

(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
2022年8月25日(25.08.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/177029 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/4172 (2006.01) C12N 9/99 (2006.01)
A61K 33/04 (2006.01) C12Q 1/37 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61P 43/00 (2006.01) C12N 9/50 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/007397

(22) 国際出願日: 2022年2月22日(22.02.2022)

(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 2021-026585 2021年2月22日(22.02.2021) JP
特願 2021-106076 2021年6月25日(25.06.2021) JP
特願 2021-165803 2021年10月7日(07.10.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人千葉大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba

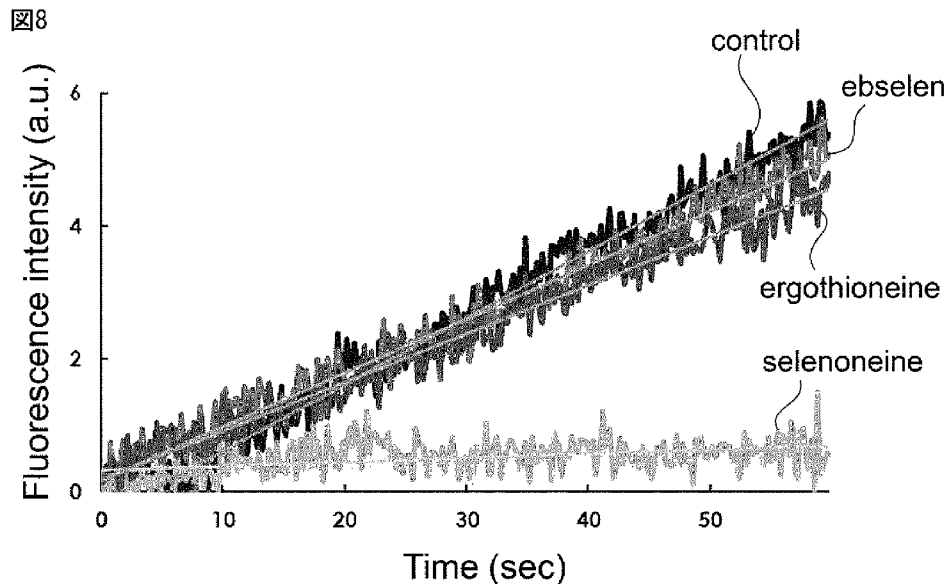
(JP). キッコーマン株式会社(KIKKOMAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田250番地 Chiba (JP).

(72) 発明者: 鈴木 紀行 (SUZUKI, Noriyuki); 〒2608675 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番地1号 国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 小椋 康光(OGRA, Yasumitsu); 〒2608675 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番地1号 国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 福本泰典(FUKUMOTO, Yasunori); 〒2608675 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番地1号 国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 市川 恵一(ICHIKAWA, Keiichi); 〒2788601 千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目23

(54) Title: THERAPEUTIC OR PROPHYLACTIC AGENT FOR COVID19 WHICH COMPRISES SELENONEINE

(54) 発明の名称: セレノネインを含む、COVID19治療又は予防薬



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a composition for treating or preventing an infection (COVID19) caused by SARS-CoV-2. A method for screening for a drug having an inhibitory activity against a protease of SARS-CoV2 is established, and it is found that selenoneine has an inhibitory activity against the protease of SARS-CoV2. On the basis of this finding, a composition for treating or preventing COVID19 which contains selenoneine is provided.



WO 2022/177029 A1

番 1 号 虎ノ門ヒルズ森タワー 青和特
許法律事務所 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (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：

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

(57) 要約：SARS-CoV-2による感染症(COVID-19)の治療又は予防用組成物の提供を目的とする。SARS-CoV-2のプロテアーゼの阻害活性を有する薬剤のスクリーニング方法を確立し、セレノネインがSARS-CoV-2のプロテアーゼの阻害活性を有することを見出したことに基づき、セレノネインを含むCOVID-19の治療又は予防用組成物を提供する。

明 細 書

発明の名称：

セレノネインを含む、COVID19治療又は予防薬

技術分野

[0001] 本発明は、セレノネインを含む、COVID19治療又は予防の技術分野に関する。

背景技術

[0002] 2019年秋から2022年にパンデミックを引き起こしたSARS-CoV-2ウイルスにより引き起こされるCOVID19に対するワクチンや治療薬の開発が急務である。いくつかの効果が認められたワクチンの開発が進み、使用されてきている。一方、日本を含むアジア諸国において、COVID19患者の重症化率や死亡率が、欧州各国に比べ低いことが疫学的に示されており、何らかの要因が、COVID19に対して抵抗性を付与することが考えられている。かかる要因の候補について研究が行われている。体内のセレン欠損により、コクサッキーウイルスやインフルエンザウイルスなどのRNAウイルスの毒性が高まることが知られている。こうした背景から中国の都市間におけるセレン状態と、COVID19患者のアウトカムとの関連性が報告されている（非特許文献1：Am J Clin Nutr. 2020 Jun 1;111(6):1297-1299. doi: 10.1093/ajcn/nqaa095）。

[0003] コロナウイルスは、一本鎖RNAをゲノムとして有し、宿主細胞に感染すると、RNAゲノムから長いポリタンパク質が翻訳される。ポリタンパク質が適切に切断されることで、各断片がウイルス増殖に必要な構造タンパク質や酵素として機能するようになり、ウイルスが増殖する。ポリタンパク質の切断を主に触媒するプロテアーゼとして、メインプロテアーゼ（M^{pro}）とパパイ様プロテアーゼ（PL^{pro}）が挙げられ、これらのプロテアーゼは、有力な創薬ターゲットとなる。結晶解析による三次元モデルに対するのコンピュータスクリーニングの結果により、幾つかの既存の薬剤が、有効なM^{pro}

阻害剤として機能しうることが報告されている（非特許文献2：Nature（2020）vol. 582(7811):289-293）。なかでも、セレン化合物の一種であるエブセレンが、触媒領域に対して際立った親和性を示し、それによりCOVID-19に対する治療薬としての開発が期待されている（非特許文献3：Sci. Adv. 2020 6. eadb0345）。エブセレンは、必須微量元素のひとつであるセレンを分子内に含む機能性分子である。エブセレンは、互変異性体として遊離のセレノール基を潜在的に有する分子である。エブセレンによるM^{pro}阻害の機構は、プロテアーゼの活性中心のCys145チオール基に対し、エブセレンのセレノール基が共有結合すると考えられている。また、インシリコ解析において、有機セレン化合物が、SARS-CoV-2のメインプロテアーゼ（M^{pro}）に対し、高い結合親和性を示すことから、有機セレン化合物が抗ウイルス薬の候補分子になりうることが示されている（非特許文献4）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Am J Clin Nutr. 2020 Jun 1;111(6):1297-1299. doi: 10.1093/ajcn/nqaa095

非特許文献2：Nature（2020）vol. 582(7811):289-293

非特許文献3：Sci. Adv. 2020 6. eadb0345

非特許文献4：Chemrxiv（2020-07-02）DOI:10.26434/chemrxiv.12594134

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 創薬ターゲットであるSARS-CoV-2のプロテアーゼの阻害活性を有する薬剤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

[0006] 本発明者らは、SARS-CoV-2のメインプロテアーゼ（M^{pro}）とパパイン様プロテアーゼ（PL^{pro}）が共にシステインプロテアーゼであることに着目し、パパイン阻害活性を指標としたスクリーニング系を確立した。

かかるスクリーニングにより、M^{pro}の阻害剤として特定されたエブセレンよりも高い阻害活性を有する物質としてセレノネインをスクリーニングした。さらにSARS-CoV-2のM^{pro}を調製し、セレノネインによりプロテアーゼ活性が阻害されることを確認し、本発明に至った。そこで本発明は下記に関する：

- [0007] [1] セレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその医薬として許容される塩を含む、コロナウイルスのプロテアーゼ阻害剤。
- [2] 前記プロテアーゼが、メインプロテアーゼ又はパピン様プロテアーゼである、項目1に記載のプロテアーゼ阻害剤。
- [3] 前記コロナウイルスが、SARS-CoV2である、項目1に記載のプロテアーゼ阻害剤。
- [4-1] セレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその医薬として許容される塩を含む、コロナウイルス感染症の治療又は予防用の組成物。
- [4-2] コロナウイルス感染症の治療又は予防において使用するためのセレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその医薬として許容される塩。
- [4-3] コロナウイルスによる感染の治療又は予防を必要とする対象における、コロナウイルス感染症を治療又は予防するための方法であって、前記対象に対して、セレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその医薬として許容される塩を投与することを含む、前記方法。
- [4-4] コロナウイルスの治療薬又は予防薬の製造のための、セレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその医薬として許容される塩の使用。
- [5] 前記コロナウイルス感染症が、COVID19である、項目[4-1]～[4-4]のいずれか一項に記載の発明。
- [0008] [6] パピンに対しての阻害活性を指標とした、コロナウイルス感染症の治療又は予防薬のスクリーニング方法。

[7] 前記コロナウイルス感染症が、COVID19である、項目6に記載の方法。

[8] 前記治療薬又は予防薬が、コロナウイルスのメインプロテアーゼ又はパパイン様プロテアーゼを阻害する、項目6又は7に記載の方法。

発明の効果

[0009] セレノネインは、エブセレンよりも高いM^{pro}阻害活性を発揮する。また、セレノネインは、他の含セレン化合物に比較して、高いM^{pro}阻害活性を発揮する。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、M^{pro}の活性中心にエブセレンが作用することを、三次元モデルで示した図である。エブセレンが互変異化して現れたセレノール基が、システイン145と共有結合する。

[図2]図2は、システインプロテアーゼである(1)M^{pro}の配列および活性中心の立体構造と、(2)パパインの配列および活性中心の立体構造との比較を示す。

[図3]図3は、システインプロテアーゼである(1)PL^{pro}の配列および活性中心の立体構造と、(2)パパインの配列および活性中心の立体構造との比較を示す。

[図4]図4は、エブセレン又はセレノネインの存在下又は非存在下における、パパイン酵素活性を示す。パパイン酵素活性により、蛍光基質が分解することで時間経過とともに蛍光強度が高くなる。

[図5]図5は、パパイン酵素活性に対するエブセレン又はセレノネインの阻害曲線を示す。

[図6]図6は、M^{pro}の遺伝子を搭載したプラスミドの模式図を示す。

[図7]図7は、大腸菌により発現され、Hisタグで精製されたM^{pro}をSDS-PAGEに供した結果を示す。33.8kDaのバンドがM^{pro}のバンドに相当する。

[図8]図8は、エブセレン、エルゴチオネイン又はセレノネインの存在下又は

非存在下におけるM^{pro}のプロテアーゼ活性を示す。M^{pro}により、蛍光基質が分解することで時間経過とともに蛍光強度が高くなる。

[図9]図9は、エブセレン、エルゴチオネイン又はセレノネインによる、M^{pro}のプロテアーゼ活性の阻害曲線を示す。

[図10]図10は、M^{pro}に対する、試験化合物（セレノネイン、エブセレン、セレノシスチン（(SeCys)₂）、メチルセレノシステイン（MeSeCys）、セレノメチオニン（SeMet）、ジフェニルジセレニド（PhSeSePh）、亜セレン酸ナトリウム（selenite））による阻害活性を示す。

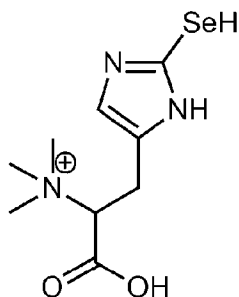
発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明の実施の形態（以下、「本実施形態」という。）について詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲で様々な変更が可能である。

[0012] 本発明は、セレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその医薬として許容される塩を含む、コロナウイルスのプロテアーゼ阻害剤或いはコロナウイルス感染症の治療又は予防用組成物に関する。

[0013] 本発明において、セレノネインは、以下の化学名：2-セレニル-N_α,N_α,N_α-トリメチル-L-ヒスチジン (2-selenyl-N_α,N_α,N_α-trimethyl-L-histidine)の化合物である。具体的に、以下の式(1)：

[化1]

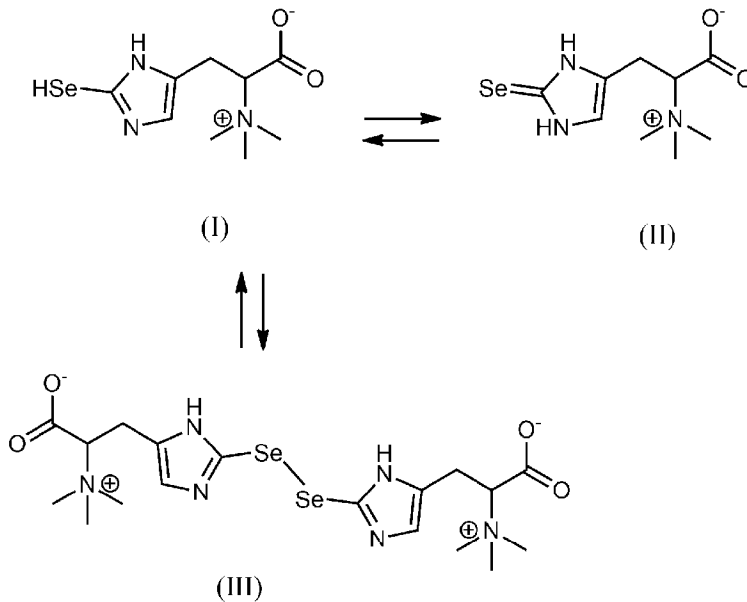


(I)

で表される化合物を指す。分子中のOH基、NH基などは水素原子の無い状態、すなわち、イオン化した状態にあってもよい。この化合物は、任意の光

学異性体、幾何異性体、互変異性体、又は二量体、或いはこれらの混合物として存在していてもよい。互変異性化及び二量化の結果、セレノネインは、下記の式 (I) ~ (III) の任意の形態をとってもよい：

[化2]



本発明において、セレノネインは、式 (I) ~ (III) の形態の化合物を任意の割合で含有してもよい。二量化された化合物は、周囲環境により、単量体へと還元されうる。また、単量体を維持するために、式 (I) 又は (II) で表される化合物を含む組成物は、さらに還元剤を含みうる。このような還元剤としては、任意の還元剤を使用しうるが、一例としてグルタチオン (GSH)、ジチオトレイトール (DTT)、メルカプトエタノールを使用しうる。セレノネインは、マグロ類、カジキ類、サバ類などの血合いに多く含まれる成分であり、日常的に摂取されている成分である。

[0014] セレノネインは、当業者であれば適宜製造することができる。セレノネインの製造方法としては、化学合成方法 (Angew. Chem. Int. Ed. 2019, 58, 1 - 6) により製造することもできるし、セレノネインを含有する生物組織からの抽出や、微生物による発酵により製造することができる。例えば、特許第5669056号公報に記載されているようにイカ類、魚類、鳥類、哺乳

類などの組織から抽出する方法；Pluskal Tらの文献(Pluskal T et al., PLoS One 2014 May 14;9(5):e97774)に記載されている、エルゴチオネイン生合成系に関する遺伝子を導入した分裂酵母であるシゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) を利用する方法；国際公開第2017/026173号に記載されている、ヒスチジン及びセレン化合物を、セレノネイン合成酵素をコードする遺伝子を過剰発現するアスペルギルス・ソーヤ (Aspergillus sojae)、アスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などのアスペルギルス属微生物や大腸菌 (Escherichia coli) などの形質転換体を利用する方法などが挙げられる。このうち、セレノネインを工業的規模で生産する場合には、セレノネインを高収量で生産する観点で国際公開第2017/026173号に記載の方法が好ましい。

[0015] なお、国際公開第2017/026173号パンフレットに記載のセレノネイン合成酵素を過剰発現する形質転換体を用いる方法では、セレノネインとともに、エルゴチオネインが同時的に生成し、これらを分離することは困難であることから、得られるセレノネインを含有する形質転換体抽出物は、セレノネインに加えて、エルゴチオネインを含有し得る。入手可能であれば、セレノネインは、精製したセレノネインであることが好ましい。セレノネインは、HPLCなどの当業者に公知の手法により精製することができる。

[0016] コロナウイルスのプロテアーゼは、好ましくはSARS-CoV2のプロテアーゼに関する。コロナウイルスのプロテアーゼとしては、メインプロテアーゼ (M^{pro}) と、パパイン様プロテアーゼ (PL^{pro}) が挙げられる。創薬ターゲットである観点から、SARS-CoV2のメインプロテアーゼ (M^{pro}) が好ましい。

[0017] メインプロテアーゼは、3Cl^{pro}、非構造タンパク質5 (nsp5) とも呼ばれ、ポリタンパク質を分解する主なプロテアーゼに関する。メインプロテアーゼは、システインプロテアーゼであり、同じサブユニットから構

成される二量体として機能する。SARS-CoV2のメインプロテアーゼは、306残基からなるアミノ酸配列（配列番号1）を有する。かかる配列のCys145と、His41から形成される活性中心が知られており、エブセレンのセレノール基が、Cys145のチオール基に対して共有結合すると考えられている（図1）。セレンを含有する化合物であるセレノニンもセレノール基を有することから、M^{pro}の活性中心のCys145に共有結合し、M^{pro}阻害活性を有しうる。

[0018] パパイン様プロテアーゼは、非構造タンパク質3（nsp3）のプロテアーゼに関し、ポリタンパク質を分解するシステインプロテアーゼである。SARS-CoV2のパパイン様プロテアーゼは、317残基からなるアミノ酸配列（配列番号3）を有する。パパイン様プロテアーゼの活性中心にかかるcatalytic triad構造は、Asp286-His272-Cys111である。

[0019] パパインは、パパイヤが含むシステインプロテアーゼの一種であり、345残基からなるアミノ酸配列（配列番号2）を有する。システインプロテアーゼは、酵素の触媒領域にシステインを含むタンパク質分解酵素をいう。通常、触媒領域のシステインの近傍に存在するヒスチジンにより、システインのチオールが脱プロトン化され、陰イオンになったチオール基が、基質ペプチド又はタンパク質のカルボニル炭素を攻撃し、ペプチド結合を加水分解する。したがって、触媒領域のシステインのチオール基に、プロテアーゼ阻害剤が共有結合することで、システインプロテアーゼの酵素活性が抑制される。

[0020] パパインと、メインプロテアーゼ又はパパイン様プロテアーゼはともにシステインプロテアーゼであり、活性中心に共通したアミノ酸残基が特徴的なcatalytic triad、もしくはcatalytic dyadを形成している。Catalytic triadとは、いくつかの酵素の活性部位にみられる3つの配位アミノ酸をいう。酵素の種類により、構成する配位アミノ酸は異なる。システインプロテアーゼのCatalytic

t r i a dは、システインと、ヒスチジンと、3つ目のアミノ酸としてアスパラギン又はアスパラギン酸とにより構成される。このうち、システインと、システインのチオール脱プロトン化に寄与するヒスチジンは必須の構成であるが、パパインなどでみられるアスパラギンは活性への影響が少なく、その場合にはシステインとヒスチジンとからなるC a t a l y t i c d y a dとも呼ばれる。したがって、パパインに対しての阻害活性を有する物質を選択することで、メインプロテアーゼ又はパパイン様プロテアーゼの阻害剤としてスクリーニングすることができる。本発明の別の態様として、パパインに対しての阻害活性を指標とした、メインプロテアーゼ又はパパイン様プロテアーゼの阻害剤又はコロナウイルス治療又は予防薬のスクリーニング方法に関する。かかるスクリーニング方法は、具体的に、候補薬剤と、パパイン分解性の蛍光基質と、パパインを含む溶液を調製し、前記溶液の蛍光強度を測定することを含む。経時的な蛍光強度を測定してもよいし、候補薬剤の濃度を変化させた際の蛍光強度変化を測定することで、候補薬剤のパパイン阻害曲線を得てもよい。c a t a l y t i c t r i a d構造又はc a t a l y t i c d y a d構造に共通点を有する観点から、パパインの阻害活性を示すセレノネインは、メインプロテアーゼ又はパパイン様プロテアーゼの阻害活性を有しうる。

[0021] 本発明のプロテアーゼ阻害剤は、コロナウイルスから生成するポリタンパク質の分解を抑制することで、コロナウイルスの増殖を抑制することができる。それにより治療薬及び予防薬として使用することができる。また、本発明のプロテアーゼ阻害剤は、食品又は食品組成物に含まれてもよい。

[0022] 本発明の組成物は、治療有効量のセレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその医薬として許容される塩を含む。さらに、医薬として許容される担体または賦形剤を含んでいてもよい。したがって、本発明の組成物は、医薬組成物ということもできる。本発明のプロテアーゼ阻害剤及び組成物は、治療又は予防を必要としている患者に投与される。

[0023] 本発明の別の態様は、セレノネイン又はその又はその互変異性体若しくは

二量体或いはその医薬として許容される塩、本発明に係るプロテアーゼ阻害剤、或いは治療又は予防用医薬組成物を、治療又は予防を必要とする対象に投与することを含む。経口投与又は非経口投与のいずれで投与されてもよい。非経口投与としては、一例として腹腔内投与、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、経鼻投与、口腔内投与、経肺投与、局所投与が挙げられる。投与量／回数は、症状に応じて適宜選択することができる。

[0024] 本明細書で使用する「薬剤として許容される賦形剤」には、いかなる担体、希釈剤、補助剤、または媒体、保存料もしくは酸化防止剤、充填剤、崩壊剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、殺カビ剤、等圧剤および吸収遅延剤なども含まれる。これらの賦形剤の有効成分に対する使用は、本技術分野において周知である。従来の賦形剤が、セレノネインと共存し得ない場合を除き、本発明の組成物に賦形剤を使用することができる。補助的な有効成分も、適当な治療用の組合せとして組成物中に組み込むことができる。

[0025] 治療又は予防を必要とする対象としては、コロナウイルスへの暴露の可能性のある対象が挙げられる。

[0026] 「治療有効量」は、投与された場合に発病に関与する活性なプロテアーゼを阻害可能な量であり、また投与された場合にCOVID-19の発症又は憎悪を予防または治療するのに有効な、本発明による化合物／薬剤の量を意味する。治療有効量は、動物実験やヒトに対する臨床試験を通じて決定することができる。一方、本発明の有効成分であるセレノネインは、魚食により摂取されており、例えば一日当たり1.7mgまでの投与であれば、安全性上問題なく使用することができ、かかる量を考慮に入れて治療有効量を決定することもできる。一例として、セレノネインは28 μ g/kgで投与することができるが、これらの量に限定されることを意図するものではない。

[0027] 本発明の組成物は、任意の剤形で提供することができ、錠剤、カプセル剤、粉末、点鼻剤、またはエアロゾルの形態、注射液、点滴、軟膏、クリーム、スプレー、経皮パッチの形態に剤形されうる。

[0028] 本発明の別の態様では、セレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその食品として許容される塩を含む、食品組成物に関していてもよい。このような食品組成物としては、コロナウイルス、特にSARS-CoV-2に対する予防や抵抗性といった機能、又はコロナウイルスのプロテアーゼ、特にメインプロテアーゼを阻害するという機能を表示した機能性表示食品、栄養機能食品、又は特定保健用食品であってもよい。食品組成物、機能性表示食品、栄養機能食品、又は特定保健用食品は、一例として、1~1000 ppm、好ましくは10~100、最も好ましくは30~70 ppm程度のセレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその食品として許容される塩を含む、飲料品、食品、サプリメントであってもよい。セレノネインは、魚類に多く含まれていることが知られている。例えば、クロマグロ中のセレノネイン含量を30 mg Se/kgとし、魚肉を100 g摂食し、体重60 kgのヒト体内で均一に分布したと仮定した場合、理論上、体内のセレノネイン含量は約1 μM、血中濃度で約8 μMとなることが推定できる。

セレノネインが含まれる魚類としては、マグロ類、カジキ類、サバ類、ブリ類、タイ類、フグ類、サケ・マス類、ヒラメ・カレイ類が挙げられ、特にマグロ類、カジキ類、サバ類、ブリ類に多く含まれる。食品組成物、機能性表示食品、栄養機能食品、又は特定保健用食品として、これらの魚類の生食可食部、又は魚類を原料とする加工食品が挙げられる。これらの魚類は天然物又は養殖物であってもよい。魚類中のセレノネイン含量は、餌の種類によって変動するため、より好ましくは、セレノネイン含量が増加された養殖魚が好ましい。魚類を原料とする加工食品としては、缶詰、瓶詰、佃煮、乾燥魚、干物、練り物、漬け魚、サプリメントなど、魚を原料とする任意の食品が挙げられる。

[0029] 食品組成物、機能性表示食品、栄養機能食品、又は特定保健用食品に使用するマグロ類としては、マグロ族及びハガツオ族を挙げることができる。マグロ族としては、マグロ属、ソウダガツオ属、スマ属、カツオ属等を挙げる

ことができ、ハガツオ族としては、イソマグロ属、ハガツオ属等を挙げる
ことができる。マグロ類としては、例えば、マグロ属のビンナガ、クロマグロ
、ミナミマグロ、タイセイヨウマグロ、タイセイヨウクロマグロ、キハダ、
メバチ、コシナガ等、カツオ属のカツオ、ソウダガツオ属のヒラソウダ及び
マルソウダ、スマ属のスマ等、ハガツオ属のハガツオを挙げる
ことができ、あるいは、ビンナガ、クロマグロ、ミナミマグロ、タイセイヨウ
マグロ、タイセイヨウクロマグロ、キハダ、メバチ、コシナガ、ハガツオ
又はスマを挙げる
ことができる。好ましくは、ビンナガ、クロマグロ、タイセイヨウ
マグロ、タイセイヨウクロマグロ、キハダ、メバチ、コシナガ、ハガツオ
又はスマを挙げる
ことができる。

[0030] 本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書
に取り込まれる。

[0031] 以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範
囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載に
よってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発
明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことが
できる。

実施例

[0032] 実施例 1 : パパイン活性の阻害活性

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のパパイン (販売元: シグマアルドリッチジャパン) と、
5 μM のエブセレン又はセレノネインを、37°C に保った 50 mM の Tris-HCl (pH 7.4) に溶解し、
プレインキュベーションを 15 分間行
った後に、同反応液に 10 μM の Bz-Arg-MCA を添加し、蛍光光度
計で Bz-Arg-MCA の切断に伴う蛍光強度変化を時間を追って観察し
た。結果を図 4 に示す。

[0033] 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のパパイン (販売元: シグマアルドリッチジャパン) と、
0 から 125 μM のエブセレン又は 0 から 5 μM のセレノネインを、37°C
に保った 50 mM の Tris-HCl (pH 7.4) に溶解し、プレインキ

ユベーションを15分間行った後に、同反応液に10 μ MのBz-Arg-MCAを添加し、蛍光光度計でBz-Arg-MCAの切断に伴う蛍光強度変化を測定して阻害活性を調べた。結果を図5に示す。図5の結果から、パパインに対するセレノネインの阻害活性 ($IC_{50}=0.25 \mu$ M)、及びエブセレンの阻害活性 ($IC_{50}=5.0 \mu$ M) を求めた。

[0034] 実施例2：SARS-CoV2のM^{pro}の調製

遺伝子全合成により、NC_45512の塩基配列(10055-10972：配列番号4)に従ってM^{pro}のDNAを合成した。M^{pro}をGSTおよびヒスチジントグ付きのプラスミドに導入し(図6)、大腸菌BL21(DE3)株にトランスフォーメーションした。大腸菌BL21(DE3)株を、37°Cで培養し、M^{pro}タンパク質を発現させた。細胞体を回収し、ヒスチジントグに対する結合剤を用いて、M^{pro}タンパク質を精製した。M^{pro}の自己消化とヒトライノウイルス3Cプロテアーゼ(HRV)によってGSTとヒスチジントグを除去し、ヒスチジントグに対する結合剤を用いて、未消化のM^{pro}とHRVを除去し、M^{pro}タンパク質の精製標品を得た。精製したM^{pro}タンパク質を、20mM Tris-HCl、100mM NaCl、0.01% Triton-X-100、50%グリセロール、1mM EDTA、1mM DTTの貯蔵緩衝液に溶解し、SDS-PAGEに供し、クマシーブリリアントブルーにより染色した(図7)。DTTを含有する貯蔵緩衝液に溶解した精製M^{pro}タンパク質を、微量透析カートリッジXpress Micro/Mini Dialyzer(販売元：フナコシ株式会社)を用いて透析することでDTTを除去し、実施例4の阻害活性試験に供した。

[0035] 実施例3：SARS-CoV2のPL^{pro}の調製

遺伝子全合成により、配列番号NC_45512の塩基配列(4955-5908：配列番号5)に従ってPL^{pro}のDNAを合成する。PL^{pro}をヒスチジントグ付きのプラスミドに導入し、大腸菌BL21(DE3)株にトランスフォーメーションする。大腸菌BL21(DE3)株を培養し、PL^{pro}タンパク質を発現させる。細胞体を回収し、ヒスチジントグに対する結合剤を用いて、

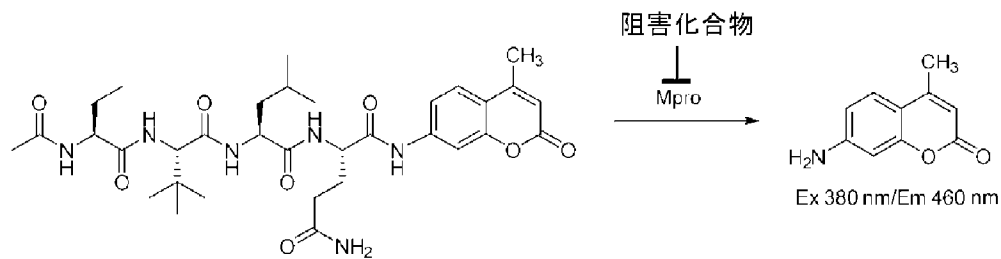
PLproタンパク質を精製する。PLproの自己消化とHRVによってGSTとヒスチジntagを除去し、ヒスチジntagに対する結合剤を用いて、未消化のPLproとHRVを除去し、PLproタンパク質の精製標品を得る。

[0036] 実施例4：SARS-CoV2のM^{pro}に対する阻害活性

2 μg/mlのM^{pro}と、5 μMのエブセレン、セレノネイン、又はエルゴチオネインをそれぞれ、37℃に保った50 mMのTris-HCl (pH 7.4) に溶解し、プレインキュベーションを5分間行った後に、同反応液に10 μMのAc-Abu-Tle-Leu-Gln-MCAを添加し、蛍光光度計でAc-Abu-Tle-Leu-Gln-MCAの切断に伴う蛍光強度変化を測定して阻害活性を調べた(図8)。対照として、阻害化合物未添加の点でのみ異なる条件で蛍光強度変化を測定した。

Ac-Abu-Tle-Leu-Gln-MCAは、M^{pro}により分解され下記の通り、蛍光物質を生成し、M^{pro}阻害化合物の作用により蛍光物質の生成が抑制される。

[化3]



Scheme 1. Ac-Abu-Tle-Leu-Gln-MCAのM^{pro}による切断.

エブセレン及びエルゴチオネインを添加した場合の蛍光強度変化は、未添加対照と同等であった。一方、セレノネインを添加した場合、未添加対照と比較して蛍光強度が低く抑えられており、セレノネインが、M^{pro}の活性を阻害していることが示された。

[0037] 2 μg/mlのM^{pro}と、0~25 μMのエブセレン、0~25 μMのエルゴチオネイン又は0~5 μMのセレノネインを、それぞれ、37℃に保った5

0 mMのTris-HCl (pH 7.4) に溶解し、プレインキュベーションを5分間行った後に、同反応液に10 μ MのAc-Abu-Tle-Leu-Gln-MCAを添加し、蛍光光度計でAc-Abu-Tle-Leu-Gln-MCAの切断に伴う蛍光強度変化を測定して蛍光強度を測定し、阻害曲線を求めた(図8)。回帰曲線から、IC₅₀値を算出したところ、下記の表の通りであった:

[表1]

表1. 回帰曲線から算出された各化合物のIC₅₀値

化合物	IC ₅₀ 値 (μ M)
セレノネイン	0.54
エブセレン	5.92
エルゴチオネイン	n. d.

n. d.: not determined

[0038] 実施例5: SARS-CoV2のM^{pro}に対する阻害活性

2 μ g/mlのM^{pro}と、1 μ Mの試験化合物をそれぞれ、37°Cに保った50 mMのTris-HCl (pH 7.4) に溶解し、プレインキュベーションを5分間行った後に、同反応液に10 μ MのAc-Abu-Tle-Leu-Gln-MCAを添加し、蛍光光度計でAc-Abu-Tle-Leu-Gln-MCAの切断に伴う蛍光強度を測定して、阻害活性を測定した(図10)。試験化合物としては、セレノネイン、エブセレン、セレノシスチン((SeCys)₂)、メチルセレノシステイン(MeSeCys)、セレノメチオニン(SeMet)、ジフェニルジセレニド(PhSeSePh)、亜セレン酸ナトリウム(sodium selenite)を用いた。亜セレン酸ナトリウムを除くこれらの含セリン化合物は、インシリコの試験において、M^{pro}阻害活性を有すると予測された化合物である(非特許文献4)。試験化合物未添加の蛍光強度を100とした場合の、試験化合物添加1分後の蛍光強度を測定したところ、セレノネインは約20%であった一方、エブセレン、セレノシスチン((SeCys)₂)、メチルセレノシステイン(MeSeCys)、セレノメチオニン(SeMet)、ジフェニルジセレニド(PhSeSePh)、亜セレン酸ナトリウム(selenite)はいずれも90%超であった。したがって、セレノネインが、他の含セレン化合物と比較し

て、特にM^{pro}阻害活性の点で顕著に優れていることが示された。

[0039] 実施例6：SARS-CoV2に対する増殖阻害活性

エブセレン又はセレノネインによるSARS-CoV2の宿主細胞への感染阻害は、例えば、プラークアッセイ法によって測定することができる。宿主細胞を37℃、5%CO₂のインキュベーターでコンフルエントになるまで単層培養する。次に培地を除去し、PBS(-)にて細胞表面を洗浄した後、ウイルス溶液と、0から100μMのプロテアーゼ阻害剤溶液を添加し30分間インキュベーションを行う。30分後に検体溶液を除去し、寒天培地を重層する。寒天が固まったらプレートを反転し37℃、5%CO₂のインキュベーターで2日間インキュベートする。その後重層培地を外し、プレートを乾燥させ、クリスタルバイオレット染色液にて5分間染色を行った後、精製水で洗浄し風乾させる。最後にプラークの数をカウントし、対照群と比較し、ウイルスに対するプロテアーゼ阻害剤の感染阻害率を計算する。

請求の範囲

- [請求項1] セレノネイン、又はその互変異性体若しくは二量体、或いはその医薬として許容される塩を含む、コロナウイルスのプロテアーゼ阻害剤。
- [請求項2] 前記プロテアーゼが、メインプロテアーゼ又はパピイン様プロテアーゼである、請求項1に記載のプロテアーゼ阻害剤。
- [請求項3] 前記コロナウイルスが、SARS-CoV2である、請求項1又は2に記載のプロテアーゼ阻害剤。
- [請求項4] セレノネイン又はその互変異性体若しくは二量体或いはその医薬として許容される塩を含む、コロナウイルス感染症の治療又は予防用の組成物。
- [請求項5] 前記コロナウイルス感染症が、COVID19である、請求項4に記載の組成物。
- [請求項6] 請求項1～3のいずれか一項に記載のプロテアーゼ阻害剤を含む、コロナウイルス感染症の治療又は予防用の組成物。
- [請求項7] パピインに対しての阻害活性を指標とした、コロナウイルス感染症の治療又は予防薬のスクリーニング方法。
- [請求項8] 前記コロナウイルス感染症が、COVID19である、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記治療薬又は予防薬が、コロナウイルスのメインプロテアーゼを阻害する、請求項7又は8に記載の方法。

[図1]

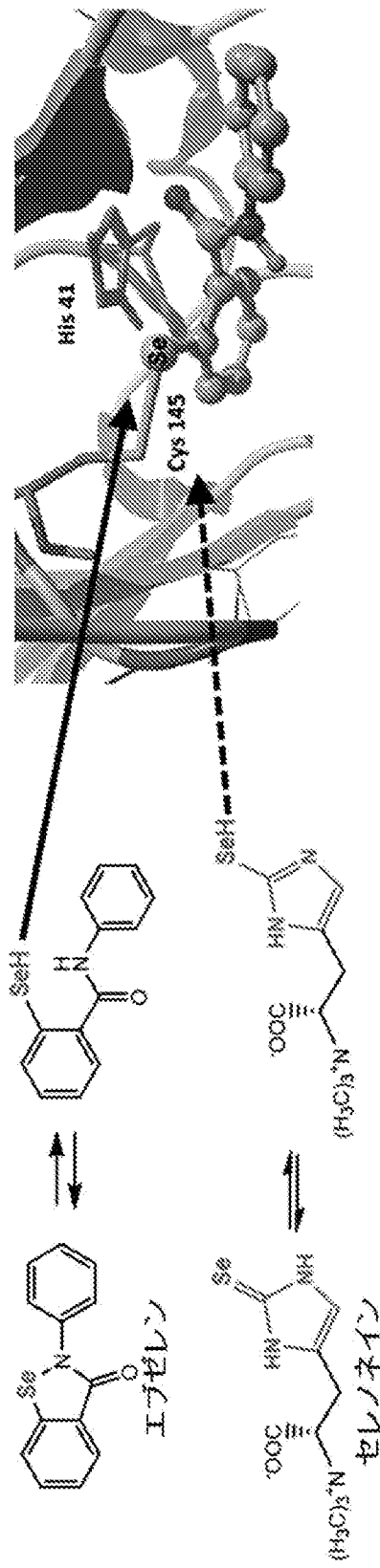


図1

[図2]

図2 (1)

Mpro の配列 :

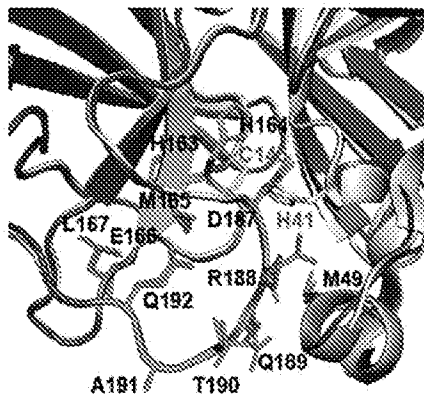
```

1 sgfrkmafps gkvegcmvqv tegtltlngl wlddvvcpr hvictsedml npryedllir
61 ksnhnflvga gnvqlrvigh smqncvklkl vdtanpktpk ykfvriqpgg tfsvlac yng
121 spsgvyqcam rpnftikgsf lngsgsvgf nidydcvsfc ymhhmelptg vhagtdlegn
181 fygpfvdrrt aqaagtdtti tvnvlawlya avingdrwfl nrftttlndf nlvamkyoye
241 pltqdhvdil gplsagtgia vldmcaslke llqngmngrt ilgsallede ftpfdvvrqc
301 sgvtfq

```

(配列番号 1)

Mpro の活性中心の立体構造 :



(2)

Papain の配列 :

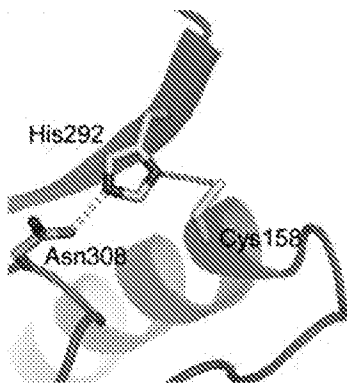
```

1 mamipsiskl lfvaiclvy mglsfgdlsi vgyqndlts terliqlfes wmlkhnkiyk
61 nidekiyrfe ifkdnlkyid etnknnsyw lglvfvadms ndefkeytg siagnyttte
121 lsyeevlndg dvnipeyv dw rkgavtpvk nqgscgswa fsavvtiegi ikirtgnlne
181 yseqelldcd rrsygcnggy pwsalqlvaq ygihyrntyp yegvqrycrs rekgpyaakt
241 dgvrqvqypn egallysian qpvsvvleaa gkdfqlrygg ifvgpcgnkv dhavaavgyg
301 pnyiliknsw gtgwgengyi rikrgtgnsy gvcglytssf ypvkn

```

(配列番号 2)

Papain の活性中心の立体構造 :



[図3]

図3

(1)

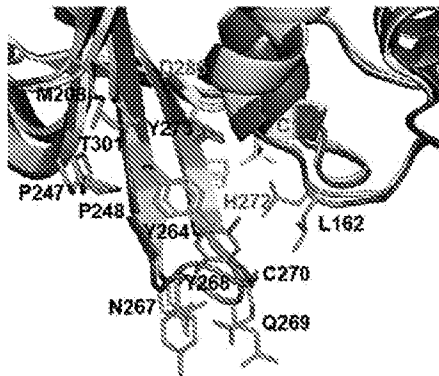
PLpro の配列

```

1 evrtikvftt vdninlhtqv vdmsmtyggq fgptyldgad vtkikphnsh egktfyvlpn
61 ddtlrveafe yyhttdpsfl grymsalnht kkwkypqvnq ltsikwadnn eylataltl
121 qqielkfnpp alqdayyrrar ageaanfcal ilaycnktvg elgdvretms ylfghanlds
181 ckrvlrvvck tcgqqqttlk gveavmymgt lsyeqfkkqv qipctcgkqa tkylvqqesp
241 fvmsappaq yelkhgtftc aseytgnyqc ghykhitske tlycidgall tksseykspi
301 tdfvykensy ttikaa (配列番号3)

```

PLpro の活性中心の立体構造



(2)

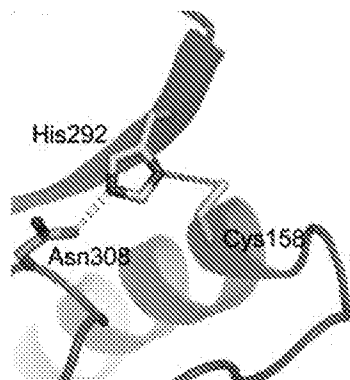
Papain の配列

```

1 mamipsiski lfvaiclfvy mqlsfqdfsi vgyqndlts terliqlfes wmlkhnkiyk
61 nidekiyrfe ifkdnlkyid etnkknsyw lglnvfadms ndefkekytg siagnyttte
121 lsyeevlndg dvnipeyvdw rkgavtpvk nqgscgswa fsavvtiegi ikirtgnlne
181 yseqelldcd rrsyggnggy pwsalqlvaq ygihyrntyp yegvqrycrs rekqpyaakt
241 dgvrqvqypn egallysian qpsvsvleaa gkdfqlyrgg ifvgpcgnkv dhavaavgyg
301 pnyilikasw gtgwengyi rikrgtgnsy gvoglytsef ypvkn (配列番号2)

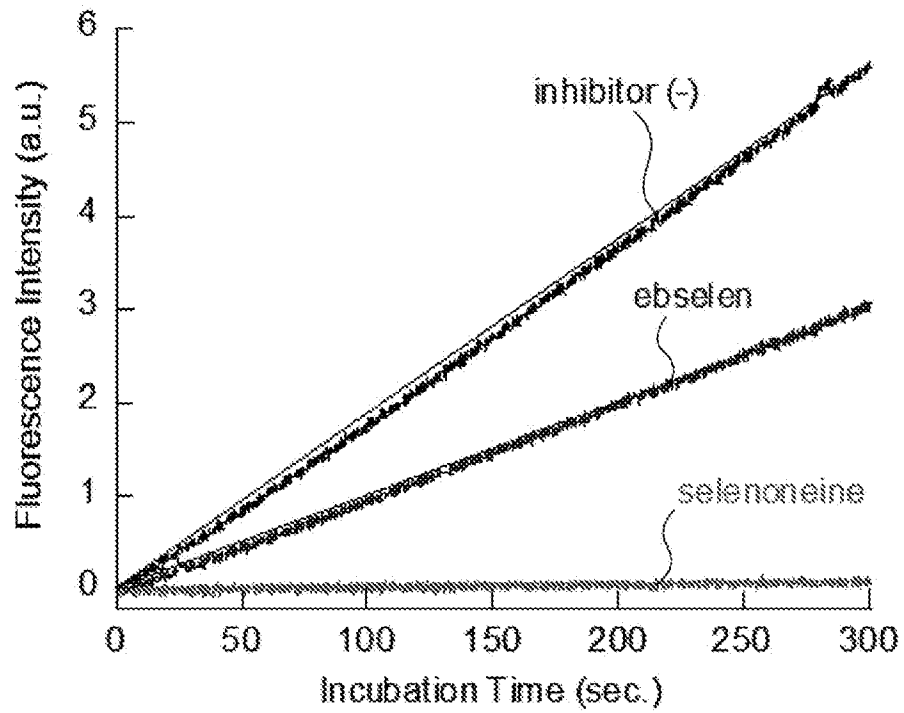
```

Papain の活性中心の立体構造



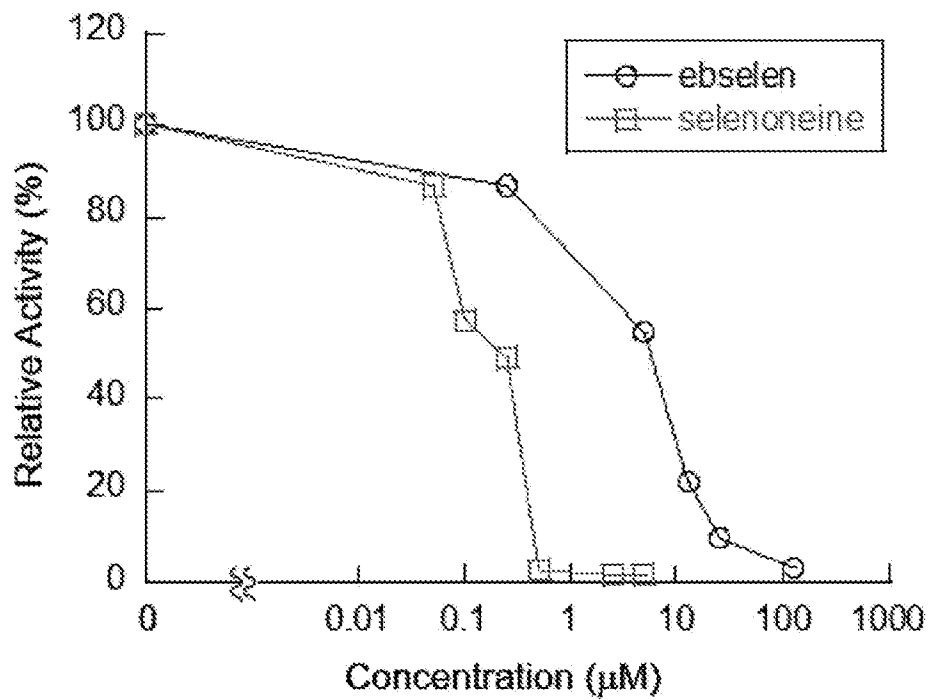
[図4]

図4



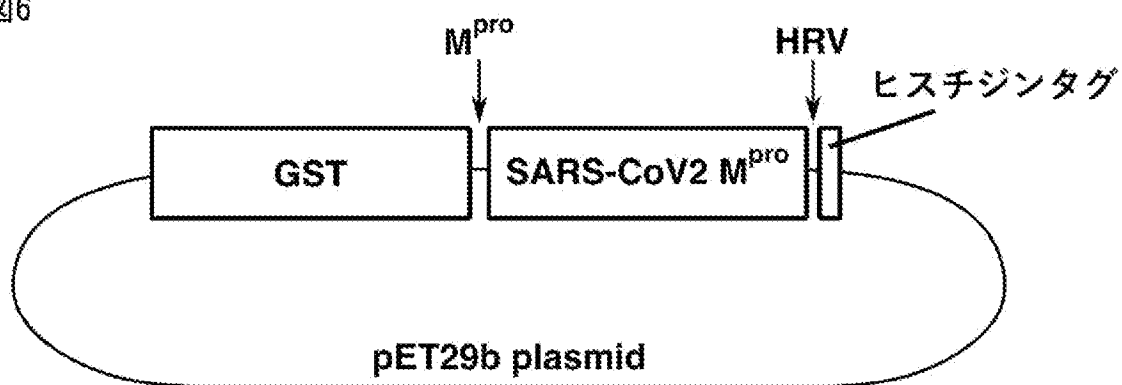
[図5]

図5



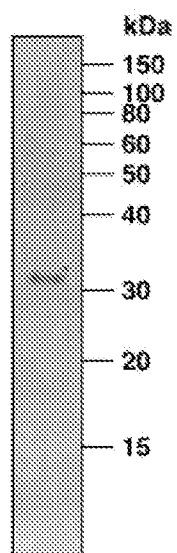
[図6]

図6



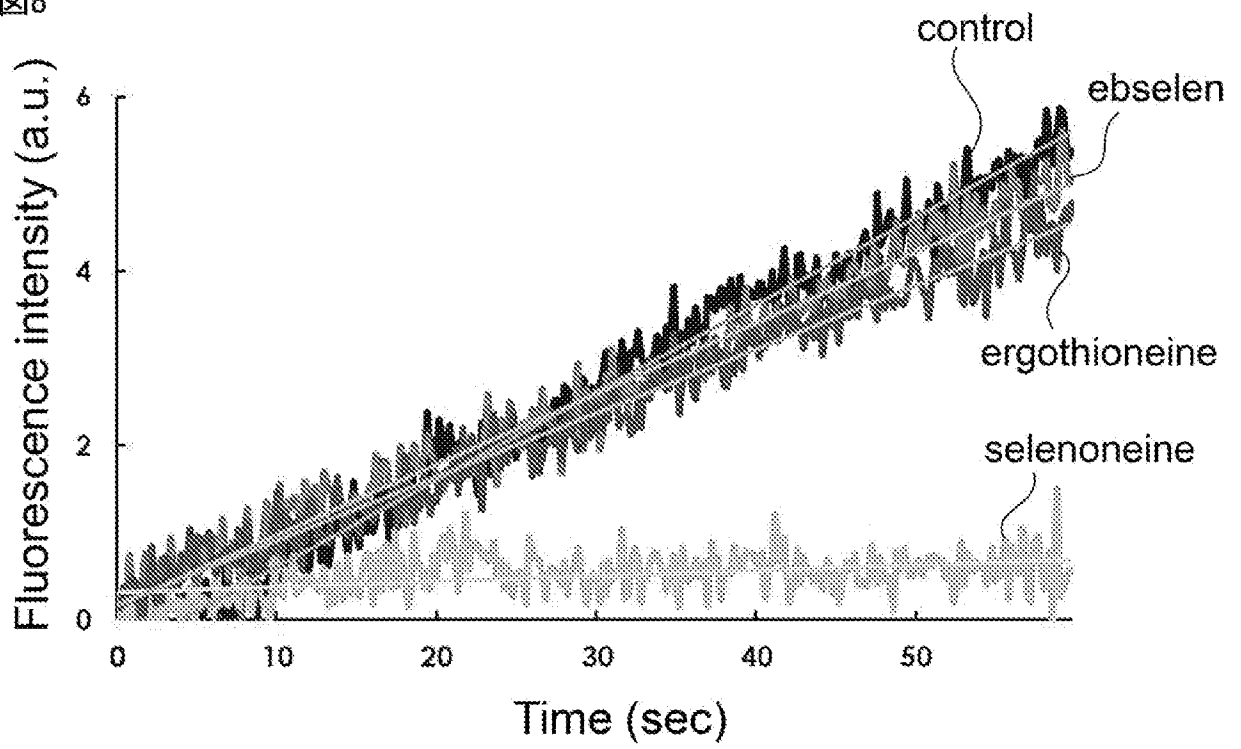
[図7]

図7



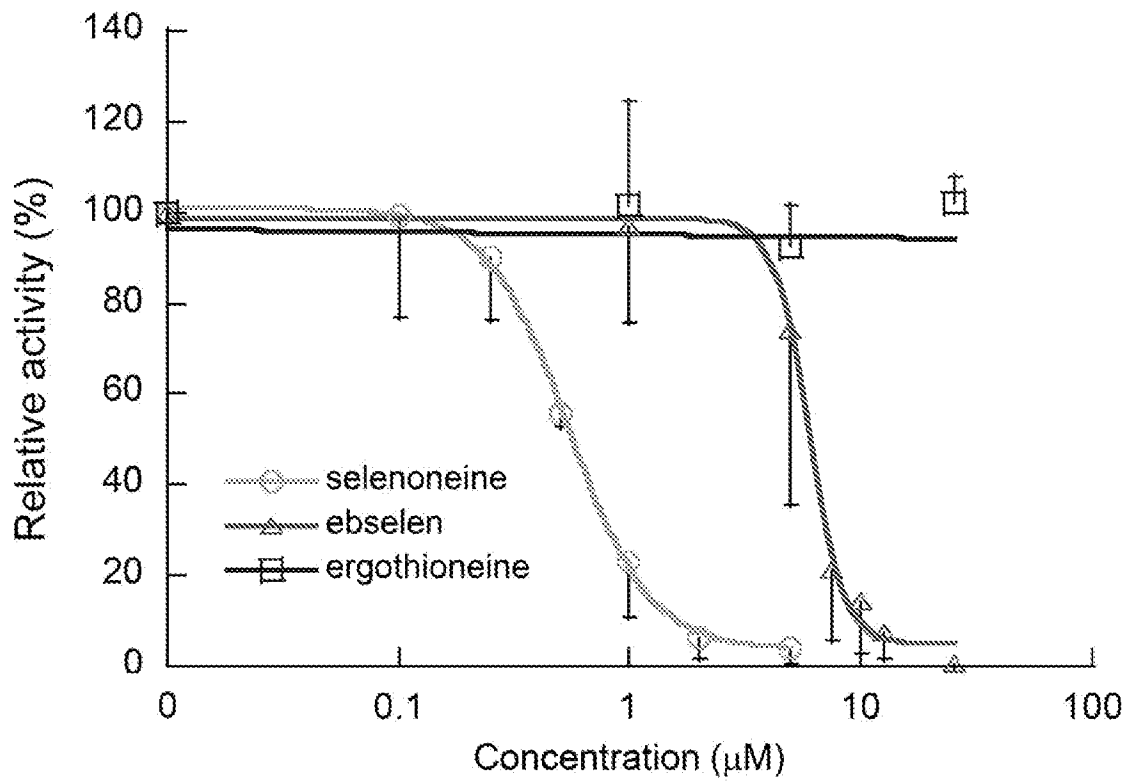
[Fig. 8]

Fig. 8



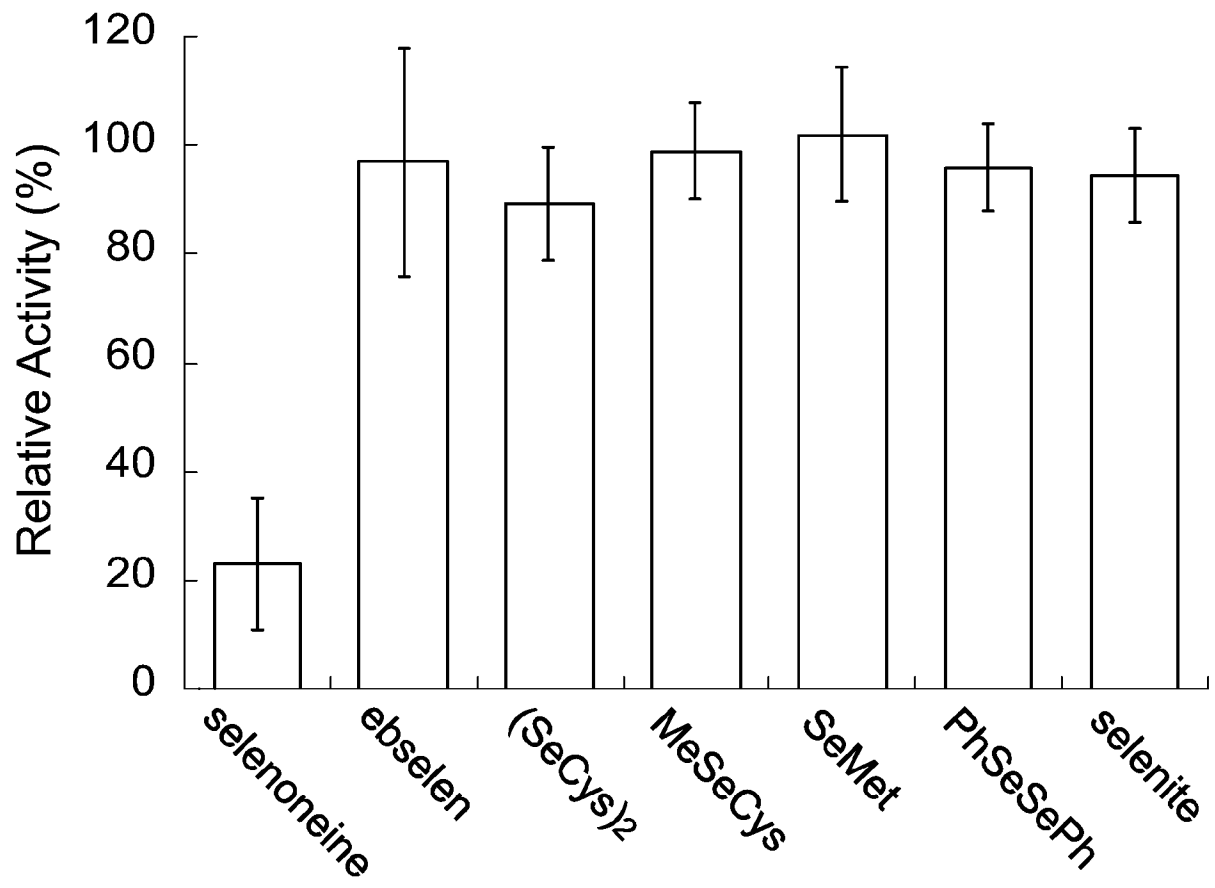
[Fig. 9]

Fig. 9



[図10]

図10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/007397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 31/4172(2006.01)i; A61K 33/04(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 9/99(2006.01)i; C12Q 1/37(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)n; C12N 9/50(2006.01)n FI: A61K31/4172 ZNA; A61K33/04; A61P31/14; A61P43/00 111; C12N9/99; C12Q1/37; A23L33/10; C12N9/50</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K31/4172; A61K33/04; A61P31/14; A61P43/00; C12N9/99; C12Q1/37; A23L33/10; C12N9/50		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SINGH, B. G. et al. In silico investigation on the binding of organoselenium compounds with target proteins of SARS-CoV-2 infection cycle. ChemRxiv. 02 July 2020, [retrieved on 30 April 2021], Retrieved from Internet, doi:10.26434/chemrxiv.12594134 tables 1, 2	1-9
A	山下倫明, 魚類に豊富に含まれる「セレン」新型コロナウイルスにも有効, 養殖ビジネス, 01 October 2020, vol. 57, no. 10, pp. 62-67 in particular, pp. 66-67, (YAMASHITA, Michiaki, Aqua culture business), non-official translation ("Selenium", which is abundant in fish, is also effective against new coronavirus)	1-9
A	CHEN, L. R. et al. Synthesis and evaluation of isatin derivatives as effective SARS coronavirus 3CL protease inhibitors. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2005, vol. 15, pp. 3058-3062 table 2	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 08 April 2022		Date of mailing of the international search report 19 April 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/007397

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARK, J. Y. et al. Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases. <i>Bioorganic and Medicinal Chemistry</i> . vol. 20, 2012, pp. 5928-5935 table 3	1-9
.....		

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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:

(Invention 1) Claims 1-6

Claims 1-6 have the special technical feature of a “coronavirus protease inhibitor containing selenoneine, a tautomer or dimer thereof, or a pharmaceutically acceptable salt thereof,” and are thus classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 7-9

Claims 7-9 share the common technical feature relating to treatment or prevention of coronavirus infections” with claim 1 classified as invention 1. However, said technical feature does not make a contribution over the prior art, and thus cannot be said to be a special technical feature. Furthermore, there are no other same or corresponding special technical features between these inventions.

In addition, claims 7-9 are not dependent on claim 1. Furthermore, claims 7-9 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Therefore, claims 7-9 cannot be classified as invention 1.

In addition, claims 7-9 have the special technical feature of using an inhibitory activity against papain as an index in a screening method for a therapeutic or prophylactic agent for coronavirus infections, and are thus classified as invention 2.

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.

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 31/4172(2006.01)i; A61K 33/04(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 9/99(2006.01)i; C12Q 1/37(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)n; C12N 9/50(2006.01)n FI: A61K31/4172 ZNA; A61K33/04; A61P31/14; A61P43/00 111; C12N9/99; C12Q1/37; A23L33/10; C12N9/50</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K31/4172; A61K33/04; A61P31/14; A61P43/00; C12N9/99; C12Q1/37; A23L33/10; C12N9/50</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>SINGH B.G.et al., In silico investigation on the binding of organoselenium compounds with target proteins of SARS-CoV-2 infection cycle, ChemRxiv, 2020.07.02, [retrieved on 2021-04-30]. Retrieved from Internet, doi:10.26434/chemrxiv.12594134 表1、2</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>山下倫明, 魚類に豊富に含まれる「セレン」新型コロナウイルスにも有効, 養殖ビジネス, 2020.10.01, Vol.57, No.10, pp.62-67 特にpp.66-67</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CHEN L.R. et al., Synthesis and evaluation of isatin derivatives as effective SARS coronavirus 3CL protease inhibitors, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2005, Vol.15, pp.3058-3062 表2</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PARK J.Y.et al., Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases, Bioorganic and Medicinal Chemistry, Vol.20, 2012, pp.5928-5935 表3</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			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	SINGH B.G.et al., In silico investigation on the binding of organoselenium compounds with target proteins of SARS-CoV-2 infection cycle, ChemRxiv, 2020.07.02, [retrieved on 2021-04-30]. Retrieved from Internet, doi:10.26434/chemrxiv.12594134 表1、2	1-9	A	山下倫明, 魚類に豊富に含まれる「セレン」新型コロナウイルスにも有効, 養殖ビジネス, 2020.10.01, Vol.57, No.10, pp.62-67 特にpp.66-67	1-9	A	CHEN L.R. et al., Synthesis and evaluation of isatin derivatives as effective SARS coronavirus 3CL protease inhibitors, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2005, Vol.15, pp.3058-3062 表2	1-9	A	PARK J.Y.et al., Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases, Bioorganic and Medicinal Chemistry, Vol.20, 2012, pp.5928-5935 表3	1-9
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	SINGH B.G.et al., In silico investigation on the binding of organoselenium compounds with target proteins of SARS-CoV-2 infection cycle, ChemRxiv, 2020.07.02, [retrieved on 2021-04-30]. Retrieved from Internet, doi:10.26434/chemrxiv.12594134 表1、2	1-9															
A	山下倫明, 魚類に豊富に含まれる「セレン」新型コロナウイルスにも有効, 養殖ビジネス, 2020.10.01, Vol.57, No.10, pp.62-67 特にpp.66-67	1-9															
A	CHEN L.R. et al., Synthesis and evaluation of isatin derivatives as effective SARS coronavirus 3CL protease inhibitors, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2005, Vol.15, pp.3058-3062 表2	1-9															
A	PARK J.Y.et al., Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases, Bioorganic and Medicinal Chemistry, Vol.20, 2012, pp.5928-5935 表3	1-9															
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>08.04.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>19.04.2022</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>深草 亜子 4C 9548</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>																

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（発明1）請求項1-6

請求項1-6は、「セレノネイン、又はその互変異性体若しくは二量体、或いはその医薬として許容される塩を含む、コロナウイルスのプロテアーゼ阻害剤」という特別な技術的特徴を有しているため、発明1に区分する。

（発明2）請求項7-9

請求項7-9は、発明1に区分された請求項1と、「コロナウイルス感染症の治療又は予防」に関するという共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項7-9は、請求項1の従属請求項ではない。また、請求項7-9は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項7-9は発明1に区分できない。

そして、請求項7-9は、コロナウイルス感染症の治療又は予防薬のスクリーニング方法においてパインに対しての阻害活性を指標とするという特別な技術的特徴を有しているため、発明2に区分する。

- 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。
- 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。
- 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
- 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

- 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
 - 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
 - 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。