

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/141847

発行日 平成29年2月16日 (2017. 2. 16)

(43) 国際公開日 **平成26年9月18日 (2014. 9. 18)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/495 (2006. 01)	A 6 1 K 31/495	4 B 0 1 8
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 19/00 (2006. 01)	A 6 1 P 19/00	
A 2 3 L 33/10 (2016. 01)	A 2 3 L 1/30 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

出願番号	特願2015-505352 (P2015-505352)	(71) 出願人	504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/054023	(74) 代理人	100114362 弁理士 萩野 幹治
(22) 国際出願日	平成26年2月20日 (2014. 2. 20)	(72) 発明者	大野 欽司 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
(31) 優先権主張番号	特願2013-47426 (P2013-47426)	(72) 発明者	石黒 直樹 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
(32) 優先日	平成25年3月10日 (2013. 3. 10)	(72) 発明者	鬼頭 浩史 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨系統疾患治療薬及びその用途

(57) 【要約】

FGFR3の過剰な活性化に起因する骨系統疾患、特に、軟骨無形成症や軟骨低形成症に対する、治療効果に優れた新規な治療戦略を提供することを課題とする。メクリジン又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、骨系統疾患の治療薬が提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

メクリジン又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、線維芽細胞成長因子受容体 3 (FGFR3) の過剰な活性化に起因する骨系統疾患の治療薬。

【請求項 2】

骨系統疾患が、軟骨無形成症、軟骨低形成症、タナトフォリック骨異形成症、クルーゾン病、遠位中間肢異形成症及び発達遅延と黒色表皮腫を伴う重度の軟骨無形成症 (SADDAN) からなる群より選択される疾患である、請求項 1 に記載の治療薬。

【請求項 3】

有効成分が塩酸メクリジンである、請求項 1 又は 2 に記載の治療薬。

10

【請求項 4】

メクリジン又はその薬学的に許容される塩を治療上有効量、線維芽細胞成長因子受容体 3 (FGFR3) の過剰な活性化に起因する骨系統疾患の患者に投与するステップを含む、骨系統疾患の治療法。

【請求項 5】

メクリジン又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、身長促進剤。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の身長促進剤を含有する身長促進用組成物。

【請求項 7】

医薬、医薬部外品又は食品である、請求項 6 に記載の身長促進用組成物。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は骨系統疾患治療薬及びその用途に関する。本発明の骨系統疾患治療薬は軟骨無形成症、軟骨低形成症、タナトフォリック骨異形成症、クルーゾン病、遠位中間肢異形成症、発達遅延と黒色表皮腫を伴う重度の軟骨無形成症 (SADDAN) 等の治療に利用され得る。本出願は、2013年3月10日に提出された日本国特許出願第2013-47426号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

【背景技術】**【0002】**

軟骨無形成症や軟骨低形成症は骨伸張のネガティブレギュレーターである線維芽細胞成長因子受容体 3 (fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)) の恒常的活性型変異によって発症する。また、特発性小人症を含む低身長にもFGFR3の関与が示されている。軟骨無形成症では骨伸張が障害されることにより、低身長だけでなく脊柱管狭窄症や大後頭孔狭窄などの重篤な合併症も生じる。軟骨無(低)形成症におけるFGFR3の活性を抑える根本的治療法はなく、低身長に対する対症的な治療として内科的には成長ホルモン治療が、外科的には骨延長術が行われている。

30

【0003】

最近になって、FGFR3シグナルを阻害する低分子化合物が同定された。しかしながら、これらの化合物の毒物学的プロファイルは殆ど分かっていない(非特許文献1~3)。一方、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)はFGFR3シグナルに対する強力なアンタゴニストであり、FGFR3-MAPK経路の阻害によって軟骨無(低)形成症の表現型(短肢)を軽減する(非特許文献4、5)。CNPの半減期は極めて短く、in vivoの実験においては持続的静脈注射が必要となる(非特許文献6)。半減期の長いCNPアナログであるBMN 111が開発され、軟骨無(低)形成症マウスへの皮下注射によって軟骨無(低)形成症マウスにおける骨成長を有意に改善することが報告された(非特許文献7)。

40

【0004】

尚、軟骨無形成症に対する新たな治療戦略がいくつか報告されている(例えば特許文献1~3を参照)。

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表平11-507828号公報

【特許文献2】特表2011-504506号公報

【特許文献3】特開2003-104908号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Krejci, P., Murakami, S., Prochazkova, J., Trantirek, L., Chlebova, K., Ouyang, Z., Aklia, A., Smutny, J., Bryja, V., Kozubik, A. et al. (2010) NF449 is a novel inhibitor of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling active in chondrocytes and multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem.*, 285, 20644-20653.

10

【非特許文献2】Jin, M., Yu, Y., Qi, H., Xie, Y., Su, N., Wang, X., Tan, Q., Luo, F., Zhu, Y., Wang, Q. et al. (2012) A novel FGFR3-binding peptide inhibits FGFR3 signaling and reverses the lethal phenotype of mice mimicking human thanatophoric dysplasia. *Hum. Mol. Genet.*, 21, 5443-5455.

【非特許文献3】Jonquoy, A., Mugniery, E., Benoist-Lasselien, C., Kaci, N., Le Corre, L., Barbault, F., Girard, A.L., Le Merrer, Y., Busca, P., Schibler, L. et al. (2012) A novel tyrosine kinase inhibitor restores chondrocyte differentiation and promotes bone growth in a gain-of-function *Fgfr3* mouse model. *Hum. Mol. Genet.*, 21, 841-851.

20

【非特許文献4】Krejci, P., Masri, B., Fontaine, V., Mekikian, P.B., Weis, M., P rats, H. and Wilcox, W.R. (2005) Interaction of fibroblast growth factor and C-natriuretic peptide signaling in regulation of chondrocyte proliferation and extracellular matrix homeostasis. *J. Cell Sci.*, 118, 5089-5100.

【非特許文献5】Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miyazawa, T., Ozasa, A., Miura, M., Kurihara, T., Rogi, T., Tanaka, S., Suda, M. et al. (2004) Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat. Med.*, 10, 80-86.

【非特許文献6】Yasoda, A., Kitamura, H., Fujii, T., Kondo, E., Murao, N., Miura, M., Kanamoto, N., Komatsu, Y., Arai, H. and Nakao, K. (2009) Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology*, 150, 3138-3144.

30

【非特許文献7】Lorget, F., Kaci, N., Peng, J., Benoist-Lasselien, C., Mugniery, E., Oppeneer, T., Wendt, D.J., Bell, S.M., Bullens, S., Bunting, S. et al. (2012) Evaluation of the therapeutic potential of a CNP analog in a *Fgfr3* mouse model recapitulating achondroplasia. *Am J Hum Genet.*, 91, 1108-1114.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

成長ホルモンはインスリン様成長因子1 (insulin-like growth factor-1 (IGF-1)) の骨端軟骨に対する伸張作用を生かした治療であるが、軟骨無形成症では一般的にはIGF-1の活性低下はないため、期待される効果が得られない。また、治療開始直後のみに効果を認めるが、徐々に効果が減弱する。一方、骨延長術は骨切りによって生じる仮骨を徐々に伸張していく骨再生法であるが、延長した仮骨が成熟するのに長期間を要し、それに伴いピン感染や関節拘縮などの合併症が多くなることが問題である。そこで本発明の課題は、FGFR3の過剰な活性化に起因する骨系統疾患（特に、軟骨無形成症や軟骨低形成症）に対する、治療効果に優れた新規な治療戦略を提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

50

本発明者らは、FGFR3シグナルの活性化に着目し、FGFR3シグナルの活性化を特異的に抑制する低分子化合物を既認可薬の中から見出すことを試みた。まず、ラット軟骨肉腫 (rat chondrosarcoma (RCS)) 細胞に線維芽細胞成長因子 2 (fibroblast growth factor 2 (FGF2)) を添加するとFGFR3シグナルが活性化され、細胞増殖の抑制および細胞外マトリクスの喪失を生じることを利用した実験系でスクリーニングを実施することにした。具体的には、RCS細胞にFGF2を加えたところに1,186種類の既認可薬(Prestwick Chemicals社)を添加し、その効果を調べた。詳細な検討の結果、驚くべきことに、抗ヒスタミン作用を有し、乗り物酔い止め薬として頻用されているメクリジン (meclizine) が細胞増殖の抑制及び細胞外マトリクスの喪失を濃度依存的にレスキューした。また、軟骨系細胞であるヒト軟骨肉腫 (human chondrosarcoma) 細胞とATDC5細胞にFGFR3の変異型を導入すると細胞増殖の抑制及び細胞外マトリクスの喪失を生じるが、メクリジンはこれらの作用もレスキューした。更には、胎生16.5日のマウス脛骨にFGF2を添加し器官培養を行うと骨の長径成長が抑制されるが、メクリジンは長径成長抑制効果を阻害した。

10

20

40

50

【0009】

以上の通り、複数の軟骨系細胞と骨の器官培養を利用した実験によってメクリジンの有効性、即ち、メクリジンがFGFR3シグナルを抑制し、薬効を示すことが明らかとなった。メクリジンを用いれば、FGFR3の過剰活性化を主因または病因の一部とする各種骨系統疾患 (特に、軟骨無形成症、軟骨低形成症、タナトフォリック骨異形成症、クルーゾン病、遠位中間肢異形成症、発達遅延と黒色表皮腫を伴う重度の軟骨無形成症 (SADDAN) など、低身長を呈する疾患) に対する根本的治療法を確立し得る。一方、正常な骨端軟骨の伸張においてもFGFR3はネガティブレギュレーターとして常に発現していることから、健常人における身長促進剤としてもメクリジンは有効といえる。実際、正常マウスへのメクリジンの経口投与により、体長および四肢の伸長効果を認めた。即ち、動物実験によってメクリジンの伸長効果も確認された。この結果を踏まえると、骨端線閉鎖を伴わない下垂体性小人症、ターナー症候群における低身長、プラダーウィリー症候群における低身長、成長ホルモン分泌不全性低身長症 (GHD)、子宮内発育遅延 (SGA) 性低身長症等に対する治療/予防にもメクリジンは有効といえる。

以下に示す本願発明は、主として上記知見及び考察に基づく。

[1] メクリジン又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、線維芽細胞成長因子受容体 3 (FGFR3) の過剰な活性化に起因する骨系統疾患の治療薬。

[2] 骨系統疾患が、軟骨無形成症、軟骨低形成症、タナトフォリック骨異形成症、クルーゾン病、遠位中間肢異形成症及び発達遅延と黒色表皮腫を伴う重度の軟骨無形成症 (SADDAN) からなる群より選択される疾患である、[1] に記載の治療薬。

[3] 有効成分が塩酸メクリジンである、[1] 又は [2] に記載の治療薬。

[4] メクリジン又はその薬学的に許容される塩を治療上有効量、線維芽細胞成長因子受容体 3 (FGFR3) の過剰な活性化に起因する骨系統疾患の患者に投与するステップを含む、骨系統疾患の治療法。

[5] メクリジン又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、身長促進剤。

[6] [5] に記載の身長促進剤を含有する身長促進用組成物。

[7] 医薬、医薬部外品又は食品である、[6] に記載の身長促進用組成物。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】メクリジンはRCS細胞においてFGF2による増殖抑制と細胞外マトリクス喪失をレスキューする。(A) RCS細胞にFGF2 (5 ng/ml) と同時にメクリジンを添加し48時間後に細胞増殖能をMTSアッセイで評価した。グラフは490 nm吸光度をvehicle比で算出し、平均値とSD値を示している (n = 8)。メクリジンはFGF2によるRCS細胞の増殖抑制を濃度依存性にレスキューしたが、50 μMで毒性が出現した。(B) メクリジンはFGF2による細胞形態の変化と細胞外マトリクス喪失をレスキューした。RCSにFGF2(5 ng/ml) 単独、またはCNP(0.2 μM) かメクリジン(20 μM) を同時に添加し72時間後に細胞外マトリクスをアルシアンブル

ー染色した。RCS細胞はFGF2非存在下で培養すると球形の形態を呈し豊富な細胞外マトリクスを形成する。このような軟骨様の表現型はFGF2により喪失する。RCS細胞にFGF2と同時にCNPかメクリジンを添加すると細胞の形態は球形に保たれアルシアンブルーの染色性も保持される。(C)メクリジンはRCS細胞においてFGF2による細胞外マトリクス分解酵素の発現を抑制した。RCS細胞にFGF2と同時にCNPまたはメクリジンを添加し4時間後にリアルタイムRT-PCRにてmRNAを定量した。グラフはMmp10、Mmp13、Adamts1の発現量をvehicle比で算出し平均値とSD値を示している(n = 3)。FGF2はMmp10、Mmp13、Adamts1の発現を上昇させ、CNPとメクリジンはこれを抑制した。

【図2】メクリジンはFGFR3の変異型(K650E、K650M)を導入したHCS-2/8細胞の増殖抑制をレスキューする。(A)FGFR3の野生型または変異型(K650E)が発現したHCS-2/8細胞を播種して48時間後にMTSアッセイにて細胞増殖能を定量した。変異型(K650E)が発現したHCS-2/8細胞の増殖能は野生型と比較して優位に抑制された(p < 0.001)。グラフは平均値とSD値を示している。(B)変異型(K650EまたはK650M)が発現したHCS-2/8細胞にメクリジンを添加し48時間後に増殖能をMTSアッセイにて評価した。グラフはvehicle比の平均値とSD値を示している(n = 12)。メクリジンは変異型(K650E、K650M)の導入による増殖抑制をレスキューした。(C)レンチウイルスによりHCS-2/8細胞に導入されたVenusの蛍光強度を評価すると、変異型(K650E)による増殖抑制はCNPとメクリジンによってレスキューされることが示された。上段のパネルよりトランスフェクション効率は90%以上であることが分かる。CNPとメクリジンの投与によりVenusの蛍光強度は増強した。グラフはvehicle比を算出し平均値とSD値を示している(n = 3)。

【図3】メクリジンはFGFR3の変異型(G380R)を導入したATDC5細胞の分化抑制をレスキューする。ATDC5細胞の微小塊培養(micromass culture)にCNPまたはメクリジンを添加して6日間培養しアルシアンブルー染色を行った。染色後に6 Mゲアニジン塩酸を200 μ l添加して610 nmの吸光度測定をした。グラフは平均値とSD値を示している(n = 6)。CNPとメクリジンは変異型(G380R)を導入したATDC5細胞のアルシアンブルー染色性を増強させた。

【図4】メクリジンはFGF2添加の有無に関わらず胎仔脛骨の器官培養において骨の長径成長を促進する。6日間の器官培養後、胎仔脛骨の切片をHE染色及びアルシアンブルー染色に供した。同一個体の両側脛骨を隣に並べている。骨の長軸方向の長さは反対側の長さの比を算出し、グラフは平均値とSD値を示している。FGF2は骨の長径成長を抑制し、FGF2にCNPまたはメクリジンを加えると有意に長径成長は増大した(P < 0.01, t-test)。FGF2非存在下においてもメクリジンは有意に骨の長径成長を増大させた(P < 0.05, t-test)。

【図5】メクリジンはRCS細胞においてFGF2によるERKのリン酸化を抑制する。(A)RCS細胞にFGF2(5 ng/ml)を添加する30分前にメクリジンを投与しウエスタンブロッティング法にてERKとMEKのリン酸化レベルを評価した。ERKとMEKをローディングコントロールとした。メクリジンはFGF2添加5分後でERKのリン酸化を抑制したが、MEKのリン酸化を抑制しなかった。(B)レンチウイルスを用いて恒常的に活性化したERK、MEK、RAFのそれぞれの変異型をRCS細胞に導入した。メクリジン添加後48時間後に細胞増殖能をMTSアッセイにより定量した。490 nm吸光度をvehicle比で算出し平均値とSD値を示した(n = 3)。メクリジンは恒常的に活性化したMEKとRAFによる増殖抑制をレスキューしたが、ERKによる増殖抑制には効果がなかった。

【図6】軟骨におけるFGFR3シグナル伝達系とFGFR3阻害剤の機序。MAPK経路とSTAT経路は軟骨細胞の増殖と分化に抑制的に働いている。MAPK経路ではRAS、RAF、MEK、ERKのシグナルカスケードを段階的に活性化する。CNPはnatriuretic peptide receptor-Bと結合すると細胞内でcGMPが上昇しPKGの活性化を介してRAFを抑制する。NF449(参考文献14)、A31(参考文献16)、P3(参考文献15)は近年同定されたFGFR3阻害薬である。NF449とA31はFGFR3キナーゼ活性を抑制する。P3はFGFR3の細胞外ドメインに結合する。メクリジンはERKのリン酸化を抑制する。

【図7】メクリジン投与実験の結果。正常の妊娠マウスに妊娠14日目からメクリジンを内服投与し、生後5日目の仔マウスの体長、肢長を評価した。

10

20

30

40

50

【図8】メクリジン投与実験の結果。正常マウスに生後2週からメクリジンを内服投与し、5週目で体長、肢長を評価した。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の第1の局面は骨系統疾患の治療薬（説明の便宜上、以下では「本発明の医薬」と呼ぶことがある）及びその用途に関する。「治療薬」とは、標的の疾病ないし病態に対する治療的又は予防的効果を示す医薬のことをいう。治療的効果には、標的疾患/病態に特徴的な症状又は随伴症状を緩和すること（軽症化）、症状の悪化を阻止ないし遅延すること等が含まれる。後者については、重症化を予防するという点において予防的効果の一つと捉えることができる。このように、治療的効果と予防的効果は一部において重複する概念であり、明確に区別して捉えることは困難であり、またそうすることの実益は少ない。尚、予防的効果の典型的なものは、標的疾患/病態に特徴的な症状の再発を阻止ないし遅延することである。尚、標的疾患/病態に対して何らかの治療的効果又は予防的効果、或いはこの両者を示す限り、標的疾患/病態に対する治療薬に該当する。

10

【0012】

本発明は、メクリジンの新規な薬理作用、即ちFGFR3シグナルを阻害する活性を見出した成果に基づく。本発明の医薬は当該薬理作用を利用するものであり、FGFR3の過剰な活性化に起因する骨系統疾患の治療又は予防に用いられる。理論に拘泥する訳ではないが、本発明の医薬によればFGFR3の過剰な活性化（換言すれば恒常的活性化）が抑制ないし阻害され、治療効果が奏される。後述の実施例に示す通り、メクリジンは古典的RAS/MAPKカスケードの下流（MEKからERKへのシグナル伝達）において阻害活性を示すことが判明した（図6）。この事実は、メクリジンが特異性に優れ、副作用の少ない薬剤であることを示唆する。

20

【0013】

治療又は予防の対象となる「骨系統疾患」は、FGFR3の過剰な活性化に起因するものである限り、特に限定されない。本明細書において「FGFR3の過剰な活性化に起因する」とは、FGFR3の過剰な活性化が主因又は病因の少なくとも一部であることを意味する。該当する「骨系統疾患」を例示すると、軟骨無形成症（Achondroplasia）、軟骨低形成症（Hypochondroplasia）、タナトフォリック骨異形成症（Thanatophoric dysplasia）、クルーゾン病（Crouzon disease）、遠位中間肢異形成症（Acromesomelic dysplasias）、発達遅延と黒色表皮腫を伴う重度の軟骨無形成症（SADDAN）である。好ましい一態様では、軟骨無形成症又は軟骨低形成症の治療又は予防に本発明の医薬が適用される。軟骨無形成症は近位四肢短縮型の低身長を呈する代表的疾患であり、頻度も高い。患者の殆どにおいて第4染色体短腕上のFGFR3のG380R点変異（380番目のグリシンがアルギニンに置換される変異）が認められる。変異のためにFGFR3が恒常的に活性化され、軟骨細胞の増殖および分化が抑制される。その結果、軟骨内骨化によって長管骨の長軸方向への成長が著しく障害される。軟骨低形成症も近位四肢短縮型の低身長を呈する疾患である。軟骨低形成症の原因遺伝子もFGFR3であり、約半数の患者においてN540K点変異（540番目のアスパラギンがリシンに置換される変異）が認められる。尚、骨系統疾患国際分類では、軟骨無形成症と軟骨低形成症は同一のグループに分類されている。

30

40

【0014】

本発明の医薬はメクリジン（meclizine）又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する。メクリジンは、物質名1-[(4-クロロフェニル)フェニルメチル]-4-[(3-メチルフェニル)メチル]ピペラジンの化合物であり、抗ヒスタミン薬の一種として知られている。メクリジンは乗り物酔い止め薬としてOTC（over the counter）販売されている。メクリジンはメクロジン（meclozine）と呼称されることもある。本明細書では用語「メクリジン」と用語「メクロジン」を交換可能に使用する。

【0015】

本発明の医薬の有効成分として、メクリジンの薬理的に許容される塩を用いても良い。市販されているメクリジン製剤では、多くの場合、メクリジンの塩酸塩の形で処方され

50

ている。そこで、本発明においても好ましくは塩酸塩を用いる。但し、「薬理的に許容される塩」はこれに限定されるものではなく、様々な塩、例えば、酸付加塩、金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩等の利用が想定される。酸付加塩の例としては塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、臭化水素酸塩などの無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩が挙げられる。金属塩の例としてはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩が挙げられる。アンモニウム塩の例としてはアンモニウム、テトラメチルアンモニウムなどの塩が挙げられる。有機アミン付加塩の例としてはモルホリン付加塩、ピペリジン付加塩が挙げられる。アミノ酸付加塩の例としてはグリシン付加塩、フェニルアラニン付加塩、リジン付加塩、アスパラギン酸付加塩、グルタミン酸付加塩が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0016】

本発明の医薬の製剤化は常法に従って行うことができる。製剤化する場合には、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を含有させることができる。賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としてはベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等と用いることができる。

【0017】

製剤化する場合の剤形も特に限定されない。剤形の例は錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、注射剤、外用剤、及び座剤である。本発明の医薬はその剤形に応じて経口投与又は非経口投与（静脈内、動脈内、皮下、皮内、筋肉内、又は腹腔内注射、経皮、経鼻、経粘膜など）によって対象に適用される。また、全身的な投与と局所的な投与も対象により適応される。これらの投与経路は互いに排他的なものではなく、任意に選択される二つ以上を併用することもできる（例えば、経口投与と同時に又は所定時間経過後に静脈注射等を行う等）。本発明の医薬には、期待される治療効果を得るために必要な量（即ち治療上有効量）の有効成分が含有される。本発明の医薬中の有効成分量は一般に剤形によって異なるが、所望の投与量を達成できるように有効成分量を例えば約0.1重量%～約99重量%の範囲内で設定する。

【0018】

本発明の医薬の投与量は、期待される治療効果が得られるように設定される。治療上有効な投与量の設定においては一般に症状、患者の年齢、性別、及び体重などが考慮される。当業者であればこれらの事項を考慮して適当な投与量を設定することが可能である。例えば、成人（体重約60kg）を対象として一日当たりの有効成分量が1mg～500mg、好ましくは5mg～300mg、特に好ましくは10mg～200mgとなるよう投与量を設定することができる。投与スケジュールとしては例えば一日一回～数回、二日に一回、或いは三日に一回などを採用できる。投与スケジュールの作成においては、患者の病状や有効成分の効果持続時間などを考慮することができる。局所投与に関しては手術時の使用、あるいは治療過程の促進目的に担体もしくは相応しい剤型で局所に注入などの方法がある。

【0019】

本発明の医薬による治療に並行して他の医薬（例えば既存の治療薬）による治療を行ったり、既存の治療手技に対して本発明の医薬による治療を組み合わせたりしてもよい。既存の治療法として成長ホルモン療法、既存の治療手技として骨延長術をそれぞれ例示することができる。骨延長術では固定装置（内固定型又は外固定型）又は骨延長器などと呼ばれる専用の装置が用いられる。骨延長術の方法は通常、骨切り、待機期間、骨延長期間及び骨硬化期間の行程からなる。尚、骨延長術については、例えば、ADVANCE SERIES II-9 骨延長術：最近の進歩（克誠堂出版、波利井清紀 監修、杉原平樹 編著）に詳しい。

【0020】

以上の記述から明らかな通り本出願は、FGFR3の過剰な活性化に起因する骨系統疾患の患者に対して本発明の医薬を治療上有効量投与することを特徴とする治療法も提供する。

10

【0021】

本発明の他の局面はメクリジン又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する身長促進剤を提供する。尚、特に言及しない事項については、上記局面の対応する説明が援用される。

【0022】

本発明の身長促進剤は低身長を呈する患者のみならず、健常者にも適用可能である。例えば、骨端線閉鎖を伴わない下垂体性小人症、ターナー症候群における低身長、ブラダーウィリー症候群における低身長、成長ホルモン分泌不全性低身長症（GHD）、子宮内発育遅延（SGA）性低身長症等の治療又は予防に本発明を適用可能である。本発明の身長促進剤は各種組成物（例えば、医薬組成物、医薬部外品組成物、食品組成物）の形態で提供できる。

20

【0023】

本発明の身長促進剤を医薬組成物又は医薬部外品組成物の形態で提供する場合の製剤化や剤型、投与経路、投与量などは、上記局面に準ずる。一方、食品組成物の場合、例えば、栄養補助食品（サプリメント、栄養ドリンク等）として粉末、顆粒末、タブレット、ペースト、液体等の形状で本発明の身長促進剤を提供することができる。食品組成物の形態で提供することによって、本発明の身長促進剤を日常的に摂取したり、継続的に摂取したりすることが容易となる。本発明の食品組成物には、治療的又は予防的効果が期待できる量の有効成分が含有されることが好ましい。添加量は、それが使用される対象となる者の病状、健康状態、年齢、性別、体重などを考慮して定めることができる。

30

【実施例】

【0024】

近年、既存薬の新たな効能を探索し、適用拡大を図ること、即ちドラッグ・リポジショニング（drug repositioning）戦略が注目されている（参考文献20、21）。この戦略のメリットの一つは、同定された薬剤は至適用量や副作用などが既に確立していることから、直ちに臨床応用できることである。以下では、軟骨無（低）形成症やFGFR3が関与する他の骨異形成症の治療に有効な薬剤を同定することを目指し、1,186種類のFDA認可薬をスクリーニングすることにした。

【0025】

1. 材料と方法

40

(1) ラット軟骨肉腫（rat chondrosarcoma (RCS)）細胞を用いた、1,186種類のFDA認可薬からのスクリーニング

Pavel Krejci博士（Medical Genetics Institute, Cedars-Sinai Medical Center, LA）より供与されたRCS細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS, Thermo Scientific)を添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM, Invitrogen)で培養した（参考文献14）。RSC増殖アッセイ（growth arrest assay）のために、約 5×10^3 個の細胞を96ウェル培養プレート(Falcon)に播種し、 $10 \mu\text{M}$ のFDA認可薬(1,186種類。Prestwick Chemical)と 5 ng/ml のFGF2(R&D Systems)の存在下、48時間、培養した。MTSアッセイ(Cell 96 AQueus One Solution Cell Proliferation Assay, Promega)により細胞の増殖を定量した。操作は添付のマニュアルに従った。

50

【 0 0 2 6 】

(2) アルシアンブルー染色

アルシアンブルー染色のために、12ウェルプレートでRCS細胞を培養し、各ウェルに5 ng/mlのFGF2と10 μMのメクリジン又は0.2 μMのCNP(Calbiochem)を添加した。72時間後、細胞をメタノールで固定化し(-20℃、30分間)、1 N HClで溶解した0.5% Alcian Blue 8 G X (Sigma)で染色した(overnight)。定量分析のために、アルシアンブルーで染色した細胞を室温にて6時間、200 μlの6 Mグアニジン塩酸で抽出した(参考文献28)。PowerScan 4(DS Pharma Biomedical)を使用し、抽出されたアルシアンブルーの光学的濃度(610nmでの吸光度)を測定した。

【 0 0 2 7 】

(3) 全RNAの抽出及びリアルタイムRT-PCR解析

20 μMのメクリジン又は0.2 μMのCNPの存在下、FGF2で処理したRSC細胞からTrizolを用いて全RNAを単離した。ReverTra Ace(Toyobo)を使用して第一鎖cDNAを合成した。LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche)とSYBR Green(Takara)を利用してマトリックプロテアーゼ(Mmp10、Mmp13、Adamts1)のmRNAレベルを定量した。尚、測定値はGapdhのmRNA発現レベルで補正した。

【 0 0 2 8 】

(4) ベクターとトランスフェクション

野生型FGFR3を発現するベクターpRK7-FGFR3-WTと変異型FGFR3(参考文献29)を発現するベクターpRK7-FGFR3-K650E及びpRK7-FGFR3-K650MはPavel Krejci博士(Medical Genetics Institute, Cedars-Sinai Medical Center, LA)より供与された。QuikChange site-directed mutagenesis kit(Stratagene)を用いてpRK7-FGFR3-G380Rを調製した。制限酵素HindIII及びBamHIによる処理により、野生型FGFR3 cDNAと変異型FGFR3 cDNAをベクターから切り出した。NheIサイト及びBamHIサイトを利用して各断片をレンチウイルスベクターCSII-CMV-MCS-IRES2-Venusにクローニングした。CSII-CMV-MCS-IRES2-Venusは三好浩之博士(Riken BioResource Center, Tsukuba, Japan.)より供与された。ライゲーションに先立ち、Quick Blunting Kit(New England Biolabs)を用いてインサートのHindIIIサイトとベクターのNheIサイトを平滑化した。トランスフェクションの前日にHEK293細胞を150mmディッシュに播種した。Lipofectamine 2000(Invitrogen)を用い、pLP1プラスミド、pLP2プラスミド、pLP/VSVGプラスミド(ViraPower Packaging Mix, Invitrogen)とCSII-CMV-MCS-IRES2-VenusベクターをHEK293に導入した。操作は添付のマニュアルに従った。トランスフェクション48時間後に、ウイルス粒子を含む培養液をMillex-HV 0.45 μm PVDFフィルター(Millex)を用いてフィルター処理し、2段階の超遠心処理(Beckman Coulter)によってレンチウイルスを精製した。精製したレンチウイルスをHCS-2/8細胞又はATDC5細胞の培養液に添加した。48時間後、90%以上の細胞がウイルスシグナル陽性であることを確認した。

【 0 0 2 9 】

MAPK/ERK経路において、恒常的に活性化した変異体を発現するクローンであるpcDNA4Myc-ERK2(PD)、pcDNA3HA-MEK1(DD)及びpcDNA3Flag-C-raf N(参考文献30)は武川睦寛博士(Medical Science Institute, Tokyo University, Japan)から供与された。インサートをBamHI及びXhoIで処理し、平滑化した後、CSII-CMV-MCS-IRES2-VenusのBamHIサイトにクローニングした。レンチウイルス粒子を上述の方法で調製し、RCS細胞に適用した。

【 0 0 3 0 】

(5) HCS-2/8細胞の増殖アッセイ

レンチウイルス(FGFR3-WT、FGFR3-K650E又はFGFR3-K650Mを発現する)をHCS-2/8(参考文献31)細胞に感染させ、96ウェル培養プレートに約 5×10^3 個播種した。48時間後、MTSアッセイによって細胞数を測定した。また、HCS-2/8細胞にFGFR3-K650Eを発現するレンチウイルスを導入し、12ウェルプレートに約 1×10^5 個播種した。72時間後、Venusタンパク質の蛍光強度をArrayScan VTI HCS Reader(Thermo Scientific)で定量した。

【 0 0 3 1 】

(6) ATDC5細胞の微小塊培養

レンチウイルス (FGFR3-WT又はFGFR3-G380Rを発現する) をマウス胚性癌腫由来ATDC5細胞 (参考文献32) に感染させた。感染後の細胞を微小塊培養 (参考文献33) に供した。概要を述べれば、5% FBSを含有するDMEM/F-12(1:1)培地 (Sigma) に 1×10^7 cells/mlの濃度でATDC5細胞を懸濁し、高濃度軟骨凝縮を模倣すべく10 μ lの液滴で播種した。1時間のインキュベーションの後、1% インスリン - トランスフェリン - 亜セレン酸ナトリウム (ITS, Sigma) を添加した培地を添加した。6日目に細胞を回収するまで、1日おきに培地を交換した。

【0032】

(7) 器官培養

器官培養のために、顕微鏡下、野生型マウス胎仔 (E16.5) の脛骨を採取し、96ウェル培養プレートに移した後、0.2%ウシ血清アルブミン、1 mM β -glycerophosphate及び50 μ g/mlアスコルビン酸を添加した α -minimal essential medium (Invitrogen) で培養した。続いて、20 μ Mメクリジン又は0.2 μ M CNPの存在下及び非存在下において、100 ng/ml FGF2で6日間処理し、10% ホルムアルデヒド (リン酸緩衝液内) で固定した。0.5 M EDTAで脱ミネラル化し、パラフィン包埋した。切片をヘマトキシリンエオジン及びアルシアンブルーで染色した後、XZ-1デジタルカメラ (Olympus) を装着したSZ61顕微鏡 (Olympus) で撮影した。骨の長径の長さ (関節軟骨の基部 - 先端部間の長さとして定義される) をImageJ (NIH) を用いて測定した。

【0033】

(8) ウエスタンブロット及びシグナル経路に関する検討

RCS細胞を20 μ Mメクリジンで30分間処理した (メクリジン非処理細胞をVehicleとした)。5 ng/ml FGF2を添加し、5分後、プロテアーゼインヒビターを添加した氷冷RIPA Lysis Buffer (Santa Cruz) で細胞を融解した。全細胞ライセートをSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。以下の抗体、即ちERK1/2、リン酸化-ERK1/2 (Thr²⁰²/ Tyr²⁰⁴)、MEK1/2、及びリン酸化-MEK1/2 (Ser^{217/221}) (Cell Signaling) を使用して、MAPK経路における各分子のリン酸化レベルをウエスタンブロットで決定した。

【0034】

(9) 正常マウスへのメクリジンの内服投与

正常の妊娠マウスに妊娠14日目からメクリジンを内服投与し (5gの餌にメクリジン2mgを含有)、生後5日目の仔マウスの体長、肢長を評価した。一方、正常マウスに生後2週からメクリジンを内服投与し、5週目で同様に評価した。

【0035】

2. 結果

(1) メクリジンはRCS細胞においてFGF2による増殖抑制と細胞外マトリクス喪失をレスキューする

ラット軟骨肉腫 (RCS) 細胞はFGFR3を高発現しているため、FGF2を添加すると軟骨無 (低) 形成症の成長軟骨で見られる特徴を *in vitro* で再現できる (参考文献22)。FGF2 (5 ng/ml) を加えたRCS細胞に1,186種類のFDA認可薬 (Prestwick Chemical) をそれぞれ10 μ M添加した。RCS細胞の増殖能をMTSアッセイで定量した結果、メクリジンを添加するとvehicleと比較して1.4倍以上の細胞増殖能が再現性をもって示された。さらに、0、1、2、5、10、20、50 μ Mのメクリジンを添加するとRCSの細胞増殖能は濃度依存性に増加したが、50 μ Mで毒性が認められた (図1A)。

【0036】

次にCNP (参考文献6、17) をポジティブコントロールとしメクリジンの効果を検証した。RCS細胞は培養により豊富な軟骨性のプロテオグリカンを生産し、アルシアンブルー染色性を有する。FGF2を添加するとプロテオグリカンの産生が抑制される上に細胞外マトリクス分解酵素が産生されるため、72時間後にはアルシアンブルー染色性はほとんど認められない (参考文献6)。FGF2に加えメクリジンを添加するとRCS細胞のアルシアンブルー染色性と軟骨細胞様の形態が保持されるが、この効果はCNPと同等であった (図1B

10

20

30

40

50

)。RCS細胞にFGF2を添加すると4時間後にMmp10、Mmp13、Adamts1の発現が上昇することが知られている(参考文献6)。RCS細胞にFGF2を添加するとMmp10、Mmp13、Adamts1の発現が上昇し、そしてメクリジンとCNPはこれらの細胞外マトリクス分解酵素の発現を抑制した(図1C)。以上より、メクリジンはRCS細胞においてFGF2による細胞外マトリクス分解酵素の発現を抑制しプロテオグリカン喪失を阻害することが分かった。

【0037】

(2)メクリジンはFGFR3の変異型(K650E、K650M)を導入したHCS-2/8の増殖抑制をレスキューする

次に、レンチウイルスを用いてFGFR3の変異型(K650E:致死性異形成症、K650M:SADDA N)を導入したヒト軟骨肉腫(human chondrosarcoma)細胞(HCS-2/8)において、メクリジンによるFGFR3シグナル抑制効果を検証した。K650Eを導入したHCS-2/8は有意に細胞増殖能が低下したことをMTSアッセイで確認した(図2A)。K650EまたはK650Mが発現したいずれのHCS-2/8においてもメクリジン(20 μ M)は増殖抑制を一部阻害した(図2B)。さらに、細胞内に発現しているVenusの蛍光強度比較することでも、K650Eが導入されたHCS-2/8はメクリジンにより細胞増殖が促進されることが分かった(図2C)。

10

【0038】

(3)メクリジンはFGFR3の変異型(G380R)を導入したATDC5細胞の分化抑制をレスキューする

ATDC5細胞は軟骨分化能を有するため軟骨分化過程をin vitroで解析するのによく用いられている(参考文献15)。軟骨無形成症の成長軟骨では分化抑制が起きることが知られており、FGFR3の変異型(G380R:軟骨無形成症)をレンチウイルスにて導入したATDC5細胞の微小塊培養(micromass culture)にメクリジン(20 μ M)を加えて分化誘導を行うことにより、メクリジンが軟骨の分化抑制をレスキューできるか否か検証した。FGFR3の野生型を導入したATDC5細胞ではアルシアンブルーの染色性が良好であるのに対し、変異型を導入したATDC5細胞では染色性が低下する。この変異型を導入したATDC5細胞にメクリジンを添加するとアルシアンブルーの染色性がレスキューされた。次に、アルシアンブルー染色後にグアニジン塩酸を加え610 nmの吸光度測定し染色性の定量を行った。変異型を導入したATDC5では吸光度の低下が認められたが、これをメクリジンがレスキューした(図3)。以上より、メクリジンはFGFR3変異型の導入による軟骨分化抑制効果をレスキューする。

20

30

【0039】

(4)メクリジンはFGF2添加の有無に関わらず胎仔脛骨の器官培養において骨の長径成長を促進する

胎仔脛骨にFGF2を添加し器官培養を行うと骨の長径成長が抑制されることが知られているが(参考文献14)、FGF2と同時にメクリジンを投与すると成長抑制がレスキューされるかどうか検証した。FGF2(100 ng/ml)と同時にCNP(0.2 μ M)またはメクリジン(20 μ M)を器官培養液に加え、骨の長さを同一個体の反対側と比較した。FGF2を添加し6日間器官培養を行うと胎仔脛骨の長径成長は抑制され、CNPとメクリジンはFGF2による骨の成長抑制を有意にレスキューした(図4)。さらに、メクリジンはFGF2を添加しない脛骨の長径成長も促進した。

40

【0040】

(5)メクリジンはRCSにおいてFGF2によるERKのリン酸化を抑制する

RCS細胞を用いてFGFR3シグナルにおけるメクリジンの効果を検証した。RCS細胞に対してFGF2添加30分前にメクリジンを投与し、ウエスタンブロッティング法にてERKとMEKのリン酸化レベルを評価した。メクリジンはFGF2添加によるERK1/2のリン酸化を抑制したが、MEK1/2のリン酸化を抑制しなかった(図5A)。さらに、恒常的にシグナルが活性化したERK、MEK、RAFのそれぞれの変異型をレンチウイルスによりRCSに導入し、細胞増殖能をMTSアッセイにより評価した。メクリジンは活性化したMEKとRAFによる増殖抑制をレスキューした一方、ERKによる増殖抑制を阻害する効果は認められなかった(図5B)。以上より、メクリジンはリン酸化MEKによるERKのリン酸化の抑制、またはERKのリン酸化酵素の

50

活性を抑制することが示唆された(図6)。

【0041】

(6)メクリジンは体長及び四肢長を増大させる

正常の妊娠マウスに妊娠14日目からメクリジンを内服投与し、生後5日目の仔マウスを評価したところ、メクリジン投与群において体長、上肢長及び下肢長の増大を認めた(図7)。また、正常マウスに生後2週からメクリジンを投与し、5週目で評価したところ、メクリジン投与群において体長及び尾長の増大を認めた(図8)。

【0042】

3. 考察

Drug Repositioningは既存薬の新たな効能を発見する手法であり、候補薬を段階的に絞り込んでいく手順により研究の経費と時間を削減できることがメリットである(参考文献20、23)。有用性と毒性がすでに担保されている1,186種類のFDA認可薬のなかで、メクリジンは新規のFGFR3シグナル阻害薬であり、軟骨無(低)形成症における低身長の治療薬として臨床応用される可能性を秘めている。メクリジンは抗ヒスタミン作用を有し、乗り物酔い止め薬としてOTC(over the counter)販売されており、50年以上安全に使用されてきた実績がある。したがって至適用量・副作用・禁忌など安全性が確立されており、この薬剤が臨床応用可能な濃度においてFGFR3の抑制効果を示せば、そのまま臨床応用ができる可能性が高い。

【0043】

現在、軟骨無(低)形成症において根本的治療法はないため、FGFR3シグナルの活性を抑制する新規治療法の開発が期待されてきた。Krejciらは1,120種類の化合物のスクリーニングを行った結果、NF449がRCSと胎仔脛骨の器官培養においてFGFR3シグナルを抑制することを報告した。しかし、NF449は抗癌作用を有するsuraminと構造が類似している(参考文献14)。Jonquoyetらはin silico解析によりFGFR3のチロシンキナーゼ阻害作用を持つ合成化合物(A31)を創薬した。A31はFGFR3の恒常的リン酸化を抑制し、器官培養において軟骨無形成症モデルマウス(Fgfr3^{Y367C/+})の長管骨の成長抑制をレスキューすることが示された。さらに、A31はFgfr3^{Y367C/+}の成長軟骨の分化抑制をレスキューすることが示された(参考文献16)。Jinらはペプチドファミリーライブラリーのスクリーニングを行った結果、P3がFGFR3の細胞外ドメインに最も親和性が高いことでP3を同定した。P3はATDC5細胞において増殖・分化促進作用を有し、致死性異形成症モデルマウス(Fgfr3^{Ne0-K644E/+})の長管骨の器官培養において骨の成長抑制をレスキューし、さらに母体への投与によりFgfr3^{Ne0-K644E/+}の長期生存可能であることが示された(参考文献15)。しかし、これらの新規FGFR3阻害薬はFGFR3以外のチロシンキナーゼにも作用する可能性があり、ヒトへ投与した場合の毒性が懸念される。メクリジンの作用部位も同様にチロシンキナーゼの特異性が懸念されるが、50年以上安全に使用されてきた実績があることから、重篤な副作用はないと考えられる。

【0044】

CNPは軟骨無形成症においてFGFR3シグナルの活性を抑制する作用を有する。CNP欠損マウスの表現型は低身長であり、成長軟骨は増殖軟骨細胞層と肥大軟骨細胞層が狭小化していることが特徴である(参考文献24)。acromesomelic dysplasia Maroteaux-type (AMDM)はCNPのレセプター遺伝子であるNPR2の機能喪失により四肢短縮型低身長となる(参考文献25)。一方、CNPの過剰発現によりMAPKシグナルの抑制を介して軟骨無形成症における長管骨の成長抑制はレスキューされる(参考文献17)。八十田らはCNPを投与することで軟骨無形成症モデルマウス(Fgfr3^{ach})の低身長をレスキューすることに成功した。しかし、CNPは半減期が非常に短いため持続静脈投与が必要である(参考文献18)。Lorgetらは中性エンドペプチダーゼによって分解されにくい構造であるCNPアナログ(BM N111)を開発し、これにより半減期が延長され、皮下注射によりFgfr3^{Y367C/+}の低身長を改善させることができた(参考文献19)。今回の研究では、メクリジンはin vitroとex vivoモデルにおいてCNPと同等にFGFR3シグナルを抑制することができた。また、メクリジンは乗り物酔い止め薬として臨床で使用されてきた実績があることより、CNPやCNPアナ

10

20

30

40

50

ログに代わる薬剤として使用されることが期待される。

【0045】

軟骨細胞の増殖と分化においてMAPK経路はFGFR3シグナルの主要経路の一つである。軟骨細胞においてERKが活性化し続けると増殖抑制、細胞外マトリクスの分解、細胞形態の変化、分化抑制が起こることが知られている（参考文献5、6）。CNPはPKGIIの活性化を介してRAF1キナーゼのリン酸化を抑制する（参考文献6、17）。今回、メクリジンが軟骨細胞においてERKのリン酸化を抑制することを証明した。メクリジンには抗ヒスタミン作用や抗ムスカリン作用の他に抗酸化的リン酸化作用があることをGohilらは報告している（参考文献26、27）。メクリジンは脳や心臓の虚血による細胞障害を抑制することが示された。今回の研究では抗ヒスタミン作用、抗ムスカリン作用又は抗酸化的リン酸化作用を示す薬剤の中で唯一メクリジンがFGFR3シグナルを抑制した。よって、内軟骨性骨化におけるメクリジンの薬理作用機序は抗ヒスタミン作用、抗ムスカリン作用又は抗酸化的リン酸化作用ではないと考えられる。

10

【0046】

今回の研究ではメクリジンはRCS細胞においてFGF2による細胞増殖抑制、細胞外マトリクスの喪失、細胞形態の変化、細胞外マトリクス分解酵素の発現をレスキューすることが証明された。また、メクリジンはFGFR3の変異型が発現したHCS細胞とATDC5細胞において増殖抑制と分化抑制をレスキューした。さらに、メクリジンはFGF2による胎仔長管骨の成長抑制をレスキューした。メクリジンは軟骨無（低）形成症に対して有用な治療法となりうる。

20

【0047】

一方、動物実験の結果、メクリジンが体長及び四肢の伸長効果を示すことが裏づけられた。この事実を鑑みると、例えば、骨端線閉鎖を伴わない下垂体性小人症、ターナー症候群における低身長、プラダーウィリー症候群における低身長、成長ホルモン分泌不全性低身長症（GHD）、子宮内発育遅延（SGA）性低身長症に対してもメクリジンは有効と考えられる。

【産業上の利用可能性】

【0048】

本発明の治療薬は、FGFR3シグナルの抑制という、メクリジンの新規な作用によって薬効を示す。メクリジンは乗り物酔い止め薬としてOTC(over the counter)販売されており、50年以上安全に使用されてきた実績があり、至適服用量・副作用・禁忌など、安全性が確立されている。この事実は、臨床応用上の大きなメリットとなる。軟骨無形成症、軟骨低形成症、タナトフォリック骨異形成症、クルーゾン病、遠位中間肢異形成症、発達遅延と黒色表皮腫を伴う重度の軟骨無形成症（SADDAN）等、FGFR3の過剰な活性化に起因する各種骨系統疾患の治療に本発明が適用されることが期待される。

30

【0049】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

40

【0050】

<参考文献>

1. Waller, D.K., Correa, A., Vo, T.M., Wang, Y., Hobbs, C., Langlois, P.H., Pearson, K., Romitti, P.A., Shaw, G.M. and Hecht, J.T. (2008) The population-based prevalence of achondroplasia and thanatophoric dysplasia in selected regions of the US. *Am J Med Genet A*, 146A, 2385-2389.

2. Horton, W.A., Hall, J.G. and Hecht, J.T. (2007) Achondroplasia. *Lancet*, 370, 162-172.

3. Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J.M., Maroteaux, P., Le Merrer, M. and Munnich, A. (1994) Mutations in the gene encoding

50

g fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*, 371, 252-254.

4. Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.Z., Church, D.M., Fielder, T.J., Bocian, M., Winokur, S.T. and Wasmuth, J.J. (1994) Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*, 78, 335-342.

5. Krejci, P., Bryja, V., Pachernik, J., Hampl, A., Pogue, R., Mekikian, P. and Wilcox, W.R. (2004) FGF2 inhibits proliferation and alters the cartilage-like phenotype of RCS cells. *Exp. Cell Res.*, 297, 152-164.

6. Krejci, P., Masri, B., Fontaine, V., Mekikian, P.B., Weis, M., Prats, H. and Wilcox, W.R. (2005) Interaction of fibroblast growth factor and C-natriuretic peptide signaling in regulation of chondrocyte proliferation and extracellular matrix homeostasis. *J. Cell Sci.*, 118, 5089-5100.

7. Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D. and de Crombrughe, B. (2004) Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.*, 18, 290-305.

8. Prinos, P., Costa, T., Sommer, A., Kilpatrick, M.W. and Tsipouras, P. (1995) A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 2097-2101.

9. Tavormina, P.L., Bellus, G.A., Webster, M.K., Bamshad, M.J., Fraley, A.E., McIntosh, I., Szabo, J., Jiang, W., Jabs, E.W., Wilcox, W.R. et al. (1999) A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am J Hum Genet*, 64, 722-731.

10. Tavormina, P.L., Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.Z., Wilkin, D.J., Lachman, R.S., Wilcox, W.R., Rimoïn, D.L., Cohn, D.H. and Wasmuth, J.J. (1995) Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.*, 9, 321-328.

11. Toydemir, R.M., Brassington, A.E., Bayrak-Toydemir, P., Krakowiak, P.A., Jorde, L.B., Whitby, F.G., Longo, N., Viskochil, D.H., Carey, J.C. and Bamshad, M.J. (2006) A novel mutation in FGFR3 causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. *Am J Hum Genet*, 79, 935-941.

12. Beever, J.E., Smit, M.A., Meyers, S.N., Hadfield, T.S., Bottema, C., Albrechtsen, J. and Cockett, N.E. (2006) A single-base change in the tyrosine kinase II domain of ovine FGFR3 causes hereditary chondrodysplasia in sheep. *Anim. Genet.*, 37, 66-71.

13. Horton, W.A., Hecht, J.T., Hood, O.J., Marshall, R.N., Moore, W.V. and Hollowell, J.G. (1992) Growth hormone therapy in achondroplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 42, 667-670.

14. Krejci, P., Murakami, S., Prochazkova, J., Trantirek, L., Chlebova, K., Ouyang, Z., Aklian, A., Smutny, J., Bryja, V., Kozubik, A. et al. (2010) NF449 is a novel inhibitor of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling active in chondrocytes and multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem.*, 285, 20644-20653.

15. Jin, M., Yu, Y., Qi, H., Xie, Y., Su, N., Wang, X., Tan, Q., Luo, F., Zhu, Y., Wang, Q. et al. (2012) A novel FGFR3-binding peptide inhibits FGFR3 signaling and reverses the lethal phenotype of mice mimicking human thanatophoric dysplasia. *Hum. Mol. Genet.*, 21, 5443-5455.

16. Jonquoy, A., Mugniery, E., Benoist-Lasselín, C., Kaci, N., Le Corre, L., Barbault, F., Girard, A.L., Le Merrer, Y., Busca, P., Schibler, L. et al. (2012) A novel tyrosine kinase inhibitor restores chondrocyte differentiation and promo

10

20

30

40

50

tes bone growth in a gain-of-function *Fgfr3* mouse model. *Hum. Mol. Genet.*, 21, 841-851.

17. Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miyazawa, T., Ozasa, A., Miura, M., Kurihara, T., Rogi, T., Tanaka, S., Suda, M. et al. (2004) Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat. Med.*, 10, 80-86.

18. Yasoda, A., Kitamura, H., Fujii, T., Kondo, E., Murao, N., Miura, M., Kanamoto, N., Komatsu, Y., Arai, H. and Nakao, K. (2009) Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasia. *Endocrinology*, 150, 3138-3144.

19. Lorget, F., Kaci, N., Peng, J., Benoist-Lasselien, C., Mugniery, E., Oppener, T., Wendt, D.J., Bell, S.M., Bullens, S., Bunting, S. et al. (2012) Evaluation of the therapeutic potential of a CNP analog in a *Fgfr3* mouse model recapitulating achondroplasia. *Am J Hum Genet.*, 91, 1108-1114.

20. Abbott, A. (2002) Neurologists strike gold in drug screen effort. *Nature*, 417, 109.

21. Bian, Y., Masuda, A., Matsuura, T., Ito, M., Okushin, K., Engel, A.G. and Ohno, K. (2009) Tannic acid facilitates expression of the polypyrimidine tract binding protein and alleviates deleterious inclusion of *CHRNA1* exon P3A due to an hnRNP H-disrupting mutation in congenital myasthenic syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 18, 1229-1237.

22. Dailey, L., Laplantine, E., Priore, R. and Basilico, C. (2003) A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *J. Cell Biol.*, 161, 1053-1066.

23. Heemskerk, J., Tobin, A.J. and Bain, L.J. (2002) Teaching old drugs new tricks. Meeting of the Neurodegeneration Drug Screening Consortium, 7-8 April 2002, Washington, DC, USA. *Trends Neurosci.*, 25, 494-496.

24. Chusho, H., Tamura, N., Ogawa, Y., Yasoda, A., Suda, M., Miyazawa, T., Nakamura, K., Nakao, K., Kurihara, T., Komatsu, Y. et al. (2001) Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 4016-4021.

25. Bartels, C.F., Bukulmez, H., Padayatti, P., Rhee, D.K., van Ravenswaaij-Arts, C., Pauli, R.M., Mundlos, S., Chitayat, D., Shih, L.Y., Al-Gazali, L.I. et al. (2004) Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet.*, 75, 27-34.

26. Gohil, V.M., Sheth, S.A., Nilsson, R., Wojtovich, A.P., Lee, J.H., Perocchi, F., Chen, W., Clish, C.B., Ayata, C., Brookes, P.S. et al. (2010) Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nat. Biotechnol.*, 28, 249-255.

27. Gohil, V.M., Offner, N., Walker, J.A., Sheth, S.A., Fossale, E., Gusella, J.F., MacDonald, M.E., Neri, C. and Mootha, V.K. (2011) Meclizine is neuroprotective in models of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 20, 294-300.

28. De Bari, C., Dell'Accio, F. and Luyten, F.P. (2001) Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.*, 44, 85-95.

29. Krejci, P., Masri, B., Salazar, L., Farrington-Rock, C., Prats, H., Thompson, L.M. and Wilcox, W.R. (2007) Bisindolylmaleimide I suppresses fibroblast growth factor-mediated activation of Erk MAP kinase in chondrocytes by preventing Shp2 association with the Frs2 and Gab1 adaptor proteins. *J. Biol. Chem.*, 282, 29

10

20

30

40

50

29-2936.

30. Emrick, M.A., Hoofnagle, A.N., Miller, A.S., Ten Eyck, L.F. and Ahn, N.G. (2001) Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase 2 by synergistic point mutations. J. Biol. Chem., 276, 46469-46479.

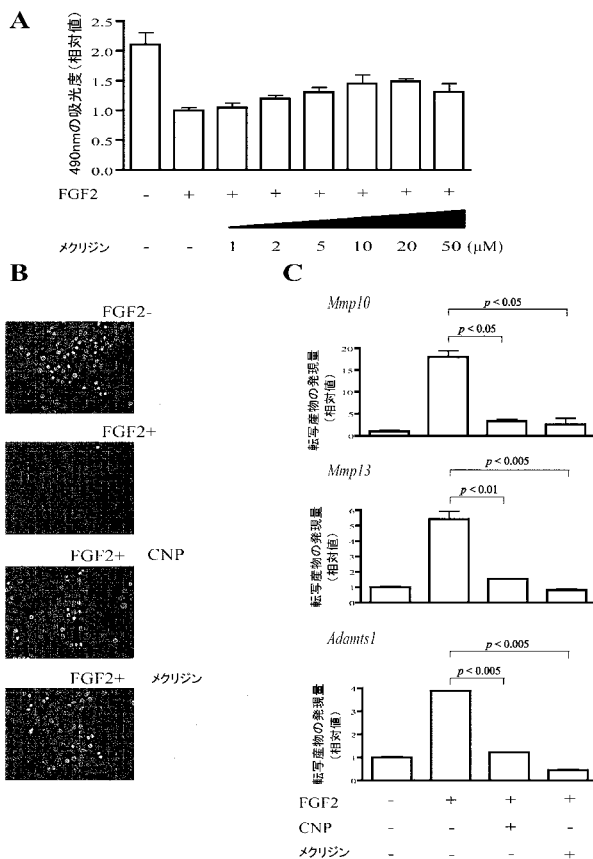
31. Takigawa, M., Tajima, K., Pan, H.O., Enomoto, M., Kinoshita, A., Suzuki, F., Takano, Y. and Mori, Y. (1989) Establishment of a clonal human chondrosarcoma cell line with cartilage phenotypes. Cancer Res., 49, 3996-4002.

32. Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K. and Ikawa, Y. (1990) A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. Cell Differ. Dev., 30, 109-116.

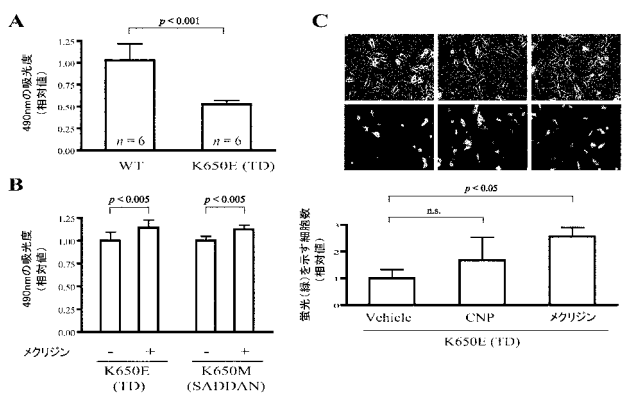
33. Hoogendam, J., Parlevliet, E., Miclea, R., Lowik, C.W., Wit, J.M. and Karpriën, M. (2006) Novel early target genes of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes. Endocrinology, 147, 3141-3152.

10

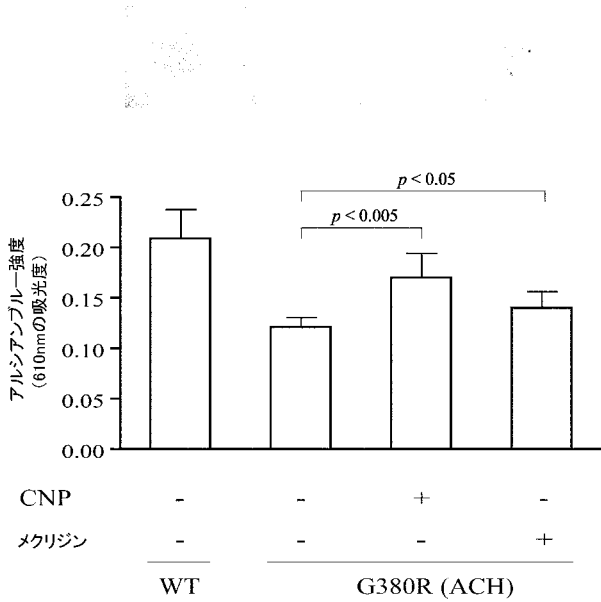
【 図 1 】



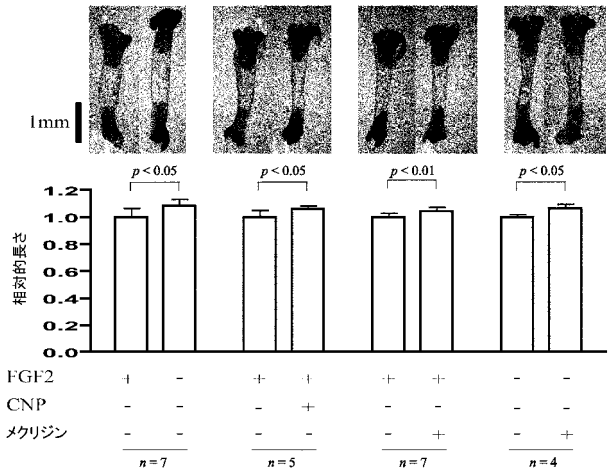
【 図 2 】



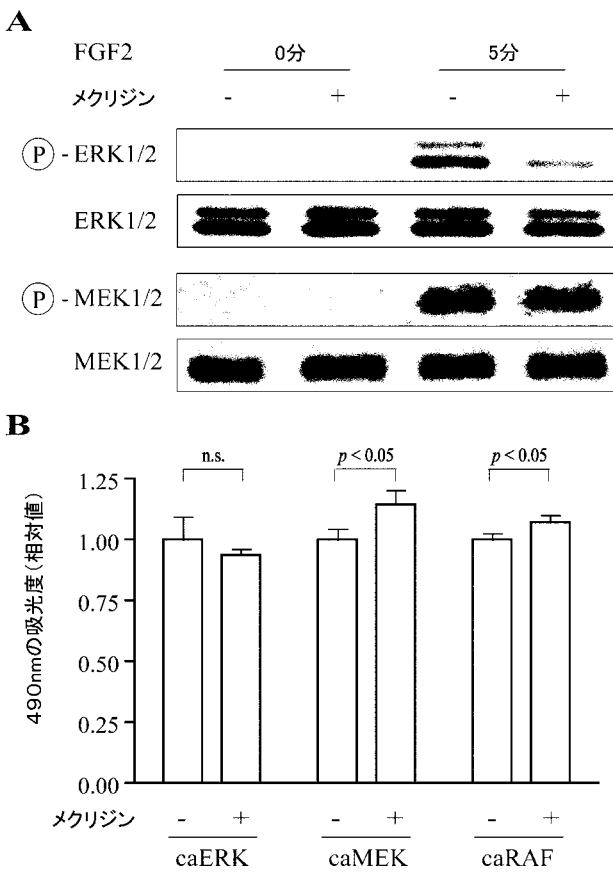
【 図 3 】



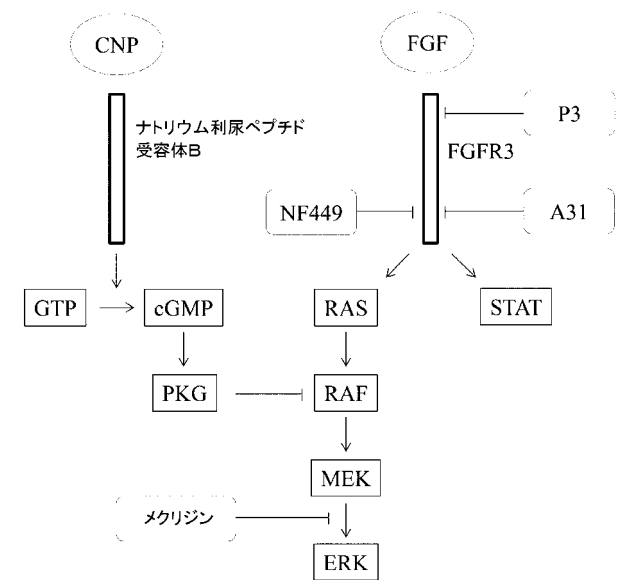
【 図 4 】



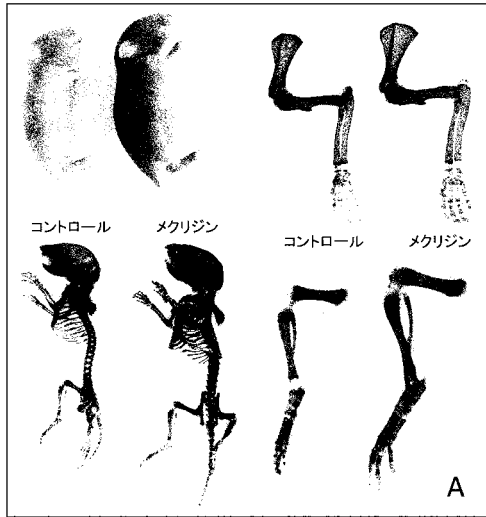
【 図 5 】



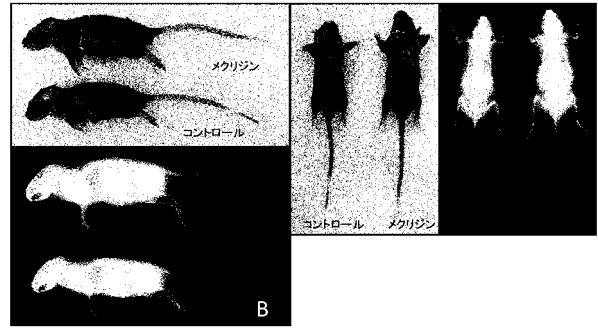
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/054023
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/495(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P43/00(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) A61K31/495, A23L1/30, A61P19/00, 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 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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.
P, X	Masaki Matsushita et al, Meclozine Facilitates Proliferation and Differentiation of Chondrocytes by Attenuating Abnormally Activated FGFR3 Signaling in Achondroplasia, PLOS ONE, [on line], 2013.12.04, 8(12), p.1-9, [retrieved on 2014-05-09]	1-3, 5-7
P, X	"Norimonoyoi OTC-yaku Meclozine no Off-label Kono ni yoru Teishinchoshu no Chiryu", Press Release Nagoya University, [on line], 05 December 2013 (05.12.2013), [retrieval date 09 May 2014 (09.05.2014)]	1-3, 5-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 09 May, 2014 (09.05.14)		Date of mailing of the international search report 27 May, 2014 (27.05.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054023

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Masaki MATSUSHITA et al., "Meclozine wa Nankotsu Mukeiseisho ni Okeru FGFR3 Signal ni yoru Nankotsu Saibo no Zoshoku Bunka Yokusei o Rescued suru", The Journal of the Japanese Orthopaedic Association, 30 August 2013 (30.08.2013), 87(8), page S1322	1-3,5-7
A	JP 08-239327 A (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 September 1996 (17.09.1996), claim 3 (Family: none)	1-3,5-7
A	WO 2007/061130 A1 (Eisai R & D Management Co., Ltd.), 31 May 2007 (31.05.2007), claims 1, 40 & US 2009/0247576 A1 & EP 1964837 A1	1-3,5-7
A	JP 2008-533111 A (Sanofi-Aventis), 21 August 2008 (21.08.2008), claims 1, 10, 15 & US 2008/0108648 A1 & US 2011/0136856 A1 & EP 1861403 A & WO 2006/097625 A1 & FR 2883286 A & CA 2599643 A & KR 10-2007-0113227 A & NO 20075169 A & CN 101160309 A & EA 200701991 A & ZA 200707901 A & BRA PI0607589 & NZ 561205 A & IL 185611 D	1-3,5-7
A	JP 2009-520768 A (Novartis AG.), 28 May 2009 (28.05.2009), claims 1, 8; paragraph [0028] & US 2008/0312248 A1 & US 2013/0030171 A1 & EP 1976847 A & WO 2007/071752 A2 & CA 2634047 A & NO 20083214 A & KR 10-2008-0090439 A & CN 101336237 A & BCA OSP088561 & EA 200801565 A & ZA 200805092 A & SM 200800041 A & IL 192093 D & MA 30063 B	1-3,5-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054023

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: The invention of claim 4 pertains to a therapeutic method.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 4 0 2 3									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/495(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P43/00(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. A61K31/495, A23L1/30, A61P19/00, 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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									
P, X	Masaki Matsushita et al, Meclozine Facilitates Proliferation and Differentiation of Chondrocytes by Attenuating Abnormally Activated FGFR3 Signaling in Achondroplasia, PLOS ONE, [on line], 2013.12.04, 8(12), p.1-9, [retrieved on 2014-05-09]	1-3, 5-7									
P, X	乗り物酔いOTC薬メクロジンのオフラベル効能による低身長症の治療, Press Release 名古屋大学, [on line], 2013.12.05, [検索日 2014.05.09]	1-3, 5-7									
<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		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 09.05.2014		国際調査報告の発送日 27.05.2014									
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) 原田 隆興	4U 9167								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3439									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 4 0 2 3
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
P, X	松下 雅樹 他, Meclozineは軟骨無形成症におけるFGFR3シグナルによる軟骨細胞の増殖・分化抑制をレスキューする, 日本整形外科学会雑誌, 2013.08.30, 87(8), p.S1322	1-3, 5-7
A	JP 08-239327 A (大正製薬株式会社) 1996.09.17, 請求項3 (ファミリーなし)	1-3, 5-7
A	WO 2007/061130 A1 (エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社) 2007.05.31, 請求項1、請求項4 O & US 2009/0247576 A1 & EP 1964837 A1	1-3, 5-7
A	JP 2008-533111 A (サノフイーアベンティス) 2008.08.21, 請求項1、請求項1 O、請求項1 5 & US 2008/0108648 A1 & US 2011/0136856 A1 & EP 1861403 A & WO 2006/097625 A1 & FR 2883286 A & CA 2599643 A & KR 10-2007-0113227 A & NO 20075169 A & CN 101160309 A & EA 200701991 A & ZA 200707901 A & BRA PI0607589 & NZ 561205 A & IL 185611 D	1-3, 5-7
A	JP 2009-520768 A (ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト) 2009.05.28, 請求項1、請求項8、段落O O 2 8 & US 2008/0312248 A1 & US 2013/0030171 A1 & EP 1976847 A & WO 2007/071752 A2 & CA 2634047 A & NO 20083214 A & KR 10-2008-0090439 A & CN 101336237 A & ECA OSP088561 & EA 200801565 A & ZA 200805092 A & SM 200800041 A & IL 192093 D & MA 30063 B	1-3, 5-7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 4 0 2 3

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 4 は、この国際調査機関が調査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4に係る発明は、治療方法の発明である。
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ので、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ので、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。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 松下 雅樹

愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

Fターム(参考) 4B018 MD01 MD07 MD18 ME05

4C086 AA01 AA02 BC50 MA01 MA04 NA14 ZA96 ZC02

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。