

(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2011-526608

(P2011-526608A)

(43) 公表日 平成23年10月13日(2011.10.13)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/737 (2006.01)	A 6 1 K 31/737	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/727 (2006.01)	A 6 1 K 31/727	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁)

(21) 出願番号	特願2011-515493 (P2011-515493)	(71) 出願人	511002917
(86) (22) 出願日	平成21年6月30日 (2009. 6. 30)		ラボラトリオス ファルマセウティコス
(85) 翻訳文提出日	平成23年2月24日 (2011. 2. 24)		ロビ, ソシエダッド アノニマ
(86) 国際出願番号	PCT/ES2009/070264		スペイン国, エー28037 マドリッド
(87) 国際公開番号	W02010/000904		, セ/ジュリアン カマリロ, 35
(87) 国際公開日	平成22年1月7日 (2010. 1. 7)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	P200802002		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成20年7月1日 (2008. 7. 1)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100108903
			弁理士 中村 和広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリコサミノグリカンを含む医薬組成物及び慢性潰瘍の処理へのその使用

(57) 【要約】

本発明は、糖尿病性足部潰瘍の処理のためのグリコサミノグリカンの組成物に関し、特に、慢性潰瘍、特に糖尿病性足部潰瘍の処理における、及びより特定には、慢性潰瘍、及び特に糖尿病性足部潰瘍及び圧迫潰瘍の処理のための医薬製品の製造における低分子量ヘパリン (LMWH) 及び非常に低い分子量のヘパリン (VLMWH) に関する。

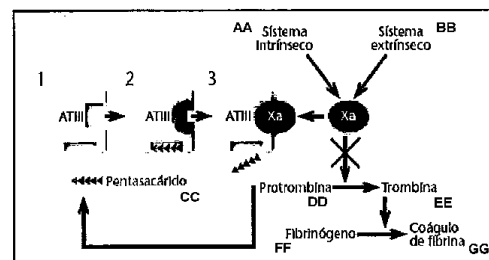


FIGURA 1

AA... Intrinsic System
BB... Extrinsic System
CC... Pentasaccharide
DD... Prothrombin

EE... Thrombin
FF... Fibrinogen
GG... Fibrin coagulum

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

医薬的に許容できる媒体に、少なくとも次の単糖類：

a) N - スルホ - D - グルコサミン：25 - 50 %

b) D - グルクロン酸：3 - 25 %

(% は、組成物中の単糖類の合計 % に基づかれる) を含んで成る、慢性潰瘍の処理のためのグリコサミノグリカンの医薬組成物であって、N - スルホ - 3 - スルホ - D - グルコサミンに結合される二糖単位D - グルクロン酸の割合が、20 % 以下であることを特徴とする組成物。

【請求項 2】

N - スルホ - 3 - スルホ - D - グルコサミンに結合される二糖単位D - グルクロン酸の割合が、組成物中の単糖類の合計 % に基づいて、10 % 以下であることを特徴とする、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

N - スルホ - 3 - スルホ - D - グルコサミンに結合される二糖単位D - グルクロン酸の割合が、組成物中の単糖類の合計 % に基づいて、5 % 以下であることを特徴とする、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】

組成物中の単糖類の合計 % に基づいて、10 % までの割合のN - アセチル - D - グルコサミンをさらに含んで成ることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 5】

組成物中の単糖類の合計 % に基づいて、35 % までの割合のL - イズロン酸をさらに含んで成ることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 6】

前記L - イズロン酸の割合が、組成物中の単糖類の合計 % に基づいて、10 % までであることを特徴とする、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 7】

組成物の単糖類の合計 % に基づいて、50 % までの割合で 2 - 硫酸化されたL - イズロン酸をさらに含んで成ることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 8】

前記 2 - 硫酸化されたL - イズロン酸の割合が、組成物中の単糖類の合計 % に基づいて、15 ~ 50 % の範囲で存在することを特徴とする、請求項 7 記載の組成物。

【請求項 9】

低分子量ヘパリンを含んで成ることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 10】

前記低分子量ヘパリンが、8,000ダルトン以下の平均分子量を有するヘパリンであることを特徴とする、請求項 9 記載の組成物。

【請求項 11】

非常に低い分子量のヘパリンを含んで成ることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 12】

非分別ヘパリンを含んで成ることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 13】

慢性潰瘍の処理のための医薬製品の製造への請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の組成物の使用。

【請求項 14】

前記慢性潰瘍が、糖尿病性足部潰瘍である、請求項 13 記載の使用。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記慢性潰瘍が、圧迫潰瘍である、請求項13記載の使用。

【請求項16】

前記組成物が低分子量ヘパリンを含んで成り、そして血漿半減期：言及されるヘパリンのIUにおける用量の比が1：800～1：5000であることを特徴とする、請求項13～15のいずれか1項記載の使用。

【請求項17】

前記組成物が5.2～5.4時間の血漿半減期を有する低分子量ヘパリンを含んで成り、そして血漿半減期：言及されるヘパリンのIUにおける用量の比が1：900～1：1200であることを特徴とする、請求項13～15のいずれか1項記載の使用。

【請求項18】

前記組成物が4.0～4.4時間の血漿半減期を有する低分子量ヘパリンを含んで成り、そして血漿半減期：言及される低分子量ヘパリンのIUにおける用量の比が1：1000～1：2500であることを特徴とする、請求項13～15のいずれか1項記載の使用。

【請求項19】

血漿半減期：言及される低分子量ヘパリンのIUにおける用量の比が約1：2000であることを特徴とする、請求項18記載の使用。

【請求項20】

前記低分子量ヘパリンが、静脈内経路により投与される、請求項13～19のいずれか1項記載の使用。

【請求項21】

前記低分子量ヘパリンが、皮下経路により投与される、請求項13～19のいずれか1項記載の使用。

【請求項22】

前記低分子量ヘパリンが、経口経路により投与される、請求項13～19のいずれか1項記載の使用。

【請求項23】

前記低分子量ヘパリンが、局部経路により投与される、請求項13～19のいずれか1項記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、慢性潰瘍、特に糖尿病性足部潰瘍及び圧迫潰瘍の処理のためのグリコサミノグリカンの組成物に関する。それは、より特定には、慢性潰瘍の処理における、及びより特定には、慢性潰瘍の処理のための医薬製品の製造における低分子量ヘパリン（LMWH）及び非常に低い分子量のヘパリン（VIMWH）の組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

真性糖尿病（DM）は、末梢ニューロパシー、及びマクロ及び微小血管合併症の開始に寄与する、血漿グルコースレベルの持続した上昇により特徴づけられる代謝疾患である。世界保健機構（WHO）により公開されるデータによれば、DMの発生率は驚くべき態様で上昇しており、2000年の世界人口において2.8%であり、そして2030年には、この数値は4.4%に上昇することが推定される。従って、DMの患者数は2000年には約1億7100万であり、そして2030年には、この数は3億6600万に上昇することが推定される。

【0003】

DMの発生率のこの上昇は、他の要因の中で、年齢と疾病の流行との間の直接的関係が存在するので、一般的な高齢化社会的に関連している。従って、スペインにおけるDMの普及率は2%～6%であり；10%はタイプ1のDMに対応し、タイプ2のDMを有する患者の50%は診断されていない。スペインの異なった地域でのDMの流行の公開された研究は2000年より前であり、そして発生率の上昇の傾向を考慮すると、スペインにおいては現在、2500万人の糖尿病患者が存在することが推定される。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

末梢及び自立神経系の両者の神経学的損傷はたぶん、DMの最も共通する合併症を提供する。それは両タイプのDM上に発生し、そしてその流行及び重症性は、糖尿病の進行の年数及び血糖調節の度合いに関係している。この合併症はDM患者の60%に影響を及ぼし、糖尿病患者の足部における潰瘍の開始の主要原因であることが推定される。この系統においては、その60回目の科学セッションにおけるアメリカ糖尿病協会は、DMを有する患者の15%が足部潰瘍を彼らの生涯を通して進行し、そして足部潰瘍は、糖尿病患者において発生する入院の6%の原因であることを推定した。糖尿病を有する患者において発生するすべての潰瘍の15%は切断に終わり、DMに関連する合併症は非外傷性切断(40 - 70%)の主要原因であり、糖尿病患者に発生する切断の85%は足部潰瘍に関係している。

10

【 0 0 0 5 】

アメリカ合衆国においては、100,000人の切断が毎年実施されており、これは相当にヘルスケア費用に影響を及ぼし、2001年においては、潰瘍及び切断は、USにおいては、10億ドルのおおよそその費用を有し、そしてこの費用はUKにおいては4億5000万ドルであることが計算されている。糖尿病性足部潰瘍に由来するそれらの費用は、切断が存在する否かに依存して、大きく異なり、そして従って、1990年にスイスにおいて行われた研究においては、回復し、そして虚血性成分を有さないそれらの潰瘍の場合、関連する費用は16,500ドルであったことが観察された。対照的に、マイナーな切断が必要とされる場合、その費用は27,000ドルに達し、主要切断が発生する場合、63,000ドルに達する。

20

【 0 0 0 6 】

脈管学及び脈管外科学についてのスペイン社会のGrupo de Consenso sobre Pie Diabetico (糖尿病性足に対するコンセンサスグループ)により提供される糖尿病性足の定義は、“虚血の同時存在を伴って又は伴わないで、及び外傷性トリガーの後、足部病巣及び/又は潰瘍形成が発生する、持続した高血糖により誘発されるニューロパシー性病因に基づく臨床学的変更”である。

【 0 0 0 7 】

足部潰瘍形成は、疾病、例えば糖尿病の有意な合併症であり、その毎年の発生率はわずかに2%以上である(Abbott C.A., et al. (2002) The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. Diabet. Med. 19(5):377-84)。糖尿病を有する患者の15%が彼らの生涯のある時期に潰瘍を進行し(Reiber G. E. (1996) The epidemiology of diabetic foot problems. Diabet. Med. 13 Suppl 1:S6-11)、そして潰瘍を有するそれらの約10~30%が手足の切断を伴って進行する(Lipsky B.A. (2004) Medical treatment of diabetic foot infections. Clin. Infect Dis. 39 Suppl 2:S104-14)ことが推定される。さらに、これは、潰瘍が出現する下肢に虚血が存在する場合、複雑化され、ほとんどの場合、血栓症の高い発生率のために不十分な血液供給のために発生する。

30

【 0 0 0 8 】

下肢の切断を受けた患者の5年の死亡率に関しては、それは50~60%である(Reiber G. E. (1996) The epidemiology of diabetic foot problems. Diabet. Med. 13 Suppl 1: S6-11)。糖尿病性足を有する患者の処理のための種々の方法、例えば厳格な代謝制御、改良できる危険因子の予防、壊死組織切除、包帯剤の使用、感染の抗菌処理、病巣部分の圧力の排除、皮膚移植片の使用、成長因子の投与及び微候が存在する場合、血管再生方法の使用が用いられて来た。

40

【 0 0 0 9 】

ほとんどの場合、このタイプの慢性潰瘍の処理は、局所経路により実施され、例えば潰瘍、例えば糖尿病性足部潰瘍における包帯剤の使用は通常である。調節された臨床試験において研究された新規タイプの包帯剤は、半透性ポリマー膜、Promogran(コラーゲンマトリックス)、アルギネート、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸及び減圧に基づく包帯剤を包含する(Eldor R. et al. (2004) New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment

50

strategies. Diabet. Med. 21(11):1161- 73)。

【 0 0 1 0 】

潰瘍性病巣上に配置される皮膚置換体を創造するための方法がまた開発されて来た。Dermagraft (商標) は、より少ない時間で高い治療割合を伴って、低グレード潰瘍において効果的であることがわかっている生物吸収性材料の合成骨格上にヒト皮膚線維芽細胞を播種することにより生成される (Marston W.A., et al. (2003) Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group. The efficacy and safety of Dermagraft (商標) in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. Diabetes Care 26:1701-5)。Apligraf (商標) は、ウシタイプIコラーゲンマトリックスにおいてヒト線維芽細胞から形成される皮膚層、及びヒト角質細胞から形成される皮膚層から成る。

10

【 0 0 1 1 】

同様に、この皮膚置換体は、それが低グレード及び非感染性ニューロパシー性潰瘍に適用される場合、病巣の高く且つ早い治療と有意に関連されることがわかっている (Veves A., et al (2001) Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. Diabetes Care 24:290-5)。

【 0 0 1 2 】

第III期のランダム化された二重盲目ブラシーボ - 調節された臨床試験において、ゲル形での血小板由来の成長因子 (PDGF) は、良好な血液還流を有するニューロパシー性潰瘍を有する糖尿病患者の処理のための効果的且つ安全であることを証明した (Wieman T.J., et al. (1998) Clinical efficacy of beclapernin (rh PDGF-BB) gel. Diabetes Care 21 (5):822-7)。ほとんどの患者 (95%) は、この研究において、地物測定による評価によれば、10cm²以下の面積を有する潰瘍を有した。ブラシーボに比較して、100 µg/gのベカプレルミンゲルは、完全な病巣閉鎖比を43%、有意に高め (50対35%、p = 0.007)、そして前記効果を達成する時間を32%低めた (86対127日、p = 0.013)。

20

【 0 0 1 3 】

PDGF又はベカプレルミン (Regranex (商標)) による満足する結果は、皮下組織又はより深く拡張し、そして適切な血流を有する糖尿病患者の下肢におけるニューロパシー性潰瘍の処理のための彼らの承認を導いた (Brem H., Sheehan P., Boulton A.J. (2004) Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. Am. J. Surg. 187(5A): 1 S-1 OS)。しかしながら、数ヶ月五糖尿病性手足及び足潰瘍上にJohnson & Johnsonの局部成長因子Regranex (商標) を直接的に適用した、糖尿病患者における癌のより高い危険性を示した研究のデータの再考の後、FDAは安全生の再考を開始し、従ってこの治療手段は現在、再考下にあり、そしていずれかのタイプの腫瘍を有する素因を有する患者に限定されて来た。

30

【 0 0 1 4 】

局部非経口路による処理に関して、治療剤、例えば皮膚細胞成長因子 (EGF) を投与するための方法は、数年前、公開されており、この方法は、数回の注入による病巣中への生分子の溶液の侵入から成る (WO03053458号)。この処理は、糖尿病性足の切断を防ぐために効果的であることをわかっているが、しかし病巣中への注入剤の適用は非常に苦痛であり、そして数回の注入剤が個々の処理において数週間、適用されるべきであるので、患者のためにはトラウマ的である欠点を有する。また、EP1499317号は、ナトリウム - 水素交換体タイプ 1 (NHE-1) インヒビターにより糖尿病性合併症、例えば糖尿病性足を処理するための方法を開示し、そして国際公開WO02077155号は、角質細胞成長因子 (KGF-2) が病巣の治療を促進するか又は早めのことを記載している。

40

【 0 0 1 5 】

最終的に、国際公開WO2007087759号は、慢性皮膚状態、例えば糖尿病性足潰瘍を有する患者のための非経口投与のための皮膚細胞成長因子を有する微小球体を含む医薬組成物を言及している。多くの他の患者は、治療範囲を促進するための他の方法に集中して来た。しかしながら、それらの方法のどれも、広く効果的であることは証明されていない。

50

【 0 0 1 6 】

さらに、いくつかの研究は、血管微小循環を改良することができる既知抗血栓剤及び炎症剤である低分子量ヘパリン（LMWH）により処理される糖尿病性足患者についての一定の有望な結果を開示する非特許文献に公開されている。“Effect of Dalteparin of healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease”, Diabetes Care, vol. 26(9), September 2003、及び“Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers”, Thrombosis Research. 120, 653-661, 2007と称するM. Kalani, A. などの同じグループの出版物において、低分子量ヘパリン（LMWH）、例えばグルテパリンが末梢動脈閉塞性疾患を有する患者における糖尿病性足潰瘍の進行を改良することを示す臨床学的試験が記載されている。

10

【 0 0 1 7 】

しかしながら、それらの文献においては、患者がアセチルサリチル酸により一緒に処理されていることは衝撃的であり、すなわち抗凝集効果を有する2種の活性成分の結合が末梢動脈閉塞性患者を有する患者における糖尿病性足潰瘍の進行を共同でいかにして好むかが提案されている。“Low molecular weight heparin seem to improve local capillary circulation and healing of chronic foot ulcers in diabetic patients”, VASA, Brand 22, 1993, FET 2は、糖尿病性足潰瘍を有する患者におけるダルテパリンの効果を評価するための二重盲目、プラシーボ調節された臨床試験をまた開示する。

20

【 0 0 1 8 】

この研究の予備結果は、ダルテパリンが常に予防用量においてではあるが、すなわちいかなる時も、使用される2500IU/日よりも高いデルテパリンの用量ではあるが、より高い用量での処理の間、出血が、糖尿病性足潰瘍を有する患者の場合、高い効果を包含することの上昇を伴わないで、予測されるので、このタイプの創傷の予防に対して有益な効果を有することを示唆しているように見える。これは、糖尿病患者が、前記疾病を有さない患者よりも高い出血危険性を有する、技術水準における一般的な信念のためである（Adverse impact of bleeding on prognosis in patients with acute coronary syndromes, Eikelboom JW et al. Circulation. 2006 Aug 22;114(8):774-82）。

【 0 0 1 9 】

発明の簡単な記載：

30

慢性潰瘍、特に糖尿病性足潰瘍の処理におけるグリコサミノグリカンの使用、及び特に、このためへのいくつかの低分子量ヘパリンの使用は、それらの低分子ヘパリンが抗-活性化因子X（Xa）及び抗-因子IIaの効果として表される、抗血栓及び抗凝集活性を有するので、重度の循環条件を有する患者について今日まで、おおまかに記載されて来た。しかしながら、それらは一般的に、より高い用量での処理に包含される出血危険性のために、末梢動脈閉塞性患者を伴わないでは、糖尿病性足潰瘍を有する糖尿病患者のために使用されない。

【 0 0 2 0 】

これは、抗血栓効果を表し、そして低分子量及び非常に低い分子量のヘパリンを形成する糖構造に存在する特定の五糖のヘパリノイド構造内で直接的な関係を有する、このタイプの化合物の抗-第Xa因子効果、及び抗-第Xa因子/抗-第IIa因子効果比率のためである。この比率は、全体構造における五糖の量が多いほど、抗-第Xa因子活性は高く、この合成五糖（ファンダパリヌクス）は最も選択的な第Xa因子インヒビター及び従って、選択的態様で最も高い抗血栓能力を有する分子であるので、決定される。

40

【 0 0 2 1 】

従って、フォンダパリヌクスの抗血栓活性は、抗トロピンIII（ATIII）により介在される、第Xa因子の選択的阻害の結果である。ATIIIへのその選択的結合のために、フォンダパリヌクスは、ATIIIによる第Xa因子の生得の中和を300倍、増強する。第Xa因子の中和は、血液凝固カスケードを中断し、そしてトロピン形成及び血栓進行を阻害する（図1を参照のこと）。

50

【 0 0 2 2 】

技術水準を考慮すれば、初めに、構造体中の多量の五糖が治療（非緩和）効果を得るために必要であると思われる。しかしながら、上記に示されたように、このアプローチは、より高い用量での処理に包含される出血危険性のために、実施されない。本発明の発明者は、五糖が少ない割合で存在するか、又は選択的態様で化学的にまたは酵素的に変更されるが、治療及び再生効果は、グルコサミノグリカンの構造において真に重要であるものは、五糖を含まない多糖鎖の割合であるので、影響されないことを示す管理をしたので、技術水準のこの偏見の克服を達成した。さらに、本発明の研究者は、慢性であると思われるいずれかのタイプの潰瘍（糖尿病性足潰瘍においてのみではない）において少ない量の五糖を有するグリコサミノグリカンの投与の有益な治療効果を、及び前記投与が次の3種の投与路：非経口、経口及び局部路により効果的であることを、実験的に決定することができた。

10

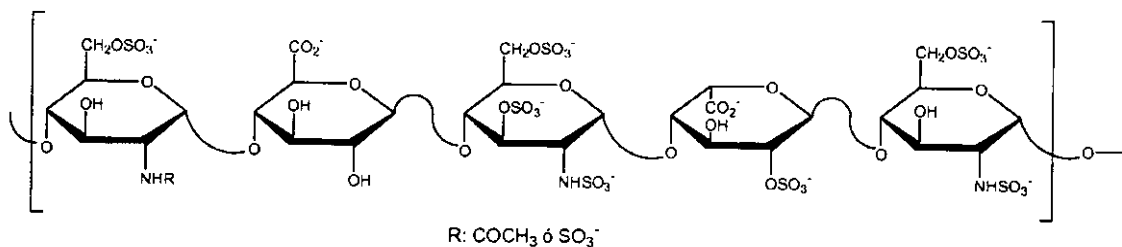
【 0 0 2 3 】

ヘパリン鎖内に、抗トロピンIIIと選択的に相互作用する五糖に対応する特定配列が存在する仮説が創造されたことは、Lindahl and Choay (Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sinag P and Fareed J. Ann NY Acad Sci 1981; 370:644-649; Thunberg L, Backstrom G and Lindahl U. Carbohydr Res 1982; 100:393-410)のグループにより、1980年代の開始で行われた研究のためであった。この五糖の構造は次の通りである（式1）：

【 0 0 2 4 】

【 化 1 】

20



30

式 1

【 0 0 2 5 】

分別されていないヘパリン、及び既知の脱重合（酵素的、亜硝酸、⁻排除、等）により得られる種々のLMWH又はWLMWHにおいては、N - スルホ - 3 - スルホ - D - グルコサミン（A_{NS}, 3_S）に結合されるD - グルクロン酸と呼ばれる五糖中の特定の及び唯一の二糖単位の含有率の定量化を通して、その一般構造体内の五糖の量の決定を可能にする測定が存在する。この測定は、ヘパリン構造におけるこの二糖の存在%と五糖の含有率及び従って、問題のヘパリンの抗 - FXa活性の程度との間の良好な相互関係の入手を可能にする（Guerrini M et al. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2007; 33: 478-787）。

40

【 0 0 2 6 】

五糖の完全性に影響を及ぼすことができる異なった化学的及び/又は酵素的変性はまた、化合物の抗 - FXa活性の低下とそれらとの相互関係を示した。それらの反応は、脱 - N - アセチル化、N及びO - 硫酸化、O - アシル化、開環反応、等であり得る。

【 0 0 2 7 】

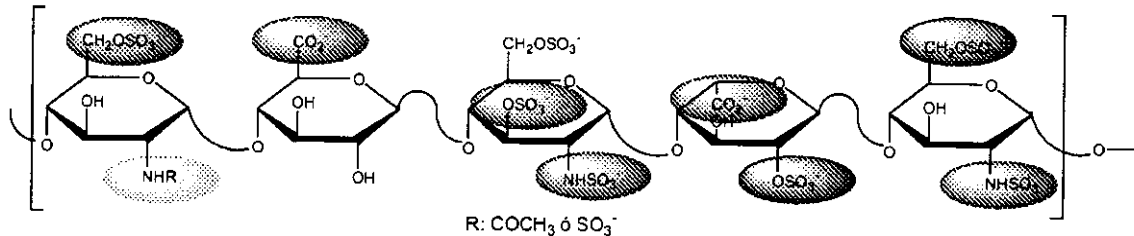
例えば、五糖が硫酸化の程度に関して、化学的に又は酵素的に変更される場合、抗 - 第Xa因子効果もまた変更される。しかしながら、種々の研究（Lindahl U, Backstrom G and Thunberg L. J. Biol. Chem. 1983; 258:9826-9830; Riesenfeld J, Thunberg L, Hook M and Lindahl U. J. Biol. Chem. 1981; 256:2389-2393）においては、硫酸化の程度が

50

変更される場合、抗トロンピンIII に対する親和性を有する五糖に存在するスルフェート基のすべては、同等に重要でないことが示されており、従って、それらの基のいずれかの排除がいかにかに後者の抗-Xa因子活性に影響を及ぼすかを確立することが可能である：

【 0 0 2 8 】

【 化 2 】



抗-Xa 活性の損失>95%

抗-Xa 活性の損失、約 75%

抗-Xa 活性の損失、約 50%

10

20

【 0 0 2 9 】

この理由のために、本発明においては、異なったLMWH又はVLMWH（例を参照のこと）は、定性的及び定量的態様で抗-FXa活性を担当する五糖を変更するために、物理的に及び化学的に変性され、潰瘍、特に糖尿病性足潰瘍の場合、このタイプのグリコサミノグリカンにおいて、N-スルホ-D-グルコサミン及びD-グルクロン酸、及び本発明の好ましい態様においては、またN-アセチル-D-グルコサミン、L-イズロン酸及び2-硫酸化されたL-イズロン酸から成る群から選択された単糖類に富んでいる、高い割合のオリゴ糖配列、及び抗-FXa活性を担当する、同じくらい多くない五糖（五糖の抗血栓活性のために必要な高濃度のN-スルホ-3-スルホ-D-グルコサミン単位の存在は必要でない）が存在することが興味の対象であることが示された。この理由のために、本発明のためには、五糖の割合は、技術水準に従って、抗-FXa活性を担当でき、そして従って、より高い割合を有するために適切であるグリコサミノグリカンの構造において、最大20%の五糖の特徴的二糖（N-スルホ-3-スルホ-D-グルコサミンに結合されるD-グルクロン酸）に制限される。

30

【 0 0 3 0 】

技術水準は、糖尿病患者がそれ自体変更された疾病により引起される潰瘍の治療工程を有することを明白に示すが、しかし本発明の発明者はまた、本発明の医薬組成物の効果がすべてのタイプの潰瘍（慢性及び圧迫潰瘍の両者を包含する）のために作動することを示した。

【 0 0 3 1 】

本発明のためには、慢性潰瘍は、圧迫潰瘍、糖尿病性潰瘍、虚血性（動脈又は静脈）潰瘍、熱傷後潰瘍、放射線療法後潰瘍、等として分類され得る、潰瘍の起源に依存して、皮膚における物質の連続した損失を伴っての溶液として現解される。

40

【 0 0 3 2 】

この分類は、原因生成潰瘍に従って行われて来たが、しかしながら、創傷/潰瘍を慢性に転換する生理病理学的機構は、皮膚壊死及びその再生困難性に、天然の手段により導く虚血性工程における変更である（Kirman CN. Pressure ulcers, non surgical treatment and principles, Emedicine Jul 2008 (www.emedicine.com/plastic) An G, Faeder J, Vodovotz Y. Transactional systems biology: introduction of an engineering approach to the pathophysiology of the burn patient. J Burn Care Res. 2008; 29(2):277-

50

85. Nikolovska S, et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of venous ulcers. Acta Dermatovenereol Croat 2005; 13(4):242-6)。

【 0 0 3 3 】

この意味において、例えば虚血は、毛細管に対する外圧（床ずれ又は圧迫性潰瘍）のために、熱による損傷（熱傷）のために、又は血管閉鎖（糖尿病、アテローム硬化症、等）のために生じる。皮膚及び周囲器官の虚血工程の後、損傷された組織の再灌流が存在し、初期病巣が大きくなり、病巣の悪化及び深刻化を導く。初期壊死の後に生じる、初期病巣を悪化し、そして病巣の慢性化を導く虚血 - 再灌流の正確な機構は、知られていないが、しかし炎症性メディエーター（サイトカイン、インターロイキン、等）の連続した生成が初期虚血工程を悪化し、病巣を悪化し、そして潰瘍の慢性化を導く。

10

【 0 0 3 4 】

そのために、組織再生を促進するが、しかし細胞損傷を悪化しない炎症性メディエーターの生成をモデル作成するための異なった治療手段が研究されて来た。強調されるべき事実は、創傷の治療が、いずれかの破壊的工工程への暴露の後、ほとんどすべての組織において同じであることであり（Gurtner GC et al. Wound repair and regeneration. Nature 2008; 453:314-21）；従って、研究が熱傷の予防のために低分子量ヘパリンにより最近実施されたが（Gurtner GC et al. Wound repair and regeneration. Nature 2008; 453:314-21）；research has thus been recently conducted with low molecular weight heparins in the prevention of the burn wounds (Ravikumar T et al. Low molecular weight heparin-induced pharmacological modulation of burn wound healing. Ann Burn fire Disast 2006;19(3):1-10 Oremus M, et al. The uses of heparin to treat burn injury. Evid Rep Technol Assess (Full Rep). 2006;(148):1-58)、しかし今日まで、慢性潰瘍の再生を促進する前進性処理は存在せず（Fonder MA et al. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. J Am Acad dermatol 2008; 58:185-206）、そして組成物であり、そして/又は生理学的システムの出現を好むこの治療及び再生活性、例えば炎症性メディエーターの生成の阻止、毛細血管再生、又は潰瘍再灌流及び治癒機構を担当する単糖類の百分率であるグリコサミノグリカンの場合、ほとんど知られていない。

20

【 0 0 3 5 】

言い換えれば、本発明の目的組成物は、糖尿病を有さず、そして容易に治癒しない一定のタイプの慢性潰瘍、例えば圧迫潰瘍（必ずしも強くないが、及び位置に関係なく、硬質の平面上に延長された圧力により引起される皮膚及び下部組織に損傷部分を有する潰瘍として理解される）の開始が存在する患者についてさえ、慢性潰瘍について作動する。用語、床ずれは、その開始における決定因子である圧力を言及するので、及び床ずれ位置に出現しなかったそれらを排除するので、現在、廃棄されている。

30

【 0 0 3 6 】

それは、制限された移動性、相当な罹患 - 死亡率、及び高い経済的及び社会的影響を有する高齢患者における慢性疾患を有する患者の養生において共通する問題であり、従って、本発明の目的のためには、動物において糖尿病を引起す例のほとんどは実施されたが、例 5 においては、本発明の医薬組成物の投与が、動物は糖尿病ではないが、いかに驚くべき良好に作動するかが明白に見出される。

40

【 0 0 3 7 】

さらに、理論により拘束されることは望まないが、しかしながら、発明者は、この仮説がそれらの例の結果により支持されると信じている。なぜならば、合成五糖（フォンダパリヌクス）が潰瘍及び特に糖尿病性足潰瘍の処理のために使用される場合、その治癒及び/又は再生活性は、N - スルホ - D - グルコサミン及びD - グルクロン酸、及び本発明の好ましい態様においては、また、N - アセチル - D - グルコサミン、L - イズロン酸及び 2 - 硫酸化されたL - イズロン酸から成る群から選択された単糖類が化学的に及び/又は酵素的に修飾される場合、発明者のグリコサミノグリカンの活性が劇的に低下するのと同じ態様で高く低められるからである。従って、構造に五糖部分が存在するが、それは組織治癒及び

50

/又は再生活性を担当せず、そして前述の単糖が定性的に又は定量的に変更される場合、良好な組織治療及び/又は再生活性は得られないことが結論づけられる。

【0038】

この理由のために、本発明の主要観点は、慢性潰瘍及び特に、糖尿病性足潰瘍の処理のために、一定割合の一定の単糖類、及び20%を越えない割合の五糖の特徴的二糖を含むグリコサミノグリカンの組成物を目的とする。

本発明者はまた、予防用量ではなく疾病“処理”用量を達成するために、生成物の血漿半減期を有する単糖類(IU)の割合に関して、前述の単糖類の必要な量と医薬的有効量のグリコサミノグリカンを含む医薬製品の用量との間の関係を調製した。

【0039】

今日までに公開された研究においては、慢性潰瘍及び特に糖尿病性足潰瘍のために使用される数種のヘパリンの目的は常に予防であり(すなわち用量の上昇が患者における出血を引起すと思われる)、又は凝集カスケード、例えばASAにおける異なったレベルで作用するもう1つのタイプの化合物による疾病の補助療法であった。従って、それらの場合に使用される条件は、非常に低濃度のヘパリンを用いることを包含する予防のための通常条件であり、例えばベミパリンの場合、血漿半減期(時)とIUにおける用量との間の比は、ベミパリンの場合、1:472である。

【0040】

ヘパリンにより追求される効果は、技術水準を考慮すると、抗血栓活性を担当する五糖の量は糖尿病性足潰瘍を有する患者において下肢血管形成を好むのに十分過ぎ、そして示される用量よりも高い用量で、一般的な確信は、出血危険性が、真に重要なことは、配合物において五糖の一部を形成しない多量の他の単糖類を投与することを実現しないで、糖尿病患者が出血への高い素因を有することを考慮して、過剰の前記抗血栓効果のために上昇することであるので、予防下で作用することがこの理由である。従って、非常に低い用量がこの目的のために従来常に使用され、ここで血漿半減期とLMWHのIUにおける用量との間の比は、1:500以下である。なぜならば、同じ抗-凝固及び抗血栓効果は、合併疾患、例えば糖尿病をすでに有する患者については、低い出血危険性を伴って、達成されると思われるからである。

【0041】

発明者が知っている限り、グリコサミノグリカン、例えば低分子量ヘパリンの組成物による、それらの予防用量での糖尿病性足潰瘍の処理についての特許文献は実質的に存在しない。なぜならば、前記ヘパリンは、治療的ではなく、むしろ予防的であり、そして顆粒組織再生を伴っての治療により潰瘍を実際的に治療せず、むしろそれらは、それらがその形成を妨げ、そしてほとんどの場合、他の薬物、例えばアセチルサリチル酸による共同処理に使用されられると思われるからである(Effect of Dalteparin of healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease”, Diabetes Care, vol. 26(9), September 2003; M. Kalani, A. et al. entitled Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers. Thrombosis Research. 120, 653-661, 2007)。

【0042】

さらに、本発明者は、一定のグリコサミノグリカン、例えばLMWH及びVLMWHの場合、糖尿病性足潰瘍(糖尿病患者における)の処理のための五糖の量は有意ではないが、しかしむしろ、真に重要なことは、特定の単糖類に富んでいる、ある割合のオリゴ糖の存在であることを決定したので、技術水準の偏見の排除に達した。本発明の特定の記載に言及される一定の特定の単糖類のこの割合は、糖尿病患者におけるこのタイプの潰瘍の治療を担当する。なぜならば、このタイプのグリコサミノグリカンが皮下経路又は非経口経路により投与される場合、この治療効果は、低分子量及び非常に低い分子量のヘパリンにおける抗第Xa因子効果に、技術水準下で通常結合される五糖を含まない一定のオリゴ糖画分の存在のためであるからである。さらに、本発明者は、五糖がヘパリノイド構造においてわずか

10

20

30

40

50

に（定量的に及び一定性的に）変更される場合、抗-FXa活性が相当に低下することを決定した。しかしながら、治癒力における類似する低下は、観察されていない。

【0043】

従って、糖尿病性足潰瘍の処理における重要な問題は、虚血性組織再生を達成し、そして糖尿病性足の切断を妨げ、そして予防のみならず、また治療処理においてもより効果的である、医薬製品の有効且つ効果的用量を達成することである。選択の処理が有すべきもう1つの追加の利点は、患者のために非常にトラウマ性ではないことである。なぜならば、糖尿病性足潰瘍は、非常に高い苦痛により特徴づけられ、従って、投与の経路は創傷に隣接して、非常にトラウマ性でないからである。従って、本発明のためには、投与の好ましい経路は、非経口路、経口路、及び非侵入性であるか、又は処理されるべき粘膜上に直接適用される局部路である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0044】

従って、本発明により解決されるべき問題は、従来技術の問題を解決する医薬組成物を供給することである。

【0045】

解決策は、本発明者が、次の割合の次の単糖類（すべての百分率は、組成物中の単糖類の合計百分率に基づく）：

a) N - スルホ - D - グルコサミン：25 - 50%

20

b) D - グルクロン酸：3 - 25%、

を含む、慢性潰瘍、例えば糖尿病性足潰瘍の処理のための、皮下又は非経口路、経口路及び/又は局部路によるグリコサミノグルカン、特にLMWH及びVLMWHの医薬組成（N - スルホ - 3 - D - グルコサミンに結合される二糖単位D - グルクロン酸の割合が25%以上ではなく、そして好ましくは20%以上でない）が、それが足の切断を妨げる、組織再生を達成し、そして予防においてのみならず、治療処理としても効果的であるので、示される問題の解決策を達成することを同定した事実に基づく。

【0046】

本発明のもう1つの観点はまた、N - スルホ - D - グルコサミン、N - アセチル - D - グルコサミン、L - イズロン酸、2 - 硫酸化されたL - イズロン酸及びD - グルクロン酸から選択された、特徴的割合の少なくとも単糖類を含む、皮下又は非経口路、経口路及び/又は局部路によるグリコサミノグルカン、特にLMWH及びVLMWHの組成物の、慢性潰瘍、例えば圧迫潰瘍及び糖尿病性足潰瘍の処理のための他の医薬製品の製造のためへの使用にも関する。

30

【0047】

前記解決策は、本発明者が、一般的な信念に反して、糖尿病性足潰瘍を有する患者に、高い出血の危険性を伴わないで、静脈性血栓塞栓疾患処理用量として分類される低分子量ヘパリン（LMWH）の用量から成る処理を実施することが可能であり、そしてより低い濃度、例えば予防のための通常濃度で投与される場合よりも良好な結果が、グリコサミノグリカンにおける一定割合の一定単糖類の存在のために、驚くべきことには、得られることを同定した事実に基づく。従って、本発明は、血漿半減期とLMWHのIUにおける用量との間の比が1：800～1：5,000であるそれらの用量、すなわち多量の特定の単糖類を含むそれらの用量として処理用量を理解して、静脈性血栓塞栓患者のための通常の処理用量を用いての糖尿病性足潰瘍の処理のための医薬組成物を供給する。

40

【0048】

本発明の特定の態様においては、次の割合での次の単糖類：

- N - スルホ - D - グルコサミン：25 - 50%

- N - アセチル - D - グルコサミン：0 - 10%

- L - イズロン酸：0 - 35%

- 2 - 硫酸化されたL - イズロン酸：0 - 50%

50

- D - グルクロン酸 : 3 - 25 %、

を含む、糖尿病性足潰瘍の処理のための、皮下又は非経口路、経口路及び/又は局部路によるグルコサミノグリカン、特にLMWH及びVLMWHの医薬組成物が供給される。

【 0 0 4 9 】

本発明のもう 1 つの特定の態様においては、次の割合での次の単糖類 :

- N - スルホ - D - グルコサミン : 25 - 50 %
- N - アセチル - D - グルコサミン : 0 - 10 %
- L - イズロン酸 : 0 - 10 %
- 2 - 硫酸化された L - イズロン酸 : 15 - 50 %
- D - グルクロン酸 : 3 - 25 %、

10

を含む、糖尿病性足潰瘍の処理のための、皮下又は非経口路、経口路及び/又は局部路によるグルコサミノグリカン、特にLMWH及びVLMWHの医薬組成物が供給される。

【 0 0 5 0 】

本発明のもう 1 つの特定の態様においては、次の割合での次の単糖類 :

- N - スルホ - D - グルコサミン : 25 - 50 %
- N - アセチル - D - グルコサミン : 0.1 - 8 %
- L - イズロン酸 : 1 - 10 %
- 2 - 硫酸化された L - イズロン酸 : 15 - 40 %
- D - グルクロン酸 : 3 - 15 %、

20

を含む、糖尿病性足潰瘍の処理のための、皮下又は非経口路、経口路及び/又は局部路によるグルコサミノグリカン、特にLMWH及びVLMWHの医薬組成物が供給される。

【 0 0 5 1 】

より特定には、本発明は、合計糖組成物の 20 % 以下、さらにより特定には 10 % 以下及び最も好ましくは 5 % 以下の割合の二糖単位、N - スルホ - 3 - スルホ - D - グルコサミン (A_{NS, 3S}) に結合される D - グルクロン酸を含む、慢性潰瘍、例えば糖尿病性足潰瘍の処理のための、皮下又は非経口路、経口路及び/又は局部路によるグリコサミノグリカン、特にLMWH及びVLMWHの医薬組成物を目的とする。

【 0 0 5 2 】

本発明の 1 つの利点は、技術水準の偏見を排除するのみならず、またそれらのグリコサミノグリカンの血漿半減期に従って、糖尿病性足潰瘍を処理し、そして患者における組織治癒及び再生を支持するために必要な前記医薬組成物を含む医薬製剤の用量と、前記単糖類の割合との間の効果的相互関係の達成である。

30

【 0 0 5 3 】

種々の既知LMWHのための血漿半減期が、表 1 に示されており、それらのデータは、出版物Planes, A. Review on bemiparin sodium - a second generation low molecular weight heparin- and its applications in venous thromboembolism. Expert opinion Pharmacother. 2003; 4:1551-61から抜粋された。

【 0 0 5 4 】

【表 1】

表 1		
LMWH	血漿半減期 (時)	血漿半減期 (時)
RO-14	6.5 - 6.9	6.7
ベミパリン	5.2 - 5.4	5.3
エノキサパリン	4.0 - 4.4	4.2
ナドロパリン	3.7	3.7
ダルテパリン	2.3 - 2.8	2.5
チンザパリン	3.0	3.0

10

【0055】

異なったタイプのLMWHに関して、使用される用量は、表2に示されるように、血漿半減期に依存することが観察される（源：“Expert opinion Pharmacother”の前記論説を参考のこと、但しRO14の場合を除く、このデータは出願人の実験からである）：

【0056】

20

【表 2】

表 2		
LMWH	平均用量 (IU/日)	およその半減期/用量比
RO-14	5,400	1:800
ベミパリン	5,000	1:950
エノキサパリン	8,000	1:1,900
ナドロパリン	7,600	1:2,000
ダルテパリン	10,000	1:4,000
チンザパリン	10,000	1:3,300

30

【0057】

結果として、本発明の追加の観点は、LMWHのIUにおける血漿半減期とその用量との間の比が1:800～1:5,000であることにおいて特徴づけられる、糖尿病性足潰瘍の処理のための医薬製品の製造へのグルコサミノグリカン、得に低分子量ヘパリンの使用を目的とし、すなわちN-スルホ-D-グルコサミン、N-アセチル-D-グルコサミン及びD-グルクロン酸、及び本発明の好ましい態様においては、L-イズロン酸及び2-硫酸化されたL-イズロン酸から成る群から選択された多量の単糖類、及び合計糖組成物の20%以下、より好ましくは、糖尿病性足潰瘍の処理のためには、10%以下及び最も好ましくは5%以下の一定割合の二糖単位、N-スルホ-3-スルホ-D-グルコサミンに結合されるD-グルクロン酸を含む組成物が投与されることが特徴づけられる。

40

【0058】

もう1つの観点においては、本発明は、LMWHが6,000ダルトン以下の平均分子量を有するヘパリンである、糖尿病性足潰瘍の処理のための医薬製品の製造への低分子量ヘパリンの使用を目的とする。

【0059】

50

もう1つの観点においては、本発明は、N - スルホ - D - グルコサミン及びD - グルクロン酸、及び本発明の好ましい態様においてはまた、N - アセチル - D - グルコサミン、L - イズロン酸及び2 - 硫酸化されたL - イズロン酸から成る群から選択された特定割合の単糖類、及び合計糖生成物中の20%以下、より好ましくは10%以下及び最も好ましくは5%以下の二糖単位、N - スルホ - 3 - スルホ - N - グルコサミンに結合されるG - グルクロン酸を有することを確保する、血漿半減期が5.2~5.4であり、そして毎日の平均用量が5,000IUであることを特徴とする、糖尿病性足潰瘍の処理のための医薬製品の製造への低分子量ヘパリンの使用を目的とする。

【0060】

もう1つの観点においては、本発明は、N - スルホ - D - グルコサミン、N - アセチル - D - グルコサミン、L - イズロン酸、2 - 硫酸化されたL - イズロン酸及びD - グルクロン酸から成る群から選択された、特定割合の単糖類を有することを確保する、血漿半減期が2.3~2.8であり、そして毎日の平均用量が10,000IUであることを特徴とする、糖尿病性足潰瘍のための医薬製品の製造への低分子量ヘパリンの使用を目的とする。

【0061】

もう1つの観点においては、本発明は、N - スルホ - D - グルコサミン、N - アセチル - D - グルコサミン、L - イズロン酸、2 - 硫酸化されたL - イズロン酸及びD - グルクロン酸から成る群から選択された、特定割合の単糖類を有することを確保する、血漿半減期が4.0~4.4であり、そして毎日の平均用量が7,600IUであることを特徴とする、糖尿病性足潰瘍のための医薬製品の製造への低分子量ヘパリンの使用を目的とする。

【0062】

示されたように、個々のLMWHの血漿半減期と個々のLMWHのIUにおける用量との間の比が1:800~1:5,000である、処理用量でのLMWHの供給の結果として、従来の処理よりも高い有効性を提供する、慢性潰瘍、例えば糖尿病性足潰瘍の処理のための他の医薬製品を供給する利点が、それが多量の一定の単糖類、及び合計糖組成物に基づく20%以下の制限された量の二糖単位、N - スルホ - 3 - スルホ - D - グルコサミンに結合されるD - グルクロン酸を含む事実のために、典型的には、この処理に伴う欠点、例えば高い出血の危険性の有意な上昇を伴わないで達成される。

【0063】

本発明は、本発明者が、通常(低い)の予防用量での維持の代わりに、静脈血栓塞栓性疾患の処理用量の程度にLMWHの濃度レベルを高めることに対して、ヘパリンの技術分野に存在する偏見を克服した事実の結果として可能であり、ここで手短には、そのような濃度レベルの上昇は、本発明において観察されるように、上皮組織再生及び治癒に関して、有益な効果を引起さないで、出血危険性を有意に高めるであろう。

【0064】

さらに、理論により結合されることは望まないが、しかしながら、本発明者は、合成五糖(フォンダパリヌクス)が糖尿病性足潰瘍の処理のために使用される場合、治癒、及び/又は再生活性は、N - スルホ - d - グルコサミン、N - アセチル - D - グルコサミン、L - イズロン酸、2 - 硫酸化されたL - イズロン酸及びD - グルクロン酸化から成る群から選択された単糖類が化学的に及び/又は酵素的に修飾される場合、グリコサミノグリカンの組成物の活性が劇的に低下するのと同じ態様で、高く低められるので、それらの仮説を支持すると思われる。従って、構造体に五糖部分が存在するが、それは組織治癒及び/又は再生活性を担当せず、そして前述の単糖類が定性的に又は定量的に変更される場合、良好な組織治癒及び/又は再生活性は得られないことが結論づけられる。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】図1は、合成五糖(フォンダパリヌクス)の作用の機構を示す。

【0066】

【図2A】図2Aは、重水素水(D₂O)において298Kで記録されたフォンダパリヌクス(抗トロンビンIII)との相互作用を担当する五糖)の¹³C - ¹H HSQCスペクトルのアノマーシグ

10

20

30

40

50

ナル (H1-C1相互関係) の領域を示す。スペクトルにおいて、五糖を形成する 5 種の単糖類に対応する 5 種の相互関係ピークが観察され得る。ANSred、還元端の N - スルホ - D - グルコサミン ; I2S、2 - 硫酸化された L - イズロン酸 ; ANS、3S、N - スルホ - 30 - スルホ - D - グルコサミン ; G - (ANS, 3S)、ANS, 3S ユニット及び ANS - (G) を先行する D - グルクロン酸、前記 D - グルクロン酸環を先行する N - スルホ - D - グルコサミン。G - (ANS, 3S) ユニットの H1 - C1 相互関係ピークは、円により強調され (なぜならば、それは五糖の最も特徴的なシグナルであるからである)、そして種々のサンプルにおけるその存在を定量化するために対照として取られるであろう。フォンダパリヌクスにおけるこの単糖の割合は 20 % である。

【 0 0 6 7 】

【図 2 B】図 2B は、重水素水 (D₂O) において 298K で記録された低分子量の ¹³C - ¹H HSQC スペクトルのアノマーシグナル (H1-C1 相互関係) の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位 (I、硫酸化されていない L - イズロン酸 ; ANA、N - アセチル - D - グルコサミン) の存在、及びより高い割合で存在する、2 - 硫酸化された L - イズロン酸環、I2S の場合良くあることだが、存在する単位の割合の変更のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル (図 2A を参照のこと) よりも、より複雑である。

【 0 0 6 8 】

五糖の特徴的 G - (ANS、3S) 単位の H1-C1 相互関係ピークは、円により強調されている。図において観察されるように、このシグナルの強度は、主要グルクロン環である N - スルホ - D - グルコサミン G - (ANS) に結合される D - グルクロン酸の割合の上昇のために、フォンダパリヌクスサンプルに比較して、低下した。ベミパリンサンプルにおける G - (ANS、3S) の割合の低下 (合計単糖含有率の 1.5 %) は、オリゴン糖鎖のほとんどが抗トロンビン III との相互作用を担当する構造モチーフを有さないことを示す。

【 0 0 6 9 】

次のシグナルがまた、ラベルされた :

ANSred, 還元端の N - スルホ - D - グルコサミン ; ANS, 3S, N - スルホ - 30 - スルホ - D - グルコサミン。

【 0 0 7 0 】

【図 2 C】図 2C は、重水素水 (D₂O) において 298K で記録された非常に低い分子量のヘパリン R014 ckw2_13_11L の ¹³C - ¹H HSQC スペクトルのアノマーシグナル (H1-C1 相互関係) の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位 (I、硫酸化されていない L - イズロン酸 ; ANA、N - アセチル - D - グルコサミン) の存在、及びより高い割合で存在する、2 - 硫酸化された L - イズロン酸環、I2S の場合良くあることだが、存在する単位の割合の変更のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル (図 2A を参照のこと) よりも、より複雑である。

【 0 0 7 1 】

五糖の特徴的 G - (ANS、3S) 単位の H1-C1 相互関係ピークは、円により強調されている。図において観察されるように、このシグナルの強度は、主要グルクロン環である N - スルホ - D - グルコサミン G - (ANS) に結合される D - グルクロン酸の割合の上昇のために、フォンダパリヌクスサンプルに比較して、低下した。R014 ckw2_13_11L サンプルにおける G - (ANS、3S) の割合の低下 (合計単糖含有率の 2.6 %) は、オリゴ糖鎖のほとんどが抗トロンビン III との相互作用を担当する構造モチーフを有さないことを示す。

【 0 0 7 2 】

次のシグナルがまた、ラベルされた :

ANSred, 還元端の N - スルホ - D - グルコサミン ; ANS, 3S, N - スルホ - 30 - スルホ - D - グルコサミン。

【 0 0 7 3 】

【図 2 D】図 2D は、重水素水 (D₂O) において 298K で記録された低分子量ヘパリン エノキサパリンの ¹³C - ¹H HSQC スペクトルのアノマーシグナル (H1-C1 相互関係) の領域を示

10

20

30

40

50

す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位（1、硫酸化されていないL-イズロン酸；ANA、N-アセチル-D-グルコサミン）の存在、及びより高い割合で存在する、2-硫酸化されたL-イズロン酸環、12Sの場合良くあることだが、存在する単位の割合の変更のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル（図2Aを参照のこと）よりも、より複雑である。

【0074】

五糖の特徴的G-（ANS、3S）単位のH1-C1相互関係ピークは、円により強調されている。図において観察されるように、このシグナルの強度は、主要グルクロン環であるN-スルホ-D-グルコサミン G-（ANS）に結合されるD-グルクロン酸の割合の上昇のために、フォンダパリヌクスサンプルに比較して、低下した。エノキサバリンサンプルにおけるG-（ANS、3S）単位の割合の低下（合計単糖含有率の1.7%）は、オリゴ糖鎖のほとんどが抗トロンビンIIIとの相互作用を担当する構造モチーフを有さないことを示す。

10

次のシグナルがまた、ラベルされた：

ANSred,還元端のN-スルホ-D-グルコサミン；ANS,3S,N-スルホ-30-スルホ-D-グルコサミン。

【0075】

【図2E】図2Eは、重水素水（D₂O）において298Kで記録された低分子量ヘパリン チンザパリンの¹³C-¹H HSQCスペクトルのアノマーシグナル（H1-C1相互関係）の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位（1、硫酸化されていないL-イズロン酸；ANA、N-アセチル-D-グルコサミン）の存在、及びより高い割合で存在する、2-硫酸化されたL-イズロン酸環、12Sの場合良くあることだが、存在する単位の割合の変更のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル（図2Aを参照のこと）よりも、より複雑である。五糖の特徴的G-（ANS、3S）単位のH1-C1相互関係ピークは、円により強調されている。

20

【0076】

図において観察されるように、このシグナルの強度は、主要グルクロン環であるN-スルホ-D-グルコサミン G-（ANS）に結合されるD-グルクロン酸の割合の上昇のために、フォンダパリヌクスサンプルに比較して、低下した。チンザパリンサンプルにおけるG-（ANS、3S）単位の割合の低下（合計単糖含有率の1.05%）は、オリゴ糖鎖のほとんどが抗トロンビンIIIとの相互作用を担当する構造モチーフを有さないことを示す。

30

次のシグナルがまた、ラベルされた：

ANSred,還元端のN-スルホ-D-グルコサミン；ANS,3S,N-スルホ-30-スルホ-D-グルコサミン。

【0077】

【図2F】図2Fは、重水素水（D₂O）において298Kで記録された非常に低い分子量のヘパリンR014_H13_96_5の¹³C-¹H HSQCスペクトルのアノマーシグナル（H1-C1相互関係）の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位（1、硫酸化されていないL-イズロン酸；ANA、N-アセチル-D-グルコサミン）の存在、及びより高い割合で存在する、2-硫酸化されたL-イズロン酸環、12Sの場合良くあることだが、存在する単位の割合の変更のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル（図2Aを参照のこと）よりも、より複雑である。五糖の特徴的G-（ANS、3S）単位のH1-C1相互関係ピークは、円により強調されている。

40

【0078】

図において観察されるように、このシグナルの強度は、主要グルクロン環であるN-スルホ-D-グルコサミン G-（ANS）に結合されるD-グルクロン酸の割合の上昇のために、フォンダパリヌクスサンプルに比較して、低下した。R014_H13_96_5サンプルにおけるG-（ANS、3S）単位の割合の低下（合計単糖含有率の1.9%）は、オリゴ糖鎖のほとんどが抗トロンビンIIIとの相互作用を担当する構造モチーフを有さないことを示す。

次のシグナルがまた、ラベルされた：

ANSred,還元端のN-スルホ-D-グルコサミン；ANS,3S,N-スルホ-30-スルホ-D

50

- グルコサミン。

【 0 0 7 9 】

【図 2 G】図2Gは、重水素水 (D_2O) において298Kで記録された低分子量ヘパリンBEMI_99_4の ^{13}C - 1H HSQCスペクトルのアノマーシグナル (H1-C1相互関係) の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位 (1、硫酸化されていないL - イズロン酸 ; ANA、N - アセチル - D - グルコサミン) の存在、及びいくつかの特徴的シグナル、例えばANS, 3S 及び G-(ANS, 3S)の消出のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル (図2A を参照のこと) と非常に異なる。五糖のシグナルG - (ANS, 3S) の消出は、このタイプの低分子量ヘパリンが、抗トロンビンIII との相互作用を担当する構造モチーフの検出できる量を有さないことを示す。同様に、12Sのシグナルの消出は、このLMWHがまた、ヘパリンの規則的領域の特徴的単位に有意な変化を有することを示す。

10

【 0 0 8 0 】

【図 2 H】図2Hは、重水素水 (D_2O) において298Kで記録されたヘパリンナトリウムの ^{13}C - 1H HSQCスペクトルのアノマーシグナル (H1-C1相互関係) の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位 (1、硫酸化されていないL - イズロン酸 ; ANA、N - アセチル - D - グルコサミン) の存在、及びより高い割合で存在する、2 - 硫酸化されたL - イズロン酸環、12Sの場合良くあることだが、存在する単位の割合の変更のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル (図2A を参照のこと) よりも、より複雑である。五糖の特徴的G - (ANS、 3S) 単位のH1-C1相互関係ピークは、円により強調されている。

20

【 0 0 8 1 】

図において観察されるように、このシグナルの強度は、主要グルクロン環であるN - スルホ - D - グルコサミン G - (ANS) に結合されるD - グルクロン酸の割合の上昇のために、フォンダパリヌクスサンプルに比較して、低下した。ヘパリンナトリウムサンプルにおけるG - (ANS、 3S) 単位の割合の低下 (合計単糖含有率の1.0%) は、オリゴ糖鎖のほとんどが抗トロンビンIII との相互作用を担当する構造モチーフを有さないことを示す。

次のシグナルがまた、ラベルされた :

ANSred, 還元端のN - スルホ - D - グルコサミン ; ANS, 3S, N - スルホ - 3O - スルホ - D - グルコサミン。

30

【 0 0 8 2 】

【図 2 I】図2Iは、重水素水 (D_2O) において298Kで記録された低分子量ヘパリンBEMI_99_2の ^{13}C - 1H HSQCスペクトルのアノマーシグナル (H1-C1相互関係) の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位 (1、硫酸化されていないL - イズロン酸 ; ANA、N - アセチル - D - グルコサミン ; ANH2、D - グルコサミン ; ANH2、3S、D-3-O-スルホ-グルコサミン) の存在、及びいくつかの特徴的シグナル、例えばANS, 3S 及び G-(ANS, 3S)の消出のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル (図 1 を参照のこと) と非常に異なる。

【 0 0 8 3 】

【図 2 J】図2Jは、重水素水 (D_2O) において298Kで記録されたヘパリンカルシウムの ^{13}C - 1H HSQCスペクトルのアノマーシグナル (H1-C1相互関係) の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位 (1、硫酸化されていないL - イズロン酸 ; ANA、N - アセチル - D - グルコサミン) の存在、及びより高い割合で存在する、2 - 硫酸化されたL - イズロン酸環、12Sの場合良くあることだが、存在する単位の割合の変更のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル (図 1 を参照のこと) よりも、より複雑である。五糖の特徴的G - (ANS、 3S) 単位のH1-C1相互関係ピークは、円により強調されている。

40

【 0 0 8 4 】

図において観察されるように、このシグナルの強度は、主要グルクロン環であるN - スルホ - D - グルコサミン G - (ANS) に結合されるD - グルクロン酸の割合の上昇のために

50

、フォンダパリヌクスサンプルに比較して、低下した。ヘパリンナトリウムサンプルにおけるG - (ANS、3S) 単位の割合の低下 (合計単糖含有率の1.0%) は、オリゴ糖鎖のほとんどが抗トロンビンIII との相互作用を担当する構造モチーフを有さないことを示す。

次のシグナルがまた、ラベルされた：

ANSred, 還元端のN - スルホ - D - グルコサミン ; ANS, 3S, N - スルホ - 3O - スルホ - D - グルコサミン。

【0085】

【図2K】図2Kは、重水素水 (D_2O) において298Kで記録された低分子量ヘパリンBP06408-66/27-Aの ^{13}C - 1H HSQCスペクトルのアノマーシグナル (H1-C1相互関係) の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位 (I、硫酸化されていないL - イズロン酸 ; ANA、N - アセチル - D - グルコサミン) の存在、及びANS, 3S及びG - (ANS, 3S) に対応するシグナルの低下のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル (図2Aを参照のこと) と非常に異なる。五糖のシグナルG - (ANS, 3S) の低下は、このタイプの低分子量ヘパリンが、抗トロンビンIII との相互作用を担当する低濃度の構造モチーフを有することを示す。

10

【0086】

【図2L】図2Lは、重水素水 (D_2O) において298Kで記録された低分子量ヘパリンBP06408-66/28-Aの ^{13}C - 1H HSQCスペクトルのアノマーシグナル (H1-C1相互関係) の領域を示す。前記スペクトルは、フォンダパリヌクスに存在しなかった新規単糖単位 (I、硫酸化されていないL - イズロン酸 ; ANA、N - アセチル - D - グルコサミン) の存在、及びANS, 3S及びG - (ANS, 3S) に対応するシグナルの消出のために、フォンダパリヌクスのために得られるスペクトル (図2Aを参照のこと) と非常に異なる。五糖のシグナルG - (ANS, 3S) の消出は、このタイプの低分子量ヘパリンが、抗トロンビンIII との相互作用を担当する低濃度の構造モチーフの検出できる量を有さないことを示す。

20

【0087】

【図3】図3は、ベミパリンが健康な個人においては、17時間の血漿半減期を有し、従ってwistarラットにおいては、ベミパリンはラット当たり0.22mgであるので、1:950の半減期：用量の比を伴って、ベミパリンが投与される場合、1:472の半減期：用量の比を伴って、ベミパリンが投与される場合、及びフォンダパリヌクスが同等の処理用量、すなわち5mg/mlで投与される場合、例2のマウスにおける潰瘍領域の低下の%を示す。

30

【0088】

【図4】図4は、ベミパリンナトリウムにより処理されたマウスに関して、例4の糖尿病管理マウスの進行を示す。創傷領域は、個々の動物の右に示された。

【図5】図5は、例4のマウスにおける、時間に対する創傷の治療の%の進行を示す。

【0089】

【図6】図6は、ヘマトキシリン - エオシンによる染色の後、例4のマウスの創傷部分の顕微鏡写真を示す。A：糖尿病対照。B：フォンダパリヌクスナトリウムにより処理された糖尿病動物。C：ベミパリンナトリウムにより処理された糖尿病動物。

【図7】図7は、局部経路による対照組成物、ベミパリンナトリウムの局部組成物及びフォンダパリヌクスナトリウムの局部組成物、非分別ヘパリンの局部組成物がマウスに投与される場合、例5のマウスの潰瘍領域低下率を示す。

40

【0090】

【図8】図8は、ベミパリンカルシウムにより処理されたマウスに関して、例5の非糖尿病管理マウスの進行を示す。創傷領域は、個々の動物の右に示された。

【図9】図9は、例5のマウスにおける、時間に対する創傷の治療の%の進行を示す。

【0091】

【図10】図10は、ヘマトキシリン - エオシンによる染色の後、例5のマウスの創傷部分の顕微鏡写真を示す。A：非糖尿病対照。B：ベミパリンナトリウムにより処理された非糖尿病動物。C：ヘパリンカルシウムにより処理された非糖尿病動物。

【図11】図11は、経口経路による対照溶液、経口100mg/kgベミパリンナトリウム懸濁液

50

及び10mg/kgフォンダパリヌクスナトリウム懸濁液がラットに投与される場合、糖尿病性wistarラットにおける潰瘍領域低下率を示す。

【実施例】

【0092】

下記に提供される次の特定の例は、本発明の性質を例示するよう作用する。それらの例は、例示的目的のためにのみ包含され、そして本発明のを制限するものではない。

一連の実験は、個々のLMWHの血漿半減期とLMWHのIUにおける用量との間の比が1:800 ~ 1:5,000であるLMWHのための処理用量での糖尿病性足部潰瘍の処理のための医薬製品の製造へのグリコサミノグリカン、例えば低分子量ヘパリンの使用が本発明の示される利点を提供することを示すために実施されて来た。

10

いくつかの化合物、特に次のものが、それらの実験に使用されて来た：

【0093】

市販の製品：

- フォンダパリヌクス：化学合成により得られる抗トロンビンIII に対して高い親和性を有する五糖類似体。それは、中でも次の特徴を有する：1728ダルトンの分子量及び抗 - 第Xa因子活性：700IU/mg。

【0094】

- ベミパリン：それは、低分子量（3,600ダルトンの平均分子量）及び8以上の抗 - Xa/抗 - IIa比を有する第2世代ヘパリンである。ベミパリンは、これまでのヘパリンよりもさらに低い分子量を達成するための非水性媒体方法における新規脱重合化及び分別 - 排除、及び得られる6,000ダルトン異常の画分の%がLMWHの残りよりも一層、低く、そして高い割合の決定的な長さ以下の鎖（MW < 5,400D）を有するよう、そのフラグメントの最適な分布により得られる。理論による結合を所望しないが、本発明者は、それが、示される利点を有する本発明のLMWHを供給する、二次的であると思われ、そして今日まで重要であると思われなかった、抗血栓活性を担当する五糖の特徴的部分の一部を形成しない、存在する単糖類であると思われ、この理由のために、それらの単糖類の用量が高いほど、糖尿病性足部潰瘍の良好な治癒及び治療が得られる。

20

【0095】

- エノキサパリン：ヘパリンの前に形成されたベンジルエステルの水性媒体における - 排除方法による脱重合化により得られる低分子量ヘパリン。それは、中でも次の特徴を有する（Ph. Eur. 6th Edition）：3500 ~ 5500ダルトンの平均分子量及び抗 - 第Xa因子活性：90 - 125IU/mg。

30

【0096】

- ダルテパリン：硝酸による脱重合化により得られる低分子量ヘパリン。それは中でも、次の特徴を有する（ph. Eur. 6th Edition）：5600 - 6400ダルトンの平均分子量及び抗 - 第Xa因子活性：110 - 210IU/mg。

- チンザパリン：ヘパリナーゼIによる酵素脱重合化により得られる低分子量ヘパリン。それは中でも、次の特徴を有する（ph. Eur. 6th Edition）：5500 - 7500ダルトンの平均分子量及び抗 - 第Xa因子活性：70 - 120IU/mg。

40

【0097】

- ヘパリンナトリウム：分別されていないヘパリン。それは中でも、次の特徴を有する（Ph. Eur. 6th Edition）：抗 凝固活性：150IU/mg。

- ヘパリンカルシウム：分別されていないヘパリン。それは中でも、次の特徴を有する（Ph. Eur. 6th Edition）：抗 凝固活性：150IU/mg。

【0098】

治験相における製品：

- RO - 14非水性媒体における - 排除方法による脱重合化により得られる非常に低い分子量ヘパリン。それは、中でも次の特徴を有する：1800 ~ 3000ダルトンの平均分子量及び抗 - 第Xa因子活性：80 - 140IU/mg。

- BEMI - 99/4：それは、それがグルコサミンの位置Nにスルフェート基を単に有するよ

50

う変更された硫酸化の程度を有する低分子量ヘパリンである。この理由のために、その抗 - 第Xa因子活性は、その五糖部分が定性的に及び定量的に影響されるので、相当に低下する。

【 0 0 9 9 】

このヘパリンを得るための修飾は、Nagasawa and Inoue (Nagasawa K, Inoue Y. De-N-sulfation. Methods Carbohydr. Chem. 1980; 8:287-289)により記載される条件に伴って実施される脱 - N, O - 硫酸化、及びLloyd et al. Lloyd AG, Embrey G, Fowler LJ. Studies on heparin degradation-I: Preparation of [35S] sulphamate derivatives for studies on heparin degrading enzymes of mammalian origin. Biochem. Pharmacol. 1971; 20:637-648の条件に伴ってのN - 硫酸化の反応に基づかれ、従って、10gのベミパリンを150mlの水に溶解し、そしてその溶液をDowex 50WX8, H+カラムに通した。溶出物をピリジンにより中和し、そして凍結乾燥し、11.2gのベミパリンピリジニウム塩を得る。 10

【 0 1 0 0 】

ベミパリンピリジニウム塩 (3g) を、10%メタノールを含む75mlのジメチルスルホキシドに溶解し、そしてその溶液を105 で24時間、保持する。この後、75mlの水を添加し、pHを水酸化ナトリウムにより9.0~9.5に調節し、そしてそれを15分間、攪拌する。その溶液を、塩酸により中和し、0.5gの塩化ナトリウムを溶解し、そしてそれを3体積のメタノールの添加により沈殿し、脱 - N, O - 硫酸化された誘導体を得る。

【 0 1 0 1 】

脱 - N, O - 硫酸化された誘導体 (1g) を、Lloydなどの条件に従って、N - 硫酸化する。その生成物を75mlの飽和炭酸水素ナトリウム溶液に溶解し、そしてpHを9に調節する。その溶液を55 に加熱し、そして3gの硫黄トリオキシド - トリメチルアミン複合体を添加する。反応を55 で3時間、保持する。この後、3gの硫黄トリオキシド - トリメチルアミン複合体を再び添加し、55 でさらに3時間、反応を放置する。その溶液を冷却し、そしてpHを塩酸によりお7に調節し、1gの塩化ナトリウムを添加し、そしてそれを、3体積のメタノールにより沈殿する。0.88gのBEMI - 99/4を得る。得られる生成物は次の特徴を有する：3468ダルトンの平均分子量及び抗 - 第Xa因子活性：4IU/mg。 20

【 0 1 0 2 】

- BEMI - 99/2：それは、脱 - N - 硫酸化反応により変更された硫酸化の程度を有する低分子量ヘパリンである。これは、五糖が影響されるので、その抗 - 第Xa因子活性の低下を包含する。 30

このヘパリンを得るための修飾は、Nagasawa and Inoue (Nagasawa K, Inoue Y. De-N-sulfation. Methods Carbohydr. Chem. 1980; 6:287-289)により記載される条件に基づかれる。

【 0 1 0 3 】

3gのベミパリンピリジニウム塩 (前記例に示されるようにして調製された) を、10%メタノールを含む450mlのジメチルスルホキシドに溶解し、そしてその溶液を55 で2時間、保持する。この後、pHを水酸化ナトリウムにより9.0~9.5に調節し、そしてそれを15分間、攪拌する。その溶液を塩酸により中和し、0.5gの塩化ナトリウムを溶解し、そしてそれを3体積のメタノールの添加により沈殿し、脱 - N, O - 硫酸化された誘導体を得る。0.91gのBEMI - 99/2を得る。得られる生成物は次の特徴を有する：3619ダルトンの平均分子量及び抗 - 第Xa因子活性：19IU/mg。 40

【 0 1 0 4 】

- H13-96/5：それは、低い程度のアセチル化を有する低分子量ヘパリンである。この理由のために、その抗 - 第Xa因子活性は、その五糖部分が定性的に及び定量的に影響されるので、相当に低下する。

【 0 1 0 5 】

この場合、このグリコサミノグリカンを得ることができるとためには、脱 - N - アセチル化を、Shaklee and Conrad (Shaklee PN, Conrad HE. Hydrazinolysis of heparin and other glycosaminoglycans. Biochem J 1984; 217:187-197)により記載される条件に従っ 50

て実施する。従って、5gのRO-14を、1%硫酸ヒドラジンを含む125mlの無水ヒドラジンに溶解し、そして95℃で6時間、保持する。その溶液を濃縮乾燥し、最少量の水に再溶解し、そして塩酸により中和する。2.5gの塩化ナトリウムを添加し、そして3体積のメタノールにより沈殿し、生成物のH13-96/5 (3.4g)を得る。得られる生成物は次の特徴を有する：2008ダルトンの平均分子量及び抗-第Xa因子活性：46IU/mg。

【0106】

-BP06408-66/27-A：それは、ATIII 上での親和性クロマトグラフィーによるベミパリンの分別により得られる、低められた抗-第Xa因子活性を有する低分子量ヘパリンである。

この誘導体を得るために、10mgのベミパリンを、Hook et al. (Hook M, Bjork I, Hopwood J, Lindahl U. FEBS Lett. 1976; 66, :90-93)により記載される条件に従って調製された、(ヒト)ATIII により前もって活性化された、CNBr-活性化されたSephacrose 4Bカラムに通す。カラムを、1mMのトリス-HCl + 0.4MのNaClの緩衝溶液 (pH7.40) により4で溶出し、従って低親和性の画分を溶出する。

【0107】

この画分を、水により溶出するBiogel P2カラムにより精製する。生成物を含む溶液を凍結乾燥し、最終的に7.6mgの生成物を得る。得られる生成物は次の特徴を有する：3567ダルトンの平均分子量及び抗-第Xa因子活性：32IU/mg。

【0108】

-BP06408-66/28-A：それは、ATIII 上での親和性クロマトグラフィーによるベミパリンの分別により得られる、最少化された抗-第Xa因子活性を有する低分子量ヘパリンである。

この誘導体を得るために、10mgのベミパリンを、前記生成物の調製に記載される親和性カラムに通す。カラムを、1mMのトリス-HCl + 0.25MのNaClの緩衝溶液 (pH7.40) により4で溶出し、従って低親和性の画分を溶出する。

【0109】

この画分を、水により溶出するBiogel P2カラムにより精製する。生成物を含む溶液を凍結乾燥し、最終的に3.6mgの生成物を得る。得られる生成物は次の特徴を有する：3611ダルトンの平均分子量及び抗-第Xa因子活性：5.4IU/mg。

実施される実験は一般的に次の通りであった：グリコサミノグリカン画分の調製、及びNMRによるその定量化及び同定、及び前もって糖尿病化されたWistarラット及び前記潰瘍の治癒の評価のための遺伝子的に修飾されたマウスへの投与。

NMRによる画分の定量化及び同定の研究：

【0110】

生成物の単糖割合の決定：

本発明は、市販のサンプル及び彼ら自身の研究サンプルを分析し、糖尿病性足部潰瘍の治癒を担当するそれらの単糖類の単糖割合、及び五糖に存在する異なった糖画分を決定した。

【0111】

グリコサミノグリカン (GAG) における単糖類の平均含有率を、Marco Guerriniなどにより記載される方法に従って、定量的¹³C-¹H HSQC (複素核シグナル量子コヒーレンス) 二次元実験を用いて、核磁気共鳴 (NMR) 技法により決定した。二次元により達成される解像度の上昇は、一次元スペクトルにおいてオーバーラッピングするシグナルの定量化を可能し、この技法は、複雑な炭水化物、例えばGAGを研究するために特別な興味の対象である。それらの分子は、それらの定量化のために1Dにおける単離されたピークの領域を決定するために、それを困難にする一次元¹Hスペクトルにおいて重度のオーバーラップ問題を有する。

【0112】

天然ヘパリンから得られたGAGに存在するN-スルホ-3-スルホ-D-グルコサミンG (ANS, 3S) に結合されるD-グルクロン酸の単位の量は、M. Guerriniなどにより記載され

10

20

30

40

50

るように、その抗-Xa活性に直接関係する。この二糖は、抗トロンビンIIIとの相互作用を担当する五糖に属し、そして活性配列において単に検出される。直接的に結合される水素を有する、このタイプのグルクロン酸のアノマー炭素の相互関係シグナルは、HSQCスペクトルにおいて特徴的且つオーバーラップフリーの領域に出現し、そして従って、GAGにおける五糖の割合を定量化するために使用され得る。

【0113】

フォンダパリヌクス及び異なったGAGの ^{13}C - ^1H HSQCスペクトルは、添付される図2A~2Lに示されており、ここで五糖のグルクロン酸の単位に相当するアノマープロトンの ^1H - ^{13}C 相互関係シグナルが円により強調されている。

【0114】

スペクトルにおけるこのシグナルの強度の測定は、五糖の割合の決定を可能する。この結果は、単糖G-(ANS, 3S)の百分率が、その割合が20%であるフォンダパリヌクスとは異なって、分析されるGAGにおいて決して3%を越えない。

しかしながら、研究されるGAGは、新規単糖単位、例えば硫酸化されていないイズロン酸環(I)又はN-アセチル化されたグルコサミン(ANAc)を有する。同様に、2-硫酸化されたイズロン酸のその単位の割合は、五糖においてよりも一層高い。従って、分析されるサンプルは、フォンダパリヌクスとは異なったオリゴ糖鎖をほとんど含む。

【0115】

【表 3】

表 3

画分	フォンダ パリヌクス	ベミ パリン	R014	H13_96_5	BEMI_99_2	BEMI_99_4	BP06408 66/27A	BP06408 66/28A	エノキ サパリン	δ- パリン	チンザ パリン	分別されて いない ヘパリン	%
ANS	40	44.4	35.3	39.6	-	44.4	43.4	49.3	40.65	37.3	42.45	42.6	25-50
ANAc	0	2.9	2.2	0.1	2.5	6.03	1.8	4.1	5.6	5.15	7.5	5.1	0-10
I2S	20	30.7	28.3	23.1	26.9	0	34.6	22.6	26	37.7	30.2	38.4	0-50
I	0	2.8	3.3	1.4	1.8	34.2	1.8	1.3	3.35	5.0	4.30	5.7	0-35
G	20	5.7	5.7	6.8	5.7	9.26	6.2	8.6	8.4	7.25	7.9	7.0	3-25
A _{NS,3S}	20	2.4	3.1	3.0	0	0	<0.1	0	2.2	2.3	1.0	2.2	<20
G-A _{NS,3S}	20	1.5	2.6	1.9	0	0	<0.1	0	1.7	2.05	1.05	1.0	<20

この表におけるすべてのデータは、%で表される。

ANS : N-スルホ-D-グルコサミン

ANAc : N-アセチル-D-グルコサミン

I2S : 2-硫酸化されたL-イズロン酸

I : L-イズロン酸、G : D-グルクロン酸

A_{NS,3S} : N-スルホ-3-スルホ-D-グルコサミン

G-A_{NS,3S} : N-スルホ-3-スルホ-D-グルコサミンに結合されるD-グルクロン酸

【0116】

非経口路によるwistarラットの研究：

例1：wistarラットの糖尿病化：

10

20

30

40

50

この例を実施するために、45mg/kgの用量のストレプトゾシン（STZ）を、筋肉内経路により投与し、8匹のラットを糖尿病にした（Andrades Ja et al. Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. Growth Factors. 2001; 18(4):261-75）。

【0117】

ラット当たり250gの平均体重を有する雄wistarラットを使用し、これに、ラット当たり11.25mgの用量のSTZを、個々のラットの左足への100μlの筋肉内投与により投与した。

甘くされた水（350mg/dL）をすべてのラットに3日間、投与し、そしてグルコース測定を毎日グルコメーターにより実施し、ラットが実際、糖尿病になったかを確認めた。この理由のために、ストレプトゾシンの投与の前、及び投与の4日後、血液を、続く血糖の定量化のために、及びそれらが潰瘍化アッセイの前、糖尿病であったかどうかを見るために、ラットの尾の静脈から採血した。

【0118】

【表4】

表4：wistarラットの重量－血糖測定：

ラット	体重 (g)	血糖 日0 (mg/dL)	血糖 日4 (mg/dL)	血糖 日9 (mg/dL)
1	250	120	>350	>350
2	245	129	>350	----
3	255	119	>350	----
4	250	135	>350	----
5	240	136	>350	----
6	260	171	>350	>350
7	270	124	>350	----
8	245	133	>350	----

【0119】

wistarラットの潰瘍化及び治療の程度の測定：

この例に関しては、合計8匹の雄のWistarラットの3つのグループを選択した：

【0120】

【表5】

表5

対照グループ	2匹のラット
グループ1: 高い用量のヘパリン (217 IU)	3匹のラット
グループ2: 低い用量のヘパリン (108 IU)	3匹のラット

【0121】

個々のグループに含まれるラットの選択はランダムに行われた。

ラットを糖尿病化した後、それぞれ1cmの直径を有する4種の潰瘍を、メスを用いてこれらのラット上に製造した。ケタミン/キシラジンによる麻酔/無覚消失プロトコールは、“Handbook of laboratory animal management and welfare”の本の推薦に従った：

- 麻酔：10mg/kgのキシラジン + 90mg/kgのケタミン IP
- 無覚消失：経口路による300mg/kgのパラセタモール（水に溶解された）

【 0 1 2 2 】

この例においては、潰瘍形成の後日、グループ 1 からの 1 匹のラット及びグループ 2 からの 1 匹のラットを除いて、研究に包含されるすべてのラットは死亡した。死亡の原因は感染現象のためではなく、しかしむしろ、たぶん麻酔の効果のためであった。従って、実験は、それぞれ 4 種の潰瘍を有する 2 匹のラットにより続けられ、1 匹は高い用量のベミパリンを与えられ、そしてもう 1 匹は低用量のベミパリンを与えられ、従って実験は、異なった用量間での治療及び潰瘍形成された表面の差異を観察するために続けられた。

【 0 1 2 3 】

潰瘍を水により処理し、そして潰瘍形成の後、9日間、掃除した。

ベミパリンの投与を、潰瘍の処理のために、皮下経路 (100 μ l) によるベミパリン溶液により実施した。

潰瘍の直径を、治癒の進行を見るために、透明なもの上に潰瘍を追跡することにより定量化した。

表 6 は、日 1 に対する日 9 の面積低下の百分率の計算を示す：

【 0 1 2 4 】

【表 6】

表 6：

108 IU ラット		217 IU ラット	
E	43.23%*	A	26.2%
F	17.36%	B	20.14%
G	32.24%	C	25.64%
H	23.59%	D	37.43%
平均: 24.39 \pm 7.47		平均: 27.35 \pm 7.25	

(*：それは、誤った定量化のために平均から排除される)

【 0 1 2 5 】

治癒の進行：

定量的に、それほど多くない差異が、2 匹のラット間で潰瘍の面積に関して見られる。しかしながら、D = 217 IU ラットの治癒進行は、巨視的にはより良好である。なぜならば、潰瘍の閉鎖は、D = 108 IU ラットよりも低い繊維質含有率を伴って、粒状化又は皮膚組織再生において高い品質を有したからであり、従って定性的改良が、D = 217 投与により、潰瘍形成された組織治癒及び再生に関して見られる。

【 0 1 2 6 】

例 2：wistar ラットの糖尿病化：

この態様を実施するために、45mg/kg の用量のストレプトゾシン (STZ) を、筋肉内経路により投与し、8 匹のラットを糖尿病にした (Andrades Ja et al. Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. Growth Factors. 2001; 18(4):261-75)。

【 0 1 2 7 】

ラット当たり 250g の平均体重を有する雄 wistar ラットを使用し、これに、ラット当たり 11.25mg の用量の STZ を、個々のラットの左足への 100 μ l の筋肉内投与により投与した。

甘くされた水 (350mg/dL) をすべてのラットに 3 日間、投与し、そしてグルコース測定を毎日グルコメーターにより実施し、ラットが実際、糖尿病になったかを確認めた。この理由のために、ストレプトゾシンの投与の前、及び投与の 4 日後、血液を、続く血糖の定量化のために、及びそれらが潰瘍化アッセイの前、糖尿病であったかどうかを見るために、ラットの尾の静脈から採血した。

【 0 1 2 8 】

【 表 7 】

表 7 : wistarラットの重量－血糖測定 :

ラット	体重 (g)	血糖 日 0 (mg/dL)	血糖 日 4 (mg/dL)	血糖 日 9 (mg/dL)
1	240	128	>350	1
2	240	132	>350	2
3	250	121	>350	3
4	260	138	>350	4
5	250	142	>350	5
6	245	136	>350	6
7	265	129	>350	7
8	245	141	>350	8

10

【 0 1 2 9 】

wistarラットの潰瘍化及び治療の程度の測定 :

20

この例に関しては、合計 8 匹の雄のWistarラットの 3 つのグループを選択した :

【 0 1 3 0 】

【 表 8 】

表 8

対照グループ フォンダパリヌクス	2匹のラット
グループ1: 高い用量のヘパリン (217 IU)	3匹のラット
グループ2: 低い用量のヘパリン (108 IU)	3匹のラット

30

【 0 1 3 1 】

個々のグループに含まれるラットの選択はランダムに行われた。

ラットを糖尿病化した後、それぞれ1cmの直径を有する 2 種の潰瘍を、メスを用いてこれらのラット上に製造した。ケタミン/キシラジンによる麻酔/無覚消失プロトコールは、

“ Handbook of laboratory animal management and welfare ” の本の推薦に従った :

- 麻酔 : 10mg/kgのキシラジン + 90mg/kgのケタミン IP
- 無覚消失 : 経口路による300mg/kgのバラセタモール (水に溶解された)

潰瘍を水により処理し、そして潰瘍形成の後、9日間、掃除した。

ベミパリン及びフォンダパリヌクスの投与を、潰瘍の処理のために、皮下経路 (100 μ l) によるベミパリン溶液により実施した。

40

【 0 1 3 2 】

潰瘍の直径を、治癒の進行を見るために、透明なもの上に潰瘍を追跡することにより定量化した。

表 9 は、日 1 に対する日 9 の面積低下の百分率の計算を示す :

【 0 1 3 3 】

【表 9】

表 9 :

217 IU ラット バッチ 1		108 IU ラット バッチ 2		フォンダパリヌクス ラット バッチ 3	
A	29.31%	E	16.96%	H	17.00%*
B	31.85%	F	13.26%	I	20.69%
C	28.40%	G	19.14%	J	21.32%
D	24.89%	H	19.71%	K	23.81%
平均: 27.35±7.25		平均: 24.39±7.47		平均: 20.70±7.20	

10

【0134】

このアッセイの3種のバッチの平均が図3に示される。

治癒の進行:

このアッセイにおいては、潰瘍形成された領域の低下が日0～日9日ですでに出現し（図3を参照のこと）；さらに、例1におけるように、潰瘍形成された組織の治療のタイプに関しての巨視的に定量的差異が実際、見られ、すなわちD=217 IUラットの治癒進行は、フォンダパリヌクスの場合よりも巨視的により良好であり、ここで創傷は日0に対して日9の変動はほとんど存在しなかった。D=217ラットの場合、潰瘍の閉鎖は、D=108 IUラットよりも低い繊維質含有率を伴って、粒状化又は皮膚組織再生において高い品質を有し、従って定性的改良が、D=217投与及びフォンダパリヌクスを伴うラットにより、潰瘍形成された組織治癒及び再生に関して見られる。

20

【0135】

例3:wistarラットの糖尿病化:

この態様を実施するために、45mg/kgの用量のストレプトゾシン（STZ）を、筋肉内経路により投与し、10匹のラットを糖尿病にした（Andrades Ja et al. Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. Growth Factors. 2001; 18(4):261-75）。

30

【0136】

ラット当たり250gの平均体重を有する雄wistarラットを使用し、これに、ラット当たり11.25mgの用量のSTZを、個々のラットの左足への100μlの筋肉内投与により投与した。

糖尿病はすべてのラットのうち6匹に誘発され、そしてそれらの4匹は、糖尿病により引起されなかった慢性潰瘍の治癒の結果を試験するために、非糖尿病対照として残された。

【0137】

甘くされた水（350mg/dL）をラットに3日間、投与し、そしてグルコース測定を毎日グルコメーターにより実施し、ラットが実際、糖尿病になったかを確認した。この理由のために、ストレプトゾシンの投与の前、及び投与の4日後、血液を、続く血糖の定量化のために、及びそれらが潰瘍化アッセイの開始前、糖尿病であったかどうかを見るために、ラットの尾の静脈から採血した。

40

【0138】

【表 10】

表10: wistarラットの重量－血糖測定：

ラット	体重 (g)	血糖 日0 (mg/dL)	血糖 日4 (mg/dL)
1	250	138	>350
2	255	145	>350
3	250	129	>350
4	260	122	>350
5	255	146	>350
6	260	140	>350
非－糖尿病ラット			
ラット	体重 (g)	血糖 日0 (mg/dL)	血糖 日4 (mg/dL)
7	245	135	141
8	260	149	137
9	245	152	129
10	250	148	138

10

20

【0139】

wistarラットの潰瘍化及び治療の程度の測定：

この例に関しては、合計10匹の雄のWistarラットの5つのグループを選択した：

【0140】

【表 11】

表11

非－糖尿病対照グループ	2匹のラット
糖尿病対照グループ	2匹のラット
グループ1: 非－糖尿病ベミバリン (217 IU/ラット)	2匹のラット
グループ2: 糖尿病Bemi 99_2 (2.2 mg/ラット)	2匹のラット
グループ3: 糖尿病フォンダバリヌクス (0.22 mg/ラット)	2匹のラット

30

【0141】

個々のグループに含まれるラットの選択はランダムに行われた。

40

ラットが用意されると、それぞれ1cmの直径を有する2種の潰瘍を、メスを用いてそれらのラット上に製造した。ケタミン/キシラジンによる麻酔/無覚消失プロトコールは、“Handbook of laboratory animal management and welfare” の本の推薦に従った：

- 麻酔：10mg/kgのキシラジン + 90mg/kgのケタミン IP
- 無覚消失：経口路による200mg/kgのイブプロフェン（1Lの水に溶解された）。

【0142】

この例においては、潰瘍形成の後日、グループ3の糖尿病性ラットの1匹が死亡した。この死亡の原因は感染現象のためではなく、しかしむしろ、それはたぶん、麻酔の効果のためであった。従って、実験は、糖尿病性対照グループ、非糖尿病性対照グループ、グループ1及びグループ2のそれぞれ2種の潰瘍を有する8匹のラット、及びグループ3の2

50

種の潰瘍を有する 1 匹のラットにより続けられ、従って、実験は、異なった用量間での治療及び潰瘍形成された表面の差異を観察するために続けられた。

【 0 1 4 3 】

潰瘍を水により処理し、そして潰瘍形成の後、9日間、掃除した。対応する溶液を、潰瘍の処理のためにSC経路（100 μ l）により個々のグループに投与した。潰瘍の直径を、治癒の進行を見るために、透明なもの上に潰瘍を追跡することにより定量化した。

表 1 2 は、日 1 に対する日 9 の治癒の百分率の計算を示す：

【 0 1 4 4 】

【表 1 2】

表12：

非－糖尿病対照	グループ1	糖尿病対照	Bemi 99_2	フォンダ パリヌクス
A 39.85%	A 75.05%	A 56.70%	A 51.98%	A 50.99%
B 46.12%	B 69.83%	B 57.24%	B 37.08%	B 49.55%
C 51.02%	C 72.56%	C 47.41%	C 68.21%	--
D 43.74%	D 69.83%	D 51.82%	D 62.12%	--%
平均：45.18%	平均：71.82%	平均：53.29%	平均：54.85%	平均：50.22%

10

20

【 0 1 4 5 】

治療の百分率の研究をこのアッセイにおいて実施した：観察され得るように、ラットは、9日間の研究工程において、約50%治療率を有し、すなわち9日目には、創傷は半分に低下される。しかしながら、前記例において観察されるように、高い%の下記単糖類：

a) N - スルホ - D - グルコサミン：25 - 50%

b) D - グルクロン酸：3 - 25%、

を有するオリゴ糖類の組成物（ここで、二糖類単位、すなわちN - スルホ - 3 - スルホ - D - グルコサミンに結合されるD - グルクロン酸の割合は20%以上ではない）がそれらに投与される場合、治癒率は約70%に上昇し、そしてその用量が高い場合（合計単糖類に対して多い量）、さらに高いことが観察される。

30

【 0 1 4 6 】

非糖尿病性ラットにおいては、治癒は糖尿病化されたラットに類似する。言い換えれば、糖尿病対照と非糖尿病対照との間での治癒の差異は観察されない。

フォンダパリヌクスがそれらに投与される場合、治癒率は等しいままであり、すなわちその糖尿病性対照に比較して、改良は存在せず、従って、この製品は潰瘍の治癒を真には支持しないことが結論づけられる。

【 0 1 4 7 】

変更された低分子量ヘパリンBemi_99_2が投与される場合、その応答は、その糖尿病性対照と実質的に同じであり、従って、この製品は、それが変更された潰瘍の治癒を担当する単糖類を有する事実のために、潰瘍の治癒を真には支持しないことが結論づけられる。

40

【 0 1 4 8 】

非糖尿病性ベミパリン（217 IU/ラット）の投与の場合、すなわちグループ1のラットの場合、治癒はその非糖尿病対照に比較して、71.82%実質的に低められることが観察され、従って非糖尿病患者の慢性潰瘍（例えば、圧迫性潰瘍）の場合、高い%の下記単糖類：

a) N - スルホ - D - グルコサミン：25 - 50%

b) D - グルクロン酸：3 - 25%、

を有するオリゴ糖類の組成物（ここで、二糖類単位、すなわちN - スルホ - 3 - スルホ - D - グルコサミンに結合されるD - グルクロン酸の割合は20%以上ではない）がそれらに投

50

与される場合、治癒率は約70%であることが観察される。

【0149】

研究の定性的一般的結論として、グループ1のラットの治癒工程は、潰瘍の閉鎖がグループの残りにおいてよりも低い繊維含有率を伴って、粒状化又は皮膚組織再生において高い品質を有したので、巨視的により良好であることが強調される。

経口路によるwistarラットの研究：

この研究の目的は、アッセイ製品：糖尿病性ラット創傷モデルにおける経口路によるこれらの投与の後、フォンダパリヌクスナトリウム及びベミパリンの治癒活性を評価することである。

【0150】

両処理剤は、10ml/kgの投与体積で経口路により投与された。フォンダパリヌクスの場合、10mg/kgの用量が投与され、そしてベミパリンの場合、100mg/kgが投与された。

対照グループは、アッセイ製品を調製するために使用されるキャリアーを単に受けた。アッセイ製品の調製のためのキャリアーは、注射のためには、水中、1.5% (w/v) 炭酸水素溶液である。調製される配合物のpHは8.00以上であることが確かめられた。

【0151】

wistarラットの糖尿病化：

アッセイの開始で、真性糖尿病を、すべての動物において誘発した。このためには、それらは、ストレプトゾトシン (60mg/kg、10ml/kg) の単一の腹腔内注入を受けた。72時間後、糖尿病の確立が、血液グルコースレベルを分析することにより確かめられた。このためには、動物はイソフランにより麻酔され、そして0.8mlの血液を、眼窩後方網状構造から採血した。動物は、15mモル/L以上のグルコース値を有すべきであった。糖尿病の誘発の1週間後、創傷が創造された。

【0152】

動物に麻酔をかけた (ケタミン + キシラジン、90 + 10mg/kg、i.m.)。それらの背部の毛を剃り、そして消毒薬 (ポビドンヨード) によりきれいにし、そして創傷が生じた領域を、すべての動物におけるその位置を均質化するためにテンプレートにより印を付けた。

創傷を、約1.5cmの直径を有する円形の切開により創造し、中間の背側領域の皮膚を除いた。1ml/動物の生理血清を、介入の後、i.p.路により投与した。介入の後、7日間、麻酔薬 (パラセタモール、1mg/ml) を、介入の後、7日間、飲料水に入れて供給した。

【0153】

創傷の創造の後日、及び合計14日間、割り当てられた処理剤を動物に投与した。動物のフォローアップを行い、創傷の進行を、創傷のデジタル写真により、週当たり2度、巨視的に評価した。動物の体重も、週2度、記録した。

最後の投与の後日、動物を、過用量の麻酔薬 (ペントバルビタールナトリウム) により殺害した。創傷が創造された領域を取り出した。前の半分を液体窒素により凍結し、そしてフリーザー (-80 ± 5 °C) に貯蔵し、そして後の半分を、その続く組織学的プロセッシングのためにホルマリンに貯蔵した。

【0154】

治癒の程度の測定：

創傷領域を、次の標準化された式により、その治癒の程度を評価するために、その低下率として計算した：

$$\% \text{ 治癒率} = \left[\left(A_{\text{baseline}} - A_{\text{time}} \right) / \left(A_{\text{baseline}} \right) \right] \times 100$$

介入又は切開の直後に行われた測定を、基線領域として使用した。

【0155】

非糖尿病化されたラット：

次の日及び合計14日間、10mg/kgを、経口路により動物に投与した。

このためには、動物を、グループ当たり少なくとも5匹の動物を有する次の処理グループに、体重に従って、前もって均等に分配した：

【0156】

【表 1 3】

表13

処理	用量
非糖尿病対照	—
フォンダパリヌクスナトリウムにより処理されたラット	10 mg/kg
ベミパリンナトリウムにより処理されたラット	100 mg/kg

10

【0 1 5 7】

創傷の創造の後日及び合計14日間、割り当てられた処理剤を動物に投与した。

動物のフォローアップを行い、創傷の進行を、創傷のデジタル写真により、週当たり2度、巨視的に評価した。動物の体重も、週2度、記録した。

【0 1 5 8】

創傷領域の測定：

創傷領域に対応する値は有意でなかった。この場合、ベミパリンナトリウムにより処理されたラットは、対照動物と同じ程度に、多かれ少なかれ、潰瘍形成領域を低めた。

【0 1 5 9】

組織病理学的評価：

動物を、研究の15日目、殺害し、そして創傷が引起された皮膚の領域をホルマリンに貯蔵し、組織病理学的評価を実施した（ヘマトキシリン - エオシン染色）。

個々の切片を得、組織学的評点をグレードI～グレードV範囲で与え、ここでグレードIは治癒されていない創傷を意味し、そしてグレードVは完全に上皮形成された創傷を意味する。評点は、細胞侵入の程度、粒状化組織の形成、血管形成及び上皮形成に基づかれる。

20

異なったグループに関して得られる組織病理学的評点を、次の表に示す：

【0 1 6 0】

【表 1 4】

30

表14

処理	評点	グレード
非糖尿病対照	10.0	III
フォンダパリヌクスナトリウムにより処理された糖尿病動物	9.5	III
ベミパリンナトリウムにより処理された糖尿病動物	9.0	III

【0 1 6 1】

処理の開始後15日目に殺害された動物に属するすべてのサンプルは、粒状化組織の明白な存在、新血管形成及び多かれ少なかれ、誘発された皮膚潰瘍形成の完全な再上皮化を伴って、治癒活性を進行せしめた。

40

【0 1 6 2】

この場合、すべての動物は多かれ少なかれ、同一程度の平均治癒を示し；しかしながら、対照グループ及びフォンダパリヌクスにより処理されたグループにおいては、平均が計算されるデータにおいて高い変動性が存在することが観察される。いずれの場合においても、ベミパリンナトリウムにより処理されたグループの5匹の動物は、9.0の組織学的値を得、それにより、治癒の程度は驚くべきことには、均等であることが観察される。

【0 1 6 3】

さらに、より著しい痂皮工程が、フォンダパリヌクスにより処理された動物においてよ

50

りもベミパリンにより処理されたグループの場合に観察される。この場合、痂皮の形成が、それが経皮水の損失の制限、及び細菌及び外部病原体に対するバリエーとしての作用（創傷の感染を妨げる）の目的を満たすので、創傷の治癒工程において必須であることが強調されるべきである。

【0164】

この例においては、痂皮が前日に形成されたラットは、真皮のパターンが、痂皮が形成されず、又は小さい動物の創傷に比較して、正常に近いことを、痂皮の組織病理学的分析において示す。その事実にもかかわらず、その低下の後、治癒領域が大きく、そして従って、その測定が、痂皮が形成されなかった動物に比較して、結論的でない。従って、痂皮の形成は、天然の治癒工程の良好なインジケータであり、この特定の場合、ベミパリンにより処理されたグループにおいては単に巨視的に観察される。

10

【0165】

糖尿病ラットにおけるグリコサミノグリカンの第Xa因子阻害活性及び経口路によるその治癒力の関係の研究：

次の日及び合計14日間、10mg/kgを、経口路により動物に投与した。

このためには、動物を、次の処理グループに、体重に従って、前もって均等に分配した：

【0166】

【表15】

20

表15

処理	用量
糖尿病対照	-
フォンダパリヌクスナトリウムにより処理されたラット	10 mg/kg
ベミパリンナトリウムにより処理されたラット	100 mg/kg

【0167】

創傷の創造の後日及び合計14日間、割り当てられた処理剤を動物に投与した。

30

動物のフォローアップを行い、創傷の進行を、創傷のデジタル写真により、週当たり2度、巨視的に評価した。動物の体重も、週2度、記録した。

【0168】

創傷領域の測定：

図11は、ベミパリンナトリウム及びフォンダパリヌクスにより処理された、糖尿病化されたラットに対しての糖尿病化された対照ラットの進行を示す。このグラフは、ベミパリンにより処理されたラットがフォンダパリヌクスにより処理されたラットよりもいかにより良好に治癒するかを示す。潰瘍の領域に関して、すべての製品が比較される場合、高い割合の規則的領域の単糖類を有するグリコサミノグリカンがいかにして、創傷の治癒に対して有益な効果を有するかが観察される。

40

【0169】

組織病理学的評価：

動物を、研究の15日目、殺害し、そして創傷が引起された皮膚の領域をホルマリンに貯蔵し、組織病理学的評価を実施した（ヘマトキシリン - エオシン染色）。

個々の切片を得、組織学的評点をグレードI～グレードV範囲で与え、ここでグレードIは治癒されていない創傷を意味し、そしてグレードVは完全に上皮形成された創傷を意味する。評点は、細胞侵入の程度、粒状化組織の形成、血管形成及び上皮形成に基づかれる。

【0170】

50

【表 16】

表16

グレード	評点	説明
I	1-3	無し～最少の細胞蓄積、粒状化組織の非存在、又は皮膚成長。
II	4-6	炎症性細胞に支配される良好且つ未成熟粒状化組織、但し少数の線維芽細胞、毛細管又はコラーゲン沈着を伴う；最少上皮移動
III	7-9	適度に厚い粒状化組織。それは、炎症性細胞～線維芽細胞の高い存在及びコラーゲン沈着、高い新生血管形成、最少～中位の上皮移動により支配されることから変動する。
IV	10-12	線維芽細胞及び高いコラーゲン沈着により支配されている厚く且つ血管粒状化組織。上皮が創傷を部分的に又は完結に被覆する。
V	13-15	多かれ少なかれ、創傷の痕跡を伴わないで、全体的に上皮形成された創傷に対応する領域。

10

【0171】

異なったグループに関して得られる組織病理学的評点を、次の表に示す：

【表 17】

20

表17

処理	評点	グレード
糖尿病対照	10.0	III
フォンダバリヌクスナトリウムにより処理された糖尿病動物	9.5	III
ベミパリンナトリウムにより処理された糖尿病動物	11.3	IV

【0172】

30

処理の開始後15日目に殺害された動物に属するすべてのサンプルは、粒状化組織の明白な存在、新血管形成及び多かれ少なかれ、誘発された皮膚潰瘍形成の完全な再上皮化を伴って、治癒活性を進行せしめた。

より高い治癒レベルを伴って、より進行した粒状化組織、すなわち強い新生血管形成がすべての動物において得られた結果においての高い均等性の他に、ベミパリンナトリウムにより処理されたグループにおいて観察される。ベミパリンナトリウムにより処理された高血糖動物は、血糖正常対照グループのそれらのレベルよりも高い治癒レベルを示した。

それらの結果は、ベミパリンナトリウムにより処理された糖尿病動物において高い治療レベルの入手に基づいて、組織学的発見により支持される。

【0173】

40

遺伝学的に誘発された糖尿病を有する糖尿病マウスにおける糖尿病性足潰瘍の皮下路による研究：

例 4：C57BL/KS BKS.Cg-m +Lepr^{db} /+Lepr^{db} /J糖尿病マウスの潰瘍形成、治癒の程度の測定及び組織学的評価：

C57BL/KsJ-db/db糖尿病マウスを、タイプI糖尿病モデルである、前の例において使用されるストレプトゾトシンにより誘発された糖尿病を有するマウスとは異なって、変更された治癒を有するタイプII糖尿病モデルとして使用した (Michaels, J., et al, db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model. Wound Repair Regen, 2007, 15(5): p. 665-70)。遺伝学的糖尿病マウスは、成人糖尿病において観察されるそれらに

50

類似するインスリン及び高血糖に対する耐性を進行する。それらの動物の背部に創造された全体的な厚さの創傷は、非糖尿病動物において引起される同じ創傷よりも、粒状化組織の形成及び閉鎖において時間がかかる。

【0174】

アッセイの最初の日、動物に麻酔をかけた（ケタミン＋キシラジン、100＋10mg/kg、i.m.）。動物の背部の毛を剃り、そして消毒薬によりきれいにし、そして創傷の領域を、すべての動物におけるその位置を同じにするためにテンプレートにより印を付けた。

創傷を、約1.5cmの直径を有する円形の切開により創造し、中間の背側領域の皮膚を除いた。続いて、半透性ドレッシングをその創傷上に置いた。1ml/動物の生理血清を、介入の後、i.p.路により投与した。

10

【0175】

介入の後、7日間、麻酔薬（パラセタモール、1mg/ml）を、飲料水に入れて供給した。

創傷領域を、次の標準化された式により、その治癒の程度を評価するために、その低下率として計算した：

$$\% \text{治癒率} = (A_{\text{baseline}} - A_{\text{time}}) / (A_{\text{baseline}}) \times 100$$

介入又は切開の直後に行われた測定を、基線領域として使用した。次の日、及び合計14日間、割当てられた処理剤を動物に投与した。

【0176】

グリコサミノグリカンの第Xa因子阻害活性及び皮下路によるその治癒力の関係の研究：

次の日及び合計14日間、10mg/kgを、創傷の領域を回避するために、動物の背部への皮下路により動物に投与した。

20

このためには、動物を、次の処理グループに、体重に従って、前もって均等に分配した：

【0177】

【表18】

表18

処理	用量
糖尿病対照	-
フォンダパリヌクスナトリウムにより処理された糖尿病動物	1 mg/kg
ベミパリンナトリウムにより処理された糖尿病動物	1000 IU Xa/kg
ヘパリンカルシウムにより処理された糖尿病動物	600 IU Xa/kg
BP06408-66/28-Aにより処理された糖尿病動物	10 mg/kg
R0-14により処理された糖尿病動物	1000 IU Xa/kg

30

【0178】

動物のフォローアップを、21日間（この動物モデルにおける創傷の治療のために必要な平均時間）まで、実施した。評価は、創傷のデジタル写真及び続く映像分析により実施した。

40

【0179】

創傷領域の測定：

図4は、ベミパリンナトリウムにより処理されたマウスに対する糖尿病対照マウスの進行を示す。創傷領域は、個々の動物の右側に示された。

図5は、時間に対する創傷の治療率の進行を示す。

未処理の糖尿病性動物は、それらは21日目、90%治療率に達しないので、遅い治癒速度を示す動物であり、続いて完全な治療に達しなかった動物はフォンダパリヌクスにより処理され、21日目に96%に達する。ベミパリンにより処理された動物は、21日目で完全な治療に達し、そして18日目から98%の治癒値を有する。

50

【0180】

それらの結果は、使用されるグリコサミノグリカンの抗-Xa活性（抗トロンビンIIIへの結合を担当する五糖の存在により決定される）と、治癒に対するそれらの有益な効果との間に関係は存在せず、なぜならばベミパリンナトリウムはその構造における五糖の最低含有率の製品であるからであり（単糖類の合計含有率のわずかに1.5%が五糖の特徴的なN-スルホ-3-スルホ-D-グルコサミンに結合されるD-グルクロン酸に対応する）、そしてしかしながら、それはフォンダパリヌクス（純粋な五糖、N-スルホ-3-スルホ-D-グルコサミンに結合されるD-グルクロン酸は単糖類の合計含有率の20%を表す）よりも短い治癒時間を有することを示す。

【0181】

潰瘍の領域に関して、すべての製品が比較される場合、規則的領域の高い割合の単糖類を有するグリコサミノグリカンが創傷の治療において有益な効果をいかにして有するかが観察される。この事実は、分別されていないヘパリン及びベミパリンナトリウムが治癒を支持し、投与の後11日目、80%以上の百分率を入手することが、図5において観察される。

10

【0182】

巨視的評価：

取り出されたデータにおいては、相当な巨視的差異が、分別されていないヘパリンカルシウム、R0-14及びベミパリン間で観察され、異なった挙動性が観察の5日目から観察される。この手段で、ベミパリンにより処理されたグループが処理の5日後、いかにして傷跡の性質において明白な差異を示すかが見出され、粒状化組織により被覆される層が創傷において（この事実は対照グループにおいて生じない）、及びフォンダパリヌクスにより処理されたグループにおいては、一部、観察される。

20

【0183】

この特異的事実は、治癒の工程及び性質における評価を示し（図5に観察されるように）、なぜならば粒状化組織は、可能性ある感染から動物を保護する他、細胞組織再生及び治療を担当できるからである。

【0184】

さらに、対照グループにおいては、粒状化組織が生成されないことが観察され（創傷の基部が透明且つ輝く）、そしてフォンダパリヌクスにより処理されたグループにおいては、創傷の端にのみ見られる。従って、対照糖尿病性マウスの創傷及びフォンダパリヌクスにより処理されたそれらの閉鎖は、創傷の端の収縮により生じ、この工程は、粒状化組織の形成により生じる工程よりも遅い。さらに、ベミパリンにより処理されたグループの創傷は18日目に閉鎖し、ところが対照グループにおいては、創傷は開いたままであり、感染及び合併症の続く危険性が伴う。

30

【0185】

組織病理学的評価：

動物を、研究の21日目、殺害し、そして創傷が引起された皮膚の領域をホルマリンに貯蔵し、組織病理学的評価を実施した（ヘマトキシリン-エオシン染色）。

個々の切片を得、組織学的評点をグレードI~グレードV範囲で与え、ここでグレードIは治癒されていない創傷を意味し、そしてグレードVは完全に上皮形成された創傷を意味する。評点は、細胞侵入の程度、粒状化組織の形成、血管形成及び上皮形成に基づかれる。

40

【0186】

【表 19】

表19

グレード	評点	説明
I	1-3	無し～最少の細胞蓄積、粒状化組織の非存在、又は皮膚成長。
II	4-6	炎症性細胞に支配される良好且つ未成熟粒状化組織、但し少数の線維芽細胞、毛細管又はコラーゲン沈着を伴う；最少上皮移動
III	7-9	適度に厚い粒状化組織。それは、炎症性細胞～線維芽細胞の高い存在及びコラーゲン沈着、高い新生血管形成、最少～中位の上皮移動により支配されることから変動する。
IV	10-12	線維芽細胞及び高いコラーゲン沈着により支配されている厚く且つ血管粒状化組織。上皮が創傷を部分的に又は完結に被覆する。
V	13-15	多かれ少なかれ、創傷の痕跡を伴わないで、全体的に上皮形成された創傷に対応する領域。

10

【0187】

異なったグループに関して得られる組織病理学的評点を、次の表に示す：

【0188】

20

【表 20】

表20：

処理	評点	グレード
糖尿病対照	6.7	III
フォンダパリヌクスナトリウムにより処理された糖尿病動物	7.2	III
ベミパリンナトリウムにより処理された糖尿病動物	11.5	IV
ヘパリンカルシウムにより処理された糖尿病動物	8.0	III
BP06408-66/28-Aにより処理された糖尿病動物	9.0	III

30

【0189】

皮膚サンプルに対応する切片の形態学的研究は、すべてのグループにおいて瘢痕修復工程の正常な進行を示した。処理されたグループにおいては、粒状化組織が十分に形成され、ベミパリンナトリウムは最良の評点を得、なぜならば、この場合、元の条件への補充による完全に新規の細胞構造が観察されるからであり（図6、パネルCを参照のこと）、ここで次の結果が観察される：

【0190】

A：完全な再上皮化。ほとんどの炎症が皮膚に浸透しない。皮膚における線維芽細胞の適度な存在。皮膚における適度な新規血管形成。

40

B：完全な再上皮化、適度な炎症の浸透、皮膚における多形核好中球の存在。皮膚における線維芽細胞の適度な存在。皮膚における適度な新規血管形成。

C：完全に再生された細胞構造。

【0191】

創傷領域の決定及び組織病理学的評価により得られる結果から、アッセイされた最良の製品は、それが最短の治療時間及び最高の組織性質を有するので、ベミパリンであることが結論づけられ得る。最良に作用すると思われるもう1つの製品は、実験製品EP06408-66/28-Aである。従って、より高い第Xa因子阻害活性は、治療に対しての良好な効果に相互関係しないことが再び示される。

50

【0192】

グリコサミノグリカンの第Xa因子阻害活性及び局部路によるその治癒力の関係の研究：

この場合、潰瘍上への直接的投与のための局部配合物が調製され、この配合物中のキャリアーは、Carbopol, Phenonip (商標)、Span 80、グリセロール及び水により形成される。

領域の潰瘍形成及び測定は、皮下投与アッセイにおいて詳細されるようにして実施された。切開の後日及び合計14日間、割り当てられた処理、すなわち動物背部の創傷上への局部経路による0.15ml/動物が、動物に投与された。

このためには、動物を、次の処理グループに、体重に従って、前もって均等に分配した：

【0193】

【表21】

表21

処理	用量
糖尿病対照	—
ベミパリンナトリウムにより処理された糖尿病動物	1000 IU/kg
フォンダパリヌクスナトリウムにより処理された糖尿病動物	1000 IU/kg
ヘパリンカルシウムにより処理された糖尿病動物	1000 IU/kg

【0194】

動物のフォローアップを、14日間（この動物モデルにおける創傷の治療のために必要な平均時間）まで、実施した。評価は、創傷のデジタル写真及び続く映像分析により実施した。図7は、対照グループに比較して、処理グループの創傷低下率の進行の全体的値を示す。グラフから観察されるように、最良の創傷はベミパリンにより観察され、60%以上の領域低下の値が、処理の最後で得られる。

【0195】

巨視的評価：

巨視的に観察されるように、相当の差異が、すべてのグループ（対照、ベミパリン、ボンダパリヌクス及び分別されていないヘパリンカルシウム（NFH）において見られており、異なった挙動性が観察の7日目の後、区別される。

【0196】

対照グループにおいては、それは、粒状化組織が生成されていない7日目に観察されるが（創傷の基部は透明且つ輝いている）、処理されたグループは処理の同じ日、瘢痕の性質における明白な差異を示すことが対照的に見出され、粒状化組織により被覆される層が創傷において観察される。この特異的事実は、治癒の工程及び性質における評価を示し、なぜならば粒状化組織は、線維芽細胞、毛細血管及びコラーゲンにおいて非常に富んでいるので、可能性ある感染から動物を保護する他、細胞組織再生及び治療を担当できるからである。

【0197】

組織病理学的評価：

動物を、最後の投与後の日（15日目）、殺害し、そして創傷が創造された領域を取り出した。創傷を含む領域の後方部を、その組織学的プロセッシングのためにホルマリンに貯蔵した（ヘマトキシリン - エオシン染色）。

【0198】

その結果は、Greenhalghなど、(1990)の方法により与えられる評点に基づかれた。個々のブロックが1～15の組織学的評点を与えられ、ここで1は治癒されなかった創傷を意味し、そして15は完全に上皮形成された創傷を意味する。その評点は、細胞侵入の程度、粒

10

20

30

40

50

状化組織の形成、血管形成及び上皮形成に基づかれる。

異なったグループについて得られる組織病理学的評点が、下記表に示される：

【 0 1 9 9 】

【 表 2 2 】

表22

処理	評点	グレード
糖尿病対照	6.7	III
ベミパリンにより処理された糖尿病動物	8.7	III
フォンダパリヌクスにより処理された糖尿病動物	8.6	III
NFHにより処理された糖尿病動物	9.4	IV

10

【 0 2 0 0 】

3種の処理されたグループは一般的に、少なくとも2つの点で、対照グループよりも良好な組織学的評点を得る。すべてのグループ（対照及び処理されたグループ）における治癒が適度に厚い粒状化組織の存在により特徴づけられる事実にかかわらず、それらの間の差異は、処理されたグループに良くあることだが、線維芽細胞及びコラーゲン組織沈着の存在に比較して、対照グループの場合に生じるように、炎症性細胞の高い存在下にある。これは、対照グループの場合、治癒工程が初期段階に存在し、従って創傷領域低下の研究において示される遅い治療速度を説明することを示す。処理内で、ベミパリン及びNFHにより処理されたグループに属する皮膚サンプルは、幾分より進行した癒痕修復速度、より進行した粒状化組織、線維芽細胞及び皮膚新生血管形成の高い存在を有する。

20

【 0 2 0 1 】

NFHにより処理されたグループは、他のグループに関する治療において、より高い性質を示す、グレードIV内に包含される、組織学的評点において異なる。形成される粒状化組織は厚く、そして強いコラーゲン繊維沈着を伴って、線維芽細胞により支配される上皮は、創傷を部分的に又は完全に被覆する。

【 0 2 0 2 】

創傷領域の決定により得られる結果から、及び組織病理学的評価により、アッセイされる最良の製品はベミパリン及びNFHであることが結論づけられ得る。ベミパリンは高い治癒速度を有し、ところがNFHの場合、治癒は遅いが、しかし形成される組織における高い性質を有する。

30

【 0 2 0 3 】

例 5 : C57BL/KS.Cg-m Lepr^{db} +/+ mマウスの潰瘍形成、治癒の程度の測定及び組織学的評価：

非糖尿病動物におけるNFH及びLMWHの治癒効果の研究。経口、皮下及び局部路による、非糖尿病患者における慢性潰瘍の処理へのヘパリンの可能性ある適用の決定。

C57BL/KS.Cg-m Lepr^{db} +/+ mマウスは、前の例に使用されるマウスの非糖尿病性類似体である。

40

【 0 2 0 4 】

アッセイの最初の日、動物に麻酔をかけた（ケタミン＋キシラジン、100＋10mg/kg、i.m.）。動物の背部の毛を剃り、そしてその領域を消毒薬によりきれいにし、そして創傷の領域を、すべての動物におけるその位置を同じにするためにテンプレートにより印を付けた。

創傷を、約1.5cmの直径を有する円形の切開により創造し、中間の背側領域の皮膚を除いた。続いて、半透性ドレッシングをその創傷上に置いた。1ml/動物の生理血清を、介入の後、i.p.路により投与した。

【 0 2 0 5 】

介入の後、7日間、麻酔薬（パラセタモール、1mg/ml）を、飲料水に入れて供給した。

50

創傷領域を、次の標準化された式により、その治癒の程度を評価するために、その低下率として計算した：

$$\% \text{ 治癒率} = [(A_{\text{baseline}} - A_{\text{time}}) / (A_{\text{baseline}})] \times 100$$

介入又は切開の直後に行われた測定を、基線領域として使用した。次の日、及び合計14日間、割当てられた処理剤を動物に投与した。

【0206】

グリコサミノグリカンの第Xa因子阻害活性及び皮下路によるその治癒力の関係の研究：

次の日及び合計14日間、10mg/kgを、創傷の領域を回避するために、動物の背部への皮下路により動物に投与した。

このためには、動物を、次の処理グループに、体重に従って、前もって均等に分配した：

【0207】

【表23】

表23

処理	用量
非糖尿病対照	-
ベミパリン Na により処理された非糖尿病動物	1000 IU Xa/kg
ヘパリン Ca により処理された非糖尿病動物	600 IU Xa/kg
BP06408-66/28-A により処理された非糖尿病動物	10 mg/kg

20

【0208】

動物のフォローアップを、21日間まで、実施した。評価は、創傷のデジタル写真及び続く映像分析により実施した。

図8は、ヘパリンカルシウムにより処理されたマウスに対する非糖尿病対照マウスの進行を示す。創傷領域は、個々の動物の右側に示された。

【0209】

図9は、時間に対する創傷の治療率の進行を示す。

30

未処理の非糖尿病性動物は、14日後、90%以上の創傷低下の値に達する。ベミパリンナトリウムによる処理は、治癒速度を改良しない。しかしながら、ヘパリンカルシウムにより処理された動物は、対照に対して改良し、11日目、90%の治癒率に達する。

【0210】

巨視的評価：

3種の動物グループは正常な治癒工程を有し、創傷は21日目で治癒される。しかしながら、ヘパリンカルシウムにより処理されたマウスグループにおいては、その工程は、11日目、創傷は乾燥し、そして閉鎖され、そして21日目、それは毛により被覆されるので、加速したように思える。

【0211】

40

組織病理学的評価：

動物を、研究の21日目、殺害し、そして創傷が引起された皮膚の領域をホルマリンに貯蔵し、組織病理学的評価を実施した（ヘマトキシリン - エオシン染色）。

個々の切片を得、組織学的評点をグレードI～グレードV範囲で与え、ここでグレードIは治癒されていない創傷を意味し、そしてグレードVは完全に上皮形成された創傷を意味する。評点は、細胞侵入の程度、粒状化組織の形成、血管形成及び上皮形成に基づかれる。

【0212】

【表 2 4】

表24

グレード	評点	説明
I	1-3	無し～最少の細胞蓄積、粒状化組織の非存在、又は皮膚成長。
II	4-6	炎症性細胞に支配される良好且つ未成熟粒状化組織、但し少数の線維芽細胞、毛細管又はコラーゲン沈着を伴う；最少上皮移動
III	7-9	適度に厚い粒状化組織。それは、炎症性細胞～線維芽細胞の高い存在及びコラーゲン沈着、高い新生血管形成、最少～中位の上皮移動により支配されることから変動する。
IV	10-12	線維芽細胞及び高いコラーゲン沈着により支配されている厚く且つ血管粒状化組織。上皮が創傷を部分的に又は完結に被覆する。
V	13-15	多かれ少なかれ、創傷の痕跡を伴わないで、全体的に上皮形成された創傷に対応する領域。

10

【 0 2 1 3 】

異なったグループに関して得られる組織病理学的評点が、次の表 2 5 に示される：

【 0 2 1 4 】

20

【表 2 5】

表25：

処理	評点	グレード
非糖尿病対照	11.7	IV
ベミパリンナトリウムにより処理された非糖尿病動物	8	III
ヘパリンカルシウムにより処理された非糖尿病動物	15	V
BP06408-66/28-Aにより処理された非糖尿病動物	12.8	V

30

【 0 2 1 5 】

皮膚サンプルに対応する切片の形態学的研究は、すべてのグループにおいて瘢痕修復工程の正常な進行を示した。処理されたすべてのグループにおいては、粒状化組織が十分に形成され、ヘパリンカルシウムによる処理において最良の評点が得られ、なぜならば、この場合、元の条件への補充による完全に新規の細胞構造が観察されるからである。さらに、非糖尿病動物の場合、その構造に五糖の存在をほとんど有さない、調査製品BP06408-66/28Aのサンプルにより得られる評価は、完全な細胞構造及び非常に高い程度の上皮形成を伴って、特に良好であり、これは、高い第Xa因子阻害活性が慢性潰瘍の処理のために必要でないことを再び示し、なぜならば、それは治癒に対しての良好な効果と相互関係しないからである。

40

【 0 2 1 6 】

図10は、ヘマトキシリン - エオシンによる染色の後、創傷の切片の顕微写真を示す：A：非糖尿病対照、B：ベミパリンナトリウムにより処理された非糖尿病性動物、C：ヘパリンカルシウムにより処理された非糖尿病性動物。得られる結果は次の通りであった：

A：完全な再上皮化。変更は観察されなかった。

B：完全な再上皮化。軽い炎症の浸透、皮膚における多形核好中球。皮膚における多核巨細胞の存在。皮膚における線維芽細胞の適度な存在。皮膚における適度な新規血管形成。

【 0 2 1 7 】

50

C：完全に再生された細胞構造。

創傷領域の決定及び組織病理学的評価により得られる結果から、続いて研究段階EP0640 8-66/28-Aにおける製品により得られる結果から、ヘパリンカルシウムによる処理が非糖尿病性動物の治療に対する有益な効果、短い治療時間、及び完全に再生された細胞構造を有することが結論づけられる。従って、本発明のグリコサミノグリカン目的物は、糖尿病性足潰瘍とは異なる他の慢性潰瘍の処理のために使用され得る。

【 0 2 1 8 】

上記例により拘束されることは望まないが、得られる結果及び動物において観察される挙動性のために、本発明は他の枝分れされた又は枝なしの多糖類、例えば中でも、ペントサンポリスルフェート、 α -グルカン、硫酸コンドロイチン、硫酸デルマタン、カラギーナン、アルギネート、アラビノキシラン、ガラクトマンナン及びグルコマンナンのためにたぶん作動するであろうと思われる。

10

【 図 1 】

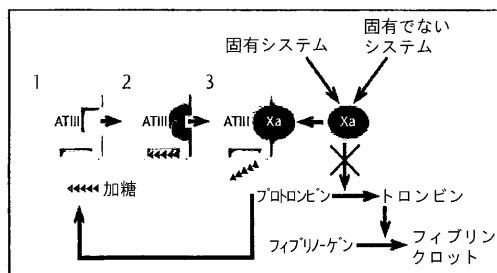


図1

【 図 2 B 】

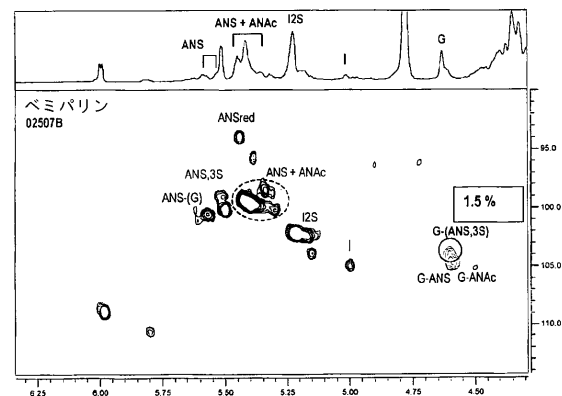


図2B

【 図 2 A 】

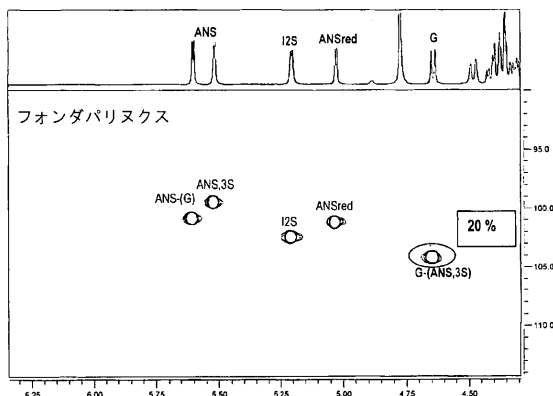
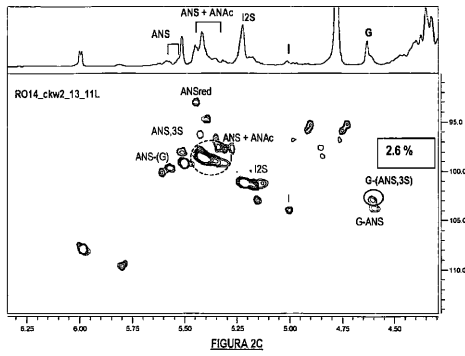
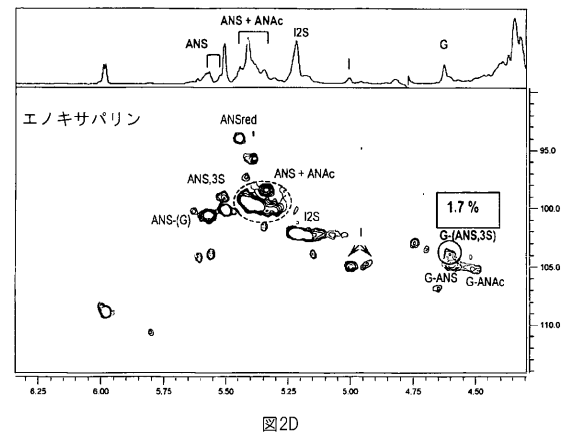


図2A

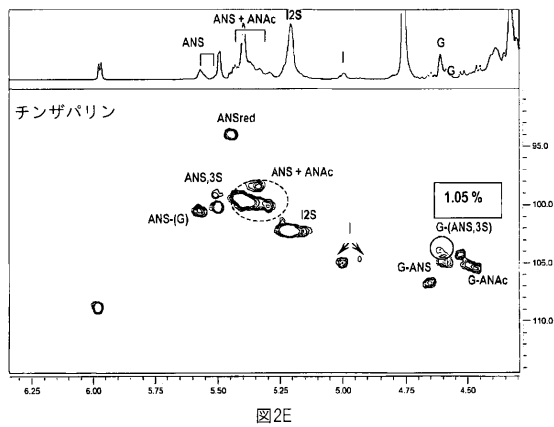
【 図 2 C 】



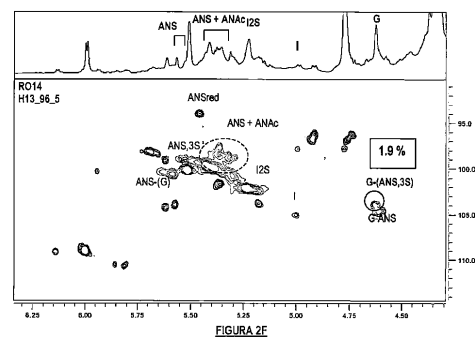
【 図 2 D 】



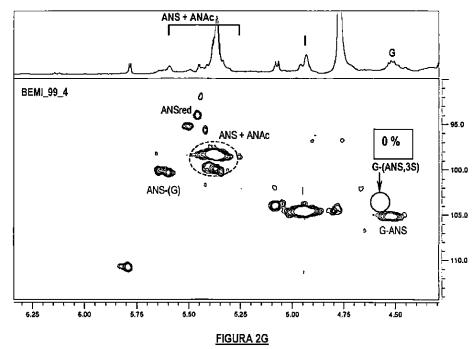
【 図 2 E 】



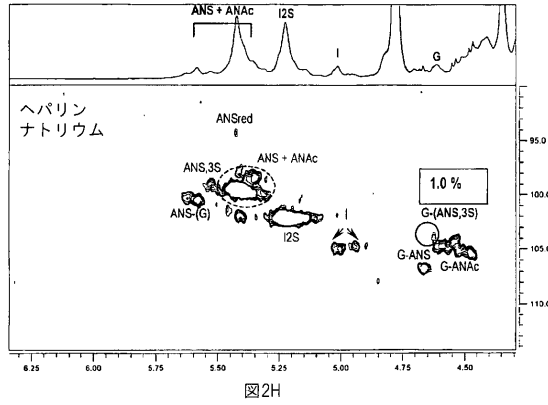
【 図 2 F 】



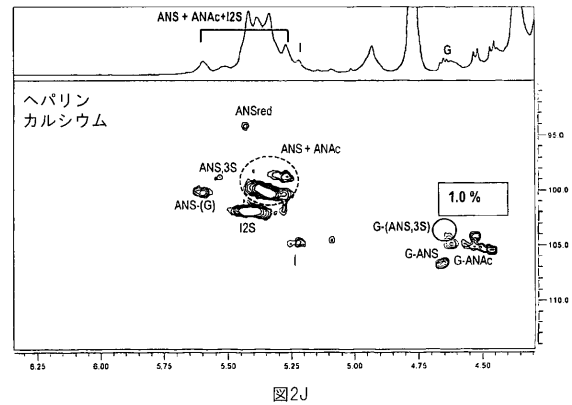
【 図 2 G 】



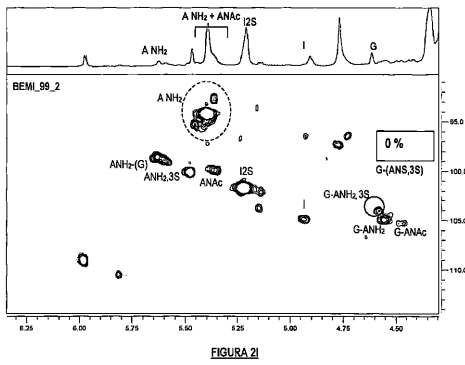
【図 2 H】



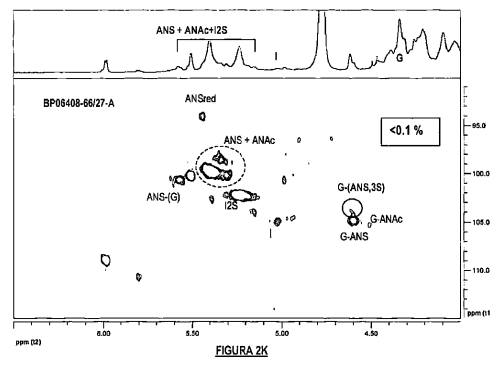
【図 2 J】



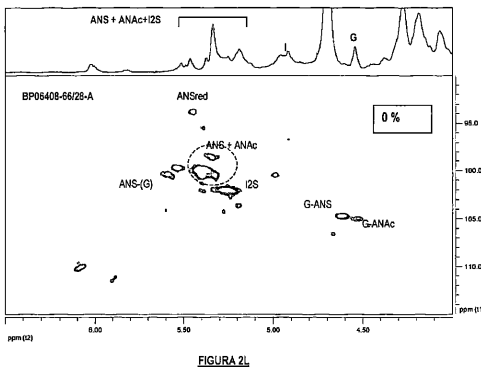
【図 2 I】



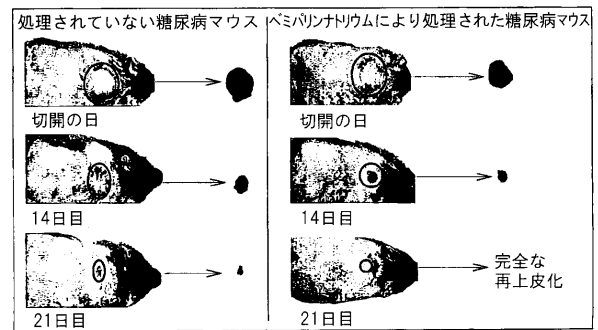
【図 2 K】



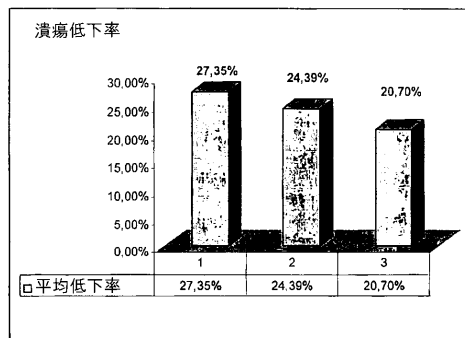
【図 2 L】



【図 4】



【図 3】



【図 5】

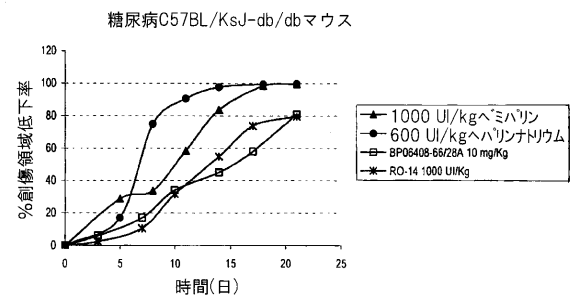


図 5

【図 6】

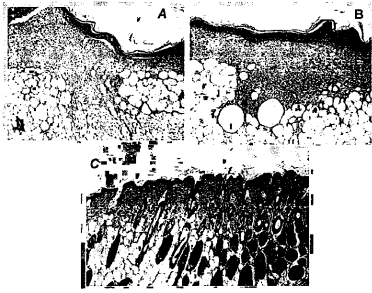


FIGURE 6

【図 7】

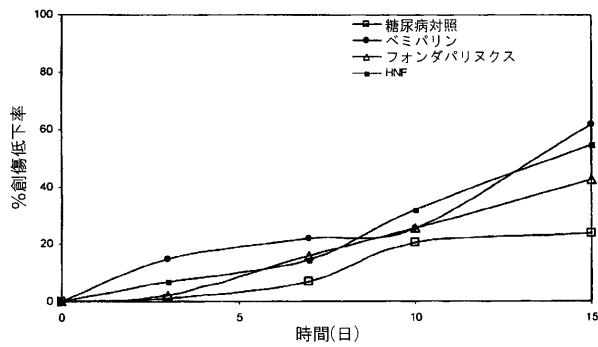


図7

【図 8】

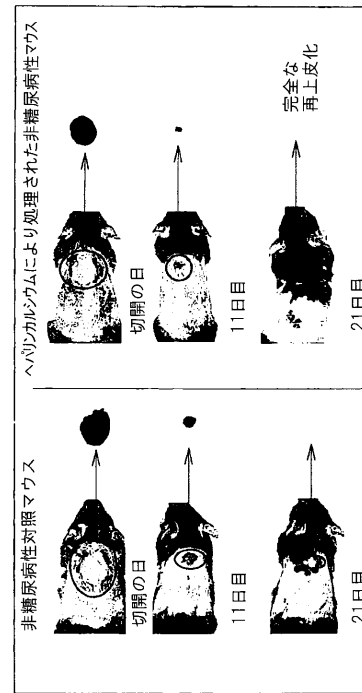


図8

【図 9】

非糖尿病C57BL/KsJ-db/dbマウス

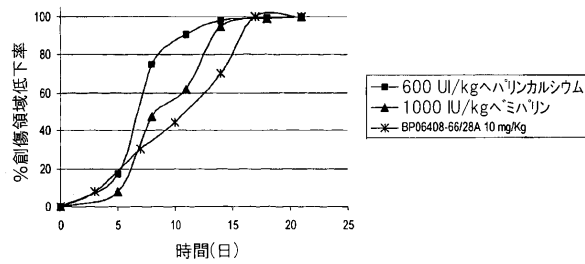


図9

【図 11】

糖尿病化されたWISTARラット

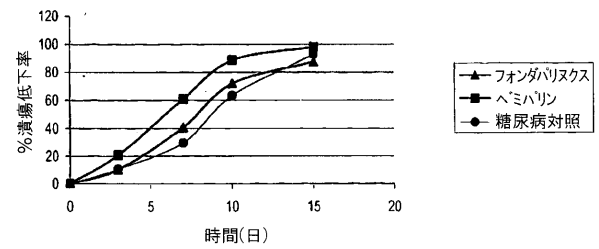


図11

【図 10】

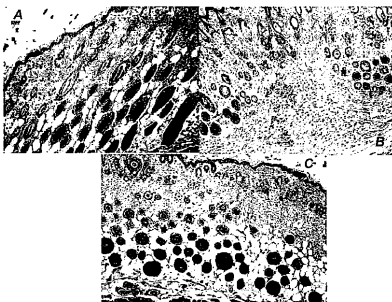


FIGURE 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2009/070264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/727 A61K31/726 A61K9/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KALANI M. ET AL.: "Effect of dalteparin on healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease" DIABETES CARE, vol. 26, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 2575-2580, XP002556862 the whole document	1-23
X	KALANI M. ET AL.: "Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers" THROMBOSIS RESEARCH, vol. 120, 2007, pages 653-661, XP002556863 the whole document	1-23
-/-		
<input checked="" 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 November 2009		10/12/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Giménez Miralles, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2009/070264

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JIVEGARD L ET AL: "Effects of Three Months of Low Molecular Weight Heparin (dalteparin) Treatment After Bypass Surgery for Lower Limb Ischemia-A Randomised Placebo-controlled Double Blind Multicentre Trial" EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND ENDOVASCULAR SURGERY, SAUNDERS, LONDON, GB, vol. 29, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 190-198, XP004707848 ISSN: 1078-5884 the whole document	1-23
X	ROZIN A.P. ET AL.: "Recalcitrant leg ulcer due to mixed connective tissue disease" THE NETHERLANDS JOURNAL OF MEDICINE, vol. 64, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 91-94, XP009126220 the whole document	1-23
X	RULLAN M. ET AL.: "Ensayo clínico, controlado con placebo, triple ciego, para evaluar la eficacia de una heparina de bajo peso molecular (bemiparina) en el tratamiento de las úlceras tórpidas del pie diabético, en atención primaria" ATEN PRIMARIA, vol. 31, no. 8, 2003, pages 539-544, XP002556864 the whole document	1-23
X	US 2006/040896 A1 (KENNEDY THOMAS P [US]) 23 February 2006 (2006-02-23) paragraphs [0069], [0070]	1-23
A	EP 0 513 513 A (ALFA WASSERMANN SPA [IT]) 19 November 1992 (1992-11-19) page 3, line 49 - page 4, line 11	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2009/070264

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006040896 A1	23-02-2006	WO 2006023397 A2	02-03-2006
EP 0513513 A	19-11-1992	CA 2066785 A1	18-11-1992
		DE 69212620 D1	12-09-1996
		DE 69212620 T2	28-11-1996
		IT 1245907 B	25-10-1994
		US 5236910 A	17-08-1993

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2009/070264

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD INV. A61K31/727 A61K31/726 A61K9/08 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) A61K Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	KALANI M. ET AL.: "Effect of dalteparin on healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease" DIABETES CARE, vol. 26, no. 9, September 2003 (2003-09), p. 2575-2580, XP002556862 todo el documento	1-23
X.	KALANI M. ET AL.: "Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers" THROMBOSIS RESEARCH, vol. 120, 2007, p. 653-661, XP002556863 todo el documento	1-23
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "B" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.	
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 23 de Noviembre de 2009		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 10 de Diciembre de 2009
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional: European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Giménez Miralles, J
N° de fax		N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2009/070264

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	JIVEGARD L ET AL: "Effects of Three Months of Low Molecular Weight Heparin (dalteparin) Treatment After Bypass Surgery for Lower Limb Ischemia-A Randomised Placebo-controlled Double Blind Multicentre Trial" EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND ENDOVASCULAR SURGERY, SAUNDERS, LONDON, GB, vol. 29, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), p. 190-198, XP004707848 ISSN: 1078-5884 todo el documento	1-23
X	ROZIN A.P. ET AL.: "Recalcitrant leg ulcer due to mixed connective tissue disease" THE NETHERLANDS JOURNAL OF MEDICINE, vol. 64, no. 3, March 2006 (2006-03), p. 91-94, XP009126220 todo el documento	1-23
X	RULLAN M. ET AL.: "Ensayo clínico, controlado con placebo, triple ciego, para evaluar la eficacia de una heparina de bajo peso molecular (bemiparina) en el tratamiento de las úlceras tórpidas del pie diabético, en atención primaria" ATEN PRIMARIA, vol. 31, no. 8, 2003, p. 539-544, XP002556864 todo el documento	1-23
X	US 2006/040896 A1 (KENNEDY THOMAS P [US]) 23 February 2006 (2006-02-23) párrafo [0069], [0070]	1-23
A	EP 0 513 513 A (ALFA WASSERMANN SPA [IT]) 19 November 1992 (1992-11-19) p. 3, línea 49 - p. 4, línea 11	1-23

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud internacional nº	
Información relativa a miembros de familias de patentes		PCT/ES2009/070264	
Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 2006040896 A1	23-02-2006	WO 2006023397 A2	02-03-2006
EP 0513513 A	19-11-1992	CA 2066785 A1	18-11-1992
		DE 69212620 D1	12-09-1996
		DE 69212620 T2	28-11-1996
		IT 1245907 B	25-10-1994
		US 5236910 A	17-08-1993

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 ロペス - ベルモンテ エンシナ, イバン

スペイン国, エ - 2 8 0 3 7 マドリッド, セノジュリアン カマリロ, 3 5

(72)発明者 カナレス マヨルドモ, マリア デ ロス アンヘレス

スペイン国, エ - 2 8 0 3 7 マドリッド, セノジュリアン カマリロ, 3 5

(72)発明者 セバデラ ミランダ, エレナ

スペイン国, エ - 2 8 0 3 7 マドリッド, セノジュリアン カマリロ, 3 5

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA26 EA27 MA01 MA04 NA14 ZA89 ZC35 ZC54