

(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2008-518090

(P2008-518090A)

(43) 公表日 平成20年5月29日(2008.5.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 8 B 37/10 (2006.01)</b>	C 0 8 B 37/10	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 31/727 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/727	4 C 0 9 0
<b>A 6 1 P 7/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2007-539188 (P2007-539188)	(71) 出願人	507132145
(86) (22) 出願日	平成17年10月26日 (2005.10.26)		パリンジェニックス、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年6月26日 (2007.6.26)		アメリカ合衆国アリゾナ州85711、タクソン、ノース・ウィルモット・ロード
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/039011		101、スウィート 600
(87) 国際公開番号	W02006/047755	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開日	平成18年5月4日 (2006.5.4)		弁理士 奥山 尚一
(31) 優先権主張番号	10/974,566	(74) 代理人	100096769
(32) 優先日	平成16年10月27日 (2004.10.27)		弁理士 有原 幸一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヘパリン起因性血小板減少症 (HIT) 症候群の硫酸化多糖類治療のための方法および医薬

## (57) 【要約】

平均硫酸化度が1単糖あたり0.6硫酸基以上であり、平均分子量が2.4 kD以上の2-O脱硫酸化ヘパリンを用いて、ヘパリン-血小板第4因子複合体反応性抗体の存在下で、血小板活性化または血栓症を治療および予防する方法および医薬。この医薬は、エアロゾル化または経口により静脈内に投与されることが好ましい。好ましくは、2-O脱硫酸化ヘパリン薬には、生理緩衝食塩水、通常の生理食塩水および蒸留水からなる群から選択され得る生理学的に許容される担体を含む。さらに、2-O脱硫酸化ヘパリンを合成する方法が提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

患者においてヘパリン起因性血小板減少症症候群を治療する方法であって、2 - O 脱硫酸化ヘパリンを用いて、ヘパリン - 血小板第 4 因子複合体反応性抗体の存在下で血小板活性化または血栓症を誘導することなく、前記患者へ有効量の硫酸化多糖類を投与するステップを含む方法。

**【請求項 2】**

前記硫酸化多糖類が、1 単糖あたり約 0 . 6 硫酸基以上の平均硫酸化度を有し、2 . 4 k D 以上の平均分子量を有する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記硫酸化多糖類が、2 - O、3 - O 脱硫酸化ヘパリンである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記投与が、静脈内、皮下、吸入、経口、および経直腸からなる群から選択される方法による、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記 2 - O 脱硫酸化ヘパリンが、ヘパリンを含有する溶液を p H 1 3 以上にアルカリ化するステップを含む方法によって作製される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記有効量が、硫酸化多糖類 3 m g / k g ~ 1 0 0 m g / k g である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

患者において H I T 抗体とヘパリンに起因する血小板活性化を改善する方法であって、2 - O 脱硫酸化ヘパリンを用いて、ヘパリン - 血小板第 4 因子複合体反応性抗体の存在下で血小板活性化または血栓症を誘導することなく、前記患者へ有効量の硫酸化多糖類を投与するステップを含む、方法。

**【請求項 8】**

前記硫酸化多糖類が、1 単糖あたり約 0 . 6 硫酸基以上の平均硫酸化度を有し、2 . 4 k D 以上の平均分子量を有する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記硫酸化多糖類が、2 - O、3 - O 脱硫酸化ヘパリンである、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 1 0】**

前記投与が、静脈内、皮下、吸入、経口、および経直腸からなる群から選択される方法による、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 1 1】**

前記 2 - O 脱硫酸化ヘパリンが、ヘパリンを含有する溶液を p H 1 3 以上にアルカリ化するステップを含む方法によって作製される、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 1 2】**

前記有効量が、硫酸化多糖類 3 m g / k g ~ 1 0 0 m g / k g である、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 1 3】**

ヘパリン起因性血小板減少症を発症するリスクの高い患者においてヘパリン起因性血小板減少症症候群を予防する方法であって、2 - O 脱硫酸化ヘパリンを用いて、ヘパリン - 血小板第 4 因子複合体反応性抗体の存在下で血小板活性化または血栓症を誘導することなく、前記患者へ有効量の硫酸化多糖類を投与するステップを含む、方法。

**【請求項 1 4】**

前記硫酸化多糖類が、1 単糖あたり約 0 . 6 硫酸基以上の平均硫酸化度を有し、2 . 4 k D 以上の平均分子量を有する、請求項 1 3 に記載の方法。

**【請求項 1 5】**

10

20

30

40

50

前記硫酸化多糖類が、2 - O、3 - O脱硫酸化ヘパリンである、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記投与が、静脈内、皮下、吸入、経口、および経直腸からなる群から選択される方法による、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

前記2 - O脱硫酸化ヘパリンが、ヘパリンを含有する溶液をpH13以上にアルカリ化するステップを含む方法によって作製される、請求項13に記載の方法。

【請求項18】

前記有効量が、硫酸化多糖類3mg/kg～100mg/kgである、請求項13に記載の方法。

10

【請求項19】

患者においてヘパリン起因性血小板減少症候群を治療する方法であって、2 - O脱硫酸化ヘパリンと、抗トロンビン薬、抗血小板薬、および抗炎症薬からなる群から選択される薬物とを用いて、ヘパリン - 血小板第4因子複合体反応性抗体の存在下で血小板活性化または血栓症を誘導することなく、前記患者へ有効量の硫酸化多糖類を投与するステップを含む、方法。

【請求項20】

前記硫酸化多糖類が、1単糖あたり約0.6硫酸基以上の平均硫酸化度を有し、2.4kD以上の平均分子量を有する、請求項19に記載の方法。

20

【請求項21】

前記硫酸化多糖類が、2 - O、3 - O脱硫酸化ヘパリンである、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記投与が、静脈内、皮下、吸入、経口、および経直腸からなる群から選択される方法による、請求項19に記載の方法。

【請求項23】

前記2 - O脱硫酸化ヘパリンが、ヘパリンを含有する溶液をpH13以上にアルカリ化するステップを含む方法によって作製される、請求項19に記載の方法。

【請求項24】

前記有効量が、硫酸化多糖類3mg/kg～100mg/kgである、請求項19に記載の方法。

30

【請求項25】

患者においてヘパリン起因性血小板減少症候群を治療または予防するための医薬であって、2 - O脱硫酸化ヘパリンを用いて、ヘパリン - 血小板第4因子複合体反応性抗体の存在下で血小板活性化または血栓症を誘導することなく、硫酸化多糖類を含む、医薬。

【請求項26】

前記硫酸化多糖類が、2 - O、3 - O脱硫酸化ヘパリンである、請求項24に記載の医薬。

【請求項27】

前記2 - O脱硫酸化ヘパリンが、ヘパリンを含有する溶液をpH13以上にアルカリ化するステップを含む方法によって作製される、請求項24に記載の医薬。

40

【請求項28】

前記多糖が、1単糖あたり約0.6硫酸基以上の硫酸化度を有し、2.4kD以上の平均分子量を有し、生理学的に許容される担体を有する、請求項24に記載の医薬。

【請求項29】

HIT抗体とその抗原決定基との相互作用が積極的に抑制され、その結果生じる血小板凝集およびHIT症候群に誘導される凝血促進状態が減少する、請求項24に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、2 - O脱硫酸化ヘパリンを用いて、ヘパリン - 血小板第4因子複合体反応性抗体の存在下で、血小板活性化または血栓症を治療および予防するための医薬、ならびに治療のための方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヘパリンという薬物は、ほぼ1世紀前に発見され、現在でも血液の凝固を防ぐために用いられている。その適用は、医学において深静脈血栓症の予防および静脈血栓症と続いて起こる肺塞栓のリスクのある外科患者から、肺塞栓、心筋梗塞、またはその他の血栓性疾患に罹っている患者の治療としての完全な抗凝固、および血管内カテーテル治療の処置または心臓手術を受ける患者において血栓症をカテーテルまたは心肺バイパス装置で防止するための完全な抗凝固にまで及ぶ。近年、ヘパリンは血管増殖または炎症の障害を治療するために有用であることが見出され、二次性低酸素性肺高血圧症、喘息、嚢胞性線維症、炎症性腸疾患、湿疹、熱傷および糸球体腎炎を含む、その他の多くの疾患に有益であることが示された。しかし、ヘパリンにはその使用を制限する2つの重要かつ深刻な副作用がある。

10

## 【0003】

その副作用の1つ目は、その主な治療指標：抗凝固部分からの過剰な出血である。抗凝固は血栓症の予防または治療に利益があるが、抗凝固が治療上の利益として必要でない喘息などの他の疾患を治療するためにヘパリンが用いられる場合には欠点があり、患者にさらなるリスクをもたらすことさえあり得る。抗凝固部分からの有害な出血は、抗凝固が示される血栓性疾患の予防または治療にヘパリンが用いられる場合、重要な副作用でありさえする。幸いにも、出血の副作用は通常自然に治まる。ヘパリン療法および血管腔から失われた血液の交換が終了すると、血液凝固機能および血圧は通常短時間で正常に回復しリスク期間は終止する。

20

## 【0004】

2つ目の副作用である、ヘパリン起因性血小板減少症は、頻度は低いがはるかに重大である。この状態は、何らかの形でヘパリン療法を受けている一部の患者において血小板数の減少が起こることをさす。この状態は、数人の著者により広範囲にわたって総説されている(Fabris F,Ahmad S,Cella G,Jeske WP,Walenga JM,Fareed J.Pathophysiology of heparin-induced thrombocytopenia.Clinical and diagnostic implications--a review.Archiv Pathol Lab Med 124:1657-1666,2000;Arepally G,Cines DB.Pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis.Autoimmunity Rev 1:125-132,2002;Warkentin TE,Greinacher A.Heparin-induced thrombocytopenia and cardiac surgery.Ann Thorac Surg 76:638-648,2003;Warkentin TE.Heparin-induced thrombocytopenia:pathogenesis and management.Brit J Haematol 121:535-555,2003;Chong GH.Heparin-induced thrombocytopenia.J Thromb Haemostas 1:1471-1478,2003)。

30

## 【0005】

2種類のヘパリン起因性血小板減少症(HIT)が存在する。ヘパリン起因性血小板減少症-1(HIT-1)は、 $100 \times 10^9 / L$ 程度まで低い、短時間かつ無症候性の血小板数の減少を特徴とする。この状態は自発的に独力で回復し、薬物の中断は必要としない。この状態は、ヘパリンに誘導される血小板凝集に起因すると考えられ、疾患の免疫成分は何も確認されておらず、この状態の合併症は珍しい。

40

## 【0006】

もう1つの種類のヘパリン起因性血小板減少症のほうが致死的である。ヘパリン起因性血小板減少症-II(HIT-2)には免疫学的な原因があり、多くの場合ヘパリン療法の5日目の後の、血小板数の著しい減少( $> 50\%$ )を特徴とする。合併症が稀であるHIT-1とは対照的に、HIT-2は通常、器官機能の損失または肢の灌流を含む、主な動脈、静脈または微小血管の血栓症を伴う。処置しなければ、この状態は死に至る可能性

50

がある。ウシ肺由来のヘパリン（患者の 5 %）のほうがブタ腸由来のヘパリン（患者の 1 %）よりも多く見られるが、疾患の罹患率は、ヘパリンの種類、投与経路または患者母集団に応じて大いに異なっている。

#### 【 0 0 0 7 】

静脈内ヘパリンは、約 1 . 7 % の H I T - 2 の全罹患率に関連しているが、その状態は稀であって、深静脈血栓症を予防するための予防的皮下投与を伴う(Schmitt BP,Adelman B.Heparin-associated thrombocytopenia:a critical review and pooled analysis.Am J Med Sci 305:208-215,1993)。低分子量であるが完全な抗凝固性のヘパリン、例えばエノキサパリンまたはダルテパリンを使用するとこの症候群を招く可能性が低い、H I T - 2 は低分子量ヘパリンで報告されている。H I T - 2 誘導のリスクが完全にはないと考えられる唯一の抗凝固薬は、最近認可された合成五糖類 X a 因子阻害剤フォンダパリヌクスナトリウムである。(Walenga JM,Jeske WP,Bara L,Samama MM,Fareed,J,State-of-the-art article,Biochemical and Pharmacologic rationale for the development of a Heparin pentasaccharide.Thromb Res 86(1):1-36(1997))。

10

#### 【 0 0 0 8 】

H I T - 2 の病因は、7 0 アミノ酸（7 . 7 8 k D）の血小板特異的ケモカインである血小板第 4 因子（P F 4）に中心的に集中し、血小板第 4 因子は血小板 顆粒に蓄えられ、そこでグリコサミノグリカンのコンドロイチン硫酸と結合している。放出されると、P F 4 は自己会合して約 3 1 k D の四量体となる。P F 4 は高塩基性であり（四量体あたり 3 2 リシンおよび 1 2 アルギニン残基）、そのため高度に正に荷電している。P F 4 の通常の血漿レベルは低く、約 8 n m o l / L である。血小板活性化の後血小板から放出されたその P F 4 は、貯蔵所として内皮細胞の糖衣と結合する。ヘパリンの注入は、血管内皮界面から P F 4 を置換することにより、P F 4 レベルを数時間 1 5 ~ 3 0 倍に、一時的に増加させる。

20

#### 【 0 0 0 9 】

P F 4 - ヘパリン複合体の形成は、P F 4 とヘパリンの同等の化学量論的濃度で最適に起こる。治療用の抗凝固薬として投与する場合、ヘパリンレベルは 0 . 2 ~ 0 . 4 I U / m l、または 1 0 0 ~ 2 0 0 n m o l / L で変動し、P F 4 - ヘパリン複合体形成のための最適温度よりも高い。しかし、例えば心臓手術または股関節手術を受ける患者では、インビボで血小板の活性化が起こり、P F 4 を循環中に放出し、1 : 1 の化学量論的複合体形成のための最適濃度まで循環 P F 4 レベルを（7 5 ~ 1 0 0 n m o l / L まで）増加させる。ヘパリンは、P F 4 と結合すると、タンパク質の立体構造変化を生じ、抗体の結合する抗原エピトープが露出する。

30

#### 【 0 0 1 0 】

H I T 抗体は高い親和性でヘパリン - P F 4 複合体と結合する。次に、この抗体 - ヘパリン - P F 4 複合体は、抗体の F c ドメインと血小板の F c 受容体（F c R I I a）の連結により血小板と結合する。これは順々に F c 血小板受容体を架橋し、血小板活性化、トロンボキサン合成および血小板凝集を誘導する。活性化した凝集血小板から放出された P F 4 は、さらなる細胞外ヘパリンと複合体化して、血小板表面と結合し、H I T 抗体結合のさらなる部位として働くさらなるヘパリン - P F 4 複合体を形成する。この H I T 抗体の血小板局在化ヘパリン - P F 4 複合体との結合という次の波は、抗体の F a b ドメインにわたって起こり、F c ドメインを、隣接する血小板の F c 受容体、架橋 F c R I I a 受容体と自由に相互作用させ、さらなる血小板活性化および凝集を誘導する。平行して、血小板活性化は C D 4 0 リガンド / C D 4 0 放出および相互作用ももたらし、内皮細胞およびマクロファージの表面での組織因子発現の誘導をもたらす。凝固促進性の高い H I T 抗体の存在時の血小板微粒子の生成；血小板表面の接着分子 P - セレクチンの上方制御；および H I T との炎症促進状態の誘導は、患者において、好中球および単球が、H I T 抗体ならびにサイトカインの上方制御により活性化された血小板と関係していることを示す。(Walenga JM,Jeske WP,Prechel MM,Makhos M.Newer insights on the mechanism of heparin-induced thrombocytopenia.Semin Thromb Hemost 30(Suppl 1):57-67(2004))。

40

50

これは外因性の血液凝固カスケードを開始させるための刺激をもたらすことにより凝固亢進状態を混合させ、HIT-2症候群の血栓性合併症の背景をもたらす。血小板減少症は、細網内皮系による活性化された血小板および血小板凝集体のクリアランスに起因する。

#### 【0011】

HIT-2を特徴付ける臨床的な症候群は、約 $55 \times 10^9 / L$ の最下点中央値(median nadir)に対して通常50%を超える血小板数の大幅な減少で識別される。血小板の減少は、静脈血栓症および肺塞栓か、頻度は低いが、大きな下肢動脈に関する動脈血栓症の発症を併発する可能性がある。脳血栓症および心筋梗塞はそれほど多く起こらない。この症候群の別の特徴は、ヘパリン注射部位の皮膚病変の出現であり、その出現は紅斑から明らかな皮膚の壊死まで様々である。循環HIT-2抗体が存在する時点でヘパリンを静脈内に受けると、患者の4分の1が、熱、悪寒、呼吸困難、高血圧症および全健忘からなる急性症候群を発症する。播種性血管内凝固が生じる可能性さえある。これらの合併症を予防するため、HIT-2が認識されると、沈殿しているヘパリン類似物質を停止させ、患者を、代替物質、例えば直接トロンビン阻害剤(レビルジン、アルガトロバンもしくはビバリルジン)または、HIT抗体と交差反応しない合成五糖類フォンダパリヌクスで完全に抗凝固することが提案されている。HIT-2の設定において急性的なワルファリンの使用は微小血管血栓症または皮膚の壊死の発症と関連するため、長期のワルファリンでの抗凝固の追跡は、血小板減少症の回復まで遅らせる。これは、直接トロンビン阻害剤などの代替抗凝固薬の投与のために長期の入院を必要とすることが多い。

#### 【0012】

HIT-2に関連するヘパリン類似物質の構造上の特徴は、詳細に特徴付けられている(Greinacher A, Alban S, Dummel V, Franz G, Mueller-Eckhardt C, Characterization of the structural requirements for a carbohydrate based anticoagulant with a reduced risk of inducing the immunological type of heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemostas* 74:886-892(1995); Walenga JM, et al., supra(2004); Walenga JM, Koza MJ, Lewis BE, Pifarre R. Relative heparin induced thrombocytopenic potential of low molecular weight heparins and new antithrombotic agents. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2(Suppl 1):S21-S27(1996); and Jeske WP, Jay AM, Haas S, Walenga JM. Heparin-induced thrombocytopenic potential of GAG and non-GAG-based antithrombotic agents. *Clin Appl Thromb Hemost* 5(Suppl 1):S56-S62(1999))。直鎖ヘパリン様炭水化物スルファートに関して、HIT抗体およびPF4の存在下での血小板活性化のリスクは、高分子の分子量とその硫酸化度(すなわち、炭水化物モノマーあたりの硫酸塩の平均数)の両方に非常に依存した。HIT反応性ヘパリン-PF4抗原複合体を形成するために決定的な硫酸化度は、0.6~1.20の間にある(すなわち炭水化物モノマーあたり0.6~1.2硫酸基)ことが見出された。HIT反応性ヘパリン-PF4抗原複合体を形成する硫酸化多糖類の傾向と、その後続く血小板活性化も分子量に左右される。分子量が2.4kDまで低下したヘパリンを調査する時には、複合体形成には漸増濃度のヘパリンが必要であった。2.4kDよりも小さい糖類では、複合体形成は観察されなかった。分子量約1.7kDの合成五糖類フォンダパリヌクスでも、HIT抗体活性化は観察されなかった。研究者らは、ただ2つの戦略のみがHIT-反応性ヘパリン-PF4複合体形成のリスクを予想通りに低下させる: 1)炭水化物単位あたりの硫酸化度を<0.6硫酸に低下させること; または2)多糖の分子量を<2.4kDまで小さくすること、と結論付けた。

#### 【0013】

PF4と相互作用せずにHIT-抗体反応性複合体を形成するヘパリン様化合物は、現在治療での使用に利用可能な未分画ヘパリンまたは低分子量ヘパリンよりも大きな利点をもたらす。抗凝固薬としての臨床的裏付けはないが、新規な五糖類フォンダパリヌクスがその目標を達成すると思われる。それというのもそれはHIT抗体の存在下で血小板を活性化させないためである(Greinacher A, et al., supra; Walenga JM, et al., supra(2004); Walenga JM, et al., supra(1996); and Jeske WP, et al., supra(1999))。しかし、抗凝固薬として理想的ではあるが、この低分子量ヘパリン類似体は完全な抗凝固薬であり、患者が

出血の素因またはその血管系の完全性に亀裂を有する場合、治療した患者を過度の出血のリスクに置く。これは、胃腸または中枢神経系の出血も被っているHITの被験体において特に問題である。命に関わる動脈血栓症または静脈血栓症を潜在的に予防するためにHITにおいてフォンダパリヌクスまたは任意の薬剤での抗凝固が必要であるが、被験体が盛んに大量出血している場合には命を脅かす可能性がある。さらに、たとえ被験体が大量出血していなくても、HITを治療するための低い抗凝固薬戦略のほうが、全てが完全な抗凝固薬であって、直接トロンビン阻害剤であるアルガトロバンおよびレビルジンを含む、現在利用可能な戦略よりもはるかに安全であり、好ましい。

#### 【0014】

本発明はこの目的を達成する。心筋梗塞による心臓の虚血 - 再灌流損傷などの炎症を阻害するための薬剤として有用である2 - O脱硫酸化ヘパリンが合成されている。本発明の利点は、この2 - O脱硫酸化ヘパリン(ODSヘパリン)を工業規模で大量に製造する方法が提供されていることである。ODSヘパリンはまた、大幅に減少したUSPおよび抗Xa抗凝固活性を有し、抗炎症薬用量での使用に安全であり、出血を招く可能性も低い。2 - O脱硫酸化ヘパリンの平均分子量は10.5 kDであり、そのおよその硫酸化度は1.0(五糖類あたり5硫酸基、図1参照)であり、十分HIT抗体相互作用のリスク範囲内にある(Greinacher A, et al., supra)。意外にも、また別に予想される大きさおよび硫酸化度にもかかわらず、ODSヘパリンは、低濃度または高濃度の既知のHIT - 反応性抗血清の存在下で血小板活性化を引き起こさない。従って、ODSヘパリンは、HIT - 2関連血小板減少症および血栓症のリスクを有意に低下させることにより、他の抗炎症薬ヘパリンのより安全な代替薬を成す。

10

20

#### 【0015】

さらになお意外にも、2 - O脱硫酸化ヘパリンは、一たび確立されたHIT症候群を治療するため、およびヘパリン - PF4複合体に対する抗体からの血小板凝集の活性を低下させるためにも有用である。従って、大いに低下した抗凝固活性および出血リスクを有する2 - O脱硫酸化ヘパリンの投与は、HIT症候群の臨床治療として用いることができ、現在HIT療法に使用されている、リスクを伴う、完全な抗凝固治療の必要性をなくす。

#### 【発明の開示】

#### 【0016】

本発明の目的は、HIT抗体を含有する血清の存在下で、血小板活性化を引き起こさないヘパリン類似体を製造する方法を提供することである。

30

#### 【0017】

本発明のさらなる目的は、確立されたHIT症候群を治療し、血小板凝集およびこの状態の結果として生じる血管血栓症を予防するために用いることのできるヘパリン類似体を提供することである。

#### 【0018】

本発明の別の目的は、抗炎症薬であるためにサイズが十分に大きく、十分な保持された硫酸化度を有するヘパリン類似体を提供することである。

#### 【0019】

本発明のさらなる目的は、実質的に抗凝固活性を誘導しないヘパリン類似体を提供することである。

40

#### 【0020】

本発明の別の目的として、抗凝固活性を誘導せずに、確立されたHIT症候群を治療するために用いることのできる治療薬を使用する方法が提供される。

#### 【0021】

本発明の一層さらなる目的は、治療薬が毒物学的に特徴付けされた化合物から製造されることである。

#### 【0022】

また、本発明の別の目的は、商業的に実現可能なレベルで2 - O脱硫酸化ヘパリンの合成が実現されることである。

50

## 【 0 0 2 3 】

本発明は、治療有効量の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンを生理学的に許容される担体中に含む、H I T 反応性またはリスクのないヘパリン薬を提供する。生理学的に許容される担体は基本的に、生理緩衝食塩水、通常の生理食塩水および蒸留水からなる群から選択してよい。医薬は、2 m g / 患者体重 k g ~ 1 0 0 m g / k g の用量を含むことが好ましいが、好ましくは、3 . 5 ~ 2 5 m g / k g である。これらの用量は、生理学的に許容される担体中にも提供される。

## 【 0 0 2 4 】

また、本発明は、分子量が 2 . 4 k D より大きく、硫酸化度が 0 . 6 よりも大きい、実質的に H I T 反応性またはリスクのないヘパリン薬を提供する。また、本発明は、H I T 抗体とその抗原決定基との相互作用を積極的に抑制し、結果として生じる血小板凝集(platelet aggregation)および H I T 症候群に誘導される凝血促進状態(procoagulant state)を減少させるヘパリン薬を提供する。

10

## 【 0 0 2 5 】

本発明の好ましい実施形態では、H I T 反応性またはリスクのない 2 - O 位脱硫酸化ヘパリン類似体を、エアロゾル化により、静脈注射により、皮下注射により、経口的に、または直腸への注入により投与することができる。ヒトへの投与のための、特に静脈内に用いる場合の有効量は、2 - O 脱硫酸化ヘパリン 2 m g / k g ~ 1 0 0 m g / k g の用量である。本発明の別の実施形態では、分子量は 2 . 4 k D よりも大きい。本発明のもう 1 つの実施形態では、硫酸化度は 0 . 6 より大きく 1 . 2 よりも小さい。好ましくは、医薬には、生理緩衝食塩水、通常の生理食塩水および蒸留水からなる群から選択され得る生理学的に許容される担体が含まれる。

20

## 【 0 0 2 6 】

本発明は、実質的に H I T 抗体反応性またはリスクのないヘパリン類似体を製造する方法、かつ積極的に H I T 症候群を治療するために効果的に用いることのできる方法をさらに提供し、その方法は、溶液中のヘパリンを還元し、還元したヘパリン溶液を凍結乾燥することを含む。別の実施形態では、実質的に H I T 抗体反応性またはリスクがなく、H I T 症候群の治療にも有用なヘパリン類似体を、溶液中のヘパリンを還元せずに凍結乾燥することにより製造する。好ましい実施形態では、還元ヘパリン溶液または非還元ヘパリン溶液の pH は 1 3 よりも上昇する。

30

## 【 0 0 2 7 】

本発明の前述の目的および他の目的、利点および特徴、ならびにそれが達成される方法は、好ましく、かつ、例示的な実施形態を説明する添付の図面と併せて、次の発明の詳細な説明から明らかとなる。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 2 8 】

本発明を、これから本発明の好ましい実施形態が示されている、付随する実施例を参照して下文により十分に説明する。実際に、これらの発明は、多くの異なる形態で具体化することができ、本明細書に示す実施形態に限定されるものと解釈されるべきではない；むしろ、これらの実施形態は、本開示が徹底的かつ完全であり、当業者に本発明の範囲を十分に伝えるように提供される。

40

## 【 0 0 2 9 】

通常の抗凝固薬用量よりも多いヘパリンおよび種々の非抗凝固薬のヘパリン ( N - 脱硫酸化 ; 2 - O 、 3 - O または 6 - O 脱硫酸化 ; N - 脱硫酸化および再アセチル化 ; および O - 脱炭酸化ヘパリン ) は、インビボで炎症反応を減弱させる、例えば気管に注入されると肺でヒト白血球エラストラーゼ ( H L E ) の破壊効果を阻害することが見出されている。これらの同じヘパリンおよび非抗凝固薬ヘパリンは、心臓、脳およびその他の器官において虚血 - 再灌流損傷を減弱させ、器官の壊死の面積で測定される器官の梗塞の面積を減少させる。3 - O 脱硫酸化されてもいる、2 - O 脱硫酸化非抗凝固薬ヘパリンの調製の例は、例えば、米国特許第 5,668,188 号 ; 米国特許第 5,912,237 ; および米国特許第 6,489,311

50



号に見出すことができ、これらは参照により本明細書に組み込まれる。2 - O 脱硫酸化ヘパリンの量は、2 mg / kg ~ 100 mg / kg の量であってよいが、約 3 . 5 mg / kg ~ 25 mg / kg の量であることが好ましい。非抗凝固薬ヘパリンである 2 - O 脱硫酸化ヘパリンは、虚血 - 再灌流に誘導される H I E 誘導性の肺の炎症または心筋の炎症などの炎症を阻害するという利点を有するが、同等用量の未修飾ヘパリンに起因する過剰な抗凝固の副作用はない。その他の非抗凝固薬ヘパリン、低分子量ヘパリン (Yanaka K, Spellman SR, McCarthy JB, Oegema TR Jr, Low WC, Camarata PJ., Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. I. Protective mechanism. J Neurosurg 85:1102-1107, 1996) および硫酸化多糖類ヘパリン類似体 (Kilgore KS, Naylor KB, Tanhehco EJ, Park JL, Booth EA, Washington RA, Lucchesi BR., The semisynthetic polysaccharide pentosan polysulfate prevents complement-mediated myocardial injury in the rabbit perfused heart. J Pharmacol Exp Therap 285:987-994, 1998) も、炎症を阻害できる。しかし、これらのヘパリンおよびその他のヘパリンならびに硫酸化グリコサミノグリカンヘパリン類似体は、ヘパリン抗体と反応して、血小板活性化および H I T - 2 血栓症候群を誘導することのできるグリコサミノグリカン - P F 4 - H I T - 反応性抗体複合体を形成する。この潜在的に致命的なリスクは、非抗凝固薬ヘパリンの抗炎症療法としての使用を厳しく制限する。

10

#### 【0030】

H I T - 2 血栓症候群のリスクなく予想通りに用いることのでき得る唯一の硫酸化多糖類は、合成抗凝固薬五糖類フォンダパリヌクスである (Greinacher A, et al., supra)。この超低分子量ヘパリン類似体は有効な抗凝固薬であるが、それが完全な抗凝固薬であり、従って出血を誘導するリスクがあること、および小型であるためセレクトリンに媒介される P M N 付着の阻害の際にその活性が大いに縮小されることから、炎症の治療にはあまり有用でない (Koenig A, et al., supra)。

20

#### 【0031】

H I T - 抗体反応性のない硫酸化炭水化物に関する構造上の要件は、1 炭水化物部分あたり分子量が < 2 . 4 k D であり、硫酸化度が < 0 . 6 硫酸と特徴付けられている (Greinacher A, et al., supra)。35 単糖の一定鎖長の直鎖硫酸化多糖類について、H I T 抗原を形成する重大な硫酸化度は、1 単糖あたり 0 . 6 ~ 1 . 2 硫酸であった。市販のヘパリンの範囲の硫酸化炭水化物に関して、H I T に媒介される血小板活性化は 1 . 25 の硫酸化度で最大であった。一定の硫酸化度の直鎖硫酸化多糖類の存在下での血小板活性化も分子量に依存し、分子量が増加するにつれて、H I T に媒介される 50 % の最大血小板活性化に必要とされる硫酸化多糖類の濃度が減少した。例として、ほぼ市販の未分画ヘパリンの分子量である、分子量 12 . 2 k D の 50 % の最大血小板活性化に、濃度 50 nmol / L の硫酸化多糖類が必要であった。この濃度は臨床的な H I T - 2 症候群の誘発のための最適ヘパリン濃度に近い。ヘパリンの場合では、最適な分子量は実際に 4 . 8 k D であることが見出され (十六糖)、市販の低分子量ヘパリンの分子量に近いが、高い分子量も H I T に媒介される血小板活性化を後押しした。分枝鎖硫酸化炭水化物は、低い硫酸化度および分子量であってさえも P F 4 と H I T 抗原を形成することができた。Walenga JM, et al., supra (2004); Walenga JM, et al., supra (1996); および Jeske WP, et al., supra) 。分子量 2 . 4 k D 未満または 1 単糖あたりの硫酸化度 0 . 6 硫酸基未満の唯一の硫酸化多糖類は、H I T 反応性がなかった。例として、分子量 1 . 78 k D の、完全な抗凝固薬五糖類フォンダパリヌクスは、用いる五糖類の濃度に関係なく、H I T 抗体の存在下で、何ら血小板活性化を引き起こさなかった。

30

40

#### 【0032】

部分的に脱硫酸化したヘパリンである、2 - O 脱硫酸化ヘパリンは、米国特許第 5,668,188 号；米国特許第 5,912,237 号；および米国特許第 6,489,311 号に概説されるように、溶液中のヘパリンを還元し、乾燥させ、凍結乾燥するかまたは還元したヘパリン溶液を真空蒸留することにより製造される。出発ヘパリンは、例えば、水またはその他の溶媒に入ればよい。ヘパリン溶液の一般的な濃度は、ヘパリン 1 ~ 10 パーセントであってよい。

50

反応に用いるヘパリンは、当分野で既知の多数の供給源、例えばブタ腸管またはウシ肺などから得ることができる。当業者に既知の多数の方法で修飾されたヘパリン、例えば過ヨウ素酸塩酸化または亜硝酸脱重合により製造された低分子量ヘパリンが利用できる。また、出発物質として現在入手可能な完全な抗凝固薬低分子量ヘパリンである、エノキサパリンまたはダルテパリンを用いてもよい。その他の可能性のある出発物質は、本明細書に提供される教示により、当業者に明らかである。

#### 【0033】

溶液中の選択されたヘパリン出発物質は、還元剤、例えば水素化ホウ素ナトリウム、触媒水素、または水素化リチウムアルミニウムとともにインキュベートすることにより、溶液中で還元することができる。好ましいヘパリンの還元は、ヘパリンを、水素化ホウ素ナトリウム（一般に濃度1%（w t / v o l）、または溶液1リットルあたり10グラムの $\text{NaBH}_4$ ）とともにインキュベートすることにより実施される。さらに、その他の既知の還元剤を利用してもよい。還元物質とのインキュベーションは、ヘパリンがカラメル化する温度があまり高くないことを考慮すれば、広範囲の温度で達成することができる。提案される温度範囲は約4～30、または好ましくは約20～25である。インキュベーションの長さも、それが還元の起こるのに十分である限り、広範囲にわたってよい。例えば、数時間から一晩（すなわち約4～約12時間）が十分であり得る。しかし、この時間は数日間、例えば約60時間超にまで延長することができる。凍結乾燥中にその分子量が維持されるヘパリンの還元の代わりに、この段階を省略して直接、製造のための凍結乾燥または乾燥に進んでもよい。しかし、還元段階がないとより強力に脱重合が起こり、得られる生成物の分子量は予想通りに小さくなる。

10

20

#### 【0034】

さらに、2-O脱硫酸化ヘパリンを製造する方法は、還元または非還元ヘパリン溶液に対してpHを13以上上昇させることの可能な塩基の添加により、還元または非還元ヘパリンのpHを13以上まで上昇させる段階をさらに含む。pHは、水酸化物、例えばナトリウム、カリウムもしくは水酸化バリウムを含む、任意の数の物質を添加することにより上昇させることができる。好ましい物質は水酸化ナトリウム（ $\text{NaOH}$ ）である。13以上のpHが達成されれば、塩基の濃度をさらに増加させることが有益である。例えば、濃度約0.25M～約0.5M  $\text{NaOH}$ に $\text{NaOH}$ を添加することが好ましい。次にこのアルカリ性の溶液を次に乾燥させ、凍結乾燥するか、真空蒸留する。

30

#### 【0035】

米国特許第5,668,188号；米国特許第5,912,237号；および米国特許第6,489,311号に概説される方法で製造された部分的に脱硫酸化したヘパリンは、主として3-O脱硫酸化し、約1.0（五糖あたり5硫酸基；図1参照）の硫酸化度を有する2-O脱硫酸化ヘパリンである。平均分子量11.5kDの未分画ブタヘパリンを出発物質として用い、それを凍結乾燥の前に水素化ホウ素ナトリウムで還元したならば、得られる生成物の平均分子量は10.5kDである。硫酸化度1.0および分子量10.5kDの、このヘパリン類似体はHIT抗体およびPF4の存在下で血小板活性化を有意に引き起こすと予測される。未分画ヘパリンが濃度0.4  $\mu\text{mol/L}$ の場合にこれらの環境下で積極的に血小板活性化を刺激するのに対して、この薬物、つまり記載された方法による2-O脱硫酸化ヘパリン類似体の通常の治療用抗凝固濃度は、0.78  $\mu\text{mol/L}$ ～100  $\mu\text{mol/L}$ の範囲の濃度で調べた場合に血小板を活性化させない。これらの結果は、血小板活性化を血小板からの $^{14}\text{C}$ セロトニンの放出により調べた場合、または血小板活性化をフローサイトメトリーを用いて検出される微粒子の形成により測定した場合に得られる。後続く実施例はこれらの点を詳細に説明する。2-O脱硫酸化ヘパリンがHIT抗体の存在下でHIT抗原を誘導しないことは大きな利点であり、炎症状態、およびヘパリン類似物質が示されるかまたは有用であるその他の状態を治療する際に用いるヘパリン類似体として治療上安全となる。

40

#### 【0036】

さらにより意外には、2-O脱硫酸化ヘパリンはHIT様血小板活性化を引き起こさな

50

いだけでなく、臨床上的 H I T 症候群の患者由来の血清の存在下で未修飾ヘパリンに暴露されるとそれ自体が血小板の活性化を抑制するのに効果的でもある。H I T 血小板活性化に関して、低い抗血栓濃度のヘパリンを血小板および H I T 血清に加えた試験系において、 $3.13 \mu\text{g}/\text{ml}$  という低い濃度の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンでセロトニン放出の改善が観察された。高い抗凝固濃度のヘパリンを血小板および H I T 血清に加えた場合に改善を開始させるためには、より高い濃度 ( $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) が必要であった。セロトニン放出の完全な改善は、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上の濃度の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンで観察された。H I T 血小板活性化の試験系が活性化した血小板からの微粒子形成であった場合、改善は、H I T 血清の存在下で血小板を活性化させるために  $0.1 \text{ U}/\text{ml}$  および  $0.5 \text{ U}/\text{ml}$  の両方の量のヘパリンが用いられる試験系で  $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$  という低い濃度の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンで見られた。ヘパリンおよび H I T 血清に反応した血小板微粒子形成の完全な改善は、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンで達成された。最後に、血小板活性化を血小板表面の P - セレクチン (C D 6 2) 発現として測定した場合、 $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$  という低い濃度の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンは、H I T 血清および  $0.1 \text{ U}/\text{ml}$  または  $0.5 \text{ U}/\text{ml}$  の未分画ヘパリンの存在下で血小板活性化を改善した。血小板 P - セレクチン発現の完全な改善は、濃度  $> 25 \mu\text{g}/\text{ml}$  の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンに見られた。全体に、血小板活性化を測定する 3 つの方法を考慮すると、2 - O 脱硫酸化ヘパリンは  $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$  から H I T に誘導される血小板活性化の抑制に有効であり、H I T に誘導される血小板活性化は  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンで完全に抑制された。適度な量の薬物を用いてインビボで達成できるのは、2 - O 脱硫酸化ヘパリンの濃度である。

10

20

#### 【0037】

意図する投与様式に応じて、医薬組成物は固体、半固体、または液体の投与形、例えば、錠剤、坐剤、丸剤、カプセル剤、粉末、液体、懸濁液、ローション、クリーム、ゲルなどであってよく、正確な用量の単回投与に適した単位投与形であることが好ましい。組成物には有効量の選択された薬物が製薬上許容される担体と組み合わせて含まれ、さらに、その他の薬剤、医薬品、担体、アジュバント、希釈液などを含んでもよい。

#### 【0038】

本発明は、さらに生理学的に許容される担体および有効量の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンまたはその類似体を含むエアゾール粒子を提供する。粒子は基本的に  $10 \mu\text{m}$  未満、好ましくは  $5 \mu\text{m}$  未満の粒子からなる。気道または肺への送達には、2 - O 脱硫酸化ヘパリンを微粉末として送達するか、または市販のネブライザー装置を用いて溶液として吸入することができる。鼻腔粘膜への送達には、2 - O 脱硫酸化ヘパリンを市販の霧化装置または噴霧装置によってエアロゾル化する溶液として投与するか、または鼻腔投与される乾燥微粉末として送達することができる。

30

#### 【0039】

固形組成物のための、従来の無毒固体担体としては、例えば、医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。液体の薬剤として投与可能な組成物は、例えば、本明細書に記載される活性化合物および任意選択の賦形剤中の製薬補助剤、例えば、水、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどを溶解、分散などにより調製し、それによって溶液または懸濁液を形成することができる。所望であれば、投与される医薬組成物も、湿潤剤または乳化剤、pH 緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミン酢酸ナトリウム、およびトリエタノールアミンオレエートなどの微量の無毒の補助物質を含んでもよい。液体組成物は、投与のためにエアロゾル化することができる。そのような投薬形態の実際の調製方法は当業者に既知であるか、自明である；例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin (ed.), Mack Publishing Co., Easton, PA. 参照。

40

#### 【0040】

経口投与には、微細粉末または顆粒剤は、希釈剤、分散剤、および/または界面活性剤

50

を含んでよく、水中またはシロップ剤中、カプセル剤中または乾燥状態でサシェ剤中、あるいは沈殿防止剤を含めることのできる非水性溶液または懸濁液中、結合剤と滑沢剤を含めることのできる錠剤中、あるいは水またはシロップ剤の懸濁液中に提示することができる。所望または必要であれば、香味料、保存料、懸濁化剤、増粘剤、または乳化剤を含めてもよい。錠剤および顆粒は好ましい経口投与形態であり、コーティングしてもよい。経口浸透および消化管吸収を高めるため、2-O脱硫酸化ヘパリンを、オリーブオイル、胆汁酸塩、またはナトリウムN-[8-(2ヒドロキシベンゾイル)アミノ]カプリレート(SNAC)の混合物とともに処方することができる。約2.25gのSNAC対200~1,000mgの2-O脱硫酸化ヘパリンの好ましい比を用いる。消化管吸収を促進するさらなる製剤は、数ある中でも米国特許第6,153,217号；同第5,994,318号；同第5,840,707号に記載の方法を用いて、ホスホチジルセリン(phosphatidylserine)およびカルシウムとともに2-O脱硫酸化ヘパリンのリン脂質-陽イオン沈殿蝸牛送達小胞を処方することにより製造することができる。

10

#### 【0041】

直腸投与には、2-O脱硫酸化ヘパリンを坐剤、泡沫、ゲル、溶液または浣腸で投与することができる。

#### 【0042】

用いられる場合、非経口投与は一般に注射を特徴とする。注射可能物質は、従来の形態、液体溶液かもしくは懸濁液中に、注射前に液体中の溶液または懸濁液とするのに適した固体形態で、またはエマルジョンとして調製することができる。つい最近改正された非経口投与のためのアプローチは、遅延放出系または徐放系、例えば一定レベルの用量が維持される系の使用が含まれる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第3,710,795参照。

20

#### 【0043】

「製薬上許容される」とは、生物学的にまたは別の点で望ましくないものでない材料を意味する、すなわちその材料が、望ましくない生物学的影響を何ら起こさず、医薬組成物中に含まれる他の成分のいずれかと有害な方法で相互作用することもない、2-O、3-O脱硫酸化ヘパリンまたはヘパリン類似体とともに個体に投与され得ることを意味する。

#### 【0044】

本発明の多数の修正および改変は当業者に明らかであるため、その例証のみを目的とする以下の実施例において本発明をより詳細に説明する。

30

#### 【実施例】

#### 【0045】

[実施例I：非抗凝固薬であり、ヘパリン起因性血小板減少症抗体の存在下で血小板を活性化せず、ヘパリン起因性血小板減少症抗体の存在下でヘパリンに起因する血小板活性化を改善さえする2-O脱硫酸化ヘパリンの製造]

部分的に脱硫酸化した2-O脱硫酸化ヘパリンは、米国特許第5,668,188号；米国特許第5,912,237号；および米国特許第6,489,311号に記載されている方法により商業的に実用的な量で製造することができる。ヘパリンの(ODSヘパリンへの)修飾は、ロットEM3037991のブタ腸管粘膜ヘパリンナトリウム500グラムを脱イオン水10Lに添加することにより行った(最終ヘパリン濃度5%)。水素化ホウ素ナトリウムを1%終濃度まで加え、その混合物を一晩25℃にてインキュベートした。次いで、水酸化ナトリウムを0.4M終濃度まで加え(13より高いpH)、その混合物を凍結乾固させた。過剰の水素化ホウ素ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを限外濾過により除去した。その最終生成物をpH7.0に調整し、3容量の冷エタノールを加えて沈殿させ、乾燥させた。この手順により生成した2-O脱硫酸化ヘパリンは、微粒子結晶構造のやや灰色がかった白色の粉末であり、USP抗凝固活性が10単位/mg未満であり抗Xa抗凝固活性が10未満単位/mgであった。このヘパリンの構造を、図1に示す。分子量は、miniDAWN検出器(Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA)(690nmで動作)を用いて、多角度レーザー光散乱を併用した高速サイズ排除クロマトグラフィーにより測定した。出発物質の

40

50

平均分子量 13.1 kD と比べると、ODS ヘパリンの平均分子量は 11.8 kD であった。

#### 【0046】

親分子と ODS ヘパリンの分子量分布の違いは、図 2 に明示している。Guo and Conrad (Guo Y, Conrad HE, Analysis of oligosaccharides from heparin by reversed-phase ion-pairing high performance liquid chromatography. Anal Biochem 178:54-62, 1988) の方法により二糖分析を行った。図 3 A に示した出発物質と比べると、ODS ヘパリンは、ISM [L-イズロン酸(2-硫酸)-2, 5-アンヒドロマンニトール] の IM [L-イズロン酸-2, 5-アンヒドロマンニトール] への変換と、ISMS [L-イズロン酸(2-硫酸)-2, 5-アンヒドロマンニトール(6-硫酸)] の IMS [L-イズロン酸-2, 5-アンヒドロマンニトール(6-硫酸)] への変換(いずれも 2-O 脱硫酸化を示す)を特徴とする 2-O 脱硫酸化ヘパリン(図 3 B に示す)である。2-O 脱硫酸化について提案されている順序は、図 4 に示している。ODS ヘパリンはまた、GMS 2 [D 47 グルクロン酸-2, 5-アンヒドロマンニトール(3, 6-二硫酸)] の GMS [D-グルクロン酸-2, 5-アンヒドロマンニトール(6-硫酸)] への変換(3-O 脱硫酸化を示す)を特徴とする 3-O 脱硫酸化ヘパリンでもある。

10

#### 【0047】

HIT-2 と臨床的に診断された 3 名の異なる患者のドナー血小板および血清を用いて、この 2-O、3-O 脱硫酸化ヘパリンの HIT 抗体および活性血小板と相互作用する可能性を、ヘパリン曝露に関連する血小板減少症、ヘパリン除去による血小板減少症の改善、および血小板活性化試験で陽性(血栓症を有するまたは有さない)を明らかにすることにより調べた。HIT 反応性血清の存在下でのヘパリンまたは 2-O 脱硫酸化ヘパリンによる血小板の活性化を測定するために、2つの手法を使用した。

20

#### 【0048】

第 1 の手法は、HIT に関して最も基準になる臨床検査と考えられているセロトニン放出アッセイ(SRA)であり、Sheridan (Sheridan D, Carter C, Kelton JC, A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. Blood 67:27-30, 1986) によって記載されているように実施した。洗浄した血小板に  $^{14}\text{C}$  セロトニン ( $^{14}\text{C}$ -ヒドロキシ-トリプタミン-クレアチン硫酸塩、Amersham) を添加した後、抗体源として既知の HIT 陽性患者の血清の存在下で種々の濃度の試験ヘパリンまたはヘパリン類似体とともにインキュベートした。活性化を、活性化中の血小板からの  $^{14}\text{C}$  セロトニンの放出として評価し、 $^{14}\text{C}$  セロトニンを液体シンチレーションカウンターを用いて定量した。ヘパリン-PF4-HIT 抗体複合体の形成により、血小板の活性化が起こり、緩衝培地への同位元素放出が起こる。活性化された血小板は、%同位元素放出 20% と定義される。

30

#### 【0049】

具体的に言えば、2 シリンジ法を用いて、ボランティアドナーから、抗凝固薬 1 に全血 9 の割合でクエン酸ナトリウム (0.109 M) に全血を採取した。第 1 のシリンジでの最初の全血 3 ml は廃棄した。抗凝固処理血液を遠心分離して (80 x g、15 分、室温)、多血小板血漿 (PRP) を得た。その PRP を 0.1  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -セロトニン/ml で標識した (45 分、37 ) 後、洗浄し、アルブミンフリータイロイド液に血小板数 300,000 /  $\mu\text{l}$  まで再懸濁した。HIT 血清 (20  $\mu\text{l}$ ) を血小板懸濁液 70  $\mu\text{l}$ 、および 2-O 脱硫酸化ヘパリン 5  $\mu\text{l}$  (終濃度 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.78  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  および 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) とともにインキュベートした (室温にて 1 時間)。系対照に関しては、このアッセイでは、2-O 脱硫酸化ヘパリンの代わりに未分画ヘパリン (UFH; 抗血栓性のある用量または完全な抗凝固性のある用量それぞれにおいて患者に見られる血漿中の濃度に対応する 0.1 U/ml または 0.5 U/ml 終濃度のいずれかのもの) 10  $\mu\text{l}$  を使用した。EDTA を加えて、反応を停止させ、その混合物を遠心分離して、血小板をペレット化した。上清に放出された  $^{14}\text{C}$ -セロトニンをシンチレーションカウンターで測定した。10% Triton X-100 で血小

40

50

板を溶解した後に最大放出を測定した。その試験の結果は、 $0.1 \text{ U/ml}$  および  $0.5 \text{ U/ml}$   $\text{UFH}$  ( $2\text{-O}$ 脱硫酸化ヘパリンを加えず)の場合に放出が  $20\%$  セロトニンであり、 $100 \text{ U/ml}$   $\text{UFH}$ の場合に  $< 20\%$  セロトニンであったならば、陽性であった。その試験は、 $20\%$  セロトニン放出が起こったならば、 $2\text{-O}$ 脱硫酸化ヘパリンと  $\text{HIT}$  抗体の交差反応性によるものであった。

#### 【0050】

第2の手法は、フローサイトメトリーによる血小板分析であった。この機能試験では、 $\text{HIT}$ と臨床的に診断された患者の血清中のヘパリン抗体の存在下でヘパリンまたはヘパリン類似体により全血中の血小板を活性化する。フローサイトメトリーを用いて、2通りの方法：血小板微粒子の形成によりおよび血小板表面に結合される  $\text{P}$ -セレクトリンの増加により血小板活性化を測定した。通常、非活性化状態の血小板はそれらの表面において  $\text{CD}62$ を発現せず、血小板微粒子はほとんど検出されない。陽性応答は、生理食塩水対照の応答よりも有意に大きい任意の応答と定義される。

10

#### 【0051】

具体的に言えば、慎重なダブルシリンジ法により採取した全血をヒルジン (終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ ) で抗凝固処理した。 $1$  アリコートの全血 ( $50 \mu\text{l}$ ) を直ちに  $1\%$  パラホルムアルデヒド  $1 \text{ ml}$  で固定した (ゲート制御)。 $\text{HIT}$  血清 ( $160 \mu\text{l}$ ) および  $2\text{-O}$  脱硫酸化ヘパリン ( $50 \mu\text{l}$ ; 終濃度  $0 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.78 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.56 \mu\text{g/ml}$ 、 $3.13 \mu\text{g/ml}$ 、 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 、 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $25 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$  および  $100 \mu\text{g/ml}$ ) を全血 ( $290 \mu\text{l}$ ) に加え、インキュベートした ( $600 \text{ rpm}$  で攪拌しながら  $37^\circ\text{C}$ 、 $15$  分)。アリコート ( $50 \mu\text{l}$ ) を除去し、パラホルムアルデヒド  $1 \text{ ml}$  で固定した ( $30$  分、 $4^\circ\text{C}$ )。それらのサンプルを遠心分離し ( $350 \text{ g}$ 、 $10$  分)、その上清のパラホルムアルデヒドを除去した。それらの細胞をカルシウムフリータイロイド液 ( $500 \mu\text{l}$ 、 $\text{pH} 7.4 \pm 0.1$ ) に再懸濁した。細胞懸濁液  $150 \mu\text{l}$  をフルオレセインイソチオシアネート ( $\text{FITC}$ ) 標識抗  $\text{CD}61$  抗体 (Becton-Dickinson; San Jose, CA; あらゆる血小板の  $\text{GP} \text{IIb/IIIa}$  に対して特異的である)  $6.5 \mu\text{l}$  に加えた。サンプルを暗所でインキュベートする ( $30$  分、室温)。飽和濃度を評価する試験に先立ち、全ての抗体を、それらの特異的抗原を発現している細胞に対して用量を設定した。サンプルを  $\text{EPICS XL}$  フローサイトメーター (Beckman-Coulter; Hialeah, FL) で、前角 ( $\text{FALS}$ ) および側角光散乱、ならびに  $\text{FITC}$  および  $\text{PE}$  蛍光について解析した。毎日サンプルを流す前に、既知サイズの蛍光標識ビーズ (Flow-Check; Coulter) を流し、 $1.0 \mu\text{m}$  ビーズが  $4\text{-ディケード} \log \text{FALS}$  光散乱スケールの第2ディケードの初めに落下するように増幅度を調整することによりサイズ較正を行った。 $\text{FITC}$  シグナルで設定した弁別閾値を利用して、抗  $\text{CD}61$  抗体で標識されていない事象 (非血小板) を排除した。

20

30

#### 【0052】

ゲート制御サンプルを用いて、単一血小板および血小板微粒子を含むように無定形領域を取り出した。血小板微粒子を、それらの特徴的な、フローサイトメトリーによる細胞サイズ ( $\text{FALS}$ ) および  $\text{FITC}$  蛍光 ( $\text{CD}61$  血小板マーカー) プロフィールに基づいて血小板と区別した。血小板微粒子は、単一非凝集血小板集団 ( $< 1 \mu\text{m}$ ) よりも小さい  $\text{CD}61$  陽性事象として定義された。各サンプルにおいて  $20,000$  の全  $\text{CD}61$  陽性事象 (血小板) を採取した。データは、解析した  $\text{CD}61$  陽性事象数全体のパーセントとして記録した。ヘパリン依存性  $\text{HIT}$  抗体との交差反応性に関する試験において、 $\text{UFH}$  対照 ( $2\text{-O}$ 脱硫酸化ヘパリンなし) は、陽性応答 ( $0.1 \text{ U/ml}$  および  $0.5 \text{ U/ml}$   $\text{UFH}$  において血小板微粒子領域で  $\text{CD}61$  陽性事象の割合が増加するが、 $100 \text{ U/ml}$   $\text{UFH}$  では増加しない) を示すはずである。その試験の結果は、血小板微粒子の形成の増加が生じたならば、 $2\text{-O}$ 脱硫酸化ヘパリンと  $\text{HIT}$  抗体の交差反応性について陽性であった。

40

#### 【0053】

$\text{HIT}$ に関連した血小板活性化によって血小板の表面上で誘導される  $\text{P}$ -セレクトリン発

50

現の定量を以下のように行った。P - セレクチンの血小板表面発現を定量するために、多血小板血漿を採取し、血小板を上記のように標識し、フィコエリトリン ( P E ) 標識抗体 ( Becton-Dickinson ; 活性化血小板で発現される P - セレクチンに対して特異的である )  $6.5 \mu\text{l}$  でさらに標識した。そのゲート制御サンプルを用いて、F A L S および C D 6 1 - F I T C 蛍光に基づき、単一血小板および血小板微粒子の領域を位置づけた。P E 蛍光 ( P - セレクチン発現 ) のヒストグラムをゲート制御して、血小板凝集体を排除した。マーカーを含む全ピークを決めて、P - セレクチン蛍光の中央値を決めた。結果は、非凝集血小板集団での C D 6 2 の平均蛍光強度単位 ( M F I ) で記録した。ヘパリン依存性 H I T 抗体との交差反応性についての試験において、U F H 対照は、 $0.1 \text{ U/ml}$  および  $0.5 \text{ U/ml}$  U F H において陽性応答 ( P - セレクチン蛍光の中央値が増加する ) を示すが、 $100 \text{ U/ml}$  U F H では陽性応答を示さないはずである。その試験の結果は、血小板 P - セレクチン発現の増加が生じたならば、2 - O 脱硫酸化ヘパリンと H I T 抗体の交差反応性について陽性であった。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 5 4 】

図 5 は、未分画ヘパリンが通常の治療的抗凝固薬濃度  $0.4 \mu\text{g/ml}$  においてこの系における全放射性標識セロトニンの  $> 80\%$  の放出を誘発するというを示している。これに対して、濃度  $0.78 \sim 100 \mu\text{g/ml}$  の範囲で調べた 2 - O 脱硫酸化ヘパリンでは、実質的な  $^{14}\text{C}$  セロトニン放出は誘発し得ず、この 2 - O 脱硫酸化ヘパリンが、血小板活性化を引き起こす、前もって生成された H I T 抗体とは相互作用しないということを示す。

#### 【 0 0 5 5 】

図 6 は、未分画ヘパリンを通常の治療的抗凝固薬濃度  $0.4 \mu\text{g/ml}$  において血小板および H I T - 抗体陽性血清ともにインキュベートすると、血小板のおよそ  $20\%$  の表面上で顕著な C D 6 2 発現が生じるということを示している。生理食塩水対照のインキュベーションでは、C D 6 2 の低発現 ( 血小板の  $< 2\%$  ) が特徴であった。これに対して、 $0.78 \sim 100 \mu\text{g/ml}$  で調査した 2 - O 脱硫酸化ヘパリンでは、生理食塩水対照のインキュベーションで観察された C D 6 2 発現レベルを上回る C D 6 2 発現レベルへの増加はなかった。さらに、 $0.4 \mu\text{g/ml}$  の未分画ヘパリンにより実質的な血小板微粒子の形成が起こったが、一方、 $0.78 \sim 100 \mu\text{g/ml}$  の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンによる、生理食塩水対照インキュベーションでの血小板微粒子形成レベル (  $< 5\%$  活性 ) を上回る血小板微粒子形成レベルへの誘導はなかった。

#### 【 0 0 5 6 】

分子量が  $10.5 \text{ kD}$  であり、硫酸化度が約  $1.0$  である O D S ヘパリンは、セロトニン放出アッセイおよび血小板微粒子形成アッセイにおいて H I T 様血小板活性化応答を誘発すると予測される (Greinacher A, et al., supra)。よって、2 - O 脱硫酸化ヘパリンが、血小板を活性化する H I T 抗体および P F 4 と反応せず、H I T 症候群を引き起こす可能性が低いことは意外であり、先行技術からは予測できなかった。これは、2 - O 脱硫酸化ヘパリンが重篤で生命に関わる H I T - 2 症候群を引き起こさないことから、2 - O 脱硫酸化ヘパリンが、ヘパリンまたはヘパリン類似体療法を必要とする炎症状態および他の状態の治療のための患者への投与に、より安全な治療用ヘパリン類似体であるということを示す。

#### 【 0 0 5 7 】

さらに意外にも、2 - O 脱硫酸化ヘパリンは H I T 抗体および未分画ヘパリンによって起こる血小板活性化を実際に抑制する。これらの改善試験では、使用する 2 - O 脱硫酸化ヘパリンを実施例 I I I に詳述している大規模商用プロセスにより製造した。上記のものを少し変更した S R A およびフローサイトメトリー法を用いて、2 - O 脱硫酸化ヘパリンのこの独特の効果を立証した。

#### 【 0 0 5 8 】

具体的に言えば、S R A では前述のように多血小板血漿を採取し、調製し、標識した。試験系混合物は、2 - O 脱硫酸化ヘパリン ( 終濃度  $0 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.78 \mu\text{g/ml}$ 、

1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ および100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 5  $\mu\text{l}$ および未分画ヘパリン(終濃度0.1 U/mlまたは0.5 U/mlいずれかのもの) 5  $\mu\text{l}$ の両方を混合した。そのSRAの結果は、UFH応答が2-O脱硫酸化ヘパリンの存在下で阻害されたならば、2-O脱硫酸化ヘパリンによる、未分画ヘパリンによって誘導される血小板活性化の改善について陽性であった。UFHおよび2-O脱硫酸化ヘパリンの存在下でのセロトニン放出<20%は、完全改善と考えられる。

#### 【0059】

具体的に言えば、フローサイトメトリーによる分析では、前述のように全血を採取し、調製した。試験系混合物は、2-O脱硫酸化ヘパリン(終濃度0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.78  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ および100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 25  $\mu\text{l}$ および未分画ヘパリン(終濃度0.1 U/mlまたは0.5 U/mlいずれかのもの) 25  $\mu\text{l}$ の両方を混合した。2-O脱硫酸化ヘパリンを含まないヘパリンを対照として使用した(終濃度0 U/ml、0.1 U/ml、0.5 U/mlおよび100 U/ml UFH)。2-O脱硫酸化ヘパリンなどのいずれの試験薬も、0.1 U/mlおよび0.5 U/ml UFHの応答が阻害されるならば、改善について陽性であると考えられる。その血小板活性化応答が100 U/ml UFHの対照(2-O脱硫酸化ヘパリンなどの試験薬は存在しない)のものと同等であるならば、完全改善が起こる。

#### 【0060】

SRAでは、3-O脱硫酸化も受ける2-O脱硫酸化ヘパリンの、3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ という低い濃度で改善を観察することができた。0.5 U/ml UFH系において改善を開始させるには、0.1 U/ml UFH系に必要な2-O脱硫酸化ヘパリン濃度と比べて、より高い2-O脱硫酸化ヘパリン濃度(平均して3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対して6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )が必要であった。HIT抗体/未分画ヘパリンによって誘導される血小板活性化の完全遮断は常に得られたが、2-O脱硫酸化ヘパリンの濃度はHIT抗体の強度により異なった。図7は、典型的なHIT患者の血清を用いたSRAの改善結果を示している。ほとんどの患者の血清では、12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度の2-O脱硫酸化ヘパリンで完全改善(<20%セロトニン放出として定義される)が観察された。4名の異なるHIT患者の血清を用いたSRA阻害研究において得られたデータの合成グラフは、0.1 U/ml UFH系(図8)および0.5 U/ml UFH系(図9)を用いて示している。6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の2-O脱硫酸化ヘパリンで改善が始まり、25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の2-O脱硫酸化ヘパリンでSRA応答の完全改善が達成されることが分かる。50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の2-O脱硫酸化ヘパリンの存在下では血小板の活性化は観察されなかった。データの一貫性から、エラーバー(平均の標準誤差; SEM)は示していない。

#### 【0061】

血小板活性化の指標として、血小板微粒子形成および細胞表面P-セレクチン発現のフローサイトメトリーによる分析を用いた、HIT抗体/未分画ヘパリンによって誘導される血小板活性化の改善についての2-O脱硫酸化ヘパリンの評価では、全ての試験系において改善効果が示された(2-O脱硫酸化ヘパリンが存在しない場合の0.1 U/mlおよび0.5 U/ml UFH応答で得られる応答の阻害として定義される)。血小板微粒子形成については、2-O脱硫酸化ヘパリンの、6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ という低い濃度で改善が観察された。0.1 U/ml UFH系および0.5 U/ml UFH系で観察された改善応答には顕著な違いはなかった。平均して、6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の2-O脱硫酸化ヘパリンで改善が始まった。血小板活性化の完全遮断は常に得られたが、2-O脱硫酸化ヘパリンの濃度はHIT抗体の強度により異なった。図10は、典型的なHIT患者の血清を用いた、HIT/未分画ヘパリンによって誘導される血小板微粒子形成の改善結果を示している。4名の異なるHIT患者の血清を用いた血小板微粒子形成阻害研究において得られたデータの合成グラフは、0.1 U/ml UFH系(図11)および0.5 U/ml UFH系(図12)を用いて示している。6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度の2-O



脱硫酸化ヘパリンから完全改善（試験薬 2 - O 脱硫酸化ヘパリンが存在しない場合の 100 U / m l U F H 対照の血小板活性化応答と同等である血小板活性化応答として定義される）が観察された。血小板微粒子形成の完全緩解を達成するには、平均して、濃度 50  $\mu$  g / m l の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンが必要であった。

#### 【 0 0 6 2 】

P - セレクチン ( C D 6 2 ) 発現については、2 - O 脱硫酸化ヘパリンの、1 . 5 6  $\mu$  g / m l という低い濃度で改善を観察することができた。0 . 1 U / m l U F H 系および 0 . 5 U / m l U F H 系で観察された改善応答には顕著な違いはなかった。平均して、6 . 2 5  $\mu$  g / m l の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンで改善が始まった。血小板活性化の完全遮断は常に得られたが、2 - O 脱硫酸化ヘパリンの濃度は H I T 抗体の強度により異なった。図 1 3 は、典型的な H I T 患者の血清を用いた、H I T / 未分画ヘパリンによって誘導される血小板 C D 6 2 発現の改善結果を示している。6 . 2 5  $\mu$  g / m l 以上の濃度の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンから完全改善が観察された。血小板活性化の完全改善または抑制を達成するには、平均して、濃度 > 2 5  $\mu$  g / m l の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンが必要であった。4 名の異なる H I T 患者の血清を用いた血小板 C D 6 2 発現阻害研究において得られたデータの合成グラフは、0 . 1 U / m l U F H 系（図 1 4 ）および 0 . 5 U / m l U F H 系（図 1 5 ）を用いて示している。6 . 2 5  $\mu$  g / m l の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンで改善が始まり、50  $\mu$  g / m l の 2 - O 脱硫酸化ヘパリンで、C D 6 2 発現によって測定される血小板活性化応答の完全改善が達成される。

#### 【 0 0 6 3 】

[ 実施例 I I : 2 - O 脱硫酸化ヘパリンの静脈注射は、ヘパリン起因性血小板減少症抗体の存在下でのヘパリンによる血小板活性化の完全改善に必要な血中濃度をもたらす ]

2 - O 脱硫酸化ヘパリンのレベルがインビボで H I T に関連した血小板活性化を抑制するのに十分な濃度に達するかどうかを確認するために、3 群のビーグル犬（各群 n = 4 ）に、実施例 I I I のとおりに製造した 2 - O 脱硫酸化ヘパリン（O D S H ）を注射した。注射は、用量 0 m g / k g （生理食塩水対照、群 1 ）、4 m g / k g （群 2 ）、1 2 m g / k g （群 3 ）および 2 4 m g / k g （群 4 ）で 2 分間かけて行った。毎日 4 回、1 0 日間注射を実施した。一日の O D S H 総投与量は 0 m g / k g 、1 6 m g / k g 、4 8 m g / k g および 9 6 m g / k g とした。調査の第 1 日目、第 2 日目、第 4 日目、第 6 日目および第 8 日目に、その当日の第 1 回目の注射の 1 5 分後および 6 時間後に全血を採取した。また、最後の O D S H 注射の後、1 5 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間および 8 時間の時点でもサンプルを採取した。全てのサンプルを抗凝固薬としてクエン酸塩を入れたヴァキュテナー採血管に集めた。

#### 【 0 0 6 4 】

O D S H の濃度は、体液中の硫酸化多糖類の測定のために開発された電位差測定法により測定した (Ramamurthy N, Baliga N, Wakefield TW, Andrews PC, Yang VC, Myerhoff ME, Determination of low-molecular-weight heparins and their binding to protamine and a protamine analog using polyion-sensitive membrane electrodes. Anal Biochem 266:116-124, 1999 参照)。円筒型ポリカチオン感応電極は前述のように調製する (Ramamurthy N, Baliga N, Wahr JA, Schaller U, Yang VC, Meyerhoff ME, Improved protamine-sensitive membrane electrode for monitoring heparin concentrations in whole blood via protamine titration. Clin Chem 44:606-61, 1998 参照)。1 % ( w / w ) ジノイルナフタレンスルホン酸塩 (dinoylnaphthalene sulfonate)、4 9 . 5 % ( w / w ) ニトロフェニルオクチルエーテル、および 4 9 . 5 % ( w / w ) ポリウレタン M 4 8 の組成物を含むカクテルは、成分を蒸留テトラヒドロフラン ( 2 0 0 m g / m l ) に溶かすことにより調製する。得られた溶液を、1 インチ片のタイゴンチューブ ( 内径 = 1 . 3 ~ 1 . 5 m m ) から少し突き出た密閉ガラス毛细管の丸みを帯びた端面に浸漬被覆する。その溶液を 1 5 分間隔で 1 2 回浸漬被覆した後、センサー本体をドラフトチャンバーで一晩乾燥させる。使用当日に、そのセンサー本体を P B S に少なくとも 1 時間浸漬し、ガラス毛管を慎重に取り出す。次いで、そのセンサー本体に P B S を満たし、A g / A g C l ワイヤを挿入して、セン

サーを完成させる。センサーは1度使用したら廃棄する。2つのセンサーとAg/AgCl基準ワイヤをMac IIcxコンピュータのNB-MIOアナログ/デジタル入力/出力ボード(National Instruments)とインターフェースで接続されたVF-4増幅器モジュール(World Precision Instruments)と接続する。3秒間隔でデータサンプリングし、Lab View 2.0ソフトウェアを用いて記録した。PBS中の1mg/ml硫酸プロタミン(クルペイントタイプ、Sigma)の滴定剤溶液を調製し、その滴定剤をシリンジポンプ(Bioanalytical Systems)を介して連続供給する。滴定終点はKolthoff法を用いてコンピュータで計算し(Sergeant EP, Potentiometry and potentiometric titrations. In: Chemical Analysis Kolthoff IM, Elwing PJ, eds. 69:362-364, 1985参照)、その後、校正曲線の終点に達するのに必要なプロタミン濃度に相当する減法補正係数の適用を行う。

10

【0065】

図16は、3用量群および対照についての定期的な採取間隔での血漿中のODSH濃度を示している。種々の時点における平均濃度を下記表1に示す。

【0066】

【表1】

注射後の平均 ODS ヘパリン濃度

サンプル	ODS ヘパリン濃度 (μg/ml)			
	0 mg/kg/日	16 mg/kg/日	48 mg/kg/日	160 mg/kg/日
注射後 15 分	-0.1 ± 0.4	14.0 ± 0.9	50.4 ± 18.9	237.9 ± 26.5
注射後 1 時間	2.3 ± 0.7	2.4 ± 0.7	14.6 ± 0.9	86.4 ± 12.1
注射後 3 時間	0.9 ± 0.7	0.6 ± 0.7	1.7 ± 0.7	17.2 ± 0.8
注射後 4 時間	1.0 ± 0.7	0.4 ± 0.7	-0.1 ± 0.7	10.7 ± 0.8
注射後 6 時間	1.8 ± 0.7	0.4 ± 0.7	1.4 ± 0.7	5.7 ± 0.8
注射後 8 時間	0.9 ± 0.7	0.1 ± 0.7	0.9 ± 0.7	2.1 ± 0.8
注射後 12 時間	1.7 ± 0.7	2.3 ± 0.7	0.9 ± 0.7	3.7 ± 0.8

20

コンパートメントモデリングは、WinNonlin version 4.1を用いて実施した。表2および表3は、各群それぞれについての薬物動態パラメーターAUC(曲線下面積)、K10-HL(最終半減期)、Cmax(最高血中濃度)、CL(クリアランス)、AUMC(1次モーメント曲線下面積)、MRT(平均滞留時間)、およびVss(定常状態の分布容積)を示す。

30

【0067】

【表2】

薬物動態パラメーター\*の概要

用量 (mg/kg/日)	AUC (時間*ug/mL)	Vss (mL/kg)	CL (mL/時間/kg)	Cmax (ug/mL)	半減期 (時間)
16	12.39 ± 1.92	127.23 ± 11.63	322.80 ± 49.98	23.28 ± 1.41	0.27 ± 0.06
48	59.90 ± 1.41	80.01 ± 1.11	200.35 ± 4.71	111.47 ± 1.03	0.28 ± 0.01
96	134.14 ± 10.96	97.39 ± 4.68	178.91 ± 14.63	197.60 ± 7.43	0.38 ± 0.04

40

\*推定値は±SEMである

【0068】

【表 3】

コンパートメント解析の結果

用量	パラメーター	単位	推定値	標準誤差	CV%
16	AUC	時間*ug/mL	12.391491	1.916640	15.47
16	K10-HL	時間	0.273207	0.057834	21.17
16	Cmax	ug/mL	23.279975	1.406524	6.04
16	CL	mL/時間/kg	322.802142	49.978994	15.48
16	AUMC	時間*時間*ug/mL	6.433104	1.988164	30.91
16	MRT	時間	0.394155	0.083437	21.17
16	Vss	mL/kg	127.234069	11.627849	9.14
48	AUC	時間*ug/mL	59.895111	1.405766	2.35
48	K10-HL	時間	0.276820	0.008857	3.20
48	Cmax	ug/mL	111.469287	1.030526	0.92
48	CL	mL/時間/kg	200.350243	4.707016	2.35
48	AUMC	時間*時間*ug/mL	31.407007	1.471781	4.69
48	MRT	時間	0.399367	0.012778	3.20
48	Vss	mL/kg	80.013235	1.107527	1.38
96	AUC	時間*ug/mL	134.144991	10.958943	8.17
96	K10-HL	時間	0.377308	0.039373	10.44
96	Cmax	ug/mL	197.499118	7.433318	3.76
96	CL	mL/時間/kg	178.910892	14.630699	8.18
96	AUMC	時間*時間*ug/mL	89.788574	14.548574	16.20
96	MRT	時間	0.544340	0.056803	10.44
96	Vss	mL/kg	97.388309	4.684936	4.81

## 【 0 0 6 9 】

注射量 4 m g / k g ( 1 6 m g / k g / 日 ) 以上で H I T 血小板活性化のあらゆる面を改善する 2 - O 脱硫酸化ヘパリンのレベルに達する。負荷注入速度が毎時負荷量のおよそ 5 分の 1 で、いかなる場合でも定常状態レベルが達成される可能性が高い。

## 【 0 0 7 0 】

[ 実施例 I I I : 非抗凝固薬であり、ヒト白血球エラスターゼに対して阻害性がある 2 - O 脱硫酸化ヘパリンの商業的に実現可能な製造 ]

非抗凝固薬である 2 - O 脱硫酸化ヘパリンは、さらに多くの、より商業的に実現可能な量で製造することができる。U S P ブタ腸管ヘパリンは、Scientific Protein Laboratories (SPL), Waukegan, WI などの信頼できる民間の製造供給元より購入する。その U S P ブタ腸管ヘパリンを室温 ( 2 0 ± 5 ) にて脱イオン水に溶かして、5 % ( 重量 / 容量 ) 溶液を作る。還元工程として、1 % ( 重量 / 容量 ) 水素化ホウ素ナトリウムを加え、2 時間攪拌する。次いで、その溶液を室温にて 1 5 時間放置する。その後、5 0 % 水酸化ナトリウムを加えてその溶液の pH を 1 3 より高い pH までアルカリ化する。アルカリ化した溶液を 2 ~ 3 時間攪拌する。このアルカリ化した溶液を、次いで、市販の凍結乾燥機のトレーに載せ、- 4 0 に冷却することにより冷凍する。その凍結乾燥機に真空を適用し、冷凍した溶液を凍結乾固させる。凍結乾燥生成物を冷水 ( < 1 0 ) に溶かして、5 % 溶液を得る。塩酸を攪拌しながらゆっくりと加えてその pH を約 6 . 0 に調整し、その溶液の温度が < 1 5 にならないように注意する。さらに、その溶液を少なくとも 1 0 容量の水で透析するか、または限外濾過に供して、過剰の塩および還元剤を除去する。透析した溶液に、2 % 塩化ナトリウム ( 重量 / 容量 ) を添加する。次いで、1 容量のハイソール ( 変性エタノール ) を用いてその 2 - O 脱硫酸化ヘパリン生成物を沈殿させる。その沈殿物を約 1 6 時間静置した後、その上清を取り出す。その沈殿物を水に再び溶かして 1 0 % ( 重量 / 容量 ) 溶液にする。その pH を塩酸または水酸化ナトリウムを用いて 5 ~ 6 に調整し、

その溶液を0.2 μ フィルターカプセルで洗浄容器に濾過する。さらに、濾過した溶液を凍結乾固させる。得られた生成物は、この方法により1.5 kgまでの収量で作製することができる。最終生成物は、pHが6.4であり、USP抗凝固活性が約6 U/mgであり、抗Xa抗凝固活性が1.9 U/mgである2-O脱硫酸化ヘパリンである。この生成物は、微生物およびエンドトキシン汚染がなく、ICP-AESによって測定したホウ素含量は<5 ppmである。この2-O脱硫酸化ヘパリンは、ラットおよびイヌにおいて、160 mg/kgという高用量で毎日最大10日間試験したが、実質的な毒性はなかった。

#### 【0071】

得られた2-O脱硫酸化ヘパリンは、ヒト白血球エラスターゼの酵素活性を阻害するのに有用である。これについては、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,668,188号；米国特許第5,912,237号；および米国特許第6,489,311号に詳述されている方法によって試験される。手短に言えば、ヒト白血球エラスターゼ(HLE)の阻害を、一定量のHLE(100 pmol)を等モル量の2-O脱硫酸化ヘパリン(I/E比 1:1)とともにHepesバッファー(0.125 M、0.125% Triton X-100、pH 7.5)500 μL中で25 にて30分間インキュベートすることにより測定し、最終容量900 μLに希釈した。残存酵素活性は、3 mM N-Suc-Ala-Ala-Val-ニトロアナリド(nitroanilide)(Sigma Chemical, St. Louis, MO, ジメチルスルホキシド中で作製)100 μLを添加することにより測定する。タンパク質分解により放出される色素原4-ニトロアンリン(4-nitroaniline)の吸光度の変化速度を405 nmでモニターする。阻害率は、阻害薬を含まない場合の酵素活性に基づいて算出する。上記の方法によって製造された2-O脱硫酸化ヘパリンは、酵素：阻害薬モル比 1:1においてHLE > 90%を阻害する。

#### 【0072】

大量生成物は、50 mg/mlの便宜な単位用量バイアルに処方することができる。これは、2-O脱硫酸化ヘパリンをUSP滅菌注射水に加えて、6.5%(重量/重量)溶液を作ることにより実現できる。塩化ナトリウムおよび滅菌注射水を加えて、最終重量オスモル濃度を280~300 mOsmに調整し、必要に応じて1 N塩酸または水酸化ナトリウムを用いてそのpHを7.1~7.3に調整する。その溶液を濾過し、無菌フィルクラス100区域に移し、そこで、単位用量ガラスバイアルそれぞれに21 ml溶液を充填し、密閉し、クランプし、ラベルを付ける。

#### 【0073】

[実施例IV：2-O脱硫酸化ヘパリンを用いた、ヒト白血球エラスターゼによる肺損傷の予防]

2-O脱硫酸化ヘパリンの、ヒト白血球エラスターゼ(HLE)介在性肺障害を予防する能力を、重量90~110 gの雌ゴールデンシリアンハムスター(Harlan Industries, Indianapolis, IN)において評価した。フェノバルビタールで麻酔をかけたハムスターに滅菌0.9%生理食塩水(NS)0.25 ml、HLE(100 μg)含有NS 0.25 ml、またはヘパリン(Sigma)もしくは実施例Iの2-O脱硫酸化ヘパリン500 μgを含有するNS 0.25 ml、続いて、HLEを含むNS 0.25 mlを気管内注射した。処置の24時間後に動物を放血死させた。咽喉を切開し、肺を一塊として摘出した。気管にカニューレ(ポリエチレンチューブ)を挿入し、3 ml NSの一連の5アリコートで洗浄した。洗浄液を200 × gで10分間遠心分離した。細胞計数および分画を行うために、得られた細胞ペレットをハンス平衡塩溶液(HBSS)1 mlに再懸濁した。上清は、急性障害の指標としてタンパク質およびヘモグロビンについてアッセイした。それらの結果は図17~19に示している。ヘパリンと2-O脱硫酸化ヘパリンはいずれも、エラスターゼによって誘導される障害のインビボでの強力な阻害薬であった。

#### 【0074】

実施例Iの2-O脱硫酸化ヘパリンは、毒性について試験されているが、硫酸デキストランなどの他の硫酸化多糖類エラスターゼ阻害薬は、ラットに0.5 mg/kgという低

用量で気管内注射したときに、肺の空気嚢への出血（肺胞出血）を引き起こす。実施例Ⅰの２－Ｏ脱硫酸化ヘパリンでは、気管内用量１０ｍｇ／ｋｇにおいてさえも、ラットでの肺胞出血はなかった。

#### 【００７５】

実施例Ⅰの２－Ｏ脱硫酸化ヘパリンは、エラスターゼ介在性肺障害を治療するためにヒトに使用することができる。例として、嚢胞性線維症患者の治療のために、５：１比の阻害薬とプロテアーゼを与える用量を調製し、エアゾールとして投与する。１日当たり痰５０ｍｌを生じ、痰中の白血球エラスターゼが平均値の患者では、この用量を、２－Ｏ脱硫酸化ヘパリン約２５～２５０ｍｇ（２４時間の間にネブライザーによって投与される）とすることができる。患者の痰中のエラスターゼレベルは、治療中モニタリングすることができる。ヒトエラスターゼ介在性肺障害の治療において未修飾ヘパリンに優る２－Ｏ脱硫酸化ヘパリンの利点は、２－Ｏ脱硫酸化ヘパリンが非抗凝固薬であり、嚢胞性線維症のような血液を喀出（喀血）しやすい患者において肺出血を引き起こす可能性が低いということである。未修飾ヘパリンに優る２－Ｏ脱硫酸化ヘパリンのもう１つの実質的な利点は、２－Ｏ脱硫酸化ヘパリンがＨＩＴ抗体と反応しないため、生命に関わるヘパリン起因性血小板減少症および血栓症のリスクがないということである。

10

#### 【００７６】

[ 実施例Ⅴ：後の実施例で使用する材料 ]

塩化アセチルコリン、カルシウムイオノフォアＡ２３１８７、ニトロプルシドナトリウム、およびインドメタシン(Sigma, St. Louis, MO)、ならびにU-46619(Upjohn, Kalamazoo, MI)をSato et alによって決定された濃度で使用した(Sato H, et al. L arginine inhibits neutrophil adherence and coronary artery dysfunction. Cardiovasc Res 31:63-72, 1996 参照)。ブタ腸管粘膜のグレードⅠ－Ａヘパリンナトリウム塩(Sigma)をKrebs-Henseliet(KH)バッファーに再懸濁し、静脈内ボラスとして投与した（イヌに３ｍｇ／ｋｇ）。非抗凝固薬である２－Ｏ脱硫酸化ヘパリン（ＯＤＳ－ＨＥＰ）は、抗凝固活性１７０ＵＳＰ／ｍｇおよび抗Ⅹａ活性１５０Ｕ／ｍｇの未分画ブタ腸管ヘパリンから、実施例Ⅰに従い、Fryer et al(Fryer A, et al., Selective O-desulfation produces nonanticoagulant heparin that retains pharmacologic activity in the lung. J Pharmacol Exp Therap 282:208-219, 1997 参照)に従って合成した。１．０ｍｇ／ｍｌの未修飾ヘパリンによりイヌ血漿によるヒト赤血球の溶解が $91 \pm 2\%$ 阻害された一方で、ＯＤＳ－ＨＥＰでは、１．０ｍｇ／ｍｌにおいて赤血球溶解が $4 \pm 2\%$ だけ減少した。ＯＤＳ－ＨＥＰをKrebs Heinseleit(K-H)バッファーに再懸濁し、静脈内ボラスとして投与した（イヌに３ｍｇ／ｋｇ；ラットに６ｍｇ／ｋｇ、単離心臓へのＫ－Ｈ灌流液に１００μｇ／ｍｌを加えた）。

20

30

#### 【００７７】

[ 実施例ⅤⅠ：インビボ虚血－再灌流調査の実施 ]

[ 外科的手順 ]

全ての動物を米国国立衛生研究所(the National Institutes of Health)によって発表されたthe Guide for the Care and Use of Laboratory Animals(NIH Publication No.85-23, revised 1985)に基づいて取り扱った。エモリー大学(Emory University)およびカロライナメディカルセンター(Carolinas Medical Center)の動物実験委員会(the Institutional Animal Care and Use Committees)により研究プロトコルの認可を受けた。

40

#### 【００７８】

雌雄両方の犬系状虫フリー成体イヌ２４匹にペントバルビタールナトリウム（２０ｍｇ／ｋｇ）で麻酔をかけ、気管内挿管した。麻酔にはクエン酸フェンタニル（０．３μｇ／ｋｇ／分）およびジアゼパム（０．０３μｇ／ｋｇ／分）を補い、深い麻酔を維持する必要に応じて静脈内投与した。各イヌに酸素富化室内空気を用いて従量式人工呼吸器で換気した。直腸温プローブを挿入して、中核温を測定した。動脈血採取および静脈内投与それぞれのために、右大腿動脈および静脈にカニューレ（ポリエチレンカテーテル）を挿入した。経時的に動脈血液ガスを測定して、１００ｍｍＨｇを上回る動脈血酸素分圧に維持した。動脈血二酸化炭素分圧は３０～４０ｍｍＨｇ間に維持し、動脈ｐＨは呼吸数の調整に

50

より 7.35 ~ 7.45 間に維持し、酸血症は静脈内炭酸水素ナトリウムで中和した。

#### 【0079】

胸骨正中切開後、上下大静脈を臍テープで輪にし、心臓をペリカルディアルクレードル (pericardial cradle) を用いて吊るした。Millar カテーテル付圧力変換器 (Millar Instruments, Houston, Texas) を大動脈近位部および左心室腔に置いて、大動脈圧および左心室圧それぞれを測定した。有色ミクロスフェアの注入のために、ポリエチレンカテーテルを左心房に挿入した。第一対角枝の遠位側にある左前下行枝 (LAD) 冠動脈の 1 センチメートル部分を切開し、2 - 0 絹縫合系でゆるく巻いた。1 対の対向する超音波クリスタルを左前下行枝冠動脈分布内のリスクのある候補虚血領域内に心筋内配置し、それらを使用して、リスクのある領域内の局所機能を評価した (Jordan JE, et al., Adenosine A2 receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary adherence. J Pharmacol Exp Therap 280;301-309, 1997 参照)。

10

#### 【0080】

##### 〔実験プロトコル〕

イヌを 3 群のうちの 1 つに無作為化した (各群  $n = 8$ ) : 1) 対照 (生理食塩水)、2) 未修飾ヘパリン (HEP、 $3 \text{ mg / kg}$ ) および 3) 修飾ヘパリン (ODS-HEP、 $3 \text{ mg / kg}$ )。LAD を 90 分間閉塞して、虚血を起こした後、4 時間の再灌流のために解放した。各医薬品 (生理食塩水、HEP、ODS-HEP) を再灌流開始の 10 分前、再灌流中 90 分および 180 分の時点で静脈内ボラスとして注入した。アナログデジタル変換器 (Data Translation, Marlboro, MA) を使用して、パーソナルコンピュータによりアナログ血流力学データおよび心臓力学データをサンプリングした。血流力学および心臓力学データは、少なくとも 10 心周期の平均をとった。収縮期短縮率、部分機能、および指数曲線適合解析で表される部分スティフネスの特徴を、J.E. Jordan, et al., supra ですでに記載されているように決定した。試験中 Hemochron 401 全血凝固システム (International Technidyne, Edison, NJ) を用いて活性凝固時間 (ACT、秒) を測定した。動脈血クレアチンキナーゼ活性を Sigma Diagnostics のキットを用いて解析し、タンパク質 1 グラム当たりの国際単位として表した。ペントバルビタールナトリウム ( $100 \text{ mg / kg}$ ) の静脈内ボラスで試験を終わらせた。心臓を、さらなる解析のために直ちに摘出し、次の組成 ( $\text{mmol / L}$ ) :  $118 \text{ NaCl}$ 、 $4.7 \text{ KCl}$ 、 $1.2 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 、 $1.2 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $2.5 \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $12.5 \text{ NaHCO}_3$ 、および  $11 \text{ g}$  のグルコース、 $\text{pH } 7.4$  の氷冷 Krebs-Henseleit (K-H) バッファーに入れた。

20

30

#### 【0081】

##### 〔リスクのある領域、梗塞面積および局所心筋血流の決定〕

心臓の試験後摘出後、リスクのある心筋領域および梗塞面積を J.E. Jordan, et al., supra により、Unisperse 色素排除および 1% 塩化トリフェニルテトラゾリウムそれぞれを用いて決定した。リスクのある領域 (AAR) および梗塞面積は、前述のように (J.E. Jordan, et al. supra) 重量測定法で算出した。虚血再灌流心筋および非虚血心筋における局所心筋血流は、色素放出有色ミクロスフェア (Triton Technology, San Diego, CA) の分光光度分析により得た。ミクロスフェアの左心房注入および参照血液の採取をベースライン時、90 分の虚血終了時、ならびに再灌流の 15 分および 4 時間の時点に行った。

40

#### 【0082】

##### 〔心筋好中球蓄積の測定〕

Jordan JE, et al., supra に記載のとおり、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性 (吸光度 / 分) の分光光度分析のため、心筋における好中球 (PMN) 蓄積の評価のため、非虚血領域、ならびにリスクのある領域の非壊死領域および壊死領域から組織サンプル  $0.4 \text{ g}$  を採取した。

#### 【0083】

##### 〔試験後冠動脈内皮への PMN 付着〕

基礎的内皮機能の生物検定法として試験後冠動脈への PMN 付着を用いた。これまでに

50

記載されているように、イヌPMNを動脈血から単離し、蛍光標識した(Zhao,Z-Q,Sato H,Williams MW,Fernandez AZ,Vinten-Johansen J,Adenosine A2-receptor activation inhibits neutrophil-mediated injury to coronary endothelium.Am J Physiol Heart Circ Physiol 271:H1456-H1464,1996参照)。心臓摘出後、虚血再灌流LAD部分および非虚血左回旋枝(LCx)部分を単離し、3-mm切片にし、内皮を露出させるために氷冷K-Hバッファーに浸しながら切開し、その後、37℃のK-Hバッファーの入ったディッシュに入れた。これまでに記載されているように、未刺激の蛍光標識PMN(6×10<sup>6</sup>細胞/ディッシュ)を試験後切片とともに15分間インキュベートした後、その冠動脈切片を付着していないPMNについて洗浄し、ガラススライドに載せ、付着したPMNを落射蛍光顕微鏡下で計数した(490-nm励起、504-nm発光)(Thourani VH,Nakamura N,Durarter IG,Bufkin BL,Zhao Z-Q,Jordan JE,Shearer ST,Guyton RA,Vinten-Johansen J,Ischemic preconditioning attenuates postischemic coronary artery endothelial dysfunction in a model of minimally invasive direct coronary artery bypass grafting.J Thorac Cardiovasc Surg 117:838-389,1999参照)。

10

#### 【0084】

##### 〔アゴニスト刺激時の大血管弛緩〕

虚血(LAD)および非虚血(LCx)の心外膜大血管におけるアゴニスト刺激時の血管反応性をオーガンチャンパー技術を用いて調べた(Zhao,Z-Q,et al.,supra参照)。インドメタシン(10μmol/L)を用いてプロスタグランジンの放出を阻害した。蹄冠をトロンボキサンA2類似体U-46619(5nmol/L)で前収縮させた。内皮機能は、漸増濃度のアセチルコリン(1~686μmol/L)およびA23187(1~191μmol/L)に対する血管緊張低下応答を比較することにより評価し、一方、平滑筋機能は、ニトロプルシドナトリウム(1~381μmol/L)を用いて評価した。

20

#### 【0085】

##### 〔実施例VII：インビトロ虚血-再灌流調査の実施〕

##### 〔PMN脱顆粒〕

上清MPO活性を、Jordan JE,Thourani VH,Auchampach JA,Robinson JA,Wang N-P,Vinten-Johansen Jによって変更されたElyの方法、A<sub>3</sub> adenosine receptor activation attenuates neutrophil function and neutrophil-mediated reperfusion injury.Am J Physiol Heart Circ Physiol 277:H1895-H1905,1999を用いて、イヌPMN脱顆粒の成果として測定した。イヌPMN(20×10<sup>6</sup>細胞/ml)をODSヘパリンの存在または不在下でインキュベートし、血小板活性化因子(PAF、10μmol/L)およびサイトカラシンB(5μg/ml)で刺激して、脱顆粒させた。上清のMPO活性を分光光度法によりアッセイした。

30

#### 【0086】

##### 〔正常冠動脈内皮へのPMN付着〕

正常イヌ心外膜動脈へのPMN付着を正常動物の冠動脈切片およびPMNを用いて評価した。付着調査で記載したとおりに調製および標識した未刺激PMNおよび冠動脈切片をヘパリンまたはODSヘパリンの存在または不在下で同時インキュベートした。15分間のPAF(100nmol/L)刺激後、既に概説したように付着しているPMNを計数した。

40

#### 【0087】

##### 〔ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた試験〕

Jaffe,et al.の方法に従って、初代HUVECを単離し(Jaffe EA,Nachmann RL,Becker CG.Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins:identification by morphological criteria.J Clin Invest 52:2745-2750,1973)、内皮細胞増殖培地(Clonetics)を用いてカバーガラス上で培養し、フォン・ウィルブランド因子の発現について試験した。HUVECをPBSで2回洗浄し、Neuman/Tytell培地単独中で24時間インキュベートし、続いて、10~20ng/ml TNFを加えたりボ多糖類(1μg/ml)とともに2時間のインキュベーションを行うか、またはヘパリンもしくはODS

50

- HEP (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 中で4時間のインキュベーションを行って、2時間後にリボ多糖類およびTNF を加えた。HUVECを、プロテアーゼ阻害薬、PI (1 mmol/L ペファブロック、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンチパイン、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチン、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ペプスタチン、40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ベスタチン、3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  E-64、および100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  キモスタチン)を含むCEB (10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.9、60 mmol/L KCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L ジチオトレイトール) 中4%パラホルムアルデヒドで、氷上で20分間固定し、CEB/PI 中0.1%NP40で2分間透過処理し、冷CEBで1回洗浄し、前述同様に10分間固定した。カバーガラスを3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  中で30分間インキュベートして、ペルオキシダーゼを抑制し、冷PBSで3回洗浄し、PBS中2%ウシ血清アルブミン(BSA)で、氷上で2時間ブロックし、0.1%BSA/PBSで希釈した1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗p65抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)とともに4 にて一晩インキュベートした。結合していない抗p65を2%BSA/PBSで洗い流し、結合した抗体を0.1%BSA/PBS中ビオチン化ブタ抗ウサギ免疫グロブリン(1:1000)とともに氷上で45分間インキュベートし、続いて、2%BSA/PBSで3回の洗浄を行った。次いで、カバーガラスをストレプトアビジンビオチンペルオキシダーゼとともに室温にて1時間インキュベートし、再び洗浄し、褐色の反応生成物が見られるまで0.003%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含む0.03%重量/容量3-3'ジアミノベンジジン中でインキュベートし、エオシンで対比染色し、光学顕微鏡下で観察した。

10

20

30

40

50

#### 【0088】

また、電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)を用いて、NF- $\kappa$ Bの細胞質から核への転座も調べた。Digman, et al. によって記載されているように(Digman JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acid Res 11:1475-1481, 1983)、HUVECから次のプロテイナーゼ阻害薬: 1 mmol/L フッ化フェニルメチルスルホニル、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ペプスタチンA、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  キモスタイン(chymostatin)、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンチパイン、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチンおよび4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アプロチニンを加えて、核タンパク質を得た。NF- $\kappa$ B コンセンサス配列AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC [配列番号1] の二本鎖オリゴヌクレオチドDNAプローブ(Santa Cruz)をポリヌクレオチドキナーゼを用いて [ $^{32}\text{P}$ ] ATPで5' OH末端標識した。Sephadex G-25カラムを用いて遊離放射性ヌクレオチドを除去した。そのプローブ(0.5 ng)を、終濃度10 mmol/L HEPES、pH 7.5、50 mmol/L KCl、5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、1 mmol/L ジチオトレイトール、1 mmol/L EDTAおよび5%グリセロールを含む20  $\mu\text{l}$  バッファー中HUVEC核タンパク質10  $\mu\text{g}$  (Bio-Rad法)、さらにポリ(dI-dC) 5  $\mu\text{g}$  とともにインキュベートして、非特異的結合を低減した。インキュベーションは室温にて20分間行った。反応物を0.5  $\times$  TBE (45 mmol/L Trisホウ酸塩、25 mmol/L ホウ酸、1 mmol/L EDTA) 中6%非変性ポリアクリルアミドゲルで4 にて14 V/cmで1.5~2.0時間電気泳動にかけ、-80 にてオートラジオグラフを撮影した。

#### 【0089】

〔ラット単離灌流心臓を用いた試験〕

雄Sprague-Dawleyラット(300~400 g)にペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg、i.p.)で麻酔をかけ、それらの心臓を素早く摘出し、118 (mmol/L) NaCl、4.7 KCl、1.2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.0  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (EDTAの存在下で2.5 mmol/L 遊離 $\text{Ca}^{2+}$ が得られる)、0.5 EDTA、11 デキストロース、および25  $\text{NaCHO}_3$  からなる改変Krebs-Henseleit重炭酸バッファー(KHB)を用いて、これまでに記載されているLangendorff装置(Watts JA, Maiorano PC, Trace amounts of albumin protect against ischemia and reperfusion injury in isolated rat hearts. J Mol Cell Cardiol 31:1653-1662, 1999)で灌流した。3群を調べた: 1) 非虚血対照心臓を45分灌流し; 2) 虚血再灌流心臓を



15分の温全虚血と15分の再灌流に供し、; 3) 心臓摘出の120分前に6mg/mg ODSヘパリンをi.v.注射したラットのODSヘパリン心臓を各15分の、全虚血と灌流バッファー中100µg/ml ODSヘパリンでの再灌流に供した。灌流後、液体N<sub>2</sub>で予冷したWollenbergerクランプで心室を冷凍し、液体N<sub>2</sub>下で粉碎した。冷凍心筋粉末から直ちにLi et al.の方法により核タンパク質を単離した(Li C, Browder W, Kao R, Early activation of transcription factor NF- B during ischemia in perfused rat heart .Am J Physiol Heart Circ Physiol 276:H543-H552,1999)。各結合反応における核タンパク質15µgを用いてEMSAを実施した(Pierceタンパク質アッセイ)。<sup>32</sup>P-標識NF- Bプローブを添加する前に、核タンパク質を10×非標識KF- BまたはサイクリックAMP応答配列オリゴヌクレオチド(CRE、AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG) [配列番号2]とともに5分間インキュベートすることにより、競合試験を実施した。標識プローブの後、NF- Bのp65およびp50成分に対する抗体(Santa Cruz)0.5µgを結合反応物に添加することにより、スーパーシフトアッセイを実施した。反応物を0.5×TGE(120mmol/Lグリシン、1mmol/L EDTA、25mmol/L Tris、pH8.5)中5%非変性ポリアクリルアミドゲルで室温にて100Vで2時間電気泳動にかけ、オートラジオグラフを撮影した。

【0090】

〔統計分析〕

群、時間および群-時間相互作用の解析のために、データを一元配置分散分析または反復測定二元配置分散分析により解析した。有意な相互作用が認められた場合には、チューキーまたはスチューデント・ニューマン・クールズ事後多重比較検定を適用して、差の源を特定した。処置および未処置のラット虚血再灌流心臓間のp65含有NF- Bゲルバンドの密度における差は、t検定を用いて比較した。p<0.05を有意とし、値は平均±平均(SEM)の標準誤差として表される。

【0091】

〔実施例VII: 2-O脱硫酸化ヘパリンは梗塞面積を縮小させる〕

上記手順を用いて、ヘパリンおよび2-O脱硫酸化ヘパリンにより心筋の梗塞面積が大幅に縮小した。図20に示されるように、リスクのある領域(AAR)は梗塞のリスクのある左心室(LV)の割合として表される。梗塞面積(壊死領域、AN)はリスクのある領域(AAR)の割合として表される。<sup>\*</sup>p<0.05 対照との比較。ヘパリン(HEP)または2-O脱硫酸化ヘパリン(ODS-HEP)処置により、リスクのある領域の割合(AN/AAR)として表される梗塞面積(壊死領域、AN)がそれぞれ、対照と比較して35%および38%縮小した。HEP群およびODS-HEP群間において梗塞面積に統計的な差はなく、左心室肥大(AAR/LV)の割合として表されるLAD閉塞のリスクのある領域は群間では同程度であった。

【0092】

図21に示されるように、血漿クレアチンキナーゼ(CK)活性を利用して、実験の時間的経過の間の梗塞面積の組織学的大きさを確認した。<sup>\*</sup>p<0.05 HEPおよびOPSHEPの対照との比較。群間においてベースライン時の血漿CK活性には有意差はなく、局所虚血後のCK活性の増加はなかった。対照群の心臓は再灌流開始時間にCK活性の急激な増大を示し、この増大はHEPまたはODS-HEP処置によって有意に減少した。このことはこれらの群における梗塞面積の縮小と一致した(4時間再灌流後のCK=対照43.4±3.7; HEP27.6±5.3; およびODS-HEP21.9±4.0国際単位/g タンパク質)。

【0093】

HEPおよびODS-HEPは、梗塞面積に対するそれらの有利な効果にもかかわらず、心筋血流に有意な変化をもたらさなかった。虚血再灌流LAD冠動脈領域における心内膜下血流は、3群間ではベースライン時において統計的に同程度であった。虚血再灌流左前下行枝(LAD)冠動脈の分布にあるリスクのある領域(AAR)において局所心筋血流を調べた。非虚血再灌流左回旋枝(LCx)冠動脈の分布における局所心筋血流にも差

10

20

30

40

50

はなかった。リスクのある領域における壁内血流は、虚血中有意に減少したが、群差はなかった。全ての群が再灌流15分の時点でリスクのある領域において同程度の充血応答を示し、その後、血流は4時間の間、全ての群において同レベルまで減少した。プロトコールを通じて、非虚血再灌流LCx冠動脈領域における壁内血流は全ての群で同程度であった。

#### 【0094】

梗塞面積における差は、血流力学的または心臓力学的な差によるものでもない。ベースライン時と虚血および再灌流中の血行動態は群間で類似していた(データは示さず)。心拍数は、全ての動物において虚血および再灌流中、有意に増加し、左心室拡張末期圧は、虚血中、3群全てにおいて同等に上昇した。虚血後、全ての群の心臓はリスクのある領域において壁運動異常を示した。4時間の再灌流中の収縮期短縮率の回復は全ての心臓で弱く(4時間再灌流時の対照心臓 -  $6 \pm 2\%$ ; HEP処置心臓 -  $7 \pm 3\%$ ; およびODS - HEP処置心臓 -  $6 \pm 4\%$ )、拡張期スティッフネス(バリューレスのベータ係数によって判断される)は虚血後、全ての群で同等のレベルまで増大した(対照心臓ではベースライン時の  $0.2 \pm 0.05$  単位から4時間再灌流後の  $0.7 \pm 0.1$  単位まで; HEP処置心臓ではベースライン時の  $0.2 \pm 0.04$  単位から4時間再灌流後の  $1.0 \pm 0.2$  単位まで; ODS - HEP処置心臓ではベースライン時の  $0.2 \pm 0.04$  単位から4時間再灌流後の  $0.5 \pm 0.2$  単位まで)。

#### 【0095】

[実施例IX: ヘパリンおよび2-O脱硫酸化ヘパリンは再灌流心筋におけるPMN蓄積を減少させる]

上記手順を用いて、ヘパリンおよび2-O脱硫酸化ヘパリンにより再灌流心筋におけるPMN蓄積が減少することが見出された。PMN流入は、致死再灌流障害の基礎にある主要機構である。図22に示されるように、HEPまたはODS - HEPでの処置により、壊死心筋におけるミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性が対照群に対して有意に50%低減した。図22のミエロペルオキシダーゼ活性では、各群の正常虚血および壊死心筋組織サンプルにおけるPMN蓄積率を示す。 $*p < 0.05$  HEPおよびODS - HEPの対照との比較。正常心筋内のPMN蓄積は少なく、対照、HEPおよびODS - HEP群間では同程度であった(それぞれ、 $16 \pm 8$ 、 $18 \pm 11$ 、および $18 \pm 8$  吸光度単位/分)。HEPおよびODS - HEPは両方ともリスクのある非壊死領域におけるMPO活性を低減したが、これらの変化は有意には至らなかった( $p > 0.10$ )。

#### 【0096】

[実施例X: 2-O脱硫酸化ヘパリンは抗凝固をもたらさない]

ODS - HEPは、梗塞面積を縮小するにもかかわらず、抗凝固をもたらさない。図23に示されるように、活性凝固時間(秒単位で測定)を用いて、全身全血の抗凝固を調べた。 $*p < 0.05$  HEPの他の群との比較。4時間の再灌流時の活性凝固時間(AC T)は、HEP処置後、対照と比べて10倍を上回って延長された(それぞれ、 $1425 \pm 38$ 秒と $123 \pm 10$ 秒)、これに対して、ODS - HEP群のAC T( $145 \pm 10$ 秒)は対照と変わらなかった( $123 \pm 10$ 秒、 $p = 0.768$ )。よって、ODS - HEPは、HEPと同じ利益が得られたが、抗凝固は示さなかった。

#### 【0097】

[実施例XI: ヘパリンおよび2-O脱硫酸化ヘパリンは冠動脈における好中球付着および内皮機能不全を減少させる]

本実施例は、ヘパリンおよび2-O、3-O脱硫酸化ヘパリンが冠動脈における好中球および内皮機能不全が減少することを示す。ODS - HEPは、PAF刺激によるPMN脱顆粒を有意に減少させず、ODS - HEPがPMN活性に直接的な影響をほとんど及ぼさないことが示唆された。しかし、PAF刺激による冠動脈内皮へのPMN付着は、HEPおよびODS - HEPのいずれによっても用量依存的に有意に減少した(図24)。正常冠動脈内皮への好中球付着は、培地に加えた100nM血小板活性化因子(PAF)によって刺激され、HEPまたはODS - HEPによって用量依存的に阻害された。 $*p <$

0.05 HEP群のHEP対照との比較、@  $p < 0.05$  HEP群の0mg HEP群との比較、+  $p < 0.05$  ODS-HEPのODS対照との比較および#  $p < 0.05$  ODS-HEPの0mg ODS群との比較。PAF刺激による冠動脈内皮へのPMN付着の阻害は、ポリカチオンプロタミンの結合によるポリアニオンHEPまたはODS-HEPの阻害効果の逆転によって示唆されるように電荷依存的であった(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  HEPではPMN/mm<sup>2</sup> 内皮 =  $66 \pm 3$ であるのに対して、HEP + 1mg/mlプロタミンでは $180 \pm 8$ ; 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ODS-HEPでは $86 \pm 4$ であるのに対して、ODSHEP + 1mg/mlプロタミンでは $136 \pm 4$ ; いずれの場合も  $p < 0.05$ )。

#### 【0098】

HEPおよびODS-HEPは、in vivoで虚血-再灌流冠動脈内皮へのPMN付着も減少させた。図25の棒グラフは、非処置対照群における虚血-再灌流LAD冠動脈へのPMN付着が、非虚血-再灌流LCx動脈と比較して300%増加したことを示している。冠動脈内皮への好中球(PMN)付着は、冠動脈内皮の付着PMN数/mm<sup>2</sup>として定量した。LCx = 非虚血再灌流左回旋枝冠動脈、LAD = 虚血再灌流左前下行枝冠動脈。  
\*  $p < 0.05$  HEPおよびODS-HEPのLAD対照との比較。HEPまたはODS-HEPにより虚血再灌流LADへのPMN付着が、非処置対照と比べて、それぞれ51%および42%減少した(図25)。

#### 【0099】

HEPおよびODS-HEPは、虚血および再灌流後の冠動脈内皮の受容体介在性血管拡張応答も保存した。心外膜冠動脈におけるアゴニスト刺激時の内皮機能不全を定量するために、虚血後冠動脈血管輪調製物において漸増濃度の血管拡張薬アセチルコリン(内皮依存性; 受容体依存性)、A23187(内皮依存性; 受容体非依存性)、およびニトロプルシドナトリウム(直接平滑筋)に対する血管応答を調べた。

#### 【0100】

図26は、虚血再灌流LADの単離蹄冠におけるアセチルコリンに対する血管拡張応答を示し、U46619によって誘導される前収縮率として表される。対照群では、濃度反応曲線右側への統計的に有意なシフトがあり、アセチルコリンによる弛緩が減少したことを示している。これに対して、HEPまたはODS-HEP処置ではアセチルコリンによる冠動脈の弛緩効果が保存された。応答曲線は、U46619により前収縮させた虚血再灌流左前下行枝(LAD)冠動脈において漸増濃度のアセチルコリン(Ach)について示したものである。  
\*  $p < 0.05$  HEPおよびODS-HEPの対照との比較、ならびに\*  $p < 0.05$  HEPの対照との比較。

#### 【0101】

50%弛緩をもたらすのに必要なアセチルコリン濃度(EC<sub>50</sub>; -log[M])は、対照(-6.98  $\pm$  0.06)において、HEP(-7.30  $\pm$  0.06)またはODSHEP(-7.20  $\pm$  0.05)群よりも有意に高い値であった( $p < 0.05$ )。LCxの非虚血再灌流輪調製物では差はなかった。さらに、漸増濃度のA23187(LADおよびLCxでは、それぞれ、最大弛緩 =  $122 \pm 4\%$ および $120 \pm 7\%$ 、EC<sub>50</sub> -log[M] = -7.18  $\pm$  0.06および-7.17  $\pm$  0.09)またはニトロプルシドナトリウム(LADおよびLCxでは、それぞれ、最大弛緩 =  $129 \pm 5\%$ および $121 \pm 4\%$ 、EC<sub>50</sub> -log[M] = -7.31  $\pm$  0.02および-7.29  $\pm$  0.04)に対するLADおよびLCx血管拡張応答間で差はなく、応答はHEPまたはODS-HEPにより影響を受けなかった。

#### 【0102】

[実施例XII: 2-O脱硫酸化ヘパリンは核因子- Bの活性化を抑制する]

本実施例により、2-O脱硫酸化非抗凝固薬ヘパリンが核因子- Bの活性化を抑制することを示す。炎症性サイトカインの宿主の発現を調節するこの転写因子は、未刺激細胞の細胞質に常在のものであるが、活性化されると核へと移動し、そこでその調節コンセンサス配列と結合し、サイトカイン発現を促進する。NF- Bは、その阻害因子、I-

10

20

30

40

50

Bに物理的に結合されるため、その阻害因子により細胞の細胞質区画に拘束されている。NF- $\kappa$ Bは、その阻害因子、I $\kappa$ Bと複合体を形成するとサイトゾルとなるが、I $\kappa$ Bのリン酸化、ユビキチン化およびタンパク質分解によって活性化される。I $\kappa$ Bからの放出によりNF- $\kappa$ B核局在配列(NLF)、すなわち、核転座を狙う8個のアミノ酸の高カチオン性ドメイン(VQRDRQKLM、一文字アミノ酸表記)が露出する。NF- $\kappa$ Bは、心臓において虚血または虚血と再灌流によって活性化される(Li C, et al., supra参照)。NF- $\kappa$ Bの核転座は、核取込みで競合するNF- $\kappa$ B NLFを含む合成細胞透過性ペプチドによって抑制される(Lin Y-Z, Yao SY, Veatch RA, Torgerson TR, Hawiger J, Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- $\kappa$ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. J Biol Chem 270:14255-14258, 1995参照)。ヘパリンは、内皮、血管および気道平滑筋、メサングウム細胞、さらには心筋細胞によってさえも容易に結合され、細胞質区画中に内在化される。一度、細胞質中に内在化されれば、ポリアニオンヘパリンがNLFの正に帯電したアミノ酸と静電的に結合し、そのポリアニオンヘパリンがNF- $\kappa$ Bを核膜孔へと向けるのを防ぐ可能性があることを前提としている。

10

20

30

40

50

#### 【0103】

虚血-再灌流後のPMN付着の増加は、内皮細胞接着分子の発現が増強されたことによるものであり、それらの転写は心筋虚血-再灌流の結果としての核転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化によって強い影響を受ける(Li C, et al., supra参照)。ヘパリンがNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害することができるかどうかを調べるために、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)のNF- $\kappa$ Bの免疫組織化学的染色を、ODS-HEPでの刺激または前処置を行った場合と行わない場合において実施した。図28Aは、未刺激状態において、核因子-B(NF- $\kappa$ B、褐色に染色されている)は通常HUVECの細胞質にのみ存在し、核には存在しないということを示している。ヘパリンを加えずに腫瘍壊死因子(TNF)で刺激したHUVECにおいては、核でNF- $\kappa$ Bの、細胞質からの核への転座に対応するNF- $\kappa$ Bのp65成分が陽性染色(褐色)されている(図28B)。しかし、200  $\mu$ g/mL 2-O脱硫酸化ヘパリンで前処置したHUVECにおいては、TNF刺激によりNF- $\kappa$ Bの、細胞質から核への転座は起こらない(図28C)。

#### 【0104】

ヘパリンおよび2-O脱硫酸化ヘパリンによる内皮NF- $\kappa$ B活性化の遮断を、図29に示す電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)により確認した。非処置対照(レーン1)と比べて、腫瘍壊死因子(TNF)は、NF- $\kappa$ Bの内皮DNA結合を刺激する(図29、レーン2)。200  $\mu$ g/mL ODS-HEPで前処置することによりNF- $\kappa$ B結合活性が失われ(レーン3)、これによりODS-HEPがNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制することが分かる。HUVECを10 ng/mL TNFで1時間刺激し、電気泳動移動度シフトアッセイ用に核タンパク質を回収して、[ $^{32}$ P]ATPで末端標識したオリゴヌクレオチドコンセンサスAFTTGAGGGGACTTTCCAGGC[配列番号1]を用いてNF- $\kappa$ Bの結合を検出した。非処置対照(レーン1)と比べて、単層のTNFでの処置はNF- $\kappa$ BのDNA結合を刺激する(レーン2)。200  $\mu$ g/mL ODS-HEPで細胞を前処置することにより核タンパク質抽出物におけるNF- $\kappa$ B結合活性が実質的に失われ(レーン3)、このことにより2-O脱硫酸化ヘパリンがNF- $\kappa$ Bの、細胞質から核への転座を抑制することが確認される。

#### 【0105】

2-O脱硫酸化非抗凝固薬ヘパリンはまた、虚血再灌流心筋におけるNF- $\kappa$ BのDNA結合も減少させた。ラット心臓を15分の温全虚血と15分の再灌流に曝すと、NF- $\kappa$ Bのオリゴヌクレオチド配列との心筋核タンパク質のDNA結合が増加した(図29A、レーン2)。DNA結合が増加した3つの異なるバンドが観察されたが、過剰の非標識NF- $\kappa$ Bオリゴヌクレオチドプローブを加えることによりそれらの全てがなくなった。スーパーシフト試験により、複合体IがNF- $\kappa$ Bのp65成分を含むバンドであることを確認した(図29、レーン5)。ODS-HEP処置は、3つのバンド全てにおいてD

NAへのNF-B結合の虚血-再灌流関連刺激を減少させた(図29、レーン3)。p65含有複合体IのDNA結合は、ODS-HEPによってほとんどなくなり、濃度測定法により測定されたように非処置のラット虚血再灌流心臓の複合体Iと比べて $54 \pm 6\%$ の減少であった( $p < 0.05$ 、 $n = 4$ )。よって、HEPまたはODS-HEPは、冠動脈内皮へのPMNの血管付着を直接減じ、危険性のある領域におけるPMN蓄積を低減し、心筋壊死を減少させることに加えてNF-B活性化、さらに場合によっては付着分子および心筋サイトカインの発現も遮断する。

#### 【0106】

Langendorff灌流したラット心臓を15分の温全虚血、続いて、15分の再灌流に供した。次いで、EMSA用に核タンパク質を回収して、NF-BのDNA結合を測定した。シャム灌流対照心臓(図29A、レーン1)と比べて、虚血および再灌流により、一般に、NF-Bのオリゴヌクレオチド配列との心筋核タンパク質のDNA結合が増加した(レーン2および4)。3つの異なる複合体が確認された。p65に対する抗体(レーン5)、p50に対する抗体(レーン6)または両方の抗体(レーン7)で実施したスーパーシフト試験では、複合体Iがシフトし(矢印)、それによりその複合体IがNF-Bのp65成分を含むバンドであることを確認した。ODS-HEPでの前処置および灌流(心臓灌流前にivにより $6\text{ mg/kg}$ 、2時間;灌流液中 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ )は、p65含有複合体IのNF-B DNA結合の虚血-再灌流関連刺激を抑制した(レーン3)。p65含有複合体IのDNA結合は、ODS-HEPによってほとんどなくなり、濃度測定法により測定されたように非処置のラット虚血再灌流心臓の複合体Iと比べて $54 \pm 6\%$ の減少であった( $p < 0.05$ 、 $n = 4$ )。図29Bの右側に、標識NF-Bプローブを加える前に、核タンパク質を $10\times$ 非標識NF-B(レーン2)またはサイクリックAMP応答配列オリゴヌクレオチド(CRE、AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG[配列番号2]、レーン3)とともに5分間インキュベートした競合試験を示す。過剰のプローブを加えない結合反応(レーン1)と比べて、非標識NF-Bの添加は、3つの複合体全てにおいてDNA結合を遮断した。

#### 【0107】

[実施例XIII: 2-O脱硫酸化ヘパリンによる、ラット単離心臓の虚血および再灌流後の収縮不全の減少]

本実施例は、2-O脱硫酸化ヘパリンがラット単離心臓の虚血および再灌流後の収縮不全を減少させることを示す。15分の虚血および再灌流両方の後、心臓は高い収縮機能を回復した(ベースラインの95%、虚血-再灌流;およびベースラインの93% ODS-HEP虚血-再灌流)。そのため、さらなる調査において、虚血時間を30分に延長した。30分の虚血と15分の再灌流の後、非処置の心臓もODS-HEP処置した心臓も収縮機能が低下した(シャムでは圧脈拍 $= 36, 780 \pm 2, 589\text{ mmHg/分}$ であるのに対し、虚血再灌流心臓では $4, 575 \pm 1, 856\text{ mmHg/分}$ およびODS-HEP処置した虚血再灌流心臓では $10, 965 \pm 2, 908\text{ mmHg/分}$ 、それぞれ $n = 4$ )が、ODS-HEPで処置した心臓では収縮機能の回復に有意な改善があり、ODS-HEPを受けなかった心臓で見られる収縮機能の回復よりも2.4倍優れていた( $p < 0.05$ )。よって、この厳しいモデルにおいて、ODS-HEPは虚血および再灌流の分子的影響も生理学的影響も低減させる。

#### 【0108】

本明細書において教示したように2-O脱硫酸化ヘパリンとなるように修飾されたヘパリンは、生命に関わる血栓症を伴うことの多いヘパリン起因性血小板減少症候群HIT-2を引き起こさないという利点を含む、これらの多くの、抗炎症による利益を患者に提供することができる。

#### 【0109】

上述の説明および関連図面に示された教示の利点を得た本発明の多くの改変および他の実施形態は、本発明が関連する技術分野の技術者ならば思い付く。従って、当然のことながら、本発明は開示した具体的な実施形態に限定されるものではなく、添付の請求項の範

囲内で改変および他の実施形態が含まれるものとする。本明細書では具体的な用語を使用した、それらの用語は一般的な意味で説明するためにのみ使用し、限定を目的としたものではない。

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】2-O、3-O脱硫酸化ヘパリン(ODSヘパリン)の未分画ヘパリンおよび匹敵する配列の五糖結合配列の化学式を示す図である。

【図2】ODSヘパリンの、それを製造した起源である親ブタ腸管ヘパリンと比較した、高速サイズ排除クロマトグラフィーを併用した、多角度レーザー光散乱検出器で測定された差次的分子量分布プロットを示すグラフである。

【図3】3Aは、ヘパリンの二糖分析を示すグラフである；3Bは、本発明のODSヘパリンの二糖分析を示すグラフである。

【図4】ヘパリンの五糖結合配列中の-L-イズロン酸の2-O位を脱硫酸するために提案される反応スキームを示す。

【図5】セロトニン放出アッセイで測定される、本発明の2-O脱硫酸化ヘパリンとヘパリン抗体との交差反応を示すグラフである。

【図6】フローサイトメトリーにより定量された血小板表面P-セレクチン(CD62)の発現で測定される、本発明の2-O、3-O位脱硫酸化ヘパリンとヘパリン抗体との交差反応を示すグラフである。

【図7】0.1U/mlまたは0.5U/mlヘパリンをHIT症候群の患者由来の血清への添加に応答する血小板セロトニンの放出により示される、3-O位脱硫酸化もされた漸増濃度の2-O脱硫酸化ヘパリンが、HITに媒介される血小板活性化を抑制することを示すグラフである。

【図8】4名のHITの患者由来の血清の存在下で0.1U/mlヘパリン(UFH)に誘導されるセロトニン放出により示される、3-O位脱硫酸化もされた2-O脱硫酸化ヘパリンが、血小板活性化を抑制する実験の平均結果を示すグラフである。

【図9】4名のHITの患者由来の血清の存在下で0.5U/mlヘパリン(UFH)に誘導されるセロトニン放出により示される、3-O位脱硫酸化もされた2-O脱硫酸化ヘパリンが、血小板活性化を抑制する実験の平均結果を示すグラフである。

【図10】3-O位脱硫酸化もされた2-O脱硫酸化ヘパリンが、HIT患者の血清を0.1U/mlまたは0.5U/mlヘパリンと混合した場合、血小板微粒子形成を抑制することを示すグラフである。

【図11】3-O位脱硫酸化もされた2-O脱硫酸化ヘパリンが、4名のHIT患者の各々由来の血清を0.1U/mlヘパリンと混合した場合、血小板微粒子形成を抑制する実験の平均結果を示すグラフである。

【図12】3-O位脱硫酸化もされた2-O脱硫酸化ヘパリンが、4名のHIT患者の各々由来の血清を0.5U/mlヘパリンと混合した場合、血小板微粒子形成を抑制する実験の平均結果を示すグラフである。

【図13】P-セレクチン(CD62)の血小板表面発現により測定される、3-O位脱硫酸化もされた2-O脱硫酸化ヘパリンが、HITに誘導される血小板活性化を抑制することを示すグラフである。

【図14】3-O位脱硫酸化もされた2-O脱硫酸化ヘパリンが、0.1U/ml未分画ヘパリンの存在下で、4名のHIT患者の各々由来のHIT血清により誘導されるP-セレクチン(CD62)の血小板表面発現を抑制する実験の平均結果を示すグラフである。

【図15】3-O位脱硫酸化もされた2-O脱硫酸化ヘパリンが、0.5U/ml未分画ヘパリンの存在下で、4名のHIT患者の各々由来のHIT血清により誘導されるP-セレクチン(CD62)の血小板表面発現を抑制する実験の平均結果を示すグラフである。

【図16】ODSHと呼ばれる2-O脱硫酸化ヘパリンの、雄ビーグル犬へ、10日間、6時間毎に4mg/kg(16mg/kg/日)、6時間毎に12mg/kg(48mg/kg/日)、および6時間毎に24mg/kg(96mg/kg/日)の用量での最終

10

20

30

40

50

の注射後の血中濃度を示すグラフである。

【図 1 7】生理食塩水（対照）、ヒト白血球エラスターゼ（H L E）、H L E + ヘパリン、および H L E + O D S ヘパリンの投与から 2 4 時間後の気管支肺胞洗浄液中で測定したヘモグロビン含量を示すグラフである。

【図 1 8】生理食塩水（対照）、ヒト白血球エラスターゼ（H L E）、H L E + ヘパリン、および H L E + O D S ヘパリンの投与から 2 4 時間後の気管支肺胞洗浄液中のタンパク質の濃度を示すグラフである。

【図 1 9】生理食塩水（対照）、ヒト白血球エラスターゼ（H L E）、H L E + ヘパリン、および H L E + O D S ヘパリンの投与から 2 4 時間後の気管支肺胞洗浄液中の多形核白血球（P M N）細胞の数を示すグラフである。

【図 2 0】ヘパリンおよび O D S 脱硫酸化ヘパリンが血漿梗塞面積を低下させることを示すグラフである（壊死面積 / リスク面積、または A N / A A R の比）。

【図 2 1】ヘパリンおよび O D S ヘパリンが心筋梗塞の後に血漿クレアチンキナーゼ活性を低下させることを実証するグラフである。

【図 2 2】心筋組織における P M N 特異的酵素ミエロペルオキシダーゼの活性により測定した、ヘパリンおよび O D S ヘパリンが心筋梗塞の後に多形核白血球（P M N）の心筋への流入を減少させることを示すグラフである。

【図 2 3】O D S ヘパリンインビボで抗凝固を引き起こさない（活性凝固時間（A C T）により測定される）が、同一量のヘパリンが完全な抗凝固を引き起こす（A C T の延長により測定される）ことを示すグラフである。

【図 2 4】ヘパリンおよび O D S ヘパリンがインビトロで P M N の正常な冠動脈内皮への接着を阻害することを実証するグラフである。

【図 2 5】ヘパリンおよび O D S ヘパリンが実験後の冠動脈内皮への P M N 接着を減少させることを実証するグラフである。

【図 2 6】ヘパリンおよび O D S ヘパリンが虚血 - 再灌流冠動脈の血管拡張機能を保存することを示すグラフである。

【図 2 7 A】核因子 B（N F - B、茶色染色されている）が未刺激のヒト臍帯静脈内皮細胞（H U V E C）の細胞質中に通常存在することを実証する。

【図 2 7 B】H U V E C がヘパリンを加えないと腫瘍壊死因子（T N F）に刺激されることを示す。全てではないが、いくつかの核が現在抗 p 6 5 に陽性染色され、転座に対応している。

【図 2 7 C】T N F 刺激が、2 0 0  $\mu$  g / m L O D S ヘパリンで前処置した H U V E C における細胞質から核への N F - B の転座を引き起こさないことを示す。

【図 2 8】T N F で刺激した H U V E C において O D S ヘパリンが N F - B の D N A 結合を減少させることを示す、核タンパク質の電気泳動移動度シフトアッセイを示す。

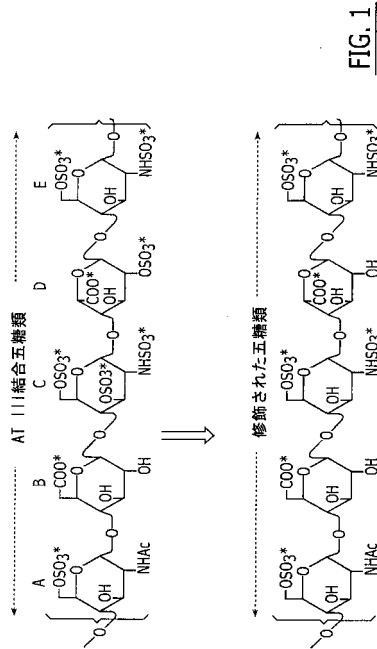
【図 2 9】O D S ヘパリンが虚血 - 最灌流により刺激された N F - B の D N A 結合を減少させることを示す、虚血 - 細灌流ラット心筋からの核タンパク質の電気泳動移動度シフトアッセイを示す。

10

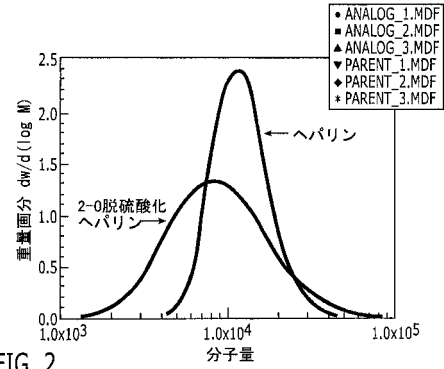
20

30

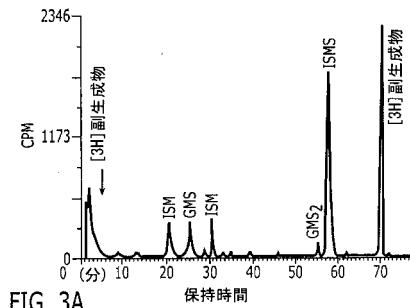
【 図 1 】



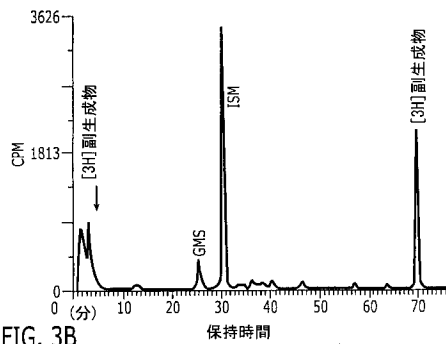
【 図 2 】



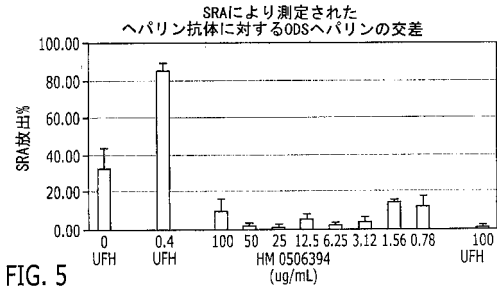
【 図 3 A 】



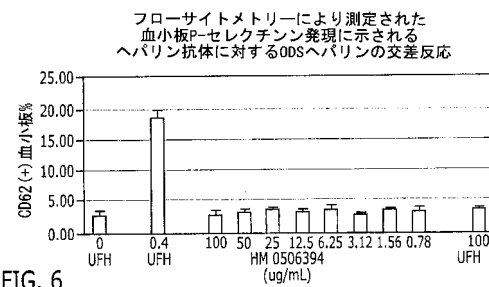
【 図 3 B 】



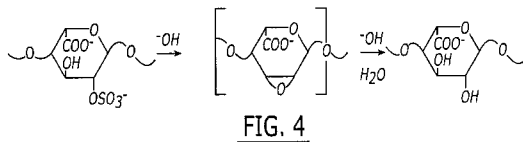
【 図 5 】



【 図 6 】

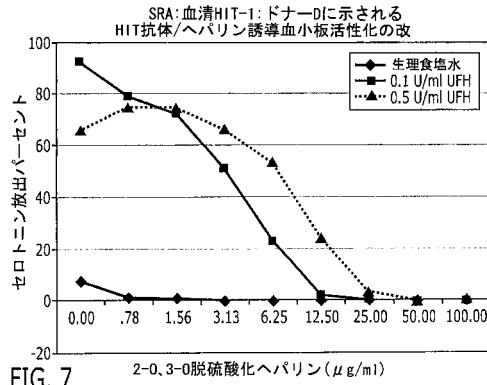


【 図 4 】

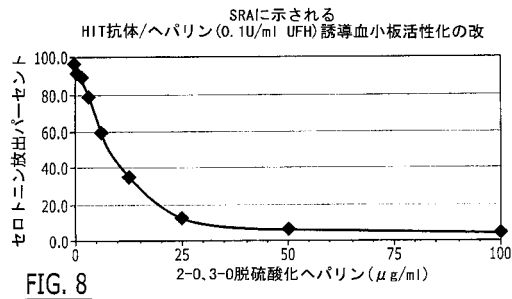




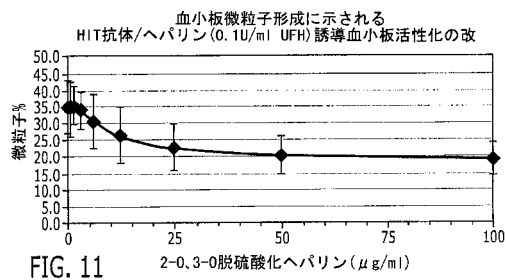
【 図 7 】



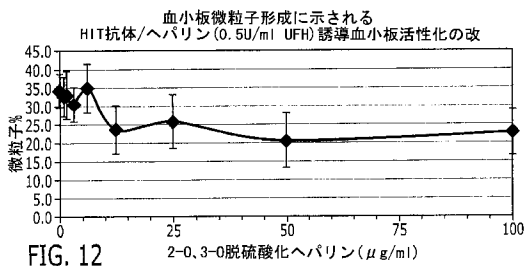
【 図 8 】



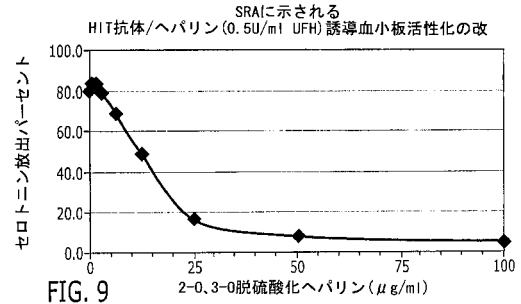
【 図 1 1 】



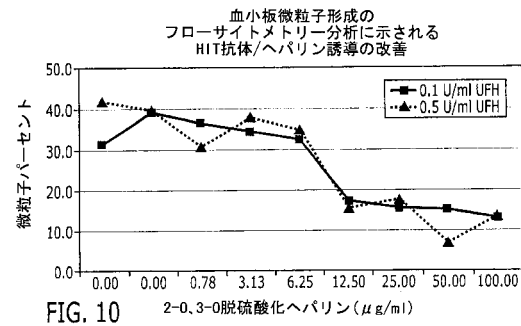
【 図 1 2 】



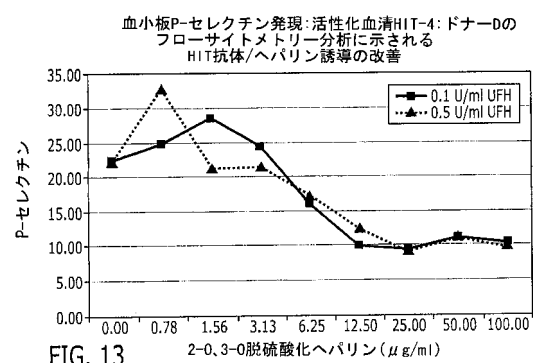
【 図 9 】



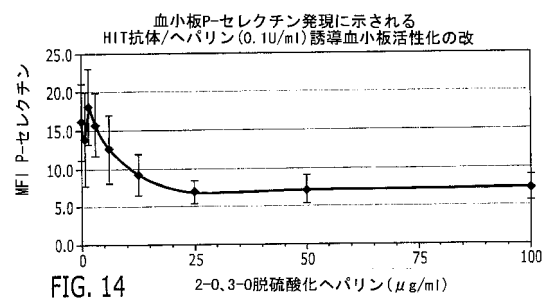
【 図 1 0 】



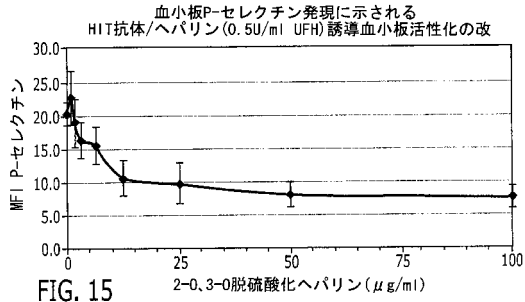
【 図 1 3 】



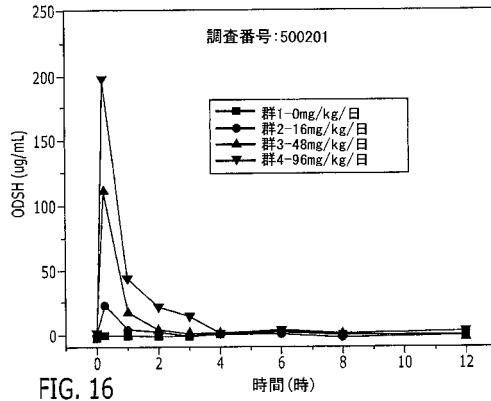
【 図 1 4 】



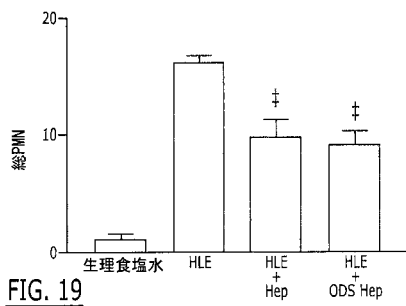
【図 15】



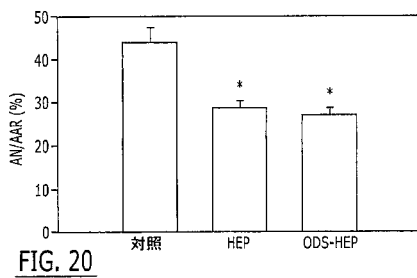
【図 16】



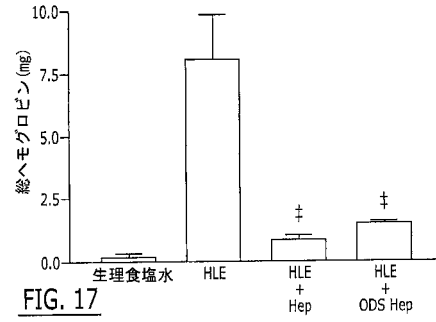
【図 19】



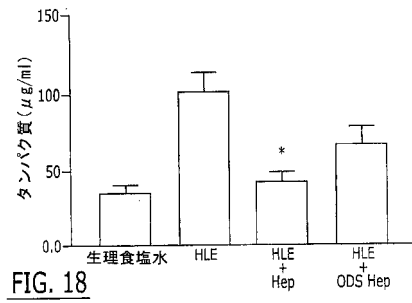
【図 20】



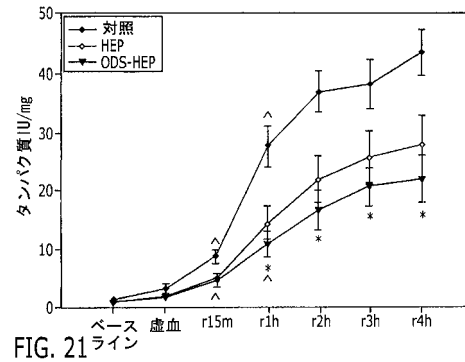
【図 17】



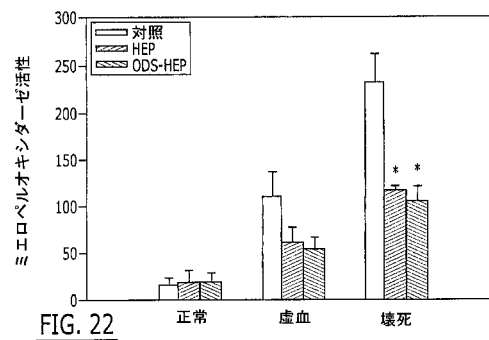
【図 18】



【図 21】



【図 22】



【図 2 3】

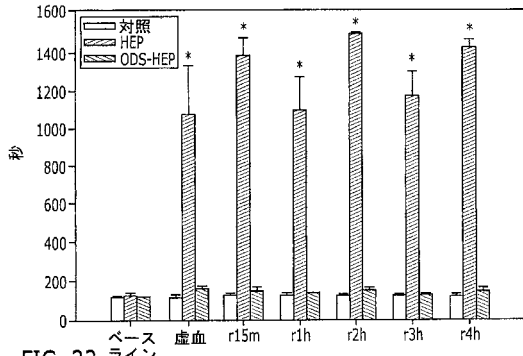


FIG. 23

【図 2 4】

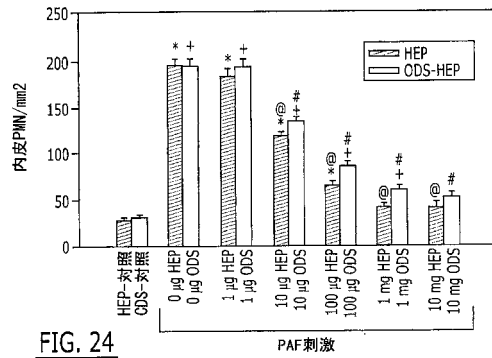


FIG. 24

【図 2 5】

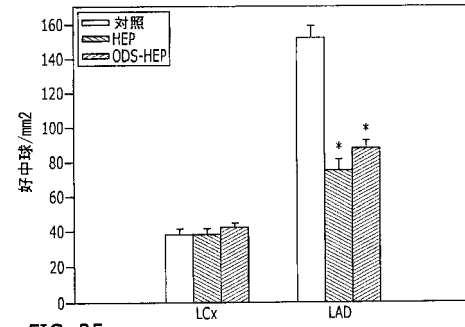


FIG. 25

【図 2 6】

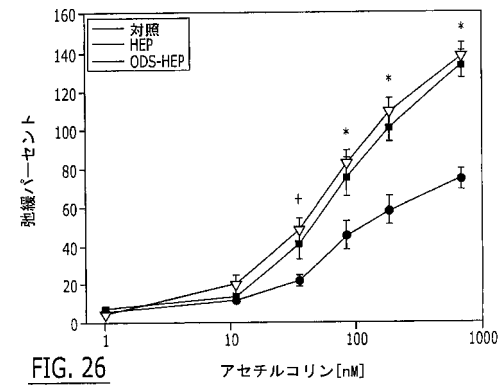


FIG. 26

【図 2 7 A】



FIG. 27A

【図 2 7 C】

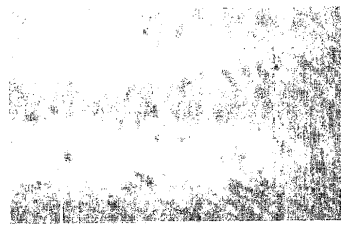


FIG. 27C

【図 2 7 B】

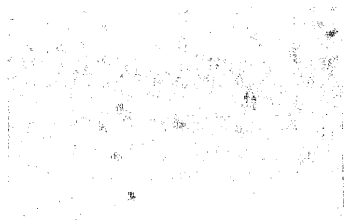
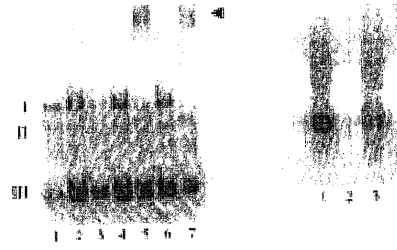


FIG. 27B

【図 28】

FIG. 28

【図 29】

FIG. 29

【配列表】

2008518090000001.xml

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/39011																								
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: <b>A61K 31/727( 2007.01)</b>  USPC: 514/56,54;536/21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																										
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/56, 54; 536/21  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN DATABASE ONLINE																										
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 6,077,683 A (KENNEDY) 20 June 2000 (20.06.2000), see abstract and example III, col. 10, line 33 to col. 11, line 200).</td> <td>25-27, 29</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>STN ABSTRACT: ACCESSION NO.: 2000190233 MEDLINE; DOCUMENT NO.: PubMed ID: 10726034; TITLE: Functional heterogeneity of antiheparin-platelet factor 4 antibodies: implications in the pathogenesis of the HIT syndrome; AUTHOR: AHMED et al., Clinical and Applied thrombosis/hemostasis: official journal of the international Academy of clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, (1999 Oct) Vol. 5, Suppl 1, pages S32-7, see Abstract.</td> <td>1-29</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6,743,426 B2 (FISHER et al) 01 June 2004 (01.06.2004), see entire patent.</td> <td>1-29</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 6,077,683 A (KENNEDY) 20 June 2000 (20.06.2000), see abstract and example III, col. 10, line 33 to col. 11, line 200).	25-27, 29	A	STN ABSTRACT: ACCESSION NO.: 2000190233 MEDLINE; DOCUMENT NO.: PubMed ID: 10726034; TITLE: Functional heterogeneity of antiheparin-platelet factor 4 antibodies: implications in the pathogenesis of the HIT syndrome; AUTHOR: AHMED et al., Clinical and Applied thrombosis/hemostasis: official journal of the international Academy of clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, (1999 Oct) Vol. 5, Suppl 1, pages S32-7, see Abstract.	1-29	A	US 6,743,426 B2 (FISHER et al) 01 June 2004 (01.06.2004), see entire patent.	1-29												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
X	US 6,077,683 A (KENNEDY) 20 June 2000 (20.06.2000), see abstract and example III, col. 10, line 33 to col. 11, line 200).	25-27, 29																								
A	STN ABSTRACT: ACCESSION NO.: 2000190233 MEDLINE; DOCUMENT NO.: PubMed ID: 10726034; TITLE: Functional heterogeneity of antiheparin-platelet factor 4 antibodies: implications in the pathogenesis of the HIT syndrome; AUTHOR: AHMED et al., Clinical and Applied thrombosis/hemostasis: official journal of the international Academy of clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, (1999 Oct) Vol. 5, Suppl 1, pages S32-7, see Abstract.	1-29																								
A	US 6,743,426 B2 (FISHER et al) 01 June 2004 (01.06.2004), see entire patent.	1-29																								
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																										
<table border="0"> <tr> <td colspan="2">* Special categories of cited documents:</td> <td>"T"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"Y"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>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)</td> <td>"&amp;"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		"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	"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"&"	document member of the same patent family	"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		
* Special categories of cited documents:		"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																							
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																							
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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																							
"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)	"&"	document member of the same patent family																							
"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																									
Date of the actual completion of the international search 11 November 2006 (11.11.2006)		Date of mailing of the international search report 05 DEC 2006																								
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Michael C. Henry <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600																								

## 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ワレンガ, ジェニー・エム

アメリカ合衆国イリノイ州 6 0 1 4 8 , ロンバード, サウス・ロッジ・レイン 5 1 6

(72)発明者 ケネディ, トーマス・プレストン

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 8 2 2 6 , シャーロット, バーズタウン・ロード 1 6 1 9

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA27 MA01 MA04 MA52 MA56 MA60 MA66 NA06

NA14 ZA54

4C090 AA09 BA68 BD36 CA40 DA23