

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年7月31日(31.07.2014)



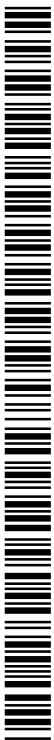
(10) 国際公開番号

WO 2014/115885 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 31/661 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
A61K 31/662 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/051748
- (22) 国際出願日: 2014年1月28日(28.01.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2013-012859 2013年1月28日(28.01.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人お茶の水女子大学 (OCHANOMIZU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1128610 東京都文京区大塚2丁目1番1号 Tokyo (JP). 学校法人 埼玉医科大学 (SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 室伏 きみ子 (MUROFUSHI Kimiko); 〒1128610 東京都文京区大塚2丁目1番1号 国立大学法人お茶の水女子大学内 Tokyo (JP). 後藤 真里 (GOTOH Mari); 〒1128610 東京都文京区大塚2丁目1番1号 国立大学法人お茶の水女子大学内 Tokyo (JP). 丸山 敬 (MARUYAMA Kei); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人 埼玉医科大学内 Saitama (JP). 吉川 圭介 (YOSHIKAWA Keisuke); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人 埼玉医科大学内 Saitama (JP). 山本 梓司 (YAMAMOTO Shinji); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人 埼玉医科大学内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (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:

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



WO 2014/115885 A1

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR DEMYELINATING DISEASE

(54) 発明の名称: 脱髄疾患治療薬

(57) Abstract: The present invention provides a novel therapeutic agent for demyelinating disease which acts to suppress the demyelination of the neuroaxis. The present invention provides a therapeutic agent for demyelinating disease, the therapeutic agent comprising a cyclic phosphatidic acid, a carbacyclic phosphatidic acid, a thiacyclic phosphatidic acid, or a salt of the same.

(57) 要約: 本発明の課題は、神経軸索の脱髄抑制作用を有する新規な脱髄疾患治療薬を提供することである。本発明によれば、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩を含有する脱髄疾患治療薬が提供される。

## 明 細 書

発明の名称： 脱髄疾患治療薬

### 技術分野

[0001] 本発明は、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸を有効成分とする脱髄疾患治療薬、並びに環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸を有効成分とする神経軸索の脱髄抑制剤に関する。

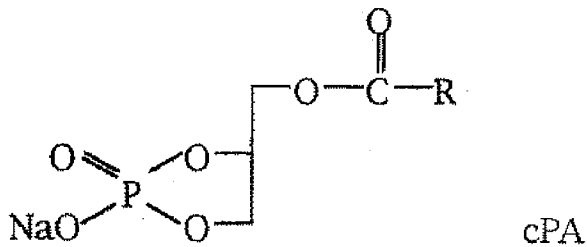
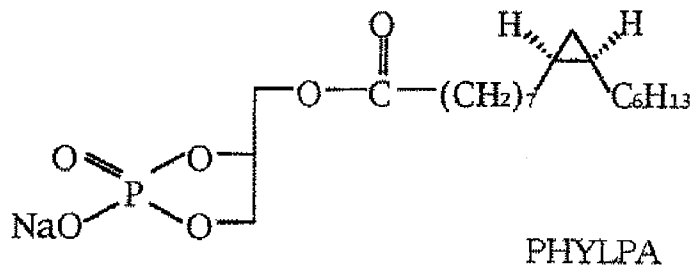
### 背景技術

[0002] 神経線維は、中心部を走る軸索とその外側をかこむ髄鞘から成り立っている。髄鞘は、大部分が脂質で構成されていて、神経の電気伝導を速める仕組みにかかわっている。脱髄疾患とは神経疾患の一種で、この髄鞘が破壊される（脱髄変化）ことで起こる疾患であり、ウイルス感染、アルコールなどによる中毒、栄養障害などが原因で起こるが、原因不明のもの（特発性脱髄）もある。脱髄疾患は、アレルギー、自己免疫などの免疫異常がかかわって発症すると推定されている。脱髄疾患では、目・顔・口・舌・のど・手足の運動障害や知覚障害、直腸・膀胱障害など、いろいろな症状が複雑に絡み合っ出て出現してくる。脱髄疾患としては、中枢性脱髄疾患と末梢性脱髄疾患がある。中枢性脱髄疾患としては、多発性硬化症（視神経脊髄炎（Devic症候群）、同心円硬化症（Balo病））、急性散在性脳脊髄炎、炎症性広汎性硬化症（Schilder病）、亜急性硬化症全脳炎、進行性多巣性白質脳症、低酸素脳症、橋中心髄鞘破壊症、ビタミンB12欠乏症、Binswanger病などが挙げられる。末梢性脱髄疾患としては、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎などが挙げられる。

[0003] 一方、1992年に、真性粘菌*Physarum polycephalum*の単相体ミクソアメーバから、真核細胞のDNA複製酵素であるDNAポリメラーゼ $\alpha$ の活性を抑え、動物培養細胞の増殖を抑制する脂溶性物質が見いだされ、単離・精製された（Murakami-Murofushi, K., 他, J. Biol. Chem. 267, 21512-21517 (1992))。この物

質はグリセロール骨格のsn-1位にシクロプロパンを含むヘキサデカン酸が結合し、2位と3位にリン酸が環状エステル結合した物質であることがわかり、P hysarum由来のLPA様物質であることから、PHYLPAと命名された。PHYLPAがsn-1位に特徴的な脂肪酸を有することから、一般的な脂肪酸に置換した誘導体を化学合成し、その活性を検討した結果、細胞増殖を抑制することが示され、P HYLPAの増殖抑制作用が、2位と3位の環状リン酸基によることが明らかになった。現在では、このような環状リン酸基を持つLPA類似体を総称して、環状ホスファチジン酸 (cPA、cyclic phosphatidic acid) と呼んでいる。

[0004] [化1]



[0005] 環状ホスファチジン酸及びその誘導体については、神経栄養因子作用と神経変性疾患への適用（特許文献1及び2）、癌細胞の増殖と浸潤・転移の抑制（特許文献3）、鎮痛作用（特許文献4）、並びにアトピー性皮膚炎への適用（特許文献5）などについての報告があるが、神経軸索の脱髄に及ぼす影響についての知見はない。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：特開2002-308778号公報

特許文献2：特開2002-308779号公報

特許文献3：国際公開WO 2002 / 94286号公報

特許文献4：国際公開WO 2008 / 81580号公報

特許文献5：特開2012-56853号公報

### 非特許文献

[0007] 非特許文献1：Murakami-Murofushi, K., 他, J. Biol. Chem. 267, 21512-21517 (1992)

### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

[0008] 神経軸索の脱髄を抑制する作用を有する薬剤を見出すことができれば、新規脱髄疾患治療薬を開発することが可能である。本発明は、神経軸索の脱髄抑制作用を有する新規な脱髄疾患治療薬を提供することを解決すべき課題とする。

#### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸及びその誘導体が、神経軸索の脱髄抑制作用を有することを見だし、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明によれば、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩を含有する、脱髄疾患治療薬が提供される。

本発明の別の側面によれば、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩を含有する、神経軸索の脱髄抑制剤が提供される。

[0011] 好ましくは、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸は、式(1)で示される化合物である。



ン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩を、脱髄疾患の患者に投与することを含む、神経軸索の脱髄を抑制する方法が提供される。

[0014] 本発明によればさらに、脱髄疾患治療薬の製造のための、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩の使用が提供される。

本発明によればさらに、神経軸索の脱髄抑制剤の製造のための、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩の使用が提供される。

### 発明の効果

[0015] 本発明によれば、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする脱髄疾患治療薬並びに神経軸索の脱髄抑制剤を提供できる。

### 図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、被験化合物又は生理食塩水を投与した後のマウスを、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、クリオスタットにより凍結組織染色用切片を作成した結果を示す。

[図2]図2は、被験化合物又は生理食塩水を投与した後のマウスについて、Black Gold染色によりミエリン量を測定した結果を示す。

[図3]図3は、cPAを投与した場合の脳梁の組織染色と脱髄の評価を示す。

[図4]図4は、2ccPAを投与した場合の脳梁の組織染色と脱髄の評価を示す。

[図5]図5は、電子顕微鏡観察の結果を示す。

[図6]図6は、cPAを投与した場合のQ-PCRを用いた遺伝子学的解析を示す。

[図7]図7は、2ccPAを投与した場合のQ-PCRを用いた遺伝子学的解析を示す。

。

[図8]図8は、2ccPAを投与した場合のQ-PCRを用いた遺伝子学的解析を示す。

。

[図9]図9は、cPAを投与した場合のロータロッドを用いた運動機能障害試験の結果を示す。



ルキル基の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、エイコシル基などが挙げられる。

[0021] 置換基Rが示す炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基の具体例としては、例えば、アリル基、ブテニル基、オクテニル基、デセニル基、ドデカジエニル基、ヘキサデカトリエニル基などが挙げられ、より具体的には、8-デセニル基、8-ウンデセニル基、8-ドデセニル基、8-トリデセニル基、8-テトラデセニル基、8-ペンタデセニル基、8-ヘキサデセニル基、8-ヘプタデセニル基、8-オクタデセニル基、8-イコセニル基、8-ドコセニル基、ヘプタデカ-8, 11-ジエニル基、ヘプタデカ-8, 11, 14-トリエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13-テトラエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13, 16-ペンタエニル基、ヘニコサ-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサエニル基などが挙げられる。

[0022] 置換基Rが示す炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基の具体例としては、例えば、8-デシニル基、8-ウンデシニル基、8-ドデシニル基、8-トリデシニル基、8-テトラデシニル基、8-ペンタデシニル基、8-ヘキサデシニル基、8-ヘプタデシニル基、8-オクタデシニル基、8-イコシニル基、8-ドコシニル基、ヘプタデカ-8, 11-ジイニル基などが挙げられる。

[0023] 上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうるシクロアルカン環の具体例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロヘキサン環、シクロオクタン環などが挙げられる。シクロアルカン環は、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、例えば、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、N-メチルプロリジン環などが挙げられる。

[0024] 上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうる芳香環

の具体例としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などが挙げられる。

[0025] 従って、置換基Rがシクロアルカン環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、例えば、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシルエチル基、8, 9-メタノペンタデシル基などが挙げられる。

[0026] 置換基Rが芳香環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、ベンジル基、フェネチル基、p-ペンチルフェニルオクチル基などが挙げられる。

[0027] Rは、好ましくは、炭素数9~17の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数9~17の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数9~17の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基である。Rは、さらに好ましくは、炭素数9、11、13、15又は17の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、又は炭素数9、11、13、15又は17の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基である。Rは、特に好ましくは、炭素数9、11、13、15又は17の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基である。

[0028] 一般式(1)で示される化合物中のX及びYはそれぞれ独立に、-O-、-S-又は-CH<sub>2</sub>-を示すが、X及びYが同時に-CH<sub>2</sub>-になることはない。即ち、X及びYの組み合わせは以下の3通りである。

(1) Xが-O-であり、Yが-O-である。

(2) Xが-CH<sub>2</sub>-であり、Yが-O-である(2カルバcPA(2ccPAとも略記))。またはXが-S-であり、Yが-O-である

(3) Xが-O-であり、Yが-CH<sub>2</sub>-である(3カルバcPA(3ccPAとも略記))。またはXが-O-であり、Yが-S-である

上記の中でも、Xが-CH<sub>2</sub>-でありYが-O-である(2カルバcPA)が特に好ましい。

[0029] 式(1)で示される環状ホスファチジン酸誘導体中のMは、水素原子又は対カチオンである。Mが対カチオンである場合の例としては、例えば、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子、置換若しくは無置換アンモニウム基

が挙げられる。アルカリ金属原子としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどが挙げられ、アルカリ土類金属原子としては、例えば、マグネシウム、カルシウムなどが挙げられる。置換アンモニウム基としては、例えば、ブチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基、テトラメチルアンモニウム基などが挙げられる。

[0030] 式(1)の化合物はその置換基の種類に応じて、位置異性体、幾何異性体、互変異性体、又は光学異性体のような異性体が存在する場合があるが、全ての可能な異性体、並びに2種類以上の該異性体を任意の比率で含む混合物も本発明の範囲内のものである。

[0031] また、式(1)の化合物は、水あるいは各種溶媒との付加物(水和物又は溶媒和物)の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明の範囲内のものである。さらに、式(1)の化合物及びその塩の任意の結晶形も本発明の範囲内のものである。

[0032] 好ましくは、式(1)で示される化合物は、1-オレオイル環状ホスファチジン酸、又は1-パルミトオレオイル環状ホスファチジン酸である。本発明で用いられる式(1)で示される化合物の具体例としては、オレオイル2カルバcPA ( $\Delta$ Ole-2ccPA)、パルミトオレオイル2カルバcPA ( $\Delta$ Pal-2ccPA)などを挙げることができる。

[0033] 式(1)で示される化合物のうちX及びYが-O-である化合物は、例えば、Kobayashi, S., 他: Tetrahedron Lett., 34, 4047-4050 (1993)、特開平5-230088号公報、特開平7-149772号公報、特開平7-258278号公報、特開平9-25235号公報に記載の方法等に準じて化学的に合成することができる。

[0034] また、式(1)で示される化合物のうちX及びYが-O-である化合物は、特開2001-178489号公報に記載の方法に準じてリゾ型リン脂質にホスホリパーゼDを作用させることによって合成することもできる。ここで用いるリゾ型リン脂質は、ホスホリパーゼDを作用しうるリゾ型リン脂質であれば特に限定されない。リゾ型リン脂質は多くの種類が知られており、脂

脂肪酸種が異なるもの、エーテル又はビニルエーテル結合をもった分子種などが知られており、これらは市販品として入手可能である。ホスホリパーゼDとしては、キャベツや落花生などの高等植物由来のものや*Streptomyces chromofuscus*, *Actinomadula* sp.などの微生物由来のものが市販試薬として入手可能であるが、*Actinomadula* sp. No.362由来の酵素によって極めて選択的にcPAが合成される（特開平11-367032号明細書）。リゾ型リン脂質とホスホリパーゼDとの反応は、酵素が活性を発現できる条件であれば特に限定されないが、例えば、塩化カルシウムを含有する酢酸緩衝液（pH5～6程度）中で室温から加温下（好ましくは37℃程度）で1から5時間程度反応させることにより行う。生成したcPA誘導体は、常法に準じて、抽出、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー（TLC）などにより精製することができる。

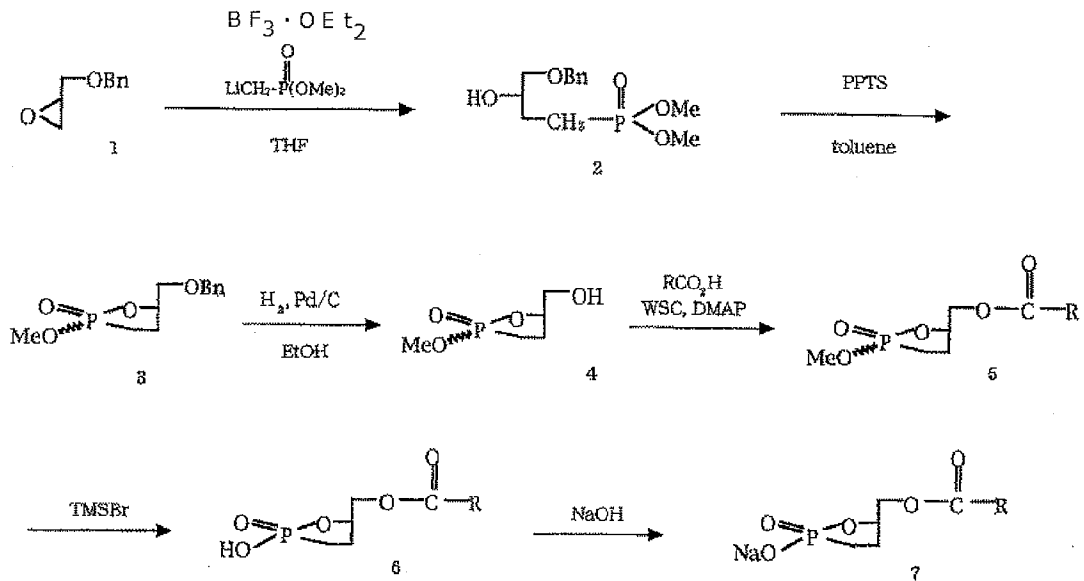
また、式(1)で示される化合物のうちX又はYが-S-である化合物は、*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (2011) 4180-4182、又は*Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (2012) 3196-3201の記載に準じて合成することができる。

[0035] また、式(1)で示される化合物のうちXが-CH<sub>2</sub>-であり、Yが-O-である化合物は、特開2004-010582号公報又は国際公開WO03/104246号公報に記載の方法により合成することができる。

[0036] また、式(1)で示される化合物のうちXが-O-であり、Yが-CH<sub>2</sub>-である化合物は、文献記載の方法（Uchiyama A. et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1771 (2007) 103-112；並びに「日本薬学会 第23回 反応と合成の進歩シンポジウム1997年11月17、18日（熊本市民会館）環状ホスファチジン酸およびカルバ体誘導体の合成と生理作用、要旨集ページ101-104」）に準じて合成することができる、また国際公開WO2002/094286号公報に記載の方法により合成することができる。具体的な合成経路の一例を以下に示す。

[0037]

## [化4]



[0038] 上記においては、先ず、市販の(R)-ベンジルグリシジルエーテル(1)を $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ で活性化させ、メチルホスホン酸ジメチルエステルに $n\text{-BuLi}$ を作用させて得られるリチオ体を反応させることでアルコール(2)を得る。

得られたアルコールを、トルエン中で過剰の

-トルエンスルホン酸のピリジニウム塩を用いて80℃で反応させることにより、環化体(3)を得る。この環化体を、水素雰囲気下で20%  $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ を用いて加水素分解し、脱ベンジル化を行う(4)。縮合剤として1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を用いて、脂肪酸と反応させてカップリング体(5)を得る。次に、求核剤としてプロモトリメチルシランを用いて、メチル基だけを位置選択的に除去し、環状ホスホン酸(6)を得る。これをエーテルを用いて分液ロートに移しこみ、少量の0.02Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、分液操作を行い、ナトリウム塩(7)として目的化合物を抽出、精製する。

[0039] 本発明において有効成分として用いる環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩は、神経軸索の脱髄抑制作用を有することにより、脱髄疾患治療薬又は神経軸索の脱髄抑制剤として使用することができる。

[0040] 本発明の薬剤の投与対象となる脱髄疾患としては、中枢性脱髄疾患でも末

梢性脱髄疾患でもよい。中枢性脱髄疾患としては、多発性硬化症（視神経脊髄炎（Devic症候群）、同心円硬化症（Balo病））、急性散在性脳脊髄炎、炎症性広汎性硬化症（Schilder病）、亜急性硬化症全脳炎、進行性多巣性白質脳症、低酸素脳症、橋中心髄鞘破壊症、ビタミンB12欠乏症、Binswanger病などが挙げられる。末梢性脱髄疾患としては、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎などが挙げられる。本発明の薬剤は、これらの中でも特に、多発性硬化症の治療薬として有用である。

[0041] 本発明の薬剤は、1又は2以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有効成分である環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸（好ましくは、式（1）で示される化合物）あるいはその塩とを含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

[0042] 本発明の薬剤は、種々の形態で投与することができるが、好適な投与形態としては、経口投与でも非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）でもよい。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げることができるが、本発明の薬剤の剤形はこれらに限定されることはない。さらに、公知の技術によって持続性製剤とすることもできる。例えば、ゼラチンを基剤としたハイドロゲル中に、有効成分である環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩を封入することによって、徐放性製剤とすることができる。

[0043] 本発明の薬剤の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH調節剤、溶解剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的な成分は当業者に周知されている。

[0044] 経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

[0045] 注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物としては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、界面活性剤等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン、等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

[0046] 本発明の薬剤はヒトなどの哺乳動物に投与することができる。

本発明の薬剤の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ から $1,000\ \text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\ \text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲である。上記投与量の薬剤は一日一回に投与してもよいし、数回（例えば、2～4回程度）に分けて投与してもよい。

[0047] 以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

## 実施例

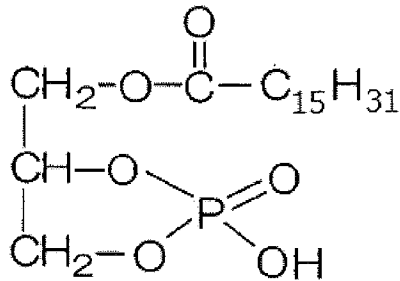
[0048] 実施例 1 :

(1) 被験化合物

実験で用いたcPAは、cPA(16:0)で、カルバcPAは 2ccPA(16:1)である。

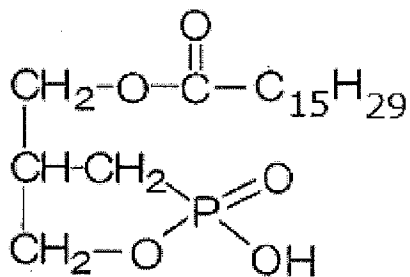
[0049] cPA(16:0)の構造は以下の通りである。ここで $-C_{15}H_{31}$ は、 $-(CH_2)_{14}CH_3$ を示す。cPA(16:0)は、Kobayashi, S., 他: Tetrahedron Lett., 34, 4047-4050 (1993) に記載の方法に準じて合成した化学合成品を使用した。

[0050] [化5]



[0051] 2ccPA(16:1)の構造は以下の通りである。ここで $-C_{15}H_{29}$ は、 $-(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_5CH_3$ (シス体)を示す。2ccPA(16:1)は、特開2004-010582号公報に記載の方法により合成した。

[0052] [化6]



[0053] (2) 脱髓モデルマウスの作成

10週齢雄C57BL/6マウスを0.2%クプリゾンを含む粉餌で、最も顕著な脱髓が起こる5週間後まで飼育し、脱髓モデルマウスを作成した。

[0054] (3) 被験化合物の投与方法

cPA、カルバcPAの粉末を、生理食塩水に溶解し、 $40\mu\text{g}/200\mu\text{l}$  saline/dayで5週間連日腹腔内投与した。ネガティブコントロールマウスには、生理食塩水( $200\mu\text{l}/\text{day}$ )を同様に腹腔内投与した。

[0055] (4) 脱髓の評価

被験化合物を投与した後のマウスを、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、クリオスタットにより凍結組織染色用切片(30 $\mu$ m)を作成した(図1)。ミエリン量はBlack Gold染色を用い、染色の濃度により脱髄レベルを測定した(図2)。

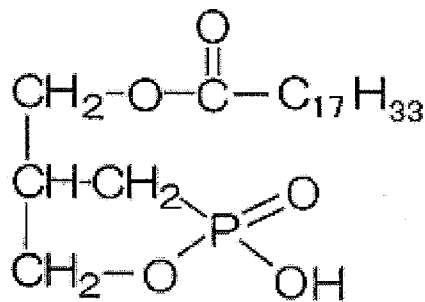
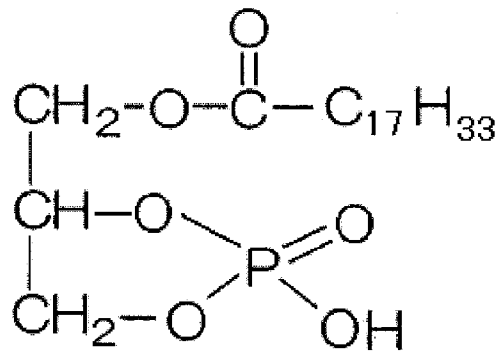
図2に示す結果より、cPA又はカルバcPAを投与したマウスのミエリン量は、対照マウスのミエリン量より高く、cPA又はカルバcPAの投与により神経軸索の脱髄を抑制できることが示された。

[0056] なお、クプリゾンモデルマウスが、多発性硬化症などの脱髄疾患のモデルマウスとして使用できることは、例えば、O. Torkildsen et al., *Acta Neurol Scand* 2008: 117 (suppl.188):72-76; 並びにGlenn K. Matsushima et al., *Brain Pathology* 11: 107-116 (2001)に記載されている。また、クプリゾンモデルマウスにおけるミエリン量の減少を抑制する作用が脱髄疾患の治療効果を裏付けるものであることについては、例えば、K. Yoshikawa et al., *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 85 (2011) 43-52 (特にFigure 4及びFigure 5D及び5E)に記載されている。

[0057] また、以下に構造  $[-C_{17}H_{33}]_n$  は  $-(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$  (シス体) を示す] を示すcPA(18:1)及び2ccPA(18:1)を用いた場合でも、cPA(16:0)及び2ccPA(16:1)の場合と同様の結果が得られた。

[0058]

[化7]



[0059] 実施例 2 :

(1) 実験動物および多発性硬化症モデル作製法

10週齢雄C57BL/6jマウス（東京動物実験株式会社、東京、日本）を0.2%クプリゾン（ビスシクロヘキサノンオキサリルヒドラゾン; Merck KGaA, Darmstadt, Germany）を含んだ粉末飼料（クレア・ジャパン、東京、日本）により自由摂取で最も脱髄が進行する5週間後まで飼育し、オリゴデンドロサイト特異的細胞死による脱髄モデルマウスを作製した。

[0060] 遺伝子解析用マウス脳梁組織は、マウス脳を取り出し脳梁組織を採取した。詳しくは、Bregma 約-0.25 mm から -1.25 mmの部位を冠状面にカットし、さらに脳梁より上部、下部の組織を横断面にカットして除き、脳梁組織を回収し、液体窒素で凍結させ-80℃で保存した。

[0061] 組織学的解析用組織は、マウスを心臓から4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳組織を摘出し、後固定し、30%スクロース浸透後、凍結組織ブロックを作製しクライオスタットで薄切した。

[0062] (2) cPA、2ccPAの投与

実験で用いたcPAは、実施例1と同様のcPA(16:0)及びカルバcPAは2ccPA(16:1)である。cPA、2ccPAは化学精製し(Biochimica et Biophysica Acta, Emi Nozaki 2011)、0.9%生理食塩水に溶解した。cPA、2ccPAはクプリゾン投与と同時に5週間後まで連日腹腔内投与(1.6mg/kg/day)した。コントロールマウスは通常粉末飼料で飼育し、5週間生理食塩水を連日腹腔内投与した。

[0063] (3) 脳梁の組織染色と脱髓の評価

凍結組織ブロックをクリオスタット(LEICA CM1900, Wetzlar, Germany)により脳梁を含むBregma -0.22mmから-0.58mmの間で20 $\mu$ mの切片を作製し、ゲラチンコーティングスライドガラスに回収した。切片は0.3% Black Gold I I (Histo-Chem, Jefferson, AR)で65 $^{\circ}$ C、12分染色後、滅菌水でリンスし、1%チオ硫酸ナトリウムを3分間通した後、脱水、透徹し、ポリマウント(Polysciences Inc. Boston, MA)で封入した。染色後の切片はKEYENCE BZ-9000で撮影し、KEYENCE BZ-9000 Analyzer BZ-II Analyzerによりバックグラウンドの除去、スケールバーの挿入を行った。ミエリン量の解析は、image J 1.46rソフトウェアを用い脳梁エリアにおける染色濃度を測定し、コントロールを100%として脱髓レベルを評価した。

[0064] cPAを投与した場合の結果を図3に示す。2ccPAを投与した場合の結果を図4に示す。cPA及び2ccPAにより脱髓が抑制されることが示された。

[0065] (4) 電子顕微鏡

クプリゾン投与5週間後のマウスを、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳を採取し、脳梁組織を取り出し、2.5%グルタルアルデヒド固定液で前固定し、0.1Mカコジレイト緩衝液で洗浄し、脳梁を含む組織を約1mmの切片にカットした後、1%オスミウム固定液で後固定、脱水し、QY-1で、エポキシ樹脂に置換後、脳梁組織をカプセルに包埋し、56 $^{\circ}$ Cで重合させた。切片はウルトラミクロトームReichert-Nissei ULTRACUT-N (Nissei Sangyo、東京、日本)で、ダイヤモンドナイフを用い超薄切切片を作製し、酢酸ウラン染色を行った。撮影は透過型電子顕微鏡JEM-1400 Electron Microscope (JEOL Ltd、東京、日本)を用い、脳梁部位における神経を取り巻くミエリン構造を観察、

撮影した。結果を図5に示す。cPAにより脱髄が抑制されることが示された。

[0066] (5) Q-PCRを用いた遺伝子学的解析

凍結した脳梁組織をISOGEN (株式会社ニッポンジーン、東京、日本)を用い mRNAを抽出し、RNase free molecular grade water (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本)に溶解し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。mRNAはPrime script RT reagent kit (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本)により逆転写した。遺伝子発現は7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems)により検出した。リアルタイムPCRの結果はphosphoglycerate kinase 1 (PGK1)の発現レベルをインターナルコントロールとして解析を行った。遺伝子発現解析は各遺伝子特異的プライマーを作製し、測定した(PGK-1; NM\_008828 Forward: ctgctgt tccaagcatcaaa Reverse: gcatcttttcccttcccttc); Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP; NM\_001131020 Forward: acgcttctccttgtctcgaa Reverse: cggcgatagtcgtagcttc); Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1; D86382 Forward: atgagccaaagcaggattt Reverse: gaccagttggcctcttgtgt); Platelet Derived Growth Factor Receptor, alpha (PDGFRa; NM\_011058 Forward caacagtggcctctttgtca Reverse ctcccgttattgtgcaaggt); Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7 (P2rx7; NM\_011027 Forward tgtgtgcattgacttgcctca Reverse cttgcagacttttcccaagc); NLR family, pyrin domain containing 3 (Nlrp3; NM\_145827.3 Forward ccttgaccagggtc agtgt Reverse aggagatgtcgaagcagcat)。Q-PCR条件は、 $95^{\circ}\text{C}$ , 30秒の初期変性後、 $95^{\circ}\text{C}$ , 5秒と $60^{\circ}\text{C}$ , 34秒を40サイクル反応させた。遺伝子発現量は $\Delta\Delta C_T$ 法により算出した。データは相対的定量法により解析した。遺伝子発現における相対的变化はコントロールマウスでの発現量を100%として解析した。

cPAを投与した場合の結果を図6に示す。2ccPAを投与した場合の結果を図7及び図8に示す。cPA及び2ccPAにより神経炎症が抑制されることが示された。

[0067] (6) ロータロッドを用いた運動機能障害試験

運動機能障害試験はマウス用ロータロッドトレッドミル(室町機械、東京、

日本)を用い、クプリゾン投与5週間後のマウス運動機能を測定した。全てのマウスは28rpmで実験を行った。ロッド上での運動継続可能時間 (Locomotion time) は、300秒間の記録時間内に、回転するロッドから最初に落下するまでの時間を測定し評価した。また、落下後もすぐに運動を継続させ、300秒間のロッドからの落下あるいはロッドに捕まる行動 (number of falls and flips) の合計回数を測定し評価した。

[0068] (7) 統計学的解析

運動機能障害試験のデータは、クラスカル・ウォリス検定によるノンパラメトリック手法により解析した。他の全てのデータはニューマン・クルーズ検定によるone-way ANOVA法により解析した。全てのデータはGraph Pad Prism Ver. 5.01 ソフトウェア(Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA) を用い、mean  $\pm$  SEM. p values  $< 0.05$ を統計学的優位差として評価した。

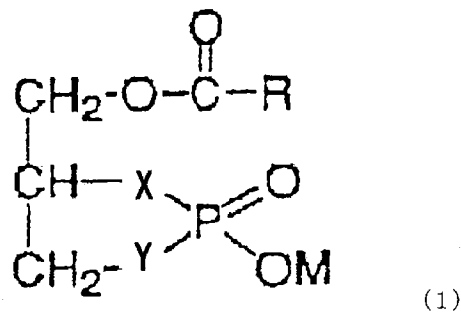
cPAを投与した場合の結果を図9に示す。2ccPAを投与した場合の結果を図10に示す。cPA及び2ccPAにより運動機能障害が改善されることが示された。

## 請求の範囲

[請求項1] 環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩を含有する、脱髄疾患治療薬。

[請求項2] 環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸が、式(1)で示される化合物である、請求項1に記載の脱髄疾患治療薬。

[化1]



(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。X及びYはそれぞれ独立に、-O-、-S-又は-CH<sub>2</sub>-を示すが、X及びYが同時に-CH<sub>2</sub>-になることはない。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

[請求項3] 式(1)において、X及びYが-O-である、請求項2に記載の脱髄疾患治療薬。

[請求項4] 式(1)において、Xが-CH<sub>2</sub>-であり、Yが-O-である、請求項2に記載の脱髄疾患治療薬。

[請求項5] 式(1)において、Xが-O-であり、Yが-CH<sub>2</sub>-である、請求項2に記載の脱髄疾患治療薬。

[請求項6] 式(1)で示される化合物が、1-オレオイル環状ホスファチジン酸又は1-パルミトオレオイル環状ホスファチジン酸である、請求項2

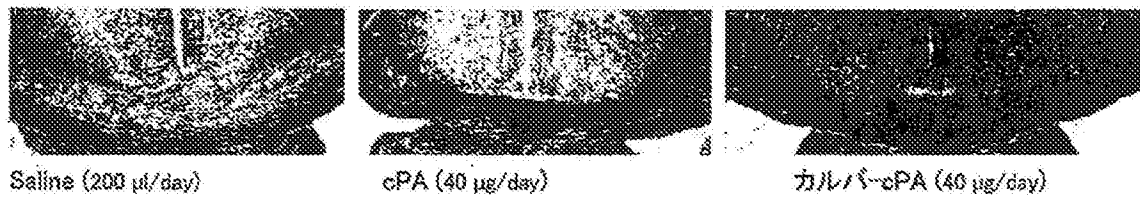
から5の何れか1項に記載の脱髄疾患治療薬。

[請求項7] 神経軸索の脱髄抑制剤として使用する、請求項1から6の何れか1項に記載の脱髄疾患治療薬。

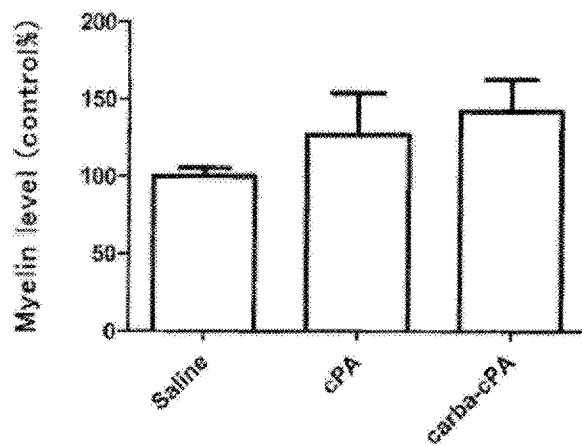
[請求項8] 環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩を含有する、神経軸索の脱髄抑制剤。

[請求項9] 環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸あるいはその塩を、脱髄疾患の患者に投与することを含む、脱髄疾患を治療する方法。

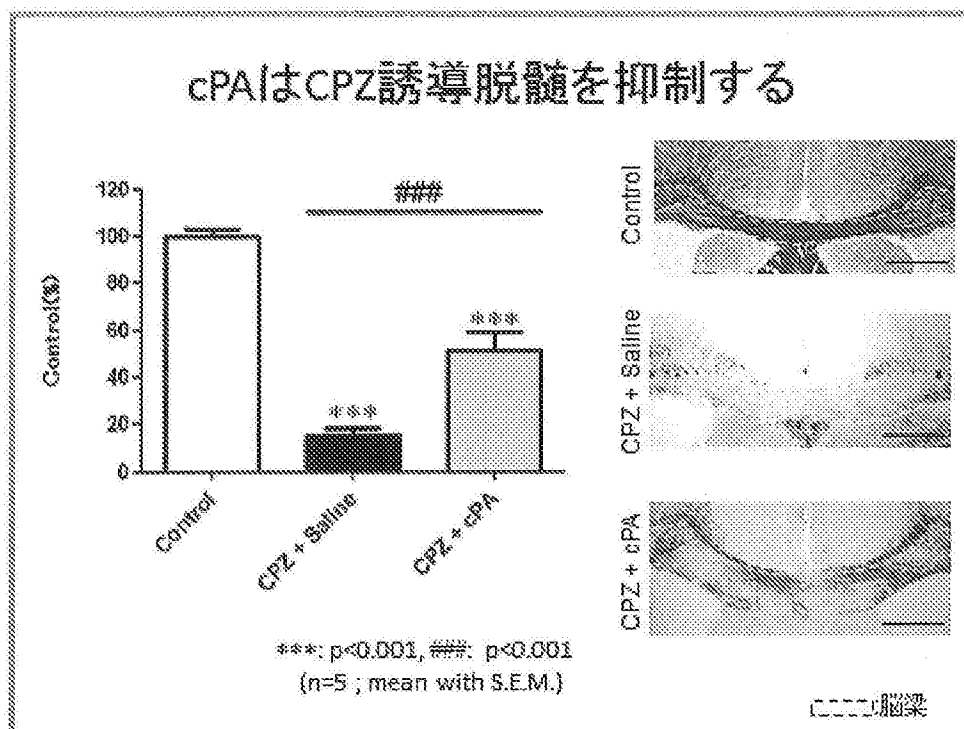
[図1]



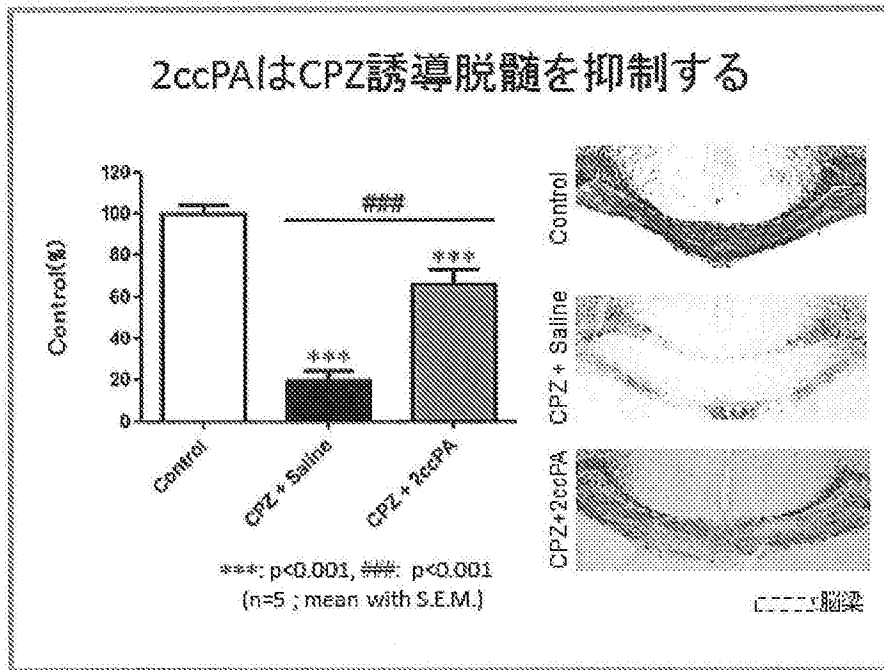
[図2]



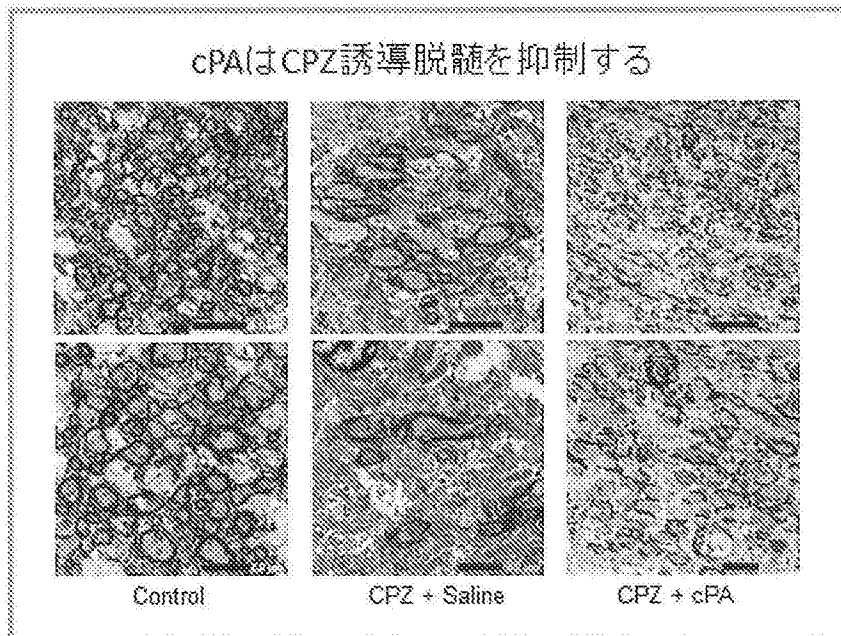
[図3]



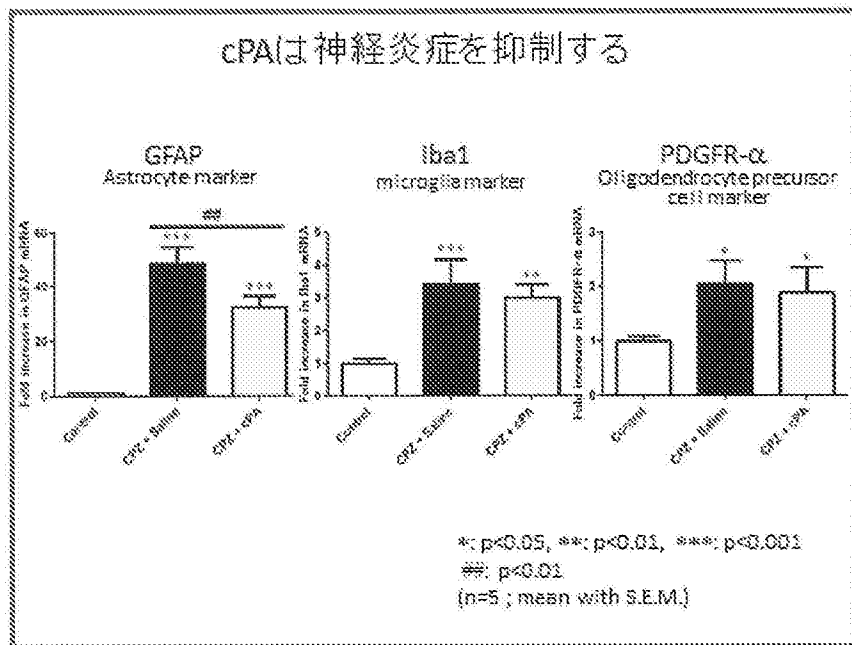
[図4]



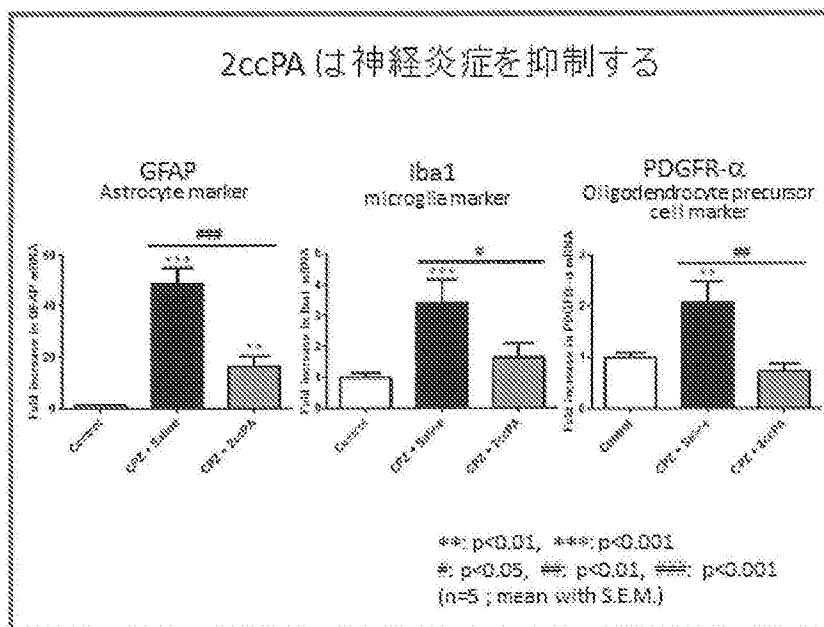
[図5]



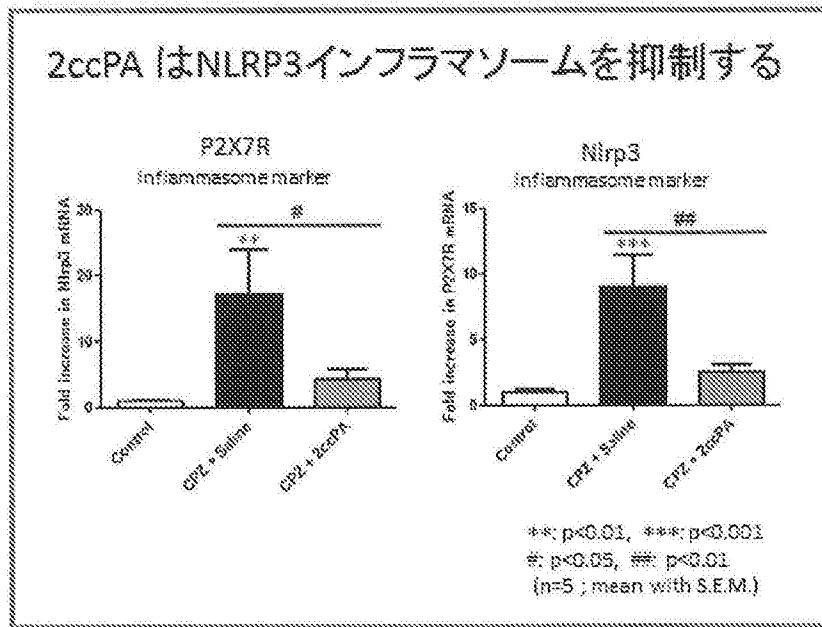
[図6]



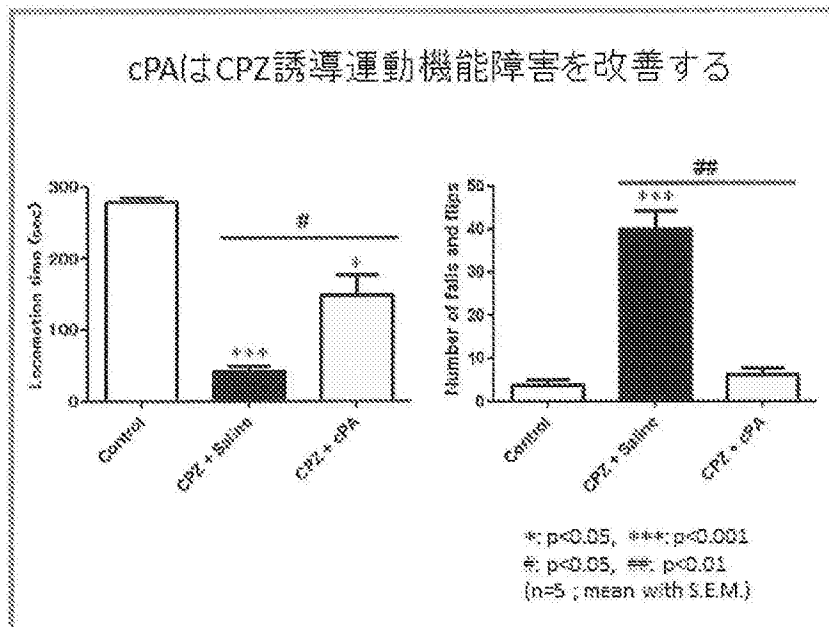
[図7]



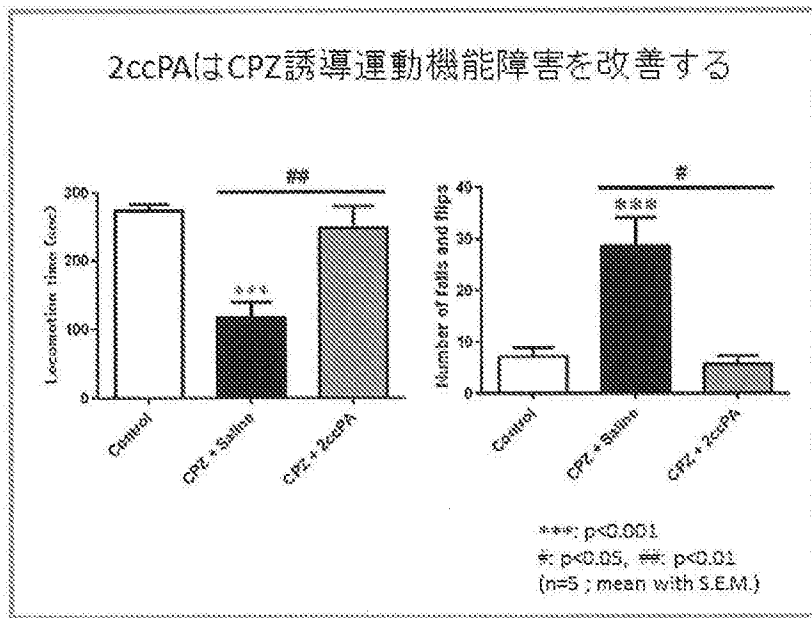
[図8]



[図9]



[図10]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/051748

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K31/661(2006.01)i, A61K31/662(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/661, A61K31/662, A61P25/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2002-308779 A (Gen Com Co.), 23 October 2002 (23.10.2002), claims; paragraphs [0028], [0033] & US 2004/0176329 A1 & EP 1386612 A1 & WO 2002/083149 A1	1-3, 6-8 4-5
X A	WO 00/09139 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 24 February 2000 (24.02.2000), claims; examples 1, 2, 7 & US 6150345 A & AU 5473599 A	1-3, 6-8 4-5
A	WO 2011/065480 A1 (Ochanomizu University), 03 June 2011 (03.06.2011), claims; examples (Family: none)	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 April, 2014 (09.04.14)

Date of mailing of the international search report  
13 May, 2014 (13.05.14)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/051748

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NOZAKI, Emi et al, Pharmacological evaluation of a novel cyclic phosphatidic acid derivative 3-S-cyclic phosphatidic acid, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2012, Vol.20, p.3196-3201	1-8
A	JP 2002-308778 A (Gen Com Co.), 23 October 2002 (23.10.2002), the entire specification & US 2004/0220149 A1 & EP 1391204 A1 & WO 2002/083148 A1	1-8
A	HO, Peggy P. et al, Identification of naturally occurring fatty acids of the myelin sheath that resolve neuroinflammation, Science Translational Medicine, 2012, Vol.4, No.137, p.137ra73, (abstract) STN CAPLUS (online) Accession no 2013:90360 (retrieved on 9 April 2014)	1-8
P,A	US 2013/0281409 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY), 24 October 2013 (24.10.2013), the entire specification; particularly, fig. 2D (Family: none)	1-8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/051748

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 9  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 9 pertains to a method for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
 Int.Cl. A61K31/661(2006.01)i, A61K31/662(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））  
 Int.Cl. A61K31/661, A61K31/662, A61P25/00

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 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2014年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2014年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2014年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）  
 CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2002-308779 A（株式会社ジェンコム）2002.10.23, 特許請求の 範囲、段落0028, 0033 & US 2004/0176329 A1 & EP 1386612 A1 & WO 2002/083149 A1	1-3, 6-8 4-5
X A	WO 00/09139 A2（THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA） 2000.02.24, 特許請求の範囲、実施例1, 2, 7 & US 6150345 A & AU 5473599 A	1-3, 6-8 4-5

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 09.04.2014	国際調査報告の発送日 13.05.2014
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 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） 福永 千尋 電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2011/065480 A1 (国立大学法人お茶の水女子大学) 2011.06.03, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-8
A	NOZAKI, Emi et al, Pharmacological evaluation of a novel cyclic phosphatidic acid derivative 3-S-cyclic phosphatidic acid, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2012, Vol.20, p.3196-3201	1-8
A	JP 2002-308778 A (株式会社ジェンコム) 2002.10.23, 明細書全体 & US 2004/0220149 A1 & EP 1391204 A1 & WO 2002/083148 A1	1-8
A	HO, Peggy P. et al, Identification of naturally occurring fatty acids of the myelin sheath that resolve neuroinflammation, Science Translational Medicine, 2012, Vol.4, No.137, p.137ra73, (abstract) STN CAPLUS (online) Accession no 2013:90360 (retrieved on 9 April 2014)	1-8
P, A	US 2013/0281409 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2013.10.24, 明細書全体、特に Fig. 2D (ファ ミリーなし)	1-8

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項9は治療による人体の体の処置方法に関するものであって、PCT17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国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

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

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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