

(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2021-529196

(P2021-529196A)

(43) 公表日 令和3年10月28日(2021.10.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7032 (2006.01)	A 6 1 K 31/7032	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/715 (2006.01)	A 6 1 K 31/715	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2020-572817 (P2020-572817)  
 (86) (22) 出願日 令和1年6月28日 (2019.6.28)  
 (85) 翻訳文提出日 令和3年2月25日 (2021.2.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2019/093799  
 (87) 国際公開番号 WO2020/001639  
 (87) 国際公開日 令和2年1月2日 (2020.1.2)  
 (31) 優先権主張番号 201810714008.2  
 (32) 優先日 平成30年6月29日 (2018.6.29)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 中国 (CN)

(71) 出願人 519237834  
 シャンハイ、グリーン、バレー、ファーマ  
 スーティカル、カンパニー、リミテッド  
 SHANGHAI GREEN VALL  
 EY PHARMACEUTICAL C  
 O., LTD.  
 中華人民共和国シャンハイ、ブードン、ニ  
 ユー、エリア、チャン、ジャン、ハイーテ  
 ク、パーク、ニウドウン、ロード、421

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疼痛の治療におけるマンヌロン二酸組成物の使用

(57) 【要約】

本発明は、疼痛の治療におけるマンヌロン二酸オリゴ糖組成物の使用に関する。

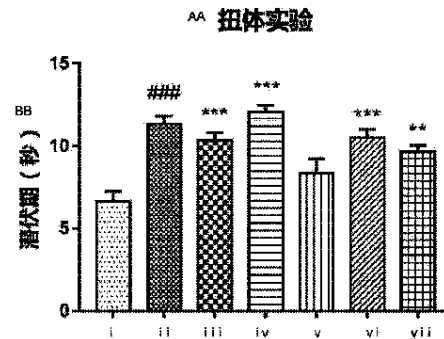


図 4

AA WRITHING TEST  
 BB LATENT PERIOD (SECONDS)

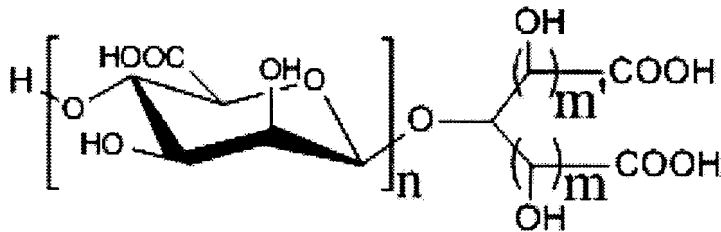
## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

疼痛の治療のための薬剤の製造におけるマンヌロン二酸オリゴ糖組成物の使用であって

、  
前記マンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、式 (III) を有するマンヌロン二酸またはその薬学上許容可能な塩：

## 【化 1】



式(III),

10

(式中、 $n$  は 1 ~ 9 から選択される整数であり、 $m$  は 0、1 または 2 から選択され、 $m'$  は 0 または 1 から選択される)、

を含んでなり、

20

$n = 1 \sim 5$  であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して、60% 以上であり、

$n = 1 \sim 2$  であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して、60% 未満である、

使用。

## 【請求項 2】

前記疼痛が急性疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、術後痛、慢性腰痛、群発性頭痛、疱疹性神経痛、幻肢痛、中枢痛、歯痛、オピオイド耐性疼痛、内臓痛、手術痛、骨損傷痛、疲労および分娩中の疼痛、日焼けを含む火傷により引き起こされる疼痛、分娩後痛、片頭痛、アンギナ、および尿生殖路関連疼痛（膀胱炎を含む）、血管痛、三叉神経痛、肋間神経痛、外科的切開痛、慢性筋膜炎痛、踵痛、筋肉痛、骨痛、関節痛、癌性疼痛、非癌性疼痛である、請求項 1 に記載の使用。

30

## 【請求項 3】

前記マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $n = 1 \sim 2$  であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して、10% ~ 50%、好ましくは 25% ~ 50% である、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 4】

前記マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $n = 4 \sim 7$  であるマンヌロン二酸の総重量に対する、 $n = 1 \sim 3$  であるマンヌロン二酸の総重量の比率が、1.0 ~ 3.5 の間である、請求項 1 に記載の使用。

40

## 【請求項 5】

前記マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $m + m' = 1$  または 2 であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して、50% 以上、好ましくは 60% ~ 90%、より好ましくは 70% ~ 90% である、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 6】

$m + m' = 1$  であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して、10% 以上、好ましくは 30% ~ 40% である、請求項 5 に記載の使用。

## 【請求項 7】

$m + m' = 2$  であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して、10% 以上、好ましくは 30% ~ 50% である、請求項 5 に記載の使用。

50

## 【請求項 8】

n = 1 ~ 5 であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して、80 ~ 95 % である、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 9】

n = 1 ~ 3 であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して、20 ~ 70 % である、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 10】

n = 4 ~ 7 であるマンヌロン二酸の総重量に対する、n = 1 ~ 3 であるマンヌロン二酸の総重量の比率が、1.0 ~ 3.0 の間である、請求項 4 に記載の使用。

## 【請求項 11】

前記組成物において、それぞれの重合度のマンヌロン二酸の重量パーセント含量が、二糖類 5 ~ 25 %、三糖類 15 ~ 30 %、四糖類 15 ~ 28 %、五糖類 5 ~ 25 %、六糖類 2 ~ 20 %、七糖類 2 ~ 20 %、八糖類 2 ~ 20 %、九糖類 2 ~ 20 %、十糖類 2 ~ 20 % である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の使用。

10

## 【請求項 12】

前記組成物において、それぞれの重合度のマンヌロン二酸の重量パーセント含量が、二糖類 5 ~ 25 %、三糖類 15 ~ 30 %、四糖類 15 ~ 28 %、五糖類 10 ~ 20 %、六糖類 5 ~ 15 %、七糖類 3 ~ 10 %、八糖類 2 ~ 5 %、九糖類 1 ~ 5 %、十糖類 1 ~ 5 % である、請求項 11 に記載の使用。

20

## 【請求項 13】

前記組成物において、それぞれの重合度のマンヌロン二酸の重量パーセント含量が、二糖類 10 ~ 20 %、三糖類 18 ~ 30 %、四糖類 15 ~ 28 %、五糖類 15 ~ 20 %、六糖類 5 ~ 10 %、七糖類 3 ~ 5 %、八糖類 2 ~ 5 %、九糖類 1 ~ 3 %、十糖類 1 ~ 3 % である、請求項 12 に記載の使用。

## 【請求項 14】

薬学上許容可能な塩が、ナトリウム塩またはカリウム塩である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 15】

有効量の請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物を、それを必要とする患者に投与することを含んでなる、疼痛を有する患者を治療する方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、生物活性スクリーニング法により得られたマンヌロン二酸の最適な組成物の、疼痛の治療における使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

疼痛は、複雑な生理的および心理的活動であり、極めて一般的な臨床症状の 1 つである。急性疼痛は多くの場合、他の疾患の一症状であり、慢性疼痛はそれ自体が疾患である。現在、世界の人口の約 30 % 慢性疼痛に苦しんでいる。中国では慢性疼痛に苦しむ患者が少なくとも 1 億人いる。片頭痛は、臨床診療で一般的な頭痛のタイプの 1 つである。片頭痛は、正常な間欠期間を有する再発性の頭痛を特徴とする。片頭痛の厳密な原因はまだ明らかでない。臨床診療は発作中の症状の緩和と予防的処置に注力するが、理想的な治療薬は存在しない。

40

## 【0003】

マンヌロン二酸は、その潜在的な医学的価値のために広く注目を集めている。マンヌロン二酸は通常、アルギン酸を原料として用いる多段階方法により調製される。

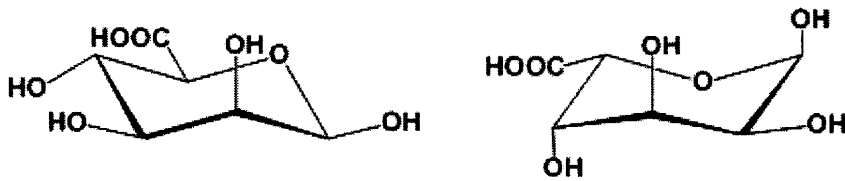
## 【0004】

原料であるアルギン酸の多糖分子は、-1, 4-グルコシド結合により連結された D-マンヌロン酸から形成される M セグメント、-1, 4-グルコシド結合により連結さ

50

れた L - グルロン酸から形成される G セグメント、およびこの 2 つの糖のハイブリダイゼーションにより形成される M G セグメントを含んでなる。D - マンヌロン酸および L - グルロン酸の構造式を以下の式 ( I ) に示す。

【化 1】



M; $\beta$ -D-マンヌロン酸

G; $\alpha$ -L-グルロン酸

( I )

10

【 0 0 0 5 】

M セグメントおよび G セグメントは、原料であるアルギン酸から分離することができる。一般的な方法を、以下に簡単に記載することができる。アルギン酸を予め分解し、ポリマンヌロン酸とポリグルロン酸の多糖混合物を得る。次いでこの多糖混合物を酸性沈殿に供し、その中のポリグルロン酸を除去し、さらに精製して純度が 90 % を超えるホモポリマンヌロン酸 ( 以後、「M セグメント中間体」とも称する ) を得る。例えば、中国特許出願第 9 8 8 0 6 6 3 7 . 8 号および C N 0 2 8 2 3 7 0 7 . 2 号に開示された方法を参照

20

【 0 0 0 6 】

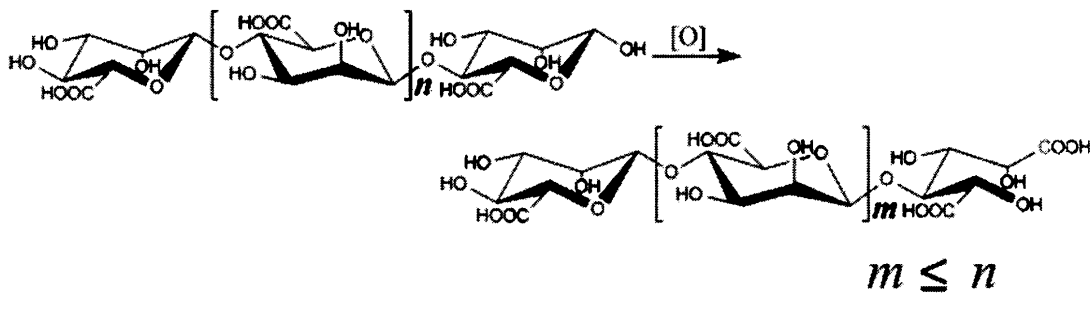
オリゴマンヌロン酸の一般的な調製方法は次の通りである：上記で得た M セグメント中間体を酸性条件下で加熱することによりさらに酸分解に供し、所望の範囲の分子量を有する小断片マンヌロン酸ポリマーを得る。さらに、分解効率は酸化分解方法により向上させることができ、一方、還元末端は開環サッカリン二酸に酸化することができる。詳細については、Meiyu Geng らが出願した中国特許出願第 2 0 0 5 8 0 0 0 9 3 9 6 . 5 号 ( 特許文献 1 ) および米国特許第 8 , 8 3 5 , 4 0 3 B 2 号 ( 特許文献 2 ) を参照。便宜上、特許文献 1 および 2 を以後まとめて先行文献といい、引用することによりその全体が本明細書の開示の一部とされる。

30

【 0 0 0 7 】

先行文献において開示されているマンヌロン二酸を得る反応は、以下の反応式 ( I I ) で表すことができる。すなわち、オリゴマンヌロン酸多糖の還元末端にあるマンヌロン酸の C 1 位のアルデヒド基が、カルボキシル基に酸化される。

【化 2】



$m \leq n$  ( II )

40

【 0 0 0 8 】

上記の酸化変換過程において、慣用される酸化剤は、アルカリ性硫酸銅溶液、すなわちフェーリング試薬である。先行文献は、この酸化方法を採用している。具体的には、アルカリ性条件下で、反応基質のポリマンヌロン酸、すなわち、上記の M セグメント中間体を硫酸銅溶液に加え、沸騰水浴中で 1 5 分 ~ 2 時間反応させる。この方法は、アルデヒド基

50

を酸化するために  $\text{Cu}^{2+}$  イオンを酸化剤として用いており、赤れんが色の酸化第一銅の沈殿が、反応において生成される。この反応は、しばしば還元糖の同定に使用される。

【0009】

先行文献は、オリゴマンナル酸が、アルツハイマー病（AD）および糖尿病に効果を有することを開示している。アルツハイマー病および2型糖尿病の病因は、アミロイド（アミロイドおよびアミリン）と密接に関連している。アミロイドタンパク質は、凝集し、次いでタンパク質オリゴマーを形成し、さらに凝集して線維を形成する。これらのタンパク質凝集物は細胞傷害性であり、細胞における酸化反応を誘導してミトコンドリアを損傷させ、疼痛反応などのカスケード反応を惹起して、多数のニューロンおよび細胞に損傷を引き起こし、最終的に、アルツハイマー病および2型糖尿病の発症に至る。オリゴマンナル酸はアミロイドタンパク質を標的とし、アミロイドタンパク質により誘導されるカスケード反応と拮抗するため、アルツハイマー病および2型糖尿病を予防および治療する効果を有する。

10

【0010】

先行文献CN106344595Aは、疼痛の治療におけるオリゴマンナル酸の適用を開示しており、また、疼痛の治療における四糖類～十糖類混合物の薬学的活性も開示している。

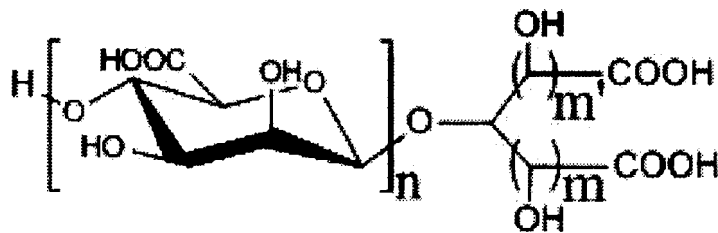
【発明の概要】

【0011】

本発明は、疼痛の治療におけるマンヌロン二酸オリゴ糖組成物の使用に関する。本出願人らは、特定の構成を有するマンヌロン二酸オリゴ糖組成物が疼痛を治療する効果を有することを見出し、その組成物は、式（III）を有するマンヌロン二酸またはその薬学上許容可能な塩：

20

【化3】



式(III),

30

（式中、 $n$  は 1 ~ 9 から選択される整数であり、 $m$  は 0、1 または 2 から選択され、 $m'$  は 0 または 1 から選択される）

を含んでなり、

$n = 1 \sim 5$  であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して 60% 以上であり、

$n = 1 \sim 2$  であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して 60% 未満である。

40

【0012】

本発明の別の態様は、疼痛に苦しむ患者を治療する方法であって、有効量の本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物を、それを必要とする患者に投与することを含んでなる方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、生成物Aにおける二糖類、三糖類および四糖類の質量スペクトルを示す。

【図2】図2は、生成物Aにおける五糖類、六糖類および七糖類の質量スペクトルを示す。

50

【図3】図3は、生成物Aにおける八糖類、九糖類および十糖類の質量スペクトルを示す。

【図4】図4は、酢酸により誘発されたマウスにおけるライジング反応の潜時に対するオリゴ糖組成物、比較実験サンプルおよび六糖類の効果を示す。図の横座標の数字に対応するサンプルは、i：モデル群；ii：生成物A；iii：生成物B；iv：生成物C；v：生成物D；vi：比較実験サンプル；vii：六糖類である。

【図5】図5は、酢酸により誘発されたマウスにおけるライジング反応の回数に対するオリゴ糖組成物、比較実験サンプルおよび六糖類の効果を示し、横軸の記号は図4と同様である。

【図6】図6は、ニトログリセリンにより誘発された片頭痛ラットにおけるヘッドスクラッチング回数に対するオリゴ糖組成物、比較実験サンプルおよび六糖類の効果を示す。図の横座標の数字に対応するサンプルは、i：対照群；ii：モデル群；iii：生成物A；iv：生成物B；v：生成物C；vi：生成物D；vii：比較実験サンプル；viii：六糖類である。

【図7】図7は、三叉神経節の電気刺激により誘発された片頭痛ラットにおける三叉脊髄核の尾側部（尾側核）のc-fos陽性細胞の数に対するオリゴ糖組成物、比較実験サンプルおよび六糖類の効果を示し、横軸の記号は図6と同様である。

【発明の具体的説明】

【0014】

本発明の種々の態様を以下に詳細に説明するが、本発明はこれらの特定の実施態様に限定されない。当業者ならば、以下の実質的な開示を踏まえ、本発明に多少の改変および調整を行うことができ、このような調整も、本発明の範囲に包含される。

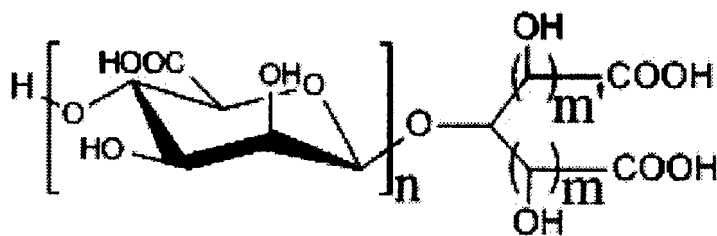
【0015】

本発明は、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物の疼痛の治療における使用に関する。本発明はまた、有効量の本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物を、それを必要とする患者に投与することを含んでなる、疼痛を治療する方法に関する。

【0016】

本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、式(III)を有するマンヌロン二酸またはその薬学上許容可能な塩：

【化4】



式(III),

(式中、nは1～9から選択される整数であり、mは0、1または2から選択され、m'は0または1から選択される)

を含んでなり、

n = 1～5であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して60%以上であり、

n = 1～2であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量に対して60%未満である、特定の組成を有する。

【0017】

本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、重合度の異なるマンヌロン二酸の混合物であり、その主成分は2～10の重合度を有するマンヌロン二酸オリゴ糖である。マンヌロン二酸において最も活性が高い糖類は、四糖類～十糖類、特に六糖類である。しかしなが

ら、本発明者らは今般、活性が低い二糖類および三糖類を最も活性が高い四糖類～十糖類に特定の割合で加えると、同一質量の投与量のもとでは、生物活性は低下することなく、むしろ活性が高くなることを見出している。いかなる理論にも拘束されるものではないが、これは、低分子量の二糖類～三糖類は、単独では作用できないものの、他のオリゴ糖と混合し場合に相乗作用を示すためと推測される。しかしながら、二糖類～三糖類の割合が高すぎると、組成物の全体的な活性は低下する。従って、組成物中の二糖類および三糖類の割合は特定の範囲内に制御しなければならない。

**【0018】**

実際の調製工程では、酸化分解反応において多量の二糖類～三糖類が生成され、通常、その活性の低さから、生成物の医薬効果に影響を及ぼすことを避けるため、分離後に生成物から除去される。しかしながら、本発明者らの上記発見に基づけば、酸化分解生成物中の二糖類～三糖類を分離および除去する必要はなく、ただ、二糖類～三糖類の割合を特定の範囲内に制御するために酸化分解反応の条件を制御する必要があるだけである。得られた組成物の活性は、先願に開示されている組成物の活性と同等か、またはより高い可能性もある。さらに、二糖類および三糖類は除去すべき不純物とはみなされないため、生成物収量もまた、先願で開示されている生成物よりもかなり高い。このように、本発明は生産コストを大幅に削減し、廃棄物の排出を低減し、それにより実際の生産の実現が容易となり、産業的大規模生産の実現が容易となる。

10

**【0019】**

好ましい実施態様によれば、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $m + m' = 1$  または  $2$  であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量に対して  $50\%$  以上、好ましくは  $60\% \sim 90\%$ 、より好ましくは  $70\% \sim 90\%$  である。特に、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $m + m' = 1$  であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量に対して  $10\%$  以上、好ましくは  $30 \sim 40\%$  である。別の好ましい実施態様では、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $m + m' = 2$  であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量に対して  $10\%$  以上、好ましくは  $30 \sim 50\%$  である。

20

**【0020】**

好ましい実施態様によれば、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $n = 1 \sim 5$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量は、前記組成物の総重量に対して  $80 \sim 95\%$  である。

30

**【0021】**

好ましい実施態様によれば、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $n = 1 \sim 2$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量は、前記組成物の総重量に対して  $10 \sim 50\%$ 、好ましくは、 $25 \sim 50\%$  である。

**【0022】**

好ましい実施態様によれば、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $n = 1 \sim 3$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量は、前記組成物の総重量に対して  $20 \sim 70\%$  である。

**【0023】**

好ましい実施態様によれば、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $n = 4 \sim 7$  であるマンヌロン二酸の総重量に対する  $n = 1 \sim 3$  であるマンヌロン二酸の総重量の比率は、 $1.0 \sim 3.5$  の間、好ましくは  $1.0 \sim 3.0$  の間である。

40

**【0024】**

好ましい実施態様によれば、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、前記組成物のそれぞれの重合度のマンヌロン二酸の重量パーセント含量は、二糖類  $5 \sim 25\%$ 、三糖類  $15 \sim 30\%$ 、四糖類  $15 \sim 28\%$ 、五糖類  $5 \sim 25\%$ 、六糖類  $2 \sim 20\%$ 、七糖類  $2 \sim 20\%$ 、八糖類  $2 \sim 20\%$ 、九糖類  $2 \sim 20\%$ 、十糖類  $2 \sim 20\%$  である。特に、前記組成物において、前記組成物におけるオリゴ糖の重量パーセント含量は、二糖類  $5 \sim 25\%$ 、三糖類  $15 \sim 30\%$ 、四糖類  $15 \sim 28\%$ 、五糖類  $10 \sim 20\%$ 、六糖類  $5 \sim 15\%$ 、七糖類  $3 \sim 10\%$ 、八糖類  $2 \sim 5\%$ 、九糖類  $1 \sim 5\%$ 、十糖類  $1 \sim 5\%$  である。より好まし

50

くは、前記組成物において、前記組成物におけるオリゴ糖の重量パーセント含量は、二糖類 10 ~ 20 %、三糖類 18 ~ 30 %、四糖類 15 ~ 28 %、五糖類 15 ~ 20 %、六糖類 5 ~ 10 %、七糖類 3 ~ 5 %、八糖類 2 ~ 5 %、九糖類 1 ~ 3 %、十糖類 1 ~ 3 %である。

【0025】

本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、薬学上許容可能な塩は、ナトリウム塩またはカリウム塩であり得る。

【0026】

本願の発明者らは、重合度の異なるオリゴ糖を特定の割合で配合すると、高活性オリゴ糖組成物を得ることができ、その活性は、最も活性が高い六糖類よりも高いことを見出した。特に、特定の割合で二糖類および三糖類を加えた組成物は、二糖類および三糖類を配合しない組成物よりも高い活性を有していた。高活性オリゴ糖組成物中のそれぞれのオリゴ糖の割合は、以下に示す割合を有し得る。

10

【0027】

組成物中の  $n = 1 \sim 5$  であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量に対して 60 % 以上であり、好ましくは 80 ~ 95 % である。 $n = 1 \sim 2$  であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量に対して 60 % 未満であり、好ましくは 10 ~ 50 %、より好ましくは 25 ~ 50 % である。 $n = 1 \sim 3$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量は、前記組成物の総重量に対して 20 ~ 70 % である。 $n = 4 \sim 7$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量に対する  $n = 1 \sim 3$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量の比率は、1 . 0 ~ 3 . 5 の間、好ましくは 1 . 0 ~ 3 . 0 の間である。

20

【0028】

本発明の疼痛の治療のための薬剤は、式 ( I I I ) を有するマンヌロン二酸またはその薬学上許容可能な塩、および 1 以上の薬学上許容可能な担体を含んでなる、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物を含んでなる。本発明の薬剤は、経口または非経口投与のための錠剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、腸溶カプセル剤、マイクロカプセル、顆粒、シロップ、注射、顆粒、エマルジョン、懸濁液、溶液および徐放性製剤の形であり得る。

【0029】

本発明の薬学上許容可能な担体とは、当業者に公知の薬学上許容可能な担体を指す。本発明の薬学上許容可能な担体には、限定されるものではないが、増量剤、湿潤剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、粘着剤、流動促進剤、矯味剤、界面活性剤、保存剤などが含まれる。増量剤には、限定されるものではないが、ラクトース、微晶質セルロース、デンプン、糖粉末、デキストリン、マンニトール、硫酸カルシウムなどが含まれる。湿潤剤および結合剤には、限定されるものではないが、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、スクロース、ポリビニルピロリドンなどが含まれる。崩壊剤には、限定されるものではないが、カルボキシメチルデンプンナトリウム、架橋ポリビニルピロリドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロースなどが含まれる。滑沢剤には、限定されるものではないが、ステアリン酸マグネシウム、シリカゲル微粉末、タルク、水素化植物油、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸マグネシウムなどが含まれる。粘着剤には、限定されるものではないが、アラビアガム、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、グルコース結合剤、デキストリン、デキストロース、エチルセルロース、ゼラチン、液状グルコース、グアーガム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、マルトデキストリン、メチルセルロース、ポリメタクリレート、ポリビニルピロリドン、アルファー化デンプン、アルギン酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン、シロップ、およびトラガカントガムが含まれる。流動促進剤には、限定されるものではないが、コロイドシリカ、セルロース粉末、三ケイ酸マグネシウム、シリカおよびタルクが含まれる。矯味剤には、限定されるものではないが、アスパルテーム、ステビオシド、フルクトース、グルコース、シロップ、ハチミツ、

30

40

50

キシリトール、マンニトール、ラクトース、ソルビトール、マルチトール、およびグリチルリチンが含まれる。界面活性剤には、限定されるものではないが、Tween-80およびポロキサマーが含まれる。保存剤には、限定されるものではないが、パラベン、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウムなどが含まれる。

【0030】

本明細書で言及される疼痛には、急性疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、術後痛、慢性腰痛、群発性頭痛、疱疹性神経痛、幻肢痛、中枢痛、歯痛、オピオイド耐性疼痛、内臓痛、手術痛、骨損傷痛、疲労および分娩中の疼痛、日焼けを含む火傷により引き起こされる疼痛、分娩後痛、片頭痛、アングナ、および尿生殖路関連疼痛（膀胱炎を含む）、血管痛、三叉神経痛、肋間神経痛、外科的切開痛、慢性筋膜炎痛、踵痛、筋肉痛、骨痛、関節痛、癌性疼痛、非癌性疼痛などを含む様々な疼痛が含まれる。

10

【0031】

本明細書で使用する場合、「治療」という用語は一般に、所望の薬理学的および/または生理学的効果を達成することを指す。この効果は、疾患またはその症状の完全または部分的予防によれば、予防的なものであり得、ならびに/あるいは疾患および/または疾患による副作用の部分的または完全な安定化または治癒によれば、治療的なものであり得る。本明細書で使用する場合、「治療」は患者の疾患のいかなる治療をも対象とし、(a) 疾患または症状を起こしやすいが、まだ疾患に罹患していると診断されていない患者において発現する疾患または症状の予防、(b) 疾患の症状の抑制、すなわちその発症の予防、または(c) 疾患の症状の軽減、すなわち疾患の発症または症状の悪化の軽減、を含む。

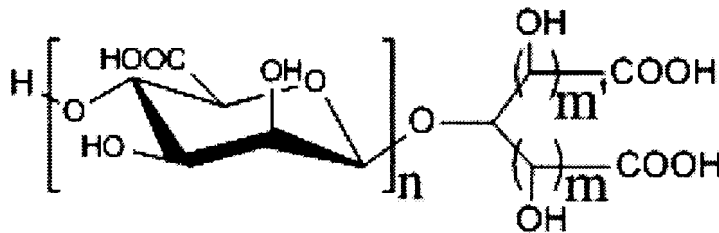
20

【0032】

マンヌロン二酸オリゴ糖組成物

本発明の疼痛の治療のためのマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、式(III)を有するマンヌロン二酸またはその薬学上許容可能な塩：

【化5】



30

式(III),

(式中、nは1~9から選択される整数であり、mは0、1または2から選択され、m'は0または1から選択される)

を含んでなり、

n = 1 ~ 5であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量に対して60%以上であり、

40

n = 1 ~ 2であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量に対して60%未満である。

【0033】

例示的な実施態様では、疼痛の治療のためのマンヌロン二酸オリゴ糖組成物の調製方法は、以下の工程を含んでなる。

【0034】

(1) マンヌロン二酸生成物の調製：

Mセグメント中間体の調製。上記のように、本発明において用いる原料であるMセグメント中間体は、従来技術において公知の方法、例えば、中国特許出願第98806637

50

． 8号およびCN02823707． 2号に開示の方法により調製することができる。一般的な方法は、以下に簡単に説明することができる。アルギン酸を予め分解し、ポリマンヌロン酸およびポリグルロン酸の多糖混合物を得る。次いで多糖混合物を酸性沈殿に供し、その中のポリグルロン酸を除去し、さらに精製して純度が90%を超えるホモポリマンヌロン酸、すなわちMセグメント中間体を得る。

#### 【0035】

オゾン酸化分解。Mセグメント中間体を、適当な量の水に溶かし、室温でまたは加熱条件下で攪拌する。オゾンを連続的に導入し、反応を開始する。反応のpH値は、希塩酸または希NaOH溶液を滴下することにより、3～13、好ましくは4～10、より好ましくは6～8に調整することができる。温度は、好ましくは0～70、より好ましくは10～45である。反応完了後、オゾンの導入を停止し、pHを中性に調整する。

10

#### 【0036】

膜分離および精製。上記で得た反応生成物を、約10%の濃度の溶液に調合し、分子カットオフ膜により分離して、単糖類以下の分解生成物を除去する。保持液を回収する。使用する分子カットオフ膜は、1000Da～3000Da、好ましくは2000DaのMWCOを有する。回収した液体を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させ、オリゴマンヌロン二酸混合物を得る。分析の後、これらの生成物は総て、含量が特定の割合の範囲内である二糖類～十糖類のオリゴ糖組成物であることが見出される。実施例1～3は、調製方法の例である。

#### 【0037】

20

#### (2) 単一の重合度を有するオリゴ糖の調製

工程(1)において得たオリゴ糖混合物を、約10%の濃度まで溶解し、P6ゲルクロマトグラフィーカラムで分離し、紫外検出に供し、各溶出液成分を回収する。同じ重合度を有する成分を合わせる。二糖類～十糖類の9種類の成分を回収し、G10ゲルカラムクロマトグラフィーにより脱塩し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させる。特定の精製法および調製プロセスを実施例4に示す。カラムクロマトグラフィー、脱塩および乾燥のこれらの操作は、当業者に公知である。

#### 【0038】

#### (3) オリゴ糖組成物の活性の比較

本発明のオリゴ糖組成物と、精製された六糖類を、薬理活性に関して比較する。結果は、本発明のオリゴ糖組成物は単一の重合度のオリゴ糖において最も高い活性を有する六糖類よりも活性が高いことを示し、一方、二糖類および三糖類をより高い量で含んでなる組成物の活性は、六糖類の活性よりもわずかに低い。従って、単一のオリゴ糖は組み合わせた後に相乗作用を示し得ると見ることができる。組成物中の二糖類～六糖類の割合が60%以上である場合、ならびに二糖類～三糖類の割合が60%未満である場合に、組成物の活性は最も高い。しかしながら、二糖類～三糖類の割合が60%を超える場合、組成物の活性はまた、低下する。

30

#### 【0039】

#### 動物モデルおよび薬力学的活性の評価

#### 1. 抗疼痛薬力学的評価のための動物モデル - 酢酸により誘発されるマウス疼痛モデル

40

Kunmingマウス、半分は雄、半分は雌、体重18～22gを、各群10匹として、ブランク対照群、モデル群、および薬剤投与群に無作為に群分けした。群分け当日から、ブランク対照群には、連続7日間、1日1回、20ml/kgの蒸留水を胃内に与え、他群には、連続7日間、1日1回、対応する薬物を胃内投与した。最後の投与の1時間後に、各群のマウスに0.2mlの0.6%酢酸溶液を腹腔内投与し、ライジング潜時(酢酸注射からライジング反応の発生までの時間)および酢酸の注射後20分以内のマウスのライジング回数を記録した。

#### 【0040】

酢酸溶液などの化学物質のマウスの腹腔への注射は、マウスの腹膜を刺激し、間欠的な持続疼痛を生じさせることができ、これは腹部の凹み、前腹壁がケージの底部に付く、臀

50

部の屈曲および後肢の進展により現れ、ライジング反応と呼ばれる特異な姿勢を示す。特定の時間内のライジング潜時（酢酸注射からライジング反応の発生までの時間）およびライジング回数は、疼痛の重篤度を表し得る。ライジング潜時が短く、ライジング回数が多いほど、疼痛は重篤である。

#### 【0041】

2. 抗疼痛薬力学的評価のための動物モデル - ニトログリセリンにより誘発される片頭痛ラットモデル

SD雄ラット、体重180～220gを、各群8匹として、ブランク対照群、モデル群、および薬剤投与群に無作為に群分けした。投与は群分け当日に開始した。ブランク対照群およびモデル群には、連続28日間、1日1回、蒸留水を胃内に与え、他群には、連続28日間、1日1回、対応する薬物を胃内投与した。最後の投与の30分後に、ブランク対照群を除く動物に生理食塩水を与え、他群には、モデルを確立するために、10mg/kgのニトログリセリンを右肩に皮下注射した。モデル確立の後、ラットの耳の発赤の出現時間および持続時間、ならびにモデル確立後30～45分以内のヘッドスクラッチ回数を観察した。脳組織の5-HT含量を蛍光分光測光法で決定し、Ex356nm/Em483nm波長で測定した。結果はng/g脳重量で示す。

#### 【0042】

片頭痛は、血管および神経機構の相互作用による血管および神経の機能不全である。ニトログリセリンは、三叉神経線維の過敏反応を引き起こし、髄膜血管の拡張、神経性炎症の形成ならびに視床下部、脳幹および脊髄ニューロンの機能の亢進によって片頭痛を引き起こし得る。ニトログリセリンモデルは、1995年に確立された動物モデルであり、現在では古典的動物片頭痛モデルとなっている。ニトログリセリンの病原機序に従い、片頭痛の重篤度を評価するために、血管拡張により引き起こされた耳の発赤時間、疼痛より引き起こされたヘッドスクラッチングの回数およびセロトニン（5-HT）の（脳組織の疼痛感受性因子）の含量の検出を用いた。耳の発赤が長く、ヘッドスクラッチングの回数が多く、5-HT含量が高いほど、片頭痛は重篤である。

#### 【0043】

3. 抗疼痛薬力学的評価のための動物モデル - 三叉神経節の電気刺激により誘発される片頭痛ラットモデル

SDラット、5か月齢、雄、体重200～240gを、各群10匹として、ブランク対照群、擬似手術群、モデル群、および薬剤投与群に無作為に群分けした。

#### 【0044】

各群に対応する薬物を経口投与し、ブランク対照群、擬似手術群、およびモデル群には蒸留水を経口投与した。10日間の連続投与後に、ブランク対照群以外の総てのラットを抱水クロラル350mg/kgの腹腔内注射により麻酔した。ラットを定位固定装置に固定し、頭頂部を正中切開した。皮膚および筋肉を層毎に切断し、矢状縫合の中央部に橈骨を露出させた。歯科用ドリルを用いて前頂から3mm後部、3mm横に孔を開けた後、三叉神経節に電極を挿入した（硬膜から深さ9.5mm）。手術後も麻酔を継続した。手術は総て無菌条件下で行った。刺激電極をデバッグした。電気刺激パラメーターは、10分間の刺激で、周期200ミリ秒、振幅10v、およびパルス幅5ミリ秒とした。擬似手術群では、電極を挿入するだけで刺激は与えなかった。刺激7分前に右大腿静脈に50mg/kgのエバンスブルーを注射し、次いで、刺激後20分以内に灌流および固定を行った。

#### 【0045】

刺激終了の5分後に、左心室を2分間灌流した。開頭し、全脳を取り出し、病理学的切片において免疫組織化学によりc-fosを特定するために固定した。電極の位置も特定し、電極挿入部位の硬膜およびもう一方の大脳半球の対応する位置を分離した後、脱イオン水で洗浄し、それをスライドガラス上に平らに拡げ、37℃で15分間乾燥させ、70%グリセロールで固定した。刺激側および対照側の示された領域の蛍光強度を、共焦顕微鏡下、興奮波長647nmおよび発光波長680nmで検出する。刺激側/対照側の蛍光

10

20

30

40

50

強度の比を計算して血漿タンパク質管外遊出 ( P P E ) を示す。切片厚 10  $\mu$  m の全脳の連続凍結冠状切片を作製し、c - f o s 陽性細胞を免疫組織化学蛍光標識した。共焦顕微鏡下で無作為に 5 視野を選択して、三叉脊髄核の尾側部の実験側と対照側の陽性細胞数を決定し、5 視野の平均を陽性細胞の平均数とした。

【 0 0 4 6 】

三叉神経血管系の活性化は、片頭痛患者の疼痛の発生に重要な部分であり、髄膜の神経炎症は片頭痛疼痛の発生と持続に重要な役割を果たす。硬膜に分布している三叉神経が刺激されると、この神経は血管作用物質を放出して、髄膜の血管拡張、血漿成分の管外遊出、肥満細胞の脱顆粒および血小板の活性化を引き起こし、片頭痛を生じる。加えて、疼痛刺激後に放出された神経伝達物質が細胞膜上の対応する受容体に結合する。このセカンドメッセンジャーの作用下で、核内で c - f o s mRNA 遺伝子が発現され、翻訳され、c - f o s タンパク質へと合成され、身体に長期の生理作用を及ぼす。従って、片頭痛の発生中、三叉神経の脊髄路核および大縫線内の c - f o s mRNA および c - f o s タンパク質発現細胞の数は増える。よって、片頭痛の程度は、片頭痛動物の硬膜から浸出した血清タンパク質の量および三叉脊髄核の尾側部 ( 尾側核 ) の c - f o s 陽性細胞の数を測定することによって表すことができる。細胞の数が少ないほど、片頭痛の重篤度は低い。

10

【 0 0 4 7 】

本発明の利点を、以下の限定されない例においてさらに示す。しかしながら、実施例で使用される特定の材料およびその量、ならびに他の実験条件は、本発明を限定するものと解釈してはならない。特に断りのない限り、本発明における部、割合、パーセンテージ、および同様のものは総て、質量で算出する。

20

【 実施例 】

【 0 0 4 8 】

実施例 1 :

工程 1 ) : マヌロン二酸オリゴ糖混合物の調製

M セグメント中間体を、先行特許に開示の方法により調製した。特定の操作を以下に簡単に記載する。5 k g のアルギン酸ナトリウムを約 10 % の溶液に調合し、希塩酸を加えることにより、pH を約 3 . 0 に調整した。この溶液を 80 に加熱し、攪拌した。これを 10 時間反応させた後、加熱を停止した。室温に冷却した後、NaOH を加えることにより pH を 9 . 0 に調整し、希塩酸を加えることにより、さらに 2 . 85 に調整した、この溶液を 5000 r p m で 10 分間遠心分離した。上清を回収し、HCl を加えることにより pH を 1 . 0 に調整した。遠心分離後、沈殿を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥して、1500 g の M セグメント中間体を得た。M セグメント中間体 500 g を秤量し、蒸留水に溶かして、5 L の容量の溶液を調製した。溶液を NaOH で pH 6 . 5 に調整し、水浴中で加熱して、反応温度を 75 に制御した。オゾンを経過流速 8 g / 時で反応溶液に導入するように、酸素ポンプの出口のガス流速およびオゾン発生器の出力を調整した。4 時間の反応の後、オゾンの導入を停止し、好適な量の水を加えて、溶液の濃度を約 10 % に調整した。2 , 000 D a の分子量カットオフを有する限外濾過膜で溶液を濾過し、保持液を回収した。回収した液体を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させ、350 g のマヌロン二酸生成物 A を得た。

30

40

【 0 0 4 9 】

工程 2 ) : マヌロン二酸生成物 A における種々の重合度を有するオリゴ糖の割合および構造の分析

上記乾燥マヌロン二酸生成物 A 100 m g を正確に秤量し、濃度 10 m g / m L まで水に溶かし、0 . 22  $\mu$  m 濾過膜に通して試験サンプル溶液を得た。組成物における異なる重合度を有するオリゴ糖の割合を、多角度光散乱 ( M A L S , W y a t t C o . ) と組み合わせた Superdex ペプチド分子排除クロマトグラフィー ( G E C o . ) により測定した。実験条件は、以下のとおりであった。

クロマトグラフィーカラム : Superdex ペプチド 10 / 300 G 1

50

移動相：0.1 mol/L NaCl

注入量：10  $\mu$ L

流速：0.3 mL/分

試験結果：二糖類～十糖類は、それぞれ dp 2～dp 10 で表し、dp 2 は 19%、dp 3 は 25%、dp 4 は 22%、dp 5 は 13%、dp 6 は 9%、dp 7 は 6%、dp 8 は 3%、dp 9 は 2%、および dp 10 は 1%であった。

【0050】

工程3)：マンヌロン二酸生成物Aにおける種々の重合度を有するオリゴ糖の構造のLC-MS分析

実験条件：

クロマトグラフィーカラム：Superdex ペプチド10/300 G1

移動相：20%メタノール+80% 80 mmol/L NH<sub>4</sub>Ac

流速：0.1 mL/分

カラム温度：25  $\pm$  0.8

質量分析条件：Agilent 6540 QTOF；イオン源：ESI 衝突電圧120 V；陰イオンモード。取得したシグナルの幅(m/z)は、100～1000であった。

【0051】

種々の重合度を有するオリゴ糖の質量スペクトルを図1～3に示す。質量スペクトルにおける種々のシグナルピークを割り当て、生成物Aにおける全オリゴ糖の分子構造、すなわち一般式(III)に示される構造を確認した。シグナルの割り当ておよびシグナルに対応する構造は、以下の表1を参照。

【0052】

10

20

【表 1】

表 1: 生成物 A における異なる重合度を有するオリゴ糖中の 6 つの二酸の構造および質量スペクトルにおけるそれらの質量電荷比

番号	分子構造	分子式	質量電荷比 (m/z)								
			n=1 [M-1] <sup>-</sup>	n=2 [M-1] <sup>-</sup>	n=3 [M-1] <sup>-</sup>	n=4 [M-1] <sup>-</sup>	n=5 [M-1] <sup>-</sup>	n=6 [M-1] <sup>-</sup>	n=7 [M-2] <sup>2-</sup>	n=8 [M-2] <sup>2-</sup>	n=9 [M-2] <sup>2-</sup>
1		$(C_6H_8O_6)_n C_6H_{10}O_8$ n=1-9	385	561	737	913	1089	1265	720	808	896
2		$(C_6H_8O_6)_n C_5H_8O_7$ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
3		$(C_6H_8O_6)_n C_5H_8O_7$ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
4		$(C_6H_8O_6)_n C_4H_6O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
5		$(C_6H_8O_6)_n C_4H_6O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
6		$(C_6H_8O_6)_n C_3H_4O_5$ n=1-9	295	471	647	823	999	1175	675	763	851

10

20

30

40

## 【0053】

上記の質量分析構造解析から、生成物 A における糖鎖の還元末端のマンヌロン酸は、サッカリン二酸構造（構造は一般式 III を参照）に酸化され、この構造は、含量が約 10 ~ 30% である 6 個の炭素原子を含んでなるマンナル二酸構造（ $m + m' = 3$ ）であり得

50

るか、または、マンナル二酸の脱炭酸生成物、すなわち、5個の炭素原子を含んでなるサッカリン二酸 ( $m + m' = 2$ ) (30 ~ 50%) および4個の炭素原子を含んでなるサッカリン二酸 ( $m + m' = 1$ ) (30 ~ 40%) であり得ることが分かった。

【0054】

#### 実施例 2 :

実施例 1 の M セグメント中間体 100 g を秤量し、蒸留水に溶かして、0.8 L の容量の溶液を調製した。溶液を NaOH で pH 4.0 に調整し、室温 (25 ) にて反応を行った。オゾンを経過濃度流速 1 g / 時で反応溶液に導入するように、酸素ポンプの出口のガス流速およびオゾン発生器の出力を調整した。10 時間の反応の後、オゾンの導入を停止し、好適な量の水を加えて、溶液の濃度を約 15% に調整した。1,000 Da の分子量カットオフを有する限外濾過膜で溶液を濾過し、保持液を回収した。回収した液体を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させ、80 g のマンヌロン二酸生成物 B を得た。

10

【0055】

B における種々の重合度を有するオリゴ糖成分の割合を、多角度光散乱 (MALS, Wyatt Co.) と組み合わせた Superdex ペプチド分子排除クロマトグラフィー (GE Co.) により決定した。測定方法は、実施例 1 の関連部分と同じであった。試験結果：二糖類 ~ 十糖類は、それぞれ dp 2 ~ dp 10 で表し、dp 2 は 20%、dp 3 は 25%、dp 4 は 19%、dp 5 は 12%、dp 6 は 9%、dp 7 は 5%、dp 8 は 5%、dp 9 は 3% および dp 10 は 2% であった。

20

【0056】

#### 実施例 3 :

実施例 1 の M セグメント中間体 100 g を秤量し、蒸留水に溶かして、1.5 L 容量の溶液を調製した。溶液を NaOH で pH 9.0 に調整し、水浴中 45 にて反応を行った。オゾンを経過濃度流速 3 g / 時で反応溶液に導入するように、酸素ポンプの出口のガス流速およびオゾン発生器の出力を調整した。2 時間の反応の後、オゾンの導入を停止し、好適な量の水を加えて、溶液の濃度を約 5% に調整した。3,000 Da の分子量カットオフを有する限外濾過膜で溶液を濾過し、保持液を回収した。回収した液体を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させ、60 g のマンヌロン二酸生成物 C を得た。

30

【0057】

C における種々の重合度を有するオリゴ糖の割合を、多角度光散乱 (MALS, Wyatt Co.) と組み合わせた Superdex ペプチド分子排除クロマトグラフィー (GE Co.) により決定した。測定方法は、実施例 1 の関連部分と同じであった。試験結果：二糖類 ~ 十糖類は、それぞれ dp 2 ~ dp 10 で表し、dp 2 は 8%、dp 3 は 20%、dp 4 は 28%、dp 5 は 19%、dp 6 は 13%、dp 7 は 6%、dp 8 は 3%、dp 9 は 2%、および dp 10 は 1% であった。

【0058】

#### 実施例 4

単一の重合度を有するマンヌロン二酸オリゴ糖の調製は、以下のとおりであった。

40

【0059】

1. サンプル調製：実施例 1 において調製したマンヌロン二酸生成物 A 300 g を秤量し、水に溶かし、1000 mL の濃縮液を調製し、使用するために、4 の冷蔵庫に入れた。それぞれの使用のために、50 mL を分取し、水で 1 : 2 に希釈した後、0.22 μm 限外濾過膜で吸引濾過した。

【0060】

2. クロマトグラフィー分離条件：クロマトグラフは、UV 検出器および自動コレクターを備えた AKTA pure 150 (GE Co. から購入) であった。分離クロマトグラフィーカラム：1.2 kg の BioGel P6 (Bio-Rad Co. から購入) を脱イオン水と混合し、真空脱気し、手動でガラスカラム (内径：10 cm) に充填し

50

、10カラム容量の純水ですすいだ。クロマトグラフィーカラムベッドは安定であり、高さは1.0mであった。次に、移動相を0.02M NaCl溶液に変え、10カラム容量で平衡化した後、サンプルローディングを開始した。

【0061】

3. サンプルのローディングおよび分離：ポンプの流速を1mL/分に設定した。100mLのサンプル溶液をクロマトグラフ自体のポンプを介してカラムの上部に注入した後、これを移動相に切り替え、流速5mL/分で溶出させた。水のデッドボリュームを流出させた後、自動回収を開始し、チューブ1本あたり50mLを回収した。

【0062】

4. サンプルローディングを繰り返し、調製を20回繰り返した後、同じ画分を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥して、二糖類～十糖類の単一の重合度を有する計9種類のオリゴ糖を得た。

10

【0063】

#### 実施例5

組成物における異なる重合度を有するオリゴ糖の相乗作用およびオリゴ糖の割合の範囲を調べるために、組成物と六糖類との間での薬理活性評価を行った。

【0064】

サンプル調製：

(1) 組成物生成物D：

実施例4において調製した単一の重合度を有するマンヌロン二酸オリゴ糖を、重合度別に二糖類～十糖類を正確に秤量した。用いた各糖類の重量は以下のとおりであった。二糖類3.0g、三糖類3.0g、四糖類1.5g、五糖類1.5g、六糖類0.4g、七糖類0.2g、八糖類0.2g、九糖類0.1g、および十糖類0.1g。これらを均一に混合し、10gの組成物生成物Dを得た。

20

【0065】

(2) 比較実験サンプルの調製

四糖類～十糖類を含有する混合物は、先行特許文献CN106344592Aの実施例1および2に開示された方法を参照して調製した。

【0066】

1gのポリマンヌロン酸ナトリウム(重量平均分子量8235Da、Shanghai Green Valley Pharmaceutical Co., Ltd.により提供)を秤量し、適当な量の蒸留水を加えて1%(重量パーセント)ポリマンヌロン酸ナトリウム水溶液を調製した。1%ポリマンヌロン酸ナトリウム水溶液のpHは塩酸を用いて4に調整し、次いで水溶液をオートクレーブ内においた。110℃で4時間加熱し、反応させた。反応溶液をオートクレーブから取り出し、放冷した。冷却後、NaOH溶液を用いて反応溶液のpH値を中性液体となるよう調整した。攪拌しながら、中性液体を容量の4倍の容量のエタノール中にゆっくりと加えた。アルコール沈殿を行い、溶液は一晚静置した。アルコール沈殿により得られた固形物質を濾過して分離し、無水エタノールを用いて、濾過および分離プロセス中に濾過および分離で得られた固形物質を洗浄した。最終的に、白色濾過ケーキが生成された。この濾過ケーキを60℃のオープン中で濾過し、粗アルギン酸オリゴ糖を得た。

30

40

【0067】

5gの粗アルギン酸オリゴ糖を用いて5%(重量パーセント)水溶液を調製した。要時調製酸化剤である水酸化銅は、25mLの5%(重量パーセント)硫酸銅溶液を50mLの10%(重量パーセント)水酸化ナトリウム溶液に加え、直ちに混合して調製した。要時調製酸化剤である水酸化銅を直ちに40mLの上記5%(重量パーセント)アルギン酸オリゴ糖溶液に加え、赤レンガ色の沈殿が生成されなくなるまで沸騰水浴中で加熱した。反応系を遠心分離し、沈殿を除去して上清を得た。酸化剤に少量の上清を再び加え、さらに赤レンガ色の沈殿が生成されるかどうかを確認した。赤レンガ色の沈殿がまだ生成された場合は、遠心分離から得られた総ての上清と残りの酸化剤との反応を、赤レンガ色の沈

50

殿が生成されないことが確認されるまで継続した。最終反応系を遠心分離し、上清を得た。4倍の容量の95%エタノールを上清に加え、アルコール沈殿に付し、溶液を一晚静置した。アルコール沈殿により得られた固形物質を濾過および分離し、固形物質を無水エタノールで洗浄した。得られた固形物質を60のオープンに入れて乾燥させ、式(II)で表される粗アルギン酸オリゴ糖を得た。

【0068】

1gの粗アルギン酸オリゴ糖で10%(重量パーセント)水溶液を調製し、95%エタノール溶液を用いて再度アルコール沈殿を行った。再アルコール沈殿により得られた沈殿を濾過および分離した後、所望により、無水エタノールを用いて洗浄した。沈殿物を分離および乾燥させて固形物質を得た。この固形物質で5%(重量パーセント)水溶液を調製した。この水溶液を3μm孔径の膜を用いて濾過し、濾液を回収した。濾液は、分子排除クロマトグラフィー Bio-Gel-P6ゲルカラム(1.6×180cm、Bio-Rad Companyより購入)で溶出および分離した。移動相の溶出剤は0.2mol/L-NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>であった。カラムクロマトグラフィーの溶出液は複数の5ml試験管に順次回収し、次いで各試験管中の溶出液の糖類含量を硫酸-カルバゾール法を用いて検出した。検出結果に従って、様々な分子量のアルギン酸オリゴ糖成分を含有する溶出液をそれぞれ回収した。様々な分子量のアルギン酸オリゴ糖成分を含有する溶出液をそれぞれ減圧下で濃縮し、凍結乾燥した。成分1は廃棄し、アルギン酸オリゴ糖成分2~12が得られ、式(II)(nはそれぞれ0~10の重合度の値)に示されるように様々な分子量を有し、式(II)のn=2~8で示されるアルギン酸オリゴ糖溶出液を回収し、これらを合して乾燥させた。式(II)においてn=2~8で示されるアルギン酸オリゴ糖混合物(四糖類~十糖類混合物)は、比較実験サンプルとして生成した。

【0069】

比較実験サンプルにおける種々の重合度を有するオリゴ糖成分の割合を、多角度光散乱(MALS, Wyatt)と組み合わせたSuperdexペプチド(GE Co.)分子排除クロマトグラフィーを用いて検出した。測定方法は、実施例1の関連部分と同じである。試験結果：四糖類~十糖類はdp4~dp10で表し、それぞれdp4は10%、dp5は12%、dp6は13%、dp7は14%、dp8は15%、dp9は19%、およびdp10は17%である。

【0070】

実施例1、2および3においてそれぞれ調製した生成物A、BおよびC、本実施例の生成物D、ならびに比較実験サンプル中のオリゴ糖の割合を以下の表2に示す。

【0071】

【表2】

表 2: マンヌロン二酸オリゴ糖組成物生成物および比較実験サンプル中のオリゴ糖のパーセンテージ

割合 組成	二糖類	三糖類	四糖類	五糖類	六糖類	七糖類	八糖類	九糖類	十糖類
A	19%	25%	22%	13%	9%	6%	3%	2%	1%
B	20%	25%	19%	12%	9%	5%	5%	3%	2%
C	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
D	30%	30%	15%	15%	4%	2%	2%	1%	1%
比較 サンプル	0	0	10%	12%	13%	14%	15%	19%	17%

【0072】

上記4種類のサンプルA、B、CおよびDそれぞれ10gを取り出した。これらの組成物、ヘキソース(6T)と比較実験サンプルの薬理活性を、「抗疼痛薬力学的評価のため

の動物モデル」に記載の方法に従って比較した。

【0073】

1. 酢酸により誘発される疼痛マウスモデル

実験において、ブランク対照群と比較して、モデル群のライジング潜時は有意に短く、ライジング回数は有意に多く、評価モデルの確立に成功したことを示している。モデル群と比較して、各薬物投与群のライジング潜時は有意に延長され、ライジング回数は有意に減少した。図4および5参照。

【0074】

2. ニトログリセリンにより誘発される片頭痛ラットモデル

ラットはニトログリセリンの皮下注射の約3分後に耳の発赤を示し、これは約2.5時間持続した。モデル群におけるモデル確立後30~45分以内のヘッドスクラッチング回数は、ブランク対照群よりも有意に多かった。モデル群と比較して、薬物投与群は、耳の発赤の出現の有意な遅延、耳の発赤の持続時間の短縮、および30~45分以内のヘッドスクラッチング回数の減少を示した。図6参照。

10

【0075】

3. 三叉神経節の電気刺激により誘発される片頭痛モデル

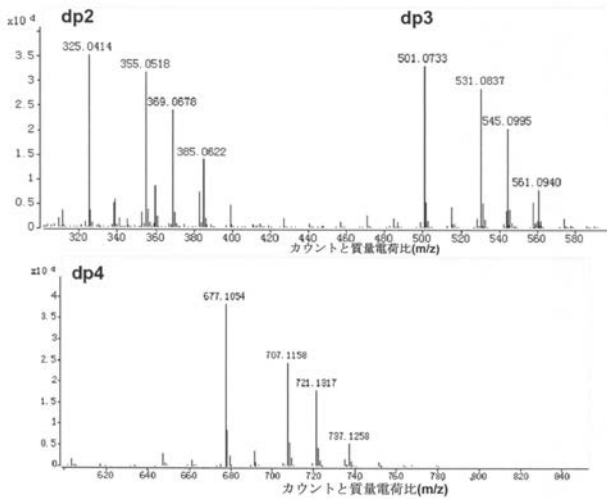
ラット三叉神経節の電気刺激は、硬膜血清タンパク質の滲出を明らかに引き起こした。ブランク対照群および擬似手術群と比較して、モデル群では、PPE速度は有意に増し、c-fos発現陽性細胞の数は有意に増大した。モデル群と比較して、薬物投与群では、PPE速度は有意に低下し、c-fos発現陽性細胞の数は有意に減少した。図7参照。

20

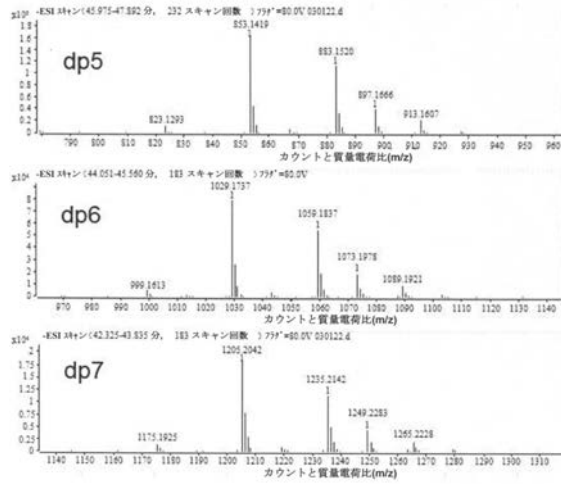
【0076】

これらの実験結果は、生成物A、BおよびCの薬力学的活性は総て比較実験サンプルよりも良好であり、単一の重合度では最も活性の高い六糖類よりも良好であることを示した。しかしながら、生成物Dの活性は六糖類よりも弱く、このことは、組成物中のオリゴ糖の割合が重要であり、特定の割合の二糖類および三糖類の添加が相乗作用を有することを示している。しかしながら、二糖類および三糖類の割合が高すぎると、組成物の活性は低下すると思われる。

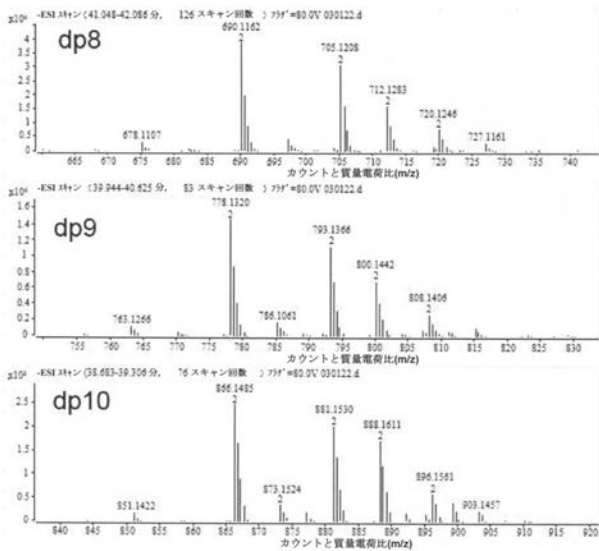
【 図 1 】



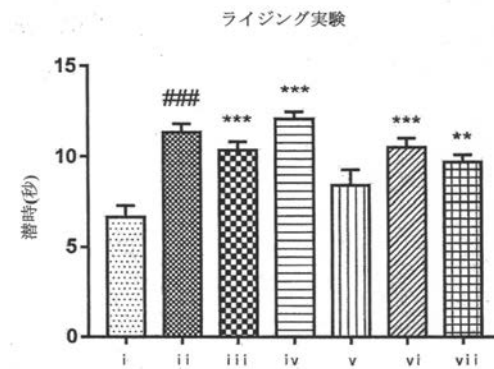
【 図 2 】



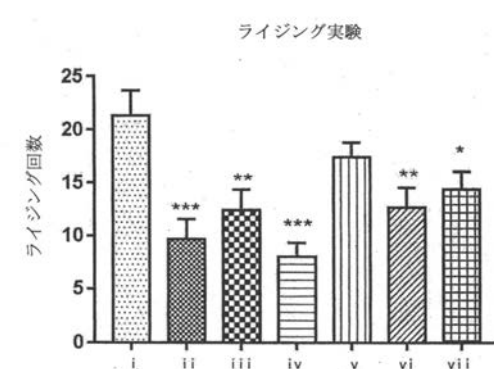
【 図 3 】



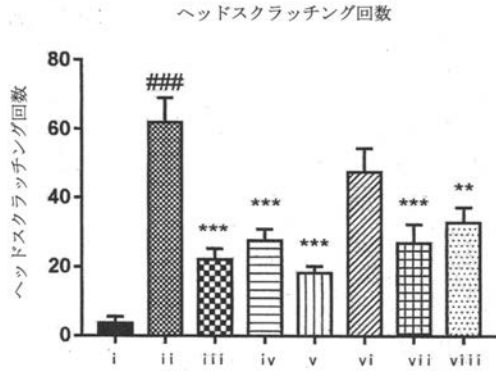
【 図 4 】



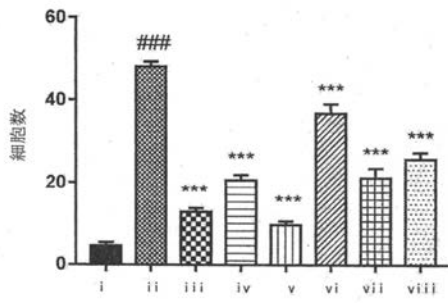
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



## 【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/CN2019/093799</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K 31/702(2006.01)i; A61P 25/04(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 中国药物专利数据库, CTCMPD, CNKI, 百度搜索, BAIDU XUESHU SEARCH, ISI-WEB OF SCIENCE; +ache, arthralgia, intercostal neuralgia, myalgia, talalgia, myosalgia, trigeminal neuralgia, pain, tic douloureux, 痛, 疼, mannuron+, courbature, 甘露糖醛, trifacial neuralgia, myodynia		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106344595 A (SHANGHAI GREEN VALLEY PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25 January 2017 (2017-01-25) see the abstract, and claims 1-7	1-15
A	CN 1362860 A (KBP CO., LTD.) 07 August 2002 (2002-08-07) see entire document	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>16 September 2019</b>		Date of mailing of the international search report <b>09 October 2019</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer   Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/093799

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 15  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
[1] The claim relates to methods of Treatment of pain, which is the subject matter that does not warrant a search (PCT Rule 39.1(iv)). However, the search is still made on the use of the compositions in the preparation of a medicament for treating pain.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2019/093799**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106344595	A	25 January 2017	None			
CN	1362860	A	07 August 2002	US	2002137723	A1	26 September 2002
				EP	1175157	A1	30 January 2002
				US	6747015	B2	08 June 2004
				KR	100501584	B1	18 July 2005
				EP	1175157	A4	14 May 2003
				KR	20010077950	A	20 August 2001
				JP	2003521573	A	15 July 2003
				AU	3238001	A	14 August 2001
				WO	0156404	A1	09 August 2001

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2019/093799
<b>A. 主题的分类</b> A61K 31/702(2006.01)i; A61P 25/04(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
<b>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, VEN(DWPI+SIPCOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 中国药物专利数据库, CNKI, 百度学术搜索, ISI-WEB OF SCIENCE:+ache, arthralgia, intercostal neuralgia, myalgia, talalgia, myosalgia, trigeminal neuralgia, pain, tic douloureux, 痛, 疼, manuron+, courbature, 甘露糖醛, trifacial neuralgia, myodynia		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 106344595 A (上海绿谷制药有限公司) 2017年 1月 25日 (2017 - 01 - 25) 参见说明书摘要, 权利要求1-7	1-15
A	CN 1362860 A (韩国生物高分子株式会社) 2002年 8月 7日 (2002 - 08 - 07) 参见全文	1-15
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2019年 9月 16日		国际检索报告邮寄日期 2019年 10月 9日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 修文 电话号码 (86-10)62411076

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/093799

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 15  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 该权利要求涉及治疗疼痛的方法，这属于不要求检索的主题(PCT细则39.1(iv))，但还是针对所述组合物在制备治疗疼痛的药物中的应用进行了检索。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/093799

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	106344595	A	2017年 1月 25日	无	
CN	1362860	A	2002年 8月 7日	US	2002137723 A1 2002年 9月 26日
				EP	1175157 A1 2002年 1月 30日
				US	6747015 B2 2004年 6月 8日
				KR	100501584 B1 2005年 7月 18日
				EP	1175157 A4 2003年 5月 14日
				KR	20010077950 A 2001年 8月 20日
				JP	2003521573 A 2003年 7月 15日
				AU	3238001 A 2001年 8月 14日
				WO	0156404 A1 2001年 8月 9日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

## フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(71)出願人 509011765

シャanghai インスティテュート オブ マテリア メディカ、チャイニーズ アカデミー オブ  
サイエンス

SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE  
ACADEMY OF SCIENCES

中国 201203 シャanghai プドン チャンジャンハイ - テックパーク ズーチョンツォー  
ロード 555

555 Zu Chong Zhi Road Zhang Jiang Hi-Tech Pa  
rk Pudong Shanghai 201203 (CN)

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74)代理人 100120617

弁理士 浅野 真理

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 ゲン、メイユ

中華人民共和国シャanghai、プードン、ニュー、エリア、チャン、ジャン、ハイ - テク、パーク、  
ニウドゥン、ロード、421

(72)発明者 シン、シャanghai

中華人民共和国シャanghai、プードン、ニュー、エリア、チャン、ジャン、ハイ - テク、パーク、  
ニウドゥン、ロード、421

(72)発明者 チャン、チェンチン

中華人民共和国シャanghai、プードン、ニュー、エリア、チャン、ジャン、ハイ - テク、パーク、  
ニウドゥン、ロード、421

(72)発明者 ディン、ジャン

中華人民共和国シャanghai、プードン、ニュー、エリア、チャン、ジャン、ハイ - テク、パーク、  
ニウドゥン、ロード、421

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA04 EA25 GA13 MA01 MA04 NA14 ZA08