【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】平成23年3月31日(2011.3.31)

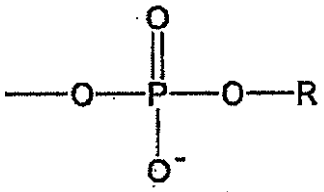
【公表番号】特表2005-531559(P2005-531559A)
【公表日】平成17年10月20日(2005.10.20)
【年通号数】公開・登録公報2005-041
【出願番号】特願2004-505099(P2004-505099)
【国際特許分類】
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　31/675　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　1/18　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　9/10　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　13/12　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　17/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　17/02　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　19/02　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　21/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　29/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　31/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　31/04　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　31/12　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　33/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　37/08　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　39/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ａ６１Ｋ　45/00
Ａ６１Ｋ　31/675
Ａ６１Ｐ　1/18
Ａ６１Ｐ　9/10
Ａ６１Ｐ　9/10　１０１
Ａ６１Ｐ　13/12
Ａ６１Ｐ　17/00
Ａ６１Ｐ　17/02
Ａ６１Ｐ　19/02
Ａ６１Ｐ　21/00
Ａ６１Ｐ　29/00
Ａ６１Ｐ　29/00　１０１
Ａ６１Ｐ　31/00
Ａ６１Ｐ　31/04
Ａ６１Ｐ　31/12
Ａ６１Ｐ　33/00
Ａ６１Ｐ　35/00
Ａ６１Ｐ　37/08
Ａ６１Ｐ　39/00
Ａ６１Ｐ　43/00　１０５

【誤訳訂正書】

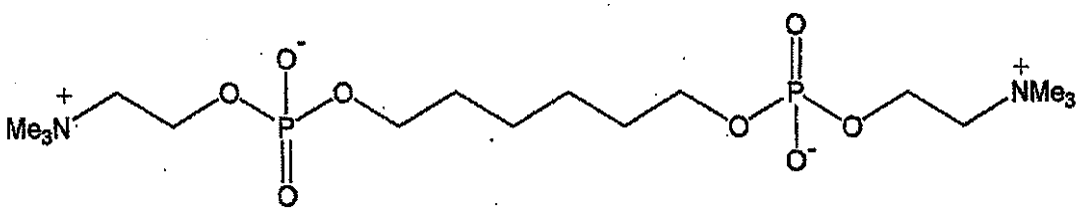
【提出日】平成23年2月10日(2011.2.10)
【誤訳訂正１】
【訂正対象書類名】特許請求の範囲
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
炎症状態および／または組織損傷を与える状態を有する患者の組織損傷を治療または予防するための薬剤であって、複数のＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）分子が存在する場合にその複数のＣＲＰ分子と複合体を形成するように共有結合により相互に連結された２つのリガンドを含む化合物を含み、当該化合物が一般構造：

リガンド － リンカー － リガンド

［式中、リンカーは２～２０個の原子の鎖長を有する直鎖状または分枝鎖状のヒドロカルビレン基であり、各リガンドは、ＣＲＰ分子に存在するリガンド結合部位によって結合され得るものであり、かつ各リガンドは独立して一般式：
【化１】



（式中、Ｒはメチレン基またはエチレン基を介して－Ｏ－に連結されたアミンであり、該アミン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である）
で表される］
で表される、薬剤。
【請求項２】
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、請求項１に記載の薬剤。
【請求項３】
上記リンカーが、一般構造：－（ＣＨ２）$_n$－（式中、ｎは５～７である）で表される、請求項１または２に記載の薬剤。
【請求項４】
上記化合物が下記式：
【化２】



で表される、請求項１～３のいずれか１項に記載の薬剤。
【請求項５】
上記炎症状態および／または組織損傷を与える状態が、アテローム性動脈硬化症を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の薬剤。
【請求項６】
上記炎症状態および／または組織損傷を与える状態が、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、請求項１～４のいずれか１項に記載の薬剤。
【請求項７】
上記状態が、細菌感染、ウイルス感染および寄生生物感染からなる群から選択される感染である、請求項６に記載の薬剤。
【請求項８】
上記状態が、リウマチ熱、糸球体腎炎、および癩性結節性紅斑からなる群から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６に記載の薬剤。
【請求項９】
上記状態が、関節リウマチ、若年性慢性（リウマチ性）関節炎、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、クローン病および家族性地中海熱からなる群から選択される炎症性疾患である、請求項６に記載の薬剤。
【請求項１０】
上記状態が、心筋梗塞、虚血性脳卒中、腫瘍性塞栓および急性膵炎からなる群から選択される組織ネクローシスである、請求項６に記載の薬剤。
【請求項１１】
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から選択される外傷である、請求項６に記載の薬剤。
【請求項１２】
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から選択される悪性腫瘍である、請求項６に記載の薬剤。
【誤訳訂正２】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【発明の詳細な説明】
【発明の名称】組織ダメージの治療と予防
【技術分野】
【０００１】
本発明は、患者の組織損傷を治療または予防する方法に関するものであり、特に、炎症状態および／または組織損傷を与える状態を有するヒト患者を対象とするものである。また、本発明は、インビボ(in vivo)における自己由来或いは外来のリガンドへのＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）の結合を阻害する特性を有し、その結果、前記組織損傷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古典的な急性期タンパク質であり、大部分の状態で得られるその値は疾患の程度や活動度との密接な相関を示す（参考文献２）。ＣＲＰは、カルシウム依存性リガンド結合タンパク質であり、ＣＲＰが最も高い親和性で結合するリガンドはホスホコリン残基であるが（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、自己由来の構造のものも外来の構造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）と変性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、多くのグリカン、リン脂質、および微生物の他の成分、例えば細菌、菌類および寄生生物の莢膜成分や細胞体成分、ならびに植物

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）、さらに最終溶菌期Ｃ５～Ｃ９の関与を引き起こすことが可能になる（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関与するとの直接の証拠はなかった。炎症病変や壊死組織病変において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が組織損傷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、極微量の沈着が生じること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発表済みの研究で、ＣＲＰが、炎症細胞の浸潤を下方制御したり、組織損傷を低減するといった抗炎症的役割を有する可能性があ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、炎症を起す可能性のある補体活性化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の操作を含む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、インビボにおける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、ＣＲＰ産生の上昇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／または併発性の合併症の存在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インビボで虚血性の組織損傷を悪化させ得ることを明確に実証し、ＣＲＰの結合をインビボ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蔓延しており、その主要な合併症である心筋梗塞症と脳卒中とを合わせて、死亡事由の約３分の１を占めている。いくつかの病因面に対する理解や、予防処置および事後的な救済治療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、著しく高い早期死亡率と関係している。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、これら様々な状態の全てにおいて、重症度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、医薬において用いるための薬剤であって、特に、炎症状態および／または組織損傷を与える状態を有する患者における組織損傷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と複合体を形成するように、相互に共有結合により連結された複数のリガンドを含む。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によって結合され

る能力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によって結合される能力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によって結合される能力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ことが見出された。ＣＲＰは、特に、虚血性傷害により引き起こされる心筋障害の程度を増強することによって、疾病状態における直接の病因的役割を担うことが示された。斯かる病因的役割は、インビボにおいてＣＲＰがその標的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、処置または予防することができる。ここで、理論的な裏付けにとらわれることなく、そして本明細書により詳しく説明されているように、インビボにおいてＣＲＰの標的リガンドに対する結合を阻害すれば、ＣＲＰの補体活性化を防ぐことになる。その結果、本発明が治療すべき対象としている状態において、現在、組織損傷の原因と考えられているＣＲＰ媒介による補体活性化の有害作用を、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、炎症状態および／または組織損傷を与える状態は、アテローム性動脈硬化症を含むものとする。

【０００８】

組織傷害，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10 mg/l（これは健康な被験者において見られる範囲の90～99％を表す）を超えている場合の血中ＣＲＰを検出し測定するためだけに設計されている。しかし、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おり、これらの研究で、ＣＲＰに関する基準の範囲内でさえ、従来は“正常”と考えられていた値の中に、ＣＲＰの産生増大が、心筋梗塞症、脳卒中および血管疾患の進行を含むアテローム血栓性事象に非常に大きく関係していることが明確に示されている（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発症、進行および合併症との関係の根底にあるメカニズムは、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であると知られていること、および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が、大いに関係していると高い確率で考えられる（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、“変性された”、即ちアテローム斑で見られる様な部分的に分解したＬＤＬに結合すると、補体が強く活性化される（参考文献５１）。ＣＲＰは、インビトロでマクロファージと血管平滑筋細胞による未変性ＬＤＬの取り込みを促進して泡沫細胞を形成する。この泡沫細胞は、インビボ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。最終的に、アテローム斑に浸潤する最も豊富に存在する細胞であるマクロファージをＣＲＰが刺激し、組織因子（ＴＦ）を産生させ得るとの証拠もある（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、心筋梗塞や脳卒中を引き起こす。この様に、ＣＲＰは、アテローム性動脈硬化症の病因、進行およびその臨床的に重要な合併症に直接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、到達するピーク値は、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が虚血性疾患の程度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値、特に経時的なＣＲＰの累積的産生は、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）やクローン病；急性および慢性の細菌、ウィルス、真菌および寄生生物による感染症；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、術前のＣＲＰ値と術後の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により悪化させたラットの心筋梗塞モデル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状態において疾患の重篤度に積極的に関与していることが指摘されている。

【００１１】

さらなる態様では、上記炎症状態および／または組織損傷を与える状態は、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、状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。状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，糸球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。状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（リウマチ性）関節炎，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，クロー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。状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，虚血性脳卒中，腫瘍性塞栓および急性膵炎からなる群より選択されるものがある。状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。状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、インビボでＣＲＰがそのリガンドへ結合することを阻害する、および／またはインビボでの斯かる結合に対するＣＲＰの利用能を減ずる薬剤は、ＣＲＰの疾病の原因への寄与を阻止し、それにより疾病の程度や重篤度を低減し、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，脳卒中および末梢血管疾患，その病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。

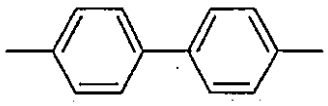
【００１４】

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互いに直接結合され得るが、リンカーを介して互いに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に分離され、そのため、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、一つのタンパク質が他の一つまたは複数のタンパク質の結合を妨害することはない。リンカーの厳密な構造は重要ではないが、典型的には反応性基を含まないことが好適である。当該リンカーは、直鎖状または分枝鎖状のヒドロカルビレン(hydrocarbylene)であってよく、かかるヒドロカルビレンは、その１または２以上の炭素原子がヘテロ原子で任意に置き換えられていてもよい。当該リンカーは、２～２０個の原子分に相当する鎖長を有するものでよいが、好ましくは５～７個の原子分に相当する鎖長を有する。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していてもよい。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てもよく、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。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も意図され、その場合、３，４またはそれ以上の標的タンパク質は複合体を形成できる。例えば、当該リンカーは、環状コアを有してもよく、当該環状コアは、そ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によって結合される能力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によってまたはＳＡＰ分子のリガンド結合部位のいずれかによって結合される能力を有するリガンドにより置換されている。

【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よって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よって結合されることが、例えばＸ線結晶情報などの結合部位に関する入手可能な構造的情報に基づいて予想されるリガンドや、その構造類縁体から選択され得る。好適な化合物は、化合物ライブラリのハイスループットスクリーニングおよび／または構造に基づく分子デザインにより同定することができる。個々のリガンドとＣＲＰ結合部位との相互作用の親和性は、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。親和性は、マイクロモルまたはそれ以上が好ましい。可能な限り高い親和性が望ましいことは明らかであるものの、ＣＲＰの場合マイクロモルレベルの親和性で十分であることが判明している。

【００１８】

さらに、本発明は、炎症および／または組織損傷を与える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）リガンド結合を可能にする条件下において、ＣＲＰとその試験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、複数のリガンドを有し、その複数のリガンドは、同一でも異なってもよく、複数のＣＲＰ分子と複合体を形成するように互いに共有結合されている。

【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学的に許容される誘導体を用意することによっ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リガンド結合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の試験リガンドへの結合を阻害する試験化合物は全て、可能性のある薬剤として選択される。例えば、試験化合物は、特定された後、化学的もしくは生化学的合成により大量に製造され得るか、または医薬としての直接処方のために選択され得るという意味で選択されてもよい。医薬用薬剤の製造方法にしたがって、試験化合物は医薬用途のために製剤化されてもよく、あるいはその医薬上許容される誘導体を製造するために、誘導体化され、または化学的に修飾されてもよい。その様な誘導体化は、単純に新しい官能基を導入するために必要とされてもよく、または既に存在する置換基を変更して例えば溶解性を変えることによって製剤化を容易にするために必要とされてもよい。この種の誘導体化は、化合物の毒性を低減したり、化合物の安定性を変えたり、或いはその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、または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ことが必要だろう。このプロセスは、その医薬特性を改善するため、本発明薬剤に同様に適用され得る。

【００２１】

試験化合物をＣＲＰに接触させる工程においては、その条件は、試験化合物の不在下でＣＲＰとリガンドを結合させるのに十分でなければならない。このような方法において、試験化合物の存在下で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、かかる効果は試験化合物に起因するものであり得る。ここで、結合の阻害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ず、結合の程度の低下があれば、本発明でいう結合の阻害に相当する。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、ＣＲＰの特異的なカルシウム依存性結合を可能にするのに十分量の遊離のカルシウムイオンを含む条件下で行う。当該接触のために好適な緩衝液は、緩衝化生理食塩水である。ＣＲＰは、純粋なまたは単離された形態で提供されてもよく、或いは全血清に組み込まれた形で提供されてもよい。

【００２２】

ＣＲＰ，試験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、本質的に同時に混合でき、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つの成分が液相中にある状況で行う。しかし、試験手順において結合種を非結合種から分離するための技術として相分離を使用することでＣＲＰのリガンド結合の程度についての試験を容易化することができるように、ＣＲＰまたは試験リガンドのいずれかが固相の一部を形成することが都合がよい。

【００２３】

従って、ＣＲＰまたは試験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、他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リガンド結合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み得る。第２成分の固相に対する結合の検出は、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ることによって行うことができる。

【００２４】

この態様では、固相は、固体担体へ結合させた第１成分を含むことが好ましい。この固体担体は、粒子状担体や固体表面を有するものであってもよい。利便性の高い態様では、当該固体表面は、マイクロタイタープレートウェルの様な容器の内部表面を含む。

【００２５】

ＣＲＰリガンド結合の試験工程は、結合していない材料を除去するために、さらに固相を洗浄する工程を含むことが都合がよい。

【００２６】

第２成分は、ここで説明する様な放射標識，蛍光色素または酵素などの検出可能なラベ

ルで標識化してもよい。その他、固相への第２成分の結合は、固相へ結合した第２成分への抗体結合によって、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って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、そのありとあらゆる既知の生物学的および化学的リガンドへの結合を阻害する能力を有する化合物を検出するためのインビトロスポットテスト、低スループット、及び高スループットスクリーニング方法を提供するものである。これら方法は、有機，無機および生物起源の天然化合物の化合物ライブラリー、ならびに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学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結合を阻害するメカニズムの分析に適しておてり、また、スクリーニングやスポットテストにより同定されたリード化合物から可能性がある医薬品或いは実際の医薬品を化学的および医薬化学的に開発する際の、阻害の有効性の評価にも適している。本発明は、ヒトや実験動物でのＣＲＰ結合，血漿代謝回転および異化作用におけるＣＲＰ－阻害化合物の効果および効力、また、ヒトＣＲＰにより悪化した疾患の実験モデルにおけるＣＲＰ－阻害化合物の効果および効力をインビボで試験する方法にも関する。

【００２８】

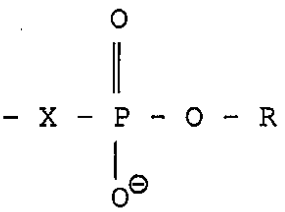
上記方法に伴い、本発明のさらなる態様では、複数の試験化合物から、組織損傷を治療または予防するための医薬用化合物を選択する方法であって、反応区画と複数の試験化合物のアレイを用意し、各反応区画において上記記載の化合物選択方法を行なうことによって医薬化合物を選択することを含む方法を提供する。

【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、独立して下記一般式を有する。

【００３０】

【化２】



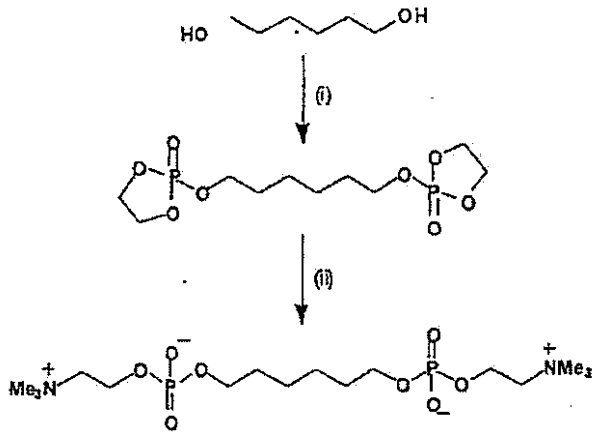
【００３１】

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。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、脂肪族でも芳香族でもよく、窒素基が環の一部であるヘテロ環式化合物も含まれる。アミンは、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-0-に結合しているものであってもよく、基は、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。好ましくは、アミンは、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。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】
本発明薬剤と、場合により薬学的に許容される賦形剤，希釈剤または担体を含む医薬組成物が製剤化され得る。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により結合される生理学的な成分は、ＣＲＰの一部の外因性高分子リガンドおよびＣＲＰの一部の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、その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ＰＣＨＰＣ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），密閉チューブ，30分間

【００３８】
新たに蒸留したジクロロメタン（50 mL）に無水炭酸カリウム（29.84 g，0.216 mol）を加えた懸濁液を攪拌し、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）にヘキサン 1,6-ジオール（5 g，42.34 mmol）を加えた溶液を、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。トリメチルアミン（2 mL, -10℃）を各容器に加えた後、バイアルをシールし、電磁波（300 W）照射下30分間100℃に加熱した。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、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

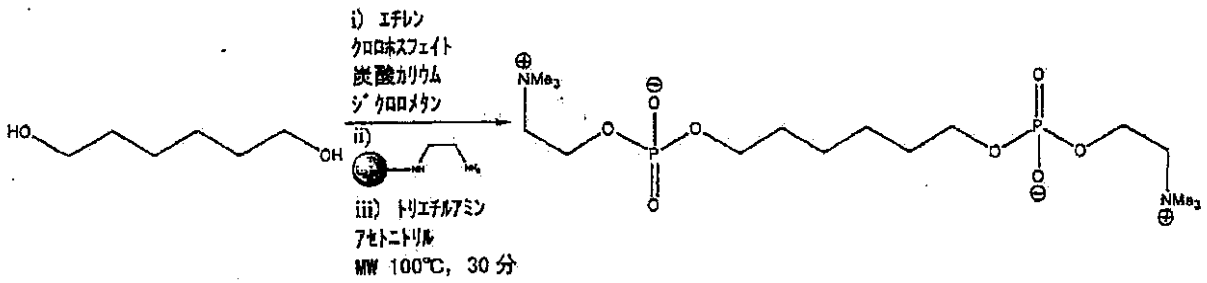
電磁波による加熱実験を、専用ガラス器中のPersonal Chemistry Smith Synthesizer（Personal Chemistry社製，ウプサラ，スウェーデン）で実施した。分析用薄層クロマトグラフィを、プレコートしたガラスプレート（Merck Kieselgel 60 F254）上で行なった。モリブデン酸アンモニウムまたは過マンガン酸カリウム水溶液と、それに続く加熱により可視化した。全ての湿気および／または空気感受性の反応は、アルゴンの不活性雰囲気下オーブン（150℃）で乾燥したガラス器中で行なった。アセトニトリルとジクロロメタンを、水素化カルシウムから留去した。ベンゾフェノンの存在下、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）に無水炭酸カリウム（14 g, 107.6 mmol, 5.1当量）を加えた懸濁液を攪拌し、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 mmol, 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 mmol）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ると反応は完了しているように見えた。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（約22 gの2.8 mM/gロードポリマー，理論上の未反応エチレン クロロホスフェイトの62 mmolに相当）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。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、バイアルをシールし、電磁波（300W）照射下、30分間100℃まで加熱した。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（６ｇ，定量的）が得られた。1H NMR (400 MHz, MeOD): 4.27 (2H, br, CH_2CH_2N), 3.89 (2H, m, CH_2CH_2N), 3.65 (2H, br, $CH_2OP(O)O_2CH_2CH_2N$), 3.24 (9H, s, $N(CH_3)_3$), 1.65 (2H, br, $CH_2CH_2CH_2OP$), 1.45 (2H, br, $CH_2CH_2CH_2OP$)。

【００４３】

外来性の高分子リガンドとして最もよく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。ＣＰＳに対する、^{125}Ｉ-ラベル化した精製ヒトＣＲＰの典型的なカルシウム依存性の結合は、容易に実証することができた。この結合は、明らかに溶液中のホスホコリンにより阻害されており（約20μＭのIC_{50}）、それに対してＰＣＨＰＣは、10倍も低い約2μＭのIC_{50}でＣＲＰ結合を阻害した（図１）。さらに、ＣＲＰに対するＰＣＨＰＣのK_dを等温熱量計で直接測定したところ、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。一方、当該値と比較して、ＣＲＰに対するホスホコリンのK_d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ＣＲＰの結合の阻害剤としてのＰＣＨＰＣの効力がフリーのホスホコリンに比べて高いことは、ＰＣＨＰＣ分子の二官能性、パリンドローム性の性質を反映するものである。リンカー部分の各末端におけるホスホコリン残基（これは五量体ＣＲＰ分子の各プロトマーに存在するリガンド結合ポケットによって認識され、結合され得る）の存在は、ＰＣＨＰＣによるＣＲＰ分子のペアの橋架けおよび架橋結合を可能にする。こういった複合的な相互作用能は、ＰＣＨＰＣとＣＲＰ間の相互作用の結合力を強く増強する。ＣＲＰ分子における５つのプロトマー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アセンブリの同一面上に存在している。ＰＣＨＰＣ分子によるＣＲＰ分子ペアの架橋は、タンパク質の結合面すなわち“Ｂ”面を遮蔽することによって、他のリガンドに対するＣＲＰの結合能もさらに減ずる。大過剰モルのＰＣＨＰＣ存在下においては、ＣＲＰの全てのリガンド結合部位は個々のＰＣＨＰＣ分子により占有されており、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に結合するが、“モノマー的な”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の未変性の１個の五量体アセンブリと、本発明薬剤により二量化されているかかる五量体のペアとを明確に区別する分子ふるいクロマトグラフィにより実証される。重要なことに、インビボで病原の可能性があるＣＲＰ結合の阻害剤として働くＰＣＨＰＣの能力について、同様の効果が、水性緩衝液中の単離された純粋な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の分子アセンブリにおけるＰＣＨＰＣの効果

【表１】

モル過剰のPCHPC またはフリーのホスホコリン	CRPの分子アセンブリ
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、絶対的にカルシウム依存的なものである。遊離のカルシウムイオンが存在しない場合には、ＰＣＨＰＣは、ＣＲＰの分子アセンブリ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される。
【００４８】
ＰＣＨＰＣを含むまたは含まない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、公知の共有結合構造によるMr 23027という５つのプロトマーについて計算された値に近いMrを有する予測された五量体が主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Mr種も、極微量存在した。しかしながら、ＰＣＨＰＣとカルシウムイオンの両方の存在下では、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Mr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Mr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Mrは448）と２０個のカルシウムイオン（それぞれのMr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２ｂ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分子の五量体のペアが面と面で相互作用していることを示している（図２ｃ）。これはまさしく、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、ＣＲＰ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たＣＲＰ二量体が形成されることによって、このエピトープはマスクされ、当該アッセイではＣＲＰ－ＰＣＨＰＣ複合体が検出不能になる（図３）。これは、インビトロまたはインビボで生じたその様な複合体の証明のための利便性の高い方法を提供する。このことは図３に示されており、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、対してフリーのホスホコリン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】
ＣＲＰの炎症誘発性の組織損傷を与える作用がインビボで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の有害作用をブロックする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はこの点において強力である。図４は、二次元免疫電気泳動法により示した全血清中における補体第３成分Ｃ３の活性化と、ＰＣＨＰＣによるその阻害を示す図である。左上図は、正常なヒト血清（ＮＨＳ）を4℃で単独でインキュベートした結果であり、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℃で単独でインキュベートした結果であり、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作用を防ぐことも重要である。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、炎症誘発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、このことがインビボで起こると、ＣＲＰ産生の増加によりアテローム形成促進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 O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、泡沫細胞の形成が効果的に阻害される（図６）。

【００５３】

インビボ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、心欠陥疾患を引き起こすアテローム性動脈硬化症の発症および進行に関わることは、一般的に容認されている。一酸化窒素の適切な産生の減少が、同様に血管拡張の欠陥に関係しており、ＣＲＰがインビトロで血管壁や内皮細胞において一酸化窒素の産生を減ずることが主張されている。しかし、我々の研究は、ヒトＣＲＰが、ｅＮＯＳのアップレギュレーションによって媒介される一酸化窒素産生の増大の結果として、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を実際に減少させることを再現よく示した（図７）。ＣＲＰの斯かる効果がアテローム性動脈硬化症やインビボでの他の病理に関してどのような病態生理学的重要性を有しているかは明らかでない。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）に対する血管応答におけるＣＲＰの効果とＰＣＨＰＣによる阻害を示す。移植された動脈のＰＥに応答した収縮は、培地へのＣＲＰの添加により有意に低減された。これは、ＣＲＰによるｅＮＯＳのアップレギュレーション（データは示していない）と、それに対応した血管弛緩薬であるＮＯの産生の増大（データは示していない）によるものである。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を予め注射されたマウスにＰＣＨＰＣをインビボ投与することによって、循環系で実証可能な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の電気化学的イムノアッセイで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。電気化学的イムノアッセイは、カルシウムにキレートし複合体からＣＲＰを遊離させるＥＤＴＡの存在下で行なわれる。さらに、ヒトＣＲＰを注射したマウスへＰＣＨＰＣを投与した後には、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17％しかセファロース－ＰＥへ結合できなかった。

【００５６】

ＰＣＨＰＣの臨床的な効果は、本発明によれば、ＰＣＨＰＣがインビボでＣＲＰのリガンドへの結合を阻害するのみでなく、インビボにおいてＣＲＰの生物学的効果をも消失させることを必要とする。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に示されている。

【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のインビボでの強い生物活性をインビボ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をインビボ投与しても循環系からのＣＲＰのクリアランス速度は影響を受けない。この実験と同様のサンプルをＣＲＰに関するＭＩＲＡアッセイで測定すると（図１０（ｂ））、ＣＲＰと複合体を形成することによってこのアッセイでその免疫反応性を消失させことにおけるその薬剤の効果が明らかになる。しかし、ＰＣＨＰＣ自体は速やかに消失し、４時間後にはマウスにおけるヒトＣＲＰ循環が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速度で消失する。

【００５９】

薬剤とＣＲＰとの複合体の形成にもかかわらず、マウス血漿からのヒトＣＲＰのクリアランスにＰＣＨＰＣが影響を与えないという事実は、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一定の速い速度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（参考文献３１）。また、実験動物における研究でも、ＣＰＳの様な強い高分子リガンドの存在にも関わらず、ヒトＣＲＰは常に同じ速度で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、ヒトペントラキシンタンパク質ファミリーの他のメンバーである密接に関連した分子血清アミロイドＰ成分（ＳＡＰ）のインビボ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円盤状の立体配置で非共有結合により結合し、それぞれのサブユニットの一つの面上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パリンドローム型（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、インビボ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、インビボにおけるヒトＳＡＰ凝集体のハンドリングは、ＣＲＰ凝集体とはかなり異なり得る。一方、ＣＲＰとＰＣＨＰＣとの複合体は、ＳＡＰとＣＰＨＰＣ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については400 nMであるのに対し、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、インビボにおけるマウスＳＡＰのクリアランスは促進されないが、ヒトＳＡＰトランスジェニックマウスで発現したヒトＳＡＰは劇的に消失される（参考文献６７）。よって、ＣＲＰにより高い親和性で結合され、且つ

より高い安定性でＣＲＰを架橋する化合物は、インビボにおいて血漿からのクリアランスを促進することができる。

【００６０】

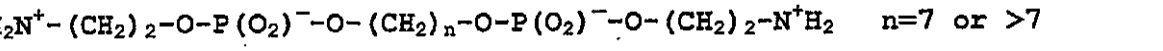
ＰＣＨＰＣの様に、ＣＲＰによるリガンド結合を阻害するのみでなく、ＣＲＰのクリアランスを促進することによって、有害な病原性の作用を発揮できないようにする化合物が本発明において好ましい。その様な化合物は、カルシウム依存性結合ポケットにおいてホスホコリン頭部基を認識できることに加え、ＣＲＰとの補助的な相互作用(accessory interactions)に基づくＣＲＰによる高親和性結合を特徴とする。例えば、ホスホコリン結合部位に隣接して小さな疎水性の割れ目があり、これがメチル基やその他の小さな疎水性基を収容する。そして、ＰＣＨＰＣ分子の各末端に適切に配置された基が結合すると、ＣＲＰによる結合親和性が顕著に向上する（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基の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、最適なコンフォメーションを確固なものとするために二重結合を導入したり、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をもたらす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依存性結合にとって重要な要素は、コリンの第４級アンモニウムと残基Ｇｌｕ８１との静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おいて維持される。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】

本発明によるパリンドローム型（palindromic）となる様な頭部基を有する他のホスフェートを、以下に示す。化合物１，５と６は、ＣＲＰリガンド結合ポケットにおけるＴｒｐ６６と積み重なる環を生じさせ、それによってカルシウムの配位結合を維持しつつ結合親和性を増大させる。化合物５と６は、環の窒素原子と、ＣＲＰとの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】

結合親和性を向上させる他のバリエーションは、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つにおける水素原子の１つを、アミノ基で置換することである。それによって、コリン頭部基に近い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親和性結合が得られる。斯かる構造を有する頭部基は、下記構造式中の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と追加の水素結合を形成する。化合物７は、有利なことに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、正電荷をもつアミノ基はコリンの第４級窒素よりも小さく、頭部全体基をポケットへよりぴったりと適合させる。これによって、本発明にとり好ましい高い親和性結合が得られる。

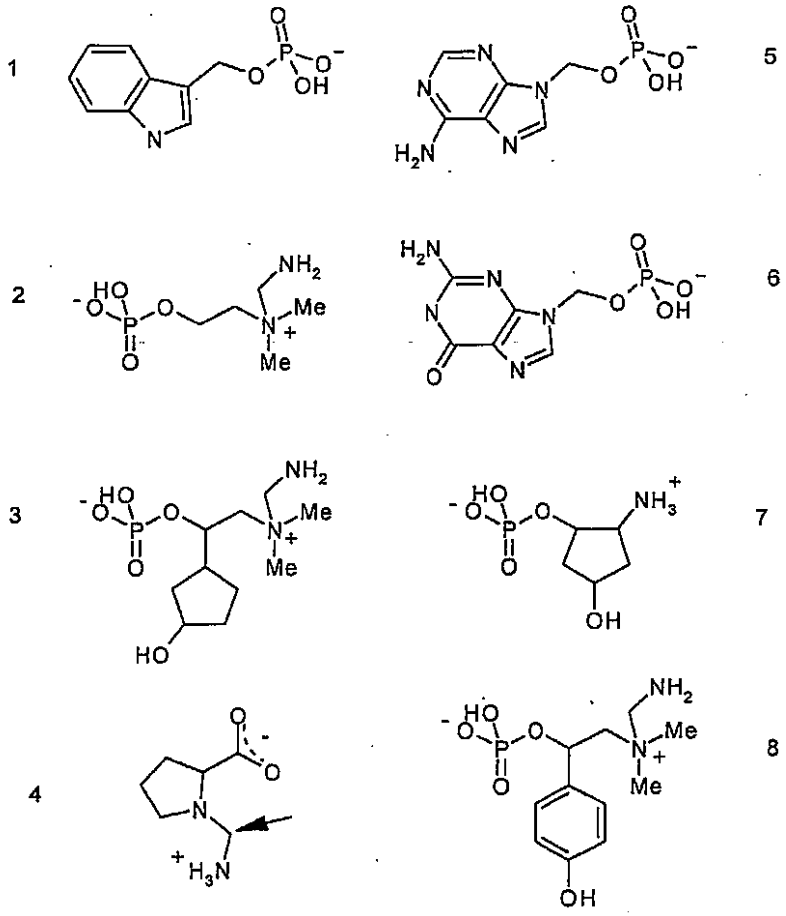
【００６５】

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をもつ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方にある炭素原子は、リンカーの結合部位である。下記に示す他の全ての頭部基については、リンカーは、ＰＣＨＰＣの様にホスフェートの水酸基を介

して結合される。

【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いかつ４個のプロリン炭素のうちの３個に結合するＴｙｒ７４、Ｔｙｒ６４およびＬｅｕ６２残基の代わりにＣＲＰのＴｈｒ７６残基を有することによって極性側鎖を有している。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、頭部基とリンカー上の枝分かれ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枝分かれ部分がポケット内に侵入してＴｈｒ７４と水素結合することができる。その結果、高い親和性結合が得られる。従って、このタイプのパリンンドローム型化合物は、本発明において好ましい。

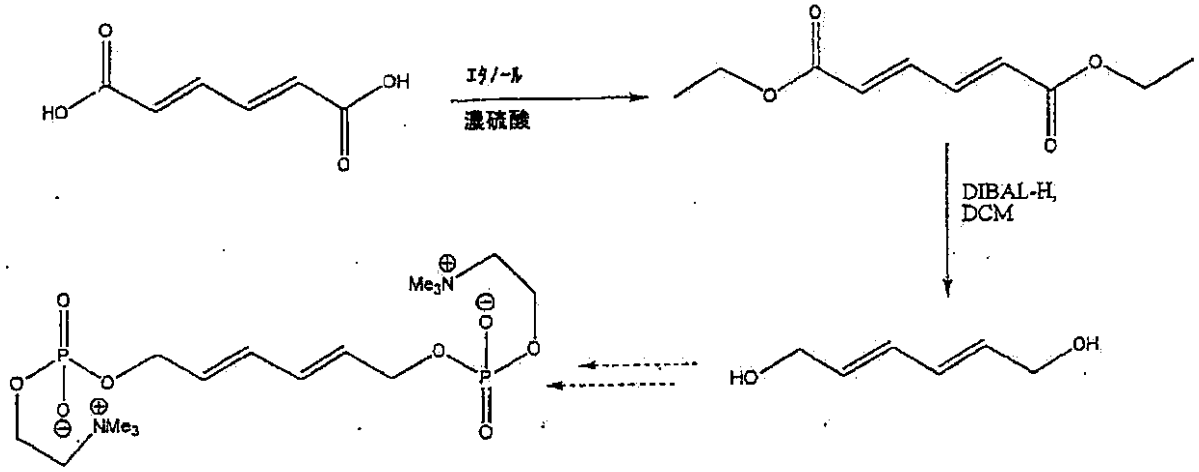
【００６８】

リンカー鎖に関しては、ＰＣＨＰＣにおける６炭素鎖長が、完全な(intact)五量体の５回対称軸(five fold axis)から離れるように傾いた（参考文献６８）ＣＲＰプロトマーにおけるカルシウム依存性リガンド結合部位の位置で最適化される。しかし、本発明においては、５または７個のメチレン基を含む鎖も好適である。５個のメチレン基の場合、より多くの五量体と五量体との接触が可能になり、これらによって望ましいことに結合強度が高まる。７個のメチレン基の場合、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、結合親和性が高まる。

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ので望ましい。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)。

【００７１】

トランス－トランス－ムコノール

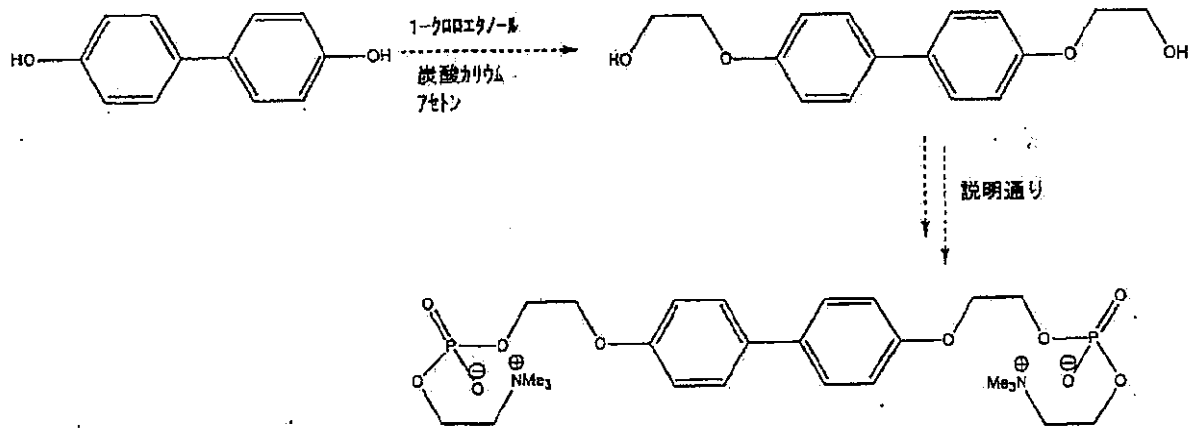
攪拌したジエチル－トランス－トランス－ムコン酸（1.67 g, 8.4 mmol）の無水ジクロロメタン（60 mL）溶液へ、30分かけてシリンジポンプからジブチルアルミニウムハイドライド（1.0 M, 33.6 mL, 4当量）のエーテル溶液を加えた。添加完了後、黄色溶液を20℃まで温め、8時間攪拌した。その後、未反応のジブチルアルミニウムハイドライドを分解するために過剰のメタノール（250 mL）でクエンチし、当該混合物を1時間攪拌した。その後、当該懸濁液を濾過して濾液を分離し、残渣をメタノールと共にすり鉢中ですり、再びセライトを用いて濾過し、最初の濾液と合わせた。この有機層を乾燥し（$MgSO_4$）、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基をトランス－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によるホスホコリン頭部基の高い親和性結合を促進し、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成分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基を結合させる。

【００７３】

【化８】

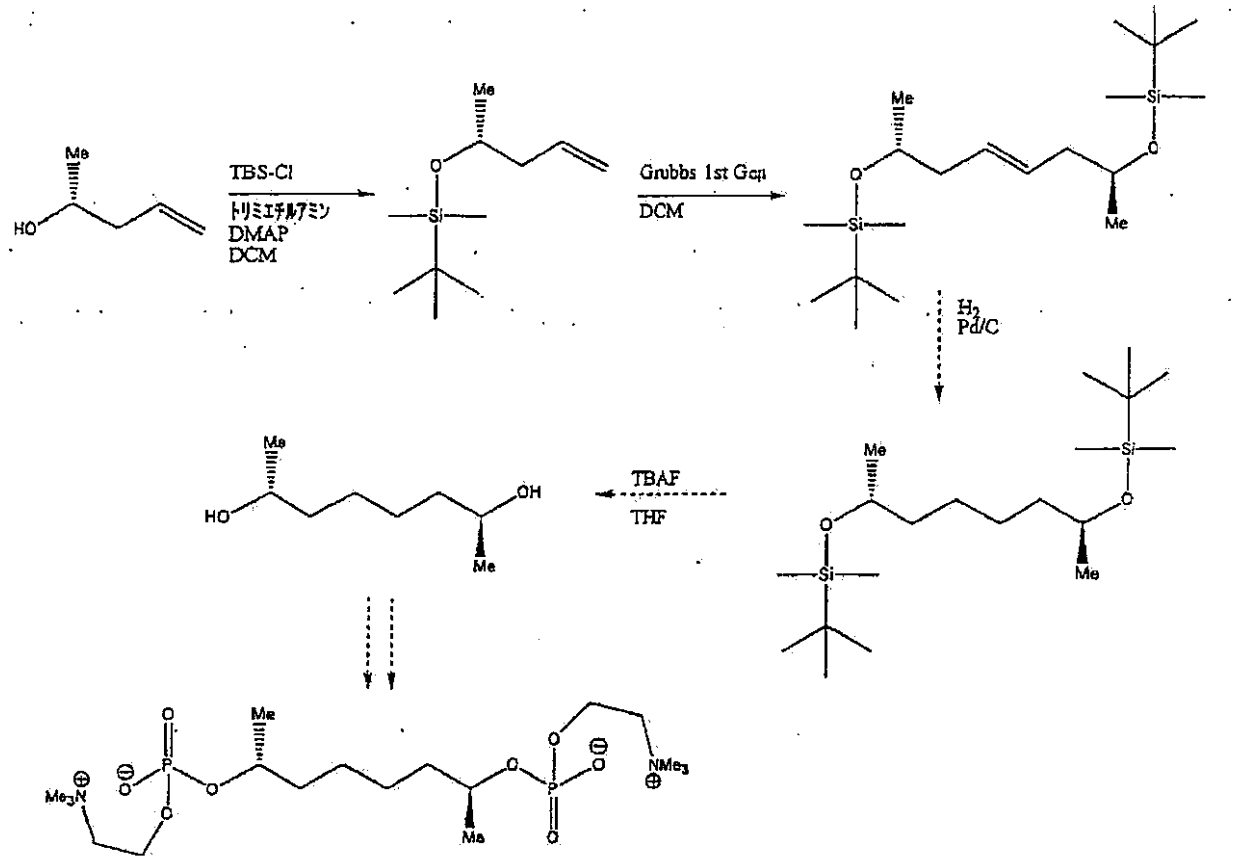


【００７４】

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親和性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基に近いリンカー炭素原子上にメチル側鎖が好適に配置され、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との結合親和性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)-O-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）溶液を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】

O,O-2,7-ジ-(tert-ブチルジメチルシリル)-オクト-4-エン

(R)-O-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基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】

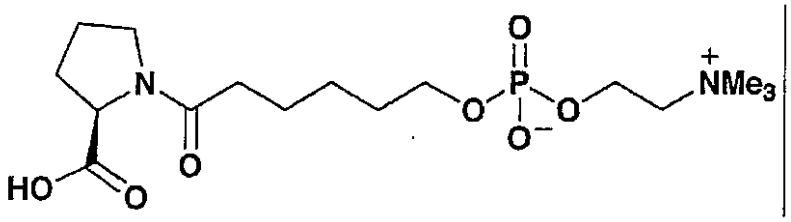
ＣＲＰにより結合される複数のホスホコリン、或いは他の頭部基を有する多量体の薬剤化合物であって、その複数のホスホコリンまたは頭部基が当該薬剤により架橋された二量体における各ＣＲＰ分子ペア上の複数のプロトマーと相互作用できる様に適切に空間をあけて配置されているものは、非常に強く安定な薬剤－ＣＲＰ複合体を形成することができ、斯かる化合物は本発明において好適なものである。特に、ＣＲＰ分子の平面的な結合（Ｂ）面上にある５つのリガンド結合ポケットのそれぞれに結合できるよう適切に空間をあけて配置された配列でリガンド頭部基を有する化合物は、多様な相互作用により親和力が非常に高められる点で好ましい。

【００７９】

本発明におけるＣＲＰの作用阻害とクリアランスのための他のアプローチとしては、ホスホコリンまたはＣＲＰによって認識される上記の様々な異なる頭部基のいずれか一つを一方の頭部基として有し、ＳＡＰによって認識されるＤ－プロリンを他方の頭部として有するヘテロ二官能性化合物を使用することである。構造上このタイプに分類される典型例を下記に示す。

【００８０】

【化１０】



【００８１】

この化合物により、１つのＣＲＰ分子と１つのＳＡＰ分子が薬剤によって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関連頭部基の結合は、ＣＲＰが他のリガンドと相互作用する能力を抑制し、斯かる抑制はＣＲＰ分子のＢ面を覆い隠すと増強される。重要なことに、ＳＡＰとの複合化と凝集によって、インビボで異物と認識され、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、ＣＲＰの有害な病原性作用を無効にし、その結果疾病を改善することにおける本発明に係る薬剤の有効性をさらに高める。

【００８２】

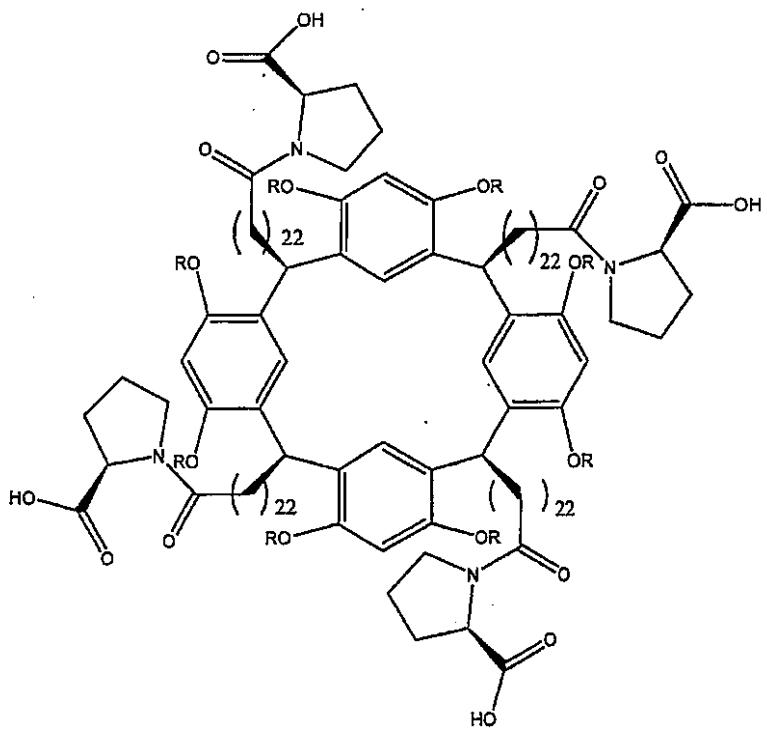
ＰＣＨＰＣについて説明した通り、ＣＲＰのＭＩＲＡアッセイにおいてモノクローナル抗ＣＲＰ抗体の１つに認識されるエピトープが存在するＣＲＰ分子のＢ面を覆い隠すことによって、このアッセイで検出されるＣＲＰの量は減ぜられる。同様に、ホスホコリン基を介してＣＲＰにより結合される、本明細書に示したヘテロ二官能性リガンド化合物、D-Pro-ヘキサノイル-ホスホコリン（ＤＰＨＰＣ）は、単離された純粋なＣＲＰに添加された場合、おそらく単純な立体障害によって、ＭＩＲＡアッセイにおいて見掛けのＣＲＰ濃度をわずかに低減する。しかし、純粋なＳＡＰが存在すると、ＤＰＨＰＣは用量依存的にＭＩＲＡ ＣＲＰ濃度を劇的に減ずる。100 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％下がるが、ＤＰＨＰＣが400 μM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％、2 mMのＤＰＨＰＣで89％、400μMのＤＰＨＰＣで58％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を用いた別の典型的な実験では、ＭＩＲＡ ＣＲＰ濃度は62％低減された。しかし、約4μMのＳＡＰが存在すると、ＭＩＲＡ ＣＲＰ値は85％；2μMのＳＡＰでは73％；800 nMまたは400 nMのＳＡＰでは61％(ＳＡＰが無い場合と同等)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複合体を形成する同様の効果を有し、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％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％下がった。2μMのＳＡＰでは29％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の両方に結合される能力を有する多量体化合物は、より強い相互作用をもたらしし、その結果、ＣＲＰ分子とＳＡＰ分子の混合複合体をより安定化する。また、かかる化合物はＣＲＰの結合をより効果的に阻害し、ＣＲＰのクリアランスもより効果的に促進する。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空間をあけて配置されている。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】

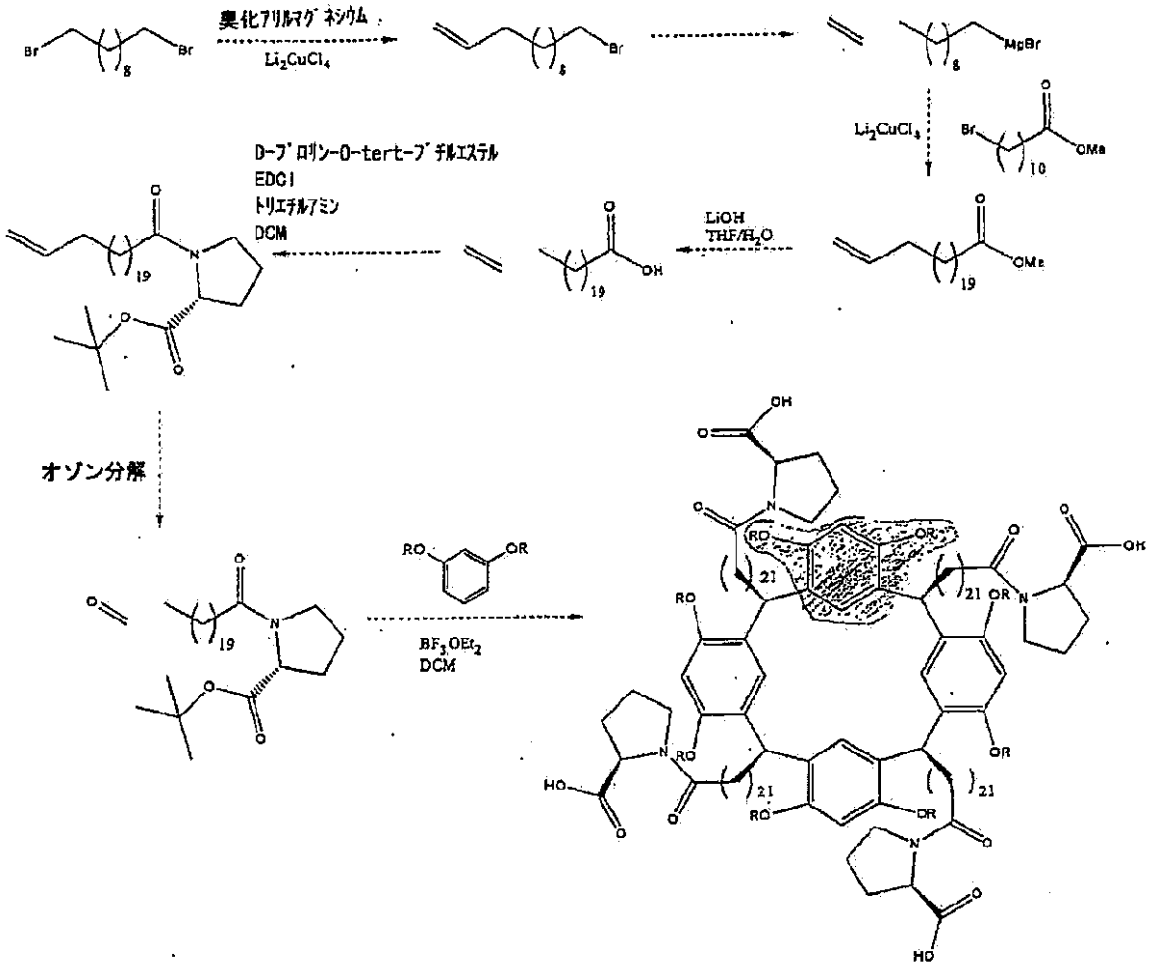


【００８５】

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。

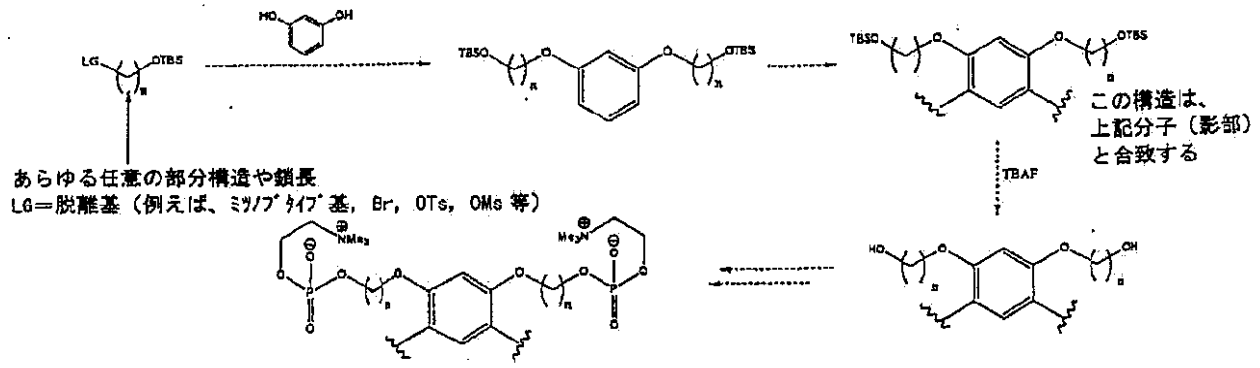
【００８６】

【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のみのネガティブ染色された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つの五量体ＣＲＰ分子が

、互いに向かい合って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細胞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細胞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によるインビボ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が最初にＣＲＰと複合体を形成したにもかかわらず（これは下の図１０（ｂ）において、ＭＩＲＡアッセイにおけるＣＲＰの免疫反応性の消失により明確に示されている）、電気化学的イムノアッセイ結果による図１０（ａ）に示されているとおり、ＰＣＨＰＣが、インビボでマウスの循環系からのヒトＣＲＰのクリアランスに対して影響を及ぼさないことを示す図である。
【００８９】

1. Pepys, M.B. and Baltz, M.L. (1983) Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv. Immunol.*, **34**: 141-212.

2. Pepys, M.B. (1996) The acute phase response and C-reactive protein. ***In:*** *Oxford Textbook of Medicine, Third Ed., Vol. 2* (Weatherall, D.J., Ledingham, J.G.G. and Warrell, D.A., eds.), Oxford University Press, Oxford, pp. 1527-1533.

3. Volanakis, J.E. and Kaplan, M.H. (1971) Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**: 612-614.

4. de Beer, F.C., Soutar, A.K., Baltz, M.L., Trayner, I., Feinstein, A. and Pepys, M.B. (1982) Low density and very low density lipoproteins are selectively bound by aggregated C-reactive protein. *J. Exp. Med.*, **156**: 230-242.

5. Pepys, M.B., Rowe, I.F. and Baltz, M.L. (1985) C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **27**: 83-111.

6. Narkates, A.J. and Volanakis, J.E. (1982) C-reactive protein binding specificities: artificial and natural phospholipid bilayers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **389**: 172-182.

7. Volanakis, J.E. and Wirtz, K.W.A. (1979) Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature*, **281**: 155-157.

8. Du Clos, T.W. (1989) C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *J. Immunol.*, **143**: 2553-2559.

9. Pepys, M.B., Booth, S.E., Tennent, G.A., Butler, P.J.G. and Williams, D.G. (1994) Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. *Clin. Exp. Immunol.*, **97**: 152-157.

10. Kindmark, C.-O. (1972) *In vitro* binding of human C-reactive protein by some pathogenic bacteria and zymosan. *Clin. Exp. Immunol.*, **11**: 283-289.

11. Fletcher, T.C., White, A. and Baldo, B.A. (1980) Isolation of a phosphorylcholine-containing component from the turbot tapeworm, *Bothriocephalus scorpii* (Muller) and its reaction with C-reactive protein. *Parasite Immunol.*, **2**: 237-248.

12. de Beaufort, A.J., Langermans, J.A.M., Matze-van der Lans, A.M., Hiemstra, P.S., Vossen, J.M. and Van Furth, R. (1997) Difference in binding of killed and live *Streptococcus pneumoniae* serotypes by C-reactive protein. *Scand. J. Immunol.*, **46**: 597-600.

13. Weiser, J.N., Pan, N., McGowan, K.L., Musher, D., Martin, A. and Richards, J. (1998) Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J. Exp. Med.*, **187**: 631-640.

14. Culley, F.J., Bodman-Smith, K.B., Ferguson, M.A.J., Nikolaev, A.V., Shantilal, N. and Raynes, J.G. (2000) C-reactive protein binds to phosphorylated carbohydrates. *Glycobiology*, **10**: 59-65.

15. Lysenko, E., Richards, J.C., Cox, A.D., Stewart, A., Martin, A., Kapoor, M. and Weiser, J.N. (2000) The position of phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein-mediated killing. *Mol. Microbiol.*, **35**: 234-245.

16. Kaplan, M.H. and Volanakis, J.E. (1974) Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J. Immunol.*, **112**: 2135-2147.

17. Volanakis, J.E. and Kaplan, M.H. (1974) Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. II. Consumption of guinea-pig complement by CRP complexes: requirement for human Clq. *J. Immunol.*, **113**: 9-17.

18. Claus, D.R., Siegel, J., Petras, K., Osmand, A.P. and Gewurz, H. (1977) Interactions of C-reactive protein with the first component of human complement. *J. Immunol.*, **119**: 187-192.

19. Volanakis, J.E. (1982) Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **389**: 235-250.

20. Mortensen, R.F., Osmand, A.P., Lint, T.F. and Gewurz, H. (1976) Interaction of C-reactive protein with lymphocytes and monocytes: complement-dependent adherence and phagocytosis. *J. Immunol.*, **117**: 774-781.

21. Nakayama, S., Mold, C., Gewurz, H. and Du Clos, T.W. (1982) Opsonic properties of C-reactive protein *in vivo*. *J. Immunol.*, **128**: 2435-2438.

22. Osmand, A.P., Mortensen, R.F., Siegel, J. and Gewurz, H. (1975) Interactions of C-reactive protein with the complement system. III. Complement-dependent passive hemolysis initiated by CRP. *J. Exp. Med.*, **142**: 1065-1077.

23. Finland, M. and Dowling, H.F. (1935) Cutaneous reactions and antibody response to intracutaneous injections of pneumococcus polysaccharides. *J. Immunol.*, **29**: 285-299.

24. Kushner, I. and Kaplan, M.H. (1961) Studies of acute phase protein. I. An immunohistochemical method for

the localization of Cx-reactive protein in rabbits. Association with necrosis in local inflammatory lesions. *J. Exp. Med.*, **114**: 961-973.

25. Kushner, I., Rakita, L. and Kaplan, M.H. (1963) Studies of acute phase protein. II. Localization of Cx-reactive protein in heart in induced myocardial infarction in rabbits. *J. Clin. Invest.*, **42**: 286-292.

26. Gitlin, J.D., Gitlin, J.I. and Gitlin, D. (1977) Localisation of C-reactive protein in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **20**: 1491-1499.

27. Du Clos, T.W., Mold, C., Paterson, P.Y., Alroy, J. and Gewurz, H. (1981) Localization of C-reactive protein in inflammatory lesions of experimental allergic encephalomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.*, **43**: 565-573.

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. and Hack, C.E. (1997) C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation*, **95**: 97-103.

29. Torzewski, J., Torzewski, M., Bowyer, D.E., Fröhlich, M., Koenig, W., Waltenberger, J., Fitzsimmons, C. and Hombach, V. (1998) C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**: 1386-1392.

30. Wolbink, G.-J., Bossink, A.W.J., Groeneveld, A.B.J., de Groot, M.C.M., Thijs, L.G. and Hack, C.E. (1998) Complement activation in patients with sepsis is in part mediated by C-reactive protein. *J. Infect. Dis.*, **177**: 81-87.

31. Vigushin, D.M., Pepys, M.B. and Hawkins, P.N. (1993) Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J. Clin. Invest.*, **91**: 1351-1357.

32. Kew, R.R., Hyers, T.M. and Webster, R.O. (1990) Human C-reactive protein inhibits neutrophil chemotaxis *in vitro*: possible implications for the adult respiratory distress syndrome. *J. Lab. Clin. Med.*, **115**: 339-345.

33. Heuertz, R.M., Xia, D., Samols, D. and Webster, R.O. (1992) Transgenic mice expressing plasma rabbit C-reactive protein exhibit diminished vascular permeability and neutrophil infiltration in C5a-induced alveolitis. *FASEB J.*, **6**: 1064 (abstract).

34. Mold, C. and Gewurz, H. (1980) Activation of the alternative pathway by liposomes: inhibitory effect of C-reactive protein. *Fed. Proc.*, **39**: 702.

35. Mold, C. and Gewurz, H. (1981) Inhibitory effect of C-reactive protein on alternative C pathway activation by liposomes and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.*, **127**: 2089-2092.

36. Gershov, D., Kim, S., Brot, N. and Elkon, K.B. (2000) C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.*, **192**: 1353-1363.

37. Griselli, M., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Taylor, K.M., Sohail, M., Krausz, T. and Pepys, M.B. (1999) C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J. Exp. Med.*, **190**: 1733-1739.

38. Shine, B., de Beer, F.C. and Pepys, M.B. (1981) Solid phase radioimmunoassays for C-reactive protein. *Clin. Chim. Acta*, **117**: 13-23.

39. Hutchinson, W.L., Koenig, W., Fröhlich, M., Sund, M., Lowe, G.D.O. and Pepys, M.B. (2000) Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. *Clin. Chem.*, **46**: 934-938.

40. Liuzzo, G., Biasucci, L.M., Gallimore, J.R., Grillo, R.L., Rebuzzi, A.G., Pepys, M.B. and Maseri, A. (1994) The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N. Engl. J. Med.*, **331**: 417-424.

41. Kuller, L.H., Tracy, R.P., Shaten, J. and Meilahn, E.N. (1996) Relation of C-reactive protein and coronary

heart-disease in the MRFIT nested case control study. *Am. J. Epidemiol.*, **144**: 537-547.

42. Haverkate, F., Thompson, S.G., Pyke, S.D.M., Gallimore, J.R. and Pepys, M.B. (1997) Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet*, **349**: 462-466.

43. Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P. and Hennekens, C.H. (1997) Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.*, **336**: 973-979.

44. Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P. and Hennekens, C.H. (1998) Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*, **97**: 425-428.

45. Ridker, P.M., Buring, J.E., Shih, J., Matias, M. and Hennekens, C.H. (1998) Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*, **98**: 731-733.

46. Ridker, P.M. (1998) C-reactive protein and risks of future myocardial infarction and thombotic stroke. *Eur. Heart J.*, **19**: 1-3.

47. Danesh, J., Collins, R., Appleby, P. and Peto, R. (1998) Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **279**: 1477-1482.

48. Koenig, W., Sund, M., Fröhlich, M., Fischer, H.-G., Löwel, H., Döring, A., Hutchinson, W.L. and Pepys, M.B. (1999) C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation,* **99**: 237-242.

49. Danesh, J., Whincup, P., Walker, M., Lennon, L., Thomson, A., Appleby, P., Gallimore, J.R. and Pepys, M.B. (2000) Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *B.M.J.*, **321**: 199-204.

50. Zhang, Y.X., Cliff, W.J., Schoefl, G.I. and Higgins, G. (1999) Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **145**: 375-379.

51. Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M. and Hemmes, M. (1999) Complement and atherogenesis. Binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**: 2348-2354.

52. Cermak, J., Key, N.S., Bach, R.R., Balla, J., Jacob, H.S. and Vercellotti, G.M. (1993) C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood,* **82**: 513-520.

53. de Beer, F.C., Hind, C.R.K., Fox, K.M., Allan, R., Maseri, A. and Pepys, M.B. (1982) Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br. Heart J.*, **47**: 239-243.

54. Ueda, S., Ikeda, U., Yamamoto, K., Takahashi, M., Nishinaga, M., Nago, N. and Shimada, K. (1996) C-reactive protein as a predictor of cardiac rupture after acute myocardial infarction. *Am. Heart J.*, **131**: 857-860.

55. Pietilä, K.O., Harmoinen, A.P., Jokiniitty, J. and Pasternack, A.I. (1996) Serum C-reactive protein concentration in acute myocardial infarction and its relationship to mortality during 24 months of follow-up in patients under thrombolytic treatment. *Eur. Heart J.*, **17**: 1345-1349.

56. Morrow, D.A., Rifai, N., Antman, E.M., Weiner, D.L., McCabe, C.H., Cannon, C.P. and Braunwald, E. (1998) C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. Thrombolysis in myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **31**: 1460-1465.

57. Tommasi, S., Carluccio, E., Bentivoglio, M., Buccolieri, M., Mariotti, M., Politano, M. and Corea, L. (1999) C-reactive protein as a marker for cardiac ischemic events in the year after a first, uncomplicated myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, **83**: 1595-1599.

58. de Winter, R.J., Bholasingh, R., Lijmer, J.G., Koster, R.W., Gorgels, J.P.M.C., Schouten, Y., Hoek, F.J. and Sanders, G.T. (1999) Independent prognostic value of C-reactive protein and troponin I in patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, **42**: 240-245.

59. Nikfardjam, M., Müllner, M., Schreiber, W., Oschatz, E., Exner, M., Domanovits, H., Laggner, A.N. and Huber, K. (2000) The association between C-reactive protein on admission and mortality in patients with acute myocardial infarction. *J. Intern. Med.*, **247**: 341-345.

60. Beranek, J.T. (1997) C-reactive protein and complement in myocardial infarction and postinfarction heart failure. *Eur. Heart J.*, **18**: 1834-1835.

61. Beranek, J.T. (1998) C-reactive protein in postinfarction heart rupture. *Am. Heart J.*, **136**: 563-564.

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. and Limburg, P.C. (1997) Individual relationship between progression of radiological damage and the acute phase response in early rheumatoid arthritis. Towards development of a decision support system. *J. Rheumatol.*, **24**: 20-27.

63. Boralessa, H., de Beer, F.C., Manchie, A., Whitwam, J.G. and Pepys, M.B. (1986) C-reactive protein in

patients undergoing cardiac surgery. *Anaesthesia*, **41**: 11-15.

64. Eda, S., Kaufmann, J., Roos, W. and Pohl, S. (1998) Development of a new microparticle-enhanced turbidometric assay for C-reactive protein with superior features in analytical sensitivity and dynamic range. *J. Clin. Lab. Anal.*, **12**: 137-144.

65. Baltz, M.L., Rowe, I.F. and Pepys, M.B. (1985) *In vivo* studies of the clearance of C-reactive protein. *Clin. Exp. Immunol.*, **59**: 243-250.

66. Pepys, M.B. Patent Application No. 0119370.5: Therapeutic protein depletion (University College London, filed 2001).

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. and Hawkins, P.N. (2002) Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, **417**: 254-259.

68. Thompson, D., Pepys, M.B. and Wood, S.P. (1999) The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, 7: 169-177.