(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年2月11日(11.02.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/024906 A1

(51) 国際特許分類:

A61P 1/04 (2006.01)	*C08F 290/06* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)	*C08G 65/334* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)	*C08F 293/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)	*A61K 47/60* (2017.01)
C08F 8/14 (2006.01)	*A61K 31/19* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/029239

(22) 国際出願日： 2020年7月30日(30.07.2020)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2019-143619 2019年8月5日(05.08.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人筑波大学(**UNIVERSITY OF TSUKUBA**) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ Ibaraki (JP).

(72) 発明者: 長崎 幸夫 (**NAGASAKI, Yukio**); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). シャスニ バビータ(**SHASHNI, Babita**); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). ホン ビン ロン(**VONG, Binh Long**); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 岡田 隆策(**OKADA, Ryusaku**); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 田鹿 裕也(**TAJIKA, Yuya**); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). リー ヤロスラブ(**LEE, Yaroslav**); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人小田島特許事務所(**PATENT PROFESSION CORPORATION ODAJIMA PATENT OFFICE**); 〒1000014 東京都千代田区永田町二丁目４番３号 永田町ビル Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** HYDROPHILIC-HYDROPHOBIC COPOLYMER CARRYING SHORT-CHAIN FATTY ACID ESTER

(54) 発明の名称： 短鎖脂肪酸エステルを担持する親水－疎水性共重合体

(57) **Abstract:** [Problem] To provide a short-chain fatty acid derivative capable of performing a physiological function inherent to a short chain fatty acid. [Solution] Provided is a block or graft copolymer containing: a hydrophobic segment having a repeating unit including a short-chain fatty acid that can be hydrolyzed by an esterase in vivo; and a hydrophilic segment including a poly(ethylene glycol) chain. This copolymer is effective in treating or therapeutically treating various diseases or disorders including cancer.

(57) 要約：【課題】短鎖脂肪酸固有の生理機能を発揮し得る短鎖脂肪酸の誘導体の提供。 【解決手段】 生体内のエステラーゼにより加水分解可能な短鎖脂肪酸エステルを含む反復単位の疎水性セグメントと、ポリ（エチレングリコール）鎖を含む親水性セグメントとを含有するブロック又はグラフト共重合体が提供される。これらの共重合体は、がんをはじめとする各種疾患又は障害の処置又は治療に有効である。

WO 2021/024906 A1

明　細　書

発明の名称 ：

短鎖脂肪酸エステルを担持する親水－疎水性共重合体

技術分野

[0001] 本発明は、短鎖脂肪酸エステルを担持する疎水性部とポリ（エチレングリコール）鎖を親水性部として含有するブロック共重合体又はグラフト共重合体及びそのナノメディシン材料としての使用に関する。

背景技術

[0002] 酢酸、プロピオン酸、酪酸（又はブタン酸）をはじめとする短鎖脂肪酸は、その鎖長に応じて免疫抑制能、肝線維化抑制、肥満抑制能、抗がん能など、様々な生理機能を有することが報告されている（例えば、非特許文献１、参照。）。前述の生理機能を有する短鎖脂肪酸は、腸内細菌叢により糖類から生産されるものの、必ずしも十分ではなく、十分な供給が期待されている。

[0003] しかし、短鎖脂肪酸は、その溶解性や臭いにより投与方法が限定されることのみならず、低分子であることに起因して代謝が早く、また、会合によってその生理機能が変化するなど扱いが困難である。そのため、一部サプリメント等として提供されているが、短鎖脂肪酸が本質的に有する生理機能を発揮することのできる効果的な投与方法又は製剤は存在しないといっても過言でない。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：坂田隆、市川宏文、短鎖脂肪酸の生理活性、日本油化学雑誌、第４６巻、１２０５－１２１２（１９９７）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、短鎖脂肪酸を生体内へ効果的に投与し、デリバリーでき

る手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、従来から被デリバリー薬物を、会合性を有し、かつ、水性媒体中で自己組織化し得る高分子化合物に薬物を担持させ、薬物のデリバリー特性を改変する高分子化薬物系を設計し、提案してきた（例えば、ＷＯ２００９／１３３６４７、ＷＯ ２０１６／０５２４６３）。本発明者らは、前述の目的を達成する上でも何らかの高分子化薬物系が成功裏に利用できれば、上記課題の解決に資するものと仮定して検討を重ねてきた。

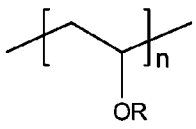
[0007] その結果、短鎖脂肪酸エステルを担持する疎水性部とポリ（エチレングリコール）鎖を一つ若しくは複数含有若しくは担持するブロック共重合体又はグラフト共重合体若しくはそれらの水中での会合を介して自己組織化することにより形成されるナノ粒子若しくはナノサイズの高分子ミセルは、前記の短鎖脂肪酸をデリバリーする際の短所又は欠陥を治癒又は矯正できることが確認された。

[0008] したがって本発明により提供される、主たる態様のものとしては次のものを挙げることができる。

態様１：親水－疎水性共重合体であって、

（１）式Ｉ：

[0009]



（Ｉ）

[0010] 式中、Ｒは、－（Ｃ＝Ｏ）Ｒ[1]又は水素原子であり、Ｒ[1]は、非置換又は置換された炭素原子数１～７個の直鎖又は分岐のアルキル（置換された場合の置換基は非置換若しくは置換されたフェニルであり、置換されたフェニルの置換基は、１以上のハロゲン、ヒドロキシ、メチルオキシである）であり、ここで、水素原子は存在するとしてもｎの３０％以下、好ましくは２０％以下、より好ましくは１０％以下、最も好ましくは０％であり、ｎは５～１００

０、好ましくは１０～１０００、より好ましくは１５～１０００，３０～１０００の整数である、

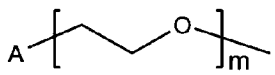
で表される、

反復単位に由来する疎水性セグメント、と

（２）ポリ（エチレングリコール）鎖を含む親水性セグメントであって、

（ｉ）式ＩＩａ：

[0011]



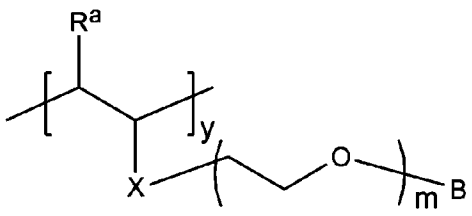
（ＩＩａ）

[0012] 式中、Ａは、非置換又は置換C_1－C_{12}アルキルオキシであり、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式Ｒ’Ｒ”ＣＨ－基、フェニルアミノ基又はフェネチルアミノ基、フェニル基、メトキシフェニル基であり、ここで、Ｒ’及びＲ”は独立してC_1－C_4アルキルオキシ又はＲ’とＲ”は一緒になって－ＯCH_2CH_2O－、－Ｏ（CH_2）$_3$Ｏ－もしくは－Ｏ（CH_2）$_4$Ｏ－であり、ｍは２～５００、好ましくは１０～３００、より好ましくは２０～２００の整数である、

で表される、親水性セグメント、又は

（ｉｉ）式ＩＩｂ：

[0013]



（ＩＩｂ）

[0014] 式中、R^aは水素原子又はカルボキシ基であり、

ＸはR^aがカルボキシ基であるとき、Ｃ（＝Ｏ）Ｏ若しくはＣ（＝Ｏ）ＮＨであり、又はR^aが水素原子であるとき、Ｏ若しくはＮＨであり、

Ｂは、Ａ－CH_2CH_2であって、Ａ及びｍはそれぞれ、上記定義のとおりで

あり、

ｙは１～３００、好ましくは２～１５０、より好ましくは５～１００、の整数である、

で表される反復単位に由来する親水性セグメントを含み、

前記（１）の疎水性セグメントと、（２）（ｉ）の親水性セグメントは、それぞれブロックとして存在し、

前記（１）の疎水性セグメントと、（２）（ｉｉ）の親水性セグメントを含むそれぞれの反復単位の各構成員は、相互にランダムに存在する、

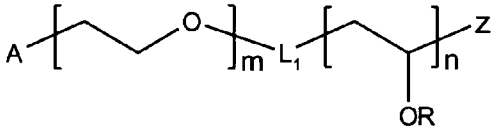
親水－疎水性共重合体。

態様２：水中で会合して自己組織化することによりナノ粒子又はナノサイズの高分子ミセルを形成する、態様１の親水－疎水性共重合体。

態様３：　態様１又は２の親水－疎水性共重合体であって、

前記（１）の式（Ｉ）で表される反復単位に由来する疎水性セグメントと前記（２）（ｉ）の式ＩＩａの親水性セグメントを含む共重合体は、式ＢＣ：

[0015]



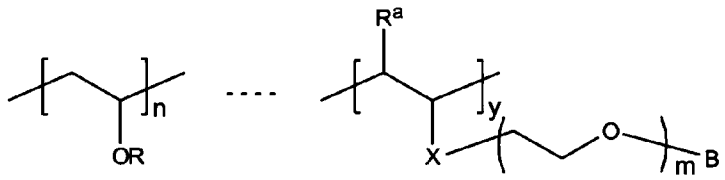
（ＢＣ）

[0016] 式中、Ａ、Ｒ、ｍ、ｎはそれぞれ、上記定義のとおりであり、$Ｌ_{1}$は直接結合又は二価の連結基を表し、Ｚは、水素原子、ＳＨ、Ｓ（Ｃ＝Ｓ）－Ｐｈ、Ｓ（＝Ｓ）ＯＣ$Ｈ_{2}$Ｃ$Ｈ_{3}$、ヒドロキシル基、$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$アルキルオキシ基又はアリール－$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{2}$アルキルオキシ基である、

で表されるブロック共重合体であり、

前記（１）の式（Ｉ）で表される反復単位に由来する疎水性セグメントと前記（２）（ｉｉ）の式ＩＩｂの親水性セグメントを含む共重合体は、式ＧＣ：

[0017]



（ＧＣ）

[0018] 式中、Ｒ、Ｒ^{a}、Ｂ、Ｘ、ｍ、ｎ、ｙはそれぞれ、上記定義のとおりである、で表されるグラフト共重合体である、

親水－疎水性共重合体。

態様４；態様１～３のいずれかの親水－疎水性共重合体から水性媒体中で形成された、ナノ粒子。

態様５：態様１～３のいずれかの親水－疎性共重合体又は態様４のナノ粒子を有効成分として含んでなる、製薬学的製剤。

態様６：がんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療（若しくは肝線維化の抑制）、糖尿病の予防若しくは治療、放射線療法における放射線の増強、又は、高アンモニア血症の予防若しくは治療に使用するための態様５の製薬学的製剤。

態様７：がんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療、糖尿病の予防若しくは治療、放射線療法における放射線の増強、又は、高アンモニア血症の予防若しくは治療に使用するための態様１～３のいずれかの親水－疎水性共重合体。

態様８：がんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療（若しくは肝線維化の抑制）、糖尿病の予防若しくは治療、放射線療法における放射線の増強、又は、高アンモニア血症の予防若しくは治療に使用するための態様４のナノ粒子。

態様９：態様１～３のいずれかの親水－疎水性共重合体を、それらを必要とする患者に投与してがんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療（若しくは肝線維化の抑制）、糖尿病の予防若しくは治療、放射線療法における放射線の増強、又は、高アンモニア血症の予防若しくは治療するための方法。

態様１０：態様４のいずれかの親水－疎水性共重合体を、それらを必要とする患者に投与してがんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療、糖尿病の予防若しくは治療（若しくは肝線維化の抑制）、放射線療法における放射線の増強、肝線維化の抑制、又は、高アンモニア血症の予防若しくは治療するための方法。

発明の効果

[0019] 本発明の親水－疎水性共重合体又はそのナノ粒子若しくは高分子ミセルは、ヒトをはじめとする哺乳動物に投与したとき、生体局所にデリバリーされ、その局所において疎水性セグメント中の短鎖脂肪酸エステル結合を酵素的に加水分解して対応する短鎖脂肪酸を徐放することができ、短鎖脂肪酸それ自体の投与に随伴する問題点を解消乃至緩和できる。そのため、短鎖脂肪酸が本質的に有する様々な生理機能を哺乳動物の生体局所又は全身で効率よく発揮することができる共重合体、並びにそのナノ粒子及び製薬学的製剤が提供できる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]製造例３で得られたＮ６８４の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトル。

[図2]製造例４で得られたＮ７３１の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトル。

[図3]製造例５で得られたＮ７２１の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトル。

[図4]製造例６で得られたＮ７４１の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトル。

[図5]製造例７で得られたＮ６８４、Ｎ７３１、Ｎ７２１の各動的光散乱スペクトル。

[図6]製造例８で得られたＮ７４１の動的光散乱スペクトル。

[図7]試験例１のビニルエステルナノ粒子（Ｎ６８４、Ｎ７３１、Ｎ７２１）の細胞毒性のグラフ表示。

[図8]試験例２のビニルエステルナノ粒子（Ｎ７４１）の細胞毒性のグラフ表示。

[図9]試験例３の各試験群マウスの体重変化のグラフ表示。データは左から、５倍希釈、１０倍希釈、２０倍希釈、４０倍希釈サンプルのものに相当する

。

[図10]試験例３の肺がん転移数の確認（肉眼観察）結果のグラフ表示。データは、水（対照）、５倍希釈、１０倍希釈、２０倍希釈、４０倍希釈、８０倍希釈、１６０倍希釈のサンプルのものに相当する。

[図11]試験例３の肺がん転移数の確認を肉眼で観察できない微小転移巣の数を顕微鏡下で計測した結果のグラフ表示。

[図12]試験例３の肺組織図のＨ＆Ｅ染色図に代わる写真（左）及び図より求めた転移がんの数のグラフ表示（右）。

[図13]試験例３の肺組織図のＨ＆Ｅ染色図に代わる写真（左）及び図より求めた転移がんの面積のグラフ表示（右）。

[図14]試験例３の血液中のＡＬＴ、ＡＳＴ、ＬＤＨ及びＡＬＢレベルのグラフ表示。

[図15]試験例３の十二指腸のＨ＆Ｅ染色図に代わる写真（左）及び各試験群の絨毛の長さのグラフ表示（右）。

[図16]試験例３の空腸のＨ＆Ｅ染色図に代わる写真（左）及び各試験群の絨毛の長さのグラフ表示（右）。

[図17]試験例３の回腸のＨ＆Ｅ染色図に代わる写真（左）及び各試験群の絨毛の長さのグラフ表示（右）。

[図18]試験例３の大腸組織のＨ＆Ｅ染色図に代わる写真（左）及び各試験群の絨毛の長さのグラフ表示（右）。

[図19]試験例４の体重変化のグラフ表示。

[図20]試験例５の疾患活動性評価指標（ＤＡＩ）のグラフ表示。

[図21]試験例５の各処置群（対照を含む）での各実験動物の白血球数のグラフ表示。

[図22]試験例６の各処置群（対照を含む）での各実験動物の肝臓及び脾臓重量のグラフ表示。

[図23]試験例７の試験中のサンプル消費量及び実験動物の体重の変化のグラフ表示

[図24]試験例８の試験（１）のサンプル消費量及び実験動物の体重の変化のグラフ表示

[図25]試験例８の試験（２）のグルコース耐性試験の結果のグラフ表示

[図26]試験例８の試験（３）の試験終了時点での器官の重量のグラフ表示

[図27]試験例８の試験（４）のＨ及びＥ染色腸管の組織学的解析結果を示す図に代わる写真

[図28]試験例８の試験（５）のＨ及びＥ染色膵臓組織の組織学的解析結果を示す図に代わる写真

[図29]試験例９の試験（１）の放射線照射の体重変化体積変化への影響を示すグラフ表示

[図30]試験例９の試験（２）の放射線照射のがんの体積変化への影響を示すグラフ表示

[図31]試験例１０の試験（１）のがん増殖プロファイルのデータのグラフ表示

[図32]試験例１０の試験（２）の試験終了時点でのがんの重量のグラフ表示

[図33]試験例１０の試験（３）の被検動物の体重変化を示すグラフ表示

[図34]試験例１１の放射線増強効果に関するスフェロイドがん細胞の成長抑制効果を示す図に代わる写真

[図35]試験例１２の試験（１）の肝臓及び脾臓の重量のグラフ表示

[図36]試験例１２の試験（２）のＨＥ染色された肝臓の組織学的解析結果のグラフ表示

[図37]試験例１２の試験（３）のＭＴ染色された肝臓の組織学的解析結果のグラフ表示

[図38]製造例９で得られたＮ８２１の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトル

[図39]製造例１０で得られたナノ粒子（Ｐｈ－ＢＮＰ，　Ｎ８３２）のサイズ分布の表示

[図40]試験例１３の試験（１）の血液の生化学検定結果のグラフ表示

[図41]試験例１３の試験（２）の血液のＨＥ染色された肝臓の組織学的解図

に代わる写真

[図42]試験例１４の薬物動態試験（１）の結果のグラフ表示

[図43]試験例１４の薬物動態試験（２）の結果のグラフ表示

発明の詳細な説明

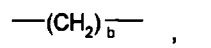
[0021] 本発明に関して記述された用語等は、特に言及しない限り、当該技術分野で常用されている意味又は内容を有するものとして使用されている。一般的に、本発明について以下の追加の説明をすることができる。

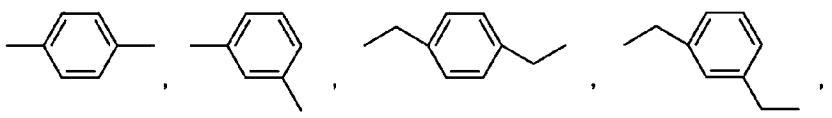
[0022] 短鎖脂肪酸は、前述のとおり、哺乳動物の、腸内細菌叢により糖類から生産されるものであることができ、典型的には、酢酸、プロピオン酸、酪酸（若しくはブタン酸）を包含するが、場合によって一定の分岐鎖アミノ酸を含むタンパク質が分解されることにより生産されることのあるイソ酪酸やイソ吉草酸のような分岐鎖脂肪酸、さらには、これらの脂肪酸に類似する機能を発揮する場合のある、炭素原子数７までの直鎖又は分岐鎖脂肪酸が包含される。したがって、本明細書で開示される共重合体において、疎水性ドメインを提供するための、式Ｉで表される疎水性セグメント中のＲが－（Ｃ＝Ｏ）$Ｒ^{1}$である場合の、$Ｒ^{1}$としては、限定されるものでないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ヘプチル、ペンチル、３－メチルブチル等を挙げることができる。これらの基は置換されていてもよく、置換されている場合の置換基は、好ましくは非結合末端の炭素原子に結合することのできる、非置換若しくは置換されたフェニルであり、置換されたフェニルの置換基は、１以上のハロゲン、ヒドロキシ、メチルオキシであることができる。また、$Ｃ_{ｘ}$－$Ｃ_{ｘｘ}$アルキルオキシ等と記載するアルキル部分は、炭素原子数ｘ個～ｘｘ個の直鎖又は分岐のアルキルを意味する。Ｒは、水素原子であることができ、このとき、ｎの反復単位の総数の３０％以下、好ましくは２０％以下、より好ましくは１０％以下、最も好ましくは０％（存在しない）である。このような好ましさの度合いは、共重合体が、水中で会合し、自己組織化するとき、より確実に疎水性ドメイン又は領域を形成するための度合いである。

[0023] 本明細書で開示される共重合体において、親水性セグメントを提供するための、式ＩＩａで表されるセグメントは、親水性ブロックを提供し、一方で、式Ｉで表される疎水性セグメントを疎水性ブロックとする、親水－疎水性ブロック共重合体の構成員となることができ、あるいはまた、

親水性セグメントを提供する式ＩＩｂで表される各反復単位は、式Ｉで表される各疎水性セグメントと相互にランダムに存在できる親水－疎水性ランダム共重合体の構成員となることができる。相互にランダムと称するのは、適する場合には、例えば、式Ｉのｎと式ＩＩｂのｙが近似する数値であるときは、交互に存在してもよく、また、例えば、式Ｉのｎ対式ＩＩｂのｙが、３０以上：１であるときは、実質的に、疎水性セグメントは複数のセグメントがブロックを形成するような形態にあってもよい。

[0024] これらの、ブロック共重合体及びランダム共重合体は、水中で、複数の共重合体が、会合し、自己組織化することにより、コアに疎水性セグメントが含まれ、シェルに親水性セグメントが含まれる、所謂、コア－シェル型ナノ粒子又は高分子ミセルを形成することができるものであれば、他の構成員を含むことができる。こうして、限定されるものでないが、本明細書で開示される共重合体の典型的なものとしては、上記の、式ＢＣ又は式ＧＣで表される共重合体を挙げることができる。例えば、式ＢＣにおける、$Ｌ_1$が、二価の連結基を表す場合の、二価の連結基は、一般的には、最大３４個、好ましくは１８個、より好ましくは最大１０個の炭素、並びに任意に酸素及び窒素原子を含有する基を意味する。このような連結基として、具体的には次の基を挙げることができる：

[0025] 



[0026] で表される基から選ばれるか、又は－（$ＣＨ_2$）$_c$Ｓ－、－ＣＯ（$ＣＨ_2$）$_c$

Ｓ－、－（ＣＨ$_2$）$_c$ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_c$ＣＯ－、－ＣＯ－、－ＯＣＯＯ－、－ＣＯＮＨ－からなる群より選ばれ、ここで、それぞれ独立してｂは２～６の整数であり、ｃは１～５の整数である、ことができる。

[0027] 本発明に関してナノ粒子又はナノサイズの高分子ミセルにいう、ナノ又はナノサイズとは、水中でナノ粒子又は高分子ミセルの動的光散乱測定（ＤＬＳ）を行ったとき、平均径がナノメートル台にあり、一般的に、平均径が、約１０ｎｍ～約２０００ｎｍ、好ましくは約１０ｎｍ～約５００ｎｍ、より好ましくは約２５ｎｍ～約２００ｎｍのサイズにあることを意味する。

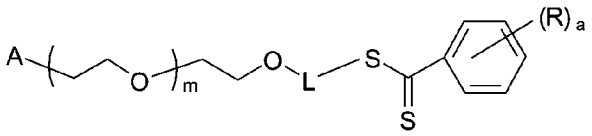
[0028] 上記の親水－疎水性共重合体は、定義された化学構造を参照に、それ自体公知の製造方法に準じて製造することができる。都合よくは、次のいずれかの方法に従うことができる。

[0029] 上記（１）と上記（２）（ｉ）とにより定義される、典型的な式ＢＣで表わされる共重合体は、上記のＷＯ　２００９／１３３６４７、ＷＯ　２０１６／０５２４６３を参照して、次の様に製造するのが便宜である。

[0030] まず、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）セグメントを、

式Ａ－１：

[0031]

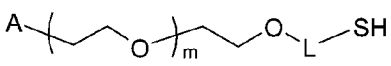


（A-1）

[0032] 又は

式Ａ－２：

[0033]



（A-2）

[0034] （上式中の、Ａ、Ｌ、ｍは上記に定義したとおりである。）

で表されるＰＥＧ誘導体を用意し、次いで、式Ｉの反復単位に対応するビニ

ルアルコールの短鎖脂肪酸エステルを用意し、可逆的な交換連鎖移動を介するリビング的なラジカル重合反応により、前者の単位に後者を付加する方法を利用することができる。このとき、Ａ－１における、Ｌ－Ｓ（Ｃ＝Ｓ）Ｐｈは、後述する、Ｌ－Ｓ（Ｃ＝Ｓ）ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_3$であると、より効率よく目的の共重合体を得ることができる。なお、Ａが置換基としてフェニルアミノ基、フェネチルアミノ基を有する場合には、置換基としてホルミル基を有する式ＩＩａに対応する化合物のホルミル基と対応するアミンとの還元アミノ化反応により当該置換基を導入することができる。

[0035] 典型的な式ＧＣで表されるグラフト共重合体は、式Ｉの反復単位に対応するビニルアルコールの短鎖脂肪酸エステル及びカルボキシ基若しくはその保護された基又はハロゲン原子（ＣＩ、Ｂｒ等）を担持する重合性不飽和モノマー、例えば、無水マレイン酸又は塩化ビニルを用意し、これらをラジカル開始剤の存在下でラジカル重合し、得られるランダム共重合体の酸無水物単位又は塩化ビニル単位中に、例えば、片末端のヒドロキシル基をリチオ化等の金属アルコラート化するか、又は当該片末端のヒドロキシル基をアミノ基（ＮＨ$_2$）に転化したポリ（エチレングリコール）誘導体を用いて、エステル若しくはアミド結合又はエーテル（－Ｏ－）もしくは－ＮＨ－を介してポリ（エチレングリコール）鎖をグラフトすることにより、製造することができる。ところで、上記の重合反応の際に、メチル（フェニル）カルバモジチオ酸シアノメチル又はシアノメチルメチル（フェニル）カルバモジチオレートのような連鎖移動剤を併用すると、合成される重合体の分子量を下げることができ、続くグラフト化反応の操作を簡潔にすることができる。無論、このような連鎖移動剤を用いることなく、目的の共重合体を製造することもできる。

[0036] 上記のナノ粒子又は高分子ミセルは、本発明にしたがう共重合体が両親媒性であり、水可溶性有機溶媒、例えば、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）やジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）含有水溶液を調製した後、一定の分子量カット－オフの透析膜を介して水に対して透析することにより、共

重合体それ自体が会合してミセルを形成することにより作製される。こうして形成されたミセル又はナノ粒子は、例えば、凍結乾燥、遠心分離、等をすることにより、分離した固形物として取得できる。

[0037] こうして提供される、ナノ粒子及びナノサイズの高分子ミセルは、水性媒体（必要により、生理食塩やｐＨ調整剤を含むことのできる水溶液）中で、可溶化または均一に分散した溶液または液剤として提供できるので非経口製剤をはじめ、各種形態にある経口製剤とすることができる。例えば、経口製剤として提供する場合、本発明のナノ粒子は、それ自体の当該技術分野で常用されている賦形剤、希釈剤を利用して錠剤、丸薬、顆粒剤として提供することもできる。賦形剤又は希釈剤は、限定されるものでないが、当該技術分野で常用されている、クロロカルメロースナトリウム、結晶セルロース、ヒプロメロース、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、マクロゴール４０００、酸化チタン、等であることができる。

[0038] このようなナノ粒子を有効成分として含む製薬学的製剤は、前述した、短鎖脂肪酸それ自体が本質的に有する生理機能を、当該ナノ粒子がデリバリーされるヒトをはじめとする哺乳動物の生体局所で発揮することができる。このような製薬学的製剤は、処置を目的とする疾患や投与方法により、最適用量が変動するので用量を一義的に特定することはできないが、用量は、小規模の臨床試験等を通して得られるデータ等に基づいて専門医が決定することができる。

発明を実施するための形態

[0039] 以下、説明が煩雑になることを避けるため、本発明の典型的な例について具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものでない。

[0040] 製造例１： $CH_3O-(CH_2CH_2O)_m-CH_2PhCH_2Br$（Ｎ６８６）の合成

市販の$CH_3O-(CH_2CH_2O)_m-H$（ＭＷ＝５，０００，１００ｇ，２０ｍｍｏｌ）にテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）（２００ｍＬ）及びブチルリチウム１４．４ｍＬ（２３ｍｍｏｌ，１．６Ｍ－ヘキサン）を加えたのち

、α，α‘－ジブロモキシレン（２５ｇ，９５ｍｍｏｌ）を加え５０°Ｃ、２日間反応させた。２－プロパノール（ＩＰＡ）に沈殿させた後沈殿物を減圧乾燥した。得られた淡黄色ポリマーをメタノールに溶解し、遠心分離してα，α‘－ジブロモキシレンを沈殿として除いた。メタノール溶液をＩＰＡに投入し、得られた白色沈殿を減圧乾燥させ、目的物（Ｎ６８６）を得た。（収量１０４ｇ）

[0041] 製造例２：　$CH_3O-(CH_2CH_2O)_m-CH_2PhCH_2S(=S)OCH_2CH_3$（Ｎ７１７）の合成

製造例１で合成したＮ６８６（２０ｇ）を１００ｍＬのエタノールに溶解させ、エチルキサントゲン酸カリウム（$CH_3CH_2OC(=S)SK$，７ｇ）を加え、室温で１０分間反応させた。沈殿を遠心分別した後エタノールを減圧留去した。残渣をクロロホルムに溶解し、水で洗浄、クロロホルム層を分別し、無水硫酸ナトリウム脱水ろ過後ＩＰＡに沈殿させ、遠心分離後減圧乾燥して目的物（Ｎ７１７）を得た（収量１５ｇ）。

[0042] 製造例３：　$CH_3O-(CH_2CH_2O)_m-CH_2PhCH_2[CH_2CH(OC(=O)CH_3)]_nS(=S)OCH_2CH_3$（Ｎ６８４）の合成

製造例２で合成したＮ７１７（１ｇ）、アゾビスイソブチロニトリル（１５ｍｇ）、酢酸ビニル（６．６ｇ）をフラスコに加え、５分間窒素バブルしたのち６０°Ｃ、１日反応させた。得られた目的物をＴＨＦに溶解させ、ＩＰＡに沈殿、減圧乾燥し目的物（Ｎ６８４）を得た（２．６ｇ）。Ｎ６８４の^1H　ＮＭＲスペクトルを図１に示す。

[0043] 製造例４：$CH_3O-(CH_2CH_2O)_m-CH_2PhCH_2[CH_2CH(OC(=O)CH_2CH_3)]_nS(=S)OCH_2CH_3$（Ｎ７３１）の合成

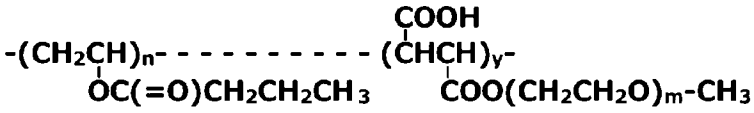
製造例２で合成したＮ７１７（５ｇ）、アゾビスイソブチロニトリル（７５ｍｇ）、プロピオン酸ビニル（７ｇ）をフラスコに加え、５分間窒素バブルしたのち６０°Ｃ、２日反応させた。得られた目的物をＴＨＦに溶解させ、ＩＰＡに沈殿、減圧乾燥し目的物を得た（９．３ｇ）。Ｎ７３１の^1H　ＮＭＲスペクトルを図２に示す。

[0044] 製造例５：　$CH_3O-(CH_2CH_2O)_m-CH_2PhCH_2[CH_2CH(OC(=O)CH_2CH_2CH_3)]_nS(=S)OCH_2CH_3$（Ｎ７２１）の合成

実施例２で合成したＮ７１７（５ｇ）、アゾビスイソブチロニトリル（７５ｍｇ）、酪酸ビニル（１０ｇ）をフラスコに加え、５分間窒素バブルしたのち６０°Ｃ、２日反応させた。得られた目的物をＴＨＦに溶解させ、ＩＰＡに沈殿、減圧乾燥し目的物（Ｎ７２１）を得た（１２．３ｇ）。Ｎ７２１の^1H　ＮＭＲスペクトルを図３に示す。

[0045] 製造例６：　グラフト共重合体（Ｎ７４１）の合成

[0046]



（Ｎ７４１）

[0047] アゾビスイソブチロニトリル（７５ｍｇ）、酪酸ビニル（５．７ｇ）、無水マレイン酸（１００ｍｇ）、シアノメチルメチル（フェニル）カルバモジチオレート（$PhN(CH_3)C(=S)SCH_2CN$、２００ｍｇ）をフラスコに加え、５分間窒素バブルしたのち６０°Ｃ、２日反応させた。得られた目的物をＴＨＦに溶解し、少量サンプリング後、下記のとおり、別に調製した$CH_3O-(CH_2CH_2O)_mOLi$＊のＴＨＦ溶液を加えて３０分攪拌する。反応溶液をＩＰＡに注ぎ、沈殿を乾燥することで目的物（Ｎ７４１）を得た（６ｇ）。Ｎ７４１の１Ｈ　ＮＭＲスペクトルを図４に示す。

＊ＴＨＦ（２０ｍＬ）に$CH_3O-(CH_2CH_2O)_mOH$（ＭＷ＝５，０００，５ｇ）及びブチルリチウム（０．６ｍＬ）を加え$CH_3O-(CH_2CH_2O)_mOLi$のＴＨＦ溶液を作製した。

[0048] 製造例７：　自己組織化粒子の調製１

上記で合成したポリマー（Ｎ６８４，Ｎ７３１，Ｎ７２１）をそれぞれ５０ｍｇ採取し、１ｍＬのＤＭＦに溶解させ水を１ｍＬ加えて透析膜（ＭＷＣＯ＝３．５ＫＤａ）に入れて２Ｌの水に対して透析した。半日ごとに３度透析水を交換した後、動的光散乱測定を行い、平均３０－１００ｎｍの粒子が

形成していることを確認した（図５参照）。

[0049] 製造例８：　自己組織化粒子の調製２

製造例６で合成したグラフトポリマー（Ｎ７４１）を用いたこと以外、製造例７の操作を繰り返し、１５３ｎｍの平均粒径を有する粒子が形成していることを確認した（図６参照）。

[0050] 試験例１：　細胞毒性１

各１ｘ１０^{4}のＨｅｐＧ２細胞を播種した９６穴プレートに、製造例７で作製した自己組織化粒子の各サンプルを添加し、２４時間インキュベートした後、ＷＳＴ溶液を添加し、２時間後に４５０ｎｍのＵＶ吸収を測定しコントロールと比較したところ、いずれも測定の濃度下ではほとんど毒性が出ないことを確認した（図７：Ｎ６８４，Ｎ７３１，Ｎ７２１の各ナノ粒子の細胞毒性を示す。）。

[0051] 試験例２：　細胞毒性２

製造例８で作製した自己組織化粒子を使用したこと以外、試験例１の操作を繰り返し、Ｎ７４１の細胞毒性を評価した。試験結果を図８に示す。図８から、Ｎ７４１のナノ粒子は本試験系で細胞毒性を示さないことが判る。

[0052] 試験例３：　がん転移抑制効果

１群５－７匹の５週齢ＢＡＬＢ／ｃマウス（オス）に、下記のＧＰ１乃至ＧＰ６の投与群に記載の各サンプルを自由摂取させた。２日後、１ｘ１０^{4}のＢ１６Ｆ１０／Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞（理研細胞バンクから入手）を尾静注し、サンプル水の摂水を継続した。１１日目に解剖し、肺に正着しているがんの個数を肉眼観察により確認した結果を図１０に示し、また、試験中の実験動物の体重変化を図９に示す。

[0053] 図１０から、短鎖脂肪酸では、ほぼ全くがん転移数抑制効果が見られないのに対し、プロピオン酸ナノ粒子のＧＰ５群が極めて高いがん転移抑制を示した。図１１には肉眼で観察できない微小転移巣の数を顕微鏡下で計測した結果を示す。図１０と同様、プロピオン酸ナノ粒子（図中ではＰＥＧ－ｂ－ＰＶＰｒｏと略記）が極めてがん転移を抑えていることが確認された。

[0054] 図１２には肺組織図のＨ＆Ｅ染色図（左）及び図より求めた転移がんの数（右）を示す。コントロールに比べて、プロピオン酸ナノ粒子及び酪酸ナノ粒子で有意にがんの数の低下が認められた。図１３には肺組織図のＨ＆Ｅ染色図（左）及び図より求めた転移がんの面積（右）を示す。コントロール及び低分子脂肪酸に比べて、プロピオン酸ナノ粒子及び酪酸ナノ粒子で有意にがんの面積の低下が認められた。図１４には血液中のＡＬＴ、ＡＳＴ、ＬＤＨ及びＡＬＢレベルを示す。いずれの場合にも肝臓や臓器に対して障害は殆ど見られないことを確認した。

[0055] 図１５～１８には小腸及び大腸組織のＨ＆Ｅ染色図を示す。場所により低分子脂肪酸群で、絨毛の短縮化が見られ、ダメージがあることが確認された。

サンプル投与群

ＧＰ１　：健康群（ｎ＝５）

ＧＰ２　：メラノーマ投与群（ｎ＝７）

ＧＰ３　：メラノーマ投与群／３０ｍＭプロピオン酸自由摂取群（ｎ＝７）

ＧＰ４　：メラノーマ投与群／３０ｍＭ酪酸自由摂取群（ｎ＝７）

ＧＰ５　：メラノーマ投与群／３０ｍＭ　Ｎ７３１自由摂取群（ｎ＝７）

ＧＰ６　：メラノーマ投与群／３０ｍＭ　Ｎ７２１自由摂取群（ｎ＝７）

[0056] 試験例４：　ダイエット効果

１群５匹の４週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（オス）にＥＰＳ益新株式会社より購入した固形飼料Ｄ１２４９２（６０％　Ｆａｔ、超高脂肪飼料）を与え、下記のＧＰ１乃至ＧＰ３の各投与群に記載の各サンプルを与え、体重測定を行った。結果を図１９に示す。

[0057] 図１９から、水道水群及びプロピオン酸粒子（Ｎ７３１）に対し、酪酸粒子群（Ｎ７２１）が有意に体重増加を抑制することが確認された。

サンプル投与群

ＧＰ１：水道水自由摂取

ＧＰ２：Ｎ７３１自由摂取（５ｍｇ／ｍＬ）

ＧＰ３：Ｎ７２１自由摂取（５ｍｇ／ｍＬ）

[0058] 試験例５：潰瘍性大腸炎に対する効果

１群７匹の７週齢ＩＣＲマウス（オス）に４％デキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）を自由摂取させ、下記サンプルをゾンデで一日一度経口投与した。１０日後疾患活動性評価指標（ｄｉｓｅａｓｅ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｉｎｄｅｘ（ＤＡＩ））を測定し、血液を評価した。図２０に示すように、酪酸ナノ粒子（図中ではＢＮＰと表記）が潰瘍性大腸炎モデルに対して有意に低下しており、治療効果を認めた。また、図２１に示すように潰瘍性大腸炎モデルでは白血球数の著しい上昇が見られるのに対し、ＢＮＰでは有意に抑制した。

<u>サンプル投与群</u>

ＧＰ１：水道水自由摂取＋水道水（０．６５ｍＬ）

ＧＰ２：４％ＤＳＳ摂取＋水道水（０．６５ｍＬ）

ＧＰ３：４％ＤＳＳ摂取＋酪酸（２．３２ｍｇ／ｍＬ，０．６５ｍＬ）

ＧＰ４：４％ＤＳＳ摂取＋ＣＮＰ（ＰＥＧ－ｂ－ポリスチレン）（１０ｍｇ／ｍＬ，０．６５ｍＬ）

ＧＰ５：４％ＤＳＳ摂取＋ＢＮＰ（ＰＥＧ－ｂ－Ｐｏｌｙ（ｖｉｎｙｌ　ｂｕｔｙｒａｔｅ）（１０ｍｇ／ｍＬ，０．６５ｍＬ）

[0059] 試験例６：非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ）に対する効果

４９匹の５週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（オス）にＥＰＳ益新株式会社より購入した固形飼料Ａ０６０７１３０２（コリン欠乏高脂肪飼料、メチオニン減量、０．１％メチオニン添加）を自由摂取にて与え、４週間後に無作為に１群７匹に分け、下記のＧＰ１乃至ＧＰ７の各投与群に記載の各サンプルを自由摂取にて投与した。８週間後にデータ解析を行った。図２２に肝臓及び脾臓重量を示す。ＮＡＳＨ群が炎症により肥大化しているのに対し、プロ

ピオン酸粒子投与群で有意に肥大化が抑制されていることを確認した。

サンプル投与群

ＧＰ１：通常固形飼料（オリエンタル酵母ＭＦ）

ＧＰ２：固形飼料Ａ０６０７１３０２

ＧＰ３：固形飼料Ａ０６０７１３０２＋酪酸（６５ｍＭ）

ＧＰ４：固形飼料Ａ０６０７１３０２＋プロピオン酸（５０ｍＭ）

ＧＰ５：固形飼料Ａ０６０７１３０２＋酪酸ナノ粒子（１０ｍｇ／ｍＬ，ポリマー濃度１ｍＭ　酪酸換算６５ｍＭ）

ＧＰ６：固形飼料Ａ０６０７１３０２＋プロピオン酸ナノ粒子（１０ｍｇ／ｍＬ，ポリマー濃度１ｍＭ　プロピオン酸換算５０ｍＭ）

ＧＰ７：固形飼料Ａ０６０７１３０２＋ポリスチレンナノ粒子（１０ｍｇ／ｍＬ）

[0060] 試験例７：　がん転移抑制効果その２

１群５－７匹の７－８週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（オス）をチャールズリバー　ジャパン社、横浜より入手した。これらのマウスを、無病原性条件下、１２時間の暗／明サイクルで、制御された温度（２３±１℃）及び湿度（５０±５％）において標準固形飼料を自由摂餌させながら飼育した。マウスは下記のＧＰ１乃至ＧＰ６の投与群に無作為に分け、記載の各サンプルを自由摂取させた。１日後、２００μＬ（生理食塩水）当たり２．５ｘ１０^{5}のＢ１６Ｆ１０／Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞（理研細胞バンクから入手）を尾静注した。この尾注射の１日前から試験の終点である１１日迄、各サンプルを自由飲水形式として継続してマウスに与えた。１１日目に血漿及び他の臓器を採取し、下記のさらなる各分析に備えて適切に貯蔵した。

[0061] 試験中のサンプルの消費量の変化及びの実験動物の体重変化を図２３に示す。その他の試験については、試験例３で観察され、又は確認された試験結果と実質的に等価の試験結果が得られた。

サンプル投与群

ＧＰ１：健康群（ｎ＝５）

ＧＰ２：メラノーマ投与群（ｎ＝７）

ＧＰ３：メラノーマ投与群／３０ｍＭプロピオン酸自由摂取群（ｎ＝７）

ＧＰ４：メラノーマ投与群／３０ｍＭ酪酸自由摂取群（ｎ＝７）

ＧＰ５：メラノーマ投与群／３０ｍＭ　ＰＮＰ（Ｎ７３１由来の粒子：製造例７参照）自由摂取群（ｎ＝７）

ＧＰ６：メラノーマ投与群／３０ｍＭ　ＢＮＰ（Ｎ７２１由来の粒子：製造例７参照）自由摂取群（ｎ＝７）

[0062] 試験例８：抗糖尿病試験に対する効果

本試験及び本明細書に開示するすべての実験動物を用いる試験における動物の管理及び使用については当該管理等に関する筑波大学のガイドラインに厳密に従って行った。

１群７匹の７－８週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（オス）をチャールズ　リバー　ジャパン社（横浜）より入手した。これらのマウスを、無病原性条件下、１２時間の暗／明サイクルで、制御された温度（２３±１℃）及び湿度（５０±５％）において標準固形飼料を自由摂餌させながら飼育した。マウスは下記のＧＰ１乃至ＧＰ６の投与群に無作為に分け、記載の各サンプルを３６日迄自由に飲めるようにして摂取させた。１日後、グルコース耐性試験を行った。試験では、１日おきに各マウスの体重及びサンプルの消費についてモニターした。その後、試験の終了時点（４０日目）まで、サンプルを飲料水で置き換えた。

サンプル投与群

ＧＰ１：エキセナチド（伝統的な抗糖尿病薬）、１μｇ（１－４日目）、２μｇ（５－３６日目）の各毎日皮下注射群

ＧＰ２：６０ｍＭ　ＢＮＰ（Ｎ７２１由来の粒子：製造例７参照）自由摂取群

ＧＰ３：６０ｍＭ　ＰＮＰ（Ｎ７２１由来の粒子：製造例７参照）自由摂取群

ＧＰ４：３０ｍＭ　酪酸自由摂取群

ＧＰ５：３０ｍＭ　プロピオン酸自由摂取群。

ＧＰ６：対照群（水自由摂取）

[0063] （１）当該試験におけるサンプルの消費量をマウス当たり量（ｍＬ）として、マウスの体重を平均±ＳＤ値として図２４にそれぞれ示す。

[0064] （２）グルコース耐性試験は、投与されたグルコースの代謝を制御する際の短鎖脂肪酸の治療効果を評価するために行った。１夜拘束の１６時間後、グルコース（２ｇ／ｋｇ）をマウスに経口投与した。グルコース投与の１時間前後で、血液１０μＬを尾静脈から採取し、ヘパリン含有（５０ユニット／ｍＬ）生理食塩水と、容量（ｖ：ｖ）比１：１で混合した。希釈血液中のグルコース濃度をＦＵＪＩ　ＤＲＹ－ＣＨＥＭ　７０００Ｖ（富士フイルム）で測定した。最終血中グルコース濃度を次の式によって計算した。

最終グルコース濃度（ｍｇ／ｍＬ）＝　［グルコース］$_{60分}$　－［グルコース］$_{0分}$

[0065] 平均±ＳＥＭ（ｎ＝７）値としてのデータを図２５に示す。
スチューデントのｔ－検定、テール（２）及びタイプ（２）を行い平均値間の統計誤差を決定した（Ｐ＜０．０５は統計的に有意であると考えられた）。

[0066] 糖尿病モデルマウスに対し、プロピオン酸投与群、酪酸投与群及びプロピオン酸ナノ粒子（ＰＮＰ）投与群は有意差が見られなかったのに対し、糖尿病薬エキセナチド及びＢＮＰ投与群では有意にグルコース濃度を低下させることができ、膵臓機能が向上していることが分かる。

[0067] （３）試験の終了時点での器官の重量

マウスの解剖後，速やかに取り出した脾臓、腎臓、及び肝臓の重量を測定した結果を図２６に示す、これらの臓器をさらなる組織学的分析用として１

０％中性緩衝液中に保存した。スチューデントのｔ－検定は上記と同じ。

[0068] この結果ではプロピオン酸投与群で脾臓重量の上昇が見られ、酪酸投与群及びエキセナチド投与群で肝臓重量上昇が確認された。これは臓器炎症を示す。一方でＢＮＰ投与群では脾臓、腎臓、肝臓いずれもコントロールと同等で毒性を示していない。

[0069]（４）Ｈ及びＥ染色腸管の組織学的解析

解剖後取り出したマウスの器官を、速やかに１０％中性ホルマリン液に入れて１日間浸漬することによって固定した。その後、パラフィン包埋するために７０％エタノール溶液に置換した。パラフィン包埋後のすべての器官を厚さ５μｍの組織切片に加工し、常法により、ヘマトキシリン・エオシン（Ｈ・Ｅ）染色した。組織切片を高濃度アルコールで脱水し、キシレンで洗浄した後、顕微鏡検査を行った（ｂｉｏｒｅｖｏ，　ＢＺ－９０００，Ｋｅｙｅｎｃｅ）。絨毛の長さをイメージ　ジェイ　ソフトウエア（ＩｍａｇｅＪ　ｓｏｆｔｗａｒｅ）（ＮＩＨ）により測定した。結果を図２９に示す。定量データは、最小と最大範囲の値、上限と下限の四分価（ｑｕａｒｔｉｌｅ）、中央値：十二指腸（ｎ＝１３０－１３２）、空腸（ｎ＝９６－１８５）、回腸（ｎ＝１０９－１３８）、結腸（ｎ＝３７－４７），をボックス中のプロットとして表示した。ｔ－検定は上記に同じ。

[0070] 十二指腸、空腸、回腸、大腸において、エキセナチド投与群は絨毛が有意に短くなっており、強い副作用を示していることが示される。プロピオン酸及び酪酸投与群も同様の傾向にある。一方でＢＮＰ投与群、ＰＮＰ投与群では絨毛の短縮は見られず、消化管に対するダメージがないことが分かる。

[0071]（５）Ｈ及びＥ染色膵臓組織の組織学的解析

解剖後取り出したマウスの器官を、速やかに１０％中性ホルマリン液に入れて１日間浸漬することによって固定した。その後、パラフィン包埋するために７０％エタノール溶液に置換した。常法に従い、パラフィン包埋後のすべての臓器を厚さ５μｍの組織切片に加工し、常法により、ヘマトキシリン・エオシン（Ｈ・Ｅ）染色した。組織切片を高濃度アルコールで脱水し、キ

シレンで洗浄した後、固定して顕微鏡検査に供した（ｂｉｏｒｅｖｏ，　ＢＺ－９０００，Ｋｅｙｅｎｃｅ）。イメージ　ジェイ　ソフトウエア（Ｉｍａｇｅ　Ｊ　ｓｏｆｔｗａｒｅ）（ＮＩＨ）によりランゲルハンス島の領域を決定した。結果を図３０に示す。定量データは、最小と最大範囲の値、上限と下限の四分価（ｑｕａｒｔｉｌｅ）、中央値（ｎ＝１０－２０）をボックス中のプロットとして表示している。ｔ－検定は上記に同じ。

[0072] 糖尿病モデルマウス及び、プロピオン酸投与群、酪酸投与群、ＰＮＰ投与群でランゲルハンス島サイズが縮小しているが、ＢＮＰ投与群及びエキセナチド投与群でランゲルハンス島の萎縮が見られず、ランゲルハンス島の機能を維持していることが示される。

[0073] 試験例９：放射線増強剤としての効果その１

上記試験と同様に入手した、一群５匹の５－７週令のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスを、同様の条件下で飼育した。１００μＬ（血清不含ＤＭＥＭ）当たり０．０７６×10^6のメラノーマＢ１６Ｆ１０細胞をマウスの右腿外側部に皮下注射した（照射前７日目）。がん増殖１週間後、マウスを下記投与群に無作為に分けた。ＢＮＰ５００ｍｇ／ｋｇを照射前１日及び照射直後にマウスの腹腔内（ｉ．ｐ．）に投与し、放射線増強効果を確認した（それぞれ、ＧＰ３及びＧＰ４）。照射条件は、１０Ｇｙ、１５０ｋＶ、２０ｍＡ、ＡＩフィルトレーション、３３０ｍｍ間隔に設定した。

サンプル投与群

ＧＰ１：がん対称群

ＧＰ２：がん＋照射（ＩＲ：１０Ｇｙ）群

ＧＰ３：ＢＮＰ　５００ｍｇ／ｋｇ　（照射前１日）群

ＧＰ４：ＢＮＰ　５００ｍｇ／ｋｇ　（照射後０日）群

[0074] （１）照射後、試験終了時点（８日）までがん増殖及び体重について追跡した。結果を図３１に示す。０日は照射前のデータであり、８日は照射後（試

験の終了時点）のデータである。

ＢＮＰ投与群でも非投与群と同様に体重変化がなく、毒性が見られない。

[0075] （２）試験の終了時点で血漿及び他の器官を採取し、さらなる分析用として適切に保存した。がんの大きさをキャリパーで測定し、ガンの体積を下記の等式を用いて算出した。

がんの体積＝０．５２×長さ×幅^2

結果を図３０に示す。ｔ－検定は、試験８（２）に同じ。

１０Ｇｙ照射群で腫瘍成長抑制効果があり、Ｘ線照射前及び後にＢＮＰを投与しても８日後の腫瘍サイズはＢＮＰ非投与群に比較して有意に小さく、放射線増強効果が確認される。

[0076] 試験例１０：放射線増強剤としての効果その２

上記試験と同様に入試した、一群５又は７匹の５－７週令のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスを、同様の条件下で飼育した。１００μＬ（血清不含ＤＭＥＭ）当たり０．０７６×１０^{6}のメラノーマＢ１６Ｆ１０細胞をマウスの右腿外側部に皮下注射した（照射前９日目）。がんの体積が３５０－５６０ｍｍ^{3}になったとき、マウスを下記投与群に無作為に分けた。照射条件は、１０Ｇｙ、１５０ｋＶ、２０ｍＡ、Ａｌ＋Ｃｕ（０．５ｍｍ＋０．１ｍｍ）フィルトレーション、３３０ｍｍ間隔に設定した。

がん体積は上記と同様に算出した。

<u>サンプル投与群</u>

ＧＰ１：健康（生理食塩水）群（ｎ＝５）

ＧＰ２：がん対照群（ｎ＝７）

ＧＰ３：がん＋照射（ＩＲ（５Ｇｙ））群（ｎ＝７）

ＧＰ４：酪酸（ｉ．ｐ．；２５０ｍｇ／ｋｇ）（照射前６時間）＋ＩＲ群（ｎ＝７）

ＧＰ５：酪酸（ｉ．ｐ．；５００ｍｇ／ｋｇ）（照射前２４時間）＋ＩＲ群（ｎ＝７）

ＧＰ６：ＢＮＰ（ｉ．ｐ．：５００ｍｇ／ｋｇ）（照射前６時間）＋ＩＲ群（ｎ＝７）

ＧＰ７：ＢＮＰ（ｉ．ｐ．：５００ｍｇ／ｋｇ）（照射前１２時間）＋ＩＲ群（ｎ＝７）

[0077] （１）メラノーマ異種移植モデルでの酪酸及びＮＰ投与後の５Ｇｙ照射によるがん増殖プロファイルのデータを図３３に示す。

放射線照射前に酪酸及びＢＮＰを投与した。腫瘍増殖抑制効果は　照射群＜６時間前酪酸投与群＜６時間前ＢＮＰ投与群＝２４時間前酪酸投与群＜２４時間前ＢＮＰ投与群の順に増加した。

[0078] （２）試験終了時点（照射後６日目）のがんの重量のデータを平均±ＳＥＭ値（ｎ＝２－７）として図３２に示す。ｔ－検定は、試験８（５）に同じ。

[0079] 腫瘍重量の結果は２４時間前ＢＮＰ投与群及び６時間前酪酸投与群が有意に腫瘍サイズを減少させた。（３）マウスの体重変化を平均±ＳＤ値（ｎ＝７）としてのデータを図３５に示す。ｔ－検定は、上記に同じ。

[0080] 酪酸投与群で体重減少が見られ、毒性が出ている。一方で、ＢＮＰ投与群は体重減少が見られず、毒性が出ていない。

[0081] 試験例１１：スフェロド検定により評価するＢＮＰの放射線増強効果のイン・ビトロ評価　メラノーマＢ１６Ｆ１０細胞を５０ｍＭの酪酸で７時間処理した後、２Ｇｙ（ＡＩ＋Ｃｕ（０．５ｍｍ＋０．１ｍｍ）フィルター）を照射した。３７℃で１時間停止し、培地を除去し、数度洗浄してサンプルを除去し、次いで新鮮な培地を補充した。処理細胞を２４時間インキュベートした後、０．６％のメチルセルロース及びＤＭＥＭ（１：１）中で３日間培養してスフェロイドを形成した。直接鏡検法により画像を撮り、イメージ　ジェイ　ソフトウエア（ＮＩＨ）によりスフェロイドを測定した。グループ分けし、次いで、細胞を、２Ｇｙ照射後７時間サンプルを用いて処理した。デ

ータを平均±ＳＥＭ値（ｎ＝３２－３７）として表示する。これらの結果を図３８に示す。ｔ－検定は上記に同じ。

[0082] 細胞培養：

マウスメラノーマＢ１６Ｆ１０細胞は、Ｃｅｌｌ　Ｂａｎｋ（理研、日本）から購入した。これらの細胞株を、１０％ウシ胎児血清及び１００ｎｇ／ｍＬのペニシリン－ストレプトマイシン－ネオマイシンの抗生物質混合物を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ；Ｌ－グルタミン、１ｇ／Ｌ　グルコース、重炭酸ナトリウム、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ，　ＭＯ，　ＵＳＡ）中に５％CO_2の加湿雰囲気下に３７℃で保持した。結果を図３４に示す。

ＢＮＰ投与群で明らかにスフェロイドがん細胞の成長抑制効果が確認される。

[0083] 試験例１２：非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ）に対する効果その２

４２匹の５週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（オス）にＥＰＳ益新（株）より購入した固形飼料Ａ０６０７１３０２（コリン欠乏高脂肪飼料、メチオニン減量、０．１％メチオニン添加）を自由摂取にて与え、４週間後に無作為に１群７匹に分け、下記の健康群（Ｈｅａｌｔｈｙ）（固形飼料Ａ０６０７１３０２無投与）、ＮＡＳＨ、酪酸投与（ＢＡ）、プロピオン酸投与（ＰＡ）、ＰＮＰ投与、ＢＮＰ投与６群に記載の各サンプルを（ＰＡ及びＰＮＰ群はＰＡが６５ｍＭ、ＢＡおよびＢＮＰ群はＢＡが５０ｍＭの濃度に調製）自由摂取にて投与した。８週間後にデータ解析を行った。

[0084] （１）肝臓及び脾臓重量を図３５に示す。ＮＡＳＨ群が炎症により肥大化しているのに対し、プロピオン酸粒子投与群で有意に肥大化が抑制されていることを確認した。

ここでは、肝臓に蓄積した脂肪量の違いと肝臓での炎症に呼応した脾臓の腫大の程度を比較するために、マウスの解剖後に取り出した肝臓および脾臓の重量を測定し、各群の平均重量を求めた。（各群ｎ＝７）。各群の平均肝臓重量値および平均脾臓重量値のエラーバーは、標準偏差値（各群ｎ＝７）を

用いた。ｔ－検定は、平均値間の統計的有意差の有無を調べるために行われ、Ｐ＜０．０５で統計的に有意差がある。

[0085] 肝臓重量（左図）は健康群に対してＮＡＳＨ群の肝臓重量が有意に重く、炎症を惹起している。一方ＰＮＰ投与群はＮＡＳＨ群に比較して肝臓重量が有意に軽く、炎症を抑制している。

[0086] 脾臓重量（左図）も同様に健康群に対してＮＡＳＨ群が有意に上昇し、ＰＮＰ投与群で有意に低下している。

[0087]（２）ＨＥ染色された肝臓の組織学的解析

解剖後取り出されたマウスの肝臓は、速やかに１０％中性緩衝ホルマリン液に入れて１日間浸漬することによって固定した。その後、パラフィン包埋するために７０％エタノール溶液に置換した。パラフィン包埋後すべての肝臓は、厚さ５μｍの組織切片に加工され、ヘマトキシリン・エオジン（ＨＥ）染色された。染色後のすべての組織切片は、顕微鏡（オールインワン蛍光顕微鏡、ＢＺ－Ｘ７１０，Ｋｅｙｅｎｃｅ）によって画像データ化された後、ＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ）によって肝臓組織面積に対する油滴組織面積の割合が求められた（各群ｎ＝７）。結果を図３６に示す。グラフは各群の油滴組織面積の平均値及び標準偏差によるエラーバーを示したものである。ｔ－検定は、平均値間の統計的有意差の有無を調べるために行われ、Ｐ＜０．０５で統計的に有意差がある。

肝臓の油滴量は健康群に対してＮＡＳＨ群が大幅に増加している（脂肪肝状態）。一方ＰＮＰ投与群はＮＡＳＨ群に比較して油滴量が有意に少ない。

[0088]（３）ＭＴ染色された肝臓の組織学的解析

解剖後取り出されたマウスの肝臓は、速やかに１０％中性緩衝ホルマリン液に入れて１日間浸漬することによって固定した。その後、パラフィン包埋するために７０％エタノール溶液に置換した。パラフィン包埋後すべての肝臓は、厚さ５μｍの組織切片に加工され、マッソントリクローム（ＭＴ）染色された。染色後のすべての組織切片は、顕微鏡（オールインワン蛍光顕微鏡、ＢＺ－Ｘ７１０，Ｋｅｙｅｎｃｅ）によって画像データ化された後、Ｉ

ｍａｇｅ　Ｊ（ＮＩＨ）によって肝臓組織面積に対する線維化組織面積の割合が求められた（各群ｎ＝７）。結果を図４２に示す。グラフは各群の線維化組織面積の平均値及び標準偏差によるエラーバーを示したものである。Ｔ－検定は、平均値間の統計的有意差の有無を調べるために行われ、ｐ＜０．０５で統計的に有意差がある。

肝線維化量は健康群に対してＮＡＳＨ群が有意に多い。一方ＰＮＰ投与群はＮＡＳＨ群に比較して肝線維化量が有意に少ない。

[0089] 製造例９：$CH_3O-(CH_2CH_2O)_m-CH_2PhCH_2[CH_2CH_2(OC(C=O)CH_2CH_2CH_2Ph)_n]S(=S)OCH_2CH_3$（Ｎ８２１）の合成

製造例２（本願）で合成したＮ７１７と同様にして合成したＮ８１７（１．５ｇ）、アゾビスイソブチロニトリル（４５ｍｇ）、４－フェニル酪酸ビニル（２ｇ）をフラスコに加え、５分間窒素バブルしたのち６０°Ｃ、１日反応させた。得られた目的物をＴＨＦに溶解させ、イソプロピルアルコール（ＩＰＡ）に沈殿、減圧乾燥し目的物（Ｎ８２１）を得た（２．８ｇ）。Ｎ８２１の^1H　ＮＭＲスペクトルを図３８に示す。

[0090] 製造例１０：　自己組織化粒子（Ｐｈ－ＢＮＰ）の調製

製造例９で合成したポリマー（ＮＮ８２１）をそれぞれ５０ｍｇ採取し、１ｍＬのＤＭＦに溶解させ水を１ｍＬ加えて透析膜（ＭＷＣＯ＝３．５ＫＤａ）に入れて２Ｌの水に対して透析した。半日ごとに３度透析水を交換した後、動的光散乱測定を行い、平均６７ｎｍの粒子が形成していることが確認できた。動的散乱測定の結果である、ＰＥＧ－ｂ－ポリ（ビニル４－フェニル酪酸）ナノ粒子（Ｐｈ－ＢＮＰ，Ｎ８３２）のサイズ分布を図４４に示す。

[0091] 試験例１３：抗アンモニア血症効果

２４匹の６週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｎマウス（オス）をランダムに４群にわけ

、４日間に渡ってゾンデによりサンプルを経口投与（１日１回、１．２２ｍｍｏｌ－４ＰＢＡ／ｋｇ）した。投与群２ＧＰ－４ＧＰにおいては、４日目にアセトアミノフェン（アセチル－ｐ－アミノフェノール；ＡＰＡＰ；３００ｍｇ／ｋｇ）を腹腔投与することで急性肝障害及び高アンモニア血症を引き起こし、５日目に解剖し評価した。

サンプル投与群：

１ＧＰ：　生理食塩

２ＧＰ：　ＡＰＡＰ＋水

３ＧＰ：　ＡＰＡＰ＋４－フェニル酪酸（２００ｍｇ／ｋｇ，１．２２ｍｍｏｌ－４ＰＢＡ／ｋｇ）

４ＧＰ：　ＡＰＡＰ＋Ｐｈ－ＢＮＰ（２００ｍｇ／ｋｇ，１．２２ｍｍｏｌ－４ＰＢＡ／ｋｇ）

[0092]（１）血液の生化学検定

試験開始５日目の心採血直後に血中アンモニア濃度、肝機能指標として血漿アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）、血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）レベルをそれぞれ、比色法スライドを用いて動物用生化学自動分析装置で測定した。結果（ＡＰＡＰ急性肝障害モデルに対するＰｈ－ＢＮＰの経口投与効果）を、図４０に示す。

図より、４－Ｐｈ－ＢＮＰが有意に血中アンモニア濃度を下げ、また、ＡＳＴ、ＡＬＴレベルも有意に低下し、肝機能が回復に寄与していることが分かる。

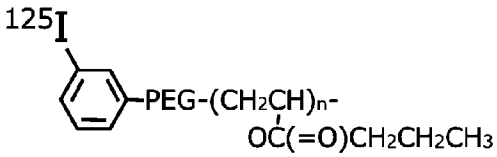
[0093]（２）ＨＥ染色された肝臓の組織学的解析

解剖後取り出されたマウスの肝臓を、前述した器官又は臓器のＨＥ染色法に従い、染色した。その結果を図４１に示す。図より、ＡＰＡＰ投与で肝臓に強く障害が現れているものの、Ｐｈ－ＢＮＰでダメージが抑制されていることが分かる。図中、Ｈｅａｌｔｈｙは健康群マウス、ＡＰＡＰ投与群マウス、ＡＰＡＰ＋ＰＢＡは、ＡＰＡＰと４－フェニル酪酸の投与群、ＡＰＡＰ

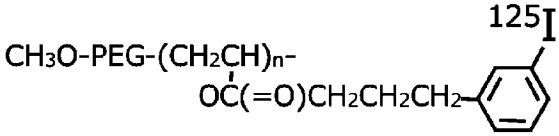
＋Ｐｈ－ＢＮＰは、ＡＰＡＰとＰｈ－ＢＮＰ（本発明に従うナノ粒子）の投与群に相当する。

[0094] 試験例１５：薬物動態試験

上述の製造例１～８の方法に準じ、該当する改変を常法に従い行い、ベンゼン環をＰＥＧのα末端に有するＰＥＧ－ｂ－ポリ（ビニル酪酸）（下式左参照。）及びＰＥＧ－ｂ－ポリ（ビニル４－フェニル酪酸）（下式右参照。）のフェニル基にクロラミン法で^{125}Ｉを導入し、ＰＤ－１０カラムにて２回精製、未反応ヨウ素を分別した。



（Ｎ９３２）



（Ｎ９３０）

[0095] （１）

Ｎ９３２を給水瓶から自由摂取させたマウスを２４時間後、血液、肝臓および消化管を採取し、そのガンマ線強度をシンチレーション検出器により測定した。結果を、図４２（左）に示す。図より、Ｎ９３２は消化管にほぼ完全に局在化することが確認された。

[0096] 一方、Ｎ９３０をゾンデにより強制経口投与し、２４時間後に主要臓器のガンマ線強度を測定した。結果を図４２（右）に示す。この図より、消化管に加えて血液、肝臓、腎臓等広く分布し、４－フェニル酪酸が消化管中で加水分解し、循環系に取り込まれていることが確認できる。

[0097] （２）

４５匹の７週齢ＩＣＲマウス（オス）をランダムに以下の３群にわけ、投与群：２ＧＰと３ＧＰの投与量について、含まれるフェニル酪酸が２００ｍｇ／ｋｇ（１．２２ｍｍｏｌ－４ＰＢＡ／ｋｇ）となるように決定した。各サンプルをほぼ同時に全マウスに投与後、各エンドポイント（３０ｍｉｎ，１ｈ，２ｈ，４ｈ，１２ｈ，１６ｈ，２４ｈの７つのエンドポイント）に従い、心臓穿刺によって血液１ｍＬ取り、血漿を分離させる。また、マウスか

らターゲット臓器の肝臓を取り出し、高速液体クロマトグラフィー／質量分析法（ＬＣ／ＭＳ）によりフェニル酪酸モノマーの含有量を定量化した。測定結果を図４３に示す。これらの図より、ＰＢＡは４時間以内に完全に体内から代謝されたのに対して、４－Ｐｈ－ＢＮＰは血中及び肝臓において持続的にフェニル酪酸モノマーを放出させ、２４時間経過時点でもその放出は終わっていなかった。また、濃度時間曲線化面積（ＡＵＣ）を計算しても、血液においては、４－Ｐｈ－ＢＮＰはＰＢＡの約３倍、肝臓においては約１５倍の増加を見せた。

サンプル投与群：

１ＧＰ：　生理食塩　（コントロール、３匹）

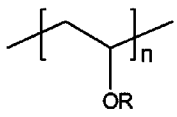
２ＧＰ：　４－フェニル酪酸　（３０ｍｉｎ，１ｈ，２ｈ，４ｈ，１２ｈ，１６ｈ，２４ｈの７つのエンドポイント×３匹）

３ＧＰ：　Ｐｈ－ＢＮＰ　（３０ｍｉｎ，１ｈ，２ｈ，４ｈ，１２ｈ，１６ｈ，２４ｈの７つのエンドポイント×３匹）

請求の範囲

[請求項1] 親水－疎水性共重合体であって、

（１）式Ｉ：



（Ｉ）

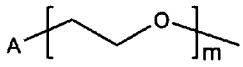
式中、

Ｒは、－（Ｃ＝Ｏ）Ｒ[1]又は水素原子であり、Ｒ[1]は、非置換又は置換された炭素原子数１～７個の直鎖又は分岐のアルキル（置換された場合の置換基は非置換若しくは置換されたフェニルであり、置換されたフェニルの置換基は、１以上のハロゲン、ヒドロキシル、メチルオキシである。）であり、ここで、水素原子は存在するとしてもｎの３０％以下であり、ｎは５～１０００の整数である、

で表される、反復単位に由来する疎水性セグメント、と

（２）ポリ（エチレングリコール）鎖を含む親水性セグメントであって、

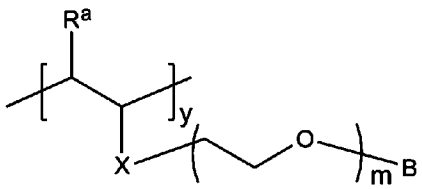
（ｉ）式ＩＩａ：



（ＩＩａ）

式中、Ａは、非置換または置換C_1－C_{12}アルキルオキシであり、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式Ｒ’Ｒ”ＣＨ－基、又はフェニルアミノ基若しくはフェネチルアミノ基であり、ここで、Ｒ’及びＲ”は独立してC_1－C_4アルキルオキシ又はＲ’とＲ”は一緒になって－ＯＣH_2ＣH_2Ｏ－、－Ｏ（ＣH_2）$_3$Ｏ－もしくは－Ｏ（ＣH_2）$_4$Ｏ－であり、ｍは１０～５００の整数である，で表される、親水性セグメント、又は

（ｉｉ）式ＩＩｂ：



（ＩＩｂ）

式中、Ｒ^{a}は水素原子又はカルボキシ基であり、

ＸはＲ^{a}がカルボキシ基であるとき、Ｃ（＝Ｏ）Ｏ若しくはＣ（＝Ｏ）ＮＨであるか、又はＲ^{a}が水素原子であるとき、Ｏ若しくはＮＨであり、

Ｂは、Ａ－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$であって、Ａ及びｍはそれぞれ、上記定義のとおりであり、

ｙは１～３００の整数である、

で表される反復単位に由来する親水性セグメント、

とを含み、前記（１）の疎水性セグメントと、（２）（ｉ）の親水性セグメントは、それぞれブロックとして存在し、

前記（１）の疎水性セグメントと、（２）（ｉｉ）の親水性セグメントを含むそれぞれの反復単位の各構成員は、相互にランダムに存在する、

親水－疎水性共重合体。

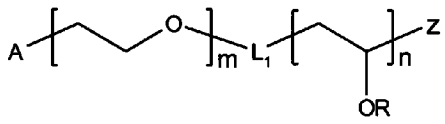
[請求項2] 水中で会合して自己組織化することによりナノ粒子又はナノサイズの高分子ミセルを形成する、請求項１に記載の親水－疎水性共重合体。

[請求項3] 請求項１又は２に記載の親水－疎水性共重合体であって、

前記（１）の式Ｉで表される反復単位に由来する疎水性セグメントと

前記（２）（ｉ）の式ＩＩａの親水性セグメントを含む共重合体は、

式ＢＣ：



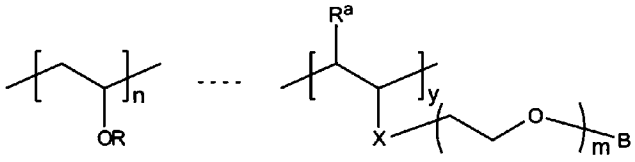
（ＢＣ）

式中、Ａ、Ｒ、ｍ、ｎはそれぞれ、上記定義のとおりであり、$Ｌ_{1}$は直接結合又は二価の連結基を表し、Ｚは、水素原子、ＳＨ、Ｓ（Ｃ＝Ｓ）－Ｐｈ、Ｓ（＝Ｓ）ＯＣ$Ｈ_{2}$Ｃ$Ｈ_{3}$、ヒドロキシル基、$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{6}$アルキルオキシ基又はアリール－$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{2}$アルキルオキシ基である

、

で表されるブロック共重合体であり、

前記（１）の式Ｉで表される反復単位に由来する疎水性セグメントと前記（２）（ｉｉ）の式ＩＩｂの親水性セグメントを含む共重合体は、式ＲＣ：



（ＧＣ）

式中、Ｒ、$Ｒ^{a}$、Ｂ、Ｘ、ｍ、ｎ、ｙはそれぞれ、上記定義のとおりである、

で表されるグラフト共重合体である、

親水－疎水性共重合体。

[請求項4] 請求項１～３のいずれかに記載の親水－疎水性共重合体の水性媒体中で形成されるナノ粒子。

[請求項5] 請求項１～３のいずれかに記載の親水－疎性共重合体又は請求項４に記載のナノ粒子を有効成分として含んでなる、製薬学的製剤。

[請求項6] がんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療（若しくは肝線維化の抑制）、糖尿病の予防若しくは治療、放射線療法における放射線の増強、又は、高アン

モニア血症の予防若しくは治療に使用するための請求項５の製薬学的製剤。

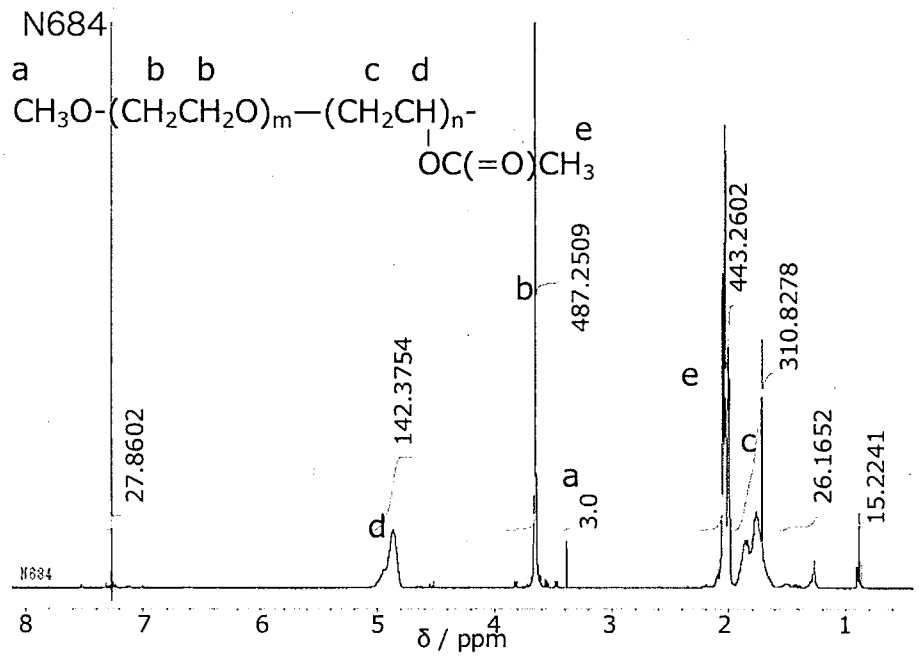
[請求項7] がんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療、糖尿病の予防若しくは治療、放射線療法における放射線の増強、又は、高アンモニア血症の予防若しくは治療に使用するための請求項１～３のいずれかの親水－疎水性共重合体。

[請求項8] がんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療（若しくは肝線維化の抑制）、糖尿病の予防若しくは治療、放射線療法における放射線の増強、又は、高アンモニア血症の予防若しくは治療に使用するための請求項４のナノ粒子。

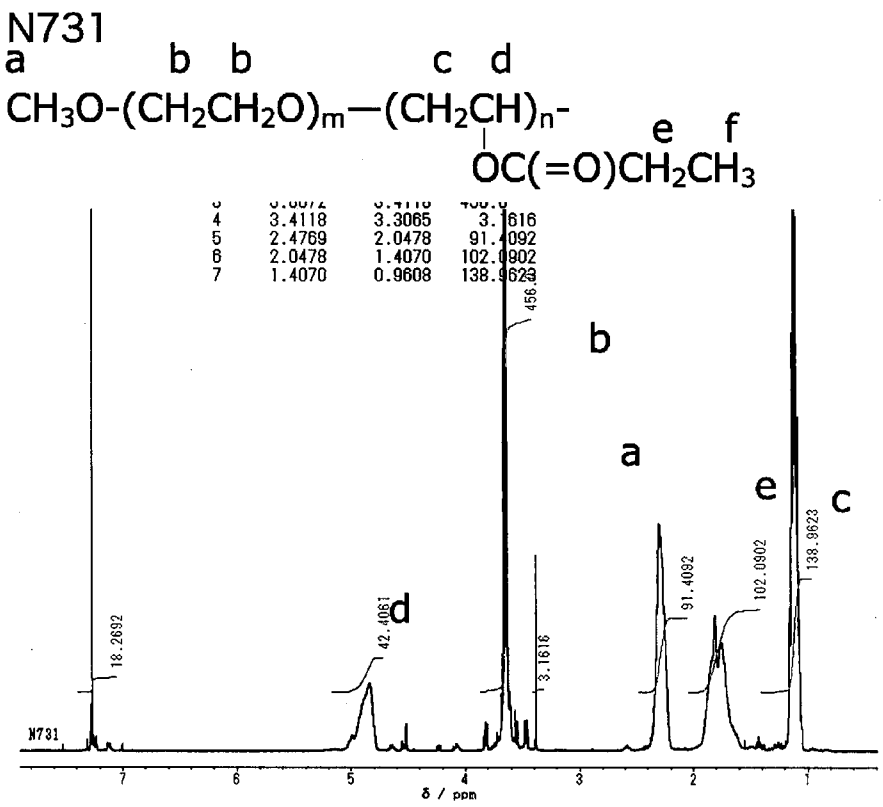
[請求項9] 請求項１～３のいずれかの親水－疎水性共重合体を、それらを必要とする患者に投与してがんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療（若しくは肝線維化の抑制）、糖尿病の予防若しくは治療、放射線療法における放射線の増強、又は、高アンモニア血症の予防若しくは治療するための方法。

[請求項10] 請求項４のナノ粒子を、それらを必要とする患者に投与してがんの予防若しくは治療、肥満抑制、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝の予防若しくは治療、糖尿病の予防若しくは治療（若しくは肝線維化の抑制）、放射線療法における放射線の増強、肝線維化の抑制、又は、高アンモニア血症の予防若しくは治療するための方法。

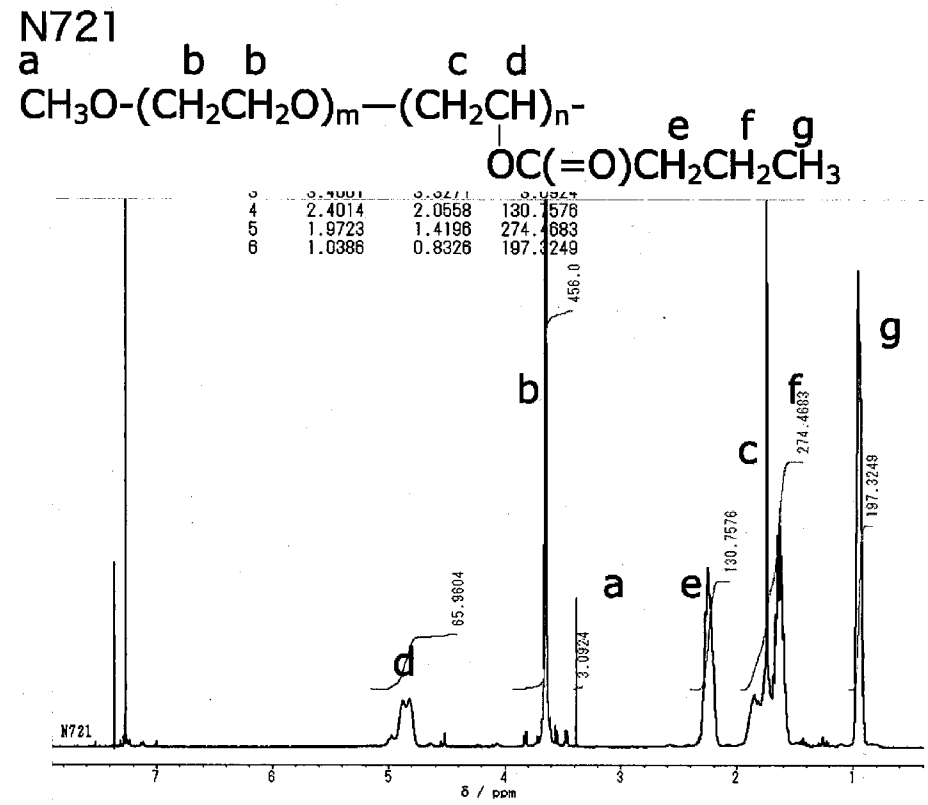
[図 1]


N684
a b b c d
CH3O-(CH2CH2O)m—(CH2CH)n-
OC(=O)CH3
e
27.8602
142.3754
487.2509
443.2602
310.8278
26.1652
15.2241
3.0
δ / ppm

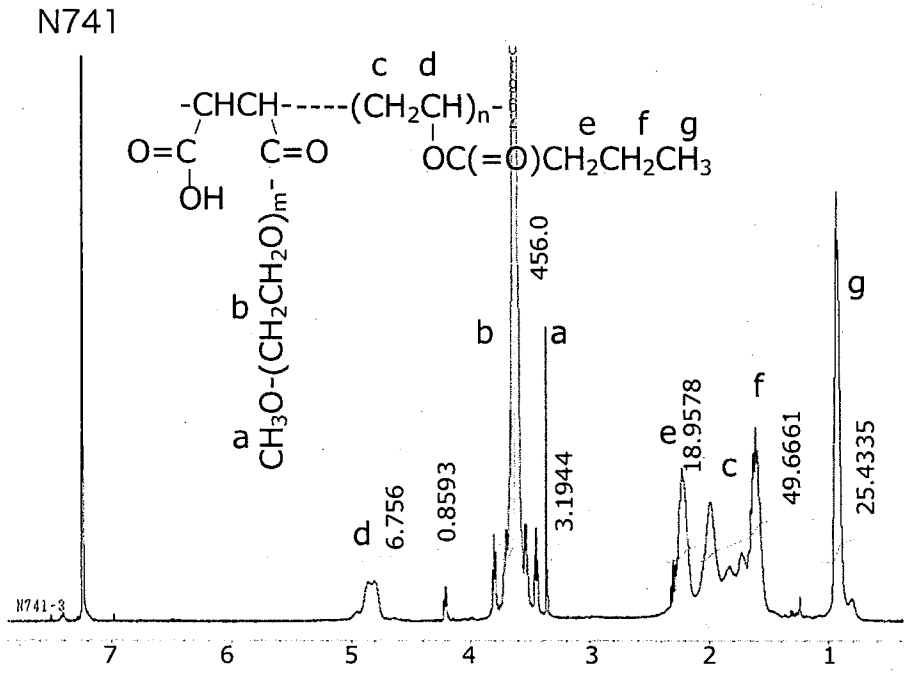
[図 2]


N731
a b b c d
CH3O-(CH2CH2O)m—(CH2CH)n-
OC(=O)CH2CH3
e f
4 3.4118 3.3065 3.1616
5 2.4769 2.0478 91.4092
6 2.0478 1.4070 102.0902
7 1.4070 0.9608 138.9623
18.2692
42.4061
456.3
3.1618
91.4092
102.0902
138.9623
δ / ppm

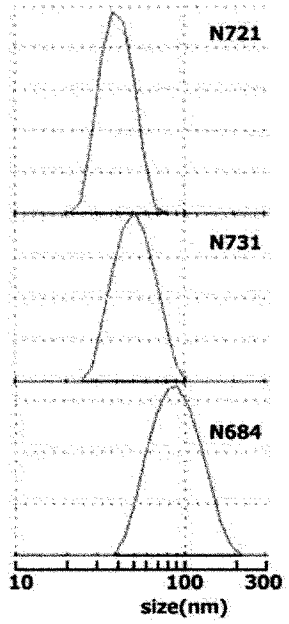
[図 3]


N721
a b b c d
CH3O-(CH2CH2O)m—(CH2CH)n-
e f g
OC(=O)CH2CH2CH3
4 2.4014 2.0558 130.7576
5 1.9723 1.4196 274.4683
6 1.0386 0.8326 197.3249
456.0
65.9804
3.0924
130.7576
274.4683
197.3249
N721
δ / ppm

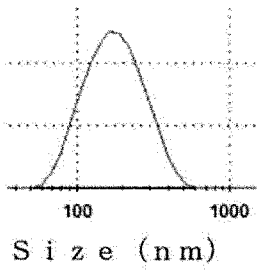
[図 4]


N741
-CHCH-----(CH2CH)n-
O=C C=O
OH
CH3O-(CH2CH2O)m-
OC(=O)CH2CH2CH3
456.0
6.756
0.8593
3.1944
18.9578
49.6661
25.4335
N741-3

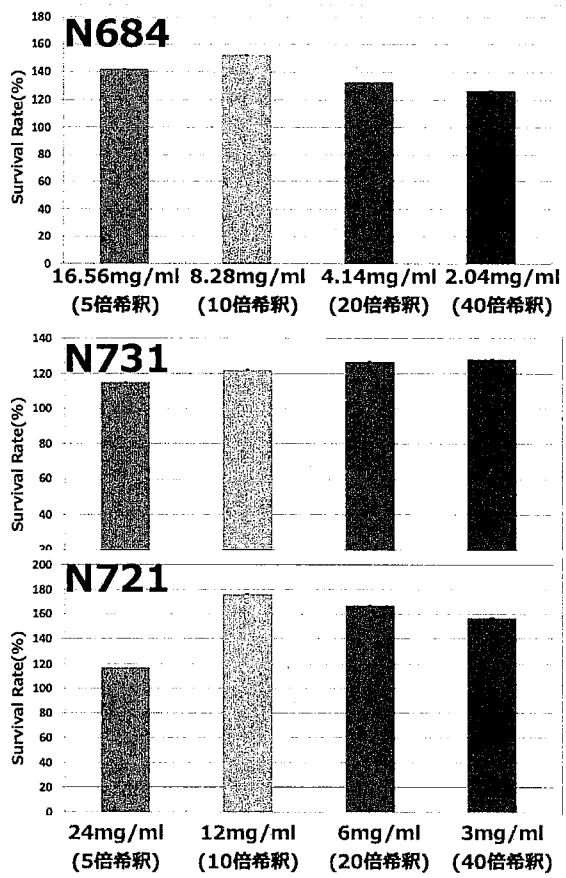
[図5]



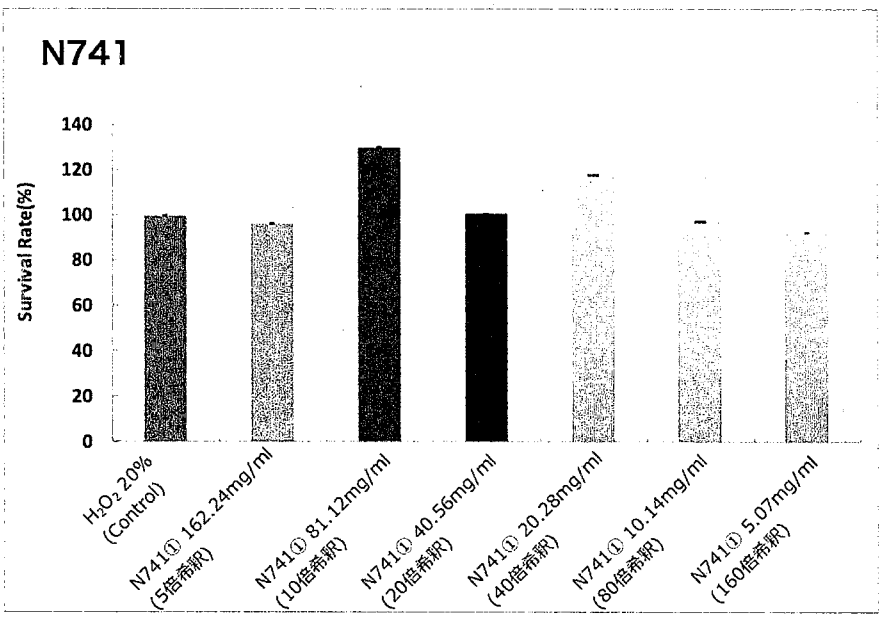
[図6]



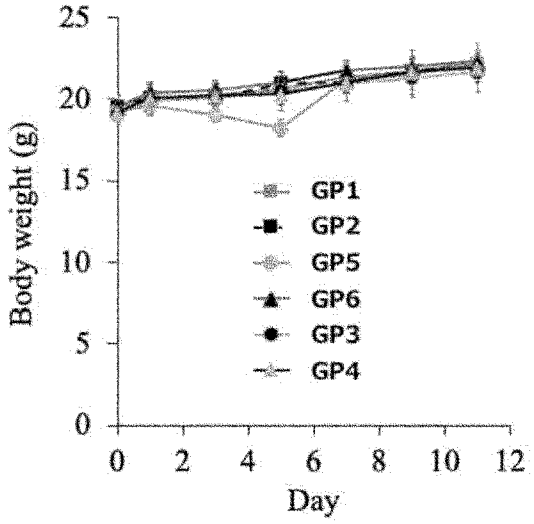
[図 7]


N684
Survival Rate(%)
16.56mg/ml (5倍希釈)
8.28mg/ml (10倍希釈)
4.14mg/ml (20倍希釈)
2.04mg/ml (40倍希釈)
N731
Survival Rate(%)
N721
Survival Rate(%)
24mg/ml (5倍希釈)
12mg/ml (10倍希釈)
6mg/ml (20倍希釈)
3mg/ml (40倍希釈)

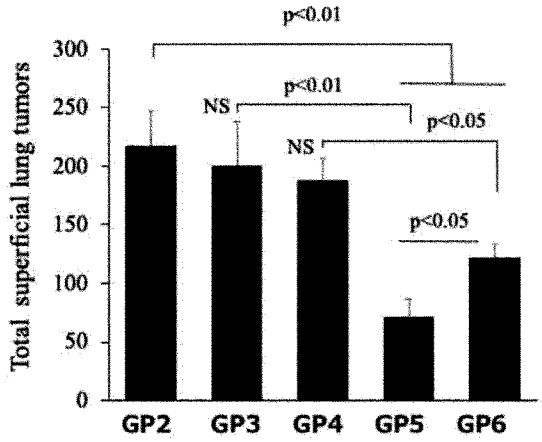
[図 8]


N741
Survival Rate(%)
H2O2 20% (Control)
N741① 162.24mg/ml (5倍希釈)
N741① 81.12mg/ml (10倍希釈)
N741① 40.56mg/ml (20倍希釈)
N741① 20.28mg/ml (40倍希釈)
N741① 10.14mg/ml (80倍希釈)
N741① 5.07mg/ml (160倍希釈)

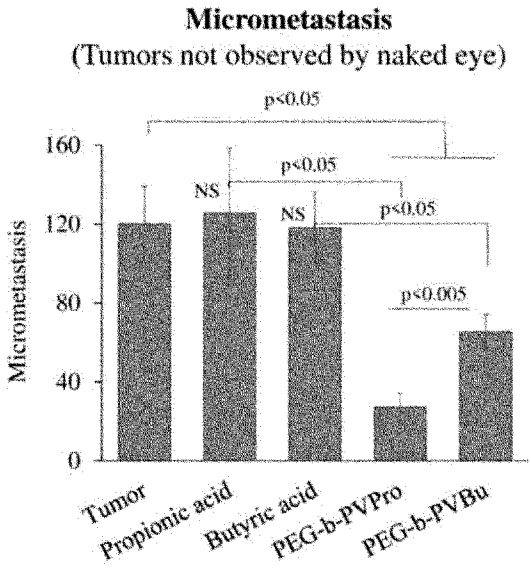
[図9]


Body weight (g)
25
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12
Day
GP1
GP2
GP5
GP6
GP3
GP4

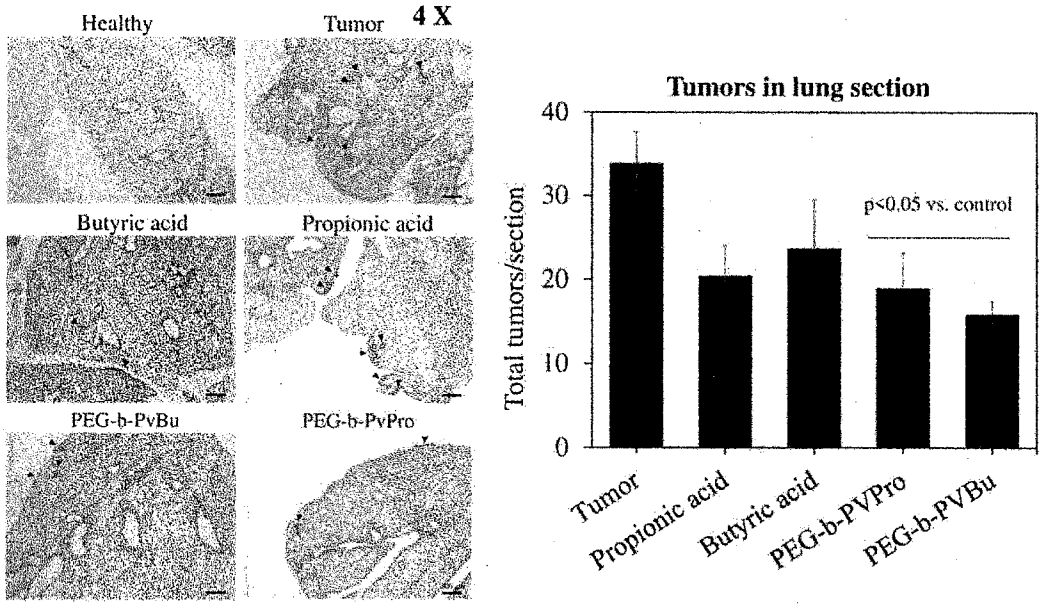
[図10]


Total superficial lung tumors
300
250
200
150
100
50
0
p<0.01
p<0.01
NS
p<0.05
NS
p<0.05
GP2 GP3 GP4 GP5 GP6

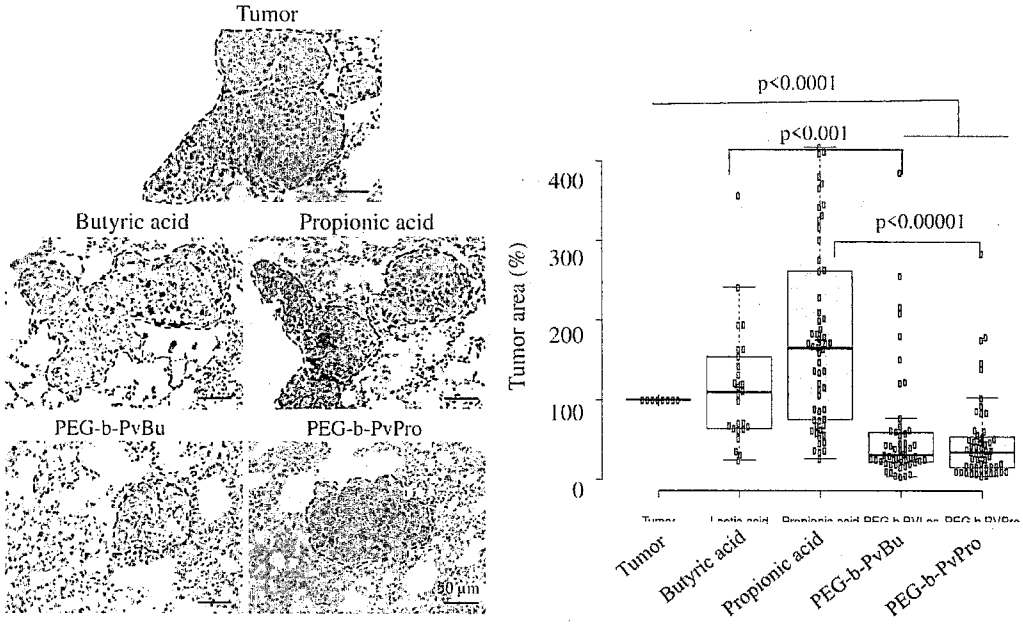
[図11]


Micrometastasis
(Tumors not observed by naked eye)
Micrometastasis
160
120
80
40
0
p<0.05
p<0.05
NS
NS
p<0.05
p<0.005
Tumor
Propionic acid
Butyric acid
PEG-b-PVPro
PEG-b-PVBu
NS: Non-significant vs. Control

[図 12]


Healthy
Tumor
4 X
Butyric acid
Propionic acid
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro
Tumors in lung section
Total tumors/section
40
30
20
10
0
p<0.05 vs. control
Tumor
Propionic acid
Butyric acid
PEG-b-PVPro
PEG-b-PVBu

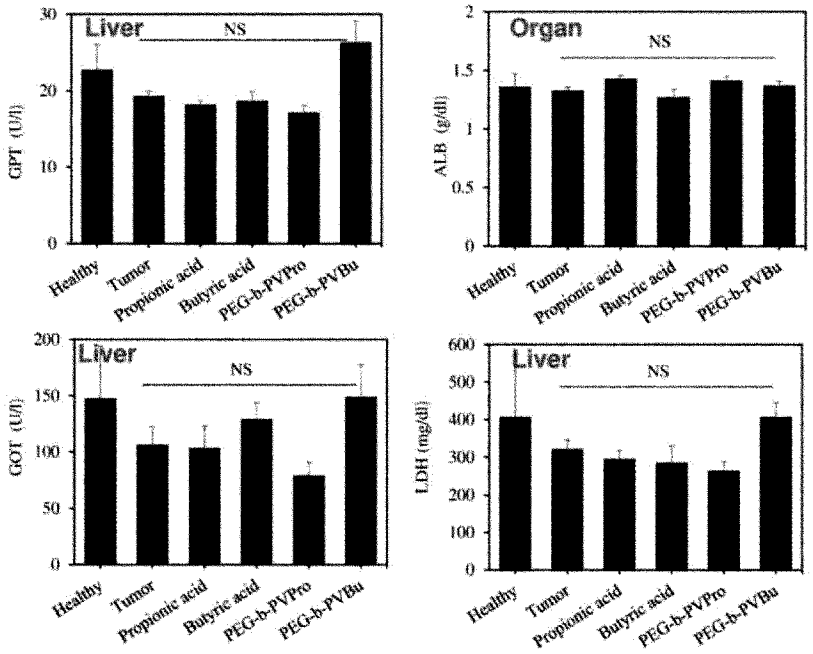
[図 13]


Tumor
Butyric acid
Propionic acid
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro
50 μm
p<0.0001
p<0.001
p<0.00001
Tumor area (%)
400
300
200
100
0
Tumor
Butyric acid
Propionic acid
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro

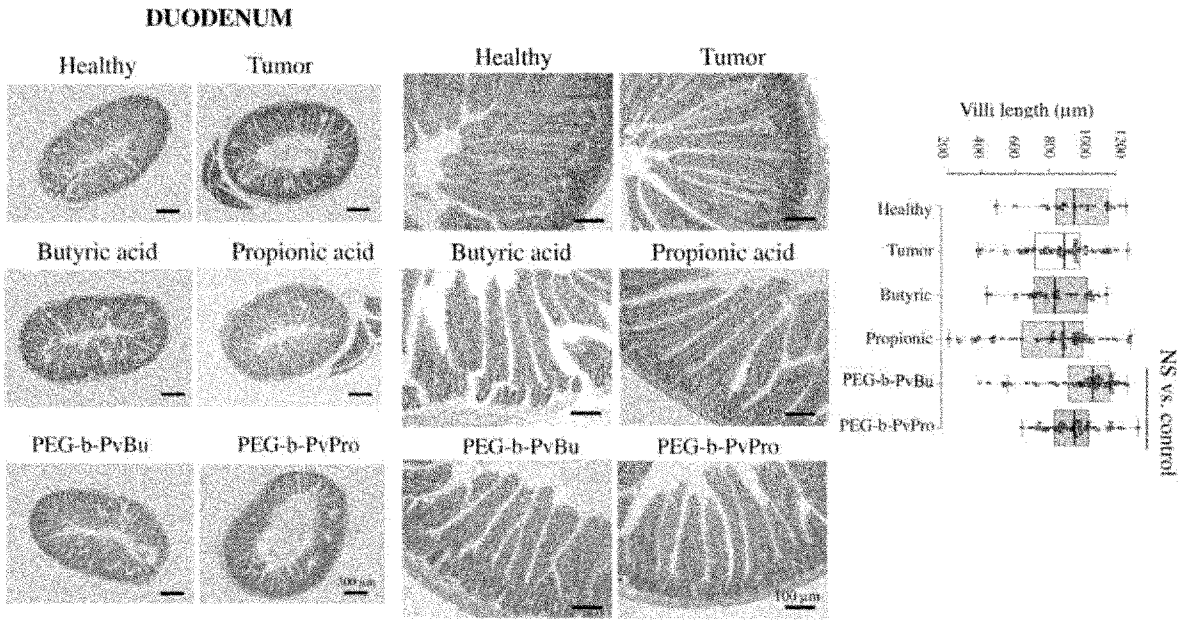
[図14]

Sample type: Plasma
Sample volume: 10 uL
Measurement machine: DriChem

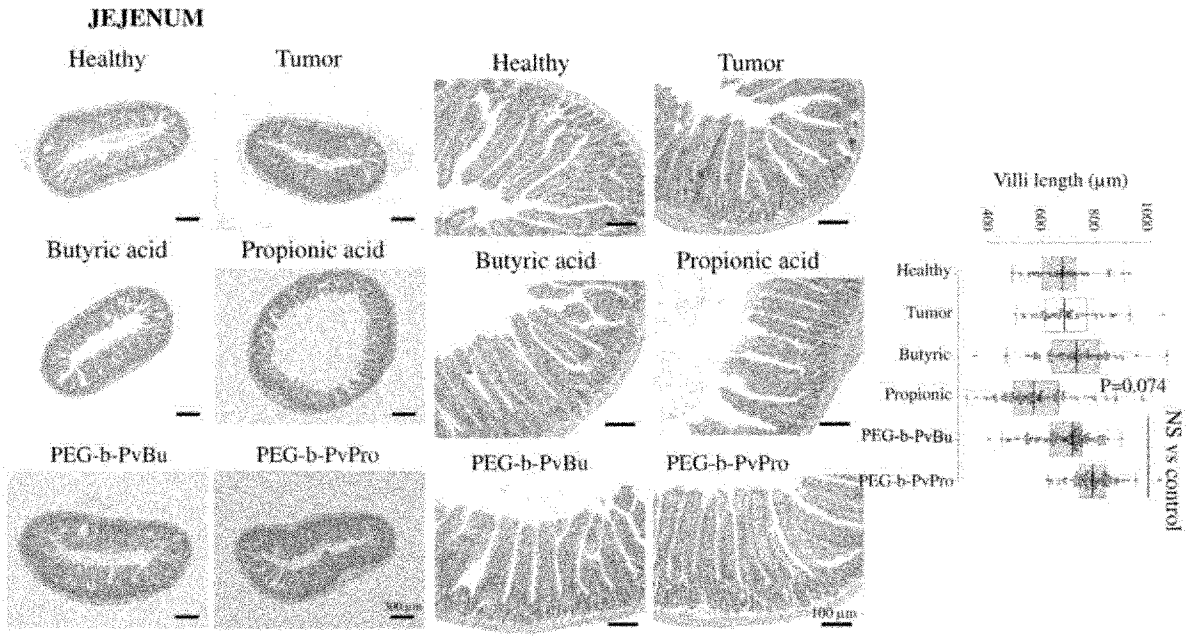
No. of samples: 5-7/group



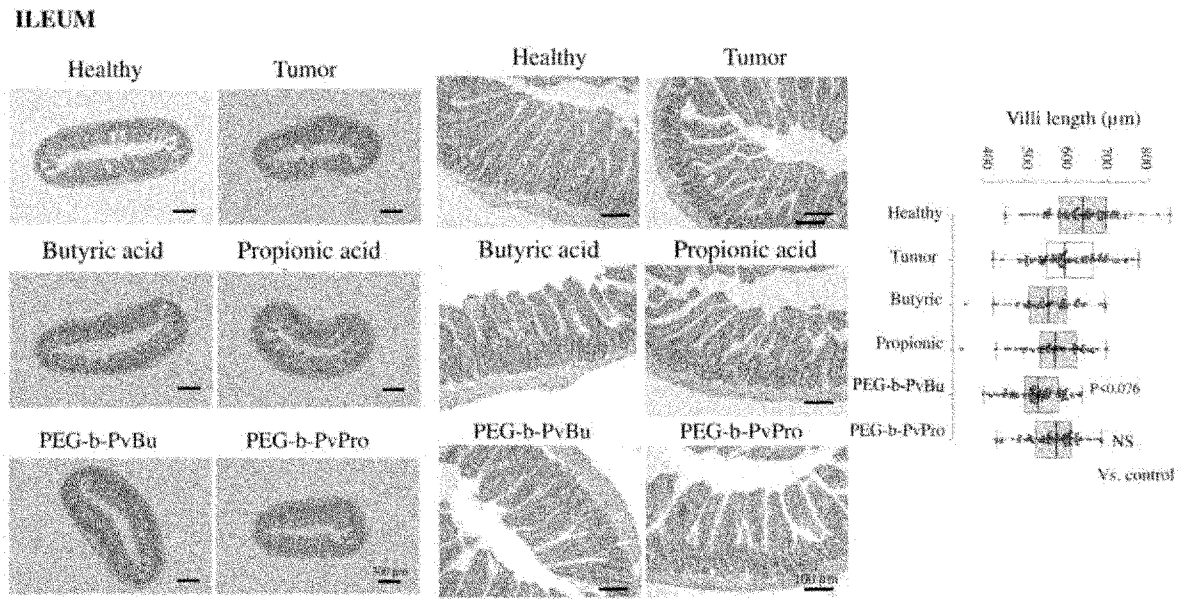
[図15]



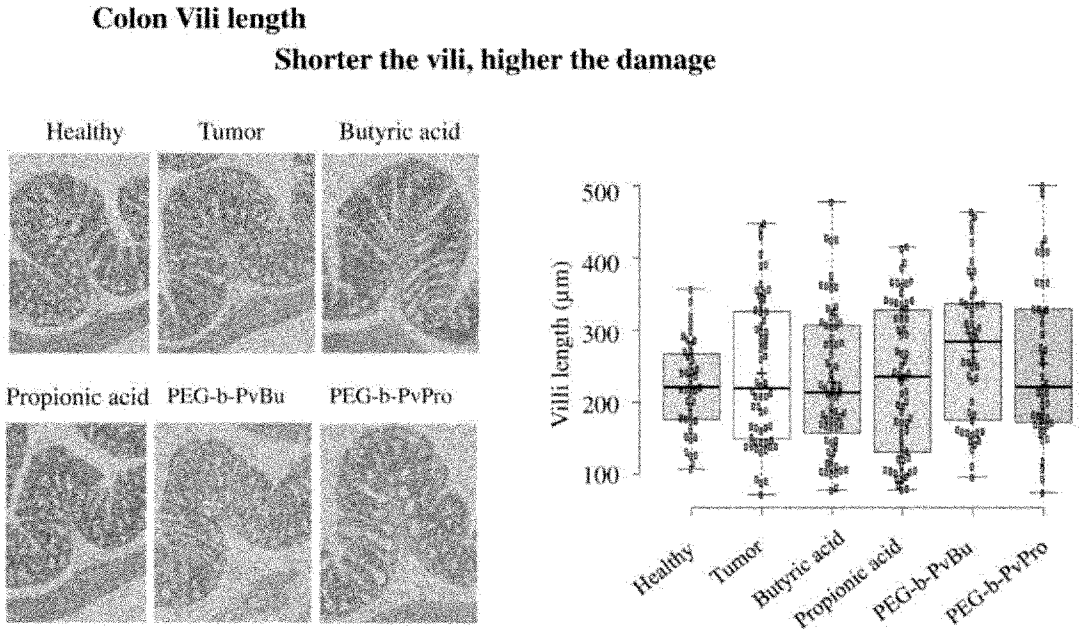
[図16]


JEJENUM
Healthy
Tumor
Healthy
Tumor
Butyric acid
Propionic acid
Butyric acid
Propionic acid
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro
100 μm
Villi length (μm)
Healthy
Tumor
Butyric
Propionic
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro
P=0.074
NS
NS VS CONTROL

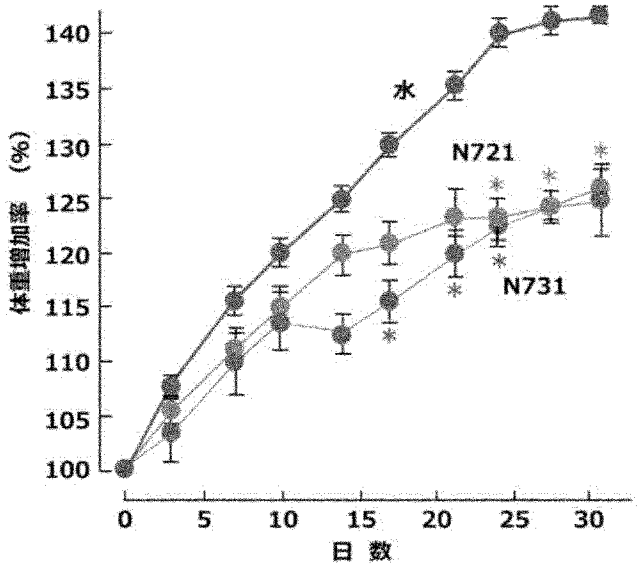
[図17]


ILEUM
Healthy
Tumor
Healthy
Tumor
Butyric acid
Propionic acid
Butyric acid
Propionic acid
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro
100 μm
Villi length (μm)
Healthy
Tumor
Butyric
Propionic
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro
P=0.076
NS
Vs. control

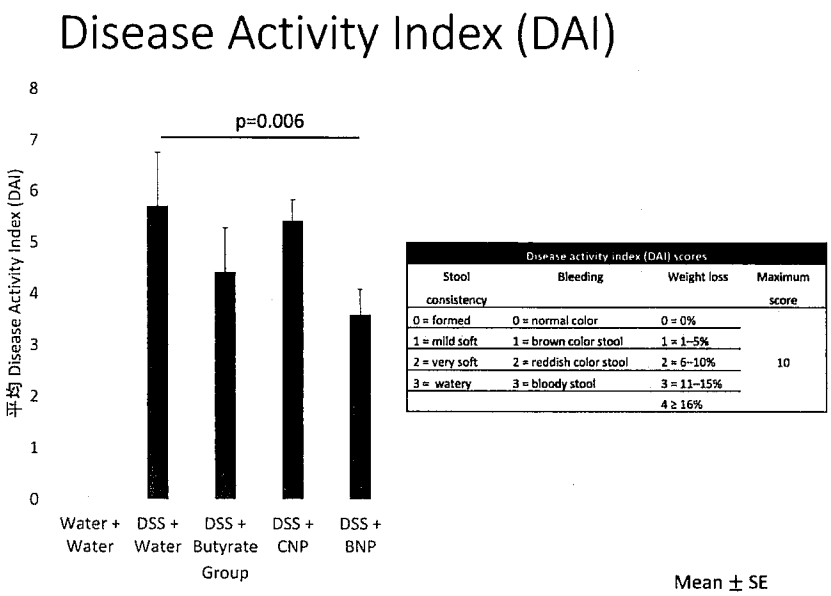
[図18]


Colon Vili length
Shorter the vili, higher the damage
Healthy
Tumor
Butyric acid
Propionic acid
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro
Villi length (μm)
500
400
300
200
100
Healthy
Tumor
Butyric acid
Propionic acid
PEG-b-PvBu
PEG-b-PvPro

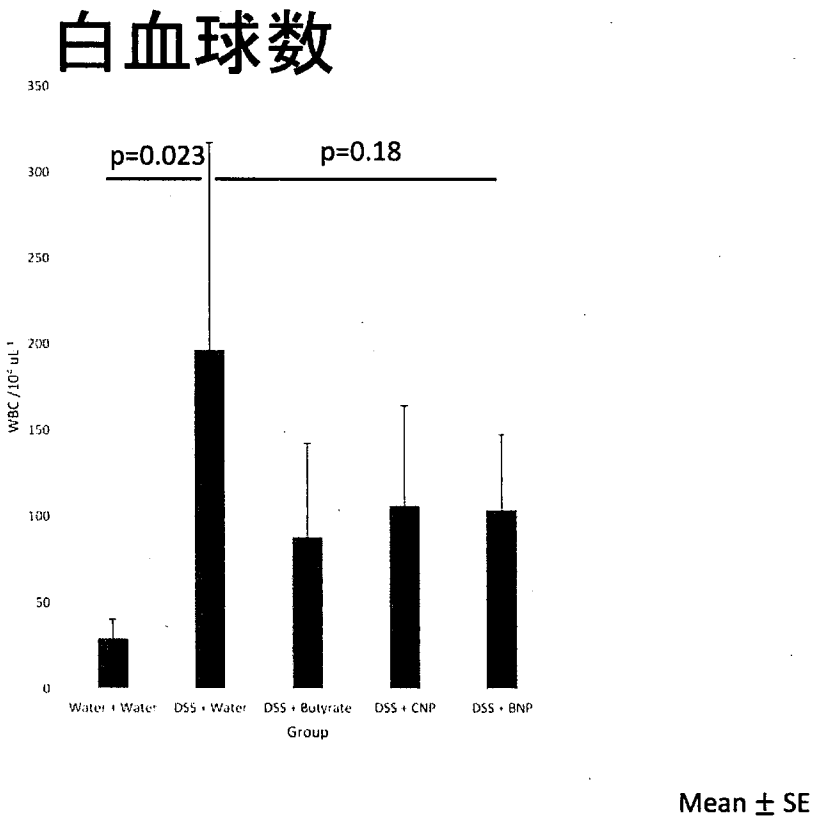
[図19]


体重増加率 (%)
140
135
130
125
120
115
110
105
100
水
N721
N731
0
5
10
15
20
25
30
日 数

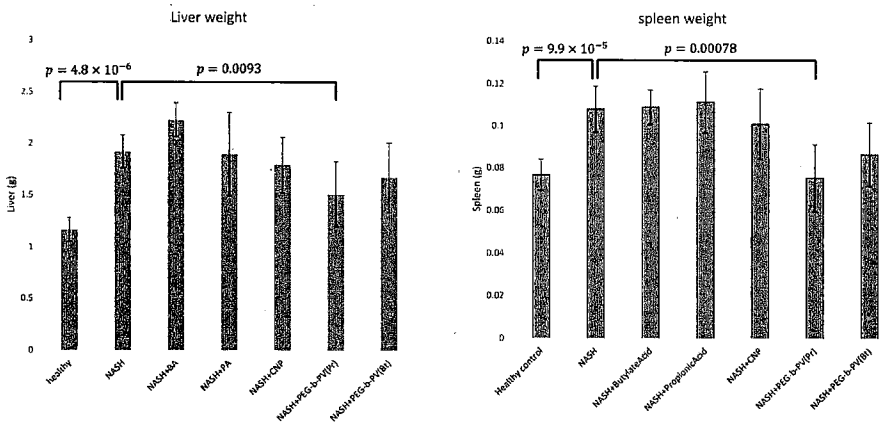
[図 20]


Disease Activity Index (DAI)
p=0.006
平均 Disease Activity Index (DAI)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Water + Water
DSS + Water
DSS + Butyrate
DSS + CNP
DSS + BNP
Group
Disease activity index (DAI) scores
Stool consistency
Bleeding
Weight loss
Maximum score
0 = formed
0 = normal color
0 = 0%
1 = mild soft
1 = brown color stool
1 = 1–5%
2 = very soft
2 = reddish color stool
2 = 6–10%
10
3 = watery
3 = bloody stool
3 = 11–15%
4 ≥ 16%
Mean ± SE

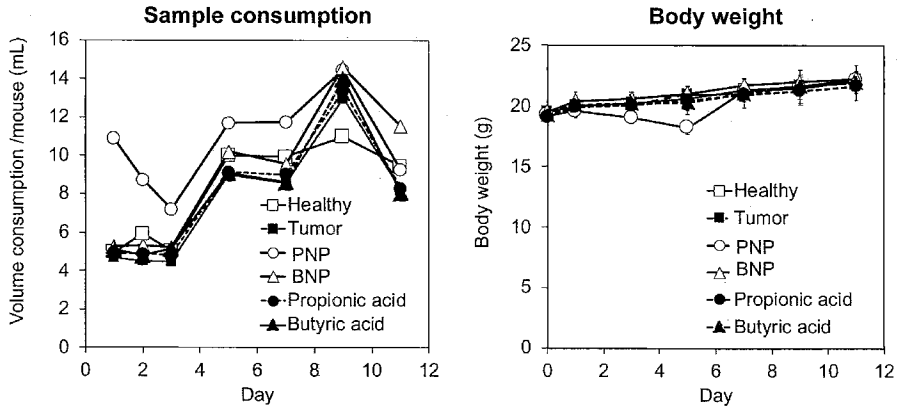
[図 21]


白血球数
p=0.023
p=0.18
WBC /10² uL⁻¹
0
50
100
150
200
250
300
350
Water + Water
DSS + Water
DSS + Butyrate
DSS + CNP
DSS + BNP
Group
Mean ± SE

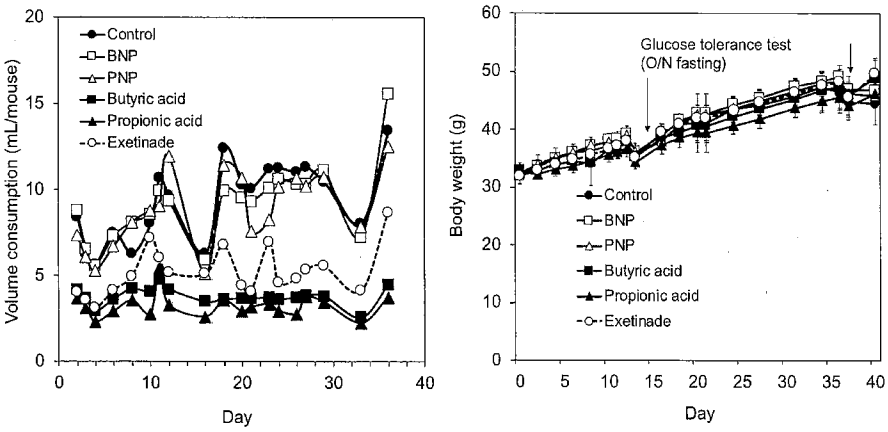
[図 22]


Liver weight
$p = 4.8 \times 10^{-6}$
$p = 0.0093$
Liver (g)
healthy
NASH
NASH+BA
NASH+PA
NASH+CNP
NASH+PEG-b-PV(Pr)
NASH+PEG-b-PV(Bu)
spleen weight
$p = 9.9 \times 10^{-5}$
$p = 0.00078$
Spleen (g)
Healthy control
NASH
NASH+ButyricAcid
NASH+PropionicAcid
NASH+CNP
NASH+PEG-b-PV(Pr)
NASH+PEG-b-PV(Bu)

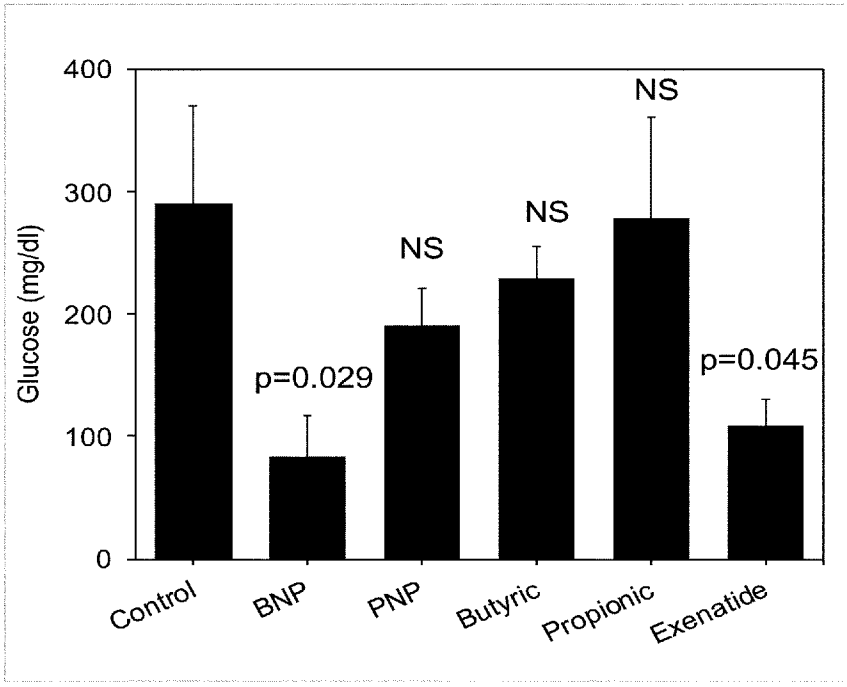
[図 23]


Sample consumption
Volume consumption /mouse (mL)
Day
Healthy
Tumor
PNP
BNP
Propionic acid
Butyric acid
Body weight
Body weight (g)
Day
Healthy
Tumor
PNP
BNP
Propionic acid
Butyric acid

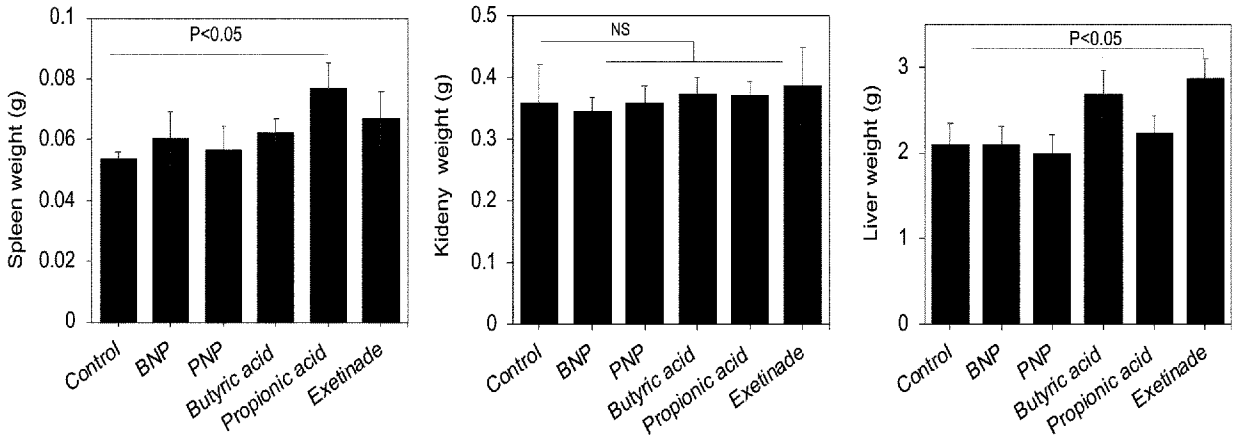
[図 24]


Volume consumption (mL/mouse)
Day
Control
BNP
PNP
Butyric acid
Propionic acid
Exetinade
Body weight (g)
Glucose tolerance test
(O/N fasting)
Day
Control
BNP
PNP
Butyric acid
Propionic acid
Exetinade

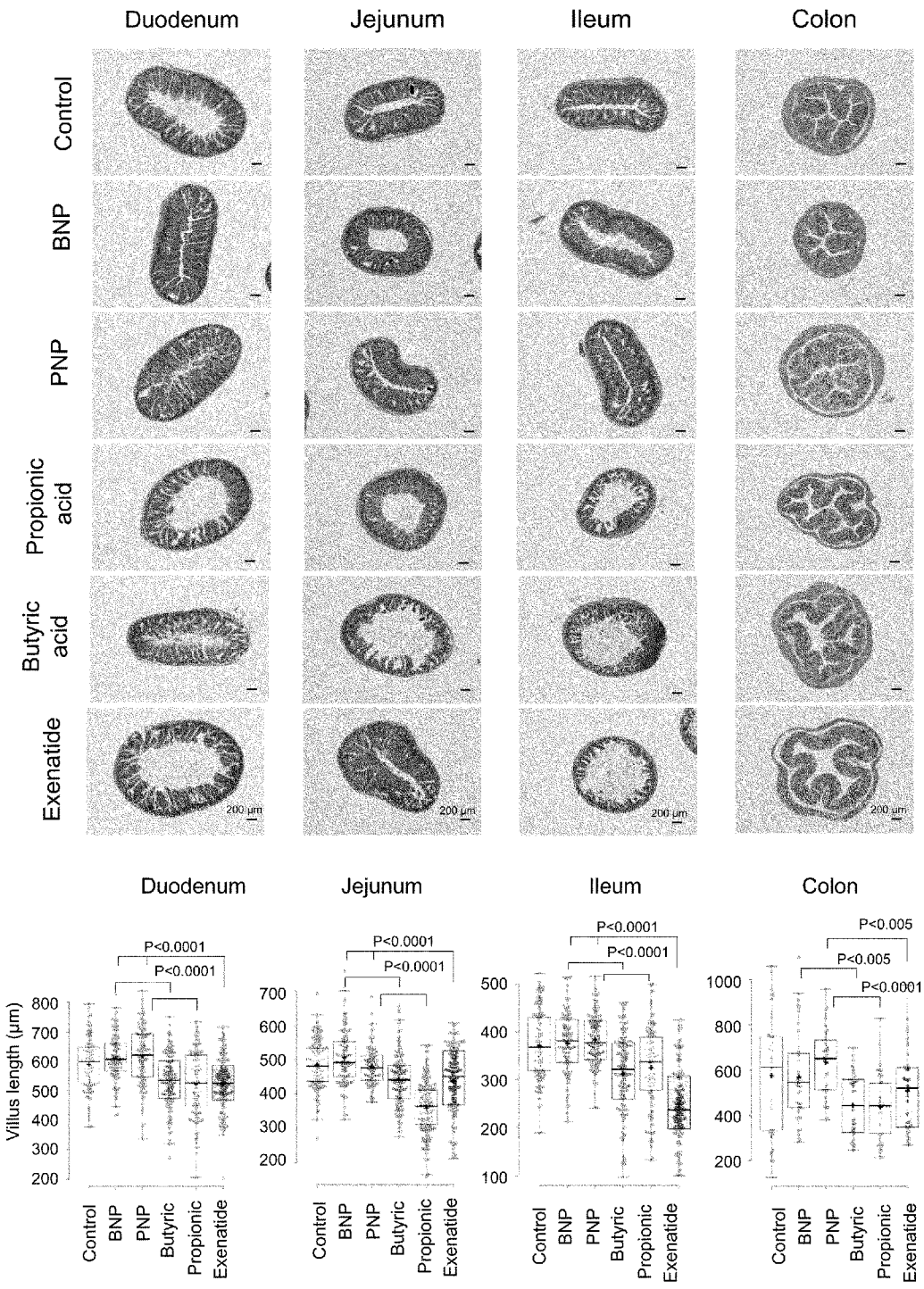
[図25]


Glucose (mg/dl)
400
300
200
100
0
NS
NS
NS
p=0.029
p=0.045
Control
BNP
PNP
Butyric
Propionic
Exenatide

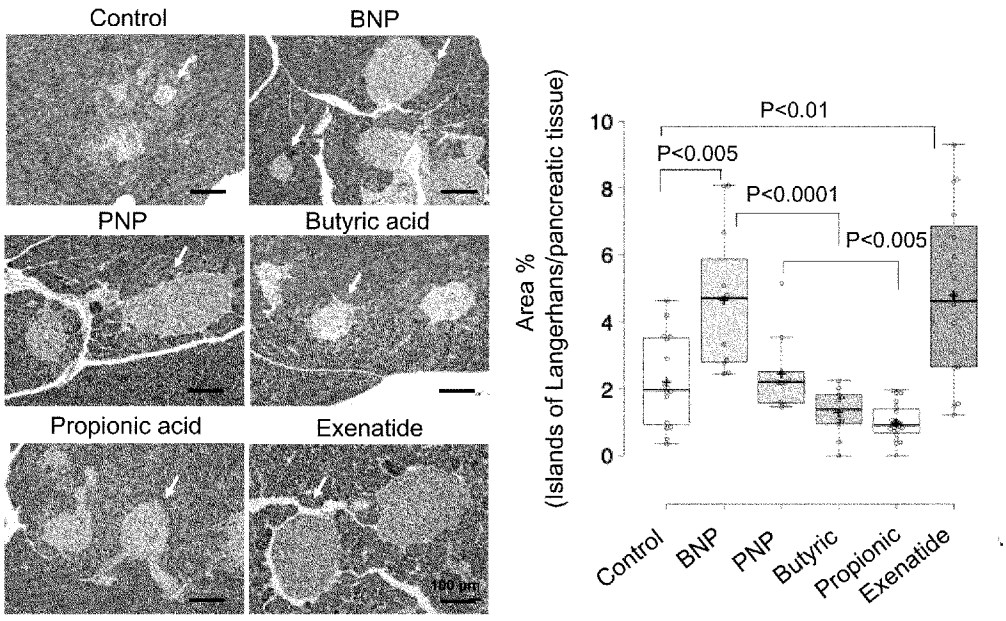
[図26]


Spleen weight (g)
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
P<0.05
Control
BNP
PNP
Butyric acid
Propionic acid
Exetinade
Kideny weight (g)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
NS
Control
BNP
PNP
Butyric acid
Propionic acid
Exetinade
Liver weight (g)
3
2
1
0
P<0.05
Control
BNP
PNP
Butyric acid
Propionic acid
Exetinade

[図27]

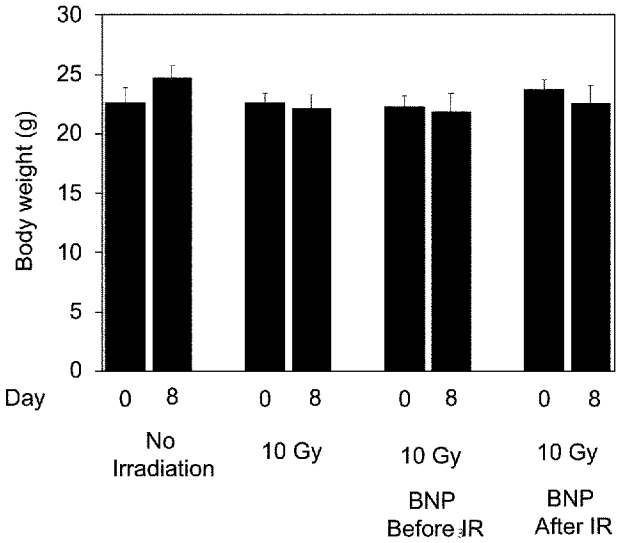

Duodenum
Jejunum
Ileum
Colon
Control
BNP
PNP
Propionic acid
Butyric acid
Exenatide
200 μm
Villus length (μm)
P<0.0001
P<0.005
Control
BNP
PNP
Butyric
Propionic
Exenatide

[図28]

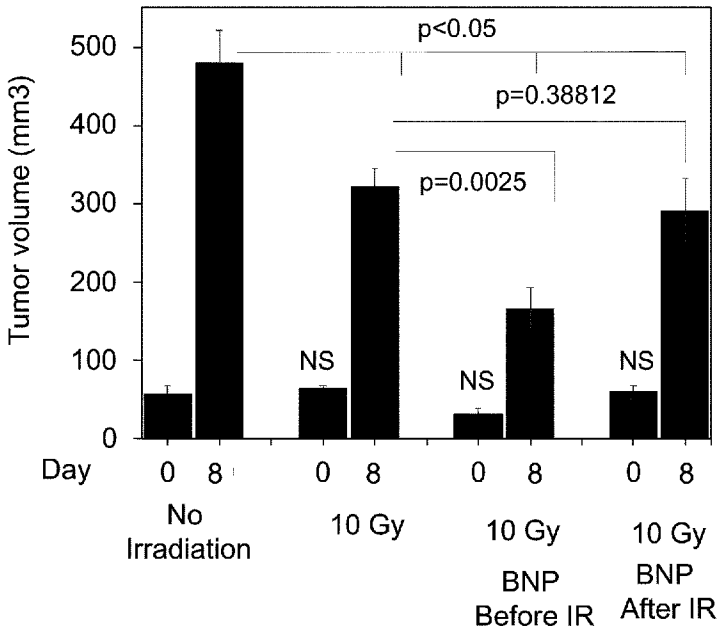


Arrows indicate island of langerhans

[図29]

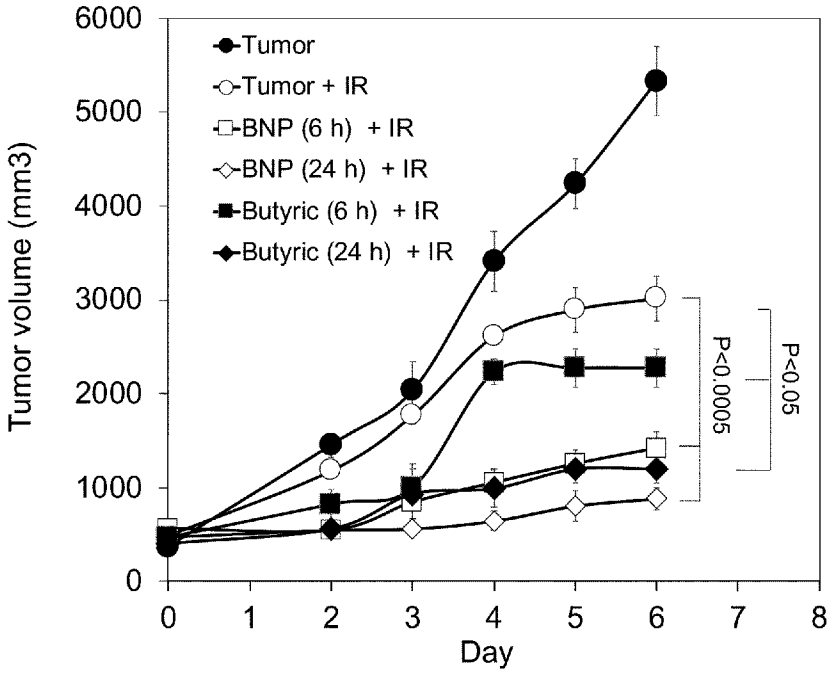


[図30]

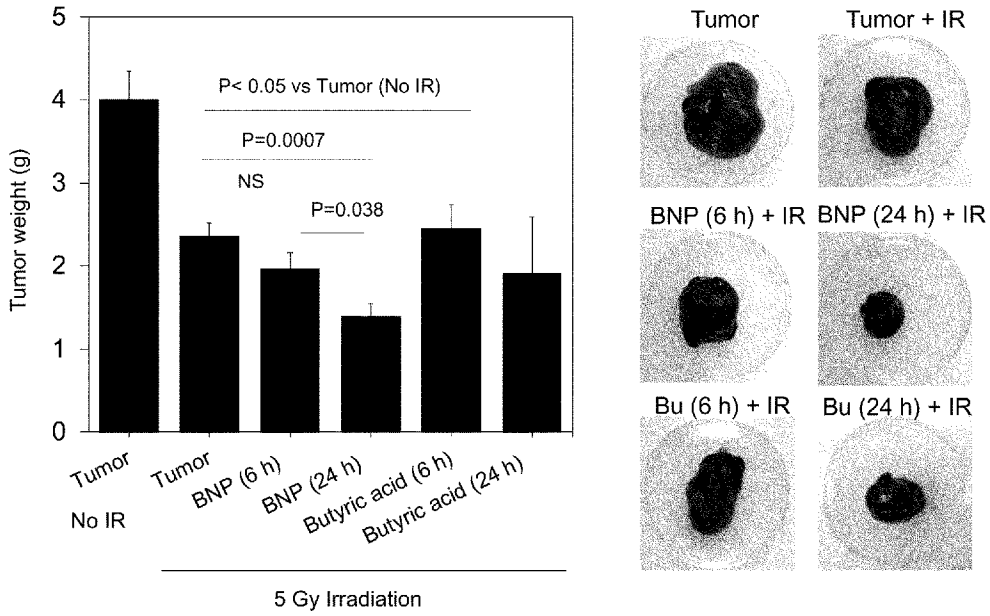


NS: non-significant vs no irradiation at day 0

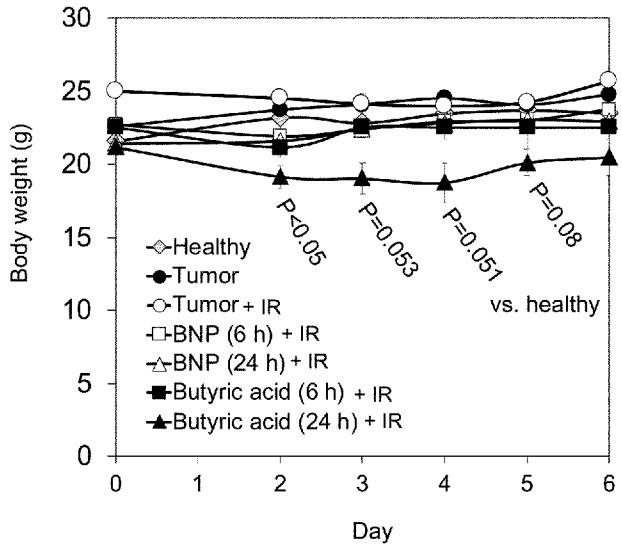
[図31]



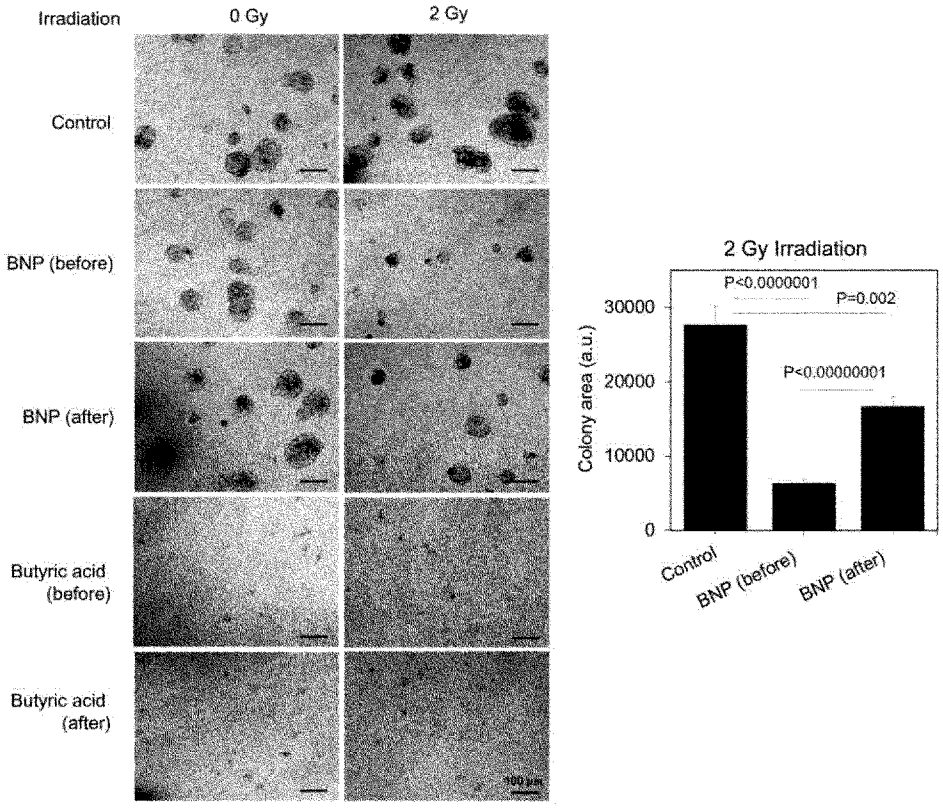
[図32]


Tumor weight (g)
P< 0.05 vs Tumor (No IR)
P=0.0007
NS
P=0.038
Tumor
No IR
Tumor
BNP (6 h)
BNP (24 h)
Butyric acid (6 h)
Butyric acid (24 h)
5 Gy Irradiation
Tumor
Tumor + IR
BNP (6 h) + IR
BNP (24 h) + IR
Bu (6 h) + IR
Bu (24 h) + IR

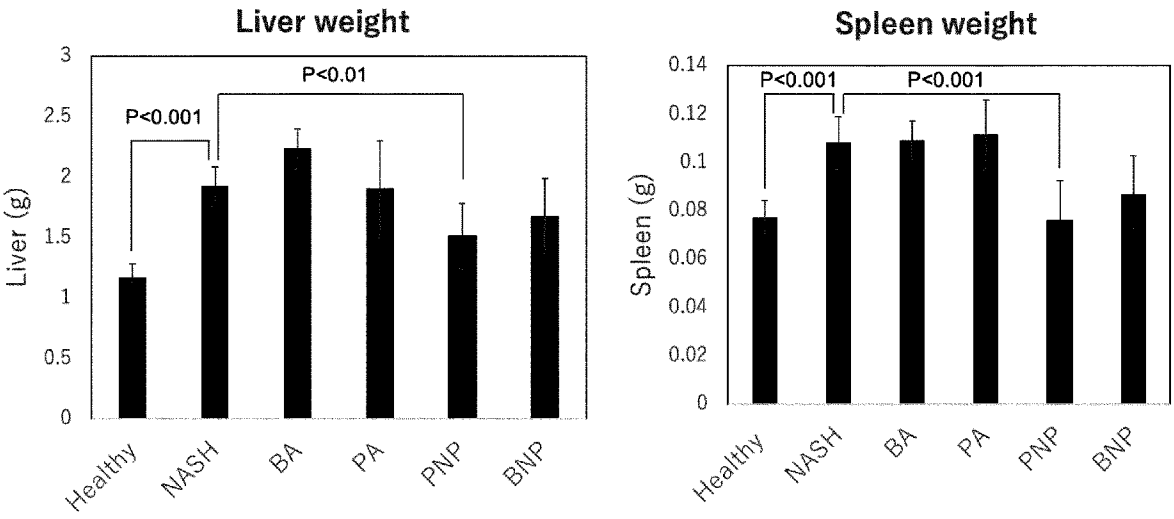
[図33]


Body weight (g)
P<0.05
P=0.053
P=0.051
P=0.08
Healthy
Tumor
Tumor + IR
BNP (6 h) + IR
BNP (24 h) + IR
Butyric acid (6 h) + IR
Butyric acid (24 h) + IR
vs. healthy
Day

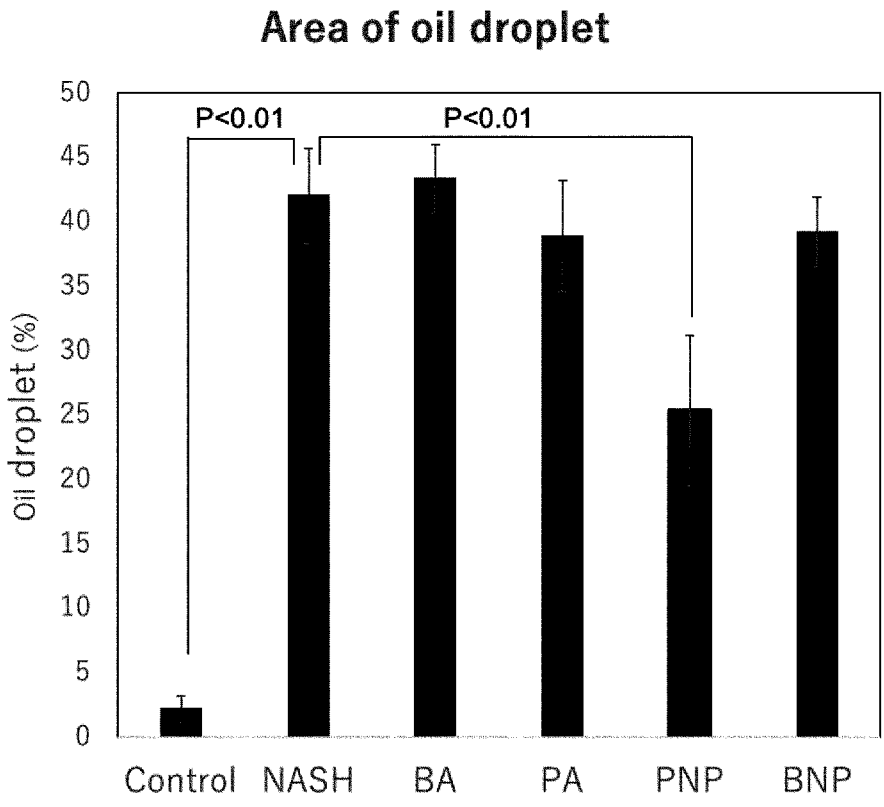
[図34]


Irradiation
0 Gy
2 Gy
Control
BNP (before)
BNP (after)
Butyric acid (before)
Butyric acid (after)
100 μm
2 Gy Irradiation
P<0.0000001
P=0.002
P<0.00000001
Colony area (a.u.)
30000
20000
10000
0
Control
BNP (before)
BNP (after)

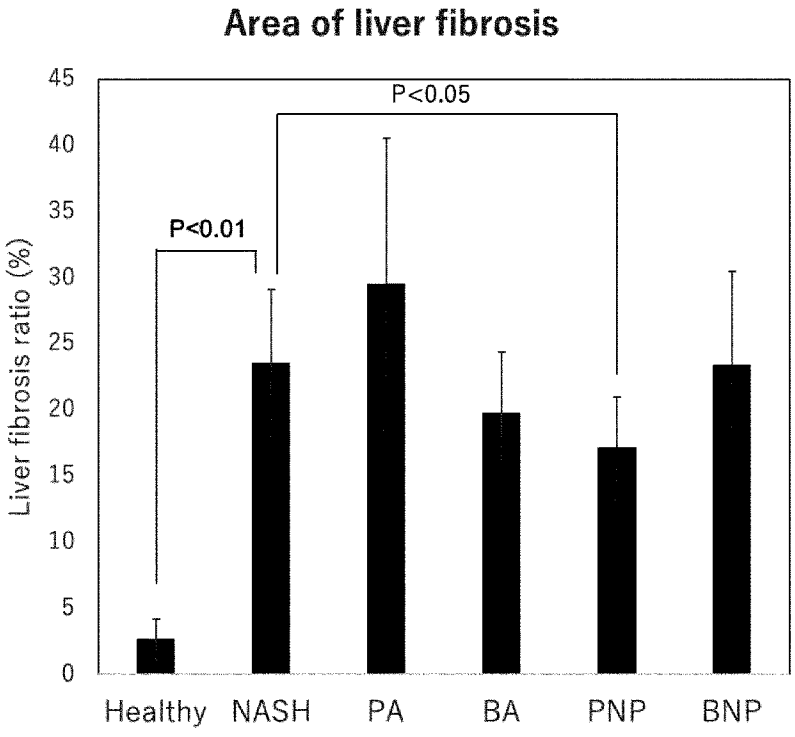
[図35]


Liver weight
P<0.001
P<0.01
Liver (g)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Healthy
NASH
BA
PA
PNP
BNP
Spleen weight
P<0.001
P<0.001
Spleen (g)
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
Healthy
NASH
BA
PA
PNP
BNP

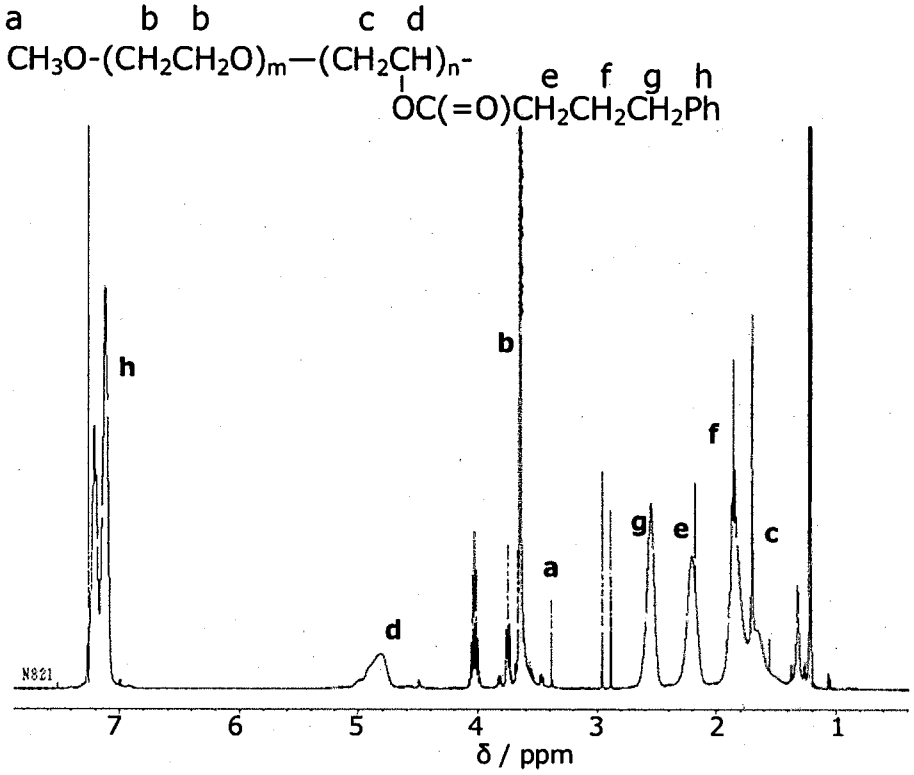
[図36]


Area of oil droplet
P<0.01
P<0.01
Oil droplet (%)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Control
NASH
BA
PA
PNP
BNP

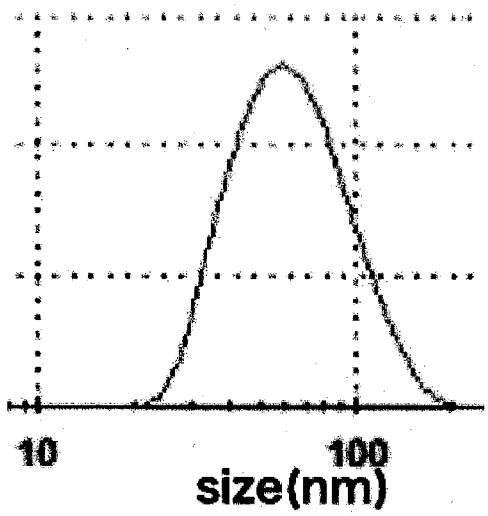
[図37]


Area of liver fibrosis
P<0.05
P<0.01
Liver fibrosis ratio (%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Healthy
NASH
PA
BA
PNP
BNP

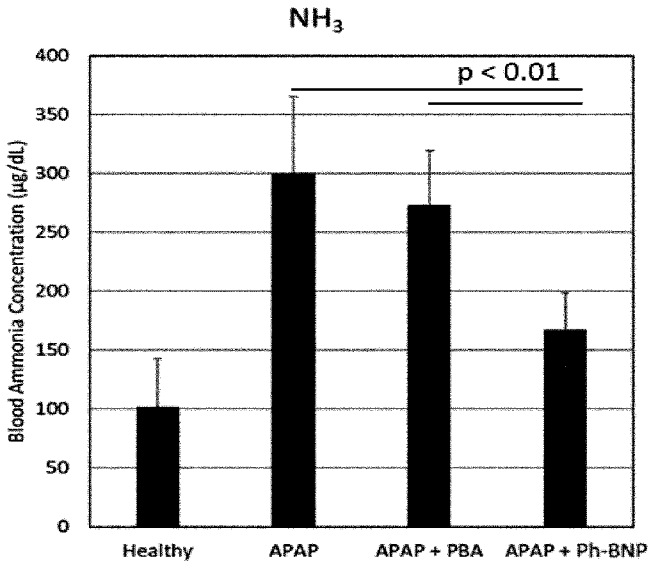
[図 38]

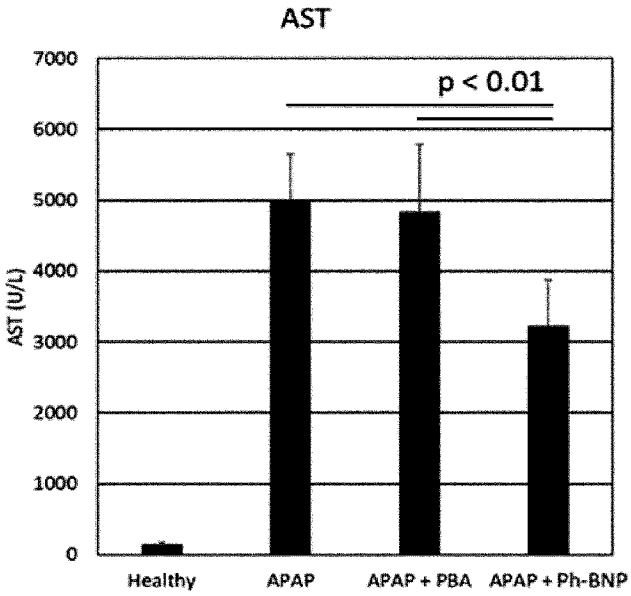

a b b c d
CH3O-(CH2CH2O)m—(CH2CH)n-
e f g h
OC(=O)CH2CH2CH2Ph
h
b
f
g
e
c
a
d
N821
7
6
5
4
3
2
1
δ / ppm

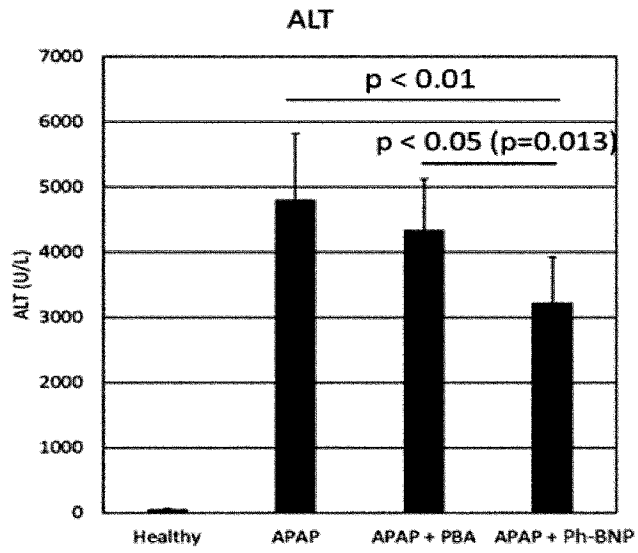
[図 39]


10
100
size(nm)

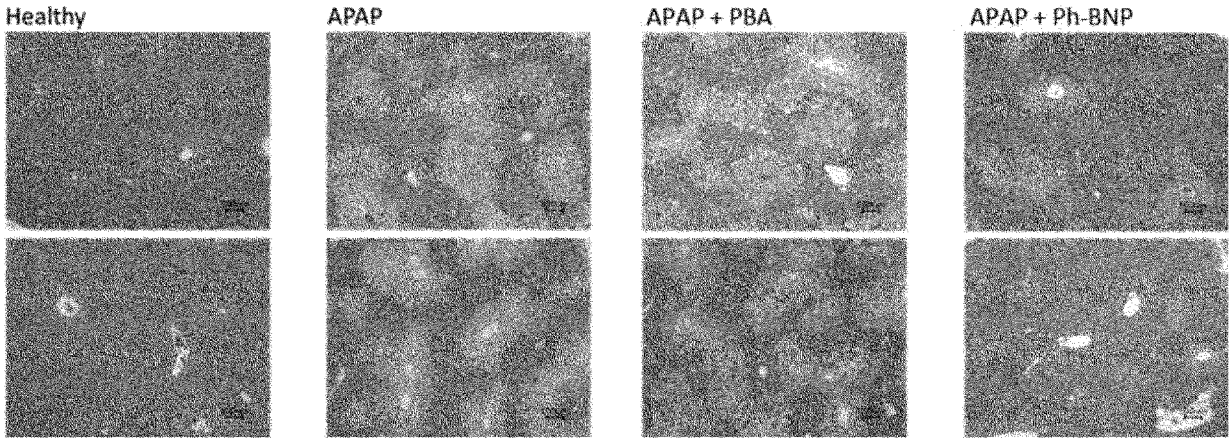
[図40]


NH3
p < 0.01
Blood Ammonia Concentration (μg/dL)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Healthy
APAP
APAP + PBA
APAP + Ph-BNP

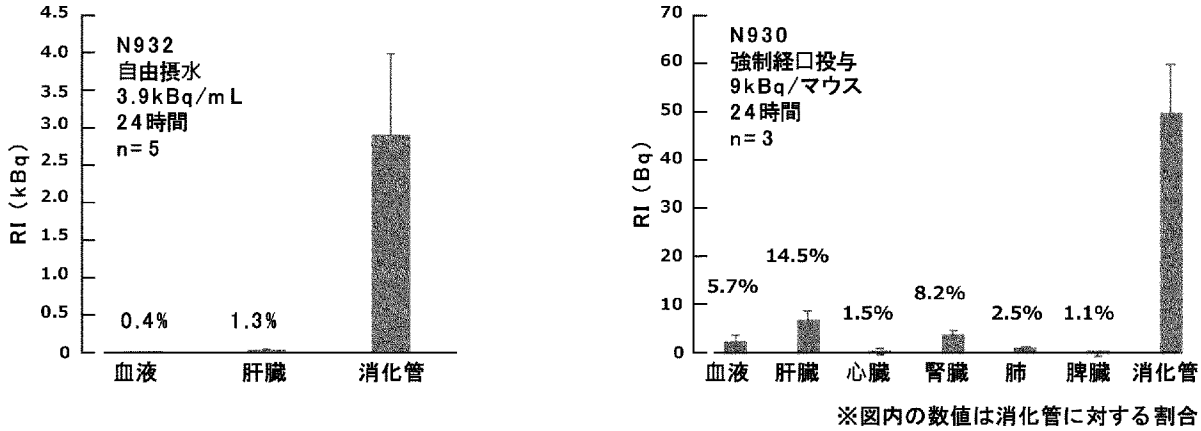

AST
p < 0.01
AST (U/L)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Healthy
APAP
APAP + PBA
APAP + Ph-BNP


ALT
p < 0.01
p < 0.05 (p=0.013)
ALT (U/L)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Healthy
APAP
APAP + PBA
APAP + Ph-BNP

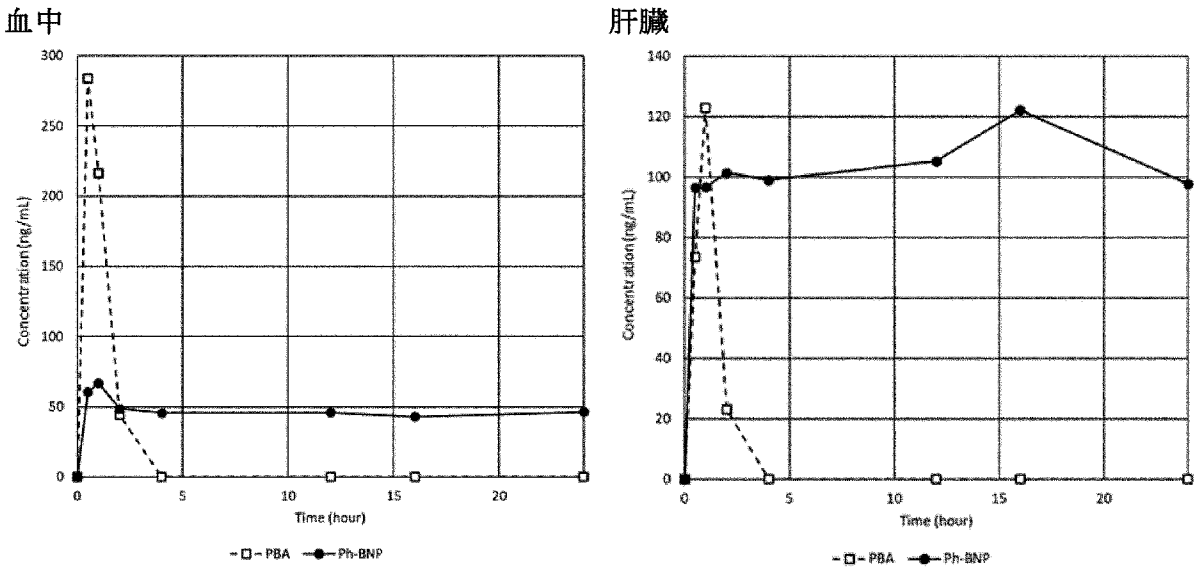
[図41]


Healthy
APAP
APAP + PBA
APAP + Ph-BNP

[図42]


N932
自由摂水
3.9kBq/mL
24時間
n=5
RI（kBq）
0.4%
1.3%
血液
肝臓
消化管
N930
強制経口投与
9kBq/マウス
24時間
n=3
RI（Bq）
5.7%
14.5%
1.5%
8.2%
2.5%
1.1%
血液
肝臓
心臓
腎臓
肺
脾臓
消化管
※図内の数値は消化管に対する割合

[図43]


血中
肝臓
Concentration(ng/mL)
Time (hour)
PBA
Ph-BNP

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/029239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
K61P 1/04(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 3/04(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C08F 8/14(2006.01)i; C08F 290/06(2006.01)i; C08C 65/334(2006.01)i; C08F 293/00(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 31/19(2006.01)i
FI: C08F293/00; C08C65/334; A61K31/19; A61P1/04; A61P3/04; A61P1/16; A61P35/00; C08F290/06; C08F8/14; A61K47/60

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)
A61P1/04; A61P1/16; A61P3/04; A61P35/00; C08FS/14; C08F290/06; C08G65/334; C08F293/00; A61K47/60; A61K31/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
A61P1/04; A61P1/16; A61P3/04; A61P35/00; C08FS/14; C08F290/06; C08G65/334; C08F293/00; A61K47/60; A61K31/19

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 6-16752 A (HUELS AKTIENGESELLSCHAFT) 25.01.1994 (1994-01-25) claims, paragraphs [0029]-[0052]	1-4,7 5,6,8-10
X A	JP 6-16747 A (KURARAY CO., LTD.) 25.01.1994 (1994-01-25) claims, paragraphs [0012], [0016]-[0027], [0048]-[0068]	1-4,7 5,6,8-10
X A	JP 2007-185494 A (CORDIS CORPORATION) 26.07.2007 (2007-07-26) claims	1,2,4,7 3,5,6,8-10
A	WO 2018/135592 A1 (UNIVERSITY OF TSUKUBA) 26.07.2018 (2018-07-26)	1-10
A	JP 2019-1786 A (UNIVERSITY OF TSUKUBA) 10.01.2019 (2019-01-10)	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 October 2020 (02.10.2020)	20 October 2020 (20.10.2020)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/029239

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 2019/208017 A1 (UNIVERSITY OF TSUKUBA, ASAHIKAWA MEDICAL UNIVERSITY) 31.10.2019 (2019-10-31)	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/029239

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 6-16752 A	25 Jan. 1994	US 5385971 A claims, column 5, line 7 to column 8, line 24 US 5516836 A EP 565825 A1 DE 4212768 A1 FI 931635 A	
JP 6-16747 A	25 Jan. 1994	(Family: none)	
JP 2007-185494 A	26 Jul. 2007	US 2007/0122443 A1 claims EP 1790702 A1 CA 2569162 A CA 2569162 A1	
WO 2018/135592 A1	26 Jul. 2018	US 2019/0345293 A1 EP 3572443 A1	
JP 2019-1786 A	10 Jan. 2019	(Family: none)	
WO 2019/208617 A1	31 Oct. 2019	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/029239

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61P 1/04(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 3/04(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C08F 8/14(2006.01)i; C08F 290/06(2006.01)i; C08G 65/334(2006.01)i; C08F 293/00(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 31/19(2006.01)i
FI: C08F293/00; C08G65/334; A61K31/19; A61P1/04; A61P3/04; A61P1/16; A61P35/00; C08F290/06; C08F8/14; A61K47/60

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61P1/04; A61P1/16; A61P3/04; A61P35/00; C08F8/14; C08F290/06; C08G65/334; C08F293/00; A61K47/60; A61K31/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 6-16752 A (ヒユールス アクチエンゲゼルシヤフト) 25.01.1994 (1994-01-25) 特許請求の範囲, [0029]-[0052]	1-4,7
A		5,6,8-10
X	JP 6-16747 A (株式会社クラレ) 25.01.1994 (1994-01-25) 特許請求の範囲, [0012],[0016]-[0027],[0048]-[0068]	1-4,7
A		5,6,8-10
X	JP 2007-185494 A (コーディス・コーポレイション) 26.07.2007 (2007-07-26) 特許請求の範囲	1,2,4,7
A		3,5,6,8-10
A	WO 2018/135592 A1 (国立大学法人筑波大学) 26.07.2018 (2018-07-26)	1-10
A	JP 2019-1786 A (国立大学法人 筑波大学) 10.01.2019 (2019-01-10)	1-10

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
02.10.2020	20.10.2020

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

権限のある職員（特許庁審査官）
内田　靖恵 4J 9553
電話番号 03-3581-1101 内線 3457

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/029239

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
P, A	WO 2019/208617 A1 (国立大学法人筑波大学, 国立大学法人旭川医科大学) 31.10.2019 (2019-10-31)	1-10

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/029239

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 6-16752 A	25.01.1994	US 5385971 A 特許請求の範囲，第5欄第7行－第8欄第24行 US 5516836 A EP 565825 A1 DE 4212768 A1 FI 931635 A	
JP 6-16747 A	25.01.1994	（ファミリーなし）	
JP 2007-185494 A	26.07.2007	US 2007/0122443 A1 特許請求の範囲 EP 1790702 A1 CA 2569162 A CA 2569162 A1	
WO 2018/135592 A1	26.07.2018	US 2019/0345293 A1 EP 3572443 A1	
JP 2019-1786 A	10.01.2019	（ファミリーなし）	
WO 2019/208617 A1	31.10.2019	（ファミリーなし）	