(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2006 年9 月14 日 (14.09.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/095624 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/4545 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *C07D 213/85* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/303905

(22) 国際出願日: 2006 年3 月1 日 (01.03.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-064664 2005 年3 月8 日 (08.03.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京医科歯科大学 (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島１丁目５番４５号 Tokyo (JP). 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP). 国立感染症研究所長 (Director of national institute of infectious diseases) [JP/JP]; 〒1628640 東京都新宿区戸山一丁目２３番１号 Tokyo (JP).

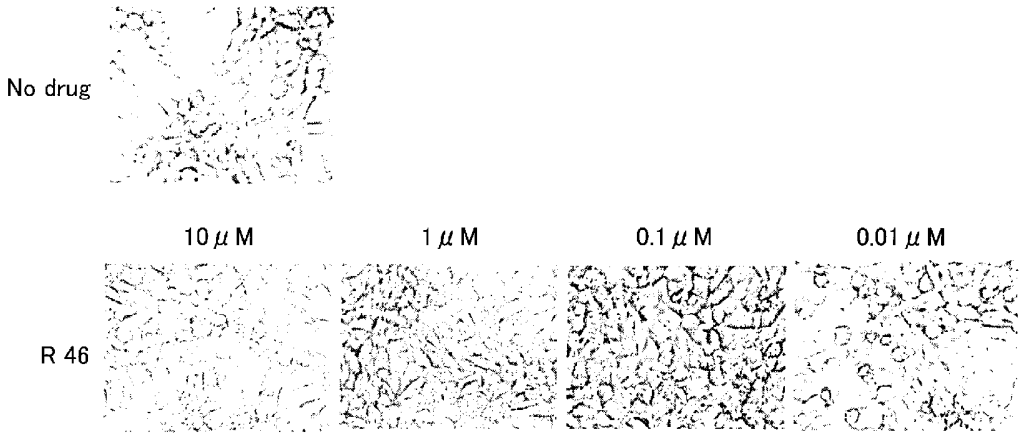
(72) 発明者; および

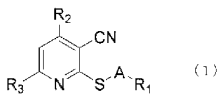
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山本 典生 (YAMAMOTO, Norio) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島１丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島１丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 横山 茂之 (YOKOYAMA, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町１丁目７番２２号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 廣田 洋 (HIROTA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町１丁目７番２２号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 大貫 裕之 (ONUKI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町１丁目７番２２号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 佐藤 万仁 (SATOU, Kazuhito) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町１丁目７番２２号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 田仲 昭子 (TANAKA, Akiko) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市

[続葉有]

(54) Title: PROTEASE INHIBITOR

(54) 発明の名称: プロテアーゼインヒビター





(1)

(57) Abstract: A new protease inhibitor which inhibits protease activity. Also provided is a new antiviral agent which contains the protease inhibitor as an active ingredient. The protease inhibitor is a pyridinecarbonitrile compound represented by the following general formula (1) or a pharmaceutically acceptable salt thereof. It may contain a 4-morpholinyl or 1-piperidyl group.

[続葉有]

WO 2006/095624 A1

鶴見区末広町１丁目７番２２号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). **松本 武久 (MATSUMOTO, Takehisa)** [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町１丁目７番２２号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). **梅山 秀明 (UMEYAMA, Hideaki)** [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町１丁目７番２２号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). **志鷹 真由子 (SHITAKA, Mayuko)** [JP/JP]; 〒1890001 東京都東村山市秋津町４－３３－５８－２０５ Tokyo (JP). **森川 茂 (MORIKAWA, Shigeru)** [JP/JP]; 〒2060802 東京都稲城市東長沼３１１２－１－５０２ Tokyo (JP). **西條 政幸 (SAIJO, Masayuki)** [JP/JP]; 〒1890024 東京都東村山市富士見町１－１２－２－９－１１０７ Tokyo (JP). **倉根 一郎 (KURANE, Ichiro)** [JP/JP]; 〒1510066 東京都渋谷区西原１－４８－１－１１６ Tokyo (JP).

(74) **代理人：正林 真之 (SHOBAYASHI, Masayuki)**; 〒1700013 東京都豊島区東池袋１丁目２５番８号 タカセビル本館 Tokyo (JP).

(81) **指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), **ユーラシア** (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), **ヨーロッパ** (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

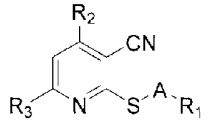
添付公開書類:
— **国際調査報告書**
— **電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能**

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

プロテアーゼの活性を阻害する新たなプロテアーゼインヒビターを提供することを目的とする。また、プロテアーゼインヒビターを有効成分として含む新たな抗ウイルス剤を提供することを目的とする。

本発明によれば、下記一般式（１）で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビターであって、４－モルホリニル基または１－ピペリジル基を含むことのあるプロテアーゼインヒビターを提供する。また、このプロテアーゼインヒビターを有効成分として含む抗ウイルス剤を提供する。



（1）

明 細 書

プロテアーゼインヒビター

技術分野

[0001] 本発明は、プロテアーゼインヒビターに関するものであり、特に、ピリジンカルボニトリル系化合物であるプロテアーゼインヒビターに関するものである。

背景技術

[0002] ウイルス由来の感染症に現在多くの人々が苦しんでいる。例えば、世界保健機関(WHO)の調査によれば、ウイルス由来の感染症である重症急性呼吸器症候群(SARS)によって、2002年11月1日から2003年7月31日の間に約8000人の患者が報告され、774人が亡くなっており、致死率は約10%に及んでいる。このように、ウイルス由来の感染症に対して治療および予防に使用できる抗ウイルス剤の開発が求められている。

[0003] しかしながら、ウイルスによる感染症は、細菌による感染症と異なり、抗生物質などでは治療し得ず、抗ウイルス剤の開発は困難である。現在、抗ウイルス剤としては、ウイルスの細胞への進入を阻害する(例えば、ノイラミニダーゼ阻害剤など)細胞侵入阻害剤や、核酸合成を阻害する(例えば、アシクロビル、ガンシクロビル、ジドブジン、ラミブジンなど)核酸合成阻害剤や、タンパク質の合成を阻害する(例えば、リトナビルや、フロロタンニンなど)プロテアーゼインヒビターなどの限られた種類しかない。

[0004] 例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のエンベロープタンパク質のGP120などは、変異が起こり易い。このため、エンベロープタンパク質を標的にした抗ウイルス薬では、ウイルスがエンベロープタンパク質の変異によって、抗ウイルス剤に耐性を容易に獲得し得る。

[0005] 一方、細胞内でウイルス増殖に必要なプロテアーゼは、比較的変異が起こりにくい。このため、プロテアーゼを標的にした抗ウイルス剤では、ウイルスが耐性を獲得しにくく、プロテアーゼを標的にした抗ウイルス剤の開発が有望である。このため、現在、例えば、リトナビルやフロロタンニンなど、プロテアーゼの活性を阻害することを目的とし、プロテアーゼインヒビターを有効成分とする抗ウイルス剤の開発が行われている(

特許文献1参照)。

特許文献1:特開2004－189648号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、リトナビルや、フロロタンニンは、SARSウイルス由来のプロテアーゼの活性中心に十分に結合しないため、十分にプロテアーゼの活性を阻害できない。このため、SARSに対して、リトナビルや、フロロタンニンは、プロテアーゼインヒビターを有効成分とする抗ウイルス剤として使用するには不十分である。このような事情から、現時点において、プロテアーゼの活性を阻害する新たなプロテアーゼインヒビターの開発が望まれている。

[0007] 本発明は、上述したような課題に鑑みてなされたものである。その目的は、プロテアーゼの活性を阻害する新たなプロテアーゼインヒビターを提供するものである。また、プロテアーゼインヒビターを有効成分として含む新たな抗ウイルス剤を提供するものである。

課題を解決するための手段

[0008] 以上のような目的を達成するために、本発明は、以下のようなものを提供する。

[0009] (1) 下記一般式(1)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

[化1]



・・・式(1)

(式中、

Aは、

(a)置換基として低級アルキル基または水酸基を有していてもよいジメチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基のいずれか、あるいは

(b)－$(CH_2)_n$CO－(nは1から3の整数)で示される基、のいずれかを示し、

R_1は、

窒素原子を介してAと結合し、置換基としてアルキル基を有していてもよい含窒素飽和の4から8員環基のいずれかを示し、ここで、前記環を形成するメチレン基の少なくとも1個は、酸素原子、硫黄原子、窒素原子、または低級アルキル基を有する窒素原子で置換されていてもよく、

R_2およびR_3は、それぞれ独立して、

(c)水素原子、または

(d)フェニル基、または

(e)ハロゲン基、ハロゲノメチル基、低級アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキレンジオキシ基、アラルキルオキシ基、あるいはこれらの複数個で置換されたフェニル基のいずれか、から選ばれる原子または基を示す。)

[0010] (1)の発明によれば、式(1)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物であるプロテアーゼインヒビターは、例えば、一種の基質としてプロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位とプロテアーゼ側の活性中心とが結合して安定な複合体を形成する。従って、このプロテアーゼインヒビターは、例えば、プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害し、さらに、このプロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することができる。

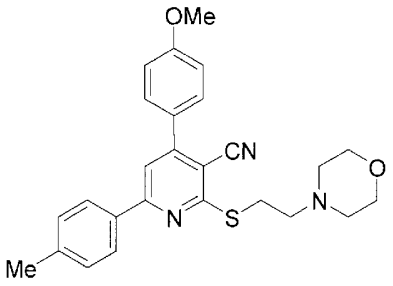
[0011] (2) (1)に記載のプロテアーゼインヒビターであって、ピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩におけるR_1は、4－モリホリニル基または1－ピペリジル基であるプロテアーゼインヒビター。

[0012] (2)の発明によれば、(2)の発明によるプロテアーゼインヒビターが、例えば、一種の基質としてプロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位とプロテアーゼ側の活性中心とが結合して、さらに、安定な複合体を形成する。従って、このプロテアーゼインヒビターは、例えば、プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害し、さらに、このプロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することができる。

[0013] (3) 下記式(2)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容

され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

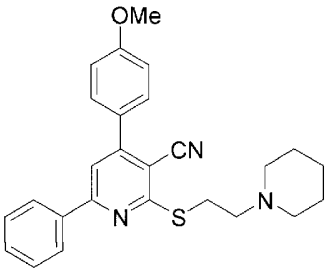
[化2]



・・・式(2)

[0014] (4) 下記式(3)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

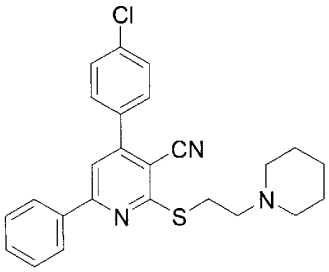
[化3]



・・・式(3)

[0015] (5) 下記式(8)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

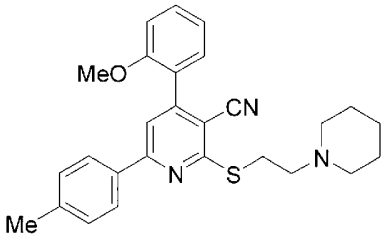
[化4]



・・・式(8)

[0016] (6) 下記式(14)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

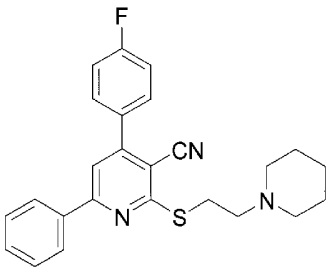
[化5]



・・・式(14)

[0017] (7) 下記式(17)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

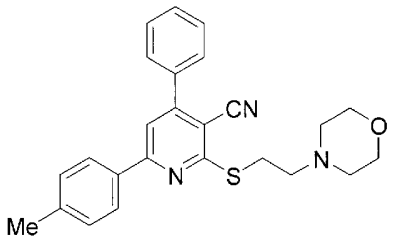
[化6]



・・・式(17)

[0018] (8) 下記式(23)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

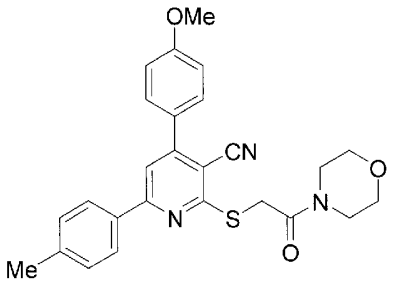
[化7]



・・・式(23)

[0019] (9) 下記式(102)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

[化8]



・・・式(102)

[0020] (3)から(9)の発明によれば、式(2)、式(3)、式(8)、式(14)、式(17)、式(23)、式(102)、で表されるそれぞれのピリジンカルボニトリル系化合物であるプロテアーゼインヒビターは、例えば、一種の基質としてプロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位とプロテアーゼ側の活性中心とが結合して安定な複合体を形成する。従って、このプロテアーゼインヒビターは、例えば、プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害し、さらに、このプロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することができる。

[0021] (10) (1)から(9)いずれかに記載のプロテアーゼインヒビターであって、活性中心にSH基を有するプロテアーゼの活性を阻害するプロテアーゼインヒビター。

[0022] (10)の発明によれば、(10)の発明によるプロテアーゼインヒビターが、一種の基質として、例えば、活性中心にSH基を有するプロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位と、例えば、活性中心にSH基を有するプロテアーゼ側の活性中心とが結合して、さらに、安定な複合体を形成する。従って、このプロテアーゼインヒビターは、例えば、プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害し、さらに、活性中心にSH基を有するプロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することができる。

[0023] (11) (1)から(10)いずれかに記載のプロテアーゼインヒビターであって、ウイルス由来のプロテアーゼの活性を阻害するプロテアーゼインヒビター。

[0024] (11)の発明によれば、(11)の発明によるプロテアーゼインヒビターが、一種の基質として、例えば、ウイルス由来のプロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位と、例えば、ウイルス由来のプロテアーゼ側の活性中心とが結合して、さらに、安定な複合体を形成する。従って、このプロテアーゼインヒビターは、例えば、

プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害し、さらに、ウイルス由来のプロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することができる。

[0025] (12) (11)に記載のプロテアーゼインヒビターであって、前記ウイルス由来のプロテアーゼが、RNAウイルス由来のプロテアーゼであるプロテアーゼインヒビター。

[0026] (12)の発明によれば、(12)の発明によるプロテアーゼインヒビターが、一種の基質として、例えば、RNAウイルス由来のプロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位と、例えば、RNAウイルス由来のプロテアーゼ側の活性中心とが結合して、さらに、安定な複合体を形成する。従って、このプロテアーゼインヒビターは、例えば、プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害し、さらに、RNAウイルス由来のプロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することができる。

[0027] (13) (12)に記載のプロテアーゼインヒビターであって、前記RNAウイルス由来のプロテアーゼが、一本鎖(+)RNAウイルス由来のプロテアーゼであるプロテアーゼインヒビター。

[0028] (13)の発明によれば、(13)の発明によるプロテアーゼインヒビターが、一種の基質として、例えば、一本鎖(+)RNAウイルス由来のプロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位と、例えば、一本鎖(+)RNAウイルス由来のプロテアーゼ側の活性中心とが結合して、さらに、安定な複合体を形成する。従って、このプロテアーゼインヒビターは、例えば、プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害し、さらに、一本鎖(+)RNAウイルス由来のプロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することができる。

[0029] (14) (13)に記載のプロテアーゼインヒビターであって、前記一本鎖(+)RNAウイルス由来のプロテアーゼが、コロナウイルス科に属するウイルス由来のプロテアーゼであるプロテアーゼインヒビター。

[0030] (14)の発明によれば、(14)の発明によるプロテアーゼインヒビターが、一種の基質として、例えば、コロナウイルス科に属するウイルス由来のプロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位と、例えば、コロナウイルス科に属するウイル

ス由来のプロテアーゼ側の活性中心とが結合して、さらに、安定な複合体を形成する。従って、このプロテアーゼインヒビターは、例えば、プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害し、さらに、コロナウイルス科に属するウイルス由来のプロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することができる。

[0031] (15) (14)に記載のプロテアーゼインヒビターであって、前記コロナウイルス科に属するウイルス由来のプロテアーゼが、ヒトコロナウイルス、ブタコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群(SARS)ウイルスのいずれかのウイルス由来のプロテアーゼであるプロテアーゼインヒビター。

[0032] (15)の発明によれば、(15)の発明によるプロテアーゼインヒビターが、一種の基質として、例えば、ヒトコロナウイルス、ブタコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群(SARS)ウイルスのいずれかのウイルス由来のプロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位と、例えば、ヒトコロナウイルス、ブタコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群(SARS)ウイルスのいずれかのウイルス由来のプロテアーゼ側の活性中心とが結合して、さらに、安定な複合体を形成する。従って、このプロテアーゼインヒビターは、例えば、プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害し、さらに、ヒトコロナウイルス、ブタコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群(SARS)ウイルスのいずれかのウイルス由来のプロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することができる。

[0033] (16) (1)から(15)いずれかに記載のプロテアーゼインヒビターを有効成分として含む抗ウイルス剤。

[0034] (16)の発明によれば、プロテアーゼインヒビターが、一種の基質として、例えば、プロテアーゼに作用し、このプロテアーゼインヒビターの反応部位と、例えば、プロテアーゼ側の活性中心とが結合して、さらに、安定な複合体を形成する。このため、本発明のプロテアーゼインヒビターは、例えば、ウイルス増殖に必要なプロテアーゼによるタンパク質分解反応を阻害することによって、ウイルスの増殖を抑えることができる。このため、このプロテアーゼインヒビターは抗ウイルス剤の有効成分として、ウイルス感染症の治療及び予防に使用することができる。

発明の効果

[0035] 本発明のプロテアーゼインヒビターは、プロテアーゼの活性中心に結合することによって、プロテアーゼの活性を阻害することができる。また、本発明のプロテアーゼインヒビターは、例えば、ウイルス増殖に必要なプロテアーゼの活性を阻害することによって、抗ウイルス剤として、ウイルス感染症の治療及び予防に使用できる。

図面の簡単な説明

[0036] [図1]化合物によるSARS－CoVメインプロテアーゼ活性阻害効果の結果を示すグラフである。

[図2]化合物によるSARSウイルス増殖阻害効果の結果を示すグラフである。

[図3]化合物投与後のSARSウイルスによるCPEを示す写真である。

[図4]各化合物によるSARSウイルス増殖阻害効果の結果を示すグラフである。

[図5]各化合物によるSARSウイルス増殖阻害効果の結果を示すグラフである。

[図6]各化合物による50%CPE抑制濃度(EC50)および50%細胞障害濃度(CC50)を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0037] 本発明にかかるプロテアーゼインヒビターであるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩(以下、単にピリジンカルボニトリル系化合物ともいう)は、下記式(1)で表される硫黄原子を含む化合物である。

[0038] [化9]



・・・式(1)

[0039] (式中、

Aは、

(a)置換基として低級アルキル基または水酸基を有していてもよいジメチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基のいずれか、あるいは

(b)－$(CH_2)_n$CO－(nは1から3の整数)で示される基、のいずれかを示し、

R_1は、

窒素原子を介してAと結合し、置換基としてアルキル基を有していてもよい含窒素飽和の4から8員環基のいずれかを示し、ここで、前記環を形成するメチレン基の少なくとも1個は、酸素原子、硫黄原子、窒素原子、または低級アルキル基を有する窒素原子で置換されていてもよく、

R_2およびR_3は、それぞれ独立して、

(c)水素原子、または

(d)フェニル基、または

(e)ハロゲン基、ハロゲノメチル基、低級アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキレンジオキシ基、アラルキルオキシ基、あるいはこれらの複数個で置換されたフェニル基のいずれか、から選ばれる原子または基を示す。)

[0040] 本発明に係る式(1)にて表されるAは、具体的には、エチレン、トリメチレン、テトラメチレン、プロピレン、2－メチルトリメチレン、2，2－ジメチルトリメチレン、2－ヒドロキシトリメチレン、メチレンカルボニル、エチレンカルボニル等が例示することができる。

[0041] 本発明に係る式(1)にて表されるR_1は、具体的には、1－ピロリジニル、1－ピペリジル、パーヒドロ－1－アゼピニル、4－モルホリニル、4－チオモルホリニル、4－メチル－1－ピペラジニル等が例示することができる。

[0042] 本発明に係る式(1)にて表されるR_2およびR_3は、具体的には、フェニル、4－フルオロフェニル、4－クロロフェニル、4－トリフルオロメチルフェニル、2－メチルフェニル、3－メチルフェニル、4－メチルフェニル、3，4－ジメチルフェニル、2－メトキシフェニル、4－メトキシフェニル、3，4－ジメトキシフェニル、4－エトキシフェニル、3，4－メチレンジオキシフェニル、4－ベンジルオキシ－3－メトキシフェニル等が例示することができる。

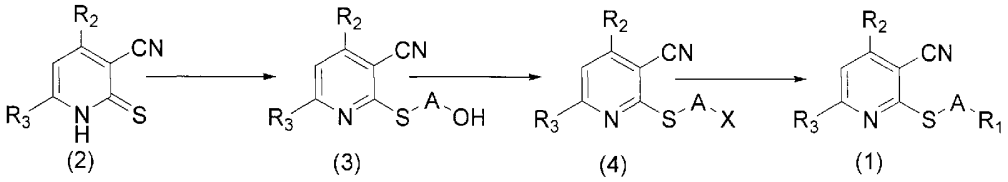
[0043] 本発明に係る式(1)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物の薬学的に許容され得る塩とは、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、硝酸塩のような鉱酸塩;メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p－トルエンスルホン酸塩のようなスルホン酸塩;シュウ酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、マンデル酸塩、アスコルビ

ン酸塩、乳酸塩、グルコン酸塩、リンゴ酸塩のような有機酸塩等の酸付加塩が挙げられる。

[0044] 本発明に係る式(1)で表されるプロテアーゼインヒビターに含まれるピリジンカルボニトリル系化合物は、SPECS社(オランダ)等から市販品を購入することができる。また、下記の合成法にて製造することができるが、特に限定されるものではない。

[0045] 反応式1:Aに水酸基の置換基がない例

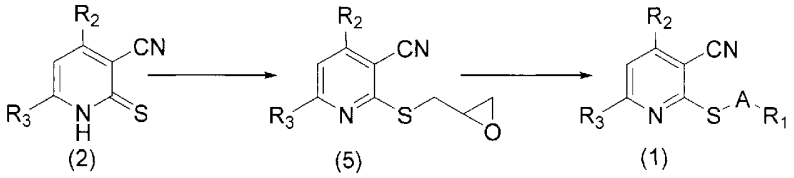
[化10]



・・・式(4)

[0046] 反応式2:Aに水酸基がある例

[化11]



・・・式(5)

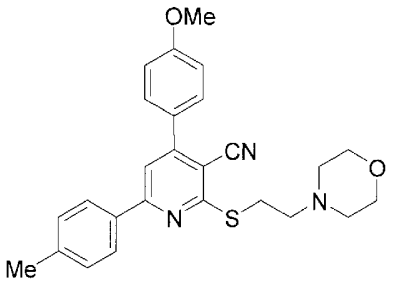
[0047] 式中のA、R_1、R_2、R_3は上記に同じであり、Xはハロゲン基を示す。化合物(2)はG. E. H. Elgemeie, Heterocycles, 31, 123－127(1990)を参考にして製造することができる。化合物(2)から化合物(3)あるいは化合物(5)の合成はJ. L. Soto et al., Organic Preparation and Procedures Int., 16, 11－24(1984)を参考にして製造することができる。化合物(3)から化合物(4)の合成は公知のアルコール性水酸基のハロゲン化反応あるいはカルボン酸ハライドの合成反応を利用して製造することができる。化合物(4)から化合物(1)の合成は公知のアミン誘導体のアルキル化反応あるいはカルボン酸アミドの合成反応を利用して製造することができる。化合物(5)から化合物(1)の合成は公知のオキシラン誘導体のアミンによる開環反応を利用して製造することができる。

[0048] 本発明においては、前記式(1)で表される硫黄原子を含むピリジンカルボニトリル

系化合物の具体例としては、例えば、下記式(2)4－(4－メトキシフェニル)－6－(4－メチルフェニル)－2－[[2－(4－モルホリニル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(3)4－(4－メトキシフェニル)－6－フェニル－2－[[2－(1－ピペリジル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(8)4－(4－クロロフェニル)－6－フェニル－2－[[2－(1－ピペリジル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(14)4－(2－メトキシフェニル)－6－(4－メチルフェニル)－2－[[2－(1－ピペリジル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(23)6－(4－メチルフェニル)－4－フェニル－2－[[2－(4－モルホリニル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(102)4－(4－メトキシフェニル)－6－(4－メチルフェニル)－2－[(4－モルホリニル)カルボニルメチルチオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(6)4－(4－メチルフェニル)－6－フェニル－2－[[3－(4－モルホリニル)－2－ヒドロキシプロピル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル　シュウ酸塩、式(7)4，6－ジフェニル－2－[[2－(1－ピペリジル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(9)4－(4－メトキシフェニル)－6－(3，4－ジメチルフェニル)－2－[(4－モルホリニル)カルボニルメチルチオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(10)4－(4－メトキシフェニル)－6－フェニル－2－[(4－モルホリニル)カルボニルメチルチオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(11)4，6－ジフェニル－2－[(4－モルホリニル)カルボニルメチルチオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(12)6－フェニル－2－[[2－(4－モルホリニル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(13)4－(3，4－ジメトキシフェニル)－6－(4－メチルフェニル)－2－[[2－(1－ピペリジル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(15)6－(4－メチルフェニル)－4－フェニル－2－[[2－(1－ピペリジル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(16)4－(2－メトキシフェニル)－6－フェニル－2－[[2－(パーヒドロ－1－アゼピニル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(17)4－(4－フルオロフェニル)－6－フェニル－2－[[2－(1－ピペリジル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(18)6－(4－メチルフェニル)－4－フェニル－2－[(4－モルホリニル)カルボニルメチルチオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(19)4－(3，4－ジメトキシフェニル)－6－(4－メチルフェニル)－2－[(4－モルホリニル)カルボニルメチルチオ]－3－ピリジンカルボニトリル

、式(20)4－(2－メトキシフェニル)－6－(4－メチルフェニル)－2－[(4－モルホリニル)カルボニルメチルチオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(21)6－(4－エトキシフェニル)－4－フェニル－2－[[2－(1－ピペリジル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(22)4－(4－ベンジルオキシ－3－メトキシフェニル)－6－フェニル－2－[[2－(1－ピペリジル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリル、式(101)4－(4－メトキシフェニル)－6－フェニル－2－[[2－(4－モルホリニル)エチル]チオ]－3－ピリジンカルボニトリルの化合物を挙げることができる。これらの中では、式(2)、式(3)、式(8)、式(14)、式(17)、式(23)、式(102)の化合物が好ましくは用いられ、さらに式(2)の化合物が最も好ましく用いられる。

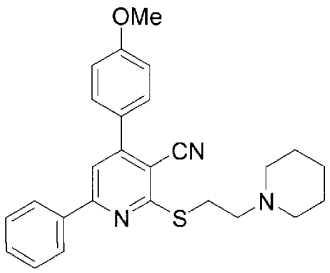
[0049] [化12]



・・・式(2)

[0050] 式(2)で表される化合物は、例えば、ピリジン環に置換基を導入することにより得ることができる。また、市販品をそのまま利用することも可能である。市販品としては、例えば、SPECS社(オランダ)のAG－690／40750097、TimTec社(米国)のOVS 2314344、Interchim社(フランス)、Ambinter社(フランス)、AsInEx社(ロシア)からのBAS1816428などを挙げることができる。

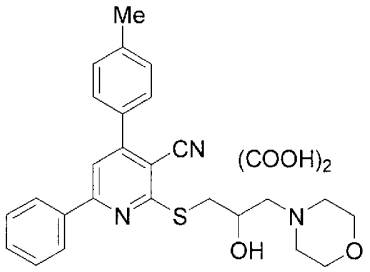
[0051] [化13]



・・・式(3)

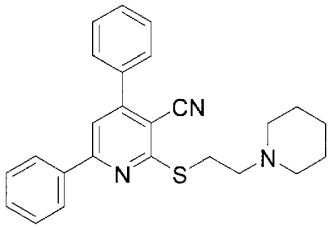
[0052] 式(3)で表される化合物は、例えば、ピリジン環に置換基を導入することにより得ることができる。また、市販品をそのまま利用することも可能である。市販品としては、例えば、SPECS社(オランダ)のAK－777／36840021、AKos Consulting and Solutions社(ドイツ)のOWHUSSH－3071988、Ambinter社(フランス)のA1168などを挙げることができる。

[0053] [化14]



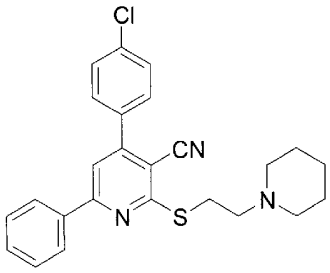
・・・式(6)

[0054] [化15]



・・・式(7)

[0055] [化16]

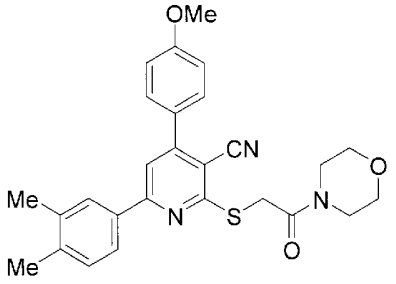


・・・式(8)

式(8)で表される化合物は、例えば、ピリジン環に置換基を導入することにより得ることができる。また、市販品をそのまま利用することも可能である。市販品としては、例えば、AKos Consulting and Solutions社(ドイツ)AKR 7131480、Ambinter社(フランス)PHAR 041282、AsInEx社(ロシア)BAS 1883847、Interbios

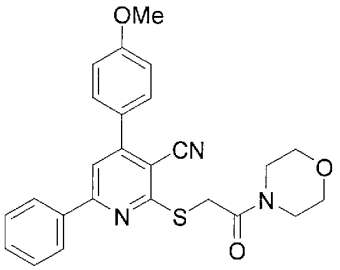
creen社(ロシア)STOCK2S－83093、Interchim社(フランス)BAS 01883847、PHARMEKS社(ロシア)PHAR 041282、SPECS社(オランダ)AK－777／10805024、TimTec社(米国)ST 5031751などを挙げることができる。

[0056] [化17]



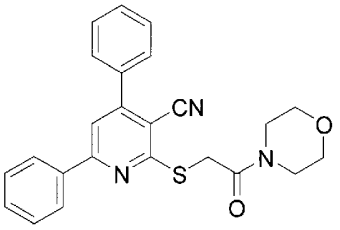
・・・式(9)

[0057] [化18]



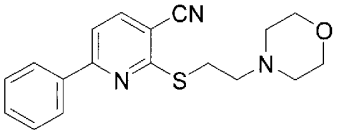
・・・式(10)

[0058] [化19]



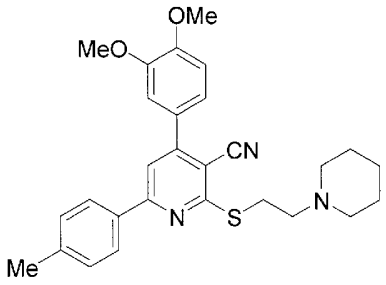
・・・式(11)

[0059] [化20]



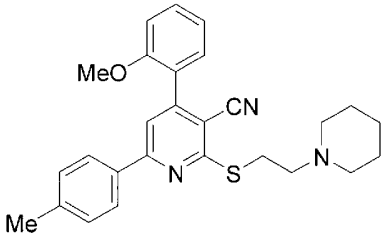
・・・式(12)

[0060] [化21]



・・・式(13)

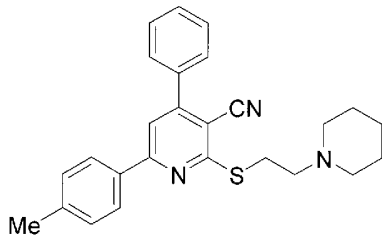
[0061] [化22]



・・・式(14)

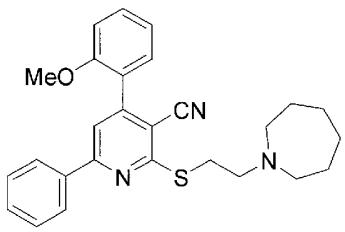
式(14)で表される化合物は、例えば、ピリジン環に置換基を導入することにより得ることができる。また、市販品をそのまま利用することも可能である。市販品としては、例えば、Interchim社(フランス)BAS 01816413、AsInEx社(ロシア)BAS 181 6413、SPECS社(オランダ)AG－690／40750093、TimTec社(米国)OVS 2 310379などを挙げることができる。

[0062] [化23]



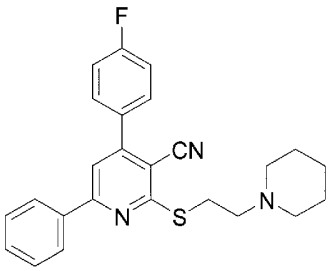
・・・式(15)

[0063] [化24]



・・・式(16)

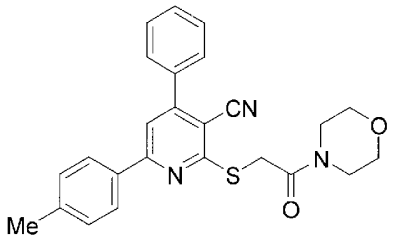
[0064] [化25]



・・・式(17)

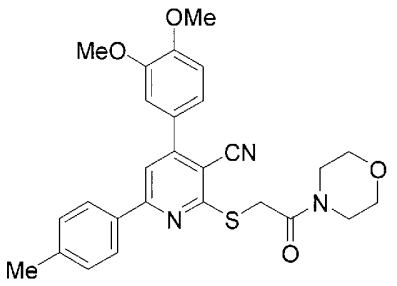
式(17)で表される化合物は、例えば、ピリジン環に置換基を導入することにより得ることができる。また、市販品をそのまま利用することも可能である。市販品としては、例えば、Ambinter社(フランス)PHAR 003307、Chemical Block社(ロシア)A1168／0054379、Interbioscreen社(ロシア)STOCK1S－20782、Interchim社(フランス)STOCK1S－20782、PHARMEKS社(ロシア)PHAR 003307、Zelinsky Institute社(米国)A1168／0054379などを挙げることができる。

[0065] [化26]



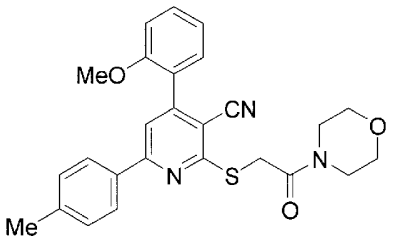
・・・式(18)

[0066] [化27]



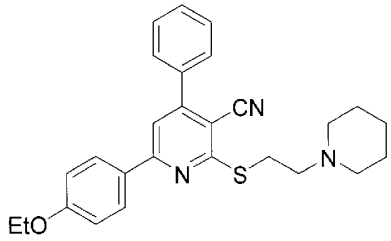
・・・式(19)

[0067] [化28]



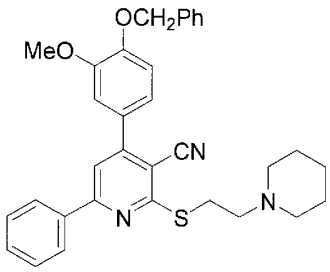
・・・式(20)

[0068] [化29]



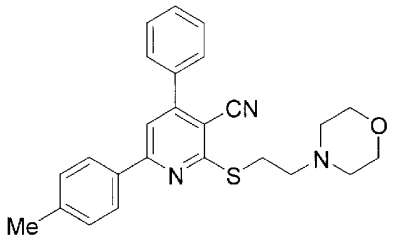
・・・式(21)

[0069] [化30]



・・・式(22)

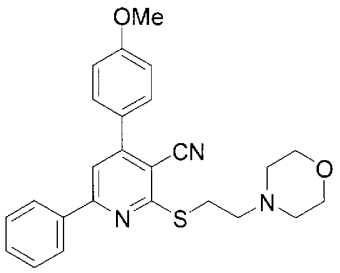
[0070] [化31]



・・・式(23)

式(23)で表される化合物は、例えば、ピリジン環に置換基を導入することにより得ることができる。また、市販品をそのまま利用することも可能である。市販品としては、例えば、AsInEx社(ロシア)BAS 1816427、Interchim社(フランス)BAS 0181 6427、TimTec社(米国)OVS 2251452などを挙げることができる。

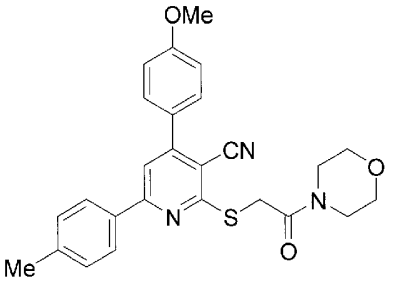
[0071] [化32]



・・・式(101)

[0072] 式(101)で、表される化合物は、例えば、ピリジン環に置換基を導入することにより得ることができる。また、市販品をそのまま利用することも可能である。市販品としては、例えば、AsInEx社(ロシア)BAS 1842546などを挙げることができる。

[0073] [化33]



・・・式(102)

[0074] 式(102)で、表される化合物は、例えば、ピリジン環に置換基を導入することにより得ることができる。また、市販品をそのまま利用することも可能である。市販品としては、例えば、AsInEx社(ロシア)ASN 1403434、Interchim社(フランス)ASN 01403434、TimTec社(米国)OVS 2339368、SPECS社(オランダ)AG－690／40749483などを挙げることができる。

[0075] ウイルスによる感染症は、DNAウイルスやRNAウイルスなどのウイルスが、宿主に感染することによって生じる。

[0076] DNAウイルスの例としては、二本鎖DNAウイルスと一本鎖DNAウイルスがある。二本鎖DNAウイルスの例としては、例えば、ポックスウイルス科、イリドウイルス科、バキュロウイルス科、ヘルペスウイルス科、アデノウイルス科、パポーバウイルス科、ポリドナウイルス科、ヘパドナウイルス科に属するウイルスなどがある。一本鎖DNAウイル

スの例としては、シルコウイルス科、パルボウイルス科に属するウイルスなどがある。

[0077] RNAウイルスの例としては、二本鎖RNAウイルス、一本鎖(+)RNAウイルス、一本鎖(−)RNAウイルスなどがある。二本鎖RNAウイルスの例としては、レオウイルス科、ビルナウイルス科に属するウイルスがある。また、一本鎖(+)RNAウイルスの例としては、ヒトコロナウイルス、ブタコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群(SARS)ウイルスなどのコロナウイルス科、ピコルナウイルス科、カリシウイルス科、アストロウイルス科、ノダウイルス科、テトラウイルス科、フラビウイルス科、トガウイルス科、レトロウイルス科に属するウイルスなどがある。一本鎖(−)RNAウイルスの例としては、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科に属するウイルスなどがある。

[0078] なお、コロナウイルス科に属するウイルス由来のプロテアーゼは、非常に類似していることが知られている(Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti−SARS drugs. Science. 2003 Jun 13; 300(5626):1763−7)。

[0079] これらのDNAウイルスやRNAウイルスなどによるウイルス感染は、正常宿主細胞膜にある受容体タンパクにウイルスが結合するところから始まる。例えば、RNAウイルスは、受容体を介して細胞内に入り、細胞質内でRNAウイルス由来のRNAから一本鎖のタンパク質への翻訳を行う。

[0080] この一本鎖のタンパク質は、プロテアーゼとして機能する部位を有する。細胞質内において、この一本鎖のタンパク質が複数翻訳されると、これらの複数の一本鎖のタンパク質は、一方の一本鎖のタンパク質のプロテアーゼとして機能する部位によって、他方の一本鎖のタンパク質を切断する。このように翻訳された一本鎖のタンパク質が切断されることによって、例えば、プロテアーゼやキャプシドなどのウイルス増殖に必要なタンパク質が作られる。

[0081] このため、ウイルスの増殖において、プロテアーゼによるタンパク質の分解は重要である。プロテアーゼインヒビターによって、プロテアーゼによるタンパク質の分解を阻害することによりウイルスの増殖を抑えることが可能である。なお、プロテアーゼは、ウ

イルス由来のプロテアーゼ以外に、宿主細胞由来のプロテアーゼの場合がある。

[0082] なお、ウイルスごとにプロテアーゼのタイプ(例えば、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼなど)が決まっているが、例えば、HIVのプロテアーゼ(アスパラギン酸プロテアーゼ)に対するプロテアーゼインヒビターであるネルフィナビルがシステインプロテアーゼを阻害するなど、あるタイプのプロテアーゼに対するプロテアーゼインヒビターが、別のタイプのプロテアーゼに対するプロテアーゼインヒビターとして機能し得ることが知られている。

[0083] 本発明に係る式(1)の化合物は、プロテアーゼの活性中心に結合するプロテアーゼインヒビターとして機能し、化合物の反応部位と、プロテアーゼ側の活性中心とが結合して、安定的な複合体を形成する。このため、これらの化合物は、プロテアーゼの活性部位と結合することにより、このプロテアーゼの基質となるタンパク質と結合することを阻害することができる。また、シアノ基がSH基と反応し得るため、本発明に係る式(1)の化合物によって阻害されるプロテアーゼは、活性部位にSH基を有するプロテアーゼが好ましい。

[0084] また、本発明に係る式(1)の化合物によって阻害されるプロテアーゼは、宿主細胞由来のプロテアーゼやウイルス由来のプロテアーゼが好ましく、さらに、一本鎖(+)RNAウイルス由来のプロテアーゼがより好ましい。さらに、コロナウイルス科に属するウイルス由来のプロテアーゼがより好ましい。

[0085] 感染細胞内において、例えば、キャプシドなどのタンパク質が十分に生産され、RNAの複製が十分に行われると、ウイルスは、感染細胞を破壊し、細胞外に放出され、新たな正常宿主細胞膜にある受容体タンパクに結合し得る。このため、ウイルス増殖に必要なタンパク質が産出されるためには、ウイルス感染から5～6時間かかる。本発明に係る式(1)の化合物は、ウイルス感染後に投与されると、細胞内において、ウイルス増殖に必要なプロテアーゼによるタンパク質分解反応を阻害し、ウイルスの増殖を抑えることが可能である。このため、このプロテアーゼインヒビターは抗ウイルス剤の有効成分として、ウイルス感染症の治療及び予防に使用することができる。

[0086] 本発明のプロテアーゼインヒビターを抗ウイルス剤として用いる場合、任意の剤型にすることができる。又、投与も各経路で行なわれる。経口投与の場合には、それに適

用される錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などは、それらの組成物中に製剤上一般に使用される結合剤、包含剤、賦形剤、潤滑剤、崩壊剤、湿潤剤のような添加物を含有していてもよく、又経口用液体製剤として用いる場合は、内用水剤、振盪合剤、懸濁液剤、乳剤、シロップ剤の形態であってもよく、又使用する前に再溶解させる乾燥生成物の形態であってもよい。さらに、このような液体製剤は普通用いられる添加剤、保存剤のいずれを含有してもよい。注射用の場合には、その組成物は安定剤、緩衝剤、保存剤、等張化剤などの添加剤を含んでいてもよく、単位投与量アンプル、又は多投与量容器中で提供される。なお、上記組成物は水溶液、懸濁液、溶液、乳液などのような形態であってもよく、一方活性成分は使用する前に適当な滅菌した水などで再溶解させる粉末であってもよい。

[0087] 本発明の抗ウイルス剤は人間及び動物に経口的または非経口的に投与される。経口的投与は舌下投与を包含する。非経口的投与は注射例えば皮下、筋肉、静脈注射、点滴などを含む。本発明の抗ウイルス剤の投与量は動物か人間により、また年齢、個人差、病状などに影響されるので、場合によっては下記範囲外の量を投与する場合も生ずるが、一般に人間を対象とする場合、本物質の経口投与量は体重1Kg、1日当り0．1～1000mg、好ましくは1～100mgを1回から3回に分けて投与する。

実施例

[0088] 以下、本発明を実施例、試験例に基づいて説明するが、本発明は、これらの例に限定されるものではない。

[0089] 実施例1 SARSウイルスプロテアーゼ阻害効果比較実験

大腸菌から抽出したS30画分を用いた無細胞タンパク質合成系によりSARSウイルスプロテアーゼを作製した。基質として、SARSウイルスプロテアーゼ活性による切断の結果、蛍光を発する消光性蛍光色素標識ペプチドを合成して使用した。酵素反応は、最終濃度が400nMとなるプロテアーゼ酵素タンパク質に最終濃度が0．1mM、0．3mMあるいは1mMとなるように化合物を混和し、30℃で15分間反応させた後、最終濃度が30μMとなるように基質を加えて、30℃で1時間反応させた。基質切断によって生じた蛍光の強度を測定した。

[0090] 図1は、式(2)の化合物(図1中のR046)、式(8)の化合物(図1中のR148)、式(1

4)の化合物(図1中のR154)、式(16)の化合物(図1中のR156)、式(17)の化合物(図1中のR158)、式(23)の化合物(図1中のR164)、式(101)の化合物(図1中のR325)とSARS－CoVメインプロテアーゼとの反応の結果を示している。コントロールであるDMSOを添加したプロテアーゼ活性を100%とする。式(2)の化合物は基質の10倍濃度の0．3mMで、プロテアーゼの活性を50%阻害した。また、式(8)の化合物は、基質の10倍濃度の0．3mMで、プロテアーゼの活性を86%阻害した。また、式(14)の化合物は、基質の33倍濃度の1mMで、プロテアーゼの活性を98%阻害した。また、式(16)の化合物は、基質の33倍濃度の1mMで、プロテアーゼの活性を87%阻害した。また、式(17)の化合物は、基質の10倍濃度の0．3mMで、プロテアーゼの活性を79%阻害した。また、式(23)の化合物は、基質の10倍濃度の0．3mMで、プロテアーゼの活性を84%阻害した。式(101)の化合物は、基質の10倍濃度の0．3mMで、プロテアーゼの活性を63%阻害した。

[0091] これらの実験結果より、式(2)の化合物、式(8)の化合物、式(14)の化合物、式(16)の化合物、式(17)の化合物、式(23)の化合物、式(101)の化合物がSARS－CoVメインプロテアーゼと結合することによって、プロテアーゼインヒビターとして機能することが分かった。

[0092] 実施例2 SARSウイルス増殖阻害効果比較実験

Vero E6細胞にSARS－CoVをMOI 0．01で感染させ、24時間後に培養上清を回収し、ISOGEN(Nippongene)試薬でウイルスRNAを回収した。次にこのRNAを1step RT－PCR kit (ABI)とABI7700 sequence detector systemを用いて定量した。そのときに用いたプライマー・プローブの配列はORF1－F(配列番号1)、ORF1－R(配列番号2)、ORF1－probe(配列番号3)である。

[0093] 図2は、様々な濃度の式(2)の化合物(図中のR00046)を投与したSARSウイルス増殖阻害効果の比較結果を示している。コントロール(Control)を添加したPCRのウイルスRNA量を100%とする。0．01μMの式(2)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して88．6%阻害している。0．1μMの式(2)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して95．0%阻害している。1μMの式(2)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99．6%阻害している。10μMの式(2)の化合

物は、RNAの増加をコントロールと比較して99．9%阻害している。

[0094] これらの実験結果より、式(2)の化合物がSARSウイルスのRNAの増加を阻害することが分かった。

[0095] 実施例3 SARSウイルス感染後に起こる細胞変性(CPE)実験

Vero E6細胞にSARS－CoVをMOI 0．01で感染させ、60時間後に3－(4，5－dimethylthiazol－2－yl)－2，5－diphenyltetrazolium bromideを加えた。3時間37℃でインキュベーションしたあと、Triton／HCl－isopropyl alcoholで細胞を溶解し生成したFormazanの濃度を測定した。

[0096] 表1は、様々な濃度の式(2)の化合物(表中のR46)を投与したSARSウイルス感染後に起こる細胞変性(CPE)実験の結果を示している。EC50は、50%CPE抑制濃度を表している。CC50は、50%細胞障害濃度を表している。

[表1]

	EC50(micro M)	CC50(micro M)	selectivity index
R46	0.043	>40.00	>930.23

[0097] 図3は、様々な濃度の式(2)の化合物(図中のR46)を投与したSARSウイルス感染後に起こる細胞変性(cytopathic effect CPE)実験による細胞の写真を示している。式(2)の化合物を非投与(0μM)の場合、CPEが生じている。また、式(2)の化合物を0．1μM以上の濃度で投与した場合、CPEが非常に抑制されている。

[0098] これらの実験結果より、式(2)の化合物がSARSウイルスの増加を阻害することが分かった。

[0099] 実施例4 MTT分析実験

式(2)の化合物(図4中の46)、式(3)の化合物(図4中の157)、式(6)の化合物(図4中の146)、式(7)の化合物(図4中の147)、式(8)の化合物(図4中の148)、式(9)の化合物(図4中の149)、式(10)の化合物(図4中の150)、式(11)の化合物(図4中の151)、式(12)の化合物(図4中の152)、式(13)の化合物(図4中の153)、式(14)の化合物(図4中の154)、式(15)の化合物(図4中の155)、式(16)の化合物(図4中の156)、式(17)の化合物(図4中の158)、式(18)の化合物(図4中の159)、式(19)の化合物(図4中の160)、式(20)の化合物(図4中の161)、式(21)の化合物(図4中の162)、式(22)の化合物(図4中の163)、式(23)の化合物(図4

中の164)に対して、MTT分析を行った。MTT分析は、市販の試薬を用いて、それぞれ5μMの濃度の化合物に対して行った。

[0100] 図4は、式(2)の化合物、式(3)の化合物、式(6)の化合物、式(7)の化合物、式(8)の化合物、式(9)の化合物、式(10)の化合物、式(11)の化合物、式(12)の化合物、式(13)の化合物、式(14)の化合物、式(15)の化合物、式(16)の化合物、式(17)の化合物、式(18)の化合物、式(19)の化合物、式(20)の化合物、式(21)の化合物、式(22)の化合物、式(23)の化合物に対するMTT分析の結果を示している。

[0101] これらの実験結果より、式(2)、式(3)、式(6)、式(7)、式(8)、式(9)、式(10)、式(11)、式(12)、式(13)、式(14)、式(15)、式(16)、式(17)、式(18)、式(19)、式(20)、式(21)、式(22)、及び式(23)の化合物がウイルスによるCPEを抑制し、かつ細胞の活性を阻害しないことが分かった。

[0102] 実施例5 SARSウイルス増殖阻害効果比較実験

MTT分析の結果、特に高い抑制活性を示した、式(2)の化合物(図4中の46)、式(3)の化合物(図4中の157)、式(8)の化合物(図4中の148)、式(9)の化合物(図4中の149)、式(13)の化合物(図4中の153)、式(14)の化合物(図4中の154)、式(15)の化合物(図4中の155)、式(16)の化合物(図4中の156)、式(17)の化合物(図4中の158)、式(19)の化合物(図4中の160)、式(21)の化合物(図4中の162)、式(22)の化合物(図4中の163)に対して、以下のようにSARSウイルス増殖阻害効果比較実験を行った。

[0103] Vero E6細胞にSARS－CoVをMOI 0.01で感染させ、24時間後に培養上清を回収し、ISOGEN(Nippongene)試薬でウイルスRNAを回収した。次にこのRNAを1 step RT－PCR kit (ABI)とABI7700 sequence detector systemを用いて定量した。そのときに用いたプライマー・プローブの配列はORF1－F(配列番号1)、ORF1－R(配列番号2)、ORF1－probe(配列番号3)である。

[0104] 図5は、式(2)の化合物(図5中のR46)、式(3)の化合物(図5中のR157)、式(8)の化合物(図5中のR148)、式(9)の化合物(図5中のR149)、式(13)の化合物(図5中のR153)、式(14)の化合物(図5中のR154)、式(15)の化合物(図5中のR15

5)、式(16)の化合物(図5中のR156)、式(17)の化合物(図5中のR158)、式(19)の化合物(図5中のR160)、式(21)の化合物(図5中のR162)、式(22)の化合物(図5中のR163)を投与したSARSウイルス増殖阻害効果の比較結果を示している。コントロール(Control)を添加したPCRのウイルスRNA量を100%とする。5μMの式(2)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.9%阻害している。5μMの式(3)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.9%阻害している。5μMの式(8)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.9%阻害している。5μMの式(9)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.9%阻害している。5μMの式(13)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.6%阻害している。5μMの式(14)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.9%阻害している。5μMの式(15)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.9%阻害している。5μMの式(16)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.2%阻害している。5μMの式(17)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.9%阻害している。5μMの式(19)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して93.6%阻害している。5μMの式(21)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して99.9%阻害している。5μMの式(22)の化合物は、RNAの増加をコントロールと比較して90.3%阻害している。

[0105] これらの実験結果より、式(2)、式(3)、式(8)、式(9)、式(13)、式(14)、式(15)、式(16)、式(17)、式(19)、式(21)、及び式(22)の化合物がSARSウイルスのRNAの増加を阻害することが分かった。

[0106] 実施例6 SARSウイルス感染後に起こる細胞変性(CPE)の化合物による阻害効果および細胞毒性効果のMTT分析による比較実験

式(2)の化合物(図6中のR046)、式(3)の化合物(図6中のR157)、式(8)の化合物(図6中のR148)、式(9)の化合物(図6中のR149)、式(13)の化合物(図6中のR153)、式(14)の化合物(図6中のR154)、式(15)の化合物(図6中のR155)、式(16)の化合物(図6中のR156)、式(17)の化合物(図6中のR158)、式(19)の化合物(図6中のR160)、式(22)の化合物(図6中のR163)、式(102)の化合物(図6中のR326)に対してMTT分析を行った。さまざまな濃度の上記化合物を投与し

たVero E6細胞にSARS－CoVをMOI 0．01で感染させるか、あるいは感染させずに60時間37℃で培養し、3－(4，5－dimethylthiazo1－2－yl)－2，5－diphenyltetrazolium bromideを加えた。3時間37℃でインキュベートした後、Triton／HCl－isopropyl alcoholで細胞を溶解し生成したFormazanの濃度を測定した。MTT分析結果から各化合物のSARSウイルス感染後に起こる細胞変性(CPE)の50％抑制濃度(EC50)および50％細胞障害濃度(CC50)を算出した。

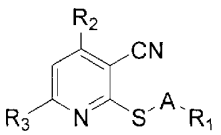
[0107] 図6は式(2)の化合物、式(3)の化合物、式(8)の化合物、式(9)の化合物、式(13)の化合物、式(14)の化合物、式(15)の化合物、式(16)の化合物、式(17)の化合物、式(19)の化合物、式(22)の化合物、式(102)の化合物の50％CPE抑制濃度(EC50)および50％細胞障害濃度(CC50)を示している。

[0108] これらの実験結果より、式(2)の化合物が細胞の活性を阻害しない580nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(3)の化合物が細胞の活性を阻害しない680nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(8)の化合物が細胞の活性を阻害しない280nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(9)の化合物が細胞の活性を阻害しない770nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(13)の化合物が細胞の活性を阻害しない70nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(14)の化合物が細胞の活性を阻害しない300nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(15)の化合物が細胞の活性を阻害しない170nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(16)の化合物が細胞の活性を阻害しない500nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(17)の化合物が細胞の活性を阻害しない210nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(19)の化合物が細胞の活性を阻害しない510nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(22)の化合物が細胞の活性を阻害しない470nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。また、式(102)の化合物が細胞の活性を阻害しない48nMでウイルスによるCPEを50％抑制することが分かった。

請求の範囲

[1] 下記一般式(1)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

[化1]



・・・式(1)

(式中、

Aは、

(a)置換基として低級アルキル基または水酸基を有していてもよいジメチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基のいずれか、あるいは

(b)－(CH_2)$_n$CO－(nは1から3の整数)で示される基、のいずれかを示し、

R_1は、

窒素原子を介してAと結合し、置換基としてアルキル基を有していてもよい含窒素飽和の4から8員環基のいずれかを示し、ここで、前記環を形成するメチレン基の少なくとも1個は、酸素原子、硫黄原子、窒素原子、または低級アルキル基を有する窒素原子で置換されていてもよく、

R_2およびR_3は、それぞれ独立して、

(c)水素原子、または

(d)フェニル基、または

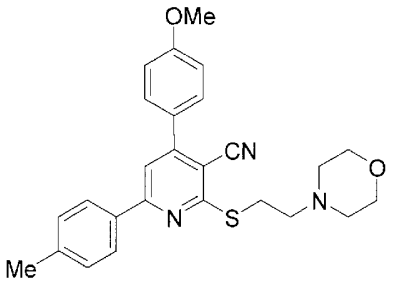
(e)ハロゲン基、ハロゲノメチル基、低級アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキレンジオキシ基、アラルキルオキシ基、あるいはこれらの複数個で置換されたフェニル基のいずれか、から選ばれる原子または基を示す。)

[2] 前記ピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩におけるR_1は、4－モルホリニル基または1－ピペリジル基である請求項1に記載のプロテアーゼインヒビター。

[3] 下記式(2)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され

得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

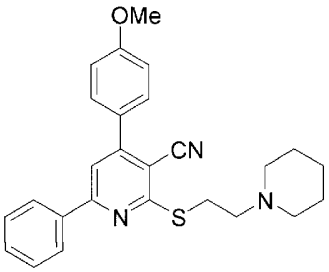
[化2]



・・・式(2)

[4] 下記式(3)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

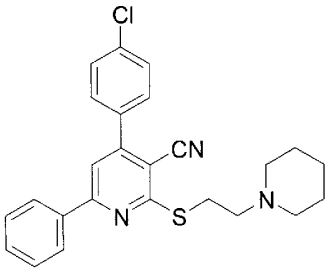
[化3]



・・・式(3)

[5] 下記式(8)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

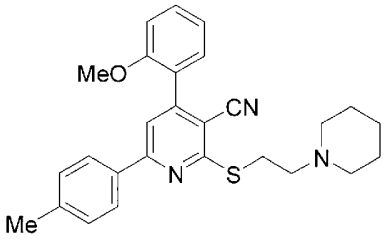
[化4]



・・・式(8)

[6] 下記式(14)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

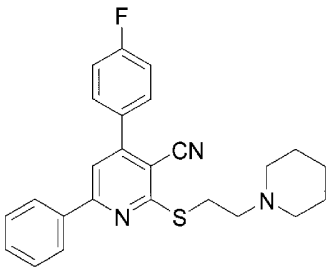
[化5]



・・・式(14)

[7] 下記式(17)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

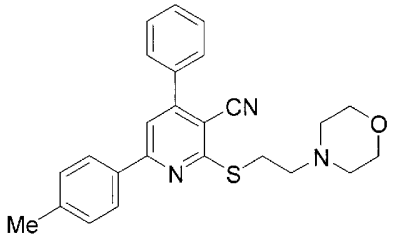
[化6]



・・・式(17)

[8] 下記式(23)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

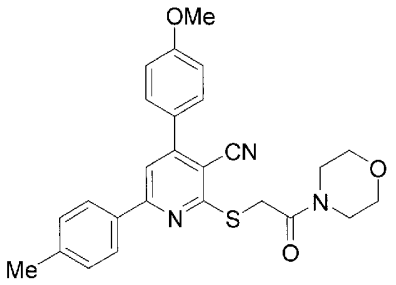
[化7]



・・・式(23)

[9] 下記式(102)で表されるピリジンカルボニトリル系化合物又はその薬学的に許容され得る塩であるプロテアーゼインヒビター。

[化8]



・・・式(102)

[10] 活性中心にSH基を有するプロテアーゼの活性を阻害する請求項1から9いずれかに記載のプロテアーゼインヒビター。

[11] ウイルス由来のプロテアーゼの活性を阻害する請求項1から10いずれかに記載のプロテアーゼインヒビター。

[12] 前記ウイルス由来のプロテアーゼが、RNAウイルス由来のプロテアーゼである請求項11に記載のプロテアーゼインヒビター。

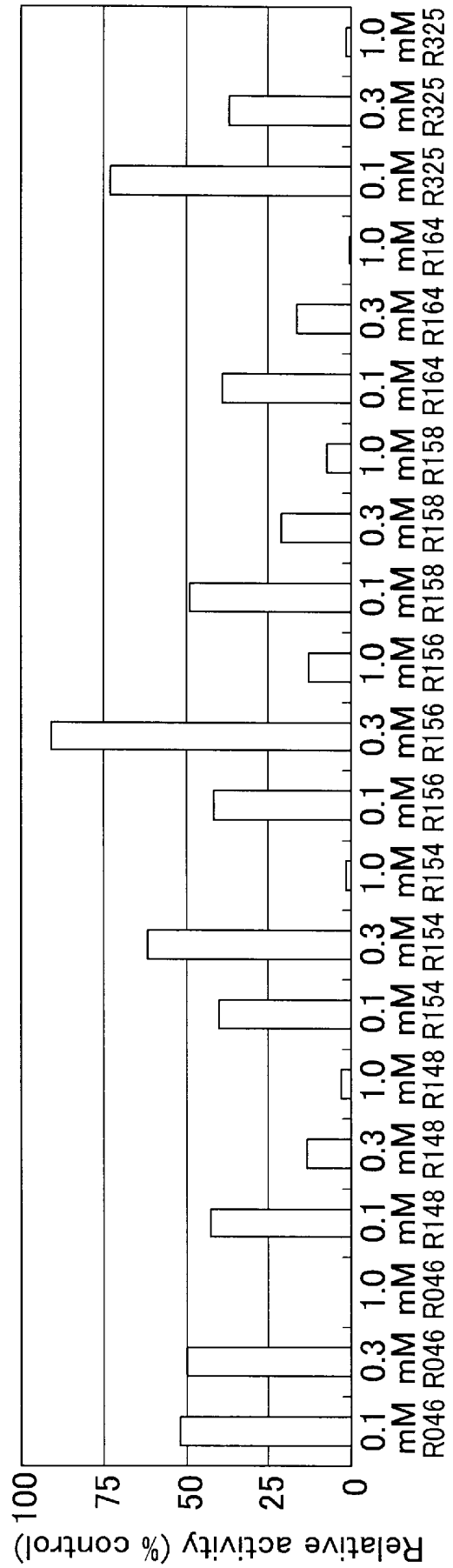
[13] 前記RNAウイルス由来のプロテアーゼが、一本鎖(+)RNAウイルス由来のプロテアーゼである請求項12に記載のプロテアーゼインヒビター。

[14] 前記一本鎖(+)RNAウイルス由来のプロテアーゼが、コロナウイルス科に属するウイルス由来のプロテアーゼである請求項13に記載のプロテアーゼインヒビター。

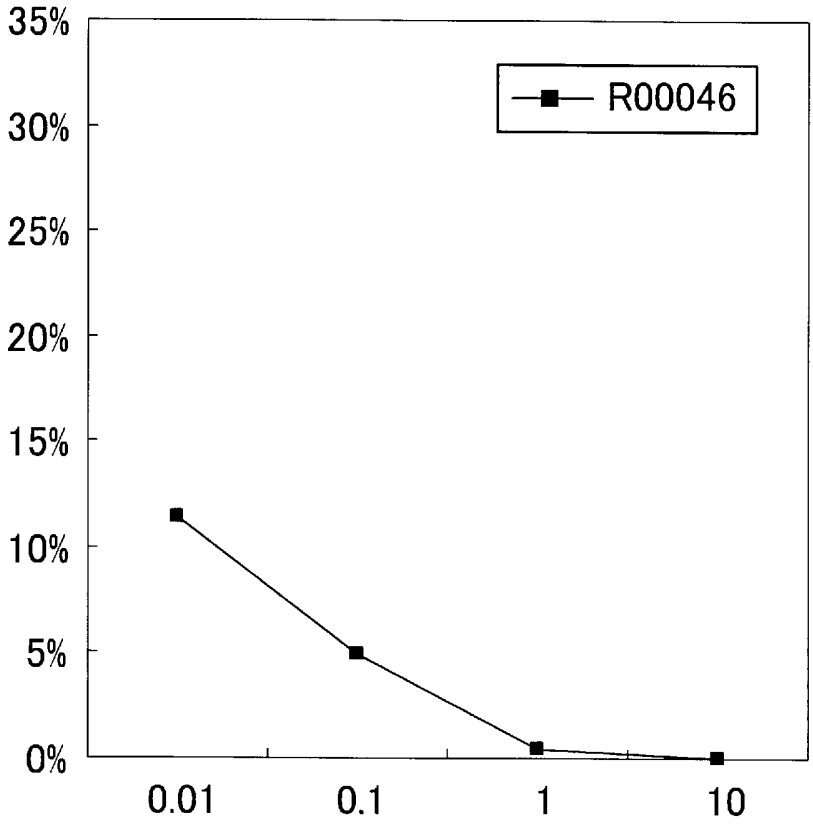
[15] 前記コロナウイルス科に属するウイルス由来のプロテアーゼが、ヒトコロナウイルス、ブタコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群(SARS)ウイルスのいずれかのウイルス由来のプロテアーゼである請求項14に記載のプロテアーゼインヒビター。

[16] 請求項1から15いずれかに記載のプロテアーゼインヒビターを有効成分として含む抗ウイルス剤。

[図1]

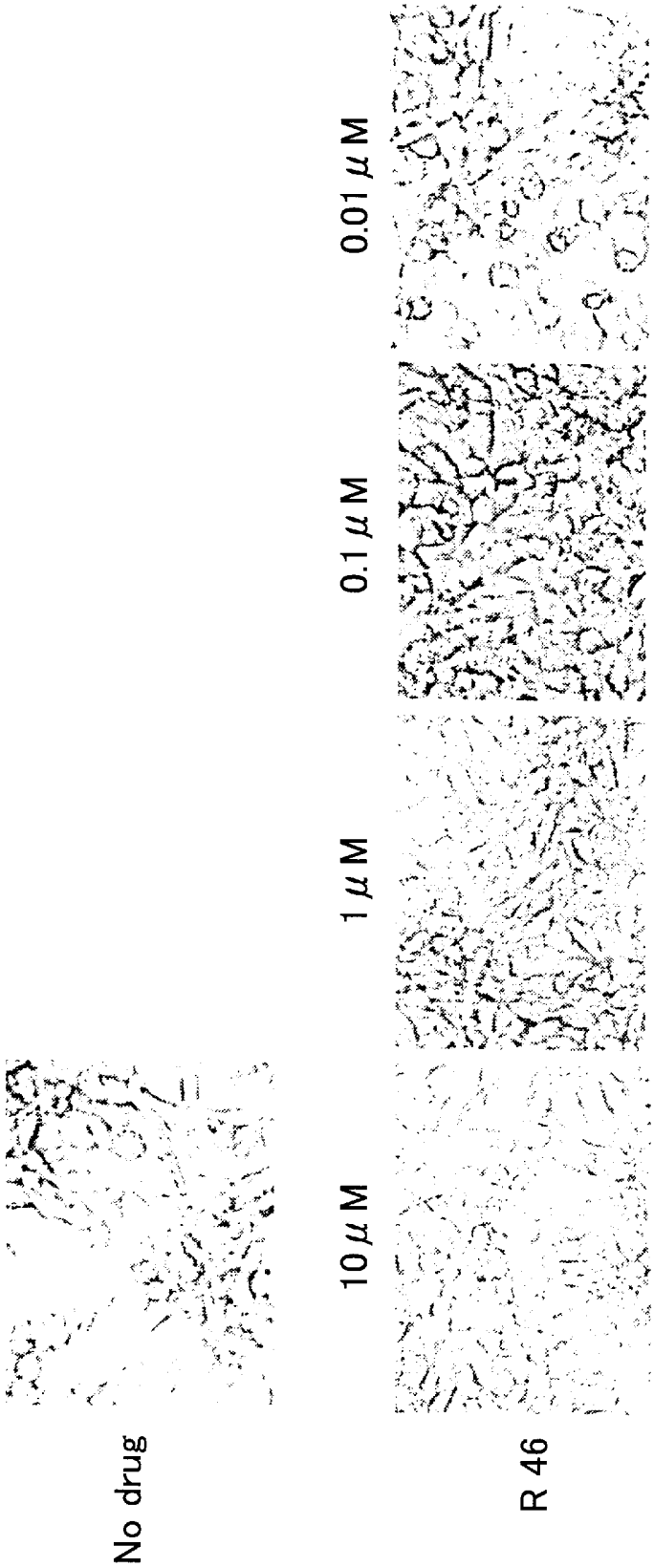

Relative activity (% control)
100
75
50
25
0
0.1 mM R046
0.3 mM R046
1.0 mM R046
0.1 mM R148
0.3 mM R148
1.0 mM R148
0.1 mM R154
0.3 mM R154
1.0 mM R154
0.1 mM R156
0.3 mM R156
1.0 mM R156
0.1 mM R158
0.3 mM R158
1.0 mM R158
0.1 mM R164
0.3 mM R164
1.0 mM R164
0.1 mM R325
0.3 mM R325
1.0 mM R325

[図2]

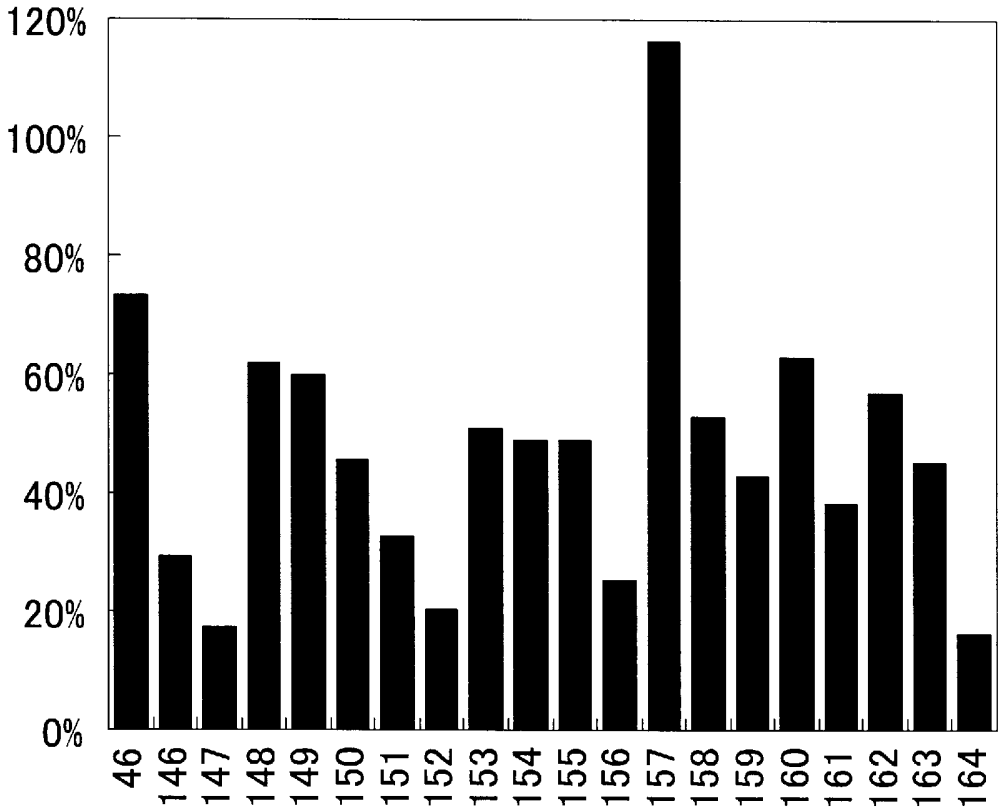


	0.01 μM	0.1 μM	1 μM	10 μM
R00046	11.399%	4.951%	0.389%	0.0008%

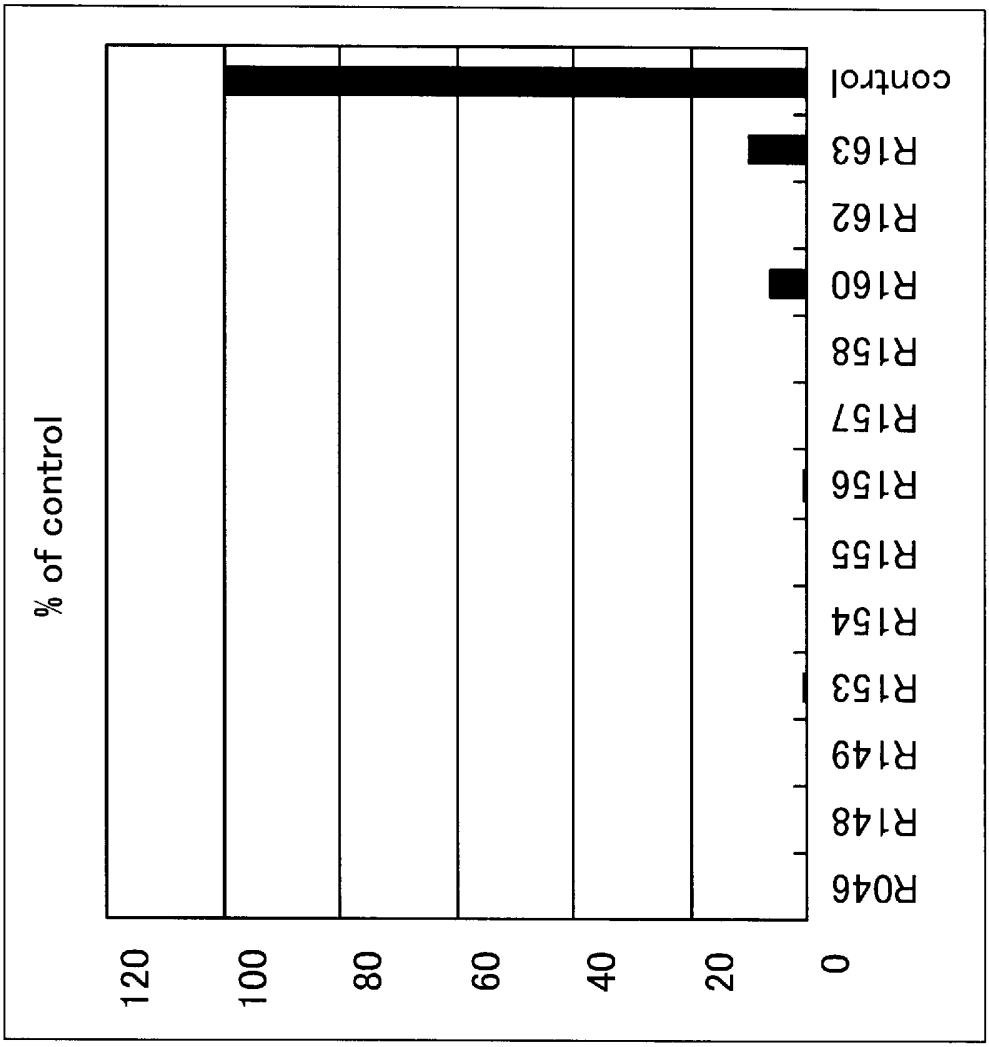
[図3]



[図4]

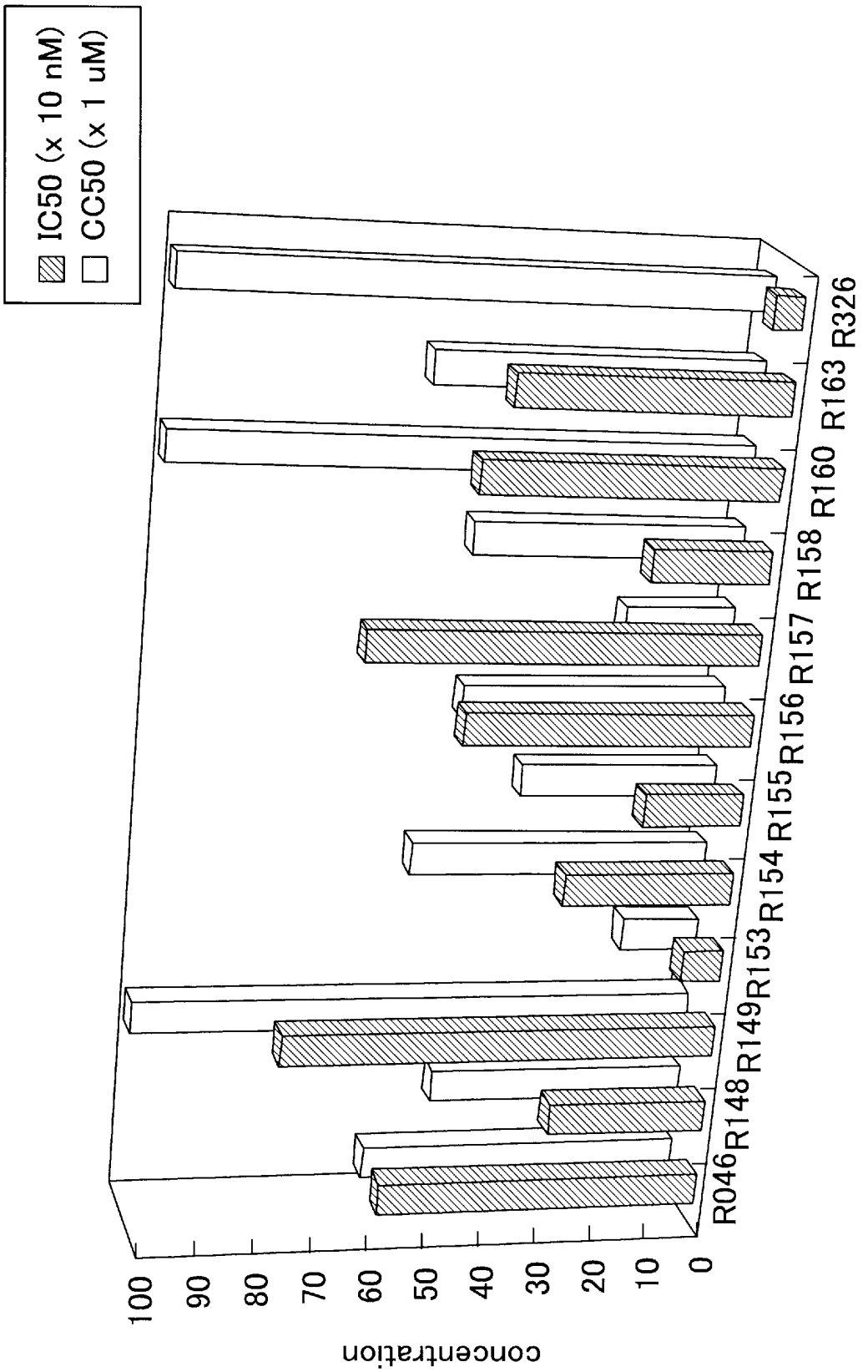

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
46
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164

[図5]



ID	% of control
R046	0.003
R148	0.004
R149	0.070
R153	0.345
R154	0.006
R155	0.003
R156	0.749
R157	0.003
R158	0.004
R160	6.337
R162	0.012
R163	9.672
control	100.000

[図6]


IC50 (x 10 nM)
CC50 (x 1 uM)
concentration
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
R046
R148
R149
R153
R154
R155
R156
R157
R158
R160
R163
R326

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/303905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K31/4545(2006.01), ***A61K31/5377***(2006.01), ***A61P11/00***(2006.01), ***A61P31/12***(2006.01), ***A61P43/00***(2006.01), *C07D213/85*(2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K31/4545, A61K31/5377, A61P11/00, A61P31/12, A61P43/00, C07D213/85

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus(STN), CAOLD(STN), REGISTRY(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), EMBASE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 40-6234 B (Deutsche Gold-und Silber-Scheideanstalt vormals Roessler), 27 March, 1965 (27.03.65), Full text; particularly, Claims; example 12 & BE 630125 A & GB 1041342 A & US 3370059 A & DE 1445649 A & FR 1451191 A & ZA 6301067 A & AU 6328656 A & CA 706396 A	1-16
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 332910-78-8	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 March, 2006 (27.03.06)	04 April, 2006 (04.04.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/303905

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 311333-16-1	1-16
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 332869-47-3	1-16
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 332910-70-0	1-16
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 311333-15-0	1-16
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 444153-64-4	1-16
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 337925-04-9	1-16
A	JP 49-62477 A (Cassella Farbwerke Mainkur AG.), 17 June, 1974 (17.06.74), Full text & US 3946024 A & US 3947463 A & US 3954782 A & US 3956294 A & US 3980659 A & US 4061642 A & DE 2230392 A & FR 2189402 A & FR 2330679 A & GB 1420987 A & NL 7308294 A & BE 801342 A & CH 610889 A	1-16
A	WO 03/011210 A2 (ASTRAZENECA AB), 13 February, 2003 (13.02.03), Full text & JP 2005-506307 A & EP 1572068 A2 & US 2005/0143379 A1 & AU 2002355706 A1	1-16

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３０３９０５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　***A61K31/4545*** (2006.01), ***A61K31/5377*** (2006.01), ***A61P11/00*** (2006.01), ***A61P31/12*** (2006.01), ***A61P43/00*** (2006.01), *C07D213/85* (2006.01)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K 31/4545, A61K 31/5377, A61P 11/00, A61P 31/12, A61P 43/00, C07D 213/85

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus(STN), CAOLD(STN), REGISTRY(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), EMBASE(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ａ	JP 40-6234 B（ドイツチエ、ゴールド、ウント、ジルベル、シヤイデアンスタルト、フオールマールス、ロエツスレル）1965.03.27, 全文、特に、特許請求の範囲、実施例12 & BE 630125 A & GB 1041342 A & US 3370059 A& DE 1445649 A & FR 1451191 A & ZA 6301067 A & AU 6328656 A & CA 706396 A	１－１６
Ａ	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 332910-78-8	１－１６

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ２７．０３．２００６	国際調査報告の発送日 ０４．０４．２００６
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｐ　２９３９ 新　留　素　子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 311333-16-1	１－１６
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 332869-47-3	１－１６
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 332910-70-0	１－１６
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 311333-15-0	１－１６
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 444153-64-4	１－１６
A	DATABASE REGISTRY [online]; Chemical Abstracts Service, Retrieved from: STN International, Columbus, Ohio, USA. Registry Number 337925-04-9	１－１６
A	JP 49-62477 A (カセラ・フアルブウエルケ・マインクア・アクチエンゲゼルシヤフト) 1974.06.17, 全文 & US 3946024 A & US 3947463 A & US 3954782 A & US 3956294 A & US 3980659 A & US 4061642 A & DE 2230392 A & FR 2189402 A & FR 2330679 A & GB 1420987 A & NL 7308294 A & BE 801342 A & CH 610889 A	１－１６
A	WO 03/011210 A2 (ASTRAZENECA AB) 2003.02.13, 全文 & JP 2005-506307 A & EP 1572068 A2 & US 2005/0143379 A1 & AU 2002355706 A1	１－１６