

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 19 日 (19.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/014412 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/00,
45/00, A61P 9/00, 9/10, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010158

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 8 日 (08.08.2003)

(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2002-234029 2002 年 8 月 9 日 (09.08.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科研製薬株式会社 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒113-8650 東京都文京区本駒込2丁目2番8号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 村田 隆彦 (MURATA, Takahiko) [JP/JP]; 〒607-8042 京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14番地 科研製薬株式会社 総合研究所内 Kyoto (JP). 天川 昌洋 (AMAKAWA, Masahiro) [JP/JP]; 〒607-8042 京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14番地 科研製薬株式会社 総合研究所内 Kyoto (JP). 池上 玲子 (IKEGAMI, Reiko) [JP/JP]; 〒607-8042 京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14番地 科研製薬株式会社 総合研究所内 Kyoto (JP). 大山 但 (OHYAMA, Tadashi) [JP/JP]; 〒607-8042 京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14番地 科研製薬株式会社 総合研究所内 Kyoto

(JP). 上尾 治喜 (UEO, Haruyoshi) [JP/JP]; 〒607-8042 京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14番地 科研製薬株式会社 総合研究所内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MYOCARDIAL CELL PROTECTING AGENTS

(54) 発明の名称: 心筋細胞保護剤

(57) Abstract: It is intended to provide a preventive or a remedy for conditions associated with myocardial cell death characterized by containing, as the active ingredient, a ghrelin receptor agonist selected from the group consisting of ghrelin, ghrelin analogs, non-peptidic compounds and pharmacologically acceptable salts thereof. This preparation directly acts on myocardial cells and inhibits cell death (necrosis and apoptosis) in a heart disease associated with myocardial cell death or the conditions of the heart associated with myocardial cell death caused by a heart surgery such as a heart bypass, thereby quickly inhibiting cell death of remaining myocardial cells even in a severe heart disease such as heart infarction, heart enlargement, myocarditis, etc. Thus, it exerts an excellent immediate action of preventing the progress of such a disease into heart failure.

(57) 要約: 本発明は、グレリン、グレリン類似体、非ペプチド性化合物及びこれらの製薬的に受容される塩からなる群から選択されるグレリン受容体作動性物質を有効成分として含有することを特徴とする、心筋細胞死を伴う状態の予防または治療剤を提供する。本発明の製剤は、心筋細胞死を伴った心疾患及び心臓バイパス手術などの心臓手術によって生じる心筋細胞死を伴う心臓の状態において、心筋細胞に直接作用し細胞死（ネクロシス及びアポトーシス）を抑制し、心筋梗塞、心肥大及び心筋炎などの重度の心疾患においても残存心筋細胞の死を迅速に抑制することができ、それによって、心不全への移行を防止することができるという優れた即効性を有する。

WO 2004/014412 A1

明 細 書

心筋細胞保護剤

5 技術分野

本発明は、グレリン、グレリン類似体、非ペプチド性化合物及びこれらの製薬的に受容される塩からなる群から選択されるグレリン受容体作動性物質を有効成分として含有することを特徴とする、心筋細胞死を伴う状態の予防または治療剤に関する。

10

背景技術

成長ホルモン遊離促進物質（以下 Growth hormone secretagogue、GHS と略すこともある）は視床下部あるいは下垂体に存在する GHS 受容体を介して、下垂体から成長ホルモン（以下 Growth hormone、GH と略す）の遊離を促進する一連の物質の総称である。GHS には GHS 受容体の生体内リガンドであるグレリンに加えて合成ペプチド性 GHS や非ペプチド性 GHS などが含まれるが、古くから GH 分泌ホルモンとして知られる GHRH は GHS には含まれない。

成長ホルモン（GH）の長期投与により拡張型心筋症患者の心機能を高め、心不全治療に一定の効果を示した研究がある(N Engl J Med 334:809-814(1996))。

20 この研究が基になって GHS を心疾患モデルに適用する研究がなされた。

非ペプチド性 GHS の CP-424391 がペーシング誘発心不全ブタモデル (Circulation 103:308-313(2001))、GHS 受容体の内因性リガンドであるグレリンが冠結紮心不全ラットで(Circulation 104:1430-1435(2001))、ともに長期投与により循環改善作用を示す。この作用は GH 依存的であり、GH 分泌とそれによって増加した IGF-1 に基づく作用機序が考えられている。

25 一方、ペプチド性 GHS であるヘキサレリンはラットへの長期投与で心臓に虚血抵抗性をもたらすことが報告された (Eur J Pharmacol 334:201-207(1997))。この報告者らはさらに、非ペプチド性 GHS には、GH 分泌促進作用はあるにも

かわらず、心臓で虚血抵抗性の効果がないことも結論づけている

(Endocrinology 140:4024-4031(1999))。実際、ペプチド性 GHS 特有な作用であるこれらの作用は、GH 分泌とは無関係な作用であるが (Eur J Pharmacol 334:201-207(1997)、Endocrinology 140:4024-4031(1999))、長期投与によって
5 獲得される遅延性のものであることがわかった (Pharmacol Res 42:129-136(2000))。

このペプチド性 GHS の作用点は、ヘキサレリン結合タンパク質と呼ばれるものであることが、当業者の研究から示唆されている。GHS には、ラット摘出心臓において灌流圧を上げるものと上げないものがあり、灌流圧を上げるヘキサレリンの標識体が心臓に結合することから、ヘキサレリン結合タンパク質は発見された(Circ Res 85:796-802(1999))。ヘキサレリンはペプチド性 GHS を意味する GH 分泌ペプチド (以下 GH releasing peptide、GHRP と略す) であることから、このタンパク質を GHRP 受容体と呼ぶこともある。このタンパク質には GHRP-2 も結合することが示されているがグレリンは結合しない(J Clin Endocrinol
10 Metab 85:3803-3807(2000))。さらに、このタンパク質は、2 回膜貫通型構造をした B 型スカベンジャー受容体の CD36 であることがわかり(Circ Res 90:844-849(2002))、脳下垂体等に発現している 7 回膜貫通型構造を有する GHS 受容体とは全く異なる構造をしている (Science 273:974-977(1996))。
15

以上のように、ペプチド性 GHS あるいは非ペプチド性 GHS を長期投与することによって、心臓に対する上記のような作用を示すことが報告されている。
20

また、ペプチド性 GHS の心臓直接的心保護作用が報告された (Endocrine 14:113-119(2001))。ヘキサレリンは培養心筋細胞 (H9 c 2) においてドキソルビシン誘発性細胞死を抑制し、その媒介受容体としてヘキサレリン結合タンパク質であると考察している。このタンパク質に非ペプチド性 GHS である MK-0677
25 は結合しなかったことから、この作用はペプチド性 GHS 固有の作用であると結論付けている。

従って、ヘキサレリン結合タンパク質に結合するペプチド性 GHS のみが心筋直接的な保護作用を有すると当業者は考えてきた。

発明の開示

本発明は、心筋細胞死の抑制に関する受容体およびその活性物質を新たに見出すことにより、その新たな作用機序に基づく心筋細胞保護剤を提供することを課題とする。

- 5 本発明者らは、GHSの心筋細胞への作用について鋭意検討した結果、上記の事実と反して、ヘキサレリン結合タンパク質に結合しないグレリン及びグレリン受容体作動性の非ペプチド性GHSも心筋細胞死を抑制する作用を有することを見出し、心筋細胞死抑制の媒介受容体はグレリン受容体であることを発見した。したがって、グレリン受容体作動性であれば、ヘキサレリン結合タンパク質に結合しなくても心筋細胞死抑制作用を有するという発見に基づき本発明を完成した。

10 本発明の態様によると、グレリン、グレリン類似体、非ペプチド性化合物及びこれらの製薬的に受容される塩からなる群から選択されるグレリン受容体作動性物質を有効成分として含有することを特徴とする、心筋細胞死を伴う状態の予防または治療剤（以下「本発明の製剤」または「本願製剤」という）を提供する。

- 15 本発明の他の態様によると、グレリン受容体作動性物質がグレリン、グレリン類似体、またはこれらの製薬的に受容される塩である、上記心筋細胞死を伴う状態の予防または治療剤を提供する。

- 20 本発明の他の態様によると、グレリン受容体作動性物質がグレリンまたはその製薬的に受容される塩である、上記心筋細胞死を伴う状態の予防または治療剤を提供する。

- 25 本発明の他の態様によると、心筋細胞死を伴う状態を予防または治療そのような予防又は治療を必要とする哺乳動物（ヒトを含む）に、そのような疾患の予防又は治療に有効な量のグレリン、グレリン類似体、非ペプチド性化合物及びこれらの製薬的に受容される塩からなる群から選択されるグレリン受容体作動性物質を投与することを含む方法を提供する。

本発明の他の態様によると、グレリン受容体作動性物質がグレリン、グレリン類似体、またはこれらの製薬的に受容される塩である、上記方法を提供する。

本発明の他の態様によると、グレリン受容体作動性物質がグレリンまたはその

製薬的に受容される塩である、上記方法を提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、H9c2 細胞における虚血／低酸素処置後のアポトーシスに対する
5 MK-0677、ヘキサレリン、IGF-1 およびグレリンの作用を、TUNEL 陽性細胞数
を指標に示す。実験は 2 度行われた（実験 1 及び実験 2）。各値は、平均値±標準
偏差(n=3)で表す。*、**：溶媒に対して $p < 0.05$ 、 0.01 で有意差あ
りを示す。

図 2 は、H9c2 細胞における虚血／低酸素処置後の細胞死に対する MK-0677、
10 ヘキサレリン、IGF-1 およびグレリンの作用を、遊離細胞数を指標に示す。実験
は 2 度行われた（実験 1 及び実験 2）。各値は、平均値±標準偏差(n=3)で表す。
*、**：溶媒に対して $p < 0.05$ 、 0.01 で有意差ありを示す。

図 3 は、H9c2 細胞における DOX 誘発アポトーシスに対するヘキサレリン、
MK-0677、NN-703 および CP424, 391 の作用を、TUNEL 陽性細胞数を指標に
15 示す。各値は、平均値±標準偏差(n=3)で表す。*、**：溶媒に対して $p < 0.05$ 、 0.01 で有意差ありを示す。

図 4 は、H9c2 細胞における DOX 誘発アポトーシスに対する S-38855、グレリ
ン、デスオクタノイルグレリン（デス-O-グレリン）、IGF-1、GHRH お
よび GH の作用を、TUNEL 陽性細胞数を指標に示す。各値は、平均値±標準偏
20 差(n=3)で表す。**：溶媒に対して $p < 0.01$ で有意差ありを示す。

発明を実施するための最良の形態

本明細書でいう「グレリン受容体」とは、グレリンが特異的に結合し、シグナ
ル伝達能を有する機能的な受容体である。本受容体は下垂体（Endocrinology
25 143:1968-1971(2002)）、J Endocrinol Invest. 24:RC7-9(2001)）や心臓で存在が
確認され（Br J Pharmacol. 134:143-149 (2001)）、下垂体においては成長ホルモ
ンの分泌促進を媒介する（Nature 402:656-660(1999)）。

本明細書でいう「グレリン受容体作動性」とは、グレリン受容体に対して特異

的に結合し、細胞内にシグナルを伝達するものを言い、下垂体においては成長ホルモンの分泌を促進する活性を言い、例えばグレリンおよびMK-0677はグレリン受容体作動性を有する化合物、すなわち本発明でいう「成長ホルモン分泌促進物質」であり、デス-O-グレリンはグレリン受容体作動性を有さない化合物である。

- 5 本明細書でいう「ヘキサレリン結合タンパク質」とは、2回膜貫通型構造を有するB型スカベンジャー受容体のCD36 (Circ Res 90:844-849 (2002))である。

本明細書でいう「ヘキサレリン結合タンパク質に結合しない」とは、ヘキサレリン結合タンパク質に対してバインディングアッセイ (Endocrine 14:113-119 (2001)) で結合を示さないことを言い、例えばヘキサレリン結合タン

10 パク質に結合しない化合物にはグレリンが挙げられる。

以下に、本願製剤を詳細に説明する。

本明細書でいう、「グレリン」とは、下記表に記載された化学構造で示される、オクタノイル基をもっていることを特徴とする28個のアミノ酸を有するペプチドである。「グレリン類似体」には、グレリン受容体作動性を有し、分子中にその

15 オクタノイル基を有し、28個のアミノ酸の1個以上のアミノ酸が欠損、置換または付加されているものも包含される。さらに、これらの各種誘導体〔例えば、ペプチド構成アミノ酸が置換された誘導体（アミノ酸間に基、例えば、アルキレンが挿入されたものも包含する）及びエステル誘導体〕も包含される。

ペプチド中のアミノ酸残基やアミノ酸誘導体残基の由来（例えば、ヒト、ラットの細胞より分離、精製したもの、合成品、半合成品、遺伝子工学により得られたものなど）などについては、特に制限がない。

20

28個のアミノ酸の1個以上のアミノ酸が欠損、置換または付加されているものの例としては、下記のものあげられる。

グレリンのアミノ酸が1個欠損した例としては、14番目のGln残基が欠除

25 した、des-Gln14-グレリンなどが代表的である。

さらに、本発明のグレリン類似体には、J. Med. Chem. 2000, 43, 4370-4376に記載された下記のようなものも包含される。

例えば、グレリン28個のアミノ酸のうち、N末端から3及び4番目のアミノ

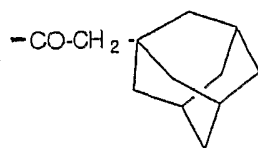
酸（好ましくは、N末端4個のアミノ酸）を有し、かつN末端から3番目のアミノ酸（Ser）の側鎖が置換されているペプチド及びその誘導体であって、グレリン受容体作動性を有するものがあげられる。

N末端から3番目のアミノ酸の側鎖の例としてはグレリンの側鎖であるオクタノイル以外のアシル基及びアルキル基（これらの炭素数は6～18が好ましい）があげられる。

具体的には、下記のものがあげられる：

$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{COPh}$ 、

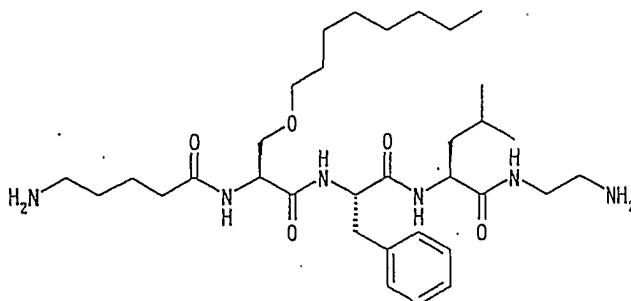
下記式：



15

N末端から3及び4番目のアミノ酸を有し、かつN末端から3番目のアミノ酸（Ser）の側鎖が置換されているグレリン類似体の具体的な例としては、第37回ペプチド討論会（2000年10月18日～20日）で報告された化合物：
 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-\text{Ser}(\text{オクチル})-\text{Phe}-\text{Leu}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ があげられる。

20



25

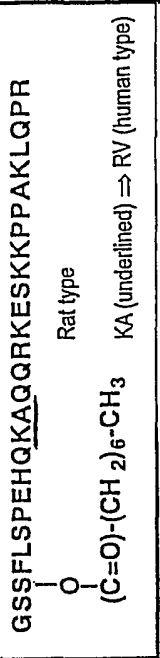
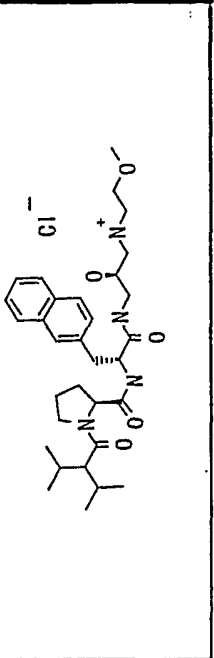
本明細書でいう、「非ペプチド性化合物」とは、タンパク質を構成する20種のL-アミノ酸及びそのD体であるアミノ酸の2量体以上がペプチド結合で結合し

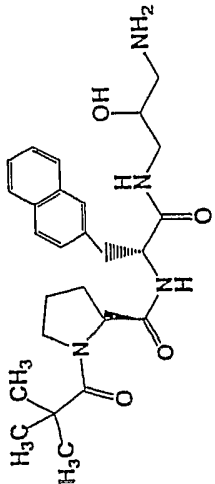
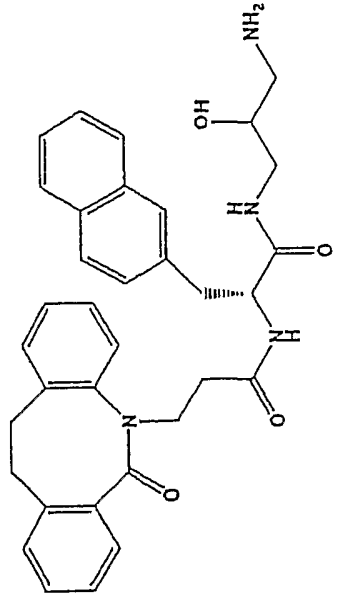
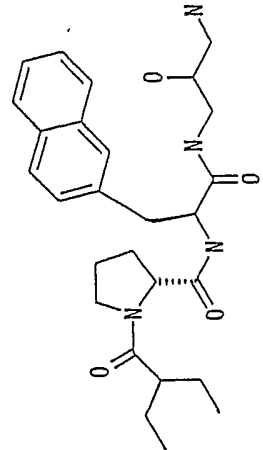
ている構造部分を含まない化合物をいう。

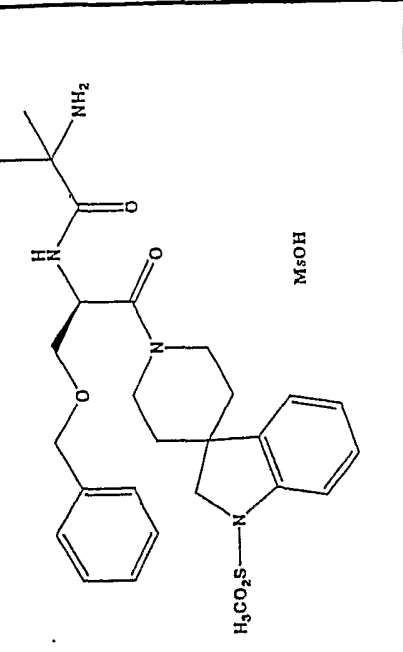
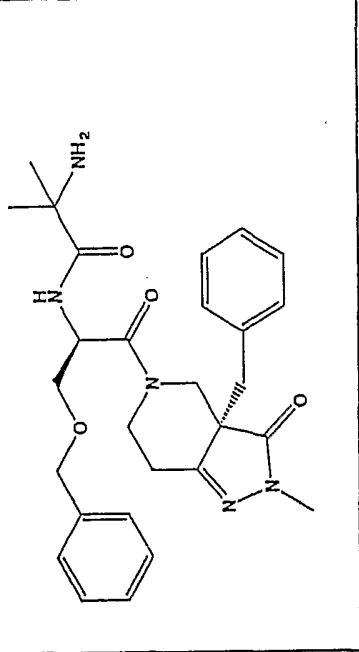
- 非ペプチド性成長ホルモン分泌促進物質の具体例としては、グレリン受容体作動性を有する限りこれらに限定されるものではないが、S-42875、S-38855、S-37555、S-39100、イブタモレリン[例えば、イブタモレリンメシレート (MK-0677)]、カ
- 5 プロモレリン(CP-424391)、NNC-260722、NNC-260323、L-163661、L-163540、L-168721、LY-426410、LY-444711、L-692, 429、L-692, 585、L-700, 653、L-252, 564、L-162, 752、L-164, 080、G-7203、G-7039、G-7052、G-7220、タビモレリン(NN-703)、SM-130686、L-739943、CP-336156、CP-464709 またはそれらの塩、エステルなどが挙げられる。
- これらの塩の例は、下記に記載されるが、好ましい例としては、塩酸塩があげら
- 10 れる。

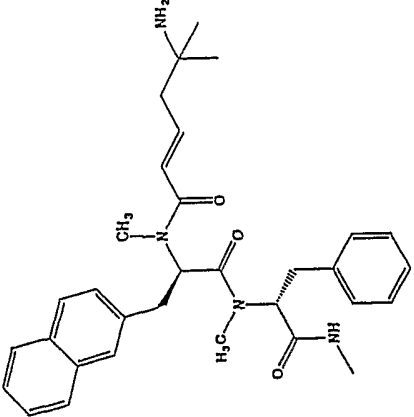
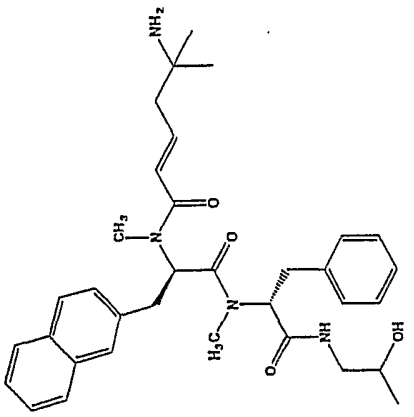
上記化合物の代表的なものは、以下の表に詳細に記載する。

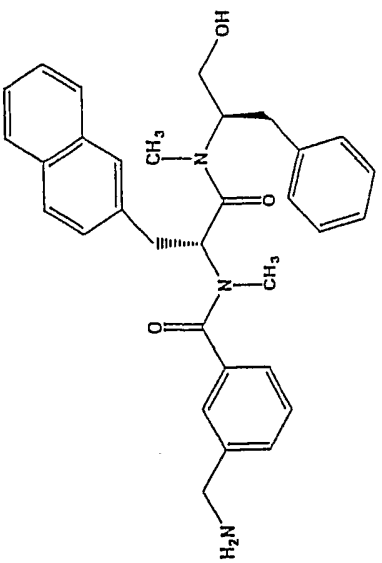
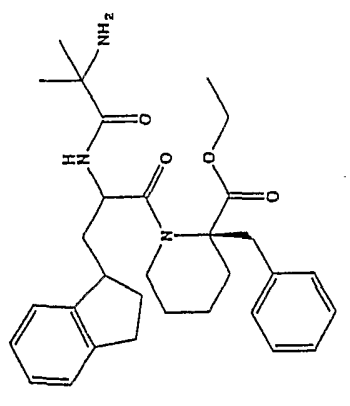
具体例化合物の化学名および構造式

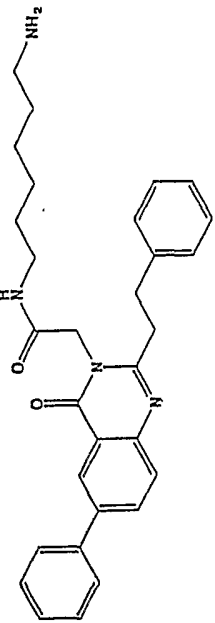
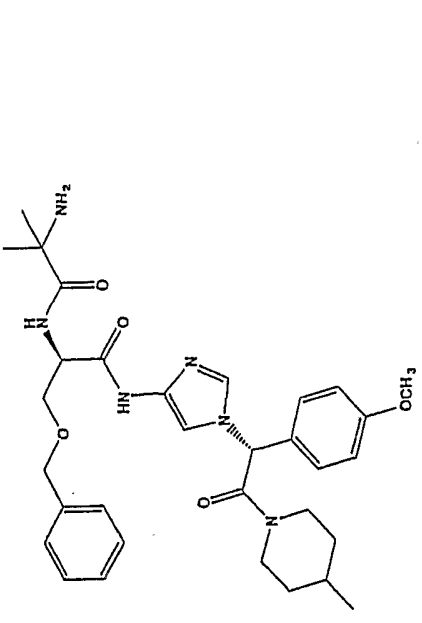
一般名	化学名	化学構造
ゲレリン		GSSFLSPEHQK<u>QA</u>QQRKESKKPPAKLQPR 
S-42875	N-[3-(2-メトキシエチルアミノ)-2(S)-ヒドロキシプロピル]-2(R)-[1-(2-インプロピル-3-メチル-ブチリル)-ピロリジン-2(S)-カルボニルアミノ]-3-ナフトレン-2-イル-プロピオンアミド 塩酸塩	

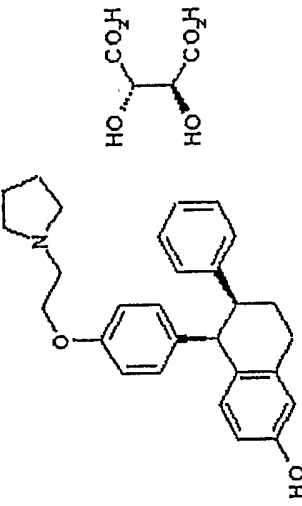
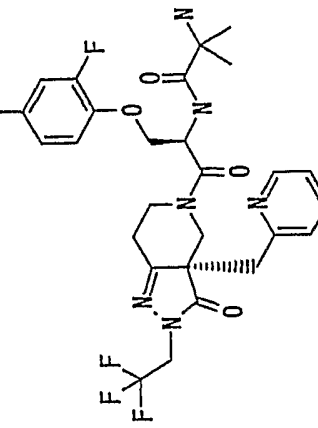
S-38855	N-(3-アミノ-2-ヒドロキシプロピル)-2(R)-[1-(2,2-ジメチルプロピオニル)ピロリジン-2(S)-カルボニルアミノ]-3-ナフトレン-2-イル-プロピオンアミド	
S-37555	N-[1(R)-(3-アミノ-2-ヒドロキシプロピルカルバモイル)-2-イル-エチル]-3-(6-オキソ-11,12-ジヒドロ-6H-ジベンゾ[b,f]アズシン-5-イル)-プロピオンアミド	
S-39100	N-(3-アミノ-2-ヒドロキシプロピル)-2(S)-[1-(2-エチルブチリル)ピロリジン-2(R)-カルボニルアミノ]-3-ナフトレン-2-イル-プロピオンアミド	

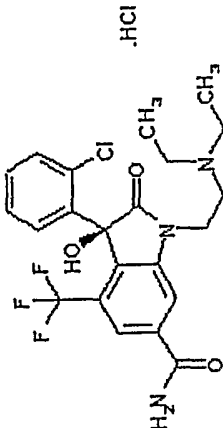
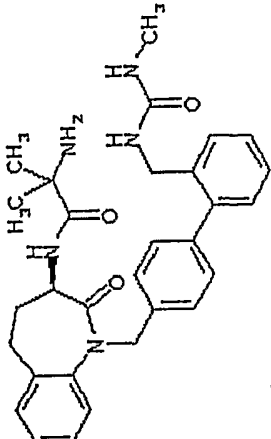
MK-0677 (ibutamorelin mesylate)	2-アミノ-N-[(R)-2-(ベンジルオキシ)-1-[[1-(メチルスルホニル)スピロ[インドリン-3,4'-ピペリジン]-1'-イル]カルボニル]エチル]-2-メチルプロピオンアミドモノメタンサルホネート	
CP-424391 (Capromorelin)	2-アミノ-N-[(1R)-1-[[[(3aR)-3a-ベンジル-2,3,3a,4,6,7-ヘキサヒドロ-2-メチル-3-オキシノ-5H-ピラゾロ[4,3-c]ピリジン-5-イル]カルボニル]-2-(ベンジルオキシ)エチル]-2-メチルプロピオンアミド	

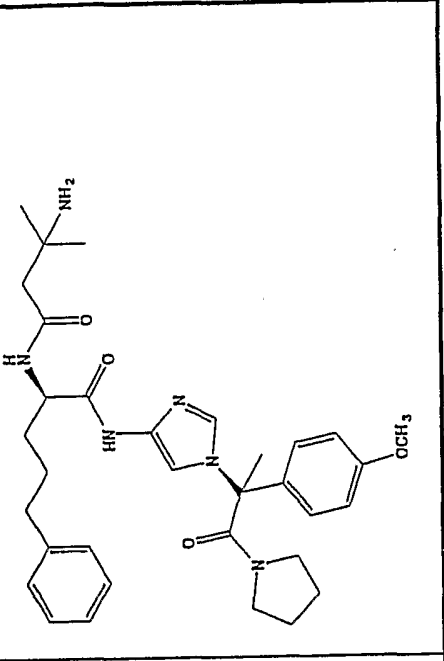
NNC-260703 (Tabimorelin) NN-703	5-アミノ-5-メチルヘキサ-(2E)-エノイック酸 N-メチル-N-[(1R)-1-[N-メチル-N-[(1R)-1-(メチルカルバモイル)-2-フェニルエチル]カルバモイル]-2-(2-ナフチル)エチル]アミド	
NNC-260722	5-アミノ-5-メチルヘキサ-(2E)-エノイック酸 N-メチル-N-[(1R)-1-[N-メチル-N-[(1R)-1-(2-ヒドロキシプロピルカルバモイル)-2-フェニルエチル]カルバモイル]-2-(2-ナフチル)エチル]アミド	

NNG-260323	(2R)-2-[N-(3-アミノメチルベンゾイル)-N-メチル-D-2-ナリ]-N-メチル-3-フェニル-1-プロパノール	
L-163540	1-[2(R)-(2-アミノ-2-メチルプロピオニルアミノ)-3-(1H-インドル-3-イル)プロピオニル]-3-ベンジルピペリジン-3(S)-カルボン酸エチルエステル	

L-168721	N-(6-アミノヘキシル)-2-(4-オキソ-2-フェネチル-6-フェニル-4H-キノリジン-3-イル)アセトアミド	
LY-426410	2-アミノ-N-[2-ベンジルオキシ-(1R)-[1-[(1R)-(4-メトキシフェニル)-2-(4-メチルピペリジン-1-イル)-2-オキソ-エチル]-1H-イミダゾール-4-イルカルバモイル]エチル]-2-メチルプロピオンアミド	

CP-336156		
CP-464709	2-アミノ-N-[1-(2,4-ジフルオロフェノキシ)エチル]-2-オキシノ-2-[3-オキシノ-3a-ピリジン-2-イルメチル]-2-(2,2,2-トリフルオロエチル)-2,3,3a,4,6,7-ヘキサヒドロピラゾロ[4,3-c]ピリジン-5-イル]-エチル]-2-メチルプロピオンアミド	

SM-130686	 Chemical structure of SM-130686: A complex molecule featuring a central benzene ring. At the 1-position, there is a trifluoromethyl group (CF₃) and a hydroxyl group (OH). At the 2-position, there is a chlorine atom (Cl). At the 3-position, there is a carboxamide group (CONH₂). At the 4-position, there is a side chain consisting of a methylene group (CH₂) attached to a nitrogen atom (N), which is further attached to a methyl group (CH₃). The molecule is shown as a hydrochloride salt (.HCl).
L-739943	 Chemical structure of L-739943: A complex molecule featuring a central benzene ring. At the 1-position, there is a side chain consisting of a methylene group (CH₂) attached to a nitrogen atom (N), which is further attached to a methyl group (CH₃). At the 2-position, there is a carboxamide group (CONH₂). At the 3-position, there is a side chain consisting of a methylene group (CH₂) attached to a nitrogen atom (N), which is further attached to a methyl group (CH₃). At the 4-position, there is a side chain consisting of a methylene group (CH₂) attached to a nitrogen atom (N), which is further attached to a methyl group (CH₃). The molecule is shown as a hydrochloride salt (.HCl).

LY-444711	2-メチルアラニル-N-[1-[(1R)-1-(4-メトキシフェニル)-1-メチル-2-オキソ-2-(1-ピロリジニル)エチル]-1H-イミダゾール-4-イル]-5-フェニル-D-ノルバリンアミド	
-----------	--	--

本明細書でいう、「心筋細胞死を伴う状態」とは、例えば、心筋梗塞、その治療に行われるバイパス手術や PTCA による再灌流障害、冠微小循環障害、心筋炎(アルコール性、ウイルス性など)、拡張型心筋症、心臓移植、不整脈、心不全さらには、化学療法剤による薬剤性心筋障害等が上げられるが、これに限定されるものではない。

本願製剤は、心筋細胞に直接作用し細胞死(ネクロシス及びアポトーシス、特にアポトーシス)を抑制することができるという優れた即効性を有する。したがって、心筋梗塞、心肥大及び心筋炎などの重度の心疾患においても残存心筋細胞の死を迅速に抑制することができる。例えば、心筋梗塞後に生じる、梗塞拡大及び心室の拡張を予防することができるので、心筋梗塞後に生じうる心不全、再発性心筋梗塞及び／又は死亡を防止することができる。

「製薬的に受容される塩」としては、例えば塩酸、硫酸、リン酸等の鉱酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸との塩、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属との塩、アルギニン等の塩基性アミノ酸との塩等が挙げられる。

本発明の製剤において、有効成分を2種以上組み合わせて用いてもよい。

本発明に用いられるグレリン、グレリン類似体、グレリン受容体作動性である非ペプチド性化合物及びこれらの製薬的に受容される塩は、公知の製剤技術により、単独でまたは薬理学的に許容しうる担体、添加剤等とともに、通常の経口型製剤及び非経口型製剤、例えば、液剤(注射剤、点鼻剤、シロップ剤、ドライシロップ剤など)、錠剤、トローチ剤、カプセル剤(硬、軟、マイクロカプセル等)、散剤、細粒剤、顆粒剤、軟膏剤、坐剤等などに製剤可能であり、また、ドラッグデリバリーシステム(例えば、徐放剤等)などの剤型にも製剤可能である。

本願の製剤に用いることができる担体、添加剤等としては以下のような通常医薬品の調剤に使用されるものがあげられる：例えば生理食塩液、水(常水、蒸留水、精製水、注射用水など)、リンゲル液等の水性溶剤、例えば、油性溶剤(植物油など)、水溶性溶剤(プロピレングリコール、マクロゴール、エタノール、グリ

- セリンなど)等の非水性溶剤、例えばカカオ脂、ポリエチレングリコール、マイクロクリスタリンワックス、サラシミツロウ、流動パラフィン、白色ワセリン等の基剤、例えば蔗糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、ぶどう糖、セルロース、タルク、燐酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、
- 5 メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、蔗糖、デンプン等の結合剤、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルデンプン、炭酸水素ナトリウム、燐酸カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ラ
- 10 ウリル硫酸ナトリウム等の滑沢剤、例えばクエン酸、メントール、グリシン、ソルビトール、オレンジ末等の矯味剤、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、ベンジルアルコール、クロロブタノール、四級アンモニウム塩(塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムなど)等の保存剤及び防腐剤、例えばアルブミン、ゼラチン、ソルビトール、マンニトール等の安定剤、例えばメチルセルロース、ポ
- 15 リビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁化剤、例えばグリセリン、ソルビトール等の可塑剤、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース等の分散剤、例えば塩酸等の溶解補助剤、例えばモノステアリン酸ナトリウム等の乳化剤、例えば塩化ナトリウム等の電解質並びに例えば糖アルコール類、糖類及びアルコール類等の非電解質の浸透圧調整剤、着香剤等。
- 20 本発明において、グレリン受容体作動性物質の好ましい投与量は、 $0.01 \mu\text{g/kg/日}$ ～ 25mg/kg/日 、より好ましくは、 $0.1 \mu\text{g/kg/日}$ ～ 1mg/kg/日 である。

投与方法は、静脈内投与、経鼻投与、皮下投与、筋肉内投与(心筋を含む)、経口投与などがあげられる。静脈内投与では、単回(bolus)投与のみ、持続(infusion)投与のみ、あるいは単回投与直後から持続投与、のいずれかの投与方法で行われ

25 る。

以下に試験例を示して具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

試験例

(1) 試験物質および試薬

1) 試験物質

5 グレリン (ラット型、ペプチド研究所)、デスオクタノイルグレリン (デス-
ーグレリン) (合成品)、ヘキサレリン (PENINSULA LABORATORIES)、GH (ラット型、
和光純薬)、GHRH (BACHEM)、IGF-I (PEPRO TECH)、非ペプチド性 GHS として、S-38855
(合成品)、MK-0677 (合成品)、NN-703 (合成品)、CP424, 391 (合成品) を用いた。

S-38855、MK-0677、NN-703 及び CP424, 391 は、ジメチルスルホキシド (ナカラ
イテスク) に 10mM になるように溶解後、1mg/mL ウシ血清アルブミン (SIGMA) を
10 含む日局注射用水 (大塚製薬) で所定の濃度に希釈して使用した。また、グレリ
ン、デスオクタノイルグレリン (デス-ーグレリン)、GH、GHRH 及び IGF-I は、
1mg/mL ウシ血清アルブミン/日局注射用水に溶解し、所定の濃度に希釈して使用
した。

2) 試薬

15 試験には、以下の試薬を使用した。DMEM 培地、ウシ胎児血清、トリプシン-EDTA、
以上 GIBCO 社製。ウシ血清アルブミン (SIGMA 社製)。ドキソルビシン (和光純薬
社製)。DAB 溶液 (シンプルステイン DAB 溶液)、ニチレイ社製。in situ 細胞死検
出キット (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)。その他の試薬、ナカライテス
ク社製。

20 (2) 細胞培養

H9c2 細胞は、大日本製薬より購入し、ウシ胎児血清 (以下、FBS という)、ペニ
シリン及びストレプトマイシンを含む DMEM 培地を用い、37℃、5% CO₂-95% 空気
の培養インキュベーター内で培養した。

(3) 試験方法

25 1) 虚血/低酸素誘発細胞死

心臓の虚血-再灌流障害においては、心筋細胞のアポトーシスとネクローシス
による細胞死が誘発されることが知られている (*Am. J. Cardiol.* 82, 30K-41K(1998)
参照)。したがって、虚血/低酸素による誘発細胞死を、Brar らの方法 (*J. Biol.*

Chem. 275, 8508-8514 (2000))を一部改変した方法により生じさせた。すなわち、前培養した H9c2 細胞を、5%FBS を含む DMEM にて 1.5×10^4 細胞/cm² になるように 48 ウエル培養プレートに播種し、培養インキュベーター(37℃、5% CO₂-95% 空気)内で 24 時間培養した。虚血/低酸素状態は、Esumi (*Am. J. Physiol.* 260, H1743-52(1991)) の虚血緩衝液 (ISB) 処置および低酸素培養インキュベーター (37℃、5% CO₂-95% N₂ 通気) 内で 4 時間培養することによって作った。ISB の組成は、137mM NaCl、12mM KCl、0.49mM MgCl₂、0.9mM CaCl₂、4mM HEPES、10mM デオキシグルコース、20mM 乳酸ナトリウム (pH 6.2) である。虚血/低酸素処置後、ISB を血清不含 DMEM に交換し、通常の培養インキュベーター(37℃、5% CO₂-95% 空気)に戻し培養した。培養 2 時間後、細胞は PBS で 1 回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで固定しアポトーシス細胞数測定まで冷蔵庫内で保存した。また、虚血/低酸素処置後、20 時間培養した細胞を死細胞数測定用に用いた。試験化合物は、虚血/低酸素処置と同時に処置した。陰性対照の溶媒 (ジメチルスルホキシド) も同様に添加した。

15 2) ドキソルビシン誘発細胞死

ドキソルビシン(以下、DOX と略す)は細胞内でフリーラジカルを生成させることで、心筋細胞のアポトーシスとネクローシスによる細胞死を誘発することが知られている (*Ann. N. Y. Acad. Sci.* 874, 156-168(1999)参照)。したがって DOX 誘発細胞死を、Kang らの方法 (*J. Biol. Chem.* 275, 13690-13698(2000))を改変した方法によって生じさせた。前培養した H9c2 細胞を、5%FBS を含む DMEM にて 1.5×10^4 細胞/cm² になるように 24 ウエル培養プレートに播種し、培養インキュベーター(37℃、5% CO₂-95% 空気)内で培養した。24 時間培養後、DOX を最終濃度 1 μM になるように添加し細胞死を誘発した。DOX 添加 5 時間後、細胞は PBS で 1 回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、アポトーシス細胞数測定まで冷蔵庫内で保存した。試験化合物は、DOX 添加 4 時間前に処置した。陰性対照の溶媒 (ジメチルスルホキシド) も同様に添加した。

3) アポトーシス細胞数の測定

アポトーシス細胞の検出は、*in situ* DNA 断片化検出法として知られる TUNEL

法 (*in situ* 細胞死検出キット) にて行った。TUNEL 陽性細胞数の測定は、顕微鏡下、100 倍視野 (high power microscopic field, HPF) に存在する TUNEL 陽性細胞を 1 ウエルあたりに 5HPF をカウントした (この 5 視野は、全面積の約 30% (24 ウエル プレート) または約 60% (48 ウエル プレート) を占める)。1HPF 当たりの平均値を算出し、アポトーシス細胞数とした。

4) 死細胞数の測定

培地中の遊離細胞を死細胞とし、顕微鏡下で観察し 1 ウエルあたり 5 HPF (1 HPF はウエルの中心を含む) をカウントした。1HPF 当たりの平均値を算出し、死細胞数とした。尚、本測定法は、血球計算板を用いて測定した遊離細胞数と有意な相関 (相関係数: $r=0.902$ 、有意差危険率: $p=0.00003$ 、 $n=12$) を示すことを確かめている。

5) データの表示及び統計解析

各データは、1 群 3 ウエルの平均値 $\pm$ 標準偏差で表した (図 1 ~ 4)。図中、試験化合物濃度は、IGF-I 及び GH を除き対数モル濃度で表した。

15 結果

(1) 虚血/低酸素誘発細胞死に対する作用

H9c2 細胞の虚血/低酸素処置後、2 時間でのアポトーシス細胞に対する作用を、TUNEL 陽性細胞数を指標に検討した。本試験系における虚血緩衝液中の酸素分圧は、約 70mmHg であり通常の培養条件の約 1/2 であった。通常の培養条件下で培養した無処置群において TUNEL 陽性細胞はほとんど認められなかったのに対して、虚血/低酸素処置における溶媒群の TUNEL 陽性細胞数は、 21.3 ± 1.9 細胞/HPF (実験 1)、 20.9 ± 1.2 細胞/HPF (実験 2) であった。

MK-0677 ($1 \mu\text{M}$) はヘキサレリン ($1 \mu\text{M}$) および IGF-1 (100ng/mL) と同様に、TUNEL 陽性細胞数の有意な低下作用を示した (実験 1、図 1)。グレリン ($1 \mu\text{M}$) もまた MK-0677 ($1 \mu\text{M}$) と同様に TUNEL 陽性細胞数の有意な低下作用を示した (実験 2、図 1)。

次に、虚血/低酸素処置後、24 時間での死細胞数に対する作用を、遊離細胞数を指標に評価した。その結果、ヘキサレリンおよび IGF-1 と同様に、MK-0677

およびグレリンは有意な遊離細胞数の低下作用を示した(図2)。したがって、ヘキサレリン結合タンパク質に結合しない非ペプチド GHS およびグレリンにも心筋細胞アポトーシス抑制作用が明らかとなった。

(2) DOX 誘発細胞死に対する作用

- 5 H9c2 細胞の DOX によるアポトーシスに対する作用を検討した。

DOX 非処置群では、TUNEL 陽性細胞は全く観察されなかったのに対して、陰性対照の DOX (1 μ M) 処置 5 時間後の TUNEL 陽性細胞数は、 13.1 ± 0.1 細胞/HPF であった。

- 10 アポトーシスに対する GHS の効果を検討した結果、ヘキサレリン、MK-0677、NN-703、CP424,391、グレリン及び S-38855 (それぞれ 1 μ M) は、いずれも TUNEL 陽性細胞数の有意な低下作用を示した (図3及び4)。また、IGF-I (100ng/mL) も同様に有意な低下作用を示したが、デスオクタノイルグレリン (デスオーグレリン) (1 μ M)、GHRH (1 μ M) 及び GH (10 μ g/mL) ではその作用は認められなかった (図4)。

- 15 以上のように、グレリンおよび非ペプチド性 GHS は虚血/低酸素誘発細胞死に加え、DOX 誘発細胞死をも抑制した。しかし、グレリン受容体作動性でないデスオクタノイルグレリン、GHRH や GH は抑制しなかった。したがって、グレリン作動性であれば、ヘキサレリン結合タンパク質に結合しなくても、心筋細胞死抑制作用を有することが明らかとなった。

20

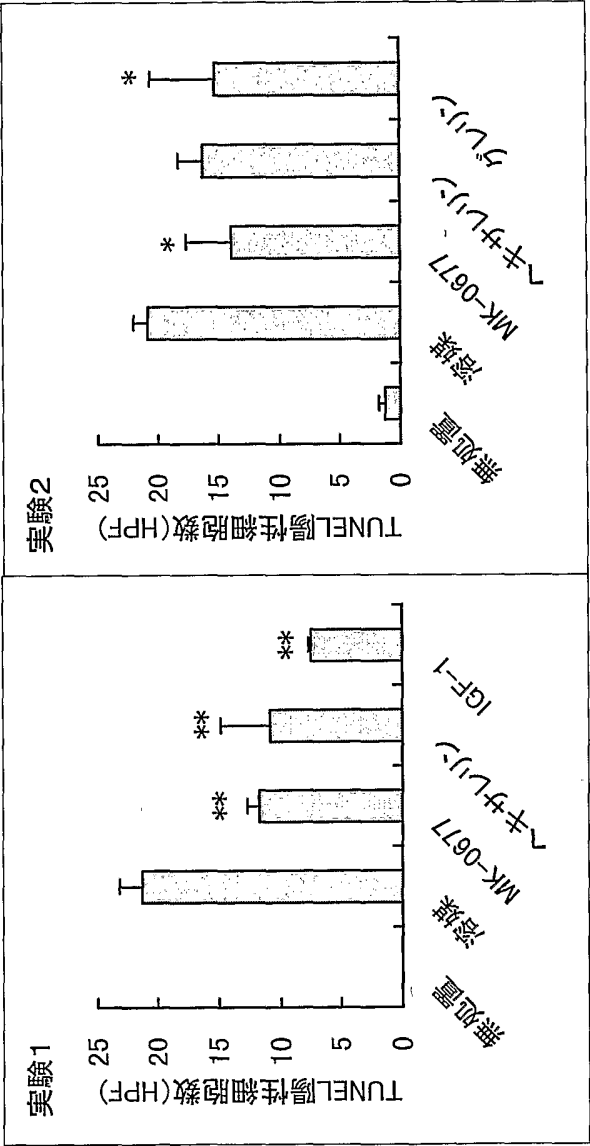
産業上の利用可能性

- 25 本発明の薬剤は、心筋細胞死を伴った心疾患及び心臓バイパス手術などの心臓手術によって生じる心筋細胞死を伴う心臓の状態において、心筋細胞に直接作用し細胞死 (ネクロシス及びアポトーシス) を抑制し、心筋梗塞、心肥大及び心筋炎などの重度の心疾患においても残存心筋細胞の死を迅速に抑制することができ、それによって、心不全への移行を防止することができるという優れた即効性を有する。

請求の範囲

1. グレリン、グレリン類似体、非ペプチド性化合物及びこれらの製薬的に受容される塩からなる群から選択されるグレリン受容体作動性物質を有効成分として含有することを特徴とする、心筋細胞死を伴う状態の予防または治療剤。
2. グレリン受容体作動性物質がグレリン、グレリン類似体、またはこれらの製薬的に受容される塩である、請求項 1 に記載の心筋細胞死を伴う状態の予防または治療剤。
3. グレリン受容体作動性物質がグレリンまたはその製薬的に受容される塩である、請求項 2 に記載の心筋細胞死を伴う状態の予防または治療剤。
4. 心筋細胞死を伴う状態を予防または治療そのような予防又は治療を必要とする哺乳動物に、そのような疾患の予防又は治療に有効な量のグレリン、グレリン類似体、非ペプチド性化合物及びこれらの製薬的に受容される塩からなる群から選択されるグレリン受容体作動性物質を投与することを含む方法。
5. グレリン受容体作動性物質がグレリン、グレリン類似体、またはこれらの製薬的に受容される塩である、請求項 4 に記載の方法。
6. グレリン受容体作動性物質がグレリンまたはその製薬的に受容される塩である、請求項 5 に記載の方法。

図1



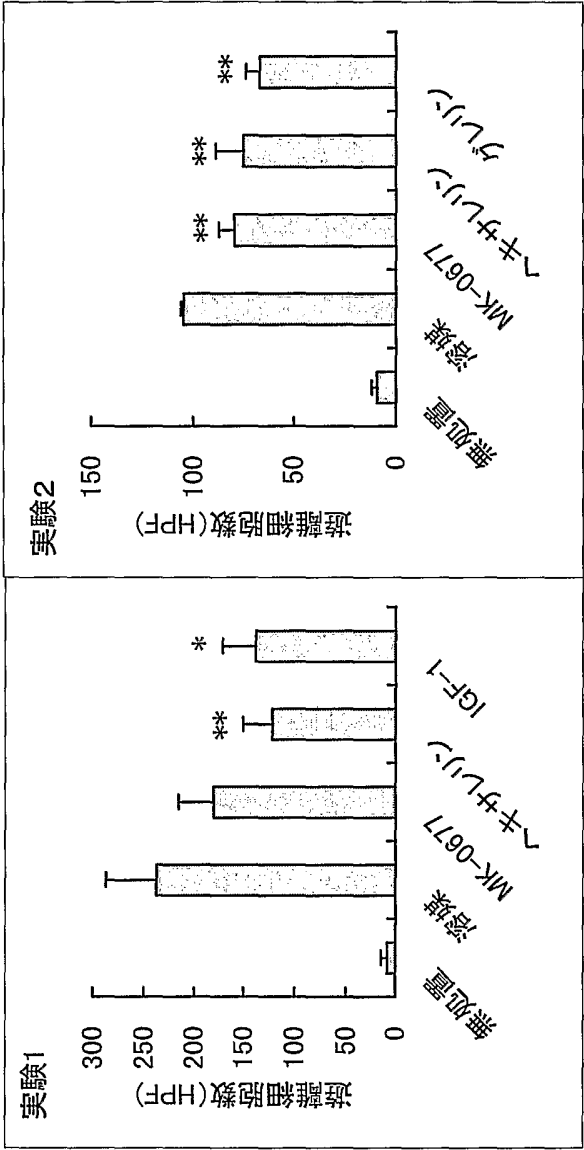
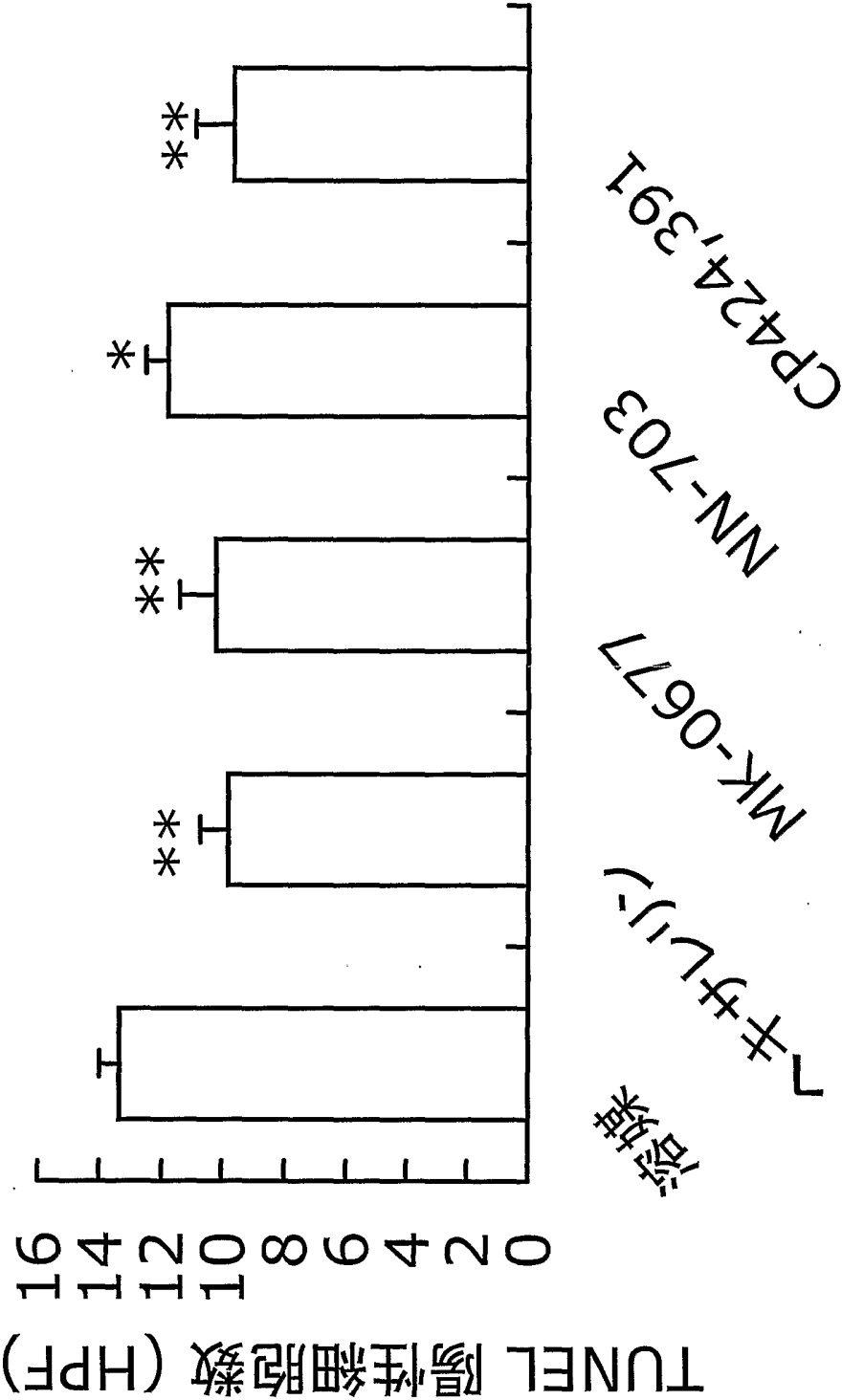


図2

3



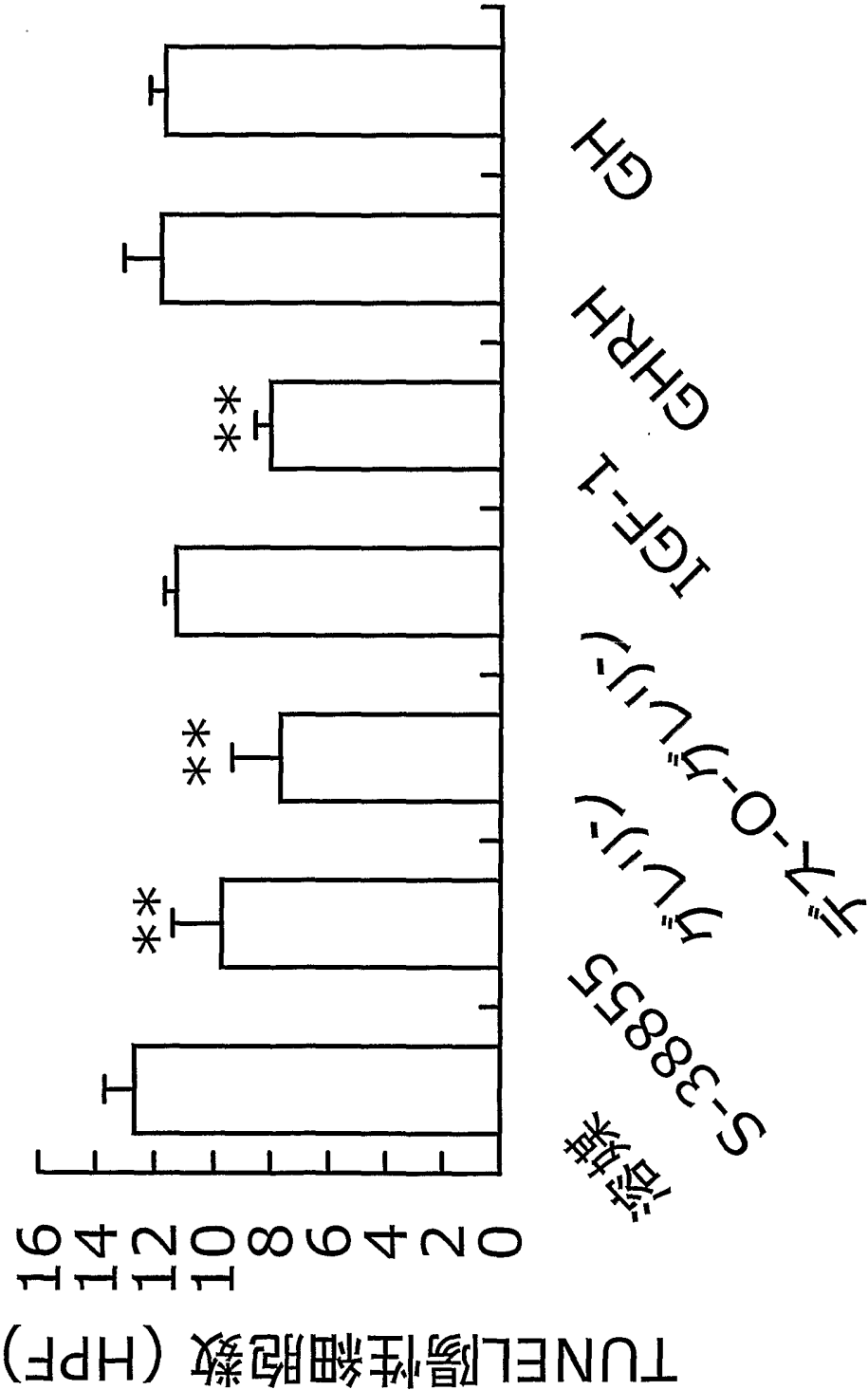


図4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10158

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

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)

Int.Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	BALDANZI, Gianluca et al., Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/ AKT, J.Cell Biol., December 2002, Vol.159, No.6, pages 1029 to 1037	1-3
P, X	NAGAYA, Noritoshi et al., Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure, Regulatory Peptides, July 2003, Vol.114, pages 71 to 77	1-3
A	WO 92/07578 A1 (Genentech, Inc.), 14 May, 1992 (14.05.92), Full text & JP 6-503320 A & EP 554381 A1	1-3

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

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 September, 2003 (25.09.03)

Date of mailing of the international search report
07 October, 2003 (07.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10158

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 99/08697 A1 (Eli Lilly and Co.), 25 February, 1999 (25.02.99), Full text & JP 2001-515045 A & EP 898963 A2	1-3
A	WO 98/22124 A1 (Pharmacia & Upjohn AB), 28 May, 1998 (28.05.98), Full text & AU 9851424 A1	1-3
A	WO 01/097831 A1 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 December, 2001 (27.12.01), Full text & EP 1297839 A1	1-3
A	WO 01/047558 A1 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), 05 July, 2001 (05.07.01), Full text & EP 1258250 A1	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10158

Box I 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.: 4-6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 4-6 involves methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
☐ 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. Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

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. Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1992

日本国公開実用新案公報 1971-1992

日本国登録実用新案公報 1994-1996

日本国実用新案登録公報 1996-2003

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)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (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 請求の範囲の番号
P X	BALDANZI, Gianluca et al, Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT, J. Cell Biol., December 2002, Vol.159, No.6, pages 1029-1037	1-3
P X	NAGAYA, Noritoshi et al, Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure, Regulatory Peptides, July 2003, Vol.114, pages 71-77	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

25.09.03

国際調査報告の発送日

07.10.03

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)

岩下 直人

4 C

9841

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

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 請求の範囲の番号
A	WO 92/07578 A1 (Genentech, Inc.) 1992.05.14 全文 & JP 6-503320 A & EP 554381 A1	1-3
A	WO 99/08697 A1 (Eli Lilly and Company) 1999.02.25 全文 & JP 2001-515045 A & EP 898963 A2	1-3
A	WO 98/22124 A1 (Pharmacia & Upjohn AB) 1998.05.28 全文 & AU 9851424 A1	1-3
A	WO 01/097831 A1 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) 2001.12.27 全文 & EP 1297839 A1	1-3
A	WO 01/047558 A1 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) 2001.07.05 全文 & EP 1258250 A1	1-3

第Ⅰ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. ☒ 請求の範囲 4-6 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、請求の範囲 4-6 は手術または治療による人体の処置方法を包含するものであるので、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 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. ☐ 請求の範囲 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Ⅱ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の範囲について作成した。
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の範囲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の範囲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の範囲について作成した。

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なかった。