

【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 3 区分  
 【発行日】平成 19 年 9 月 6 日 (2007.9.6)

【公表番号】特表 2007-501305 (P2007-501305A)  
 【公表日】平成 19 年 1 月 25 日 (2007.1.25)  
 【年通号数】公開・登録公報 2007-003  
 【出願番号】特願 2006-522341 (P2006-522341)  
 【国際特許分類】

**C 0 8 B 37/10 (2006.01)**  
**A 6 1 K 31/727 (2006.01)**  
**A 6 1 P 9/10 (2006.01)**  
**A 6 1 P 7/02 (2006.01)**  
**A 6 1 P 7/00 (2006.01)**  
**C 1 2 P 19/26 (2006.01)**

【F I】

C 0 8 B 37/10  
 A 6 1 K 31/727  
 A 6 1 P 9/10  
 A 6 1 P 7/02  
 A 6 1 P 7/00  
 A 6 1 P 9/10 1 0 1  
 C 1 2 P 19/26

【手続補正書】  
 【提出日】平成 19 年 6 月 29 日 (2007.6.29)  
 【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲  
 【補正対象項目名】全文  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【特許請求の範囲】  
 【請求項 1】

下記の工程：

a) 天然のまたはリコンビナント細菌株から単離した N - アセチルヘパロサン多糖の N - 脱アセチル化および N - 硫酸化、  
 b) グルクロニル C 5 - エピメラーゼ酵素を用いた酵素的エピマー化、  
 c) 部分的 O - 硫酸化とそれに続く部分的 O - 脱硫酸化、  
 d) 部分的 6 O - 硫酸化、  
 e) N - 再硫酸化、  
 を含み、さらに工程 b)、c)、d) のいずれかの後に制御された解重合工程を含む、アセチル N - ヘパロサンを原料としてグリコサミノグルカン - 硫酸塩を製造する方法であって、  
 前記方法は、工程 c) の部分的 O - 硫酸化が 10 時間未満の時間で、かつ前記硫酸化剤と N - アセチルヘパロサンのモル比が 5 以下で実施されること、および、工程 d) の部分的 6 O - 硫酸化が 2 時間以下の時間で、かつ硫酸化剤と N - アセチルヘパロサンの水酸基のモル比が 2 以下で実施されることを特徴とする方法。

【請求項 2】

工程 d) と e) の順番を逆にして実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

中間的な解重合が、工程 b) のエピマー化の後に実施される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 c) の O - 硫酸化は、硫酸化剤と N - アセチルヘパロサンのモル比が 2 . 5 未満で実施される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記モル比が、1 . 5 以下である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 d) の部分的 O - 硫酸化が、6 時間以下の時間で実施される、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

工程 d) の部分的 O - 硫酸化が、1 . 5 以下の硫酸化剤と N - アセチルヘパロサンの水酸基のモル比を用いて実施される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

工程 d) の 6 O - 硫酸化が、60 分以下の時間で実施される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

硫酸化が、30 分以下の時間で実施される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 a) の N - アセチルヘパロサン多糖が、大腸菌 ( E . c o l i ) K 5 から単離される、請求項 1 ~ 2 に記載の方法。

【請求項 11】

アンチトロンピン III またはその断片を結合した基質上で実施される親和性選択工程 f) を追加で含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 10 に記載の方法。

【請求項 12】

工程 c) の部分硫酸化および工程 d) の 6 O - 硫酸化が、トリエチルアミン -  $\text{SO}_3$ 、トリメチルアミン -  $\text{SO}$ 、ピリジン -  $\text{SO}_3$  からなる群から選ばれる硫酸化剤を非プロトン性極性溶媒中で使用して実施されることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 に記載の方法。

【請求項 13】

非プロトン性極性溶媒が、ホルミル基を供給しない溶媒である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

非プロトン性極性溶媒が、テトラメチレンサルフォン、2 , 4 - ジメチルスルフォラン、N , N - ジメチルアセトアミド、または N , N - ジエチルアセトアミドの中から選ばれる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

工程 d) の部分的 O - 硫酸化が、4 から 30 の範囲の温度で実施される、請求項 1 ~ 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記温度が、10 から 25 である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

中間的な制御された解重合が、化学的または物理的方法により実施される、請求項 1 ~ 16 いずれかに記載の方法。

【請求項 18】

前記物理的方法がガンマ線照射を含み、かつ前記化学的方法が、亜硝酸若しくはその塩での処理、またはベータ解離、または過ヨウ素酸またはフリーラジカル処理である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

解重合が、亜硝酸またはその塩により実施される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

亜硝酸またはその塩と多糖の比が多糖 1 g あたり 1 から 100 mg であり、かつ、反応

が 4 から 10 の温度で実施される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

制御された解重合が、亜硝酸またはその塩の存在下で、かつ 30 分未満の時間で実施される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

亜硝酸塩が、亜硝酸ナトリウムである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

解重合が、モル過剰のホウ化水素を加えることで停止される、請求項 17 ~ 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

下記の工程：

a) 天然のまたはリコンビナント細菌株から分離した N - アセチルヘパロサン多糖の N - 脱アセチル化および N - 硫酸化、

b) グルクロニル C5 - エピメラーゼ酵素を用いた酵素的エピマー化、

c) 部分的脱 O - 硫酸化と組み合わせた部分的 O - 硫酸化、

d) 部分的 6 O - 硫酸化、

を含み、かつ、工程 b)、c)、d) のいずれかの後に制御された解重合工程を含む、アセチル N - ヘパロサンを原料として硫酸化グリコサミノグルカンを製造する方法であって、

工程 c) の部分的 O - 硫酸化が 10 時間以下の時間で、かつ前記硫酸化剤と N - アセチルヘパロサンのモル比を 5 以下として実施されること、および、工程 d) の部分的 6 O - 硫酸化が 2 時間以下の時間で、かつ前記硫酸化剤と N - アセチルヘパロサンの水酸基のモル比が 2 以下で実施されること、および、工程 c) と d) の O - 硫酸化がトリエチルアミン -  $\text{SO}_3$ 、トリメチルアミン -  $\text{SO}$ 、ピリジン -  $\text{SO}_3$  の中から選ばれた硫酸化剤を使用して非プロトン性極性溶媒中で実施されることを特徴とする方法。

【請求項 25】

工程 c) の C5 エピマー化反応が、35 以下の温度で実施されることを特徴とし、かつグルクロニル C5 - エピメラーゼは、抽出またはリコンビナントであって、固定相に固定化されたものである、請求項 1 ~ 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

リコンビナント C5 エピメラーゼが、昆虫または酵母細胞で発現したマウス酵素である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記温度が、15 から 30 である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記温度が、20 から 25 である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

固定相が、CNBr で活性化されたエポキシ基またはジオール基を有するポリスチレンまたはポリメタクリル樹脂であり、かつ C5 エピメラーゼの固定化が、100 から 300 mM 濃度の炭酸水素ナトリウムを含む緩衝液中または 10 から 50 mM 濃度のリン酸緩衝液中で、7.0 から 8.3 の範囲の pH で、4 から 25 の範囲の温度で、12 から 72 時間の範囲の時間で実施される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

工程 c) のエピマー化が、10 から 30 mM の EDTA、70 から 150 mM の  $\text{CaCl}_2$  を含み、pH が 5.5 から 8.0 の範囲である HEPES 緩衝液中で実施される、請求項 25 ~ 29 に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 30 に記載の方法で得られ得る変性 N - アセチルヘパロサン。

【請求項 32】

15000 Da 以下の分子量を有する、請求項 31 に記載の変性 N - アセチルヘパロサ

ン。

【請求項 3 3】

3 0 0 0 から 9 0 0 0 D a の範囲の分子量を有する、請求項 3 2 に記載の変性 N - アセチルヘパロサン。

【請求項 3 4】

分子中にホルミル基を含まないことを特徴とする、請求項 1 3 に記載の方法で得られ得る変性 N - アセチルヘパロサン。

【請求項 3 5】

還元末端に硫酸化 2, 5 無水マンニトール残基を有することを特徴とする、請求項 3 1 ~ 3 4 に記載の変性 N - アセチルヘパロサン。

【請求項 3 6】

無水マンニトールの位置 1, 3 および 6 の水酸基が部分的に硫酸化されている、請求項 3 5 に記載の N - アセチルヘパロサン。

【請求項 3 7】

無水マンニトールの位置 1 および 6 の水酸基が部分的に硫酸化されている、請求項 3 6 に記載の N - アセチルヘパロサン。

【請求項 3 8】

位置 1 の水酸基の硫酸化比率が 2 0 % から 8 5 % の範囲である、請求項 3 7 に記載の N - アセチルヘパロサンの K 5 O S 6 O S N S - e p i。

【請求項 3 9】

グルコサミンの位置 6 の水酸基の硫酸化比率が 4 0 % より高い、請求項 3 7 に記載の N - アセチルヘパロサンの K 5 O S 6 O S N S - e p i。

【請求項 4 0】

硫酸化比率が 5 0 % から 8 5 % の範囲である、請求項 3 9 に記載の N - アセチルヘパロサンの K 5 O S 6 O S N S - e p i。

【請求項 4 1】

グルコサミンの位置 3 の水酸基の硫酸化比率が 6 0 % より低い、請求項 3 6 に記載の N - アセチルヘパロサン。

【請求項 4 2】

請求項 2 4 に記載の方法で得られ得る K 5 O S 6 O S N H<sub>2</sub> - e p i。

【請求項 4 3】

請求項 2 4 の工程 a ) ~ c ) 記載の方法で得られ得る K 5 O S N H<sub>2</sub> - e p i。

【請求項 4 4】

血漿の存在下で測定した抗因子 Xa 活性が、5 0 I U / m g 以上であることを特徴とする、請求項 3 1 ~ 4 1 に記載の変性 N - アセチルヘパロサン。

【請求項 4 5】

抗因子 Xa 活性と因子 IIa 阻害活性の比率が、1 . 0 以上であることを特徴とする、請求項 4 4 に記載の変性 N - アセチルヘパロサン。

【請求項 4 6】

抽出ヘパリンと比較して、T F P I 活性化活性度が同等以上であることを特徴とする、請求項 4 4 に記載の変性 N - アセチルヘパロサン。

【請求項 4 7】

抽出ヘパリンより高いヘパリナーゼ I 耐性を有することを特徴とする、請求項 4 4 に記載の変性 N - アセチルヘパロサン。

【請求項 4 8】

トロンピンと Xa 因子プロテアーゼの生成を抑制することを特徴とする、請求項 4 4 に記載の変性 N - アセチルヘパロサン。

【請求項 4 9】

抽出ヘパリンと比較して、P F 4 因子に対する低い親和性を有することを特徴とする、請求項 4 4 に記載の変性 N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 50】

抽出へより高いパリンHCII因子により特徴づけられる、請求項44に記載の変性N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 51】

$^{13}\text{C}$  - NMRスペクトルの多重シグナルが79から89 ppmの領域で無水マンニトールのシグナルと比較して多く、かつ51および165 ppmにはシグナルが無いこと、および、 $^1\text{H}$  - NMRスペクトルが7 - 9.5 ppmの領域にシグナルが無いこと、を特徴とする、請求項44～50に記載の変性N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 52】

図2に対応する $^1\text{H}$  - NMRスペクトルを有する請求項51に記載のK5OS6OSN - epi。

## 【請求項 53】

図7に対応する $^{13}\text{C}$  - NMRスペクトルを有する請求項51に記載のK5OS6OSN - epi。

## 【請求項 54】

薬理学用途のための請求項31～41および44～53に記載の変性N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 55】

ヘパリン様の抗血栓活性と抗凝固活性を有する薬剤の製造用途への、請求項54に記載の変性N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 56】

線溶活性と抗凝集活性を有する薬剤の製造用途への、請求項54に記載の変性N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 57】

不安定な狭心症、心筋心臓発作、深刻な静脈血栓症、肺塞栓症、および虚血症諸症状に対する予防と治療用の薬剤の製造用途への、請求項55に記載の変性N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 58】

敗血症および汎発性血管内凝固症候群(CID)のような併発症の治療用の薬剤の製造用途への、請求項55～56のいずれかに記載の変性N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 59】

不安定な狭心症、心筋急性心臓発作、静脈および動脈血栓症、肺塞栓症、虚血症諸症状および動脈硬化に対する予防と治療用の薬剤の製造用途への、請求項56に記載の変性N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 60】

先天的または後天的なアントロピンIII欠乏症に起因する血栓症症状に対する予防と治療用の薬剤の製造用途への、請求項55また56に記載の変性N - アセチルヘパロサン。

## 【請求項 61】

適切な賦形剤および/または希釈剤と組み合わせて、請求項31～41および44～53に記載の製品のいずれかを有効成分として含む医薬組成物。

## 【請求項 62】

経口投与用に適切な組成の、請求項61に記載の医薬組成物。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0002】

自然界のヘパリンは、グリコサミノグリカン構造を持つ高分子で、3000から30000Daの可変的な分子量を有し、ウロン酸(L - イズロン酸またはD - グルクロン酸)

とアミノ糖（グルコサミン）が互いに - 1 , 4 - 結合で結ばれた二糖類単位の繰り返し連鎖からなっている。ウロン酸は位置 2 で硫酸化されていてもよく、グルコサミンは N - アセチル化または N - 硫酸化され 6 - O - 硫酸化されていてもよい。さらに、グルコサミンは、位置 3 にも硫酸基を含んでいてもよい。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 4 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 4 3】

a) 多糖の調製

N - アセチルヘパロサン多糖を大腸菌、B i 8 3 3 7 / 4 1 ( O 1 0 : K 5 : H 4 ) ( A T C C 2 3 5 0 6 ) の発酵により得、特許 W O 0 1 / 0 2 5 9 7 号明細書に記述された方法に従って培養液からの抽出と精製を実施した。使用した培養液の組成は、大豆小麦粉 2 g / l 、  $K_2HPO_4$  9 . 7 g / l 、  $KH_2PO_4$  2 g / l 、  $MgCl_2$  0 . 1 1 g / l 、クエン酸ナトリウム 0 . 5 g / l 、硫酸アンモニウム 1 g / l 、ブドウ糖（あらかじめ殺菌されたもの） g / l 、水 1 0 0 0 m l q . b 、 p H 7 . 3 。