

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5905455号  
(P5905455)

(45) 発行日 平成28年4月20日 (2016. 4. 20)

(24) 登録日 平成28年3月25日 (2016. 3. 25)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 31/727 (2006. 01)	A 6 1 K	31/727
A 6 1 P 17/14 (2006. 01)	A 6 1 P	17/14
A 6 1 Q 7/00 (2006. 01)	A 6 1 Q	7/00
A 6 1 K 9/20 (2006. 01)	A 6 1 K	9/20
A 6 1 K 9/48 (2006. 01)	A 6 1 K	9/48

請求項の数 37 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-515473 (P2013-515473)	(73) 特許権者	508134441
(86) (22) 出願日	平成23年6月15日 (2011. 6. 15)		モメンタ ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2013-528653 (P2013-528653A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ウェスト ケンドール ストリート 675
(43) 公表日	平成25年7月11日 (2013. 7. 11)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/040470		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W02011/159770	(74) 代理人	100102118
(87) 国際公開日	平成23年12月22日 (2011. 12. 22)		弁理士 春名 雅夫
審査請求日	平成26年6月4日 (2014. 6. 4)	(74) 代理人	100160923
(31) 優先権主張番号	61/355, 610		弁理士 山口 裕孝
(32) 優先日	平成22年6月17日 (2010. 6. 17)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 刑部 俊
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発毛を促進する方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発毛を誘発するのに十分な量の低分子量ヘパリン (LMWH) 製剤を含む、対象において発毛を誘発する方法における使用のための医薬組成物であって、

該方法が、

発毛の必要がある対象を同定する工程；および

発毛を誘発するのに十分な期間および量で該医薬組成物を該対象に局所投与する工程

；

を含み、

該 LMWH 製剤が、下記式 I：



の多糖から本質的になり、

式中、Uは、ウロン酸残基を示し、Hは、ヘキソサミン残基を示し；

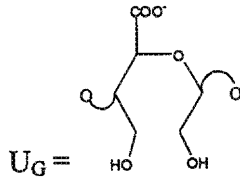
mおよびnは、m = 4 ~ 16、および n = 1 ~ 4 であるような整数であり；

w = - 2 OS または - 2 OH であり；

x = - NS または - NAc であり；

y = - 3 OS または - 3 OH であり；

z = - 6 OS または - 6 OH であり；および



であり、式中、記号～は、mおよびnで示される単位が多糖鎖に沿って分布しており、かつ必ずしも順序どおりではないことを示し、w、x、y、およびzがそれぞれ、mで示される各単位で同一または異なり、かつx、y、およびzがそれぞれ、nで示される各単位で同一または異なる、

かつ

10

該LMWH製剤が、

オリゴ糖の10～50%が分子量3000Da未満を有し；

オリゴ糖の40～65%が分子量3000～8000Daを有し；かつ

オリゴ糖の5～30%が8000Daを超える分子量を有する

ような分子量分布を有し、かつ

該LMWH製剤の1つまたは複数の多糖鎖が、還元性末端に2,5-アンヒドロマンニトール残基を有し、かつ

該LMWH製剤が、下記特性(a)～(c)：

(a)それぞれ50IU/mg未満である抗Xa活性および抗IIa活性；

(b)グリコール分割ウロン酸残基；および

(c)重量平均分子量3,500～8,000Da

20

のうちの1つまたは複数を有し、かつ

任意で、下記特性(d)～(g)：

(d)40%を超えるU<sub>2S</sub>H<sub>NS</sub>,<sub>6S</sub>二糖残基；

(e)脱硫酸化度40%未満；

(f)多糖鎖1本当たり3個以下のグリコール分割ウロン酸残基(U<sub>G</sub>)；および

(g)多分散性約1.2～1.7

のうちの1つまたは複数を有する、医薬組成物。

【請求項2】

前記LMWH製剤が、それぞれ20IU/mg未満である抗Xa活性および抗IIa活性を有する、請求項1に記載の使用のための医薬組成物。

30

【請求項3】

前記LMWH製剤が、それぞれ10IU/mg未満である抗Xa活性および抗IIa活性を有する、請求項1に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項4】

前記LMWH製剤が、それぞれ5IU/mg以下である抗Xa活性および抗IIa活性を有する、請求項1に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項5】

前記LMWH製剤が、LMWH製剤のオリゴ糖の10～40%が分子量3000Da未満を有するような分子量分布を有する、請求項1から4のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

40

【請求項6】

前記LMWH製剤が、LMWH製剤のオリゴ糖の45～65%が分子量3000～8000Daを有するような分子量分布を有する、請求項1から5のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項7】

前記LMWH製剤が、LMWH製剤のオリゴ糖の15～30%が8000Daを超える分子量を有するような分子量分布を有する、請求項1から6のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項8】

50

前記 L M W H 製剤が、グリコール分割ウロン酸残基を有する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 9】

前記毛が、頭皮の毛、顔の毛、体の毛、睫および眉毛からなる群から選択される、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 10】

前記対象が脱毛症を有する、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 11】

前記対象が、アンドロゲン性脱毛症、円形脱毛症、完全脱毛症、全身性脱毛、休止期脱毛、成長期脱毛状態、外傷性脱毛症、ヘアスタイリングの日常的手順からの機械的な「牽引性脱毛」、化学的誘発脱毛症、熱誘発脱毛症、放射線誘発脱毛症、化学療法誘発脱毛症、瘢痕化脱毛症、自己免疫疾患誘発脱毛症、疾患に関連する脱毛症、薬物誘発脱毛症および梅毒性脱毛症からなる群から選択される症状を有する、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

10

【請求項 12】

自己免疫疾患誘発脱毛症が、円板状エリテマトーデスまたは慢性皮膚エリテマトーデスからの脱毛症である、請求項 11 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 13】

疾患に関連する脱毛症が、甲状腺機能亢進症もしくは甲状腺機能低下症、または鉄欠乏からの脱毛症である、請求項 11 に記載の使用のための医薬組成物。

20

【請求項 14】

薬物誘発脱毛症が、抗生物質、抗真菌薬、抗うつ薬、抗痙攣薬、抗凝固薬、または非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) によって誘発される脱毛症である、請求項 11 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 15】

前記対象が脱毛症を有しない、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 16】

前記方法が、発毛を促進する第 2 の作用物質と併せて医薬組成物を投与する工程を含む、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

30

【請求項 17】

前記方法が、フィナスチリド (Propecia (登録商標)) またはミノキシジル (Rogaine (登録商標)) と併せて医薬組成物を投与する工程を含む、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 18】

前記方法が、発毛を促進する作用物質、ビタミン、ヒドロキシ酸、化学的または物理的日焼け止め、酸化防止剤、レチノイド、プロゲステロン、毛の暗色化剤または着色剤、毛の保湿剤、およびペプチドからなる群から選択される 1 種または複数種の作用物質と併せて医薬組成物を投与する工程を含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

40

【請求項 19】

ローション、クリーム、セーラム、スプレー、ムース、エアロゾル、エマルジョン、ゲル、軟膏、ジェル、ペースト、パッチ、ペンシル、ぬれナプキン、マスク、スティック、フォーム、エリキシル、または濃縮物として配合される、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 20】

泡立て界面活性剤、モイスチャーライザー、ふけ防止剤、発毛を促進する第 2 の作用物質、ビタミン、ヒドロキシ酸、化学的または物理的日焼け止め、酸化防止剤、レチノイド、プロゲステロン、毛の暗色化剤または着色剤、毛の保湿剤、およびペプチドからなる群

50

から選択される作用物質をさらに含む、請求項 19 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 21】

低分子量ヘパリン (LMWH) 製剤を含み、シャンプー、クリーム、ローション、フォーム、ゲル、セラム、スプレー、ムース、エアロゾル、エマルジョン、ケーキ、軟膏、ペースト、パッチ、ペンシル、ぬれナプキン、マスク、スティック、エリキシル、または濃縮物である、対象において発毛を誘発する方法における使用のための局所製剤であって

該方法が、

発毛の必要がある対象を同定する工程；および

発毛を誘発するのに十分な期間および量で該局所製剤を該対象に局所投与する工程；

10

を含み、

該 LMWH 製剤が、下記式 I：



の多糖から本質的になり、

式中、U は、ウロン酸残基を示し、H は、ヘキソサミン残基を示し；

m および n は、 $m = 4 \sim 16$ 、および  $n = 1 \sim 4$  であるような整数であり；

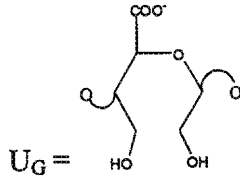
w = -2OS または -2OH であり；

x = -NS または -NAc であり；

y = -3OS または -3OH であり；

z = -6OS または -6OH であり；および

20



であり、式中、記号 ~ は、m および n で示される単位が多糖鎖に沿って分布しており、かつ必ずしも順序どおりではないことを示し、w、x、y、および z がそれぞれ、m で示される各単位で同一または異なり、かつ x、y、および z がそれぞれ、n で示される各単位で同一または異なる、

かつ

30

該 LMWH 製剤が、

オリゴ糖の 10 ~ 50 % が分子量 3000 Da 未満を有し；

オリゴ糖の 40 ~ 65 % が分子量 3000 ~ 8000 Da を有し；かつ

オリゴ糖の 5 ~ 30 % が 8000 Da を超える分子量を有する

ような分子量分布を有し、かつ

該 LMWH 製剤の 1 つまたは複数の多糖鎖が、還元性末端に 2,5-アンヒドロマンニトール残基を有し、かつ

該 LMWH 製剤が、下記特性 (a) ~ (c)：

(a) それぞれ 50 IU/mg 未満である抗 Xa 活性および抗 IIa 活性；

(b) グリコール分割ウロン酸残基；および

40

(c) 重量平均分子量 3,500 ~ 8,000 Da

のうちの 1 つまたは複数をも有し、かつ

任意で、下記特性 (d) ~ (g)：

(d) 40 % を超える U<sub>2S</sub>H<sub>NS</sub>,<sub>6S</sub> 二糖残基；

(e) 脱硫酸化度 40 % 未満；

(f) 多糖鎖 1 本当たり 3 個以下のグリコール分割ウロン酸残基 (U<sub>G</sub>)；および

(g) 多分散性約 1.2 ~ 1.7

のうちの 1 つまたは複数をも有する LMWH 製剤を含む、局所製剤。

【請求項 22】

前記 LMWH 製剤が、それぞれ 20 IU/mg 未満である抗 Xa 活性および抗 IIa 活

50

性を有する、請求項 2 1 に記載の局所製剤。

【請求項 2 3】

前記 L M W H 製剤が、それぞれ 1 0 I U / m g 未満である抗 X a 活性および抗 I I a 活性を有する、請求項 2 1 に記載の局所製剤。

【請求項 2 4】

前記 L M W H 製剤が、それぞれ 5 I U / m g 以下である抗 X a 活性および抗 I I a 活性を有する、請求項 2 1 に記載の局所製剤。

【請求項 2 5】

前記 L M W H 製剤が、L M W H 製剤のオリゴ糖の 1 0 ~ 4 0 % が分子量 3 0 0 0 D a 未満を有するような分子量分布を有する、請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の局所製剤。 10

【請求項 2 6】

前記 L M W H 製剤が、L M W H 製剤のオリゴ糖の 4 5 ~ 6 5 % が分子量 3 0 0 0 ~ 8 0 0 0 D a を有するような分子量分布を有する、請求項 2 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の局所製剤。

【請求項 2 7】

前記 L M W H 製剤が、L M W H 製剤のオリゴ糖の 1 5 ~ 3 0 % が 8 0 0 0 D a を超える分子量を有するような分子量分布を有する、請求項 2 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の局所製剤。

【請求項 2 8】

前記 L M W H 製剤が、グリコール分割ウロン酸残基を有する、請求項 2 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の局所製剤。 20

【請求項 2 9】

発毛を促進する第 2 の作用物質、泡立て界面活性剤、モイスチャーライザー、ふけ防止剤、ビタミン、ヒドロキシ酸、化学的または物理的日焼け止め、酸化防止剤、レチノイド、プロゲステロン、毛の暗色化剤または着色剤、毛の保湿剤、香料、ワックス、オイル、およびペプチドからなる群から選択される作用物質をさらに含む、請求項 2 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の局所製剤。

【請求項 3 0】

低分子量ヘパリン ( L M W H ) 製剤を含み、対象において発毛を誘発する方法における使用のためにパッケージされ、かつ同定された、対象において発毛を誘発する方法における使用のための医薬局所組成物、獣医学的または美容的局所組成物であって、 30

該方法が、

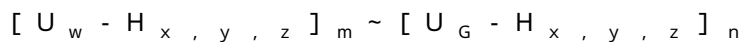
発毛の必要がある対象を同定する工程；および

発毛を誘発するのに十分な期間および量で該局所組成物を該対象に局所投与する工程

；

を含み、

該 L M W H 製剤が、下記式 I :



の多糖から本質的になり、 40

式中、U は、ウロン酸残基を示し、H は、ヘキソサミン残基を示し；

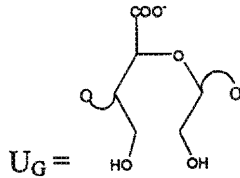
m および n は、m = 4 ~ 1 6、および n = 1 ~ 4 であるような整数であり；

w = - 2 O S または - 2 O H であり；

x = - N S または - N A c であり；

y = - 3 O S または - 3 O H であり；

z = - 6 O S または - 6 O H であり；および



であり、式中、記号～は、mおよびnで示される単位が多糖鎖に沿って分布しており、かつ必ずしも順序どおりではないことを示し、w、x、y、およびzがそれぞれ、mで示される各単位で同一または異なり、かつx、y、およびzがそれぞれ、nで示される各単位で同一または異なる、

かつ

10

該LMWH製剤が、

オリゴ糖の10～50%が分子量3000Da未満を有し；

オリゴ糖の40～65%が分子量3000～8000Daを有し；かつ

オリゴ糖の5～30%が8000Daを超える分子量を有する

ような分子量分布を有し、かつ

該LMWH製剤の1つまたは複数の多糖鎖が、還元性末端に2,5-アンヒドロマンニトール残基を有し、かつ

該LMWH製剤が、下記特性(a)～(c)：

(a)それぞれ50IU/mg未満である抗Xa活性および抗IIa活性；

(b)グリコール分割ウロン酸残基；および

(c)重量平均分子量3,500～8,000Da；

20

のうちの1つまたは複数を有し、かつ

任意で、下記特性(d)～(g)：

(d)40%を超えるU<sub>2S</sub>H<sub>NS</sub>,<sub>6S</sub>二糖残基；

(e)脱硫酸化度40%未満；

(f)多糖鎖1本当たり3個以下のグリコール分割ウロン酸残基(U<sub>G</sub>)；および

(g)多分散性約1.2～1.7；

のうちの1つまたは複数を有する、局所組成物。

【請求項31】

前記LMWH製剤が、それぞれ20IU/mg未満である抗Xa活性および抗IIa活性を有する、請求項30に記載の局所組成物。

30

【請求項32】

前記LMWH製剤が、それぞれ10IU/mg未満である抗Xa活性および抗IIa活性を有する、請求項30に記載の局所組成物。

【請求項33】

前記LMWH製剤が、それぞれ5IU/mg以下である抗Xa活性および抗IIa活性を有する、請求項30に記載の局所組成物。

【請求項34】

前記LMWH製剤が、LMWH製剤のオリゴ糖の10～40%が分子量3000Da未満を有するような分子量分布を有する、請求項30から33のいずれか一項に記載の局所組成物。

40

【請求項35】

前記LMWH製剤が、LMWH製剤のオリゴ糖の45～65%が分子量3000～8000Daを有するような分子量分布を有する、請求項30から34のいずれか一項に記載の局所組成物。

【請求項36】

前記LMWH製剤が、LMWH製剤のオリゴ糖の15～30%が8000Daを超える分子量を有するような分子量分布を有する、請求項30から35のいずれか一項に記載の局所組成物。

【請求項37】

50

前記 LMWH 製剤が、グリコール分割ウロン酸残基を有する、請求項 30 から 36 のいずれか一項に記載の局所組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

ヘパリン関連化合物は、抗凝固薬および抗血栓剤として広く使用されている。それらは発毛を抑制するとも報告されている。Wang and Po(2006)Enoxaparin-induced alopecia in patients with cerebral venous thrombosis. J Clin Pharm Ther 31(5):513-7 (非特許文献1); Tsele et al.(2003)Diffuse alopecia in a hemodialysis patient caused by a low molecular weight heparin, tinzaparin. Am J Kidney Dis 41:E15 (非特許文献2); Paus(1991)Hair growth inhibition by heparin in mice:a model system for studying the modulation of epithelial growth by glycosaminoglycans? Br J Dermatol 124:415-22 (非特許文献3)を参照されたい。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0002】

【非特許文献1】Wang and Po(2006)Enoxaparin-induced alopecia in patients with cerebral venous thrombosis. J Clin Pharm Ther 31(5):513-7

【非特許文献2】Tsele et al.(2003)Diffuse alopecia in a hemodialysis patient caused by a low molecular weight heparin, tinzaparin. Am J Kidney Dis 41:E15

20

【非特許文献3】Paus(1991)Hair growth inhibition by heparin in mice:a model system for studying the modulation of epithelial growth by glycosaminoglycans? Br J Dermatol 124:415-22

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本発明は、低分子量ヘパリン(例えば本明細書に記載のLMWH、例えば低減された抗凝固活性を有するLMWH)が発毛を促進することができるという発見に少なくとも一部基づく。したがって、本発明はとりわけ、発毛を増加する方法、ならびに関連する医薬製剤、獣医学的および/または美容的製剤を特徴とする。

30

【0004】

本明細書で使用される「毛」とは、限定されないが、頭皮の毛、睫、眉毛、口髭、および顎鬚などの頭皮、頭、顔および/または体の毛を意味する。

【0005】

本明細書で使用される「発毛を誘発する」とは、毛の成長の誘発および毛を見た目により多く見えるようにすることなどを含むがこれに限定されない、新たな毛周期の成長のより早い誘発(対照と比較して)、および/または毛周期の活性化成長段階の延長、および/または毛の成長速度の増加、および/または毛幹の幅の増加を意味する。

【0006】

40

本明細書で使用される、「併せて」2種類以上の作用物質を投与することとは、個々の作用物質が、同時に、または対象に対する作用物質の生理学的作用がオーバーラップするような時間間隔内で、投与されることを意味する。その2種類以上の作用物質は、同一配合物または製剤で投与してもよいし、またはしなくてもよい。

[本発明1001]

対象において発毛を誘発する方法であって、

(a) 発毛の必要がある対象を同定する工程; および

(b) 発毛を誘発するのに十分な期間および量で本明細書に記載のLMWHを前記対象に投与する工程

を含む、方法。

50

[本発明1002]

前記毛が、頭皮の毛、顔の毛、体の毛、睫および眉毛からなる群から選択される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記投与工程の前および前記投与工程の後のうちの一方または両方で発毛を評価する工程をさらに含む、本発明1001および1002のいずれかの方法。

[本発明1004]

前記対象が脱毛症を有する、本発明1001から1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

前記対象が、アンドロゲン性脱毛症、円形脱毛症、完全脱毛症、全身性脱毛、休止期脱毛、成長期脱毛状態、外傷性脱毛症、ヘアスタイリングの日常的手順からの機械的な「牽引性脱毛」、化学的誘発脱毛症、熱誘発脱毛症、放射線誘発脱毛症、化学療法誘発脱毛症、癬痕化脱毛症、自己免疫疾患誘発脱毛症（例えば、円板状エリテマトーデスまたは慢性皮膚エリテマトーデスからの）、疾患に関連する脱毛症（例えば、甲状腺機能亢進症または甲状腺機能低下症、鉄欠乏からの）、薬物誘発脱毛症（例えば、抗生物質および抗真菌薬、抗うつ薬、抗痙攣薬、ヘパリンおよび一部のLMMHなどの抗凝固薬、アスピリンなどのNSAID、抗高血圧薬、ホルモン補充療法によって誘発される脱毛症）および梅毒性脱毛症からなる群から選択される症状を有する、本発明1001から1004のいずれかの方法。

10

[本発明1006]

前記対象が脱毛症を有しない、本発明1001から1003のいずれかの方法。

20

[本発明1007]

前記LMMHが、発毛を促進する第2の作用物質と併せて投与される、本発明1001から1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

前記LMMHが、フィナスチリド（Propecia（登録商標））またはミノキシジル（（登録商標））と併せて投与される、本発明1001から1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

前記LMMHが、発毛を促進する作用物質、ビタミン、ヒドロキシ酸、化学的または物理的日焼け止め、酸化防止剤、レチノイド、プロゲステロン、毛の暗色化剤または着色剤、毛の保湿剤、およびペプチドからなる群から選択される1種または複数種の作用物質と併せて投与される、本発明1001から1008のいずれかの方法。

30

[本発明1010]

前記LMMHが局所投与される、本発明1001から1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記LMMHが、ローション、クリーム、セラム、スプレー、ムース、エアロゾル、エマルジョン、ケーキ、軟膏、ゲル、ペースト、パッチ、ペンシル、ぬれナプキン、マスク、スティック、フォーム、エリキシル、または濃縮物として配合される、本発明1010の方法。

[本発明1012]

前記局所製剤が、泡立て界面活性剤、モイスチャーライザー、ふけ防止剤、発毛を促進する第2の作用物質、ビタミン、ヒドロキシ酸、化学的または物理的日焼け止め、酸化防止剤、レチノイド、プロゲステロン、毛の暗色化剤または着色剤、毛の保湿剤、およびペプチドからなる群から選択される作用物質をさらに含む、本発明1010または1011の方法。

40

[本発明1013]

前記LMMHが経口投与される、本発明1001から1009のいずれかの方法。

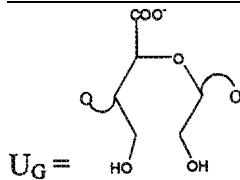
[本発明1014]

前記LMMHが、錠剤、カプセル剤、水溶液、ゼラチン固形物または半固形物、または懸濁液として配合される、本発明1013の方法。

[本発明1015]

前記LMMHが、注入によって投与される、本発明1001から1009のいずれかの方法。

50

[本発明1016]前記LMWHが、皮下または静脈内注射用に配合される、本発明1014の方法。[本発明1017]前記LMWHが、以下：(a) それぞれ50IU/mg、20IU/mg、10IU/mg未満、5IU/mg以下である抗Xa活性および抗IIa活性；(b) グリコール分割ウロン酸残基（例えば、グリコール分割ウロン酸残基50%、40%、30%、20%未満）；(c) 重量平均分子量3,500~8,000Da、例えば、4,000~8,000Da；という特性(a)~(c)のうちの1つまたは複数を有し、かつ任意で、以下：(d) 40%を超える $U_{2S}H_{NS-6S}$ 二糖残基；(e) 脱硫酸化度40%未満；(f) 非還元性ウロン酸末端残基の4,5-不飽和を有する1つまたは複数の多糖鎖；(g) 還元性末端に2,5-アンヒドロマンニトール残基を有する1つまたは複数の多糖鎖；(h) 多糖鎖1本当たり3個以下のグリコール分割ウロン酸残基( $U_G$ )；(i) オリゴ糖の10~50%（例えば、10~40%、10~30%、15~30%または15~25%）が分子量3000Da未満を有する；(j) オリゴ糖の40~65%（例えば、40~60%、45~65%、50~65%、または55~65%）が分子量3000~8000Daを有する；(k) オリゴ糖の5~30%（例えば、10~30%、15~30%、10~25%、または15~25%）が8000Daを超える分子量を有する；(l) 多分散性約1.2~1.7（例えば、約1.3~1.7、1.4~1.6、または1.3~1.6）；(m) 式I： $[U_w-H_{x,y,z}]_m \sim [U_G-H_{x,y,z}]_n$ を含む多糖から本質的になり、式中、Uは、ウロン酸残基を示し、Hは、ヘキソサミン残基を示し；mおよびnは、 $m=4\sim 16$ 、および $n=1\sim 4$ であるような整数であり； $w = -20S$ または $-20H$ であり； $x = -NS$ または $-NAc$ であり； $y = -30S$ または $-30H$ であり； $z = -60S$ または $-60H$ であり；およびであり、式中、記号 $\sim$ は、mおよびnで示される単位が多糖鎖に沿って分布しており、かつ必ずしも順序どおりではないことを示し、w、x、y、およびzがそれぞれ、mで示される各単位で同一または異なり、かつx、y、およびzがそれぞれ、nで示される各単位で同一または異なる；(n) 式II： $[U_w-H_{x,y,z}]_m - [U_G-H_{x,y,z}]_n - [U_w-H_{x,y,z}]_o - [U_G-H_{x,y,z}]_p - [U_w-H_{x,y,z}]_q$ を含む多糖から本質的になり、式中、Uは、ウロン酸残基を示し、Hは、ヘキソサミン残基を示し；m~rは、 $m = 0\sim 10$ ； $n = 0\sim 3$ ； $o = 0\sim 10$ ； $p = 0\sim 3$ ； $q = 0\sim 10$ であるような整数であり； $w = -20S$ または $-20H$ であり；

10

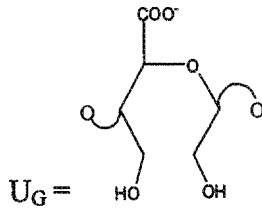
20

30

40

50

x = - NSまたは - NAcであり ;  
y = - 3OSまたは - 3OHであり ;  
z = - 6OSまたは - 6OHであり ; および



であり ; w、x、y、 およびzがそれぞれ、m、n、o、p、またはqで示される各単位で同一または異なる ;

10

という特性 (d) ~ (m) のうちの1つまたは複数を有する、本発明1001から1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

以下 :

(a) それぞれ50IU/mg、20IU/mg、10IU/mg未満、5IU/mg以下である抗Xa活性および抗IIa活性 ;

(b) グリコール分割ウロン酸残基 (例えば、グリコール分割ウロン酸残基50%、40%、30%、20%未満) ;

(c) 重量平均分子量3,500 ~ 8,000Da、例えば、4,000 ~ 8,000Da ;

20

という特性 (a) ~ (c) のうちの1つまたは複数を有し、かつ任意で、以下 :

(d) 40%を超える  $U_2S^H_{NS-6S}$  二糖残基 ;

(e) 脱硫酸化度40%未満 ;

(f) 非還元性ウロン酸末端残基の4,5 - 不飽和を有する1つまたは複数の多糖鎖 ;

(g) 還元性末端に2,5 - アンヒドロマンニトール残基を有する1つまたは複数の多糖鎖 ;

(h) 多糖鎖1本当たり3個以下のグリコール分割ウロン酸残基 ( $U_G$ ) ;

(i) オリゴ糖の10 ~ 50% (例えば、10 ~ 40%、10 ~ 30%、15 ~ 30%または15 ~ 25%) が分子量3000Da未満を有する ;

(j) オリゴ糖の40 ~ 65% (例えば、40 ~ 60%、45 ~ 65%、50 ~ 65%、または55 ~ 65%) が分子量3000 ~ 8000Daを有する ;

30

(k) オリゴ糖の5 ~ 30% (例えば、10 ~ 30%、15 ~ 30%、10 ~ 25%、または15 ~ 25%) が8000Daを超える分子量を有する ;

(l) 多分散性約1.2 ~ 1.7 (例えば、約1.3 ~ 1.7、1.4 ~ 1.6、または1.3 ~ 1.6) ;

(m) 式I :  $[U_w - H_{x,y,z}]_m \sim [U_G - H_{x,y,z}]_n$  を含む多糖から本質的になり、

式中、Uは、ウロン酸残基を示し、Hは、ヘキシサミン残基を示し ;

mおよびnは、 $m = 4 \sim 16$ 、および $n = 1 \sim 4$ であるような整数であり ;

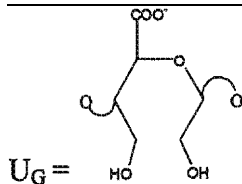
w = - 2OSまたは - 2OHであり ;

x = - NSまたは - NAcであり ;

40

y = - 3OSまたは - 3OHであり ;

z = - 6OSまたは - 6OHであり ; および



であり、式中、記号 ~ は、mおよびnで示される単位が多糖鎖に沿って分布しており、かつ必ずしも順序どおりではないことを示し、w、x、y、 およびzがそれぞれ、mで示される各単位で同一または異なり、かつx、y、 およびzがそれぞれ、nで示される各単位で同一また

50

は異なる；

(n) 式II：  $[U_w - H_{x,y,z}]_m - [U_G - H_{x,y,z}]_n - [U_w - H_{x,y,z}]_o - [U_G - H_{x,y,z}]_p - [U_w - H_{x,y,z}]_q$  を含む多糖から本質的になり、

式中、Uは、ウロン酸残基を示し、Hは、ヘキソサミン残基を示し；

m ~ rは、

m = 0 ~ 10；

n = 0 ~ 3；

o = 0 ~ 10；

p = 0 ~ 3；

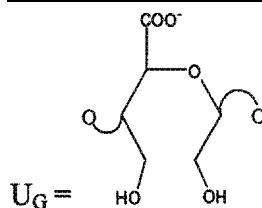
q = 0 ~ 10であるような整数であり；

w = -20Sまたは-20Hであり；

x = -NSまたは-NAcであり；

y = -30Sまたは-30Hであり；

z = -60Sまたは-60Hであり；および



であり；w、x、y、およびzがそれぞれ、m、n、o、p、またはqで示される各単位で同一または異なる）；

という特性(d) ~ (m)のうちの1つまたは複数を有するLMWHを含む、局所製剤。

[本発明1019]

発毛を促進する第2の作用物質、泡立て界面活性剤、モイスチャーライザー、ふけ防止剤、ビタミン、ヒドロキシ酸、化学的または物理的日焼け止め、酸化防止剤、レチノイド、プロゲステロン、毛の暗色化剤または着色剤、毛の保湿剤、香料、ワックス、オイル、酸化防止剤、およびペプチドからなる群から選択される作用物質をさらに含む、本発明1018の局所製剤。

[本発明1020]

シャンプー、クリーム、ローション、フォーム、ゲル、セーラム、スプレー、ムース、エアロゾル、エマルジョン、ケーキ、軟膏、ペースト、パッチ、ペンシル、ぬれナブキン、マスク、スティック、エリキシル、または濃縮物である、本発明1018または1019の局所製剤。

[本発明1021]

パッケージされ、かつ対象において発毛を誘発する方法に関して同定された医薬製剤、獣医学的または美容的製剤であって、以下：

(a) それぞれ50IU/mg、20IU/mg、10IU/mg未満、5IU/mg以下である抗Xa活性および抗IIa活性；

(b) グリコール分割ウロン酸残基（例えば、グリコール分割ウロン酸残基50%、40%、30%、20%未満）；

(c) 重量平均分子量3,500 ~ 8,000Da、例えば、4,000 ~ 8,000Da；

という特性(a) ~ (c)のうちの1つまたは複数を有し、かつ任意で、以下：

(d) 40%を超えるU<sub>2S</sub>H<sub>NS-6S</sub>二糖残基；

(e) 脱硫酸化度40%未満；

(f) 非還元性ウロン酸末端残基の4,5-不飽和を有する1つまたは複数の多糖鎖；

(g) 還元性末端に2,5-アンヒドロマンニトール残基を有する1つまたは複数の多糖鎖；

；

(h) 多糖鎖1本当たり3個以下のグリコール分割ウロン酸残基(U<sub>G</sub>)；

(i) オリゴ糖の10 ~ 50%（例えば、10 ~ 40%、10 ~ 30%、15 ~ 30%または15 ~ 25%）

10

20

30

40

50

が分子量3000Da未満を有する；

(j) オリゴ糖の40～65%（例えば、40～60%、45～65%、50～65%、または55～65%）が分子量3000～8000Daを有する；

(k) オリゴ糖の5～30%（例えば、10～30%、15～30%、10～25%、または15～25%）が8000Daを超える分子量を有する；

(l) 多分散性約1.2～1.7（例えば、約1.3～1.7、1.4～1.6、または1.3～1.6）；

(m) 式I： $[U_w - H_{x,y,z}]_m \sim [U_G - H_{x,y,z}]_n$ を含む多糖から本質的になり、

式中、Uは、ウロン酸残基を示し、Hは、ヘキソサミン残基を示し；

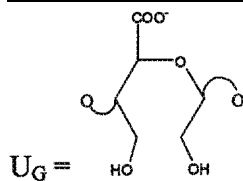
mおよびnは、 $m = 4 \sim 16$ 、および $n = 1 \sim 4$ であるような整数であり；

$w = -20S$ または $-20H$ であり；

$x = -NS$ または $-NAc$ であり；

$y = -30S$ または $-30H$ であり；

$z = -60S$ または $-60H$ であり；および



であり、式中、記号 $\sim$ は、mおよびnで示される単位が多糖鎖に沿って分布しており、かつ必ずしも順序どおりではないことを示し、w、x、y、およびzがそれぞれ、mで示される各単位で同一または異なり、かつx、y、およびzがそれぞれ、nで示される各単位で同一または異なる；

(n) 式II： $[U_w - H_{x,y,z}]_m - [U_G - H_{x,y,z}]_n - [U_w - H_{x,y,z}]_o - [U_G - H_{x,y,z}]_p - [U_w - H_{x,y,z}]_q$ を含む多糖から本質的になり、

式中、Uは、ウロン酸残基を示し、Hは、ヘキソサミン残基を示し；

m～rは、

$m = 0 \sim 10$ ；

$n = 0 \sim 3$ ；

$o = 0 \sim 10$ ；

$p = 0 \sim 3$ ；

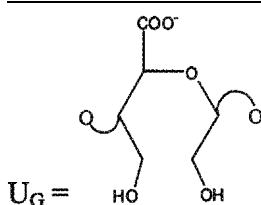
$q = 0 \sim 10$ であるような整数であり；

$w = -20S$ または $-20H$ であり；

$x = -NS$ または $-NAc$ であり；

$y = -30S$ または $-30H$ であり；

$z = -60S$ または $-60H$ であり；および



であり；w、x、y、およびzがそれぞれ、m、n、o、p、またはqで示される各単位で同一または異なる；

という特性(d)～(m)のうちの1つまたは複数を有するLMWHを含む、前記製剤。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】処置して16日後の、生理食塩水、Fragmin、MONC402またはMONC202で浸透圧ポンプによって処置された剪毛したマウスの写真を示す。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 8 】

詳細な説明

脱毛

脱毛症は、ヒトの頭または体の毛が減少すること、または薄くなること、あるいは動物の毛または羽が減少することである。遺伝、ホルモン作用、特定の疾患、および特定の薬物および処置が脱毛症の原因となり得る。脱毛症は年齢が上昇するにしたがって、より一般的となるが、脱毛は若い年齢でも始まり得る。

## 【 0 0 0 9 】

化学療法により誘発される脱毛症は、臨床腫瘍学における問題である。特定の化学療法薬、例えば、代謝拮抗剤（メトトレキサート、5-フルオロウラシル、シタラピン）、アルキル化剤（シクロホスファミド、メクロレタミン、ダカルバジン、イホスファミド）、抗悪性腫瘍抗生物質（ブレオマイシン、アクチノマイシンD、ダウノマイシン、ドキソルビシン、ミトキサントロン）、ピンカアルカロイド（ピンシスチン、ピンプラスチン）およびタキサン（タキソール、タキソテル）は、毛母の活性増殖細胞を殺すことによって成長期脱毛状態を引き起こし、脱毛症を誘発する。

10

## 【 0 0 1 0 】

低分子量ヘパリン

本明細書に記載のLMWHは、発毛を誘発する方法において使用することができる。

## 【 0 0 1 1 】

一態様において、このLMWH、例えばFragmin（登録商標）（ダルテパリン）またはM402は、亜硝酸の解重合によって製造される。

20

## 【 0 0 1 2 】

一部の態様において、LMWHは、以下の特徴：（a）低減された抗凝固活性、例えば、それぞれが50IU/mg、20IU/mg、10IU/mg未満、5IU/mg以下（例えば、0.5~10IU/mg、0.5~5IU/mg、1~10IU/mg、1~5IU/mg）である抗Xa活性および抗IIa活性；（b）グリコール分割ウロン酸残基（例えば、グリコール分割ウロン酸残基50%、40%、30%、20%未満）；（c）重量平均分子量3、500~8、000Da、例えば、4,000~8,000Daを有し得る。

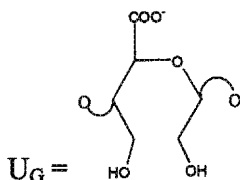
## 【 0 0 1 3 】

一部の態様において、LMWHはさらに、以下の特性：

- (d) 40%を超える $U_{2S}H_{NS,6S}$ 二糖残基；
- (e) 脱硫酸化度40%未満；
- (f) 非還元性ウロン酸末端残基の4,5-不飽和を有する1つまたは複数の多糖鎖；
- (g) 還元性末端に2,5-アンヒドロマンニトール残基を有する1つまたは複数の多糖鎖；
- (h) 多糖鎖1本当たり3個以下のグリコール分割ウロン酸残基（ $U_G$ ）；
- (i) オリゴ糖の10~50%（例えば、10~40%、10~30%、15~30%または15~25%）が分子量3000Da未満を有する；
- (j) オリゴ糖の40~65%（例えば、40~60%、45~65%、50~65%、または55~65%）が分子量3000~8000Daを有する；
- (k) オリゴ糖の5~30%（例えば、10~30%、15~30%、10~25%、または15~25%）が8000Daを超える分子量を有する；
- (l) 多分散性約1.2~1.7（例えば、約1.3~1.7、1.4~1.6、または1.3~1.6）；
- (m) 式I： $[U_w-H_{x,y,z}]_m \sim [U_G-H_{x,y,z}]_n$ を含む多糖から本質的になり、式中、Uは、ウロン酸残基を示し、Hは、ヘキソサミン残基を示し；mおよびnは、 $m=4\sim 16$ 、および $n=1\sim 4$ であるような整数であり； $w=-2OS$ または $-2OH$ であり； $x=-NS$ または $-NAc$ であり； $y=-3OS$ または $-3OH$ であり； $z=-6OS$ または $-6OH$ であり；および

30

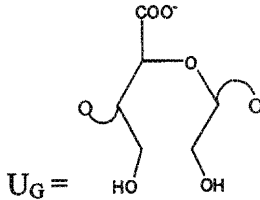
40



50

であり、式中、記号～が、mおよびnで示される単位が多糖鎖に沿って分布しており、かつ必ずしも順序どおりではないことを示し、w、x、y、およびzがそれぞれ、mで示される各単位で同一または異なり、かつx、y、およびzがそれぞれ、nで示される各単位で同一または異なる；

(n) 式II:  $[U_w-H_{x,y,z}]_m-[U_G-H_{x,y,z}]_n-[U_w-H_{x,y,z}]_o-[U_G-H_{x,y,z}]_p-[U_w-H_{x,y,z}]_q$  を含む多糖から本質的になり、式中、Uは、ウロン酸残基を示し、Hは、ヘキソサミン残基を示し；m～qは、m=0～10；n=0～3；o=0～10；p=0～3；q=0～10であるような整数であり；w=-2OSまたは-2OH；x=-NSまたは-NAc；y=-3OSまたは-3OH；z=-6OSまたは-6OHであり；および



10

であり、式中、w、x、y、およびzがそれぞれ、m、n、o、p、またはqで示される各単位で同一または異なる；

のうちの1つまたは複数（例えば、2、3、4、5、6、7、8、または9、10、11個）を有し得る。

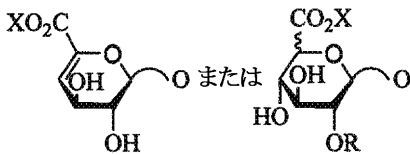
【0014】

20

上記では、w、x、y、およびzがそれぞれ、 $[U_w-H_{x,y,z}]$ のそれぞれの場合で同一または異なり、x、y、およびzがそれぞれ、 $[U_G-H_{x,y,z}]$ のそれぞれの場合で同一または異なる。それぞれの場合のUは独立して、イズロン酸(I)またはグルクロン酸(G)である。一部の実施形態において、n+pの合計が4以下（例えば、3、2、1、または0以下）である。一部の実施形態において、nとpの合計は4、3、2または1である。一部の実施形態において、m、oおよびqの合計は、4から18、例えば、4～8、4～9、4～10、4～11、4～12、4～13、4～14、4～15、4～16または4～17である。

【0015】

一態様において、LMWH製剤における多糖鎖のうちの少なくとも1つは、非還元性末端に以下の構造：



30

のうちの1つを有し、式中、XはHまたはMeであり、RはHまたはSO<sub>3</sub>である。製剤または医薬組成物の非還元性末端の、例えば約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または実質的にすべてがその構造を有する。

【0016】

一態様において、製剤または医薬組成物における多糖鎖のうちの少なくとも1つは、還元性末端に2,5-アンヒドロマンニトール残基を含む。製剤または医薬組成物における多糖鎖の、例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または実質的にすべてが、還元性末端に2,5-アンヒドロマンニトール残基を含む。

40

【0017】

抗IIa活性：

抗IIa活性は、平行線検定に関する統計的方法を用いて、1ミリグラム当たりの抗IIa活性の国際単位で計算される。本明細書に記載の抗IIa活性レベルは、以下の原理を用いて測定される。

多糖(PS)+ATIII [PS・ATIII]

IIa

PS・ATIII [PS・ATIII・IIa]+IIa(過多)

50

IIa ( 過 多 ) + 基 質 ペプチド+pNA ( 分 光 光 度 法 で 測 定 )

【 0 0 1 8 】

抗第IIa因子活性は、トロンビンの抑制においてアンチトロンビン ( ATIII ) への効果を増強する試料によって決定される。トロンビンの過多は間接的に、分光光度法で測定することができる。例えば、Chromogenixから市販の試薬 ( S - 2238基質、トロンビン ( 53kat / バイアル ) 、およびアンチトロンビン ) を使用して、Diagnostica Stago分析器またはACL Futura3 Coagulationシステム、または同等ないずれかのシステムで、抗第IIa因子活性を測定することができる。分析器の応答は、低分子量ヘパリンに対する第二国際基準を用いて較正される。

【 0 0 1 9 】

抗Xa活性 :

製剤の抗Xa活性は、平行線検定に関する統計的方法を用いて、1ミリグラム当たりの抗第Xa因子活性の国際単位で計算される。本明細書に記載の製剤の抗第Xa因子活性は、以下の原理を用いて測定される。

PS + ATIII [PS · ATIII]

FXa

PS · ATIII [PS · ATIII · FXa]+FXa( 過 多 )

FXa( 過 多 ) + 基 質 ペプチド+pNA( 分 光 光 度 法 で 測 定 )

【 0 0 2 0 】

抗第Xa因子活性は、活性化第Xa因子 ( Fxa ) の抑制においてアンチトロンビン ( ATIII ) への効果を増強する試料によって決定される。第Xa因子の過多は間接的に分光光度法で測定することができる。例えば、Stachrom ( 登録商標 ) ヘパリンテストキットを用いてDiagnostica Stago分析器で、Chromogenixから市販のCoatest ( 登録商標 ) ヘパリンキットを用いてACL Futura3 Coagulationシステムで、同等ないずれかのシステムで、抗第Xa因子活性を測定することができる。分析器の応答は、低分子量ヘパリンに対するNIBSC国際基準を用いて較正することができる。

【 0 0 2 1 】

分子量および鎖長 :

製剤の重量平均分子量が決定される場合、重量平均分子量約3500 ~ 8000Da、約3500 ~ 6300Da、好ましくは約4000 ~ 6000Da、約4200 ~ 5900、または約4300 ~ 5800Daは、多糖製剤におけるかなりの数の鎖が十分な鎖長の鎖であることを意味する。本明細書で使用される「重量平均分子量」とは、ウロン酸 / ヘキソサミン二糖が反復している鎖の重量平均 ( ダルトン ) を意味する。非ウロン酸および / または非ヘキソサミン構成単位の存在は、重量平均分子量の決定に含まれていない。したがって、製剤の1つまたは複数の鎖内の非ウロン酸および非ヘキソサミンの分子量は、重量平均分子量の決定に含まれない。重量平均分子量 (  $M_w$  ) は、以下の等式 :  $M_w = \frac{\sum (c_i m_i)}{\sum c_i}$  から計算される。変数  $c_i$  は、スライス  $i$  におけるポリマーの濃度であり、 $m_i$  は、スライス  $i$  におけるポリマーの分子量である。総和は、データの多くのスライスを含むクロマトグラフのピークについて算出される。データのスライス、クロマトグラフのピーク対時間のプロット上で垂線として描かれる。したがって、溶離ピークは、多くのスライスに分割される。重量平均分子量の計算値は、濃度および分子量のすべてのスライスの総和に依存する平均値である。重量平均分子量は、例えばWyatt Astraソフトウェアまたは適切ないずれかのソフトウェアを使用して測定することができる。本明細書に記載の重量平均分子量は、直列に2つのカラムを備えた高速液体クロマトグラフィー、例えば、多角度光散乱 ( MALS ) 検出器および屈折率検出器が直列で連結されたTSK G3000 SWXLおよびG2000 SWXLによって決定される。使用される溶離剤は、0.2M硫酸ナトリウム、pH5.0、および0.5mL / 分である。

【 0 0 2 2 】

多糖製剤が十分な鎖長を含むかどうかの決定は、例えば、製剤中の鎖の平均鎖長を決定することによって、かつ / または製剤中の鎖の重量平均分子量を決定することによって行われる。平均鎖長を決定する場合、二糖の反復が約5 ~ 22個、例えば約7 ~ 18個、一般に約

10

20

30

40

50

7～14個または8～13個の平均鎖長は、製剤における十分な数の鎖が十分な鎖長であることを意味する。

【0023】

「平均鎖長」とは、鎖内に存在するウロン酸/ヘキシサミン二糖が反復している鎖の平均鎖長を意味する。非ウロン酸および/または非ヘキシサミン構成単位（例えば、付属的PEG部位）の存在は、平均鎖長の決定に含まれない。平均鎖長は、その数平均分子量（Mn）を二糖（500Da）の数平均分子量で割ることによって決定される。

【0024】

グリコール分割ウロン酸：

本明細書に記載の多糖製剤は、従来から還元-酸化（RO）誘導体と呼ばれている、グリコシド環の開環を含み得る。これらの製剤において、ビニルジオールを有する1つまたは複数のグリコシド環は、酸化作用に続いて還元によって、例えばC2とC3の間の結合で開環される。本明細書で言及される化合物は、「グリコール分割（Glycol Split）」誘導体とも呼ばれる。本明細書に記載の更なる実施形態において、グリコール分割残基は、その後の官能基化にそれ自体を与える。したがって、その化合物は、グリコール分割から誘導される第1級ヒドロキシ基の代わりに、同じまたは異なる基、例えば、単一のサッカリドまたはアミノ酸から、1単位を超える長さ、例えば2または3単位の長さまでの範囲の、アルデヒド基、メトキシ基、またはオリゴ糖もしくはペプチド基も有し得る。

10

【0025】

一部の実施形態において、ウロン酸残基の50%未満は、グリコール分割ウロン酸残基である（例えば、ウロン酸残基の40%、30%、25%、または20%未満がグリコール分割ウロン酸残基である）。

20

【0026】

還元性末端構造：

一部の場合において、本明細書に記載の多糖製剤中の鎖の少なくとも約50%が、2,5-アンヒドロマンノース残基またはアルコールを形成するように還元された2,5-アンヒドロマンノースなどの修飾還元性末端構造を有する。一部の実施形態において、還元性末端が、2,5-アンヒドロマンノース残基およびアルコールを形成するように還元された2,5-アンヒドロマンノースを含有するように、製剤中の鎖の少なくとも約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%が、修飾還元性末端構造を有する。

30

【0027】

多分散性：

本明細書で提供される多糖製剤の多分散性指数は、約2以下、例えば、1.7以下、例えば、約1.7または1.6～1.2、約1.4～1.5、およびその間の数である。「多分散系」または「多分散性」という用語は、数平均分子量（Mn）で割った組成物の重量平均分子量（Mw）を意味する。数平均分子量（Mn）は以下の等式： $Mn = \sum c_i / (\sum c_i / m_i)$  から計算される。変数 $c_i$ は、スライス $i$ における多糖の濃度であり、 $m_i$ はスライス $i$ における多糖の分子量である。その総和は、データの多くのスライスを含む、クロマトグラフのピークについて算出される。データのスライス、クロマトグラフのピーク対時間のプロット上で垂線として描かれる。したがって、溶離ピークは、多くのスライスに分割される。数平均分子量は、データの各スライスでの分子量および濃度に従属的な計算値である。重量平均分子量を決定する方法は上述されており、それを用いて多分散性も決定した。

40

【0028】

本明細書に記載のLMWHを製造する方法

一方法は、前駆物質ヘパリン製剤（UFHなど）を提供し、前駆物質ヘパリン製剤を処理して（例えば、酵素または化学解重合によって、例えば亜硝酸解重合によって）、重量平均分子量約3000～7000Daまたは平均鎖長約7～18個の二糖を有する多糖製剤を得ることを含む。

【0029】

ヘパリン前駆物質製剤は、解重合（例えば、亜硝酸処理、加水分解、または酵素的解重

50

合による)に続いて任意でグリコール分割反応を含む方法によって処理することができる。例えば、温度約10~30、pH約2~4にて指定の時間(例えば、約1~5時間)、亜硝酸(例えば、約0.02~0.04M亜硝酸)でヘパリン前駆物質製剤(例えばUFH)を処理することによって、亜硝酸解重合を達成することができる。グリコール分割反応は、過ヨウ素酸塩(例えば、約0.05M~0.2M過ヨウ素酸ナトリウム)を使用した、温度約0~10で約10~20時間の過ヨウ素酸酸化を伴う。一部の実施形態において、塩またはジエチレングリコール( DEG )などの残留不純物は引き続き、クロマトグラフ法、例えばゲル濾過クロマトグラフィーによって除去することができる。任意で、次いで、pH約6.0~7.0および温度約0~10にて還元剤(例えば、約0.5~2.0%(w/v)水素化ホウ素ナトリウム)で約0.5~3時間処理することによって、酸化製剤が還元される。

10

#### 【0030】

ヘパリン前駆物質製剤は、酵素的消化、化学的消化またはその組み合わせを用いて処理することができる。化学的消化の例としては、例えば、 $H_2O_2$ または $Cu^+$ および $H_2O_2$ を用いた酸化的解重合、例えば、亜硝酸イソアミルまたは亜硝酸を用いた脱アミノ切断(deaminative cleavage)、例えば、ベンジルエステルでの、かつ/またはアルカリ処理による-脱離切断が挙げられる。酵素的消化は、1つまたは複数のヘパリン分解性酵素の使用を含み得る。例えば、ヘパリン分解性酵素は、例えば、1種または複数種のヘパリナーゼ、ヘパリンリアーゼ、ヘパリン硫酸グリコアミノグリカン(HSGAG)リアーゼ、ヘパリンを分解することもできるグリコアミノグリカン(GAG)リアーゼとして記載されているリアーゼであることができる。好ましくは、その酵素は、非硫酸化ウロン酸の1つまたは複数のグリコシド結合にて切断する。

20

#### 【0031】

##### 配合および投与

本明細書に記載のLMWHは、薄毛または脱毛(脱毛症)を示す体の部分で発毛を促進する医薬組成物または美容的組成物として配合することができる。かかる組成物は一般に、周知の配合プロトコルを用いて、薬学的または美容的に許容可能な適切な担体(緩衝剤、補助剤、潤滑剤、溶媒、皮膚軟化剤など)および任意で、他の医薬または美容的作用物質を含む。組成物の投与は、賦形剤、例えば注射可能な溶液、経口剤形、局所剤形を用いて行うことができる。投与は、例えば、静脈内、皮下、経口または局所投与であることができる。組成物において使用されるLMWHの正確な量は、配合物の性質および投与計画に基づいて決定されるであろう。用量は25mg~1g/日であり得るが、剤形は投与経路に応じて異なる。例えば、非経口投与の場合には、0.5~5mg/kg(例えば、1~2mg/kg)が適切であり得るのに対して、局所投与される場合には、用量は約0.1~10mg/mL(例えば、約1mg/mL)であり得る。投与は概して、長期の投与、つまり長期間にわたる複数回投与、例えば少なくとも4、7、10、15、21、30、45、60、90日以上の間1日1または2回;または例えば、少なくとも4、7、10、15、21、30、45、60、90日以上の間1日おきの投与であると考えられる。本明細書に記載のLMWH組成物を用いて、発毛が望まれる、または必要とされる体の部分に発毛を誘発することができる。

30

#### 【0032】

非経口投与(例えば、静脈内または皮下投与)については、1種または複数種の補助剤、例えば注入用の水などの滅菌希釈剤、生理食塩水、抗菌薬、酸化防止剤、キレート剤、緩衝剤および張度を調節する作用物質も含み得る溶液または懸濁液にLMWHを組み入れることができる。非経口製剤は、バイアル、アンプル、シリンジまたはインフュージョンで提供することができる。ヘパリンおよびヘパリンをベースとする作用物質の非経口製剤の製造は、当技術分野において慣例である。

40

#### 【0033】

ヘパリンをベースとする化合物の経口製剤を製造する方法は当技術分野で公知である。例えば、Baughmanらは(Oral Delivery of Anticoagulant Doses of Heparin: A randomized, double blind, controlled study in humans (1998) Circulation 98: 1610-1615)、送達作用物質、ナトリウムN-[8(-2-ヒドロキシベンゾイル)アミノ]カプリレート(SN

50

AC) と併せて経口投与されるヘパリンについて記述している。Kimら (A newly developed oral Heparin derivative for deep vein thrombosis: Non-human study (2007) J Controlled Release 123: 155 - 163) は、固形剤形の経口的に活性なヘパリン、Db-LHDについて記述している。米国特許出願公開第2010-0081708号明細書には、経口的に利用可能なLMWHが記述されている。したがって、本明細書に記載のLMWHは、慣例の方法を用いて経口製剤として提供することができる。

#### 【0034】

経口投与については、本明細書に記載のLMWHは、錠剤、カプセル剤、水溶液、ゼラチンまたは懸濁液の形で提供することができる。かかる場合には、活性成分は、不活性希釈剤、結合剤、潤滑剤、甘味剤、顔料、着香剤、着色剤および保存剤などの薬学的または美容的に許容可能な賦形剤と混合され得る。不活性希釈剤としては、炭酸ナトリウムおよび炭酸カルシウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カルシウムおよびラクトースが挙げられる。潤滑剤としては、オイル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクが挙げられる。錠剤またはカプセル剤は、胃腸管内での吸収を遅らせるために材料、例えばモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルでコーティングされ得る。リポソーム、ミクロスフェア、ペグ化LMWHなどの徐放性製剤も含まれる。かかる経口剤形は通常、LMWH化合物を少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%以上含む。経口投与の一般的な投与計画は25~100mg/日であり得るが、1gまで、またはそれ以上であることができる。一態様において、本明細書に記載のLMWH組成物は、カプセル剤、錠剤、または水溶液で栄養補助食品として投与され、例えば1日1回、1日2回、1週間に1回、2週間に1回、1週間に2回、または月1回摂取される。

#### 【0035】

ヘパリンをベースとする化合物の局所製剤の製造もまた、当技術分野において慣例である。例えば、局所用ヘパリンゲル (Lioton (登録商標) またはMenaven (登録商標)) は、末梢血管障害に伴う局所症状の予防および治療において欧州で広く使用されている。米国特許第5888984号明細書および米国特許第5668119号明細書に、ヘパリンおよび他のグリコサミノグリカンの局所製剤が記述されている。VecchioおよびFrisinghelli (Topically applied Heparin for the treatment of vascular disorders: a comprehensive review. Clin Drug Investig (2008) 28: 603 - 14) およびCesaroneら (Topical Heparin: New Observations (2007) Angiology 58: 16S - 20S) は、ヘパリンゲルおよび他のヘパリンベースの局所製品について記述している。SongおよびKim (Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes (2006) Biomaterials 27: 271 - 280) は、LMWHの局所製剤について記述している。したがって、本明細書に記載のLMWHは、慣例の方法を用いて局所配合物として提供することができ、つまり製剤は、局所適用に従来から使用される薬学的または美容的賦形剤を用いて、従来の薬学的または美容的慣例に従って配合され得る。特定のいずれかの組成物の製造に用いられる賦形剤の性質は、その組成物の投与に意図される方法に応じて異なるであろう。

#### 【0036】

本明細書に記載の局所製剤は、ローション、クリーム、セーラム、スプレー、エアロゾル、エマルジョン、ケーキ、軟膏、エッセンス、ゲル、ムース、ペースト、パッチ、ペンシル、ぬれナプキン、マスク、スティック、フォーム、エリキシル、濃縮物等の様々な製品形態で配合され得る。その製剤は、溶媒、乳化剤、皮膚軟化剤、滑り助剤 (slip aid) (例えば、シリコーン)、湿潤剤、香料、顔料または着色剤、保存剤、界面活性剤、増粘剤、金属イオン封鎖剤、ワックス、オイル、ゲル化剤、真珠様光沢剤 (pearlising agent)、pH調整剤のうちの1つまたは複数を含むことができる。本明細書に記載の局所組成物は、色素と任意で併せられたシャンプー、ヘアコンディショニング製品、洗い流し不要なヘアマスク、ヘアムース、ヘアジェル、ヘアスプレー、および/または本明細書に記載のLMWHの局所適用と同時に毛髪を洗浄、スタイリング、処理、コンディショニングまたはカラーリングするための他のヘアケア製品の形もとることができる。許容可能な賦形剤としては、水 (例えば、脱イオン水); 植物油または鉱油などのオイル; パルミチン酸オクタ

ール、ミリスチン酸イソプロピルおよびパルミチン酸イソプロピルなどのエステル；ジカプリルエーテルおよびジメチルイソソルピドなどのエーテル；エタノールおよびイソプロパノールなどのアルコール；セチルアルコール、セテアリルアルコール、ステアリルアルコールおよびピフェニルアルコールなどの脂肪アルコール；イソオクタン、イソドデカンおよびイソヘキサデカンなどのイソパラフィン；シクロメチコン、ジメチコン、ジメチコンクロスポリマー、ポリシロキサンおよびその誘導体、好ましくは有機修飾誘導体などのシリコン油；ポリエチレングリコール；鉱油、ペトロラタム、イソエイコサンおよびポリイソブテンなどの炭化水素油；プロピレングリコール、グリセリン、ブチレングリコール、ペンチレングリコールおよびヘキシレングリコールなどのポリオール；蜜ろうおよび植物ワックスなどのワックス；または上述のいずれかの組み合わせまたは混合物が挙げられる。

10

#### 【0037】

本明細書に記載の局所LMWH製剤は、LMWHを0.01～50重量%含み得る。例えば、局所製剤は、LMWHを0.5～30重量%、1～20重量%、1～10重量%含み得る。次いで、局所製剤は、体の所望の部位（例えば、頭皮または眉毛部位）に例えば1日1～4回適用され得る。その代わりとして、これらの製剤は、所望の部位に頻繁に、つまり週に1～5回適用することができる。一態様において、LMWH製剤は、少なくとも3週間、4週間、12週間またはそれ以上の間、例えば無期限に、1日に少なくとも1回、体の所望の部位に局所的に適用され得る。

#### 【0038】

##### 併用

本明細書に記載のLMWHは、他の活性化化合物、例えば発毛を促進する他の作用物質、例えば、フィナステリド（Propecia（登録商標））、ミノキシジル（Rogaine（登録商標））；ビタミン（ビタミンA、ビタミンB3、ビタミンB5、およびビタミンB12、ビタミンC、ビタミンK、ビタミンEおよびその混合物など）；ヒドロキシ酸（グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、サリチル酸、クエン酸、および酒石酸など）；化学的および物理的日焼け止め（例えば、Mexoryl（登録商標）、アボベンゾン、オクチノキサート、オクチサレート、オキシベンゾン、二酸化チタン、酸化亜鉛）；酸化防止剤（例えば、スルフヒドリル化合物およびその誘導体、例えばメタ重亜硫酸ナトリウムおよびN-アセチル-システイン、リポ酸およびジヒドロリポ酸、レスベラトロール、ラクトフェリン、およびアスコルビン酸およびアスコルビン酸誘導体、ブチル化ヒドロキシルエン）；レチノールおよびレチニル

パルミテートなどのレチノイド；トコフェロールおよびそのエステル；プロゲステロンおよびプロゲステロン様活性を有する天然由来の成分；暗色化剤（darkening agent）（例えば、メラニンまたは合成メラニン誘導体、またはメラニン様分子、バニリンポリマー、天然抽出物または顔料、例えばヘディチウム（Hedychium）属またはベアベリー（Bearberry）属からの植物由来の茶色顔料、またはカロテノイドもしくはカンタキサンチンを含む植物由来の黄色、オレンジ色および赤色顔料；コールタールまたはケトコナゾールなどのふけ防止剤；パルミトイルペンタパペプチド（Matrixyl（登録商標））などのペプチドと併せて用いることもできる。このような更なる作用物質は、本明細書に記載のLMWHと別に提供されてもよいし、または同じ製剤中に、例えば約0.001～約10重量%の量で、特に約0.01～約5重量%の量で存在してもよい。

20

30

40

#### 【実施例】

#### 【0039】

##### 実施例1：LMWHの製造

グリコール分割低分子量ヘパリンアルコール（GS-LMWH-CH<sub>2</sub>-OH）が、制御された亜硝酸解重合に続いて、酸化的グリコール分割、続いてアルコールへの還元によって、未分画ヘパリン（UFH）から生成される。第1工程において、UFHを解重合して、多糖の還元性末端にアンヒドロマンノース部位を有する解重合ヘパリン（DPH-CHO）が得られる。これに続く工程IIで、解重合ヘパリン中に存在する2,3-ジオールの酸化的切断を過ヨウ素酸ナトリウムを用いて行い、ヘパリン鎖に沿って開環グリコール分割残基（GS-DPH-CHO）が生成される。工程IIIは、還元段階を含み、水素化ホウ素ナトリウムを使用して、アルデヒド

50

部位はアルコールへと転化され、グリコール分割低分子量ヘパリンアルコールが生成される。以下のパラグラフでは、製造の工程がより詳細に説明される。

【 0 0 4 0 】

解重合：室温で平衡化された10倍体積の脱イオン水にUFHを溶解する。この溶液のpHをpH3.1に調整し、亜硝酸ナトリウム（0.03M）を添加する。この反応溶液を数時間攪拌し、その後、塩化ナトリウム（UFH出発材料と同じ量）を添加する前にpHを中和する。塩を完全に溶解した後、コンスタントに攪拌しながら、少なくとも2倍体積のメタノールを添加する。得られた沈殿物をおよそ室温にて約1時間エイジングする。次いで、この沈殿物を濾過、乾燥させて、標準収率80～85%でDPHが得られる。

【 0 0 4 1 】

過ヨウ素酸酸化：5 で平衡化された約10倍体積の水に、工程Iで得られたアルデヒドを溶解する。この溶液に、冷却された等しい体積のNaIO<sub>4</sub>溶液（0.1M）を添加し、反応混合物を16時間攪拌する。完了したら、アルコールを添加して反応をクエンチし、その後、温度を室温に戻す。次いで、この溶液に塩化ナトリウム（アルデヒド出発材料の2倍量）を添加し、続いて少なくとも3倍体積のメタノールを添加して、ヘパリンを沈殿させる。濾過および乾燥前に、沈殿物をおよそ室温にて2時間エイジングし、グリコール分割多糖（一般に収率約95～98%）が得られる。

【 0 0 4 2 】

還元：5 に維持された10倍体積の水に、工程IIで得られたグリコール分割多糖を溶解する。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム（GS多糖の出発量の10分の1）を添加し、続いて反応混合物を1時間攪拌する。次いで、反応混合物を室温にし、続いて塩化ナトリウム（GS多糖の出発量と同じ量）を添加する。塩を溶解した後、コンスタントに攪拌されているこの溶液に2倍体積のメタノールを添加する。濾過および乾燥前に、このようにして得られた沈殿物をおよそ室温でエイジングし、所望の生成物が得られる。このようにして、以下の特徴：

Mw：5000～7800ダルトン

Mw分布：(i) < 3000ダルトン：15～25%

(ii) 3000～8000ダルトン：55～65%

(iii) > 8000ダルトン：15～25%

抗Xa活性：1～20IU/mg

抗IIa活性：1～20IU/mg

を有するMONC402LMWH - ナトリウム製剤が収率約55～60%で得られる。

【 0 0 4 3 】

実施例2：発毛に対するMONC402の効果

多くの癌の実験動物モデルにおいて、癌細胞の接種または移植、注射、ポンプの埋め込み等を容易にするために、動物の腹部または背部などの特定の部位を日常的に剪毛する。かかるマウス腫瘍モデルにおけるMONC402の効果进行分析過程において、本発明者らは意外なことに、MONC402で処置された腫瘍を有するマウスは一貫して、対照として生理食塩水で処置されたマウスよりも剪毛部分の毛の再成長が速いことを確認した。

【 0 0 4 4 】

この観察をさらに研究するために、本発明者らは、正常なマウスにおける発毛に対するMONC402の効果を評価するために実験を行った。8週齢の雌BALB/cマウスの背部を剪毛した。剪毛されたマウス4匹/処置群において生理食塩水、Fragmin、MONC402またはMONC202（UFHの亜硝酸解重合から誘導されたN-脱硫酸化LMWH）を含有する浸透圧ポンプを埋め込んだ。埋め込んだ創傷を閉じるために使用されたステーブルを7日後に除去した。浸透圧ポンプを埋め込んで16日後に、マウスを屠殺した。（実験が終了する前に、Fragminを投与されたマウス1匹が死んだ）。マウスの写真を撮り（図1参照）、屠殺前にそれぞれのマウスについて、剪毛部位上の発毛のスコアを決定した（表1）。

【 0 0 4 5 】

（表1）

スコア	各処置においてスコアリングされた動物の数					
	生理食塩水	MONC202 30 mg/kg/日	Fragmin 15 mg/kg/日	MONC402 10 mg/kg/日	MONC402 20 mg/kg/日	MONC402 30 mg/kg/日
0: 目に見える再成長なし	4/4	2/4	1/3	2/4	-	-
1: ごく薄い、またはまばらな再成長	-	1/4	-	-	-	-
2: 薄い再成長	-	1/4	-	1/4	1/4	1/4
3: 中程度の再成長	-	-	2/3	1/4	3/4	3/4
4: 完全な再成長 (未剪毛と区別がつかない)	-	-	-	-	-	-

10

## 【 0 0 4 6 】

表1に示されるように、対照、生理食塩水で処置された動物のいずれも、試験期間中に目に見える毛の再成長を示さなかった。MONC202対照（亜硝酸解重合され、N-脱硫酸化されたLMWH）で処置されたマウス4匹のうち2匹が、16日目までにごくわずかな（ごく薄い、または薄い）発毛を示した。それに対して、MONC402で処置されたマウスは、より高いレベルで毛の再成長を示した。MONC402の20および30mg/kg/日で処置されたマウスは、10mg/kg/日より高い効果を示し（マウス4匹のうち3匹が中程度の発毛を有する）、用量依存的な反応を示している。

20

## 【 0 0 4 7 】

## 実施例3：化学療法と併用した発毛に対するMONC402の効果

この実施例は、MONC402を化学療法剤と併せて投与した場合の発毛に対するMONC402の効果を示す。

## 【 0 0 4 8 】

8週齢の雌BALB/cマウスの背部を剪毛した。生理食塩水またはMONC402のいずれかを含有する浸透圧ポンプをマウス64匹に埋め込んだ（生理食塩水32匹、MONC402 32匹）。ポンプの埋め込みから13日後に開始して、週1回生理食塩水またはドセタキセル（10mg/kg）を腹腔内投与された群にマウスをさらに分けた。さらに、未処置のマウスの群1つ（n=4）ならびに剪毛またはポンプ埋め込みを受けていない、化学療法のみを受けたマウスの群1つ（ドセタキセル, 10mg/kg, ポンプの埋め込みから6日後に開始して、週1回腹腔内投与, n=16）があった。埋め込んだ創傷を閉じるために使用されたステープルを7日後に除去した。浸透圧ポンプを埋め込んで27日後に、剪毛部位上の発毛についてマウスをスコアリングした。

30

## 【 0 0 4 9 】

表2に示されるように、MONC402のみで処置されたマウスまたはドセタキセルと併せてMONC402で処置されたマウスは、27日目に対照よりも完全な毛の再成長を示した。

40

## 【 0 0 5 0 】

（表2）

スコア	各処置においてスコアリングされた動物の数					
	未処置	生理食塩水 + 生理食塩水	生理食塩水 + MONC402 (40 mg/kg/日)	ドセタキセル (週1回腹腔内投与 10mg/kg) +生理食塩水	ドセタキセル + MONC402	ドセタキセル (剪毛またはポンプ の埋め込みなし)
1: 成長なし						
1.5		1/16		1/16		
2: わずかに成長		9/16		7/16		
2.5		2/16		2/16		
3: まばらな/ 高密度の成長		4/16		6/16	1/16	
3.5			16/16		14/16	
4: 完全な成長 (未剪毛と 区別が つかない)	4/4				1/16	16/16

10

## 【 0 0 5 1 】

## 実施例4：LMWHの局所製剤

この実施例では、本質的にHandbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations : Semisolid Products . Niazi, Ed . 2d Edition, 2009によってヘパリン - ナトリウムゲルクリームについて記述されるようなLMWHゲルクリームの製造について説明する。

20

## 【 0 0 5 2 】

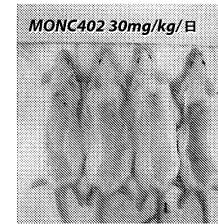
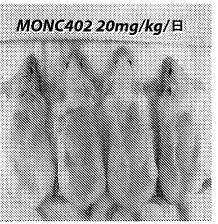
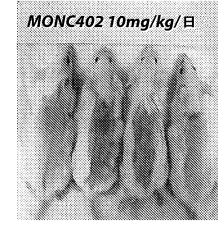
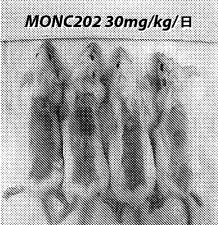
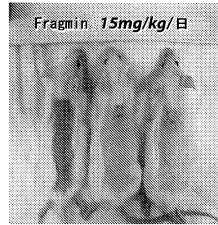
100gスケールの製造に従って、以下：実施例1に記述されるように製造されたLMWH - ナトリウム0.2g; Lutrol E 400 (登録商標) (ポリエチレングリコール400) 15.0g; 液体パラフィン10.0g; Lutrol F127 (登録商標) (ポロキサマー407) 23.0g; 適量の精製水 (全体が100gに達するまでの量); が提供される。

## 【 0 0 5 3 】

局所製剤は以下のように製造される：LMWH - ナトリウムを水に溶解する。Lutrol E 400および液体パラフィンを添加する。混合物を攪拌し、6 に冷却する。Lutrol F 127を混合物にゆっくりと添加し、溶解するまで混合物を攪拌する。気泡が逃げる場合には、得られた混合物を室温に加熱する。

30

【 図 1 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	9/06 (2006.01)	A 6 1 K 9/06
A 6 1 K	9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10
A 6 1 P	9/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/08
A 6 1 K	8/73 (2006.01)	A 6 1 K 8/73

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チョウ ヘ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 マルデン クロス ストリート 128

(72)発明者 コ克蘭 エドワード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 マーシュフィールド ウェスト ストリート 54

審査官 澤田 浩平

(56)参考文献 特開2008-150441(JP,A)

特開昭60-115525(JP,A)

国際公開第02/083086(WO,A1)

Y -Y WANG , ENOXAPARIN-INDUCED ALOPECIA IN PATIENTS WITH CEREBRAL VENOUS THROMBOSIS , JOURNAL OF CLINICAL PHARMACY AND THERAPEUTICS , 2006年10月 1日 , V31 N5 , P513-517  
 BASSAS P , ANTICOAGULATION AND ANTIPLATELET THERAPY IN DERMATOLOGY , ACTAS DERMOSIFILIOG RAFICAS , ELSEVIER , 2009年 1月 1日 , V100 N1 , P7-16

CHU CHIA LIN , M-ONC 402, A NOVEL LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN (LMWH) INTERACTS WITH HEPARIN-BINDING 以下備考 , PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING , 2009年 4月 , V50 , P1210 , PROTEINS AND INHIBITS METASTATIC SEEDING OF TUMOR CELLS IN MICE

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0 , A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

P u b M e d