

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6363693号
(P6363693)

(45) 発行日 平成30年7月25日(2018.7.25)

(24) 登録日 平成30年7月6日(2018.7.6)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/737	(2006.01)
A 61 K 38/46	(2006.01)
A 61 P 7/02	(2006.01)
A 61 P 43/00	(2006.01)
	A 61 K 31/737 Z N A
	A 61 K 38/46
	A 61 P 7/02
	A 61 P 43/00 1 2 1

請求項の数 18 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2016-503772 (P2016-503772)
(86) (22) 出願日	平成26年3月21日 (2014.3.21)
(65) 公表番号	特表2016-516079 (P2016-516079A)
(43) 公表日	平成28年6月2日 (2016.6.2)
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/060039
(87) 国際公開番号	W02014/147597
(87) 国際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)
審査請求日	平成29年2月7日 (2017.2.7)
(31) 優先権主張番号	13305340.5
(32) 優先日	平成25年3月21日 (2013.3.21)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591100596
アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メ
ディカル
フランス国、エフー 75013 パリ、リ
ュ・ドゥ・トルビアック 101

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血栓性疾患におけるフィブリン溶解のための媒介物としてのアミノフコイダン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フコイダン部分の還元末端と1つ以上のアミノ基を含む化学基との間の共有結合によりアミノ化される、フコイダン部分からなるt-P A結合特性を有する媒介物。

【請求項 2】

式(I):

FUCO-C1-[NH]y-[L]z-[NH]x-R1 (I)

(式中、

- 「FUCO」が、フコイダン鎖に共有結合した1つ以上の1級アミン基を場合により含有する、フコイダン部分を意味し、

10

- x、y、及びzが、0又は1を意味する独立した整数であり、
- C1が、フコイダン部分の還元末端に位置する糖単位の1位の炭素原子であり、
- Lが、リンカーであり、
- R1が、1つ以上のアミノ基を含むか、又は1つのアミノ基に存する化学基であり

、
- L及びR1が、独立し、等しいか又は異なっていてもよい)
の化合物である、請求項1記載の媒介物。

【請求項 3】

式(I)(式中、

- R1が、1級アミン末端の直鎖又は分岐炭化水素鎖を含むか、又はこれに存する化

20

学基、アミノ酸、ポリアミノ酸、及び／又はリジン、ポリリジン、アルギニン、ポリアルギニン、オルニチン、ポリオルニチン、-アミノ酪酸、ポリアミン、ポリエーテルアミン、又はグアニジン基若しくは1級アミンを含む任意の他の化学基を含むか、又はこれに存するリストにおいて選択される化学基であり、

ここで、

- 当該化学基が、5つ又は6つの炭素原子を有する1つ以上の非芳香族炭化水素環により場合により中断され、

- 当該化学基が、1つ以上のヘテロ原子により場合により中断され、

- 当該化学基が、1つ以上のアミド基及び／又は1つ以上のエステル基の場合により含有し、

10

- 当該化学基が、1つ以上のアミン基により場合により置換されており、

- 当該化学基が、(a)直鎖又は分岐炭化水素鎖、(b)アミノ酸又はポリアミノ酸、(c)ポリアミン又はポリエーテルアミン、(d)-アミノ酪酸、(e)グアニジン基、及び(f)1級アミンから選択される同一又は異なる1つ以上の基により場合により中断されるか、及び／又は置換される)

の化合物である、請求項1又は2記載の媒介物。

【請求項4】

フコイダンが、フコイダン鎖に共有結合した基を含有する1級アミンを更に含む、請求項1～3のいずれか一項記載の媒介物。

【請求項5】

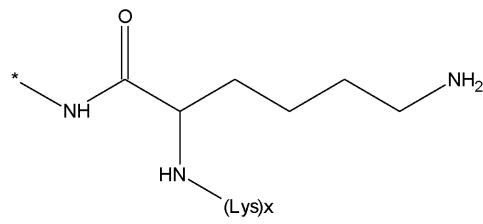
R1又はLが1～4個のアミン基により置換されている、請求項1～4のいずれか一項記載の媒介物。

20

【請求項6】

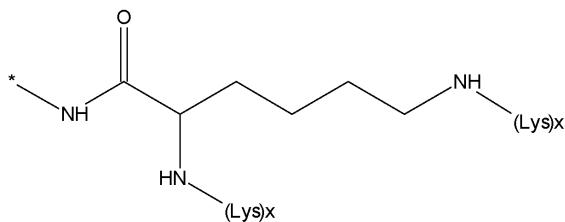
[NH]_x-R1が、式(VI)又は(VII)：

【化15】



30

(VI), 又は



(VII)

40

(式中、

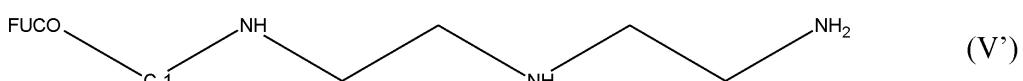
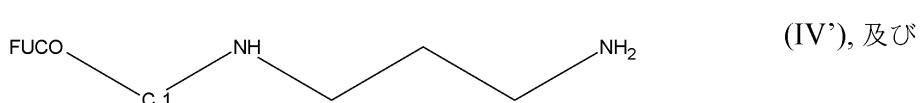
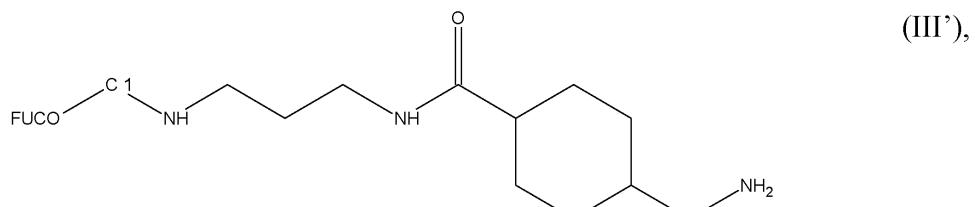
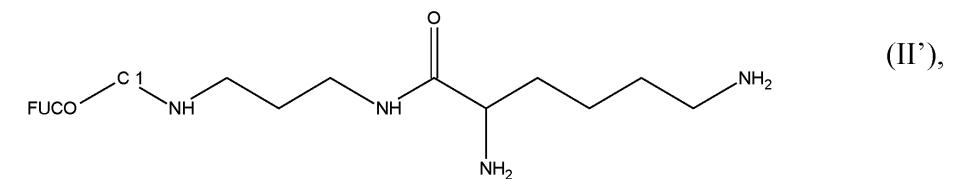
- <<lys>>が、リジン又はリジン誘導体であり、

- xが、少なくとも1に等しいか又はそれより大きい)

のものである、請求項1～5のいずれか一項記載の媒介物。

【請求項7】

【化 1 6】



からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の媒介物。

【請求項 8】

フコイダン部分が、1 0 0 0 0 0 Da未満である平均分子量を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の媒介物。

【請求項 9】
30

フコイダン部分がポリ硫酸化される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の媒介物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の媒介物の t - PA との複合体を含む、媒介物化された t - PA。

【請求項 11】

40 : 1 ~ 1 : 1 の範囲にある媒介物の t - PA に対するモル比を有する、請求項 10 記載の媒介物化された t - PA。

【請求項 12】

医薬として使用するための、請求項 10 ~ 11 のいずれか一項記載の媒介物化された t - PA。

【請求項 13】
40

対象における血栓を予防又は治療するための有効成分として使用するための、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項記載の媒介物化された t - PA。

【請求項 14】

a) 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の媒介物を用意すること、

b) t - PA を用意すること、及び

c) ステップ a) で用意された媒介物をステップ b) で用意された t - PA と接触させて、当該媒介物と t - PA の間の複合体を得ること
のステップを含む、媒介物化された t - PA を製造する方法。

【請求項 15】
50

- 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の媒介物を含む第 1 の容器、及び
 - t - P A を含む第 2 の容器
- を含む、キット。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の媒介物及び t - P A を含み、当該媒介物及び当該 t - P A が無水形態である、容器。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の媒介物の t - P A との複合体を含む、医薬組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の媒介物を含む非経口投与のための医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、急性血管性血栓性疾患の予防及び治療のための改良されたシステム及び分子ストラテジーに関する。

【0 0 0 2】

より詳細には、本発明は、組織プラスミノーゲンアクチベーターに結合するアミン含有部分、及び静脈内注射された t - P A をその血漿輸送中に保護すること、及びそれを血管内血栓に媒介することの両方をすることができる媒介システムを行う、血栓に結合するフコイダン部分を含むキメラ双極分子により、組織プラスミノーゲンアクチベーター（本明細書において t - P A としても言及される）の血栓への媒介を用いた、静脈内組換え組織プラスミノーゲンアクチベーターにより誘導されるフィブリン溶解に関する。

20

【0 0 0 3】

従って、この態様の 1 つにより、本発明は、フコイダン部分の還元末端と 1 つ以上のアミノ基を含む化学基との間の共有結合によりアミノ化される、フコイダン部分からなる t - P A 結合特性を有する媒介物に関する。

【0 0 0 4】

この態様の別のものにより、本発明は、媒介物化された t - P A 、及び / 又はそれを含む医薬組成物、並びに当該血栓に媒介物化された t - P A 又は医薬組成物を製造する方法に関する。

30

【0 0 0 5】

発明の背景

止血は、止血性血餅の形成を導く本質的な恒常システムとして定義される。止血は、出血、又は放血、及び本明細書において血栓症としても言及される病的な閉塞性の血液の血餅の出現のリスクを回避するために、微調整されなければならない。急性血栓性現象は、西洋諸国における死亡率及び罹患率の主要な原因のままである。

【0 0 0 6】

血餅の形成は、凝固カスケード及び血小板の協調された活性化に由来する。これは、凝固酵素複合体のアセンブリーをサポートする血小板、及び凝固の最終酵素を活性化する拡大されたプロセスであり、トロンビンは、血小板の強力なアクチベーターである。最終産物は、表面上かつ重合フィブリン線維の特異的部位を発現する血小板の凝集を含む。凝固及び血小板のそれぞれの役割は、血管床及びレオロジー状態により変動し得、血小板及びフィブリンは、それぞれ、動脈性血栓及び静脈性血栓においてより優勢である。

40

【0 0 0 7】

動的プロセスとしての凝固のより良好な理解のため、当業者はまた、補完的な情報のため、Kottke-Marchant 及び Lefkowitz (KOTTKE-MARCHANT & LEFKOWITZ, 2008, Chapter 1 - Coagulation Pathway and Physiology. An Algorithmic Approach to Hemostasis Testing) に言及し得る。

【0 0 0 8】

止血性血餅が形成されるとき、組織修復（治癒）を可能にする、第 2 の血餅吸収を誘発

50

する更なる生物学的機序を熟考しなければならない。これらの第2の機序は、血餅除去システム、又は<<フィブリン溶解>>として一般に言及され得る。

【0009】

血餅が構築と破壊の間の永久的平衡にあることを熟考しなければならない。血栓性血餅が動脈又は静脈において形成されるとき、血餅の自然吸収は、下流組織を不可逆的虚血から保護するのに効率的であるにはあまりに遅い。従って、2つのストラテジーを現在用いて、血栓症を治療する、(i) 抗血小板薬物及び抗凝固薬物により血餅の増加性形成を制限すること、及び(ii) フィブリン溶解を誘導することにより、血餅破壊を増強すること。

【0010】

本発明は、この第2のストラテジーに言及する。

10

【0011】

フィブリン溶解剤経路は、アクチベーターとインヒビターの両方を含む。従って、フィブリン溶解剤経路の<<アクチベーター>>は、フィブリンの溶解を誘発する能力を有し得る一方、フィブリン溶解剤経路の<<インヒビター>>は、逆の作用を有し得る。

【0012】

形成中、血餅は、その吸収に必要とされる成分にさらされ、フィブリンは、結合部位を循環する酵素前駆体プラスミノーゲン及びそのアクチベーターである組織型プラスミノーゲンアクチベーター(t-PA)にさらす。フィブリン、プラスミノーゲン及びt-PAが関連する3つからなる複合体の形成は、フィブリン溶解の有効性を確かにし、血流へのその拡大を妨げる(線溶現象)。フィブリン結合プラスミノーゲンは、Arg-561-Va1562にてそのアクチベーター t-PA により切断され、2本鎖タンパク質分解酵素プラスミンに結合したジスルフィド結合を生じる。

20

【0013】

t-PA及びプラスミンが、フィブリンネットワーク上で発現したリジン残基のカチオニン残基、主にアミン(NH₂)基に結合することは、周知である(Lijnen et al., 2001, Elements of the fibrinolytic system. Ann NY Acad Sci, 936, 226-236)。

【0014】

更に、プラスミノーゲンは、高い親和性でカルボキシ末端のリジン(Lys)に結合する。フィブリンのプラスミン切断は、新規カルボキシ末端Lysにさらされ、更なるプラスミノーゲン結合部位及び更なるプラスミンを形成させる(增幅プロセス)。対照的に、TAFI(トロンビン活性化線溶阻害因子)、カルボキシペプチダーゼは、カルボキシ末端Lysを取り除き、プラスミノーゲンの結合を妨げ、フィブリン溶解を阻害する。t-PAはまた、側鎖遊離アミンに結合する。

30

【0015】

リジン模倣物、例えば、-アミノカプロン酸又はトランセキサム酸(Royston, 1995, Blood-sparing drugs: Aprotinin, tranexamic acid, and epsilon-aminocaproic acid, Int Anesthesiol Clin)は、プラスミノーゲンをC末端リジン残基から移し、これにより、フィブリン溶解を制限する。他方、アミン結合t-PAは、セルピン、主に、内皮プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター又はセルピンE1としても公知のプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター(PAI-1)により阻害から保護される。

40

【0016】

急性の非介入性処置は、本明細書においてrt-PA(Alteplase、Actilyse(登録商標)又はTenecteplase、Metalyse(登録商標)、Boehringer Ingelheim)としても言及される、主に組換え組織プラスミノーゲンアクチベーターの静脈注射のままである。例えば、国際的なガイドラインは、急性脳卒中における組換えt-PAの超早期IV注射を推奨する(group IST et al., 2012, The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): A randomised controlled trial, Lancet)。しかし、組換えt-PA抹消注射の有効性は、

50

- 全血中の強力な化合物の希釈化、
 - キレート剤、例えば、P A I - 1をその血漿輸送中に循環させることによる組換え
 - t - P A の阻害、
 - 血栓への r t - P A 結合の低い初期レベル、
 - 高用量及び遅延した注射のための出血のリスクの増大
- に起因して 10 % に制限される。

【0017】

更に、t - P A の血栓溶解作用は有益であるが、現在用いられる、必要とされる高用量範囲でその神経毒性が問題になる。

【0018】

r t - P A を血漿インヒビターから仮に保護するために、A r g の存在下 (Alteplase 形成) であることが条件付けられる。アミン残基の保護作用はまた、シャペロンとしてのアネキシン 2 の使用で利用される。実に、細胞表面でのプラスミノーゲンと t - P A の共存は、細胞がフィブリン溶解において制御的役割を果たすことを可能にする。アネキシン 2 - S 1 0 0 A 1 0 複合体は、t - P A 及びプラスミノーゲンの認識のため正しい 3 次元配向性の C 末端 L y s の提示のおかげで、プラスミノーゲンの活性化のためのかかるプラットフォームを提供する (Madureira et al., 2011 The role of the annexin A2 hetero tetramer in vascular fibrinolysis, Blood)。この文脈において、アネキシン A 2 は、t - P A の I V 注射のためのシャペロンとして首尾よく提案されている (Zhu et al., 2010, Annexin 2 combined with low-dose t-PA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke, J Cereb Blood Flow Metab)。このストラテジーに対する制限は、t - P A 媒介の不存在、及びアネキシン A 2 が産生するには非常に高価な組換えタンパク質であるという事実である。

【0019】

急性血管性血栓性疾患に関連する改善された治療についての一般的な需要が存在する。従って、この有効成分の毒性副作用を少なくとも穏やかにするために、現在投与されるものより少ない t - P A 量でより治療上有効な t - P A の新規形態又は t - P A に由来する活性な化合物についての緊急の需要が存在する。

【0020】

従って、血漿循環中の t - P A の保護、及び血栓へのその効率的媒介は、重要な挑戦を表す。

【0021】

発明の概要

本発明は、t - P A 及び血栓の両方に結合する能力を有し、治療的 t - P A をその生物学的に標的することができる、化合物に関する。

【0022】

本発明は、t - P A 結合特性及び t - P A 保護特性を有する基を含有するアミンに共有結合した血栓標的化フコイダンを含む媒介物化合物に関する。

【0023】

フコイダン部分の血栓結合特性を用いて、治療的化合物を血餅に標的化する。

【0024】

従って、本発明は、フコイダン部分の還元末端と 1 つ以上のアミノ基 (- N H₂)、例えば、1 級アミン基又はグアニジン基を含む化学基との間の共有結合によりアミノ化される、フコイダン部分からなる t - P A 結合特性を有する媒介物に関する。

【0025】

ある種の実施態様において、当該媒介物は、式 (I) :

F U C O - C 1 - [N H] y - [L] z - [N H] x - R 1 (I)

(式中、

- 「F U C O」は、フコイダン鎖に共有結合した 1 つ以上の 1 級アミン基を場合により含有する、フコイダン部分を意味し、

10

20

30

40

50

- x、y、及びzは、0又は1を意味する独立した整数であり、
- C1は、フコイダン部分の還元末端に位置する糖単位の1位の炭素原子であり、
- Lは、リンカーであり、
- R1は、1つ以上のアミノ基を含むか、又は1つのアミノ基に存する化学基であり

 - L及びR1は、独立し、等しいか又は異なっていてもよい)
 の化合物である。

【0026】

- いくつかの実施態様において、当該媒介物は、式(I)（式中、
 - R1は、1級アミン末端の直鎖又は分岐炭化水素鎖を含むか、又はこれに存する化学基、アミノ酸、ポリアミノ酸、及び/又はリジン、ポリリジン、アルギニン、ポリアルギニン、オルニチン、ポリオルニチン、-アミノ酪酸、ポリアミン、ポリエーテルアミン、又はグアニジン基若しくは1級アミンを含む任意の他の化学基を含むか、又はこれに存するリストにおいて選択される化学基であり、
 ここで、
 - 当該化学基は、5つ又は6つの炭素原子を有する1つ以上の非芳香族炭化水素環（複数を含む）、好ましくは、5つ又は6つの炭素原子を有する多くとも1つの非芳香族炭化水素環により場合により中断され、
 - 当該化学基は、1つ以上のヘテロ原子により場合により中断され、
 - 当該化学基は、1つ以上のアミド基及び/又は1つ以上のエステル基、特に、1つ以上のアミド基を場合により含有し、
 - 当該化学基は、1つ以上のアミン基により場合により置換されており、
 - 当該化学基は、(a)直鎖又は分岐炭化水素鎖、(b)アミノ酸又はポリアミノ酸、(c)ポリアミン又はポリエーテルアミン、(d)-アミノ酪酸、(e)グアニジン基、及び(f)1級アミンから選択される同一又は異なる1つ以上の基（複数を含む）により場合により中断されるか、及び/又は置換される）
 の化合物である。

【0027】

当該媒介物のいくつかの実施態様において、フコイダン部分は、100000Da未満であり、好ましくは、20000Da未満であり、特に、2000Da~15000Daの範囲にある、平均分子量を有する。
 30

【0028】

本発明はまた、上で定義された媒介物のt-PAとの複合体を含む媒介物化されたt-PAに関する。

【0029】

いくつかの実施態様において、当該媒介物化されたt-PAは、40:1~1:1、好ましくは、20:1~3:1、最も好ましくは、15:1~5:1の範囲にある、媒介物のt-PAに対するモル比を有する。

【0030】

本発明はまた、
 a) 上で定義された媒介物を用意すること、
 b) t-PAを用意すること、及び
 c) ステップa)で用意された媒介物を、ステップb)で用意されたt-PAと接触させて、当該媒介物とt-PAの間の複合体を得ること
 のステップを含む、媒介物化されたt-PAを製造する方法に関する。
 40

【0031】

本発明はまた、
 - 上で定義された媒介物を含む第1の容器、及び
 - t-PAを含む第2の容器
 を含むキットに関する。
 50

【0032】

本発明はまた、上で定義された媒介物の t - P A との複合体を含む医薬組成物、並びに当該医薬組成物の治療上の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】アミノフコイダンに媒介物化された t - P A による血小板リッチ血栓のインピト口溶解。血小板リッチ血餅を、 r t - P A (対照、第1のカラム) 、又はアミノフコイダンに対して複合体化された r t - P A (2番目、3番目及び4番目のカラム) 、又は非アミノ化フコイダン (カラム7) 、又はフコイダン単独 (カラム6) と共にインキュベーションした。フィブリン溶解を測定し、 y 軸において百分率として表す。平均値を水平の棒 (1条件当たり n = 3) で示す。 Di - 1 y s 及び Tr i - 1 y s (2番目のカラム及び3番目のカラム) は、それぞれ、ジ - リジン及びトリ - リジンの略語である。 Ac - Tra n (4番目のカラム) はトラネキサム酸の略語であり、 D E T A (5番目のカラム) はジエチレントリアミンの略語である。
10

【図2】マウスにおける媒介物化された t - P A による腸間膜血栓のインピボ溶解。時間 0 にて、 Fe C l₃ への暴露により、腸間膜血管の血栓症を誘導し、 T = 10 / 15 分にて発生させた。 r - t P A (対照) 又はアミノフコイダン結合 r t P A により、血栓溶解を誘導した。 40 ~ 50 分においてアミノフコイダンにより誘導したときのみ、溶解を観察した。腸間膜の暴露した血管を、可視光 (左カラム) 、及び t - P A - F I T C を用いて蛍光 (右カラム) の両方で観察する。
20

【0034】

発明の詳細な説明

フコイダンは、褐海藻から主にもたらされる硫酸化多糖類 (ポリアニオン) の一種に言及し、 Sialyl-Lewis^X (Li et al., 2008, Fucoidan: Structure and bioactivity, Molecules) の天然に存在する模倣物である。

【0035】

sialyl Le^X 及び SLe^X としても公知の Sialyl Lewis^X は、細胞の表面上の O - グリカン又は N - グリカンに結合され得、細胞と細胞の認識に重要である四糖類炭水化物である。

【0036】

これは、血小板 P - セレクチン (Bachelet, 2009, Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets, Bioc him Biophys Acta) 、及びインピボの腔内血栓 (Rouzet et al., 2011, Radiolabeled fu coidan as a P-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thro mbus and 内皮 activation, J Nucl Med) を結合することができる。
30

【0037】

アミノフコイダンが、腔内血管性血餅に対する組織プラスミノーゲンアクチベーターのための媒介する剤として作用し得ることが、ここで示される。特に、アミノフコイダンが、対象及び / 又は血栓性疾患において腔内血栓の出現と関連する病態の予防及び / 又は処置のための媒介物として作用し得ることが示される。

【0038】

本発明により、 << 媒介物 >> 又は << 媒介物化剤 >> は、フコイダン又はフコイダン部分を、分子、特に、タンパク質を血液の血餅に運ぶためのビーグルとして含む、生物学的剤に言及する。
40

【0039】

<< 対象 >> 又は << 生物学的標的 >> は、セレクチンを産生し、及び / 又は含有し得る任意の生物学的実体であり得る。例えば、生物学的標的は、細胞、生体液、又は生物学的組織であり得る。生物学的標的は、生きている対象 (例えば、これは、採血により、又は生検により得られ得る) 、又は死亡した対象 (例えば、これは、検死時に得られ得る) に由来し得る。対象は、ヒト又は別の哺乳類であり得る。ある種の好ましい実施態様において、生物学的標的は、血管内血栓の出現と関連する臨床状態を有することが疑われる患者に由來
50

する。特に、当該対象は、慢性又は急性血栓性疾患又は血栓性障害に罹患し得る。

【0040】

本発明により、用語<<プラスミノーゲンのアクチベーター>>、又はt - PAはまた、天然t - PA及び組換えt - PA、例えば、2本鎖t - PA又は1本鎖組換えt - PAも包含する。ヒトにおいて、t - PAは、配列番号1のタンパク質であるか、又はHarrisら(Harris et al., 1986, Cloning of cDNA coding for human tissue-type plasminogen activator and its expression in Escherichia coli, Mol. Biol. Med. 3 (3), 279-292)に記載される。

【0041】

本発明により、フコイダンは、褐海藻及びいくつかの他の海洋無脊椎動物から主にもたらされる、実質的百分率のL - フコース及び硫酸エステル基を含有する、多糖類の一種に言及する。当該フコイダンは、当該技術分野で公知の種々の方法により得られることができ、更に以下で開発される。フコイダンの構造及び生物活性のより完璧な抄録について、当業者は、Liら(Li et al., 2008, Fucoidan : Structure and Bioactivity, Molecules)に言及し得る。

10

【0042】

用語<<フコイダン>>、<<フコイダン部分>>、<<フカン>>、<<フコサン>>及び<<硫酸化フカン>>は、本記載の目的上均等である。

【0043】

好ましい実施態様により、本発明は、セレクチン、それ故、血栓に対する高親和性、特異性、及び/又は選択性を発揮する任意のフコイダン実体に言及する。本発明の文脈において、フコイダン部分が媒介する剤として用いられるとき、これは、分子へのその特異性/選択性/親和性特性を確かにし、分子は、「血栓に標的化」される(すなわち、分子が、セレクチン及びフィブリンと特異的及び/又は効率的に相互作用し、及び/又は結合する)。用語「結合親和性」と「親和性」は、本明細書において互換的に用いられ、分子実体間の引力のレベルに言及する。親和性は、解離定数(KD)、又はその逆の結合定数(KA)として定量的に表され得る。

20

【0044】

本発明により、用語<<約>>は、10%より多いか、又は少ないと理解され得る。

【0045】

30

本発明により、<<血栓性疾患>>及び<<血栓性障害>>は、不所望の血管内血液血餅及び/又は血栓の出現、又は根強さと関連する疾患及び/又は障害である。

【0046】

本発明による血栓性障害及び疾患は、例えば、静脈血栓症、例えば、深部静脈血栓症、門脈血栓症、腎静脈血栓症、頸静脈血栓症、又は脳静脈洞血栓症の形成をもたらす。いくつかの場合において、当該血栓症は、本明細書において<<血栓性静脈炎>>としても言及される静脈炎、時に肺塞栓症を導き得る。これはまた、心不整脈と関連する心房性血栓及び心室性血栓を含む。

【0047】

これらはまた、しばしば動脈硬化プラークの破裂の結果である、動脈血栓症をもたらし得、この場合において、これは<<アテローム血栓症>>としても言及され得る。動脈血栓症は、例えば、脳卒中、心筋梗塞及び/又は動脈性塞栓を導き得る。

40

【0048】

血栓性疾患は当該技術分野で周知であり、種々の原因を有し得る。これらは、原因疾患又は後天性疾患であり得る。特に、これらは、遺伝性であるか、及び/又は遺伝的素因と結び付けられ得る。かかる疾患の例は、例えば、血友病、ファン・ヴィルブランド病、並びに凝固性亢進及び凝固性低下と結び付けられる他の凝固障害を含む。

【0049】

フコイダンは、優れた感受性及び特異性で血小板及びフィブリン含有血栓をインピボで標的にすることができる(Rouzet et al., 2011, Radiolabeled fucoidan as a P-select

50

in targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. J Nucl Med).

【0050】

本発明により、<<アミノフコイダン>>は、フコイダン部分の還元末端と1つ(モノ-アミンフコイダン)又はそれ以上のアミノ基(-NH₂)(ポリ-アミンフコイダン)、例えば、1級アミン基又はグアニジン基を含む化学基の間の共有結合によりアミノ化される、フコイダン部分である。好ましくは、当該化学基は、末端置換基(複数を含む)として1つ以上のアミノ基(-NH₂)を含むだけである。

【0051】

なおより好ましくは、当該化学基は、末端置換基(複数を含む)として1つ以上の1級アミンを含むだけである。 10

【0052】

本発明により、アミノ基(-NH₂)は、遊離(-NH₂)基を有する任意の化学基、特に、1級アミン基及びグアニジン基、より詳細には、1級アミン基に言及する。非限定的な方法において、化学基は、リジン、アルギニン、オルニチン、又は-L-アミノ酪酸に存する群において選択され得る。

【0053】

本発明により、「末端置換基」は、炭化水素鎖の末端の任意の置換基に言及する。

【0054】

本発明により、<<炭化水素鎖>>は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、又は44個の炭素原子を含む、1~44個の間の炭素原子、より詳細には、1~22個の間の炭素原子、なおより詳細には、1~10個の間の炭素原子を特に含み得る。 20

【0055】

好ましい実施態様により、当該化学基は、末端置換基(複数を含む)として1級アミン基に存する末端置換基(複数を含む)のみを含む。従って、当該アミノフコイダンは、本明細書において「リジン様/リジン模倣1級アミン末端修飾フコイダン」としても言及され得る。 30

【0056】

本発明により、アミノフコイダンは、その還元末端にて修飾されるフコイダンである。このため、その鎖に沿った硫酸塩基の量及び分布に依存する当該フコイダンの生物学的活性は、妨げられない。しかしながら、更なる1級アミンを、当該鎖を構成するフコースのヒドロキシル基に直接導入することも可能である。

【0057】

従って、特定の実施態様により、当該フコイダンは、フコイダン鎖に共有結合した基を含有する1級アミンを含む。

【0058】

特定の実施態様により、当該鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10個の1級アミン含有基を含む、1つのフコイダン鎖当たり平均1~10個の1級アミン含有基を含む。 40

【0059】

本発明により、「ヘテロ原子」は、好ましくは、窒素(N)、硫黄(S)及び酸素(O)、なおより好ましくは、窒素及び酸素から選択される原子に言及する。

【0060】

従って、本発明は、本明細書においてアミノフコイダンとしても言及される、当該双極媒介物を製造する双極分子プラットフォーム及び方法を提供する。

【0061】

本発明により、当該双極媒介物は、2つの主な特徴

- 1つの極（アニオン性フコイダン）は、血栓へ媒介することができる、
 - 1つの極は、少なくとも1つの1級アミン結合機能を介してt-PAと相互作用し、保護することができる、
 を有することが示されている。

【0062】

従って、本発明は、アミノフコイダンと組織プラスミノーゲンアクチベーター（t-PA）の間の複合体に関する。当該複合体は、非共有結合複合体である。

【0063】

特に、P-セレクチン（血小板の表面で発現される）をフコイダン部分により標的にすることは、血栓における又は近くでのt-PAの局所濃度を有利に増大し、次に、フィブリン溶解の速度の増大に関与する。
10

【0064】

有利には、アミノフコイダンの1つの極における1級アミンは、アミノ酸又はポリ-アミノ酸、特に、リジン、ポリ-リジン、又はリジン誘導体の一部、あるいは模倣物である。かかるリジン、ポリリジン、又はリジン誘導体は、t-PA、プラスミノーゲン及びフィブリンの間のアンカー残基として作用する。

【0065】

特に特定されない限り、「アミノ酸」、例えば、「リジン」は、アミノ酸及びその誘導体の両方に言及する。

【0066】

非限定的な方法で、アミン極はまた、t-PAを結合することができる1級アミン含有部分、例えば、リジン、アルギニン、オルニチン、又は-L-アミノ酪酸を含み得る。
20

【0067】

もちろん、得られたアミノフコイダンが、少なくとも1つの遊離アミノ基(-NH₂)、例えば、1級アミン又はグアニジン基を、末端置換基として含む限り、アミノ酸、又はポリアミノ酸は、当該技術分野で公知の任意の方法によりフコイダンに結合され得る。

【0068】

好ましい実施態様により、アミノ酸又はポリアミノ酸は、フコイダン、又はリンカーリーにアミド基を介して結合される。

【0069】

任意の特定の理論により結び付けられることを望むことなく、本出願人は、化合物のアミン部分へのt-PAの非共有結合が、これをセルピンから保護し、これがフィブリンにデリバリーされることを可能にすることが想定されると考える。
30

【0070】

本出願人はまた、フコイダン部分をt-PAにアミノ基、例えば、1級アミン、特に、アミノ酸及びアミノ酸誘導体を介して結合することは、t-PA内の立体構造の変化を誘導すると考える。次に、この構造の変化は、その活性部位を循環するインヒビターから保護し得、従って、血栓に対するt-PA/アミノフコイダン複合体の半減期及びバイオアベイラビリティの両方を増大する。

【0071】

本発明により、アミノ酸及び-L-又はそれらの誘導体は、L配置又はD配置、特に、L-配置を有し得る。
40

【0072】

本発明により、<<アミノ酸誘導体>>は、L配置又はD配置、特に、L配置、及び少なくとも1つの遊離アミノ基、特に、遊離1級アミン、好ましくは、2つ以上の遊離1級アミンを有する修飾されたアミノ酸である。

【0073】

修飾されたアミノ酸は、アミノ酸（ここで、側鎖は、同一又は異なる1つ以上の化学基（複数を含む）により、場合により中断されるか、又は置換される）である。

【0074】

10

20

30

40

50

特定されない限り、本発明による<<アミノ酸>>は、当該<<アミノ酸>>及びその誘導体の両方を包含し得る。

【0075】

有利には、アミノ酸は、ポリアミノ酸を形成するために、ペプチド結合（又はアミド基）により一緒に共有結合され得る。

【0076】

ポリアミノ酸（複数を含む）は、1、2、3、4、5つ又は6つのアミノ酸、特に、2又は4つのアミノ酸を有利に含む。

【0077】

特に、ポリアミノ酸は、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリグルタミン、ポリシトルリン、ポリオルニチン、及び好ましくは、ポリリジンからなるリストにおいて選択され得る。

【0078】

フコイダン部分が、t - PAにポリ - リジン（複数を含む）を介して結合されるとき、当該ポリ - リジン（複数を含む）は、1、2、3、4、5つ又は6つのリジン、特に、2又は4つのリジンを有利に含む。

【0079】

従って、リジンのデンドリマーはまた、本発明により「リジン誘導体」として考えられ得る。それらが市販で入手可能でないなら、Kim及びZimmermanら (Y. Kim and SC Zimmerman, 1998, << Applications of dendrimers in bioorganic chemistry >>, Current Opinion in Chemical Biology, vol. 2, pp 733-742)において記載されるプロトコールにより合成され得る。

【0080】

上述の通り、当該アミノフコイダンでの媒介は、血栓における又は近くでのt - PA濃度の増大を可能にし、当該t - PAをその血漿デリバリー中に保護する。従って、当該媒介は、t - PAの局所濃度を増大させること、またt - PAを他の化合物、及び／又はインヒビター、例えば、PAI - 1から保護することという2重の利点を有する。

【0081】

従って、1つの実施態様により、本発明は、フコイダン部分の還元末端と1つ以上のアミノ基を含む化学基との間の共有結合によりアミノ化される、フコイダン部分からなるt - PA結合特性を有する媒介物に関する。

【0082】

本発明により、用語<<還元末端>>は、アノマー炭素原子（ヘキソース、例えば、グルコースについてC1、及びペントース、例えば、フルクトースについてC2）は、遊離であり、グリコシド結合を形成するために用いられない末端である。

【0083】

特定の実施態様により、当該媒介物は、式(I)：

FUCO - C1 - [NH]_y - [L]_z - [NH]_x - R1 (I)

(式中、

- 「FUCO」は、フコイダン鎖に共有結合した1つ以上の1級アミン基を場合により含有する、フコイダン部分を意味し、

- x、y、及びzは、0又は1を意味する独立した整数であり、
- C1は、フコイダン部分の還元末端に位置する糖単位の1位の炭素原子であり、
- Lは、リンカーであり、
- R1は、1つ以上のアミノ基を含むか、又は1つのアミノ基に存する化学基であり、
- L及びR1は、独立し、等しいか又は異なっていてもよい）の化合物である。

【0084】

<<リンカー>>Lは、任意の化学基に言及し得、1級アミンを有するか、又は有さない化

10

20

30

40

50

学基を含む。

【0085】

より特定の実施態様により、当該媒介物は、式(I)(式中、y及びzは0を意味する)の化合物である。

【0086】

従って、当該実施態様により、当該媒介物は、式(I')：

FUCO-C1-[NH]_x-R1(I')

(式中、

- 「FUCO」は、フコイダン鎖に共有結合した1つ以上の1級アミン基を場合により含有する、フコイダン部分を意味し、

10

- xは、0又は1を意味する整数であり、

- C1は、フコイダン部分の還元末端に位置する糖単位の1位の炭素原子であり、

- Lは、リンカーであり、

- R1は、1つ以上のアミノ基を含むか、又は1つのアミノ基に存する化学基であり

、

- L及びR1は、独立し、等しいか又は異なっていてもよい)

の化合物である。

【0087】

いくつかの実施態様において、当該媒介物は、式(I)又は(I')

(式中、

20

- R1は、1級アミン末端の直鎖又は分岐炭化水素鎖を含むか、又はこれに存する化学基、アミノ酸、ポリアミノ酸、及び/又はリジン、ポリリジン、アルギニン、ポリアルギニン、オルニチン、ポリオルニチン、-アミノ酪酸、ポリアミン、ポリエーテルアミン、又はグアニジン基若しくは1級アミンを含む任意の他の化学基を含むか、又はこれに存するリストにおいて選択される化学基であり、

ここで、

- 当該化学基は、5つ又は6つの炭素原子を有する1つ以上の非芳香族炭化水素環(複数を含む)、好ましくは、5つ又は6つの炭素原子を有する多くとも1つの非芳香族炭化水素環により場合により中断され、

- 当該化学基は、1つ以上のヘテロ原子により場合により中断され、

30

- 当該化学基は、1つ以上のアミド基及び/又は1つ以上のエステル基、特に、1つ以上のアミド基を場合により含有し、

- 当該化学基は、1つ以上のアミン基により場合により置換されており、

- 当該化学基は、(a)直鎖又は分岐炭化水素鎖、(b)アミノ酸又はポリアミノ酸、(c)ポリアミン又はポリエーテルアミン、(d)-アミノ酪酸、(e)グアニジン基、及び(f)1級アミンから選択される同一又は異なる1つ以上の基(複数を含む)により場合により中断されるか、及び/又は置換される)

の化合物である。

【0088】

1つの実施態様により、Lは、1級アミン末端の直鎖又は分岐炭化水素鎖を含むか、又はこれに存するリンカー、アミノ酸、ポリ-アミノ酸、及び/又はリジン、ポリリジン、アルギニン、ポリアルギニン、グルタミン、ポリグルタミン、シトルリン、ポリシトルリン、オルニチン、ポリオルニチン、-アミノ酪酸、ポリアミン、ポリエーテルアミン、又はグアニジン基若しくは1級アミンを含む任意の他の化学基を含むか、又はこれに存するリストにおいて選択される化学基であり、

40

ここで、

- 当該化学基は、5つ又は6つの炭素原子を有する1つ以上の非芳香族炭化水素環(複数を含む)、好ましくは、5つ又は6つの炭素原子を有する多くとも1つの非芳香族炭化水素環により場合により中断され、

- 当該化学基は、1つ以上のヘテロ原子により場合により中断され、

50

- 当該化学基は、1つ以上のアミド基及び／又は1つ以上のエステル基、特に、1つ以上のアミド基を場合により含有し、

- 当該化学基は、1つ以上のアミン基により場合により置換されており、
- 当該化学基は、(a)直鎖又は分岐炭化水素鎖、(b)アミノ酸又はポリアミノ酸、(c)ポリアミン又はポリエーテルアミン、(d)-アミノ酪酸、(e)グアニジン基、及び(f)1級アミンから選択される同一又は異なる1つ以上の基(複数を含む)により場合により中断されるか、及び／又は置換される。

【0089】

別の特定の実施態様により、当該媒介物は、式(I)又は(I')(式中、

- R1は、1級アミン末端の直鎖又は分岐炭化水素鎖を含むか、又はこれに存する化学基、アミノ酸、ポリ-アミノ酸、及び／又はリジン、ポリリジン、アルギニン、ポリアルギニン、グルタミン、ポリグルタミン、シトルリン、ポリシトルリン、オルニチン、ポリオルニチン、-アミノ酪酸、ポリアミン、ポリエーテルアミン、又はグアニジン基若しくは1級アミンを含む任意の他の化学基を含むか、又はこれに存する化学基である)の化合物である。

【0090】

別の特定の実施態様により、当該媒介物は、式(I)又は(I')(式中、R1又はLは、1つ、2つ、3つ又は4つのアミン基を意味する1～4つのアミン基により置換される)の化合物である。

【0091】

別の特定の実施態様により、当該媒介物は、式(I)又は(I')(式中、R1及び／又はLは、1、2、3又は4つのアミン基及び／又は1つ、2つ、3つ、又は4つのエステル基を意味する1～4つのアミド基及び／又は1～4つのエステル基により置換される)の化合物である。

【0092】

より詳細な実施態様により、当該媒介物は、式(I)又は(I')(式中、Lは、1～22個の炭素原子、特に、1～10個の炭素原子、より詳細には、1～5個の炭素原子の直鎖又は分岐炭化水素鎖、特に、直鎖炭化水素鎖を意味し、ここで、

- 当該炭化水素鎖は、1つ以上のヘテロ原子により場合により中断され、
- 当該炭化水素鎖は、1つ以上のアミド基を場合により含有し、
- 当該炭化水素鎖は、1つ以上のアミン基により場合により置換される)の化合物である。

【0093】

特定の実施態様により、Lは、(CH₂)₂、(CH₂)₃及び(CH₂)₂-NH-(CH₂)₂、好ましくは、(CH₂)₃及び(CH₂)₂-NH-(CH₂)₂に存する群において選択される。

【0094】

有利には、R1が、アミノ酸又はポリアミノ酸のリストにおいて選択される化学基であるとき、当該アミノ酸又はポリアミノ酸は、フコイダンに当該アミノ酸の(a)C末端の末端(-COOH)、又は(b)N末端の末端(-NH₂)のいずれかを介して結合され得る。

【0095】

好ましくは、アミノ酸又はポリアミノ酸は、フコイダンに当該アミノ酸のC末端の末端(-COOH)を介して結合される。

【0096】

本発明により、アミノ酸又はポリアミノ酸の「N末端の末端」又は「C末端の末端」は、このアミノ酸の炭素により生じた、それぞれ、1級アミン(-NH₂)及びカルボキシ基(-COOH)として理解されなければならない。

【0097】

もちろん、アミノ酸又はポリアミノ酸が、そのN末端の末端(-NH₂)を介して結合

10

20

30

40

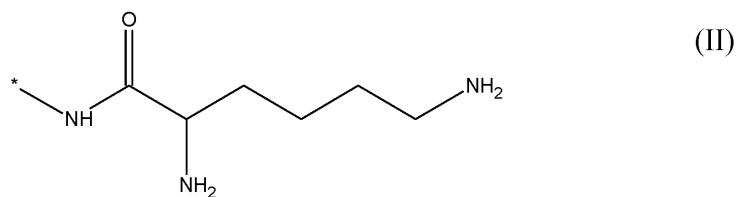
50

されるとき、血栓に対する媒介物化された t - P A に適當な少なくとも 1 つの遊離アミノ基を生じるアミノフコイダンを得るために、少なくとも 1 つの更なる遊離 1 級アミン又は遊離グアニジン基を末端置換基として生じるアミノ酸、又は誘導体を選択しなければならない。

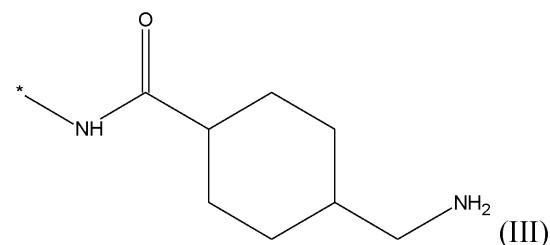
【 0 0 9 8 】

別の特定の実施態様により、当該媒介物は、式 (I) 又は (I') (式中、 - [N H] x - R 1 は、

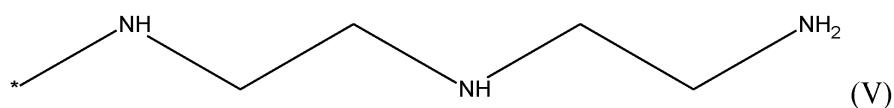
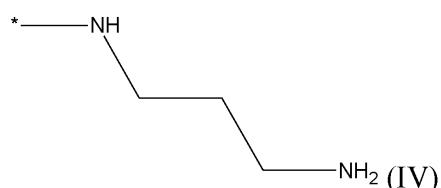
【 化 1 】



10



20



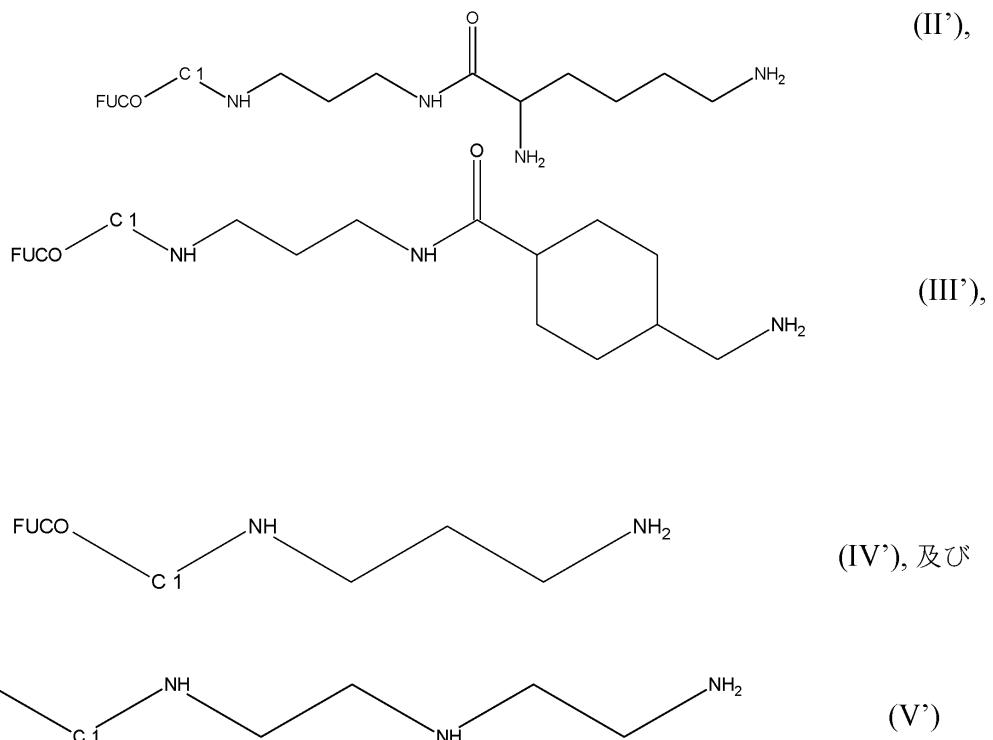
30

からなる群から選択される) の化合物である。

【 0 0 9 9 】

好みしい実施態様により、当該媒介物は、

【化2】



(式中、

- 「FUCO」は、フコイダン鎖に共有結合した1つ以上の1級アミン基を場合により含有する、フコイダン部分を意味し、
- C1は、フコイダン部分の還元末端に位置する糖単位の1位の炭素原子である)からなる群より選択される。

【0100】

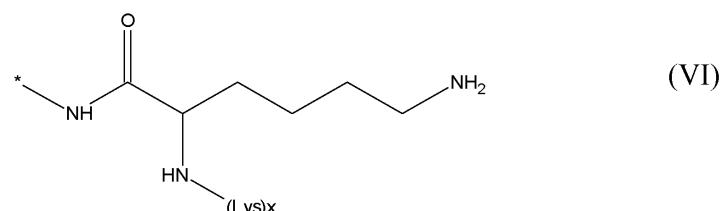
特定の実施態様により、当該媒介物は、ポリ-リジン又はリジン誘導体、特に、ポリ-リジンを含む、式(I)又は(I')の化合物である。

30

【0101】

この特定の実施態様により、-[NH]_x-R1は、式(VI)：

【化3】



(式中、

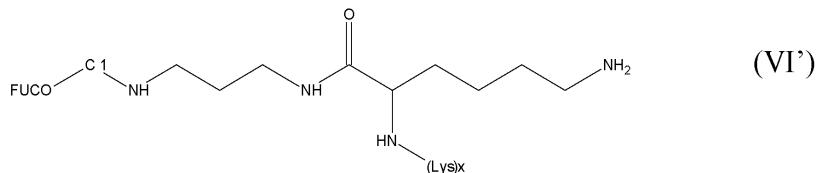
- <<lys>>は、リジン又はリジン誘導体、好ましくは、リジンであり、
 - xは、少なくとも1に等しいか又はそれより大きく、好ましくは、2、3、4、5又は6、最も好ましくは、2又は4と等しい)
- のものであり得る。

【0102】

従って、好ましい実施態様により、当該媒介物は、式(VI')：

40

【化4】



(式中、

- 「FUCO」は、フコイダン鎖に共有結合した1つ以上の1級アミン基を場合により含有する、フコイダン部分を意味し、

10

- C1は、フコイダン部分の還元末端に位置する糖単位の1位の炭素原子であり、

- <<Lys>>は、リジン又はリジン誘導体であり、好ましくは、リジンであり、

- xは、少なくとも1に等しいか又はそれより大きく、好ましくは、2、3、4、5又は6に等しく、最も好ましくは、2又は4に等しい)

の化合物である。

【0103】

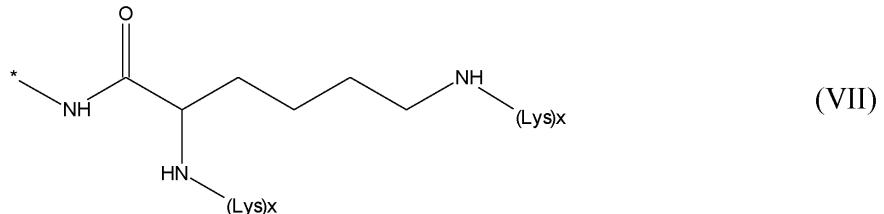
好ましい実施態様により、アミノ酸、例えば、リジンは、アミド基を介して共有結合して、ポリリジン又はデンドリマーを形成する。当該ポリリジン又はデンドリマーは、当該技術分野で公知の任意の方法により得られ得る。

【0104】

20

別の特定の実施態様により、-[NH]_x-R1及び/又はリジン誘導体は、式(VI I)：

【化5】



30

(式中、

- <<Lys>>は、リジン又はリジン誘導体であり、好ましくは、リジンであり、

- xは、少なくとも1に等しいか又はそれより大きく、好ましくは、2、3、4、5又は6に等しく、最も好ましくは、2又は4に等しい)

のものであり得る。

【0105】

従って、当該式(VI I)は、リジンのデンドリマーの一部であり得る。

【0106】

40

リジン及びポリリジンは別に、他のアミノ酸及びポリアミノ酸は、フコイダンに結合され得る。特に、本発明はまた、一般式(I)又は(I')(式中、R1は、アルギニン、ポリアルギニン、及び/又は任意の他のゲアニジン含有化学基からもたらされる)の媒介物に関する。

【0107】

ポリアミン及びポリエーテルアミン

別の実施態様により、当該媒介物は、式(I)又は(I')(式中、R1は、ポリアミン又はポリエーテルアミンからもたらされる)の化合物である。ポリエーテルアミンは、いずれかのモノアミンポリエーテルアミン、又はポリアミンポリエーテルアミン、例えば、ジアミン又はトリアミンポリエーテルアミン、好ましくは、ポリアミンポリエーテルアミンであり得る。

50

【0108】

有利には、ポリアミン及び／又はポリエーテルアミンは、フコイダン又はリンカーレにその遊離1級アミンのいずれか1つを介して結合され得る。

【0109】

特定の実施態様により、当該媒介物は、式(I)又は(I')（式中、R₁は、ポリエーテルアミンからなる群より選択される）の化合物である。

【0110】

かかるポリエーテルアミンは、当該技術分野において周知であり、JEFFAMINE（登録商標）ポリエーテルアミンの名称の下販売され得る。

【0111】

ポリエーテルアミンは、ポリエーテル骨格の末端に結合した1級アミン基を含有する。ポリエーテル骨格は、いずれかのプロピレンオキシド(PO)単位、エチレンオキシド EO)単位、又は混合PO/EO単位に基づく。

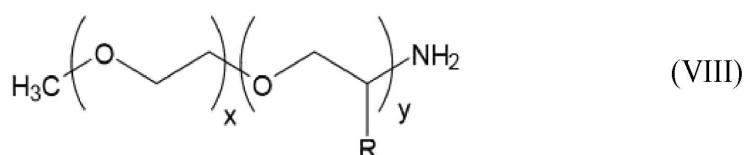
【0112】

従って、かかるポリエーテルアミンのポリエーテル骨格は、所定のPO/EO単位比に依存して変動し得る。ポリエーテルアミンは、1つの末端に1級アミン基(本明細書においてモノアミンとしても言及される)、2つの末端に1級アミン基(ジアミン)又は3つの末端に1級アミン基(トリアミン)を含み得る。

【0113】

本発明に適当なモノアミンポリエーテルアミンの一般式(VIII)は、本明細書において以下：

【化6】



(式中、Rは、(EO)についてH、又は(PO)についてCH₃であり、好ましくは、CH₃であり、

式中、x及びyは、等しいか又は異なっていてもよい)で付与される。

【0114】

かかるモノアミンは、モノ-アルコール開始剤のEO及び／又はPOとの反応、続いて得られた末端ヒドロキシル基のアミンへの変換により調製され得る。

【0115】

当該実施態様により、RがCH₃と等しいとき、y/x比は、特に、0.1~1.0、特に、0.15~0.9の範囲にあり得る。

【0116】

有利には、式(VIII)のモノアミンポリエーテルアミンは、500~5000g/mol⁻¹、特に、600~2000g/mol⁻¹の範囲にある平均分子量を有し得る。

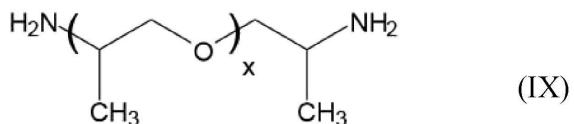
【0117】

上述の一般式に対応するモノアミンポリエーテルアミンは、JEFFAMINE（登録商標）モノアミン(Mシリーズ)、例えば、M-600、M-1000、M-2005及びM-2070として販売される。

【0118】

本発明に適当なジアミンポリエーテルアミンの第1の一般式(IX)は、本明細書において以下：

【化7】



(式中、 x は、1～100、特に、2～70の範囲にあり得る整数である)
で付与される。

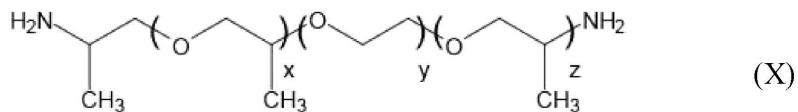
【0119】

有利には、式(IX)のジアミンポリエーテルアミンは、100～5000g/mol⁻¹、
特に、200～400g/mol⁻¹の範囲にある平均分子量を有し得る。 10

【0120】

本発明に適當なジアミンポリエーテルアミンの第2の一般式(X)は、本明細書において以下：

【化8】



(式中、 x 、 y 、及び z は、等しいか又は異なっていてもよく、
式中、 y は、1～50、特に、2～40の範囲にあり得、
式中、 x 及び z は、0～10、特に、0～6の範囲にあり得、
式中、 x と z の合計は、場合により1～6の範囲にあり得る)
で付与される。

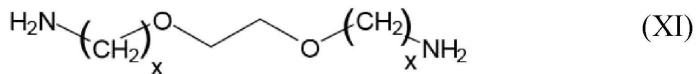
【0121】

有利には、式(X)のジアミンポリエーテルアミンは、100～5000g/mol⁻¹の範囲にある、特に、200～2000g/mol⁻¹の範囲にある平均分子量を有し得る。

【0122】

本発明に適當なジアミンポリエーテルアミンの第3の一般式(XI)は、本明細書において、以下：

【化9】



(式中、 x は、1～5、特に、1～3、好ましくは、2又は3の範囲にあり得る)
で付与される。

【0123】

有利には、式(XI)のジアミンポリエーテルアミンは、100～500g/mol⁻¹の範囲にある、特に、100～200g/mol⁻¹の範囲にある平均分子量を有し得る。 40

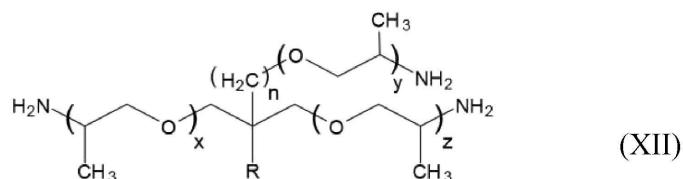
【0124】

ジアミンポリエーテルアミンは、JEFFAMINE(登録商標)ジアミン(D、ED、EDR
シリーズ)、例えば、D-230、D400、D-2000、D-4000、HK-51
1、ED-60D、ED-90D、ED-20D3、EDR-148、EDR-176として市販され得る。

【0125】

本発明に適當なトリアミンポリエーテルアミンの一般式(XII)は、本明細書において以下：

【化10】



(式中、nは、0又は1に等しくあり得、

式中、Rは、H又はC₂H₅を表し得、

式中、x、y及びzは、等しいか又は異なっていてもよく、0～100、特に、0～85の範囲にあり得、

式中、x、yとzの合計は、5～100、特に、5～85の範囲である)
で付与される。

【0126】

トリアミンポリエーテルアミンは、JEFFAMINE(登録商標)トリアミン(Tシリーズ)、例えば、T-403、T-3000、T5000として市販され得る。

【0127】

好ましくは、ポリエーテルアミンは、式(式中、x、y及びzは、2～10の範囲にある)のポリアミンポリエーテルアミン、より好ましくは、ジアミン又はトリアミンポリエーテルアミン、例えば、ポリエーテルアミンに存する群において選択され得る。

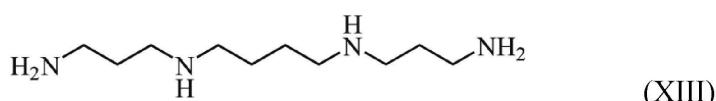
【0128】

あるいは、当該媒介物は、式(I)又は(I')(式中、R1は、ポリアミン、例えば、スペルミン又はスペルミジン、ジアミノプロパン又はジエチレントリアミンからもたらされる)の化合物である。

【0129】

スペルミンは、式(XIII)：

【化11】

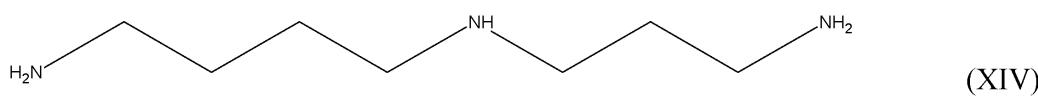


のポリアミンである。

【0130】

スペルミジンは、式(XIV)：

【化12】



のポリアミンである。

【0131】

ポリアミン又はポリエーテルアミンは、当該技術分野において公知の任意の方法、又は本明細書において後述されるか、又は実施例において示される任意の方法を用いて、フコイダン又はリンカーリンに結合される。

【0132】

例えば、ポリアミン又はポリエーテルアミンは、例えば、Belbekhoucheら(Belbekhouche S. et al., 2013, Carbohydrate Polymers, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.032>)において、フコイダンに還元的アミノ化を介してフコイダンの還元糖のアルデヒド官能基とポリエーテルアミンのアミン官能基との間の末端と末端のカップリング反

10

20

30

40

50

応により結合され得る。

【0133】

有利には、本発明の化合物は、本明細書において以下で定義されるか、又は実施例1、2、3及び4において説明される方法により更に得られ得る。

【0134】

媒介物化されたt-PA

従って、本発明はまた、

a) 本発明の媒介物を用意すること、

b) t-PAを用意すること、及び

c) ステップa)で用意された媒介物をステップb)で用意されたt-PAと接触させて、当該媒介物とt-PAの間の複合体を得ること

のステップを含む、媒介物化されたt-PAを製造する方法に関する。

【0135】

1つの実施態様により、本発明は、本発明による媒介物のt-PAとの複合体を含む媒介物化されたt-PAに更に關する。

【0136】

1つの実施態様により、本発明の媒介物又は媒介物化されたt-PAを含む組成物は、実質的に純粹な形態で考慮される。

【0137】

上で定義され、本発明による媒介物又は媒介物化されたt-PAを含む実質的に純粹な組成物は、当該組成物におけるフコイダンの総量、又は当該組成物におけるアミノ化フコイダンの総量のいずれかと比較して、主要な形態として、フコイダンがその還元末端にてアミノ化される媒介物又は媒介物化されたt-PAを含有し得る。

【0138】

当該実施態様により、実質的に純粹な組成物は、その還元末端にてアミノ化される媒介物のモル比において少なくとも50%を含有し得、ここで、当該モル比は、当該組成物におけるフコイダンの総量に基づく。

【0139】

あるいは、実質的に純粹な組成物は、その還元末端にてアミノ化される媒介物のモル比において少なくとも50%を含有し得、ここで、当該モル比は、当該組成物におけるアミノ化フコイダンの総量に基づく。

【0140】

従って、上で定義される実質的に純粹な組成物は、モル比において50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，又は100%でさえ含む、その還元末端にてアミノ化される媒介物のモル比において少なくとも50%、好ましくはそれより多くを含有し得る。

【0141】

上述の通り、双極媒介物の1つの極におけるアミン官能基の存在は、これがt-PA及びプラスミノーゲンと相互作用すること、及び保護することを可能にする。

【0142】

有利には、複合体として、又は医薬組成物の環境においてt-PAと相互作用し得る媒介物の平均量を変動することを可能にする。

【0143】

特定の実施態様により、媒介物化されたt-PAは、40:1~1:1、好ましくは、20:1~3:1、最も好ましくは、15:1~5:1の範囲にある媒介物のt-PAに対するモル比を有し得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 4 】

好ましい実施態様により、媒介物の t - P A に対するモル比は、媒介物がモノ - アミンフコイダンであるとき、約 10 : 1 であり、媒介物がポリ - アミンフコイダンであるとき、約 5 : 1 である。

【 0 1 4 5 】

従って、本発明による媒介物化された t - P A は、医薬としての使用が意図され得る。特に、当該媒介物化された t - P A は、対象における血栓を予防又は治療するための有効成分として使用することが意図され得る。

【 0 1 4 6 】

上記から、当業者は、本発明の媒介物又は媒介物化された t - P A 、あるいは本発明の媒介物又は媒介物化された t - P A を含む医薬組成物が、これを必要とする対象への投与に適当であるべきであることを理解する。 10

【 0 1 4 7 】

特に、かかる医薬組成物は、これを必要とする対象への非経口投与に適当であり、及び / 又は適合すべきである。

【 0 1 4 8 】

好ましくは、本発明の医薬組成物は、無菌であり、及び / 又は微生物を欠くべきである。

【 0 1 4 9 】**フコイダン部分**

フコイダン (f u c o s 、フコサン又は硫酸化フカンとも呼ばれる) は、抗凝固活性、抗血栓症活性、抗ウイルス活性、抗腫瘍活性、免疫調節活性、抗炎症活性、及び酸化防止活性を含む、広範囲の生物学的活性を有する硫酸化多糖類である。フコイダンは、主に褐海藻の種々の種において見出される (B. Li et al, Molecules, 2008, 13: 1671-1695; M . Kusaykin et al, Biotechnol. J., 2008, 3: 904-915) 。

【 0 1 5 0 】

特定の実施態様により、本発明に適当なフコイダン又はフコイダン部分は、海藻、特に、褐海藻から得られる。

【 0 1 5 1 】

フコイダンの変異体形態は、ナマコを含む海洋動物種においても見出されている。従つて、他の硫酸化多糖類と比較して、フコイダンは、種々の種類の安価な供給源から広く入手可能であり、当該技術分野において公知の抽出方法 (C. Collicet al, Phytochemistry, 1994, 35(3):697-700) を用いて容易に得られる。 30

【 0 1 5 2 】

これらの抽出方法は、70 ~ 800 kDa の範囲の分子量を有するフコイダンを一般的に生じる。プロセスはまた、例えば、約 20 kDa 未満 (欧州特許第 0 4 0 3 3 7 7 B 号、米国特許第 5 , 3 2 1 , 1 3 3 号) 、又は約 10 kDa 未満 (欧州特許第 0 8 4 6 1 2 9 B 号、米国特許第 6 , 0 2 8 , 1 9 1 号、 A. Nardella et al, Carbohydr. Res., 1996, 289: 201-208) の低分子量フコイダンにおいて高分子量フコイダンを脱重合するよう開発されている。 40

【 0 1 5 3 】

特定の実施態様により、本発明に適当なフコイダン又はフコイダン部分は、実施例 1 に記載される抽出方法及び脱重合化方法により得られる。

【 0 1 5 4 】

他の実施態様により、フコイダンは、以下の会社から商業的に得られ得る : Sigma-Aldrich 社 (米国) のフコイダン : 粗フコイダン (フカス・ベシキュロサス (Fucus vesiculosus)) ref F 5 6 3 1 、 C A S 番号 9 0 7 2 - 1 9 - 9 、 MM = 2 0 , 0 0 0 ~ 2 0 0 , 0 0 0 g/mol 、 Algues-et-Mer 社 (フランス) のフコイダン : Asphyscient (登録商標) (アスコフィラム・ノドサム (Ascophyllum nodosum) 由来) 、依頼に基づき、 MM = 5 , 0 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0 g/mol 、 Kraeber GmbH (ドイツ) のフコイダン : 依頼に基づき 50

、LMWF、8, 500g/mol、HMWF、600, 000g/mol、異なる褐藻類由来。

【0155】

フコイダンは、骨格分岐に存在し得る -1,3-L-Fuc 又は交互の -1,3-L-Fuc、-1,4-L-Fuc、又は -1,2-L-Fuc でできている直鎖骨格から一般的に作られる。硫酸塩基は、フコースの C-2 及び / 又は C-3 又は C-4 を占める。

【0156】

特定の実施態様により、フコイダンは、グリコシド結合後に 4 位及び 2 位又は 3 位にて主に硫酸化される -1,2- 結合 L-フコースポリマー又は -1,3- 結合 L-フコースポリマーである。しかしながら、フコース及び硫酸塩残基に加えて、フコイダンはまた、他の単糖（例えば、マンノース、ガラクトース、グルコース、キシロースなど）及びウロン酸基を含有する。異なる褐藻類由来のフコイダンの構造は、種から種で変動することは、当該技術分野において公知である。
10

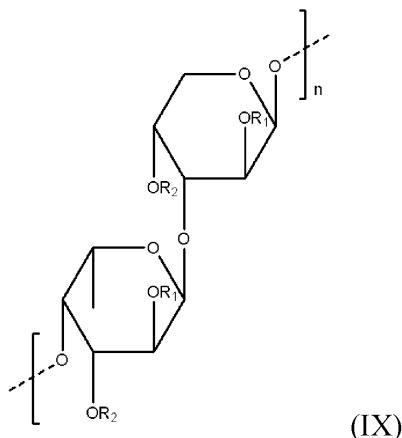
【0157】

フコイダンが、ウロン酸 (UA) 及び他のヘキソースを含有するとき、当該フコイダンの構造は、ウロン酸、ヘキソース（1 単位）、硫酸塩基、及びアセチル基からなる群において選択される置換基を生じるポリ硫酸化ポリ-L-フコース直鎖骨格の周りで構築され得る。例として、褐海藻アスコフィラム・ノドサムから抽出されたフコイダンの模式的に広く認められた構造は、Berteau 及び Mulloy、又は Pomin 及び Mourao (O. Berteau and B. Mulloy, 2003, Glycobiology, 13(6) 29-40, DOI: 10.1093/glycob/cwg058、V. Pomin and PAS Mourao, 2008, Glycobiology 18(12) 1016-1027, review, DOI: 10.1093/glycob/cwn085) において付与される。
20

【0158】

好ましい実施態様により、フコイダンは、式 (IX) :

【化13】



(式中、

- R₁ 及び R₂ は、独立して、他の H、硫酸塩基、アセチル基、ヘキソース及び / 又はウロン酸に由来するものを意味し、

- n は、1 に等しいか又はそれより大きい)
の繰返し単位を含み得る。

【0159】

更に、フコイダンの構造はまた、化学的に修飾され得る。例えば、方法は、過硫酸化フコイダン又は過硫酸化フコイダン断片を得るために、フコイダンの硫酸塩基の百分率を増大させるよう開発されている (T. Nishino et al, Carbohydr. Res., 1992, 229: 355-362; S. Soeda et al, Thromb. Res., 1993, 72: 247- 256)。

【0160】

特定の実施態様により、フコイダン又はフコイダン部分は、ポリ硫酸化される。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 1 】

より特定の実施態様により、当該ポリ硫酸化フコイダンは、1より高い、特に、1.2より高い、好ましくは、又は1.9以上の硫酸塩対糖の比を有する。

【 0 1 6 2 】

特定の実施態様により、フコイダン又はフコイダン部分は、フコイダン鎖に共有結合するが、当該フコイダンの還元末端に共有結合しない、1級アミンを含む。

【 0 1 6 3 】

あるいは、フコイダンがアミノフコイダンであるとき、当該アミノフコイダンは、フコイダン鎖に共有結合した1級アミンを更に含む。

【 0 1 6 4 】

当該実施態様により、当該フコイダン又はアミノフコイダンは、1本のフコイダン鎖当たり平均で1~10個の間の1級アミンを含み得る。

10

【 0 1 6 5 】

より特定の実施態様により、当該フコイダン又はアミノフコイダンは、フコイダン鎖、例えば、コースの遊離ヒドロキシル基にて1級アミンによりアミノ化される。

【 0 1 6 6 】

当該フコイダンの還元末端におけるアミノ化と異なる当該アミノ化は、例えば、実施例1において記載されるプロトコールを用いて達成され得る。

【 0 1 6 7 】

本発明における使用に適当なフコイダン部分は、媒介する剤の一部であるとき、セレクチン、特に、P-セレクチンに対してある程度の引力を有し、標的化する役割を果たし得るフコイダン部分である。好ましくは、フコイダン部分は、インピトロ及びインピボの条件下でそれらの親和性/特異性/選択性特性を保持する安定な無毒性実体である。好ましい実施態様において、フコイダン部分は、セレクチンに対して高い親和性及び特異性を発揮し、すなわち、それらは、セレクチンと特異的及び効率的に相互作用し、結合し、又は関連する。適当なフコイダン部分は、セレクチンの1つのみに対して(すなわち、L-セレクチン、E-セレクチン又はP-セレクチンに対して)親和性及び特異性を発揮するフコイダン、並びに全3つのセレクチンと効率的に相互作用し、結合し、又は関連し得る部分を含む、1つより多いセレクチンに対して親和性及び特異性を発揮するフコイダンを含む。好ましくは、セレクチンと、媒介する剤の一部としてのフコイダン部分の間の相互作用は、少なくとも、t-PAを血栓に媒介するのに必要な時間、十分に強力である。ある種の実施態様において、適当なフコイダン部分は、解離定数(K_D)約0.1nM~約500nMの間、好ましくは、約0.5nM~約10nMの間、より好ましくは、約1nM~約5nMの間でセレクチンと相互作用する。

20

30

【 0 1 6 8 】

フコイダンは、高分子量又は低分子量のものであり得る。

【 0 1 6 9 】

本発明による<<分子量>>は、<<重量平均分子量>>、又は M_w に関する。

【 0 1 7 0 】

本発明による<<低分子量フコイダン>>は、20000Da以下、特に、2000~20000Daの間の範囲内の平均分子量を有する任意のフコイダンに関する。

40

【 0 1 7 1 】

本発明による<<高分子量フコイダン>>は、20000Daより多い、特に、20000~600000Daの間の範囲内の平均分子量を有する任意のフコイダンに関する。

【 0 1 7 2 】

ある種の実施態様において、フコイダン部分は、平均分子量約2000~約8000Daを有する。他の実施態様において、フコイダン部分は、平均分子量約2000~約70000Daを有する。なお他の実施態様において、フコイダン部分は、平均分子量約10000~約50000Daを有する。

【 0 1 7 3 】

50

1つの実施態様により、フコイダン部分は、100000Da未満、好ましくは、20000Da未満、例えば、2000~20000Daの間である平均分子量を有する。

【0174】

別の実施態様により、フコイダン部分は、2000Da~15000Daの範囲にある平均分子量を有する。

【0175】

特定の実施態様により、フコイダンは、低分子量フコイダン、例えば、国際公開公報第2010116209号に記載されるものから選択される。

【0176】

アミノ-フコイダンを得る方法

10

本発明によるアミノフコイダンを得る方法が後述される。当業者は、特定のアミノフコイダンを得るため、当該方法を便宜的に容易に適応し得る。

【0177】

非限定的な方法において、本明細書において<<アミノフコイダン>>としても言及されるフコイダンのアミン誘導体を合成するストラテジーは、2ステップのプロセスであり得る。

【0178】

1. 還元末端におけるフコイダンの還元的アミノ化

a. 多糖類のアルデヒドとスペーサーの1級アミンの間のシッフ塩基(イミン)形成、すなわち、<<架橋化合物>>、例えば、ジアミノプロパン(DAP)。この反応は、水性媒体において可逆的である。

20

b. 当該反応の可逆性を阻害するためのイミンのアミンへの還元。

【0179】

2. C末端の先端におけるカルボキシル官能基(-COOH)とステップ1においてフコイダン部分に固定されたジアミノプロパンの1級アミンを反応させることによる、アミノ酸残基又は誘導体の結合。

【0180】

この第2のステップは、例えば、活性化結合試薬、例えば、NHS及びEDCを用いることにより達成される。当該NHS及びEDC試薬は、市販されており、会社、例えば、Sigma Aldrich(Ref.130672又はRef.03449)により販売される。

30

【0181】

この2ステップのプロトコールは、多糖類鎖の還元末端由来のアルデヒド基とスペーサーの1級アミンの間の反応に特異的であるという利点を有する。これは、(i)単純かつ頑強であること、及び(ii)化学修飾が鎖内で行われるとき、生物学的活性を損なうリスクを回避するために、多糖類部分のその末端への構造的修飾を制限するという利点を有する(O. Roger et al., 2002, << Polysaccharide labelling: impact on structural and biological properties >>, Carbohydr. Pol., 50(3)273-278)。第2のステップは、水性媒体における1級アミン官能基とカルボキシル官能基の間の古典的カップリング反応であり、従って、進めるのが容易である(G.T. Hermanson, << Bioconjugate Techniques >> Academic Press, 2008)。

40

【0182】

更に、当該プロトコールの頑強さは、その末端に少なくとも1つの遊離アミノ基、特に、1級アミンを含む任意のアミノフコイダンを得るために、他の<<スペーサー>>、又はリンクカードによりジアミノプロパン(DAP)を置換することを有利に可能にする。

【0183】

本発明による<<スペーサー>>は、少なくとも2つの遊離アミノ基、例えば、遊離1級アミンを有する任意の化合物を含み、好ましくは、これに存する。

【0184】

有利には、当該ジアミノプロパン(DAP)は、2つの遊離1級アミンを含む任意の化合物により置換され得る。

50

【0185】

従って、本発明は、スペーサーがジアミノプロパン（DAP）でなく、及び／又は還元末端がジアミノプロパンにより官能基を持たされないアミノフコイダンを更に熟考する。

【0186】

従って、本発明はまた、フコイダン部分の還元末端と1つ以上のアミノ基を含む化学基（ここで、当該化学基は、当該フコイダン部分の還元末端とジアミノプロパンとの間の共有結合から得られない）との間の共有結合によりアミノ化される、フコイダン部分からなるt-PA結合特性を有する媒介物に関する。

【0187】

特定の実施態様により、式 $(\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2)$ のジアミノプロパン（DAP）は、第1のステップにおいて、遊離1級アミン、例えば、ポリアミン、及び特に、ジエチレントリアミン、式 $(\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_2 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{NH}_2)$ の（DETA）を含有する他の化合物により置換され得る。 10

【0188】

本発明はまた、スペーサーがジエチレントリアミン（DETA）ではなく、及び／又は還元末端がジエチレントリアミンにより官能基を持たされないアミノフコイダンも熟考することは理解される。

【0189】

従って、本発明はまた、フコイダン部分の還元末端と1つ以上のアミノ基を含む化学基（ここで、当該化学基は、当該フコイダン部分の還元末端とジエチレントリアミンとの間の共有結合から得られない）との間の共有結合によりアミノ化される、フコイダン部分からなるt-PA結合特性を有する媒介物に関する。 20

【0190】

特定の実施態様により、反応の第2のステップにおいて結合され得るアミノ酸残基又は誘導体は、アミノカプロン酸、トラネキサム酸、リジン又はポリ／オリゴリジン、又はリジン誘導体を含み、好ましくは、これに存する群において選択され得る。 30

【0191】

「代替のストラテジー」として定義され得る他のストラテジーも報告されている。これらは、上で定義される2ステップの方法と置き換わることができるが、これらはまた、2、3の制限により妨げられる。

【0192】

これらの「代替のストラテジー」のうち3つが、本明細書において以下で開発される。

【0193】

A. ラクトンの形成

1つの特定の実施態様において、アミノフコイダンは、例えば、Hernandezら（Hernandez et al., 2007, "Synthesis, reactivity, and pH-responsive assembly of new double hydrophilic block copolymers of carboxymethylated dextran and poly(ethylene glycol)", Polymer 48, pp921-930）におけるラクトンの形成を介して得られ得る。

【0194】

この特定の実施態様により、方法は、 40

1. ジ-ヨウ化物とカリの混合物での還元糖の酸化によるフコイダンの還元末端でのラクトンの形成

2. アミド結合を形成するための、1級アミン、例えば、アミノ酸残基又は誘導体を生じる分子の、当該アミンを介したラクトンとの反応のステップを含む。

【0195】

当該実施態様により、酸化糖は、酸化が効率的なままであるように、任意の置換基の遊離でなければならず、そしてこれは全ての硫酸化フコイダンにとって必ずしも真実ではない。ラクトンと反応するアミン誘導体はまた、大幅な過剰でなければならない。更に、反応は60で数日間続き、Hernandezらにおいて教示されるデキストランとは対応に、フ 50

コイダン自体の構造を変え得る。

【0196】

B . セミカルバゾン又はチオセミカルバゾンの形成

別の特定の実施態様において、アミノフコイダンは、例えば、Zhangら (Zhang et al., 2011, "One-pot fluorescent labeling of saccharides with fluorescein-5-thiosemic arbazide for imaging polysaccharides transported in living cells", Carbohydr. Res., 346 pp2156-2164) におけるセミカルバゾン又はチオセミカルバゾンの形成を介して得られ得る。当該セミカルバゾンは、例えば、アルデヒド又はアセトンでのセミカルバジドの縮合により得られ得る。

【0197】

セミカルバゾンが、アルデヒドの縮合（例えば、多糖類の還元末端）を介して得られるとき、反応は以下である：



（式中、Rは、多糖類、例えば、フコイダンであり、

式中、R'は、炭素構造、例えば、フルオロフォアである）。

【0198】

セミカルバゾンは、2重結合C=Nの還元により安定化される。

【0199】

当該実施態様により、セミカルバジドは、R'基が、EDC/NHSを介して他の化合物、例えば、アミノ酸、及び/又はアミノ酸誘導体のカルボキシル官能基で更に結合され得る遊離アミン官能基(-NH₂)、特に、アミン官能基(-NH₂)を含有するような方法で合成され得る。

【0200】

C . オキシムの形成

別の特定の実施態様において、アミノフコイダンは、例えば、Novoa-Carballal及びMuller (Novoa-Carballal and Muller, 2012, "Synthesis of polysaccharide-b-PEG block copolymers by oxime click", Chem Comm, 48 pp3781-3783) におけるオキシムの形成を介して得られ得る。

【0201】

当該特定の実施態様は、1つの単一ステップにおいて多糖類、例えば、フコイダンの還元末端（アルデヒド）をR-O-NH₂誘導体で縮合することを可能にする、いわゆる「クリックケミストリー」に頼る。

【0202】

当該実施態様により、R-O-NH₂誘導体は、複合体有機合成(Mitsonobu反応)によりR-OH前駆体から調製されなければならない。オキシムは、pH3及び4.5にて効率的に形成される。これらの条件において、pH5未満に認識可能であるフコイダンは、迅速に低下する傾向を有する。

【0203】

従って、カルボン酸官能基を有し、水中でさらに溶解可能であるアミノ酸、例えば、リジン、ポリリジン及びリジン誘導体である全ての化合物が、このストラテジーのため考慮され得る。

【0204】

また、リジンのデンドリマーを含むアミノフコイダンの合成が考慮され得る。この特定の実施態様により、当該デンドリマーは、別々に、かつフコイダンへの結合ステップに先立ち、合成されるべきである。

【0205】

好ましくは、ポリ-アミノ酸、例えば、オリゴリジン及び/又はデンドリマーが考慮されるとき、アニオンの多糖類へのカチオン性ペプチド鎖のフォールディングをもたらし（アミノフコイダンの場合）、当該アミノフコイダンの水溶解度を低減し得る相互の高分子

10

20

30

40

50

電解質の形成を防ぐよう注意しなければならない。

【0206】

従って、本発明はまた、当該方法により得られ得るアミノフコイダン、特に、式(I)、(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及び(VI')の化合物に関する。

【0207】

フコイダン及びアミノフコイダンは、本発明により、それらの物理化学的特性、特に、それらのアミノ化の程度、それらのフコースの程度又は質量百分率、それらのウロン酸又はグルクロン酸の程度又は質量百分率、それらの硫酸化の程度又は質量百分率、及びそれらの分子量により更に特徴付けられ得る。

10

【0208】

当該特性は、平均値として理解されなければならない。質量百分率は、%、並びにg/100gで表され得る。従って、当業者はまた、フコイダン及びアミノフコイダンの調製物を、必ずしも1つの単一種のフコイダン、又はアミノフコイダンを含まないが、平均的物理化学的特性により互いに関連する一連の化合物を含む均一な混合物又は調製物とみなすだろう。

【0209】

特定の実施態様により、当該アミノフコイダンは、約0.1NH₂/mol～約3NH₂/molの範囲にある、特に、約1NH₂/mol～約3NH₂/molの範囲にある、好ましくは、約1～約2NH₂/molの範囲にあるアミノ化の程度を有する。

20

【0210】

特定の実施態様により、当該フコイダンは、約30%～約60%の範囲にある、特に、約30%～約50%の範囲にあるフコースの質量百分率を有する。

【0211】

特定の実施態様により、当該フコイダンは、約5%～約40%の範囲にある、特に、約10%～約30%の範囲にあるグルクロン酸の質量百分率を有する。

【0212】

特定の実施態様により、当該フコイダンは、約10%～約45%の範囲にある、特に、約15%～約40%の範囲にある硫酸塩の質量百分率を有する。

【0213】

特定の実施態様により、当該フコイダンは、100000Da未満、好ましくは、20000Da未満である平均分子量を有する。好ましい実施態様により、当該フコイダンは、2000Da～15000Daの範囲にある平均分子量を有する。

30

【0214】

医薬組成物

既に上述された通り、本発明は、

- a) 本発明の媒介物を用意すること、
- b) t-PAを用意すること、及び
- c) ステップa)で用意された媒介物をステップb)で用意されたt-PAと接触させて、当該媒介物とt-PAの間の複合体を得ること

40

のステップを含む、媒介物化されたt-PAを製造する方法に関する。

【0215】

従って、本発明はまた、本発明による媒介物のt-PAとの複合体を含む医薬組成物に関する。

【0216】

有利には、当該複合体を含む医薬組成物は、当該方法により得られ得る。

【0217】

特定の実施態様により、本発明はまた、40:1～1:1、好ましくは、20:1～3:1、最も好ましくは、15:1～5:1の範囲にある、媒介物のt-PAに対するモル比を含む医薬組成物に関する。

50

【0218】

好ましい実施態様により、当該医薬組成物における媒介物の t - PA に対するモル比は、媒介物がモノ - アミンフコイダンであるとき、約 10 : 1 であり、媒介物がポリ - アミンフコイダンであるとき、約 5 : 1 である。あるいは、本発明は、

- 本発明の媒介物を含む第 1 の容器、及び
- t - PA を含む第 2 の容器

を含むキットに関する。

【0219】

本発明に適當な<<容器>>は、当該技術分野で公知の任意の医薬容器、好ましくは、無菌容器であり得、注射に直接的に適當であるか、単独で又は本発明による第 2 の容器と混合されるとき、注射可能な試料を調製するのに適當であり得るかのいずれかである。当該容器の例は、ピル、タブレット、カプセル、瓶、シリンジ、針、カテーテル、注入ポンプ、膨大部を含む群において選択され得、より一般的には、試料を含有し、保存するために用いられ得る任意の小さな密封バイアルである。当該容器は、ガラス又はプラスチック、例えば、ポリプロピレンから作られ得る。

10

【0220】

有利には、当該容器は、本発明により特定の医薬組成物を達成するために、統いて混合される。

【0221】

この特定の実施態様により、それぞれの容器における媒介物及び t - PA の量は、媒介物の t - PA に対する特定の比に達するように、当業者により容易に調節され得る。

20

【0222】

しばしば、医薬組成物は、注射により投与されるだろう。注射による投与のため、血栓溶解剤の医薬組成物は、無菌の水性溶液若しくは非水性溶液として、又は無菌の注射可能な溶液の即時調製のための無菌粉末として製剤化され得る。かかる医薬組成物は、製造及び保存の条件下で安定であるべきであり、微生物、例えば、細菌及び真菌の混入作用に対して保存されなければならない。

【0223】

本発明は、本発明の媒介物、及び t - PA を含む容器に更に関する。有利には、当該媒介物及び当該 t - PA が、無水形態、例えば、無菌粉末で処方されるとき、次に、医薬組成物は、1 つの単一容器において、適當な組成を有し、更なる混合ステップを有することなく、再構成され得る。

30

【0224】

注射による投与のための薬学的に許容し得る担体は、溶媒又は分散媒、例えば、水溶液（例えば、ハンクス溶液、アルコール性 / 水性溶液、又は食塩水溶液）、並びに非水性担体（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、及び注射可能な有機エステル、例えば、オレイン酸エチル）である。注射可能な医薬組成物はまた、非経口ビーカー（例えば、塩化ナトリウム及びリングルデキストロース）、及び / 又は静脈内ビーカー（例えば、体液及び栄養補充薬）、並びに塩、緩衝液、及び保存剤、例えば、抗菌剤及び抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなど）を含む他の従来の薬学的に許容し得る無毒性の賦形剤及び添加剤を含有し得る。注射可能な組成物の遅延した吸収は、吸収を遅延し得る剤（例えば、モノステリン酸アルミニウム及びゼラチン）を加えることによりもたらされ得る。組成物の pH 及び濃度は、当業者により容易に決定され得る。

40

【0225】

好ましい実施態様により、アミノフコイダンを含む組成物の pH は、5 ~ 8 の間に含まれるべきである。

【0226】

無菌の注射可能な溶液は、活性化合物（複数を含む）及び他の成分を必要量の適切な溶媒に取り込むことにより、及び次に、得られた混合物を、例えば、濾過又は照射により無

50

菌化することにより調製される。無菌の注射可能な溶液の調製のための無菌の粉末の調製方法は、当該技術分野で周知であり、真空乾燥技術及び凍結乾燥技術を含む。

【0227】

一般的に、媒介物化された t - P A (又はその医薬組成物) の投薬量は、考慮事項、例えば、患者の年齢、性別及び体重、並びに患者に影響することが疑われる特定の病態、疾患の程度、又は調べられるべき身体の範囲(複数を含む)に依存して変動するだろう。要因、例えば、禁忌、治療、及び他の変動するものがまた、投与されるべき剤の投薬量を調節するために考慮される。しかしながら、これは、訓練を受けた医師により容易に達成され得る。一般的に、媒介物化された t - P A (又はその医薬組成物) の適当な 1 日用量は、対象における血栓の予防又は治療を可能にするのに十分である t - P A (又は医薬組成物) の最小量に対応する。10

【0228】

t - P A、例えば、媒介物化された及び媒介されない t - P A の投与のための 1 日用量は、モル濃度で、又は質量として表され得る。1 日用量が投与される t - P A の質量として表されるとき、それは、「t - P A の均等な用量」の観点から理解されなければならない。

【0229】

本発明により、「t - P A の均等な用量」は、2つの分子が同一分子量を有するなら、媒介されない t - P A に比較して、投与される媒介物化された t - P A の質量を意味する。参照の t - P A (すなわち、非媒介物化 t - P A) の平均分子量及び本発明による媒介物化された t - P A の平均分子量を考慮するとき、例えば、かかる換算は、当業者により容易に計算され得る。20

【0230】

この用量を最小にするために、投与は静脈内であることが好ましい。静脈内投与は、標的部位(静脈内)に対して近位(すなわち、血餅内注射)又は遠位であり得る。有利には、媒介物化された t - P A (又はその医薬組成物) は、遠位投与に適当である。

【0231】

1日用量は、多くの要因、例えば、患者の体重及び年齢、標的にされる血液の血餅の局在性及び投与頻度又は経路、すなわち、近位又は遠位に依存し得る。例えば、組換え t - P A の血餅内注射は、Changら (Chang et al., 2011, Low Dose Once Daily, Intraclot Injections of Alteplase for Treatment of Acute Deep Venous Thrombosis, J. Vasc. Interv. Radiol., 22(8):1107-1116)において教示される通り、急性深部静脈血栓症の処置のため提案されている。当該プロトコールにより、血餅内注射は、平均 2 . 1 の治療又は治療日数を伴い、1人の患者当たり t - P A 7 . 1 mg の平均総用量で効率的であり得る。30

【0232】

急性心筋梗塞(MI)のため、媒介物化された t - P A は、例えば、加速注射(1 ~ 1 / 2 時間)として、又は 3 時間の注射として投与され得る。

【0233】

他の実施態様において、例えば、急性虚血性脳卒中を治療するため、総用量は、例えば、90 mg に達し得る。40

【0234】

従って、1日用量は、患者の体重及び注射の長さに主に依存するだろう。比較のため、媒介されない t - P A が、67 kg 未満の患者に、急性 MI を処置するため、1 ~ 2 分間(15 mg)かかるボーラスにおいて 1 ~ 1 時間 30 分間抹消投与され、次に、最大 50 mg の用量で 30 分間投与され(0 . 75 mg/kg)、最終ステップにおいて、0 . 5 mg/kg t - P A が、次の 60 分間かかり、好ましくは、35 mg を超えない用量で注射される。したがって、注射され得る t - P A の最終用量は、例えば、100 mg に達し得る。有利には、t - P A のアミノフコイダンでの媒介は、最小の 1 日用量を低減することにより高用量の投与に関連する問題を解決しやすく、従って、必要な 1 日用量の観点で、特定の実施態様は50

、少なくとも 1 - 10 g の低減を可能にし、特定の実施態様は少なくとも 2 - 10 g の低減を可能にする。

【 0 2 3 5 】

従って、特定の実施態様において、媒介物化された t - P A は、急性深部静脈血栓症を処置又は予防するための血餅内注射として、効率的な血餅血栓溶解のため、7 mgに等しいか又はそれより少ない最小1日用量、特に、5 mgに等しいか又はそれより少ない最小1日用量、特に、2 mgに等しいか又はそれより少ない最小1日用量、特に、1 mgに等しいか又はそれより少ない最小1日用量で、投与され得る。

【 0 2 3 6 】

他の実施態様において、媒介物化された t - P A は、通常又は増大した1日用量で、t - P A 注射と通常関連する2次的症状を経験することなく、投与され得る。あるいは、当該症状は、1日用量が一定に維持されるとき、媒介されない t - P A と比較して、低減されるか又は予防され得る。

【 0 2 3 7 】

従って、特定の実施態様において、媒介物化された t - P A は、より高い1日用量で投与され得る。有利には、当該1日用量は、100 mgに等しいか又はそれより多く、150 mgに等しいか又はそれより多くあり得る。特定の実施態様において、1日用量は、200 mg又は300 mgに等しいか又はそれより多くさえあり得る。

【 0 2 3 8 】

当業者は、患者の要求により、及び処置されるべき状態に依存して、当該1日用量を調整することができる。

【 0 2 3 9 】

実施例

以下の実施例において用いる出発フコイダンを、本明細書において後述の市販の供給源から得た：

1) Sigma-Aldrich社(米国)のフコイダン：粗フコイダン(フカス・ベシキュロサス由来) ref F 5 6 3 1、CAS番号9072-19-9、MM=20,000~200,000 g/mol。

2) Algues-et-Mer社(フランス)のフコイダン：Asphyscient(登録商標)(アスコフイラム・ノドサム由来)、依頼に基づき、MM=5,000~10,000 g/mol。

3) Kraeber GmbH(ドイツ)のフコイダン：依頼に基づき、LMWF、8,500 g/mol、HMWF、600,000 g/mol、異なる褐藻類由来。

【 0 2 4 0 】

実施例 1 :

フコイダンのヒドロキシリル基のアミノ化

フコイダン(500 mg、5 kDaの1 mmol)を水15 mLに溶解し、2.5 M NaOH 5 mL及びエピクロロヒドリン 0.1 mL(1.3 mmol)と混合した。混合物を40℃で2時間攪拌し、25℃で2日間水に対して透析する。透析液を凍結乾燥した後、残渣を水中の30%(v/v)アンモニア 3 mLに溶解し、40℃で90分間アミノ化する。反応混合物を水に対して透析し、凍結乾燥して、アミノ化フコイダンを得る。

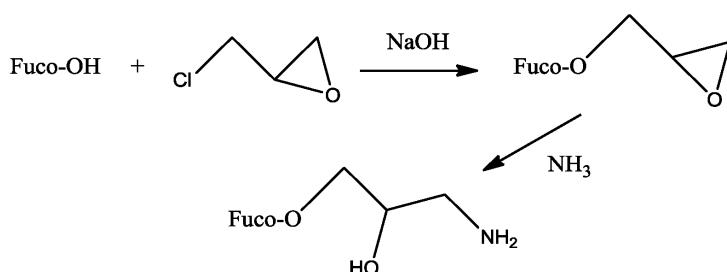
【 0 2 4 1 】

当該プロトコールにより、1級アミンの量は、反応において誘導されるエピクロロヒドリンの量に依存する。エピクロロヒドリン 0.1 mLに対応し得るエピクロロヒドリンの最小量について、導入される1級アミンの平均数は、フコイダンの1つの鎖当たり1~10個の1級アミンの範囲である。

【 0 2 4 2 】

反応を以下の通り記載することができる。

【化14】



10

式中、Fucoはフコイダンを意味する。

【0243】

しかしながら、反応が、フコイダン、特に、フコースにより生じるヒドロキシリ（-O-H）官能基のいずれか1つにて生じ得るので、当該反応の主要な弱点は、置換が鎖内で発生する場所を正確に制御することが可能でないことである。

【0244】

従って、当該方法は、当該フコイダンの還元末端を標的にするのに適当ではない。

【0245】

実施例2：

2ステップストラテジーを用いた双極分子又はシステムの構築

20

主要な化学ステップは、分子、すなわち、リジン、オリゴリジン、又はリジン模倣物を生じる1級アミンでのフコイダン還元末端の結合、及び基本的な有機化学の書籍に広く記載される、イミンの2級アミンへの還元である。アミノ化分子の種類（すなわち、DAP及びDETA-fuco）に依存して、2つの異なるストラテジーを本明細書において説明する。

【0246】

ストラテジー1：

第1のステップにおいて、フコイダン(F)をジアミノプロパン(NH₂-(CH₂)₃-NH₂)に結合させて、F-NH-(CH₂)₃-NH₂(すなわち、F-NH₂)を得る。これにより、当該アミノフコイダンをDAP-fucoとして定義する。

30

【0247】

強化ガラス試験管において、乾燥フコイダン500mgを、再蒸留水中の1.5Mジアミノプロパン溶液5.4mLに溶解する。試験管に封をし、90で3時間加熱する。冷却後、冰酢酸中の3Mの新たに調製したジメチルボラン1.4mLを加え、混合物を90で3時間加熱する。

【0248】

溶液を中和し、透析し(45mM炭酸緩衝液(pH9.6)中の1MNaCl 5×1L、水/エタノール80/20(v:v)中0.5MNaCl 5×1L、再蒸留水5×1L)、透析チャンバーにおいて、3000Daのカットオフで)、凍結乾燥する。F-NH₂を、フワフワした白色の固体として収率60%(w/w)で得る。

40

【0249】

その後、以下で示す通り、本明細書において「アミノ酸誘導体」としても言及するリジン、オリゴリジン(2~4つのリジン)、-アミノカプロン酸又はトラネキサム酸を、第2のステップにおいてF-NH₂に場合により結合する。

【0250】

再蒸留水中の10.4mMアミノ酸誘導体5mLの溶液に、EDC 20mg及びNHS 12mgを室温にて連続的に加える。混合物を、攪拌下で15分間維持し、その後、F-NH₂ 76.4mgを加える。

【0251】

攪拌下室温にて2時間後、溶液を、透析し(45mM炭酸緩衝液(pH9.6)中の1M

50

N a C l 5 × 1 L、水 / エタノール 8 0 / 2 0 (v:v) 中の 0 . 5 M N a C l 5 × 1 L、再蒸留水 5 × 1 L で、カットオフ 3 0 0 0 D)、凍結乾燥する。

【 0 2 5 2 】

ストラテジー 2 :

フコイダン (F) を、以下に示す通り、ジエチレントリアミン (D E T A = N H ₂ - (C H ₂) ₂ - N H - (C H ₂) ₂ - N H ₂) に直鎖上に結合する。従って、合成するアミノフコイダンを、D E T A - f u c o として定義する。

【 0 2 5 3 】

強化ガラス試験管において、乾燥フコイダン 5 0 0 mg を、再蒸留水中の 1 . 5 M D E T A 溶液 5 . 4 mL に溶解する。試験管に封をし、9 0 で 3 時間加熱する。冷却後、冰酢酸中の 3 M の新たに調製したジメチルボラン 1 . 4 mL を加え、混合物を 9 0 で 3 時間加熱する。

【 0 2 5 4 】

溶液を中和し、透析し (4 5 mM 炭酸緩衝液 (pH 9 . 6) 中の 1 M N a C l 5 × 1 L 、水 / エタノール 8 0 / 2 0 (v:v) 中の 0 . 5 M N a C l 5 × 1 L 、再蒸留水 5 × 1 L で、カットオフ 3 0 0 0 D) 、凍結乾燥する。

【 0 2 5 5 】

その後、ストラテジー 1 に示す通り、リジン、オリゴリジン (2 ~ 4 つのリジン) 、 - アミノカプロン酸又はトラネキサム酸を F - N H ₂ に結合する。

【 0 2 5 6 】

再蒸留水中の 1 0 . 4 mM アミノ酸誘導体の溶液 5 mL に、E D C 2 0 mg 及び N H S 1 2 mg を室温で連続して加える。混合物を、攪拌下で 1 5 分間維持し、その後、F - N H ₂ 7 6 . 4 mg を加える。

【 0 2 5 7 】

攪拌下室温にて 2 時間後、溶液を透析し (4 5 mM 炭酸緩衝液 (pH 9 . 6) 中の 1 M N a C l 5 × 1 L 、水 / エタノール 8 0 / 2 0 (v:v) 中の 0 . 5 M N a C l 5 × 1 L 、再蒸留水 5 × 1 L で、カットオフ 3 0 0 0 D) 、凍結乾燥する。

【 0 2 5 8 】

結論 : いくつかのアミン及びアミノ酸誘導体、例えば、f u c o - ジアミノプロパン (D A P - f u c o) 、f u c o - ジエチレントリアミン (D E T A - f u c o) 、f u c o - トラネキサム酸 (t r a n - f u c o) 、f u c o - モノ / ポリリジン (L y s - f u c o 、 d i L y s - f u c o 、 t r i L y s - f u c o ...) を得て、試験した。

【 0 2 5 9 】

実施例 3 :

フコイダン及びアミノフコイダンの物理化学的特性

A . 材料及び方法

アミノ化定量化

プロモプロピルアミンを Roth の研究 (M. Roth, 1971 "Fluorescence reaction for amino acids." Analytical Chemistry, 43, 880-882) に従った標準として用いたフタルアルデヒド比色アッセイで、1 級アミンの量を決定する。

【 0 2 6 0 】

フコース定量化

フコース定量化を、Dische (Z. Dische, 1955, New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. Methods Biochem. Anal. 313-358) により決定した。

【 0 2 6 1 】

グルクロン酸定量化

グルクロン酸定量化を、Bitter 及び Muir (T. Bitter et H.M. Muir, 1962, A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4 330-334) により決定した。

【 0 2 6 2 】

10

20

30

40

50

硫酸塩定量化

硫酸塩定量化を、Gustafsson (L. Gustafsson, 1960, Determination of ultramicro amounts of sulphate as mthylene blue-II: The reduction, Talanta 4, 236) 出典の、Bacheletら (Bachelet et al, 2009, Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. Biochim Biophys Acta., 1790(2) 141-146) に記載されるプロトコールにより決定し得る。

【0263】

酢酸溶液中のヨウ化水素酸及び次亜リン酸を用いて、硫酸塩を硫化水素として還元し、次に、 Zn^{2+} により複合体化し、芳香族ジアミンと反応させる。メチレンブルーの形成を、670 nm 及び 744 nm での吸収で定量する。

10

【0264】

分子の質量分析

分子の質量分析を、MALLS 技術 (Multi Angle Laser Light Scattering) を用いて決定することができる。簡単に言うと、10 mM トリス緩衝液、pH 7.4、150 mM NaCl、0.02% アジ化ナトリウムにおいて平衡化したゲル濾過クロマトグラフィーカラム (TSKgel GMPW × 1) に 0.5 mL/分にて添加する (HPLC pump Dionex UltiMate 3000)。屈折率検出器 (Iota2, Precison Instrument) 及び光散乱検出器 (TREOS, Wyatt) を用いて、シグナルを更に検出する。

【0265】

赤外線 (IR) スペクトル分析

20

Omnic (Nicolet) プログラム一式を用い、Nicolet アバター装置にて Fourier 変換赤外線分光学を用いて、IR スペクトルを記録する。臭化カリウム (KBr) 中、凍結乾燥産物の重量において 2% の範囲で、試料を調製し、32 回のスキャンで記録する。同様の条件下で KBr 単独のスペクトルも記録し、自動的に減じる。

【0266】

NMR - 1H 分析

3 回の凍結乾燥後、NMR Bruker 500 Avance III (プローブ: 5 mm PAQXI 1H/X) にて D2O 溶媒 (99.9%) 中で 1H スペクトルを記録する: TD 32k、16 回のスキャン、SW: 10 ppm / 500 Hz、P 90°: 9.5 μ s、温度 300 K、D 1、1 s。

30

【0267】

B. 結果

本発明による一連のフコイダン及びアミノフコイダンの物理化学特性を測定し、以下の表において要約した。

【0268】

【表1】

	アミノ化 (NH ₂ /mol PS)	フコース (g/100g)	グルクロン酸 (g/100g)	硫酸塩 (g/100g)	MW (*) (g/mol)
フコイダン	-	30,2 ± 4,1	19,5 ± 5,2	17,8 ± 2,4	5000
フコイダン-DAP	1,05 ± 0,01	49,3 ± 4,6	25,6 ± 2,1	25,9 ± 3,8	10000
フコイダン-DAP-アミノカプロン酸	0,32 ± 0,01	35,7 ± 13,2	8,2 ± 1,0	32 ± 2,1	10000
フコイダン-DAP-トラネキサム酸	0,61 ± 0,02	34,9 ± 11,8	7,9 ± 1,8	30,6 ± 3,4	10000
フコイダン-DETA	1,08 ± 0,04	34,1 ± 13,3	13,8 ± 1,3	32,3 ± 1,1	10000
フコイダン-DAP-リジン	1,11 ± 0,03	31,2 ± 7,2	14,7 ± 1,9	30,2 ± 4,4	10000
フコイダン-DAP-ジリジン	1,97 ± 0,04	53,4 ± 6,6	22,1 ± 1,9	18,6 ± 0,8	10000
フコイダン-DAP-トリリジン	2,45 ± 0,01	45,4 ± 4,1	33,9 ± 3,5	21,5 ± 0,8	10000
フコイダン-DAP-テトラリジン	2,38 ± 0,03	43,6 ± 4,6	20,7 ± 6,6	13,6 ± 0,7	10000

PS = 多糖類

(*) = 重量平均化分子量 (10%より多いか又は少ない)

【0269】

それぞれの分析を、3～8回繰り返した。

【0270】

フコイダン-DAP及びfucos-DAP-ジリジン/トリリジン/テトラリジン化合物のIRスペクトルは、1200cm⁻¹にて特徴的な硫酸塩ピークを含む、硫酸化多糖類に対応する一致スペクトルを強調する。DAP-アミノ化フコイダンとリジン-アミノ化フコイダンの間の有意差の欠如は、オリゴリジン(ジ-リジン、トリ-リジン及びテトラ-リジン)間の結合条件が、当該フコイダンの構造を変えないことを示す。1540cm⁻¹における振れるバンドは、多糖類とオリゴ-リジンの間のアミド結合(CO-NH)、及びリジン自体の特徴である。

【0271】

IR分光学に対する補完として、アミノフコイダン及び対応するフコイダン調製物のNMRプロファイルは、アミノ化後にフコイダン構造が保存されることを確かにする。

【0272】

実施例4：分子構築物のインビトロ薬理評価

A. 材料及び方法

血餅形成及びエクスピボフィブリン溶解

ヒト血小板リッチ血漿、及びヒト血小板プア血漿(PRP及びPPP)を、2ステップの遠心分離：120gにて15分間、続いて1200gにて12分間の第2の遠心分離ステップ後、クエン酸塩添加血から得た。プア血小板血漿(PPP)で、PRPを1mL当たり3×10⁸血小板に調整し、75μg/mLフルオレセインイソチオシアネート-フィブリノーゲンを添加した。ガラス試験管において、10mmol/LCaCl₂を加えることにより、血餅形成を誘導し、37℃で1時間インキュベーションした。退縮後、血餅をハンクス緩衝液(Sigma)において洗浄し、吸収紙にて迅速に乾燥させ、計量した。フィブリン溶解を評価するために、PRP又はPPP血餅を、媒介物化されたt-PA複合体(t-PA 10UI、又は1.72μg/mLに対応する)を含有するハンクス緩衝液において、室温で1時間インキュベーションした。血餅を、1μMヒトプラスミノーゲンを添加したハンクス緩衝液500μlを含有する新しいエッペンドルフに移した。血餅から上清への蛍光の放出を分光蛍光光度計(485nm/520nm)で測定することにより、フィブリン

10

20

30

40

50

溶解の動態を評価した。17時間後、血餅を再計量して、総フィブリン溶解に対応する重量の喪失を計算した。

【0273】

この実験において試験するアミノフコイダンを、実施例2に記載する、ストラテジー1(トラネキサム酸-fucos、ジリジン-及びトリリジン-fucos)及びストラテジー2(DETA-fucos)により調製した。

【0274】

アミノフコイダンを、t-PA(10UI(1.72μg/mlに対する)に対する変動可能な分子比にて用いた:モノ-アミンフコイダンについて比1/10を、ポリ-アミンフコイダンについて比1/5を用いた。評価基準は、開始溶解動態(上清における蛍光の出現)、及び17時間/37のインキュベーションにおける最終血栓重量喪失であった。

【0275】

アミノフコイダン媒介物化されたt-PA

t-PA 1molをアミノフコイダン10molと、0.1%ヒト血清アルブミン(HSA)及び0.01%Tween20を添加したリン酸緩衝食塩水において、4で2時間混合することにより、アミノフコイダンとの1本鎖組換えt-PA(American diagnostica)複合体を形成し、血餅溶解のため直ちに用いるか、又は将来的な使用のため-80で保存した。最大10molまで増大する量のアミノフコイダンを加えることにより、他の調製物を作製した。

【0276】

1本鎖組換えt-PAは、ヒトメラノーマ細胞株(American diagnostic)の製品番号173)から得たヒトt-PAのcDNAで遺伝子導入した、チャイニーズハムスター卵巣細胞株の分泌産物である。

【0277】

1本鎖組換えt-PAの調製物の特徴:

- 分子量は約70000ダルトンであり、
- 純度は98%より高く、
- 特異的活性は、約580000UI/mgである。

【0278】

0.22μmで濾過した脱イオン水100μlで、この凍結乾燥したt-PA担体-遊離タンパク質標準50μgを再構成し、10μg/ml溶液にリン酸緩衝食塩水において希釈した。

【0279】

Jonesら(Jones CI, Payne DA, Hayes PD, Naylor AR, Bell PR, Thomson MM, Goodall AH. The antithrombotic effect of dextran-40 in man is due to enhanced fibrinolysis in vivo. J Vasc Surg. 2008; 48:715-722)において記載される通り、溶解動態実験を実施した。

【0280】

Boulaftaliら(Boulaftali Y, Ho Tin Noe B, Pena A, Loyau S, Venisse L, Francois D, Richard B, Arocas V, Collet JP, Jandrot-Perrus M, Bouton MC. PLatelet Protease Nexin-1, a Serpin that Strongly Influences Fibrinolysis and Thrombolysis. Circulation. 2011;123:1326-1334)において記載される通り、血栓重量の測定を実施した。

【0281】

Boulaftaliら(Boulaftali Y, Ho Tin Noe B, Pena A, Loyau S, Venisse L, Francois D, Richard B, Arocas V, Collet JP, Jandrot-Perrus M, Bouton MC. PLatelet Protease Nexin-1, a Serpin that Strongly Influences Fibrinolysis and Thrombolysis. Circulation. 2011;123:1326-1334)及びMalletら(Mallet SV, Cox DJA. Thromboelastograph(登録商標)Analysis. British J of anaest. 1992;69:307-313)において記載される通り、トルンボエラストグラフィ実験を回転血栓弾性描写器(Rotem(登録商標))にて実施した。

10

20

30

40

50

【0282】

B. 結果

第1のステップにおいて、フコイダンは、活性化及び凝集した血小板にて発現したP-セレクチンに結合するので、本発明者らは、蛍光フィブリノーゲン (Fg - FITC 75 μg/血漿ml) を用いて、異なるアミノフコイダンの血小板リッチ血栓及び血小板プア血栓に結合する能力をインピトロで評価した。

【0283】

まず、t-PA単独は、血小板リッチ血栓におけるものより血小板プア血栓の開始溶解及び最終溶解においてより活性であり、これは、血小板の抗フィブリン溶解活性を示す。それ故、17時間における血栓重量喪失を含む血小板プア血栓の溶解においてt-PA単独とアミノフコイダンによる媒介物化されたt-PAの間の差はなく、t-PA単独で既に最大(97%)であった。対照的に、アミノフコイダンでの媒介物化されたt-PAは、t-PA単独と比較して、血小板リッチ血栓の開始溶解を有意に増大することができた(+50%、p < 0.01)。試験したアミノフコイダンのうち、トラネキサム酸-fucosidase、DAP-fucosidase及びジリジン-fucosidaseが、血小板リッチ血栓溶解の開始速度を増大するのに最も効率的であった。

【0284】

並行して、アミノフコイダン及び媒介物化されたt-PAはまた、t-PA単独と比較して、血小板リッチ血栓重量の喪失を増大した(それぞれ、65%対30%(p < 0.01))(図1)。中でもジリジン-フコイダンが最も効率的であった。

【0285】

第3の一連のインピトロ実験において、赤血球を含む全血において行った血栓の溶解を促進するアミノフコイダンの能力を、回転血栓弹性描写(Rotem(登録商標))で試験した。この実験において、1/5又は1/10の比(t-PA/fucosidase)のジリジン-フコイダン媒介物化されたt-PAは、t-PA単独(55%)と比較して、血栓溶解を75%まで増大した。この実験において、血漿PAI-1が存在した。

【0286】

結論：インピトロのシステムにおいて、アミノ-フコイダンは、拡散によってのみ、及びPAI-1の不存在下で標的にする(血栓弹性描写実験以外)ので、これらの試験は、アミノ-フコイダンのt-PAを血栓にインピボで媒介する能力を評価することができない。しかしながら、これらのインピトロの薬理実験は、アミノ-フコイダンがt-PAの血栓にアクセスする能力を有意に制限しないことを示す(右の最後の2つのカラム)。更に、それは、t-PAのための媒介物としてのアミノ-フコイダンが、インピトロでt-PAによる血栓溶解を有意に促進すること、及びこの作用が活性化/凝集した血小板の存在に依存することを示す。

【0287】

実施例5：

アミノ-フコイダンによるt-PA媒介のインピボ検証：血栓形成及び血栓溶解のリアルタイム生体内イメージング

A. 材料及び方法

この実験において試験するジリジン-フコイダンを、実施例2に記載されるストラテジー1により調製した。

【0288】

グループは、生体内顕微鏡のインピボで血栓の溶解を追跡する能力を最近公開した。従って、Boulaftaliら(Boulaftali et al., 2011, Platelet protease nexin-1, serpin that strongly influences fibrinolysis and thrombolysis. Circulation; Boulaftali et al., 2012, The mouse dorsal skinfold chamber as a model for the study of thrombolysis by intravital microscopy. Thromb Haemost)において記載されるプロトコールにより、生体内顕微鏡でのアミノ-フコイダンによるt-PA媒介の検証を実施した。

【0289】

10

20

30

40

50

マウスにおいて暴露した血管における酸化鉄の局所適用により、血栓を誘導する。酸化鉄の局所適用後、蛍光 t - P A 又はアミノ - フコイダンと t - P A の混合物を静脈内注射する。t - P A の蛍光及び血栓溶解を、腸間膜組織の生体内透視により追跡した。

【 0 2 9 0 】

より正確には、麻酔 (100 mg/kg ケタミン、10 mg/kg キシラジン) 及び開腹後、マウス腸間膜血管を血栓症の誘導及びビデオ顕微鏡生体内観察のため暴露した。10% FeCl₃ (Sigma, St. Louis, MO) で飽和した濾紙片 (1 × 0.5 mm) を 2 分 30 秒置くことにより、血管損傷を誘導した。次に、濾紙を取り除き、暴露した領域を食塩水で洗浄し、損傷後の血栓形成を、CCD カメラ (Hamamatsu) につなげた 5 × 対象での蛍光顕微鏡 (Axio Observer, Carl Zeiss MicroImaging) を用いて、ローダミン 6 G 標識血小板及び白血球 (ローダミン 6 G 3 mg / マウス kg, Sigma, St. Louis, MO) の蓄積、及び Alexa 647ヒト結合フィブリノーゲン (10 mg / マウス kg, Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) の蓄積をモニターすることによりリアルタイムで調べた。血管損傷の導入に先立ち、全ての蛍光マーカーを逆眼窩静脈叢に静脈内投与した。血小板沈着及び血栓成長を、損傷後 15 分間モニターし、次に、部分的に閉塞性に形成させた血栓の血栓溶解するために、蛍光 t - P A ± ジリジン - フコイダンを静脈内注射した。次に、血栓発展を処置後少なくとも 1 時間リアルタイムで調べた。

【 0 2 9 1 】

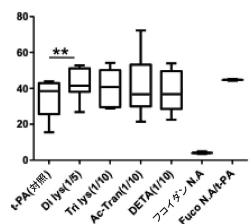
B . 結果

FeCl₃ で誘導した損傷の 1 時間後 (処置後約 45 分)、損傷した血管の閉塞性血栓症は、蛍光 t - P A 単独で処置した全 3 匹のマウスにおいて発生した。対照的に、ジリジン - フコイダンと合わせて t - P A で処置した全てのマウスにおいて、血管灌流を維持した。更に、これらのマウスにおいて、処置後、血栓サイズの低下を観察した (図 2)。

【 0 2 9 2 】

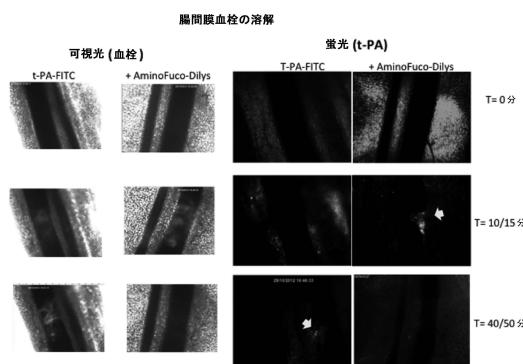
結論：インビボ実験は、媒介物としてのアミノ - フコイダンの血栓溶解に対する有益な作用を示す。特に、これらの実験は、アミノ - フコイダンが、抹消注射した t - P A のインビボ血栓溶解活性を強めることを示す。

【図1】



血小板リッチ血栓の百分率溶解

【図2】



【配列表】

0006363693000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 505429360

ユニヴェルシテ パリ 13
UNIVERSITE PARIS 13
フランス、エフ - 93430 ヴィルタヌーズ、アヴェニュ ジャン - バプティスト クレマン、
99
99, avenue Jean-Baptiste Clement, F - 93430 Ville
etaneuse, FRANCE

(73)特許権者 508266546

ユニベルシテ パリ ディドロ - パリ 7
UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7
フランス国 エフ - 75205 パリ セデックス 13 リュ トマ マン 5
5, rue Thomas Mann F - 75205 Paris Cedex 13 FR
ANCE

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 ロヤウ , ステファーヌ

フランス国、エフ - 75877 パリ・セデックス 18、リュ・アンリ・ユシャール 46、オ
ピタル・イクス・ビシャ、エルヴェテエス・ユエムエールエス・1148

(72)発明者 ジャンドロ - ペリュ , マルティーヌ

フランス国、エフ - 75018 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 46、オピタル・ビシャ、ア
ンセルム・ユ698

(72)発明者 ルトゥールヌール , ディディエ

フランス国、エフ - 75018 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 46、オピタル・ビシャ、ア
ンセルム・ユ698

(72)発明者 ショーベ , フレデリク

フランス国、エフ - 93430 ヴィルタヌーズ、アヴニュ・ジベ・クレマン 99、ユニヴェル
シテ・パリ 13、アンスティチュ・ガリレエ、ペセ - ユニテ・アンセルム・698

(72)発明者 ホ - ティン - ノエ , ブノワ

フランス国、エフ - 75018 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 46、オピタル・ビシャ、ア
ンセルム・ユエムエール・698

(72)発明者 メール , ミュリエール

フランス国、エフ - 93430 ヴィルタヌーズ、アヴニュ・ジベ・クレマン 99、アンスティ
チュ・ガリレエ、ユ698 - アンセルム - ユペ13 - ユペ7

(72)発明者 ミシェル , ジャン - バティスト

フランス国、エフ - 75018 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 46、オピタル・ビシャ、ア
ンセルム・ユ698

審査官 横山 敏志

(56)参考文献 特表2012-506940 (JP, A)

特表2012-523403 (JP, A)

特表2009-535341 (JP, A)

Biol. Pharm. Bull., 1994年 6月, Vol.17, No.6, pp.784-788

Cancer Letters, 1994年, Vol.85, pp.133-138

International Journal of Biological Macromolecules, 2009年, Vol.44, pp.170-174

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A61K31/00 - 33 / 44

A 61K38 / 46

A 61P7 / 02

A 61P43 / 00

C 07K14 / 47

CAplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)