

(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2004-535461

(P2004-535461A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 37/02

4 C O 7 6

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 45/00

4 C O 8 4

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/42

A 6 1 P 1/04

A 6 1 P 1/04

A 6 1 P 1/18

A 6 1 P 1/18

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-513312 (P2003-513312)

(86) (22) 出願日 平成14年7月19日 (2002.7.19)

(85) 翻訳文提出日 平成16年1月19日 (2004.1.19)

(86) 国際出願番号 PCT/US2002/022951

(87) 国際公開番号 W02003/007686

(87) 国際公開日 平成15年1月30日 (2003.1.30)

(31) 優先権主張番号 60/307,005

(32) 優先日 平成13年7月19日 (2001.7.19)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 60/344,514

(32) 優先日 平成13年12月28日 (2001.12.28)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502113644

ディーエムアイ バイオサイエンスズ インコーポレイテッド

D M I B I O S C I E N C E S , I N C

.

アメリカ合衆国 80110 コロラド州

エングルウッド サウス クラークソン

ストリート 3601 스위트 42

O

(74) 代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣

(74) 代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテインCの不活性化を抑制するための銅キレート剤の使用

(57) 【要約】

本発明は、活性化プロテインC (A P C) が銅により不活性化されるという予期せぬ発見に基づいている。したがって、本発明は、銅によるA P Cの不活性化を抑制するために銅キレート剤を用いる、A P Cにより治療可能な疾患および状態を治療する改善された方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性化プロテイン C (A P C) による治療を必要とする動物を治療する方法であって、該動物に

有効量の銅キレート剤、および

有効量の

(a) A P C 、

(b) プロテイン C 、該動物におけるプロテイン C の合成を増加させる物質、もしくはこれら両方、

(c) プロテイン C の活性化剤、または

(d) (a) 、 (b) および (c) のうち 1 つもしくは複数の組合せ

のうちの 1 つを投与することからなる方法。

10

【請求項 2】

前記キレート剤がヒトアルブミンまたは N 末端銅結合性配列 A s p A l a H i s を含むその断片である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記キレート剤が下式を有するペプチドまたはその生理学的に許容できる塩である請求項 1 に記載の方法。

$P_1 - P_2$

[式中、

P_1 は、

$X a a_1 \quad X a a_2 \quad H i s$ または

$X a a_1 \quad X a a_2 \quad H i s \quad X a a_3$ であり、

P_2 は $(X a a_4)_n$ であり、

$X a a_1$ はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、イソグルタミン酸、グルタミン、リシン、ヒドロキシリシン、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、

$X a a_2$ はグリシン、アラニン、 - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リシン、ヒドロキシリシン、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、

$X a a_3$ はグリシン、アラニン、バリン、リシン、アルギニン、オルニチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはトリプトファンであり、

$X a a_4$ は任意のアミノ酸であり、

n は 0 ~ 100 である]

20

30

【請求項 4】

$X a a_1$ がアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、トレオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンである請求項 3 に記載の方法。

40

【請求項 5】

$X a a_2$ がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、トレオニン、セリン、アスパラギン、メチオニン、ヒスチジンまたは - ヒドロキシメチルセリンである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

$X a a_3$ がリシンである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

$X a a_1$ がアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、トレオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、 $X a a_2$ がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、トレオニン、セリン、アスパラギン、メチオニン、ヒスチジンまたは - ヒドロキシ

50

メチルセリンであり、 Xaa_3 がリシンである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

Xaa_1 がアスパラギン酸またはグルタミン酸であり、 Xaa_2 がアラニン、グリシン、バリン、トレオニン、セリン、ロイシンまたは - ヒドロキシメチルセリンである請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

Xaa_2 がアラニン、トレオニン、ロイシンまたは - ヒドロキシメチルセリンである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

Xaa_1 がアスパラギン酸であり、 Xaa_2 がアラニンである請求項 9 に記載の方法。 10

【請求項 11】

n が 0 ~ 10 である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 12】

n が 0 ~ 5 である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

n が 0 である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

P_2 が金属結合性配列を含む請求項 3 に記載の方法。

【請求項 15】

P_2 が以下の配列のうち 1 つを含む請求項 14 に記載の方法。 20

$(Xaa_4)_m Xaa_3 His Xaa_2 Xaa_5$ 、

$(Xaa_4)_m His Xaa_2 Xaa_5$ 、

$(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His Xaa_3$ または

$(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His$

[式中、 Xaa_5 は遊離の側鎖 - NH_2 を有するアミノ酸であり、 m は 0 ~ 5 である]

【請求項 16】

Xaa_5 が Orn または Lys である請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

P_2 が以下の配列のうち 1 つを含む請求項 14 に記載の方法。

$[(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His Xaa_3]_r$ 、 30

$[(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His]_r$ 、

$[(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His Xaa_3 (Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His]_r$ または

$[(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His (Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His Xaa_3]_r$

[式中、 Xaa_5 は遊離の側鎖 - NH_2 を有するアミノ酸であり、 m は 0 ~ 5 であり、 r は 2 ~ 100 である]

【請求項 18】

P_2 が $Cu(I)$ に結合する配列を含む請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

P_2 が以下の配列 40

$Met Xaa_4 Met$ 、

$Met Xaa_4 Xaa_4 Met$ 、

$Cys Cys$ 、

$Cys Xaa_4 Cys$ 、

$Cys Xaa_4 Xaa_4 Cys$ 、

$Met Xaa_4 Cys Xaa_4 Xaa_4 Cys$ 、

$Gly Met Xaa_4 Cys Xaa_4 Xaa_4 Cys$ [配列番号 3]、

$Gly Met Thr Cys Xaa_4 Xaa_4 Cys$ [配列番号 4]、

$Gly Met Thr Cys Ala Asn Cys$ [配列番号 5] または 50

- G l u C y s G l y

のうち1つを含む請求項18に記載の方法。

【請求項20】

P_2 が G l y M e t T h r C y s A l a A s n C y s [配列番号 5] である請求項19に記載の方法。

【請求項21】

P_2 が、該ペプチドの細胞膜への浸透、標的組織への到達またはこれら両方の能力を増大させる配列からなる請求項3に記載の方法。

【請求項22】

P_2 が疎水性またはアルギニンオリゴマーである請求項21に記載の方法。

10

【請求項23】

- アラニン (存在する場合) 以外の P_1 のアミノ酸のうち少なくとも1つが D - アミノ酸である請求項3に記載の方法。

【請求項24】

X a a₁ が D - アミノ酸であるか、H i s が D - アミノ酸であるか、または X a a₁ および H i s の両方が D - アミノ酸である請求項23に記載の方法。

【請求項25】

- アラニン (存在する場合) 以外の P_1 のアミノ酸のすべてが D - アミノ酸である請求項24に記載の方法。

【請求項26】

20

P_2 のアミノ酸のうち少なくとも50%が D - アミノ酸である請求項23に記載の方法。

【請求項27】

P_2 のアミノ酸のうち少なくとも50%が D - アミノ酸である請求項24に記載の方法。

【請求項28】

P_2 のアミノ酸のうち少なくとも50%が D - アミノ酸である請求項25に記載の方法。

【請求項29】

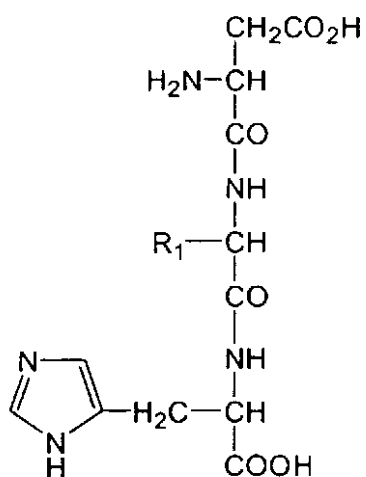
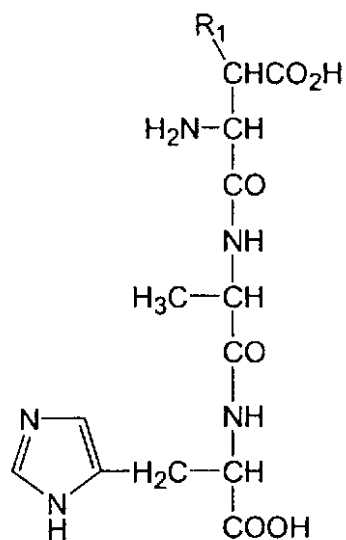
P_1 の少なくとも1つのアミノ酸、 P_2 の少なくとも1つのアミノ酸、または P_1 の少なくとも1つのアミノ酸および P_2 の少なくとも1つのアミノ酸が、(a) 銅イオンに結合する P_1 の能力を変化させることなく、該ペプチドの親油性を増加させる置換基、(b) 銅イオンに結合する P_1 の能力を変化させることなく、タンパク質分解酵素から該ペプチドを保護する置換基、または (c) 銅イオンに結合する P_1 の能力を変化させない非ペプチド金属結合性官能基である置換基、で置換されている請求項3に記載の方法。

30

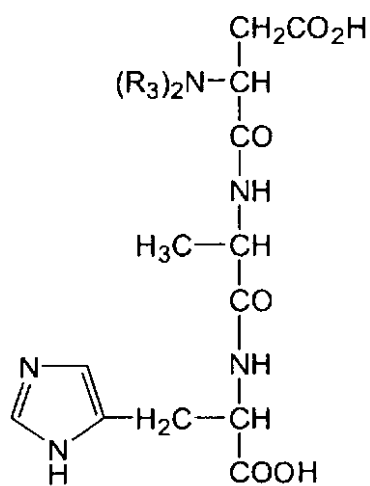
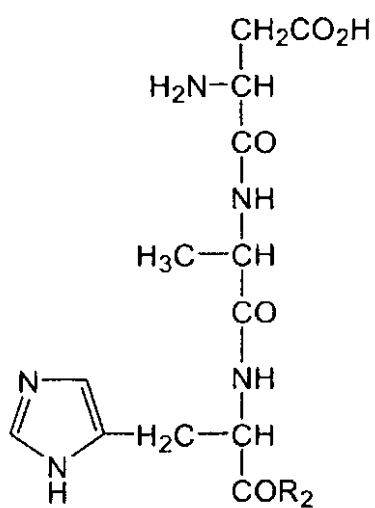
【請求項30】

n が 0 であり、 P_1 が以下の式のうち1つを有する請求項29に記載の方法。

【化 1】



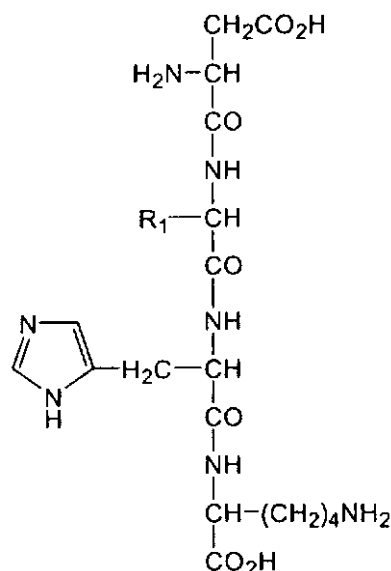
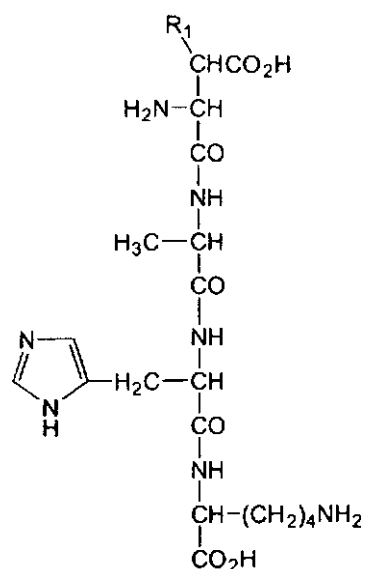
10



20

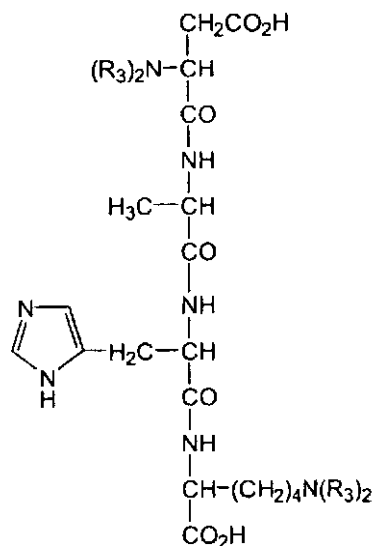
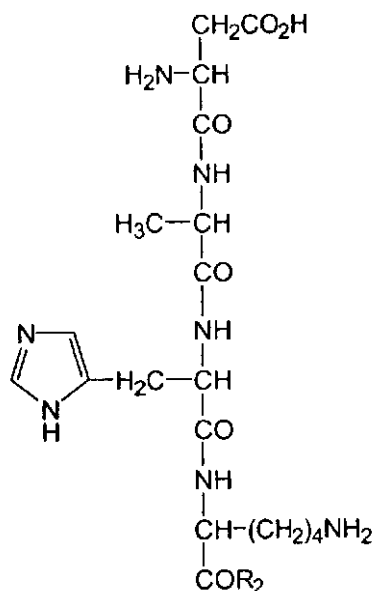
30

【化 2】



10

20



30

40

50

[式中、

 R_1 はアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり、 R_2 は $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $N(R_1)_2$ 、 $-OR_1$ または R_1 であり、 R_3 は H、非ペプチド金属結合性官能基であるか、または 2 つの R_3 基と一緒に非ペプチド金属結合性官能基を形成している]

【請求項 3 1】

前記キレート剤が次式を有するペプチド 2 量体である請求項 1 に記載の方法。



[式中、

各 P_3 は同じであるか、または異なっていてよく、銅に結合することができるペプチドであり、 L は 2 つの P_3 ペプチドにそれらの C 末端アミノ酸を介して結合している化学基である]

【請求項 3 2】

各 P_3 が 2 ~ 10 アミノ酸を含む請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

少なくとも 1 つの P_3 が P_1 であり、 P_1 が

Xaa_1 Xaa_2 His または

Xaa_1 Xaa_2 His Xaa_3 であって、

Xaa_1 はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、イソグルタミン酸、グルタミン、リシン、ヒドロキシリシン、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、

Xaa_2 はグリシン、アラニン、 - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リシン、ヒドロキシリシン、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、
 Xaa_3 はグリシン、アラニン、バリン、リシン、アルギニン、オルニチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはトリプトファンである請求項 31 に記載の方法。

10

【請求項 34】

Xaa_1 がアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、トレオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンである請求項 33 に記載の方法。

20

【請求項 35】

Xaa_2 がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、トレオニン、セリン、アスパラギン、メチオニン、ヒスチジンまたは - ヒドロキシメチルセリンである請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

Xaa_3 がリシンである請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

Xaa_1 がアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、トレオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、 Xaa_2 がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、トレオニン、セリン、アスパラギン、メチオニン、ヒスチジンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、 Xaa_3 がリシンである請求項 33 に記載の方法。

30

【請求項 38】

Xaa_1 がアスパラギン酸またはグルタミン酸であり、 Xaa_2 がアラニン、グリシン、バリン、トレオニン、セリン、ロイシンまたは - ヒドロキシメチルセリンである請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

Xaa_2 がアラニン、トレオニン、ロイシンまたは - ヒドロキシメチルセリンである請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

Xaa_1 がアスパラギン酸であり、 Xaa_2 がアラニンである請求項 39 に記載の方法。

40

【請求項 41】

- アラニン（存在する場合）以外の P_1 のアミノ酸のうち少なくとも 1 つが D - アミノ酸である請求項 33 に記載の方法。

【請求項 42】

- アラニン（存在する場合）以外の P_1 のアミノ酸のすべてが D - アミノ酸である請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

両方の P_3 ペプチドが P_1 である請求項 33 に記載の方法。

【請求項 44】

P_3 の少なくとも 1 つのアミノ酸が、(a) 銅イオンに結合する P_3 の能力を変化させる

50

ことなく、該ペプチドの親油性を増加させる置換基、(b)銅イオンに結合する P_3 の能力を変化させることなく、タンパク質分解酵素から該ペプチドを保護する置換基、または(c)銅イオンに結合する該ペプチドの能力を変化させない非ペプチド金属結合性官能基である置換基、で置換されている請求項31に記載の方法。

【請求項45】

P_3 が、 P_3 の銅イオン結合能力をもたらす非ペプチド金属結合性官能基で置換されているアミノ酸配列を含む請求項31に記載の方法。

【請求項46】

Lが中性である請求項31に記載の方法。

【請求項47】

Lが1～18個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖アルカンまたはアルケン残基である請求項31に記載の方法。

【請求項48】

Lが2～8個の炭素原子を含む請求項47に記載の方法。

【請求項49】

Lが2～8個の炭素原子を含む環式アルカン残基である請求項31に記載の方法。

【請求項50】

Lが3～5個の炭素原子を含む請求項49に記載の方法。

【請求項51】

Lが窒素含有複素環式アルカン残基である請求項31に記載の方法。

【請求項52】

Lがピペラジドである請求項51に記載の方法。

【請求項53】

Lがグリセリルエステルである請求項31に記載の方法。

【請求項54】

前記銅キレート剤は非ペプチド金属結合性官能基を結合したペプチドであり、該ペプチドが銅結合性部位を含み、かつ/または該非ペプチド官能基が銅に結合する請求項1に記載の方法。

【請求項55】

該動物が後天性凝固性亢進状態または後天性プロテインC欠乏症に罹患しているためAPCを必要としている請求項1に記載の方法。

【請求項56】

該動物が敗血症に罹患しているためAPCを必要としている請求項1に記載の方法。

【請求項57】

該動物が血管内凝固を伴う疾患または状態に罹患しているためAPCを必要としている請求項1に記載の方法。

【請求項58】

銅キレート剤を投与した後に、APC、プロテインC、プロテインCの活性化剤、またはこれらのうち1つもしくは複数の組合せを投与する請求項1に記載の方法。

【請求項59】

銅キレート剤を、APC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質、プロテインCの活性化剤、またはこれらのうち1つもしくは複数の組合せと配合してから動物に投与する請求項1に記載の方法。

【請求項60】

活性化プロテインC(APC)による治療を必要とする動物を治療する方法であって、有効量の銅キレート剤を以下の

(a) APC、

(b) プロテインC、該動物におけるプロテインCの合成を増加させる物質、もしくはこれら両方、

(c) プロテインCの活性化剤、または

10

20

30

40

50

(d)(a)、(b)および(c)のうち1つもしくは複数の組合せ
のうちの1つを含む組成物と接触させて、該組成物中に存在する全ての銅に結合させるよ
うにするステップと、

有効量のAPC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質、プロテインCの
活性化剤、もしくはそれらのうち1つまたは複数の組合せをAPCによる治療を必要とす
る動物に投与するステップと

からなる方法。

【請求項61】

前記銅キレート剤がヒトアルブミンまたはN末端銅結合性配列Asp Ala Hisを
含むその断片である請求項60に記載の方法。

10

【請求項62】

前記銅キレート剤が次式を有するペプチドまたはその生理学的に許容できる塩である請求
項60に記載の方法。

$P_1 - P_2$

[式中、

P_1 は、

Xaa₁ Xaa₂ Hisまたは

Xaa₁ Xaa₂ His Xaa₃であり、

P_2 は(Xaa₄)_nであり、

Xaa₁はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン
、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、イソグルタミン
酸、グルタミン、リシン、ヒドロキシリシン、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フ
ェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロ
キシメチルセリンであり、

20

Xaa₂はグリシン、アラニン、 - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリ
ン、トレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リシン、
ヒドロキシリシン、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フェニルアラニン、チロシン
、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、

Xaa₃はグリシン、アラニン、バリン、リシン、アルギニン、オルニチン、アスパラギ
ン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはトリプトファンであり、

30

Xaa₄は任意のアミノ酸であり、

nは0~100である]

【請求項63】

P_1 の少なくとも1つのアミノ酸が、(a)銅イオンに結合する P_1 の能力を変化させる
ことなく、ペプチドの親油性を増加させる置換基、(b)銅イオンに結合する P_1 の能力
を変化させることなく、タンパク質分解酵素からペプチドを保護する置換基、または(c
)銅イオンに結合する P_1 の能力を変化させない非ペプチド金属結合性官能基である置換
基、で置換されている請求項62に記載の方法。

【請求項64】

前記銅キレート剤が次式を有するペプチド2量体である請求項60に記載の方法。

40

$P_3 - L - P_3$

[式中、

各 P_3 は同じであるか、または異なっていてよく、銅に結合することができるペプチドで
あり、

Lは2つの P_3 ペプチドにそれらのC末端アミノ酸を介して結合している化学基である]

【請求項65】

少なくとも1つの P_3 が P_1 であり、 P_1 が

Xaa₁ Xaa₂ Hisまたは

Xaa₁ Xaa₂ His Xaa₃であって、

Xaa₁はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン

50

、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、イソグルタミン酸、グルタミン、リシン、ヒドロキシリシン、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、

X a a₂ はグリシン、アラニン、 - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リシン、ヒドロキシリシン、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、X a a₃ はグリシン、アラニン、バリン、リシン、アルギニン、オルニチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはトリプトファンである、
請求項 6 4 に記載の方法。

10

【請求項 6 6】

P₃ の少なくとも 1 つのアミノ酸が、(a) 銅イオンに結合する P₃ の能力を変化させることなく、ペプチドの親油性を増加させる置換基、(b) 銅イオンに結合する P₃ の能力を変化させることなく、タンパク質分解酵素からペプチドを保護する置換基、または(c) 銅イオンに結合する P₃ の能力を変化させない非ペプチド金属結合性官能基である置換基、で置換されている請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記銅キレート剤は非ペプチド金属結合性官能基を結合したペプチドであり、該ペプチドが銅結合性部位を含み、かつ / または該非ペプチド官能基が銅に結合する請求項 6 0 に記載の方法。

20

【請求項 6 8】

A P C、プロテイン C、プロテイン C の活性化剤、もしくはこれらのうち 1 つまたは複数の組合せを投与する前に、前記銅キレート剤を除去する請求項 6 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、活性化プロテイン C (A P C) で治療可能な疾患および状態を治療する方法の改善に関する。特に、本発明は、銅による A P C の不活性化を抑制するための銅キレート剤を用いる、A P C により治療可能な疾患および状態を治療する方法に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

組換えヒト活性化プロテイン C (A P C) は、重症敗血症の治療用に最近承認された (X i g r i s (登録商標)、イーライ・リリー (E l i L i l l y) [インディアナ州インディアナポリス所在]) が、A P C は、凝固障害および重症炎症の治療に有用であると思われる。(非特許文献 1 ~ 5)。A P C は、生理学的条件下で微小血管血栓症を予防し、敗血症のような疾患における血液凝固性反応および炎症性反応を制御する助けとなると考えられている。(非特許文献 6、7)。敗血症の際の A P C の作用機序は、抗凝固活性および抗炎症活性の組合せであると思われるが、完全には理解されていない。(非特許文献 6)。

40

【0 0 0 3】

A P C は、プロテイン S に結合してタンパク質分解作用により第 V a 因子および第 V I I I a 因子を不活性化することにより、また、プラスミノーゲン活性化因子インヒビターの中和により線維素溶解を刺激することにより、抗凝固因子として機能するセリンプロテアーゼである。(非特許文献 8 ~ 1 0)。プロテイン C 前駆体は、主として肝臓で産生される。活性化は、プロテイン C の重鎖の N 末端におけるドデカペプチドの除去により達成される。プロテイン C 経路は、トロンピンが内皮細胞表面タンパク質であるトロンボモジュリンに結合し、プロテイン C が内皮細胞のプロテイン C 受容体に結合するときに開始される。A P C は、第 V a および第 V I I I a 因子を不活性化することにより、生成するトロンピンの量を制限する。(非特許文献 9)。

50

【 0 0 0 4 】

A P C の抗凝固活性は、急性および慢性疾患のいずれにおいても変動し得る。いくつかの報告によれば、A P C 活性の障害は、血症性ショック、播種性血管内凝固（D I C）、多臓器不全症候群およびアテローム動脈硬化症のような疾患と病原として関連している可能性があることが示唆されている。（非特許文献 1 1 ~ 1 4）。血漿 A P C 活性の低下と A P C による有用な治療とが、敗血症性ショック、電撃性紫斑病、深部静脈血栓性静脈炎、D I C および臓器不全症候群のような重篤な疾患と関連づけられている。（非特許文献 6、1 1、1 5）。ヘパリン依存性血漿セリンプロテアーゼプロテイン C 阻害物質（セルピン）、アンチトロンビン I I I、₁ アンチトリプシン、₂ マクログロブリンなどの数種の A P C 阻害物質が同定された。（非特許文献 9）、（非特許文献 1 2）、（非特許文献 1 6）、（非特許文献 1 7）、（非特許文献 1 8）、（非特許文献 1 9）。 10

【 0 0 0 5 】

知られている限り、銅阻害性の A P C 抗凝固活性に関する既往の報告は存在しない。銅は通常、セルロプラスミン、アルブミンおよびマクログロブリンのような血漿担体タンパク質の非特異的（互換的）結合部位および密着（非互換的）結合部位の両方に平衡状態をなして結合している。（非特許文献 2 0）。しかし、敗血症のような重篤な疾病においては、銅イオンを放出し得る、全身性または限局性の虚血およびアシドーシスがしばしば引き起こされる。（非特許文献 2 1）、（非特許文献 2 2）、（非特許文献 2 3）、（非特許文献 2 4）、（非特許文献 2 5）、（非特許文献 2 6）、（非特許文献 2 7）、（非特許文献 2 8）。敗血症の際の虚血およびアシドーシスにより放出された遊離の銅は、内因性または治療で投与された A P C に対して結合可能となると思われる。 20

【 特 許 文 献 1 】

米国特許第 6 , 1 5 6 , 7 3 4 号

【 特 許 文 献 2 】

米国特許第 6 , 2 6 8 , 3 4 4 号

【 特 許 文 献 3 】

国際出願国際公開第 9 9 / 2 0 2 9 3 号

【 特 許 文 献 4 】

米国特許第 5 , 1 5 1 , 2 6 8 号

【 特 許 文 献 5 】

国際出願国際公開第 0 1 / 7 2 3 2 8 号

【 特 許 文 献 6 】

国際出願国際公開第 0 1 / 5 6 5 3 2 号

【 特 許 文 献 7 】

米国特許第 6 , 3 9 5 , 2 7 0 号

【 特 許 文 献 8 】

米国特許第 6 , 1 6 2 , 6 2 9 号

【 特 許 文 献 9 】

米国特許第 6 , 1 5 9 , 4 6 8 号

【 特 許 文 献 1 0 】

米国特許第 6 , 1 5 6 , 7 3 4 号

【 特 許 文 献 1 1 】

米国特許第 5 , 8 3 1 , 0 2 5 号

【 特 許 文 献 1 2 】

米国特許第 5 , 3 3 0 , 9 0 7 号

【 特 許 文 献 1 3 】

米国特許第 4 , 9 8 1 , 9 5 2 号

【 特 許 文 献 1 4 】

国際出願国際公開第 8 9 / 1 2 6 8 5 号

【 特 許 文 献 1 5 】

30

40

50

国際出願国際公開第 9 8 / 4 8 8 1 8 号
【特許文献 1 6】
国際出願国際公開第 0 1 / 5 6 5 3 2 号
【特許文献 1 7】
国際出願国際公開第 0 1 / 5 9 0 8 4 号
【特許文献 1 8】
欧州特許第 7 2 6 , 0 7 6 号
【特許文献 1 9】
米国特許第 5 , 4 5 3 , 3 7 3 号
【特許文献 2 0】
米国特許第 5 , 5 1 6 , 6 5 0 号
【特許文献 2 1】
国際出願国際公開第 9 3 / 0 9 8 0 7 号
【特許文献 2 2】
米国特許第 4 , 9 5 9 , 3 1 8 号
【特許文献 2 3】
米国特許第 5 , 0 9 3 , 1 1 7 号
【特許文献 2 4】
米国特許第 5 , 5 7 1 , 7 8 6 号
【特許文献 2 5】
米国特許第 4 , 9 9 0 , 4 4 7 号
【特許文献 2 6】
米国特許第 5 , 0 3 7 , 7 4 4 号
【特許文献 2 7】
米国特許第 5 , 2 5 0 , 6 6 2 号
【特許文献 2 8】
米国特許第 5 , 2 6 0 , 2 0 2 号
【特許文献 2 9】
米国特許第 5 , 3 8 0 , 7 1 2 号
【特許文献 3 0】
米国特許第 5 , 4 4 0 , 0 1 8 号
【特許文献 3 1】
米国特許第 5 , 5 0 3 , 9 9 3 号
【特許文献 3 2】
米国特許第 5 , 5 2 1 , 2 8 7 号
【特許文献 3 3】
米国特許第 5 , 7 0 7 , 8 2 8 号
【特許文献 3 4】
米国特許第 5 , 7 2 8 , 5 5 3 号
【特許文献 3 5】
米国特許第 5 , 7 5 6 , 3 1 3 号
【特許文献 3 6】
米国特許第 5 , 7 5 9 , 8 0 2 号
【特許文献 3 7】
米国特許第 5 , 8 4 9 , 8 7 4 号
【特許文献 3 8】
米国特許第 5 , 8 7 9 , 9 0 7 号
【特許文献 3 9】
米国特許第 6 , 0 3 4 , 2 2 1 号
【特許文献 4 0】

10

20

30

40

50

米国特許第 6 , 1 5 0 , 5 0 4 号	
【特許文献 4 1】	
国際出願国際公開第 8 4 / 0 3 5 1 1 号	
【特許文献 4 2】	
国際出願国際公開第 8 9 / 0 2 4 6 7 号	
【特許文献 4 3】	
国際出願国際公開第 9 6 / 3 7 5 1 5 号	
【特許文献 4 4】	
国際出願国際公開第 9 7 / 3 1 9 4 7 号	
【特許文献 4 5】	10
国際出願国際公開第 9 9 / 6 5 9 4 3 号	
【特許文献 4 6】	
国際出願国際公開第 0 1 / 7 2 9 5 9 号	
【特許文献 4 7】	
欧州特許第 7 3 6 4 6 号	
【特許文献 4 8】	
欧州特許第 2 0 6 7 3 3 号	
【特許文献 4 9】	
欧州特許第 3 0 8 3 8 1 号	
【特許文献 5 0】	20
米国特許出願第 1 0 / 号、2 0 0 2 年 6 月 2 7 日出願	
【特許文献 5 1】	
米国特許出願第 1 0 / 0 7 6 , 0 7 1 号、2 0 0 2 年 2 月 1 3 日出願	
【特許文献 5 2】	
米国特許出願公開第 0 9 / 6 7 8 , 2 0 2 号、2 0 0 0 年 9 月 2 9 日出願	
【特許文献 5 3】	
国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 2 6 9 5 2 号、2 0 0 0 年 9 月 3 0 日出願 (国際公開第 0 1 / 2 5 2 6 5 号)	
【特許文献 5 4】	
国際出願番号 P C T / U S / 0 4 2 7 5 号、2 0 0 2 年 2 月 1 3 日出願	30
【特許文献 5 5】	
米国特許第 4 , 0 2 2 , 8 8 8 号	
【特許文献 5 6】	
米国特許第 4 , 4 6 1 , 7 2 4 号	
【特許文献 5 7】	
米国特許第 4 , 6 6 5 , 0 5 4 号	
【特許文献 5 8】	
米国特許第 4 , 7 6 0 , 0 5 1 号	
【特許文献 5 9】	
米国特許第 4 , 7 6 7 , 7 5 3 号	40
【特許文献 6 0】	
米国特許第 4 , 8 1 0 , 6 9 3 号	
【特許文献 6 1】	
米国特許第 4 , 8 7 7 , 7 7 0 号	
【特許文献 6 2】	
米国特許第 5 , 0 2 3 , 2 3 7 号	
【特許文献 6 3】	
米国特許第 5 , 0 5 9 , 5 8 8 号	
【特許文献 6 4】	
米国特許第 5 , 1 0 2 , 9 9 0 号	50

【特許文献 6 5】	
米国特許第 5, 1 1 8, 6 6 5 号	
【特許文献 6 6】	
米国特許第 5, 1 2 0, 8 3 1 号	
【特許文献 6 7】	
米国特許第 5, 1 3 5, 9 1 3 号	
【特許文献 6 8】	
米国特許第 5, 1 4 5, 8 3 8 号	
【特許文献 6 9】	
米国特許第 5, 1 6 4, 3 6 7 号	10
【特許文献 7 0】	
米国特許第 5, 5 9 1, 7 1 1 号	
【特許文献 7 1】	
米国特許第 5, 1 7 7, 0 6 1 号	
【特許文献 7 2】	
米国特許第 5, 2 1 4, 0 3 2 号	
【特許文献 7 3】	
米国特許第 5, 2 5 2, 5 5 9 号	
【特許文献 7 4】	
米国特許第 5, 3 4 8, 9 4 3 号	20
【特許文献 7 5】	
米国特許第 5, 4 4 3, 8 1 6 号	
【特許文献 7 6】	
米国特許第 5, 5 3 8, 9 4 5 号	
【特許文献 7 7】	
米国特許第 5, 5 5 0, 1 8 3 号	
【特許文献 7 8】	
米国特許第 5, 6 9 0, 9 0 5 号	
【特許文献 7 9】	
米国特許第 5, 7 5 9, 5 1 5 号	30
【特許文献 8 0】	
米国特許第 5, 8 6 1, 1 3 9 号	
【特許文献 8 1】	
米国特許第 5, 8 9 1, 4 1 8 号	
【特許文献 8 2】	
米国特許第 5, 9 2 8, 9 5 5 号	
【特許文献 8 3】	
米国特許第 6, 0 1 7, 8 8 8 号	
【特許文献 8 4】	
国際出願国際公開第 9 4 / 2 6 2 9 5 号	40
【特許文献 8 5】	
国際出願国際公開第 9 9 / 5 7 2 6 2 号	
【特許文献 8 6】	
国際出願国際公開第 9 9 / 6 7 2 8 4 号	
【特許文献 8 7】	
国際出願国際公開第 0 0 / 3 6 1 3 6 号	
【特許文献 8 8】	
欧州特許出願第 3 2 7 2 6 3 号	
【特許文献 8 9】	
国際出願国際公開第 0 0 / 3 6 1 3 6 号	50

【特許文献 90】	
米国特許第 3, 941, 763 号	
【特許文献 91】	
米国特許第 5, 786, 335 号	
【特許文献 92】	
ポーランド共和国特許第 3 1 5 4 7 4 号	
【特許文献 93】	
米国特許第 5, 101, 041 号	
【特許文献 94】	
米国特許第 5, 650, 134 号	10
【特許文献 95】	
米国特許第 5, 650, 134 号	
【特許文献 96】	
米国特許第 5, 422, 096 号	
【特許文献 97】	
米国特許第 5, 527, 522 号	
【特許文献 98】	
米国特許第 5, 628, 982 号	
【特許文献 99】	
米国特許第 5, 874, 573 号	20
【特許文献 100】	
米国特許第 5, 906, 996 号	
【特許文献 101】	
国際出願国際公開第 97 / 44313 号	
【特許文献 102】	
国際出願国際公開第 97 / 49409 号	
【特許文献 103】	
国際出願国際公開第 99 / 39706 号	
【特許文献 104】	
米国特許第 5, 807, 535 号	30
【特許文献 105】	
米国特許第 5, 650, 134 号	
【特許文献 106】	
国際出願国際公開第 93 / 23425 号	
【特許文献 107】	
米国特許第 5, 739, 395 号	
【特許文献 108】	
米国特許第 5, 994, 339 号	
【特許文献 109】	
米国特許第 5, 087, 696 号	40
【特許文献 110】	
米国特許第 5, 637, 311 号	
【特許文献 111】	
米国特許第 6, 004, 953 号	
【特許文献 112】	
米国特許第 5, 683, 907 号	
【特許文献 113】	
米国特許第 5, 380, 747 号	
【特許文献 114】	
米国特許第 5, 922, 761 号	50

【特許文献 115】

米国特許第 4, 912, 118 号

【特許文献 116】

米国特許第 5, 104, 865 号

【特許文献 117】

国際出願国際公開第 98/54138 号

【非特許文献 1】

バーナードら (Bernard et al.), Crit. Care Med. 29, 2051 - 2059 (2001)

【非特許文献 2】

バーナードら (Bernard et al.), N. Engl. J. Med. 344, 699 - 709 (2001)

【非特許文献 3】

ミズタニら (Mizutani et al.), Blood 95, 3781 - 3787 (2000)

【非特許文献 4】

テラーら (Taylor et al.), J. Clin. Invest. 79, 918 - 925 (1987)

【非特許文献 5】

シバタら (Shibata et al.), Circulation 103, 1799 - 1805 (2001)

【非特許文献 6】

エスモン (Esmon), Crit. Care Med. 29, S48 - 51 (2001)

【非特許文献 7】

ハックら (Hack et al.), Crit. Care Med. 29, S21 - 27 (2001)

【非特許文献 8】

ウォーカーら (Walker et al.), FASEB J. 6, 2561 - 2567 (1992)

【非特許文献 9】

エスモン (Esmon), Arterioscler. Thromb. 12, 135 - 145 (1992)

【非特許文献 10】

ファン ヒンスベルフラ (van Hinsbergh et al.), Blood 65, 444 - 451 (1985)

【非特許文献 11】

フーリエら (Fourrier et al.), Chest 101, 816 - 823 (1992)

【非特許文献 12】

フーゲンドーンら (Hoogendoorn et al.), Blood 78, 2283 - 2290 (1991)

【非特許文献 13】

マーシャル (Marshall), Crit. Care Med. 29, S99 - 106 (2001)

【非特許文献 14】

メツザノら (Mezzano et al.), Br. J. Haematol. 113, 905 - 910 (2001)

【非特許文献 15】

マーシャル (Marshall), Crit. Care Med. 29, S99 - 106

10

20

30

40

50

(2 0 0 1)

【非特許文献 1 6】

エスパンナら (E s p a n a e t a l .) , B l o o d 7 7 , 1 7 5 4 - 1 7 6 0 (1 9 9 1)

【非特許文献 1 7】

ハーマンスら (H e r m a n s e t a l .) , B i o c h e m . J . 2 9 5 , 2 3 9 - 2 4 5 (1 9 9 3)

【非特許文献 1 8】

エスパンナら (E s p a n a e t a l .) , T h r o m b . R e s . 5 9 , 5 9 3 - 6 0 8 (1 9 9 0)

10

【非特許文献 1 9】

ワタナベら (W a t a n a b e e t a l .) , A m . J . H e m a t o l . 6 5 , 3 5 - 4 0 (2 0 0 0)

【非特許文献 2 0】

リンダーら (L i n d e r e t a l .) , B i o c h e m i s t r y o f C o p p e r (プレナムプレス (P l e n u m P r e s s) , ニューヨーク、1 9 9 1))

【非特許文献 2 1】

ミゾックら (M i z o c k e t a l .) , C r i t . C a r e M e d . 2 0 , 8 0 - 9 3 (1 9 9 2)

【非特許文献 2 2】

20

パストラスら (P a s t o r e s e t a l .) , A m . J . G a s t r o e n t e r o l . 9 1 , 1 6 9 7 - 1 7 1 0 (1 9 9 6)

【非特許文献 2 3】

マチエドら (M a c h i e d o e t a l .) , A r c h . S u r g . 1 2 3 , 4 2 4 - 4 2 7 (1 9 8 8)

【非特許文献 2 4】

ベレンシュタインら (B e r e n s h t e i n e t a l .) , J . M o l . C e l l . C a r d i o l . 2 9 , 3 0 2 5 - 3 0 3 4 (1 9 9 7)

【非特許文献 2 5】

ラムら (L a m b e t a l .) , F E B S L e t t . 3 3 8 , 1 2 2 - 1 2 6 (1 9 9 4)

30

【非特許文献 2 6】

スリニバスら (S r i n i v a s e t a l .) , S c a n d . J . C l i n . L a b . I n v e s t . 4 8 , 4 9 5 - 5 0 0 (1 9 8 8)

【非特許文献 2 7】

サスマンら (S u s s m a n e t a l .) , M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 6 , 7 1 1 - 7 2 3 (1 9 9 0)

【非特許文献 2 8】

ハリウエルら (H a l l i w e l l e t a l .) , M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 6 , 1 - 8 5 (1 9 9 0)

40

【非特許文献 2 9】

フェントンら (F e n t o n e t a l .) , T h r o m b . R e s . , 4 , 8 0 9 - 8 1 7 (1 9 7 4)

【非特許文献 3 0】

ミリナルツら (M l y n a r t z e t a l .) , S p e c i a t i o n 9 8 : A b s t r a c t s , 4 / 2 1 / 9 8 , <http://www.jate.uszeged.hu/spec98/abstr/mlynar.html>)

【非特許文献 3 1】

ラッピンら (L a p p i n e t a l .) , I n o r g . C h e m . , 1 7 , 1 6 3 0 - 3 4 (1 9 7 8)

50

【非特許文献 32】

ボスら (Bossu et al.), Inorg. Chem., 17, 1634 - 40 (1978)

【非特許文献 33】

チャクラバルティ (Chakrabarti), Protein Eng., 4, 57 - 63 (1990)

【非特許文献 34】

アドマン (Adman), Advances In Protein Chemistry, 42, 145 - 97 (1991)

【非特許文献 35】

コテレら (Cotelle et al.), J. Inorg. Biochem., 46, 7 - 15 (1992)

【非特許文献 36】

カンタースら (Canters et al.), FEBS, 325, 39 - 48 (1993)

【非特許文献 37】

レーガン (Regan et al.), Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 22, 257 - 281 (1993)

【非特許文献 38】

ウエダら (Ueda et al.), J. Inorg. Biochem., 55, 123 - 30 (1994)

【非特許文献 39】

ウエダら (Ueda et al.), Free Radical Biol. Med., 18, 929 - 33 (1995)

【非特許文献 40】

レーガン (Regan et al.), TIBS, 20, 280 - 85 (1995)

【非特許文献 41】

ウエダら (Ueda et al.), Chem. Pharm. Bull., 43, 359 - 61 (1995)

【非特許文献 42】

バルら (Bal et al.), Chem. Res. Toxicol., 10, 906 - 914 (1997)

【非特許文献 43】

バルら (Bal et al.), Chem. Res. Toxicol., 10, 915 - 21 (1997)

【非特許文献 44】

コッホら (Koch et al.), Chem. Biol., 4, 549 - 60 (1997)

【非特許文献 45】

コワリク - ジャンコウスカ (Kowalik - Jankowska et al.), J. Inorg. Biochem., 66, 193 - 96 (1997)

【非特許文献 46】

ハーフォードおよびサーカー (Harford and Sarkar), Acc. Chem. Res., 30, 123 - 130 (1997)

【非特許文献 47】

プリンスら (Prince et al.), TIBS, 23, 197 - 98 (1998)

【非特許文献 48】

アイケン (Aitken), Molec. Biotechnol., 12, 241 - 53 (1999)

10

20

30

40

50

【非特許文献49】

ウィットラルら (Whittall et al.), Protein Science, 9, 332-343 (2000)

【非特許文献50】

シュレンバーガーら (Shullenberger et al.), J. Am. Chem. Soc., 115, 11038-11039 (1993)

【非特許文献51】

ピッケリングら (Pickering et al.), J. Am. Chem. Soc., 115, 9498-9505 (1993)

【非特許文献52】

ウインゲら (Winge et al.), in Bioinorganic Chemistry Of Copper, pages 110-123 Karlin and Tyeklar, eds., Chapman & Hall), New York, NY, (1993)

【非特許文献53】

コッホら (Koch et al.), Chem & Biol., 4, 549-560 (1997)

【非特許文献54】

コビンら (Cobine et al.), in Copper Transport And Its Disorders, pages 153-264 (Leone and Mercer) eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers), New York, NY, (1999)

【非特許文献55】

ロウチ (Rouchi), Chem. & Eng. News, 49-50 (January 15, 2001)

【非特許文献56】

メリフィールド (Merrifield), in Chem. Polypeptides, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis, eds. 1973)

【非特許文献57】

メリフィールド (Merrifield), J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963)

【非特許文献58】

デビスら (Davis et al.), Biochem. Int'l, 10, 394-414 (1985)

【非特許文献59】

スチュアートおよびヤング (Stewart and Young), Solid Phase Peptide Synthesis (1969)

【非特許文献60】

フィンら (Finn et al.), in The Proteins, 3rd ed., vol. 2, pp. 105-253 (1976)

【非特許文献61】

エリクソンら (Erickson et al.), in The Proteins, 3rd ed., vol. 2, pp. 257-527 (1976)

【非特許文献62】

マニアティスら (Maniatis et al.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1986)

【非特許文献63】

サムブルックら (Sambrook et al.), Molecular Cloni 50

ng: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989)

【非特許文献64】

ラオおよびP.ウィリアムス(Rao & Williams), J. Chromatography A. 693, 633 (1995)

【非特許文献65】

ピーターズ(Peters), All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications (Academic Press, San Diego, 1996)

【非特許文献66】

サドラーら(Sadler et al.), Eur. J. Biochem. 220, 193 - 200 (1994)

【非特許文献67】

バルオルら(Bar-Or et al.), Eur. J. Biochem. 268, 42 - 47 (2001)

【非特許文献68】

バルオルら(Bar-Or et al.), Biochem. Biophys. Res. Commun. 284, 856 - 862 (2001)

【非特許文献69】

バルオルら(Bar-Or et al.), Biochem. Biophys. Res. Commun. 282, 356 - 360 (2001)

【非特許文献70】

フランシスら(Francis et al.), Am. J. Clin. Pathol. 87, 619 - 625 (1987)

【非特許文献71】

ウーら(Wu et al.), Biotechnol. Prog. 15, 928 - 931 (1999)

【非特許文献72】

ベレンシュタインら(Berenshtein et al.), J. Mol. Cell. Cardiol. 29, 3025 - 3034 (1997)

【非特許文献73】

ルオら(Ruot et al.), Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279, E244 - 251 (2000)

【非特許文献74】

ダウイドソンら(Dawidson et al.), Crit. Care Med. 18, 60 - 66 (1990)

【非特許文献75】

ラコウら(Rackow et al.), Crit. Care Med. 11, 839 - 850 (1983)

【非特許文献76】

オットソンら(Ottosson et al.), Crit. Care Med. 17, 772 - 779 (1989)

【非特許文献77】

モックら(Moch et al.), Shock 4, 425 - 432 (1995)

【非特許文献78】

ユングら(Jung et al.), J. Hepatol. 33, 387 - 394 (2000)

【非特許文献79】

アンガスら(Angus et al.), Crit. Care Med. 29, 1303 - 1310 (2001)

10

20

30

40

50

【非特許文献 80】

バーナードら (Bernard et al.), N. Engl. J. Med. 344, 699 - 709 (2001)

【非特許文献 81】

バーナードら (Bernard et al.), Crit. Care Med. 29, 2051 - 2059 (2001)

【非特許文献 82】

グルーバーら (Gruber et al.), Circulation 82, 578 - 585 (1990)

【非特許文献 83】

オカジマら (Okajima et al.), Thromb. Haemost. 63, 48 - 53 (1990)

【非特許文献 84】

ヤンら (Yan et al.), Crit. Care Med. 29, S69 - 74 (2001)

【非特許文献 85】

グリーンネルら (Grinnell et al.), Crit. Care Med. 29, S53 - 60; discussion S60 - 1 (2001)

【非特許文献 86】

シャンブリエら (Chambrier et al.), Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 10824 - 10829 (1999)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、活性化プロテイン C (APC) で治療可能な疾患および状態を治療する方法を改善することである。特に、本発明の目的は、銅による APC の不活性化を抑制するための銅キレート剤を用いる、APC により治療可能な疾患および状態を治療する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、活性化プロテイン C (APC) が銅により不活性化されるという予期せぬ発見に基づいている。したがって、本発明は、銅による APC の不活性化を抑制するために銅キレート剤を用いる、APC により治療可能な疾患および状態を治療する改善された方法を提供する。

【0008】

本発明の 1 つの方法は、APC による治療を必要とする動物に有効量の銅キレート剤を投与して、銅による APC の不活性化を抑制することからなる。有効量の、

(a) APC、

(b) プロテイン C、動物においてプロテイン C の合成を増加させる物質、またはこれら両方、

(c) プロテイン C の活性化剤、もしくは

(d) (a)、(b) および (c) のうち 1 つまたは複数の組合せ

のうち 1 つも該動物に投与する。プロテイン C、プロテイン C の合成を増加させる物質および / またはプロテイン C の活性化剤を動物に投与して、プロテイン C (内因的に産生されたプロテイン C および / または該動物に投与されたプロテイン C) からの APC の *in vivo* 産生を増加させる。

【0009】

本発明の第 2 の方法は、有効量の銅キレート剤を以下の

(a) APC、

(b) プロテイン C、動物におけるプロテイン C の合成を増加させる物質、またはこれら

10

20

30

40

50

両方、

(c) プロテイン C の活性化剤、もしくは

(d) (a)、(b) および (c) の 1 つまたは複数の組合せ

のうちの 1 つを含む組成物と接触させて、該組成物中に存在する銅に結合させるようにする方法からなる。次いで、有効量の APC、プロテイン C、プロテイン C の合成を増加させる物質、プロテイン C の活性化剤、もしくはそれらの 1 つまたは複数の組合せを APC による治療を必要とする動物に投与する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

活性化プロテイン C (APC) は、以下の疾患および状態の治療に有効であると報告されている。 10

(a) 敗血症、敗血症性ショック、電撃性紫斑病、髄膜炎菌性敗血症、骨髄もしくはその他の移植、重症熱傷、妊娠、大手術、重症外傷または成人呼吸促迫症候群 (ARDS) に伴う後天性の凝固性亢進状態または後天性プロテイン C 欠乏症 (例えば、特許文献 1 および特許文献 2 ならびに特許文献 3 参照)。

【0011】

(b) 深部静脈血栓症、肺塞栓症、末梢動脈血栓症、心臓もしくは末梢動脈を起源とする塞栓、急性心筋梗塞、血栓性卒中および播種性血管内凝固 (DIC) のような血管内凝固に関係する疾患または状態 (例えば、特許文献 4 参照)。

【0012】

20

(c) 転移性癌および浸潤癌 (例えば、特許文献 4 参照)。

(d) アルツハイマー病、パーキンソン病、自己免疫疾患、ウイルス感染、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、血管炎、虚血性腎不全、インスリン依存性糖尿病、膵炎、乾癬、多発性硬化症、橋本甲状腺炎、グレーブズ病、全身性エリテマトーデス、自己免疫性胃炎、線維化肺疾患、HIV 誘発性リンパ腫、劇症 B 型ウイルス肝炎、劇症 C 型ウイルス肝炎、慢性肝炎、慢性肝硬変、ヘリコバクター・ピロリ関連潰瘍、アテローム動脈硬化症、癌治療時の細胞保護、慢性糸球体腎炎、骨粗しょう症、再生不良性貧血および骨髄異形成などのようなアポトーシスに関連する疾患または状態 (例えば、特許文献 5 参照)。

【0013】

(e) ニューロン変性疾患、移植片対宿主反応、急性炎症の状態、全身性炎症性反応、急性期反応、虚血性再灌流傷害、アテローム動脈硬化症、HIV 感染および癌のような核因子 B (NF- κ B) により誘発される疾患または状態 (例えば、特許文献 5 参照)。 30

【0014】

(f) クローン病、潰瘍性大腸炎、関節炎、急性腹膜炎、心不全等の、TNF- α が病理状態の主たるモジュレーターとなる疾患または状態。

(g) 臓器移植、感染性疾患および自己免疫疾患などの、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I または HLA-B 無発現 (null) 対立遺伝子が免疫機能のモジュレーターである疾患または状態 (例えば、特許文献 5 参照)。

【0015】

(h) 増殖性細胞核抗原 (PCNA) または G₂ タンパク質が細胞増殖および生存のレギュレーターである、内皮細胞の細胞増殖および血管新生のような疾患または状態 (例えば、特許文献 5 参照)。 40

【0016】

(i) 冠動脈アテローム硬化症、バルーン血管形成術後の動脈の再狭窄、高血圧症、心不全、移植後の冠動脈疾患ならびに妊娠誘発の高血圧症および子癇前症のような、内皮細胞活性化および血小板接着に起因した疾患または状態 (例えば、特許文献 5 参照)。

【0017】

(j) 細胞-細胞接着が病態生理のモジュレーターである疾患または状態 (例えば、特許文献 5 参照)。

(k) 虚血、虚血再灌流、アルツハイマー病、ハンチントン病または舞蹈病、低酸素症、 50

てんかんに起因する細胞死、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、精神遅滞、加齢に起因する神経変性性変化、炎症性腸疾患（例えば、クローン病および潰瘍性腸炎）、ショック、糸球体腎炎、冠動脈閉塞、不整脈、うっ血性心不全、心筋症、気管支炎、急性アレルギー反応および過敏症、外傷、移植片/移植拒絶反応、心筋炎、インスリン依存性糖尿病、関節炎、皮膚の慢性炎症性状態およびARDSのような、炎症および神経病理学的障害を伴う疾患または状態（例えば、特許文献5および特許文献6参照）。

【0018】

(1) 抗カルレティキュリン抗体が病態生理のモジュレーターである、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、糸状虫症、慢性関節リウマチ、混合性結合組織病および先天性完全心ブロックのような疾患または状態（例えば、特許文献5参照）。

10

【0019】

(m) 乳癌、胃腸悪性腫瘍、女性に特有な癌、肺癌、腎繊維症および心筋梗塞後の心臓肥大のような、トロノスポンジン(TSP-1)およびTGF- β のレベルの上昇に関連する疾患または状態（例えば、特許文献5参照）。

【0020】

(n) 細菌感染、真菌感染、原虫感染およびウイルス感染、疼痛、癌、食欲不振、多食症、喘息、パーキンソン病、急性心不全、低血圧症、高血圧症、尿閉、骨粗鬆症、狭心症、潰瘍、アレルギー、良性前立腺肥大ならびに精神障害および神経障害（例えば、不安、精神分裂病、躁うつ病、せん妄、痴呆、重度精神遅滞、およびハンチントン病、ジルドラトゥーレット症候群等の運動障害）のような、RDC1のレベルの上昇に関連する疾患または状態（例えば、特許文献5参照）。

20

【0021】

APCを調製する方法、APCを含む適切な薬剤組成物、ならびに上記の疾患および状態に対するAPCの有効用量および投与計画は、周知である。例えば、これらすべての完全な開示を本願明細書に援用する、特許文献7、特許文献2、特許文献8、特許文献9、特許文献10、特許文献11、特許文献12、特許文献4、特許文献13、特許文献14、特許文献15、特許文献3、特許文献16、特許文献17、特許文献5および特許文献18を参照のこと。

【0022】

特に、APCは、当技術分野でよく知られている方法により、血漿から精製したプロテインCまたは組換えDNA技術により調製したプロテインCの*in vitro*活性化により調製することができる。例えば、特許文献13、特許文献4、特許文献11、特許文献10、特許文献2および特許文献7を参照のこと。あるいは、APCは組換えDNA技術により直接調製することができる。例えば、特許文献13、特許文献4、特許文献10、特許文献2および特許文献7を参照のこと。APCは、任意の種の動物由来であってよいが、ヒトAPCが好ましい。APCの断片および誘導体も、本明細書に記載する活性を示すならば、本発明の実施に用いることが可能である。例えば、特許文献4、特許文献19、特許文献20、特許文献14、特許文献16、特許文献17および特許文献5を参照のこと。

30

【0023】

APCの適切な薬剤組成物は、APCと製薬上許容できる担体とからなる。例えば、特許文献7、特許文献9、特許文献15、特許文献16および特許文献5を参照のこと。好ましい組成物は、充てん剤（ショ糖、マンニトール、トレハロースおよびラフィノースなど）、塩（塩化ナトリウムおよび塩化カリウムなど）、緩衝液（クエン酸ナトリウム、トリス酢酸およびリン酸ナトリウムなど）およびAPCからなる高純度の安定な凍結乾燥製品である。好ましい安定な凍結乾燥組成物は、重量比で約1部のAPC、約7~8部の塩および約5~7部の充てん剤からなる。そのような安定な凍結乾燥組成物の例は、バイアル当たり5.0mg APC、30mg ショ糖、38mg NaClおよび7.56mg クエン酸、pH 6.0である。

40

【0024】

50

A P C は、好ましくは非経口的（好ましくは、静脈内）に、最も好ましくは静脈内持続注入により投与する。例えば、特許文献 2 および特許文献 5 を参照のこと。好ましくは約 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ ~ 約 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ の A P C、より好ましくは約 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ ~ 約 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ 、さらに好ましくは約 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ ~ 約 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ 、最も好ましくは約 24 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ をヒト患者に約 1 時間 ~ 約 240 時間かけて、より好ましくは約 1 時間 ~ 約 144 時間かけて、最も好ましくは約 24 時間 ~ 96 時間かけて持続注入することにより投与する。A P C は、約 0.01 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ~ 約 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ の用量を 1 ~ 10 日間、より好ましくは 3 日間にわたり B. I. D.（1 日 2 回）注射して投与することもできる。他の別法として、A P C を 1 時間当たりの適切な用量の 1 部（1/3 ~ 1/2）をボーラス注射として約 5 分間 ~ 約 120 分間かけて注射した後、適切な用量を最長 240 時間にわたり持続注入することにより投与する。投与した量の A P C から得られる好ましい血漿中濃度は、約 0.02 ng/ml ~ 約 500 ng/ml 、より好ましくは約 2 ng/ml ~ 約 200 ng/ml 、最も好ましくは約 35 ng/ml ~ 約 65 ng/ml であろう。

10

【0025】

他の別法において、A P C は、高リスク血管形成術（ステント留置術を伴う場合と伴わない場合があり、抗血小板薬を用いる、もしくは用いない併用抗血栓療法を伴う場合と伴わない場合がある）の補助剤として冠動脈内カテーテルを介しての局所送達により投与することが可能である。投与する A P C の量は、持続注入、ボーラス注射またはそれらの組合せにより約 0.01 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ~ 約 10.0 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ であろう。他の別法において、A P C を関節に直接注射することが可能である。さらに他の別法において、A P C は、血流へのより緩やかな放出を確実にするために 0.01 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ~ 約 10.0 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で皮下投与することが可能である。皮下製剤の調合は、そのような薬剤組成物を調製する既知の方法を用いて行う。

20

【0026】

A P C の特に好ましい製剤は、イーライ・リリー社（Eli Lilly and Co.）[インディアナ州インディアナポリス所在]により Xigris という登録商標のもとに販売されている製品である。Xigris（登録商標）は、静脈内注入用の無菌の凍結乾燥粉末として供給されている。Xigris（登録商標）の 5 mg バイアルは、5.3 $\text{mg}/\text{バイアル}$ のヒト型組換え A P C、31.8 $\text{mg}/\text{バイアル}$ のショ糖、40.3 $\text{mg}/\text{バイアル}$ の NaCl および 10.9 $\text{mg}/\text{バイアル}$ のクエン酸ナトリウムを含み、Xigris（登録商標）の 20 mg バイアルは、20.8 $\text{mg}/\text{バイアル}$ のヒト型組換え A P C、124.9 $\text{mg}/\text{バイアル}$ のショ糖、158.1 $\text{mg}/\text{バイアル}$ の NaCl および 42.9 $\text{mg}/\text{バイアル}$ のクエン酸ナトリウムを含む。バイアルを USP の注射用滅菌水で再構成して、約 2 mg/ml の A P C 濃度とし、この希釈した A P C を 0.9% 塩化ナトリウム注射液に加えて、患者への投与用の濃度約 100 ~ 約 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の A P C とする。重症敗血症においては、Xigris（登録商標）を約 12 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ ~ 約 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時}$ の速度で持続注入して、注入開始約 2 時間後に約 45 ng/ml A P C の定常状態の血漿中濃度を得る。

30

【0027】

上記の疾患および状態は、A P C の内因性産生を増加させることによって治療することが可能である。例えば、特許文献 21 を参照のこと。これは、種々の方法で達成することが可能である。例えば、これは、A P C を生産する内因性プロテイン C 経路により生体内（in vivo）で活性化されるであろう有効な量のプロテイン C を投与することにより達成することが可能である。例えば、特許文献 4 および特許文献 21 を参照のこと。上記のように、プロテイン C は、血漿から精製することが可能であり、あるいは、組換え DNA 技術により作製することが可能である。例えば、特許文献 22、特許文献 13、特許文献 23、特許文献 4、特許文献 24、特許文献 10、特許文献 2 および特許文献 7 を参照のこと。プロテイン C を含む適切な薬剤組成物は周知である（例えば、特許文献 4 および特許文献 24 を参照）。プロテイン C を、ヒト患者に対して、好ましくは非経口的に、

40

50

より好ましくは静脈内に、約 $1 \mu\text{g} / \text{日}$ ~ 約 $500 \text{mg} / \text{日}$ または約 $1 \text{IU} / \text{kg} / \text{日}$ ~ 約 $6000 \text{IU} / \text{kg} / \text{日}$ の用量で投与する。例えば、特許文献 4 および特許文献 24 を参照のこと。1 IU は、正常血漿 1 ml 中の APC アミド分解活性の当該量である。

【0028】

APC の内因性産生は、動物におけるプロテイン C の合成を増加させる量の薬剤を投与することによっても増加させることが可能である。例えば、特許文献 21 を参照のこと。適切な薬剤は、タンパク質同化性ステロイド（例えば、ダナゾロール）などである。例えば、特許文献 21 を参照のこと。

【0029】

さらに、APC の内因性産生は、内因的に合成されたプロテイン C からの、かつ / または、併用投与したプロテイン C からの *in vivo* での APC の産生を引き起こすのに有効な量のプロテイン C 活性化剤を投与することによっても増加させることができる。例えば、特許文献 21 を参照のこと。プロテイン C 活性化剤は、APC の生成を引き起こす、または増加させる任意の化合物である。適切なプロテイン C 活性化剤としては、トロンビン、 α -トロンビン、活性部位アシル化トロンビン、トロンビン類似体および突然変異体（例えば、トロンビン E192Q およびトロンビン K52E）、可溶性トロンビン-トロンボモジュリン複合体、トロンビン-トロンボモジュリン複合体のクリアランスまたは崩壊を防ぐと思われる薬剤、トロンボモジュリンの合成を増大させるかクリアランスを遅延させる薬剤、毒（Protac（商標）またはラッセルマムシ毒）、第 Xa 因子、プラスミン、トリプシン、ならびにプロテイン C からの APC の生成を引き起こす、または増加させることができる他のあらゆる毒、酵素または化合物が挙げられる。例えば、特許文献 21 を参照のこと。好ましいプロテイン C 活性化剤は、トロンビンおよび活性部位アシル化トロンビンである。プロテイン C 活性化剤を、好ましくは非経口的に、より好ましくは静脈内投与する。例えば、特許文献 21 を参照のこと。APC の血中濃度を正常レベルの 3 ~ 5 倍増加させ、かつ / または、APC の血中濃度が約 $10 \text{ng} / \text{ml}$ ~ 約 $760 \text{ng} / \text{ml}$ となる量のプロテイン C 活性化剤を投与することが好ましい。特許文献 21 を参照のこと。トロンビンについては、約 $0.05 \text{U} / \text{kg} / \text{分}$ ~ 約 $2 \text{U} / \text{kg} / \text{分}$ の用量がこれらの APC レベルを達成するのに有効である。特許文献 21 を参照のこと。活性部位アシル化トロンビンについては、活性部位が *in vivo* で脱アシル化されるとき、約 $0.05 \text{U} / \text{kg} / \text{分}$ ~ 約 $2 \text{U} / \text{kg} / \text{分}$ のトロンビン活性を（本質的に「放出制御」的に）もたらす用量を用いる。特許文献 21 を参照のこと。1 単位（U）のトロンビンとは、当技術分野で一般的に知られており、同じアッセイを用いた場合の 1 NIH 単位の対照標準酵素と同等のフィブリノーゲン血液凝固活性を意味する。特許文献 21 および本願明細書に引用する参考文献である非特許文献 29 を参照のこと。

【0030】

前述のことにもかかわらず、APC、プロテイン C、プロテイン C の合成を増加させる薬剤および / またはプロテイン C 活性化剤の投与量は、用いる特定の化合物または化合物の組合せ、治療する疾患または状態、疾患または状態の重症度、投与経路、化合物の排泄速度、治療期間、該動物に投与する他の薬剤の同一性、該動物の年齢、大きさおよび種、ならびに医療および獣医学の技術分野で知られているような因子によって異なることは、当業者には当然のことである。一般的に、化合物または化合物の組合せの適切な 1 日投与量は、治療効果をもたらすのに有効な最低投与量である。投与量、投与形態および投与法は、担当の医師または獣医師が適切な医療上の判断の範囲内で決定するものとする。種々の化合物または化合物の組合せの有効な投与量、投与形態および投与法は、実験的に決定することが可能であり、そのような決定を行うことは、当技術分野の技術の範囲内にある。

【0031】

本発明は、APC により治療可能な疾患または状態を治療する改善された方法を提供する。本発明は、活性化プロテイン C（APC）が銅により不活性化されるという予期せぬ発見に基づいており、本発明の改善された方法は、銅による APC の不活性化を抑制するために銅キレート剤を用いている。本明細書で用いているように、「抑制する」およびその

10

20

30

40

50

変形は、銅によるAPCの不活性化を低減または予防すること、かつ/または銅により不活性化されたAPCの活性を完全または部分的に再活性化または回復させることを意味する。本明細書で用いているように、「不活性化する」およびその変形は、APCの活性を低下または完全に失わせることを意味する。

【0032】

あらゆる銅キレート剤を本発明の実施に用いることができる。本明細書で用いているように、「銅キレート剤」は、Cu(II)イオンに結合するあらゆる化合物を意味する。本発明の実施に用いられる好ましい銅キレート剤は、親和性の高いN末端銅結合性部位を有する特定のアルブミン類および該N末端銅結合性部位を含むこれらのアルブミン類の断片などである。これらのアルブミン類は、ヒト、ラットおよびウシの血清アルブミンなどである。特に好ましいものは、高親和性のN末端銅結合性配列Asp Ala Hisを含むヒト血清アルブミンまたはその断片である。血漿/血清から、および組換えDNA技術により、アルブミンまたはアルブミンの断片を調製する方法は、当技術分野でよく知られている。例えば、特許文献25、特許文献26、特許文献27、特許文献28、特許文献29、特許文献30、特許文献31、特許文献32、特許文献33、特許文献34、特許文献35、特許文献36、特許文献37、特許文献38、特許文献39、特許文献40、特許文献41、特許文献42、特許文献43、特許文献44、特許文献45、特許文献46、特許文献47、特許文献48および特許文献49を参照のこと。

10

【0033】

本発明の実施に用いられる他の好ましい銅キレート剤は、次式

20

$$P_1 - P_2$$

[式中、

P_1 は、

Xaa_1 Xaa_2 Hisまたは

Xaa_1 Xaa_2 His Xaa_3 であり、

P_2 は $(Xaa_4)_n$ であり、

Xaa_1 はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、イソグルタミン酸、グルタミン、リシン(lysine)、ヒドロキシリシン(hydroxylysine)、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、

30

Xaa_2 はグリシン、アラニン、 - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リシン(lysine)、ヒドロキシリシン(hydroxylysine)、ヒスチジン、アルギニン、オルニチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニンまたは - ヒドロキシメチルセリンであり、

Xaa_3 はグリシン、アラニン、バリン、リシン(lysine)、アルギニン、オルニチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはトリプトファンであり、

Xaa_4 は任意のアミノ酸であり、

40

n は0~100である]を有するペプチドまたは生理学的に許容できるその塩である。

【0034】

P_1 は、元素の周期表の1b~7bまたは8族の遷移金属イオン(V、Co、Cr、Mo、Mn、Ba、Zn、Hg、Cd、Au、Ag、Co、Fe、NiおよびCuを含む)ならびに他の金属イオン(As、SbおよびPbを含む)に結合する金属結合性ペプチド配列である。特に、 P_1 は、Cu(II)、Ni(II)、Co(II)およびMn(II)に高い親和力で結合するので、銅によるAPCの不活性化を抑制するための特に有効な銅キレート剤である。さらに、 P_1 による金属イオンの結合が、これらの金属イオンにより引き起こされる活性酸素種(ROS)の産生および/またはROSの蓄積を抑制(すなわち、低減または予防)し、かつ/または該結合金属イオンにより依然として産生される

50

可能性のあるROSによりなされるペプチド自体に対する損傷を標的にすることは、周知である。その結果、 P_1 への金属イオンの結合が存在しない場合にROSにより引き起こされ得る損傷が低減する。したがって、これらのペプチドは、ROSの産生および/または蓄積にも関係するAPCで治療可能な疾患および状態の治療においてさらなる利点を提供する。そのような疾患および状態としては、血管形成術、ARDS、血管形成性疾患、アテローム動脈硬化症、関節炎、喘息、自己免疫疾患、癌、大腸炎、クローン病、糖尿病、気腫、頭部損傷および外傷性脳損傷、感染性疾患、炎症および炎症性疾患、転移、虚血、腫瘍性疾患、神経疾患、神経外傷、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、多発性硬化症および老年痴呆）、肺炎、末梢性血管疾患、肺塞栓症、腎疾患、再灌流、敗血症、ショック、手術、移植、外傷、血管炎およびその他多くのものがある（例えば、特許文献50、特許文献51、特許文献52、特許文献53および特許文献54参照、これらの完全な開示を本明細書に援用する）。

10

【0035】

P_1 において、 Xaa_1 はAspであることが最も好ましく、 Xaa_2 はAlaであることが最も好ましく、 Xaa_3 はLysであることが最も好ましい（上を参照）。したがって、 P_1 の好ましい配列は、Asp Ala HisおよびAsp Ala His Lys（配列番号1）である。最も好ましくは、 P_1 の配列はAsp Ala His Lys（配列番号1）である。Asp Ala Hisは、Cu(II)およびNi(II)を高い親和性で結合するのに必要なヒト血清アルブミンのN末端金属結合性部位の最小配列であり、Lysは、この部位へのこれらの金属イオンの結合に寄与していると報告されている。同様に、Asp Ala His Lys（配列番号1）は、Fe(II)に結合し、血液脳関門のモデルを通過することが質量分析により見出されている。 P_1 の他の好ましい配列としては、Thr Leu His（ヒト-フェトプロテインのN末端配列）、Arg Thr His（ヒト精子プロタミンHP2のN末端配列）およびHMS HMS His（銅との極めて安定な錯体を形成すると報告された合成ペプチド；非特許文献30を参照）などがある。

20

【0036】

P_2 は $(Xaa_4)_n$ であり、式中 Xaa_4 は任意のアミノ酸で、 n は0~100である。 n が大きい場合（ $n > 約20$ ）、該ペプチドは細胞外で有効であろう。小さいペプチドほど細胞に入る能力が高く、したがって、小さいペプチドほど細胞内および細胞外のいずれにおいても有効であり得る。小さいペプチドほど、タンパク質分解も受けにくい。したがって、 P_2 においては、 n は好ましくは0~10であり、より好ましくは n は0~5であり、最も好ましくは n が0である。 P_2 はなんらかの配列を有してよく、 P_2 は、（1）遷移金属に結合する、（2）細胞膜を透過し、かつ/または標的組織に到達するペプチドの能力（例えば、血液脳関門を通過する能力）を増大させる、または（3）別の方法でペプチドの能力を安定化または増大させる、配列からなることが好ましい。 P_2 は P_1 とともに、ヒト、ラットまたはウシの血清アルブミンのような、銅およびニッケルに対して高い親和力を有するN末端金属結合性部位を有するタンパク質のN末端配列であってもよい。 $n = 100$ である場合、該ペプチドは、上記アルブミンのおおよそドメイン1の配列を有するであろう。

30

40

【0037】

遷移金属イオンの結合性部位を含む多くのペプチドの配列が知られている。例えば、特許文献55~86および特許文献88、非特許文献31、非特許文献32、非特許文献33、非特許文献34、非特許文献36、非特許文献37、非特許文献38、非特許文献39、非特許文献40、非特許文献41、非特許文献42、非特許文献43、非特許文献44、非特許文献45、非特許文献46、非特許文献47、非特許文献30および非特許文献48、非特許文献49を参照のこと。 P_2 は、1つまたは複数の、これらのペプチドの金属結合性部位の配列を含んでいてよい。

【0038】

50

$P_1 - P_2$ が銅によるAPCの不活性化を抑制し、かつ/またはROSの形成および/または蓄積を抑制する能力がより十分発揮されるように、 P_2 は銅結合性部位および/または鉄結合性部位の配列を含むことが好ましい。銅結合性部位を含む多くのペプチドの配列は周知である。例えば、特許文献55～88、非特許文献31～34、非特許文献36～47、非特許文献30および非特許文献48、非特許文献49を参照のこと。鉄結合性部位を含むペプチドの配列は周知である。例えば、特許文献55、特許文献56、特許文献64、特許文献66、特許文献73、特許文献75、特許文献77、特許文献78、特許文献79、特許文献81、特許文献82、特許文献85、特許文献86、特許文献87および特許文献88、非特許文献31、非特許文献33、非特許文献34、非特許文献47および非特許文献48、非特許文献49を参照のこと

10

P_2 が金属結合性部位を含む場合、 P_1 と P_2 の各金属結合性部位が協同して金属イオンを結合することが可能であるように(1:1の錯体よりも強固な結合をもたらす2:1のペプチド-金属錯体と同様)、 P_2 が、 P_2 の金属結合性部位と P_1 との間に短いスペーサー配列を含む配列を有することが好ましい。スペーサー配列は、1～5個、好ましくは1～3個の中性アミノ酸で構成されることが好ましい。したがって、スペーサー配列はGly、Gly Gly、Gly Ala Gly、Pro、Gly Pro Gly等であってよい。

【0039】

P_2 が金属結合性部位を含む場合、 P_1 と P_2 の各金属結合性部位が協同して金属イオンを結合することが可能であるように(1:1の錯体よりも強固な結合をもたらす2:1のペプチド-金属錯体と同様)、 P_2 が、 P_2 の金属結合性部位と P_1 との間に短いスペーサー配列を含む配列を有することが好ましい。スペーサー配列は、1～5個、好ましくは1～3個の中性アミノ酸で構成されることが好ましい。したがって、スペーサー配列はGly、Gly Gly、Gly Ala Gly、Pro、Gly Pro Gly等であってよい。

20

【0040】

特に、 P_2 が金属結合性部位を含む場合、 P_2 は次の配列のうちの1つを含むことが好ましい。すなわち、(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His Xaa_3 または(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 Hisである。 Xaa_2 、 Xaa_3 および Xaa_4 は上で定義されており、mは0～5、好ましくは1～3である。 P_2 がこれらの配列の1つを含むとき、銅に結合し得る。 Xaa_4 アミノ酸は、存在する場合、 P_1 および P_2 の各金属結合性部位が協同して銅および他の金属に結合することができるよう、 P_2 の金属結合性部位と P_1 との間に短いスペーサー配列を形成しており、かつ Xaa_4 は中性アミノ酸であることが好ましい(前段落参照)。 Xaa_5 は、-アミノ基を含むアミノ酸(好ましくはOrnまたはLys、より好ましくはOrn)であり、 Xaa_4 アミノ酸(存在する場合)または P_1 を -アミノ基によって結合させている。非特許文献46および非特許文献50を参照のこと(この結合の手段の結果として、 Xaa_5 の -アミノ基がATCUNモチーフによる銅およびニッケルとの結合に依然として関与することが可能である)。したがって、例えば、 $P_1 - P_2$ は、Asp Ala His Gly Gly () - Orn Ala His [配列番号2]であってよい。

30

40

【0041】

さらに、 P_2 は、以下の配列のうちの1つを含んでいてよい。すなわち[(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His Xaa_3]_r、[(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His]_r、[(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His Xaa_3 (Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His]_r および[(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His (Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His Xaa_3]_r であり、該配列中、 Xaa_2 、 Xaa_3 、 Xaa_4 、 Xaa_5 および m は上で定義され記載されており、rは2～100である。このようにして、銅に結合することが可能な金属結合性ポリマーを形成することができる。

【0042】

50

他の好ましい実施形態において、 P_2 は $Cu(I)$ に結合し得るペプチド配列を含む。 $Cu(I)$ はアスコルビン酸または他の還元剤の存在下で $Cu(I)$ に変換され、 $Cu(I)$ は酸素と反応して ROS を生成する。 P_1 は、 $Cu(I)$ に強固に結合することが可能であり（上を参照）、銅をキレートし、 ROS の生成を抑制することに関してそれ自体非常に有効である。しかし、 $Cu(I)$ に結合し得る P_2 を用いることも望ましいと思われる。

【0043】

$Cu(I)$ に結合し得るペプチド配列は、当技術分野で知られている。例えば、非特許文献51、非特許文献52、非特許文献53、非特許文献54を参照のこと。これらの配列としては、

Met Xaa₄ Met、
 Met Xaa₄ Xaa₄ Met、
 Cys Cys、
 Cys Xaa₄ Cys、
 Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys、
 Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys、
 Gly Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [配列番号3]
 Gly Met Thr Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [配列番号4] および
 Gly Met Thr Cys Ala Asn Cys [配列番号5] があり、
 該配列中、Xaa₄ は上で定義されている。グルタチオン (- Glu Cys Gly) も $Cu(I)$ に結合することが知られている。他の $Cu(I)$ 結合性ペプチド配列は、例えば、特許文献87に記載されているような金属ペプチド・コンビナトリアル・ライブラリーを用いて同定することが可能である。 $Cu(I)$ 結合性ペプチドは、配列 Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys (例えば、Gly Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [配列番号3]、より好ましくは Gly Met Thr Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [配列番号4]、最も好ましくは Gly Met Thr Cys Ala Asn Cys [配列番号5]) を含むことが好ましい。

【0044】

細胞膜を透過し、かつ/または標的組織に到達する $P_1 - P_2$ ペプチドの能力を増大させるために、 P_2 は疎水性であるか、またはアルギニンオリゴマーであることが好ましい（非特許文献55参照）。 P_2 が疎水性である場合、1～3個の疎水性アミノ酸（例えば、Gly Gly）、好ましくは、D-アミノ酸を含むことが好ましい。血液脳関門を通過しなければならない $P_1 - P_2$ の使用においては、疎水性 P_2 が特に望ましいかもしれない。アルギニンオリゴマーは、好ましくは6～9個のArg残基、最も好ましくは6～9個のD-Arg残基を含む（非特許文献55参照）。 $P_1 - P_2$ を局所または経皮投与すべきである場合、アルギニンオリゴマーの P_2 の使用が特に望ましいと言える。

【0045】

該ペプチドのアミノ酸は、L-アミノ酸、D-アミノ酸またはそれらの組合せであってよい。 - Ala（存在する場合）を除き、 P_1 のアミノ酸の少なくとも1つはD-アミノ酸（好ましくは、Xaa₁ および/またはHis）であることが好ましい。 - Ala（存在する場合）以外の P_1 のアミノ酸のすべてがD-アミノ酸であることが最も好ましい。同様に、 P_2 のアミノ酸の約50%がD-アミノ酸であることが好ましく、最も好ましくは P_2 のアミノ酸のすべてがD-アミノ酸である。D-アミノ酸が好ましい理由は、D-アミノ酸を含むペプチドが、動物（ヒトを含む）への投与時に遭遇するようなタンパク質分解酵素に対して抵抗性であるためである。また、D-アミノ酸を使用しても、銅に高い親和力で結合するペプチドの能力をはじめ、金属イオンに結合するペプチドの能力は変化しないであろう。

【0046】

本発明のペプチドは、当技術分野でよく知られている方法により調製することができる。例えば、ペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸またはL-およびD-アミノ酸の組合

10

20

30

40

50

せを含むかどうかを問わず、標準的固相ペプチド合成法により合成することができる。適切な技術は、当技術分野でよく知られており、非特許文献56、非特許文献57、非特許文献58、非特許文献59、特許文献90および特許文献91、非特許文献60および非特許文献61に記載されているものなどがある。また、特許文献92（HMSを含むペプチドの合成）および非特許文献50（ α -Ornを含むペプチドの合成）を参照のこと。あるいは、ペプチドは、L-アミノ酸のみを含む場合には、組換えDNA技術により合成することができる。組換えDNA法ならびにそれに用いられる適切な宿主細胞、ベクターおよび他の試薬は、当技術分野でよく知られている。例えば、非特許文献62、非特許文献63を参照のこと。

【0047】

本発明はさらに、タンパク質分解酵素に対してより抵抗性が大きく、より脂溶性が高く（ペプチドが細胞膜をより容易に透過し、かつ/または脳のような標的器官に到達することを可能にする）、または両方の特性を有する、L-アミノ酸、D-アミノ酸またはL-およびD-アミノ酸の組合せのいずれかからなるペプチド P_1 - P_2 の誘導体を含む。図1Aに示すように、 P_1 を、 P_1 の金属結合機能を変化させることなく、矢印で示した領域において修飾することが可能である。特に、 P_1 を炭素1または2において R_1 で置換することが可能であり、 P_1 の末端-COOHを保護基 R_2 で置換することが可能である（図1B~D）。 P_2 のタンパク質分解酵素に対する抵抗性をより大きくし、脂溶性をより高くし、あるいは両方の特性をもたせるために、 P_1 について述べたのと同様な方法で P_2 を修飾することが可能である。

【0048】

R_1 は、1~16個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖アルキルであってよく、「アルキル」という用語はRおよびS異性体を含む。 R_1 はまた、1または2個の環を含むアリールまたはヘテロアリールであってよい。「アリール」という用語は、少なくとも1つの芳香環（例えば、フェニル、ナフチルおよびジフェニル）を含む化合物を意味する。「ヘテロアリール」という用語は、少なくとも1つの環が1つまたは複数のS、NまたはO原子を含むアリールを意味する。これらの置換は、金属イオンに結合する P_1 の能力を実質的に低下させない。特に、高親和力で銅に結合する P_1 の能力は、これらの置換により低下しない。例えば、炭素2に結合しているn-ブチル（図1C、 R_1 はn-ブチル）のようないくつかの置換基は、該アルキル基の誘起効果のため、銅のような金属イオンに対するペプチドの親和力を増加させるはずである。炭素2（図1C）のアリール、ヘテロアリールまたは長鎖アルキル（炭素原子が約6~16個）による置換は、脂質膜を通過するペプチドの輸送を増加させるはずである。

【0049】

上記のように、固相合成によりペプチドを合成する方法もよく知られている。これらの方法は、図1B~Cに示す誘導体を調製するために修正することができる。例えば、 R_1 がオクチルである、図1Cに示す P_1 の誘導体は、図2Aに示すように調製することが可能である。図2Aにおいて、楕円形エレメントはポリマー樹脂を表し、 R_p は標準的なカルボキシル保護基である。図2Aに示すように、オクタン酸（新たに蒸留した）を乾燥臭素で、続いて三塩化リンで処理する。混合物を約100℃に加熱し、その温度に4時間維持する。蒸留により、 α -ブromoオクタン酸が無色液体として得られる。ブromo酸のアミノ化は、この酸とアンモニア溶液を40~50℃で30時間放置することにより達成される。アミノ酸のオクチル誘導体は、臭化アンモニウムをメタノール洗浄により除去することにより得られる。古典的光学分割法により、所望の光学的に純粋なD形が得られる。 R_1 がアルキル、アリールまたはヘテロアリールである他の誘導体は、図2Aに示す方法で調製することが可能である。

【0050】

さらに、 R_1 がフェニルである、図1Bに示す P_1 の誘導体は、図2Bに示すように調製することが可能である。図2Bにおいて、ポリマーは樹脂であり、t-Buはt-ブチルであり、Bzはベンジルである。 R_1 がアルキル、アリールまたはヘテロアリールである

10

20

30

40

50

他の誘導体は、図 2 B に示す方法で調製することが可能である。

【0051】

R_2 は、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-N(R_1)_2$ 、 $-OR_1$ または R_1 であってよく（図 1 D を参照）、 R_1 は上で定義されている。これらの誘導体は、当技術分野でよく知られている方法によりペプチドを樹脂から除去する前に、固相ペプチド合成の最後の段階として調製することが可能である。 R_2 による置換は、金属イオンに結合する P_1 の能力を実質的に低下させない。

【0052】

さらに、 P_1 および P_2 を、金属イオンに結合する非ペプチド官能基で置換することが可能である。これらの金属結合性官能基は、ペプチドの 1 つまたは複数のペンダント基に結合させることが可能であり、得られるペプチド誘導体は、 P_1 により与えられる結合性部位、および場合により P_2 により与えられる結合性部位に加えて、金属イオンに結合することができる 1 つまたは複数の部位を有するであろう。その結果、当該ペプチド誘導体の金属イオンに結合する能力は、対応する未修飾ペプチドと比べて改善される。例えば、ペプチド誘導体は 1 つではなく 2 つの同じ種類の金属イオン（例えば、2 つの $Cu(II)$ ）に結合することが可能であるし、ペプチド誘導体は 1 種ではなく 2 種の金属イオン（例えば、1 種は $Cu(II)$ で、1 種は $Fe(III)$ ）に結合することが可能であるし、またはペプチド誘導体は対応する未修飾ペプチドよりも良い状態で（例えば、より大きい親和力で）1 つの金属イオンに結合することが可能である。

【0053】

金属結合性官能基としては、銅に結合し得るポリアミン類（例えば、ジアミン類、トリアミン類等）が挙げられる。適切なジアミン類は、1, 2 - アルキルジアミン類、好ましくは、アルキルが 2 ~ 10 個の炭素原子を含むアルキルジアミン類（例えば、 $H_2N-(CH_2)_n-NH_2$ 、 $n = 2 \sim 10$ ）などである。適切なジアミン類としては、1, 2 - アリールジアミン類、好ましくは、ベンゼンジアミン類（例えば、1, 2 - ジアミノベンゼン）などもある。適切なジアミン類としては、さらに 1, 2 - 環状アルカンジアミン類などがある。「環状アルカン」は、それぞれが 5 ~ 7 個の炭素原子を含む 1 ~ 3 個の環を含む化合物である。好ましくは、環状アルカンジアミンは 1, 2 - ジアミノシクロヘキサン（シクロヘキサジアミン）である。

【0054】

特に好ましいジアミンは、1, 2 - ジアミノシクロヘキサンである（図 3 A ~ B）。ラオおよび P. ウィリアムス（Rao & P. Williams）（非特許文献 64）により実施された以前の試験により、シクロヘキサジアミン誘導体（図 3 A、PYR がピリジンである）が様々な金属イオンに結合することが示された。得られた金属キレート剤を用いてアミノ酸およびペプチドを分割することに成功し、この分子が - アミノ酸に対して非常に高い親和力を有し、多くの点で特異的な非常に安定な配位錯体を形成することが示された。1, 2 - ジアミノシクロヘキサンは、本発明のペプチドが結合することが可能である反応性アミノ官能基を有する。 M が金属イオンであり、少なくとも 1 つの R_4 が - アルキル - CO - ペプチド、- アリール - CO - ペプチド、- アリール - アルキル - CO - ペプチドまたは - アルキル - アリール - CO - ペプチドである図 3 B を参照のこと（図 3 C ~ D も参照）。他の R_4 は、同じであるか、または - アルキル - COOH、- アリール - COOH、- アリール - アルキル - COOH もしくはアルキル - アリール - COOH であってよい。図 3 B に示すタイプの誘導体はいくつかの金属結合性部位を有することになり、したがって非置換ペプチドよりも容易に金属イオンに結合することが期待できる。さらに、シクロヘキサンの機能が存在するため、該化合物は、脂質膜を通してのその輸送の助けとなる脂質様の特性を有するであろう。

【0055】

本発明のペプチドのシクロヘキサジアミン誘導体は、2 つの別個の経路により調製することが可能である。第 1 の経路は、最初にアルデヒドと縮合してから還元を必要とする（図 3 C を参照、図 3 C で Bz はベンジルである）。多くのアルデヒド（アルキルおよびア

10

20

30

40

50

リール)が室温でシクロヘキサンジアミンと容易に反応して、オキシムを生成する。オキシムは、嫌氣的条件下で水素化ホウ素ナトリウムにより還元し、二酸誘導体を得ることが可能である。次いで、カルボキシル部分をカルボキシ保護 P_1 に存在する遊離アミノ基と反応させて、ペプチドのシクロヘキサンジアミン誘導体を得る。第2の経路は、図3Dに示す直接アルキル化法である。例えば、シクロヘキサンジアミンをブromo酢酸で処理して、二酢酸誘導体を得る。次いで、カルボキシル部分をカルボキシ保護 P_1 に存在する遊離アミノ基と反応させて、誘導体を得る。図3Dにおいて、 R_5 はHまたは他のペプチドである。 R_5 がHである場合、当技術分野でよく知られている方法により、誘導体をさらに反応させてエステルのような一般的なカルボン酸誘導体を生成させることが可能である。金属結合実験で、この基が存在するか存在しないかは分子全体の金属結合能力に何らの関係もないことが示された。しかし、これらの基は、置換基によって分子を疎水性または親水性にし、これがひいては膜を通過する該分子の送達または標的組織への該分子の送達に影響を及ぼす可能性がある。これらの2つの合成経路は、上記の他のジアミン誘導体を用いるジアミンペプチド誘導体の合成に有効であろう。

10

【0056】

他の適切なポリアミンおよびポリアミン誘導体とそれらをペプチドに結合させる方法は、完全な開示を本願明細書に援用する特許文献93および特許文献94に記載されている。ペプチドへの結合に適した他のポリアミンキレート剤が知られている。例えば、特許文献96~102を参照のこと。

【0057】

隣接する二酸が金属イオンに結合し、銅に対する親和力が特に高いことはよく知られている。したがって、隣接二酸官能基を有するペプチドは、金属を結合するのに極めて有効であると予想される。適切な隣接二酸としては、二酢酸(コハク酸)のようなあらゆる1, 2-アルキル二酸およびあらゆる1, 2-アリール二酸が挙げられる。

20

【0058】

ペプチドのアミノ基を二酢酸と反応させて、二酸誘導体を生成させることが可能である(図4を参照)。これは、樹脂に結合したペプチドのアミノ基をハロゲン化酢酸(例えば、ブromo酢酸またはクロロ酢酸)またはハロゲン化酢酸誘導体(例えば、ベンジルオキシエステル)と反応させることにより都合よく実現することが可能である。固相合成法では、溶媒で洗浄することにより未反応物質を除去することが可能である。最終生成物は、加水分解切断により樹脂から遊離させる。本発明のペプチドの他の二酸誘導体を、同様な方法で調製することが可能である。

30

【0059】

ポリアミノポリカルボン酸は、銅および鉄のような金属に結合することが知られている。本発明のペプチドの誘導体を調製するための適切なポリアミノポリカルボン酸およびこれらをペプチドと結合させる方法は、完全な開示を本願明細書に援用する特許文献104、特許文献105および特許文献106に記載されている。特許文献107も参照のこと。

【0060】

隣接ポリヒドロキシ誘導体も本発明に含まれる。適切な隣接ポリヒドロキシ誘導体は、単糖類および多糖類(例えば、2糖類、3糖类等)などである。現在のところ、好ましいものは単糖類である。図7を参照のこと。単糖類は、2つの主なカテゴリー、すなわち、フラノースとピラノースに分類される。フラノース環系の主な例の1つは、グルコースである。グルコースのヒドロキシ基は、アルデヒドをテトラペプチドのアミン基(例えば、リシンのアミン基)と自由に反応するようにしたままで、ベンジルまたは活性なt-ブチルオキシ官能基として保護することが可能である。温和な還元/加水分解により、単糖ペプチド誘導体が生成する。他の単糖ペプチド誘導体をこの方法で調製することが可能である。

40

【0061】

ビスピリジルエチルアミン誘導体は、2価金属イオンと強い錯体を形成することが知られている。ペプチドに結合するとき、この官能基は銅をはじめとする金属イオンをキレート

50

する別の部位を与える。テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] のビスピリジルエチル誘導体を図 5 に示す。このテトラペプチド誘導体の金属結合能力は、非誘導体化ペプチドと比較して少なくとも 3 倍増加すると期待される。このビスピリジルエチルアミン誘導体の調製には、二酸誘導体の合成といくつかの類似性がある。テトラペプチドの 2 つのアミノ基 (1 つは A s p、もう 1 つは L y s) が 2 - ブロモエチルピリジンと反応して、テトラ置換ペプチド誘導体が生成する。この反応は、樹脂に結合したテトラペプチドをブロモエチルピリジンと反応させた後、樹脂から生成物を切断して達成される。

【 0 0 6 2 】

フェナントロリンは、2 価金属イオンに結合することができる他の複素環式化合物である。ペプチドのフェナントロリン誘導体は、ビスピリジルエチルアミン誘導体と同じ方法で合成することが可能である。

10

【 0 0 6 3 】

ポルフィリン類は、すべての生物に認められる化合物の一群であり、金属に結合することができるテトラピロール大員環を含む。ヘム、クロロフィルおよびコリンは、それぞれ鉄、マグネシウムおよびコバルトを含むこのクラスの化合物の主な例である。メソポルフィリン I X (図 6 A ~ B、図中の M は金属イオン) は、ヘムから誘導され、銅に対して特異的親和性を有することが認められている。本発明のペプチドへのこの構造の付加により、いくつかの銅結合性部位を有するポルフィリン - ペプチド誘導体が生成するであろう (図 6 C を参照)。金属結合におけるそれらの役割に加えて、図 6 C に示すテトラペプチドの位置 3 および 3 ' のイミダゾール残基が銅以外の金属に結合性部位を与え、それにより、ポルフィリン - 金属錯体を安定化する可能性がある。特に、シアノコバラミン (ビタミン B - 1 2) はポルフィリン核における金属としてコバルトを含み、この錯体はイミダゾール基により安定化されている。この類似に基づいて、ポルフィリン - テトラペプチド誘導体は、通常の生理的条件下でポルフィリン核においてコバルト (または他の金属) に結合し、該錯体は H i s イミダゾール基により安定化されることが予想される。

20

【 0 0 6 4 】

図 6 C に示すポルフィリン - ペプチド誘導体を調製するために、標準的な固相ペプチド合成を用いて、メソポルフィリン I X のカルボキシル基を活性化し、ペプチドのアミノ基と結合させることが可能である。一般的に、樹脂に結合したペプチドのリシン残基の遊離アミノ基をカルボキシ活性化ポルフィリン核と結合させることが可能である。縮合生成物は、標準的方法を用いて樹脂から切り離すことができる。この方法を用いて、本発明のペプチドの他のポルフィリン誘導体を合成することが可能である。

30

【 0 0 6 5 】

他の適切なポルフィリンおよび大環状キレート剤ならびにそれらをペプチドに結合させる方法は、完全な開示を本願明細書に援用する特許文献 1 0 8 および特許文献 1 0 9 に記載されている。ペプチドに結合させることが可能と思われる他のポルフィリンおよび大環状キレート剤は周知である。例えば、特許文献 9 6、特許文献 9 7、特許文献 9 8、特許文献 1 1 0、特許文献 9 9、特許文献 1 1 1、特許文献 1 0 1 および特許文献 1 0 3 を参照のこと。

40

【 0 0 6 6 】

種々の別の金属キレート剤およびそれらをタンパク質に結合させる方法が、その完全な開示を本願明細書に援用する特許文献 1 1 2 に記載されている。

ジチオカルバメート類は、鉄などの金属に結合することが知られている。本発明のペプチドの誘導体を調製するための適切なジチオカルバメート類は、その完全な開示を本願明細書に援用する特許文献 1 1 3 および特許文献 1 1 4 に記載されている。

【 0 0 6 7 】

ヒドロキシピリドン類も鉄キレート剤として知られている。本発明のペプチドの誘導体を調製するための適切なヒドロキシピリドン類は、その完全な開示を本願明細書に援用する特許文献 1 1 5 ~ 1 1 7 に記載されている。

50

【0068】

別の非ペプチド金属キレート剤は当技術分野で知られているか、あるいは開発されるであろう。化合物をタンパク質およびペプチドに結合させる方法は当技術分野でよく知られており、本発明のペプチドに非ペプチド金属キレート剤を結合させることは、当技術分野の技術の範囲内である。例えば、そのような結合の方法を記載した上記の特許を参照のこと。

【0069】

当然であるが、非ペプチド金属結合性官能基を、ペプチド $P_1 - P_2$ に対するのと同じ方法で他のペプチドに結合させることが可能であろう。得られるペプチド誘導体は、任意選択でペプチドの金属結合性部位（上記のように、銅結合性ペプチドを含む多くの金属結合性ペプチドの配列が知られている）を含みうるペプチドに結合した、1つまたは複数の非ペプチド金属結合性官能基を含むであろう。少なくとも1つの金属結合性官能基または任意選択のペプチドの金属結合性部位が銅に結合しなければならない。好ましくは、該ペプチドは2～10個、より好ましくは3～5個のアミノ酸を含む。ペプチドは1つまたは複数のD-アミノ酸を含むことが好ましく、ペプチドのアミノ酸のすべてがD-アミノ酸であることが最も好ましい。これらのペプチド、およびそれらに1つまたは複数の非ペプチド金属結合性官能基が結合したそれらの誘導体は、ペプチド $P_1 - P_2$ およびそれらの類似の誘導体について上述したのと同じ方法で調製することが可能である。

【0070】

本発明の方法の実施において好ましい他の銅キレート剤群は、次式のペプチド2量体である。



P_3 は銅に結合する能力のある任意のペプチドで、各 P_3 は同じでも異なってもよい。各 P_3 は、好ましくは2～10個、より好ましくは3～5個のアミノ酸を含む。上記のように、銅結合性ペプチドは知られており、各 P_3 はこれらのペプチドの1つまたは複数の銅結合性部位の配列を含んでいてよい。 P_3 は、上記のように、非ペプチド金属結合性官能基を有するものなどの P_1 および P_2 で置換されていてもよいが、 P_3 ペプチドがいずれも置換されていないことが好ましい。 P_3 はまた、 P_3 の銅結合能力を確保するために、上記のように非ペプチド銅結合性官能基で置換された任意のアミノ酸配列を含んでいてもよい。好ましくは、各 P_3 は置換されていない銅結合性ペプチドである（すなわち、銅に結合するペプチド配列を含む非置換ペプチド）。最も好ましくは、 P_3 基の一方または両方が P_1 である（すなわち、2量体が配列 $P_3 - L - P_1$ 、 $P_1 - L - P_3$ または最も好ましくは $P_1 - L - P_1$ を有する）。 P_1 は上で定義されている。

【0071】

Lは、各 P_3 のC末端アミノ酸に結合しているリンカーである。Lは、2つの P_3 ペプチドにそれらのC末端アミノ酸を介して結合し得る生理学的に許容できる化学基であってよい。「生理学的に許容できる」は、ペプチド2量体にリンカーLを含めた結果として、リンカーLを含むペプチド2量体を投与する動物（ヒトを含む）または器官に対して該ペプチド2量体が有毒ではないことを意味する。Lは、2つの P_3 基が協同して金属イオンに結合し得るように（2：1のペプチド：金属錯体と同様に）それらを連結させることが好ましい。Lも好ましくは中性である。最も好ましくは、Lは、1～18個、好ましくは2～8個の炭素原子を含む直鎖もしくは分枝鎖のアルカンもしくはアルケン残基（例えば、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2(CH_3)CH_2-$ 、 $-CHCH-$ 等）であるか、または3～8個、好ましくは5～6個の炭素原子を含む環状のアルカンもしくはアルケン残基（図19A、化合物D₁を参照）であって、好ましくはアミド結合により P_3 に結合している。そのようなリンカーは、ペプチド2量体に疎水性を与えるので、特に好ましい。他の好ましい実施形態において、Lは窒素含有複素環式アルカン残基（図19A、化合物D₂、D₃ およびD₄を参照）であり、好ましくは、ピペラジド（図19A、化合物D₂を参照）である。他の好ましい実施形態において、Lはグリセリルエステルである（図19A、化合物D₅を参照、式D₅中、Rは好まし

10

20

30

40

50

くは1～6個の炭素原子を含むアルキルまたはアリールである)。最後に、Lは金属結合性ポルフィリンであり得る(図6Cを参照)。これらの好ましいリンカーLは、2つのペプチドP₃が協同して金属イオンに結合することを可能にし、かつ生体適合性であり、これらの好ましいリンカーを含むペプチド2量体は、容易に、しかも大量に調製することが可能である。「生体適合性」とは、リンカーLを含むペプチド2量体が、ペプチド2量体を投与した動物(ヒトを含む)においてリンカーLに起因する望ましくない副作用を引き起こさないことを意味する。

【0072】

ペプチド2量体を合成する方法を図19B～Dに示す。一般的に、2つのP₃基のC末端アミノ酸(保護の方法および保護基は当技術分野で知られている)をLに結合させ、得られるアミノ酸2量体を用いて標準的ペプチド合成法によりペプチド2量体を作製する。

10

【0073】

例えば、各ペプチドが配列Asp Ala His Lys[配列番号1]を有するペプチド2量体は、保護されたリシンを、酸塩化物として、もしくはペプチド合成に用いられる標準的カップリング剤を用いて、遊離ジアミン官能基にカップリングすることにより合成することが可能である(図19B～Cを参照)。多くの適切なジアミンが市販されており、あるいは適切なジアミンを当技術分野で知られている方法により容易に合成することが可能である。

【0074】

例えば、リシン2量体(2)(図19B)を次のように調製することが可能である。9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)およびt-ベンジルオキシカルボニル(Boc)で保護したD-Lys(Fmoc-D-Lys(Boc)-OH)(20mmol)を乾燥ジメチルホルムアミド(DMF、100mL、乾燥アルゴンでフラッシュ)に溶解した攪拌中の溶液に、ブタン-1,4-ジアミン(1)および2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,2,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸(TBTU、0.5mmol)を加える。該溶液を室温で36時間攪拌する。ビス保護リシン(2)を、シリカ上のフラッシュクロマトグラフィーにかけて酢酸エチル/メタノールの混合物で溶離することにより分離する。次いで、ペプチド2量体(3)を古典的ペプチド合成法を用いて保護リシン2量体(2)から調製する(図19Bを参照)。

20

【0075】

各ペプチドが配列Asp Ala His Lys[配列番号1]を有する他のペプチド2量体は、次のように合成することが可能である。最初に、異なる保護リシン2量体(4)を、ピペラジン(5)の2つのアミノ中心をアシル化することにより合成する(図19Cを参照、非特許文献86も参照)。次いで、標準的ペプチド合成法を用いて残りのアミノ酸残基を付加して、ペプチド2量体(6)を得る(図19Cを参照)。

30

【0076】

各ペプチドが配列Asp Ala His Lys[配列番号1]を有し、Lがグリセリルエステルであるペプチド2量体は、次のように合成することが可能である。図19Dの式(7)の3-置換プロパン-1,2-ジオール(Rはアルキルまたはアリールである)は市販されている。Rがメチルであるリシンジエステル(8)は、次のように調製することができる(図19Dを参照)。乾燥トルエン(100mL、乾燥アルゴンでフラッシュ)に溶解したFmoc-D-Lys(Boc)-OH(20mmol)の攪拌中の溶液に3-メトキシプロパン-1,2-ジオール(200mmol)およびイミダゾール(15mmol)を加える。該溶液を室温で36時間攪拌する。溶媒を減圧下で除去し、残留物を酢酸エチルに溶解する。この溶液をクエン酸溶液(2%)、水、0.5N NaHCO₃溶液で洗浄し、再び水で洗浄し、次いで、有機層を硫酸マグネシウムで脱水する(溶媒の除去により、淡黄色の残留物が得られる)。ビス保護リシン(8)をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィーにかけて酢酸エチル/メタノールの混合物で溶離することにより分離する。次いで、ペプチド2量体(9)を、古典的ペプチド合成法を用いて保護リシン2量体(8)から調製する(図19Dを参照)。

40

50

【0077】

金属結合性化合物の生理学的に許容できる塩も本発明に含まれる。生理学的に許容できる塩としては、無機酸（塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸等）、有機酸（酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸等）または塩基（製薬上許容できる金属陽イオンの水酸化物、炭酸塩または重炭酸塩等）から得られる塩のような通常の無毒性の塩が挙げられる。塩は、通常の方法、例えば、化合物の遊離塩基形を酸で中和させて調製する。

【0078】

本発明の一実施形態では、APCによる治療を必要とする動物に有効量の銅キレート剤を投与する。好ましくは、動物は、ウサギ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウマまたはヒトのような哺乳類であり、最も好ましくはヒトである。キレート剤に加えて、有効な量のAPC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質および/またはプロテインC活性化剤を動物に投与する（上記を参照）。銅キレート剤は、APC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質および/またはプロテインC活性化剤を投与する前、同時および/または後に投与することが可能である。銅キレート剤をAPC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質および/またはプロテインC活性化剤の投与の前に投与し、キレート剤の投与を、APC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質および/またはプロテインC活性化剤の投与の間継続することが好ましい。銅キレート剤をAPC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質および/またはプロテインC活性化剤と同時に投与する場合、すべての化合物を互いに混合して、あるいは別個に投与することが可能である。

10

20

【0079】

本発明の様々な銅キレート剤のための有効な剤形、投与方法および投与量は、実験的に決定することができ、そのような決定を行うことは、当技術分野の技術の範囲内である。有効な用量は約2～約200mg/kg、好ましくは約10～約40mg/kg、最も好ましくは約20mg/kgであることが見出されている。しかし、当業者には当然のことであるが、投与量は、用いる個々のキレート剤、治療する疾患または状態、疾患または状態の重症度、投与経路、化合物の排泄速度、投与期間、その動物に投与されている何らかの他の薬物の同一性、動物の年齢、大きさおよび種、ならびに医療および獣医学の技術分野において知られている同様な因子によって異なる。一般的に、本発明のキレート剤の適切な1日投与量は、治療効果をもたらすのに有効な最低投与量であるキレート剤の量である。しかし、1日投与量は、担当の医師または獣医師が適切な医療上の判断の範囲内で決定するものとする。所望ならば、有効な1日投与量を、2、3、4、5、6またはそれ以上の分割量として1日をとおして適切な間隔で別個に投与してもよく、あるいは持続注入として投与してもよい。キレート剤の投与は、好ましい応答が達成されるまで、継続すべきである。

30

【0080】

本発明のキレート剤は、経口、鼻腔内、直腸内、膣内、非経口（例えば、静脈内、脊髄内、腹腔内、皮下または筋肉内）、槽内、経皮、経粘膜、頭蓋内、脳内および局所（頬および舌下を含む）などの任意の適切な投与経路により、治療のために動物患者に投与することができる。好ましい投与経路は、非経口である。

40

【0081】

本発明のキレート剤を単独で投与することは可能であるが、当化合物を医薬製剤（組成物）として投与することが好ましい。本発明の薬剤組成物は、1つまたは複数の製薬上許容できる担体、ならびに場合により1つまたは複数の他の化合物、薬物または他の物質との混合物中の有効成分として、本発明の1つのキレート剤または複数のキレート剤を含む。各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、動物に対して有害でないという意味において「許容できる」ものでなければならない。製薬上許容できる担体は、当技術分野でよく知られている。選択する投与経路にかかわらず、本発明の化合物を、当業者に周知の通常の方法により製薬上許容できる投与形態に調剤する。例えば、Remington's

50

Pharmaceutical Sciencesを参照のこと。

【0082】

非経口投与に適する本発明の薬剤組成物は、1つまたは複数の製薬上許容できる無菌の等張水性液剤または非水性液剤、分散剤、懸濁剤もしくは乳剤、または使用直前に無菌の注射用液剤または分散剤に再構成することができる無菌の散剤と配合されている本発明の1つまたは複数のキレート剤を含み、抗酸化剤、緩衝剤、該製剤を被投与者の血液と等張にするための溶質、または懸濁化剤もしくは粘稠化剤を含んでよい。

【0083】

薬剤組成物に用いることができる適切な水性担体および非水性担体としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）およびそれらの適切な混合物、オリーブ油のような植物油、オレイン酸エチルのような注射用有機エステルなどがある。例えば、レシチンのようなコーティング材の使用、分散剤の場合には必要とする粒度サイズの維持、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可能である。

【0084】

これらの組成物は、湿潤剤、乳化剤および分散化剤のような補助剤も含みうる。糖類、塩化ナトリウム等の等張性物質を組成物に含めることも望ましい。さらに、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅延させる物質を含めることにより、注射剤の長期吸収をもたらすことができる。

【0085】

場合によって、薬物の効果を延長させるために、皮下または筋肉内注射による薬物の吸収を遅くすることが望ましい。これは、水に対する溶解度が低い結晶性または無定形物質の液体懸濁剤を用いることにより達成することができる。薬物の吸収速度は、その溶解速度に依存し、ひいては結晶の大きさおよび結晶形に依存する。別例として、非経口投与する薬物の吸収の遅延は、該薬物を油性の媒体に溶解または懸濁することにより達成される。

【0086】

デポ注射剤は、ポリラクチド-ポリグリコリドのような生分解性ポリマー中に薬物のマイクロカプセル化マトリックスを形成させることにより調製する。薬物とポリマーとの比率、および用いる個々のポリマーの性質によって、薬物の放出速度を制御することが可能である。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）などがある。デポ注射剤は、生体組織と適合性のあるリポソームまたはマイクロエマルジョンに薬物を封じ込めることによっても調製することが可能である。注射用物質は、例えば、細菌保持フィルターを通してろ過することにより滅菌することが可能である。

【0087】

製剤は、1回用量分または複数回用量分を密閉容器、例えば、アンプルまたはバイアルに入れて提供され、使用直前に無菌の液体担体、例えば、注射用水の添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。即時注射液剤および懸濁剤は、上記のタイプの無菌の散剤、顆粒剤および錠剤から調製することができる。

【0088】

経口投与に適した本発明の製剤は、それぞれが有効成分として所定量の本発明のキレート剤（1つまたは複数）を含む、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、散剤、顆粒剤の形態で、または水性もしくは非水性液体中の液剤または懸濁剤として、または水中油型もしくは油中水型乳剤として、またはエリキシル剤もしくはシロップ剤として、またはトローチ剤（ゼラチンおよびグリセリン、またはショ糖およびアラビアゴムのような不活性の基剤を用いる）として投与することができる。本発明の1つのキレート剤または複数のキレート剤は、巨丸剤（ポーラス）、舐剤またはペースト剤としても投与することができる。

【0089】

経口投与用の本発明の固形剤形（カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣剤、散剤、顆粒剤等）では、有効成分がクエン酸ナトリウムまたは第二リン酸カルシウム、および/または次のうちのいずれかなどの1つまたは複数の製薬上許容できる担体と混合されている。すなわち

、(1)デンプン、ラクトース、ショ糖、グルコース、マンニトールおよび/またはケイ酸のような賦形剤または増量剤、(2)例えばカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ショ糖および/またはアラビアゴムの様な結合剤、(3)グリセロールの様な湿潤希釈剤、(4)寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、ある種のケイ酸塩および炭酸ナトリウムの様な崩壊剤、(5)パラフィンの様な溶解遅延剤、(6)第四級アンモニウム化合物の様な吸収促進剤、(7)例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールの様な湿潤剤、(8)カオリンおよびベントナイト粘土の様な吸収剤、(9)タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウムおよびそれらの混合物の様な滑沢剤、ならびに(10)着色剤。カプセル剤、錠剤および丸剤の場合、薬剤組成物は緩衝剤も含んでいてよい。ラクトースすなわち乳糖、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどの賦形剤を用いたゼラチン軟カプセルおよび硬カプセル剤中の増量剤として、同様なタイプの固体組成物を用いることができる。

10

20

30

40

50

【0090】

錠剤は、任意選択で1つまたは複数の補助成分とともに、圧縮または成形することにより調製することができる。圧縮錠剤は、結合剤(例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース)、滑沢剤、不活性の希釈剤、保存剤、崩壊剤(例えば、デンプン、グリコール酸ナトリウムまたは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム)、界面活性剤または分散化剤を用いて調製することができる。成形錠剤は、不活性の液体希釈剤で湿ら

【0091】

上記錠剤、ならびに糖衣錠、カプセル剤、丸剤および顆粒剤の様な本発明の薬剤組成物のその他の固形剤形は、任意選択で溝を入れるか、もしくは腸溶コーティングおよび製剤調合技術分野においてよく知られている他のコーティングの様なコーティングおよび外皮を調製することができる。それらは、例えば所望の放出プロファイルを得るために様々な割合のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、リポソームおよび/またはマイクロスフェアを用いて、該製剤中の有効成分の徐放または放出制御が可能ないように調合することもできる。それらは、例えば、細菌保持フィルターを通する過により滅菌することができる。これらの組成物は、任意選択で乳白剤を含んでいてもよく、胃腸管の特定の部分において有効成分のみを、または有効成分を優先的に、場合により遅延して放出する組成物であってもよい。使用可能な包埋用組成物の例は、ポリマー物質およびワックスなどである。有効成分は、マイクロカプセル剤に封入することも可能である。

【0092】

本発明のキレート剤を経口投与するための液体剤形は、製薬上許容できる乳剤、マイクロエマルジョン、液剤、懸濁剤、シロップ剤およびエリキシル剤などである。有効成分に加えて、液体剤形は、例えば、水または他の溶媒の様な当技術分野で一般的に用いられている不活性の希釈剤、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油(特に、綿実油、アメリカホドイモ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油およびゴマ油)、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステルならびにそれらの混合物の様な可溶化剤および乳化剤を含んでいてよい。

【0093】

不活性の希釈剤のほかに、経口組成物には、湿潤剤、乳化および懸濁化剤、甘味料、調味料、着色剤、香料および保存剤の様な補助剤も含めることが可能である。

懸濁剤には、活性化合物に加えて、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガcantゴムならびにそれらの混合物

のような懸濁化剤を含めてよい。

【0094】

直腸または膣投与用の本発明の薬剤組成物の製剤は坐剤として提供することができるが、該坐剤は本発明の1つまたは複数の化合物と、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤ワックスまたはサリチル酸などを含む1つまたは複数の適切な非刺激性賦形剤または担体とを混合することにより調製可能であり、かつ室温では固体であるが体温では液体であり、したがって直腸または膣腔内で融解して活性化合物を放出する。膣投与に適している本発明の製剤としては、当技術分野で適切であることが知られている担体を含む、ペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、泡剤または噴霧剤などもある。

10

【0095】

本発明のキレート剤の局所、経皮または経粘膜投与用の剤形は、散剤、噴霧剤、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、液剤、パッチ剤、点滴剤および吸入剤などである。1つまたは複数のキレート剤を、無菌条件下で、製薬上許容できる担体と、必要とする緩衝剤または噴射剤とともに混合することができる。

【0096】

軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤およびゲル剤は、本発明の1つまたは複数のキレート剤に加えて、動物脂肪および植物脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカントゴム、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび酸化亜鉛またはそれらの混合物のような賦形剤を含んでいてよい。

20

【0097】

散剤および噴霧剤は、本発明の1つまたは複数のキレート剤に加えて、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムおよびポリアミド粉末またはこれらの物質の混合物のような賦形剤を含んでいてよい。噴霧剤はさらに、クロロフルオロ炭化水素ならびにブタンおよびプロパンのような揮発性非置換炭化水素のような通常の噴射剤を含んでいてよい。

【0098】

有効成分（すなわち、本発明の1つまたは複数のキレート剤）は、通常の経皮薬物送達システム、すなわち、一般的に有効成分が皮膚に貼付される薬物送達装置としての役割を果たす積層構造内に含まれている経皮パッチ剤を用いて皮膚を介して送達してもよい。そのような構造においては、有効成分は一般的に、上方の裏打ち層の下にある層、すなわち「リザーバー」に含まれている。積層装置は、リザーバーを1つだけ含んでいてもよく、あるいは複数のリザーバーを含んでいてもよい。一実施形態において、リザーバーは、薬物送達時に該システムを皮膚に貼付する役割を果たす製薬上許容できる接触粘着物質のポリマーマトリックスを含む。適切な皮膚接触粘着物質の例は、ポリエチレン、ポリシロキサン、ポリイソブチレン、ポリアクリル酸、ポリウレタンなどを含むが、これらに限定されない。別例として、薬物含有リザーバーと皮膚接触粘着物質とが別個の異なる層として存在し、粘着物質はリザーバーの下にあり、この場合リザーバーは上述のようにポリマーマトリックスであるか、または液体もしくはヒドロゲルリザーバーであってよく、または他の形態であってよい。

30

40

【0099】

装置の上部面としての役割を果たす、上記積層物の裏打ち層は、積層構造の主要な構造エレメントとして機能し、装置にその可撓性の多くを与えている。裏打ち材料として選択される材料は、有効成分および存在する他のあらゆる物質に対して実質的に不透過性であるように選択すべきである。裏打ち層は、皮膚が薬物送達時に水和されることが望ましいかどうかによって、閉塞性が非閉塞性のいずれかであってよい。裏打ちは、好ましくは柔軟な弾性材料のシートまたはフィルムからなっていることが好ましい。裏打ち層に適するポリマーの例としては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステルなどがある。

【0100】

貯蔵中および使用前には、積層構造は放出ライナーを含んでいる。使用直前にこの層を装

50

置から除去して、その基底表面、すなわち薬物リザーバーまたは別個の接触粘着層のいずれかを露出させて、該システムを皮膚に貼付できるようにする。放出ライナーは、薬物/媒体に不透過性の物質で構成されなければならない。

【0101】

経皮薬物送達装置は、当技術分野で知られている通常の技術を用いて作製することができる。例えば、粘着物質、有効成分および媒体の液体混合物を裏打層上に成形(casting)した後、放出ライナーを積層して作製することができる。同様に、粘着物質混合物を放出ライナー上に成形した後、裏打層を積層してもよい。別例として、薬物リザーバーを有効成分または媒体の非存在下で調製し、次いで、薬物/媒体混合物に「浸漬」して装てんしてもよい。

10

【0102】

積層経皮薬物送達システムは、さらに皮膚透過促進剤を含んでいてよい。すなわち、ある種の有効成分に対する皮膚本来の透過性が低すぎて、治療レベルの薬物が適度な広さの無傷の皮膚を経て通過できないので、そのような薬物と皮膚透過促進剤とを併用投与することが必要である。適切な促進剤は、当技術分野でよく知られている。

【0103】

本発明の薬剤組成物は、鼻腔エアゾール剤または吸入により投与することもできる。そのような組成物は、製剤調合技術分野でよく知られている手法に従って調製し、ペンシルアルコールまたは他の適切な保存剤、生物学的利用能を増大させるための吸収促進剤、フルオロカーボンまたは窒素のような噴射剤、および/または他の通常の可溶化または分散剤を用いて、生理食塩水中の溶液として調製することができる。

20

【0104】

局所薬物送達用の好ましい製剤は、軟膏剤およびクリーム剤である。軟膏剤は、一般的にワセリンまたは他のワセリン誘導体に基づく半固体製剤である。選択した活性物質を含むクリーム剤は、当技術分野で知られているように、水中油型または油中水型の粘稠液体または半固体乳剤である。クリーム基剤は、水に可洗性で、油相、乳化剤および水相を含む。油相は、しばしば「内(internal)」相とも呼ばれており、一般的にワセリンおよびセチルアルコールもしくはステアリルアルコールのような脂肪族アルコールからなっている。水相は、必ずではないが通常は油相より容積が大きく、一般的に湿潤剤を含む。クリーム剤中の乳化剤は、一般に非イオン性、陰イオン性、陽イオン性または両性界面活性剤である。使用される特定の軟膏またはクリーム基剤は、当業者により認識されるように、最適の薬物送達を可能にする基剤である。他の担体または媒体と同様に、軟膏基剤は、不活性で、安定で、非刺激性かつ非感作性であるべきである。

30

【0105】

本発明の口腔内投与用製剤は、錠剤、トローチ剤、ゲル剤などである。別例として、口腔内投与は当業者に知られている経粘膜送達システムを用いて行うことができる。

本発明の他の実施形態において、有効な量のAPC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質および/またはプロテインC活性化剤を投与する前に、組成物中に存在するあらゆる銅をキレートするために、APC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質および/またはプロテインC活性化剤を含む組成物を銅キレート剤と接触させる。適切な接触条件は、実験的に決定することが可能であり、それを行うことは当技術分野の範囲内にある。例えば、接触は、キレート剤の溶液と他の化合物の溶液とを単に合わせ、キレート剤を組成物中のすべての銅に結合させるに十分な条件(例えば、時間、温度およびpH)を用いてインキュベートすることにより実現することが可能である。銅キレート剤は、投与前に除去することが可能であり(例えば、銅を含まない組成物の製造における銅キレート剤の使用)、あるいは、APC、プロテインC、プロテインCの合成を増加させる物質および/またはプロテインC活性化剤とともに投与することが好ましい。銅キレート剤は、キレート剤に特異的な抗体を含むアフィニティカラムの使用などの様々な方法で除去することが可能である。

40

【0106】

50

「a」または「an」の付くものは、そのものが1つまたは複数であることを指すことに注意すべきである。「a cell (細胞)」とは1つまたは複数の細胞を指す。

【実施例1】

【0107】

この実施例では、銅が活性化プロテインC (APC) の抗凝固活性を阻害するかどうかを検討した *in vitro* 試験について述べる。下記のように、30分間のインキュベーション期間の後に、銅はAPCの抗凝固活性を阻害した。

【0108】

ヒトアルブミンは、そのN末端に銅に対する1つの高親和性結合性部位と他所に多くの非特異的銅結合性部位とを有する。非特許文献20、非特許文献65、非特許文献66、非特許文献67。アルブミンは遊離銅イオンを封鎖し、そのN末端銅結合性部位は、銅により誘発される活性酸素種の形成を妨げることが示された。非特許文献68、非特許文献69。

【0109】

この実施例で述べる *in vitro* 試験においても銅によるAPC阻害をヒト血清アルブミン (HSA) またはヒトアルブミンN末端銅結合性部位の類似体 D-Asp D-Ala D-His D-Lys (d-DAHK) により抑制または逆転することが可能であるかどうかを検討した。以下に示すように、30分間のインキュベーション期間の後に、HSAおよびd-DAHKはいずれも銅によるAPC活性の阻害に対して防御効果を示し、銅のキレートによりAPC治療の有効性が増大することが示唆された。

【0110】

(材料)

ヒトアルブミンN末端類似体 d-DAHK は、ボーマンリサーチ社 (Bowman Research, Ltd.) [英国ウェールズ ニューポート (Newport, Wales) 所在] により合成された。APC 抗凝固活性のアッセイは、Accucolor (登録商標) 比色アッセイ (シグマダイアグノスティックス (Sigma Diagnostics) [米国ミズーリ州セントルイス所在] とした。APC (シグマ (Sigma)、製品番号 P2200)、HSA (シグマ (Sigma)、製品番号 A1653) および他のすべての化学物質は (シグマ (Sigma) [米国ミズーリ州セントルイス所在] から入手した。APC の銅含量は、黒鉛炉原子吸光 (ガルブレースラボラトリーズ (Galbraith Laboratories) [米国テネシー州ノックスビル (Knoxville) 所在] により測定した。

【0111】

(APC 活性アッセイ)

最初に血漿試料についてデザインされた APC アッセイ (非特許文献70) を清浄な水環境用に修正した。CuCl₂、HSA および d-DAHK の溶液を 20 mM KH₂PO₄ 緩衝液 (pH 7.4) を溶媒として調製した。実験は 96 ウエルプレートで行った。APC (2 mg/L) を次の溶液、すなわち a) 20 mM KH₂PO₄ 緩衝液単独、b) 10 μM CuCl₂、c) 40 μM HSA、d) 40 μM d-DAHK、e) HSA : CuCl₂ (1 : 4、1 : 2、1 : 1、2 : 1 および 4 : 1 の比で)、ならびに f) d-DAHK : CuCl₂ (1 : 4、1 : 2、1 : 1、2 : 1 および 4 : 1 の比で) (n = 3、それぞれについて2連) に加え、37 °C で30分間インキュベートした。次いでプロテインC基質 (2 mg/L) を各ウエルに加え、37 °C で10分間インキュベートした。濃酢酸を各ウエルに加えて反応を停止させ、結果をマイクロプレート蛍光リーダー (FL600型、バイオテクインスツルメンツ社 (Bio-Tek Instruments Inc.) [米国バーモント州ウィノースキー (Winouski) 所在] で 410 nm で読み取った。銅単独、HSA 単独、d-DAHK 単独ならびに HSA : CuCl₂ および d-DAHK : CuCl₂ のすべての組合せにおける APC 活性を、緩衝液のみを用いたベースライン APC 活性からの平均変化率 (±標準偏差) として表した。

【0112】

10

20

30

40

50

(A P C の銅による阻害)

2つの独立した実験において $CuCl_2$ を A P C とともにインキュベートしたところ、ベースラインと比較して A P C 活性が $27.9\% \pm 15.5\%$ (図1) および $24.1\% \pm 9.7\%$ (図2) 低下した (総平均で $26.0\% \pm 11.8\%$ 低下)。銅はかつて金属アフィニティークロマトグラフィー法で A P C を結合させるために使用されている。非特許文献71。しかし、知られている限り、本試験は、銅が A P C の抗凝固活性を *in vitro* で阻害するという証拠を初めて提供している。

【0113】

銅は、正常条件下では血漿タンパク質により厳格に制御されている必須微量元素である。*in vitro* で酸性状態にすると遊離銅イオンがセルロプラスミンおよび他のタンパク質から放出されることが知られており、また、*in vivo* で虚血およびアシドーシスを伴う状態では遊離銅イオンが放出される。非特許文献20、非特許文献72、非特許文献25。虚血およびアシドーシスは、しばしば敗血症性ショックを伴い、組織の酸素要求量の増加、酸素摂取の障害および血流の異常分布に起因して、敗血症における初期に起こることが多い。非特許文献22。したがって、遊離の銅は敗血症時に容易に利用され得る状態にあり、内因性および治療的に投与された A P C の活性を阻害しうる。このことは、銅の封鎖 (sequestration) により A P C または内因的に不活性化された A P C の治療上の有効性が増大しうることを意味する。

【0114】

(H S A は銅による A P C 阻害を抑制する)

H S A を A P C とともにインキュベートしたところ、ベースライン A P C 活性と比べて $202.1\% \pm 48.1\%$ に増加した (図1)。このような A P C 活性の劇的な増加は、実験に用いた A P C が銅を含んでいた可能性のあることを示唆していた。本試験のすべての実験に用いた A P C ストック溶液 (300 mg/L 、 $5.45\text{ }\mu\text{M}$) の銅含量を分析したところ、 $88.5\text{ }\mu\text{g/L}$ ($1.39\text{ }\mu\text{M}$) の銅を含むと測定された。H S A に存在する多数の銅結合性部位により A P C に結合した銅が除去されて、A P C 活性がベースラインと比べて増加したと思われる。非特許文献20、非特許文献65。A P C 上に活性部位を露出させるコンフォーメーション変化や H S A の基質様活性のような、他の生じうる H S A - A P C 相互作用も A P C 活性を増加させた可能性がある。種々の比率の H S A : $CuCl_2$ において A P C の銅による阻害が一貫して抑制され、ベースラインと比べて、 $180.0\% \pm 68.2\% \sim 207.1\% \pm 53.3\%$ の範囲の A P C 活性の劇的な増加がもたらされた (図1)。

【0115】

低アルブミン血症は、敗血症においてしばしば報告されているが、アルブミン異化の増加、血管外漏出、およびそれほどではないがアルブミン合成の低下に起因している可能性がある。非特許文献73。敗血症性ショックおよび腸虚血ショックに対してヒトアルブミンを投与することにより、電解質溶液単独投与と比較して、血行動態パラメーターおよび生存率が改善することが報告されている。非特許文献74~76。銅および鉄をキレートするデフェロキサミンも敗血症の動物モデルにおいて有用であると報告された。非特許文献77、非特許文献78。理論的には、ここに示した結果を考慮すると、敗血症およびショックに対するアルブミンまたは金属キレート剤の投与の有用性の一部は、銅による A P C 阻害の抑制または内因的に不活性化された A P C の再活性化により説明できよう。

【0116】

(d - D A H K は A P C の銅による阻害を抑制する)

d - D A H K を A P C とともにインキュベートしたところ、ベースライン A P C 活性と比べて $18.2\% \pm 13.0\%$ 増加した (図2)。2 : 1 および 4 : 1 の d - D A H K : $CuCl_2$ 比では、ベースラインと比べて A P C 活性が増加した (それぞれ $12.9\% \pm 1.1\%$ および $14.8\% \pm 12.7\%$) が、より低い d - D A H K : $CuCl_2$ 比では銅による A P C 阻害に対する有意な防御は示されなかった (図2)。この所見は、d - D A H K が少なくとも 2 : 1 の d - D A H K : $CuCl_2$ 比で遊離の銅と効果的に結合すると

10

20

30

40

50

いう我々の以前の報告と一致している。非特許文献 67 ~ 69。A P C 単独に対する d - D A H K の最大効果 (図 2) がベースラインと比べて 18 . 2 % の活性の増加をもたらしたが、これは別途測定された A P C 中の銅の量 (5 . 45 μ M の A P C に対して 1 . 39 μ M の銅、1 : 4) が d - D A H K によりキレートされていることに相当する。

【 0 1 1 7 】

救急救命診療が進歩したにもかかわらず、重症敗血症は比較的発症率が高く、しばしば致命的疾患となり、高齢患者で致命的である可能性がより大きい。非特許文献 79。重症敗血症の治療の第 3 相臨床試験において、組換えヒト A P C は 28 日死亡率を 31 % から 25 % に減少させたが、A P C の投与を受けた患者のうち多くは有用な効果がなかった。非特許文献 80。静脈内投与されたヒト組換え A P C は、タンパク質分解酵素により 15 分以内に健常被験者の血漿から除去される。製造業者によれば、重症敗血症の患者では最大 50 % 速く除去される。非特許文献 81 ~ 85。したがって、現行の臨床ガイドラインは、静脈内投与の A P C は 4 日間にわたり連続的に投与することを推奨している。非特許文献 80。アルブミンまたは d - D A H K を用いて遊離の銅を封鎖することにより A P C の銅による阻害を抑制することは、A P C の臨床的有用性を維持または増強しつつ、A P C の投与をより低用量かつ短時間にすることを可能にするかもしれない。

10

【 0 1 1 8 】

結論すると、これらの結果から、銅が A P C 抗凝固活性を *i n v i t r o* で部分的に阻害し、H S A および d - D A H K (ヒトアルブミンの高親和性銅結合性部位の類似体) は銅による A P C 阻害を抑制することが示唆される。敗血症に伴う虚血およびアシドーシス時に動態化される遊離の銅は、A P C の不活性化に寄与し、その臨床的有用性を減少させる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 1 9 】

【 図 1 A 】置換可能な箇所を示す、テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] の式。

【 図 1 B 】置換可能な箇所を示す、テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] の式。

【 図 1 C 】置換可能な箇所を示す、テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] の式。

30

【 図 1 D 】置換可能な箇所を示す、テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] の式。

【 図 2 A 】図 1 C の式に含まれるテトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] の誘導体の合成の概略図。

【 図 2 B 】図 1 B の式に含まれるテトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] の誘導体の合成の概略図。

【 図 3 A 】シクロヘキサンジアミン誘導体の式。

【 図 3 B 】シクロヘキサンジアミン誘導体の式。

【 図 3 C 】テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] のシクロヘキサンジアミン誘導体の合成の概略図。

40

【 図 3 D 】テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] のシクロヘキサンジアミン誘導体の合成の概略図。

【 図 4 】テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] のテトラ酢酸誘導体の式。

【 図 5 】テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] のビスピリジルエチルアミン誘導体の式。

【 図 6 A 】結合金属イオン M を含まないメソポルフィリン I X の式。

【 図 6 B 】結合金属イオン M を含むメソポルフィリン I X の式。

【 図 6 C 】テトラペプチド A s p A l a H i s L y s [配列番号 1] のメソポルフィリン I X 誘導体の式。

50

【図 7】単糖類の式。

【図 8 A】本発明によるペプチド 2 量体の式。

【図 8 B】本発明によるペプチド 2 量体の合成を示す図。

【図 8 C】本発明によるペプチド 2 量体の合成を示す図。

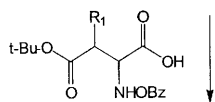
【図 8 D】本発明によるペプチド 2 量体の合成を示す図。

【図 9】銅 (Cu) 単独、ヒト血清アルブミン (HSA) 単独および種々の比の HSA : Cu の、活性化プロテイン C (APC) 抗凝固活性に対する影響を示すグラフ。データは、ベースライン APC 活性からの変化率 (%) として表す (各バーについて $n = 3$ 、平均値 \pm 標準偏差)。

【図 10】銅 (Cu) 単独、テトラペプチド D - Asp D - Ala D - His D - Lys (d - DAHK) 単独および種々の比の d - DAHK : Cu の、APC 抗凝固活性に対する影響を示すグラフ。データは、ベースライン APC 活性からの変化率 (%) として表す (各バーについて $n = 3$ 、平均値 \pm 標準偏差)。

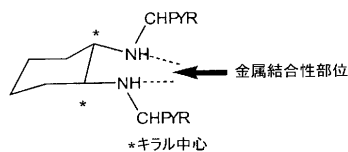
【図 2 B】

ポリマー...Lys(vNおよびC保護)-His(N保護)-Ala-NH₂



ポリマー...Lys(vNおよびC保護)-His(N保護)-Ala-Asp
(R₁で置換)

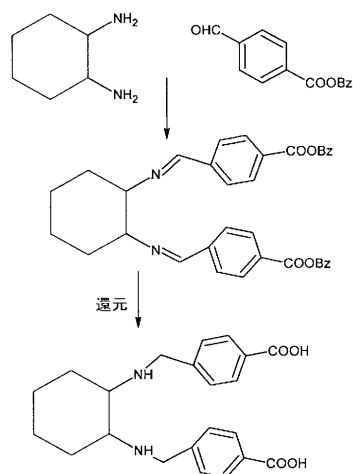
【図 3 A】



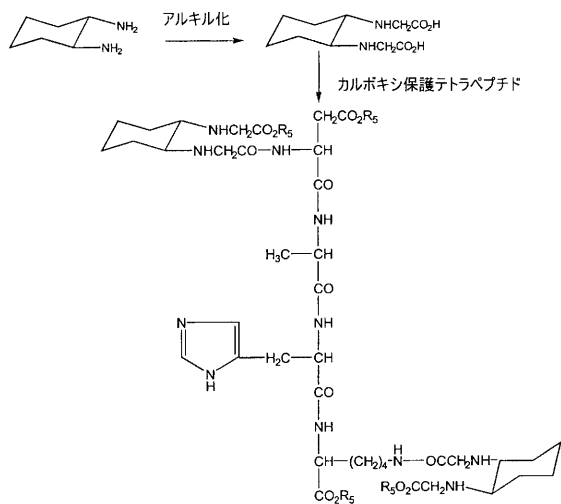
【図 3 B】



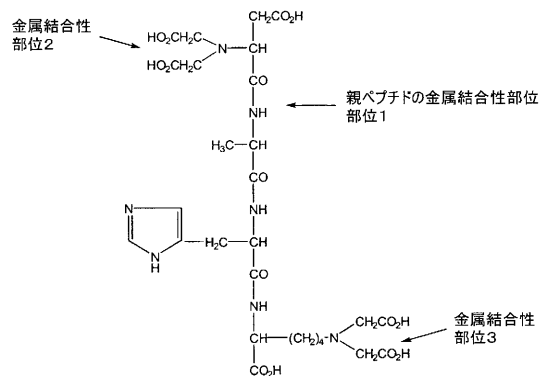
【図 3 C】



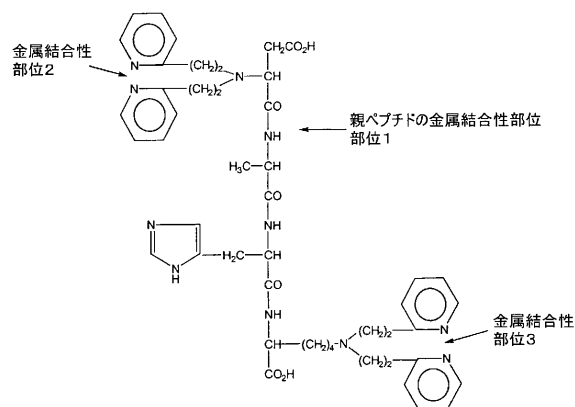
【図3D】



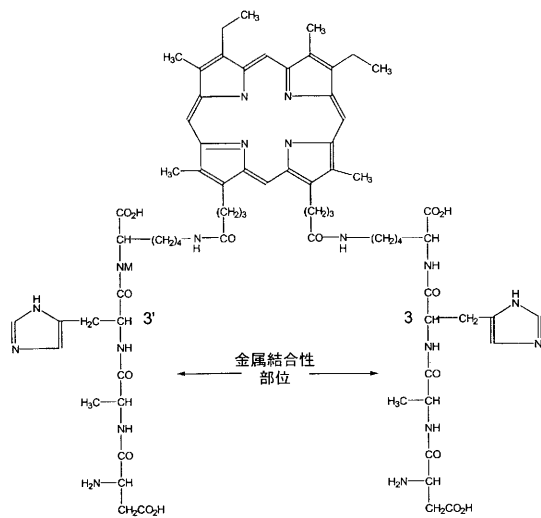
【図4】



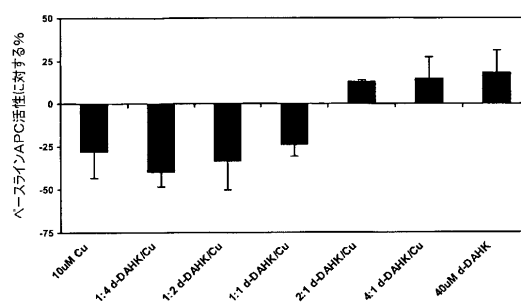
【図5】



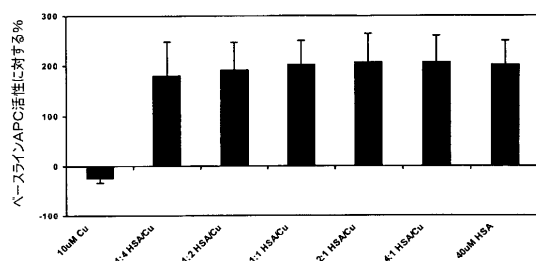
【図6C】



【図10】



【図9】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/007686 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number: PCT/US02/22951

(22) International Filing Date: 19 July 2002 (19.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/307,005 19 July 2001 (19.07.2001) US
60/344,514 28 December 2001 (28.12.2001) US(71) Applicant: DMI BIOSCIENCES, INC. [US/US]; 3601
S. Clarkson Street #420, Englewood, CO 80110-3948 (US).

(72) Inventors: BAR-OR, David; 9801 E. Oxford Avenue, Englewood, CO 80110 (US); YUKL, Richard, L.; 3230 S. Monroe Street, Denver, CO 80210 (US).

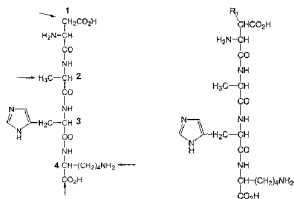
(74) Agents: CONNELL, Gary, J. et al.; Sheridan Ross P.C.,
Suite 1200, 1560 Broadway, Denver, CO 80202-5141 (US).

(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

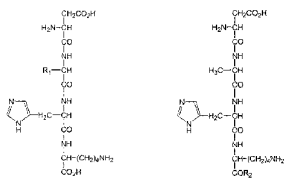
[Continued on next page]

(54) Title: USE OF COPPER CHELATORS TO INHIBIT THE INACTIVATION OF PROTEIN C



(57) Abstract: The present invention is based on the unexpected discovery that activated protein C (APC) is inactivated by copper. Accordingly, the invention provides improved methods of treating diseases and conditions treatable with APC which utilize a copper chelator to inhibit the inactivation of APC by copper.

WO 03/007686 A2



WO 03/007686 A2 

Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

USE OF COPPER CHELATORS TO INHIBIT
THE INACTIVATION OF PROTEIN CFIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to improved methods of treating diseases and conditions treatable with activated protein C (APC). In particular, the invention relates to methods of treating diseases and conditions treatable with APC which utilize a copper chelator to inhibit the inactivation of APC by copper.

10 BACKGROUND

Recombinant human activated protein C (APC) was recently approved for the treatment of severe sepsis (Xigris™, Eli Lilly, Indianapolis, IN), and APC may be useful in the treatment of coagulation disorders and severe inflammation. Bernard et al., *Crit. Care Med.* **29**, 2051-2059 (2001); Bernard et al., *N. Engl. J. Med.* **344**, 699-709 (2001); Mizutani et al., *Blood* **95**, 3781-3787 (2000); Taylor et al., *J. Clin. Invest.* **79**, 918-925 (1987); Shibata et al., *Circulation* **103**, 1799-1805 (2001). APC is believed to prevent microvascular thrombosis under physiological conditions and to help control pro-coagulant and pro-inflammatory reactions in diseases such as sepsis. Esmon, *Crit. Care Med.* **29**, S48-51 (2001); Hack et al., *Crit. Care Med.* **29**, S21-27 (2001). The mechanism of action of APC during sepsis is not completely understood, although it appears to be a combination of both anticoagulant and anti-inflammatory activities. Esmon, *Crit. Care Med.* **29**, S48-51 (2001).

APC is a serine protease that functions as an anticoagulant by binding to protein S and proteolytically inactivating factors Va and VIIIa and by stimulating fibrinolysis through neutralization of a plasminogen activator inhibitor. Walker et al., *FASEB J.* **6**, 2561-2567 (1992); Esmon, *Arterioscler. Thromb.* **12**, 135-145 (1992); van Hinsbergh et al., *Blood* **65**, 444-451 (1985). Precursor protein C is produced primarily in the liver. Activation is achieved by the removal of a dodecapeptide at the N-terminus of the heavy chain of protein C. The protein C pathway is initiated when thrombin binds to the endothelial cell surface protein, thrombomodulin, and protein C binds to the endothelial cell protein C receptor. By inactivating factors Va and VIIIa, APC limits the amount of thrombin formed. Esmon, *Arterioscler. Thromb.* **12**, 135-145 (1992).

APC anticoagulant activity can fluctuate in both acute and chronic disease. Some reports suggest that inhibition of APC activity may be pathogenically associated with diseases such as septic shock, disseminated intravascular coagulation (DIC), multiple organ

WO 03/007686

PCT/US02/22951

2

dysfunction syndrome, and atherosclerosis. Fourrier et al., *Chest* **101**, 816-823 (1992); Hoogendoorn et al. *Blood* **78**, 2283-2290 (1991); Marshall, *Crit. Care Med.* **29**, S99-106 (2001); Mezzano et al., *Br. J. Haematol.* **113**, 905-910 (2001). Decreased plasma APC activity and beneficial treatment with APC have been associated with critical diseases such as septic shock, purpura fulminans, deep vein thrombophlebitis, DIC, and multiple organ dysfunction syndrome. Esmon, *Crit. Care Med.* **29**, S48-51 (2001); Fourrier et al., *Chest* **101**, 816-823 (1992); Marshall, *Crit. Care Med.* **29**, S99-106 (2001). Several APC inhibitors have been identified, including a heparin-dependent, plasma serine protease protein C inhibitor (serpin), antithrombin III, alpha 1-antitrypsin, and alpha 2-macroglobulin. Esmon, *Arterioscler. Thromb.* **12**, 135-145 (1992); Hoogendoorn et al. *Blood* **78**, 2283-2290 (1991); Espana et al., *Blood* **77**, 1754-1760 (1991); Hermans et al., *Biochem. J.* **295**, 239-245 (1993); Espana et al., *Thromb. Res.* **59**, 593-608 (1990); Watanabe et al., *Am. J. Hematol.* **65**, 35-40 (2000).

As far as is known, there are no prior reports of copper inhibiting APC anticoagulant activity. Copper is normally bound to plasma carrier proteins such as ceruloplasmin, albumin, and macroglobulins in an equilibrium of both non-specific (exchangeable) and tight (non-exchangeable) binding sites. Linder et al., *Biochemistry of Copper* (Plenum Press, New York, 1991). However, critical illnesses like sepsis often cause generalized or localized ischemia and acidosis, which can release copper ions. Mizock et al., *Crit. Care Med.* **20**, 80-93 (1992); Pastores et al., *Am. J. Gastroenterol.* **91**, 1697-1710 (1996); Machiedo et al., *Arch. Surg.* **123**, 424-427 (1988); Berenshtein et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 3025-3034 (1997); Lamb et al., *FEBS Lett.* **338**, 122-126 (1994); Srinivas et al., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **48**, 495-500 (1988); Sussman et al., *Methods Enzymol.* **186**, 711-723 (1990); Halliwell et al., *Methods Enzymol.* **186**, 1-85 (1990). Free copper released by ischemia and acidosis during sepsis would be available to bind to endogenous or therapeutically administered APC.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is based on the unexpected discovery that activated protein C (APC) is inactivated by copper. Accordingly, the invention provides improved methods of treating diseases and conditions treatable with APC which utilize a copper chelator to inhibit the inactivation of APC by copper.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

3

One method of the invention comprises administering to an animal in need of treatment with APC an effective amount of a copper chelator to inhibit the inactivation of APC by copper. An effective amount of one of the following is also administered to the animal:

- 5 (a) APC;
- (b) protein C, an agent that increases the synthesis of protein C in the animal, or both;
- (c) an activator of protein C; or
- (d) a combination of one or more of (a), (b) and (c).

10 The protein C, the agent that increases the synthesis of protein C, and/or the activator of protein C are administered to the animal to increase the *in vivo* production of APC from protein C (endogenously produced protein C and/or protein C administered to the animal).

A second method of the invention comprises contacting an effective amount of a copper chelator with a composition comprising one of the following:

- 15 (a) APC;
- (b) protein C, an agent that increases the synthesis of protein C in the animal, or both;
- (c) an activator of protein C; or
- (d) a combination of one or more of (a), (b) and (c);

20 so as to bind any copper present in the composition. Then, an effective amount of the APC, protein C, the agent that increases the synthesis of protein C, the activator of protein C, or the combination of one or more of them is administered to an animal in need of treatment with APC.

25 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figures 1A-D: Formulas of tetrapeptide Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1] showing points of possible substitution.

Figures 2A-B: Schematic diagrams of the synthesis of derivatives of the tetrapeptide Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1] coming within the formula of Figure 1C (Figure 2A) and

30 Figure 1B (Figure 2B).

Figure 3A-B: Formulas of cyclohexane diamine derivatives.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

4

Figures 3C-D: Schematic diagrams of syntheses of cyclohexane diamine derivatives of the tetrapeptide Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1].

Figure 4: Formula of a tetraacetic acid derivative of the tetrapeptide Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1].

5 Figure 5: Formula of a bispyridylethylamine derivative of the tetrapeptide Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1].

Figures 6A-B: Formulas of mesoporphyrin IX with (Figure 6B) and without (Figure 6A) a bound metal ion M.

10 Figure 6C: Formula of mesoporphyrin IX derivative of the tetrapeptide Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1].

Figure 7: Formulas of monosaccharides.

Figure 8A: Formulas of peptide dimers according to the invention.

Figures 8B-C: Diagrams illustrating the synthesis of peptide dimers according to the invention.

15 Figure 9: Graph showing effects of copper (Cu) alone, human serum albumin (HSA) alone, and various ratios of HSA:Cu on activated protein C (APC) anticoagulant activity. The data are expressed as percent change from baseline APC activity (n = 3 for each bar, mean \pm standard deviation).

20 Figure 10: Graph showing effects of copper (Cu) alone, the tetrapeptide D-Asp D-Ala D-His D-Lys (d-DAHK) alone, and various ratios of d-DAHK:Cu on APC anticoagulant activity. The data are expressed as percent change from baseline APC activity (n = 3 for each bar, mean \pm standard deviation).

DETAILED DESCRIPTION OF THE PRESENTLY-PREFERRED EMBODIMENTS

25 Activated protein C (APC) has been reported to be effective in the treatment of the following diseases and conditions:

(a) an acquired hypercoagulable state or an acquired protein C deficiency associated with sepsis, septic shock, purpura fulminans, meningococcal sepsis, bone marrow or other transplantations, severe burns, pregnancy, major surgery, severe trauma, or adult respiratory distress syndrome (ARDS) (see, e.g., U.S. Patents Nos. 6,156,734 and 6,268,344 and PCT application WO 99/20293);

30

WO 03/007686

PCT/US02/22951

5

(b) diseases or conditions involving intravascular coagulation, such as deep vein thrombosis, pulmonary embolism, peripheral arterial thrombosis, emboli originating from the heart or peripheral arteries, acute myocardial infarction, thrombotic strokes and disseminated intravascular coagulation (DIC) (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,151,268);

5 (c) metastatic cancers and invasive cancers (see U.S. Patent No. 5,151,268);

(d) diseases or conditions associated with apoptosis, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, autoimmune diseases, viral infections, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, vasculitis, ischemic renal failure, insulin-dependent diabetes mellitus, pancreatitis, psoriasis, multiple sclerosis, Hashimoto's thyroiditis, Graves disease, systemic lupus erythematosus, autoimmune gastritis, fibrosing lung disease, HIV-induced lymphoma, fulminant viral hepatitis B, fulminant viral hepatitis C, chronic hepatitis, chronic cirrhosis, *H. pylori*-associated ulceration, atherosclerosis, cytoprotection during cancer treatment, chronic glomerulonephritis, osteoporosis, aplastic anemia, and myelodysplasia (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328);

15 (e) a disease or condition induced by nuclear factor kappa B (NF- κ B), such as neuronal degeneration diseases, graft versus host reactions, acute inflammatory conditions, systemic inflammatory responses, acute phase response, ischemic reperfusion injury, atherosclerosis, HIV infections, and cancer (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328);

(f) a disease or condition where TNF- α is a primary modulator of pathophysiology, such as Crohn's disease, ulcerative colitis, arthritis, acute peritoneal inflammation, and heart failure (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328);

(g) a disease or condition in which major histocompatibility complex (MHC) class I or HLA-B null allele is a modulator of immune function, such as organ transplantation, infectious diseases and autoimmune diseases (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328);

25 (h) a disease or condition where proliferating cell nuclear antigen (PCNA) or Gu protein is a regulator of cell growth and survival, such as cell growth of endothelial cells and angiogenesis (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328);

(i) a disease or condition due to endothelial cell activation and platelet adhesion, such as coronary artery atherosclerosis, arterial restenosis following balloon angioplasty, hypertension, cardiac failure, coronary disease after transplantation, and pregnancy-induced hypertension and pre-eclampsia (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328);

30

WO 03/007686

PCT/US02/22951

6

(j) a disease or condition where cell-cell adhesion is a modulator of pathophysiology (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328);

(k) diseases or conditions involving inflammation and neuropathological disorders, such as ischemia, ischemia reperfusion, Alzheimer's disease, Huntington disease or chorea, hypoxia, cell death due to epilepsy, amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis, mental retardation, neurodegenerative changes resulting from aging, inflammatory bowel diseases (*e.g.*, Crohn's disease and ulcerative colitis), shock, glomerulonephritis, coronary arterial occlusion, cardiac arrhythmias, congestive heart failure, cardiomyopathy, bronchitis, acute allergic reactions and hypersensitivity, trauma, graft/transplant rejection, myocarditis, insulin dependent diabetes, arthritis, chronic inflammatory conditions of the skin, and ARDS (see, *e.g.*, PCT applications WO 01/56532 and WO 01/72328);

(l) diseases or conditions where anti-calreticulin antibodies are a modulator of pathophysiology, such as systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, onchocerciasis, rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease and complete congenital heart block (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328);

(m) diseases or conditions associated with elevated levels of thrombospondin (TSP-1) and TGF- β , such as breast cancer, gastrointestinal malignancies, gynecological cancers, lung cancer, kidney fibrosis, and cardiac hypertrophy following myocardial infarction (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328); and

(n) diseases or conditions associated with elevated levels of RDC1, such as bacterial, fungal, protozoan and viral infections, pain, cancers, anorexia, bulimia, asthma, Parkinson's disease, acute heart failure, hypotension, hypertension, urinary retention, osteoporosis, angina pectoris, ulcers, allergies, benign prostatic hypertrophy, and psychotic and neurological disorders (*e.g.*, anxiety, schizophrenia, manic depression, delirium, dementia, severe mental retardation and dyskinesias such as Huntington's disease or Gilles de la Tourette's syndrome) (see, *e.g.*, PCT application WO 01/72328).

Methods of making APC, suitable pharmaceutical compositions containing APC, and effective doses and schedules for administration of APC for these diseases and conditions are known. See, *e.g.*, U.S. Patents Nos. 6,395,270, 6,268,344, 6,162,629, 6,159,468, 6,156,734, 5,831,025, 5,330,907, 5,151,268, and 4,981,952, PCT applications WO 89/12685, WO 98/48818, WO 99/20293, WO 01/56532, WO 01/59084, and WO 01/72328, and EP

WO 03/007686

PCT/US02/22951

7

patent no. 726,076, the complete disclosures of all of which are incorporated herein by reference.

In particular, APC may be prepared by *in vitro* activation of protein C purified from plasma or prepared by recombinant DNA techniques by methods well known in the art. See, 5 *e.g.*, U.S. Patents Nos. 4,981,952, 5,151,268, 5,831,025, 6,156,734, 6,268,344, and 6,395,270. Alternatively, APC may be prepared directly by recombinant DNA techniques. See, *e.g.*, U.S. Patents Nos. 4,981,952, 5,151,268, 6,156,734, 6,268,344 and 6,395,270. APC may be from any species of animal, but human APC is preferred. Fragments and derivatives of APC can also be used in the practice of the invention, provided that they exhibit the 10 activities described herein. See, *e.g.*, U.S. Patents Nos. 5,151,268, 5,453,373 and 5,516,650 and PCT applications WO 89/12685, WO 01/56532, WO 01/59084, and WO 01/72328.

Suitable pharmaceutical compositions of APC comprise the APC and a pharmaceutically-acceptable carrier. See, *e.g.*, U.S. Patents Nos. 6,395,270 and 6,159,468 and PCT applications WO 98/48818, WO 01/56532 and WO 01/72328. A preferred 15 composition is one that is a stable lyophilized product of high purity comprising a bulking agent (such as sucrose, mannitol, trehalose, and raffinose), a salt (such as sodium chloride and potassium chloride), a buffer (such as sodium citrate, Tris-acetate, and sodium phosphate), and APC. A preferred stable lyophilized composition will comprise a weight ratio of about 1 part APC, between about 7-8 parts salt, and between about 5-7 parts bulking 20 agent. An example of such a stable lyophilized composition is: 5.0 mg APC, 30 mg sucrose, 38 mg NaCl, and 7.56 mg citrate, pH 6.0, per vial.

APC is preferably administered parenterally (preferably intravenously), most preferably by continuous intravenous infusion. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 6,268,344 and PCT application WO 01/72328. Preferably, from about 0.01 $\mu\text{g/kg/hr}$ to about 50 $\mu\text{g/kg/hr}$ of 25 APC, more preferably from about 1 $\mu\text{g/kg/hr}$ to about 40 $\mu\text{g/kg/hr}$, even more preferably from about 10 $\mu\text{g/kg/hr}$ to about 30 $\mu\text{g/kg/hr}$, most preferably about 24 $\mu\text{g/kg/hr}$, are administered to a human patient by continuous infusion for a period of from about 1 hour to about 240 hours, more preferably for a period of from about 1 hour to about 144 hours, most preferably from about 24 hours to about 96 hours. APC may also be administered by 30 injecting a dose of from about 0.01 mg/kg/day to about 10 mg/kg/day, B.I.D. (2 times a day), for one to ten days, most preferably for three days. As another alternative, APC can be

WO 03/007686

PCT/US02/22951

8

administered by injecting a portion (1/3 to 1/2) of the appropriate dose per hour as a bolus injection over a time of from about 5 minutes to about 120 minutes, followed by continuous infusion of the appropriate dose for up to 240 hours. The preferred plasma levels obtained from the amount of APC administered will be from about 0.02 ng/ml to about 500 ng/ml, more preferably from about 2 ng/ml to about 200 ng/ml, most preferably from about 35 ng/ml to about 65 ng/ml.

In other alternatives, APC can be administered by local delivery through an intracoronary catheter as an adjunct to high-risk angioplasty (with and without stenting and with or without combination antithrombotic therapy with or without anti-platelet agents). The amount of APC administered will be from about 0.01 mg/kg/day to about 10.0 mg/kg/day by continuous infusion, bolus injection, or a combination thereof. In another alternative, APC can be injected directly into joints. In yet another alternative, APC can be administered subcutaneously at a dose of 0.01 mg/kg/day to about 10.0 mg/kg/day to ensure a slower release into the bloodstream. Formulation of subcutaneous preparations will be done using known methods to prepare such pharmaceutical compositions.

A particularly preferred formulation of APC is the product sold by Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana, under the trademark Xigris™. Xigris™ is supplied as a sterile, lyophilized powder for intravenous infusion. The 5 mg vials of Xigris™ contain 5.3 mg/vial of human recombinant APC, 31.8 mg/vial sucrose, 40.3 mg/vial NaCl, and 10.9 mg/vial sodium citrate, and the 20 mg vials of Xigris™ contain 20.8 mg/vial of human recombinant APC, 124.9 mg/vial sucrose, 158.1 mg/vial NaCl, and 42.9 mg/vial sodium citrate. The vials are reconstituted with Sterile Water for Injection, USP, to give a concentration of about 2 mg/ml APC, and this diluted APC is then added to 0.9% Sodium Chloride Injection to give a concentration of from about 100 to about 1000 µg/ml APC for administration to a patient. For severe sepsis, Xigris™ is administered by continuous infusion at a rate of from about 12 µg/kg/hr to about 30 µg/kg/hr to give a steady state plasma concentration of about 45 ng/ml APC after about two hours of infusion.

The diseases and conditions listed above can also be treated by increasing endogenous production of APC. See, e.g., PCT application WO 93/09807. This can be accomplished in a variety of ways. For instance, this can be accomplished by administering an effective amount of protein C which will be activated *in vivo* by the endogenous protein C pathway

WO 03/007686

PCT/US02/22951

9

to produce APC. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,151,268 and PCT application WO 93/09807. As noted above, protein C can be purified from plasma or can be made by recombinant DNA techniques. See, *e.g.*, U.S. Patents Nos. 4,959,318, 4,981,952, 5,093,117, 5,151,268, 5,571,786, 6,156,734, 6,268,344, and 6,395,270. Suitable pharmaceutical compositions comprising protein C are known (see, *e.g.*, U.S. Patents Nos. 5,151,268 and 5,571,786). Protein C is preferably administered parenterally, most preferably intravenously, at a dose of from about 1 µg/day to about 500 mg/day or from about 1 IU/kg/day to about 6000 IU/kg/day for a human patient. See, *e.g.*, U.S. Patents Nos. 5,151,268 and 5,571,786. One IU is that amount of APC amidolytic activity in 1 ml of normal plasma.

10 Endogenous production of APC can also be increased by administering an amount of an agent that increases the synthesis of protein C in the animal. See, *e.g.*, PCT application WO 93/09807. Suitable agents include anabolic steroids (*e.g.*, danazolol). See, *e.g.*, PCT application WO 93/09807.

In addition, endogenous production of APC can be increased by administering an amount of a protein C activator effective to cause the production of APC *in vivo* from endogenously synthesized protein C and/or from co-administered protein C. See, *e.g.*, PCT application WO 93/09807. A protein C activator is any compound that causes or increases the generation of APC. Suitable protein C activators include thrombin, α -thrombin, active site acylated thrombin, thrombin analogs and mutants (*e.g.*, thrombin E192Q and thrombin K52E), soluble thrombin-thrombomodulin complexes, agents that would prevent clearance or decay of thrombin-thrombomodulin complexes, agents that enhance the synthesis or delay the clearance of thrombomodulin, a venom (such as Protac or Russel Viper venom), factor Xa, plasmin, trypsin, and any other venom, enzyme or compound capable of causing or increasing the generation of APC from protein C. See, *e.g.*, PCT application WO 93/09807.

25 Preferred protein C activators are thrombin and active site acylated thrombin. The protein C activator is preferably administered parenterally, most preferably intravenously. See, *e.g.*, PCT application WO 93/09807. Preferably, an amount of the protein C activator is administered which increases the blood level of APC 3-5 times over the normal level and/or that gives a blood concentration of APC of from about 10 ng/ml to about 760 ng/ml. See

30 PCT application WO 93/09807. For thrombin, a dosage of from about 0.05 U/kg/min to about 2 U/kg/min is effective to achieve these levels of APC. See PCT application WO

WO 03/007686

PCT/US02/22951

10

93/09807. For active site acylated thrombin, a dosage is used which will produce (essentially in a "controlled release" manner) from about 0.05 U/kg/min to about 2 U/kg/min of thrombin activity as the active site is deacylated *in vivo*. See PCT application WO 93/09807. One unit (U) of thrombin is generally known in the art and means equivalent fibrinogen clotting activity to one NIH unit of reference enzyme using the same assay. See PCT application WO 93/09807 and the Fenton et al., *Thromb. Res.*, **4**, 809-817 (1974) reference cited therein..

Notwithstanding the foregoing, it is understood by those skilled in the art that the dosage amount of the APC, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, and/or protein C activator will vary with the particular compound or combination of compounds employed, the disease or condition to be treated, the severity of the disease or condition, the route(s) of administration, the rate of excretion of the compound, the duration of the treatment, the identify of any other drugs being administered to the animal, the age, size and species of the animal, and like factors known in the medical and veterinary arts. In general, a suitable daily dose of a compound or combination of compounds will be that amount which is the lowest dose effective to produce a therapeutic effect. The dosage amount, dosage form and mode of administration will be determined by an attending physician or veterinarian within the scope of sound medical judgment. Effective dosage amounts, dosage forms, and modes of administration for the various compounds and combination(s) of compounds can be determined empirically and making such determinations is within the skill of the art.

The present invention provides improved methods of treating a disease or condition treatable with APC. The present invention is based on the unexpected discovery that APC is inactivated by copper, and the improved methods of the invention utilize a copper chelator to inhibit the inactivation of APC by copper. As used herein, "inhibit" and variants thereof mean to reduce or prevent the inactivation of APC by copper and/or to wholly or partially reactivate or restore the activity of APC that has been inactivated by copper. As used herein, "inactivate" and variants thereof mean to reduce or completely abolish the activity of APC.

Any copper chelator may be used in the practice of the present invention. As used herein, "copper chelator" means any compound that binds Cu(II) ions.

Preferred copper chelators for use in the practice of the invention include certain albumins which possess an N-terminal copper binding site of high affinity and fragments of these albumins which comprise the N-terminal copper binding site. These albumins include human, rat and bovine serum albumins. Particularly preferred is human serum albumin or

WO 03/007686

PCT/US02/22951

11

a fragment thereof that comprises the high-affinity N-terminal copper-binding sequence Asp Ala His. Methods of preparing albumin and fragments of albumin from plasma/serum and by recombinant DNA techniques are well known in the art. See, e.g., U.S. Patents Nos. 4,990,447, 5,037,744, 5,250,662, 5,260,202, 5,380,712, 5,440,018, 5,503,993, 5,521,287, 5,707,828, 5,728,553, 5,756,313, 5,759,802, 5,849,874, 5,879,907, 6,034,221, and 6,150,504, PCT applications nos. WO 84/03511, WO 89/02467, WO 96/37515, WO 97/31947, WO 99/65943 and WO 01/72959, and EP 73646, 206733 and 308381.

Additional preferred copper chelators for use in the practice of the invention are peptides of the formula:

10 $P_1 - P_2$,

wherein:

P_1 is:

Xaa₁ Xaa₂ His; or

Xaa₁ Xaa₂ His Xaa₃;

15 P_2 is (Xaa_n)_n;

Xaa₁ is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, isoaspartic acid, asparagine, glutamic acid, isoglutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α-hydroxymethylserine;

20 Xaa₂ is glycine, alanine, β-alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α-hydroxymethylserine;

25 Xaa₃ is glycine, alanine, valine, lysine, arginine, ornithine, aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine or tryptophan;

Xaa₄ is any amino acid; and

n is 0-100;

or a physiologically-acceptable salt thereof.

30 P_1 is a metal-binding peptide sequence that binds transition metal ions of Groups 1b-7b or 8 of the Periodic Table of elements (including V, Co, Cr, Mo, Mn, Ba, Zn, Hg, Cd, Au, Ag, Co, Fe, Ni, and Cu) and other metal ions (including As, Sb and Pb). In particular,

WO 03/007686

PCT/US02/22951

12

P₁ binds Cu(II), Ni(II), Co(II), and Mn(II) with high affinity, and P₁ is a particularly effective copper chelator for inhibiting the inactivation of APC by copper. In addition, it is known that the binding of metal ions by P₁ inhibits (*i.e.*, reduces or prevents) the production of reactive oxygen species (ROS) and/or the accumulation of ROS caused by these metal ions and/or targets the damage done by ROS that may still be produced by the bound metal ions to the peptide itself. As a result, the damage that can be caused by ROS in the absence of the binding of the metal ions to P₁ is reduced. Accordingly, these peptides will provide added advantages in treating diseases and conditions treatable with APC which also involve the production and/or accumulation of ROS. Such diseases and conditions include angioplasty, ARDS, angiogenic diseases, atherosclerosis, arthritis, asthma, autoimmune diseases, cancer, colitis, Crohn's disease, diabetes, emphysema, head injury and traumatic brain injury, infectious diseases, inflammation and inflammatory diseases, metastasis, ischemia, neoplastic diseases, neurological diseases, neurological trauma, neurodegenerative diseases (*e.g.*, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's chorea, Parkinson's disease, multiple sclerosis, and senile dementia), pancreatitis, peripheral vascular disease, pulmonary embolism, renal diseases, reperfusion, sepsis, shock, surgery, transplantation, trauma, vasculitis, and many others (see, *e.g.*, U.S. patent applications numbers 10/_____, filed June 27, 2002, 10/076,071, filed February 13, 2002, and 09/678,202, filed September 29, 2000, and PCT applications PCT/US00/26952, filed September 30, 2000 (published as WO 01/25265), and PCT/US02/04275, filed February 13, 2002, the complete disclosures of which are incorporated herein by reference).

In P₁, Xaa₁ is most preferably Asp, Xaa₂ is most preferably Ala, and Xaa₃ is most preferably Lys (see above). Thus, the preferred sequences of P₁ are Asp Ala His and Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1]. Most preferably the sequence of P₁ is Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1]. Asp Ala His is the minimum sequence of the N-terminal metal-binding site of human serum albumin necessary for the high-affinity binding of Cu(II) and Ni(II), and Lys has been reported to contribute to the binding of these metal ions to this site. Also, Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1] has been found by mass spectrometry to bind Fe(II) and to pass through a model of the blood brain barrier. Other preferred sequences for P₁ include Thr Leu His (the N-terminal sequence of human α -fetoprotein), Arg Thr His (the N-terminal sequence of human sperm protamin HP2) and HMS HMS His (a synthetic peptide reported to form

WO 03/007686

PCT/US02/22951

13

extremely stable complexes with copper; see Mlynarz et al., *Speciation 98: Abstracts*, 4/21/98, <http://www.jate.uszeged.hu/spec98/abstr/mlynarz.html>).

P_2 is $(Xaa)_n$, wherein Xaa is any amino acid and n is 0-100. When n is large (n > about 20), the peptides will be effective extracellularly. Smaller peptides are better able to enter cells, and smaller peptides can, therefore, be effective both intracellularly and extracellularly. Smaller peptides are also less subject to proteolysis. Therefore, in P_2 , preferably n is 0-10, more preferably n is 0-5, and most preferably n is 0. Although P_2 may have any sequence, P_2 preferably comprises a sequence which (1) binds a transition metal, (2) enhances the ability of the peptide to penetrate cell membranes and/or reach target tissues (e.g., to be able to cross the blood brain barrier), or (3) otherwise stabilizes or enhances the performance of the peptide. P_2 together with P_1 may also be the N-terminal sequence of a protein having an N-terminal metal-binding site with high affinity for copper and nickel, such as human, rat or bovine serum albumin. In the case where n = 100, the peptide would have the sequence of approximately domain I of these albumins.

The sequences of many peptides which comprise a binding site for transition metal ions are known. See, e.g., U.S. Patents Nos. 4,022,888, 4,461,724, 4,665,054, 4,760,051, 4,767,753, 4,810,693, 4,877,770, 5,023,237, 5,059,588, 5,102,990, 5,118,665, 5,120,831, 5,135,913, 5,145,838, 5,164,367, 5,591,711, 5,177,061, 5,214,032, 5,252,559, 5,348,943, 5,443,816, 5,538,945, 5,550,183, 5,591,711, 5,690,905, 5,759,515, 5,861,139, 5,891,418, 5,928,955, and 6,017,888, PCT applications WO 94/26295, WO 99/57262 and WO 99/67284, European Patent application 327263, Lappin et al., *Inorg. Chem.*, **17**, 1630-34 (1978), Bossu et al., *Inorg. Chem.*, **17**, 1634-40 (1978), Chakrabarti, *Protein Eng.*, **4**, 57-63 (1990), Adman, *Advances In Protein Chemistry*, **42**, 145-97 (1991), Cotellet et al., *J. Inorg. Biochem.*, **46**, 7-15 (1992), Canters et al., *FEBS*, **325**, 39-48 (1993), Regan, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 257-281 (1993), Ueda et al., *J. Inorg. Biochem.*, **55**, 123-30 (1994), Ueda et al., *Free Radical Biol. Med.*, **18**, 929-33 (1995), Regan, *TIBS*, **20**, 280-85 (1995), Ueda et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 359-61 (1995), Bal et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 906-914 (1997), Bal et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 915-21 (1997), Koch et al., *Chem. Biol.*, **4**, 549-60 (1997), Kowalik-Jankowska et al., *J. Inorg. Biochem.*, **66**, 193-96 (1997), Harford and Sarkar, *Acc. Chem. Res.*, **30**, 123-130 (1997), Prince et al., *TIBS*, **23**, 197-98 (1998), Mlynarz, et al., *Speciation 98: Abstracts*, <http://www.jate.u->

WO 03/007686

PCT/US02/22951

14

[szege.hu/~spec98/abstr/mlynar.html](http://www.szege.hu/~spec98/abstr/mlynar.html), and Aitken, *Molec. Biotechnol.*, **12**, 241-53 (1999), Whittall et al., *Protein Science*, **9**, 332-343 (2000). P₂ may comprise the sequence of one or more of the metal-binding sites of these peptides.

Preferably, P₂ will comprise the sequence a copper-binding site and/or of an iron-binding site so that P₁ - P₂ will be better able to inhibit the inactivation of APC by copper and/or to inhibit the formation and/or accumulation of ROS. The sequences of many peptides which comprise a copper-binding site are known. See, e.g., U.S. Patents Nos. 4,022,888, 4,461,724, 4,665,054, 4,760,051, 4,767,753, 4,810,693, 4,877,770, 5,023,237, 5,059,588, 5,102,990, 5,118,665, 5,120,831, 5,135,913, 5,145,838, 5,164,367, 5,177,061, 5,214,032, 5,252,559, 5,348,943, 5,443,816, 5,538,945, 5,550,183, 5,591,711, 5,690,905, 5,759,515, 5,861,139, 5,891,418, 5,928,955, and 6,017,888, PCT applications WO 94/26295, WO 99/57262, WO 99/67284 and WO 00/36136, European Patent application 327263, Lappin et al., *Inorg. Chem.*, **17**, 1630-34 (1978), Chakrabarti, *Protein Eng.*, **4**, 57-63 (1990), Adman, *Advances In Protein Chemistry*, **42**, 145-97 (1991), Canters et al., *FEBS*, **325**, 39-48 (1993), Regan, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 257-281 (1993), Ueda et al., *J. Inorg. Biochem.*, **55**, 123-30 (1994), Ueda et al., *Free Radical Biol. Med.*, **18**, 929-33 (1995), Regan, *TIBS*, **20**, 280-85 (1995), Ueda et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 359-61 (1995), Bal et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 906-914 (1997), Bal et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 915-21 (1997), Koch et al., *Chem. Biol.*, **4**, 549-60 (1997), Kowalik-Jankowska et al., *J. Inorg. Biochem.*, **66**, 193-96 (1997), Harford and Sarkar, *Acc. Chem. Res.*, **30**, 123-130 (1997), Prince et al., *TIBS*, **23**, 197-98 (1998), Mlynarz, et al., *Speciation 98: Abstracts*, <http://www.jate.u-szege.hu/~spec98/abstr/mlynar.html>, and Aitken, *Molec. Biotechnol.*, **12**, 241-53 (1999), Whittall et al., *Protein Science*, **9**, 332-343 (2000). The sequences of peptides which comprise an iron-binding site are known. See, e.g., U.S. Patents Nos. 4,022,888, 4,461,724, 5,102,990, 5,120,831, 5,252,559, 5,443,816, 5,550,183, 5,690,905, 5,759,515, 5,891,418, 5,928,955, PCT applications WO 99/57262, WO 99/67284 and WO 00/36136, European Patent application 327263, Lappin et al., *Inorg. Chem.*, **17**, 1630-34 (1978), Chakrabarti, *Protein Eng.*, **4**, 57-63 (1990), Adman, *Advances In Protein Chemistry*, **42**, 145-97 (1991), Prince et al., *TIBS*, **23**, 197-98 (1998), and Aitken, *Molec. Biotechnol.*, **12**, 241-53 (1999), Whittall et al., *Protein Science*, **9**, 332-343 (2000).

WO 03/007686

PCT/US02/22951

15

When P_2 comprises a metal-binding site, it preferably has a sequence which includes a short spacer sequence between P_1 and the metal binding site of P_2 , so that the metal-binding sites of P_1 and P_2 may potentially cooperatively bind metal ions (similar to a 2:1 peptide:metal complex which gives tighter binding than a 1:1 complex). Preferably, the
 5 spacer sequence is composed of 1-5, preferably 1-3, neutral amino acids. Thus, the spacer sequence may be Gly, Gly Gly, Gly Ala Gly, Pro, Gly Pro Gly, etc.

When P_2 comprises a metal-binding site, it preferably has a sequence which includes a short spacer sequence between P_1 and the metal binding site of P_2 , so that the metal-binding sites of P_1 and P_2 may potentially cooperatively bind metal ions (similar to a 2:1
 10 peptide:metal complex which gives tighter binding than a 1:1 complex). Preferably, the spacer sequence is composed of 1-5, preferably 1-3, neutral amino acids. Thus, the spacer sequence may be Gly, Gly Gly, Gly Ala Gly, Pro, Gly Pro Gly, etc.

In particular, when P_2 comprises a metal-binding site, it preferably comprises one of the following sequences: $(Xaa_4)_m Xaa_3 Xaa_2 His Xaa_1$ or $(Xaa_4)_m Xaa_3 Xaa_2 His Xaa_1 Xaa_4$, and Xaa_4 are defined above, and m is 0-5, preferably 1-3. When P_2 comprises one of these
 15 sequences, it can bind copper. The Xaa_4 amino acid(s), if present, form(s) a short spacer sequence between P_1 and the metal-binding site of P_2 , so that the metal-binding sites of P_1 and P_2 may cooperatively bind copper and other metals, and Xaa_4 is preferably a neutral amino acid (see the previous paragraph). Xaa_3 is an amino acid which comprises a δ -amino group
 20 (preferably Orn or Lys, more preferably Orn) having the Xaa_4 amino acid(s), if present, or P_1 attached to it by means of the δ -amino group. See Harford and Sarkar, *Acc. Chem. Res.*, **30**, 123-130 (1997) and Shullenberger et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11038-11039 (1993) (as a result of this means of attachment, the α -amino group of Xaa_3 can still participate in binding copper and nickel by means of the ATCUN motif). Thus, for instance, $P_1 - P_2$ could
 25 be Asp Ala His Gly Gly (δ)-Orn Ala His [SEQ ID NO:2].

In addition, P_2 may comprise one of the following sequences: $[(Xaa_4)_m Xaa_3 Xaa_2 His Xaa_1]_n$, $[(Xaa_4)_m Xaa_3 Xaa_2 His]_n$, $[(Xaa_4)_m Xaa_3 Xaa_2 His Xaa_1 (Xaa_4)_m Xaa_3 Xaa_2 His]_n$, and $[(Xaa_4)_m Xaa_3 Xaa_2 His (Xaa_4)_m Xaa_3 Xaa_2 His Xaa_1]_n$, wherein Xaa_2 , Xaa_3 , Xaa_4 , Xaa_1 and m
 30 are defined and described above, and n is 2-100. In this manner metal-binding polymers that can bind copper may be formed.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

16

In another preferred embodiment, P₂ comprises a peptide sequence that can bind Cu(I). Cu(II) is converted to Cu(I) in the presence of ascorbic acid or other reducing agents, and the Cu(I) reacts with oxygen to produce ROS. P₁ can bind Cu(II) tightly (see above) and is very effective by itself in chelating copper and inhibiting the production of ROS.

5 However, it would be desirable to also employ a P₂ which could bind Cu(I).

Peptide sequences which can bind Cu(I) are known in the art. See, e.g., Pickering et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9498-9505 (1993); Winge et al., in *Bioinorganic Chemistry Of Copper*, pages 110-123 (Karlin and Tyeklar, eds., Chapman & Hall, New York, NY, 1993); Koch et al., *Chem & Biol.*, **4**, 549-560 (1997); Cobine et al., in *Copper Transport And Its Disorders*, pages 153-164 (Leone and Mercer eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 10 New York, NY, 1999). These sequences include:

Met Xaa₄ Met,
 Met Xaa₄ Xaa₄ Met,
 Cys Cys,
 15 Cys Xaa₄ Cys,
 Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys,
 Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys,
 Gly Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:3],
 Gly Met Thr Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:4], and
 20 Gly Met Thr Cys Ala Asn Cys [SEQ ID NO:5],

wherein Xaa₄ is defined above. Glutathione (γ-Glu Cys Gly) is also known to bind Cu(I). Additional Cu(I)-binding peptide sequences can be identified using a metallopeptide combinatorial library as described in, e.g., PCT application WO 00/36136. Preferably, the Cu(I)-binding peptide comprises the sequence Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys (e.g., Gly Met Xaa₄ Cys 25 Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:3], more preferably Gly Met Thr Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:4], most preferably Gly Met Thr Cys Ala Asn Cys [SEQ ID NO:5]).

To enhance the ability of the P₁ - P₂ peptide to penetrate cell membranes and/or reach target tissues, P₂ is preferably hydrophobic or an arginine oligomer (see Rouhi, *Chem. & Eng. News*, 49-50 (January 15, 2001)). When P₂ is hydrophobic, it preferably contains 1-3 30 hydrophobic amino acids (e.g., Gly Gly), preferably D-amino acids. A hydrophobic P₂ may be particularly desirable for uses of P₁ - P₂ where P₁ - P₂ must cross the blood brain barrier.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

17

The arginine oligomer preferably contains 6-9 Arg residues, most preferably 6-9 D-Arg residues (see Rouhi, *Chem. & Eng. News*, 49-50 (January 15, 2001)). The use of a P_2 which is an arginine oligomer may be particularly desirable when $P_1 - P_2$ is to be administered topically or transdermally.

- 5 The amino acids of the peptide may be L-amino acids, D-amino acids, or a combination thereof. Preferably, at least one of the amino acids of P_1 is a D-amino acid (preferably Xaa_i and/or His), except for β -Ala, when present. Most preferably, all of the amino acids of P_1 , other than β -Ala, when present, are D-amino acids. Also, preferably about 50% of the amino acids of P_2 are D-amino acids, and most preferably all of the amino acids
- 10 of P_2 are D-amino acids. D-amino acids are preferred because peptides containing D-amino acids are resistant to proteolytic enzymes, such as those that would be encountered upon administration of the peptide to an animal (including humans). Also, the use of D-amino acids would not alter the ability of the peptide to bind metal ions, including the ability of the peptide to bind copper with high affinity.
- 15 The peptides of the invention may be made by methods well known in the art. For instance, the peptides, whether containing L-amino acids, D-amino acids, or a combination of L- and D-amino acids, may be synthesized by standard solid-phase peptide synthesis methods. Suitable techniques are well known in the art, and include those described in Merrifield, in *Chem. Polypeptides*, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds. 1973);
- 20 Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149 (1963); Davis et al., *Biochem. Int'l.*, 10, 394-414 (1985); Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (1969); U.S. Patents Nos. 3, 941,763 and 5,786,335; Finn et al., in *The Proteins*, 3rd ed., vol. 2, pp. 105-253 (1976); and Erickson et al. in *The Proteins*, 3rd ed., vol. 2, pp. 257-527 (1976). See also, Polish Patent 315474 (synthesis of HMS-containing peptides) and Shullenberger et al., *J. Am. Chem. Soc.*,
- 25 115, 1103811039 (1993) (synthesis of (δ)-Om-containing peptides). Alternatively, the peptides may be synthesized by recombinant DNA techniques if they contain only L-amino acids. Recombinant DNA methods and suitable host cells, vectors and other reagents for use therein, are well known in the art. See, e.g., Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1982), Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- 30

WO 03/007686

PCT/US02/22951

18

The invention further comprises derivatives of the peptide $P_1 - P_2$, whether composed of L-amino acids, D-amino acids, or a combination of L- and D-amino acids, which are more resistant to proteolytic enzymes, more lipid soluble (to allow the peptides to more readily penetrate cell membranes and/or reach target organs, such as the brain), or both. As illustrated in Figure 1A, P_1 can be modified in the regions indicated by the arrows without altering the metal binding function of P_1 . In particular, P_1 can be substituted at carbons 1 or 2 with R_1 , and the terminal -COOH of P_1 can be substituted with protecting group R_2 (Figures 1B-D). P_2 can be modified in ways similar to those described for P_1 to make P_2 more resistant to proteolytic enzymes, more lipid soluble, or both.

R_1 can be a straight-chain or branched-chain alkyl containing from 1 to 16 carbon atoms, and the term "alkyl" includes the R and S isomers. R_1 can also be an aryl or heteroaryl containing 1 or 2 rings. The term "aryl" means a compound containing at least one aromatic ring (e.g., phenyl, naphthyl, and diphenyl). The term "heteroaryl" means an aryl wherein at least one of the rings contains one or more atoms of S, N or O. These substitutions do not substantially decrease the ability of P_1 to bind metal ions. In particular, the ability of P_1 to bind copper with high affinity is not decreased by these substitutions. For instance, some of the substituents, such as a n-butyl attached to carbon 2 (see Figure 1C, R_1 is n-butyl) should increase the affinity of the peptide for metal ions, such as copper, due to the inductive effect of the alkyl group. Substitution of carbon 2 (Figure 1C) with an aryl, heteroaryl, or a long chain alkyl (about 6-16 carbon atoms) should enhance transport of the peptide across lipid membranes.

As noted above, methods of synthesizing peptides by solid phase synthesis are well known. These methods can be modified to prepare the derivatives shown in Figures 1B-C. For example, the derivative of P_1 illustrated in Figure 1C, wherein R_1 is octyl, can be prepared as illustrated in Figure 2A. In Figure 2A, the elliptical element represents the polymer resin and R_p is a standard carboxyl protecting group. As illustrated in Figure 2A, octanoic acid (freshly distilled) is treated with dry bromine followed by phosphorus trichloride. The mixture is heated to about 100°C and kept at that temperature for 4 hours. α -Bromooctanoic acid is obtained as a colorless liquid upon distillation. Amination of the bromoacid is achieved by allowing the acid and an ammonia solution to stand at 40-50° C for 30 hours. The octyl derivative of the amino acid is obtained by removing ammonium

WO 03/007686

PCT/US02/22951

19

bromide with methanol washes. Classical resolution methods give the desired optically-pure D-form. Other derivatives wherein R_1 is an alkyl, aryl or heteroaryl can be prepared in the manner illustrated in Figure 2A.

In addition, the derivative of P_1 illustrated in Figure 1B, wherein R_1 is phenyl, can be prepared as illustrated in Figure 2B. In Figure 2B, Polymer is the resin, t-Bu is t-butyl, and Bz is benzyl. Other derivatives wherein R_1 is an alkyl, aryl or heteroaryl can be prepared in the manner illustrated in Figure 2B.

R_2 can be $-NH_2$, $-NHR_1$, $-N(R_1)_2$, $-OR_1$, or R_1 (see Figure 1D), wherein R_1 is defined above. These derivatives can be prepared as the last step of a solid-phase peptide synthesis before the peptide is removed from the resin by methods well known in the art. Substitutions with R_2 do not substantially decrease the ability of P_1 to bind metal ions.

In addition, P_1 and P_2 can be substituted with non-peptide functional groups that bind metal ions. These metal-binding functional groups can be attached to one or more pendant groups of the peptide, and the resulting peptide derivatives will possess one or more sites that are capable of binding metal ions, in addition to the binding site provided by P_1 and, optionally, the binding site provided by P_2 . As a consequence, the ability of such peptide derivatives to bind metal ions is improved as compared to the corresponding unmodified peptide. For instance, the peptide derivative can bind two of the same type of metal ion instead of one (e.g., two Cu(II)), the peptide derivative can bind two different metal ions instead of one type of metal ion (e.g., one Cu(II) and one Fe(III)), or the peptide derivative can bind one metal ion better (e.g., with greater affinity) than the corresponding unmodified peptide.

Metal-binding functional groups include polyamines (e.g., diamines, triamines, etc.) which can bind copper. Suitable diamines include 1,2-alkyldiamines, preferably alkyl diamines wherein the alkyl contains 2-10 carbon atoms (e.g., $H_2N - (CH_2)_n - NH_2$, wherein $n = 2-10$). Suitable diamines also include 1,2-aryldiamines, preferably benzene diamines (e.g., 1,2-diaminobenzene). Suitable diamines further include 1,2-cyclic alkane diamines. "Cyclic alkanes" are compounds containing 1-3 rings, each containing 5-7 carbon atoms. Preferably the cyclic alkane diamine is 1,2-diaminocyclohexane (cyclohexane diamine).

A particularly preferred diamine is 1,2-diaminocyclohexane (Figures 3A-B). Previous studies carried out by Rao & P. Williams (*J. Chromatography A*, **693**, 633 (1995))

WO 03/007686

PCT/US02/22951

20

have shown that a cyclohexane diamine derivative (Figure 3A, where PYR is pyridine) binds to a variety of metal ions. The resulting metal chelator has been successfully used to resolve amino acids and peptides, showing that the molecule has a very high affinity for α -amino acids, forming a very stable coordination complex, which is unique in many respects. 1,2-Diaminocyclohexane possesses a reactive amino functional group to which a peptide of the invention can be attached. See Figure 3B, where M is a metal ion and at least one R_4 is -alkyl-CO-peptide, -aryl-CO-peptide, -aryl-alkyl-CO-peptide, or -alkyl-aryl-CO-peptide (see also Figures 3C-D). The other R_4 may be the same or may be -alkyl-COOH, -aryl-COOH, -aryl-alkyl-COOH, or alkyl-aryl-COOH. Derivatives of the type shown in Figure 3B will have several metal-binding sites and can, therefore, be expected to bind metal ions more readily than the unsubstituted peptide. Further, due to the presence of the cyclohexane functionality, the compound will possess lipid-like characteristic which will aid its transport across lipid membranes.

Cyclohexane diamine derivatives of the peptides of the invention can be prepared by two distinct routes. The first involves initial condensation with an aldehyde followed by reduction (see Figure 3C; in Figure 3C Bz is benzyl). A number of aldehydes (alkyl and aryl) react readily with cyclohexane diamine at room temperature, forming an oxime. The oxime can be reduced with sodium borohydride under anaerobic conditions to give the diacid derivative. The carboxyl moieties are then reacted with the free amino groups present in carboxy-protected P_1 to give the cyclohexane diamine derivative of the peptide. The second route is a direct alkylation process which is illustrated in Figure 3D. For example, cyclohexane diamine is treated with bromoacetic acid to give the diacetic acid derivative. The carboxyl moieties are then reacted with the free amino groups present in carboxy-protected P_1 to give the derivative. In Figure 3D, R_2 is H or another peptide. When R_2 is H, the derivative can be further reacted to produce typical carboxylic acid derivatives, such as esters, by methods well known in the art. Metal binding experiments have indicated that the presence or absence of this group does not have a bearing on the metal binding capacity of the whole molecule. However, these groups would either make the molecule hydrophobic or hydrophilic, depending upon the substituent, and this may, in turn, have an effect on delivery of the molecule across membranes or to target tissues. These two synthetic routes

WO 03/007686

PCT/US02/22951

21

will work for the synthesis of diamine peptide derivatives using the other diamines described above.

Additional suitable polyamines and polyamine derivatives and methods of attaching them to peptides are described in U.S. Patents Nos. 5,101,041 and 5,650,134, the complete disclosures of which are incorporated herein by reference. Other polyamine chelators suitable for attachment to peptides are known. See, *e.g.*, U.S. Patents Nos. 5,422,096, 5,527,522, 5,628,982, 5,874,573, and 5,906,996 and PCT applications WO 97/44313, WO 97/49409, and WO 99/39706.

It is well known that vicinal diacids bind to metal ions, and the affinity for copper is particularly high. It is therefore envisaged that a peptide having a vicinal diacid functional group will be extremely effective in metal binding. Suitable vicinal diacids include any 1,2-alkyldiacid, such as diacetic acid (succinic acid), and any 1,2-aryldiacid.

The amino groups of the peptide can be reacted with diacetic acid to produce a diacid derivative (see Figure 4). This can be conveniently accomplished by reacting the amino groups of the resin-bound peptide with a halogenated acetic acid (*e.g.*, bromoacetic acid or chloroacetic acid) or a halogenated acetic acid derivative (*e.g.*, benzyloxy ester). Solid phase synthetic procedures enable removal of unreacted materials by washing with solvent. The final product is released from the resin by hydrolytic cleavage. Other diacid derivatives of the peptides of the invention can be made in the same manner.

Polyaminopolycarboxylic acids are known to bind metals, such as copper and iron. Suitable polyaminopolycarboxylic acids for making derivatives of the peptides of the invention and methods of attaching them to peptides are described in U.S. Patents Nos. 5,807,535 and 5,650,134, and PCT application WO 93/23425, the complete disclosures of which are incorporated herein by reference. See also, U.S. Patent No. 5,739,395.

Vicinal polyhydroxyl derivatives are also included in the invention. Suitable vicinal polyhydroxyls include monosaccharides and polysaccharides (*i.e.*, disaccharide, trisaccharide, etc.). Presently preferred are monosaccharides. See Figure 7. The monosaccharides fall into two major categories - furanoses and pyranoses. One of the prime examples of a furanose ring system is glucose. The hydroxyl groups of glucose can be protected as benzyl or labile *t*-butoxy functional groups, while leaving the aldehyde free to react with an amine group (*e.g.*, that of lysine) of the tetrapeptide. Mild reduction/hydrolysis produces the

WO 03/007686

PCT/US02/22951

22

monosaccharide peptide derivative. Other monosaccharide peptide derivatives can be prepared in this manner.

Bispyridylethylamine derivatives are known to form strong complexes with divalent metal ions. When attached to the peptide, this functional group would provide additional
5 chelating sites for metal ions, including copper. The bispyridylethyl derivative of the tetrapeptide Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1] is shown in Figure 5. It is anticipated that the metal-binding capacity of this tetrapeptide derivative will be increased by at least three-fold as compared to the underivatized peptide. The preparation of this bispyridylethylamine derivative shares some similarities with the synthesis of diacid derivatives. The two amino
10 groups of the tetrapeptide (one at Asp and the other at Lys) are reacted with 2-bromoethylpyridine to give the tetra-substituted peptide derivative. The reaction is accomplished by reacting the resin-bound tetrapeptide with the bromoethylpyridine, followed by cleavage of the product from the resin.

Phenanthroline is another heterocyclic compound capable of binding divalent metal
15 ions. Phenanthroline derivatives of the peptides can be synthesized in the same manner as for the bispyridylethylamine derivatives.

Porphyrins are a group of compounds found in all living matter and contain a tetrapyrrolic macrocycle capable of binding to metals. Heme, chlorophyll and corrins are prime examples of this class of compounds containing iron, magnesium and cobalt,
20 respectively. Mesoporphyrin IX (Figure 6A-B, where M is a metal ion) is derived from heme and has been observed to possess specific affinity for copper. Addition of this structure to a peptide of the invention would produce a porphyrin-peptide derivative possessing several sites for binding of copper (see Figure 6C). In addition to their roles in metal binding, the imidazole residues at positions 3 and 3' of the tetrapeptide shown in Figure 6C may provide
25 a binding site for metals other than copper, thereby stabilizing the porphyrin-metal complex. In particular, cyanocobalamin (vitamin B-12) contains cobalt as the metal in the porphyrin nucleus, and the complex is stabilized by the imidazole groups. On the basis of this analogy it is anticipated that the porphyrin-tetrapeptide derivative would bind cobalt (or other metals) at normal physiological conditions in the porphyrin nucleus and that the complex would be
30 stabilized by the His imidazole groups.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

23

To prepare the porphyrin-peptide derivative shown in Figure 6C, the carboxyl groups of mesoporphyrin IX can be activated and coupled with the amino groups of the peptide employing standard solid-phase peptide synthesis. Typically, the free amino group of the lysine residue of the resin-bound peptide can be coupled with carboxy activated porphyrin
5 nucleus. The condensation product can be cleaved off the resin using standard methods. This method can be used to synthesize other porphyrin derivatives of peptides of the invention.

Other suitable porphyrins and macrocyclic chelators and methods of attaching them to peptides are described in U.S. Patents Nos. 5,994,339 and 5,087,696, the complete
10 disclosures of which are incorporated herein by reference. Other porphyrins and macrocyclic chelators that could be attached to peptides are known. See, e.g., U. S. Patents Nos. 5,422,096, 5,527,522, 5,628,982, 5,637,311, 5,874,573, and 6,004,953, PCT applications WO 97/44313 and WO 99/39706.

A variety of additional metal chelators and methods of attaching them to proteins are
15 described in U.S. Patent No. 5,683,907, the complete disclosure of which is incorporated herein by reference.

Dithiocarbamates are known to bind metals, including iron. Suitable dithiocarbamates for making derivatives of the peptides of the invention are described in U.S.
Patents Nos. 5,380,747 and 5,922,761, the complete disclosures of which are incorporated
20 herein by reference.

Hydroxypyridones are also known to be iron chelators. Suitable hydroxypyridones for making derivatives of the peptides of the invention are described in U.S. Patents Nos.
4,912,118 and 5,104,865 and PCT application WO 98/54138, the complete disclosures of
which are incorporated herein by reference.

Additional non-peptide metal chelators are known in the art or will be developed.
25 Methods of attaching chemical compounds to proteins and peptides are well known in the art, and attaching non-peptide metal chelators to the peptides of the invention is within the skill in the art. See, e.g., those patents cited above describing such attachment methods.

As can be appreciated, the non-peptide metal-binding functional groups could be
30 attached to another peptide in the same manner as they are to peptide P₁ - P₂. The resulting peptide derivatives would contain one or more non-peptide metal-binding functional groups

WO 03/007686

PCT/US02/22951

24

attached to a peptide which could, optionally, comprise a metal-binding site of a peptide (as described above, the sequences of many metal-binding peptides, including copper-binding peptides, are known). At least one of the metal-binding functional group(s) or the optional metal-binding site of the peptide must bind copper. Preferably, the peptide contains from 2-10, more preferably 3-5, amino acids. Preferably the peptide contains one or more D-amino acids; most preferably all of the amino acids of the peptide are D-amino acids. These peptides and derivatives of them having one or more non-peptide metal-binding functional groups attached to them can be prepared in the same ways as described above for peptides P_1 - P_2 and similar derivatives of them.

Another preferred group of copper chelators for use in the practice of the method of the invention are peptide dimers of the formula:



P_3 is any peptide capable of binding copper, and each P_3 may be the same or different. Each P_3 preferably contains 2-10, more preferably 3-5, amino acids. As described above, copper-binding peptides are known, and each P_3 may comprise the sequence of one or more of the copper-binding sites of these peptides. Although each P_3 may be substituted as described above for P_1 and P_2 , including with a non-peptide, metal-binding functional group, both P_3 peptides are preferably unsubstituted. P_3 may also comprise any amino acid sequence substituted with a non-peptide, copper-binding functional group as described above to provide the copper-binding capability of P_3 . Preferably, each P_3 is an unsubstituted copper-binding peptide (*i.e.*, an unsubstituted peptide comprising a peptide sequence which binds copper). Most preferably, one or both of the P_3 groups is P_1 (*i.e.*, the dimers have the sequence $P_3 - L - P_1$, $P_1 - L - P_3$ or, most preferably, $P_1 - L - P_1$). P_1 is defined above.

L is a linker which is attached to the C-terminal amino acid of each P_3 . L may be any physiologically-acceptable chemical group which can connect the two P_3 peptides through their C-terminal amino acids. By "physiologically-acceptable" is meant that a peptide dimer containing the linker L is not toxic to an animal (including a human) or an organ to which the peptide dimer is administered as a result of the inclusion of the linker L in the peptide dimer. Preferably, L links the two P_3 groups so that they can cooperatively bind metal ions (similar to a 2:1 peptide:metal complex). L is also preferably neutral. Most preferably, L is a straight-chain or branched-chain alkane or alkene residue containing from 1-18, preferably from 2-8,

WO 03/007686

PCT/US02/22951

25

carbon atoms (*e.g.*, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CHCH}-$, etc.) or a cyclic alkane or alkene residue containing from 3-8, preferably from 5-6, carbon atoms (see Figure 19A, compound D₁), preferably attached to a P₃ by means of an amide linkage. Such linkers are particularly preferred because they impart hydrophobicity to the peptide dimers.

5 In another preferred embodiment, L is a nitrogen-containing heterocyclic alkane residue (see Figure 19A, compounds D₂, D₃ and D₄), preferably a piperazide (see Figure 19A, compound D₂). In another preferred embodiment L is a glyceryl ester (see Figure 19A, compound D₅; in formula D₅, R is an alkyl or aryl preferably containing 1-6 carbon atoms). Finally, L could be a metal-binding porphyrin (see Figure 6C). These preferred linkers L will allow the two
10 peptides P₃ to bind metal ions cooperatively and are biocompatible, and the peptide dimers containing these preferred linkers can be made easily and in large quantities. By "biocompatible" is meant that a peptide dimer containing the linker L does not produce any undesirable side-effects due to the linker L in an animal (including a human) to which the peptide dimer is administered.

15 Methods of synthesizing the peptide dimers are illustrated in Figures 19B-D. In general, the C-terminal amino acids (protected by methods and protecting groups well known in the art) of the two P₃ groups are attached to L, and the resulting amino acid dimers used in standard peptide synthetic methods to make the peptide dimers.

For instance, a peptide dimer, where each peptide has the sequence Asp Ala His Lys,
20 [SEQ ID NO:1] can be synthesized by coupling protected lysines to a free diamine functional group, either as an acid chloride or by using standard coupling agents used in peptide synthesis (see Figures 19B-C). Many suitable diamines are available commercially or suitable diamines can be readily synthesized by methods known in the art.

For instance, the lysine dimer **2** (Figure 19B) can be prepared as follows. To a stirred
25 solution of 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)- and t-benzyloxycarbonyl(Boc)-protected D-Lys (Fmoc-D-Lys(Boc)-OH) (20 mmole) in dry dimethylformamide (DMF; 100 mL; dry argon flushed) are added butane-1,4-diamine **1** and 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,2,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborate (TBTU; 0.5 mmole). The solution is stirred for 36 hours at room temperature. The bis-protected lysine **2** is isolated by flash chromatography over
30 silica and elution with mixtures of ethyl acetate/methanol. The peptide dimer **3** is then

WO 03/007686

PCT/US02/22951

26

prepared from the protected lysine dimer **2** employing classical peptide synthesis methodology (see Figure 19B).

Another peptide dimer, where each peptide has the sequence Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1], can be synthesized as follows. First, a different protected lysine dimer **4** is synthesized by acylating the two amino centers of a piperazine **5** (see Figure 19C; see also Chambrier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 10824-10829 (1999)). Then, the remainder of the amino acid residues are added employing standard peptide synthesis methodology to give the peptide dimer **6** (see Figure 19C).

Peptide dimers, where each peptide has the sequence Asp Ala His Lys [SEQ ID NO:1] and where L is a glyceryl ester, can be synthesized as follows. The 3-substituted propane-1,2-diols of formula **7** in Figure 19D, wherein R is an alkyl or aryl, are commercially available. A lysine diester **8**, wherein R is methyl, can be prepared as follows (see Figure 19D). To a stirred solution of Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (20 mmole) in dry toluene (100 mL; dry argon flushed) is added 3-methoxypropane-1,2-diol (200 mmole) and imidazole (15 mmole). The solution is stirred for 36 hours at room temperature. The solvent is removed in vacuo, and the residue is dissolved in ethyl acetate. This solution is washed with citric acid solution (2%), water, 0.5 N NaHCO₃ solution, and again with water; then the organic layer is dried over magnesium sulphate (removal of the solvent gives a pale yellow residue). The bis-protected lysine **8** is isolated by flash chromatography over silica and elution with mixtures of ethyl acetate/methanol. The peptide dimer **9** is then prepared from the protected lysine dimer **8** employing classical peptide synthesis methodology (see Figure 19D).

The physiologically-acceptable salts of the metal-binding compounds are also included in the invention. Physiologically-acceptable salts include conventional non-toxic salts, such as salts derived from inorganic acids (such as hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, phosphoric, nitric, and the like), organic acids (such as acetic, propionic, succinic, glycolic, stearic, lactic, malic, tartaric, citric, glutamic, benzoic, salicylic, and the like) or bases (such as the hydroxide, carbonate or bicarbonate of a pharmaceutically-acceptable metal cation). The salts are prepared in a conventional manner, e.g., by neutralizing the free base form of the compound with an acid.

In one embodiment of the invention, an effective amount of a copper chelator is administered to an animal in need of treatment with APC. Preferably, the animal is a

WO 03/007686

PCT/US02/22951

27

mammal, such as a rabbit, goat, dog, cat, horse or human, most preferably a human. In addition to the chelator, an effective amount of APC, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, and/or protein C activator is administered to the animal (see above). The copper chelator can be administered prior to, at the same time and/or after the APC, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, and/or protein C activator is administered. Preferably, the copper chelator is administered prior to administration of APC, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, and/or protein C activator, and administration of the chelator is continued during the administration of the APC, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, and/or protein C activator. If the copper chelator is administered at the same time as the APC, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, and/or protein C activator, all of the compounds can be administered in admixture with each other or separately.

Effective dosage forms, modes of administration and dosage amounts for the various copper chelators of the invention may be determined empirically, and making such determinations is within the skill of the art. It has been found that an effective dosage is from about 2 to about 200 mg/kg, preferably from about 10 to about 40 mg/kg, most preferably about 20 mg/kg. However, it is understood by those skilled in the art that the dosage amount will vary with the particular chelator employed, the disease or condition to be treated, the severity of the disease or condition, the route(s) of administration, the rate of excretion of the compound, the duration of the treatment, the identify of any other drugs being administered to the animal, the age, size and species of the animal, and like factors known in the medical and veterinary arts. In general, a suitable daily dose of a chelator of the present invention will be that amount of the chelator which is the lowest dose effective to produce a therapeutic effect. However, the daily dosage will be determined by an attending physician or veterinarian within the scope of sound medical judgment. If desired, the effective daily dose may be administered as two, three, four, five, six or more sub-doses, administered separately at appropriate intervals throughout the day, or may be administered as a continuous infusion. Administration of the chelator should be continued until an acceptable response is achieved.

The chelators of the present invention may be administered to an animal patient for therapy by any suitable route of administration, including orally, nasally, rectally, vaginally, parenterally (e.g., intravenously, intraspinally, intraperitoneally, subcutaneously, or

WO 03/007686

PCT/US02/22951

28

intramuscularly), intracisternally, transdermally, transmucosally, intracranially, intracerebrally, and topically (including buccally and sublingually). The preferred route of administration is parenterally.

While it is possible for a chelator of the present invention to be administered alone,
5 it is preferable to administer the compound as a pharmaceutical formulation (composition). The pharmaceutical compositions of the invention comprise a chelator or chelators of the invention as an active ingredient in admixture with one or more pharmaceutically-acceptable carriers and, optionally, with one or more other compounds, drugs or other materials. Each carrier must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the
10 formulation and not injurious to the animal. Pharmaceutically-acceptable carriers are well known in the art. Regardless of the route of administration selected, the compounds of the present invention are formulated into pharmaceutically-acceptable dosage forms by conventional methods known to those of skill in the art. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

15 Pharmaceutical compositions of this invention suitable for parenteral administrations comprise one or more chelators of the invention in combination with one or more pharmaceutically-acceptable sterile isotonic aqueous or non-aqueous solutions, dispersions, suspensions or emulsions, or sterile powders which may be reconstituted into sterile injectable solutions or dispersions just prior to use, which may contain antioxidants, buffers, solutes
20 which render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient or suspending or thickening agents.

Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers which may be employed in the pharmaceutical compositions include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof, vegetable oils, such
25 as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

These compositions may also contain adjuvants such as wetting agents, emulsifying agents and dispersing agents. It may also be desirable to include isotonic agents, such as
30 sugars, sodium chloride, and the like in the compositions. In addition, prolonged absorption

WO 03/007686

PCT/US02/22951

29

of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as aluminum monostearate and gelatin.

In some cases, in order to prolong the effect of a drug, it is desirable to slow the absorption of the drug from subcutaneous or intramuscular injection. This may be accomplished by the use of a liquid suspension of crystalline or amorphous material having poor water solubility. The rate of absorption of the drug then depends upon its rate of dissolution which, in turn, may depend upon crystal size and crystalline form. Alternatively, delayed absorption of a parenterally-administered drug is accomplished by dissolving or suspending the drug in an oil vehicle.

Injectable depot forms are made by forming microcapsule matrices of the drug in biodegradable polymers such as polylactide-polyglycolide. Depending on the ratio of drug to polymer, and the nature of the particular polymer employed, the rate of drug release can be controlled. Examples of other biodegradable polymers include poly(orthoesters) and poly(anhydrides). Depot injectable formulations are also prepared by entrapping the drug in liposomes or microemulsions which are compatible with body tissue. The injectable materials can be sterilized, for example, by filtration through a bacterial-retaining filter.

The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, for example, ampules and vials, and may be stored in a lyophilized condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier, for example water for injection, immediately prior to use.

Extemporaneous injection solutions and suspensions may be prepared from sterile powders, granules and tablets of the type described above.

Formulations of the invention suitable for oral administration may be in the form of capsules, cachets, pills, tablets, powders, granules or as a solution or a suspension in an aqueous or non-aqueous liquid, or an oil-in-water or water-in-oil liquid emulsions, or as an elixir or syrup, or as pastilles (using an inert base, such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia), and the like, each containing a predetermined amount of a chelator or chelators of the present invention as an active ingredient. A chelator or chelators of the present invention may also be administered as bolus, electuary or paste.

In solid dosage forms of the invention for oral administration (capsules, tablets, pills, dragees, powders, granules and the like), the active ingredient is mixed with one or more pharmaceutically acceptable carriers, such as sodium citrate or dicalcium phosphate, and/or

WO 03/007686

PCT/US02/22951

30

any of the following: (1) fillers or extenders, such as starches, lactose, sucrose, glucose, mannitol, and/or silicic acid; (2) binders, such as, for example, carboxymethylcellulose, alginates, gelatin, polyvinyl pyrrolidone, sucrose and/or acacia; (3) humectants, such as glycerol; (4) disintegrating agents, such as agar-agar, calcium carbonate, potato or tapioca starch, alginic acid, certain silicates, and sodium carbonate; (5) solution retarding agents, such as paraffin; (6) absorption accelerators, such as quaternary ammonium compounds; (7) wetting agents, such as, for example, cetyl alcohol and glycerol monostearate; (8) absorbents, such as kaolin and bentonite clay; (9) lubricants, such as talc, calcium stearate, magnesium stearate, solid polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate, and mixtures thereof; and (10) coloring agents. In the case of capsules, tablets and pills, the pharmaceutical compositions may also comprise buffering agents. Solid compositions of a similar type may be employed as fillers in soft and hard-filled gelatin capsules using such excipients as lactose or milk sugars, as well as high molecular weight polyethylene glycols and the like.

A tablet may be made by compression or molding optionally with one or more accessory ingredients. Compressed tablets may be prepared using binder (for example, gelatin or hydroxypropylmethyl cellulose), lubricant, inert diluent, preservative, disintegrant (for example, sodium starch glycolate or cross-linked sodium carboxymethyl cellulose), surface-active or dispersing agent. Molded tablets may be made by molding in a suitable machine a mixture of the powdered compound moistened with an inert liquid diluent.

The tablets, and other solid dosage forms of the pharmaceutical compositions of the present invention, such as dragees, capsules, pills and granules, may optionally be scored or prepared with coatings and shells, such as enteric coatings and other coatings well known in the pharmaceutical-formulating art. They may also be formulated so as to provide slow or controlled release of the active ingredient therein using, for example, hydroxypropylmethyl cellulose in varying proportions to provide the desired release profile, other polymer matrices, liposomes and/or microspheres. They may be sterilized by, for example, filtration through a bacteria-retaining filter. These compositions may also optionally contain opacifying agents and may be of a composition that they release the active ingredient only, or preferentially, in a certain portion of the gastrointestinal tract, optionally, in a delayed manner. Examples of embedding compositions which can be used include polymeric substances and waxes. The active ingredient can also be in microencapsulated form.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

31

Liquid dosage forms for oral administration of the chelators of the invention include pharmaceutically-acceptable emulsions, microemulsions, solutions, suspensions, syrups and elixirs. In addition to the active ingredient, the liquid dosage forms may contain inert diluents commonly used in the art, such as, for example, water or other solvents, solubilizing agents and emulsifiers, such as ethyl alcohol, isopropyl alcohol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, benzyl benzoate, propylene glycol, 1,3-butylene glycol, oils (in particular, cottonseed, groundnut, corn, germ, olive, castor and sesame oils), glycerol, tetrahydrofuryl alcohol, polyethylene glycols and fatty acid esters of sorbitan, and mixtures thereof.

Besides inert diluents, the oral compositions can also include adjuvants such as wetting agents, emulsifying and suspending agents, sweetening, flavoring, coloring, perfuming and preservative agents.

Suspensions, in addition to the active compound(s), may contain suspending agents as, for example, ethoxylated isostearyl alcohols, polyoxyethylene sorbitol and sorbitan esters, microcrystalline cellulose, aluminum metahydroxide, bentonite, agar-agar and tragacanth, and mixtures thereof.

Formulations of the pharmaceutical compositions of the invention for rectal or vaginal administration may be presented as a suppository, which may be prepared by mixing one or more compounds of the invention with one or more suitable nonirritating excipients or carriers comprising, for example, cocoa butter, polyethylene glycol, a suppository wax or salicylate, and which is solid at room temperature, but liquid at body temperature and, therefore, will melt in the rectum or vaginal cavity and release the active compound. Formulations of the present invention which are suitable for vaginal administration also include pessaries, tampons, creams, gels, pastes, foams or spray formulations containing such carriers as are known in the art to be appropriate.

Dosage forms for the topical, transdermal or transmucosal administration of a chelator of this invention include powders, sprays, ointments, pastes, creams, lotions, gels, solutions, patches, drops and inhalants. The chelator or chelators may be mixed under sterile conditions with a pharmaceutically-acceptable carrier, and with any buffers, or propellants which may be required.

The ointments, pastes, creams and gels may contain, in addition to a chelator or chelators of this invention, excipients, such as animal and vegetable fats, oils, waxes,

WO 03/007686

PCT/US02/22951

32

paraffins, starch, tragacanth, cellulose derivatives, polyethylene glycols, silicones, bentonites, silicic acid, talc and zinc oxide, or mixtures thereof.

Powders and sprays can contain, in addition to a chelator or chelators of this invention, excipients such as lactose, talc, silicic acid, aluminum hydroxide, calcium silicates and polyamide powder or mixtures of these substances. Sprays can additionally contain customary propellants such as chlorofluorohydrocarbons and volatile unsubstituted hydrocarbons, such as butane and propane.

The active ingredient (*i.e.*, a chelator or chelators of the invention) may also be delivered through the skin using conventional transdermal drug delivery systems, *i.e.*, transdermal patches, wherein the active ingredient is typically contained within a laminated structure that serves as a drug delivery device to be affixed to the skin. In such a structure, the active ingredient is typically contained in a layer, or "reservoir," underlying an upper backing layer. The laminated device may contain a single reservoir, or it may contain multiple reservoirs. In one embodiment, the reservoir comprises a polymeric matrix of a pharmaceutically acceptable contact adhesive material that serves to affix the system to the skin during drug delivery. Examples of suitable skin contact adhesive materials include, but are not limited to, polyethylenes, polysiloxanes, polyisobutylenes, polyacrylates, polyurethanes, and the like. Alternatively, the drug-containing reservoir and skin contact adhesive are present as separate and distinct layers, with the adhesive underlying the reservoir which, in this case, may be either a polymeric matrix as described above, or it may be a liquid or hydrogel reservoir, or may take some other form.

The backing layer in these laminates, which serves as the upper surface of the device, functions as the primary structural element of the laminated structure and provides the device with much of its flexibility. The material selected for the backing material should be selected so that it is substantially impermeable to the active ingredient and any other materials that are present. The backing layer may be either occlusive or nonocclusive, depending on whether it is desired that the skin become hydrated during drug delivery. The backing is preferably made of a sheet or film of a preferably flexible elastomeric material. Examples of polymers that are suitable for the backing layer include polyethylene, polypropylene, polyesters, and the like.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

33

During storage and prior to use, the laminated structure includes a release liner. Immediately prior to use, this layer is removed from the device to expose the basal surface thereof, either the drug reservoir or a separate contact adhesive layer, so that the system may be affixed to the skin. The release liner should be made from a drug/vehicle impermeable material.

Transdermal drug delivery devices may be fabricated using conventional techniques, known in the art, for example by casting a fluid admixture of adhesive, active ingredient and vehicle onto the backing layer, followed by lamination of the release liner. Similarly, the adhesive mixture may be cast onto the release liner, followed by lamination of the backing layer. Alternatively, the drug reservoir may be prepared in the absence of active ingredient or excipient, and then loaded by "soaking" in a drug/vehicle mixture.

The laminated transdermal drug delivery systems may, in addition, contain a skin permeation enhancer. That is, because the inherent permeability of the skin to some active ingredients may be too low to allow therapeutic levels of the drug to pass through a reasonably sized area of unbroken skin, it is necessary to coadminister a skin permeation enhancer with such drugs. Suitable enhancers are well known in the art.

The pharmaceutical compositions of the invention may also be administered by nasal aerosol or inhalation. Such compositions are prepared according to techniques well-known in the art of pharmaceutical formulation and may be prepared as solutions in saline, employing benzyl alcohol or other suitable preservatives, absorption promoters to enhance bioavailability, propellants such as fluorocarbons or nitrogen, and/or other conventional solubilizing or dispersing agents.

Preferred formulations for topical drug delivery are ointments and creams. Ointments are semisolid preparations which are typically based on petrolatum or other petroleum derivatives. Creams containing the selected active agent, are, as known in the art, viscous liquid or semisolid emulsions, either oil-in-water or water-in-oil. Cream bases are water-washable, and contain an oil phase, an emulsifier and an aqueous phase. The oil phase, also sometimes called the "internal" phase, is generally comprised of petrolatum and a fatty alcohol such as cetyl or stearyl alcohol; the aqueous phase usually, although not necessarily, exceeds the oil phase in volume, and generally contains a humectant. The emulsifier in a cream formulation is generally a nonionic, anionic, cationic or amphoteric surfactant. The specific

WO 03/007686

PCT/US02/22951

34

ointment or cream base to be used, as will be appreciated by those skilled in the art, is one that will provide for optimum drug delivery. As with other carriers or vehicles, an ointment base should be inert, stable, nonirritating and nonsensitizing.

Formulations for buccal administration include tablets, lozenges, gels and the like.

- 5 Alternatively, buccal administration can be effected using a transmucosal delivery system as known to those skilled in the art.

- In another embodiment of the invention, a composition comprising the APC, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, and/or protein C activator is contacted with the copper chelator prior to administration of an effective amount of the APC, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, and/or protein C activator in order to chelate any copper present in the composition. Suitable contacting conditions can be determined empirically and doing so is within the skill in the art. For instance, contacting can be accomplished by simply combining a solution of the chelator and a solution of the other compound(s) and incubating them employing conditions (*e.g.*, time, temperature, and pH)
- 10 sufficient to allow the chelator to bind any copper in the compositions. The copper chelator can be removed prior to administration (*e.g.*, use of a copper chelator in the manufacture of a copper-free composition) or, preferably, is administered along with the APC, protein C, agent that increases the synthesis of the protein C, and/or protein C activator. The copper chelator can be removed in a variety of ways, including using an affinity column comprising
- 15 an antibody specific for the chelator.
- 20

It is to be noted that "a" or "an" entity refers to one or more of that entity. For example, "a cell" refers to one or more cells.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

35

EXAMPLESEXAMPLE 1

5 This example describes an *in vitro* study which investigated whether copper inhibits activated protein C (APC) anticoagulant activity. As shown below, after a thirty-minute incubation period, copper inhibited APC anticoagulant activity.

Human albumin has one high-affinity binding site for copper at its N-terminus and numerous non-specific copper binding sites elsewhere. Linder et al., *Biochemistry of Copper* (Plenum Press, New York, 1991); Peters, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (Academic Press, San Diego, 1996); Sadler et al., *Eur. J. Biochem.* **220**, 193-200 (1994); Bar-Or et al., *Eur. J. Biochem.* **268**, 42-47 (2001). Albumin sequesters free copper ions, and the N-terminal copper-binding site has been shown to prevent copper-induced formation of reactive oxygen species. Bar-Or et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 856-862 (2001); Bar-Or et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 356-360 (2001).

15 The *in vitro* study described in this example also investigated whether the copper-induced APC inhibition could be prevented or reversed by human serum albumin (HSA) or an analogue of the human albumin N-terminus copper-binding site, D-Asp D-Ala D-His D-Lys (d-DAHK). As shown below, after a thirty-minute incubation period, both HSA and d-DAHK demonstrated a protective effect against copper-induced inhibition of APC activity, suggesting that copper chelation would enhance APC therapeutic efficacy.

Materials. The human albumin N-terminus analogue, d-DAHK, was synthesized by Bowman Research, Ltd (Newport, Wales, U.K.). The assay for APC anticoagulant activity was the Accucolor™ colorimetric assay (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). APC (Sigma, product number P2200), HSA (Sigma, product number A1653), and all other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Copper content of APC was determined by graphite furnace atomic absorption (Galbraith Laboratories, Knoxville, TN).

25 **APC activity assay.** The APC assay, originally designed for plasma samples (Francis et al., *Am. J. Clin. Pathol.* **87**, 619-625 (1987)) was modified for use in a clean, aqueous environment. Solutions of CuCl₂, HSA, and d-DAHK were prepared in 20 mM KH₂PO₄ buffer (pH 7.4). Experiments were performed in a 96-well plate. APC (2 mg/L) was added

WO 03/007686

PCT/US02/22951

36

to the following solutions: a) 20mM KH_2PO_4 buffer alone, b) 10 μM CuCl_2 , c) 40 μM HSA, d) 40 μM d-DAHK, e) HSA: CuCl_2 together in ratios of 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, and 4:1 and f) d-DAHK: CuCl_2 together in ratios of 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, and 4:1 ($n=3$, in duplicate, for each) and incubated for 30 minutes at 37°C. Protein C substrate (2 mg/L) was then added to each well and incubated for ten minutes at 37°C. Concentrated acetic acid was added to each well to stop the reaction and the results were read at 410 nm on a microplate fluorescence reader (Model FL600, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). APC activity for copper alone, HSA alone, d-DAHK alone, and all combinations of HSA: CuCl_2 and d-DAHK: CuCl_2 were expressed as the mean percent change (\pm standard deviation) from baseline APC activity using buffer alone.

Copper Inhibition of APC. Incubating CuCl_2 with APC in two separate experiments demonstrated a decrease of $27.9\% \pm 15.5\%$ (Figure 1) and $24.1\% \pm 9.7\%$ (Figure 2) in APC activity compared to baseline (overall mean decrease $26.0\% \pm 11.8\%$). Copper has previously been used to bind APC during metal-affinity chromatography techniques. Wu et al., *Biotechnol. Prog.* **15**, 928-931 (1999). However, as far as is known, the present study is the first to provide evidence that copper inhibits *in vitro* APC anticoagulant activity.

Copper is an essential trace metal that is tightly regulated by plasma proteins under normal conditions. Acidic conditions *in vitro* are known to cause free copper ions to be released from ceruloplasmin and other proteins, and free copper is released *in vivo* during conditions involving ischemia and acidosis. Linder et al., *Biochemistry of Copper* (Plenum Press, New York, 1991); Berenshtein et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 3025-3034 (1997); Lamb et al., *FEBS Lett.* **338**, 122-126 (1994). Ischemia and acidosis frequently accompany septic shock and often occur early in sepsis (without signs of shock) due to increased tissue oxygen requirements, impaired oxygen extraction, and maldistribution of blood flow. Pastores et al., *Am. J. Gastroenterol.* **91**, 1697-1710 (1996). Thus, free copper is readily available during sepsis to inhibit the activity of both endogenous and therapeutically administered APC, implying that copper sequestration may enhance the therapeutic efficacy of APC or of endogenously inactivated APC.

HSA Prevents Copper Inhibition of APC. Incubating HSA with APC resulted in a $202.1\% \pm 48.1\%$ increase over baseline APC activity (Figure 1). Such a dramatic increase in APC activity suggested that the APC used in the experiments may have contained copper.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

37

Analysis of the copper content of the APC stock solution (300 mg/L; 5.45 μ M) used in all experiments in the present study was determined to contain 88.5 μ g/L (1.39 μ M) copper. Numerous available copper-binding sites of HSA may have removed the APC-bound copper to increase APC activity over baseline). Linder et al., *Biochemistry of Copper* (Plenum Press, New York, 1991); Peters, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (Academic Press, San Diego, 1996). Other potential HSA-APC interactions, such as conformational changes exposing active sites on APC or a substrate-like activity of HSA, could also have increased APC activity. Various ratios of HSA:CuCl₂ consistently prevented any copper-induced inhibition of APC and resulted in dramatically increased APC activity ranging from 180.0% \pm 68.2% to 207.1% \pm 53.3% over baseline (Figure 1). Hypoalbuminemia is often reported in sepsis and may be due to increased albumin catabolism, extravascular escape, and to a lesser extent by decreased albumin synthesis. Ruot et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**, E244-251 (2000). The administration of human albumin for septic shock and intestinal ischemic shock has been reported to improve hemodynamic parameters and survival when compared to electrolyte solution alone. Dawidson et al., *Crit. Care Med.* **18**, 60-66 (1990); Rackow et al., *Crit. Care Med.* **11**, 839-850 (1983); Ottosson et al., *Crit. Care Med.* **17**, 772-779 (1989). Deferoxamine, which chelates both copper and iron, was also reported to be beneficial in animal models of sepsis. Moch et al., *Shock* **4**, 425-432 (1995); Jung et al., *J. Hepatol.* **33**, 387-394 (2000). Theoretically, in view of the results presented here, part of the benefit of administering albumin or a metal chelator for sepsis and shock might be explained by the prevention of copper-induced APC inhibition or reactivation of endogenously inactivated APC.

d-DAHK Prevents Copper Inhibition of APC. Incubating d-DAHK with APC resulted in an 18.2% \pm 13.0% increase over baseline APC activity (Figure 2). Ratios of 2:1 and 4:1 d-DAHK:CuCl₂ increased APC activity over baseline (12.9% \pm 1.1%, and 14.8% \pm 12.7%, respectively), while lower d-DAHK:CuCl₂ ratios demonstrated no significant protection of copper-induced inhibition of APC (Figure 2). That observation is consistent with our previous reports that d-DAHK effectively binds free copper in a ratio of at least 2:1 d-DAHK:CuCl₂. Bar-Or et al., *Eur. J. Biochem.* **268**, 42-47 (2001); Bar-Or et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 856-862 (2001); Bar-Or et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 356-360 (2001). The maximal effect of d-DAHK on APC alone (Figure 2) resulted in

WO 03/007686

PCT/US02/22951

38

an 18.2% increase in activity above baseline, which corresponds to the independently measured amount of copper in APC (1.39 μ M copper for 5.45 μ M APC, 1:4) being chelated by d-DAHK.

Despite advances in critical care, severe sepsis is a relatively common and frequently fatal disease that is more likely to be fatal in elderly patients. Angus et al., *Crit. Care Med.* **29**, 1303-1310 (2001). In a Phase 3 clinical trial for the treatment of severe sepsis, recombinant human APC reduced 28-day mortality rates from 31% to 25%; however, a substantial number of patients receiving APC did not have any beneficial effect. Bernard et al., *N. Engl. J. Med.* **344**, 699-709 (2001). Intravenous human recombinant APC is cleared from the plasma of healthy subjects by proteolytic enzymes in less than 15 minutes and, according to the manufacturer, up to 50% faster in patients with severe sepsis. Bernard et al., *Crit. Care Med.* **29**, 2051-2059 (2001); Gruber et al., *Circulation* **82**, 578-585 (1990); Okajima et al., *Thromb. Haemost.* **63**, 48-53 (1990); Yan et al., *Crit. Care Med.* **29**, S69-74 (2001); Grinnell et al., *Crit. Care Med.* **29**, S53-60; discussion S60-1 (2001). Thus, current clinical guidelines recommend that intravenous APC be administered continuously over four days. Bernard et al., *N. Engl. J. Med.* **344**, 699-709 (2001). Preventing copper-induced inhibition of APC by sequestering free copper with albumin or d-DAHK might allow lower doses of APC to be administered over a shorter period of time, while maintaining, or even enhancing, the clinical benefit of APC.

In conclusion, these results suggest that copper partially inhibits APC anticoagulant activity *in vitro* and that HSA and d-DAHK, an analogue of the high affinity copper-binding site of human albumin, prevent copper-induced inhibition of APC. Free copper that is mobilized during the ischemia and acidosis accompanying sepsis may contribute to the deactivation of APC, reducing its clinical benefit.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

39

WE CLAIM:

1. A method of treating an animal in need of treatment with activated protein C (APC), the method comprising administering to the animal:
 - an effective amount of a copper chelator; and
 - an effective amount of one of the following:
 - (a) APC;
 - (b) protein C, an agent that increases the synthesis of protein C in the animal,
 - or both;
 - (c) an activator of protein C; or
 - (d) a combination of one or more of (a), (b) and (c).
 2. The method of Claim 1 wherein the chelator is human albumin or a fragment thereof comprising the N-terminal copper-binding sequence Asp Ala His.
 3. The method of Claim 1 wherein the chelator is a peptide having the formula:

$$P_1 - P_2,$$
 - wherein:
 - P_1 is:
 - Xaa₁ Xaa₂ His: or
 - Xaa₁ Xaa₂ His Xaa₃;
 - P_2 is (Xaa_n)_n;
 - Xaa₁ is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, isoaspartic acid, asparagine, glutamic acid, isoglutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α -hydroxymethylserine;
 - Xaa₂ is glycine, alanine, β -alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α -hydroxymethylserine;
 - Xaa₃ is glycine, alanine, valine, lysine, arginine, ornithine, aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine or tryptophan;
 - Xaa₄ is any amino acid; and
 - n is 0-100;
- or a physiologically-acceptable salt thereof.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

40

4. The method of Claim 3 wherein Xaa₁ is aspartic acid, glutamic acid, arginine, threonine, or α-hydroxymethylserine.
5. The method of Claim 3 wherein Xaa₂ is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, threonine, serine, asparagine, methionine, histidine or α-hydroxymethylserine.
- 5 6. The method of Claim 3 wherein Xaa₃ is lysine.
7. The method of Claim 3 wherein Xaa₁ is aspartic acid, glutamic acid, arginine, threonine, or α-hydroxymethylserine, Xaa₂ is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, threonine, serine, asparagine, methionine, histidine or α-hydroxymethylserine, and Xaa₃ is lysine.
- 10 8. The method of Claim 7 wherein Xaa₁ is aspartic acid or glutamic acid and Xaa₂ is alanine, glycine, valine, threonine, serine, leucine, or α-hydroxymethylserine.
9. The method of Claim 8 wherein Xaa₂ is alanine, threonine, leucine, or α-hydroxymethylserine.
10. The method of Claim 9 wherein Xaa₁ is aspartic acid and Xaa₂ is alanine.
- 15 11. The method of Claim 3 wherein n is 0-10.
12. The method of Claim 11 wherein n is 0-5.
13. The method of Claim 12 wherein n is 0.
14. The method of Claim 3 wherein P₂ comprises a metal-binding sequence.
15. The method of Claim 14 wherein P₂ comprises one of the following sequences:
- 20 (Xaa₄)_m Xaa₃ His Xaa₂ Xaa₅,
 (Xaa₄)_m His Xaa₂ Xaa₅,
 (Xaa₄)_m Xaa₅ Xaa₂ His Xaa₃, or
 (Xaa₄)_m Xaa₅ Xaa₂ His,
- wherein Xaa₅ is an amino acid having a free side-chain -NH₂ and m is 0-5.
- 25 16. The method of Claim 15 wherein Xaa₅ is Orn or Lys.
17. The method of Claim 14 wherein P₂ comprises one of the following sequences:
- [(Xaa₄)_mXaa₅Xaa₂HisXaa₃]_n,
 [(Xaa₄)_mXaa₅Xaa₂His]_n,
 [(Xaa₄)_mXaa₅Xaa₂HisXaa₃(Xaa₄)_mXaa₅Xaa₂His]_n, or
 30 [(Xaa₄)_mXaa₅Xaa₂His(Xaa₄)_mXaa₅Xaa₂HisXaa₃]_n,
 wherein Xaa₅ is an amino acid having a free side-chain -NH₂, m is 0-5 and n is 2-100.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

41

18. The method of Claim 14 wherein P_2 comprises a sequence which binds Cu(I).
19. The method of Claim 18 wherein P_2 comprises one of the following sequences:
- Met Xaa₄ Met,
 Met Xaa₄ Xaa₄ Met,
 Cys Cys,
 Cys Xaa₄ Cys,
 Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys,
 Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys,
 Gly Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:3],
 Gly Met Thr Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:4],
 Gly Met Thr Cys Ala Asn Cys [SEQ ID NO:5], or
 γ-Glu Cys Gly.
20. The method of Claim 19 wherein P_2 is Gly Met Thr Cys Ala Asn Cys [SEQ ID NO:5].
21. The method of Claim 3 wherein P_2 comprises a sequence which enhances the ability of the peptide to penetrate cell membranes, reach target tissues, or both.
22. The method of Claim 21 wherein P_2 is hydrophobic or an arginine oligomer.
23. The method of Claim 3 wherein at least one of the amino acids of P_1 other than β-alanine, when present, is a D-amino acid.
24. The method of Claim 23 wherein Xaa₄ is a D-amino acid, His is a D-amino acid, or both Xaa₄ and His are D-amino acids.
25. The method of Claim 24 wherein all of the amino acids of P_1 other than β-alanine, when present, are D-amino acids.
26. The method of Claim 23 wherein at least 50% of the amino acids of P_2 are D-amino acids.
27. The method of Claim 24 wherein at least 50% of the amino acids of P_2 are D-amino acids.
28. The method of Claim 25 wherein at least 50% of the amino acids of P_2 are D-amino acids.
29. The method of Claim 3 wherein at least one amino acid of P_1 , at least one amino acid of P_2 , or at least one amino acid of P_1 and at least one amino acid of P_2 , is substituted with

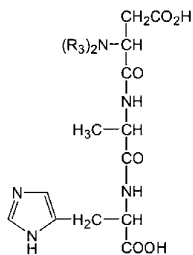
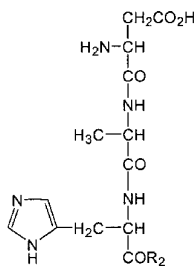
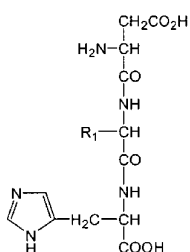
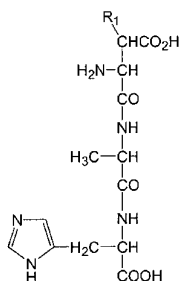
WO 03/007686

PCT/US02/22951

42

- (a) a substituent that increases the lipophilicity of the peptide without altering the ability of P_1 to bind copper ions, (b) a substituent that protects the peptide from proteolytic enzymes without altering the ability of P_1 to bind copper ions, or (c) a substituent which is a non-peptide, metal-binding functional group that does not alter the ability of P_1 to bind copper ions.

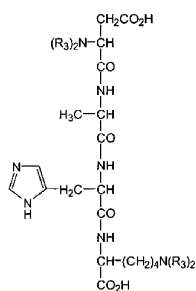
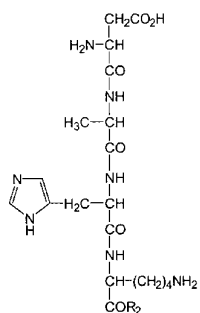
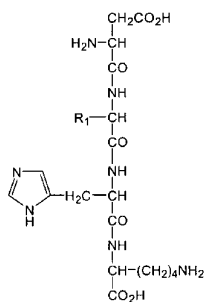
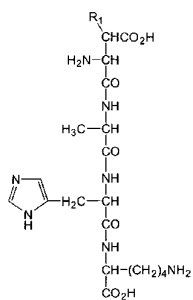
30. The method of Claim 29 wherein n is 0 and P_1 has one of the following formulas:



WO 03/007686

PCT/US02/22951

43



wherein:

- 5 R_1 is an alkyl, aryl, or heteroaryl;
 R_2 is $-NH_2$, $-NHR_1$, $N(R_1)_2$, $-OR_1$, or R_1 ; and
 R_3 is H, a non-peptide, metal-binding functional group or the two R_3 groups together form a non-peptide, metal-binding functional group.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

44

31. The method of Claim 1 wherein the chelator is a peptide dimer having the formula:



wherein:

5 each P_3 may be the same or different and is a peptide which is capable of binding copper; and

L is a chemical group which connects the two P_3 peptides through their C-terminal amino acids.

32. The method of Claim 31 wherein each P_3 contains 2-10 amino acids.

10 33. The method of Claim 31 wherein at least one P_3 is P_1 , wherein P_1 is:

Xaa₁, Xaa₂, His; or

Xaa₁, Xaa₂, His Xaa₃; and

Xaa₁ is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, isoaspartic acid, asparagine, glutamic acid, isoglutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, 15 histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α -hydroxymethylserine;

Xaa₂ is glycine, alanine, β -alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α - 20 hydroxymethylserine; and

Xaa₃ is glycine, alanine, valine, lysine, arginine, ornithine, aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine or tryptophan.

34. The method of Claim 33 wherein Xaa₁ is aspartic acid, glutamic acid, arginine, threonine, or α -hydroxymethylserine.

25 35. The method of Claim 33 wherein Xaa₂ is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, threonine, serine, asparagine, methionine, histidine or α -hydroxymethylserine.

36. The method of Claim 33 wherein Xaa₃ is lysine.

37. The method of Claim 33 wherein Xaa₁ is aspartic acid, glutamic acid, arginine, threonine, or α -hydroxymethylserine, Xaa₂ is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, 30 threonine, serine, asparagine, methionine, histidine or α -hydroxymethylserine, and Xaa₃ is lysine.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

45

38. The method of Claim 37 wherein Xaa_1 is aspartic acid or glutamic acid and Xaa_2 is alanine, glycine, valine, threonine, serine, leucine, or α -hydroxymethylserine.
39. The method of Claim 38 wherein Xaa_2 is alanine, threonine, leucine, or α -hydroxymethylserine.
- 5 40. The method of Claim 39 wherein Xaa_1 is aspartic acid and Xaa_2 is alanine.
41. The method of Claim 33 wherein at least one amino acid of P_1 other than β -alanine, when present, is a D-amino acid.
42. The method of Claim 41 wherein all of the amino acids of P_1 other than β -alanine, when present, are D-amino acids.
- 10 43. The method of Claim 33 wherein both P_2 peptides are P_1 .
44. The method of Claim 31 wherein at least one amino acid of P_3 is substituted with (a) a substituent that increases the lipophilicity of the peptide without altering the ability of P_3 to bind copper ions, (b) a substituent that protects the peptide from proteolytic enzymes without altering the ability of P_3 to bind copper ions, or (c) a substituent which is a non-peptide, metal-binding functional group which does not alter the ability of the peptide to bind copper ions.
- 15 45. The method of Claim 31 wherein P_3 comprises an amino acid sequence which is substituted with a non-peptide, metal-binding functional group to provide the copper-binding capability of P_3 .
- 20 46. The method of Claim 31 wherein L is neutral.
47. The method of Claim 31 wherein L is a straight-chain or branched-chain alkane or alkene residue containing from 1-18 carbon atoms.
48. The method of Claim 47 wherein L contains 2-8 carbon atoms.
49. The method of Claim 31 wherein L is a cyclic alkane residue containing from 2-8 carbon atoms.
- 25 50. The method of Claim 49 wherein L contains 3-5 carbon atoms.
51. The method of Claim 31 wherein L is a nitrogen-containing heterocyclic alkane residue.
52. The method of Claim 51 wherein L is a piperazine.
- 30 53. The method of Claim 31 wherein L is a glyceryl ester.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

46

54. The method of Claim 1 wherein the copper chelator is a peptide having attached thereto a non-peptide metal-binding functional group, wherein the peptide comprises a copper-binding site and/or the non-peptide functional group binds copper.

55. The method of Claim 1 wherein the animal is in need of the APC because it is suffering from an acquired hypercoagulable state or an acquired protein C deficiency.

56. The method of Claim 1 wherein the animal is in need of the APC because it is suffering from sepsis.

57. The method of Claim 1 wherein the animal is in need of the APC because it is suffering from a disease or condition involving intravascular coagulation.

58. The method of Claim 1 wherein the copper chelator is administered prior to administration of the APC, protein C, activator of protein C or combination of one or more of them.

59. The method of Claim 1 wherein the copper chelator is combined with the APC, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, activator of protein C, or combination of one or more of them prior to their administration to the animal.

60. A method of treating an animal in need of treatment with activated protein C (APC) comprising:

contacting an effective amount of a copper chelator with a composition comprising one of the following:

- (a) APC;
- (b) protein C, an agent that increases the synthesis of protein C in the animal, or both;
- (c) an activator of protein C; or
- (d) a combination of one or more of (a), (b) and (c);

so as to bind any copper present in the composition; and

administering an effective amount of the APC, protein C, protein C, agent that increases the synthesis of protein C, activator of protein C, or combination of one or more of them to an animal in need of treatment with APC.

61. The method of Claim 60 wherein the copper chelator is human albumin or a fragment thereof comprising the N-terminal copper-binding sequence Asp Ala His.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

47

62. The method of Claim 60 wherein the copper chelator is a peptide having the formula:



wherein:

5 P_1 is:

Xaa₁ Xaa₂ His; or

Xaa₁ Xaa₂ His Xaa₃;

P_2 is (Xaa₄)_n;

10 Xaa₁ is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, isoaspartic acid, asparagine, glutamic acid, isoglutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α -hydroxymethylserine;

15 Xaa₂ is glycine, alanine, β -alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α -hydroxymethylserine;

Xaa₃ is glycine, alanine, valine, lysine, arginine, ornithine, aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine or tryptophan;

Xaa₄ is any amino acid; and

20 n is 0-100;

or a physiologically-acceptable salt thereof.

63. The method of Claim 62 wherein at least one amino acid of P_1 is substituted with (a) a substituent that increases the lipophilicity of the peptide without altering the ability of P_1 to bind copper ions, (b) a substituent that protects the peptide from proteolytic enzymes without altering the ability of P_1 to bind copper ions, or (c) a substituent which is a non-peptide, metal-binding functional group which does not alter the ability of P_1 to bind copper ions.

64. The method of Claim 60 wherein the copper chelator is a peptide dimer having the formula:

30 $P_3 - L - P_3,$

WO 03/007686

PCT/US02/22951

48

wherein:

each P_3 may be the same or different and is a peptide which is capable of binding copper; and

L is a chemical group which connects the two P_3 peptides through their C-terminal amino acids.

65. The method of Claim 64 wherein at least one P_3 is P_1 , wherein P_1 is:

Xaa₁ Xaa₂ His; or

Xaa₁ Xaa₂ His Xaa₃; and

Xaa₁ is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, isoaspartic acid, asparagine, glutamic acid, isoglutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α -hydroxymethylserine;

Xaa₂ is glycine, alanine, β -alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, ornithine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine, methionine, or α -hydroxymethylserine; and

Xaa₃ is glycine, alanine, valine, lysine, arginine, ornithine, aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine or tryptophan.

66. The method of Claim 64 wherein at least one amino acid of P_3 is substituted with (a) a substituent that increases the lipophilicity of the peptide without altering the ability of P_3 to bind copper ions, (b) a substituent that protects the peptide from proteolytic enzymes without altering the ability of P_3 to bind copper ions, or (c) a substituent which is a non-peptide, metal-binding functional group which does not alter the ability of P_3 to bind copper ions.

67. The method of Claim 60 wherein the copper chelator is a peptide having attached thereto a non-peptide metal-binding functional group, wherein the peptide comprises a copper-binding site and/or the non-peptide functional group binds copper.

68. The method of Claim 60 wherein the copper chelator is removed prior to administration of the APC, protein C, activator of protein C or combination of one or more of them.

WO 03/007686

PCT/US02/22951

1/16

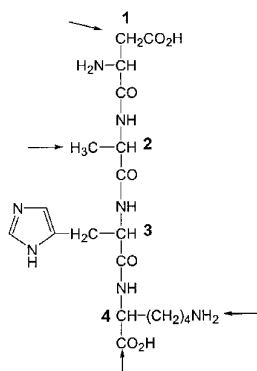


FIG. 1A

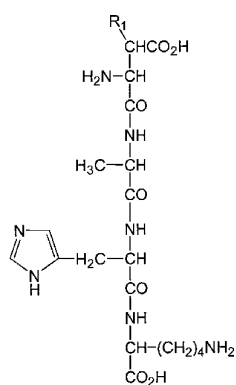


FIG. 1B

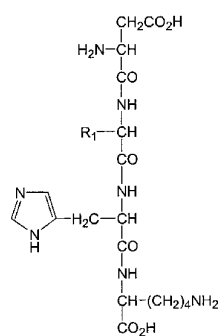


FIG. 1C

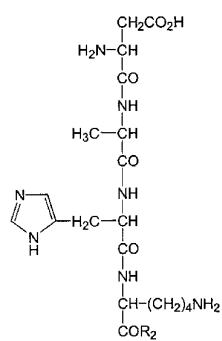


FIG. 1D

WO 03/007686

PCT/US02/22951

2/16

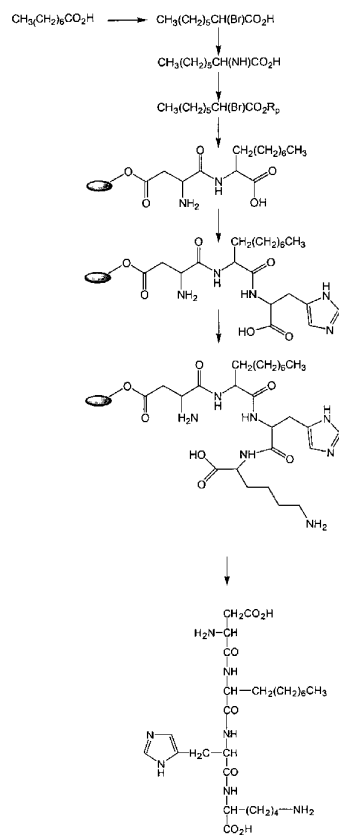


FIG. 2A

WO 03/007686

PCT/US02/22951

3/16

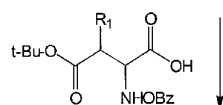
Polymer-----Lys(vN and C-protected)-His(N-protected)-Ala - NH₂Polymer-----Lys(vN and C-protected)-His(N-protected)-Ala - Asp
(substituted with R₁)

FIG. 2B

WO 03/007686

PCT/US02/22951

4/16

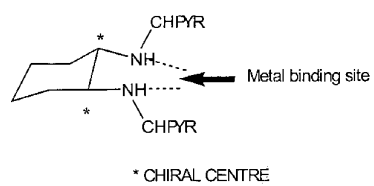


FIG. 3A

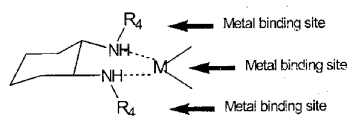


FIG. 3B

WO 03/007686

PCT/US02/22951

5/16

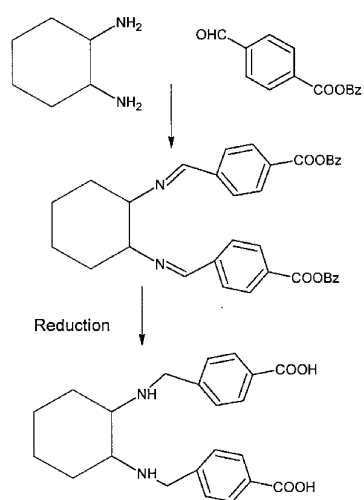


FIG. 3C

WO 03/007686

PCT/US02/22951

6/16

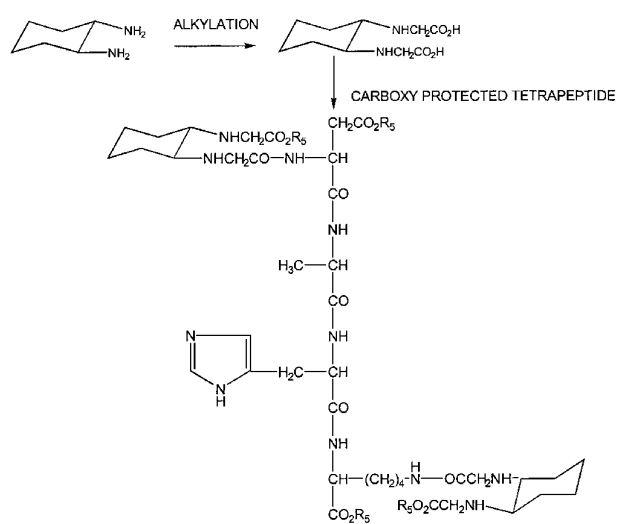


FIG. 3D

WO 03/007686

PCT/US02/22951

7/16

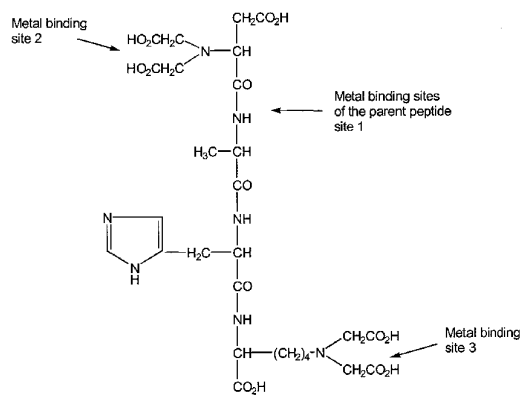


FIG. 4

WO 03/007686

PCT/US02/22951

8/16

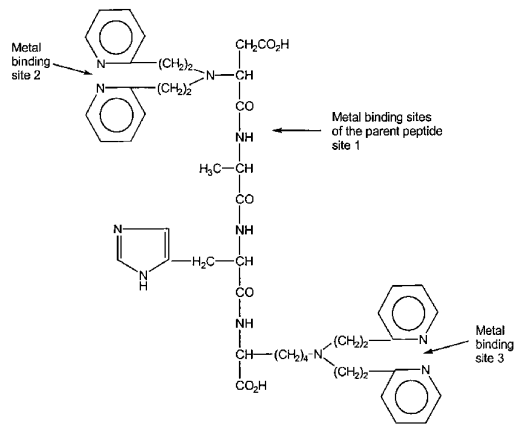


FIG. 5

WO 03/007686

PCT/US02/22951

9/16

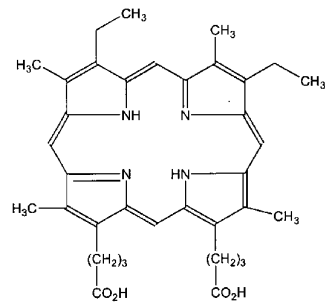


FIG. 6A

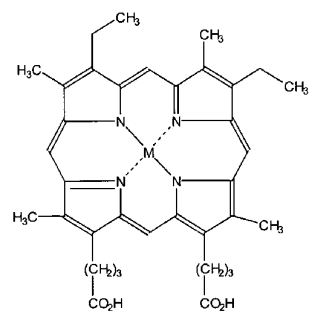


FIG. 6B

WO 03/007686

PCT/US02/22951

10/16

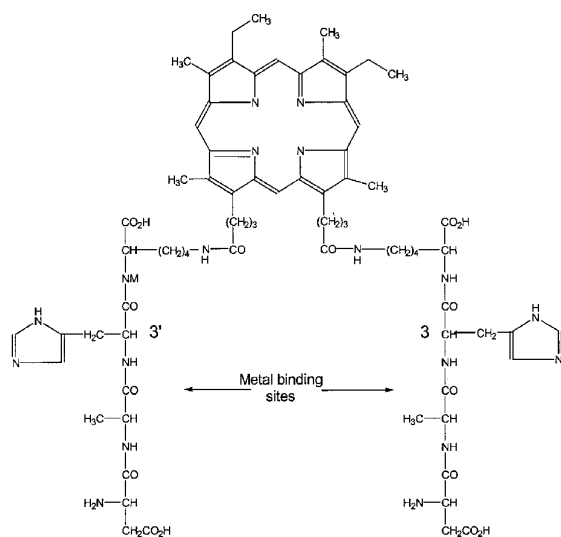


FIG. 6C

WO 03/007686

PCT/US02/22951

11/16

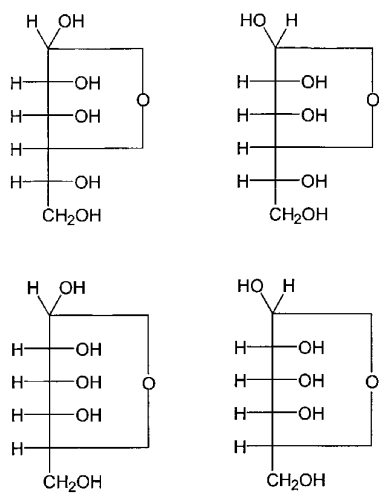


FIG. 7

WO 03/007686

PCT/US02/22951

12/16

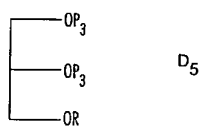
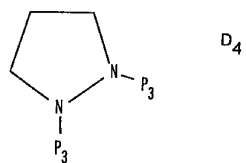
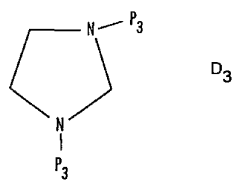
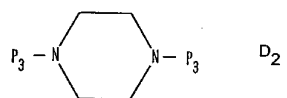
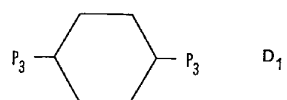


FIG. 8A

WO 03/007686

PCT/US02/22951

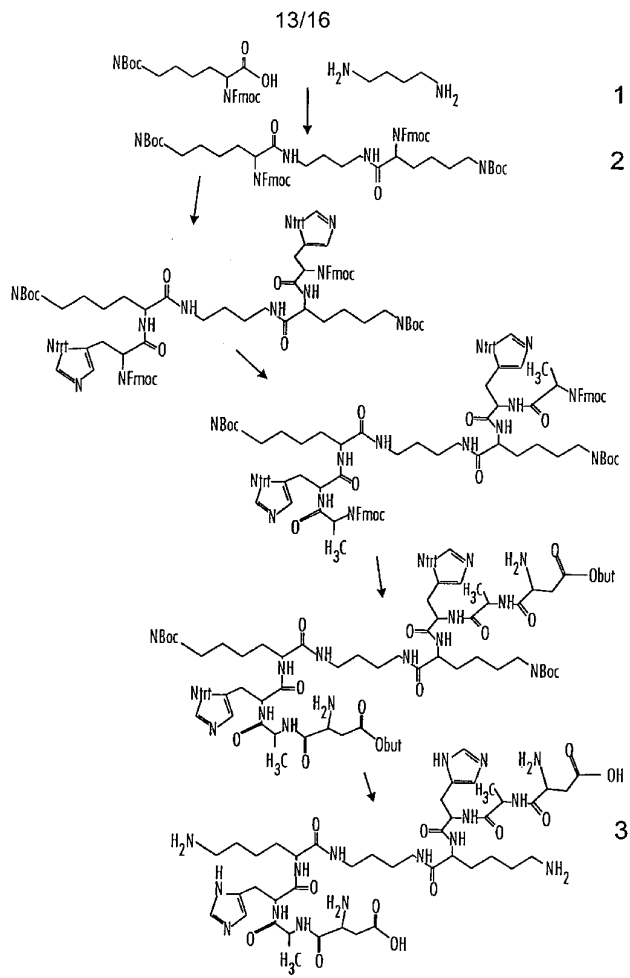
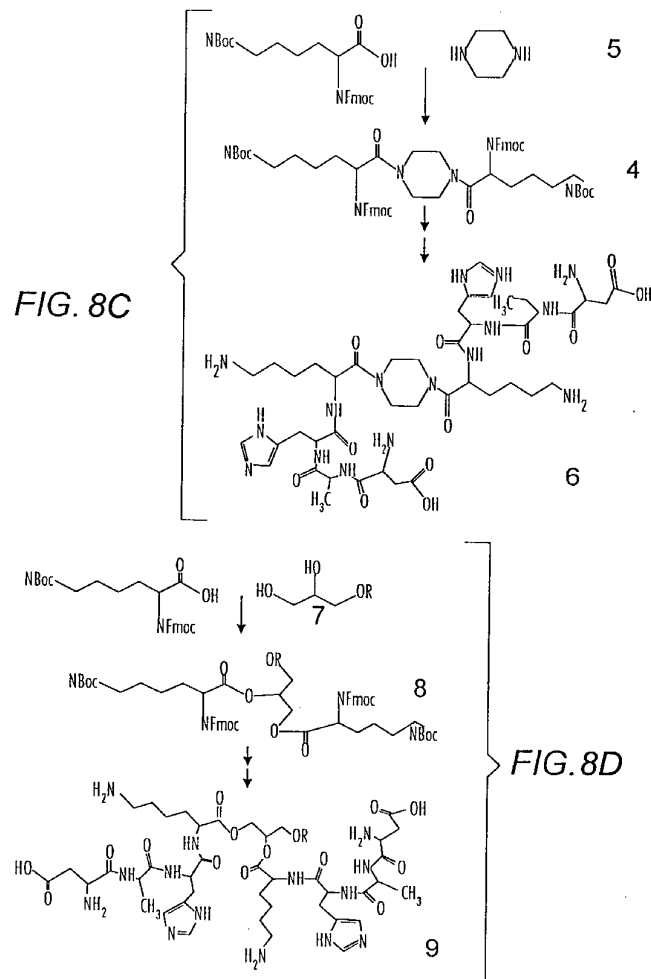


FIG. 8B

WO 03/007686

PCT/US02/22951

14/16



WO 03/007686

PCT/US02/22951

15/16

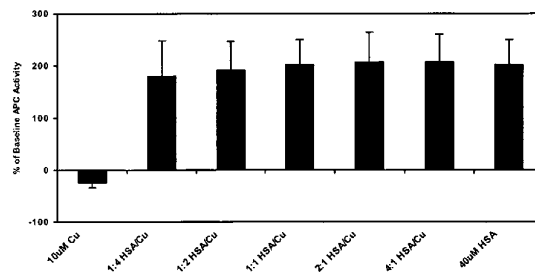


FIGURE 9

WO 03/007686

PCT/US02/22951

16/16

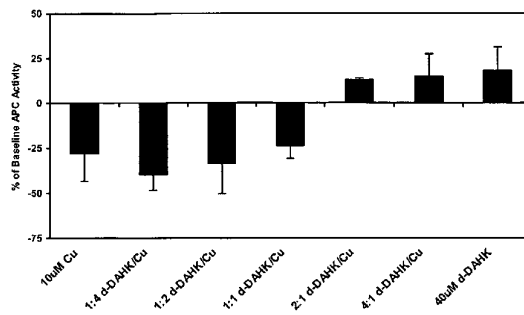


FIGURE 10

WO 03/007686

PCT/US02/22951

SEQUENCE LISTING

<110> DMI BioSciences, Inc.
Bar-Or, David
Yukl, Richard L.

<120> USE OF COPPER CHELATORS TO INHIBIT THE INACTIVATION OF PROTEIN C

<130> 4172-69-PCT

<140> not yet assigned
<141> 2002-07-19

<150> 60/307,005
<151> 2001-07-19

<150> 60/344,514
<151> 2001-12-28

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Asp Ala His Lys
1

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> metal

<220>
<221> METAL
<222> (1)..(8)
<223> copper, nickel and other transition metals

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Orn

<400> 2
Asp Ala His Gly Gly His Ala Xaa
1 5

WO 03/007686

PCT/US02/22951

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Xaa = any amino acid

<400> 3
Gly Met Xaa Cys Xaa Xaa Cys
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Xaa = any amino acid

<400> 4
Gly Met Thr Cys Xaa Xaa Cys
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Enterococcus hirae

<400> 5
Gly Met Thr Cys Ala Asn Cys
1 5

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/007686 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 38/16 (81) Designated States (*national*): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/22951 (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 19 July 2002 (19.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/307,005 19 July 2001 (19.07.2001) US
60/344,514 28 December 2001 (28.12.2001) US
- (71) Applicant: DMI BIOSCIENCES, INC. [US/US]; 3601 S. Clarkson Street #420, Englewood, CO 80110-3948 (US).
- Published:
with international search report
- (72) Inventors: BAR-OR, David; 900 E. Oxford Avenue, Englewood, CO 80110 (US). YUKL, Richard, L.; 3230 S. Monroe Street, Denver, CO 80210 (US).
- (88) Date of publication of the international search report:
6 November 2003
- (74) Agents: CONNELL, Gary, J. et al.; Sheridan Ross P.C., Suite 1200, 1560 Broadway, Denver, CO 80202-5141 (US).
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/007686 A3

(54) Title: USE OF COPPER CHELATORS TO INHIBIT THE INACTIVATION OF PROTEIN C

(57) Abstract: The present invention is based on the unexpected discovery that activated protein C (APC) is inactivated by copper. Accordingly, the invention provides improved methods of treating diseases and conditions treatable with APC which utilize a copper chelator to inhibit the inactivation of APC by copper.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/22951
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/16 US CL : 514/002 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) U.S. : 514/002 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) WEST, CAS online		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,017,888 A (PALLENGER et al) 25 January 2000 (25.01.2000), see entire document.	1-68
A	US 6,162,629 A (BAKER et al) 19 December 2000 (19.12.2000), see entire document.	1-68
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See parent 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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the principles or theory underlying the invention	
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"I" 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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 03 March 2003 (03.03.2003)	Date of mailing of the international search report 07 APR 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Lukton David Telephone No. (703)305-6196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/22951
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 41/00	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 41/00	
	A 6 1 P 43/00	1 2 1

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI, GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,N Z,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 バーオー、デイビッド

アメリカ合衆国 8 0 1 1 0 コロラド州 エングルウッド イー・オックスフォード アベニュー
9 0 0

(72)発明者 ユークル、リチャード エル.

アメリカ合衆国 8 0 2 1 0 コロラド州 デンバー エス・モンロー ストリート 3 2 3 0

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC01 CC04 CC07 CC09 CC11 CC14 CC15 CC16 CC17
CC18 CC19 CC27 CC29 CC32 EE41 FF63 FF68
4C084 AA02 AA19 BA44 DC03 MA02 NA05 ZA01 ZA15 ZA36 ZA45
ZA54 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZA96 ZB08 ZB15 ZB26 ZB35
ZC19 ZC20 ZC35 ZC75