

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4613008号
(P4613008)

(45) 発行日 平成23年1月12日(2011.1.12)

(24) 登録日 平成22年10月22日(2010.10.22)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 31/722 (2006.01)

A 6 1 K 31/722

A 6 1 K 31/715 (2006.01)

A 6 1 K 31/715

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/02

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 1 O 1

請求項の数 9 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-530312 (P2003-530312)	(73) 特許権者	505432555
(86) (22) 出願日	平成14年9月26日 (2002.9.26)		ジェニス イーエイチエフ.
(65) 公表番号	特表2005-507891 (P2005-507891A)		Genis ehf.
(43) 公表日	平成17年3月24日 (2005.3.24)		アイスランド、101 レイキャビク、ミ
(86) 国際出願番号	PCT/IS2002/000016		ラールゴトゥ 2
(87) 国際公開番号	W02003/026677		Myrargotu 2, 101 Rey
(87) 国際公開日	平成15年4月3日 (2003.4.3)		kjavik, Iceland
審査請求日	平成17年9月20日 (2005.9.20)	(74) 代理人	100065248
(31) 優先権主張番号	6085		弁理士 野河 信太郎
(32) 優先日	平成13年9月26日 (2001.9.26)	(72) 発明者	エイナーソン, ジョン, エム
(33) 優先権主張国	アイスランド (IS)		アイスランド、アイエス-101 レイキ
前置審査		(72) 発明者	ジャスラソン, ヨハネス
			アイスランド、アイエス-105 レイキ
			ャビク、ミドチュニ 56
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キトーオリゴマーを含む医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キト - オリゴマーの鎖長が 2 ~ 50 の範囲にあり、脱アセチル化度が 30 ~ 50 % の範囲にある、変形性関節炎およびリウマチ性関節炎を含む関節障害の治療用医薬製造のための、N - アセチルグルコサミン (NAG) およびグルコサミンのキト - オリゴマーの使用。

【請求項 2】

キト - オリゴマーの少なくとも 10 重量 % が 2 ~ 12 の鎖長をもつ請求項 1 の使用。

【請求項 3】

キト - オリゴマーの 15 ~ 75 重量 % が 2 ~ 12 の鎖長をもつ請求項 1 の使用。

10

【請求項 4】

変形性関節炎およびリウマチ性関節炎を含む群から選択される関節障害の治療用医薬製造のための請求項 1 の使用。

【請求項 5】

治療が対象者の関節障害の症状を緩和する請求項 1 の使用。

【請求項 6】

医薬品が経口投与用である請求項 1 の使用。

【請求項 7】

キト - オリゴマーの鎖長が 2 ~ 50 の範囲にあり、脱アセチル化度が 30 ~ 50 % の範囲にある N - アセチルグルコサミン (NAG) およびグルコサミンのキト - オリゴマーを

20

含む、変形性関節炎およびリウマチ性関節炎を含む関節障害の治療用医薬組成物。

【請求項 8】

キト - オリゴマーの少なくとも 10 重量 % が 2 ~ 12 の鎖長をもつ請求項 7 の医薬組成物。

【請求項 9】

キト - オリゴマーの 15 ~ 75 重量 % が 2 ~ 12 の鎖長をもつ請求項 7 の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬分野、特にリウマチ関節炎や変形性関節炎のような関節障害の治療のための発明である。 10

【背景技術】

【0002】

キチンとキトサンは、一般に甲殻類の殻の廃棄物から得られるバイオポリマーであるが、特定の菌から得ることもできる。キトサンはキチンから化学的脱アセチル化によって製造することができる。これは、一般にキチン中の N - アセチル結合を濃縮アルカリ (40 ~ 50 % の NaOH または KOH) で加水分解することにより行われる。

【0003】

定義上、キトサンは一般に D - グルコサミン (GlcN) と N - アセチル - D - グルコサミン (GlcNAc または NAG) のコポリマーとして記載されており、遊離アミン基の等電点である pH 6.2 より上では水に不溶であるが、pH 6.2 より下では溶解する (スキーム 1 および 2 参照)。キトサン中、モノマー単位の 65 ~ 100 % は D - グルコサミンであり、このものは通常、65 ~ 100 % の脱アセチル化キチンとして記載されている。キトサンの化学的および生物学的性質は、脱アセチル化度 (DDA) および重合度 (DP)、すなわちポリマーの鎖長により直接的に影響を受ける。 20

【0004】

pH 6.2 より下の溶液中で、D - グルコサミン残基のアミン基がプロトン化されているとき、キトサンは正電荷をもつポリマーである。アミンであるキトサンは弱塩基であり、カルボン酸や無機酸のような酸と塩を形成することができる。これら塩の大半は水溶性である。 30

【0005】

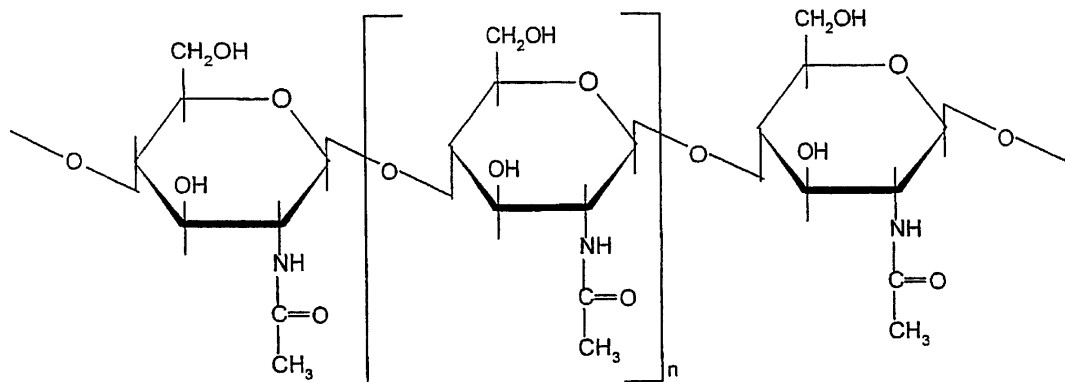
その本来の形態では、キチンは水に不溶である。しかしながら、アルカリ処理を通して部分的に脱アセチル化することにより、それを水溶性にすることが可能である [1]。DDA が 35 ~ 50 % の部分脱アセチル化キチンは、pH の広い範囲で水に溶解する。この形態の水溶性キチンは、キチン変換酵素にとって優れた基質であることを示している [2, 3]。

【0006】

さらに、不溶性キチンがキチナーゼで非常にゆっくり加水分解されるので、水溶性キチンの生成はキチナーゼを用いるキト - オリゴマーの高収率を維持するために必要な工程であることを示している [1]。 40

【0007】

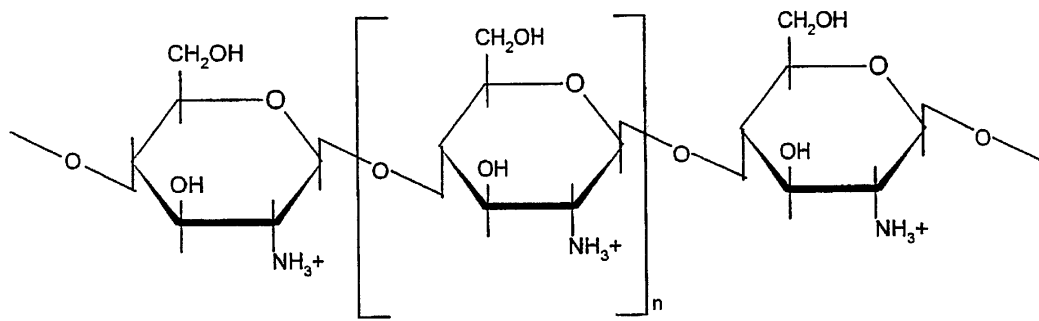
【化 1】



10

スキーム 1：完全アセチル化キチン（ポリ N-アセチル - D - グルコサミン）の構造
【 0 0 0 8 】

【化 2】



20

スキーム 2：完全脱アセチル化キトサン（ポリ D-グルコサミン、低い pH におけるプロトン化フォーム）の構造
【 0 0 0 9 】

【 0 0 1 0 】

モノマーに連結するベータ - (1 , 4) - 結合の加水分解により、高分子量のポリサッカリドから製造されるキト - オリゴマー (C O s) ならびに、低分子量のキチンおよびキトサンは、より短いセグメントである。ここで、キト - オリゴマーとは、短～中の長さのポリマー、好ましくは 2 ～ 5 0 の範囲の重合度 (D P) をもち、約 3 6 0 ～ 約 1 0 , 0 0 0 D a の分子量に相当するものを言う。水溶性キチン (D D A 3 5 ～ 5 0 %) から製造される C O s は、それらの水溶性を維持している。

30

【 0 0 1 1 】

C O s は、塩酸のような強酸を用いて、高温でベータ - (1 , 4) - 結合の加水分解に触媒作用を及ぼして化学的に、あるいは酵素的加水分解により製造される [4 , 5]。酵素的加水分解は、コントロールがより容易であり、条件が非常に緩和であり、物質の化学的修飾をもたらす副反応の危険性がより低いいため好ましい。

40

【 0 0 1 2 】

関節炎は、関節部の炎症のための一般的な用語であり、時にはすべての関節障害を含むのに用いられる。変形性関節炎は、関節の表面に対するダメージと、基礎をなす骨に異常な反応が見られる、関節疾患の最も一般的な形態である。骨関節症、関節症および変形性関節症といったようなその他の用語もこの疾患を示すのに用いられる。この疾患は、主に膝、臀部および手（最も一般的）に、ならびに足、首および背中に影響を及ぼす。リウマチ性関節炎は、関節部の一般的な炎症性疾患であり、関節部の内面膜（滑膜）の炎症を引き起こす。これは、通常の骨関節症よりひどい腫れと他の徴候を生じ、関節部に深刻なダメージを引き起こし得る。

【 0 0 1 2 】

50

キト-オリゴサッカライドの生物学的作用

キチンおよびキトサンキトサンの生物学的作用は、文献にて数多く立証されている。

生物学的作用の研究は、脱アセチル化度（DDA）と同様に、重合度（DP）の重要性を明瞭に証明している〔6〕。植物中では、DP5～7オリゴマーは、DP1～4よりも活性である〔7〕。

【0013】

その理由は、キト-オリゴマーを結合させるいわゆるキチナーゼ様のプロテイン（CLPs）の能力と関係している。これらのプロテインは、高い配列相同性およびファミリー18キチナーゼとの構造的関連性を共有している〔8〕。それらの触媒領域における単点突然変異のために、CLPsは触媒作用が欠落しているが、通常5～7キト-オリゴサッカライド単位を含むオリゴサッカライドの結合能力を維持している。

10

【0014】

N-アセチル-グルコサミン、キト-オリゴサッカライドおよびヒアルロナン：

グルコサミン（GNまたはGlcN）は、糖分子における炭素2上のOH基をNH₂で置換して修飾されたグルコースである。動物の細胞中で、グルコサミンは、グルコサミン6-ホスフェート（GN-6-P）およびN-アセチルグルコサミン（NAGまたはGlcNAc）として、2つの形態のみが見出されている。

【0015】

アミノ糖GN-6-Pは、グルタミンとフルクトース-6-ホスフェート（F-6-P）から合成される。この反応は、グルコサミンシンターゼにより触媒作用を受け、これがアミノ糖生合成における律速工程である。GN-6-Pは、あらゆるヘキソサミンおよびヘキソサミン誘導体への前駆体である。GN-6-Pは、引き続き、アセチル補酵素Aでアセチル化されてN-アセチルグルコサミン（NAG）になり得る。

20

【0016】

次いで、NAGはN-アセチルガラクトサミンまたはN-アセチルマンノサミンに変換され得る。これら3つのアミノ糖は、プロテインのグリコシル化ならびに糖脂質、グリコサミノグリカン（CAG）、ヒアルロナンおよびプロテオグリカンのためのブロック形成に重要である。多くのプロテオグリカンのバックボーンであるヒアルロナン（HA）は、NAGとグルクロン酸（GlcA）のジサッカライドくり返し単位（25,000糖単位までの）からなるポリサッカライドである。

30

【0017】

HAはGAGの最も初期の進化形態であると考えられている。

HAは、単に軟骨、滑膜液、眼のガラス体液や脊椎動物の皮膚における重要なポリサッカライドであるだけでなく、組織編成、形態形成、ガン転移、創傷治療および炎症においても重要な役割を果たし得る〔9〕。

それは創傷修復の間に大量に生成され、潤滑液として作用する滑液（滑流流体）の不可欠な構成物質でもある〔10〕。NAGは、中皮細胞および繊維芽細胞によるヒアルロナンの合成を用量依存的に増進させる〔11〕。

【0018】

HAは、プラズマ膜組織中に埋め込まれたHASシンターゼ（HAS）という酵素錯体により細胞から分泌される〔9〕。これらの酵素は、キチンシンターゼまたはセルロースシンターゼから進化したと考えられている〔9〕。マウスHASシンターゼ（HAS1）は、UDP-GlcAおよびUDP-NAGと共に供給されるとき、インビトロでHAを合成することができる〔12〕。HAS1がUDP-NAGのみと培養されると、それはキト-オリゴサッカライド（Cos）を合成する〔12〕。生体内真核HASシンターゼの類似作用の立証は、哺乳動物におけるCosのための新規な機能を示唆している〔9〕。

40

【0019】

Cosは、脊椎動物（爪蛙、ゼブラフィッシュやネズミ）の発達の間に生体内で生成される。そこで、キチナーゼ様のDG42/HASサブファミリーは、細胞分化の間にCosとHAの両方を合成し、Cosは後期原腸胚中での通常の前後軸形成にとってきわめて

50

重要であることが示されてきた [9 , 1 2 ~ 1 6]、[8] により再検討。

【 0 0 2 0 】

最近の研究は、グルコサミンの投与による関節炎の治療方法を提案している。これらの研究は、グルコサミンの投与が軟骨代謝を正常化する傾向があり、劣化を防ぎ、プロテオグリカンの合成を促進し、関節機能の修復をもたらすことを示している。

グルコサミンを用いることによる治療効果は、多数の動物およびヒトでの研究で立証されている。

【 0 0 2 1 】

米国特許第 6 , 1 1 7 , 8 5 1 号 [1 7] は、(ポリ) - N - アセチルグルコサミン (ポリ - N A G)、すなわちキチンが関節炎の治療および / またはそれらの症状の緩解のために用いられ得ることを教示している。

10

しかしながら、内臓中で不溶性繊維のように作用するキチンは、消化・吸収されにくいようである。また、内臓環境では溶解性が乏しいために、キチンは最近発見された酸性の哺乳類キチナーゼ (A M C a s e) [1 8]、または吸収可能な低分子キチンフラグメントを生成する腸内細菌によって、効果的に加水分解されにくいようである。

しかしながら、部分的に脱アセチル化されたキチンは、いずれの p H でも水溶性であり、A M C a s e または腸内細菌のための基質としてすぐに利用できる。

【 0 0 2 2 】

免疫応答および炎症反応に対するキト - オリゴマーの作用 - 軟骨細胞およびマクロファージ :

20

哺乳動物類において、キチンおよびキトサンは免疫賦活作用を有することが示唆されている [1 9 ~ 2 2]。

また、キチンおよびキトサンは、創傷治療や人工皮膚代替物において数年間にわたり研究されてきた [1 9 ~ 2 2]。これらの研究で、キチンおよびキトサンは、活性マクロファージによる酸化窒素 (N O) の生成に対して顕著な阻害効果を示している。

ヘキサ - N - アセチルキトヘキサオース (G l c N A c)₆ およびペンタ - N - アセチルキトペンタオース (G l s N A c)₅ も、N O の生成を阻害したが、その効能は低い。

【 0 0 2 3 】

これらの結果は、創傷治療に対するキチン物質の効能が活性化されたマクロファージによる N O 生成の阻害に少なくとも部分的には関係していることを示している [2 3]。

30

また、グルコサミンおよび N - アセチルグルコサミンの両方が、正常なヒトの関節軟骨細胞における N O 生成を阻害し、N - アセチルグルコサミンが炎症プロセスの阻害のための新しいメカニズムを有することが示されている [2 4]。

【 0 0 2 4 】

ヒト軟骨グリコプロテイン - 3 9 (H C g p - 3 9) と呼ばれているキチナーゼ様のプロテイン Y K L - 4 0 は、ファミリー 1 8 キチナーゼの一種である [2 5]。Y K L - 4 0 は、軟骨細胞、滑膜細胞およびマクロファージにより分泌される [2 6]。H C g p - 3 9 (Y K L - 4 0) は、高齢者および若年の関節炎患者において誘発されると思われる [2 8]。Y K L - 4 0 は、リウマチ性関節炎 (R A) において自己抗原としての役割を有することが報告されており [2 9 - 3 1]、非病変組織においてではなく、病人の変形性関節症軟骨および骨増殖体において発現している。

40

【 0 0 2 5 】

参考文献

1. Cho, Y.-W., 趙., *Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins*. Biomacromolecules, 2000. **1**(4): p. 609-614.
2. Tokuyasu, K., M. Ohnishi-Kameyama, および K. Hayashi, *Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from Colletotrichum lindemuthianum*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996. **60**(10): p. 1598-1603.
3. Dunkel, C. および D. Knorr, *Enhancement of chitin deacetylase activity in Mucor rouxii and Absidia coerulea with chitin and its detection with a non-radioactive substrate*. Food Biotechnology, 1994. **8**(1): p. 67-74. 10
4. Ilyina, A.V., N.Y. Tatarinova, および V.P. Varlamov, *The preparation of low-molecular-weight chitosan using chitinolytic complex from Streptomyces kurssanovii*. Process Biochemistry, 1999. **34**(9): p. 875-878.
5. Li, T., R. Brzezinski, および C. Beaulieu, *Enzymatic production of chitosan oligomers*. Plant Physiol. Biochem., 1995. **33**(5): p. 599-603.

20

【 0 0 2 6 】

6. Staehelin, C., 趙., *N-deacetylation of Sinorhizobium meliloti Nod factors increases their stability in the Medicago sativa rhizosphere and decreases their biological activity*. Mol plant microbe interact, 2000. **13**(1): p. 72-9.
7. Kendra, D.F. および L.A. Hadwiger, *Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to Fusarium solani and elicits pisatin formation in Pisum sativum*. Exp. Mycol., 1984. **8**(3): p. 276-281. 30
8. van der Holst, P.P.G., H.R.M. Schalaman, および H.P. Spaink, *Proteins involved in the production and perception of oligosaccharides in relation to plant and animal development*. Current Opinion in Structural Biology, 2001. **11**: p. 608-616.
9. Lee, J.Y. および A.P. Spicer, *Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule*. Curr. Opin Cell Biol, 2000. **12**: p. 581-586.
10. Alberts, B., 趙., *The Cell*. Third Ed. ed. 1994, New York & London: Garland Publishing, Inc. 1294. 40

【 0 0 2 7 】

11. Breborowicz, A., り., *The effect of N-acetylglucosamine as a substrate for in vitro synthesis of glycosaminoglycans by human peritoneal mesothelial cells and fibroblasts*. Advances in Peritoneal Dialysis, 1998. **14**: p. 31-5.
12. Yoshida, M., り., *In vitro synthesis of hyaluronan by a single protein derived from mouse HAS1 gene and characterization of amino acid residues essential for the activity*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(1): p. 497-506.
13. Semino, C.E. および M.L. Allende, *Chitin oligosaccharides as candidate patterning agents in zebrafish embryogenesis*. Int j dev biol, 2000. **44**(2): p. 183-93. 10
14. Rosa, F., り., *Accumulation and decay of DG42 gene products follow a gradient pattern during Xenopus embryogenesis*. Dev Biol, 1988. **129**(1): p. 114-23.
15. Semino, C.E., り., *Homologs of the xenopus developmental gene DG42 are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996. **93**: p. 4548-4553. 20

【 0 0 2 8 】

16. Bakkers, J., り., *An important developmental role for oligosaccharides during early embryogenesis of cyprinid fish*. Proc. natl. acad. sci. USA, 1997. **94**: p. 7982-7986.
17. Sherman, W.T. および R.W. Gracy, *Treatment of osteoarthritis by administering poly-N-acetyl-D-glucosamine*,, US6, 851, Editor. 2000, Lescarden Inc: USA.
18. Suzuki, M., り., *Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society, 2002. **50**(8): p. 1081-1089. 30
19. Merayo-Llodes, J.M., り., *Chitosan modulate corneal wound healing and increase corneal transparency in an experimental model of photorefractive keratectomy (PRK)*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2000. **41**(4): p. 3621B719.
20. Sugamori, T., り., *Local hemostatic effects of microcrystalline partially deacetylated chitin hydrochloride*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. **49**(2): p. 225-232. 40

【 0 0 2 9 】

21. Ueno, H., 他, *Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes*. *Biomaterials*, 2001. **22**(12): p. 1667-1673.
22. Ueno, H., 他, *Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages*. *Biomaterials*, 2001. **22**(15): p. 2125-2130.
23. Hwang, S.M., 他, *Chitinous materials inhibit nitric oxide production by activated RAW 264.7 macrophages*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. **271**(1): p. 229-233. 10
24. Shikhman, A.R., 他, *N-acetylglucosamine prevents IL-1 β -mediated activation of human chondrocytes*. *J. Immunol.*, 2001. **166**(8): p. 5155-5160.
25. Hakala, B.E., C. White, および D. Recklies, *Human Cartilage gp-39, a major Secretory Product of Articular Chondrocytes and Synovial Cells, Is a Mammalian Member of a Chitinase Protein Family*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993. **268**(34): p. 25803-25810.

【 0 0 3 0 】

20

26. Kirkpatrick, R.B., 他, *Induction and expression of human cartilage glycoprotein 39 in rheumatoid inflammatory and peripheral blood monocyte-derived macrophages*. *Experimental Cell Research*, 1997. **237**(1): p. 46-54.
27. De Ceuninck, F., 他, *Development of an enzyme-linked immunoassay for the quantification of YKL-40 (cartilage gp-39) in guinea pig serum using hen egg yolk antibodies*. *Journal of Immunological Methods*, 2001. **252**: p. 153-161. 30
28. Dozin, B., 他, *Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects*. *Matrix biology*, 2002. **21**: p. 449-459.
29. Boots, A.M.H., G.F.M. Verheijden, および E.S. Bos, *Proteins and novel peptides derived from autoantigen for use in immunotherapy of autoimmune diseases*, in 19 pp., *Cont.-in-part of U.S. 5,736,507*. 1996, Akzo Nobel N.V., Neth.: U.S.
30. Cope, A.P., 他, *T cell responses to a human cartilage autoantigen in the context of rheumatoid arthritis-associated and nonassociated HLA-DR4 alleles*. *Arthritis and Rheumatism*, 1999. **42**(7): p. 1497-1507. 40

【 0 0 3 1 】

31. Volck, B., ら., *YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils*. Proceedings of the Association of American Physicians, 1998. **110**(4): p. 351-360.
32. Connor, J., ら., *Human cartilage glycoprotein 39 (HC gp-39) mRNA expression in adult and fetal chondrocytes, osteoblasts and osteocytes by in-situ hybridization*. Osteoarthritis and Cartilage, 2000. **8**(2): p. 87-95.
33. Bahrke, S., ら., *Sequence analysis of Chitooligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Postsource Decay Mass Spectrometry*. Biomacromolecules, 2002. **3**(4): p. 696-704. 10
34. Miller, G.L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Anal Chem, 1959. **31**(3): p. 426-428.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0032】

発明の要約

われわれは、キト - オリゴマー (2 ~ 5 0 m e r s) を含む組成物が、関節炎のような関節障害の症状を和らげるのに著しく良好な結果をもたらすことを見出した。結果は、特にオリゴマーの投与が炎症を実質的に抑えるので、この点においてキト - オリゴマーがモノマーグルコサミンよりも驚くほど有効であると思われることを示している。

【0033】

われわれはキチンのリガンド、すなわちキト - オリゴサッカライド (C O s) が Y K L - 4 0 または同様のキチナーゼ様プロテインに結合することによって、それらの発現を低減させ、そして / またはそれらのエピトープをマスクするか、または変化させることにより自己抗原活性を低減させることを示唆する。

われわれは、キト - オリゴマーを 3 ~ 4 週間投与した後、リウマチ性関節炎を患う被験者における抗炎症効果を観察した。

【0034】

これらの抗炎症効果は、Y K L - 4 0 を介して軟骨細胞、マクロファージおよびおそらく骨芽細胞に影響を与え得るだろう。

予備的な結果は、キト - オリゴマーと共に培養したとき、インビトロでヒト軟骨細胞成長の誘発を示している (未公開データ) 。

【0035】

ここに提示の仮説によると、本発明のオリゴマー組成物は、キチナーゼ様プロテインをブロックする有益なオリゴマー基質を提供するとともに、オリゴマーが減成するにつれて、モノマー N A G および G 1 c N の公知の有益な効果を与える。

【0036】

さらに、ここで、そのような水溶性ポリマーが酸性キチナーゼおよび腸内細菌叢によって与えられるキトリティック酵素による分解をいくらか許容するように、部分的に脱アセチル化されたポリマー水溶性キチンは、そのまま水溶性キト - オリゴマーおよび N A G およびグルコサミンモノマーを供給して、同様に抗炎症効果および関節障害に対する治療効果を与えるであろうと仮定される。

【課題を解決するための手段】

【0037】

第一の観点では、本発明は、少なくとも 5 0 % のキト - オリゴマーが約 D P 2 ~ 5 0 の範囲の鎖長を有し、オリゴマーの脱アセチル化度が約 0 ~ 7 0 % の範囲にある N - アセチ

10

20

30

40

50

ルグルコサミン (NAG) およびグルコサミンのオリゴマーを含む組成物を提供する。

さらなる観点では、それを必要とする対象者の関節障害治療のために、キチンの部分脱アセチル化および部分解重合によって得られる医薬組成物が提供される。

【0038】

さらなる本発明の観点は、関節障害治療用医薬品の製造に用いるキト - オリゴマーの使用を提供する。ここで、キト - オリゴマーはN-アセチルグルコサミン (NAG) とグルコサミンのオリゴマーを含み、キト - オリゴマーの鎖長はおよそ1 ~ 50の範囲にあり、少なくとも60重量%のキト - オリゴマーは2以上の鎖長を有し、グルコサミンの脱アセチル化度は約0 ~ 50%の範囲にある。

もう一つの観点では、本発明はヒトにおける炎症作用の治療用医薬品を製造するためのキト - オリゴマーの使用を提供する。

【0039】

図面の説明

図1：サンプル1のバイオゲルP4 GPC分析。DP (ポリマー鎖長) および各鎖長のホモログが表1に挙げられている。

図2：全サンプルのMALDI-TOFにより測定されたサンプル1およびサンプル2中のキト - オリゴマーホモログ分布。分析からの相対シグナルは、DP2 ~ DP10からの全ホモログに対するシグナルを加え、100%に調節することにより計算される。各ホモログのシグナルは相対シグナル (%) で表される。

図3：MALDI-TOF MSにより判断された、サンプル1およびサンプル2からのキト - オリゴマーの合わされたDP分布。図2に示されたDP2 ~ DP10からの各DPに対するホモログを加え、合わせた相対シグナル (%) で表す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0040】

詳細な説明

本発明の組成物は、少なくとも50%のキト - オリゴマーが約2 ~ 50の範囲の鎖長を有し、オリゴマーの脱アセチル化度が約0 ~ 70% ($F_A = 0.3 - 1.0$) の範囲にある、N-アセチルグルコサミン (NAG) およびグルコサミンのオリゴマーを含む。

ここで用いられるキト - オリゴマーという用語は、N-アセチルグルコサミン (NAG) およびグルコサミンの一方、または両方のオリゴマーおよびポリマー、すなわち最短鎖長が2 (二量体) であるオリゴマー鎖を意味する。この説明と実施例に記載の通り、本組成物はとりわけ医薬品としての使用のために有用である。

【0041】

ホモログという用語は、異なる配列を有していてもよい、同じモノマー比を有する同じ長さのオリゴマー鎖を規定する。すなわち、ホモログA3D2は例えばオリゴマー配列A-A-A-D-DおよびA-A-D-A-D (AおよびDは、それぞれN-アセチルグルコサミンおよびグルコサミンを意味する) を含み得る。

【0042】

好ましくは、キト-オリゴマーの脱アセチル化度は、約0 ~ 50%の範囲にあり、より好ましくは約30 ~ 50%、さらに好ましくは約40%または約50%を含み、約40 ~ 50%のような、約35 ~ 50%の範囲にある。脱アセチル化度DDAは、アセチル化因子 F_A として表すこともでき、ここで例えばDDA30%は $F_A=0.7$ に相当する。

好ましくは、キト-オリゴマーの少なくとも約60%が、より好ましくは少なくとも約75%が、さらに好ましくは少なくとも約85%が約2 ~ 50の範囲の鎖長を有する。

【0043】

本発明の組成物は、海老の殻のようなキチン質の原料から好適に得ることができる。キチンは、約70 ~ 90、例えば約70、約80、または約90のような、約70 ~ 95の範囲を含む、約70 ~ 100の範囲にある温度で、実質的に乾燥したキチンを塩基の濃縮溶液 (例えば、40 ~ 60%のNaOHまたはKOH) 中、溶解することにより、強塩基で有利に脱アセチル化され得る。

【 0 0 4 4 】

反応時間およびキチンの濃度は、所望の脱アセチル化度によって変動してよく、個々の処理装置および個々の所望の脱アセチル化度にも、容易に最適化できる。この反応は、得られたキチン/キトサンを冷水で洗浄することにより中断され、得られた溶解性キチンの溶液は、キト-オリゴマーを得るために加水分解に付してもよく、あるいはその物質を次の処理または保存のために適当な乾燥手段によって乾燥してもよい。

【 0 0 4 5 】

上記の通り、キト-オリゴマーを得るには、キチン/キトサンの酵素加水分解が好ましいが、解重合のための適当な鉱酸（例えば、塩酸あるいは亜硝酸）の使用も本発明に含まれる。いくつかのキチナーゼ活性酵素、例えばSigma-Aldrichから得られるキチナーゼ（EC No. 3.2.1.14）が入手可能であり、この点において採用することができる。また、リゾチーム（EC No. 3.2.1.17）もキチナーゼ作用のあることが見出されている（例えば、米国特許第5,262,310号参照）。

10

【 0 0 4 6 】

酵素培養条件（酵素/基質比、温度、pH、反応時間）は、採用される酵素の個々の活性および至適反応条件により変動し得る。実施例2で行われているように（サンプル1およびサンプル2参照；製造）、小～中サイズのオリゴマーの所望の比を得るように、条件を最適化することができる。

【 0 0 4 7 】

より長いオリゴマーおよびポリマー（DP 30以上）は、分離用クロマトグラフィーによって、あるいは高いpH（約pH 9以上）での沈殿によって、所望の短および中の長さを有するオリゴマーから任意に分離することができる。

20

キト-オリゴマー組成物は、カプセル充填あるいは摂取用の水溶液中に溶解または懸濁できる粉末、フレークまたは繊維性材料を含む実質的に乾燥した形態で都合よく供給され得る。

【 0 0 4 8 】

そのような組成物は、実質的に前記のオリゴマー、すなわち約80～100重量%の範囲のキト-オリゴマーのみからなってもよい。有用な具体例では、該組成物は約50～90重量%のように、約25～95重量%を含む20～100重量%の範囲で該オリゴマーを含む。製造方法によっては、組成物は、オリゴマー塩例えばNaClまたはKCl以外の塩を相当量含み得るが、そのような余分な塩の含量は最小限に維持されるのが好ましい。

30

【 0 0 4 9 】

原料ポリマーの加水分解の際に適用される方法および条件によっては、全サッカライドの約50重量%未満のような、約0～60重量%であるような量で、若干量のグルコサミンおよびNAGのモノマーが本発明の組成物中に存在する。しかし、該モノマーは全サッカライドの20重量%未満を含む約25重量%未満のような、約40重量%未満であるのが好ましい。

【 0 0 5 0 】

しかしながら、われわれの試験結果は、本発明の組成物中に存在する、ある量のモノマー、特にNAGは好ましい相乗効果を有することを示している。

40

さらに、この組成物は、医薬的に受け入れられる賦形剤、希釈剤、着香剤、栄養剤あるいは着色剤を含み得る。

【 0 0 5 1 】

より短いオリゴマーは、本発明の組成物の活性にとって極めて重要であると思われる。有用な具体例では、組成物の少なくとも約10重量%のオリゴマーが2～12の鎖長を有し、より好ましくは少なくとも25重量%を含んで少なくとも15重量%、さらに好ましくはオリゴマーの少なくとも50重量%が2～12の鎖長を有する。

【 0 0 5 2 】

ある具体例では、オリゴマーの約50重量%のような約15～75重量%が2～12の

50

鎖長を有し、オリゴマーの約 15 ~ 75 重量%が 2 ~ 9 の鎖長を有することが好ましい。ある具体例では、オリゴマーの少なくとも 70 %または少なくとも約 80 %を含んで、少なくとも 60 重量%のような、少なくとも 50 重量%が 2 ~ 15 の範囲の鎖長を有する。

【0053】

本発明のもう一つの観点においては、本発明のオリゴマー組成物を含む医薬組成物が、ここに記載のように供給される。

医薬組成物は、例えばグラス 1 杯の水に容易に溶ける乾燥形態のような、経口投与に適した形態にあるのが好ましい。

そのような形態は、粉末、顆粒、フレーク、繊維状やペースト形態を含む。

しかしながら、本組生物はピルまたはカプセル中に包まれることも可能である。

10

【0054】

その他の有用な具体例では、本発明の組成物は、筋肉内、皮下または静脈内投与のような、全身投与に適した形態にある。そのような好適な形態は、標準的な医薬の実務に従って、医薬的に受け入れられる担体または賦形剤と共に溶液の形態である。この溶液の形態は、無菌で、その pH は適切に調整され、緩衝されている。静脈内に用いるためには、溶質の全濃度は製剤を等張化するために調節されるべきである。

【0055】

添付の実施例に示されるように、医薬組成物は、それを必要とする対象者のリウマチ性関節障害の治療に有用であることが見出されており、とりわけ変形性関節炎およびリウマチ性関節炎を含む群から選ばれる関節障害の治療に有用であることが見出されている。

20

このことから、治療は、組成物が投与される対象者において関節障害の症状を緩和することを含む。

【0056】

さらなる観点において、本発明は、それを必要とする対象者の関節障害治療のための医薬組成物を提供する。該組成物は、キチンの部分脱アセチル化および部分解重合により得られる。そのような組成物は、上記のようなものが好ましい。

【0057】

さらなる観点では、脱アセチル化度が約 35 ~ 約 50 % の範囲にある水溶性の部分脱アセチル化キチンを含む組成物が、抗炎症治療および関節障害の治療に提供される。ポリマーの水溶性は、腸内細菌叢により生成されるキトリテック酵素によるポリマーの分解をいくらか許容する。したがって、組成物が摂取されると、上記の加水分解されたキト - オリゴマーと同程度までではあるが、その場で水溶性のキト - オリゴマーおよびグルコサミンモノマーを提供する。

30

【0058】

さらなる観点によれば、本発明は、キト - オリゴマーの鎖長が約 2 ~ 50 の範囲にあり、オリゴマーの脱アセチル化度が約 30 ~ 50 % の範囲を含む約 0 ~ 70 % ($F_A = 0.3 - 1.0$) の範囲、好ましくは約 0 ~ 50 % の範囲にある、N - アセチルグルコサミン (NAG) およびグルコサミンのオリゴマーの治療的に活性な量を、それを必要とする対象者に投与することからなる、関節障害および炎症性障害の治療方法を提供する。好ましい具体例では、この方法は、ここに記載のような組成物の投与を含む。

40

【0059】

本発明の方法で有利に治療できる関節障害は、変形性関節炎、リウマチ性関節炎、炎症性障害、およびその他のリウマチ性症状を含む。

さらなる観点によれば、本発明は、変形性関節炎およびリウマチ性関節炎のような関節障害の治療用医薬の製造のための、上記のようなキト - オリゴマーの使用を提供する。

【0060】

その他の観点によれば、ヒトにおける炎症性作用に対する治療のための上記組成物の使用、ならびに骨および肉組織における炎症性作用に対する治療用薬剤の製造用組成物の使用を提供する。

【実施例】

50

【 0 0 6 1 】

実施例 1

キト - オリゴマーの特徴づけ：分析方法

1 A：水分および灰分含量の測定

噴霧乾燥したキト - オリゴマーのサンプル 4 ~ 5 g を、1 0 5 で 3 時間培養の前後に、重量測定分析により水分含量のために分析した。8 0 0 で 3 時間の完全燃焼により灰分含量を測定し、乾燥重量に基づく無機残渣の重量 % として計算した。

【 0 0 6 2 】

1 B：直接滴定による脱アセチル化度の測定

キト - オリゴマー (5 0 0 m g、水分および灰分修正済) を、密封エルレンマイヤーフラスコ中で 1 2 5 m l の 0 . 0 6 0 N H C l と混合し、回転式振とう機 (1 5 0 r p m) 中、2 2 で一夜溶解した。続いて、1 2 5 m l の蒸留水を加え、溶液をさらに少なくとも 1 5 分間振とうした。5 0 . 0 g の溶液をビーカーに移し、1 . 0 0 m l / 分 (H P L C ポンプ) の流速で、0 . 5 0 0 N N a O H 溶液で滴定した。p H を p H 1 . 8 ~ 9 の間でモニターし、p H 3 . 7 5 ~ P H 8 . 0 の滴定曲線の変曲点間で消費された N a O H の量に基づいて、等式 $DDA = VOI (m l) NaOH * 16116 * 0.0500 / 100 mg$ キトサンを用いて D D A を計算した。

各サンプルをそれぞれ 3 回滴定した。

【 0 0 6 3 】

1 C：平均重合度 (D P) 測定のための D N S 検定

0 . 5 0 % のオリゴマー溶液の平均重合度 (D P 値) を、3 , 5 - ジニトロサリチル酸 (D N S) を試薬として、グルコースをスタンダードとして用いて、糖還元末端基分析により測定した。この方法は、ミラーにより最初に記載された [3 4]。キトサンオリゴマー溶液 (5 . 0 0 m g / m l 、0 . 5 % 酢酸中で水分と灰分を修正) 1 . 0 0 m l の量を、D N S 試薬 2 . 0 0 m l と混合し、8 分間沸騰させ、冷却し、2 0 0 0 x g で 3 分間遠心分離した。上清の光学密度を 5 4 0 n m で分光光度計で測定し、グルコース 1 0 0 m g / m l (5 . 5 5 m M) の吸光度を基準として用いて、平均 D P 値を計算した。水 (2 . 0 0 m l の D N S 溶液中 1 . 0 0 m l) を、5 4 0 n m でブランクとして供給した。D P 計算に用いられる平均分子量は 2 0 0 D a であった。各サンプルそれぞれ 2 回分析した。

【 0 0 6 4 】

1 D：バイオゲル P 4 ゲル浸透クロマトグラフィー分析 (G P C)

高級のバイオゲル P 4 を備えた 2 つの連結カラム (P h a r m a c i a) (B i o R a D、ミュンヘン、ドイツ) を、0 . 0 5 M 酢酸アンモニウム緩衝液を用い、流動相として 0 . 2 3 M 酢酸で p H 4 . 2 に調整した。流速は 2 7 . 7 m l / 時間であった。島津製作所製 R I D 6 A 屈折インデックス検出器を用いて検出を行った。M A L D I - T O F M S 分析に先立って、フラクションを集め、適当に組み合わせ、凍結乾燥した。

【 0 0 6 5 】

1 E：M A L D I - T O F 質量分析

サンプルの調製：

H₂O (1 μ L) 中のサンプルの溶液を標的に置き、M e O H 中の T H A P または D H B の 5 % 溶液 1 μ L と混合した。室温で乾燥後、M e O H 1 μ L 中にサンプルを再度溶解して、室温乾燥したとき、非常に微細な結晶の薄層を得た。質量スペクトルを [3 4] 中にさらに詳細に記載されているように B r u k e r R e f l e x I I 装置 (B r u k e r D a l t o n i k プレーメン、ドイツ) で記録した。

【 0 0 6 6 】

実施例 2

関節炎に対する経口投与に用いられるキト - オリゴマー (C O s) の製造

サンプル 1 (G 0 0 0 8 2 3 - 1 K) の製造：

2 5 k g の水酸化ナトリウムを 8 0 L のブレンダー中で 2 5 k g の水に溶解し、7 0 に加熱した。2 . 5 k g のエビのキチン (P r i m e x e h f .) を加え、1 5 r p m で 2 0 分

10

20

30

40

50

間攪拌した。次いで、スラリーを水で冷却し、チーズ・クロス袋（ $200 \times 40 \text{ cm}$ ）で濾過し、 $10 \sim 15$ 分間洗浄した。キチンゲルをブレンダー中に戻し、 $30\% \text{ HCl}$ を加えて $\text{pH} 4$ に調節し、水を加えて 80 L にした。 380 g （ 750 U/g ）のキチナーゼ溶液を加え、ゲルを 30° で 16 時間攪拌した。 pH を 7 に調節し、溶液を 10 分間で 70° に加熱することによって、酵素を変性させた。冷却後、オリゴマー溶液をメッシュの大きさが $280 \mu\text{m}$ の濾し器を通して注入した。回転式噴霧乾燥機を用いて、吸気温度 190° 、排気温度 80° で、溶液を噴霧乾燥に付した。噴霧ローター速度は $20,000 \text{ rpm}$ であった。 2.0 kg の微細な白色のキトサン粉末を集め、室温に維持した。サンプル 1 という。

【0067】

10

サンプル 1 の分析

噴霧乾燥したキト - オリゴマーサンプルを灰分と水分含量について分析した。灰分含量は 53.7% （ W/W ）であり、水分は 5.4% （ W/W ）であった。キト - オリゴマーおよびモノマーは 40.9% （ W/W ）であった。脱アセチル化度（ DDA ）は $42.3\% \pm 0.1\%$ （ SD ）であった。

MALDI - TOF 分析（表 1）後のバイオゲル P4 GPC （図 1）は、モノマー（ $\text{DP} 1$ ）が主に N - グルコサミン （ GlcN ）がわずかに見られる N - アセチルグルコサミン （ GlcNAc ）であることを示した。二量体（ $\text{DP} 2$ ）は、 $(\text{GlcNAc})_2$ と $(\text{GlcNAc})(\text{GlcN})$ との混合物であった。三量体（ $\text{DP} 3$ ）は、 $(\text{GlcNAc})_2(\text{GlcN})$ を主な物質として含み、 $(\text{GlcNAc})_3$ をマイナーな物質として含んでいた。

20

主な三量体物質の配列は、 $\text{GlcN - GlcNAc - GlcNAc}$ 、すなわち D - A - A であると決定された。バイオゲル P4 分析で判定されたように、より長いオリゴマー（ $\text{DP} 4 \sim \text{DP} 20$ ）が少量検出された。中間の長さのオリゴマーの存在を、バイオゲル P4 および MALDI - TOF MS 分析の両方によって確認した。

【0068】

表 1 図 1 に示されたのサンプル 1 からのバイオゲル P4 GPC ピークの MALDI - TOF MS

それぞれ番号の付いたピークを回収し、 MALDI - TOF MS により分析した。表は、フラクション番号および各フラクションの算出したオリゴマーおよびホモログを示す。

30

【0069】

【表 1】

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
D8A4	D6A3	D4A3	D3A3	D2A3	D1A3	D2A2	D1A2	A2	A2	A
D7A5	D5A4	D3A4		D3A3	D3A2	D1A3		D1A2		
D6A6	D4A5	D2A5		D4A2	D2A3					
	D7A3									
	D6A4									
	D5A5									

40

$\text{A} = \text{GlcNAc}$ および $\text{D} = \text{GlcN}$

【0070】

サンプル 2（ G010430 - 1K ）の製造：

このサンプルは、酵素の不活性化（ $10\% \text{ NaOH}$ により $\text{pH} 8.0$ に調節）および篩過後、溶液を Alpha - Laval フロー遠心機（ LAPX 型）を用いて 9800 rpm

50

で清浄化したことを除いては、サンプル 1 のために記載したものと実質的に同じプロトコルで製造された。液体の流速は 5 2 0 m l / 分であり、ローターを 3 ~ 5 分毎に空にした。ペレットを処分し、清澄なオリゴマー溶液を実施例 2 のようにして噴霧乾燥した。製品の収量は粉末で 1 . 7 4 kg であった。

【 0 0 7 1 】

サンプル 2 の分析

このサンプルの灰分含量は 4 8 . 3 % (W / W) と測定された。NaCl 含量は 4 7 . 0 % であった。水分含量は 5 . 0 % (W / W) であった。キト - オリゴマーおよびモノマーは、4 6 . 7 % (W / W) であった。脱アセチル化度 (DDA) は 3 8 . 7 % +/- 0 . 9 であった。

10

【 0 0 7 2 】

サンプル 1 および 2 の MALDI - TOF MS 分析を図 2 および 3 に示す。図 2 は、DP 2 ~ DP 1 0 のキト - オリゴマーのホモログ分布を表す。ホモログ分布は、2 つのサンプル間で多少異なっている。図 3 に示すように、同じ DP に異なるホモログを加えると、2 つのサンプルについて DP 分布が類似していることが明らかである。MALDI - TOF MS 分析における異なったオリゴマーに対する強度シグナルは、定量的ではなくて定性的シグナルであり、特により高いオリゴマーのピークはより低いオリゴマーのピークよりも強度が比較的弱く現れるかもしれないことを、念頭に置くことが重要である。

【 0 0 7 3 】

実施例 3

20

キト - オリゴマー (COs) の経口投与

関節炎を患う対象者が、水に溶かしたサンプル 1 の噴霧乾燥キト - オリゴマー粉末を 1 日用量 3 . 0 g (小さじ 1 杯 ; 5 . 0 m l , 1 2 2 3 m g の COs) で、最長 2 年間、少なくとも 5 週間服用した。これらの患者の 2 人は連続投与後に 5 ~ 6 週間投与を中止し、その後 2 . 9 g のサンプル 2 (小さじ 1 杯 ; 5 . 0 m l , 1 3 3 1 m g の COs) の服用を再開した。

【 0 0 7 4 】

投与の結果

対象者 1 : リウマチ性関節炎の治療

5 5 歳の女性被験者はリウマチ性関節炎を患っていた。両手の関節の腫れがひどく、指は硬直し、動かすと痛みが走った。この被験者はサンプル 1 キト - オリゴマー粉末を毎日 3 g 服用した。この被験者は 4 ~ 5 週間後に顕著な改善を報告した。症状が顕著に軽減され、炎症が治まり、指の関節が正常に戻った。痛みが緩和され、この被験者は緻密な作業が再びできるほどに指をより自由に動かすことができるようになった。約 2 ヶ月で、彼女はキト - オリゴマー粉末の服用を 5 ~ 6 週間中止した。3 ~ 4 週間のうちに、関節炎の症状が徐々に再発した。服用中止後 2 ~ 3 週間で、2 . 9 g のサンプル 2 (1 3 3 1 m g の COs) を用いて毎日の服用を再開し、2 回目の投与開始後 4 ~ 5 週間で緩和したと報告されている。この被験者は、およそ 2 1 ヶ月間、炎症も痛みも伴わずに、サンプル 1、2 および類似のキト - オリゴマー製品を 1 日用量で服用している。

30

【 0 0 7 5 】

被験者 2 - 4 : リウマチ性関節炎の治療

この被験者らはリウマチ性関節炎を患っていた。彼らは 3 . 0 g のサンプル 2 キト - オリゴマー粉末を毎日服用した。1 ヶ月後、被験者らは RA 症状が顕著に緩和したことを報告した。炎症 (関節の腫れ) が治まり、関節の硬直は和らいだ。

【 0 0 7 6 】

被験者 5 - 1 4 : 変形性関節炎の治療

変形性関節炎を患う 1 0 人の被験者が、3 . 0 g のサンプル 1、2 . 9 g のサンプル 2 および類似のキト - オリゴマー製品をそれぞれ毎日服用した。2 ~ 4 週間後、8 人の被験者が炎症および痛みが軽減したという好結果を報告した。2 人の被験者は、症状の軽減がないと報告した。

40

50

【 0 0 7 7 】

試験を受けた被験者全員について、サンプル 1 と 2 の間で症状の軽減に明白な差異は見られなかった。被験者が判断した通り、サンプル 1 および 2（より高い D D A、より高い D P）とは異なって、サンプルの製造における変更は、抗関節炎活性における向上をもたらさなかった。試験は引き続き進行中である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 8 】

【図 1】図 1 は、サンプル 1 のバイオゲル P 4 G P C 分析。D P（ポリマー鎖長）および各鎖長のホモログが表 1 に挙げられている。

【図 2】図 2 は、全サンプルの M A L D I - T O F により測定されたサンプル 1 およびサンプル 2 中のキト - オリゴマーホモログ分布。分析からの相対シグナルは、D P 2 ~ D P 1 0 からの全ホモログに対するシグナルを加え、1 0 0 % に調節することにより計算される。各ホモログのシグナルは相対シグナル（%）で表される。

【図 3】図 3 は、M A L D I - T O F M S により判断された、サンプル 1 およびサンプル 2 からのキト - オリゴマーの合わされた D P 分布。図 2 に示された D P 2 ~ D P 1 0 からの各 D P に対するホモログを加え、合わせた相対シグナル（%）で表す。

【図 1】

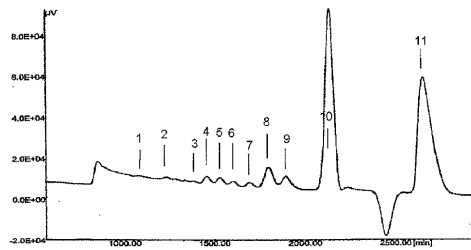
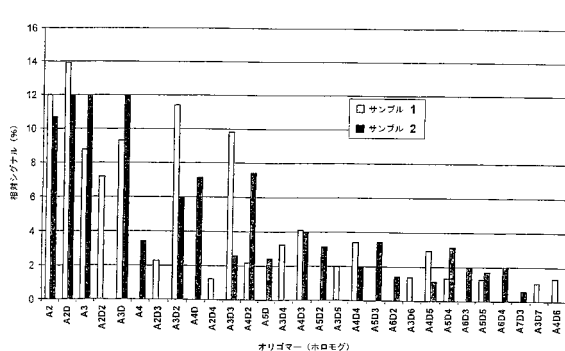
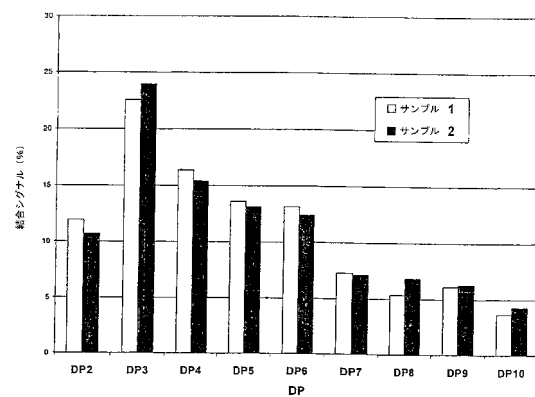


Figure 1

【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(72)発明者 ピーター, マーティン

ドイツ、14476 ゴルム、ディーノオー. 06-0.07、ハウス 25、カール-リープネ
ック-シュトラッセ24-25、インスティテュート フュアー オーガニスク ケミ ウント
シュトラクチュラナリティク

(72)発明者 バーク, スヴェン

ドイツ、14476 ゴルム、ディーノオー. 06-0.07、ハウス 25、カール-リープネ
ック-シュトラッセ24-25、インスティテュート フュアー オーガニスク ケミ ウント
シュトラクチュラナリティク

審査官 澤田 浩平

(56)参考文献 欧州特許出願公開第01127574(E P, A1)

国際公開第97/042975(WO, A1)

国際公開第01/068714(WO, A1)

特開昭53-047479(J P, A)

特開昭63-156726(J P, A)

国際公開第98/025631(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A61K31/33-31/80

A61P1/00-43/00

JSTPlus(JDream2)

JMEDPlus(JDream2)

JST7580(JDream2)

PubMed