(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-524512
(P2024-524512A)
(43)公表日　令和6年7月5日(2024.7.5)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　35/42　(2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/42	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ　11/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	11/00	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ　9/72　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	9/72	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ　31/685　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/685	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ　38/17　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	38/17	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全21頁）

(21)出願番号　特願2024-500025(P2024-500025)
(86)(22)出願日　令和4年7月4日(2022.7.4)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月1日(2024.3.1)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/068366
(87)国際公開番号　WO2023/280737
(87)国際公開日　令和5年1月12日(2023.1.12)
(31)優先権主張番号　21183790.1
(32)優先日　令和3年7月5日(2021.7.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　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,
最終頁に続く

(71)出願人　591095465
キエシ・ファルマチエウテイチ・ソチエタ・ペル・アチオニ
イタリア・パルマ・ビアパレルモ２６／エイ
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷 道子
(74)代理人　100156144
弁理士　落合 康
(72)発明者　グイディ，トマーゾ
イタリア４３１２２パルマ、ヴィア・パレルモ２６／ア、キエージ・ファルマチェウティチ・ソチエタ・ペル・アツィオーニ内
(72)発明者　リッツォ，ルカ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　肺サーファクタントを調製する方法

(57)【要約】
肺サーファクタントを調製する方法
本発明は、外因性肺サーファクタント、特に修飾天然サーファクタントまたは再構成サーファクタントを調製する方法であって、最終濾過工程が塩素系溶媒を使用せずに行われる方法に関する。本発明はまた、前記方法によって得られる生成物および対応する医薬組成物に関する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
修飾天然サーファクタントまたは再構成合成サーファクタントから選択される外因性肺サーファクタントを調製する方法であって、
i)哺乳動物の肺から前記修飾天然サーファクタントを乾燥ペーストの形態で抽出するか、前記再構成合成サーファクタントの乾燥成分を混合する工程；
ii)得られたペーストまたは混合物を精製する工程；
iii)工程ii)の精製は、以下の工程によって行われる：
iv)前記修飾天然サーファクタントのペーストまたは前記再構成サーファクタントの成分を、2-メチル-2-プロパノールを含む有機溶媒に溶解する工程、
v)得られた溶液を濾過による滅菌にかける工程；および
vi)乾燥工程、
を含む方法。
【請求項２】
有機溶媒が、2-メチル-2-プロパノールのみからなる、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
溶解工程i)が、30℃～40℃の温度で撹拌しながら行われる、請求項1または2に記載の方法。
【請求項４】
前記撹拌が、300～400rpmの速度で15～30分間行われる、請求項3に記載の方法。
【請求項５】
工程1におけるサーファクタントと有機溶媒との比が6～20％w/vである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記再構成サーファクタントが、ルシナクタントまたはエリファクタントである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記修飾天然サーファクタントが、ポラクタントアルファおよびそのバイオシミラー、ベラクタント、カルファクタントおよびボバクタントからなる群から選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記修飾天然サーファクタントがポラクタントアルファである、請求項7に記載の方法。
【請求項９】
以下の工程を含む、請求項6に記載の方法：
i)適当なブレンダーでブタの肺を切り刻む工程；
ii)切り刻んだ肺を生理学的溶液で抽出し、次に、濾過し、混合物を遠心分離にかける工程；
iii)上清を有機溶媒またはその混合物で抽出し、次に、有機相を蒸発乾固させる工程；
iv)極性脂質および疎水性タンパク質SP-CおよびSP-Bを含有する画分を分離する工程；
v)前記画分を集めてプーリングし、次に、有機溶液を蒸発乾固させることで、サーファクタントを乾燥ペーストの形態で得る工程；
vi)前記修飾天然サーファクタントのペーストを、2-メチル-2-プロパノールを含む有機溶媒に溶解する工程；
vii)得られた溶液を濾過による滅菌にかける工程；および
viii)乾燥工程。
【請求項１０】
工程iv)の分離が、サイズ排除液体-ゲルクロマトグラフィーにより行われる、請求項9に記載の方法。
【請求項１１】

工程iv)の分離が、塩素系溶媒を使用せずに行われる、請求項9に記載の方法。
【請求項１２】
工程iv)の分離が、超臨界液を使用することによって行われる、請求項11に記載の方法。
【請求項１３】
以下の工程をさらに含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法：
ix)前記乾燥生成物を、室温で攪拌しながら無菌生理学的塩化ナトリウム水溶液に再懸濁する工程；
x)場合により、懸濁液のpHを所望の値に調整する工程；および
xi)懸濁液を無菌条件下で適当な単回使用バイアルに充填する工程。
【請求項１４】
請求項1～13のいずれか一項に記載の方法によって得られる外因性肺サーファクタント。
【請求項１５】
請求項1～13のいずれか一項に記載の方法によって得られる外因性肺サーファクタントを含む医薬製剤。
【請求項１６】
肺サーファクタントの欠乏または機能不全に起因または関連するさまざまな肺障害、異常状態および疾患の予防または処置に使用するための、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法によって得られる外因性肺サーファクタント。
【請求項１７】
新生児呼吸促迫症候群(RDS)の処置に使用するための、請求項16に記載の外因性肺サーファクタント。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、修飾天然サーファクタントを調製する方法に関する。本発明はまた、前記方法によって得られる生成物、対応する医薬組成物およびその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
肺サーファクタントは、肺胞の内側を覆う脂質-タンパク質混合物である。肺胞内の気液界面に単層として脂質が存在すると、表面張力が低下する。それにより、呼気中に肺胞が虚脱する傾向が低下し、おそらく気腔への液体の浸出も減少する。
【０００３】
内因性肺サーファクタントは、約80重量％のリン脂質、10重量％のタンパク質および10重量％のトリグリセリドなどの中性脂質、ならびにさらなる微量成分を含む。
【０００４】
リン脂質の中でも、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)は、吸気段階で気液界面に単分子膜を形成することで、肺胞システムを安定化させるため、最も重要な役割を担っている。
【０００５】
天然肺サーファクタントには通常、少なくともSP-A、SP-B、SP-CおよびSP-Dといった4種類のタンパク質が存在する。これらの4種類のうち、SP-BとSP-Cは、異なる低分子量の疎水性タンパク質であり、おそらくバルク相のラメラ組織から気水界面への脂質の移動を促進し、また呼気中の脂質単分子膜を安定化することによってサーファクタントリン脂質混合物の表面活性特性を高めることが示されている(Hawgood S et al Biochim Biophys Acta. 1998 Nov 19；1408(2-3) pp 150-160； Johansson J Biochim Biophys Acta. 1998 Nov 19；1408(2-3) pp 161-72参照)。
【０００６】
肺サーファクタントの欠乏または機能不全は、呼吸困難と名づけられた重度呼吸器疾患

を引き起こし、これは、特に早産児や重度肺動脈弁閉鎖不全を伴うさまざまな病態に罹患した成人において、高い罹患率と死亡率の原因となっている。

【０００７】

さまざまな外因性サーファクタントによる置換療法は、実験的研究でも臨床研究でも有益であることが証明されている。

【０００８】

特に、哺乳動物の肺から抽出された修飾天然サーファクタントは、置換療法として広く使用されている。

【０００９】

広く利用されている修飾天然サーファクタントは、Curosurf(登録商標)(Chiesi Farmaceutici SpA, Italy)の商標で販売されているブタ肺由来のポラクタントアルファ(poractant alfa)、ウシ肺由来のベラクタント(beractant)(Survanta(登録商標), AbbVie Inc, USA)およびボバクタント(bovactant)(Alveofact(登録商標) Lyomark Pharma GmbH, Germany)、および子ウシ肺由来のカルファクタント(calfactant)(Infasurf(登録商標), Ony Biotech, USA)である。

【００１０】

一般的には、哺乳動物の肺の気道から表面活性物質をさまざまな方法で取り出し、次に、有機溶媒で抽出し、乾燥させる。

【００１１】

以下、乾燥して得られた原料をペーストと定義する。

【００１２】

例えば、US6,129,934には、カルファクタントを得る方法であって、気管支肺胞洗浄のプロセスによって子ウシの肺の気道から表面活性物質を取り出す、方法が開示されている。気管支肺胞洗浄によって集められた液体を遠心分離し、表面活性物質の濃縮された沈殿物を集める。次に、該表面活性物質の沈殿物を生理食塩水などの水溶液を添加することによって所望の量にする。

【００１３】

水性懸濁液からの表面活性物質の抽出は、クロロホルム、ベンゼン、クロロホルムおよびメタノールの混合物、エーテルおよびエタノールの混合物、ならびにヘキサンおよびエタノールの混合物、を含むがこれらに限定されないさまざまな有機溶媒を用いて実施され得る。好ましい実施態様において、クロロホルムおよびメタノールの混合物が使用される。

【００１４】

代わりにベラクタントを得る方法は、US4,397,839に開示されており、(a)哺乳動物の切り刻んだ肺組織を電解液に接触させることで抽出物を得る工程；(b)前記抽出物を遠心分離することで粗沈殿物を集める工程；(c)塩化ナトリウムを添加することにより前記粗沈殿物の水性懸濁液の比重を調整し、該調整された懸濁液を遠心分離して乳化したスカム層を含む最上層を単離する工程；(d)前記最上層の水性懸濁液を透析し、該透析された懸濁液を凍結乾燥して粗乾燥物を得る工程；(e)前記粗乾燥物を酢酸エステルに接触させることで酢酸エステルに不溶性の物質を集め、次に、前記不溶性の物質を有機溶媒混合物に接触させることで精製濾液を得る工程；および(f)前記精製濾液を濃縮して固体残留物を得る工程、を含む。

【００１５】

ポラクタントアルファを調製する方法はEP286,011に開示されており、以下の工程を含む：i)動物の肺を切り刻み、食塩水溶液で洗浄する工程；ii)その後の濾過、遠心分離、クロロホルムとメタノール2:1(v/v)の混合溶媒による抽出によってサーファクタントを分離する工程；iii)溶媒を蒸発乾固させることを介して生脂質画分を回収する工程；iv)後者を、溶出剤として1,2-ジクロロエタン：メタノール＝1:4(v/v)を用い、樹脂Lipidex(登録商標)-5000を用いた逆相クロマトグラフィーで精製する工程、を含む。

【００１６】

クロマトグラフィーカラムによる精製工程は、明確に定義された再現性のある組成を有する修飾天然サーファクタントを確保するために重要であると考えられ、生物活性の原因と考えられる成分、すなわち極性脂質、主にリン脂質、疎水性タンパク質SP-CおよびSP-Bが豊富であり、必須でない成分、すなわち炭水化物、中性脂質、例えばトリグリセリド、コレステロールおよび遊離脂肪酸を実質的に除去した表面活性物質を得るために最適化されている。

【００１７】

サーファクタントの調製を改善する必要性から、修飾天然サーファクタントの組成を模倣した合成サーファクタントが開発されてきた。当該合成サーファクタントは、再構成サーファクタントとして知られている。

【００１８】

再構成サーファクタントの例としては、限定されるものではないが、WO2010/139442の9ページおよび10ページを要約した段落に開示されている組成を有し、実験コードCHF 5633の当技術分野で知られている生成物である、ルチナクタント(Surfaxin™, Windtree Therapeutics, Inc., Warrington, Pa.)およびエリファクタント(elifactant)が挙げられる。

【００１９】

サーファクタントの種類に関係なく、修飾天然サーファクタントのペーストまたは再構成サーファクタントの成分は、一般的に溶解され、滅菌濾過によるさらなる精製工程を経る。

【００２０】

例えば、EP 286,011によれば、濾過前のペーストは98:2のクロロホルム/メチルアルコール(V/V)に溶解することができる。

【００２１】

ただし、クロロホルムなどの特定の溶媒の使用は、製造方法の残りの工程と生成物の品質の両方に潜在的に影響を与えることがある。例えば：

i)配管およびフィルターの両方は通常、化学的ストレスにさらされており、使用できる材料の範囲が減少する可能性がある；

ii)結果として、生成物への抽出可能な成分のレベルが、追加処理を必要とすることがある；

iii)溶媒蒸発工程のプロセスでは、残留する化学成分を除去するために、ある程度の時間または複数回の繰り返しを要することがある。

【００２２】

したがって、上記のリスクを低減または軽減し、同時に生成物のすべての品質特性を保証するためには、異なる溶媒が関与する代替工程が望ましい。

【００２３】

他方で、リン脂質の疎水性構造のため、水性媒体中で溶解相の検証を行うことは非常に困難である。したがって、新しい候補は、以下のようないくつかの定義された基準を満たす有機溶媒でなければならない：

i)クロロホルムに置換可能であること；

ii)タンパク質などの温度に敏感な成分が存在し、体温の周囲で表面活性物質を溶解できること。

iii)溶解段階において同程度の割合の問題となる体積を許容すること；

iv)蒸発段階に適していること、すなわち適切な物理的性質(沸点、蒸気圧など)を有すること；

v)市場において、段階的廃止のリスクが低下、または全くなく、容易に入手可能であること。

【００２４】

この問題は本発明によって解決される。

【発明の概要】

【００２５】
第一の実施態様において、本発明は、修飾天然サーファクタントまたは再構成合成サーファクタントから選択される外因性肺サーファクタントを調製する方法であって、
i)哺乳動物の肺から前記修飾天然サーファクタントを乾燥ペーストの形態で抽出するか、前記再構成合成サーファクタントの乾燥成分を混合する工程；
ii)得られたペーストまたは混合物を精製する工程；
ここで、工程ii)の精製は、以下の工程によって行われる：
iii)前記修飾天然サーファクタントのペーストまたは前記再構成サーファクタントの成分を、2-メチル-2-プロパノールを含む有機溶媒に溶解する工程、
iv)得られた溶液を濾過による滅菌にかける工程；および
v)乾燥工程、
を含む方法。
【００２６】
有利には、修飾天然サーファクタントの乾燥ペーストは、洗浄またはカラム溶出によって哺乳動物の肺から得ることができる。
【００２７】
好ましくは、修飾天然サーファクタントは、ポラクタントアルファである。
【００２８】
従って、好ましい実施態様において、本発明は、以下の工程を含む、ポラクタントアルファを調製する方法を提供する:
i)ブレンダーでブタの肺を切り刻む工程；
ii)切り刻んだ肺を生理学的溶液で抽出し、次に、濾過し、混合物を遠心分離にかける工程；
iii)上清を有機溶媒またはその混合物で抽出し、次に、有機相を蒸発乾固させる工程；
iv)極性脂質および疎水性タンパク質SP-CおよびSP-Bを含有する画分を分離する工程；
v)前記画分を集めてプーリングし、次に、有機溶液を蒸発乾固させることで、サーファクタントを乾燥ペーストの形態で得る工程；
vi)得られたペーストを、2-メチル-2-プロパノールを含む有機溶媒に溶解する工程；
vii)得られた溶液を滅菌にかける工程；および
viii)乾燥工程。
【００２９】
本発明はまた、本発明の方法によって得られる外因性肺サーファクタントに関する。
【００３０】
別の態様において、本発明は、本発明の方法によって得られる外因性肺サーファクタントを活性成分として含む医薬製剤に関する。
【００３１】
また、本発明は、肺サーファクタントの欠乏または機能不全に起因または関連するさまざまな肺障害、異常状態および疾患の予防または処置に使用するための、本発明の方法によって得られる外因性肺サーファクタントに関する。
【００３２】
さらなる態様において、本発明は、肺サーファクタントの欠乏または機能不全に起因または関連する種々の肺障害、異常状態および疾患を予防または処置するための医薬の製造における、本発明の方法によって得られる外因性肺サーファクタントの使用に関する。
【００３３】
さらに、本発明は、肺サーファクタントの欠乏または機能不全に起因または関連する種々の肺障害、異常な状態および疾患を予防または処置する方法であって、そのような処置を必要とする患者に、本発明の方法よって得られる外因性肺サーファクタントの治療有効量を投与することを含む方法を提供する。
【図面の簡単な説明】
【００３４】

【図１】本発明の方法によって得られたCurosurf(登録商標)の時間/圧力の関数としての一回呼吸量(ml/kg)を、Curosurf(登録商標)対照および未処理動物と比較した結果を示す。

【００３５】

定義

用語「サーファクタント」および「表面活性物質」は、同義語として使用される。

【００３６】

さまざまな種類の外因性肺サーファクタントの包括的な定義については、Wilson D. Expert Opin Pharmacother 2001, 2, 1479-1493を参照のこと。

【００３７】

用語「修飾天然サーファクタント」とは、製造方法で使用される脂質抽出工程により、親水性タンパク質SP-AおよびSP-Dが除去され、疎水性タンパク質SP-BおよびSP-Cが一定量含有されている、切り刻んだ哺乳動物の肺の脂質抽出物を意味する。抽出方法によっては、異なる量のリン脂質、非サーファクタント脂質、およびその他の微量成分が含まれることがある。

【００３８】

用語「人工サーファクタント」とは、天然サーファクタントの脂質組成と性状を模倣するように配合されるが、サーファクタントタンパク質を含まない、合成化合物、主にリン脂質およびその他の脂質の単純な混合物を意味する。

【００３９】

用語「再構成」肺サーファクタントとは、動物から単離される肺サーファクタントタンパク質／ペプチド、または組換え技術により製造されるタンパク質／ペプチドが添加された人工肺サーファクタントを意味する。

【００４０】

用語「乾燥」とは、有機溶媒の蒸発後に得られるサーファクタント物質を意味する。水を含む残留溶媒の量は限られた量で含まれる。

【００４１】

アルコール2-メチル-2-プロパノールはtert-ブタノールとしても知られている。

【００４２】

用語「極性脂質」には、主にリン脂質のほか、プラスマロゲン、糖脂質、カルジオリピンおよびリゾリン脂質などの微量成分が含まれる。

【００４３】

用語「リン脂質」とは、非極性疎水性尾部、グリセロールまたはスフィンゴシン部分、および極性頭部からなる脂質を意味する。非極性疎水性尾部は通常、飽和(例えば、ミリスチン酸、パルミチン酸およびステアリン酸)、一価不飽和(例えばオレイン酸)または多価不飽和(例えば、リノール酸やアラキドン酸)の長鎖脂肪酸である。

【００４４】

極性頭部は窒素含有塩基に結合したリン酸基を有する。

【００４５】

サーファクタント中のリン脂質画分は主にホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルグリセロール(PG)およびスフィンゴミエリン(SM)を含む。

【００４６】

用語「中性脂肪」は、トリグリセリド、ジグリセリドおよびモノグリセリドを含む。

【００４７】

用語「サイズ排除液体-ゲルクロマトグラフィー」とは、固定相が分子サイズに従って分離される物質を保持するゲルであるクロマトグラフィーシステムを意味する。

【００４８】

用語「ポラクタントアルファのバイオシミラー」とは、同一の安全性プロファイルを有し、治療的に同等であり、少なくとも80%(特にリン脂質およびサーファクタント蛋白質

SP-BおよびSP-Cに関して)の定性-定量組成の類似性を有し、80/mg/mlの濃度で水溶液中に懸濁させたときに室温で15mPas(cP)以下の粘度を有する修飾天然肺サーファクタントを意味する。粘度は既知の方法に従って決定することができる。

【００４９】

用語「ブレンダー」とは、有機物質を混合し、粉砕し、切り刻むために使用される、典型的にはステンレス鋼の装置を意味する。一般的には、下部に回転する金属製のブレードが付いた容器で構成され、電気モーターで駆動される。

【００５０】

用語「無菌」は、欧州薬局方(Ph. Eur. 1998, Chapters 2.6.1 and 5.1.1)による無菌の基準を満たす生成物を意味する。最終生成物の無菌性に関する更なる規制には、米国薬局方23/NF18, 1995, pp. 1686-1690および1963-1975が含まれる。

【００５１】

サーファクタント調剤の「サーファクタント活性」は、表面張力を低下させる能力と定義される。

【００５２】

外因性サーファクタント調剤のインビトロ有効性は、Wilhelmy BalanceやCaptive Bubble Surfactometerのような適切な装置を用いて表面張力を低下させる能力を測定することにより試験されるのが一般的である。

【００５３】

外因性サーファクタント調剤のインビボでの有効性は、一般に2つのパラメータを測定することによって試験される：

i)肺コンプライアンスの指標である一回呼吸量、および

ii)呼気終了時の肺胞気膨張または開存性の指標であり、したがって呼気終了時に肺胞内に安定なリン脂質膜を形成する能力である肺ガス容量。

【００５４】

本発明の詳細な説明

本発明の方法、得られた生成物および対応する医薬組成物の特徴は以下の詳細な説明に記載される。

【００５５】

第一の実施態様において、本発明は、修飾天然サーファクタントまたは再構成合成サーファクタントから選択される外因性肺サーファクタントを調製する方法であって、

i)哺乳動物の肺から前記修飾天然サーファクタントを乾燥ペーストの形態で抽出するか、前記再構成合成サーファクタントの乾燥成分を混合する工程；

ii)得られたペーストまたは混合物を精製する工程；

iii)ここで、工程ii)の精製は以下の工程によって行われる:

iv)前記修飾天然サーファクタントのペーストまたは再構成サーファクタントの成分を、2-メチル-2-プロパノールを含む有機溶媒に溶解する工程；

v)得られた溶液を濾過による滅菌にかける工程；および

vi)乾燥工程、

を含む方法を提供する。

【００５６】

有利には、修飾天然サーファクタントのペーストは、当該技術分野で報告されている方法、例えばクロマトグラフィーカラム上の溶出または気管支肺胞洗浄に基づく方法に従って調製することができる。

【００５７】

好ましくは、有機溶媒は2-メチル-2-プロパノールを含み、2-メチル-2-プロパノールのみからなる溶媒がさらに好ましい。さらに好ましい実施態様において、溶媒は、純度が99.5%より高い無水2-メチル-2-プロパノールである。

【００５８】

本発明の方法の工程iii)の溶解は、通常、穏やかな加温、すなわち30℃～40℃の温度

、好ましくは35℃±1℃で撹拌しながら行われる。

【００５９】

当業者は撹拌の速度と時間を決定しなければならないが、これは通常300～400rpmで15～30分間である。

【００６０】

当業者は、サーファクタントと有機溶媒との間の比を決定しなければならない。本発明の好ましい実施態様において、前記比は5％w/wより高い。より低い割合では完全な溶解が得られないことが実際に見出されている。

【００６１】

好ましくは、6～20％w/v、より好ましくは8～12％w/vを含む。

【００６２】

本発明の方法の工程iv)の濾過による滅菌は、当業者の知識に基づいて行うことができる。

【００６３】

場合により、溶液は、0.45ミクロンの孔径の膜フィルターを介して浄化工程にかけ；その後、例えば0.22および0.1ミクロンの孔径のフィルターを用いた濾過によって滅菌される。

【００６４】

本発明の方法の工程v)において、溶媒は、当業者に公知の方法、例えば、窒素下での透析または蒸発および/または真空への曝露、または凍結乾燥などの他の適切な技術によって除去することができる。

【００６５】

本発明の溶媒としての2-メチル-2-プロパノールの化学的性質および物理的性質から、接線流濾過などのより迅速な乾燥技術を有利に適用することができる。

【００６６】

注目すべきことに、本工程によれば、乾燥工程の終わりにおける残留2-メチル-2-プロパノールの量は、3000ppm以下、好ましくは1500rpm以下である。

【００６７】

任意の外因性修飾天然肺サーファクタントまたは再構成肺サーファクタントを使用することができる。有利には、再構成サーファクタントは、ルシナクタント(Surfaxin™, Windtree Therapeutics, Inc., Warrington, Pa)およびCHF 5633として当該技術分野で引用されているサーファクタント(Chiesi Farmaceutici SpA, Italy)から選択され、修飾天然サーファクタントは、ポラクタントアルファ(Curosurf(登録商標),Chiesi Farmaceutici SpA, Italy)およびそのバイオシミラー、ベラクタント (Survanta(登録商標), AbbVie Inc, USA)およびボバクタント(Alveofact(登録商標), Lyomark Pharma GmbH, Germany)、カルファクタント(Infasurf(登録商標), Ony Biotech, USA)、Bles(登録商標)(Bles Biochemicals Inc, Canada)、KeLiSu(Double Crane, China)、サーファクタントTA(Surfaten(登録商標), Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Tokyo)および他のSurfacen(登録商標)、Beraksurf(登録商標)、Newfactan(登録商標)、サーファクタントGray(登録商標)およびサーファクタントBL(登録商標)から選択される。好ましい修飾天然サーファクタントはポラクタントアルファである。

【００６８】

従って、好ましい実施態様において、本発明は、ポラクタントアルファを調製する方法であって、以下の工程を含む方法に関する:

i)適当なブレンダーでブタの肺を切り刻む工程；

ii)切り刻んだ肺を生理学的溶液で抽出し、次に、濾過し、混合物を遠心分離にかける工程；

iii)上清を有機溶媒で抽出し、次に、有機相を蒸発乾固させる工程；

iv)極性脂質および疎水性タンパク質SP-CおよびSP-Bを含有する画分を分離する工程；

v)前記画分を集めてプーリングし、次に、有機溶液を蒸発乾固させることで、サーフ

ァクタントを乾燥ペーストの形態で得る工程；
vi)前記修飾天然サーファクタントのペーストを、2-メチル-2-プロパノールを含む有機溶媒に溶解する工程；
vii)得られた溶液を濾過による滅菌にかける工程；および
viii)乾燥工程。
【００６９】
好ましくは、有機溶媒は2-メチル-2-プロパノールのみからなる。
【００７０】
実施例3および4を参照して以下の実験部分でさらに詳細に説明するように、2-メチル-2-プロパノールを使用することにより、同じ定性-定量組成を示し、ポラクタントアルファ対照バッチと同様の一回呼吸量を示す生成物を得ることができる。
【００７１】
工程i)は、当業者の知識に従って実施することができる。
【００７２】
上記の工程ii)において、切り刻んだ肺を生理学的溶液で抽出する。混合物をストレーナーで濾過し、有利には20℃で1,000×g、30分未満、好ましくは15分間遠心分離にかけることで、細胞デブリを除去する。
【００７３】
4℃に2時間冷却した後、上清をさらに3,000×gで、有利には2時間以内、好ましくは1時間以内、より好ましくは15分間再遠心分離する。
【００７４】
上記工程iii)において、ペレット状の生固体サーファクタントを取り出し、EP 286,011に開示されるハロゲン炭化水素および短鎖脂肪族アルコールの混合物で抽出する。
【００７５】
得られた溶液を濾過し、水で洗浄し、次に、当業者に周知の装置を用いて真空下で蒸発乾固させる。
【００７６】
工程iv)によれば、生物活性の原因となる成分(極性脂質、主にリン脂質、疎水性タンパク質SP-C、SP-B)を含む画分を抽出によって他の画分から分離することは、当該技術分野で公知の方法に従って行うことができる(Saini R K et al Int J Molecular Sci 2021, 22, 1-19)。
【００７７】
ポラクタントアルファの場合、有利には、生物活性の原因となる成分(極性脂質、主にリン脂質、疎水性タンパク質SP-C、SP-B)を含む画分を他の画分から分離する(工程iv)は、EP 286,011で報告されているように、固定相として親油性Sephadex誘導体、および溶出剤としてハロゲン炭化水素および短鎖脂肪族アルコールの混合物を使用するサイズ排除ゲルクロマトグラフィーによって行われる。
【００７８】
より有利には、クロマトグラフカラムに充填するのに使用される固定相は、Sigma CoやPackard Insなどの異なる供給者からLipidex(登録商標)-5000の商標で販売されているSephadex(登録商標)で構成される。
【００７９】
あるいは、工程iv)は、クロロホルムなどの塩素系溶媒を使用しない方法を用いて行うことができる。
【００８０】
例えば、工程iv)は、EP 670846に記載されているように、超臨界液を用いて実施することができる。不活性支持体、超臨界液の圧力および温度、ならびに共溶媒の種類および量の更なる調整は、当業者がその知識に従って行うことができる。
【００８１】
そうでなければ、前記工程は、まず、当該技術分野で知られている方法(C. Allegre e

t al. / Journal of Membrane Science 269 (2006) 109-117)に従って、ナノ濾過および限外濾過によって、コレステロールならびにモノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリドなどの成分を除去し、次に、イオン交換クロマトグラフィーならびに溶出剤としてのt-ブタノールと水の混合物によって、生物活性の原因となる成分を得ることによって実施することができる(Separation of lipid mixtures, 1972. Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol. 3, 393-469)。

【００８２】

前記工程v)において、極性脂質および疎水性タンパク質SP-BおよびSP-Cを含む画分を集めてプーリングし、次に、有機溶液を50℃未満、好ましくは40℃未満の温度で蒸発乾固させる。

【００８３】

上記に開示されたように実施される上記工程vi)～viii)は、ポラクタントアルファにとって特に重要である。

【００８４】

前記修飾天然サーファクタントは、現在利用可能な他のものと比較して、粘度の点で確かに特異な性質を有する。

【００８５】

従来技術によれば、これは、ポラクタントアルファが生物活性に関与すると考えられる成分、すなわち極性脂質および疎水性タンパク質SP-CおよびSP-Bから本質的に構成されていること、ならびに、リン脂質画分が2つの成分、すなわちプラスマロゲンとPLを含む多価不飽和脂肪酸が豊富であることに起因する(Rudiger M et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005, 288, 379-383を参照のこと)。

【００８６】

したがって、選択される溶媒および条件は、次の工程vi)およびvii)のサーファクタントの組成が変化しないことを保証すべきである。

【００８７】

工程viii)の終わりのポラクタントアルファのペーストは、次の組成を有する(すべての値は、サーファクタントの乾燥質量の総重量に対するパーセンテージで示される)：

総リン含有量(P)：3.6～4.2％；

疎水性タンパク質SP-CおよびSP-B:0.5～2.2％；

中性脂質:0.5％以下；

コレステロール:0.5％以下；

遊離脂肪酸(FFA):1.5％以下、好ましくは1.0％未満；

残留溶媒:6.0％以下；

【００８８】

ホスファチジルコリン種に関する限り、サーファクタントは総リン含有量に基づいて以下の百分組成を有する：

ホスファチジルコリン(PC)含有量:66～77％；

ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)含有量:28％超、好ましくは33～45％；

リゾフスパチジルコリン(lysophspatidylcholine, LPC)含有量：2.0％以下

【００８９】

場合により、乾燥ペーストは、中性脂質、コレステロール、遊離脂肪酸、炭水化物および残留溶媒などの生物活性に必須でない成分を少量含み得る。

【００９０】

有利には、前記必須でない成分の総量は、サーファクタントの乾燥質量の総重量に対して算出して5％未満、好ましくは3.5％未満、より好ましくは2.5％未満、さらに好ましくは1％未満である。

【００９１】

肺サーファクタントのさまざまな成分は、当該技術分野で報告されている方法に従って決定することができる。

【００９２】
例えば、総リン含有量は、Barlett GR J Biol Chem, 1959, 234, 406-408の方法に基づく比色操作に従って推定することができる。
【００９３】
PCおよびLPCの含有量は以下の操作で推定できる。
【００９４】
まず、サーファクタントのリン脂質クラスを、Poorthius BJH et al.J Lipid Res 1976, 17, 433-436に従って次元の薄層クロマトグラフィー(TLC)によって最初に分離する。
【００９５】
PCおよびLPCのスポットに対応するシリカ(参照標準物質との比較により同定)を、TLCプレートから適切な刃物で回収し、試験管に移す。
【００９６】
試料の無機化は、総リン含有量の測定のために報告された手順に従って、各試験管内で実施される(上述)。
【００９７】
DDPCの含有量は、Mason RJ J Lipid Res 1976, 17, 281-284に報告された方法に従ってOsO_4で推定できる。
【００９８】
DPPCに関連するリン含有量は、総リン含有量に対して決定される。
【００９９】
遊離脂肪酸、中性脂質(トリグリセリド、ジグリセリドおよびモノグリセリド)およびコレステロール(分画遊離コレステロールおよびコレステロールエステル)の含有量は、当技術分野で公知の方法によるHPLC分析によって推定することができる。
【０１００】
疎水性タンパク質SP-CおよびSP-Bの含有量は、市販のキット「BCAタンパク質定量試薬」を用いて以下の操作に従って測定することができる。そうでなければ、当該技術分野で報告されているHPLCまたはキャピラリー電気泳動法に従って測定することができる。
【０１０１】
炭水化物は、Dubois et al Anal Chem 1956, 28, 350-356に記載の方法に従って定量することができ、グルコースで示すことができる。
【０１０２】
それぞれ残留溶媒および残留水含有量は、当業者に周知の方法に従って、ガスクロマトグラフィおよびカールフィッシャー法により推定する。
【０１０３】
本発明はまた、本発明の方法によって得られるまたは得ることができる、哺乳動物の肺からペーストの形態で抽出される修飾天然サーファクタント、または再構成サーファクタントに関する。
【０１０４】
本発明はまた、本発明の方法により得られるまたは得ることができる、哺乳動物の肺からペーストの形態で抽出される修飾天然サーファクタント、または再構成サーファクタント、を含む医薬組成物に関する。
【０１０５】
前記組成物は、有利には、溶液、分散液、懸濁液または乾燥粉末の形態で投与される。好ましくは、前記組成物は、肺サーファクタントが適当な溶媒または再懸濁媒体、典型的には生理的塩化ナトリウム水溶液中に懸濁された無菌製剤の形態である。
【０１０６】
したがって、懸濁液の形態で無菌製剤を調製するために、本発明の方法は、場合により以下の工程を含んでいてもよい：
-ix)乾燥生成物を、室温で攪拌しながら無菌生理的塩化ナトリウム水溶液に再懸濁させ

る工程：
-x)場合により、懸濁液のpHを所望の値に調整する工程、および
-xi)懸濁液を、無菌条件下で適当な単回使用バイアル(single-use vial)に充填する工程。
【０１０７】
工程ix)は、当技術分野では薄膜水和として知られており、機械的撹拌または超音波処理によって達成することができ、場合により、次いで押出加工を行う。
【０１０８】
有利には、肺サーファクタントの濃度は、1ml当たり約2mg～約160mgのサーファクタント、好ましくは10mg/ml～から100mg/ml、より好ましくは20mg/ml～80mg/mlの範囲である。ポラクタントアルファ使用する場合、好ましい濃度は80mg/mlである。
【０１０９】
本発明の方法によって得られる肺サーファクタントを含む無菌製剤は、当業者に公知の方法、好ましくは気管内設置(注入またはボーラス)またはネブライザーによって投与され、肺サーファクタントの欠乏または機能不全に起因または関連する種々の肺障害、異常状態および疾患の処置または予防に有用である。例として、硝子膜疾患、乳児および成人の呼吸窮迫症候群(IRDSおよびARDS)、急性肺傷害(オゾンの吸入、煙の吸入または吸引の近くに起因するものなど)、容量損傷および気圧性外傷により誘発されるサーファクタント不活化の状態、胎便吸引症候群、毛細管漏出症候群、細菌性肺炎およびウイルス性肺炎および気管支肺異形成症などがある。
【０１１０】
また、肺炎、気管支炎、COPD(慢性閉塞性肺疾患)、喘息および嚢胞性線維症などの他の呼吸器障害の処置または予防、漿液性中耳炎(グルー耳)の処置にも有用である。
【０１１１】
以下の実施例では、本発明を詳細に例示する。
【実施例】
【０１１２】
実施例1-ポラクタントアルファの乾燥ペーストの調製
ブタ肺約180kgをブレンダーで粉砕し、組織断片を生理的溶液で洗浄する。混合物をストレーナーで濾過し、1000×g、20℃で15分間予備遠心分離にかけ、細胞デブリを除去する。次に、上清液を3000×g、4℃で2時間再遠心分離する。生サーファクタントを取り出し、クロロホルム:メタノール2:1(v/v)で抽出し、濾過し、水で洗浄し、有機相を蒸発させて、生脂質抽出物を得る。脂質画分抽出物(約500g)を約4リットルのクロロホルム:メタノール1:4(v/v)で回収し、0.2～0.4気圧で窒素を充満させた2.5ミクロンの膜フィルターを介して濾過し、次に、溶出剤としてクロロホルム:メタノール1:4(v/v)を有するLipidex(登録商標)-5000包装材料2を充填したカラムを用いて逆相クロマトグラフィーによって分離する。
【０１１３】
乾燥物質として約200gの精製ポラクタントアルファを得て、上記で報告した分析法を用いて試験した。
【０１１４】
精製ポラクタントアルファ乾燥物質は、以下の組成を有する(すべての値は、乾燥質量の総重量に対する百分率で示される)：
総リン含量：3.8％；
ホスファチジルコリン(PC)含有量:68％；
ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)含有量:40％；
リゾフスパチジルコリン(LPC)含有量：1.0％
疎水性タンパク質SP-CおよびSP-B:1.6％；
遊離脂肪酸:0.9％；

中性脂質:検出不能；
コレステロール: 検出不能；
炭水化物:検出不能。

【０１１５】

実施例2-濾過による滅菌に適した溶媒の決定

アルコール化学基、すなわちエタノール、1-プロパノール、2-プロパノールおよび2-メチル-2-プロパノール(tert-ブタノール)についての評価を含む。

【０１１６】

最初のスクリーニング試験として、同量のポラクタンアルファペースト(約10g)を希釈し、各アルコール100mLと混合した。いずれの場合も、若干の加熱(35℃)を行うことで、溶解を促進し、析出現象を回避した。

【０１１７】

次に、関連する外観を視覚的に評価し、クロロホルム中のポラクタントアルファの参照溶液と比較した。試験したアルコールの中でtert-ブタノールのみがクロロホルムの参照と同様に透明な溶液を提供した。他のアルコールでは、乳白色または非常に混濁した不均一な溶液を得た。

【０１１８】

tert-ブタノールを代替溶媒として定義した後、ユニット操作中の生成物の性状(behavior)を理解するために、濾過工程に移行することが決定された。

【０１１９】

次の濾過システムを使用した：
-孔径0.45μm、濾過面約17cm^{2}のガラス繊維プレフィルター。
-孔径0.22μm、濾過面約17cm^{2}のPVDFバイオバーデン低減フィルター。
-孔径0.1μm、濾過面約17cm^{2}のPVDF殺菌フィルター。

【０１２０】

濾過を蠕動運動と一定圧力モニタリングによって行い、膜の上流側と下流側の間のΔPを計算した。

【０１２１】

比較のために、t-ブタノールとクロロホルム溶液の両方について同じ試験を行った。

【０１２２】

プロセス中で臨界は観察されなかった。

【０１２３】

得られた溶液を以下のパラメータに従う回転蒸発器(Rotavapor(登録商標))を用いて乾燥させた:
-温浴温度:35℃
-冷却器温度:15～17℃
-真空:45～50mbar
-回転:100rpm

【０１２４】

固体ペーストを集め、水に0.9%w/vの塩化ナトリウムの無菌溶液で再懸濁させた。最終懸濁液をバイアルに充填し、2～8℃で保存した。

【０１２５】

実施例3-生成物の特徴づけ

上記のプロセスに基づいて、一般的な生成物の実現可能性と、Curosurf(登録商標)の主要な重要品質特性の作用を評価するパイロットバッチを作成した。

【０１２６】

乾燥ペーストを滅菌生理学的塩化ナトリウム水溶液中に再懸濁させ、Rotavapor(登録商標)中で混合した。

【０１２７】

このようにして得られた懸濁液を、生理学的塩化ナトリウム水溶液1ml当たりサーフ

ァクタント80mgの濃度で使用するバイアルに分配した。

【０１２８】

バイアルについて分析試験を行うことで、製造プロセスに修正が適用されたにもかかわらず、生成物の現在の仕様が依然として満たされているかどうかを確認した。

【０１２９】

結果はすべての仕様基準を満たしていた。

【０１３０】

また、このバッチを、粒子特性評価のための形態学的イメージングについて試験し、標準的な条件、すなわちプロセス溶媒としてクロロホルムを使用する現在の方法で製造された参照バッチと比較した。

【０１３１】

本発明の方法によって得られたCurosurf(登録商標)が、ミセル寸法およびミセル形状の点でCurosurf(登録商標)対照バッチと非常に類似していることが判明された。

【０１３２】

実施例4-インビボでの特徴づけ

サーファクタント活性を測定するため、本発明の方法で得られたバッチを気管内投与した場合の一回呼吸量への影響を、早産新生のウサギを用いたインビボ試験で評価した。

【０１３３】

Curosurf(登録商標)対照バッチを使用した。

【０１３４】

サーファクタント調剤を2.5ml/kgの標準用量で投与した。

【０１３５】

未熟な新生ウサギを、標準化された一連のピーク吹送圧力と並行して人工呼吸した。肺を開くために、まず圧力を35cmH_2Oで1分間設定する。このリクルートメント手技(recruitment manoeuvre)の後、圧力を25cmH_2Oに15分間下げ、さらに20cmH_2Oと15cmH_2Oに下げる。

【０１３６】

最後に、圧力を25cmH_2Oまで5分間かけて再び上げ、その後、肺を窒素でさらに5分間人工呼吸する。

【０１３７】

ml/kgで示される一回呼吸量を測定し、中央値として示される結果を図1に報告する。

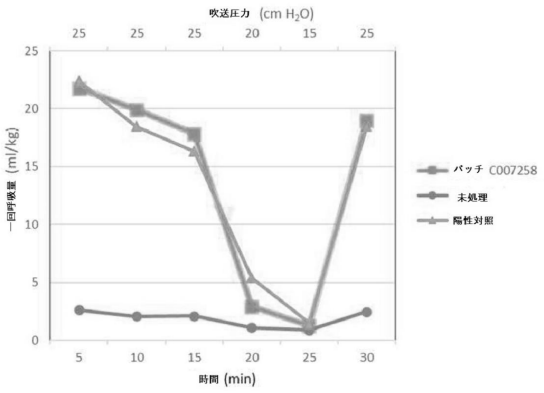
【０１３８】

本発明の方法によって得られたCurosurf(登録商標)で処理した動物は、Curosurf(登録商標)対照バッチで得られたものと同様の一回呼吸量を示すことが理解できる。

【図面】

【図１】

Figure 1



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/068366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/00 A61K47/10 A61P11/00
ADD.

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 A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, BIOSIS, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 286 011 A2 (CHIESI FARMA SPA [IT]) 12 October 1988 (1988-10-12) cited in the application	14-17
Y	examples 1,2 page 1, line 1 - line 5	1-17
X	US 5 708 144 A (CHIESI PAOLO [IT] ET AL) 13 January 1998 (1998-01-13)	14-17
Y	claims 1-12	1-17

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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	Date of mailing of the international search report
16 August 2022	26/08/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schüle, Stefanie

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/068366

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WILLSON D: "Calfactant", EXPERT OPIN PHARMACOTHER, ASHLEY PUBLICATIONS LTD, LONDON, UK, vol. 2, no. 9, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 1479-1493, XP008081886, ISSN: 1465-6566, DOI: 10.1517/14656566.2.9.1479	14-17
Y	the whole document	1-17
X	WO 2008/148469 A1 (CHIESI FARMA SPA [IT]; HERTING EGBERT [IT] ET AL.) 11 December 2008 (2008-12-11)	14-17
Y	claims 1-18	1-16
X	WO 2006/071796 A2 (DISCOVERY LAB INC [US]; RAIRKAR MAITHILI [US] ET AL.) 6 July 2006 (2006-07-06)	14-17
Y	examples 1-4	1-17
X	WO 2006/055532 A2 (DISCOVERY LAB INC [US]; JOHNSON MARK [US]; COE ROY [US]) 26 May 2006 (2006-05-26)	14-17
Y	paragraph [0069] - paragraph [0071]	1-17
X	WO 2013/149013 A1 (DISCOVERY LAB INC [US]) 3 October 2013 (2013-10-03)	14-17
Y	paragraph [0066]	1-17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/068366

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0286011 A2	12-10-1988	AT 99949 T	15-01-1994
		AU 619462 B2	30-01-1992
		CA 1320440 C	20-07-1993
		DE 286011 T1	09-03-1989
		DE 3886970 T2	26-05-1994
		DK 190088 A	09-10-1988
		EG 19626 A	30-09-1995
		EP 0286011 A2	12-10-1988
		ES 2004856 A4	16-02-1989
		FI 881508 A	09-10-1988
		GR 890300026 T1	12-04-1989
		HK 1007103 A1	01-04-1999
		HU 211950 A9	29-01-1996
		IE 61384 B1	02-11-1994
		IT 1203873 B	23-02-1989
		JP 2700323 B2	21-01-1998
		JP S6463526 A	09-03-1989
		MY 103260 A	29-05-1993
		NO 174733 B	21-03-1994
		NZ 224146 A	25-06-1991
		PH 25300 A	30-04-1991
		PT 87188 A	01-05-1988
		US 5024995 A	18-06-1991
		ZA 882416 B	28-09-1988
US 5708144 A	13-01-1998	AT 176244 T	15-02-1999
		AU 5625594 A	22-06-1994
		CA 2150225 A1	09-06-1994
		EP 0670846 A1	13-09-1995
		ES 2126737 T3	01-04-1999
		HK 1013656 A1	03-09-1999
		IT 1255967 B	17-11-1995
		US 5708144 A	13-01-1998
		WO 9412525 A1	09-06-1994
WO 2008148469 A1	11-12-2008	AU 2008258872 A1	11-12-2008
		BR PI0811387 A2	21-07-2015
		CA 2690097 A1	11-12-2008
		CN 101765431 A	30-06-2010
		CY 1116680 T1	15-03-2017
		CY 1118635 T1	12-07-2017
		DK 2164504 T3	12-10-2015
		DK 2719391 T3	20-02-2017
		EA 200901499 A1	30-06-2010
		EP 2164504 A1	24-03-2010
		EP 2719391 A1	16-04-2014
		ES 2547489 T3	06-10-2015
		ES 2616727 T3	14-06-2017
		HK 1141457 A1	12-11-2010
		HR P20150966 T1	09-10-2015
		HR P20170270 T1	21-04-2017
		HU E025957 T2	30-05-2016
		HU E031750 T2	28-07-2017
		JP 5490683 B2	14-05-2014
		JP 2010528729 A	26-08-2010
		KR 20100028530 A	12-03-2010
		KR 20130038940 A	18-04-2013
		LT 2719391 T	10-02-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/068366

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		ME 02327 B	20-06-2016
		MX 359316 B	25-09-2018
		PL 2164504 T3	29-01-2016
		PL 2719391 T3	30-06-2017
		PT 2164504 E	16-10-2015
		PT 2719391 T	02-03-2017
		SI 2164504 T1	30-10-2015
		US 2008305180 A1	11-12-2008
		US 2012017896 A1	26-01-2012
		WO 2008148469 A1	11-12-2008
WO 2006071796 A2	06-07-2006	AU 2005322062 A1	06-07-2006
		CA 2595162 A1	06-07-2006
		EP 1833503 A2	19-09-2007
		HK 1109077 A1	30-05-2008
		JP 5065047 B2	31-10-2012
		JP 2008525490 A	17-07-2008
		US 2006286038 A1	21-12-2006
		US 2013184198 A1	18-07-2013
		WO 2006071796 A2	06-07-2006
WO 2006055532 A2	26-05-2006	AU 2005306619 A1	26-05-2006
		CA 2586395 A1	26-05-2006
		EP 1811966 A2	01-08-2007
		EP 2292215 A2	09-03-2011
		JP 2008520577 A	19-06-2008
		US 2006205663 A1	14-09-2006
		WO 2006055532 A2	26-05-2006
WO 2013149013 A1	03-10-2013	AU 2013237985 A1	02-10-2014
		AU 2017239624 A1	26-10-2017
		BR 112014024057 A2	20-06-2017
		CA 2867649 A1	03-10-2013
		CL 2014002553 A1	06-04-2015
		CN 104271118 A	07-01-2015
		CO 7081146 A2	10-10-2014
		CR 20140449 A	04-05-2015
		CU 20140116 A7	29-01-2015
		CY 1117380 T1	26-04-2017
		DK 2723323 T3	11-01-2016
		EC SP14024363 A	30-09-2015
		EP 2723323 A1	30-04-2014
		EP 2837377 A1	18-02-2015
		ES 2557805 T3	28-01-2016
		HK 1197174 A1	09-01-2015
		HK 1205685 A1	24-12-2015
		HK 1206979 A1	22-01-2016
		HR P20151392 T1	25-03-2016
		HU E026363 T2	28-06-2016
		JP 6178402 B2	09-08-2017
		JP 2015514714 A	21-05-2015
		KR 20140137453 A	02-12-2014
		MA 37445 A1	29-04-2016
		MX 359654 B	05-10-2018
		MY 164868 A	30-01-2018
		NZ 630219 A	30-09-2016
		PE 20142302 A1	21-01-2015
		PL 2723323 T3	31-05-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/068366

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PT 2723323 E	27-01-2016
		RU 2014143247 A	20-05-2016
		SG 11201405944P A	30-10-2014
		SI 2723323 T1	29-04-2016
		SM T201500320 B	25-02-2016
		US 2014088025 A1	27-03-2014
		US 2014088026 A1	27-03-2014
		US 2015297524 A1	22-10-2015
		WO 2013149013 A1	03-10-2013
		WO 2013149074 A1	03-10-2013
		ZA 201406982 B	25-05-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

イタリア４３１２２パルマ、ヴィア・パレルモ２６／ア、キエージ・フアルマチェウティチ・ソチエタ・ペル・アツィオーニ内

(72)発明者　ボッキ，モニカ

イタリア４３１２２パルマ、ヴィア・パレルモ２６／ア、キエージ・フアルマチェウティチ・ソチエタ・ペル・アツィオーニ内

Ｆターム（参考）　4C076　AA93 BB27 CC15 FF68
4C084　BA03 BA46 CA21
4C086　DA42
4C087　AA01 AA02 AA05 BB55 MA13 NA14 ZA59