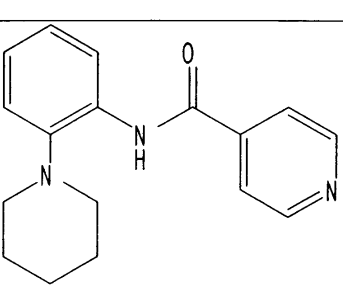
10

## 【0119】

以下、一般式(I)で表される具体的な化合物について、下記に挙げることができるが、本発明は、以下に列挙された化合物に限定されるものではない。

## 【0120】

[表1]

化合物番号	構造式	化合物番号	構造式
340		345	
341		346	
342		347	
343		348	
344		349	

10

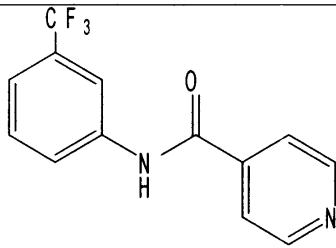
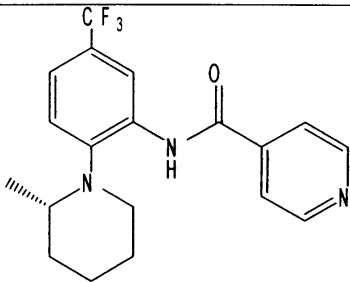
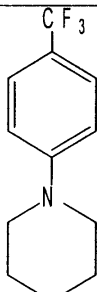
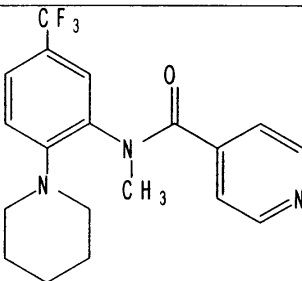
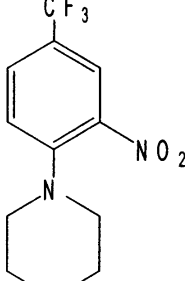
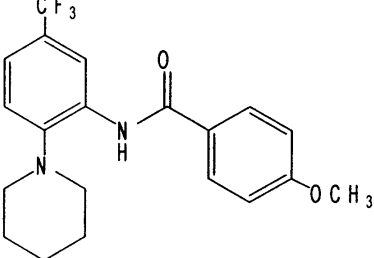
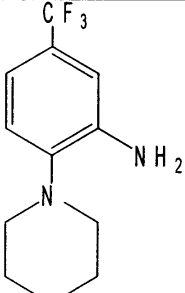
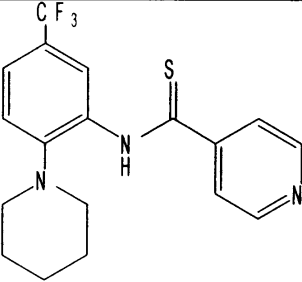
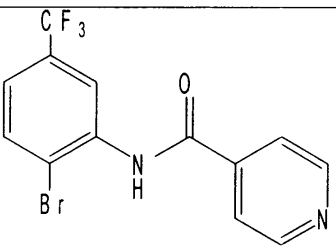
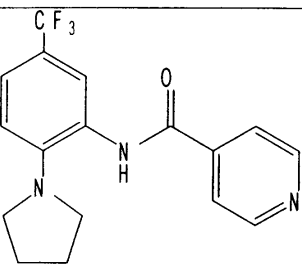
20

30

40

【 0 1 2 1 】

[表 2]

化合物番号	構造式	化合物番号	構造式
608		613	
609		614	
610		615	
611		616	
612		617	

10

20

30

40

【 0 1 2 2 】

[表 3]

化合物番号	構造式	化合物番号	構造式
618		623	
619		624	
620		625	
621		626	
622			

10

20

30

40

## 【 0 1 2 3 】

本発明は、上記に例示した任意の化合物に関するが、これらの例示化合物のうち、好ましくは、上記例示化合物番号340、341、342、343、344、345、346、347、348、608、613、615、616、618、619、620、621、622、623、624、625、626の化合物が挙げられ、より好ましくは、340、341、342、343、345、347、348、608、613、615、616、618、619、620、622、623、624、625、626の化合物が挙げられ、さらに好ましくは、上記例示化合物番号340、348、613、616、618、622、624の化合物が挙げられ、さらに好ましくは、例示化合物番号340、348、613、618、624が挙げられる。

## 【 0 1 2 4 】

50

また本発明は、上記に例示した任意の化合物にも関する。特に本発明は、記例示化合物番号341、342、346、347、348、349、612、613、614、616、617、618、619、620、621、622、および624からなる群より選択される新規化合物にも関する。

【0125】

これらの化合物（アニリン誘導体）、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物は、SRPK阻害剤として有効である。

【0126】

また、これらの化合物（アニリン誘導体）、もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物は、抗ウイルス剤として有用である。

【0127】

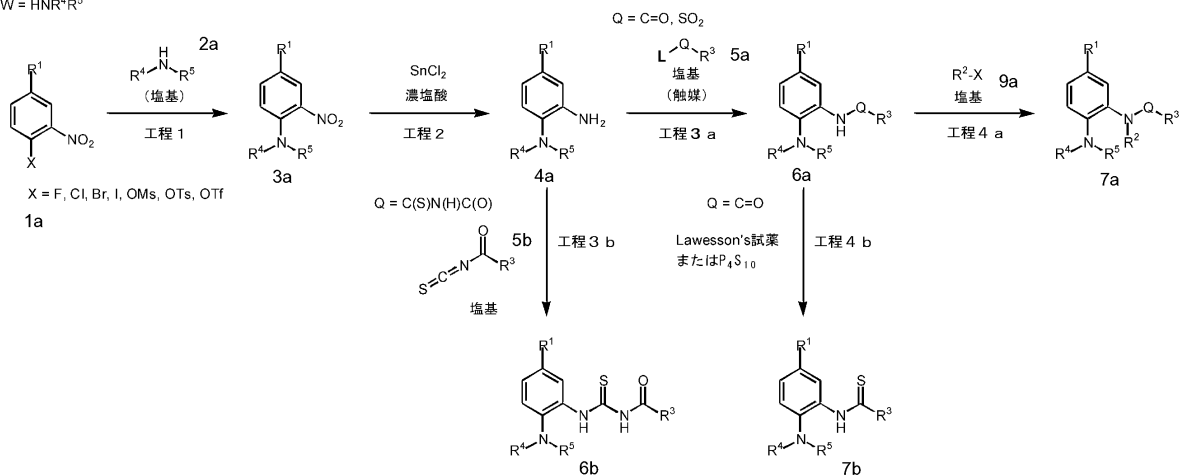
本発明に係る前記式（I）で表される化合物の代表的な製造方法について以下に記す。

以下、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $Q$ 、 $W$ は前記定義と同意義である。室温とは、20～30 程度の温度を意味する。

【0128】

製造方法 A

$W = \text{HNR}^4\text{R}^5$



【0129】

工程 1

化合物 1 a と化合物 2 a とを反応させ、化合物 3 a を得る工程である。原料のニトロベンゼン誘導体 1 a は、市販品または適宜官能基を誘導して入手する。 $X$ は脱離基となるハロゲン原子またはスルホン酸エステルである。化合物 2 a は導入する  $- \text{NR}^5\text{R}^6$  を含む試薬である。化合物 2 a は、1～2 当量用いることが好ましい。反応は、溶媒中、塩基の存在下で行うことができる。

【0130】

塩基としては、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4 - (ジメチルアミノ)ピリジン等を用いることができる。塩基は 1～5 当量用いることが好ましい。また、塩基として過剰量（1 から 5 当量）の  $\text{H} - \text{NR}^5\text{R}^6$  を代わりに用いることができる。

溶媒としては、例えばジメチルスルホキシド、 $N, N$  - ジメチルホルムアミド、 $N$  - メチルピロリドン、ジオキサソラン、テトラヒドロフラン、トルエン等をあげることができる。

反応温度は、0 から 150 で反応を行うことができるが、好ましくは室温で行うことができる。

【0131】

工程 2

化合物 3 a のニトロ基をアミノ基に還元し、化合物 4 a を得る工程である。

還元方法としては、溶媒中、塩化スズ等の存在下、濃塩酸等を接触させて行うことができる。その他、接触水素化などの一般的な還元反応も利用可能である。

【0132】

10

20

30

40

50

反応溶媒としてはメタノール、エタノール、N, N - ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、1, 2 - ジメトキシエタン、1, 4 - ジオキサン、水、またはこれらの混合溶媒を用いることができる。

還元剤となる塩化スズ等は質量比で1 ~ 20当量の量を用いることが好ましい。反応温度は0 から100 で反応を行うことができる。

#### 【0133】

なお化合物3aおよび4aは市販品を入手できる場合もあり、その場合は市販品を用いればよい。特に一般式(I)のWが水素またはハロゲンの場合は、多くの場合、市販品を入手可能である。例えば、本明細書の化合物番号608、612、623~626などがこれに該当する。

#### 【0134】

##### 工程3a

化合物4aと化合物5aを反応させ、化合物6aを得る工程である。Lはハロゲン原子などである。

反応は、溶媒中、塩基の存在下、必要に応じ触媒を添加して行うことができる。この場合、化合物5aを1~3当量用いることが好ましい。

#### 【0135】

反応溶媒は、ジクロロメタン、クロロホルム、1, 4 - ジオキサン、テトラヒドロフラン、トルエン、ピリジン、N, N - ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドンなどを用いることができる。

塩基としては、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4 - (ジメチルアミノ)ピリジン等を用いることができる。

その他、Lが水酸基である場合に縮合剤を用いる一般的なアミド結合形成反応などや、Lとしてスクシンイミジル基やイミダゾイル基などの脱離基である場合の一般的なアミド結合形成反応も利用可能である。

触媒としては、4 - (ジメチルアミノ)ピリジンなどが挙げられる。

反応温度は0 から100 で反応を行うことができる。

#### 【0136】

##### 工程3b

化合物4aと化合物5bとを反応させ、化合物6bを得る工程である。

反応は、溶媒中、塩基の存在下でアシルイソチオシアナートを作用させて行うことができる。アシルイソチオシアナートは、市販品、または適宜アシルハライドとチオシアン酸塩とから反応溶液中で調製したものをそのまま用いることができる。アシルイソチオシアナートは、1~5当量用いることが好ましい。チオシアン酸塩としては、チオシアン酸カリウム、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸アンモニウム等を用いることができ、1~5当量用いることが好ましい。

溶媒としては、例えばアセトニトリル、N, N - ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドン、テトラヒドロフラン、エチレングリコールジメチルエーテル、1, 4 - ジオキサン等をあげることができる。

塩基としては、例えばトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4 - (ジメチルアミノ)ピリジン等を用いることができる。塩基は、1~5当量用いることが好ましい。

反応温度は、0 から150 で反応を行うことができる。

#### 【0137】

##### 工程4a

化合物6aのアミド基部分をアルキル化( $R^2$ 化)し、化合物7aを得る工程である。

反応は、溶媒中、塩基の存在下でアルキル化試薬( $R^2-X$ )を用いて行うことができる。Xは、脱離基となるハロゲン原子またはスルホン酸エステルである。アルキル化試薬( $R^2-X$ )は、1~5当量用いることが好ましい。

溶媒としては、例えばN, N - ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドン、テトラ

10

20

30

40

50

ヒドロフラン、エチレングリコールジメチルエーテル、1,4-ジオキサン、アセトニトリル、エーテル等をあげることができる。

塩基としては、水素化ナトリウム、水素化カリウム、水素化リチウム、ブチルリチウム、メチルリチウム、フェニルリチウム、リチウムジイソプロピルアミド等を用いることができる。塩基は、1～5当量用いることが好ましい。

反応温度は、0 から150 で反応を行うことができる。

【0138】

#### 工程4b

化合物6aのアミド結合のカルボニル基をチオカルボニル基へと変換し、化合物7bを得る工程である。

反応は、溶媒中、チオカルボニル化試薬を用いて行う。

チオカルボニル化試薬としては、例えばLawesson's試薬(2,4-bis(4-methoxyphenyl)-1,3,2,4-dithiadiphosphetane 2,4-disulfide)、五硫化二リン(十硫化四リン、 $P_4S_{10}$ )等を用いることができる。チオカルボニル化試薬は、1～5当量用いることが好ましい。

溶媒としては、例えばトルエン、ベンゼン、クロロベンゼン、キシレン、N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、エチレングリコールジメチルエーテル、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン等をあげることができる。

反応温度は、0 から200 で反応を行うことができる。

【0139】

以上が本発明にかかる化合物(I)の製造方法の代表例であるが、本発明化合物の製造における原料化合物・各種試薬は、塩や水和物あるいは溶媒和物を形成していてもよく、いずれも出発原料、使用する溶媒等により異なり、また反応を阻害しない限りにおいて特に限定されない。用いる溶媒についても、出発原料、試薬等により異なり、また反応を阻害せず出発物質をある程度溶解するものであれば特に限定されないことは言うまでもない。本発明に係る化合物(I)がフリー体として得られる場合、前記の化合物(I)が形成していてもよい塩またはそれらの水和物の状態に常法に従って変換することができる。

【0140】

本発明に係る化合物(I)が化合物(I)の塩または化合物(I)の水和物として得られる場合、前記の化合物(I)のフリー体に常法に従って変換することができる。

【0141】

また、本発明に係る化合物(I)について得られる種々の異性体(例えば幾何異性体、不斉炭素に基づく光学異性体、回転異性体、立体異性体、互変異性体、等)は、通常分離手段、例えば再結晶、ジアステレオマー塩法、酵素分割法、種々のクロマトグラフィー(例えば薄層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、等)を用いることにより精製し、単離することができる。

【0142】

本発明において、SRPIN-1類縁体は、SRPKの活性を阻害するために用いることができる。すなわち、本明細書に記載のSRPIN-1類縁体を投与することにより、SRPK1および/またはSRPK2のリン酸化活性を阻害することができる。本発明は、SRPK活性の阻害における、SRPIN-1類縁体の使用に関する。また本発明は、SRPIN-1類縁体を含むSRPK阻害剤に関する。また本発明は、SRPK阻害剤の製造における、SRPIN-1類縁体の使用に関する。さらに本発明は、SRPIN-1類縁体をSRPKに接触させる工程を含む、SRPK活性を阻害する方法に関する。ここでSRPKに接触させるとは、SRPKを発現する細胞、組織、および/または個体にインビボまたはインビトロでSRPIN-1類縁体を投与することであってもよい。

【0143】

また本発明において、SRPIN-1類縁体は、ウイルスの増殖を抑制するために用いることができる。すなわち、本明細書に記載のSRPIN-1類縁体を投与することにより、SRPK1および/またはSRPK2のリン酸化活性を阻害することを通して、ウイルス増殖が抑制される。本発明は、ウイルス増殖の抑制における、SRPIN-1類縁体の使用に関する。また本発明は、SRPIN-1類縁体を含む抗ウイルス剤に関する。また本発明は、抗ウイルス剤の製造における

10

20

30

40

50

、SRPIN-1類縁体の使用に関する。さらに本発明は、SRPIN-1類縁体をSRPKに接触させる工程を含む、ウイルス増殖を抑制する方法に関する。ここでSRPKに接触させるとは、SRPKを発現する細胞、組織、および/または個体にインビボまたはインビトロでSRPIN-1類縁体を投与することであってもよい。

【0144】

また本発明は、上記SRPIN-1類縁体もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物を含むパッケージであって、該化合物がSRPK阻害活性および/または抗ウイルス作用を有することが、該パッケージまたは該パッケージの内容物中に記載されている、パッケージを提供する。ここでパッケージとは、該SRPIN-1類縁体もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物を含む包装物のことであり、該SRPIN-1類縁体もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物を入れるための容器を含んでいてよく、さらに該容器を収納するバッグまたは外箱等を含んでもよい。

10

【0145】

また本発明は、SR蛋白質の活性または発現量を低下させる化合物を含むパッケージであって、該化合物が抗ウイルス作用を有することが、該パッケージまたは該パッケージの内容物中に記載されている、パッケージを提供する。特に本発明は、該化合物がSRPKの発現および/または活性を阻害する活性を有する化合物であるパッケージを提供する。

【0146】

本発明の化合物は、薬学的に許容される担体と共に組成物とすることができる。例えば、周知の製剤技術を適用して、医薬組成物としてよい。本発明の医薬組成物を、SRPK阻害剤、または抗ウイルス剤（すなわち、ウイルス疾患の予防剤または治療剤）、あるいはその他の医薬として使用する場合、その投与形態としては、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ剤もしくはシロップ剤等による経口投与、又は注射剤、エアゾール剤、座剤、貼布剤、パップ剤、ローション剤、リニメント剤、軟膏剤、若しくは点眼剤等による非経口投与を挙げることができる。これらの製剤は、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤などの添加剤を用いて周知の方法で製造される。

20

【0147】

例えば、賦形剤としては、デンプン、バレイショデンプン、トウモロコシデンプン等のデンプン、乳糖、結晶セルロース、リン酸水素カルシウム等を挙げることができる。

30

【0148】

コーティング剤としては、例えば、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、セラック、タルク、カルナウバロウ、パラフィン等を挙げることができる。

【0149】

結合剤としては、例えばポリビニルピロリドン、マクロゴール及び前記賦形剤と同様の化合物を挙げることができる。

【0150】

崩壊剤としては、例えば前記賦形剤と同様の化合物及びクロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類を挙げることができる。

40

【0151】

安定剤としては、例えばメチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェエノール類；チメロサル；デヒドロ酢酸；及びソルビン酸を挙げることができる。

【0152】

矯味矯臭剤としては、例えば通常使用される、甘味料、酸味料、香料等を挙げることができる。

また、液剤を製造するための溶媒としては、エタノール、フェノール、クロロクレゾー

50

ル、精製水、蒸留水等を使用することができる。

【0153】

界面活性剤又は乳化剤としては、例えば、ポリソルベート80、ステアリン酸ポリオキシシル40、ラウロマクロゴール等を挙げることができる。

【0154】

本発明の医薬組成物を、SRPK阻害剤または抗ウイルス剤として使用する場合、本発明の化合物又はその薬理上許容される塩の使用量は症状、年齢、投与方法等により異なる。例えば経口投与の場合、患者（温血動物、特に人間）に対して1日あたり、下限として（0.01）mg（好ましくは（0.1）mg）、上限として、（2000）mg（好ましくは（500）mg、より好ましくは（100）mg）を1回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。静脈内投与の場合には、成人に対して1日当たり、下限として（0.001）mg（好ましくは（0.01）mg）、上限として、（500）mg（好ましくは（50）mg）を1回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。

【実施例】

【0155】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、これらは例示的なものであって、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、すべて本明細書の一部として組み込まれる。

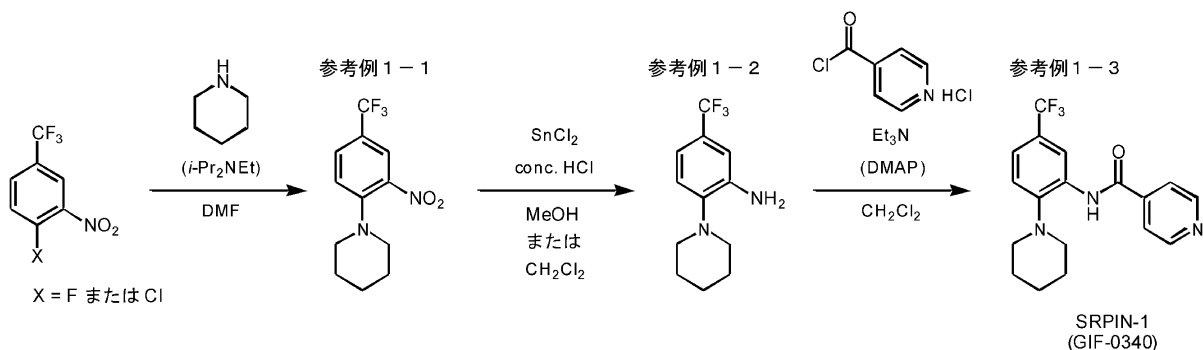
【0156】

下記で、カラムクロマトグラフィーはシリカゲル（MERCK 9385-5B, 70-230 mesh）を用いて行った。薄層クロマトグラフィー（TLC）は、あらかじめシリカゲルが塗布されたガラスプレート（MERCK 5715, silica gel 60 F<sub>254</sub>）を用いて行った。融点は、ヤナコ社製微量融点測定装置YANACO MP-500Dを用いて測定した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは日本電子（JEOL）社製JNM AL-400核磁気共鳴装置を用いて測定した。NMRスペクトル測定用溶媒には、CDCl<sub>3</sub>またはCD<sub>3</sub>OD（ISOTEC社製）を使用した。化学シフトはテトラメチルシラン（（CH<sub>3</sub>）<sub>4</sub>Si）を内部標準（0 ppm）として相対的な値として表し、結合定数（J）はHzで示した。略号s、d、t、m、およびbrはそれぞれ単重線、二重線、三重線、四重線、多重線、およびブロードピークを表す。

[参考例1] SRPIN-1の合成

SRPIN-1 (code name GIF-0340)の代表的な合成法は以下の通りである。

【0157】



【0158】

[参考例1-1A]

1-フルオロ-2-ニトロ-4-(トリフルオロメチル)ベンゼン (1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (427 mg, 2.04 mmol、商品品) の N,N-ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (1 mL) 溶液に順次、ピペリジン (piperidine) (220 μL, 2.22 mmol) 及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (N,N-diisopropylethylamine) (220 μL, 2.40 mmol) が室温で添加された。混合物は、1時間攪拌された。

これに、水が添加され、混合物はエーテル (×3) で抽出された。抽出された有機層は、ブラインで洗浄、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥、フィルターにかけ、減圧下で濃縮された。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 9 】

残査は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (40 g, hexane/ethyl acetate = 10/1) で精製され、1 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] ピペリジン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]piperidine) (561 mg, 2.04 mmol, quant.) をオレンジ色の固体として得た。

## 【 0 1 6 0 】

T L C 及び  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) の結果は次の通りである。: TLC  $R_f$  0.47 (hexane/acetone = 16/1);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1.61-1.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.72 (tt, 4H,  $J = 5.3, 5.3$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 3.13 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 7.13 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, aromatic) 7.61 (dd, 1H,  $J = 2.0, 8.8$  Hz, aromatic), 8.03 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, aromatic).

10

## 【 0 1 6 1 】

## [参考例 1 - 2 A]

参考例 1 - 1 A で得られた 1 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] ピペリジン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]piperidine) (559 mg, 2.03 mmol) の methanol (10 mL) 溶液に順次、濃塩酸 (2.00 mL, 24.0 mmol) および無水二塩化スズ (2.50 g, 13.1 mmol) が 0 で添加された。混合物は、室温に戻され、17.5 時間攪拌された。これに重炭酸ナトリウムの飽和水溶液が添加された。混合物は酢酸エチル (x 3) で抽出された。得られた有機層はブラインで洗浄され  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥され、濾過され、減圧濃縮された。残査はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, hexane/ethyl acetate = 14/1) で精製され、2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) アニリン (2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline) (448 mg, 1.83 mmol, 90.4%) を淡黄色の固体として得た。

20

## 【 0 1 6 2 】

T L C および  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) の結果は次の通りである。TLC  $R_f$  0.30 (hexane/acetone = 18/1);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1.59-1.60 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.71 (tt, 4H,  $J = 5.4, 5.4$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 2.85 (brs, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 4.09 (brs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.92 (d, 1H,  $J = 1.9$  Hz, aromatic), 6.97 (dd, 1H,  $J = 1.9, 8.4$  Hz, aromatic), 7.01 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, aromatic).

## 【 0 1 6 3 】

## [参考例 1 - 3 A]

参考例 1 - 2 A で得られた 2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) アニリン (2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline) (173 mg, 0.708 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (5 mL) 溶液に順次、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (151 mg, 0.850 mmol、商用品)、トリエチルアミン (triethylamine) (450  $\mu\text{L}$ , 3.23 mmol), 及び触媒量の 4 - (ジメチルアミノ) ピリジン (4-(dimethylamino)pyridine) が 0 で添加された。混合物は室温に戻され、19 時間半攪拌された。これに水が添加され、混合物は、酢酸エチル (x 3) で抽出された。得られた有機層は重炭酸ナトリウム飽和水溶液で洗浄され、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥され、濾過され、そして減圧濃縮された。残査はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (10 g, hexane/ethyl acetate = 1.5/1) および再結晶 (ヘキサン) にて精製され、N - [ 2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル ] イソニコチン酸アミド (N-[2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (SRPIN-1, code name GIF-0340) (83.8 mg, 0.240 mmol, 33.9%) を無色の固体として得た。

40

## 【 0 1 6 4 】

融点、T L C 及び  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) の結果は次の通りである。  
融点 96-98 ; TLC  $R_f$  0.40 (hexane/ethyl acetate = 1/1);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1.67-1.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.78 (tt, 4H,  $J = 5.5, 5.5$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 2.88 (t, 4H,  $J = 5.5$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 7.29 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, aromatic), 7.40 (dd, 1H,  $J = 1.8, 8.2$  Hz, aromatic), 7.76 (dd, 2H,  $J = 2.0, 4.4$  Hz, aromatic), 8.86 (dd, 2H,  $J = 2.0,$

50

4.4 Hz, aromatic), 8.87 (d, 1H, J = 1.8 Hz, aromatic), 9.53 (s, 1H, NH).

【 0 1 6 5 】

[ 参考例 1 - 1 B ]

1 - クロロ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン (1-chloro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (5.00 g, 22.4 mmol、商用品) のN,N - ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (7 mL) 溶液に、ピペリジン (piperidine) (5.50 mL, 55.5 mmol、商用品) を0 にて加え、混合物を40分間攪拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した (x 3)。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (200 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 8 / 1) にて精製し、1 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] ピペリジン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]piperidine) (6.13 g, quant.) をオレンジ色の固体として得た。

10

【 0 1 6 6 】

[ 参考例 1 - 2 B ]

参考例 1 - 1 B で得られた 1 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] ピペリジン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]piperidine) (6.13 g, 22.4 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (10 mL) 溶液に、濃塩酸 (12.2 mL, 146 mmol) および無水二塩化スズ (12.7 g, 67.2 mmol) を0 にて順次加え、混合物を7時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (x 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (200 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 15 / 1) にて精製し、2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) アニリン (2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline) (4.55 g, 83.0%) を淡黄色の固体として得た。

20

【 0 1 6 7 】

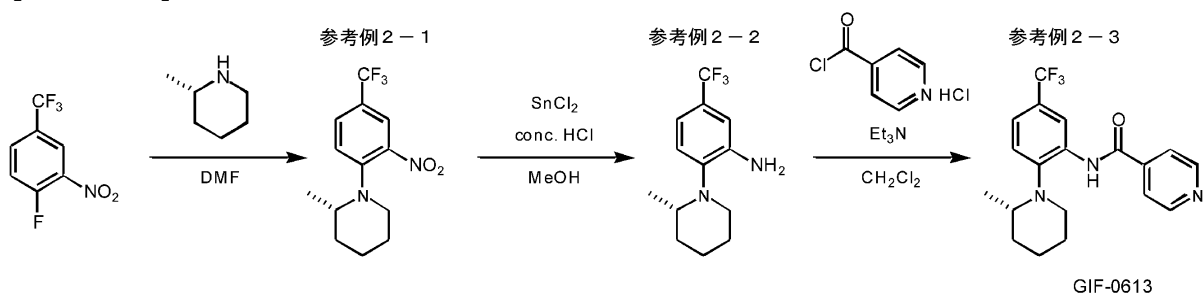
[ 参考例 1 - 3 B ]

参考例 1 - 2 B で得られた 2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) アニリン (2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline) (4.45 g, 18.2 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (10 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (6.48 g, 36.4 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (5.57 mL, 54.6 mmol)、を0 にて順次加え、混合物を0.5時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (x 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (200 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) および再結晶 (ヘキサン) にて精製し、N - [ 2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル ] イソニコチン酸アミド (N-[2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (SRPIN-1, GIF-0340) (5.49 g, 86.3%) を無色の固体として得た。

30

【 0 1 6 8 】

[ 参考例 2 ] code name GIF-0613の合成



[ 参考例 2 - 1 ]

1 - フルオロ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン (1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (211 mg, 1.00 mmol、商用品) のN,N - ジメチルホルム

50

アミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (0.5 mL) 溶液に、(S)-2-メチルピペリジン ((S)-2-methylpiperidine) (270  $\mu$ L, 2.24 mmol、商用品) を室温にて加え、混合物を2時間攪拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した ( $\times 3$ )。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ヘキサン/酢酸エチル = 12/1) にて精製し、(S)-1-[2-ニトロ-4-(トリフルオロメチル)フェニル]-2-メチルピペリジン ((S)-1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-2-methylpiperidine) (286 mg, 99.2%) をオレンジ色の油状物質として得た。

TLC  $R_f$  0.44 (ヘキサン/酢酸エチル = 16/1)。

【0169】

[参考例 2 - 2]

[参考例 2 - 1] で得られた (S)-1-[2-ニトロ-4-(トリフルオロメチル)フェニル]-2-メチルピペリジン ((S)-1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-2-methylpiperidine) (275 mg, 0.953 mmol) のメタノール (5 mL) 溶液に、濃塩酸 (1.00 mL, 12.0 mmol) および無水二塩化スズ (903 mg, 4.76 mmol) を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、17時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル ( $\times 3$ ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, ヘキサン/酢酸エチル = 12/1) にて精製し、(S)-2-(2-メチル-1-ピペリジニル)-5-(トリフルオロメチル)アニリン ((S)-2-(2-methyl-1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline) (233 mg, 94.6%) を無色の油状物質として得た。

TLC  $R_f$  0.38 (ヘキサン/酢酸エチル = 16/1)。

【0170】

[参考例 2 - 3]

[参考例 2 - 2] で得られた (S)-2-(2-メチル-1-ピペリジニル)-5-(トリフルオロメチル)アニリン ((S)-2-(2-methyl-1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline) (223 mg, 0.863 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (5 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (466 mg, 2.61 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (600  $\mu$ L, 4.30 mmol) を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、19時間半攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル ( $\times 3$ ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (25 g, ヘキサン/酢酸エチル = 1.5/1) にて精製し、(S)-N-[2-(2-メチル-1-ピペリジニル)-5-(トリフルオロメチル)フェニル]イソニコチン酸アミド ((S)-N-[2-(2-methyl-1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0613) (293 mg, 93.4%) を無色の油状物質として得た。

【0171】

TLCおよび $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) の結果は次の通りである。

TLC  $R_f$  0.40 (ヘキサン/酢酸エチル = 1/1);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 0.84 (d, 3H,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.39-1.69 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ , CH), 1.82-1.86 (m, 1H, CH), 1.92-1.95 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.65-2.72 (m, 1H, CH), 2.89-2.92 (m, 1H, CH), 2.98-3.02 (m, 1H, CH), 7.35 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, aromatic), 7.40 (dd, 1H,  $J = 2.2, 8.4$  Hz, aromatic), 7.75 (dd, 2H,  $J = 1.8, 4.4$  Hz, aromatic), 8.86 (dd, 2H,  $J = 1.8, 4.4$  Hz, aromatic), 8.93 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz, aromatic), 10.1 (s, 1H, NH)。

【0172】

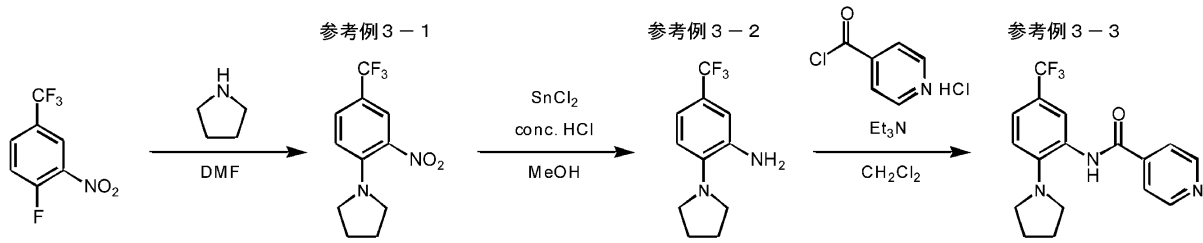
[参考例 3] code name GIF-0617の合成

10

20

30

40



GIF-0617

## [ 参考例 3 - 1 ]

1 - フルオロ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン (1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (1.02 g, 4.89 mmol、商用品) のN,N - ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (4 mL) 溶液に、ピロリジン (pyrrolidine) (983  $\mu$ L, 12.0 mmol、商用品) を0 にて加えた。混合物を室温に戻し、4.5時間攪拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した (x 3)。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 5 / 1) にて精製し、1 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] ピロリジン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]pyrrolidine) (1.26 g, 99.3%) をオレンジ色の固体として得た。

TLC R<sub>f</sub> 0.45 (ヘキサン / 酢酸エチル = 5 / 1)。

【 0 1 7 3 】

## [ 参考例 3 - 2 ]

参考例 3 - 1 で得られた 1 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] ピロリジン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]pyrrolidine) (606 mg, 2.33 mmol) のメタノール (4 mL) 溶液に、濃塩酸 (1.36 mL, 16.3 mmol) および無水二塩化スズ (1.55 g, 8.16 mmol) を0 にて順次加え、混合物を4時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル (x 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 15 / 1) にて精製し、1 - [ 2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] ピロリジン (1-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]pyrrolidine) (550 mg, quant.) を赤橙色の油状物質として得た。

TLC R<sub>f</sub> 0.63 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1)。

【 0 1 7 4 】

## [ 参考例 3 - 3 ]

参考例 3 - 2 で得られた 1 - [ 2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] ピロリジン (1-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]pyrrolidine) (516 mg, 2.24 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (10 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (705 mg, 3.96 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (823  $\mu$ L, 5.94 mmol) を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、5時間攪拌した。これに水を加え、混合物をジクロロメタン (x 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (25 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 2) にて精製し、N - [ 2 - (1 - ピロリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル ] イソニコチン酸アミド (N-[2-(1-pyrrolidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0617) (734 mg, 97.8%) を無色の固体として得た。

【 0 1 7 5 】

融点、TLCおよび<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。

融点134-135 ; TLC R<sub>f</sub> 0.29 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz

10

20

30

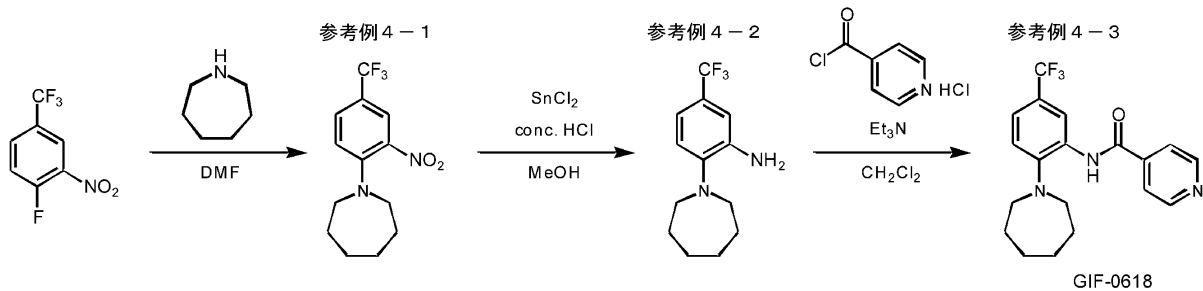
40

50

) 2.01 (tt, 4H, J = 3.2 Hz, 6.4 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 3.15 (t, 4H, J = 6.4 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 7.19 (d, 1H, J = 8.5 Hz, aromatic), 7.38 (dd, 1H, J = 2.2, 8.5 Hz, aromatic), 7.71 (dd, 2H, J = 1.6, 4.4 Hz, aromatic), 8.53 (d, 1H, J = 2.2, Hz, aromatic), 8.79 (s, 1H, NH), 8.83 (dd, 2H, J = 1.6, 4.4 Hz, aromatic)。

【 0 1 7 6 】

[ 参考例 4 ] code name GIF-0618の合成



[ 参考例 4 - 1 ]

1 - フルオロ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン (1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (506 mg, 2.42 mmol、商用品) のN,N - ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (2 mL) 溶液に、ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピン (hexahydro-1H-azepine) (682 μL, 6.05 mmol、商用品) を0 にて加えた。混合物を室温に戻し、1時間攪拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した (x 3)。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 7 / 1) にて精製し、ヘキサヒドロ - 1 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] - 1 H - アゼピン (hexahydro-1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-azepine) (680 mg, 97.5%) をオレンジ色の固体として得た。

20

【 0 1 7 7 】

TLCおよび<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。

TLC R<sub>f</sub> 0.49 (ヘキサン / 酢酸エチル = 5 / 1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 1.57-1.63 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 1.79-1.83 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.31 (t, 4H, J = 5.5 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 7.11 (d, 1H, J = 9.1 Hz, aromatic) 7.53 (dd, 1H, J = 2.0, 9.1 Hz, aromatic), 7.99 (d, 1H, J = 2.0 Hz, aromatic)。

30

【 0 1 7 8 】

[ 参考例 4 - 2 ]

参考例 4 - 1 で得られたヘキサヒドロ - 1 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] - 1 H - アゼピン (hexahydro-1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-azepine) (675 mg, 2.34 mmol) のメタノール (5 mL) 溶液に、濃塩酸 (1.27 mL, 15.2 mmol) および無水二塩化スズ (1.43 g, 7.54 mmol) を0 にて順次加え、混合物を2時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル (x 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 20 / 1) にて精製し、1 - [ 2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] - ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピン (1-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]-hexahydro-1H-azepine) (522 mg, 86.3%) を無色の固体として得た。

40

【 0 1 7 9 】

TLCおよび<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。

TLC R<sub>f</sub> 0.81 (ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 1.70-1.84 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 3.04 (t, 4H, J = 5.4, Hz, 2CH<sub>2</sub>), 4.10 (brs, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.92 (d, 1H, J = 1.2 Hz, aromatic), 6.94 (dd, 1H, J = 1.2, 7.9 Hz, aromatic), 7.05 (d, 1H, J = 7.9 Hz, aromatic)。

【 0 1 8 0 】

## [ 参考例 4 - 3 ]

参考例 4 - 2 で得られた 1 - [ 2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル)フェニル ] - ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピン (1-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]-hexahydro-1H-azepine) (512 mg, 1.98 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (6 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (704 mg, 3.95 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (823  $\mu$ L, 5.94 mmol) を 0 にて順次加え、混合物を 1.5 時間撹拌した。これに水を加え、混合物をジクロロメタン (x 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 2 / 1) にて精製し、N - [ 2 - (1 - ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピニル) - 5 - (トリフルオロメチル)フェニル ] イソニコチン酸アミド (N-[2-(1-hexahydro-1H-azepinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0618) (697 mg, 97.0%) を無色の固体として得た。

10

## 【 0 1 8 1 】

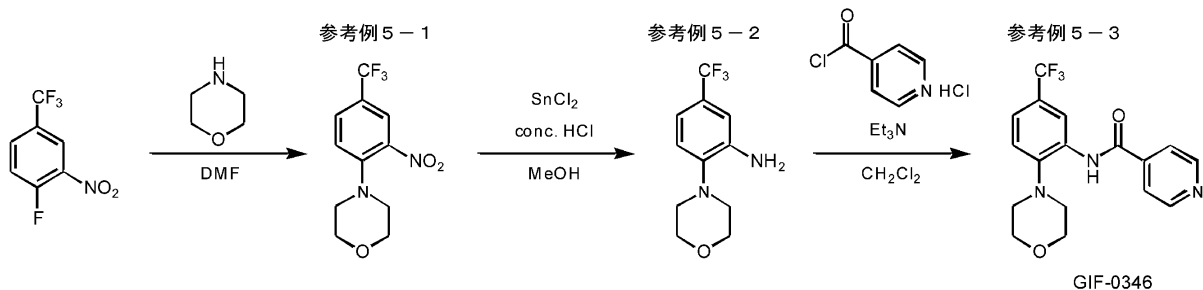
融点、TLC および  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) の結果は次の通りである。

融点 138-139 ; TLC  $R_f$  0.40 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1.79 (br, 8H,  $4\text{CH}_2$ ), 3.06-3.10 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 7.31 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, aromatic), 7.37 (dd, 1H,  $J = 1.6, 8.2$  Hz, aromatic), 7.76 (dd, 2H,  $J = 2.0, 6.0$  Hz, aromatic), 8.85 (m, 3H, aromatic), 9.66 (s, 1H, NH)。

20

## 【 0 1 8 2 】

[ 参考例 5 ] code name GIF-0346 の合成



GIF-0346

30

## 【 0 1 8 3 】

[ 参考例 5 - 1 ]

1 - フルオロ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル)ベンゼン (1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (209 mg, 1.00 mmol、商用品) の N,N - ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (0.5 mL) 溶液に、モルホリン (morpholine) (190  $\mu$ L, 2.17 mmol、商用品) を室温にて加え、混合物を 3 時間撹拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した (x 3)。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1) にて精製し、4 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル)フェニル ] モルホリン (4-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]morpholine) (270 mg, 97.7%) をオレンジ色の油状物質として得た。

40

TLC  $R_f$  0.27 (ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1)。

## 【 0 1 8 4 】

[ 参考例 5 - 2 ]

参考例 5 - 1 で得られた 4 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル)フェニル ] モルホリン (4-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]morpholine) (263 mg, 0.952 mmol) のメタノール (5 mL) 溶液に、濃塩酸 (1.00 mL, 12.0 mmol) および無水二塩化スズ (905 mg, 4.77 mmol) を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、20 時間撹拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル (x 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、

50

減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 2 / 1）にて精製し、4 - [ 2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル)フェニル ] モルホリン（4-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]morpholine）（214 mg, 91.2%）を無色の固体として得た。

TLC  $R_f$  0.31（ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1）。

【 0 1 8 5 】

[ 参考例 5 - 3 ]

参考例 5 - 2 で得られた 4 - [ 2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル)フェニル ] モルホリン（4-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]morpholine）（196 mg, 0.796 mmol）のジクロロメタン（dichloromethane）（5 mL）溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩（isonicotinoyl chloride hydrochloride）（320 mg, 1.80 mmol、商用品）、およびトリエチルアミン（triethylamine）（480  $\mu$ L, 3.44 mmol）を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、60時間撹拌した。これに水を加え、混合物をジクロロメタン（ $\times 3$ ）で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（30 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 2 / 1）にて精製し、N - [ 2 - ( 4 - モルホリンイル ) - 5 - ( トリフルオロメチル ) フェニル ] イソニコチン酸アミド（N-[2-(4-morpholinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide）（GIF-0346）（65.1 mg, 23.2%）を無色の固体として得た。

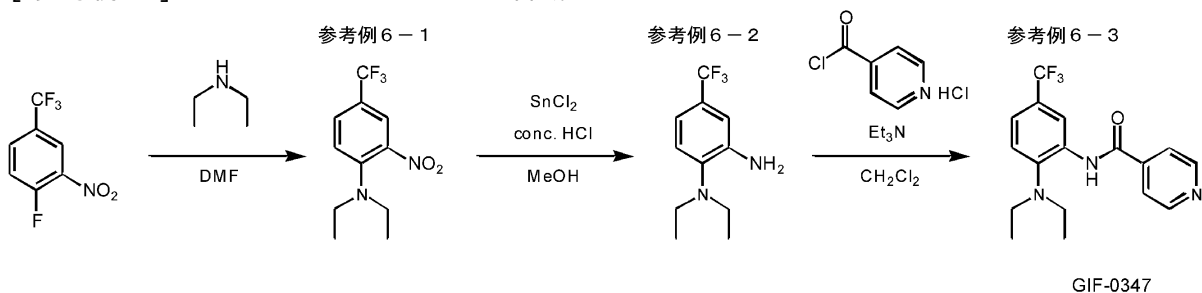
【 0 1 8 6 】

融点、TLCおよび $^1\text{H}$  NMR（ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz）の結果は次の通りである。

融点172-173 ; TLC  $R_f$  0.23（ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 3）;  $^1\text{H}$  NMR（ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz） 2.96 (t, 4H, J = 4.4 Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 3.92 (t, 4H, J = 4.4 Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 7.34 (d, 1H, J = 8.4 Hz, aromatic), 7.44 (dd, 1H, J = 1.6, 8.4 Hz, aromatic), 7.75 (dd, 1H, J = 1.6, 4.4 Hz, aromatic), 8.87-8.88 (m, 3H, aromatic) 9.48 (s, 1H, NH)。

【 0 1 8 7 】

[ 参考例 6 ] code name GIF-0347の合成



【 0 1 8 8 】

[ 参考例 6 - 1 ]

1 - フルオロ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル)ベンゼン（1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene）（211 mg, 1.01 mmol、商用品）のN,N - ジメチルホルムアミド（N,N-dimethylformamide (DMF)）（0.5 mL）溶液に、ジエチルアミン（diethylamine）（230  $\mu$ L, 2.22 mmol、商用品）を室温にて加え、混合物を3時間撹拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した（ $\times 3$ ）。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 8 / 1）にて精製し、1 - ジエチルアミノ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル)ベンゼン（1-diethylamino-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene）（258 mg, 98.3%）をオレンジ色の油状物質として得た。

TLC  $R_f$  0.37（ヘキサン / 酢酸エチル / エーテル = 16 / 1 / 1）。

【 0 1 8 9 】

[ 参考例 6 - 2 ]

10

20

30

40

50

参考例 6 - 1 で得られた 1 - ジエチルアミノ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン (1-diethylamino-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (251 mg, 0.957 mmol) のメタノール (5 mL) 溶液に、濃塩酸 (1.00 mL, 12.0 mmol) および無水二塩化スズ (908 mg, 4.78 mmol) を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、22時間撹拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル (×3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ヘキサン/酢酸エチル = 20/1 ~ 10/1) にて精製し、2 - アミノ - 1 - ジエチルアミノ - 4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン (2-amino-1-diethylamino-4-(trifluoromethyl)benzene) (144 mg, 64.7%) を無色の油状物質として得た。

10

TLC R<sub>f</sub> 0.22 (ヘキサン/酢酸エチル = 30/1)。

【0190】

[参考例 6 - 3]

参考例 6 - 2 で得られた 2 - アミノ - 1 - ジエチルアミノ - 4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン (2-amino-1-diethylamino-4-(trifluoromethyl)benzene) (103 mg, 0.443 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (3 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (88.2 mg, 0.495 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (140 μL, 1.00 mmol) を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、1.5時間撹拌した。これに水を加え、混合物をジクロロメタン (×3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) にて精製し、N - [2 - ジエチルアミノ - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル] イソニコチン酸アミド (N-[2-diethylamino-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0347) (51.0 mg, 34.1%) を無色の固体として得た。

20

【0191】

融点、TLCおよび<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。

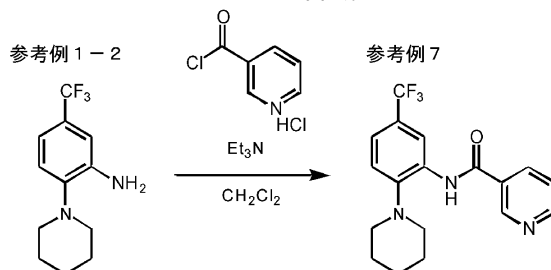
融点 78-80 ; TLC R<sub>f</sub> 0.31 (ヘキサン/酢酸エチル = 1/1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

1.01 (t, 6H, J = 7.1 Hz, 2CH<sub>3</sub>), 3.04 (q, 4H, J = 7.1 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 7.33 (d, 1H, J = 8.2 Hz, aromatic), 7.41 (dd, 1H, J = 1.8, 8.2 Hz, aromatic), 7.73 (dd, 2H, J = 1.8, 4.4 Hz, aromatic), 8.60 (d, 1H, J = 2.6 Hz, aromatic), 8.85 (dd, 2H, J = 1.8, 4.4 Hz, aromatic), 8.91 (d, 1H, J = 1.8 Hz, aromatic) 9.90 (s, 1H, NH)。

30

【0192】

[参考例 7] code name GIF-0343の合成



GIF-0343

参考例 1 - 2 で得られた 2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) アニリン (2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline) (152 mg, 0.622 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (5 mL) 溶液に、ニコチン酸クロリド塩酸塩 (nicotinoyl chloride hydrochloride) (122 mg, 0.685 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (250 μL, 1.79 mmol)、を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、16.5時間撹拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (×3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (15 g, ヘキサン/酢酸エチル

40

50

= 1.5 / 1 ~ 1 / 1) にて精製し、N - [ 2 - ( 1 - ピペリジニル ) - 5 - ( トリフルオロメチル ) フェニル ] ニコチン酸アミド ( N - [ 2 - ( 1 - piperidinyl ) - 5 - ( trifluoromethyl ) phenyl ] nicotinamide ) ( GIF-0343 ) ( 98.4 mg, 45.3% ) を無色の固体として得た。

【 0 1 9 3 】

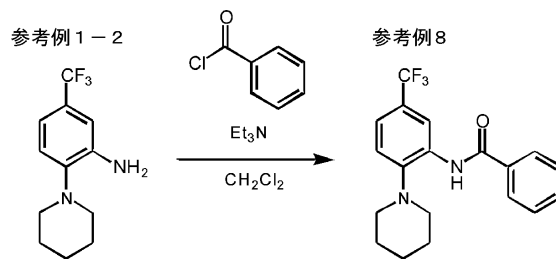
融点、TLCおよび<sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz ) の結果は次の通りである。

融点145-146 ; TLC R<sub>f</sub> 0.40 ( ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1 ) ; <sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz ) 1.62-1.69 ( m, 2H, CH<sub>2</sub> ), 1.79 ( tt, 4H, J = 5.8, 5.8 Hz, 2CH<sub>2</sub> ), 2.88 ( t, 4H, J = 5.8 Hz, 2CH<sub>2</sub> ), 7.29 ( d, 1H, J = 8.4 Hz, aromatic ), 7.39 ( dd, 1H, J = 2.0, 8.4 Hz, aromatic ), 7.51 ( dd, 1H, J = 4.8, 8.0 Hz, aromatic ), 8.30 ( ddd, 1H, J = 1.6, 2.4, 8.0 Hz, aromatic ), 8.82 ( dd, 1H, J = 1.6, 4.8 Hz, aromatic ), 8.87 ( d, 1H, J = 2.0 Hz, aromatic ), 9.16 ( d, 1H, J = 2.4 Hz, aromatic ), 9.53 ( s, 1H, NH )

10

【 0 1 9 4 】

[ 参考例 8 ] code name GIF-0344の合成



GIF-0344

参考例 1 - 2 で得られた 2 - ( 1 - ピペリジニル ) - 5 - ( トリフルオロメチル ) アニリン ( 2 - ( 1 - piperidinyl ) - 5 - ( trifluoromethyl ) aniline ) ( 102 mg, 0.417 mmol ) のジクロロメタン ( dichloromethane ) ( 3 mL ) 溶液に、塩化ベンゾイル ( benzoyl chloride ) ( 50.0 μL, 0.430 mmol、商用品 )、およびトリエチルアミン ( triethylamine ) ( 170 μL, 1.21mmol )、を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、18時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル ( × 3 ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( 20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 10 / 1 ) にて精製し、N - [ 2 - ( 1 - ピペリジニル ) - 5 - ( トリフルオロメチル ) フェニル ] 安息香酸アミド ( N - [ 2 - ( 1 - piperidinyl ) - 5 - ( trifluoromethyl ) phenyl ] benzamide ) ( GIF-0344 ) ( 126 mg, 86.7% ) を無色の固体として得た。

20

30

【 0 1 9 5 】

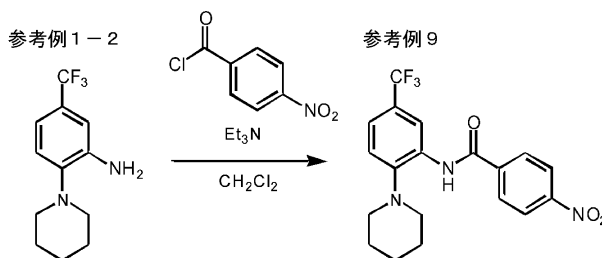
融点、TLCおよび<sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz ) の結果は次の通りである。

融点128-129 、 TLC R<sub>f</sub> 0.46 ( ヘキサン / 酢酸エチル = 4 / 1 ) ; <sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz ) 1.62-1.70 ( m, 2H, CH<sub>2</sub> ), 1.78 ( tt, 4H, J = 5.2, 5.2 Hz, 2CH<sub>2</sub> ), 2.88 ( t, 4H, J = 5.2 Hz, 2CH<sub>2</sub> ), 7.26 ( d, 1H, J = 8.6 Hz, aromatic ), 7.35 ( d, 1H, J = 0.8, 8.6 Hz, aromatic ), 7.52-7.61 ( m, 1H, aromatic ), 8.10 ( m, 2H, aromatic ), 7.94 ( m, 2H, aromatic ), 8.91 ( d, 1H, J = 0.8 Hz, aromatic ), 9.44 ( s, 1H, NH )。

40

【 0 1 9 6 】

[ 参考例 9 ] code name GIF-0345



GIF-0345

50

参考例 1 - 2 で得られた 2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) アニン (2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline) (51.2 mg, 0.209 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (2 mL) 溶液に、塩化 4 - ニトロベンゾイル (4-nitrobenzoyl chloride) (64.2 mg, 0.345 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (120  $\mu$ L, 0.859 mmol)、を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、60 時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (× 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 8 / 1 ~ 6 / 1) にて精製し、N - [ 2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル ] - 4 - ニトロ安息香酸アミド (N-[2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-4-nitrobenzamide) (GIF-0345) (46.3 mg, 56.3%) を黄色の固体として得た。

10

## 【 0 1 9 7 】

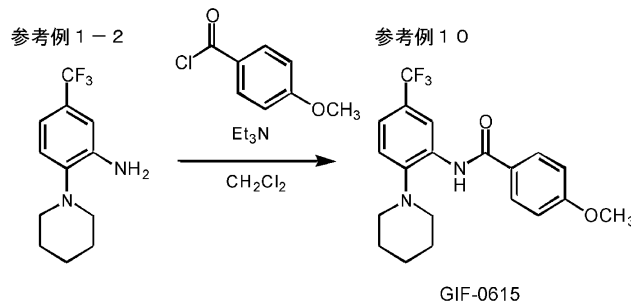
融点、TLC および  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) の結果は次の通りである。

融点 125-136 ; TLC  $R_f$  0.33 (ヘキサン / 酢酸エチル = 4 / 1) ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1.62-1.70 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.77 (tt, 4H,  $J = 5.0, 5.0$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 2.88 (t, 4H,  $J = 5.0$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 7.30 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, aromatic), 7.40 (dd, 1H,  $J = 1.6, 8.2$  Hz, aromatic), 8.10 (dd, 2H,  $J = 1.8, 6.8$  Hz, aromatic), 8.41 (d, 2H,  $J = 1.8, 6.8$  Hz, aromatic), 8.86 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, aromatic), 9.54 (s, 1H, NH)。

## 【 0 1 9 8 】

[ 参考例 1 0 ] code name GIF-0615 の合成

20



参考例 1 - 2 で得られた 2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) アニン (2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline) (147 mg, 0.602 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (4 mL) 溶液に、塩化 4 - メトキシベンゾイル (4-methoxybenzoyl chloride) (250 mg, 1.47 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (254  $\mu$ L, 1.83 mmol)、を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、17 時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (× 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 5 / 1) にて精製し、N - [ 2 - (1 - ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル ] - 4 - メトキシ安息香酸アミド (N-[2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-4-methoxybenzamide) (GIF-0615) (240 mg, quant.) を無色の固体として得た。

30

## 【 0 1 9 9 】

融点、TLC および  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) の結果は次の通りである。

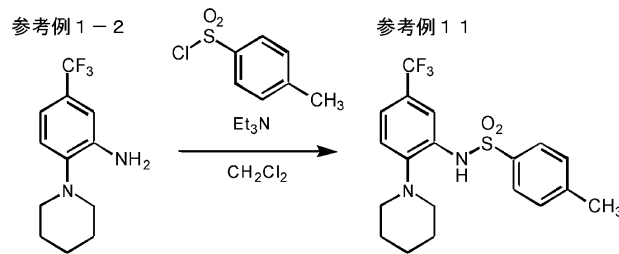
融点 111-114 ; TLC  $R_f$  0.33 (ヘキサン / 酢酸エチル = 4 / 1) ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1.64-1.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.78 (tt, 4H,  $J = 5.4, 5.4$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 1.60-1.70 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.39-2.41 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.87 (t, 4H,  $J = 5.4$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 3.89 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.03 (dd, 2H,  $J = 2.0, 7.0$  Hz, aromatic), 7.23 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, aromatic), 7.32 (dd, 1H,  $J = 1.6, 8.0$  Hz, aromatic), 7.91 (dd, 2H,  $J = 2.0, 7.0$  Hz, aromatic), 8.88 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz, aromatic), 9.34 (s, 1H, NH)。

40

## 【 0 2 0 0 】

[ 参考例 1 1 ] code name GIF-0622 の合成

50



GIF-0622

参考例 1 - 2 で得られた 2 - ( 1 - ピペリジニル ) - 5 - ( トリフルオロメチル ) アニリン ( 2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline ) ( 149 mg, 0.610 mmol ) のジクロロメタン ( dichloromethane ) ( 5 mL ) 溶液に、p-トルエンスルホン酸クロリド ( p-toluenesulfonyl chloride ) ( 233 g, 1.22 mmol、商用品 )、およびトリエチルアミン ( triethylamine ) ( 254  $\mu$ L, 1.83 mmol )、を室温にて順次加え、混合物を 60 時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (  $\times 3$  ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( 20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 10 / 1 ) にて精製し、N - [ 2 - ( 1 - ピペリジニル ) - 5 - ( トリフルオロメチル ) フェニル ] - p-トルエンスルホン酸アミド ( N-[2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-p-toluenesulfonamide ) ( GIF-0622 ) ( 243 mg, quant ) を無色の固体として得た。

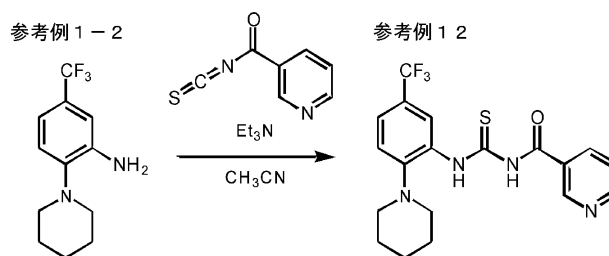
【 0 2 0 1 】

融点、TLCおよび $^1\text{H}$  NMR (  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz ) の結果は次の通りである。

融点 117-134 ; TLC  $R_f$  0.49 ( ヘキサン / 酢酸エチル = 5 / 1 ) ;  $^1\text{H}$  NMR (  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz ) 1.55-1.60 ( m, 2H,  $\text{CH}_2$  ), 1.66 ( tt, 4H,  $J = 5.2, 5.2$  Hz,  $2\text{CH}_2$  ), 2.36 ( s, 3H,  $\text{CH}_3$  ), 2.51 ( t, 4H,  $J = 5.2$  Hz,  $2\text{CH}_2$  ), 7.11 ( d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, aromatic ), 7.22-7.28 ( m, 3H, aromatic ), 7.71 ( dd, 2H,  $J = 1.8, 8.6$  Hz, aromatic ), 7.85 ( d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, aromatic ), 7.94 ( s, 1H, NH )。

【 0 2 0 2 】

[ 参考例 1 2 ] code name GIF-0624 の合成



GIF-0624

チオシアン酸カリウム ( potassium thiocyanate、商用品 ) ( 119 mg, 1.22 mmol ) およびニコチン酸クロリド塩酸塩 ( nicotinoyl chloride hydrochloride ) ( 352 mg, 1.97 mmol、商用品 ) のアセトニトリル ( 15 mL ) 溶液を 70 にて 40 分間攪拌した。混合物を室温に戻したのち、これに参考例 1 - 2 で得られた 2 - ( 1 - ピペリジニル ) - 5 - ( トリフルオロメチル ) アニリン ( 2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)aniline ) ( 244 mg, 1.00 mmol ) のアセトニトリル ( 5 mL ) 溶液およびトリエチルアミン ( triethylamine ) ( 278  $\mu$ L, 2.00 mmol ) を順次加え、混合物を 50 にて 1 時間攪拌した。これに水を加え、混合物をジクロロメタン (  $\times 3$  ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( 25 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 4 / 1 ~ 1 / 1 ) にて精製し、1-ニコチノイル-3-[2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]thiourea ( GIF-0624 ) ( 383 mg, 93.7% ) を淡黄色の固体として得た。

【 0 2 0 3 】

10

20

30

40

50



2時間還流撹拌した。室温に戻した後、これに2M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて溶液をアルカリ性にし、さらに混合物を12M 水酸化ナトリウム水溶液 (×3) で逆抽出した。得られた水層に2M 塩酸を加えて溶液を酸性としたのち混合物をエーテル (×3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) にて精製し、N-[2-(1-ピペリジニル)-5-(トリフルオロメチル)フェニル]イソニコチン酸チオアミド (N-[2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinthioamide) (GIF-0616) (186 mg, 33.7%) を無色の固体として得た。

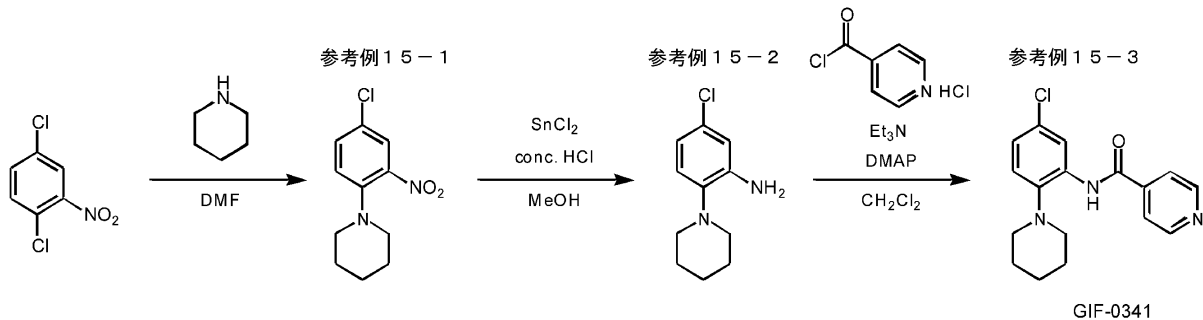
## 【0207】

融点、TLCおよび<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。

融点108-109 ; TLC R<sub>f</sub> 0.27 (ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 1.61-1.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.68 (tt, 4H, J = 5.0, 5.0 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 2.87 (t, 4H, J = 5.0 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 7.32 (d, 1H, J = 7.8 Hz, aromatic), 7.51 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, aromatic), 7.71 (dd, 2H, J = 1.6, 6.4 Hz, aromatic), 8.76 (dd, 2H, J = 1.6, 6.4 Hz, aromatic), 9.58 (d, 1H, J = 1.6 Hz, aromatic), 10.5 (s, 1H, NH)。

## 【0208】

[参考例15] code name GIF-0341の合成



## 【0209】

[参考例15-1]

1、4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (1,4-dichloro-2-nitrobenzene) (390 mg, 2.03 mmol、商用品) のN,N-ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (1 mL) 溶液に、ピペリジン (piperidine) (660 μL, 6.66 mmol、商用品) を室温にて加え、混合物を18.5時間撹拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した (×3)。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン/酢酸エチル = 10/1) にて精製し、1-(4-クロロ-2-ニトロフェニル)ピペリジン (1-(4-chloro-2-nitrophenyl)piperidine) (471 mg, 96.4%) をオレンジ色の油状物質として得た。

TLC R<sub>f</sub> 0.18 (ヘキサンのみ)。

## 【0210】

[参考例15-2]

参考例15-1で得られた1-(4-クロロ-2-ニトロフェニル)ピペリジン (1-(4-chloro-2-nitrophenyl)piperidine) (471 mg, 1.95 mmol) のメタノール (10 mL) 溶液に、濃塩酸 (2.00 mL, 24.0 mmol) および無水二塩化スズ (1.84 g, 9.70 mmol) を0にて順次加えた。混合物を室温に戻し、16時間撹拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル (×3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン/酢酸エチル = 9/1) にて精製し、5-クロロ-2-(1-ピペリジニル)アニリン (5-chloro-2-(1-piperidinyl)aniline) (388 mg, 94.3%) を無色の油状物質として得た。

10

20

30

40

50

TLC R<sub>f</sub> 0.26 (ヘキサン / 酢酸エチル = 18 / 1)。

【 0 2 1 1 】

[ 参考例 1 5 - 3 ]

参考例 1 5 - 2 で得られた 5 - クロロ - 2 - ( 1 - ピペリジニル ) アニリン (5-chloro-2-(1-piperidinyl)aniline) (378 mg, 1.79 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (10 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (350 mg, 1.96 mmol、商用品)、トリエチルアミン (triethylamine) (740 μL, 5.30 mmol)、および触媒量の 4 - (ジメチルアミノ)ピリジン (4-(dimethylamino)pyridine) を室温にて順次加え、混合物を19時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (× 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (200 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) にて精製し、N - [ 5 - クロロ - 2 - ( 1 - ピペリジニル ) フェニル ] イソニコチン酸アミド (N-[5-chloro-2-(1-piperidinyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0341) (180 mg, 31.8%) を無色の固体として得た。

10

【 0 2 1 2 】

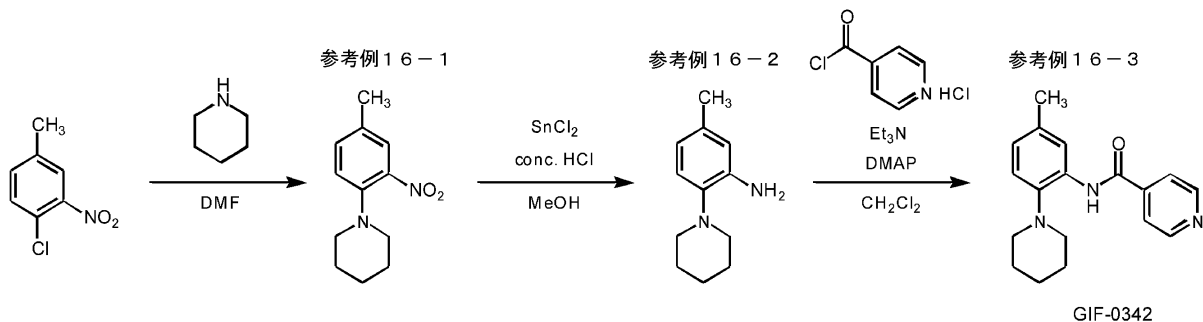
融点、TLCおよび<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。

融点141-143 ; TLC R<sub>f</sub> 0.32 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 1.61-1.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.76 (tt, 4H, J = 5.0, 5.0 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 2.82 (t, 4H, J = 5.0 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 7.09 (dd, 1H, J = 2.6, 8.8 Hz, aromatic), 7.14 (d, 1H, J = 8.8 Hz, aromatic), 7.75 (dd, 2H, J = 1.6, 4.4 Hz, aromatic), 8.60 (d, 1H, J = 2.6 Hz, aromatic), 8.85 (dd, 2H, J = 1.6, 4.4 Hz, aromatic), 9.66 (s, 1H, NH)。

20

【 0 2 1 3 】

[ 参考例 1 6 ] code name GIF-0342の合成



30

【 0 2 1 4 】

[ 参考例 1 6 - 1 ]

4 - クロロ - 3 - ニトロトルエン (4-chloro-3-nitrotoluene) (358 mg, 2.08 mmol、商用品) のN,N - ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (1 mL) 溶液に、ピペリジン (piperidine) (660 μL, 6.66 mmol、商用品) を室温にて加えたのち、混合物を100 にて17時間攪拌した。室温に戻したのちに、これに水を加え、混合物を酢酸エチルで抽出した (× 3)。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 50 / 1) にて精製し、1 - ( 4 - メチル - 2 - ニトロフェニル ) ピペリジン (1-(4-methyl-2-nitrophenyl)piperidine) (212 mg, 46.2%) を無色の油状物質として得た。

40

TLC R<sub>f</sub> 0.54 (ヘキサン / 酢酸エチル = 10 / 1)。

【 0 2 1 5 】

[ 参考例 1 6 - 2 ]

参考例 1 6 - 1 で得られた 1 - ( 4 - メチル - 2 - ニトロフェニル ) ピペリジン (1-(4-methyl-2-nitrophenyl)piperidine) (212 mg, 0.880 mmol) のメタノール (5 mL) 溶液に、濃塩酸 (0.70 mL, 8.4 mmol) および無水二塩化スズ (834 mg, 4.39 mmol) を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、16時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム

50

水溶液を加え、混合物を酢酸エチル (×3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ヘキサン/酢酸エチル = 12/1) にて精製し、5-メチル-2-(1-ピペリジニル)アニリン (5-methyl-2-(1-piperidinyl)aniline) (164 mg, 95.0%) を淡黄色の油状物質として得た。

TLC R<sub>f</sub> 0.36 (ヘキサン/酢酸エチル = 10/1)

【0216】

[参考例16-3]

参考例16-2で得られた5-メチル-2-(1-ピペリジニル)アニリン (5-methyl-2-(1-piperidinyl)aniline) (155 mg, 0.815 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (5 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (172 mg, 0.966 mmol、商用品)、トリエチルアミン (triethylamine) (340 μL, 2.44 mmol)、および触媒量の4-(ジメチルアミノ)ピリジン (4-(dimethylamino)pyridine) を室温にて順次加え、混合物を19時間撹拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (×3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (10 g, ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) にて精製し、N-[5-メチル-2-(1-ピペリジニル)フェニル]イソニコチン酸アミド (N-[5-methyl-2-(1-piperidinyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0342) (69.5 mg, 28.8%) を無色の固体として得た。

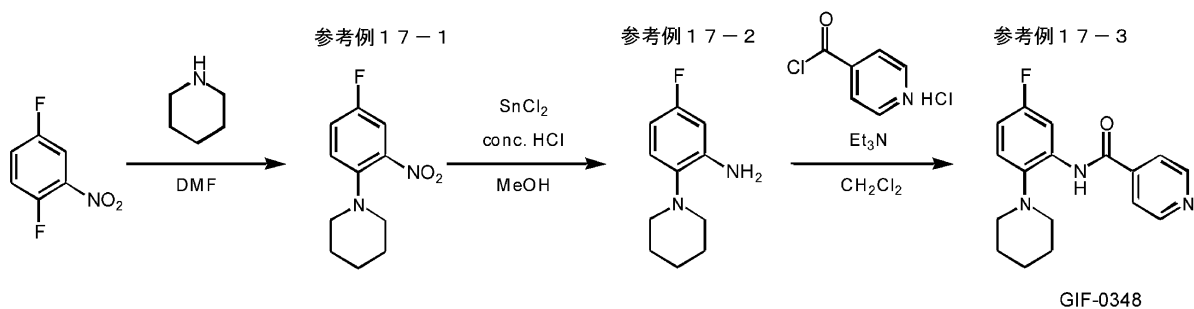
【0217】

融点、TLCおよび<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。

融点142-144 ; TLC R<sub>f</sub> 0.35 (ヘキサン/酢酸エチル = 1/1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 1.62-1.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.75 (tt, 4H, J = 4.9, 4.9 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.82 (t, 4H, J = 4.9 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 6.94 (dd, 1H, J = 1.6, 8.1 Hz, aromatic), 7.12 (d, 1H, J = 8.1 Hz, aromatic), 7.76 (dd, 2H, J = 1.3, 4.5 Hz, aromatic), 8.38 (d, 1H, J = 1.6 Hz, aromatic), 8.84 (dd, 2H, J = 1.3, 4.5 Hz, aromatic), 9.75 (s, 1H, NH)。

【0218】

[参考例17] code name GIF-0348の合成



【0219】

[参考例17-1]

1、4-ジフルオロ-2-ニトロベンゼン (1,4-difluoro-2-nitrobenzene) (225 mg, 1.41 mmol、商用品) のN,N-ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (0.5 mL) 溶液に、ピペリジン (piperidine) (320 μL, 3.23 mmol、商用品) を室温にて加え、混合物を2時間撹拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した (×3)。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ヘキサン/酢酸エチル = 12/1) にて精製し、1-(4-フルオロ-2-ニトロフェニル)ピペリジン (1-(4-fluoro-2-nitrophenyl)piperidine) (298 mg, 94.2%) をオレンジ色の油状物質として得た。

TLC R<sub>f</sub> 0.46 (ヘキサン/酢酸エチル = 12/1)。

【0220】

10

20

30

40

50

## [ 参考例 17 - 2 ]

参考例 17 - 1 で得られた 1 - (4 - フルオロ - 2 - ニトロフェニル) ピペリジン (1-(4-fluoro-2-nitrophenyl)piperidine) (289 mg, 1.28 mmol) のメタノール (5 mL) 溶液に、濃塩酸 (1.20 mL, 14.4 mmol) および無水二塩化スズ (1.22 g, 6.43 mmol) を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、21時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル (×3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (25 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 12 / 1) にて精製し、5 - フルオロ - 2 - (1 - ピペリジニル) アニリン (5-fluoro-2-(1-piperidinyl)aniline) (250 mg, quant.) を無色の油状物質として得た。

10

TLC R<sub>f</sub> 0.34 (ヘキサン / 酢酸エチル = 16 / 1)

## 【 0 2 2 1 】

## [ 参考例 17 - 3 ]

参考例 17 - 2 で得られた 5 - フルオロ - 2 - (1 - ピペリジニル) アニリン (5-fluoro-2-(1-piperidinyl)aniline) (248 mg, 1.27 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (10 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (454 mg, 2.55 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (385 μL, 3.83 mmol)、を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、17時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (×3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (15 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 1.5 / 1) にて精製し、N - [5 - フルオロ - 2 - (1 - ピペリジニル) フェニル] イソニコチン酸アミド (N-[5-fluoro-2-(1-piperidinyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0348) (257 mg, 67.6%) を無色の固体として得た。

20

## 【 0 2 2 2 】

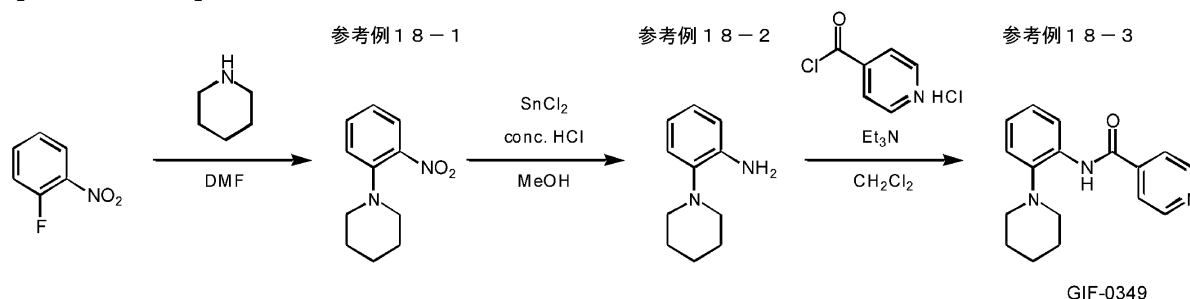
融点、TLCおよび<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。

融点 115-116 ; TLC R<sub>f</sub> 0.40 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 1.62-1.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.76 (bs, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2.82 (bs, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 6.81 (ddd, 1H, J = 2.8, 8.8, 10.8 Hz, aromatic), 7.18 (dd, 1H, J = 5.6, 8.8 Hz, aromatic), 7.75 (dd, 2H, J = 2.0, 4.4 Hz, aromatic), 8.34 (dd, 1H, J = 2.8, 10.8 Hz, aromatic), 9.16 (dd, 2H, J = 2.0, 4.4 Hz, aromatic), 9.83 (s, 1H, NH)。

30

## 【 0 2 2 3 】

## [ 参考例 18 ] code name GIF-0349の合成



40

## 【 0 2 2 4 】

## [ 参考例 18 - 1 ]

2 - フルオロ - 1 - ニトロベンゼン (2-fluoro-1-nitrobenzene) (219 mg, 1.55 mmol、商用品) の N,N - ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (0.5 mL) 溶液に、ピペリジン (piperidine) (338 μL, 3.41 mmol、商用品) を室温にて加え、混合物を 2 時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチルで抽出した (×3)。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 20 / 1) にて精製し、1 - (2 - ニトロフェニル) ピペリジン (1-(2-nitrophenyl)piperidi

50

ne) (315 mg, 98.8%) を無色の油状物質として得た。

TLC  $R_f$  0.53 (ヘキサン / 酢酸エチル = 16 / 1)。

【 0 2 2 5 】

[ 参考例 1 8 - 2 ]

参考例 1 8 - 1 で得られた 1 - ( 2 - ニトロフェニル ) ピペリジン ( 1-(2-nitrophenyl)piperidine ) ( 315 mg, 1.52 mmol ) のメタノール ( 10 mL ) 溶液に、濃塩酸 ( 1.50 mL, 18.0 mmol ) および無水二塩化スズ ( 1.45 g, 7.64 mmol ) を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、17時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル ( × 3 ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( 20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 15 / 1 ) にて精製し、2 - ( 1 - ピペリジニル ) アニリン ( 2-(1-piperidinyl)aniline ) ( 238 mg, 88.8% ) を淡黄色の油状物質として得た。

TLC  $R_f$  0.19 (ヘキサン / 酢酸エチル = 18 / 1)

【 0 2 2 6 】

[ 参考例 1 8 - 3 ]

参考例 1 8 - 2 で得られた 2 - ( 1 - ピペリジニル ) アニリン ( 2-(1-piperidinyl)aniline ) ( 203 mg, 1.15 mmol ) のジクロロメタン ( dichloromethane ) ( 5 mL ) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 ( isonicotinoyl chloride hydrochloride ) ( 616 mg, 3.46 mmol、商用品 )、およびトリエチルアミン ( triethylamine ) ( 800  $\mu$ L, 5.73 mmol ) を 0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、2時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル ( × 3 ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( 20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1 ) にて精製し、N - [ 2 - ( 1 - ピペリジニル ) フェニル ] イソニコチン酸アミド ( N-[2-(1-piperidinyl)phenyl]isonicotinamide ) ( GIF-0349 ) ( 259 mg, 80.0% ) を無色の固体として得た。

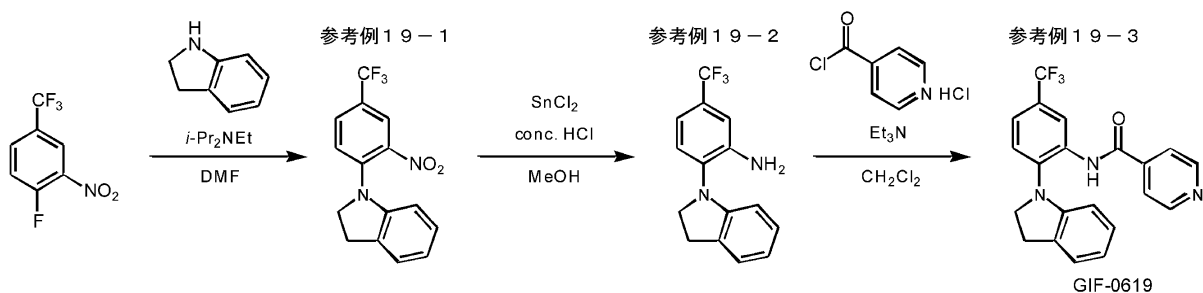
【 0 2 2 7 】

融点、TLCおよび $^1\text{H}$  NMR (  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz ) の結果は次の通りである。

融点 111-113 ; TLC  $R_f$  0.35 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) ;  $^1\text{H}$  NMR (  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz ) 1.62-1.67 ( m, 2H,  $\text{CH}_2$  ), 1.76 ( tt, 4H,  $J = 4.8, 4.8$  Hz,  $2\text{CH}_2$  ), 2.85 ( t, 4H,  $J = 4.8$  Hz,  $2\text{CH}_2$  ), 7.13 ( td, 1H,  $J = 1.6, 7.8$  Hz, aromatic ), 7.21 ( td, 1H,  $J = 1.6, 7.8$  Hz, aromatic ), 7.24 ( dd, 1H,  $J = 1.6, 7.8$  Hz, aromatic ), 7.77 ( dd, 2H,  $J = 1.9, 4.4$  Hz, aromatic ), 8.53 ( dd, 1H,  $J = 1.6, 7.8$  Hz, aromatic ), 8.84 ( dd, 2H,  $J = 1.9, 4.4$  Hz, aromatic ), 9.71 ( s, 1H, NH )。

【 0 2 2 8 】

[ 参考例 1 9 ] code name GIF-0619の合成



【 0 2 2 9 】

[ 参考例 1 9 - 1 ]

1 - フルオロ - 2 - ニトロ - 4 - ( トリフルオロメチル ) ベンゼン ( 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene ) ( 498 mg, 2.38 mmol、商用品 ) の N,N - ジメチルホルムアミド ( N,N-dimethylformamide ( DMF ) ) ( 2 mL ) 溶液に、インドリン ( indoline ) ( 402  $\mu$ L, 3.59 mmol、商用品 ) および N,N - ジイソプロピルエチルアミン ( N,N-diisopropylet

hylamine) (619  $\mu$ L, 3.59 mmol) を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、1時間撹拌したのち、さらに70 に加熱し、5.5時間撹拌した。混合物を室温に戻し、これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した ( $\times 3$ )。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン/酢酸エチル = 20/1) にて精製し、1 - [2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル] インドリン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]indoline) (730 mg, 99.4%) を濃赤色の油状物質として得た。

TLC  $R_f$  0.48 (ヘキサン/酢酸エチル = 6/1)。

【0230】

[参考例19-2]

参考例19-1で得られた1 - [2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル] インドリン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]indoline) (730 mg, 2.37 mmol) のメタノール (7 mL) 溶液に、濃塩酸 (1.28 mL, 15.4 mmol) および無水二塩化スズ (1.57 g, 8.30 mmol) を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、8時間撹拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル ( $\times 3$ ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, ヘキサン/酢酸エチル = 10/1) にて精製し、1 - [2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル] インドリン (1-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]indoline) (619 mg, 93.9%) を赤橙色の油状物質として得た。

TLC  $R_f$  0.27 (ヘキサン/酢酸エチル = 6/1)。

【0231】

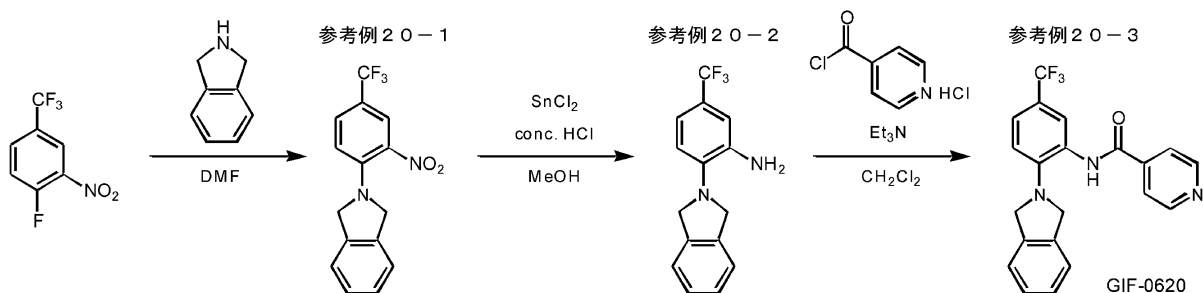
[参考例19-3]

参考例19-2で得られた1 - [2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル] インドリン (1-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]indoline) (518 mg, 1.86 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (5 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (669 mg, 3.76 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (773  $\mu$ L, 5.58 mmol) を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、2.5時間撹拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル ( $\times 3$ ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) にて精製し、N - [2 - (1 - インドリニル) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル] イソニコチン酸アミド (N-[2-(1-indolinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0619) (643 mg, 90.1%) を無色の固体として得た。

TLC  $R_f$  0.32 (ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)。

【0232】

[参考例20] code name GIF-0620の合成



【0233】

[参考例20-1]

1 - フルオロ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン (1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (508 mg, 2.43 mmol、商用品) のN,N - ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (2 mL) 溶液に、イソインドリン (isoindoline

10

20

30

40

50

) (679  $\mu$ L, 5.98 mmol、商用品) を0 にて加えた。混合物を室温に戻し、2時間撹拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した ( $\times 3$ )。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン/酢酸エチル = 15/1) にて精製し、2 - [2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル] イソインドリン (2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]isoindoline) (749 mg, quant.) を黄色の固体として得た。

TLC  $R_f$  0.42 (ヘキサン/酢酸エチル = 10/1)。

【0234】

[参考例20-2]

参考例20-1で得られた2 - [2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル] イソインドリン (2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]isoindoline) (641 mg, 2.08 mmol) のメタノール (7 mL) 溶液に、濃塩酸 (1.13 mL, 13.5 mmol) および無水二塩化スズ (1.38 g, 7.28 mmol) を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、8.5時間撹拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル ( $\times 3$ ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン/酢酸エチル = 15/1) にて精製し、2 - [2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル] イソインドリン (2-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]isoindoline) (225 mg, 38.9%) を赤橙色の油状物質として得た。

TLC  $R_f$  0.38 (ヘキサン/酢酸エチル = 10/1)。

【0235】

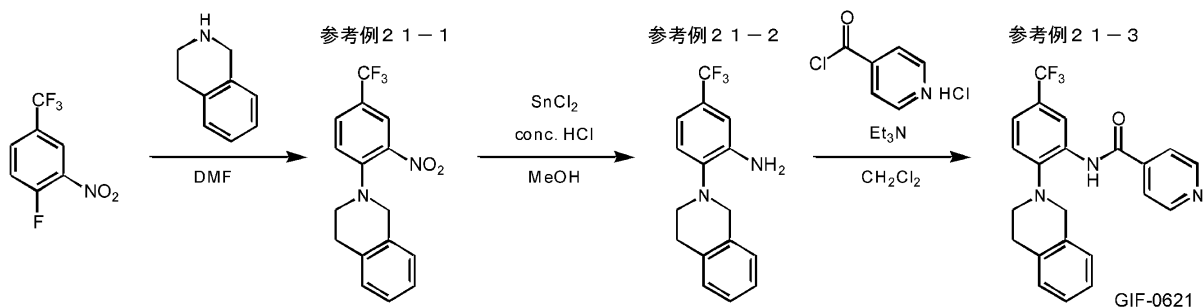
[参考例20-3]

参考例20-2で得られた2 - [2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル] イソインドリン (2-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]isoindoline) (193 mg, 0.694 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (6 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (250 mg, 1.40 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (287  $\mu$ L, 2.07 mmol) を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、3時間撹拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル ( $\times 3$ ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5 g, ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) にて精製し、N - [2 - (2 - イソインドリニル) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル] イソニコチン酸アミド (N-[2-(2-isoindolinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0620) (266 mg, quant.) を無色の固体として得た。

TLC  $R_f$  0.31 (ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)。

【0236】

[参考例21] code name GIF-0621の合成



【0237】

[参考例21-1]

1 - フルオロ - 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン (1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (506 g, 2.42 mmol、商用品) のN,N - ジメチルホルムア

10

20

30

40

50

ミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (4 mL) 溶液に、1、2、3、4 - テトラヒドロイソキノリン (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) (909  $\mu$ L, 7.26 mmol、商用品) を0にて加えた。混合物を室温に戻し、3.5時間攪拌した。これに水を加えたのち、混合物を酢酸エチルで抽出した ( $\times 3$ )。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 10 / 1) にて精製し、1、2、3、4 - テトラヒドロ - 2 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] イソキノリン (1,2,3,4-tetrahydro-2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]isoquinoline) (779 mg, 99.9%) をオレンジ色の固体として得た。

TLC  $R_f$  0.54 (ヘキサン / 酢酸エチル = 10 / 1)。

【 0 2 3 8 】

[ 参考例 2 1 - 2 ]

参考例 2 1 - 1 で得られた 1、2、3、4 - テトラヒドロ - 2 - [ 2 - ニトロ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] イソキノリン (1,2,3,4-tetrahydro-2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]isoquinoline) (658 mg, 2.04 mmol) のメタノール (8 mL) 溶液に、濃塩酸 (1.11 mL, 13.3 mmol) および無水二塩化スズ (1.35 g, 7.12 mmol) を0にて順次加えた。混合物を室温に戻し、18時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、混合物を酢酸エチル ( $\times 3$ ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 20 / 1) にて精製し、2 - [ 2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] - 1、2、3、4 - テトラヒドロイソキノリン (2-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) (426 mg, 71.4%) を赤橙色の油状物質として得た。

TLC  $R_f$  0.36 (ヘキサン / 酢酸エチル = 10 / 1)。

【 0 2 3 9 】

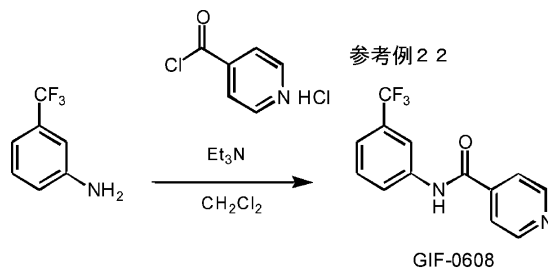
[ 参考例 2 1 - 3 ]

参考例 2 1 - 2 で得られた 2 - [ 2 - アミノ - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル ] - 1、2、3、4 - テトラヒドロイソキノリン (2-[2-amino-4-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) (315 mg, 1.08 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (5 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (390 mg, 2.19 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (449  $\mu$ L, 3.24 mmol) を0にて順次加えた。混合物を室温に戻し、0.5時間攪拌した。これに水を加え、混合物をジクロロメタン ( $\times 3$ ) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ヘキサン / 酢酸エチル = 2 / 1) にて精製し、N - [ 2 - ( 1、2、3、4 - テトラヒドロイソキノリン - 2 - イル ) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル ] イソニコチン酸アミド (N-[2-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0621) (418 mg, 97.6%) を無色の固体として得た。

TLC  $R_f$  0.52 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1)。

【 0 2 4 0 】

[ 参考例 2 2 ] code name GIF-0608の合成



10

20

30

40

50

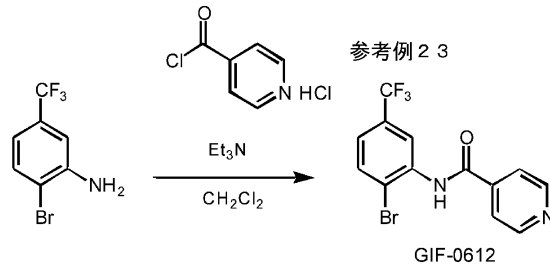
【0241】

3 - (トリフルオロメチル) アニリン (3-(trifluoromethyl)aniline、商用品) (208 mg, 1.29 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (5 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (670 mg, 3.76 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (864  $\mu$ L, 6.20 mmol)、を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、23時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (x 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣を再結晶 (酢酸エチル) にて精製し、N - [ ( 3 - (トリフルオロメチル) フェニル ) ] イソニコチン酸アミド (N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0608) (166 mg, 48.3%) を無色の固体として得た。TLC R<sub>f</sub> 0.26 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 2)。

10

【0242】

[参考例 2 3] code name GIF-0612の合成



20

【0243】

2 - プロモ - 5 - (トリフルオロメチル) アニリン (2-bromo-5-(trifluoromethyl)aniline、商用品) (480 mg, 2.00 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (5 mL) 溶液に、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (427 mg, 2.39 mmol、商用品)、およびトリエチルアミン (triethylamine) (410  $\mu$ L, 2.94 mmol)、を0 にて順次加えた。混合物を室温に戻し、24時間攪拌した。これに水を加え、混合物を酢酸エチル (x 3) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、濾過を行い、減圧濃縮した。残渣を再結晶 (酢酸エチル) にて精製し、N - [ 2 - プロモ - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル ] イソニコチン酸アミド (N-[2-bromo-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide) (GIF-0612) (308 mg, 44.8%) を無色の固体として得た。

30

TLC R<sub>f</sub> 0.46 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1)。

【0244】

[参考例 2 4] SRPIN-1の毒性試験

哺乳動物細胞を用いて、SRPIN-1の染色体異常スクリーニング試験を行った。チャイニーズ・ハムスター CHL細胞 (大日本製薬株式会社) を用い、染色体異常誘発性を指標としてSRPIN-1の変異原性を検索した。試験は、短時間処理 (処理時間: 6時間、回復時間: 18時間) の代謝活性化法による場合 (+S9 mix)、及び代謝活性化系非存在下での連続処理法 (24時間処理) について検討した。CHL細胞は、10% 牛胎仔血清 (ICN Flow) を10% 添加したMEMアール液体培地 (GIBCO BRL) 中、5% CO<sub>2</sub>、37 °C の条件下で培養した。Sprague-Dawley系ラット (雄、日本チャールスリバー、7週齢) にphenobarbitalを1日1回の割合で4日間連続腹腔内投与し (1回目30mg/kg、2~4回目60mg/kg)、さらに投与3日目に5, 6-benzoflavone 80mg/kgを腹腔内投与した肝臓から調製したS9 fraction (オリエンタル酵母工業; A.T. Natarajan et al., Mutation Res., 37, pp 83-90 (1976)) を、代謝活性化法によるアッセイのために用いた。アッセイに用いるS9 mixの組成は、1 mL中に4  $\mu$ mol HEPES buffer (pH 7.4)、5  $\mu$ mol MgCl<sub>2</sub>、33  $\mu$ mol KCl、5  $\mu$ mol G6P、4  $\mu$ mol NADP及び0.3 mL S9 fractionとした。

40

【0245】

短時間処理法では、CHL細胞 (約4 x 10<sup>3</sup> cells/mL) を5mLの培養液で60mmシャーレで3日

50

間培養後、シャーレから培養液1.33 mLを抜き取り、S9 mixを0.83 mL加え、直ちに各用量の被験液0.5 mL（最終濃度5、1.58、0.5 mg/mL；0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC-Na）水溶液に溶解）を加えた。6時間培養した後、PBSで洗浄し新しい培養液5 mLと交換して、さらに18時間培養した。別に陰性対照として0.5%CMC-Na水溶液（0.5 mL）、陽性対照にはdimethylnitrosamine（DMN；最終濃度500 µg/mL）を用いて、同様に操作した。連続処理法では、CHL細胞（約 $4 \times 10^3$  cells/mL）を含む培養液5 mLを60 mmシャーレで3日間培養後、培養液0.5 mLを抜き取り、各用量の被験液0.5 mL（最終濃度5、1.58、0.5 mg/mL）を加え、そのまま24時間（約1.5細胞周期）培養した。別に陰性対照として0.5%CMC-Na水溶液（0.5 mL）、陽性対照にはmitomycin C（MMC；最終濃度0.05 µg/mL）を用いて、同様に操作した。

10

## 【0246】

培養終了2時間前に10 µg/mLのcolcemid 0.1 mLを加え、0.25% trypsin溶液で処理して細胞を回収し、0.075 M塩化カリウム溶液で低張処理後、methanol：酢酸（3：1）混合液にて固定し、乾燥後、Giemsa染色を施した。各用量あたり50個の良く広がった分裂中期像を観察し、染色体の構造異常と数的異常の種類及び出現数を計測した。構造異常は染色体切断（ctb）、染色分体交換（cte）、染色体切断（csb）、染色体交換（cse）、その他（5個以上の異常、断片化、細粉化など）に分類し、異常の種類別に出現数を記録した。また、これらの異常を1個でも有する細胞を異常細胞とした。異常細胞の出現率が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性と判定した。被験物質処理群で染色体異常細胞出現頻度が10%以上の出現頻度となった場合に、被験物質は染色体異常を誘発する物質であると判定した。陽性対照群における染色体構造異常細胞の出現頻度は、DMN 500 µg/mL処理群で26個（52.0%）、MMC 0.5 µg/mL処理群で24個（48.0%）であり、陰性対照では異常は認められなかったことから、本試験は適切に実施されたと判断された。

20

## 【0247】

試験の結果、SRPIN-1の処理群における染色体構造異常細胞は、短時間処理法、連続処理法ともに、いずれの処理条件においても染色体構造異常及び数的異常細胞の増加は陰性であった。以上の結果、本試験条件下において、当該化合物はほ乳類培養細胞に対し染色体異常誘発性を有さないと考えられた。

## 【0248】

## [参考例25] SRPIN-1のインビボ投与

SRPIN-1のラットにおける単回経口投与毒性試験を行った。馴化期間中の体重増加が順調で一般状態にも異常を認めないSlc:SDラット（5週齢、日本エスエルシー）に、125、250、500、1000、2000 mg/kgのSRPIN-1を、1群あたり雌雄各2匹に経口投与した（投与容量10 mL/kg）。動物は投与前日の夕方より投与後約4時間まで絶食させた。投与後2日間観察した結果、雌雄共に死亡の発現はみられず一般状態にも変化は認められなかった。次にSRPIN-1 2000 mg/kgを、上記と同様にSlc:SDラット（5週齢）雌雄各5匹に経口投与し、投与後14日間にわたって観察し、肉眼による毒性徴候の種類、程度、発現時期、回復時期及び死亡時期を記録した。その結果、雌雄共に死亡は認められず、一般状態にも異常は認められなかった。

30

## 【0249】

## [実施例1A] HIV感染細胞におけるSR蛋白質のリン酸化

ヒト胎児腎臓由来のFlp-In-293細胞（R750-07: Invitrogenより購入）に、HIVpNL4-3ゲノム（Adachi, A. et al., 1986, J. Virol. 59:284-289）の3マイクログラムを、遺伝子導入試薬Genejuice（70967-4; Novagenより購入）9マイクロリットルを用いて遺伝子導入を行った。4日後、細胞にSDS-PAGEサンプルバッファーを1ミリリットル加えて溶解させ、95 °Cで3分熱変性させた後に、すみやかに氷上において、蛋白質サンプルとした。

40

## 【0250】

この蛋白質サンプルをウエスタン解析に用いた。サンプルは4-20%のグラジエントゲルによって、40mA、45分の条件でLaemmli のバッファーを用いたSDS-PAGEにより分離した。マーカーとしてブロードレンジプレステインドマーカー（02525-35; ナカライ）を用いて

50

分子量を検量した。続いてPROTRANニトロセルロースメンブレン (BA85; Schleicher&Schuell BioScienceより購入) にTransBlot SDセル(170-3940; Bio-radより購入)を用いて160 mA, 60minの条件でセミドライプロットングした。プロットング終了後、メンブレンはTBSで5分間振盪洗浄し、続けてBlockingOne(03953-95; ナカライより購入)を用いてブロッキングを1時間、室温で行った。メンブレンを再度TBSで洗浄し、TBSで希釈したリン酸化SR蛋白質を認識するマウスモノクローナル104抗体(Mab104; ATCCよりハイブリドーマを購入)、マウス抗SC35抗体 (S4045; BDTransductionより購入)、マウスモノクローナル抗SF2抗体 (AK103: Dr. Adrian Krainer氏より供与; Hanamura, A. et al., 1998, RNA 4:430-444; Kojima, T. et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:32247-56) と4、over nightでインキュベートした。

10

## 【0251】

メンブレンをTBSで室温10分振盪洗浄し、これを3回行った。その後、二次抗体としてHRP標識されたヒツジ抗マウスIgG抗体 (NA9310; アマシャムより購入) をTBSで希釈し、メンブレンと室温で1時間インキュベートした。メンブレンをTBSで室温10分振盪洗浄し、これを3回行った。その後、ECL Detection Reagents (RPN2105; アマシャムより購入) を用いた化学発光法により、LAS1000CCDカメラ (LAS1000; 富士フイルム) で取り込みを行った。結果を図1Aに示す。

## 【0252】

その結果、HIVpNL4-3の感染にともなってMab104抗体、SC35抗体、SF2抗体を用いたウエスタン解析のシグナルは認められなくなり、SR蛋白質が脱リン酸化されているだけでなく、SC35やSF2という内在性のSR蛋白質が分解されていることが明らかとなった。

20

## 【0253】

## [実施例1B] SR蛋白質の分解

ヒト胎児腎臓由来のFlp-In-293細胞に、HAタグを融合したSRp75, SRp55, SRp40遺伝子のプラスミド (HA-SRp75, HA-SRp55, HA-SRp40; Dr. Woan-Yuh TARNより供与) 1マイクログラムをGenejuiceを用いて遺伝子導入し、36時間後に、ユビキチンプロテアソーム阻害剤であるMG132(474790; CALBIOCHEMより購入) を終濃度(10 μM) で加えた。さらに10時間後に、SDS-PAGEサンプルバッファーで細胞を溶解して熱変性を行い、蛋白質サンプルとした。これを同様にSDS-PAGEを行い、ウサギ抗HA抗体 (H1803; サンタクルーズより購入) を一次抗体、ロバ抗ウサギIgG抗体 (NA9340; アマシャムより購入) を二次抗体としてウエスタン解析した。結果を図1Bに示す。

30

## 【0254】

その結果、MG132を添加した細胞では、コントロールに比べて、強いシグナルが得られたことから、MG132によってSR75, SR55, SR40の蛋白質分解が阻害される結果を得た。また、この他のSR蛋白質についても同様のことが解っている (data not shown) ことから、SR蛋白質はMG132によるユビキチンプロテアソームを介して蛋白質分解されていることが明らかとなった。

## 【0255】

## [実施例2A] SRPK2安定的発現細胞におけるSR蛋白質のリン酸化

Flp-In-293細胞を用いて、マウスSRPK2遺伝子をFlp-In部位に1コピー導入したSRPK2安定的発現細胞を複数株樹立した。解析では親株Flp-In293をmockとして、複数株樹立したSRPK2安定的発現細胞のうちSRPK2-2を実験に用いた。この2つの細胞にpNL4-3を遺伝子導入して、4日後にHIV感染における内在性SR蛋白質の動態をウエスタン解析により調べた。

40

## 【0256】

図1Aと同様にウエスタン解析を行ったところ、SRPK2-2細胞にHIVpNL4-3ゲノムを遺伝子導入した場合に、Mab104抗体でSRp35、SRp40、SRp55、SRp75の位置にシグナルが認められることから、Mab104で認識されるSRドメインはリン酸化状態にあることが明らかとなった。

## 【0257】

さらに、SC35抗体、SF2抗体を用いたウエスタン解析によるとHIVpNL4-3ゲノムを遺伝子

50

導入したSRPK2-2細胞ではSC35、SF2のシグナルが認められた。図2Aに示す。

これらの結果、通常HIV感染に伴ってSR蛋白質は分解されるが、SRPK2安定的発現細胞ではSR蛋白質のリン酸化状態が維持され、結果としてSR蛋白質が安定化される。このことは、SRPK2安定的発現細胞では、SR蛋白質がリン酸化状態にあり、ユビキチンプロテアソームを介した蛋白質の分解が起きないと考えられる。

【0258】

[実施例2B] SRPK2安定的発現細胞におけるSR蛋白質の存在

親株Flp-In293 (mock) とSRPK2遺伝子をFlp-In部位に1コピー導入したSRPK2安定的発現Flp-In-293細胞 (SRPK2-2細胞) に、HIVpNL4-3ゲノムを1マイクログラムと、HAタグを融合したSRp75, SRp55, 及びSRp40遺伝子のプラスミド (HA-SRp75, HA-SRp55, HA-SRp40; Dr. Woan-Yuh TARNより供与) 1マイクログラムをGenejuiceにより遺伝子導入し、36時間後にサンプルを回収して、ウエスタン解析を行った。結果を図2Bに示す。その結果、HIV感染に伴ってFlp-In293細胞ではSC35, SF2だけでなく、SRp75, SRp55, SRp40についても、抗HA抗体によるシグナルが無くなるか、または弱くなっていた。またSRPK2-2細胞では、同様にシグナルはコントロールに比べて弱くなっているが、SC35, SF2と同様にSRp75, SRp55, SRp40のシグナルが見られる。

【0259】

これらの結果は、HIV感染に伴ってSR蛋白質の分解が促進されるが、SRPK2-2細胞ではSR蛋白質をリン酸化するので、SR蛋白質が安定化されていることを意味している。

【0260】

[実施例2C] HIVの産生量を測定

実施例2A (図2A) の実験の際に培養上清を回収してHIVの産生量を測定した。遺伝子導入後の培養上清を回収し、培養上清に含まれるHIV外膜蛋白質であるp24の量を、ルミパルスELISAシステム (富士レピオ) によって測定した。結果を図2Cに示す。

【0261】

その結果、mockの培養上清に比べてSRPK2-2細胞では2.3倍量のHIVが産生されている結果を得た。

【0262】

以上のことから、HIV感染にตอบสนองしてSR蛋白質が脱リン酸化されるが、SR蛋白質を恒常的にリン酸化状態にした場合には、感染にตอบสนองしたSR蛋白質の制御機構が働かないので、結果としてHIV産生を昂進させることが明らかとなった。

【0263】

このことは、HIV感染にตอบสนองしたSR蛋白質の脱リン酸化は、宿主の防御機構として機能していることを示唆している。

【0264】

[実施例3A] *in vivo*でのHIVの産生に寄与するSR蛋白質の検討

HIVは、その遺伝子発現過程において宿主の因子を用いて転写、プロセッシング、翻訳を行っている。特に、HIVのTat、Revは分断されたエクソンを持ち、その遺伝子発現にはmRNAのスプライシング反応が必須であると想定されている。

【0265】

実施例1-2 (図1-2) で示した様に、HIV感染に伴って宿主の防御機構が作動し、SR蛋白質は分解されることを示したが、*in vivo*でのHIVのスプライシング反応や、それに寄与するSR蛋白質については不明である。実際、SR蛋白質は細胞内に複数種類が存在しているので、これらのSR蛋白質を発現するプラスミド (0.5 µg) をHIVpNL4-3ゲノム (1.0 µg) とともに遺伝子導入して、その効果を検討した。結果を図3Aに示す。

【0266】

Mock, SC35, SF2, SRp40, SRp55, SRp75発現プラスミドを各々Flp-In293細胞に遺伝子導入し、36時間後に培養上清を回収し、ルミパルスELISAシステムを用いてHIVp24の量を測定した。

【0267】

その結果、mockに比べてSRp40、SRp75ではHIVp24量は増加していることから、SRp40、SRp75にHIV産生を促進する効果を認めた。

【0268】

[実施例3B] hnRNPA1を用いた、in vivoにおけるHIV産生への効果の検討

図3Bに示したように、HIVpNL4-3ゲノム(0.5 µg)と共に、一定量(500ng)のSRp40、SRp75発現プラスミドに加えて、hnRNPA1発現プラスミドの量を段階的に増やしてFlp-In293細胞へ遺伝子導入を行った。36時間後に培養上清を回収し、ルミパルスELISAシステムを用いてHIVp24の量を測定した。

【0269】

その結果、hnRNPA1の量に依存して、ルミパルスELISAシステムにより測定したHIVp24量が減少する結果を得た。すなわちSRp40とSRp75に対して競合的にhnRNPA1が働いて、HIV産生を抑制している。

【0270】

このことは、細胞内でHIVの遺伝子発現に、スプライシング反応を介して発現制御していることが示唆された。実際、細胞内にはSRp40やSRp75とhnRNPA1が共存しているので、HIV感染にともなう細胞内SR蛋白質の分解は、細胞内におけるhnRNPA1を優位にして、HIVの遺伝子発現を抑制することで防御機構として成立していると考えられる。

【0271】

[実施例4A] 細胞内SR蛋白質のリン酸化を阻害するための、SRPKの阻害剤の探索

リン酸化酵素が共通に持つATP結合部位を標的として、競合的に結合する阻害剤を探索した。スクリーニングの結果ヒットした化合物は、分子量349.35のMaybridge社から既に販売されている化合物の一つであった(CAS Registry No. 218156-96-8)。しかしながら、リン酸化酵素の阻害に関しては、これまでいかなる発表もなされていない。我々はこれをSRPIN-1(SRPk Inhibitor-1)と名づけた。

【0272】

[実施例4B] SRPIN-1を用いたSRPK1のリン酸化活性の阻害の検討

SF2のRSドメインに相当するRSペプチド(NH<sub>2</sub>-RSPSYGRSRSRSRSRSRSRSRNSRSRSY-OH)(配列番号:5)を合成した。これを10mM Tris-HCl(pH 7.5)で1mg/mlになるように溶解した。大腸菌で発現精製した組み換えSRPK1蛋白質を1 µg用いて、反応バッファー(250 µM MgCl<sub>2</sub>、0.25mM ATP、1 mCi [ -<sup>32</sup>P] ATP、SRPIN-1終濃度0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 µM)中で30分の湯浴で10分間インキュベートした。このリン酸化酵素の活性測定におけるSRPK1とRSペプチドの量、および反応時間の条件は、予め反応の直線性を検討し、直線性が成立する条件を選んでいる。

【0273】

SRPK1とRSペプチドの反応を10分行った後、反応液をP81フォスフォセルロースメンブレン(P81; Whatman)に滴下し、5%リン酸溶液で洗浄した。洗浄後、P81メンブレンの<sup>32</sup>Pについての放射活性を液体シンチレーションカウンターによって測定した。結果を図4Bに示す。

【0274】

その結果、SRPIN-1のSRPK1に対するIC<sub>50</sub>は約400nMである結果を得た。また同様の手法によって検討したCLK1、CLK2、CLK3、CLK4、SRPK2、PRP4、PKA、PKCについては、終濃度10 µMでも阻害効果を見出せなかったことから、SRPIN-1はSRPK1の特異的酵素阻害剤と言える。

【0275】

[実施例4C] SRPIN-1を用いたin vivoにおけるSR蛋白質のリン酸化阻害と、それに伴うSR蛋白質分解の誘導の検討

Flp-In293細胞にHA-SRp75プラスミド(1.0 µg)を遺伝子導入して、36時間後にMG132(終濃度10 µM)、SRPIN-1(10、20、50 µM)をそれぞれ添加して15時間インキュベートした。その後、SDS-PAGEサンプルバッファーで細胞を溶解して、蛋白質サンプルとした。このサンプルを、SDS-PAGEして、抗HA抗体を用いたウエスタン解析を行った。また蛋白質量の

10

20

30

40

50

コントロールとして抗 アクチン抗体を用いてウエスタン解析を行った。結果を図 4 C に示す。

【 0 2 7 6 】

その結果、SRPIN-1の濃度依存的にHA抗体のシグナルが弱くなる結果を得た。このことは、SRPIN-1依存的に内在性のSRPK1活性が阻害されたことで、結果としてSRp75蛋白質が分解されたことを示している。

【 0 2 7 7 】

このことは、SRPIN-1によるSRPK1の阻害は、in vivoにおいてSR蛋白質のリン酸化を阻害することが可能であり、その結果としてSR蛋白質は不安定化して蛋白質分解が促進されることを意味している。

10

【 0 2 7 8 】

[ 実施例 4 D ] SRPIN-1の添加による、HIV感染の阻害の検討

MT-4細胞に、293T細胞で調製したHIVビリオンを添加して、感染実験を行った。まずウイルス調製液をMT-4細胞に加えると同時に、SRPIN-1(終濃度0.5、10、20 μM)を添加する。2時間37 5% CO<sub>2</sub>の培養条件下でインキュベートした後、細胞を遠心して新しい培養液に交換した。その後、48時間後に培養上清を回収してルミパルスELISAシステムによってHIVp24の量を測定した。結果を図 4 D に示す。

【 0 2 7 9 】

その結果、ルミパルスELISAシステムによって測定したHIVp24の量は、SRPIN-1の濃度に依存して減少する結果を得た。このことは、SRPIN-1がHIV産生を濃度依存的に阻害できることを意味している。

20

【 0 2 8 0 】

[ 実施例 5 ] SRPIN-1類縁体を用いたSRPK1/2のリン酸化活性の阻害

実施例 4 B と同様に、SRPIN-1類縁体を用いたSRPK1およびSRPK2のリン酸化活性の阻害活性を確認した。大腸菌で発現精製した組み換えSRPK1蛋白質およびSRPK2蛋白質 1 μgを用いて、反応バッファー(400 μM HEPES (pH 7.5)、100 μM MgCl<sub>2</sub>、200 μM ATP、1 mCi [ -<sup>32</sup>P] ATP、RSペプチド(配列番号:5) 1 mg/ml、SRPIN-1類縁体各 10 μM (DMSO中))中で30 の湯浴で20分間インキュベートした。

【 0 2 8 1 】

SRPK1またはSRPK2とRSペプチドの反応を20分行った後、反応液をP81フォスフォセルロースメンブレン(P81; Whatman)に滴下し、5%リン酸溶液で洗浄(10分を3回)した。洗浄後、P81メンブレンの<sup>32</sup>Pについての放射活性を液体シンチレーションカウンターによって測定した。その結果、図 5 A に示したように、各SRPIN-1類縁体はSRPK1および/またはSRPK2に対するリン酸化活性阻害効果を示した。特に、化合物番号340 (SRPIN-1) ~ 348、612、613、615、618、619、621、624、625では、SRPK1またはSRPK2に強い阻害効果が認められた。

30

【 0 2 8 2 】

次に、各SRPIN-1類縁体のHIV複製に対する抑制効果を確認した。MT-4細胞(JCRB No. JCRB0135)に、293T細胞で調製したHIVビリオンを添加して、感染実験を行った。まずウイルス調製液をMT-4細胞に加えると同時に、SRPIN-1類縁体(終濃度 5、10、20 μM)を添加した。2時間37、5% CO<sub>2</sub>の培養条件下でインキュベートした後、細胞を遠心して新しい培養液に交換した。48時間後に培養上清を回収してルミパルスELISAシステムによってHIV p24の量を測定した。その結果、図 5 B に示した各SRPIN-1類縁体はHIV複製を阻害する活性を有していた。特に化合物番号340、341、342、343、345、347、348、608、613、615、616、618、619、620、622、623、624、625、626では、HIV増殖に対する強い抑制効果が認められた。また、図 5 C に示したように、他の細胞(Jurkat)を用いた実験でも同様にHIV増殖を抑制する効果が確認された。

40

【 0 2 8 3 】

[ 実施例 6 ] シンドビスウイルスに対する増殖抑制効果

Vero細胞(JCRB0111)にシンドビスウイルス(4.7x10<sup>7</sup> PFU/ml)を5 microL加え、24時

50

間培養した培養上清をストックウイルスとして調製した。これをBHK21 C13 細胞 (JCRB90 20) に、 $10^2$ から $10^7$  PFU となるように希釈して添加すると同時に、SRPIN-1 (終濃度 5、10、20、または $40 \mu\text{M}$ ) を添加した。室温で1時間感染させた後、1%メチルセルロース (SIGMA M0512-100G) を含む培地を加え、48時間、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の培養条件下で静かに培養し、位相差顕微鏡下で細胞形態を観察するとともに、シンドビスウイルス感染により細胞死したプラーク数をカウントし (プラークアッセイ)、PFU/ml を計算した。

【0284】

図6Aに、ウイルス感染の20時間後の細胞の位相差顕微鏡像を示した。SRPIN-1非投与細胞 (図中の "+SIN、対照") では、シンドビスウイルスの増殖による細胞傷害が顕著に認められたが、SRPIN-1 ( $40 \mu\text{M}$ ) の投与により細胞傷害は劇的に抑制されることが分かる (図中の "+SIN、 $40 \mu\text{M}$  (#340)")。プラークアッセイの結果でも、 $5 \mu\text{M}$ 以上のSRPIN-1はシンドビスウイルスの増殖を有意かつ濃度依存的に抑制することが判明した (図6B)。

【0285】

[実施例7] サイトメガロウイルスに対する増殖抑制効果

HFL1細胞 (IF050074) に、サイトメガロウイルス ( $1 \times 10^4$  PFU/ml) を添加すると同時に、SRPIN-1またはその類縁体 (化合物番号 340および349; 終濃度 20または $40 \mu\text{M}$ ) を添加した。その結果、感染7日後に、位相差顕微鏡下でサイトメガロウイルスの感染したHFL1細胞を観察したところ、図7に示すように、SRPIN-1を添加しなかった対照群のHFL1細胞 (図中の1および2) はサイトメガロウイルス感染に特有の形態変化と細胞死が高率に観察されたのに対し、SRPIN-1 ( $20 \mu\text{M}$ ) を添加したHFL1細胞 (図中の3) においては、サイトメガロウイルスを感染させたにも関わらず、異常な形態変化や細胞死は認められなかった。高濃度 ( $40 \mu\text{M}$ ) のSRPIN-1を添加したHFL1細胞においては一部の当該化合物が惹起したと思われる細胞の形態変化を認めた。またSRPIN-1類縁化合物 (化合物番号349)  $20 \mu\text{M}$ あるいは $40 \mu\text{M}$ をHFL1細胞に添加することによっても、サイトメガロウイルスの感染による異常な形態変化や細胞死は抑制された (図中の5および6)。この結果、本試験条件下において、SRPIN-1とその類縁化合物はサイトメガロウイルスの感染による細胞の形態変化や細胞死を抑制できることが確認された。

【0286】

[実施例8] SARSウイルスに対する増殖抑制効果

Vero細胞 (JCRB0111) に、SARSウイルス (FFM-1) (Yamamoto, N. et. al., Biochem Biophys Res Commun. 318, 719-725 (2004)) を感染させ、同時にSRPIN-1またはその類縁体 (終濃度 5、10、20、 $40 \mu\text{M}$ ) を添加した。室温で2時間感染させた後、1%メチルセルロース (SIGMA M0512-100G) を含むD-MEMを加え、48時間、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の培養条件下で培養した。その結果、SARSウイルス感染により細胞死したプラーク数をカウントし (プラークアッセイ)、PFU/ml を計算した。その結果、図8Aに示したように、 $40 \mu\text{M}$ のSRPIN-1およびその類縁化合物 (化合物番号349) はSARSウイルスの増殖を有意に抑制した。ただし、その効果はSRPIN-1の方が、類縁化合物 (化合物番号349) と比べて、ウイルス増殖抑制効果がより顕著であった。また図8Bに示したように、SRPIN-1は $1 \mu\text{M}$ から $40 \mu\text{M}$ の濃度範囲において濃度依存的にSARSウイルスの増殖を抑制することが判明した。

【産業上の利用可能性】

【0287】

本発明により、SRPIN-1 (SR protein phosphorylation inhibitor 1) およびその類縁体がリン酸化酵素SRPKの阻害活性を有することが明らかにされた。SR蛋白質はSRPKによるリン酸化によって細胞中で安定に存在しているが、これらのSRPK阻害剤によってSRPKの酵素活性を阻害すると、SR蛋白質のリン酸化が阻害され、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して分解されることを見出した。そこでSRPK阻害剤を添加してSRPKの阻害を試みたところ、HIV感染実験ではSRPK阻害剤にウイルス複製を抑制する抗ウイルス作用を有することを見出した。

【0288】

更に、本発明は、SR蛋白質の活性を制御することにより、同一のメカニズムで、広範

10

20

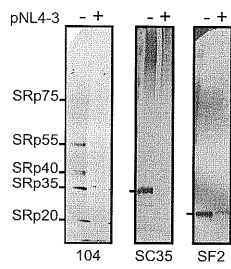
30

40

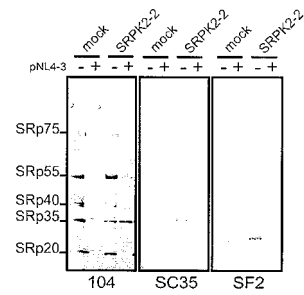
50

困なウイルスに対して有効な抗ウイルス剤を提供するという効果を奏するものである。

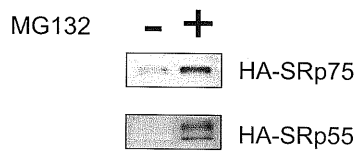
【図 1 A】



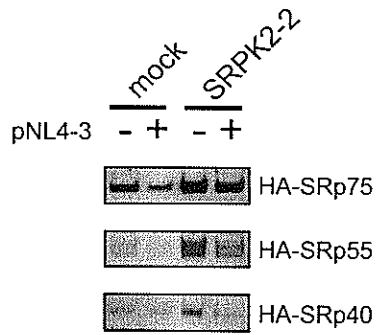
【図 2 A】



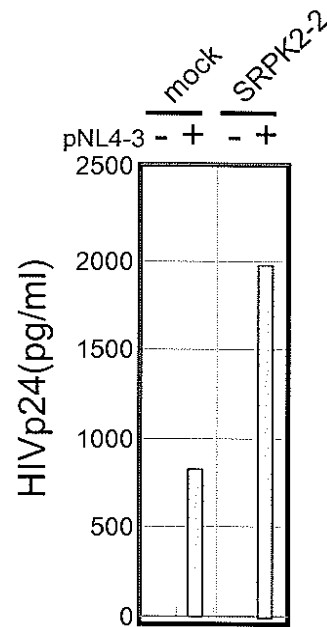
【図 1 B】



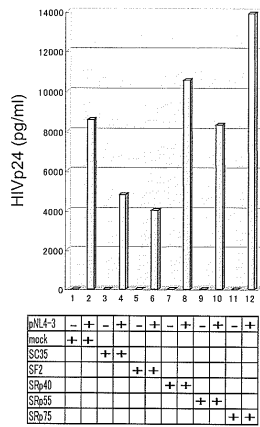
【 2 B 】



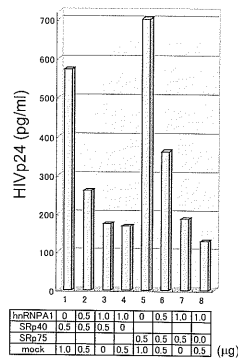
【 2 C 】



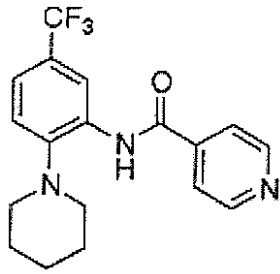
【 3 A 】



【 3 B 】

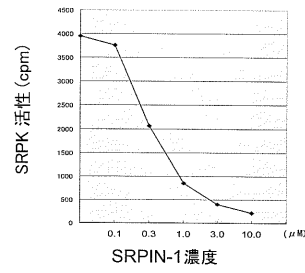


【 図 4 A 】

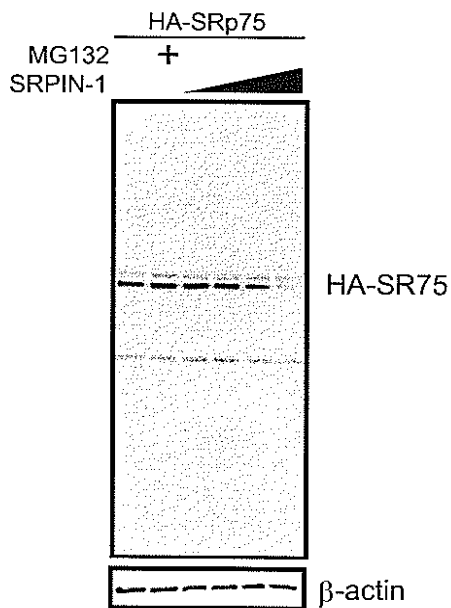


SRPIN-1(C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O)  
MW349.35

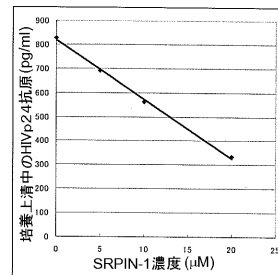
【 図 4 B 】



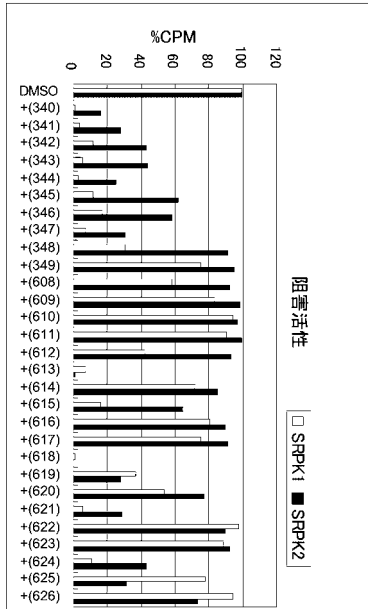
【 図 4 C 】



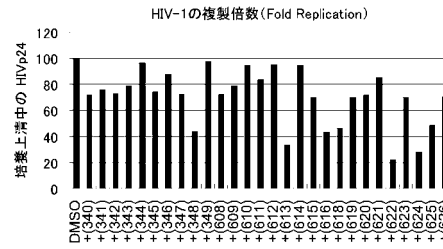
【 図 4 D 】



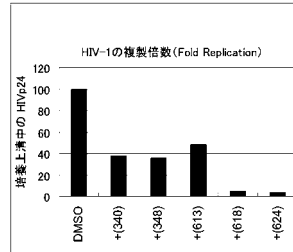
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



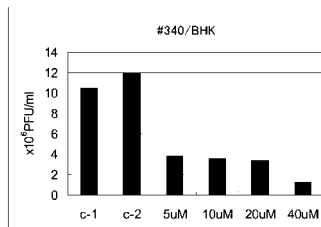
【 図 5 C 】



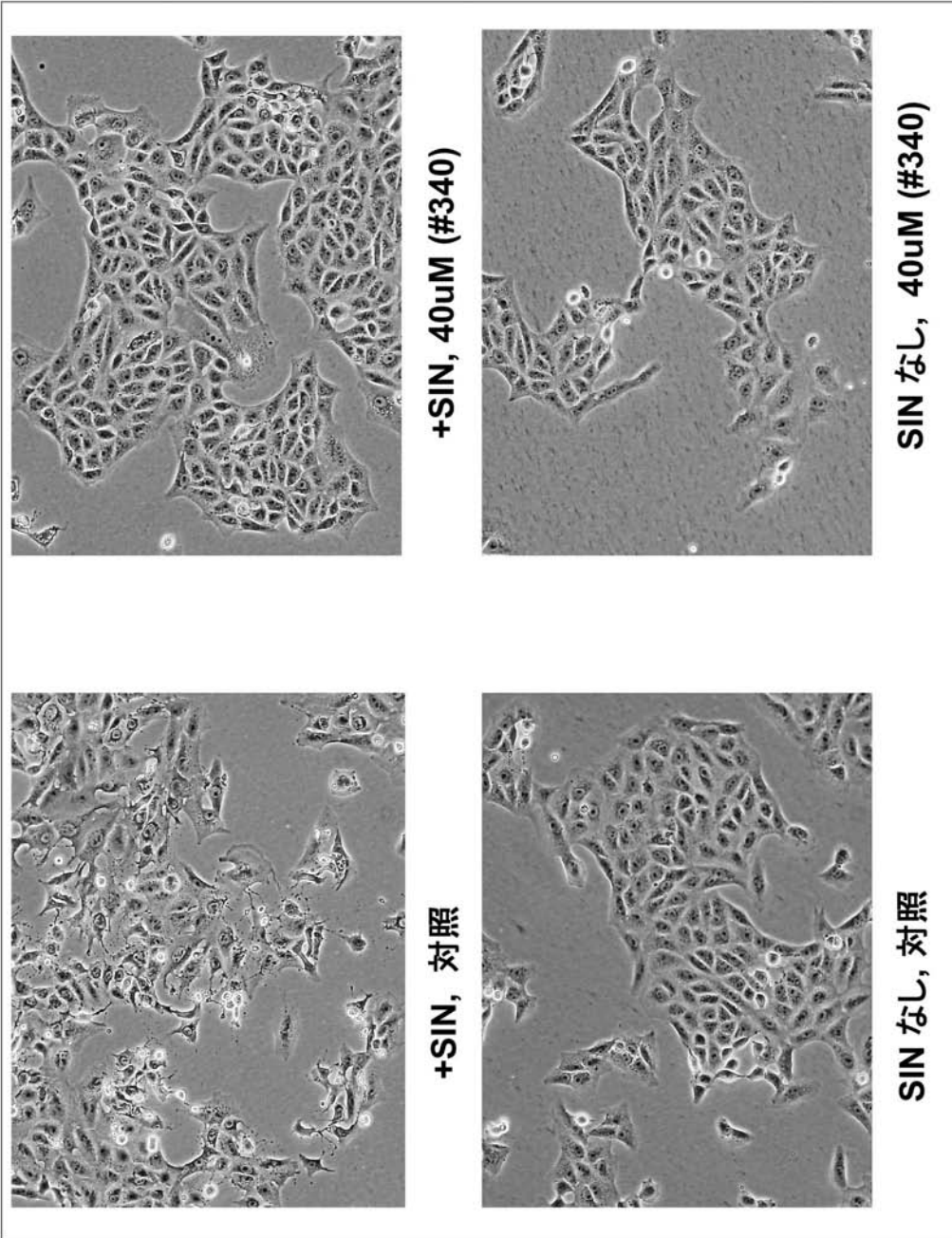
【 図 6 B 】

ブランクアッセイ

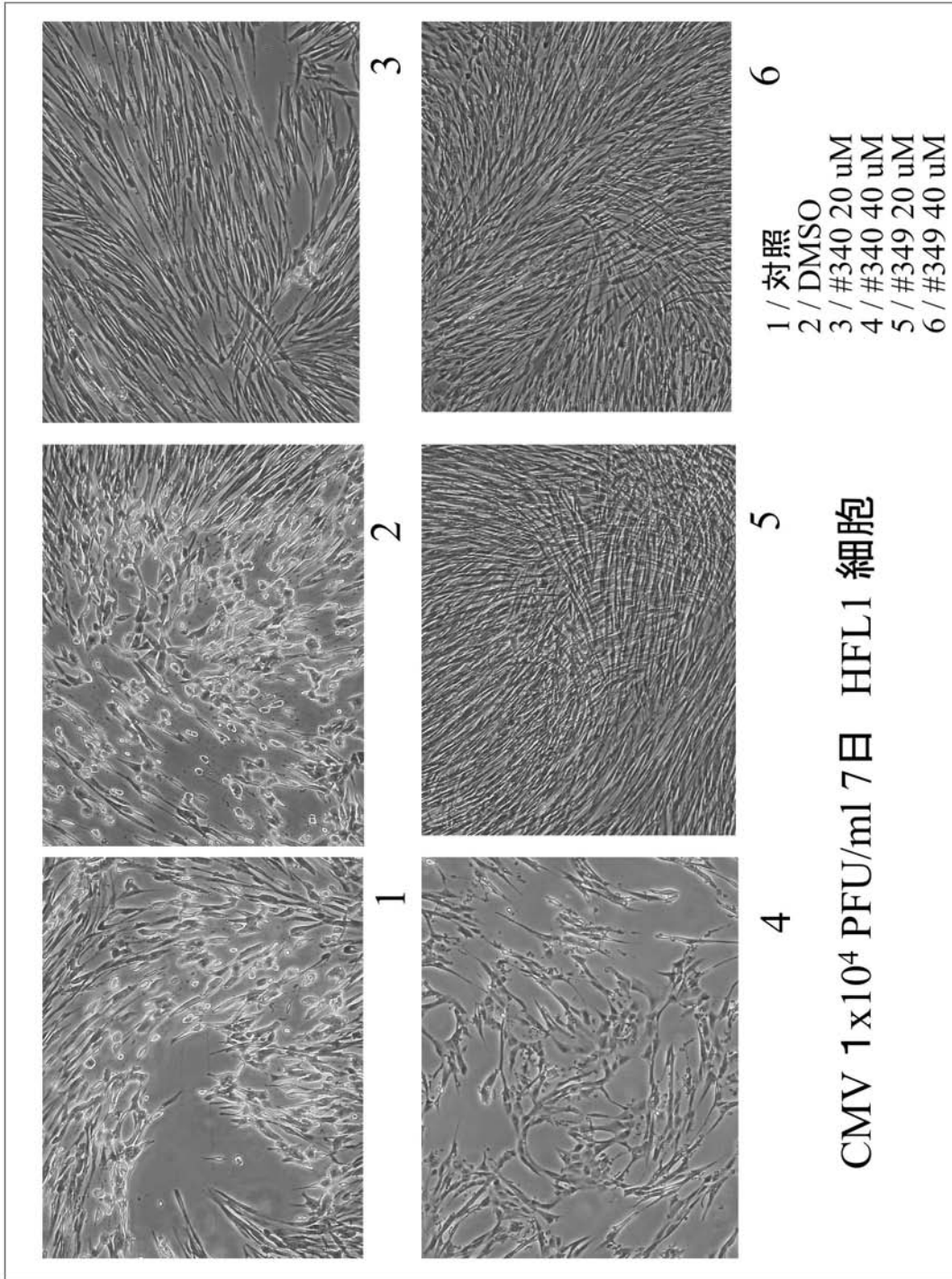
結果	N.o	340	PFU/ml
340c-1	0		1.05x10 <sup>7</sup>
340c-2	DMSO		1.20x10 <sup>7</sup>
340-1	5uM(F/c)		3.85x10 <sup>6</sup>
340-2	10uM(F/c)		3.60x10 <sup>6</sup>
340-3	20uM(F/c)		3.40x10 <sup>6</sup>
340-4	40uM(F/c)		1.25x10 <sup>6</sup>



【 図 6 A 】



【 図 7 】



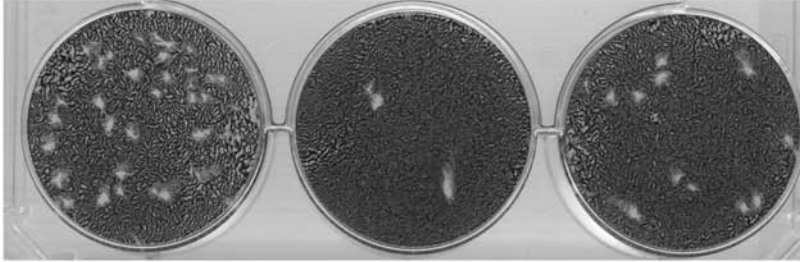
【 図 8 】

(A)

対照

#340  
(40  $\mu$  M)

#349  
(40  $\mu$  M)



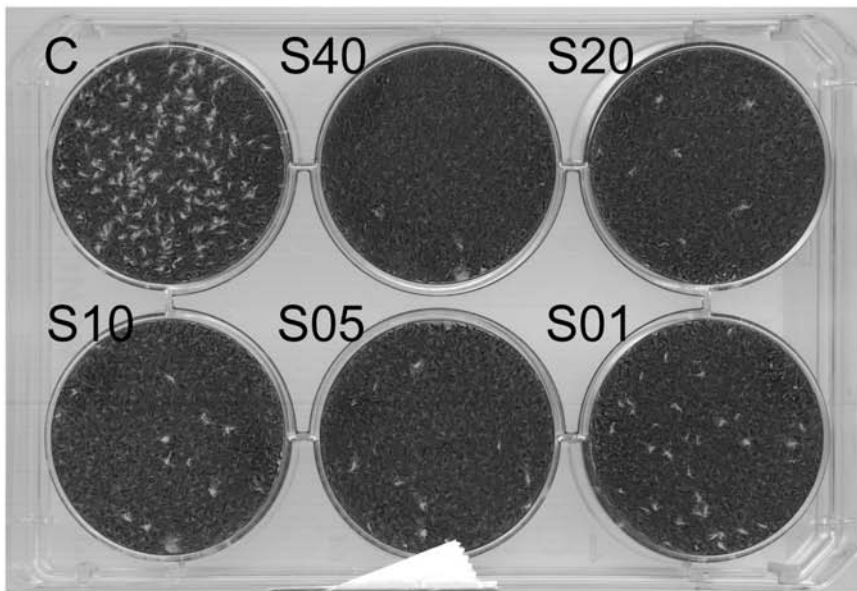
15.5

1.5

7 (\*10<sup>6</sup> PFU/ml)

(B)

C : 対照, S: SRPIN-1(#340) 濃度 ( $\mu$  M)



【 配列表 】

[0004771468000001.app](#)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 31/16	(2006.01)	A 6 1 P 31/16
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 31/22	(2006.01)	A 6 1 P 31/22

(72)発明者 細谷 孝充  
 岐阜県岐阜市福光東2丁目7番17号 サンライズ88-605

審査官 宮坂 隆

(56)参考文献 独国特許出願公開第10109856( DE, A1 )  
 特開昭59-016871( JP, A )  
 特表平10-504292( JP, A )  
 国際公開第98/045298( WO, A1 )  
 特表2002-537396( JP, A )  
 国際公開第01/002350( WO, A1 )  
 特表平09-505293( JP, A )  
 特表2000-510865( JP, A )  
 国際公開第02/002524( WO, A1 )  
 特表平07-503966( JP, A )  
 特開平01-151593( JP, A )  
 J. Med. Chem., 1998年, Vol.41, pp.3467-76

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/4523  
 A61K 31/4406  
 A61K 31/4409  
 A61K 31/55  
 A61P 31/12  
 A61P 31/16  
 A61P 31/18  
 A61P 31/22  
 CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
 PubMed