

(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
2014 年 12 月 18 日(18.12.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/200116 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/08 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 36/81 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/066083
- (22) 国際出願日: 2014 年 6 月 11 日(11.06.2014)
- (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 2013-125860 2013 年 6 月 14 日(14.06.2013) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: ワダワ レヌー(WADHWA, Renu); 〒3058562 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 4 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). カウル スニル(KAUL, Sunil); 〒3058562 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 4 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕

グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF CANCER

(54) 発明の名称: がん治療用医薬組成物

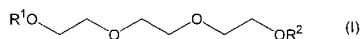
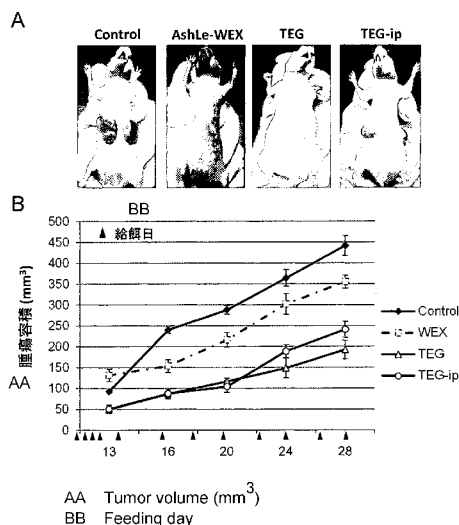


図 7



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a novel medicament for the treatment of cancer. The present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment or prophylaxis of cancer, which contains a triethylene glycol represented by formula (I) or a derivative thereof as an active ingredient. (In the formula, each of R¹ and R² is independently selected from among a hydrogen atom, C₁₋₆ alkyl groups, C₁₋₆ haloalkyl groups and -C(=O)R³ groups; and R³ is selected from among C₁₋₆ alkyl groups or C₁₋₆ haloalkyl groups.)

(57) 要約: 本発明は新規のがん治療薬を提供することを目的とする。本発明は、式 (I) [式中、R¹とR²は、それぞれ独立して、水素、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆ハロアルキル、または -C(=O)R³から選択され、R³は、C₁₋₆アルキルまたはC₁₋₆ハロアルキルから選択される] で表されるトリエチレングリコールまたはその誘導体を有効成分として含む、がん治療または予防用医薬組成物に関する。

明 細 書

がん治療用医薬組成物

5 技術分野

本発明は、新規のがん治療用医薬組成物に関する。

背景技術

10 がんは全世界において死亡原因の上位であり、高い割合を占める。がんの診断法および治療法の進歩により患者の生存率は高まってきているが、全世界人口の約 75% にあたる発展途上国に住む人々にとって、先進的ながん治療を受けることは難しい。そのため、より安価ながん治療法が求められている。

15 先進医療の一方で、ハーブなどを用いた自然療法も古くから知られている。アーユルヴェーダはインドに紀元前から伝わる自然療法の一種である。アーユルヴェーダで用いられる薬草アシュワガンダ（学名 *Withania somnifera*、インド人参（Indian ginseng）や冬桜（Winter cherry）とも称される）の根は、滋養強壮作用や健康増進作用などを有することが知られている。

20 本発明者らは、そのアシュワガンダに関して、根よりも採取しやすい葉に着目し、葉の抽出物の薬理作用について研究を行った。その結果、本発明者らは、以前アシュワガンダの葉の水抽出物が抗がん活性を有することを見出している（国際公開第 2009/110546 号公報）。

発明の概要

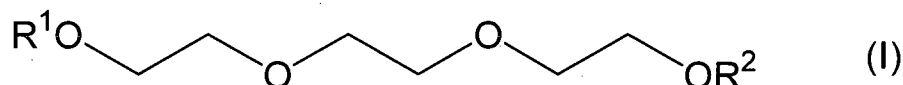
発明が解決しようとする課題

25 しかし、アシュワガンダの葉の水抽出物に含まれる成分のいずれが抗がん活性をもたらしているかは不明であった。アシュワガンダの葉の水抽出物に含まれる有効成分を特定することができれば、それに基づいて新規のがん治療薬を提供することが可能となる。そこで、本発明は、アシュワガンダの葉の水抽出物から有効成分を特定し、それに基づいた新規のがん治療薬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

本発明者らは、アシュワガンダの葉の水抽出物について研究を重ねた結果、抗がん活性を有する有効成分を特定し、それが実際にがん細胞に対して細胞毒性などの抗がん活性を有することを確認することに成功した。本発明の要旨は以下のとおりである。

[1] 式 (I) :



[式中、

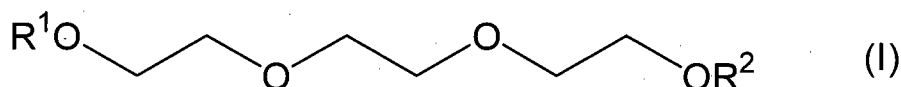
R^1 と R^2 は、それぞれ独立して、水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、または $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^3$ から選択され、

R^3 は、 C_{1-6} アルキルまたは C_{1-6} ハロアルキルから選択される]

で表されるトリエチレングリコールまたはその誘導体を有効成分として含む、がん治療または予防用医薬組成物。

[2] がんが固形癌である、[1]に記載の医薬組成物。

[3] 式 (I) :



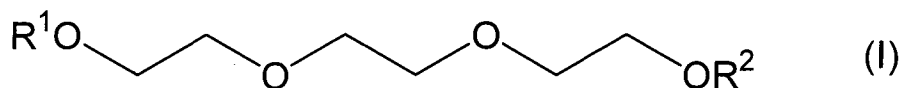
[式中、

R^1 と R^2 は、それぞれ独立して、水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、または $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^3$ から選択され、

R^3 は、 C_{1-6} アルキルまたは C_{1-6} ハロアルキルから選択される]

で表されるトリエチレングリコールまたはその誘導体を有効成分として含む、がん転移抑制剤。

[4] がん治療を必要とする対象に、有効量の式 (I) :



[式中、

R^1 と R^2 は、それぞれ独立して、水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、または $-C(=O)R^3$ から選択され、

5 R^3 は、 C_{1-6} アルキルまたは C_{1-6} ハロアルキルから選択される]

で表されるトリエチレングリコールまたはその誘導体を投与することを含む、がんを治療または予防するための方法。

発明の効果

10 本発明により、新規のがん治療薬を提供することが可能となる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2013-125860号の明細書、特許請求の範囲および図面に記載された内容を包含する。

15 図面の簡単な説明

図1：ヒト骨肉腫細胞(U2OS)およびヒト乳癌細胞(MCF7)に対するAshLee-WEXの細胞毒性アッセイの結果を示す写真である。対照群(C)は、AshLee-WEXで処理していないヒト骨肉腫細胞(U2OS)とヒト乳癌細胞(MCF7)とを示す。

20 図2：AshLee-WEXおよびそのタンパク成分を不活性化したものについて、ヒト骨肉腫細胞(U2OS)および正常ヒト繊維芽細胞(TIG-1)を用いた細胞毒性アッセイを行った結果を示す写真である。AshLee-WEXのタンパク成分を不活性化したものとしては、熱変性により不活性化させたもの(AshLee-WEX-HI)またはプロテイナーゼ分解により不活性化させたもの(AshLee-WEX-PI)を使用した。対照群は、AshLee-WEXまたはそのタンパク成分を不活性化したもので処理していないヒト骨肉腫細胞(U2OS)と正常ヒト繊維芽細胞(TIG-1)とを示す。

25

図3：A s h L e－W E X－F 2（本願明細書中の実施例4に記載された分画試験より得られたA s h L e－W E X由来の第2分画）およびトリエチレングリコールのNMRチャートである。図3中、(a) および (b) は、A s h L e－W E Xの分析結果を示し、(c) および (d) はトリエチレングリコールの分析結果を示す。

図4：A s h L e－W E XのH P L Cチャートである。市販の精製されたトリエチレングリコールを標準物質として加えている。

図5：トリエチレングリコールを用いたヒト骨肉腫細胞（U 2 O S）および正常ヒト繊維芽細胞（T I G－1）に対する細胞毒性アッセイの結果を示す写真である。

図6：A s h L e－W E Xまたはトリエチレングリコールで処理したヒト骨肉腫細胞（U 2 O S）の細胞周期分析の結果を示すチャートおよびグラフである。対照群は、A s h L e－W E Xまたはトリエチレングリコールで処理していないヒト骨肉腫細胞（U 2 O S）とした。

図7：A s h L e－W E Xおよびトリエチレングリコールを用いた *i n v i v o* 抗腫瘍アッセイの結果を示す写真およびグラフである。*i n v i v o* 抗腫瘍アッセイは、ヌードマウスにH T 1 0 8 0細胞を皮下注射および経尾静脈注射することで腫瘍を形成させ、当該ヌードマウスにA s h L e－W E X（経口投与）またはトリエチレングリコール（経口投与（T E G）または腹腔内注射（T E G－i p））を投与することにより行った。対照群のマウスには、腫瘍形成後、A s h L e－W E Xおよびトリエチレングリコールの代わりに、2%カルボキシメチルセルロースを経口投与した。図7 Aは、2%カルボキシメチルセルロース投与（対照群）、A s h L e－W E X投与、トリエチレングリコールの経口投与（T E G）、またはトリエチレングリコールの腹腔内投与（T E G－i p）した際の投与期間経過後のマウス腹部を撮影した写真である。図7 Bは、*i n v i v o* 抗腫瘍アッセイ期間における腫瘍容積の変化を経時的に測定した結果のグラフである。

図8：トリエチレングリコールの抗がん転移活性を測定するための *i n v i v o* 腫瘍転移アッセイの結果を示す。図8 Aは、*i n v i v o* 腫瘍転移アッセイ後、マウスより摘出した肺を撮影した写真である（丸印で囲まれた部分が腫瘍を

示す)。なお、上段は2%カルボキシメチルセルロース投与群(対照群)、中段はA s h L e - W E X投与群、下段はトリエチレングリコール投与群を示す。図8 Bは、i n v i v o腫瘍転移アッセイ後の各群の肺腫瘍容積の平均値を示すグラフである。

5 図9:HT1080細胞を用いたi n v i t r oマトリゲル浸潤アッセイの結果を示すグラフである。試験対象物質として、トリエチレングリコール(T E G)またはA s h L e - W E Xを使用した。対照群はトリエチレングリコールまたはA s h L e - W E Xで処理していないHT1080細胞のアッセイ結果を示す。

10 図10:図10Aは、ヒト骨肉腫細胞(U2OS)または正常ヒト繊維芽細胞(TIG-1)をA s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールで処理した際のがん抑制タンパク(p53、p21、pRB)の発現量をウェスタンブロッティングにより測定した結果の写真およびグラフを示す。図10Bは、ヒト骨肉腫細胞(U2OS)または正常ヒト繊維芽細胞(TIG-1)をA s h L e -
15 W E Xまたはトリエチレングリコールで処理した際の細胞周期調節タンパク(サイクリン-B1、サイクリン-D1、サイクリン-E1、CDK-2、CDK-4、およびCDK-6)の発現量をウェスタンブロッティングにより測定した結果の写真およびグラフを示す。また、図10Aおよび図10Bにおいて、対照群はA s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールで処理していない細胞の各
20 タンパクの発現量を示す。

図11:A s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールで処理したヒト骨肉腫細胞(U2OS)または正常ヒト繊維芽細胞(TIG-1)に対して、抗pRB抗体を用いて免疫組織化学を行った結果を示す写真である。対照群はA s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールで処理していないヒト骨肉腫細胞
25 (U2OS)または正常ヒト繊維芽細胞(TIG-1)を示す。

図12:ヒト乳癌細胞(MCF7)に対してA s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールを処理した際のテロメラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。ポジティブコントロール群はTRAPアッセイキットに含まれるテロメラーゼ活性がん細胞の結果を示し、ネガティブコントロール群はテロメラーゼ

酵素を有しないヒト骨肉腫細胞（U2OS）の結果を示す。対照群（control）は、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理していないヒト乳癌細胞（MCF7）の結果を示す。

図13：ヒト肺がん細胞（A549）に対してAshLee-WEXまたはトリエチレングリコールを処理した際のKeap1の発現量を調べた結果を示す写真である。なお、対照群は、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理していないヒト肺がん細胞におけるKeap1の発現量を示す。

図14：ヒト骨肉腫細胞（U2OS）に対してAshLee-WEXまたはトリエチレングリコールを処理した際のマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP-9、MMP-3およびMMP-2）の発現量を調べた結果を示す写真およびグラフである。なお、対照群では、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理していないヒト骨肉腫細胞（U2OS）におけるマトリックスメタロプロテアーゼの発現量を示す。

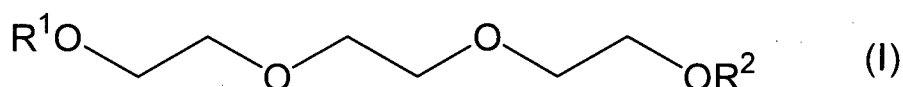
図15：膠芽腫細胞（C6 Glioma cell）に対してAshLee-WEXまたはトリエチレングリコールを用いた分化誘導アッセイの結果を示す写真である。図15Aは、分化誘導処理後の細胞を光学顕微鏡下で撮影した写真を示す。図15Bは、分化誘導処理後の細胞におけるGFAP（膠細胞の分化マーカー）の発現を免疫組織化学により観察した写真を示す。図15Cは、図15Bよりもさらに高倍率で撮影した免疫組織化学の写真を示す。対照群は分化誘導処理における過酸化水素処理はしたが、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理していない細胞を示す。

図16：神経芽細胞腫（IMR32；neuroblastoma cell）に対してAshLee-WEXまたはトリエチレングリコールを用いた分化誘導アッセイの結果を示す写真である。図16Aは、分化誘導処理後の細胞を光学顕微鏡下で撮影した写真を示す。図16Bは、分化誘導処理後の細胞におけるニューロフィラメントタンパク（NF200）の発現を免疫組織化学により観察した写真を示す。図16Aおよび図16Bにおいて対照群は分化誘導処理における過酸化水素処理はしたが、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理していない神経芽細胞腫（IMR32）を示す。図16Cは、分化誘導処理後の細胞におけるN

F 2 0 0 の発現量をウェスタンブロッティングにより測定した結果の写真を示す。
 図 1 6 C 中、左から一番目のレーンは、過酸化水素処理をせず、かつ、A s h L
 e - W E X またはトリエチレングリコールで処理していない対照群を示し、左か
 ら二番目のレーンは、過酸化水素処理はしたが、A s h L e - W E X またはトリ
 エチレングリコールで処理していない対照群を示す。

発明を実施するための形態

本発明の医薬組成物は、下記の一般式 (I) で表されるトリエチレングリコー
 ルまたはその誘導体を有効成分として含むことを特徴とする。



式 (I) 中、 R^1 と R^2 は、それぞれ独立して、水素、 C_{1-6} アルキル (好まし
 くは C_{1-3} アルキル)、 C_{1-6} ハロアルキル (好ましくは C_{1-3} ハロアルキル)、
 または $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^3$ から選択され、 R^3 は、 C_{1-6} アルキル (好ましくは C_{1-3}
 アルキル) または C_{1-6} ハロアルキル (好ましくは C_{1-3} ハロアルキル) から選
 択される。

より好ましくは、 R^1 と R^2 は、それぞれ独立して、水素、 C_{1-6} アルキル (特
 に C_{1-3} アルキル)、または C_{1-6} ハロアルキル (特に C_{1-3} ハロアルキル) から
 選択される。とりわけ、 R^1 と R^2 は、それぞれ独立して、水素または C_{1-6} アル
 キル、特に水素または C_{1-3} アルキルから選択されるのが好ましい。また、 R^1
 と R^2 のいずれか一方が水素であることがより好ましい。

本発明者らは、アシュワガンダの葉の水抽出物における抗がん活性を有する有
 効成分がトリエチレングリコールであることを特定することに成功した。この知
 見に基づき、上述の一般式 (I) に記載の化合物であれば、その化合物自体が、
 あるいはその化合物が生体内で代謝されて生成する代謝生成物として、所望の抗
 がん作用を発揮するものと考えられる。

本明細書において、「 C_{1-6} アルキル」とは、炭素数が 1 ~ 6 の、直鎖または
 分岐鎖の飽和炭化水素基を意味する。 C_{1-6} アルキルの例としては、メチル、エ

チル、プロピル、イソプロピル、イソブチル、*n*-ブチル、*tert*-ブチル、イソペンチル、*n*-ペンチルが挙げられる。または「 C_{1-3} アルキル」は、メチル、エチル、プロピルまたはイソプロピルを意味する。

「 C_{1-6} ハロアルキル」または「 C_{1-3} ハロアルキル」とは、それぞれ、少なくとも一つの水素がハロゲン、すなわちフッ素、塩素、臭素、またはヨウ素で置換された、 C_{1-6} アルキルまたは C_{1-3} アルキルを意味する。

本明細書において、抗がん活性とは、がんの増殖を抑制する活性を意味し、より詳細には、がん細胞に対して細胞毒性を有し、がん細胞に対する増殖および浸潤の抑制、がん抑制タンパク p 5 3 または p R B の活性化、テロメラゼ活性の阻害、分化誘導などの作用を有することを意味する。本発明の医薬組成物は、単独で、あるいは他の抗がん剤を用いた化学療法あるいは放射線療法などと併用して、がんの治療または予防に用いることができる。本発明の医薬組成物は、がん細胞にのみ作用し、正常細胞にはほとんど影響を及ぼさない点で有利である。

また、本発明者らは、トリエチレングリコールが、がん細胞の転移を抑制する作用を有することを見出した。本発明の医薬組成物は、他の抗がん剤を用いた化学療法あるいは放射線療法などと併用したり、治療後のがん再発を予防したりするためのがん転移抑制剤としても用いることができる。

本明細書において「がん」とは、膵臓がん、胃がん、大腸がん、腎臓がん、肝臓がん、骨髄がん、副腎がん、皮膚がん、メラノーマ、肺がん、小腸がん、前立腺がん、精巣がん、子宮がん、乳がんまたは卵巣がんなどの上皮組織に生じる癌、および筋肉や骨などの非上皮性の部位に生じる悪性腫瘍である肉腫を含む固形癌、ならびにその他の白血病や悪性リンパ腫などの液性がんの全てを包含する。本発明の医薬組成物は、なかでも固形癌の治療または予防に有効である。

トリエチレングリコールは水分子を保持する能力において優れており、溶媒などとして使用されている。また、トリエチレングリコールは、空气中、液中および表面における細菌やウイルスに対する低毒性の緩効性殺菌剤としても既知である。トリエチレングリコールは市販されていて容易に入手可能であり、その誘導体についても市販されているか、あるいは当業者であれば市販の試薬を用いた公

知の手法により容易に調製が可能である。従って、本発明の医薬組成物は比較的安価に提供することができる。

本発明の医薬組成物は、必要に応じて製薬上許容される担体と共に、有効成分である式（I）の化合物を任意の剤形に製剤化してよく、種々の投与形態を採用可能である。剤形の具体例としては、錠剤、カプセル剤、液剤、粉剤、散剤、顆粒剤、注射剤などが挙げられる。投与経路は、経口および非経口のいずれでもよく、非経口投与経路としては、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与などが挙げられる。

製薬上許容される担体としては、固形製剤では賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤などが挙げられる。液剤では溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などが挙げられる。また、必要に応じて防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、安定化剤等の製剤添加物を用いることもできる。

経口固形製剤を調製する場合は、有効成分である式（I）の化合物に、必要に応じて賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味・矯臭剤などを加えた後、常法により錠剤、顆粒剤、カプセル剤などとすることができる。

注射剤を調製する場合は、有効成分である式（I）の化合物に、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤などを添加し、常法により静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、または腹腔内投与用注射剤とすることができる。

本発明は、がん治療を必要とする哺乳動物、特にヒトに、式（I）で表されるトリエチレングリコールまたはその誘導体の有効量を投与することを含む、がんを治療または予防するための方法にも関する。「有効量」とは、例えば研究者または臨床医の望む、組織、系、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を誘発する有効成分の量を意味する。本発明の有効成分である式（I）の化合物の有効量は、投与対象の年齢、体重、重症度、製剤の性質、および投与経路などに依存する。哺乳動物、特にヒトの治療のための式（I）の化合物の有効量は、例えば、経口投与で50～500mg/kg/日、特に50～250mg/kg/日、とりわけ100～250mg/kg/日の範囲、非経口投与で50～500mg/kg/日、特に50～250mg/kg/日、とりわけ50～200mg/kg/日の範囲である。この有効量を1日1回、または2～3回程度に分けて投与

するのが好ましい。経口投与剤および非経口投与剤は投与単位あたり10～500mg、特に50～250mgの式(I)の化合物を含むことが好ましい。

実施例

- 5 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

1. アシュワガンダ葉の水抽出物(AshLee-WEX)の調製

- 10gのアシュワガンダ(Withania somnifera)乾燥葉粉末(インド原産、iGENE社より購入)を100mLの水に加え、10%の懸濁液を用意した。懸濁液を45℃のインキュベータ内に入れ、一晩ゆつくり振盪させることにより抽出処理を行った。抽出処理を終えた懸濁液を10,000rpmで20分間遠心し、上澄みを0.45μmのフィルタを用いて濾過して、アシュワガンダ葉の水抽出物(AshLee-WEX)を得た。

2. 癌細胞に対するAshLee-WEXの細胞毒性アッセイ

- 15 ヒト骨肉腫細胞(U2OS、American Type Culture Collectionより入手)またはヒト乳癌細胞(MCF7、JCRB生物資源バンクより入手)を培養する培地に対して、0.8～6.2%の最終濃度となるようにAshLee-WEXを添加した。AshLee-WEXを添加後、48時間、37度で培養した後、クリスタルバイオレットで各細胞を染色した。なお、AshLee-WEXを添加していない培地で同様に培養した細胞群を対照群とした。図1に示したように、AshLee-WEXは試験した両方の癌細胞に対して細胞毒性を示した。

3. AshLee-WEXのタンパク成分不活性化

- 25 AshLee-WEXの抗癌活性成分を特定するため、熱変性またはプロテアーゼ分解によりAshLee-WEXのタンパク成分を不活性化した試料を用意した(AshLee-WEX-HIおよびAshLee-WEX-PI)。AshLee-WEXとタンパク成分を不活性化した試料とを用いてヒト骨肉腫細胞(U2OS)および正常ヒト繊維芽細胞(TIG-1、JCRB生物資源バンクより入手)

に対する細胞毒性を試験した。その結果を図2に示す。この試験により、A s h L e - W E Xの細胞毒性は、そのタンパク成分から独立していることがわかった。

4. A s h L e - W E Xの分画

上記1で得られたA s h L e - W E Xを、C 1 8カラム (T S K g e l O D S - 1 0 0 Z、東ソー社) を用いた逆相H P L Cで分画した。流速1 m L / 分、カラム温度4 0 ° Cとし、検出波長2 2 0 n mとし、溶液Aとして水、溶液Bとしてエタノールを用いてグラジエント溶出を以下の条件に従って行った。

～ 5分：溶液A 1 0 0 %一定

～ 2 0分：溶液B 0 . 7 5 %までのグラジエント

10 ～ 2 5分：溶液B 0 . 7 5 %から5 0 %までのグラジエント

～ 3 0分：溶液B 5 0 %一定

～ 3 2分：溶液B 5 0 %から0 %までのグラジエント

～ 3 7分：溶液A 1 0 0 %一定

15 グラジエント溶出により、A s h L e - W E Xを4つの画分に分割することができた (A s h L e - W E X - F 1 ~ F 4) 。

5. A s h L e - W E Xおよびその画分の細胞毒性アッセイ

ヒト骨肉腫細胞 (U 2 O S) を、ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M、インビトロジェン社) に1 0 %ウシ胎児血清を添加した培地を用い、加湿インキュベータ (3 7 ° C、5 % C O ₂) 中で培養した。細胞を4 0 ~ 6 0 %コンフルエントまで培養した後、A s h L e - W E X (最終濃度1 %、2 0 0 μ g / m L) ならびにその第1および第2画分 (A s h L e - W E X - F 1 および F 2) でそれぞれ処理した。処理は、細胞を3 7 ° Cで培養しながら、典型的には4 8時間かけて行った。

25 A s h L e - W E Xおよびその画分の細胞毒性を、M T Tを用いたアッセイにより評価した。上記の処理の後、M T T (0 . 5 m g / m L) を細胞培養培地に加え、4時間インキュベートした。次いで、M T Tを含む培地を除去し、1 0 0 μ LのD M S Oを各ウェルに加えてフォルマザン結晶を完全に溶解させた。分光光度計 (W a l l a c A R V O S X) を用いて5 5 0 n mで吸光度を測定した。

細胞毒性アッセイにより、第2画分 (A s h L e - W E X - F 2) に抗癌活性成分が含まれることがわかった。

6. 抗癌活性成分の特定

A s h L e - W E X - F 2 を、タンパク質を熱変性させた後、乾燥させ、重水
5 に溶解させてNMR分析 (^1H -NMRおよび ^{13}C -NMR) を行った。得られたスペクトルを図3中の(a)および(b)に示す。公知のスペクトルデータ (図3(c)および(d)) と比較し、A s h L e - W E X - F 2 の主成分がトリエチレングリコール (T E G) であることを確認した。

A s h L e - W E X におけるトリエチレングリコールの存在を確認するために
10 H P L C による分析を行った。L U N A C 1 8 (2) カラム (長さ150mm、内径4.6mm、粒子径5 μm 、Phenomenex社) および示差屈折率検出器R I D - 1 0 A (島津製作所) を用い、水 (注入量10 μL 、流速2mL/分) を移動相とし、40 $^{\circ}\text{C}$ で行った。市販の精製されたトリエチレングリコールを標準物質として用いた。得られたチャートを図4に示す。分析結果から、A s h L e - W
15 E X にはトリエチレングリコールが含まれていることが確認された。

7. トリエチレングリコール (T E G) の細胞毒性アッセイ

上記5と同様の手順により、トリエチレングリコールを用いてヒト骨肉腫細胞 (U 2 O S) および正常ヒト繊維芽細胞 (T I G - 1) に対する細胞毒性を試験した。その結果を図5に示す。トリエチレングリコールは、濃度0.5%以上の
20 投与量で癌細胞の増殖を抑制する一方、正常ヒト繊維芽細胞に対してはほとんど毒性を示さないことがわかった。また、ヒト骨肉腫細胞 (U 2 O S) を用いた細胞周期分析を行ったところ、A s h L e - W E X とトリエチレングリコールは、いずれもG 1 アレストを起こすことがわかった (図6)。すなわち、A s h L e - W E X およびトリエチレングリコールは、癌細胞特異的にG 1 期での細胞周期
25 停止効果を有することがわかった。

8. i n v i v o 抗腫瘍アッセイ

高肺転移を伴う浸潤性腫瘍由来のHT1080細胞（ヒト繊維肉腫細胞、JCRB生物資源バンクより入手）による皮下異種移植および経尾静脈転移モデルのマウスを用いて、AshLe-WEXおよびトリエチレングリコールについて *in vivo* 抗腫瘍アッセイを行った。

- 5 Balb/cヌードマウス（4週齢、雌、日本クレア社から購入）に、HT1080細胞（0.2mLの成長培地に 6×10^6 個）を1匹あたり2箇所皮下注射し、さらにそれと同量を経尾静脈注射した。対照群は2%カルボキシメチルセルロースを給餌により投与し、AshLe-WEX群は100~250mg/kg体重/回のAshLe-WEXを含むように2%カルボキシメチルセルロースと混ぜ合わせたものを給餌により投与し、TEG群は5%のトリエチレングリコール水溶液を経口投与（2%カルボキシメチルセルロースと混合して調製した5%トリエチレングリコールを250 μ L/回で使用）または腹腔内注射（5%トリエチレングリコールを100 μ L/回で使用）で処理した。処理はHT1080細胞の注射後8日目から開始し、隔日で12回行った。1ヶ月にわたって腫瘍形成を観察し、皮下の腫瘍の容積を算出した。転移アッセイのため、経尾静脈注射の5週間後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、肺を4%ホルムアルデヒドで固定し、腫瘍コロニーを数えた。このアッセイは各群につき3匹のマウスを用いて行い、2回繰り返した。
- 10
- 15

結果を図7に示す。トリエチレングリコールをマウスに給餌により経口投与した群（TEG群）では腫瘍成長抑制効果がみられ、腹腔内注射した群（TEG-ip群）でも、同様の腫瘍成長抑制効果がみられた。すなわち、トリエチレングリコールの経口投与および腹腔内注射のいずれによっても、腫瘍の成長に伴う腫瘍容積の増大を顕著に減少させる効果がみられた。

20

さらに、トリエチレングリコールは強力な抗転移活性を示した。図8に *in vivo* 腫瘍転移アッセイの結果を示す。図8Aは、*in vivo* 腫瘍転移アッセイ後、マウスより摘出した肺の画像データを示し、画像データ中において丸で囲まれた部分が転移により形成された腫瘍を示す。なお、図8A中、上段は2%カルボキシメチルセルロース投与群（対照群）、中段はAshLe-WEX投与群、下段はトリエチレングリコール投与群を示す。また、図8Bは、*in vivo* 抗

25

腫瘍アッセイ後の各群の肺腫瘍容積の平均値を示すグラフである。対照群のマウスではいずれも肺に巨大な腫瘍がみられたが、A s h L e - W E X またはトリエチレングリコールで処理したマウスでは対照群のマウスの肺腫瘍と比較して肺腫瘍の数が少なく、容積は顕著に小さかった。また、A s h L e - W E X または T E G で処理した H T 1 0 8 0 細胞において *i n v i t r o* マトリゲル浸潤アッセイを行ったところ、浸潤の減少がみられた（図 9）。これらの結果は、トリエチレングリコールが A s h L e - W E X における主たる抗腫瘍因子であることを示唆していた。

9. トリエチレングリコールの抗癌活性メカニズム

10 トリエチレングリコールの細胞毒性の作用機序を調べるため、ヒト骨肉腫細胞（U 2 O S）および正常ヒト繊維芽細胞（T I G - 1）をそれぞれ A s h L e - W E X またはトリエチレングリコール（T E G）で処理し、癌抑制タンパク質である p 5 3 および p R B の発現を S D S - P A G E およびウェスタンブロッティングで調べた。なお、A s h L e - W E X またはトリエチレングリコール（T E G）の処理は、各細胞を培養する培地に A s h L e - W E X（最終濃度 0. 5 %）またはトリエチレングリコール（最終濃度 0. 5 %、1. 0 %、または 2. 0 %）を添加し、4 8 時間培養することにより行った。結果を図 1 0 A に示す。なお、下段の発現量を示す棒グラフのそれぞれに示した 1 ~ 5 の番号は、上段の写真の各レーンに付した 1 ~ 5 の番号に対応するものである。U 2 O S 細胞では、A s h L e - W E X またはトリエチレングリコールで処理した場合に対照群と比較して p 5 3 の増加がみられた。また、正常細胞では A s h L e - W E X またはトリエチレングリコールで処理した場合に対照群と比較して p 5 3 と p 2 1 の増加がみられた。さらに、癌細胞および正常細胞の両方でリン酸化 p 5 3 タンパク質が増加していることが抗ホスホセリン特異的抗体を用いた試験により判明した。リン酸 - p 5 3 / p 5 3 の比に基づき、A s h L e - W E X またはトリエチレングリコールで処理した細胞では対照群と比較してリン酸化が 3 0 ~ 4 0 % 増加していることがわかった。このことは、A s h L e - W E X およびトリエチレングリコールが、癌細胞および正常細胞の両方で p 5 3 を活性化させることを示唆して

いる。一方、pRBについては、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理した細胞では、対照群と比較してリン酸化pRBが癌細胞では減少するのに対し、正常細胞では増加することがわかった。リン酸化pRB/RBの比は、対照細胞における約0.5からトリエチレングリコール処理細胞における約0.3まで減少していた（約20%減少）のに対し、正常細胞では逆に約20%増加していた。

これらと並行して、サイクリン-B1、-D1およびE1、ならびにCDK-2、-4および-6の発現量を試験した。結果を図10Bに示す。AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理した癌細胞ではサイクリン-B1の減少がみられたのに対し、正常細胞では逆に対照群と比較してサイクリン-B1が増加していた。一方、サイクリン-D1では反対の傾向を示し、トリエチレングリコールで処理した場合、癌細胞では増加したのに対し、正常細胞では減少した。サイクリン-E1では、癌細胞および正常細胞の両方で増加した。CDK-4は正常細胞で減少していた。

AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理したヒト骨肉腫細胞（U2OS）および正常ヒト繊維芽細胞（TIG-1）におけるp53およびpRBのリン酸化状態を可視化するために免疫組織化学を行った。AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールによる処理は、培地に最終濃度がそれぞれ0.5%となるようにAshLee-WEXまたはトリエチレングリコールを添加し、当該培地を用いて各細胞を48時間培養することにより行った。細胞は、抗p53抗体（DO-1）および抗pRb抗体（S780）で染色した。免疫染色を、Alexa-488またはAlexa-594標識二次抗体を用いて可視化した。サイクリン-CDK複合体の下流エフェクタであるpRBは、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理した癌細胞におけるリン酸化が減少している一方、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールで処理した正常細胞では増加していた（図11）。

10. テロメラーゼ活性測定

確立された癌細胞の特徴であるテロメラーゼ活性へのトリエチレングリコールの効果についてTRAPアッセイキット (TeloTAGGG telomerase PCR ELISA PLUS ; Roche applied science より購入 ; Cat#12 013 789 001) を使用して試験した。

細胞は、ヒト乳癌細胞 (MCF 7) を用いた。ヒト乳癌細胞は、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコールを最終濃度で0.5%含む培地で48時間培養した後、テロメラーゼ活性の測定に使用した。試験の結果を図12に示す。トリエチレングリコールとAshLee-WEXは、20~40%テロメラーゼ活性を阻害することがわかった。また、図13に示したウェスタンブロッティングのアッセイの結果より、トリエチレングリコールとAshLee-WEXは、酸化ストレス依存的に転写因子NRF2を活性化するKeap1の発現量を増加させることがわかった。

11. トリエチレングリコールの抗転移活性メカニズム

AshLee-WEXおよびトリエチレングリコールの抗転移活性のメカニズムを調べるために、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-9、-3および-2) の発現レベルを調べた。試験は、ヒト肺がん細胞 (A549) を用いて行った。ヒト肺がん細胞 (A549) は、AshLee-WEX (最終濃度0.5%) またはトリエチレングリコール (最終濃度0.5%、1.0%、または2.0%) を含む培地で48時間培養した後、マトリックスメタロプロテアーゼの発現量の測定に使用した。図14に示されるように、癌細胞は、AshLee-WEXおよびTEGで処理した際、MMP-3およびMMP-9の発現のレベルにおいて著しい減少を示し、上述の*in vitro*および*in vivo*アッセイでみられた抗転移活性を示唆していた。この効果はMMP-2については観察されなかった。

12. トリエチレングリコールの分化誘導活性

25 膠芽腫細胞と神経芽細胞腫のトリエチレングリコールによる分化誘導を試験した。なお、膠芽腫細胞の分化誘導は、当該細胞を100 μ molの過酸化水素で2~3時間処理した後、AshLee-WEXまたはトリエチレングリコール (最終濃度0.6%) を含む培地で48時間培養することにより行った。対照群の細

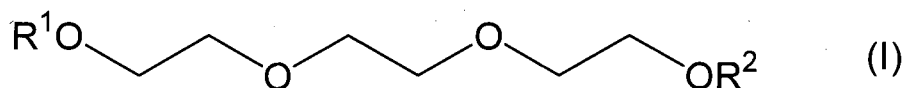
胞は、上記と同様の過酸化水素処理の後、A s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールのいずれも含まない培地で培養した。膠芽腫細胞の分化誘導アッセイの結果を図15に示す。図15Aに示したように、A s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールにより処理した膠芽腫細胞は星状膠細胞様の形態を有し、
5 分化を示した。さらに、G F A P（膠細胞分化のマーカータンパク）の誘導がA s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコール処理した細胞で上方調節されていた（図15B）。分化した細胞の高倍率写真によれば、星状膠細胞様の形態がみられ、G F A Pの高発現がみられる（図15C）。

次に、A s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールで処理したIMR3
10 2神経芽細胞腫に対する効果を調べた。神経芽細胞腫の分化誘導は、当該細胞を100 μ molの過酸化水素で2～3時間処理した後、A s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコール（最終濃度0.5%）を含む培地で48時間培養することにより行った。対照群の細胞は、上記と同様の過酸化水素処理の後、A s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールのいずれも含まない培地で培養した
15 群と、過酸化水素処理をせず、かつ、A s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールのいずれも含まない培地で培養した群とを作成した。結果を図16に示す。A s h L e - W E Xまたはトリエチレングリコールで処理したIMR32は神経様の形態を示し、ニューロフィラメント・タンパク質（NF200）の増加を示した（図16A、図16BおよびC）。

20 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 式 (I) :



5 [式中、

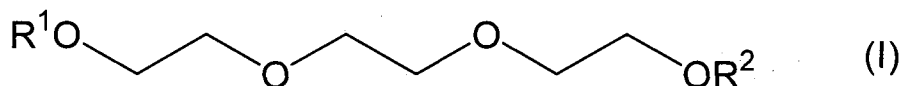
R^1 と R^2 は、それぞれ独立して、水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、
または $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^3$ から選択され、

R^3 は、 C_{1-6} アルキルまたは C_{1-6} ハロアルキルから選択される]

10 で表されるトリエチレングリコールまたはその誘導体を有効成分として含む、がん治療または予防用医薬組成物。

2. がんが固形癌である、請求項1に記載の医薬組成物。

3. 式 (I) :



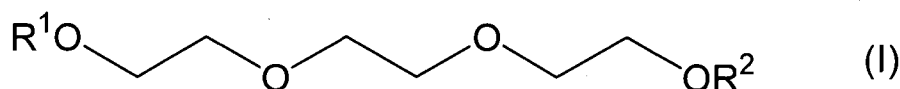
[式中、

15 R^1 と R^2 は、それぞれ独立して、水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、
または $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^3$ から選択され、

R^3 は、 C_{1-6} アルキルまたは C_{1-6} ハロアルキルから選択される]

で表されるトリエチレングリコールまたはその誘導体を有効成分として含む、がん転移抑制剤。

20 4. がん治療を必要とする対象に、有効量の式 (I) :



[式中、

R^1 と R^2 は、それぞれ独立して、水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、
または $-C(=O)R^3$ から選択され、

R^3 は、 C_{1-6} アルキルまたは C_{1-6} ハロアルキルから選択される]

5. で表されるトリエチレングリコールまたはその誘導体を投与することを含む、がんを治療または予防するための方法。

図 1

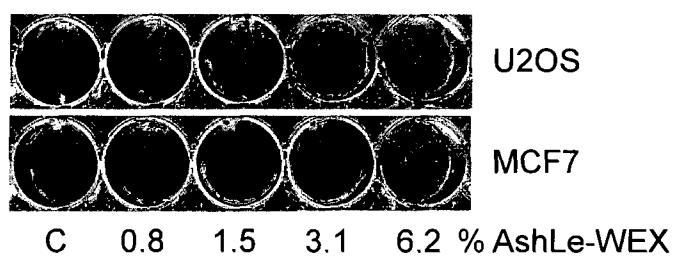
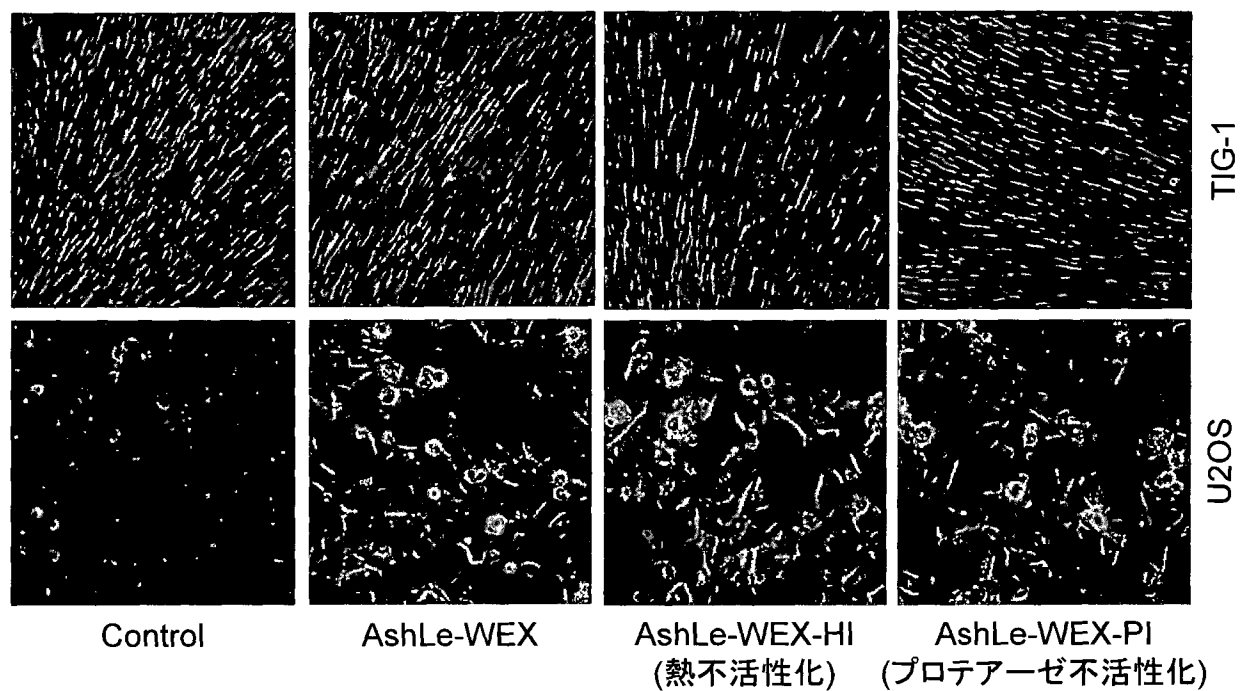


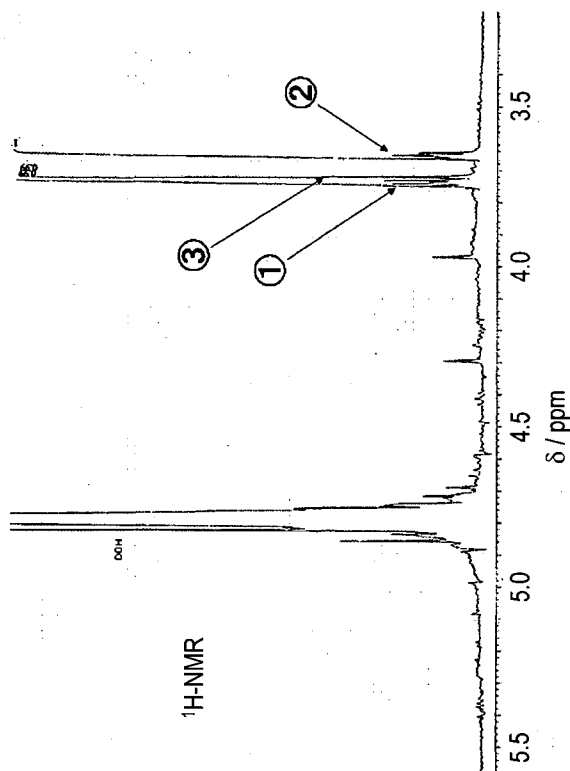
図 2



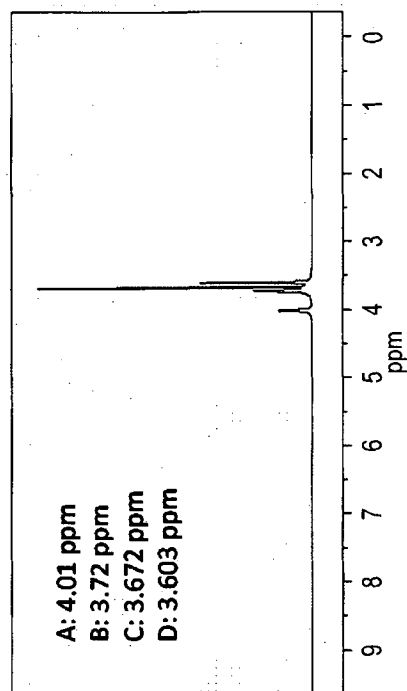
3



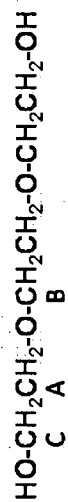
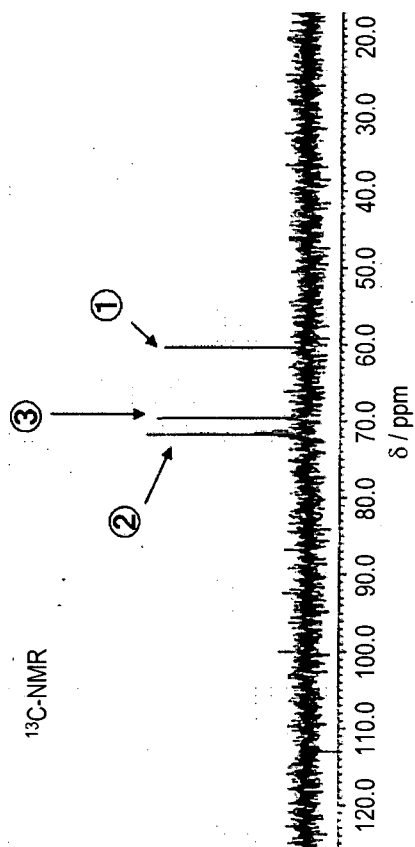
a



A: 4.01 ppm
B: 3.72 ppm
C: 3.672 ppm
D: 3.603 ppm



¹³C-NMR



A: 70.69 ppm
B: 70.26 ppm
C: 61.33 ppm

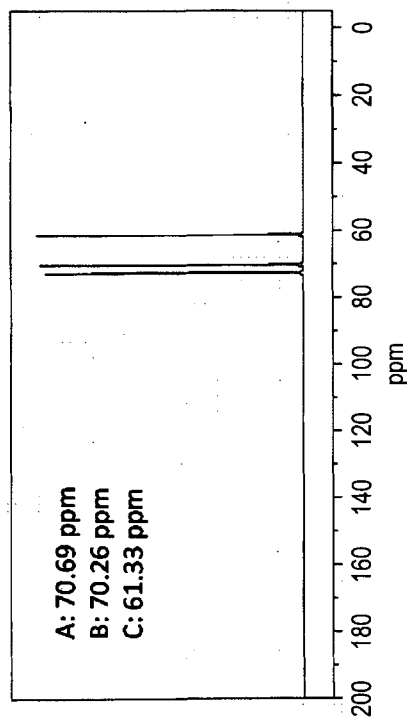


図 4

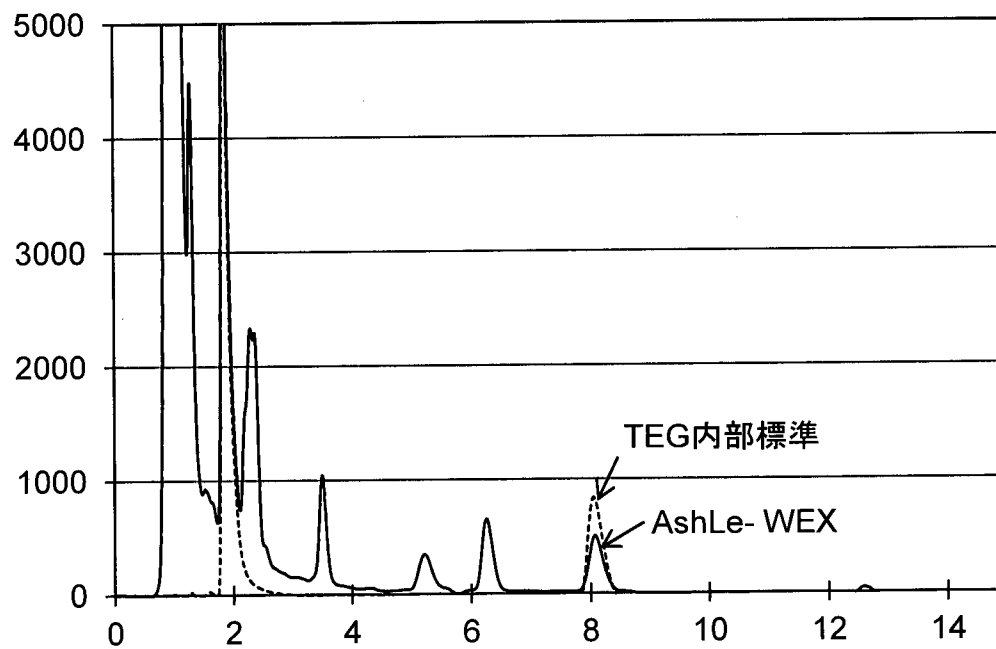


図 5

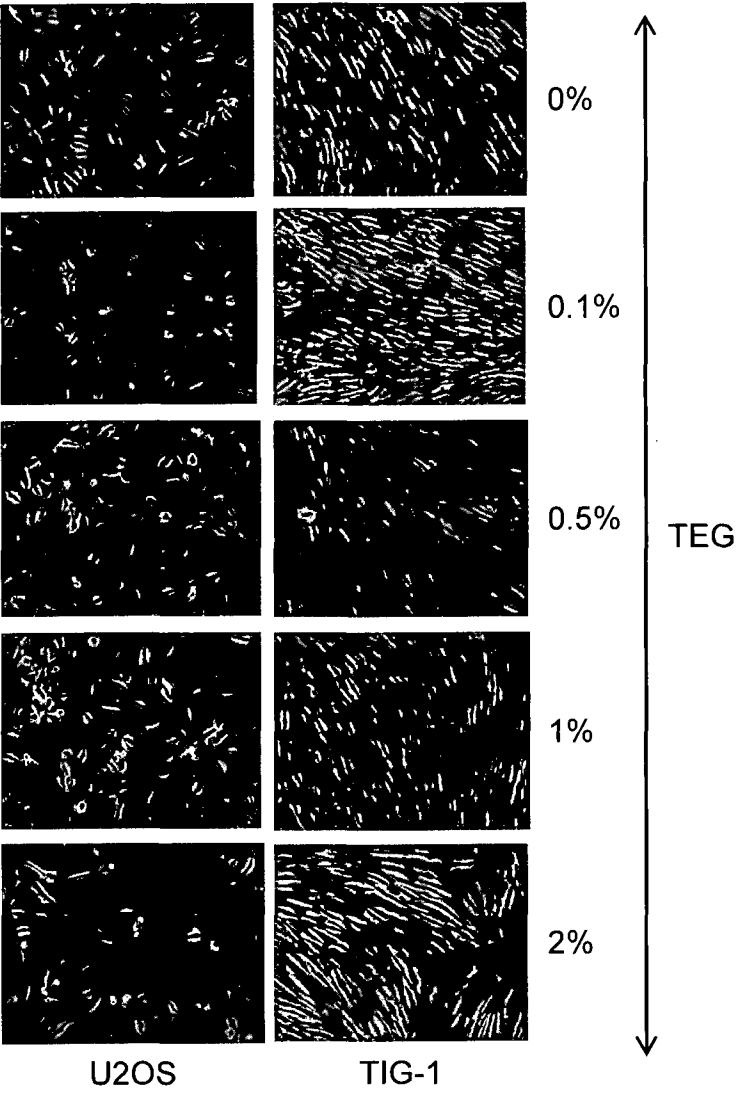


図 6

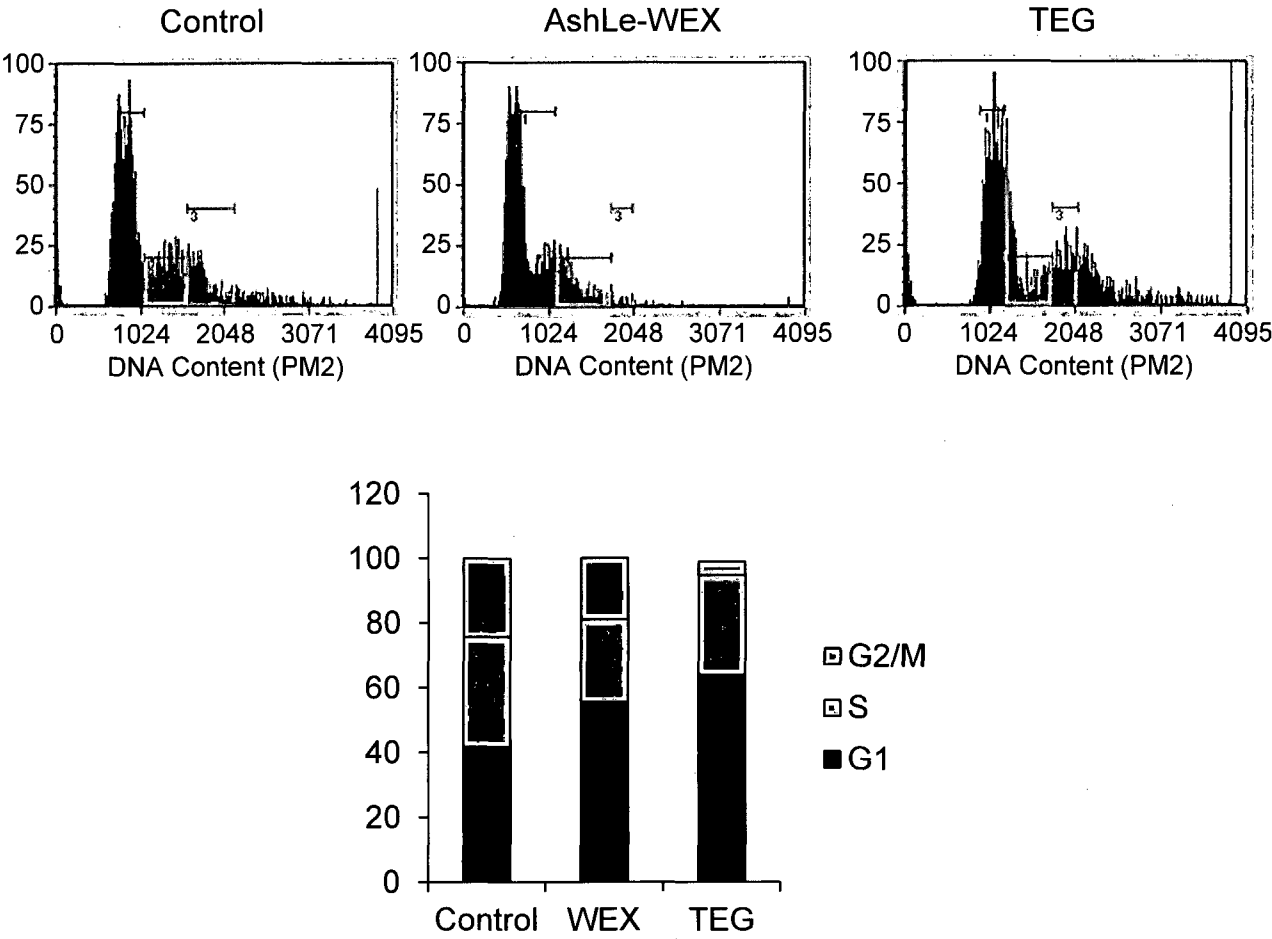
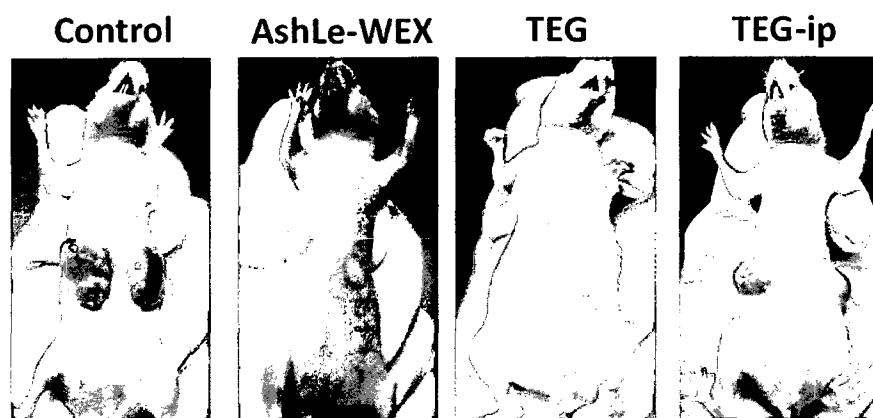


図 7

A



B

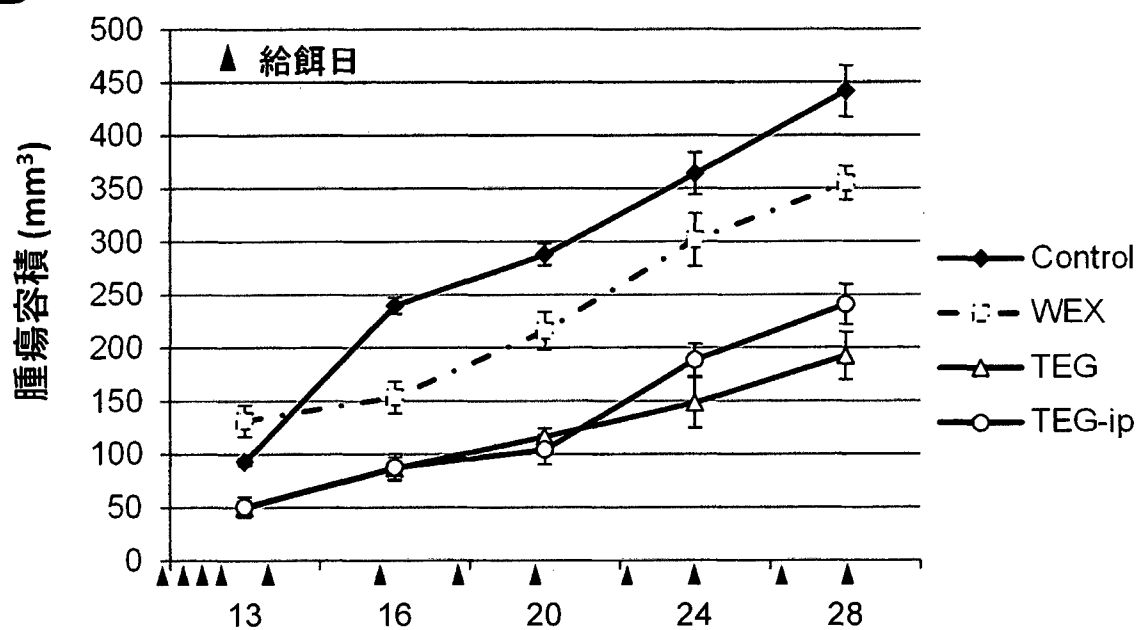


図 8

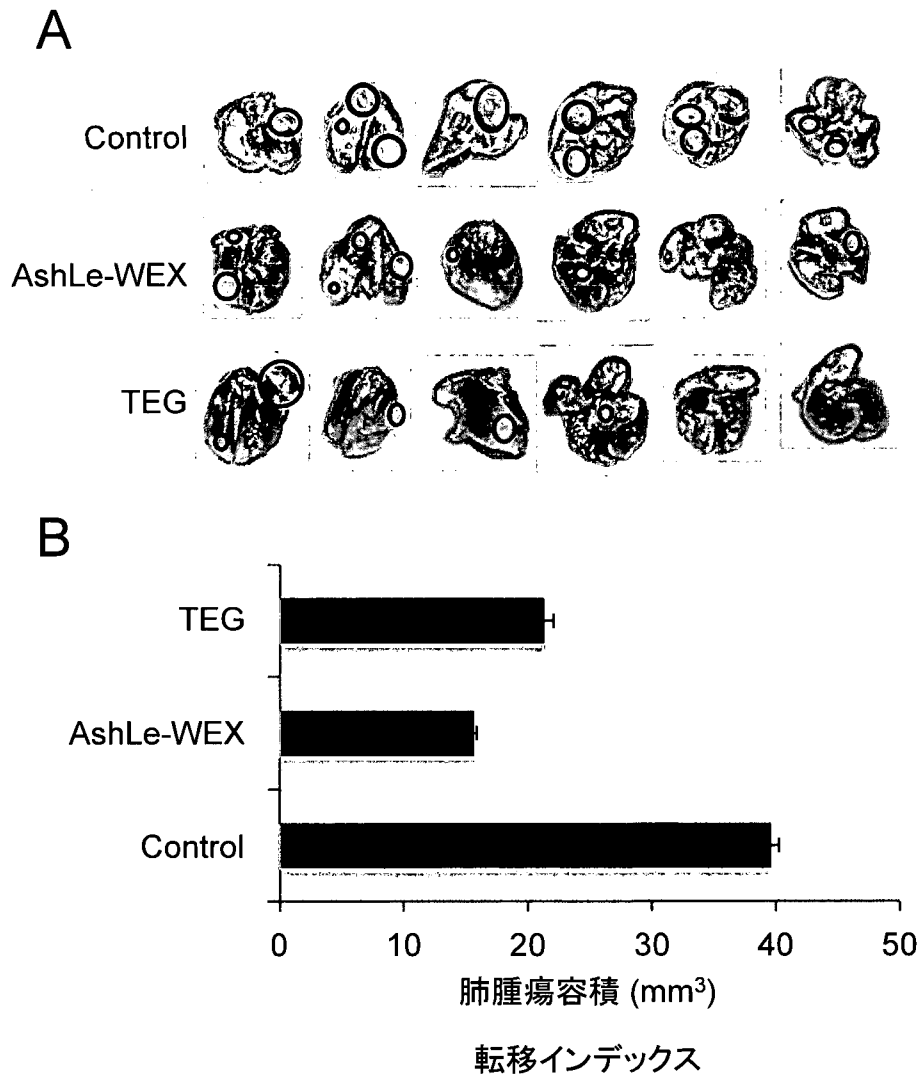
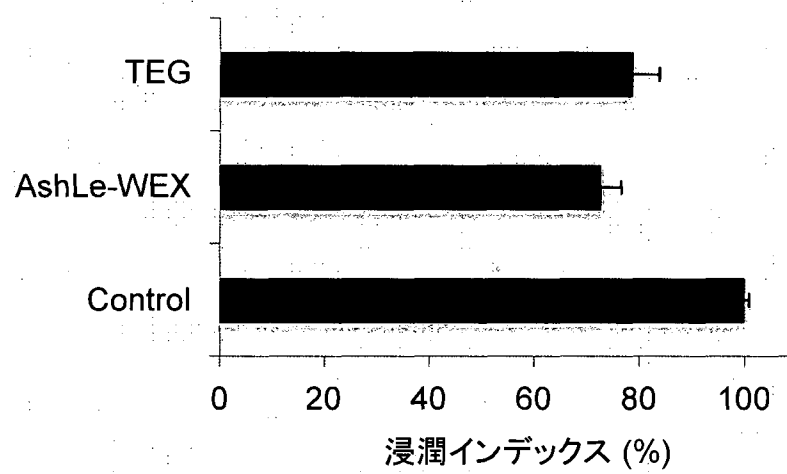


図 9



10

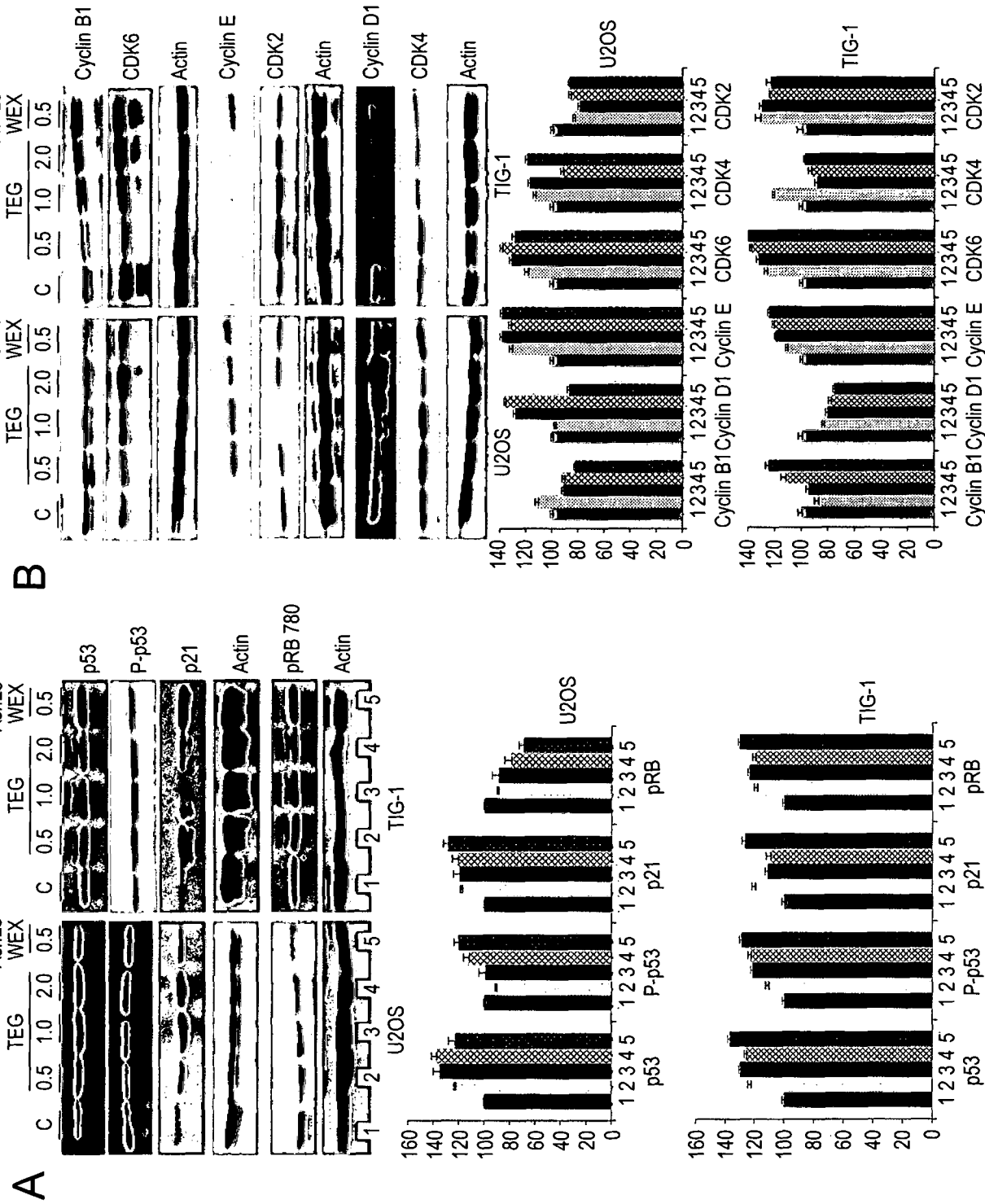


図 1-1

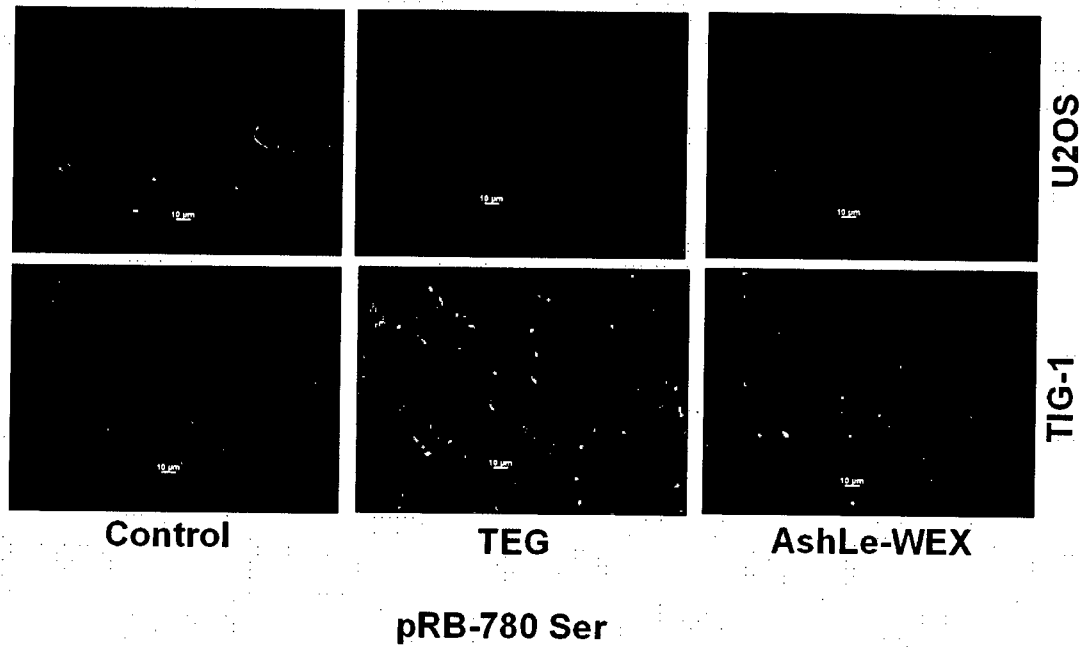


図 1 2

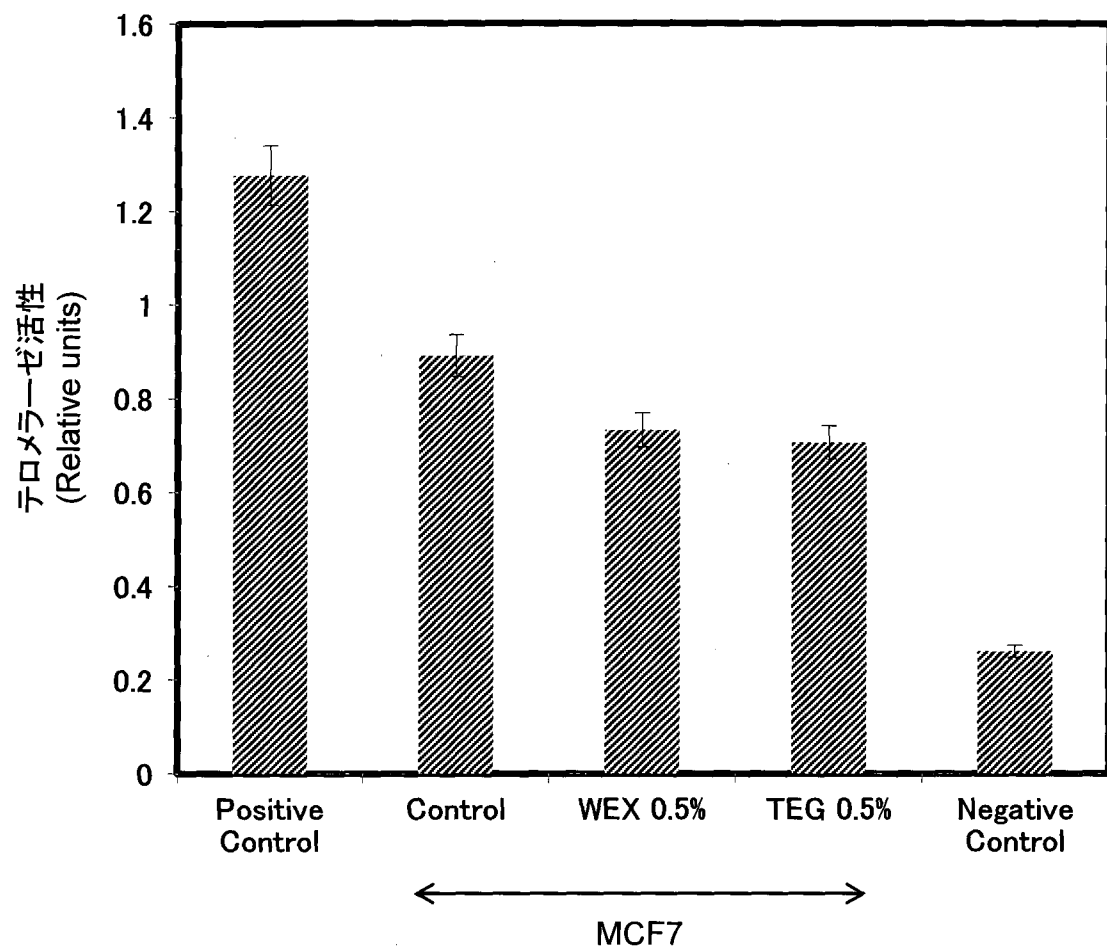
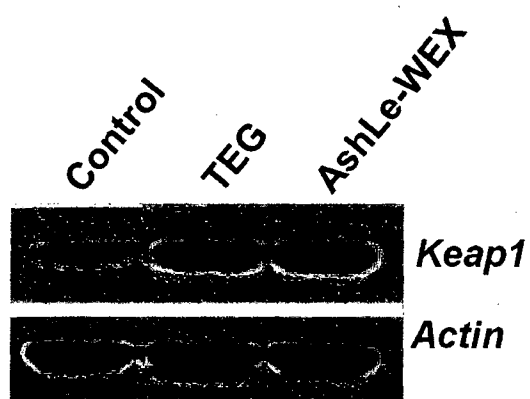


図 1 3



A549

図 1 4

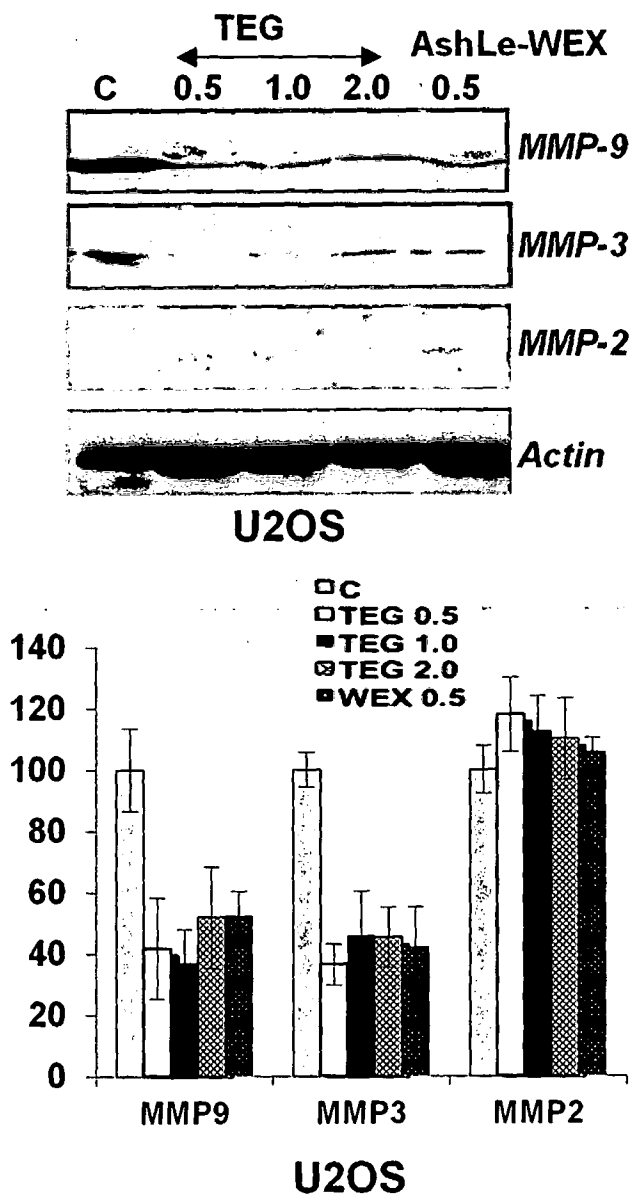
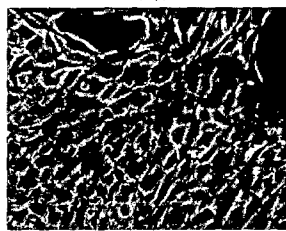
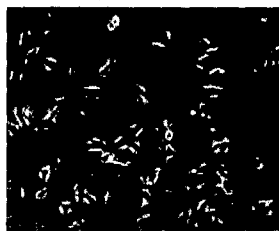


図 15

A



Control

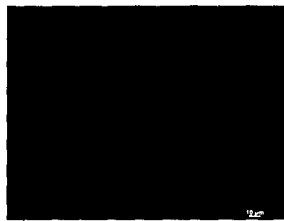


AshLe-WEX
(0.6%)



TEG (0.6%)

B



Control



AshLe-WEX
(0.6%)



TEG (0.6%)

C



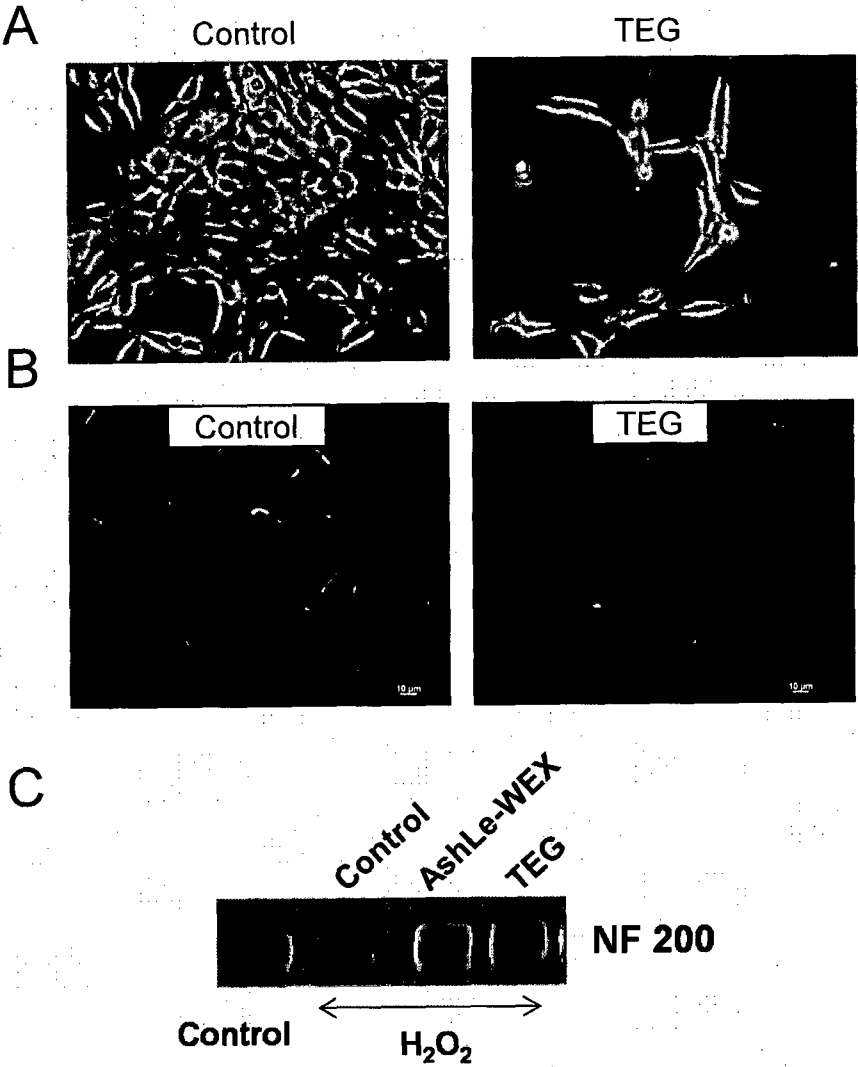
Control



TEG (0.6%)

C6 Glioma

図 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/066083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/08(2006.01)i, A61K36/81(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(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)

A61K31/08, A61K36/81, A61P35/00, A61P35/04

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/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.
X	NAKAMOTO, T. et al., Chemical and molecular characterization of the anticancer activity in the water extract of Ashwagandha Leaves, The Journal of Experimental & Applied Cell Culture Research, 2013.03.31, Vol.32, No.1, p.127, entire text	1-3
P, X	WADHWA, R. et al., Water extract of Ashwagandha leaves has anticancer activity: identification of an active component and its mechanism of action, PLOS ONE, 2013.10, Vol.8, No.10, e77189, entire text	1-3



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

26 August, 2014 (26.08.14)

Date of mailing of the international search report

09 September, 2014 (09.09.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/066083

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/110546 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 11 September 2009 (11.09.2009), entire text & EP 2260855 A1	1-3
A	WO 2005/082392 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 09 September 2005 (09.09.2005), entire text & JP 4868403 B	1-3
A	JP 2008-195704 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 28 August 2008 (28.08.2008), entire text (Family: none)	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/066083

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.: 4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention of claim 4 involves "a method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy".
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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K31/08(2006.01)i, A61K36/81(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(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（I P C））

Int.Cl. A61K31/08, A61K36/81, A61P35/00, A61P35/04

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 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/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
X	NAKAMOTO, T. et al., Chemical and molecular characterization of the anticancer activity in the water extract of Ashwagandha Leaves, 組織培養研究, 2013.03.31, Vol.32, No.1, p.127 全文	1-3
P, X	WADHWA, R. et al., Water extract of Ashwagandha leaves has anticancer activity: identification of an active component and its mechanism of action, PLOS ONE, 2013.10, Vol.8, No.10, e77189 全文	1-3

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 6 . 0 8 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

0 9 . 0 9 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

鳥居 福代

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

4 U

3 4 3 6

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
A	WO 2009/110546 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2009. 09. 11, 全文 & EP 2260855 A1	1-3
A	WO 2005/082392 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2005. 09. 09, 全文 & JP 4868403 B	1-3
A	JP 2008-195704 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2008. 08. 28, 全文 (ファミリーなし)	1-3

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（P C T 17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 4 に係る発明は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」を包含するものである。
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 P C T 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。