

(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
2010年3月4日(04.03.2010)

PCT

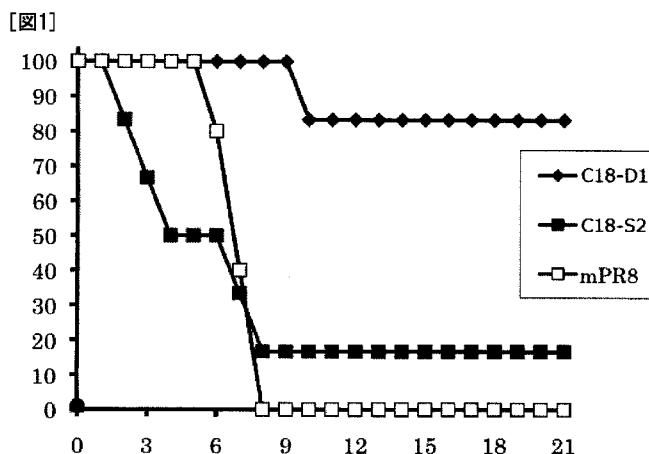
(10) 国際公開番号
WO 2010/024108 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 7/08 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/064012
- (22) 国際出願日: 2009年8月7日(07.08.2009)
- (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 2008-222062 2008年8月29日(29.08.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45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): 佐藤 智典 (SATO, Toshinori) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 石原 豪史 (ISHIHARA, Goshi) [JP/JP]; 〒1570074 東京都世田谷区大蔵1-9-23-203 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (Sae-gusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC AGENT FOR INFLUENZA VIRUS INFECTION

(54) 発明の名称: インフルエンザウイルス感染症の予防ないし治療剤



(57) Abstract: Disclosed is a self-assembled product of a compound represented by formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof. R¹-Gly Leu Ala Met Ala Pro Ser Val Gly His Val Arg Gln His Gly-R² (I) [In the formula, R¹ represents a linear or branched acyl group having 14 to 24 carbon atoms; R² represents OH, NH₂, NR³R⁴, a substituted or unsubstituted alkoxy group, a substituted or unsubstituted aryloxy group, or a substituted or unsubstituted aralkyloxy group; and R³ and R⁴ independently represent a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted aryl group, a substituted or unsubstituted aralkyl group, an alkoxy group, or a hydroxy group, provided that both R³ and R⁴ do not represent a hydroxy group or an alkoxy group simultaneously.]

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2010/024108 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

本発明は、式 I: (式中、 R^1 は炭素数 14~24 の直鎖又は分岐を有するアシル基を示す。 R^2 は OH、 NH_2 、 NR^3R^4 、置換または非置換のアルコキシ基、置換または非置換のアリールオキシ基、置換または非置換のアラルキルオキシ基を示す。 R^3 、 R^4 は同一または異なって、置換または非置換のアルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアラルキル基、アルコキシ基、水酸基が挙げられる。ただし、 R^3 と R^4 は同時に水酸基、アルコキシ基となることはない。) で示される化合物又はその薬学的に許容される塩の自己集合体を提供する。

明 細 書

発明の名称： インフルエンザウイルス感染症の予防ないし治療剤 技術分野

[0001] 本発明は、インフルエンザウイルス感染症(インフルエンザ)の予防もしくは治療作用を有する物質、およびインフルエンザウイルス感染症の予防ないし治療剤に関する。また、本発明は、インフルエンザウイルス感染症(インフルエンザ)の予防もしくは治療方法に関する。

背景技術

[0002] インフルエンザウイルス膜にはヘマグルチニン(HA)及びノイラミニダーゼ(NA、シアリダーゼ)といった2種類のスパイク糖蛋白質が存在し、それぞれウイルスの感染成立及びウイルスの宿主細胞からの出芽に重要な役割を果たしている。

[0003] インフルエンザウイルス感染の第1ステップに関与するヘマグルチニンには、極めて変異しやすい抗原決定領域(A~E)のアミノ酸配列の多様性に基づいて、種々の亜型が存在する。ヘマグルチニンの亜型間のアミノ酸配列の相違は25~75%にわたるが、宿主細胞の受容体と結合するいわゆる受容体結合ポケット領域は、比較的変異がなく、その三次元構造はよく保存されている(非特許文献1)。

[0004] 従来から、インフルエンザウイルスの感染を防止するために、感染成立に寄与するヘマグルチニンに特異的に結合することによってその働きを阻害する作用を有するワクチンの開発が検討されている。

[0005] 例えば、特許文献1は、インフルエンザウイルスの感染を防止するためのペプチド、特にリポソーム製剤について記載し、インビトロにおいてリポソーム製剤の効果を確認している。

[0006] また、特許文献2の図1には、H3G-1のペプチドがH1N1とH3N2の両方に阻害効果を有することが示されているが、その作用は弱いものであった。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2002-284798

特許文献2：特開2006-101709

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Y. Suzuki, Prog. Lipid. Res., 33, 429 (1994)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、インフルエンザウイルス感染症(インフルエンザ)の予防ないし治療効果が高い物質を提供することを目的とする。

[0010] また、本発明は、インフルエンザウイルスの予防ないし治療剤を提供することを目的とする。

[0011] さらに、本発明はインフルエンザウイルスの予防ないし治療方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者は、配列番号1に記載のステアロイル化ペプチドについて、抗インフルエンザウイルス作用をさらに検討したところ、当該ペプチドはリポソーム製剤ではH3N2のみに抗インフルエンザウイルス作用を有するが、自己集合体ではH1亜型、H3亜型、H5亜型、H7亜型を含む広範囲のインフルエンザウイルスに対しより有効性が高いことを見出した。さらに、ペプチドのN末端を炭素数14～24のアシル基でアシル化することによりペプチドの自己集合体が得られることを見出した。

[0013] 本発明は、以下の自己集合体及びインフルエンザウイルス感染症の予防ないし治療剤を提供するものである。

項1. 式I：



(式中、R¹は炭素数14～24の直鎖又は分岐を有するアシル基を示す。R²はOH、NH₂、NR³R⁴、置換または非置換のアルコキシ基、置換または非置換の

アリールオキシ基、置換または非置換のアラルキルオキシ基を示す。R³、R⁴は同一または異なって、置換または非置換のアルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアラルキル基、アルコキシ基、水酸基が挙げられる。ただし、R³とR⁴は同時に水酸基、アルコキシ基となることはない。))

で示される化合物又はその薬学的に許容される塩の自己集合体。

項 2. R¹はステアロイル基、パルミトイル基、オレオイル基またはパルミトオレオイル基を示す、項 1 に記載の自己集合体。

項 3. R²はOHまたはNH₂を示す、項 1 に記載の自己集合体。

項 4. R¹はステアロイル基を示し、R²はOHまたはNH₂を示す、項 1 に記載の自己集合体。

項 5. 前記自己集合体が凍結乾燥物の形態である、項 1 ~ 4 のいずれかに記載の自己集合体。

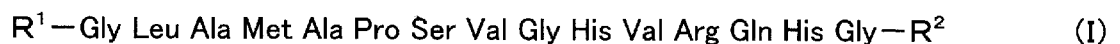
項 6. 項 1 ~ 5 のいずれかに記載の自己集合体を含むインフルエンザウイルスの感染症の予防又は治療剤。

項 7. インフルエンザウイルスがH1亜型、H3亜型、H5亜型またはH7亜型である、項 6 に記載の予防又は治療剤。

項 8. インフルエンザウイルスがH1亜型またはH3亜型インフルエンザウイルスである、項 6 に記載の予防又は治療剤。

項 9. インフルエンザウイルスがH1亜型インフルエンザウイルスである、項 6 に記載の予防又は治療剤。

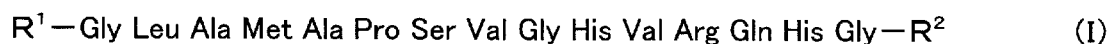
項 10. 式 I :



(式中、R¹はステアロイル基を示し、R²はNH₂を示す。)

で示される化合物又はその薬学的に許容される塩、もしくはその自己集合体。

項 11. 式 I :



(式中、R¹は炭素数14~24の直鎖又は分岐を有するアシル基を示す。R²はO、NH₂、NR³R⁴、置換または非置換のアルコキシ基、置換または非置換のアリールオキシ基、置換または非置換のアラルキルオキシ基を示す。R³、R⁴は同一または異なって、置換または非置換のアルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアラルキル基、アルコキシ基、水酸基が挙げられる。ただし、R³とR⁴は同時に水酸基、アルコキシ基となることはない。)

で示される化合物又はその薬学的に許容される塩もしくはその自己集合体の有効量をインフルエンザウイルスに感染した患者もしくは感染する可能性のある被験体に投与することを包含する、インフルエンザウイルス感染症の予防又は治療方法。

発明の効果

- [0014] 本発明によれば、インフルエンザ/インフルエンザウイルス感染症に対する強力な予防ないし治療剤を得ることができる。
- [0015] 配列番号2のペプチドは、in vitroでは強い効果を有するが、in vivoでは効果がないだけでなく、むしろインフルエンザウイルス感染を増悪する効果を有する。
- [0016] 一方、本発明の式(I)のN-アシル化ペプチド(特に配列番号2のペプチド)は、in vitroで強い効果を有するだけでなく、in vivoでも強力なインフルエンザウイルスに対する予防ないし治療効果を有する。
- [0017] また、C18D1 (ステアロイル-GLAMAPSVGHVRQHG-NH₂) は、リポソームに組み込むとH1型およびH3型インフルエンザウイルスに対するIC₅₀はともに約500 μMと非常に低く、実質的に抗インフルエンザウイルス効果を有しないが、自己集合体にすることにより非常に強い効果を有する。

図面の簡単な説明

- [0018] [図1] C18-D1によるインフルエンザウイルス感染マウスでのペプチド投与による延命効果。C18-D1 (C18-GLAMAPSVGHVRQHG-NH₂)、C18-S2 (C18-ARLPRTMVHPKPAQP-NH₂)。ペプチド投与量は、C18-D1 (17.4mg/kg)、C18-S2 (19.4mg/kg) であ

る。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明では、以下の式 I の化合物又はその薬学的に許容される塩の自己集合体をインフルエンザウイルス感染症の予防ないし治療剤として用いることができる。



(式中、 R^1 は炭素数14~24の直鎖又は分岐を有するアシル基を示す。 R^2 はO、H、 NH_2 、 NR^3R^4 、置換または非置換のアルコキシ基、置換または非置換のアリールオキシ基、置換または非置換のアラルキルオキシ基を示す。 R^3 、 R^4 は同一または異なって、置換または非置換のアルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアラルキル基、アルコキシ基、水酸基が挙げられる。ただし、 R^3 と R^4 は同時に水酸基、アルコキシ基となることはない。)

[0020] 本発明の化合物は、式Iの化合物を自己集合体とすることで、インフルエンザウイルス感染症の予防ないし治療作用を増強できるだけでなく、H1亜型(例えばH1N1、H1N2)、H3亜型(例えばH3N2)、H5亜型(例えばH5N1型)、H7亜型(例えばH7N1型)を含む広範囲のインフルエンザウイルスに対する有効性を獲得することができる。

[0021] 本発明の自己集合体は、実施例に示されるようにH1亜型、H3亜型に有効であることが実証されている。式Iの化合物の自己集合体は、H1亜型とH3亜型の両方に有効であるので、ヘマグルチニンの亜型間で比較的変異がなく、その三次元構造がよく保存されている宿主細胞の受容体結合ポケット領域に結合して抗インフルエンザウイルス作用を発現していると考えられる。従って、本発明の式Iの化合物の自己集合体は、インフルエンザウイルスのH1亜型、H3亜型だけでなく、受容体結合ポケット領域が共通するH5亜型、H7亜型の感染症に対しても有効である。

[0022] また、本発明の自己集合体は、インビトロだけでなく、インビボでも有効である。例えばS2 (ARLPRTMVHPKPAQP-NH₂) のN末端をステアロイル化したC18-S2

(ステアロイル-ARLPRTMVHPKPAQP-NH₂)は、インビトロでは強力な抗インフルエンザウイルス作用を有するが、インビボでは有効でないだけでなく、インフルエンザウイルス感染による死亡を早める傾向を有する。このように、抗インフルエンザウイルス作用はインビボとインビトロでは大きく異なっており、本発明のペプチドはインビトロだけでなくインビボでも抗インフルエンザウイルス作用を有することが特徴の1つである。

[0023] 本発明の自己集合体は、R¹で表されるアシル基の部分の内側に向け、ペプチド部分を外側に向けたミセル様の構造を有するものであり、リポソーム製剤では、リン脂質が主要な構成要素となるリポソームを形成するため式Iの化合物の自己集合体は形成することができない。また、特許文献1の実施例で得られているのは、C末端がカルボキシル基(COOH)であるN末端のステアロイル化(C18)ペプチドであり、C末端がアミド(CONH₂)である本願のステアロイル化ペプチドは開示されていない。

[0024] 特許文献1はR¹がステアロイル基であり、R²がOHである式Iの化合物の生成とそのリポソーム製剤のみが開示され、自己集合体は得られていない。理論に拘束されることを望むものではないが、特許文献1は、式Iの化合物のリポソーム製剤がH3亜型(H3N2)にのみ有効でありH1亜型(H1N1)には効果がないことを示しているので、本発明の式Iの化合物の自己集合体の広範囲のインフルエンザウイルスに対する効果は、自己集合体の構造に起因しているものと本発明者は考えている。

[0025] なお、特許文献2の図1においてH3G-1として記載されている、N末端がアシル化されていない(R¹=H)式(I)のペプチドは、H1N1型のインフルエンザウイルスに対するプラークアッセイでのIC₅₀が>100 μMであり、インフルエンザウイルスの感染阻害効果は非常に弱いものとなる。R¹=Hである式(I)のペプチドは自己集合体を形成できないので、自己集合体の構造が重要であると本発明者は考える。

[0026] 式Iの化合物の自己集合体は、式Iの化合物を水に溶解し、必要に応じて攪拌することで製造することができる。自己集合体を形成するときの水溶液中

の濃度は臨界ミセル濃度が約0.5~約2 μ M(例えばR¹=ステアロイル基の場合約1.3 μ M)であるので、この臨界ミセル濃度以上の濃度で式Iの化合物を水に溶解することで自己集合体を製造できる。式Iの化合物の濃度が大きくなるほど、自己集合体の平均粒径は大きくなる傾向にある。式Iの化合物の自己集合体の平均粒径は、約100nm以上であるのがよく、例えば約100nm~約20 μ m程度、好ましくは約300nm~約10 μ m程度、より好ましくは約500nm~約7 μ m程度、特に好ましくは約700nm~約5 μ m程度である。

- [0027] 本明細書において、自己集合体は、水に溶解して得られた、すなわち水に分散された状態であってもよく、その凍結乾燥物のように水と接触した場合に容易に自己集合体を再生するものを広く包含する。
- [0028] 本明細書において、アシル基としては、炭素数14~24の直鎖または分岐を有し、水酸基で置換されていてもよいアシル基、例えばミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、アラキノイル基、ベヘノイル基、リグノセロイル基、ミリストオレオイル基、パルミトオレオイル基、オレオイル基、リノレオイル基、 γ リノレノイル基、 α リノレノイル基、アラキドイル基、エライドイル基、エイコサトリエノイル基、イソステアロイル基、12-ヒドロキシステアロイル基、リシノレオイル基などが挙げられる。
- [0029] これらのR¹基は、対応する炭素数14~24、好ましくは炭素数16~22、より好ましくは炭素数16~20、特に炭素数18~20の直鎖または分岐を有し、水酸基で置換されていてもよい高級脂肪酸であるミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキシン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、ミリストオレイン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ リノレン酸、 α リノレン酸、アラキドン酸、エライジン酸、エイコサトリエノイン酸、イソステアリン酸、12-ヒドロキシステアリン酸、リシノレイン酸などの酸クロライド、酸無水物、活性エステル、あるいはDIC(ジイソプロピルカルボジイミド)、DCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド)などのカップリング試薬と対応するカルボン酸をGly Leu Ala Met Ala Pro Ser Val Gly His Val Arg Gln His Gly-R²(R²は前記に定義されるとおりである)で表されるペプチドと反応

させることにより得ることができる。

- [0030] $R^1=H$ である式Iの化合物は、自己集合体形成能がないために本発明の化合物よりも抗インフルエンザウイルス作用は非常に弱い。また、 R^1 =ラウリル基(C12)である式Iの化合物は、自己集合体形成能が低いためにインビトロの試験では活性が非常に弱い。一方、 $R^1=C14$ (ミリストイル)であるポリペプチドは中程度の活性を有する。 $R^1=C16\sim C22$ であるポリペプチドは強い活性を有する。なお、 R^1 の炭素数が20を超えると得られるペプチドの水溶性が低下するので、 R^1 の炭素数は、好ましくは16~20、特に18~20である。
- [0031] 本明細書において、アルキル基としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどの炭素数1~6、好ましくは炭素数1~4のアルキル基が挙げられる。アルキル基の置換基としては、水酸基、フッ素原子、メトキシ基、エトキシ基などが挙げられる。
- [0032] アリール基としては、フェニル、ナフチル、フルオレニル、アントリル、ビフェニリル、テトラヒドロナフチル、クロマニル、2,3-ジヒドロ-1,4-ジオキサナフタレニル、インダニル及びフェナントリルが挙げられる。
- [0033] アラルキル基の具体例としては、ベンジル、ナフチルメチル、フルオレニルメチル、アントリルメチル、ビフェニリルメチル、テトラヒドロナフチルメチル、クロマニルメチル、2,3-ジヒドロ-1,4-ジオキサナフタレニルメチル、インダニルメチル及びフェナントリルメチル、フェネチル、ナフチルエチル、フルオレニルエチル、アントリルエチル、ビフェニリルエチル、テトラヒドロナフチルエチル、クロマニルエチル、2,3-ジヒドロ-1,4-ジオキサナフタレニルエチル、インダニルエチル及びフェナントリルエチルが挙げられる。
- [0034] アルコキシ基としては、O-(アルキル)が挙げられ、アルキルは前記に定義されたとおりである。アルコキシ基の置換基としては、水酸基、フッ素原子、メトキシ基、エトキシ基などが挙げられる。

- [0035] アリールオキシとしては、O-(アリール)が挙げられ、アリールは前記に定義されたとおりである。
- [0036] アラルキルオキシとしては、O-(アラルキル)が挙げられ、アラルキルは前記に定義されたとおりである。
- [0037] アルキル基の置換基としては、フッ素原子、アルコキシ基、シアノ、ヒドロキシなどが挙げられる。
- [0038] アリール基、アラルキル基、アリールオキシ基などのアリール部分、アラルキルオキシ基などのアラルキル部分の置換基としては、ハロゲン原子 (F, Cl, Br, I)、ニトロ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アセチル、メチレンジオキシ、アルキル、アルコキシ、カルバモイル、アセチルアミノなどが挙げられ、置換基の数は1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個である。
- [0039] R^2 は、OH、 NH_2 、 NR^3R^4 (R^3 、 R^4 は前記に定義されるとおりである)、アルコキシが好ましい。
- [0040] 本明細書において、式Iの化合物は、Fmoc法などのペプチド合成の常法に従い、液相合成または固相合成により $R^1=H$ 、 $R^2=$ 各基である化合物 (H-Gly Leu Ala Met Ala Pro Ser Val Gly His Val Arg Gln His Gly- R^2) を合成し、 R^1 のアシル基をDICなどのカップリング試薬を用いて導入することにより得ることができる。なお、 R^2 基はC末端のアミノ酸としてGly- R^2 を用いることで、導入することができる。 R^2 基は、固相合成の担体の選択により、OHまたは NH_2 のペプチドとして切り出すことができる。
- [0041] 本明細書において、式Iの化合物の薬学的に許容される塩としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、臭化水素酸などの無機酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸などの有機酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の塩が挙げられる。
- [0042] 本発明の自己集合体は、有効成分としての本発明の自己集合体と任意成分

としての薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤とを含有する医薬製剤として、インフルエンザウイルスに感染若しくは感染前のヒトを含む哺乳動物、鳥などに投与することができる。

[0043] 本発明のインフルエンザウイルス感染症の予防・治療剤の投与方法は特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、その他の条件、疾病の重篤度等に応じて適宜決定される。製剤形態としては錠剤、カプセル剤、顆粒剤、舌下錠などの経口剤、注射剤、点滴剤、点鼻剤、吸入剤、貼付剤、パップ剤、等の非経口投与形態を好適に挙げることができる。吸入剤が特に好ましい。

[0044] 本発明のインフルエンザの予防ないし治療剤（医薬組成物、医薬製剤を含む）の有効成分である式 I の化合物の自己集合体の 1 日当りの投与量は、被験者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概に決定できないが、通常成人 1 日当り約 0.001 ~ 100 mg 程度の範囲から選ぶことができる。当該インフルエンザの予防ないし治療剤は 1 日 1 回投与に限らず、数回に分けて投与することができる。

[0045] 以下、本発明を更に詳しく説明するため、参考例及び実施例を挙げるが本発明はこれに限定されるものではない。

実施例

[0046] 参考例 1

Fmoc法に従い、Fmocアミノ酸（1.4当量）とHOBt（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール；2.5当量）、DIC（2.8当量）を用い、固相合成によりH-Gly Leu Ala Met Ala Pro Ser Val Gly His Val Arg Gln His Gly-NH₂で表されるポリペプチドを合成した。得られたポリペプチドを、ペプチド合成と同様な条件下でステアリン酸（1当量）、DIC（2.8当量）、HOBt（2.5当量）を用い、DMF/DCM溶媒中で90分間反応させて、N末端のアミノ基にステアロイル基が結合した本発明の（ステアロイル）-Gly Leu Ala Met Ala Pro Ser Val Gly His Val Arg Gln His Gly-NH₂で表されるポリペプチド（以下、「C18-D1」もしくは「C18-D1」とする）を合成した。精製は、C-18カラムを使用するHPLCにより

行った。C18-D1が得られたことは、質量分析 ($[M+H]^+=1782.29$) により確認した。

[0047] 参考例2

参考例1と同様にして、C18-S2 (ステアロイル-ARLPRTMVHPKPAQP-NH₂)、S2 (ARLPRTMVHPKPAQP-NH₂)、D1 (GLAMAPSVGHVRQHG-NH₂) を合成した。C18-S2、S2、D1が得られたことは、質量分析により確認した。

[0048] なお、D1は配列番号1で表され、S2は配列番号2で表される。

[0049] 実施例1

精製したC18-D1の臨界ミセル濃度 (CMC) を以下のように測定した。
1 μ MのN-フェニル-1-ナフチルアミン(以下「NPN」と略記する)を含むPBS (pH 7.5)を調製し、C18-D1のペプチドストック溶液(1 mM)を終濃度0.1, 0.3, 1.3, 10, 30 μ Mで系列希釈した。これらの溶液を波長350 nmで励起し、450 nmの蛍光強度(FI)を測定した。PBSのみの場合とのFIの差を縦軸に、ペプチド溶液を横軸にプロットし、高濃度および低濃度の直線の交点の時の濃度を求めた。交点の濃度 (CMC) は1.3 μ Mであった。

[0050] 実施例2：インフルエンザ感染阻害のインビトロ試験

インフルエンザウイルスの感染の阻害をMDCK細胞上のプラークアッセイにより決定した。6ウェルプレート中のMDCK細胞は、C18-D1、S2 (H-ARLPRTMVHPKPAQP-NH₂)、C18-S2 (ステアロイル-ARLPRTMVHPKPAQP-NH₂)、D1 (H-GLAMAPSVGHVRQHG-NH₂) を含むインフルエンザA/P R / 8 / 3 4 ウイルス溶液 (100-200 p f u、p f uとはプラーク形成ユニット、H1N1型) 0.2 mL、もしくはインフルエンザA/V i c t r i a / 1 / 7 5 ウイルス溶液 (100-200 p f u、H3N2型) とインキュベートした。5%のCO₂の下での37°C、30分間のインキュベーションの後、上清を除去し、細胞をPBSを用いて洗浄した。0.6%のアガロース (0.01%のオージエチルアミノエチルセルロースデキストラン、0.1% NaHCO₃、0.01 μ g/mLアセチルトリプシンを含む2×MEM+BSA 2 mL (1つのウェル当たり) を添加し、2日間インキュベートした。生細胞をクリスタ

ルバイオレット溶液（20%のエタノール中1mg/mL）で染色し、プラークの数をカウントした。最高感染活性（100%）はC18-D1のない場合のプラークの数として定義した。C18-D1のIC₅₀値（50%抑制濃度）は、 $\log [f / (1 - f)]$ と $\log [C18-D1]$ 、ここで f は感染活性割合である、の間のプロットから得られた。S2、C18-S2、D1のIC₅₀値も同様に算出した。

[0051] MDCK細胞へのインフルエンザウイルスの感染の化合物Aによる阻害の検討の結果は以下の通りであった。

[0052] MDCK細胞へのインフルエンザウイルスの感染のC18-D1によるin vitro阻害をプラークアッセイにより決定した。C18-D1 (C18-D1) の存在下で、MDCK細胞へのA型インフルエンザウイルスHA1 (A/PR/8/34 (H1N1))、A型インフルエンザウイルスHA3 (A/Victoria/1/75 (H3N2)) の感染は阻害された。

[0053] [表1]

投与形態	IC ₅₀	
C18-D1の自己集合体	11 μM (H1N1)	7.5 μM (H3N2)
C18-D1-NH2のリポソーム製剤	500 μM (H1N1)	500 μM (H3N2)
C18-S2の自己集合体	10 μM (H1N1)	
D1-NH2(自己集合体を形成しない)	>100 μM (H1N1)	
S2-NH2(自己集合体を形成しない)	>100 μM (H1N1)	

[0054] 上記表1に示されるように、本発明のC18-D1の自己集合体とC18-S2の自己集合体は、in vitroで非常に優れた抗インフルエンザウイルス活性を示すことが明らかになった。

[0055] 実施例3：インフルエンザ感染阻害の動物試験

本発明のC18-D1およびC18-S2のマウスに対するウイルスの感染阻害実験を行った。ペプチドストック溶液（2.5-7.5mM in PBS）とインフルエンザウイルス（H1N1）を含むPBS（200 pfu）を以下の容量で混合し、30分室温放置した。作製したサンプルを一匹ずつマウスの鼻腔内に50 μLずつ投与した。

[0056] 終濃度3.75 mMのC18-D1、C18-S2または溶媒（PBS、mPR8）およびインフルエ

ンザウイルス200 pfu/50 μ Lを含む溶液を投与した。C18-D1は感染阻害活性があり、マウスは80%以上生存した（図1）。一方、in vitro の試験ではC18-D1と同等以上の活性を有するC18-S2は、in vivoの試験ではコントロールと比較しても死亡を早める結果となった。

[0057] つまり、自己集合体ではin vitroのデータからin vivoのデータを推定することは不可能であり、本発明の自己集合体の予測できない効果を実証された。

[0058] ウイルスのみの投与 (mPR8) では、マウスはすべて死亡した。

[0059] なお、「mPR8」は、インフルエンザウイルスとPBSを混合したコントロールを意味する。

請求の範囲

- [請求項1] 式I：

$$R^1\text{---Gly Leu Ala Met Ala Pro Ser Val Gly His Val Arg Gln His Gly---}R^2 \quad (I)$$
 (式中、 R^1 は炭素数14~24の直鎖又は分岐を有するアシル基を示す。 R^2 はOH、 NH_2 、 NR^3R^4 、置換または非置換のアルコキシ基、置換または非置換のアリールオキシ基、置換または非置換のアラルキルオキシ基を示す。 R^3 、 R^4 は同一または異なって、置換または非置換のアルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアラルキル基、アルコキシ基、水酸基が挙げられる。ただし、 R^3 と R^4 は同時に水酸基、アルコキシ基となることはない。)で示される化合物又はその薬学的に許容される塩の自己集合体。
- [請求項2] R^1 はステアロイル基、パルミトイル基、オレオイル基またはパルミトオレオイル基を示す、請求項1に記載の自己集合体。
- [請求項3] R^2 はOHまたは NH_2 を示す、請求項1に記載の自己集合体。
- [請求項4] R^1 はステアロイル基を示し、 R^2 はOHまたは NH_2 を示す、請求項1に記載の自己集合体。
- [請求項5] 前記自己集合体が凍結乾燥物の形態である、請求項1~4のいずれかに記載の自己集合体。
- [請求項6] 請求項1~5のいずれかに記載の自己集合体を含むインフルエンザウイルスの感染症の予防又は治療剤。
- [請求項7] インフルエンザウイルスがH1亜型、H3亜型、H5亜型またはH7亜型である、請求項6に記載の予防又は治療剤。
- [請求項8] インフルエンザウイルスがH1亜型またはH3亜型インフルエンザウイルスである、請求項6に記載の予防又は治療剤。
- [請求項9] インフルエンザウイルスがH1亜型インフルエンザウイルスである、請求項6に記載の予防又は治療剤。
- [請求項10] 式I：

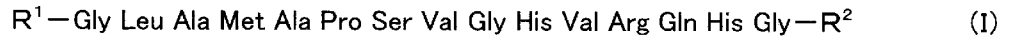
$$R^1\text{---Gly Leu Ala Met Ala Pro Ser Val Gly His Val Arg Gln His Gly---}R^2 \quad (I)$$

(式中、R¹はステアロイル基を示し、R²はNH₂を示す。)

で示される化合物又はその薬学的に許容される塩、もしくはその自己集合体。

[請求項11]

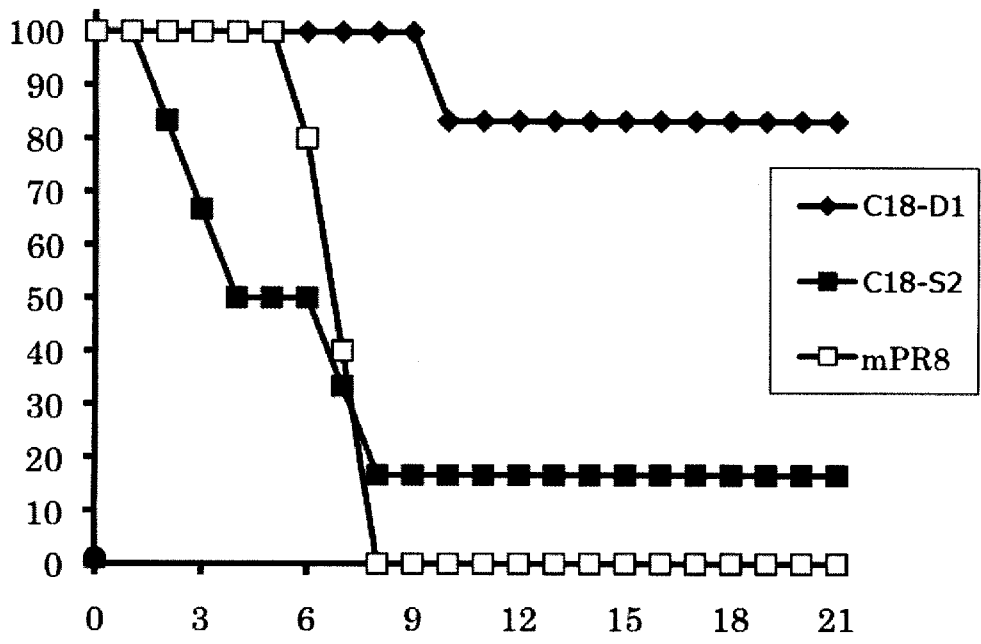
式I:



(式中、R¹は炭素数14~24の直鎖又は分岐を有するアシル基を示す。R²はOH、NH₂、NR³R⁴、置換または非置換のアルコキシ基、置換または非置換のアリールオキシ基、置換または非置換のアラルキルオキシ基を示す。R³、R⁴は同一または異なって、置換または非置換のアルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のアラルキル基、アルコキシ基、水酸基が挙げられる。ただし、R³とR⁴は同時に水酸基、アルコキシ基となることはない。)

で示される化合物又はその薬学的に許容される塩もしくはその自己集合体の有効量をインフルエンザウイルスに感染した患者もしくは感染する可能性のある被験体に投与することを包含する、インフルエンザウイルス感染症の予防又は治療方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/064012

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K7/08(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i

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)
C07K7/00-7/66, A61K38/10, A61K39/00, A61P31/16

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/REGISTRY (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-145777 A (Glycomedics, Inc.), 14 June, 2007 (14.06.07), (Family: none)	1-10
Y	WO 2007/105565 A1 (Keio University), 20 September, 2007 (20.09.07), & EP 2003198 A2	1-10
Y	Teruhiko MATSUBARA et al., "Hemagglutinin Ketsugosei Peptide no Kaihen Oyobi Tansaka ni yoru Influenza Virus Kansen Sogai Kassei no Kojo", Symposium on Polymers and Biosciences Koen Yoshishu, 2008, Jul., Vol.18, pages 81 to 82	1-10

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 25 August, 2009 (25.08.09)	Date of mailing of the international search report 01 September, 2009 (01.09.09)
---	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/064012

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Teruhiko MATSUBARA et al., "Sialyloligo-to Ketsugosei Peptide no Influenza Virus Kansen Sogai Kassei", Polymer Preprints, Japan, 2008, May, Vol.57, No.1, page 1703 [1G06]	1-10
Y	JP 2002-284798 A (Keio University), 03 October, 2002 (03.10.02), (Family: none)	1-10
Y	SATO, T. et.al., Inhibition of Influenza Virus Infection by Hemagglutinin-Binding Peptides. Pept. Sci., 2002, vol.38, p.329-330	1-10
A	WO 2000/059932 A1 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 12 October, 2000 (12.10.00), & EP 1167382 A1	1-10
A	WO 2005/084694 A1 (Glycomedics, Inc.), 15 September, 2005 (15.09.05), & EP 1728515 A1 & US 2009/0098195 A1	1-10
A	JP 2006-101709 A (Glycomedics, Inc.), 20 April, 2006 (20.04.06), (Family: none)	1-10
P,X	Shoko CHIBA et al., "Influenza Virus Kansen Sogai Peptide no Kassei o Kojo suru Kagaku Shushoku", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, 2009, Mar., Vol.89, No.2, page 1291 [1 J1-05]	1-10
P,Y	Teruhiko MATSUBARA et al., "Saibo Hyomen no Sial-san, Gan'yu Tosa o Hyoteki to suru Peptide no Sekkei Oyobi Kino Kaiseki", Polymer Preprints, Japan, 2008, Sep., Vol.57, No.2, pages 4801 to 4802 [1U07]	1-10
P,Y	MATSUBARA, T. et.al., Inhibition of Influenza Virus Infections by Sialylgalactose-Binding Peptides Selected from a Phage Library. J. Med. Chem., 2009, Jul., vol.52, no.14, p.4247-4256	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/064012

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.: 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
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:

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
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K7/08(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i

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. C07K7/00-7/66, A61K38/10, A61K39/00, A61P31/16

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	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009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/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/REGISTRY (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)

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
Y	JP 2007-145777 A (株式会社グライコメディクス) 2007. 06. 14. (ファミリーなし)	1-10
Y	WO 2007/105565 A1 (学校法人慶應義塾) 2007. 09. 20. & EP 2003198 A2	1-10

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 25.08.2009	国際調査報告の発送日 01.09.2009
--------------------------	--------------------------

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)	4B	3964
	戸来 幸男 電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

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
Y	松原輝彦他, ヘマグルチニン結合性ペプチドの改変および短鎖化によるインフルエンザウイルス感染阻害活性の向上. バイオ・高分子シンポジウム講演要旨集, 2008, Jul., vol.18, p.81-82	1-10
Y	松原輝彦他, シアリルオリゴ糖結合性ペプチドのインフルエンザウイルス感染阻害活性. 高分子学会予稿集, 2008, May, vol.57, no.1, p.1703[1G06]	1-10
Y	JP 2002-284798 A (学校法人慶應義塾) 2002. 10. 03. (ファミリーなし)	1-10
Y	SATO, T. et.al., Inhibition of Influenza Virus Infection by Hemagglutinin-Binding Peptides. Pept. Sci., 2002, vol.38, p.329-330	1-10
A	WO 2000/059932 A1 (大塚製薬株式会社) 2000. 10. 12. & EP 1167382 A1	1-10
A	WO 2005/084694 A1 (株式会社グライコメディクス) 2005. 09. 15. & EP 1728515 A1 & US 2009/0098195 A1	1-10
A	JP 2006-101709 A (株式会社グライコメディクス) 2006. 04. 20. (ファミリーなし)	1-10
P, X	千葉頌子他, インフルエンザウイルス感染阻害ペプチドの活性を向上する化学修飾. 日本化学会講演予稿集, 2009, Mar., vol.89, no.2, p.1291[1J1-05]	1-10
P, Y	松原輝彦他, 細胞表面のシアル酸含有糖鎖を標的とするペプチドの設計および機能解析. 高分子学会予稿集, 2008, Sep., vol.57, no.2, p.4801-4802[1U07]	1-10
P, Y	MATSUBARA, T. et.al., Inhibition of Influenza Virus Infections by Sialylgalactose-Binding Peptides Selected from a Phage Library. J. Med. Chem., 2009, Jul., vol.52, no.14, p.4247-4256	1-10

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 1 1 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、請求項 1 1 は「治療による人体の処置方法に関するもの」であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
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。

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。