

(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11日(11.03.2010)

PCT

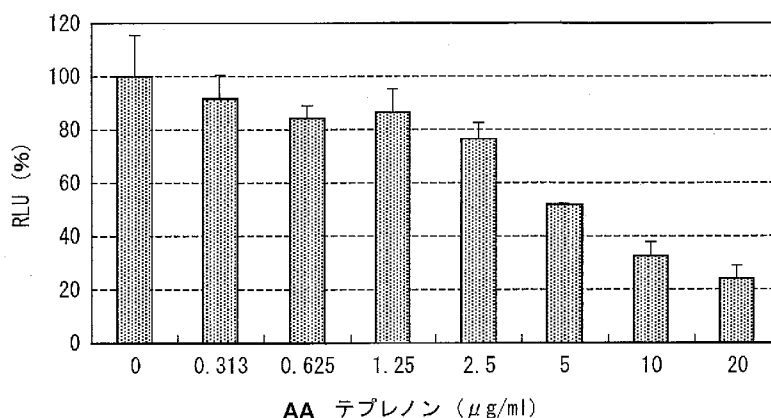
(10) 国際公開番号
WO 2010/026966 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/047 (2006.01) *A61K 38/21* (2006.01)
A61K 31/121 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/351 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
A61K 31/4045 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/065264
- (22) 国際出願日: 2009年9月1日(01.09.2009)
- (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 2008-225328 2008年9月2日(02.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人岡山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤 宣之 (KATO, Nobuyuki). 池田 正徳 (IKEDA, Masanori).
- (74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所 (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル 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).
- 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))

(54) Title: NOVEL ANTI-HCV AGENT AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新規抗 HCV 剤およびその利用

[図1(a)]



AA TEPRENONE (μg/ml)

(57) Abstract: The object aims to develop a novel anti-HCV technique. A composition containing a compound having an anti-osporotic activity is provided as an anti-HCV agent.

(57) 要約: 新たな抗 HCV 技術を開発する。抗骨粗しょう症作用を有する化合物を含有する組成物を抗 HCV 剤として提供する。

WO 2010/026966 A1

明 細 書

発明の名称：新規抗HCV剤およびその利用

技術分野

[0001] 本発明は、新規な抗HCV技術に関するものであり、より詳細には、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を含有する抗HCV剤およびその利用に関するものである。

背景技術

[0002] C型肝炎ウイルス（HCV）は非A非B型肝炎の原因ウイルスとして1989年に発見同定されたフラビウイルス科に属するRNAウイルスである。HCVは持続感染を成立させるウイルスであることから、HCV感染により引き起こされる肝炎（C型肝炎）は高率に慢性肝炎に移行する。その後、二十数年の経過のなかで肝硬変、そして最終的に肝細胞癌発症に至ることが明らかになっている。

[0003] HCV感染者の数は日本国内で約200万人、世界で約2億人と推定されている。最近の社会的問題にもなっているフィブリノゲン製剤によるHCV感染という事態からもわかるように、HCVに感染していることを自覚していないいわゆる無症候性キャリアーも多数存在している。現在、日本国内における肝細胞癌による犠牲者は年間約3.5万人となっており、その8割はHCV感染によるものである。また、その前段階である肝硬変においても年間約2万人が犠牲となっている。したがって、HCVは深刻な感染症を引き起こすウイルスであると言える。

[0004] HCVが増殖し、その感染、複製、粒子産生、再感染が繰り返される状態（すなわちHCVの生活環）が再現されるシステムを得ることは、抗HCV技術の開発に非常に有用である。しかしながら、HCVの発見以後、多くの培養細胞や動物を用いて人工増殖システムの開発が試みられたものの、実用的なものは得られなかった。また、HCV感染のモデル動物はチンパンジーのみであり、これに代わる動物は未だ見つかっていない。また、抗HCV剤の開発にあたって、多数

のモデル動物（チンパンジー）を用いた薬理試験を実施することができないため、代替の薬効評価システムが必要とされている。

[0005] 抗HCV剤の開発にあたって、多数のモデル動物（チンパンジー）を用いた薬理試験を容易に実施することができないため、代替の薬効評価システムが必要とされている。このようなシステムとして、全長HCVゲノムの複製システムが開発され、これまでに、3種類のHCV株（N株、Con-1株およびH77株）の全長ゲノムを複製できる細胞（全長HCV RNA複製システム）の樹立が報告されている（非特許文献1～3参照）。また、レポーター遺伝子を含む、HCVゲノムの複製レベルをモニタリングし得るアッセイ系（非特許文献4および特許文献1参照）が開発されている。

[0006] また、抗HCV剤を開発するには、HCVタンパク質を評価することも重要である。非特許文献5には、2a遺伝子型に属するJFH1株HCVを用いた感染性HCV粒子産生細胞（HuH-7細胞由来のクローン化細胞）が開示されている。

[0007] インターフェロン（IFN）のみが、C型慢性肝炎に対して単独で抗ウイルス効果を示す治療薬として知られている。著効率を上げることを目的として、近年になって核酸構造類似体で幅広い抗ウイルス活性を示すことが知られていたリバビリン（単独ではC型肝炎には効果がない）とIFN- α との併用療法（2001年12月に保険適用認可）やIFN- α にポリエチレングリコールを結合させてIFN- α の血中での安定性を高め、かつ腎排泄度を低下させたPEG-IFN- α を用いた療法（2003年12月使用認可）が行われるようになってきている。しかし、約半数の患者には治癒が望めないことから、IFN療法の限界も明らかになっている。

[0008] 本発明者らは、HCV-0株（遺伝子型1b）由来の全長HCV RNA複製細胞（OR6細胞）を開発している（特許文献1参照）。OR6細胞で複製する全長HCV RNAには、レポーター遺伝子としてのRenilla luciferase遺伝子、選択マーカー遺伝子としてのネオマイシン耐性遺伝子、およびEMCV IRESが含まれている。OR6細胞において、Renilla luciferase遺伝子産物およびネオマイシン耐性遺伝子産物は融合タンパク質として細胞内で発現する。G418を添加した培地中

では、ネオマイシン耐性遺伝子産物によって、安定したHCV RNA複製細胞が選択され得、かつ維持され得る。また、細胞内のRenilla luciferase活性はHCV RNA量と非常に良く相関するため、簡便かつ正確なRenilla luciferase活性を測定することによって煩雑なHCV RNA定量を代用し得る。このようなOR6システムを開発したことにより、これまで困難であった薬剤の併用効果の微妙な判定が可能になった。OR6システムの開発によってフルバスタチン（FLV）が強い抗HCV活性を有することが見出され（特許文献1参照）、この知見に基づいた臨床での有用性が国内外から報告されている（非特許文献6および7参照）。

[0009] スタチン剤は高コレステロール血症治療剤として広く臨床使用されている物質である。スタチン剤による抗HCV活性は、アセチル-CoAからファルネシルピロリン酸を経てコレステロールが合成される過程でのHMG-CoAからメバロン酸への変換を司るHMG-CoA還元酵素を阻害することによる。

[0010] 非特許文献8には、上述したコレステロール合成経路においてファルネシルピロリン酸から変換されるゲラニルゲラニルピロリン酸がHCV RNAの複製に重要であることが記載されている。また非特許文献8および9には、長鎖不飽和脂肪酸がHCV RNAの複製を阻害することが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：日本国公開特許公報「特開2006-325582号公報（平成18年12月7日公開）」

非特許文献1：Blight et al., J. Virol. 77: 3181-3190 (2003)

非特許文献2：Ikeda et al., J. Virol. 76: 2997-3006 (2002)

非特許文献3：Pietschmann et al., J. Virol. 76: 4008-4021 (2002)

非特許文献4：Ikeda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 329: 1350-1359 (2005)

非特許文献5：Wakita et al., Nat. Med. 11: 791-796 (2005)

非特許文献6 : The American Journal of Gastroenterology. 103: 1383-1389 (2008)

非特許文献7 : 瀬崎ら、肝臓 49巻 1号 22-24頁 (2008)

非特許文献8 : Kapadia et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102: 2561-2566 (2005)

非特許文献9 : Yano et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51: 2016-2027 (2007)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 確かに、スタチン剤（特にFLV）の抗HCV活性は優れている。しかし、コレステロール値の低い患者に適用することができない。非特許文献8では長鎖不飽和脂肪酸（アラキドン酸（AA）、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA））が抗HCV活性を有していることが報告されている。本発明者らは、OR6システムを用いて4つの栄養素群（ビタミン、アミノ酸、脂肪酸および塩）を試験した結果、非特許文献8に開示されているように長鎖不飽和脂肪酸（LA、AA、EPAおよびDHA）が抗HCV活性を有していることを確認したが、AA、EPAおよびDHAを用いると細胞増殖が抑制されてしまい、抗HCV剤として好ましくないことがわかった（非特許文献9参照）。また、LAと同様に、 β -カロテンおよびビタミンD2もまた抗HCV活性を有することを見出した（非特許文献9参照）。しかし、 β -カロテン、ビタミンD2およびLAの間に構造上の共通点はなく、化合物の構造面に基づいて抗HCV剤を予測することはできなかった。

[0013] また、非特許文献8は、抗HCV活性がタンパク質のゲラニルゲラニル化の阻害に起因することを示唆しているが、ゲラニルゲラニル化を阻害することが知られているビタミンK2はHCV RNAの複製を促進する（非特許文献9参照）。このように、コレステロール合成経路の調節によってHCV RNA複製を制御することは、スタチン剤以外では達成されていない。

[0014] 本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、新た

な抗HCV技術を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0015] 上述したように、HCV RNA複製のメカニズムは未だ不明である。本発明者らは、上記コレステロール合成経路に再度着目し、ゲラニルゲラニルピロリン酸と構造が類似する化合物は、ゲラニルゲラニルピロリン酸と競合してHCV RNAの複製を阻害することを期待して、このような構造の化合物の能力を調べた。しかし、Geranylgeranoic acidはHCV RNAの複製に影響を与えず、GeranylgeraninolはHCV RNAの複製を促進した。ゲラニルゲラニル化による効果が細胞における脂肪酸含量に依存していること（非特許文献8）および長鎖不飽和脂肪酸が抗HCV活性を有していること（非特許文献8および9）を考慮すると、ゲラニルゲラニル化の調節はHCV RNA複製の阻害に必要ではあるが十分ではないことを示している。
- [0016] しかし、本発明者らは、独自の観点に基づいてさらなる検証を行うことにより、特定の物質が抗HCV活性を有していることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0017] 本発明に係る抗HCV剤は、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を含有していることを特徴としている。本明細書中で使用される場合、「抗骨粗しょう症作用を有する化合物」は、骨粗しょう症の症状を軽減／抑制し得る化合物が意図され、臨床にて治療に用いられている特定の化合物に限定されない。本発明に係る抗HCV剤は、テプレノンまたはプラウノールを含有していることが好ましいが、ラロキシフェンを含有していてもよい。
- [0018] 本発明に係る抗HCV剤は、インターフェロンと組み合わせて適用されることが好ましい。
- [0019] また、本発明に係る抗HCV剤は、スタチン剤による抗HCV活性を増強するために用いられることが好ましい。例えば、本発明に係る抗HCV剤は、スタチン剤と組み合わせて適用されてもよい。この場合、本発明に係る抗HCV剤は、スタチン剤をさらに含有していてもよい。また、本発明に係る抗HCV剤は、抗骨粗しょう症作用を有する化合物とスタチン剤とを別々に備えているキットの

形態であってもよい。

- [0020] 本発明者らは、抗骨粗しょう症作用を有する化合物が、スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強することを見出した。すなわち、抗骨粗しょう症作用を有する化合物は、スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強し得る。スタチン剤は、ゲラニルゲラニル化を抑制することによって抗HCV活性を発揮するので、抗骨粗しょう症作用を有する化合物は、スタチン剤による抗HCV活性を増強するために用いられてもよい。
- [0021] 本発明に係る治療組成物は、C型肝炎を治療するために、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を含有していることを特徴としている。本発明に係る治療組成物は、テプレノンまたはプラウノールを含有していることが好ましいが、ラロキシフェンを含有していてもよい。
- [0022] 本発明に係る治療組成物は、インターフェロン治療を必要とするC型肝炎患者に対して適用されることが好ましく、インターフェロンをさらに含有していてもよく、スタチン剤をさらに含有していてもよい。
- [0023] 本発明に係る治療キットは、C型肝炎を治療するために、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を備えていることを特徴としている。本発明に係る治療キットは、テプレノンまたはプラウノールを備えていることが好ましいが、ラロキシフェンを備えていてもよい。
- [0024] 本発明に係る治療キットは、インターフェロン治療を必要とするC型肝炎患者に対して適用されることが好ましく、インターフェロンをさらに備えていてもよく、スタチン剤をさらに備えていてもよい。
- [0025] 本発明に係るさらなる組成物（第2の組成物）は、スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強するために、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を含有していることを特徴としている。本発明に係る第2の組成物は、テプレノンまたはプラウノールを含有していることが好ましい。
- [0026] 本発明に係るさらなるキット（第2のキット）は、スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強するために、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を備えていることを特徴としている。本発明に係る第2のキットは、テ

プレノンまたはプラウノトールを備えている。また、本発明に係る第2のキットは、スタチン剤をさらに備えていてもよい。

発明の効果

[0027] 本発明を用いれば、新規抗HCV剤およびC型肝炎治療薬を提供し得る。

図面の簡単な説明

[0028] [図1(a)] テプレノンの抗HCV活性を調べた結果を示す図である。

[図1(b)] テプレノンのOR6細胞増殖に対する影響を調べた結果を示す図である。

[図2(a)] プ라우ノトールの抗HCV活性を調べた結果を示す図である。

[図2(b)] プ라우ノトールのOR6細胞増殖に対する影響を調べた結果を示す図である。

[図3] 抗HCV活性についてのテプレノンとIFN- α との併用効果を示す図である。

[図4] ラロキシフェンの抗HCV活性を調べた結果を示す図である。

[図5] ラロキシフェンによるHCVタンパク質の発現抑制を示す図である。

[図6] 抗HCV活性についてのラロキシフェンとIFN- α との併用効果を示す図である。

[図7] HCVレプリコン複製細胞および全長HCV RNA複製細胞を作製する手順を示す図である。

[図8] ORL8細胞およびORL11細胞におけるルシフェラーゼ活性とHCV RNA量との相関を示す図である。

[図9] ORL8細胞およびORL11細胞、ならびにOR6細胞を用いた、IFN- α の抗HCV活性の比較を示す図である。

[図10] ORL細胞における、テプレノンの抗HCV活性を検証した結果を示す図である。

[図11] ORL細胞における、ラロキシフェンの抗HCV活性を検証した結果を示す図である。

[図12] PTVの抗HCV活性およびゲラニルゲラニル化抑制効果に対するテプレノ

ンの効果を調べた結果を示す図である。

[図13] ゲラニルゲラニル化を受ける宿主タンパク質であるRap1Aを指標として、ゲラニルゲラニル化を評価するアッセイの原理を示す図である。

[図14] PTV以外のスタチン剤の抗HCV活性およびゲラニルゲラニル化抑制効果に対するテプレノンの効果を調べた結果を示す図である。

[図15] アセチル-CoAからファルネシルピロリン酸を経てコレステロールおよびゲラニルゲラニルピロリン酸が合成される過程（メバロン酸経路）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0029] [1] 抗HCV剤

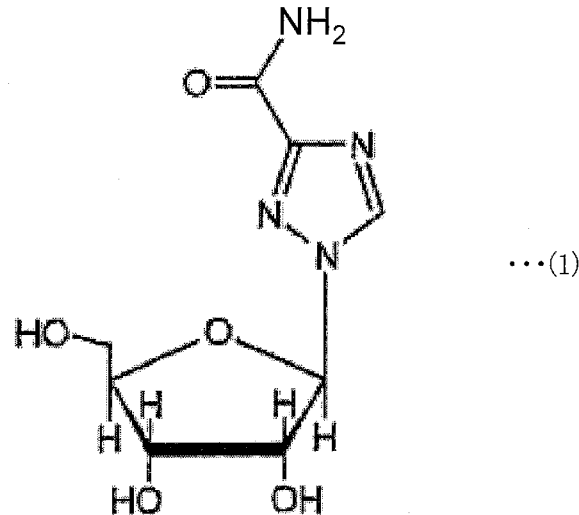
本発明は、新規抗HCV剤を提供する。一般に、抗HCV作用は、HCVの感染、複製、粒子産生および再感染のいずれかを抑制または阻害する作用が意図されるが、本明細書中において使用される場合、「抗HCV」は、HCVの複製の抑制または阻害が意図される。なお、「抗HCV剤」の適用は生体内および生体外が包含されるが、生体内での使用の局面は「治療組成物」として後述する。

[0030] HCVは、1989年に米国のカイロン社のグループによって発見された。それ以前は、原因不明の肝炎を引き起こす病原体として、非A非B型肝炎ウイルスと呼ばれていた。C型慢性肝炎に対する治療の歴史をさかのぼると、HCVが発見される以前から非A非B型肝炎ウイルスに対するIFN療法が有効であることが報告されていた。HCV感染の診断が可能となつてから、はじめにIFN単独療法が行われたがその著効率は約30%であった。2001年よりIFN- α とリバビリンとの併用療法が開始され、その著効率は約40%となった。2004年よりPEG-IFN- α とリバビリンとの併用療法が開始されて、その著効率は約50%に改善された。しかし、依然として約半数のC型慢性肝炎患者ではウイルスが排除されず、肝硬変、肝癌等へ進行している。また、IFN治療が有効ではない患者では、グリチルリチン製剤、ウルソデオキシコール酸などを用いた対症療法の継続、肝硬変、肝癌等に対する診断、治療に対する経済的負担もまた、大きな問題である。このような、現状では新しい治療法の

開発が急務とされており、社会的な需要も大きい。

[0031] また、IFN- α との併用によるC型慢性肝炎治療剤として臨床で用いられているリバビリンの構造を下記式(1)

[0032] [化1]



[0033] に示す。リバビリンは核酸構造類似体であり、本発明に係る抗HCV剤の有効成分の構造とは全く類似していない。また、リバビリンは単独では抗HCV作用がほとんどないことが知られている。したがって、リバビリンの構造または作用に基づいて、当業者が本発明に係る抗HCV剤の有効成分の抗HCV作用を推測することは非常に困難であることは明らかである。

[0034] 本発明に係る抗HCV剤は、IFNと組み合わせて適用されることが好ましい。従来から抗HCV剤として用いられているIFN以外にも、シクロスポリン (CsA) にも優れた抗HCV活性があることが報告されている。本発明に係る抗HCV剤は、これらの抗HCV活性を増強し、特にIFNの抗HCV活性を相乗的に増強し得る。

[0035] 後述するように、本発明者らは、抗骨粗しょう症作用を有する化合物がスタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強することを見出している。このことは、本発明に係る抗HCV剤がスタチン剤と組み合わせて適用されてもよいことを示している。すなわち、本発明に係る抗HCV剤は、スタチン剤の抗HCV活性を増強するために用いられ得る。

[0036] 抗骨粗しょう症作用を有する化合物による抗HCV活性は、スタチン剤による

抗HCV活性（ゲラニルゲラニル化抑制効果）とは全く別の作用機序である。スタチン剤とは独立した作用機序にて抗HCV活性を発揮する物質（抗骨粗しょう症作用を有する化合物）が、スタチン剤の機能を増強することは、全く予想すらできなかった。

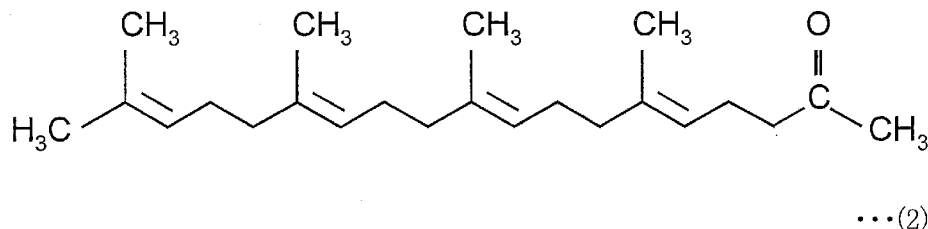
[0037] 本発明に係る抗HCV剤と併用されるスタチン剤としては、後述する「〔4〕スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果の増強」の項に記載するものが挙げられる。

[0038] 〔2〕抗HCV剤の有効成分

〔2-1〕テプレノン

テプレノンは、胃粘液の合成および分泌を促す作用を有している物質であり、胃粘膜の血流増加、プロスタグランジン（胃粘膜保護）の生成増加などの作用を有していることも知られている。特に、胃粘膜保護作用に優れ、胃炎や胃潰瘍を改善する物質である。テプレノンの構造を下記式（2）

[0039] [化2]



[0040] に示す。

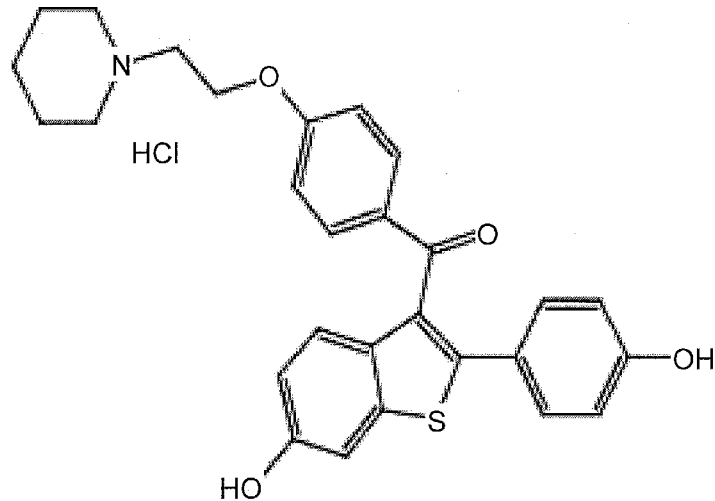
[0041] 本発明者らは、「抗ウイルス効果」という、これまでに全く予期し得なかったテプレノンの能力を見出した。テプレノンの「抗ウイルス効果」を教示または示唆する報告は、これまで全くなされていない。また、テプレノンの構造は、核酸構造類似体であるリバビリンの構造と全く類似していない。このように、テプレノンの抗HCV活性は当業者に容易に予測し得たものではない。なお、テプレノンは、エーザイ社より入手可能である。

[0042] 〔2-2〕プラウノトール

プラウノトールは、テプレノンと同様に、胃粘液の合成および分泌を促す作用を有している物質であり、胃粘膜の血流増加、プロスタグランジン（胃

の治療剤として用いられているラロキシフェンの抗HCV活性を検証した。ラロキシフェンの構造を下記式（４）

[0048] [化4]



…(4)

[0049] に示す。

[0050] 本発明者らは、「抗ウイルス効果」という、これまでに全く予期し得なかったラロキシフェンの能力を見出した。ラロキシフェンの「抗ウイルス効果」を教示または示唆する報告は、これまで全くなされていない。また、ラロキシフェンの構造は、核酸構造類似体であるリバビリンの構造と全く類似していないだけでなく、テプレノンまたはプラウノトールの構造とも類似していない。このように、ラロキシフェンの抗HCV活性は当業者に容易に予測し得たものではない。ラロキシフェンは、IFN治療効果が低い更年期以降の女性の治療成績を改善し、1 b型HCV全体の治療成績を向上させ得る。なお、ラロキシフェンは、LKT Labs, Incより入手可能である。

[0051] [3] 治療組成物、治療キットおよび治療方法

本発明は、C型肝炎を治療するための治療組成物、治療キットおよび治療方法を提供する。本発明に係る治療組成物は、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を含有していることを特徴としている。C型肝炎は、急性C型肝炎と慢性C型肝炎とに分けられ得るが、本発明に係る治療組成物は慢性C型肝炎

に好適である。

[0052] 上述したように、本発明者らは、抗骨粗しょう症作用を有する化合物の抗HCV活性を見出し、その能力を、OR6システムを用いて抗骨粗しょう症作用を有する化合物の抗HCV活性を検証し、後述する実施例に示すように、抗骨粗しょう症作用を有する化合物が濃度依存的にHCV RNAの複製を抑制することを確認した。上述したテプレノン、プラウノールおよびラロキシフェンについては、種々の薬理作用についての報告が多くなされているが、ウイルス複製抑制機能に関する報告は全くなされていない。

[0053] 本発明に係る治療組成物は、経口、非経口、または局所のいずれかの経路で被験体へ投与され得る。当業者は、有効成分である抗骨粗しょう症作用を有する化合物の含有量を、治療対象の体重および状態、治療される疾病の状態、および選択される特定の投与経路に応じて、適宜選択し得る。有効成分である抗骨粗しょう症作用を有する化合物は、任意の投与経路により、単独で、あるいは薬学的に受容可能な担体または希釈剤と組み合わせて、単回または複数回投与され得る。本発明に係る治療組成物の剤形は特に限定されず、錠剤、カプセル剤、ロゼンジ剤、トローチ剤、ハードキャンディー剤、散剤、スプレー剤、クリーム剤、塗剤、坐剤、ゼリー剤、ゲル剤、ペースト剤、ローション剤、軟膏剤、水性懸濁液、注射溶液、エリキシル剤、シロップ剤などの形態にて、種々の薬学的に受容可能な担体と組み合わせられ得る。なお、薬学的に受容可能な担体は当業者には周知であり、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Merck Pub. Co., N. J. 1991) に十分に記載されている。

[0054] 現在、C型慢性肝炎に対する標準的な治療法は、IFNとリバビリンの併用療法である。しかし、この治療法を適用したときのC型肝炎に対する有効性は、血中での安定性を高めたPEG-IFN- α を用いた場合でも最大50%に過ぎず、残りの患者は、致命的な肝硬変、肝癌発症の危険に曝されている。また、リバビリンは65歳以上の高齢者には溶血性貧血の副作用が頻発し、治療の中止を余儀なくされるという事態が生じている。したがって、リバビリンに

代わる新たなIFNとの併用に有効な薬剤の早期開発が望まれている。

[0055] 本発明者らが見出した、抗骨粗しょう症作用を有する化合物（特に、テプレノン、プラウノールおよびラロキシフェン）の特性は、現状のIFN治療を大きく改善することを期待させ得る。また、本発明は、PEG-IFN- α とリバビリンとの併用療法の治療効果を大きく改善することを期待させる。すなわち、本発明に係る治療組成物は、IFN治療を必要とするC型肝炎患者に対して適用されることが好ましい。また、上述したように、抗HCV活性を有しているIFNとともに用いられることによって、抗骨粗しょう症作用を有する化合物はこれらの抗HCV活性を相乗的に増強する。すなわち、本発明に係る治療組成物は、IFNをさらに含有し得る。IFNとしては、IFN- α またはIFN- β が好ましく、IFN- α が特に好ましい。また、IFNはPEG化等の修飾がされていてもよい。また、優れた抗HCV活性があることが報告されているCsAを併用してもよい。すなわち、本発明に係る治療組成物は、CsAをさらに含有し得る。

[0056] 後述するように、本発明者らは、抗骨粗しょう症作用を有する化合物がスタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強することを見出している。このことは、本発明に係る治療組成物がスタチン剤と組み合わせて適用されてもよいことを示している。すなわち、本発明に係る治療組成物は、スタチン剤をさらに含有し得る。

[0057] 本発明に係る抗HCV剤と併用されるスタチン剤としては、後述する「[4]スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果の増強」の項に記載するものが挙げられる。

[0058] また、本発明は、HCVの治療のみならず他の病原ウイルス（インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルスなど）についての研究に大きな影響を与えることが期待される。

[0059] 本発明に係る治療キットは、上述した治療組成物がキットの態様で提供されたものであり得る。本明細書中において使用される場合、用語「キット」は、特定の材料を内包する容器（例えば、ボトル、プレート、チューブ、ディッシュなど）を備えた包装が意図され、好ましくはこれらの材料を使用す

るための使用説明書を備えている。使用説明書は、紙またはその他の媒体に書かれていても印刷されていてもよく、あるいは磁気テープ、コンピューター読み取り可能ディスクまたはテープ、CD-ROMなどのような電子媒体に付されてもよい。

[0060] 本発明に係る治療キットは、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を備えていればよく、本発明に係る治療組成物を備えていてもよい。本発明に係る治療キットは、抗骨粗しょう症作用を有する化合物または本発明に係る治療組成物と異なる成分を含むさらなる組成物が備えられていてもよい。本発明に係る治療組成物と異なる成分を含む組成物としては、特に限定されないが、IFNを有効成分とするC型肝炎治療用組成物が好ましい。IFNとしては、IFN- α またはIFN- β が好ましく、IFN- α が特に好ましい。また、IFNはPEG化等の修飾がされていてもよい。すなわち、本発明に係る治療キットは、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を備えていればよく、IFNをさらに備えていてもよい。また、優れた抗HCV活性があることが報告されているCsAおよびスタチン剤を併用してもよい。すなわち、本発明に係る治療キットは、CsAまたはスタチン剤をさらに備えていてもよい。本発明に係る治療キットと併用されるスタチン剤としては、「[4]スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果の増強」において記載するものが挙げられる。

[0061] キットに2種類以上の組成物が備えられる場合には、これらは別個の容器（例えば、分割されたボトルなど）に入れて備えられてもよく、分割されていない単独の容器に入れて備えられてもよい。またキットは、希釈剤、溶媒、洗浄液またはその他の試薬を内包した容器を備え得る。さらに、治療キットは、C型肝炎治療法に適用するために必要な器具をあわせて備えてもよい。

[0062] キットの形態は、別個の成分が好ましくは異なる剤形（例えば経口および非経口）で投与され、異なる投与量で投与され、または、処方する医師が当該組合せの各成分の滴定を所望する場合などに特に有利である。本発明に係る治療キットの使用方法は、上述した組成物の使用形態に従えばよいことを

、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。

[0063] また、本発明に係る治療法は、上述した治療組成物または治療キットを適用する態様であり得る。すなわち、本発明に係る治療法は、抗骨粗しょう症作用を有する化合物をC型肝炎患者に投与する工程を包含していればよく、IFN、CsAまたはスタチン剤を投与する工程をさらに包含してもよい。本発明に係る治療法における上記組成物等の適用については、上述した使用形態に従えばよいことを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。

[0064] [4] スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果の増強

本発明は、スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強するための組成物（第2の組成物）、キット（第2のキット）および方法を提供する。

[0065] 本発明者らは、テプレノンが「抗ウイルス効果」だけでなく、「スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強する」という能力を有していることを見出した。このような知見はこれまで全く知られていない。また、プラウノトールはテプレノンと類似の構造を有しているため、プラウノトールもスタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強する能力を有していると考えられる。さらに、テプレノンおよびプラウノトールが、上述したように抗骨粗しょう症作用を有する化合物であることから、抗骨粗しょう症作用を有する化合物は、スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強する能力を有していると考えられる。

[0066] このように、本発明に係る第2の組成物は、スタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強するための組成物であって、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を含有していることを特徴としている。特に、本発明に係る第2の組成物は、テプレノンまたはプラウノトールを含有していることが好ましい。

[0067] 一実施形態において、本発明に係る第2の組成物は、スタチン剤による抗HCV活性を増強するために用いられ得る。例えば、本発明に係る第2の組成物は、スタチン剤と組み合わせて適用されてもよく、本発明に係る第2の組成

物はスタチン剤をさらに含有している態様であってもよい。本発明に係る第2の組成物は、上述した治療組成物であってもよいし、試薬の用途の組成物であってもよい。

[0068] スタチン剤による抗HCV活性は、ゲラニルゲラニル化を抑制することによって発揮されることが知られている。そのメカニズムを図15に示す。具体的には、以下の通りである。アセチル-CoAからメバロン酸を経てゲラニルゲラニルピロリン酸およびコレステロールが合成される（メバロン酸経路）。ファルネシルピロリン酸の下流においてゲラニルゲラニルピロリン酸合成経路とコレステロール合成経路とに分岐する。スタチン剤はメバロン酸の合成酵素であるHMG-CoA還元酵素を阻害することによって、メバロン酸の生合成を抑制し、下流の代謝産物であるゲラニルゲラニルピロリン酸およびコレステロールの生合成を阻害する。HCV RNAの複製にはFBL2などのゲラニルゲラニル化の修飾を受ける宿主タンパク質が必要であることが知られている。スタチン剤によってゲラニルゲラニルトランスフェラーゼの基質であるゲラニルゲラニルピロリン酸が供給されなくなるため、HCV RNAの複製が抑制される。

[0069] このような機構により、抗骨粗しょう症作用を有する化合物とスタチン剤とを併用した場合に、スタチン剤によるゲラニルゲラニル化が一層抑制されるため、これらを単独で用いる場合よりも抗HCV活性が相乗的に高まり得る。

[0070] 本発明に係る第2の組成物とともに用いられるスタチン剤は、ゲラニルゲラニル化抑制効果を示すスタチン剤が意図され、このようなスタチン剤としては、例えばFLV、ピタバスタチン（PTV）、アトロバスタチン（ATV）、シンバスタチン（SIV）およびローバスタチン（LOV）が挙げられる。また、このようなスタチン剤は、上述した抗HCV剤、治療組成物および治療キットと併用されてもよい。

[0071] 本発明に係る第2のキットは、上述した第2の組成物がキットの態様で提供されたものであり得る。本発明に係る第2のキットは、上述した治療キットであってもよいし、試薬の用途のキットであってもよい。

- [0072] 本発明に係る第2のキットは、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を備えていればよく、本発明に係る第2の組成物を備えていてもよい。本発明に係る第2のキットは、抗骨粗しょう症作用を有する化合物と異なる成分がさらに備えられていてもよい。このような異なる成分としては、特に限定されないが、スタチン剤が好ましい。
- [0073] また、本発明に係る増強方法は、スタチン剤によるゲラニルゲラニル化が抑制されるべきサンプル（細胞、組織など）または被験体（哺乳動物など）に対して、抗骨粗しょう症作用を有する化合物がスタチン剤とともに適用される工程を包含している。抗骨粗しょう症作用を有する化合物は、上記サンプルまたは被験体に対して、スタチン剤と同時に適用されても、連続的に適用されてもよく、スタチン剤より先に適用されても、スタチン剤より後に適用されてもよい。なお、本発明に係る増強方法は、抗骨粗しょう症作用を有する化合物を適用する態様であっても、上述した第2の組成物または第2のキットを適用する態様であってもよい。本発明に係る増強方法における上記第2の組成物等の適用については、上述した使用形態に従えばよいことを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。
- [0074] なお、スタチン剤は、抗HCV活性の他に、コレステロール合成の抑制、血管内皮機能改善、抗炎症作用、血栓形成抑制等の多くの機能を有していることが知られており、これらの機能の多くが、スタチン剤のプレニル化（イソプレニル化またはゲラニルゲラニル化）抑制効果に基づく事が報告されている。例えば、プレニル化される宿主タンパク質としては細胞増殖に関するタンパク質が挙げられ、プレニル化を阻害することは抗癌剤の標的でもあり得、E1-Seraqらは、スタチン剤が肝癌発生のリスクを減少させることを報告している。
- [0075] このように、抗骨粗しょう症作用を有する化合物はスタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果をさらに増強させるため、スタチン剤を有効成分とする医薬の機能を改善することができる。すなわち、本発明は広範囲にわたる技術に適用可能であり、具体的には、抗HCV、コレステロール合成の抑制、

血管内皮機能改善、抗炎症作用、血栓形成抑制、抗癌等を目的とした医薬を提供し得る。

[0076] 本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

[0077] また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

実施例

[0078] [1: 試薬]

テプレノンはエーザイ社より購入した。プラウノトールは第一三共社より購入した。ラロキシフェンはLKT Labs, Incより購入した。IFN- α はシグマ社より購入した。

[0079] [2: テプレノンの抗HCV活性]

テプレノンのHCV RNA複製に対する効果についてOR6細胞を用いて検討した。24ウエルプレートに播種したOR6細胞(2x10⁴個)を、37°Cで24時間培養した後、テプレノン(0, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml)を含む500 μ lの10% FBS含有DMEMで培地を置換した。この細胞を、37°Cでさらに72時間培養した後にPBSで洗浄し、100 μ lのRenilla lysis buffer (Promega社)を用いて回収した。10 μ lのサンプルに対して50 μ lのRenilla assay buffer (Promega社)を添加し、サンプル中のRenilla luciferase活性(図中の縦軸(RLU))を測定した。テプレノンを添加していない場合(コントロール)のRenilla luciferase活性を100%として図中に示した。なお、全ての実験において、異なる3種類のサンプルより得られた結果より平均値、標準偏差を算出した。図1(a)に示すように、Renilla luciferase活性は、テプレノンの濃度に依存して抑制されることが分かった(EG₅₀: 5.23 μ g/ml)。

[0080] [3: テプレノンのOR6細胞増殖に対する影響]

テプレノンの細胞増殖に及ぼす影響について検討した。6 ウエルプレートに播種したOR6細胞 (8×10^4 個) を、 37°C で24時間培養した後、テプレノン (0, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む2 mlの10% FBS含有DMEMで培地を置換した。この細胞を、 37°C でさらに72時間培養した後にPBSで洗浄し、0.25%トリプシン処理にて回収した細胞をトリパンブルーにて染色し、生細胞数を測定した。テプレノンを添加していない場合 (コントロール) の生細胞数を100%として図中に示した。全ての実験において、異なる3種類のサンプルより得られた結果より平均値、標準偏差を算出した。図1 (b) に示すように、テプレノンは、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度ではOR6細胞に対する細胞増殖に影響を与えないことがわかった。

[0081] [4 : プラウノールの抗HCV活性]

プラウノールのHCV RNA複製に対する効果についてOR6細胞を用いて検討した。24 ウエルプレートに播種したOR6細胞 (2×10^4 個) を、 37°C で24時間培養した後、プラウノール (0, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む500 μl の10% FBS含有DMEMで培地を置換した。この細胞を、 37°C でさらに72時間培養した後にPBSで洗浄し、100 μl のRenilla lysis bufferを用いて回収した。10 μl のサンプルに対して50 μl のRenilla assay bufferを添加し、サンプル中のRenilla luciferase活性 (図中の縦軸 (RLU)) を測定した。プラウノールを添加していない場合 (コントロール) のRenilla luciferase活性を100%として図中に示した。なお、全ての実験において、異なる3種類のサンプルより得られた結果より平均値、標準偏差を算出した。図2 (a) に示すように、Renilla luciferase活性は、プラウノールの濃度に依存して抑制されることが分かった (EC_{50} : 2.57 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 。

[0082] [5 : プラウノールのOR6細胞増殖に対する影響]

プラウノールの細胞増殖に及ぼす影響について検討した。6 ウエルプレートに播種したOR6細胞 (8×10^4 個) を、 37°C で24時間培養した後、プラウノール (0, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む2 mlの10% FBS含有DMEMで培地を置換した。この細胞を、 37°C でさらに72時間培養した後にP

BSで洗浄し、0.25%トリプシン処理にて回収した細胞をトリパンブルーにて染色し、生細胞数を測定した。プラウノールを添加していない場合（コントロール）の生細胞数を100%として図中に示した。全ての実験において、異なる3種類のサンプルより得られた結果より平均値、標準偏差を算出した。図2（b）に示すように、プラウノールは、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度ではOR6細胞に対する細胞増殖に影響を与えないことがわかった。

[0083] [6 : IFN- α の抗HCV活性に対するテプレノンの効果]

IFN- α の抗HCV活性に対するテプレノンの効果についてOR6細胞を用いて検討した。24ウエルプレートに播種したOR6細胞（ 2×10^4 個）を、37°Cで24時間培養した後、IFN- α （0, 2.5, 5 IU/ml）とともにテプレノン（0, 1.25, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ）を添加した500 μl の10% FBS含有DMEMで培地を置換した。この細胞を、37°Cでさらに72時間培養した後にPBSで洗浄し、100 μl のRenilla lysis bufferを用いて回収した。10 μl のサンプルに対して50 μl のRenilla assay bufferを添加し、サンプル中のRenilla luciferase活性（図中の縦軸（RLU））を測定した。テプレノンおよびIFN- α を添加していない場合（コントロール）のRenilla luciferase活性を100%として図中に示した。なお、全ての実験において、異なる3種類のサンプルより得られた結果より平均値、標準偏差を算出した。図3に示すように、テプレノンはIFN- α の効果を濃度依存的に増強することがわかった。

[0084] [7 : ラロキシフェンの抗HCV活性]

ラロキシフェンのHCV RNA複製に対する効果についてOR6細胞を用いて検討した。24ウエルプレートに播種したOR6細胞（ 2×10^4 個）を、37°Cで24時間培養した後、ラロキシフェン（0, 0.625, 1.25, 2.5 μM ）を含む500 μl の10% FBS含有DMEMで培地を置換した。この細胞を、37°Cでさらに72時間培養した後にPBSで洗浄し、100 μl のRenilla lysis bufferを用いて回収した。10 μl のサンプルに対して50 μl のRenilla assay bufferを添加し、サンプル中のRenilla luciferase活性（図中の縦軸（RLU））を測定した。ラロキシフェンを添加していない場合（コントロール）のRenilla luciferase活性を100

%として図中に示した。なお、全ての実験において、異なる3種類のサンプルより得られた結果より平均値、標準偏差を算出した。図4に示すように、Renilla luciferase活性は、ラロキシフェンの濃度に依存して抑制されることが分かった (EC_{50} : $1\mu\text{M}$)。

[0085] [8 : ラロキシフェンによるHCVタンパク質の発現抑制]

上記ラロキシフェンの抗HCV活性が、HCV RNAの外来性遺伝子産物を抑制しているのではなくHCV RNA複製そのものを抑制していることに起因していることを確認した。外来性遺伝子を含まない本来の9.6kbの全長HCV-0 RNAが複製されるOR6c細胞を用いた。HCV-0には複製効率を増強させる4つの適応変異 (K1609E, E1202G, Q1112R, P1115L) を導入している。

[0086] 6ウエルプレートに播種したOR6c細胞 (10^5 個) を、 37°C で24時間培養した後、ラロキシフェン (0, 0.625, 1.25, $2.5\mu\text{M}$) を添加し、さらに72時間または120時間培養した。陽性コントロールとしてIFN- α (10 IU/ml) を用いた。SDSを含むサンプルバッファ- $100\mu\text{l}$ を加えて、細胞溶解液を回収した。10分間超音波破碎機にてソニケーションを行った後、各サンプルに $10\mu\text{l}$ の2-メルカプトエタノールを加え 100°C で3分間処理した。 $10\sim 20\mu\text{l}$ のサンプルを10%のSDS-PAGEに供し、これをメンブレン (PVDF膜) に転写した。5%のスキムミルクを含む0.1% トリス緩衝液 ($10\text{mM Tris (pH}7.5)$, 150mM NaCl , 0.1% Tween20) で60分間、タンパク質を転写したメンブレンをブロッキングした。その後、各HCVタンパク質 (Coreタンパク質およびNS3タンパク質) に対する抗体および β -actinタンパク質に対する抗体を0.1% トリス緩衝液で1000倍希釈した溶液と前記のメンブレンとを接触させ、60分間反応を行った。メンブレンを0.1% トリス緩衝液にて5分 \times 3回洗浄後、1000倍希釈したHRP標識マウス二次抗体を加えた0.1% トリス緩衝液と接触させ、60分間反応を行った。メンブレンを0.1% トリス緩衝液にて20分 \times 3回洗浄した。ルネッサンス™ルミノールウエスタンブロット化学発光検出試薬プラス (NEN Life Science) にて化学発光させ、X線フィルム (KODAK BioMax) で感光した。なお、実験で用いた抗体は、抗Core抗体 (Institute

of Immunology社)、抗NS3抗体 (Novocastera Laboratories社) および抗 β -actin抗体 (Sigma社) である。

[0087] 図5に示すようにラロキシフェン処理をした72時間、120時間後の細胞ではラロキシフェンの濃度依存的にHCVタンパク質の発現が抑制されていた。このことは、ラロキシフェンが前出のOR6細胞においてもHCV RNAの外来性遺伝子産物を抑制しているのではなくHCV RNA複製そのものを抑制していることを示している。ラロキシフェンのHCVタンパク質抑制効果は72時間後よりも120時間後のほうが増強されており、1回のラロキシフェンの抗HCV活性が長時間持続することがわかった。

[0088] [9 : IFN- α の抗HCV活性に対するラロキシフェンの効果]

IFN- α の抗HCV活性に対するラロキシフェンの効果についてOR6細胞を用いて検討した。24ウエルプレートに播種したOR6細胞 (2×10^4 個) を、37°Cで24時間培養した後、IFN- α (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 IU/ml) とともにラロキシフェン (0, 0.625, 1.25, 2.5 μ M) を添加した500 μ lの10% FBS含有DMEMで培地を置換した。この細胞を、37°Cでさらに72時間培養した後、PBSで洗浄し、100 μ lのRenilla lysis bufferを用いて回収した。10 μ lのサンプルに対して50 μ lのRenilla assay bufferを添加し、サンプル中のRenilla luciferase活性 (図中の縦軸 (RLU)) を測定した。ラロキシフェンおよびIFN- α を添加していない場合 (コントロール) のRenilla luciferase活性を100%として図中に示した。なお、全ての実験において、異なる3種類のサンプルより得られた結果より平均値、標準偏差を算出した。図6に示すように、ラロキシフェンはIFN- α の効果を濃度依存的に増強することがわかった。

[0089] [10 : HuH-7細胞株以外の細胞に由来する全長HCV RNA複製細胞]

本発明者らは、HuH-7細胞株由来のHCV生活環再現システムに匹敵する能力を有する、HuH-7細胞株以外の細胞株に由来するHCV生活環再現システムを構築している (本願出願時は未公開)。この新規システムは、HuH-7細胞株以外の特定の細胞 (Li23細胞) に由来し、特定の全長HCVゲノム配列と選択マーカ

一遺伝子配列とを含んでいるRNAが導入されている全長HCV RNA複製細胞（ORL細胞）を用いるものである。全長HCV RNA複製細胞（ORL細胞）の作製手順を、図7に示す。また、ORL細胞（ORL8細胞およびORL11細胞）におけるルシフェラーゼ活性とHCV RNA量との相関を、図8に示す。この結果は、ORL細胞が、薬剤の効果を簡便に評価できる（細胞由来のルシフェラーゼ活性値がHCV RNA量と相関している）細胞系であるOR6細胞（特許文献1参照）と同様に、薬剤の効果を簡便に評価できる細胞系であることを示している。

[0090] なお、本発明者らが作製した細胞は、岡山大学寄託機関である国立大学法人岡山大学知的財産本部（岡山市津島中一丁目1番1号）に寄託されており、その寄託番号は以下の通りである。

[0091] [表1]

細胞名	寄託番号
Li23	OP-KITAKU-0001
sOL	OP-KITAKU-0002
OL8	OP-KITAKU-0003
OL11	OP-KITAKU-0004
OL14	OP-KITAKU-0005
sORL8(pool)	OP-KITAKU-0006
sORL11(pool)	OP-KITAKU-0007
ORL8	OP-KITAKU-0008
ORL11	OP-KITAKU-0009
1B-4RL8	OP-KITAKU-0010
KAH5RL8	OP-KITAKU-0011
1B-4RN/C-5B	OP-KITAKU-0012
OR6	OP-KITAKU-0013

[0092] また、これらの細胞は、独立行政法人産業技術総合研究所、特許生物寄託センター（305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 つくばセンター中央第6）に平成20年7月31日に受託され、かつ平成21年7月30日に国際移管の申請が受領されており、その受領番号は以下の通りである。

[表2]

細胞名	受領番号
Li23	FERM ABP-11150
sOL	FERM ABP-11151
OL8	FERM ABP-11152
OL11	FERM ABP-11153
OL14	FERM ABP-11154
sORL8(pool)	FERM ABP-11155
sORL11(pool)	FERM ABP-11156
ORL8	FERM ABP-11157
ORL11	FERM ABP-11158
1B-4RL8	FERM ABP-11159
KAH5RL8	FERM ABP-11160
OR6	FERM ABP-11161
1B-4RN/C-5B	FERM ABP-11162

[0093] これまでに抗HCV活性が報告されているIFN- α について、ORL細胞のアッセイ系を用いた評価を行った結果を、図9に示す（対照としてOR6細胞のアッセイ系を用いている。）。手順としては、各細胞にIFN- α （0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 10 IU/ml : Sigma社, 12396）を添加し、72時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。解析の結果、ORL8細胞、ORL11細胞およびOR6細胞におけるEC₅₀はそれぞれ0.13 IU/ml、0.30 IU/mlおよび0.40 IU/mlと算定された。同様の実験をさらに3回行ったが、ほぼ同じような値が得られ再現性は良好であった。IFN- α については、ORL8細胞の感受性が高く、ORL11細胞、OR6細胞の順であった。

[0094] なお、IFN- α の添加により生じるルシフェラーゼ活性の減少が、IFN- α による細胞の増殖抑制、または細胞毒性によるものではないことを確認するために、ルシフェラーゼアッセイと同じ条件にて細胞を培養して、トリパンブルー染色法にて細胞数を測定した。それぞれの細胞で得られたEC₅₀値に相当する濃度のIFN- α の添加効果を調べた。その結果、いずれの細胞においても、対照細胞と比較して95%以上であり、IFN- α による細胞毒性もほとんど認められなかった（図9）。

[0095] 本発明者らは、IFN- α 以外の抗HCV活性が報告されている化合物（例えば、IFN- β 、IFN- γ 、CsA、FLV等）についても同様の実験を行い、同様の結果を得ている（結果は示さず）。

[0096] [11：ORL細胞アッセイ系を用いたテプレノンの抗HCV活性]

各細胞にテプレノン（最終濃度0, 0.313, 0.615, 1.25, 2.5, 5.0 μ g/ml）を添加し、72時間後のルシフェラーゼ活性を測定した（図10）。解析の結果、ORL8細胞、ORL11細胞およびOR6細胞におけるEC₅₀はそれぞれ1.12 μ g/ml、1.88 μ g/mlおよび3.27 μ g/mlと算定された。同様の実験をさらに3回行ったが、ほぼ同じような値が得られ再現性は良好であった。

[0097] [12：ORL細胞アッセイ系を用いたラロキシフェンの抗HCV活性]

各細胞にラロキシフェン（最終濃度0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3および5 μ M）を添加し、72時間後のルシフェラーゼ活性を測定した（図11）。解析の結果、ORL8細胞およびOR6細胞におけるEC₅₀はそれぞれ2.45 μ Mおよび1.01 μ Mと算定された。同様の実験をさらに3回行ったが、ほぼ同じような値が得られ再現性は良好であった。

[0098] [13：PTVの抗HCV活性・ゲラニルゲラニル化抑制効果に対するテプレノンの効果]

PTVの抗HCV活性およびゲラニルゲラニル化抑制効果に対するテプレノンの効果についてOR6細胞を用いて検討した。24ウエルプレートに播種したOR6細胞（2x10⁴個）を、37°Cで24時間培養した後、PTV（0, 0.25, 0.5, 1.0 μ M）とともにテプレノン（0, 10, 20 μ g/ml）を添加した500 μ lの10% FBS含有DMEMで培地を置換した。この細胞を37°Cでさらに72時間培養した後にPBSで洗浄し、100 μ lのRenilla lysis bufferを用いてサンプルを回収した。次いで、この回収したサンプルを用いて、ルシフェラーゼアッセイおよびウエスタンブロット解析を実施した。

[0099] <ルシフェラーゼアッセイ>

10 μ lのサンプルに対して50 μ lのRenilla assay bufferを添加し、サンプル中のRenilla luciferase活性を測定した。テプレノンおよびPTVを添加して

いない場合（コントロール）のRenilla luciferase活性を100%として図中に示した。なお、全ての実験において、異なる3種類のサンプルより得られた結果より平均値、標準偏差を算出した。図12に示すように、テプレノンはPTVの抗HCV活性の効果を濃度依存的に増強することがわかった。

[0100] <ウエスタンブロット解析>

ウエスタンブロット解析を実施して、PTVのゲラニルゲラニル化抑制効果に対するテプレノンの効果を検討した。

[0101] 図13に、ゲラニルゲラニル化を受ける宿主タンパク質であるRap1Aを指標として、ゲラニルゲラニル化を評価するアッセイの原理を示す。図中の「GG」はゲラニルゲラニル基を表し、「GGPP」はゲラニルゲラニルピロリン酸を表し、「GGTase」はゲラニルゲラニルトランスフェラーゼを表し、「Rap1A-GG」はゲラニルゲラニル化されたRap1Aを表し、「Cys-Xaa-Xaa-Xaa」は、Rap1Aのゲラニルゲラニル化のモチーフであるカルボキシ末端に存在する配列を示している。なお、Cysはシステイン；2, 3番目のXaaは脂肪族のアミノ酸；4番目のXaaはロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニンである。

[0102] 抗Rap1A抗体（図中の「 α -Rap1A」）はCys-Xaa-Xaa-Xaaのモチーフをエピトープとして認識するため、ゲラニルゲラニル基がこのモチーフに結合している通常の状態では、抗Rap1A抗体はRap1Aを認識することができない。スタチン剤によってゲラニルゲラニルピロリン酸が枯渇して、カルボキシ末端にゲラニルゲラニル基が結合していない状態でのみ、抗Rap1A抗体はRap1Aを認識することが可能である。

[0103] したがって、抗Rap1A抗体を用いてウエスタンブロットを実施する場合に、スタチン剤で細胞を処理してゲラニルゲラニル化が阻害されている条件下でのみ、Rap1Aのバンドを検出することが可能である。一方、抗Rap1抗体（図中の「 α -Rap1」）はCys-Xaa-Xaa-Xaa以外の領域をエピトープとして認識するため、ゲラニルゲラニル化の有無に関わらずRap1Aを認識することができる。

[0104] 上述したアッセイを、ルシフェラーゼアッセイに用いたサンプルと同じサンプルを用いて以下のように実施した。Renilla lysis bufferを用いて回収

した80 μ lのサンプルに20 μ lの5×サンプルバッファーを加えた後に、各サンプルに10 μ lの2-メルカプトエタノールを加え100°Cで3分間処理した。

[0105] 10~20 μ lのサンプルを10%のSDS-PAGEに供し、これをメンブレン (PVDF膜) に転写した。5%のスキムミルクを含む0.1% トリス緩衝液 (10mM Tris (ph7.5), 150mM NaCl, 0.1% Tween20) で60分間、タンパク質を転写したメンブレンをブロッキングした。

[0106] その後、各HCVタンパク質 (Coreタンパク質、NS5Aタンパク質およびNS5Bタンパク質) に対する抗体、抗Rap1A抗体、抗Rap1抗体および β -actinタンパク質に対する抗体を0.1% トリス緩衝液で1000倍希釈した溶液と前記のメンブレンとを接触させ、60分間反応を行った。メンブレンを0.1% トリス緩衝液にて5分×3回洗浄後、1000倍希釈したHRP標識マウス二次抗体を加えた0.1% トリス緩衝液と接触させ、60分間反応を行った。メンブレンを0.1% トリス緩衝液にて20分×3回洗浄した。

[0107] ルネッサンス™ルミノールウエスタンブロット化学発光検出試薬プラス (NE N Life Science) にて化学発光させ、X線フィルム (KODAK BioMax) で感光した。なお、実験で用いた抗体は、抗Core抗体 (Institute of Immunology社)、抗NS5A抗体 (大阪大学、高見沢博士より供与)、抗NS5B抗体 (東京都臨床研究所、小原博士より供与)、抗Rap1A抗体 (sc-1482: Santa Cruz社)、抗Rap1抗体 (sc-65: Santa Cruz社) および抗 β -actin抗体 (Sigma社) である。

[0108] 図12のウエスタンブロット解析の結果に示すように、テプレノン単独処理 (レーン1-3) では抗Rap1A抗体によるRap1Aのバンドは検出できなかった。PTV単独 (レーン4, 7, 10) ではRap1Aのバンドが検出され、PTVの濃度依存的にシグナル強度は増強した。さらにPTVにテプレノンを併用 (レーン5, 6, 8, 9, 11, 12) するとPTVで検出されたRap1Aのバンドのシグナル強度はテプレノンの濃度依存的にさらに増強された。これらの結果はテプレノン単独ではゲラニルゲラニル化の抑制は認められないが、PTVにテプレノンを併用するとテプレノンがPTVのゲラニルゲラニル化の抑制効果を増強することを示してい

る。すなわちテプレノンはPTVのゲラニルゲラニル化の抑制の強力なアジュバントとしての機能を有することがわかった。

[0109] また、各HCVタンパク質 (core, NS5A, NS5B) はRap1Aのシグナル強度が増強するほど減弱する逆相関となっていた。このことから、ゲラニルゲラニル化が抑制されるほど、HCVの複製が抑制または阻害されることがわかった。

[0110] [1 4 : PTV以外のスタチン剤の抗HCV活性およびゲラニルゲラニル化抑制効果に対するテプレノンの効果]

PTV以外のスタチン剤の抗HCV活性およびゲラニルゲラニル化抑制効果に対するテプレノンの効果についてOR6細胞を用いて検討した。テプレノン (0, 10 μ g/ml) を用い、PTVの代わりにアトロバスタチン (ATV: 0, 5 μ M)、シンバスタチン (SIV: 0, 5 μ M)、フルバスタチン (FLV: 0, 5 μ M) およびローバスタチン (LOV: 0, 10 μ M) を用いたこと以外は、実施例 1 3と同様にして、ルシフェラーゼアッセイおよびウエスタンブロット解析を実施した。その結果を、図 1 4に示す。

[0111] なお、アトロバスタチンはアステラス製薬から入手した。フルバスタチンはCalbiochem社およびLKT Laboratories社より購入した。シンバスタチン、ローバスタチンはWako chemical社より購入した。

[0112] <ルシフェラーゼアッセイ>

図 1 4 のルシフェラーゼアッセイの結果によれば、テプレノンはATV、SIV、FLVおよびLOVの抗HCV活性の効果を増強することがわかった。

[0113] <ウエスタンブロット解析>

図 1 4 のウエスタンブロット解析の結果によれば、ATV、SIV、FLVおよびLOVのスタチン剤を単独で処理した細胞では、抗Rap1A抗体によってRap1Aのバンドを検出することができた。また、ATV、SIV、FLVおよびLOVのスタチン剤にテプレノンを併用した細胞ではRap1Aのバンドのシグナル強度が増強した。これらの結果は、テプレノンがATV、SIV、FLVおよびLOVのゲラニルゲラニル化の抑制効果を増強することを示している。また、各HCVタンパク質 (core, NS5A, NS5B) はRap1Aのシグナル強度が増強するほど減弱する逆相関となってい

た。

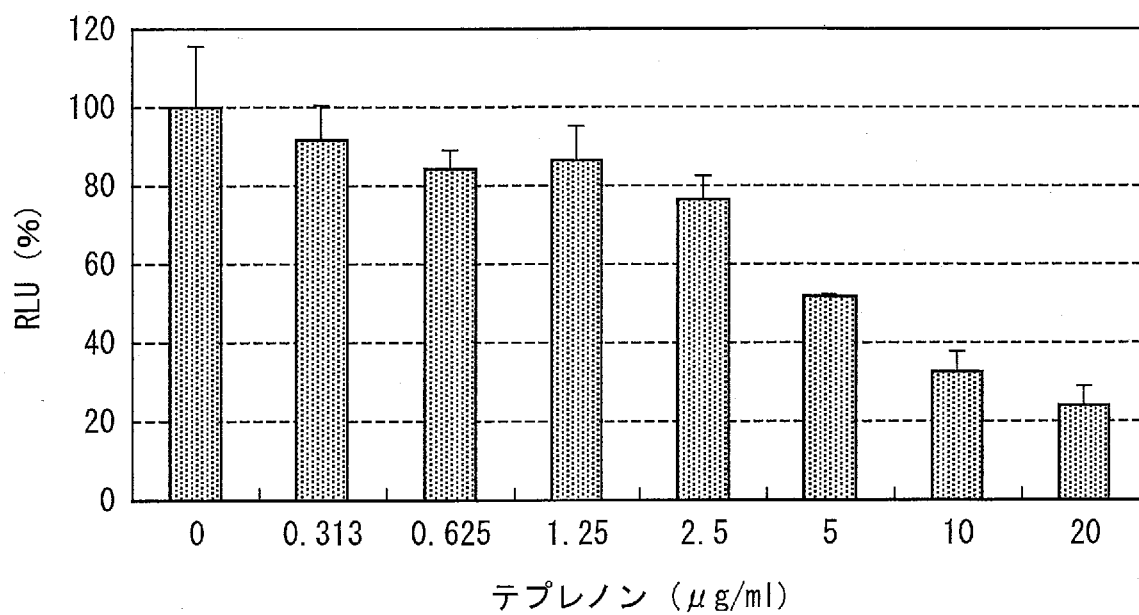
産業上の利用可能性

[0114] 本発明を用いれば、抗HCV作用を有する物質およびC型肝炎治療薬を新たに提供できるので、試薬産業、医薬品産業などの発展に貢献することができる。

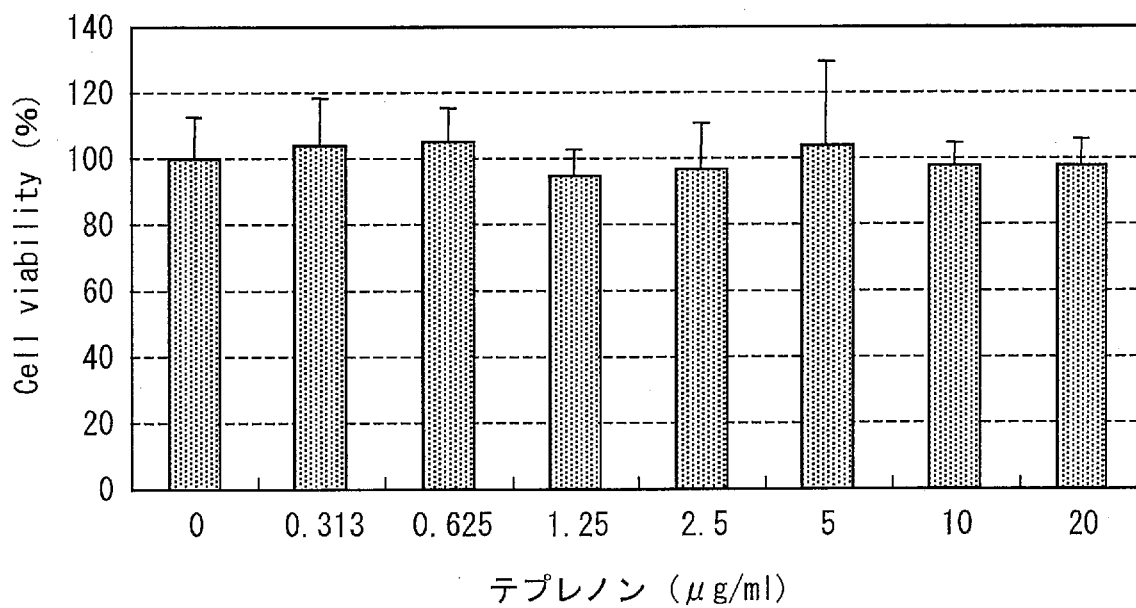
請求の範囲

- [請求項1] テプレノンまたはプラウノールを含有していることを特徴とする抗HCV剤。
- [請求項2] スタチン剤と組み合わせて適用されることを特徴とする請求項1に記載の抗HCV剤。
- [請求項3] スタチン剤をさらに含有していることを特徴とする請求項1に記載の抗HCV剤。
- [請求項4] インターフェロンと組み合わせて適用されることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の抗HCV剤。
- [請求項5] テプレノンまたはプラウノールを含有していることを特徴とするC型肝炎に対する治療組成物。
- [請求項6] インターフェロン治療を必要とするC型肝炎患者に対して適用されることを特徴とする請求項5に記載の治療組成物。
- [請求項7] インターフェロンをさらに含有していることを特徴とする請求項5に記載の治療組成物。
- [請求項8] テプレノンまたはプラウノールを備えていることを特徴とするC型肝炎治療キット。
- [請求項9] インターフェロン治療を必要とするC型肝炎患者に対して適用されることを特徴とする請求項8に記載のC型肝炎治療キット。
- [請求項10] インターフェロンをさらに備えていることを特徴とする請求項8に記載のC型肝炎治療キット。
- [請求項11] テプレノンまたはプラウノールを含有していることを特徴とするスタチン剤によるゲラニルゲラニル化抑制効果を増強するための組成物。

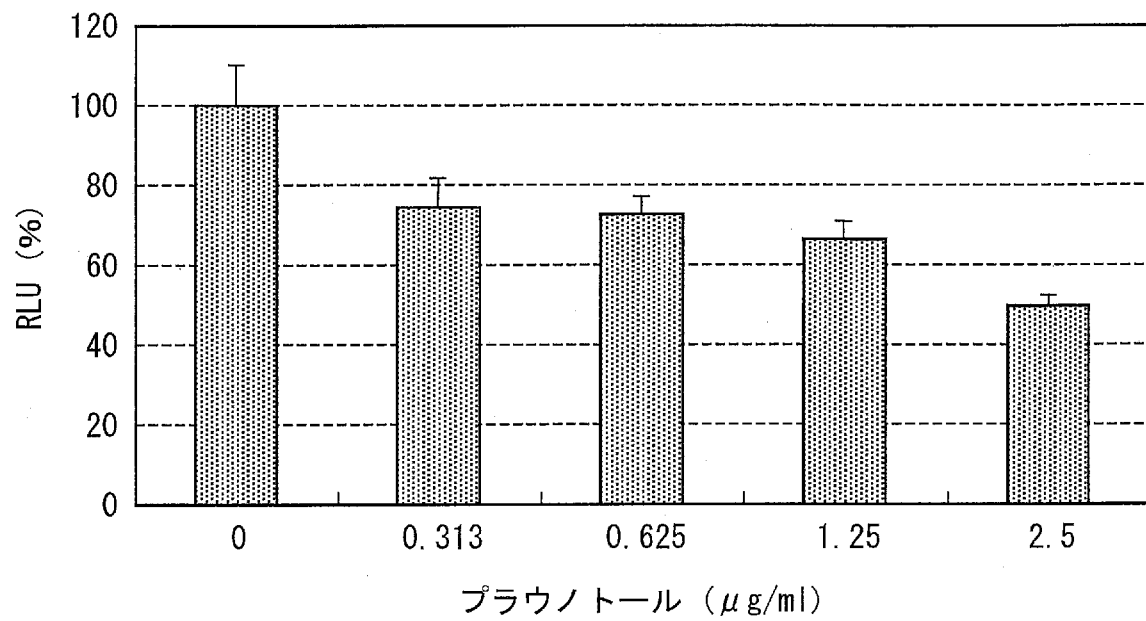
[図1(a)]



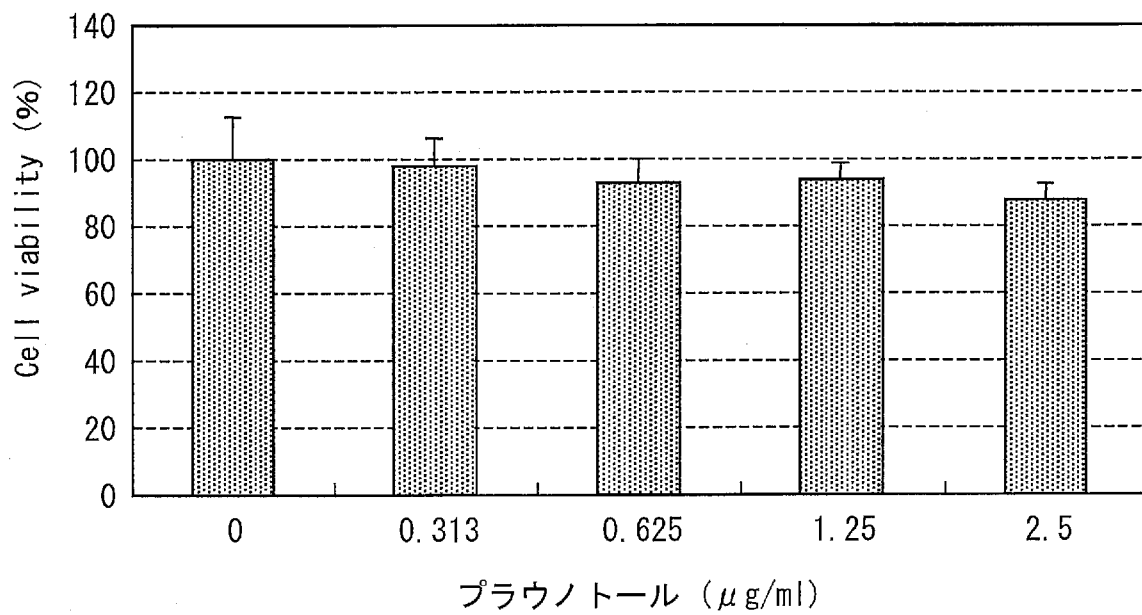
[図1(b)]



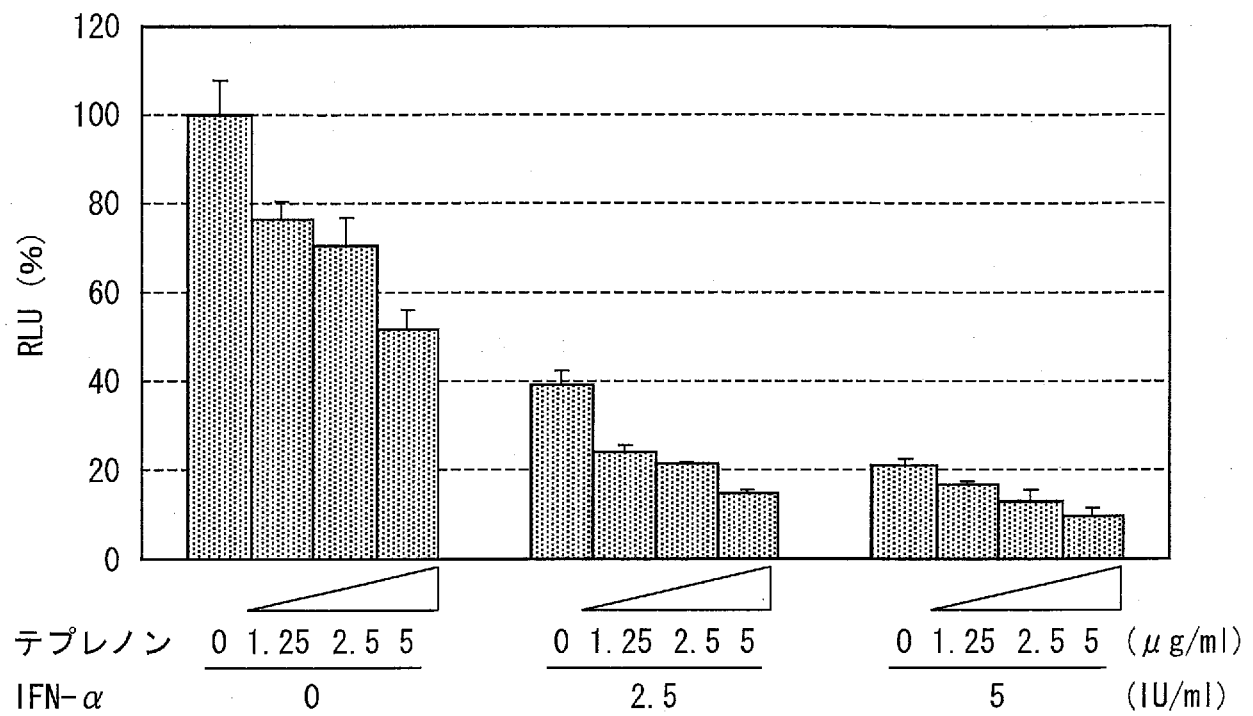
[図2(a)]



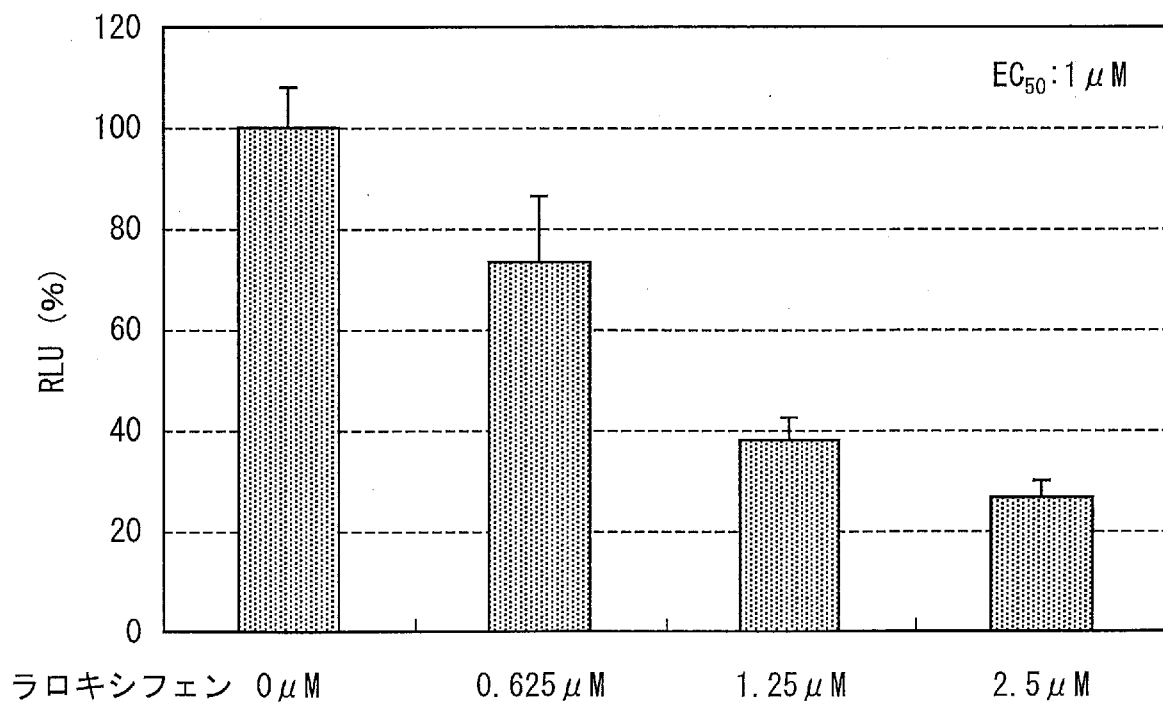
[図2(b)]



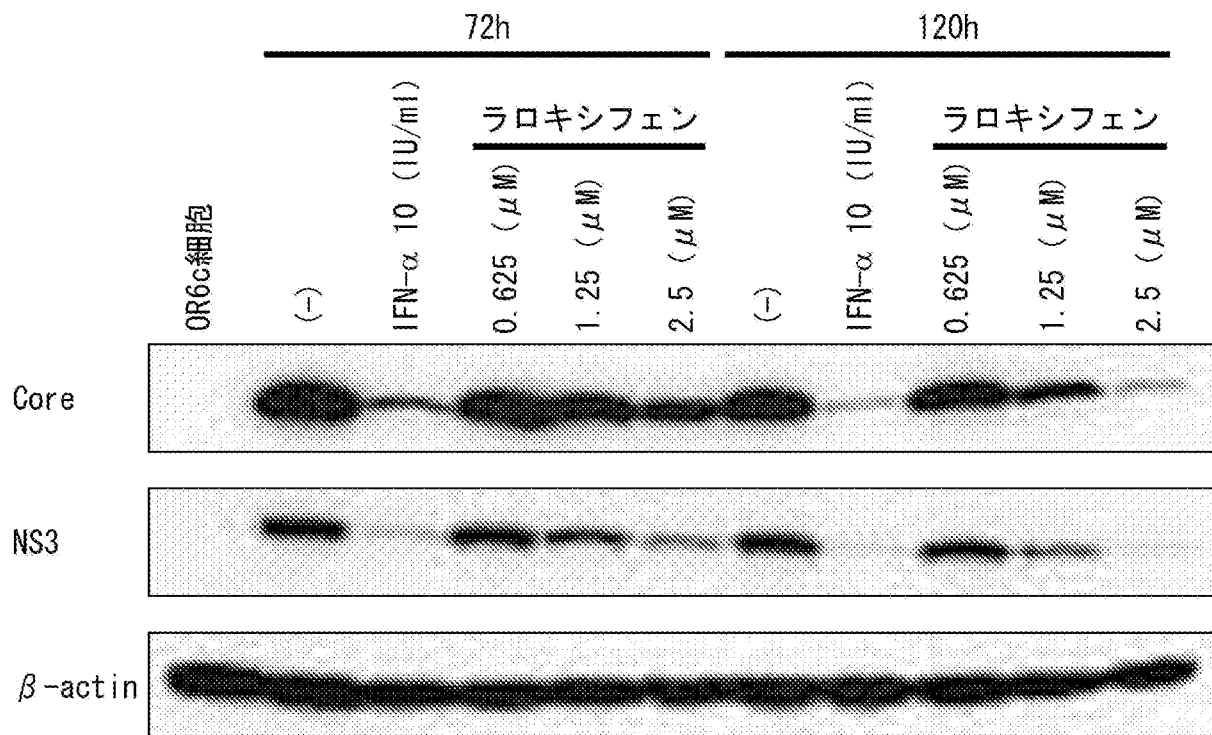
[図3]



[図4]



[図5]



[図6]

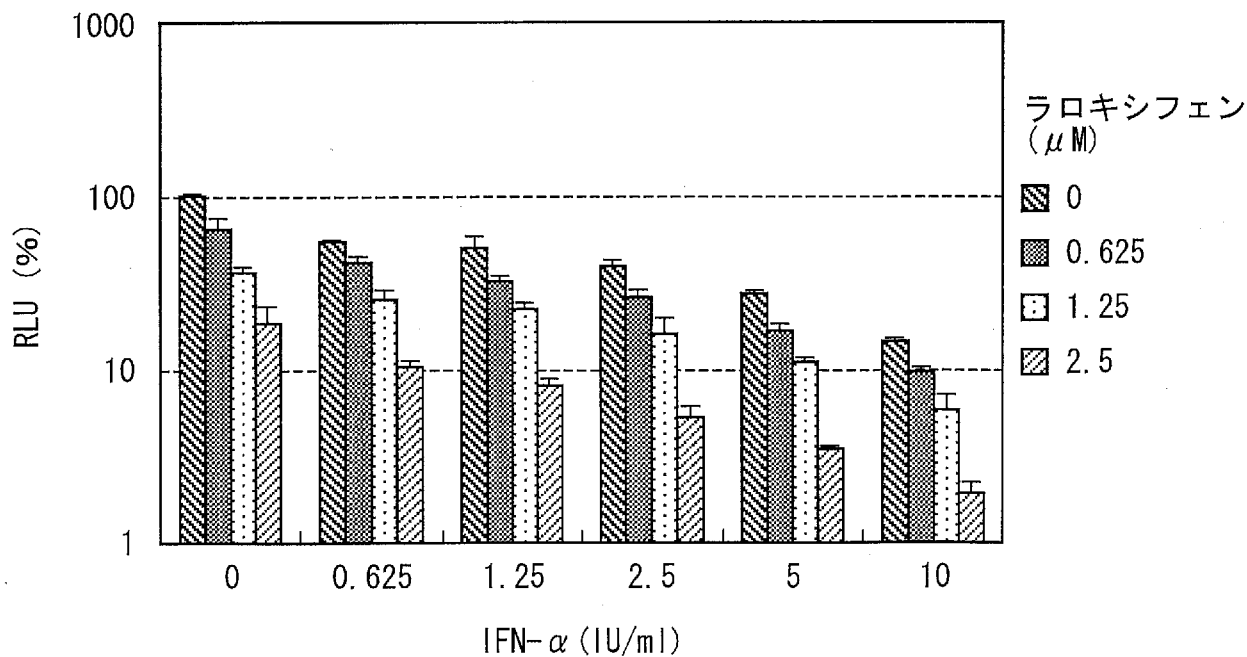
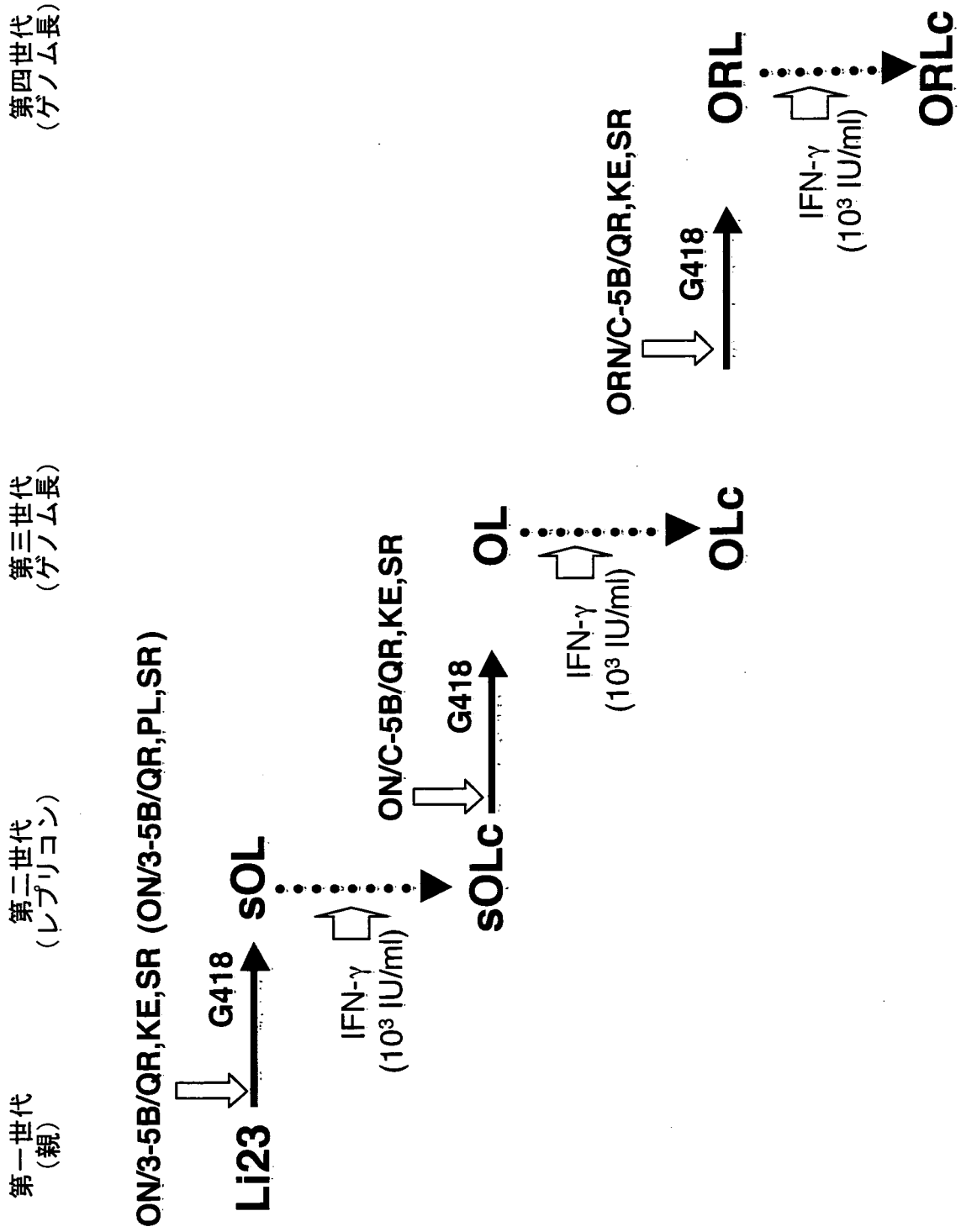
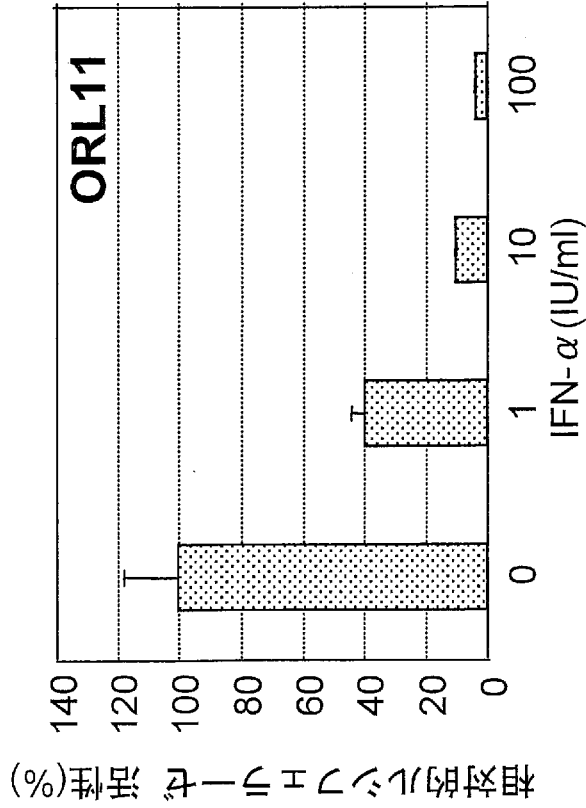
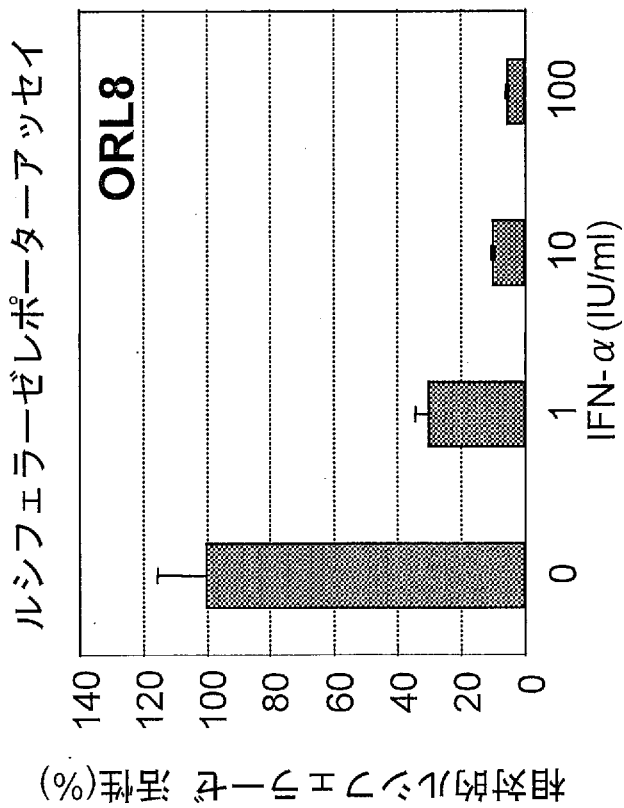
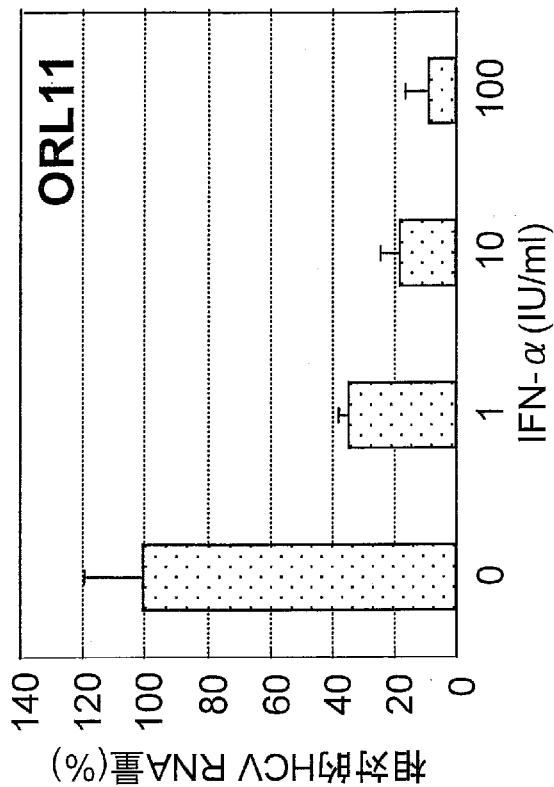
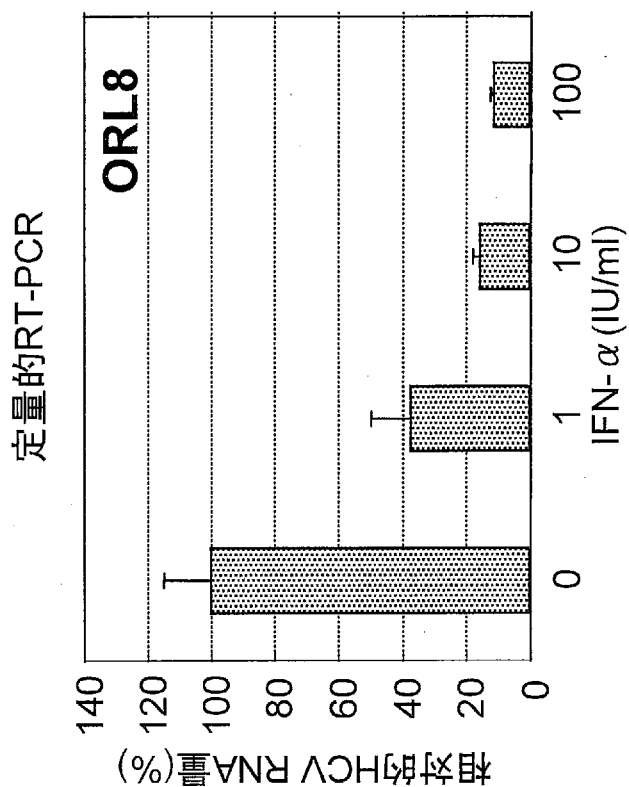


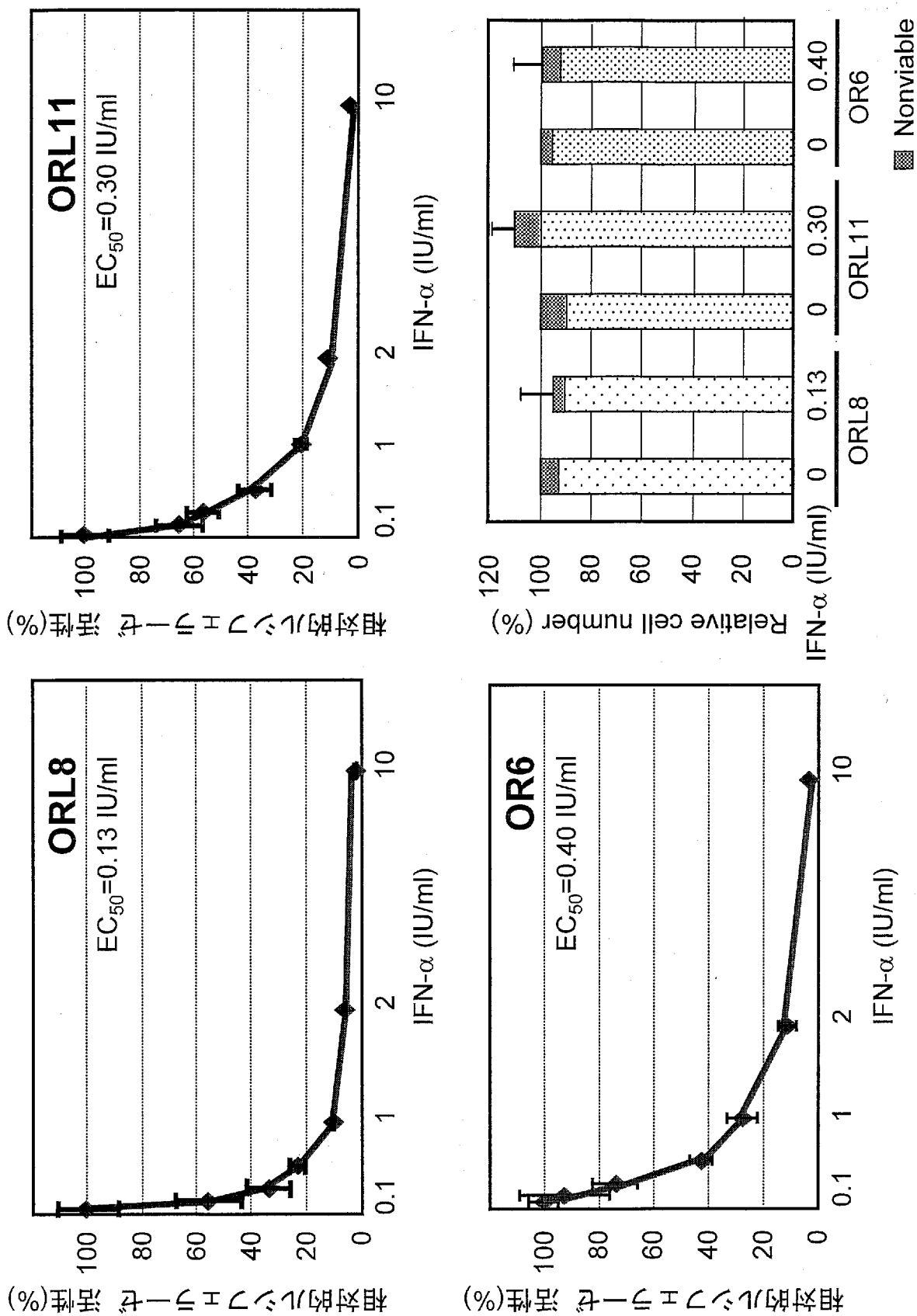
図 7



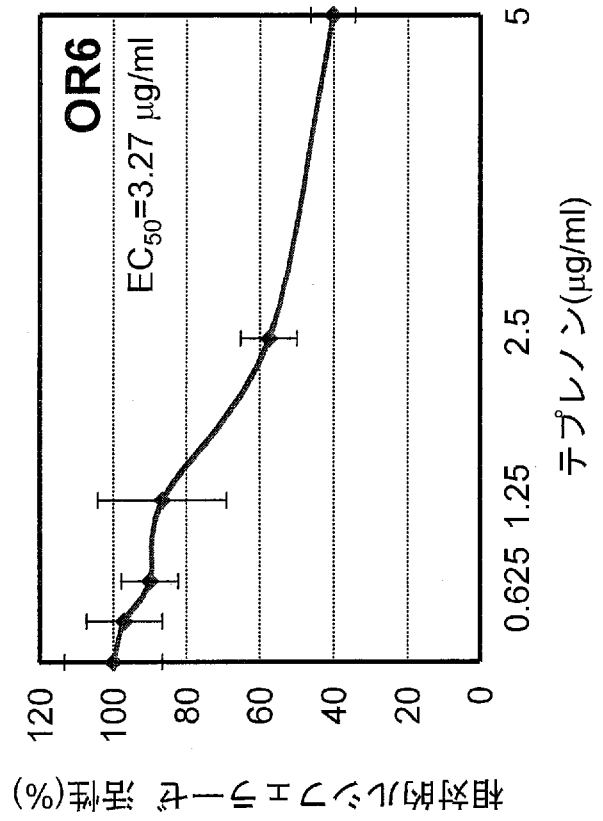
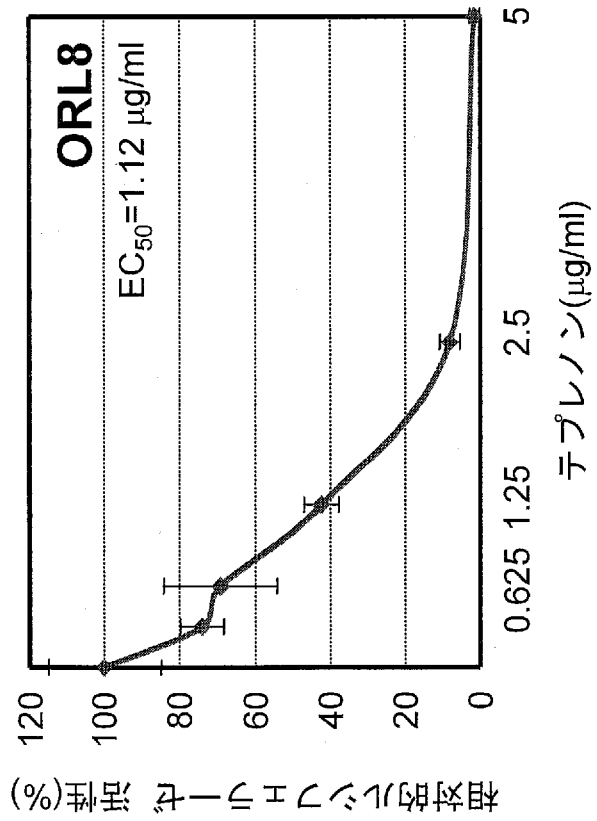
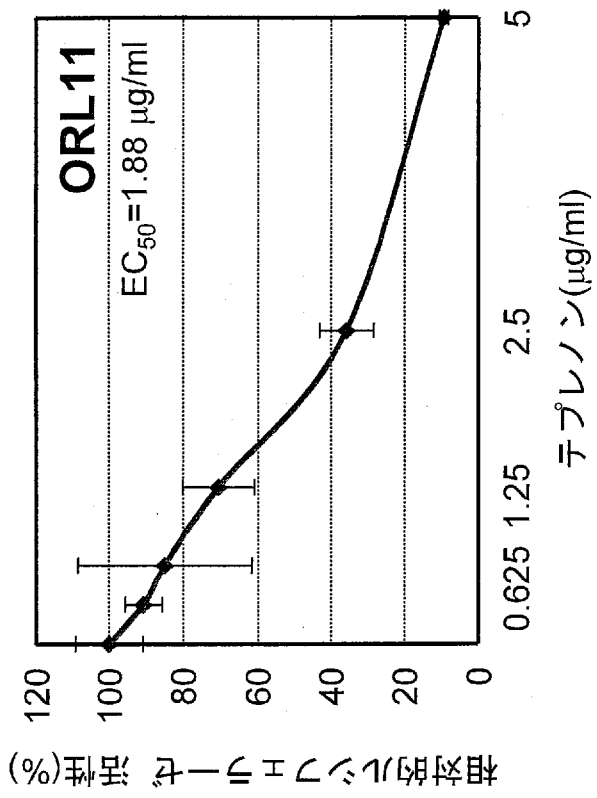
[図8]



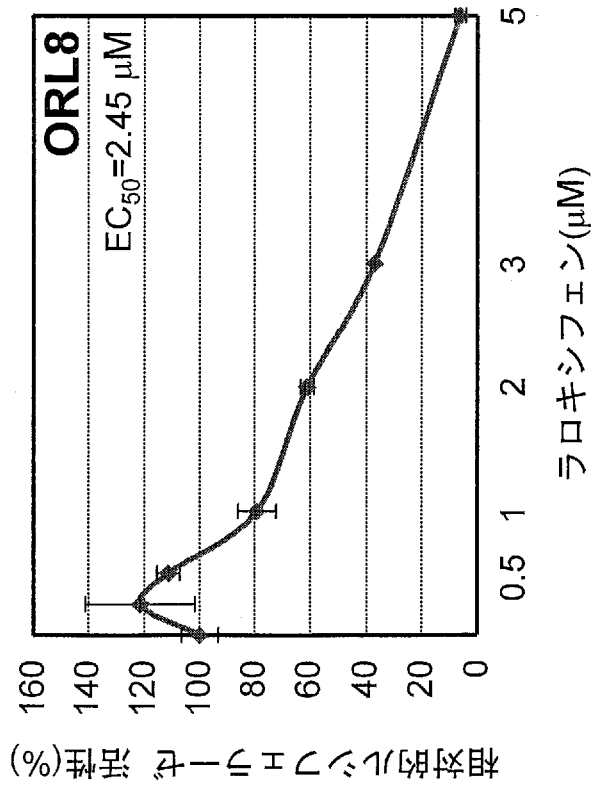
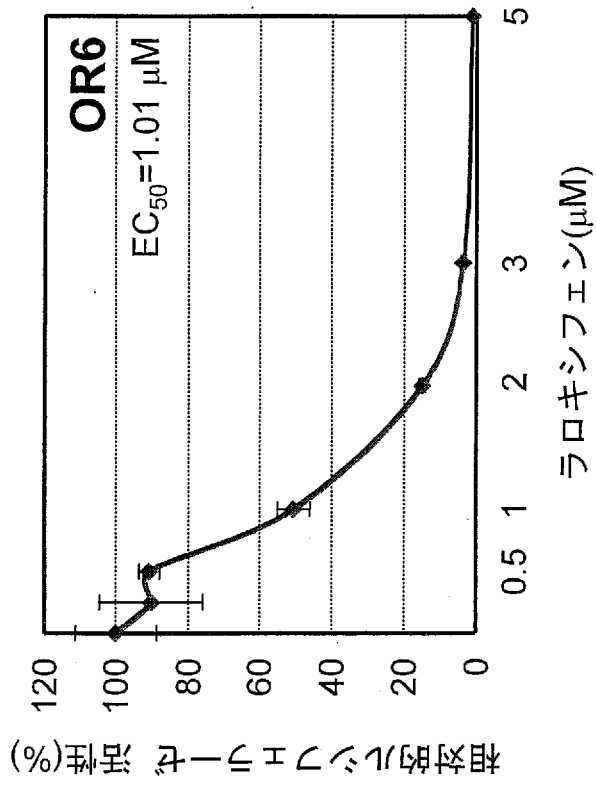
[図9]



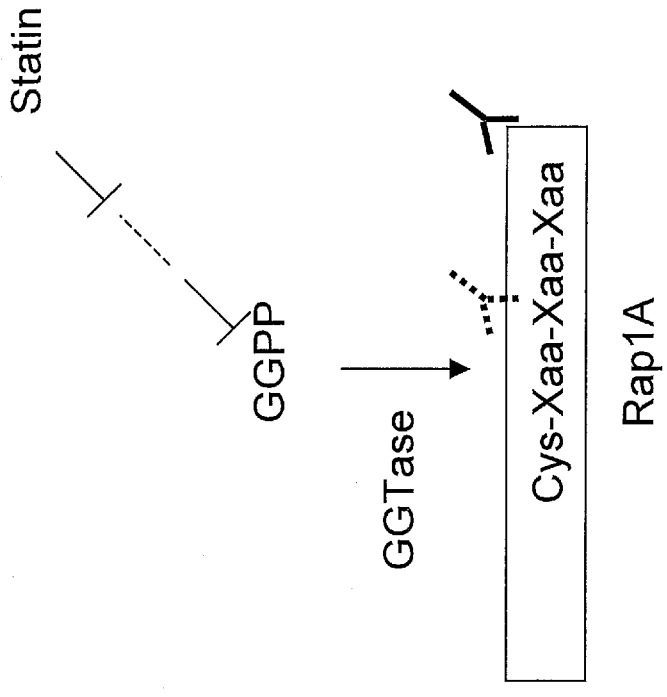
[図10]



[図11]



[図13]

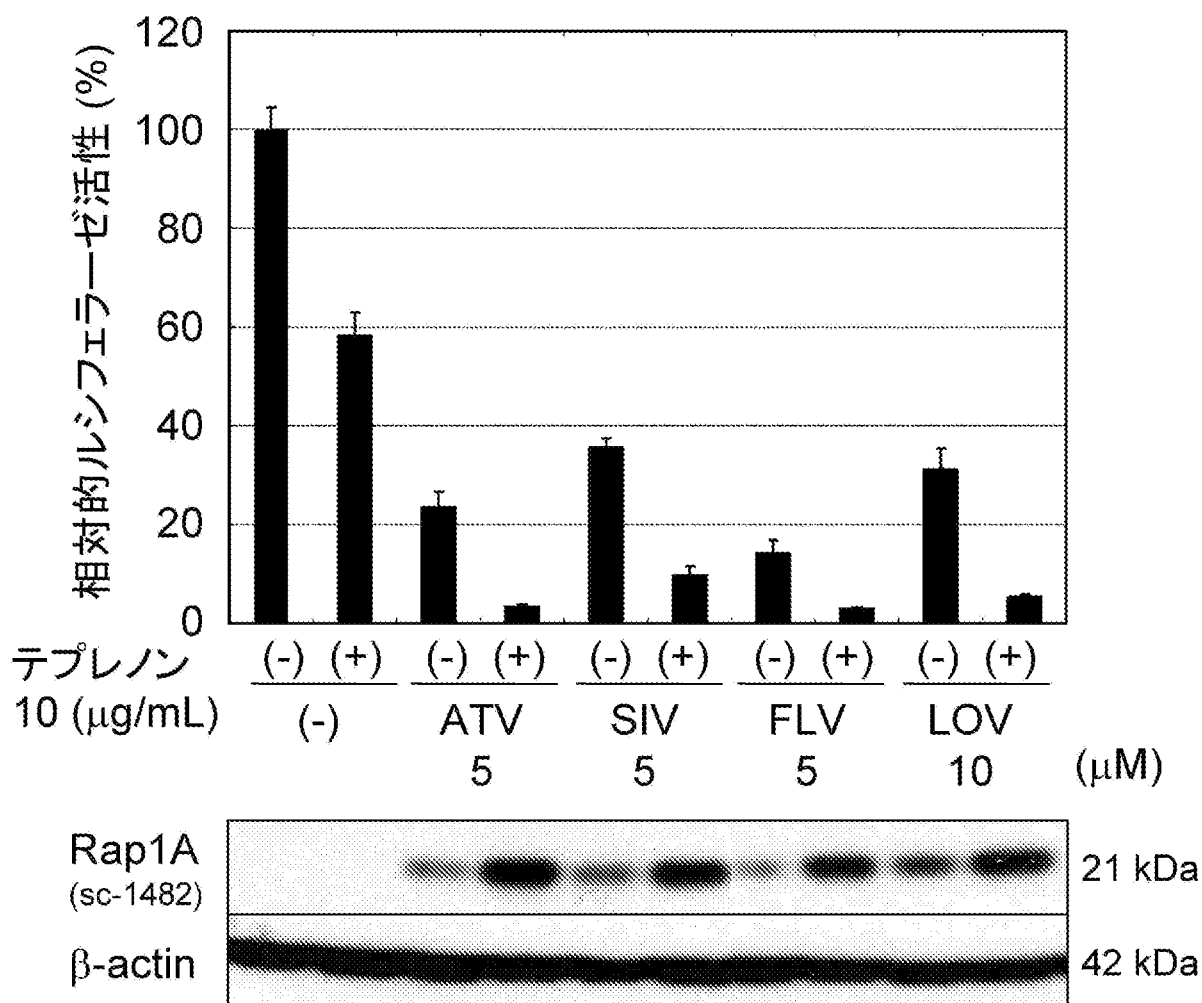


Y-shaped symbol : α -Rap1A (sc-1482): 非ゲラニルゲラニル化Rap1A のみを認識する

Dotted line symbol : α -Rap1 (sc-65): ゲラニルゲラニル化および非ゲラニルゲラニル化Rap1Aを認識する

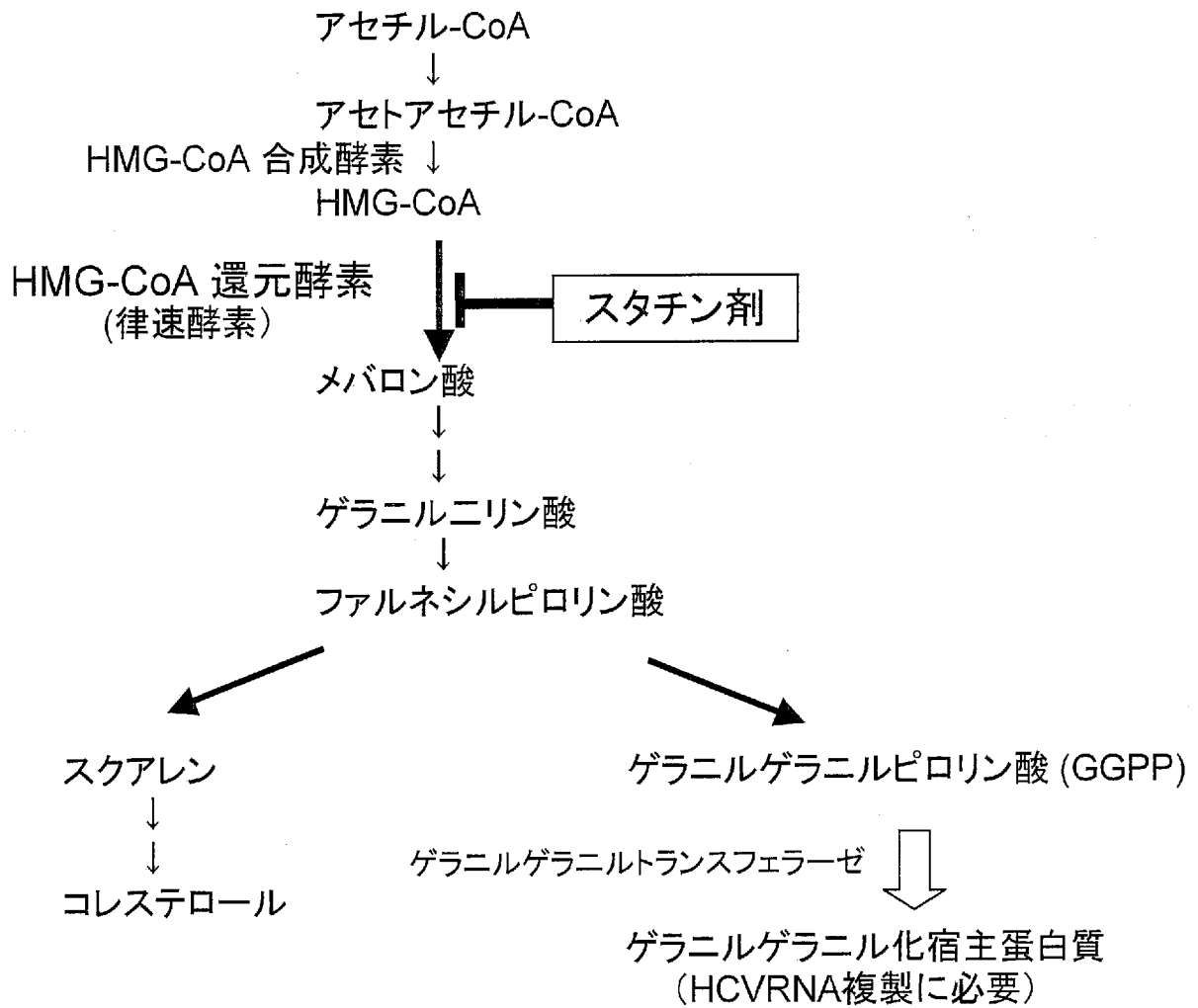
Cys-Xaa-Xaa-Xaa モチーフ: Cysはシステイン、2,3番目のXaaは脂肪族のアミノ酸、4番目のXaaはロイシン、バリン、イソロイシンまたはフェニルアラニンである

[図14]



ATV (アトロバスタチン); SIV (シンバスタチン);
 FLV (フルバスタチン); LOV (ローバスタチン)

[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/065264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 A61K31/047(2006.01)i, A61K31/121(2006.01)i, A61K31/351(2006.01)i,
 A61K31/40(2006.01)i, A61K31/4045(2006.01)i, A61K38/21(2006.01)i,
 A61K45/06(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P31/14(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)
 A61K31/047, A61K31/121, A61K31/351, A61K31/40, A61K31/4045, A61K38/21,
 A61K45/06, A61P1/16, A61P31/14

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)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS(STN), CPlus(STN), EMBASE(STN),
 MEDLINE(STN), REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Tatsuki ICHIKAWA, et al., "Keiko Toyo Kano na geranylgeranylacetone ni yoru Ko-virus Tanpaku no Yudo", Japanese Journal of gastroenterology, 2000, vol. 97, Rinji Zokango Sokai, page A282	1, 5, 6, 8, 9 2-4, 7, 10 11
Y A	Kapadia, S.B., et al, Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, Vol. 102, No. 7, p. 2561-2566	1-3, 11 4-10

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 20 October, 2009 (20.10.09)	Date of mailing of the international search report 02 November, 2009 (02.11.09)
--	--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065264

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ye, J., et al, Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, Vol. 100, No. 26, p. 15865-15870	1-11
Y	Ikeda, K., et al, Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon, Hepatology, 2006, Vol. 44, p. 117-125	1-11
Y A	Nanke, Y., et al, The effect of geranylgeranylacetone on human osteoclastogenesis and synovitis in patients with rheumatoid arthritis, Inflammation and Regeneration, 2008.03, Vol.28, No.2, p.111-116	11 1-10
A	JP 2004-26715 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 29 January 2004 (29.01.2004), paragraph [0005] (Family: none)	1-11
A	Nomura, H., et al, The effect of plaunotol on stomatitis induced by interferon, Current Therapeutic Research, 1997, Vol. 58, No.7, p.428-433	1-11
P,X P,A	Yoshinari KAWAI et al., "Kokaiyozai ni yoru C-gata Mansei Kan'en no Aratana Chiryō Senryaku -Teprenone(Selbex) to Plaunotol(Kelnac) no HCV Fukusei Yokusei Koka, Kanzo, 30 April 2009 (30.04.2009), vol. 50, Supplement 1, page A248	1,4-10 2,3,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065264

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 invention of claim 1, 5, 6, 8 or 9 is not novel, as disclosed in the document shown below. Therefore, the invention has no special technical feature.

Document: Tatsuki ICHIKAWA, et al., "Keiko Toyo Kano na geranylgeranylacetone ni yoru Ko-virus Tanpaku no Yudo", Japanese Journal of gastroenterology, 2000, vol. 97, Rinji Zokango Sokai, page A282

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. A61K31/047(2006.01)i, A61K31/121(2006.01)i, A61K31/351(2006.01)i, A61K31/40(2006.01)i, A61K31/4045(2006.01)i, A61K38/21(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P31/14(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. A61K31/047, A61K31/121, A61K31/351, A61K31/40, A61K31/4045, A61K38/21, A61K45/06, A61P1/16, A61P31/14

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)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), REGISTRY(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	市川辰樹, et al, 経口投与可能な geranylgeranyl acetone による抗ウイルス蛋白の誘導, 日本消化器病学会雑誌, 2000, Vol. 97, 臨時増刊号総会, p. A282	1, 5, 6, 8, 9 2-4, 7, 10 11
Y A	Kapadia, S.B., et al, Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, Vol. 102, No. 7, p. 2561-2566	1-3, 11 4-10

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
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な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 20. 10. 2009
 国際調査報告の発送日 02. 11. 2009

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 小堀 麻子
 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C 4495

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	Ye, J., et al, Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, Vol. 100, No. 26, p. 15865-15870	1-11
Y	Ikeda, K., et al, Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon, Hepatology, 2006, Vol. 44, p. 117-125	1-11
Y A	Nanke, Y., et al, The effect of geranylgeranylacetone on human osteoclastogenesis and synovitis in patients with rheumatoid arthritis, Inflammation and Regeneration, 2008.03, Vol. 28, No. 2, p. 111-116	11 1-10
A	JP 2004-26715 A (住友製薬株式会社) 2004.01.29, 段落【0005】 (ファミリーなし)	1-11
A	Nomura, H., et al, The effect of plaunotol on stomatitis induced by interferon, Current Therapeutic Research, 1997, Vol. 58, No. 7, p. 428-433	1-11
P, X P, A	河合良成, et al, 抗潰瘍剤によるC型慢性肝炎の新たな治療戦略— T e p r e n o n e (S e l b e x) と P l a u n o t o l (K e l n a c) の H C V 複製抑制効果, 肝臓, 2009.04.30, Vol. 50, Supplement 1, p. A248	1, 4-10 2, 3, 11

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の国際調査機関は認めた。

請求項1、5、6、8、又は9に係る発明は、下記文献に記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

文献：市川辰樹, et al, 経口投与可能な geranyl geranyl acetone による抗ウイルス蛋白の誘導, 日本消化器病学会雑誌, 2000, Vol. 97, 臨時増刊号総会, p. A282

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。