(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
2022年4月14日(14.04.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/075470 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/455 (2006.01) *A61P 9/12* (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) *C08G 69/40* (2006.01)
A61P 3/02 (2006.01) *C08G 69/48* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/037453

(22) 国際出願日： 2021年10月8日(08.10.2021)

(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 2020-171414 2020年10月9日(09.10.2020) JP

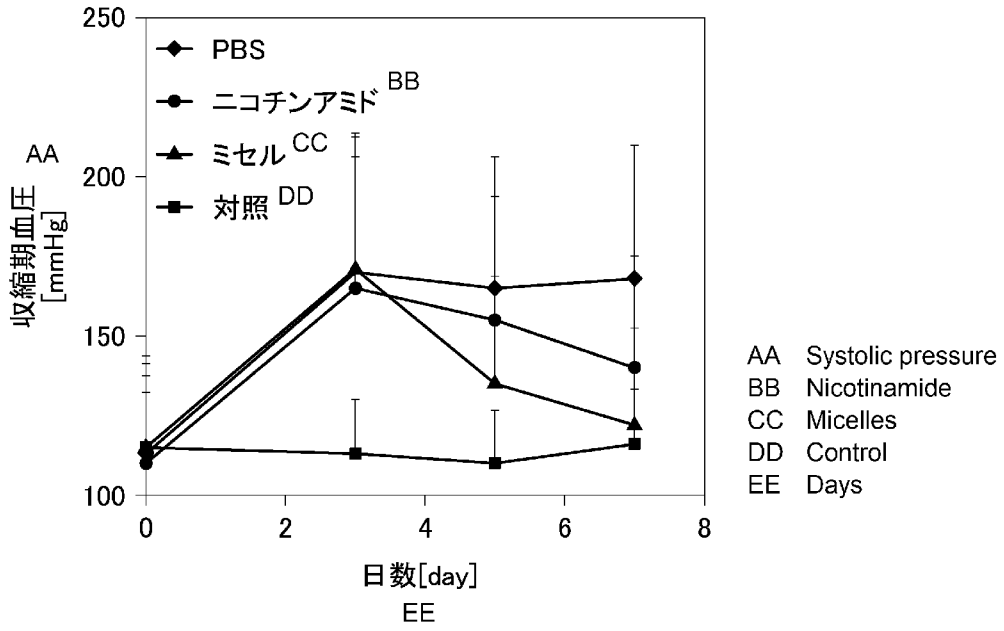
(71) 出願人: 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP). あすか製薬株式会社(ASKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1088532 東京都港区芝浦二丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: カブラル オラシオ(CABRAL, Horacio); 〒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). 宮崎 拓也(MIYAZAKI, Takuya); 〒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). チェン ポンウェン(CHEN, Pengwen); 〒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). 川島 直也(KAWASHIMA, Naoya); 〒2518555 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６

(54) **Title:** NICOTINAMIDE-ENCAPSULATING MICELLES, AND PREGNANCY-INDUCED HYPERTENSION SYNDROME THERAPY COMPOSITION CONTAINING NICOTINAMIDE-ENCAPSULATING MICELLES

(54) 発明の名称： ニコチンアミド内包ミセル、及びニコチンアミド内包ミセルを含む妊娠高血圧症候群治療用組成物

図9



(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a pregnancy-induced hypertension syndrome therapy composition having controlled placental permeability. Provided are nicotinamide-encapsulating micelles having a particle diameter of 25-100 nm. Controlling the particle diameter of the nicotinamide-encapsulating micelles enables

WO 2022/075470 A1

[続葉有]

－１ 湘南ヘルスイノベーションパーク あすか製薬株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人：青 木 篤，外 (**AOKI, Atsushi** et al.)；〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目２３番１号 虎ノ門ヒルズ森タワー 青和特許法律事務所 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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.

(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：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

control of placental permeability so as to make it possible to accumulate nicotinamide-encapsulating micelles in a placenta while suppressing transfer to a fetus. Administering the nicotinamide-encapsulating micelles brings about a superior effect of reducing blood pressure during a pregnancy-induced hypertension syndrome.

(57) 要約：胎盤通過性を制御された妊娠高血圧症候群治療用の組成物の提供を課題とする。粒径が２５～１００ｎｍのニコチンアミド内包ミセルを提供する。ニコチンアミド内包ミセルの粒径を制御することで、胎盤通過性を制御することが可能になり、胎児への移行を抑制しつつ、ニコチンアミド内包ミセルの胎盤への蓄積が可能になる。さらにニコチンアミド内包ミセルを投与することで、妊娠高血圧症候群においてより優れた血圧低下効果が発揮される。

明　細　書

発明の名称 ：

ニコチンアミド内包ミセル、及びニコチンアミド内包ミセルを含む妊娠高血圧症候群治療用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、胎盤通過性が低減された妊娠高血圧症候群治療のための組成物に関する。

背景技術

[0002] 妊娠２０週以降に発症した高血圧を妊娠高血圧症という。通常、妊娠成立後血圧は緩やかに降下し、妊娠２０週以降出産に向けて緩やかに上昇する。妊娠２０週未満で高血圧を有する場合、高血圧合併妊娠と呼ぶ。妊娠高血圧症は、さらに蛋白尿や浮腫を伴うことがある。妊娠中の高血圧に随伴的に生じる症状をまとめて、妊娠高血圧症候群という。妊娠高血圧症候群は、妊娠高血圧、妊娠高血圧腎症、加重型妊娠高血圧腎症に分類され、妊娠高血圧症候群が重症化すると、子癇、脳出血、肝機能障害、ＨＥＬＬＰ症候群、腎機能障害、神経障害、血液凝固障害、胎児発育不全、胎盤早期剥離といった合併症を引き起こす。

[0003] 妊娠高血圧症候群と診断された場合、安静・食事療法などにより経過を観察するが、改善が見られない場合に降圧薬の投与が行われる。一方、降圧薬は、胎児の低酸素・低栄養を引き起こし、発育不良を引き起こす可能性がある。したがって、降圧薬の投与は医師の管理下で慎重に行われなくてはならない。また、催奇性の問題から、妊婦に対し禁忌の薬剤が多く、使用可能な薬剤であってもその効果が十分でない場合もある。

[0004] 降圧薬の投与を行っても十分な治療効果が得られず、母体や胎児に命の危険性が生じる場合には、帝王切開や分娩誘発により妊娠の中断を選択することもある。妊娠を中断させることで、妊娠高血圧症候群の症状は通常回復するが、重症化している場合には、産後も高血圧や蛋白尿などの症状が継続す

ることもある。新生児集中治療の進歩により、早期に出産された低体重児の生存率も向上しているが、成長後に後遺症を発症することもあり、妊娠高血圧症候群の治療方法の確立が望まれている。

[0005] ニコチンアミドは、ｃｙｃｌｉｃ ＡＤＰリボースの合成酵素であるＡＤＰリボシルサイクラーゼを阻害し、エンドテリン－１（ＥＴ－１）やアンジオテンシンＩＩ（ＡｎｇＩＩ）による血管収縮を抑制することが知られている。またニコチンアミドは催奇性や発がん性が無いと報告されている（非特許文献１：Diabetologia (2000) vol. 43(11), 1337 - 45）。またニコチンアミドは、ビタミン剤として妊婦にも投与されており、妊娠高血圧症候群の治療又は予防薬としての開発が進行している（特許文献１：特開２０１５－３０７２１号公報）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２０１５－３０７２１号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Diabetologia (2000) vol. 43(11), 1337 - 45

非特許文献2：Macromol. Biosci. (2020) (20) 1900161

非特許文献3：H. Cabral et. al., Nat. Nanotech. 6 (2011) 815-823

非特許文献4：K. Shintaku et. al., Drug Metab. Dispos. 37 (2009) 962

非特許文献5：J. R. Huston et. al., Clin. Pharmacol. Ther. 90 (2011) 67

非特許文献6：M. Nagai et. al., Drug Metab. Dispos. 41 (2013) 2124

非特許文献7：F. Li et. al., PNAS (2016) , vol. 113, No.47 13450-13455

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 妊娠高血圧症候群の治療薬として、ニコチンアミドを含む治療薬の開発が進められている。ニコチンアミドは、ヒトに対する催奇性や発癌性について

の安全性が確認されている量で、妊婦の血圧を下げることが報告されている。しかしながら、妊婦へ投与された場合に、胎盤を通過して胎児に作用する場合の影響は、催奇性や発癌性のみならず、神経毒性など多面的に評価する必要がある。したがって、胎盤通過性が低減され、また作用部位への標的化された薬剤の開発が望まれている。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、薬剤の胎盤通過性について鋭意研究を行った結果、親水性ポリマーや疎水性ポリマーの構造を改変しナノ粒子の大きさを制御することにより、胎盤通過性を抑制できることを見出した。また胎盤通過性が抑制された結果、ナノ粒子が胎盤へ蓄積することを見出し、本発明に至った。そこで、本発明は以下に関する：

[0010] ［１］ ニコチンアミドがアミノ酸側鎖に結合されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーから形成されたニコチンアミド内包ミセルであって、動的光散乱法により測定した場合に粒径が２５～１００ｎｍである、前記ミセル。

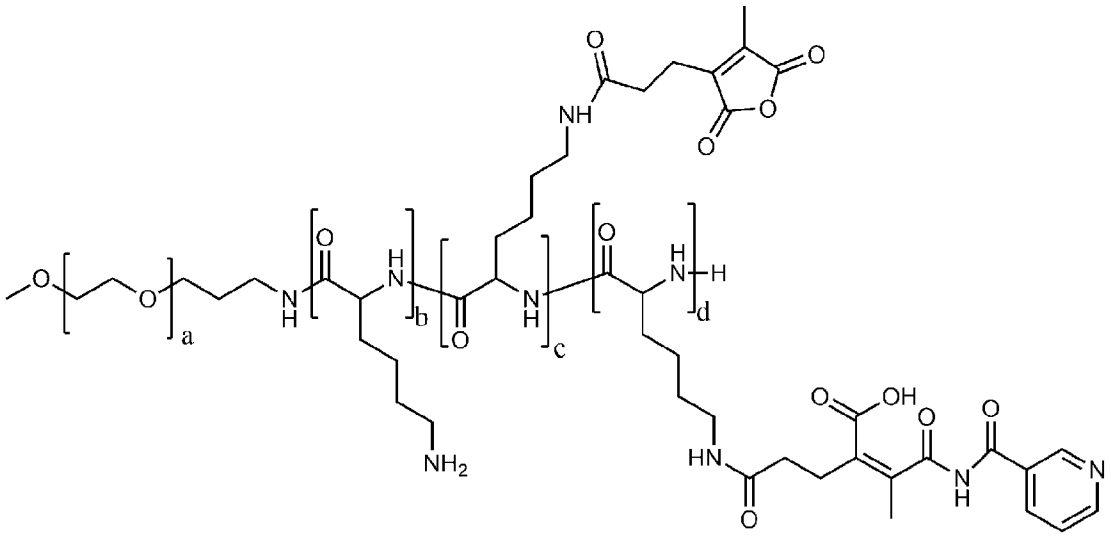
［２］ 前記ポリエーテルーポリアミノ酸ブロックコポリマーが、アミノ酸ブロックとして、リジンを含む、項目１に記載のミセル。

［３］ 前記ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーが、ポリエチレングリコール－ポリアミノ酸ブロックコポリマーである、項目１又は２に記載のミセル。

［４］ ニコチンアミドが、カルボキシメチル無水マレイン酸反応性基を介して、アミノ酸側鎖に結合される、項目１～３のいずれか一項に記載のミセル。

［５］ 前記ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーが、以下の：

[化1]



（式中、ａ＝４５～２０００、ｂ＝０～２０、ｃ＝０～３９及びｄ＝１～４０である）

で表される化合物である、項目１～４のいずれか一項に記載のミセル。

［６］　前記ニコチンアミド内包ミセルの粒径が、３０～５０ｎｍである、項目１～５のいずれか一項に記載のミセル。

［７］　項目１～６のいずれか一項に記載のミセルを含む、組成物。

［８］　妊婦における高血圧の治療又は予防用の組成物である、項目７に記載の組成物。

［９］　妊婦における高血圧が、妊娠高血圧症候群、並びに妊娠高血圧症候群に起因する流産・早産、及び／又は子宮内胎児発育不全である、項目８に記載の組成物。

［１０］　胎児への移行性が低減された、項目７～９のいずれか一項に記載の組成物。

［１１］　胎盤標的化組成物である、項目７～１０のいずれか一項に記載の組成物。

［１２］　妊娠高血圧治療のための、ニコチンアミド内包ミセルの製造方法であって、

ニコチンアミドと、アミノ酸側鎖にカルボキシメチル無水マレイン酸反応

基を含むポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーとを反応させる工程；

ニコチンアミドが搭載されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーを精製する工程；

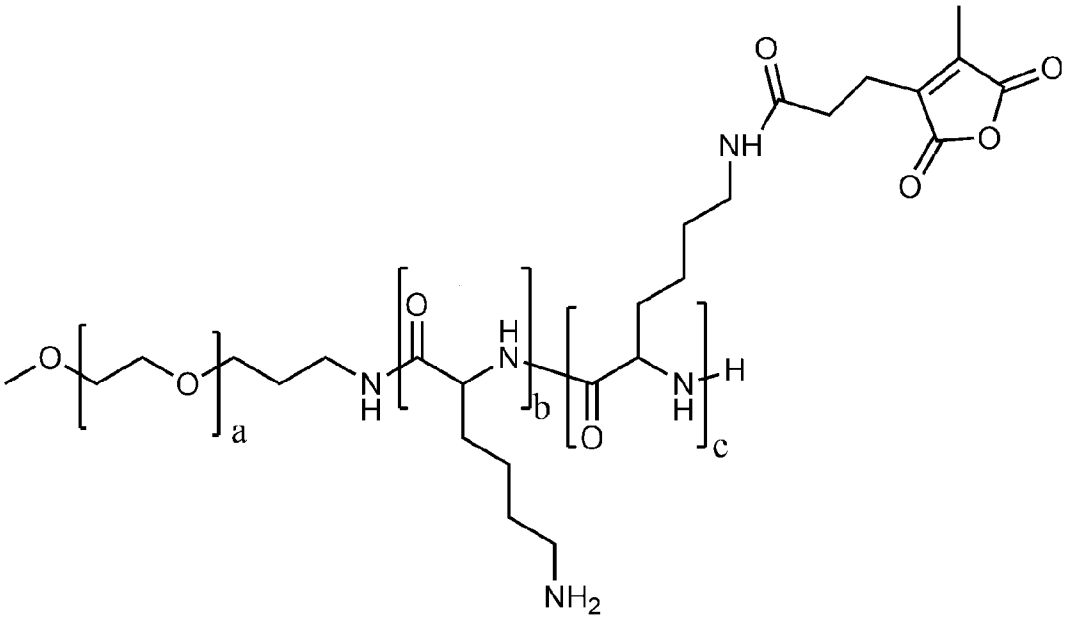
ニコチンアミドが搭載されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーを極性溶媒中に溶解する工程；

分画分子量３５００～１６０００の透析膜を用いて限外ろ過を行って、動的光散乱法により測定した場合に２５～１００ｎｍの粒径を有するミセルを取得する工程、

を含む、前記方法。

［１３］　前記アミノ酸側鎖にカルボキシメチル無水マレイン酸反応基を含むポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーが、以下の式：

[化2]



（式中、ａ＝４５～２０００、ｂ＝０～２０、及びｃ＝１～６０である）

で表される、項目１２に記載の方法。

［１４］妊婦における高血圧の治療又は予防において使用するための、項目１～６のいずれか一項に記載のミセル。

［１５］妊娠高血圧症候群、流産・早産、及び／又は子宮内胎児発育不全の治療又は予防において使用するための、項目１～６のいずれか一項に記載のミセル。

［１６］胎児への移行性の低減を介する、項目１４又は１５に記載のミセル。

［１７］胎盤への蓄積を介する、項目１４又は１５に記載のミセル。

［１８］妊娠中の対象において、高血圧を治療又は予防する方法であって、

項目１～６のいずれか一項に記載のミセルを、前記対象に投与することを含む、

前記方法。

［１９］妊娠中に高血圧を患う対象において、妊娠高血圧症候群、流産・早産、及び／又は子宮内胎児発育不全を治療又は予防する方法であって、

項目１～６のいずれか一項に記載のミセルを、前記対象に投与することを含む、前記方法。

［２０］胎児への移行性の低減を介する、項目１８又は１９に記載の方法。

［２１］胎盤への蓄積を介する、項目１８又は１９に記載の方法。

［２２］妊婦における高血圧の治療又は予防用の医薬の製造のための、項目１～６のいずれか一項に記載のミセルの使用。

［２３］　妊娠高血圧症候群、流産・早産、及び／又は子宮内胎児発育不全の治療又は予防用の医薬の製造のための、項目１～６のいずれか一項に記載のミセルの使用。

［２４］胎児への移行性の低減を介する、項目２２又は２３に記載の使用。

［２５］胎盤への蓄積を介する、項目２２又は２３に記載の使用。

発明の効果

[0011]　本発明のニコチンアミド内包ミセルは、胎盤通過性が低減されており、胎児へのニコチンアミドの移行が抑制される。一方で、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれると、小胞体中の低ｐＨ環境下でニコチンアミドが放出され、エンドサイトーシスを行った細胞に作用することが可能になる。

また、ミセル化によりニコチンアミドの血中滞留性が増大する一方、胎盤への蓄積が増大する。さらにニコチンアミドのミセル化により、妊娠高血圧症候群の対象における血圧低下効果が増大する。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１Ａは、ポリエチレングリコール－ポリ（リジン）－ブロックコポリマー（ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ））のＮＭＲデータを示す。図１Ｂは、ＧＰＣデータを示す。

[図2]図２は、ポリエチレングリコール－ポリ（リジン－カルボキシメチルマレイン酸無水物）－ブロックコポリマー（ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＣＤＭ））のＮＭＲデータを示す。

[図3]図３は、ニコチンアミド結合ポリエチレングリコール－ポリアミノ酸ブロックコポリマー（ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＣＤＭ－ＮＡ））のＮＭＲデータを示す。

[図4]図４は、ニコチンアミド内包ミセル（ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＣＤＭ－ＮＡ）のミセル）のＮＭＲデータを示す。

[図5]図５は、ニコチンアミド内包ミセルを生理条件（ｐＨ７．４）及び小胞内条件（ｐＨ５．５）の外液に対して透析された場合の、外液中のニコチンアミドの放出量を表す。

[図6]図６は、ニコチンアミド及びニコチンアミド内包ミセルのそれぞれについて、ヒト胎盤還流モデルを用いて胎盤通過性を調べた結果を示す。

[図7]図７は、正常妊娠マウスに対しニコチンアミド及びニコチンアミド内包ミセルをそれぞれ、尾静脈投与した場合の血中滞留性を示す。

[図8]図８は、正常妊娠マウスに対しニコチンアミド及びニコチンアミド内包ミセルをそれぞれ、尾静脈投与した場合の胎盤蓄積性（１）及び胎児蓄積性（２）を示す。

[図9]図９は、妊娠高血圧マウスモデルにおいて、ニコチンアミド及びニコチンアミド内包ミセルの妊娠高血圧治療効果を調べた結果を示す。

[図10]図１０は、正常妊娠マウスに対しニコチンアミド及びニコチンアミド

内包ミセルをそれぞれ、尾静脈投与した場合の胎盤蓄積性（１）と、高血圧モデルマウスに対しニコチンアミド及びニコチンアミド内包ミセルをそれぞれ、尾静脈投与した場合の胎盤蓄積性（２）を示す。

[図11]図１１は、高分子ミセルの胎盤および胎児への集積性を示す写真である。

[図12]図１２は、ヒト胎盤灌流モデルによる薬剤の胎盤透過性を示すグラフである。図１２Ａでは、オキサリプラチン、３０ｎｍダハプラチン内包ミセル、７０ｎｍダハプラチン内包ミセル、及び８－ａｒｍＰＥＧについての結果を示す。図１２Ｂでは、１０ｎｍ、２０ｎｍ、３０ｎｍのＰＥＧ被覆金ナノ粒子について結果を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解される。従って、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語及び科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で特定される数値範囲は、その下限値及び上限値を含むものとする。

[0014] ［定義］

［ニコチンアミド］

ニコチンアミド（nicotinamide）は、ＩＵＰＡＣ名：ピリジン－３－カルボキシアミドの化合物である。ニコチンアミドはナイアシンアミドもしくはニコチン酸アミドとも呼ばれ、ビタミンＢ群に含まれる水溶性ビタミンである。ビタミンB_3であるニコチン酸（ナイアシン）は肝臓でニコチンアミドに変換され、ビタミンとしての機能はニコチンアミドとほぼ同じである。ニコチンアミドはｃｙｃｌｉｃＡＤＰリボースの合成酵素であるＡＤＰリボシルサイクラーゼを強力に阻害し、ＥＴ－１やＡｎｇＩＩによる血管収縮を抑制することが知られている。ニコチンアミドは、通常の投与量での催奇形性・発癌性がなく、ペラグラ（ニコチン酸欠乏症）やニコチン酸の経口摂取が十

分でない妊婦のための安全な医薬あるいは食品（ビタミン剤）として利用されている。

[0015] ［妊娠高血圧症候群］

妊娠高血圧症候群とは、高血圧を主体とし、浮腫、蛋白尿をきたす病態であり、日本産科婦人科学会よれば「妊娠２０週以降、分娩後１２週までに高血圧が見られる場合、または高血圧に蛋白尿を伴う場合のいずれかで、かつこれらの症状が単なる妊娠の偶発合併症によるものではないものをいう」と定義されている。

[0016] ［ミセル］

本発明において、ミセルとは、親水性部分と疎水性部分を含む多数の分子が、疎水性相互作用により会合した集合体をいう。親水性部分と疎水性部分とを含むポリマーは、親水性部分を外側とし、疎水性部分を内側に配置したミセルを形成する。本発明では、親水性部分と疎水性部分を含む分子として、ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーがミセルを形成する。

[0017] ［ブロックコポリマー］

ブロックコポリマーとは、複数種のモノマーが、それぞれ順番に重合して複数の領域を形成する重合体をいう。領域の数は任意に選択されるが、本発明では特にポリエーテル領域と、ポリアミノ酸領域から形成されるジブロック体のコポリマーを指す。ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーは、ポリエーテルから形成される親水性部分と、側鎖の性質により疎水性となるポリアミノ酸の疎水性部分とを含む。ポリアミノ酸の側鎖には、薬剤を導入することができ、薬剤が導入された側鎖が疎水性になり、ミセルの疎水性コアを形成する。ポリエーテルとしては、十分な親水性を有する観点から、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングルコール、ポリブチレングリコールなどが選択され、最も好ましくはポリエチレングリコールである。

[0018] ［胎盤］

胎盤は、母体と胎児とを連絡する器官である。胎盤を介して、酸素や二酸化炭素などのガス交換、栄養素の吸収、老廃物の放出がされる。また、胎盤

からはプロゲステロンやエストロゲンといったホルモンが分泌されて妊娠継続に寄与する。さらに胎盤からは、血管拡張因子やその拮抗因子といった血圧調節因子なども分泌されており、これらの作用により妊娠高血圧症候群が生じると考えられている。胎盤は、母体由来の脱落膜（dedidua）（Ｄ）層と胎児側のラビリンス（labyrinth）（Ｌ）層と、Ｄ層とＬ層との間の海綿状栄養膜細胞（spongiotrophoblast）（Ｓ）層から構成される。胎盤を介して母体側と、胎児側とで血中の物質が自由に行き来できるわけではなく、胎盤関門とも呼ばれている。ミセルの粒径を制御することで、胎盤通過性が変動する。一例として、非限定的に、粒径３０ｎｍのミセルであれば、Ｄ層、Ｓ層までの移行みられる一方、胎児への移行は抑制される。さらに粒径が７０ｎｍのミセルであれば、Ｄ層までしか移行しない（図１１）。胎盤を通過しないミセルの一部は、胎盤に蓄積する。本発明に係るニコチンアミド内包ミセルは、ヒト胎盤を通過して胎児側へと移行することができない一方、ミセル化されていないニコチンアミドはヒト胎盤を通過し、胎児側へと移行する（図６）。胎盤に蓄積したミセルは、胎盤を構成する細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれて作用する。したがって、本発明の別の態様では、本発明のミセルを含む組成物は、胎盤標的用、胎児薬害低減用又は胎盤関門通過低減用の医薬組成物として使用しうる。

[0019] 本発明は、ニコチンアミドが結合されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーから形成されたニコチンアミド内包ミセルに関する。ミセルの粒径は、動的光散乱法により測定した場合に２５～２００ｎｍであることを特徴とする。胎盤通過性の観点から、通常、粒径は２５ｎｍ超であり、好ましくは３０ｎｍ以上であり、さらに好ましくは３５ｎｍ以上である。肝臓の細網内皮系を回避するという観点から、通常、粒径は２００ｎｍ以下であり、好ましくは１００ｎｍ以下であり、胎盤を標的化するという観点から、より好ましくは７５ｎｍ以下である。このサイズの粒子であれば、胎盤通過性が低く、胎児への影響を低減することができる。本発明の組成物において、粒子の粒径の多分散度（ＰＤＩ）は、０．２以下が好ましく、さらにより

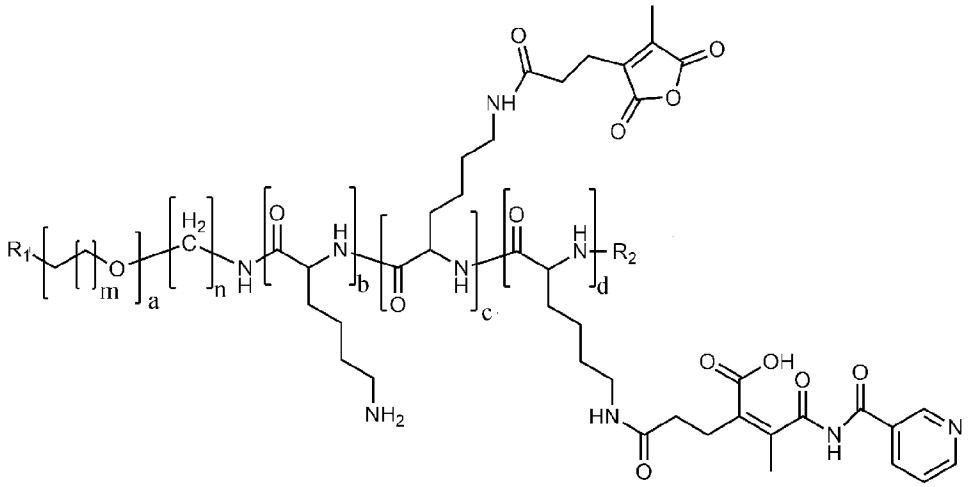
好ましくは０．１５以下である。ニコチンアミドと、ニコチンアミド内包ミセルとを比較すると、血中滞留性が改善される（図７）。ニコチンアミドは投与後に速やかに吸収される一方、ニコチンアミド内包ミセルは血中滞留性が高く、持続性の薬効を発揮することができる。また、ニコチンアミドを投与した場合、投与後１０分以内に組織への蓄積がピークとなり、胎盤及び胎児の両組織へと蓄積する一方、ニコチンアミド内包ミセルを投与した場合、胎盤への蓄積のピークは２０分を超えており、またその蓄積量も増大した一方、胎児への蓄積は抑制される（図８）。また、高血圧モデルでは、正常モデルと比較して胎盤への蓄積量がより増大し、作用部位である胎盤において作用し、速やかに血圧を低下させることが期待される（図１０）。ニコチンアミドは、血管内皮に作用し血圧を低下させる他、作用部位の１つとされている胎盤において作用し、胎盤からのｓＦｌｔ１の産生を抑制する（非特許文献７：PNAS （2016）, vol. 113, No.47 13450-13455)。ｓＦｌｔ１は、胎盤から生成される血管増殖因子阻害タンパク質であり、妊娠高血圧に寄与する。実際に、妊娠高血圧モデルマウスにニコチンアミド内包ミセルを投与した場合の血圧低下効果は、ニコチンアミドを投与した場合の血圧低下効果よりも高く、ニコチンアミドの所望の作用部位に集積して作用していることが推察される（図９）。

[0020] ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーから形成されたミセルは、ｐＨ依存性の薬剤放出特性を有する。かかる薬剤放出特性は、ブロックコポリマー中のポリエーテルのユニット数、アミノ酸の種類及びユニット数、並びに内包する薬剤の種類及び量により変化しうる。本発明に係るニコチンアミド内包ミセルは、血液中などの生理的ｐＨであるｐＨ７．４では、２４時間で１０％程度のニコチンアミドを放出するのに対し、ｐＨ５．５では、２４時間で約７０％超のニコチンアミドを放出する。ミセルは、生体内においてエンドサイトーシスにより細胞中に取り込まれ、小胞体中に配置される。小胞体のｐＨは、生理的ｐＨより低く、通常ｐＨ５．５程度である。したがって本発明のニコチンアミド内包ミセルは、細胞に取り込まれ小胞体中に

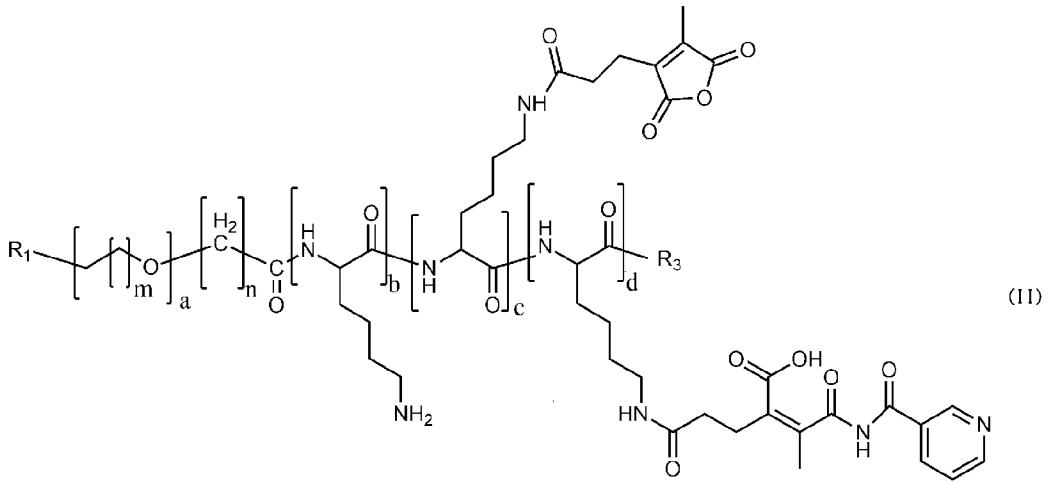
配置されると、薬剤を放出し細胞に直接作用する。

[0021] 本発明において使用されるポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーにおいて、ポリアミノ酸部分は、内包するニコチンアミドとの結合性の観点から任意に選択することができる。一例として、リジンを用いることができる。製造を容易にする観点から、１種類のアミノ酸が用いられることが好ましいが、複数種のアミノ酸を用いてもよい。リジンのアミン基に無水ジカルボン酸反応基を結合させることで、さらにニコチンアミドを結合することができる。本明細書中の式において、無水カルボン酸反応基として、カルボキシメチル無水マレイン酸（ＣＤＭ）（IUPAC名：２，５－ジヒドロ－４－メチル－２，５－ジオキソ－３－フランプロパン酸）を使用して表されるが、他の無水カルボン酸反応基が使用されてもよい。本発明のニコチンアミド内包ミセルを形成するブロックコポリマーは、一例として、下記の式（Ｉ）又は（ＩＩ）：

[化3]



(I)



(II)

（式中、

R_1はポリエーテルの末端基であり、

R_2及びR_3は、それぞれポリアミノ酸の末端基であり、

ｎ＝１～５

ｍ＝１～３

ａ＝４５～２０００、

ｂ＝０～２０、

ｃ＝０～３９、及び

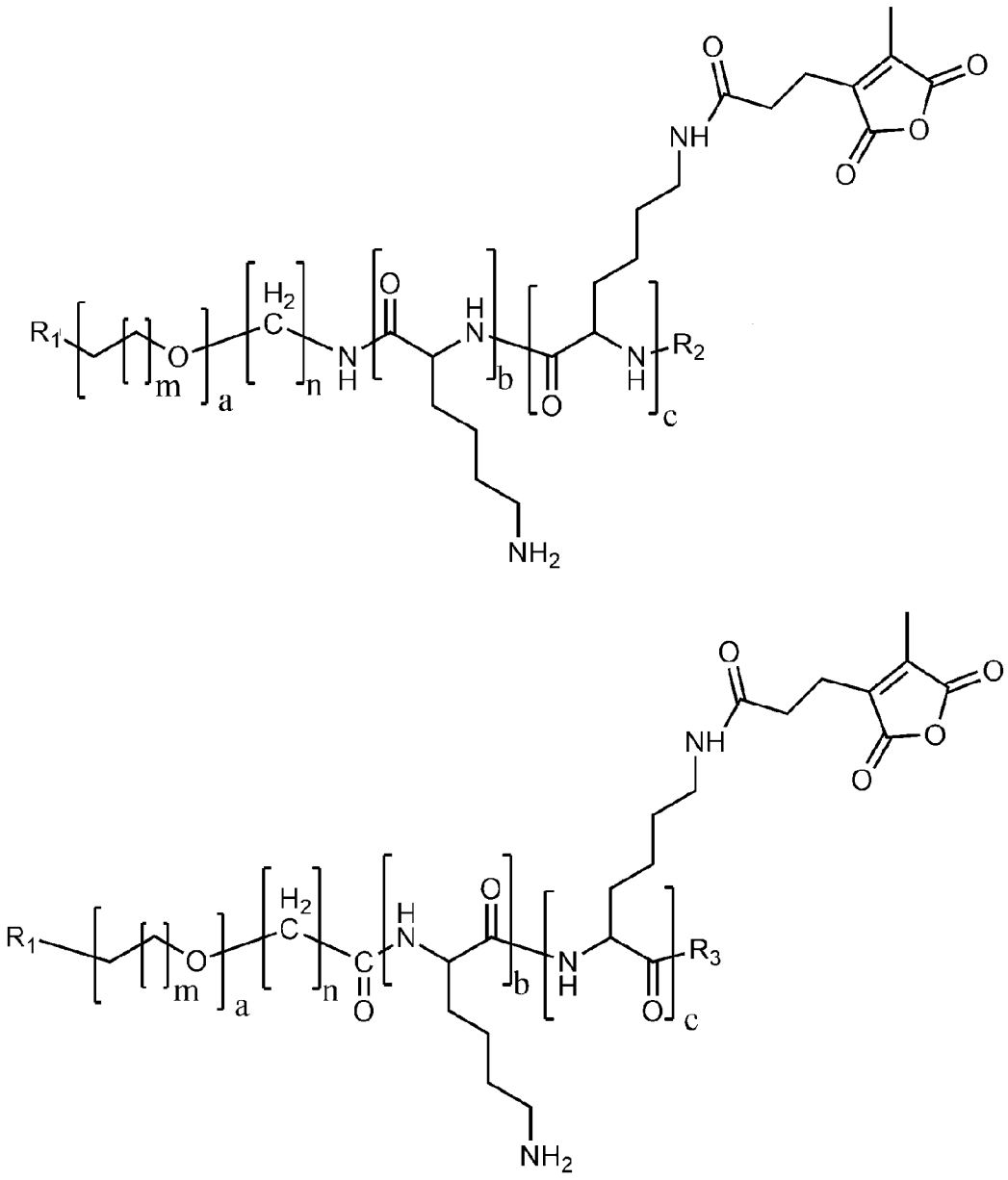
ｄ＝１～４０である）で表される。

式（Ｉ）と式（ＩＩ）のポリマーは、親水性であるポリエーテル部分と、

疎水性であるポリアミノ酸部分とを連結する基を変更することで、ポリアミノ酸の配向のみを変化させた関係にある。これらのコポリマーは、コポリマーとしての性質は同等であり、いずれのコポリマーも使用できる。一方の配向のコポリマーを例示として言及している場合も、他方の配向のコポリマーについても包含するものとする。

[0022] ニコチンアミド導入前のポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーは下記式：

[化4]



（式中、

R_1はポリエーテルの末端基であり、

R_2及びR_3は、それぞれポリアミノ酸の末端基であり、

ｎ＝１～５

ｍ＝１～３

ａ＝４５～２０００、

ｂ＝０～２０、及び

ｃ＝１～６０である）で表される。

[0023] R_1は、ポリエーテルの末端基であり、通常コポリマーに通常用いられる任意の基であってよく、一例として水素原子、水酸基又は未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝のC_{1-12}アルキル基又はC_{1-12}アルコキシ基を表す。

R_2は、ポリアミノ酸の末端基であり、通常コポリマーに通常用いられる任意の基であってよく、一例として水素原子、保護基、疎水性基又は重合性基を表す。

R_3は、ポリアミノ酸の末端基であり、通常コポリマーに通常用いられる任意の基であってよく、一例として水酸基、オキシベンジル基、－ＮＨ－（CH_2）$_m$－Ｘ基又は開始剤残基を表し、ここで、ｍは１～５の整数であり、Ｘは、一級、二級、三級アミン又は四級アンモニウム塩の内の１種類又は２種類以上を含むアミン化合物残基、又は、アミンでない化合物残基である。

[0024] ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーのポリエーテルの繰り返し数ａは、ミセルを形成する観点から、４５以上が好ましく、さらに好ましくは２００以上であり、またミセルの大きさを制御する観点から、２０００以下が好ましく、さらに好ましくは５００以下である。

[0025] ＣＤＭ未結合リジン残基数ｂは、ＣＤＭとアミノ酸側鎖との反応率に応じて決定される。ポリマーに対するＣＤＭ量を過剰にすることで、ＣＤＭ未結合リジン残基数は低減することができる。ニコチンアミド結合ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーにおいて、ニコチンアミド数を増加させる観点から、ｂは２０以下が好ましく、より好ましくは５以下である。

[0026] ニコチンアミド未結合ＣＤＭ結合リジン残基数ｃは、ニコチンアミドが結合していないＣＤＭが結合されたリジン残基数を表す。ニコチンアミド未結合ＣＤＭ結合リジン残基数ｃは、最終生成物であるニコチンアミド結合ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーにおいて、ＣＤＭとニコチンアミドとの反応率に応じて決定されるが、ニコチンアミドを搭載する観点から低減することが好ましく、３９以下、通常１０以下、より好ましくは５以下である。最も好ましくは０であってもよく、その場合ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーに存在するＣＤＭ結合リジンの全てにニコチンアミドが搭載されていることを示す。中間生成物であるニコチンアミド導入前のポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーにおいて、ニコチンアミド未結合ＣＤＭ結合リジン残基数ｃは、リジン残基と、無水ジカルボン酸反応基との反応率に応じて決定される。ニコチンアミド未結合ＣＤＭ結合リジン残基数ｃはミセル中に搭載するニコチンアミドの分子数に応じて適宜選択することができ、搭載されるニコチンアミドの分子数を多くする観点、又は疎水性を高めミセル安定性を高める観点から１０以上が好ましく、さらに好ましくは２０以上であり、さらにより好ましくは３０以上であってもよい。ニコチンアミド未結合ＣＤＭ結合リジン残基数ｃはミセルを安定化させる観点から、通常６０以下、例えば４０以下である。

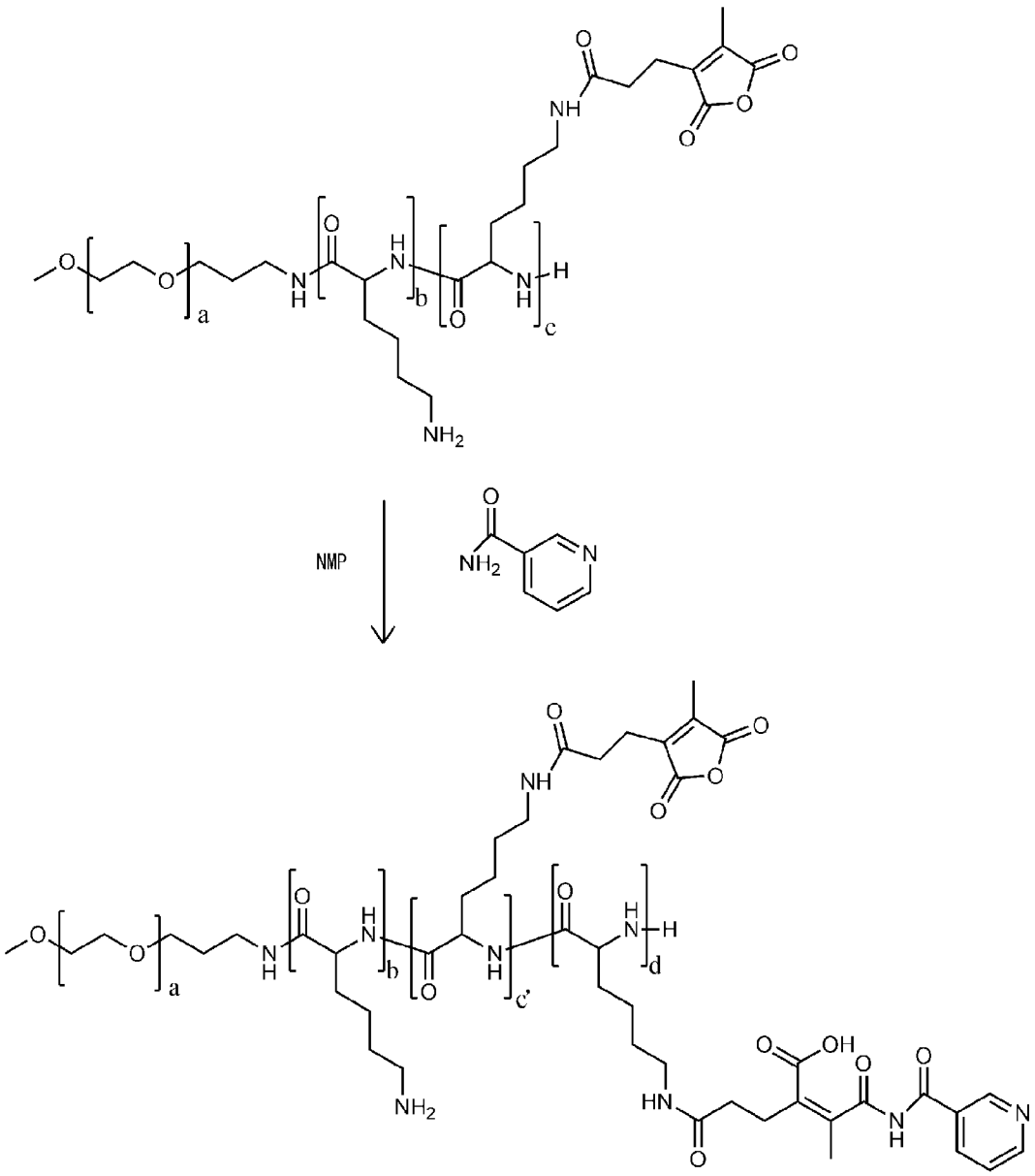
[0027] ニコチンアミド結合リジン残基数ｄは、ミセル中に搭載するニコチンアミドの分子数に応じて適宜選択することができ、搭載されるニコチンアミドの分子数を多くする観点、又は疎水性を高めミセル安定性を高める観点から１０以上が好ましく、さらに好ましくは２０以上であり、さらにより好ましくは３０以上であってもよい。ニコチンアミド結合リジン残基数ｄの最大値は、ニコチンアミド導入前のポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーにおいて、ニコチンアミド未結合ＣＤＭ結合リジン残基数ｃに等しくなる。

[0028] ポリアミノ酸総数は、ポリエーテル数とブロックコポリマーの性質に応じて任意に決定することができ、一例として２～８０であり、好ましくは２０～６０、より好ましくは３０～５０である。最終生成物であるニコチンアミ

ド結合ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーにおいて、ＣＤＭ未結合リジン残基数ｂ、ニコチンアミド未結合ＣＤＭ結合リジン残基数ｃ、及びニコチンアミド結合リジン残基数ｄの合計は、ポリアミノ酸総数を超えることはない。中間生成物であるニコチンアミド導入前のポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーにおいて、ＣＤＭ未結合リジン残基数ｂ及びニコチンアミド未結合ＣＤＭ結合リジン残基数ｃの合計は、ポリアミノ酸総数を超えることはない

[0029] ニコチンアミドは、ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーのポリアミノ酸側鎖に結合された反応性基を介して結合する。反応性基はさらにリンカーを介していてもよい。反応性基は搭載薬剤であるニコチンアミドとの結合性を考慮し、任意に選択することができる。反応性基の一例として、無水ジカルボン酸反応基、例えばカルボキシメチル無水マレイン酸（ＣＤＭ）、無水マレイン酸、無水コハク酸等を使用することができる。リジン側鎖に結合された無水ジカルボン酸が、ニコチンアミドのアミンと反応する。一例として、以下の反応により、ニコチンアミドが結合されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーが生成する。カルボキシメチル無水マレイン酸が結合された側鎖全てにニコチンアミドが結合していてもよいが、反応率に応じてニコチンアミドが未結合のカルボキシメチル無水マレイン酸が存在することもある。カルボキシメチル無水マレイン酸は、周囲環境に応じて、カルボキシメチルマレイン酸として存在してもよい。

[化5]



（式中、a＝４５～２０００、b＝０～２０、ｃ＝ｃ’＋ｄ、ｃ’＝０～３９及びｄ＝１～４０である）

[0030] 本発明において使用されるポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーに搭載されるニコチンアミドの導入率は、所望の粒径のニコチンアミド内包ミセルを調製できれば、特に限定されないが、一例として６０～９０％であり、１ポリマーあたり平均で１０～２０個搭載される。一方、ミセル調製過程、又は分析過程のいずれかにおいて、ニコチンアミドはポリマーから脱

落することがある。したがって、ミセル形成後のポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーに搭載されるニコチンアミドの導入率は、ミセル形成前の導入率より低くなる。通常、５～１０％低くなり、ミセル形成後のポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーに搭載されるニコチンアミドの導入率は、５０～８０％であり、１ポリマーあたり平均で５～２０個搭載される。

[0031] 本発明の別の態様では、２５～１００ｎｍの粒径を有するニコチンアミド内包ミセルの製造方法にも関する。具体的には、以下の：

ニコチンアミドと、アミノ酸側鎖に無水ジカルボン酸反応基を含むポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーとを反応させる工程；

ニコチンアミドが搭載されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーを精製する工程；

ニコチンアミドが搭載されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーを極性溶媒中に溶解する工程；

分画分子量３５００～１６０００の透析膜を用いて透析を行う工程、

を含む。動的光散乱法により測定した場合に２５～１００ｎｍの粒径を有するミセルを取得するために、透析膜を変更して複数回透析を行ってもよい。本発明のさらに別の態様では、当該方法により製造された２５～１００ｎｍの粒径を有するニコチンアミド内包ミセルにも関する。

[0032] 本発明の２５～１００ｎｍの粒径を有するニコチンアミド内包ミセルの製造方法は、前工程として、アミノ酸側鎖に無水ジカルボン酸反応基を含むポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーを調製する工程を含んでもよい。具体的に、ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーと、無水ジカルボン酸の塩化アシル物を混合して反応させる工程を含む。

[0033] ニコチンアミドと、無水ジカルボン酸反応基との反応は、任意の溶媒中で行うことができ、一例としてｎ－メチル－２－ピロリドン、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミドや緩衝溶液中で行われてもよい。

[0034] ニコチンアミドが搭載されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーの精製は、ジエチルエーテル、ヘキサンなどの有機溶媒に添加することで、沈殿を取得し、次いで減圧濾過法によりポリマーを回収することで行われる。

[0035] ニコチンアミドが搭載されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーは、極性溶媒、例えば緩衝溶液中に溶解させることでミセルを形成する。こうして形成されたポリマーミセルは、通常２０ｎｍ～１００ｎｍの粒径を有するミセルの集合として得られる。この中で、結合していないポリマーや薬剤を除去することにより精製する必要がある。ミセルの精製方法として典型的なものとて、限外濾過法、透析法が挙げられる。透析法としては、例えば分画分子量３５００～１６０００の透析膜を用い、ＰＢＳに対して透析が行われる。透析法により、ミセルを形成していないポリマーや薬剤、所望サイズ外のミセルを除くことができる。さらに、所望のミセルの粒径に合わせたフィルターを用いて限外濾過することにより、所望の粒径のミセルを取得することができる。一例として限外濾過に用いるフィルターは、分画分子量１０００～１０００００のフィルターを使用することができる。透析及び／又は限外濾過を複数回行うことで、より分散度の低いミセルを得ることができる。

[0036] 得られたミセルを形成するポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーに対するニコチンアミドの導入率は、ミセル溶液を凍結乾燥し、^{1}Ｈ－ＮＭＲを行うことで、決定することができる。また、ミセルの品質は、動的光散乱法によりミセルの粒径を決定し、またゲル浸透クロマトグラフィーにより分散度を決定することにより行われうる。本発明のミセルは３０～５０ｎｍの粒径を有し、また０．１０～０．３０の分散度を有することが好ましい。

[0037] 精製して得られたニコチンアミドが搭載されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーから形成されたニコチンアミド内包ミセルは、そのまま、又は必要に応じてさらに滅菌処理が行われ、製剤に適した任意の助剤を添加して、医薬製剤としてもよい。このような医薬製剤としては、注射剤や

輸液製剤が挙げられる。また、ニコチンアミド内包ミセル溶液を凍結乾燥して、固体状の粉体としてもよい。粉体は投与前に投与可能な溶液で再構成されて投与されてもよい。投与可能な溶液としては、脱イオン水、一定のｐＨに調節された緩衝水溶液を使用することができる。

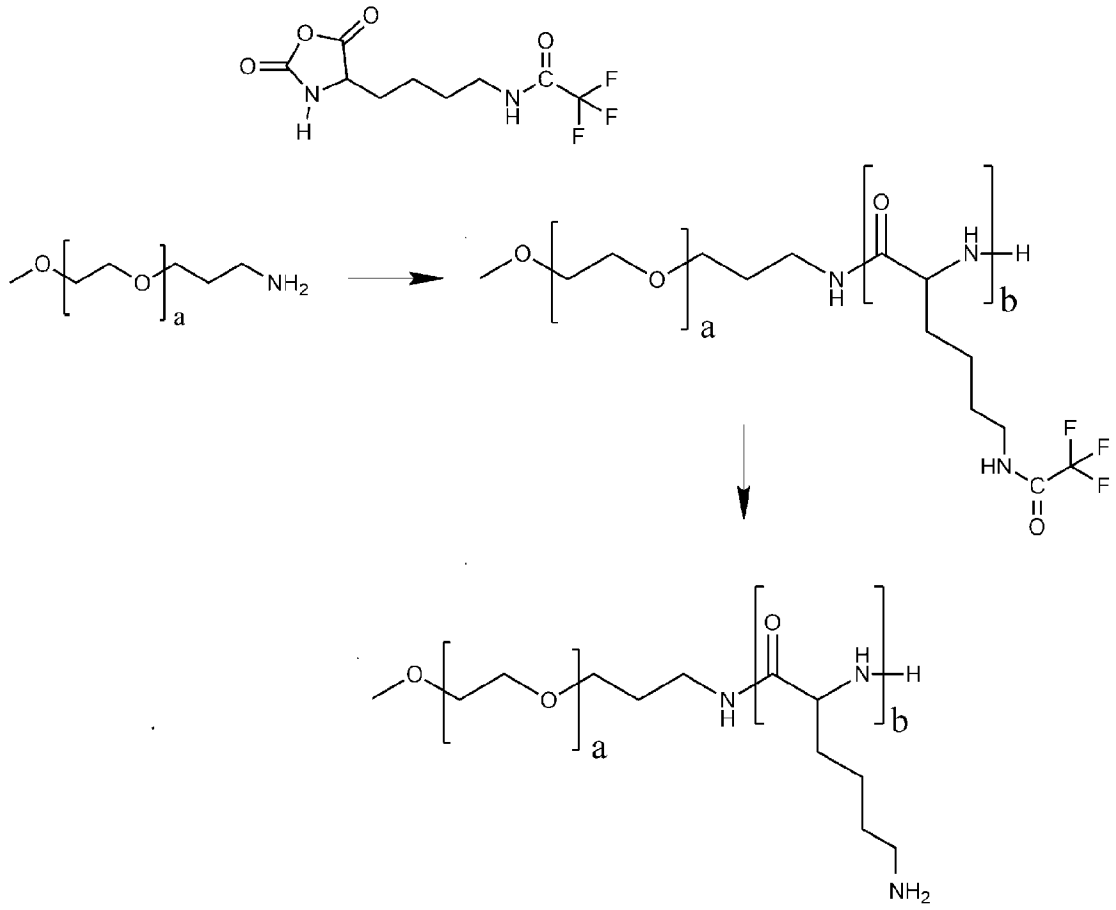
[0038] 本発明のニコチンアミド内包ミセル及び当該ミセルを含む組成物は、妊娠中に高血圧を患う対象に投与することができる。より具体的に、かかる対象は、妊娠高血圧症候群を患う対象である。かかる対象に対し、ミセルは任意の非経口的投与、例えば静脈内、皮下、筋中で投与されうるが、通常静脈注射やボーラス注入により投与される。

実施例

[0039] 実施例１：ニコチンアミド内包ミセルの製造

（１）ポリエチレングリコール－ポリ（リジン）－ブロックコポリマー（ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ））の調製

[化6]



（式中、ａ，ｂは、使用したＰＥＧの分子量、及びＬｙｓ（ＴＦＡ）－ＮＣＡの反応数による）

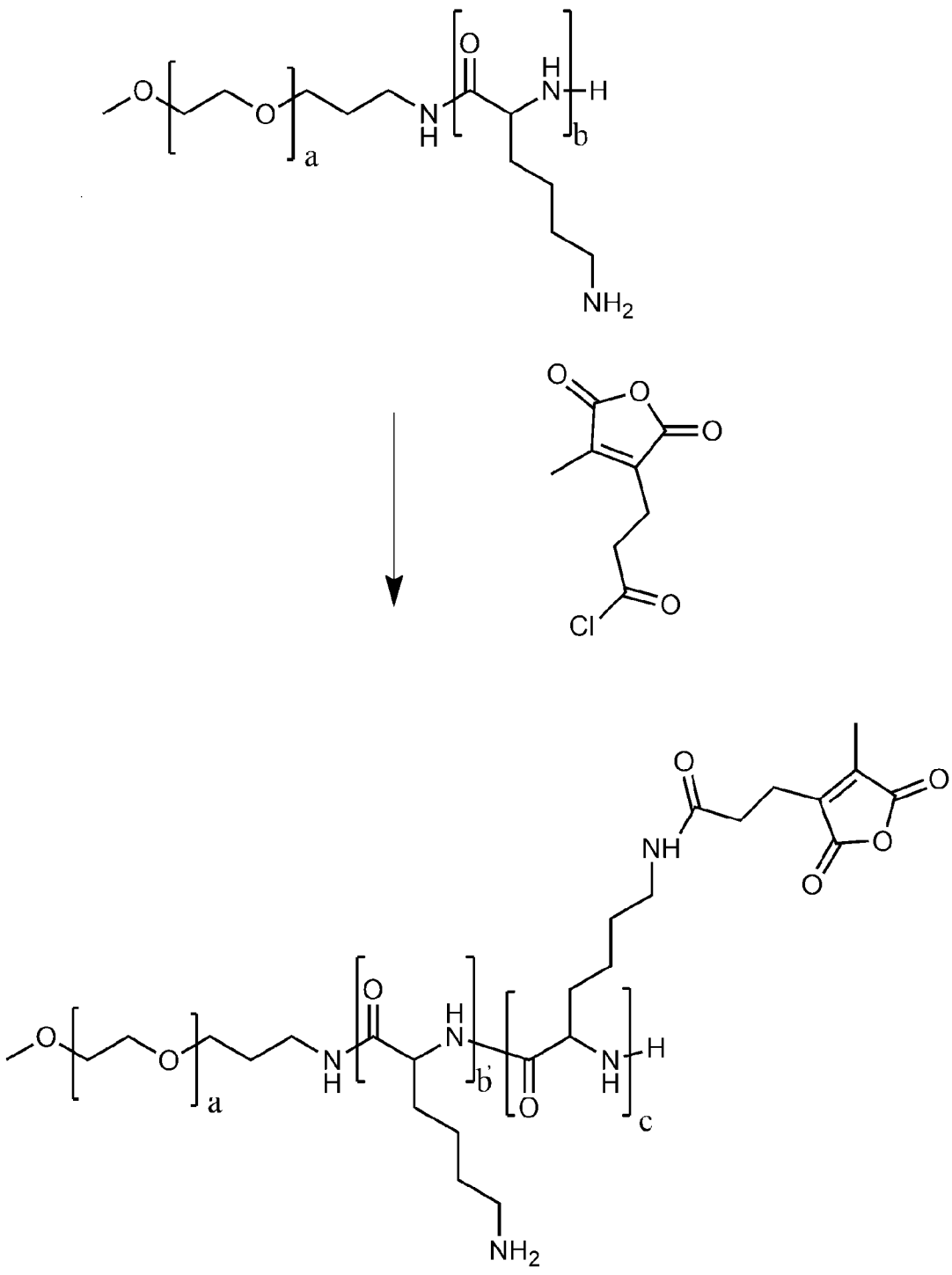
ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ）を、既報の通り調製した（非特許文献２：Macromol. Biosci. (2020) (20) 1900161）。具体的に、α－メトキシ－ω－アミノ－ポリ（エチレングリコール）（ＭｅＯ－ＰＥＧ－NH_2；Ｍｗ＝１２０００ｇ／ｍｏｌ）（NOF Corporation）とＮ－トリフルオロアセチル－Ｌ－リジンＮ－カルボキシ無水物（Ｌｙｓ（ＴＦＡ）－ＮＣＡ）（Chuo Kaseihin Co., Inc.）とを開環重合反応に供して、ポリエチレングリコール－ポリ（トリフルオロアセチル－リジン）（ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＴＦＡ））を形成し、そしてトリフルオロアセチル基を脱保護により取り除いた。より具体的に、チオウレア（１．５ｇ、２０ｍｍｏｌ）を脱水ＤＭＦ（２０ｍｌ）に溶解し、

チオウレア含有ＤＭＦを得た。次いで、ＭｅＯ－ＰＥＧ－NH_2（１ｇ、０．０８３ｍｍｏｌ）と、Ｌｙｓ（ＴＦＡ）－ＮＣＡ（１．００５ｇ、３．７５ｍｍｏｌ）をチオウレア含有ＤＭＦ（１０ｍｌ）に溶解し、次いでアルゴン雰囲気下にて３５℃で３日間攪拌して反応させた。ジエチルエーテル中で沈殿させて、吸引下で乾燥させることにより、ポリマーを白色粉末として得た。重合度を、^{1}Ｈ－ＮＭＲ分光計（ＤＭＳＯ－d_6、８０℃）で決定し、そして分子量分布を、有機相ＧＰＣ（溶出液：１０ｍＭ　ＬｉＣｌ含有ＤＭＦ；温度４０℃；流速０．８ｍｌ／分；検出器：屈折率）により測定した。さらに、トリフルオロアセチル保護基を、３５℃、１Ｎ　ＮａＯＨメタノール溶液で１晩処理することにより取り除き、６～８ｋＤのＭＷＣＯ透析膜で透析を行った。凍結乾燥後に最終生成物を白色粉末として得た。脱保護されたポリマーを^{1}Ｈ－ＮＭＲ分光計（D_2O、２５℃）で分析した。ＰＥＧの－ＯＣH_2－ＣH_2－と、リジンの－C_3H_6のプロトンピークを用いて、ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ）ブロックコポリマーの組成を決定した。分子量分布を、水相ＧＰＣ（移動相：ｐＨ３．３酢酸緩衝生理食塩水（１０ｍＭアセテートと５００ｍＭ・ＮａＣｌ）；室温；流速０．７５ｍｌ／分；検出器：ＵＶ、波長２２０ｎｍ）で分析した。ＮＭＲデータ及びＧＰＣデータを図１に示す。

[0040] （２）ポリエチレングリコール－ポリ（リジン－カルボキシメチルマレイン酸無水物）－ブロックコポリマー（ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＣＤＭ））の調製

カルボキシメチルマレイン酸無水物（ＣＤＭ）の塩化アシルと、ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ）とを反応させて、ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＣＤＭ）を得た。

[化7]



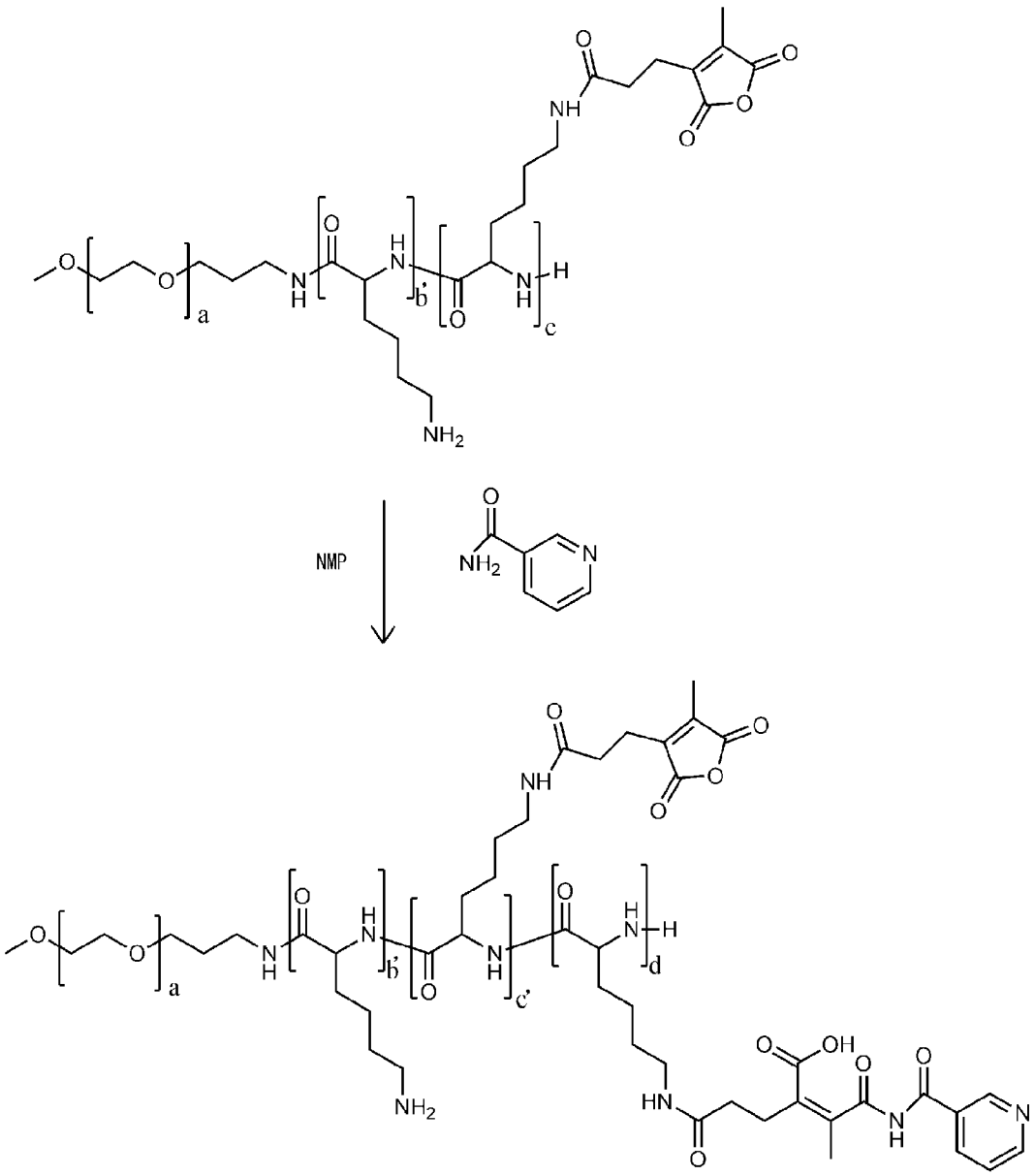
（式中、ａは、使用したＰＥＧの分子量に依り、ｂはＬｙｓ（ＴＦＡ）－ＮＣＡの反応数に依り、ｃはＣＤＭの反応数に依る。ｂ’＝ｂ－ｃである）

２－プロピオニック－３－メチルマレイン酸無水物（ＣＤＭ、Ｔｏｋｙｏ

Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｙ Ｃｏ． Ｌｔｄ．，２００ｍｇ、１．０９ｍｍｏｌ）を無水トルエンに溶解し、吸引下でエバポレーションを行った。ＣＤＭを無水CH_2Cl_2（１５ｍｌ）に溶解し、次いで塩化オキサリル（Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.,４ｍｌ、５．９ｇ、４６ｍｍｏｌ）を添加して、室温で１２時間反応させた。次に、CH_2Cl_2及び残渣の塩化オキサリルをエバポレーションにより取り除いて、透明な油を得た。CH_2Cl_2（４ｍｌ）を加えてＣＤＭ－Ｃｌを溶解し、CH_2Cl_2（２０ｍｌ）を用いてＰＥＧ－Ｐ（Ｌｙｓ）（２００ｍｇ、０．０１１ｍｍｏｌ）を溶解した。ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ）溶液を次にＣＤＭ－Ｃｌ溶液に移し、反応液を室温で１２時間攪拌した。攪拌後、生成物をジエチルエーテル沈殿と一晩の吸引乾燥により得た。生成物を１Ｈ　ＮＭＲにより分析し、１ポリマーあたり、２０のＣＤＭ未結合のリジンと、１７のＣＤＭ結合リジンが含まれることを確認した。ＮＭＲデータを図２に示す。

[0041] （３）　ニコチンアミド結合ポリエチレングリコール－ポリアミノ酸ブロックコポリマー（ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＣＤＭ－ＮＡ））の製造

[化8]



（式中、ａは、使用したＰＥＧの分子量に依り、ｂ’＝ｂ－ｃであり、ここでｂはＬｙｓ（ＴＦＡ）－ＮＣＡの反応数、ｃはＣＤＭの反応数に依り、ｃ’＝ｃ－ｄであり、ｄはニコチンアミドの反応数に依る）

ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＣＤＭ）（量：１０ｍｇ）とニコチンアミド（販売元：東京化成工業株式会社、ＣＤＭに対して１０倍量：１２ｍｇ）とを、ｎ－メチル－２－ピロリドン（ＮＭＰ：２ｍＬ）中で、室温２４時間反応させた。反応溶液をジエチルエーテルに添加し、沈殿を形成した。減圧ろ過によ

り、ポリマーを回収した。回収したポリマーを１Ｈ　ＮＭＲにより分析し、ニコチンアミドの導入率は、ポリマーのＣＤＭに対し７３％であった（１ポリマーあたり１５個）。ＮＭＲデータを図３に示す。

[0042] （４）　ミセルの製造

ニコチンアミド内包ミセル（ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＣＤＭ－ＮＡ）のミセル）については、透析法により調製した。ＰＥＧ－ｐ（Ｌｙｓ－ＣＤＭ－ＮＡ）ポリマーをｎ－メチルピロリドン（１ｍｇ／ｍＬ）に溶解し、ポア３透析膜（ＭＷＣＯ：３５００）を用いて、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）に対して透析を行い精製した（２４時間、計６回）。調製したミセルのサイズおよび多分散度（ＰＤＩ）を動的光散乱法（ＤＬＳ）により測定した。ミセルサイズ４２ｎｍであり、多分散度は０．１９であった。ミセルについて、凍結乾燥を行うことによりポリマーを回収し、１Ｈ－ＮＭＲによりニコチンアミドの導入率を決定した（６５％；１ポリマーあたり１３個）。ＮＭＲデータを図４に示す。

[0043] 実施例２：ニコチンアミド内包ミセルの特性解析

（１）ｐＨ依存性の薬剤放出試験

ミセル溶液を、ポア３透析膜（ＭＷＣＯ：３５００）を用いて、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）と、ＰＢＳ（ｐＨ６．５）に対して透析を行った。透析開始後、１時間、３時間、６時間及び２４時間で外液をサンプリングした。サンプリングされた外液を濃縮後、凍結乾燥を行った。粉体を溶解し、ＨＰＬＣ法（ＵＶ２６８ｎｍ、移動相２０ｍＭリン酸緩衝液）により定量した。結果を図５に示す。

[0044] 実施例３：サイズの異なる高分子ミセルを用いた胎盤および胎児に対する集積性の評価

この実施例では、サイズの異なる高分子ミセルおよび低分子化合物の胎盤および胎児への集積性を、妊娠モデルマウスを用いた蛍光分析、元素分析および質量分析により評価した。

[0045] （１）ダハプラチン内包ミセルの調製

蛍光標識された２種類（粒径３０ｎｍ及び７０ｎｍ、粒径３０ｎｍのミセルはＡｌｅｘａ－５５５標識、粒径７０ｎｍのミセルはＡｌｅｘａ６４７標識）のダハプラチン内包ミセルを調製した（非特許文献３:H. Cabral et. al., Nat. Nanotech. 6 (2011) 815-823）。

[0046] （２）妊娠モデルマウスへの投与

妊娠後１４日目のマウスに２種類のダハプラチン内包ミセル（粒径３０ｎｍ及び７０ｎｍ）の混合溶液を投与した。投与４８時間後に胎盤と胎児と摘出し、凍結サンプルを調製した。その後、凍結切片（厚さ：１０ｍｍ）を作製し、ヘキストにより核染色を行った。ヘキスト由来の蛍光（図１１Ａ）、及びミセルの標識（Ａｌｅｘａ　５５５及びＡｌｅｘａ６４７）由来の蛍光（図１１Ｂ及びＣ）を測定した。図１１の結果から、２種類のダハプラチン内包ミセル（粒径３０ｎｍ及び７０ｎｍ）が胎児（Ｆ）に集積していないことが確認された。粒径３０ｎｍのダハプラチン内包ミセルでは、胎児（Ｆ）への集積は見られなかったものの、胎盤の胎児側のラビリンス（labyrinth）（Ｌ）層までミセルの集積がみられた。粒径７０ｎｍのダハプラチン内包ミセルでは、胎盤の母体側の脱落膜（dedidua）（Ｄ）層までの集積がみられたが、Ｄ層とＬ層の間にある海綿状栄養膜細胞（spongiotrophoblast）（Ｓ）層への集積は見られなかった。この結果より、薬剤のサイズを精密に設計することにより胎盤内分布を制御できることが示された。

[0047] （３）ヒト胎盤に対する通過性の評価

この実施例では、サイズの異なる高分子ミセルおよび低分子化合物、ポリマーのヒト胎盤における通過性を、ヒト胎盤灌流モデルを用いて評価した。

[0048] ヒト胎盤灌流モデルについては非特許文献４（K. Shintaku et. al., Drug Metab. Dispos. 37 (2009) 962）　非特許文献５（J. R. Huston et. al., Clin. Pharmacol. Ther. 90 (2011) 67）に従い作製した。具体的には、東大病院の産婦人科から提供されたヒト胎盤の母体側にニードル（１８ゲージ）を、胎児側の静脈と動脈にそれぞれニードル（１８ゲージ）を導入し、非特許文献６（M. Nagai et. al., Drug Metab. Dispos. 41 (2013) 2124）に従

い作製したＫｒｅｂｓ－Ｒｉｎｇｅｒ炭酸バッファーを３７°Ｃで３０分間灌流した（母体側の流速：１５ｍＬ／ｍｉｎ、胎児側の流速：３ｍｌ／ｍｉｎ）。ここで、バッファーは過酸化水素水と塩化鉄の酸化還元反応により生成した酸素により飽和させた。その後、ダハプラチン内包ミセル（粒径３０ｎｍ及び７０ｎｍ）（ダハプラチンの投与量：８５．４ｍｇ／Ｌ）、オキサリプラチン（２．７ｍｇ／Ｌ）およびＣｙ３標識８ａｒｍＰＥＧ（蛍光強度：３，０００（ＲＦＵ））を６０分間灌流し、胎児側の静脈からの溶液を５分ごとに１　ｍＬずつ回収した。オキサリプラチンおよびダハプラチン内包ミセル投与群については回収したサンプル中の白金含有量を誘導結合プラズモン質量分析により測定した。ポリマーについては、蛍光強度をＨＰＬＣ法により定量した。各薬剤の投与量に対する透過量の割合を算出して図１２Ａに示した。図１２Ａの結果から、オキサリプラチンは胎盤を透過したが、ダハプラチン内包ミセル（粒径３０ｎｍ及び７０ｎｍ）はともに胎盤を透過しなかったことから、薬剤のサイズを３０ｎｍ以上にすることにより胎盤の透過が抑制されたことが示唆された。また、８‐ａｒｍＰＥＧにおいて、オキサリプラチンに比較して低下しているものの、胎盤の透過が見られたことから、薬剤のサイズに関して１０ｎｍから３０ｎｍの間に閾値が存在することが示唆された。図１２Ａの結果より、オキサリプラチンが胎盤に集積しミセルが胎盤に集積しなかったことから、マウスとヒトの胎盤構造の違いによりミセルの胎盤への集積が抑制されたことが示された。その結果、薬剤のサイズを３０ｎｍ以上にすることにより胎盤への集積および透過を抑制できることが確認された。

[0049]　胎盤を通過する物質の大きさを同定するために、ＰＥＧ被覆金ナノ粒子（ＮＰ）の１０、２０、及び３０ｎｍ（5 mL, Nanocs, Inc., USA）を用いて、上述の方法と同様にｅｘ　ｖｉｖｏヒト胎盤潅流実験を行った。１０ｎｍ金ＮＰを潅流すると、胎児側からの金ナノ粒子の検出量は時間依存的に増加し、６０分後に投与量の４．５８％に達した。また、２０ｎｍのＧｏｌｄ　ＮＰを潅流した場合、胎児側からの検出線量は２．２１％であった。一方、３

０ｎｍのＧｏｌｄナノ粒子を潅流した場合、胎児側からの検出線量は６０分後に投与線量の０．０５％であった。結果を図１２Ｂに示す。これらの結果は、材料が胎盤を通過するために２０ｎｍから３０ｎｍの間のサイズのカットオフがあり得ることを示唆する。

[0050] 実施例４：ニコチンアミド内包ミセルを用いた胎盤および胎児に対する集積性の評価

（１）妊娠モデルマウスへの投与

実施例１で製造されたニコチンアミド内包ミセルを、実施例３（２）と同様に、妊娠モデルマウスへ投与し、胎盤及び胎児に対する集積性を評価する。

[0051] （１－１）血中滞留性の評価

妊娠後１７日目のマウスにニコチンアミド内包ミセル（ミセルサイズ４２ｎｍ、多分散度は０．１９、ニコチンアミドの導入率：６５％、ミセルに内包されたニコチンアミド１０ｍｇ）をＰＢＳに溶解し、尾静脈投与を行った。対照として、妊娠後１７日目のマウスに１０ｍｇのニコチンアミドをＰＢＳに溶解し、尾静脈投与を行った。投与後、１時間、３時間、６時間、２４時間、４８時間に眼球から血液を採取した。採取した血液試料のｐHを調節し、ミセル中のニコチンアミドを放出させ、血液試料中のニコチンアミド量をＨＰＬＣ（機器：日本分光株式会社EXTREMA、カラム：東ソー株式会社TSKgel ODS-120H 1.9μm）により測定した。投与前のニコチンアミド希釈溶液の濃度を１００とし、ニコチンアミドの血中濃度の変化を示した（図７）。ニコチンアミドは、投与後６時間で約１０分の１に減少する一方、ニコチンアミド内包ミセルは、投与後４８時間で約１０分の１に減少しており、血中滞留性が高かった。

[0052] （１－２）胎盤及び胎児への蓄積性の評価

妊娠後１７日目のマウスにニコチンアミド内包ミセル（ミセルサイズ４２ｎｍ、多分散度は０．１９、ニコチンアミドの導入率：６５％、ミセルに内包されたニコチンアミド１０ｍｇ）をＰＢＳに溶解し、尾静脈投与を行った

。対照として、妊娠後１４日目のマウスに１０ｍｇのニコチンアミドをＰＢＳに溶解し、尾静脈投与を行った。投与前、投与後１時間、３時間、６時間、２４時間、４８時間にマウスを屠殺し、胎盤及び胎児を摘出した。胎盤及び胎児をそれぞれ計量後にホモジナイズし、ＰＢＳ中に溶解して試料とし、ｐＨ調節を行ってミセル中のニコチンアミドを放出させ、試料中のニコチンアミド濃度をＨＰＬＣ（機器：日本分光株式会社EXTREMA、カラム：東ソー株式会社TSKgel ODS-120H 1.9μm）により測定した。組織１ｇあたりの投与量に対する割合（％）を測定し、蓄積量として示した（図８）。ニコチンアミド内包ミセルは、胎児への移行性が抑制される一方、胎盤中への蓄積がみられた。また、胎盤への蓄積に着目すると、ニコチンアミドを投与した場合には、即座にピークが生じるものの、ニコチンアミド内包ミセルを投与した場合には、ピークは２４時間過ぎであり、持続性が長く、かつ胎盤蓄積量も高かった。

[0053] 正常妊娠マウスの皮下に浸透圧ポンプを搭載した妊娠１７日後の高血圧モデルマウスにニコチンアミド内包ミセル（ミセルサイズ４２ｎｍ、多分散度は０．１９、ニコチンアミドの導入率：６５％、ミセルに内包されたニコチンアミド１０ｍｇ）をＰＢＳに溶解し、尾静脈投与を行った。また、同じ高血圧モデルマウスに１０ｍｇのニコチンアミドをＰＢＳに溶解し、尾静脈投与を行った。投与前、投与後１時間、３時間、６時間、２４時間、４８時間にマウスを屠殺し、胎盤を摘出した。胎盤をそれぞれ計量後にホモジナイズし、ＰＢＳ中に溶解して試料とし、ｐＨ調節を行ってミセル中のニコチンアミドを放出させ、試料中のニコチンアミド濃度をＨＰＬＣ（機器：日本分光株式会社EXTREMA、カラム：東ソー株式会社TSKgel ODS-120H 1.9μm）により測定した。組織１ｇあたりの投与量に対する割合（％）を測定し、蓄積量として示した（図１０（１））。なお、図１０（２）は、正常妊娠後１７日のマウスにおいて同じ実験を行った際の、胎盤中へのニコチンアミドの蓄積量を示す。高血圧モデルマウスにおいて、ニコチンアミド内包ミセルを投与した場合に、正常マウスと比較して、胎盤へのニコチンアミドの蓄積が高かっ

た。

[0054] （２）ヒト胎盤に対する通過性の評価

実施例１で製造されたニコチンアミド内包ミセルを、実施例３（３）と同様に、ヒト胎盤還流モデルを用いて、胎盤の通過性及び胎盤への集積性を評価する。

[0055] ヒト胎盤灌流モデルについては非特許文献４（K. Shintaku et. al., Drug Metab. Dispos. 37 (2009) 962） 非特許文献５（J. R. Huston et. al., Clin. Pharmacol. Ther. 90 (2011) 67）に従い作製した。具体的には、東大病院の産婦人科から提供されたヒト胎盤の母体側にニードル（１８ゲージ）を、胎児側の静脈と動脈にそれぞれニードル（１８ゲージ）を導入し、非特許文献６（M. Nagai et. al., Drug Metab. Dispos. 41 (2013) 2124）に従い作製したＫｒｅｂｓ－Ｒｉｎｇｅｒ炭酸バッファーを３７°Ｃで３０分間灌流した（母体側の流速：１５ｍＬ／ｍｉｎ、胎児側の流速：３ｍｌ／ｍｉｎ）。ここで、バッファーは過酸化水素水と塩化鉄の酸化還元反応により生成した酸素により飽和させた。その後、ニコチンアミド内包ミセル（ミセルサイズ４２ｎｍ、多分散度は０．１９、ニコチンアミドの導入率：６５％、ミセルに内包されたニコチンアミド１００ｍｇ）を溶解した１LのＰＢＳを６０分間灌流し、胎児側の静脈からの溶液を１０分ごとに１ｍＬずつ回収した。対照として、１００ｍｇのニコチンアミドを溶解した１LのＰＢＳを同様に６０分間灌流し、胎児側の静脈からの溶液を回収した。回収された試料のｐＨを調節して、ニコチンアミドを放出させ、溶液中のニコチンアミドをＨＰＬＣ（機器：日本分光株式会社EXTREMA、カラム：東ソー株式会社TSKgel ODS-120H 1.9μm）により測定した。胎盤通過前の溶液中のニコチンアミド濃度に対する、胎盤通過後の溶液中のニコチンアミドの濃度の割合を胎盤通過性として示した（図６）。

[0056] 実施例５：ニコチンアミド内包ミセルを用いた高血圧治療効果の評価

正常妊娠マウス（妊娠１０日目）の皮下に浸透圧ポンプを搭載し（Day 0）、その後妊娠１７日目（Day 7）まで、アンジオテンシンII（販売元：Sigma-

Aldrich、１．５μg／ｋｇマウス）を皮下経路で投与し、妊娠高血圧モデルマウスとした。妊娠１３日目（Day 3)～１６日目（Day 6)まで、薬剤の尾静脈投与を行った。投与した薬剤として、ニコチンアミド（１０ｍｇ／日）、ニコチンアミド内包ミセル（ミセルサイズ４２ｎｍ、多分散度は０．１９、ニコチンアミドの導入率：６５％、ミセルに内包されたニコチンアミド１０ｍｇ）をそれぞれＰＢＳに溶解したものと薬剤とした。対照として、薬剤未添加ＰＢＳ（ＰＢＳ）を投与した。また、アンジオテンシンII未投与群を対照とした（対照）。Day 0、３、５、７のマウスにおいて収縮血圧を測定した（図９）。アンジオテンシンIIの投与により、血圧が増大する一方（Day 3)、ニコチンアミド及びニコチンアミド内包ミセルの投与群において血圧が低下した（Day 5及びDay 7）。高血圧モデルマウスにおいて、ニコチンアミド内包ミセルを投与した場合に、ニコチンアミドを投与した場合に比較して、血圧低下効果が高かった。

請求の範囲

[請求項1] ニコチンアミドがアミノ酸側鎖に結合されたたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーから形成されたニコチンアミド内包ミセルであって、動的光散乱法により測定した場合に粒径が２５～１００ｎｍである、前記ミセル。

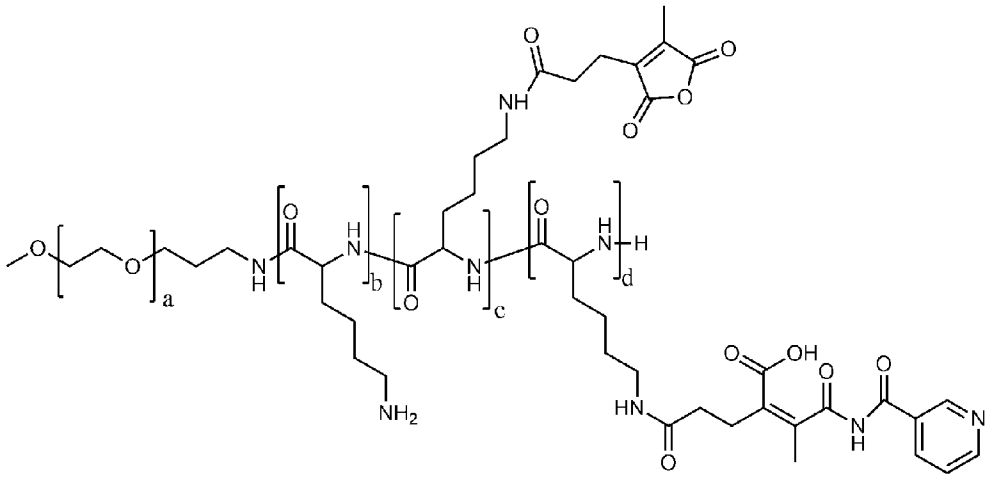
[請求項2] 前記ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーが、アミノ酸ブロックとして、リジンを含む、請求項１に記載のミセル。

[請求項3] 前記ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーが、ポリエチレングリコール－ポリアミノ酸ブロックコポリマーである、請求項１又は２に記載のミセル。

[請求項4] ニコチンアミドが、ジカルボン酸無水物反応性基を介して、アミノ酸側鎖に結合される、請求項１～３のいずれか一項に記載のミセル。

[請求項5] 前記ポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーが、以下の：

[化1]



（式中、ａ＝４５～２０００、ｂ＝０～２０、ｃ＝０～３９及びｄ＝１～４０である）

で表される化合物である、請求項１～４のいずれか一項に記載のミセル。

[請求項6] 前記ニコチンアミド内包ミセルの粒径が、３０～５０ｎｍである、請求項１～５のいずれか一項に記載のミセル。

[請求項7] 請求項１～６のいずれか一項に記載のミセルを含む、組成物。

[請求項8] 妊婦における高血圧の治療又は予防用の医薬組成物である、請求項７に記載の組成物。

[請求項9] 妊婦における高血圧が、妊娠高血圧症候群、並びに妊娠高血圧症候群に起因する流産・早産、及び／又は子宮内胎児発育不全の治療又は予防用の医薬組成物である、請求項８に記載の組成物。

[請求項10] 胎児への移行性が低減された、請求項７～９のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項11] 胎盤標的化組成物である、請求項７～１０のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項12] 妊娠高血圧治療のための、ニコチンアミド内包ミセルの製造方法であって、

ニコチンアミドと、アミノ酸側鎖にカルボキシメチル無水マレイン酸反応基を含むポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーとを反応させる工程；

ニコチンアミドが搭載されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーを精製する工程；

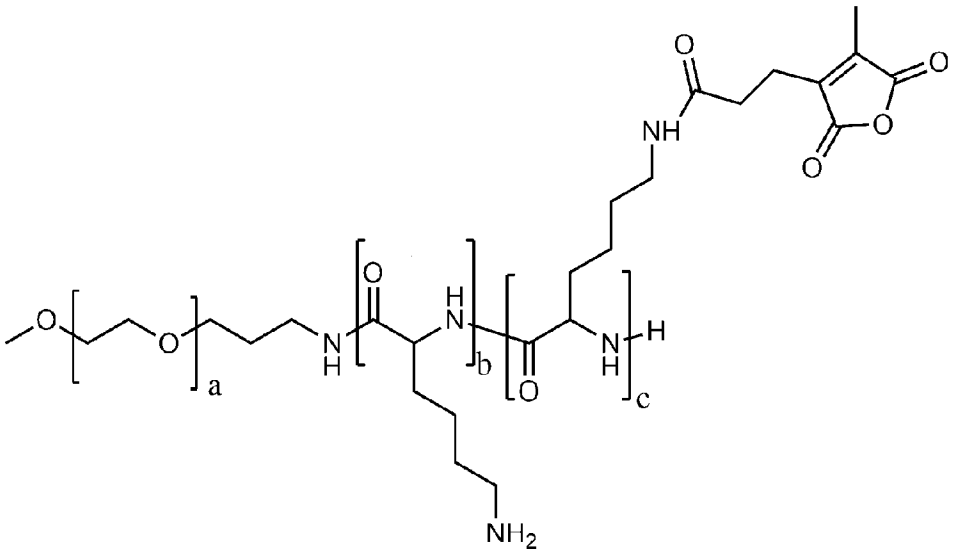
ニコチンアミドが搭載されたポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーを極性溶媒中に溶解する工程；

分画分子量３５００～１６０００の透析膜を用いて限外ろ過を行って、動的光散乱法により測定した場合に２５～１００ｎｍの粒径を有するミセルを取得する工程、

を含む、前記方法。

[請求項13] 前記アミノ酸側鎖にカルボキシメチル無水マレイン酸反応基を含むポリエーテル－ポリアミノ酸ブロックコポリマーが、以下の式：

[化2]

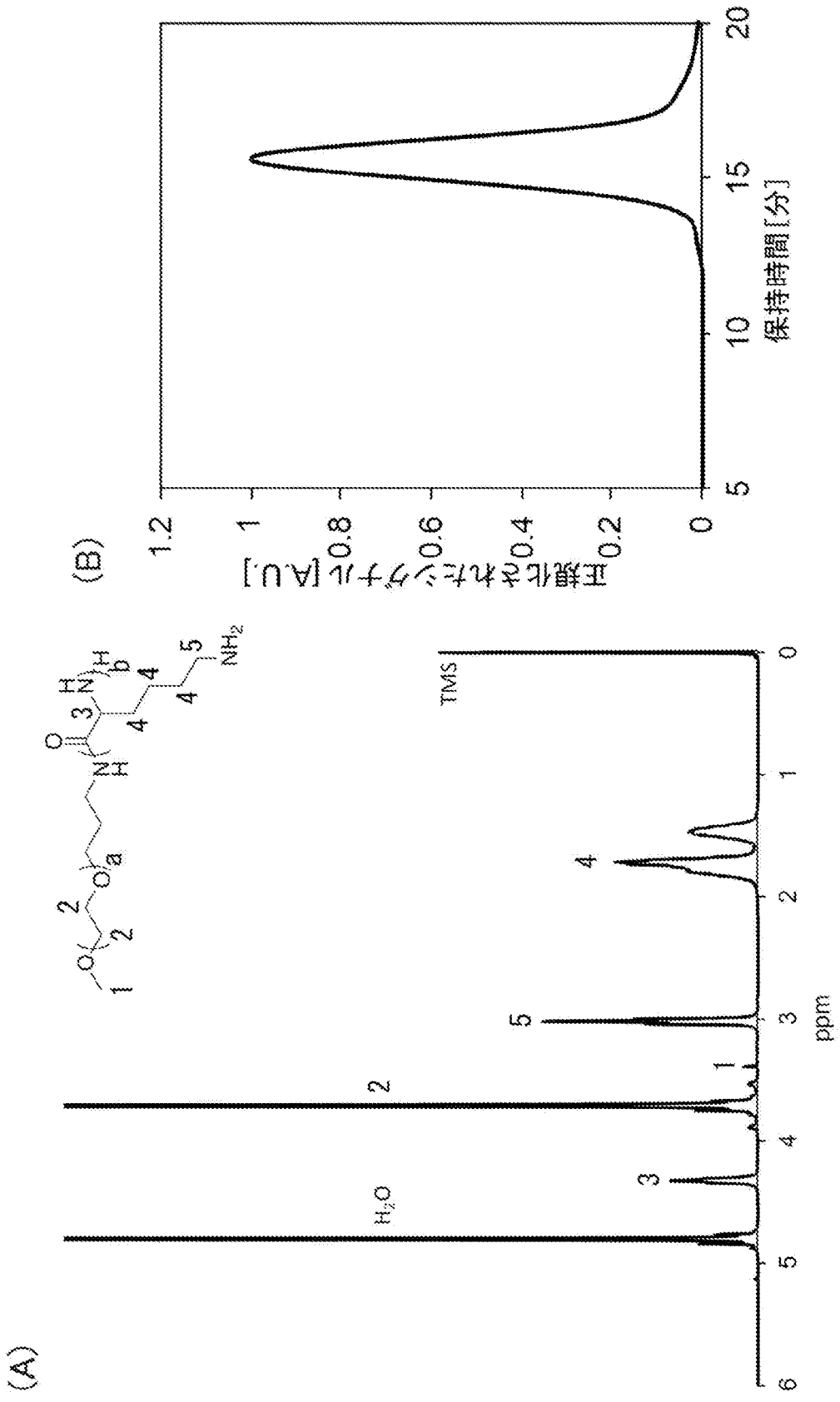


（式中、ａ＝４５～２０００、ｂ＝０～２０、及びｃ＝１～６０である）

で表される、請求項１２に記載の方法。

[図1]

図1



[図2]

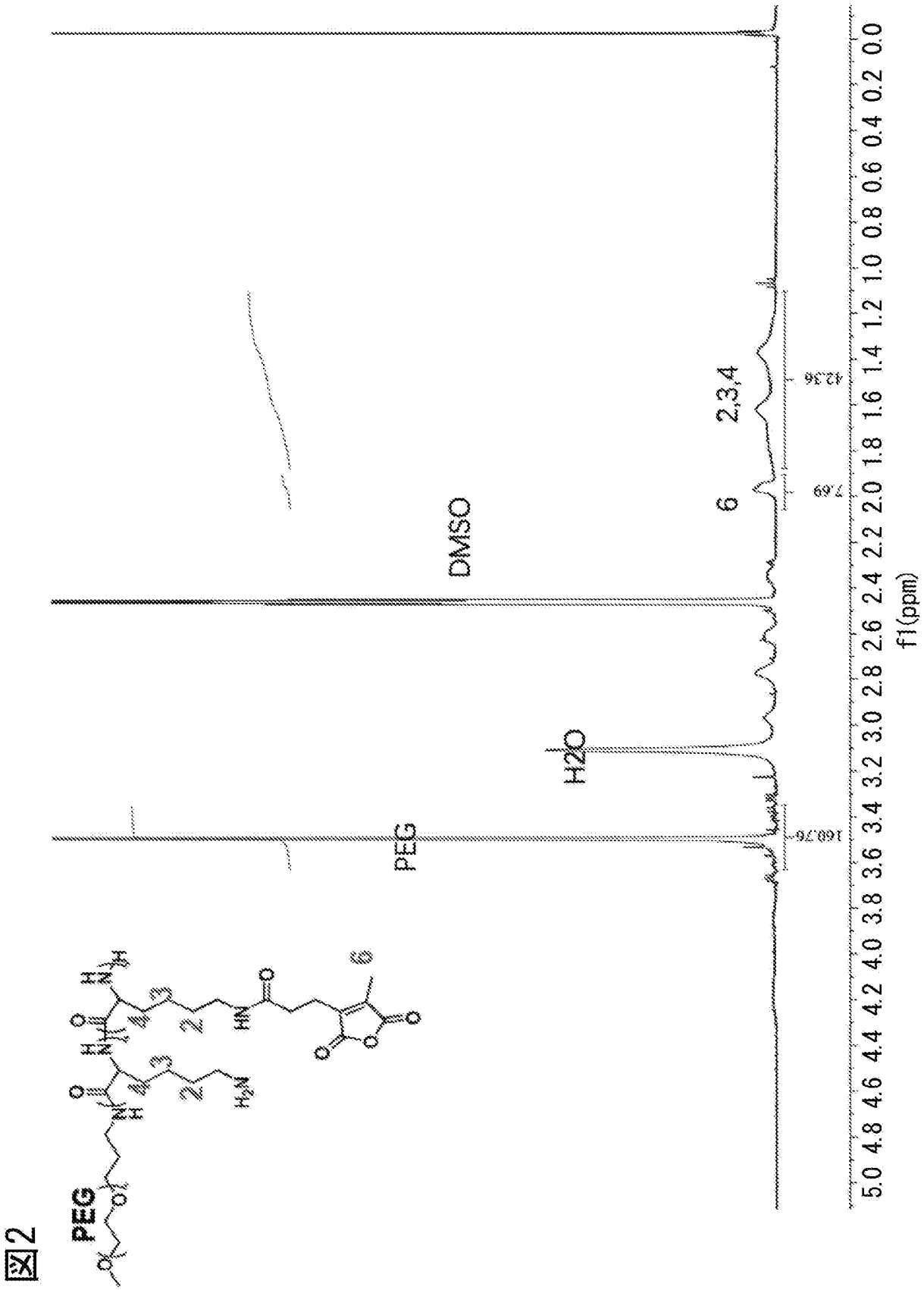
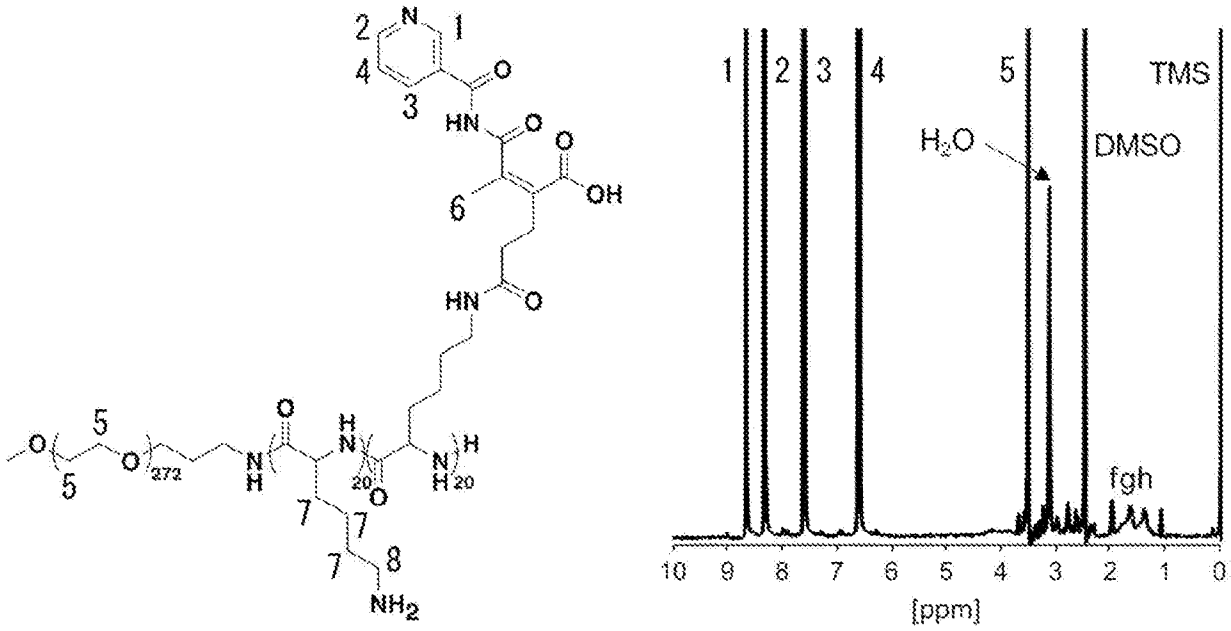


図2

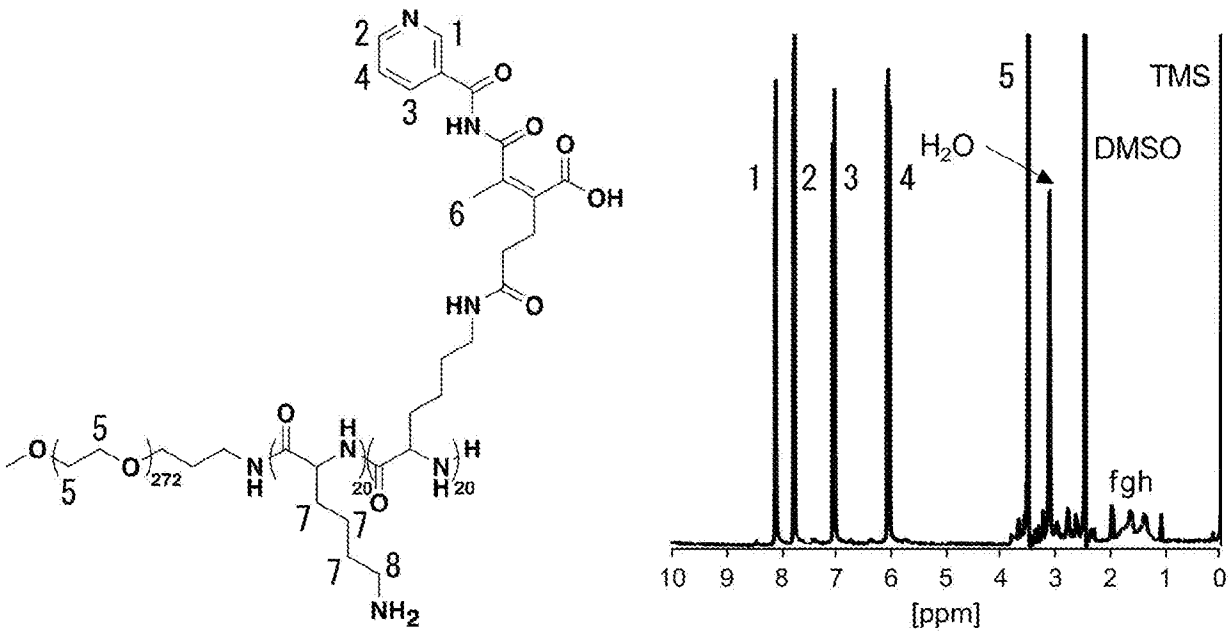
[図3]

図3


1
2
3
4
5
TMS
H2O
DMSO
fgh
10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
[ppm]

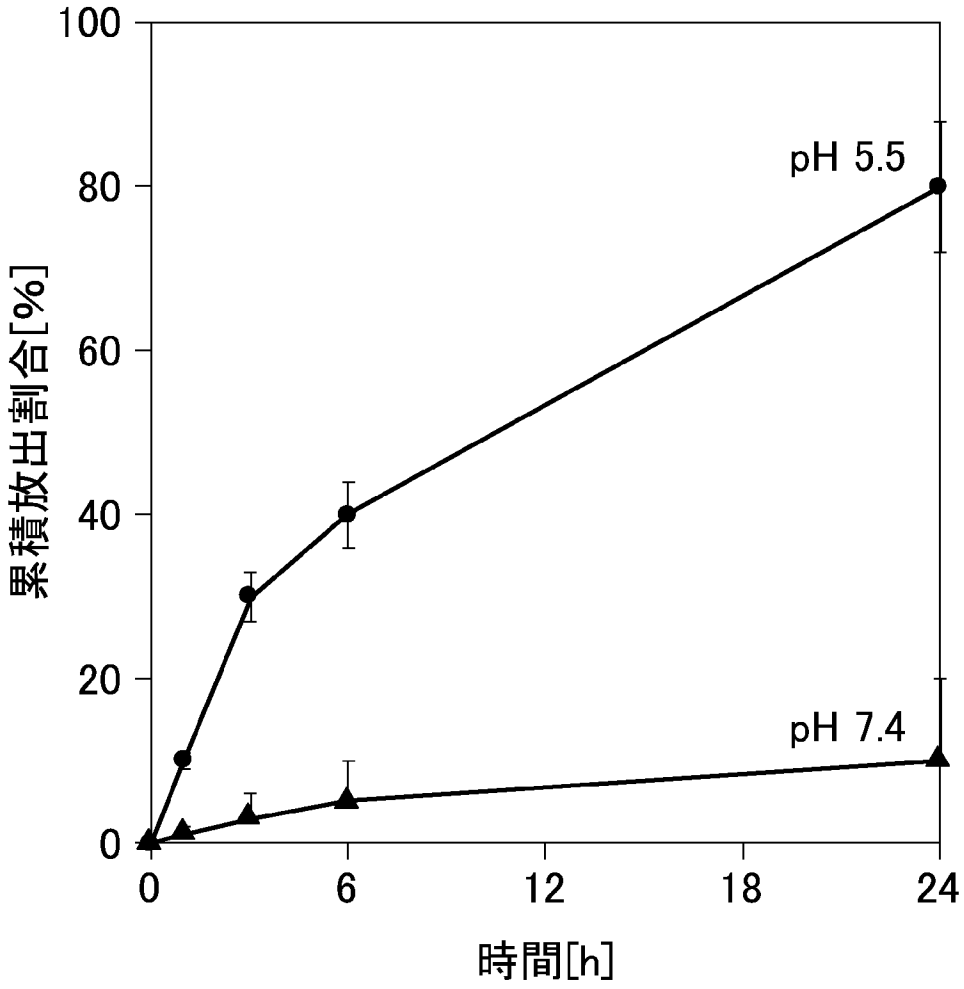
[図4]

図4


1
2
3
4
5
TMS
H2O
DMSO
fgh
10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
[ppm]

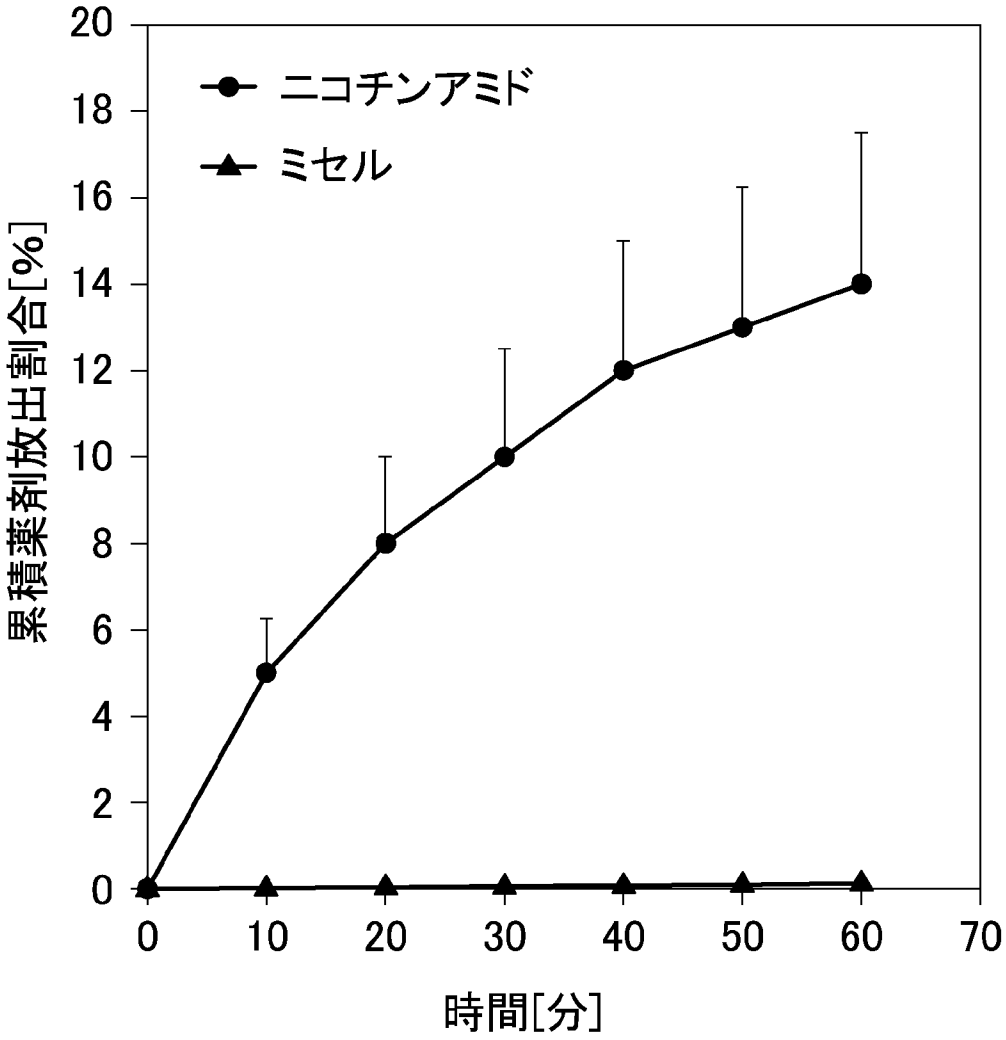
[図5]

図5



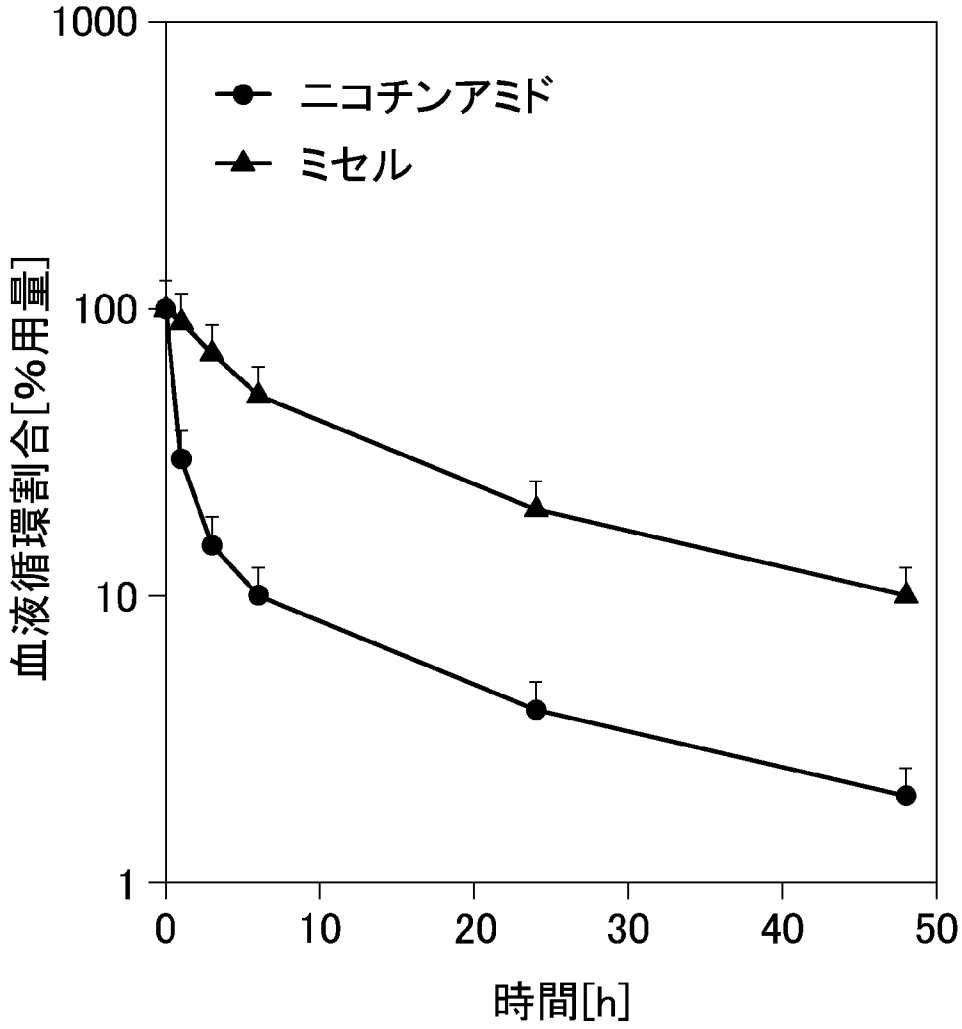
[図6]

図6


20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
累積薬剤放出割合[%]
ニコチンアミド
ミセル
0
10
20
30
40
50
60
70
時間[分]

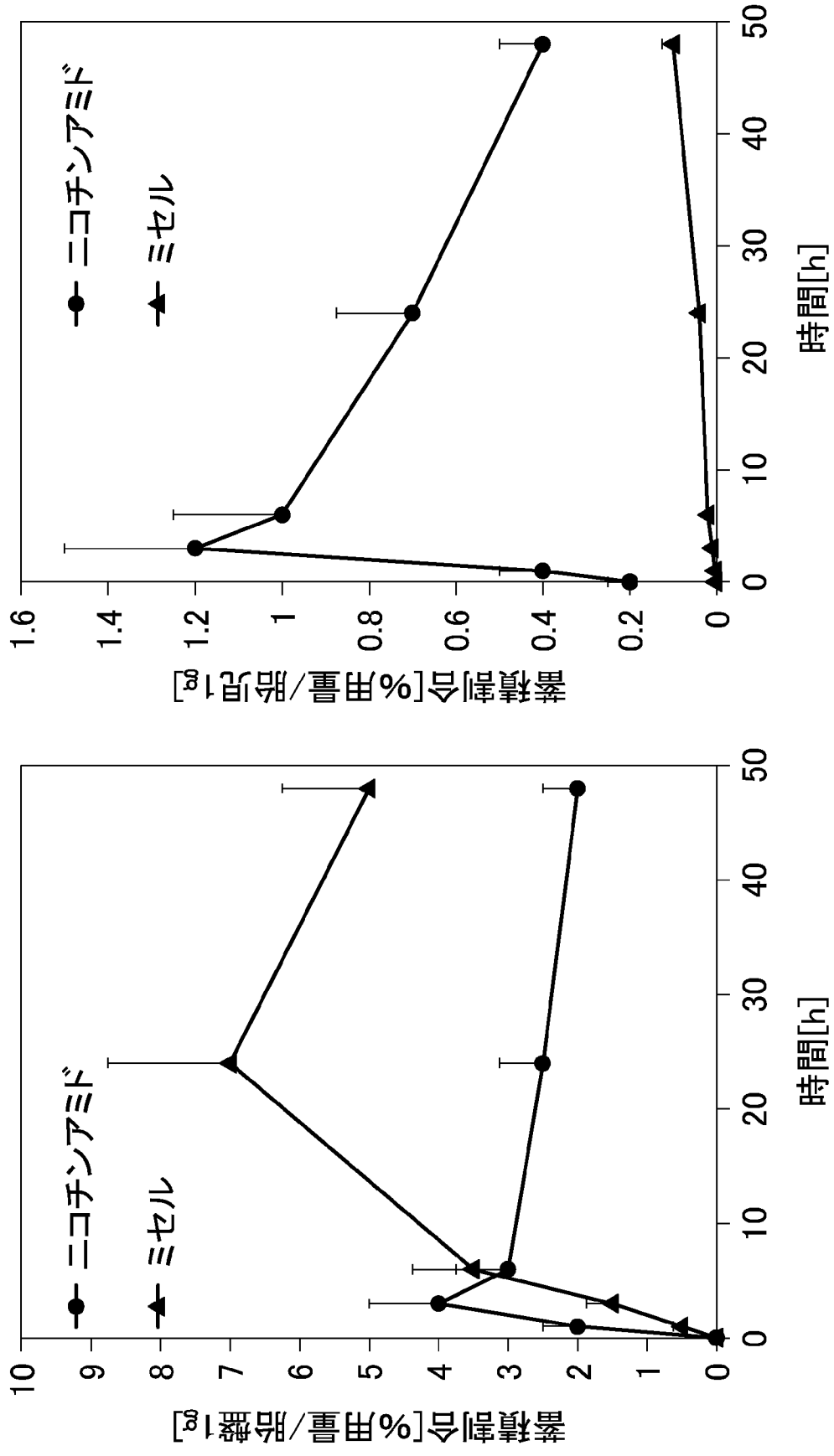
[図7]

図7



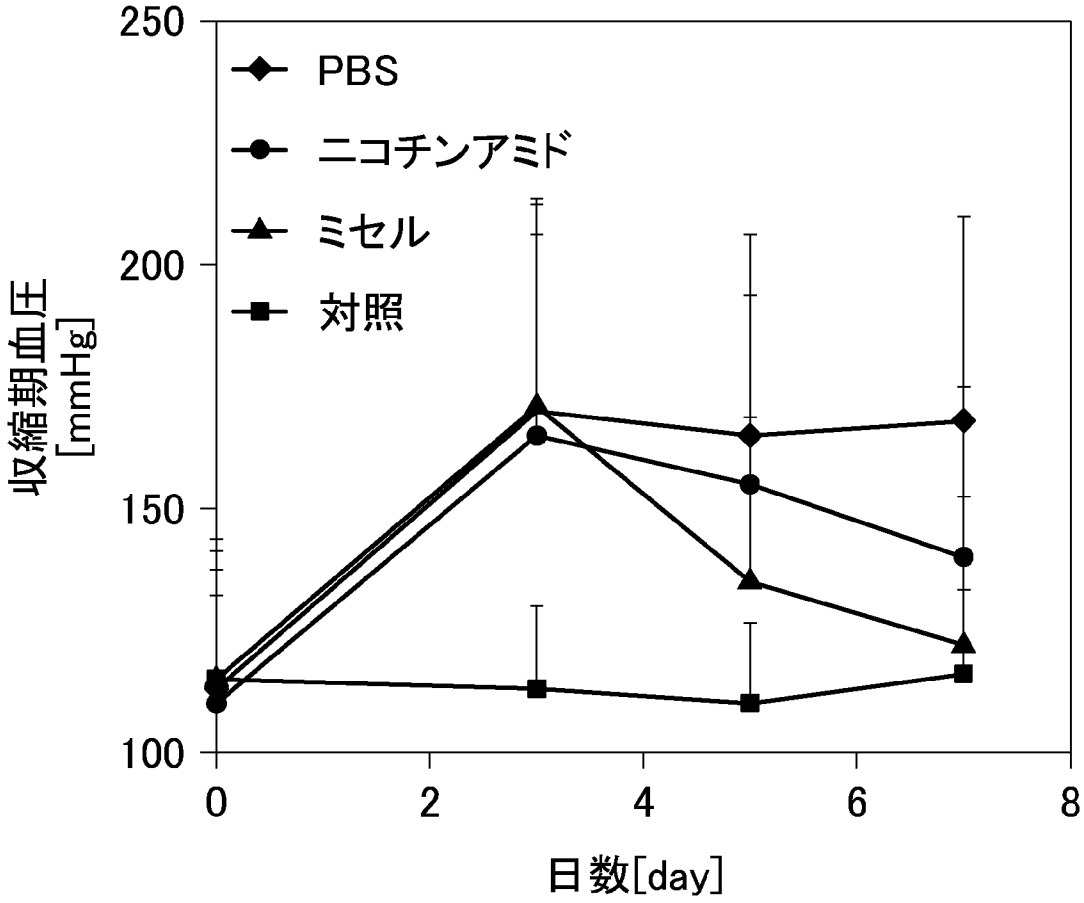
[図8]

図8


ニコチンアミド
ミセル
蓄積割合[%用量/胎盤1g]
時間[h]
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
10
20
30
40
50
ニコチンアミド
ミセル
蓄積割合[%用量/胎児1g]
時間[h]
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
0
10
20
30
40
50

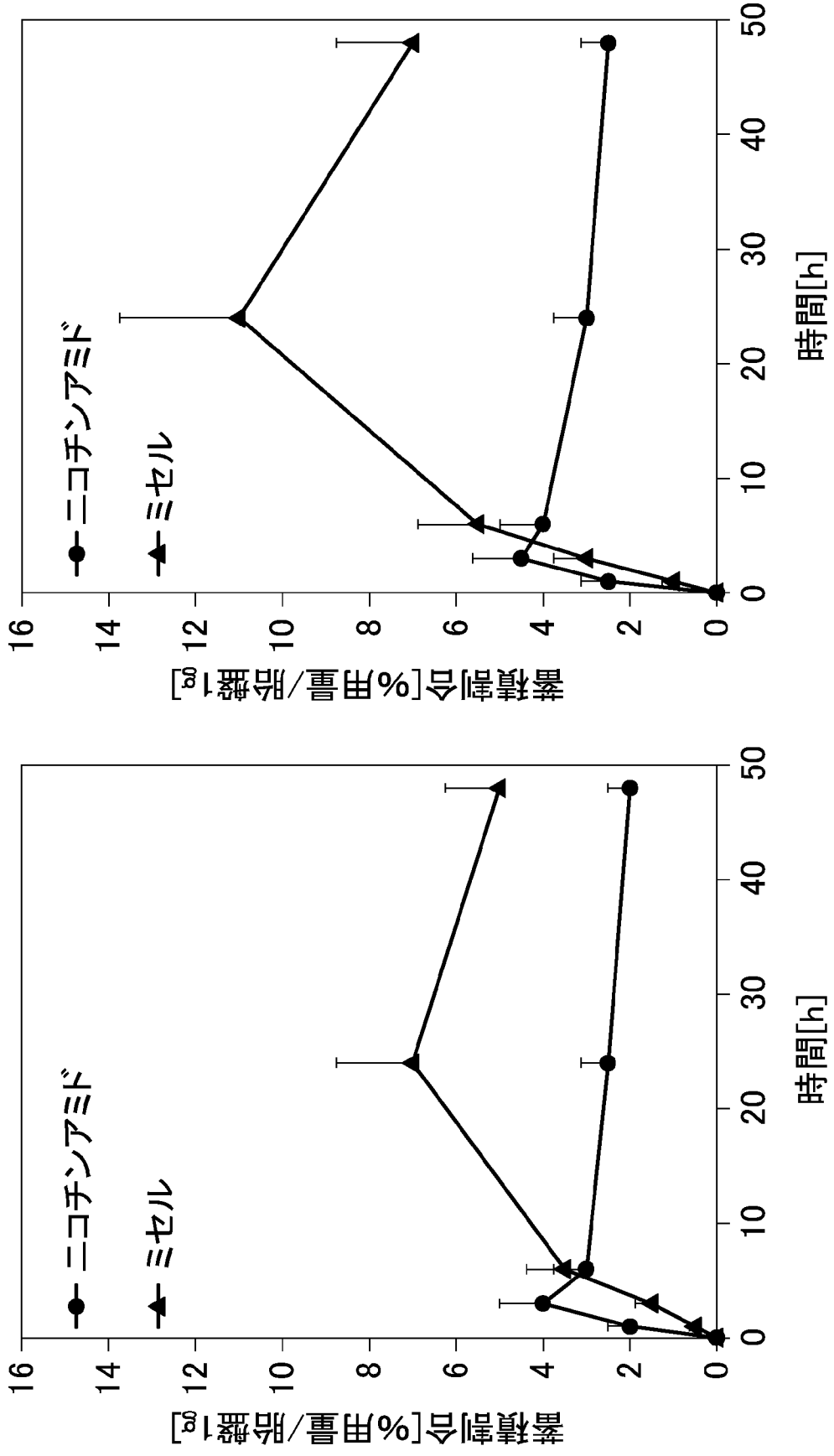
[図9]

図9



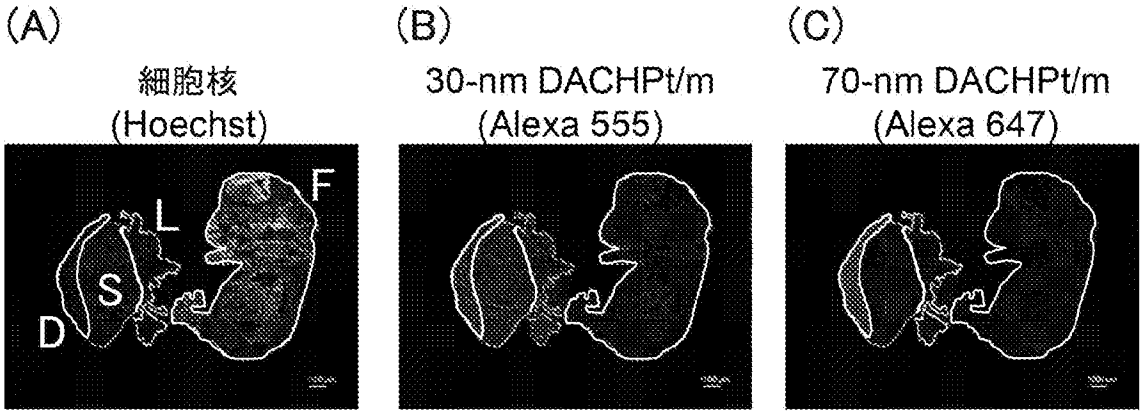
[図10]

図10



[図11]

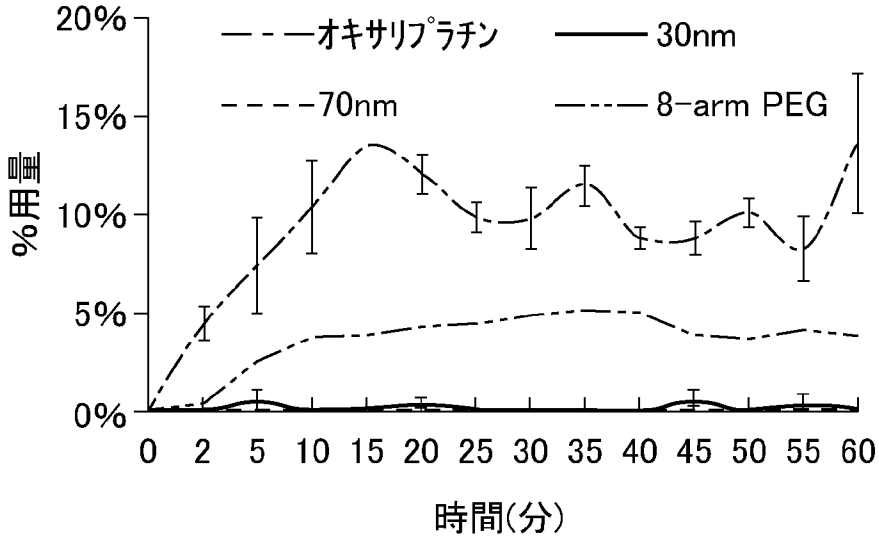
図11


(A)
細胞核
(Hoechst)
(B)
30-nm DACHPt/m
(Alexa 555)
(C)
70-nm DACHPt/m
(Alexa 647)
F
L
S
D

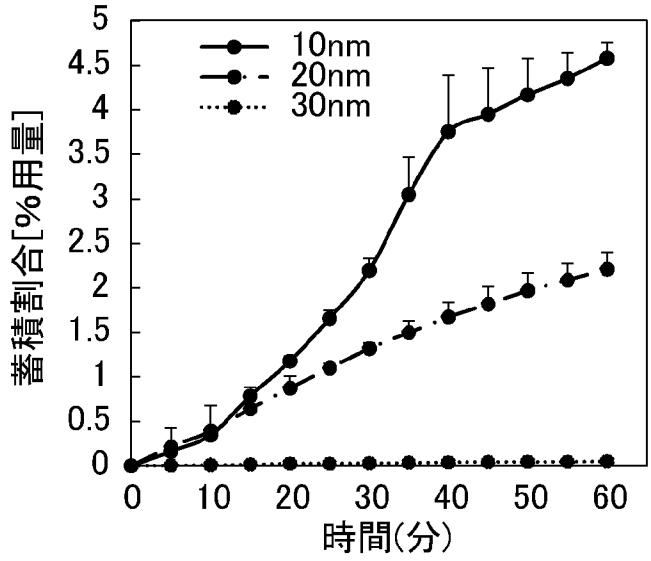
[図12]

図12

A


20%
15%
10%
5%
0%
%用量
オキサリプラチン
30nm
70nm
8-arm PEG
0 2 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
時間(分)

B


5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
蓄積割合[%用量]
10nm
20nm
30nm
0 10 20 30 40 50 60
時間(分)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/037453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/455(2006.01)i; ***A61K 9/107***(2006.01)i; ***A61K 47/64***(2017.01)i; ***A61P 3/02***(2006.01)i; ***A61P 9/12***(2006.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i; ***C08G 69/40***(2006.01)i; ***C08G 69/48***(2006.01)i
FI: A61K31/455; A61K9/107; A61K47/64; A61P3/02 104; A61P9/12; A61P43/00 101; C08G69/40; C08G69/48

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)

A61K31/455; A61K9/107; A61K47/64; A61P3/02; A61P9/12; A61P43/00; C08G69/40; C08G69/48

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/30466 A2 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 18 April 2002 (2002-04-18) page 1, lines 7-8, etc.	1-13
A	WO 2009/065077 A1 (PHARMAIN CORPORATION) 22 May 2009 (2009-05-22) paragraph [0008], etc.	1-13
A	JP 2015-30721 A (UNIV TOHOKU) 16 February 2015 (2015-02-16) claim 1, etc.	1-13
P, X	WO 2020/261227 A1 (BIORCHESTRA CO., LTD.) 30 December 2020 (2020-12-30) paragraphs [0057], [0328], [0333], fig. 5	1-3, 6-7
P, A		4-5, 8-13

☐ 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	Date of mailing of the international search report
18 November 2021	**30 November 2021**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/037453

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 02/30466 A2	18 April 2002	US 2003/0031715 A1	
WO 2009/065077 A1	22 May 2009	US 2009/0156459 A1	
JP 2015-30721 A	16 February 2015	(Family: none)	
WO 2020/261227 A1	30 December 2020	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/037453

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 31/455(2006.01)i; A61K 9/107(2006.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61P 3/02(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C08G 69/40(2006.01)i; C08G 69/48(2006.01)i
FI: A61K31/455; A61K9/107; A61K47/64; A61P3/02 104; A61P9/12; A61P43/00 101; C08G69/40; C08G69/48

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））

A61K31/455; A61K9/107; A61K47/64; A61P3/02; A61P9/12; A61P43/00; C08G69/40; C08G69/48

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１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); CAplus/REGISTRY (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
A	WO 02/30466 A2 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 18.04.2002 (2002-04-18) 第１頁第７－８行等	1-13
A	WO 2009/065077 A1 (PHARMAIN CORPORATION) 22.05.2009 (2009-05-22) 段落［０００８］等	1-13
A	JP 2015-30721 A (国立大学法人東北大学) 16.02.2015 (2015-02-16) ［請求項１］等	1-13
P, X	WO 2020/261227 A1 (BIORCHESTRA CO., LTD.) 30.12.2020 (2020-12-30) [0057], [0328], [0333], FIG. 5	1-3, 6-7
P, A		4-5, 8-13

☐ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
18.11.2021	30.11.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
福山　則明 4C 4870
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/037453

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 02/30466 A2	18.04.2002	US 2003/0031715 A1	
WO 2009/065077 A1	22.05.2009	US 2009/0156459 A1	
JP 2015-30721 A	16.02.2015	（ファミリーなし）	
WO 2020/261227 A1	30.12.2020	（ファミリーなし）	