

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/111801

発行日 平成27年5月11日 (2015. 5. 11)

(43) 国際公開日 平成25年8月1日 (2013. 8. 1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO8F 8/32 (2006.01)</b>	CO8F 8/32	4C086
<b>CO8F 293/00 (2006.01)</b>	CO8F 293/00	4J002
<b>CO8L 53/00 (2006.01)</b>	CO8L 53/00	4J005
<b>CO8F 112/14 (2006.01)</b>	CO8F 112/14	4J026
<b>A61K 31/787 (2006.01)</b>	A61K 31/787	4J100
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 26 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2013-555297 (P2013-555297)	(71) 出願人 504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/051395	(74) 代理人 110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(22) 国際出願日 平成25年1月24日 (2013. 1. 24)	(72) 発明者 長崎 幸夫 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
(31) 優先権主張番号 特願2012-12279 (P2012-12279)	(72) 発明者 プア ミン・リー 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
(32) 優先日 平成24年1月24日 (2012. 1. 24)	(72) 発明者 ションパトンピクンラット ペンナパー 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トリブロックコポリマー及びその使用

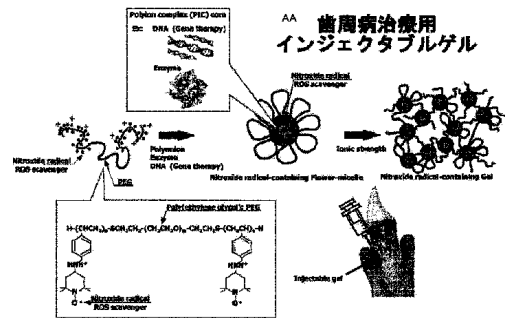
(57) 【要約】

一般式 ( I )

CNR - PEG - CNR ( I )

式中、

CNRは、独立して、少なくとも1つのイミノ基またはエーテル結合を有する連結基を介してポリマー主鎖に結合する環状ニトロキソドラジカルをペンダント基の一部として含む反復単位を含むポリマーセグメントであり、PEGはポリ(エチレングリコール)を含むセグメントである、  
で表されるトリブロックコポリマーまたはそのポリカチオンが提供される。

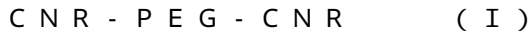


AA Injectable gel for treatment of periodontal diseases

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一般式 ( I )



式中、

CNR は、独立して、少なくとも 1 つのイミノ基またはエーテル結合を有する連結基を介してポリマー主鎖に結合する環状ニトロキシドラジカルをペンダント基の一部として含む反復単位を含むポリマーセグメントであり、

PEG はポリ(エチレングリコール)を含むセグメントである、  
で表されるトリブロックコポリマーまたはその塩。

10

## 【請求項 2】

環状ニトロキシドラジカルが、o - もしくは p - フェニレン - (C<sub>1</sub> - 6 アルキレン - NH)<sub>p</sub> - (C<sub>1</sub> - 6 アルキレン)<sub>q</sub> - または o - もしくは p - フェニレン - (C<sub>1</sub> - 6 アルキレン - O)<sub>p</sub> - (C<sub>1</sub> - 6 アルキレン)<sub>q</sub> - であって、p は 1 ~ 3 の整数であり、q は 0 または 1 の整数である、の連結基を介してポリマー主鎖に結合しており、かつ、環状ニトロキシドラジカルが、2, 2, 6, 6 - テトラメチルピペリジン - 1 - オキシル - 4 - イル、2, 2, 5, 5 - テトラメチルピロリジン - 1 - オキシル - 3 - イル、2, 2, 5, 5 - テトラメチルピロリン - 1 - オキシル - 3 - イル及び 2, 4, 4 - トリメチル - 1, 3 - オキサゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イル、2, 4, 4 - トリメチル - 1, 3 - チアゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イル及び 2, 4, 4 - トリメチル - イミダゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イルからなる群より選ばれ、

20

ここで、ポリマー主鎖が重合性不飽和二重結合に由来し、当該主鎖にフェニレンの未結合末端が結合している、請求項 1 に記載のトリブロックコポリマーまたはその塩。

## 【請求項 3】

環状ニトロキシドラジカルが、o - もしくは p - フェニレン - (C<sub>1</sub> - 6 アルキレン - NH)<sub>p</sub> - (C<sub>1</sub> - 6 アルキレン)<sub>q</sub> - であって、p が 1 ~ 3 の整数であり、q が 0 または 1 の整数である、の連結基を介してポリマー主鎖に結合しており、かつ、環状ニトロキシドラジカルが、2, 2, 6, 6 - テトラメチルピペリジン - 1 - オキシル - 4 - イル、2, 2, 5, 5 - テトラメチルピロリジン - 1 - オキシル - 3 - イル、2, 2, 5, 5 - テトラメチルピロリン - 1 - オキシル - 3 - イル及び 2, 4, 4 - トリメチル - 1, 3 - オキサゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イル、2, 4, 4 - トリメチル - 1, 3 - チアゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イル及び 2, 4, 4 - トリメチル - イミダゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イルからなる群より選ばれ、

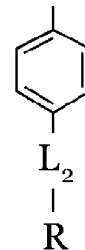
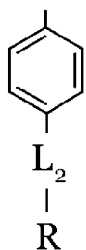
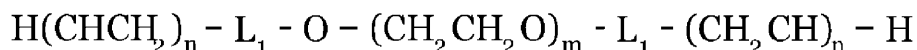
30

ここで、ポリマー主鎖が重合性不飽和二重結合に由来し、当該主鎖にフェニレンの未結合末端が結合している、請求項 1 に記載のトリブロックコポリマーまたはその塩。

## 【請求項 4】

一般式 ( II )

## 【化 1】



(II)

40

式中、

50

$L_1$  は、独立して、単結合、 $-S-(CH_2)_c-$ 、 $-S-(CH_2)_cCO-$ 、 $-(CH_2)_cS-$ 、 $-CO(CH_2)_cS-$ 、からなる群より選ばれ、ここで  $c$  は 1 ないし 5 の整数であり、

$L_2$  は、独立して、 $-C_{1-6}$  アルキレン-NH- $(C_{1-6}$  アルキレン) $_q$ -または  $-C_{1-6}$  アルキレン-O- $(C_{1-6}$  アルキレン) $_q$ -であり、ここで  $q$  は 0 または 1 の整数であり、そして

$R$  は、独立して、 $R$  の総数  $n$  の少なくとも 50% が 2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル-4-イル、2, 2, 5, 5-テトラメチルピロリジン-1-オキシル-3-イル、2, 2, 5, 5-テトラメチルピロリン-1-オキシル-3-イル及び 2, 4, 4-トリメチル-1, 3-オキサゾリジン-3-オキシル-2-イル、2, 4, 4-トリメチル-1, 3-チアゾリジン-3-オキシル-2-イル及び 2, 4, 4-トリメチル-イミダゾリジン-3-オキシル-2-イルからなる群より選ばれる環状ニトロキシドラジカル化合物の残基を表し、存在する場合には、残りの  $R$  が水素原子、ハロゲン原子またはヒドロキシ基であり、

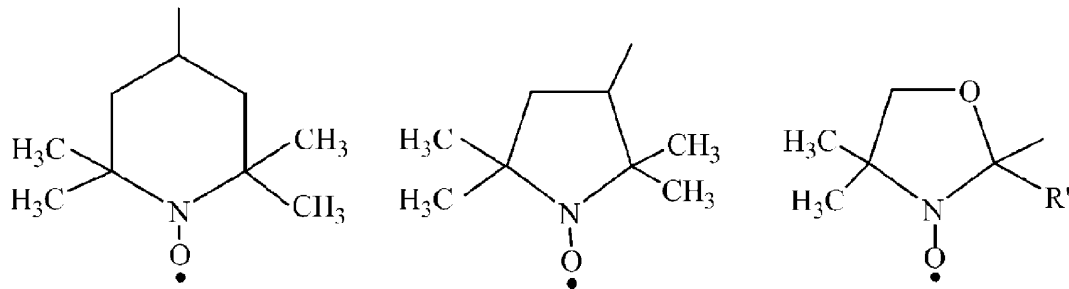
$m$  は、20 ~ 5, 000 の整数であり、そして

$n$  は、独立して、3 ~ 1, 000 の整数である、  
で表されるトリブロックコポリマーまたはその塩。

【請求項 5】

$R$  が、次式

【化 2】



式中、 $R'$  はメチル基である、

で表される基から選ばれ、 $R$  の総数  $n$  の少なくとも 80% を前記式で表される基が占める

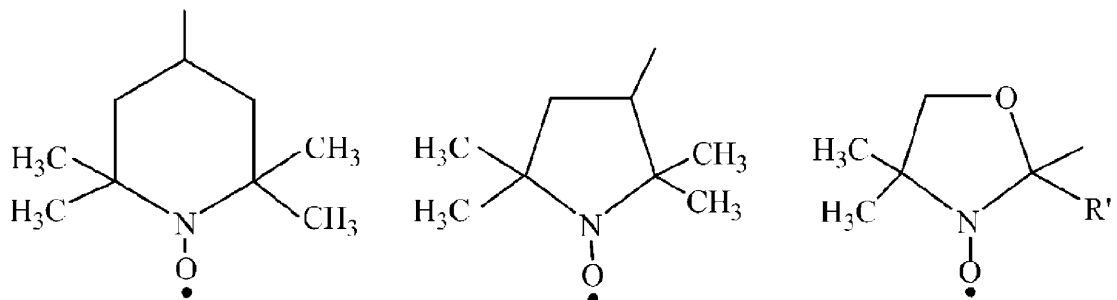
、  
請求項 4 記載のトリブロックコポリマーまたはその塩。

【請求項 6】

$L_2$  が、独立して、 $-C_{1-6}$  アルキレン-NH- $(C_{1-6}$  アルキレン) $_q$ -であり

$R$  が、次式

【化 3】



式中、 $R'$  はメチル基である、

で表される基から選ばれ、 $R$  の総数  $n$  の少なくとも 80% を前記式で表される基が占める

、  
請求項 4 記載のトリブロックコポリマーまたはその塩。

【請求項 7】

請求項 3 に記載のトリブロックコポリマーおよびポリアニオンを含むポリイオンコンプレックス。

【請求項 8】

請求項 6 に記載のトリブロックコポリマーおよびポリアニオンを含むポリイオンコンプレックス。

【請求項 9】

ポリアニオンが、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリスルホン酸、DNA、RNA およびアニオン性蛋白質からなる群より選ばれる請求項 7 または 8 に記載のポリイオンコンプレックス。

10

【請求項 10】

水性媒体中でミセルを形成している請求項 7 または 8 に記載のポリイオンコンプレックス。

【請求項 11】

請求項 7 または 8 に記載のポリイオンコンプレックスと生理学的に許容され得る希釈剤または賦形剤を含む組成物。

【請求項 12】

炎症を抑制するための請求項 11 に記載の組成物。

20

【請求項 13】

活性酸素の除去を必要とする生体内局所に滞留させるための請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

生体内局所が、歯周ポケット、癌病巣部および関節炎の発症部位からなる群より選ばれる請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

活性酸素の除去を必要とする患者に請求項 9 に記載のポリイオンコンプレックスを含む組成物を投与することを含んでなる、炎症を抑制するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、トリブロックコポリマーに関し、より具体的には、環状ニトロキシドラジカルをペンダント基として有する 2 つのポリマーブロックとそれらを両端に共有結合したポリ(エチレングリコール)のブロックを含むトリブロックコポリマー、ならびに当該トリブロックコポリマーを活性成分として含む生体適用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

活性酸素種(ROS)は、体内で、脂質、蛋白質、糖、核酸などを酸化変性させ、細胞機能を障害する。通常、生体内では酸化-抗酸化(レドックス)のバランスを厳密に調節しているが、この ROS が過剰に生成されると、酸化-抗酸化因子のバランスが酸化の方向に傾く。この状態のことを「酸化ストレス」といい、様々な疾患の原因または誘因になることが知られている。実際に、体内の酸化ストレスが増加すると、アルツハイマーやパーキンソン病などの神経難病、動脈硬化、脳梗塞、心筋梗塞、腎不全、糖尿病、癌など、さまざまな病気を発症することが明らかとなっている。このため、酸化ストレス障害を効果的に治療できるデバイスの開発が求められている。

40

【0003】

特に、近年、歯周病が引き起こす酸化ストレスが全身の疾患に対して大きな影響を与えていることが明らかになりつつある。このような特定の体内局所において、低分子または高分子化 ROS 除去剤を用いた治療が考えられるものの、これらの ROS 除去剤は歯周ポケットをはじめとする特定の体内局所から簡単に除去されるため治療効果が低いことが問

50

題であった。このような特定の体内局所の疾患、例えば歯周病を効果的に治療し、全身疾患への波及を防ぐには i ) 当該局所、例えば歯周ポケットに容易に注入が可能であり、 i i ) 注入された薬剤が長期にわたって当該局所、例えば歯周ポケット内に滞留し、継続的效果を示すことに加え、 i i i ) エネルギー産生に関係する「善玉活性酸素」を消去することなく安全である。という三つのポイントをクリアしなければならない。

#### 【 0 0 0 4 】

これまで本発明者らは触媒的に活性酸素を消去するニトロキシドラジカルをナノ粒子に封入し、静脈投与あるいは経口投与用ナノ治療薬として検討を進め、癌や虚血性疾患、腸疾患に有効であることを示してきた（特許文献 1、特許文献 2、特許文献 3、特許文献 4、特許文献 5、参照）。特に炎症や癌など、pH の低下している疾病部位で崩壊し、抗酸化能を発揮するナノ粒子の設計は安全で高い効果を発揮している。これまでのナノ粒子の役割はこのように、「安全に薬物を運ぶ」という大きな使命を果たし、効果が認められてきた。

10

#### 【 0 0 0 5 】

しかしながら、上述したように、体内局所に滞留し、継続的效果を示し、局所以外には実質的に作用しない手段を提供することも必要であろう。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 W O 2 0 0 9 / 1 3 3 6 4 7

20

【 特許文献 2 】 特開 2 0 1 1 - 0 7 8 7 0 6

【 特許文献 3 】 特願 2 0 1 0 - 2 8 1 9 9

【 特許文献 4 】 特願 2 0 1 0 - 2 1 1 8 2 6

【 特許文献 5 】 特願 2 0 1 0 - 2 6 0 4 7 1

#### 【 発明の概要 】

#### 【 発明が解決しようとする課題 】

#### 【 0 0 0 7 】

上記課題を解決すべく、本発明の目的は、高分子化薬剤またはそのナノ粒子による生体処置に際して安全性を向上することのみならず、特定の生体内局所に滞留する新規な材料を提供することにある。本発明者等は、このような材料として、特定の生体内局所およびその周囲環境に応答して高分子化薬剤またはナノ粒子がゲル化する材料を開発の対象とした。

30

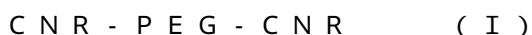
#### 【 0 0 0 8 】

こうして、本発明者等は、一定の活性薬剤残基、特に、活性薬剤残基とポリカチオン荷電性のペンダント、を含有するポリマーブロック 2 個とそれらには含まれたポリ（エチレングリコール）ブロックを含む A - B - A 型のトリブロックコポリマーが、上記の生体内局所またはその周囲環境に応答してゲル化し、局所で所望の活性を示すことを見出した。また、活性薬剤残基を有するが、ポリイオン荷電性でないペンダント基を含有する場合のトリブロックコポリマーも当該技術分野で利用できることを見出した。

40

#### 【 0 0 0 9 】

したがって、上記課題を解決するための手段として、ここに、一般式（ I ）



式中、

CNR は、独立して、少なくとも 1 つのイミノ基またはエーテル結合を有する連結基を介してポリマー主鎖に結合する環状ニトロキシドラジカルをペンダント基の一部として含有する反復単位を含むポリマーセグメントであり、

PEG はポリ（エチレングリコール）を含むセグメントである、  
で表されるトリブロックコポリマーまたはその塩を開示する。

#### 【 0 0 1 0 】

概括的には、前記環状ニトロキシドラジカルが、o - もしくは p - フェニレン - ( C<sub>1</sub>

50

- 6 アルキレン - NH )<sub>p</sub> - ( C<sub>1</sub> - 6 アルキレン )<sub>q</sub> または o - もしくは p - フェニレン - ( C<sub>1</sub> - 6 アルキレン - O )<sub>p</sub> - ( C<sub>1</sub> - 6 アルキレン )<sub>q</sub> で表され、ここで、p は 1 ~ 3 の整数であり、q は 0 または 1 の整数である、の連結基を介してポリマー主鎖に結合しており、かつ、限定されるものではないが、環状ニトロキシドラジカルが、2, 2, 6, 6 - テトラメチルピペリジン - 1 - オキシル - 4 - イル、2, 2, 5, 5 - テトラメチルピロリジン - 1 - オキシル - 3 - イル、2, 2, 5, 5 - テトラメチルピロリン - 1 - オキシル - 3 - イル及び 2, 4, 4 - トリメチル - 1, 3 - オキサゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イル、2, 4, 4 - トリメチル - 1, 3 - チアゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イル及び 2, 4, 4 - トリメチル - イミダゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イルからなる群より選ばれ、

10

ここで、ポリマー主鎖が重合性不飽和二重結合に由来し、当該主鎖にフェニレンの未結合末端が結合していることを特徴とするトリブロックコポリマーまたはその塩が提供される。

上記連結基は、o - もしくは p - フェニレン - ( C<sub>1</sub> - 6 アルキレン - NH )<sub>p</sub> - ( C<sub>1</sub> - 6 アルキレン )<sub>q</sub> が好ましい。このような連結基を有するトリブロックコポリマーまたはその塩は一定の酸性水中でカチオン荷電性を示し当該ポリマーに追加の機能を付与する。

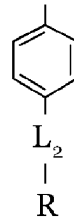
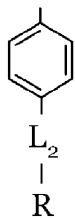
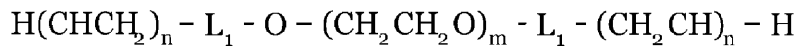
【0011】

より具体的な態様の本発明として、  
一般式 (I I)

20

【0012】

【化1】



(II)

30

【0013】

式中、

L<sub>1</sub> は、独立して、単結合、- S - ( CH<sub>2</sub> )<sub>c</sub> -、- S - ( CH<sub>2</sub> )<sub>c</sub> CO -、- ( CH<sub>2</sub> )<sub>c</sub> S -、- CO ( CH<sub>2</sub> )<sub>c</sub> S -、からなる群より選ばれ、ここで c は 1 ないし 5 の整数であり、

L<sub>2</sub> は、独立して、- C<sub>1</sub> - 6 アルキレン - NH - ( C<sub>1</sub> - 6 アルキレン )<sub>q</sub> - または - C<sub>1</sub> - 6 アルキレン - O - ( C<sub>1</sub> - 6 アルキレン )<sub>q</sub> - であり、ここで q は 0 または 1 であり、そして

R は、独立して、R の総数 n の少なくとも 50% が 2, 2, 6, 6 - テトラメチルピペリジン - 1 - オキシル - 4 - イル、2, 2, 5, 5 - テトラメチルピロリジン - 1 - オキシル - 3 - イル、2, 2, 5, 5 - テトラメチルピロリン - 1 - オキシル - 3 - イル及び 2, 4, 4 - トリメチル - 1, 3 - オキサゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イル、2, 4, 4 - トリメチル - 1, 3 - チアゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イル及び 2, 4, 4 - トリメチル - イミダゾリジン - 3 - オキシル - 2 - イルからなる群より選ばれる環状ニトロキシドラジカル化合物の残基を表し、存在する場合には、残りの R が水素原子、ハロゲン原子またはヒドロキシ基であり、

40

m は、20 ~ 5, 000 の整数であり、そして

n は、独立して、3 ~ 1, 000 の整数である、

で表されるトリブロックコポリマーまたはその塩を提供する。

50

## 【0014】

当該トリブロックコポリマーの複数の分子は、非荷電状態では水中でCNR部をコアとし、一方でPEG部をシェル部とするように会合した分子集合体、所謂、ポリマーミセルを形成する。したがって、かような集合体を形成する際に、疎水性の低分子薬剤を共存させることにより、これらの薬剤をコア部に封入することができることから、例えば、薬剤のデリバリー用キャリアーとして使用できる（必要があれば、一般的な高分子界面活性剤の挙動を参照されたい。）。また、連結基中にイミノ基を含有するトリブロックコポリマーは、酸性水性媒体中でポリカチオンを形成し、適当なアニオンとのゲルを形成する目的で使用できる。このようなゲル組成物は、本発明の別の態様でもあり、活性酸素の除去を必要とする生体内局所に滞留させるための都合よく使用できる。

10

## 【0015】

< 発明の記述 >

本願発明にいう、ペンダント基は、当該技術分野で一般に認識されているとおりの、ある官能基を持った側鎖を意味する。具体的には、ペンダント基は、o-もしくはp-フェニレン-(C<sub>1-6</sub>アルキレン-NH)<sub>p</sub>-(C<sub>1-6</sub>アルキレン)<sub>q</sub>-またはo-もしくはp-フェニレン-(C<sub>1-6</sub>アルキレン-O)<sub>p</sub>-(C<sub>1-6</sub>アルキレン)<sub>q</sub>(ここで、pは1~3の整数であり、qは0または1の整数である)の連結基に、その記載されている右末端において環状ニトロキシドラジカル残基が共有結合している基である。より具体的には、上記一般式(II)の-fフェニレン-(C<sub>1-6</sub>アルキレン-NH)<sub>p</sub>-(C<sub>1-6</sub>アルキレン)<sub>q</sub>-Rまたは-C<sub>1-6</sub>アルキレン-O-(C<sub>1-6</sub>アルキレン)<sub>q</sub>-Rで表される側鎖を参照すれば、本発明にいうペンダント基をより明瞭に理解できるであろう。このようなペンダント基が結合する主鎖としては、限定されるものではない。本発明において、残基とは、それぞれ対応する化合物から水素原子が1個除去された状態にある基を意味し、例えば、典型的な環状ニトロキシドラジカルにあっては、一般式(II)のRについて定義する基を参照できる。

20

こうして、ペンダント基の好ましい態様のものとしては、前記環状ニトロキシドラジカルが、o-もしくはp-フェニレン-C<sub>1-6</sub>アルキレン-NH-(C<sub>1-6</sub>アルキレン)<sub>q</sub>-(ここで、qは0または1である)の連結基を介してポリマー主鎖に結合しており、かつ、環状ニトロキシドラジカルが、2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル-4-イル、2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-1-オキシル-3-イル、2,2,5,5-テトラメチルピロリン-1-オキシル-3-イル及び2,4,4-トリメチル-1,3-オキサゾリジン-3-オキシル-2-イル、2,4,4-トリメチル-1,3-チアゾリジン-3-オキシル-2-イル及び2,4,4-トリメチル-イミダゾリジン-3-オキシル-2-イルからなる群より選ばれる。

30

## 【0016】

当該主鎖にフェニレンの未結合末端が結合していることを特徴とするトリブロックコポリマーまたはそのポリカチオンにおいて、「フェニレンの未結合末端」とは、o-もしくはp-フェニレンのC<sub>1-6</sub>アルキレンが結合している位置と反対側の末端を意味する。また、本願明細書において、結合という場合、他に特記しない限り、共有結合を意味する。

40

## 【0017】

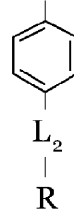
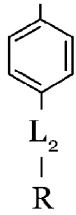
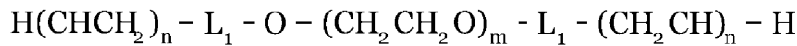
上述のとおり、ポリマー主鎖は本発明の目的に沿う限り限定されないが、好ましくは、重合性不飽和二重結合を有する、例えば、置換エチレンのような不飽和二重結合を有する重合性モノマーのラジカル重合により形成される主鎖を意味する。このような主鎖の具体的なものとしては、上記特許文献1に記載のものを挙げる事ができる。

## 【0018】

さらに好ましいトリブロックコポリマーは、一般式(II)

## 【0019】

## 【化2】



(II)

10

## 【0020】

式中、

L<sub>1</sub>は、独立して、単結合、-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-、-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>CO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>S-、-CO(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>S-、からなる群より選ばれ、ここでcは1ないし5の整数であり(なお、単結合に続く前者の2つはそれらが記載されている方向性で結合される式中の左側のL<sub>1</sub>に相当し、後者の2つはそれらが記載されている方向性で結合される式中の右側のL<sub>1</sub>に相当する)、

L<sub>2</sub>は、独立して、-C<sub>1-6</sub>アルキレン-NH-(C<sub>1-6</sub>アルキレン)<sub>q</sub>-または-C<sub>1-6</sub>アルキレン-O-(C<sub>1-6</sub>アルキレン)<sub>q</sub>-であり、ここでqは0または1であり、そして

20

Rは、独立して、Rの総数nの少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは約100%が2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル-4-イル、2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-1-オキシル-3-イル、2,2,5,5-テトラメチルピロリン-1-オキシル-3-イル及び2,4,4-トリメチル-1,3-オキサゾリジン-3-オキシル-2-イル、2,4,4-トリメチル-1,3-チアゾリジン-3-オキシル-2-イル及び2,4,4-トリメチル-イミダゾリジン-3-オキシル-2-イルからなる群より選ばれる環状ニトロキシドラジカル化合物の残基を表し、存在する場合には、残りのRが水素原子、ハロゲン原子またはヒドロキシ基であり、

mは、20~5,000、好ましくは、20~1000、より好ましくは50~200

30

の整数であり、そして  
nは、独立して、3~1,000、好ましくは、3~100、より好ましくは3~50の整数である、  
で表される。

## 【0021】

C<sub>1-6</sub>アルキレンは、具体的には、限定されるものではないが、メチレン、1,2-プロパンジイル、1,3-プロパンジイル、1,4-ブタンジイル、等の対応するアルキルのジイル基を挙げることができる。

## 【0022】

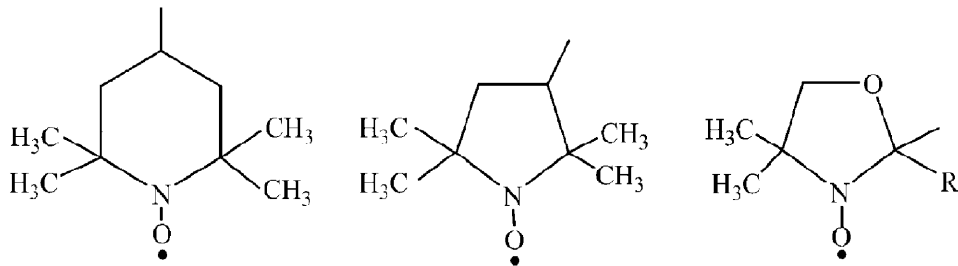
R基の環状ニトロキシドラジカルは、好ましくは、次式

40

## 【0023】



## 【化 3】



10

## 【 0 0 2 4 】

式中、R' はメチル基である、  
で表される基を挙げることができる。上記の最初の式で表される残基が、以下で、TEMPOと略称されることのある基である。

## 【 0 0 2 5 】

このようなトリブロックコポリマーは、主鎖または主鎖とペンダント基の一部を有するトリブロックコポリマーの前駆体を準備し、次いで、当該前駆体に環状にトロキシドラジカル残基を導入することにより都合よく製造することができる。また、別法では、各ブロックをそれぞれ独立して準備し、次いで、それらを目的のトリブロックコポリマーを形成するように結合してもよい。典型的な製造方法は、後述する実施例に示すが、両末端を反応可能に修飾したポリ(エチレングリコール)の末端にCNRの前駆体となる得るポリマーセグメントを結合し、または当該両末端から成長させた後、少なくとも1つイミノ基またはエーテル結合を有する連結基を介して結合されている環状ニトロキドラジカルを導入することにより実施できる。上記特許文献1には、CNRに相当するポリマーブロックとPEGに相当するポリマーブロックを含むジブロックコポリマーの製造方法が記載されているが、一旦、本発明に従うトリブロックコポリマーの前駆体を生成したら、本発明にいうペンダント基を完成させる方法は、特許文献1に記載の方法に習うことができる。

20

## 【 0 0 2 6 】

こうして製造したトリブロックコポリマーの中、ペンダント基にイミノ基(-NH-)を有するものは、適当な無機または有機の酸と塩を形成し得る。かような酸としては、限定されるものでないが、塩酸、硫酸、硝酸等の鉱酸等の無機酸、酢酸、蔞酸、メタンスルホン酸等の有機酸を挙げることができる。また、当該イミノ基を有するトリブロックコポリマーはイミノ基に起因し、酸性の水性媒体中でカチオンに荷電可能であり、ポリカチオンとなり得る。したがって、当該ポリカチオンはアニオン性基を1個またはそれ以上有する化合物またはポリアニオンとイオンコンプレックスを形成できる。このような化合物としては、酵素、例えばエラスターゼ、が挙げられ、ポリアニオンとしては、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリスルホン酸、DNA、RNA、アニオン性蛋白質、等が挙げられる。

30

## 【 0 0 2 7 】

理論により、拘束されるものではないが、このとき当量のポリアニオンとポリカチオンからなるポリイオンコンプレックスは水性媒体中で疎水化して、親-疎水性ポリマーミセルのコアとなり、水溶性のPEGはループ状に表層を形成するシェルとなり、図1の概念図から理解できるような、所謂、フラワーミセルをもたらす。このイオンコンプレックスは塩濃度と温度に敏感であるので、例えば、温度37℃、イオン強度150mMの体液に触れると壊れ、粒子間での架橋が生じてゲル化する。上記トリブロックコポリマーは、ポリカチオン部に環状ニトロキドラジカルを導入しているため、ゲル化とともに環状ニトロキドラジカル部分を表面に露出することにより、所謂、悪玉活性酸素を消去するように作用するものと理解できる。

40

一方、ペンダント基にエーテル結合(-O-)を有するトリブロックコポリマーは、水中で、CNRセグメントに相当する部分が疎水性を示し、ポリイオンコンプレックスの形

50



ーのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 測定とNMRスペクトル測定の結果を表す図である。

【図3】製造例2で得られるPMNT-b-PEG-b-PMNTトリブロックコポリマーのSEC測定NMRスペクトルの測定結果を表す図である。

【図4】上記PMNT-b-PEG-b-PMNTトリブロックコポリマー精製結果を表す図である。

【図5】製造例3で得られたポリオンコンプレックスミセルのモル比とpH変化に対するポリオンコンプレックスミセルの動的光散乱測定の結果である。

【図6】濃縮したポリオンコンプレックスミセルのゲル化様子 (r = 1 : 1、60 mg / ml) を表す図に代わる写真である。

【図7】ポリオンコンプレックスミセル (r = 1 : 1) の生体内ゲル化の観察図に代わる写真である。

【図8】ポリオンコンプレックス注射後のマウスの体重変化を表すグラフである。

【図9】ポリオンコンプレックスゲル (RIG) の局所滞留性を示す図面に代わるイメージング写真である。

【図10】ポリオンコンプレックスゲル (RIG) の局所滞留性 (定量化) についてのグラフ表示である。

【図11】カラギーナン誘発性炎症モデルに対するポリオンコンプレックスゲル (RIG) の保護効果についてのグラフ表示である。

#### 【実施例】

##### 【0031】

以下に、具体例を挙げ、さらに本発明を具体的に説明するが、これらの具体例に本発明を限定することを意図するものではない。

##### 【0032】

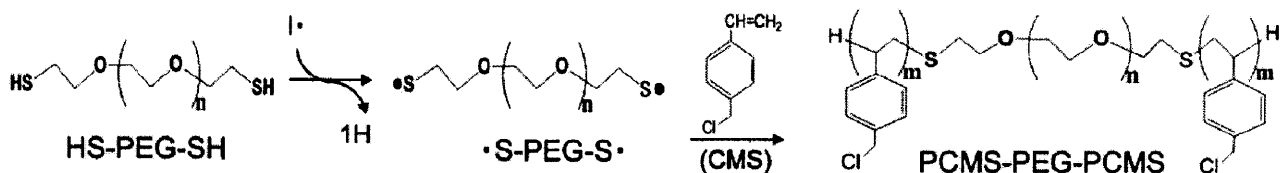
<製造例1> ポリクロロメチルスチレン-b-ポリエチレングリコール-b-ポリクロロメチルスチレン (PCMS-b-PEG-b-PCMS) トリブロックコポリマーの合成

PCMS-b-PEG-b-PCMSは、次の合成スキーム1に従い合成した：

##### 【0033】

##### 【化4】

スキーム1.



##### 【0034】

両末端にチオール基を有しているポリエチレングリコール (HS-PEG-SH) (Mn : 10000 ; 0.115 mmol, 1.15 g) を反応容器に加えた。次に、反応容器中を真空にした後、窒素ガスを吹き込む操作を3回繰り返すことにより、反応容器内を窒素雰囲気にした。反応容器に1.89 mg / mLのアゾビスイソブチロニトリル/トルエン (0.115 mmol / 10 ml) 溶液とクロロメチルスチレン (8.63 mmol, 1.22 mL) を加え、60℃まで加熱し、24時間攪拌した。反応混合物をポリクロロエチルスチレンホモポリマーに対しての良溶媒であるジエチルエーテルを用いて3回洗浄操作を行った後、ベンゼン凍結乾燥を行い、白い粉体を得た。収量は、1.45 mgであり、収率は91.6%であった。得られたPCMS-b-PEG-b-PCMSトリブロック共重合体のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 測定とNMRスペクトルの結果を図2に示す。

10

20

30

40

50

## 【0035】

<製造例2> 2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン1-オキシル(TEMPO)を有するトリブロックコポリマーの合成

(1)式(II)における $L_2$ が $-CH_2-NH-$ であるトリブロックコポリマー(PMNT-b-PEG-b-PMNT)

反応容器に、PCMS-b-PEG-b-PCMS( $M_n$ :13800; 1.45g, 0.105mmol)を加えた。次に、4-アミノ-TEMPO(2.34g, 13.69mmol)を12mLのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、反応容器に加え、室温で24時間攪拌を行った。反応終了後、反応溶液を透析膜(Spectra/Por molecular weight cut-off size 3,500 Spectrum Medical Industries Inc., Houston TX)中に加え、2Lのメタノールに対して透析を行った。メタノールは2時間ごとに8回交換し、エバポレーションを行い、ベンゼン凍結乾燥を行った。収率は、92.1%であった。

10

## 【0036】

$^1H$  NMR測定の結果より、クロロメチル基が100%反応し、TEMPOが導入されていることが認められた(図3)。またSECの結果は、副反応が生じず、PCMS-b-PEG-b-PCMSと同様のクロマトグラムを示すことが明らかとなった。さらに、SECを用いて分取し、各フラクションの電子スピン共鳴(ESR)シグナルを測定したところ、未反応アミノ-TEMPOのESRシグナルが消失したことから、未反応のアミノ-TEMPOが精製によって完全除去されていることが確認された(図4)。

20

(2)式(II)における $L_2$ が $-CH_2-O-$ であるトリブロックコポリマー

4-アミノ-TEMPOに代え、4-ヒドロキシ-TEMPOを用い、反応溶液にNaHを溶解したジメチルホルムアミド(DMF)を用いる他は、上記(1)に記載のものと同様な操作を繰り返すことにより、目的のトリブロックコポリマーを製造する。

## 【0037】

<製造例3> ポリオンコンプレックスミセルの設計

PMNT-b-PEG-b-PMNTトリブロックポリマーの粉末を0.1M HCl水溶液に溶解し、PMNT鎖のアミノ基を完全にプロトン化させ、水系の凍結乾燥を行い回収した。次に、PMNT-b-PEG-b-PMNTトリブロックポリマーとポリアクリル酸(PAA;  $M_n$ :5000)をそれぞれ $Na_2HPO_4$ バッファー(0.1M, pH6.28)に溶解し、濃度を5mg/mlにしたカチオンPMNT-b-PEG-b-PMNT水溶液とアニオンPAA水溶液を調製した。PAA水溶液にPMNT-b-PEG-b-PMNTトリブロックポリマー水溶液を攪拌しながら滴下し、ポリオンコンプレックスミセルを調製した。ここで、PMNT-b-PEG-b-PMNTとPAAのモル比 $r$ が4:1、2:1、1:1、1:2となるように4つのポリオンコンプレックスミセルを調製した(モル比 $r = [PAAの活性化されたカルボキシル基のモル数] / [PMNT-b-PEG-b-PMNTの活性化されたアミノ基のモル数]$ )。得られたポリオンコンプレックスミセルのゼータ電位を測定した(下記表1参照)。さらに、各モル比のポリオンコンプレックスミセル溶液を5つのグループに分け、0.01M HCl/NaOHによりそれぞれのpHを4から8まで調整した。得られたポリオンコンプレックスミセルの平均粒径を動的光散乱(DLS)測定により行ったところ、平均粒径が45~80nmの単峰性の粒子であることが確認された(図5参照)。

30

40

## 【0038】

【表 1】

表 1 ポリイオンコンプレックスミセルのゼータ電位測定

モル比 r	ゼータ電位 (mV)
PAA	-4.33
PMNT-PEG-PMNT	+3.76
4:1	-3.73
2:1	-2.24
1:1	-0.119
1:2	+1.43

10

【0039】

&lt; 製造例 4 &gt; インジェクタブルゲルの設計

上記で調製した各モル比および pH を有するポリイオンコンプレックスミセル（モル比  $r = 4 : 1$ 、 $2 : 1$ 、 $1 : 1$ ；pH 4 - 8）溶液（ $5 \text{ mg/ml}$ ）を遠心エバポレーションにより濃縮し、イオン強度を  $150 \text{ mM}$  に調整し、温度  $37^\circ\text{C}$  の水浴中でゲル化実験を試験管反転法により検討した。イオン強度  $150 \text{ mM}$  かつ温度  $37^\circ\text{C}$  の環境下で不可逆的ゲル化したポリイオンコンプレックスミセルのモル比に対する pH 及び濃度の最適な条件を検討したところ、モル比  $r$  が  $4 : 1$  の場合が  $40 \text{ mg/ml}$  と pH 5、モル比  $r$  が  $2 : 1$  の場合が  $50 \text{ mg/ml}$  と pH 4 - 5、モル比  $r$  が  $1 : 1$  の場合が  $60 \text{ mg/ml}$  と pH 5 - 6 の条件でゲル化することを見出した（下記表 2 および図 6 参照）。

20

【0040】

【表 2】

表 2  $37^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ mM}$  のイオン強度におけるポリイオンコンプレックスミセルのゲル化条件

モル比 r	4:1	2:1	1:1
濃度/ mg/ml	40	50	60
pH 4	ゲル( $25^\circ\text{C}$ )	インジェクタブルゲル	液体
pH 5	インジェクタブルゲル	インジェクタブルゲル	インジェクタブルゲル
pH 6	ゲル( $25^\circ\text{C}$ )	液体	インジェクタブルゲル
pH 7	沈殿( $25^\circ\text{C}$ )	—	ゲル( $25^\circ\text{C}$ )
pH 8	沈殿( $25^\circ\text{C}$ )	沈殿( $25^\circ\text{C}$ )	沈殿( $25^\circ\text{C}$ )

30

【0041】

&lt; 試験 1 &gt; 生体内でのゲル化の形成

製造例 3 にしたがって、PMNT - b - PEG - b - PMNT と PAA のモル比  $r$  が  $1 : 1$  のポリイオンコンプレックス（ $5 \text{ mg/ml}$ 、 $9 \text{ ml}$ ）を調製し、2つのグループに分けて  $0.1 \text{ M}$  HCl 水溶液により pH を 5 と 6 に調整し、遠心エバポレーションにより  $50 \text{ mg/ml}$  に濃縮した。濃縮した各 pH のミセル溶液をマウスの左腿に  $100 \mu\text{l}$  皮下注射したところ、マウスの体内でゲルの形成を確認し、また組織接着性を示した（表 3、図 7）。しかしながら、モル比  $r$  が  $2 : 1$ （pH 4、5、6）の条件ではゲル化は確認されなかった。

40

【0042】

【表 3】

表 3 ポリイオンコンプレックスミセルの in vivo ゲル化結果

モル比 r	2:1			1:1	
濃度 mg/ml	50			60	
pH	4	5	6	5	6
In vivo ゲル化	△	△	△	○	○

10

【0043】

&lt;試験 2&gt; インジェクタブルゲルの毒性試験

またゲルの生体毒性評価実験において、モル比 r が 1 : 1、pH 6、60 mg / ml のポリイオンコンプレックスを調製し、10匹のマウスの左腿と右後足にそれぞれ 100  $\mu$  l と 50  $\mu$  l ずつ皮下注射し、4週間にわたってマウスの体重変化を記録した。その結果、マウスの体重が徐々に増加し、生存率が 100%であることが確認された(図 8 参照)。この結果から、本発明により開発されたインジェクタブルゲルの毒性が非常に低いことが示される。

20

【0044】

&lt;試験 3&gt; インジェクタブルゲルの局所滞留性 (L - band 電子スピン共鳴法によるイメージング)

各群 3 匹のマウスを使用した。試験 1 で用いたニトロキシドラジカル含有ポリイオンコンプレックスミセル (PMNT - b - PEG - b - PMNT と PAA のモル比 r が = 1 : 1 (RIG)、pH 6、60 mg / ml) の溶液を 3 匹のマウスの左後足に 70  $\mu$  l 皮下注射した。比較群として、3 匹のマウスの右後足にそれぞれ低分子のニトロキシドラジカル化合物 (4 - aminoTEMPO ; 5.45 mg / ml)、ニトロキシドラジカル含有高分子 (PEG - b - PMNT 両親媒性ブロック子ポリマーから透析法を用いて高分子ミセルを形成させたもの) のミセル溶液 (RNP<sup>N</sup> ; 60 mg / ml)、および低分子の 4 - aminoTEMPO を物理的にニトロキシドラジカルなしのポリイオンコンプレックスミセルに内包させたものに混ぜた溶液 (TEMPO の代わりにアミノエタノールを導入したポリマーを用いて形成させた TEMPO の含有されていないフラワーミセル (nRIG) と 4 - aminoTEMPO を混合し、そのままゲル化させることにより、ゲル中に 4 - aminoTEMPO を内包させることにより形成した。) (nRIG + 4 - aminoTEMPO ; モル比 r = 1 : 1、pH 6、60 mg / ml) を、それぞれ、70  $\mu$  l 注射した。投与直後のマウスを用いて L - band の電子スピン共鳴法 (ESR) によりマウスの足におけるニトロキシドラジカルの局所滞留性をイメージング化した。その結果、低分子の 4 - aminoTEMPO 溶液は投与後に 30 分以内にマウスの足から ESR シグナルが消失した。4 - aminoTEMPO をミセル化した RNP<sup>N</sup> 溶液は少し滞留性が上がったものの、1 時間でシグナルが消失した。同様に 4 - aminoTEMPO を混合した nRIG 含有ゲルも拡散により 1 時間までしか滞留性が見られなかった。これらに対し、本発明にしたがうポリイオンコンプレックスミセル溶液を注射してマウスの足底内で RIG をゲル化させた結果、測定中の 5 時間の間ずっと強い ESR シグナルが検出されていた。したがって、本発明にしたがうポリイオンコンプレックスミセルから形成されるゲルは優れた局所滞留性をもつことが確認された。当該イメージングを示す図面に代わる写真を添付する(図 9 参照)。

30

40

このように、非侵襲的なイメージングを用いる評価方法は、通常、薬剤残存量を評価したり、また酸化ストレス度合を評価することに適するものと認識されている。

【0045】

50

< 試験 4 > インジェクタブルゲルの局所滞留性 ( X - b a n d 電子スピン共鳴法による定量化 )

4つのグループ ( 4 - a m i n o T E M P O、R N P<sup>N</sup>、R I G、n R I G + 4 - a m i n o T E M P O ) につき、各グループ3匹のマウス ( n = 3 ) を使用した。低分子のニトロキシドラジカル化合物である 4 - a m i n o T E M P O ( 5 . 4 5 m g / m l )、ニトロキシドラジカル含有高分子ミセル溶液 ( R N P<sup>N</sup> ; 6 0 m g / m l )、ニトロキシドラジカル含有ポリオンコンプレックスミセル ( R I G : モル比 r = 1 : 1、p H 6、6 0 m g / m l ) 溶液、低分子の 4 - a m i n o T E M P O を物理的にニトロキシドラジカルなしのポリオンコンプレックスミセル ( n R I G + 4 - a m i n o T E M P O : モル比 r = 1 : 1、p H 6、6 0 m g / m l ) に混ぜた溶液を 5 0 μ l ずつマウスの右後足に皮下注射した。投与後に異なる時間帯 ( 0 h、1 h、3 h、1 2 h、2 4 h、7 2 h ) においてマウスを解剖し、採取した右後足の組織に酸化剤のフェリシアン化カリウム ( 2 0 0 m M ) を入れてホモジナイズした溶液を X - b a n d 電子スピン共鳴法により各時間帯の局所滞留性を定量化した。結果を図 1 0 に示す。

低分子化合物 ( 4 - a m i n o T E M P O ) および 4 - a m i n o T E M P O 混合 n R I G ゲル ( n R I G + 4 - a m i n o T E M P O ) のほうでは1時間以内投与部位から拡散により消失したことが分かった。また T E M P O 含有ジブロックポリマーから成る高分子ミセル ( R N P ) では12時間以内に投与部位から消失したのに対し、R I G は72時間後にも40%残存していることが明らかとなった。これらの結果から、R I G は優れた局所滞留性を示すことが改めて確認できた。

【 0 0 4 6 】

< 試験 5 > カラギーナン誘発性関節炎モデルに対するインジェクタブルゲルの保護効果  
9つのグループ ( 対照 ( C o n t r o l )、R I G、n R I G、S a l i n e @ C a r r、R I G @ C a r r、n R I G @ C a r r、4 - a m i n o - T E M P O @ C a r r、R N P<sup>N</sup> @ C a r r、n R I G + 4 - a m i n o - T E M P O @ C a r r ) につき、各5匹のマウス ( n = 5 ) を使用した。

試験した各グループは、それぞれ次の意味を有する :

C o n t r o l : 後述

R I G : T E M P O 含有フラワーミセルを投与して、T E M P O 含有ゲルが生体内で形成されたもの

n R I G : T E M P O が含有されていないフラワーミセルを投与して、T E M P O の含有されていないゲルが生体内で形成されたもの

S a l i n e @ C a r r : 生理食塩水を投与して18時間後にカラギーナンが投与されたもの

R I G @ C a r r : T E M P O 含有フラワーミセルを投与して18時間後にカラギーナンが投与されたもの

n R I G @ C a r r : T E M P O が含有されていないフラワーミセルを投与して18時間後にカラギーナンが投与されたもの

4 - a m i n o - T E M P O @ C a r r : 4 - a m i n o - T E M P O を投与して18時間後にカラギーナンが投与されたもの

R N P<sup>N</sup> @ C a r r : T E M P O 含有高分子ミセルを投与して18時間後にカラギーナンが投与されたもの

n R I G + 4 - a m i n o - T E M P O @ C a r r : 4 - a m i n o - T E M P O が内包された T E M P O 非含有フラワーミセルを投与して18時間後にカラギーナンが投与されたもの

まずマウスを6時間絶食させ、ホットプレートによる熱刺激試験 ( 5 1 ) を用いる正常なマウスの後足の痛覚過敏を評価した。マウスがホットプレートの上で後足を舐めたり、引っ張ったり、震えたりするまでの時間を P a w W i t h d r a w a l L a t e n c i e s ( P W L ) とした。そして、R I G ゲルを形成するニトロキシドラジカル含有ポ

ライオンコンプレックスミセル (RIG; モル比  $r = 1 : 1$ 、pH 6、60 mg/ml)、nRIGゲルを形成するニトロキシドラジカルなしのポリオンコンプレックスミセル (nRIG; モル比  $r = 1 : 1$ 、pH 6、60 mg/ml)、食塩水 (Saline)、低分子ニトロキシドラジカル化合物溶液 (4-aminoTEMPO; 5.45 mg/ml)、ニトロキシドラジカル含有高分子ミセル溶液 (RNP<sup>N</sup>; 60 mg/ml)、低分子の4-aminoTEMPOを物理的にニトロキシドラジカルなしのポリオンコンプレックスミセル (nRIG + 4-aminoTEMPO; モル比  $r = 1 : 1$ 、pH 6、60 mg/ml) に混ぜた溶液をマウスの右後足に50  $\mu$ l ずつ皮下注射した。18時間後、Saline@Carr、RIG@Carr、nRIG@Carr、4-amino-TEMPO@Carr、RNP<sup>N</sup>@Carr、およびnRIG + 4-amino-TEMPO@Carrの各グループ ( $n = 5$ ) のマウスの右後足に5%カラギーナン (Carrageenan) 懸濁液を50  $\mu$ l 皮下注射した。Controlグループ ( $n = 5$ ) は何も投与しないグループにした。カラギーナン投与6時間後、再びホットプレートによる熱刺激試験を行った。炎症発生後のPWL時間を炎症発生前のPWL時間を引いた後のPaw Withdrawal latency (PWL) の時間差をグラフの縦軸に表す。この時間差が大きいほど、炎症が高いことを示している。そして、採取したマウスの右後足の組織をホモジナイズし、遠心分離により取った上澄みについて、好中球の浸潤の指標であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性及び炎症性サイトカイン量 (TNF- と IL-1) をELISAキットにより測定した。結果を図11に示す。

10

図から、ニトロキシドラジカルを含有しないnRIGのみのグループでは、MPOの活性惹起が局所の足及び血中の両方において確認された。一方で、RIGグループはその活性化を有意に抑制した。これらの結果はRIG自身が炎症惹起を引き起こすことがないことを示唆する。また、Saline@Carr、nRIG@Carr、4-amino-TEMPO@Carr、RNP<sup>N</sup>@Carr、nRIG + 4-amino-TEMPO@Carrのグループではカラギーナンにより誘起されたMPO活性を有意に抑制することができなかったのに対して、RIG@CarrのグループではMPOの活性の有意な抑制が確認された。

20

同様な傾向として、RIGゲルは炎症性サイトカインであるTNF- とIL-1の発生も有意に抑制し、カラギーナン誘発の痛覚過敏を効果的に予防した。これらの結果から、RIGゲルが好中球やマクロファージの産生する活性酸素を効果的に消去していることを示唆する。

30

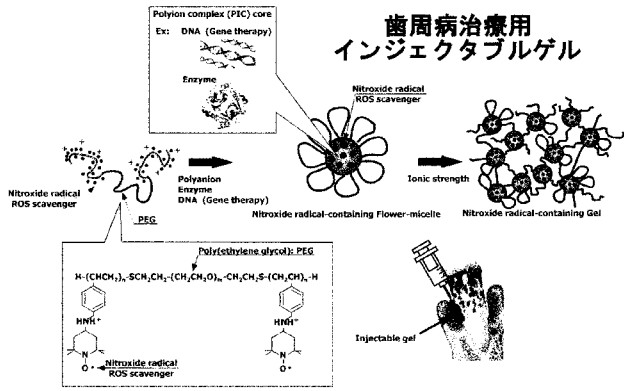
【産業上の利用可能性】

【0047】

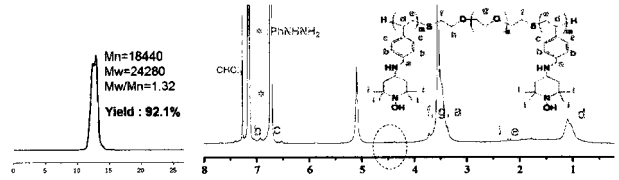
本発明のトリブロックコポリマーは、生体内に注入することによりゲルを形成するための組成物の活性成分として利用できることのみならず、ポリマー中に環状ニトロキシドラジカルを担持しているので生体内活性酸素除去剤として使用できる。したがって、本発明は医薬製造業等で利用可能である。



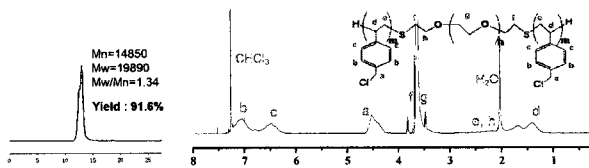
【 図 1 】



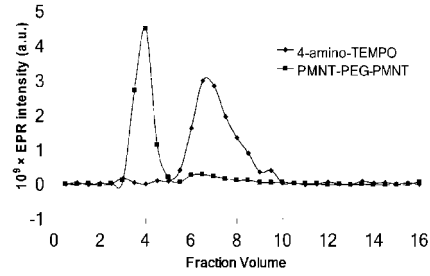
【 図 3 】



【 図 2 】

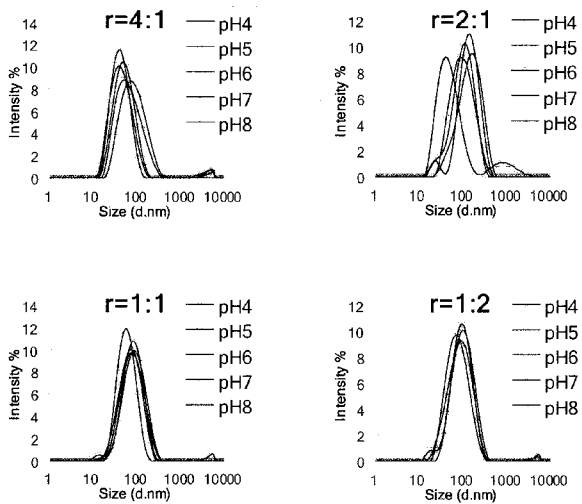


【 図 4 】

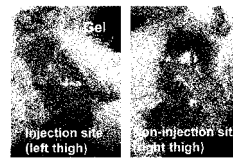


PCMS-*b*-PEG-*b*-PCMS トリブロック共重合体の SEC と NMR スペクトル

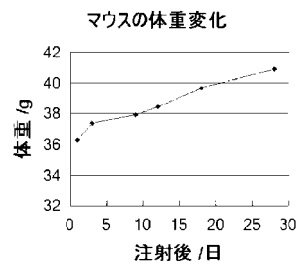
【 図 5 】



【 図 7 】

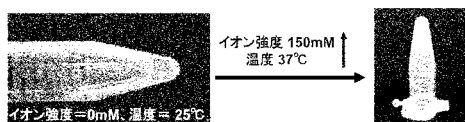


【 図 8 】

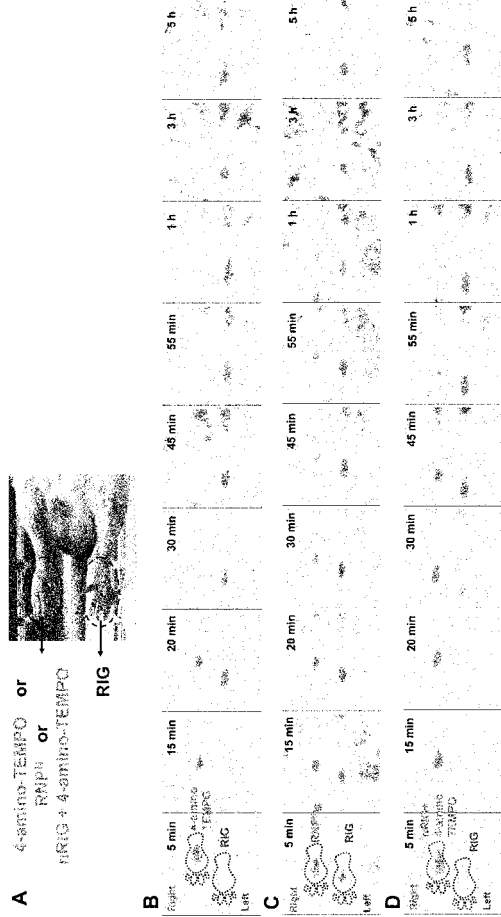


ポリイオンコンプレックスゲルの生体毒性評価結果

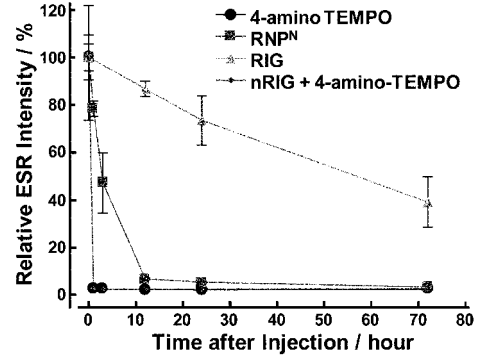
【 図 6 】



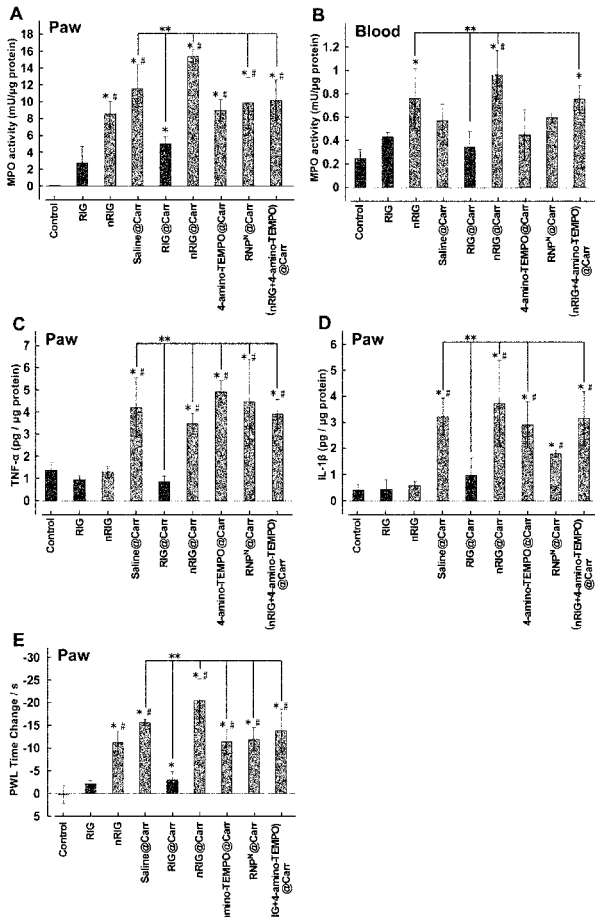
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/051395
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C08F8/32(2006.01)i, A61K31/787(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i, A61P39/06 (2006.01)i, C08F112/14(2006.01)i, C08F293/00(2006.01)i, C08L53/00 (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C08F6/00-246/00, C08F251/00-283/00, C08F283/02-289/00, C08F291/00-297/08, C08F301/00, C08G65/00-67/04, C08L1/00-101/14, A61K31/33-33/44, A61P1/00-43/00 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 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-184429 A (University of Tsukuba), 22 September 2011 (22.09.2011), claims; examples (Family: none)	1-14
A	WO 2009/133647 A1 (University of Tsukuba), 05 November 2009 (05.11.2009), claims; examples & US 2011/0142787 A1 & CA 2723118 A	1-14
A	JP 2007-520260 A (Advanced Cardiovascular Systems, Inc.), 26 July 2007 (26.07.2007), claims; paragraph [0017]; examples & US 2005/0112172 A1 & EP 1686924 A2 & WO 2005/053571 A2	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 12 March, 2013 (12.03.13)		Date of mailing of the international search report 26 March, 2013 (26.03.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/051395

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	JP 2012-067025 A (University of Tsukuba), 05 April 2012 (05.04.2012), claims; examples (Family: none)	1-14
P,A	JP 2012-111700 A (University of Tsukuba), 14 June 2012 (14.06.2012), claims; examples (Family: none)	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/051395

**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.: 15  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
(See extra sheet)
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.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/051395

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Claim 15 relates to a treatment method involving administering a specific compound, and therefore pertains to a method for the treatment of a human body or an animal body by surgery or therapy. Thus, the invention of this claim relates to a subject matter which this international searching authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 1 3 9 5	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C08F8/32(2006.01)i, A61K31/787(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i, A61P39/06(2006.01)i, C08F112/14(2006.01)i, C08F293/00(2006.01)i, C08L53/00(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. C08F6/00-246/00, C08F251/00-283/00, C08F283/02-289/00, C08F291/00-297/08, C08F301/00, C08G65/00-67/04, C08L1/00-101/14, A61K31/33-33/44, A61P1/00-43/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)			
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	
A	JP 2011-184429 A (国立大学法人 筑波大学) 2011.09.22, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-14	
A	WO 2009/133647 A1 (国立大学法人 筑波大学) 2009.11.05, 特許請求の範囲、実施例 & US 2011/0142787 A1 & CA 2723118 A	1-14	
<input checked="" 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。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 12.03.2013		国際調査報告の発送日 26.03.2013	
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) 松本 淳	4 J   4 6 7 5
		電話番号 03-3581-1101 内線 3457	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2013/051395
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	JP 2007-520260 A (アドヴァンスド カーディオヴァスキュラー システムズ、 インコーポレイテッド) 2007.07.26, 特許請求の範囲、【0017】、実施例 & US 2005/0112172 A1 & EP 1686924 A2 & WO 2005/053571 A2	1-14
P, A	JP 2012-067025 A (国立大学法人 筑波大学) 2012.04.05, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-14
P, A	JP 2012-111700 A (国立大学法人 筑波大学) 2012.06.14, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-14



国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 1 3 9 5

## 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 \_\_\_\_\_ 15 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲15は、特定の化合物を投与することを含んでなる治療方法についてであり、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法に該当し、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査期間が調査することを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ 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。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	1/02		
<b>A 6 1 P</b>	<b>39/06</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	39/06		
<b>C 0 8 G</b>	<b>65/326</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 8 G	65/326		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 吉富 徹

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 AA03 FA03 MA02 MA04 MA28 MA57 MA65 NA12  
 ZA67 ZA96 ZB11 ZC80  
 4J002 AA07W AD00X BC10W BC12X BG01X BP03W BQ00X CH02W GB04 HA07  
 4J005 AA04 BD06  
 4J026 HA06 HA08 HA22 HA45 HA50 HE02  
 4J100 AB08P BA28H BC65H CA31 HA61 HC61 HC63 HG01 JA15 JA52  
 JA53

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。