

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-525515

(P2016-525515A)

(43) 公表日 平成28年8月25日(2016.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/415 (2006.01)	A 6 1 K 31/415	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/445 (2006.01)	A 6 1 K 31/445	
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-525847 (P2016-525847)	(71) 出願人	513175734 アイホル コーポレーション アメリカ合衆国 89148 ネバダ州、 ラスベガス、ファースト オン ドライブ 448
(86) (22) 出願日	平成26年8月27日 (2014.8.27)	(74) 代理人	100082418 弁理士 山口 朔生
(85) 翻訳文提出日	平成28年1月7日 (2016.1.7)	(72) 発明者	リン、ホアーヤン 台湾、タイペイ、ネイファー ディストリク ト、ネイファー ロード、セクション 1、 ナンバー 88、4フロアー
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/052813	Fターム(参考)	4C076 AA95 BB01 BB11 CC04 CC05 EE37 FF68
(87) 国際公開番号	W02015/031425		
(87) 国際公開日	平成27年3月5日 (2015.3.5)		
(31) 優先権主張番号	61/871, 352		
(32) 優先日	平成25年8月29日 (2013.8.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリコサミノグリカンの化合物及びその調製方法並びに応用

(57) 【要約】

本発明は、薬物を、ヒアルロン酸(HA)等のグリコサミノグリカンとコンジュゲートした化合物であって、上記薬物が、炎症、自己免疫疾患、アレルギー、感染症、及び好ましくはガン等の疾患の治療に有用である化合物に関する。本発明のコンジュゲート化合物は、標的薬物送達キャリアとして使用される、グリコサミノグリカンとCD44細胞表面受容体との相互作用により、疾患の特定の部位での薬物の濃度を増加させ、その結果、療法効力を増強させ、部位に送達された薬物の全身性副作用を低減することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリコサミノグリカン及び活性化合物に由来するコンジュゲート体からなる化合物であって、前記活性化合物が、官能基により、前記グリコサミノグリカン、その誘導体、又はその塩のカルボキシル酸基にコンジュゲートされて、共有結合によるコンジュゲーションを形成し、前記活性化合物が、抗炎症薬、抗アレルギー薬、及びステロイドからなる化合物。

【請求項 2】

前記抗炎症薬が、COX-2アンタゴニストである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記COX-2アンタゴニストがセレコキシブである、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

前記抗アレルギー薬がフェキソフェナジンである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

前記ステロイドが、ブデソニド及びプレドニゾロンである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記共有結合によるコンジュゲーションが、アミド結合又はエステル結合による直接コンジュゲーションである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

前記活性化合物が、リンカーを介して前記グリコサミノグリカンの前記カルボキシル酸基に、更に間接的にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 8】

前記リンカーが、アジピン酸ジヒドラジド、ポリペプチド、ペプチド、脂質、アミノ酸、及び直鎖又は分岐、脂肪族、芳香族、又は芳香脂肪族C₂~C₂₀ジカルボン酸からなる群から選択される、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 9】

前記グリコサミノグリカンがヒアルロン酸である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 10】

前記ヒアルロン酸が、5kDaから2000kDaまでの範囲に含まれる平均分子量を有する、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 11】

急性又は慢性炎症の治療に使用するための請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 12】

前記炎症が、感染症、傷害、自己免疫疾患、又はアレルギーにより誘導又は引き起こされる、請求項 11 に記載の化合物。

【請求項 13】

前記自己免疫疾患が関節リウマチである、請求項 11 に記載の化合物。

【請求項 14】

炎症を治療するための方法であって、請求項 1 に記載のグリコサミノグリカン及び活性化合物に由来するコンジュゲート体からなる治療上有効量の化合物を、その必要性のある対象体に投与するステップを含む方法。

【請求項 15】

前記炎症が、感染症、傷害、自己免疫疾患、又はアレルギーにより誘導又は引き起こされる、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

少なくとも1つの賦形剤及び/又は希釈剤と組み合わせて、請求項 1 に記載のグリコサミノグリカン及び活性化合物に由来する少なくとも1つのコンジュゲート体を含む医薬組成物。

【請求項 17】

前記組成物が炎症を治療するためのものである、請求項 16 に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

前記炎症が、感染症、傷害、自己免疫疾患、又はアレルギーにより誘導又は引き起こされる、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記組成物が、経口投与用又は注射可能な投与用に設計されている、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グリコサミノグリカンの薬物とのコンジュゲート体からなる化合物及びその調製に関する。 10

【背景技術】

【0002】

細胞外マトリックス (ECM) は、刺激に応答して細胞機能及び相互作用を制御する相互作用分子の動的集合体である。1つのクラスの細胞外マトリックス巨大分子であるグリコサミノグリカンは、細胞遊走、分化、増殖、免疫応答、及び細胞骨格形成を含む、多様な正常及び異常両方の生物学的プロセスに関与することが知られている分子である。

【0003】

グリコサミノグリカン (GAG) は、二糖単位の繰り返しで構成される非分岐鎖である。これら二糖単位は、ほとんどの場合で硫酸化されているアミノ糖 (N - アセチルグルコサミン又は N - アセチルガラクトサミン) を常に取り込み、第 2 の糖は、通常はウロン酸 (グルクロン酸又はイズロン酸) である。GAG は、それらの糖残基のほとんどにカルボキシル基又は硫酸基が存在するため、高度に負に荷電されている。そのため、それらは、非常に親水性である。 20

GAG は、高度に伸長したコンフォメーションを取り、空間充填性で、圧縮力に耐性であるマトリックスを形成する傾向がある。4つの主要なグループの GAG が、それらの糖残基、それら残基間の連結のタイプ、並びに硫酸基の数及び位置により区別されている。それらには以下のものが含まれる。(1) ヒアルロナン、(2) コンドロイチン硫酸及びデルマタン硫酸、(3) ヘパラン硫酸及びヘパリン、及び(4) ケラタン硫酸。 30

【0004】

ヒアルロナン (ヒアルロン酸又はヒアルロナート又は HA と呼ばれる) は、GAG の中で最も単純なものである。ヒアルロナンは、非硫酸化二糖単位、具体的には N - アセチルグルコサミン及びグルクロン酸の規則的な繰り返し配列からなる。その分子量は、400 ダルトン (二糖) から数百万ダルトンを超える範囲であり得る。

ヒアルロナンは、皮膚、軟骨、及び眼等の、全ての組織にて様々な量で見出され、成体動物では、全てではないとしても、ほとんどが流体である。ヒアルロナンは、特に初期胚に豊富に存在する。関節軟骨では、HA は、軟骨の機能にとって重要な大型凝集体を形成することができる。更に、細胞運動性及び免疫細胞接着は、細胞表面受容体 RHAMM (ヒアルロナン媒介性運動性受容体) 及び CD44 により媒介される。 40

【0005】

HA は、細胞表面の内膜で直接合成され、成長中の高分子は、合成される共に膜を介して細胞外部に押し出される。合成は、単一のタンパク質酵素、ヒアルロナンシンターゼ (HAS) により媒介される。対照的に、他の GAG は、細胞内部のゴルジ装置で合成され、恐らくは、あるコアタンパク質と結合し、その後、エキソサイトーシスにより放出される。脊椎組織における *in vivo* での HA 分解は、ヒアルロニダーゼ、及び糖を順番に除去するエキソグリコシダーゼにより媒介される。

哺乳類型ヒアルロニダーゼは、加水分解活性及びトランスグリコシダーゼ活性を両方とも有しており、HA 及びコンドロイチンを分解することができる。結合組織では、HA に結合している水和水は、組織間に空間を生み出し、したがって、細胞運動及び増殖に資する環境が生み出される。HA は、迅速な発育、再生、修復、胚形成、発生学的発生、創傷 50

治癒、血管新生、及び腫瘍形成を含む、細胞運動に関連する生物学的現象に重要な役割を果たす。

【0006】

CD44 (Pgp-1、Hermes-3、HCAM、ECMR IIIとしても知られている)は、85~90kDaの分子量を有する、広範に発現される糖タンパク質である。CD44は、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸(HA)の主要な細胞表面受容体である。

CD44は、特異的にHAと結合するが、あるコンドロイチン硫酸含有プロテオグリカンも認識される場合がある。CD44は、HAへの接着及び遊走、HA分解、及び腫瘍転移を含む、種々の細胞機能及び生理機能に役割を果たす。また、CD44は、細胞外マトリックス結合、細胞遊走、リンパ球活性化、リンパ球ホーミング、及び気管支平滑筋細胞の増殖に役割を果たすことが示されている(非特許文献1)。

CD44は、HAの特に重要な白血球受容体であると考えられており、したがって、喘息の病因に関与している可能性がある。加えて、HAのレベルは、対照マウスでは実験的喘息中に増加するが、抗体処置マウスでは著しく低減され、CD44が、HA代謝に(具体的には、高分子量HAの炎症促進性低分子量形態への分解)に関与していることが支持される。これは、HA由来オリゴ糖がツール様受容体と結合及び活性化することができるため、特に重要であり得る。明らかに、上記結果の中で最も印象的な側面は、抗CD44処置の有益効果の大きさが著しいことである。

【0007】

HA-CD44相互作用は、発育、炎症、T細胞動員及び活性化、肺炎症、並びに腫瘍増殖及び転移に重要な役割を果たす場合がある。

【0008】

標準的CD44及び全てのアイソフォームを標的欠失させたマウスは、正常に発育する。研究によると、関節リウマチ、及び組織炎症の部位へのT細胞の血管外漏出等の炎症状態にCD44が重要な役割を果たすことが示唆されている。CD44は、マウスのアレルギー誘導性気管炎症での炎症細胞の動員に重要な役割を有する場合がある。CD44は、慢性炎症の調節に重大な役割を果たすことが示唆されており、CD44が、HAとの相互作用とは無関係にマクロファージ活性化の調節に重大な役割を有する場合があることが示唆される(非特許文献2)。

【0009】

炎症応答及び免疫応答を制御する能力は、幅広い範囲の疾患の療法の要である。CD44は、活性化リンパ球の内皮及び平滑筋細胞への接着を支援する。更に、CD44のライゲーションは、炎症細胞及び血管細胞の活性化を両方とも誘導する。CD44の主要なリガンドであるHAは、apoE-欠損マウスのアテローム性動脈硬化病巣では上方制御され、HAの低分子量炎症促進性形態は、VCAM-1(血管細胞接着分子-1)発現及び培養初代大動脈平滑筋細胞の増殖を刺激するが、HAの高分子量形態は、平滑筋細胞増殖を阻害する。Gal-9(ガレクチン-9)は、AHR(気道過敏性)並びにTh2関連気道炎症を低減することができる。更に、Gal-9並びに抗CD44モノクローナル抗体の投与は、末梢血Th2細胞の気管への浸潤を阻害した。興味深いことには、Gal-9は、CD44接着分子と直接結合し、HAとの相互作用を阻害した。

CD44-HA相互作用は、T細胞の肺内への遊走を媒介するという概念の通り、Gal-9は、BW5147マウスT細胞のHAへのCD44依存性接着を阻止した。Gal-9は、細胞外マトリックスのCD44依存性白血球認識を調節することにより、気道のアレルギー性炎症及びAHRを阻害すると結論付けられた(非特許文献3)。

【0010】

CD44は、全身性エリトマトーデス(SLE)、関節リウマチ、シェーグレン症候群、炎症性腸疾患(IBD)、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、乾癬、皮膚筋炎、血管炎、及びベーチェット病のような自己免疫疾患で発現されるだろう。全身性エリトマトーデスは

10

20

30

40

50

、多臓器系に影響を及ぼすプロトタイプの自己免疫疾患である。ヒアルロナン及びその細胞表面受容体CD44との相互作用が、SLEの発症機序の媒介に重要な役割を果たすことを示唆する根拠が蓄積されている（非特許文献4）。関節リウマチ（RA）は、患者の滑膜関節の炎症をもたらす一般的な自己免疫障害である。RAは、人口のおよそ1%に影響を及ぼし、自己免疫障害と分類されるが、耐性の回避を開始する分子事象（複数可）は、依然として推測であり、確認されていない（非特許文献5）。

シェーグレン症候群（SS）は、全身性エリトマトーデス（SLE）及び関節リウマチ（RA）等の関連自己免疫障害よりも一般的であるが、SSの科学的及び医学的研究は、著しく遅れている。これは、SS遺伝学の分野において特に当てはまり、現在までの努力は、候補遺伝子手法に極度に依存している（非特許文献6）。強直性脊椎炎（AS）は、中軸骨格の偏好を示す一般的な炎症性リウマチ疾患であり、人口の0.2%に影響を及ぼす。現行の診断基準は、臨床的变化及び放射線学的变化の複合に依存し、平均診断時間は5~10年である（非特許文献7）。結果は、活性化CD44を担持するTリンパ球の循環は、慢性炎症条件下で上昇し、これらは、自己免疫又は慢性炎症性疾患の活性の信頼できるマーカーを供給することができる活性化循環細胞の病因的に重要な亜集団を代表することができることを示唆する（非特許文献8）。

クローン病（CD）及び潰瘍性大腸炎（UC）を含む炎症性腸疾患（IBD）は、臨床的特徴及び免疫学的特徴が乾癬と共通している。ゲノムワイド関連研究により、共通の感受性遺伝子が見出された。しかしながら、乾癬、乾癬性関節炎、及びIBDのリスク間の関連性を評価する疫学的データは希である。この研究は、米国女性における、乾癬、乾癬性関節炎、並びに付随的なCD及びUC間の関連性を評価することを目的としていた。乾癬性関節炎を伴う乾癬は、付随的なCDのリスク増加と関連している（非特許文献9）。

皮膚筋炎（DM）は、筋肉及び皮膚の炎症を特徴とする多発性筋炎（PM）と関連する結合組織疾患である。DMは、最も頻繁に皮膚及び筋肉に影響を及ぼすが、関節、食道、肺、及びあまり一般的ではないが心臓にも影響を及ぼす場合のある全身性障害である。血管炎は、炎症により血管を破壊する一群の障害である。動脈及び血管は両方とも影響を受ける。血管炎の病態生理は、十分に理解されていないが、続いて起こる炎症応答は、一般的に十分に説明されている（非特許文献10）。ベーチェット病（BD）は、あらゆるサイズの動脈及び血管の両方に関与する唯一の全身性血管炎である。リウマチ診療所では、ベーチェット病が頻繁に見受けられる。ベーチェット病は、いくらか重症な病的状態、及びある場合には致命的転帰さえも示す（非特許文献11）。

【0011】

ポリエチレングリコール（PEG）とコンジュゲートされたインターフェロナルファ（IFN）は、週1回の注射製剤として、C型肝炎ウイルス（HCV）感染症の治療に広く使用されている。しかしながら、ペグ化IFNは、恐らくはペグ化による非特異的送達のため、注射を繰り返すと39%の低効力及び副作用を示す。したがって、標的特異的長期作用性ヒアルロン酸-インターフェロナルファ（HA-IFN）コンジュゲート体が、HCV感染症の治療のために開発された。HA-IFNコンジュゲート体は、アルデヒド修飾HAとIFNのN末端基との結合反応により合成された。IFN含有量は、単一HA鎖当たり2~9分子の範囲で制御することができ、生体コンジュゲーション効率は95%よりも高い。

【0012】

幾つかの研究によると、CD44は、細菌と宿主細胞との直接的相互作用、並びに宿主細胞を変更し、感染症により罹りやすくするシグナル伝達事象に関与するとされている。例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）は、そのヒアルロナン豊富な多糖類莢膜（又は細胞壁）を介して細胞に結合する。HAは、CD44に結合し、次いで、それにより、幾つかの宿主細胞タンパク質のチロシンリン酸化、並びにひだ形成及び葉状仮足の伸長を引き起こす細胞骨格の再編成が誘発される。その結果、細胞間接着は、密着結合及びE-カドヘリンの数減少のため緩められ、このプロセスは、細菌の上皮下組織への進入を可能にする。

10

20

30

40

50

【0013】

特許文献1には、炎症の治療又は癌転移の検出におけるCD44の使用が記載されている。著者らは、CD44が炎症性条件で上方制御され、CD44ペプチドが、T細胞活性化を阻害することができることを示している。CD44による転移の阻害に関するデータ又は請求項は示されておらず、腫瘍増殖又は血管新生を阻害するためのCD44の使用に向けた請求項は存在しない。

特許文献2には、癌及び血管新生依存性疾患を阻害するための、CD44を含むHA結合タンパク質及びペプチドの使用が開示されている。この刊行物では、B16マウス黒色腫及びルイス肺癌の肺転移を阻害するために、メタスタチン、軟骨リンクタンパク質の38kDa断片、並びにこの断片に由来するHA結合ペプチドが使用される。HA結合ペプチドの場合、ニワトリCAMでのB16黒色腫の増殖、及びHAでの内皮細胞遊走が阻害されている。両刊行物では、HA結合ペプチドの使用は、ヒアルロン酸に結合するそれらの能力と直接的に関連する。

【0014】

特許文献3には、可溶性組換えCD44ヒアルロン酸結合ドメイン(CD44HABD)が、ニワトリ及びマウスにおいて血管新生を*in vivo*で阻害し、それにより、由来が様々なヒト腫瘍増殖を阻害することが示されている。上記発明は、血管細胞表面受容体の標的化に基づく新規のクラスの血管形成阻害剤としての、可溶性非グリコシル化CD44組換えタンパク質を開示するものである。

【0015】

したがって、この従来技術では、あらゆる効果がHA-CD44相互作用に依存することを特定するための、CD44の潜在的な使用が開示されている。結果的に、これまでCD44-HAコンジュゲート体に帰するとされている有用性は全て、ヒアルロン酸に結合するそれらの能力に直接的に依存する。

【0016】

しかしながら、幾つかの薬物は、HAとのコンジュゲートが依然として成功しておらず、更なる実験を行って、活性化化合物の部位送達キャリアとしてのHAの潜在的有用性が確認されるべきである。特に、従来技術では、CD44の過剰発現を特徴とする疾患において、活性化化合物を標的送達するために、表面細胞受容体CD44と、HAとそのような活性化化合物とのコンジュゲート体との相互作用を活用することが有益であり、その有効な治療向上を得ることができることは示されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献1】国際公開第94/09811号

【特許文献2】国際公開第99/45942号

【特許文献3】米国特許第8,192,744号

【非特許文献】

【0018】

【非特許文献1】Gunther et al., 1991年、A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells, 5; 65巻(1号): 13~24頁

【非特許文献2】Dianhua Jiang, hyaluronan in Tissue Injury and Repair, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2007年; 23巻: 435~61頁

【非特許文献3】Shigeki Katoh et al., Galectin-9 Inhibits CD44-Hyaluronan Interaction and Suppresses a Murine Model of Allergic Asthma, American Journal of Respiratory and Crit

10

20

30

40

50

ical Care Medicine、2007年7月1日；176巻(1号)：27～35頁

【非特許文献4】Yung S及びChan TM、2012年、The Role of Hyaluronan and CD44 in the Pathogenesis of Lupus Nephritis、Autoimmune Dis. 2012巻(2012年)、論文ID 207190、9頁

【非特許文献5】Patrick J. Mott、CD44 Antibodies and Immune Thrombocytopenia in the Amelioration of Murine Inflammatory Arthritis、PLoS One、2013年、8巻(6号)：e65805

【非特許文献6】John A. Ice、Genetics of Sjogren's syndrome in the genome-wide association era、J Autoimmun. 2012年8月；39巻(1～2号)：57～63頁

【非特許文献7】Roman Fischer、2011年、Discovery of Candidate Serum Proteomic and Metabolomic Biomarkers in Ankylosing Spondylitis、Mol Cell Proteomics、2012年2月；11巻(2号)：M111.013904

【非特許文献8】Estess Pら、1998年、Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity、J Clin Invest. 1998年9月15日；102巻(6号)：1173～82頁

【非特許文献9】Wen-Qing Li、2013年、Psoriasis, psoriatic arthritis and increased risk of incident Crohn's disease in US women、Ann Rheum Dis. 2013年7月；72巻(7号)：1200～5頁

【非特許文献10】Henry S. Su、2012年、Vasculitis: Molecular Imaging by Targeting the Inflammatory Enzyme Myeloperoxidase、Radiology、2012年1月；262巻(1号)：181～90頁

【非特許文献11】M. B. Owlia、2012年、Behcet's Disease: New Concepts in Cardiovascular Involvements and Future Direction for Treatment、ISRN Pharmacol、2012年：760484

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明の目的は、表面細胞受容体CD44を過剰発現する疾患において、活性化合物の部位送達に好適な、HAとそのような活性化合物とのコンジュゲーションに基づく新しい化合物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0020】

したがって、本発明は、グリコサミノグリカンを薬物とコンジュゲートさせた化合物であって、上記薬物が、CD44の発現と高度に関連する炎症の疾患を治療するために使用される化合物を提供する。

【0021】

第1の態様では、本発明の目的は、グリコサミノグリカン及び活性化合物に由来するコンジュゲート体からなる化合物であって、上記活性化合物が、官能基により、グリコサミ

10

20

30

40

50

ノグリカン、その誘導体、又はその塩のカルボキシル酸基にコンジュゲートされて、共有結合によるコンジュゲーションを形成し、上記活性化合物が、抗炎症薬、抗アレルギー薬、及びステロイドを含む化合物である。

【0022】

本発明によるコンジュゲート体のグリコサミノグリカンは、好ましくはヒアルロン酸である。

【0023】

更に、本発明によるグリコサミノグリカンコンジュゲート体は、好ましくは、炎症疾患を治療するために使用されるものである。

【0024】

したがって、第2の態様では、本発明の更なる目的は、炎症を治療するための、及び上記治療処置用の医薬組成物を調製するための、グリコサミノグリカン及び活性化合物に由来するコンジュゲート体からなる化合物の使用であって、上記活性化合物が、官能基により、グリコサミノグリカン、その誘導体、又はその塩のカルボキシル酸基にコンジュゲートされて、共有結合によるコンジュゲーションを形成し、上記活性化合物が、セレコキシブ、フェキソフェナジン、ブデソニド、及びプレドニゾロンからなる使用である。

【0025】

また更なる態様では、本発明の目的は、グリコサミノグリカン及び活性化合物に由来するコンジュゲート体からなる化合物を調製するための方法であって、上記活性化合物が、官能基により、グリコサミノグリカン、その誘導体、又はその塩のカルボキシル酸基に結合されて、共有結合によるコンジュゲーションを形成し、上記活性化合物が、セレコキシブ、フェキソフェナジン、ブデソニド、及びプレドニゾロンからなる方法である。

【0026】

本発明を適切に説明するために、その実施形態への参照が、添付の図面に示されている。添付されているこれら図面は、本明細書の一部を形成する。しかしながら、添付図面は、それらの範囲を限定するとみなされるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】正常結腸組織及び傷害結腸組織におけるヒアルロン酸(HA)の親和性を、蛍光インデックスにより示す図である。

【図2A】HCT15細胞系及びHT29細胞系に作用するHA-色素化合物の蛍光結果の、6時間のHCT15細胞系を表わす図である。

【図2B】HCT15細胞系及びHT29細胞系に作用するHA-色素化合物の蛍光結果の、12時間のHCT15細胞系を表わす図である。

【図2C】HCT15細胞系及びHT29細胞系に作用するHA-色素化合物の蛍光結果の、6時間のHT29細胞系を表わす図である。

【図2D】HCT15細胞系及びHT29細胞系に作用するHA-色素化合物の蛍光結果の、12時間のHT29細胞系を表わす図である。

【図3】HA-セレコキシブコンジュゲート体の構造を示す図である。

【図4】対照、リポポリサッカリド(LPS)、HA、セレコキシブ(Cele)、及びHA-セレコキシブコンジュゲート体(HA-celle)のRaw264.7細胞系に対する抗炎症効果を示す図である。ここでの炎症インデックスは、プロスタグランジンE₂(PGE₂)量の変化割合である。

【図5】HA-ADH-ブデソニドコンジュゲート体の構造を示す図である。

【図6】対照(control)、LPS、HAプラスLPS(HA+LPS)、ブデソニド(bude)、ブデソニドプラスLPS(bude+LPS)、HA-ブデソニドコンジュゲート体(HA-bude、「HA-bude」は、「HA-ADH-ブデソニド」を表わす)、及びHA-ブデソニドコンジュゲート体プラスLPS(HA-bude+LPS)のRAW254.7細胞系に対する抗炎症効果を示す図である。ここでの炎症インデックスは、亜硝酸塩(NO)濃度の変化である。

10

20

30

40

50

【図7】HA-ADH-フェキソフェナジンコンジュゲート体の構造を示す図である。

【図8】対照、LPS、HA、フェキソフェナジン(Fexo)、及びHA-フェキソフェナジンコンジュゲート体(HA-fexo、「HA-fexo」は、「HA-ADH-フェキソフェナジン」を表わす)のRaw264.7細胞系に対する抗炎症効果を示す図である。ここでの炎症インデックスは、プロスタグランジンE₂(PGE₂)量の変化割合である。

【図9】HA-ADH-プレドニゾンコンジュゲート体の構造を示す図である。

【図10】対照、LPS、HA、プレドニゾン(Pred)、及びHA-プレドニゾンコンジュゲート体(HA-pred、「HA-pred」は、「HA-ADH-プレドニゾン」を表わす)のRaw264.7細胞系に対する抗炎症効果を示す図である。ここでの炎症インデックスは、プロスタグランジンE₂(PGE₂)量の変化割合である。

10

【図11】対照(賦形剤)、プレドニゾン(Pred)、プレドニゾンとコンジュゲートされたHA(HA-ADH-Pred)、及びHAによる、関節リウマチ(RA)の治療効果を示す図である。ここでの治療インデックスは、足掌の厚さ(平均±SE)の変化割合である。ラットには、D1~D13の間、RAを誘導する餌が与えられ、D14で投薬した。データは、ノンパラメトリック統計により算出した。賦形剤群に対して、* p < 0.05; Prep群に対して、# p < 0.05、及びHA群に対して、& p < 0.05。

【図12】対照(賦形剤)、プレドニゾン(Pred)、プレドニゾンとコンジュゲートされたHA(HA-ADH-Pred)、及びHAによる、関節リウマチ(RA)の治療効果を示す図である。ここでの治療インデックスは、足首周囲(平均±SE)の変化割合である。ラットには、D1~D13の間、RAを誘導する餌が与えられ、D14で投薬した。データは、ノンパラメトリック統計により算出した。賦形剤群に対して、* p < 0.05; Prep群に対して、# p < 0.05、及びHA群に対して、& p < 0.05。

20

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明の他の目的、利点、及び新規な特徴は、添付図面を参照した、以下の詳細な説明からより明白になるだろう。

【0029】

一般的に、経口投与された又は循環系に注射された薬物は、その標的治療領域に直接到着しなければならない。したがって、標的疾患及び正常器官に対する薬効は、標的部位での濃度及び特異性がそれほど高くないため、非常に類似したものになり、安全性プロファイルにより制限を受ける。

30

【0030】

良好な安全性プロファイルを有するものを組み合わせて治療効力を向上させるための1つの戦略は、薬物をキャリアと共有結合で結合させることにより、疾患領域に対してより標的選択的になるように薬物を修飾することである。これは、以前に予期されているように、抗炎症療法の分野で特に求められている必要性である。

【0031】

この目的で、本発明者は、活性物質を標的送達するために、ヒアルロン酸(HA)とその受容体CD44との相互作用を活用するという着想を得た。

40

【0032】

正常組織又は正常器官よりも標的部位においてより高い薬物の濃度を維持するという発想は、本発明者が、HAに関する長期研究及び実験を続けたことにより確立されたものである。

【0033】

本発明はその結果から生み出されたものであるが、それらは、実施例で十分に説明されており、以下に簡便に要約されている。

【0034】

50

実際、本発明では、異なる平均分子量 (MW) を有するヒアルロン酸が、正常組織よりも傷害組織でより高い付着インデックスを示し、低平均分子量を有する HA が、高平均分子量を有する HA よりも良好な性能を示すことが見出されている。特に、図 1 に示されているように、傷害結腸組織に付着した 3 つの平均分子量の HA の違いを比較すると、傷害結腸組織による 350 KDa の HA の付着の蛍光インデックスは、他の 2 つの平均分子量 (2000 KDa = 2 MDa) 及び (1000 KDa = 1 MDa) の HA よりも高かった。更に、正常結腸組織又は傷害結腸組織の場合でさえも、1 MDa HA の付着の蛍光インデックスは、2 MDa HA よりも高かった。この結果により、HA は、より特異的に炎症部位に付着することができることが確認された。

これを受けて、本発明者は、更に本発明を発明し、その表面細胞受容体 CD44 との HA の相互作用によると考えられる、ヒアルロン酸の組織付着のこの独特の特徴を、このグリコサミノグリカンが他の化合物とコンジュゲートされた場合に維持することができるかどうかを検証する。したがって、更に、本発明者は、HA を標的送達媒体として使用して、薬物を CD44 豊富な部位に導くことができるかどうかを検証するために、薬物を HA にコンジュゲートさせる。前述したように、CD44 が、炎症、感染症、又は癌が存在する状況中に過剰発現される場合、関連薬物は、リガンド HA が受容体 CD44 に結合するため、標的部位に容易に到着し、標的部位で相対的に高い濃度を保持することができる。

炎症部位又は CD44 豊富な部位に対する HA の付着効果に伴って、コンジュゲート薬物は、標的部分に特に凝集し、その部位での薬物の濃度が比較的より高くなるため療法効力が増強され、したがって、使用される薬物の量が減少され、安全性プロフィールがより良好になるはずである。薬物又は色素の HA とのコンジュゲーションが成功したことを確認し、更に HA 結合効果を確認するために、本発明の発明者は、色素を HA にコンジュゲートさせ (HA - 色素)、細胞系及びマウスを別々に処置することを含む実験を実施した。

図 2 A 及び図 2 B は、細胞系 HCT15 (CD44 がより少ない結腸直腸腺癌) における様々な作用時間での実験を示し、図 2 C 及び図 2 D は、細胞系 HT29 (CD44 が豊富な結腸直腸腺癌) における様々な作用時間での実験を示す。HT29 (図 2 C 及び図 2 D) の結果は、HA - 色素のコンジュゲーションが成功し、HT29 の CD44 豊富な領域に結合し (図 2 C)、更に HT29 細胞内に進入したことを示す (図 2 D)。これは、本発明の発想が適切及び有効であることを意味し、薬物又は色素を HA にコンジュゲートさせることができ、HA は、CD44 に結合するその能力を保持することも意味する。

【0035】

4 週間の、マウスの HT29 及び HCT15 の細胞系での遊離色素及び HA - 色素の結合条件を実施した。遊離色素をマウスの尾静脈に注射した。結果は、2 つの異なる CD44 発現癌細胞の結合結果に差異が一切ないことを示した。HT29 の結合面積の比率は、50.15% である一方で、HCT15 は、49.86% である。しかしながら、HA コンジュゲート色素をマウス尾静脈に注射した場合、より多くの CD44 を発現する癌細胞 HT29 は、HA コンジュゲート色素の著しい濃度を示したが、より少ない CD44 を発現する HCT15 は、非常に限定的な結果を示した。

HT29 の結合面積の比率は、74.15% であるが、HCT15 は、25.85% である。結果は、色素を HA とコンジュゲートさせた場合、色素の濃度は、HA が CD44 豊富な部位に結合するため、増加したことを示すことができる。

【0036】

CD44 と高度に関連する疾患には、癌、感染症、及び炎症が含まれる。感染性病原体には、これらに限定されないが、幾つかのウイルス、細菌、真菌、原虫、多細胞寄生生物、及びプリオンとして知られている異常タンパク質が含まれる。これら病原体は、病原体が存在しないと感染性流行が生じないという意味で、疾患流行の原因である。

好ましい実施形態では、感染症には、下気道感染症、HIV/エイズ、下痢性疾患、結核、マラリア、麻疹、百日咳、破傷風、髄膜炎、梅毒、B 型肝炎、敗血症、及び熱帯病が含まれる。炎症性異常は、非常に様々なヒト疾患の根底にある障害の大きなグループであ

10

20

30

40

50

る。好ましい実施形態では、炎症性疾患は、尋常性ざ瘡、アレルギー性疾患、喘息、自己免疫疾患、セリアック病、慢性前立腺炎、糸球体腎炎、過敏症、炎症性腸疾患、骨盤内炎症性疾患、再灌流傷害、関節リウマチ、サルコイドーシス、移植拒絶反応、血管炎、及び間質性膀胱炎が含まれる。

【0037】

本明細書及び特許請求の範囲では、用語「薬物」又は「化合物」又は「作用剤」は、本発明で使用される場合、抗喘息薬、抗ヒスタミン薬、抗感染症薬物、抗炎症薬、抗アレルギー薬、抗ウイルス薬、免疫抑制剤、NSAID（非ステロイド系抗炎症薬）、及びステロイドを含んでいてもよい。それらの中で、抗アレルギー薬、抗感染症薬、抗炎症薬、及びステロイドが好ましい。

10

大多数の抗アレルギー薬は、フェキソフェナジン、セチリジン、マレイン酸クロルフェニラミン、ブソイドエフェドリン、及びブデソニド等の、抗ヒスタミン、抗炎症剤、うっ血除去薬、及びステロイドに分割することができる。大多数の抗感染症薬は、皮膚又は粘膜に外部的に使用され、血流に進入せず、肝臓で新陳代謝されない局所的抗感染症手段、及び経口又は注射投与で内臓感染症を治療するために使用される全身性抗感染症手段に分割することができる。大多数の抗炎症薬は、非ステロイド抗炎症剤、又はNSAID、COX-2アンタゴニスト、及びステロイドに分割することができる。

【0038】

別の実施形態では、適切な薬物の例は、抗喘息薬、抗真菌薬、抗ヒスタミン薬、抗炎症薬、抗ウイルス薬、NSAID、及びそのステロイドである。好ましい実施形態では、サルブタモールを含む抗喘息薬、ニメスリド、セレコキシブ、メロキシカム、ジクロフェナク、及びピロキシカムを含むNSAID、フェキソフェナジンを含む抗アレルギー薬、アムホテリシンBを含む抗真菌薬、リバビリンを含む抗ウイルス薬、並びにブデソニド及びプレドニゾロンを含むステロイドのHAとのコンジュゲーションが好ましい。更に、COX-2アンタゴニストは、セレコキシブを含む。

20

【0039】

本発明の目標は、HAのカルボキシル基、ヒドロキシル基、又はアミノ基により、リンカー又はスペーサーを用いて又は用いずに、HAを前述の薬物と結合又はコンジュゲートさせて、特定の位置及び特定の時間で作用効果を達成することである。したがって、豊富なCD44を有する特定部位に薬物を運ぶ標的送達媒体としてのHAは、より良好な治療効力及び安全性をもたらすことができる。

30

【0040】

本明細書で使用される場合、一般的に、用語「リンカー」又は「スペーサー」は、化合物の2つの部分を連結する有機部分を意味する。リンカーは、典型的には、直接結合、又は酸素若しくは硫黄等の原子、SS、NH、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NH等の単位、又は1つ若しくは複数のメチレンが、O、S、S(O)、SO₂、NH、NH₂、C(O)により中断又は終了されていてもよい置換又は非置換アルキル等の原子の鎖を含む。本発明の用語「リンカー」又は「スペーサー」は存在しなくともよく、化学的に、酵素的に除去されてもよく又は自然に分解してもよい、薬物とHAとの間に存在する任意の化学化合物を指す。また、用語「リンカー」又は「スペーサー」は、薬物を連結するのに有用な少なくとも1つの他の基、例えば、アミノ基、チオール基、更にはカルボキシル基等も含む。リンカー又はスペーサーは、ポリペプチド、ペプチド、又は脂質であってもよい。

40

【0041】

好適なリンカー又はスペーサーは、例えば、アジピン酸ジヒドラジド(ADH)、直鎖又は分岐、脂肪族、芳香族、又は芳香脂肪族C₂~C₂₀ジカルボン酸、アミノ酸、ペプチドである。

【0042】

リンカーの役割は、存在する場合はいつでも、ヒアルロン酸と薬物との間にアーム又はスペーサーを生成することにある。リンカーは、一方の側では、アミド、カルボキシル基

50

、ヒドロキシル基、又はアミノ基連結によりH Aと結合し、他方の側では、任意の考え得る共有結合型の結合により薬物と結合する。

【0043】

リンカー又はスペーサーがジカルボン酸である場合、薬物とエステル結合を形成するカルボキシル基は、化合物のヒドロキシル基であってもよい。リンカー又はスペーサーがジヒドラジドである場合、H Aとアミド結合を形成するアミノ基は、H Aの自由カルボキシル基であってもよい。好ましいリンカー又はスペーサーは、薬物に対してはコハク酸、H Aに対してはアジピン酸ジヒドラジドである。

【0044】

好ましい実施形態では、本発明は、グリコサミノグリカン、好ましくはヒアルロン酸、及び活性化合物に由来するコンジュゲート体からなる化合物であって、上記活性化合物が、官能基により、グリコサミノグリカン、その誘導体、又はその塩のカルボキシル酸基にコンジュゲートされて、共有結合によるコンジュゲーションを形成し、上記活性化合物が、抗炎症薬、抗アレルギー薬、及びステロイドからなる化合物を提供する。

10

【0045】

活性化合物である、COX-2アンタゴニストであるセレコキシブを含む抗炎症薬、フェキソフェナジンを含む抗アレルギー薬、並びにブデソニド及びプレドニゾロンを含むステロイドは、好ましくは、H Aの官能性カルボキシル基及び活性化合物の-NH₂基により、好ましくは直接的に又はリンカーを介して間接的に結合されていてもよい。

【0046】

本発明の好ましい実施形態では、直接的又はリンカーを介して間接的のいずれでもよい、H A及び活性化合物の官能性カルボキシル基の1つとの間の共有結合によるコンジュゲーションは、アミド結合又はエステル結合のいずれでもよい。

20

【0047】

リンカーによる間接的コンジュゲーションの場合、上記リンカーは、ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、ポリペプチド、ペプチド、脂質、アミノ酸、又は直鎖若しくは分岐、脂肪族、芳香族、又は芳香脂肪族C₂~C₂₀ジカルボン酸から選択される。

【0048】

コンジュゲーション用の好ましいH Aは、5kDaから2000kDaまでを含む範囲の平均分子量を有し、コンジュゲーションには、H Aのカルボキシル基の少なくとも40%

30

【0049】

感染症、傷害、自己免疫疾患、又はアレルギー、及び関節リウマチを含む自己免疫疾患により誘導又は引き起こされる急性又は慢性炎症を治療するためには、本発明の製剤又は剤形の好ましい実施形態は、経口使用用又は循環系使用用の投与剤形を製剤化するための賦形剤及び/又は希釈剤を含む。経口剤形のより好ましい実施形態は、固形剤形、これらに限定されないが、懸濁液を含む溶液、これらに限定されないが、制御放出錠剤含む錠剤、及びこれらに限定されないが、腸コーティングカプセルを含むカプセルからなる群から選択される。循環系又は全身性投与形態のより好ましい実施形態は、静脈内(IV)、筋肉内(IM)、及び皮下(SC)からなる群から選択される。

40

【0050】

以下の例は、本発明の種々の実施形態を示す目的で挙げられおり、いかなる様式でも本発明を限定することは意図されていない。

【0051】

実施例

実施例1：結腸組織でのH Aの付着(IVIS画像システム-バージョン3) 手順：

1. 0.25gの高分子量ヒアルロン酸ナトリウム粉末(HHA; Mw:2MDa; Freda社)及び0.25gの低分子量ヒアルロン酸ナトリウム粉末(LHA; Mw:0.35MDa; Freda社)を、それぞれ50mLのPBS緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水)に添加して、0.5%の溶液を形成し、その後、粉末が完全に溶解するまで6時

50

間攪拌した。0.25 gの中分子量ヒアルロン酸ナトリウム粉末(MHA; Mv: 1MDa; Freda社)を、50 mLのPBS緩衝液に添加し、その後、粉末が完全に溶解し、下記ステップで使用する準備ができるまで、6時間攪拌した。

【0052】

2.

(1) 蛍光性HA(HA-f)を、0.39 gのMES遊離酸(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、Calbiochem社)により調製し、100 mLのdd水に溶解した。

(2) 溶液A: 65 mgのフルオレセインアミン粉末(アイソマーI、Fluka社)を、9 mLの95% EtOH溶液に溶解し、その後、光が禁止された条件下で10分間攪拌した。

(3) 溶液B: 359 mgのEDC粉末(N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N-エチルカルボジイミド塩酸塩、Sigma社)を、9 mLのMES緩衝液に溶解し、その後10分間攪拌した。

(4) 溶液C: 216 mgのNHS粉末(N-ヒドロキシスクシンイミド)、Sigma社)を、9 mLのMES緩衝液に溶解し、その後、10分間攪拌した。

(5) 3 mLの溶液Aを、50 mLの0.5% HA溶液にゆっくりと落下させ、その後、光が禁止された条件下で10分間攪拌した。

(6) 3 mLの溶液B及び5 mLの溶液Cを、ステップ(5)の溶液に別々に落下させ、その後、光が禁止された条件下で10分間攪拌した。

(7) 0.02 MのMES緩衝液を、容積が100 mLになるまで、ステップ(6)の溶液にゆっくりと添加し、その後、光が禁止された条件下で室温にて24時間攪拌した。

(8) 透析溶液としての5 Lのdd水中の透析チューブ(MW: 12000~14000)に、反応後の産物を注ぎ、その後、光が禁止された条件下で4にて5日間、12時間毎に透析溶液を換え、透析溶液が蛍光を示さなくなるまで攪拌した。

(9) 透析後の液体を、50 ccのプラスチック遠心分離管に配分し、その後、-20の冷蔵庫で一晩保存し、次に、光が禁止された条件下にて凍結乾燥機で乾燥した。

(10) 乾燥したHA-f粉末を、-20の冷蔵庫で保存した。

(11) 50 mgのHA-f粉末を、10 mLのPBS緩衝液にゆっくりと添加し、その後、粉末が完全に溶解するまで、6時間攪拌した。

【0053】

3. 7~8週歳のSD-ラット(Sprague-Dawleyラット)の結腸組織をメスで切断し、その後PBS緩衝液で洗浄し、次に3~4 cmの長さに切断し、最終的にPBS緩衝液に浸漬した。

【0054】

4. 歯ブラシで縦に20回ブラシをかけ、その後PBS緩衝液に浸漬することにより、傷害結腸組織を調製した。

【0055】

5. 正常結腸組織及び傷害結腸組織を、12ウエルプレートに入れ、その後1 mLの0.5% HA-f溶液を各ウエルに添加し、室温で2時間振とうした。余分のHA-f溶液を、2時間後にチップで吸引し、その後PBS緩衝液に10分間浸漬し、次に3回繰り返してPBS緩衝液を除去した。

【0056】

6. 洗浄した結腸組織を、12ウエルプレートの内側組織の上に配置し、その後IVIS(in vivo画像システム、XENOGEN社)のドックに配置した。初期設定パラメーターは、GFP(緑色蛍光タンパク質)として設定したが、励起は465 nmであり、発光は500 nmだった。その後、画像をソフトウェアでキャプチャした。

【0057】

7. 値は全て、n回観察の平均として算出されている。組織学的インデックスは、スチューデントのt検定で分析した。

10

20

30

40

50

【0058】

結果：蛍光インデックスを定量化し、図1のように整理した。正常結腸組織の蛍光インデックスを1と定義した。他の結腸組織試験は、定義された値で校正した。結果は、同じ平均Mwを有するHAは、正常結腸組織でよりも明らかに高い蛍光インデックスで、傷害結腸組織に付着したことを示した ($P < 0.01$)。傷害結腸組織に付着した3つの異なる平均分子量のHA間の違いを比較すると、傷害結腸組織による350kDa HAの付着の蛍光インデックスは、他の2つの平均分子量(2MDa)及び(1MDa)のHAよりも明らかに高かった。更に、正常結腸組織又は傷害結腸組織の場合でさえも、1MDa HAの付着の蛍光インデックスは、2MDa HAよりも高かった。

【0059】

実施例2：HA-色素コンジュゲーションプロセス及びHA-色素の*in vitro*画像

HA-色素コンジュゲーションの以下の全プロセスは、暗所で維持されなければならない。

HA-ADHの合成

1. HA (0.34MDa、50mg)を水に溶解して、4mg/mLの濃度を得た。
2. 5倍過剰のADH (114.8mg)をこの溶液に添加した。
3. 反応混合物のpHを、0.1NのHClを添加することにより4.75に調整した。
4. 次に、1当量のEDC (25.1mg)を固体形態で添加した。反応混合物のpHを、0.1NのHClを添加することにより4.75に調整した。
5. 15分の反応後、0.1NのNaOHを添加することにより反応を停止させ、反応混合物のpHを7.0に調整した。
6. その後、反応混合物を、前処理した透析チューブ (Mwカットオフ3500)に移し、100mMのNaClに対して、次に25% EtOH/水の4サイクル、最後に水に対して、徹底的に透析した。その後、この溶液を、0.2µmセルロースアセテート膜でろ過し、瞬間凍結し、凍結乾燥した。
7. ADHの置換度を、¹H NMRで測定した。

【0060】

HA-ADH-FITCの合成

1. 88mgのHA-ADH (DS = 36%)を、35mLの水に溶解した。
2. 9.5mgのFITCを、10mLのDMSOに溶解した。
3. HA-ADH溶液及びFITC溶液を混合する。
4. 室温で48時間攪拌した後、MWCO 12000 ~ 14000の透析バッグを使用して、溶液を、0.3MのNaCl及び純水で交互に3日間透析した。
5. その後、この溶液を2日間凍結乾燥した。
6. 最後に、置換度を、UVスペクトラムで決定した。

【0061】

HA-色素の*in vitro*画像

- (1) 1×10^5 個のHT29細胞及びHCT15細胞 (ヒト結腸癌、CD44陽性細胞)を、3.5cmディッシュ内の顕微鏡スライドに接種した。
- (2) 示されている色素濃度、1µMのHA-色素 (HA: 0.34MDa)を、示されている時間、細胞にそれぞれ添加した。
- (3) インキュベーション後、細胞をPBSで洗浄し、その後3.7%ホルムアルデヒドで固定した。
- (4) HA-色素と細胞との相互作用の観察を、共焦点顕微鏡で実施した。

【0062】

結果：蛍光観察は、HCT15 (図2A及び図2B)及びHT29 (図2C及び図2D)に対する色素の付着部位及び量を示すことができる。結果は、色素のHAとのコンジュ

10

20

30

40

50

ゲーションが成功し、HAが、HT29のCD44豊富な部位でのHA-色素濃度を増強するが、HT29は、HCT15が有するよりも豊富なCD44に合致する、より強い蛍光を示すことを明らかにする。HA-色素が細胞に進入することができることさえ証明された(2D図)。HA-色素は、HT29(より多くのCD44)では、6時間の処理後に蓄積され、12時間の処理の後に内在化された。そのような現象は、HCT15(より少ないCD44)では、6時間又は12時間のHA-色素の処理後に観察されなかった。

【0063】

実施例3：HA-セレコキシブコンジュゲート体の合成

手順：

1. 100mgのHA(10K~700kDa)を25mLのDD水に溶解した。 10
2. 0.8当量の水酸化テトラブチルアンモニウム(TBA-OH)を、HA溶液に添加し、16時間撹拌した。
3. この溶液を乾燥し、HA-TBA白色固形物を得た。
4. 40mgのHA-TBAを、1mLのDD水に溶解し、その後、この溶液に30mgのEDC及び18mgのNHS粉末を添加し、室温で5分間撹拌した。
5. 4mgのセレコキシブを、2mLのジメチルスルホキシド(DMSO)溶液に溶解した。
6. この混合物(HA-TBA、EDC、NHS、及びセレコキシブ)を、室温で72時間撹拌した。
7. 透析器バッグ(MWCO:1200~1400)を使用することにより、混合物を、割合が2対1であるDMSO及びDD水に対して1日間透析した。溶液は3回交換した。 20
8. その後、透析器バッグ(MWCO:1200~1400)を使用することにより、混合物を、0.3MのNaClに対して2日間透析した。溶液は、1日2回交換した。
9. HA-セレコキシブ溶液を凍結乾燥機で脱水することにより、HA-セレコキシブ粉末を得た。

図3には、HA-セレコキシブコンジュゲート体の構造が示されている。

【0064】

実施例4：HA-セレコキシブのRAW264.7細胞に対する*in vitro*抗炎症効果。 30

手順：

1. RAW264.7細胞(1×10^6 細胞/ウェル、1000 μ L)を、24ウェル培養プレートで、24時間37℃にて5%CO₂の存在下で培養した。
2. 10%FBSを含有するDMEMに培地を変更し、細胞を、種々の濃度の化合物(100nMセレコキシブ、HA-セレコキシブ(100nMセレコキシブと等しい)、及び4.9 μ g/mLのHA)で4時間処理し、その後1 μ g/mLのリボポリサッカリド(LPS)で24時間処理した。
3. 細胞培地を収集し、PGE₂の測定に使用した。
4. Nunc-Immuno 96ウェルプレートを、ヤギポリクローナル抗マウスIgG二次抗体でコーティングした。 40
5. 細胞培地の分割量を、一次PGE₂モノクローナル抗体及びトレーサPGE₂アセチルコリンエステラーゼを有する免疫プレートに、暗所で室温にて一晚添加した。
6. 翌日、ウェルを吸引し、100 μ Lの洗浄緩衝液(Cayman Chemical社、アンアーバー、ミシガン州、米国)で5回洗浄した。
7. 200 μ Lのエルマン試薬を各ウェルに添加し、直射日光を避けて室温にて60~90分インキュベートした。
8. 穏やかな回転/振とうを使用して、発色に必要な時間を減少させた。
9. 吸光度を412nmで測定した。
10. 各試料のPGE₂濃度を、PGE₂標準曲線から算出した。
11. PGE₂量パーセントは、LPS処理された対照群の1つで除算し、次にこの 50

値に100を掛けた、各試料のPGE₂レベルの関数としてであった。

12. PGE₂の実際の量は、LPS処理した対照群の場合、1370 ng/mLであると推定した。

【0065】

結果：図4に示されているように、インデックスがPGE₂の量であるため、LPSによる炎症の誘導は成功した。薬物みの群(セレコキシブ)は、治療効果を示す。しかしながら、HAをセレコキシブでコンジュゲートすると(HA-cel e)、薬物のみよりも良好な治療効果を示す。

【0066】

実施例5：HA-ADH-ブデソニドコンジュゲート体の合成

10

手順：

HA-ADHの合成：

1. HA(50 mg)を水に溶解して、4 mg/mLの濃度を得た。
2. 5倍過剰のADH(114.8 mg)をこの溶液に添加した。
3. 反応混合物のpHを、0.1 NのHClを添加することにより4.75に調整した。
4. 次に、1当量のEDC(25.1 mg)を固体形態で添加した。反応混合物のpHを、0.1 NのHClを添加することにより4.75に調整した。
5. 15分の反応後、0.1 NのNaOHを添加することにより反応を停止させ、反応混合物のpHを7.0に調整した。

20

6. その後、反応混合物を、前処理した透析チューブ(Mwカットオフ3500)に移し、100 mMのNaClに対して、次に25% EtOH/水の4サイクル、及び最後に水に対して徹底的に透析した。その後、この溶液を、0.2 μmセルロースアセテート膜でろ過し、瞬間凍結し、凍結乾燥した。

7. ADHの置換度は、¹H NMRで測定した。

【0067】

HA-ADH-ブデソニドの合成：

1. EDC及びNHSを使用して、ブデソニドスクシナートのカルボキシル基をHA-ADHのアミン基と化学コンジュゲーションすることにより、HA-ADH-ブデソニドスクシナートを形成した。
2. 7.4 mgのブデソニドスクシナートを、1 mLのDMSOに溶解し、14.5 μmolのEDC及び14.5 μmolのNHSを含有する1 mLの純水と5分間反応させた。
3. 5分後、混合溶液を、20 mgのHA-ADHを含有する8 mLの水：DMSO = 1：1 (v/v)に滴加した。
4. 混合溶液を、室温(約30)で24時間攪拌した。
5. 24時間後、MWCO 12000~14000の透析バッグを使用して、この溶液を、0.3 MのNaCl及び純水で交互に3日間透析した。
6. その後、この溶液を2日間凍結乾燥し、4 で保管した。
7. 最後に、置換度を、¹H-NMRで決定した。

30

40

結果：図5には、HA-ADH-ブデソニドコンジュゲート体の構造が示されている。

【0068】

実施例6：HA-ADH-ブデソニドのRAW264.7細胞に対するin vitro抗炎症効果

手順：

1. Raw264.7細胞を、フェノールレッド(Gibco-BRL社、ウィーン、オーストリア)を含まない培養培地に懸濁し、10⁶細胞/mLに調整し、10 μMのブデソニド、378 μg/mLのHA、及びHA-ADH-ブデソニド(10 μMブデソニドと等しい)で処理した。
2. 薬物で4時間処理した後、1 μg/mLのLPSを、24時間培地に添加した。

50

3. 培地で処理した細胞は、陰性対照群としての役割を果たしたに過ぎず、陽性対照群としてLPS (1 μ g/mL) で処理した。

4. その後、培養上清を除去し、誘導型NOS活性を測定するために、グリース反応により酸化窒素を蓄積させた。

5. 100 μ Lのグリース試薬(2.5%のリン酸中の1%スルファニルアミド、0.1%のナフチルエチレンジアミン二塩酸塩)を、100 μ Lの培養上清に添加し、発色は、ELISAマイクロプレートリーダー(SpectraMax(登録商標)M2eマルチモードプレートリーダー、Molecular Devices社、米国)を用いて550 nmで評価した。

6. フェノールレッドを含まない培養培地に溶解した亜硝酸ナトリウムの系列希釈を用いて標準曲線を生成した。

結果：図6に示されているように、LPSのみの群と比較すると、HA+LPS、bude.+LPS、及びHA-bude+LPS(「HA-bude」は、「HA-ADH-ブデソニド」を表わす)、群HA+LPS及びHA-bude+LPSは、治療効果を示している。炎症インデックスは、ここでは亜硝酸塩である。

【0069】

実施例7：HA-ADH-フェキソフェナジンコンジュゲート体の合成

手順：

1. EDC及びNHSを使用して、フェキソフェナジンのカルボキシル基をHA-ADHのアミン基と化学コンジュゲートすることにより、HA-ADH-フェキソフェナジンを合成した。

2. 7.8 mgのフェキソフェナジンを、1 mLのDMSOに溶解し、73.3 μ molのEDC及び73.9 μ molのNHSを含有する1 mLの純水と5分間反応させた。

3. 5分後、混合溶液を、20 mgのHA-ADHを含有する8 mLの水：DMSO = 1：1 (v/v) に滴加した。

4. 混合溶液を、室温(約30)で24時間攪拌した。

5. 24時間後、MWCO12000~14000の透析バッグを使用して、この溶液を、0.3 MのNaCl及び純水で交互に3日間透析した。

6. その後、この溶液を2日間凍結乾燥し、4 で保管した。

7. 最後に、置換度を、¹H-NMRで決定した。

結果：図7には、HA-ADH-フェキソフェナジンコンジュゲート体の構造が示されている。

【0070】

実施例8：HA-ADH-フェキソフェナジンのRAW264.7細胞に対する*in vitro*抗炎症効果。

手順：

1. RAW264.7細胞(1 \times 10⁶細胞/ウェル、1000 μ L)を、37 にて24時間、5%CO₂の存在下で24ウェル培養プレートにてインキュベートした。

2. 10%FBSを含有するDMEMに培地を変更し、細胞を、種々の濃度の化合物(100 μ Mフェキソフェナジン、HA-ADHフェキソフェナジン(100 μ Mフェキソフェナジンと等しい)で4時間処理し、その後1 μ g/mLのLPSで24時間処理した。

3. 細胞培地を収集し、PGE₂の測定に使用した。

4. Nunc-Immuno 96ウェルプレートを、ヤギポリクローナル抗マウスIgG二次抗体でコーティングした。

5. 細胞培地の分割量を、一次PGE₂モノクローナル抗体及びトレーサPGE₂アセチルコリンエステラーゼを有する免疫プレートに、暗所で室温にて一晚添加した。

6. 翌日、ウェルを吸引し、100 μ Lの洗浄緩衝液で5回洗浄した。

7. 200 μ Lのエルマン試薬を各ウェルに添加し、直射日光を避けて室温にて60

10

20

30

40

50

～90分インキュベートした。

8. 穏やかな回転/振とうを使用して、発色に必要な時間を減少させた。

9. 吸光度を412nmで測定した。

10. 各試料のPGE₂濃度を、PGE₂標準曲線から算出した。

11. PGE₂量パーセントは、LPS処理された対照群の1つで除算し、次にこの値に100を掛けた、各試料のPGE₂レベルの関数としてであった。

12. PGE₂の実際の量は、LPS処理した対照群の場合、1370ng/mLであると推定した。

結果：図8に示されているように、薬物みの群（フェキソフェナジン）は、治療効果を示した。しかしながら、HAをフェキソフェナジンとコンジュゲートすると（HA-fexoxo、「HA-fexoxo」は、「HA-ADH-フェキソフェナジン」を表わす）、薬物のみよりも良好な治療効果を示す。

10

【0071】

実施例9：HA-ADH-プレドニゾンコンジュゲート体の合成

手順：

1. プレドニゾン21-ヘミエステルの合成：

2. ピリジン（8mL）中のプレドニゾン（1g；2.77mmol）及び無水コハク酸（1.125g；12.55mmol）の溶液を、室温で撹拌した。

3. 24時間後、反応混合物を、氷（25g）、水（25mL）、及び濃HCl（10mL）の混合物に注いだ。

20

4. 分離した結晶をろ過で収集し、水で洗浄し、乾燥し、トルエンから再結晶させ、再び一晚乾燥した。

5. 調製したヘミエステルを、¹H-NMR分光法で特徴付けた。

【0072】

HA-ADH-プレドニゾンヘミエステルの合成：

1. 溶液1：73.3μmol（14mg）のEDC及び73.9μmol（8.5mg）のNHSを、1mLの水に添加した。

2. 溶液2：14.5μmol（6.4mg）のプレドニゾンヘミエステルを、1mLのDMSOに溶解した。

3. 溶液3：20mg（ADH：14.5μmol）のHA-ADH（D.S=31%）を、8mLの共溶媒（水：DMSO=1：1）に溶解した。

30

4. 溶液1&2を混合し、5分間撹拌して、プレドニゾンヘミエステルのカルボニル基を活性化する。

5. 5分後、混合物を、撹拌混合下で溶液3に滴加した（1mL/分）。

6. 混合溶液を、室温（約30℃）で24時間撹拌した。

7. 24時間後、MWCO12000～14000の透析バッグを使用して、この溶液を、0.3MのNaCl/純水で交互に3日間透析した。

8. その後、この溶液を2日間凍結乾燥した。

9. 最後に、HA-ADH-Pre dの置換度を、¹H-NMRで決定した。

結果：図9には、HA-ADH-プレドニゾンコンジュゲート体の構造が示されている。

40

【0073】

実施例10：HA-ADH-プレドニゾンのRAW264.7細胞に対する*in vitro*抗炎症効果。

1. RAW264.7細胞（1×10⁶細胞/ウェル、1000μL）を、24時間37℃にて5%CO₂の存在下で、24ウェル培養プレートにてインキュベートした。

2. 10%FBSを含有するDMEMに培地を変更し、細胞を、種々の濃度の化合物（86.7μMプレドニゾン、HA-ADH-プレドニゾン（86.7μMプレドニゾンと等しい）、及び70μg/mLのHA）で4時間処理し、その後1μg/mLのLPSで24時間処理した。

50

3. 細胞培地を収集し、PGE₂の測定に使用した。
4. Nunc-Immuno 96 ウエルプレートを、ヤギポリクローナル抗マウス IgG 二次抗体でコーティングした。
5. 細胞培地の分割量を、一次 PGE₂ モノクローナル抗体及びトレーサ PGE₂ アセチルコリンエステラーゼを有する免疫プレートに、暗所で室温にて一晚添加した。
6. 翌日、ウエルを吸引し、100 μL の洗浄緩衝液で5回洗浄した。
7. 200 μL のエルマン試薬を各ウエルに添加し、直射日光を避けて室温にて60~90分インキュベートした。
8. 穏やかな回転/振とうを使用して、発色に必要な時間を減少させた。
9. 吸光度を412 nmで測定した。
10. 各試料のPGE₂濃度を、PGE₂標準曲線から算出した。
11. PGE₂量パーセントは、LPS処理した対照群の1つで除算し、次にこの値に100を掛けた、各試料のPGE₂レベルの関数としてであった。
12. PGE₂の実際の量は、LPS処理した対照群の場合、1370 ng/mLであると推定した。

10

結果：図10に示されているように、薬物みの群（プレドニゾロン）は、治療効果を示す。しかしながら、HAを、プレドニゾロンとコンジュゲートすると（HA-pred、「HA-pred」は、「HA-ADH-プレドニゾロン」を表わす）、薬物のみよりも良好な治療効果を示す。

20

【0074】

実施例11：HA-ADH-プレドニゾロンによる関節リウマチ（RA）の*in vivo*治療効果

手順：

1. 30匹の8週齢の雄Sprague-Dawleyラット（BioLASCO Taiwan CO., Ltd.）を準備した。ラットを、無作為に4つの群に分割した（賦形剤群及びプレドニゾロン群は、n=9、HA-ADH-プレドニゾロン群及びHA群は、n=6）。Institute of Taiwan Animal Technologyのげっ歯動物設備の1つのケージに、ラットを2匹ずつ入れた。
2. 10 mg/mLの加熱死ミコバクテリウムを含有する0.1 mLのCFA（完全フロイントアジュバント、10 mg/mL、Chondrex Inc.社）を右後肢の足蹠に皮下注射する。
3. 針は、足蹠の皮膚下に足首に向かって挿入されるべきである。これにより、流入膝窩リンパ節に対するアジュバントの送達が最大化される。
4. 重症及び急性炎が、注射の30数分以内に観察され、3~4日以内にピークに達し、20~25日間続くことが多い。
5. アジュバント誘導性関節炎（AIA）の誘導後の14日目に、プレドニゾロン又はHA-プレドニゾロン（両方とも10 mg/kg）、又は対照としての生理食塩水を静脈内注射することにより、ラットを処置した。
6. 処置後の20日目にラットを犠牲にし、その後、組織を単離した。

30

関節炎測定：

40

足掌の厚さ及び足首周囲：足掌の厚さは、Mitsuyo社製デジマチックカリパス等のカリパスを使用して、足掌直径を測定することにより決定した。足首周囲は、2つの垂直な直径、側方-横方向の直径（a）及び前後方向の直径（b）をデジタルカリパスで測定し、以下の式を使用することにより決定した。

【0075】

【数 1】

$$\text{周囲} = 2\pi(\sqrt{(a^2+b^2)}/2)$$

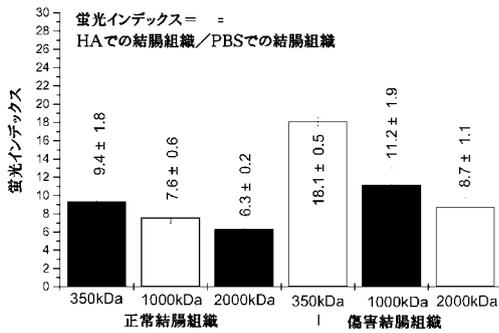
【0076】

結果：図 1 1 に示されているように、RA の誘導は成功した。薬物を投与する日（14 日目）の始めでは、HA のみの群は、足掌の厚さの変化としてのこの種類のインデックスが、対照群（賦形剤）と比較してほとんど同じ傾向を示す。薬物のみの群（プレドニゾロン）は、治療効果を示した。しかしながら、薬物を HA とコンジュゲートさせると（HA - ADH - Pred 群）、その治療効果は、薬物のみよりも更に良好であった。これは統計的に有意である。

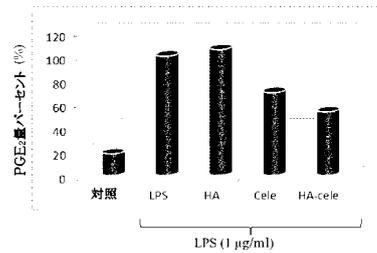
10

また、図 1 2 に示されているように、HA のみでさえ、この種類のインデックス（足首周囲の変化）の点で、RA 症状を強化した。しかしながら、薬物を HA とコンジュゲートさせると（HA - ADH - Pred 群）、その治療効果は、薬物のみよりも更に良好であった。これは統計的に有意である。

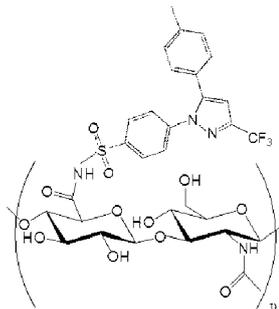
【図 1】



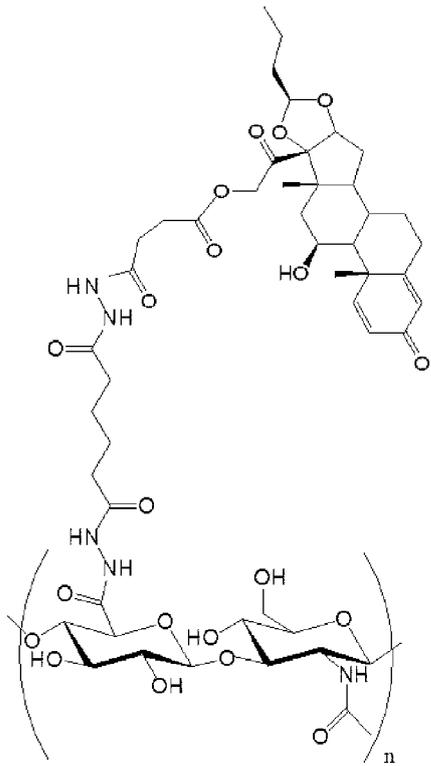
【図 4】



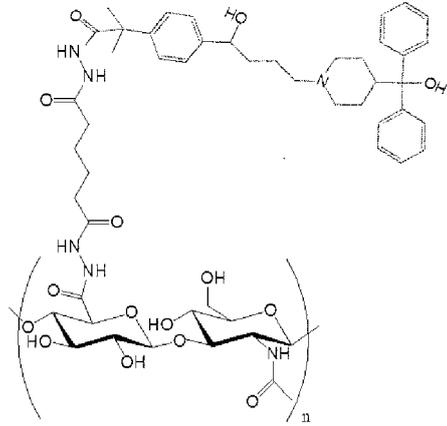
【図 3】



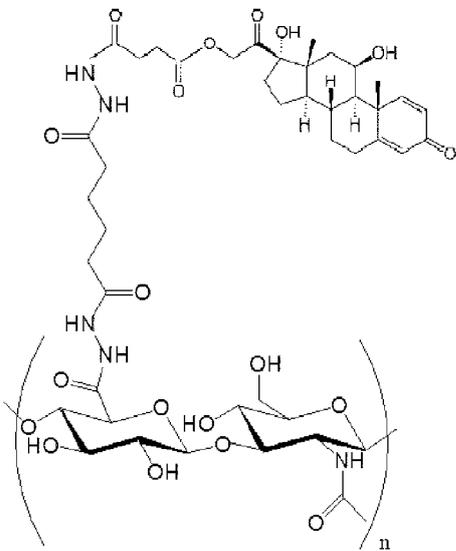
【 図 5 】



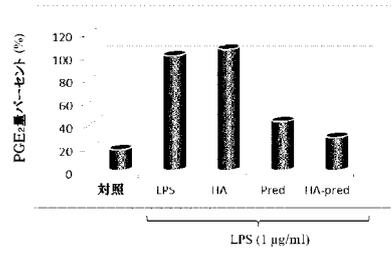
【 図 7 】



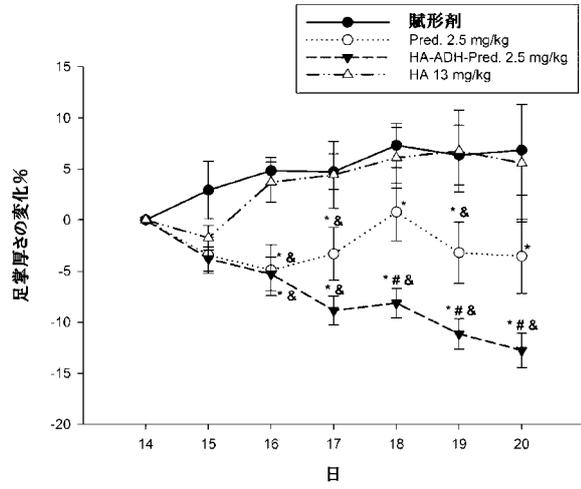
【 図 9 】



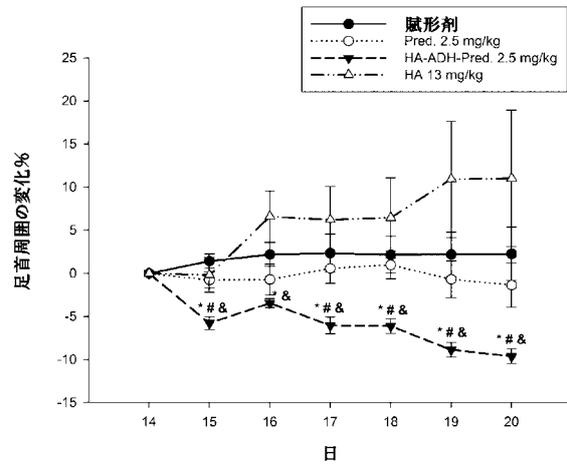
【 図 10 】



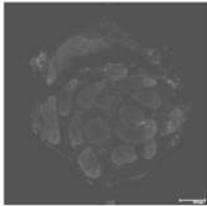
【 図 1 1 】



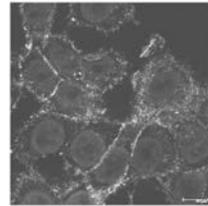
【 図 1 2 】



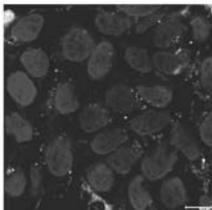
【 図 2 A 】



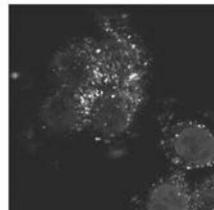
【 図 2 C 】



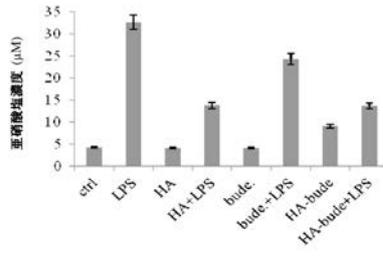
【 図 2 B 】



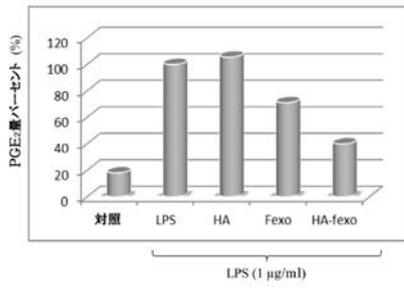
【 図 2 D 】



【 図 6 】



【 図 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/052813
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/36(2006.01)i, A61K 31/415(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 37/00(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) A61K 47/48; A01N 43/04; C07K 9/00; C08B 37/00; A61K 31/725; C08B 37/08; A61K 38/16; A61K 47/36; A61K 31/415; A61P 29/00; A61P 37/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords: conjugate, hyaluronic acid, COX-2 antagonist, celecoxib, fexofenadine, prednisolone, rheumatoid arthritis, CD44, glycosaminoglycan		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1082963 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 14 March 2001 See abstract; paragraphs [0034]-[0056],[0149]; and claims 1-14.	1-13,16-19
A	US 2010-0210509 A1 (OH, E.-J. et al.) 19 August 2010 See abstract and claims 1-7.	1-13,16-19
A	US 8088916 B2 (IKEYA, H. et al.) 03 January 2012 See abstract; and claims 1-6.	1-13,16-19
A	JIN, Y.-J. et al., `Hyaluronic acid in drug delivery systems`, Journal of Pharmaceutical Investigation, 2010, Vol. 40, No. Special issue, pp. 33-43 See abstract.	1-13,16-19
A	HUH, Y. et al., `Preparation and evaluation of spray-dried hyaluronic acid microspheres for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride`, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, Vol. 40, pp. 9-15 See abstract.	1-13,16-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 08 December 2014 (08.12.2014)		Date of mailing of the international search report 08 December 2014 (08.12.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer CHOI, Sung Hee  Telephone No. +82-42-481-8740

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2014/052813

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.: 14-15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 14-15 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), 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 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 an additional fees, this Authority did not invite payment of any 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/052813

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1082963 A1	14/03/2001	AU 1999-38490 A1	06/12/1999
		AU 1999-38490 B2	12/09/2002
		CA 2332802 A1	25/11/1999
		EP 1082963 A4	17/03/2004
		KR 10-2001-0025040 A	26/03/2001
		WO 99-59603 A1	25/11/1999
US 2010-0210509 A1	19/08/2010	WO 2009-048280 A2	16/04/2009
		WO 2009-048280 A3	28/05/2009
US 8088916 B2	03/01/2012	AU 2005-219733 A1	15/09/2005
		AU 2005-219733 B2	06/05/2010
		AU 2005-219733 C1	16/12/2010
		CA 2559188 A1	15/09/2005
		CA 2559188 C	08/01/2013
		CN 1946743 A	11/04/2007
		CN 1946743 B	02/06/2010
		EP 1724287 A1	22/11/2006
		EP 1724287 A4	27/10/2010
		HK 1102481 A1	08/10/2010
		JP 4927536 B2	09/05/2012
		KR 10-1234476 B1	18/02/2013
		KR 10-2007-0006798 A	11/01/2007
		TW 1359665 B	11/03/2012
		US 2007-0197465 A1	23/08/2007
		WO 2005-085294 A1	15/09/2005
WO 2005-085294 A1	15/09/2005		

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
		A 6 1 P	37/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

Fターム(参考) 4C084 AA17 MA52 MA66 NA13 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132
 ZB151 ZB152 ZC081 ZC082 ZC201 ZC202
 4C086 AA01 AA02 BC21 BC36 DA10 MA01 MA02 MA04 MA05 MA52
 MA66 NA13 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZC08 ZC20