

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7359396号

(P7359396)

(45)発行日 令和5年10月11日(2023.10.11)

(24)登録日 令和5年10月2日(2023.10.2)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/7028(2006.01)	A 6 1 K	31/7028
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02

請求項の数 12 (全93頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-552068(P2020-552068)

(86)(22)出願日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(65)公表番号 特表2021-517582(P2021-517582 A)

(43)公表日 令和3年7月26日(2021.7.26)

(86)国際出願番号 PCT/AU2018/051337

(87)国際公開番号 WO2019/113645

(87)国際公開日 令和1年6月20日(2019.6.20)

審査請求日 令和2年12月15日(2020.12.15)

(31)優先権主張番号 2017905024

(32)優先日 平成29年12月15日(2017.12.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
オーストラリア(AU)

前置審査

(73)特許権者 501004316

ジ・オーストラリアン・ナショナル・ユニヴァーシティ

オーストラリア国オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 0 1, アクトン

(73)特許権者 520211948

グリフィス・ユニヴァーシティ

オーストラリア国, クイーンズランド州 4 1 1 1, ネイサン, ケセルズ・ロード 1 7 0

(74)代理人 100099623

弁理士 奥山 尚一

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞外ヒストンによって媒介される病気を処置及び予防するための化合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞外ヒストンによって媒介される病気の処置又は予防のための薬物であって、前記薬物が、ポリアニオン性ヘプタ硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩を含み、前記小さい非荷電グリコシド結合置換基が $O-(C_1 \sim 6)$ アルキル及び $S-(C_1 \sim 6)$ アルキルからなる群から選択され、

前記細胞外ヒストンによって媒介される病気が、敗血症、IRI、血栓症、及び自己免疫疾患からなる群から選択される、薬物。

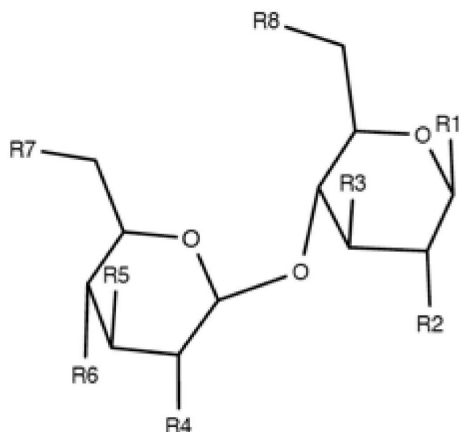
【請求項 2】

前記血栓症が、深部静脈血栓症である、請求項 1 に記載の薬物。

【請求項 3】

前記還元末端において小さい非荷電置換基で改変されているポリアニオン性ヘプタ硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩が、

【化 1】



(式中、R 1は、O－(C₁～6)アルキル及びS－(C₁～6)アルキルからなる群から選択される小さい非荷電グリコシド結合置換基であり、及びR 2～R 8は、それぞれサルフェート基である)

の全体構造を有する、請求項 1 に記載の薬物。

【請求項 4】

(a) R 1は、メトキシ基又はエトキシ基である、および／または

(b) R 2～R 8は、それぞれO－サルフェート又はN－サルフェートから選択される、請求項 3 に記載の薬物。

【請求項 5】

前記還元末端において小さい非荷電置換基で改変されている硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩が、硫酸化β－O－メチルセロビオシド二糖又はその薬学的に許容される塩である、請求項 1 に記載の薬物。

【請求項 6】

前記還元末端において小さい非荷電置換基で改変されている硫酸化セロビオシドが、ナトリウムβ－O－メチルセロビオシドサルフェートである、請求項 1 に記載の薬物。

【請求項 7】

細胞外ヒストンによって媒介される病気の処置又は予防に適した薬物の製造のための、ポリアニオン性ヘプタ硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩を含む化合物の使用であって、

前記小さい非荷電グリコシド結合置換基がO－(C₁～6)アルキル及びS－(C₁～6)アルキルからなる群から選択され、

前記細胞外ヒストンによって媒介される病気が、敗血症、IRI、血栓症、及び自己免疫疾患からなる群から選択される、使用。

【請求項 8】

前記血栓症が、深部静脈血栓症である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記還元末端において小さい非荷電置換基で改変されているポリアニオン性ヘプタ硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩が、

10

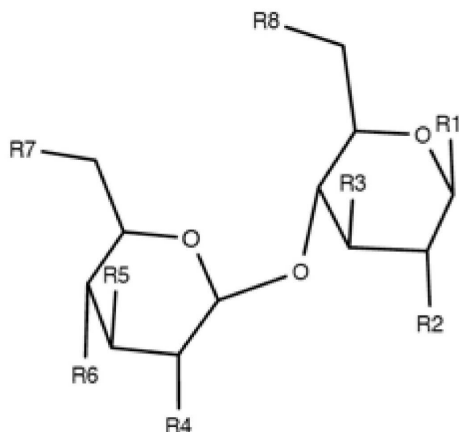
20

30

40

50

【化 2】



(式中、R 1は、O－(C₁～6)アルキル及びS－(C₁～6)アルキルからなる群から選択される小さい非荷電グリコシド結合置換基であり、及びR 2～R 8は、それぞれサルフェート基である)

の全体構造を有する、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 10】

(a) R 1は、メトキシ基又はエトキシ基である、および／または

(b) R 2～R 8は、それぞれO－サルフェート又はN－サルフェートから選択される、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

前記化合物が、硫酸化β－O－メチルセロビオシド二糖又はその薬学的に許容される塩である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 12】

前記化合物が、ナトリウムβ－O－メチルセロビオシドサルフェートである、請求項 7 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、対象における細胞外ヒストンの病理活性を阻害するための化合物及び方法に関する。具体的には、本発明は、細胞外ヒストンによって媒介される病気（例えば、敗血症、全身性免疫反応症候群（SIRS）及び虚血再灌流傷害（IRI）等）を阻害するか又は寛解させるための化合物、使用及び方法に関する。より具体的には、本発明は、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシドの方法及び使用であって、この置換基の存在は、化学的安定性が高い分子を、細胞外ヒストンによって媒介される病気の治療で有効であるこの分子の能力に影響を及ぼすことなくもたらす、方法及び使用に関する。例えば、本発明は、対象における細胞外ヒストンによって媒介される様々な病気の治療における、β－O－メチルセロビオシドサルフェート（mCBS）又はその薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）の方法及び使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒストンは、DNAと複合体化してヌクレオソームを形成することにより遺伝子発現を調節するように細胞核中で機能する小さい塩基性タンパク質であり、このヌクレオソームは、クロマチン構造に集合する。核内機能に加えて、Xuら（Nat Med. 2009. 15: 1318-21）は、炎症プロセスに反応して放出されるヒストンの細胞毒性活性を報告しており、この細胞外ヒストンは、敗血症における内皮細胞の機能障害、臓器不

全及び死のメディエータとして作用する。

【0003】

ヒストンは、現在、核から核外空間に移行する際の内因性危険シグナル又はDAMPとしても認識されている。ヒストンは、ストレスに反応して、免疫細胞、小脳ニューロン、シュワン細胞及びミクログリアの細胞表面において又は細胞質中で検出されることが多く、Toll様レセプタ及びインフラマソーム経路を活性化することにより全身性の炎症反応及び毒性反応を引き起こすことが分かっている。ヒストン及びヌクレオソームの循環レベルの上昇は、疾患（例えば、自己免疫疾患、炎症性疾患及び癌）の複数の病態生理学的プロセス及び進行に関与しており、多くのヒト疾患での細胞外ヒストンの役割を支持している。

10

【0004】

近年、細胞外ヒストンによって媒介される疾患の有効な新規の治療法を見出そうといういくつかの試みが行われている。例えば、炎症の重要なメディエータに対するモノクローナル抗体を作製するために相当な努力が払われているが、これらは、臨床的に効果がないことが証明されており、特に敗血症患者で危険な副作用があることも分かっている。

【0005】

抗ヒストン処置（例えば、中和抗体、活性化プロテインC、組換えトロンボモジュリン及びヘパリン）は、致死性の内毒血症、敗血症、虚血／再灌流傷害、外傷、肺炎、腹膜炎、脳卒中、凝血及び血栓症からマウスを保護することが分かっているが、有効性の欠如又は容認できない副作用に起因して臨床的価値が限定されている。例えば、精製済ヒト凝固因子（例えば、組換えヒトAPC（例えば、Xigris（登録商標））等の活性化プロテインC（APC））は、臨床的影響がほとんどない。これにはいくつかの理由がある。1つの理由として、出血のリスクの増加につながるAPCの抗凝固活性が挙げられ、そのため、APC薬物は、手術後又は外傷後の患者で発症する可能性があるSIRSの治療から除外されている。同様の理由から、APCをベースとする治療薬は、出血のリスクが高い白血病患者で生じる敗血症での使用から除外されている。さらに、敗血症は、急速に発症することから、APCの比較的遅い作用様式は、不利である。実際に、有効性の欠如に起因して、Xigris（登録商標）は、2011年10月25日に販売が中止された。

20

【0006】

そのため、これらの努力にもかかわらず、細胞外ヒストンによって媒介される疾患は、ヒトに存在する最も衰弱させて致命的である疾患のいくつかであるものの、ほとんど処置されないままである。従って、重要な臨床的問題が示されている。

30

【0007】

細胞外ヒストンによって媒介される状態又は疾患（例えば、敗血症）の処置に適用されている化合物の1つのクラスが米国特許第9,226,939号明細書で開示されている。この米国特許は、対象における細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害する方法に関する発明を対象としており、この方法は、対象へのポリアニオンの有効量の投与を必要とする。この米国特許公報では、構造が非常に異なる多様なポリアニオンが開示された。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0008】

本発明は、複数の疾患における細胞外ヒストンの役割の認識の高まりというこの背景に対して開発されている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

炎症性チャレンジに反応して放出される細胞外ヒストンは、内皮機能障害、臓器不全及び細胞死（特に敗血症中）の一因となるメディエータである。本発明は、選択された非常に安定なポリアニオン性化合物がヒストンと静電的に相互作用して、この分子の細胞変性特性、赤血球損傷特性、血小板活性化特性及び凝血促進特性を中和し得るという発見に基づいている。生きている動物の循環中でのそのようなポリアニオン性分子と細胞外ヒス

50

トンとの複合体化は、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を少なくとも改善する手段を提供する。

【0010】

具体的には、本発明者らは、特定の硫酸化二糖類がヒストンのこれらの病理学的効果の中和で有効であることを確認している。例えば、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシドは、細胞外ヒストンによって媒介される病気（例えば、敗血症、SIRS及びIRI）に対して非常に有効な処置も提供し得、且つ患者においてこれらの状態を少なくとも寛解させ得る化学的に安定したポリアニオンを提供する。

【0011】

本発明者らは、本発明の化合物が、細胞外ヒストンによって媒介される病気の診断、予後及び管理のための方法を提供することも確認している。

【0012】

本発明は、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシドが濃度依存的に細胞外ヒストンの細胞毒性から内皮細胞を保護し、且つヒストンによって誘発される損傷（例えば、赤血球の凝集及び溶解）を減少させるか又はさらに反転させ、且つ例えば敗血症、SIRS及びIRIの対象において細胞傷害及び臓器機能不全から保護するという本発明者らの発見にも基づいている。

【0013】

結果的に化学的に安定であるポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電置換基で改変されている硫酸化セロビオシドの使用により、ヒストンによって媒介される病理に罹患している患者の処置の分野及び／又はリスクのある患者においてヒストンによって媒介される病理が生じることを予防する分野での、適用の新規の一般的原理が提示又は提供される。

【0014】

本発明の第1の態様では、細胞外ヒストンによって媒介される病気の処置又は予防での使用のための化合物であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩を含む化合物が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。

【0015】

本発明の化合物は、治療上有効な量又は薬学的に有効な量で存在する場合、細胞外ヒストンによって媒介される病気を寛解させるか、処置するか又は予防する手段を提供する。

【0016】

本発明のある実施形態では、この改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシドは、全体構造：

10

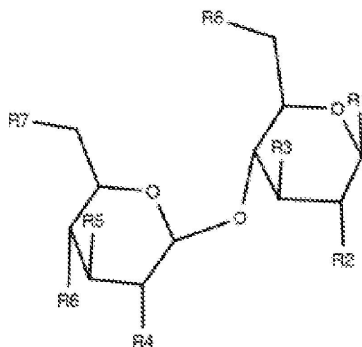
20

30

40

50

【化 1】



(式中、R 1 は、小さい非荷電グリコシド結合置換基、例えば O—又はS— (C₁~6) アルキルであり、及び R 2 ~ R 8 は、それぞれ (i) 小さい非荷電 O 結合置換基、又は (i i) サルフェート基から選択される)

を有する。

【0017】

好ましくは、R 1 は、O—又はS— (C₁~6) アルキルである。好ましくは、R 1 は、R 1 でサルフェート基を有する同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。

【0018】

好ましくは、R 2 ~ R 8 は、それぞれ (a) 非改変ヒドロキシル基、又は (b) サルフェート基から選択される。

【0019】

より好ましくは、R 1 は、メトキシ基又はエトキシ基であり、及び R 2 ~ R 8 は、それぞれ O—サルフェート又は N—サルフェートから選択されるサルフェート基である。

【0020】

望ましくは、このクラスの化合物は、高い正味の負電荷を有し、即ちポリアニオンである。

【0021】

この小さい非荷電グリコシド置換基 (R 1) のアノマー配置は、α 位又は β 位のいずれかであり得る。好ましくは、この小さい非荷電置換基は、β 配置である。

【0022】

本発明の非常に好ましい形態では、本化合物は、硫酸化 β—O—メチルセロビオシド二糖である mCBS 又はその薬学的に許容される塩である。实例として、この化合物は、β—O—メチルセロビオシドサルフェートのナトリウム塩、即ちナトリウム β—O—メチルセロビオシドサルフェート (mCBS・Na) である。

【0023】

mCBS は、CBS と比べて非常に安定しており、高濃度で良好に耐容性である。mCBS は、抗凝固効果が最小限に抑えられており、ヒストンによって誘発される血漿凝固攪乱を減少させ得る。mCBS の抗凝固活性は、低分子量ヘパリンと比べて 110 倍低く、非分画ヘパリンと比べて 750 倍低い。

【0024】

本発明の第 2 の態様では、対象における細胞外ヒストンを伴う医学的状態、病気又は疾患を (治療的又は予防的に) 処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与することを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性

10

20

30

40

50

を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S . N a）である。

【0025】

例えば、本発明の第2の態様のある実施形態では、対象における敗血症、S I R S又は敗血症及び／若しくはS I R Sと関連する医学的状態若しくは疾患を処置するか、又は予防するか、又は寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S . N a）である。

10

【0026】

本発明のこの実施形態によれば、この敗血症／S I R Sの処置により、敗血症／S I R S若しくは敗血症性／S I R S状態又はこれらと関連する疾患が寛解され、二次的な状態を処置するために医師が他の薬物を投与することを可能にする。

【0027】

本発明の第2の態様の別の実施形態では、対象におけるI R I又はI R Iと関連する医学的状態若しくは疾患を処置するか、又は予防するか、又は寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S . N a）である。

20

【0028】

本発明の第3の態様では、対象における細胞外ヒストンの蓄積を寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与することを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S . N a）である。

30

【0029】

例えば、本発明の第3の態様のある実施形態では、この方法を使用して、細胞外ヒストン関連の合併症（例えば、敗血症、S I R S又はI R I）と関連する状態又は病気を予防する。

【0030】

本発明の第2又は第3の態様に係る特定の例示的实施形態では、この特定された方法は、抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤及び／又は対象が患っているか若しくは患うリスクがある1種若しくは複数の状態を処置する任意の他の形態の医薬組成物の1つ又は複数から選択される第2の活性剤、化合物又は組成物の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を、この改変されている硫酸化セロビオシドと一緒に又はこの硫酸化セロビオシドに付随（c o n c o m i t a n t l y）して対象に投与するステップをさらに含む得る。

40

【0031】

この実施形態によれば、第2の活性剤、化合物又は組成物は、細胞外ヒストンに関連する合併症（例えば、敗血症、S I R S若しくはI R I）及び／又はそのような合併症と関

50

連する医学的状态若しくは疾患を対象とする処置に対して補助的処置を提供する。好ましくは、第2の活性剤、化合物又は組成物は、1種又は複数の抗炎症剤を含む。

【0032】

好ましくは、第2の活性剤は、本発明の化合物によって処置される医学的病気に関連するか又はこの医学的病気と異なる、患者が患っている疾患の医学的介入の手段を提示し、前記第2の活性剤は、この患者に補助的処置を提供する。

【0033】

本発明の第4の態様では、対象における細胞外ヒストンと関連する医学的状态又は疾患を処置又は予防する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0034】

本発明の第4の態様の好ましい一例では、この方法を使用して、(i)対象の内皮に対して細胞毒性であり、及び／又は(ii)対象の内皮機能障害の一因となる細胞外ヒストンを中和する。加えて又は代わりに、この方法を使用して、対象における感染、炎症若しくは低酸素症又はあらゆる感染、炎症若しくは低酸素症の反応後の対象における細胞外ヒストンの放出であるか、それによって引き起こされるか、又はそれによって媒介される敗血症性状態若しくはSIRS状態、又はIRI、又は敗血症、SIRS若しくはIRIと関連する疾患を処置する。

【0035】

本発明の第5の態様では、細胞外ヒストン関連の合併症の処置での使用のための治療用組成物又は医薬組成物であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩を少なくとも含む治療用組成物又は医薬組成物が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。好ましくは、この化合物は、治療用組成物又は医薬組成物中に治療上有効な量又は薬学的に有効な量で存在する。この組成物は、治療上許容されるか又は薬学的に許容される担体、添加剤及び／又は希釈剤も含み得る。この治療又は医薬での化合物は、中性遊離塩基形態又は塩形態のいずれかである。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシド化合物は、mCBSであるか、又はより具体的にはβ-オ-メチルセロビオシドサルフェートのナトリウム塩である。

【0036】

本発明の第5の態様に係る特定の例示的实施形態では、この特定された組成物は、抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤及び／又は対象が患っている1種若しくは複数の状態を処置する任意の他の形態の治療用化合物若しくは医薬化合物の1つ又は複数から選択される第2の活性剤、化合物又は組成物も含み得る。

【0037】

この実施形態によれば、第2の活性剤、化合物又は組成物は、望ましくは、敗血症、SIRS若しくはIRIの補助的治療又は敗血症、SIRS若しくはIRIと関連する医学的状态若しくは疾患のための補助的治療を提供する。好ましくは、第2の活性剤、化合物又は組成物は、1種又は複数の抗炎症剤を含む。

【0038】

本発明の第6の態様では、細胞外ヒストンを伴う医学的状态、病気又は疾患を処置するための薬物の製造における、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端

10

20

30

40

50

において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療用有効な量又は薬学的に有効な量の使用が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

【0039】

例えば、本発明の第6の態様のある実施形態では、対象における敗血症、S I R S若しくはI R I又は敗血症、S I R S若しくはI R Iと関連する医学的状態若しくは疾患の処置又は予防のための薬物の製造における、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量の使用が提供される。好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

10

【0040】

そのような使用の一実施形態では、この薬物は、対象における敗血症若しくはS I R S又は敗血症若しくはS I R Sと関連する医学的状態若しくは疾患を処置するためのものであり、前記処置により、前記敗血症若しくはS I R S又は前記敗血症若しくはS I R Sと関連する前記状態若しくは疾患が寛解されるか又は阻害される。

20

【0041】

そのような使用の別の実施形態では、この薬物は、対象におけるI R I又はI R Iと関連する医学的状態若しくは疾患を処置するためのものであり、前記処置により、前記I R I又は前記傷害と関連する前記状態若しくは疾患が寛解されるか又は阻害される。

【0042】

そのような使用のさらに別の実施形態では、この薬物を使用して、（i）対象の内皮に対して細胞毒性であるか、又は（i i）対象の内皮機能障害の一因となるか、又は（i i i）対象の血小板を活性化させることによって凝血を開始させるか、又は（i v）対象において赤血球脆弱性及びその結果としての貧血を誘発する細胞外ヒストンを中和する。

30

【0043】

さらに別の実施形態では、製造された薬物は、第2の活性剤、化合物又は組成物の治療上有効な量又は薬学的に有効な量も含み得る。この実施形態によれば、第2の活性剤、化合物又は組成物は、細胞外ヒストンを伴う医学的状態、病気又は疾患を処置するための補助的治療を提供する。望ましくは、第2の活性剤、化合物又は組成物は、敗血症、S I R S若しくはI R Iの処置のための補助的治療又は敗血症、S I R S若しくはI R Iと関連する医学的状態若しくは疾患のための補助的治療を提供する。好ましくは、第2の活性剤は、抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤及び／又は対象が患っている1種若しくは複数の状態を処置する任意の他の形態の治療用化合物若しくは医薬化合物の1つ又は複数から選択される。より好ましくは、第2の活性剤、化合物又は組成物は、1種又は複数の抗炎症剤を含む。

40

【0044】

本発明の方法のいずれかにおいて、改変されている硫酸化セロビオシド化合物を使用する場合、この化合物を、製剤の単回用量において、それを必要とする対象に投与し得るか、又はこの投与のために製剤化し得る。特定の代替実施形態では、この改変されている硫酸化セロビオシド化合物を、複数回用量製剤として、それを必要とする対象に投与するか、又はこの投与のために製剤化する。

【0045】

追加の目的、利点及び新規の特徴は、下記の説明に記載されるか、又は図面及び下記に続くいくつかの非限定的な実施形態の詳細な説明の考察により当業者に明らかになるであ

50

ろう。

【0046】

本開示は、下記の図面を参照して、好ましい実施形態の下記の説明で詳細を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】HPLCで測定した場合における、 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ (図1A)、 $25 \pm 2^\circ\text{C} / 60\% \text{RH}$ (図1B) 及び $40 \pm 2^\circ\text{C} / 75\% \text{RH}$ (図1C) で貯蔵した際のmCBSに対するCBSの安定性の比較を示す。この図は、mCBS及びCBSの開始量 ($T=0$) に対するこれらのパーセント (%) 変化を示す。

【図2】第I相代謝を許容する条件下でのヒト肝ミクロソームの存在下におけるmCBSの濃度 (μM) の測定値 (平均 $\pm$ SEM) で示される、ヒト肝ミクロソームにおけるmCBSの代謝安定性を示すグラフである。

【図3】第I相代謝を許容する条件下でのラット肝ミクロソームの存在下におけるmCBSの濃度 (μM) の測定値 (平均 $\pm$ SEM) で示される、ヒトラットミクロソームにおけるmCBSの代謝安定性を示すグラフである。

【図4】第I相代謝を許容する条件下でのイヌ肝ミクロソームの存在下におけるmCBSの濃度 (μM) の測定値 (平均 $\pm$ SEM) で示される、イヌ肝ミクロソームにおけるmCBSの代謝安定性を示すグラフである。

【図5】A~Dは、フローサイトメトリーのアウトプットを示すグラフであり、パネルE~Gは、mCBSがヒストン損傷からヒト微小血管内皮細胞 (HMEC) を保護することを示す共焦点顕微鏡観察の結果を示す画像である。培養したHMECを (A及びE) 水体积等量、(B及びF) ヒストン $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、(C及びG) mCBS $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ + ヒストン $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は (D) mCBS $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ + ヒストン $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ で60分にわたり処理し、次いで色素カルセイン-AM及びPIで標識し、フローサイトメトリー (A、B、C及びD) 又は共焦点顕微鏡 (E、F及びG) を使用して、色素取り込みの程度に関して分析した。四分の一区中の数字は、各四分の一区中に存在する細胞の割合を示す。生存細胞は、カルセイン-AM (緑色) を取り込み且つPIを排除するが、損傷細胞及び死滅細胞は、PI (赤色) を取り込み且つカルセイン-AMを保持し得ない。フローサイトメトリーをベースとするアッセイは、HMECの懸濁液を使用した (パネルA~D)、共焦点顕微鏡実験は、HMEC単層を使用しており (パネルE~G)、HMECの単層は、ヒストン損傷に対してより敏感である。

【図6】ヒストンによって誘発されるHMECへの損傷に対するmCBSの保護効果は、濃度依存的であることを示すグラフである。培養したHMECを、上昇する濃度のmCBSの添加後に $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒストンに曝露し、次いでフローサイトメトリーを使用してカルセイン-AM (生存) 又はPI (死滅) の取り込みに関して分析した。死滅/生存細胞をコントロール未処理細胞の%として表した。エラーバーは、SEMを示す。

【図7】1時間にわたりヒストンに曝露したHMECの一部においてmCBSが損傷を反転させ得ることを示すグラフである。培養したHMECを60分にわたり $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒストンに曝露し、10分にわたりmCBS ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) で処理し、次いでフローサイトメトリーを使用してPI取り込みに関して分析した。細胞毒性を、60分にわたりヒストン (+veコントロール) で処理した細胞によるPI取り込みの割合として表した。エラーバーは、SEMを示す。

【図8】パネルA~Cは、フローサイトメトリーのアウトプットのグラフを示し、パネルD~Fは、ヒストンによって誘発されるRBC凝集がmCBSにより防止されることを示す走査型電子顕微鏡観察の結果の図を示す。単離ヒトRBCを、(A及びD) 処理なし後、(B及びE) 60分にわたるヒストン ($400 \mu\text{g}/\text{mL}$) とのインキュベーション後及び (C及びF) 60分にわたるヒストン ($400 \mu\text{g}/\text{mL}$) による処理、次いで10分にわたるmCBS ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$) への曝露後の凝集の程度に関して、 $\log FSC$ 対 $\log$ 自己蛍光 (FL-1チャンネル) パラメータを使用するフローサイトメトリーで分析するか、又は走査型電子顕微鏡を使用して可視化した。

10

20

30

40

50

【図9】mCBSは、ヒストンによって誘発されるRBC凝集を用量依存的に阻害することを示すグラフである。単離ヒトRBCを60分にわたり様々な濃度のヒストンに曝露し（パネルA）、凝集の程度を、図8のように自己蛍光（FL-1）のレベルにより測定した。400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒストンの添加前に様々な濃度のmCBSをRBCに添加することを除いて（A）と同様である（パネルB）。エラーバーは、SEMを示す。アスタリスクは、コントロール（ヒストンが存在しない）との有意差を示し、P値は、 <0.001 （****）である。

【図10】mCBSは、より高いせん断流速及びせん断曝露の持続時間により悪化する効果である、ヒストンによって誘発されるRBC脆弱性を阻害することを示すグラフである。60%の生理食塩水（6：4の比率での通常の生理食塩水：水）で希釈した単離ヒトRBCを60分にわたり、上昇する濃度のヒストンと共にインキュベートし、次いでロボットシステム内において、40回反復で次第に早い流速（mm/秒）に曝露する（パネルA）か、100 mm/秒の流速で様々な反復のピペッティングに曝露する（パネルB）か、又は様々な濃度のmCBSで処理し、次いで60分にわたり且つ100 mm/秒のせん断流速及び40回ピペッティング反復で400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒストンに曝露した（パネルC）。次いで、各サンプルからの上清を、RBC溶解の程度の指標としてのA540 nmでのヘモグロビン含有量に関して測定した。エラーバーは、SEMを示す。アスタリスクは、これまでの処理との有意差を示し、P値は、 <0.5 （*）、 <0.01 （**）及び <0.001 （****）である。

【図11】mCBSは、ヒストンによって誘発されるRBCの溶解及び凝集に対する感受性を反転させることを示すグラフである。単離ヒトRBCを55分にわたり400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒストンに曝露し、次いで5分にわたり様々な濃度のmCBSに曝露した後（パネルA）、せん断力（100 mm/秒の流速及び40回ピペッティング反復）を適用し、A540 nmにより上清中のヘモグロビンの測定し、フローサイトメトリーを使用するFL1での自己蛍光のレベルにより測定してRBC凝集の程度を分析した（パネルB）。エラーバーは、SEMを示す。アスタリスクは、コントロール処理（ヒストンのみ、mCBSは存在しない）との有意差を示し、全てのP値は、 <0.001 （****）である。

【図12】mCBSが、ヒストンによって媒介される病理の効果的な阻害剤であるには、mCBSの高レベル硫酸化が必要であることを示す。a. 完全に硫酸化された（ヘプタ硫酸化）mCBSと比較した、ジー、トリ、テトラ及びペンタ硫酸化mCBS調製物の構造。b. ペンタ硫酸化mCBSのみが、HEMC-1に関するヒストンによって媒介される細胞毒性を弱く阻害することを示す阻害曲線。c. ヒストンによって誘発される赤血球脆弱性の阻害の調査時に得られた同様の結果。データを平均 $\pm$ s. e. m（n = 3）で表した。

【図13】ヒストンは、血小板の凝集及び脱顆粒を誘発し、且つこれらの効果は、mCBS及びCBSにより阻害され得ることを示すグラフである。（パネルA）単離ヒト血小板を1時間にわたり様々な濃度のヒストンと共にインキュベートした後、FSC及びSSCを使用するフローサイトメトリーによる凝集の分析により、単一の血小板と凝集した血小板とを識別した。（パネルB）（A）と同様であるが、ヒストン（150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の前に様々な濃度のmCBS、CBS及び非硫酸化CBを添加した。（パネルC）全血中のヒト血小板を、ケミルミノメトリー（chemiluminescence）を使用して、上昇する濃度のヒストンの添加後の脱顆粒（ATP放出）に関して分析し、陽性コントロールとしてトロンビンを含めた。（パネルD）ヒストンの添加（400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）前に、上昇する濃度のmCBS、CBS及び非硫酸化CBを添加したことを除いて（C）と同様である。エラーバーは、SEMを示す。

【図14】ヒストンによって媒介される細胞に対する細胞毒性は、細胞表面のヘパラン硫酸を必要としない。a. 懸濁液中のHEMC-1を細菌ヘパリナーゼ1、2及び3（フラボバクテリウム（Flavobacterium）由来）又はヒト血小板ヘパリナーゼのいずれかで処理した。次いで、未処理（ヒストン単独）及びヘパリン化した／ヘパリナーゼ処理したHEMC-1の、ヒストンによって媒介される細胞毒性に対する感受性を決定

10

20

30

40

50

した。HMEC-1からのヘパリン硫酸の酵素的除去は、ヒストンによって媒介される細胞毒性に対する細胞の感受性に影響を及ぼさず、処理は、HMECの生存率（Hep'aseのみ）にいかなる影響も及ぼさなかった。b. 野生型CHO-K1細胞及びGAG欠損pgsA-745 CHO-K1細胞の懸濁液を、上昇する濃度のヒストンと共に37℃で1時間にわたりインキュベートし、フローサイトメトリーにより死滅細胞を検出した。GAGの非存在により、高ヒストン濃度で、ヒストン細胞毒性に対する細胞の感受性がごくわずかではあるが有意に減少した。データを平均±s.e.m (n=3) で表した。* $P \leq 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Sidakの多重比較検定による二元ANOVA)。

【図15】ヒストンは、脂質二重層を破壊して細胞内 Ca^{2+} 流動を誘発するが、このプロセスは、mCBS及びCBSによりブロックされることを示す。a. ヒストン(HIS) (1 μ m) 単独 (n=47) 又はCBS (n=52) (10 μ M) の存在下で曝露した人工脂質二重層の寿命。コントロール二重層 (n=125) は、R μ R1イオンチャネルタンパク質を含んだ。ノンパラメトリックKruskal-Wallis検定を使用してP値を算出した。b. ヒストン添加 (100 μ g ml^{-1}) 後の Ca^{2+} 流動HMEC-1を示す、 Ca^{2+} 感受性色素Indo-1を使用する代表的なフローサイトメトリープロット。c. HMEC-1による、ヒストンによって誘発される Ca^{2+} 流動へのmCBS (100 μ g ml^{-1}) の効果の時間経過。

【図16】ヒストンは、血液凝固を減少させることを示すグラフである。ROTEM全血凝固分析 (パネルA) を使用して、ヒト全血への増加するヒストン濃度の添加により、全てのアッセイで凝固時間が長くなったが、特にNATEMアッセイ及びINTEMアッセイで長くなった。(パネルB) 凝固へのヒストンの同一の抗凝固効果を、血漿ベースの凝固アッセイ (活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)) を使用して実証した。エラーバーは、SEMを示す。

【図17】全血凝固への硫酸化糖類の効果のROTEM分析を示すグラフである。(パネルA) NATEM (非活性化) アッセイ、EXTEM (外因性経路活性化) アッセイ、INTEM (内因性経路活性化) アッセイ及びFIBTEM (中和した血小板による外因性経路活性化) アッセイを実施する直前に全血にmCBS、マルトトリオースサルフェート又はメレチトースサルフェート (200 μ g ml^{-1}) を補充した。データは、水コントロールの倍数増加として表される凝固時間を示す。(パネルB) 様々な濃度のmCBS、メレチトースサルフェート又はマルトトリオースサルフェートを補充した全血を、凝固時間に関してNATEMアッセイを使用して分析した。データが20分での血餅振幅 (clot amplitude) を示すことを除いて (B) と同様である (パネルC)。50及び100 μ g ml^{-1} では2種の三糖類により凝固が検出されなかった。エラーバーは、SEMを示す。

【図18】mCBSの抗凝固効果と、ヘパリン及び低分子量ヘパリンであるエノキサパリンとの比較を示すグラフである。NATEMアッセイを使用して、括弧内に示す濃度 (μ g ml^{-1}) のヘパリン、エノキサパリン、三糖であるマルトトリオースサルフェート及びmCBSの添加後に全血凝固を測定した。

【図19】mCBSは、ヒストンによって誘発される全血凝固の混乱を阻害することを示すグラフである。EXTEMアッセイを使用して、400 μ g ml^{-1} 及び800 μ g ml^{-1} のヒストンによって誘発される凝固時間の延長を200 μ g ml^{-1} のmCBSの事前の添加により阻害し得た。同量の水の添加は、阻害効果がなかった。エラーバーは、SEMを示す。

【図20】mCBS及びCBSは、ヒストンによって誘発される臓器損傷からマウスを保護することを示すグラフである。マウスに対し、50 mg kg^{-1} のヒストン (又は等量のPBS) の静脈注射の10分前に、示した濃度のmCBS、CBS若しくは非硫酸化CB (又は等量のPBS) を腹腔内注射した。4時間後、細胞傷害のマーカー (LDH-乳酸デヒドロゲナーゼ)、肝臓機能障害のマーカー (ALT-アラニンアミノトランスフェラーゼ) 及び腎臓機能障害のマーカー (Cre-クレアチニン) の分析のために眼窩後から血液を採取した。エラーバーは、SEMを示す。データを平均±s.e.mで表す。*

$P \leq 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ (Dunnettの多重比較検定による一元ANOVA)。

【図21】mCBSは、循環している白血球、血小板及び赤血球のヒストンによって媒介される減少を弱めるか又は予防することを示すグラフである。マウスに対し、 50 mg/kg のヒストン(又は等量のPBS)の静脈内注射の10分前に 100 mg/kg のmCBS(又は等量のPBS)を腹腔内注射し、次いで10分後に後眼窩出血させた。AD VIA 2120血液システムを使用して、全血を白血球数、血小板数及び赤血球数並びにヘモグロビン濃度に関して分析した。エラーバーは、SEMを示す。アスタリスクは、PBS+HISコントロールとの有意差を示し、p値は、 < 0.1 (**)、 < 0.01 (***)である(Dunnettの多重比較検定による一元ANOVA)。

10

【図22】mCBSは、中程度の敗血症によって誘発される細胞損傷からラットを保護することを示す。中程度の敗血症のラットモデルにおいて(パネルA)、mCBSで処理した(mCBS)ラット及び未処理の(コントロール)ラットの生存率を示し、中程度の敗血症の動物モデルにおいて(パネルB)、mCBSが細胞損傷(乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH))を減少させることを示すグラフである。雄のWistarラット($n = 8$ /群)を、開腹して盲腸の結紮及び穿刺(CLP)を行って、便性腹膜炎及びその後の敗血症を刺激し、次いで術後0、5及び10時間でi.p.注射により生理食塩水(コントロールCLP)又は 50 mg/kg のmCBSで処理し、20時間にわたりモニタリングした。ラットが重度の病的状態に達すると、その時点で人道的に安楽死させ、死亡を記録した。パネルAで見られるように、mCBSで処理したラットは、100%の生存率を示し、パネルBで見られるように、mCBS処理は、コントロールCLP群のラットと比較して循環LDHレベルを有意に低下させた(統計解析：両側、Studentのt検定、 $p \leq 0.05$)。

20

【図23】CBSは、重度の敗血症によって誘発される病的状態及び臓器損傷からラットを保護する。a. 盲腸の結紮及び穿刺(CLP)が行われ、生理食塩水(コントロール)及びCBSが投与されたラット($n = 8$ /群)の生存率。P値をLog rank (Mantel-Cox)検定により得た。b. それぞれALT及びクレアチニンの血中レベルにより測定した、CLPラットにおける肝臓及び腎臓の損傷。

【図24】CBSは、心臓虚血再灌流傷害モデルにおける微小血管閉塞及び心筋壊死を減少させる。左心室(LV)での虚血域(IZ)、微小血管閉塞(MVO)及び心筋壊死(梗塞領域)を測定した、心臓IRIへのCBS($n = 6$ /群)の効果。

30

【図25】mCBSは、虚血再灌流後の組織弁の生存率を改善することを示す。筋膜弁を、血管茎を無傷のままにしてラット($n = 3 \sim 5$ /群)の腹部から切除し、栄養血管を10時間にわたりクランプし、次いで解放した。クランプの適用5分前及びこのクランプの除去5分後、mCBS(50 mg/kg)又は生理食塩水をi.p.投与した。ラットを、術後24時間及び48時間で追加の化合物又は生理食塩水をラットにi.p.投与した72時間の総実験期間にわたりモニタリングした。示した代表的な写真による弁の壊死(黒くなったか又は赤くなった領域)の程度を用いて、弁の生存率を72時間で決定した。

【図26】CBSは、ヒストンによって誘発される深部静脈血栓症を予防することを示す。マウス($n = 8$ /群)の下大静脈(IVC)を約10%の開存性まで結紮し、その後、全てのマウスに尾静脈を介してヒストン(10 mg/kg)又は等量の生理食塩水をi.v.注射し、続いて5分後にCBS(50 mg/kg)又は生理食塩水をi.v.注射した。マウスを48時間にわたりモニタリングし、その後、再び麻酔して、IVC狭窄の遠位で発症していた任意の血栓を分析のために取り出した。データを平均 $\pm$ s.e.mで表す。 $*P \leq 0.05$ 。(Dunnettの多重比較検定によるANOVA)。

40

【図27】多発性硬化症モデルにおけるmCBS活性を示す。C57BL/6マウスにMOG35-55/CFA/PTで免疫付与して、EAEを誘発させた。0~9日目に、mCBS又はPBSのみ(ビヒクル)を毎日i.p.投与した。マウスを疾患の徴候に関して免疫付与後の17~35日の期間にわたり毎日モニタリングした。mCBS処理($n = 36$)及びビヒクル処理($n = 33$)、EAE誘発のみ($n = 14$)、未処理コントロー

50

ル（ $n=32$ ）の平均臨床スコア。データを、6個の独立してプールした実験から得ている。示しているのは、平均疾患スコア $\pm$ SEMである。統計的有意性を、Sidak-Bonferroni法を使用して決定した。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明は、対象における細胞外ヒストンによって媒介される病気（例えば、敗血症、SIRS又はIRI）の処置又は予防における、化学的安定性が高い、改変されている硫酸化セロピオシド化合物の使用を対象とする。そのような化合物により、対象における細胞外ヒストンの細胞毒性効果を寛解させ得るか、又は阻害し得るか、又は予防し得る。

【0049】

便宜のために、下記のセクションは、本明細書で使用される用語の様々な意味を全体的に概説する。この議論後、本発明を例示する一般的な例示の実施形態を開示し、続いて本発明の様々な例示の実施形態の特性のより具体的な例示を提供する具体例を開示する。

【0050】

概要

本明細書で説明されている本発明は、本明細書で説明されている本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、具体的に説明されているもの以外に変形及び改変される余地があることを当業者は認識するであろう。本発明は、全てのそのような変形形態及び改変形態を含む。本発明はまた、個々に又はまとめて、本明細書で言及されるか又は示される全てのステップ、特徴、組成物及び構成要素と、前記ステップ又は特徴の任意の及び全ての組み合わせ又は任意の2つ以上とを含む。機能的に均等な製品、物質の組成及び方法は、明らかに、本明細書で説明されている本発明の範囲内である。

【0051】

上記参照又は下記参照のいずれかで本明細書で引用されている全ての刊行物、参考文献、文献、特許及び特許出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれ、これは、これらの刊行物、参考文献、文献、特許及び特許出願が本文の一部として読まれるべきであり且つ見なされるべきであることを意味する。本文で引用されている任意の刊行物、参考文献、文献、特許及び特許出願を本文中で繰り返さないのは、単に簡潔さのためである。しかしながら、本明細書で言及されている刊行物、参考文献、文献、特許及び特許出願は、これらの刊行物で報告されており且つ本発明に関連して使用される可能性があるプロトコル、試薬及び生成物を説明及び開示するために引用されている。本明細書のいかなるものも、先行発明により又はあらゆる他の理由により、本発明がそのような開示に先行する権利がないことを認めるものと解釈すべきではない。これらの文献の日付に関する全ての記載又は内容に関する表示は、本出願人らが入手可能な情報に基づくものであり、これらの文献の日付又は内容の正確さに関していかなる承認も構成しない。

【0052】

本明細書で言及されているか又は参照により本明細書に組み込まれる任意の文献で言及されている任意の製品のあらゆる製造業者の指示書、説明書、製品仕様書及び製品シートは、参照により本明細書に組み込まれ、且つ本発明の実施で用いられ得る。

【0053】

本明細書で使用される選択された用語の定義は、本発明の要約及び本発明の詳細な説明内に見出され得、且つ全体を通して適用される。別途定義しない限り、本明細書で使用される全ての他の科学用語及び技術用語は、本発明が属する技術分野における当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。当該技術分野における用語の使用法と、本明細書に記載されているこの用語の定義との間に明らかな矛盾が存在する場合、本明細書内に記載されている定義が優先されるものとする。

【0054】

定義

作業実施例又は別途指示されている場合を除いて、本明細書で使用されている成分又は反応条件の量を表す全ての数字は、全ての場合において用語「約」により修飾されている

10

20

30

40

50

と理解すべきである。例えば、用語「約」は、百分率と関連して使用される場合、± 10 %を意味し得る。

【0055】

別途文脈が必要としない限り又は本明細書が明確に反対のことを述べない限り、単数の整数、ステップ又は要素として本明細書で列挙されている本発明の整数、ステップ又は要素は、列挙された整数、ステップ又は要素の単数形及び複数形の両方を明確に包含する。本明細書全体を通して、別途述べない限り又は別途文脈が必要としない限り、単一のステップ、組成物若しくは物質、ステップの群又は物質の組成物の群への言及は、1つ及び複数（即ち1つ以上）の又はこれらのステップ、組成物若しくは物質、ステップの群又は物質の組成物の群を包含すると見なすものとする。従って、本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その」は、別途文脈が明確に指示しない限り、複数の言及を含む。そのため、例えば、「硫酸化セロピオシドであって、その還元末端で小さい非荷電置換基で改変されている硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩」への言及は、複数のそのような改変されている硫酸化セロピオシド化合物又は複数のその塩及び同類のものを含む。

10

【0056】

本明細書及び特許請求の範囲の全体を通して、別途文脈が必要としない限り、単語「含む(comprise)」又は「含む(contains)」若しくは「含んでいる」等のバリエーションは、述べられているステップ、若しくは要素、若しくは整数又はステップ、若しくは要素、若しくは整数の群の包含を暗示するが、あらゆる他のステップ、若しくは要素、若しくは整数又はステップ、若しくは要素、若しくは整数の群の排除を暗示しないと理解されるであろう。

20

【0057】

本明細書で使用される場合、用語「包含している」並びに「包含する」及び「包含される」等のバリエーションも限定的ではないと理解されるであろう。

【0058】

本出願では、「又は」の使用は、別途述べない限り「及び／又は」を意味する。

【0059】

本明細書で説明されている本発明は、1つ又は複数の範囲の値（例えば、サイズ、変位及び電界強度等）を含み得る。値の範囲は、この範囲を定義する値等のこの範囲内の全ての値と、この範囲の境界を定義する値に直接隣接する値と同一の又は実質的に同一の結果を導く、この範囲に隣接する値とを含むと理解されるであろう。例えば、関連分野の当業者は、範囲の上限又は下限の10%変動が完全に適切であり得、且つ本発明に包含されることを理解するであろう。より具体的には、範囲の上限又は下限の変動は、5%であるか、又は当該技術分野で一般的に認識されているようにいずれかがより大きい。

30

【0060】

本明細書で使用される場合、用語「状態」、「病気」又は「疾患」（互換的に使用される）は、細胞外ヒストンの放出によって媒介される細胞外ヒストン関連の合併症を意味する。

【0061】

本明細書で使用される場合、語句「細胞外ヒストン関連の合併症」は、特に限定されることなく、ヒストンによって媒介される、(a) 例えば、敗血症（細菌、ウイルス、真菌、寄生生物、プリオンによって誘発される敗血症を含む）等の感染又は手術、外傷、出血、熱傷、急性肺炎及び急性腎傷害を含む非感染性誘発因子に対する全身性炎症反応、(b) 例えば、粥状動脈硬化、血管の自然破裂、血管への外傷性損傷に起因する動脈の閉塞後の且つ心臓の及び移植に関連するIRIを含む局所組織レベルでの低酸素症又は例えば溺死、ガス曝露若しくは心肺停止に起因する呼吸停止後の且つ例えば急性呼吸促迫症候群、慢性閉塞性肺疾患及び薬剤介在組織傷害等の病気を含む全身レベルでの低酸素症、(c) 止血又は血管閉塞、例えば心血管疾患又は慢性心血管疾患、例えば粥状動脈硬化、凝血及び血栓症（例えば、深部静脈血栓症）、(d) 自己免疫疾患状態及び炎症疾患状態、例え

40

50

ば多発性硬化症、過剰炎症疾患状態、全身性エリテマトーデス、脊椎関節症、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、腸炎性関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、過敏性腸疾患、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、小血管の破壊及び炎症によって特徴付けられる抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎（AAV）、例えば多発性血管炎を伴う肉芽腫症、多発性血管炎及び顕微鏡的多発血管炎を伴う好酸球性肉芽腫症）、家族性地中海熱、筋萎縮性側索硬化症、シェーグレン症候群、早期関節炎、ウイルス性関節炎、乾癬、加齢に伴う臓器線維症、特発性肺線維症、若年性糖尿病（Ⅰ型）、糖尿病（Ⅱ型）、抗リン脂質抗体症候群及び様々な中枢神経系疾患、例えばハンチントン病を意味する。

【0062】

本明細書で使用される場合、用語「敗血症」は、その意味において、標準的な医学参考文献で特徴付けられており、及び／又は当業者に既知である敗血症の疾患又は状態の全てのステージを含む。例えば、敗血症は、重度の敗血症、急性及び慢性の敗血症並びに敗血症性ショックを含む。用語「敗血症」は、本明細書で使用される場合、感染と関連するエピソードも含む。本明細書で使用される用語「SIRS」（全身性免疫反応症候群）は、感染と関連しないエピソード（例えば、外傷、熱傷、肺炎、臓器移植、手術、癌の治療レジーム後の腫瘍溶解、周産期合併症及び同種移植片の免疫抑制予防）を含む。

【0063】

本明細書で使用される場合、用語「敗血症若しくはSIRSと関連する医学的状态」又は「敗血症若しくはSIRSと関連する疾患」は、それらの意味において、標準的な医学参考文献で特徴付けられており、及び／又は当業者に既知である敗血症又はSIRSの疾患又は状態の任意の又は全てのステージと直接的に又は間接的に関連するか、それに由来するか、それによって引き起こされるか又はそれを伴う全ての徴候及び症状を含む。例えば、敗血症又はSIRSと関連する医学的状态又は疾患として、感染の有無にかかわらず対象において現れる場合がある対象における敗血症又はSIRSの疾患又は状態の任意の又は全てのステージと関連するか、それに由来するか、それによって引き起こされるか又はそれを伴う下記の徴候又は症状の1つ又は複数が挙げられる：動脈性低血圧、代謝性アシドーシス、全身性血管抵抗減少、心拍数増加（頻脈）、呼吸速度増加（頻呼吸）、全体炎症若しくは全身性炎症、白血球数上昇若しくは白血球減少（白血球増加症又は白血球減少症）、血液中の細胞外ヒストンの増加、臓器機能不全、例えば急性臓器機能不全、循環系の機能不全、多臓器不全症候群、播種性血管内凝固（DIC）、1種若しくは複数の臓器の微小血管系中でのフィブリンの沈着、発熱、錯乱、肺炎、肺炎を伴う咳、腎感染、腎感染を伴う排尿時痛及び／又は敗血症性ショック。

【0064】

本明細書で使用される場合、用語「低減する」、「低減した」、「低減」、「減少する」又は「阻害する」は、全て統計的に有意な量の減少を意味するために概して使用される。しかしながら、疑念を回避するために、「低減した」、「低減」若しくは「減少する」又は「阻害する」は、例えば、薬剤の非存在下で基準レベルと比較して少なくとも10%の減少を意味し、例えば少なくとも約20%、又は少なくとも約30%、又は少なくとも約40%、又は少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%の減少を意味する。

【0065】

本明細書で使用される場合、用語「改善する」、「増加した」、「増加する」若しくは「増強する」又は「活性化する」は、全て統計的に有意な量の増加を概して意味するように使用され、あらゆる疑念を回避するために、用語「改善する」、「増加した」、「増加する」若しくは「増強する」又は「活性化する」は、例えば、薬剤の非存在下で基準レベルと比較して少なくとも10%の増加を意味し、例えば少なくとも約20%、若しくは少なくとも約30%、若しくは少なくとも約40%、若しくは少なくとも約50%、若しくは少なくとも約60%、若しくは少なくとも約70%、若しくは少なくとも約80%の増加又は少なくとも約2倍、若しくは少なくとも約3倍、若しくは少なくとも約4倍、若しくは少なくとも約5倍、若しくは少なくとも約10倍の増加又は基準レベルと比較して

10

20

30

40

50

2 倍～10 倍以上の任意の増加を意味する。

【0066】

本明細書で使用される場合、用語「投与する」、「投与した」及び「投与すること」は、所望の効果が生じるように、所望の部位での組成物の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法又は経路による、この組成物の対象への配置を指す。本明細書で説明されている化合物又は組成物を、当該技術分野で既知の任意の適切な経路により投与し得、この経路として経口経路又は非経口経路が挙げられるが、これらに限定されず、例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、気道（エアロゾル）投与、肺投与、経鼻投与、直腸投与並びに局所（例えば、頬側及び舌下）投与が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本化合物は、ポリアニオン性硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩である。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロピオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。上記化合物が治療用組成物又は治療用組成物等の組成物中に存在する場合、この化合物は、非経口投与のために調製されるか、又は標的部位への送達を可能にする別の他の方法のために調製される。いくつかの例示的な投与形態として、注射、注入、点滴、吸入又は経口摂取が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0067】

本明細書で使用される場合、用語「注射」は、下記を含むが、これらに限定されない：静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、脳室内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節腔内、嚢下、くも膜下、脊髓内、脳脊髄内及び胸骨内の注射及び注入。好ましい実施形態では、本組成物を静脈内注入又は静脈内注射により投与する。

20

【0068】

本明細書で使用される場合、本明細書で列举されている状態又は疾患のいずれかに関する限り、本発明に関連して、用語「処置する」、「処置」、「処置すること」及び同類のものは、そのような状態又は疾患と関連する少なくとも1種の症状又は合併症の進行、悪化（aggravation）、悪化（deterioration）、進行、予想される進行又は重症度を軽減するか、緩和するか、寛解させるか、阻害するか、減速させるか、反転させるか又は停止させることを意味する。ある実施形態では、状態又は疾患の症状は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%又は少なくとも50%緩和される。

30

【0069】

本明細書で使用される場合、語句「有効量」、「治療上有効な量」又は「有効用量」（本明細書では互換的に使用される）は、これらの意味において、本発明の化合物又は組成物の、所望の効果が生じるのに十分であるが、非毒性である量を含む。必要とされる化合物又は組成物の正確な量は、所望の効果、処置する種、対象の年齢及び全身状態、処置する状態の重症度、投与する薬剤、投与様式及び同類のもの等の因子に応じて対象毎に異なるであろう。そのため、正確な「有効量」を指定することは、不可能である。しかしながら、任意の所与の場合に関して、適切な有効量（用量）を、日常的な実験のみを使用して当業者により決定し得る。一般に、治療上有効な量は、対象の病歴、年齢、状態、性別及び対象の医学的状态の重症度及び種類並びに他の薬学的に活性な薬剤の投与により変化し得る。

40

【0070】

本明細書で使用される場合、治療用途又は医薬用途での化合物及び組成物の使用への言及は、ヒト用途及び非ヒト（例えば、獣医）用途にも同様に適用可能であることが理解されるであろう。従って、別途指示されている場合を除いて、「患者」、「対象」又は「個体」（本明細書では互換的に使用される）への言及は、ヒト又は非ヒト（例えば、社会的に重要な、経済的に又は研究上重要なあらゆる種の個体）を意味することが理解され、この個体として下記が挙げられるが、これらに限定されない：哺乳類、鳥類、ウサギ類、ヒ

50

ツジ、ウシ、ウマ、ブタ、ネコ、イヌ、霊長類及び齧歯類の種。より好ましくは、患者、対象又は個体は、哺乳類の種に属する動物である。この哺乳類の種は、望ましくは、ヒト若しくは非ヒトの霊長類であるか、又はコンパニオン動物（例えば、家畜化されたイヌ、ネコ、ウマ、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ウシ若しくはブタ）である。特に好ましい一例では、患者、対象又は個体は、ヒトである。

【0071】

本明細書で使用される選択された用語の定義は、本発明の詳細な説明中に見出され得、且つ全体を通して適用される。別途定義しない限り、本明細書で使用される全ての他の科学用語及び技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。

【0072】

本発明の例示的实施形態

下記の本発明の詳細な説明は、本発明を例示する目的のためにのみ含まれており、上記に記載されているような本発明の広範な説明への限定として決して理解されるべきではない。

【0073】

1. 本発明の化合物

本発明の第1の態様では、細胞外ヒストンによって媒介される合併症の処置での使用のための化合物であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩を含む化合物が提供される。この置換基は、同一のポリアニオンであるが、還元末端で硫酸化されているポリアニオンと比べて、分子に高い化学的安定性を付与する。好ましくは、このクラスの化合物は、高い正味の負電荷を有するはずである。

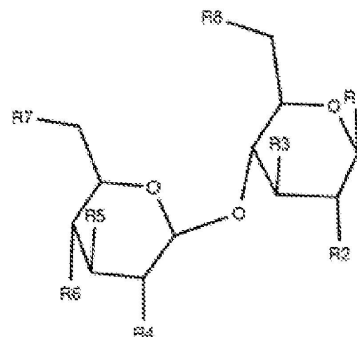
【0074】

本発明の化合物は、細胞外ヒストンによって媒介される合併症（例えば、敗血症又は虚血再灌流傷害）を、予防的（即ち医療処置に対する予防的前処置として）又はこの状態若しくは疾患が発生した後の処置中の治療的の両方で寛解させ得る。

【0075】

本発明のある実施形態では、この改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシドは、全体構造：

【化2】



（式中、R1は、小さい非荷電グリコシド結合置換基であり、例えばO-又はS-（C₁～6）アルキルであり、及びR2～R8は、それぞれ（i）小さい非荷電O結合置換基、又は（ii）サルフェート基から選択される）

を有する。

【0076】

好ましくは、R1は、O-又はS-（C₁～6）アルキルである。好ましくは、R1は、R1でサルフェート基を有する同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性

を改善する。

【0077】

好ましくは、R2～R8は、それぞれ(a)非改変ヒドロキシル基、又は(b)サルフェート基から選択される。

【0078】

より好ましくは、R1は、メトキシ基又はエトキシ基であり、及びR2～R8は、それぞれO-サルフェート又はN-サルフェートから選択されるサルフェート基である。

【0079】

望ましくは、この化合物のクラスは、高い正味の負電荷を有し、即ちポリアニオンである。

【0080】

この小さい非荷電グリコシド置換基(R1)のアノマー配置は、α位又はβ位のいずれかであり得る。好ましくは、この小さい非荷電置換基は、β配置である。

【0081】

本発明の非常に好ましい形態では、本化合物は、硫酸化β-O-メチルセロビオシド二糖であるβ-O-メチルセロビオシドサルフェート又はその薬学的に許容される塩である。実例として、この化合物は、β-O-メチルセロビオシドサルフェートのナトリウム塩である。

【0082】

mCBSは、CBSと比べて非常に安定しており、高用量で良好に耐容性である。mCBSは抗凝固効果が最小限に抑えられており、ヒストンによって誘発される血漿凝固攪乱を減少させ得る。mCBSの抗凝固活性は、低分子量ヘパリンと比べて110倍低く、非分画ヘパリンと比べて750倍低い。

【0083】

ポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。

【0084】

化学的安定性は、本明細書で使用される場合、本発明の化合物の、変化(具体的には自然環境中での分解又は空気、熱、光、圧力若しくは他の自然条件に曝露された際の分解又は内部反応に起因する分解)に抵抗する傾向を表す。

【0085】

本発明の化合物は、予想される使用条件又は通常的环境条件下での少なくとも1ヶ月の貯蔵後、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べて有意に分解していない場合に「安定」である。

【0086】

本発明の化合物は、予想される使用条件又は通常的环境条件下での少なくとも1ヶ月の貯蔵後に3個以上のサルフェート基が失われている場合、有意に分解されているであろう。好ましくは、本発明の化合物は、予想される使用条件又は通常的环境条件下での少なくとも1ヶ月の貯蔵後に2個のサルフェート基が失われている場合、有意に分解されているであろう。最も好ましくは、本発明の化合物は、予想される使用条件又は通常的环境条件下での少なくとも1ヶ月の貯蔵後に1個のサルフェート基が失われている場合、有意に分解されているであろう。

【0087】

好ましくは、本発明の化合物は、pH7.5に緩衝化されたリン酸塩製剤中に保存され且つ2～8℃で保存された場合、少なくとも2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月、13ヶ月、14ヶ月、15ヶ月、16ヶ月、17ヶ月、18ヶ月、19ヶ月、20ヶ月、21ヶ月、22ヶ月、23ヶ月又は24ヶ月にわたり化学的に安定である。より好ましくは、pH7.5に緩衝化されたリン酸塩製剤中で保存され且つ約2～8℃で保存されている化合物では、6ヶ月～2年

10

20

30

40

50

の期間にわたり安定性が測定される。

【0088】

本明細書で使用される場合、語句「薬学的に許容される塩」は、健全な医学的判断の範囲内において、過度の毒性、刺激、アレルギー反応及び同類のものを伴うことなくヒト及び下級動物の組織との接触での使用に適しており、且つ合理的な利益／リスク比に見合う塩を含む。

【0089】

薬学的に許容される塩は、当該技術分野で公知である。この塩として、例えば、無機酸（例えば、塩酸若しくはリン酸）又は有機酸（例えば、クエン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸及び同類のもの）に由来する酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基で形成されている）が挙げられる。同様に、タンパク質の遊離カルボキシル基で形成された塩も、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム若しくは第二鉄の水酸化物）又は有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン及び同類のもの）に由来し得る。

【0090】

本発明の好ましい形態では、本発明の改変されている硫酸化セロビオシドは、薬学的に許容される塩として存在する。実例として、この化合物は、 β -O-メチルセロビオシドサルフェートのナトリウム塩であり、即ちナトリウム β -O-メチルセロビオシドサルフェート (mCBS. Na) である。

【0091】

本発明の方法又は組成物で使用される、改変されている硫酸化セロビオシド化合物又はその薬学的に許容される塩は、当業者に既知の方法により調製され得る。例えば、硫酸化化合物であって、その還元末端において非荷電置換基で改変されている硫酸化化合物を調製する方法は、全体が参照により本明細書に組み込まれる Katrin C Probst and Hans Peter Wessel, 2001, J. Carbohydrate Chemistry, 20 (7 & 8) : 549-560 で概して説明されている。

【0092】

2. 処置方法

本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、細胞外ヒストンタンパク質の病理活性を寛解させ得るか又は予防し得ることから、本発明は、本発明の第2の態様として、細胞外ヒストン関連の合併症の処置又は予防の方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法を提供する。好ましくは、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS. Na）である。

【0093】

さらに、本発明の第3の態様では、対象における細胞外ヒストンの蓄積を寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与することを包含する方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS. Na）である。

【0094】

本発明の第2及び第3の態様により説明されているような本発明は、ヒストンの放出及びその結果として生じる細胞外毒性によって引き起こされる様々な異なる細胞外ヒストン病気を処置又は予防することを企図する。本発明のこれらの態様によれば、それぞれの方法を、下記を有する対象における細胞外ヒストン関連の合併症の処置又は予防に使用し得る：(a)例えば、敗血症(細菌、ウイルス、真菌、寄生生物、プリオンによって誘発される敗血症を含む)等の感染又は手術、外傷、出血、熱傷、急性膵炎及び急性腎傷害を含む非感染性誘発因子に対する全身性炎症反応、(b)例えば、粥状動脈硬化、血管の自然破裂、血管への外傷性損傷に起因する動脈の閉塞後の且つ心臓の及び移植に関連するIRIを含む局所組織レベルでの低酸素症又は例えば溺死、ガス曝露若しくは心肺停止に起因する呼吸停止後の且つ例えば急性呼吸促迫症候群、慢性閉塞性肺疾患及び薬剤介在組織傷害等の病気を含む全身レベルでの低酸素症、(c)止血又は血管閉塞、例えば心血管疾患又は慢性心血管疾患、例えば粥状動脈硬化、凝血及び血栓症(例えば、深部静脈血栓症)、(d)自己免疫疾患状態及び炎症疾患状態、例えば多発性硬化症、過剰炎症疾患状態、全身性エリテマトーデス、脊椎関節症、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、腸炎性関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、過敏性腸疾患、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、小血管の破壊及び炎症によって特徴付けられる抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎(AAV)、例えば多発性血管炎を伴う肉芽腫症、多発性血管炎及び顕微鏡的多発性血管炎を伴う好酸球性肉芽腫症)、家族性地中海熱、筋萎縮性側索硬化症、シェーグレン症候群、早期関節炎、ウイルス性関節炎、乾癬、加齢に伴う臓器線維症、特発性肺線維症、若年性糖尿病(1型)、糖尿病(2型)、抗リン脂質抗体症候群及び様々な中枢神経系疾患、例えばハンチントン病。

10

20

【0095】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、それぞれの方法は、本発明の化合物と同時に又はこの化合物に付随して、対象が罹患しているか又は罹患する可能性がある医学的状态のための補助的処置を提供する、本発明の化合物と異なる第2の治療薬(例えば、抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤又は他の形態の医学的介入)を対象に投与することをさらに含み得る。

【0096】

好ましくは、本発明のこれらの態様の一例として、それぞれの方法は、対象における敗血症若しくはSIRS又は敗血症若しくはSIRSと関連する医学的状态若しくは疾患を処置又は予防する手段を提供する。本発明のこれらの態様の別の例として、それぞれの方法は、対象におけるIRI又はIRIと関連する医学的状态若しくは疾患を処置又は予防する手段を提供する。

30

【0097】

好ましくは、この方法は、二次的な状態を処置するために医師が他の薬物を投与することを可能にするためにこの状態又は疾患状態を十分に寛解させる。そのため、本発明は、患者における細胞外ヒストン関連の合併症を寛解させる目的で、ポリアニオン性硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量を対象に投与することも含む。

40

【0098】

本発明の第2又は第3の態様に係る特定の例示的实施形態では、この特定された方法は、抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤及び／又は対象が患っているか若しくは患うリスクがある1種若しくは複数の状態を処置する任意の他の形態の医薬組成物の1つ又は複数から選択される第2の活性剤、化合物又は組成物の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を、この改変されている硫酸化セロピオシドと一緒に又はこの硫酸化セロピオシドに付随して対象に投与するステップをさらに含み得る。

【0099】

この実施形態によれば、第2の活性剤、化合物又は組成物は、細胞外ヒストン関連の合併症(例えば、敗血症、SIRS若しくはIRI)及び／又はそのような合併症と関連す

50

る医学的状態若しくは疾患を対象とする処置に対して補助的処置を提供する。好ましくは、第2の活性剤、化合物又は組成物は、1種又は複数の抗炎症剤を含む。

【0100】

好ましくは、第2の活性剤は、本発明の化合物によって処置される医学的病気に関連するか又はこの医学的病気と異なる、患者が患っている疾患の医学的介入の手段を提示し、前記第2の活性剤は、この患者に補助的処置を提供する。

【0101】

本明細書で開示されている本発明の治療用及組成物及び／又は医薬組成物を治療的又は予防的に投与し得る。治療用途では、化合物及び組成物を、細胞外ヒストン関連の合併症又はヒストン関連の合併症と関連する病気を既に罹患している患者に、この症状を治癒するか又は少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で投与する。この化合物又は組成物を、単回用量において又は処置レジーム（例えば、複数回用量処置レジーム）の一部として、この患者を効果的に処置するのに十分な量の活性化合物で提供すべきである。予防的用途では、本発明の化合物及び組成物を、細胞外ヒストン関連の合併症と関連する病気を発症するリスクがある対象に、この病気の症状及び／又は合併症を少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で投与する。

【0102】

本発明の第4の態様では、対象における細胞外ヒストンによって媒介される病理と関連する医学的状態、病気又は疾患を処置又は予防する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。

【0103】

好ましくは、この硫酸化セロピオシドは、 β -O-メチルセロピオシドサルフェート（mCBS）又はその薬学的に許容される塩である。

【0104】

好ましい一例では、この方法を使用して、（i）対象の内皮に対して細胞毒性であるか、又は（ii）対象の内皮機能障害の一因となるか、又は（iii）対象の血小板を活性化させることによって凝血を開始させるか、又は（iv）対象において赤血球脆弱性及びその結果としての貧血を誘発する細胞外ヒストンを処置する。

【0105】

本明細書で説明されているあらゆる態様、実施形態又は例に係る本発明の非常に好ましい例示的形態では、本発明の化合物を使用して、後に論じる病気又は状態の1つ又は複数

【0106】

A. 敗血症

敗血症（敗血症性ショックを含む）とは、動脈性低血圧、代謝性アシドーシス、全身性血管抵抗減少、頻呼吸及び臓器機能不全を特徴とする、感染に対する全身反応のことである。敗血症（敗血症性ショックを含む）は、サイトカインネットワーク、白血球並びに補体及び凝固線維素溶解系を含む多くの宿主防御機構の活性化と関連し且つこの活性化によって媒介される、感染に対する全身炎症反応でもある。様々な臓器の微小血管系中に線維素が広範に沈着した播種性血管内凝固（DIC）は、敗血症の初期症状の場合がある。DICは、多臓器不全症候群の発症において重要なメディエータであり、敗血症性ショックの患者の予後不良の一因となる。

【0107】

敗血症を引き起こす免疫学的反応は、炎症及び凝固経路の広範な活性化を引き起こす全身性炎症反応である。これは、循環器系の機能障害に進行する場合があり、たとえ最適な処置を受けても多臓器不全症候群を引き起こし、最終的に死に至る場合がある。

【0108】

敗血症の症状は、基礎となる感染プロセスに関連することが多く、未処置まま放置する

10

20

30

40

50

と、重度の敗血症（急性臓器機能不全を伴う敗血症）又は敗血症性ショック（難治性の動脈性低血圧を伴う敗血症）として現れる可能性がある。全身性炎症反応症候群の基準（例えば、全身の炎症、発熱、白血球数の上昇（白血球増多症）並びに心拍数の上昇（頻脈）及び呼吸速度の上昇（頻呼））の2つ以上が感染の証拠なく満たされる場合、患者は、全身に影響を及ぼす敗血症性炎症状態である「SIRS」と単に診断される場合がある。

【0109】

敗血症の多くの患者は、24～48時間にわたる急速な衰弱を示す。敗血症の効果的な処置のために迅速な処置が不可欠である。残念ながら、感染のタイプの診断には、数日を要する場合がある病原体を同定するための微生物学的分析が必要である。従って、病原体を除去するための治療（例えば、抗生物質治療）は、病原体のタイプ及び種を知ることなく且つ感染の程度を知る手段がない状態で開始されなければならない。本発明は、そのような方法を提供する。

【0110】

敗血症に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇しており、このタンパク質は、敗血症の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0111】

本発明の第2、第3又は第4の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における細胞外ヒストン関連の敗血症を（予防的又は治療的に）処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0112】

本明細書で実証されているように、本発明の化合物（特にmCBS）は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし、それにより敗血症の処置として有用である。

【0113】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と敗血症が発症した後の処置との両方を含む、敗血症における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0114】

B. 非感染性SIRS

非感染性の全身炎症性反応症候群（SIRS）は、全身に影響を及ぼす炎症状態である。非感染性SIRSは、非感染性の侵襲に対する身体の実質的反応である。SIRSの定義は、非感染性SIRSを「炎症性」の反応と称するが、非感染性SIRSは、実際には炎症誘発性成分及び抗炎症性成分を有する。

【0115】

SIRSは、全身の炎症、臓器機能障害及び臓器不全に関連する重篤な状態である。SIRSは、サイトカインストームのサブセットであり、様々なサイトカインの異常な調節が存在する。SIRSは、敗血症とも密接に関係しており、この敗血症では、患者は、SIRSの基準を満たしており、且つ感染が疑われるか又は感染が証明されている。非感染性SIRSの原因として、例えば外傷、手術、外傷性出血、熱傷及び急性膵炎が実例として挙げられる。

【0116】

本発明の第2、第3又は第4の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における細胞外ヒストン関連の非感染性SIRSを（予防的又は治療的に）処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、

その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

【0117】

本明細書で実証されているように、本発明の化合物（特にm C B S）は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし、それにより非感染性S I R Sの処置として有用である。

【0118】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と非感染性S I R Sが発症した後の処置との両方を含む、非感染性S I R Sにおける細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0119】

B. 1 外傷

身体外傷とは、重篤で身体が変わる身体的損傷（例えば、四肢の粉碎又は切断）のことである。

【0120】

鈍力外傷は、鈍器から又は鈍器により加えられる衝撃又は他の力によって引き起こされる身体外傷の一種であり、貫通性外傷は、物体が皮膚又は組織を貫く身体外傷の一種である。外傷は、事故等の無計画なもの又は手術の場合の計画的なものの両方としても説明され得る。両方とも軽度～重度の組織損傷、出血及び／又はショックを特徴とし得、両方ともS I R Sを引き起こす可能性があるが、その後の感染及び敗血症のリスクも著しく高める。

【0121】

ヒストンは、感染の非存在下において、外傷又は重度の細胞ストレス後に放出される。例えば、血清ヒストンレベルは、重度の非胸部鈍の外傷後に有意に上昇する。高い血清ヒストンレベルは、重度の合併症、発生率及び予後不良と正の相関がある。インビトロでは、外因性ヒストンは、様々なサイトカイン（例えば、TNF- α 、IL-6及びIL-10）の産生及び分泌を引き起こし、ミエロペルオキシダーゼの放出を刺激し、免疫細胞及び内皮細胞におけるカルシウム流入を増加させ、これにより、ヒストンによって誘発される細胞毒性が部分的に媒介される。インビボでは、ヒストン投与は、動物の外傷モデルにおいて、サイトカイン放出、内皮損傷、凝固活性化及び肺損傷も促進する。

【0122】

外傷を受けている患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇している可能性があり、このタンパク質は、外傷の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0123】

本発明の第2、第3又は第4の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における細胞外ヒストン関連の外傷を（予防的又は治療的に）処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

【0124】

m C B S等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため外傷患者での処置として有用である。

【0125】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と外傷性傷害が生じた後の処置との両方を含む、外傷における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0126】

B. 2. 手術

手術は、身体の機能若しくは外観の改善に役立つために又はときにいくつかの他の理由のために、疾患又は傷害等の病的状態を調査及び／又は処置するために患者に手術的な手技又は機器技術を使用する。本発明は、下記でさらに定義されるように、手術に起因する外傷に対処し得る。

【0127】

本発明の第2、第3又は第4の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における細胞外ヒストン関連の外科的外傷を（予防的又は治療的に）処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

【0128】

概して、処置は、患者の組織の切除又は以前から持続する傷の縫合を伴う場合に手術と見なされる。必ずしもこの範疇に該当しない他の処置（例えば、血管形成術又は内視鏡検査）も、一般的な外科的処置又は外科的設定（例えば、無菌環境、麻酔、無菌条件、典型的な手術器具及び縫合又はステープリングの使用）を伴う場合に手術と見なされる場合がある。手術の全ての形態は、侵襲的処置と見なされるが、いわゆる非侵襲的手術は、通常、対象となる構造を貫通しない切除（例えば、角膜のレーザー焼灼術）又は放射線外科的処置（例えば、腫瘍の照射）を指す。

【0129】

本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させ得ることから、本発明は、（医療処置の場合における）前処置と外科的傷害が生じた後の処置との両方を含む、外科的外傷での使用のための処置を提供する。

【0130】

B. 3. 外傷性出血

外傷性出血は、傷害の広範にわたる国際的影響の大半を占めており、死亡の大部分の原因となり、負傷者に大きい罹患率をもたらす。病院前救護の差異にもかかわらず、外傷性出血の急性期管理は、世界中で類似しており、十分に受け入れられる公表されたガイドラインに従う。重傷の患者のケアは、蘇生段階、手術段階及び救命治療段階の4つの多くの場合に重複するセグメントとして起こる。出血の診断及びコントロールは、外傷ケアの全ての段階で高い優先度であるべきであり、出血性ショックの状態である患者で特に重要である。出血コントロールの初期の試みは、直接圧迫、圧迫包帯又は止血帯による、目に見える重度の出血源の直接コントロール；長骨及び骨盤の骨折の安定化；並びに患者の保温を含む。蘇生段階では、温めた静脈内輸液、出血の外科的コントロール前の低血圧蘇生並びに血液及び血液製剤の適切な注入が行われる。手術段階では、出血及び任意の他の傷害の外科的コントロール並びに追加の輸血が行われる。最後に、救命治療段階では、術後のサポート及び組織灌流が提供される）。

【0131】

本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させ得ることから、本発明は、（医療処置の場合における）前処置と外傷性出血が生じた後の処置との両方を含む、外傷性出血での使用のための処置を提供する。

【0132】

B. 4. 熱傷

熱傷は、熱、寒さ、電気、化学物質、摩擦又は放射線によって引き起こされる傷害であり得る。第1度熱傷は、通常、発赤（紅斑）、白斑及び受傷部位での軽度の痛みに限定される。この熱傷は、通常、表皮中にのみ広がる。第2度熱傷は、透明な液体でさらに満たされ、皮膚の表面に水膨れができ、且つ神経関与のレベルに応じて多少の痛みを伴う可能性がある。第2度熱傷は、表皮（真皮乳頭層）に及ぶが、深い真皮層（真皮網状層）にも及ぶ場合がある。第3度熱傷は、皮膚の炭化をさらに有し、硬くて革のような焼痂が生じる。焼痂とは、身体の影響を受けていない部分から分離している痂皮のことである。多くの場合、紫色の液体も存在する。このタイプの熱傷は、火傷した領域中では神経末端が破壊されていることから痛みを伴わないことが多い。深刻な熱傷（特に身体の広範な領域を覆う場合）は、死をもたらす可能性があり、（例えば、煙の吸入による）肺への熱傷のあらゆる兆候は、医療的緊急事態である。

【0133】

皮膚の下にある組織（例えば、筋肉又は骨）を傷つける熱傷は、第4度熱傷に分類されることがある。この熱傷は、下記のさらなる3段階に分けられる：皮膚が取り返しのつかないほど失われる第4度熱傷、筋肉が取り返しのつかないほど失われる第5度熱傷及び骨が炭化している第6度熱傷。

【0134】

様々な熱傷が細胞外ヒストンレベルの上昇につながり、その結果、毒性と関連している。この毒性がヒストンの細胞外作用により少なくとも部分的に引き起こされる限り、本発明は、本発明の医薬組成物を使用してこの毒性を低減し、それにより患者側の不快感を低減又は緩和し、さらにより高用量の治療を可能にしようとする。

【0135】

熱傷に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇している可能性があり、このタンパク質は、熱傷の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0136】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、対象への熱傷によって引き起こされるヒストンによって誘発される細胞毒性を寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロピオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロピオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0137】

mCBS等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため熱傷患者での処置として有用である。

【0138】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、対象の熱傷における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0139】

B. 5. 急性膵炎

急性膵炎は、無菌性炎症及び腺房細胞死（例えば壊死及びアポトーシス）による膵臓の急速に発症する炎症を特徴とする。この点において、活性化免疫細胞における細胞外ヒストンによって媒介されるHMGB1放出は、HMGB1膵臓条件付きノックアウトマウスにおけるアレルギー性急性膵炎の原因となる。膵臓におけるHMGB1の喪失により、広範な核損傷及び細胞死後の循環中へのヒストン放出が増加する。循環しているヒストンは、マクロファージを補充し、マクロファージの活性化及びさらなるHMGB1放出をもたらす。

【0140】

急性膵炎は、その重症度に応じて、重度の合併症を有する可能性があり、処置にもかかわらず高い死亡率を有する可能性がある。軽症例では、保存的処置又は腹腔鏡検査による処置が成功することが多いが、重症例では、疾患プロセスを抑制するために侵襲的手術（多くの場合に複数の介入）が必要である。

【0141】

急性膵炎に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇している可能性があり、このタンパク質は、急性膵炎の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0142】

本発明の第2、第3又は第4の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における細胞外ヒストン関連の急性膵炎を（予防的又は治療的に）処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0143】

mCBS等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため急性膵炎患者での処置として有用である。

【0144】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と急性膵炎が発症した後の処置との両方を含む、急性膵炎における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0145】

C. 虚血再灌流傷害

虚血再灌流傷害（例えば、移植関連の虚血再灌流傷害）及び薬剤介在組織傷害は、微生物の非存在下で起こるプロセスである無菌性炎症を生じる。

【0146】

虚血とは、組織への血液供給が制限され、細胞の代謝に必要な酸素が欠乏することである。長期にわたる虚血（60分以上）では、ATP代謝の分解産物としてヒポキサンチンが形成される。酵素キサンチンデヒドロゲナーゼは、酸素のより高い利用可能性の結果として、キサンチンオキシダーゼに変換される。この酸化により、分子酸素が、反応性がより高いスーパーオキシド及びヒドロキシルラジカルに変換される。キサンチンオキシダーゼは、尿酸も産生し、この尿酸は、酸化促進剤と、ペルオキシニトライト等の反応種の捕捉剤との両方として作用する場合がある。再灌流中に生成された過剰な一酸化窒素は、スーパーオキシドと反応して強力な反応種ペルオキシナイトライトを生成する。そのようなラジカル及び活性酸素種は、細胞膜脂質、タンパク質及びグリコサミノグリカンを攻撃し、さらなる損傷を与える。このラジカル及び活性酸素種は、酸化還元シグナル伝達により

10

20

30

40

50

特定の生物学的プロセスを開始する場合もある。

【0147】

再灌流傷害は、損傷した組織の炎症反応に部分的に起因する損傷を指す。新たに戻る血液により、この領域に運ばれた白血球は、インターロイキン等の炎症性因子のホストを放出し、組織損傷に反応してフリーラジカルも放出する。血流の回復により細胞内に酸素が再導入され、細胞のタンパク質、DNA及び原形質膜が損傷を受ける。その結果、細胞膜への損傷がさらなるフリーラジカルの放出を引き起こす可能性がある。そのような反応種は、酸化還元シグナル伝達で間接的に作用してアポトーシスを活性化する。白血球も小さい毛細血管中に蓄積し、この毛細血管を閉塞させ、より多くの虚血を引き起こす。

【0148】

再灌流傷害は、脳卒中及び脳外傷に関与する脳の虚血性カスケードにも関与する。虚血及び再灌流傷害の発作の繰り返しも、褥瘡及び糖尿病性足部潰瘍等の慢性創傷の形成及び治癒不全につながる要因であると考えられている。連続的な圧力は、血液供給を制限して虚血を引き起こし、再灌流中に炎症が生じる。このプロセスが繰り返されるうちに、最終的に創傷が生じるのに十分な損傷を組織が受ける。

【0149】

血清ヒストンレベルは、肝臓、腎臓、肺及び脳の傷害を伴う動物の虚血再灌流モデルにおいて有意に上昇しており、これは、無菌性炎症の調節におけるヒストンの重要な役割を示唆する。実際に、循環しているヒストンは、いくつかの肝臓傷害モデル（例えば、コンカナバリンA誘発性肝傷害、アセトアミノフェン誘発性肝毒性、肝臓I/R及び急性肝不全）において、動物の死亡の主要なメディエータである。

【0150】

放出されると、ヒストンは、TLR2、TLR4及びTLR9 27等のToll様レセプタ（TLR）に選択的に結合して炎症促進性サイトカイン（例えば、TNF- α 及びIL-6）を生じ、その結果、炎症反応及び組織傷害が促進される。

【0151】

細胞外ヒストンは、肝臓だけでなく、直接的毒性又は炎症促進効果を介して急性腎傷害又は虚血性脳卒中でも媒介する。同様に、TLR2及びTLR4によって媒介されるシグナル伝達経路（例えば、MyD88、NF- κ b及びマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK））は、細胞外ヒストンによって媒介される急性腎傷害の原因となる。

【0152】

ヒストン注入により脳梗塞のサイズが増大し、脳卒中の転帰が悪化する。急性肺傷害（ALI）の動物モデル又は患者の気管支肺胞洗浄液では、血清H3及びH4レベルが顕著に増加している。

【0153】

まとめると、細胞外ヒストンは、DAMPとして機能し、無菌性炎症及び臓器損傷を媒介する。ヒストンの放出及び活性の阻害は、組織傷害の治療戦略を提示する。

【0154】

虚血再灌流傷害（例えば、移植関連の虚血再灌流傷害）及び薬剤介在組織傷害に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇しており、このタンパク質は、虚血／再灌流及び薬剤介在組織傷害の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0155】

本発明の第2、第3又は第4の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における細胞外ヒストン関連のIRI及び／又は薬剤介在組織傷害を（予防的又は治療的に）処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロピオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結

10

20

30

40

50

合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

【0156】

m C B S等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため虚血／再灌流及び薬剤介在組織傷害の患者での処置として有用である。

【0157】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と虚血／再灌流及び薬剤介在組織傷害が発症した後の処置との両方を含む、虚血／再灌流及び薬剤介在組織傷害における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0158】

D．凝血及び血栓症

凝血は、血液が血餅を形成する生物学的プロセスである。正確な調節機構により、出血（bleeding）（出血（haemorrhage））又は閉塞性凝固（血栓症）のリスクの増加をもたらす異常な凝血が防止される。マウスでのヒストン投与は、例えば、血管バリアの喪失を伴う微小血管血栓症を増加させ、この微小血管血栓症は、多臓器の機能障害及び不全の一因となる。

【0159】

ヒストン（例えば、H1、H2A、H2B、H3、及びH4）は、インビボ及びインビトロで血小板凝集及びその後の血小板依存性のトロンビン形成を誘発する。これらの中でも、H4は、血小板活性に最も強く影響を及ぼす。ヒストンは、ヒト血小板においてプロコアグラント表現型も誘発し、このプロコアグラント表現型は、トロンビンの生成を増強し、且つ血液凝固プロセスを促進する。TLR2及びTLR4は、シグナル伝達経路（例えば、ERK、Akt、p38及びNF-κB）の活性化、カルシウム流入の誘発並びにフィブリノゲンの動員を介して、ヒストンによって媒介される血小板活性化に関与する。

【0160】

ヒストン-DNA複合体は、トロンビン生成を増強するが、このプロセスは、APCの投与により破壊される。ヘパリン及びアルブミンは、インビトロ及びインビボでヒストン毒性を中和し、ヒストン関連の血小板活性化も中和する。加えて、ヒストン注入によりマウスにおけるフォン・ヴィレブランド因子の血漿レベルが上昇し、血小板活性化及びその後の深部静脈血栓症の発症の一因となる。血小板以外にも、ヒストンは、プロテインC-トロンボモジュリン系を損なう。外因性ヒストンは、トロンボモジュリンの存在下において、血漿トロンビン生成を用量依存的に増加させる。興味深いことに、日本において播種性血管内凝固患者の処置に承認されている組換えトロンボモジュリン（rTM）は、ヒストンに直接結合し、マウスでは致死性の血栓症からマウスを保護する。ヒストン毒性に対するrTMの保護効果は、APC依存的方法及びAPC非依存的方法の両方によって媒介される。

【0161】

細胞外ヒストンによって引き起こされる凝血及び又は血栓症に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇しており、このタンパク質は、凝血及び又は血栓症の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0162】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における凝血及び血栓症を処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷

10

20

30

40

50

電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

【0163】

m C B S等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため凝血及び又は血栓症の患者での処置として有用である。

【0164】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と凝血又は血栓症が発症した後の処置との両方を含む、細胞外ヒストンタンパク質によって引き起こされる凝血及び又は血栓症における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0165】

E．自己免疫／炎症性疾患

本発明は、多発性硬化症、脊椎関節症、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、腸炎性関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、過敏性腸疾患、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、家族性地中海熱、筋萎縮性側索硬化症、シェーグレン症候群、早期関節炎、ウイルス性関節炎又は乾癬等の様々な自己免疫及び／又は炎症性疾患状態の処置を企図する。これらの疾患の診断及び処置は、文献に十分に記述されている。

【0166】

ヒストンは、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、小型血管炎及び輸血関連疾患等のいくつかの自己免疫疾患及び自己炎症性疾患に関与している。自己免疫障害における直接的な自己抗原としての作用に加えて、細胞外ヒストンは、ヒストン-DNA複合体の形成によりDNA分解を防止し得、これにより自己免疫反応が増強される。加えて、タンパク質アルギニンデアミナーゼ（例えばPDA4）は、ヒストンの脱イミノ化及びシトルリン化を媒介し、その結果、ヒストンの免疫原性が増加する。

【0167】

自己免疫及び／又は炎症性疾患に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇しており、このタンパク質は、自己免疫及び／又は炎症性疾患の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0168】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における自己免疫及び／又は炎症性疾患を処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

【0169】

m C B S等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため自己免疫及び／又は炎症性疾患の患者での処置として有用である。

【0170】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と自己免疫及び／又は炎症性疾患が発症した後の処置との両方を含む、自己免疫及び／又は炎症性疾患における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0171】

10

20

30

40

50

F. 急性呼吸促迫症候群

呼吸促迫症候群（RDS）又は成人呼吸促迫症候群（IRDSとは対照的）としても既知である急性呼吸促迫症候群（ARDS）とは、肺への様々な形態の傷害に対する重篤な反応のことである。これは、透過性肺水腫の増加をもたらす最も重要な障害である。

【0172】

ARDSは、様々な直接的侵襲及び間接的侵襲によって引き起こされる。ARDSは、炎症、低酸素血症を引き起こし且つ多臓器不全を引き起こすことが多い炎症性メディエータの全身放出を伴うガス交換の障害につながる肺実質の炎症を特徴とする。この状態は、生命を脅かし、多くの場合に致死的であり、通常、人工呼吸器及び集中治療室への入院を必要とする。重症度が低い形態は、輸血関連急性肺傷害（TRALI）等の急性肺傷害（ALI）と呼ばれている。

【0173】

ARDSは、傷害又は急性疾病の発作の24～48時間以内に発症する可能性がある。そのような場合、患者は、通常、息切れ、頻呼吸及び根本的原因（即ちショック）に関連する症状を呈する。マラリア等の長期にわたる疾病がARDSの引き金になる可能性もある。次いで、ARDSは、特に急性感染の発症後しばらくしてから発症する場合がある。

【0174】

ARDSに罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇している可能性があり、このタンパク質は、ARDSの病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0175】

本発明の第2、第3又は第4の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における細胞外ヒストン関連の急性呼吸促迫症候群を（予防的又は治療的に）処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロピオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロピオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0176】

mCBS等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのためARDSの患者での処置として有用である。

【0177】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置とARDSが発症した後の処置との両方を含む、ARDSにおける細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0178】

G. 心血管疾患

心血管疾患は、心臓又は血管（動脈及び静脈）に関与する疾患のクラスを指す。この用語は、技術的には、心血管系に影響を及ぼすあらゆる疾患を指すが、通常、粥状動脈硬化（動脈疾患）に関連するものを指すために使用される。これらの状態は、原因、機序及び処置が類似している。

【0179】

心血管疾患の処置は、各患者における疾患の特定の形態に依存するが、効果的な処置は、上記で論じた予防的な生活様式の変化を常を含む。血圧を下げる薬物、アスピリン及びスタチン系コレステロール降下薬等の薬物が有用な場合がある。状況によっては、手術又は血管形成術により、損傷した血管を再開するか、修復するか又は置き換えることが正当

10

20

30

40

50

化される場合がある。

【0180】

心血管疾患の様々な形態として、下記が挙げられる：動脈瘤、狭心症、不整脈、粥状動脈硬化、心筋症、脳血管疾患、先天性心疾患、うっ血性心不全、心筋炎、弁疾患、冠動脈疾患、拡張型心筋症、拡張機能障害、心内膜炎、高血圧（high blood pressure）（高血圧（hypertension））、肥大型心筋症、僧帽弁逸脱、心筋梗塞及び静脈血栓塞栓。

【0181】

ヒストン関連の心血管疾患に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇しており、このタンパク質は、ヒストン関連の心血管疾患の病理の重要なメ

10

【0182】

本発明の第2、第3又は第4の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における細胞外ヒストン関連の心血管疾患を（予防的又は治療的に）処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。

20

より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0183】

mCBS等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのためヒストン関連の心血管疾患の患者での処置として有用である。

【0184】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置とヒストン関連の心血管疾患が発症した後の処置との両方を含む、ヒストン関連の心血管疾患における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

30

【0185】

H．網膜剥離

網膜剥離とは、網膜の神経層が網膜色素上皮から剥がれ落ちる眼の障害のことであり、通常、網膜破裂又は網膜裂傷によって引き起こされる。網膜剥離の患者の眼では、正常な眼と比べてヒストンの硝子体中濃度が高い。

【0186】

細胞外ヒストンは、毒性であり、TLR4／MAPK（ERK1／2及びp38）依存性経路を介してインビボ及びインビトロでIL-8産生を誘発する。硝子体ヒアルロン酸は、ヒストンの拡散を阻害することにより、ヒストンによって媒介される毒性を低減する。そのため、瀕死の網膜から放出されたヒストンは、DAMPとして作用して、炎症促進性サイトカインの放出を誘発し、且つ細胞毒性を媒介する可能性がある。

40

【0187】

網膜剥離に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇しており、このタンパク質は、網膜剥離の病理の重要なメディーエータとして示唆されている。

【0188】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における網膜剥離を処置する方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ま

50

しくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0189】

mCBS等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため網膜剥離患者での処置として有用である。

【0190】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と網膜剥離が発症した後の処置との両方を含む、網膜剥離における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0191】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、熱傷対象者における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0192】

I. 線維症

線維症に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇しており、このタンパク質は、線維症の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0193】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、対象におけるヒストン誘発細胞毒性によって引き起こされる線維症を寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0194】

mCBS等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため線維症患者での処置として有用である。

【0195】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と線維症が発症した後の処置との両方を含む、対象の線維症における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0196】

J. 糖尿病

糖尿病に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇している可能性があり、このタンパク質は、糖尿病の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0197】

本発明は、糖尿病におけるヒストン関連の合併症（例えば、炎症及び創傷治癒の遅延）を処置する方法を提供する。この方法は、1型糖尿病、1.5型糖尿病又は2型糖尿病と診断されている対象に本発明の少なくとも1種の化合物の治療上有効な量を投与することを含む。

【0198】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、対象における糖尿病を寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい

10

20

30

40

50

非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、mC B Sであるか、又はより具体的にはmC B Sの薬学的に許容される塩（例えば、mC B S・Na）である。

【0199】

mC B S等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため糖尿病患者での処置として有用である。

【0200】

特定の実施形態では、ヒストンが関与している糖尿病の症状は、炎症である。炎症の減少を理学的検査及び炎症マーカーの存在の減少によりモニタリングし得る。

【0201】

特定の実施形態では、糖尿病を処置する方法であって、糖尿病を処置するために使用される薬剤と、本発明の少なくとも1種の化合物との治療上有効な量の投与を含む方法が提供される。糖尿病を処置するために使用される薬剤は、インスリンであり得るか、又は下記から選択される別の薬剤であり得る：ピグアナイド、メトホルミン（Glucophage）、液状メトホルミン（Riomet）、徐放メトホルミン（Glucophage XR、Fortamet、Glumetza）、スルホニル尿素、グリメピリド（Amaryl）、グリブリド（Diabeta、Micronase）、グリピジド（Glucotrol、Glucotrol XL）、微粒子化グリブリド（Glynase）、メグリチニド（Meglitinides）、レパグリニド（Prandin）、D-フェニルアラニン誘導体、ナテグリニド（Starlix）、チアゾリジンジオン、ピオグリタゾン（TZDs）、ピオグリタゾン、（Actos）、DPP-4阻害剤、シタグリプチン（Januvia）、サキサグリプチン（Onglyza）、リナグリプチン（Tradjenta）、アルファ-グルコシダーゼ、アカルボース（Precose）、ミグリトール（Glyset）、胆汁酸捕捉剤、コレセベラム（Welchol）、ピオグリタゾン及びメトホルミン（Actoplus Met）、グリブリド及びメトホルミン（Glucovance）、グリピジド及びメトホルミン（Metaglip）、シタグリプチン及びメトホルミン（Janumet）、サキサグリプチン及びメトホルミン（kombiglyze）、レパグリニド及びメトホルミン（Prandimet）並びにピオグリタゾン及びグリメピリド（Duetact）。

【0202】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、対象の糖尿病における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。従って、本発明は、（医療処置の場合における）前処置と糖尿病が発症した後の処置との両方を含む、対象における糖尿病の処置を提供する。

【0203】

K．化学療法、放射線療法及びサイトカイン療法の毒性

様々な形態の癌治療（例えば、化学療法、放射線及びサイトカイン）は、癌患者において毒性を伴い、ときに重篤である。この毒性がヒストンの細胞外作用により少なくとも部分的に引き起こされる限り、本発明は、本発明の医薬組成物を使用してこの毒性を低減し、それにより患者側の不快感を低減又は緩和し、さらにより高用量の治療を可能にしようとする。

【0204】

様々な形態の癌治療（例えば、化学療法、放射線及びサイトカイン療法）の副作用を罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇している可能性があり、このタンパク質は、この副作用の重要なメディエータとして示唆されている。

【0205】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することにより、対象における様々な形態の癌治療（例えば、化学療法、放射線及びサイトカイン療法）の副作用を寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロビオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロビオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S . Na）である。

10

【0206】

m C B S等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため様々な形態の癌治療（例えば、化学療法、放射線及びサイトカイン療法）の副作用の処置として有用である。

【0207】

本発明の非常に好ましい形態では、様々な形態の癌治療（例えば、化学療法、放射線及びサイトカイン療法）を受けている患者における、そのような治療の副作用の処置で使用される化合物は、化合物β-オ-メチルセロビオシドサルフェート又はその薬学的に許容される塩である。例えば、この方法で使用される化合物は、ナトリウムβ-オ-メチルセロビオシドサルフェートである。

20

【0208】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と、様々な形態の癌治療（例えば、化学療法、放射線及びサイトカイン療法）を行った後の処置との両方を含む、これらの治療の副作用における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0209】

L. 創傷治療

同様に提供されるのは、創傷治療での使用のための方法である。本明細書で使用される場合、「創傷治療」は、皮膚（又は別の臓器-組織）が傷害後に自己を修復する複雑なプロセスを指す。創傷治療の古典的なモデルは、下記の3つ又は4つの連続した（さらに重複している）時期に分けられる：（1）血餅が止血した場合の止血、（2）炎症、（3）増殖、及び（4）再構築。皮膚が傷害を受けると、損傷を修復するために、一連の複雑な生化学的事象が、密接に組織化されたカスケードで起こる。炎症期中、白血球により、細菌及び細胞残屑が貪食されて創傷から除去される。血小板由来の成長因子（血小板のアルファ顆粒中に貯蔵されている）が創傷中に放出され、増殖期中に細胞の遊走及び分裂を引き起こす。増殖期は、血管新生、コラーゲン沈着、肉芽組織形成、上皮化及び創傷収縮を特徴とする。新たな血管が形成され、線維芽細胞が成長し、コラーゲン及びフィブロネクチンが排泄されることにより新たな仮の細胞外マトリックス（ECM）が形成される。同時に、表皮の再上皮化が起こり、上皮細胞が増殖して創傷床の上を「這い」、新たな組織のカバーを生成する。

30

【0210】

創傷治療の困難さに悩まされている患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇している可能性があり、このタンパク質は、創傷治療の病理の重要なメディエータとして示唆されている。

【0211】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、対象の創傷治療中に生じるヒストン誘発細胞毒性を寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効

50

な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロピオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロピオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

【0212】

m C B S等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため創傷治療の困難さに悩まされている患者での処置として有用である。

【0213】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、対象の創傷の処置における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0214】

M. 中枢神経系疾患におけるヒストン

中枢神経系疾患に罹患している患者は、血液中に存在する細胞外ヒストンのレベルが上昇している可能性があり、このタンパク質は、中枢神経系疾患の病理の重要なメディエータとして示唆されている。例えば、ハンチントン病は、ポリグルタミンの反復伸長によって引き起こされる常染色体優性の神経変性障害であり、ハンチントンタンパク質中のポリグルタミントラック（polyglutamine track）が伸長される。最近の証拠は、ヒストン改変によって媒介される転写脱制御がハンチントン病における重要な発病機序であることを示す。

【0215】

ヒストンデアセチラーゼ活性の薬理学的操作は、中枢神経系疾患（例えば、ハンチントン病、てんかん及びアルツハイマー病）の様々な実験モデルにおいて有益であった。神経細胞死、炎症反応及び反応性神経膠症は、主要な神経疾患のマーカーである。より最近の証拠は、細胞外ヒストンH1が、神経毒性のある炎症促進因子であり、中枢神経系で反応性神経膠症を引き起こすことを示す。これらの発見は、ヒストン改変及び細胞外ヒストンの両方が中枢神経系疾患の一因となることを示唆する。

【0216】

本発明の第2又は第3の態様のある実施形態では、対象におけるヒストンによって誘発される中枢神経系疾患を寛解させる方法であって、ポリアニオン性硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロピオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロピオシドは、m C B Sであるか、又はより具体的にはm C B Sの薬学的に許容される塩（例えば、m C B S・Na）である。

【0217】

m C B S等の化合物は、細胞外ヒストンの毒性効果をブロックし得、そのため中枢神経系疾患での処置として有用である。

【0218】

そのため、本発明の化合物及び前記化合物を含む治療用組成物又は医薬組成物は、（医療処置の場合における）前処置と中枢神経系疾患が発症した後の処置との両方を含む、対象の中枢神経系疾患における細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を寛解させる手段を提供する。

【0219】

3. 治療形態及び医薬形態

本発明の第5の態様では、細胞外ヒストン関連の合併症の処置での使用のための治療用

10

20

30

40

50

組成物又は医薬組成物であって、ポリアニオン性硫酸化セロビオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロビオシド又はその治療上許容されるか若しくは薬学的に許容される塩を少なくとも含む治療用組成物又は医薬組成物が提供される。好ましくは、この組成物は、治療上許容されるか又は薬学的に許容される担体、添加剤及び／又は希釈剤を含む。この治療又は医薬での化合物は、中性遊離塩基形態であり得るか又は塩形態であり得る。好ましくは、この化合物は、 β -O-メチルセロビオシドサルフェートのナトリウム塩である。

【0220】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される」又は「治療上許容される」は、合理的な利益／リスク比に見合っており、過度の毒性、刺激、アレルギー反応又は他の問題若しくは合併症を伴わず、健全な医学的判断の範囲内でヒト及び動物の組織との接触での使用に適している化合物、物質、組成物及び／又は剤形を指す。

10

【0221】

投与可能な組成物を調製する方法は、当業者に明らかであり、例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. でより詳細に説明されている。

【0222】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」、又は「薬学的に許容される添加剤」、又は「薬学的に許容される希釈剤」、「治療上許容される担体」、又は「治療上許容される添加剤」、又は「治療上許容される希釈剤」は、ある臓器又は身体の部分から別の臓器又は身体の部分への対象化合物の担持又は輸送に関与する物質、組成物又はビヒクル（例えば、液体又は固体の充填剤、希釈剤、添加剤、製造補助剤（例えば、潤滑剤、タルクマグネシウム、カルシウム、若しくはステアリン酸亜鉛、若しくはステアリン酸）又は溶媒カプセル化物質）を意味する。各担体、希釈剤及び添加剤は、製剤の他の成分と適合し且つ患者に有害ではないという意味で「許容される」ものでなければならない。これは、生物学的に又は他の方法で望ましくないものではない物質であり、即ち、この物質は、許容されない生物学的効果を引き起こすことなく又はこれが含まれる組成物の成分の任意の1つ又は複数と有害な方法で相互作用することなく、活性剤と共に個体に提供され得る。薬学的に許容される担体、希釈剤及び添加剤として機能し得る物質のいくつかの例として下記が挙げられるが、これらに限定されない：（1）糖類、例えばラクトース、グルコース及びスクロース；（2）デンプン類、例えばトウモロコシデンプン及びジャガイモデンプン；（3）セルロース及びその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロース及び酢酸セルロース；（4）トラガント末；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム及びタルク；（8）添加剤、例えばココアバター及び座薬ワックス；（9）油、例えばピーナッツ油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及び大豆油；（10）グリコール類、例えばプロピレングリコール；（11）ポリオール類、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコール（PEG）；（12）エステル類、例えばオレイン酸エチル及びラウリン酸エチル；（13）寒天；（14）緩衝剤、例えば水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム；（15）アルギン酸；（16）パイロジェンフリー水；（17）等張生理食塩水；（18）リンゲル液；（19）エチルアルコール；（20）pH緩衝溶液；（21）ポリエステル類、ポリカーボネート類及び／又はポリ無水物；（22）増量剤、例えばポリペプチド及びアミノ酸；（23）血清成分、例えば血清アルブミン、HDL及びLDL；（22）C₂～C₁₂アルコール、例えばエタノール；並びに（23）医薬製剤で用いられる他の非毒性の適合性物質。製剤中に湿潤剤、結合剤、充填剤、潤滑剤、着色剤、崩壊剤、放出剤、コーティング剤、甘味料、着香料、芳香剤、保存料、水、塩溶液、アルコール、抗酸化剤、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、

20

30

40

50

ポリビニルピロリドン及び同類のものも存在し得る。「添加剤」、「担体」、「希釈剤」及び「薬学的に許容される単体」又は同類のもの等の用語は、本明細書では互換的に使用される。

【0223】

治療上許容されるか又は薬学的に許容される担体、添加剤又は希釈剤の例は、下記である：脱塩水又は蒸留水；生理食塩水；植物ベースの油、例えばピーナッツ油、紅花油、オリーブ油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、例えばピーナッツ油、紅花油、オリーブ油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、落花生油又はヤシ油；シリコーン油、例えばポリシロキサン類、例えばメチルポリシロキサン、フェニルポリシロキサン及びメチルフェニルポリシロキサン；揮発性シリコーン；鉱油、例えば流動パラフィン、軟パラフィン又はスクアラン；セルロース誘導体、例えばメチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム又はヒドロキシプロピルメチルセルロース；低級アルカノール類、例えばエタノール又はイソプロパノール；低級アラルカノール類（lower alkanols）；低級ポリアルキレングリコール類又は低級アルキレングリコール類、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、1，3-ブチレングリコール又はグリセリン；脂肪酸エステル類、例えばパルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピル又はオレイン酸エチル；ポリビニルピロリドン；寒天；カラギーナン；トラガントガム又はアカシアゴム並びにワセリン。典型的には、担体は、組成物の10重量%～99.9重量%を形成するであろう。

【0224】

本明細書で説明されている組成物は、医薬組成物中に従来見出される他の補助成分を、この補助成分の技術的に確立された使用レベルでさらに含み得る。そのため、例えば、この組成物は、追加の適合性の薬学的に活性な物質（例えば、鎮痒薬、収斂薬、局所麻酔薬又は抗炎症剤）を含み得る。しかしながら、そのような物質は、添加された場合、本明細書で説明されている組成物の成分の生物学的活性を過度に妨げるべきではない。

【0225】

下記で詳細に説明するように、本明細書で説明されている治療上許容されるか又は薬学的に許容される組成物は、固体又は液体の形態での投与のために特に製剤化され得、下記に適合したものが挙げられる：（1）経口投与、例えば水薬（水性若しくは非水性の溶液若しくは懸濁液）、ロゼンジ、糖衣錠、カプセル、丸薬、錠剤（例えば、頬側吸収、舌下吸収及び全身吸収を目標とするもの）、ボラス、粉末、顆粒、舌への塗布のためのペースト；（2）例えば、滅菌溶液若しくは滅菌懸濁液又は徐放性製剤として、例えば皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射又は硬膜外による非経口投与；（3）例えば、（脳中の）実質内投与、髄腔内投与、心室内投与若しくは肝内投与による、処置を必要とする臓器への直接注射；（4）例えば、皮膚に適用されるクリーム、ローション、ジェル、軟膏又は放出制御されたパッチ若しくはスプレーとしての局所適用；（5）吸入（例えば経鼻吸入若しくは経口吸入）による投与に適したエアロゾル形態；（6）例えば、ペッサリー、クリーム、座薬若しくは泡沫剤としての腔内用又は直腸内用；（7）舌下；（8）点眼薬としての眼用；（9）経皮用；（10）経粘膜用；又は（11）経鼻用。

【0226】

一実施形態では、本発明の組成物を非経口注射（例えば、皮下注射、筋肉内注射若しくは静脈内注射）等の注射により投与するか、又は例えば（脳中の）実質内投与、髄腔内投与、心室内投与若しくは肝内投与により組織及び臓器に局所投与する。

【0227】

注射に適した医薬組成物として、滅菌の水溶液（水溶性）又は分散液及び滅菌注射用溶液又は滅菌注射用分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。理想的には、この組成物は、製造及び貯蔵の条件下で安定であり、微生物（例えば細菌及び真菌）の夾雑作用に対してこの組成物を安定化させるための保存料を含み得る。

【0228】

上記で列挙した成分の1つ又は組み合わせと共に、適切な溶媒に必要な量の本発明の医薬組成物を組み込み、必要に応じて続いて滅菌ろ過することにより、滅菌注射用溶液を調製し得る。実例として、単回用量を等張NaCl溶液1mlに溶解させ、液体1000mlに添加し得るか、又は提案されている注入部位で注射し得る（例えば、“Remington's Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, pages 1035-1038及び1570-1580を参照されたい）。

【0229】

注射溶液の場合、担体は、下記を含む溶媒又は分散媒体であり得る：例えば、水、リンゲル液、等張生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール（例えば1, 2プロピレングリコール）及び液体ポリエチレングリコール並びに同類のもの）、これらの適切な混合物並びに植物油。

【0230】

例えば、レシチン等のコーティングを使用して、分散系の場合には必要な粒径の維持により且つ界面活性を使用して、適切な流動性を維持し得る。微生物の作用の予防を、様々な抗菌剤及び又は抗真菌剤を含むことにより達成し得る。適切な薬剤は、当業者に公知であり、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ベンジルアルコール、アスコルビン酸、チオメロサル（thiomerosal）及び同類のものが挙げられる。多くの場合、本組成物が等張剤を含むことが好ましい場合があり、例えば糖類、多価アルコール類、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含むことが好ましい場合がある。注射用組成物の持続的吸収を、吸収を遅延させる薬剤（例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチン）をこの組成物に含めることによりもたらし得る。

【0231】

第2の実施形態では、本発明の組成物を例えば不活性希釈剤又は吸収可能な食用担体と共に経口投与する。経口治療的投与のために、この医薬組成物を添加剤と組み合わせ、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハース及び同類なものの形態で使用し得る。

【0232】

経口使用に適した担体、希釈剤、添加剤、アジュバントの一部の例として、ピーナッツ油、液体パラフィン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、アカシアガム、トラガカントゴム、ブドウ糖、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、ゼラチン及びレシチンが挙げられる。加えて、これらの経口製剤は、適切な着香料及び着色料を含み得る。

【0233】

カプセル形態で使用する場合、このカプセルは、崩壊を遅延させる化合物（例えば、モノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリル）でコーティングされ得る。同様に、錠剤、トローチ、丸剤、カプセル及び同類のものは、下記を含み得る：結合剤、例えばトラガカントゴム、アカシア、コーンスターチ若しくはゼラチン；添加剤、例えばリン酸二カルシウム；追加の崩壊剤、例えばコーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸及び同類のもの；潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム；並びに甘味料、例えばショ糖、ラクトース若しくはサッカリン又は着香料、例えばペパーミント、冬緑油若しくはサクランボ香料（cherry flavouring）。

【0234】

投与単位形態がカプセルである場合、このカプセルは、上記のタイプの物質に加えて、液体担体を含み得る。様々な他の物質は、コーティングとして存在し得るか、又は他の方法でこの投与単位の物理的形狀を修飾するために存在し得る。例えば、錠剤、丸剤又はカプセルをシェラック、糖又は両方でコーティングし得る。

【0235】

経口投与のための液体形態（例えばシロップ又はエリキシル）は、上記の薬剤に加えて、液体担体、甘味料（例えばショ糖）、保存料（例えばメチルパラベン及びプロピルパラベン）、色素並びに香料（例えば、サクランボフレーバー又はオレンジフレーバー）を含

10

20

30

40

50

み得る。適切な液体担体として下記が挙げられる：水、油、例えば、オリーブ油、ピーナツ油、ゴマ油、ヒマワリ油、紅花油、落花生油、ヤシ油、液体パラフィン、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、グリセロール、脂肪アルコール類、トリグリセリド類又はこれらの混合物。

【0236】

経口投与のための懸濁液は、分散剤及び／又は懸濁剤をさらに含み得る。適切な懸濁剤として、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム又はアセチルアルコールが挙げられる。適切な分散剤として下記が挙げられる：レシチン、ステアリン酸等の脂肪酸のポリオキシエチレンエステル、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート若しくはジオレエート、ステアレート又はラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート若しくはジオレエート、ステアレート又はラルレート及び同類のもの。経口投与のための乳濁液は、1種又は複数の乳化剤をさらに含み得る。適切な乳化剤として、上記で例示したような分散剤又は天然ガム、例えばグアーガム、アカシアガム若しくはトラガカントゴムが挙げられる。

【0237】

第3の例示的な実施形態では、本発明の組成物をエアロゾルの形態において又は吸入投与により対象の気道に直接投与する。エアロゾルとしての使用のために、本発明の薬学的に許容される組成物の溶液又は懸濁液を適切な噴霧剤（例えば、プロパン、ブタン又はイソブタンのような炭化水素噴霧剤）及び従来のアジュバントと一緒に加圧エアロゾル容器に充填し得る。そのような組成物を（例えば、ネブライザ又はアトマイザ中での）非加圧形態でも投与し得る。

【0238】

気道への送達のためのエアロゾルは、当該技術分野で既知である：例えば、Adj ei , A. and Garren, J. Pharm. Res. , 1 : 565 - 569 (1990) ; Zanen, P. and Lamm, J-W. J. Int. J. Pharm. , 114 : 111 - 115 (1995) ; Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6 : 273 - 313 (1990) ; Anderson et al. , Am. Rev. Respir. Dis. , 140 : 1317 - 1324 (1989)) を参照されたい。

【0239】

第4の例示的な実施形態では、本組成物をリポソームの形態で投与し得る。リポソームは、一般に、リン脂質又は他の脂質物質に由来し、水性媒体中に分散している単層状又は多層状の水和液晶で形成されている。リポソームを形成し得る、非毒性で生理的に許容されて代謝可能なあらゆる脂質を使用し得る。リポソーム形態の組成物は、安定剤、保存料、添加剤及び同類のものを含み得る。好ましい脂質は、リン脂質及びホスファチジルコリン（レシチン）であり、両方とも天然及び合成である。リポソームを形成するための方法は、当該技術分野で既知であり、これに関して、Prescott, Ed. , Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N. Y. (1976), p. 33 et seq. (この内容は、参照により本明細書に組み込まれる) が具体的に参照される。

【0240】

加えて、本明細書で説明されている任意の態様、実施形態又は例に係る本発明の治療的又は薬学的に許容される組成物を徐放性調製物及び徐放性製剤に組み込み得る。そのような治療用組成物又は医薬組成物は、酸の加水分解を最小限に抑えるために、適切な緩衝剤をさらに含み得る。適切な緩衝剤は、当業者に公知であり、リン酸塩、クエン酸塩、炭酸塩及びこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0241】

本発明の化合物を「プロドラッグ」の形態で投与し得る。プロドラッグとは、インビボで活性型に変換される不活性型の化合物のことである。適切なプロドラッグとして、活性型の化合物のエステル類、ホスホン酸エステル類等が挙げられる。

【0242】

加えて、本発明の組成物を患者に移植し得るか、又は薬物送達システムを使用して注射し得る。コーティングされた送達デバイスも有用であり得る。例えば、Urquhart, et al. (1984), Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24:199-236; Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981); 米国特許第3,773,919号明細書; 同第6,747,014号明細書; 及び同第353,270,960号明細書を参照されたい。

10

【0243】

特定の実施形態では、例えば創傷の処置のプロセスで使用されるデバイス又は包帯を使用して、本組成物を送達する。

【0244】

任意の特定の対象のための、本明細書で開示されている医薬組成物の治療上有効な量は、様々な因子に依存し、この因子として下記が挙げられる：この医薬組成物の毒性及び治療効果；病気の重症度；患者の年齢、体重、全体的な健康、性別及び食事；投与時間；投与経路；この組成物の捕捉率；処置の持続期間；医学で公知の他の関連因子と一緒に、処置と組み合わせて又は同時に使用される薬物。

20

【0245】

毒性及び治療上の有効性を、例えばLD₅₀（母集団の50％に対する致死量）及びED₅₀（母集団の50％において治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学的手順により決定し得る。毒性と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、比LD₅₀/ED₅₀で表され得る。大きい治療指数を示す組成物が好ましい。

【0246】

本明細書で説明されている細胞培養アッセイ及び動物モデルから得られたデータを、ヒトでの使用のための治療上有効な投与量の範囲の策定で使用し得る。そのような化合物の投与量は、好ましくは、ほとんど又は全く毒性がないED₅₀を含む循環濃度の範囲内である。この投与量は、用いられる投与形態及び利用される投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。

30

【0247】

剤形を生成するために担体物質と組み合わせられ得る、本明細書で説明されている本発明の化合物の量は、概して、治療効果を生じるこの化合物の量であるであろう。一般に、100％の内、この量は、約0.1％～99％の化合物の範囲であり、好ましくは約5％～約70％の範囲であり、最も好ましくは10％～約30％の範囲であるであろう。

【0248】

投与量は、医師により決定され得、且つ必要に応じて処置の観察された効果に適合するように調整され得る。実例のみとして、組成物を、薬学的に許容される組成物が下記の用量で投与されるように投与し得る：1 µg/kg～150 mg/kg、1 µg/kg～100 mg/kg、1 µg/kg～50 mg/kg、1 µg/kg～20 mg/kg、1 µg/kg～10 mg/kg、1 µg/kg～1 mg/kg、100 µg/kg～100 mg/kg、100 µg/kg～50 mg/kg、100 µg/kg～20 mg/kg、100 µg/kg～10 mg/kg、100 µg/kg～1 mg/kg、1 mg/kg～100 mg/kg、1 mg/kg～50 mg/kg、1 mg/kg～20 mg/kg、1 mg/kg～10 mg/kg、10 mg/kg～100 mg/kg、10 mg/kg～50 mg/kg又は10 mg/kg～20 mg/kg。ここで示された範囲は、全ての間隔範

40

50

図を含むことを理解すべきであり、例えば範囲 $1\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ は、 $1\text{ mg/kg} \sim 2\text{ mg/kg}$ 、 $1\text{ mg/kg} \sim 3\text{ mg/kg}$ 、 $1\text{ mg/kg} \sim 4\text{ mg/kg}$ 、 $1\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$ 、 $1\text{ mg/kg} \sim 6\text{ mg/kg}$ 、 $1\text{ mg/kg} \sim 7\text{ mg/kg}$ 、 $1\text{ mg/kg} \sim 8\text{ mg/kg}$ 、 $1\text{ mg/kg} \sim 9\text{ mg/kg}$ 、 $2\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ 、 $3\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ 、 $4\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ 、 $5\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ 、 $6\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ 、 $7\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ 、 $8\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ 、 $9\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ 等を含む。上記で示されたものの中間の範囲（例えば、範囲 $1\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ では、 $2\text{ mg/kg} \sim 8\text{ mg/kg}$ 、 $3\text{ mg/kg} \sim 7\text{ mg/kg}$ 、 $4\text{ mg/kg} \sim 6\text{ mg/kg}$ 等の用量範囲）も、本明細書で説明されている方法及び組成物の範囲内であることをさらに理解すべきである。

10

【0249】

本発明の化合物が mCBS 又は $\text{mCBS} \cdot \text{Na}$ である場合、投与量は、 $10 \sim 800\text{ }\mu\text{g/ml}$ であり得る。好ましくは、この投与量は、 $50 \sim 500\text{ }\mu\text{g/ml}$ の範囲である。より好ましくは、この投与量は、ヒト対象に投与される場合、 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 110 、 120 、 130 、 140 、 150 、 160 、 170 、 180 、 190 、 200 、 210 、 220 、 230 、 240 、 250 、 260 、 270 、 280 、 290 、 300 、 310 、 320 、 330 、 340 、 350 、 360 、 370 、 380 、 390 、 400 、 410 、 420 、 430 、 440 、 450 、 460 、 470 、 480 、 490 、 500 、 510 、 520 、 530 、 540 、 550 、 560 、 570 、 580 、 590 、 600 、 610 、 620 、 630 、 640 、 650 、 660 、 670 、 680 、 690 、 700 、 710 、 720 、 730 、 740 、 750 、 760 、 770 、 780 、 790 又は $800\text{ }\mu\text{g/ml}$ である。

20

【0250】

本発明の特定の例では、改変されている硫酸化セロピオシド化合物の有効量を単回用量で投与する。特定の例では、この用量を繰り返し投与する。即ち、処置レジメンは、疾患の重症度及びタイプ、患者の全体的な健康状態及び年齢並びに処置する医師が考慮すべき様々な他の条件に応じて変わるであろう。処置の持続時間及び頻度に関して、熟練した臨床医は、典型的には、対象をモニタリングして、処置が治療上の有益性をいつ提供するかを決定し、且つ投与量を増減させるかどうか、投与頻度を増減させるかどうか、処置を中断するかどうか、処置を再開するかどうか又は処置レジメンに他の変更を行うかどうかを決定する。

30

【0251】

本明細書で説明されている任意の態様、実施形態又は例に係る本発明の治療用組成物又は薬学的に許容される組成物は、単回のボーラス投与で投与され得るか又は複数回の用量若しくは処置で投与され得、且つ少量の治療用組成物が長期間にわたり持続的に投与される「持続的」治療により適用され得る。

【0252】

複数回投与が処置（持続的治療を含む）で使用される場合、治療用組成物又は医薬組成物を、いくつかの臨床的因子（例えば、この治療用組成物又は医薬組成物で使用する改変されている硫酸化セロピオシド化合物に対する対象の感受性）に応じて1週間に1回～毎日で変化し得る投与スケジュールにより投与するであろう。そのようなレジームで投与する所望の用量を一度に単回用量として送達し得るか、又は部分用量（例えば、2～4回の部分用量）に分割して、ある期間にわたり（例えば、1日中を通して適切な間隔又は他の適切なスケジュールで）投与し得る。そのような部分用量を単位剤形として投与し得る。

40

【0253】

いくつかの実施形態では、投与は、慢性的であり、例えば数週間又は数ヶ月の期間にわたり1日1回又は複数回の用量である。投与スケジュールに例は、1週間、2週間、3週間、4週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月若しくは6ヶ月又はより長い期間にわたり1日1回、1日2回、1日3回又は1日4回以上の投与である。

50

【0254】

所望の用量を、連続的注入を使用するか又は放出制御製剤による送達を使用して投与し得る。この場合、各部分用量に含まれる医薬組成物は、1日当たりの総投与量を達成するために相応に少なくなければならない。

【0255】

また、投与量単位を、例えば数日の期間にわたる医薬組成物の持続放出をもたらす従来の徐放性製剤を使用して、数日にわたる送達のためにも配合し得る。徐放性製剤は、当該技術分野で公知であり、例えば本明細書で説明されている薬剤により使用され得る、ある部位への薬剤の送達に特に有用である。この実施形態では、この投与量単位は、1日当たりの用量の対応する倍数を含む。

【0256】

4. 併用レジーム

本発明の第5の態様に係る特定の例示的な実施形態では、特定された組成物は、抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤及び／又は対象が患っている1種若しくは複数の状態を処置する任意の他の形態の治療用化合物若しくは医薬化合物の1つ又は複数から選択される第2の活性剤、化合物又は組成物を含む場合がある。この実施形態によれば、第2の活性剤、化合物又は組成物は、望ましくは、敗血症、SIRS及びIRI又は敗血症、SIRS及びIRIと関連する医学的状态若しくは疾患のための補助的治療を提供する。好ましくは、第2の活性剤、化合物又は組成物は、1種又は複数の抗炎症剤を含む。

【0257】

治療上の利点を併用レジメンにより実現できる場合がある。本発明の特定の実施形態では、説明されている方法は、予防的に送達される際、患者が有しているか、又は罹患しているか、又は有する若しくは罹患するリスクがある敗血症、SIRS及びIRI又は敗血症、SIRS及びIRIと関連する医学的状态若しくは疾患のための補助的処置である第2の活性剤を本発明の処置と同時に又は付随して対象に投与するステップをさらに含み得る。

【0258】

第2の活性剤として、抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤又は本発明の化合物と異なる他の形態の医学的介入が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0259】

実例として、本方法又は本処置が、対象における細胞外ヒストンによって媒介される病理を伴う敗血症性疾患状態又は非敗血症性疾患状態を処置するか又は寛解させることに向けられている場合、この方法は、細胞外ヒストンによって媒介される病理を伴う医学的状态のための補助処置を提供する第2の抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤又は本発明の化合物と異なる他の形態の医学的介入を同時に又は付随して対象に投与することも含み得る。

【0260】

一例では、第2の活性剤は、敗血症、SIRS若しくはIRI又は敗血症、SIRS若しくはIRIと関連する医学的状态若しくは疾患（例えば、対象における細胞外ヒストンによって媒介される病理を伴う敗血症、SIRS若しくはIRI又は敗血症、SIRS若しくはIRIと関連する医学的状态若しくは疾患）のための補助的処置又は補助的予防を提供する。

【0261】

別の例では、第2の活性剤は、細胞外ヒストン細胞毒性を伴う医学的状态のための補助的処置又は補助的予防を提供する。

【0262】

実例として、本処置方法が、対象における細胞外ヒストンによって媒介される病理を伴う敗血症、SIRS又はIRIを関連する敗血症性疾患状態又は非敗血症性疾患状態を処置するか又は寛解させることに向けられている場合、この方法は、細胞外ヒストンによって媒介される病理を伴う医学的状态のための補助処置を提供する第2の抗炎症剤、抗生物

10

20

30

40

50

質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤又は本発明の化合物と異なる他の形態の医学的介入を同時に又は付随して対象に投与することも含み得る。

【0263】

いくつかの例では、投与される追加の薬剤は、抗炎症剤であり、例えばステロイド、副腎皮質ステロイド、COX-2阻害剤、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、アスピリン又はこれらの任意の組み合わせである。より具体的には、投与される追加の薬剤は、下記からなる群から選択される抗炎症剤であり得る：アルクロフェナク；プロピオン酸アルクロメタゾン；アルゲストンアセトニド（Algestone Acetonide）；アルファアミラーゼ；アムシナファル（Amcinafal）；アムシナフィド（Amcinafide）；アンフェナクナトリウム；塩酸アミプリロース；アナキンラ；アニロラク；アニトラザフェン；アパゾン；バルサラジドニナトリウム；ベンダザック；ベノキサプロフェン；塩酸ベンジダミン；ブロメライン；プロペラモール；ブデソニド；カプロフェン；シクロプロフェン；ジンタゾン；クリプロフェン；プロピオン酸クロベタゾール；酪酸クロベタゾン；クロピラク；プロピオン酸クロチカソン（Cloticasone Propionate）；酢酸コルメタゾン；コルトドキシソン；デフラザコート；デソニド；デスオキシメタゾン；ジプロピオン酸デキサメタゾン；ジクロフェナクカリウム；ジクロフェナクナトリウム；酢酸ジフロラゾン；ジフルミドンナトリウム；ジフルニサル；ジフルプレドナート；ジフタロン、ジメチルスルホキシド；ドロシノニド；エンドリソン；エンリモマブ；エノリカムナトリウム；エビリゾール；エトドラク；エトフェナメート；フェルビナク；フェナモル（Fenamole）；フェンブフェン；フェンクロフェナク；フェンクロラク；フェンドサル；フェンピパロン；フェンチアザク；フラザロン；フルアザコート；フルフェナム酸；フルミゾール；酢酸フルニソリド；フルニキシン；フルニキシメグルミン；フルコルチンブチル；酢酸フルオロメトロン；フルクアゾン（Fluquazone）；フルルビプロフェン；フルレトフェン；プロピオン酸フルチカソン；フラプロフェン；フロブフェン；ハルシノニド；プロピオン酸ハロベタゾール；酢酸ハロプレドン；イブフェナク；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフェンピコノール；イロニダップ；インドメタシン；インドメタシンナトリウム；インドプロフェン；インドキシオール（Indoxole）；イントラゾル（Intrazole）；酢酸イソフルプレドン；イソキセパック；イソキシカム；ケトプロフェン；塩酸ロフェミゾール；ロモキシカム（Lomoxicam）；エタボン酸ロテプレドノール；メクロフェナム酸ナトリウム；メクロフェナム酸；二酪酸メクロリゾン（Mecloresone Dibutyrate）；メフェナム酸；メサラミン；メセクラゾン；メチルプレドニゾロンスレプタネート；モルニフルメート；ナブメトン；ナプロキセン；ナプロキセンナトリウム；ナプロキソール（Naproxol）；ニマゾン；オルサラジンナトリウム；オルゴテイン；オルパノキシン；オキサプロジン；オキシフェンブタゾン；塩酸パラニリン；ペントサンポリスルフェートナトリウム；フェンブタゾンナトリウムグリセレート；ピルフェニドン；ピロキシカム；桂皮酸ピロキシカム；ピロキシカムオラミン；ピプロフェン；プレドナゼート（Prednazate）；プリフェロン；プロドリック酸；プロクアゾン；プロキサゾール；クエン酸プロキサゾール；リメキシロン；ロマザリト；サルコレックス（Salcollex）；サルナセジン；サルサラート；サルシレート（Sallylate）；塩化サンギナリウム；セクラゾン；セルメタシン；スドキシカム；スリンダク；スプロフェン；タルメタシン；タルニフルメート；タロサレート；テブフェロン；テニダップ；テニダップナトリウム；テノキシカム；テシカム；テシミド；テトリダミン；チオピナク；チキソコルトールピバレート；トルメチン；トルメチンナトリウム；トリクロニド；トリフルミデート（Triflumidate）；ジドメタシン；グルココルチコイド；ゾメピラックナトリウム；及びこれらの組み合わせ。

【0264】

いくつかの例では、投与される追加の薬剤は、抗生物質製剤であり、例えばカナマイシン、アクチノマイシンD、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アミノグリコシド、アンサマイシン、カルバセフェム、カルバペネム、セファロスポリン、糖ペプ

10

20

30

40

50

チド、リンコサミド、マクロライド、モノバクタム、ペニシリン、ポリペプチド、キノロン、スルホンアミド及び／又はテトラサイクリンである。

【0265】

いくつかの例では、投与される追加の薬剤は、抗ウイルス剤であり、例えば非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（例えば、ヌクレオシド類似体）、プロテアーゼ阻害剤及び／又はヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤である。

【0266】

いくつかの例では、投与される追加の薬剤は、抗真菌剤であり、例えばイミダゾール、トリアゾール、チアゾール、アリルアミン及び／又はエキノキャンディン化合物である。

【0267】

いくつかの例では、投与される追加の薬物は、糖尿病を処置するための薬剤である。そのような薬剤として、糖尿病の処置のための及び又は抗高血糖活性を有するための、当該技術分野で既知の薬物が挙げられ、例えば下記が挙げられる：ジペプチジルペプチダーゼ4（DPP-4）の阻害剤（例えば、アログリプチン、リナグリプチン、サキサグリプチン、シタグリプチン、ビルダグリプチン及びベルベリン）、ビグアナイド（例えば、メトホルミン、ブホルミン及びフェンホルミン）、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR）モジュレータ、例えばチアゾリジンジオン（TZD）（例えば、ピオグリタゾン、リボグリタゾン、ロシグリタゾン及びトログリタゾン）、デュアルPPARアゴニスト（例えば、アレグリタザル、ムラグリタザル及びテサグリタザル）、スルホニル尿素（例えば、アセトヘキサミド、カルブタミド、クロルプロパミド、グリクラジド、トルブタミド、トラザミド、グリベンクラミド（グリブリド）、グリピジド、グリキドン、グリクロピラミド及びグリメピリド）、メグリチニド（「グリニド」）（例えば、ナテグリニド、レパグリニド及びミチグリニド）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）及び類似体（例えば、エキセナチド、リラグルチド、アルビグルチド）、インスリン及びインスリン類似体（例えば、インスリンリスプロ、インスリンアスパルト、インスリングルリジン、インスリンラルギン、インスリンデテミル、エクスベラ及びNPHインスリン）、アルファ-グルコシダーゼ阻害剤（例えば、アカルボース、ミグリトール及びボグリボース）、アミリン類似体（例えばプラムリンチド）、ナトリウム依存性グルコース共輸送体T2（SGLT2）阻害剤（例えば、ダパグリフロジン、レモグリフロジン及びセルウグリフロジン）並びに他のもの（例えば、ベンフルオレックス及びトルレスタット）。

【0268】

説明されている任意の態様、実施形態又は例に係る組成物は、敗血症、SIRS若しくはIRI又は敗血症、SIRS若しくはIRIと関連する疾患若しくは状態の処置のための併用治療アプローチの一部として投与され得ることを当業者は認識するであろう。併用治療では、各薬剤を同時に投与し得るか又は任意の順序で逐次投与し得る。逐次投与する場合、各成分を同一経路で投与することが好ましい場合がある。

【0269】

2種の薬剤が別々に適用されるいくつかの例では、両方の薬剤が、有利に組み合わせられた効果を依然として発揮し得るように、各送達の間隔に有意な期間が失効しなかったことが概して保証されるであろう。そのような例では、両方の治療法が互いに約12～24時間以内、より好ましくは互いに約6～12時間以内に概して投与されることが企図され、約12時間のみの遅延時間が最も好ましいが、いくつかの状況では処置のための時間を大いに延ばすことが望ましい場合があり、それぞれの投与間に数日（2、3、4、5、6又は7）～数週間（1、2、3、4、5、6、7又は8）経過する。また、薬剤の複数回の投与が望ましいであろうことも考えられる。

【0270】

本発明の組成物と第2の活性剤とを別々の組成物で投与する場合、投与経路は、異なり得る。例えば、本発明の組成物を、当該技術分野で既知の任意の適切な経路（例えば、限定されないが、経口経路又は非経口経路、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、

10

20

30

40

50

経皮投与、気道（エアロゾル）投与、肺投与、経鼻投与、直腸投与並びに局所（例えば、頬側及び舌下）投与で投与し、第2の薬学的に活性な薬剤を別の経路（例えば、前記薬学的に活性な薬剤の投与のために当該技術分野で一般に使用される経路）で投与する。非限定的な例では、本発明の組成物を注射により投与し得、第2の活性剤を経口投与し得る。

【0271】

5. 薬物の製造

本発明の第6の態様では、細胞外ヒストンを伴う医学的状態、病気又は疾患を処置するための薬物の製造における、ポリアニオン性硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量の使用が提供される。好ましくは、このポリアニオン性硫酸化セロピオシドの還元末端に存在する小さい非荷電グリコシド結合置換基は、還元末端で硫酸化されている同一のポリアニオンと比べてポリアニオンの化学的安定性を改善する。より好ましくは、この改変されている硫酸化セロピオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0272】

例えば、本発明の第6の態様のある実施形態では、対象における敗血症、SIRS若しくはIRI又は敗血症、SIRS若しくはIRIと関連する医学的状態若しくは疾患の処置又は予防のための薬物の製造における、ポリアニオン性硫酸化セロピオシドであって、その還元末端において小さい非荷電グリコシド結合置換基で改変されているポリアニオン性硫酸化セロピオシド又はその薬学的に許容される塩の治療上有効な量又は薬学的に有効な量の使用が提供される。好ましくは、この改変されている硫酸化セロピオシドは、mCBSであるか、又はより具体的にはmCBSの薬学的に許容される塩（例えば、mCBS・Na）である。

【0273】

そのような使用の一実施形態では、この薬物は、対象における敗血症若しくはSIRSを処置するためのものであるか、又は対象における敗血症若しくはSIRSと関連する医学的状態若しくは疾患を処置するためのものであり、前記処置は、前記敗血症若しくはSIRS又は前記敗血症若しくはSIRSと関連する前記状態若しくは疾患を寛解させるか又は阻害する。

【0274】

そのような使用の別の実施形態では、この薬物は、対象におけるIRIを処置するためのものであるか、又は対象におけるIRIと関連する医学的状態若しくは疾患を処置するためのものであり、前記処置は、前記IRI又は前記傷害と関連する前記状態若しくは疾患を寛解させるか又は阻害する。

【0275】

そのような使用のさらに別の実施形態では、この薬物を使用して、(i)対象の内皮に対して細胞毒性であるか、又は(ii)対象の内皮機能障害の一因となるか、又は(iii)対象の血小板を活性化させることによって凝血を開始させるか、又は(iv)対象において赤血球脆弱性及びその結果としての貧血を誘発する細胞外ヒストンを中和する。

【0276】

さらに別の実施形態では、製造された薬物は、第2の活性剤、化合物又は組成物の治療上有効な量又は薬学的に有効な量も含み得る。この実施形態によれば、第2の活性剤、化合物又は組成物は、細胞外ヒストンを伴う医学的状態、病気又は疾患を処置するための補助的治療を提供する。望ましくは、第2の活性剤、化合物又は組成物は、敗血症、SIRS若しくはIRI又は敗血症、SIRS若しくはIRIと関連する医学的状態若しくは疾患の処置のための補助的治療を提供する。好ましくは、第2の活性剤は、抗炎症剤、抗生物質製剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤及び／又は対象が患っている1種若しくは複数の状態を処置する任意の他の形態の治療用化合物若しくは医薬化合物の1つ又は複数から選択される。より好ましくは、第2の活性剤、化合物又は組成物は、1種又は複数の抗炎症剤を

含む。

【0277】

本発明の方法のいずれかで、改変されている硫酸化セロビオシド化合物を使用する場合、この化合物を、単回用量の製剤において、それを必要とする対象に投与し得るか、又はそれを必要とする対象への投与のために製剤化し得る。特定の代替実施形態では、この改変されている硫酸化セロビオシド化合物を、複数回用量の製剤として、それを必要とする対象に投与するか、又はそれを必要とする対象への投与のために製剤化する。

【0278】

好ましくは、対象への投与のために、本治療用組成物又は医薬組成物は、薬学的に許容される組成物として提供される。この形態の場合、(1) この組成物は、1種又は複数の薬学的に許容される担体(添加剤(additive))、及び／又は希釈剤、及び／又は添加剤(excipient)と一緒に薬学的に製剤化され、(2) この組成物中の改変されている硫酸化セロビオシド化合物は、中性又は塩の形態で製剤化され得る。

【実施例】

【0279】

本発明を下記の非限定的な実施例でさらに説明し、この実施例は、例証のみを目的として提供され、本明細書全体を通して本明細書の開示の一般性を制限すると解釈すべきではない。

【0280】

実施例1：mCBS・Naの調製方法

β -O-メチルセロビオシドを、Jon K Fairweather et al., 2004, Aust. J. Chem., 57:197-205により説明されているように調製する。

【0281】

β -O-メチルセロビオシドサルフェート(mCBS)化合物及びナトリウム β -O-メチルセロビオシドサルフェート(mCBS・Na)化合物を、Katrin C Probst and Hans Peter Wessel, 2001, J. Carbohydrate Chemistry, 20(7&8):549-560(この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)により説明されているように調製した。

【0282】

β -O-メチルセロビオシドサルフェート(mCBS)を下記の概要に従って調製した。

10

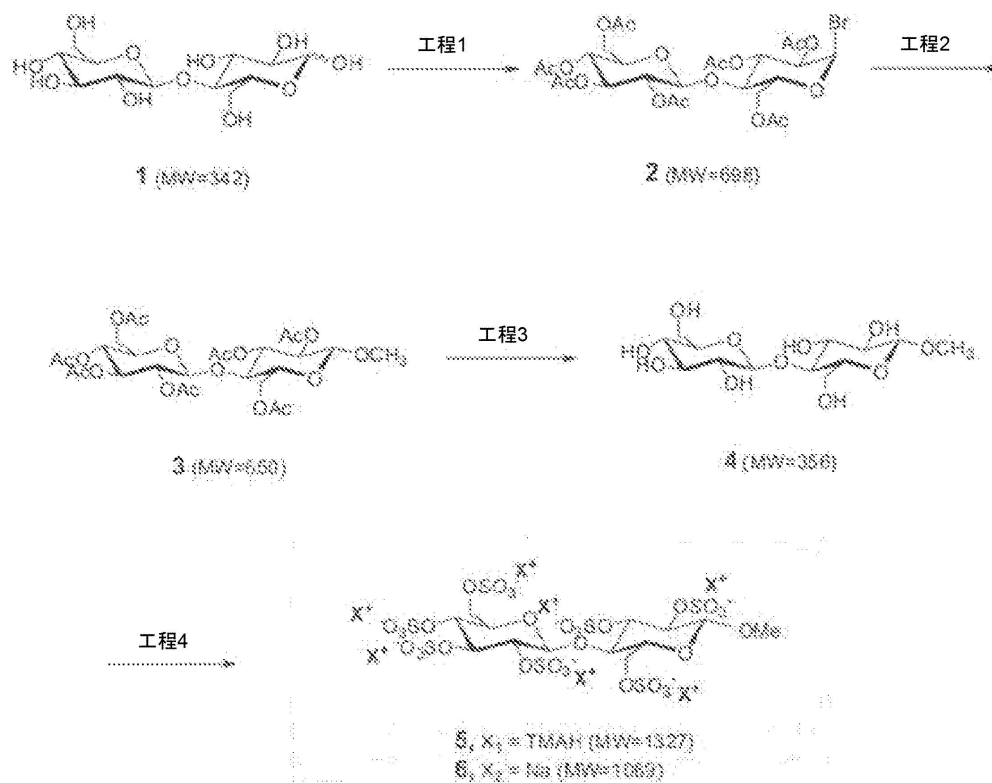
20

30

40

50

【化 3】



【0283】

ステップ1：α-D-セロピオース1（116 g、338 mmol）及び氷酢酸（1.6 L）の混合物に、室温で臭化アセチル（300 mL、500.0 g、4065 mmol、12.0 当量）を添加した。得られたクリーム状の混合物を、この反応混合物が、反応の完了を示す透明な溶液に変わるまで、45～55分にわたり60℃で加熱した。

【0284】

この熱い溶液を、割れた氷（4 kg）が入っているビーカー（10 L）に慎重に注ぐ。この混合物を、白色固体が沈殿するまで攪拌する（約10分）。冷水の別の一部（1 L）を添加し、10分にわたり攪拌し続ける。

【0285】

焼結漏斗でろ別し、固体を冷水で洗浄した（700 mL×3回）。得られた漏斗中の固体をDCM（1 L）に溶解させ、この漏斗をDCMで洗浄した（300 mL×2回）。まとめたDCM層をブライン（1.5 L）で洗浄し、DCM（0.5 L）で逆抽出した。最終DCM層をNa₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、2時間以内に<35℃において減圧下で濃縮して、次のグリコシル化に直接使用する目的の臭化物2（172.5 g、74.3%収率）を得た。

【0286】

ステップ2：per-O-アセチル化セロピオシルブロミド2（171 g、250 mmol）、無水DCM（800 mL）、無水MeOH（800 mL）、活性化3Aモレキュラーシーブ（70 g）の混合物に炭酸銀（Ag₂CO₃、75 g、275 mmol、1.1 当量）を添加した。得られた混合物を16時間にわたり光の非存在下で攪拌した。この混合物をシリカのプラグに通して精製し、EtOAcで溶出した。集めた画分を濃縮して褐色固体として粗生成物を得、この粗生成物を次のステップに直接使用した。化合物3のR_f=0.28（EtOAc-ヘキサン、1:1）。

【0287】

ステップ3：ステップ2で得られた粗生成物及び無水MeOH（1 L）の混合物に室温

でNaの小片（1.72 g、0.3当量、75 mmol）を添加した。その後まもなく、溶液から白色固体が沈殿し始めた。得られた混合物を一晩攪拌して、脱アセチル化を確実に完了させた。最終懸濁液をろ別し、MeOHで洗浄した（300 mL × 2回）。白色固体を集め、一晩にわたり真空下で乾燥させて、最終セロピオシド4（72.5 g、2段階で81.4%）を得た。

【0288】

【化4】



10

ステップ4の合成及び精製の手順：

ステップ4 化合物4（84.0 g、236 mmol）、 $\text{SO}_3 \cdot \text{TMA}$ （367.4 g、2.64 mol、11.2当量）、無水DMF（3140 mL）及び無水DCE（767 mL）の混合物をAr下で3回脱気し、2時間にわたり80～90℃で加熱した。（反応のモニタリング：10分にわたる加熱後、クリーム状の混合物が透明な溶液に変化した。30分後、この溶液は再び濁った。50分後、フラスコの表面上に、凝集した固体を観察した）。冷却後、得られた混合物を低温室（-5℃）に移し、一晩沈降させて溶媒から固体を完全に凝集させた。化合物4から5への完全な変換を $^1\text{H-NMR}$ で確認した。この溶液を排水口にデカントする。粗固体をろ別し、DCMで2～3回洗浄した。得られた固体を脱イオン水に溶解させ、イオン交換カラム〔DOWEX 50W×8のNa形態：樹脂（ H^+ 形態）3 kgをガラス製重力カラムに予め充填し、1 MのNaOH（-6 L）の溶出により再生し、脱イオン水（-12 L）で中和した〕に直接かけた。集めた画分を濃縮し、ガラス状固体として最終的な硫酸化セロピオシド6（232.1 g、92.0%）を得た。

20

【0289】

実施例2：mCBS・Na化合物の安定性研究

安定性研究を $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 、 $25 \pm 2^\circ\text{C} / 60\% \text{RH}$ 及び $40 \pm 2^\circ\text{C} / 75\% \text{RH}$ ℃条件で実行した。HPLCにより、製剤化した臨床材料（即ちリン酸緩衝液中のmCBS）中において、mCBS及びセロピオースサルフェート（CBS）の両方のレベルを追跡した。mCBS及びCBSの開始量（ $T=0$ ）に対するこれらのパーセント（%）変化のグラフ化により、経時的にmCBSのレベルが非常に安定していることが分かった。対照的に、CBSのレベルは非常に急激に下がり、約3ヶ月でほぼなくなっている。実際の安定性プロファイルは促進条件（即ち $25 \pm 2^\circ\text{C} / 60\% \text{RH}$ 及び $40 \pm 2^\circ\text{C} / 75\% \text{RH}$ ）で類似しており、CBSの消失速度は、より速いように見える。2ロットの製剤からのmCBS対CBSの安定性の差異の一例を図1に示す。このデータは、CBSは水溶液中で非常に不安定であるが、CBSの還元末端にメチル基を付加することにより、水溶液中で非常に安定である分子（mCBS）が得られることを示す。

30

40

【0290】

加えて、安定性試験において様々なmCBS製剤を試験した。これらの実験のデータから、mCBSの安定性は、使用する緩衝液によって差が出ないことが分かった。表1は、使用する緩衝液に関するmCBSの様々な製剤の組成を示す。

【0291】

50

【表 1】

表2a

表 1: 緩衝系の組成				
緩衝系	成分	量	pH	mCBS.Na の濃度
リン酸緩衝液	リン酸水素 二ナトリウム	1.35 mg/ml	7.4-7.6	80 mg/ml
	リン酸二水素 ナトリウム	0.33 mg/ml		
クエン酸緩衝液	クエン酸ナトリウム 二水和物	10 mg/ml		
	1M のクエン酸	pH 調整用に 適量		
酢酸緩衝液	酢酸ナトリウム	1.20 mg/ml		
	酢酸	pH 調整用に 適量		

10

20

【0292】

表 2 a は、様々な製剤の緩衝能力に応じて pH が経時的に変化することを示し、且つ酢酸緩衝液による製剤の pH が、たとえ約 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ であっても約 pH 7.5 に留まらないことを示すが、このデータ自体は、この期間中の mCBS 安定性の差異を示す。

【0293】

【表 2】

表2b

表 2a: 安定性研究中の pH							
緩衝液	条件	0 日目	3 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目
リン酸 緩衝液	$5 \pm 3^\circ\text{C}$	7.58	7.28	7.19	7.14	7.13	7.14
	$25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$		7.27	7.21	7.14	7.18	7.22
	$40^\circ\text{C}/75\%\text{RH}$		7.28	7.19	7.15	7.09	7.10
クエン酸 緩衝液	$5 \pm 3^\circ\text{C}$	7.60	7.27	7.24	7.15	7.15	7.17
	$25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$		7.22	7.18	7.15	7.18	7.30
	$40^\circ\text{C}/75\%\text{RH}$		7.20	7.20	7.12	7.12	7.17
酢酸 緩衝液	$5 \pm 3^\circ\text{C}$	7.5	6.97	7.02	6.94	6.93	6.92
	$25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$		7.00	7.02	7.10	7.15	7.38
	$40^\circ\text{C}/75\%\text{RH}$		6.87	6.89	6.81	6.81	6.84
コントロール (即ち 非緩衝化)	$5 \pm 3^\circ\text{C}$	6.82	6.81	6.81	6.84	6.79	6.89
	$25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$		7.04	7.18	7.32	7.43	7.41
	$40^\circ\text{C}/75\%\text{RH}$		7.03	7.16	7.10	7.20	7.29

30

40

【0294】

表 2 b は、24 ヶ月にわたり -20°C で貯蔵した場合のバルク粉末の代表的なバッチにおける mCBS レベルと CBS レベルとを比較する。T は、月数が単位の時間であり、 $T = 0$ 又は T_0 は、製造完了時に実行した分析結果を示す。示した後続の分析は、薬物の粉末又は製剤の最初の分析と相対的である（例えば、 T_1 = 製造日から 1 ヶ月）。CAD (

50

荷電化粒子検出器)を用いる分析方法を使用して、mCBSの純度及びその不純物のレベルを測定し、CAD%で表した。

【0295】

【表3】

表 2b

	T0	T1	T3	T6	T9	T12	T18	T24
mCBS	98.56 CAD%	98.45 CAD%	98.28 CAD%	98.22 CAD%	97.77 CAD%	98.00 CAD%	97.94 CAD%	98.26 CAD%
CBS*	0.23 CAD%	0.25 CAD%	0.28 CAD%	0.32 CAD%	0.36 CAD%	0.36 CAD%	0.36 CAD%	0.29 CAD%

10

*-αアノマー及びβアノマーの合計として算出した。

【0296】

表 2 c は、18ヶ月超にわたり2～8℃で貯蔵した場合のリン酸緩衝化pH7.5臨床試験材料製剤の代表的なバッチにおけるmCBSレベルとCBSレベルとを比較する。

【0297】

【表4】

表 2C

	T0	T2	T3	T7	T10	T13	T19
mCBS	98.33 CAD%	98.39 CAD%	98.37 CAD%	98.54 CAD%	98.47 CAD%	98.44 CAD%	98.78 CAD%
CBS*	0.25 CAD%	0.03 CAD%	0.07 CAD%	0.03 CAD%	0.04 CAD%	0.04 CAD%	<0.03 CAD%†

20

*-αアノマー及びβアノマーの合計として算出した、†-検出限界未満

【0298】

上記の表 2 b 及び 2 c は、18～24ヶ月にわたる様々な条件下での貯蔵後の粉末又は溶液のいずれかにおけるmCBS及びCBSのレベルを示す。CBSは、これらの調製物中において低レベルの不純物として現れる。結果は、CBSは、レベルが経時的に顕著に変化するようには見えないことから、-20℃で貯蔵した場合には粉末中で安定しているように見えることを示す。しかしながら、水性緩衝溶液中では、CBSは非常に不安定であり、レベルは、2～8℃での3～6ヶ月の貯蔵以内に0.03CAD%（即ち検出限界）まで低下する。対照的に、mCBSのレベルは、経時的に顕著に変動するようには見え、粉末中に又は溶液中に保存した場合には高い安定性を示すように見える。

30

【0299】

様々な緩衝製剤中におけるmCBSの28日後のHPLC分析（表3）も実行した。mCBSは、たとえ促進条件25±2℃/60%RH及び40±2℃/75%RHであっても、リン酸緩衝液中における又はクエン酸緩衝液中における28日後の変動が公称のわずかに-/+約2%であるように見え、良好な安定性を示す。

40

【0300】

50

【表 5】

表2c

表 3: HPLC 分析結果				
緩衝系及び安定条件*	日数	mCBS.Na の 指示濃度 (mg/ml)	分析するサンプル の量(μl)	検出% (n=3)
リン酸緩衝液(40℃)	28	80	50	97.53 ± 2.42
リン酸緩衝液(25℃)	28	80	50	98.68 ± 3.69
クエン酸緩衝液(40℃)	28	80	50	101.25 ± 3.18
クエン酸緩衝液(25℃)	28	80	50	102.53 ± 3.57
酢酸緩衝液(40℃)	28	80	50	-*
酢酸緩衝液(25℃)	28	80		
-*: 行なっていない;. 25℃及び 40℃は、25±2℃/60%RH 又は及び 40±2℃/75%RH (それぞれ)を示す				

【0301】

β-O-メチルセロピオシドサルフェート化合物の毒性及び薬物動態プロファイルの前臨床動物研究

下記の実施例3～10は、本発明で使用されるβ-O-メチルセロピオシドサルフェート化合物の毒性及び薬物動態(PK)プロファイルの、本発明者らが行った動物における例示的な前臨床研究を概説する。

【0302】

実施例3：動物研究で用いたmCBS・Na化合物

この実施例は、後に説明する動物で行った毒性及びPK研究で用いるナトリウムβ-O-メチルセロピオシドサルフェート(mCBS・Na)化合物の特性を示す。

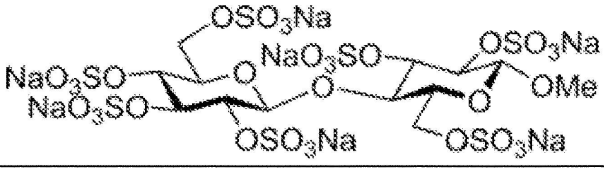
【0303】

下記で説明するSTX研究を、特に本発明で使用されるmCBS・Na等のβ-O-メチルセロピオシドサルフェート化合物の毒性及びPKプロファイルの予備的な理解を提供するために実行した。この研究を、同一のロットの化合物を使用して実行し、この化合物の特性を下記の表4にまとめる。

【0304】

【表 6】

表4:動物での毒性及びPK研究で使用したmCBS・Na化合物の特性

名称:	ナトリウムβ-O-メチルセロピオシドサルフェート(mCBS・Na)
分子量	1070.6 ダルトン
分子式	C ₁₃ H ₁₇ Na ₇ O ₃₂ S ₇
純度	>96%
説明	
貯蔵条件	2-8°C (粉末)
ビヒクル中の溶解性	水/水性中に約250 mg/mL
ビヒクル中の安定性	試験物の製剤を使用後に廃棄した。

10

【0305】

20

実施例4: β-O-メチルセロピオシドサルフェートの用量及び濃度

通常、本明細書で説明されている毒性及びPKの動物研究では、mCBSのナトリウム塩を使用した。しかしながら、本明細書で概説されている生物学的分析測定は、mCBSの遊離塩基形態を検出して報告したことに留意すべきである。従って、明確性のため、生物学的分析結果との関係を明確にするために、本明細書では、遊離塩基としての用量／濃度も報告している。ナトリウム含有量（塩形態に対する遊離塩基のMWの比率に基づく）及び試験物の純度を補正することにより、mCBS遊離塩基の用量を得た。しかしながら、いずれの用量（即ちナトリウム塩又は遊離塩基）も、バッチ中の化合物の効力を考慮していない。

【0306】

30

実施例5: β-O-メチルセロピオシドサルフェートの効力

上述したように、報告したmCBSの動物に投与した用量又は濃度は、効力（即ち含水量及び他の不純物）に関して補正しておらず、なぜなら、この研究を実行している間、使用したバッチ中のmCBSのナトリウム塩（即ちmCBS・Na）の効力分析を決定しなかったからである。これらの研究で使用したバッチのその後の分析は、それ以降、ナトリウム塩の効力が約74.5%であることを示している。これらの実施例で使用した実際の用量は、指示したものと比べて少なかった可能性が非常に高い。

【0307】

実施例6: Sprague Dawleyラットへの静脈内投与後のmCBSの毒性

この実施例は、1週間の用量範囲探索（DRF）研究におけるSprague Dawleyラットへの単回ボラス用量の静脈内投与後のmCBSの急性毒性の評価と、7日にわたるSprague Dawleyラットへのボラス用量の毎日の静脈内投与後のmCBSの毒性の評価とを示す。

40

【0308】

この研究では、mCBS・Na及び遊離塩基としてのmCBSの用量を最初に調べた。この効力評価から、最大耐量（MTD）の推定値は、mCBSのナトリウム塩の場合には約745 mg/kgであり、mCBS遊離塩基の場合には約600 mg/kgであった可能性が高い。

【0309】

1週間の用量範囲探索（DRF）研究におけるSprague Dawleyラットへの

50

単回ボラス用量の静脈内投与後のβ-Ο-メチルセロビオシドサルフェート（mCBS）の急性毒性の評価

この研究では、最大1000mg/kgの用量でのラットにおけるmCBSの単回IV投与からの急性毒性を調べた。

【0310】

β-Ο-メチルセロビオシドサルフェート（mCBS）の急性毒性を単回ボラス用量の静脈内投与後にSprague Dawleyラットで評価した。この用量範囲探索研究では、ナトリウム塩の形態でのmCBS試験物（mCBS・Na）の10、30、100、300及び1000mg/kgの用量において、n=3の成体の雌ラットの合計5つの群を処理した。純度及びナトリウム含有量の補正により、これらの用量レベルは、mCBS遊離塩基の約8.2、24.5、81.5、244.5及び815mg/kgに相当した。次いで、このラットを、剖検することなく終了前7日にわたり観察した。mCBS試験物による処理は、1000mg/kg用量までの全ての用量レベルで良好な耐容性を示した。処理に関連すると考えられる所見はなかった。

10

【0311】

従って、この研究からのmCBS・Naの最大耐量（MTD）又は急性耐量は1000mg/kgと特定し、これは、mCBS遊離塩基の815mg/kgに相当する。異常な所見又は（コントロール動物と比較した）体重の変化は観察しなかった。

【0312】

7日にわたるSprague Dawleyラットへのボラス用量の毎日の静脈内投与後のβ-Ο-メチルセロビオシドサルフェート（mCBS）の毒性の評価

20

この研究では、最大1000mg/kgの用量での7日にわたるラットにおけるmCBSの反復IV投与からの毒性を調べた。

【0313】

β-Ο-メチルセロビオシドサルフェートの急性耐容性及び毒性を7日の期間にわたる毎日の静脈内用量投与後のSprague Dawleyラットで評価した。この反復用量研究では、ナトリウム塩の形態のmCBS（mCBS・Na）の0、100、300及び1000mg/kgの用量において、n=3の成体の雌ラットの合計4つの群を処理した。純度及びナトリウム含有量の補正により、これらの用量レベルは、mCBS遊離塩基の約81.5、244.5及び815mg/kgに相当する。次いで、このラットを終了前7日にわたり観察し、肉眼による剖検並びに終末の血液分析及び生化学分析を行った。n=3の雄ラットの追加の群も、同一の研究デザインに従って1000mg/kgの最高用量で処理した。

30

【0314】

mCBSは、1000mg/kg用量までの全ての用量レベルで良好な耐容性を示した。処理に関連すると考えられる有害な所見はなかった。処理した動物における血学的パラメータ及び生化学的パラメータは目立たないものであった。肉眼による剖検及び病理で観察した影響は、処理との関連はないと考えられた。

【0315】

従って、この研究におけるMTDは1000mg/kgと特定し、これは、mCBS遊離塩基の815mg/kgに相当する。

40

【0316】

実施例7：Sprague Dawleyラットへの静脈内投与後のmCBSの薬物動態

この実施例は、Sprague Dawleyラットに静脈内投与したmCBSの薬物動態（PK）の評価を示す。

【0317】

下記の研究は、mCBSのナトリウム塩及び遊離塩基の両方として報告するmCBSの用量を示す。後者は、特にmCBS（遊離塩基）の測定した血漿レベルと投与した用量とを関連付ける場合且つクリアランス（CL）及び分布容積（Vz）等の終末期PKパラメータを決定するために重要であると考えられる。STX-09研究は、約25及び50m

50

g / k g / 時間でのラットにおける 5 時間の連続注入にわたり m C B S の血漿中濃度を示す。

【0318】

Sprague Dawley ラットに静脈内経路で投与した β -O-メチルセロピオシドサルフェートの薬物動態研究

この研究は、Sprague Dawley ラットにおける m C B S のボラス I V 投与 (20 mg / k g) P K プロファイルを調べ、化合物のほとんどが迅速に排出され、投与した用量の 90 % 超が最初の 4 時間で中央コンパートメントから除去されており、投与した用量の残余の m C B S がより長い期間をかけてゆっくりと除去されることを示す。大きい分布容積は、m C B S 化合物が中央コンパートメントから組織に迅速に移動していることを示す。

10

【0319】

β -O-メチルセロピオシドサルフェート (m C B S) の薬物動態を、ヘプタナトリウム塩の形態での m C B S のナトリウム塩 (m C B S · Na) としての 20 mg / k g のボラス用量 (又はナトリウム含有量及び純度に関する調整後の 16.3 mg / k g の遊離塩基) の静脈内投与後、Sprague Dawley ラットで評価した。

【0320】

効力を考慮して、このラットに投与した用量は、ナトリウム塩及び遊離塩基のそれぞれに関して 14.9 mg / k g 及び 12.65 mg / k g である可能性が高いと推定した。補正した m C B S 遊離塩基の用量は約 20 % 低かったことから、これにより、算出したクリアランス (C l) 及び分布容積 (V z) の値は、同様の割合で効果的に減少した。

20

【0321】

投与前から投与後 48 時間までの範囲の時点で 3 匹のラットから合計 10 個の血液サンプルを採取した。得られた血液サンプルを血漿に処理し、その後、L C - M S / M S ベースの方法を使用して m C B S (遊離塩基) の濃度に関して分析した。血漿中濃度対時間のデータを薬物動態パラメータの算出に使用した。

【0322】

時間ゼロ (C 0) での m C B S 濃度の平均 ($\pm$ S E M) 値は、73400 ($\pm$ 8560) n g / m L であった。時間ゼロから最後に測定した時点 (A U C l a s t) までの及び無限大 (A U C i n f) までの曲線下面積の平均 ($\pm$ S E M) 値は、それぞれ 34300 ($\pm$ 2460) n g · 時間 / m L 及び 35000 ($\pm$ 2940) n g · 時間 / m L であった。見かけ上の排出半減期 (T 1 / 2) の平均 ($\pm$ S E M) 値は 77.5 ($\pm$ 54.5) 時間であったが、平均残留時間 (M R T) の平均 ($\pm$ S E M) 値は 5.58 ($\pm$ 3.99) 時間と比較的短かった。分布容積 (V z) の平均 ($\pm$ S E M) 値は 46.9 ($\pm$ 30.7) L / k g と高く、全身クリアランス (C l) の平均 ($\pm$ S E M) 値は 0.472 ($\pm$ 0.0377) L / 時間 / k g と低かった。T 1 / 2 (122 % C V)、V z (113 % C V) 及び M R T (124 % C V) の高い対象者間変動は、対数線形濃度対時間曲線の終末消失部分の不完全なキャラクタリゼーションに起因している可能性が最も高かった。

30

【0323】

Sprague Dawley ラットに静脈内経路で投与した m C B S の薬物動態研究

この研究は、Sprague Dawley ラットにおけるボラス I V 投与 (100 mg / k g) 後の m C B S の P K を調べた。

40

【0324】

m C B S の薬物動態を、6 匹のラットの群へのナトリウム塩の形態でのボラス 100 mg / k g 用量の m C B S (又はナトリウム含有量及び純度に関する補正後の 81.5 mg / k g の遊離塩基) の静脈内投与後、Sprague Dawley ラットで評価した。

【0325】

効力を考慮して、このラットに投与した用量をナトリウム塩及び遊離塩基のそれぞれに関して 74.5 mg / k g 及び 63.25 mg / k g であると推定した。補正した m C B S 遊離塩基の用量は約 20 % 低かったことから、これにより、算出したクリアランス (C

50

l) 及び分布容積 (V_z) の値は、同様の割合で効果的に減少した。

【0326】

投与前から投与後192時間までの範囲の時点で各ラットから合計9個の血液サンプルを採取した。最初の48時間にわたり尿サンプルも採取した。得られた血液サンプルを血漿に処理した。その後、尿サンプル及び血漿サンプルを、LC-MS/MSベースの方法を使用してmCBS (遊離塩基) の濃度に関して分析した。

【0327】

mCBSに関する血漿薬物動態パラメータの推定値を、プールした平均濃度対時間のデータから得た。時間ゼロ(0)での濃度は308,000 ng/mLであった。時間ゼロから最後に測定した濃度(AUClast)の時間までの曲線下面積及び無限大(AUCinf)まで外挿された場合の曲線下面積は両方とも、135,000 ng・時間/mLであった。1.43時間の平均残留時間(MRT)とは対照的に、見かけ上の終末排出半減期($T_{1/2}$)は56.1時間であった。この化合物は、49.0 L/kgという比較的高い分布容積(V_z)を示したが、終末全身クリアランス(CL)は0.605 L/時間/kgと比較的低かった。

【0328】

mCBS遊離塩基に関する尿中薬物動態物質収支の推定値を、排泄された尿量のデータから得た。投与後0~4時間、0~24時間及び0~48時間の採取間隔で排泄されたmCBSの総用量の割合の平均($\pm$ SEM)値は、それぞれ52.0($\pm$ 5.0) %、65.0($\pm$ 7.0) %及び69.2($\pm$ 10.8) %であった。尿の排泄は、投与後最初の48時間における化合物の排出のための主要な経路として特定されている。

【0329】

この研究は、mCBSが、投与直後に中央コンパートメントから迅速に除去され、大きい分布容積により示されているように組織に吸収されることを確認した。この化合物の分布半減期(これは、排出の主要な決定因子である)は0.65時間であると推定した。終末期の多重サンプリングにより、終末排出半減期のキャラクタリゼーションが改善され、この終末排出半減期は約56時間であると算出した。

【0330】

mCBSを静脈内注入により投与したSprague Dawleyラットにおける薬物動態研究

この研究は、約25及び50 mg/kg/時間でのラットにおける5時間の連続注入にわたりmCBSの血漿中濃度を調べた。

【0331】

雄Sprague Dawleyラットへの5時間にわたる注入としての静脈内投与後、mCBSの薬物動態(PK)を研究した。この研究では、静脈内注入後にmCBS化合物の薬物動態を調査した。この化合物を、ハルトマン溶液を使用して製剤化し、25.3 mg/kg/時間の割合でn=3のラットの群に投与し(総用量:126.5 mg/kg;群1)、且つ50.6 mg/kg/時間の割合でn=3のラットの第2の群に投与した(総用量:253 mg/kg;群2)。

【0332】

この研究では、5時間にわたる連続注入に使用したmCBSナトリウム塩の名目上の用量は、40及び80 mg/kg/時間(又は遊離塩基としてそれぞれ34及び68 mg/kg/時間)であった。

【0333】

投与前から注入の開始後5時間までの範囲の時点で各ラットから合計6個の血液PKサンプルを採取した。得られた血液サンプルを血漿に処理し、その後、LC-MS/MSベースの方法を使用してmCBSの濃度に関して分析した。Phoenix 64 WinNonlin(登録商標)ソフトウェアを使用して、0~5時間の注入間隔をかけて濃度対時間曲線下面積(AUC)の値を推定した。定常状態の濃度(Css)及びクリアランス(CL)の値も推定した。

10

20

30

40

50

【0334】

mCBSの濃度は、用量投与前に採取した血漿サンプルではアッセイの定量限界未満であり、投与後30分～5時間に採取した全ての血漿サンプルでは濃度が定量可能であった。0～5時間の注入間隔の平均(±SEM)AUC値は、群1及び群2それぞれに関して260,000(±30,200)ng・時間/mL及び532,000(±25,500)ng・時間/mLであった。群1のCss及びClの平均(±SEM)値は、群1に関して58,400(±6,920)ng/mL及び0.601(±0.081)L/時間/kgであったが、群2のCss及びClの平均(±SEM)値は、120,000(±5,560)ng/mL及び0.571(±0.025)であった。

【0335】

これらの結果は、mCBSが2時間の注入後に定常状態の血漿レベル(Css)に達したことを示す。50mg/kg/時間で処理したラットにおける両方のCss及びAUCは両方とも、25mg/kg/時間で処理したラットと比べて2倍高く、これは、全身曝露が、この研究で使用した用量に比例することを示す。凝固試験は、より高い用量のmCBSで処理したラットは基準範囲と比べてAPTTスコアが高いことを示し、これは、この用量でのmCBSの存在により凝固時間が長くなることを示す。

【0336】

実施例8：ヒト、イヌ及びラットにおけるmCBSの血漿タンパク質への結合及び代謝のインビトロでの調査

この実施例は、mCBSの代謝及び血漿タンパク質結合を調べるために実行したインビトロ研究を示す。具体的には、この研究で、ヒト、イヌ及びラットの肝ミクロソームにおけるmCBSの代謝を調べ、mCBSの代謝を検出しないと結論付けた。同様に、この研究で、限外ろ過技術を使用してヒト、ラット及びイヌの血漿タンパク質へのmCBSの結合を調べ、試験した全ての種において血漿タンパク質への結合が約20%であると結論付けた。

【0337】

ヒト、イヌ及びラットの肝ミクロソームにおけるβ-O-メチルセロビオシドサルフェートのインビトロでの代謝

要約すると、この研究は、ラット、イヌ及びヒトの肝ミクロソームによるmCBSの第I相及び第II相の代謝を調べるために設計されたインビトロでの調査であった。結果は、mCBSの代謝を検出なかったことを示す。

【0338】

(i) ヒト、ラット及びイヌの肝ミクロソームにおけるβ-O-メチルセロビオシドサルフェートの第I相代謝

水中の50%メタノールに溶解させた25μMのmCBSのストック濃縮物を反応管に入れた(10μL)。反応混合物(最終体積250μL)は下記を含んだ：0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.4)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド2'-ホスフェート(NADPH)(1mM)及びプールしたヒト、ラット又はイヌの肝ミクロソーム(0.3mg/mL)。5分間のプレインキュベーション期間後にNADPHを添加することにより反応を開始させ、振盪水浴中において37℃でインキュベートした後、氷冷アセトニトリル500μLで停止させた。次いで、サンプルをボルテックス混合し、14,000rpmで10分にわたり遠心分離した。サンプルの半分(375μL)をガラス管に移し、窒素流下及び37℃において蒸発させた。次いで、サンプルを移動相A(250μL)中で再構成した。mCBSの最終濃度は、インキュベーション媒体中で1μMであった。

【0339】

この反応混合物を1時間にわたりインキュベートし、0、15、30、45及び60分の時点で三重にサンプリングした。研究サンプルと並行して陰性コントロール(NADPHなし)を使用した。陽性コントロール；ミダゾラム、25μM(10μL)を1時間にわたり同一条件下でインキュベートした。ミダゾラムの最終濃度は、インキュベーション

10

20

30

40

50

媒体中で $1 \mu\text{M}$ であった。

【0340】

【表7】

表5:ミクロソーム反応インキュベーション条件の概要

	第I相代謝 安定性	第II相代謝 安定性
基質濃度	$1 \mu\text{M}$	$100 \mu\text{M}$
インキュベーション体積	$250 \mu\text{L}$	$250 \mu\text{L}$
インキュベーション媒体	リン酸緩衝液 100 mM $\text{pH } 7.4$	リン酸緩衝液 100 mM $\text{pH } 7.4$
インキュベーション合計時間	1時間	2時間
肝ミクロソームタンパク質濃度	0.3 mg/ml	0.3 mg/ml
補因子濃度	1 mM (NADPH)	5 mM (UDPGA)
反応の停止	$500 \mu\text{L}$ アセトニトリル	$500 \mu\text{L}$ 冷アセトニトリル

【0341】

(ii) 生物分析: mCBS の較正曲線

水中の 50% メタノール中の mCBS ($30 \mu\text{g/ml}$ — 遊離塩基として) 及びミダゾラム ($10 \mu\text{g/ml}$) の混合ストック溶液を、水中の 50% メタノールを使用して、mCBS の場合には 2.5 、 20 、 12.5 、 6.25 、 2.5 、 1.25 、 0.25 及び $0.125 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、且つ 8333 、 6667 、 4167 、 2083 、 833 、 417 、 83.3 、 41.7 ng/ml に希釈し、ワーキング標準溶液のアリコート ($10 \mu\text{L}$) をプラスチック管に入れた。次に、この管にリン酸緩衝液 (100 mM 、 $\text{pH } 7.4$) のアリコート ($190 \mu\text{L}$) 及びミクロソームのリン酸緩衝液 (100 mM 、 $\text{pH } 7.4$) 溶液 ($50 \mu\text{L}$) を入れ、続いてアセトニトリルのアリコート $500 \mu\text{L}$ を入れた。管をボルテックス混合し、 $14,000 \text{ rpm}$ で 10 分にわたり遠心分離した。上清のアリコート ($375 \mu\text{L}$) を窒素流下で蒸発させ、移動相 A ($250 \mu\text{L}$) 中で再構成し、LC-MS/MC システムに直接注入した ($10 \mu\text{L}$)。

【0342】

(iii) ヒト、ラット及びイヌの肝ミクロソームにおける mCBS の第II相代謝

メタノール ($50 \mu\text{L}$) に溶解させた 1 mg/ml の mCBS のストック濃縮物を反応管中で蒸発乾固させ、 $100 \mu\text{M}$ の最終濃度において反応混合物に再懸濁させた。混合物 (最終体積 $250 \mu\text{L}$) は下記を含んだ: 0.1 M のリン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.4$)、 MgCl_2 (1 mM)、ウリジン $5'$ -ジホスホグルクロン酸 (UDPGA) (5 mM)、肝ミクロソーム (0.3 mg/ml) 及びアラメチシン ($25 \mu\text{g/タンパク質mg}$)。5 分間のプレインキュベーション期間後に UDPGA を添加することにより反応混合物を開始させ、振盪水浴中において 37°C でインキュベートした後、氷冷アセトニトリル ($500 \mu\text{L}$) で停止させた。次いで、サンプルをボルテックス混合し、 $14,000 \text{ rpm}$ で 5 分にわたり遠心分離した。

【0343】

この反応混合物を肝ミクロソーム中で 2 時間にわたりインキュベートした ($n=3$)。この研究サンプルと一緒に陰性コントロール (UDPGA なし) 及び陽性コントロール (

パラセタモール 100 μ M) をインキュベートした。

【0344】

(iv) 質量分析条件

mCBS及びミダゾラムの分析に使用したLC-MS/MSパラメータを表6にまとめる。

【0345】

【表8】

表6:目的の分析物用のHPLC条件及び質量分析条件。

HPLC			
オートサンブラ温度	4°C		
カラム	X-Terra MS C18 5 μ m 2.1 x 150 mm		
Mistral温度 (カラムオープン)	40°C		
移動相A	80%酢酸アンモニウム10mM、pH=5/20%アセトニトリル/0.1%ヘキシルアミン/0.1%ヘキサフルオロ-2-プロパノール		
移動相B	水中の80%アセトニトリル		
洗浄溶媒1(R2)	水中の0.2%ギ酸		
洗浄溶媒2(R0)	水中の20%アセトニトリル		
勾配	時間(分)	ポンプ流量	ポンプ割合B%
	1:00	0.4	0
	2:00	0.4	50
	2:30	0.4	50
	2:36	0.4	0
	4:00	0.4	0

MS/MS						
分析物	Q1質量	Q3質量	滞在時間	DP	CE	CXP
β -O-メチルセロピオン ドサルフェート (遊離塩基)	709.7	256.9	150	-95.00	-88.00	-17.00
ミダゾラム	325.8	291.1	150	136.0	39.00	22.00

【0346】

(V) 結果

第I相代謝を許容する条件下でのヒト、ラット及びイヌの肝ミクロソームの存在下におけるmCBSの代謝安定性を図2～4に示す。これらの結果は、これらの条件下では試験化合物の有意な代謝がなかったことを示す。図2は、第I相代謝を許容する条件下でのヒト肝ミクロソームの存在下におけるmCBSの濃度 (μ M) の測定値 (平均 $\pm$ SEM) で示される、ヒト肝ミクロソームにおけるmCBSの代謝安定性を示すグラフである。図3は、第I相代謝を許容する条件下でのラット肝ミクロソームの存在下におけるmCBSの濃度 (μ M) の測定値 (平均 $\pm$ SEM) で示される、ヒトラット肝ミクロソームにおけるmCBSの代謝安定性を示すグラフである。図4は、第I相代謝を許容する条件下でのイヌ肝ミクロソームの存在下におけるmCBSの濃度 (μ M) の測定値 (平均 $\pm$ SEM) で示される、イヌ肝ミクロソームにおけるmCBSの代謝安定性を示すグラフである。

【0347】

(vi) 第II相代謝

第ⅠⅠ相代謝を許容する条件下での化合物とヒト、ラット及びイヌの肝ミクロソームとのインキュベーション後の反応サンプル中で検出したmC B Sのグルクロン酸代謝産物と一致するイオンは存在しなかった。インキュベーション媒体中でのパラセタモールグルクロニドの形成をニュートラルロス (Neutral loss) 及びMRMスキュンの両方で確認した。

【0348】

このインビトロでの研究では、反応媒体中での遊離塩基の形態のレベルの変化を測定することにより、mC B Sの代謝を評価した。

【0349】

第Ⅰ相代謝を許容する条件下では、評価した3種の肝ミクロソームとの1時間のインキュベーション後、mC B S濃度は低下しなかった。同一条件下では、陽性コントロール化合物であるミダゾラムは、3種のミクロソームの存在下でほぼ完全に代謝された。

【0350】

mC B Sの濃度は、ヒト肝ミクロソームとの反応では時間ゼロで0.6 μM未満であったことに留意されたい（一方、添加した濃度は1 μMであった）。同様の観察が、肝ミクロソームを含むがNADPHを含まない陰性コントロールサンプルで見られたが、NADPHを含むがミクロソームを含まない陰性コントロールサンプルでは見られなかった。肝ミクロソームは、タンパク質、リン脂質及び脂肪酸の混合物を含む複雑な組織である。肝ミクロソーム組織の成分は、質量分析計のイオン化に影響を及ぼしてシグナルを抑制する可能性がある。肝ミクロソームの成分は、種間で異なることから、イオン抑制は、ヒトミクロソームではより強く、時間及びNADPHの存在に依存しない化合物濃度の見かけ上の低下をもたらす場合がある。

【0351】

要約すると、ヒト、ラット及びイヌのミクロソームを用いたミクロソーム反応において、試験物の無／最小の第Ⅰ相代謝を検出した。第2のインビトロでの代謝研究（第ⅠⅠ相）において、グルクロニド代謝産物もウリジン5'-ジホスホグルクロン酸 (UDPGA) の存在下での各種の肝ミクロソームとの2時間のインキュベーション後に検出しなかった。

【0352】

いかなる理論又は特定の作用様式に拘束されることなく、本出願人は、mC B Sの広範なインビトロでの代謝の欠如が、この分子への酵素のアクセスを妨げる7種のサルフェート (S03) 群の存在により説明され得ることを推測した。しかしながら、この結果は、第Ⅰ相又は第ⅠⅠ相の代謝に続くインビボでの脱硫酸化の可能性を排除し得ない。

【0353】

限外ろ過技術を使用する、ヒト、ラット及びイヌの血漿タンパク質に結合するmC B Sの調査

要約すると、この研究は、ラット、イヌ及びヒトの血漿タンパク質へのmC B Sの結合を調べるために設計されたインビトロでの研究であった。得られた結果は、試験した全ての種において、血漿タンパク質への約20%の結合が存在したことを示す。

【0354】

ここで説明されている研究では、既存の方法を、内部標準として重水素化mC B S (mC B S-d3) の使用を含むように改変した。この生物学的分析方法を使用して、ラット、イヌ及びヒトの血漿とのmC B Sの血漿タンパク質結合を評価した。

【0355】

30000ダルトンの分子量カットオフポイントを有するCentrifree（登録商標）限外ろ過装置を使用する限外ろ過方法により、タンパク質結合を評価した。簡潔に説明すると、既知の濃度の（遊離塩基としての）mC B Sをヒト、ラット及びイヌの血漿サンプルに添加し、37℃で20分にわたりインキュベートした。次いで、このサンプルを限外ろ過にかけて、タンパク質が結合した薬物と結合していない薬物を分離した。次いで、タンパク質結合の程度を薬物の全濃度と未結合の濃度との間の百分率差として定義した（リン酸緩衝液のみの存在下での限外ろ過装置への非特異的結合の減算を含む）。

【0356】

使用した試薬を下記の表7で詳述する。mCBS及びmCBS-d3の分析に使用したLC-MS/MSパラメータを表8にまとめる。

【0357】

【表9】

表7:ラット、イヌ、及びヒトの血漿タンパク質へのmCBSの結合を調べるために使用した試薬の説明。

物品	説明
ナトリウム 0-メチル セロピオシド サルフェート (mCBS·Na)	TQ # 1829, 有効期限: 2016 年 4 月 16 日, バッチ番号: IG-01-327 (3), 純度:96%
内部標準: mCBS-d3	TQ# 1886, 有効期限: 2020 年 11 月 17 日, ロット番号: AML-Sra- 016i, 純度: 90.1%, 同位体純度: 99.5%
mCBS ストック溶液 (200 µg/mL)	水中の 50%メタノールに mCBS 粉末を溶解させ、さらに水 で希釈して、200 µg/mL 濃度の溶液を調製することにより 調製した(分析物のナトリウム含有量及び純度%に関して調 整した)。
mCBS-d3 ストック溶液 (1 µg/mL)	水中の 50%メタノールに mCBS-d3 粉末を溶解させ、さ らに水で希釈して、1 µg/mL 濃度の溶液を調製すること により調製した(分析物の純度%に関して調整した)。
ヒト、ラット、及びイヌの血漿	プールしたブランクのヒト、ラット、及びイヌの血漿(抗凝固剤 として Li-Hep), NaH ₂ PO ₄ を使用して pH を 7.40 に調整した
リン酸緩衝液	2.50 mM; pH 7.40
Centrifree® 限外ろ過装置	Millipore 商品番号 4104 - 30 000 NMWL

【0358】

(i) 分析方法のパラメータ

【0359】

10

20

30

40

50

【表 10】

表8:目的の分析物用のHPLC条件及び質量分析条件。

分析物	Q1質量	Q3質量	滞在時間	DP	CE	CXP
mCBS	709.7	256.9	150	-75.00	-74.00	-19.00
mCBS-d3	711.2	258.5	150	-75.00	-74.00	-16.00
HPLC						
オートサンブラ温度	4°C					
カラム	X-Terra MS C18 5 µm 2.1 x 150 mm					
Mistral温度 (カラムオープン)	40°C					
移動相A	80%酢酸アンモニウム10mM、pH=5/20%アセトニトリル/ 0.1%ヘキシルアミン/0.1%ヘキサフルオロ-2-プロパノール					
移動相B	水中の80%アセトニトリル					
洗浄溶媒(S1)	水中の20%アセトニトリル					
パラメータ表		mCBS		mCBS-d3		
CUR		35.00		35.00		
CAD		中間(Medium)		中間(Medium)		
IS		-2000		-2000		
TEM		450		450		
GS1		60.00		60.00		
GS2		60.00		60.00		
EP		-10.0		-10.0		
洗浄溶媒1(S1)		水中の20%アセトニトリル				
洗浄溶媒2(S2)		水中の50%アセトニトリル				
洗浄溶媒3(S3)		50%メタノール中の0.1%ギ酸				
勾配	時間(分)	ポンプ流量		ポンプ割合B%		
	1:00	0.45		0		
	2:30	0.45		50		
	2:50	0.45		50		
	3:00	0.45		0		
	4:30	0.45		0		

MS/MSパラメータ: Q1-第1の質量フィルタ; Q3-質量分析器; 滞在時間-各遷移で機器が費やす時間;
DP:デクラスタリング電位; EP: 入口電位; CE:衝突エネルギー; CXP:生成物イオン用の衝突セル出口電位

【0360】

(ii) サンプル調製

mCBSストック溶液(10 µL)を、最終濃度が200 ng/mL及び2000 ng/mLとなるように、下記の表9に列挙されている各試験マトリックス(490 µL)の溶液にスパイクした。

【0361】

【表11】

表9: 各試験マトリックスのmCBSスパイクサンプル

マトリックス	マトリックスにスパイクした ストック溶液の mCBS 濃度 (µg/mL)	mCBS 最終濃度 (ng/mL)
リン酸緩衝液	10	200
リン酸緩衝液	100	2000
血漿(ヒト, ラット, イヌ)	10	200
血漿(ヒト, ラット, イヌ)	100	2000

【0362】

次いで、スパイクサンプルを水浴中で20分にわたり37℃でインキュベートした。各試験群からのサンプルのアリコート（500 μL）を限外ろ過装置に移し（n=3）、1000 gで20分にわたり遠心分離した。遠心分離後、限外ろ過液のアリコート（50 μL）を、各試験群からの限外ろ過前のサンプルの二重のアリコートと共に、抽出のために別の試験管に移した。

【0363】

(iii) 校正曲線の作成

200 μg/mLでのmCBS標準溶液アリコートを下記に示すように希釈した。

【0364】

【表12】

標準 ID / 濃度	調製の詳細
St A 200 μg/ml	
St B 100 μg/ml	A 500ul + 水 500 μL の混合
St C 75 μg/ml	B 750ul + 水 250 μL の混合
St D 50 μg/ml	C 600ul + 水 300 μL の混合
St E 25 μg/ml	D 500ul + 水 500 μL の混合
St F 10 μg/ml	E 400ul + 水 600 μL の混合
St G 5 μg/ml	F 500ul + 水 500 μL の混合

【0365】

次いで、得られた標準溶液のアリコート（10 μL）を関連マトリックス（ヒト、ラット及びイヌの血漿並びにリン酸緩衝液2.5 mM、pH 7.4）のそれぞれ490 μLにスパイクし、よく混合した。

【0366】

(iv) 抽出

スパイクした標準及びサンプルのアリコート（50 μL）（インキュベーション及び限外ろ過後）を1 μg/mLの内部標準溶液50 μLと混合した。純粋なアセトニトリル（150 μL）を添加し、サンプルを直ちにボルテックスした。上清溶液をガラス管に移し、空気流下で37℃において蒸発させた。次いで、乾燥したサンプルを移動相A' 150 μL中で再構成した。

【0367】

限外ろ過前のサンプルの定量のために、サンプルを、血漿において新たに作成した標準曲線に対して分析した。限外ろ過後に採取したタンパク質に乏しいサンプルを、2.5 mMのリン酸緩衝液、pH 7.4において新たに作成した校正曲線に対して定量した。非特異的結合の推定のために、限外ろ過の前後両方のサンプルをリン酸緩衝液での校正曲線に対して定量した。

【0368】

(v) 結果：非特異的結合

限外ろ過装置への非特異的結合は、200及び2000 ng/mLそれぞれで0.5%及び-1.97%と推定した（下記表10）。従って、限外ろ過装置への化合物の結合は無視できると考えられた。

【0369】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表10:限外ろ過装置へのmCBSの非特異的結合

マトリックス:リン酸緩衝液pH7.4				
mCBSの濃度				
反復	200ng/mL フィルタ前	200ng/mL フィルタ後	2000ng/mL フィルタ前	2000ng/mL フィルタ後
1	195	207	2090	1860
2	209	194	1970	2190
3		202		2160
平均	202	201	2030	2070
算出:非特異的結合				
非特異的結合(NSB%) : $100 - \left[\frac{\text{フィルタ後濃度}}{\text{フィルタ前濃度}} \times 100 \right]$				
200 ng/mL	$100 - \left[\frac{201}{202} \times 100 \right]$		0.50%	
2000 ng/mL	$100 - \left[\frac{2070}{2030} \times 100 \right]$		-1.97%	

【0 3 7 0】

(v i) 血漿タンパク質結合

ヒト、ラット及びイヌの血漿にスパイクしたmCBSのろ過の前後での濃度の比較により、血漿タンパク質結合を算出した。結合の程度は、16～23%の範囲で3種全ての種に関して類似していた（下記の表11～13を参照されたい）。mCBSの血漿タンパク質結合は、試験した両方の濃度で類似していた。

【0 3 7 1】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表11:ヒト血漿へのmCBS結合

マトリックス:ヒト血漿				
mCBSの濃度				
反復	200ng/mL フィルタ前	200ng/mL フィルタ後	2000ng/mL フィルタ前	2000ng/mL フィルタ後
1	213	169	2070	1770
2	217	181	2190	1860
3		150		1750
平均	215	167	2130	1793

算出:血漿タンパク質結合		
血漿タンパク質結合(%): $100 - \left[\frac{\text{フィルタ後濃度}}{\text{フィルタ前濃度}} \times 100 \right]$		
200 ng/mL	$100 - \left[\frac{167}{215} \times 100 \right]$	22.5%
2000 ng/mL	$100 - \left[\frac{1793}{2130} \times 100 \right]$	15.8%

【 0 3 7 2 】

【表 1 5】

表12:ラット血漿へのmCBS結合

マトリックス:ラット血漿				
mCBSの濃度				
反復	200ng/mL フィルタ前	200ng/mL フィルタ後	2000ng/mL フィルタ前	2000ng/mL フィルタ後
1	205	179	2090	1740
2	217	167	2180	1690
3		164		1710
平均	211	170	2135	1713
算出:血漿タンパク質結合				
血漿タンパク質結合(%): $100 - \left[\frac{\text{フィルタ後濃度}}{\text{フィルタ前濃度}} \times 100 \right]$				
200 ng/mL	$100 - \left[\frac{170}{211} \times 100 \right]$		19.4%	
2000 ng/mL	$100 - \left[\frac{1713}{2135} \times 100 \right]$		19.8%	

【 0 3 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 16】

表13:イヌ血漿へのmCBS結合

マトリックス:イヌ血漿				
mCBSの濃度				
反復	200ng/mL フィルタ前	200ng/mL フィルタ後	2000ng/mL フィルタ前	2000ng/mL フィルタ後
1	225	186	2330	1900
2	230	194	2490	1970
3		169		1840
平均	228	183	2410	1903
算出:血漿タンパク質結合				
血漿タンパク質結合(%): $100 - \left[\frac{\text{フィルタ後濃度}}{\text{フィルタ前濃度}} \times 100 \right]$				
200 ng/mL	$100 - \left[\frac{183}{228} \times 100 \right]$		19.6%	
2000 ng/mL	$100 - \left[\frac{1903}{2410} \times 100 \right]$		21.0%	

【0374】

この研究では、ヒト、ラット及びイヌの血漿タンパク質へのmCBS結合は約20%であった。結合の程度は200及び2000ng/mLで類似しており、限外ろ過装置への非特異的結合は無視できた。

【0375】

実施例9：ラットにおける7日連続の長期間にわたる連続IV注入後のmCBSの投与量及び毒性のインビボでの調査

この実施例は、7日連続の期間にわたる連続した（24時間／日）Sprague-DawleyラットへのIV注入により投与した場合の、mCBSの用量範囲及び毒性の調査のインビボでの研究を概説する。この実施例は、ラットにおけるmCBSのこの集中投与計画下において、ラットに投与した場合、1394mg/kg／日（遊離塩基；効力及び塩含有量の補正後）の投与量でmCBSの観察可能な副作用レベルが存在しなかったことを示す。

【0376】

この研究の目的は、Sprague-Dawleyラットへの、7日連続にわたる、外科的に留置されたカテーテルを介した連続（24時間／日）の静脈内注入により投与した場合における、試験物であるmCBSの毒性を決定することであった。

【0377】

mCBSの試験物用量製剤及びコントロール物用量製剤（ヘプタナトリウム塩mCBS・Naの形態）を、下記の表14で説明するように、7日連続にわたる連続（24時間／日）の静脈内注入により、ラットの群に投与した。

【0378】

10

20

30

40

50

【表 17】

表14:7日連続にわたり、外科的に留置されたカテーテルを介した連続の静脈内注入により Sprague-Dawleyラットに投与した、mCBS(ヘプタナトリウム塩mCBS・Naの形態)の投与製剤。

群番号	群名称	用量レベル (mg/kg/日) **	用量 濃度 (mg/mL) **	補正された 用量レベル (mg/kg/日)**	補正された 用量濃度 (mg/mL)**	注入速度 (mL/kg/時間)	注入 持続時間 (日数)	動物の数	
								雄	雌
1	コントロール	0	0	0	0	2.5	7	3	3
2	低用量	1930	32	1994	33.2	2.5	7	3	3
3	中用量	3860	63	3978	66.3	2.5	7	3	3
4	高用量	4880	80	5084	84.7	2.5	7	3	3
5	コントロール2	0	0	0	0	4	7	3	3
6	高用量2	7880	130	8075	134.5	4	7	3	3

*コントロール及びコントロール2の動物に、注射用の0.9%のNaCl(USP)のみを投与した。

**用量のレベル及び濃度を、効力に関して補正していない。

***用量のレベル及び濃度を、0.726の補正係数で効力及び塩含有量に関して補正した後のmCBS(遊離塩基)に関して表す。

【0379】

この研究中にモニタリングしたパラメータとして、死亡率、臨床観察、体重及び摂食量が挙げられる。加えて、9日目に血液学的パラメータ、凝固パラメータ及び臨床化学パラメータを評価した。血漿中における試験物濃度を分析するために、注入開始に対して相対的な時点で動物から血液サンプルを採取した。終了時(9日目)、全ての動物を安楽死させ、肉眼による剖検検査にかけた。選択した臓器に対して臓器重量を測定し、肉眼的病変等の組織の選択したリストを保持し、顕微鏡による評価のために調製した。

【0380】

Sprague-Dawleyラットへの、7日連続にわたる、外科的に留置されたカテーテルを介した連続(24時間/日)の静脈内注入によるmCBS・Naの投与により、効力及び塩レベルに関する補正後の5575mg/kg/日のmCBS(遊離塩基)で1匹の雌が死亡した。

【0381】

血漿中濃度対時間のデータは、mCBSの定常状態の濃度が5時間～96時間(又は168時間)の注入間隔にわたり維持されたことを示す。AUC5～96時間及びC_{ss}の平均(±SEM)値は、用量と共に直線的に増加した。

【0382】

5575mg/kg/日においてmCBS(遊離塩基)で処理した両方の性別の動物では、摂食量の減少と相関して、体重増加の減少が認められた。用量≥3484mg/kg/日での両方の性別の動物において、白血球系統の増加が認められ、5575mg/kg/日での雄では、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積及び平均赤血球ヘモグロビン濃度の低下と、網状赤血球の増加とが認められた。用量≥2178mg/kg/日での雄において及び用量≥3484mg/kg/日での雌において、活性化部分トロンボプラスチン時間の増加が認められた。5575mg/kg/日で投与した雄では、肝酵素、アラニンアミノトランスフェラーゼ及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ並びにコレステロール及びトリグリセリドが増加した。加えて、5575mg/kg/日での両方の性別の動物において、尿素が増加し、且つ総タンパク質及びアルブミンが減少した。

【0383】

腎臓では、≥2178mg/kg/日のmCBS(遊離塩基)で処理した動物において、近位尿細管の空胞化/粗鬆化を両側で観察した。この所見(単純な尿細管の空胞化/粗鬆化)は、いかなる他の病理学的変化とも関連していなかった。腎臓の顕微鏡的所見は、腎臓重量の増加と相関していた。

【0384】

脾臓では、≥1394mg/kg/日のmCBS(遊離塩基)で処理した動物において、赤色髄でのアポトーシス細胞の増加と関連する泡沫状マクロファージの蓄積を観察した。

。これらの脾臓の変化は、間質細胞の過形成、白色髄（胚中心）の細胞充実性／サイズの増加、莢膜線維化及び造血の増加をときに伴った。脾臓の顕微鏡的所見は、脾臓重量の増加と相関していた。

【0385】

肝臓では、 $\geq 1394 \text{ mg/kg/day}$ の mCBS（遊離塩基）で処理した動物では、（ $\geq 1394 \text{ mg/kg/day}$ の）類洞並列細胞の増加、（ 5575 mg/kg/day の）髓外造血と関連することが多い泡沫状 Kupffer 細胞の蓄積が認められた。加えて、 $\geq 2178 \text{ mg/kg/day}$ の mCBS（遊離塩基）で処理した動物では単細胞壊死が見られ、 2178 及び 5575 mg/kg/day で処理した動物では、限局性又は多発性の巣状壊死が認められた。 5575 mg/kg/day 群では、雌と比べて雄で肝変化が顕著であり及び／又は頻発しており、mCBS に十分に曝露された両方の雄の動物は、最小～中程度の肝変化を示した。

10

【0386】

様々なリンパ節（気管支、下顎、縦隔、腸間膜、脾臓、肝臓及び／又は耳介）では、 $\geq 1394 \text{ mg/kg/day}$ の mCBS（遊離塩基）で処理した多くの動物において、泡沫状マクロファージの蓄積を観察した。

【0387】

（脾臓及びリンパ節での）泡沫状マクロファージの蓄積、（肝臓での）泡沫状 Kupffer 細胞の蓄積及び（腎臓での）近位尿細管の空胞化／粗鬆化の所見は、試験物 mCBS 及び／又はその分解生成物が、（脾臓、肝臓及びリンパ節での）単核貪食細胞系に捕捉され且つ腎尿細管上皮に取り込まれる可能性が最も高かったことを示唆する。従って、いかなる特定の理論又は特定の作用様式に拘束されることなく、本出願人らは、これらの所見が、試験物及び／又はその分解生成物の食作用及び排除の結果として、単核貪食細胞系及び腎臓の適応変化を表している可能性が最も高いと推論した。加えて、脾臓での他の所見〔アポトーシス細胞の増加、間質細胞の過形成、白色髄（胚中心）の細胞充実性／サイズの増加、造血の増加及び莢膜線維化〕並びに肝臓での他の所見（類洞並列細胞の増加及び髓外造血）も、活性化された貪食細胞系への適応反応であると本出願人らは推論した。

20

【0388】

しかしながら、 2178 、 3484 及び 5575 mg/kg/day （遊離塩基）で認められた肝臓の単細胞壊死は、潜在的に有害であると考えられた。加えて、 2178 及び 5575 mg/kg/day では、肝臓の限局性又は多発性の巣状壊死が認められた。巣状壊死は、 3484 mg/kg/day で処理した動物では見られず、自然に生じる可能性があるが、この所見を mCBS で処理した動物のみで観察したという事実を考慮すると、試験物との関連性を排除できない。

30

【0389】

結果として、 $\geq 2178 \text{ mg/kg/day}$ （遊離塩基）で肝臓において観察した病理組織学的変化に起因して、この研究では、mCBS の無有害作用量（NOAEL）は 1394 mg/kg/day （遊離塩基）であると決定した。

【0390】

実施例 10：イヌにおける最大 14 日連続の長期間にわたる連続 IV 注入後の mCBS の投与量及び毒性のインビボでの調査

40

この実施例は、14 日の期間にわたるビーグル犬への連続 IV 注入により投与した場合の、mCBS の用量範囲及び毒性の調査のインビボでの研究を概説する。この実施例は、イヌにおける mCBS のこの集中投与レジーム下において、14 日にわたる 2788 mg/kg/day の mCBS の連続静脈内注入（48 時間にわたる 24 時間／日）は良好な耐容性を示しており、死亡率、臨床観察、体重、摂食量、臨床病理（血液、凝固及び臨床化学）、臓器重量又は巨視的評価への影響がなかったことを示す。

【0391】

イヌにおける mCBS の連続注入

要約すると、この研究は、14 日連続の注入イヌ研究で使用するために mCBS の最大

50

用量を選択することを目的として、連続注入によるイヌにおけるmCBSの用量範囲を調べた。同様に、選択した用量は、MTD又は少なくとも300ug/mlのmCBS（遊離塩基）血漿レベル（即ち目標ヒト血漿レベルの約3倍）をもたらすものであった。

【0392】

特に、ビーグル犬に最大4回の用量レベルにわたり1回の用量レベル当たり48時間で、外科的に留置されたカテーテルを介した連続（24時間/日）静脈内注入により投与した場合における試験物mCBSの最大耐量（MTD）を決定するためにもこの研究を行った。

【0393】

フェーズ1：用量の段階的増大

mCBS用量製剤を、下記の表15で説明しているように、最大4回の用量レベルにわたり1回の用量レベル当たり48時間での連続（24時間/日）静脈内注入により、ビーグル犬に投与した。

【0394】

【表18】

表15:外科的に留置されたカテーテルを介した連続の静脈内注入によりビーグル犬に投与したmCBS(ヘプタナトリウム塩mCBS・Naの形態)の投与製剤。

群番号	群名称	研究 日数	用量レベル (mg/kg/日)*	用量濃度 (mg/mL)*	補正された 用量レベル (mg/kg/日)**	補正された 用量濃度 (mg/mL)**	注入速度 (mL/kg/時間)	注入 持続時間 (時間)	動物の数	
1	低用量	1~3	480	20	348	14.5	1	48	1	1
	中用量	3~5	960	40	697	29.0	1	48		
	高用量	5~7	1920	80	1394	58.1	1	48		
	高用量2	7~9	3840	80	2788	58.1	2	48		

*用量のレベル及び濃度を、効力に関して補正していない。

**用量のレベル及び濃度を、0.726の補正係数で効力及び塩含有量に関して補正した後のmCBS(遊離塩基)に関して表す。

【0395】

この研究のこのフェーズ中にモニタリングしたパラメータには、死亡率、臨床観察、体重及び摂食量が含まれた。下記の時点でmCBS血漿レベルを確認するために、各動物から一連の血液サンプルを採取した：各用量レベルの注入の開始後24及び48時間。同様に、1日目に、3日目、5日目及び7日目の新たな用量レベルの投与前且つ9日目に、臨床病理評価（血液、凝固及び臨床化学）のために各動物から血液サンプルを採取した。

【0396】

最高用量レベルまでの段階的投与後、用量制限毒性（有害臨床症状）は認められず、従って、最大耐量（MTD）は、48時間にわたる連続（24時間/日）の静脈内注入により投与した2788mg/kg/日のmCBSであると見なした。定常状態の血漿中濃度（C_{ss}）が、ヒトでの目標血漿中濃度と比べて3倍高い300μg/mLよりも高かったことから、この用量をさらに段階的に増大させなかった。

【0397】

各時点で全ての動物から採取した血漿サンプル中において、定量可能なレベルのmCBSが検出され、これは、動物にmCBSが適切に投与されることを示した。定常状態の血漿中平均濃度（C_{ss}）は53.8~358μg/mLの範囲であり、mCBSは222~450mL/時間/kgの速度で除去された（CL）。

【0398】

イヌにおけるmCBSの連続注入

要約すると、この研究は、上記のSTX-102研究で特定した最大耐量（MTD）を使用して、イヌにおけるmCBSの連続注入を調べた。

【0399】

MTD (2788 mg/kg/日)の確認後、イヌをこの研究のフェーズ2に移し、下記の表16に示すように、さらなる6日の連続注入にわたり、投与をMTDで再開した。

【0400】

【表19】

表16:さらなる6日にわたる、STX 102で使用したビーグル犬への連続静脈内注射により投与した最大耐量であるとSTX-102研究で特定したmCBS(ヘプタナトリウム塩mCBS・Naの形態)の投与製剤。

群番号	用量レベル (mg/kg)*	用量濃度 (mg/mL)*	補正された用量 レベル(mg/kg)**	補正された 用量濃度 (mg/mL)**	注入速度 (mL/kg/時間)	注入 持続時間	動物の数	
							雄	雌
1	3840	80	2788	58.1	2	6日 (144時間)	1	1

*用量のレベル及び濃度を、効力に関して補正していない。

**用量のレベル及び濃度を、0.726の補正係数で効力及び塩含有量に関して補正した後のmCBS(遊離塩基)に関して表す。

【0401】

この研究のこのフェーズ中にモニタリングしたパラメータには、死亡率、臨床観察、体重、摂食量、臨床病理（血液、凝固及び臨床化学）並びに臓器重量の変化が含まれた。下記の時点で各動物から毒物動態学的分析のための一連の血液サンプルを採取した：注入の開始後24及び48時間、注入の終了直前、注入の終了後15、30分及び1、1.5、2、3、4、6、24時間。

【0402】

さらなる6日の連続注入の完了及び最後の毒物動態学的血液サンプルの採取後、8日目に全ての動物を安楽死させて剖検検査にかけた。全ての動物の肝臓及び腎臓に対して組織学的検査を実施した。

【0403】

6日（144時間にわたる）2788 mg/kg/日でのmCBSの連続静脈内注入（48時間にわたる24時間/日）は良好な耐容性を示し、死亡率、臨床観察、体重、摂食量、臨床病理（血液、凝固及び臨床化学）、臓器重量又は巨視的評価に影響はなかった。

【0404】

顕微鏡的所見として、腎臓の腎近位尿細管の空胞化／粗鬆化及び肝臓の泡沫状Kupffer細胞の蓄積が挙げられたが、非有害性又は適応性と考えられた。

【0405】

毒物動態学的分析は、定常状態の血漿中濃度（ C_{ss} ）が223～246 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であり、 $AUC_{0\sim144}$ （ $AUC_{0\sim168}$ ）が43800（44100）～48300（48800）時間* $\mu\text{g/mL}$ の範囲であることを示した。注入終了後、mCBS血漿中濃度は、両方の動物に関して約1時間の推定 $t_{1/2}$ 値で急速に低下した。mCBSは、472～522 mL/時間/kgの速度で除去された（ CL ）。分布容積（ V_z ）は740～741 mL/kgの範囲であり、これは、mCBSが組織間に広く分布していることを示唆する。性別に関する特筆すべき差異はなかった。

【0406】

実施例11～22：セロビオースサルフェート及びmCBSの比較

下記の研究では、セロビオースサルフェート（CBS）及びmCBSを比較する。mCBSはCBSと比べてはるかに化学的に安定であり、その結果、より優れた薬物候補を示す。実施例11～22で使用される方法論を下記に記載する。

【0407】

下記の実施例（11～22）に関する方法及び材料

ヒト対象。全てのヒト関連の研究は、ANU Health Human Research Ethics Committeeの承認を受けた。インビトロでの研究のための赤血球及び血小板の供給源として、健康な成人ドナーを使用した。

10

20

30

40

50

【0408】

動物。全ての動物実験は、Australian National University Animal Experimentation Ethics Committeeの承認を受けた。病原体フリーの雄及び雌のC57BL/6マウス（6～8週齢）、雌のBALB/cマウス（5～6週齢）並びに雄のWistarラット（体重250～350g）を、Australian National UniversityのAustralian Phenomics Facilityから得た。

【0409】

細胞系統及び細胞培養条件。ヒト微小血管内皮細胞-1（HMEC-1）（血液型Oであり、そのためヒト血清中の抗血液型抗体と反応しない）を、ATCCから供給され、10%の熱不活性化ウシ胎仔血清（FCS）、2mMのL-グルタミン、100IU mL^{-1} のペニシリン及び100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のストレプトマイシンが補充されたMCDB 131培地中で培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を、既に説明されているように（Jaffe, E. A. *Biology of endothelial cells*. (Martinus Nijhoff Publishers; Distributors for the United States and Canada, Kluwer Boston, 1984)、初代培養物から確立し、20%のFCS、2mMのL-グルタミン、100IU mL^{-1} のペニシリン、100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のストレプトマイシン、130 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のヘパリン及び1.2 mg mL^{-1} の内皮細胞増殖用サプリメント（Sigma-Aldrich）が補充されたMedium 199中で培養した。チャイニーズハムスター卵巣（CHO）-K1細胞並びにHS及びGAGが欠損しているキシロトランスフェラーゼ（xylotransferase）-1-欠損CHO-K1細胞（pgsA-745細胞）を、ATCCから供給され、5%のFCS及び抗生物質が補充されたRPMI-1640培地中で増殖させた。全ての細胞系統を37℃で5%CO₂及び周囲O₂下でインキュベートし、MycoAlert Assayキット（Lonza）を使用して、マイコプラズマに関して繰り返し試験した。

【0410】

ヒストンによって媒介される細胞毒性のアッセイ。子牛胸腺ヒストン（Sigma-Aldrich）の細胞毒性を決定するために、様々な濃度のヒストン（100～800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）を、96ウェルプレート中のHMEC-1又はHUVEC（1×10⁶ mL^{-1} ）の懸濁液に添加し、37℃で1時間にわたりインキュベートした。次いで、細胞を、死滅細胞を検出するためにヨウ化プロピジウム（PI；2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）（ThermoFisher Scientific）と共に、且つ生存細胞を検出するためにCalcein-AM（0.04 μM ）（ThermoFisher Scientific）と共に37℃で5分にわたりインキュベートし、氷上に置き、拡張データ図1に描かれているゲーティング戦略を使用するフローサイトメトリーにより、死滅細胞及び生存細胞の割合を決定した。阻害アッセイでは、HMEC-1を、様々な濃度の化合物（12.5～400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）の存在下で37℃において1時間にわたりヒストン（400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）と共にインキュベートした後、PI及びカルセイン-AMを添加した。次いで、各化合物濃度でのHMEC-1細胞毒性を、式：

【数1】

$$\text{細胞毒性(\%)} = \frac{\text{死滅(化合物及びヒストン)} - \text{死滅(細胞のみ)}}{\text{死滅(ヒストンのみ)} - \text{死滅(細胞のみ)}} \times 100$$

に基づいて決定し、次いで各ポリアニオンのIC50値を、最良適合線（line of best fit）に基づいて決定した。いくつかの実験では、96ウェルプレート中のHMEC-1のコンフルエントな単層を、希釈剤のみ（生理食塩水）、ヒストンのみ（400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）又はmCBSの存在下でのヒストン（100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）と共に、1

時間にわたり血清フリーMCDB131培地中でインキュベートし、次いでLeica SP5共焦点顕微鏡を使用して、カルセイン-AM又はPIの取り込みにより、生存細胞及び死滅細胞それぞれを検出した。HMEC-1の懸濁液も、他(Khanna, M., Ranasinghe, C., Jackson, R. & Parish, C. R. Heparan sulfate as a receptor for poxvirus infections and as a target for antiviral agents. J Gen Virol, doi:10.1099/jgv.0.000921 (2017))で報告されているように、フラボバクテリウム(Flavobacterium)ヘパリナーゼ(HPNSE)I、II及びIII(Sigma-Aldrich)又はヒト血小板ヘパリナーゼ(HPSE)(Freeman, C. & Parish, C. R. Human platelet heparanase: purification, characterization and catalytic activity. Biochem J 330 (Pt 3), 1341-1350 (1998))による消化により、細胞表面HSを枯渇させ、次いでHMEC-1に関して上記で説明したように、ヒストンによって媒介される細胞毒性への感受性を調べた。同様に、野生型CHO-K1の懸濁液及びHS/GAG欠損pgsA-745 CHO-K1細胞の懸濁液を、ヒストンによって媒介される細胞毒性への感受性に関して比較した。

【0411】

脂質二重層アッセイ。既に説明されているように(Rebeck, R. T. et al. The beta(1a) subunit of the skeletal DHPR binds to skeletal RyR1 and activates the channel via its 35-residue C-terminal tail. Biophys J 100, 922-930, doi:10.1016/j.bpj.2011.01.022 (2011).)調製し、150mM又は250mMのKCl(pH約5.5)溶液に対称的に分離した人工脂質二重層である。二重層にヒストン(1μM、15.2μgml⁻¹)を単独で添加したか、又は約20℃での10μMのCBS(3.5μgml⁻¹)又は10μMのMTS(5.1μgml⁻¹)と一緒に0.5~3時間のインキュベーション後に添加した。ヒストンの添加後、この二重層が破れるか又は実験が終了するまで、電流を連続的に記録した。

【0412】

内皮細胞におけるカルシウム流動研究。RPMI-1640培地中のHMEC-1($2 \times 10^7 \text{ml}^{-1}$)を60分にわたり37℃でIndo-1 AM(5μM)(ThermoFisher)と共にインキュベートした。(Tellam, R. L. & Parish, C. R. The effect of sulfated polysaccharides on the free intracellular calcium ion concentration of lymphocytes. Biochim Biophys Acta 930, 55-64 (1987) & Weston, S. A., Tellam, R. L. & Parish, C. R. Dextran sulfate induces changes in the free intracellular calcium ion concentration of a subpopulation of immature thymocytes. Immunol Cell Biol 69 (Pt 6), 369-376, doi:10.1038/icb.1991.53 (1991))。5%のFCSが補充されたRPMI-1640培地による3回の洗浄後、細胞を、10mMのHEPESが補充された氷冷HEPES緩衝生理食塩水(NaCl 8g l⁻¹、KCl 0.4g l⁻¹、CaCl₂ 0.2g l⁻¹、MgCl₂·6H₂O 0.2g l⁻¹、D-グルコース 1.8g l⁻¹、pH7.4)に $4 \times 10^6 \text{ml}^{-1}$ で再懸濁させた。この細胞懸濁液を氷上で保持し、3時間以内に使用した。フローサイトメトリーを使用して、細胞内Ca²⁺流動をモニタリングした。細胞を予め平衡化し、加熱水浴に接続された外部シース(external sheath)を使用して、分析中に37℃で維持した。(FSC/SSC光散乱に基づく)細胞残屑及び塊状の細胞の排除後、新規の化

10

20

30

40

50

化合物の存在下／非存在下でのヒストン添加前2分にわたり、基底 Ca^{2+} レベルをモニタリングした。一定の流速（約300事象／秒）でヒストン添加の1、4及び10分後に Ca^{2+} レベルを測定した。 Ca^{2+} 流動を Ca^{2+} 非結合Indo-1に対する Ca^{2+} 結合Indo-1の幾何平均蛍光強度（GMFI）の比率の増加として決定した。

【0413】

インビトロでの赤血球の顕微鏡観察、凝集、脆弱性及び変形能のアッセイ。ヒト赤血球のヒストンによって媒介される凝集及び様々な化合物によるこの凝集の阻害を、本発明者らの一部により既に報告されているように（Kordbacheh, F., O'Meara, C. H., Coupland, L. A., Lelliott, P. M. & Parish, C. R. Extracellular histones induce erythrocyte fragility and anemia. *Blood* 130, 2884–2888, doi:10.1182/blood-2017-06-790519 (2017) を参照されたい）、前方及び側方散乱パラメータ又は赤血球自己蛍光のいずれかに基づくフローサイトメトリーと、以前に説明されているような（Yabas, M. et al. Mice deficient in the putative phospholipid flippase ATP11C exhibit altered erythrocyte shape, anemia, and reduced erythrocyte life span. *J Biol Chem* 289, 19531–19537, doi:10.1074/jbc.C114.570267 (2014)）走査型電子顕微鏡とにより検出した。同様に、阻害剤の存在下又は非存在下でヒストンによって誘発される赤血球の脆弱性を、本発明者らの一部により既に報告されているような（Kordbacheh, F., O'Meara, C. H., Coupland, L. A., Lelliott, P. M. & Parish, C. R. Extracellular histones induce erythrocyte fragility and anemia. *Blood* 130, 2884–2888, doi:10.1182/blood-2017-06-790519 (2017) を参照されたい）せん断ストレスアッセイを使用して定量した。最後に、ヒストンの存在下での赤血球の変形能の低下及びこのプロセスへの阻害剤の効果を、人工ヒト脾臓を通る赤血球の通過を測定することにより評価した（Deplaine, G. et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood* 117, e88–95, doi:10.1182/blood-2010-10-312801 (2011) を参照されたい）。

【0414】

インビトロでの血小板の凝集及び脱顆粒のアッセイ。凝集研究のために、室温での2段階遠心分離（20分にわたる200×g、次いで15分にわたる血小板リッチの血漿800×g）により、クエン酸Naバキュテナ中に採取したヒト全血から血小板を単離し、血小板ペレットを、カルシウム及びマグネシウムを含むハンクス平衡塩類溶液に再懸濁させ、ヒストンを添加し、示したそれぞれの濃度において化合物の存在下／非存在下でインキュベートした。血小板の特徴的なlog FSC対log SSC識別を使用するフローサイトメトリーにより、ヒストンへの15分間の曝露後の血小板凝集の程度に関してサンプルを評価し、log FSCの幾何平均の増加は血小板凝集を示す。

【0415】

血小板活性化アッセイのために、クエン酸Naバキュテナ中に採取した全血を、Chrono-Lume試薬（Chrono-Log Corp）を用いたChrono-Log Model 700の発光モードを使用して、血小板の脱顆粒をモニタリングした。インサイチュでスターラーバーにより、予め温めた血液（420μl）に生理食塩水（300μl）を添加した。次いで、Chrono-Lume試薬（100μl）を添加し、2分にわたりインキュベートした後、水で希釈したヒストン±化合物を、示した濃度において180μlの総量で添加した。結果を、ヒストン+生理食塩水コントロールの割合として

算出したATP放出として表した。

【0416】

インビボでのヒストン毒性アッセイ。BALB/c雌マウス(5~6週齢)(C57BL/6マウスと比べて、この若い年齢で、ヒストンによって誘発される貧血を起こし易く且つIV注射し易い)に、示した濃度での試験化合物のi.p.注射の10分後にリン酸緩衝生理食塩水中のヒストン(50mg kg^{-1})をi.v.注射した。ヒストン注射の10分後に眼窩後出血(retro-orbital bleed)を実施し、採取した血液を酸性クエン酸デキストロース(ACD)に添加し、この10分血液サンプルを、ADVIA 2120i Hematology Analyzerを使用して血小板及び赤血球の含有量に関する血液分析にかけた。ヒストン注射の10分後に脾臓も摘出し、ヘモグロビンアッセイキット(Sigma-Aldrich)を使用して脾臓ヘモグロビン含有量を定量した。4時間血液サンプルの場合、雄C57BL/6マウス(6~8週齢)に、上記のように試験化合物及びヒストンを注射し、その後の生化学的試験のために血漿を単離して凍結保存し、肝臓損傷のマーカー(アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALT)、腎臓損傷のマーカー(クレアチニン、Crea)及び一般組織損傷のマーカー(乳酸デヒドロゲナーゼ、LDH)を、Department of Pathology, The Canberra Hospitalにより測定した。

10

【0417】

マウス深部静脈血栓症(DVT)モデル。使用する手順は大部分が既に説明されている通りである(Brill, A. et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. J Thromb Haemost 10, 136-144, doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x (2012)を参照されたい)。簡潔に説明すると、8週齢の雄C57BL/6マウスに麻酔して開腹切開を行い、腸を体外から出し、次いで腹部大動脈からの緩やかな分離後、腎静脈直下の下大静脈(IVC)を約10%の開存性まで結紮し、全ての関連するIVC支流を結紮した。腹膜及び皮膚を閉じ、その後、全てのマウスに尾静脈を介してヒストン(10mg kg^{-1})又は等量の生理食塩水をi.v.注射し、続いて5分後に試験化合物(50mg kg^{-1})又は生理食塩水をi.v.注射した。マウスを48時間にわたりモニタリングし、その後、再び麻酔して再び開き、IVC狭窄の遠位で発症していた任意の血栓を、分析のために取り出した。偽手術するコントロール動物を開腹手術し、IVCを90%結紮したが、この結紮をIVCの閉塞直後に除去した。

20

30

【0418】

敗血症に関するラット盲腸結紮及び穿刺(CLP)アッセイ。CLPアッセイを、既に説明されているように(Hubbard, W. J. et al. Cecal ligation and puncture. Shock 24 Suppl 1, 52-57 (2005)を参照されたい)雄のWistarラットで実施した。生理食塩水に溶解させた試験化合物(50mg kg^{-1})又は等量の生理食塩水のみ(コントロールコホート)を、CLPの5分前且つ20時間での実験停止まで術後5、10及び15時間にi.p.投与した。偽CLPラットに同一の手順を行ったが、盲腸を結紮していないか又は穿刺しておらず、このラットに、上記と同じ時間に生理食塩水を投与した。実験期間の終了時(20時間)又は病的状態が倫理上安楽死を必要とした場合、ラットを麻酔し、後のDepartment of Pathology, The Canberra Hospitalによる肝臓(ALT)及び腎臓(クレアチニン)の機能の分析のために、心臓穿刺によりEDTA中に採血した。生理食塩水で処理したコントロールCLP動物の血液サンプル内では(EDTAの存在にもかかわらず)血餅が形成される傾向があるため、全ての動物からの血漿サンプルの分析は成功しなかった。

40

【0419】

ラット心臓IRIモデル。使用方法は、既に公開されている手順の組み合わせに基づく(Takada, Y., Hashimoto, M., Kasahara, J., Ai

50

hara, K. & Fukunaga, K. Cytoprotective effect of sodium orthovanadate on ischemia/reperfusion-induced injury in the rat heart involves Akt activation and inhibition of fodrin breakdown and apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 1249–1255, doi:10.1124/jpet.104.070839 (2004) & Hale, S. L., Dae, M. W. & Kloner, R. A. Hypothermia during reperfusion limits 'no-reflow' injury in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 59, 715–722 (2003) を参照されたい)。雄のWistarラットをイソフルレンで麻酔し、気管切開術により挿管し、 $1\text{ ml } 150\text{ g}^{-1}$ の一回換気量及び65回の呼吸 分^{-1} の呼吸数で人工呼吸した。酸素補給を約30%の FiO_2 で供給した。左心室を可視化し得るように、左半開胸術を実施した。左冠動脈叢(LCA)を、30分にわたる再灌流前に30分にわたり非侵襲的スネアを使用して閉塞させた。虚血を心筋充血により確認した。試験化合物(30 mg kg^{-1})又は等量($200\text{ }\mu\text{L}$)の生理食塩水を、再灌流フェーズのためのスネアの開放の5分前に、左心室の内腔(吸引で確認)に注射した。

【0420】

再灌流(30分)の終了時、左心室の内腔にチオフラビンS(体重の $1\text{ ml } 200\text{ g}^{-1}$)を緩やかに注射して、虚血ゾーン(IZ)内の微小血管閉塞(MVO)の領域を定義した。このIZ領域を、非侵襲的スネアの再閉塞と、CD-6800(Unisonics)超音波処理器を使用する超音波処理による、溶液内に分散された左心室への青色微粒子(Unisperse Blue, BASF)の注入とにより決定した。次いで、心臓を胸部から切除し、等張生理食塩水ですすぎ、心室間線に対して直角において非侵襲的スネアの遠位で2mm切片を切り取った。この方法は、秤量し且つ紫外線(MVOの領域)下及び明るい光(IZ領域)下で撮影した(Sony Handycam(登録商標), Zeiss 60倍光学ズーム)4枚の心筋切片を作製した後、塩化テトラゾリウム(TTC)中でインキュベートして、壊死心筋の領域を決定した。Planimetry(Image J, Freeware)を使用して、IZ、MVO及び壊死の領域を定量した。

【0421】

ラット虚血再灌流組織弁モデル。用いる手順は大部分が既に説明されている方法に基づく(Askar, I., Oktay, M. F., Gurlek, A. & Bac, B. Protective effects of some antineoplastic agents on ischemia-reperfusion injury in epigastric island skin flaps. *Microsurgery* 26, 193–199, doi:10.1002/micr.20193 (2006))。簡潔に説明すると、雄のWistarラットに麻酔し、局所的に脱毛し、 $3\text{ cm}\times 6\text{ cm}$ の筋膜弁を、血管茎を無傷のままにして摘出した。下腹壁動脈をクランプし、下の組織からの酸素拡散を防ぐために、この弁の下に細かいゴムシートを置き、この弁を所定の位置に再縫合した。この弁に血流が戻ることを可能にするために、適用の10時間後にクランプを除去した。試験化合物(50 mg kg^{-1})又は生理食塩水を、クランプ適用の5分前及びこのクランプの除去の5分後にi.p.投与した。ラットを、術後24時間及び48時間でこのラットに追加の化合物又は生理食塩水をi.p.投与している72時間の合計実験期間にわたりモニタリングした。「コントロールクランプなし」ラットは、摘出して再縫合前にゴムを下に置いた組織弁を有したが、血管はクランプされておらず、他のラットと同じ時点で生理食塩水を投与した。実験期間の終了時、この弁の生存率を黒色の壊死領域又は発赤領域対ピンク色の生存領域の割合で決定した。エリザベスカラーの適用及び沈降剤としての鎮痛の使用にもかかわらず、少数のラットを、その弁の自己共食いを繰り返す際に早期に安楽死させなければならなかった。

【0422】

多発性硬化症のEAEモデル。1日目に、完全フロイントアジュバント（Sigma）中の $115\mu\text{g}$ ／マウスのミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG35-55 genscript）による皮下免疫化により、8～12週齢のC57BL／6マウスにおいてEAEを誘発した。0日目及び2日目に、PBS中の 300ng ／マウスの百日咳毒素（List Biological Laboratories）を腹腔内（i.p.）注射した。PBS中の $50\text{mg}/\text{kg}$ のmCBS又はPBSのみ（ビヒクル）を、0～9日目に毎日i.p.投与した。マウスを疾患の徴候に関して毎日モニタリングし、疾患の身体的症状に基づいて0～5のスケールでスコア化した。マウスを下記のようにスコア化した：0、臨床的に正常；1、尾の弛緩及び／又は運動失調；2、後肢脱力；3、後肢麻痺；4、後肢及び前肢の麻痺；並びに5、瀕死。

10

【0423】

統計解析。Prismソフトウェア（Graphpad Software）を使用して統計試験を実施してグラフを作成し、使用した試験の詳細は図の凡例に含まれている。

【0424】

mCBSの生物学的効果のインビトロでの証拠

下記の実施例11～14は、遊離細胞外ヒストンの中和におけるmCBSの生物学的効果のインビトロでの証拠を提供する。

【0425】

実施例11：mCBSは内皮細胞をヒストン毒性から保護する

20

この実施例は、mCBSがヒト内皮細胞をヒストン損傷から保護すること及び内皮細胞へのヒストンによって誘発される損傷に対するこのmCBSの保護効果が濃度依存的であることを示す。この実施例は、mCBSが、ヒストンに曝露された内皮細胞の一部で損傷を反転させ得ることも示す。

【0426】

内皮細胞は血管の内腔に並んでおり、且つ血管系の完全性に必須であり、血液細胞を通過させるために基礎組織間に多くのシグナルを生じ、血液が流れる抗凝固表面として作用する。ヒストンは内皮細胞の細胞膜を損傷してこの内皮細胞の死滅を誘発し、そのため、微小血管系の完全性及び内皮の抗凝固特性が失われている。これにより血餅が広範に形成され、重要な臓器への酸素及び栄養素を含む液体の送達に損なわれ、次にこの臓器が損傷を受けて不全になる。

30

【0427】

mCBSがヒト微小血管内皮細胞（HMEC）をヒストン損傷から保護するかどうかを評価するために、2種の蛍光色素カルセイン-AM及びヨウ化プロピジウム（PI）を使用して、内皮細胞の健康状態をインビトロで決定した。健康な生存細胞はカルセインAMを取り込み且つPIを排除したが、損傷しているか又は死滅した細胞では逆であった。図5に示すように、これらの色素の取り込み／排除を、フローサイトメトリーを使用して測定し、且つ共焦点顕微鏡を使用して可視化した。

【0428】

図5に関して、培養したHMECを、水体积等量で（図5のパネルA及びE）、ヒストン $400\mu\text{g}/\text{mL}$ で（図5のパネルB及びF）、mCBS $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 及びヒストン $400\mu\text{g}/\text{mL}$ で（図5のパネルC及びG）又はmCBS $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 及びヒストン $400\mu\text{g}/\text{mL}$ で（図5のパネルD）、60分にわたり処理し、次いで色素カルセイン-AM及びPIで標識し、フローサイトメトリー（パネルA、B、C及びD）又は共焦点顕微鏡（パネルE、F及びG）を使用して、色素取り込みの程度に関して分析した。図5に示すように、培養して未処理のヒト微小血管内皮細胞（HMEC）は大部分が生存しており、76%がカルセイン-AMを含み、19%がPIを含んでいた（図5A）。しかしながら、ヒストン（ $400\mu\text{g}/\text{mL}$ ）に曝露した場合、37%が生存可能なままであったが、56%がPIを取り込んだ（図5B）。ヒストンへの曝露前にHMECにmCBS（ $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を添加した場合、74%が生存可能なままであり、PI取り

40

50

込みに基づいて20%が死滅しており、そのため、mCBSは、ヒストンによって媒介される傷害からHMECを保護し得る(図5C)。この保護効果は濃度依存的であり、より低い量のmCBS(25 µg/mL)では保護のレベルが低下している(図5D)。HMECへのヒストン及びmCBSの効果を、健康な未処理内皮細胞(図5E)及びヒストンに曝露したmCBS処理内皮細胞が、緑色の蛍光カルセイン-AM色素を蓄積するが(図5G)、未処理のヒストン曝露内皮細胞は赤色の蛍光色素PIを取り込む(図5F)共焦点顕微鏡を使用しても見ることができる。

【0429】

培養したHMECを、上昇する濃度のmCBSの添加後に400 µg/mLのヒストンに曝露し、次いでフローサイトメトリーを使用してカルセイン-AM(生存)又はPI(死滅)の取り込みに関して分析した。HMECに関するヒストンの損傷効果に対するmCBSの用量依存的な保護効果を図6に示し、図6は、mCBS濃度の上昇により、生存細胞(カルセイン-AMの取り込み)が増加し且つ死滅細胞(PI取り込み)が減少したことを示す。従って、これらの結果は、ヒストンによって誘発されるHMECへの損傷に対するmCBSの保護効果が濃度依存的であることを示す。

【0430】

mCBSが、ヒストンへの曝露後の内皮細胞における損傷を反転させ得るかどうかを評価するために、培養したHMECを60分にわたり400 µg/mLのヒストンに曝露し、次いで10分にわたりmCBS(100 µg/mL)で処理し、次いで最後の5分にわたりカルセイン-AM及びPIを添加した。次いで、細胞を、フローサイトメトリーを使用してPI取り込みに関して分析し、結果を図7に示す。結果は、重要なことに、特に臨床状況では、mCBSは、HMECの亜集団におけるヒストンの損傷効果を反転させ得たことも示す。この状況(培養したHMECにヒストンを添加し、次いで60分後に10分にわたりmCBSを添加し、最後の5分にわたりカルセイン-AM及びPIを添加した)では、HMECの約30%が、PI取り込みから、mCBSの処理後にPI排除及びカルセイン-AM取り込みに反転した。

【0431】

実施例12:mCBS及びCBSは、ヒストンによって誘発される赤血球の凝集及び溶解を予防し、減少させ、さらに反転させる

この実施例は、mCBSが、ヒストンによって誘発されるRBC凝集を予防し、ヒストンによって誘発されるRBC凝集を用量依存的に阻害することを示す。さらに、この実施例は、mCBSが、より高いせん断流速及びせん断曝露の持続時間により悪化する効果であるヒストンによって誘発されるRBC脆弱性を阻害することを示す。これ以外にも、この実施例は、mCBSが、溶解及び凝集に対する、ヒストンによって誘発されるRBC感受性を、ほぼ完全に反転させ得ることを示す。

【0432】

赤血球(RBC)は組織への酸素輸送に関与しており、血栓形成の足場として作用する膜タンパク質を提供することにより血餅形成の一因となる。RBCの円盤状の形状及び柔軟な構造は、RBCが狭い毛細血管を通して圧迫して、急速に流れる血流内で経験するせん断力に抵抗することを可能にする。RBCは核を欠いていることから、RBCは、修復又はアポトーシスを介して損傷に応答することができず、代わりに、RBCが変形した場合、脾臓内のマクロファージにより除去される。しかしながら、損傷したRBCは、脾臓に達する前に、RBCの円盤状の形状を失い、従って柔軟性を失う場合があり、そのため、せん断力曝露に起因する血管内溶解を起こし易くなる。敗血症等のヒストンレベルが上昇する疾患では、貧血を観察することが多い。

【0433】

RBCへのヒストンの損傷効果を、この効果を無効にするmCBSの能力と一緒に研究した。ヒストンと共にインキュベートした単離ヒトRBCの初期研究では、フローサイトメトリー及び電子顕微鏡を使用して、有意な凝集を証明した。図8に示すように、このヒストンのRBC凝集効果は、mCBSによる処理によって予防され得た(CBSにより同

10

20

30

40

50

様のデータが見られる)。この場合、単離ヒトRBCを、処理なし後(パネルA及びD)、60分にわたるヒストン(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とのインキュベーション後(パネルB及びE)及びmCBS(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の添加、次いで60分にわたるヒストン(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)への曝露の直後(パネルC及びF)の凝集の程度に関してlog FSC対log自己蛍光(FL-1チャンネル)パラメータを使用するフローサイトメトリーを使用して分析し(図8、パネルA~C)、走査型電子顕微鏡を使用して可視化した(図8、パネルD~F)。図8の結果から明確に観察され得るように、ヒストンによって誘発されるRBC凝集は、mCBSにより予防される。

【0434】

図9に示すように、ヒストンが用量依存的にRBCの凝集を誘発すること、さらにmCBS及びCBSが用量依存的に再びこの凝集を有意に減少させ得ることをさらに確認する後続の実験を行った。具体的には、この場合、単離ヒトRBCを、60分にわたり様々な濃度のヒストン(0、1.25、25、50、100、200、400及び800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)に曝露し、図9Aに示すように、自己蛍光(FL-1)のレベルによりRBC凝集の程度を測定した。次いで、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒストンの添加前に様々な濃度のmCBS及びCBS(0、12.5、25、50、100及び200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)をRBCに添加したことを除いて、これを繰り返した。再び、図9Bに示すように、自己蛍光(FL-1)のレベルによりRBC凝集の程度を測定した。結果は、mCBS及びCBSの両方が、ヒストンによって誘発されるRBC凝集を用量依存的に阻害することを示す。

【0435】

加えて、上昇する濃度のヒストンと共に60分にわたりインキュベートした場合の、増加するせん断力(ピペッティングの速度)及びせん断曝露(ピペッティングの反復)下での溶解に対するRBCの感受性を、ロボットピペッティングシステムを使用して決定した。結果を図10に示す。具体的には、60%の生理食塩水(6:4の比率での通常の生理食塩水:水)で希釈した単離ヒトRBCを、60分にわたり、上昇する濃度のヒストン(0、1.25、25、50、100、200、400及び800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と共にインキュベートし、次いでロボットシステム内において、40回反復で次第に早い流速(mm/秒)に曝露する(図10A)か、100mm/秒の流速で様々な反復のピペッティングに曝露する(パネルB)か、又は様々な濃度(0、12.5、25、50、100及び200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)のmCBSで処理し(図10C)、次いで60分にわたり且つ100mm/秒のせん断流速及び40回ピペッティング反復で400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒストンに曝露した。次いで、各サンプルからの上清を、RBC溶解の程度の指標としてのA540nmでのヘモグロビン含有量に関して測定した。

【0436】

これらの実験を、RBCにベースラインストレスを誘発するために、60%張度の生理食塩水で実施した。540nmで上清中のヘモグロビンレベルを測定することにより、溶解を測定した。これらの結果は、ヒストン濃度の上昇により、増加するせん断力及びせん断曝露下でRBCの溶解に対する感受性が劇的に増加することを示す(図10A及びB)。ヒストン曝露前のmCBS(及びCBS、図示せず)によるRBCの処理は、せん断下において、ヒストンによって誘発される溶解を用量依存的に阻害し得る(図10C)。従って、結果は、ヒストン効果が、より高いせん断流速及びせん断曝露の持続時間により悪化した場合でも、mCBS(及びCBS)が、ヒストンによって誘発されるRBC脆弱性を阻害したことを示す。

【0437】

臨床シナリオをより密接に再現するために、55分にわたるヒストンへの曝露後のmCBSによる5分にわたるRBCの処理により、せん断力下での溶解及び凝集への感受性のほぼ完全な阻害がもたらされることを実証した(図11)。具体的には、単離ヒトRBCを、55分にわたり400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒストンに曝露し、次いで5分にわたり様々な濃度のmCBSに曝露した後(図11A)、せん断力(100mm/秒の流速及び40回ピペッティング反復)を適用し、A540nmにより上清中のヘモグロビンを測定し、フロ

ーサイトメトリーを使用するF L 1での自己蛍光のレベルにより測定してR B C凝集の程度を分析した（図1 1 B）。結果は、m C B Sが、ヒストンによって誘発されるR B Cの溶解及び凝集に対する感受性を反転させ得たことを示す。

【0 4 3 8】

実施例1 3：m C B Sの硫酸化

上述したように、m C B SはC B Sと比べて化学的にはるかに安定しており、その結果、より優れた薬物候補を示す。従って、本発明者らは、活性に関して、C B Sに必要な硫酸化を試験した。H M E C - 1細胞毒性アッセイ（図1 2 b）及びR B C脆弱性アッセイ（図1 2 c）を使用して、C B S化合物のこれらの様々な硫酸化状態（図1 2 a）を試験した際、本発明者らは、抗ヒストン活性には高硫酸化C B Sが必要であると決定しており、なぜなら、たとえ7個のO - 硫酸化部位の5個が占有された場合でも、低硫酸化m C B Sはヒストン阻害活性が最低限であったからである。

【0 4 3 9】

実施例1 4：m C B S及びC B Sは、ヒストンによって誘発される血小板の凝集及び脱顆粒を減少させる

この実施例は、m C B S及びC B Sが、ヒストンによって誘発される血小板の凝集及び脱顆粒を阻害することを示す。

【0 4 4 0】

血小板は、血餅形成において重要な役割を果たし、血管傷害後に血漿凝固タンパク質と相互作用して効果的な栓を形成する。また、血小板は免疫細胞とも相互作用し、免疫細胞の活性化及び感染領域への遊走を支援する。

【0 4 4 1】

従って、本発明者らは、血小板へのヒストンの効果及びこれらの効果を阻害するm C B S及びC B Sの能力を研究した。具体的には、単離して洗浄したヒト血小板を、1時間にわたり様々な濃度のヒストン（例えば0 ~ 1 0 0 0 μ g / m L）と共にインキュベートした後、単一の血小板と凝集した血小板とを識別するためにF S C及びS S Cを使用するフローサイトメトリーにより凝集を分析した（この結果を図1 3 Aに示す）。次いで、（1 5 0 μ g / m Lでの）ヒストンの添加前に、ある範囲の濃度のm C B S及びC B Sを添加したことを除いて、これを繰り返した（図1 3 B）。全血中のヒト血小板を、A T P放出を検出するためにケミルミノメトリーを使用して、上昇する濃度のヒストンの添加後の脱顆粒に関して分析し、陽性コントロールとしてトロンビンを含めた（図1 3 C）。ヒストン（4 0 0 μ g / m L）の添加前に、上昇する濃度のm C B S及びC B Sを添加したことを除いて、この最後のステップを繰り返した（図1 3 Dに示す）。

【0 4 4 2】

得られた結果は、単離血小板は、上昇する濃度のヒストンに曝露された際、フローサイトメトリーにより測定した場合には（図1 3 A）凝集する傾向の上昇を示し、血小板ルミノメトリーによるA T P放出を使用して測定した場合には（図1 3 C）脱顆粒する傾向の上昇を示したことを示す。しかしながら、血小板調製物をm C B S及びC B Sで予め処理した場合、凝集（図1 3 B）及び脱顆粒（図1 3 D）が有意に減少した。対照的に、非硫酸化セロピオース（C B）は阻害活性を有さなかった。

【0 4 4 3】

従って、この結果は、ヒストンが血小板の凝集及び脱顆粒を誘発すること並びにこれらの効果はm C B S及びC B Sにより阻害されることを裏付ける。

【0 4 4 4】

実施例1 5：m C B Sは、ヒストンによる脂質二重層破壊を予防する

次に、本発明者らは、どのようにしてヒストンがその細胞毒性を媒介し、その結果として、C B S及びm C B Sが、ヒストンによって媒介される損傷から細胞を保護するかを調べた。ヒストンは、細胞表面上で一様に発現されるG A G（特にH S）に結合することから、ヒストンは、細胞表面H Sへの結合により、このヒストンの細胞傷害性エフェクター機能を開始させる可能性があると思われた。

【0445】

この考えを試すために、3種の細菌ヘパリナーゼの混合物又はヒト血小板ヘパリナーゼのいずれかとのインキュベーション後のヒストンへの曝露により、HMEC-1細胞の細胞表面HSを枯渇させ、HS除去は、フローサイトメトリーによりモニタリングした場合、これら2種の酵素処理に関してそれぞれ86%及び97%であった。

【0446】

本発明者らは、細菌HS分解酵素又はヒトHS分解酵素のいずれかによるHMEC-1細胞の前処理は、ヒストンによって媒介される細胞毒性への細胞の感受性に影響を及ぼさず、これら2種の酵素による前処理は、HMECの生存率にも影響を及ぼさない(図14a)ことを発見した。この発見を確認するために、本発明者らは、GAG鎖生合成を開始するキシロトランスフェラーゼの変異に起因して細胞表面GAGを欠くCHO細胞系統(pgsA-745)を使用した。親CHO-K1細胞系統と比較して、細胞表面GAGの欠失はヒストンの細胞毒性にほとんど影響を及ぼさず、試験した最高ヒストン濃度では、細胞毒性がごくわずかではあるが有意に減少した(図14b)。そのため、細胞表面GAGは、ヒストンによって媒介される細胞毒性に必須ではない。

【0447】

ヒストンは、脂質二重層と相互作用して損傷を与えることが既に分かっており、細胞透過性タンパク質として作用することも既に分かっている。そのため、本発明者らは、ヒストンが脂質二重層を直接破壊することにより細胞毒性を媒介するかどうかを調べた。

【0448】

この可能性を調べるために、人工脂質二重層を調製し、この二重層を横切る電流の変化により、ヒストン破断に対するこの人工脂質二重層の感受性を検出した。

【0449】

脂質二重層は寿命が有限であり、通常、30~120分のオーダーである。本発明者らの実験では、リアノジン受容体1(RyR1)イオンチャネルタンパク質を含むコントロール脂質二重層は、平均寿命が46±4分であり、ヒストン(1μM)の添加により、この寿命が5.7±1.2分まで顕著に縮まった(図15a)。実際には、47個の二重層の13個(28%)がヒストン添加の0.3~0.5分以内に壊れたのに対して、125個のコントロール二重層の2個のみ(1.6%)が同じ期間で破裂し、より高いヒストン濃度(≥50μM)により、ほとんどの二重層が急速に破裂した(図示しない)。二重層は、CBSが存在する場合にはヒストンにより破裂し難く、平均二重層寿命は、CBSの場合には18±4分及び36±5分まで有意に増加した(図15a)。ヒストン単独(28%)と比較して、CBSの場合、急速な二重層破裂の発生が52個の二重層の3個(5.8%)まで減少した。

【0450】

以前の研究により、ヒストンが、細胞中で非選択的なCa²⁺チャネル及び形質膜の脱分極を誘発し得ることも実証されている。この発見は、ヒストンが細胞表面のリン脂質と直接相互作用して膜の完全性を乱すという概念をさらに支持する。

【0451】

mCBSが、ヒストンによって誘発されるCa²⁺流動に対して細胞を保護するかどうかを調べるために、HMEC-1をCa²⁺感受性色素Indo-1で負荷し、mCBSの存在下又は非存在下においてヒストンでチャレンジし、フローサイトメトリーによりCa²⁺取り込みを測定した(図15b)。ヒストンは、高い細胞内Ca²⁺レベルを示す細胞の集団において約6倍の増加を誘発し、この反応は、ヒストン添加の4~10分後に定常に達する。mCBSの存在により、この反応が実質的に阻害された(図15c)。本発明者らの発見は、ヒストンが細胞の脂質二重層を直接破壊することにより細胞膜に損傷を与え、mCBSは、ヒストンのこの望ましくない性質を中和することを示す。

【0452】

実施例16:mCBSは、最低限の固有の抗凝固活性を有し、ヒストンによって誘発される血漿凝固混乱を減少させる

この実施例は、ヒストンが血液凝固を減少させること及びmCBSが最低限の抗凝固効果を有し、ヒストンによって誘発される血漿凝固混乱を減少させ得ることを示す。

【0453】

ヒストンが血小板の凝固及び脱顆粒を促進し得ることが分かったにもかかわらず、本発明者らは、ヒストンが、内因性経路に関与する因子を介して血漿凝固を特異的に阻害することにより全血凝固のレベルを低下させることも発見した。

【0454】

これを、回転トロンプオエラストメトリ (ROTEM) (図16A) 及び伝統的な血漿ベースの活性化部分トロンビン時間 (APTT) アッセイ (図16B) を使用して実証した。

【0455】

具体的には、ROTEM (図16A) を使用して、全血への増加するヒストン濃度 (0 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の添加により、全てのアッセイで凝固時間 (単位秒で測定) が長くなったが、特にNATEMアッセイ及びINTEMアッセイで長くなった。凝固へのヒストンの同一の抗凝固効果を、血漿ベースの凝固アッセイAPTTを使用して実証した (図16B)。

【0456】

mCBSは硫酸化二糖であることから、本発明者らは、mCBSは、非分画で低分子量の抗凝固ヘパリンのはるかに小さい同類であると考えられ得ると推論した。従って、ROTEMを使用して、mCBS (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の凝固特性を研究した。比較対象として、2種の硫酸化三糖類メレチトース及びマルトトリオースを含めた (図17)。具体的には、NATEM (非活性化) アッセイ、EXTEM (外因性経路活性化) アッセイ、INTEM (内因性経路活性化) アッセイ及びFIBTEM (中和した血小板による外因性経路活性化) アッセイを実施する直前に、全血に、mCBS、マルトトリオース又はメレチトース (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を補充した。データは、水コントロールの倍数増加として表される凝固時間を示し、図17Aに示す。様々な濃度 (0 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のmCBS、メレチトース又はマルトトリオースを補充した全血を、凝固時間に関してNATEMアッセイを使用して分析し、結果を図17Bに示す。次いで、データが20分での血餅振幅を示すことを除いて (パネルBと) 同じことを繰り返した。この結果を図17Cに示す。50及び100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では2種の三糖類により血餅が検出されないことに気付いた。

【0457】

図17に示す結果から、mCBSが、全血凝固への影響が最低限か又は全くないが、2種の硫酸化三糖化合物は、NATEM (非活性化トロンプオエラストメトリ (TEM)) アッセイ及びINTEM (内因性経路活性化TEM) アッセイで検出された有意な抗凝固活性を有することが実証された。NATEMアッセイは、これらの化合物によって誘発される変化に最も敏感であったことから、より低濃度の3種の硫酸化化合物を全血に添加して、抗凝固剤としてのこれらの効力をより明確にした。この分析は、硫酸化三糖類は25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でコントロールの凝固時間を2倍にしたが、同一の結果を達成するために100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のmCBSが必要であったことを示す (図17B)。

【0458】

さらに、mCBSの抗凝固効果とヘパリン及び低分子量ヘパリンであるエノキサパリンとの比較を行った。具体的には、NATEMアッセイを使用して、(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 若しくは10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度での) ヘパリンの添加、(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 若しくは10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度での) エノキサパリンの添加、(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度での) 三糖マルトトリオースサルフェートの添加又は(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度での) mCBSの添加後、全血凝固を測定した。結果を図18に示す。mCBSと、非分画ヘパリン及び低分子量ヘパリン (LMWH) との比較は、LMWH (エノキサパリン) と比較してmCBSの抗凝固活性の110倍の低下を示し、且つ非分画ヘパリンと比較して>750倍の低下を示した。

【0459】

EXTEMアッセイではヒストンが凝固時間を増加させることが分かったが、mCBS

10

20

30

40

50

は同一のパラメータに影響を及ぼさなかったことから、NATEMアッセイを使用して、ヒストンに誘発される凝固の混乱を阻害するmCBSの能力も試験した。この結果を図19に示す。実証されているように、 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ のmCBSの添加により、 400 及び $800\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒストンの両方の抗凝固効果を阻害し得た。比較すると、同量の水は効果がなかった(図19)。従って、この結果は、mCBSが、ヒストンによって誘発される全血凝固の混乱を阻害することを示す。

【0460】

mCBS及びCBSの生物学的効果のインビボでの証拠

実施例17:mCBS及びCBSは、ヒストンによって媒介される傷害から臓器を保護する

この実施例は、mCBS及びCBSが、ヒストンによって誘発される臓器損傷からマウスを保護し得ることを示す。

【0461】

ヒストンのマウスへの静脈内注射により、臓器中に微小血栓が形成されて細胞傷害及び臓器機能障害が引き起こされることが実証されている(Xu et al., Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. Nat Med. 2009 Nov; 15(11):1318-21, 2009)。Xu et al., 2009と同一の敗血症のマウスモデルを使用して、本発明者らは、mCBS及びCBSが、ヒストンによって誘発される臓器障害からマウスを保護し得るかどうかを調べた。マウスに、 $50\text{mg}/\text{kg}$ のヒストン(又は等量のPBS)の静脈注射の10分前に、 6.25 、 25 及び $100\text{mg}/\text{kg}$ の濃度のmCBS若しくはCBS又は等量のPBSを腹腔内注射した。先に述べたように、4時間後、細胞傷害のマーカー(乳酸デヒドロゲナーゼ、LDH)、肝臓機能障害のマーカー(アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALT)及び腎臓機能障害のマーカー(クレアチニン、Creat)の分析のために、眼窩後から血液を採取した。結果を図20に示す。具体的には、これらの結果を使用して、本発明者らは、mCBS及びCBSが、ヒストンによって媒介される傷害から動物を用量依存的に保護し、肝機能及び腎機能の有意な保存が実証された(図20)が、非硫酸化CBは不活性であることを示すことができた。

【0462】

実施例18:mCBSは、ヒストンによって媒介される傷害から血流内の細胞を保護する

この実施例は、mCBSが、マウス中で循環している白血球、血小板及び赤血球のヒストンによって媒介される減少を弱める及び/又は予防することを示す。

【0463】

マウスへのヒストンの注射は、重度の血小板減少症を誘発することも分かっている。従って、本発明者らは、この実施例において、ヒストンの静脈内注射後の血流内の細胞へのmCBSの保護効果を調べた。先の実施例と同一のマウスモデルを使用して、マウスに、 $50\text{mg}/\text{kg}$ のヒストン(又は等量のPBS)の静脈内注射の10分前に $100\text{mg}/\text{kg}$ のmCBS(又は等量のPBS)を腹腔内注射し、次いで10分後に後眼窩出血させた。ADVIA 2120血液システムを使用して、全血を、白血球数、血小板数及び赤血球数並びにヘモグロビン濃度に関して分析した。結果を図21に示す。この結果は、循環している血小板数がヒストン注射の数分以内に有意に減少するだけでなく、白血球、赤血球(erythrocyte)(赤血球(red blood cell))及び血漿中ヘモグロビンレベルも有意に減少することを示した。さらに、ヒストンの前にmCBSを注射した場合、これらのヒストンによって媒介される効果は、完全には消失しないにしても有意に阻害された(図21)。

【0464】

従って、これらの結果は、mCBSが、ヒストンによって媒介される傷害から血流内の細胞を保護することを示す。

【0465】

実施例19: CBS及びmCBSは敗血症を阻害する

本発明者は、次に、中程度及び重度の敗血症のラット盲腸結紮穿孔(CLP)モデルに

10

20

30

40

50

におけるmCBS及びCBSの有効性を調べた。死亡したのはわずかであった(図22A)がSIRS反応が誘発されている中程度の敗血症の例では、mCBS処理により、コントロールCLP群と比較して循環LDHレベルが有意に低下することが実証された(0.6 ± 0.1 及び $1.1 \pm 0.2 \text{ U/L} \times 10^3$ 、 $p = 0.03$; 図22B)。群間にALTレベル又はクレアチニンレベルの差異は認められず、軽症型の敗血症の誘発が裏付けられた(データは示さない)。

【0466】

病的状態がはるかに明白であった重度の敗血症の例では、齧歯類の死亡率は、PBSコントロールと比較して、CBSを投与した動物では有意に低く、実際には、CBS処理群では死亡率はゼロであった(図23A)。重要なことに、広範囲に及ぶ肝臓及び腎臓の損傷を示す、未処理群で検出された高いALTレベル及びクレアチニンレベルは、CBSで処理された動物では見られなかった(図23B)。

【0467】

まとめると、これらの結果は、CBS及びより安定なmCBSは、敗血症及びSIRSのヒストンによって媒介される効果を制限し得、そのため、組織損傷が制限されて末端臓器の機能が保存されることを示す。

【0468】

実施例20：CBS及びmCBSはIRIを阻害する

IRIを阻害するCBS及びmCBSの能力を調べるために、ラット心臓IRI(cIRI)モデルを用いた。虚血域は群間で等しかった(図24A)。CBS処理は、微小血管閉塞の領域(図24B)及び虚血域における筋壊死(図24C)を有意に50%減少させた。さらに、ラットの皮膚弁IRIモデルでは、mCBSは、皮膚弁の生存領域を一貫して且つ有意に増加させた(図25)。

【0469】

実施例21：CBSは静脈血栓症を阻害する

CBSがヒストンの局所的な血管効果を制御するかどうかを調べるために、ヒストンによって媒介される深部静脈血栓症(DVT)のモデルを確立し、CBSによりほぼ完全に阻害されることを示した(図26)。

【0470】

このデータは、遊離ヒストンによって媒介される全身及び局所の両方の血管病理がCBS/mCBSによる阻害に適していることと一致する。

【0471】

実施例22：mCBSは自己免疫を阻害する

本発明者らは、次に、ヒトでの多発性硬化症に類似する実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)と呼ばれる自己免疫の動物モデルを阻害するmCBSの能力を評価した。データを図27に示し、このデータから、mCBSは、毎日投与された場合、35日間のウィンドウにわたりEAE発症からマウスを実質的に保護することが明らかになった。

【0472】

上記実施例では、本発明者らは、遊離ヒストンによって媒介される多くの病理プロセス(例えば、細胞毒性、赤血球の脆弱性/変形能及び血小板活性化)の非常に有効なインビトロ阻害剤としての小さいポリアニオン性分子の開発を説明する。

【0473】

これらのデータは、CBS/mCBSが、ヒストンによって媒介される病気(例えば、敗血症、IRI、血栓症及び自己免疫)を阻害し得る主要データの証明も提供する。

【0474】

ヒト及び動物では、mCBSは非常に安定しており、且つ高用量で良好な耐受性を示し、唯一の用量制限特性は抗凝固活性であるが、この活性は、LMW-ヘパリンと比べて110倍低く、非分画ヘパリンと比べて750倍低い。そのため、mCBSは、相当な臨床的可能性を有する新しいクラスの治療法を示す。

10

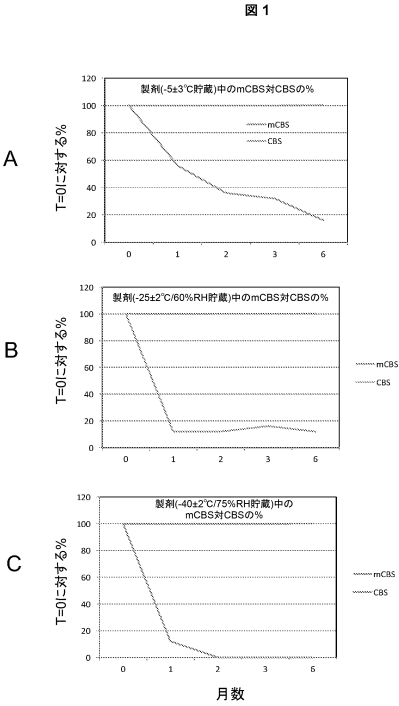
20

30

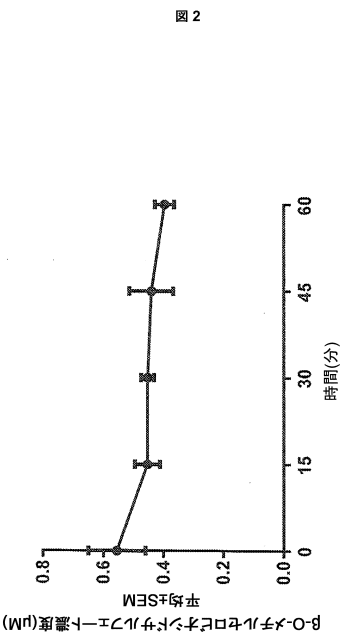
40

50

【図面】
【図 1】



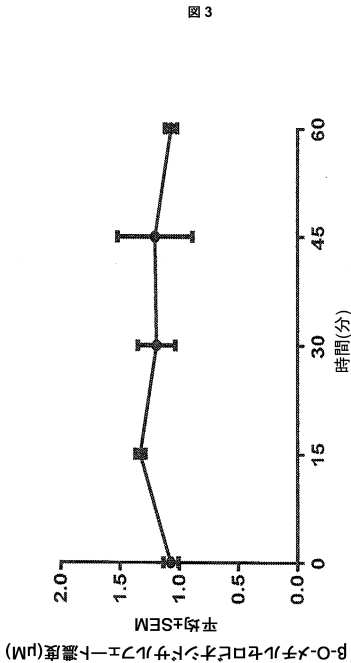
【図 2】



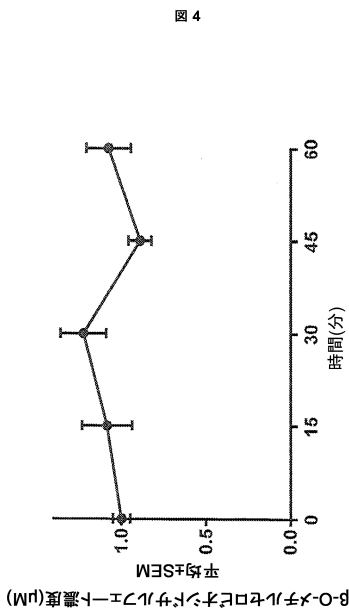
10

20

【図 3】



【図 4】



30

40

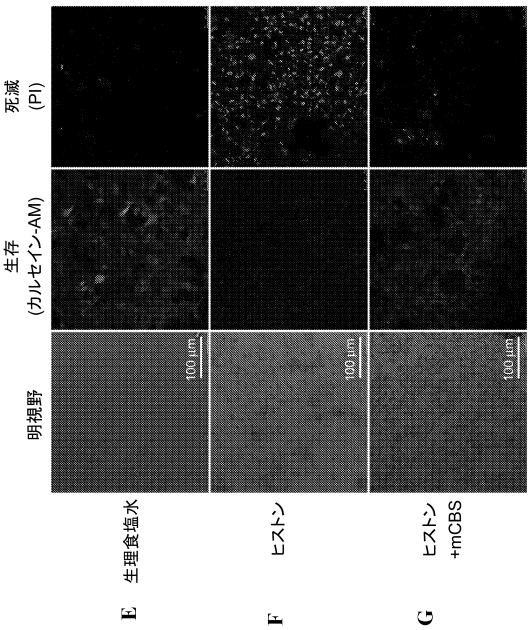
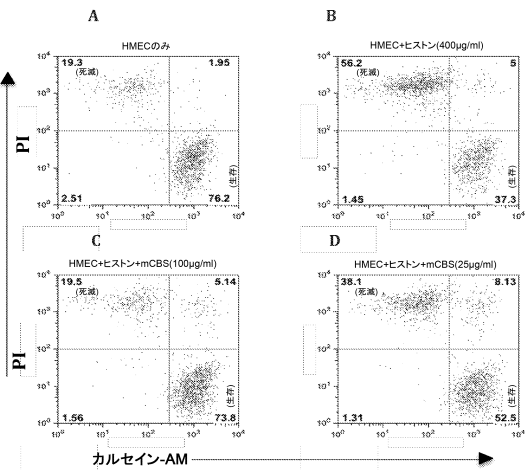
50

【図 5 - 1】

【図 5 - 2】

図 5

図 5 (続き)

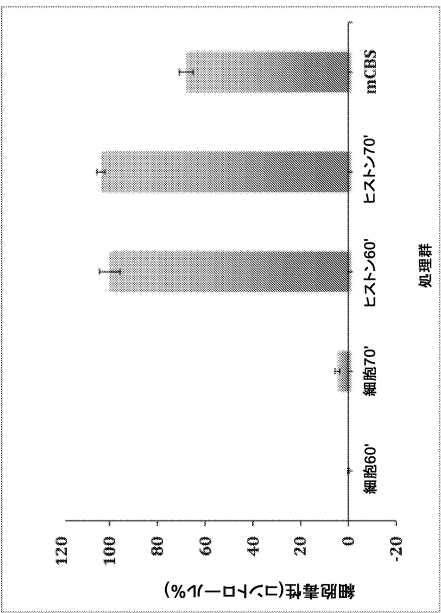
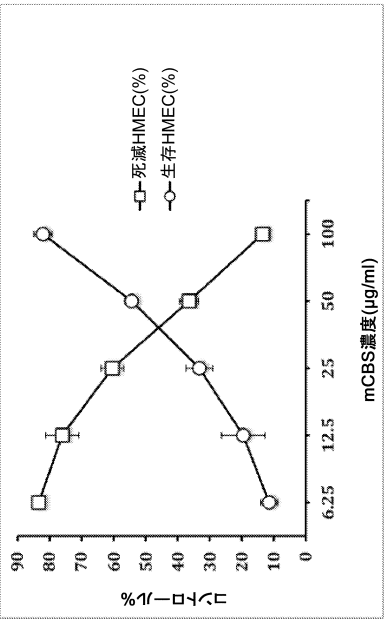


【図 6】

【図 7】

図 6

図 7



10

20

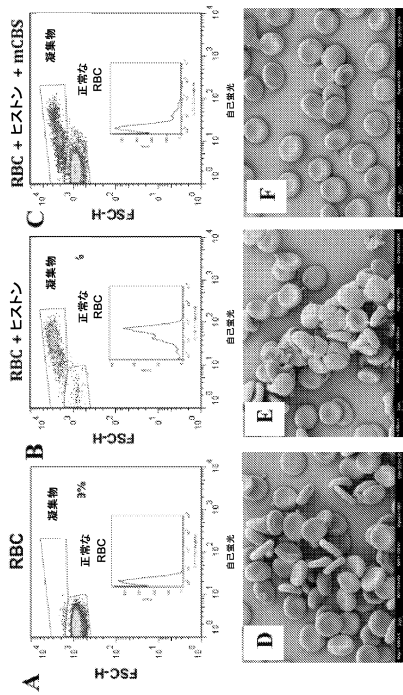
30

40

50

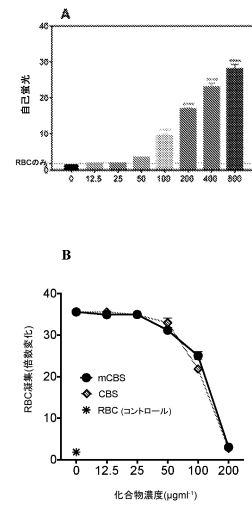
【図 8】

図 8



【図 9】

図 9

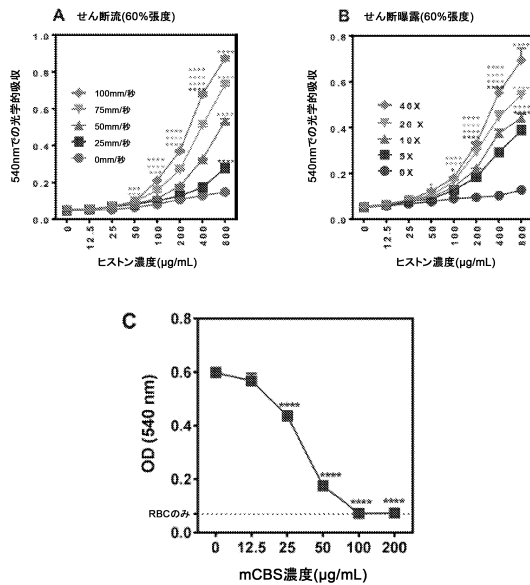


10

20

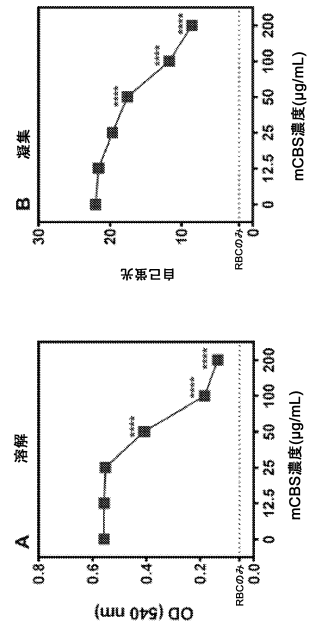
【図 10】

図 10



【図 11】

図 11



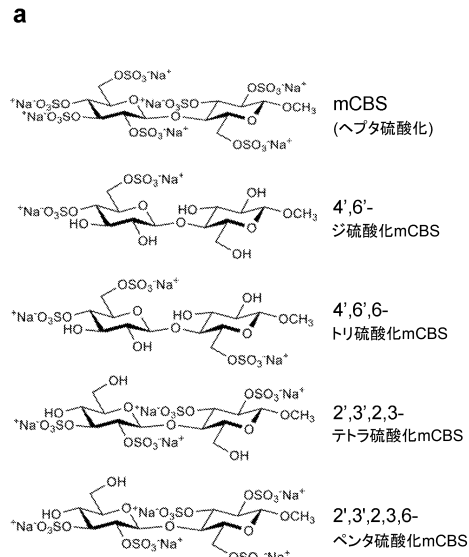
30

40

50

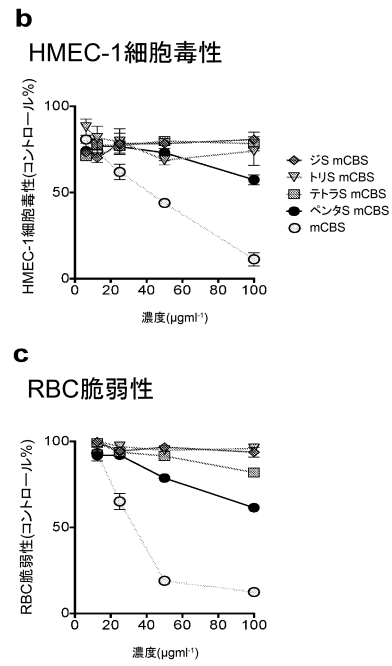
【図 12-1】

図 12



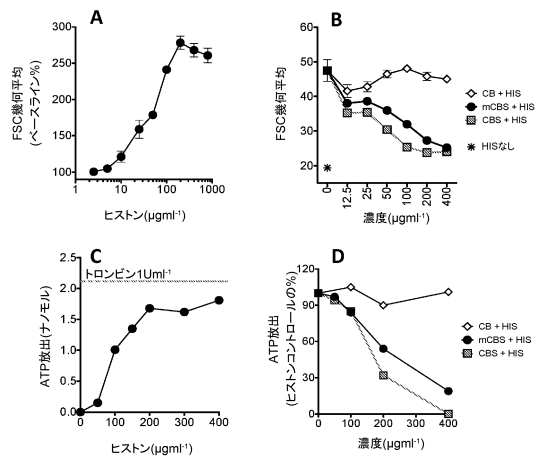
【図 12-2】

図 12 (続き)



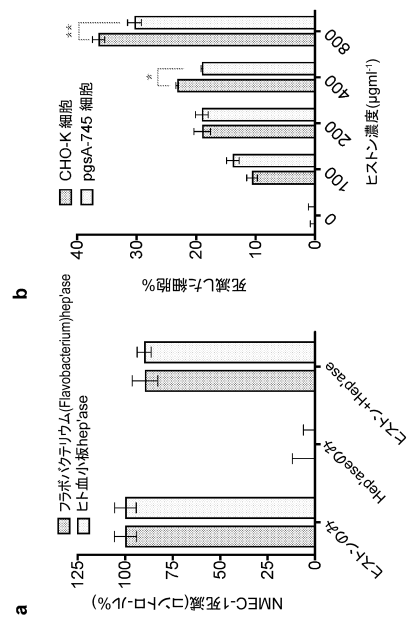
【図 13】

図 13



【図 14】

図 14



10

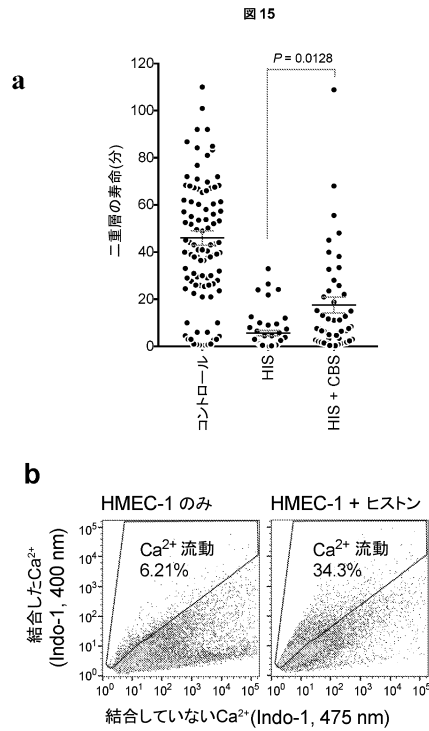
20

30

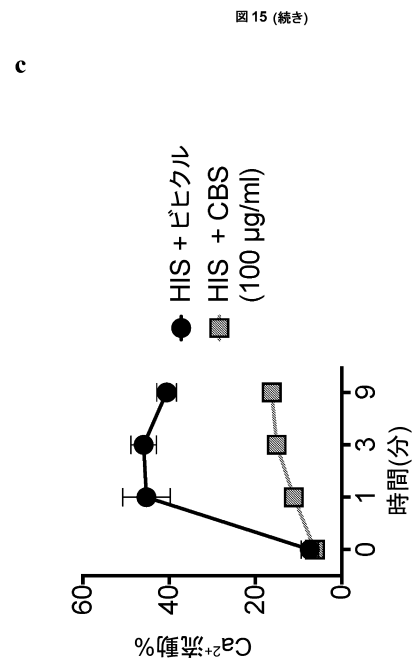
40

50

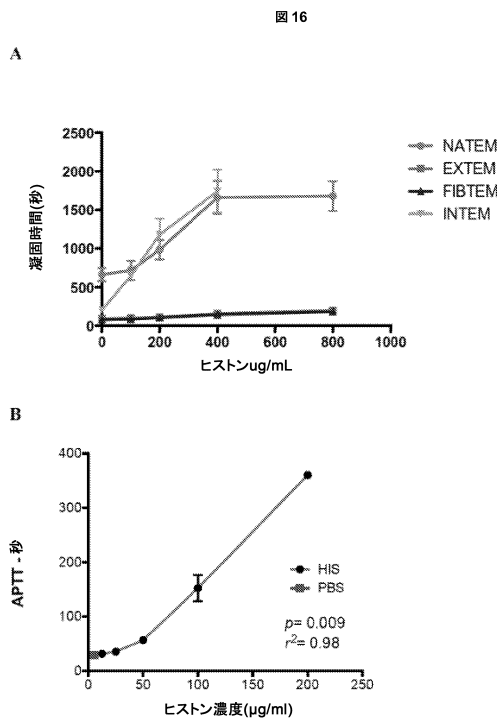
【図 15 - 1】



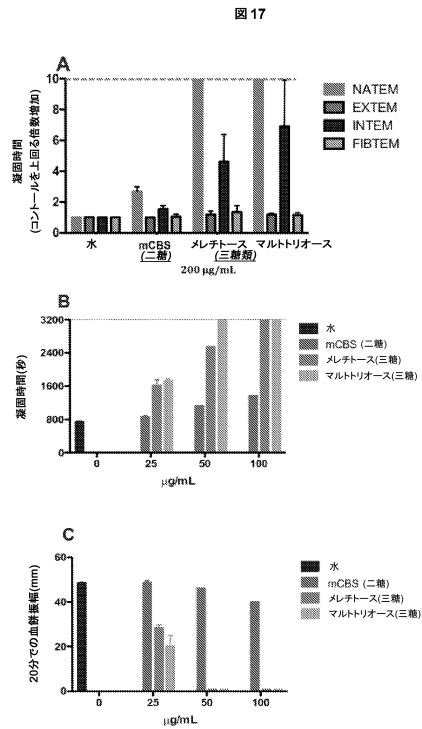
【図 15 - 2】



【図 16】



【図 17】



10

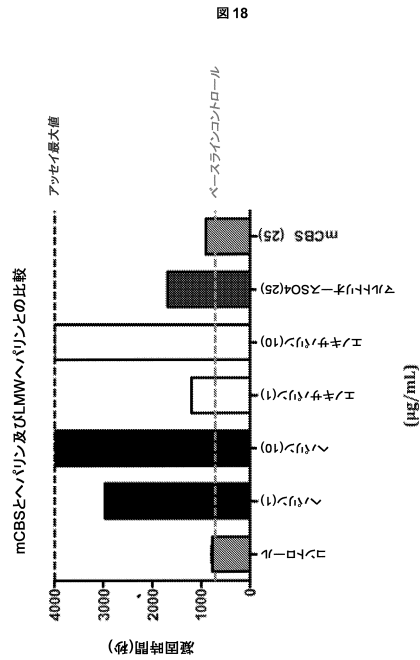
20

30

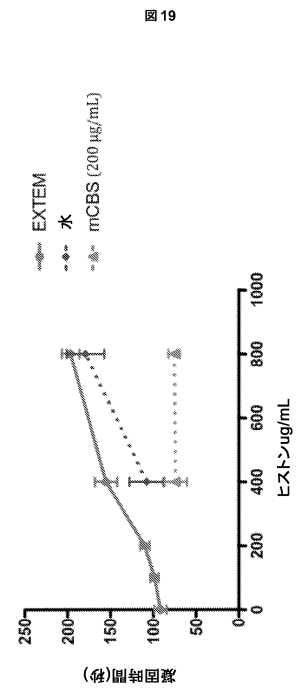
40

50

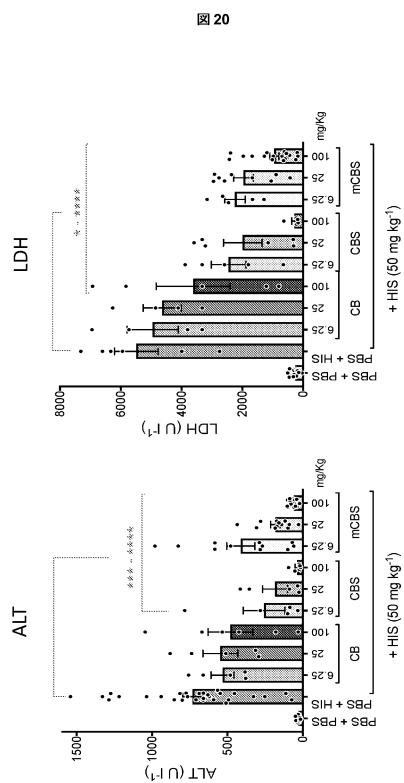
【図 18】



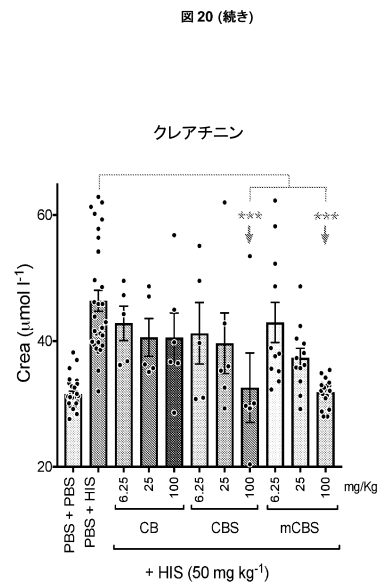
【図 19】



【図 20-1】



【図 20-2】



10

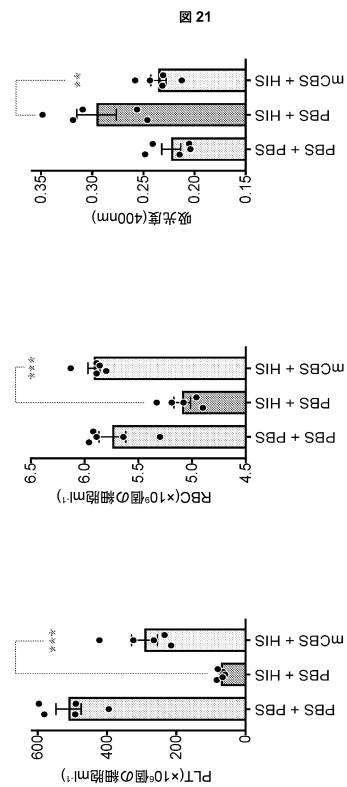
20

30

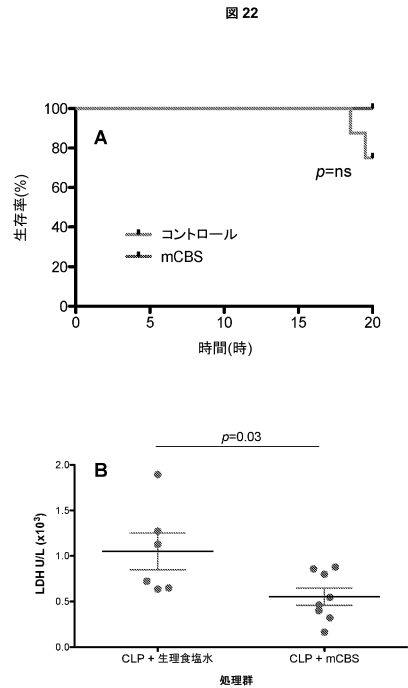
40

50

【図 2 1】



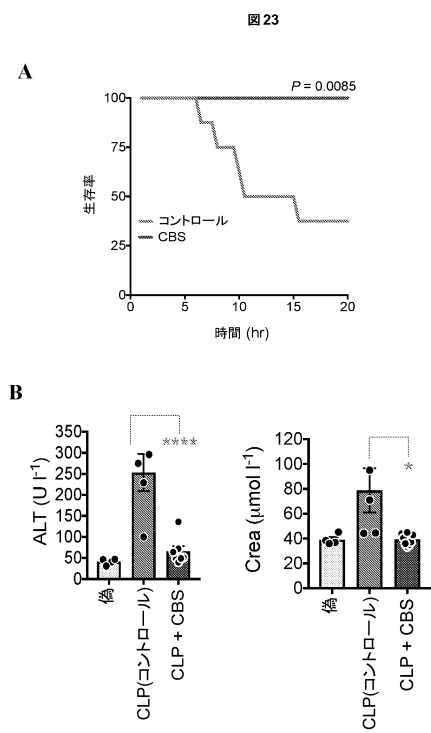
【図 2 2】



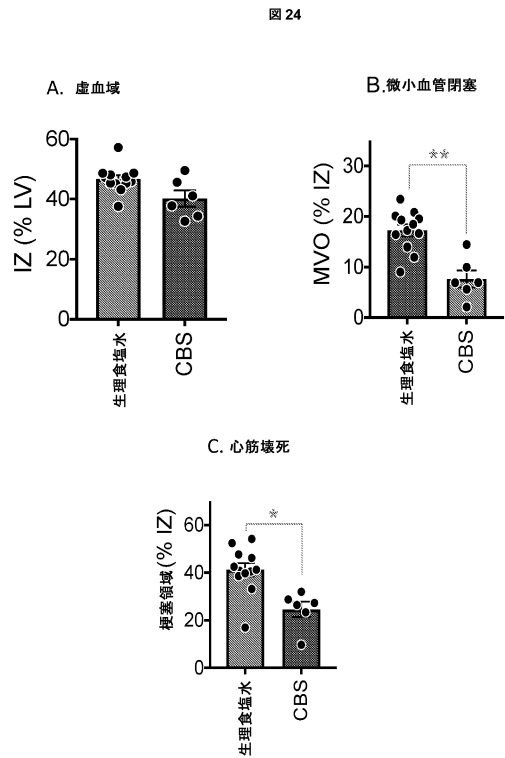
10

20

【図 2 3】



【図 2 4】

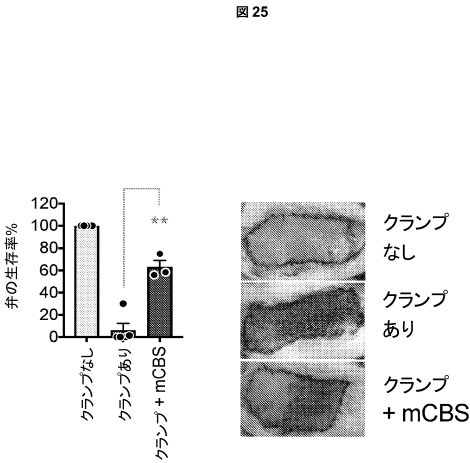


30

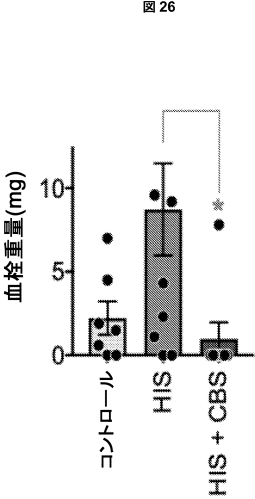
40

50

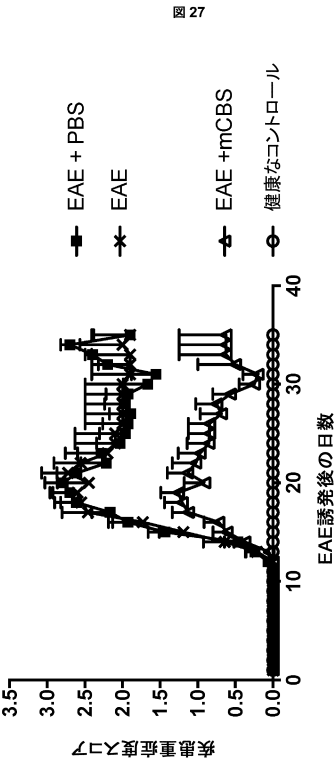
【図 2 5】



【図 2 6】



【図 2 7】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(72)発明者 パリッシュ, クリストファー

オーストラリア国, オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 0 4, キングストン, エア・ストリート 5 7, ユニット 8

(72)発明者 オメーラ, コナー

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ州 2 3 0 0, ニューキャッスル, ワット・ストリート 6 7 / 6 1 1

(72)発明者 クーブランド, ルーシー

オーストラリア国, オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 0 6, チフリー, ワース・プレイス 5

(72)発明者 カー, ベンジャミン・ジュー・チャイ

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ州 2 6 1 9, ジェラボンベラ, グーラーラ・プレイス 9

(72)発明者 コルドバッチェ, ファルザネ

オーストラリア国, オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 1 7, ベルコナン, ベンジャミン・ウェイ 3 9 / 7 4

(72)発明者 ベゾス, アンナ

オーストラリア国, オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 0 4, ナラバンダ, カーネギー・クレセント 1 3

(72)発明者 ブラウン, アンナ

オーストラリア国, オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 0 1, アクトン, ジ・オーストラリアン・ナショナル・ユニヴァーシティ内

(72)発明者 スティーヴンス, ロス

オーストラリア国, オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 1 1, スターリング, マッケイル・クレセント 1 8

(72)発明者 トレドウェル, グレゴリー・デイヴィッド

オーストラリア国, オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 1 2, ターナー, ノースボーン・アヴェニュー 2 1 9 エイ / 6

(72)発明者 フィリップ, リー・アンドリュー

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ州 2 6 2 0, グリーンリー, グランヴィル・クローズ 3

(72)発明者 ノックス, カレン

オーストラリア国, クイーンズランド州 4 0 7 8, エレン・グローヴ, バグナル・ストリート 1 6 0 / 8 9

(72)発明者 フォン・イツシュタイン, ローレンス・マーク

オーストラリア国, クイーンズランド州 4 2 1 1, ギルストン, ブルー・ガム・クレセント 1 0

(72)発明者 チャン, チー・ウェイ

オーストラリア国, クイーンズランド州 4 2 0 9, アッパー・クーメラ, グリーンリーフ・ストリート 2 6

(72)発明者 ブリュストル, アン

オーストラリア国, オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 0 1, アクトン, ガラン・ロード 1 3 1, ザ・ジョン・カーティン・スクール・オブ・メディカル・リサーチ

(72)発明者 デイヴィス, デイヴィッド・アナク・サイモン

オーストラリア国, オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2 6 0 1, アクトン, ガラン・ロード 1 3 1, ザ・ジョン・カーティン・スクール・オブ・メディカル・リサーチ

審査官 愛清 哲

- (56)参考文献 国際公開第1994/022885 (WO, A1)
特表2014-501730 (JP, A)
国際公開第2012/160337 (WO, A1)
PROBST, K.C., et al., Journal of Carbohydrate Chemistry, 2001年, Vol.20, p.549-560
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K 31/00-31/80
A61P 7/00-7/12
A61P 9/00-9/14
A61P 31/00-31/22
A61P 37/00-37/08
A61P 43/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)