

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-501730

(P2014-501730A)

(43) 公表日 平成26年1月23日(2014.1.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/702 (2006.01)	A 6 1 K 31/702	4 C 0 5 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 39/02 (2006.01)	A 6 1 P 39/02	4 C 0 9 0
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 31/7016 (2006.01)	A 6 1 K 31/7016	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-541148 (P2013-541148)	(71) 出願人	509111928
(86) (22) 出願日	平成23年11月29日 (2011.11.29)		ジ オーストラリアン ナショナル ユニ
(85) 翻訳文提出日	平成25年7月12日 (2013.7.12)		バーシティ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2011/001550		オーストラリア連邦 オーストラリアン・
(87) 国際公開番号	W02012/071611		キャピタル・テリトリー キャンベラ ア
(87) 国際公開日	平成24年6月7日 (2012.6.7)		クトン
(31) 優先権主張番号	61/418,826	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成22年12月1日 (2010.12.1)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒストン阻害

(57) 【要約】

本発明は、対象に多価陰イオンの有効量を投与する段階を含む、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。具体的には、本発明では、敗血症に罹患している患者の処置のための方法に関し、多価陰イオンを利用して、細胞外ヒストンタンパク質、例えば、敗血症患者の循環血中に見出される細胞外ヒストンタンパク質と複合体を迅速に形成させ、かくして、細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を中和または阻害する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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であって、該対象に多価陰イオンの有効量を投与する段階を含む、該方法。

【請求項 2】

対象における細胞外ヒストンの蓄積を阻害する方法であって、該対象に多価陰イオンの有効量を投与する段階を含む、該方法。

【請求項 3】

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ことにより敗血症を処置する方法であって、該対象に多価陰イオンの有効量を投与する段階を含む、該方法。

10

【請求項 4】

細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することによる敗血症の処置用の医薬の製造のための多価陰イオンの有効量の使用。

【請求項 5】

多価陰イオンが実質的な抗凝固活性を持たない、請求項1～3のいずれか一項記載の方法または請求項4記載の使用。

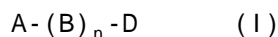
【請求項 6】

多価陰イオンが実質的に非免疫原性である、請求項1～3のいずれか一項記載の方法または請求項4記載の使用。

【請求項 7】

20

多価陰イオンが、一般構造(I)を有する多価陰イオンオリゴ糖であり：



式中でAおよびBが各々独立して、環状単糖類または環状デオキシ単糖類であり；

Dが環状単糖類、環状デオキシ単糖類、開環単糖類、または糖アルコールであり；

nが、0、1、2、3、4、5、6、7および8より選択される整数であり；かつ

ここで環状単糖類、環状デオキシ単糖類、開環単糖類、または糖アルコールの各々が OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアルケニル、置換されてもよいアルキニル、置換されてもよいアリール、または置換されてもよいアラールキルで独立して置換されてもよく；かつ

ここで多価陰イオンオリゴ糖が、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される少なくとも2つの陰イオン置換基を含む、

30

請求項1～3のいずれか一項記載の方法または請求項4記載の使用。

【請求項 8】

環状単糖類が、グルコース、ガラクトース、フルクトース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース、グロース、イドース、タロース、リブロース、キシロース、ブシコース、ソルボース、タガトースおよびセドヘプトロースからなる群より選択される、請求項7記載の方法または使用。

【請求項 9】

環状単糖類が、グルコース、ガラクトースおよびフルクトースからなる群より選択される、請求項8記載の方法または使用。

40

【請求項 10】

環状デオキシ単糖類が、フコース、デオキシリボースおよびラムノースからなる群より選択される、請求項7記載の方法または使用。

【請求項 11】

糖アルコールが、グリコール、グリセロール、エリトリトール、トレイトール、リビトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール(グルシトール)、マンニトール、ズルシトール(ガラクトール)、イジトールおよびフシトールからなる群より選択される、請求項7記載の方法または使用。

【請求項 12】

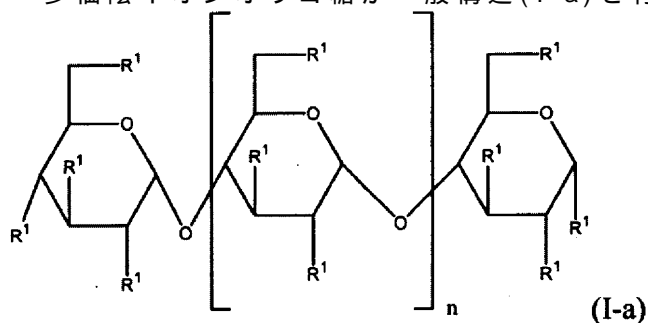
開環単糖類が、グルコース、ガラクトース、フルクトース、エリトロース、トレオース

50

、エリトルコース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース、グルコース、イドース、タロース、リブロース、キシルロース、ブシコース、ソルボース、タガトースおよびセドヘブツロースからなる群より選択される、請求項7記載の方法または使用。

【請求項13】

多価陰イオンオリゴ糖が一般構造(I-a)を有する、請求項7記載の方法または使用：

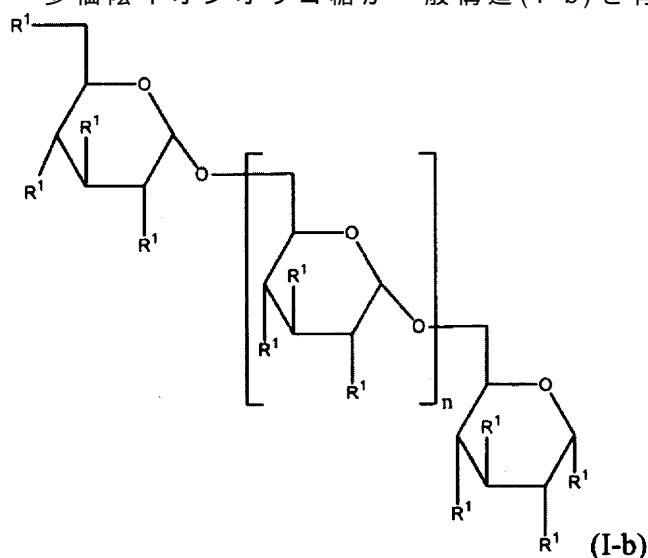


10

式中で各 R^1 が、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、OHまたはHより独立して選択され；かつ n が0、1、2、3、4、5、6、7、および8の間の整数であり；かつ R^1 の少なくとも2つが、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される。

【請求項14】

多価陰イオンオリゴ糖が一般構造(I-b)を有する、請求項7記載の方法または使用：



20

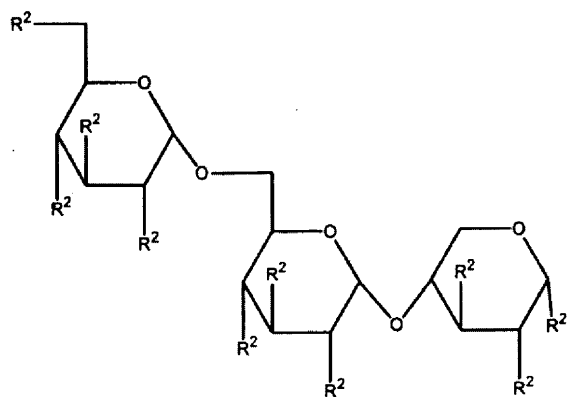
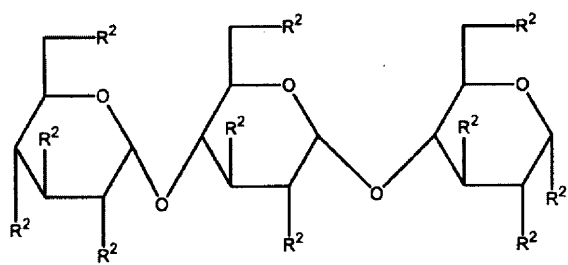
30

ここで各 R^1 が、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、OHまたはHより独立して選択され；かつ n が0、1、2、3、4、5、6、7、および8の間の整数であり；かつ R^1 の少なくとも2つが、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される。

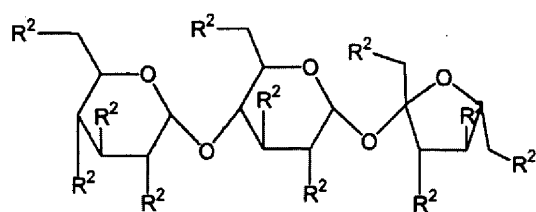
【請求項15】

多価陰イオンオリゴ糖が、以下からなる群より選択される、請求項7記載の方法または使用：

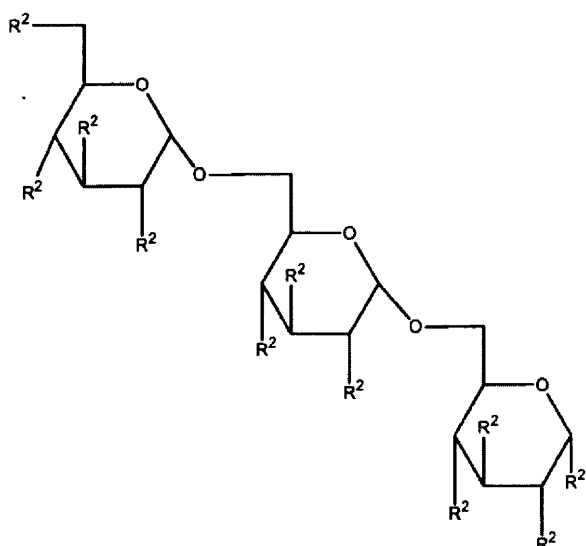
40



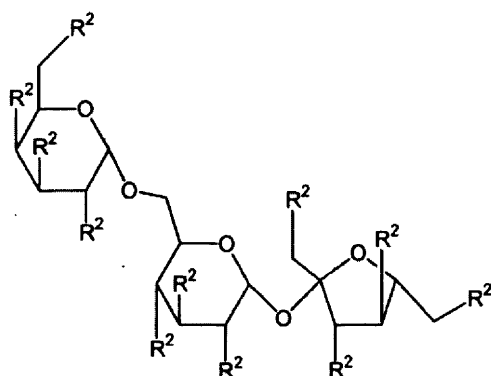
10



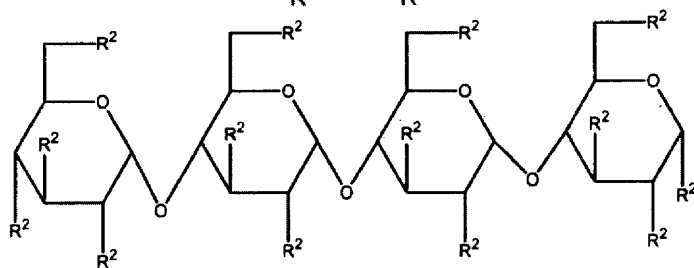
20



10

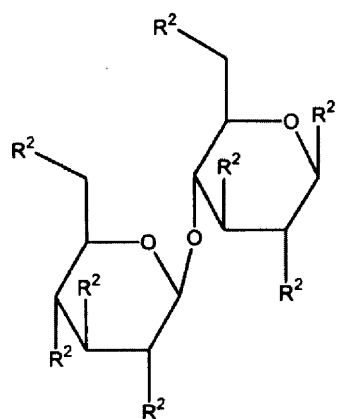


20



30

および



40

式中で各 R^2 が、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、 OH または H より独立して選択され；かつ R^2 の少なくとも2つが、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される。

【請求項16】

多価陰イオンオリゴ糖が、マルトース硫酸、マルトトリオース硫酸、マルトテトラオース硫酸、マルトペンタオース硫酸、マルトヘキサオース硫酸、マルトヘプタオース硫酸、マルトオクタノース硫酸、マルトノナオース硫酸およびマルトデカオース硫酸、パノース硫酸、イソマルトトリオース硫酸、エルロース硫酸、セロビオース硫酸ならびにラフィノース硫酸からなる群より選択される、請求項7記載の方法または使用。

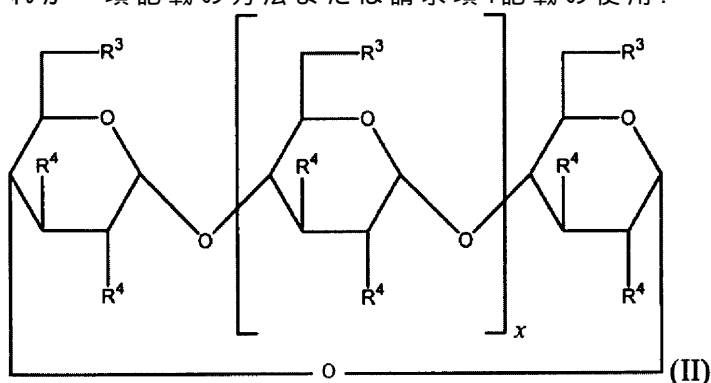
50

【請求項 17】

多価陰イオンオリゴ糖がセロビオース硫酸である、請求項7記載の方法または使用。

【請求項 18】

多価陰イオンが、一般構造(II)を有するシクロデキストリンである、請求項1～3のいずれか一項記載の方法または請求項4記載の使用：



10

式中、各 R^3 が、置換されてもよいO-アルキル、O-アリール、O-アラルキル、O-アルケニル、O-アルキニル基、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPO_3^- 、OHまたはHより独立して選択され、かつ各 R^4 が OSO_3^- 、 COO^- 、 OPO_3^- 、OHまたはHより独立して選択され；xが3、4、5、6、7、8、9、および10の間の整数であり、かつ多価陰イオンシクロデキストリンが OSO_3^- 、 COO^- 、および OPO_3^- からなる群より選択される少なくとも2つの陰イオン置換基を含む。

20

【請求項 19】

シクロデキストリンが α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリンまたは γ -シクロデキストリンである、請求項18記載の方法または使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、ヒストンの細胞毒性活性を阻害するための多価陰イオンの使用に関する。さらに、本発明は、ヒストンの細胞毒性活性を阻害する多価陰イオンをスクリーニングするためのナノ粒子標識ヒストンの使用、および敗血症の処置におけるヒストンの細胞毒性活性を阻害するための多価陰イオンの使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

背景

敗血症は、サイトカイン・ネットワーク、白血球、ならびに補体および凝固線溶系を含むいくつかの宿主防御機構の活性化に関連した、かつそれによって媒介される、感染または外傷に対する全身性炎症反応である。敗血症は細菌感染、真菌感染、ウイルス感染および他の感染によって、ならびに多発外傷、重度の熱傷および臓器移植のような非感染性の刺激によって引き起こされうる。数時間または数日内に、敗血症は血管における自発的凝固、重症低血圧、多臓器不全および死に進行しうる。

40

【0003】

最新の抗生物質の臨床使用にもかかわらず、敗血症を有する患者の無効な処置に起因して死亡率のレベルは甚だ高いままである。例えば移植片拒絶に対する予防に起因して、免疫抑制状態にある患者もリスクが高い。白血病患者は、その白血病が原因で死亡するよりも敗血症が原因で死亡するものが多い。米国では1年に敗血症の症状発現が500,000例あり、35%の粗死亡率、および敗血性ショックの症状発現が200,000例あり、40～70%の死亡率であるものと推測されている。敗血症は、非冠疾患集中治療室における主な死亡原因である。損傷後の院内死亡の40%が、敗血症によって引き起こされる多臓器不全症候群によるものである。

【0004】

50

最近では、敗血症患者に有効な新しい治療法を見つけ出そうとする試みがいくつかなされている。炎症の鍵になるメディエータに対するモノクローナル抗体、例えば抗腫瘍壊死因子モノクローナル抗体を産生するために相当な努力が払われてきたが、しかしこれらは臨床的に無効だと判明しており、敗血症患者には危険な副作用があることも分かっている。別のアプローチは、組み換えヒトAPC（例えばXigris(登録商標))を含む活性化プロテインC (APC)のような、精製ヒト凝固因子を用いることであった。しかしながら、これらのAPCに基づく敗血症治療には、臨床的影響がほとんどなかった。この理由はいくつかあるが、そのなかには、出血リスクの増大をもたらすAPCの抗凝固活性があり、したがって、手術後または外傷後の患者で発症する敗血症の場合には薬物が排除されてしまう。同じ理由で、APCに基づく敗血症治療用物質は、出血のリスクが高い白血病患者の場合には排除されてしまう。敗血症は急激に進行しうるので、APCに基づく敗血症治療用物質の比較的遅い作用機序は、急性敗血症の急激な進行に対しては不利である。Xigrisは2011年10月25日付で市場から回収された。

10

【0005】

ヒストンは低分子量の塩基性タンパク質であり、これは細胞核内で機能して、遺伝子発現を調節し、かつDNAと複合体を形成して、クロマチン構造にアSEMBルするヌクレオソームを形成する。Xuら(Nat Med. 2009. 15:1318-21)(非特許文献1)は、炎症過程に反応して放出されるヒストンの細胞毒性活性について、細胞外ヒストンが敗血症での内皮細胞機能不全、臓器不全および死のメディエータとして作用することを報告している。

20

【0006】

本発明は、多価陰イオンが、生きている動物の循環血中の細胞外ヒストンと複合体を形成し、その細胞毒性活性を阻害しうるという所見を前提としている。さらに、多価陰イオンは、細胞外ヒストンと複合体を形成し、臓器におけるヒストンの蓄積を阻止しう。さらに、これらの多価陰イオンは、抗凝固性をわずかにしか持ちえない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】 Xuら(Nat Med. 2009. 15:1318-21)

【発明の概要】

30

【0008】

概要

本発明者らは、細胞外ヒストンの細胞毒性活性および臓器における細胞外ヒストンの蓄積がオリゴ糖多価陰イオンの投与によって阻害されうることを特定した。オリゴ糖多価陰イオンの投与は、現在利用できる敗血症処置の欠陥の少なくともいくつかを改善する手段を供与する。さらに、ナノ粒子標識ヒストンの使用は、臓器におけるヒストンの蓄積を阻害できる化合物をスクリーニングするための手段を提供する。

【0009】

第1の局面において、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であって、該対象に多価陰イオンの有効量を投与する段階を含む該方法が提供される。

40

【0010】

第2の局面において、対象における細胞外ヒストンの蓄積を阻害する方法であって、該対象に多価陰イオンの有効量を投与する段階を含む該方法が提供される。

【0011】

第3の局面において、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ことにより敗血症を処置する方法であって、該対象に多価陰イオンの有効量を投与する段階を含む該方法が提供される。

【0012】

第4の局面において、細胞外ヒストンの細胞毒性活性を阻害することによる敗血症の処置用の医薬の製造のための多価陰イオンの有効量の使用が提供される。

【0013】

50

第5の局面において、敗血症の処置で用いるための多価陰イオンの有効量が提供される。

【0014】

1つの態様において、多価陰イオンは実質的な抗凝固活性を持たない。

【0015】

1つの態様において、多価陰イオンは実質的に非免疫原性でありうる。

【0016】

1つの態様において、多価陰イオンは、一般構造(I)を有する多価陰イオンオリゴ糖でありうる：



式中でAおよびBが各々独立して、環状単糖類または環状デオキシ単糖類であり；

Dが環状単糖類、環状デオキシ単糖類、開環単糖類、または糖アルコールであり；

nが、0、1、2、3、4、5、6、7および8より選択される整数であり；ならびに

ここで環状単糖類、環状デオキシ単糖類、開環単糖類、または糖アルコールの各々がOS O_3^- 、COO $^-$ 、OP O_3^- 、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアルケニル、置換されてもよいアルキニル、置換されてもよいアリール、または置換されてもよいアララルキルで独立して置換されてもよく；ならびに

ここで多価陰イオンオリゴ糖が、OSO $_3^-$ 、COO $^-$ 、およびOP O_3^- からなる群より選択される少なくとも2つの陰イオン置換基を含む。

【0017】

1つの態様において、環状単糖類は、グルコース、ガラクトース、フルクトース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース、グロース、イドース、タロース、リブロース、キシルロース、プシコース、ソルボース、タガトースおよびセドヘブツロースからなる群より選択される。

【0018】

別の態様において、環状単糖類は、グルコース、ガラクトースおよびフルクトースからなる群より選択される。

【0019】

別の態様において、環状デオキシ単糖類は、フコース、デオキシリボースおよびラムノースからなる群より選択される。

【0020】

別の態様において、糖アルコールは、グリセロール、エリトリトール、トレイトール、リビトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール(グルシトール)、マンニトール、ズルシトール(ガラクチトール)、イジトールおよびフシトールからなる群より選択される。

【0021】

別の態様において、開環単糖類は、グルコース、ガラクトース、フルクトース、エリトロース、トレオース、エリトルロース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース、グロース、イドース、タロース、リブロース、キシルロース、プシコース、ソルボース、タガトースおよびセドヘブツロースからなる群より選択される。

【0022】

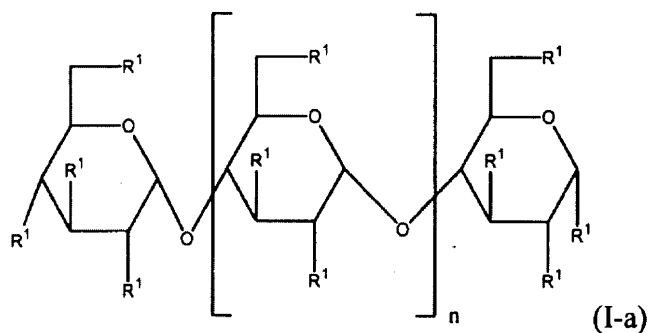
別の態様において、多価陰イオンは、一般構造(I-a)を有する多価陰イオンオリゴ糖でありうる：

10

20

30

40

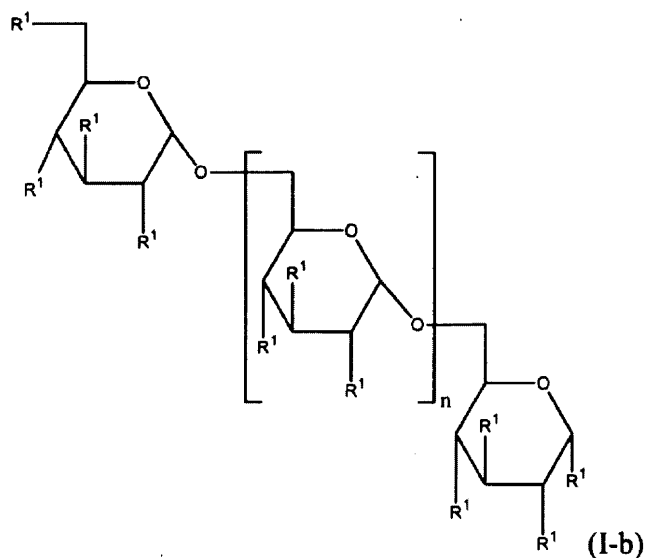


式中で各 R^1 が、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、 OH または H より独立して選択され；ならびに n が0、1、2、3、4、5、6、7、および8の間の整数であり；ならびに式中で R^1 の少なくとも2つが、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される。

10

【0023】

別の態様において、多価陰イオンは、一般構造(I-b)を有する多価陰イオンオリゴ糖でありうる：



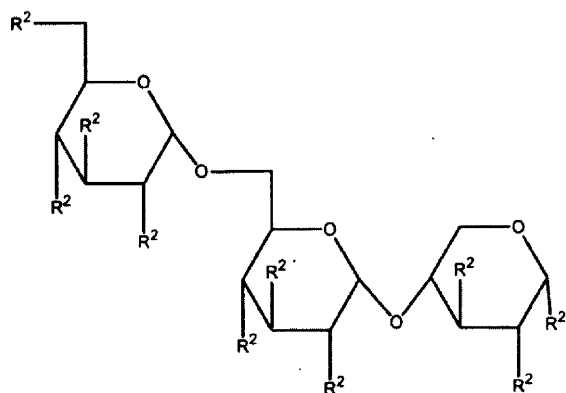
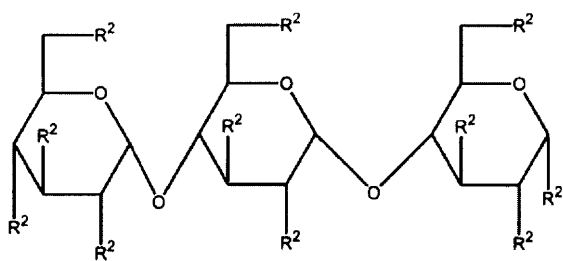
20

ここで各 R^1 が、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、 OH または H より独立して選択され；ならびに n が0、1、2、3、4、5、6、7、および8の間の整数であり；ならびに式中で R^1 の少なくとも2つが、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される。

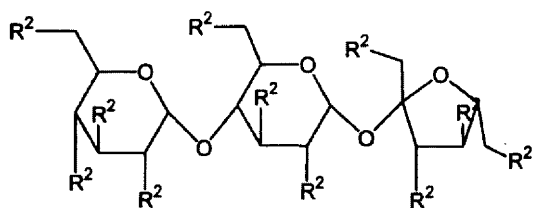
30

【0024】

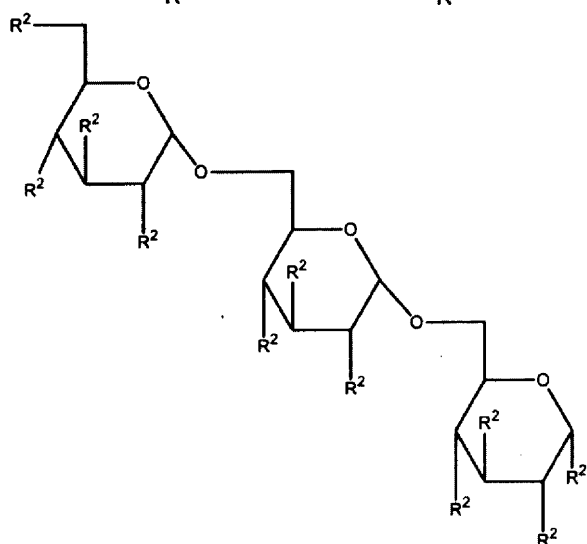
別の態様において、多価陰イオンは、以下からなる群より選択される多価陰イオンオリゴ糖でありうる：



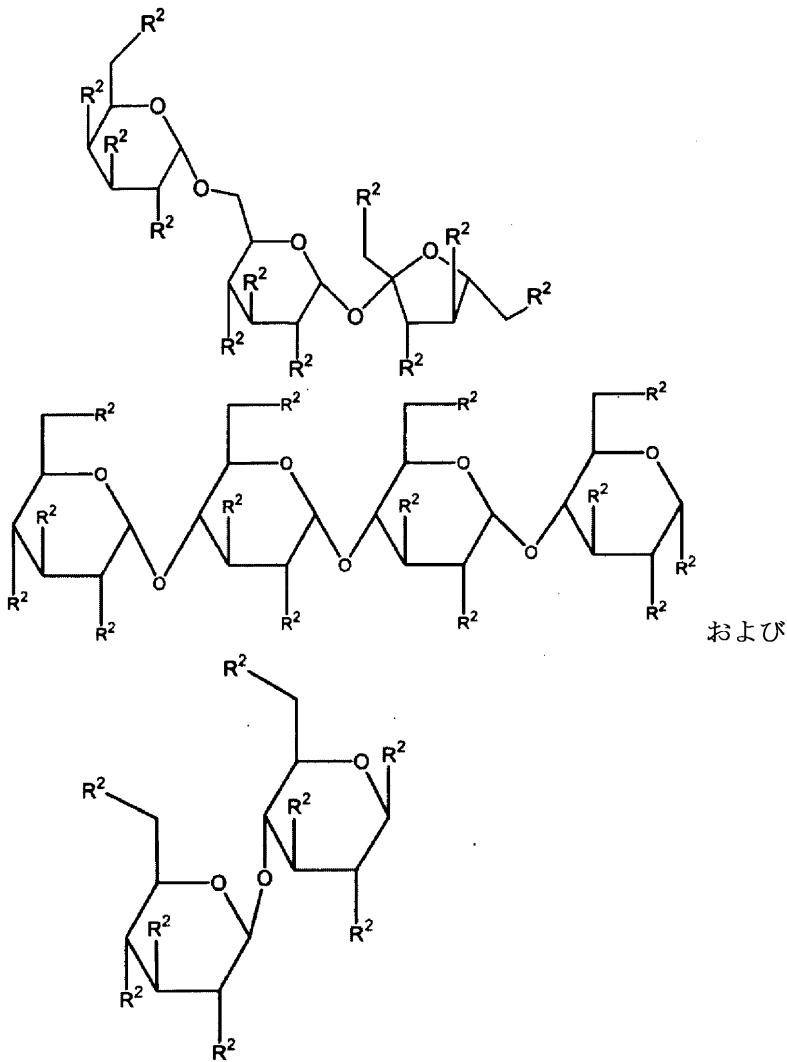
10



20



30



式中で各 R^2 が、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、 OH または H より独立して選択され；ならびに式中で R^2 の少なくとも2つが、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される。

【0025】

別の態様において、多価陰イオンは、マルトース硫酸、マルトトリオース硫酸、マルトテトラオース硫酸、マルトペンタオース硫酸、マルトヘキサオース硫酸、マルトヘプタオース硫酸、マルトオクタノース硫酸、マルトノナオース硫酸およびマルトデカオース硫酸、パノース硫酸、イソマルトトリオース硫酸、エルロース硫酸、セロビオース硫酸ならびにラフィノース硫酸からなる群より選択される多価陰イオンオリゴ糖でありうる。

【0026】

さらなる態様において、多価陰イオンは、多価陰イオンオリゴ糖のセロビオース硫酸でありうる。

【0027】

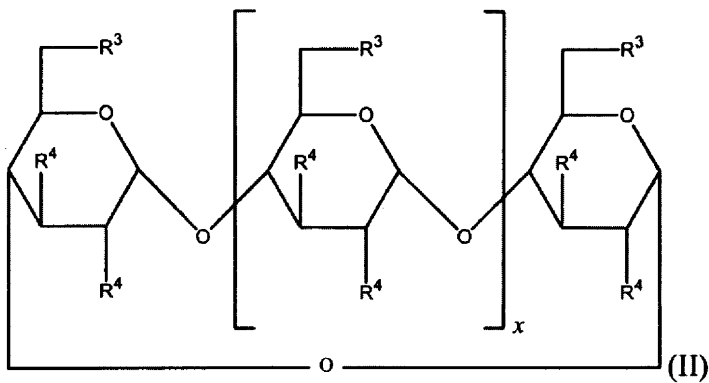
1つの態様において、多価陰イオンは、一般構造(II)を有する多価陰イオンシクロデキストリンでありうる：

10

20

30

40



ここで各 R^3 が、置換されてもよいO-アルキル、O-アリール、O-アラルキル、O-アルケニル、O-アルキニル基、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPO_3^- 、OHまたはHより独立して選択され、ならびに各 R^4 が OSO_3^- 、 COO^- 、 OPO_3^- 、OHまたはHより独立して選択され；xが3、4、5、6、7、8、9、および10の間の整数であり、ならびにここで多価陰イオンシクロデキストリンが OSO_3^- 、 COO^- 、および OPO_3^- からなる群より選択される少なくとも2つの陰イオン置換基を含む。

【0028】

シクロデキストリンは α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリンまたは γ -シクロデキストリンでありうる。

【0029】

1つの態様において、ヒストン阻害剤をスクリーニングする方法であって、

- (i) ヒストンを候補化合物と接触させる段階
- (ii) 該ヒストンへの該候補化合物の結合を判定する段階
- (iii) 該ヒストンに結合する該候補化合物を選択する段階

を含む、該方法が提供される。

【0030】

別の態様において、ヒストン阻害剤をスクリーニングする方法であって、

- (i) ナノ粒子標識ヒストンを提供する段階
- (ii) 該標識ヒストンを被験対象に投与する段階
- (iii) 候補化合物を該被験対象に投与する段階
- (iv) 対照の対象と比べて臓器におけるヒストンの局在をモニタリングする段階

(v) 対照の対象と比べて臓器におけるヒストンの局在を変化させる該候補化合物を選択する段階

を含む、該方法が提供される。

【0031】

1つの態様において、標識ヒストンは試験化合物の前、後または試験化合物と同時に被験対象に投与されうる。

【0032】

さらなる態様において、ヒストン阻害剤をスクリーニングする方法であって、

- (i) ナノ粒子標識ヒストンを提供する段階
- (ii) 該ナノ粒子標識ヒストンを候補化合物と接触させる段階
- (iii) 該標識ヒストンおよび該試験化合物を被験対象に投与する段階
- (iv) 対照の対象と比べて該被験対象の臓器におけるヒストンの局在をモニタリングする段階

(v) 対照の対象と比べて臓器におけるヒストンの局在を変化させる該候補化合物を選択する段階

を含む、該方法が提供される。

【0033】

1つの態様において、候補化合物は多価陰イオンである。

【0034】

前記の局面のいずれか1つのうちの1つの態様において、多価陰イオンは、細胞、組織ま

10

20

30

40

50

たは臓器へのヒストンの結合を阻害する。

【図面の簡単な説明】

【0035】

ここで、添付の図面を参照しながら、ほんの一例として、本発明の好ましい態様を記述する。

【0036】

【図1】ヒストン細胞毒性に対するフローサイトメトリーアッセイ法を用いて得られたデータの一例を描いており、この場合には、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)が単独で(左側パネル)または200 $\mu\text{g/ml}$ の仔ウシ胸腺ヒストンとともに(右側パネル)インビトロにおいて1時間インキュベートされている。各パネル中の図は、各象限中のHUVECの割合を表し、生細胞(カルセイン-AM-明るい、PI-暗い)および死細胞(カルセイン-AM-暗い、PI-明るい)の象限が表示されている。

10

【図2】インビトロで1時間の曝露後に(A) HUVECおよび(B) ヒト微小血管内皮細胞(HMEC)の死を引き起こす異なる濃度の仔ウシ胸腺ヒストン(100~800 $\mu\text{g/ml}$)の能力を描く。

【図3】HUVECに対する仔ウシ胸腺ヒストン(200 $\mu\text{g/ml}$)のインビトロでの細胞毒性を阻害する異なる濃度(6.25~100 $\mu\text{g/ml}$)のマルトース硫酸、マルトトリオース硫酸、マルトペンタオース硫酸、イソマルトトリオース硫酸および α -シクロデキストリン硫酸の能力を描く。

【図4】HUVECに対する仔ウシ胸腺ヒストン(200 $\mu\text{g/ml}$)のインビトロでの細胞毒性を阻害するさらに広い濃度範囲(1.6~100 $\mu\text{g/ml}$)のマルトース硫酸、マルトトリオース硫酸およびマルトペンタオース硫酸の能力を描く。

20

【図5】25 $\mu\text{g/ml}$ および100 $\mu\text{g/ml}$ のマルトトリオース硫酸がHUVECに対する仔ウシ胸腺ヒストン(200 $\mu\text{g/ml}$)のインビトロでの細胞毒性作用を劇的に阻害しうることを示す一次フローサイトメトリーデータを描く。各パネル中の図は、各象限中のHUVECの割合を表し、生細胞(カルセイン-AM-明るい、PI-暗い)および死細胞(カルセイン-AM-暗い、PI-明るい)の象限が表示されている。

【図6】25 $\mu\text{g/ml}$ および100 $\mu\text{g/ml}$ のマルトトリオース硫酸がHMECに対する仔ウシ胸腺ヒストン(400 $\mu\text{g/ml}$)のインビトロでの細胞毒性作用を、それぞれ、完全におよび部分的に阻害しうることを示す一次フローサイトメトリーデータを描く。各パネル中の図は、各象限中のHMECの割合を表し、生細胞(カルセイン-AM-明るい、PI-暗い)および死細胞(カルセイン-AM-暗い、PI-明るい)の象限が表示されている。

30

【図7】ヒト血小板ヘパラーゼまたはフラボバクテリウム・ヘパリチナーゼによるHMECからの細胞表面ヘパラン硫酸の除去は、HMECに対する仔ウシ胸腺ヒストン(400 $\mu\text{g/ml}$)のインビトロでの細胞毒性に効果がないことを実証する。

【図8】細胞表面ヘパラン硫酸を発現する野生型CHO-K1細胞株、およびヘパラン硫酸を欠く変異体CHO細胞株(pgsA-745)は、仔ウシ胸腺ヒストンのインビトロでの細胞毒性に等しく影響されやすいことを実証する。

【図9】図9Aは麻酔下のウサギの耳静脈へのTc99m-ナノ粒子標識ヒストンの注射の初めから開始した、連続30秒ずつのガンマシンチグラフィの収集である。図9Bは、麻酔下のウサギの耳静脈へのTc99m-ナノ粒子の注射の初めから開始した、連続30秒ずつのガンマシンチグラフィの収集である。

40

【図10】図10Aは、麻酔下のウサギの耳静脈へのTc99m-ナノ粒子標識ヒストンの注射の初めから開始した、連続30秒ずつのガンマシンチグラフィの収集である。図10Bは、15 mg/kgのナトリウムマルトヘキサオース硫酸で予め処置した麻酔下のウサギの耳静脈へのTc99m-ナノ粒子標識ヒストンの注射の初めから開始した、連続30秒ずつのガンマシンチグラフィの収集である。

【図11】15 mg/kgのナトリウムマルトテトラオース硫酸で予め処置した麻酔下のウサギの耳静脈へのTc99m-ナノ粒子標識ヒストンの注射の初めから開始した、ガンマシンチグラフィの連続30秒ずつの収集(フレーム1~4)および60秒ずつの収集(フレーム5~8)である。

50

【図 1 2】15 mg/kgのナトリウムセロビオース硫酸で予め処置した麻酔下のウサギの耳静脈へのTc99m-ナノ粒子標識ヒストンの注射の初めから開始した、連続30秒ずつのガンマシンチグラフィの収集である。

【図 1 3】敗血症のリポ多糖類(LPS)誘導マウスモデルに対するカプラン・マイヤー生存プロット、ならびに被験物質1 (マルトトリオース硫酸; TA1)、2 (セロビオース硫酸; TA2)および3 (ヘパリン; TA3)のインビボでの効力の評価である。被験物質は1日目にLPS (50 mg/kg)と同時に腹腔内(i.p.)投与し、その後、さらに2日間、毎日、腹腔内(i.p.)投薬した。被験物質1および2を2用量の濃度(高用量100 mg/kgおよび低用量15 mg/kg)で評価し、被験物質3を1用量(1.1 mg/kg)で評価した。プロットに記された事象には、マウスが死体で見つかるまで、または安楽死されねばならなくなるまでの時間が記録されている。

10

【発明を実施するための形態】

【0037】

定義

ある種の用語が本明細書において用いられ、それらは以下のように記載した意味を有するものとする。

【0038】

本明細書において用いられる場合、「含む(comprising)」という用語は「主に含むが、必ずしも単独で含むわけではない」ことを意味する。さらに、「含む(comprise)」および「含む(comprises)」のような「含む(comprising)」という単語の変形は、対応して変化させた意味を有する。

20

【0039】

文脈上他の意味に解すべき場合を除き、またはそうでないと特に述べられていない限り、本明細書において単数の整数、段階または要素として列挙されている本発明の整数、段階または要素は、列挙されている整数、段階または要素の単数形も複数形もともに明らかに包含する。

【0040】

本明細書において用いられる場合、「処置する」および「処置」という用語は、状態もしくは症状を軽減するか、状態もしくは疾病の定着を予防するか、またはさもなくば、状態もしくは疾患もしくは他の望ましくない症状の進行を任意の方式で予防、妨害、遅延、または回復させる、任意のおよび全ての使用をいう。

30

【0041】

本明細書において治療的用途で用いるということは、獣医学的用途のような、ヒトおよび非ヒトでの用途に等しく適用可能であるものと理解されることに留意されたい。ゆえに、特に指示されている場合を除き、患者、対象または個体への言及は、鳥類、ウサギ類、ヒツジ類、ウシ類、ウマ類、ブタ類、ネコ類、イヌ類、霊長類およびげっ歯類種を含むがこれらに限定されない、社会的、経済的または研究的に重要な任意の種の個体のような、ヒトまたはヒト以外のものを意味することが理解されよう。

【0042】

本明細書の文脈において、「有効量」という用語はその意味のなかに、望ましい効果を供与するのに十分であるが無毒な、本発明の化合物または組成物の量を含む。必要とされる正確な量は、所望の効果、処置される種、対象の年齢および全身状態、処置される状態の重症度、投与される特定の薬剤、投与方法などのような要因に依り対象によって異なるであろう。したがって、正確な「有効量」を明記することはできない。しかしながら、所与のどの場合にも、当業者は日常的な実験だけを用いて適切な「有効量」を判定することができる。

40

【0043】

本明細書において用いられる場合、「単糖類」という用語はその意味のなかに、一般式 $C_nH_{2n}O_n$ の糖または炭水化物を含む。例えば、単糖類という用語はグルコース、ガラクトース、フルクトース、エリトロース、トレオース、エリトルロース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース、グロース、イド

50

ース、タロース、リブロース、キシロース、ブシコース、ソルボース、タガトースおよびセドヘプツロースを含むが、これらに限定されることはない。単糖類は天然に存在してもまたは合成されてもよい。大部分の単糖類は開環単糖類または環状単糖類のどちらかとして存在する。

【0044】

本明細書において用いられる場合、「デオキシ単糖類」または「デオキシ糖」という用語はその意味のなかに、炭素原子よりも少ない酸素原子を含有し、その結果、分子中に結合ヒドロキシ基を欠いた1つまたは複数の炭素を生ずる糖を含む。例えば、デオキシ単糖類という用語は、フコース、デオキシリボースおよびラムノースを含むが、これらに限定されることはない。

10

【0045】

本明細書において用いられる場合、「糖アルコール」という用語はその意味のなかに、カルボニル基(アルデヒドまたはケトン)が第一または第二ヒドロキシ基(ゆえにアルコール)に還元された、水素添加型の炭水化物または単糖類を含む。糖アルコールは一般式 $(\text{HCHO})_{n+1}\text{H}$ を有する。例えば、糖アルコールという用語は、グリコール、グリセロール、エリトリール、トレイトール、リビトリール、アラビトリール、キシリトリール、ソルビトリール(グルシトリール)、マンニトリール、ズルシトリール(ガラクトトリール)、イジトリールおよびフシトリールを含むが、これらに限定されることはない。

【0046】

本明細書において用いられる場合、「オリゴ糖」という用語はその意味のなかに、酸により加水分解されて、構成成分の単糖類単位を生じうる、グリコシド結合を通じて連結された2~10個の単糖類残基から構成される炭水化物を含む。

20

【0047】

本明細書において用いられる場合、「多糖類」という用語はその意味のなかに、酸により加水分解されて、構成成分の単糖類単位を生じうる、グリコシド結合を通じて連結された10個またはそれ以上の単糖類残基を含有する単糖類の重合体を含む。

【0048】

本明細書において用いられる場合、「アルキル」という用語はその意味のなかに、1~18個の炭素原子、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17または18個の炭素原子を有する一価直鎖または分岐鎖飽和炭化水素基を含む。例えば、アルキルという用語は、メチル、エチル、1-プロピル、イソプロピル、1-ブチル、2-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、アミル、1,2-ジメチルプロピル、1,1-ジメチルプロピル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、4-メチルペンチル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、1,2,2-トリメチルプロピル、1,1,2-トリメチルプロピル、2-エチルペンチル、3-エチルペンチル、ヘプチル、1-メチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル、3,3-ジメチルペンチル、4,4-ジメチルペンチル、1,2-ジメチルペンチル、1,3-ジメチルペンチル、1,4-ジメチルペンチル、1,2,3-トリメチルブチル、1,1,2-トリメチルブチル、1,1,3-トリメチルブチル、5-メチルヘプチル、1-メチルヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリスカイデシル(triskaidecyl)、テトラデシル、クインデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシルなどを含むが、これらに限定されることはない。

30

40

【0049】

本明細書において用いられる場合、「アルキレン」という用語はその意味のなかに、二価飽和直鎖炭化水素基を含む。

【0050】

本明細書において用いられる場合、「アリール」という用語はその意味のなかに、一価の、単一の、多核の共役および縮合芳香族炭化水素基、例えばフェニル、ナフチル、アントラセニル、ピレニル、フェナントラセニルを含む。

【0051】

50

本明細書において用いられる場合、「アリーレン」という用語はその意味のなかに、二価の、単一の、多核の共役および縮合芳香族炭化水素基を含む。

【0052】

本明細書において用いられる場合、「アラルキル」という用語はその意味のなかに、例えば、ベンジル、フェニルメチル、フェニルエチル、フェニルプロピル、フェニルイソプロピル、フェニル-第三ブチルなどのような、1つまたは複数のアリールまたは置換アリール基により置換された低級アルキル残基を含む。

【0053】

「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する炭化水素基をいう。 $C_2 \sim C_6$ アルケニル基は、直鎖状または分岐状アルケニル骨格中に2~6個の炭素原子を有するアルケニル基である。例示的なアルケニル基は、非限定的に、ビニル、プロペニル、2-ブテニルなどを含む。アルケニル基は、アルキル基について記述した通りの1つまたは複数の部分(one or moieties)で置換されてもよい。

10

【0054】

「アルキニル」という用語は、本明細書において用いられる場合、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を有する炭化水素基をいう。 $C_2 \sim C_6$ アルキニル基は、直鎖状または分岐状アルキニル骨格中に2~6個の炭素原子を有するアルキニル基である。例示的なアルキニル成分はプロピニル、3-ヘキシニルなどを含む。アルキニル基は、アルキル基について記述した通りの1つまたは複数の部分(one or moieties)で置換されてもよい。

20

【0055】

本明細書において用いられる場合、本明細書において用いられる「置換されてもよい」という用語は、この用語が言及する基が未置換であっても、またはアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、ハロ、ハロアルキル、ハロアルキニル、ヒドロキシル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、チオアルコキシ、アルケニルオキシ、ハロアルコキシ、ハロアルケニルオキシ、窒素含有基、例えば NO_2 、 NO_3^- 、 $N(アルキル)_2$ 、 $NH(アルキル)$ 、ニトロアルキル、ニトロアルケニル、ニトロアルキニル、ニトロヘテロシクリル、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルケニルアミンおよびアルキニルアミノ、アシル、アルケノイル、アルキノイル、アシルアミノ、ジアシルアミノ、アシルオキシ、アルキルスルホニルオキシ、ヘテロシクロオキシ、ヘテロシクロアミノ、ハロヘテロシクロアルキル、アルキルスルフェニル、アルキルカルボニルオキシ、アルキルチオ、アシルチオ、リン含有基、例えばホスホノおよびホスフィニル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アラルキル、アルキルヘテロアリール、シアノ、シアネート、イソシアネート、硫黄含有基、例えば SO_3H 、 SO_3^- 、 OSO_3^- 、 SO_3 アルキル、 SO_3 アリール、 $NHSO_3H$ 、および $NHSO_3^-$ 、 CO_2H 、 COO^- 、 CO_2 アルキル、 $C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NH(アルキル)$ 、ならびに $-C(O)N(アルキル)_2$ より独立して選択される1つまたは複数の基で置換されてもよいことを意味する。好ましい置換基は $C_1 \sim 10$ アルキル、 $C_1 \sim 10$ アルコキシ、 $-CH_2-(C_1 \sim 10)$ アルコキシ、 $C_6 \sim 10$ アリール、例えばフェニル、 $-CH_2$ -フェニル、ハロ、ヒドロキシル、ヒドロキシ($C_1 \sim 10$)アルキル、およびハロ-($C_1 \sim 10$)アルキル、例えば CF_3 、 CH_2CF_3 を含む。特に好ましい置換基は $C_1 \sim 10$ アルキル、 $C_1 \sim 10$ アルコキシ、ハロ、ヒドロキシル、ヒドロキシ($C_1 \sim 10$)アルキル、例えば CH_2OH 、およびハロ-($C_1 \sim 10$)アルキル、例えば CF_3 、 CH_2CF_3 を含む。

30

40

【0056】

本明細書において用いられる場合、「敗血症」という用語はその意味のなかに、標準的な医学文献書によって特徴付けられるおよび/または当業者に知られる疾患または状態の全ての段階を含む。例えば、敗血症は重症敗血症、急性および慢性敗血症ならびに敗血症性ショックを含む。敗血症は火傷の患者、がん患者の治療計画、妊婦患者における周産期合併症、被移植者のための免疫抑制的予防、および外科手術後の患者と関連する敗血症エピソードも含む。

【0057】

本明細書において用いられる場合、「ナノ粒子」という用語は、直径1ミクロン(1000 n

50

m) 未満の任意の固体粒子をいう。具体的には、ナノ粒子は、黒鉛状炭素の複数の層によって被包されたテクネチウム-99m放射性核種の金属プレートレットからなるFibrinLiteナノ粒子でありうる。FibrinLiteナノ粒子の直径は、およそ200 nmの中位径で20 ~ 400 nmの範囲にわたり対数正規分布される。

【0058】

詳細な説明

本発明は、感染による敗血症に罹患している患者の処置のための方法に関し、多価陰イオンを利用して、細胞外ヒストンタンパク質と複合体を素早く形成させ、かくして、細胞外ヒストンタンパク質、例えば、敗血症患者の循環血中に見られる細胞外ヒストンタンパク質の細胞毒性活性を中和または阻害する。さらに、多価陰イオンは細胞外ヒストンと複合体を形成することができ、臓器、具体的には肺でのヒストンの蓄積を防ぐことができる。好ましい態様において、多価陰イオンは、血液凝固および止血へのその低障害ならびに/または循環血中に存続するその能力について選択される。

【0059】

本発明は、抗凝固性をわずかにしか持ちえないオリゴ糖多価陰イオンが、生きている動物の循環血中のヒストンと複合体を形成でき、臓器へのヒストンの結合を防止できるという所見を前提としている。これらの多価陰イオンは、敗血症での治療的介入の新たな手段を提供し、中和抗体、APCまたはヘパリンの使用に代わるさらに魅力的な手段を提供する。

。

【0060】

敗血症

敗血症は、動脈低血圧、代謝性アシドーシス、全身性血管抵抗減少、多呼吸および臓器機能不全によって特徴付けられる全身性反応である。敗血症(敗血性ショックを含む)は、サイトカイン・ネットワーク、白血球、ならびに補体および凝固線溶系を含むいくつかの宿主防御機構の活性化に関連した、かつそれによって媒介される、感染または外傷に対する全身性炎症反応である。さまざまな臓器の微小血管系での線維素の広範な沈着を伴う播種性血管内凝固(DIC)は、敗血症の早期徴候でありうる。DICは、多臓器不全症候群の発症における重要なメディエータであり、敗血性ショックを有する患者の予後不良の一因となる。

【0061】

敗血症は血流中の生物、その代謝産物または毒素から発生しうる。すなわち、敗血症は菌血症、真菌血症、ウイルス血症および寄生虫血症を包含する。したがって、いくつかの生物または疾患過程によって敗血性ショック(多臓器不全および高死亡率と関連することが多い敗血症から生じる急性循環不全)が引き起こされうる。敗血症は外傷、重度の火傷、腸捻転、羊水塞栓症および臓器移植のような非感染刺激によっても引き起こされうる。

【0062】

敗血症を有する多くの患者は、24 ~ 48時間にわたって急速な悪化を示す。したがって、効果的な敗血症処置には素早い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、病原体を特定するための微生物分析が必要となり、これには何日かかかりうる。それゆえ、病原体を取り除くための治療(例えば抗生物質治療)は、病原体のタイプおよび種の認識を持たずに、および感染の程度を知る手段を持たずに開始されなければならない。

【0063】

炎症の鍵になるメディエータに対するモノクローナル抗体および活性化プロテインC (APC)のような、敗血症患者に有効な新しい治療法を見つけ出すために、いくつかの試みがなされてきた。しかしながら、これらの処置には臨床的影響がほとんどなく、APCは最近になって市場から引き揚げられている。低用量ヘパリンが敗血症患者の処置において用いられているが、この状況でそれを用いることは、敗血症が播種性血管内凝固(DIC)を誘発した場合には特に、血小板数の低下および/または凝固因子の枯渇に起因して敗血症患者でよく認識されている出血リスクの増大により複雑であり、議論の余地が残されている。低用量ヘパリンによる血小板および/または凝固因子の枯渇はその後、凝固機能不全につ

10

20

30

40

50

ながる可能性があり、壊滅的な出血が起こる可能性がある。ヘパリンはまた、一部の患者において、抗体を介した血小板破壊が同じく危険な出血につながりうる、ヘパリン誘導性血小板減少症(HIT)として公知の状態を誘発しうる。

【0064】

ヒストン

ヒストンは、リジンまたはアルギニンの含量が高い低分子量の塩基性タンパク質であり、DNAのパッケージングにおいて機能する。ヒストンは、高度に保存されており、コアヒストン(H2A、H2B、H3およびH4)およびリンカーヒストン(H1およびH5)の2つのスーパークラスで構成されている5つの主要なクラス：H1/H5、H2A、H2B、H3およびH4に分類することができる。

10

【0065】

各コアヒストンの2つがアセンブルして、タンパク質複合体の周りにDNAを巻き付けることにより八量体のヌクレオソームコア粒子を形成させる。リンカーヒストンはヌクレオソームおよびヌクレオソームの出入口のDNAに結合し、それによって所定位置にDNAを固定し、高次構造の形成を容易にする。

【0066】

本明細書において記述されるように、ヒストンは全長ヒストン、その断片または変種であってよい。ヒストン変種は、例えば、アミノ酸の欠失、付加および/または置換によって修飾されてもよい。あるいは、ヒストンはリジンおよびアルギニンのアセチル化および/またはメチル化によって修飾されてもよい。概して、修飾は、ヒストンの多価陽イオン性または臓器に局在するヒストンの能力を実質的に損なわない。

20

【0067】

適当なアミノ酸置換は、当技術分野において「保存的」として公知のアミノ酸置換を含むが、必ずしもこれに限定されることはない。「保存的」置換は、ペプチド化学の当業者であればポリペプチドの生物活性、二次構造および/または疎水性親水性指標の性質が実質的に不変であるものと予想するような、あるアミノ酸が類似の特性を有する別のアミノ酸に置換されたものである。アミノ酸置換は一般に、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性における類似性に基づいてなされうる。例えば、負に荷電したアミノ酸はアスパラギン酸およびグルタミン酸を含む；正に荷電したアミノ酸はリシン、ヒスチジンおよびアルギニンを含む；ならびに類似の親水性値を有する非荷電極性頭部基を持つアミノ酸は、ロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンを含む。保存的变化に相当しうるアミノ酸の他の群は以下のものを含む：(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2) cys、ser、tyr、thr；(3) val、ile、leu、met、ala、phe；(4) lys、arg、his；および(5) phe、tyr、trp、his。ヒストン変種は同様に、またはあるいは、非保存的アミノ酸変化を含んでもよい。

30

【0068】

ある種の態様において、ヒストン変種は、アミノ酸の欠失、付加および/または置換によって修飾されてもよく、5個のアミノ酸またはそれ以下の、例えば4個、もしくは3個、もしくは2個、もしくは1個だけのアミノ酸の置換、欠失または付加によって非修飾配列とは異なる。

40

【0069】

本明細書において用いられる場合、ヒストン「変種」は、天然に存在するヒストンの配列と実質的に類似の配列を有するヒストンをいう。一般に、2つの配列は、その2つの配列が、同じものであるアミノ酸残基の特定の割合(「配列同一性」の割合)を有するなら「実質的に類似する」。したがって、ヒストン配列の変種は、参照ヒストン配列と少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、83%、85%、88%、90%、93%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を共有しうる。

【0070】

一般に、ヒストン配列変種は共通の定性的生物活性を保有する。「変種」という用語の

50

意味のなかに同様に含まれるのは、ヒストンの相同体である。ヒストン相同体は、典型的には、異なる種由来であるが、しかし別の種由来の対応するヒストンと実質的に同じ生物機能または活性を共有している。例えば、ヒストンの相同体は、微生物または哺乳動物の異なる種由来のものを含むが、これらに限定されることはない。

【0071】

さらに「変種」という用語はまた、ヒストン配列の類似体を含む。ヒストン「類似体」は、所与のヒストンの誘導体であるポリペプチドであり、この誘導体は、ポリペプチドが実質的に同じ機能を保持するような、1つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失、置換を含む。上記のように、「保存的アミノ酸置換」という用語は、ヒストン配列内でのあるアミノ酸の、類似の特性を有する別のアミノ酸への置換または置き換えをいう。

10

【0072】

ある種の態様において、ヒストンの「変種」は5個のアミノ酸またはそれ以下の、例えば4個、もしくは3個、もしくは2個、もしくは1個だけのアミノ酸の置換、欠失または付加によって(関連するヒストンとは)配列が異なる。

【0073】

本発明の範囲内に同様に含まれるのは、ヒストンの断片である。ヒストン「断片」は、ヒストンまたはその変種の構成成分であるポリペプチドである。典型的には、断片は、これが構成成分であるヒストンと共通の定性的生物活性を保有する。典型的には、ヒストン断片は、50超のアミノ酸長、約5～約50アミノ酸残基長、約5～約45アミノ酸残基長、約5～約40アミノ酸残基長、約5～約35アミノ酸残基長、約5～約30アミノ酸残基長、約5～約25アミノ酸残基長、約5～約20アミノ酸残基長、約5～約15アミノ酸残基長、または約5～約10アミノ酸残基長でありうる。ある種の態様において、本発明のポリペプチドの断片は、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または25超のアミノ酸残基長である。

20

【0074】

多価陰イオン

本発明者らは、ヒストンが高い等電点を有する多価陽イオンであるので、それらは硫酸化された多価陰イオン多糖類(例えばヘパリン)、多価陰イオンオリゴ糖および二糖類、直鎖状多価陰イオン、シクリトール多価陰イオン、およびアリーレン尿素多価陰イオンのような、DNA以外の多価陰イオンと複合体を形成すると考えられることを提唱する。

30

【0075】

いくつかの態様において、多価陰イオンは、凝固系に何らの影響を及ぼすことなく循環血中ヒストンと複合体を形成し、かくして循環血中ヒストンの生物活性を阻害しうる。これは、処置に当たる医師に、DICが存在する場合でさえも、出血なく、そしてさらに出血を促進させることもなく、敗血症患者の血小板数および凝固状態とは完全に独立して、利用されうるさらに広い用量範囲の多価陰イオンという選択肢を提供するであろう。これらの多価陰イオンは、血小板の破壊も促進しないはずである。

【0076】

好ましい態様において、多価陰イオンは安定であり、インビボですぐには分解されない。さらに、本明細書において記述される多価陰イオンは、室温で安定であり、かくして、実質的分解なしに長期間貯蔵されうる。

40

【0077】

多価陰イオン多糖類

ヘパリンは、抗凝固剤として臨床医学において広く使われている天然の硫酸化多糖類である。その抗凝固活性はプロタミンのような薬学的に許容される多価陽イオンの投与により、患者において制御され、または場合により中和されうる。

【0078】

ヘパリン、つまり多価陰イオンは、循環血中の多価陽イオンヒストンと複合体を形成し、それゆえ、循環血中のヒストンと複合体を形成するには十分な、しかし明らかな抗凝固効果を及ぼすには不十分な用量で敗血症患者に有益であるものと提唱される。プロテオグ

50

リカンのペルレカンおよびシンデカンを含むヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸；デルマトン硫酸；ペントサン多硫酸(エルミロン(Elmiron))、スロデキシド(HS/DS)、過硫酸化ヒアルロン酸、フコイダンならびに過硫酸化コンドロイチン硫酸(Arteparon(登録商標))のような、当業者に公知の他の多価陰イオン多糖類が、循環血中のヒストンと複合体を形成するには十分な、しかし感知できるほどの抗凝固効果を及ぼすには不十分な投与量で用いられてもよい。

【0079】

他の態様において、多価陰イオン多糖類は、硫酸基のいくつかを除去するために化学的に修飾されている部分的に脱硫酸化されたヘパリン、低分子量ヘパリン、または顕著な抗凝固活性を欠くが、しかしヒストンと効率的にすばやく複合体形成する能力を保持している化学的に修飾されたヘパリン(例えば過ヨウ素酸塩処置した、グリコール分割ヘパリン)でありうる。いくつかの態様において、多価陰イオン多糖類は、N-アセチル化ヘパリン、グリコール分割ヘパリン、グリコール分割N-アセチル化ヘパリン、エノキサパリン、グリコール分割エノキサパリンおよびグリコール分割低分子量ヘパリン(3 kDa)からなる群より選択されうる。

【0080】

多価陰イオンオリゴ糖

1つの態様において、多価陰イオンは、一般構造(I)を有する多価陰イオンオリゴ糖であり：



式中でAおよびBが各々独立して、環状単糖類または環状デオキシ単糖類であり；

Dが環状単糖類、環状デオキシ単糖類、開環単糖類、または糖アルコールであり；

nが、0、1、2、3、4、5、6、7および8より選択される整数であり；ならびに

ここで環状単糖類、環状デオキシ単糖類、開環単糖類、または糖アルコールの各々がOS₃⁻、COO⁻、OP₃⁻、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアルケニル、置換されてもよいアルキニル、置換されてもよいアリール、または置換されてもよいアラルキルで独立して置換されてもよく；ならびに

ここで多価陰イオンオリゴ糖が、OSO₃⁻、COO⁻、およびOP₃⁻からなる群より選択される少なくとも2つの陰イオン置換基を含む。

【0081】

1つの態様において、環状単糖類は、グルコース、ガラクトース、フルクトース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース、グロース、イドース、タロース、リブロース、キシルロース、プシコース、ソルボース、タガトースおよびセドヘブツロースからなる群より選択される。別の態様において、環状単糖類は、グルコース、ガラクトースおよびフルクトースからなる群より選択される。

【0082】

1つの態様において、環状デオキシ単糖類は、フコース、デオキシリボースおよびラムノースからなる群より選択される。

【0083】

1つの態様において、糖アルコールは、グリコール、グリセロール、エリトリトール、トレイトール、リビトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール(グルシトール)、マンニトール、ズルシトール(ガラクチトール)、イジトールおよびフシトールからなる群より選択される。別の態様において、糖アルコールは、ソルビトールおよびズルシトールからなる群より選択される。

【0084】

1つの態様において、開環単糖類は、グルコース、ガラクトース、フルクトース、エリトロース、トレオース、エリトルロース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース、グロース、イドース、タロース、リブロース、キシルロース、プシコース、ソルボース、タガトースおよびセドヘブツロースからなる群より選択される。

【0085】

1つの態様において、開環単糖類は、アリアルまたはアルキルアミンで還元的にアミノ化されうる。

【0086】

1つの態様において、環状単糖類は、1,1、1,2、1,3、1,4、1,5または1,6結合によって連結される。1つの態様において、環状単糖類は、1,4または1,6結合によって連結される。1つの態様において、環状単糖類は、結合によって連結される。別の態様において、環状単糖類は、結合によって連結される。さらなる態様において、2つより多くの単糖類が存在する場合、単糖類の各々は結合によって連結される。さらなる態様において、2つより多くの単糖類が存在する場合、単糖類の各々は結合によって連結される。別の態様において、2つより多くの単糖類が存在する場合、単糖類は結合および結合の組み合わせによって連結される。

10

【0087】

1つの態様において、A、BおよびDは各々、グルコース、ガラクトースおよびフルクトースからなる群より選択される環状単糖類であり、グルコース、ガラクトースまたはフルクトースの各ヒドロキシル基は SO_3^- または PO_3^- で置換されてもよい。

【0088】

多価陰イオンオリゴ糖は、マルトース硫酸、マルトトリオース硫酸、マルトテトラオース硫酸、マルトペンタオース硫酸、マルトヘキサオース硫酸、マルトヘプタオース硫酸、マルトオクタノース硫酸、マルトノナオース硫酸およびマルトデカオース硫酸、パノース硫酸、イソマルトトリオース硫酸、エルロース硫酸、セロビオース硫酸ならびにラフィノース硫酸を含む群より選択されうる。

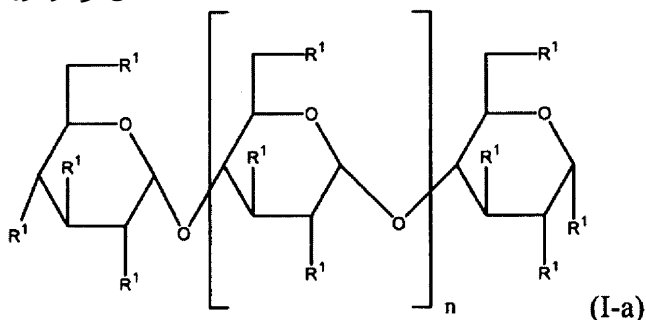
20

【0089】

さらなる態様において、多価陰イオンオリゴ糖は、セロビオース硫酸でありうる。

【0090】

別の態様において、多価陰イオンは、一般構造(I-a)を有する多価陰イオンオリゴ糖でありうる：



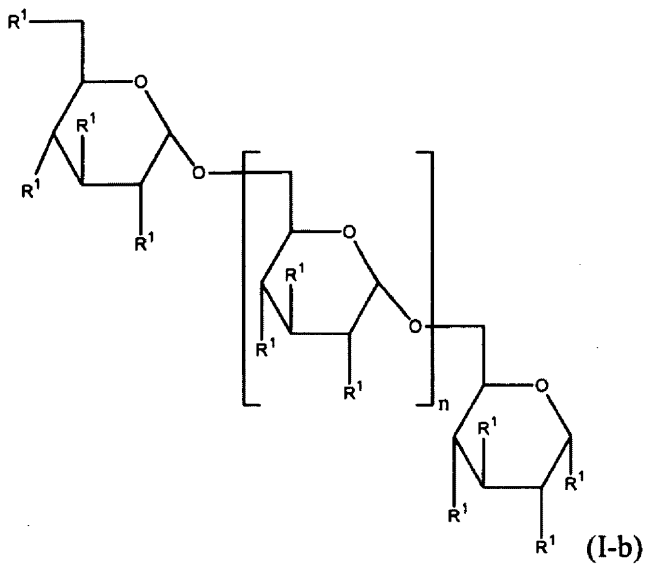
30

式中、各 R^1 が、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、 OH または H より独立して選択され；ならびに n が0、1、2、3、4、5、6、7、および8の間の整数であり；ならびに式中で R^1 の少なくとも2つが、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される。1つの態様において、 n は1、2、3または4である。別の態様において、 n は1または2である。1つの態様において、各 R^1 は OSO_3^- である。

40

【0091】

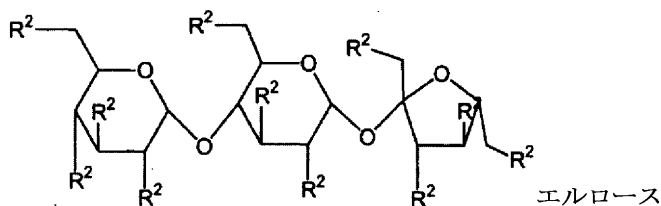
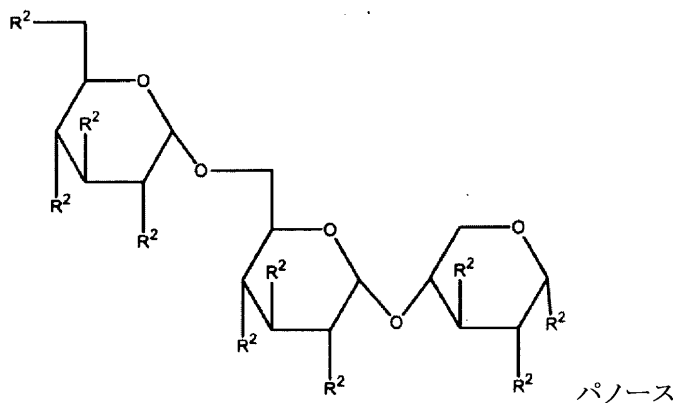
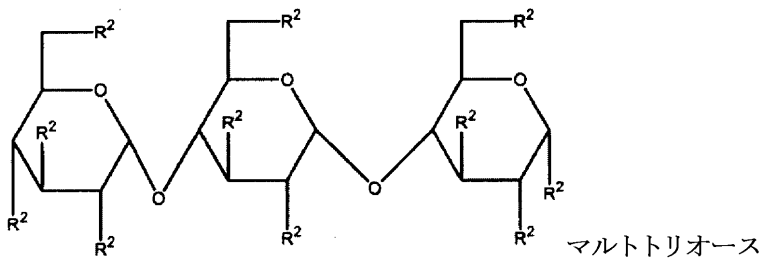
別の態様において、多価陰イオンは、一般構造(I-b)を有する多価陰イオンオリゴ糖でありうる：

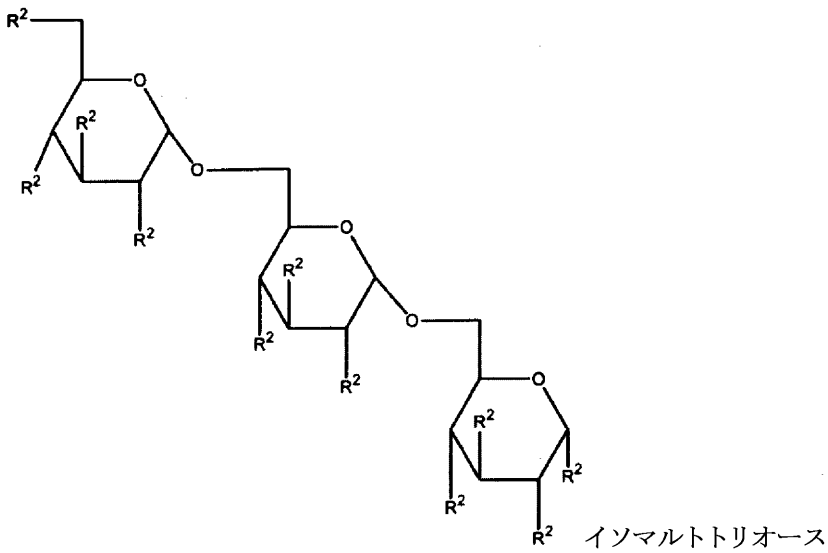


ここで各 R^1 が、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、 OH または H より独立して選択され；ならびに n が0、1、2、3、4、5、6、7、および8の間の整数であり；ならびに式中で R^1 の少なくとも2つが、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される。1つの態様において、 n は1、2、3または4である。別の態様において、 n は1または2である。1つの態様において、各 R^1 は OSO_3^- である。

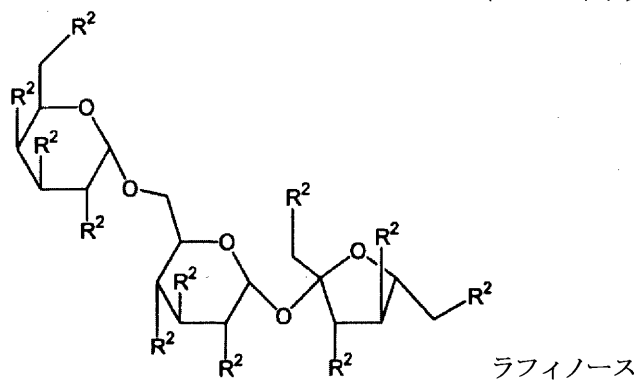
【0092】

別の態様において、多価陰イオンオリゴ糖は、以下の群より選択されうる：

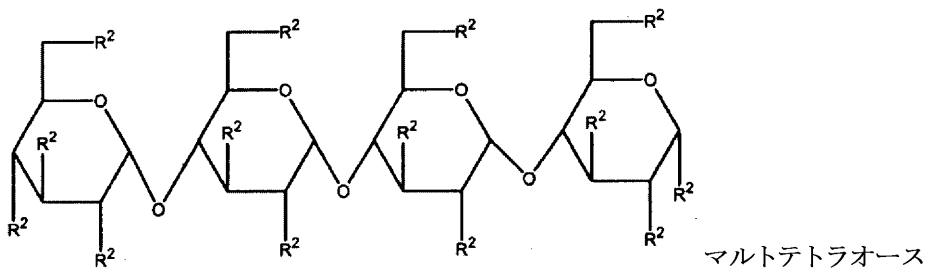




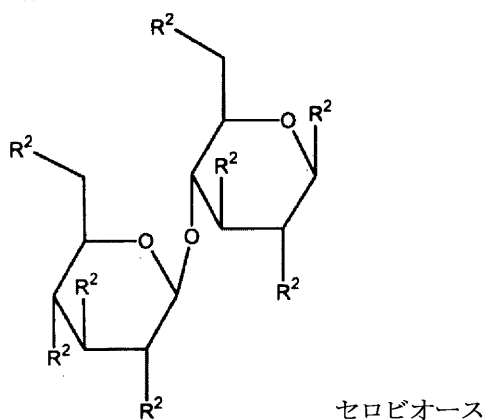
10



20



30

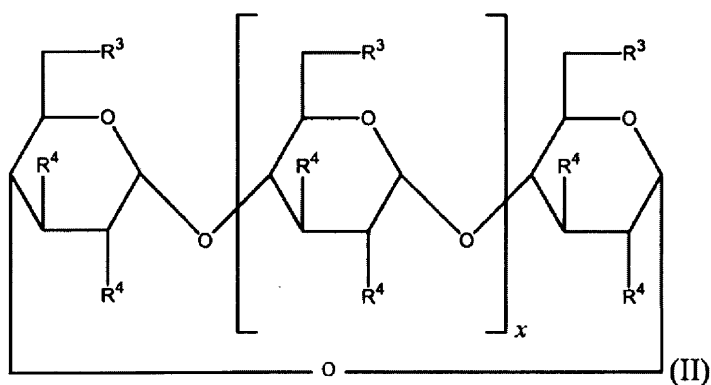


40

式中、各 R^2 が、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPo_3^- 、 OH または H より独立して選択され；ならびに式中で R^2 の少なくとも2つが、 OSO_3^- 、 COO^- 、および OPo_3^- からなる群より選択される。

【0093】

さらなる態様において、多価陰イオンは、一般構造(II)を有する多価陰イオンシクロデキストリンでありうる：



10

式中、各 R^3 が、置換されてもよいO-アルキル、O-アリール、O-アラルキル、O-アルケニル、O-アルキニル基、 OSO_3^- 、 COO^- 、 OPO_3^- 、OHまたはHより独立して選択され、ならびに各 R^4 が OSO_3^- 、 COO^- 、 OPO_3^- 、OHまたはHより独立して選択され； x が3、4、5、6、7、8、9、および10の間の整数であり、ならびにここで多価陰イオンシクロデキストリンが OSO_3^- 、 COO^- 、および OPO_3^- からなる群より選択される少なくとも2つの陰イオン置換基を含む。

【0094】

1つの態様において、 x は4、5または6である。シクロデキストリンは α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリンまたは γ -シクロデキストリンでありうる。

【0095】

別の態様において、オリゴ糖は硫酸化オリゴ糖または開環オリゴ糖である。

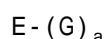
20

【0096】

他の態様において、多価陰イオンは、それぞれ、硫酸化マルトトリイトールおよびマルトテトライトールのような、三糖類または四糖類の還元糖末端の硫酸化開環形態でありうる。それらの三糖類または四糖類の誘導体は、還元糖の環を維持しているかまたは開環しているかのどちらかの、アルキルおよびアリール基で還元的にアミノ化された部分でありうる。

【0097】

別の態様において、多価陰イオンは、以下の構造式を有する二糖類、オリゴ糖、開環二糖類または開環オリゴ糖である：



30

式中で a が1～10の整数であり； E が、ジオース、トリオース、テトラオース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース、オクトースおよびノノースからなる群より選択され、ならびに各独立した G が、ジオース、トリオース、テトラオース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース、オクトースおよびノノースからなる群より選択され；

E および G 、ならびに a が2またはそれ以上の整数である場合には、 G および G が、 $-O-(\text{CH}_2)_x-O-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-NR(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_xNR_1-$ 、 $-NR(\text{CH}_2)_xNR_1-$ 、 $-O(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_xO-$ 、 $-C(O)-N(R_2)-(\text{CH}_2)_x-N(R_2)-C(O)-$ 、 $-N(R_2)-C(O)-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-C(O)-N(R_2)-$ および $-N(R_2)-(\text{CH}_2)_x-N(R_2)-$ より選択される群によって連結され； R 、 R_1 および R_2 が水素、アルキル、アリール、ヘテロアリールおよび $C(O)$ -アルキルからなる群より選択され；

x が0～10の整数であり；

40

E および G が、アルキル、アルケニル、アリール、ハロ、ヘテロアリール、 $-\text{NHCOCH}_3$ -のようなアミド誘導体、 $-OCH_3$ -のようなアルコキシ、 $-O$ -および $-OH$ からなる群より選択される官能基で置換されてもよく；

ならびにここで該ジオース、トリオース、テトラオース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース、オクトースおよびノノースが硫酸化され、リン酸化されまたはカルボキシル化されてもよい。

【0098】

1つの態様において、 E および各 G は、ペントース、ヘキソースおよびヘプトースからなる群より独立して選択され、 $-O-(\text{CH}_2)_x-O-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-NR(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_xNR_1-$ 、 $-O(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_xO-$ 、 $-C(O)-N(R_2)-(\text{CH}_2)_x-N(R_2)-C(O)-$ 、 $-N(R_2)-C(O)-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-C(O)-$

50

)-N(R₂)-より選択される基によって連結され、R、R₁、およびR₂は、水素、アセチルおよびアルキルからなる群より選択され、ならびにxは1~6の整数である。

【0099】

別の態様において、ヘキソースは、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、フコース、およびイドースからなる群より選択されてもよく、ペントースはキシロースであってもよい。

【0100】

直鎖状および連結された多価陰イオン

他の態様において、多価陰イオンはその還元末端を通じて、還元的に連結された2つの糖の硫酸化構築体であり、したがって開環を有し、直鎖状ポリオール構造を提示する。例えば、リンカー-NH₂-CH₂-CHOH-CH₂-NH₂-が2つの還元グルコースまたはグルクロン酸単位を連結する。このタイプの構造における1分子当たりの潜在的な硫酸基の鎖長および数は、開始サブユニットとしての糖のタイプの適切な選択、例えばグルコースのようなヘキソースに代えてセドヘブツロースのようなヘプトースにより伸長させることもできる。他の態様において、多価陰イオンは、環状単糖類と開環単糖類との間にリンカーを有する硫酸化構築体でありうる。

10

【0101】

他の態様において、多価陰イオンは12、13、13、15、16、17、または18個の炭素原子鎖長の多価陰イオン直鎖状ポリオールでありうる。多価陰イオン直鎖状ポリオールは、不飽和結合、分岐鎖、または飽和もしくは不飽和であってよい環構造を含みうる。多価陰イオン直鎖状ポリオールは、置換されてもよい。アルコール前駆体の例は、1,2,13,14-テトラデカン-テトラオール、5-(ヒドロキシメチル)ウンデカン-1,5,6,7,11-ペントール、オクタデカン-1,18-ジオール、および加水分解スクアレン誘導体である。1つの態様において、多価陰イオン直鎖状ポリオールは硫酸化される。他の態様において、多価陰イオン直鎖状ポリオールは、硫酸基、カルボキシレート基およびリン酸基より選択される少なくとも2つの置換基を含む。

20

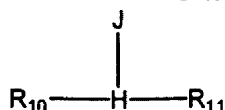
【0102】

他の態様において、多価陰イオンは、アルキルポリオールに基づくまたは芳香環に結合された多価陰イオン化合物、例えばスラミンおよび関連する誘導体でありうる。

【0103】

シクリトール多価陰イオン

さらなる態様において、多価陰イオンは、以下の構造式を有するシクリトールである：



式中で：

Hが、N、CH、O、S、または-CO-NH-K-NH-CO-、-NH-CO-K-CO-NH-、-NH-K-NH-、-O-K-O-より選択されるリンカーからなる群より選択され；

Kが、アルキレンおよびアリーレンからなる群より選択され；

R₁₀が、飽和または不飽和である4員、5員または6員炭素環であり、ここで環は少なくとも1つの硫酸基、少なくとも1つのカルボキシレート基または少なくとも1つのリン酸基を含み、

40

R₁₁が、飽和または不飽和である4員、5員または6員炭素環からなる群より選択され、ここで環は少なくとも1つの硫酸基、少なくとも1つのカルボキシレート基または少なくとも1つのリン酸基、水素、アリールおよびアルキルを含み；

Jが、水素、アルキル、アリール、-L-C(R₁₂)(R₁₃)およびアセタートからなる群より選択され；

Lが、-(CH₂)_x-、-CH₂-Ar-CH₂-、-CH₂CH(OH)CH₂-、-(CH₂)_x-Ar-(CH₂)_x-からなる群より選択され、ここでL基は1つもしくは複数の硫酸基、1つもしくは複数のカルボキシレート基または1つもしくは複数のリン酸基を任意で含んでもよく、

50

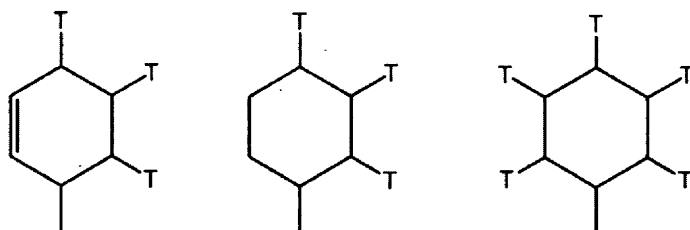
R_{12} および R_{13} が、飽和または不飽和である4員、5員または6員炭素環、水素、アリールおよびアルキルからなる群より独立して選択され、ここで R_{12} および/または R_{13} は1つもしくは複数の硫酸基、1つもしくは複数のカルボキシレート基または1つもしくは複数のリン酸基を含んでもよく、ならびに x が0~10の整数である。

【0104】

1つの態様において、 L は、 x が2~10の整数である $-(CH_2)_x-$ 、 $CH_2-Ar-CH_2$ および $CH_2CH(OSO_3H)CH_2$ からなる群より選択される。

【0105】

代替的な態様において、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} および R_{13} は以下より独立して選択されてもよく

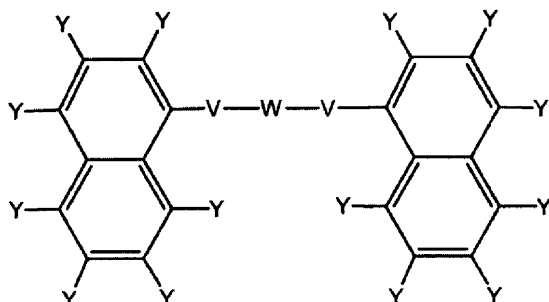


式中で T が、 SO_3H 、 SO_3^- 、 $COOH$ 、 COO^- 、 OPO_3H および OPO_3^- からなる群より独立して選択される。

【0106】

アリーレン尿素多価陰イオン

第1の局面のさらなる態様において、多価陰イオンは下記式のアリーレン尿素である：



式中で各 Y が、 SO_3H 、 SO_3^- 、水素、アルキル、ハロ、フェニル、アミド誘導体、 $-NHCOCH_3$ 、 NO_3^- 、 $-O-$ 、 $-OCH_3$ 、 $COOH$ 、 COO^- 、 OPO_3H および OPO_3^- からなる群より独立して選択され、各 V が、 $-(NHC(O)Ph)_z-$ 、 $(CH_2)_u$ およびフェニルからなる群より独立して選択され；
 W が $-NH-C(O)-NH-$ であり；

u および z が互いに独立していてもよく、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10の間の整数であってもよい。

【0107】

1つの態様において、アリーレン尿素はスラミン、またはその塩であってもよい。

【0108】

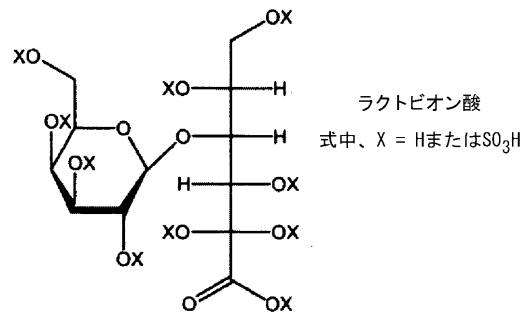
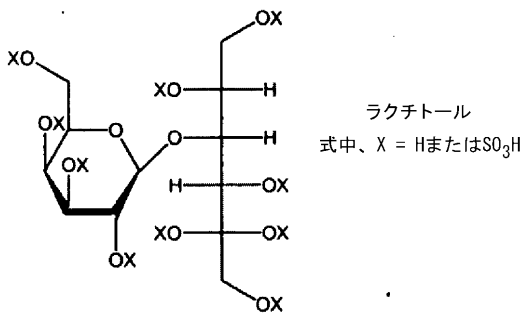
本発明の方法および組成物において有用な多価陰イオンの例としては、以下が挙げられる。

10

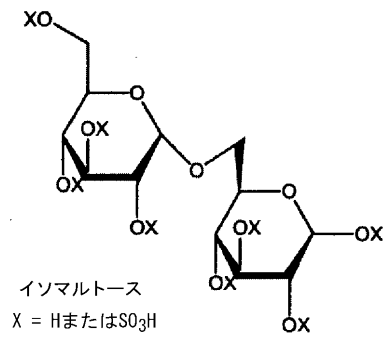
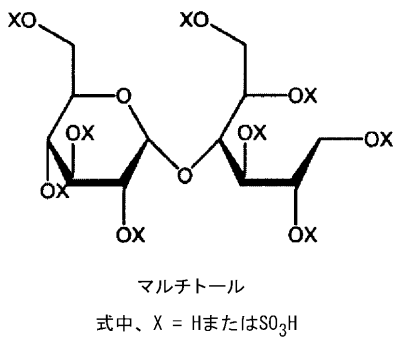
20

30

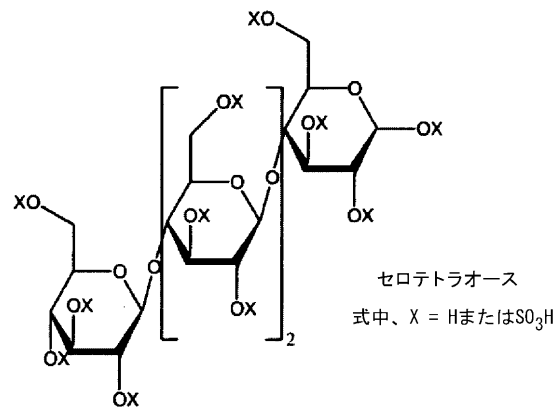
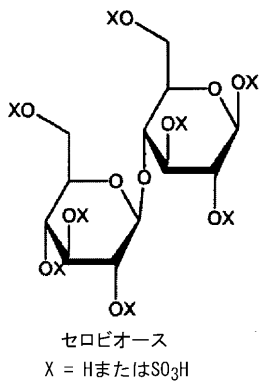
40



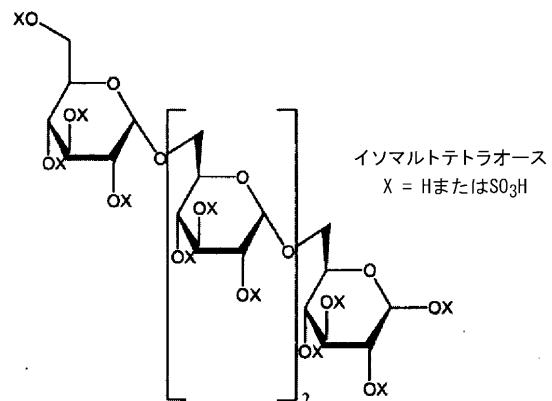
10



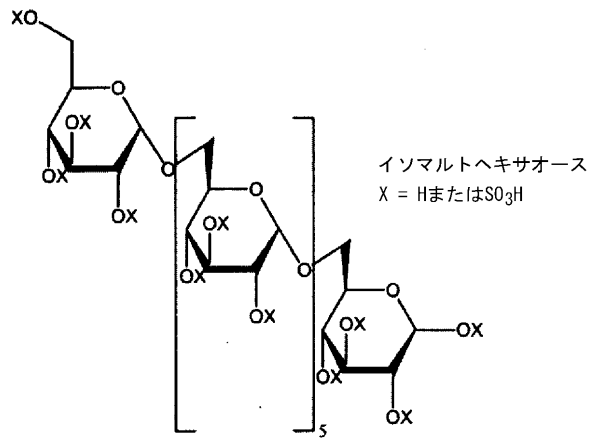
20



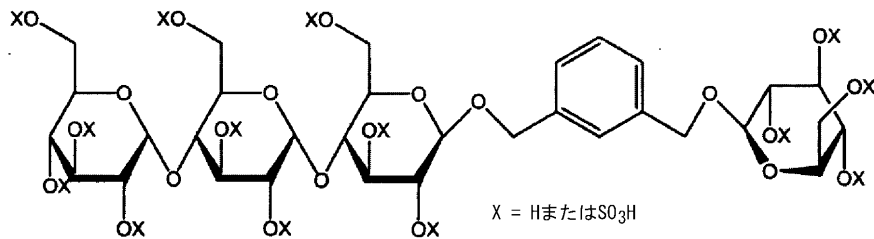
30



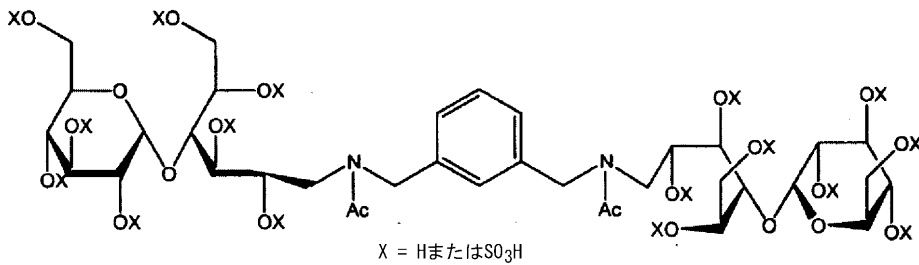
40



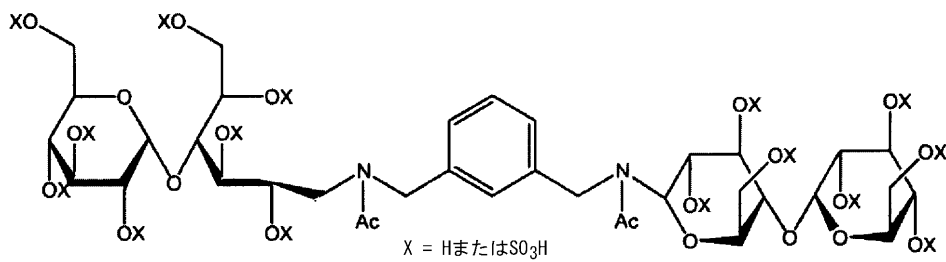
10



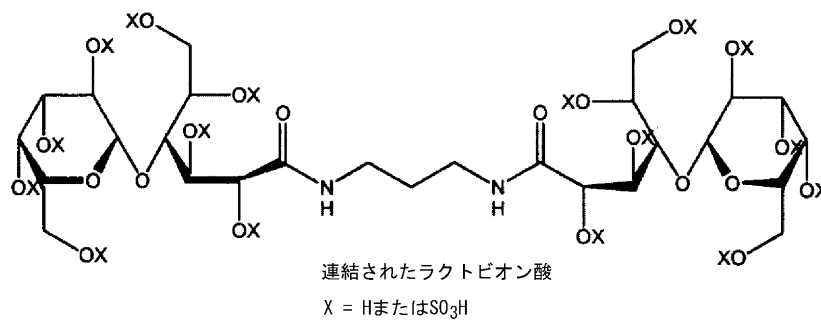
20

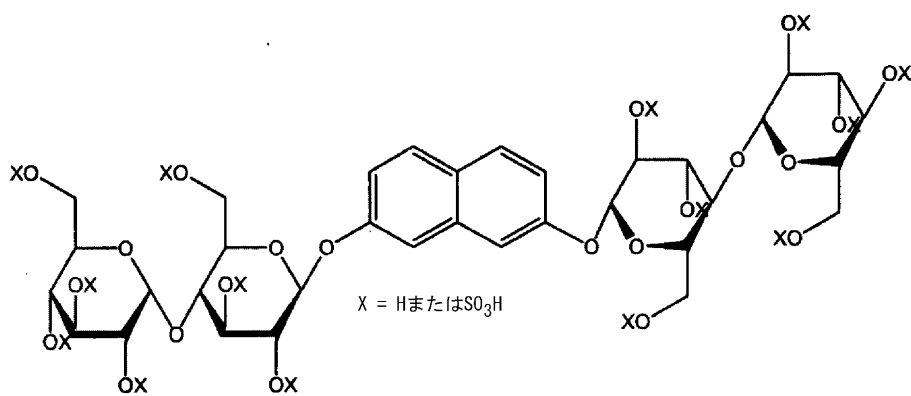


30

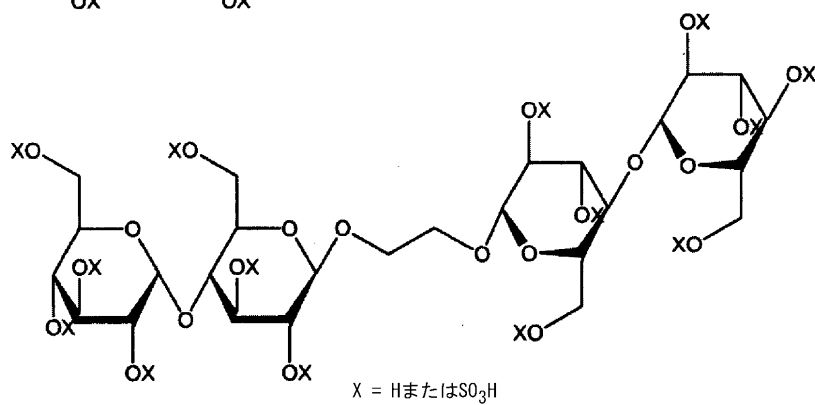


40

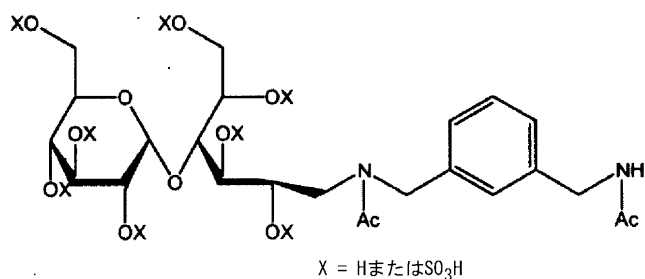




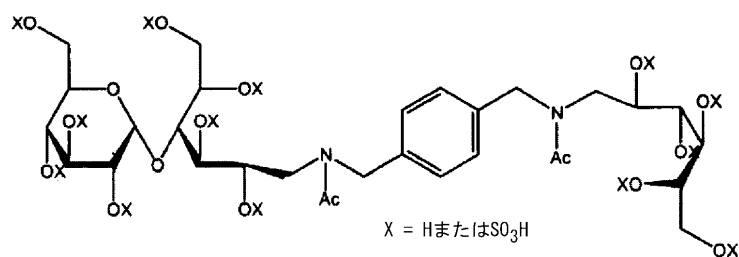
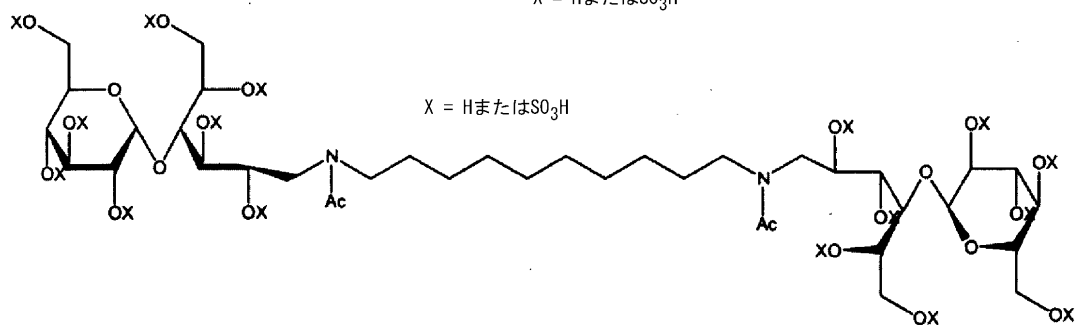
10



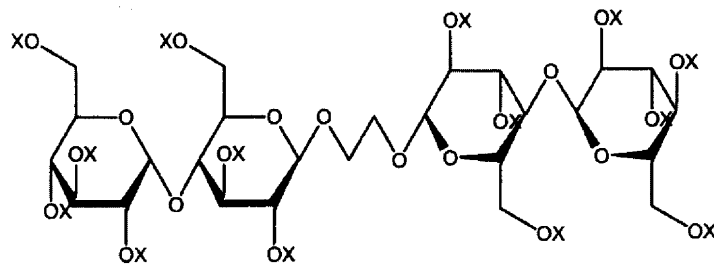
20



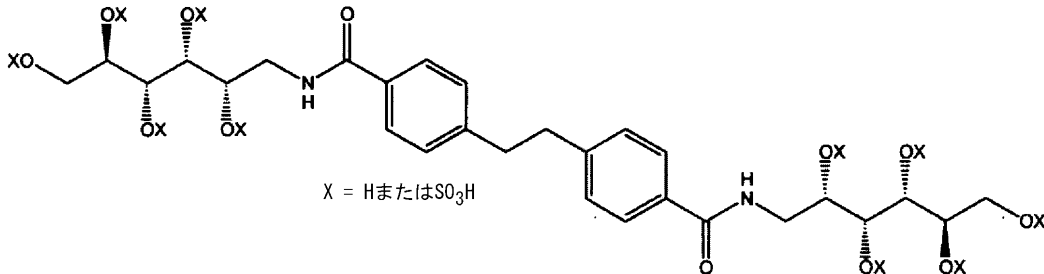
30



40



X = HまたはSO₃H



X = HまたはSO₃H

10

20

30

40

50

【0109】

多価陰イオンの調製

本発明の組成物および方法で用いるための多価陰イオンは、購入されてもよく、または当業者に公知の方法によって調製されてもよい。

【0110】

本発明の方法および組成物において用いられる硫酸化されたオリゴ糖化合物は、同様に当業者に公知の方法による、対応するオリゴ糖の硫酸化により調製されてもよい。例えば、オリゴ糖化合物を、適切な溶媒の存在下においてピリジン-三酸化硫黄複合体のような硫化剤で処理してもよい。

【0111】

本発明の1つの局面において、多価陰イオンはオリゴ糖とピリジン-三酸化硫黄複合体との反応によって得られた化合物の混合物でありうる。

【0112】

オリゴ糖には1つまたは複数の硫酸基が存在してもよい。これらの硫酸基をさまざまな塩基と反応させて、塩を形成させてもよい。硫酸化化合物は、塩の形態である場合に安定である。遊離形態の硫酸化化合物は、Dowex 50W-X8のような陽イオン交換樹脂を利用することによりその塩から導出されうる。任意で、塩を従来のイオン交換に供して、それを、さまざまな他の望ましい塩のいずれか1つに変換してもよい。

【0113】

硫酸化されるオリゴ糖は、天然に存在する産物、例えばラフィノース、スタキオースまたはシクロデキストリンであってよい。あるいは、多価陰イオンが化学合成によって調製されてもよく、またはオリゴ糖が天然多糖類の酵素的もしくは化学的分解により、引き続きその後の化学修飾により調製されてもよい。

【0114】

多価陰イオンの抗凝固活性

一部の多価陰イオンは抗凝固活性を持ちうる。「抗凝固活性」という用語は、インビトロまたはインビボ血液凝固アッセイ法において血液凝固を阻止する、阻害するまたは引き延ばす物質の活性をいう。

【0115】

血液凝固アッセイ法は、当技術分野において公知であり、フィブリン塊の形成に必要とされる時間を測定するアッセイ法を含む。例えば、アッセイ法はプロトロンビン時間(PT)、部分トロンボプラスチン時間(PTT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、フィブリノゲンアッセイ法、トロンビン凝固時間(TCT)および活性化凝固時間(ACT)を含みうる。

【0116】

いくつかの態様において、多価陰イオンの抗凝固活性は、本明細書において記述される方法において有用な多価陰イオンの臨床応用または有効用量に影響を与えうる。しかしながら、抗凝固活性を有する多価陰イオンはそれでもなお、本明細書において記述される方法において有用である。好ましい態様において、多価陰イオンは実質的な抗凝固活性を持たない。

【0117】

実質的な抗凝固活性のない多価陰イオンは、正常範囲と比べてPT、PTT、APTT、TCTまたはACTを実質的に増大しない。例えば、実質的な抗凝固性を持たない多価陰イオンは、PT、PTT、APTT、TCTまたはACTを増大しないものと考えられ、あるいは多価陰イオンは、正常範囲の0%～約10%だけPT、PTT、APTT、TCTまたはACTを増大するものと考えられる。他の態様において、多価陰イオンは、正常範囲の約1%～約5%だけPT、PTT、APTT、TCTまたはACTを増大するものと考えられる。さらなる態様において、多価陰イオンは、正常範囲の約2.5%～約7.5%だけPT、PTT、APTT、TCTまたはACTを増大するものと考えられる。さらなる態様において、多価陰イオンは、正常範囲の約5%～約10%だけPT、PTT、APTT、TCTまたはACTを増大するものと考えられる。さらなる態様において、多価陰イオンは、正常範囲の約12.5%～約15%だけPT、PTT、APTT、TCTまたはACTを増大するものと考えられる。別の態様において、多価陰イオンは、正常範囲の約15%～約20%だけPT、PTT、APTT、TCTまたはACTを増大するものと考えられる。

【0118】

ナノ粒子

「Method for detection of fibrin clots」という名称の米国特許第6,977,068号には、フィブリン塊の検出において炭素封入された放射性核種ナノ粒子を用いるための方法が記述されている。「A method of forming an injectable radioactive composition of a carbon encapsulated radioactive particulate」という名称の、2006年4月28日付で出願され、かつWO 2006/116798 A1として公開された国際特許出願第PCT/AU2006/000554号には、炭素封入ナノ粒子の注射剤の生成のためのプロセスが記述されている。その中に記述されているプロセスは、「FibrinLiteプロセス」ということができ、そのようにして生成されたナノ粒子は「FibrinLite」といわれる。

【0119】

許される範囲内で、US 6,977,068およびPCT/AU2006/000554 (WO 2006/116798)の内容全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0120】

当業者は、炭素封入ナノ粒子複合材の水分散液を生成する方法が放射性エアロゾルの水性捕捉の段階を含みうることを、およびこの段階がいくつかの方法で達成されうることを承知しているものと理解されよう。例えば、炭素封入ナノ粒子複合材を作出するために用いられる放射性エアロゾルの水性捕捉の段階は、ベンチュリスクラップにおけるエアロゾルの収集、液体電極でのエアロゾルの濃縮、またはサイクロン装置の使用を含んでもよいが、これらに限定されなくてもよい。

【0121】

1つの態様において、炭素封入ナノ粒子複合材は、PCT/AU2006/000554に記述されているプロセスを用いて調製されてもよく、ここでこのプロセスは、内容全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,792,241号に記述されているブロウィット(Browitt)沈殿分離装置を用いた水中での放射性エアロゾルの捕捉を伴う。

【0122】

既述のように、炭素封入ナノ粒子は、ヒストンのような巨大分子の高い比放射能および高い親和性標識(avidity labelling)をもたらす。

【0123】

PCT/AU2006/000554に記述されるように、炭素封入放射性微粒子(ナノ粒子)は、炭素るつぽにテクネチウムまたは他の同位体を充填すること、充填されたるるつぽを予め加熱する

こと、粒子の瞬時放出、水または他の水溶液中での粒子捕捉によって調製されうる。

【0124】

PCT/AU2006/000554に記述されるように、同位体の比放射能が十分に高いなら、例えば、100 mCi/mLなら蒸発法により、単純に、同位体のアリコットをるつぼの中の溶液に入れ、るつぼの抵抗加熱の入念な調節により液体を蒸発乾固させることによって、適当な黒鉛るつぼに充填するように同位体を用いてもよい。あるいは、るつぼを陰極としておよび純プラチナワイアの陽極を流体送出管にて用いることにより、るつぼに電解充填してもよい。この管は同位体溶液をるつぼへ送出し(そして、るつぼを通じたその再循環を促進し)、同位体は電気分解および連続ポンピングの複合作用によってるつぼの内表面に濃縮されうる。

10

【0125】

充填の後、るつぼを予加熱段階に供して、同位体溶液中の任意の担体を除去し、例えば塩化ナトリウムを、好ましくは不活性ガス流、例えば、アルゴン流への蒸発により、除去する。予加熱段階は、るつぼから後に除去される遊離炭素の量を減らし、ナノ粒子に混入している遊離同位体のレベルを減らし、おおよより小さな粒子画分に存在する同位体の割合を増やす。

【0126】

予め処理したるつぼを電子サーボ装置により3秒間、例えば2740~2790 にまで瞬時加熱して、急速な立ち上がり時間(例えば、0.3~0.7秒)、その後、例えば2765 ±15 を所定の加熱時間(例えば、2.5~15秒)にわたって維持するフラットなプラトーを特徴とする、厳密に調節されたるつぼ加熱プロファイルをもたらす。この段階中に、ナノ粒子はるつぼの表面から除去される。

20

【0127】

るつぼから除去された粒子を、低濃度の界面活性剤、例えば、10マイクロモルのデオキシコール酸ナトリウムを含有する水および非常に低いイオン強度条件(例えば、100マイクロモル未満)中で沈殿させる。好ましい態様において、ナノ粒子は非常に低い濃度の弱酸性緩衝液中で沈殿されてもよく、またはこれは沈殿分離装置からの収集後にナノ粒子分散液、例えば、終濃度300マイクロモルのクエン酸二水素ナトリウム、pH 4.1に加えられてもよい。

【0128】

したがって、ナノ粒子は、1.0 mM NaClに相当するものより低い、非常に低い電解質濃度を有する安定な水溶性分散液として作出されうる。PCT/AU2006/000554に記述されている、またはそこから粒子の調製のために導出される方法のいずれかを、本発明で用いるためのナノ粒子の調製において利用してもよい。1つの態様において、これは、例えば、15秒間およそ1600~1650 で同位体を負荷された黒鉛るつぼを加熱して、2700 超で放射性同位体の焼灼前に担体の塩化ナトリウムを除去することによって達成されうる。塩化ナトリウムの沸点は、1413 でしかなく、Tc-99m放射性同位体はこの温度では蒸発しない。別の放射性同位体が発明の方法にて利用される場合、当業者は例えばPCT/AU2006/000554を参照することにより、焼灼の適切な温度を判定することができるであろう。

30

【0129】

PCT/AU2006/000554によって作出されたナノ粒子の水溶性分散液は、例えば48時間の放置において凝集せず、沈殿せず、または沈降しない。ナノ粒子の分散液は、生体の血液循環に適合性があり、注射されうる、非常に低い(例えば、約1マイクロモルから約20マイクロモルの範囲内、典型的には約10マイクロモル)濃度の陰イオン界面活性剤、典型的にはデオキシコール酸ナトリウムを含みうる(本明細書における図5および6を参照のこと)。ナノ粒子は、300マイクロモルのクエン酸二水素ナトリウムpH 4.1の終濃度でなどの、低濃度の弱酸性緩衝液中での貯蔵によるような、任意の適切な方法で、好ましくは分散液の安定性を可能とするようにして貯蔵されうる。ナノ粒子の分散液は安定であり、孔隙率が800、450および220 nmで入手できる、ミリポア製混合セルロースエステル(MCE)シリンジ型フィルタのような、容易に入手可能な親水性膜フィルタの使用によってサイズ分画されう

40

50

る。典型的なナノ粒子調製物中の放射能の90%超が800 nmのMCEフィルタを通過し、その調製物は、典型的には5%未満の溶解性の同位体を含むことが薄層クロマトグラフィーによって示されうる。

【0130】

放射性同位体

当業者は、金属元素の任意の放射性同位体がナノ粒子に組み入れられうることを理解するであろう。PCT/AU2006/000554およびPCT/AU2009/000508に記述されているように、Tc-99m、Ga-67のような、 γ 線を放出するもの；Y-90のような、 β 線を放出するもの；Bi-213のような、 α 線を放出するもの；およびCu-64のような、ポジトロンを放出するものを含む、さまざまな放射性同位体がナノ粒子に組み入れられうる。 ^{198}Au 、 ^{64}Cu 、 ^{213}Bi 、 ^{57}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{165}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{153}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{23}Na 、 ^{24}Na 、 ^{103}Pd 、 ^{81}Rb 、 ^{82}Rb 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{75}Se 、 ^{153}Sm 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{89}Sr 、 ^{201}Th 、 ^{90}Y 、 ^{169}Yb 、 ^{192}Ir を含めて、任意の適当な金属放射性同位体が利用されうる。

【0131】

ナノ粒子において、それゆえ、本発明の方法において使用されうる同位体の範囲は、Tc-99mもしくはGa-67を用いた単光子放出コンピュータ断層撮影法(SPECT)、およびCu-64もしくはZr-89を用いたポジトロン放出断層撮影法(PET)またはガンマシンチグラフィーのような、画像診断用途に理想的に適したものを含む。

【0132】

PCT/AU2006/000554およびPCT/AU2009/000508に記述されているように、例示的な放射性核種はTc-99mである。ナノ粒子は、従来の標識法で得られるようなものを軽く超える、非常に高いレベルの比放射能が容易に得られうるように、そのコアの中に何万ものまたはそれ以上の同位体原子をそれぞれ保有しうる。モデルとなる封入された放射性同位体としてのTc-99mの場合、およびそれを用いて、約1から約100 mCi、約5から約100 mCi、約7.5から約95 mCi、約10から約90 mCi、約15から約85 mCi、約20から約80 mCi、約25から約75 mCi、約30から約70 mCi、約35から約65 mCi、約40から約60 mCi、約45から約55 mCi、または約50から約55 mCiの範囲で投入されたTc-99mが調製されうる。典型的な粒子調製物は、所望のように、水溶性懸濁液2 mL中に約1～約30 mCiを含むように容易に作出されうる。走査型移動度粒径測定(SMPS)を用いた粒子の気相の特徴付けから、懸濁液は、比放射能が600 mCi/mgの、または22 GBq/mg超ほどの高さで作出されうるように、ナノ粒子材料およ

【0133】

ナノ粒子によるヒストンの標識

好ましい態様において、ヒストンの標識は、標識ヒストンがインビボで典型的に直面する条件下で実質的に不可逆的である。典型的には、ヒストンの高親和性の標識は、インビボ条件下での解離が約10%未満となるようなものである。「Methods for radiolabelling macromolecules」という名称の、2009年4月23日付で出願され、かつWO 2009/129577 A1として公開された国際特許出願第PCT/AU2009/000508号には、ポリペプチドのような生体巨大分子の標識のためのプロセスが記述されている。許される範囲内で、PCT/AU2009/000508 (WO 2009/129577)の内容全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0134】

PCT/AU2009/000508には、放射性標識巨大分子がナノ粒子を用いて調製されうる方法が記述されており、本発明者らは、金属同位体を炭素ケージ内に包み、その結果、これはその外部環境との接触から物理的に単離されることになり、特にそれらがインビボで用いられる場合、粒子つまり巨大分子にとっては特に価値のある特性になる炭素封入プロセス(PCT/AU2006/000554参照)を活用する。放射性標識巨大分子のインビボにおける放射性金属イオンの浸出および生物学的吸収の可能性は、ナノ粒子複合材の炭素外装だけが、インビボにおける生物学的環境に曝露されるため、事実上存在しない。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 5 】

PCT/AU2009/000508には、ナノ粒子をヒストンのような多価陰イオンでコーティングすることができ、その結果、得られる粒子は、検出可能な放射性標識の高比放射能のコアおよび強固に結合されたヒストンを有するという方法が記述されている。

【 0 1 3 6 】

放射性標識ヒストンは、ヒストンが肺のような、臓器と有する特異的な生物相互作用に基づいて、インビボで所定の部位に、容易に検出可能な同位体を局在させるように用いられてよい。例えば、本明細書において実証されるように、仔ウシ胸腺ヒストンとの複合体中のTc99mナノ粒子は、肺組織に選択的であり、対象に投与される場合、ガンマシンチグラフィによって可視化したときに、肺を選択的に標的化するであろう。このように、ヒストンコーティング・ナノ粒子を、肺内でのヒストンの蓄積を阻害する候補化合物の能力を試験するためのスクリーニング剤として用いることができる。

10

【 0 1 3 7 】

ナノ粒子を用いてヒストンを放射性標識するための条件

このようにして作出されまたは得られたナノ粒子は、ヒストンを放射性標識するためにPCT/AU2009/000508に記述されている方法において用いられうる。

【 0 1 3 8 】

疎水性界面、例えば空気-水界面、炭化水素-水界面、および推論して水溶性ナノ粒子懸濁液中のような黒鉛-水界面は、純水中わずかに優位の水酸化イオンを一般的に引き付ける。この結果は、表面電位が通常非常に低い(数十ミリボルトである)とはいえ、これらの界面が、わずかに負に荷電したものである。ナノ粒子は、陰イオン界面活性剤、典型的には、それらの調製において用いられるデオキシコール酸塩の吸着に起因して、それらの表面上の負の荷電の増加も持ちうる。粒子および巨大分子が同じ水性媒体中で同様に負に荷電しているなら、それらの荷電が拡散する二層が重複している場合、何十ナノメートルの規模で互いに弱く反発しうる。しかし、ヒストンのpIのような、ヒストンの正味荷電が実質的にゼロである水性媒体のpHの選択によって、これらの系における巨大分子への粒子の吸着および密着に対するエネルギー障害がほとんどないように、この電位が非常に迅速に遮蔽される。デバイ長が< 10 nmでの、そのような遮蔽は、引力分散、イオン相互関係または疎水性力が、これらの表面の全相互作用エネルギーを通常支配するような状況を生み出す。この結果は、ヒストンといった結合した粒子は、本質的には不可逆的にその表面に頑強に接着するというものである。その条件はそれにより、ヒストンおよびナノ粒子複合材の積極的な結合を促進する。好ましい態様において、接触が行われる媒体は、長距離静電斥力を程度および大きさで減弱させることにより長距離静電斥力と比べてナノ粒子とヒストンとの間の短距離引力の影響を促進するpHおよび電解質濃度を含みうる。成功裏の接触の結果として、巨大分子は、ナノ粒子複合材と結び付いているかまたは複合体を形成しているものと記述されうる。結果として得られた実体を複合体ということもできる。本文脈中の「複合体」および「と複合体を形成する」という用語は、堅く結合するようになる成功裏の接触の結果として生じるもの以外の、ヒストンおよびナノ粒子複合材の、任意の特定の構造配列を意味するものと意図されないことに留意されたい。

20

30

40

【 0 1 3 9 】

ナノ粒子は、適当なpHおよび好ましくは同様に適当な電解質濃度の条件下で、ナノ粒子および巨大分子を接触させることによりヒストンを標識するために用いられうる。上記の遮蔽プロセスを促進し、かくして、短距離引力を可能にして静電斥力を支配し、ナノ粒子が巨大分子に実質的に不可逆的に結合されるようになるような、適当な溶液条件を選択することができる。本明細書における開示を考慮して、適切な、必要なら、最適な結合条件、例えばpHおよび電解質濃度は、ナノ粒子とヒストンとの間の望ましい接触に向けて実験的に判定されうるということが理解されよう。

【 0 1 4 0 】

接触は、水性媒体が通常好ましいが、任意の適当な媒体中で行われてもよい。接触の前

50

に、ナノ粒子は、一般的には分散液の安定性を可能とするように選択される、適当な貯蔵媒体中で調製されまたは貯蔵されうる。したがって、ナノ粒子の分散液は、非常に低い(例えば、約10マイクロモル)濃度の陰イオン界面活性剤、例えばデオキシコール酸ナトリウムを含みうる。本発明の方法の接触段階の前に、ナノ粒子を予め処理して、ナノ粒子とヒストンの結合に有利に働くように分散液の条件を調整してもよい。例えば、緩衝液のタイプ、pH、電解質の濃度およびタイプ、界面活性剤の有りまたは無し、ならびにナノ粒子を含む任意の成分の濃度などの条件が調整されてもよい。媒体のpHおよびイオン強度の調整は、ヒストン有りまたは無しで行われてもよい。典型的には、ナノ粒子の存在下での場合、媒体のpHおよびイオン強度の調整は、凝集および集塊を引き起こすナノ粒子間だけでの結合ではなく、ナノ粒子と巨大分子との間の結合を促進するよう、同様に巨大分子の存在下で行われる。

10

【0141】

ヒストンへのナノ粒子の結合は、約1 mM NaCl 超の濃度で巨大分子へのナノ粒子の積極的な結合を誘導する際に効果的な、巨大分子のpI 近傍のpHおよび単純電解質NaClの適当な濃度の使用を通じて達成されうる。理解されるように、ヒストンへのナノ粒子の積極的な結合を誘導するのに適した条件は、任意の1つまたは複数の多種多様の電解質を用いて達成されうる。約1ミリモル超の単純電解質濃度を用いて、ヒストンへのナノ粒子の積極的な結合を誘導してもよく、かくして、ナノ粒子が放射性微粒子コアを有する場合、放射性標識ヒストンの調製を提供してもよい。一般的に、接触のための溶液または媒体の単純電解質濃度は、約1ミリモルから約200ミリモル；典型的には、約10ミリモルから約175ミリモル；約20ミリモルから約150ミリモル；約50ミリモルから約150ミリモルの範囲内であると予測される。より典型的には、溶液の電解質濃度は、約1ミリモルから約200ミリモル；典型的には、約10ミリモルから約175ミリモル；約20ミリモルから約150ミリモル；約40ミリモルから約150ミリモル；約50ミリモルから約150ミリモル；約75ミリモルから約150ミリモル；約90ミリモルから約150ミリモル；約100ミリモルから約150ミリモル；約150ミリモルの範囲内であると予測される。本発明の接触段階のための電解質溶液または媒体のイオン強度は、例えば、適当なイオン強度が約150 mMのNaCl濃度で達成されうるNaClを用いることにより、または例えば、約75 mM未満のMgSO₄濃度により達成されうることを当業者は理解するであろう。電解質溶液の適当なイオン強度は、いくつかの異なるイオン種、例えばNaClおよびMgSO₄の混合物の使用により達成されうることも当業者は理解するであろう。さらに、イオン強度は、少なくとも1種のイオン種および浸透圧調整剤またはポリエチレングリコールのような高分子量重合体などの少なくとも1種の非イオン種の使用により達成されうることを当業者は理解するであろう。例えば、水の有効濃度が低下する場合、電解質の濃度は、例えば約250 mMに、増大される必要がありうる。

20

30

【0142】

任意の適当なイオン種が用いられうる。例えば、イオン種は、Na、Ni、Al、Ru、Pt、Os、Ir、Fe、Se、Sn、K、Te、Mn、Mo、V、Mg、Zn、Ca、Cu、Coの塩を含む群より選択される。好ましい態様において、イオン種は、有効濃度で無毒性であるもの、例えばNa、K、Caに、典型的には限定される。

40

【0143】

接触段階において用いられる緩衝液は、静電斥力を抑制することによりナノ粒子とヒストンとの間の短距離引力を促進するのに適当であるように選択される任意の適当なpHのものでありうる。好ましくは、緩衝液は約pH 3から約pH 10またはそれ以上、約pH 3から約pH 8、約pH 3.5から約pH 8.5、約pH 4から約pH 8、約pH 4.5から約pH 7.5、約pH 5から約pH 7の範囲内であろう。より好ましくは、水性媒体のpHのような、接触段階のpHは、ポリペプチドなどの、接触において利用される巨大分子のpIの近傍であろう。さらにより好ましくは、接触段階のpHは実質的に、接触において利用される巨大分子のpIであろう。本明細書において記述されるように、望ましいかつ最適なpHは、電解質のタイプおよび濃度ならびに巨大分子のような、他の反応条件を考慮に入れて、当業者により判定されうる。

50

【0144】

接触は、接触中のインキュベーション温度の昇降、または接触中の媒体攪拌もしくは混合の増減のような、接触過程中的条件の改変を含みうる。

【0145】

放射性標識ヒストンは、接触の後に1つまたは複数の精製段階に供されうる。これは、未標識の巨大分子からおよび/または遊離ナノ粒子複合材から放射性標識巨大分子を分離することを含みうる。典型的な反応において、接触は、接触段階の水性媒体中に未反応の成分、典型的には、ヒストンに結合しなかったナノ粒子複合材の一部を保持したまま、ヒストンへのナノ粒子の満足な結合をもたらして、放射性標識ヒストンをもたらす。未反応の成分の除去は、例えば、非標的臓器への血液輸送のような、遊離ナノ粒子複合材が有害になる状況において、望ましいかもしれない。未結合の巨大分子の除去は、さもなければ、それが細胞受容体または抗原部位などの、特異的な結合部位に向けて、標識された巨大分子と競合し、それによって撮像能およびスクリーニング感度を減弱してしまうような場合には望ましい。未反応の成分の除去は、部分的、実質的に完全または完全でありうる。本文中において「部分的」除去は、1種または複数種の未反応成分または望ましくない成分の任意の量の除去、より典型的には、1種または複数種の未反応成分または望ましくない成分の約80%、90%または95%までの除去を含むと理解され、「完全な」除去は、1種または複数種の未反応成分または望ましくない成分の約95%超の除去であると理解される。典型的には、未反応成分または望ましくない成分の少なくとも95%の除去が好ましく、未反応成分または望ましくない成分の約96%、97%、98%または99%超の除去がより好ましい。

10

20

【0146】

ゆえに、本文中において「精製」への言及は、「精製」段階後の放射性標識巨大分子(または放射性同位体の非放射性前駆体で「標識された」巨大分子)が精製段階の前と比べて少ない、接触の未反応成分または望ましくない成分などの、不純物を含む、任意の精製度を意味するよう意図されるものと理解されよう。

【0147】

未結合の放射性ナノ粒子またはヒストンのような、未反応成分または望ましくない成分から放射性標識ヒストンを分離できる任意の方法が、精製段階において用いられうる。例えば、その方法は放射性標識ヒストンから1種もしくは複数種の望ましくない成分を洗い流すことを含んでよく、または1種もしくは複数種の望ましくない成分から放射性標識ヒストンを抽出することを含んでよく、または高速での遠心分離を含んでよく、またはそのような段階の組み合わせを含んでよい。

30

【0148】

ヒストンによるナノ粒子複合材のコーティングのための方法

炭素封入された放射性核種のナノ粒子複合材は、PCT/AU2006/000554にしたがって調製されうる。中性pHまたは弱酸性pHで、炭素封入された放射性核種(例えばTc-99m)を含むナノ粒子の安定な水性分散液を作出することができる。ナノ粒子の分散液は、生体の血液循環に適合性があり、注射されうる、非常に低い(例えば、10マイクロモル)濃度の陰イオン界面活性剤、デオキシコール酸ナトリウムを含みうる(本明細書における図5および6を参照のこと)。これらの粒子は、従来の標識法で得られるようなものを軽く超える、非常に高いレベルの比放射能が容易に得られうるように、標識源として何万ものまたはそれ以上の同位体原子をそれぞれ保有しうる。モデルとなる封入された放射性同位体としてTc-99mを有するナノ粒子複合材の場合、典型的なナノ粒子調製物は、所望のように、水溶性懸濁液2 mL中に1~30 mCiを含むように容易に作出されうる。走査型移動度粒径測定(SMPS)法を用いた粒子の気相の特徴付けから、この懸濁液は、比放射能が600 mCi/mgの、または22 GBq/mg超ほどの高さで作出されうるように、ナノ粒子材料およそ50 µgを含むことが示されうる。

40

【0149】

炭素封入プロセスでは金属同位体を炭素ケージ内に包み、その結果、これはその外部環境との接触から物理的に単離されることになり、それらがインビボで用いられる場合、粒子にとっては特に価値のある特性になる。インビボにおける放射性金属イオンの浸出およ

50

び生物学的吸収の可能性は、事実上存在しない。ナノ粒子複合材の炭素外装だけが、インビボにおける生物学的環境に曝露される。炭素は黒鉛形態にあるため、天然の吸着剤特性を有し、これを、選択したポリペプチドに対する物理的吸着の根拠として用いることができる。しかし、ポリペプチドの結合に有利に働く適切な条件を判定することがまず初めに必要とされ、以下の研究および実施例は、どのようにしてこれらの条件を判定できるかを例示する。

【0150】

ナノ粒子複合材は、その黒鉛表面を伴う、疎水性相互作用または分散相互作用を介して高親和性結合が可能である。黒鉛表面がポリペプチドのような、巨大分子との疎水性相互作用を形成するために、ポリペプチドは、非常に近距離で黒鉛表面に接近できる必要がある。よって、今度は、静電斥力が抑制されることを必要とする。本発明者らは、ポリペプチドが最小の正味表面電荷でナノ粒子調製物に提示される場合、pHをポリペプチドの等電点に近くなるよう調整することにより、または電解質の対イオンの適切な濃度でポリペプチドの電荷を遮蔽することにより、この条件が満たされうること示す。経験的結合実験を用いて、適切な結合条件を確立することができる。

10

【0151】

スクリーニングの方法

本発明は、1種または複数種のヒストンの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。全体として、これらの方法は、候補化合物とヒストンの相互作用を可能とするのに適した条件の下でヒストンを候補化合物と接触させる段階、およびヒストンの活性または活性喪失をアッセイする段階を含む。

20

【0152】

ヒストンはH1、H2A、H2B、H3、H4またはH5より選択されうる。ヒストンはまた、異なるヒストンの混合物、例えば仔ウシ胸腺を含みうる。いくつかの態様において、ヒストンの変種、断片および類似体が用いられうる。

【0153】

1つの態様において、ヒストン結合化合物をスクリーニングするための方法が提供される。この方法では、被験対象への1種または複数種の放射性標識ヒストンの投与、引き続いて被験対象への1種または複数種の候補化合物の投与を利用する。放射性標識ヒストンをその後、画像化し、放射性標識ヒストンの位置によって、肺のような臓器におけるヒストンの蓄積を阻害する候補化合物の能力の評価が可能になる。

30

【0154】

他の態様において、候補化合物は放射性標識ヒストンの前にまたは放射性標識ヒストンと同時に被験対象に投与されうる。あるいは、候補化合物は被験対象への混合物の投与の前に放射性標識ヒストンと混合されてもよい。

【0155】

単光子放出コンピュータ断層撮影法(SPECT)、ポジトロン放出断層撮影法(PET)またはガンマシンチグラフィのような、当技術分野において公知の方法による外部画像化が用いられてもよい。他の態様において、ヒストンは蛍光色素、例えばFITC (フルオレセインイソチオシアネート)または量子ドットで標識されてもよい。別の態様において、ヒストンは生物発光部分で標識されてもよい。標識ヒストンの位置および濃度が、かくしてインビボで判定されうる。

40

【0156】

当技術分野において公知の任意の様式による画像化によって、その後、候補化合物がヒストンの蓄積を阻害できないことに起因しうる、組織部位または臓器部位での標識ヒストンの存在または過剰が明らかにされうる。同様に、試験化合物の非存在下における対照の標識ヒストンと比べて、組織または臓器での標識ヒストンの存在量の減少から、候補化合物はヒストンを阻害し、組織または臓器での蓄積を阻止することが示唆される。

【0157】

静脈内に注射される場合、非標識ナノ粒子複合材は細網内皮系、すなわち肝臓のクッパ

50

ー細胞のような食細胞により、20分以内に循環血中からほとんど完全に除去されることに留意されたい。したがって、肝臓、脾臓および骨髄における標識ヒストンの存在または過剰から、例えば肺へのヒストンの結合を阻害する候補化合物に起因しうる細網内皮系による循環血中ナノ粒子の迅速な除去が示唆されうる。

【0158】

ヒストン、その変種、断片および類似体は、これらの分子と相互作用する化合物および薬剤のスクリーニングおよび特定に有用である。具体的には、望ましい化合物は、これらの分子の活性を調節するものである。そのような化合物は、ヒストン、その変種、断片および類似体の機能を阻害することによって調節効果を及ぼしうる。さらに、ヒストン、その変種、断片および類似体は、ヒストンの分解を促進する化合物および薬剤のスクリー

10

【0159】

ヒストンに結合するか、またはヒストンとその他の方法で相互作用する化合物、具体的には、その活性を調節する、またはその分解を促進する化合物は、種々の適当な方法によって特定されうる。非限定的な方法には、共免疫沈降法、免疫学に基づく検出方法、例えばウエスタンブロッティング法、親和性クロマトグラフィー法、ゲルろ過法、ゲル移動度アッセイ法、質量分析法、タンデム親和性精製法、ファージディスプレイ法、標識転写法

20

【0160】

さらに、ヒストンに結合するか、またはヒストンとその他の方法で相互作用する、かつヒストンの活性を調節するまたはヒストンの分解を促進する候補化合物の能力は、ヒストンの機能に及ぼすそれらの候補化合物の効果によって評価されうる。その機能は、当技術分野において公知の任意の方法によって測定されうる。

【0161】

親和性クロマトグラフィー法

親和性クロマトグラフィー法を用いて、候補薬剤または複数の候補薬剤がヒストンまたはその変種もしくは断片と相互作用または結合するかどうかを判定してもよい。例えば、ヒストン、その変種、断片または類似体を支持体(セファロースのような)に固定し、候補化合物を単独でまたは混合物中でのいずれかでカラムに通してもよい。固定されたヒストンポリペプチドまたはその変種もしくは断片に結合する化合物をその後、カラムから溶出させ、例えば質量分析法により、特定することができる。

30

【0162】

このようにして、ヒストン、その変種、断片または類似体と直接的に相互作用しないタンパク質または他の化合物が特定されうる。例えば、ヒストンと直接的に相互作用する化合物は次いで、ヒストンとの直接的な相互作用なしでヒストン活性を調節しうる薬剤と結合し得る。化合物および結合した薬剤の複合体の、固定されたヒストンポリペプチドまたはその変種もしくは断片との相互作用によって、ヒストンとの直接的な相互作用なしでヒストン活性を調節しうる化合物の特定が容易となる。

40

【0163】

ヒストン活性の潜在的な調節因子が、当業者に公知のいくつかの技法により上記の方法によるスクリーニングを目的に作出されてもよい。例えば、X線結晶学および核磁気共鳴分光学のような方法を用いて、ヒストン、その変種、断片または類似体の構造をモデル化し、かくして、コンピュータに基づくモデル化による潜在的な調節薬剤のデザインを容易にすることができる。さまざまな形態の組み合わせ化学を用いて、推定上の調節因子をもたらしこともできる。

【0164】

ヒストン、その変種、断片または類似体を高速大量処理スクリーニングにおいて用い、

50

それらに結合する、またはそれらとその他の方法で相互作用する能力について候補化合物をアッセイすることができる。これらの候補化合物を機能的なヒストン、その変種、断片または類似体に対しさらにスクリーニングして、酵素活性に及ぼす化合物の効果を判定することができる。

【0165】

免疫学的方法

免疫学的方法を用いて、候補薬剤または複数の候補薬剤がヒストンまたはその変種もしくは断片と相互作用または結合するかどうかを判定してもよい。1つの態様において、ヒストンまたはその変種もしくは断片を、免疫沈降の使用前に少なくとも1つの候補化合物と接触させて、候補薬剤または複数の候補薬剤がヒストンまたはその変種もしくは断片と相互作用または結合するかどうかを判定してもよい。この技法を用いて、少なくとも1つの候補化合物をヒストンまたは変種もしくは断片と、典型的には各々の溶液を混合することにより、接触させてもよい。その混合物(サンプル)をその後、例えば固体支持体に結合された抗体結合タンパク質での捕捉により、溶液から免疫沈降されうる候補化合物またはヒストンのどちらかに特異的な抗体とともにインキュベートすることができる。この方法によるタンパク質の免疫沈降によって、そのタンパク質と結び付いた薬剤の共免疫沈降が容易とされる。結び付いた薬剤の特定は、SDS-PAGE法、ウエスタンブロッティング法、および質量分析法を含むが、これらに限定されない、当技術分野において公知のいくつかの方法を用いて達成されうる。

【0166】

候補化合物またはヒストンに特異的な抗体を支持体に固定してもよい。候補化合物がヒストンと結び付くのを検出することには、典型的には、固定された抗体とヒストンまたは候補化合物との間の結合に適した条件の下で、ヒストンと結び付いた候補化合物を推定的に含有するサンプルと固定された抗体を接触させること、および支持体を適当な試薬でリンスして未結合のサンプルを除去することを伴う。その後、ヒストンと結び付いた候補化合物を推定的に含有する結合したサンプルを、例えば、変性剤でリンスすることによって溶出させることができ、結合したサンプルの成分の同一性を、SDS-PAGE法、ウエスタンブロッティング法、および質量分析法を含むが、これらに限定されない、当技術分野において公知のいくつかの方法を用いて達成することができる。

【0167】

抗体は、直接的な結合によって支持体に固定されてもよく、または1つもしくは複数のさらなる化合物によって支持体に間接的に結合されてもよい。適当な支持体の非限定的な例としては、ポリエチレン、ポリプロピレンまたはポリスチレン、ポリ塩化ビニルから製造されたアッセイプレート(例えばマイクロタイタープレート)または試験管、膜(例えばニトロセルロース膜)、ビーズ/ディスク(磁気ビーズおよびディスクを含む)および粒子材料、例えばフィルタ紙、ニトロセルロース膜、セファロース、アガロース、架橋デキストラン、ならびに他の多糖類が挙げられる。

【0168】

ある種の態様において、ヒストンまたはその変種もしくは断片と相互作用または結合する候補薬剤または複数の候補薬剤の検出は、酵素結合免疫アッセイ(ELISA)法として行われる。一般に、このアッセイ法では、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどのような材料から製造された、マイクロタイタープレートのウェルまたはカラムなどの、固体支持体への適当な捕捉試薬のコーティングを伴う。1つの態様において、抗ヒストン抗体が捕捉試薬として用いられる。別の態様において、捕捉試薬は固体支持体への少なくとも1つの候補化合物のコーティングによって調製される。さらなる態様において、捕捉試薬はヘパリン、ヘパラン硫酸、ウシ血清アルブミン結合ヘパラン硫酸、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(例えばペルレカン)、哺乳動物細胞などでありうる。別の態様において、ヒストンが捕捉試薬として用いられうる。

【0169】

捕捉試薬は、例えば、非共有結合性もしくは共有結合性相互作用または物理的連結によ

り、支持体の表面に連結されてもよい。共有結合性の連結が用いられるなら、架橋剤(例えばグルタルアルデヒド、N-ヒドロキシ-スクシンイミドエスエル、二官能性マレイミド)を利用して、捕捉試薬を支持体に結合させてもよい。

【0170】

支持体をブロッキング剤(例えば無脂肪乳、ウシ血清アルブミン、カゼイン、卵アルブミン)で処理して、支持体表面上の過剰な部位への材料の不要な結合を阻止してもよい。

【0171】

サンプルはコーティングおよびブロッキングの後に支持体の表面に投与されてもよい。一般に、サンプルは適当な緩衝液を用いて適切なレベルにまで希釈される。サンプルの希釈度および適当な緩衝液の選択は、分析中のサンプル、ならびにアッセイ法において利用される支持体および捕捉試薬のタイプのような要因に依るであろう。当業者は発明的努力なしにこれらを判定することができる。

【0172】

サンプルは、捕捉試薬でコーティングされた支持体に適用されたら、アッセイ法の感度を最大化するのに、および解離を最小化するのに適した条件の下で一般的にインキュベートされる。インキュベーションは、約0 から約40 に及ぶ、および好ましくは、約20 から約30 に及ぶ、一般的に一定の温度で行われてもよい。インキュベーション混合物のpHは、約4から約10の範囲内、好ましくは約6から約9の範囲内、およびより好ましくは約7から約8の範囲内でありうる。1つの態様において、インキュベーション混合物はpH 7.4である。さまざまな緩衝液を利用して、インキュベーション中に標的pHを達成かつ維持してもよく、その非限定的な例としては、Tris-リン酸、Tris-HCl、ホウ酸、リン酸、酢酸および炭酸が挙げられる。インキュベーション時間は一般に、温度と関連しており、非特異的な結合を回避するために約12時間未満でありうる。好ましくは、インキュベーション時間は室温で、約0.5時間から約3時間、およびより好ましくは、約0.5時間から約1.5時間である。

【0173】

インキュベーションの後、生体サンプルを、例えば支持体の洗浄/リンスにより、固定された捕捉試薬から除去して未結合のサンプルを除去してもよい。適当な洗浄用緩衝液のpHは、約6から約9の範囲内、および好ましくは約7から約8の範囲内でありうる。洗浄/リンスは3回またはそれ以上の回数、行われてよい。洗浄/リンスは、一般的に約0 から約40 、および好ましくは約4 から約30 の温度で洗浄緩衝液を用いて行われてもよい。

【0174】

後続の段階において、捕捉試薬に結合されたサンプルの固定成分を検出試薬と接触させてもよい。検出可能な試薬の選択は、利用される捕捉試薬および分析中のサンプルのタイプを含む要因に依りうる。好ましくは、捕捉試薬に結合されたサンプルの固定分子は、約20 から約40 の温度で、および好ましくは約20 から約25 の温度で検出試薬と接触される。1つの態様において、捕捉試薬に結合されたサンプルの固定分子は、約1時間室温(RT)で検出試薬と接触される。検出試薬は抗体でありうる。検出可能な試薬が抗体である用途では、支持体に固定されるサンプルの分子の最大濃度に関してモル過剰の抗体が好ましい。抗体は直接的にまたは間接的に検出可能であってよい。抗体は発色標識または蛍光標識を有してよい。検出試薬に結合するさらなる抗体を用いてもよい。さらなる抗体は発色標識または蛍光標識を有してよい。

【0175】

捕捉試薬に結合されたサンプルの存在およびレベルの判定は、当技術分野において公知の方法を用いて達成することができ、利用される検出試薬に依るであろう。例えば、検出は比色定量、化学発光または蛍光定量を含みうる。検出および定量的測定は、対照サンプルに由来するバックグラウンドシグナルと比べて検出試薬に由来するシグナルに基づき行われうる。

【0176】

敗血症の処置

10

20

30

40

50

敗血症の処置は、典型的には、例えば抗生物質療法による、状態の根本原因の処置を伴う。代替処置、例えば活性化プロテインC (APC)が開発されたが、これらはその治療用物質の抗凝固性または敗血症の急激な進行と比べて遅い作用機序に起因して臨床的影響をほとんど及ぼさなかった。

【0177】

ヒストン毒性は最近になって、敗血症での内皮細胞機能不全、臓器不全および死亡のメディエータと特定された。本発明者らは、抗凝固性をわずかにしか持ちえないオリゴ糖多価陰イオンが、生きている動物の循環血中のヒストンと複合体を形成し、臓器中でのヒストンの蓄積を阻止しうることを見出した。これは敗血症の処置の基礎となり、これには、典型的には、そのような処置を必要としている患者への少なくとも1つの多価陰イオンの投与が含まれる。

10

【0178】

組成物、投与量および投与経路

本発明で用いるための多価陰イオンは、治療的にまたは予防的に組成物として投与される。治療的適応において、組成物は、疾患および/もしくはその合併症を消散させるかもしくは部分的に停止させるのに、または患者の生存を向上させるのに十分な量で、疾患(例えば敗血症)に既に罹患している対象に投与される。

【0179】

一般的に、適当な組成物は、当業者に公知である方法にしたがって調製することができ、したがって薬学的に許容される担体、希釈剤および/または補助剤を含みうる。

20

【0180】

投与可能な組成物を調製するための方法は当業者に明白であり、例えば、参照により全体が本明細書に組み入れられるRemington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.において、さらに詳細に記述されている。

【0181】

多価陰イオンは、薬学的に許容される塩として存在してよい。「薬学的に許容される塩」とは、過度の毒性、炎症、アレルギー反応などを起こさずにヒトおよび下等動物の組織と接触させて用いるのに適しており、かつ合理的な利益/リスク比にふさわしい、健全な医学的判断の範囲内にある塩を意味する。薬学的に許容される塩は当技術分野において周知である。

30

【0182】

任意の特定の対象に対する、本明細書において開示される多価陰イオンの治療有効量は、医学において周知のその他の関連要因とともに、敗血症の重症度; 利用される組成物の活性; 患者の年齢、体重、全般的健康、性別および食生活; 投与時間; 投与経路; 組成物の隔離速度; 処置期間; 処置と併用してまたは同時に用いられる薬物を含む種々の要因に依存する。

【0183】

当業者は、日常的な実験により、本発明の方法の望ましい結果を達成するために必要な製剤の成分の有効な無毒性量を判定することができる。

【0184】

一般的に、多価陰イオンの有効投与量は、約0.0001 mg ~ 約1000 mg/kg体重/24時間; 典型的には約0.001 mg ~ 約750 mg/kg体重/24時間; 約0.01 mg ~ 約500 mg/kg体重/24時間; 約0.1 mg ~ 約500 mg/kg体重/24時間; 約0.1 mg ~ 約250 mg/kg体重/24時間; 約1.0 mg ~ 約250 mg/kg体重/24時間の範囲であると予測される。より典型的には、有効用量範囲は、約1.0 mg ~ 約200 mg/kg体重/24時間; 約1.0 mg ~ 約100 mg/kg体重/24時間; 約1.0 mg ~ 約50 mg/kg体重/24時間; 約1.0 mg ~ 約25 mg/kg体重/24時間; 約5.0 mg ~ 約50 mg/kg体重/24時間; 約5.0 mg ~ 約20 mg/kg体重/24時間; 約5.0 mg ~ 約15 mg/kg体重/24時間の範囲であると予測される。

40

【0185】

あるいは、多価陰イオンの有効投与量は約500 mg/m²までであってよい。一般的に、有

50

効投与量は、約25～約500 mg/m²、好ましくは約25～約350 mg/m²、より好ましくは約25～約300 mg/m²、さらにより好ましくは約25～約250 mg/m²、なおより好ましくは約50～約250 mg/m²、およびさらにより好ましくは約75～約150 mg/m²の範囲であると予測される。

【0186】

さらに、処置される敗血症の性質および程度、投与の形態、経路および部位、ならびに処置される特定の個体の性質によって、個々の投与量の最適な量および間隔が判定されることが、当業者に明白であろう。また、そのような最適条件は従来技法によって判定される。いくつかの治療的適応において、処置は敗血症の期間中に行われる。

【0187】

規定の時間数または日数の間に1時間または1日あたりに与えられる多価陰イオンの投与回数などの、最適な処置過程が、従来の処置過程判定試験を用いて当業者により確認されうることもまた、当業者に明白であろう。

【0188】

一般的に、適当な組成物は、当業者に公知である方法にしたがって調製することができ、したがって薬学的に許容される担体、希釈剤および/または補助剤を含みうる。

【0189】

簡便な投与様式は、注射(皮下、静脈内、動脈内など)、経口投与、鼻腔内または吸入を含む。投与経路に応じて、製剤および/または多価陰イオンは、酵素、酸、および化合物の治療活性を不活化しうる他の天然条件の作用から多価陰イオンを保護する材料でコーティングされてよい。多価陰イオンは、非経口的にまたは腹腔内に投与されてもよい。

【0190】

多価陰イオンの分散液をグリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、ならびに油中で調製することもできる。貯蔵および使用の通常の条件下で、薬学的調製物は、微生物の増殖を防ぐための保存剤を含みうる。

【0191】

注射に適した薬学的組成物は、滅菌水溶液(水溶性の場合)または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液を即時調製するための滅菌粉末を含む。理想的には、組成物は製造および貯蔵の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して組成物を安定化するための保存剤を含みうる。

【0192】

本発明の1つの態様において、多価陰イオンは、例えば、不活性希釈剤または吸収性の可食担体とともに経口投与することができる。多価陰イオンおよび他の成分はまた、硬殻もしくは軟殻ゼラチンカプセル内に封入するか、錠剤に圧縮するか、または個体の食餌中に直接組み入れることもできる。経口治療投与のため、多価陰イオンを賦形剤とともに組み入れ、摂取可能な錠剤、パッカル錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、カシェ剤などの形態で用いることができる。適宜、このような組成物および調製物は、少なくとも1重量%の活性多価陰イオンを含みうる。薬学的組成物および調製物中の多価陰イオンの割合は当然ながら変動してよく、例えば、好都合には、投与量単位の重量の約2%～約90%、約5%～約80%、約10%～約75%、約15%～約65%、約20%～約60%、約25%～約50%、約30%～約45%、または約35%～約45%の範囲であってよい。治療的に有用な組成物中の多価陰イオンの量は、適当な投与量が得られるようなものである。

【0193】

本発明の別の態様において、多価陰イオンはリボソームの形態で投与することもできる。リボソームは一般的にリン脂質またはその他の脂質物質に由来し、水性媒質中に分散している単層または多層の水和液晶によって形成される。リボソームを形成しうる任意の無毒性の生理的に許容されかつ代謝可能な脂質を用いることができる。リボソーム形態の組成物は、安定剤、保存剤、賦形剤などを含みうる。好ましい脂質は、天然および合成の両方のリン脂質およびホスファチジルコリン(レシチン)である。リボソームを形成させるための方法は当技術分野において公知であり、これに関しては、参照によりその内容が本明

10

20

30

40

50

細書に組み入れられるPrescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 et seq.を特に参照されたい。

【0194】

「薬学的に許容される担体」という言語は、溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。薬学的に許容される担体または希釈剤の例は、脱塩水または蒸留水；生理食塩水溶液；ピーナッツ油、ベニバナ油、オリーブ油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、ラッカセイ油またはココナッツ油などの植物に基づく油；メチルポリシロキサン、フェニルポリシロキサンおよびメチルフェニルポリソルボキサン(polysilpoxane)などのポリシロキサンを含むシリコン油；揮発性シリコン；液体パラフィン、軟パラフィンまたはスクアランなどのミネラルオイル；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またはヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体；低級アルカノール、例えばエタノールまたはイソ-プロパノール；低級アララルカノール；低級ポリアルキレングリコールまたは低級アルキレングリコール、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またはグリセリン；パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピルまたはオレイン酸エチルなどの脂肪酸エステル；ポリビニルピロリドン；寒天；カラギナン；トラガカントゴムまたはアカシアゴム、ならびにワセリンである。典型的には、担体は組成物の10重量%~99.9重量%を形成する。

【0195】

薬学的活性物質のためのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の媒質または薬剤が多価陰イオンと適合しない場合を除いて、治療的組成物ならびに処置および予防の方法におけるその使用が企図される。補助的な活性化合物を、本発明による組成物中に組み入れることもできる。投与の簡便性および投与量の均一性のために、投与量単位形態で非経口組成物を製剤化することが特に有利である。本明細書において用いられる「投与量単位形態」は、処置される個体への単位投与量として適した物理的に別個の単位をいい、所定量の多価陰イオンを含む各単位は、必要な薬学的担体に関連して望ましい治療効果を生ずるように計算される。多価陰イオンは、有効量での簡便かつ効果的な投与のため、適当な薬学的に許容される担体とともに、許容される投与量単位で製剤化することができる。補助的な活性成分を含む組成物の場合、投与量は、該成分の通常の用量および投与様式を参照することによって判定される。

【0196】

1つの態様において、担体は経口投与可能な担体でありうる。

【0197】

薬学的組成物の別の形態は、経口投与に適した腸溶コーティング顆粒剤、錠剤またはカプセル剤として製剤化された投与量形態である。

【0198】

遅延放出性製剤もまた、本発明の範囲内に含まれる。

【0199】

多価陰イオンは、「プロドラッグ」の形態で投与することもできる。プロドラッグは、インビボにおいて活性型に変換される不活性型の化合物である。適当なプロドラッグは、活性型の多価陰イオンのエステル、ホスホン酸エステルなどを含む。

【0200】

経口用に適した担体、希釈剤、賦形剤および/または補助剤のいくつかの例としては、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、アカシアゴム、トラガカントゴム、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、ゼラチンおよびレシチンが挙げられる。さらに、これらの経口製剤は、適当な香味剤および着色剤を含みうる。カプセル形態で用いられる場合には、カプセルを、崩壊を遅延させるモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの化合物でコーティングしてもよい。

【0201】

1つの態様において、化合物は注射によって投与することができる。注射用溶液の場合、担体は、例えば、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、および液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適当な混合液、および植物油を含む溶媒または分散媒であってよい。例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用により、分散液の場合には必要な粒径の維持により、および界面活性剤の使用により、適切な流動性を維持することができる。微生物作用の防止は、さまざまな抗菌剤および/または抗真菌剤を含めることによって達成することができる。適当な薬剤は当業者に周知であり、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、チメロサルなどを含む。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、塩化ナトリウムを含めることが好ましい可能性がある。注射用組成物の持続的吸収は、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含めることによってもたらされうる。

10

【0202】

滅菌注射用溶液は、必要量の多価陰イオンを、必要に応じて、上記に列挙した成分の1つまたは組み合わせとともに適切な溶媒中に組み入れ、次にろ過滅菌することによって調製することができる。一般的に、分散液は、基礎分散媒、および上記に列挙した成分のうちの他の必要な成分を含む滅菌媒体中に類似体を組み入れることによって調製する。

【0203】

錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤などは、以下のものもまた含みうる：トラガカントゴム、アカシア、トウモロコシデンプンまたはゼラチンなどの結合剤；リン酸二カルシウムなどの賦形剤；トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸などのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；およびスクロース、ラクトースもしくはサッカリンなどの甘味剤、またはペパーミント、ウィンターグリーン油もしくはチェリー香味料などの香味剤。投与量単位形態がカプセル剤である場合には、これは上記タイプの材料に加えて、液体担体を含みうる。コーティング剤として、または投与量単位の物理的形態を別の方法で改変するために、他のさまざまな材料が存在しうる。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセル剤をセラック、糖、またはその両方でコーティングすることができる。シロップ剤またはエリキシル剤は、類似体、甘味剤としてのスクロース、保存剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、色素、およびチェリーまたはオレンジフレーバーなどの香味料を含みうる。当然ながら、任意の投与量単位形態を調製する際に用いられるいずれの材料も、薬学的に純粋であり、かつ利用される量において実質的に無毒性であるべきである。さらに、類似体を徐放性調製物および製剤中に組み入れることもできる。

20

30

【0204】

薬学的組成物は、酸加水分解を最小限にするのに適した緩衝液をさらに含みうる。適当な緩衝液は当業者に周知であり、リン酸、クエン酸、炭酸およびそれらの混合物を含むが、これらに限定されることはない。

【0205】

本発明による薬学的組成物の単回または複数回投与を行うことができる。当業者は、日常の実験により、多価陰イオンの有効な無毒性の投与量レベル、および/または敗血症を処置するのに適している投与パターンを判定することができる。

40

【0206】

併用レジメン

治療的利点は、併用レジメンを介して実現されうる。当業者は、本明細書において記述される多価陰イオンが、敗血症の処置に対する併用療法アプローチの一部として投与されることを理解するであろう。併用療法において、各薬剤は、同時にまたは任意の順序で順次投与することができる。順次投与する場合、成分を同じ経路によって投与することが好ましい場合がある。

【0207】

あるいは、成分は、併用産物として単一の投与量単位中にも組み入れられることもでき

50

る。本発明の組成物と併用して用いられうる適当な薬剤は、当業者に公知であろう。

【0208】

本発明による処置の方法は、従来療法とともに適用することができる。従来療法は、抗炎症剤、抗生物質剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤の投与、または医学的介入、例えばAPCの使用のその他の形態も含みうる。

【0209】

抗炎症剤の例としては、ステロイド、コルチコステロイド、COX-2阻害剤、非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)、アスピリンまたはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0210】

抗生物質剤の例としては、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sporin、グリコペプチド、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、スルホンアミドおよびテトラサイクリンが挙げられる。

【0211】

抗ウイルス剤の例としては、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(例えばヌクレオシド類似体)、プロテアーゼ阻害剤およびヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤が挙げられる。

【0212】

抗真菌剤の例としては、イミダゾール、トリアゾール、チアゾール、アリルアミン、およびエキノカンジンが挙げられる。

【0213】

本明細書において開示される多価陰イオンは、治療的にまたは予防的に投与されうる。治療的適応において、化合物および組成物は、敗血症に既に罹患している患者に対し、敗血症ならびにその症状および/もしくは合併症を治癒させるか、または少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で投与される。化合物または組成物は、患者を効果的に処置するのに十分な活性化合物の量を提供すべきである。

【0214】

本明細書において開示される多価陰イオンは、敗血症が臨床的に明らかになる前の患者に、例えば、敗血症を発症するリスクがある患者において投与されうる。

【0215】

担体、希釈剤、賦形剤および補助剤

担体、希釈剤、賦形剤および補助剤は、組成物のその他の成分と適合性があるという点で「許容され」なければならない、そのレシピエントに対して有害であってはならない。そのような担体、希釈剤、賦形剤および補助剤は、本発明の組成物の完全性および半減期を強化するために用いることができる。これらはまた、本発明の組成物の生物活性を強化または保護するために用いることもできる。

【0216】

薬学的に許容される担体または希釈剤の例は、脱塩水または蒸留水；生理食塩水溶液；ピーナッツ油、ベニバナ油、オリーブ油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、ラッカセイ油またはココナッツ油などの植物に基づく油；メチルポリシロキサン、フェニルポリシロキサンおよびメチルフェニルポリソルボキサン(polysilpoxane)などのポリシロキサンを含むシリコン油；揮発性シリコン；液体パラフィン、軟パラフィンまたはスクアランなどのミネラルオイル；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またはヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体；低級アルカノール、例えばエタノールまたはイソ-プロパノール；低級アラールカノール；低級ポリアルキレングリコールまたは低級アルキレングリコール、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またはグリセリン；パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピルまたはオレイン酸エチルなどの脂肪酸エステル；ポリビニルピロリドン；寒天；トラガカントゴムまたはアカシアゴム、ならびにワセリンである

10

20

30

40

50

。典型的には、担体は組成物の10重量%~99.9重量%を形成する。

【0217】

担体はまた、本発明の化合物に共有結合している融合タンパク質または化合物を含みうる。そのような生物学および化学的担体は、標的への化合物の送達を強化するために、または化合物の治療活性を強化するために用いることができる。融合タンパク質の産生のための方法は当技術分野において公知であり、例えば、Ausubelら(In: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987)およびSambrookら(In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition 2001)に記述されている。

【0218】

本発明の組成物は、注射による投与に適した形態、経口摂取に適した製剤の形態(例えば、カプセル剤、錠剤、カプレット剤、エリキシル剤などの)、局所投与に適した軟膏剤、クリーム剤またはローション剤の形態、点眼剤としての送達に適した形態、鼻腔内吸入または経口吸入によるような、吸入による投与に適したエアロゾル形態、非経口投与、すなわち皮下、筋肉内または静脈内注射に適した形態であってもよい。

【0219】

注射用溶液または懸濁液としての投与の場合、無毒性の非経口的に許容される希釈剤または担体は、リンゲル溶液、等張生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、エタノールおよび1,2プロピレングリコールを含むことができる。

【0220】

経口用に適した担体、希釈剤、賦形剤および/または補助剤のいくつかの例としては、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、アカシアゴム、トラガカントゴム、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、ゼラチンおよびレシチンが挙げられる。さらに、これらの経口製剤は、適当な香味剤および着色剤を含みうる。カプセル形態で用いられる場合には、カプセルを、崩壊を遅延させるモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの化合物でコーティングしてもよい。

【0221】

経口投与のための固体形態は、ヒトおよび動物の薬学的実施において許容される結合剤、甘味料、崩壊剤、希釈剤、香味料、コーティング剤、保存剤、潤滑剤および/または時間遅延剤を含みうる。適当な結合剤は、アカシアゴム、ゼラチン、トウモロコシデンプン、トラガカントゴム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースまたはポリエチレングリコールを含む。適当な甘味料は、スクロース、ラクトース、グルコース、アスパルテームまたはサッカリンを含む。適当な崩壊剤は、トウモロコシデンプン、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、グアーガム、キサンタンガム、ベントナイト、アルギン酸または寒天を含む。適当な希釈剤は、ラクトース、ソルビトール、マンニトール、デキストロース、カオリン、セルロース、炭酸カルシウム、ケイ酸カルシウムまたはリン酸二カルシウムを含む。適当な香味剤は、ペパーミント油、ウィンターグリーン油、チェリー、オレンジまたはラズベリー香味料を含む。適当なコーティング剤は、アクリル酸および/もしくはメタクリル酸ならびに/またはそれらのエステル重合体または共重合体、ワックス、脂肪アルコール、ゼイン、セラックまたはグルテンを含む。適当な保存剤は、安息香酸ナトリウム、ビタミンE、-トコフェロール、アスコルビン酸、メチルパラベン、プロピルパラベンまたは亜硫酸水素ナトリウムを含む。適当な潤滑剤は、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、オレイン酸ナトリウム、塩化ナトリウムまたはタルクを含む。適当な時間遅延剤は、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルを含む。

【0222】

経口投与のための液体形態は、上記の薬剤に加えて、液体担体を含みうる。適当な液体担体は、水、オリーブ油、ピーナッツ油、ゴマ油、ヒマワリ油、ベニバナ油、ラッカセイ油、ココナッツ油などの油、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

10

20

30

40

50

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、トリグリセリドまたはそれらの混合物を含む。

【0223】

経口投与のための懸濁液は、分散剤および/または懸濁化剤をさらに含む。適当な懸濁化剤は、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またはアセチルアルコールを含む。適当な分散剤は、レシチン、ステアリン酸など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またはジオレイン酸、ステアリン酸、またはラウリン酸、ポリオキシエチレンソルビタンモノまたはジオレイン酸、ステアリン酸、またはラウリン酸などを含む。経口投与のための乳濁液は、1つまたは複数の乳化剤をさらに含む。適当な乳化剤は、上記で例証されるような分散剤、またはグアーガム、アカシアゴムもしくはトラガカントゴムなどの天然ゴムを含む。

10

【0224】

治療のタイミング

当業者は、多価陰イオンが、診断時またはその後に、敗血症の処置に対する単一の薬剤として、または併用療法アプローチの一部として、例えば、敗血症に対して現在利用可能な療法の補完としての追跡処置または強化療法として投与されうること理解するであろう。敗血症のリスクが高いことが分かった患者は、敗血症の発症に対する、予防の一環として、例えば抗生物質とともに、適当に無毒性の多価陰イオンで処置されてもよい。

20

【0225】

これより、単なる例示のために、以下の実施例を参照して、本発明をさらに詳細に記述する。これらの実施例は、本発明を例示するのに役立つよう意図されており、本明細書の全体にわたっての記述に関する開示の一般性を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0226】

実施例1: 異なる多価陰イオンによる、ヒト内皮細胞に及ぼすヒストンの細胞毒性作用の阻害

異なる濃度の仔ウシ胸腺ヒストンをヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)およびヒト微小血管内皮細胞(HMEC)に対するその毒性について最初に評価した。Medium 199/20%ウシ胎仔血清(FCS)中のHUVEC/HMECの懸濁液を96ウェルプレートの各ウェルの中に分注した(培地50 μ l中に細胞 1×10^5 個/ウェル)。その後、仔ウシ胸腺ヒストン(M199/20% FCS中に50 μ l/ウェル)を添加して、100~800 μ g/mlの終濃度とし、引き続きPBS中にて25 μ l/ウェルのカルセイン-AM (終濃度0.04 μ M)およびPBS中にて25 μ l/ウェルのヨウ化プロビジウム(PI) (終濃度2.5 μ g/ml)を添加した。各96ウェルプレートを5% CO₂インキュベータ中にて60分間37 でインキュベートし、氷上に配し、各ウェルの内容物をフローサイトメトリーにより生細胞および死細胞について分析した。生細胞をカルセイン-AM-明るいおよびPI-薄暗いとして検出し、死細胞をカルセイン-AM-薄暗いおよびPI-明るいとして検出した。図1には、単独培養したHUVEC (死細胞9.15%、生細胞78.6%)を、200 μ g/mlの仔ウシ胸腺ヒストンとともに60分間培養したHUVEC (死細胞50.4%、生細胞35.6%)と比較している典型的な生存アッセイ法が描かれている。HUVECおよびHMECに対する仔ウシ胸腺ヒストンの毒性が図2に詳細に示されており、HUVEC (図2A)およびHMEC (図2B)に対するヒストン毒性は極めて濃度依存的であるが、HMECはHUVECよりもヒストン毒性に耐性であった。かくして、100 μ g/mlでヒストンは15~20%のHUVECを死滅させたものの、HMECの生存性には効果を及ぼさなかったのに対し、800 μ g/mlでヒストンは、>85%のHUVECおよびおよそ55%のHMECを死滅させた(図1)。後続の阻害実験において、仔ウシ胸腺ヒストンをHUVECの場合には200 μ g/mlおよびHMECの場合には400 μ g/mlで用いたが、これらの濃度は内皮細胞の両集団のおよそ50%の死滅化をもたらした。

30

40

【0227】

阻害実験において、各ウェルへのHUVEC/HMEC、カルセイン-AMおよびPIの添加の前に阻害剤(1.6~100 μ g/mlに及ぶ終濃度)を仔ウシ胸腺ヒストン(終濃度200または400 μ g/ml)

50

と混合した。マルトトリオース硫酸およびマルトペンタオース硫酸が、HUVECに対するヒストン細胞毒性の強力な阻害剤であり、100 $\mu\text{g/ml}$ でヒストン毒性を完全に阻害し、そしてなお、25 $\mu\text{g/ml}$ で極めて効果的であることが分かった(図3および4)。マルトトリオース硫酸に対する一次フローサイトメトリーデータのいくつかを図5に提示して、この硫酸化三糖類の強力な阻害活性をさらに強調する。対照的に、二糖類のマルトース硫酸は、ヒストン細胞毒性の弱い阻害剤であり(図3および4)、マルトース系列の多価陰イオンオリゴ糖では、鎖長が阻害活性において重要な役割を果たすことが示唆された。しかしながら、イソマルトトリオース硫酸(1-6結合グルコース)は、マルトトリオース硫酸(1-4結合グルコース)よりも低い活性の阻害剤であり、糖結合も阻害活性に影響を与えることが示唆された(図3)。しかしながら、環状-シクロデキストリン硫酸(環状1-4結合ヘプタグルコース)は、直鎖状マルトトリオース硫酸およびマルトペンタオース硫酸分子とほぼ同じくらい活性であった(図3)。

【0228】

HMECを内皮細胞標的として用い、ヒストン毒性に及ぼすマルトトリオース硫酸(図6)および他の硫酸化オリゴ糖(表1)の同様の阻害効果を認めた。実際に、HMECを標的の内皮細胞として用い、ヒストン毒性に及ぼすさまざまな範囲の多価陰イオンの阻害活性のさらに詳細な分析を表1に示す。

【0229】

(表1) ヒストンによるHMECの死滅化を阻害する異なる多価陰イオンの能力

化合物	%ヒストン死滅化 \pm SEM*
セロビオース SO_4	6.9 \pm 3.3**
八硫酸スクロース	43.5 \pm 4.0
マルトース SO_4	77.1 \pm 4.7
マルチトール SO_4	19.6 \pm 3.9
マルトトリオース SO_4	17.4 \pm 2.8
イソマルトトリオース SO_4	49.5 \pm 5.4
ラフィノース SO_4	18.0 \pm 3.0
パノース SO_4	9.3 \pm 0.5
プロパニルビス-グルコンアミド SO_4	27.8 \pm 1.5
カルボキシル化 β -シクロデキストリン	105.8 \pm 19.9
β -シクロデキストリン SO_4	11.7 \pm 2.9
ヘパリン	2.4 \pm 2.1
N-アセチル化ヘパリン	24.8 \pm 2.7
グリコール分割ヘパリン	0 \pm 1.9
グリコール分割N-アセチル化ヘパリン	0 \pm 3.1
エノキサパリン	9.1 \pm 5.6
グリコール分割エノキサパリン	0.7 \pm 3.3
グリコール分割LMWH (3 kDa)	7.2 \pm 1.3

* HMECに対する仔ウシ胸腺ヒストン(400 $\mu\text{g/ml}$)の細胞毒性を阻害する能力について50 $\mu\text{g/ml}$ で試験した化合物。

* * 太字・斜体の値は、ヒストン毒性を>80%だけ阻害した化合物を表す。

HMEC = ヒト微小血管内皮細胞。

LMWH = 低分子量ヘパリン。

【0230】

異なる硫酸化二糖類は、その阻害活性が異なり、セロビオース硫酸(1-4結合グルコース)がヒストン毒性の強力な阻害剤であったのに対し、マルトース硫酸(1-4結合グルコース)および八硫酸スクロース(グルコース1-4結合フルクトース)はもっと弱い阻害剤であった(表1)。しかしながら、マルチトール、つまり開環型のマルトースの阻害活性はマルトースよりも高かった。硫酸化三糖類もその阻害活性がさまざまであり、硫酸化マルトリオース、ラフィノースおよびパノースは硫酸化イソマルトリオースよりも活性が高かった。この分析からも、硫酸化された結合グルコース分子はいくらかの阻害活性を示し(例えば、プロパニルビス-グルコンアミド SO_4)、硫酸化 α -シクロデキストリンは活性であるが、しかしカルボキシ化 α -シクロデキストリンは活性ではなく、ヘパリン、低分子量ヘパリンおよびいくつかの化学的変種(例えば、N-脱アセチル化、グリコール分割)は活性であることが明らかになった(表1)。

10

【0231】

さらなる研究から、ヒストン細胞毒性が細胞表面ヘパラン硫酸に依らないことが明らかになった。かくして、ヒト血小板ヘパラーゼ(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間)またはフラボバクテリウム・ヘパリナム(*Flavobacterium heparinum*)由来のヘパリチナーゼI、IIおよびIII(0.25単位/ ml 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間)によるHMECの処理、つまり細胞表面ヘパラン硫酸を除去する酵素手順では、ヒストン細胞毒性に対するHMECの感受性に影響がなかった(図7)。同様に、野生型チャイニーズハムスター卵巣(CHO-K1)細胞およびこの細胞株のヘパラン硫酸欠損変種(pgsA-745)の比較から、両方の細胞株がヒストン細胞毒性に対して等しく感受性のあることが明らかになった(図8)。

20

【0232】

実施例2: 静脈内に注射されたヒストンはウサギの肺内に蓄積する

仔ウシ胸腺ヒストンをTc99m-ナノ粒子の表面上への吸着によって放射性標識した。Tc99m-ナノ粒子(およそ50 μg ; 4 mCi)の水性コロイド懸濁液(3 mL)を室温にて1時間ヒストン(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で処理した。放射性標識ヒストンをガンマ線カメラ下に置いた麻酔下のウサギの耳静脈へ注射し、動態像を、注射の初めから開始して、連続30秒ずつの収集として得た。図9A中の像は、ヒストン誘導性の組織損傷の肺局在性と一致して、肺内でのヒストンの迅速かつ選択的な蓄積を示す。ヒストンが結合していない放射性標識ナノ粒子は、細網内皮系による循環血中の外来粒子の迅速な除去について予想されるように、肝臓、脾臓および骨髄中に局在していた(図9B参照)。

30

【0233】

実施例3: 肺内でのヒストンの蓄積の競合的阻害

仔ウシ胸腺ヒストンをTc99m-ナノ粒子の表面上への吸着によって放射性標識した。放射性標識したこの調製物を次いで、半分に分けた。最初の半分をガンマ線カメラ下に置いた麻酔下の対照ウサギの耳静脈へ注射し、動態像を、注射の初めから開始して、連続30秒ずつの収集として得た。上記の実施例2と同様に、図10A中の像は、対照ウサギの肺内での放射性標識ヒストンの迅速かつ選択的な蓄積を示す。放射性標識したヒストン調製物のもう半分を、15分前に15 mg/kgのナトリウムマルトヘキサオース硫酸を静脈内注射しておいた麻酔下のウサギの耳静脈へ注射した。前処置したこのウサギの、放射性標識の注射当初からのガンマ線画像化から、肺内での放射性標識ヒストンの蓄積がブロックされたことが示された(図10B)。放射性標識ヒストンは、肺を通過し、肝臓および脾臓中に局在した。

40

【0234】

実施例4: マルトテトラオース硫酸によるウサギ肺内でのヒストンの蓄積の遮断

放射性標識したヒストン調製物を、15分前に15 mg/kgのナトリウムマルトテトラオース硫酸を静脈内注射しておいた麻酔下のウサギの耳静脈へ注射した。前処置したこのウサギの、放射性標識の注射当初からのガンマ線画像化(図11)から、肺内での放射性標識ヒストンの蓄積がブロックされたことが示された; 放射性標識ヒストンは、結合することなく肺

50

を通過し、肝臓および脾臓中に局在した。図11のフレーム1～4は30秒ずつの収集であり、一方でフレーム5～8は60秒ずつの収集である。

【0235】

実施例5: セロピオース硫酸によるウサギ肺内でのヒストンの蓄積の遮断

放射性標識したヒストン調製物を、15分前に15 mg/kgのナトリウムセロピオース硫酸を静脈内注射しておいた麻酔下のウサギの耳静脈へ注射した。前処置したこのウサギの、放射性標識の注射当初からのガンマ線画像化(図12)から、肺内での放射性標識ヒストンの蓄積がブロックされたことが示された；放射性標識ヒストンは、結合することなく肺を通過し、肝臓および脾臓中に局在した。図12のフレーム1～4は30秒ずつのガンマ線カメラ収集である。

10

【0236】

実施例6: マウスでのLPS誘導性の敗血症の研究

敗血症のリポ多糖類(LPS)誘導マウスモデルにおける被験物質1 (マルトリオース硫酸；TA1)、2 (セロピオース硫酸；TA2)および3 (ヘパリン；TA3)のインビボでの効力を評価するために研究を行った。内毒素血症を1日目にLPSの腹腔内(i.p.)注射によって誘導した。被験物質は1日目に同時に腹腔内(i.p.)投与し、その後、さらに2日間、毎日、腹腔内(i.p.)投薬した。下記表2に示されるように被験物質1および2を2用量の濃度で評価し、被験物質3を1濃度で評価した。

【0237】

(表2)

20

群	処置	用量レベル (質量/注射)	投薬経路	動物数
1	媒体対照 (PBS)	-	i.p.	雌8匹
2	被験物質1	高用量100 mg/kg (初回投薬 + 2日目(d2)および3日目(d3)には 前の投薬から24時間の投薬)	i.p.	雌8匹
3	被験物質1	低用量15 mg/kg (初回投薬 + 2日目(d2)および3日目(d3)には 前の投薬から24時間の投薬)	i.p.	雌8匹
4	被験物質2	高用量100 mg/kg (初回投薬 + 2日目(d2)および3日目(d3)には 前の投薬から24時間の投薬)	i.p.	雌8匹
5	被験物質2	低用量15 mg/kg (初回投薬 + 2日目(d2)および3日目(d3)には 前の投薬から24時間の投薬)	i.p.	雌8匹
6	被験物質3	低用量1.1 mg/kg (初回投薬 + 2日目(d2)および3日目(d3)には 前の投薬から24時間の投薬)	i.p.	雌8匹

30

40

50

【 0 2 3 8 】

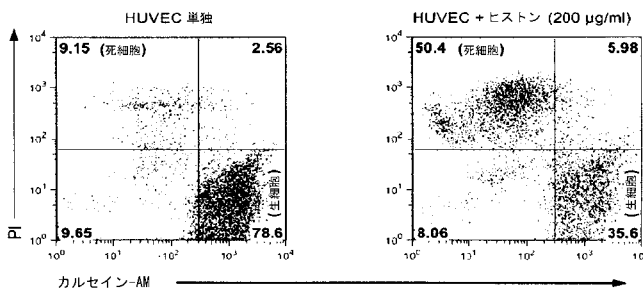
結果：

動物が死体で見つかるまで、または安楽死されねばならなくなるまでの時間が、図13中の Kaplan・マイヤープロットに示されている。本研究において用いたマルトリオース硫酸 (TA1) の高用量 (100 mg/kg) では、3回目の投薬後にいくつかの毒性 (一群の死) を生じるように思われたが、しかし低用量 (15 mg/kg) ではもっと耐容性が高かった。両用量でのセロビオース硫酸 (TA2) は耐容性良好であったが、ヘパリンの場合に選択した低用量 (TA3; 1.1 mg/kg) でもそうであった。図13中の Kaplan・マイヤープロットから、マルトリオース硫酸 (TA1) の低用量およびセロビオース硫酸 (TA2) の両用量では生存の延長が得られることが示唆された。ヘパリン (TA3) の場合、対照と比べて、生存プロットの明らかな変化は認められなかった (図13参照)。

10

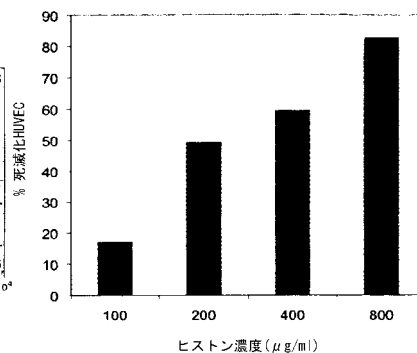
【 図 1 】

HUVECに対するヒストン細胞毒性のフローサイトメトリーアッセイ法



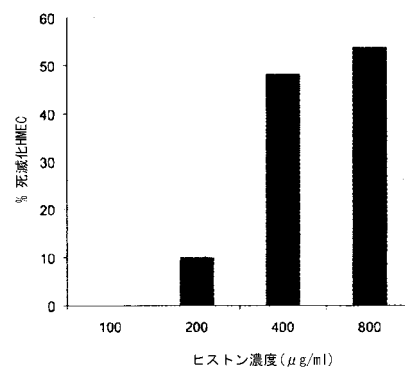
【 図 2 】

HUVECに対するヒストンの毒性



A

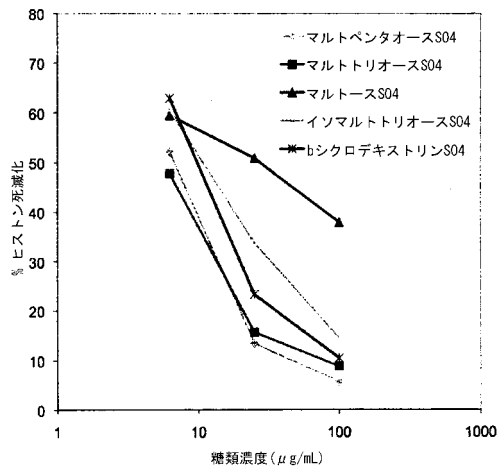
HMECに対するヒストンの毒性



B

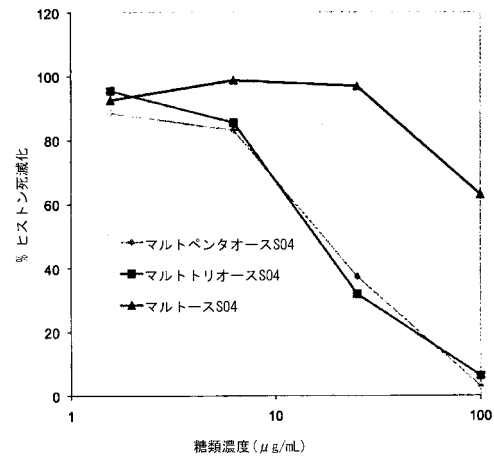
【図 3】

ヒストン細胞毒性からHUVECを保護する異なる硫酸化オリゴ糖の能力



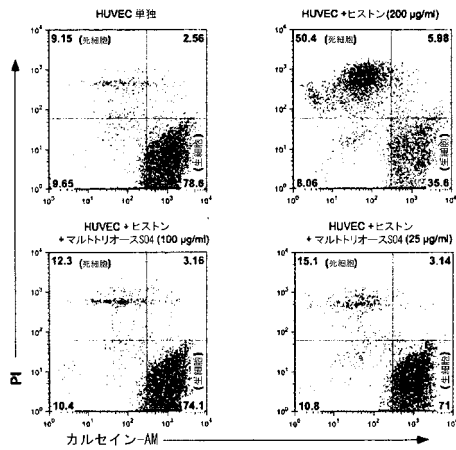
【図 4】

ヒストン細胞毒性からHUVECを保護する異なる硫酸化オリゴ糖の能力



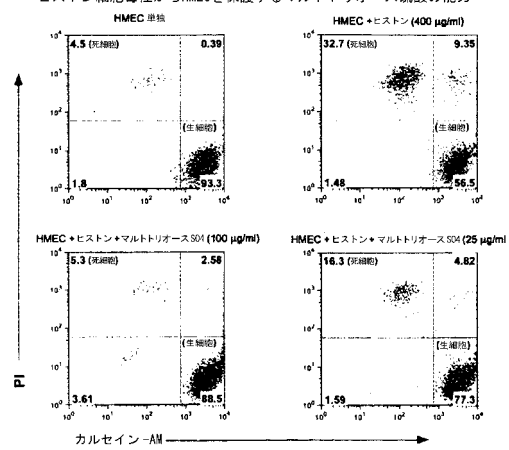
【図 5】

ヒストン細胞毒性からHMECを保護するマルトトリオース硫酸の能力



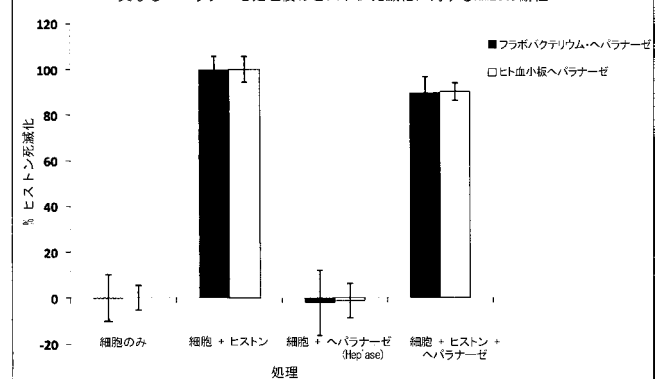
【図 6】

ヒストン細胞毒性からHMECを保護するマルトトリオース硫酸の能力

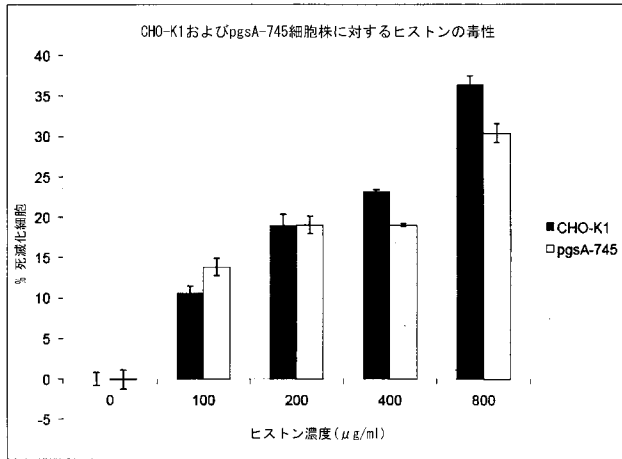


【図 7】

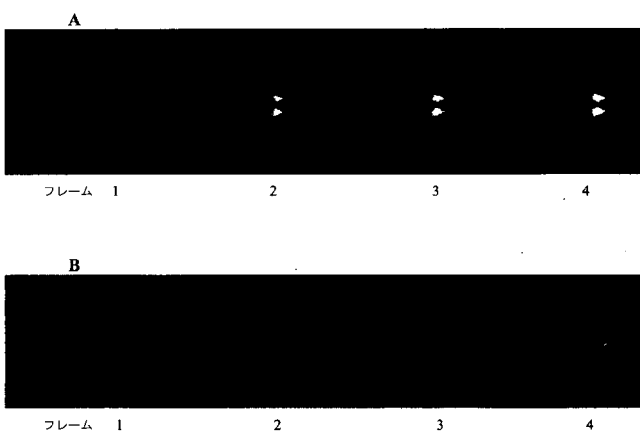
異なるヘパラーゼ処理後のヒストン死滅化に対するHMECの耐性



【図 8】



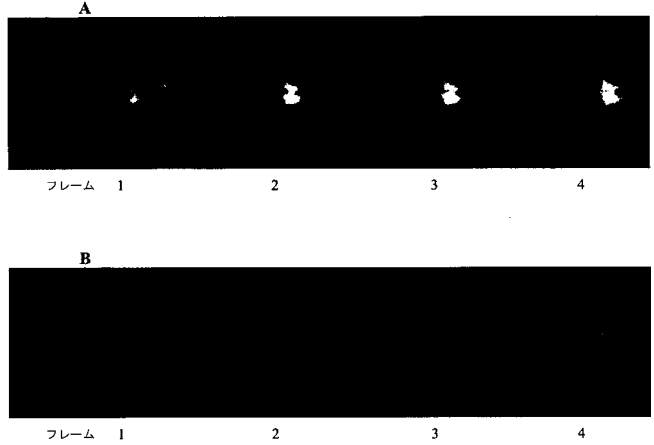
【図 9】



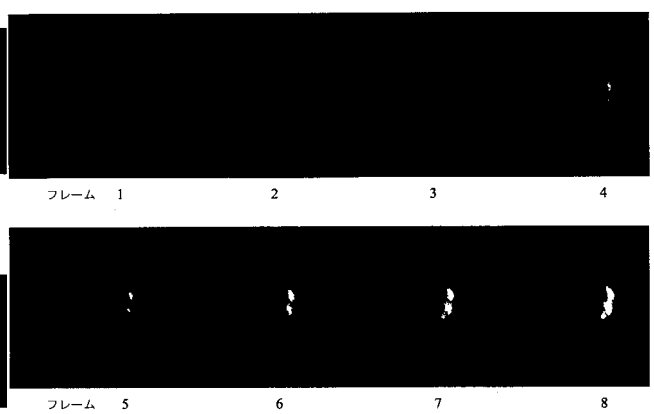
【図 12】



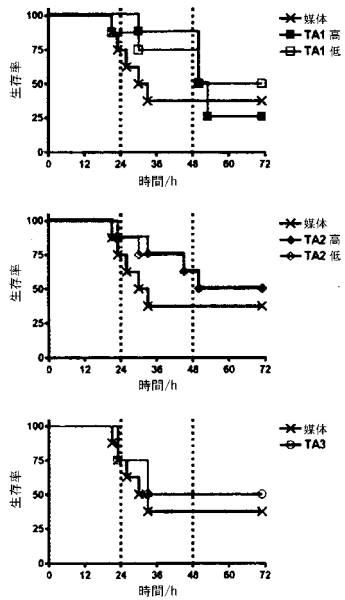
【図 10】



【図 11】



【図 13】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2011/001550
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
A61K 31/70 (2006.01)	A61K 31/715 (2006.01)	A61K 31/737 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)	A61K 31/724 (2006.01)	A61P 7/00 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)	A61K 31/727 (2006.01)	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPODOC, WPI, MEDLINE, GOOGLE, PATENTSCOPE: Keywords (sepsis, septic, septicemia, systemic inflammation, SIRS, blood poisoning, pyemia, pyohemia, polyanion, saccharide, sugar alcohol, cyclodextrin, glucose, galactose, fructose, ribose, arabinose, xylose, lyxose, allose, altrose, mannose, gulose, idose, talose, ribulose, xylulose, psicose, sorbose, tagatose, sedoheptulose, heparin, chondroitin, dermaton, pentosan, sulodexide, lactitol, lactobionic, enoxaparin, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltooctaose, panose, erlose, raffinose, cellobiose, sulphate, histone, extracellular, interstitial) & IPC A61K31/715, A61K31/727, A61K31/737, A61P71		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/061918 A1 (OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION) 14 May 2009 Page 2, lines 10-31; claims 15-16	1-4,6
X	WO 2006/015171 A2 (THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM) 09 February 2006 Page 1, lines 5-8; page 3, lines 9-13; page 4, lines 21-22; page 9, lines 15-18; page 12, line 22	1-7
X	WO 2007/013123 A1 (HUMANITAS MIRASOLE S.P.A.; ISTITUTO DI RICERCHE CHIMICHE E BIOCHIMICHE GIULIANA RONZONI) 01 February 2007 Para. [0001]-[0004], [0010], [0025]	1-6,18-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 December 2011		Date of mailing of the international search report 19 JANUARY 2012
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer ROSS HEISEY AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 3185

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2011/001550

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/0282775 A1 (KENNEDY, T.) 22 December 2005 Para. [0002], [0020], [0052]; claims 10 and 20	1-6
X	WO 2003/106503 A1 (INALCO S.P.A.) 24 December 2003 Page 2, lines 23-28; page 31, line 31-page 32, line 3	1-6
A	XU, J. et al, "Extracellular histones are major mediators of death in sepsis", Nature Medicine, 2009, 15(11), 1318-1322. Whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2011/001550

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
WO	2009061918	AU	2008323947	CA	2704974	EP	2209485
		JP	2011503012	US	2009117099		
WO	2006015171	US	2006229276				
WO	2007013123	EP	1747785				
US	2005282775	AU	2005299568	CA	2585640	EP	1807095
		JP	2008518090	US	2007123489	US	7468358
		WO	2006007392	WO	2006047755		
WO	03106503	AU	2003242681	CA	2489293	EP	1521778
		IT	MI20021294	US	2003232785	US	6900311
		US	2005234014				
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.							
END OF ANNEX							

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/724 (2006.01)	A 6 1 K 31/724	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
C 0 7 H 11/00 (2006.01)	C 0 7 H 11/00	
C 0 8 B 37/16 (2006.01)	C 0 8 B 37/16	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ステフェンズ ロス ウェントワース
オーストラリア連邦 オーストラリアン・キャピタル・テリトリー スティアリング マッカイル
クレセント 1 8

(72) 発明者 バリシュ クリストファー リチャード
オーストラリア連邦 オーストラリアン・キャピタル・テリトリー キャンベル ベイシー クレ
セント 6 2

(72) 発明者 フリーマン クレイグ ジェフリー
オーストラリア連邦 オーストラリアン・キャピタル・テリトリー リベット ウーラム プレイ
ス 3 1

(72) 発明者 センデン ティモシー ジョン
オーストラリア連邦 オーストラリアン・キャピタル・テリトリー アランダ バンジャロン ク
レセント 2 7

F ターム(参考) 4C057 BB01 BB03 DD02 GG02 GG03
4C086 AA01 AA02 EA01 EA03 EA21 EA24 EA25 EA26 MA01 MA04
NA14 ZB32 ZB33 ZB35 ZB37 ZC37 ZC41
4C090 BA09 BB04 BB52 BB54 BB63 BB64 BB95 BB96 BB97 BD34

DA23