

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-513622

(P2013-513622A)

(43) 公表日 平成25年4月22日(2013.4.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 9/08 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/08	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 33/14 (2006.01)</b>	A 6 1 K 33/14	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 33/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 33/00	4 C 2 0 6
<b>A 6 1 K 31/255 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/255	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-543328 (P2012-543328)	(71) 出願人	507088266
(86) (22) 出願日	平成22年12月13日 (2010.12.13)		ユニバーシティ オブ マサチューセッツ
(85) 翻訳文提出日	平成24年8月10日 (2012.8.10)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/060044		ストン フランクリン ストリート 2
(87) 国際公開番号	W02011/075430		2 5
(87) 国際公開日	平成23年6月23日 (2011.6.23)	(74) 代理人	100107456
(31) 優先権主張番号	61/286, 139		弁理士 池田 成人
(32) 優先日	平成21年12月14日 (2009.12.14)	(74) 代理人	100148596
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 和弘
(31) 優先権主張番号	61/350, 161	(74) 代理人	100123995
(32) 優先日	平成22年6月1日 (2010.6.1)		弁理士 野田 雅一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ミュシユクマー, ミュルガッパン
			アメリカ合衆国, マサチューセッツ州,
			アマースト, ウェイバー サークル
			2 3
			最終頁に続く

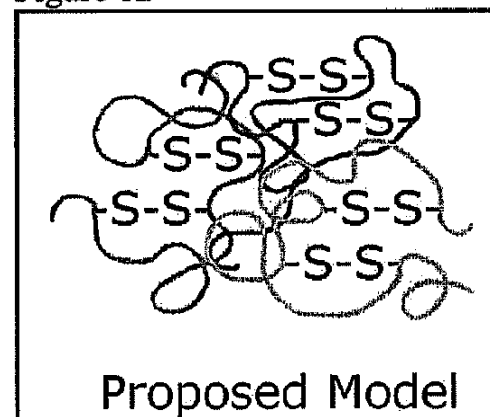
(54) 【発明の名称】 白内障及び老眼を阻害する方法

## (57) 【要約】

本明細書では、 $\gamma$  クリスタリン静電相互作用阻害剤を投与することにより、眼における白内障形成又は老眼の進行を阻害する又は後退させる方法が記述される。老眼及び白内障はいずれも、クリスタリン、特に、 $\gamma$  クリスタリンと呼ばれる、可溶性の水晶体タンパク質の凝集により引き起こされる。 $\gamma$  クリスタリンの凝集は、静電現象であり、静電相互作用阻害剤を用いて、 $\gamma$  クリスタリン凝集物の形成を阻止することに加えて、既に形成された凝集物を脱凝集化することができることが判明した。

【選択図】 図 1 2

Figure 12



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

眼における白内障形成の進行を阻害する又は後退させる方法であって、

前記眼を、ポリペプチドではない少なくとも 1 つの  $\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤を含む、白内障を阻害するのに有効な量の眼科用組成物と接触させるステップを含む方法。

**【請求項 2】**

$\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、有機塩、無機塩、イオン性液体、 $\text{pH } 9 \sim 5$  の溶液、又はこれらの組合せを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

$\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、カチオン及びアニオンを含有する有機塩を含み、前記カチオン及びアニオンがそれぞれ独立して、炭素原子 4 ~ 15 個の長さの脂肪族部分を有する脂肪族基である、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

$\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、カチオン及びアニオンを含有するイオン性液体を含み、前記カチオン及びアニオンがそれぞれ独立して、炭素原子 4 ~ 15 個の長さの脂肪族部分を有する脂肪族基である、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 5】**

$\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、 $\text{pH } 9 \sim 5$  の溶液である、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 6】**

$\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、少なくとも 1 つの眼科的に許容可能なビヒクルを含む眼科用組成物の形態である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記眼科用組成物が、点眼液である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記眼科用組成物が、眼科用デバイスである、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

眼科用デバイスが、コンタクトレンズ、眼内レンズ、又は涙点プラグである、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

眼における老眼の進行を阻害する又は後退させる方法であって、

前記眼を、ポリペプチドではない少なくとも 1 つの  $\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤を含む、老眼を阻害するのに有効な量の眼科用組成物と接触させるステップを含む方法。

**【請求項 11】**

$\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、有機塩、無機塩、イオン性液体、 $\text{pH } 9 \sim 5$  の溶液、又はこれらの組合せを含む、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

$\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、 $\text{pH } 9 \sim 5$  の溶液である、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

$\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、カチオン及びアニオンを含有する有機塩を含み、前記カチオン及びアニオンがそれぞれ独立して、炭素原子 4 ~ 15 個の長さの脂肪族部分を有する脂肪族基である、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 14】**

$\perp$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、カチオン及びアニオンを含有するイオン性液体を含み、前記カチオン及びアニオンがそれぞれ独立して、炭素原子 4 ~ 15 個の長さの脂肪族部分を有する脂肪族基である、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 15】**

ル クリスタリン 静電相互作用阻害剤が、少なくとも 1 つの眼科的に許容可能なビヒクルを含む眼科用組成物の形態である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記眼科用組成物が、点眼液である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記眼科用組成物が、眼科用デバイスである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

眼科用デバイスが、コンタクトレンズ、眼内レンズ、又は涙点プラグである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

眼における加齢による水晶体変性の進行を阻害する又は後退させる方法であって、前記眼を、ポリペプチドではない少なくとも 1 つの ル クリスタリン 静電相互作用阻害剤を含む、変性を阻害するのに有効な量の眼科用組成物と接触させるステップを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、眼の水晶体における加齢変化の進行を阻害する又は後退させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

[0001] 眼の水晶体は、虹彩のすぐ後方に吊り下げられている透明の構造であり、光線を網膜上の焦点に導く。水晶体は、可溶性タンパク質及び不溶性タンパク質の両方を含み、両タンパク質で、水晶体の湿重量の 35 パーセントを占める。若年の健常な水晶体では、クリスタリンと一般的に称する可溶性タンパク質が、水晶体タンパク質の 90 パーセントを占める。老化プロセス中、水晶体のクリスタリンは不溶性の凝集物を形成し、これは少なくとも部分的には、近傍の物体に対して焦点を変化させる眼の能力の喪失である老眼を特徴づける水晶体核の変形能低下の一因となる。老眼における水晶体の不溶性凝集物の形成は、加齢性白内障の形成における早期段階であると考えられている。

【0003】

[0002] 白内障は、眼の水晶体における濁り (cloudiness) 又は混濁化 (opacification) により定義される。個体が加齢するにつれて、水晶体内に存在するクリスタリンが凝集物へと転換されるために白内障が形成し、結果として水晶体の混濁が増大する。具体的に述べると、加齢と共に、ヒトの水晶体核における可溶性シャペロンである クリスタリンが高分子量の凝集物内及び不溶性タンパク質内に組み込まれ、クリスタリンの濃度が徐々に低下する。凝集物の存在は、水晶体の健康及び機能を損ない、治療せずに放置すると、白内障により、実質的な視力喪失、又はさらには失明がもたらされる可能性がある。現在のところ、白内障の最も一般的な治療は、手術である。

【0004】

[0003] クリスタリンとは、脊椎動物の眼の水晶体線維細胞において最も高度に発現する構造タンパク質である。クリスタリンは、2 つのサブファミリー：低分子の熱ショックタンパク質スーパーファミリーのメンバーであり、分子シャペロンとしてもまた機能する クリスタリン (A クリスタリン及び B クリスタリン)、並びに水晶体における可溶性タンパク質の大半を占め、水晶体構造の透明性及び屈折特性に寄与する、進化的に連関する クリスタリン及び クリスタリンのスーパーファミリーに分けられる。白内障の発症における役割に加えて、A クリスタリン及び B クリスタリンは、アレキサンダー病、クロイツフェルト - ヤコブ病、アルツハイマー病、及びパーキンソン病などの神経変性疾患にも関与している。

【0005】

[0004] 米国特許出願公開第 2008/0227700 号は、シャペロン活性を有するペプチドを治療的処置として用いる、タンパク質の脱凝集化について説明している。具体

10

20

30

40

50

的に述べると、Bペプチドが用いられて、光散乱により測定されるpHに誘導されるクリスタリンの凝集物が脱凝集化された。水晶体内にアルファクリスタリンを継続的に供給することは難題である。必要とされることは、白内障及び老眼の阻害及び/又は後退のためにクリスタリンを脱凝集化するために適する代替的な方法である。

【発明の概要】

【0006】

[0005] 一実施形態では、眼における白内障形成の進行を阻害する又は後退させる方法は、眼を、ポリペプチドではない少なくとも1つのLクリスタリン静電相互作用阻害剤を含む、白内障を阻害するのに有効な量の眼科用組成物と接触させるステップを含む。

【0007】

[0006] 別の実施形態では、眼における老眼の進行を阻害する又は後退させる方法は、眼を、ポリペプチドではない少なくとも1つのLクリスタリン静電相互作用阻害剤を含む、老眼を阻害するのに有効な量の眼科用組成物と接触させるステップを含む。

【0008】

[0007] 別の実施形態では、眼における加齢による水晶体変性の進行を阻害する又は後退させる方法は、眼を、ポリペプチドではない少なくとも1つのLクリスタリン静電相互作用阻害剤を含む、変性を阻害するのに有効な量の眼科用組成物と接触させるステップを含む。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】[0008] 23の(A)水中の0.2mg/mLのLクリスタリン、及び(B)水中の0.2mg/mLのクリスタリンの動的散乱によりもたらされる確率分布関数を示す図であり、図中の は、遅延時間である。

【図2】[0009] 23のPBS中の0.2mg/mLのLクリスタリンの確率分布関数を示す図であり、図中の は、遅延時間である。

【図3】[0010] 23の水中の0.2mg/mLのLクリスタリンの相対散乱強度を示す図である。

【図4】[0011] 23の水中の0.2mg/mLのLクリスタリンのフラクタル次元の解析を示す図である。

【図5】[0012] 23のPBS中の0.2mg/mLのLクリスタリンの相対散乱強度を示す図である。

【図6】[0013] 23のPBS中の0.2mg/mLのLクリスタリンのフラクタル次元の解析を示す図である。

【図7】[0014] 23の水中の0.2mg/mLのクリスタリン、0.6mg/mLのLクリスタリンの、角度を40°~85°についての確率分布関数を示す図であり、図中の は、遅延時間である。

【図8】[0015] 水中の0.2mg/mLのLクリスタリンの、(A)0.15Mの塩を含む急速モード及び0.15Mの塩を含まない急速モード、並びに(B)塩を含む緩徐モード及び塩を含まない緩徐モードの流体力学半径を傾きが明らかにするグラフである。

【図9】[0016] 23の水中の0.2mg/mLのLクリスタリンの速度論的研究を示す図である。

【図10】[0017] 23のPBS中の0.2mg/mLのLクリスタリンの速度論的研究を示す図である。

【図11】[0018] 23のPBS中の0.2mg/mLのLクリスタリンの、pH2、7、及び10についての確率分布関数を示す図である。

【図12】[0019] 白内障形成について提起される機構について例示する図である。

【図13】[0020] 水中の0.2mg/mLのLクリスタリンの、SDSを含む急速モード及びSDSを含まない急速モード、並びにSDSを含む緩徐モード及びSDSを含まない緩徐モードの流体力学半径を明らかにするグラフである。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0010】

【0021】当業者は、以下の詳細な説明、図面、及び付属の特許請求の範囲から、上記で説明した特徴及び他の特徴を認識及び理解するであろう。

## 【0011】

【0022】本明細書では、 $\text{L}$  クリスタリン凝集物を脱凝集化する方法であって、該  $\text{L}$  クリスタリン凝集物を、該  $\text{L}$  クリスタリン凝集物を脱凝集化するのに十分な量で  $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤を含む組成物と接触させるステップを含む方法が開示される。眼における白内障形成の進行を阻害する又は後退させる方法であって、眼を、 $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤を含む、白内障を阻害するのに有効な量の組成物と接触させるステップを含む方法がさらに開示される。眼における老眼の進行を阻害する又は後退させる方法であって、眼を、 $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤を含む、老眼を阻害するのに有効な量の組成物と接触させるステップを含む方法もまた開示される。特定の実施形態では、静電相互作用阻害剤は、ポリペプチドではない。

10

## 【0012】

【0023】本明細書において、本発明者らは、動的光散乱、濁度測定、及び透過型電子顕微鏡法などの技法を用いて、溶液中のクリスタリンにより形成される凝集物を調べた。興味深いことに、溶液中のクリスタリンは、流体力学半径が約  $10\text{ nm}$  の狭い範囲の集団として存在し、一方、溶液中の  $\text{L}$  クリスタリンは、1つは流体力学半径が約  $7\text{ nm}$  の集団、2つめは流体力学半径が約  $150\text{ nm}$  の集団という、2つの集団として存在する。流体力学半径が約  $150\text{ nm}$  の  $\text{L}$  クリスタリン集団は、凝集した集団である。さらに、クリスタリンを、 $\text{L}$  クリスタリンに約  $3:1$  の比で添加すると、クリスタリンのシャペロンとしての性質のために、凝集した  $\text{L}$  クリスタリン集団が消失する。 $\text{L}$  クリスタリンの様々な集団を確認することを可能とするために、本発明者らは、クリスタリンに加えて、 $\text{L}$  クリスタリンのサイズを低減させるか、又は  $\text{L}$  クリスタリンの形成を阻止することができる相互作用阻害剤を同定する実験を試みた。約  $0.15\text{ M}$  の  $\text{NaCl}$  の添加が、 $\text{L}$  クリスタリン凝集物のサイズを減少させ、一方、 $0.1\text{ mg/mL}$  のドデシル硫酸ナトリウムは、 $\text{L}$  クリスタリン凝集物のサイズに影響を及ぼさず、 $0.1\text{ mg/mL}$  のプロテオグリカンは、 $\text{L}$  クリスタリン凝集物のサイズを増大させる結果をもたらすことが判明した。加えて、 $\text{pH}$  を  $\text{pH}$  約  $10$  から  $\text{pH}$  約  $2$  へと低下させると、 $\text{L}$  クリスタリン凝集物のサイズが増大する。

20

30

## 【0013】

【0024】理論に束縛されずに、 $\text{L}$  クリスタリンの凝集は、静電現象であると考えられている。静電相互作用を破壊しうる塩などの分子種は、クリスタリンのシャペロン活性の代わりになり、 $\text{L}$  クリスタリン凝集物のサイズを阻止/低減することが可能である。ドデシル硫酸ナトリウムは、タンパク質間相互作用を破壊するには有効であることが多いが、 $\text{L}$  クリスタリン凝集物のサイズは低減しない。凝集物のサイズを低減しないのは、ドデシル硫酸ナトリウムなどの添加剤が、クリスタリン分子の疎水性残基と複合体を形成するためであると考えられている。さらにより驚くべきことに、プロテオグリカンは、 $\text{L}$  クリスタリン凝集物のサイズを増大させる。プロテオグリカンの場合、多くのクリスタリン分子が、クリスタリン分子と比較してはるかに高分子であるプロテオグリカン分子と非共有結合により結合すると考えられている。

40

## 【0014】

【0025】 $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤による治療は、白内障及び老眼など、 $\text{L}$  クリスタリンの凝集から結果として生じる疾患及び/又は状態を治療するのに用いることができる。本明細書で用いられる白内障とは、水晶体におけるタンパク質相互作用の変化により引き起こされる、眼の水晶体の混濁である。タンパク質相互作用には、タンパク質のミスフォールディングに加えて、凝集など、タンパク質間相互作用も含まれる。老眼は、加齢又は老齢に起因する視覚障害である。老眼の症状には、近くの物体に焦点を合わせる能力の低下、眼精疲労、細かい印字を読むことの困難、読書又は照明されたスクリー

50

ンを見るときの疲労、はっきりと接視することの困難、印字を読むときのコントラストの低下、読書のための明るくより直接的な照明の必要性、読書対象をはっきりと見るために読書対象を遠くに保持する必要があること、及び頭痛、とりわけ、近見視力を用いるときの頭痛が含まれる。老眼を患う個体の視力は正常であることもあるが、時間と共に、近くの物体に焦点を合わせる能力が少なくとも部分的には失われ、老眼を患う個体は、読書など、近見視力を必要とする仕事に眼鏡を必要とするようになる。40歳を過ぎたほとんどすべての個体が、多かれ少なかれ老眼に罹患する。

【0015】

〔0026〕眼における白内障形成の進行を阻害する方法では、眼を  $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤と接触させる前に、眼が、1つ又は複数の発症しつつあるか又は完全に発症した白内障を既に含有しうる。したがって、該方法を用いて、眼におけるさらなる白内障の形成を阻害することもでき、眼に既に存在する、発症しつつある白内障の成熟白内障の形成を阻害することもできる。代替的に、眼を  $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤と接触させる前に、眼が、発症しつつあるか又は完全に発症した白内障を伴わない場合もある。

10

【0016】

〔0027〕眼における白内障形成の進行を後退させる方法では、眼を本明細書で開示される  $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤と接触させることにより、眼における白内障の少なくとも部分的な後退～完全な後退を達成する。

【0017】

20

〔0028〕同様に、眼における老眼の進行を阻害する方法では、眼を  $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤と接触させる前に、個体が、1つ又は複数の老眼の症状を既に知覚している可能性がある。したがって、該方法を用いて、知覚される症状（複数可）の進行を軽減することもでき、老眼のさらなる症状の形成を阻害することもできる。代替的に、眼を  $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤と接触させる前に、眼が、老眼の症状を伴わない場合もある。

【0018】

〔0029〕眼における老眼の進行を後退させる方法では、眼を本明細書で開示される  $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤と接触させることにより、眼における老眼の症状の少なくとも部分的な後退～完全な後退を達成する。

30

【0019】

〔0030〕本明細書で用いられる  $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤とは、 $\text{L}$  クリスタリンの凝集をもたらし、 $\text{L}$  クリスタリンによるタンパク質間静電相互作用に干渉するのに適する分子である。一実施形態では、静電相互作用阻害剤は、ポリペプチドではない。 $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤は、 $\text{L}$  クリスタリン凝集物の形成を阻止、及び/又は既に形成された凝集物のサイズを低減する。特定の実施形態では、 $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、有機塩、無機塩などの塩、若しくはイオン性液体、及び/又はpH約9～約5の溶液である。

【0020】

〔0031〕一実施形態では、 $\text{L}$  クリスタリン静電相互作用阻害剤が、少なくとも1つの塩を含む。本明細書で用いられる「塩」という用語は、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ などのハロゲン化アンモニウム、 $\text{CaCl}_2$ などのハロゲン化アルカリ土類金属、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、クエン酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、酢酸カルシウム、又はこれらの混合物のうちの1つ又は複数が含まれるがこれらに限定されない有機塩又は無機塩を包含することを意図する。さらなる有機塩には、エチルアンモニウムニトレートなどのアルキルアンモニウム塩、クエン酸ナトリウム、ギ酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム、グルコン酸マグネシウム、グルコン酸ナトリウム、トロメタミン塩酸塩、コハク酸ナトリウム、及びこれらの組合せが含まれる。

40

【0021】

50

【0032】別の実施形態では、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤が、少なくとも1つのイオン性液体を含む。イオン性液体は、100未満では、有機カチオン及び無機アニオン又は有機アニオンからなる塩である。例示的なイオン性液体には、例えば、N'-アルキル及びN'-( $\gamma$ -ヒドロキシ-アルキル)-N-メチルイミダゾリウムクロリド、トリ-イソブチル(メチル)ホスホニウムp-トルエンスルホネート、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムテトラフルオロボレート、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド、1-ヘキシル-3-メチルイミダゾリウムクロリド、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムトリフルオロメタンスルホネート、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムトリフルオロメタンスルホネート、テトラエチルアンモニウムブロミド、n-ブチルピリジニウムクロリド、テトラブチルホスホニウムブロミド、ベンジルトリエチルアンモニウムクロリド、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド、1-ブチル-2,3-ジメチルイミダゾリウムテトラフルオロボレート、1,3-ジメチルイミダゾリウムメチルスルホネート、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムトリフルオロアセテート、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウム2-(2-メトキシエトキシ)エチルスルフェート、1-ブチル-1-メチルピロリジニウムジハイドロジェンホスフェート、及びこれらの組合せが含まれる。

10

## 【0022】

【0033】特定の実施形態では、有機塩及びイオン性液体が、カチオン及びアニオンを含有し、該カチオン及びアニオンがそれぞれ独立して、炭素原子4~15個の長さの脂肪族部分を有する脂肪族基である。

20

## 【0023】

【0034】別の実施形態では、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤が、pH約9~約5の溶液である。該溶液は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸、リン酸、酢酸、及び塩酸など、1つ又は複数のpH調節剤を含むことが典型的である。

## 【0024】

【0035】一実施形態では、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤が、ポリペプチドではない。本明細書では、「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すように互換的に用いられる。該用語は、1つ又は複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工の化学的模倣体であるアミノ酸ポリマーに加えて、天然のアミノ酸ポリマー及び非天然のアミノ酸ポリマーにも適用される。

30

## 【0025】

【0036】 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤を眼と接触させて、白内障の進行の阻害及び/若しくは既存の白内障の軽減、又は老眼の症状の阻害及び/若しくは軽減をもたらす。本明細書で用いられる「眼を接触させる」という用語は、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤を、眼に直接適用する方法を包含する。上記で説明した方法では、当業者に知られる適切な手段を用いて、眼を化合物と接触させることができる。このような方法の例には、眼科用デバイスの形態で適用されるか、又は他の形で眼に局所適用される、眼内への化合物の注射、又は化合物の点眼若しくは噴霧が含まれるがこれらに限定されない。

## 【0026】

40

【0037】本明細書で用いられる「白内障を阻害するのに有効な量」という用語は、眼における白内障の進行若しくは形成を阻害するか、又は眼に既に存在する、発症しつつある白内障の、進行又は成熟白内障の形成を阻害する量を意味する。白内障を阻害するのに有効な $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤の量は、当業者に知られる多様な因子に依存する。このような因子には、眼のサイズ、眼に既に存在する、完全に発症したか又は発症しつつある任意の白内障の数及び進行、並びに投与方式が含まれるがこれらに限定されない。白内障を阻害するのに有効な量は、医薬組成物が、単回投与されるかどうか、又は医薬組成物が、ある期間にわたり定期的に投与されるかどうかにもまた依存する。該期間は、任意の日数、週数、月数、年数であってよい。一実施形態では、白内障を阻害するのに有効な量の $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤は、約0.001g~約0.1gである。具

50

体的には、白内障を阻害するのに有効な量は、約 0.01 g ~ 約 0.05 g である。

【0027】

[0038] 本明細書で用いられる「老眼を阻害するのに有効な量」という用語は、眼における老眼の症状を軽減するか、又は眼における老眼のさらなる症状の進行を阻害する量を意味する。老眼を阻害するのに有効な L クリスタリン静電相互作用阻害剤の量は、当業者に知られる多様な因子に依存する。このような因子には、眼のサイズ、個体に既存する症状の数及び種類、並びに投与方式が含まれるがこれらに限定されない。白内障を阻害するのに有効な量は、医薬組成物が、単回投与されるかどうか、又は医薬組成物が、ある期間にわたり定期的に投与されるかどうかにもまた依存する。該期間は、任意の日数、週数、月数、年数であってよい。一実施形態では、老眼を阻害するのに有効な量の L クリスタリン静電相互作用阻害剤は、約 0.001 g ~ 約 0.1 g である。具体的には、老眼を阻害するのに有効な量は、約 0.01 g ~ 約 0.05 g である。

10

【0028】

[0039] 本明細書で用いられる「眼科用組成物」という用語は、眼への投与に適する薬学的に許容される製剤、送達デバイス、機構又はシステムを指す。「眼科用組成物」という用語には、溶液、懸濁液、ゲル、軟膏、スプレー、デポ剤デバイス、又は眼に対する L クリスタリン静電相互作用阻害剤の短期的送達若しくは長期的送達に適する、他の任意の種類の製剤、デバイス、若しくは機構が含まれるがこれらに限定されない。例えば、経口製剤とは対照的に、眼科用組成物は、例えば、結膜及び角膜の刺激、閉眼、涙液の分泌、並びに有痛の反応など、多様な反応の誘導を回避する、薬学的に許容される眼科用ビヒクルの使用を含めた、眼科用組成物の眼への適用と関連する、特定の技術的特徴を示す。具体的な眼科用組成物は、L クリスタリン静電相互作用阻害剤を含有する眼科用溶液若しくは眼科用懸濁液（すなわち、点眼液）、眼科用軟膏、又は眼科用ゲルの形態であることが有利である。選択した具体的な形態に応じて、組成物は、緩衝剤、等張化剤、可溶化剤、防腐剤、増粘剤、キレート化剤、抗酸化剤、及び pH 調節剤など、各種の添加剤を含有しうる。

20

【0029】

[0040] 適切な防腐剤の例には、クロロブタノール、デヒドロ酢酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム、セチルピリジニウムクロリド、フェネチルアルコール、パラヒドロキシ安息香酸エステル、塩化ベンゼトニウム、酸化エチレンとジメチルエチレンジアミンとの親水性二ハロゲン化コポリマー、これらの混合物などが含まれるがこれらに限定されない。増粘剤は、例えば、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、硫酸コンドロイチン、及びこれらの塩から選択することができる。適切な可溶化剤には、ポリオキシエチレン水添ヒマシ油、ポリエチレングリコール、ポリソルベート 80、及びモノステアリン酸ポリオキシエチレンが含まれるがこれらに限定されない。典型的なキレート化剤には、エデト酸ナトリウム、クエン酸、ジエチレントリアミン五酢酸の塩、ジエチレントリアミンペンタメチレンホスホン酸、並びにエデト酸ナトリウム及び亜硫酸水素ナトリウムなどの安定化剤が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0030】

[0041] 有用な緩衝液には、ホウ酸緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、酢酸緩衝液などが含まれるがこれらに限定されない。眼科用組成物中の緩衝液濃度は、選択した具体的な緩衝液に応じて、約 1 mM ~ 約 150 mM 以上で変化しうる。

40

【0031】

[0042] 本明細書で用いられる「ビヒクル」という用語は、眼科用に適する担体、希釈剤、又は賦形剤を包含することを意図する。「賦形剤」とは、1つ又は複数のバルクを供給し、好ましい加工特徴を賦与し、溶解速度を制御する一助となり、また他の形で組成物にさらなる望ましい特徴を与える成分を指す。特に、眼科用組成物が有効成分を同伴する涙液の分泌を誘発しないように、賦形剤を選択する。許容される賦形剤は、所望の製剤に応じて賦形剤を選択する方法について知る当業者によく知られている。

50



## 【 0 0 3 2 】

【 0043 】一実施形態では、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤を、コンタクトレンズ又は涙点プラグなどの眼科用デバイスの形態で投与する。適切な眼科用デバイスには、矯正用、美容用、又は治療用の品質を備えた生体適合性デバイスが含まれる。

## 【 0 0 3 3 】

【 0044 】一実施形態では、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤は、場合によって制御放出組成物として、コンタクトレンズに付着させてもよく、コンタクトレンズ内に組み込んでもよく、コンタクトレンズに結合させてもよい。コンタクトレンズは、既知の材料、例えば、ハイドロゲル、シリコーンハイドロゲル、シリコーンエラストマー、及びポリメチルメタクリレート ( P M M A )、メタクリル酸エステルポリマー、オリゴシロキサンルアルキル ( メタ ) アクリレート単量体 / メタクリル酸のコポリマーなどの気体透過性材料を用いて作製することができる。含水性眼科用ソフトレンズ用材料の具体例には、米国特許第 5 , 8 1 7 , 7 2 6 号において説明されている材料、米国特許第 5 , 9 0 5 , 1 2 5 号において説明されている 2 - ヒドロキシエチルメタクリレートポリマー、欧州特許出願第 7 8 1 , 7 7 7 号において説明されている眼科用レンズ材料、米国特許第 5 , 9 4 2 , 5 5 8 号において説明されている、さらに脂質層でコーティングしたハイドロゲルレンズが含まれる ( これらの特許文献のすべては、コンタクトレンズに関するこれらの特許文献の教示について、本明細書に組み込まれる )。上記において知られる材料から作製される、ハード型レンズ又は硬質の角膜型レンズ、及びゲルレンズ、ハイドロゲルレンズ、又はソフト型レンズなど、一般的に用いられるコンタクトレンズを用いることができる。

## 【 0 0 3 4 】

【 0045 】例えば、コンタクトレンズ及び徐放に関するそれらの教示について本明細書に組み込まれる、米国特許第 5 , 6 5 8 , 5 9 2、同第 6 , 0 2 7 , 7 4 5 号、国際特許公開第 W O 2 0 0 3 / 0 0 3 0 7 3 号パンフレット、米国特許出願公開第 2 0 0 5 - 0 0 7 9 1 9 7 号において説明されている、徐放薬物と共にコンタクトレンズを作製する既知の方法に従い、コンタクトレンズに、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤組成物を組み込むか、結合させるか、又は付着させることにより、徐放型  $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤組成物を作製することができる。具体的には、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤組成物を、ポリビニルピロリドン、ヒアルロン酸ナトリウムなど、微粒子化するか又はゲルによる徐放剤の一部に付着させることにより、コンタクトレンズを作製することができる。加えて、レンズの前面を形成する構成要素、及びレンズの後面を形成する構成要素からコンタクトレンズを作製することなどによって、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤組成物のリザーバーを形成することによっても、徐放をもたらすことができる。

## 【 0 0 3 5 】

【 0046 】一実施形態では、 $\gamma$ -クリスタリン静電相互作用阻害剤を、涙点プラグにより投与する。本明細書で用いられる涙点プラグという用語は、下涙点及び上涙点のそれぞれを介して、眼の下涙小管及び上涙小管へと挿入するのに適するサイズ及び形状を有するデバイスを指す。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 3 6 】

【 0047 】以下の非限定的な例により、本発明をさらに例示する。

## 【 0 0 3 7 】

材料及び方法

クリスタリンの試料調製 :

【 0048 】ウシの眼の水晶体に由来する、 $\gamma$ -クリスタリン ( C 5 1 6 3、S i g m a - A l d r i c h ) 及び  $\beta$ -クリスタリン ( C 4 1 6 3、S i g m a - A l d r i c h ) を、生体用冷凍庫内に保存した。これらの実験のために調製した 4 つのストック液は、水中の 2 m g / m L の  $\gamma$ -クリスタリン、P B S 中の 2 m g / m L の  $\beta$ -クリスタリン、水中の 2 m g / m L の  $\gamma$ -クリスタリン、及び水中の 0 . 1 5 M の N a C l であった。これらの実験で用いる水はすべて、濾過及び脱イオン化した。水中の 2 m g / m L の  $\gamma$ -クリスタリ

10

20

30

40

50

ンのストック液は、汚染を除去した 20 mL のシンチレーションバイアル内で、10 mg の  $\gamma$ -クリスタリンを、5 mL の水と混合することにより調製した。水中の 2 mg/mL の  $\gamma$ -クリスタリン及び PBS 中の 2 mg/mL の  $\gamma$ -クリスタリンを調製するのにも、同様の手順に従った。

#### 【0038】

[0049] これらのストック液の希釈液を用いて、水中の 0.2 mg/mL の  $\gamma$ -クリスタリン、水中の 0.2 mg/mL の  $\gamma$ -クリスタリン、水中の 0.2 mg/mL の  $\gamma$ -クリスタリン、0.15 M の NaCl、水中の 0.2 mg/mL の  $\gamma$ -クリスタリン、0.6 mg/mL の  $\gamma$ -クリスタリン、及び PBS 中の 0.2 mg/mL の  $\gamma$ -クリスタリンによる 2 mL ずつの試料を創出した。

10

#### 【0039】

[0050] マイクロ 90 (Micro-90) 界面活性剤 (Z281506, Sigma-Aldrich) の極希薄な溶液中で 1 時間にわたり超音波処理し、次いで、濾過した脱イオン化水で 8 回にわたりすすぎ、その後、アセトンで 8 回にわたり洗浄することにより、20 mL シンチレーションバイアルを洗浄した。ケムステーション (ChemStation) ソフトウェアを装備するアジレント 8453 (Agilent 8453) UV 分光光度計を用いて、クリスタリン濃度を検証した。280 nm における  $\gamma$ -クリスタリン及び  $\gamma$ -クリスタリンのモル吸光度は、それぞれ、0.75 及び 1.3 である。

#### 【0040】

[0051] pH 研究のために、PBS 中の 2 mg/mL の  $\gamma$ -クリスタリンストック液を用いて、被験試料を創出した。pH を調節するのに、HCl 及び NaOH を用いた。定期的に pH を点検して、安定なリーディングを確認した。

20

#### 【0041】

動的光散乱のバックグラウンド：

[0052] 動的光散乱 (DLS) は、系のブラウン運動を分子レベルで緻密にモニタリングすることを可能とするので、レンズの凝集機構を調べるのに理想的である。DLS を用いると、溶液中のクリスタリンの天然の立体構造及びサイズを決定することができる。DLS の限界の 1 つは、溶液が、Zimm レジームに従わなければならない、したがって、散乱強度の測定値が  $qR_g < 1$  の範囲内にあり、濃度が重なり濃度 ( $c^*$ )

30

#### 【数 1】

$$c^* = \frac{3M_w}{4\pi N_A R_g^3} \quad (1)$$

未満でなければならないことである。

#### 【0042】

[0053] Ar レーザー ( $\lambda = 514.5 \text{ nm}$ ) による ALV 測定器を用いて、 $35^\circ \sim 65^\circ$  では  $5^\circ$  間隔で、 $70^\circ \sim 90^\circ$  では  $10^\circ$  間隔で DLS データを収集した。ALV 5000 相関器を用いて、データを解析した。ガラス製の DLS 用試験管 (4 mL) を、マイクロ 90 の極希薄な溶液中で 1 時間にわたり超音波処理し、次いで、濾過した脱イオン化水で 8 回にわたりすすいだ後、アセトンで 8 回にわたり洗浄した。水晶体内のクリスタリン濃度は、極めて高いのが典型的である。しかし、Zimm レジームにより賦与される限界により示される通り、DLS による特徴づけには、クリスタリンの希釈溶液が必要とされる。したがって、0.2 ~ 0.6 mg/mL のクリスタリン溶液を、脱汚染化した DLS 用試験管へと注入した。

40

#### 【0043】

[0054] DLS は、リアルタイムにおける濃度の変動をモニタリングすることにより、ポリマー溶液のブラウン運動についての情報を収集する。このプロセスでは、式 (2) [式中  $q$  は、散乱の波動ベクトルである]

【数 2】

$$\frac{\langle I(q,t) \cdot I(q,t+\tau) \rangle}{\langle I^2 \rangle} = g_2(\tau) \quad (2)$$

を用いて、散乱強度の自己相関関数  $I(q, t)$  を決定する。

【0044】

[0055] ALV 測定器により収集されるデータは、 $g_2(\quad)$  を与える。Contin 解析により、自己相関関数を、確率分布関数へと変換する。これは式 3

【0045】

$$g_2(\quad) = 1 + |g_1(\quad)|^2 \quad (3)$$

10

[0056] [式中、 $g_1(\quad)$  は、分布関数  $F(\quad)$  のラプラス変換である]を用いて、 $g_1(\quad)$  について解くことにより達成される。 $\quad$  は、相関時間  $\quad$  の逆数である。 $\quad$  が直線的な  $q^{-2}$  依存性に従うことが実験的に示される限りにおいて、式 (4)

$$= D q^{-2} \quad (4)$$

を用いて、 $\quad$  を拡散係数  $D$  へと関連付けることができる。

【0046】

[0057] ストークス - アインシュタインの式

【数 3】

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (5)$$

20

を用いて、流体力学半径  $R_h$  を決定することができる。

【0047】

[0058] 式 (5) において、 $k_B$  は、ボルツマン定数であり、 $T$  は、ケルビン単位の温度であり、 $\quad$  は、溶媒の粘稠性である。

【0048】

静的光散乱のバックグラウンド：

[0059] 静的光散乱 (SLS) と DLS との根本的な違いは、SLS では、散乱光の、時間で平均した平均二乗濃度の変動が報告されるのに対し、DLS は、粒子のブラウン運動を解析するということである。SLS は、慣性半径 ( $R_g$ )、重量平均分子量 ( $M_w$ )、及び第 2 ビリアル係数 ( $A_2$ ) を決定するのに用いることが典型的である。凝集物が、 $q R_g > 1$  で溶液中に存在する場合は、フラクタル次元 ( $d_f$ ) もまた決定することができる。

30

【0049】

多重サイズスケールからの相対散乱の分配：

[0060] 単分散性の均一溶液を解析する場合は、確率分布関数に、狭いピークが 1 つ現れる。この単一のピークは、溶液中に 1 つの  $R_h$  が存在することを表わす。単一のポリマー溶液について 2 つのピークが生じる場合、ピークは、溶液中におけるポリマーの個別の鎖及び凝集形態を一般的に表わす。溶液中で多重サイズスケールが生じる場合は、角度  $1^\circ$  当たり特定の確率分布について現れる各ピークの重みづけ積分に基づき、各サイズスケールについて、相対強度を決定することができる。相対強度を決定する第 1 のステップは、式 (6)

40

【数 4】

$$F(\Gamma)d\Gamma = \int_0^a F(\Gamma)d\Gamma + \int_a^b F(\Gamma)d\Gamma = F_1 + F_2 \quad (6)$$

を用いて、各ピークの積分を決定することである。

50

## 【 0 0 5 0 】

[ 0061 ] 0 から a までの区間で求められる積分は、急速な減衰速度を表わし、急速モードとして知られている。第 2 の積分は、緩徐モードと呼ばれ、a から b までの区間で求められる。急速モードの積分及び緩徐モードの積分を、それぞれ、 $F_1$  及び  $F_2$  とする。2 つを超えるピークが存在する場合は、積分の限界を調整し、さらなる積分を加えることにより、この式を改変すべきである。各角度について  $F_1$  及び  $F_2$  を決定し、式 ( 7 )、( 8 )、及び ( 9 )

## 【 0 0 5 1 】

$$I(q)_{total} = I(q)_1 + I(q)_2 \quad (7)$$

## 【 数 5 】

10

$$I(q)_1 = I(q)_{total} \cdot \frac{F_1}{F_1 + F_2} \quad (8)$$

$$I(q)_2 = I(q)_{total} \cdot \frac{F_2}{F_1 + F_2} \quad (9)$$

を用いて、各角度について収集された静的散乱データ  $I(q)_{total}$  に相対的重みを適用することにより、それぞれについての相対散乱強度である  $I(q)_1$ 、及び凝集物についての相対散乱強度である  $I(q)_2$  を決定することができる<sup>22</sup>。

## 【 0 0 5 2 】

20

$q R_g > 1$  のときの形状因子：

[ 0062 ] 形状因子は、単量体の密度関数に対するフーリエ変換として定義される。この関数は、解析されるポリマー系の形状に対する洞察を得る目的で用いる。デバイの式は、ガウスコイルの形状因子である。

$$P(q) = 2N / (q^4 R_g^4) \times [e^{-q^2 R_g^2} - 1 + q^2 R_g^2] \quad (10)$$

この式は、2つの限界  $q R_g < 1$  及び  $q R_g > 1$  を適用することにより、さらに簡略化することができる。

$$q R_g < 1 \text{ のとき、} P(q) = (1 - q^2 R_g^2 / 3) \quad (11)$$

$$q R_g > 1 \text{ のとき、} P(q) = 2 / (q^2 R_g^2) \quad (12)$$

## 【 0 0 5 3 】

30

[ 0063 ] Zimm の条件を満たすには、 $q R_g$  が 1 未満でなければならないことは既に述べた。しかし、本明細書で論じる実験では、100 nm より大きい慣性半径  $R_g$  を有する大型の凝集物の場合、この条件は満たされない。凝集物が 100 nm より大きい場合、散乱強度は、フラクタル次元、多分散性、及び局所的な単量体密度についての情報を包含する。フラクタル次元  $d_f$  は、凝集物の形状に対して何らかの洞察をもたらすので、特に所望される。 $d_f$  についての情報を導くために、相対静的強度データを、式 ( 10 ) の形状因子  $P(q)$  に適合させた。

$$P(q) = P(0) \times [1 + 2 / (3 \times d_f) \times (q R_g)^2]^{-d_f / 2} \quad (13)$$

[ 式中、 $P(q) = (q R_g)^{-d_f}$ 、 $q R_g > 1$  ] ( 14 )

40

## 【 0 0 5 4 】

[ 0064 ] 式 ( 10 ) は、すべての次元について、 $P(q)$  が、デバイの式で  $q R_g > 1$  のときの  $N / (q R_g)^{d_f}$  に比例するという結論に基づき導出した。

## 【 0 0 5 5 】

[ 0065 ] 式 ( 13 ) の線形化形である  $y = A (1 + Bx)$  [ 式中、 $y = I(q)^{-2/d_f}$ 、 $A = I(0)^{-2/d_f}$ 、 $B = (2 R_g^2) / (3 d_f)$ 、及び  $x = q^2$  ] を用いて、 $R_g$  及び  $d_f$  の最良適合を数学的に決定した。

## 【 0 0 5 6 】

実施例 1：動的光散乱 ( DLS ) によるクリスタリンの特徴づけ

[ 0066 ] 希釈溶液における水晶体クリスタリンの凝集傾向を解析することにより、凝集

50

の物理的特性を理解することができる。解析される2つのタンパク質は、 $\gamma$  クリスタリン及び  $\alpha$  クリスタリンであった。DLSは、23 の水中の0.2 mg/mLの  $\gamma$  クリスタリン溶液が、ただ1つのサイズスケールを有することを明らかにした。溶液中には、10 nmの  $R_h$  だけが見出された。サイズ選択を、図1に示す、単一のガウスピーク分布関数へと翻訳した。 $R_h$ を10 nmとするタンパク質は、拡散係数が  $2.42 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  であると認められた。逆に、23 の水中の0.2 mg/mLの  $\alpha$  クリスタリンに対してDLSを実施したところ、分布関数には、2つのガウスピークが現れた。2つのピークは、急速モード及び緩徐モードを表わす(図2)。急速モードは、溶液中で好ましい個別のポリマー鎖の流体力学半径  $R_h$  を示唆する。緩徐モードは、凝集物の  $R_h$  を表わす。該試料についての急速モードの  $R_h$  は、20 nmであった。緩徐モードの  $R_h$  は、DLSを用いて正確に決定しうるサイズスケールを超えていた。

10

【0057】

【0067】  $\alpha$  クリスタリンを水中に入れる場合は、急速モード及び緩徐モードが存在する。しかし、 $\alpha$  クリスタリンを、リン酸緩衝生理食塩液であるPBS中に入れると、多数のモードが存在する。PBS中の0.2 mg/mLの  $\alpha$  クリスタリンの分布関数には、4つの異なるモードが存在する。ある大きな角度では、4つのモードが、2つのモードに見えるように重複する。これは、角度によりこれらのピークがシフトする結果である。小さな角度では、図2で見られる通り、4つのピークが完全に分解される。溶液に見出されうる4つの  $R_h$  値は、1 nm、4 nm、97 nm、及びDLSの正確な範囲を超えるより大きなスケールサイズである。

20

【0058】

実施例2： $\alpha$  クリスタリンのフラクタル次元解析

【0068】  $\alpha$  クリスタリンが形成する凝集物の形状及びサイズを理解するため、23 の水中の0.2 mg/mLの  $\alpha$  クリスタリン、及び23 のPBS中の0.2 mg/mLの  $\alpha$  クリスタリンに対して、フラクタル次元解析を実施した。式(6)~(9)を用いて、23 の水中の0.2 mg/mLの  $\alpha$  クリスタリンについて、個別の鎖及び凝集物に起因する相対散乱強度を決定し、次いで、図3にプロットした。

【0059】

【0069】 予測される通り、図3は、凝集物に起因して、散乱のバルクが存在することを明らかにする。このデータを用いて、 $[I(q)/I(0)] \times (qR_g)^2$  を  $qR_g$  と対比してグラフ表示することによって創出されるクラツキープロットを構築することにより、式(13)を用いて凝集物のフラクタル次元( $d_f$ )を決定した。

30

【0060】

【0070】 図4によれば、 $d_f$  は、約4.4である。 $R_g$  は、537 nmであると決定されたが、これは、DLSにより決定された値の相関オーダーにある。DLSにより約440 nmであると決定された  $R_h$  値は、この大きさのサイズスケールを解析するときのDLSの限界のために、正確ではない可能性があることに注意することが重要である。図4のピークにおけるデータ点は、右側に大きくシフトしており、理論値と比較して増幅されている。このシフト及び増幅は、凝集物の多分散性及び凝集物の分枝に起因する可能性が高い。

40

【0061】

【0071】 23 のPBS溶液中に0.2 mg/mLの  $\alpha$  クリスタリンを入れたときには4つのサイズスケールが観察されたが、クラツキープロットにより解析するための基準に適合するピークは1つだけであった。 $R_h$  1200 nmの最大凝集物が、 $qR_g > 1$  の基準を満たす唯一の凝集物であった。4つのサイズスケールの各々に起因する相対強度は、式(6)~(9)を用いて決定した(図5)。

【0062】

【0072】 式(13)を用いて、23 のPBS中の0.2 mg/mLの  $\alpha$  クリスタリンにおける最大凝集物の  $d_f$  を、クラツキープロットにより、2.3と決定した。このクラツキープロットに対応する  $R_g$  は1452 nmであり、1200 nmの  $R_h$  のオーダー

50

にある。

【0063】

[0073] 図6のデータ点は、 $d_f$ を2.3とする理論的趨勢線の近傍に一定の誤差限界を有するようである。誤差は、確率分布関数における4つのピークすべてが必ずしも分解されたとは限らないという事実に起因する可能性が高い。 $d_f$ に誤差が生じれば、相対分散強度の分配においても誤差が生じる可能性があり、したがって、クラツキープロットにも反映されるのであろう。

【0064】

実施例3： クリスタリンのシャペロンとしての役割

[0074] 前述の通り、クリスタリンは、凝集を緩和又は阻害するので、水晶体では、シャペロンタンパク質として作用する。クリスタリン及びそのシャペロン能の、 $\gamma$ -クリスタリンに対する影響を決定するため、23の水中の0.2 mg/mLの $\gamma$ -クリスタリン溶液、0.6 mg/mLのクリスタリン溶液を調製して、DLSにかけた。DLSが明らかにした分布関数のピークは、1つだけであった(図7)。したがって、シャペロンの添加は、凝集物を除去することが認められた。

【0065】

[0075]  $\gamma$ -クリスタリンと3:1の重量比でクリスタリンを混合したところ、緩徐モードが抑制された。緩徐モードは、帯電したポリマーが、電解質溶液中で凝集する自発的傾向の結果である。このようにして形成される凝集物のサイズ、及び凝集物の脆弱な構造は、静電相互作用の強度及び範囲を決定する実験変数により制御可能である。これらの凝集物は光を散乱するので、このような凝集物の形成を回避することが極めて重要である。緩徐モードの抑制により、クリスタリンと $\gamma$ -クリスタリンとの相互作用の性質についての問題が提示された。クリスタリンが $\gamma$ -クリスタリンの凝集を調整する能力のために、凝集自体の性質が静電作用によるものである可能性がある。

【0066】

実施例4：  $\gamma$ -クリスタリンの凝集における静電作用の役割

[0076] クリスタリンの凝集の性質が静電作用によるものであるかどうかを決定するため、0.15 MのNaCl水溶液中の0.2 mg/mLの $\gamma$ -クリスタリンに対して、動的光散乱を実施した(図8)。

【0067】

[0077] 急速モードは、塩により大きく影響されなかったが、緩徐モードは大幅に変化した。塩の添加により、凝集物の $R_h$ が230 nmから120 nmへと減少した。NaClの添加により、凝集物の $R_h$ が2分の1に低減されたことは、 $\gamma$ -クリスタリンの凝集の性質が静電作用によるものであることを示す。

【0068】

実施例5： 溶液における $\gamma$ -クリスタリンの速度論的趨勢

[0078] 凝集の動態は、濃度に依存する。2 mg/mLのストック液を0.2 mg/mLへと希釈することにより、各試料を調製した。したがって、各濃度のそれぞれにおいてかかった時間を記述する変数を定義することが重要であった。 $\gamma$ -クリスタリンの速度論的傾向を記述するのに用いた2つの変数は、 $t_{\text{ストック}}$ 及び $t_{\text{試験管}}$ であった。 $t_{\text{ストック}}$ とは、ストック液を創出してから希釈するまでに経過した時間を指す。 $t_{\text{試験管}}$ とは、ストック液を希釈することによりDLS用試験管中の試料を作製してから経過した時間である。まず、水中の $\gamma$ -クリスタリンの速度論的結果について論じ、次いで、PBS中の $\gamma$ -クリスタリンの結果について再検討する。

【0069】

[0079]  $t_{\text{ストック}}$ 値を5時間及び214時間とし、室温の水中の0.2 mg/mLの $\gamma$ -クリスタリンを有する試料に対してDLSを実施した。保管寿命及び混合に関して短時間及び長時間を表わすように、これらの $t_{\text{ストック}}$ 値を選択した。 $t_{\text{試験管}}$ 時間を1、4、7、24、及び214時間として、各試料に対してDLSを実施した。 $t_{\text{ストック}}$ を変化させることの影響は、急速モード及び緩徐モードのいずれに対しても顕著であること

10

20

30

40

50

が判明した（図 9）。

【 0 0 7 0 】

〔 0080 〕  $t_{\text{ストップ}}$  を 5 時間とする系では、平衡が即時的に達成されなかったので、水中の  $0.2 \text{ mg/mL}$  の  $\beta_{\text{L}}$  クリスタリンとしたときの凝集の動態は濃度依存的である。室温における  $0.2 \text{ mg/mL}$  の  $\beta_{\text{L}}$  クリスタリン溶液は、 $t_{\text{ストップ}}$  を 5 時間とし、 $t_{\text{試験管}}$  を 100 時間としたときに、安定状態を達成した。凝集物の流体力学半径もまた、 $t_{\text{ストップ}}$  時間を 214 時間として調べた各  $t_{\text{試験管}}$  値において平衡に達したことが判明した。急速モード及び緩徐モードの平衡  $R_{\text{h}}$  値は、それぞれ、7 nm 及び 210 nm であった。

【 0 0 7 1 】

〔 0081 〕 10 倍濃度のリン酸緩衝生理食塩液（PBS）（Fisher Scientific）中の  $0.2 \text{ mg/mL}$  の  $\beta_{\text{L}}$  クリスタリンについての速度論的特質を、図 10 に示す。DLS を用いたところ、室温の緩衝液中に、 $\beta_{\text{L}}$  クリスタリン凝集物の 4 つの異なるサイズ分布が観察された。ここでもまた、5 時間及び 214 時間の  $t_{\text{ストップ}}$  値を用いた。 $t_{\text{試験管}}$  値を 1、4、7、24、及び 214 時間とし、DLS を用いて、試料を解析した。図 10 によれば、流体力学半径は、濃度に依存せずに一定を維持した。したがって、PBS 中の  $0.2 \text{ mg/mL}$  の  $\beta_{\text{L}}$  クリスタリンによる凝集状態は、測定した時間スケールでは速度論的プロセスと認められなかった。

【 0 0 7 2 】

実施例 6： $\beta_{\text{L}}$  クリスタリンに対する pH の変動の影響

〔 0082 〕機能的な眼においては、pH の変化が、クリスタリンの凝集状態に影響を及ぼしうる。本節では、水晶体における  $\beta_{\text{L}}$  クリスタリンの凝集に対する pH の役割について探索する。HCl 及び NaOH による滴定を介して、pH を調整した。23 で、2、4、8、6、7、8、及び 10 の pH 値について検討した（表 1）。

【表 1】

表 1: 23°C の PBS 中の  $0.2 \text{ mg/mL}$  の  $\beta_{\text{L}}$  クリスタリンについて測定した流体力学半径

$R_{\text{h}}$ ; pH は HCl 及び NaOH で調整する

試料の pH	$R_{\text{h}}$	$R_{\text{h}}$	$R_{\text{h}}$	$R_{\text{h}}$
2	2 nm			$4.5 \mu\text{m}$
4.8				$4.6 \mu\text{m}$
6			614 nm	
7	2 nm	8 nm	165 nm	$2.2 \mu\text{m}$
8				$1.4 \mu\text{m}$
10			91 nm	$1.4 \mu\text{m}$

【 0 0 7 3 】

〔 0083 〕生理学的 pH 以外のすべての pH 値では、動的光散乱において、急速モード及び緩徐モードが存在する。各モードは、散乱実体の特定のサイズを表わす。急速モードは、非凝集分子を表わし、緩徐モードは、凝集構造を表わす。最も酸性（pH = 2）の条件下及び最も塩基性（pH = 10）の条件下では、最大サイズのスケールがデータにおいて優勢であったが、第 2 のサイズのスケールも明らかに存在した。第 2 のサイズのスケールも存在するという結論は、確率分布関数における 2 つのピークに対する相対積分に基づいて導出した（図 11）。集合したタンパク質凝集物のサイズ及び凝集傾向は、明らかに pH に依存することから、静電作用の役割が裏付けられる。

## 【 0 0 7 4 】

【 0084 】異なる溶液におけるクリスタリンの性質、及び静電作用の役割についての知見を考慮して、本明細書では、白内障において見出される凝集を引き起こすと以前考えられていた分子間ジスルフィド結合が、分子内ジスルフィド結合であることを提起する。図 1 2 は、提起されるモデルを例示するものである。

## 【 0 0 7 5 】

実施例 7 : S D S 及びプロテオグリカンは  $\beta_L$  クリスタリンを脱凝集化しない

【 0085 】実施例 4 と同様に、非イオン性界面活性剤である S D S、ドデシル硫酸ナトリウム ( S i g m a A l d r i c h から購入した ) の、  $\beta_L$  クリスタリンの脱凝集化に対する効果を調べた。S D S の C M C は  $2.36 \text{ mg/ml}$  であるので、S D S 濃度を  $2.36 \text{ mg/ml}$  未満に維持した。図 1 3 に示す通り、S D S は、  $\beta_L$  クリスタリンの脱集合を刺激しなかった。

10

## 【 0 0 7 6 】

【 0086 】プロテオグリカンは、硫酸ケラチン、硫酸コンドロイチン、及びヒアルロン酸からなる。表 2 に示す通り、プロテオグリカンを  $\beta_L$  クリスタリンに添加したところ、凝集サイズが増大した。

## 【表 2】

表 2

[プロテオグリカン]	$\beta_L$ クリスタリン	$R_h$	$R_h$	$R_h$	$R_h$	$R_h$
0	$0.2 \text{ mg/mL}$		11 nm	63 nm		
$0.1 \text{ mg/mL}$	$0.2 \text{ mg/mL}$	4 nm	21 nm	150 nm	641	6000

20

プロテオグリカンは、  $\beta_L$  クリスタリンのサイズを増大させる。

## 【 0 0 7 7 】

実施例 8 :  $\beta_L$  クリスタリンの凝集サイズに対する p H の影響

【 0087 】  $\beta_L$  クリスタリンの凝集現象を、白内障形成に關与する凝集の物理的特質を理解するためのモデルとして用いた。系の初期解析は、  $\beta_L$  クリスタリンが、溶液中で 1 つの流体力学半径  $R_h$  を表わす、1 分布ピーク系を形成することを示した。  $\beta_L$  クリスタリンは、水中では急速モード及び緩徐モードをもたらし、P B S 中では 4 つのサイズスケールをもたらした。急速モードは、単離分子に対応し、緩徐モードは、凝集物に対応する。散乱強度を、フラクタル物体についての形状因子と適合させることにより、水中の最大凝集物及び P B S 中の最大凝集物の両方について、フラクタル次元を調べた。次いで、  $\beta_L$  クリスタリンと  $\beta_L$  クリスタリンとの相互作用、又はより具体的には、  $\beta_L$  クリスタリンのシャペロンとしての性質について調べた。  $\beta_L$  クリスタリン溶液に添加すると、  $\beta_L$  クリスタリンは、  $\beta_L$  クリスタリンの集合を低減することが裏付けられた。次いで、  $\beta_L$  クリスタリンではなく、  $0.15 \text{ M}$  の N a C l を用いることにより、凝集物の低減効果を観察した。この実験は、  $\beta_L$  クリスタリンの集合の性質が、静電作用によるものであることを裏付けた。

30

## 【 0 0 7 8 】

【 0088 】2 週間にわたり、散乱強度及び時間の関数として散乱強度の相関をモニタリングすることにより、2 3 の水及び P B S の両方において、凝集の速度論的特質を調べた。水中の  $0.2 \text{ mg/mL}$  の  $\beta_L$  クリスタリンについての  $R_h$  値は、平衡に達するのに約 2 週間を必要とした。したがって、これらの溶液についての平衡は、実験に影響を及ぼす時間スケールにおいて達成されることが決定された。P B S 中の  $0.2 \text{ mg/mL}$  の  $\beta_L$  クリスタリンについての  $R_h$  値は、数分間で平衡に達した。

40

## 【 0 0 7 9 】

【 0089 】2 3 の P B S 中の  $0.2 \text{ mg/mL}$  の  $\beta_L$  クリスタリン溶液について、p H を調整した。生物学的条件は、広範な範囲の  $R_h$  値が溶液中に存在する結果をもたらした。しかし、p H を酸性 ( 4 . 8 ) のレジーム又は塩基性 ( 8 ~ 1 0 ) のレジームへと変化

50



させたところ、溶液では1つの凝集物サイズスケールが優勢となった。論じた一連の実験、すなわち、 $\alpha$ -クリスタリン及び $\beta$ -クリスタリンの組成、PBS緩衝液対水、pH、温度、SDSの存在、及び塩濃度の変化は、環境の変化が $\alpha$ -クリスタリンの凝集に対して大きな影響を及ぼしうることを裏付けた。

【0080】

[0090]  $\alpha$ -クリスタリンの集合において静電作用が果たすことが決定された顕著な役割のために、白内障の凝集機構自体においてもまた実際に、静電作用が優勢であることが本明細書で示唆される。したがって、本発明者らによる結果は、静電力に慎重に干渉することにより、 $\alpha$ -クリスタリンの凝集の原因となる力、及び白内障の発症を緩和する戦略をもたらす。

10

【0081】

[0091] イオン性液体は、凝集しつつある単量体の静電相互関係を切断するための2つの要件を満たす。イオン性液体の化学的構造は、疎水性部分とイオン性部分との複合体である。イオン性部分は、タンパク質単量体間の静電相互作用を調整する。同時に、これらの低分子イオンは、それらの疎水性テールをアンカリングすることにより、タンパク質分子の近傍に配置される。加えて、低分子イオンのテール長は短いために、低分子イオンが、油溶液中のようにタンパク質から相分離することは阻止される。

【0082】

[0092] 「1つの(a)」及び「1つの(an)」という用語は、量の限定を示すのではなく、指示された項目のうちの少なくとも1つの存在を示す。「又は」という用語は、「及び/又は」を意味する。「含む」、「有する」、「包含する」、及び「含有する」という用語は、オープンエンドの用語（すなわち、「～が含まれるがこれらに限定されない」を意味する）と解釈されるべきである。

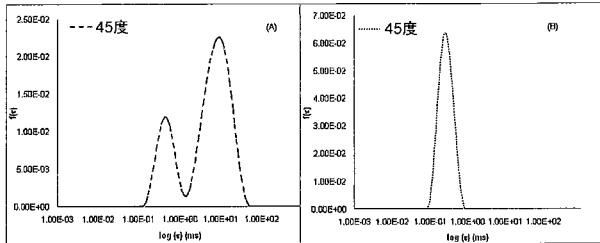
20

【0083】

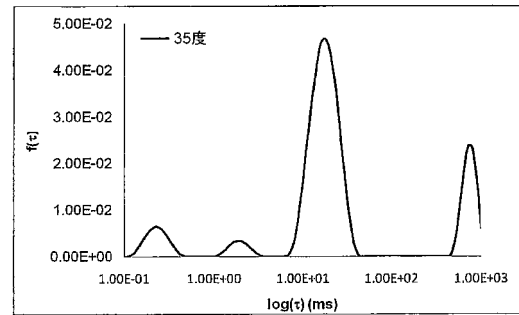
[0093] 本明細書では、本発明者らに知られる最良の形態を含めた実施形態が説明されている。前出の説明を読めば、当業者には、このような実施形態の変形形態が明らかであろう。当業者は、必要に応じてこのような変形形態を用いることが予期され、開示された方法は、本明細書で具体的に説明されたものとは別の形で実施されることが予期される。したがって、本明細書に添付の特許請求の範囲で列挙される対象物に対するすべての改変物及び同等物が、関連法規により許容される範囲内で包含される。さらに、本明細書で別段に指示されるか、又は文脈により別段に明確に反証されない限り、すべての可能な変形形態における、上記で説明した要素の任意の組合せを包含する。

30

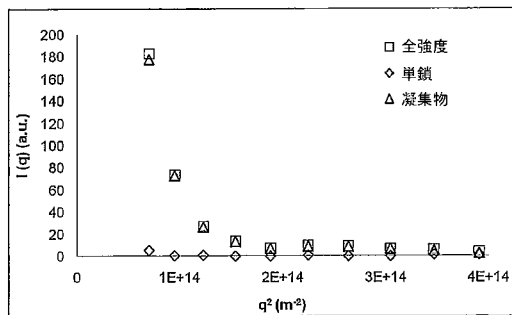
【図 1】



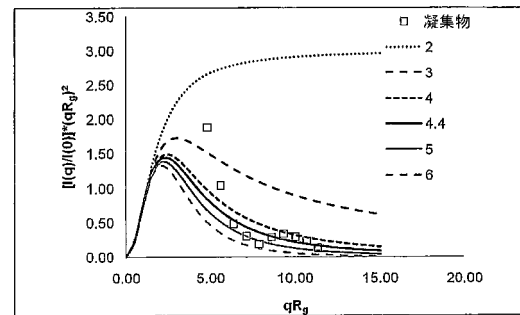
【図 2】



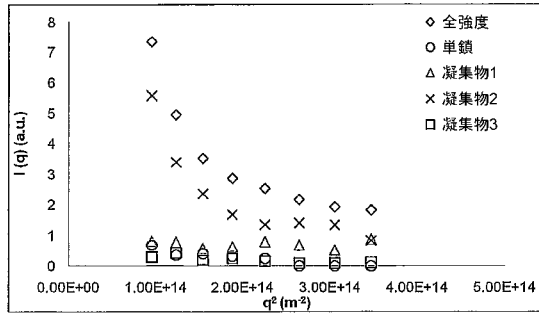
【図 3】



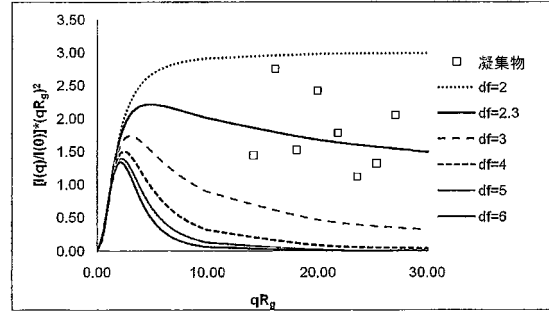
【図 4】



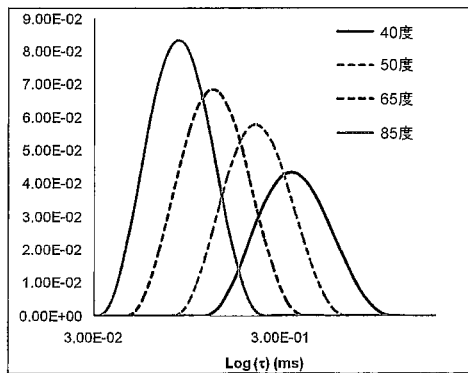
【 図 5 】



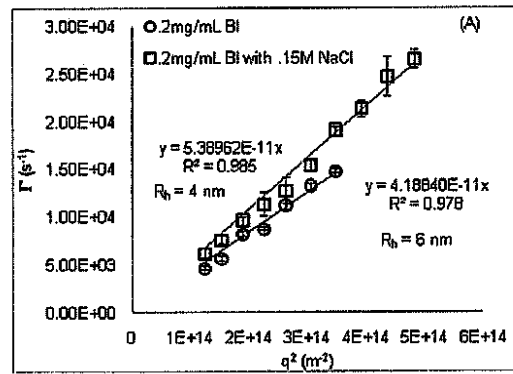
【 図 6 】



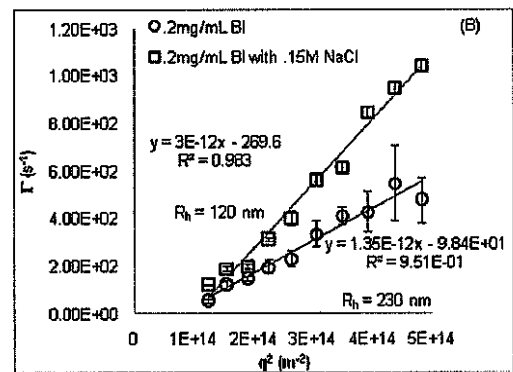
【 図 7 】



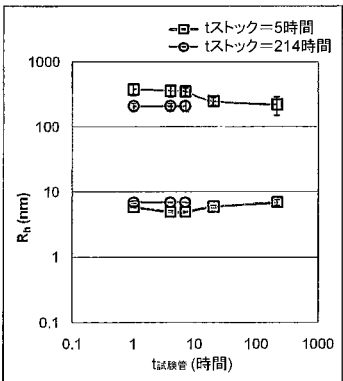
【 図 8 ( A ) 】



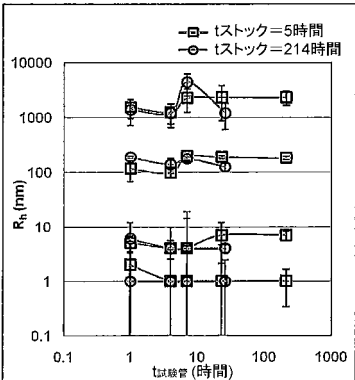
【 図 8 ( B ) 】



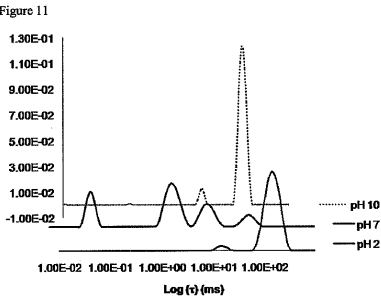
【 図 9 】



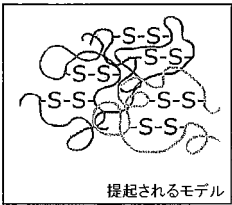
【 図 10 】



【 図 11 】

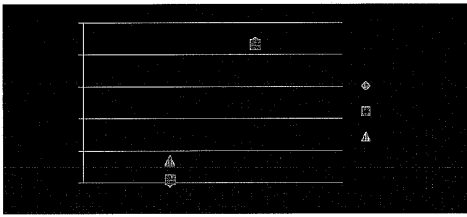


【 図 12 】



【 図 1 3 】

Figure 13



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/060044

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K33/14 A61P27/10 A61P27/12  
ADD.

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/48190 A1 (SIGMA TAU IND FARMACEUTI [IT]; CALVANI MENOTTI [IT]) 20 June 2002 (2002-06-20) page 11, line 19 - page 12, line 4; claims 14,16 page 6, line 17 - page 7, line 5 -----	1-19
X	WO 95/14482 A1 (RENSSELAER POLYTECH INST [US]) 1 June 1995 (1995-06-01) page 9, paragraph 3; claims 1-17 page 7, paragraph 2 -----	1-19
X	DE 39 06 311 A1 (ADATOMED PHARMA & MED [DE]) 30 August 1990 (1990-08-30) column 1, lines 44-46; claims 1,2 column 2, lines 9-11 column 3, line 67 - column 4, line 16 ----- -/-	1-9,19

☒ 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 document 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.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 2011

Date of mailing of the international search report

28/02/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tardi, Christine

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/060044

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1 093 259 A (WANG HUIKANG [CN]) 12 October 1994 (1994-10-12) claims 1-7; examples 1-4 -----	1-19
A	WO 2005/117987 A1 (GLAZIER ALAN N [US]) 15 December 2005 (2005-12-15) paragraphs [0039] - [0047] -----	1-19
A	WO 2009/051223 A1 (R TECH UENO LTD [JP]; MASHIMA YUKIHIKO [JP]; INOUE RYO [JP]; KISHIMOTO) 23 April 2009 (2009-04-23) example 1; tables 1-2 -----	1-19
A,P	& EP 2 213 303 A1 (R TECH UENO LTD [JP]) 4 August 2010 (2010-08-04) example 1; tables 1-2 -----	1-19
A	WANG ET AL: "Safety and efficacy of intracapsular tranilast microspheres in experimental posterior capsule opacification", JOURNAL CATARACT AND REFRACTIVE SURGERY, SURGERY, FAIRFAX, VA, US, vol. 33, no. 12, 28 November 2007 (2007-11-28), pages 2122-2128, XP022375747, ISSN: 0886-3350, DOI: DOI:10.1016/J.JCRS.2007.07.041 * abstract table 2 -----	1-19
A	QIAN J ET AL: "Effects of anionic surfactant SDS on the photophysical properties of two fluorescent molecular sensors", JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, A: CHEMISTRY, ELSEVIER SEQUOIA, LAUSANNE, CH, vol. 200, no. 2-3, 15 December 2008 (2008-12-15), pages 402-409, XP025681172, ISSN: 1010-6030, DOI: DOI:10.1016/J.JPHOTOCHEM.2008.09.002 [retrieved on 2008-09-17] page 403, column 1 * abstract -----	1-19
A	US 5 756 672 A (BUILDER STUART [US] ET AL) 26 May 1998 (1998-05-26) the whole document -----	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/060044

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0248190	A1	20-06-2002	AU 2395301 A 24-06-2002
		CA 2434911 A1 20-06-2002	
		DE 60030787 T2 13-09-2007	
		EP 1341813 A1 10-09-2003	
		ES 2272351 T3 01-05-2007	
		HU 0400737 A2 28-07-2004	
		MX PA03006266 A 25-06-2004	
		PL 367204 A1 21-02-2005	
		PT 1341813 E 31-01-2007	
		SK 8902003 A3 02-12-2003	
		US 2004120967 A1 24-06-2004	
WO 9514482	A1	01-06-1995	AU 1183595 A 13-06-1995
		CA 2177373 A1 01-06-1995	
		EP 0731707 A1 18-09-1996	
		US 5516534 A 14-05-1996	
		US 5766639 A 16-06-1998	
DE 3906311	A1	30-08-1990	NONE
CN 1093259	A	12-10-1994	NONE
WO 2005117987	A1	15-12-2005	NONE
WO 2009051223	A1	23-04-2009	CA 2702885 A1 23-04-2009
		CN 101903045 A 01-12-2010	
		EP 2213303 A1 04-08-2010	
		KR 20100096094 A 01-09-2010	
		US 2010210697 A1 19-08-2010	
US 5756672	A	26-05-1998	AT 352568 T 15-02-2007
		AT 264872 T 15-05-2004	
		CA 2168552 A1 02-03-1995	
		DE 69433724 D1 27-05-2004	
		DE 69433724 T2 28-04-2005	
		DE 69434919 T2 29-11-2007	
		DK 1486511 T3 29-05-2007	
		DK 714406 T3 26-07-2004	
		EP 0714406 A1 05-06-1996	
		ES 2280857 T3 16-09-2007	
		ES 2219649 T3 01-12-2004	
		JP 9501693 T 18-02-1997	
		JP 3648242 B2 18-05-2005	
		PT 1486511 E 30-04-2007	
		PT 714406 E 30-09-2004	
		WO 9506064 A1 02-03-1995	
US 5756672	A		US 5663304 A 02-09-1997
			US 5808006 A 15-09-1998



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 27/12 (2006.01)</b>		A 6 1 P 27/12		
<b>A 6 1 P 27/02 (2006.01)</b>		A 6 1 P 27/02		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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

(72)発明者 オウ, チャオヤン  
アメリカ合衆国, ニューヨーク州, ウェブスター, ハリス ロード 1208

(72)発明者 シバイ, デニズ  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州, ペラム, バファン ロード 29ビー

Fターム(参考) 4C076 AA12 BB24 CC10

4C084 AA17 MA01 MA17 MA58 NA14 ZA332

4C086 AA01 AA02 HA02 HA15 MA02 MA05 MA17 MA58 NA14 ZA33

4C206 AA01 AA02 JA06 KA12 MA02 MA05 MA37 MA78 NA14 ZA33