

(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
2013年10月17日(17.10.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/153821 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/11 (2006.01) A61P 1/14 (2006.01)
A61K 8/35 (2006.01) A61P 3/02 (2006.01)
A61K 8/40 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/002500
- (22) 国際出願日: 2013年4月12日(12.04.2013)
- (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:
61/623,501 2012年4月12日(12.04.2012) US
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 大村 智(OMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 中野 洋文(NA-

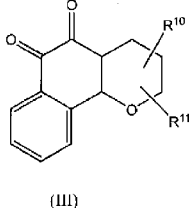
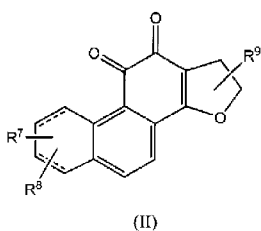
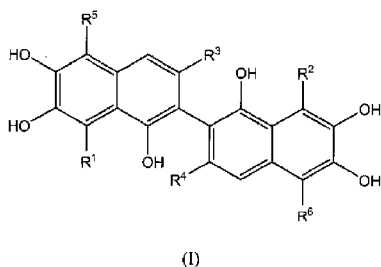
KANO, Hirofumi) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 山地 賢三郎(YAMAJI, Kenzaburo) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 山本 剛(YAMAMOTO, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 木戸 博(KIDO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18-15 徳島大学疾患酵素学研究中心内 Tokushima (JP). 千田 淳司(CHIDA, Junji) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18-15 徳島大学疾患酵素学研究中心内 Tokushima (JP). 山根一彦(YAMANE, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18-15 徳島大学疾患酵素学研究中心内 Tokushima (JP).

(74) 代理人: 長谷川 洋, 外(HASEGAWA, Hiroshi et al.); 〒2310002 神奈川県横浜市中区海岸通三丁目9番地 横浜郵船ビル2階長谷川国際特許事務所内 Kanagawa (JP).

[続葉有]

(54) Title: PDK4 INHIBITOR AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: PDK4阻害剤及びその利用



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a therapeutic agent or preventive agent for exacerbation of influenza, specifically to provide a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) inhibitor. The present invention relates to a PDK4 inhibitor, medical composition or cosmetic composition containing as the active ingredient a compound represented by any one of the following general formulas (I) through (III) and a pharmacologically acceptable ester derivative thereof, or a pharmacologically acceptable salt of the same.

(57) 要約: 本発明は、インフルエンザ重症化の治療薬又は予防薬を提供することを目的とし、具体的には新規ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ4 (PDK4) 阻害剤を提供することを目的とする。本発明は、下記一般式 (I) ~ (III) のいずれか一つで表わされる化合物はその薬理的に許容されるエステル誘導体あるいはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有するPDK4阻害剤、医薬組成物、又は化粧品組成物に関する。



WO 2013/153821 A1



(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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW,

MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), 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 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： P D K 4 阻害剤及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、新規のピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ4（以下「P D K 4」という）を阻害する化合物及びその薬理的に許容されるエステル誘導体並びにそれらの薬理的に許容される塩に関する。また、本発明はP D K 4の発現又は活性化が発症若しくは増悪化に関与する疾患群の、治療法又は予防法に関する。より具体的には、本発明は、インフルエンザ感染後の重症化、食欲不振、ミトコンドリア病、又はA T P産生の低下を伴う疾患又は障害、糖尿病、又は癌の治療薬又は予防薬、あるいはその治療方法又は予防方法に関する。更に、本発明は、新規のP D K 4を阻害する化合物又はその薬理的に許容されるエステル誘導体あるいはそれらの薬理的に許容される塩を含有する化粧品組成物に関する。

背景技術

[0002] 健常な成人がインフルエンザウイルスに感染しても大事には至らずに回復し、感染したウイルスに対する免疫が獲得される。しかし、高齢者や小児がインフルエンザウイルスに感染すると多臓器不全（M O F : M u l t i p l e o r g a n f a i l u r e）やインフルエンザ脳症（I A E : I n f l u e n z a - a s s o c i a t e d e n c e p h a l o p a t h y）を来すことがあり、死に至るケースも稀ではない。最近ではインフルエンザウイルスに感染した患者にノイラミニダーゼ阻害剤などの1990年代後半に開発された抗ウイルス薬が投与されている。しかし、2012年に臨床試験データの大規模解析からオセルタミビル（タミフル）およびザナミビル（リレンザ）などの投与により、初期症状の軽減（インフルエンザの症状が1日ほど早く収まる効果）は確認されたが、感染後の重症化を防ぐ効果は確認できないとする報告書が発表されている。（非特許文献1）

[0003] ミトコンドリアに局在するピルビン酸デヒドロゲナーゼ（以下、「P D H

」という)は糖代謝の制御に重要な酵素であり、PDKによるリン酸化により不活化される。ヒトやマウスでは4種のPDKアイソザイム(PDK1-4)が存在する。PDK4が糖尿病及び癌の発症、増悪化にも関与していることが知られている(非特許文献2及び3参照)。癌や糖尿病でPDKの過剰発現によるPDHの低下が起きていることからPDK阻害剤は癌や糖尿病の薬剤の分子標的として注目され、探索が行われてきた。

[0004] しかし、これまでPDK4を100 μ M以下のIC50で阻害できる化合物は見出されていない。例えばAZD7545、Compound K、Novartis 3rなどはPDKのアイソザイム1, 2及び3をサブ μ MオーダーのIC50で阻害するが、PDK4は逆に活性を促進することが報告されている。PDK4はPDK1-3と異なり準活性化状態で存在しており、このことがPDK4阻害剤の開発を困難にしている一因と考えられている。またPDK4の阻害剤として報告されているジクロル酢酸は阻害活性が弱く、また神経毒性など副作用が大きいため、医薬として使用することができなかった(非特許文献4参照)。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Published Online: 18 JAN 2012 DOI: 10.1002/14651858.CD008965.pub3

非特許文献2: Int. J. Cancer 2011; 128: 1001-1008

非特許文献3: Biochem. J. (2009) 423: 243-252

非特許文献4: J. Biol Chem. (2008) 283: 25305-25315

発明の概要

[0006] 本発明は、従来化合物よりも阻害活性の強い新規のPDK4を阻害する化合物を提供することを目的とする。

[0007] 発明者の木戸らはインフルエンザ重症化の発症機序を解析し、IAEやMOFを併発する患者では、ウイルス感染によって末梢血中のアデノシン三リン酸（以下、「ATP」という）レベルが低値を示すこと、及び、ミトコンドリアの脂肪酸代謝酵素（Carnitine palmitoyl transferase 2 : CPT2）に温度感受性の遺伝子多型が存在することを報告してきた（Mol Cell Biochem（2007）299 : 85-92 ; Hum Mutat（2008）29 : 718-27）。本発明者らは、さらに、3週齢のマウスにインフルエンザウイルスを感染させてミトコンドリアのエネルギー産生系遺伝子の発現量の網羅的解析を行った結果、インフルエンザウイルス感染後、サイトカイン産生の上昇、発熱に伴いPDK4遺伝子の発現誘導が起こることを見出した。これらの研究結果から、インフルエンザ感染患者が重症化するとき、急性のミトコンドリア機能の活性低下による全身性のATPの枯渇があり、PDK4阻害剤によりこの急性重症化を防止できると推定した。

[0008] 発明者の中野、大村らは1980年代から蛋白リン酸化酵素の阻害剤（Protein Kinase : PK）、Staurosporineおよびその関連物質などを見出してきた（J. Antibiotics（2009）62 : 17-26）。そこで本発明者らは、上記木戸らの推定に基づき、インフルエンザ感染患者の重症化防止の新規薬剤を提供するために新たなPDK4阻害剤の探索を行った。PDKはSer/Thr kinaseであるが、強力な汎Kinase阻害剤として知られているStaurosporineでは全く阻害されない。PDK4のATP結合部位の構造を解析した結果、StaurosporineはPDK4のATP結合部位に入れないことが明らかとなった。そこで、Staurosporineより小さい分子の天然物を中心に、PDK4を μ Mオーダーで阻害する化合物を探索した結果、本発明の化合物を見出した。本発明の化合物について、インフルエンザ感染マウスモデルを用いて実験した結果、食欲不振、体重減少等の重症化や死亡を抑制する作用を有することを確認し、本発明を完成した。

[0009] また、上述の通り、インフルエンザ感染患者が重症化した場合、PDK4 遺伝子の発現の誘導の他、ウイルス感染によって末梢血中のATPレベルが低値を示すこと、ミトコンドリアの脂肪酸代謝酵素（CPT2）に温度感受性の遺伝子多型が存在することから、本発明のPDK4阻害剤は、CPT又はミトコンドリアATP産生酵素群に変異を持つ疾患の治療にも有用であると考えられる。

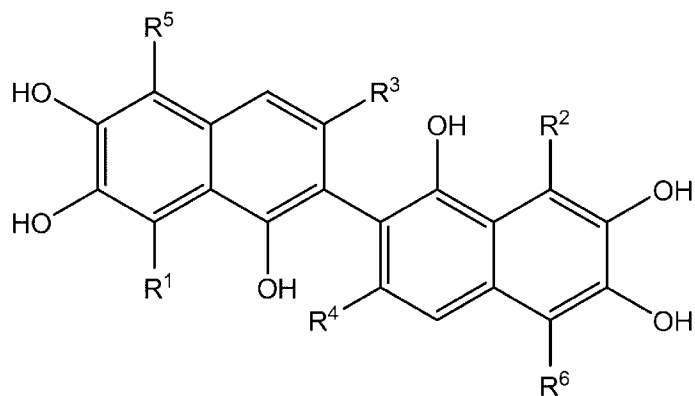
[0010] 更に、インフルエンザ感染患者の重症化防止や食欲不振の改善に加えて、PDK4が糖尿病及び癌の発症、増悪化にも関与していることが上述の通り知られている（Int. J. Cancer（2011）128：1001－1008；及びBiochem. J.（2009）423：243－252参照）ことから、本発明のPDK4阻害剤はこれらの疾患の治療にも有用であると考えられる。

[0011] よって、本発明は、インフルエンザ重症化の治療薬又は予防薬を提供することを目的とする。また、本発明は、別の態様において、新規PDK4阻害剤を提供することを目的とする。更に、本発明は、新規PDK4阻害剤を有効成分とする、ミトコンドリア機能および食欲不振の改善、癌あるいは糖尿病などの疾患の治療薬、代謝改善による化粧品を提供することを課題とする。

[0012] よって、一態様において、本発明は、下記一般式（I）～（III）のいずれか一つで表わされる化合物（以下、総称して「本発明の化合物」という）又はその薬理的に許容されるエステル誘導体あるいはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有するPDK4阻害剤、医薬組成物、又は化粧品組成物に関する：

[0013]

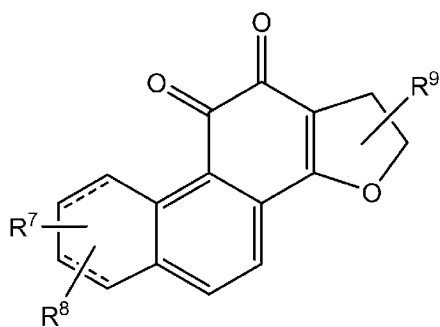
[化1]



(I)

[式中、 R^1 及び R^2 は、同一又は異なって、ホルミル基又は2-カルボキシフェニルイミノメチル基を示し、 $R^3 \sim R^6$ は、同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC1~6アルキル基を示す]；

[0014] [化2]

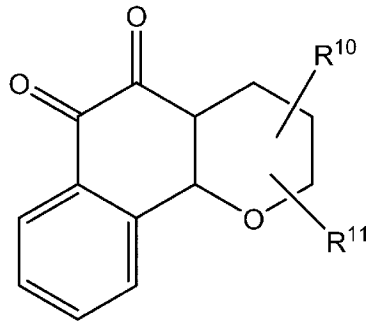


(II)

[式中、実線と破線で表わされる結合は単結合又は二重結合を示し、 R^7 及び R^8 は同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC1~6アルキル基を示し、 R^9 は直鎖又は分岐状のC1~6アルキル基を示す]；

[0015]

[化3]



(III)

[式中、 R^{10} 及び R^{11} は同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基を示す]。

[0016] 具体的には、前記医薬組成物は、PDK 4の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する疾患又は障害の治療薬又は予防薬である。より具体的には、これに限定されるものではないが、PDK 4の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する疾患又は障害には、インフルエンザ感染後の重症化、食欲不振、ミトコンドリア病、又はATP産生の低下を伴う疾患又は障害、糖尿病、又は癌が含まれる。

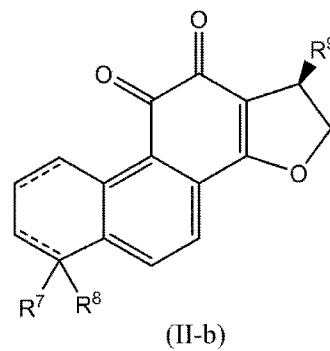
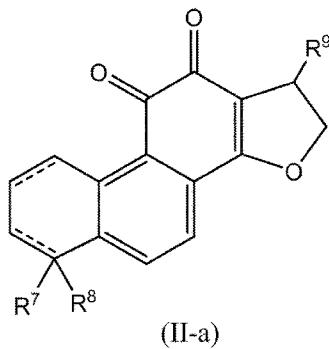
[0017] 本明細書において、「直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基」とは、直鎖又は分岐状の炭素数が1～6個の飽和炭化水素基を意味し、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、2, 3-ジメチルプロピル基、ヘキシル基、及びシクロヘキシル基などが挙げられ、好ましくは、C 1～5アルキル基であり、より好ましくは、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、又は2, 3-ジメチルプロピル基である。更に好ましくは、C 1～4アルキル基であり、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、及びイソブチル基である。 R^3 、 R^4 、及び R^7 ～ R^{11} における直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基と

して、好ましくは、メチル基、エチル基、プロピル基（例えば、*n*-プロピル基）であり、より好ましくは、メチル基である。R⁵及びR⁶における直鎖又は分岐状のC₁~6アルキル基として、好ましくは、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、及びイソブチル基であり、より好ましくは、*i*-プロピル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、及びイソブチル基であり、最も好ましくは、*i*-プロピル基である。例えば、一般式（I）において、R¹及びR²は、同一又は異なって、ホルミル基又は2-カルボキシフェニルイミノメチル基を示し、R³及びR⁴は、同一又は異なって、メチル基、エチル基、又はプロピル基（例えば、*n*-プロピル基）（好ましくは、メチル基）を示し、R⁵及びR⁶は、同一又は異なって、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、及びイソブチル基（好ましくは、*i*-プロピル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、及びイソブチル基、より好ましくは、*i*-プロピル基）である。また、一般式（II）において、実線と破線で表わされる結合は単結合又は二重結合を示し、R⁷及びR⁸は同一又は異なって、メチル基、エチル基、又はプロピル基（例えば、*n*-プロピル基）（好ましくは、メチル基）を示し、R⁹はメチル基、エチル基、又はプロピル基（例えば、*n*-プロピル基）（好ましくは、メチル基）を示す。一般式（III）において、R¹⁰及びR¹¹は同一又は異なって、メチル基、エチル基、又はプロピル基（例えば、*n*-プロピル基）（好ましくは、メチル基）を示す。

[0018] 好ましい態様において、本発明の一般式（II）で表わされる化合物は、以下の（II-a）又は（II-b）で表わされる。下記一般式（II-a）及び（II-b）においては、実線と破線で表わされる結合が二重結合を示す場合、R⁸は存在しない。

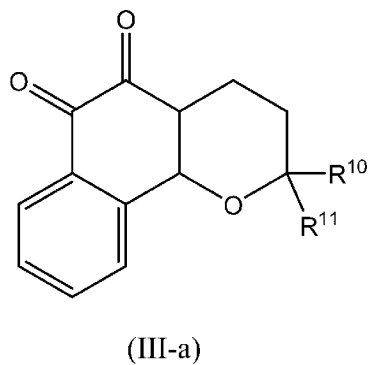
[0019]

[化4]



[0020] また、好ましい態様において、本発明の一般式 (I I I) で表わされる化合物は、以下の (I I I - a) で表わされる。

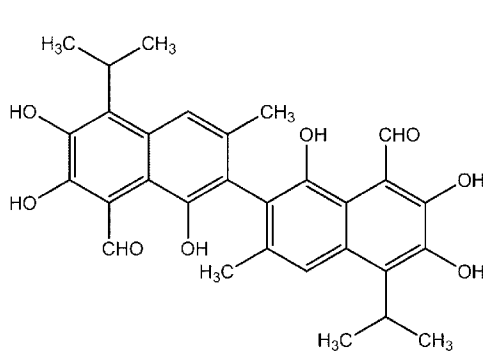
[0021] [化5]



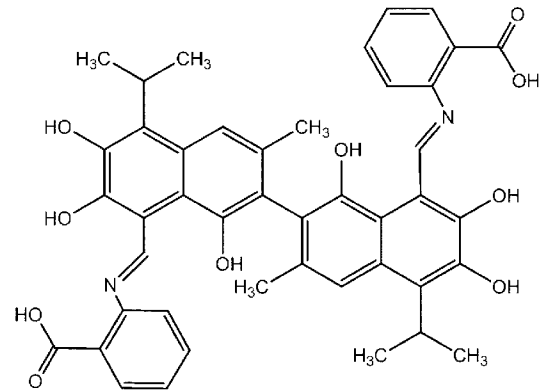
[0022] 特に、本願発明者らは、酵素阻害実験や動物実験において、それぞれ以下の式で表わされる K I S 7、K I S 2 8、K I S 3 7、K I S 1 1 6、及び K I S 2 4 が P D K 4 を阻害し、急性のインフルエンザ重症化を防止する強い活性があることが確認した。

[0023]

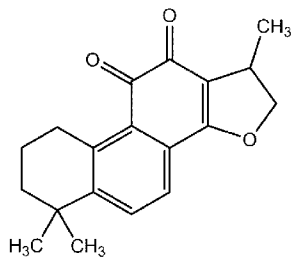
[化6]



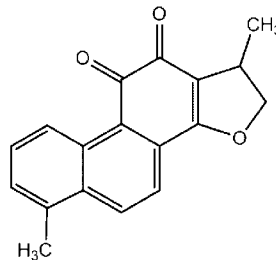
KIS7



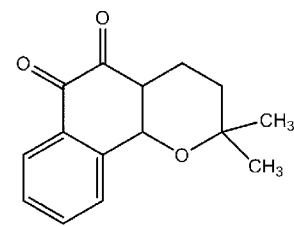
KIS28



KIS37



KIS116



KIS24

[0024] 本発明の化合物は、上記化合物の他、これらの化合物の薬理的に許容されるエステル誘導体を包含する。ここで、「薬理的に許容されるエステル誘導体」は、生体内において代謝されて、本願発明の化合物を与える基を含む化合物であって、医薬として体内に投与することが許容可能なエステルのことである。本明細書において、エステルは、エステル結合した化合物の他、アミド結合した化合物を含む。エステルは、生体内のエステラーゼにより分解されて活性型の化合物を与えてもよい。例えば、エステルとしては、置換され又は置換されていない、低級アルキルエステル、低級アルケニルエステル、低級アルキルアミノ低級アルキルエステル、アシルアミノ低級アルキルエステル、アシルオキシ低級アルキルエステル、アリールエステル、アリール低級アルキルエステル、アミド、低級アルキルアミド、水酸化アミドを挙げることができる。エステルとして、好ましくは、プロピオン酸エステル又はアシルエステルである。また、本明細書において「一般式(1)～(111)で表わされる化合物」又は「本発明の化合物」とは、それが明らか

に適さない場合を除き、明示されていない場合にも、それぞれ、一般式（I）～（III）で表わされる化合物又は本発明の化合物の薬理的に許容されるエステル誘導体をも含む。

[0025] 本明細書において「薬理的に許容される塩」とは、本発明の化合物又はその薬理的に許容されるエステル誘導体が、無機又は有機の塩基又は酸と結合して形成した塩であって、医薬として体内に投与することが許容可能な塩のことである。このような塩は、例えば、Bergerら、J. Pharm. Sci., 66: 1-19 (1977)等に記載されている。塩としては、例えば、カルボン酸基等の酸性基が存在する場合には、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ金属及びアルカリ土類金属塩；アンモニア、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、N,N-ビス（ヒドロキシエチル）ピペラジン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、エタノールアミン、N-メチルグルカミン、L-グルカミン等のアミンの塩；又はリジン、 δ -ヒドロキシリジン、アルギニンなどの塩基性アミノ酸との塩を形成することができる。塩基性基が存在する場合には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の鉱酸の塩；メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パラトルエンスルホン酸、酢酸、プロピオン酸塩、酒石酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸、シュウ酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、マンデル酸、ケイ皮酸、乳酸、グリコール酸、グルクロン酸、アスコルビン酸、ニコチン酸、サリチル酸等の有機酸との塩；又はアスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸との塩などを挙げることができる。なお、本発明の化合物の水和物又は溶媒和物及び本発明の化合物の薬理的に許容される塩の水和物又は溶媒和物も本発明の化合物に包含される。また、本明細書において「一般式（I）～（III）で表わされる化合物」又は「本発明の化合物」とは、それが明らかに適さない場合を除き、明示されていない場合にも、一般式（I）～（III）で表わされる化合物又はその薬理的に許容されるエステル誘導体の薬理的に許容される塩、水和物

及び溶媒和物、並びに一般式 (I) ~ (III) で表わされる化合物又はその薬理的に許容されるエステル誘導体の薬理的に許容される塩の水和物又は溶媒和物、又は本発明の化合物又はその薬理的に許容されるエステル誘導体の薬理的に許容される塩、水和物及び溶媒和物、並びに本発明の化合物又はその薬理的に許容されるエステル誘導体の薬理的に許容される塩の水和物又は溶媒和物をも含む。

[0026] 本発明の化合物は不斉炭素を有することがあることから、光学異性体が存在することがある。本発明の化合物としては、右旋性 (+) 又は左旋性 (-) の何れの化合物であってもよいし、ラセミ体などのこれらの異性体の混合物であってもよい。また、本発明の化合物は、特に断らない限り、いずれの互変異性体、又は幾何異性体 (例えば、E 体、Z 体など) も含むものである。

[0027] 本明細書において、PDK4 阻害剤とは、PDK4 の阻害を目的として使用される薬剤であれば特に限定されない。好ましくは、本発明の PDK4 阻害剤は医薬組成物として提供されるものである。そのような医薬組成物は、PDK4 の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する疾患又は障害の治療又は予防用とすることができる。PDK4 の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する疾患又は障害としては、例えば、インフルエンザ感染後の重症化 (インフルエンザ感染後の体重減少、摂食障害、及び/又は摂水障害を含む)、食欲不振、ミトコンドリア病、ATP 産生の低下を伴う疾患又は障害、糖尿病、又は癌を挙げることができる。ここで、ミトコンドリア病とは、ミトコンドリア ATP 合成酵素群に変異を有することに基づく疾患又は障害のことであり、例えば、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ欠損症、MELAS 等を含む。また、ATP 産生の低下を伴う疾患又は障害としては、例えば、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼの変異に基づく疾患又は障害を挙げることができる。

[0028] また、本発明の医薬組成物においては、その種類は特に限定されるものではなく、剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸

濁剤、座剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製することができる。また、液体製剤にあっては、用時、水又は他の適当な溶媒に溶解又は懸濁する形であってもよい。また錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明の化合物を水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水或いはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や保存剤を添加してもよい。経口投与用又は非経口投与用の任意の製剤形態で提供される。例えば、顆粒剤、細粒剤、散剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤又は液剤等の形態の経口投与用医薬組成物、静脈内投与用、筋肉内投与用、若しくは皮下投与用などの注射剤、点滴剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、点鼻剤、吸入剤、坐剤などの形態の非経口投与用医薬組成物として調製することができる。注射剤や点滴剤などは、凍結乾燥形態などの粉末状の剤形として調製し、用時に生理食塩水などの適宜の水性媒体に溶解して用いることもできる。

発明の効果

[0029] 本発明により、本発明の化合物は以下のように新規な酵素阻害活性と動物モデルでの薬効を示すことが明らかにされた。本発明の化合物はPDK4を μM オーダーで阻害する初めての薬剤である。具体的には本発明の化合物は唯一の既存薬であるジクロロ酢酸と比べて100倍以上低い投与量で強い効果を示すことが確認された。よって、本発明の化合物は、新規で阻害活性の強いPDK4阻害剤を提供することができる。より具体的には、インフルエンザ感染マウスモデルに本発明の化合物を投与した場合には、マウスを体重減少さらに死亡から守る作用が確認された。また摂食、摂水が非感染マウスに近いレベルまで回復するとともに生化学的な解析からATPレベルなどが改善することが観察された。本発明の化合物はインフルエンザ感染による急性の重症化を防止する作用が示された。よって、本発明の化合物は、インフルエンザの重症化、特に体重減少、摂食障害、及び／又は摂水障害を治療し又は予防することができる。具体的には、本発明の化合物にはインフルエ

ンザ感染による体重減少を抑制する効果があることから、本発明の化合物はインフルエンザ感染による体重減少の抑制剤として利用できる。また、本発明の化合物は、インフルエンザ感染による摂水量の減少を抑制することができることから、本発明の化合物はインフルエンザ感染による摂水量減少の抑制剤として利用できる。更に、本発明の化合物は摂食量の減少が抑えられていた。よって、K I S 7 は、インフルエンザ感染によるインフルエンザ感染による摂食量の減少を抑制する効果があることから、本発明の化合物はインフルエンザ感染による摂食量減少の抑制剤として利用できる。更には、本発明の化合物は、A T P レベルの低下に依存する疾患又は障害の治療又は予防に有効である。また、本発明の化合物は、インフルエンザ感染による重症化防止に加え、P D K 4 を阻害することにより期待される疾患での効果が認められており、このような疾患の治療又は予防に有効である。更に、本発明の化合物は、ミトコンドリア機能の活性化に伴う細胞の代謝改善により、化粧品としての効果が認められており、化粧品としても有用である。

図面の簡単な説明

[0030] [図1]インフルエンザ感染による急性重症化機構の解析結果とP D K 4 阻害剤による重症化防止の可能性を説明した模式図である。

[図2]P D K アイソザイムの中でP D K 4 だけが準活性化状態にあることを示した模式図である。(i) 無秩序なC末端テイル及び(i i) 閉じた活性部位溝を有する閉構造(C l o s e d c o n f o r m a t i o n) (T 状態) がP D K 2 - A D P 構造で観察される。部分的に規則的な交差テイル及び開いた活性部位溝を有する活性のある中間開構造(R ' 状態) が、ヒト a p o - P D K 2、a p o - P D K 1、及び本願のP D K 4 - A D P 構造で存在する。完全に規則的な交差テイル及び開いた活性部位溝を有する活性開構造(R 状態) がヒト a p o - P D K 3 - L 2、P D K 3 - L 2 - A D P、P D K 3 - L 2 - A T P (1 Y 8 P)、P D K 2 - L 2 (3 C R K)、及びP D K 2 - L 2 - (A M P - P N P) (3 C R L) 構造で存在する。

[図3]K I S 7、及びK I S 2 8 の構造とP D K 4 阻害活性を示した図である

。

[図4] K I S 7、K I S 3 7、K I S 1 1 6、K I S 2 4 と既存の P D K 阻害剤の活性を比較した図である。左から順に、使用した化合物 (C o m p o u n d)、P D K 1 による P D H のリン酸化の阻害活性 (P D H K 1)、P D K 2 による P D H のリン酸化の阻害活性 (P D H K 2)、P D K 4 による P D H のリン酸化の阻害活性を示す。各 P D K の P D H のリン酸化の阻害活性は、5 0 % 阻害濃度 (I C 5 0) (μ M) で示す。

[図5] インフルエンザ感染マウスモデルへの、K I S 7、K I S 2 8、K I S 3 7、K I S 1 1 6 及び K I S 2 4 投与試験のスケジュール (7 日目まで投与) を示す図である。

[図6] インフルエンザ感染マウスモデルにおけるマウスの体重変化を示すグラフである。インフルエンザ感染マウスに 5 % D M S O 生理食塩水中の K I S 7 を 2. 8 m g / k g / d a y で腹腔内投与したマウスにおける体重変化を丸印で示す。対照として、インフルエンザ非感染マウスに 5 % D M S O 生理食塩水を腹腔内投与したマウス (ひし形)、インフルエンザ感染マウスに 5 % D M S O 生理食塩水を腹腔内投与したマウス (四角)、インフルエンザ感染マウスに 5 % D M S O 生理食塩水中のジクロロ酢酸 (D C A) を 5 6 m g / k g / d a y で腹腔内投与したマウス (三角) を用いた。縦軸はマウスの体重 (g) を示し、横軸は感染後の経過日数 (感染初日を 0 日目とする) を示す。

[図7] インフルエンザ感染マウスモデルにおけるマウスの摂水 (左図) 及び摂食 (右図) の変化を示すグラフである。インフルエンザ感染マウスに 5 % D M S O 生理食塩水中の K I S 7 を 2. 8 m g / k g / d a y で腹腔内投与したマウスにおける摂食及び摂水の変化を丸印で示す。対照として、インフルエンザ非感染マウスに 5 % D M S O 生理食塩水を腹腔内投与したマウス (ひし形)、インフルエンザ感染マウスに 5 % D M S O 生理食塩水を腹腔内投与したマウス (四角)、インフルエンザ感染マウスに 5 % D M S O 生理食塩水中のジクロロ酢酸 (D C A) を 5 6 m g / k g / d a y で腹腔内投与したマ

ウス（三角）を用いた。右図の縦軸はマウスの摂水量（g／マウス）を示し、左図の縦軸はマウスの摂食量（g／マウス）を示す。両方の図において、横軸は感染後の経過日数（感染初日を0日目とする）を示す。

[図8]インフルエンザウイルス感染7日後のマウスの頸部より採取した血液について、各血液パラメーターを測定した結果を示すグラフである。血液パラメーターは、血糖値（mg／dL）（左上図）、乳酸値（mM）（右上図）、 β -ヒドロキシ酪酸（mM）（左下図）、及びATPレベル（mM）（右下図）とした。各グラフにおいて、横軸は左から、インフルエンザ非感染マウスに5%DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウス、インフルエンザ感染マウスに5%DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウス、インフルエンザ感染マウスに5%DMSO生理食塩水中のKIS7を2.8mg/kg/dayで腹腔内投与したマウス、インフルエンザ感染マウスに5%DMSO生理食塩水中のジクロロ酢酸（DCA）を56mg/kg/dayで腹腔内投与したマウスを示す。各グラフの縦軸は、各パラメーターの数値（血糖値（mg／dL）（左上図）、乳酸値（mM）（右上図）、 β -ヒドロキシ酪酸（mM）（左下図）、及びATPレベル（mM）（右下図））を示す。

[図9]インフルエンザウイルス感染7日後のマウスの各組織中のATP値を示すグラフである。グラフは左から、心臓、肝臓、及び筋肉を示す。各グラフにおいて、横軸は左から、インフルエンザ非感染マウスに5%DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウス、インフルエンザ感染マウスに5%DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウス、インフルエンザ感染マウスに5%DMSO生理食塩水中のKIS7を2.8mg/kg/dayで腹腔内投与したマウス、インフルエンザ感染マウスに5%DMSO生理食塩水中のジクロロ酢酸（DCA）を56mg/kg/dayで腹腔内投与したマウスを示す。各グラフの縦軸は、各組織中のATP濃度（ $\mu\text{mol/g wet tissue}$ ）を示す。

[図10]インフルエンザウイルス感染7日後のマウスの肝臓組織中のPDH酵素活性を示すグラフである。横軸は左から、インフルエンザ非感染マウスに

5% DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウス、インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウス、インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水中のKIS7を2.8 mg/kg/dayで腹腔内投与したマウス、インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水中のジクロロ酢酸(DCA)を56 mg/kg/dayで腹腔内投与したマウスを示す。縦軸は、肝臓中のPDH活性(Δ mOD/分)を示す。

[図11] KIS7投与群のインフルエンザ感染後14日間の生存率を示すグラフである。縦軸は生存率(%)を示し、横軸は感染後の経過日数(感染初日を0日目とする)を示す。インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水中のKIS7を2.8 mg/kg/dayで腹腔内投与したマウスを丸印で示す。対照として、インフルエンザ非感染マウスに5% DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウスをひし形で、インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウスを四角で示す。

[図12] KIS24の構造とKIS24投与群のインフルエンザ感染後14日間の生存率を示すグラフである。グラフの縦軸は生存率(%)を示し、横軸は感染後の経過日数(感染初日を0日目とする)を示す。インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水中のKIS24を1.3 mg/kg/dayで腹腔内投与したマウスを丸印で示す。対照として、インフルエンザ非感染マウスに5% DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウスをひし形で、インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウスを四角で示す。また、インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水中のジクロロ酢酸(DCA)を56 mg/kg/dayで腹腔内投与したマウスを三角で示す。

[図13] KIS37及びKIS116の構造と投与群のインフルエンザ感染後14日間の生存率を示すグラフである。グラフの縦軸は生存率(%)を示し、横軸は感染後の経過日数(感染初日を0日目とする)を示す。インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水中のKIS24を1.3 mg/kg/dayで腹腔内投与したマウスを丸印で示す。対照として、インフルエ

ンザ非感染マウスに5% DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウスをひし形で、インフルエンザ感染マウスに5% DMSO生理食塩水を腹腔内投与したマウスを四角で示す。

[図14]癌細胞足場非依存性増殖にたいするKIS7、KIS37、K及びKIS24の作用を示す図である。KIS7、KIS37、K及びKIS24はPDK4阻害と同じオーダーの $3\mu\text{M}$ でがん細胞HeLaS3の軟寒天中でのコロニー形成を阻害した。またKIS7、KIS24、KIS37及びKIS116はRasで癌化した細胞の足場非依存性スフェア増殖を $1\mu\text{M}$ – $10\mu\text{M}$ オーダーで抑制した。一方、KIS7、KIS37及びKIS116は正常細胞の足場依存性増殖は数十 μM オーダーで全く阻害しなかった。

発明を実施するための形態

- [0031] 本発明の化合物は、市販の化合物を出発物質として適宜当業者周知の化学合成の方法を採用して合成することができる。
- [0032] 本発明の医薬組成物は、通常の薬学的に許容される担体を用いて、常法により製剤化することができる。経口用固形製剤を調製する場合は、主薬に賦形剤、更に必要に応じて、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えた後、常法により溶剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等とする。注射剤を調製する場合には、主薬に必要によりpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加し、常法により皮下又は静脈内用注射剤とすることができる。
- [0033] 別の態様において本発明は、本発明の化合物の有効量をそれを必要とする患者に投与することを含む、PDK（特には、PDK4）の発現又は活性化が発症又は増悪化に係る疾患又は障害の治療方法又は予防方法に関する。あるいは、本発明は、PDK（特には、PDK4）が発症又は増悪化に係る疾患又は障害の治療又は予防のための本発明の化合物の使用に関する。
- [0034] 本発明の化合物及び医薬組成物は、経口投与形態、又は注射剤、点滴剤等の非経口投与形態で投与することができる。本化合物を哺乳動物等に投与す

る場合、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等として経口投与してもよい、又は、注射剤、点滴剤として非経口的に投与してもよい。投与量は症状の程度、年齢、体重、性別、投与ルート、投与形態、薬剤への反応性、疾患の種類等により適宜設定することができ、例えば、通常成人1日当たり50～500mgを1日1～数回に分けて投与する。

実施例

[0035] 以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、本願全体を通して引用される全文献は参照によりそのまま本願に組み込まれる。また、本願は米国特許仮出願第US61/623,501号の優先権を主張する。本願が優先権を主張する米国特許仮出願第US61/623,501号記載の内容は全て参照によりそのまま本願に組み込まれる。

[0036] (実施例1) PDK阻害活性の測定

(1) 被験物質とその溶液の調製

被験物質KIS7 (ゴシポール) とKIS24 (ベータラパコン) はEnzo Life Sciences (USA)、KIS37 (クリプトタンシノン) はAbcam (USA)、KIS116 (ジヒドロタンシノンI) はSigma-Aldrich (USA)、KIS28はナミキ商事 (日本)、陽性対照物質ジクロロ酢酸 (DCA) は和光純薬 (日本) より購入した。

被験物質 (KIS7、KIS28、KIS24、KIS37、及びKIS116) および陽性対照物質 (ジクロロ酢酸 : DCA) はジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、希釈して試験濃度の100倍濃度の溶液を調製した。

(2) Off-chip mobility shift assayによるPDK2及びPDK4阻害活性の測定

PDK2及びPDK4阻害活性は、100 μ M ATP存在下でPDHのE1サブユニットのリン酸化を測定することで決定した。

1) アッセイバッファー (20 mM HEPES, 0.01% Triton X-100, 2 mM DTT, pH 7.5) にて調製した 5 μ L の 4 倍濃度被験物質溶液、5 μ L の 4 倍濃度基質 (組換えヒト PDH) / ATP / 金属溶液および 10 μ L の 2 倍濃度ヒト組換え PDK 溶液をポリプロピレン製 384 ウェルプレート内のウェル内で混合し、室温にて 5 時間反応させた。

2) 60 μ L の Termination Buffer (Quick Scout Screening Assist MSA; Carna Biosciences) を添加して反応を停止させた。

3) 反応溶液中の基質ペプチドとリン酸化ペプチドを LabChip 3000 system (Caliper Life Science) にて分離し、定量した (ゲルシフトアッセイ)。基質ペプチドピーク高さ (S) とリン酸化ペプチドピーク高さ (P) から計算される生成物比 (P / (P + S)) にてリン酸化活性を評価した。

4) 阻害率は次のように計算した。全ての反応成分を含むウェルのリン酸化活性を阻害 0%、酵素非添加のリン酸化活性を阻害 100% とし、各被験物質試験ウェルのリン酸化活性から阻害率を計算した。

[0037] (3) 結果

KIS7 及び KIS28 の PDK4 阻害活性を図 3 に示す。また、PDK2 阻害活性、及び PDK4 阻害活性について、KIS7 と既知の PDK 阻害物質とを比較した結果を図 4 に示す。AZD7545、化合物 K、ノバルティス 3r が PDK4 を活性化するのに対し、KIS7 は PDK4 を阻害することが示された。また、KIS7 による PDK4 阻害は、DCA や Radicicol と比較して顕著に低用量で達成された。また、KIS24、KIS37 及び KIS116 の PDK2 及び PDK4 阻害活性を、図 12 (KIS24)、及び図 13 (KIS37 及び KIS116) に示す。

以上の図にも示す通り、KIS7、KIS28、KIS24、KIS37、及び KIS116 は、それぞれ、4.0 μ M、13.2 μ M、3 μ M、11 μ M、及び < 4 μ M という、強い PDK4 阻害活性を示した。

[0038] (実施例2) インフルエンザ感染マウスモデルでのK I S 7の効果(7日間投与)

(1) マウス、インフルエンザウイルス、及び試薬

5週齢のメスC57BL/6Jマウス(日本SLC)を購入し、6週目(体重16.4-18.1g)に麻酔(ケタラル62.5mg/kgとセラクトール12.5μg/kgの混合)を筋肉注射後、Influenza A/Puerto Rico 8/34株(influenza A/PR8/8/34株)を10PFU/20μL/mouseで経鼻感染させた。非感染群として、ウイルスを希釈する際に用いた生理食塩水(大塚製薬)を20μL/mouseで経鼻で投与した。感染させた日を0日目(Pre-0)とした。K I S 7は、2.8mg/kg/dayの投与量で、溶媒であるDMSOが5%になるように生理食塩水で希釈した溶液として、感染翌日(1日目: Day 1)から7日目(Day 7)まで1日2回腹腔内に投与した。各実験における群分けは、以下の計4群とし、各群10匹(1ケージ5匹)のマウスを用いた:

- 1) 非感染マウスに5%DMSO生理食塩水を腹腔内投与した群、
- 2) 感染マウスに5%DMSO生理食塩水を腹腔内投与した群、
- 3) 感染マウスに5%DMSO生理食塩水中の各K I S化合物(K I S 7)を2.8mg/kg/dayで腹腔内投与した群、
- 4) 比較として、感染マウスに5%DMSO生理食塩水中のジクロロ酢酸(DCA)を56mg/kg/dayで腹腔内投与した群。

[0039] (2) 体重、摂食量、摂水量の測定

体重は、1日1回、個別に測定した。摂食量と摂水量は、1ケージに5匹入っているマウスの、餌の量、水の量を1日1回測定し、その変化量を5匹でわることで、1匹あたりの平均値として算出した。

[0040] (3) 末梢血中の生化学的パラメーターの測定

インフルエンザウイルス感染7日後のマウスを各群5匹ずつ用い、頸部より血液を採取後、各パラメーターを測定した。

(3-1) 血糖値の測定

血糖値は、メディセーフ（登録商標）ミニGR-102（TERUMO CORPORATION JAPAN）を用い、製造者により提供された取扱説明書に従って血液を数滴用いて測定した。測定原理は、血液をチップ先端より吸引すると、血液は試験紙に展開され、血液中のグルコースは、試験紙に含まれるグルコースオキシダーゼの作用により、過酸化水素とグルコン酸を生成する。更に生成した過酸化水素は、ペルオキシダーゼの作用により、反応試験部に含まれる4-アミノアンチピリンとN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジンと反応し、キノン系色素が生成される。この赤紫色の呈色を比色定量し、血液中のグルコース量を算出した。

[0041] (3-2) 乳酸値の測定

乳酸値は、ラクテート・プロ LT-1710（株式会社ARKRAY）を用い、製造者により提供された取扱説明書に従って血液を数滴用いて測定した。測定原理は、血液を電極に供給すると反応層中の電子伝達体であるフェリシアン化カリウム（酸化型）が溶け、ラクテートオキシダーゼ（LOD）との間で酵素反応が行われ、フェロシアン化カリウム（還元型）を生成する。次に電極に一定電圧を印加してフェロシアン化カリウムを酸化し、その時発生する酸化電流を計測する。この酸化電流を、生成したフェロシアン化カリウム量、すなわち乳酸濃度に換算し、算出した。

[0042] (3-3) β -ヒドロキシ酪酸の測定

血液中のケトン体の代表として β -ヒドロキシ酪酸値を測定した。 β -ヒドロキシ酪酸値は、プレシジョン エクシード（Abbott Japan）を用い、製造者により提供された取扱説明書に従って血液を数滴用いて測定した。測定原理は、電極に血液を滴下すると、血液中の β -ヒドロキシ酪酸（ β -OHB）が電極中の β -ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼと反応し、電子伝達物質を介して微弱な電流を生じる。電流の強さは、滴下した血液中の β -OHB濃度によることから、この電流を測定し、 β -ヒドロキシ酪酸

値を算出した。

[0043] (3-4) ATP値の測定

ATP値は、AMERICAN-ATP kit (応用酵素医学研究所株式会社) を用い、製造者により提供された取扱説明書に従い、血液からATPを抽出し、ルシフェラーゼ反応を用いて測定した。

[0044] (4) マウスの各組織中のATP値の測定

ATP値は、AMERICAN-ATP kit (応用酵素医学研究所株式会社) を用い、製造者により提供された取扱説明書に従い、各組織からATPを抽出し、ルシフェラーゼ反応を用いて測定した。具体的には、心臓は全量、脳、肝臓は約半分、筋肉は右後ろ脚の筋肉部位をインフルエンザウイルス感染7日後のマウスから全量抽出し、ホモジナイザー (ウルトラトラックス T25 デジタル: IKA ジャパ株式会社) にてATP抽出液中で粉碎後、そのホモジナイズ液を、遠心分離した後、その上清を回収することで各組織中のATPを抽出した。各組織中のATP値は、用いる組織の量によって値が変わるので、用いた各組織湿重量あたりのATP値として算出した。

[0045] (5) マウス肝臓組織中のPyruvate dehydrogenase (PDH) 酵素活性の測定

インフルエンザウイルス感染7日後のマウスを各群5匹ずつ用い、肝臓のPDH酵素活性を測定した。PDHの活性測定は、Pyruvate Dehydrogenase (PDH) Enzyme Activity Microplate Assay Kit MSP18 (Mitoscience社) を用いて製造者により提供されたプロトコールに従い測定した。測定原理は、マイクロプレートにPDHがイムノキャプチャーされ、そのPDH上でPDHの活性化とともにNAD⁺からNADHに還元される反応を利用し、そこにレポーターを共役して反応させ、その吸光度を測定することにより活性の高さを測定した。具体的には、肝臓を約半分ダウンス型ホモジナイザーにてPBS (-) 中で粉碎後、まずBCAアッセイ法にてタンパク量を測定し、23.7 mg/mLに合わせた。ホモジナイズ液を調整した後、プ

ロトコールに従い、マイクロプレートに充填した。1ウェルあたり、800 μ g 充填した。最後に色試薬と反応させ、吸光度の変化を測定することにより、PDH酵素活性とし、活性の強さは、1分間あたりのOD値の変化として表した。

[0046] (6) 結果

体重変化に関する結果を図6に示す。対照である感染マウスにDMSOのみ投与した群及び感染マウスにDCAを投与した群では、それぞれ、5日目及び6日目からマウスの体重が減少したのに対し、KIS7投与群では非感染マウスと同等に全く体重減少が観察されなかった。よって、DCAはインフルエンザ感染による体重減少をほとんど抑制できないにもかかわらず、KIS7にはインフルエンザ感染による体重減少を抑制する効果があることが示された。

[0047] 摂食、摂水の変化に関する結果を図7に示す。図7の左に示す摂水量の変化においては、比較対照である感染マウスにDCAを投与した群が7日目に明らかに摂水量が大きく減少しているのに対し、KIS7投与群では摂水量の減少が抑えられていた。また、図7の右に示す摂食量の変化においては、比較対照である感染マウスにDCAを投与した群が6日目から摂食量が急激に減少するのに対し、KIS7投与群では摂食量の減少が抑えられていた。よって、KIS7は、インフルエンザ感染による摂食量及び摂水量の減少を抑制する効果があることが示された。

[0048] インフルエンザウイルス感染7日後のマウスの血液パラメーターを測定した結果を図8に示す。いずれの血液パラメーターにおいても、KIS7投与群では非感染マウスと同等の数値を示した。特に、血糖値及び β -ヒドロキシ酪酸はDCA投与群でほとんど改善されていないにもかかわらず、KIS7投与群では非感染群と同等の数値を示した。

[0049] インフルエンザウイルス感染7日後のマウスの各組織中のATP値を測定した結果を図9に示す。心臓及び肝臓において、KIS7投与群では非感染マウスと同等のATP値を示し、インフルエンザウイルス感染によるATP

の減少を抑制した。

[0050] インフルエンザウイルス感染7日後のマウスの肝臓組織中のPDH酵素活性を測定した結果を図10に示す。KIS7投与群及びDCA投与群において、非感染マウスと同等のPDH活性が確認され、KIS7及びDCAがインフルエンザウイルス感染によるPDH活性の低下を抑制することが示された。

[0051] (実施例3) インフルエンザ感染マウスモデルにおけるKIS7、KIS37、及びKIS24の効果(14日間投与)

マウス及びウイルスは実施例2と同じものを使用し、KIS化合物として、KIS7に加えて、KIS37及びKIS24についても実験を行った。KIS24及びKIS37の投与量をそれぞれ1.3mg/kg、1.6mg/kgとする以外は実施例2と同様の方法により感染及び投与を行った。感染時のマウスの体重は、15.8-17.8gであった。ウイルス感染後14日間投与を続け、その間の生存率、体重、摂食量、摂水量の測定を実施例2と同様に行った。また、ウイルス感染後14日間の生存率を測定した。

[0052] KIS7、KIS24、及びKIS37投与について、インフルエンザ感染後14日間の生存率の結果をそれぞれ図11、図12、及び図13に示す。KIS化合物非投与群では8日目からマウスが死亡し始め、14日目には半数以上のマウスが死亡した。一方で、KIS7投与群は、11日目まで生存率100%を維持し、14日目においても生存率70%を達成した。また、KIS24投与群では、6日目に死亡例が出た者の、14日目において生存率90%を達成した。更に、KIS37投与群は10日目まで生存率100%を維持し、14日目においても生存率80%を維持した。

なお、体重、摂食量、摂水量の改善効果は、KIS7と同様の結果が得られた(非図示)。よって、KIS7、KIS24及びKIS37は、インフルエンザ感染における体重減少、摂食及び摂水障害の改善、各種パラメータを改善するのみならず、死亡を抑制し、生存率を高める効果を奏することが示された。

[0053] (実施例4) K I S 7、K I S 2 4、及びK I S 3 7の癌細胞足場非依存性増殖に対する作用

[0054] (1) 実験方法

がん細胞HeLaS3の軟寒天中でのコロニー形成試験は常法を用いた (C . Oneyama et. al. Genes to Cells 2008 ; 13 : 1 - 129) 。 HeLaS3細胞 (4×10^4) を3mlの軟寒天培地 (Dulbecco modified Eagle' s培地、10%子牛血清、0.36%寒天) に混ぜて6cmの細胞培養用プレートウェルに投入した。プレートウェルには5mlの基層寒天培地 (Dulbecco modified Eagle' s培地、10%子牛血清、0.7%寒天) を予め投入した。37度の炭酸ガスインキュベーター中で8日間培養後生成したコロニーをMTT (3 - (4, 5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2, 5 - diphenyltetrazolium bromide) で染色した。

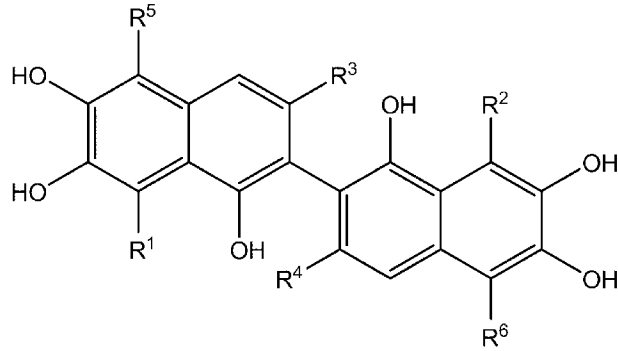
[0055] (2) 結果

K I S 7、K I S 2 4、及びK I S 3 7の癌細胞足場非依存性増殖に対する作用を図14に示す。K I S 7、K I S 3 7、K及びK I S 2 4はPDK4阻害と同じオーダーの3 μ Mでがん細胞HeLaS3の軟寒天中でのコロニー形成を阻害した。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式 (I) ~ (III) のいずれか一つで表わされる化合物
又はその薬理的に許容されるエステル誘導体あるいはそれらの薬理
学的に許容される塩を有効成分として含有する PDK4 阻害剤：

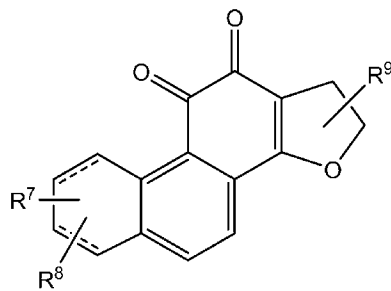
[化1]



(I)

[式中、R¹及びR²は、同一又は異なって、ホルミル基又は2-カルボキシフェニルイミノメチル基を示し、R³~R⁶は、同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC₁~6アルキル基を示す]；

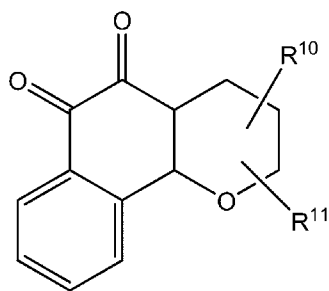
[化2]



(II)

[式中、実線と破線で表わされる結合は単結合又は二重結合を示し、R⁷及びR⁸は同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC₁~6アルキル基を示し、R⁹は直鎖又は分岐状のC₁~6アルキル基を示す]；

[化3]



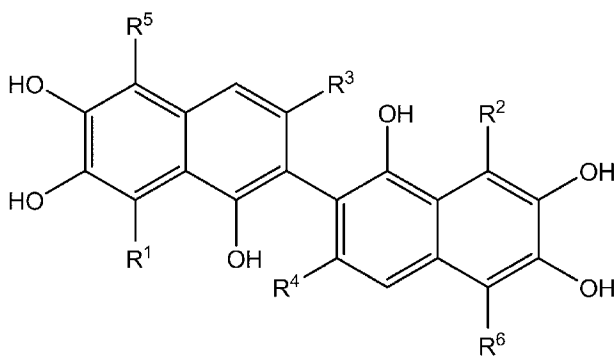
(III)

[式中、 R^{10} 及び R^{11} は同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基を示す]。

[請求項2]

下記一般式 (I) ～ (III) のいずれか一つで表わされる化合物又はその薬理的に許容されるエステル誘導体あるいはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物：

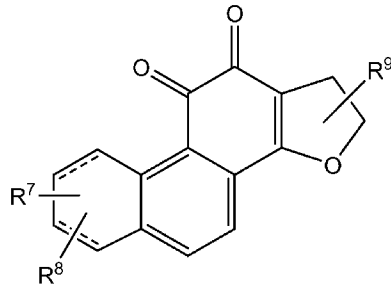
[化4]



(I)

[式中、 R^1 及び R^2 は、同一又は異なって、ホルミル基又は2-カルボキシフェニルイミノメチル基を示し、 R^3 ～ R^6 は、同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基を示す]；

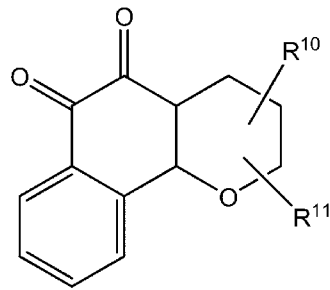
[化5]



(II)

[式中、実線と破線で表わされる結合は単結合又は二重結合を示し、R⁷及びR⁸は同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基を示し、R⁹は直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基を示す]；

[化6]



(III)

[式中、R¹⁰及びR¹¹は同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基を示す]。

[請求項3] PDK 4の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する疾患又は障害の治療薬又は予防薬である、請求項2に記載の医薬組成物。

[請求項4] PDK 4の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する疾患又は障害が、インフルエンザ感染後の重症化である、請求項3に記載の医薬組成物。

[請求項5] PDK 4の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する疾患又は障害が、食欲不振である、請求項3に記載の医薬組成物。

[請求項6] PDK 4の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する

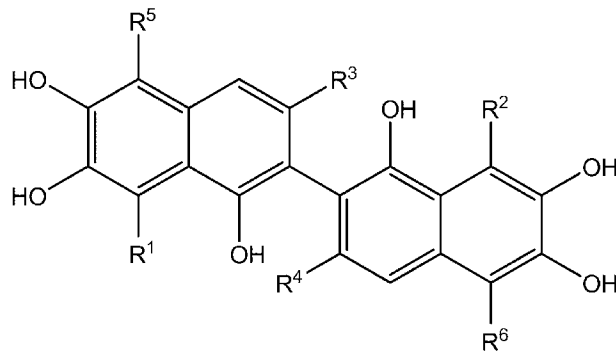
疾患又は障害が、ミトコンドリア病、又はA T P 産生の低下を伴う疾患又は障害である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

[請求項7] P D K 4 の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する疾患又は障害が、糖尿病である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

[請求項8] P D K 4 の発現又は活性化が発症又は増悪化に関係し又は寄与する疾患又は障害が、癌である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

[請求項9] 下記一般式 (I) ~ (I I I) のいずれか一つで表わされる化合物、又はその薬理的に許容されるエステル誘導体あるいはそれらの薬理的に許容される塩を配合してなる化粧品組成物：

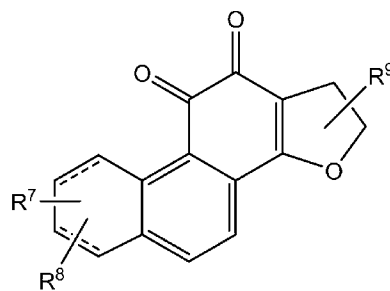
[化7]



(I)

[式中、R¹及びR²は、同一又は異なって、ホルミル基又は2-カルボキシフェニルイミノメチル基を示し、R³~R⁶は、同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC₁~6アルキル基を示す]；

[化8]



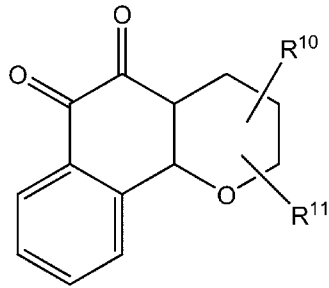
(II)

[式中、実線と破線で表わされる結合は単結合又は二重結合を示し、

R⁷及びR⁸は同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基を示す、R⁹は直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基を示す]

;

[化9]



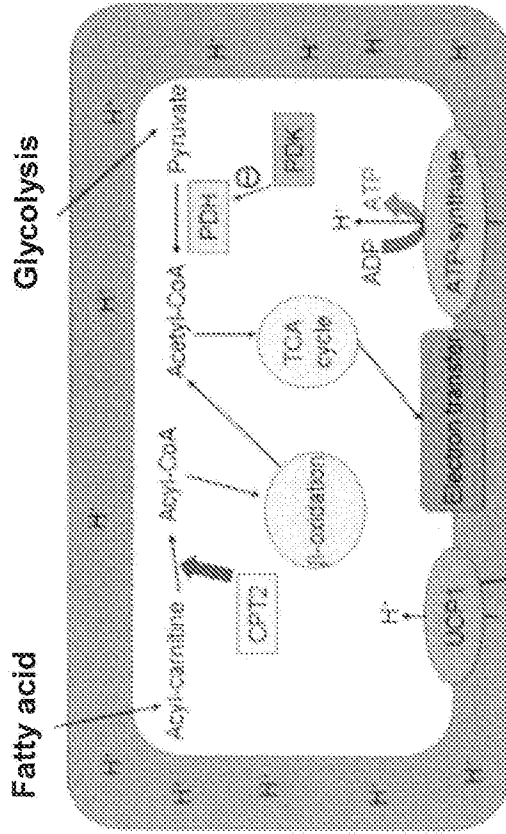
(III)

[式中、R¹⁰及びR¹¹は同一又は異なって、直鎖又は分岐状のC 1～6アルキル基を示す]。

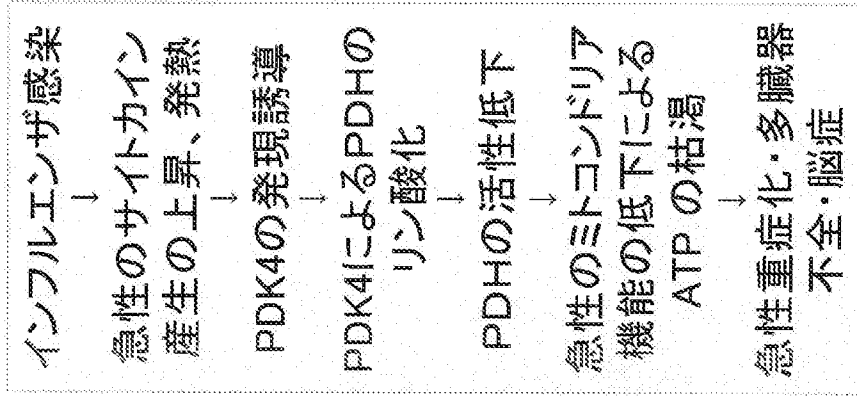
インフルエンザ感染による急性重症化機構と PDK 4 阻害剤による重症化防止

[図1]

インフルエンザ感染による急性の重症化機構の解析

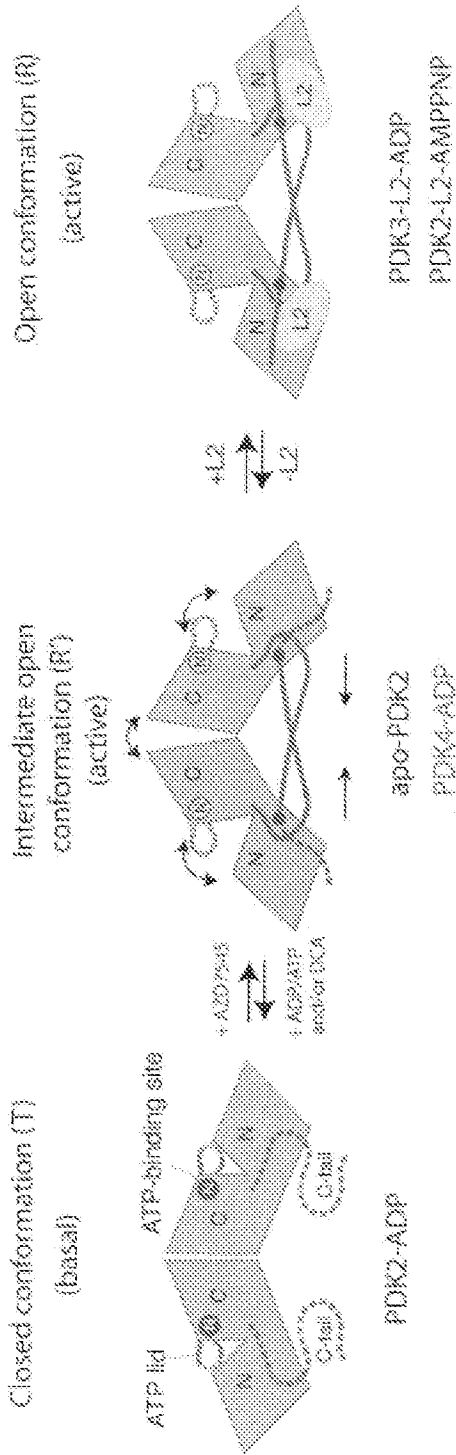


新規PDK4阻害剤の探索重症化マウスモデルでの効果



[図2]

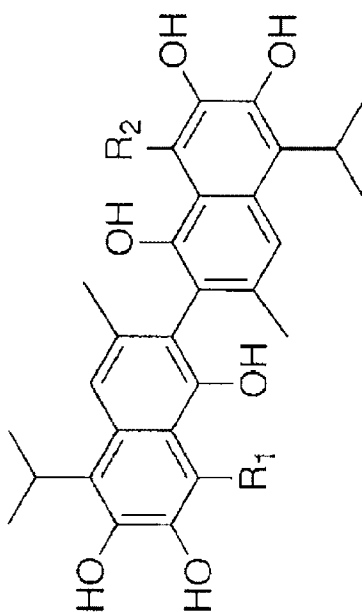
PDKアインゾイムの活性化状態



The metastable open conformation (the R' state) of PDK4 in equilibrium between the T state and the R state.

[図3]

KIS7, KIS28の構造とPDK4阻害活性



	R ₁	R ₂	PDK4 IC ₅₀ (μM)
KIS7 2,2'-bis-(Formyl-1,6,7-trihydroxy-5-isopropyl-3-methylnaphthalene) 別名: Gossypol	CHO	CHO	4.0
KIS28 (2-[(1E)-2-(7-{8-[(1E)-2-(2-carboxyphenyl)-2-azavinyl]-1,6,7-trihydroxy-3-methyl-5-(methylethyl)(2-naphthyl)}-2,3,8-trihydroxy-6-methyl-4-(methylethyl)naphthyl)-1-azavinyl]benzoic acid)			13.2

KIS7、KIS37、KIS116、KIS24と既存のPDK阻害剤の活性の比較 [図4]

KIS compounds: Potent inhibitors of PDK4

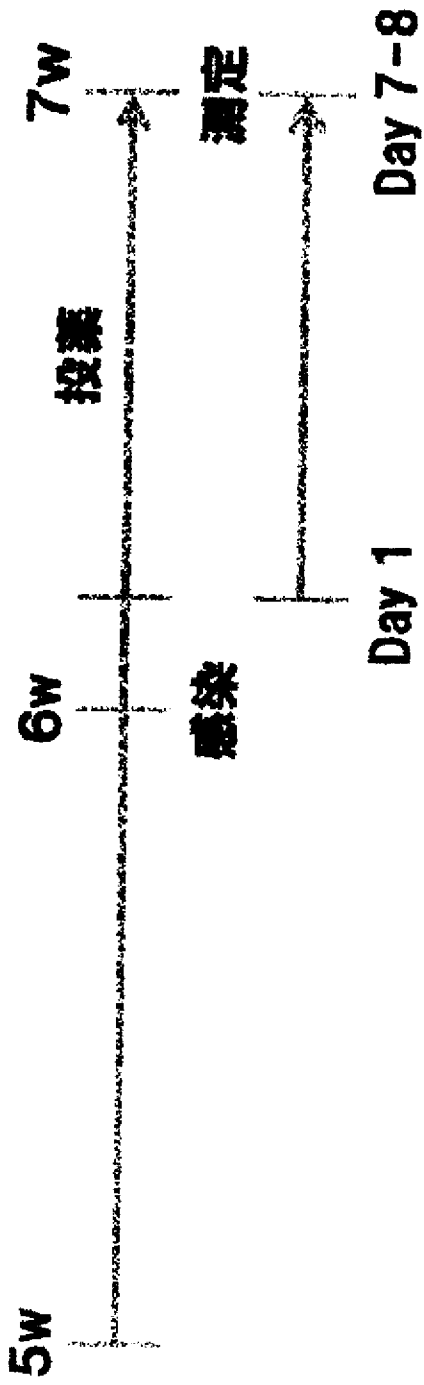
AZD7545 & related compounds inhibit PDK 2 but stimulated PDK4 paradoxically

✓ Compound	IC50 (µM)		PDK4
	PDK1	PDK2	
✓ AZD7545	0.037	0.066	increased.
✓ Compound K	0.015	0.001	increased.
✓ Novartis 3r	0.032	0.005	increased.
✓ DCA(Ki)	1000	200	500
• DCA	nt	610	330
• KIS7	nt	2	4
• KIS37	nt	> 34	11
• KIS116	nt	10	2
• KIS24	nt	78	3

- ✓ Phosphorylation of E1 subunit of PDH in the presence of 100 µM ATP, E2 subunit and Recombinant human PDK were used.
- Peptide substrate phosphorylation by Recombinant human PDK by gel shift assay

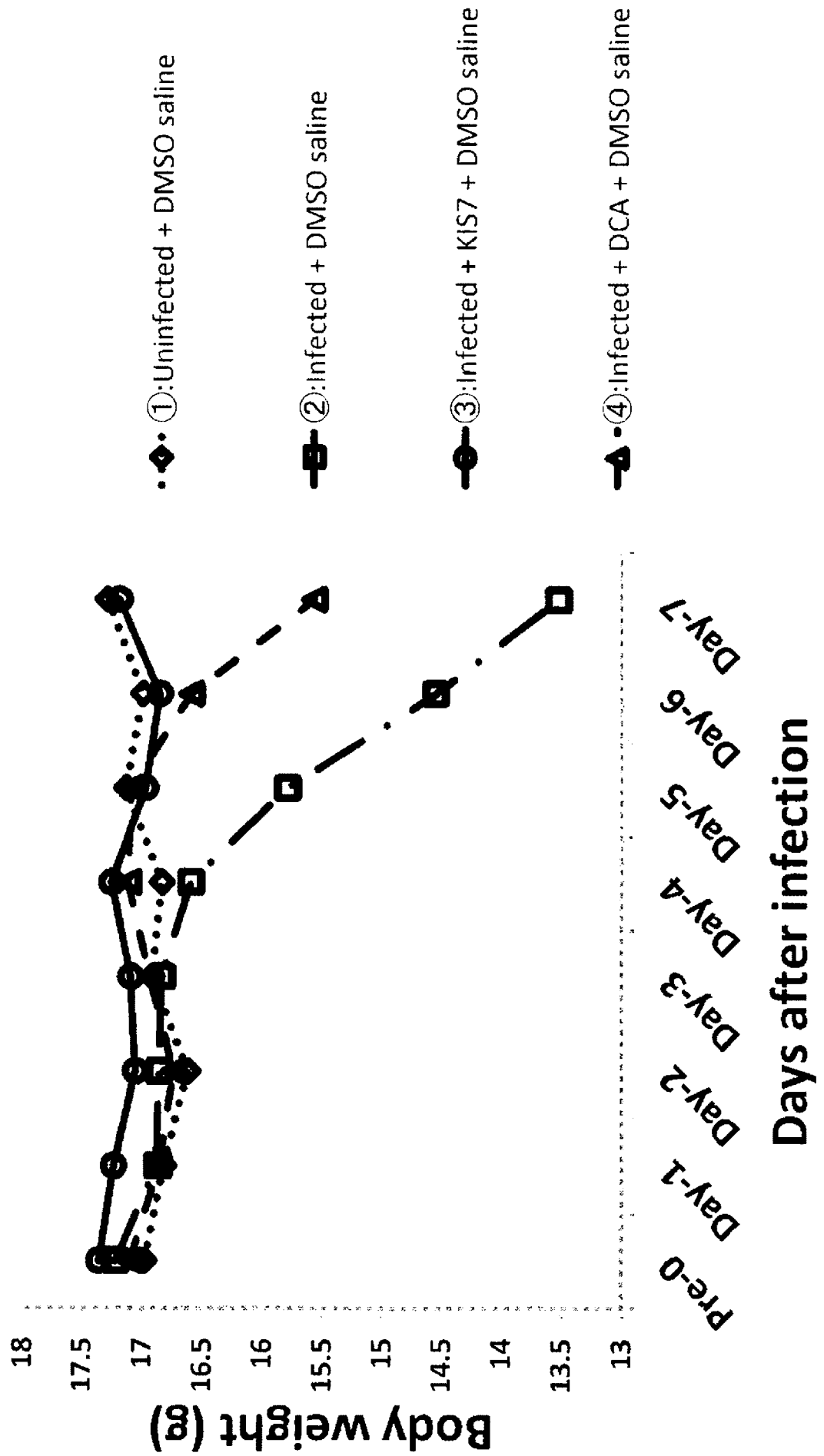
[図5]

インフルエンザ感染モデルマウス：KIS化合物投薬試験 スケジュール



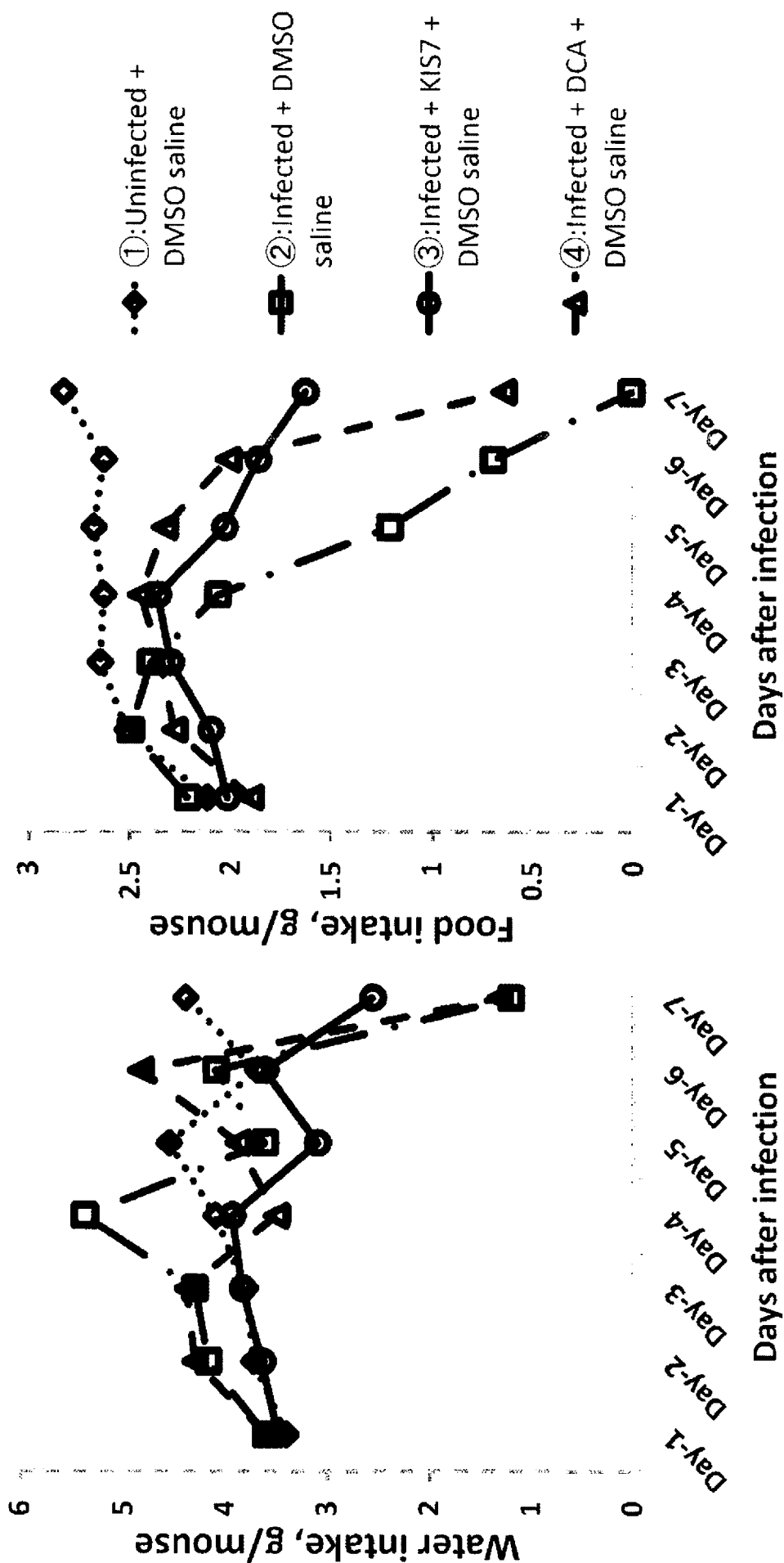
[図6]

KIS7とDCA投与による体重変化



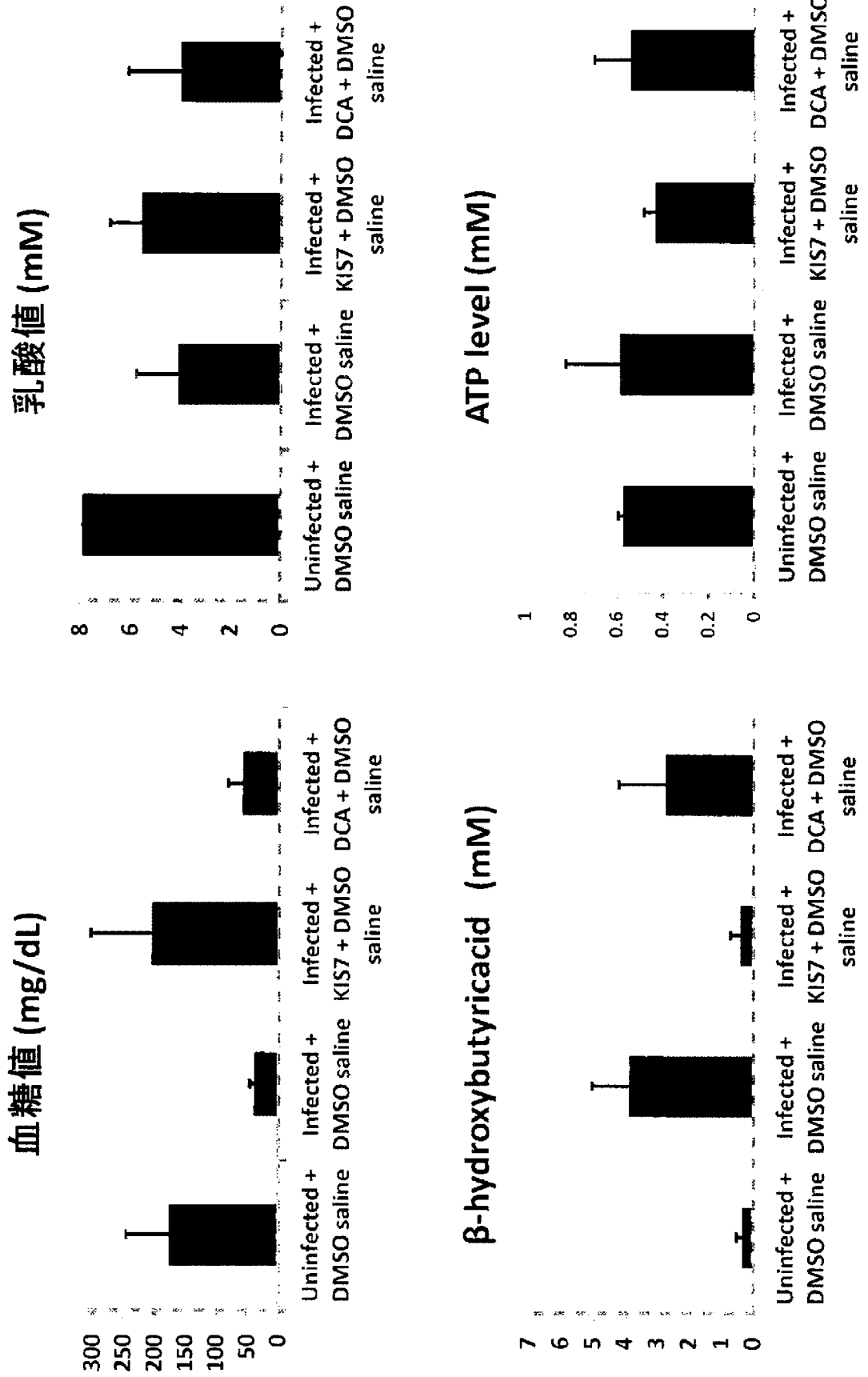
[図7]

KIS7とDCA投与による摂食、摂水変化



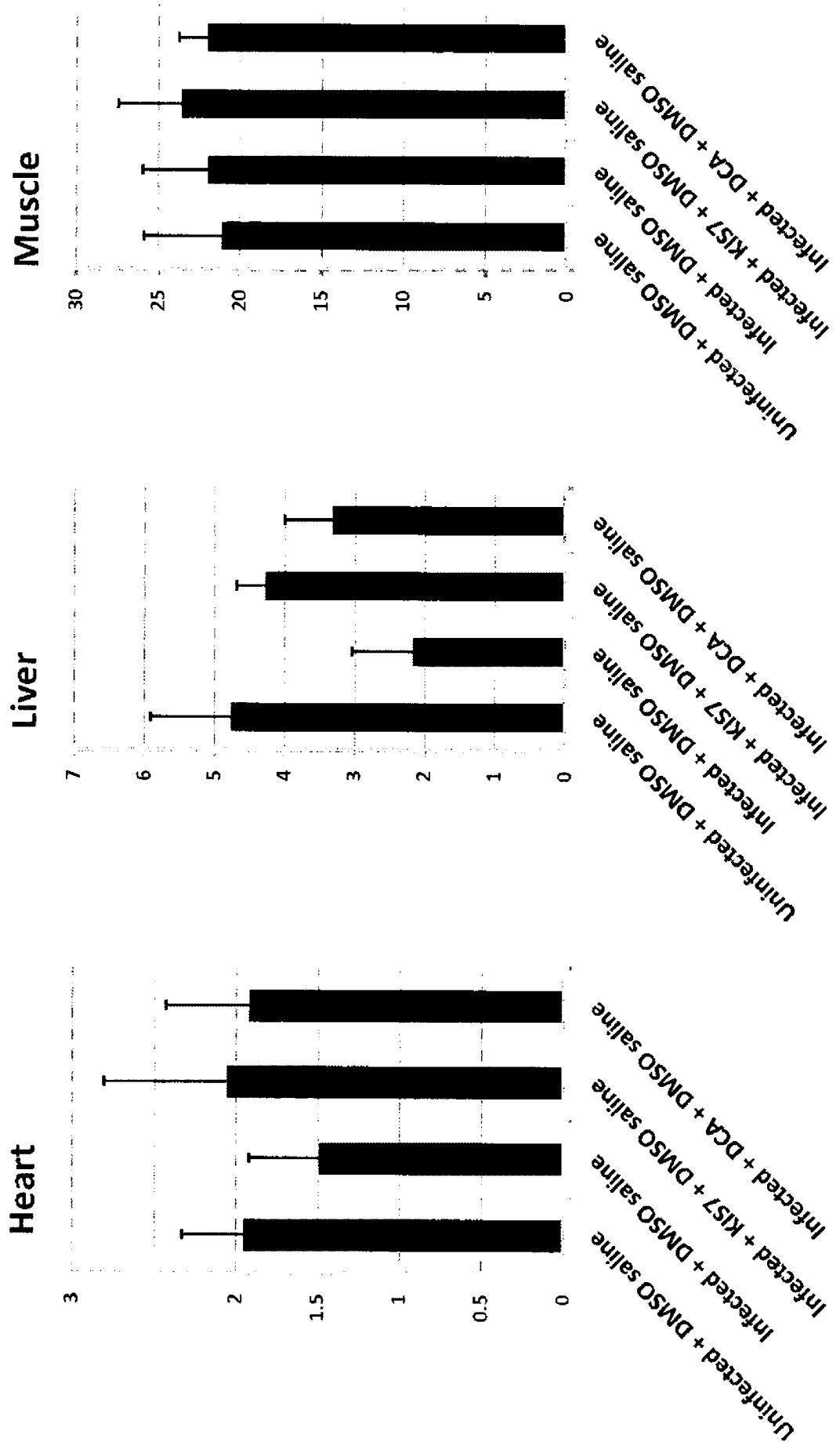
[図8]

KIS7とDCA投与による
血液パラメータ(血糖値、乳酸値、 β -ヒドロキシ酪酸、ATP)変化 7日目



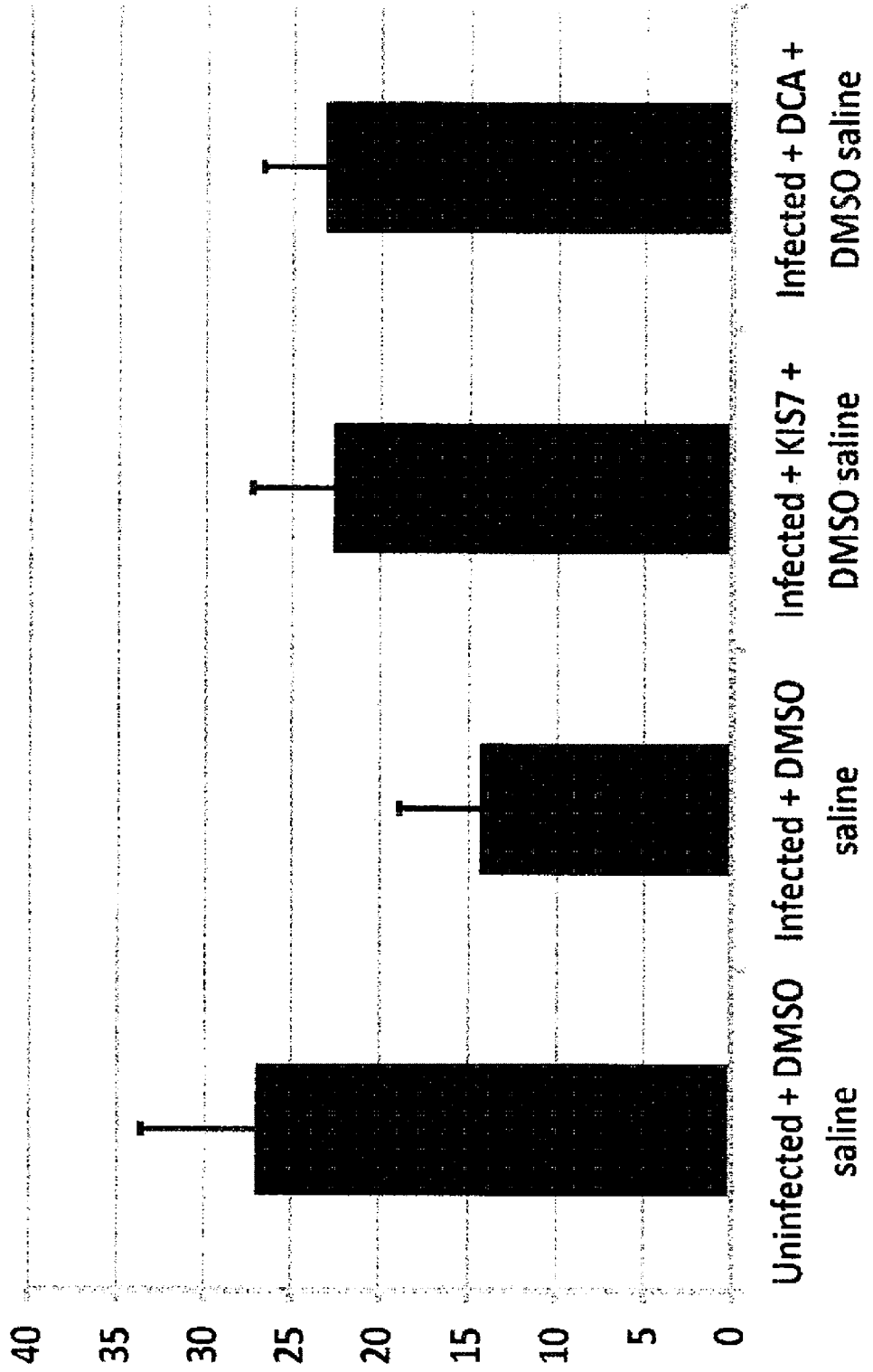
[図9]

KIS7とDCA投与による組織ATPの変化(μg/g wet tissue) 7日目



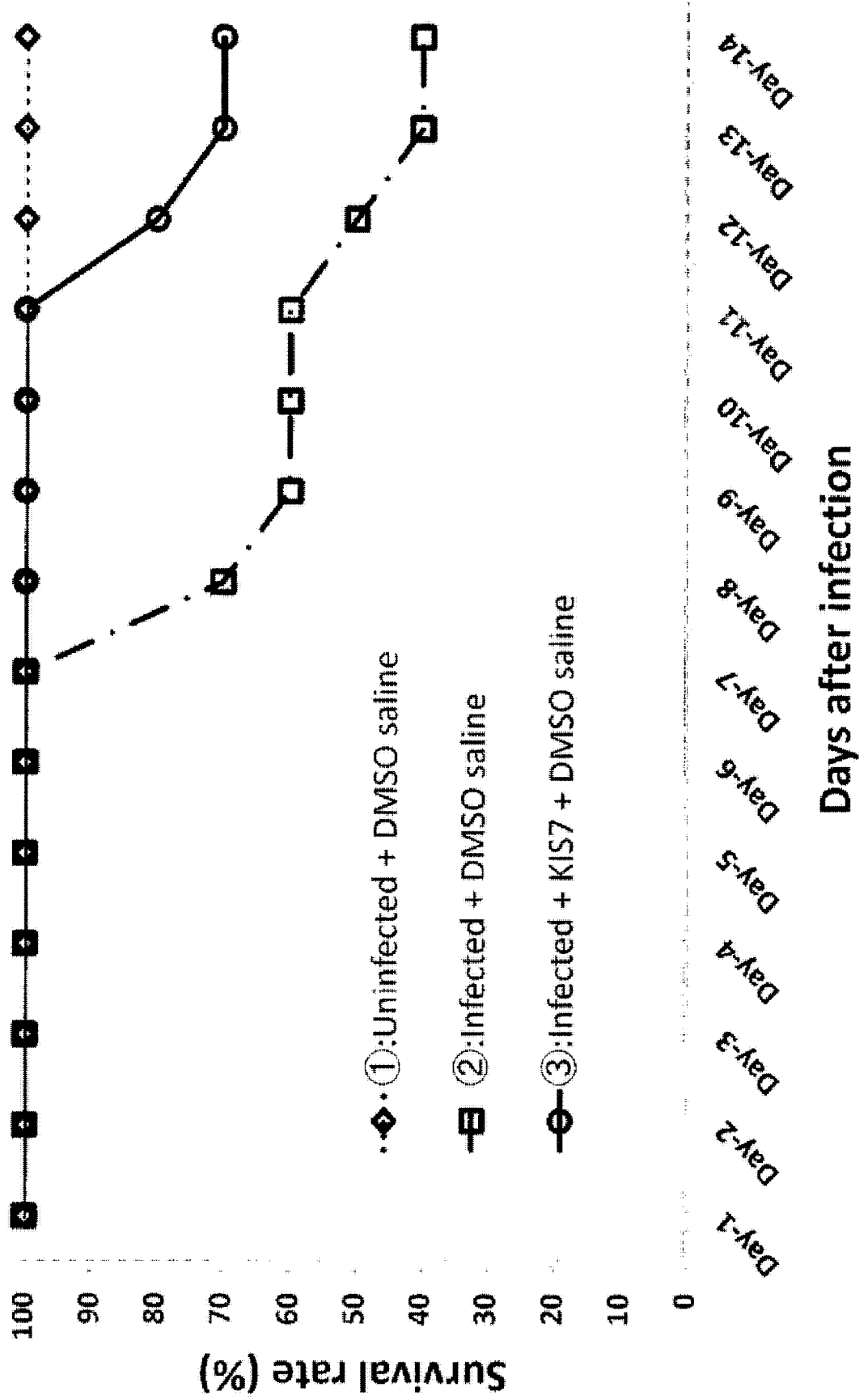
[図10]

KIS7とDCA投与による肝臓PDH活性
7日目 ($\mu\text{mol/g}$ wet tissue)
Liver PDH activity ($\Delta\text{mOD}/\text{min}$)



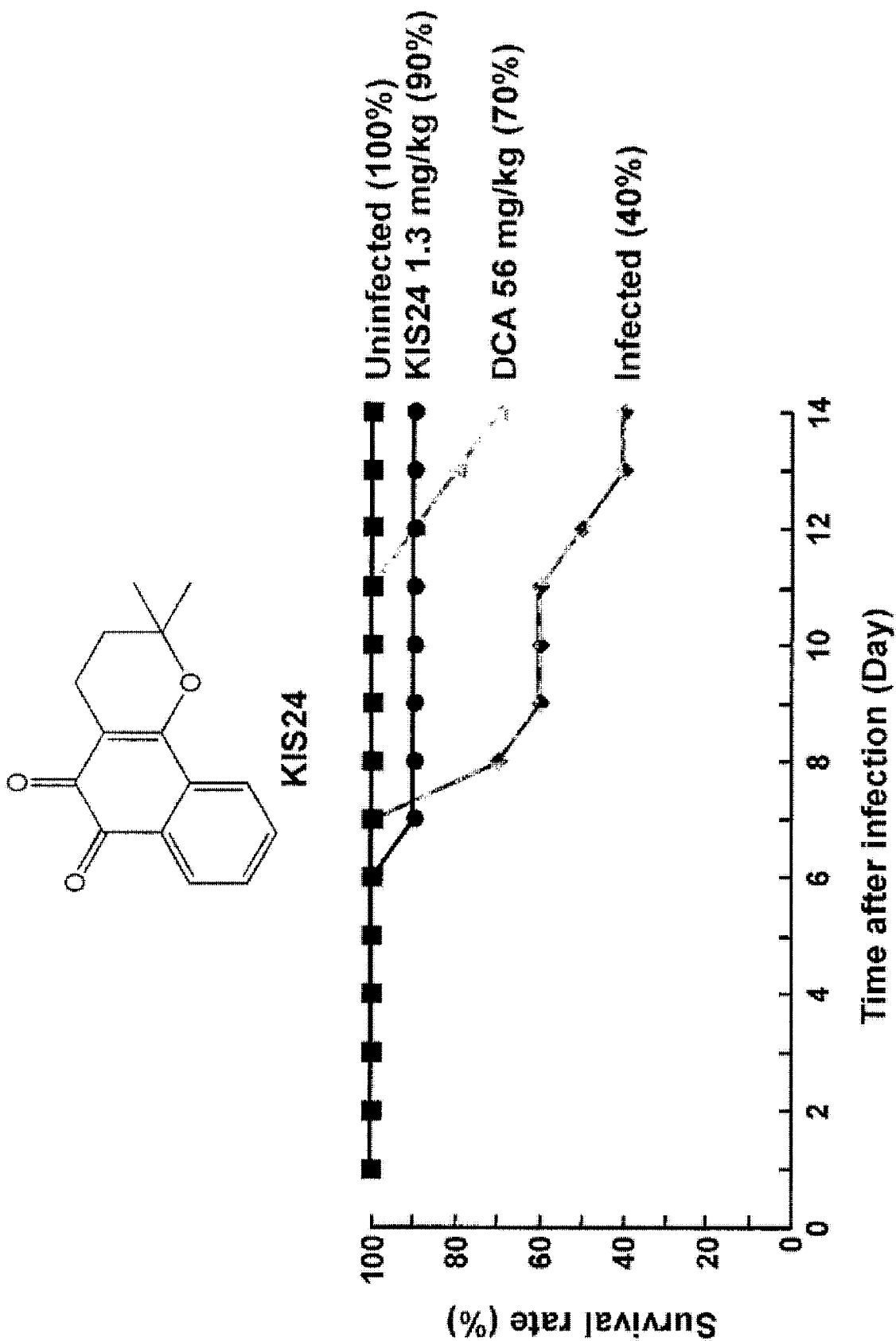
[図11]

KIS7とDCA投与による生存率 (14日まで)

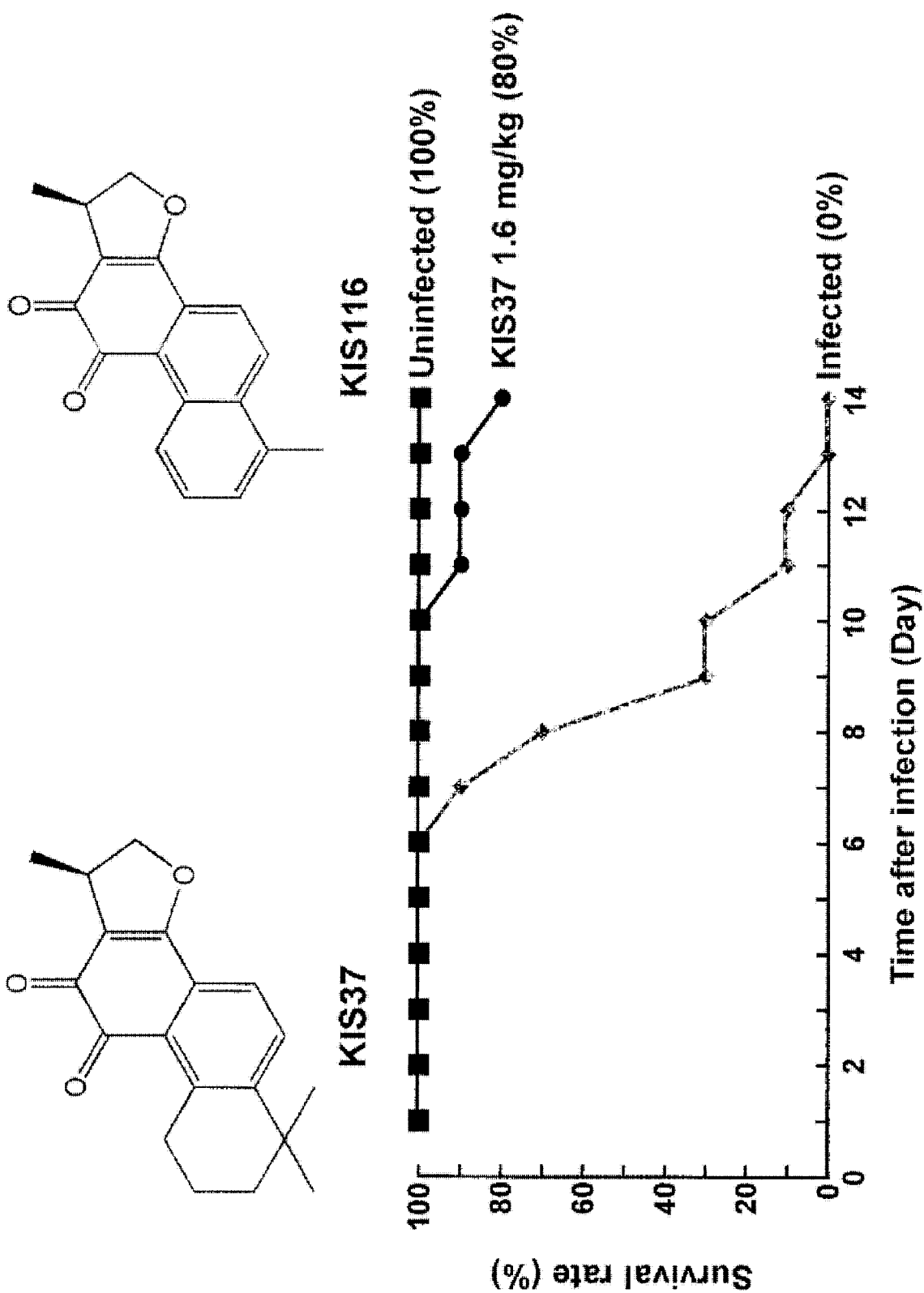


[図12]

KIS24の構造とインフルエンザ感染後14日間の生存率



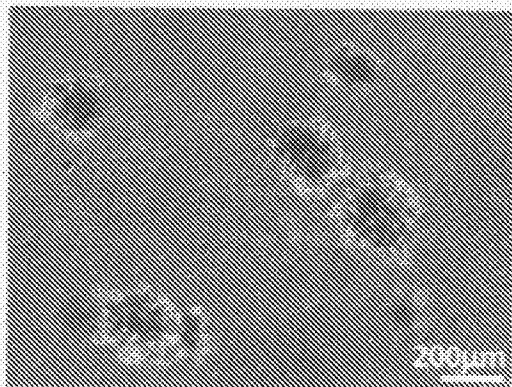
KIS37及びKIS116の構造とインフルエンザ感染後14日間の生存率 [図13]



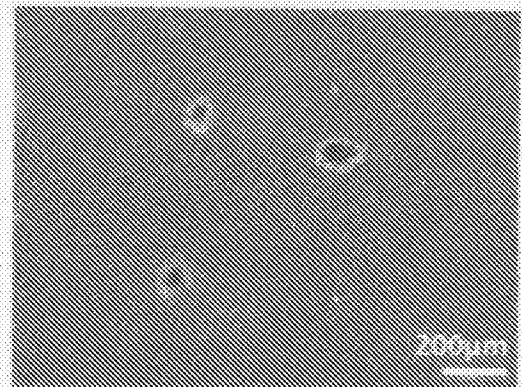
[図14]

癌細胞足場非依存性増殖に対するKIS7、KIS37及びKIS24の作用

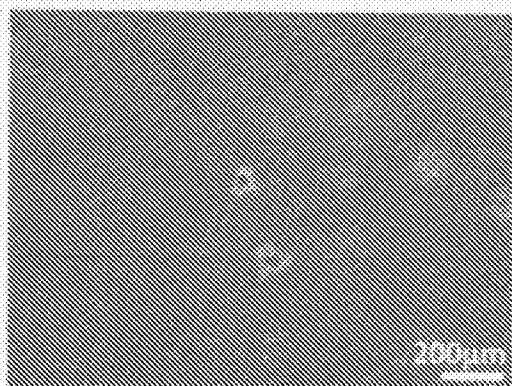
がん細胞の軟寒天中コロニー形成試験: HeLaS3, 8日培養



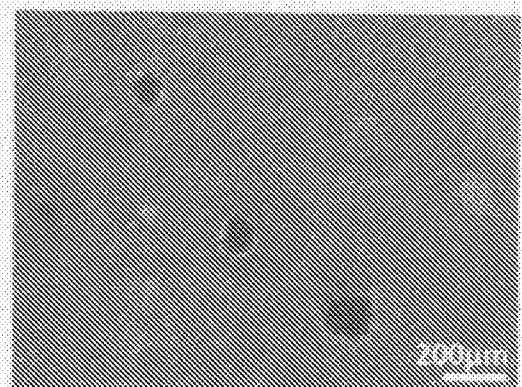
Control (0.3% DMSO)



KIS7 (3 μM)



KIS24 (3 μM)



KIS37 (3 μM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/002500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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)

A61K31/11, A61K8/35, A61K8/40, A61K8/49, A61K31/192, A61K31/343,
A61K31/352, A61P1/14, A61P3/02, A61P3/10, A61P31/16, A61P35/00, A61P43/00

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DORSETT, P.H., Antiviral activity of gossypol and apogossypol, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1975, 64, 6, 1073-1075	1-4
X Y	JP 2010-529023 A (Ascenta Therapeutics, Inc.), 26 August 2010 (26.08.2010), entire text & US 2009/0010878 A1 & EP 2152076 A1 & WO 2008/150506 A1	1-4, 8 9
X Y	JP 2007-517025 A (MD Bioalpha Co., Ltd.), 28 June 2007 (28.06.2007), entire text & US 2007/0248698 A1 & EP 1706108 A1 & WO 2005/063232 A1 & KR 10-2005-0071355 A & CN 1901900 A	1-3, 5-7 9

 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
14 May, 2013 (14.05.13)Date of mailing of the international search report
21 May, 2013 (21.05.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/002500

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-171765 A (Masahito HOASHI), 29 June 1999 (29.06.1999), entire text (Family: none)	1-4
X	JP 61-172870 A (Ciba-Geigy AG.), 04 August 1986 (04.08.1986), entire text & EP 183649 A1	1-4, 8
X Y	JP 2007-523192 A (Arqule, Inc.), 16 August 2007 (16.08.2007), entire text & US 2005/0187288 A1 & US 2005/0222246 A1 & EP 1722776 A2 & WO 2005/082358 A2	1-3, 8 9
X	JP 2008-530085 A (MD Bioalpha Co., Ltd.), 07 August 2008 (07.08.2008), entire text & US 2008/0146655 A1 & US 2009/0292011 A1 & EP 1848432 A1 & EP 2532388 A2 & EP 2532389 A2 & EP 2532390 A2 & WO 2006/088315 A1 & CN 101119726 A & KR 10-2006-0092106 A	1-3, 5-7
A	JP 2006-518343 A (Threshold Pharmaceuticals, Inc.), 10 August 2006 (10.08.2006), & US 2004/0167196 A1 & US 2005/0271723 A1 & US 2005/0272795 A1 & US 2005/0272796 A1 & US 2006/0172953 A1 & US 2004/0167079 A1 & US 2005/0245462 A1 & EP 1592430 A2 & WO 2004/064736 A2	1-9
A	JP 2010-241800 A (Kao Corp.), 28 October 2010 (28.10.2010), & US 2012/0010285 A1 & EP 2409696 A1 & WO 2010/106798 A1 & CN 102355898 A	1-9
A	DECHARY, J. M., Substituted arylimino derivatives of gossypol, Journal of the American Oil Chemists' Society, 1956, 33, 76-78, (abstract) STN [online], [retrieved on 13 May] CAPLUS ACC.NO.1956:26161	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/002500

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61K31/11(2006.01)i, A61K8/35(2006.01)i, A61K8/40(2006.01)i,
A61K8/49(2006.01)i, A61K31/192(2006.01)i, A61K31/343(2006.01)i,
A61K31/352(2006.01)i, A61P1/14(2006.01)i, A61P3/02(2006.01)i,
A61P3/10(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/002500

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions described in claims 1-9 relate to a PDK4 inhibitor, a pharmaceutical composition and a cosmetic composition each containing, as an active ingredient, a compound selected from compounds represented by general formulae (I) to (III) which have significantly different structures from one another.

(Continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/002500

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

However, a matter that the compounds represented by general formulae (I) to (III) have an anti-viral activity, an anti-cancer activity, an activity of increasing the activity of a mitochondrion and the like, which can also be achieved through the inhibition of PDK4, and the compounds can be added to compositions is known and disclosed in many documents (see, for example, JP 2010-529023 A, JP 2007-517025 A, JP 61-172870 A), and an agent capable of inhibiting PDK4 is also known to the persons skilled in the art (see, for example, JP 2010-241800 A). In view of these facts, it is considered that the inventions described in claims 1-9 include three inventions (i.e., an invention in which general formula (I) is used as an active ingredient, an invention in which general formula (II) is used as an active ingredient, and an invention in which general formula (III) is used as an active ingredient) which do not have at least the same or corresponding special technical feature.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照		
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. A61K31/11, A61K8/35, A61K8/40, A61K8/49, A61K31/192, A61K31/343, A61K31/352, A61P1/14, A61P3/02, A61P3/10, A61P31/16, A61P35/00, A61P43/00		
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 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013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/REGISTRY (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)		
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 請求項の番号
X	DORSETT, P. H., Antiviral activity of gossypol and apogossypol, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1975, 64, 6, 1073-1075	1-4
X Y	JP 2010-529023 A (アセンタ セラピューティックス インコーポレイティッド) 2010.08.26, 全文 & US 2009/0010878 A1 & EP 2152076 A1 & WO 2008/150506 A1	1-4, 8 9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 14.05.2013	国際調査報告の発送日 21.05.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 福井 悟 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 9160

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 請求項の番号
X Y	JP 2007-517025 A (エムディー バイオアルファ カンパニー リミテッド) 2007.06.28, 全文 & US 2007/0248698 A1 & EP 1706108 A1 & WO 2005/063232 A1 & KR 10-2005-0071355 A & CN 1901900 A	1-3, 5-7 9
X	JP 11-171765 A (保芦 将人) 1999.06.29, 全文 (ファミリーなし)	1-4
X	JP 61-172870 A (チバ・ガイギー・アクチエンゲゼルシャフト) 1986.08.04, 全文 & EP 183649 A1	1-4, 8
X Y	JP 2007-523192 A (アークル・インコーポレーテッド) 2007.08.16, 全文 & US 2005/0187288 A1 & US 2005/0222246 A1 & EP 1722776 A2 & WO 2005/082358 A2	1-3, 8 9
X	JP 2008-530085 A (エムディー バイオアルファ カンパニー リミテッド) 2008.08.07, 全文 & US 2008/0146655 A1 & US 2009/0292011 A1 & EP 1848432 A1 & EP 2532388 A2 & EP 2532389 A2 & EP 2532390 A2 & WO 2006/088315 A1 & CN 101119726 A & KR 10-2006-0092106 A	1-3, 5-7
A	JP 2006-518343 A (スレッシュールド ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 2006.08.10, & US 2004/0167196 A1 & US 2005/0271723 A1 & US 2005/0272795 A1 & US 2005/0272796 A1 & US 2006/0172953 A1 & US 2004/0167079 A1 & US 2005/0245462 A1 & EP 1592430 A2 & WO 2004/064736 A2	1-9
A	JP 2010-241800 A (花王株式会社) 2010.10.28, & US 2012/0010285 A1 & EP 2409696 A1 & WO 2010/106798 A1 & CN 102355898 A	1-9
A	DECHARY, J. M., Substituted arylimino derivatives of gossypol, Journal of the American Oil Chemists' Society, 1956, 33, 76-78, (abstract) STN [online] [retrieved on 13 May] CAPLUS ACC. NO. 1956:26161	1-9

発明の属する分野の分類

A61K31/11(2006.01)i, A61K8/35(2006.01)i, A61K8/40(2006.01)i, A61K8/49(2006.01)i,
A61K31/192(2006.01)i, A61K31/343(2006.01)i, A61K31/352(2006.01)i,
A61P1/14(2006.01)i, A61P3/02(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1-9に係る発明は、化学構造が顕著に異なる一般式(I)～(III)に記載の化合物を有効成分とするPDK4阻害剤、医薬組成物、化粧品組成物に関するものである。

しかし、一般式(I)～(III)に記載の化合物が、PDK4の阻害によっても得られる抗ウイルス作用、抗癌作用、ミトコンドリアの活性上昇作用等を有し、組成物に配合すること自体も多数知られていること（例えば、JP2010-529023A、JP2007-517025A、JP61-172870Aを参照。）、PDK4を阻害する剤も当業者に知られていること（例えば、JP2010-241800Aを参照。）からすると、請求項1-9に係る発明は、少なくとも同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しない3つの発明（一般式(I)を有効成分とする発明、一般式(II)を有効成分とする発明、一般式(III)を有効成分とする発明）を含むものといえる。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。