

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年8月25日(25.08.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/133135 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 31/00 (2006.01) A61K 47/02 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/054613
- (22) 国際出願日: 2016年2月17日(17.02.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-029617 2015年2月18日(18.02.2015) JP
- (71) 出願人: デンカ株式会社(DENKA COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒1038338 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 伊藤 大知(ITO Daichi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 太田 誠一(OHTA Seichi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 矢富 裕(YATOMI Yutaka); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo

(JP). 金子 誠(KANEKO Makoto); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 宮田 喜明(MIYATA Yoshiaki); 〒1038338 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号 デンカ株式会社内 Tokyo (JP). 大野 昭男(OHNO Akio); 〒1948560 東京都町田市旭町三丁目5番1号 デンカ株式会社 デンカイノベーションセンター内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

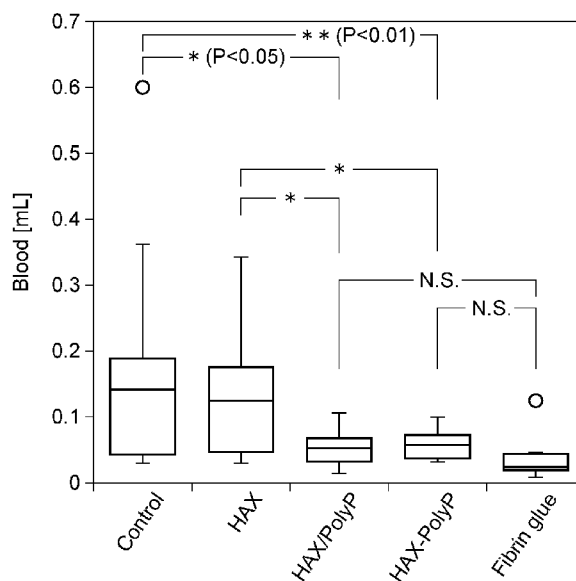
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: MEDICAL COMPOSITION, MEDICAL KIT, AND HEMOSTATIC AGENT

(54) 発明の名称: 医用組成物、医用キット、及び止血剤

[図9]



(57) Abstract: One aspect of the present invention provides a medical composition containing, as active ingredients, hyaluronic acid and polyphosphoric acid that forms a complex with calcium.

(57) 要約: 本発明は、一態様において、ヒアルロン酸、及びカルシウムと複合体を形成したポリリン酸を有効成分とする医用組成物を提供する。

WO 2016/133135 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 医用組成物、医用キット、及び止血剤

技術分野

[0001] 本発明は、医用組成物、医用キット、及び止血剤に関する。

背景技術

[0002] 外科手術時において、圧迫、結紮、縫合などの基本的手技を十分に駆使してもなお止血が困難な場合や、癒着剥離部位や肝臓、脾臓などの実質臓器からの湧出性出血が生じる場合がある。このような場合、局所的に止血することが可能な止血剤の使用が有効である。

[0003] 現在上市されている止血剤としては、酸化セルロース、コラーゲンスポンジからなる止血剤や、ヒト由来の血液製剤であるフィブリン糊などが挙げられる。しかし、例えば酸価セルロースからなる止血剤を用いた場合、適用箇所のpH低下による赤血球の溶解が生じ、周辺組織の炎症の増大及び創傷治癒の遅延につながるといった問題が報告されている（非特許文献1，2参照）。また、例えばコラーゲンスポンジからなる止血剤やヒト由来の血液製剤については、感染症のリスクが問題視されている（非特許文献3参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：JoseL. Ibarrola et al., JOURNAL OF ENDODONTICS 1985 ,11(2), 75-83

非特許文献2：JeanE. Bjorenson et al., Journal of Endodontics, 1986, 12(7), 289-292

非特許文献3：HardeanE. Acheck et al. Annals of Surgery 2010, 251, 2, 217-228

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] そこで、本発明の目的は、高い止血効果を有し、かつ毒性の低い止血剤に

用いることが可能な医用組成物及び医用キット、並びに該医用組成物、該医用キットからなる止血剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明は、ヒアルロン酸、及びカルシウムと複合体を形成したポリリン酸を含有する医用組成物を提供する。
- [0007] 医用組成物において、ヒアルロン酸は側鎖にポリリン酸を有することが好ましい。
- [0008] 医用組成物は、ゲル又は粘性溶液を形成することが好ましい。
- [0009] ヒアルロン酸は、架橋ヒアルロン酸であることが好ましい。
- [0010] 本発明はまた、第1の組成物及び第2の組成物を含む医用キットであって、ヒアルロン酸、ポリリン酸、及びカルシウムのそれぞれが、少なくとも第1の組成物及び第2の組成物のいずれかに含有され、第1の組成物及び第2の組成物のそれぞれは、ヒアルロン酸、ポリリン酸、及びカルシウムの少なくとも一つを含有する、医用キットを提供する。
- [0011] 医用キットにおいて、ヒアルロン酸は側鎖にポリリン酸を有することが好ましい。
- [0012] 第1の組成物はカルシウムを含有し、第2の組成物はヒアルロン酸及びポリリン酸を含有することが好ましい。
- [0013] 第1の組成物は第1のヒアルロン酸及びカルシウムを含有し、第2の組成物は、第1のヒアルロン酸と架橋を形成し、側鎖にポリリン酸を有する第2のヒアルロン酸を含有することが好ましい。
- [0014] 本発明はまた、ヒアルロン酸を含有する第1の組成物、ポリリン酸を含有する第2の組成物、及びカルシウムを含有する第3の組成物を含む医用キットを提供する。
- [0015] 医用キットにおいて、カルシウムの含有量は、ポリリン酸中のリン原子1モルに対して3モル以上12モル以下であることが好ましい。
- [0016] 本発明はまた、上記の医用組成物又は医用キットからなる止血剤を提供する。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、高い止血効果を有し、かつ毒性の低い止血剤に用いることが可能な医用組成物及び医用キット、並びに該医用組成物、該医用キットからなる止血剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]ヒドラジド基に対するP o l y Pの当量とゲル化時間との関係を示すグラフである。

[図2]ヒドラジド基に対するP o l y Pの当量とP o l y P修飾率との関係を示すグラフである。

[図3]フィブリン塊形成凝固速度の測定結果を示すグラフである。

[図4]ヒアルロン酸の種類とフィブリン塊形成凝固速度との関係を示すグラフである。

[図5]ヒアルロン酸の濃度と細胞生存率との関係を示すグラフである。

[図6]異なる細胞種での細胞生存率を示すグラフである。

[図7]生体適合性の評価結果を示すグラフである。

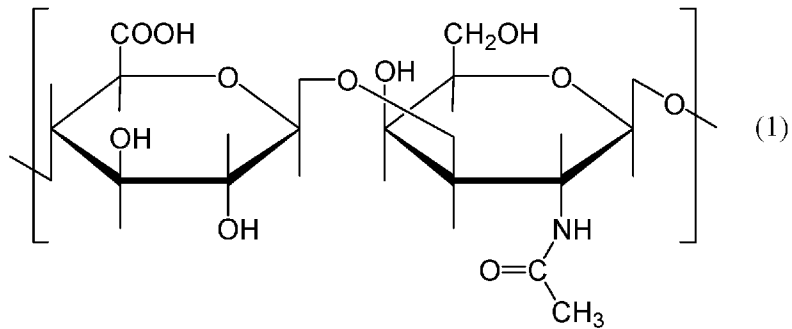
[図8]止血効果の評価手順を示す模式図である。

[図9]止血効果の評価結果を示す箱ひげ図である。

発明を実施するための形態

[0019] 本実施形態に係る組成物は、ヒアルロン酸、及びカルシウムと複合体を形成したポリリン酸を含有する。本明細書における「ヒアルロン酸」とは、少なくとも下記式（1）で表される構造単位を有する高分子化合物を意味する。

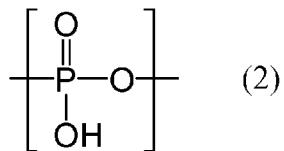
[化1]



[0020] 本明細書における「カルシウムと複合体を形成したポリリン酸」とは、カルシウム（イオン）と少なくとも一つの配位結合を形成したポリリン酸を意味する。当該ポリリン酸は、例えばカルシウムとキレートを形成したポリリン酸であってもよい。

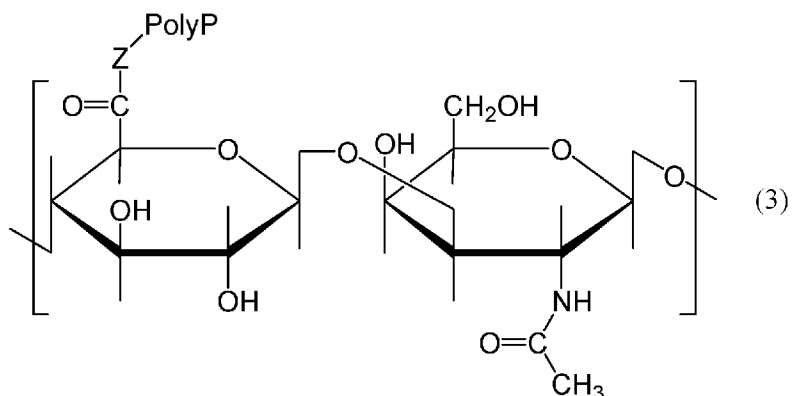
[0021] 本明細書における「ポリリン酸」とは、少なくとも下記式（2）で表される構造単位を有する高分子化合物及び官能基（ポリリン酸基）を意味する。

[化2]



[0022] ヒアルロン酸としては、公知のヒアルロン酸を用いることができる。ヒアルロン酸は、側鎖にポリリン酸を有していてもよい。側鎖にポリリン酸を有するヒアルロン酸は、例えば下記式（3）で表される構造単位を有している。

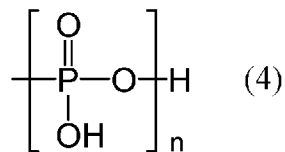
[化3]



[0023] 式(3)中、Zは、ヒアルロン酸の主鎖とポリリン酸とを結合させるスペーサを表す。Zとしては、炭化水素、ポリエチレングリコール、ポリペプチド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸などのスペーサが例示される。Zは、後述する式(5)、(6)中のX又はYで表されるスペーサであってもよい。各構造単位におけるZ-PolyPの置換位置は、式(3)における置換位置に限られず、他の置換位置であってもよい。

[0024] 式(3)中、PolyPは、下記式(4)で表されるポリリン酸基を表す。該ポリリン酸基は、カルシウムと複合体を形成している。

[化4]



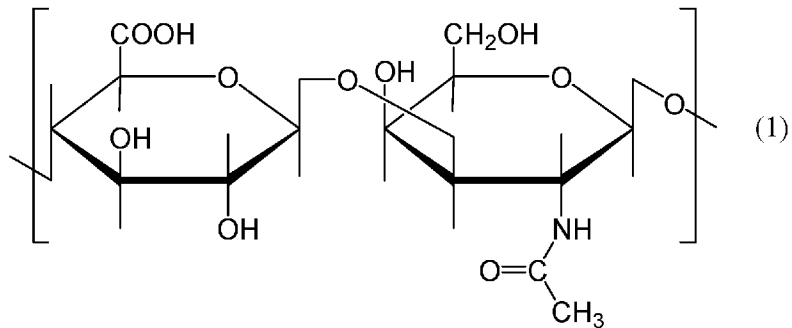
[0025] 式(4)中、nは、1～1000の整数を表す。nは、好ましくは1以上、より好ましくは3以上、更に好ましくは10以上である。nは、好ましくは1000以下、より好ましくは250以下、更に好ましくは100以下である。nが上記範囲であると、架橋ヒアルロン酸を含有する組成物の止血効果をより向上させることができる。

[0026] ヒアルロン酸は、分子内の少なくとも一部にヒアルロン酸同士により形成された架橋を有する架橋ヒアルロン酸であってもよい。架橋ヒアルロン酸は、1種又は2種以上のヒアルロン酸が架橋した化合物であってもよい。架橋ヒアルロン酸を構成するヒアルロン酸の1又は2以上は、カルシウムと複合体を形成したポリリン酸を側鎖に有していてもよい。

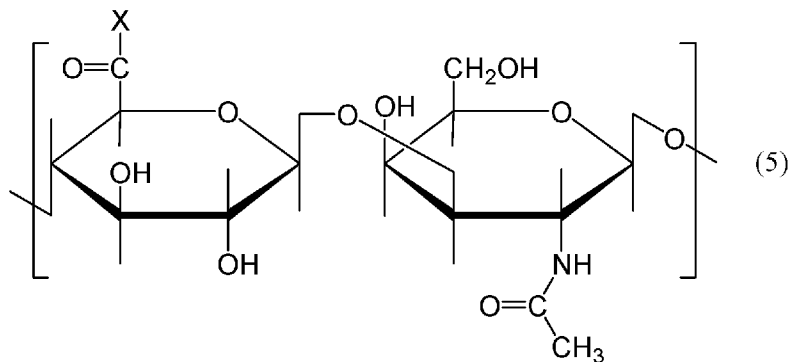
[0027] 架橋ヒアルロン酸は、例えば、第1の官能基を有する第1のヒアルロン酸と、第1の官能基と反応して架橋を形成する第2の官能基を有する第2のヒアルロン酸とを架橋させることにより得られる。すなわち、架橋ヒアルロン酸は、例えば第1のヒアルロン酸と第2のヒアルロン酸との架橋物である。より具体的には、第1のヒアルロン酸は、例えば下記式(1)で表される構造単位、及び下記式(5)で表される構造単位を有する。第2のヒアルロン

酸は、例えば下記式（１）で表される構造単位、及び下記式（６）で表される構造単位を有する。第１のヒアルロン酸及び第２のヒアルロン酸は、それぞれランダム重合体であってもよく、ブロック重合体であってもよい。

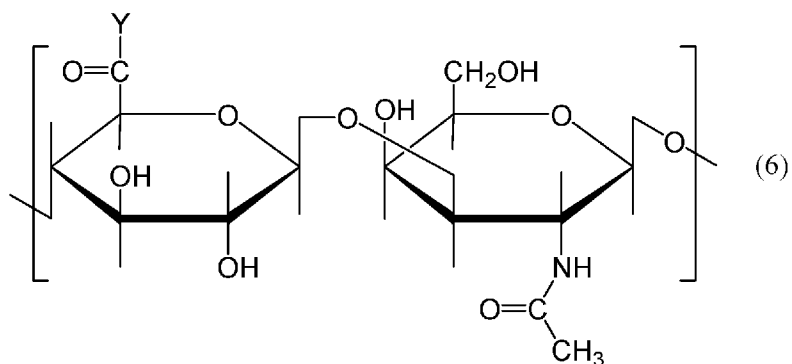
[0028] [化5]



[化6]



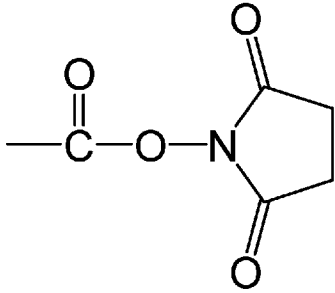
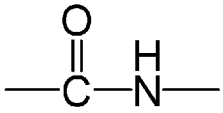
[化7]



[0029] 式（５），（６）中、X及びYは、例えば互いに反応して共有結合を形成する官能基を表す。すなわち、上記の第１のヒアルロン酸及び第２のヒアルロン酸においては、官能基Xと官能基Yとが反応することにより架橋が形成される。このようなX及びYの組合せとしては、一方が下記表１に示す末端

構造 1 を有する官能基であり、他方が下記表 1 に示す末端構造 2 を有する官能基である組合せが例示される。表 1 には、末端構造 1 及び 2 が反応することにより形成される共有結合の構造も併せて示す。X 及び Y の組合せは、クリック反応、銅フリークリック反応、Diels-Alder 反応等によって共有結合を形成するような組合せであってもよい。各構造単位における X 及び Y の置換位置は、式 (5)、(6) における置換位置に限られず、他の置換位置であってもよい。

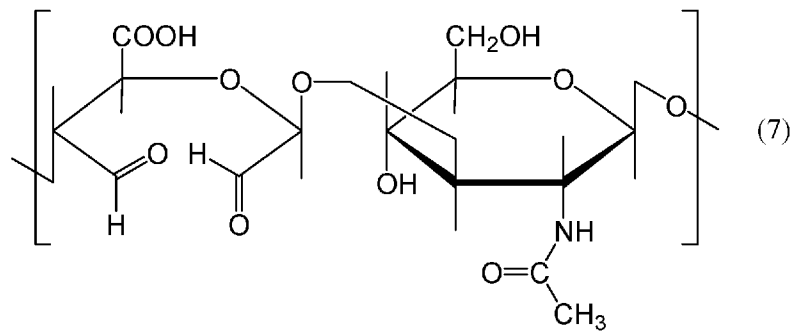
[0030] [表1]

末端構造 1	末端構造 2	共有結合
$\text{—}\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{N}}}\text{—NH}_2$	$\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}\text{—H}$	$\text{—}\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{N}}}\text{—N}=\underset{\underset{\text{H}}{ }}{\text{C}}\text{—}$
—SH	—SH	—S—S—
	—NH_2	

[0031] 第 1 のヒアルロン酸及び第 2 のヒアルロン酸における X 及び Y に相当する官能基は、例えば各構造単位における環構造が開環することにより形成されてもよい。具体的には、第 1 のヒアルロン酸又は第 2 のヒアルロン酸は、それぞれ式 (5) で表される構造単位又は式 (6) で表される構造単位に代えて、例えば表 1 に示した末端構造 2 の一例であるアルデヒド基を有する構造単位として、下記式 (7) で表される構造単位を有していてもよい。

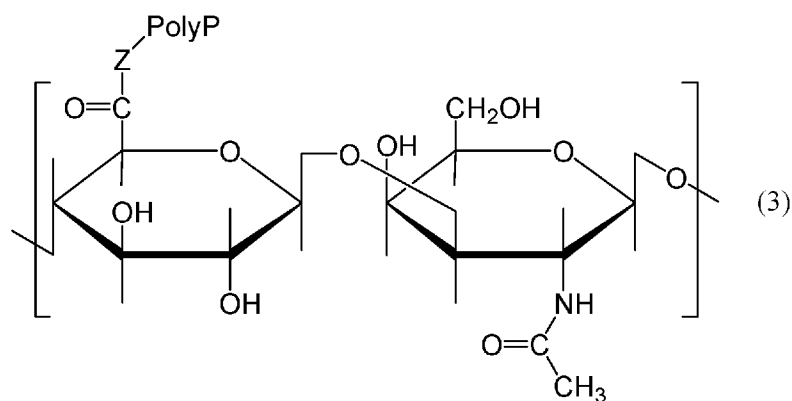
[0032]

[化8]



[0033] 第1のヒアルロン酸及び第2のヒアルロン酸は、上述の構造単位に加えて、下記式(3)で表される構造単位を有していてもよい。この場合、第1のヒアルロン酸と第2のヒアルロン酸とを架橋させた後に、式(3)におけるポリリン酸基とカルシウムとの複合体を形成することにより、カルシウムと複合体を形成したポリリン酸基を側鎖に有する架橋ヒアルロン酸が得られる。当該架橋ヒアルロン酸は、第1のヒアルロン酸及び／又は第2のヒアルロン酸におけるポリリン酸基とカルシウムとの複合体を予め形成した後に、当該第1のヒアルロン酸と第2のヒアルロン酸とを架橋させることによって得られる。

[0034] [化9]



[0035] 第1のヒアルロン酸及び第2のヒアルロン酸における式(1)で表される構造単位の割合は、それぞれ第1のヒアルロン酸及び第2のヒアルロン酸を構成する全構造単位を基準として、生体適合性の観点から、好ましくは20モル%以上、より好ましくは30モル%以上、更に好ましくは40モル%以上であり、また、ゲル化反応速度の観点から、好ましくは95モル%以下、

より好ましくは90モル%以下、更に好ましくは80モル%以下である。

[0036] 第1のヒアルロン酸における式(5)で表される構造単位の割合は、第1のヒアルロン酸を構成する全構造単位を基準として、ゲル化反応速度の観点から、好ましくは5モル%以上、より好ましくは10モル%以上、更に好ましくは20モル%以上であり、また、生体適合性の観点から、好ましくは80モル%以下、より好ましくは70モル%以下、更に好ましくは60モル%以下である。なお、第1のヒアルロン酸が式(5)で表される構造単位に代えて式(7)で表される構造単位を有する場合、式(7)で表される構造単位の割合は、上記の式(3)で表される構造単位の割合と同様である。

[0037] 第2のヒアルロン酸における式(6)で表される構造単位の割合は、第2のヒアルロン酸を構成する全構造単位を基準として、ゲル化反応速度の観点から、好ましくは5モル%以上、より好ましくは10モル%以上、更に好ましくは20モル%以上であり、また、生体適合性の観点から、好ましくは80モル%以下、より好ましくは70モル%以下、更に好ましくは60モル%以下である。なお、第2のヒアルロン酸が式(6)で表される構造単位に代えて式(7)で表される構造単位を有する場合、式(7)で表される構造単位の割合は、上記の式(4)で表される構造単位の割合と同様である。

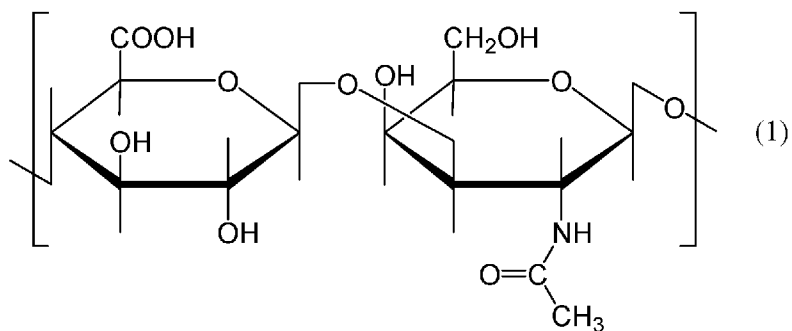
[0038] 第1のヒアルロン酸及び第2のヒアルロン酸における式(3)で表される構造単位の割合は、それぞれ第1のヒアルロン酸及び第2のヒアルロン酸を構成する全構造単位を基準として、止血効果の観点から、好ましくは0.1モル%以上、より好ましくは1モル%以上、更に好ましくは2モル%以上であり、また、生体適合性の観点から、好ましくは15モル%以下、より好ましくは10モル%以下、更に好ましくは7モル%以下である。

[0039] 第1のヒアルロン酸及び第2のヒアルロン酸の重量平均分子量 M_w は、それぞれ、好ましくは5000以上、より好ましくは10000以上、更に好ましくは20000以上であり、また、好ましくは2000000以下、より好ましくは1000000以下、更に好ましくは800000以下である。本明細書における重量平均分子量 M_w は、GPC分析により得られる重量

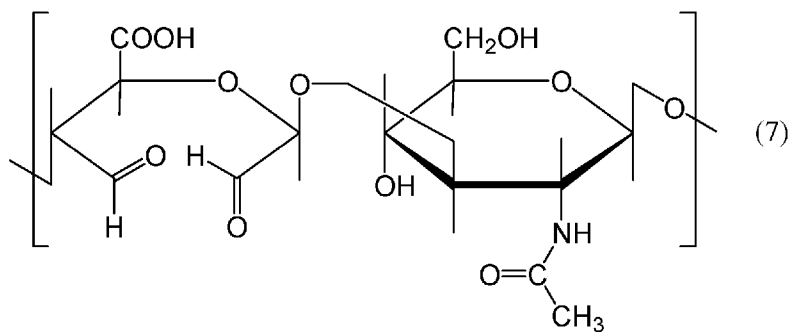
平均分子量 M_w を意味する。

[0040] 上述の第1のヒアルロン酸及び第2のヒアルロン酸の更に具体的な例としては、下記式(1)で表される構造単位、及び下記式(7)で表される構造単位を有する第1のヒアルロン酸、並びに、下記式(1)で表される構造単位、下記式(8)で表される構造単位、及び下記式(9)で表される構造単位を有する第2のヒアルロン酸がそれぞれ挙げられる。

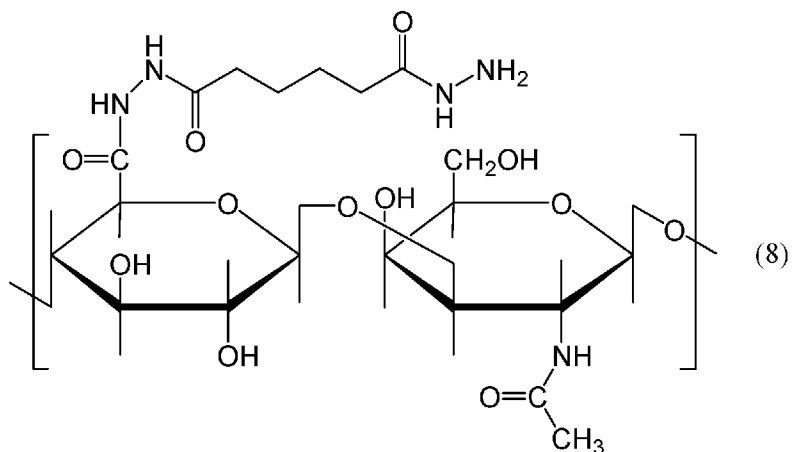
[0041] [化10]



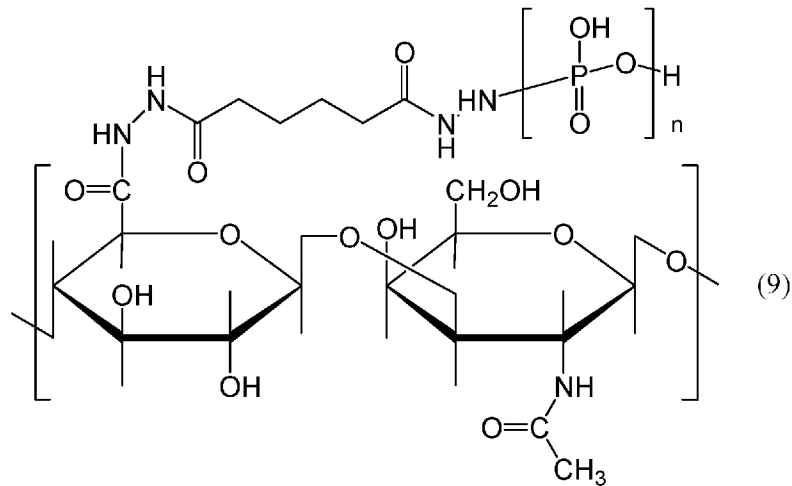
[化11]



[化12]



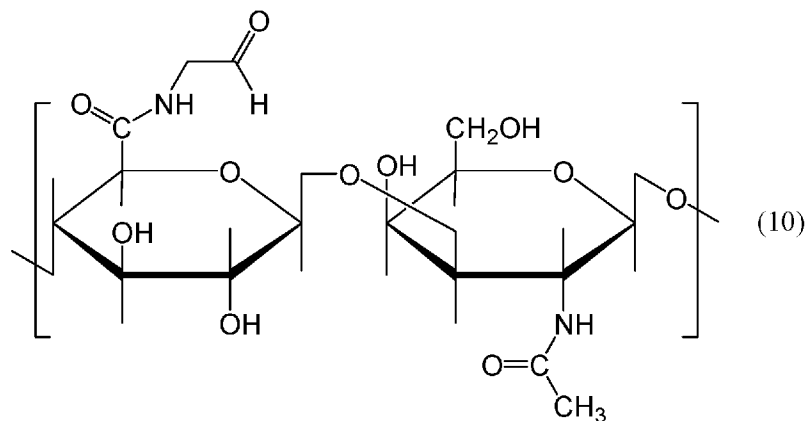
[化13]



[式(9)中、nは上記式(6)におけるnと同義である。]

[0042] 第1のヒアルロン酸は、上記式(7)で表される構造単位に代えて、下記式(10)で表される構造単位を有していてもよい。

[化14]



[0043] 第1のヒアルロン酸は、式(1)で表される構造単位、及び式(7)又は(10)で表される構造単位からなってもよい。その場合、第1のヒアルロン酸における式(1)で表される構造単位、及び式(7)又は(10)で表される構造単位の割合は、それぞれ20～95モル%、及び5～80モル%であってよく、第1のヒアルロン酸の重量平均分子量Mwは、5000～2000000であってよい。

[0044] 第2のヒアルロン酸は、式(1)で表される構造単位、式(8)で表される構造単位、及び式(9)で表される構造単位からなってもよい。その

場合、第2のヒアルロン酸における式(1)で表される構造単位、式(8)で表される構造単位、及び式(9)で表される構造単位の割合は、それぞれ20～95モル%、5～80モル%、及び1～15モル%であってよく、第2のヒアルロン酸の重量平均分子量M_wは、5000～2000000であってよい。

[0045] 架橋ヒアルロン酸を得る方法としては、上述の共有結合による架橋に加えて、例えばコレステロールを利用した疎水性相互作用による架橋や、金属イオンを利用したイオン架橋によって、ヒアルロン酸同士（これらのヒアルロン酸は同一であっても異なってもよい）を架橋させる方法が挙げられる。

[0046] 以上のようなヒアルロン酸を含有する組成物は、その他に生理食塩水、カルシウム、TRIS緩衝液、アミノ酸、グルコース、マンニトール、スクロース、トロンビンを含んでもよい。

[0047] ヒアルロン酸の含有量は、組成物全量基準で、例えば0.1質量%以上、0.5質量%以上、又は1質量%以上であってよく、また、例えば10質量%以下、8質量%以下、又は5質量%以下であってよい。ポリリン酸の含有量は、組成物全量基準で、例えば0.00025質量%以上、0.0025質量%以上、又は0.005質量%以上であってよく、また、例えば5.625質量%以下、3.75質量%以下、又は2.625質量%以下であってよい。

[0048] カルシウムの含有量は、止血効果を更に向上させる観点から、ポリリン酸中のリン原子1モルに対して、好ましくは0.5モル以上、より好ましくは1モル以上、更に好ましくは3モル以上であり、また、好ましくは40モル以下、より好ましくは20モル以下、更に好ましくは12モル以下である。カルシウムの含有量は、止血効果を更に向上させる観点から、ポリリン酸中のリン原子1モルに対して、好ましくは、0.5モル以上40モル以下、0.5モル以上20モル以下、0.5モル以上12モル以下、1モル以上40モル以下、1モル以上20モル以下、1モル以上12モル以下、3モル以上

40モル以下、3モル以上20モル以下、又は3モル以上12モル以下であってもよい。

[0049] ヒアルロン酸、及びカルシウムと複合体を形成したポリリン酸を含有する組成物は、ゲル又は粘性溶液を形成する。具体的には、該組成物は、それ自体がゲル又は粘性溶液であってもよく、あるいは、それ自体は粉体であっても、例えば水と共存した場合にゲル又は粘性溶液を形成し得る組成物であってもよい。粘性溶液は、好ましくは $0.002 \text{ Pa} \cdot \text{s} \sim 5000 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 、より好ましくは $0.01 \text{ Pa} \cdot \text{s} \sim 2000 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 、更に好ましくは $0.05 \text{ Pa} \cdot \text{s} \sim 1000 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ の粘度を有する溶液である。

[0050] ヒアルロン酸、及びカルシウムと複合体を形成したポリリン酸を含有する組成物は、該ヒアルロン酸及び該ポリリン酸を有効成分とする医用組成物として好適に用いられ、止血剤として特に好適に用いられる。該組成物は、ゲル又は粘性溶液、あるいは粉体として患部に適用されることによって、患部において止血効果を発揮する。

[0051] 本実施形態に係るキットは、第1の組成物及び第2の組成物を含む。このキットにおいては、ヒアルロン酸、ポリリン酸、及びカルシウムのそれぞれが、少なくとも第1の組成物及び第2の組成物のいずれかに含有される。第1の組成物及び第2の組成物のそれぞれは、ヒアルロン酸、ポリリン酸、及びカルシウムの少なくとも一つを含有する。第1の組成物及び第2の組成物の形状は、特に限定されず、液体、固体等であってもよい。キットは、第1の組成物及び第2の組成物に加えて、他の液体成分や固体成分等を更に含んでもよい。

[0052] キットにおけるヒアルロン酸は、例えば、上記式(1)で表される構造単位からなってもよく、上記式(1)で表される構造単位に加えて、例えば上記式(3)及び(5)～(10)から選ばれる式で表される構造単位を有していてもよい。キットにおけるヒアルロン酸は、上述した第1のヒアルロン酸及び／又は第2のヒアルロン酸であってもよい。

[0053] キットにおけるポリリン酸は、上述した組成物におけるポリリン酸と同義

である。キットにおけるカルシウムは、金属カルシウム、塩化カルシウム等のカルシウム塩、カルシウムイオン等のいずれの状態でも含有されていてもよい。

[0054] キットにおいて、第1の組成物及び第2の組成物が液体である場合、第1の組成物及び第2の組成物は、それぞれTRIS緩衝液、アミノ酸、グルコース、マンニトール、スクロース、トロンビン等を更に含有していてもよい。

[0055] キットにおけるヒアルロン酸の含有量は、第1の組成物又は第2の組成物全量基準で、例えば0.1質量%以上、0.5質量%以上、又は1質量%以上であってよく、また、例えば10質量%以下、8質量%以下、又は5質量%以下であってよい。キットにおけるポリリン酸の含有量は、第1の組成物又は第2の組成物全量基準で、例えば0.00025質量%以上、0.0025質量%以上、又は0.005質量%以上であってよく、また、例えば5.625質量%以下、3.75質量%以下、又は2.625質量%以下であってよい。

[0056] キットにおけるカルシウムの含有量は、止血効果を更に向上させる観点から、ポリリン酸中のリン原子1モルに対して、好ましくは0.5モル以上、より好ましくは1モル以上、更に好ましくは3モル以上であり、また、好ましくは40モル以下、より好ましくは20モル以下、更に好ましくは12モル以下である。キットにおけるカルシウムの含有量は、止血効果を更に向上させる観点から、ポリリン酸中のリン原子1モルに対して、好ましくは、0.5モル以上40モル以下、0.5モル以上20モル以下、0.5モル以上12モル以下、1モル以上40モル以下、1モル以上20モル以下、1モル以上12モル以下、3モル以上40モル以下、3モル以上20モル以下、又は3モル以上12モル以下であってもよい。

[0057] キットの一態様として、例えば、カルシウムを含有する第1の組成物と、ヒアルロン酸及びポリリン酸を含有する第2の組成物とを含むキットが挙げられる。このキットの第2の組成物において、ヒアルロン酸とポリリン酸と

は、別個の化合物として含有されていてもよく、側鎖にポリリン酸基を有するヒアルロン酸として含有されていてもよい。

[0058] キットの他の態様として、例えば、第1のヒアルロン酸及びカルシウムを含有する第1の組成物と、第1のヒアルロン酸と架橋を形成し、ポリリン酸基を側鎖に有する第2のヒアルロン酸を含有する第2の組成物とを含むキットが挙げられる。

[0059] キットは、更に他の態様として、第1の組成物及び第2の組成物に加えて、第3の組成物を含んでいてもよい。この場合、例えば、第1の組成物はヒアルロン酸を含有し、第2の組成物はポリリン酸を含有し、第3の組成物はカルシウムを含有している。第3の組成物におけるその他の成分や各成分の含有量は、第1の組成物及び第2の組成物と同様であってよい。

[0060] 本実施形態に係るキットは、医用キットとして好適に用いられ、止血剤として特に好適に用いられる。キットは、例えば、第1の組成物及び第2の組成物（必要に応じて他の成分）を予め混合して上記の架橋ヒアルロン酸を形成した上で患部に適用、あるいは、第1の組成物及び第2の組成物（必要に応じて他の成分）それぞれを患部に適用することによって、患部において止血効果を発揮する。

実施例

[0061] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0062] [アジピン酸ジヒドラジド修飾ヒアルロン酸（HA-ADH、上記式（8）で表される構造単位を有するヒアルロン酸）の合成]

（1）500 mLナスフラスコ中で1.500 gのヒアルロン酸（HA、重量平均分子量：5万～11万、電気化学工業）を300 mLのRO水に溶解させた。

（2）16.33 gのアジピン酸ジヒドラジド（ADH）を水溶液に直接加え、1時間攪拌した。

（3）0.1 NのHClと0.1 NのNaOHとを用いて、水溶液のpHが

6. 8になるように調整した。

(4) HOBt 溶液 (10 mL の DMSO、5 mL の H_2O 、2.297 g の 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)) と EDC 溶液 (4.5 mL の DMSO、4.5 mL の H_2O 、2.329 g の 1-エチル- (3-ジメチルアミノプロピル) -カルボジイミド (EDC)) とを順に水溶液に加えた。

(5) 水溶液が蒸発しないようにパラフィルムで蓋をした。

(6) 水溶液の pH を $5 < \text{pH} < 7$ となるように調整した。

(7) 30 分間ごとに計 4 時間、水溶液の pH を調整し、一晩攪拌した。

(8) 30 分間水に漬けておいた透析膜 (Spectra/Por 1 Dialysis Membrane、 $MwCO = 6 \sim 8000$) を用いて、4 L ビーカーで水溶液を 3 日間透析した後、3 日間、凍結乾燥した。

(9) 5 wt % NaCl 水溶液に、5 ~ 10 mg/mL の HA-ADH 濃度になるように乾燥後の HA-ADH を溶解させた。

(10) EtOH に HA-ADH 溶液を滴下した後、4 分間 2500 rpm で遠心分離した。

(11) HA-ADH を 100 mL の H_2O に溶解させ、2 時間攪拌した。

(12) 透析を 3 日間行い、透析乾燥を 3 日間行い、生成物を得た。

(13) 1H NMR により ADH 修飾率を算出したところ、49.3%であった。

[0063] [イミダゾール修飾ポリリン酸 (PolyP-Im) の合成]

(1) 100 mL ビーカーにイミダゾール 0.6108 g (8.97 mmol)、EDC 0.6163 g (3.21 mmol) を量りとり、RO 水 20 mL に溶解させ、1 N の HCl を用いて pH = 6.0 に調整した。

(2) ヘキサメタリン酸ナトリウム 0.9057 g (0.653 mmol) を加え、再び 1 N の HCl を用いて pH = 6.0 に調整した。

(3) 反応の進行とともに低下する pH を、0.1 N の NaOH を用いて pH = 6.0 となるように頻繁に調整しながら、TLC で反応の進行を確認し

た。

(4) 反応終了後、エタノール200mLを用いて、エタノール沈殿、遠心分離(16000rpm×5min)を行い、PolyP-Im及びポリリン酸(PolyP)を回収した。

(5) 減圧下溶媒留去を行い、PolyP-Im及びPolyPの混合物を得た。収量は0.7264g(0.505mmol)、収率は77.3%であった。PolyPの重量平均分子量は、1439であった。PolyPに対するイミダゾールの修飾率は、62.1%であった。

[0064] [ポリリン酸修飾ヒアルロン酸(HA-PolyP、上記式(9)に相当)の合成]

(1) 上記で合成されたHA-ADH 0.0147gをRO水4mLに溶解させた。

(2) 上記で合成されたPolyP-Im 0.5174gを加え、1NのNaOHを用いてpH8.5に調整した。

(3) pHを調整しながらTLC(展開溶媒:MeOH/H₂O=7/3)により反応を確認した。

(4) 反応終了後、溶液を透析、凍結乾燥を行い、HA-PolyPを得た。

[0065] [アルデヒド化ヒアルロン酸(HA-CHO、上記式(7)で表される構造単位を有するヒアルロン酸)の合成]

(1) ヒアルロン酸(HA、重量平均分子量:200万、電気化学工業)1.50gを300mLのナスフラスコに量り入れ、純水300mLを用いて室温下、一晩溶解させた。

(2) 得られた5mg/mLのHA水溶液に過ヨウ素酸ナトリウム0.401g(HAの2糖ユニットに対して1.25eq.)を固体の状態で添加し、遮光下、室温で2時間反応させた。

(3) 反応を停止するためにエチレングリコール200μLを加え、室温下、10分間攪拌した。

(4) ナスフラスコ内の水溶液を透析膜に入れ、4 Lの食塩水中で1日透析を行った後、4 L純水を用いて純水と同程度の電気伝導となるまで3日間透析を行った。

(5) 凍結乾燥によって、 $\text{HA}-\text{CHO}$ を得た。

[0066] 上記の $\text{HA}-\text{CHO}$ に代えて、下記の手順で合成した $\text{HA}-\text{c}-\text{CHO}$ を用いてもよいことを確認した。

[0067] [アルデヒド化ヒアルロン酸 ($\text{HA}-\text{c}-\text{CHO}$ 、上記式(10)で表される構造単位を有するヒアルロン酸)の合成]

(1) 100 mLナスフラスコにおいて、ヒアルロン酸(HA、重量平均分子量: 87万、電気化学工業) 400 mg (ユニット1 mmol)を純水60 mLに溶解させた。

(2) 3-アミノ-1, 2-プロパンジオール182 mg (155 μL 、2 mmol)をマイクロピペットでHA水溶液に滴下した。

(3) $\text{HOBt} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 153 mg (1 mmol)をDMSO 2 mLに溶解させた溶液を、HA水溶液に滴下した。

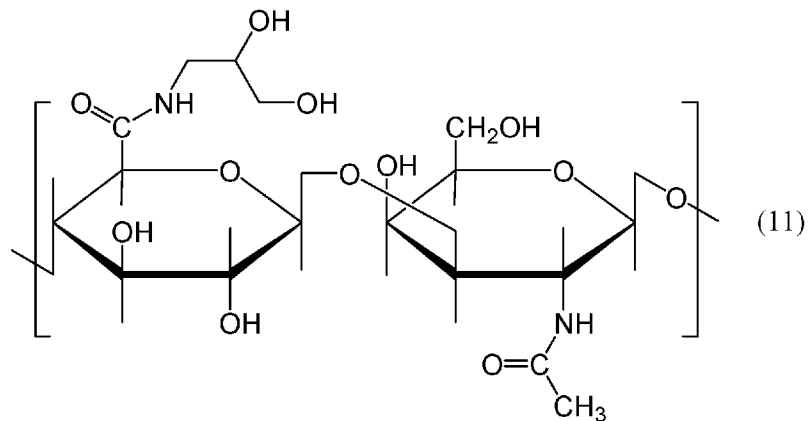
(4) 1 mol/Lの塩酸でHA水溶液のpHを6に調整した。

(5) $\text{WSCD} \cdot \text{HCl}$ (塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド) 58 mg (0.3 mmol)をHA水溶液に加えてそのまま一晩反応させた。

(6) 透析膜(Spectra/Por 1 Dialysis Membrane、 $\text{MwCO}=6\sim 8000$)を用いてHA水溶液の透析を行った。透析は、0.1 Mの塩化ナトリウム水溶液を透析液として2日、純水を透析液として1日それぞれ行った。

(7) 凍結乾燥を行い、生成物($\text{HA}-\text{c}-\text{diol}$ 、下記式(11)で表される構造単位を有するヒアルロン酸)を得た。収量は337.85 mgであった。

[化15]



[0068] (8) 50 mL ナスフラスコにおいて、HA-c-diol 200 mg (未修飾であれば0.5 mmol) を純水25 mL に溶解させた。

(9) 過ヨウ素酸ナトリウム107 mg (0.5 mmol) を0.5 mL の純水に溶解させた溶液をHA-c-diol 水溶液に滴下した。

(10) 遮光して5分間反応させた。

(11) 遮光を解き、エチレングリコール0.6 mL (10 mmol) をHA-c-diol 水溶液に加えて10分撹拌した。

(12) 透析膜 (Spectra/Por 1 Dialysis Membrane、MwCO=6~8000) を用いてHA-c-diol 水溶液の透析を行った。透析は、透析液として純水を用いて1日行った。

(13) 凍結乾燥を行い、生成物 (HA-c-CHO、上記式(10)で表される構造単位を有するヒアルロン酸) を得た。収量は183.02 mg であった。

[0069] [ゲル時間測定]

(1) HA-ADHにおけるヒドラジド基に対するPolyP-ImにおけるPolyPの当量を0.01、0.1、0.3、0.5、1 (eq) として合成した各HA-PolyPを2 wt %の濃度でPBSに溶解させた。

(2) 300 rpmのマイクロ撹拌子上に、HA-PolyP、HA-CHOの順でそれぞれ100 μ L ずつ滴下した。

(3) 目視によりゲル化に要する時間を測定した。結果を図1に示す。

[0070] [モリブデンブルー法によるリン滴定]

以下の組成を有する溶液A～Cを使用した。

溶液A：リン酸標準溶液（10 mmol/L：保存用）（リン酸二水素カリウム1.3610 g、RO水1 L）

[0071] 溶液B：酸性モリブデン酸溶液（調製手順は以下のとおり）

（1）モリブデン酸アンモニウム12.5 gを125 mLの水に溶解させた。

（2）上記（1）とは別に酒石酸アンチモニルカリウム0.5 gを20 mLの水に溶解させた。

（3）350 mLの硫酸（4.5 M）にモリブデン酸アンモニウム溶液を、絶えず攪拌しながら加えた。

（4）この水溶液に酒石酸アンチモニルカリウム溶液を加え、直ちによく混合した。

[0072] 溶液C：酸性アスコルビン酸溶液（調製手順は以下のとおり）

（1）モリブデン酸アンモニウム10 gをガラスビーカーに量り取り、50 mLのRO水に溶解させた。

（2）水溶液に硫酸（4.5 M）50 mLを加え、よく混合した。

[0073] 上記の溶液A～Cを用い、以下の手順に従ってリン滴定を行った。

（標準溶液列の調整と検量線の作成）

（1）溶液Aを用いて適当な濃度（0～10 μmol/L）の標準溶液列を作製した。濃度0の溶液としてRO水を用いた。

（2）標準溶液25 mLに対して、溶液Cを0.5 mLで加え、穏やかに混合し、次いで、溶液Bを0.5 mL加え、穏やかに混合した。

（3）溶液を15分放置した後から60分以内に、石英セルを用いて水を対照として883 nmにおける吸光度を測定し、吸光度とリン酸濃度との関係について検量線を作成した。

[0074] （試料の前処理）

HA-ADHにおけるヒドラジド基に対するPolyP-ImにおけるP

o l y P の当量を 0. 1、0. 3、0. 5、1 (e q) として合成した各 H A - P o l y P を 1 m g 程度量りとり、そこに硫酸 (0. 5 M) 1 m L を加え、8 0 °C で 2 時間加熱した。

[0075] (吸光度測定による定量)

(1) 前処理を行った各試料溶液 2 5 m L に対して、溶液 C を 0. 5 m L 加え、穏やかに混合し、次いで、溶液 B を 0. 5 m L 加え、穏やかに混合した。

(2) 1 5 分放置した後から 6 0 分以内に、石英セルを用いて水を対照として 8 8 3 n m における吸光度を測定した。

(3) 検量線を用いて、得られた吸光度から各 H A - P o l y P における P o l y P 修飾率を算出した。結果を図 2 に示す。

[0076] [T N B S a s s a y]

(1) 0. 1 M の N a H C O ₃ (p H 8. 5) に 2 ~ 2 0 0 μ g / m L の上記 [モリブデンプルー法によるリン滴定] と同じ各測定試料を溶解させた (サンプル溶液と呼ぶ)。

(2) 0. 1 M の N a H C O ₃ (p H 8. 5) に 0. 0 1 w t % のトリニトロベンゼンスルホン酸 (T N B S) を溶解させた (T N B S 溶液と呼ぶ)。

(3) 1. 5 m L のマイクロチューブに 0. 5 m L の各サンプル溶液及び 0. 2 5 m L の T N B S 溶液を加えた。

(4) 3 7 °C で 2 時間インキュベートした後、反応を停止させるために 1 N の H C l 0. 1 2 5 m L を加えた。

(5) 紫外可視分光光度計 (V - 6 3 0 B O、日本分光製) を用いて 3 3 5 n m の吸光度を測定した。得られた吸光度から各 H A - P o l y P におけるヒドラジド基に対する P o l y P 修飾率を算出した。結果を図 2 に示す。

[0077] [フィブリン塊形成凝固速度の測定]

(1) 検体であるヒト標準血漿 (S y s m e x 社製) を 1 m L の純水に添加し、転倒混和にて溶解させた。

(2) 検体 1 2 0 μ L を別のチューブにとり、3 分間 3 7 °C でインキュベ-

トした。

(3) 37℃に設定されたソノクロット装置（サイエンコ社製）にキュベットをセットし、検体をキュベットに120μL入れ、サンプルとして生理食塩水、並びに、1mg/mLのHA-PolyP及びHA-ADHをそれぞれ120μL添加した。

(4) ソノクロット装置においてスタートボタンを押し、攪拌が開始されると同時に0.025Mの塩化カルシウム水溶液を120μL添加し、測定をスタートさせた。測定条件は、37℃、30min、Scale 0-25、測定回数4回とした。結果を図3及び4に示す。図3及び4中、クロット速度が大きいほどフィブリン塊形成凝固速度が大きいことを示す。

[0078] [細胞毒性試験 (MTT assay)]

(1) マウスマクロファージ (RAW264.7)、ヒト中皮細胞 (MeT-5A)、マウス繊維芽細胞 (NIH3T3) の3種の細胞を細胞密度 5×10^4 cells/well で24穴プレートにそれぞれ播種後24時間培養した。

(2) 培養培地に0.01、0.1、0.2、1mg/mLの各濃度でHA-ADH及びHA-PolyPをそれぞれ溶解させた溶液を500μL投与し、マウスマクロファージ (RAW264.7) については2日後の細胞生存率、ヒト中皮細胞 (MeT-5A) 及びマウス繊維芽細胞 (NIH3T3) については3日後の細胞生存率をMTTアッセイ (GIBCO) によりそれぞれ測定した (N=4)。結果を図5に示す。

(3) また、500μLの培養培地が入ったwell上にダブルシリンジを用いて20mg/mLのHA-PolyP及びHAゲルのそれぞれを0.1mLトランスウェルに作製し、ゲルのMTTアッセイも行った (N=4)。結果を図6に示す。

[0079] [生体適合性評価]

(i.p. (腹腔投与))

(1) 19Gの注射針を用いて、ICRマウス (7週齢、オス) の腹腔に2

0 mg/mLのHA-PolyPをダブルシリンジにて1 mL投与した (N=4)。なお、ここで用いたHA-PolyPは、HA-ADHにおけるヒドラジド基に対するPolyP-ImにおけるPolyPの当量を0.5 (eq)として合成したHA-PolyPであり、PolyPの修飾率は、ADHに対して9.28%、HAに対して4.58%であった (以下の評価でも同様)。

(2) 1週間後、材料の残存と周辺組織への炎症と癒着の有無を確認したところ、材料の残存、炎症、癒着は見られなかった。

[0080] (s. c. (皮下投与))

(1) ICRマウス (7週齢、オス) のi. p. にて麻酔を投与した。

(2) 麻酔のかかったマウスをコルクボードに張り付けて、19 Gの注射針を用いて、腹部に20 mg/mLのHA-PolyPをダブルシリンジにて1 mL投与した (N=4)。

(3) 1週間後、材料の残存と周辺組織への炎症と癒着の有無を確認したところ、材料の残存、炎症、癒着は見られなかった。

[0081] また、以上のi. p. 及びs. c. のそれぞれについて、投与前から投与後1週間までのマウスの体重増加を測定した。結果を図7に示す。

[0082] [止血効果の評価]

以下の試料1~4を用いた。

試料1: フィブリン糊 (化血研: ボルヒール)

試料2: 20 mg/mL HAX (N=12)

試料3: 20 mg/mL HAX/PolyP (N=10)

試料4: 20 mg/mL HAX-PolyP (N=10)

[0083] 試料2~4のHAX (架橋ヒアルロン酸ゲル)、HAX/PolyP (架橋ヒアルロン酸ゲルとポリリン酸との混合物)、HAX-PolyP (ポリリン酸修飾架橋ヒアルロン酸ゲル) の作製手順は以下のとおりである。まず、HA-PolyP又はHA-ADHを生理食塩水に、HA-CHOをCaCl₂と共に生理食塩水に、それぞれ溶解させた (CaCl₂の濃度は0.5

M)。そして、PTFEシート上で二液を混合しHAX又はHAX-Poly Pを作製した。ここで、HAX-Poly P又はHAX-ADHとHAX-CHOとの質量比は1 : 1であり、HAX-Poly P中のリン原子1モルに対するCaCl₂由来のカルシウムイオンの含有量は、6.25モルであった。また、HAXではカルシウムを含有してもゲルの透明度が保たれるのに対し、HAX-Poly Pではカルシウムを含有することによりゲルが白濁することから、Poly Pとカルシウムとが複合体を形成していることが確認された。

[0084] また、コントロールとして、試料を投与しない未処置のマウス（N = 14）についても評価を行った。

[0085] 止血効果の評価は、以下の手順に従って行った。

(1) ICRマウス（8週齢、オス）にi.p.にて8倍希釈ソムノペンチル0.2mLを投与し、麻酔した。

(2) 麻酔のかかったマウスを仰向けの状態でコルクボードに張り付け、腹腔を開腹した（図8（a））。

(3) ガーゼを用いて、開腹時の出血と腹水を取り除き、パラフィルムにて肝臓以外の臓器を覆った。

(4) パラフィルム上にあらかじめ風袋を測定したろ紙を置き、もう一度ガーゼにて腹水等をよく取り除き肝臓のLLをろ紙上に静置した（図8（b））。

(5) コルクボードを水平面から45°傾けた状態で（図8（c））、メスにてLLの中心の下方部から1cmの位置を5mm切開し、3分間出血させた（図8（d））。

(6) 試料1～4をそれぞれ出血部位に投与した（図8（e））。

(7) 3分間静置した後、ろ紙に付着した血液量を重量測定より評価した。試料がゲルの場合は、ゲルと出血量とが付着したろ紙の重量、及びゲルを取り除いた後のろ紙の重量をそれぞれ測定した（ろ紙自体の重量は予め測定した風袋により差し引いた）。

[0086] 評価結果を図 9 に示す。図 9 は、各試料を用いた場合及びコントロールについて平均出血量を算出し、平均出血量に基づいてそれぞれ外れ値と有意差を示した箱ひげ図である。この際、最も厳しい異なった分散をもつ独立 2 群データで t 検定を行った。

請求の範囲

- [請求項1] ヒアルロン酸、及びカルシウムと複合体を形成したポリリン酸を有効成分とする医用組成物。
- [請求項2] 前記ヒアルロン酸が側鎖に前記ポリリン酸を有する、請求項1に記載の医用組成物。
- [請求項3] ゲル又は粘性溶液を形成する、請求項1又は2に記載の医用組成物。
- [請求項4] 前記ヒアルロン酸が架橋ヒアルロン酸である、請求項1～3のいずれか一項に記載の医用組成物。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか一項に記載の医用組成物からなる止血剤。
- [請求項6] 第1の組成物及び第2の組成物を含む医用キットであって、
ヒアルロン酸、ポリリン酸、及びカルシウムのそれぞれが、少なくとも前記第1の組成物及び前記第2の組成物のいずれかに含有され、
前記第1の組成物及び前記第2の組成物のそれぞれは、前記ヒアルロン酸、前記ポリリン酸、及び前記カルシウムの少なくとも一つを含有する、医用キット。
- [請求項7] 前記ヒアルロン酸が側鎖に前記ポリリン酸を有する、請求項6に記載の医用キット。
- [請求項8] 前記第1の組成物は、前記カルシウムを含有し、
前記第2の組成物は、前記ヒアルロン酸及び前記ポリリン酸を含有する、請求項6又は7に記載の医用キット。
- [請求項9] 前記第1の組成物は、第1のヒアルロン酸及び前記カルシウムを含有し、
前記第2の組成物は、前記第1のヒアルロン酸と架橋を形成し、側鎖に前記ポリリン酸を有する第2のヒアルロン酸を含有する、請求項6～8のいずれか一項に記載の医用キット。
- [請求項10] ヒアルロン酸を含有する第1の組成物、ポリリン酸を含有する第2の組成物、及びカルシウムを含有する第3の組成物を含む医用キット

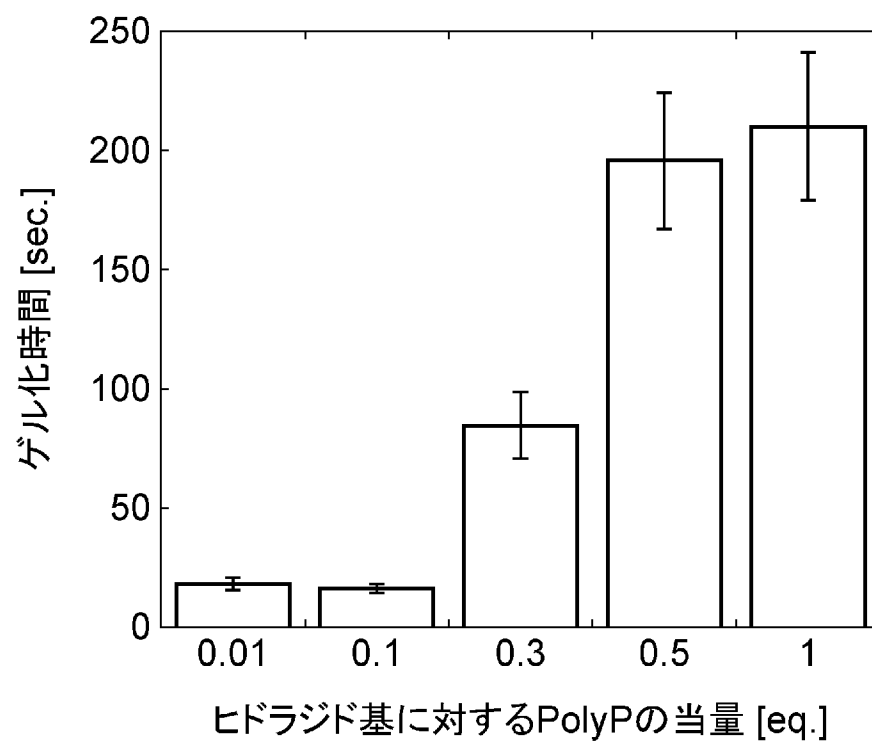
。

[請求項11] 前記カルシウムの含有量が、前記ポリリン酸中のリン原子 1 モルに対して 3 モル以上 12 モル以下である、請求項 6 ～ 10 のいずれか一項に記載の医用キット。

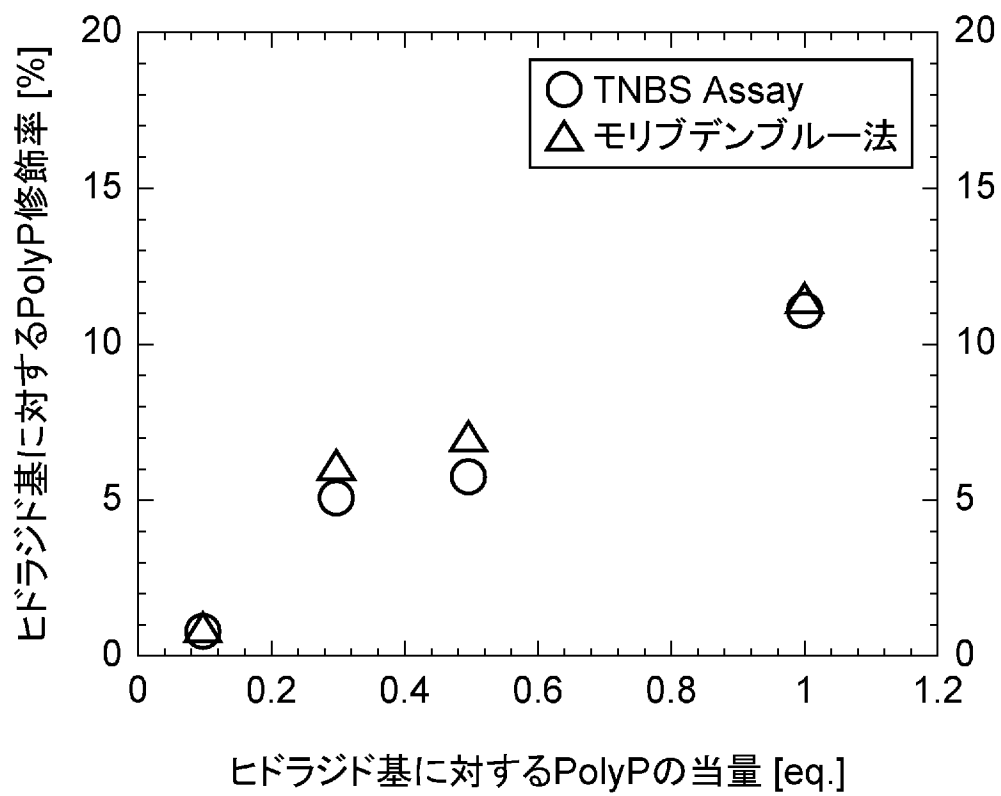
[請求項12] 請求項 6 ～ 11 のいずれか一項に記載の医用キットからなる止血剤

。

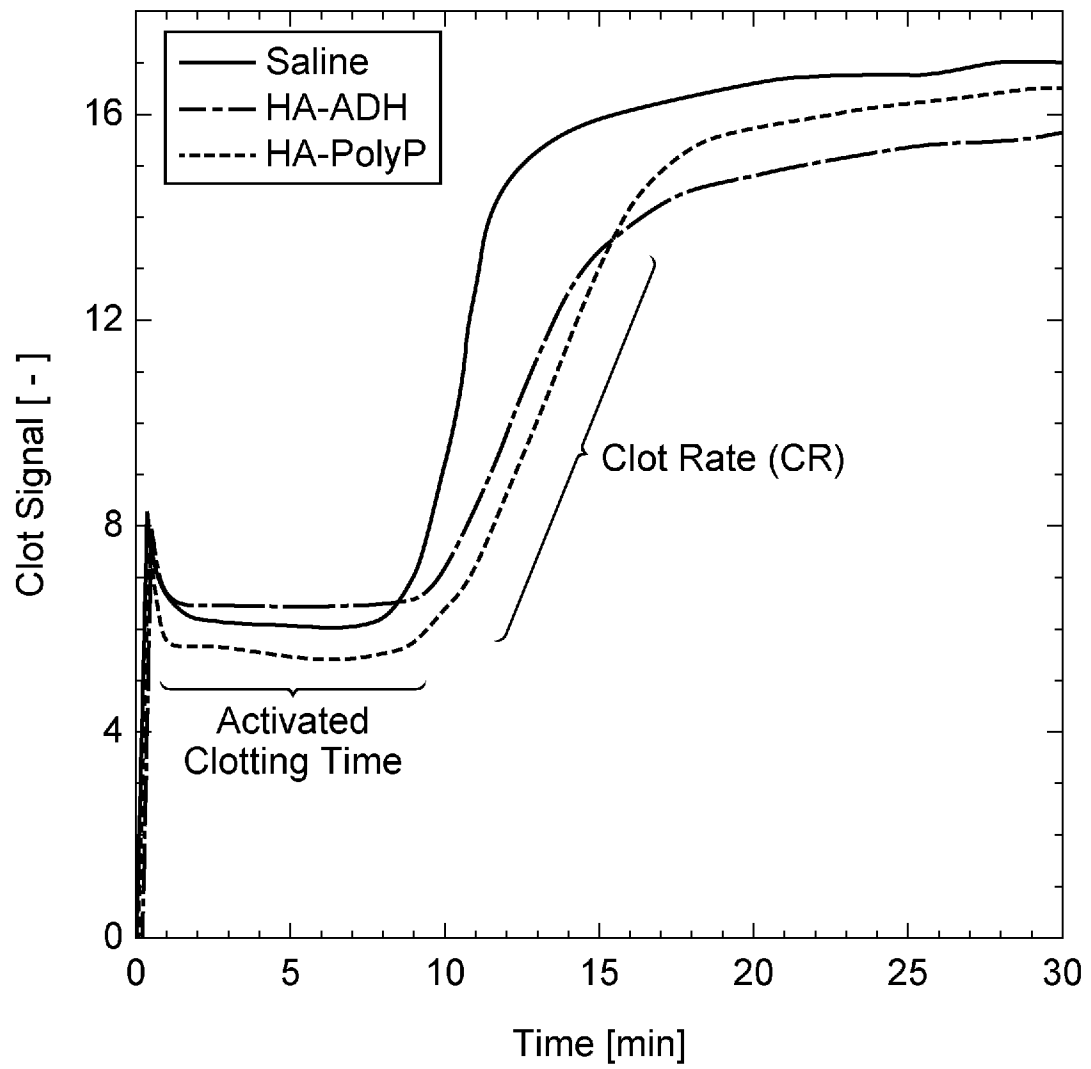
[図1]



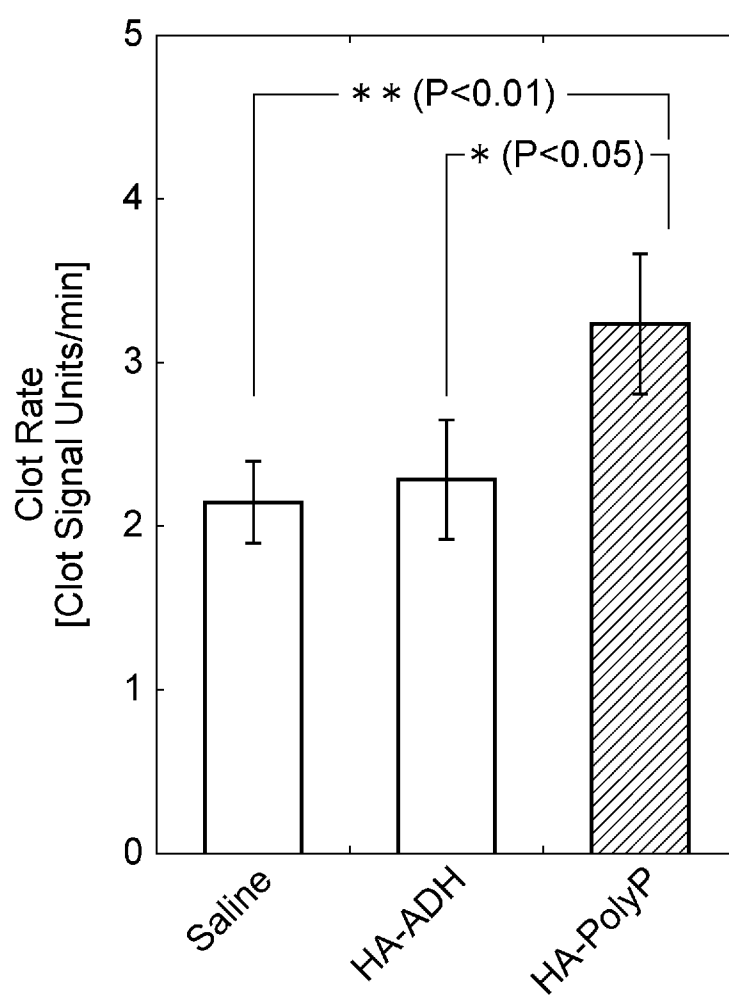
[図2]



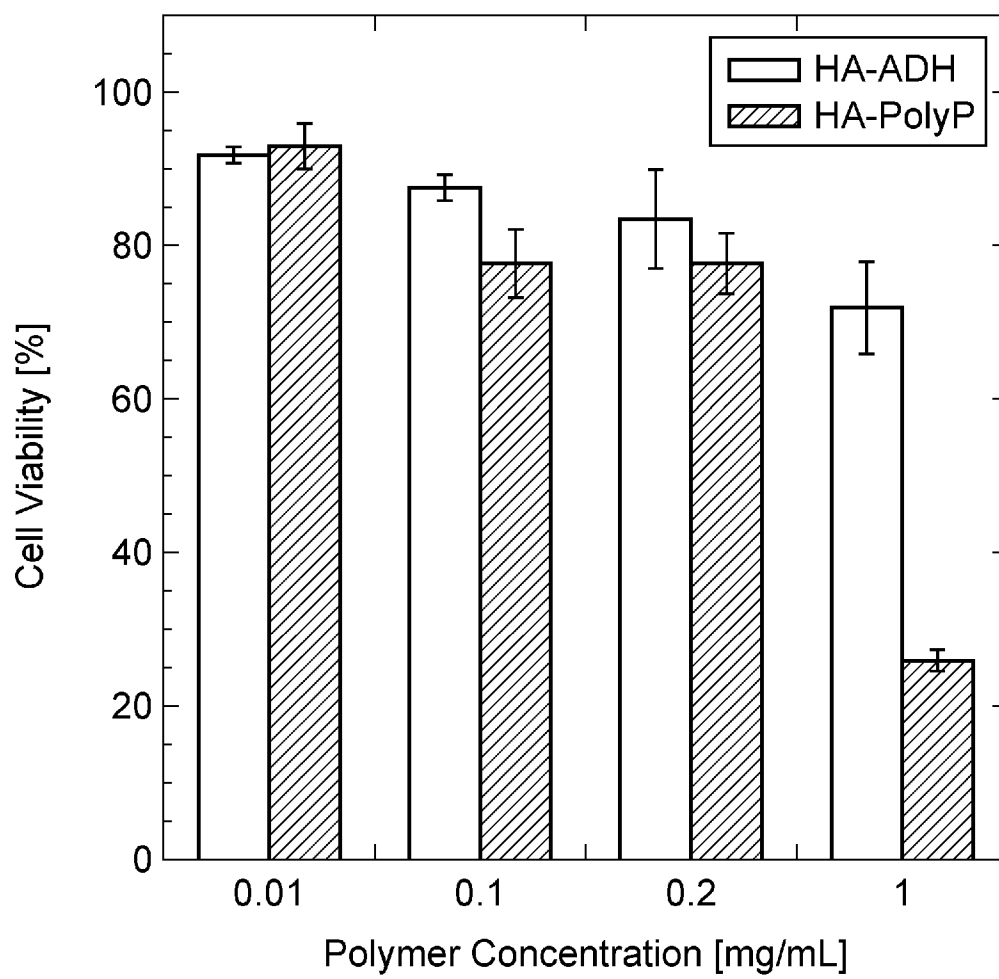
[図3]



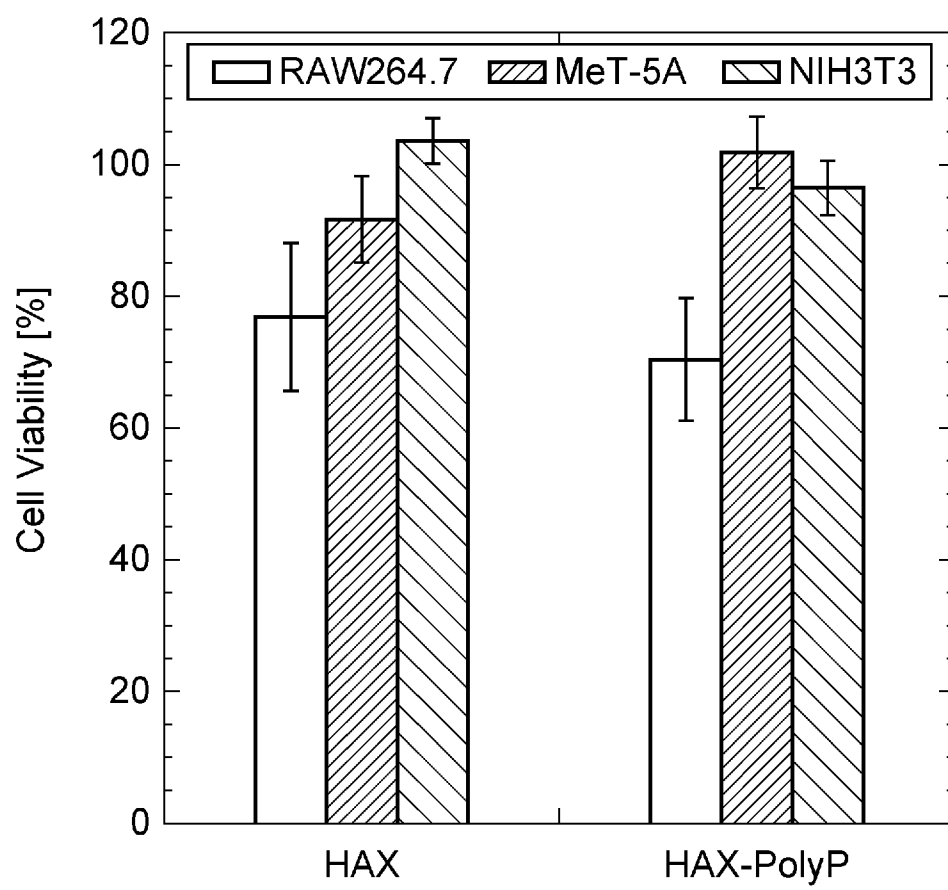
[図4]



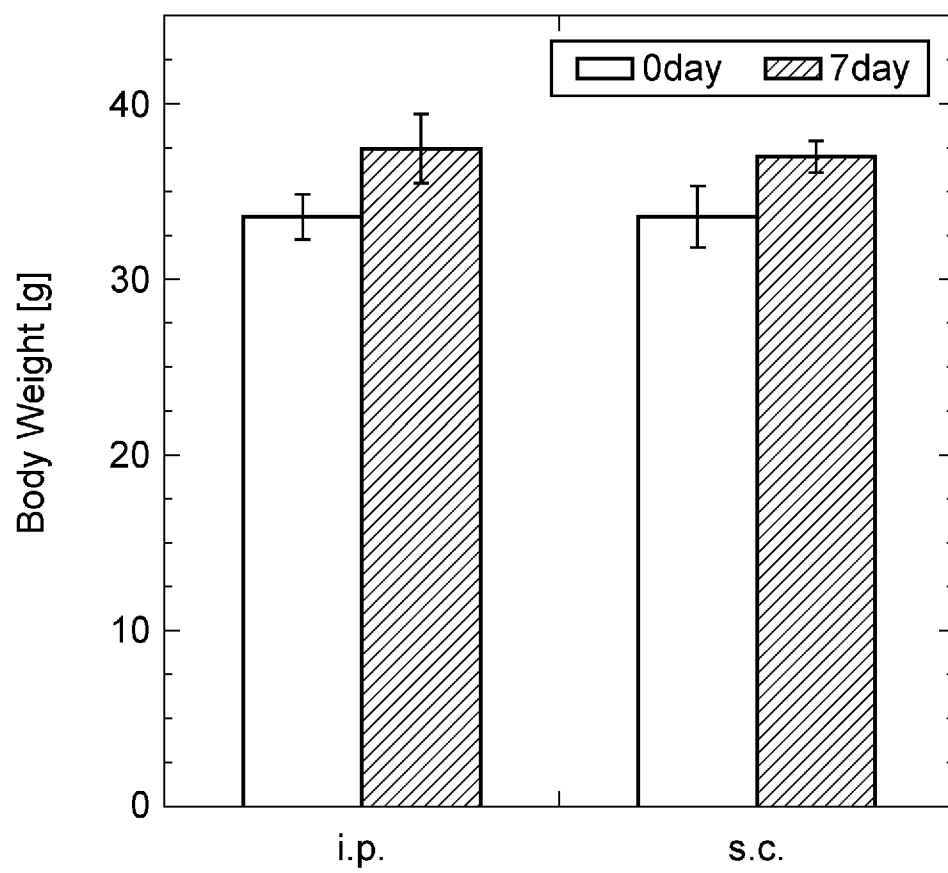
[図5]



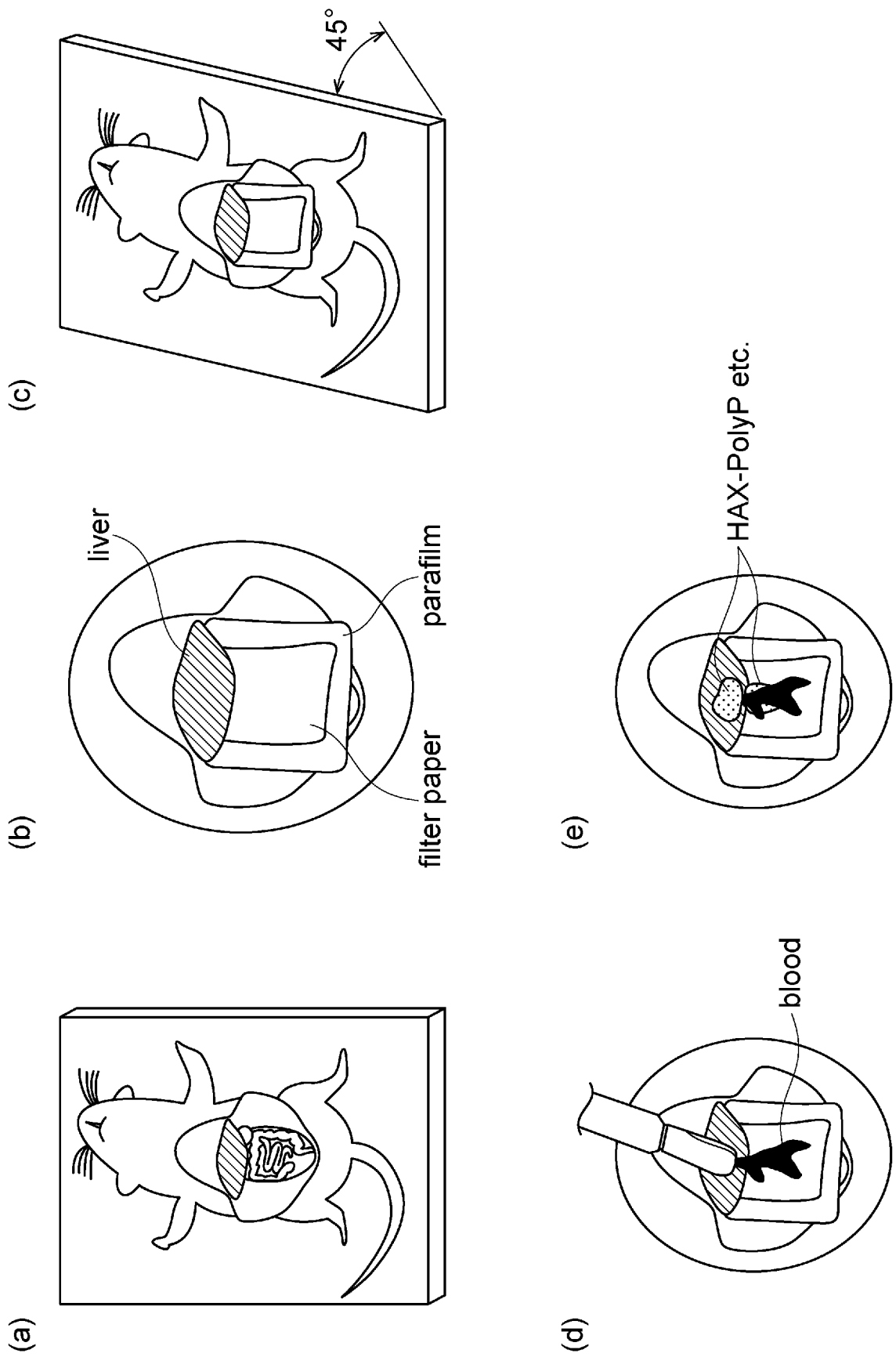
[図6]



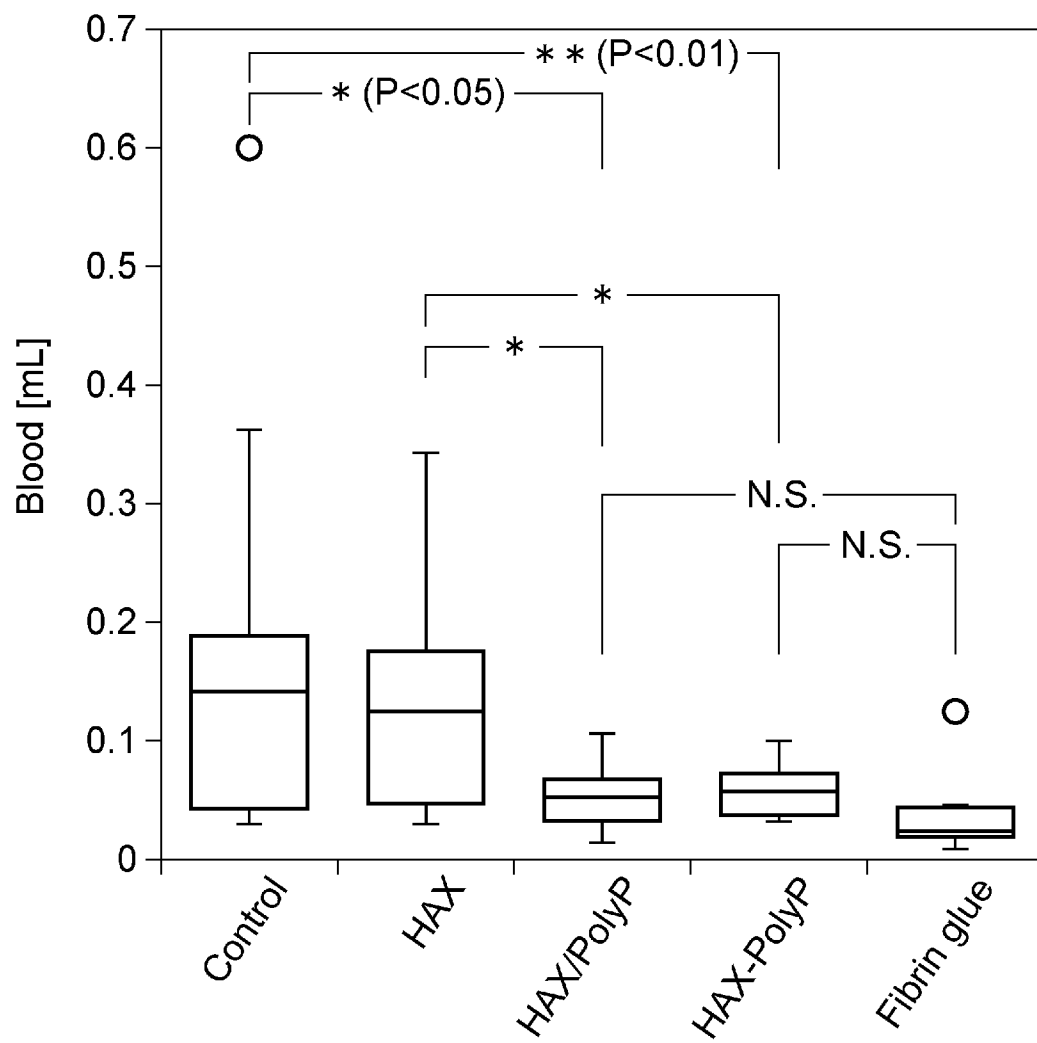
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L31/00(2006.01)i, A61K9/06(2006.01)i, A61K31/728(2006.01)i, A61K47/02(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P7/04(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L31/00, A61K9/06, A61K31/728, A61K47/02, A61K47/48, A61P7/04

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Teruo AOKI et al., "Polyphosphoric Acid Shushoku Hyaluronic Acid Ion Kakyo Gel no Sosei", 34th Abstracts of Annual Meeting of Membrane Society of Japan, 27 April 2012 (27.04.2012), page 71, particularly, fig. 1, 2, entire text	1-12
P, X	US 2015/0335684 A1 (NATIONAL TAIPEI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY), 26 November 2015 (26.11.2015), claims; paragraph [0002] & TW 201544084 A	1, 3, 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 April 2016 (20.04.16)

Date of mailing of the international search report
17 May 2016 (17.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L31/00(2006.01)i, A61K9/06(2006.01)i, A61K31/728(2006.01)i, A61K47/02(2006.01)i,
A61K47/48(2006.01)i, A61P7/04(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. A61L31/00, A61K9/06, A61K31/728, A61K47/02, A61K47/48, A61P7/04

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	青木照夫 ほか, ポリリン酸修飾ヒアルロン酸イオン架橋ゲルの創製, 日本膜学会第34年会 講演要旨集, 2012.04.27, p.71, 特に Fig. 1, 2, 全文	1-12
P, X	US 2015/0335684 A1 (NATIONAL TAIPEI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) , 2015.11.26, Claims, [0002] & TW 201544084 A	1, 3, 4

❑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

❑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「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

20.04.2016

国際調査報告の発送日

17.05.2016

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)

伊藤 基章

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

4146