

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6006292号  
(P6006292)

(45) 発行日 平成28年10月12日(2016.10.12)

(24) 登録日 平成28年9月16日(2016.9.16)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/404	(2006.01)
A 61 P 31/16	(2006.01)
A 61 K 45/00	(2006.01)
A 61 K 38/21	(2006.01)
A 61 K 39/145	(2006.01)
	A 61 K 31/404
	A 61 P 31/16
	A 61 K 45/00
	A 61 K 37/66
	A 61 K 39/145

請求項の数 7 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-503177 (P2014-503177)
(86) (22) 出願日	平成24年4月10日 (2012.4.10)
(65) 公表番号	特表2014-510130 (P2014-510130A)
(43) 公表日	平成26年4月24日 (2014.4.24)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/056467
(87) 國際公開番号	W02012/136851
(87) 國際公開日	平成24年10月11日 (2012.10.11)
審査請求日	平成27年4月1日 (2015.4.1)
(31) 優先権主張番号	11305410.0
(32) 優先日	平成23年4月8日 (2011.4.8)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)

(73) 特許権者 513246469  
インサーム (インスティテュ ナシオナル  
ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシ  
エルシェ メディカル)  
INSEERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)  
フランス国 エフ-75013 パリ リュ・ド・トルビック 101

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インフルエンザウイルス複製を阻害するための方法および医薬組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

A型インフルエンザウイルス感染の処置のために、その処置を必要とする対象者へ使用するための、オバトクラックスメシレートを含む医薬組成物。

## 【請求項 2】

請求項1に記載の医薬組成物であって、

前記A型インフルエンザウイルスは、H1N1、H2N2、H3N2及びH5N1からなる群より選択される医薬組成物。

## 【請求項 3】

請求項1又は2に記載の医薬組成物であって、

前記対象者は、ヒトである医薬組成物。

## 【請求項 4】

請求項3に記載の医薬組成物であって、

前記対象者は、ヒトの乳幼児、ヒトの子供又はヒトの高齢者である医薬組成物。

## 【請求項 5】

請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬組成物であって、

前記オバトクラックスメシレートは、ノイラミニダーゼ阻害剤、M2阻害剤、RNAポリメラーゼ阻害剤、インターフェロン、インフルエンザワクチン、インフルエンザ抗原ポリペプチド、及びインフルエンザ抗原ポリペプチドに対する中和抗体からなる群より選択される追加の治療薬と組み合わせられる医薬組成物。

10

20

**【請求項 6】**

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物であって、

前記オバトクラックスメシレートは、ゲムシタビン、ドセタキセル、H A - 1 4 、アルステルパウロン、G S K 3 ベータ阻害剤 V I I I 、G S K 3 ベータ阻害剤 X V 、インジルビン - 3 ' - モノオキシム、還元型 L - グルタチオン、フルオシノロンアセトニド、チロフィバン、塩酸トポテカン、クロファラビン、ビンプラスチン、及びメナジオン結晶からなる群より選択される化合物の有効量と組み合わせられる医薬組成物。

**【請求項 7】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物であって、

気道に投与するための医薬組成物。

10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、インフルエンザウイルス複製を阻害するための方法および医薬組成物に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 2】**

インフルエンザウイルスは、世界中に最も広く存在するウイルスのうちの1つであり、人間および家畜の両方に影響する。結果的に、インフルエンザは、経済的負担、病態、ひいては死亡率に影響を与える。

20

**【0 0 0 3】**

インフルエンザウイルスは、直径約 1 2 5 nm の粒径の、R N A エンベロープウイルスである。これは基本的に、脂質二重層構造および外部糖タンパク質を持つウイルスエンベロープに覆われた、内部ヌクレオカプシドまたは核タンパク質と結びついたリボ核酸 ( R N A ) のコアからなる。ウイルスのエンベロープの内層は、主に、マトリックスタンパク質からなり、外層は大部分が宿主由来の脂質性物質からなる。インフルエンザウイルスは、その粒子の表面に、長さ 1 0 nm ~ 1 2 nm の先の尖ったスパイクのような糖タンパク質のノイラミニダーゼ ( N A ) およびヘマグルチニン ( H A ) の 2 つの表面抗原を含む。これらの表面タンパク質、特にヘマグルチニンは、インフルエンザサブタイプの抗原特異性を決定する。ウイルス型は、宿主種の由来、地理的位置、および分離の年度、通し番号により分類され、A 型では、H A および N A のサブタイプの血清学的特性によって分類される。A 型インフルエンザウイルスとして、1 6 種の H A サブタイプ ( H 1 - H 1 6 ) および、9 種の N A サブタイプ ( N 1 - N 9 ) が見つかっている。すべての H A および N A サブタイプのウイルスは、水鳥から回収されているが、3 種の H A サブタイプ ( H I 、 H 2 、および H 3 ) 並びに 2 種の N A サブタイプ ( N 1 および N 2 ) のみが、1 9 1 8 年以来、ヒト集団において、定常的な系統になっている。H A サブタイプのうち 1 種および N A のうち 1 種のみが、B 型インフルエンザウイルスとして認識されている。

30

**【0 0 0 4】**

A 型インフルエンザウイルスは、継続的に、進化および抗原変異を行っている。ウイルス R N A ポリメラーゼによる有効な校正機構の欠如は、糖タンパク質の表面で、アミノ酸置換を生じ得る高率の転写エラーを引き起こす。これは「抗原ドリフト」と呼ばれる。断片化したウイルスゲノムは、第 2 の抗原変異型の出現を可能にさせる。また、2 つのインフルエンザウイルスが、同時に宿主細胞に感染する場合、「抗原シフト」と呼ばれる遺伝子再配分で、新しい表面または内部タンパク質を持つ新規ウイルスを生じ得る。これらの抗原変化である、「ドリフト」および「シフト」は予測不可能であり、免疫学的観点から強い衝撃を与え得る。なぜなら、これらの「ドリフト」および「シフト」が、新しいインフルエンザ型の出現を最終的に引き起こし、ウイルスが免疫系を避けることを可能にすることにより、ほぼ毎年恒例の既知の流行になるからである。これらの両遺伝子修飾は、人間ににおける世界的大流行を招く新しいウイルス変種の原因になっている。

40

**【0 0 0 5】**

50

インフルエンザウイルスは、A型またはB型ウイルスで、ほぼ毎年冬に、40%の高い感染率で6週間以上の流行の原因になる。インフルエンザ感染は、無症状感染から、軽度の上気道感染、重度のウイルス性肺炎まで、様々な病態を生じる。典型的なインフルエンザ流行は、入院率または死亡率の増加が証明するように、肺炎および下気道疾患の発症増加を引き起こす。疾患の重症度は、主として、宿主の年齢、その免疫状態、および感染場所により決定される。

#### 【0006】

65歳以上の高齢者は特に影響を受けやすく、先進国における、あらゆるインフルエンザ関連の死亡の80%~90%を占める。また、慢性疾患をもつ人々も、合併症などに最も罹りやすい。乳幼児も重度の疾患に罹る可能性がある。したがって、特にこれらのグループは保護を必要とする。保健機関は、これらの「リスクのある」グループを除き、高齢者と接触する健康な成人には、ワクチンの接種を薦めている。10

#### 【0007】

現在、インフルエンザの処置の選択肢は、ワクチンの接種および抗ウイルス薬を用いた化学療法または化学的予防を含む。インフルエンザワクチンを用いたインフルエンザに対するワクチンの接種は、子供および高齢者、または喘息、糖尿病もしくは心臓疾患を持つ人々などの危険性の高いグループに度々勧められる。しかしながら、ワクチンの接種をしても、なおインフルエンザにかかる可能性はある。ワクチンは、各時期に、数種の特定のインフルエンザ型のために再製剤化されるが、その時期に世界で人々に対し活発に感染するすべての型を含むことはできない。季節的流行に対処するために必要な数百万の用量の調製および製造には、製造業者にとっては約6ヶ月間を要する。時折、新しい、または、見落とされた型が、ある時期に顕著に現れ、ワクチンの接種をした人々にも感染する（例えば、2003~2004年のインフルエンザ流行期のH3N2福建インフルエンザ（Fujian flu）。また、ワクチン接種の直前に感染し、病気を防ぐはずのワクチンとそのまったく同じ型で発病する可能性もある。なぜなら、ワクチンが有効になるのに約2週間かかるからである。さらに、これらのインフルエンザワクチンの有効性は変化する。ウイルスの高変異率のため、特定のインフルエンザワクチンは、通常、数年を超えての防護効果を持たない。インフルエンザウイルスは時間とともに急速に変化し、異なる型が優勢になるので、1年間で製剤にしたワクチンは、次の年には効果がなくなる可能性がある。20

#### 【0008】

また、抗ウイルス剤（例えば、ノイラミニダーゼ阻害剤、またはM2阻害剤）は、インフルエンザ処置に用いられる。しかしながら、ウイルスは、標準的な抗ウイルス剤に抵抗性を持つことが可能である。したがって、ウイルス力値への感度を低減した薬剤などの、インフルエンザ感染処置のための薬剤が、いまも必要とされている。30

#### 【発明の概要】

#### 【0009】

本発明は、インフルエンザウイルス複製を阻害するための方法および医薬組成物に関する。40

#### 【0010】

より具体的には、本発明は、感染細胞においてインフルエンザウイルスの複製能を阻害するための方法に関し、ゲムシタビン、オバトクラックスメシレート（Obatoclax Mesylate）、ドセタキセル、HA-14、アルステルパウロン（Alstertapau lone）、GSK3ベータ阻害剤VIII、GSK3ベータ阻害剤XV、インジルビン-3'-モノオキシム（Indirubin-3'-monoxime）、還元型L-グルタチオン、フルオシノロンアセトニド、チロフィバン、塩酸トポテカン（Topotecan hydrochloride）、クロファラビン、ピンプラスチン、メナジオン結晶（Menadione Crystalline）、およびそれらの誘導体、または類似体からなる群より選択した少なくともひとつの化合物と該感染細胞とを接觸させることからなるステップを含む。50

## 【0011】

また、本発明は、インフルエンザ感染の処置において、その処置を必要とする対象者に使用するための、ゲムシタビン、オバトクラックスメシレート、ドセタキセル、H A - 14、アルステルパウロン、G S K 3ベータ阻害剤V I I I、G S K 3ベータ阻害剤X V、インジルピン-3'-モノオキシム、還元型L-グルタチオン、フルオシノロンアセトニド、チロフィバン、塩酸トポテカン、クロファラビン、ビンプラスチン、メナジオン結晶、およびそれらの誘導体、または類似体からなる群より選択した化合物に関する。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0012】

本発明者は、これまでに、インフルエンザウイルス複製を阻害し、インフルエンザ感染の処置のための薬剤として用いることのできる様々な化合物を発見した。前記化合物は表1に示されており、また当業者とてこの化合物自体は周知である。

## 【0013】

## 【表1】

名称	F D A 承認状況	I U P A C 名称
アルステル パウロン	未承認	14-ニトロ-8, 18-ジアツテトラシクロ[9.7.0.0^ {2,7}. 0^ {12,17}]オクタデカ-1(11), 2(7), 3, 5, 12(17), 13, 15-ヘプタエン-9-オノ
ビンプラス チン	承認	メチル(1R, 9R, 10S, 11R, 12R, 19R)-11-(アセチルオキシ)-12-エチル-4-[ (13S, 15S, 17S)-17-エチル-17-ヒドロキシ-13-(メトキカルボニル)-1, 11-ジアツテトラシクロ[13.3.1.0^ {4,12}. 0^ {5,10}]ノナテカ-4(12), 5(10), 6, 8-テトラエン-13-イル]-10-ヒドロキシ-5-メトキシ-8-メチル-8, 16-シアツテトラシクロ[10.6.1.0^ {1,9}. 0^ {2,7}. 0^ {16,19}]ノナテカ-2(7), 3, 5, 13-テトラエン-10-カルボキシレート
メナジオン 結晶	承認	2-メチル-1, 4-ジヒドロナフタレン-1, 4-ジオン
G S K 3ベ ータ阻害剤 V I I I	未承認	N-(4-メキシベンジル)-N'-(5-ニトロ-1, 3-チアゾール-2-イル)ウレア
ゲムシタビ ン	承認	4-アミノ-1-[(2R, 4R, 5R)-3, 3-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)オキソラン-2-イル]-1, 2-ジヒドロピリミジン-2-オノ
G S K 3ベ ータ阻害剤 X V	未承認	ヒドロカルバゾロシクロヘンタジエニル ルテニウム錯体、ラセミ混合物
ドセタキセ ル	承認	(1S, 2S, 3R, 4S, 7R, 9S, 10S, 12R, 15S)-4-(アセチルオキシ)-15-([(2R, 3S)-3-[(tert-ブロキシ)カルボニル]アミノ]-2-ヒドロキシ-3-フェニルフロハノイル]オキシ)-1, 9, 12-トリヒドロキシ-10, 14, 17, 17-テトラメチル-11-オキソ-6-オキサテトラシクロ[11.3.1.0^ {3,10}. 0^ {4,7}]ヘptaタ-13-エノ-2-イルペニゾアート
オバトクラ ックスメシ レート(G X 15-07)	未承認	(2E)-2-[(5E)-5-[(3, 5-ジメチル-1H-ヒドロール-2-イル)メチリデン]-4-メキシヒドロール-2-イリデン]インドール; メタヌルホン酸

10

20

30

40

インジルビン-3'-モノオキシム(Indirubin-3'-monoxime)	未承認	3-[3E)-3-(ヒドロキシメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-イントール-2-イリデン]-2,3-ジヒドロ-1H-イントール-2-オン	
フルオシノロンアセトニド	承認	(1S, 2S, 4R, 8S, 9S, 11S, 12R, 13S, 19S)-12, 19-シフルオロ-11-ヒドロキシ-8-(2-ヒドロキシアセチル)-6, 6, 9, 13-テトラメチル-5, 7-ジオキサヘンタシクロ[10.8.0.0^2, 9.0^4, 8.0^13, 18]ヘキサ-14, 17-ジエン-16-オン	10
還元型L-グルタチオン	承認	(2S)-2-アミノ-4-[(1R)-1-[(カルボキシメチル)カルバモイル]-2-スルファニルエチル]カルバモイルブタン酸	
チロフィバン	承認	(2S)-2-(ブタン-1-スルホニアミド)-3-{4-[4-(ヒドロキシ-4-イルブドキシ)フェニル]プロパン酸	
HA - 14	未承認	エチル[2-アミノ-6-ブロモ-4-(1-アノ-2-エトキシ-2-オキソエチル)]-4H-クロメン-3-カルボキシレート	
塩酸トポテカン	承認	(19S)-8-[(ジメチルアミノ)メチル]-19-エチル-7, 19-ジヒドロキシ-17-オキサ-3, 13-ジアザヘンタシクロ[11.8.0.0^2, 11.0^4, 9.0^15, 20]ヘニコサ-1(21), 2, 4(9), 5, 7, 10, 15(20)-ヘプタエン-14, 18-ジオン	20
クロファラビン	承認	(2R, 3R, 4S, 5R)-5-(6-アミノ-2-クロロ-9H-ブリン-9-イル)-4-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)オキソラン-3-オル	

## 【0014】

従って、本発明は、感染細胞におけるインフルエンザウイルス複製能の阻害方法に関し、ゲムシタビン、オバトクラックスメシレート、ドセタキセル、HA - 14、アルステルパウロン、GSK3ベータ阻害剤VIII、GSK3ベータ阻害剤XV、インジルビン-3'-モノオキシム、還元型L-グルタチオン、フルオシノロンアセトニド、チロフィバン、塩酸トポテカン、クロファラビン、ビンプラスチン、メナジオン結晶、およびそれらの誘導体、または類似体からなる群より選択した少なくともひとつの化合物と前記感染細胞とを接触させることからなるステップを含む。

## 【0015】

ウイルス表現型に関連して、ここで用いられる「複製能の阻害」という用語は、前記化合物のない場合のウイルスの成長と比較して、ウイルスが、前記化合物によって、より低い力値になることを意味する。ある実施形態では、前記化合物なしで成長したインフルエンザウイルスと比較した場合、前記化合物は、ヒト細胞において、少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約100%、または少なくとも約200%、または少なくとも約300%、または少なくとも約400%、または少なくとも約500%、複製に対するインフルエンザウイルスの能力を阻害する。

## 【0016】

本発明によると、前記の感染細胞は、鳥類および哺乳類細胞を含む真核性感染細胞である。好ましくは、前記感染細胞は哺乳類細胞である。典型的に、前記哺乳類細胞は、ヒト、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、及びウサギの細胞を含むが、これに限定されない。

## 【0017】

また、本発明は、インフルエンザ感染の処置において、その処置を必要とする対象者に

10

20

30

40

50

使用するための、ゲムシタピン、オバトクラックスメシレート、ドセタキセル、H A - 1 4、アルステルパウロン、G S K 3 ベータ阻害剤V I I I、G S K 3 ベータ阻害剤X V、インジルビン - 3' - モノオキシム、還元型L - グルタチオン、フルオシノロンアセトニド、チロフィバン、塩酸トポテカン、クロファラビン、ピンプラスチン、メナジオン結晶、およびそれらの誘導体、または類似体からなる群より選択した化合物に関する。

#### 【0018】

ここで用いられる「インフルエンザ感染」という用語は、該技術において一般的な意味を持ち、インフルエンザウイルスの感染によって引き起こされる疾患を指す。本発明のいくつかの実施形態においてインフルエンザ感染は、A型またはB型インフルエンザウイルスに関連する。本発明のいくつかの実施形態においてインフルエンザ感染は、A型インフルエンザウイルスに関連する。本発明のいくつかの特定の実施形態では、インフルエンザ感染は、H 1 N 1、H 2 N 2、H 3 N 2 またはH 5 N 1 であるA型インフルエンザウイルスにより引き起こされる。10

#### 【0019】

対象者は、インフルエンザに感染しやすいヒトまたは他の任意の動物（例えば、鳥類および哺乳類）であり得る（例えば、ネコおよびイヌなどの飼育動物、ウマ、ウシ、ブタ、ニワトリなどの家畜及び畜産用動物など）。主として、前記対象者は、非靈長類（例えば、ラクダ、ロバ、シマウマ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ラット及びマウス）および靈長類（例えば、サル、チンパンジー、およびヒト）を含む哺乳類である。特定の実施形態において対象者はヒト以外の動物である。いくつかの実施形態において対象者は家畜またはペットである。別の実施形態において対象者はヒトである。また別の実施形態において対象者はヒトの乳幼児である。別の実施形態において対象者はヒトの子供である。別の実施形態において対象者はヒトの成人である。別の実施形態において対象者はヒトの高齢者である。別の実施形態において対象者はヒトの未熟児である。20

#### 【0020】

例として、治療処置は、本発明の少なくとも1つの化合物の投与により生じる、インフルエンザ感染の進行、重症度および/または継続の抑制または改善、またはインフルエンザ感染の1つ以上の症状の改善（特に、1つ以上の識別可能な症状）を含む。特定の実施形態では、治療処置は、インフルエンザ感染の少なくとも1つの測定可能な身体的パラメータの改善を含む。他の実施形態では、治療処置は、身体的な例えば識別可能な症状の安定化などによって、もしくは生理的な例えば身体的パラメータの安定化などによって、またはその両方によって、インフルエンザ感染の進行を阻害することを含む。他の実施形態において治療処置は、インフルエンザ感染の減少または安定化を含む。地域社会において抗ウイルス剤は、症状の重さの軽減および病気である日数の減少のために、すでにインフルエンザに感染している人々の処置に用いられうる。30

#### 【0021】

特定の実施形態では、本発明の化合物は予防処置に用いてもよい。本明細書において、用語「予防」または「予防的使用」および「予防処置」とは、任意の医療的または公衆衛生上の行為を指し、その目的は、病気への処置または処置というよりも、阻止にある。本明細書において、用語「阻止する」、「阻止」および「阻止すること」は、病気ではないが、疾患を持つ患者と接近した、もしくは接近した可能性のある対象者において、特定の状態を得るもしくは発展させるリスクの低減、または、再発もしくは前記状態の低減もしくは抑制を指す。40

#### 【0022】

本明細書において、予防的使用は、深刻なインフルエンザ合併症の高いリスクを持つ多くの人々が、互いに密に接しながら暮らす場所において伝染または蔓延を阻止するため、発生が感知される状況における使用を含む（例えば、病院棟、デイケアセンター、刑務所、介護施設など）。また、予防的使用では、インフルエンザからの防護が必要だがワクチン接種後の防護効果がない（例えば、免疫系の脆弱性のため）人々における、またはワクチンを利用できない場合における、または副作用のためワクチンの接種ができない場合に50

おける使用を含む。予防的使用では、また、ワクチン接種に続く2週間でワクチンがまだ無効である時期の使用を含む。予防的使用はまた、インフルエンザに感染して、密な接触によって合併症の高いリスクを持つ人へ感染させる機会を減少させるため、インフルエンザの病気ではない、または合併症の高いリスクがあるとは考えられない人への処置を含む（例えば、医療従事者、介護施設職員など）。

#### 【0023】

本発明の化合物は、典型として、有効量で対象者に投与する。本明細書では、「有効量」は望ましい生物学的反応を引き出すのに十分な量を指す。本発明において、望ましい生物学的反応とは、インフルエンザウイルスの複製の阻害であり、インフルエンザウイルス量の低減であり、またはインフルエンザウイルス感染の重症度、期間、進行、もしくは発病の低減もしくは改善であり、インフルエンザウイルス感染進行の阻止であり、インフルエンザウイルス感染関連症状の再発、発生、発病もしくは進行の阻止であり、またはインフルエンザ感染に対して用いられる別の治療の予防的もしくは処置効果の促進もしくは改善である。対象者に投与する化合物の的確な量は、投与形態、感染型および重症度、並びに一般的健康状態、年齢、性別、体重、および薬剤に対する耐性などの対象者の特徴に依存するであろう。当業者は、これらおよび他の要因により、適切な用量を決定することができる。他の抗ウイルス剤と併用投与する場合、例えば、抗インフルエンザ薬剤と併用投与する場合、2番目の薬剤の「有効量」は使用する薬剤の種類によって決まってよい。適切な用量は、承認された薬剤では周知であり、対象者の状態、処置する状態の種類、および使用される本明細書の化合物量により、当業者によって調節されうる。分量が明確に示されない場合は、有効量は推測されるべきである。例えば、本明細書の化合物は、処置または予防処置のために、1日に、体重に対して、約0.01mg/kg～100mg/kgの範囲の用量で、対象者に対して投与可能である。10

#### 【0024】

一般に、投薬計画は様々な要因によって選択されうる。その要因は、処置する疾患、および疾患の重症度、使用する特定の化合物の活性度、使用する特定の組成物、対象者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別および食習慣、投与時間、投与経路、並びに使用する特定の化合物の排出率、対象者の腎機能および肝機能、並びに使用する特定の化合物またはその塩、治療期間、使用する特定の化合物とともに組合せでもしくは偶発的に用いられる薬剤、並びに、医療技術において周知の要因などを含む。当業者は、疾患の進行の処置、阻止、阻害（全体的にもしくは部分的に）または防止に必要である本明細書の化合物の有効量を容易に決定し、処方することができる。20

#### 【0025】

本明細書の化合物の用量は、1日に体重に対して約0.01mg/kg～約100mg/kg、1日に体重に対して約0.01mg/kg～約50mg/kg、1日に体重に対して約0.1mg/kg～約50mg/kg、または1日に体重に対して約1mg/kg～約25mg/kgの範囲でありうる。1日の薬用量は、1回の投与になりうり、または、1日2回（例えば、12時間毎）、1日3回（例えば、8時間毎）、もしくは1日4回（例えば、6時間毎）などの複数回の投与になりうることが理解される。30

#### 【0026】

治療処置にあたり、本明細書の化合物は症状（例として、鼻詰まり、咽頭痛、咳、痛み、倦怠感、頭痛、および悪寒、発汗）の発生から、例えば、48時間以内（または40時間以内、または2日未満、または1.5日未満、または24時間以内）に、対象に投与することができる。治療処置は任意の適切な期間、例えば、5日間、7日間、10日間、14日間など、続けることができる。40

#### 【0027】

地域発生での予防処置において、本明細書の化合物は、指針症例により、症状の発生から、例えば、2日以内に対象に投与することができ、そして、任意の適切な期間、例えば、7日間、10日間、14日間、20日間、28日間、35日間、42日間など、続けることができる。50

## 【0028】

本発明では、投与方法の様々な種類を用いることができ、以下に詳細を記述する。

## 【0029】

特定の実施形態では、本発明の化合物は、添加の適切な治療剤、例えば、抗ウイルス剤またはワクチンとの組合せで用いられる。「組合せ治療」が用いられるとき、有効量は、本発明の化合物の第1分量および添加の適切な治療剤の第2分量（例えば、抗ウイルス剤またはワクチン）を用いて得られる。

## 【0030】

本明細書で用いられる用語「組合せで」または「併用投与」は、2つ以上の治療（例えば、1つまたは複数の予防剤、および／または治療剤）を用いることを指し、置き換えて用いることができる。これらの用語の使用は、処置（例えば、予防剤、および／または治療剤）が対象者に行われる順序を制限しない。10

## 【0031】

併用投与は、原則的に同時に、併用投与化合物の第1および第2分量を投与することを含み、それは、例えば、第1および第2分量を一定の比率で有する单一の医薬組成物か、または各々が個別である複数のカプセル剤もしくは錠剤などである。加えてまた、このような併用投与は、順序に関わらず連続での各化合物の使用を含む。

## 【0032】

本発明の化合物と併用投与が可能である具体的な例として、ノイラミニダーゼ阻害剤を含む。ノイラミニダーゼ阻害剤の例として、オセルタミビル、オセルタミビルカルボン酸（GS4071、Eisenberg他、Antimicrob Agents Chemother. (1997) 41:1949-52など参照）、ザナミビル、ペラミビル（RWJ-27021、BXC-1812、Biocryst社）、2,3-ジデヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸（DANA）、2-デオキシ-2,3-デヒドロ-N-トリフルオロアセチルノイラミン酸（FANA）、A-322278、およびA-315675（（Maring他、米国特許第6455571号、およびKati他、Antimicrob Agents Chemother. (2002) 46:1014-21参照）を含む。20

## 【0033】

本発明の化合物と併用投与が可能である具体的な例として、M2阻害剤を含む。M2阻害剤の例として、アマンタジン（1-アミノ-アダマンタン）、リマンタジン[1-(1-アミノエチル)アダマンタン]、スピロ[シクロプロパン-1,2'-アダマンタン]-2-アミン、スピロ[ピロリジン-2,2'-アダマンタン]、スピロ[ピペリジン-2,2'-アダマンタン]、2-(2-アダマンチル)ピペリジン、3-(2-アダマンチル)ピロリジン、2-(1-アダマンチル)ピペリジン、2-(1-アダマンチル)ピロリジン、および2-(1-アダマンチル)-2-メチル-ピロリジンなどのアミノアダマンタン化合物、並びに、M2特異的モノクローナル抗体（米国特許出願公開第20050170334号、およびZebedee and Lamb, J. Virol. (1988) 62:2762-72など参照）を含む。30

## 【0034】

本発明の化合物と併用投与が可能である具体的な例として、RNAポリメラーゼ阻害剤を含む。本明細書では、RNAポリメラーゼ阻害剤という用語は、ウイルスRNAポリメラーゼ複合体またはそのサブユニットのうちの1つ（すなわち、PB1、PB2およびPA）のポリメラーゼ、プロテアーゼおよび／またはエンドヌクレアーゼ活性を阻害する抗ウイルス剤を指す。例示的なRNAポリメラーゼ阻害剤としては、リバビリン、ビラミジン、6-フルオロ-3-ヒドロキシ-2-ピラジンカルボキサミド（T-705）、2'-デオキシ-2'-フルオログアノシン、ピラゾフリン、3-デアザグアニン、カルボジン（例えば、Shannon他、Antimicrob Agents Chemother. (1981) 20:769-76参照）、およびシクロペンテニルシトシン（cy clopenenyl cytosine）（例えば、Shigeta他、Antimi40  
50

c r o b A g e n t s C h e m o t h e r . ( 1 9 8 8 ) 3 2 : 9 0 6 - 1 1 参照)などの抗ウイルスヌクレオシド類似体、並びにエンドヌクレアーゼ阻害フルチミド(例えば、T o m a s s i n i 他、A n t i m i c r o b A g e n t s C h e m o t h e r . ( 1 9 9 6 ) 4 0 : 1 1 8 9 - 9 3 参照)が挙げられる。

#### 【 0 0 3 5 】

本発明の化合物と併用投与が可能である具体的な例えとして、インフルエンザ特異的妨害オリゴヌクレオチドを含む。インフルエンザ特異的妨害オリゴヌクレオチドの例えは、s i R N A ( 例えは、Z h o u 他、A n t i v i r a l R e s . ( 2 0 0 7 ) 7 6 : 1 8 6 - 9 3 参照)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ホスホロチオアートオリゴヌクレオチド、リボザイム( 例えは、D r a p e r 、米国特許第 6 2 5 8 5 8 5 号参照)、モルホリノオリゴマー及びペプチド核酸( 例えは、S ch u b e r t a n d K u r r e c k 、H a n d b E x p P h a r m a c o l . ( 2 0 0 6 ) 1 7 3 : 2 6 1 - 8 7 参照)を含む。  
10

#### 【 0 0 3 6 】

本発明の化合物と併用投与が可能である具体的な例として、インターフェロンを含む。本明細書の「インターフェロン」または「I F N 」は、文字通りに定義される任意の分子を含むことを意図し、それは、例えは、あらゆる種類のI F N ( I 型および I I 型)、特にI F N - アルファ、I F N - ベータ、I N F - オメガおよびI F N - ガンマを含む。また、本明細書で用いられるインターフェロンという用語は、それらの、塩、官能性誘導体、変異体、突然変異タンパク質、融合タンパク質、類似体、および活性断片を含むことをも意図する。好ましい実施形態においては、インターフェロンはインターフェロン - アルファであるとよい。インターフェロン - アルファは、組み換えインターフェロン - 2 a ( 例えは、R O F E R O N 登録商標 ( H o f f m a n - L a R o c h e 社、米国) )、インターフェロン - 2 b ( 例えは、I n t r o n - A 登録商標 ( S c h e r i n g C o r p . 社、米国) )、コンセンサスインターフェロン、および精製インターフェロン - 生成物を含むが、これに限定されない。  
20

#### 【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態では、本明細書の化合物は、インフルエンザワクチンと併用投与が可能である。あらゆる種類のインフルエンザワクチンは、通常、三価ワクチンである。これらは、一般的に、2つのインフルエンザウイルスA型および1つのインフルエンザウイルスB型由来の抗原を含む。多くの場合、標準的な0.5m l の注射用量は、各型からの15u g のヘマグルチニン抗原成分を含み、一元放射免疫拡散法( S R D )により評価される。各時期に、インフルエンザワクチンに組み込まれるインフルエンザウイルス型は、各国の保健機関およびワクチン製造業者と共同で世界保健機関により取り決められる。  
30

#### 【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態では、併用療法は、インフルエンザ抗原ポリペプチド( 例えは、インフルエンザヘマグルチニンおよびマトリックス2細胞外ドメインポリペプチド)による能動免疫化、またはインフルエンザ抗原ポリペプチドを指向する1つ以上の中和抗体( 例えは、インフルエンザヘマグルチニンおよびマトリックス2細胞外ドメインポリペプチドに対する抗体)での受動免疫化を含む。  
40

#### 【 0 0 3 9 】

本発明の化合物は、薬学的に許容される担体、希釈剤、アジュバントまたはビヒクリをさらに含む医薬組成物に製剤化してもよい。ある実施形態では、本発明は、上記の本発明の化合物を含む医薬組成物、および薬学的に許容される担体、希釈剤、アジュバントまたはビヒクリに関する。ある実施形態では、本発明は、有効量の本発明の化合物または薬学的に許容されるそれらの塩、および薬学的に許容される担体、希釈剤、アジュバントもしくはビヒクリを含む医薬組成物である。薬学的に許容される担体は、例えは、目的の投与形態について適切に選択され、そして従来の業務に合う、医薬的希釈剤、賦形剤または担体を含む。

#### 【 0 0 4 0 】

薬学的に許容される担体は、本化合物の生物活性を過度に抑止しない不活性成分を含んでもよい。薬学的に許容される担体は、対象者への投与において、例えば、非毒性、非炎症性、非免疫原性、または、他の望ましくない反応もしくは副作用を持たない、などの生体適合性を持つべきである。また、標準的な医薬製剤方法を用いることができる。

#### 【0041】

本明細書の、薬学的に許容される担体、アジュvantまたはビヒクルは、望ましい特定の投与剤形に適するように、任意のおよびあらゆる溶剤、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散もしくは懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤もしくは乳化剤、保存料、固形バインダー、潤滑剤などを含む。Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、E.W.Martin編(Mack Publishing Co.社、Easton、PA州、1980年)は、薬学的に許容される組成物の製剤に用いられる様々な担体、およびそれらを調製するための既知の方法を開示している。任意の従来の担送媒介物の、望ましくない生物学的作用を引き起こすこと、または、薬学的に許容される組成物の他の任意の成分での有害作用などにより、本明細書の化合物と不適合である場合を除き、その使用は本発明の範囲内にあると考えられる。

#### 【0042】

薬学的に許容される担体になりうる物質のいくつかの例として、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質(ヒト血清アルブミンなど)、緩衝物質(ツイン80、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、もしくはソルビン酸カリウムなど)、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩、または電解質(硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウムもしくは亜鉛塩)、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸塩、ワックス、ポリエチレンポリオキシプロピレンプロックポリマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、羊毛脂、ラクトースおよびグルコースおよびスクロースなどの糖、コーンスタークおよびポテトスタークなどのデンプン、カルボキシメチルセルロースナトリウムや、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなどのセルロース並びにその誘導体、粉末トラガカント、モルト、ゼラチン、タルク、ココアバターおよび座薬ワックスなどの賦形剤、ラッカセイ油や、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油および大豆油などの油、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコール、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル、寒天、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤、アルギン酸、発熱物質非含有水、等張食塩水、リングル液、エチルアルコール、並びにリン酸緩衝液、ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなどの他の非毒性の混合可能な潤滑剤、着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味料、調味料および香料、保存料、酸化防止剤を含むが、これに限定されない。また、これらは、調製者の判断により、組成物に含まれる。

#### 【0043】

本明細書の組成物は、処置をする感染の重症度により、経口、非経口、吸収スプレー、経局所、経直腸、経鼻、経口腔、経膣、または埋め込み型リザーバー経由により投与することができる。本明細書の「非経口」という用語は、皮下、静脈、筋肉、関節内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、肝内、病巣内および頭蓋内への注射または注入法を含むが、これに限定されない。具体的には、本組成物は、経口、腹腔内または静脈内に投与する。

#### 【0044】

本明細書の組成物の無菌注射剤形は、水性または油性懸濁剤でありうる。これらの懸濁剤は、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用い、公知の技術により製剤化される。また、無菌注射調整剤は、非毒性の局所に使用可能な希釈剤または溶媒、例えば1,3-ブタンジオール内の溶剤などの、無菌注射液剤または懸濁剤でありうる。用いられる許容されるビヒクルおよび溶媒は共通して水、リングル液、および生理食塩水である。さらに、無菌、不揮発性の油は、溶媒または懸濁化剤として慣例的に用いられる。この目的のため、合成モノグリセリド、または合成ジグリセリドを含む、任意の無刺激性不揮発性油が用いられる。オレイン酸およびそのグリセリド誘導体などの脂肪酸は、オリーブ油ま

10

20

30

40

50

たはヒマシ油、特にそれらのポリオキシエチル化形などの天然の薬学的に許容される油と同様に、注射剤の調製に有用である。また、これらの油剤または油懸濁剤は、乳剤および懸濁剤を含む薬学的に許容される投与剤形の製剤に一般的に使用されるカルボキシメチルセルロースまたは同様の分散化剤などの、長鎖アルコール希釈剤または分散化剤を含むとよい。薬学的に許容される固体、液体、または他の投与剤形の製造で一般的に使用されるトゥイーン、スパン、および他の乳化剤、または生物学的利用能増強剤などの、一般的に使用される界面活性剤は、製剤の目的に使用してもよい。

#### 【 0 0 4 5 】

本明細書の医薬組成物は、これに限定されないが、カプセル剤、錠剤、水性懸濁剤または液剤を含む任意の経口的に許容される剤形で経口投与してもよい。経口使用のための錠剤の場合には、一般的に使用される担体としてラクトースおよびコーンスタークが挙げられるが、これに限定されない。また、ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤も通常添加される。カプセル形の経口投与では、有用な希釈剤として、ラクトースおよび無水コーンスタークを含む。経口使用のために水性懸濁剤が必要なときは、活性成分を乳化剤および懸濁剤と組合せる。所望ならば、特定の甘味料、調味料または着色剤を添加してもよい。

10

#### 【 0 0 4 6 】

あるいは、本明細書の医薬組成物は、直腸投与のために座薬の剤形で投与してもよい。これらは、薬剤と、室温では固体であるが、直腸温度では液体であり、それゆえ直腸内で溶融して薬剤を放出する適切な非刺激性賦形剤とを混合することによって調製可能である。このような物質として、ココアバター、ミツロウおよびポリエチレングリコールを含むが、これに限定されない。

20

#### 【 0 0 4 7 】

また、本明細書の医薬組成物は、特に、処置ターゲットが、眼、皮膚、または下部消化管の疾患を含む、容易に局所適用が可能である範囲または臓器を含むときに、局所的に投与してもよい。適切な局所製剤は、これらの各範囲または各臓器に対して容易に調製される。

#### 【 0 0 4 8 】

下部消化管のための局所的適用は、直腸座薬剤（上記参照）または適切な浣腸剤により有効に使用できる。また、局所経皮パッチを使用してもよい。

#### 【 0 0 4 9 】

30

局所適用では、本医薬組成物は、1種以上の担体に懸濁または溶解した活性成分を含有する適切な軟膏剤に剤形化してもよい。本発明の化合物の局所投与のための担体は、鉛油、流動ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックスおよび水を含むが、これに限定されない。あるいは、本医薬組成物は、1種以上の薬学的に許容される担体に懸濁もしくは溶解した活性成分を含有する適切なローション剤またはクリーム剤に剤形化することが可能である。適切な担体は、鉛油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水を含むが、これに限定されない。

#### 【 0 0 5 0 】

40

眼科用途では、本医薬組成物は、塩化ベンジルアルコニウムなどの保存料を含むかまたは含まないかのどちらかで、等張性、pH調整滅菌食塩水による微粉化懸濁剤として、または特に、等張性、pH調整滅菌食塩水による液剤として剤形化してもよい。あるいは、眼科用途では、本医薬組成物はワセリンなどの軟膏剤に剤形化してもよい。

#### 【 0 0 5 1 】

また、本医薬組成物は、気道に投与することも可能である。気道とは、中咽頭および喉頭を含む上気道、それに続き、気管のとの気管支および細気管支への分岐を含む下気道を内包する。肺送達用組成物は、患者の分散剤吸入により送達することができ、そうすることで、分散剤内の活性成分は、例えば、肺胞領域を通じて、直接かつ迅速に血液循環内へ吸収することができる肺に送り届けられる。肺送達は、ネブライザ、エアロゾル、ミセ

50

ル、および乾燥粉末から作られる製剤の使用を含む様々な方法で行うことが可能である。吸入による投与は経口および／または経鼻で可能である。送達は、液体ネプライザ、エアロゾルによる吸入、および乾燥粉末分散装置で行うことが可能である。好ましくは、定量投与装置がよい。噴霧器または吸入器使用の有用性のうちの1つは、装置が自給式であるので、汚染の可能性を最小限にすることである。乾燥粉末分散装置は、例えば、容易に乾燥粉末に製剤化できる薬剤を送達する。本発明の医薬組成物は、凍結乾燥もしくは噴霧用乾燥粉末として、単独または適切な粉末担体との組合せにより、安定的に保存されうる。吸入のための、本発明の医薬組成物の送達は、タイマー、ドーズカウンター、時間計測装置を含みうる投薬タイミング用の機器、または、エアロゾル剤の投薬時に、患者に対する投薬の追跡、服用順守の監視、および／または投薬へのきっかけを可能にする装置を包含する時間表示器で仲介されうる。エアロゾル送達のための医薬装置の例として、定量投与吸入器（M D I s）、乾燥粉末吸入器（D P I s）、およびエアジェットネプライザを含む。

#### 【0052】

本発明の方法における使用のための化合物は、単位投与剤形で製剤化することができる。「単位投与剤形」という用語は、望ましい治療効果を生じるように算出した活性物質の所定量を含む各単位で、任意に適切な医薬担体を伴って、処置を受けている対象者への単位型投与に適する物質的に個別の単位を指す。単位投与剤形は、1日1回の用量または1日にいずれか複数回の用量でありうる（例えば、1日につき約1～4回、またはそれ以上の回数）。1日複数回の用量が使用されるときは、単位投与剤形は各用量で同様であるか、または異なりうる。

#### 【0053】

本発明は、さらに以下の図面および実施例により例証される。しかしながら、これらの実施例および図面は、本発明の範囲を限定するようないかなる点にも解釈されるべきではない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0054】

【図1】図1では、M D C KまたはA 5 4 9細胞を、H 1 N 1（それぞれMO I 0 . 0 1またはMO I 0 . 1）、H 3 N 2（MO I 0 . 6）またはH 5 N 1（それぞれMO I 0 . 0 0 1またはMO I 0 . 0 1）での感染直前に、濃度の上昇したゲムシタビン（）、アマンタジン（抗ウイルス分子対照）（）、またはD M S O（）で処理した。感染後24 hおよび48 hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図2】図2では、M D C KまたはA 5 4 9細胞を、H 1 N 1（それぞれMO I 0 . 0 1またはMO I 0 . 1）、H 3 N 2（MO I 0 . 6）またはH 5 N 1（それぞれMO I 0 . 0 0 1またはMO I 0 . 0 1）での感染直前に、濃度の上昇したアルステルパウロン（A l s t e r p a u l l o n e）（）、アマンタジン（抗ウイルス分子対照）（）、またはD M S O（）で処理した。感染後24 hおよび48 hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図3】図3では、M D C KまたはA 5 4 9細胞を、H 1 N 1（それぞれMO I 0 . 0 1またはMO I 0 . 1）、H 3 N 2（MO I 0 . 6）またはH 5 N 1（それぞれMO I 0 . 0 0 1またはMO I 0 . 0 1）での感染直前に、濃度の上昇したオバトクラックスメシレート（O b a t o c l a x M e s y l a t e）（）、アマンタジン（抗ウイルス分子対照）（）、またはD M S O（）で処理した。感染後24 hおよび48 hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図4】図4では、M D C KまたはA 5 4 9細胞を、H 1 N 1（それぞれMO I 0 . 0 1またはMO I 0 . 1）、H 3 N 2（MO I 0 . 6）またはH 5 N 1（それぞれMO I 0 . 0 0 1またはMO I 0 . 0 1）での感染直前に、濃度の上昇したビンプラスチ

10

20

30

40

50

ン( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図5】図5では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇したメナジオン結晶(Menadione Crystalline)( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

10

【図6】図6では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇したGSK3ベータ阻害剤VIII( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図7】図7では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇したGSK3ベータ阻害剤XV( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

20

【図8】図8では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇したドセタキセル( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図9】図9では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇したインジルビン-3'-モノオキシム(Indirubin-3'-monoxime)( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

30

【図10】図10では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇したフルオシノロンアセトニド( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

40

【図11】図11では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇した還元型L-グルタチオン( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図12】図12では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇したチロフィ

50

パン( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図13】図13では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇したHA-14( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図14】図14では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇した塩酸トポテカン(Topotecan hydrochloride)( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

【図15】図15では、MDCKまたはA549細胞を、H1N1(それぞれMOI 0.01またはMOI 0.1)、H3N2(MOI 0.6)またはH5N1(それぞれMOI 0.001またはMOI 0.01)での感染直前に、濃度の上昇したクロファラビン( )、アマンタジン(抗ウイルス分子対照)( )、またはDMSO( )で処理した。感染後24hおよび48hで、上澄みを採取し、蛍光分析を用いてノイラミニダーゼ活性を試験した。蛍光曲線はウイルス複製における分子の作用を示す。

#### 【0055】

<実施例>

<<材料および方法>>

- 細胞およびウイルス -

A549ヒト肺上皮細胞株およびメイディン・ダービー・イヌ腎臓細胞(ECACC,)を、37、5%CO<sub>2</sub>で、100U·mL<sup>-1</sup>のペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco、15140130)、並びに10%のウシ胎児血清(PAN、3302-P221126)を添加したDMEM培地(Gibco、41966052)で成長させた。

#### 【0056】

流行性のA/H1N1/ニューカレドニア/P10型、A/H3N2/ワイオミング型、およびA/H5N1/ベトナム型を、1μg·mL<sup>-1</sup>のTPCK修飾トリプシン(Sigma、T3053)を添加したDMEMにおいてMDCK細胞で、FCSなしで、増殖させた。ウイルスストックは、標準的なブラークアッセイにより、MDCK細胞上で、寒天重層培地を使用して滴定した。

#### 【0057】

- 分子 -

すべての分子は、20mMのストック濃度で、DMSOにおいて、溶解させた。

#### 【0058】

- ウイルス感染 -

細胞(MDCKまたはA549)を、1XのD-PBS、(Gibco、14190)で2度洗浄し、指示された濃度で分子を加えた。そして、MDCKおよびA549細胞を、0.2μg·mL<sup>-1</sup>のTPCKトリプシン(感染培地)を添加したDMEMにおいて、H1N1(それぞれ、MOI 0.01および0.1)、H3N2(MOI 0.6)、またはH5N1(それぞれ、MOI 0.001および0.01)に感染させ、37、5%CO<sub>2</sub>で、24時間または48時間、感染培地においてインキュベートした。

#### 【0059】

- ノイラミニダーゼ活性による力価測定 -

インフルエンザウイルスノイラミニダーゼは、用量依存的に、放出波長が変化するメチ

10

20

30

40

50

ル - ウンベリフェリル - N - アセチルノイラミン酸 ( 4 - M U N A N A、S i g m a M 8 6 3 9 ) を切断することができる。

### 【 0 0 6 0 】

9 6 黒色プレート ( C o r n i n g 、 3 6 3 1 ) において、 $25\mu l$  の感染上澄みは、カルシウムおよびマグネシウム ( G i b C o 、 1 4 0 4 0 ) を含む  $25\mu l$  の D - P B S ( 1 X ) 並びに  $50\mu l$  の  $20\mu M \cdot 4$  - M U N A N A 内で希釈した。3 7 で 1 時間のインキュベーション後、 $100\mu l$  の  $0.1M$  グリシン、p H 1 0 . 7 の 2 5 % エタノールを添加した。測定は、 $365 nm$  の励起波長および  $450 nm$  の発光波長で、T E C A N infinite M 1 0 0 0 計器で行われた。

### 【 0 0 6 1 】

< < 結果 > >

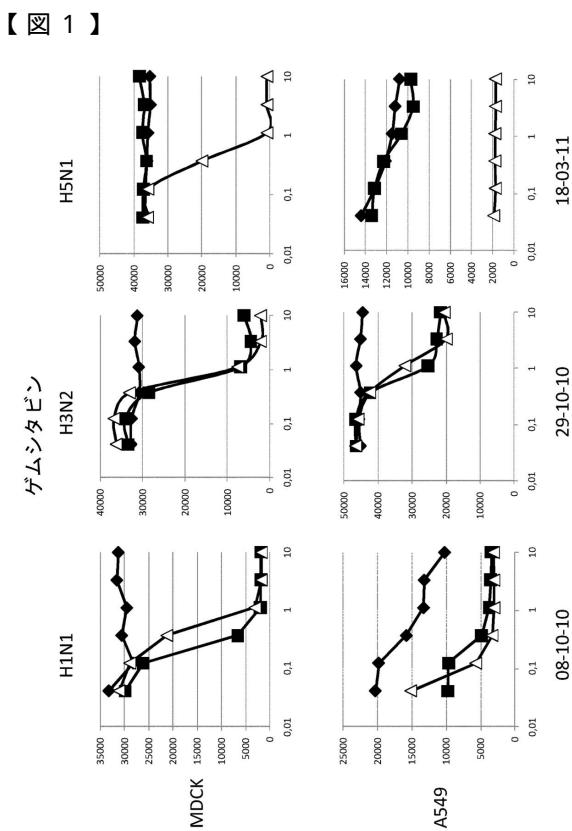
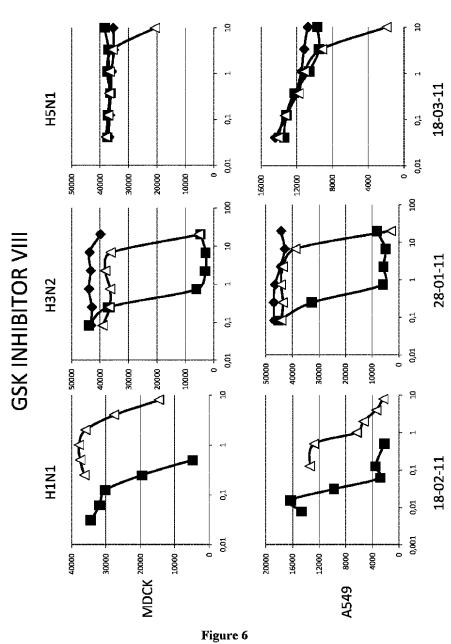
結果はすべて、図 1 ~ 1 5 に示す。

### 【 0 0 6 2 】

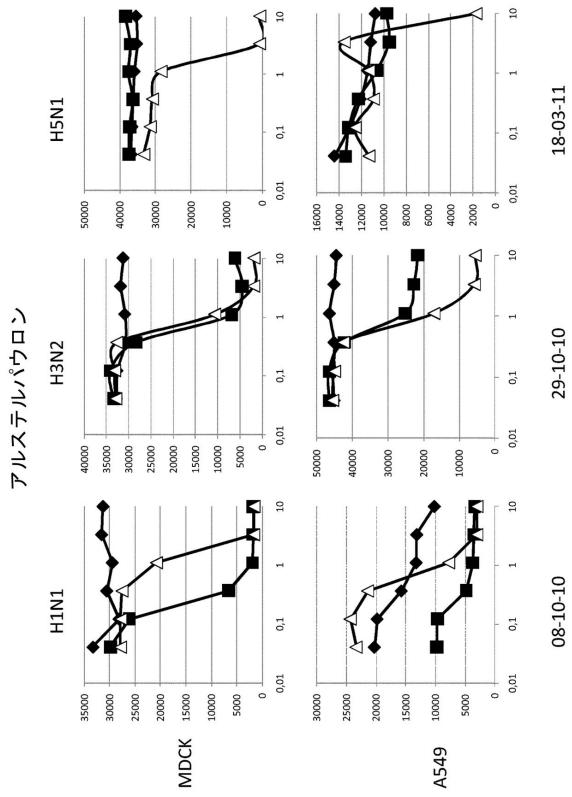
< 参考文献 >

本願を通して、様々な参考文献において、本発明の関わる先端技術が記述されている。これらの参考文献の開示は、本開示の参考文献に盛り込まれている。

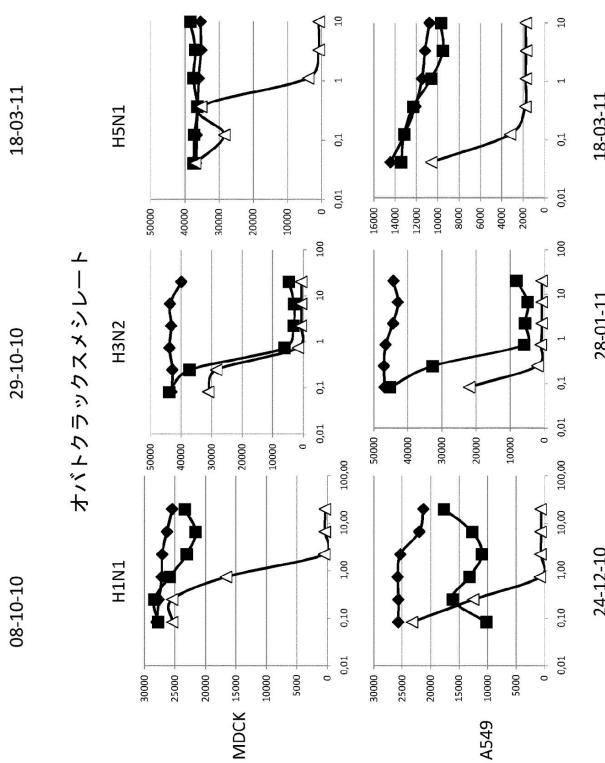
10



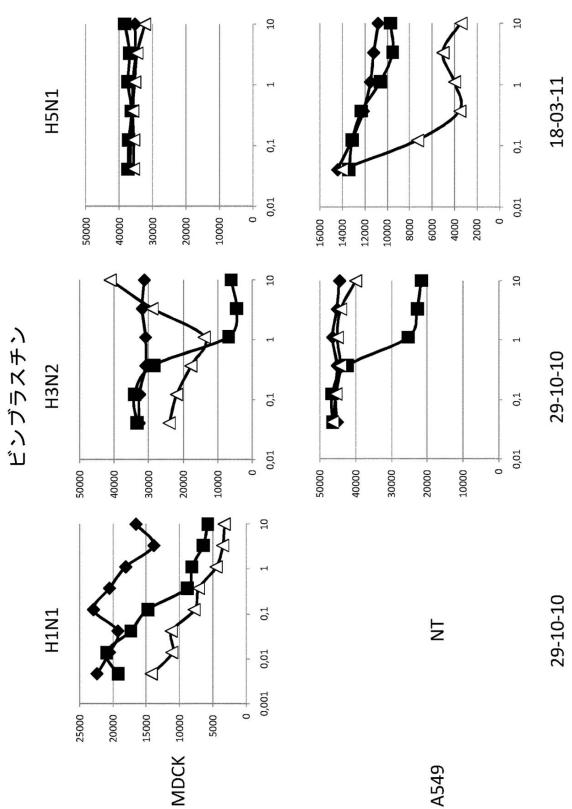
【図2】



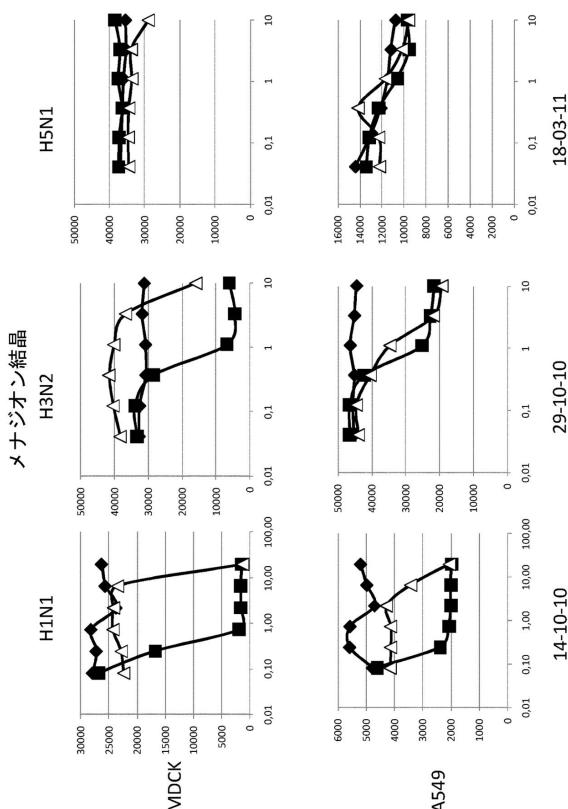
【図3】



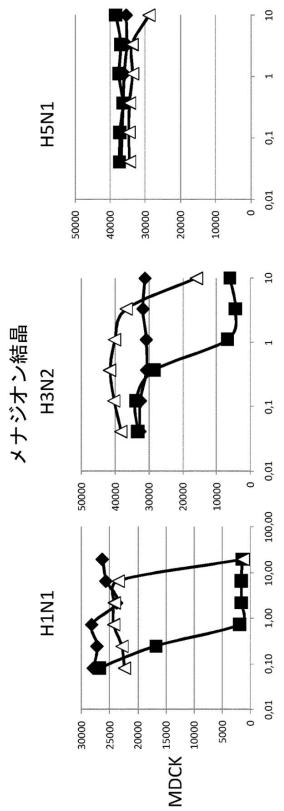
【図4】



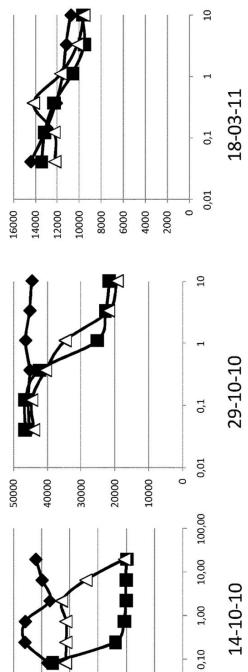
【図5】



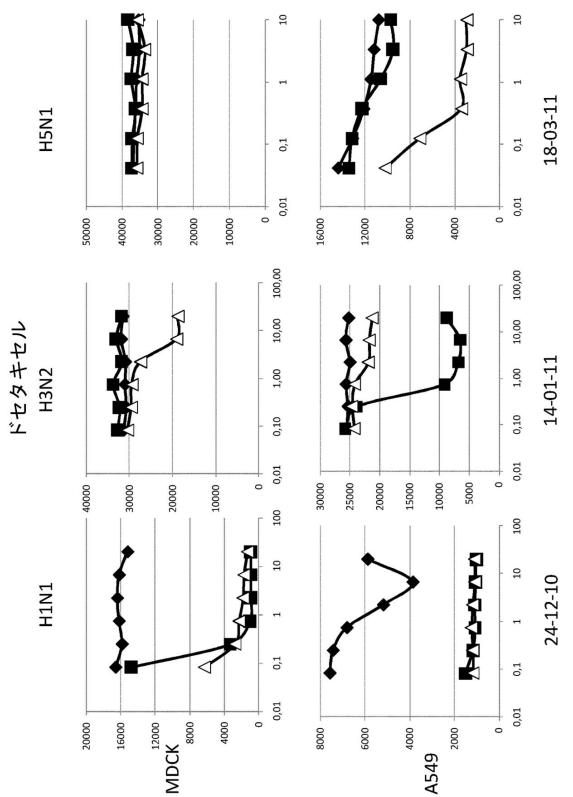
【図6】



【図7】



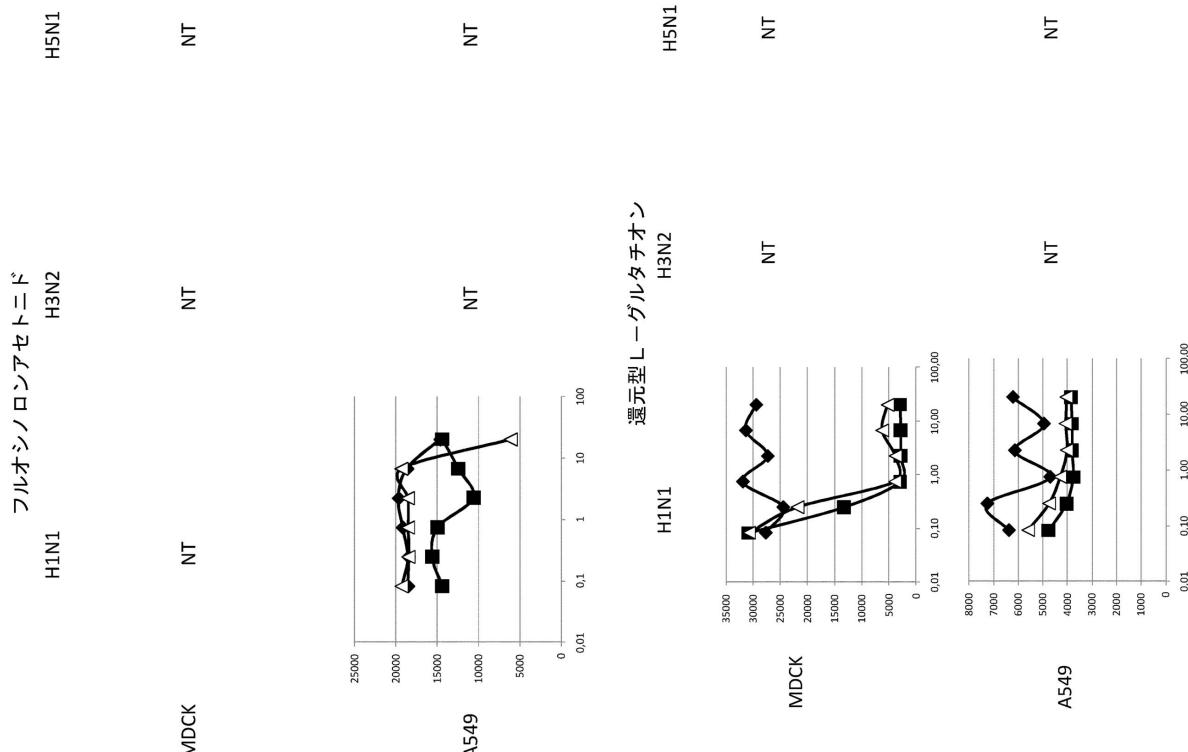
【図8】



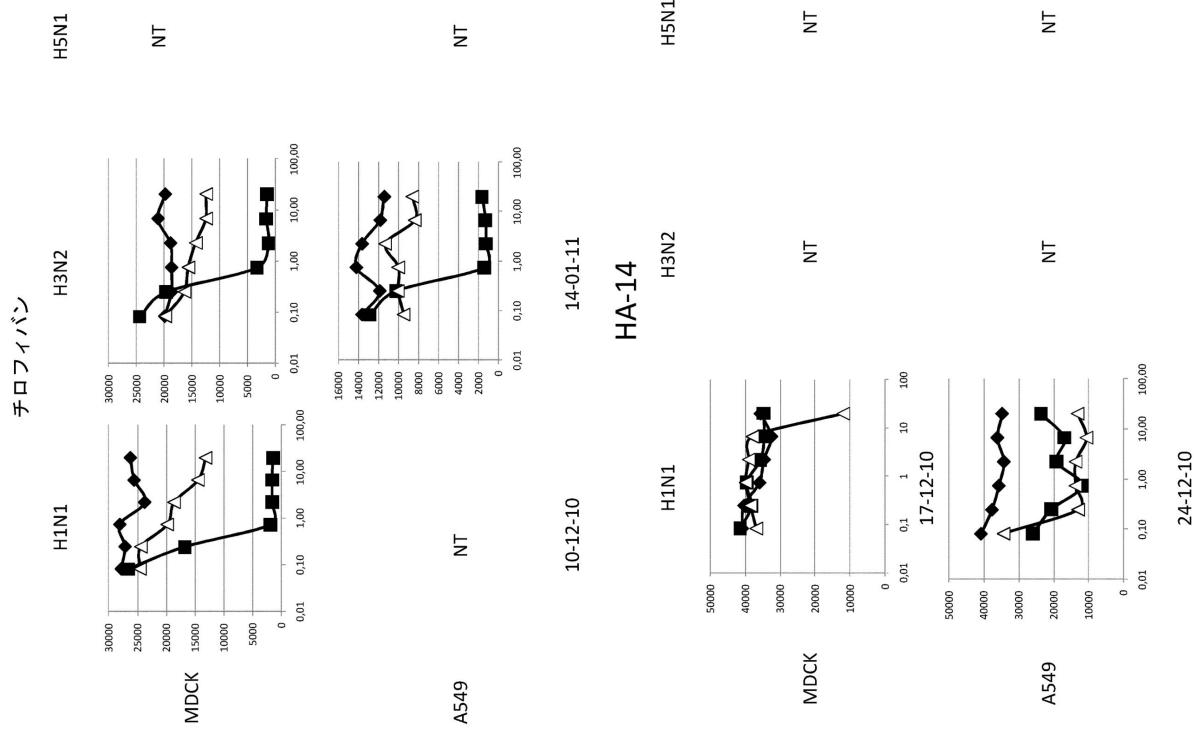
【図9】



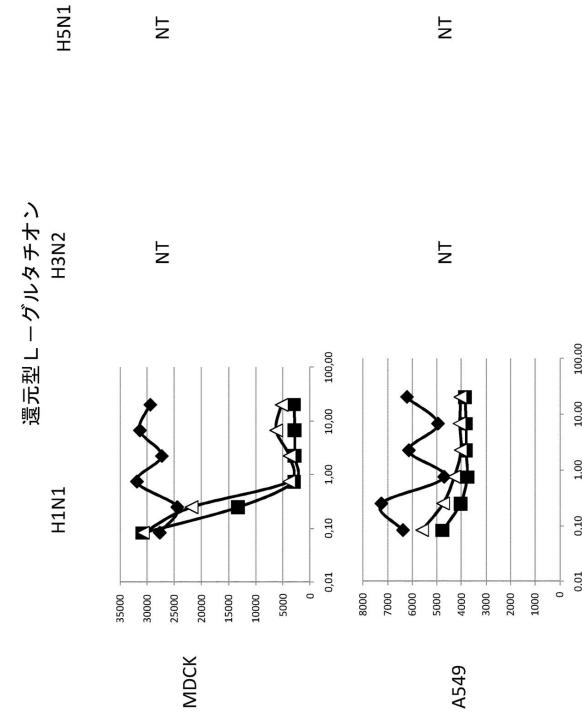
【図 1 0】



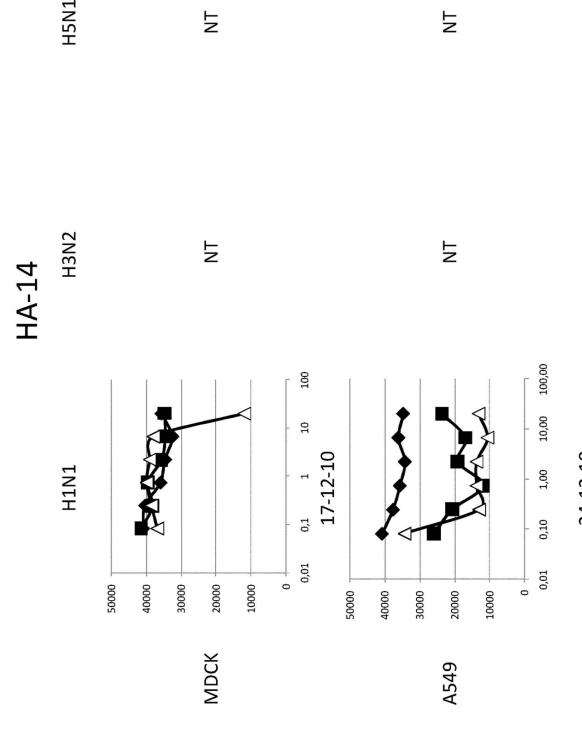
【図 1 2】



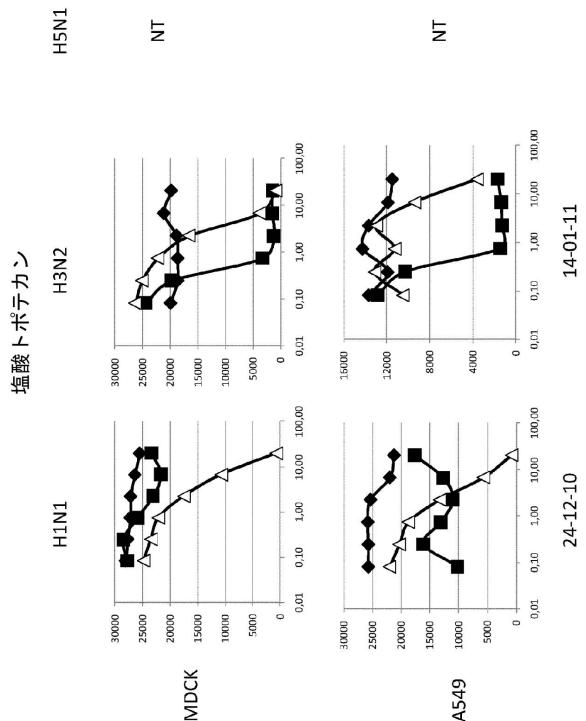
【図 1 1】



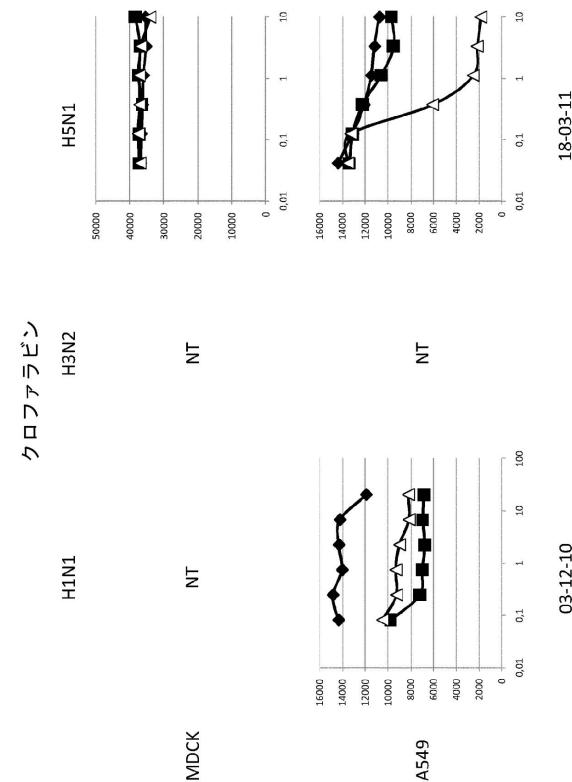
【図 1 3】



【図14】



【図15】



## フロントページの続き

			F I		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	31/513	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	S
A 6 1 K	31/337	(2006.01)	A 6 1 K	31/513	
A 6 1 K	31/353	(2006.01)	A 6 1 K	31/337	
A 6 1 K	31/55	(2006.01)	A 6 1 K	31/353	
A 6 1 K	31/426	(2006.01)	A 6 1 K	31/55	
A 6 1 K	31/437	(2006.01)	A 6 1 K	31/426	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/437	
A 6 1 K	31/58	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	31/4465	(2006.01)	A 6 1 K	31/58	
A 6 1 K	31/41	(2006.01)	A 6 1 K	31/4465	
A 6 1 K	31/7076	(2006.01)	A 6 1 K	31/41	
A 6 1 K	31/4745	(2006.01)	A 6 1 K	31/7076	
A 6 1 K	31/122	(2006.01)	A 6 1 K	31/4745	
			A 6 1 K	31/122	

(73)特許権者 513246470

ユニベルシテ クロードゥ ベルナー - リヨン1  
 UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1  
 フランス国 エフ - 6 9 6 2 2 ビルールパンヌ・セデックス ブールバール ドゥ 1 1 ヌー<sup>1</sup>  
 ボンブル 1 9 1 8 4 3

(74)代理人 100121728

弁理士 井関 勝守

(74)代理人 100129997

弁理士 田中 米藏

(72)発明者 ロットゥー パンサン

フランス国 エフ - 6 9 0 0 7 リヨン・セデックス アヴェニュー ジャン・ジョレス インサ  
 ーム ュ 8 5 1 サントレ ダンフェクシオロジー パッティモン ドミリヨン イミュニティ  
 アンフェクション バクシネシオン 3 2 1

(72)発明者 デ シャセイ ベヌア

フランス国 エフ - 6 9 0 0 7 リヨン・セデックス アヴェニュー ジャン・ジョレス インサ  
 ーム ュ 8 5 1 サントレ ダンフェクシオロジー パッティモン ドミリヨン イミュニティ  
 アンフェクション バクシネシオン 3 2 1

(72)発明者 アンドレ パトリス

フランス国 エフ - 6 9 0 0 7 リヨン・セデックス アヴェニュー ジャン・ジョレス インサ  
 ーム ュ 8 5 1 サントレ ダンフェクシオロジー パッティモン ドミリヨン イミュニティ  
 アンフェクション バクシネシオン 3 2 1

(72)発明者 メニエル シックリン ローレンヌ

フランス国 エフ - 6 9 0 0 7 リヨン・セデックス アヴェニュー ジャン・ジョレス インサ  
 ーム ュ 8 5 1 サントレ ダンフェクシオロジー パッティモン ドミリヨン イミュニティ  
 アンフェクション バクシネシオン 3 2 1

(72)発明者 オープラン ジェクス アンヌ

フランス国 エフ - 6 9 0 0 7 リヨン・セデックス アヴェニュー ジャン・ジョレス インサ  
 ーム ュ 8 5 1 サントレ ダンフェクシオロジー パッティモン ドミリヨン イミュニティ  
 アンフェクション バクシネシオン 3 2 1

(56)参考文献 特表2007-502845(JP,A)

特表2001-511770(JP,A)

国際公開第2010/101663(WO,A1)

国際公開第2010/040710(WO,A1)

国際公開第2011/041490(WO,A1)

国際公開第2006/029081(WO,A1)

Free Radical Biology & Medicine, 2003, vol.34, No.7, p.928-936

Biochemical Pharmacology, 2004, vol.67, p.167-174

J. Lab. Clin. Med., 1987, vol.110, No.5, p.592-601

Nature, 1962, vol.193, p.905-906

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 31 / 00 - 31 / 80

A 61 K 38 / 06

A 61 K 38 / 21

A 61 K 39 / 145

A 61 K 39 / 395

A 61 K 45 / 00

A 61 P 31 / 16

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )