(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2005-531559
(P2005-531559A)
(43)公表日　平成17年10月20日(2005.10.20)

| (51)Int.Cl.[7] | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|
| A61K 45/00 | A61K | 45/00 | 4C084 |
| A61K 31/675 | A61K | 31/675 | 4C086 |
| A61P 1/18 | A61P | 1/18 | |
| A61P 9/10 | A61P | 9/10 | |
| A61P 13/12 | A61P | 9/10　101 | |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 43 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-505099 (P2004-505099)
(86)(22)出願日　平成15年5月14日 (2003.5.14)
(85)翻訳文提出日　平成17年1月6日 (2005.1.6)
(86)国際出願番号　PCT/GB2003/002096
(87)国際公開番号　WO2003/097104
(87)国際公開日　平成15年11月27日 (2003.11.27)
(31)優先権主張番号　0211136.7
(32)優先日　平成14年5月15日 (2002.5.15)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

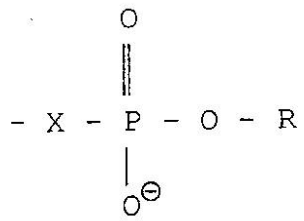
(71)出願人　504048364
ペントラキシン　セラピューティクス　リミテッド
イギリス国　ロンドン　ダブリューシー1イー　6ビーティー　ガウアー　ストリート　ユニバーシティ　カレッジ　ロンドン　ファイナンス　ディビジョン内
(74)代理人　100075409
弁理士　植木　久一
(74)代理人　100115082
弁理士　菅河　忠志
(74)代理人　100125184
弁理士　二口　治
(74)代理人　100125243
弁理士　伊藤　浩彰

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組織ダメージの治療と予防

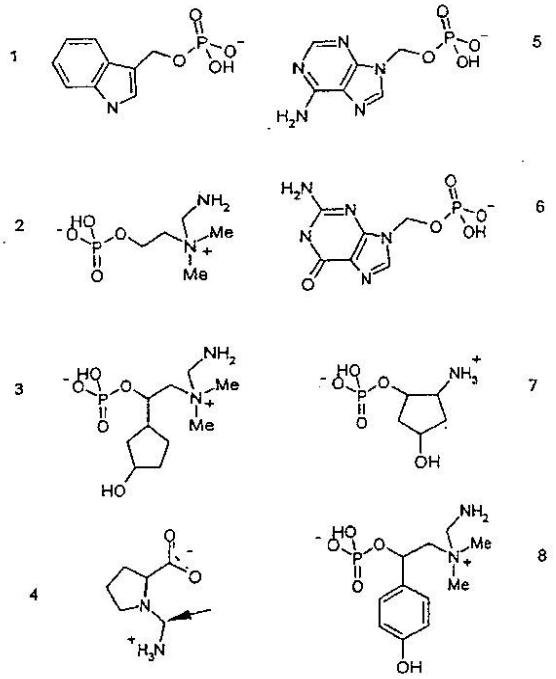
(57)【要約】
医学分野で用いるための薬剤であって、複数のＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）分子が存在する場合に、これらへ共有結合して複合体を形成することができる複数のリガンドを有するものであり、（ｉ）当該リガンドのうち少なくとも２つが、同一であっても異なっていてもよく、ＣＲＰ分子のリガンド結合部位への結合能を有するものであるか；または（ｉｉ）当該リガンドのうち少なくとも１つがＣＲＰ分子のリガンド結合部位への結合能を有するものであり、且つ少なくとも１つの他のリガンドが血清アミロイドＰ成分（ＳＡＰ）分子のリガンド結合部位への結合能を有するものであることを特徴とする薬剤。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
医学分野で用いるための薬剤であって、
複数のＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）分子が存在する場合に、これらへ共有結合して複合体を形成することができる複数のリガンドを有するものであり、
（ｉ）　当該リガンドのうち少なくとも２つが、同一であっても異なっていてもよく、ＣＲＰ分子のリガンド結合部位への結合能を有するものであるか；または
（ｉｉ）　当該リガンドのうち少なくとも１つがＣＲＰ分子のリガンド結合部位への結合能を有するものであり、且つ少なくとも１つの他のリガンドが血清アミロイドＰ成分（ＳＡＰ）分子のリガンド結合部位への結合能を有するものである
ことを特徴とする薬剤。
【請求項２】
上記各リガンドが独立して以下の一般式を有するものである請求項１に記載の薬剤。
【化１】

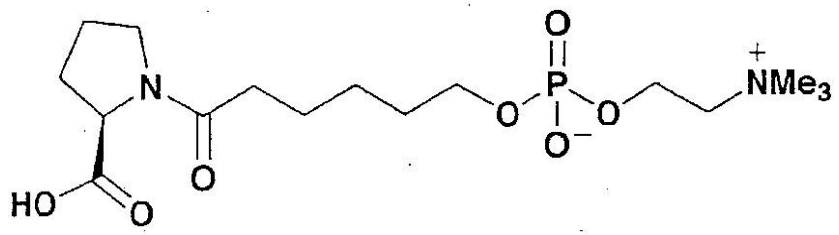


［式中、Ｘは0または$CH_2$-$CH_2$を示し、Ｒはアミンを含む基を示す。］
【請求項３】
上記アミンが、置換基を有していてもよいメチレンまたはエチレンを介して-O-に結合している請求項２に記載の薬剤。
【請求項４】
上記アミンとして、トリメチルアンモニウム，アミノメチル ジメチルアンモニウムまたは$NH_2$を含む請求項３に記載の薬剤。
【請求項５】
上記各リガンドが、[(トリメチルアンモニウム)エトキシホスフィニル]オキシ基を含むものである請求項４に記載の薬剤。
【請求項６】
ＰＣＨＰＣ，その薬事上許容される誘導体またはその薬事上許容される塩を含む請求項５に記載の薬剤。
【請求項７】
上記アミンとして、インドール，アデニンまたはグアニンを含む請求項３に記載の薬剤。
【請求項８】
上記各リガンドが、下記化合物群から選択されるものである請求項１に記載の薬剤。

【化２】

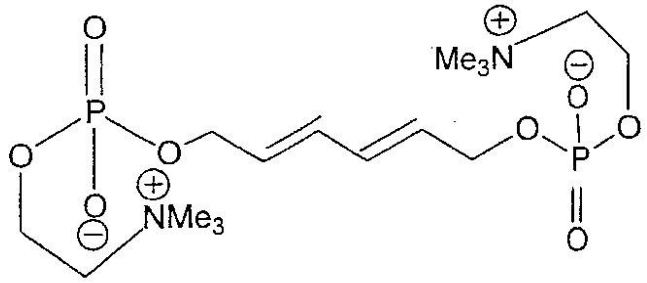


【請求項９】
ＳＡＰのリガンド結合部位への結合能を有する上記リガンドが、D-プロリンリガンドを含むものである請求項１に記載の薬剤。
【請求項１０】
ＣＲＰのリガンド結合部位への結合能を有する上記リガンドが、請求項２～８のいずれかに記載のものである請求項９に記載の薬剤。
【請求項１１】
下記化合物、その薬事上許容される誘導体またはその薬事上許容される塩を含む請求項１０に記載の薬剤。
【化３】

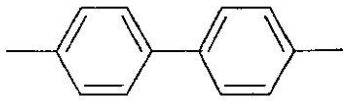


【請求項１２】
上記複数のリガンドが、リンカーにより共有結合されている請求項１～１０のいずれかに記載の薬剤。
【請求項１３】
上記リンカーが、直鎖状または分枝鎖状の炭化水素基であって、１または２以上の炭素原子がヘテロ原子で任意に置換されていてもよいものを含む請求項１２に記載の薬剤。
【請求項１４】
上記リガンドを２つ有する請求項１２または１３に記載の薬剤。
【請求項１５】
下記一般式を有する請求項１４に記載の薬剤。
リガンド － リンカー － リガンド
【請求項１６】
上記リンカーが、５～７個の原子分に相当する鎖長を有するものである請求項１５に記

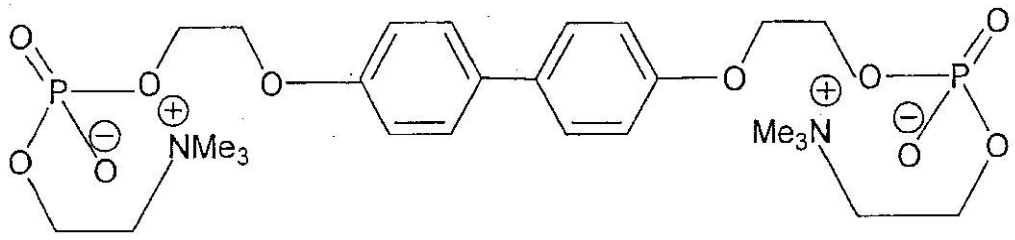
載の薬剤。
【請求項１７】
上記リンカーが、その構造中に１または２以上の二重結合を有するものである請求項１２～１６のいずれかに記載の薬剤。
【請求項１８】
上記リンカーが、互いに共役する少なくとも２つの二重結合を有するものである請求項１７に記載の薬剤。
【請求項１９】
互いに共役している上記二重結合が、トランスの位置関係にある請求項１８に記載の薬剤。
【請求項２０】
下記化合物を含む請求項１９に記載の薬剤。
【化４】




【請求項２１】
上記リンカーが、その構造中１または２以上のアリーレン基を有するものである請求項１２～１６のいずれかに記載の薬剤。
【請求項２２】
上記リンカーが、-Ar-Ar-構造を有するものである請求項２１に記載の薬剤。
【請求項２３】
上記-Ar-Ar-構造が、下記式で表されるものである請求項２２に記載の薬剤。
【化５】

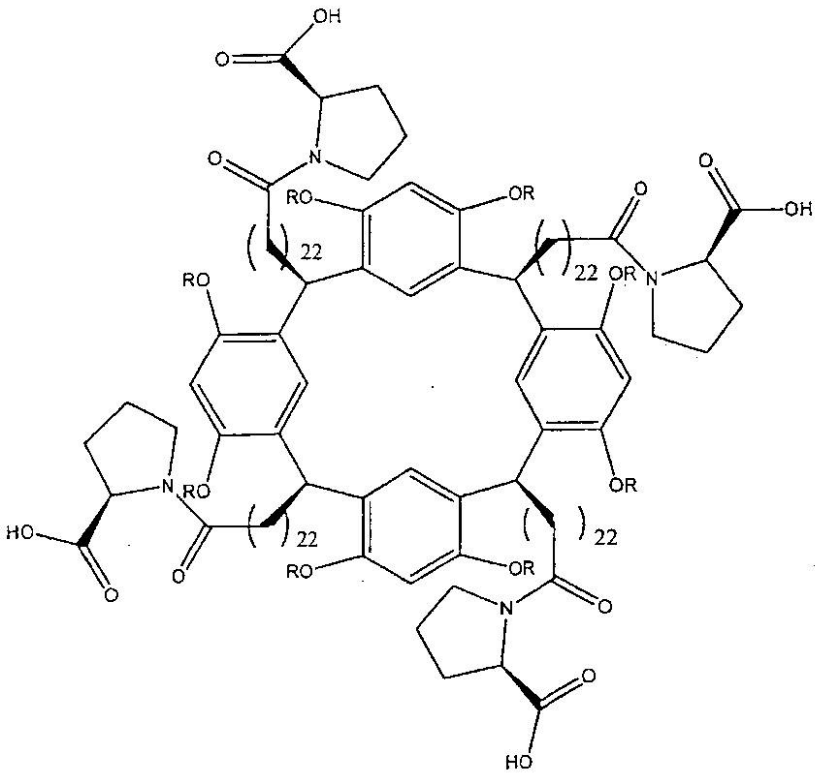


【請求項２４】
下記化合物、その薬事上許容される誘導体またはその薬事上許容される塩を含む請求項２３に記載の薬剤。
【化６】

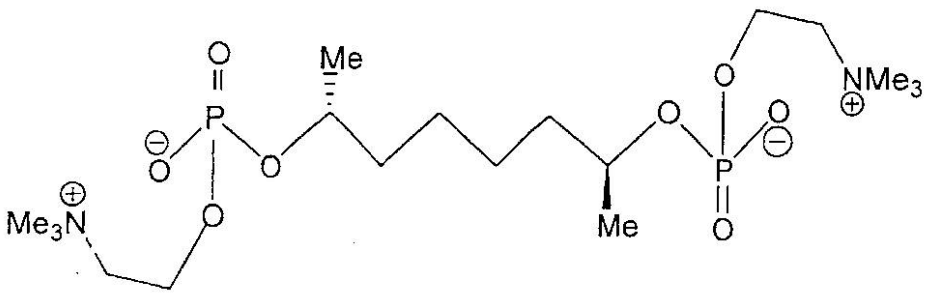



【請求項２５】
上記リンカーが環状コアを有するものであり、
当該環状コアの一方の面が複数の置換基により置換されており、当該各置換基はＣＲＰ分子のリガンド結合部位への結合能を有するリガンドを含むものであり、且つ
当該環状コアの他方の面が、ＣＲＰ分子のリガンド結合部位かＳＡＰ分子のリガンド結

合部位のいずれかへの結合能を有するリガンドにより置換されている
請求項１２または１３に記載の薬剤。
【請求項２６】
下記化合物、その薬事上許容される誘導体またはその薬事上許容される塩を含む請求項２３に記載の薬剤。
【化７】



【請求項２７】
上記リンカーが、ＣＲＰのリガンド結合部位へ結合する各リガンドに隣接する位置に疎水性置換基を有するものである請求項１２～２６のいずれかに記載の薬剤。
【請求項２８】
上記疎水性置換基がメチル基である請求項２７に記載の薬剤。
【請求項２９】
下記化合物、その薬事上許容される誘導体またはその薬事上許容される塩を含む請求項２８に記載の薬剤。
【化８】



【請求項３０】
炎症および／または組織損傷状態にある患者の組織損傷を治療または予防するための組成物を製造するための請求項１～２９のいずれかに記載の薬剤の使用。
【請求項３１】
上記炎症および／または組織損傷状態が、アテローム性動脈硬化症を含むものである請

求項３０に記載の使用。
【請求項３２】
上記炎症および／または組織損傷状態が、感染症，感染によるアレルギー性合併症，炎症性疾患，虚血性若しくはその他のネクローシス，外傷性組織損傷および悪性腫瘍からなる群から選択されるものである請求項３０に記載の使用。
【請求項３３】
上記状態が、細菌感染，ウィルス感染および寄生生物感染からなる群より選択される感染である請求項３２に記載の使用。
【請求項３４】
上記状態が、リウマチ熱，糸求体腎炎および癩性結節性紅斑からなる群より選択される感染によるアレルギー性合併症である請求項３２に記載の使用。
【請求項３５】
上記状態が、関節リウマチ，若年性慢性関節リウマチ，強直性脊椎炎，乾癬性関節炎，全身性血管炎，リウマチ性多発筋痛，ライター病，クーロン病および家族性地中海熱からなる群より選択される炎症性疾患である請求項３２に記載の使用。
【請求項３６】
上記状態が、心筋梗塞，虚血性脳梗塞，腫瘍性栓塞および急性膵炎からなる群より選択される組織ネクローシスである請求項３２に記載の使用。
【請求項３７】
上記状態が、待機手術，火傷，化学的損傷，骨折および圧迫性損傷からなる群より選択される外傷である請求項３２に記載の使用。
【請求項３８】
上記状態が、リンパ腫，ホジキン病，癌腫および肉腫からなる群より選択される悪性腫瘍である請求項３２に記載の使用。
【請求項３９】
炎症および／または組織損傷状態にある患者の組織ダメージを治療または予防するための医薬用化合物を選択する方法であって、
試験化合物の存在下、Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）のリガンドが結合できる条件において、ＣＲＰと試験用リガンドを接触させる工程；および
試験化合物が、共有結合することにより複数のＣＲＰ分子と或いはＣＲＰ分子とＳＡＰ分子の結合体との複合体を形成する互いに同一であっても異なっていてもよい複数のリガンドを含むものであって、ＣＲＰ分子と試験用リガンドとの結合を阻害するものである場合に、医薬用化合物として当該試験化合物を選択する工程；
を含むことを特徴とする方法。
【請求項４０】
請求項３９に記載の方法において、
ＣＲＰまたは試験用リガンドの一方を含む第１成分が固相の一部として存在し、これを、ＣＲＰまたは試験用リガンドのうち第１成分に含まれない方を液相の一部として有する第２成分と接触させ；
第２成分の固相に対する結合を検出することによって、ＣＲＰリガンドの結合性を試験する方法。
【請求項４１】
複数の試験化合物から、組織損傷を治療または予防するための医薬用化合物を選択する方法であって、
反応区画と複数の試験化合物を配列させ、各反応区画において請求項３９に記載の方法を行なうことによって、医薬用化合物を選択する方法。
【請求項４２】
医薬用薬剤を製造する方法であって、
（ｉ）　請求項３９に記載の方法により化合物を選択することによって、医薬用化合物を特定する工程；および

（ii） 医薬用化合物またはその薬事上許容される誘導体を特定して医薬用薬剤を製造する工程
を含む方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、患者の組織ダメージを治療または予防する方法に関するものであり、特に、炎症や組織損傷を呈している人間の患者を対象とするものである。また、本発明は、生体におけるＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）への自己由来或いは外来のリガンドの結合を阻害する特性を有し、その結果、組織ダメージ等を治療または予防できる化合物を提供するものである。
【背景技術】
【０００２】
Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）は、ペントラキシンタンパク質ファミリーに属する正常血漿タンパク質であり、当該ファミリーに属する他のタンパク質である血清アミロイドＰ成分（ＳＡＰ）と非常に類似するものである（参照：参考文献１）。ＣＲＰは、炎症，組織損傷および感染症のほとんどの形態に反応してその血中濃度が急激に上昇するという性質を示すタンパク質、即ち急性期タンパク質に分類される。これら炎症等の状態におけるＣＲＰの血中濃度は、疾病の進行や軽重との密接な相関を示す（参考文献２）。ＣＲＰは、カルシウム依存性のリガンドに結合するタンパク質であり、ホスホコリン残基に対する最も高い親和性をもってリガンドに結合するが（参考文献３）、他の様々なリガンドにも結合する。ＣＲＰは、高い親和力をもって多くのリガンドに結合する。ＣＲＰのリガンドは、自己由来のものも外来のものも知られている。自己由来のリガンドとしては、天然血漿リポタンパク質（参考文献４，５）と修飾血漿リポタンパク質、損傷細胞膜（参考文献６）、多くの様々なリン脂質とその関連化合物（参考文献７）、および核内低分子リボヌクレオタンパク質粒子（参考文献８，９）がある。外来リガンドとしては、多くの多糖類、リン脂質、および細菌の莢膜成分や菌体成分、菌類や寄生生物、植物生産物などもある（参考文献１０～１５）。ＣＲＰがそのリガンドに結合すると、Ｃ１ｑを介した古典経路により補体の活性化能を獲得する（参考文献１６～１９）。また、補体系の主要な接着分子であるＣ３の活性化と固定化を達成できるようになり（参考文献２０，２１）、さらにＣ５～Ｃ９による最終溶菌期を引き起こす（参考文献２２）。
【０００３】
極めて早い段階の臨床試験において（参考文献２３）、ＣＲＰが炎症に関与している可能性は示唆されており、その後における動物実験によれば、ＣＲＰは炎症を引き起こすものであると解釈された。しかし最近まで、ＣＲＰが炎症や組織損傷のプロセスに直接関与するとの証拠はなかった。炎症部位や壊死組織部位においてＣＲＰが沈着することや、ＣＲＰと補体の活性化との関係に関する報告がいくつかある（参考文献２４～３０）。しかし、ＣＲＰが組織ダメージの原因であることを直接示す研究はまったく無く、仮にあったとしても、ヒト患者の生体内組織におけるＣＲＰの沈着をリアルタイムで研究した唯一の例でも、極微量の沈着を示したに過ぎない（参考文献３１）。疾病の実験モデルにおいてＣＲＰの役割を直接検討した公知文献の中には、ＣＲＰが、炎症細胞における炎症を下方制御したり、組織ダメージを軽減するといった抗炎症作用を有することを示すものも確かにある（参考文献３２，３３）。このことは、複合体化したＣＲＰは補体活性化の最終段階を引き起こす能力に比較的劣っており、また、ＣＲＰが関与することによって、補体活性化による炎症の状況が下方制御されることがあるとの知見（参考文献３４，３５）と一致するものである。アポトーシスを起こした細胞による別のモデルを用いた最近の研究も、ＣＲＰが抗炎症特性を有することを示している（参考文献３６）。つまり、生体内におけるＣＲＰの役割については確固たる意見の一致はないものの、抗炎症作用を有するであろうという意見が支配的である。一般的に、増加したＣＲＰと疾病状態との関連性は、これまで、ＣＲＰの産生がその疾病の重症度および／または合併症の併発を反映することに

基づいて解釈されてきた。しかし我々は、最近、ＣＲＰが補体に依存するメカニズムを介して生体内で虚血性の組織ダメージを悪化させ得ることを実証し、ＣＲＰの結合を生体内で阻害することが治療において重要になる可能性があることを立証した（参考文献３７）。このことは、出願番号 0119370.5の米国特許出願の主題となっている。なお、当該出願の内容は、参照のために本願にも取り込まれるものとする。

【０００４】

アテローム性動脈硬化症は先進国で非常に万延しており、その主要な合併症である心筋梗塞症や脳梗塞と共に、死亡事由の約３分の１を占めている。動脈硬化症に対する理解や、予防処置および事後的な回復措置に進歩が見られるものの、治療等に要する個人的、社会的、経済的な負担は依然として多大である。同様に、その原因が明らかでない慢性炎症疾患は、治療が困難で余命を短くしてしまうこともある上に、一般的な疾病であり、患者を弱らせ、治療費用が高額であり、対症的な治療がしばしば危険な場合がある。例えば、関節リウマチは、苦痛を伴い重篤な身体障害を引き起こすと共に、５０歳以上の人口のうち約４％に悪影響を与えており、早期死亡と深く関係している。癌の苦痛は大変重く、先進国ではその死亡事由の約３分の１を占める。また、世界中で感染性疾患の深刻さと重要性は明らかである。従って、これら様々な疾患の全てにおいて、苦痛を軽減したり生存期間を延長するための新規な薬剤が、緊急に求められている。

【発明の開示】

【０００５】

そこで、本発明の第１の態様では、医学分野で用いるための薬剤であって、特に、炎症および／または組織損傷を呈している人間の患者の組織ダメージを治療または予防するための組成物を調製するためのものを提供する。本発明の薬剤は、複数のＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）分子が存在する場合に、これらへ共有結合して複合体を形成することができる複数のリガンドを有するものである。当該リガンドのうち少なくとも２つは、同一であっても異なっていてもよく、ＣＲＰ分子のリガンド結合部位への結合能を有するものである。或いは、当該リガンドのうち少なくとも１つは、ＣＲＰ分子のリガンド結合部位への結合能を有するものであり、且つ少なくとも１つの他のリガンドが血清アミロイドＰ成分（ＳＡＰ）分子のリガンド結合部位への結合能を有するものである。

【０００６】

驚くべきことに、本発明の薬剤は、リガンドのＣＲＰへの結合を阻害する作用を有する。ＣＲＰは、病状を引き起こす直接の原因であることが知られており、特に、虚血性障害により引き起こされる心臓のダメージを増強する。斯かる病原としての役割は、生体内においてＣＲＰがそのリガンドに結合することを阻害できる薬剤を使用することによって、処置または抑制することができる。ここで、理論的な裏付けにとらわれることなくより詳しく説明すれば、生体内においてＣＲＰの標的リガンドに対する結合を阻害すれば、ＣＲＰの補体活性化作用を抑制することになる。その結果、本発明が治療すべき対象としている病状において、現在、組織ダメージの原因と考えられている補体活性化を介するＣＲＰの有害作用を、低減したり排除できると考えられる。

【０００７】

本発明の一態様では、炎症および／または組織損傷状態が、アテローム性動脈硬化症を含むものとする。

【０００８】

組織損傷，炎症および感染症のほとんどの形態に対応して、ＣＲＰは大量に産生される一方で、正常で健康な被験者や一般母集団に属する個人のほとんどでは、その血中濃度は極端に低い（参考文献３８，３９）。最近まで、斯かる低濃度は臨床的に意義あるものとは全く考えられておらず、一般に使用されていたＣＲＰのアッセイ方法は、当該濃度が5或いはせいぜい10 ㎎/lを超えたときにはじめて血中ＣＲＰを検出し測定する様に設計されており、90～99%の範囲の被験者を健康としてしまうものであった。しかし、ＣＲＰに関する参考資料によれば従来は“正常”と考えられていた値であっても、産生増加されたＣＲＰは、心筋梗塞症、脳梗塞および血管疾患を含むアテローム性事象に大きく関係する

ことを明確に示し、1994年に開始した我々独自の知見（参考文献４０）以来、数多くの研究が蓄積されてきている（参考文献４１～４９）。

【０００９】

ＣＲＰ産生のわずかな増加と、アテローム性動脈硬化症の進行および合併症との関係は、まだ明らかでない。しかし、アテローム性動脈硬化症が炎症状態を呈するものであることと、ＣＲＰと活性化補体がほぼ全てのアテローム斑において共沈着することは、高い確率で関係していると考えられる（参考文献２９，５０）。さらに、ＣＲＰは、アテローム性動脈硬化症の動脈病変部において蓄積する主要なリポタンパク質である低比重リポタンパク質（ＬＤＬ）へ選択的に結合する（参考文献４，５）。また、ＣＲＰが、“修飾された”、即ち病斑部で見られる様な部分的に分解したＬＤＬに結合すると、補体が活性化される可能性がある（参考文献５１）。ＣＲＰは、生体内でマクロファージと血管平滑筋細胞による正常なＬＤＬの取り込みを促進し、これらを泡沫細胞化する。この泡沫細胞は、生体内のアテローム動脈硬化病変部位における典型的で重要な病理学的特徴である。そして、アテローム性動脈硬化症病斑に浸潤する最も多い細胞であるマクロファージをＣＲＰが刺激し、組織因子（ＴＦ）を産生するとの証拠もある（参考文献５２）。ＴＦは血液凝固のイニシエータであり、破裂した病斑部位で血栓形成開始に関与する。この血栓形成は、実際にアテローム性硬化した動脈を塞ぎ、心筋梗塞や脳梗塞を引き起こす。この様に、ＣＲＰは、アテローム性動脈硬化症の病原、その進行およびその臨床的に重要な合併症に関与すると考えられる。

【００１０】

いったん心筋梗塞が起こると、全ての患者においてＣＲＰの急性期反応が増幅し、到達するピーク値が、数日後、数週間後或いは数ヵ月後に生じる合併症や死につながる重要な予兆となる（参考文献５３～５９）。梗塞自体においてＣＲＰと活性化補体との普遍的な共沈着が起こることは、ＣＲＰが虚血性疾患の拡大と重篤度に対して強く関与することを強く示唆している（参考文献２８，６０，６１）。ＣＲＰ価、特に長期にわたる累積的なＣＲＰの産生は、原因が明らかでない慢性炎症疾患の進行、重篤さおよび合併症の重要な予兆にもなる。この様な原因不明の慢性炎症疾患としては、関節リウマチ（参考文献６２）やクーロン病；急性および慢性の細菌、ウィルス、真菌および寄生性の感染症；急性膵炎の様な虚血性および壊死性疾患；並びに多くの形態の癌がある（参考文献１，２を参照）。待機手術においてさえも、事前に測定したＣＲＰ価と術後に測定したＣＲＰ産生によって、合併症や結果を予測できる（参考文献６３）。アテローム性動脈硬化症における我々の観察と、特にヒトＣＲＰにより悪化させた心筋梗塞モデルのラットにおける観察により、いまやＣＲＰは、確かにこれら全ての様々な症状を示す疾患の重篤度に積極的に関与していることが示唆されている。

【００１１】

さらなる態様では、上記炎症および／または組織損傷状態は、感染症，感染によるアレルギー性合併症，炎症性疾患，虚血性若しくはその他のネクローシス，外傷性組織損傷および悪性腫瘍からなる群から選択されるものである。

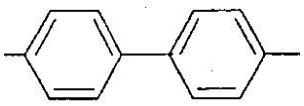
【００１２】

例えば、病態が感染症である場合には、細菌またはウィルス感染症のような非原虫性の感染症が挙げられる。病態が感染のアレルギー性合併症である場合には、リウマチ熱，糸求体腎炎および癩性結節性紅斑からなる群より選択されるものがある。病態が炎症性疾患である場合には、関節リウマチ，若年性慢性関節炎（リウマチ），強直性脊椎炎，乾癬性関節炎，全身性血管炎，リウマチ性多発筋痛，ライター病，クーロン病および家族性地中海熱からなる群より選択されるものがある。病態が虚血性のものまたはその他のネクローシスである場合には、心筋梗塞，虚血性脳梗塞，腫瘍性栓塞および急性膵炎からなる群より選択されるものがある。病態が外傷である場合には、緊急手術または待機手術，火傷，化学的または物理的損傷および骨折からなる群より選択されるものがある。病態が悪性腫瘍である場合には、リンパ腫，ホジキン病，癌腫および肉腫からなる群より選択されるものがある。

【００１３】
本発明によれば、生体内でＣＲＰがそのリガンドへ結合することを阻害する、および／または生体内で斯かる結合が起こる可能性を減ずる薬剤は、ＣＲＰが疾病の原因となることを阻止し、それにより疾病の拡大や悪化の可能性を低減し、症状を軽減し生存期間を延ばす。本発明は、その様な効果を有する化合物を提供するものであり、心筋梗塞，脳梗塞および末梢血管疾患，その原因が既知および未知の急性および慢性炎症疾患，あらゆるタイプの急性および慢性感染症，火傷，緊急手術および待機手術を含む外傷，あらゆるタイプの悪性腫瘍，並びにＣＲＰの産生増加に関係する全ての病態を含むアテローム性動脈硬化症およびその合併症を予防および／または治療するための組成物を製造するためのものを提供する。

【００１４】
本発明の薬剤によれば、複数のリガンドは共有結合により直接結合され得るが、リンカーを介して共有結合されることが好ましい。それによって、リガンドが空間的に十分余裕を持ち、標的となる複数のタンパク質が、当該薬剤に結合されることができる様になる。当該複数のタンパク質に含まれる１つのタンパク質において、他の１つのタンパク質または他の複数のタンパク質との結合が妨げられなくなるからである。リンカーの構造は、反応性基を含むことが好適ではあっても、特に厳密には規定されない。当該リンカーは、直鎖状または分枝鎖状の炭化水素基であって、１または２以上の炭素原子がヘテロ原子で任意に置換されていてもよいものを含むことが好ましい。当該リンカーとしては、５～７個の原子分に相当する鎖長を有するものが好適であるが、２～２０個の原子分に相当する鎖長を有するものでよい。有用な鎖長と化学構造は、本発明薬剤と共に複合体を形成するタンパク質により実験的に決定すればよい。本発明薬剤が２つのリガンドを有している場合には、当該リンカーは一般的には直鎖状のものとし；好適には「リガンド － リンカー － リガンド」の一般式の構造とする。この構造は、本願の目的から“パリンドローム”と表すのが便利である。当該リンカーとしては、下記でより詳しく説明するが、その構造中に１または２以上の二重結合を有するものがよい。当該リンカーが少なくとも２つの二重結合を有する場合には、これらは互いに共役していることがよく、これらが互いにトランスの位置関係にあることが好ましい。或いは、当該リンカーとしては、例えば-Ar-Ar-構造の様に、１または２以上のアリーレン基を有するものがよい。当該アリーレン基は、ヘテロアリーレン基でもよい。好適には、当該アリーレン基は下記構造である。

【００１５】
【化１】



【００１６】
適切な分枝鎖状リンカーと共に３，４またはそれ以上のリガンドを含む他の構造は、３，４またはそれ以上の標的タンパク質と複合体を形成できるものと予想される。当該リンカーとしては、例えば、環状コアを有するものであり、当該環状コアの一方の面が複数の置換基により置換されており、当該各置換基はＣＲＰ分子のリガンド結合部位への結合能を有するリガンドを含むものであり、且つ当該環状コアの他方の面が、ＣＲＰ分子のリガンド結合部位かＳＡＰ分子のリガンド結合部位のいずれかへの結合能を有するリガンドにより置換されているものがある。

【００１７】
本発明薬剤で用いられるリガンドは、ＣＲＰのリガンド結合部位に結合されることが知られているリガンドや、斯かるリガンド結合部位に結合されることが予想されるリガンドから選択すればよい。その様な予想は、例えば、Ｘ線結晶情報などの結合部位に関する有益な構造的情報に基づいたり、その構造類縁体を採用すればよい。好適な化合物は、化合物ライブラリおよび／または分子デザインに基づいた構造のスクリーニングにより高度に

解析することによって、見出すことができる。個々のリガンドとＣＲＰ結合部位との相互作用のアフィニティは、リガンドがそれぞれの標的タンパク質へ特異的であるならば、特別に高い必要はない。10ミリモルまでの解離定数であれば、十分であり得る。しかし、解離定数は、1ミリモル以下であることが好ましく、100マイクロモル未満がより好ましく、10マイクロモル未満が最も好適である。アフィニティは、マイクロモルまたはそれ以上が好ましい。マイクロモルレベルのアフィニティは、最も高いアフィニティが望ましいことは明らかであるものの、ＣＲＰの場合十分であると考えられる。

【００１８】

さらに、本発明は、炎症および／または組織損傷状態にある患者の組織ダメージを治療または予防するための医薬用化合物を選択する方法であって、試験化合物の存在下、Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）のリガンドが結合できる条件において、ＣＲＰと試験用リガンドを接触させる工程；および、試験化合物がＣＲＰ分子と試験用リガンドとの結合を阻害するものである場合に、医薬用化合物として当該試験化合物を選択する工程を含む方法を提供する。当該試験化合物は、共有結合することにより複数のＣＲＰ分子と或いはＣＲＰ分子とＳＡＰ分子の結合体との複合体を形成する互いに同一であっても異なっていてもよい複数のリガンドを含むものである。

【００１９】

本発明は、さらに、医薬用薬剤を製造する方法を提供する。当該方法は、（１）上記選択方法により化合物を選択することによって、医薬用化合物を特定する工程；および、（２）医薬用化合物またはその薬事上許容される誘導体を特定して医薬用薬剤を製造する工程を含む方法である。

【００２０】

即ち、本発明方法は、試験化合物の存在下でＣＲＰのリガンド結合性を試験することを含む医薬用化合物の選択方法に関するものである。ＣＲＰの試験用リガンドへの結合を阻害する全ての化合物は、薬剤として選択できる可能性がある。例えば、試験化合物は、特定され、化学的もしくは生物的製造方法により大容量で製造されるという意味で選択されてもよく、または医薬用製剤のために直接選択されるものであってもよい。医薬用薬剤を製造するための方法によって、試験化合物は医薬として製剤化されてもよく、またはその医薬上許容される誘導体を製造するために、誘導体化したり化学的に修飾されてもよい。その様な誘導体化は、単純に新しい置換基を導入するものであってもよく、例えば水溶性を変えるなど、製剤化を容易にするための既に存在する置換基を変換するものであってもよい。この種の誘導体化は、化合物の毒性を低減するためや、化合物の安定性を改善したり、或いは薬理活性を変更するためにも利用できる。この様に誘導体化されたり修飾された全ての化合物は、本発明方法により再試験する必要があると考えられる。このプロセスは、その薬理活性を改善するため、本発明薬剤にも同様に適用することもできる。

【００２１】

試験化合物をＣＲＰに接触させる工程においては、試験化合物の存在下、ＣＲＰとリガンドを結合させるに十分な状態としなければならない。この様な状態で、試験化合物の存在下ＣＲＰとリガンドの結合が起こらなかったり、起こっても予想された程度より低かったならば、試験化合物は本発明の効果を有することになる。ここで、結合の阻害とは広い意味で解釈されるべきであり、特定のメカニズムに限定されるものではない；例えば、あらゆる形で結合の範囲を減じたことを、本発明でいう結合の阻害とする。結合の阻害は、一般的には、コントロール値（試験化合物が存在しない状態での最大結合）との比較で測定する。$IC_{50}$は、低マイクロモル以下であることが好ましく、より好ましくはナノモル以下である。当該接触は、十分量のカルシウムイオンが存在し、ＣＲＰの特異的なカルシウム依存性結合が起こる条件下で生じる。当該接触のために好適な緩衝液は、生理食塩水である。ＣＲＰは、純粋なものまたは単離したもの、或いは全血清に組み込まれた形で提供されるものでよい。

【００２２】

ＣＲＰ，試験用リガンドおよび試験化合物を接触させる順番は、重要なものではない。

これら３成分は、原則的には同時に混合するか、或いは先ず３成分のうちの２成分を混合し、３番目の成分を加える前に事前にインキュベートすることもできる。接触は、一般的には、これら成分の少なくとも１つの成分が液相である状況で起こる。しかし、ＣＲＰまたは試験用リガンドを固相の一部とすることによって、試験中における相間分離を技術的に可能とし、ＣＲＰのリガンド結合の程度の試験を容易にするために、結合したものと結合していないものとを分離することは、利便性が高い。

【００２３】

従って、ＣＲＰまたは試験用リガンドの一方を含む第１成分が固相の一部として存在し、これを、ＣＲＰまたは試験用リガンドのうち第１成分に含まれない方を液相の一部として有する第２成分と接触させることが好ましい。次いで、ＣＲＰのリガンド結合性を試験する工程では、第２成分の固相に対する結合を検出することを含む。第２成分の固相に対する結合を検出するには、固相における第２成分の存在を検出するか、或いは固相に結合しなかった第２成分の量を測定し、最初に液相へ添加した第２成分の量から、固相へ結合した正確な量を推定すればよい。

【００２４】

この態様では、固相としては、固相担体へ結合させた第１成分を含むものであることが好ましい。この固相担体は、粒子状担体や固体表面を有するものであってもよい。利便性の高い態様としては、当該固相表面が、マイクロタイタープレートウェルの様なコンテナを内部表面に有するものがある。

【００２５】

利便性の高いＣＲＰのリガンド結合性の試験方法では、結合していない化合物を除去するために、さらに固相を洗浄する工程を行なう。

【００２６】

第２成分は、ここで説明する様な放射性同位体，蛍光色素または酵素などの検出可能なラベルで標識したものとしてよい。その他、固相への第２成分の結合は、固相へ結合した第２成分に抗体を結合させるか、或いは固相へ結合しなかった第２成分の量を定量免疫学的測定方法により免疫学的に検出してもよい。

【００２７】

本発明は、ヒトまたは他の動物由来ＣＲＰの、生物学的および化学的に知られたありとあらゆるリガンドへの結合を阻害する特性を有する化合物を検出するための、低処理能力または高処理能力のスクリーニング方法であるインビトロスポットテストを提供するものである。これら方法は、従来の合成方法やあらゆる態様のコンビナトリアルケミストリーにより作られた化合物ライブラリーのほか、有機，無機および生物由来の天然化合物ライブラリーをスクリーニングするのに適している。これら方法は、ＣＲＰの結合を阻害するメカニズムの分析、また、スクリーニングやスポットテストにより特定されたリード化合物から可能性があるものとして或いは実際の医薬としての化合物の化学的なおよび医薬化学的な進歩を通しての、阻害有効性の評価にも有用である。本発明は、ヒトや実験動物の生体内におけるＣＲＰの結合，血漿の代謝回転および異化代謝、また、ヒトＣＲＰにより悪化した疾患の実験モデルに対するＣＲＰ－阻害化合物複合体の効果や有効性を試験する方法にも関する。

【００２８】

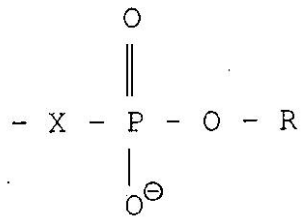
上記方法に伴い、本発明のさらなる態様では、複数の試験化合物から、組織損傷を治療または予防するための医薬用化合物を選択する方法であって、反応区画と複数の試験化合物を配列させ、各反応区画において上記記載の方法を行なうことによって、医薬用化合物を選択する方法を提供する。

【００２９】

好適な態様では、本発明に係る薬剤のリガンドのそれぞれは、下記一般式を有する。

【００３０】

【化２】



【００３１】

式中、ＸはOまたは$CH_2$-$CH_2$を示し、Ｒはアミンを含む基を示す。当該態様においては、アミンは１級，２級，３級アミンまたは４級アンモニウムでもよい。アミンは、脂肪族でも、環の一部が窒素基であるヘテロサイクリック化合物を含む芳香族でもよい。アミンは、3 ヒドロキシ,1-シクロペンタニルまたは4 ヒドロキシ,1-シクロヘキサニル等の置換基により置換されていてもよいメチレン基またはエチレン基の様なアルキレン基を介して-O-に結合しているものであってもよい。好適なアミンとしては、トリメチルアンモニウム，アミノメチル ジメチルアンモニウムまたは$NH_2$を含むものがある。これらリガンドの例としては、下記で示す化合物２，３，７および８があり、これらは実施例でさらに詳しく説明する。特に好適な態様では、各リガンドは、[(トリメチルアンモニウム)エトキシホスフィニル]オキシ基を含む。この様に、好適な本発明薬剤は、1,6-ビス[[[(トリメチルアンモニウム)エトキシ]ホスフィニル]-オキシ]ヘキサン、口語表現ではホスホコリン－ヘキサン－ホスホコリン、略して示せばＰＣＨＰＣを含む。これらリガンドとしては、例えば、下記で示す化合物２，３，７および８があり、これらは実施例でさらに詳しく説明する。

【００３２】

さらなる態様では、アミンはインドール，アデニンまたはグアニンを含むものでもよい。その様なリガンドの例は、化合物１，５および６として実施例で示す。

【００３３】

医薬組成物は、本発明薬剤を配合して製剤化することができる。当該組成物には、薬事上許容される賦形剤，希釈剤または基剤を添加してもよい。当該医薬組成物は、本発明薬剤またはその誘導体を含むプロドラックの形態をとるものであってもよい。このプロドラックは、被投与者により代謝された場合にのみ活性化するものである。その様な医薬組成物の成分の正確な性質や量は、実験的に測定することができ、また、組成物の投与経路にもよる場合がある。被投与者への投与経路としては、経口，口腔内，舌下，吸入，局所（眼を含む），直腸，膣内，鼻腔および非経口（静脈注射，動脈注射，筋肉注射，皮下注射および関節注射を含む）を例示することができる。利便性の高さからいえば、本発明の投与形態は経口によることが好ましいが、用いる薬剤やそのバイオアベイラビリティによる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３４】

ここで、本発明について、添付の図面や以下の実施例を参照してさらに詳しく説明するが、これらは単なる例示である。

【実施例】

【００３５】

強い親和性をもってＣＲＰにより結合されている生理学的な部位は、ＣＲＰの外来性および自己由来の高分子リガンドの一構成要素であるホスホコリンである。本発明の具体例によれば、１つのリンカー構造に結合された２つのホスホコリン頭部基を含むビス－ホスホコリン分子は、インビトロでもインビボでも、全てのリガンドに対するＣＲＰの結合の強力な阻害剤である。1,6-ビス[[[(トリメチルアンモニウム)エトキシ]ホスフィニル]-オキシ]ヘキサン、口語表現ではホスホコリン－ヘキサン－ホスホコリン、略して示せばＰ

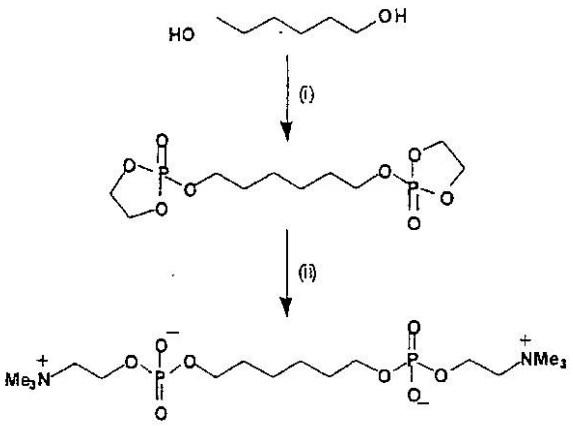
ＣＨＰＣが、本発明の典型的な実施例である。当該分子の構造と典型的な合成例を以下に示す。

【００３６】

1,6-ビス[[[(トリメチルアンモニウム)エトキシ]ホスフィニル]-オキシ]ヘキサン

【００３７】

【化３】




試薬と反応条件：(i) エチレンクロロホスフェイト，$K_2CO_3$，DCM/THF，−10℃から室温，6時間
(ii) MeCN，$Me_3N$，100℃（電磁波加熱），チューブを被覆，30分間

【００３８】

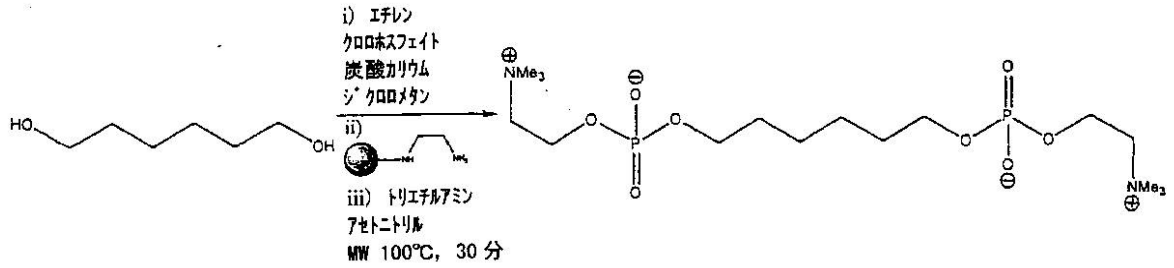
新たに蒸留したジクロロメタン（50 mL）の無水炭酸カリウム（29.84 mL，0.216 mol）懸濁液を攪拌し、ここへ、アルゴン雰囲気下-10℃でエチレン クロロホスフェイト（19.34 mL，0.212 mol）を滴下した。新たに蒸留したテトラヒドロフラン（10 mL）のヘキサン 1,6-ジオール（5 g，42.34 mol）溶液を、10分かけてこの混合物へ滴下し、得られた懸濁液を-10℃で攪拌した。当該反応液を4時間かけて25℃まで温めた。6時間後、薄層クロマトグラフィーは、メジャー化合物の存在と原料化合物の消失を示した。反応混合液をジクロロメタン（250 mL）で希釈し、濾過した後、pH 7の緩衝液（200 mL）へ注いだ。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液（200 mL）で洗浄し、水層をジクロロメタン（100 mL）とクロロホルム（100 mL）で抽出した。有機層を合わせて$MgSO_4$により乾燥し、濾過し（溶媒：ジクロロメタン）、減圧濃縮することによって、淡黄色オイルであるビスホスフェイトエステルを得た。このオイル（約9 g）を無水アセトニトリル（60 mL）に溶解し、30 Smith Process Vials（トレードマーク）（5 mL容量）に分配した。バイアルをシールし、100℃まで熱して30分間電磁波（300W）を照射する前に、トリメチルアミン（2 mL，-10℃）を各バイアルに加えた。冷却後、バイアルに穴を開け（注意が必要）、混合し（溶媒：メタノール）、減圧濃縮した。高度な真空下で徹底的に乾燥することによって、淡黄色で泡状の1,6-ビス[[[(トリメチルアンモニウム)エトキシ]ホスフィニル]-オキシ]ヘキサン（11.8 g）が得られた。

【００３９】

一般的な実験手順

電磁波による加熱実験を、専用ガラス器中のPersonal Chemistry Smith Synthesizer（Personal Chemistry社製，ウプサラ，スウェーデン）で実施した。分析用薄層クロマトグラフィを、プレコートしたガラスプレート（Merck Kieselgel 60 F254）上で行なった。モリブデン酸アンモニウムまたは過マンガン酸カリウム水溶液と、それに続く加熱により可視化した。全ての湿気および／または空気感受性の反応は、アルゴンの不活性雰囲気下オーブン（150℃）で乾燥したガラス器中で行なった。アセトニトリルとジクロロメタンを、水素化カルシウムから留去した。ベンゾフェノンの存在下、ナトリウムからテトラヒドロフランを留去した。その他の試薬と溶媒は、標準的な実験で用いられる市販の或いは精製したものを用いた。pH 7の緩衝液は、オルトリン酸二水素カリウム（212.5 g）と水酸化ナトリウム（36.25 g）を水（2375 mL）に溶解することにより調製した。

【００４０】
改良合成法は、以下に示す通りである。
【００４１】
【化４】




【００４２】
新たに蒸留したジクロロメタン（20 mL）の無水炭酸カリウム（14 g, 107.6 mol, 5.1当量）懸濁液を攪拌し、ここへ、アルゴン雰囲気下-10℃でエチレン クロロホスフェイト（15.1 g, 106 mol, 5当量）を滴下した。新たに蒸留したテトラヒドロフラン（10 mL）の1,6-ヘキサンジオール（2.5 g, 22 mol）溶液を、10分かけてこの混合物へ滴下し、得られた懸濁液を-10℃で攪拌した。当該反応液を4時間かけて25℃まで温めた。16時間後、LC-マスクロマトグラフィーにより反応の完了を確認した。当該反応混合液へ、N-(2-アミノエチル)-アミノエチル ポリスチレン樹脂（2.8 mM/gでロードした約22 g, 理論上の未反応エチレン クロロホスフェイトの62 mmol当量）を加え、得られた混合物を20℃で15分間攪拌した。その後、当該混合物を焼結漏斗に通して濾過し、濾液を濃縮することによって、淡黄色オイル状のビホスフェイトエステルを得た（定量的）。このオイルの一部（約4 g）を無水アセトニトリル（40 mL）に溶解し、20 Smith Process Vials（トレードマーク）（5 mL容量）に分配した。バイアルをシールし、100℃まで熱して30分間電磁波（300 W）を照射する前に、冷却し濃縮したトリメチルアミン（2 mL）を各バイアルに加えた。冷却後、バイアルに穴を開け（注意が必要）、上清を合わせた。各バイアルの底に残留した残渣をメタノールに溶解し、濃縮した上清と合わせ、高度な真空下で徹底的に乾燥することによって、淡黄色で泡状の1,6-ビス[[[(トリメチルアンモニウム)エトキシ]ホスフィニル]-オキシ]ヘキサン（6 g, 定量的）が得られた。1H NMR (400 MHz, MeOD): 4.27 (2H, br, $CH_2C\underline{H_2}N$), 3.89 (2H, m, $C\underline{H_2}CH_2N$), 3.65 (2H, br, $C\underline{H_2}OP(O)O_2CH_2CH_2N$), 3.24 (9H, s, $N(\underline{CH_3})_3$), 1.65 (2H, br, $CH_2C\underline{H_2}CH_2OP$), 1.45 (2H, br, $C\underline{H_2}CH_2CH_2OP$)。
【００４３】
外来性の高分子リガンドとして最も知られている肺炎球菌菌体Ｃ－ポリサッカライド（ＣＰＳ）に対するインビトロでのＣＲＰの結合を阻害するＰＣＨＰＣの強い性質を、図１に示す。ＣＰＳは、プラスチック製のマイクロタイタープレートへ共有結合により固定化した。$^{125}$Ｉ-ラベル化した精製ヒトＣＲＰへの典型的なカルシウム依存性のＣＰＳの結合は、容易に実証することができた。この結合は、約20μＭの$IC_{50}$で明らかに溶液中のホスホコリンにより阻害されており、それに対してＰＣＨＰＣは、10倍も低い2μＭの$IC_{50}$でＣＲＰの結合を阻害した（図１）。さらに、ＣＲＰに対するＰＣＨＰＣのＫｄを等温熱量計で直接測定において、反復実験することによって、0.469, 0.679, 0.73および0.855μＭの値が得られた。当該値と比較して、ＣＲＰに対するホスホコリンのものは、1.6, 2.02, 3.8μＭであった。
【００４４】
ＣＲＰの結合のリガンドとしての、および阻害剤としてのＰＣＨＰＣの強度は、フリーのホスホコリンに比べ、ＰＣＨＰＣ本来の性質として二機能性であり、またパリンドローム性である。ホスホコリン残基のリンカー部分の一末端の存在は、五量体ＣＲＰ分子のそれぞれの前駆体に存在するリガンド結合ポケットに結合するものと認識されており、また、斯かる結合能を有するものであり、ＰＣＨＰＣをしてＣＲＰ分子のペアを架橋させることができる。こういった複合的な相互作用能は、ＰＣＨＰＣとＣＲＰ間の相互作用のため

の親和力を強く増強する。ＣＲＰにおける５つの前駆体それぞれのリガンド結合部位は、全て天然タンパク質の円盤状五量体の同じ面に存在している。ＰＣＨＰＣ分子によるＣＲＰ分子ペアの架橋も、タンパク質の結合部位または“Ｂ”面を遮蔽することによって、他のリガンドに対するＣＲＰの結合能をさらに減ずる。大過剰モルのＰＣＨＰＣ下においては、ＣＲＰの全ての結合部位は個々のＰＣＨＰＣにより占められ、ＣＲＰ分子ペアの架橋は全く生じず、その結果、ＣＲＰは本来の五量体の状態のままになる。フリーのホスホコリンは、ＣＲＰに結合するものの、“単量的な”ものであり、ＣＲＰ分子ペアを架橋することはできない。これら効果は、ＣＲＰ本来の五量体の単体と、本発明薬剤によりさらに二量化された五量体とを明確に分離する分子ふるいクロマトグラフィにより実証される。生体内における病原であり得るＣＲＰ結合の阻害剤として働くＰＣＨＰＣについて重要なことに、同様の効果が、純粋に単離された水性緩衝液中のＣＲＰでも、全血清の生理的環境でのＣＲＰでも観察されている。

【００４５】

表．　ゲル濾過クロマトグラフィで示すＣＲＰの分子集積体におけるＰＣＨＰＣの効果

【表１】

| 大過剰モルのPCHPCまたはホスホコリンフリー体 | CRPの分子集積体 |
|---|---|
| 薬剤なし | 五量体の単体 |
| 等モルPCHPC | 十量体的二量体 |
| 10倍過剰PCHPC | 十量体的二量体 |
| 10倍過剰ホスホコリン | 五量体の単体 |
| 1,000倍過剰PCHPC | 十量体的二量体 |
| 10,000倍過剰PCHPC | 五量体の単体 |

【００４６】

これら効果は、カルシウム依存的なものであることは間違いない。遊離のカルシウムイオンが存在しない場合には、ＰＣＨＰＣは、ＣＲＰの分子集積体に対して何の効果も示さない。

【００４７】

マススペクトル分析によって、カルシウム依存的なＣＲＰとＰＣＨＰＣの複合体に関するより正確な証拠を提供することができる。

【００４８】

カルシウム不存在溶液における単離した純粋天然ヒトＣＲＰの試験によれば、ＰＣＨＰＣが存在している場合としていない場合において、公知の共有結合構造によればそれぞれ$M_r$ 23027の５つの前駆体として計算される値に近い$M_r$で、ＣＲＰは主に五量体として存在することが示された。十量体に正確に相当する高い$M_r$種も、極微量存在した。ＰＣＨＰＣとカルシウムイオンの存在下では、十量体種が優勢であり、純粋なＣＰＲのみで見られる十量体よりも高い$M_r$を有している。ＣＲＰのみの十量体とＰＣＨＰＣおよびカルシウムイオンの存在下で形成される十量体における$M_r$の相違は、2840～2890の範囲内にある。これは、ＣＲＰ五量体のペア当たり５つのＰＣＨＰＣ分子（それぞれの$M_r$は448）と２０のカルシウムイオン（それぞれの$M_r$は40）分に最も近いものである。

【００４９】

ＰＣＨＰＣによるＣＲＰ分子のペアリングも、図２に示す通り、直接の電子顕微鏡により写真で示すことができる。さらに、Ｘ線結晶法により解析されたＣＲＰ－ＰＣＨＰＣ複合体の構造は、ＣＲＰ分子の五量体が面と面で相互作用しつつペアリングしていることを示している（図２ｃ）。これは、正確には、本発明に係るＰＣＨＰＣ分子の設計により予想されたものである。

【００５０】

ＣＲＰのためのＲｏｃｈｅ　ＭＩＲＡ自動免疫学的アッセイ（参考文献６４）は、ＣＲ

Ｐ分子上のカルシウム依存性エピトープのモノクローナル抗体による認識に依存する。ＰＣＨＰＣにより、カルシウム依存性のリガンド結合部位が遮蔽されているＣＲＰ二量体が形成されることによって、このエピトープは覆い隠され、当該アッセイでは検出できないＣＲＰ－ＰＣＨＰＣ複合体が形成される（図３）。当該方法により、インビトロでもインビトロでも生ずるその様な複合体を実証するための利便性の高い方法を提供できる。このことは、図３に示されている、つまり、ＣＲＰ濃度をＰＣＨＰＣ（ロットナンバーＲＭＭ）の存在下でＭＩＲＡにより測定した結果は実線で示されており、対してホスホコリンのフリー体の効果は破線で示されている。同一の結果が、単離した純粋なＣＲＰでも全急性期血清中のＣＲＰでも得られた。

【００５１】

前炎症、つまりＣＲＰの組織ダメージ効果が、生体内において仲介される主要なメカニズムは、補体系の活性化を経由する。従って、その様なＣＲＰの好ましくない効果を防ぐ本発明に係る薬剤が、ＣＲＰによる補体の活性化を阻害しなければならないことは、不可欠である。図４に示されている通り、ＰＣＨＰＣは、この点において有力である。図４は、全血清中における補体第３成分Ｃ３の活性化と、ＰＣＨＰＣによる活性化の阻害を二次元免疫電気泳動法により示す図である。左上図は、正常なヒト血清（ＮＨＳ）を4℃でインキュベートしたのみの結果であり、Ｃ３は活性化されていない；右上図は、ＮＨＳをＣＲＰおよびＣＰＳと共に37℃でインキュベートした結果であり、Ｃ３が完全に活性化されていることを示す；左下図は、ＮＨＳを37℃でインキュベートしたのみの結果であり、Ｃ３は活性化されていない；右下図は、ＮＨＳをＣＲＰおよびＣＰＳに加えてＰＣＨＰＣと共に37℃でインキュベートした結果であり、Ｃ３の活性化はほとんど完全に阻害されていることを示している。

【００５２】

本発明薬剤が、ＣＲＰのその他の病原的な効果を防ぐことも必須である。マクロファージの細胞質と血管平滑筋細胞でＬＤＬが蓄積し、泡沫細胞が形成されることは、アテローム斑に特徴的なものである。これら細胞をインビトロでＬＤＬと共に培養した場合、前炎症性のサイトカインや他の細胞活性化剤と接触することにより刺激されない限り、これら細胞は泡沫細胞を形成しない。しかし、ＬＤＬと共に培養された細胞へＣＲＰを加えることによって、他のあらゆる刺激剤または活性化剤が存在しない場合であっても、泡沫細胞の形成が誘導される（図５）。そして、このことが生体内で起こると、ＣＲＰ産生の増加により前アテローム状態に直接つながるメカニズムが提示されることになる。図５は、低比重リポタンパク質（ＬＤＬ）とＣＲＰと共にインビトロで培養された血管平滑筋細胞による泡沫細胞の形成を示すものである。摂取され細胞内に保持されたＬＤＬは、Oil Red 0色素により染色される。ＣＲＰが存在しない場合、ＬＤＬ単独では細胞内に蓄積されない。重要なことに、ＬＤＬとＣＲＰの両方を含む血管平滑筋細胞培養液へＰＣＨＰＣを添加することによって、泡沫細胞の形成を効果的に阻害することができる（図６）。

【００５３】

生体内における正常な血管の弛緩と拡張の相対的な欠陥として一般的に認識されている内皮機能障害が、アテローム性動脈硬化症の心欠陥疾患への進行に関わることは、一般的に容認されている。一酸化窒素の正常な産生の減退が、血管拡張の欠陥へ次々に関係し、ＣＲＰが血管壁やインビトロの内皮細胞において一酸化窒素の産生を減ずることが求められるようになる。しかし、我々の研究により、インビトロにおいてフェニレフリンと接触したヒトとラットの血管の収縮応答は、ヒトＣＲＰにより確かに減退することが明らかにされている。その結果は、ｅＮＯＳによる正の制御に介される一酸化窒素産生の増加として示されている（図７）。ＣＲＰの斯かる効果がアテローム性動脈硬化症や生体内での他の病変に関係しているであろうことが、病態生理学的にいかなる重要性を持つかは、明らかでない。しかしながら、このことはＣＲＰの強い生物学的活性を示すものであり、それゆえ当該実験においてＰＣＨＰＣの添加によりＣＲＰの効果が完全に消失したことは、本発明に関係する原理の極めて重要な証拠となる（図７）。

【００５４】

図７は、フェニレフリン（ＰＥ）に応答する血管におけるＣＲＰの効果とＰＣＨＰＣによる阻害を示す。ＰＥに応答した外植した動脈の収縮は、培養液へのＣＲＰの添加により有意に低減した。これは、ＣＲＰによるｅＮＯＳの正の制御（データは示していない）と、血管の弛緩に対応してＮＯの産生が増加したこと（データは示していない）による。ＣＲＰの当該効果は、ＰＣＨＰＣ（ロットナンバーＲＭＭ）の添加により完全に阻害される。

【００５５】

ヒトＣＲＰの注射に先立ってマウスにＰＣＨＰＣをインビボ投与することによって、循環系で観察されるＰＣＨＰＣ－ＣＲＰ複合体の形成が誘導される。それ故に、ポリクローナル抗体を使用したＣＲＰの電気免疫アッセイでＣＲＰの完全な反応性が保持される一方で、ＭＩＲＡアッセイではＣＲＰ反応性の減退がみられる。電気免疫アッセイは、カルシウムにキレートし複合体からＣＲＰを遊離させるＥＤＴＡの存在下で行なった。さらに、ヒトＣＲＰを注射したマウスへＰＣＨＰＣを投与した後、血清中のＣＲＰは、生体外でセファロース粒子上に固定したホスホエタノールアミンに結合することができなくなる。例えば、ヒトＣＲＰを与えられたが薬剤投与されなかったマウス由来の血清中では、45 mg/lのＣＲＰの96％がセファロース－ＰＥに結合した一方で、ＣＲＰと共にＰＣＨＰＣの単回投与を受けたマウス由来の血清では、47 mg/lのうち17％のみがセファロース－ＰＥへ結合できたに過ぎなかった。

【００５６】

ＰＣＨＰＣの臨床的な効果としては、本発明によれば、ＰＣＨＰＣは生体内でＣＲＰのリガンドへの結合を阻害するのみでなく、生体内においてＣＲＰの生物学的効果をも消失させることがある。ヒトＣＲＰをマウスに投与することによって、Streptococcus pneumoniaeによる致死的な感染から動物を保護できることは古くから知られており、斯かる保護の具定例が図８として示されている。

【００５７】

Streptococcus pneumoniaeにより感染された上でヒトＣＲＰを投与されたマウスが、ＰＣＨＰＣの注射を繰り返し受けた場合、ＣＲＰを介した保護は、図９に示した通り完全に消失する。これら実験により、ＰＣＨＰＣがヒトＣＲＰの強い生物活性を生体内で完全に消失させることから、本発明で好適に使用される化合物であることが明確に示されている。

【００５８】

ＰＣＨＰＣは、ＣＲＰによる補体活性化を阻害し、また、インビトロでもインビボでもＣＲＰと複合体を形成して、インビトロでもインビボでもＣＲＰが他のリガンドへ結合することを阻害するものの、図１０（ａ）に示す通り、ＰＣＨＰＣを生体内に投与しても循環系からのＣＲＰの消失割合は影響を受けない。この実験と同様のサンプルは、ＣＲＰに関するＭＩＲＡアッセイで測定されている（図１０（ｂ））。それによって、薬剤がＣＲＰと複合体を形成し、その結果、このアッセイでその免疫反応性が消失するという効果が認められる。しかし、ＰＣＨＰＣ自体は速やかに消失し、４時間後にはマウスの循環系におけるヒトＣＲＰは、ＭＩＲＡアッセイで十分に検出可能になり、処置していないコントロール動物とほぼ同じ割合で消失する。

【００５９】

薬剤とＣＲＰとの複合体の形成にも関わらず、マウス血漿からのヒトＣＲＰの消失に影響を与えつつＰＣＨＰＣが消失するという事実は、ヒトＣＲＰが正常なヒト被験者や様々な疾病に罹患している患者から常に早い割合で消失するということを示す公知文献の記載内容と一致する（残光文献３１）。また、実験動物における研究でも、ＣＰＳの様な強い低分子量リガンドの存在にも関わらず、ヒトＣＲＰは同様の割合で常に消失するということが示されている（参考文献６５）。この現象は、ペントラキシンタンパク質ファミリーに属する他のタンパク質であり近縁の血清アミロイドＰ成分（ＳＡＰ）の生体内における挙動とは明らかに対照的である。ＳＡＰは、５つの同一のプロトマーが非共有結合により円盤状に立体配置しており、それぞれのサブユニットの一面に一つのカルシウム依存性リ

ガンド結合部位を有するホモ五量体構造をとるという点において、ＣＲＰと共通する。しかし、ＳＡＰにより認識され結合される反復性（palindromic）分子である(R)-1-[6-(R)-2-カルボキシ-ピロリジン-1-イル]-6-オキソ-ヘキサノイル]ピロリジン-2-カルボン酸（略して、ＣＰＨＰＣ）が、ＳＡＰのペアを架橋することによりＳＡＰとの複合体を形成すると、斯かる複合体は、生体内の循環系から極めて速やかに消失する（参考文献６６，６７）。この様に、生体内におけるヒトＳＡＰ凝集体の操作性は、ＣＲＰ凝集体の操作性とはかなり異なり得る。一方、ＣＲＰとＰＣＨＰＣとの複合体は、ＳＡＰとＰＣＨＰＣにより形成される複合体よりも安定性が悪いことがある。等温熱量計で測定した結合親和性は、ＣＲＰとＰＣＨＰＣの400 nMと比較して、ＳＡＰとＣＰＨＰＣでは10 nMである。マウスＳＡＰは、ヒトＳＡＰほど全てのリガンドと強く結合せず、ＣＰＨＰＣをマウスに投与しても、生体内におけるマウスＳＡＰの消失は促進しない。その一方で、ヒトＳＡＰ遺伝子組み換えマウスで発現したヒトＳＡＰを劇的に消失させる（参考文献６７）。ＣＲＰにより高いアフィニティで結合され、且つより高い安定性でＣＲＰを架橋する化合物は、生体内において血漿からの消失を促進することができる。

【００６０】

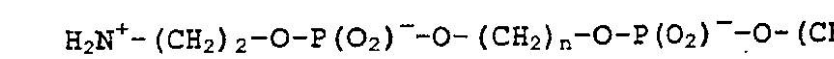
ＰＣＨＰＣの様に、ＣＲＰのリガンドへの結合を阻害するのみでなく、ＣＲＰの消失を促進することによって、その不適切で病的な効果を発揮できないようにする化合物は、本発明において好ましいものである。その様な化合物は、カルシウム依存性結合ポケットにおいてホスホコリンの頭部を認識できることに加え、ＣＲＰとの結合的な相互作用によって、ＣＲＰに対する高い結合親和性を有するという特徴を持つ。例えば、ホスホコリン結合部位の近傍部には小さな疎水性の割れ目があり、これがメチル基やその他の小さな疎水性基を収容する。そして、ＰＣＨＰＣの両末端に適切に存在する基が結合すると、ＣＲＰによる結合親和性が顕著に向上する（参考文献６８）。結合親和性と薬剤－ＣＲＰ複合体の形成能も、２つのホスホコリン頭部間の脂肪族リンカーを修飾することにより向上する。例えば、鎖の長さを変えたり、好適な構造を確固なものとするために二重結合を挿入したり、ホスホコリンのカルシウム依存性結合の他にも薬剤とタンパク質との相互作用が可能になる様な芳香族基や側鎖を導入するといった修飾がある。

【００６１】

特に、ＣＲＰのリガンド結合ポケットにおけるホスホコリンのカルシウム結合にとって重要な要素は、コリンの第４級アンモニウムとＧｌｕ８１との電気的な相互作用である。この電荷相互作用は、ＰＣＨＰＣにおける６炭素長よりも長い、例えば７炭素長またはそれ以上の鎖を有するビスホスホエタノールアミン化合物により維持される。下記一般式を有するその様な化合物は、本発明において好ましいものである。

【００６２】

【化５】




【００６３】

本発明の定義による反復的（palindromic）となる様な頭部を有する他のリン酸を、以下に示す。化合物１，５と６は、カルシウムの配位結合を維持しつつ、ＣＲＰのリガンド結合ポケットにおけるＴｒｐ６６と環相互作用をする。化合物５と６は、環の窒素原子と、ＣＲＰ複合体におけるホスホコリンの第４級窒素と相互作用する極性基との間で水素結合を形成することもできる（参考文献６８）。

【００６４】

結合アフィニティを向上させる他のバリエーションとしては、ビスホスホコリン構造の各第４級窒素におけるメチル基の１つの水素原子を、アミノ基で置換するものがある。それによって、コリン頭部に近いＳｅｒ６８および／またはＳｅｒ７４残基との水素結合が可能になり、本発明にとり望ましい高い結合アフィニティが得られる。斯かる構造を有する頭部は、下記構造式２で示されている。化合物３と８は、コリン基中に同一の好適な置

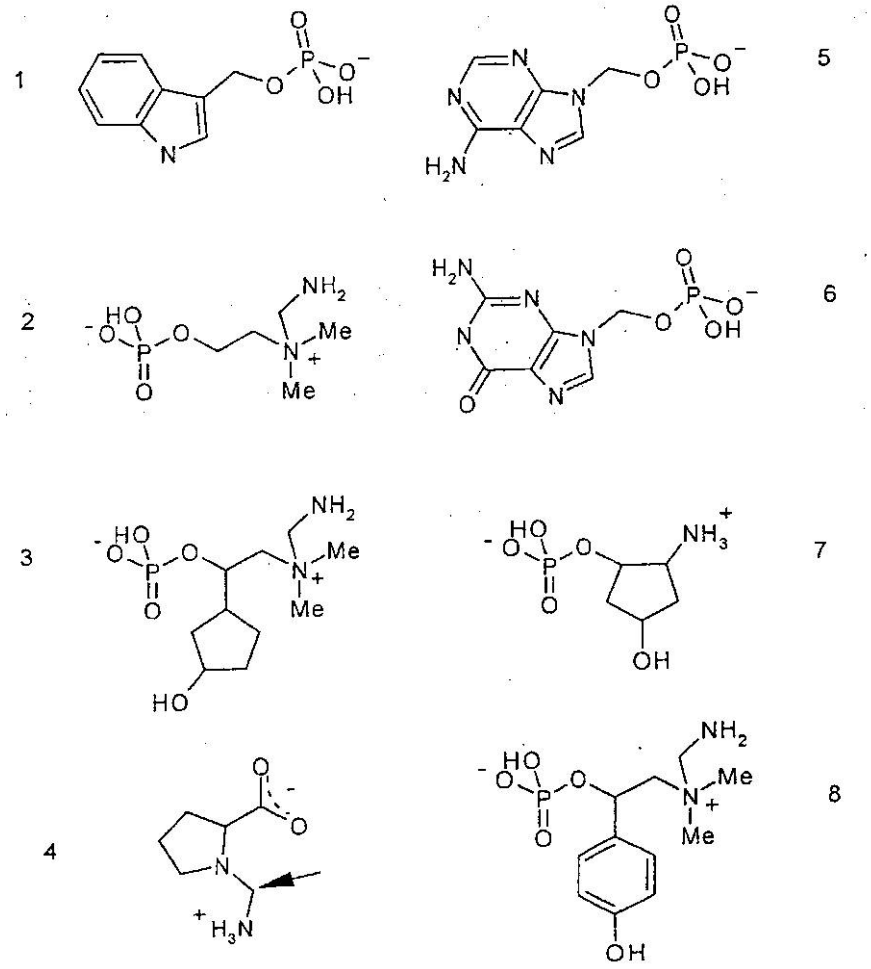
換基を有しており、それぞれ５員環、６員環の側鎖を持つ。この側鎖はＣＲＰのリガンド結合ポケットに収まり、下記でさらに説明する通りポケット壁の１つを形成する重要な極性残基であるＴｈｒ７６と付加的な水素結合を形成する。化合物７は、Ｔｈｒ７６と水素結合できるヒドロキシプロリン様の環を有しており、アミノ基の正電荷はコリンの第４級窒素よりも小さく、頭部全体がポケットへよりぴったりと適合する。これによって、本発明にとり好ましい高い結合アフィニティが得られる。

【００６５】

化合物４は、リン酸基の代わりにカルボキシル基を有し、通常はコリンの正電荷Ｎと結合するグルタミン酸残基へ届く様に延長されたアミノ基を持つ。構造式中に矢印で示したカルボキシル基の前の炭素原子は、リンカーの結合部位である。下記に示す他の全ての頭部では、リンカーは、ＰＣＨＰＣの様にリン酸の水酸基を介して結合している。

【００６６】

【化６】




【００６７】

ＣＲＰにおけるホスホコリンのためのカルシウム依存性リガンド結合ポケット（参考文献６８）は、D-プロリン残基へ結合するＳＡＰのカルシウム依存性リガンド結合ポケット（参考文献６７）よりも、わずかに大きい。ＣＲＰポケットは、ＳＡＰポケットの内側を覆うＴｙｒ７４、Ｔｙｒ６４およびＬｅｕ６２残基に置き換わる極性側部も有し、ＣＲＰのＴｈｒ７６残基によって、４つのプロリン炭素のうち３つに結合する。ＣＲＰポケットを満たすためには、リン酸や他の酸性基に結合してしまうカルシウム原子への接近を克服することが不可欠である。リン酸エステルでは、鎖中の余分なＯ原子が、頭部とリンカー上の側鎖置換基をポケットから追い出す。Ｏエステル原子を２炭素フラグメントで置換することによって、リンカーの末端における極性側鎖残基はポケット内に侵入することができ、Ｔｈｒ７４と水素結合する。その結果、高い結合アフィニティが得られる。従って、

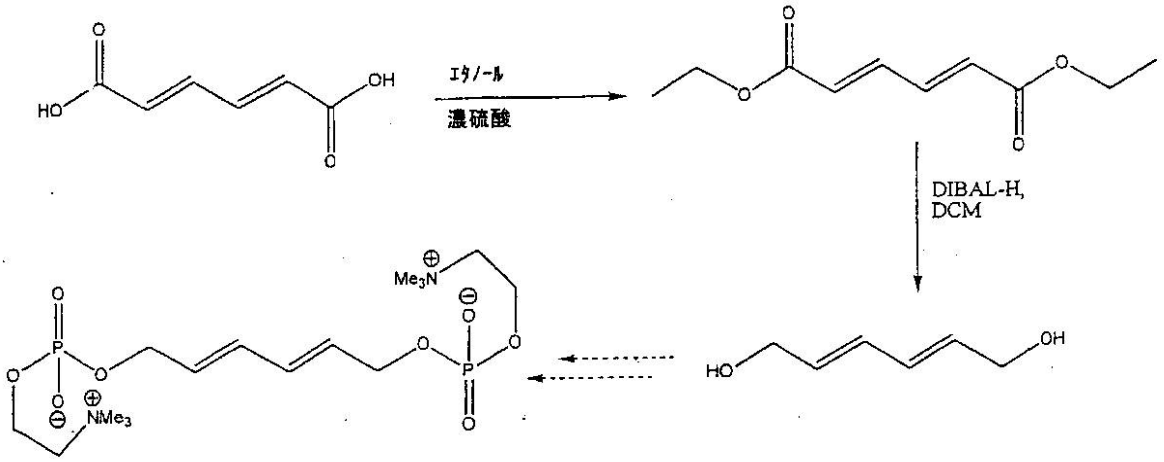
このタイプの反復的化合物（palindromic compounds）は、本発明において好ましい。

【００６８】

リンカー鎖に関しては、ＰＣＨＰＣにおける６炭素鎖長が、完全な五量体の五層軸へ折りたたまれるＣＲＰ前駆体（参考文献６８）におけるカルシウム依存性リガンド結合部位において好適である。しかし、本発明においては、５または７メチレン基も好適である。５またはそれ以上の長さのメチレン基によって、五量体と五量体とのコンタクトが可能になり、これらの結合強度が高まる。７メチレン基によって、リンカーは、リガンド結合ポケットにおけるホスホコリン頭部の位置を最適化できる所に留まることができ、その結果、結合アフィニティが高まる。リンカー鎖中に二重結合が挿入されると自由度が制限され、結合強度を高めることができ、薬理学上の特性も改良できる。その様な化合物の例とその合成経路を下記に示す。

【００６９】

【化７】




【００７０】

ジエチル－トランス－トランス－ムコン酸

トランス－トランス－ムコン酸（2.0 g, 9.71 mmol）の無水エタノール（10 mL）溶液へ濃硫酸（1 mL）を加え、当該混合液を16時間加熱還流した。当該溶液を、塩基性になるまで飽和炭酸水素ナトリウムにより希釈した。形成された固形分を濾別し、エタノール：水（1：1）から再結晶することによって、白色結晶を得た（1.8 g, 64%）。1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 7.29 (2H, m, =CH), 6.19 (2H, m, =CH), 4.22 (2H, q, J 12, $CH_2$), 1.31 (3H, t, J 12, $CH_3$), 1.65 (2H, br, $CH_2CH_2CH_2OP$), 1.45 (2H, br, $CH_2CH_2CH_2OP$)。

【００７１】

トランス－トランス－ムコノール

攪拌したジエチル－トランス－トランス－ムコン酸（1.67 g, 8.4 mmol）の無水ジクロロメタン（60 mL）溶液へ、30分かけてシリンジポンプからジブチルアルミニウムハイドライド（1.0 M, 33.6 mL, 4当量）のエーテル溶液を加えた。添加完了後、黄色溶液を20℃まで温め、8時間攪拌した。その後、未反応のジブチルアルミニウムハイドライドを分解するために過剰のメタノール（250 mL）でクエンチし、当該混合物を1時間攪拌した。その後、当該懸濁液を濾過して濾液を分離し、残渣をメタノールと共にすり鉢中ですり、再びセライトを用いて濾過し、最初の濾液と合わせた。この有機層を乾燥し（$MgSO_4$）、濾過し、減圧濃縮することによって、黄色のオイルを得た。これをフラッシュカラムクロマトグラフィ（酢酸エチル：石油エーテル，7：3）で精製した。その後、前記で詳しく説明したＰＣＨＰＣ合成の通り、ホスホコリンリガンド頭部をトランス－トランス－ムコノールの末端水酸基に結合させた。

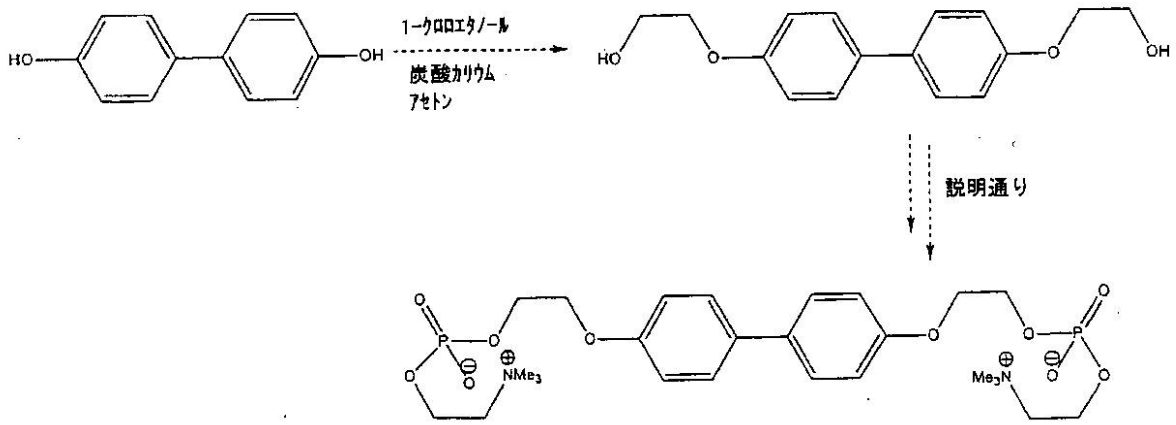
【００７２】

本発明において好適な他のリンカーとしては、ＣＲＰとホスホコリン頭部との高い結合アフィニティが得られ、薬理上の特性を改良できると共に、より強く効果的な複合体形成

を導くことができる様に薬剤とタンパク質の相互作用を増強するアリール系構造を挙げることができる。斯かる化合物の合成経路の一例を下記に示す。当該合成経路中では、適切なアルコールであるリンカーの構築に続いて、前述したＰＣＨＰＣと同様にホスホコリン頭部が結合されている。

【００７３】

【化８】

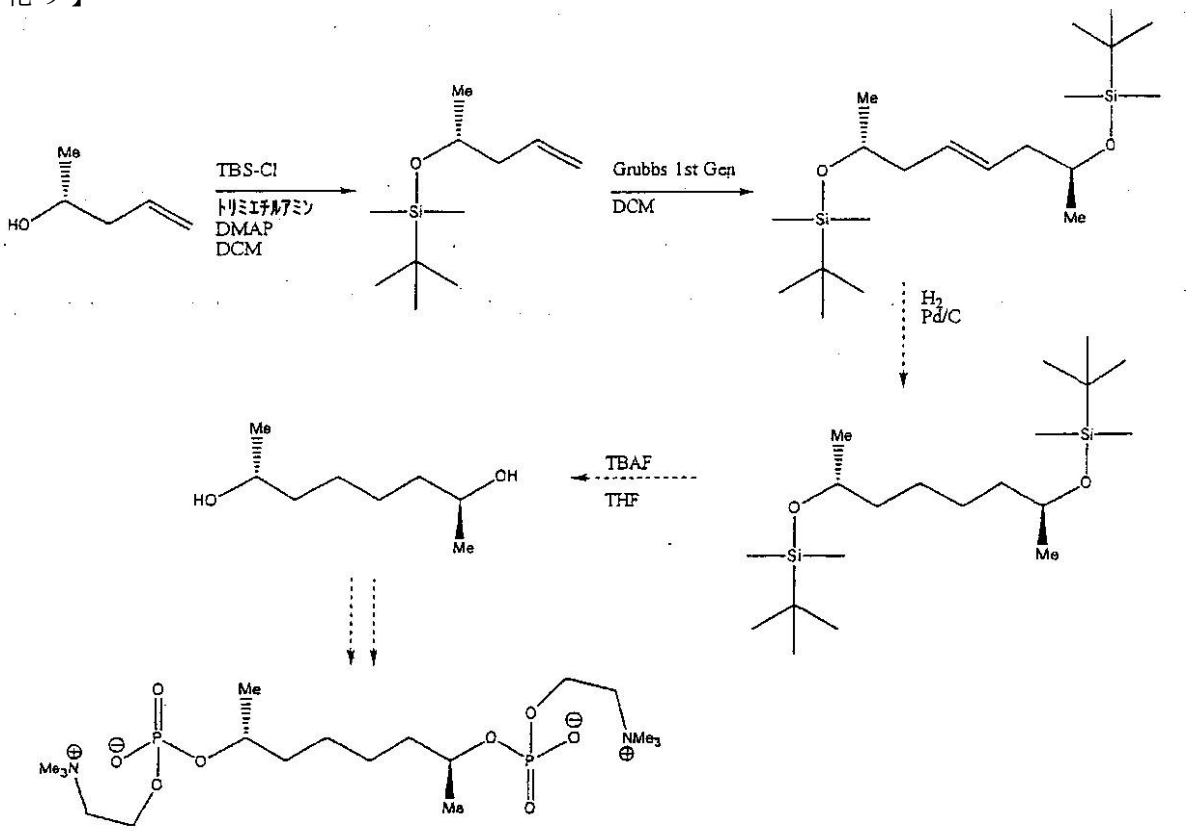



【００７４】

直鎖リンカー鎖上での置換基導入も、ＣＲＰ分子との二次的な相互作用を可能にすることにより結合のアフィニティと強度が高められるという特性によって、本発明における好適な態様である。バインダーは、ＣＲＰ上に存在するリガンド結合部位との相互作用のために、各リガンドに近い位置に疎水性置換基を有してもよい。その一例である下記では、各ホスホコリン頭部に近いリンカー炭素原子上にメチル側鎖が好適に存在し、ＣＲＰ構造において、カルシウム依存性リガンド結合部位に近接した小疎水性ポケットと疎水性相互作用することができる（参考文献６８）。これによって、化合物とＣＲＰとの結合アフィニティを大幅に向上させることができる。ここで、この化合物の合成経路を示す。

【００７５】

【化９】




【００７６】

(R)-0-tert-ブチルジメチルシリル-ペンテン-2-オール

(R)-(-)-ペンテン-2-オール（2 mL, 19.4 mmol），トリエチルアミン（5.4 mL, 38.9 mmol）およびＤＭＡＰ（0.237 g, 1.94 mmol）のジクロロメタン（25 mL）を0℃に冷却し、塩化ＴＢＤＭＳ（3.81 g, 25.3 mmol）の溶液を加えた。当該混合物を20℃まで温めて17時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム（100 mL）を加え、水層を酢酸エチル（2×100 mL）で抽出した。有機層を合わせて乾燥し（$MgSO_4$）、濾過し、減圧濃縮することによって、透明のオイルを得た。これをフラッシュカラムクロマトグラフィ（石油エーテル40-60, 100%）で精製して、透明オイル（3 g, 77%）を得た。

【００７７】

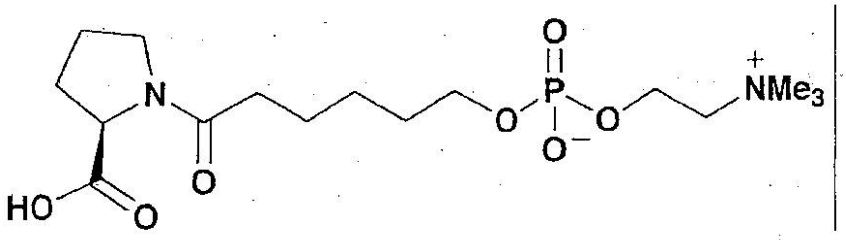
0,0-2,7-ジ-(tert-ブチルジメチルシリル)-オクト-4-エン

(R)-0-tert-ブチルジメチルシリル-ペンテン-2-オール（2 g, 10 mmol）のＤＣＭ（60 mL）溶液へ、グラブ（Grubb）の第一世代触媒（0.206 g, 25 mol%）を加え、当該混合液を16時間加熱還流した。その後、反応液を水（100 mL）で希釈し、水層を酢酸エチル（2×100 mL）で抽出した。有機層を合わせて乾燥し（$MgSO_4$）、濾過し、減圧濃縮することによって、黒色のオイルを得た。これをフラッシュカラムクロマトグラフィ（ヘキサン, 100%）で精製して、透明オイルを得た。これに続く還元と加水分解によって、ＰＣＨＰＣにおいて説明した通りホスホコリン頭部への結合に適したアルコールとしての所望のリンカーが得られる。

【００７８】

ＣＲＰにより結合される複数のホスホコリン、或いは他の頭部基を有する多様な薬剤化合物であり、当該薬剤により架橋された二量体においてそれぞれのＣＲＰ分子ペアにおける複数の前駆体と相互作用できる様な適切な空間を有するものは、非常に強く安定な薬剤－ＣＲＰ複合体を形成することができ、斯かる化合物は本発明において好適なものである。特に、ＣＲＰ分子の結合（Ｂ）面の平面上にある５つのリガンド結合ポケットのそれぞれに結合できるよう適切な空間が存在できる様に複数のリガンド頭部が配列した化合物は、多様な相互作用により親和力が非常に高められる点で好ましい。

【００７９】
本発明におけるＣＲＰの作用阻害と消失のための他のアプローチとしては、多様な複数の機能を有するホスホコリン化合物や、１つの頭部とD-プロリン部分の様にＣＲＰに認識されるもの、他の頭部の様にＳＡＰに認識されるものといった前述した様々な頭部基の１つを使用するものがある。構造上このタイプに分類される例を下記に示す。
【００８０】
【化１０】

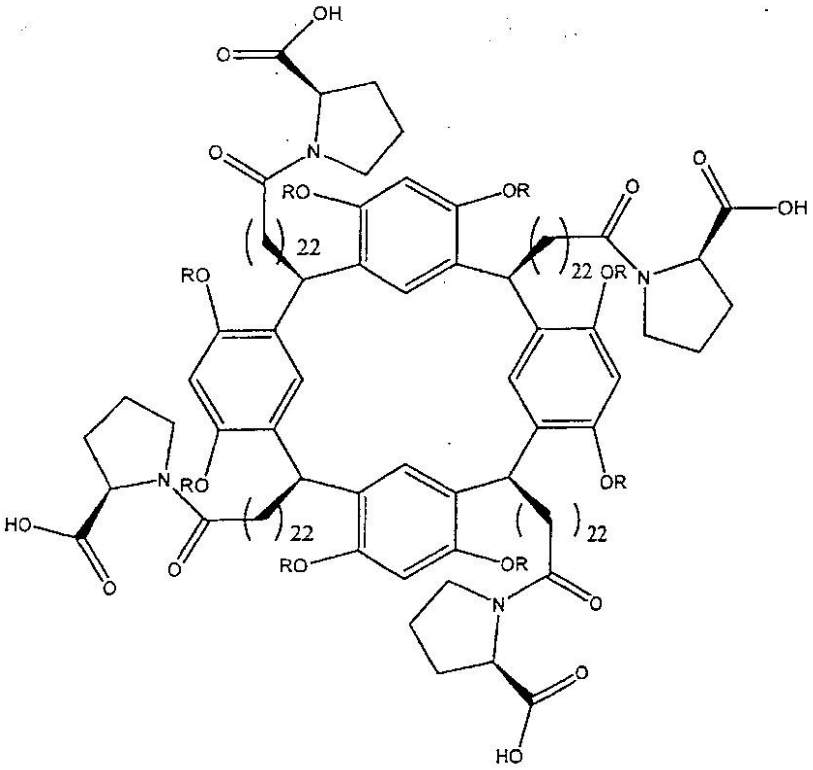



【００８１】
この化合物により、１つのＣＲＰ分子と１つのＳＡＰ分子が架橋された混合複合体を形成させることができる。ＣＲＰによるホスホコリンまたは頭部基への結合は、ＣＲＰが他のリガンドと相互作用する能力を抑制し、ＣＲＰ分子のＢ面の覆閉によって、斯かる抑制は増強される。重要なことに、ＳＡＰとの複合化と凝集によって、生体内で異物と認識され循環系から速やかに除去される複合体が形成される。この様な循環系からの除去は、本発明に係る薬剤の有効性を高め、ＣＲＰの悪影響や病原性を無くし、その結果、疾病を改善することができる。
【００８２】
ＰＣＨＰＣについて説明した通り、ＣＲＰのＭＩＲＡアッセイにおいてモノクローナル抗ＣＲＰ抗体の１つに認識されるエピトープが存在するＣＲＰ分子のＢ面を覆い隠すことによって、このアッセイで検出されるＣＲＰの量は減ぜられる。同様に、多様な複数の機能を有するリガンド化合物、例えば、ホスホコリン基を介してＣＲＰにより結合されるD-Pro-ヘキサノイル-ホスホコリン（ＤＰＨＰＣ）は、単離された純粋なＣＲＰに添加された場合に、おそらく立体障害によって、ＭＩＲＡアッセイにおいてＣＲＰ濃度をわずかに低減する。しかし、純粋なＳＡＰが存在すると、ＤＰＨＰＣは用量依存的にＭＩＲＡ ＣＲＰ濃度を劇的に減ずる。100 mg/l（およそ4μM）のＣＲＰと4 mMのＤＰＨＰＣで実験を行なうと、ＭＩＲＡ値は91%まで下がるが、ＤＰＨＰＣが400 mMである場合には、何ら効果は見られなかった。ＳＡＰが100 mg/l（およそ4μM）で存在する場合にも、4 mMのＤＰＨＰＣでＭＩＲＡ ＣＲＰ濃度は99%まで、2 mMのＤＰＨＰＣで89%まで、400μMのＤＰＨＰＣで58%まで下がった。斯かる強力な効果も、ＳＡＰ濃度に依存する。例えば、約4μMのＣＲＰと1 mMのＤＰＨＰＣで実験を行なうと、ＭＩＲＡ ＣＲＰ濃度は62%まで低減された。しかし、さらに約4μMのＳＡＰが存在すると、ＭＩＲＡ ＣＲＰ値は85%まで；2μMのＳＡＰでは73%まで；800 nMまたは400 nMのＳＡＰでは61%まで、ＳＡＰが無い場合はこれと同等まで下がった。重要なことに、等モル量のＣＲＰとＳＡＰを含む全血清に薬剤が添加された場合に、ＤＰＨＰＣは混合ＣＲＰ－ＳＡＰ複合体の形成に同様の効果を有し、この複合体が形成されるとＭＩＲＡアッセイではＣＲＰは検出されなくなる。従って、約4μMのＣＲＰを含む全血清に4 mMのＤＰＨＰＣが添加されると、ＭＩＲＡアッセイで検出できるＣＲＰ濃度は19%に低減した。ＤＰＨＰＣが存在しない場合には、最終濃度約4μMでＳＡＰを添加しても何ら効果は見られず、存在する全てのＣＲＰはＭＩＲＡアッセイで検出された。しかし、およそ4μMでＳＡＰとＣＲＰの両方を含む血清に4 mMでＤＰＨＰＣを添加した場合には、ＭＩＲＡ ＣＲＰ値は44%まで下がった。2μMのＳＡＰでは29%まで下がり、低濃度のＳＡＰでは、ＤＰＨＰＣのみの効果に対する増強効果は見られなかった。
【００８３】
ＣＲＰとＳＡＰの両方に対する結合能を有する多機能化合物は、より強い相互作用を発

揮し、その結果、ＣＲＰ分子とＳＡＰ分子の混合複合体の強度を高める。また、ＣＲＰの結合の阻害をより効果的にでき、ＣＲＰの消失もより効果的に促進できる。その様な化合物は、本発明において好ましい。その典型例を下記に示す。当該化合物では、ＣＲＰとＳＡＰの各Ｂ面上における５つのリガンド結合ポケットそれぞれと相互作用できる様に、複数のリガンド頭部基が適切に間隔を空けている。ＳＡＰにより認識されるD-プロリン頭部基は、当該化合物の一方の面に存在し、ＣＲＰにより認識されるホスホコリン頭部基（図中、Ｒと示している）は、反対の面に存在する。

【００８４】

【化１１】

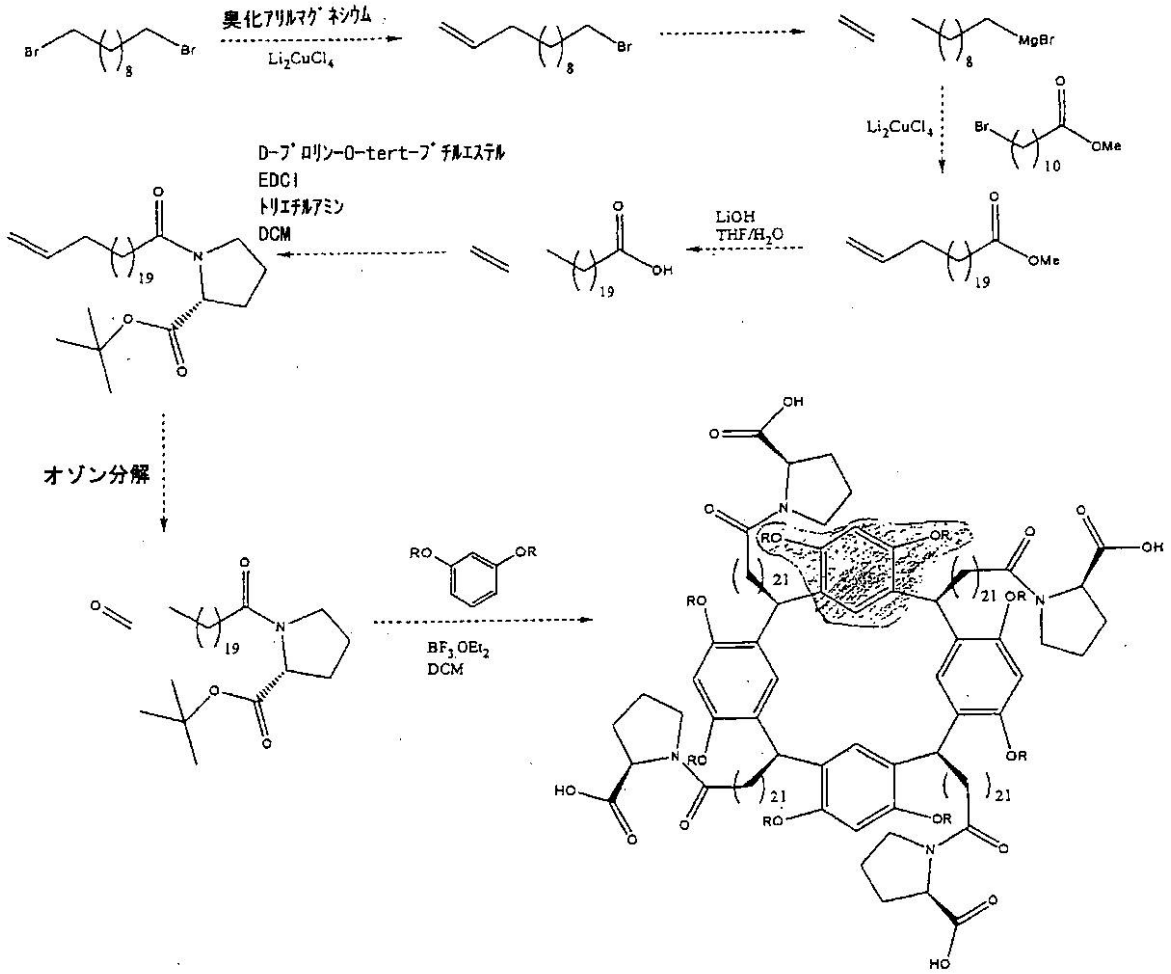



【００８５】

当該化合物の合成経路の前半部分を下記に示す。ここでは、環の形成工程が含まれている部分を上に、その下にホスホコリン頭部基の結合を含む部分を示す。

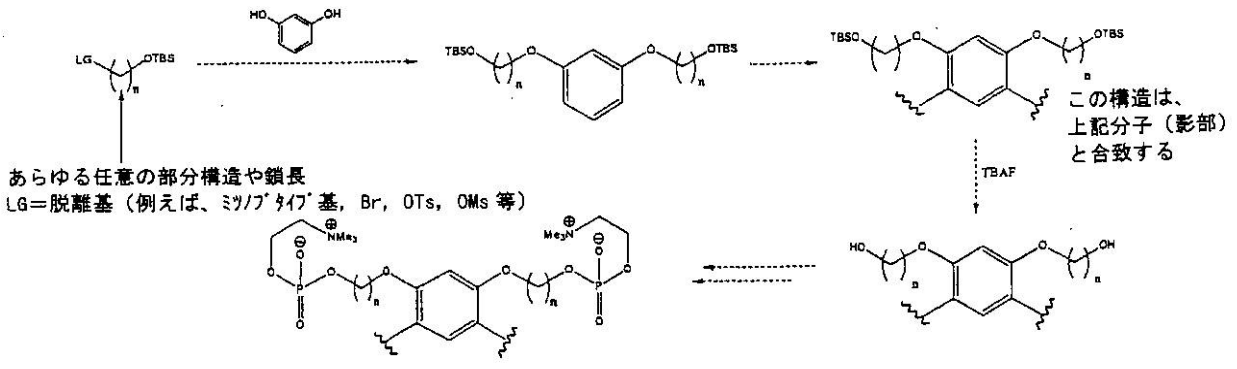
【００８６】

【化１２】




【００８７】

【化１３】




【図面の簡単な説明】

【００８８】

【図１】ホスホコリンとＰＣＨＰＣ（ロットナンバー：ＧＰ４４）による、固定化したＣＰＳへのＣＲＰの結合の阻害を示す図である。ホスホコリンよりも、ＰＣＨＰＣのＩＣ$_{50}$の方が１０倍低いことが分かる。

【図２】ＰＣＨＰＣにより架橋されたＣＲＰ分子のペアを可視化したものである。２ａは、ヒトの天然五量体ＣＲＰのみの陰イオン着色電子顕微鏡写真を示す。２ｂは、ＰＣＨＰＣを混合した後に形成されたＣＲＰの二量体を示す。２ｃは、ＣＲＰ－ＰＣＨＰＣ複合体のＸ線結晶構造をリボンモデルで表したものを示す。２つのＣＲＰ五量体が、互いに相互作用している様子を示している；それぞれのプロトマーのリガンド結合ポケットにおいて

、カルシウム原子のペアが球として表されている。ＰＣＨＰＣ分子の電子密度に相当する構造は、示していない。
【図３】ＣＲＰ濃度に対するＰＣＨＰＣ（ロットナンバーＲＭＭ）の効果について、ＭＩＲＡにより測定した結果を示す図である。
【図４】二次元免疫電気泳動法により示された全血清における補体第３成分Ｃ３の活性化を示す図である。
【図５】低濃度リポタンパク質（ＬＤＬ）とＣＲＰの存在下インビトロで培養した血管平滑筋による泡沫細胞の形成を示す図である。
【図６】ＰＣＨＰＣと共に、低濃度リポタンパク質（ＬＤＬ）とＣＲＰの存在下インビトロで培養した血管平滑筋による泡沫細胞の形成の阻害を示す図である。
【図７】フェニレフリン（ＰＥ）に対する血管の応答におけるＣＲＰの効果とＰＣＨＰＣによる阻害を示す図である。
【図８】ＣＲＰが、Streptococcus pneumoniaeによる致死的な感染からマウスを保護することを示す図である。
【図９】ＰＣＨＰＣが、Streptococcus pneumoniaeによる生体内での致死的な感染からのＣＲＰの保護効果を完全に消滅させることを示す図である。
【図１０】ＰＣＨＰＣが、インビボでマウスの循環系からのヒトＣＲＰの除去に対して影響を及ぼさないことを示す図である。このことは、ＰＣＨＰＣは当初からＣＲＰと複合体を形成した場合における、電気免疫アッセイ結果による図１０（ａ）と、ＭＩＲＡアッセイにおけるＣＲＰの免疫反応性の消失による下の図１０（ｂ）で明確に示されている。
【００８９】
参考文献
１．　Peys, M.B.とBaltz, M.L.（1983年）「急性期タンパク質、特にＣ反応性タンパク質と関連タンパク質（ペンタキシンズ）および血清アミロイドＡタンパク質に関して」Adv. Immunol., 第34号: 第141-212頁
２．　Peys, M.B.（1996年）「急性期タンパク質とＣ反応性タンパク質」, オックスフォード・テキストブック・オブ・メディシン 第３版 第２巻（Weatherall, D.J., Ledingham, J.G.G. とWarrell, D.A.編）, オックスフォード大学出版, オックスフォード, 第1527-1533頁
３．　Volanakis, J.E.とKaplan, M.H. （1971年）「肺炎球菌Ｃ-ポリサッカライドのコリンホスフェイト残基に対するＣ反応性タンパク質の特異性」Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 第136巻: 第612-614頁
４．　de Beer F.C., Soutar, A.K., Baltz, M.L., Trayner, I., Feinstein, A.とPeys, M.B. （1982年）「低密度および超低密度リポタンパク質は、凝集Ｃ反応性タンパク質により特異的に結合される」J. Exp. Med., 第156巻: 第230-242頁
５．　Peys, M.B., Rowe, I.F.とBaltz, M.L.（1985年）「Ｃ反応性タンパク質：脂質およびリポタンパク質への結合」Int. Rev. Exp. Pathol., 第27巻: 第83-111頁
６．　Narkates, A.J.とVolkanakis, J.E.（1982年）「Ｃ結合性タンパク質の結合特異性：合成および天然リン脂質二重膜」Ann. N.Y. Acad. Sci., 第389巻: 第172-182頁
７．　Volanakis, J.E.とWirtz, K.W.A（1979年）「合成ホスファチジルコリン二重膜とＣ反応性タンパク質との相互作用」Nature, 第281巻: 第155-157頁
８．　Du Clos, T.W. （1989年）「Ｕ１核内低分子リボヌクレオタンパク質とＣ反応性タンパク質との反応」J. Immunol., 第143巻: 第2553-2559頁
９．　Peys, M.B., Booth, S.E., Tennent,G.A, Butler, P.J.GとWilliams, D.G.（1994年）「様々な核構造物に対するペントラキシンの結合：Ｃ反応性タンパク質は核内低分子リボヌクレオタンパク質粒子に結合し、血清アミロイドＰ成分はクロマチンと核小体に結合する」Clin. Exp. Immunol., 第97巻: 第152-157頁
１０．　Kindmark, C.-O.（1972年）「インビトロにおける病原性細菌とザイモサンによるヒトＣ反応性プロテインの結合」Clin. Exp. Immunol., 第11巻: 第283-289頁
１１．　Fletcher, T.C., White, A.とBaldo, B.A.（1980年）「ターボット条虫（Bothri

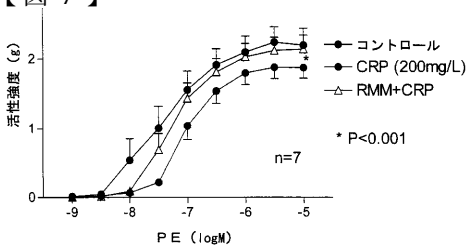
ocephalus scorpii (Muller)) 由来のホスホリルコリン含有成分の単離と、そのＣ反応性タンパク質との反応」Parasite. Immunol. 第2巻: 第237-248頁
１２．　de Beaufort, A.J., Langermans, J.A.M, Matze-van der Lans, A.M., Hiemstra,P.S., Vossen, J.M. とVan Furth, R.（1997年）「死菌および生菌Streptococcus pneumoniae血清型のＣ反応性タンパク質による結合の相違」Scand. J. Immunol., 第46巻: 第597-600頁
１３．　Weiser, J.N., Pan, N., McGowan, K.L., Musher, D., Martin, AとRichards, J.（1998年）「Haemophilus influenzaeのリポポリサッカライド上のホスホリルコリンは、呼吸管における菌の持続性と、Ｃ反応性タンパク質を介して殺菌性を示す血清に対する感受性に影響を与える」J. Exp. Med., 第187巻: 第631-640頁
１４．　Culley, F.J., Bocman-Smith, K.B., Ferguson, M.A.J., Nikolaev, A.V., Shantilal,N. とRaynes, J.G.（2000年）「Ｃ反応性タンパク質はリン酸化炭化水素に結合する」Glycobiology, 第10巻: 第59-65頁
１５．　Lysenko, E., Richards, J.C., Cox, A.D., Stewart, A., Martin, A., Kapoor, M. とWeiser, J.N.（2000年）「Haemophilus influenzaeのリポポリサッカライド上におけるホスホリルコリンの位置は、Ｃ反応性タンパク質の結合性とＣ反応性タンパク質を介する細胞死に対する感受性に影響を与える」Mol. Microbiol., 第35巻: 第234-245頁
１６．　Kaplan, M.H.とVolanakis, J.E.（1974年）「Ｃ反応性タンパク質複合体と補体系との相互作用。Ｉ．Ｃ反応性タンパク質と肺炎球菌Ｃ-ポリサッカライド並びにコリンホスファチド, レシチンおよびスフィンゴミエリンとの反応に関係するヒト補体の消費」J. Immunol., 第112巻: 第2135-2147頁
１７．　Volanakis, J.E. とKaplan, M.H.（1974年）「Ｃ反応性タンパク質複合体と補体系との相互作用。II. ＣＲＰ複合体によるモルモット補体の消費：ヒトＣ１ｑの要求性」J. Immunol., 第113巻: 第9-17頁
１８．　Claus, D.R., Siegel, J., Petras, K., Osmand, A.P. とGewurz, H.（1977年）「Ｃ反応性タンパク質とヒト補体の第１成分との相互作用」J. Immunol., 第119巻: 第187-192頁
１９．　Volanakis, J.E.（1982年）「Ｃ反応性タンパク質複合体による補体活性化」Ann. N.Y. Acad. Sci., 第389巻: 第235-250頁
２０．　Mortensen, R.F., Osmand, A.P., Lint, T.F. とGewurz, H.（1976年）「Ｃ反応性タンパク質とリンパ球および単球との相互作用：補体依存性の付着とファゴサイトーシス」J. Immunol., 第117巻: 第774-781頁
２１．　Nakayama, S., Mold, C., Gewurz, H. とDu Clos, T.W.（1982年）「生体内におけるＣ反応性タンパク質のオプソニン活性」J. Immunol., 第128巻: 第2435-2438頁
２２．　Osmand, A.P., Mortensen, R.F., Siegel, J. とGewurz, H.（1975年）「Ｃ反応性タンパク質複合体と補体系との相互作用。III. ＣＲＰにより引き起こされる補体依存性の受動的溶血反応」J. Exp. Med., 第142巻: 第1065-1077頁
２３．　Finland, M. とDowling, H.F.（1935年）「皮膚反応と肺炎球菌ポリサッカライドの皮内注射に応答する抗体」J. Immunol., 第29巻: 第285-299頁
２４．　Kushner, I. とKaplan, M.H.（1961年）「急性期タンパク質の研究。Ｉ．ウサギにおけるＣｘ反応性タンパク質を局在化するための免疫組織化学的方法。局所的炎症性病変におけるネクローシスとの関係」J. Exp. Med., 第114巻: 第961-973頁
２５．　Kushner, I., Rakita, L. とKaplan, M.H.（1963年）「急性期タンパク質の研究。II. ウサギの心筋梗塞により誘導される心臓におけるＣｘ反応性タンパク質の局在化」J. Clin. Invest., 第42巻: 第286-292頁
２６．　Gitlin, J.D., Gitlin, J.I. とGitlin, D（1977年）「関節リウマチ患者の滑膜におけるＣ反応性タンパク質の局在化」Arthritis Rheum., 第20巻: 第1491-1499頁
２７．　Du Clos, T.W., Mold, C., Paterson, P.Y., Alroy, J. とGewurz, H.（1981年）「実験的なアレルギー性脳脊髄炎の炎症病巣におけるＣ反応性タンパク質の局在化」Clin. Exp. Immunol., 第43巻: 第565-573頁

２８．　Lagrand, W.K., Niessen, H.W.M., Wolbink, G.-J., Jaspars, L.H., Visser, C.A., Verheugt, F.W.A., Meijer, C.J.L.M.とHack, C.E.（1997年）「急性心筋梗塞においては、Ｃ反応性タンパク質は補体と共にヒト心臓で局在化する」Circulation, 第95巻: 第97-103頁
２９．　Torzewski, J., Torzewski, M., Bowyer, D.E., Frohlich, M., Koenig, W., Waltenberger, J., Fitzsimmons, C. とHombach, V.（1998年）「Ｃ反応性タンパク質は、ヒト冠状動脈の初期アテローム部位の脈管内膜において、しばしばＴＣＣ（terminal complement complex）と共に局在化する」Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 第18巻: 第1386-1392頁
３０．　Wolbink, G.-J., Bossink, A.W.J., Groeneveld, A.B.J., de Groot, M.C.M., Thijs, L.G. とHack, C.E.（1998年）「敗血症患者における補体の活性化の一部は、Ｃ反応性タンパク質に媒介される」J. Infect. Dis., 第177巻: 第81-87頁
３１．　Vigushin, D.M., Pepys, M.B. とHawkins, P.N.（1993年）「健康な場合と病気の場合における放射性ヒトＣ反応性タンパク質の代謝研究およびシンチグラフィによる研究」J. Clin. Invest., 第91巻: 第1351-1357頁
３２．　Kew, R.P., Hyers, T.M. とWebster, R.O.（1990年）「ヒトＣ反応性タンパク質は、インビトロで好中球の遊走を阻害する：成人呼吸窮迫症候群との関連可能性」J. Lab. Clin. Med., 第115巻: 第339-345頁
３３．　Heuertz, R.M., Xia, D., Samols, D. とWebster, R.O.（1992年）「血漿ウサギＣ反応性タンパク質を発現した遺伝子組み換えマウスは、Ｃ５ａにより誘導した血管透過性と好中球浸潤を示す」FASEB J., 第6巻: 第1064頁（要約）
３４．　Mold, C. とGewurz, H.（1980年）「リポソームによる補体活性化第２経路の活性化：Ｃ反応性タンパク質の阻害効果」Fed. Proc., 第39巻: 第702頁
３５．　Mold, C. とGewurz, H.（1981年）「リポソームとStreptococcus pneumoniaeによる補体活性化第２経路Ｃにおけるｃ反応性タンパク質の阻害効果」J. Immunol., 第127巻: 第2089-2092頁
３６．　Gershov, D., Kim, S., Brot, N. とElkon, K.B.（2000年）「Ｃ反応性タンパク質は、アポトーシスを起こした細胞に結合し、ＴＣＣ（terminal complement complex）の会合から細胞を保護し、抗炎症作用を示す生体本来の免疫反応を持続させる」J. Exp. Med., 第192巻: 第1353-1363頁
３７．　Griselli, M., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Taylor, K.M., Sohail, M., Krausz, T. とPepys, M.B.（1999年）「Ｃ反応性タンパク質と補体は、急性脳梗塞における組織ダメージの重要な媒介である」J. Exp. Med., 第190巻: 第1733-1739頁
３８．　Shine, B., de Beer, F.C. とPepys, M.B.（1981年）「Ｃ反応性タンパク質の固相ラジオイムノアッセイ」Clin. Chim. Acta, 第117巻: 第13-23頁
３９．　Hutchinson, W.L., Koenig, W., Frohlich, M., Sund, M., Lowe, G.D.O. とPepys, M.B.（2000年）「循環Ｃ反応性タンパク質のラジオイムノアッセイ：全成人人口における加齢に関連する値」Clin. Chem., 第46巻: 第934-938頁
４０．　Liuzao, G., Biasucci, L.M., Gallimore, J.R., Grillo, R.L., Rebuzzi, A.G., Pepys, M.B. とMaseri, A. （1994年）「重篤な狭心症におけるＣ反応性タンパク質と血清アミロイドＡタンパク質の予測値」N. Engl. J. Med., 第331巻: 第417-424頁
４１．　Kuller, L.H., Tracy, R.P., Shaten, J. とMeilahn, E,N.（1996年）「ＭＲＦＩＴネスティド・ケース・コントロール研究におけるＣ反応性タンパク質と冠状動脈性心臓病との関係」Am. J. Epidemiol., 第144巻: 第537-547頁
４２．　Haverkate, F., Thompson, S.G., Pyke, S.D.M., Gallimore, J.R. とPepys, M.B.（1997年）「安定狭心症と不安定狭心症におけるＣ反応性タンパク質の産生と冠状動脈事象の危険性」Lancet, 第349巻: 第462-466頁
４３．　Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P. とHennekens, C.H.（1997年）「外見上健康な男性における炎症とアスピリンと心血管系の疾病の危険性」N. Engl. J. Med., 第336巻: 第973-979頁

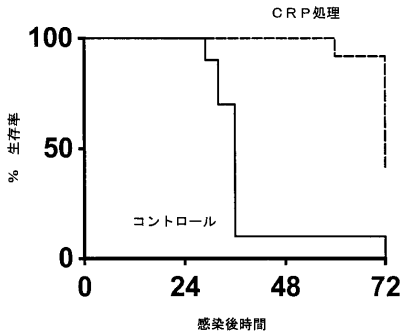
４４．　Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P. とHennekens, C.H.（1998年）「Ｃ反応性タンパク質の血漿濃度と末梢血管疾患の進行の危険性」Circulation, 第97巻: 第425-428頁
４５．　Ridker, P.M., Buring, J.E., Shin, J., Matias, M. とHennekens, C.H.（1998年）「外見上健康な女性におけるＣ反応性タンパク質と将来の心血管事象の危険性に関するプロスペクティブ研究」Circulation, 第98巻: 第731-733頁
４６．　Ridker, P.M.（1998年）「Ｃ反応性タンパク質と、将来における心筋梗塞と発作の危険性」Eur. Heart J., 第19巻: 第1-3頁
４７．　Danesh, J., Collins, R., Appleby, P. とPeto, R.（1998年）「冠状動脈性心臓病と、フィブリノーゲン、Ｃ反応性タンパク質、アルブミンまたは白血球数との関係」J. Am. Coll. Cardiol., 第279巻: 第1477-1482頁
４８．　Koenig, W., Sund, M., Frohlich, M., Fischer, H.-G., Lowel, H., Doring, A., Hutchinson, W.L. とPepys, M.B.（1999年）「Ｃ反応性タンパク質、炎症の高感度指標マーカー、健康な中年初期男性における将来的な冠状動脈性心臓病のリスク予想」Circulation, 第99巻: 第237-242頁
４９．　Danesh, J., Whincup, P., Walker, M., Lennon, L., Thomson, A., Appleby, P., Gllimore, J.R. とPepys, M.B.（2000年）「軽度の炎症と冠状動脈性心臓病：プロスペクティブ研究と最新のメタ分析」B.M.J., 第321巻: 第199-204頁
５０．　Zhang, Y.X., Cliff, W.J., Schoefl, G.I. とHiggins, G.（1999年）「冠状動脈におけるＣ反応性タンパク質の分布：そのアテローム性動脈硬化症の進行との関係」Atherosclerosis, 第145巻: 第375-379頁
５１．　Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M. とHemmes, M.（1999年）「補体とアテローム発生。ＣＲＰが脱顆粒し酸化されていないＬＤＬに結合すると、補体の活性化が増強される。」Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 第19巻: 第2348-2354頁
５２．　Cermak, J., Key, N.S., Bach, R.R., Balla, J., Jacob, H.S. とVercellotti, G.M.（1993年）「Ｃ反応性タンパク質は、組織因子を合成するために、ヒト末梢血中単球を誘導する」Blood, 第82巻: 第513-520頁
５３．　de Beer, F.C., Hind, C.R.K., Fox, K.M., Allan, R., Maseri, A. とPepys, M.B.（1982年）「心筋虚血と心筋梗塞における血漿Ｃ反応性タンパク質濃度の測定」Br. Heart J., 第47巻: 第239-243頁
５４．　Ueda, S., Ikeda, U., Yamamoto, K., Takahashi, M., Nixhinaga, M., Nago, N. とShimada, K.（1996年）「急性心筋梗塞後における心臓破裂の予測因子としてのＣ反応性タンパク質」Am. Heart J., 第131巻: 第857-860頁
５５．　Pietila, K.O., Harmoinen, A.P., Jokiniitty, J. とPasternack, A.I.（1996年）「急性心筋梗塞における血漿Ｃ反応性タンパク質濃度、およびその後24時間における血栓溶解剤による治療中患者の当該濃度と死亡率との関係」Eur. Heart J., 第17巻: 第1345-1349頁
５６．　Morrow, D.A., Rifai, N., Antman, E.M., Weiner, D.L., McCabe, C.H., Cannon, C.P. とBraunwald, E.（1998年）「Ｃ反応性タンパク質は、急性冠症候群において、トロポニンＴとの組合わせにより或いは独立して死亡率の予測因子となる可能性がある：ＴＩＭＩ　１１Ａサブスタディ。心筋梗塞症における血栓溶解」J. Am. Coll. Cardiol., 第31巻: 第1460-1465頁
５７．　Tommasi, S., Carluccil, E., Bentivoglio, M., Buccolieri, M., Mariotti, M., Politano, M. とCorea, L.（1999年）「併発症を伴わない心筋梗塞症から最初の一年後において、心虚血事象のマーカーとしてのＣ反応性タンパク質」Am. J. Cardiol., 第83巻: 第1595-1599頁
５８．　de Winter, R.J., Bholasingh, R., Lijmer, J.G., Koster, R.W., Gorgels, J.P.M.C., Schouten, Y., Hoek, F.J.とSanders, G.T.（1999年）「不安定狭心症患者または非Ｑ波心筋梗塞患者におけるＣ反応性タンパク質とトロポニンＩの独立予測値」Cardiovasc. Res., 第42巻: 第240-245頁

５９．　Nikfardjam, M., Mullner, M., Schreiber, W., Oschatz, E., Exner, M., Domanovits, H., Laggner, A.N. とHuber, K.（2000年）「急性心筋梗塞患者の入院時におけるＣ反応性タンパク質と死亡率との関係」J. Intern. Med., 第247巻: 第341-345頁
６０．　Beranek, J.T.（1997年）「心筋梗塞と心筋梗塞後の心不全におけるＣ反応性タンク質と補体」Eur. Heart J., 第18巻: 第1834-1835頁
６１．　Beranek, J.T.（1998年）「心筋梗塞後の心臓破裂におけるＣ反応性タンク質」Am. Heart J., 第136巻: 第563-564頁
６２．　van Leeuwen, M.A., van Rijswijk, M.H., Sluiter, W.J., van Riel, P.L.C.M., Kuper, I.H., van de Putte, L.B.A., Pepys, M.B. とLimburg, P.C.（1997年）「放射性物質によるダメージの進行と、関節リウマチの初期における急性期反応との関係。意思決定支援システムの発展について」J. Rheumatol., 第24巻: 第20-27頁
６３．　Boralessa, H., de Beer, F.C., Manchie, A., Whitwam, J.G. とPepys, M.B.（1986年）「心臓手術を受ける患者におけるＣ反応性タンパク質」Anaesthesia, 第41巻: 第11-15頁
６４．　Eda, S., Kaufmann, J., Roos, W. とPohl, S.（1998年）「測定感度とダイナミックレンジにおいて優れた特徴を有するＣ反応性タンパク質のための新規な微粒子増強比濁アッセイの開発」J. Clin. Lab. Anal., 第12巻: 第137-144頁
６５．　Baltz, M.L., Rowe, I.F. とPepys, M.B.（1985年）「Ｃ反応性タンパク質の消失に関するインビトロ研究」Clin. Exp. Immunol., 第59巻: 第243-250頁
６６．　Pepys, M.B. 特許出願番号第0119370.5: 「治療用タンパク質の涸渇」（ロンドン大学付属カレッジ, 2001年出願）
６７．　Pepys, M.B., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Lachmann, H.J., Gallimore, J.R., Lovat, L.B., Bartfai, T., Alanine, A., Hertel, C., Hoffmann, T., Jakob-Roetne, R., Norcross, R.D., Kemp, J.A., Yamamura, K., Suzuki, M., Taylor, G.W., Murray, S., Thompson, D., Purvis, A., Kolstoe, S., Wood, S.P. とHawkins, P.N.（2002年）「ヒトアミロイドーシスの治療のための血清アミロイドＰ成分を標的とする薬物による涸渇」Nature, 第417巻: 第254-259頁
６８．　Thompson, D., Pepys, M.B. とWood, S.P.（1999年）「ヒトＣ反応性タンパク質とそのホスホコリンとの複合体の生理学的構造」Structure, 第7巻: 第169-177頁

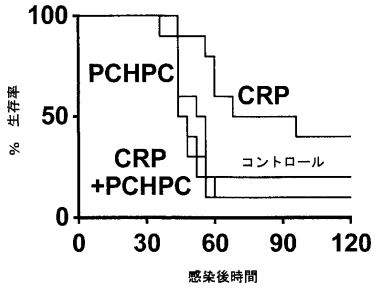
【図７】




【図８】

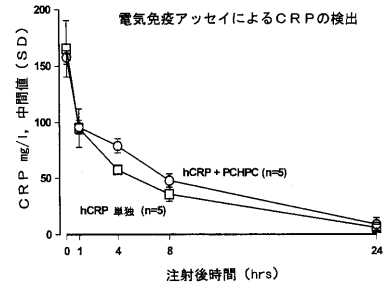



【図９】

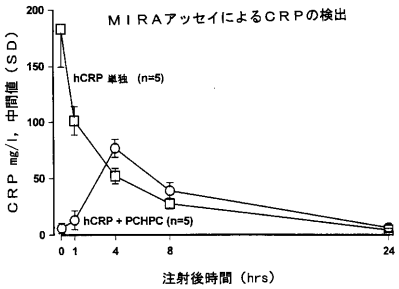



【図１０】

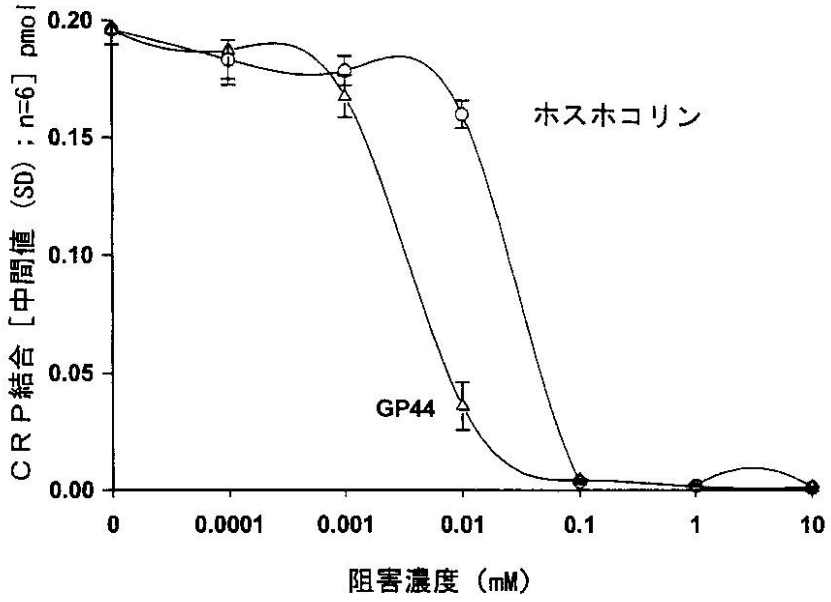
（a）




（b）

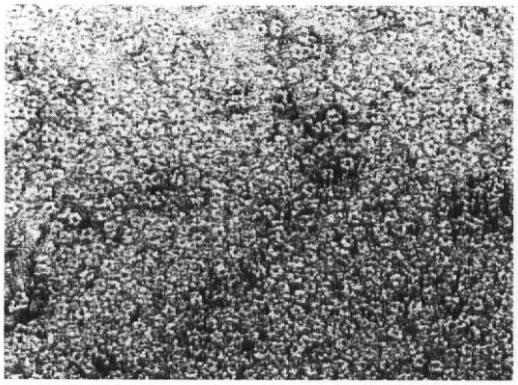


【図１】

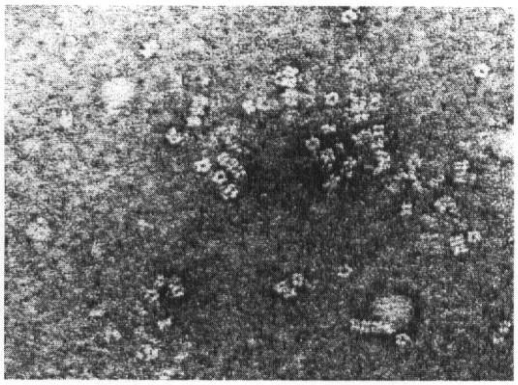

CRP結合［中間値（SD）；n=6］pmol
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
阻害濃度（mM）
ホスホコリン
GP44

【図２】

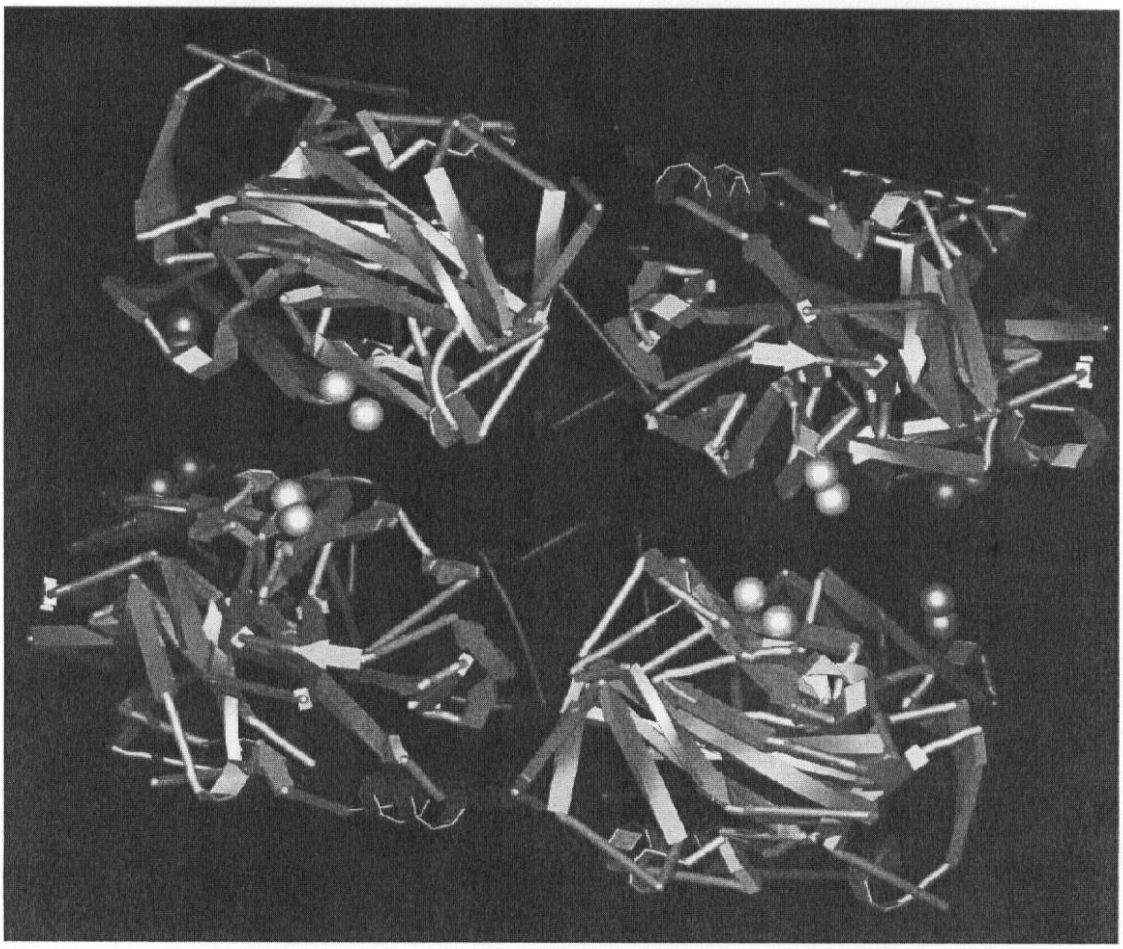
２ａ



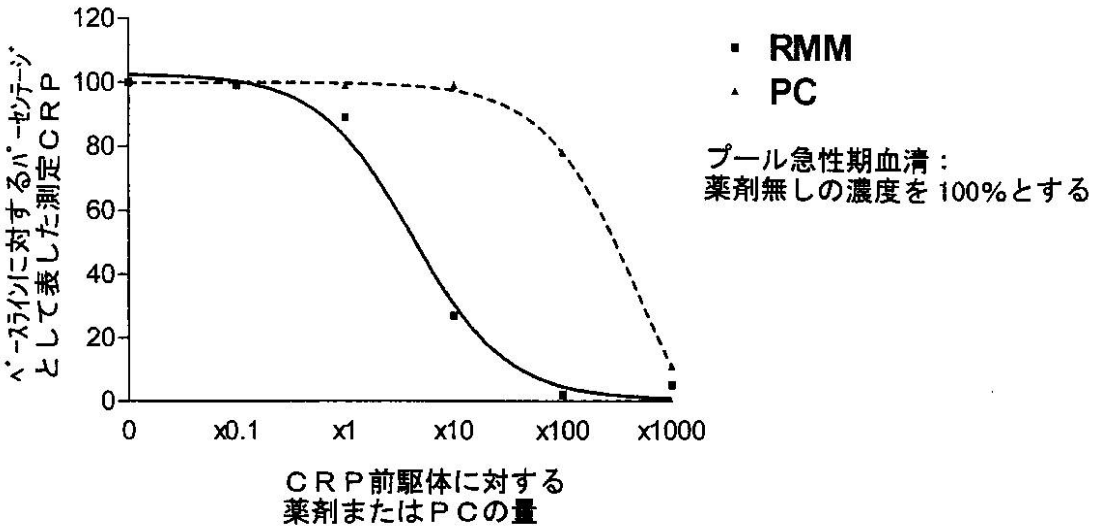
２ｂ



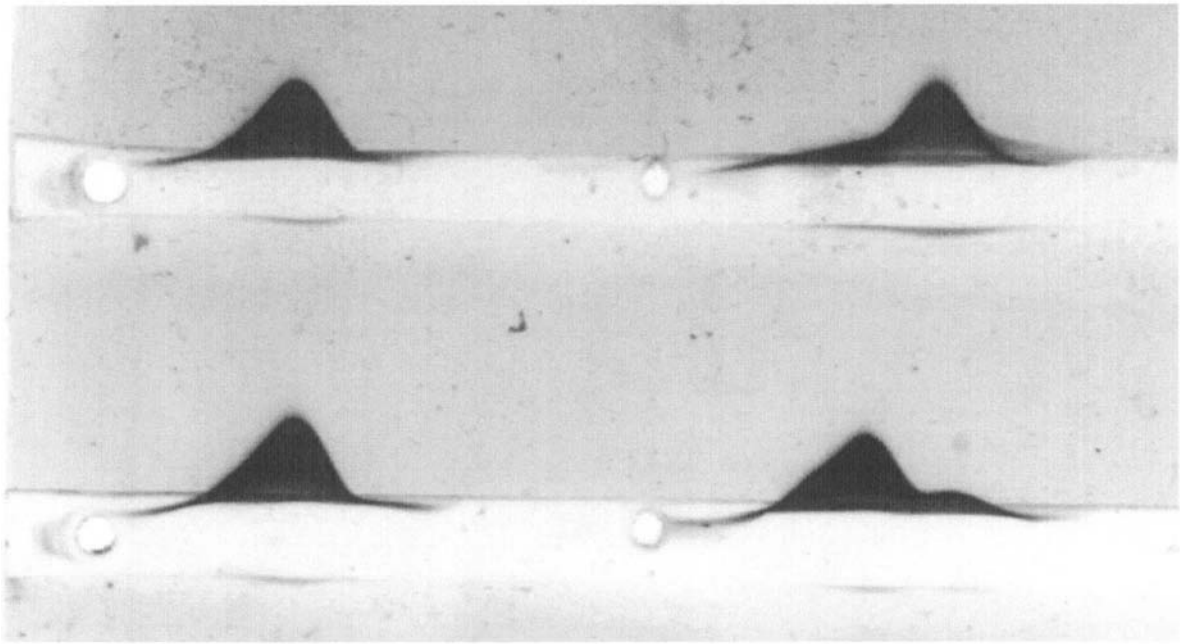
２ｃ



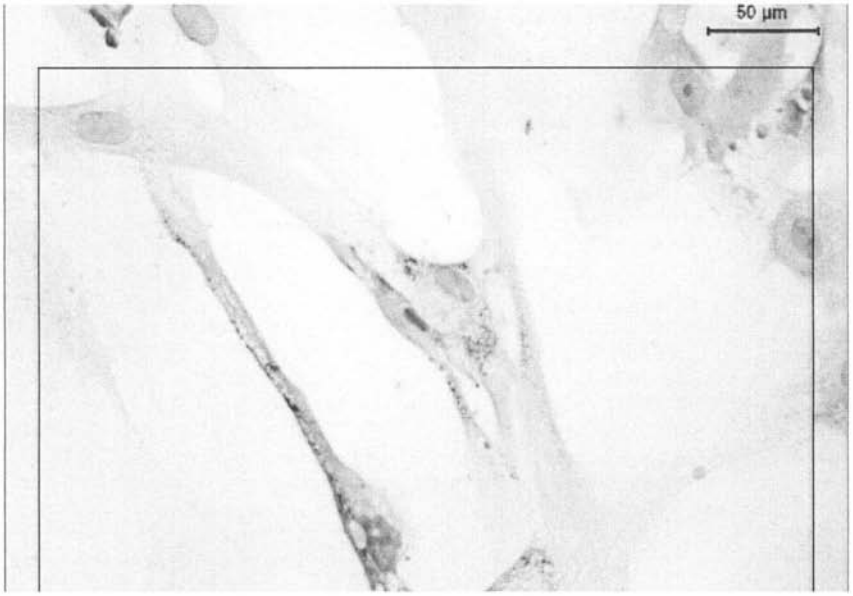
【図３】

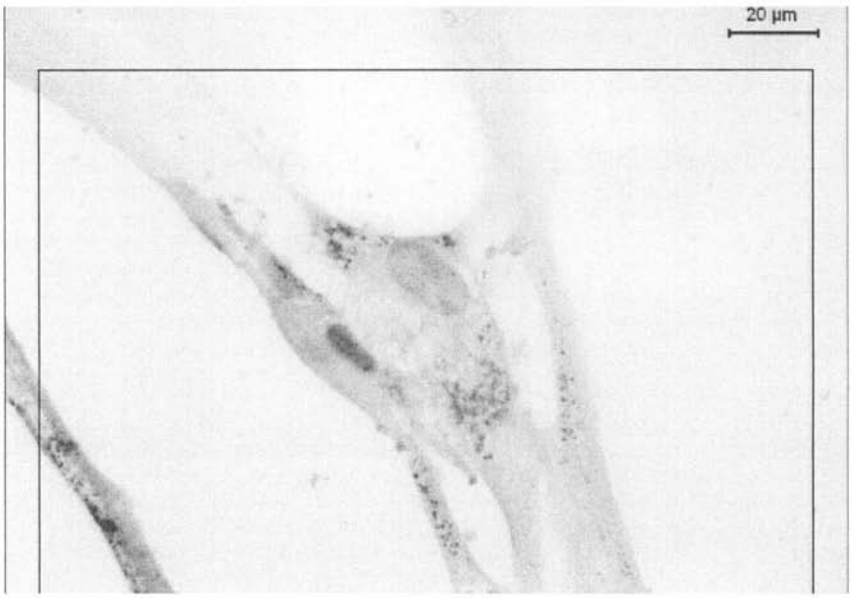

120
100
80
60
40
20
0
ベースラインに対するパーセンテージとして表した測定ＣＲＰ
0
x0.1
x1
x10
x100
x1000
ＣＲＰ前駆体に対する
薬剤またはＰＣの量
RMM
PC
プール急性期血清：
薬剤無しの濃度を100%とする

【図４】

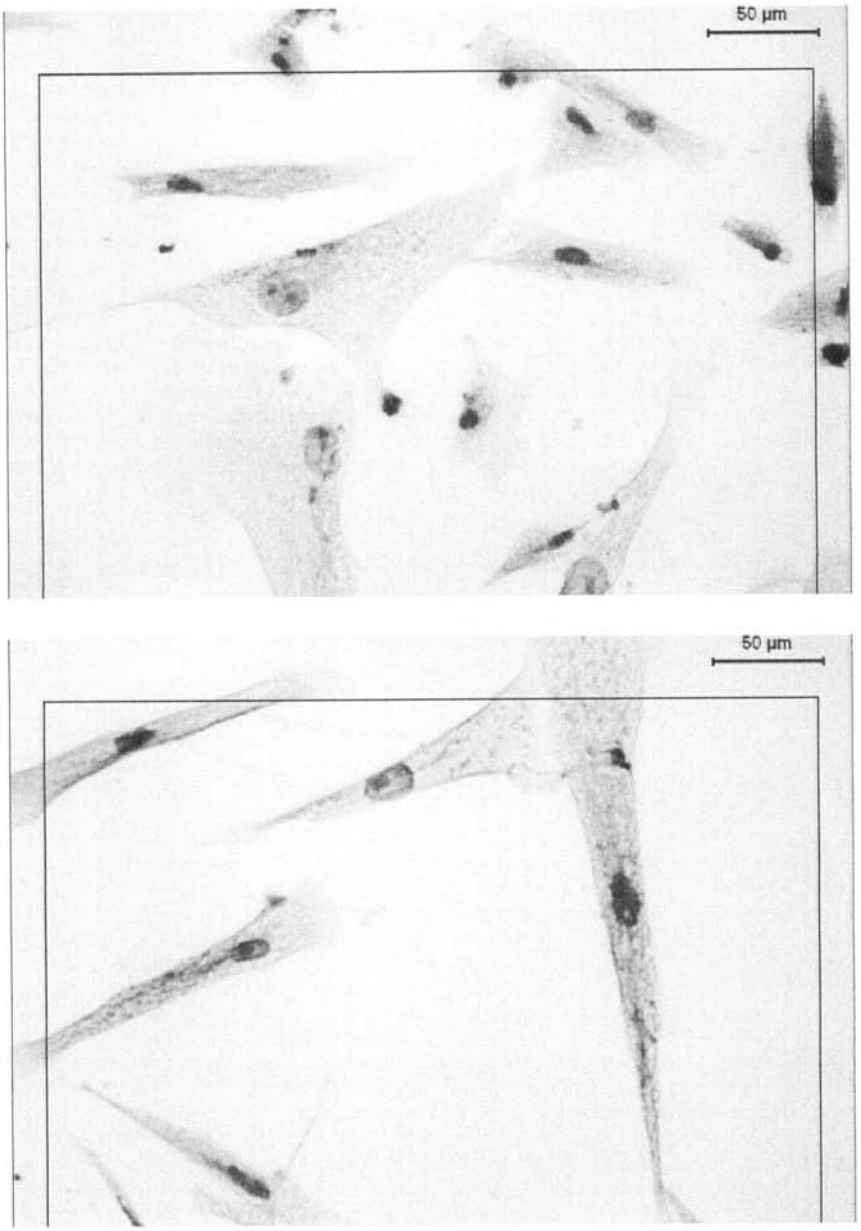


【図５】



【図６】



【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International ation No
PCT/GB 03/02096

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48 A61K49/00

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)
IPC 7 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, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | PEPYS M B ET AL: "Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 417, no. 6886, 2002, pages 254-259, XP002219442 ISSN: 0028-0836 | 1-42 |
| X | abstract | 1,8-10, 39-42 |
| | -/-- | |

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in 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.
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 25 September 2003 | 23/10/2003 |

| Name and mailing address of the ISA | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Berte, M. |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International ation No
PCT/GB 03/02096

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | CHRISTNER R B ET AL: "Binding of human serum amyloid P-component to phosphocholine." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS. 1 NOV 1994, vol. 314, no. 2, 1 November 1994 (1994-11-01), pages 337-343, XP002255627 ISSN: 0003-9861 abstract | 1-42 |
| Y | LIUZZO G ET AL: "The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 18 AUG 1994, vol. 331, no. 7, 18 August 1994 (1994-08-18), pages 417-424, XP0008022408 ISSN: 0028-4793 figure 1; table 1 | 1-42 |
| P,X | WO 03 013508 A (UNIV LONDON ; PEPYS MARK B (GB)) 20 February 2003 (2003-02-20) | 1 |
| P,Y | claims | 1-42 |
| P,X | HIRSCHFIELD G M ET AL: "Therapeutic inhibition of C-reactive protein - novel drugs, novel mechanisms." CLINICAL SCIENCE (LONDON), vol. 104, no. Supplement 49, 2003, pages 65P-66P, XP0008022417 & SPRING MEETING OF THE MEDICAL RESEARCH SOCIETY; LONDON, UK; FEBRUARY 05, 2003 ISSN: 0143-5221 abstract | 1-42 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 03/02096

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB 03 02096

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

Continuation of Box I.2

Present claims 1-42 relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many options that a lack of clarity (and conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and concise), namely compounds have been searched recited in the examples .

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International on No
PCT/GB 03/02096

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 03013508 A | 20-02-2003 | WO 03013508 A1 | 20-02-2003 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

| (51)Int.Cl.[7] | FI | テーマコード（参考） |
|---|---|---|
| Ａ６１Ｐ 17/00 | Ａ６１Ｐ 13/12 | |
| Ａ６１Ｐ 17/02 | Ａ６１Ｐ 17/00 | |
| Ａ６１Ｐ 19/02 | Ａ６１Ｐ 17/02 | |
| Ａ６１Ｐ 21/00 | Ａ６１Ｐ 19/02 | |
| Ａ６１Ｐ 29/00 | Ａ６１Ｐ 21/00 | |
| Ａ６１Ｐ 31/00 | Ａ６１Ｐ 29/00 | |
| Ａ６１Ｐ 31/04 | Ａ６１Ｐ 29/00 １０１ | |
| Ａ６１Ｐ 31/12 | Ａ６１Ｐ 31/00 | |
| Ａ６１Ｐ 33/00 | Ａ６１Ｐ 31/04 | |
| Ａ６１Ｐ 35/00 | Ａ６１Ｐ 31/12 | |
| Ａ６１Ｐ 37/08 | Ａ６１Ｐ 33/00 | |
| Ａ６１Ｐ 39/00 | Ａ６１Ｐ 35/00 | |
| Ａ６１Ｐ 43/00 | Ａ６１Ｐ 37/08 | |
| | Ａ６１Ｐ 39/00 | |
| | Ａ６１Ｐ 43/00 １０５ | |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ペピィズ マーク ビー
イギリス国 ロンドン エヌダブリュー１１ ６ティーイー ２２ ワイルドウッド ロード
(72)発明者 レイ スティーヴン ヴィクター
イギリス国 ケンブリッジ シービー３ ９エイチエイチ １２ ワーズワース グローブ
(72)発明者 コッブ アレキサンダー ジョン アンドレ
イギリス国 ハーツ エスジー６ ４キューエフ ７２ マーメット アベニュー レチワース ガーデン シティ

Ｆターム(参考) 4C084 AA17 MA01 NA14 ZA312 ZA392 ZA402 ZA452 ZA662 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZB072 ZB112 ZB132 ZB152 ZB212 ZB262 ZB332 ZB352 ZC372
4C086 AA01 AA02 AA03 DA38 MA01 MA04 NA14 ZA31 ZA39 ZA40 ZA45 ZA66 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35 ZC37