(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2004-507562
(P2004-507562A)
(43)公表日　平成16年3月11日(2004.3.11)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
A61K 31/727	A61K 31/727		4C086
A61K 31/737	A61K 31/737		
A61P 7/02	A61P 7/02		
A61P 43/00	A61P 43/00	111	
	A61P 43/00	121	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 82 頁）

(21)出願番号　特願2002-524573(P2002-524573)
(86)(22)出願日　平成13年9月7日(2001.9.7)
(85)翻訳文提出日　平成15年3月10日(2003.3.10)
(86)国際出願番号　PCT/CA2001/001287
(87)国際公開番号　WO2002/020091
(87)国際公開日　平成14年3月14日(2002.3.14)
(31)優先権主張番号　60/231,429
(32)優先日　平成12年9月8日(2000.9.8)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　397079605
ハミルトン　シビック　ホスピタルズ　リサーチ　ディベロップメント　インコーポレイテッド
カナダ国　エル８ブイ　１シー３　オンタリオ，　ハミルトン，　コンセッション　ストリート　７１１
(71)出願人　391008881
レオ・ファーマ・アクティーゼルスカブ
ＬＥＯ　Ｐｈａｒｍａ　Ａ／Ｓ
デンマーク、デェカー－２７５０バレラップ、インダストリパーケン５５番
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗血栓性組成物

(57)【要約】
本発明は、一般に、トロンビン産生または活性を防止または阻害する組成物および方法に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
医薬として使用される（ａ）少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画および（ｂ）少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせを含む組成物。
【請求項２】
ヘパリンオリゴ糖分画が以下の特性：
（ａ）　インビトロで抗トロンビンおよびヘパリン補因子ＩＩ（ＨＣＩＩ）関連抗凝固活性を有する；
（ｂ）　該オリゴ糖はトロンビンをフィブリンと架橋するには短すぎるが、抗トロンビンまたはＨＣＩＩをトロンビンに架橋するには十分な長さである；
（ｃ）　少なくとも一つまたはそれ以上の五糖配列を有するオリゴ糖を少なくとも１５％、２０％、２５％、３０％、３５％または４０％有する；
（ｄ）　約６０００から約１２０００まで、６０００ないし１１０００または６０００ないし１００００の範囲の分子量を有するオリゴ糖に富む；
（ｅ）　該オリゴ糖は約７０００ないし１００００、７５００ないし９７００または８０００ないし９０００のピーク分子量を有する；
（ｆ）　該オリゴ糖の少なくとも３０％、３５％、４０％、４５％、５０％または５５％が６０００ダルトンより大きなまたはそれに等しい分子量を有する；
（ｇ）　少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％または４０％が８０００ダルトンより大きなまたはそれに等しい分子量を有する；
（ｈ）　１．１ないし１．８の多分散度；および
（ｉ）　抗Ｘａ因子および抗ＩＩａ因子様活性を有する；
のうち一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、六つまたは七つまたはそれ以上の特性により特徴付けられるヘパリンから誘導されるオリゴ糖の混合物を含むところの、請求項１記載の組成物。
【請求項３】
ヘパリンオリゴ糖分画が上記の特性（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）；（ａ）（ｂ）、（ｃ）および（ｅ）；（ａ）、（ｂ）、（ｅ）および（ｆ）；（ａ）、（ｂ）、（ｅ）および（ｇ）；（ａ）、（ｂ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｃ）、（ｅ）および（ｇ）；（ｂ）、（ｄ）、（ｃ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）および（ｈ）；（ｂ）、（ｅ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｅ）、（ｇ）、（ｈ）および（ｉ）；または（ａ）から（ｉ）すべてを有するところの、請求項２記載の組成物。
【請求項４】
ヘパリンオリゴ糖分画が以下の特性：
（ａ）　６０００から１００００ダルトンまでの範囲の、および約８５００の平均値の分子量を有するオリゴ糖に富む；
（ｂ）　白色ないし黄白色の結晶固体である；
（ｃ）　室温で安定である；および
（ｄ）　約１．２ないし１．５の多分散度を有する；
のうち一つまたはそれ以上を有するところの、請求項２記載の組成物。
【請求項５】
デルマタン硫酸オリゴ糖分画が以下の特性：
（ａ）　硫黄含有率が６．０％ないし１０％（ｗ／ｗ）、好ましくは６．０ないし８．０％（ｗ／ｗ）、より好ましくは６．５％ないし８％（ｗ／ｗ）である；
（ｂ）　硫酸基／カルボキシル基の比率が１．２ないし２．５、好ましくは１．２から２．０まで、より好ましくは１．３ないし１．８、最も好ましくは１．３ないし１．６である；
（ｃ）　一硫酸化された二糖含有率のうち二硫酸化された二糖含有率が２０％ないし６０％（ｗ／ｗ）、好ましくは３０％ないし６０％（ｗ／ｗ）である；

（ｄ）　トロンビンに対するヘパリン補因子ＩＩ介在活性が２０ないし６０ＩＵ／ｍｇ、好ましくは３０ないし６０ＩＵ／ｍｇの範囲にある；
のうち一つまたはそれ以上の特性を有するところの、請求項２、３または４記載の組成物。
【請求項６】
デルマタン硫酸オリゴ糖分画が以下の特性：
（ａ）　５０００から８０００ダルトンまでの範囲の分子量を有するオリゴ糖に富む；
（ｂ）　白色ないし黄白色の結晶固体である；
（ｃ）　室温で安定である；および
（ｄ）　６．２重量％より多くがスルホン化されている；
のうち一つまたはそれ以上を有するところの、請求項２，３または４記載の組成物。
【請求項７】
デルマタン硫酸オリゴ糖分画が９０％またはそれ以上で約１６００ないし約２００００ダルトンの範囲にある分子量および約４５００ないし約８０００ダルトンのピーク分子量を有するデルマタン高分子鎖の混合物を含むところの、請求項２，３または４記載の組成物。
【請求項８】
（ａ）および（ｂ）の量がトロンビン産生または活性の防止または阻害において相乗効果を及ぼすのに有効であるところの、請求項１ないし７のいずれか一つに記載の組成物。
【請求項９】
ヘパリンオリゴ糖分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画の投与量が患者におけるトロンビン産生または活性を防止または阻害するのに要する各々の分画の投与量と比べて少なくとも５ないし１０分の１以下であるところの、請求項１ないし８のいずれか一つに記載の組成物。
【請求項１０】
医薬上許容される担体中に相乗効果量の少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画および少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせを含む、医薬組成物。
【請求項１１】
医薬上許容される担体が患者におけるトロンビン産生または活性を阻害または防止するための相乗効果量の分画を提供するのに適合されるところの、請求項１０記載の医薬組成物。
【請求項１２】
有効量の（ａ）少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画；および（ｂ）少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画を患者に投与することを含む患者におけるトロンビン産生または活性を防止または阻害する組み合わせ処置。
【請求項１３】
相乗効果を提供するところの、請求項１２記載の組み合わせ処置。
【請求項１４】
ヘパリンオリゴ糖分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画が同時にまたは別々に投与されるところの、請求項１２または１３記載の組み合わせ処置。
【請求項１５】
ヘパリンオリゴ糖分画が以下の特性：
（ａ）　インビトロで抗トロンビンおよびヘパリン補因子ＩＩ（ＨＣＩＩ）関連抗凝固活性を有する；
（ｂ）　該オリゴ糖はトロンビンをフィブリンと架橋するには短すぎるが、抗トロンビンまたはＨＣＩＩをトロンビンに架橋するには十分な長さである；
（ｃ）　少なくとも一つまたはそれ以上の五糖配列を有するオリゴ糖を少なくとも１５％、２０％、２５％、３０％、３５％または４０％有する；
（ｄ）　約６０００から約１２０００まで、６０００ないし１１０００または６０００ないし１００００の範囲の分子量を有するオリゴ糖に富む；

（ｅ）　該オリゴ糖は約７０００ないし１００００、７５００ないし９７００、または８０００から９０００のピーク分子量を有する；
（ｆ）　該オリゴ糖の少なくとも３０％、３５％、４０％、４５％、５０％または５５％が６０００ダルトンより大きなまたはそれに等しい分子量を有する；
（ｇ）　少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％または４０％が８０００ダルトンより大きなまたはそれに等しい分子量を有する；
（ｈ）　１．１ないし１．８の多分散度；および
（ｉ）　抗Ｘａ因子および抗ＩＩａ因子様活性を有する；
のうち一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、六つまたは七つまたはそれ以上の特性により特徴付けられるヘパリンから誘導されるオリゴ糖の混合物を含むところの、請求項１２、１３または１４記載の組み合わせ処置。
【請求項１６】
ヘパリンオリゴ糖分画が、特性（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）；（ａ）（ｂ）、（ｃ）および（ｅ）；（ａ）、（ｂ）、（ｅ）および（ｆ）；（ａ）、（ｂ）、（ｅ）および（ｇ）；（ａ）、（ｂ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｃ）、（ｅ）および（ｇ）；（ｂ）、（ｄ）、（ｃ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）および（ｈ）；（ｂ）、（ｅ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｅ）、（ｇ）、（ｈ）および（ｉ）；または（ａ）から（ｉ）すべてを有するところの、請求項１５記載の組み合わせ処置。
【請求項１７】
デルマタン硫酸オリゴ糖分画が以下の特性：
（ａ）　硫黄含有率が６．０％ないし１０％（ｗ／ｗ）、好ましくは６．０ないし８．０％（ｗ／ｗ）、より好ましくは６．５％ないし８％（ｗ／ｗ）である；
（ｂ）　硫酸基／カルボキシル基の比率が１．２ないし２．５、好ましくは１．２から２．０まで、より好ましくは１．３ないし１．８、最も好ましくは１．３ないし１．６である；
（ｃ）　一硫酸化された二糖含有率のうち二硫酸化された二糖含有率が２０％ないし６０％（ｗ／ｗ）、好ましくは３０％ないし６０％（ｗ／ｗ）である；
（ｄ）　トロンビンに対する活性が２０ないし６０ＩＵ／ｍｇ、好ましくは３０ないし６０ＩＵ／ｍｇの範囲にある；
のうち一つまたはそれ以上の特性により特徴付けられるところの、請求項１２ないし１６のいずれか一つに記載の組み合わせ処置。
【請求項１８】
デルマタン硫酸オリゴ糖分画が９０％またはそれ以上で約１６００ないし約２００００ダルトンの範囲にある分子量を有し、約４５００ないし約８０００ダルトンのピーク分子量を有するデルマタン高分子鎖の混合物を含むところの、請求項１２ないし１６のいずれか一つに記載の組み合わせ処置。
【請求項１９】
相乗効果量の少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画および少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画を、それを必要とする患者に対して、組み合わせて投与することを含む患者におけるトロンビン産生または活性を阻害または防止する方法。
【請求項２０】
過剰なトロンビン産生または活性に付随した疾患の重症度、疾患の症状および／または疾患の再発の周期性を防止および／または改善するための上記の請求項のいずれかに記載の組成物または組み合わせ処置の使用。
【請求項２１】
トロンビン産生または活性の防止または阻害に関する医薬の調製において（ａ）少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画および（ｂ）少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせを含む組成物の使用。
【請求項２２】

患者におけるトロンビン産生または活性の阻害または防止に関する医薬組成物の調製における相乗効果量の少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画および少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の使用。
【請求項２３】
上記の請求項のいずれかに記載の組成物のキット形態。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（技術分野）
本発明は、一般に、トロンビン産生または活性を阻害または防止する化合物および方法に関する。
【０００２】
（従来技術）
トロンビンの産生亢進は、心不全、心臓発作および深静脈血栓症を含む疾患に特有であるが、生命を脅かすものであって有効な治療が必要である。トロンビンの効果を遮断する様々な市販の製剤がある。ヘパリン、硫酸化された多糖類は、抗トロンビン（ＡＴ）によるトロンビンおよびＸａ因子の阻害を促進することによって抗凝固剤として作用する（１）。ヘパリンは急性冠状血管虚血性症候群の治療に広く使用されるが、経皮冠動脈インターベンションを行う患者（２）、または血栓崩壊治療法の補助剤として使用される場合（３）に限られる。これらの制限は血栓成分に結合する凝固酵素、特にフィブリンに結合するトロンビンを不活化するＡＴ－ヘパリン複合体の失活によるものであった（４、５）。
デルマタン硫酸（ＤＳ）は、実験動物（６－９）およびヒト（１０－１３）において抗血栓活性を有する硫酸化されたグリコサミノグリカンであるが、ヘパリン補因子ＩＩ（ＨＣＩＩ）のみを触媒することによって抗凝固剤として作用する。トロンビンはＨＣＩＩの唯一の血漿標的（ｐｌａｓｍａ ｔａｒｇｅｔ）であるので、ＤＳはトロンビンの選択的阻害剤であると考えられる（１４）。フィブリン結合トロンビンはヘパリン－ＨＣＩＩ複合体による不活化から保護されているが（１５）、血漿系で行われた間接的な研究ではフィブリン結合トロンビンはＤＳ－ＨＣＩＩ複合体による不活化に感受性があるということが示されている（１６）。しかしながら、デルマタン硫酸はその高い粘性に伴う特異性の低い生物学的活性のため臨床での実用には制限がある。
市販の低分子量ヘパリン（エノキサパリンまたはフラグミンのどちらか）にデルマタン硫酸を添加することによってインビトロにおいてトロンビン阻害に付加的な効果が得られた（１７）。しかしながら、試験された組み合わせはフィブリン結合トロンビンに対して有効でなく、ＤＳは有効性が低く難溶性であるので臨床には有用ではない。
【０００３】
（発明の開示）
ヘパリンから得られるオリゴ糖分画（本明細書では「ヘパリンオリゴ糖分画」ともいう）およびデルマタン硫酸から得られるオリゴ糖分画（本明細書では「デルマタン硫酸オリゴ糖分画」ともいう）の組み合わせは流動相トロンビンおよびフィブリン結合トロンビンの両方に有利な阻害効果を提供するということが示された。選択された該ヘパリンオリゴ糖分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせは予想していた付加的な阻害効果以上の、例えば相乗阻害効果を提供した。本発明の新規の意図は該オリゴ糖分画を組み合わせて出血の危険性を上げることなくヘパリンおよびデルマタン硫酸の最大抗凝固活性を保証することである。
組み合わせ処置における各オリゴ糖分画は異なる機構でトロンビンを阻害すると考えられる。理論上の作用機構に縛られたくはないが、該ヘパリンオリゴ糖分画は抗トロンビンを活性化することによって流動相トロンビンと同様にフィブリン結合トロンビンを阻害し、抗トロンビンによるＸａ因子不活化を触媒してトロンビン産生を阻害することが可能である。該デルマタン硫酸オリゴ糖分画はＨＣＩＩを活性化することによってフィブリン結合トロンビンを阻害することが可能である。その活性コンフォメーションにおいて、ＨＣＩＩのアミノ基末端領域がエキソサイトＩ（ｅｘｏｓｉｔｅ Ｉ）に結合する。トロンビン

はエキソサイトＩを介してフィブリンと結合するので、活性ＨＣＩＩはトロンビン結合に関してフィブリンと競合してフィブリンからトロンビンを除去する。除去されたフィブリンはヘパリン／ＨＣＩＩ、デルマタン硫酸／ＨＣＩＩまたはヘパリン／抗トロンビンによって不活化されうる。

【０００４】

最大限の効果を達成するために異なる機構によってトロンビンを阻害する療法の組み合わせは、治療に対する耐性を改善し、単剤療法における薬剤の多量および長期間使用により引き起こされる副作用の危険性を軽減することになるだろう。それゆえ、本発明の組み合わせ処置は各成分の少量の使用を可能にし（例えば、実施例２において説明されるような少なくとも５ないし１０分の１以下の投与量）、一方、各成分の副作用を軽減することができる。少量投与は単剤として使用される場合の各成分における安全域に比べて広範囲の安全域を提供する。加えて、好都合な単一組み合わせ投与単位が患者に提供される場合、利便性の増加は患者の応諾の増加をもたらし、ならびに薬剤の多剤単位投与形に伴うことが多い患者の混乱の可能性を減らすことが一般に認められる。

概して、本発明は患者に有効量の（ａ）少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画；および（ｂ）少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画を投与することを含む患者におけるトロンビン産生または活性を阻害または防止する組み合わせ処置に関する。本発明のある態様において該組み合わせ処置は相乗活性を提供する。別の態様において、有効量（好ましくは相乗効果量）の少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画および少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画を、それを必要とする患者に対して、組み合わせて投与することを含む、患者におけるトロンビン産生または活性を阻害または防止する方法が提供される。

【０００５】

「組み合わせ処置」または「組み合わせて投与する」は活性成分を治療対象の患者に対して同時に投与することを意味する。組み合わせて投与される場合、各要素を同時にまたはいずれの順序でもよいが連続して投与しても、異なる時間に投与してもよい。それゆえ、各成分を別々に投与してもよいが、所望の効果（好ましくは相乗効果）を提供するためには十分に近い時間で投与してもよい。

本発明はまた（ａ）少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画；および（ｂ）少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画と、任意に医薬上許容される賦形剤、担体または媒体との組み合わせを含む組成物も提供する。本発明はまた各含有物において医薬組成物も意図して、ヘパリンオリゴ糖分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画を、任意に医薬上許容される賦形剤、担体または媒体とともに含む同時または連続投与も意図する。

別の具体例において、本発明は少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画の単位投与；および少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の単位投与を、任意に医薬上許容される賦形剤、担体または媒体とともに含む医薬組成物を提供する。

上記の組成物はまた該ヘパリンオリゴ糖およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画のナトリウム、カリウム、アンモニア、マグネシウムおよびカルシウム塩のような、医薬上許容される塩も含む。

【０００６】

一の態様に関して、医薬組成物はトロンビン産生または活性の防止または阻害において相乗効果を及ぼすのに有効な（ａ）少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画；および（ｂ）少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせを含んで提供される。該方法はまた医薬上許容される賦形剤、担体または媒体中に、相乗効果量の少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画および少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせを含む医薬組成物も提供する。

好ましい具体例において、該医薬組成物は患者におけるトロンビン産生または活性を防止または阻害するのに要する各々の分画の投与量と比べて少なくとも５ないし１０分の１以下の投与量でヘパリンオリゴ糖分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画を含む。

別の態様において本発明はトロンビン産生または活性の防止または阻害に関する医薬の調

製において（ａ）少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画および（ｂ）少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせを含む組成物の使用に関するものである。別の態様において本発明は患者におけるトロンビン産生または活性の防止または阻害に関する医薬組成物の調製における相乗効果量の少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画および少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の使用に関する。

【０００７】

本発明は別々に投与されてもよい活性物質の組み合わせを含む治療法に関するものであり、本発明はまたキット形態で該活性物質を含む別々の組成物を組み合わせることに関する。

本発明はまた本発明のオリゴ糖分画に関するものであって、一般に本明細書に記載されるような上記の分画を使用する組成物および治療に関する。

本発明はまた過度のトロンビン産生または活性に付随する疾患の重症度、疾患の症状および／または疾患の再発の周期性を防止および／または改善するための本発明の組成物または本発明の組み合わせ処置の使用を意図する。

上記および他の本発明の態様、特徴および利点は以下の図面および詳細な説明から当業者に公知である。

【０００８】

（図面の簡単な説明）

本発明は以下の図面を参照するとより理解されるだろう：

図１は可溶性フィブリン（Ｆｍ）のＤＳ触媒（パネルＡ）またはヘパリン触媒（パネルＢ）ＨＣＩＩによるトロンビン阻害の二次速度定数に対する効果を示す。ＤＳまたはヘパリン触媒下１００ｎＭ　ＨＣＩＩによる１０ｎＭトロンビンの阻害に関するＦｍのある場合またはない場合の二次速度定数を擬一次条件下で定量した。各点は四つの定量の平均を表し、棒線は標準誤差を表す。

図２は４μＭフィブリンモノマーの抗トロンビン（ＡＴ）トロンビン阻害における効果であって、ヘパリナーゼ誘導ヘパリンオリゴ糖分画の分子量を増加させていった場合の効果を示す棒グラフである。

図３はヘパリンおよびＤＳのフィブリンへのトロンビンの結合における効果を示す。フィブリン凝塊へのトロンビンの結合をヘパリン（・）またはＤＳ（ｏ）の存在下、濃度を増加させて定量した。各点は二つの定量の平均を表して棒線は標準誤差を表す。

図４はヘパリンまたはヘパリナーゼ誘導分画のフィブリン凝塊へのトロンビン結合における効果を示すグラフである。

図５はＤＳまたは標準ヘパリン（ＳＨ）存在下ＨＣＩＩによるフィブリンからのトロンビンの除去を示すグラフである。

【０００９】

図６Ａはヘパリンオリゴ糖分画単独対ヘパリンオリゴ糖分画：デルマタン硫酸オリゴ糖分画の５：１の組み合わせのウサギ動脈血栓症防止モデルにおける開通性の蓄積効果を示すグラフである。

図６Ｂはヘパリンオリゴ糖分画単独対ヘパリンオリゴ糖分画：デルマタン硫酸オリゴ糖分画の５：１の組み合わせのウサギ動脈血栓症モデルにおける出血の蓄積効果を示すグラフである。

図７はヘパリン、ＬＭＷＨ、ヘパリンオリゴ糖分画およびヒルジンの開通性における効果の比較を示すグラフ（パネルＡ）および出血における効果の比較を示すグラフ（パネルＢ）である。

図８はヘパリンオリゴ糖分画のヒヒ動脈血栓症モデルにおける血管移植片上血小板沈着に対する効果を示すグラフである。

図９はデルマタン硫酸オリゴ糖分画のヒヒ動脈血栓症モデルにおける血管移植片上血小板沈着に対する効果を示すグラフである。

図１０はヘパリンオリゴ糖分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせのヒヒ動脈血栓症モデルにおける血管移植片上血小板沈着に対する効果を示すグラフである。

【００１０】
（発明を実施するための最良の形態）
ヘパリンオリゴ糖分画
「ヘパリンから得られるオリゴ糖分画」または「ヘパリンオリゴ糖分画」とはインビトロで抗トロンビン活性およびＨＣＩＩ関連抗凝固活性を有するヘパリンから誘導されるオリゴ糖の混合物のことを言う。該分画はトロンビンをフィブリンと架橋するには短すぎるが、抗トロンビンまたはＨＣＩＩをトロンビンに架橋するには十分な長さであるヘパリン鎖を含む。該分画は以下の特性：
（ａ）　インビトロで抗トロンビンおよびヘパリン補因子ＩＩ（ＨＣＩＩ）関連抗凝固活性を有する；
（ｂ）　該オリゴ糖はトロンビンをフィブリンと架橋するには短すぎるが、抗トロンビンまたはＨＣＩＩをトロンビンに架橋するには十分な長さである；
（ｃ）　少なくとも一つまたはそれ以上の五糖配列を有するオリゴ糖を少なくとも１５％、２０％、２５％、３０％、３５％または４０％有する；
（ｄ）　約６０００から約１２０００まで、６０００ないし１１０００、または６０００ないし１００００の分子量の範囲を有するオリゴ糖に富む；
（ｅ）　該オリゴ糖は約７０００ないし１００００、７５００ないし９７００または８０００から９０００のピーク分子量を有する；
（ｆ）　該オリゴ糖の少なくとも３０％、３５％、４０％、４５％、５０％または５５％が６０００ダルトンより大きなまたはそれに等しい分子量を有する；
（ｇ）　少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％または４０％が８０００ダルトンより大きなまたはそれに等しい分子量を有する；
（ｈ）　１．１ないし１．８の多分散度；および
（ｉ）　抗Ｘａ因子および抗ＩＩａ因子様活性を有し、好ましくは抗Ｘａ因子活性の抗ＩＩａ因子活性に対する比率が約２：１から１：１までである；
のうち一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、六つまたは七つまたはそれ以上を有するヘパリンから誘導されるオリゴ糖の混合物を含んでいてもよい。
本発明のある態様に関して、本発明において使用される分画は上記の特性（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）；（ａ）（ｂ）、（ｃ）および（ｅ）；（ａ）、（ｂ）、（ｅ）および（ｆ）；（ａ）、（ｂ）、（ｅ）および（ｇ）；（ａ）、（ｂ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｃ）、（ｅ）および（ｇ）；（ｂ）、（ｄ）、（ｃ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）および（ｈ）；（ｂ）、（ｅ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｈ）および（ｉ）；（ｂ）、（ｅ）、（ｇ）、（ｈ）および（ｉ）；または（ａ）から（ｉ）すべてを有する。
【００１１】
「オリゴ糖に富む」とは特定のまたは制限した分子量の範囲内で少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％または５０％のオリゴ糖を含む分画のことを言う。
「五糖配列」とは三つのＤ－グルコサミンおよび二つのウロン酸残基から成るヘパリンの基本構造単位のことを言う（下記の構造を参照）。中央のＤ－グルコサミン残基は唯一３－Ｏ－硫酸部分を含有する。
五糖配列は抗トロンビンに対して高親和性のヘパリンの最小構造を表す（Ｃｈｏａｙ，Ｊら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍ １９８３；１１６：４９２－４９９）。ヘパリンの抗トロンビンへの該五糖配列を介しての結合は、反応性に富む中央ループにおいて抗トロンビンを緩慢な阻害剤から非常に速い阻害剤へ転換させる立体配座の変化をもたらす。
ヘパリンオリゴ糖分画はトロンビンをフィブリンと架橋するには短すぎるが、抗トロンビンまたはＨＣＩＩをトロンビンに架橋するには十分な長さであるヘパリン鎖を含む。結果、本発明において選択的に使用される分画は抗トロンビンを触媒して流動相トロンビン同様フィブリン結合トロンビンを阻害し、抗トロンビンによるＸａ因子不活化を触媒してトロンビン産生を阻害することが可能だろう。好ましくは、本発明で選択的に使用される分

画はフィブリン結合トロンビンおよび流動相トロンビンを十分に等しく阻害するものである。
本発明において使用してもよい可溶性ヘパリンオリゴ糖分画の特性は表１および表２で説明される。
【００１２】
本発明において使用されるヘパリンオリゴ糖分画は抗Ｘａ因子様および抗ＩＩａ因子様活性を有していてもよい。ある具体例において、抗Ｘａ因子活性の抗ＩＩａ因子活性に対する比率は約２：１から１：１の範囲である。好ましい具体例において、抗Ｘａ因子活性は約８０ＩＵ／ｍｇないし約１５５ＩＵ／ｍｇ、好ましくは９０ＩＵ／ｍｇないし１４０ＩＵ／ｍｇの範囲である。好ましい具体例において、抗ＩＩａ因子活性は約２０ＩＵ／ｍｇないし約１５０ＩＵ／ｍｇ；さらに好ましくは４０ＩＵ／ｍｇないし約１３０ＩＵ／ｍｇの範囲である。
本発明の組成物、方法およびキットはＰＣＴ／ＣＡ９８／００５４８（ＷＯ９８／５５５１５、１９９８年１２月１０日公開）、１９９９年６月３０日登録米国出願番号６０／１４１，８６５または１９９９年９月１７日登録米国出願番号６０／１５４，７４４、これらはその出典を明示することにより本明細書の一部とする、に記載の修飾ヘパリン組成物を使用してもよい。
上記の（ｄ）、（ｅ）、（ｈ）および（ｉ）で説明される範囲内にあるより好ましい特性を有する本発明において使用されるヘパリンオリゴ糖分画を製造することは可能であるとわかるだろう。例えば、該分画は約７０００ないし１００００；７５００ないし１００００；７８００ないし１００００；７８００ないし９８００；７８００ないし９６００；７８００ないし９０００；７８００ないし８８００；７８００ないし８６００；７８００ないし８５００；または８０００ないし８５００の範囲の分子量を有していてもよい。また７８００ないし１００００；７８００ないし９８００；７８００ないし９６００；７８００ないし９０００；７８００ないし８８００；７８００ないし８６００；７８００ないし８５００；または８０００ないし８５００のピーク分子量を有するヘパリンオリゴ糖分画を使用することも可能であるだろう。本発明の組成物および方法において使用される分画を１．３ないし１．６の多分散度を有するように開発してもよい。加えて、以下の好ましい特性：（ｉ）約１．５：１から約１：１の抗Ｘａ因子活性の抗ＩＩａ因子活性に対する比率；（ｉｉ）約９５ＩＵ／ｍｇから約１２０ＩＵ／ｍｇまでまたは１００ＩＵ／ｍｇから１１０ＩＵ／ｍｇまでの抗Ｘａ因子活性；（ｉｉｉ）約８０ＩＵ／ｍｇから約１００ＩＵ／ｍｇまでまたは９０ＩＵ／ｍｇから約１００ＩＵ／ｍｇまでの抗ＩＩａ因子活性の一つまたはそれ以上を有する分画を本発明で使用するのに開発してもよい。
【００１３】
本発明の具体例において、該ヘパリンオリゴ糖分画は以下の特性：
（ａ）　６０００から１００００ダルトンまでの範囲および平均約８５００の分子量を有するオリゴ糖に富む；
（ｂ）　白色ないし黄白色の結晶固体である；
（ｃ）　室温で安定である；および
（ｄ）　約１．２ないし１．５、好ましくは１．５の多分散度を有する；
のうち一つまたはそれ以上を有する。
本発明で使用されるヘパリンオリゴ糖分画は上記ヘパリンのオリゴ糖の調製に関して従来技術で組織から得られ、またはそれ以外に合成されてもよい。特に、ヘパリンオリゴ糖分画は未分画ヘパリンからまたは、代わりに、低分子量ヘパリン（ＬＭＷＨ）から調製されてもよい。
一例として、ヘパリンオリゴ糖分画はまず未分画ヘパリンを解重合して低分子量ヘパリンを得て、所望のヘパリンオリゴ糖分画を単離または分離することによって未分画ヘパリンから得ることができる。未分画ヘパリンは医薬効果のある市販のヘパリン製剤または哺乳類の組織または器官から活性ヘパリンを抽出して得られるような、粗ヘパリン製剤のどちらかとすることができる。市販のヘパリン製品（ＵＳＰヘパリン）は数種の販売元（例え

ば、シグマケミカル社、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）から、一般にアルカリ金属塩またはアルカリ土類塩として（最も一般的にはナトリウムヘパリンとして）、入手可能である。別法として、未分画ヘパリンは哺乳類の組織または器官から、特に、例えば、ウシ、ブタおよびヒツジからの腸管粘膜または肺から、当業者に公知の様々な方法（例えば、Ｃｏｙｅｎ，Ｅｒｗｉｎ，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｈｅｐａｒｉｎ、（Ｌｕｎｄｂｌａｄ，Ｒ．Ｌ．ら、（Ｅｄｓ．）、ｐｐ．９－１７，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ／Ｎｏｒｔｈ－Ｈｏｌｌａｎｄ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８１）を参照）を使用して抽出してもよい。好ましい具体例において、未分画ヘパリンはブタ腸管粘膜ヘパリンである。

【００１４】

多くのヘパリンの解重合に関する方法が既知であって、それらは一般に化学または酵素反応のいずれかに基づく。例えば、本発明のヘパリンオリゴ糖分画は、標体の未分画ヘパリンをベンジル化してさらにアルカリ金属解重合；亜硝酸解重合；ヘパリナーゼによる酵素解重合；過酸化物解重合等の操作により調製可能である。特に、ヘパリンオリゴ糖分画はＰＣＴ／ＣＡ９８／００５４８（ＷＯ９８／５５５１５）に記載の亜硝酸解重合法または過ヨウ素酸酸化加水分解法を使用して調製されてもよい。

一の具体例において、ヘパリンオリゴ糖分画は、ヘパリナーゼ解重合（例えば、Ｕ．Ｓ．３，７６６，１６７およびＵ．Ｓ．４，３９６，７６２を参照）を使用して未分画ヘパリンから調製される。好ましい具体例において、分画はヘパリナーゼ解重合を制御することによって調製される。

【００１５】

デルマタン硫酸オリゴ糖分画

「デルマタン硫酸から得られるオリゴ糖分画」または「デルマタン硫酸オリゴ糖分画」とは抗トロンビン関連活性をほとんどまたは全く有しないが、インビトロでＨＣＩＩ関連抗凝固活性を有するデルマタン硫酸から誘導されるオリゴ糖の混合物のことを言う。デルマタン硫酸は交互のウロン酸およびＮ－アセチルガラクトサミン残基からなる。大部分のグルクロン酸残基をＣ５－エピマー化してイズロン酸残基を得る。さらに、Ｏ－硫酸化がＧａｌＮＡｃのＣ４位またはＣ６位にまたはＩｄｏＡのＣ２位に起こってもよい。本発明で使用される分画は天然の未分画デルマタン硫酸と比べてＨＣＩＩに対しより高い親和性を示す。

本発明で使用選択されるデルマタン硫酸オリゴ糖分画は以下：

（ａ）　硫黄含有率が６．０％ないし１０％（ｗ／ｗ）、例えば６．０ないし８．０％（ｗ／ｗ）、好ましくは６．５％ないし８％（ｗ／ｗ）；

（ｂ）　硫酸基／カルボキシル基の比率が１．２ないし２．５、例えば１．２から２．０まで、例えば１．３ないし１．８、好ましくは１．３ないし１．６；

（ｃ）　一硫酸化された二糖含有率のうち二硫酸化された二糖含有率が２０％ないし６０％（ｗ／ｗ）、好ましくは３０％ないし６０％（ｗ／ｗ）；

（ｄ）　トロンビンに対するヘパリン補因子ＩＩ介在活性が２０－６０ＩＵ／ｍｇ、好ましくは３０－６０ＩＵ／ｍｇの範囲；

の一つまたはそれ以上、好ましくは全ての特性を有する。

【００１６】

本発明のある具体例において、９０％またはそれ以上で約１６００ないし約２００００ダルトンの範囲である分子量を有し、約４５００ないし約８０００ダルトンのピーク分子量を有するデルマタン高分子鎖の混合物を含むデルマタン硫酸オリゴ糖分画が選択される。

本発明の好ましい具体例において、該デルマタン硫酸オリゴ糖分画は以下の特性：

（ａ）　５０００から８０００ダルトンまでの範囲の分子量を有するオリゴ糖に富む；

（ｂ）　白色ないし黄白色の結晶固体である；

（ｃ）　室温で安定である；および

（ｄ）　６．２重量％より多くがスルホン化されている；

の一つまたはそれ以上を有する。

デルマタン硫酸オリゴ糖分画は未分画デルマタン硫酸からの上記オリゴ糖の調製に関して従来技術で組織から得られ、またはそれ以外に適当な単糖から最初から合成可能である。好ましくは、未分画デルマタン硫酸の高電荷領域の単離を保護し容易にする解重合法が未分画デルマタン硫酸に比較して改善した可溶性および有効性を有する本発明での使用に適した分画を提供するのに使用される。例えば、デルマタン硫酸オリゴ糖分画は以下の工程：過ヨウ素酸酸化によるデルマタン硫酸の酸化および解重合、水素化ホウ素還元、酸加水分解およびイオン交換クロマトグラフィーで調製されてもよい。

【００１７】

該分画を調製するのに使用可能なデルマタン硫酸の供給源は哺乳類の組織、例えば、ブタまたはウシ供給源からの血管組織および皮膚を含む、哺乳類の皮膚を含む。好ましくは腸管粘膜がデルマタン硫酸供給源として使用される。

好ましくは、本発明の組成物、方法およびキットは、ＰＣＴ／ＥＰ９８／０３００７（ＷＯ９８／５５５１４、１９９８年１２月１０日公開、出典明示により本明細書の一部とする）に記載の、デルマタン硫酸オリゴ糖混合物およびかかる混合物の製法を使用する。

【００１８】

オリゴ糖分画の性質の定量

本発明で使用されるヘパリンまたはデルマタン硫酸オリゴ糖分画の分子量特性は当業者に公知のおよび当業者によって使用される標準技術を使用して定量可能である。上記技術は、例えば、ＧＰＣ－ＨＰＬＣ、粘性測定、散光、解重合過程で造られる官能基の化学的または物理化学的定量、などを含む。好ましい具体例において、オリゴ等分画の分子量特性は高性能サイズ排除クロマトグラフィーによって定量される。

特に、以下の方法は本発明で使用されるヘパリンまたはデルマタンオリゴ糖分画の性質および特性を確認するのに使用されるだろう：

（ａ）　Ｄｅｄｅｍ、Ｐｈａｒｍｅｕｒｏｐａ、３，２０２－２１８，１９９１の方法に従うＧＰＣ－ＨＰＬＣによる分子量。

（ｂ）　Ｐｈ．Ｅｕｒ．２．ｅｄ．Ｖ．３．５．３に従う硫黄含有率。

（ｃ）　Ｐｈ．Ｅｕｒ．１９９７：０８２８に従う硫酸基／カルボキシル基の比率。

（ｄ）　基準として４．国際ヘパリン標準（識別番号８２／５０２）を用いる血漿遊離系での色素アッセイ（Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃａ　Ｓｔａｇｏ，　Ｆｒａｎｃｅ）によるＨＣＩＩ介在抗トロンビン活性

（ｅ）　Ｐｈ．Ｅｕｒ．１９９７：０８２８に従う抗Ｘａ因子および抗ＩＩａ因子、両方法とも傾斜比アッセイに関する統計学的方法を使用する点を修飾。

【００１９】

組成物および方法

本発明の組成物および方法はトロンビン産生または活性亢進および／または補体活性亢進を特徴とする状態または疾患の防止または治療に関する治療法として有用である。上記の状態は患者が外傷に曝された場合、例えば外科手術を受けた患者にしばしば生じる。創傷または外科手術によって生じる外傷は血管損傷および血液凝固の二次的な活性化を引き起こす。これらの望ましくない効果は一般または整形外科手術、婦人科手術、心臓血管手術または他の手術法の後に生じるだろう。過剰なトロンビンはまた心不全、心臓発作または四肢の壊死を引き起こすアテローム性動脈硬化のような本来の疾患の進行も複雑にするだろう。それゆえ、本発明の方法および組成物は、不安定狭心症、急性心筋梗塞、（心不全）、脳血管障害（発作）、肺動脈塞栓症、深在静脈血栓症、動脈血栓症、などを含む、多くの主要な心臓血管の合併症を治療、防止または阻害するのに使用可能である。本発明の組成物および方法は透析中の凝固を減らしまたは防止して心臓切開外科手術中の血管内凝固を減らしまたは防止するのに使用されるだろう。それらはまた静脈内注入装置などの医療器具の開通性を維持するのにも使用されるだろう。

【００２０】

本発明のある態様において、方法および組成物は、止血の破綻した医学的状態（ｍｅｄｉｃａｌ　ｃｏｎｄｉｔｉｏｎ）（例えば、冠状動脈疾患、アテローム性動脈硬化等）のた

めに血栓を形成する危険性の高い患者にてトロンビンの産生または活性を防止または阻害するために提供される。別の態様において、方法および組成物は心臓手術、血管手術または経皮冠動脈インターベンションのような、医学的操作の後で血栓を形成する危険性の高い患者に対して提供される。ある具体例において、本発明の方法および組成物は心肺バイパスにおいて使用される。本発明の方法における組成物またはオリゴ糖分画は、医学的操作の前、間または後に投与されてもよい。

治療の効果および毒性はED_{50}（母集団の５０％にて治療上有効な用量）またはLD_{50}（母集団の５０％に及ぶ致死量）統計を計測するような細胞培地中または実験動物を用いる標準の医薬的方法で定量される。治療指数は治療作用の毒性作用に対する用量比であって、ED_{50}／LD_{50}比として表すことができる。高い治療指数を示す医薬組成物が好ましい。

【００２１】

組み合わせ処置を受けてもよいまたは本発明の組成物を投与されてもよい患者は哺乳類、特にヒトを含む動物を含む。動物はまたウマ、ウシ、ヒツジ、鳥類、魚類、ブタ、ネコ、イヌおよび動物園の動物を含む、家畜動物も含む。

本発明の組成物、ヘパリンオリゴ糖分画またはデルマタン硫酸オリゴ糖分画は、患者の体内で活性物質を物質の作用部位と接触させるいずれかの方法によって投与可能である。該ヘパリンおよびデルマタン硫酸オリゴ糖分画は所望の効果を提供するために、同時にまたはいずれの順序でもよいが連続して投与しても、異なる時間に投与してもよい。本発明の組成物および方法の効果を最大限にする投与法の選択は熟練の内科医または獣医の器量の範疇である。該組成物は錠剤、カプセル（その各々は持続放出または時間放出処方を含む）、丸剤、散剤、顆粒、エリキシル、チンキ、懸濁液、シロップおよび乳剤のような経口剤形で投与されてもよい。それらはまた静脈内（ボーラスまたは注入）、腹腔内、皮下または筋内形態で投与されてもよく、使用する剤形はすべて当医薬業者に通常の技術として公知である。本発明の組成物は適当な鼻内媒体の局所的使用を介する、または経皮経路を介する、例えば従来の皮膚パッチを使用する鼻内形態で投与されてもよい。経皮放出系における投与形は投与法全般において間欠的というよりむしろ継続的であるだろう。

【００２２】

本発明は相乗活性を提供するまたは相乗効果量のデルマタン硫酸またはヘパリンオリゴ糖分画を供給する組み合わせ処置を含む。本発明に適した医薬組成物は活性成分が相乗効果量だけ包含される組成物を含む。「相乗活性」または「相乗効果量」とは十分な量の該ヘパリンオリゴ糖分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画が各分画単独で達成される効果より優れた所望の効果、例えば、上記のような、血栓関連心臓血管状態を治療する際のトロンビン付着の阻害改善、例えば、血餅結合トロンビンの不活化改善、抗トロンビンによるＸａ因子不活化を触媒することによるトロンビン産生の阻害改善、などを達成するために提供されるということを意味する。

本発明の投与法は特定の物質およびその投与形態および投与経路という薬力学的な特性；患者の人種、年齢、性別、健康状態、医学的状態、および体重、症状の種類および程度、同時治療の種類、治療の頻度、投与経路、患者の腎および肝機能、および所望の効果のような既知の因子によって変化するだろう。状態の進行を防止、対抗または阻止するのに要する有効量の薬剤は通常の熟練の内科医または獣医によって容易に定量される。

【００２３】

本発明の組成物または方法は少なくとも一つのヘパリンオリゴ糖分画の単位投与形および少なくとも一つのデルマタン硫酸オリゴ糖分画の単位投与形を含むだろう。「単位投与形」は単位、例えば患者に投与可能な、および上記の活性物質またはそれの固体または液体医薬賦形剤、担体または媒体との混合物を含む物理的および化学的に安定な単位投与量のまま、容易に扱われ封入される一回投与量について言う。

典型的には、活性物質例えば、該ヘパリンオリゴ糖分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画は、各々医薬組成物として一回投与量当たり約２ｍｇから一回投与量当たり１０００ｍｇまでの範囲の濃度内におよび、より好ましくは、一回投与量当たり約５ｍｇから一回投

与量当たり５００ｍｇまでの範囲の濃度内にあるだろう（または本発明の方法で使用される）。一日投与量は広範囲に変化するが、通常一日一回投与量当たり約２０ｍｇから一日一回投与量当たり約１００ｍｇまでの範囲の濃度内におよび、より好ましくは、一日一回投与量当たり約４０ｍｇから一日一回投与量当たり約８０ｍｇまでの範囲の濃度内にあるだろう。

本発明の組成物または方法におけるヘパリンオリゴ糖分画のデルマタン硫酸オリゴ糖分画に対する比率は１：１ないし１０：１、好ましくは１：１ないし８：１、より好ましくは２：１ないし６：１、最も好ましくは５：１であるだろう。

【００２４】

本発明の組成物またはその分画は典型的には意図される投与形態に基づき、従来の医薬製法に一致して選択される適当な医薬希釈剤、賦形剤、媒体または担体を含む。担体、媒体などは患者におけるトロンビン産生または活性を阻害または防止するために相乗効果量の活性分画を提供するのに調整されるだろう。

適当な医薬希釈剤、賦形剤、媒体および担体は標準参考書、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙに記載される。カプセルまたは錠剤の形態での経口投与の例では、該活性要素をラクトース、スターチ、スクロース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、グルコース、硫酸カルシウム、リン酸二カルシウム、マンニトール、ソルビタールおよびその類似物のような経口、無毒の医薬上許容される不活性の担体で合してもよい。液体形態での経口投与では、薬剤要素はエタノール、グリセロール、水およびその類似物のようないずれの経口、無毒の、医薬上許容される不活性の担体で合してもよい。適当な結合剤（例えば、ゼラチン、スターチ、コーン甘味料、グルコースを含む天然糖；天然および合成ガムおよびワックス）、潤滑剤（例えば、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよび塩化ナトリウム）、崩壊剤（例えば、スターチ、メチルセルロース、寒天、ベントナイトおよびキサンタンガム）、芳香剤および着色料をまた該組成物またはその要素内に合してもよい。

本発明の組成物の非経口投与での処方は綿実油、ココナッツ油またはピーナッツ油のような食用油とともに水溶液、シロップ、水性または油性懸濁液および乳液を含むだろう。水性懸濁液として使用可能な分散または懸濁剤は、トラガカント、アルギナート、アカシア、デキストラン、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ゼラチン、メチルセルロースおよびポリビニルピロリドンのような、合成または天然ガムを含む。

【００２５】

非経口投与の組成物は、水、等張性食塩水、等張性グルコース溶液、緩衝液または治療活性物質の非経口投与で有利に使用される他の溶媒のような、無菌の水性または非水性溶媒を含むだろう。非経口投与で意図される組成物はまた安定剤、緩衝液または保存料のような従来の添加物、例えば、メチルヒドロキシベンゾエートまたは類似添加物のような抗酸化剤も含むだろう。

本発明の組成物は、例えば、細菌留めフィルタを通す濾過、該組成物への無菌化剤の添加、該組成物の照射または該組成物の加熱によって無菌化されてもよい。別法として、本発明の分画は無菌固体製剤、例えば、凍結乾燥散剤、それは使用直前に無菌溶媒に容易に溶ける、として提供されてもよい。

上記の処方に加えて、該組成物はまた貯留（ｄｅｐｏｔ）製剤として処方されてもよい。上記の長期作用処方は埋め込み（例えば、皮下または筋内）でまたは筋内注射で処方されてもよい。それゆえ、例えば、該分画は適当なポリマーまたは疎水性物質（例えば、許容される油状物質内の乳剤のような）またはイオン交換樹脂または、例えばやや溶けにくい塩のような、やや溶けにくい誘導体として処方されてもよい。

【００２６】

本発明の組成物およびその要素は適当な薬剤担体として可溶性ポリマーを含んでもよい。医薬組成物を調製した後、それらは適当な含有物で置換されても意図した状態の治療に関して標識されてもよい。本発明の組成物の投与に関して、上記の標識は投与量、投与頻度

および投与法を含むだろう。
本発明はまたアスピリン、プリオキシカム（ｐｒｉｏｘｉｃａｍ）、クロピドグレル（ｃｌｏｐｉｄｏｇｒｅｌ）、チクロピジンまたはグリコプロテインＩＩｂ／ＩＩＩａ受容体アンタゴニストのような抗血小板または血小板阻害剤、ボロペプチド（ｂｏｒｏｐｅｏｔｉｄｅｓ）、ヒルジンまたはアルガトロバンのようなトロンビン阻害剤；またはプラスミノゲンアクチベーター（組織プラスミノゲンアクチベーターのような）、アニストレプラーゼ（ａｎｉｓｔｒｅｐｌａｓｅ）、ウロキナーゼまたはストレプトキナーゼのような、血栓崩壊またはフィブリン溶解剤；またはその組み合わせに限らず含む一つまたはそれ以上の別の治療薬と本発明の組成物の併用法も含む。
上記の心臓血管状態の治療に関する医薬組成物において有用であることに加えて、当業者は該活性製剤がインビトロで血液凝固の機構を説明するのに試薬として使用可能であることが容易にわかるだろう。
本発明は特定の実施例によって比較的詳細に記載されるものである。以下の実施例は説明の目的で提供され、いかなる方法においても本発明を制限することを意図するものではない。当業者には変化させてまたは修正して本質的に同様の結果を得られる様々な決定的でないパラメーターが容易にわかるだろう。
【００２７】
実施例１
本発明で使用される数種類のヘパリンオリゴ糖分画および他のヘパリン分画（シグマ製ＵＦＨおよびＲｈｏｕｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｒｏｒｅｒ製エノキサパリン）の特性は表２において開示される。表の数値は平均分子量、活性、抗$ＩＩ_a$活性、多分散度および$Ｋ_d$値を含む。多分散度は$Ｍ_Ｗ$／$Ｍ_ｎ$（数平均分子量で割った重量平均分子量）であってヘパリン標本のゲル濾過ピークプロフィールに関する積分表（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ ｔａｂｌｅｓ）のデータを分析して定量される。$Ｋ_d$値はＡＴまたは$ＩＩ_a$の一方をヘパリン標本で滴定する際に観察される蛍光（２８０ｎｍ励起、３４０ｎｍ発光）の増加を平均して、$Ｉ／Ｉ_0$対（ｖｅｒｓｅｓ）ヘパリン濃度の滴定曲線を結合等温式（ｂｉｎｄｉｎｇ ｉｓｏｔｈｅｒｍ ｅｑｕａｔｉｏｎ）に適応させて、α（最大蛍光変化量）、$Ｋ_d$（解離定数）およびｎ（リガンド一モルに結合すのに要するヘパリンのモル数）を解いて得られた。結合リガンドの化学量論量（１／ｎ）を得、各ヘパリン分画内の五糖配列含有鎖の割合と解釈される。
選択されるヘパリンオリゴ糖分画は、ヘパリンとは異なり、トロンビンのフィブリンへの結合を安定化しない。これはフィブリンモノマーの添加によってＡｔおよびＨＣＩＩ存在下の未分画ヘパリンによるトロンビン不活化の比率が減るという研究で実証された。対照的に、フィブリンモノマーは等モル濃度の該ヘパリンオリゴ糖分画存在下のＡＴまたはＨＣＩＩによるトロンビン不活化の比率に対して最小の阻害効果のみを有する。選択されるヘパリンオリゴ糖分画はフィブリンに結合するトロンビンを増加させないというさらなる研究が０から７５００ｎＭまでの範囲の濃度内で該ヘパリンオリゴ糖分画または未分画ヘパリンの一方がある場合またはない場合でフィブリン凝塊に結合する$Ｉ^{125}$標識トロンビンの量を測定することによって得られた。
【００２８】
実施例２
ヘパリン分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画の抗トロンビン活性
ヘパリンオリゴ糖分画、デルマタン硫酸オリゴ糖分画およびヘパリンおよびデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせの抗トロンビン活性を比較するために体外循環を使用した。上記の循環はＷｅｉｔｚら、１９９９に詳細に記載される。要するに、異なる濃度の試験化合物を$Ｉ^{125}$標識ヒトフィブリノゲンで標識したカルシウム再沈着ヒト全血液に加えて水槽内に３７℃で維持する。蠕動ポンプで全血液を４０μ血液フィルタに通して循環させる。フィルタ内の血餅を内圧力計（ｉｎ－ｌｉｎｅ ｐｒｅｓｓｕｒｅ ｇａｕｇｅ）でフィルタに近い圧力を測定して検出する。一連の血液標本を内貯蔵器（ｉｎ－ｌｉｎｅ ｒｅｓｅｒｖｏｉｒ）から除去してフィブリノゲン消費量および血餅形成の指標として残

留放射能を数える。さらに、凝固活性化開始時間を測定した。
二つの重要な基準、開通性および凝固過程において消費されるフィブリノゲンの割合は、このモデルで試験される化合物の効果を評価するのに使用される。開通性は濾過終了までの時間として測定される。実験は９０分で終了するため、開通性の時間の上限を定義する。
実験において使用されるデルマタン硫酸オリゴ糖分画（実施例および表３ではＬＭＷＤＳとしても記載）は以下の特性：Ｍｐ：５０００Ｄａ、Ｍｗ：７６００Ｄａおよび１．４の多分散度を有する。ヘパリナーゼ誘導ヘパリンオリゴ糖分画は本明細書記載のヘパリナーゼ解重合によって得られ、８０００のピーク分子量、約１００ＩＵ／ｍｇの抗ＩＩａ活性、約１３４ＩＵ／ｍｇの抗Ｘａ活性および約１．５の多分散度を有する。一酸化二窒素誘導ヘパリンオリゴ糖分画はＰＣＴ／ＣＡ９８／００５４８記載の一酸化二窒素解重合によって得られ、７７００の分子量、８４ＩＵ／ｍｇの抗ＩＩａ活性、１２３ＩＵ／ｍｇの抗Ｘａ活性および約１．３の多分散度を有する。過ヨウ素酸塩誘導ヘパリンオリゴ糖分画はＰＣＴ／ＥＰ９８／０３００７（１９９８年１２月１０日公開、ＷＯ９８／５５５１４）記載の過ヨウ素酸塩解重合によって得られ、７９００のピーク分子量、１９ＩＵ／ｍｇの抗ＩＩａ活性、４３ＩＵ／ｍｇの抗Ｘａ活性および約１．５の多分散度を有する。
【００２９】
約８０００ダルトンのピーク分子量を有するヘパリン分画を選択した。というのも、この分画が約２７糖単位から成る鎖に一致するからである。最小１８糖単位の長さがトロンビンを抗トロンビンに架橋するのに必要とされる。ほとんど全てのこれら分画の鎖は１８以上の糖単位から成るので、それらは抗トロンビンによるトロンビンの不活化を触媒するのに十分な長さである。対照的に、これらの鎖はトロンビンをフィブリンに架橋するには短すぎる、なぜならこの架橋反応は４０糖単位またはそれ以上（例えば１２０００Ｄａまたはそれ以上）から成る鎖を必要とするからである。結果的に、８０００の平均分子量を有するヘパリン分画は抗トロンビンを活性化する能力によってトロンビンに対して優れた阻害活性を有し、トロンビンをフィブリンに架橋せずヘパリン／抗トロンビンまたはヘパリン／ＨＣＩＩ複合体に対抗しないのでフィブリン結合トロンビンを不活化できる。対照的に、エノキサパリン、約５０００の分子量を有する市販の低分子量ヘパリン（Ｒｈｏｕｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｐｏｒｅｒ、モントリオール、ＰＱ）は、トロンビンを抗トロンビンに架橋するにはほとんど短すぎる鎖から成るので、なぜそのトロンビンに対する阻害活性がＸａ因子に対する阻害活性に比べて低いのかが説明される。
上記（Ｗｅｉｔｚ ＪＩら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １９９９；９９：６８２－６８９）の通り、異なる濃度の各分画をI^{125}標識ヒトフィブリノゲンで標識したカルシウム再沈着ヒト全血液に加えて水槽内に３７℃で維持した。全血液を４０μ血液フィルタに通して循環させるのに蠕動ポンプを使用した。（ａ）フィルタ内の血餅を内圧力計でフィルタに近い圧力を測定し、（ｂ）一連の血液標本を内貯蔵器から除去してフィブリノゲン消費量の指標として残留放射能を数えて検出した。さらに、凝固活性化開始時間もまた測定した。
【００３０】
表３に説明されるように、単独で使用される場合、２５０μｇ／ｍｌのデルマタン硫酸オリゴ糖分画濃度が濾過開通性を維持して＜１０％までフィブリノゲン消費量を減らすのに必要とされた。これは上記の操作で、未分画デルマタン硫酸が４ｍｇ／ｍｌの濃度でさえ上記の循環では無効であったという報告（Ｗｅｉｔｚら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ、１９９９）からも顕著である。
低分子量デルマタン硫酸および８０００Ｄａヘパリナーゼ誘導ヘパリン分画またはエノキサパリンの組み合わせもまた評価した。ＬＭＷＤＳは１μｇ／ｍｌの８０００Ｄａヘパリナーゼ誘導ヘパリン分画と併用した場合１００μｇ／ｍｌで、または２μｇ／ｍｌの該ヘパリン分画と併用した場合５０μｇ／ｍｌで有効であった。対照的に、５０μｇ／ｍｌのＬＭＷＤＳは３μｇ／ｍｌのエノキサパリンと併用した場合無効であり、８０分で濾過終了、フィブリノゲン消費量は８５％であった。これはヘパリナーゼ誘導分画がエノキサパ

リンに比べて有効であることを示す。
ＬＭＷＤＳおよび８０００Ｄａヘパリナーゼ誘導ヘパリン分画が併用される場合、二つの薬剤は、各々、薬剤が単独で使用される場合開通性を維持するのに要する投与量に比べて５および１０分の一の投与量で有効である（例えば、５０対２５０μｇ／ｍｌのＬＭＷＤＳおよび１対１０μｇ／ｍｌの８０００Ｄａヘパリナーゼ誘導分画）。
ＬＭＷＤＳ（５０μｇ／ｍｌ）、ヘパリナーゼ、亜硝酸および過ヨウ素酸塩誘導ヘパリン分画およびエノキサパリンの組み合わせを比較した（全て２μｇ／ｍｌ）。ＬＭＷＤＳおよびヘパリナーゼまたは亜硝酸誘導ヘパリン分画の組み合わせは有効であった。他の二つの組み合わせは有効ではなかった（表４参照）。
さらにヘパリナーゼ誘導分画およびエノキサパリンを評価するために、二つを等重量投与量で比較した（表５）。３０μｇ／ｍｌでさえ、エノキサパリンは１０μｇ／ｍｌのヘパリナーゼ誘導分画に比べて効果が低かった。

【００３１】

実施例３

ＨＣＩＩによるヘパリンおよびＤＳ触媒トロンビン阻害率に対するフィブリンモノマーの効果の比較

可溶性フィブリン、上記の通り調製される（１５）、のＨＣＩＩによるトロンビンの阻害率に対する効果をまずＤＳまたはヘパリンの濃度を増加させてある場合またはない場合で試験した。ＨＣＩＩによるトロンビンの阻害に関する二次速度定数（ｋ２）を擬一次状態下３．３μＭのヘパリンまたはＤＳまたは４μＭＳＦ、または両方のある場合またはない場合で定量した。トロンビン（１０ｎＭ）をＴＢＳ含有０．６％ＰＥＧ－８０００内で様々な濃度のヘパリンまたはＤＳ（０ないし１１μＭ）、ＳＦ（０ないし４μＭ）、１０ｍＭＧＰＲＰ－ＮＨ２および１５ｍＭトリス塩酸、ｐＨ７．５存在下５分間室温でインキュベートした。反応混合物（１０μｌ）を９６ウェル丸底マイクロタイタープレートにアリコートして同体積のＨＣＩＩ（トロンビンの少なくとも１０倍の濃度）を２から５秒の範囲の時間間隔で各ウェルに加えた。全反応を１０ｍｇ／ｍｌポリブレン（ｐｏｌｙｂｒｅｎｅ）含有２００μｌＴＢＳ中２００μＭの色素基質（ｔＧＰＲ－ｐＮＡ）を加えて終了した。残留トロンビン活性をＳｐｅｃｔｒａ Ｍａｘ ３４０ Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ Ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ、Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ、ＣＡ）を使用して４０５ｎｍで吸光度を５分間測定して計測した。データを方程式：$k_1 t = \ln([P]_0 / [P]_t)$（式中、$[P]_0$は開始トロンビン活性であって$[P]_t$は時間ｔにおけるトロンビン活性である）に適合させることによりトロンビン阻害に関する擬一次速度定数（k_1）を定量した。k_1をＨＣＩＩ濃度で割って二次速度定数、k_2を定量した（１５）。図１（パネルＡ）で示されるように、可溶性フィブリン（Ｆｍ）は、２または４μＭの濃度で、ＨＣＩＩによるトロンビン阻害のＤＳ触媒比率において３倍弱の減少を引き起こすにすぎない。対照的に、ＦｍはＨＣＩＩによるトロンビン阻害のヘパリン触媒比率において投与量依存性減少を引き起こす（パネルＢ）。１μＭヘパリンおよび４μＭＦｍでは、比率において最大２４０倍の減少が観察され、上記の報告（１５）の値に一致する。

【００３２】

抗トロンビンによるトロンビン不活化の比率に対するヘパリンおよびヘパリナーゼ誘導分画存在下フィブリンモノマーの効果の比較

類似の方法を使用して、ヘパリンまたは８０００Ｄａヘパリナーゼ誘導分画存在下での抗トロンビンによるトロンビン不活化の比率に対する可溶性フィブリンモノマーの効果を比較した。図２に説明されるように、ヘパリン存在下で、トロンビン不活化の比率は４μＭフィブリンモノマーの存在下で約４５倍減少した。対照的に、フィブリンモノマーは８０００Ｄａヘパリナーゼ誘導分画存在下でのトロンビン不活化の比率において１０倍の減少のみであった。

【００３３】

^{125}Ｉ－ＦＰＲ－トロンビンのフィブリンへの結合に対するヘパリン、ＤＳまたは８０

００ヘパリナーゼ誘導分画の効果
ヘパリンはトロンビンのフィブリンへの結合を高めること、ＡＴへの親和性が高いまたは低いに関わらず生じるが、１１２００Ｄａまたはそれ以上のヘパリン鎖のみで生じる効果が以前に示された（１８）。この研究では、ＤＳのフィブリンへのトロンビン結合を促進する能力がヘパリンの能力と比較された。これを行うために、活性部位遮断トロンビン（ＦＰＲトロンビン）および^{125}Ｉ－ＦＰＲトロンビンが記載される通りに調製された（１９）。ヘパリンまたはＤＳの一方のある場合またはない場合での^{125}Ｉ－ＦＰＲトロンビンのフィブリン凝塊への結合がＴＢＳ含有０．６％ＰＥＧ－８０００および０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０内で研究された。フィブリノゲン（７．５μＭ）を総体積４０μｌで上昇する濃度（０から２．５μＭまで）のいずれかのヘパリンまたはＤＳと一緒に一連の微小沈殿管（カタログ番号７２．７０２、Ｓａｒｓｔｅｄｔ Ｉｎｃ．、Ｓｔ．Ｌａｕｒｅｎｔ、ＰＱ）内でインキュベートした。１０ｍＭ塩化カルシウム、５００ｍＭ^{125}Ｉ－ＦＰＲトロンビンおよび１０ｎＭトロンビン含有株Ａ１０μｌを加えて凝固を開始させた。室温で４５分インキュベートした後、フィブリンを５分間１５０００×ｇで遠心分離してペレット状にし、上澄みのアリコートをガンマ計数機で除去した。フィブリンに結合するトロンビン分画をグリコサミノグリカンを含有しない対照と比較して^{125}Ｉ－ＦＰＲトロンビン結合における変化として計測した。図３に示されるように、ＤＳは１μＭ以下の濃度でさえフィブリン凝塊に結合する^{125}Ｉ－ＦＰＲトロンビンに対する効果を有しない。対照的に、２５０ｎＭまでの濃度では、ヘパリンは投与量依存性にフィブリン凝塊に結合する^{125}Ｉ－ＦＰＲトロンビンを増加させる。２５０ｎＭ以上のヘパリン濃度では、凝塊に結合する^{125}Ｉ－ＦＰＲトロンビンは減少し、明瞭なヘパリン－フィブリンおよびヘパリン－トロンビン集団が蓄積するだろう。トロンビンおよびＦｍ－セファロースを低分子量（ＬＭＷ）ヘパリン（エノキサパリン）で滴定する場合、ＤＳで観察されたものに比較してトロンビン結合量において少量しか増加しなかった。エノキサパリンでの発見は予期したものである、なぜなら該ヘパリン鎖はトロンビンをフィブリンに架橋するには短すぎるためである。
トロンビンのフィブリンへの結合を促進する８０００Ｄａヘパリナーゼ分画の能力もまたヘパリンの能力と比較した。図４で示されるように、ヘパリナーゼ誘導分画はトロンビン結合において少ししか増加させなかったのに対し、ヘパリンは大幅な増加を引き起こした。これらの発見はエノキサパリンのように、ヘパリナーゼ誘導分画内の鎖もまたトロンビンをフィブリンに架橋するには短すぎるということを示す。

【００３４】
ＨＣＩＩによるＦｍセファロースからのＩＩａの除去
ＨＣＩＩによるトロンビン阻害の触媒はＤＳの存在下ではフィブリンによって損なわれないので、トロンビン上のエキソサイトＩは仮にトロンビンがこの部位を介してフィブリンに結合していてもＤＳ－ＨＣＩＩ複合体に接触可能でなければならない。この観察はＤＳ－ＨＣＩＩ複合体がトロンビンをフィブリンから除去できることが必要であることを前提とする。これはＤＳのある場合またはない場合でＨＣＩＩの濃度を増加させてＦｍセファロースから除去した^{125}Ｉ－ＦＰＲトロンビンの量をモニターすることによって試験された（図５）。ＨＣＩＩ単独、生理的濃度の三倍までの濃度で、ではトロンビンをＦｍセファロースから除去する能力は制限される。ＤＳが２．５μＭで存在する場合、トロンビンの除去が観察された。ＨＣＩＩの生理的濃度で除去は最大であって、約２５０ｎＭＨＣＩＩで最大効果の半分であった。それゆえ、ＤＳの存在下では、ＨＣＩＩのアミノ基末端はトロンビンエキソサイトＩへの結合に関してフィブリンと有効に競合することができる。これらの発見はＤＳ／ＨＣＩＩ複合体が不活化させることによってフィブリンからトロンビンを除去できるということを示す。

【００３５】
実施例４
効果対出血研究
ウサギ動脈血栓症防止モデル

ウサギ動脈血栓症防止モデル（Ｇｒｅｅｎら、Ｊ．Ｌａｂ Ｃｌｉｎ Ｍｅｄ．１２７：５８３－５８７、１９９６；Ｋｌｅｍｅｎｔら、１９９８ Ｊ．Ｌａｂ Ｃｌｉｎ Ｍｅｄ．１３２：１８１－１８５、１９９８；Ｋｌｅｍｅｎｔら、Ｂｌｏｏｄ．９４：２７３５－２７４３、１９９９）本発明の分画および組成物の効果および安全性を試験するのに使用した。該モデルにおいて、ウサギは試験抗凝固剤および少量の^{125}Ｉフィブリノゲンを注入される。対照動物は抗凝固剤の代わりに食塩水を投与される。５分後、遠位にある大動脈をバルーン内皮露出（ｂａｌｌｏｏｎ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｄｅｎｕｄａｔｉｏｎ）に付し、血流量を低下させるために狭窄（結紮緊縛）を施して、大動脈壁を１６鉗子による外部圧迫損傷に付す。抗凝固剤のない場合、外部血管壁損傷および血流量低下の組み合わせが急速な凝固を引き起こす。凝固の程度は狭窄部位から遠位に置かれた超音波流量消息子（ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃ ｆｌｏｗ ｐｒｏｂｅ）を使用して血流量を測定することによって継続的にモニター可能である。実験を抗凝固剤の注入後合計９０分間続けた。主要効果評価項目は血管が合計９０分の観察を通して開通している時間の百分率である。様々な抗血栓剤の安全性は耳出血モデルを使用して同様の動物で定量可能であって、それはウサギの耳に５ヶ所の十分な深さの切り傷を作って３０分間の観察を通して出血の蓄積を測定することを含む。これは二つの動物モデルの組み合わせ（耳出血モデルを有する動脈血栓症防止モデル）を提供して必要な動物の数を５０％まで減らす。動脈血栓症防止を研究するために設計された、このモデルは、不安定狭心症または頚動脈内膜切除後の凝固のような臨床状態を模倣する。

【００３６】

ヘパリンオリゴ糖分画

ヘパリンオリゴ糖分画（本明細書では「Ｖ２１」として記載）の効果および安全性をウサギ動脈血栓症防止モデルにおいて未分画ヘパリン、ＬＭＷＨ、ヒルジンまたは対照食塩水で比較した。試験化合物を動脈狭窄および損傷前に５分投与した。９０分を通しての血流量（％開通性として表される）を効果として測定して、一方ウサギ耳出血モデルを安全性の測定に使用した。抗凝固剤（ＳＡＬ）のない場合でヘパリン（ＵＦＨ）を多量投与した場合急速な凝固が観察された。Ｖ２１およびヒルジン（ＨＩＲ）は開通性を維持するのにＬＭＷＨに比べて非常に有効であった。図７で示されるように、Ｖ２１は最小限の出血を引き起こす投与量で１００％開通性を提供し（下パネル）、一方ヒルジンはその効果に要する投与量では非常に大きな出血傾向を示した。

【００３７】

デルマタン硫酸オリゴ糖分画

デルマタン硫酸オリゴ糖分画（本明細書では「Ｈ２４０３」として記載）の効果をウサギ動脈血栓症防止および耳出血モデルにおいて試験した。合計２０のウサギを四つの群に割り当てた。表６に記載されるようにＨ２４０３の１ｍｇ／ｋｇから１０ｍｇ／ｋｇまでの濃度でウサギに投与した。

Ｈ２４０３は開通性において投与量依存的な増加を示した。開通性は２．５ないし１０ｍｇ／ｋｇのＨ２４０３投与量では全て７６ないし９６％であったが、１ｍｇ／ｋｇの投与量ではたった１４％であった。一次閉塞までの平均時間は２．５ないし１０ｍｇ／ｋｇのＨ２４０３－１２３投与量では４４ないし５４分であったが、１ｍｇ／ｋｇの投与量ではほんの１分であった。

これらの発見に一致して、大動脈の総血液量は２．５ないし１０ｍｇ／ｋｇのＨ２４０３投与量では１６０ないし２８８ｍｌ／時であったが、１ｍｇ／ｋｇの投与量では２０ｍｌ／時以下であった。血流量の範囲および形態はウサギによって大きく変化し、標準偏差が大きいことで説明される。しかしながら、少量のＨ２４０３－１２３投与量で大動脈の血流量が低いという傾向は平均追跡調査同様個々のウサギ集団追跡調査で容易に確認できる。このデータは開通性が２．５ｍｇ／ｋｇおよびそれ以上のＨ２４０３投与量で生じるという一般的な結論を支持するものである。

【００３８】

Ｈ２４０３投与量を５ｍｇ／ｋｇから２．５ｍｇ／ｋｇまで減少させた場合凝固＋の血管

壁放射能において少しの増加（基準値の１５％ないし１９％）が確認されたが、Ｈ２４０３投与量を１ｍｇ／ｋｇまで減少させた場合大幅な増加（基準値の３３％まで）が確認された。このデータもまた効果における有意な増加はこのモデルでは２．５ｍｇ／ｋｇおよびそれ以上のＨ２４０３投与量で生じるという一般的な結論を支持するものである。
ＬＭＷＤＳの安全性は耳出血モデルを使用して同一のウサギで定量された。Ｈ２４０３の投与は出血において投与量依存的な増加を示し、２．５ｍｇ／ｋｇ以上の投与量で有意に増加した出血（８０μｌおよびそれ以上）が生じた。開通性および閉塞データは両方ともＬＭＷＤＳ効果が２．５ｍｇ／ｋｇ以上またはそれに等しい投与量で生じるということを支持する。
要するに、開通性、閉塞時間、総血液量および放射性物質で標識したフィブリノゲン沈着に基づくと、全てのパラメーターを測定することによって、Ｈ２４０３は２．５ｍｇ／ｋｇまたはそれ以上の投与量でウサギ動脈血栓症モデルにおいて効果を示す。しかしながら、有意に増加した出血が２．５ｍｇ／ｋｇ以上の投与量で生じた。

【００３９】

ＶＥＧＦおよびＨ２４０３－１２３の組み合わせ（マトリックス研究）
ＶＥＧＦ＋ＬＭＷＤＳ処方の安全性および効果の両方をウサギ動脈血栓症および防止モデルで試験した。１００匹のニュージーランドオスウサギを各５ウサギの２０治療群に分割し（表７参照）、群当たり一つのＶ－ＥＧＦ／ＬＭＷＤＳ処方のボーラス静注量を投与してさらに９０分の実験の残り時間に注入で反復投与した。
ＶＥＧＦおよびＬＭＷＤＳ要素に関する投与量反応曲線は上記の研究に矛盾の無いものであり、以下の研究の投与量範囲を拡大するものである。
ＶＥＧＦはＬＭＷＤＳに比べて安全性プロフィールに対して優れた効果を有し、投与量試験では、ＶＥＧＦおよびＬＭＷＤＳともに出血に関して浅い投与量反応曲線を有した。
ＬＭＷＤＳのＶＥＧＦへの添加は出血を有意に増加させない。
出血ではなく、効果に関してＬＭＷＤＳのＶＥＧＦに対する付加的効果または相乗効果があった。
ＶＥＧＦ－ＬＭＷＤＳの投与量組み合わせに関して最も適した組み合わせを探すために血栓重量、開通性および出血を同時に試験した。以下のＶＥＧＦ：ＬＭＷＤＳの比率が有用であることが確認された：１：１、４：１および５：１。開通性および出血は５：１組み合わせで試験された。開通性はＶＥＧＦ：ＬＭＷＤＳの５：１組み合わせを投与したウサギでＶＥＧＦ単独の同量を投与したウサギに比べて優れていた（図６Ａ）、一方出血は増加しなかった（図６Ｂ）。

【００４０】

実施例５
ヒヒ血栓症モデル
ＶＥＧＦ、ＬＭＷＤＳおよびこれらの組み合わせの危険性プロフィールに対する利益を定量するためにヒヒ研究を行った。ヒヒモデルは動静脈シャント内への置換後６０分間に及ぶダクロン製血管移植片での急性血栓症形成の評価に関連するものである（Ｈａｎｓｏｎら、Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ ５：５９５－６０３、１９８５）。
まず、全ての動物は慢性の体外シリコンゴムシャントを外科的に大腿動静脈間に移植される。これらのシャントは測定可能な血小板活性を作らない。血栓形成を評価するために、中央部に展開されるダクロン移植片の試験管部分をシャント系に挿入して１時間血流に曝した。シャントの管状部分は標準のシリコンゴム、４．０ｍｍｉ．ｄ．、であって、それは本質的に非トロンボゲン形成物質である。血流量を試験部分から遠くに置かれた鉗子によって１００ｍｌ／分に維持して超音波流量計を継続的に使用して維持した。ヒヒの自己血小板を１ｍＣｉ^{111}インジウム－オキシンで標識した。標識効率は平均＞９０％であった。ガンマシンチレーションカメラ（Ｇｅｎｅｒａｌ Ｅｌｅｃｔｒｉｃ ４００Ｔ）を継続的に使用して^{111}Ｉｎ標識血小板の蓄積を測定した。５分間隔でデータを保存し、インターフェースでカメラと連結したコンピュータ補助画像処理システム（ｃｏｍｐｕｔｅｒ－ａｓｓｉｓｔｅｄ ｉｍａｇｅ ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ）を使用して

分析した。沈着血小板の放射能（一分当たりの数）を全血液^{111}Ｉｎ血小板活性（一分当たりの数／ｍｌ）で割って循環血小板数（血小板／ｍｌ）を掛けることによって沈着した血小板の総数を計測した。

【００４１】

血液曝露６０分後に形成される全血栓のフィブリン含有量を以下のように測定した。血栓形成開始１０分前に、５μＣｉの^{125}Ｉ標識同種ヒヒフィブリノゲンを静脈内に注入する。１時間の血液曝露後、トロンボゲン形成ダクロン移植片を等張性食塩水で完全に濯ぐ。^{111}Ｉｎおよび^{125}Ｉ発光スペクトルの間で重なるために、ガンマカウンタを使用して血栓を^{125}Ｉ活性に関して計測する前に^{111}Ｉｎが崩壊するのに（半減期＝２．８日）少なくとも３０日要する。沈着した^{125}Ｉ放射能（一分当たりの数）を凝固可能なフィブリノゲン放射能（一分当たりの数／ｍｌ）で割って各実験で測定されるような循環フィブリン濃度（ミリグラム／ｍｌ）を掛けることによってフィブリン総蓄積量を計測する。

安全性はＨａｎｓｏｎら、Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ ５：５９５－６０３、（１９８５）に記載されるように、出血時間を直接測定して評価される。

６体の未治療の動物で同時対照研究を行った。ダクロン移植片上の血栓形成を上記の通り評価して、凝固時間（ＡＰＴＴ、ＰＴ）、Ｘａ因子活性（Ｓｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ ａｓｓａｙ；Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃａ）および出血時間（ＢＴ）を移植片移植直後および移植片移植１時間後の両方で測定した。さらに、０．５ｍｌのクエン酸塩加ヒヒ血漿（各時間で）をトロンビン時間の定量のために除去した。

【００４２】

ＶＥＧＦ２１およびＬＭＷＤＳに関する研究

最初に０．５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇおよび２ｍｇ／ｋｇ（総投与量の５０％をボーラスとして投与して残りを継続的な注入として６５分以上投与した）の総投与量で、ＶＥＧＦ２１をまず研究した。ボーラス薬剤投与５分後に、ダクロン移植片を移植してさらに６０分間血小板画像化を行い、その後、移植片を除去して研究を終了した。

最初に２ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇの投与量で、ＬＭＷＤＳを同様の方法で研究した。２ｍｇ／ｋｇでは総投与量の５０％をボーラスとして投与して残りを継続的な注入として６５分以上投与した。ボーラスの注入ＬＭＷＤＳに対する相対比率をその後安定した凝固時間を得るために調整した。このようにして、５ｍｇ／ｋｇの投与量ではボーラス／注入量の比率は二体のヒヒにおいて５０％／５０％および３３％／６７％であった。１０ｍｇ／ｋｇの投与量では比率は２０ないし２５％ボーラス対７５ないし８０％注入であって６０分以上の注入時間で安定したＡＰＴＴ値が得られた。

その後、ＶＥＧＦ２１およびＬＭＷＤＳを０．５ｍｇ／ｋｇＶＥＧＦ２１＋０．５ｍｇ／ｋｇＬＭＷＤＳ；１ｍｇ／ｋｇＶＥＧＦ２１＋１ｍｇ／ｋｇＬＭＷＤＳ；２ｍｇ／ｋｇＶＥＧＦ２１＋５ｍｇ／ｋｇＬＭＷＤＳ；および２ｍｇ／ｋｇＶＥＧＦ２１＋１０ｍｇ／ｋｇＬＭＷＤＳの投与量で併用した（ＶＥＧＦ２１投与量の５０％およびＬＭＷＤＳ投与量の２０％をボーラス注入として投与して残りの量を継続的な注入として６５分以上投与した。この投与法では６０分の注入の間でほとんど安定したＡＰＴＴ値が得られた。血小板血栓画像化、出血時間および実験室測定もまた本明細書記載の通りに行った。

血液曝露６０分後の（またはいずれのより早い時間で）血小板血栓形成の測定結果をスチューデントｔ－試験（両側検定）を使用して比較した。

【００４３】

結果：

ダクロン製移植片血栓に対するＶＥＧＦ２１の効果は図８に示される。少量のＶＥＧＦ２１、０．５ｍｇ／ｋｇでは血液曝露６０分後平均２．９６±０．８５ｘ１０９皿である対照値以下まで血小板沈着を減少させなかった。中間量である１ｍｇ／ｋｇでは６０分で血小板沈着を２４％まで減少させて一方多量である２ｍｇ／ｋｇでは血小板沈着を５７％まで減少させた（図８）。

ＶＥＧＦ２１による投与量依存的な方法でフィブリンを減少させた。最多量では、フィブリン総

蓄積量を５９％まで減少させた（対照では２．５４±０．３７ｍｇ、対して２ｍｇ／ｋｇ治療群では１．０５±０．５２ｍｇ）。Ｖ２１はまた２ｍｇ／ｋｇで投与量依存的な方法によって＞２００秒までＡＰＴＴを延長した。ＰＴの測定値は大きく影響されなかった。出血時間はＶ２１によって有意に増加せず、２ｍｇ／ｋｇ群の研究において平均５．１分に留まった。０．５ｍｇ／ｋｇ群において一体の動物が１２分の出血時間を記録したことは注目されるだろう；しかしながら、このおよび別の投与群における他の観察と照らすとこの結果は偽性として見なされた。

ダクロン製移植片血栓形成に対するＬＭＷＤＳの効果は図９に示される。２ないし１０ｍｇ／ｋｇの範囲にわたって、血小板沈着における減少はなかった。同様に、ＬＭＷＤＳはダクロン移植片においてフィブリン形成を減少させず、または出血時間を延長させなかった。ＡＰＴＴ凝固時間はＬＭＷＤＳによって延長し、１０ｍｇ／ｋｇ投与量では約２倍であった（平均：６０分で５９．１秒、対２８．７秒Ｐｒｅ）。ＰＴ凝固時間は影響されなかった。

【００４４】

ＶＥＧＦおよびＬＭＷＤＳ組み合わせのダクロン移植片血栓形成に関する結果は図１０に示される。２ｍｇ／ｋｇのＶ２１と組み合わせて、二体のヒヒに１０ｍｇ／ｋｇのＬＭＷＤＳを注入してさらにもう一体の動物に５ｍｇ／ｋｇのＬＭＷＤＳを投与した。２ｍｇ／ｋｇのＶ２１＋（５ないし１０ｍｇ／ｋｇ）ＬＭＷＤＳの投与量で血小板沈着において有意な減少が確認された；しかしながら、この効果は同量のＶ２１単独で得られた効果と比較したものであった（図８および１０参照）。同様に、組み合わせ処置で確認されたフィブリン沈着減少はＶ２１単独で得られたものと比較したものであった。出血時間は大きく影響されなかった。ＰＴ値は大きく影響されなかったのに対し（最多量で２秒までＰＴ延長）、ＡＰＴＴ値は平均＞５００秒であった（対して２ｍｇ／ｋｇのＶ２１単独では平均２６９秒）。

本研究において使用されるヒヒモデルは流動が速く、血小板の輸送および利用が速くなっており、強度な開始刺激を提供する高度なトロンボゲン形成表面（ダクロン移植片）と併用した。これらの条件下ではフィブリン形成は広範囲なものではなく抗凝固は一般に無効であった（例えば、標準ヘパリン、五糖、標準デルマタン硫酸）。それにも関わらず、本モデルにおいてＶ２１は出血時間を延長することなく動脈血小板およびフィブリン血栓形成を＞５０％まで実際減少させたのである。

【００４５】

【表１】

	分画１	分画２	分画３
Mp(Da)	8400	8300	8000
D	1.3	1.6	1.5
0-2kDa(%)	0.7	3.2	2.2
2-4kDa(%)	9.3	18.2	17.2
4-6kDa(%)	19	18.5	19.2
6-8kDa(%)	20.8	15.3	15.9
8-10kDa(%)	16.8	11.7	12.4
10-12kDa(%)	12.5	9.3	9.4
12-14kDa(%)	8.5	7.1	7.7
14-16kDa(%)	5.1	5	5.4
>16kDa(%)	7.3	11.7	10.6

【００４６】

【表２】

ヘパリンオリゴ糖分画対ヘパリンおよびＬＭＷＨ

化合物	ロット番号	平均分子量	多分散度	K_d(AT)nM	抗IIa	K_d(IIa) nM
ヘパリン オリゴ糖 分画	200899 42192-2 42182-2 45262-1	8,050 8,450 8,500 8,500	1.5 1.2 1.3 1.5	62 20	100 67	872 -
未分画化 ヘパリン(Sigma)	36H0763	～15,000	-	32	-	-
エノキサパリン／ LMWH （ Rhone-Poulenc)	C9005099	～4,500	-	47	-	-

【００４７】
【表３】
体外循環における低分子量デルマタン硫酸（ＬＭＷＤＳ）の単独のまたは８．０Ｋｄａヘパリナーゼ分画またはエノキサパリンとの組み合わせにおける抗血栓活性

LMWDS	ヘパリナーゼ	エノキサパリン	フィルター不良までの時間	フィブリノゲン消費量	作用開始時間
μ/ml	μ/ml	μ/ml	分	%	秒
250	-	-	>90	9	349
220	-	-	>90	15	336
200	-	-	65	82	342
100	1	-	>90	9	320
80	1	-	>90	13	316
60	1	-	70	81	273
50	2	-	>90	7	308
50	1	-	45	85	296
25	3	-	85	62	339
25	2	-	75	72	288
50	-	3	80	85	294

【００４８】
【表４】

体外循環におけるＬＭＷＤＳ（５０μＧ／Ｍｌ）の２μＧ／Ｍｌのヘパリナーゼ、亜硝酸または過ヨウ素酸塩分画とまたは２μＧ／Ｍｌエノキサパリンとの組み合わせにおける抗血栓活性

製剤	フィルター不良までの時間	フィブリノゲン消費量	作用開始時間
	分	%	秒
LMWDS およびヘパリナーゼ 8,450	>90	11.2	292
LMWDS および亜硝酸 7,700	>90	16.6	299
LMWDS および過ヨウ素酸塩 10,100	45	85.4	256
LMWDS およびエノキサパリン	85	80.5	260

【００４９】
【表５】
体外循環におけるエノキサパリンおよび該ヘパリナーゼ誘導分画との抗血栓活性の比較

製剤	投与量	フルター不良までの時間	フィブリノゲン消費量
	μl/mg	分	%
エノキサパリン	10	25	82
	20	70	65
	30	>90	33
ヘパリナーゼ(8,450Da)	10	>90	11

【００５０】
【表６】

治療群

グループ	H2403 ボーラス静注	H2403 静注	動物の数
1	10mg/kg	10mg/kg	5
2	5mg/kg	5mg/kg	5
3	2.5mg/kg	2.5mg/kg	5
4	1mg/kg	1mg/kg	5

【００５１】
【表７】
治療群

V-21	LMWDS	動物の数
食塩水	食塩水	5
0.125mg/Kg	-	5
0.25mg/Kg	-	5
0.50mg/Kg	-	5
2.50mg/Kg	-	5
-	0.125mg/Kg	5
-	0.25mg/Kg	5
-	0.50mg/Kg	5
0.125mg/Kg	0.125mg/Kg	5
0.25mg/Kg	0.125mg/Kg	5
0.50mg/Kg	0.125mg/Kg	5
2.50mg/Kg	0.125mg/Kg	5
0.125mg/Kg	0.25mg/Kg	5
0.25mg/Kg	0.25mg/Kg	5
0.50mg/Kg	0.25mg/Kg	5
2.50mg/Kg	0.25mg/Kg	5
0.125mg/Kg	0.50mg/Kg	5
0.25mg/Kg	0.50mg/Kg	5
0.50mg/Kg	0.50mg/Kg	5
2.50mg/Kg	0.50mg/Kg	5

【００５２】
【表８】

投与マトリックス

V-21/LMWDS	LMWDS(mg/Kg)			
V-21 (mg/Kg)	0.00/0.00	0.00/0.125	0.00/0.25	0.00/0.50
	0.125/0.00	0.125/0.125	0.125/0.25	0.125/0.50
	0.25/0.00	0.25/0.125	0.25/0.25	0.25/0.50
	0.50/0.00	0.50/0.125	0.50/0.25	0.50/0.50
	2.50/0.00	2.50/0.125	2.50/0.25	2.50/0.50

【００５３】
本発明は本明細書記載の特定の具体例によって範囲を制限されるものではなく、上記の具体例は本発明のある態様における単なる例示であるのでいかなる機能的に同一の具体例も本発明の範疇であるものとする。確かに、本明細書に開示され記載されるものに加えた本発明の多様な修正は上述の説明および添付図から当業者に明白であるだろう。このような修正は添付した請求の範囲に入るものとする。
本明細書で参照したすべての刊行物、特許および特許出願は、たとえ各々個々の刊行物、特許または特許出願がその出典を明示することにより本明細書の一部とするとしていても、同様にその出典を明示することにより本明細書の一部とするものである。本明細書記載のいかなる参照の引用もこのような参照が本発明に先立って入手可能であるという意味ではない。
本明細書および添付した請求で使用される、「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」なる単数形は本文脈が明確に指示していなければ複数の意味を含むことを注意しなければならない。
【００５４】
本明細書で引用される参考文献
１．Ｈｉｒｓｈ，Ｊ．Ｎ．Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．１９９１；３２４：１５６５－１５７４．
２．Ｐｏｐｍａ ＪＪら，Ｃｈｅｓｔ １９９５；１０８：４８６－５０１．
３．Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｒら，ＢＭＪ １９９６；３１３：６５２－６５９．
４．Ｈｏｇｇ ＰＪ，Ｊａｃｋｓｏｎ ＣＭ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９８９；８６：３６１９－３６２３．
５．Ｗｅｉｔｚ ＪＩら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１９９０；８６：３８５－３９１．
６．Ｃａｒｒｉｅ Ｄら，Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．１９９２；６８：６３７－６４１．
７．Ｍａｔｔｈｉａｓｏｎ ＳＥら，Ｈａｅｍｏｓｔａｓｉｓ １９９５；２５：２０３－２１１．
８．Ｃａｄｒｏｙ Ｙら，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ ａｎｄ Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ １９９３；１３：１２１３－１２１７．
９．Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ Ｆら，Ｂｒ．Ｊ Ｈａｅｍａｔｏｌ．１９８６；６４：３０９－３１７．
１０．Ｃｏｈｅｎ ＡＴら，Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．１９９４；７２：７９３－７９８．
１１．Ａｇｎｅｌｌｉ Ｇら，Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．１９９２；６７：２０３－２０８．
１２．Ｐｒａｎｄｏｎｉ Ｐら，Ｂｒ．Ｊ．Ｓｕｒｇ．１９９２；７９：５０５－５０９．
１３．ＤｉＣａｒｌｏ Ｖら，Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．１９９９；８２：３０－３４．

１４．Ｔｏｌｌｅｆｓｅｎ ＤＭら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９８３；２５８：６７１３－６７１６．
１５．Ｂｅｃｋｅｒ Ｄら，Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．１９９９；２７４：６２２６－６２３３．
１６．Ｂｅｎｄａｙａｎ Ｐら，Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．１９９４；７１：５７６－５８０．
１７．Ｃｏｓｍｉ Ｂら，Ｔｈｒｏｍｂ Ｈａｅｍｏｓｔ．１９９３；７０：４４３－４４７．
１８．Ｈｏｇｇ ＰＪ，Ｊａｃｋｓｏｎ ＣＭ，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．１９９０；２６５：２４１－２４７．
１９．Ｆｒｅｄｅｎｂｕｒｇｈ ＪＣら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９９７：２７２：２５４９３－２５４９９．

【図面の簡単な説明】

【図１】可溶性フィブリン（Ｆｍ）のＤＳ触媒（パネルＡ）またはヘパリン触媒（パネルＢ）ＨＣＩＩによるトロンビン阻害の二次速度定数に対する効果を示す。

【図２】４μＭフィブリンモノマーの抗トロンビン（ＡＴ）トロンビン阻害における効果であって、ヘパリナーゼ誘導ヘパリンオリゴ糖分画の分子量を増加させていった場合の効果を示す棒グラフである。

【図３】ヘパリンおよびＤＳのフィブリンへのトロンビンの結合における効果を示す。

【図４】ヘパリンまたはヘパリナーゼ誘導分画のフィブリン凝塊へのトロンビン結合における効果を示すグラフである。

【図５】ＤＳまたは標準ヘパリン（ＳＨ）存在下ＨＣＩＩによるフィブリンからのトロンビンの除去を示すグラフである。

【図６Ａ】ヘパリンオリゴ糖分画単独対ヘパリンオリゴ糖分画：デルマタン硫酸オリゴ糖分画の５：１の組み合わせのウサギ動脈血栓症防止モデルにおける開通性の蓄積効果を示すグラフである。

【図６Ｂ】ヘパリンオリゴ糖分画単独対ヘパリンオリゴ糖分画：デルマタン硫酸オリゴ糖分画の５：１の組み合わせのウサギ動脈血栓症モデルにおける出血の蓄積効果を示すグラフである。

【図７】ヘパリン、ＬＭＷＨ、ヘパリンオリゴ糖分画およびヒルジンの開通性における効果の比較を示すグラフ（パネルＡ）および出血における効果の比較を示すグラフ（パネルＢ）である。

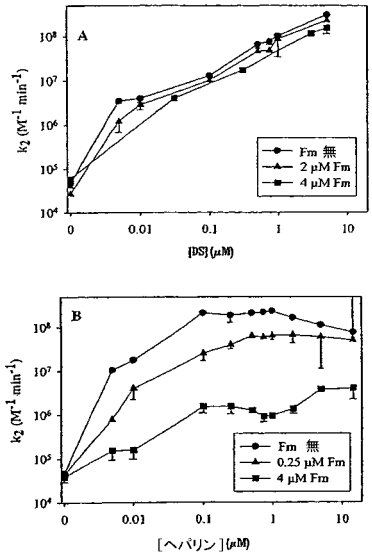
【図８】ヘパリンオリゴ糖分画のヒヒ動脈血栓症モデルにおける血管移植片上血小板沈着に対する効果を示すグラフである。

【図９】デルマタン硫酸オリゴ糖分画のヒヒ動脈血栓症モデルにおける血管移植片上血小板沈着に対する効果を示すグラフである。

【図１０】ヘパリンオリゴ糖分画およびデルマタン硫酸オリゴ糖分画の組み合わせのヒヒ動脈血栓症モデルにおける血管移植片上血小板沈着に対する効果を示すグラフである。

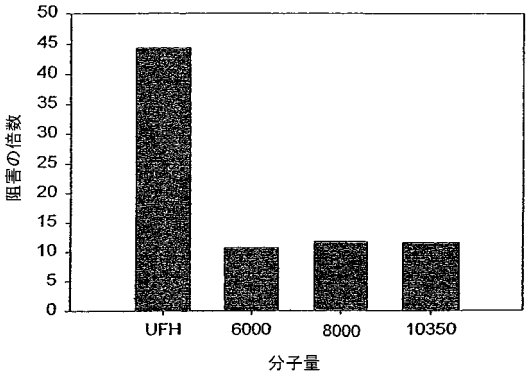
【図１】

Figure 1



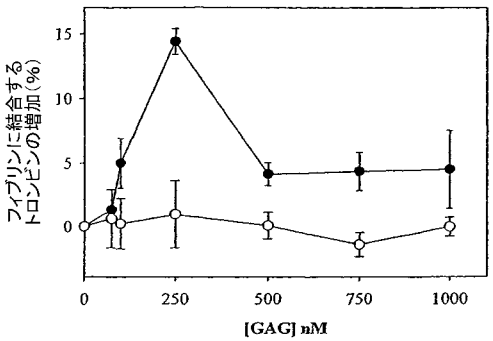
【図２】

Figure 2



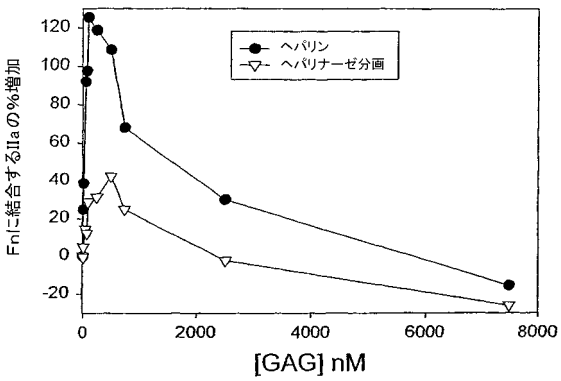
【図３】

Figure 3



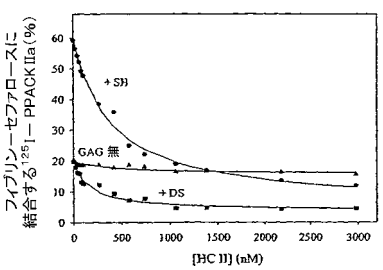
【図４】

Figure 4



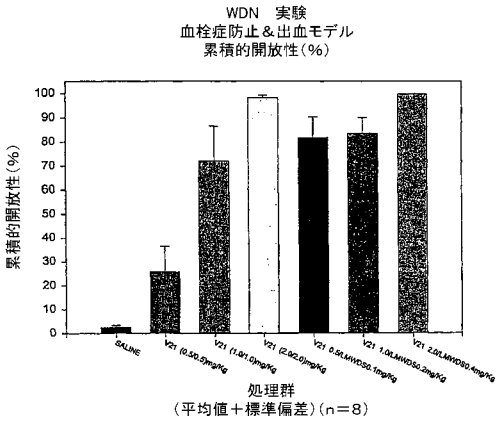
【図５】

Figure 5



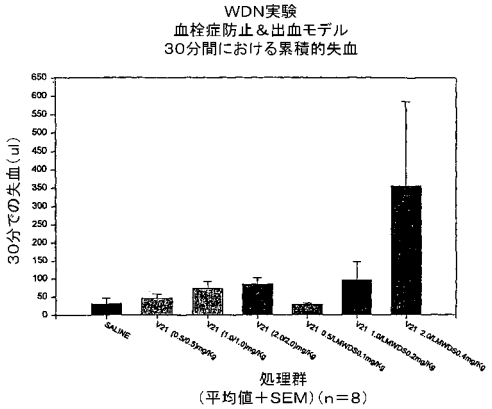
【図６Ａ】

Figure 6A



【図６Ｂ】

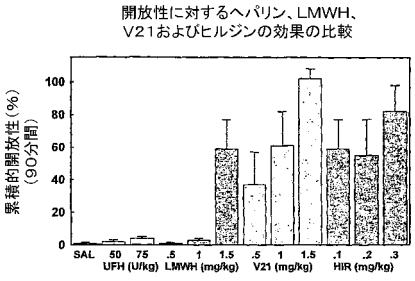
Figure 6B



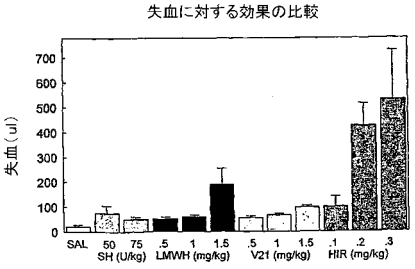
【図７】

Figure 7

A

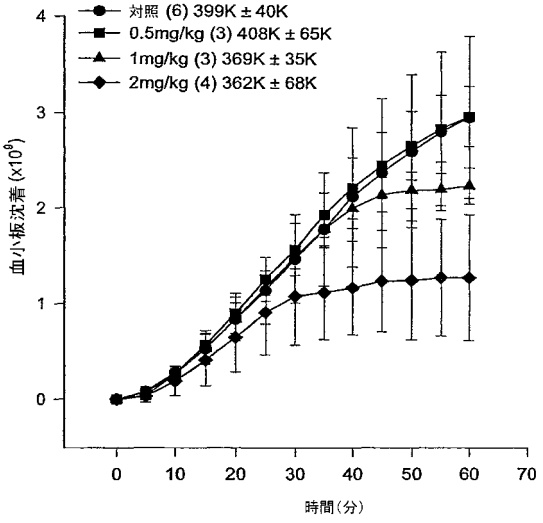


B



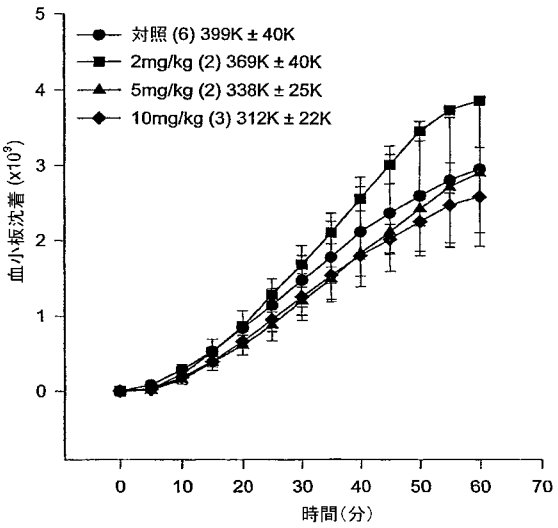
【図８】

Figure 8



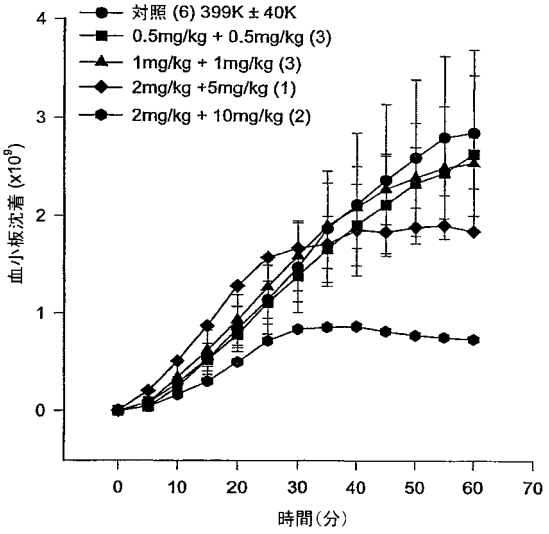
【図９】

Figure 9



【図１０】

Figure 10



【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
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/20091 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61P 7/02, A61K 31/727, 31/737

(21) International Application Number: PCT/CA01/01287

(22) International Filing Date:
7 September 2001 (07.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/231,429 8 September 2000 (08.09.2000) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **HAMILTON CIVIC HOSPITALS RESEARCH DEVELOPMENT INC.** [CA/CA]; 711 Concession Street, Hamilton, Ontario L8V 1C3 (CA). **LEO PHARMACEUTICAL PRODUCTS LTD. A/S (LOEVENS KEMISKE FABRIK PRODUKTIONSAKTIESELSKAB)** [DK/DK]; Industriparken 55, DK-2750 Ballerup DK-2750 Ballerup (DK).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **HIRSH, Jack** [CA/CA]; 21 Cottage Avenue, Hamilton, Ontario L8P 4G5 (CA). **JOHANSEN, Kristian** [DK/DK]; Sjoelundsparken 41, DK-3150 Haellebaek DK-3150 Haellebaek (DK). **WEITZ, Jeffery, I.** [CA/CA]; 54 Carluke Road East, Ancaster, Ontario L9G 3L1 (CA).

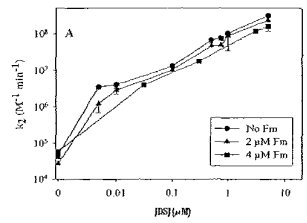
(74) Agents: **VAN ZANT, Joan M.**, et al.; Ogilvy Renault, Suite 1600, 1981 McGill College Avenue, Montreal, Québec H3A 2Y3 (CA).

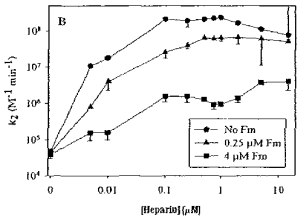
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTITHROMBOTIC COMPOSITIONS

(57) Abstract: The invention relates generally to compositions and methods for preventing or inhibiting thrombin generation or activity.





WO 02/20091 A2

WO 02/20091 A2

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, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

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

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.

Title: Antithrombotic Compositions

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates generally to compositions and methods for inhibiting or preventing thrombin generation or activity.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Excessive generation of thrombin, which is characteristic of diseases including heart attack, stroke and deep vein thrombosis, can be life threatening and requires effective treatment. There are various commercial preparations that block the effects of thrombin. Heparin, a sulfated polysaccharide, acts as an anticoagulant by accelerating the inhibition of thrombin and factor Xa by antithrombin (AT) (1). Although heparin is widely used for the treatment of acute coronary ischemic syndromes, it has limitations in patients undergoing percutaneous coronary interventions (2), or when used as an adjunct to thrombolytic therapy (3). These limitations have been attributed to the inability of the AT-heparin complex to inactivate clotting enzymes bound to components of the thrombus, particularly thrombin bound to fibrin (4,5).

Dermatan sulfate (DS), a sulfated glycosaminoglycan that has antithrombotic activity in laboratory animals (6-9) and in humans (10-13), acts as an anticoagulant by catalyzing only heparin cofactor II (HCII). Since thrombin is the exclusive plasma target of HCII, DS is considered to be a selective inhibitor of thrombin (14). Although fibrin-bound thrombin is protected from inactivation by the heparin-HCII complex (15), indirect studies done in plasma systems suggest that fibrin-bound thrombin is susceptible to inactivation by the DS-HCII complex (16). However, dermatan sulfate has practical clinical limitations because of its low specific biological activity combined with high viscosity.

The addition of dermatan sulfate to a commercially available low molecular weight heparin (either Enoxaparin or Fragmin) had an additive effect on thrombin inhibition *in vitro* (17). However, the tested combination is not clinically useful because it is not effective against fibrin-bound thrombin, and the DS has low potency and poor solubility.

SUMMARY OF THE INVENTION

It has been demonstrated that the combination of an oligosaccharide fraction obtained from heparin (herein also referred to as "heparin oligosaccharide fraction") and an oligosaccharide fraction obtained from dermatan sulfate (herein also referred to as "dermatan sulfate oligosaccharide fraction) provides advantageous inhibitory effects on both fluid-phase and fibrin-bound thrombin. Selected combinations of the heparin oligosaccharide fraction and dermatan oligosaccharide fraction provided unexpectedly greater than additive i.e. synergistic inhibitory effects. The new concept of the invention is to combine the oligosaccharide fractions to ensure maximum anticoagulant activity of heparin and dermatan sulfate without increasing the risk of bleeding.

Each oligosaccharide fraction in the combination therapy is expected to inhibit thrombin by a different mechanism. While not wishing to be bound by theoretical mechanisms of action, the heparin oligosaccharide fraction can inhibit fibrin-bound thrombin as well as fluid-phase thrombin by activating antithrombin, and it can inhibit thrombin generation by catalyzing factor Xa inactivation by antithrombin.

The dermatan sulfate oligosaccharide fraction can inhibit fibrin-bound thrombin by activating HCII. In its activated conformation, the amino-terminal domain of HCII binds to exosite I. Because thrombin binds to fibrin via exosite I, activated HCII competes with fibrin for thrombin binding and displaces thrombin from fibrin. Displaced thrombin can then be inactivated by heparin/HCII, dermatan sulfate/HCII, or heparin/antithrombin.

A combination of therapies that inhibit thrombin by different mechanisms to achieve maximum efficacy, will improve tolerance to the therapy, and result in a reduced risk of side effects that can be caused by high-dose and long-term use of the drugs in monotherapy. Therefore, a combination treatment of the invention will permit the use of lower doses of each component (e.g. at least 5 to 10 fold lower doses as illustrated in Example 2), with reduced adverse, toxic effects of each component. A lower dosage may provide an increased margin of safety relative to the margin of safety for each component when used as a single agent. In addition, where a convenient single combination dosage unit is offered to a patient, it is generally accepted that the increased convenience will result in an increase in compliance, as well as reducing the likelihood of patient confusion often associated with multiple dosage unit forms of medications.

Broadly stated, the present invention relates to a combination treatment for inhibiting or preventing thrombin generation or activation in a patient comprising administering to the patient an effective amount of (a) at least one heparin oligosaccharide fraction; and (b) at least one dermatan sulfate oligiosaccharide fraction. In an aspect of the invention the combination treatment provides synergistic activity. In another aspect a method of inhibiting or preventing thrombin generation or activity in a patient is provided comprising administering in combination, to a patient in need thereof, effective amounts (preferably synergistically effective amounts) of at least one heparin oligosaccharide fraction, and at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction.

"Combination treatment" or "administering in combination" means that the active ingredients are administered concurrently to a patient being treated. When administered in combination, each component may be administered at the same time or sequentially in any order, and at different points in time. Therefore, each component may be administered separately, but sufficiently close in time to provide the desired effect (preferably a synergistic effect).

The present invention also provides compositions comprising a combination of (a) at least one heparin oligosaccharide fraction; and (b) at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction, optionally together with a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, or vehicle. The present invention also contemplates a pharmaceutical composition in separate containers and intended for simultaneous or sequential administration, comprising a heparin oligosaccharide fraction, and a dermatan sulfate oligosaccharide fraction, both optionally together with pharmaceutically acceptable excipients, carriers, or vehicles.

In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a unit dosage of at least one heparin oligosaccharide fraction; and a unit dosage of at least one dermatan sulfate

oligosaccharide fraction, optionally together with a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, or vehicle.

The above mentioned compositions also include pharmaceutically acceptable salts of the heparin oligosaccharide and dermatan sulfate oligosaccharide fractions, such as sodium, potassium, ammonia, magnesium, and calcium salts.

In accordance with one aspect, a pharmaceutical composition is provided comprising a combination of (a) at least one heparin oligosaccharide fraction; and (b) at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction effective to exert a synergistic effect in preventing or inhibiting thrombin generation or activity. The method also provides pharmaceutical compositions comprising a synergistically effective amount of a combination of at least one heparin oligosaccharide fraction and at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction, in a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, or vehicle.

In a preferred embodiment, the pharmaceutical compositions comprise a heparin oligosaccharide fraction and a dermatan sulfate oligosaccharide fraction in doses that are at least 5 to 10 fold lower than the doses of each fraction required to prevent or inhibit thrombin generation or activity in a patient.

In another aspect the invention relates to the use of a composition comprising a combination of (a) at least one heparin oligosaccharide fraction and (b) at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction for the preparation of a medicament for the prevention or inhibition of thrombin generation or activity. In another aspect the invention relates to the use of synergistically effective amounts of at least one heparin oligosaccharide fraction, and at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction in the preparation of a pharmaceutical composition for inhibiting or preventing thrombin generation or activity in a patient.

Since the present invention relates to a method of treatment comprising a combination of active agents which may be administered separately, the invention also relates to combining separate compositions comprising the active agents in kit form.

The invention also relates to an oligosaccharide fraction of the invention, and compositions and treatments as described generally herein using such fractions.

The invention also contemplates the use of a composition of the invention or combination treatment of the invention for preventing, and/or ameliorating disease severity, disease symptoms, and/or periodicity of recurrence of a disease associated with excess thrombin generation or activity.

These and other aspects, features, and advantages of the present invention should be apparent to those skilled in the art from the following drawings and detailed description.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The invention will be better understood with reference to the drawing in which:

Figure 1 shows the effects of soluble fibrin (Fm) on the second-order rate constants for the inhibition of thrombin by DS-catalyzed (panel A) or heparin-catalyzed (panel B) HCII. The second-order rate constants for the DS- or heparin-catalyzed inhibition of 10 nM thrombin by 100 nM HCII in the absence or presence of Fm were determined under pseudo first-order conditions. Each point represents the mean of four determinations, and the bars represent the standard error.

Figure 2 is a bar graph showing the effect of 4 μM fibrin monomer on antithrombin (AT) inhibition of thrombin with heparinase derived heparin oligosaccharide fractions of increasing molecular weight.

Figure 3 shows the effect of heparin and DS on the binding of thrombin to fibrin. The binding of thrombin to fibrin clots was determined in the presence of increasing concentrations of either heparin (•) or DS (o). Each point represents the mean of two determinations and the bars represent the standard error.

Figure 4 is a graph showing the effect of heparin or heparinase-derived fractions on thrombin binding to fibrin clots.

Figure 5 is a graph showing the displacement of thrombin from fibrin by HCII in the presence of DS or standard heparin (SH).

Figure 6A is a graph showing the effect of a 5:1 combination of heparin oligosaccharide fraction: dermatan sulfate oligosaccharide fraction versus heparin oligosaccharide fraction alone on cumulative patency in a rabbit arterial thrombosis prevention model.

Figure 6B is a graph showing the effect of a 5:1 combination of heparin oligosaccharide fraction: dermatan sulfate oligosaccharide fraction versus heparin oligosaccharide fraction alone on cumulative blood loss in a rabbit arterial thrombosis model.

Figure 7 is a graph showing a comparison of the effect of heparin, LMWH, a heparin oligosaccharide fraction, and hirudin on patency (Panel A) and a graph showing a comparison of the effects on blood loss (Panel B).

Figure 8 is a graph showing the effect of a heparin oligosaccharide fraction on platelet deposition on vascular grafts in a baboon arterial thrombosis model.

Figure 9 is a graph showing the effect of a dermatan sulfate oligosaccharide fraction on platelet deposition on vascular grafts in a baboon arterial thrombosis model.

Figure 10 is a graph showing the effect of a combination of a heparin oligosaccharide fraction and a dermatan sulfate oligosaccharide fraction on platelet deposition on vascular grafts in a baboon arterial thrombosis model.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Heparin Oligosaccharide Fraction

"Oligosaccharide fraction obtained from heparin" or "heparin oligosaccharide fraction" refers to a mixture of oligosaccharides derived from heparin characterized by having antithrombin- and HCII-related anticoagulant activity *in vitro*. The fraction comprises heparin chains that are too short to bridge thrombin to fibrin, but are of a sufficient length to bridge antithrombin or HCII to thrombin.

The fraction may comprise a mixture of oligosaccharides derived from heparin characterized by one, two, three, four, five, six, or seven or more of the following characteristics:

(a) having antithrombin- and heparin cofactor II (HCII)-related anticoagulant activity *in vitro;*

(b) the oligosaccharides are too short to bridge thrombin to fibrin, but are of a sufficient length to bridge antithrombin or HCII to thrombin;

(c) having at least 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, or 40% oligosaccharides with at least one or more pentasaccharide sequence;

(d) enriched for oligosaccharides having a molecular weight range from about 6,000 to about 12,000, 6,000 to 11,000, or 6,000 to 10,000;

(e) the oligosaccharides have a peak molecular weight of about 7,000 to 10,000, 7,500 to 9,700, or 8,000 to 9,000;

(f) at least 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, or 55% of the oligosaccharides have a molecular weight greater than or equal to 6000 Daltons;

(g) at least 20%, 25%, 30%, 35%, or 40%, have a molecular weight greater than or equal to 8000 Daltons;

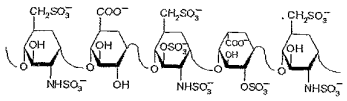
(h) a polydispersity of 1.1 to 1.8, particularly 1.2 to 1.7; and

(i) having similar anti-factor Xa and anti-factor IIa activities, preferably a ratio of anti-factor Xa activity to anti-factor IIa activity from about 2:1 to about 1:1.

In accordance with an aspect of the invention a fraction used in the present invention has the characteristics (a), (b), (c) and (d); (a) (b), (c), and (e); (a), (b), (e), and (f); (a), (b), (e), and (g); (a), (b), (e), (f), (g), (h) and (i); (b), (c), (e), and (g); (b), (d), (c), (h), and (i); (b) (c), (d), and (h); (b), (e), (h), and (i); (b), (e), (f), (h), and (i); (b), (e), (g), (h), and (i); or (a) through (i).

"Enriched for oligosaccharides" refers to a fraction comprising at least 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, or 50% oligosaccharides within a specified or restricted molecular weight range.

"Pentasaccharide sequence" refers to a key structural unit of heparin that consists of three D-glucosamine and two uronic acid residues (See the structure below). The central D-glucosamine residue contains a unique 3-O-sulfate moiety.



The pentasaccharide sequence represents the minimum structure of heparin that has high affinity for antithrombin (Choay, J. et al., Biochem Biophys Res Comm 1983; 116: 492-499). The binding of heparin to antithrombin through the pentasaccharide sequence results in a conformational change in the reactive center loop which converts antithrombin from a slow to a very rapid inhibitor.

A heparin oligosaccharide fraction comprises heparin chains that are too short to bridge thrombin to fibrin, but are of sufficient length to bridge antithrombin to thrombin. Consequently, a fraction selected for use in the present invention will be capable of inhibiting fibrin-bound thrombin as well as fluid-phase thrombin by catalyzing antithrombin, and inhibiting thrombin generation by catalyzing factor Xa inactivation by antithrombin. Preferably, fractions selected for use in the present invention are those that inhibit fibrin-bound thrombin and fluid-phase thrombin equally well.

Characteristics of suitable heparin oligosaccharide fractions that may be used in the present invention are set out in Table 1 and Table 2.

A heparin oligosaccharide fraction employed in the present invention may have similar anti-factor Xa and anti-factor IIa activities. In an embodiment, the ratio of anti-factor Xa activity to anti-factor IIa activity ranges from about 2:1 to about 1:1. In a preferred embodiment, the anti-factor Xa activity ranges from about 80 IU/mg to about 155 IU/mg, preferably 90 IU/mg to about 140 IU/mg. In a preferred embodiment, the anti-factor IIa activity ranges from about 20 IU/mg to about 150 IU/mg; more preferably 40 IU/mg to about 130 IU/mg.

The compositions, methods, and kits of the present invention may use the modified heparin compositions described in PCT/CA98/00548 (WO98/55515, published December 10, 1998), U.S. Application Serial No. 60/141,865 filed June 30, 1999, or U.S. Application Serial No. 60/154,744 filed September 17, 1999, which are incorporated herein by reference.

It will be appreciated that it may be possible to produce a heparin oligosaccharide fraction for use in the present invention that has more particular characteristics that are within those set out in (d), (e), (h), and (i) above. For example, the fraction may have a molecular weight range from about 7,000 to 10,000; 7,500 to 10,000; 7,800 to 10,000; 7,800 to 9,800; 7,800 to 9,600; 7,800 to 9,000; 7,800 to 8,800; 7,800 to 8,600; 7,800 to 8,500; or 8,000 to 8,500. It may also be possible to use a heparin oligosaccharide fraction that has a peak molecular weight of 7,800 to 10,000; 7,800 to 9,800; 7,800 to 9,600; 7,800 to 9,000; 7,800 to 8,800; 7,800 to 8,600; 7,800 to 8,500; or 8,000 to 8,500. A fraction employed in the compositions and methods of the invention may be developed that has a polydispersity of 1.3 to 1.6. In addition, fractions may be developed for use in the present invention that have one or more of the following particular characteristics: (i) a ratio of anti-factor Xa activity to anti-factor IIa activity of from about 1.5:1 to about 1:1; (ii) anti-factor Xa activity of from about 95 IU/mg to about 120 IU/mg or from about 100 to 110 IU/mg; (iii) anti-factor IIa activity of from about 80 IU/mg to about 100 IU/mg or from about 90 to 100 IU/mg.

In an embodiment of the invention, the heparin oligosaccharide fraction has one or more of the following characteristics:

(a) enriched for oligosaccharides with a molecular weight range from 6,000 to 10,000 Daltons, and a mean of about 8,500;

(b) white to off-white crystalline solid;

(c) stable at room temperature; and

(d) a polydispersity of about 1.2 to 1.5, preferably 1.5.

A heparin oligosaccharide fraction for use in the present invention can be obtained from tissues in a manner conventional for the preparation of such oligosaccharides of heparin, or it can be otherwise synthesized. In particular, a heparin oligosaccharide fraction may be prepared from unfractionated heparin or, alternatively, from low molecular weight heparin (LMWH).

By way of example, a heparin oligosaccharide fraction can be obtained from unfractionated heparin by first depolymerizing the unfractionated heparin to yield a lower molecular weight heparin, and isolating

or separating out a heparin oligosaccharide fraction of interest. The unfractionated heparin can be either a commercial heparin preparation of pharmaceutical quality or a crude heparin preparation, such as is obtained upon extracting active heparin from mammalian tissues or organs. Commercial heparin product (USP heparin) is available from several sources (e.g., SIGMA Chemical Co., St. Louis, Missouri), generally as an alkali metal or alkaline earth salt (most commonly as sodium heparin). Alternatively, the unfractionated heparin can be extracted from mammalian tissues or organs, particularly from intestinal mucosa or lung from, for example, beef, porcine and sheep, using a variety of methods known to those skilled in the art (see, e.g., Coyne, Erwin, Chemistry and Biology of Heparin, (Lundblad, R.L., et al. (Eds.), pp. 9-17, Elsevier/North-Holland, New York (1981)). In a preferred embodiment, the unfractionated heparin is porcine intestinal heparin.

Many processes for the depolymerization of heparin are known, and they are generally based on either chemical or enzymatic reactions. For instance, a heparin oligosaccharide fraction of the invention can be prepared from standard, unfractionated heparin by benzylation followed by alkaline depolymerization; nitrous acid depolymerization; enzymatic depolymerization with heparinase; peroxidative depolymerization, etc. In particular, a heparin oligosaccharide fraction may be prepared using the nitrous acid depolymerization method or periodate oxidation hydrolysis method described in PCT/CA98/00548 (WO98/55515).

In an embodiment, a heparin oligosaccharide fraction is prepared from unfractionated heparin using heparinase depolymerization (see for example, U.S. 3,766,167, and U.S. 4,396,762). In a preferred embodiment a fraction is prepared by a controlled heparinase depolymerization.

Dermatan Sulfate Oligosaccharide Fraction

"Oligosaccharide fraction obtained from dermatan sulfate", or "dermatan sulfate oligosaccharide fraction" refers to a mixture of oligosaccharides derived from dermatan sulfate characterized by having little or no antithrombin-related activity, but having HCII related anticoagulant activity *in vitro*. Dermatan sulphate consists of alternating uronic acid and N-acetylgalactosamine residues. Many glucuronic acid residues become epimerised at C-5 to yield iduronic acid residues. Subsequently, O-sulphation may occur at the C-4 or C-6 position of GalNAc or at the C-2 position of IdoA. The fractions employed in the present invention show higher affinity towards HCII than native unfractionated dermatan sulfate.

A dermatan sulfate oligosaccharide fraction selected for use in the present invention is characterized by one or more, preferably all of the following:

(a) a sulfur content of 6.0% to 10.0% (w/w), e.g. from 6.0 to 8.0% (w/w) , preferably 6.5% to 8% (w/w) ;

(b) a sulfate/carboxyl ratio of 1.2 to 2.5, e.g. from 1.2 to 2.0, e.g. from 1.3 to 1.8, , preferably from 1.3-1.6;

(c) a disulfated disaccharide content of 20% to 60%(w/w), preferably 30% to 60% (w/w) of the mono-sulfated disaccharide content;

(d) a heparin cofactor II mediated activity against thrombin in the range 20-60 IU/mg, preferably 30-60 IU/mg.

In an embodiment of the invention, a dermatan sulfate oligosaccharide fraction is selected that comprises a mixture of dermatan sulfate oligosaccharides with 90% or more having a molecular weight ranging between about 1600 to about 20,000 Daltons and a peak molecular weight from about 4,500 to about 8,000 Daltons.

In a preferred embodiment of the invention, the dermatan sulfate oligosaccharide fraction has one or more of the following characteristics:

(a) enriched for oligosaccharides with a molecular weight range from 5,000 to 8,000 Daltons;

(b) white to off-white crystalline solid;

(c) stable at room temperature; and

(d) greater than 6.2% sulfonation by weight.

A dermatan sulfate oligosaccharide fraction may be obtained from tissues in a manner conventional for the preparation of such oligosaccharides from unfractionated dermatan sulfate, or it can be otherwise synthesized de novo from the relevant monosaccharides. Preferably, a depolymerization method that protects and facilitates the isolation of highly charged regions of unfractionated dermatan sulfate is used to provide fractions for use in the present invention that have improved solubility and potency compared to unfractionated dermatan sulfate. For example, a dermatan sulfate oligosaccharide fraction may be prepared by the following steps: oxidation and depolymerization of dermatan sulfate by periodate oxidation, borohydride reduction, acid hydrolysis, and ion exchange chromatography.

Sources of the dermatan sulfate that can be used to prepare the fractions include mammalian tissues, for example, mammalian skin, including vascularized tissue and skin from porcine or bovine sources. Preferably intestinal mucosa is used as a source of dermatan sulfate.

The compositions, methods, and kits of the present invention preferably use a dermatan sulfate oligosaccharide mixture, and methods for preparing such mixtures, as described in PCT/EP98/03007 (WO 98/55514 published December 10, 1998), which is incorporated herein by reference.

Determination of Properties of Oligosaccharide Fractions

The molecular weight characteristics of a heparin or dermatan oligosaccharide fraction employed in the present invention can be determined using standard techniques known to and used by those of skill in the art. Such techniques include, for example, GPC-HPLC, viscosity measurements, light scattering, chemical or physical-chemical determination of functional groups created during the depolymerization process, etc. In a preferred embodiment, the molecular weight characteristics of an oligosaccharide fraction is determined by high performance size exclusion chromatography.

In particular, the following methods may be used to confirm the properties and characteristics of a heparin or dermatan oligosaccharide fraction used in the present invention:

(a) Molecular weight by GPC-HPLC according to the method of Dedem, Pharmeuropa, 3, 202-218, 1991.

(b) Sulfur content according to Ph. Eur. 2.ed. V.3.5.3.

(c) Sulphate/carboxylate ratio according to Ph. Eur. 1997:0828.

(d) HCII mediated antithrombin activity by a chromogenic assay (Diagnostica Stago, France) in a plasma free system with the 4. International Heparin Standard (code no. 82/502) as standard.

(e) Anti-factor Xa and antifactor IIa according to Ph. Eur. 1997:0828, both methods modified using the statistical methods for slope-ratio assays.

Compositions and Methods

The compositions and methods of the invention are useful in therapeutic applications for the prevention or treatment of conditions or diseases that are characterized by excess thrombin generation or activity, and/or excess complement activation. Such conditions often occur where a subject has been exposed to trauma, for example in surgical patients. Trauma caused by wounds or surgery results in vascular damage and secondary activation of blood coagulation. These undesirable effects may occur after general or orthopedic surgery, gynecologic surgery, heart or vascular surgery, or other surgical procedures. Excess thrombin may also complicate progression of natural diseases such as artherosclerosis which can cause heart attacks, strokes or gangrene of the limbs. Therefore, the methods and compositions of the present invention can be used to treat, prevent, or inhibit a number of important cardiovascular complications, including unstable angina, acute myocardial infarction (heart attack), cerebral vascular accidents (stroke), pulmonary embolism, deep vein thrombosis, arterial thrombosis, etc. The compositions and methods of the invention may be used to reduce or prevent clotting during dialysis and reduce or prevent intravascular coagulation during open heart surgical procedures. They may also be used to maintain the patency of medical devices such as i.v. injection devices.

In one aspect of the invention, methods and compositions are provided for preventing or inhibiting thrombin generation or activity in patients at increased risk of developing a thrombus due to medical conditions that disrupt hemostasis (e.g., coronary artery disease, atherosclerosis, etc.). In another aspect, methods and compositions are provided for patients at increased risk of developing a thrombus after a medical procedure, such as cardiac surgery, vascular surgery, or percutaneous coronary interventions. In an embodiment, the methods and compositions of this invention are used in cardiopulmonary bypass. The compositions, or oligosaccharide fractions in a method of the invention, can be administered before, during or after the medical procedure.

Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or with experimental animals such as by calculating the ED_{50} (the dose therapeutically effective in 50% of the population) or LD_{50} (the dose lethal to 50% of the population) statistics. The therapeutic index is the dose ratio of therapeutic to toxic effects and it can be expressed as the ED_{50}/LD_{50} ratio. Pharmaceutical compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred.

Patients that may receive a combination treatment or be administered a composition of the invention include animals, including mammals, and particularly humans. Animals also include domestic animals, including horses, cows, sheep, poultry, fish, pigs, cats, dogs, and zoo animals.

The compositions of the present invention, a heparin oligosaccharide fraction, or a dermatan sulfate oligosaccharide fraction, can be administered by any means that produce contact of an active agent with the agent's sites of action in the body of the patient. The heparin and dermatan sulfate oligosaccharide fractions can be administered simultaneously or sequentially in any order, and at different points in time, to provide the desired effect. It lies within the capability of a skilled physician or veterinarian to chose a dosing regime that optimizes the effects of the compositions and treatments of the present invention. The compositions may be administered in such oral dosage forms as tablets, capsules (each of which includes sustained release or timed release formulations), pills, powders, granules, elixirs, tinctures, suspensions, syrups, and emulsions. They may also be administered in intravenous (bolus or infusion), intraperitoneal, subcutaneous, or intramuscular form, all using dosage forms well known to those of ordinary skill in the pharmaceutical arts. The compositions of the invention may be administered in intranasal form via topical use of suitable intranasal vehicles, or via transdermal routes, for example using conventional transdermal skin patches. The dosage administration in a transdermal delivery system will be continuous rather than intermittent throughout the dosage regimen.

The present invention includes combination treatments providing synergistic activity or delivering synergistically effective amounts of dermatan sulfate and heparin oligosaccharide fractions. Pharmaceutical compositions suitable for use in the present invention include compositions wherein the active ingredients are contained in a synergistically effective amount. By "synergistic activity" or "synergistically effective amount" is meant that a sufficient amount of the heparin oligosaccharide fraction and dermatan sulfate oligosaccharide fraction will be present in order to achieve a desired result that is greater than the result achieved with each fraction on its own, e.g. improved inhibition of thrombin accretion when treating a thrombus-related cardiovascular condition, such as those described above by, for example, improved inactivation of clot-bound thrombin, improved inhibition of thrombin generation by catalyzing factor Xa inactivation by antithrombin, etc.

The dosage regimen of the invention will vary depending upon known factors such as the pharmacodynamic characteristics of the particular agent and its mode and route of administration; the species, age, sex, health, medical condition, and weight of the patient, the nature and extent of the symptoms, the kind of concurrent treatment, the frequency of treatment, the route of administration, the renal and hepatic function of the patient, and the desired effect. The effective amount of a drug required to prevent, counter, or arrest progression of a condition can be readily determined by an ordinarily skilled physician or veterinarian.

A composition or treatment of the invention may comprise a unit dosage of at least one heparin oligosaccharide fraction and a unit dosage of at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction. A "unit dosage" refers to a unitary i.e. a single dose which is capable of being administered to a patient, and which may be readily handled and packed, remaining as a physically and chemically stable unit dose comprising either the active agent as such or a mixture of it with solid or liquid pharmaceutical excipients, carriers, or vehicles.

Typically, the active agents i.e., the heparin oligosaccharide fraction and dermatan sulfate oligosaccharide fraction, will each be present in a pharmaceutical composition (or used in a treatment of the invention) at a concentration ranging from about 2 mg per dose to 1000 mg per dose and, more preferably, at a concentration ranging from about 5 mg per dose to 500 mg per dose.. Daily dosages can vary widely, but will usually be present at a concentration ranging from about 20 mg per dose per day to about 100 mg per dose per day and, more preferably, at a concentration ranging from about 40 mg per dose per day to about 80 mg per dose per day.

The ratio of heparin oligosaccharide fraction to dermatan sulfate oligosaccharide fraction in a composition or treatment of the invention may be 1:1 to 10:1, preferably 1:1 to 8:1, more preferably 2:1 to 6:1, most preferably 5:1.

The compositions of the present invention or fractions thereof typically comprise suitable pharmaceutical diluents, excipients, vehicles, or carriers selected based on the intended form of administration, and consistent with conventional pharmaceutical practices. The carriers, vehicles etc. may be adapted to provide a synergistically effective amount of the active fractions to inhibit or prevent thrombin generation or activity in a patient.

Suitable pharmaceutical diluents, excipients, vehicles, and carriers are described in the standard text, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company. By way of example for oral administration in the form of a capsule or tablet, the active components can be combined with an oral, non-toxic pharmaceutically acceptable inert carrier such as lactose, starch, sucrose, methyl cellulose, magnesium stearate, glucose, calcium sulfate, dicalcium phosphate, mannitol, sorbital, and the like. For oral administration in a liquid form, the drug components may be combined with any oral, non-toxic, pharmaceutically acceptable inert carrier such as ethanol, glycerol, water, and the like. Suitable binders (e.g. gelatin, starch, corn sweeteners, natural sugars including glucose; natural and synthetic gums, and waxes), lubricants (e.g. sodium oleate, sodium stearate, magnesium stearate, sodium benzoate, sodium acetate, and sodium chloride), disintegrating agents (e.g. starch, methyl cellulose, agar, bentonite, and xanthan gum), flavoring agents, and coloring agents may also be combined in the compositions or components thereof.

Formulations for parenteral administration of a composition of the invention may include aqueous solutions, syrups, aqueous or oil suspensions and emulsions with edible oil such as cottonseed oil, coconut oil or peanut oil. Dispersing or suspending agents that can be used for aqueous suspensions include synthetic or natural gums, such as tragacanth, alginate, acacia, dextran, sodium carboxymethylcellulose, gelatin, methylcellulose, and polyvinylpyrrolidone.

Compositions for parenteral administration may include sterile aqueous or non-aqueous solvents, such as water, isotonic saline, isotonic glucose solution, buffer solution, or other solvents conveniently used for parenteral administration of therapeutically active agents. A composition intended for parenteral adminstration may also include conventional additives such as stabilizers, buffers, or preservatives, e.g. antioxidants such as methylhydroxybenzoate or similar additives.

A composition of the invention may be sterilized by, for example, filtration through a bacteria retaining filter, addition of sterilizing agents to the composition, irradiation of the composition, or heating the composition. Alternatively, the fractions of the present invention may be provided as sterile solid preparations e.g. lyophilized powder, which is readily dissolved in sterile solvent immediately prior to use.

In addition to the formulations described previously, the compositions can also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example, subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, the fractions may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example, as an emulsion in an acceptable oil), or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt.

The compositions of the invention and components thereof may comprise soluble polymers as targetable drug carriers.

After pharmaceutical compositions have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. For administration of a composition of the invention, such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

The present invention also includes methods of using the compositions of the invention in combination with one or more additional therapeutic agents including without limitation anti-platelet or platelet inhibitory agents such as aspirin, prioxicam, clopidogrel, ticlopidine, or glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists, thrombin inhibitors such as boropeptides, hirudin, or argatroban; or thrombolytic or fibrinolytic agents, such as plasminogen activators (such as tissue plasminogen activator), anistreplase, urokinase, or streptokinase; or combinations thereof.

In addition to being useful in pharmaceutical compositions for the treatment of the cardiovascular conditions described above, one of skill in the art will readily appreciate that the active products, can be used as reagents for elucidating the mechanism of blood coagulation *in vitro*.

The invention will be described in greater detail by way of specific examples. The following examples are offered for illustrative purposes, and are not intended to limit the invention in any manner. Those of skill in the art will readily recognize a variety of noncritical parameters which can be changed or modified to yield essentially the same results.

Example 1

Characteristics of several lots of heparin oligosaccharide fractions employed in the present invention and other heparin fractions (UFH from Sigma and enoxaparin from Rhône-Poulenc Rorer) are summarized in Table 2. Listed characteristics include mean molecular weight, activity, anti-II_a activity, polydispersity, and K_d values. Polydispersity is M_w/M_n (weight average molecular weight divided by number average molecular weight) and is determined by analyzing data in integration tables for the gel filtration peak profiles of heparin samples. K_d values were obtained by measuring the increase in fluorescence (280nm excitation, 340nm emission) observed when either AT or II_a are titrated with a heparin sample, fitting the titration curve of I/I_o verses heparin concentration to a binding isotherm equation, and solving for α (maximum fluorescence change), K_d (dissociation constant), and n (moles of heparin required

to bind one mole ligand). Bound ligand stoichiometry (1/n) is obtained and interpreted as the proportion of pentasaccharide-containing chains within each heparin fraction.

The selected heparin oligosaccharide fraction, unlike heparin, does not stabilize the binding of thrombin to fibrin. This was demonstrated in studies where addition of fibrin monomer reduced the rate of thrombin inactivation by unfractionated heparin in the presence of both AT and HCII. In contrast, fibrin monomer had only minimal inhibitory effects on the rate of thrombin inhibition by AT or HCII in the presence of equimolar concentrations of the heparin oligosaccharide fraction. Further support that the selected heparin oligosaccharide fraction does not augment thrombin binding to fibrin was obtained by measuring the amount of I^{125} labeled thrombin binding to fibrin clots in the presence or absence of either the heparin oligosaccharide fraction or unfractionated heparin in concentrations ranging from 0 to 7,500 nM.

Example 2

Antithrombotic activity of heparin fractions and dermatan sulfate oligosaccharide fractions.

An extracorporeal circuit was used to compare the antithrombotic activity of heparin oligosaccharide fractions, dermatan sulfate oligosaccharide fractions, and a combination of the heparin and dermatan oligosaccharide fractions. This circuit is described in detail in Weitz et al, 1999. Briefly, different concentrations of the compound(s) to be tested are added to re-calcified human whole blood spiked with ^{125}I-labeled human fibrinogen and maintained at 37°C in a water bath. A peristaltic pump circulates the blood through a 40μ blood filter. Blood clotting within the filter is detected by measuring pressure proximal to the filter with an in-line pressure gauge. Serial blood samples were removed from an in-line reservoir and are counted for residual radioactivity as an index of fibrinogen consumption and clot formation. In addition, starting activated clotting times are measured.

Two key criteria, patency and the percentage of fibrinogen consumed in the clotting process, are used to assess efficacy of compounds tested in this model. Patency is measured as the time to filter failure. The experiment is stopped at 90 minutes, thus defining the maximum time for patency.

The dermatan sulfate oligosaccharide fraction used in the investigation (also referred to in the Examples and Table 3 as LMWDS) has the following characteristics: Mp: 5000 Da, Mw: 7600 Da, and polydispersity of 1.4. The heparinase derived heparin oligosaccharide fraction was obtained by heparinase depolymerization as described herein, and had a peak molecular weight of 8,000, anti-IIa activity of about 100 IU/mg, anti-Xa activity of about 134 IU/mg, and a polydispsersity of about 1.5. The nitrous oxide derived heparin oligosaccharide fraction was obtained by nitrous oxide depolymerization as described in PCT/CA98/00548, and it had a molecular weight of 7,700 Da, anti-IIa activity of 84 IU/mg, anti-Xa activity of 123 IU/mg, and a polydispersity of 1.3. The periodate derived heparin oligosaccharide fraction was obtained by periodate depolymerization as described in PCT/EP98/03007 (WO98/55514 published December 10, 1998) and it had a peak molecular weight of 7,900 Da, anti-IIa activity of 19 IU/mg, anti-Xa activity of 43 IU/mg, and a polydispersity of 1.5.

Heparin fractions with a peak molecular weight of about 8,000 Daltons were chosen because this corresponds to chains comprised of about 27 saccharide units. A minimum length of 18 saccharide units is

needed to bridge thrombin to antithrombin. Because almost all the chains in these fractions consist of more than 18 saccharide units, they are of sufficient length to catalyze the inactivation of thrombin by antithrombin. In contrast, these chains are too short to bridge thrombin to fibrin because this bridging reaction requires chains comprised of 40 saccharide units or more (i.e., 12,000 Da or greater). Consequently, heparin fractions with a mean molecular weight of 8,000 have good inhibitory activity against thrombin by virtue of their ability to activate antithrombin, and are capable of inactivating thrombin bound to fibrin because they do not bridge thrombin to fibrin and render it resistant to inactivation by heparin/antithrombin or heparin/HCII complexes. In contrast, enoxaparin, a commercial low-molecular-weight heparin with a mean molecular weight of about 5,000 (Rhone-Poulenc Rorer, Montreal, PQ), is comprised of chains that are mostly too short to bridge thrombin to antithrombin, thereby explaining why its inhibitory activity against thrombin is lower than that against factor Xa.

As previously described (Weitz JI et al. Circulation 1999;99:682-689), different concentrations of each of the fractions was added to recalcified human whole blood spiked with ^{125}I-labeled human fibrinogen and maintained at 37°C in a water bath. A peristaltic pump was then used to circulate the blood through a 40 μ blood filter. Clotting of blood within the filter was detected by (a) measuring pressure proximal to the filter with an in-line pressure gauge, and (b) removing serial blood samples from the reservoir and counting residual radioactivity as an index of fibrinogen consumption. Starting activated clotting times were also measured.

As illustrated in Table 3, when used alone, a dermatan sulfate oligosaccharide fraction concentration of 250 μg/ml was needed to maintain filter patency and reduce fibrinogen consumption to < 10%. This is noteworthy because in previous work, it was reported that unfractionated dermatan sulfate was ineffective in this circuit even at a concentration of 4 mg/ml (Weitz, et al., *Circulation*, 1999).

Combinations of low molecular weight dermatan sulfate and the 8,000 Da heparinase-derived heparin fraction or enoxaparin were also evaluated. LMWDS was effective at 100 μg/ml when combined with 1 μg/ml of the 8,000 Da heparinase-derived heparin fraction, or at 50 μg/ml when combined with 2 μg/ml of this heparin fraction. In contrast, 50 μg/ml LMWDS was ineffective when combined with 3 μg/ml of enoxaparin, with filter failure occurring at 80 min and fibrinogen consumption at 85%. These results indicate that the heparinase-derived fraction is more effective than enoxaparin.

When LMWDS and the 8,000 Da heparinase-derived heparin fractions are used in combination, the two drugs are effective at 5- and 10-fold lower doses, respectively, than those needed to maintain patency when the drugs are used alone (i.e., 50 versus 250 μg/ml of LMWDS and 1 versus 10 μg/ml of the 8,000 Da heparinase-derived fraction).

The combination of LMWDS (50 μg/ml), and heparinase, nitrous acid, and periodate derived heparin fractions, and enoxaparin were compared (all at 2μg/ml). The combinations of LMWDS and

heparinase or nitrous acid-derived heparin fractions were effective. The other two combinations were not effective. (See Table 4).

To further evaluate the heparinase-derived fraction and enoxaparin, the two were compared at gravimetrically equivalent doses (Table 5). Even at 30 µg/ml, enoxaparin was less effective than 10 µg/ml of the heparinase-derived fractions

Example 3

Comparison of the effect of fibrin monomer on the heparin- and DS-catalyzed rates of thrombin inhibition by HCII

The effect of soluble fibrin monomer, prepared as previously described (15), on the rates of thrombin inhibition by HCII was first examined in the absence or presence of increasing concentrations of DS or heparin. The second-order rate constants (k_2) for inhibition of thrombin by HCII were determined under pseudo- first-order conditions in the absence or presence of 3.3 µM heparin or DS, or 4 µM SF, or both. Thrombin (10 nM) was incubated for 5 minutes at room temperature in TBS containing 0.6% PEG-8000 in the presence of various concentrations of heparin or DS (0 to 11 µM), SF (0 to 4 µM), 10 mM GPRP-NH_2, and 15 mM Tris-HCl, pH 7.5. Reaction mixtures (10 µl) were aliquoted to 96-well round bottom microtitre plates and an equal volume of HCII (in a concentration at least 10-fold higher than that of thrombin) was added to each well at time intervals ranging from 2 sec to 5 min. All reactions were terminated by the addition of 200 µM chromogenic substrate (tGPR-pNA) in 200 µl TBS containing 10 mg/ml polybrene. Residual thrombin activity was calculated by measuring absorbance at 405 nm for 5 min using a Spectra Max 340 Microplate Reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA). The pseudo-first-order rate constants (k_1) for thrombin inhibition were determined by fitting the data to the equation $k_1 \cdot t = \ln([P]_o/[P]_t)$, where $[P]_o$ is initial thrombin activity and $[P]_t$ is thrombin activity at time t. The second-order rate constant, k_2, was then determined by dividing k_1 by the HCII concentration (15). As shown in Figure 1 (panel A), soluble fibrin (Fm), at concentrations of 2 or 4 µM, causes only a modest 3-fold decrease in the DS-catalyzed rates of thrombin inhibition by HCII. In contrast, Fm causes a dose-dependent decrease in the heparin-catalyzed rates of thrombin inhibition by HCII (panel B). At 1 µM heparin and 4 µM Fm, a maximal 240-fold decrease in the rate was observed, a value consistent with that reported previously (15).

Comparison of the effect of fibrin monomer on the heparin- and heparinase-derived fraction on the rates of thrombin inactivation by antithrombin

Using similar methodology, the effect of soluble fibrin monomer on the rates of thrombin inactivation by antithrombin in the presence of heparin or the 8,000 Da heparinase-derived fraction were compared. As illustrated in Figure 2, with heparin, the rate of thrombin inactivation is decreased about 45-fold in the presence of 4 µM fibrin monomer. In contrast, fibrin monomer produces only a 10-fold decrease on the rate of thrombin inactivation with the 8,000 Da heparinase-derived fraction.

Effect of Heparin, DS, or the 8,000 heparinase-derived fraction on the binding of ^{125}I-FPR-thrombin to fibrin

It has been shown previously that heparin enhances the binding of thrombin to fibrin, an effect that occurs regardless of whether heparin has high or low affinity for AT, but occurring only with heparin chains of 11,200 Da or more (18). In this study, the ability of DS to promote thrombin binding to fibrin was compared with that of heparin. To accomplish this, active site-blocked thrombin (FPR-thrombin) and ^{125}I-FPR-thrombin were prepared as described (19). The binding of ^{125}I-FPR-thrombin to fibrin clots in the absence or presence of either heparin or DS was studied in TBS containing 0.6% PEG-8000 and 0.01% Tween-20. Fibrinogen (7.5 μM) was incubated with increasing concentrations of either heparin or DS (0 to 2.5 μM) in a total volume of 40 μl in a series of microsedimentation tubes (catalogue number 72.702, Sarstedt Inc., St. Laurent, PQ). Clotting was initiated by addition of 10 μl of stock A containing 10 mM $CaCl_2$, 500 nM ^{125}I-FPR-thrombin, and 10 nM thrombin. After 45 min incubation at room temperature, fibrin was pelleted by centrifugation for 5 min at 15, 000 × g, and aliquots of supernatant were removed for gamma counting. The fraction of thrombin bound to fibrin was calculated as the change in ^{125}I-FPR-thrombin binding compared with controls lacking glycosaminoglycans. As shown in Figure 3, DS has no effect on ^{125}I-FPR-thrombin binding to fibrin clots, even at concentrations up to 1 μM. In contrast, at concentrations up to 250 nM, heparin enhances ^{125}I-FPR-thrombin binding to fibrin clots in a dose-dependent manner. At heparin concentrations above 250 nM, ^{125}I-FPR-thrombin binding to clots decreases, likely reflecting the accumulation of distinct heparin-fibrin and heparin-thrombin populations. When thrombin and Fm-Sepharose were titrated with low molecular weight (LMW) heparin (Enoxaparin), there was only a small increase in the amount of thrombin bound, comparable to that observed with DS. The findings with enoxaparin are not unexpected because the heparin chains are too short to bridge thrombin to fibrin.

The ability of the 8,000 Da heparinase fraction to promote thrombin binding to fibrin was also compared with that of heparin. As indicated in Figure 4, the heparinase-derived fraction produced only a small increase in thrombin binding, whereas heparin caused a much greater increase. These findings indicate that like enoxaparin, the chains within the heparinase-derived fraction also are too short to bridge thrombin to fibrin.

Displacement of IIa from Fm-Sepharose by HCII

Since catalysis of thrombin inhibition by HCII is not impaired by fibrin in the presence of DS, exosite I on thrombin must be accessible to the DS-HCII complex even though thrombin binds to fibrin via this site. This observation predicts that the DS-HCII complex should be capable of displacing thrombin from fibrin. This was tested by monitoring the amount of ^{125}I-FPR-thrombin displaced from Fm-Sepharose by increasing concentrations of HCII in the absence or presence of DS (Figure 5). HCII alone, at concentrations up to three times physiological, had limited capacity to displace thrombin from Fm-Sepharose. When DS was present at 2.5 μM, dose-dependent displacement of thrombin was observed. Maximal displacement was achieved with physiological concentrations of HCII, with half-maximal effect at about 250 nM HCII. Thus, in the presence of DS, the amino-terminus of HCII is able to compete effectively

with fibrin for binding to thrombin exosite I. These findings indicate that the DS/HCII complex can displace thrombin from fibrin thereby rendering it susceptible to inactivation.

Example 4

Efficacy versus Bleeding Studies

Rabbit Arterial Thrombosis Prevention Model

A rabbit arterial thrombosis prevention model (Green at al, J. Lab Clin Med. 127:583-587, 1996; Klement et al, 1998 J. Lab Clin Med. 132:181-185, 1998; Klement et al., Blood. 94:2735-2743, 1999) was used to test the efficacy and safety of fractions and compositions of the invention. In the model, a rabbit is injected with a test anticoagulant and a small amount of ^{125}I fibrinogen. Control animals are given saline in place of anticoagulant. Five minutes later, the distal aorta is subjected to balloon endothelial denudation, a stenosis (ligature constriction) is applied to reduce blood flow, and the aortic wall is subjected to an external crush injury from 16 clamps. In the absence of an anticoagulant, the combination of traumatic vessel wall injury and reduced blood flow causes rapid clotting. The extent of clotting can be monitored continuously by measuring blood flood using an ultrasonic flow probe placed distal to the stenosis. The experiment is followed for a total of 90 minutes after injection of the anticoagulant. The major efficacy endpoint is the percentage of time that the vessel remains patent over the total 90 minute observation. Safety of various antithrombotic agents can be determined in the same animals using a bleeding ear model, which involves making five full-thickness cuts through the rabbit ear and measuring cumulative blood loss over a 30 minute observation period. This represents a merger of two animal models (the arterial thrombosis prevention model with the bleeding-ear model) in order to reduce the number of animals required by 50%. This model, designed to study arterial thrombosis prevention, mimics clinical conditions such as unstable angina or clotting after carotid endarterectomy

Heparin Oligosaccharide Fraction

The efficacy and safety of a heparin oligosaccharide fraction (referred to herein as "V21") was compared with unfractionated heparin, LMWH, hirudin, or saline control in a rabbit arterial thrombosis prevention model. Test compounds were administered 5 minutes prior to creating the arterial stenosis and damage. Blood flow (expressed as % patency) over 90 minutes was measured for efficacy, while the rabbit ear bleeding model was used to measure safety. Rapid clotting was observed in the absence of an anticoagulant (SAL) and at high doses of heparin (UFH). V21 and hirudin (HIR) were much more effective than LMWH at maintaining patency. As shown in Figure 7, V21 produced 100% patency at doses associated with minimal bleeding (bottom panel), while hirudin demonstrated a much greater propensity for bleeding at the doses required for its efficacy.

Dermatan Sulfate Oligosaccharide Fraction

The efficacy of a dermatan sulfate oligosaccharide fraction (referred to herein as "H2403") was tested in the rabbit arterial thrombosis prevention and ear bleeding model. A total of 20 rabbits were assigned to four Groups. Rabbits were dosed with concentrations of H2403 from 1mg/kg to 10mg/kg as specified in Table 6.

H2403 produced a dose-dependent increase in patency. Patency was between 76 – 96% for all H2403 doses between 2.5 - 10mg/kg, but was only 14% at a dose of 1 mg/kg. The mean time to first occlusion was between 44 – 54 minutes for H2403-123 doses between 2.5 - 10mg/kg, but only 1 minute for the 1 mg/kg dose.

Consistent with these findings, integrated blood flow in the aorta was between 160 – 288 ml/hr for H2403 doses between 2.5 – 10 mg/ml, but less than 20 ml/hr for 1 mg/kg dose. The range and pattern of blood flow varied considerably from one rabbit to the next, accounting for large standard deviations. The trend toward lower aortic blood flow with lower H2403-123 dose, however, can easily be seen in families of individual rabbit traces as well as in the averaged traces. This data supports the general conclusion that patency occurs at a H2403 dose of 2.5mg/kg and higher.

A small increase in clot+ vessel wall radioactivity (from 15% of reference value to 19%) was seen when the H2403 dose was decreased from 5 mg/kg to 2.5mg/kg, but a large increase (to 33% of reference value) was seen when the H2403 dose was decreased to 1mg/kg. This data also supports the general conclusion that a significant increase in efficacy occurs at H2403 doses of 2.5mg/kg and higher in this model.

Safety of LMWDS was determined in the same rabbits using the ear bleeding model. Administration of H2403 produced a dose-dependent increase in blood loss with significantly increased bleeding (80µl and above) occurring at doses greater than 2.5mg/kg. Patency and occlusion data both suggest that LMWDS efficacy occurs at doses greater than or equal to 2.5 mg/kg.

In summary, based on patency, occlusion time, integrated blood flow, and radiolabeled fibrinogen deposition, by all parameters measured, H2403 shows efficacy in the rabbit arterial thrombosis model at a doses of 2.5mg/kg or greater. However, significantly increased bleeding occurred at doses greater than 2.5mg/kg.

Combination of V21 and H2403-123 (Matrix Study)

Both the safety and efficacy of V21 + LMWDS formulations were tested on the rabbit arterial thrombosis and prevention model. 100 New Zealand male rabbits were divided into 20 treatment groups of 5 rabbits each (see Table 7), and administered a bolus i.v. dose of one V-21/LMWDS formulation per group (dosage matrix Table 8) followed by a continuous infusion repeat dose over the remaining time of the 90 minute experiment.

Dose response curves for the V21 and LMWDS components were compatible with earlier studies, extending the dose range of those studies downward.

V21 had a better efficacy to safety profile than LMWDS, and at the doses tested, both V21 and LMWDS had shallow dose response curves for bleeding.

Addition of LMWDS to V21 did not significantly increase bleeding.

There were additive or synergistic effects of LMWDS on V21for efficacy, but not for bleeding.

Clot weight, patency, and blood loss were examined simultaneously for V21-LMWDS dose combinations to look for optimal combinations. The following ratios of V21:LMWDS were found to be

useful: 1:1, 4:1, and 5:1. Patency and blood loss were examined for the 5:1 combination. Patency was higher in rabbits receiving a combination of V21:LMWDS at a 5:1 ratio compared to rabbits receiving the same dose of V21 alone (Figure 6A), while bleeding was not increased (Figure 6B).

Example 5

Baboon Thrombosis Model

A baboon study was undertaken to determine the benefit to risk profiles of V21, LMWDS, and a combination of these agents. The baboon model involved assessment of acute thrombus formation onto a Dacron vascular graft over a period of 60 minutes after placement within an arterio-venous shunt (Hanson et al, Arteriosclerosis 5:595-603, 1985).

Initially, all animals have a chronic exteriorized silicone rubber shunt surgically placed between the femoral artery and vein. These shunts do not produce measurable platelet activation. To evaluate thrombus formation, a test tubing segment with a Dacron graft (2 cm x 4.0 mm i.d.) deployed centrally was inserted into the shunt system and exposed to flowing blood for 1 hour. The shunt tubing segments are standard silicone rubber, 4.0 mm i.d., which is an inherently non-thrombogenic material. Blood flow was maintained at 100 ml/min by a clamp placed distal to the test section and was measured continuously using an ultrasonic flowmeter. Autologous baboon platelets were labeled with 1 mCi ^{111}-Indium-oxine. Labeling efficiencies averaged >90%. The accumulation of ^{111}-In-labeled platelets was measured continuously using a gamma scintillation camera (General Electric 400T). Data were stored at 5 minute intervals and analyzed using a computer-assisted image processing system interfaced with the camera. The total number of deposited platelets was calculated by dividing the deposited platelet radioactivity (counts per minute) by the whole blood ^{111}-In-platelet activity (counts per minute/ml) and multiplying by the circulating platelet count (platelets/ml).

The fibrin content of all thrombi formed after 60 min of blood exposure was measured as follows. Ten minutes before initiating thrombus formation, 5 μCi of ^{125}-I-labeled homologous baboon fibrinogen are injected intravenously. After blood exposure for 1 hour, the thrombogenic Dacron graft was thoroughly rinsed with isotonic saline. Due to overlap between the ^{111}-In and ^{125}-I emission spectra, at least 30 days are allowed for the ^{111}-In to decay (half life = 2.8 days) before the thrombi are counted for ^{125}-I-activity using a gamma counter. Total fibrin accumulation was then calculated by dividing the deposited ^{125}-I-radioactivity (counts per minute) by the clottable fibrinogen radioactivity (counts per minute/ml) and multiplying by the circulating fibrinogen concentration (milligrams/ml) as measured in each experiment.

Safety is assessed by direct measurement of bleeding times, as described in Hanson et al Arteriosclerosis 5: 595-603, (1985).

Concurrent control studies were performed in 6 untreated animals. Thrombus formation onto Dacron grafts was assessed as described above, and clotting times (APTT, PT), factor Xa activity (Spectrozyme assay; American Diagnostica), and bleeding times (BT) were measured both immediately pre-graft placement, and at 1 hr following graft placement. In addition, 0.5ml of citrated baboon plasma (for each time point) was removed for determination of thrombin times.

Studies with V21 and LMWDS

V21 was studied first, beginning at total doses of 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, and 2 mg/kg (with 50% of the total dose given as a bolus and the remainder given as a continuous infusion over 65 minutes). Five minutes after bolus drug administration, the Dacron graft were placed and platelet imaging performed for an additional 60 minutes, after which, the graft was removed and the study terminated.

LMWDS was studied in an identical fashion, beginning at doses of 2 mg/kg, 5mg/kg, and 10 mg/kg. At the 2 mg/kg dose 50% of the total dose was given as a bolus and the remainder given as a continuous infusion over 65 minutes. The relative ratio of bolus to infused LMWDS was subsequently adjusted to achieve steady-state clotting times. Thus, at the 5 mg/kg dose the ratios of bolus/infusion amounts were 50%/50% and 33%/67% in two baboons. At the 10 mg/kg dose the ratios were 20-25% bolus to 75-80% infusion which resulted in constant APTT values over the 60 min infusion period.

Subsequently, the administration of V21 and LMWDS was combined in doses of 0.5 mg/kgV21 + 0.5 mg/kg LMWDS; 1 mg/kg V21 + 1mg/kg LMWDS; 2 mg/kg V21 + 5 mg/kg LMWDS; and 2 mg/kg V21 + 10 mg/kg LMWDS (with 50% of the V21 and 20% of the LMWDS doses given as bolus injections and the remaining amounts given as continuous infusions over 65 minutes. This dosing regimen produced nearly constant APTT values during the 60 min infusions. The platelet thrombus imaging, bleeding times, and laboratory measurements were also performed as described herein.

Results of the measurements of platelet thrombus formation after 60 min of blood exposure (or at any earlier time point) were compared using the Student t-test (two-tailed).

Results:

The effects of V21 on Dacron graft thrombosis are shown in Figure 8. The lower dose of V21, 0.5 mg/kg did not reduce platelet deposition below control values which averaged 2.96±0.85 x 109 plats after 60 min of blood exposure. The intermediate dose of 1 mg/kg reduced platelet deposition at 60 min by 24% while the higher dose of 2 mg/kg reduced platelet depositin by 57% (Figure 8).

Fibrin was reduced in a dose dependent manner by V21. At the highest dose, total fibrin accumulation was reduced by 59% (from 2.54 ±0.37 mg in the controls, versus 1.05 ±0.52 mg in the 2 mg/kg treated group). V21 also prolonged the APTT in a dose dependent manner to >200 sec at the 2 mg/kg dose. Measurements of PT were largely unaffected. Bleeding times were not significantly increased by V21, averaging only 5.1 min in the group studies at 2 mg/kg. It may be noted that one animal in the 0.5 mg/kg group recorded a bleeding time of 12 min; however, in light of other observations in this and the other dosing groups the result was viewed as spurious.

The effects of LMWDS on Dacron graft thrombus formation are given in Figure 9. Over the range of 2-10 mg/kg, there was no reduction in platelet deposition. Similarly, LMWDS did not reduce fibrin formation on the Dacron graft, or prolong the bleeding time. APTT clotting times were prolonged by LMWDS, approximately doubling at the 10 mg/kg dose (mean: 59.1 sec at 60 min, vs. 28.7 sec Pre) PT clotting times were unaffected.

The results for Dacron graft thrombus formation of combining V21 and LMWDS are given in

Figure 10. In combination with 2 mg/kg V21, two baboons were infused with 10 mg/kg LMWDS and one additional animal received 5 mg/kg LMWDS. A significant reduction in platelet deposition was seen at the dose of 2 mg/kg V21 + (5-10 mg/kg) LMWDS; however, this effect was comparable to that produced by V21 alone at the same dose (see Figures 8 and 10). Similarly, the reduced fibrin deposition seen with the combination therapies was comparable to that produced by V21 alone. Bleeding times were largely unaffected. While PT values were largely unaffected (PT prolonged by 2 sec at the highest doses), the APTT values averaged >500 sec (versus an average of 269 sec for V21 alone at 2 mg/kg).

The baboon model used in these studies is one of rapid flow, which promotes rapid transport and utilization of platelets, combined with a highly thrombogenic surface (Dacron graft) providing a strong initiating stimulus. Under these conditions fibrin formation is not extensive and anticoagulants have generally been ineffective (e.g. standard heparin, pentasaccharide, standard dermatan sulfate). Nonetheless, in this model V21 did reduce arterial platelet and fibrin thrombus formation by >50% without prolonged bleeding times.

TABLE 1

	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
Mp (Da)	8400	8300	8000
D	1.3	1.6	1.5
0-2 kDa (%)	0.7	3.2	2.2
2-4 kDa (%)	9.3	18.2	17.2
4-6 kDa (%)	19.0	18.5	19.2
6-8 kDa (%)	20.8	15.3	15.9
8-10 kDa (%)	16.8	11.7	12.4
10-12 kDa (%)	12.5	9.3	9.4
12-14 kDa (%)	8.5	7.1	7.7
14-16 kDa (%)	5.1	5.0	5.4
> 16 kDa (%)	7.3	11.7	10.6

TABLE 2

Characteristics of Heparin OligoSaccharide Fraction vs Heparin and LMWH

Compound	Lot #	Mean MW	Poly-Dispersity	K_d(AT) nM	Anti-IIa	K_d(II_a) nM
Heparin Oligosaccharide Fraction	200899 42192-2 42182-2 45262-1	8,050 8,450 8,500 8,500	1.5 1.2 1.3 1.5	62 20	100 67	872 ---
Unfractionated Heparin (Sigma)	36H0763	~15,000	---	32	---	---
Enoxaparin/ LMWH (Rhône-Poulenc)	C900509 9	~4,500	---	47	---	---

TABLE 3

Antithrombotic Activity Of Low Molecular Weight Dermatan Sulfate (LMWDS) Alone Or In Combination With 8.0 Kda Heparinase Fraction Or Enoxaparin In An Extracorporeal Circuit

LMWDS	Heparinase	Enoxaparin	Time to Filter Failure	Fibrinogen Consumption	Starting ACT
µg/ml	µg/ml	µg/ml	min	%	sec
250	–	–	>90	9	349
220	–	–	>90	15	336
200	–	–	65	82	342
100	1	–	>90	9	320
80	1	–	>90	13	316
60	1	–	70	81	273
50	2	–	>90	7	308
50	1	–	45	85	296
25	3	–	85	62	339
25	2	–	75	72	288
50	–	3	80	85	294

TABLE 4

Antithrombotic Activity Of LMWDS (50 µG/Ml) In Combination With 2 µG/Ml Of Heparinase, Nitrous Acid Or Periodate Fractions Or With 2 µG/Ml Enoxaparin In An Extracorporeal Circuit

PREPARATIONS	Time to Filter Failure	Fibrinogen Consumption	Starting ACT
	min	%	sec
LMWDS and Heparinase 8,450	>90	11.2	292
LMWDS and Nitrous Acid 7,700	>90	16.6	299
LMWDS and Periodate 10,100	45	85.4	256
LMWDS and Enoxaparin	85	80.5	260

TABLE 5

Comparison Of The Antithrombotic Activity Of Enoxaparin And The Heparinase-Derived Fraction In The Extracorporeal Circuit

Agent	Dose	Time to Filter Failure	Fibrinogen Consumption
	µg/ml	min	%
Enoxaparin	10	25	82
	20	70	65
	30	>90	33
Heparinase (8,450 Da)	10	>90	11

TABLE 6

Treatment Groups

Group	H2403 iv bolus	H2403 iv infusion	# Animals
1	10 mg/kg	10 mg/kg	5
2	5 mg/kg	5 mg/kg	5
3	2.5 mg/kg	2.5 mg/kg	5
4	1 mg/kg	1 mg/kg	5

TABLE 7

Treatment Groups

Group	V-21	LMWDS	# Animals
1	Saline	Saline	5
2	0.125mg/Kg	-----	5
3	0.25mg/Kg	-----	5
4	0.50mg/Kg	-----	5
5	2.50mg/Kg	-----	5
6	-----	0.125mg/Kg	5
7	-----	0.25mg/Kg	5
8	-----	0.50mg/Kg	5
9	0.125mg/Kg	0.125mg/Kg	5
10	0.25mg/Kg	0.125mg/Kg	5
11	0.50mg/Kg	0.125mg/Kg	5
12	2.50mg/Kg	0.125mg/Kg	5
13	0.125mg/Kg	0.25mg/Kg	5
14	0.25mg/Kg	0.25mg/Kg	5
15	0.50mg/Kg	0.25mg/Kg	5
16	2.50mg/Kg	0.25mg/Kg	5
17	0.125mg/Kg	0.50mg/Kg	5
18	0.25mg/Kg	0.50mg/Kg	5
19	0.50mg/Kg	0.50mg/Kg	5
20	2.50mg/Kg	0.50mg/Kg	5

TABLE 8

Dosage Matrix

V-21/LMWDS	LMWDS (mg/Kg)			
V-21 (mg/Kg)	0.00 / 0.00	0.00 / 0.125	0.00 / 0.25	0.00 / 0.50
	0.125 / 0.00	0.125 / 0.125	0.125 / 0.25	0.125 / 0.50
	0.25 / 0.00	0.25 / 0.125	0.25 / 0.25	0.25 / 0.50
	0.50 / 0.00	0.50 / 0.125	0.50 / 0.25	0.50 / 0.50
	2.50 / 0.00	2.50 / 0.125	2.50 / 0.25	2.50 / 0.50

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein, since such embodiments are intended as but single illustrations of one aspect of the invention and any functionally equivalent embodiments are within the scope of this invention. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

All publications, patents and patent applications referred to herein are incorporated by reference in their entirety to the same extent as if each individual publication, patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety. The citation of any reference herein is not an admission that such reference is available as prior art to the instant invention.

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise.

References Cited in Specification

1. Hirsh, J. N. Eng. J. Med. 1991; 324:1565-1574.
2. Popma JJ, et al., Chest 1995; 108:486-501.
3. Collins R, et al., BMJ 1996; 313:652-659.
4. Hogg PJ, Jackson CM., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86:3619-3623.
5. Weitz JI, et al., J. Clin. Invest. 1990; 86:385-391.
6. Carrie D, et al., Thromb. Haemost. 1992; 68:637-641.
7. Matthiason SE, et al., Haemostasis 1995; 25:203-211.
8. Cadroy Y, et al., Arteriosclerosis and Thrombosis 1993; 13:1213-1217.
9. Fernandez F, et al., Br. J Haematol. 1986; 64:309-317.
10. Cohen AT, et al., Thromb. Haemost. 1994; 72:793-798.
11. Agnelli G, et al., Thromb. Haemost. 1992; 67: 203-208.
12. Prandoni P, et al., Br. J. Surg. 1992; 79:505-509.
13. DiCarlo V, et al., Thromb. Haemost. 1999; 82:30-34.
14. Tollefsen DM, et al., J. Biol. Chem. 1983; 258:6713-6716.
15. Becker D, et al., J. Biol Chem. 1999: 274: 6226-6233.
16. Bendayan P, et al., Thromb. Haemost. 1994; 71:576-580.
17. Cosmi B, et al., Thromb Haemost. 1993; 70: 443-447.
18. Hogg PJ, Jackson CM, J Biol Chem. 1990; 265:241-247.
19. Fredenburgh JC, et al., J. Biol. Chem. 1997: 272:25493-25499.

WE CLAIM:

1. A composition comprising a combination of (a) at least one heparin oligosaccharide fraction and (b) at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction for use as a medicament.

2. A composition as claimed in claim 1 wherein the heparin oligosaccharide fraction comprises a mixture of oligosaccharides derived from heparin characterized by one, two, three, four, five, six, or seven or more of the following characteristics:
   (a) having antithrombin- and heparin cofactor II (HCII)-related anticoagulant activity *in vitro;*
   (b) the oligosaccharides are too short to bridge thrombin to fibrin, but are of a sufficient length to bridge antithrombin or HCII to thrombin;
   (c) having at least 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, or 40% oligosaccharides with at least one or more pentasaccharide sequence;
   (d) enriched for oligosaccharides having a molecular weight range from about 6,000 to about 12,000, 6,000 to 11,000, or 6,000 to 10,000;
   (e) the oligosaccharides have a peak molecular weight of about 7,000 to 10,000, 7,500 to 9,700, or 8,000 to 9,000;
   (f) at least 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, or 55% of the oligosaccharides have a molecular weight greater than or equal to 6000 Daltons;
   (g) at least 20%, 25%, 30%, 35%, or 40%, have a molecular weight greater than or equal to 8000 Daltons;
   (h) a polydispersity of 1.1 to 1.8; and
   (i) having similar anti-factor Xa and anti-factor IIa activities.

3. A composition as claimed in claim 2 wherein the heparin oligosaccharide fraction has the characteristics (a), (b), (c) and (d); (a) (b), (c), and (e); (a), (b), (e), and (f); (a), (b), (e), and (g); (a), (b), (e), (f), (g), (h) and (i); (b), (c), (e), and (g); (b), (d), (e), (h), and (i); (b) (c), (d), and (h); (b), (e), (h), and (i); (b), (e), (f), (h), and (i); (b), (e), (g), (h), and (i); or (a) through (i).

4. A composition as claimed in claim 2 wherein the heparin oligosaccharide fraction has one or more of the following characteristics:
   (a) enriched for oligosaccharides with a molecular weight range from 6,000 to 10,000 Daltons, and a mean of about 8,500;
   (b) white to off-white crystalline solid;
   (c) stable at room temperature; and
   (d) a polydispersity of about 1.2 to 1.5.

5. A composition as claimed in claim 2, 3, or 4 wherein the dermatan sulfate oligosaccharide fraction is characterized by one or more of the following:

(a) a sulfur content of 6.0% to 10% (w/w) preferably 6.0 to 8.0% (w/w), more preferably 6.5% to 8% (w/w);

(b) a sulfate/carboxyl ratio of 1.2 to 2.5, preferably from 1.2 to 2.0, more preferably 1.3 to 1.8, most preferably 1.3-1.6;

(c) a disulfated disaccharide content of 20% to 60% (w/w), preferably 30% to 60% (w/w) of the mono-sulfated disaccharide content;

(d) a heparin cofactor II mediated activity against thrombin in the range 20-60 IU/mg, preferably 30-60 IU/mg.

6. A composition as claimed in claim 2, 3, or 4 wherein the dermatan sulfate oligosaccharide fraction has one or more of the following characteristics:

(a) enriched for oligosaccharides with a molecular weight range from 5,000 to 8,000 Daltons;

(b) white to off-white crystalline solid;

(c) stable at room temperature; and

(d) greater than 6.2% sulfonation by weight.

7. A composition as claimed in claim 2, 3, or 4 wherein the dermatan sulfate oligosaccharide fraction comprises a mixture of dermatan polymeric chains with 90% or more having a molecular weight ranging between about 1600 to about 20,000 Daltons and a peak molecular weight of about 4,500 to about 8,000 Daltons.

8. A composition as claimed in any one of claims 1 to 7 wherein the amounts of (a) and (b) are effective to exert a synergistic effect in preventing or inhibiting thrombin generation or activity.

9. A composition as claimed in any one of claims 1 to 8 wherein the doses of the heparin oligosaccharide fraction and dermatan sulfate oligosaccharide fraction are at least 5 to 10 fold lower than the doses of each fraction required to prevent or inhibit thrombin generation or activity in a patient.

10. A pharmaceutical composition comprising a synergistically effective amount of a combination of at least one heparin oligosaccharide fraction and at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction in a pharmaceutically acceptable carrier.

11. A pharmaceutical composition as claimed in claim 10 wherein the pharmaceutically acceptable carrier is adapted to provide the synergistically effective amount of the fractions to inhibit or prevent thrombin generation or activity in a patient.

12. A combination treatment to prevent or inhibit thrombin generation or activity in a patient comprising administering to the patient an effective amount of (a) at least one heparin oligosaccharide fraction; and (b) at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction.

13. A combination treatment as claimed in claim 12 wherein the method provides synergistic activity.

14. A combination treatment as claimed in claim 12 or 13 wherein the heparin oligosaccharide fraction and dermatan sulfate oligosaccharide fraction are administered concurrently or separately.

15. A combination treatment as claimed in claim 12, 13, or 14 wherein the heparin oligosaccharide fraction comprises a mixture of oligosaccharides derived from heparin characterized by one, two, three, four, five, six, or seven or more of the following characteristics:

(a) having antithrombin- and heparin cofactor II (HCII)-related anticoagulant activity *in vitro;*

(b) the oligosaccharides are too short to bridge thrombin to fibrin, but are of a sufficient length to bridge antithrombin or HCII to thrombin;

(c) having at least 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, or 40% oligosaccharides with at least one or more pentasaccharide sequence;

(d) enriched for oligosaccharides having a molecular weight range from about 6,000 to about 12,000, 6,000 to 11,000, or 6,000 to 10,000;

(e) the oligosaccharides have a peak molecular weight of about 7,000 to 10,000, 7,500 to 9,700, or 8,000 to 9,000;

(f) at least 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, or 55% of the oligosaccharides have a molecular weight greater than or equal to 6000 Daltons;

(g) at least 20%, 25%, 30%, 35%, or 40%, have a molecular weight greater than or equal to 8000 Daltons;

(h) a polydispersity of 1.1 to 1.8; and

(i) having similar anti-factor Xa and anti-factor IIa activities.

16. A combination treatment as claimed in claim 15 wherein the heparin oligosaccharide fraction has the characteristics (a), (b), (c) and (d); (a) (b), (c), and (e); (a), (b), (e), and (f); (a), (b), (e), and (g); (a), (b), (e), (f), (g), (h) and (i); (b), (c), (e), and (g); (b), (d), (c), (h), and (i); (b) (c), (d), and (h); (b), (e), (h), and (i); (b), (e), (f), (h), and (i); (b), (e), (g), (h), and (i); or (a) through (i).

17. A combination treatment as claimed in any one of claims 12 to 16 wherein the dermatan sulfate oligosaccharide fraction is characterized by one or more of the following:

(a) a sulfur content of 6.0% to 10% (w/w) preferably 6.0 to 8.0% (w/w), more preferably 6.5% to 8% (w/w);

(b) a sulfate/carboxyl ratio of 1.2 to 2.5, preferably from 1.2 to 2.0, more preferably 1.3 to 1.8, most preferably 1.3-1.6;

(c) a disulfated disaccharide content of 20% to 60% (w/w), preferably 30% to 60% (w/w) of the mono-sulfated disaccharide content;

(d) an activity against thrombin in the range 20-60 IU/mg, preferably 30-60 IU/mg

18. A combination treatment as claimed in any one of claims 12 to 16 wherein the dermatan sulfate oligosaccharide fraction comprises a mixture of dermatan polymeric chains with 90% or more having a molecular weight ranging between about 1600 to about 20,000 Daltons and a peak molecular weight of about 4,500 to about 8,000 Daltons.

19. A method of inhibiting or preventing thrombin generation or activity in a patient comprising administering in combination, to a patient in need thereof, synergistically effective amounts of at

least one heparin oligosaccharide fraction, and at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction.

20. Use of a composition or combination treatment as claimed in any of the preceding claims for preventing, and/or ameliorating disease severity, disease symptoms, and/or periodicity of recurrence of a disease associated with excess thrombin generation or activity.

21. Use of a composition comprising a combination of (a) at least one heparin oligosaccharide fraction and (b) at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction for the preparation of a medicament for the prevention or inhibition of thrombin generation or activity.

22. Use of synergistically effective amounts of at least one heparin oligosaccharide fraction, and at least one dermatan sulfate oligosaccharide fraction in the preparation of a pharmaceutical composition for inhibiting or preventing thrombin generation or activity in a patient.

23. A kit form of a composition as claimed in any of the preceding claims.

Figure 1

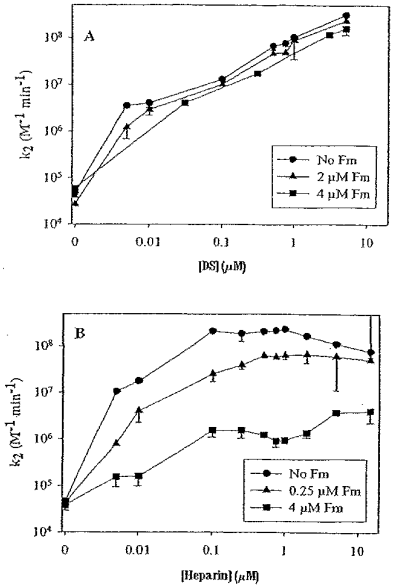

A
k_2 (M^{-1} min^{-1})
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
No Fm
2 μM Fm
4 μM Fm
0
0.01
0.1
1
10
[DS] (μM)
B
k_2 (M^{-1} min^{-1})
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
No Fm
0.25 μM Fm
4 μM Fm
0
0.01
0.1
1
10
[Heparin] (μM)

Figure 2

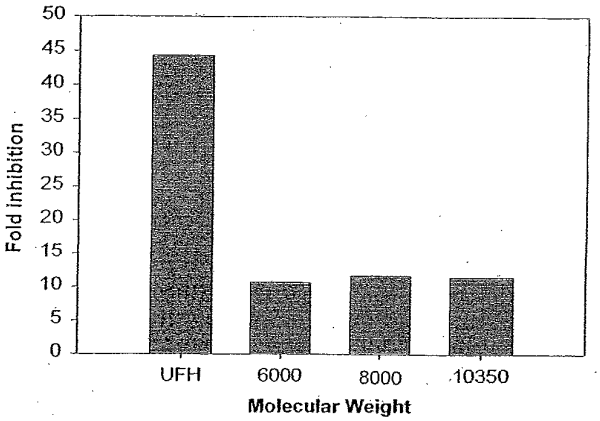

50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Fold inhibition
UFH
6000
8000
10350
Molecular Weight

Figure 3

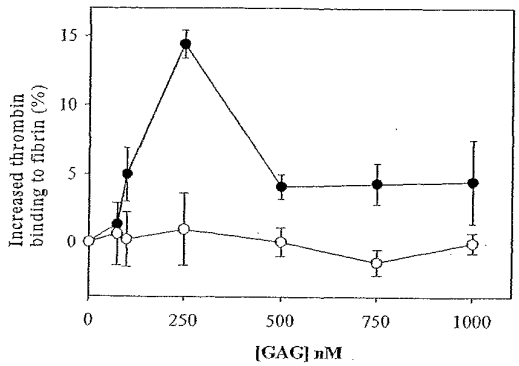

Increased thrombin binding to fibrin (%)
15
10
5
0
0
250
500
750
1000
[GAG] nM

Figure 4

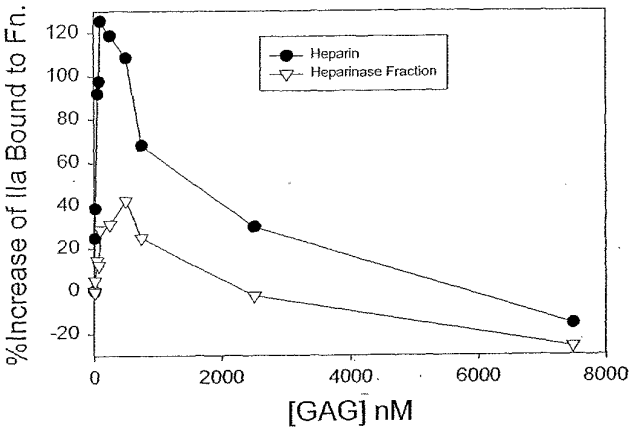

%Increase of IIa Bound to Fn.
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
2000
4000
6000
8000
[GAG] nM
Heparin
Heparinase Fraction

Figure 5

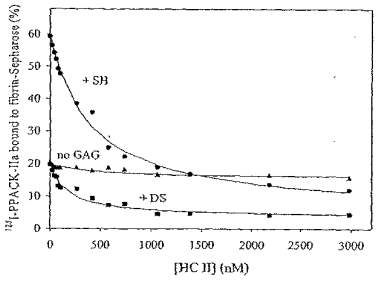

^{125}I-PPACK-IIa bound to fibrin-Sepharose (%)
60
50
40
30
20
10
0
+ SH
no GAG
+ DS
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
[HC II] (nM)

Figure 6A

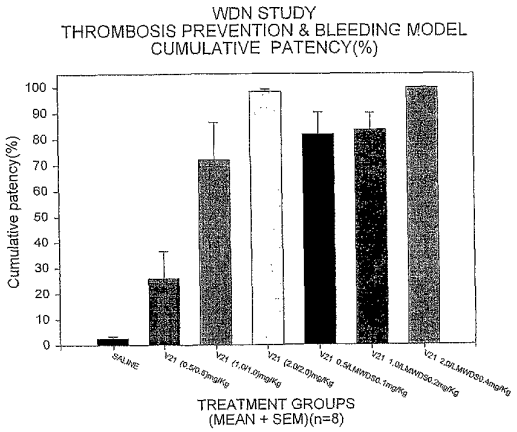

WDN STUDY
THROMBOSIS PREVENTION & BLEEDING MODEL
CUMULATIVE PATENCY(%)
Cumulative patency(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
SALINE
V21 (0.5/0.5mg/Kg
V21 (1.0/1.0mg/Kg
V21 (2.0/2.0)mg/Kg
V21 0.5/LMWD50.1mg/Kg
V21 1.0/LMWD50.2mg/Kg
V21 2.0/LMWD50.4mg/Kg
TREATMENT GROUPS
(MEAN + SEM)(n=8)

Figure 6B

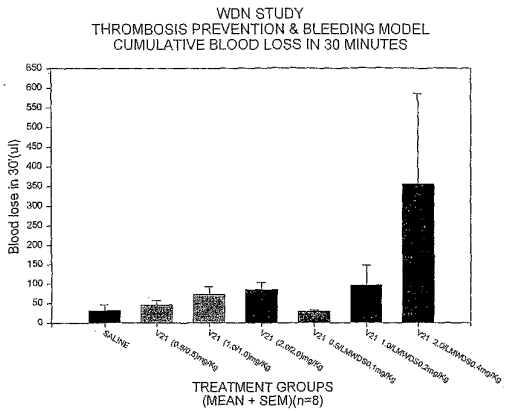
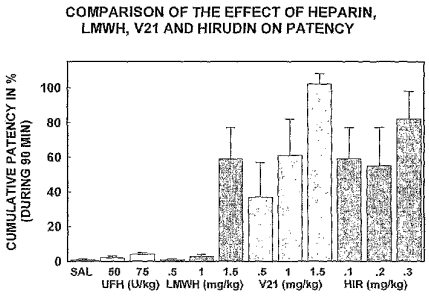

WDN STUDY
THROMBOSIS PREVENTION & BLEEDING MODEL
CUMULATIVE BLOOD LOSS IN 30 MINUTES
Blood lose in 30'(ul)
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
SALINE
V21 (0.50.5mg/Kg
V21 (1.0/1.0)mg/Kg
V21 (2.0/2.0)mg/Kg
V21 0.5/LMWD50.1mg/Kg
V21 1.0/LMWD50.2mg/Kg
V21 2.0/LMWD50.4mg/Kg
TREATMENT GROUPS
(MEAN + SEM)(n=8)

Figure 7

A


COMPARISON OF THE EFFECT OF HEPARIN, LMWH, V21 AND HIRUDIN ON PATENCY
CUMULATIVE PATENCY IN % (DURING 90 MIN)
0
20
40
60
80
100
SAL
50
75
.5
1
1.5
.5
1
1.5
.1
.2
.3
UFH (U/kg)
LMWH (mg/kg)
V21 (mg/kg)
HIR (mg/kg)

B

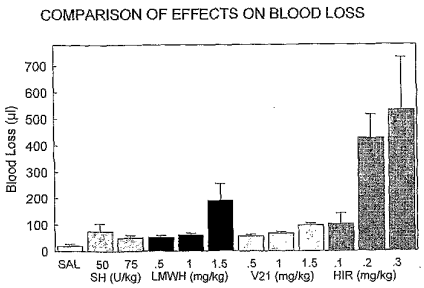

COMPARISON OF EFFECTS ON BLOOD LOSS
Blood Loss (µl)
0
100
200
300
400
500
600
700
SAL
50
75
.5
1
1.5
.5
1
1.5
.1
.2
.3
SH (U/kg)
LMWH (mg/kg)
V21 (mg/kg)
HIR (mg/kg)

Figure 8

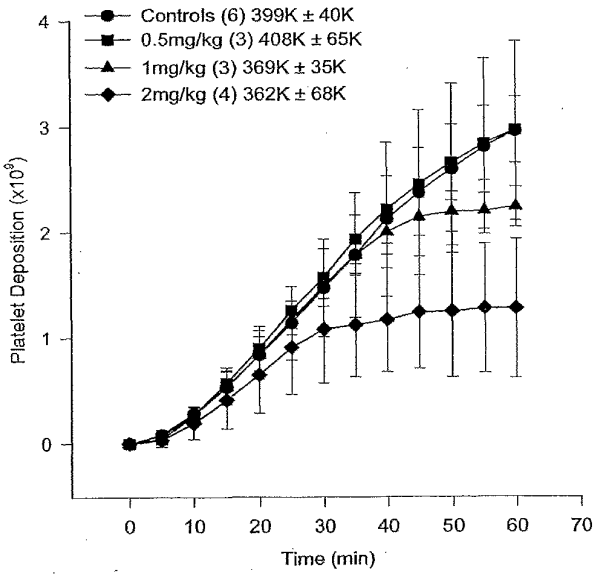

Controls (6) 399K ± 40K
0.5mg/kg (3) 408K ± 65K
1mg/kg (3) 369K ± 35K
2mg/kg (4) 362K ± 68K
Platelet Deposition (x10⁹)
0
1
2
3
4
0
10
20
30
40
50
60
70
Time (min)

Figure 9

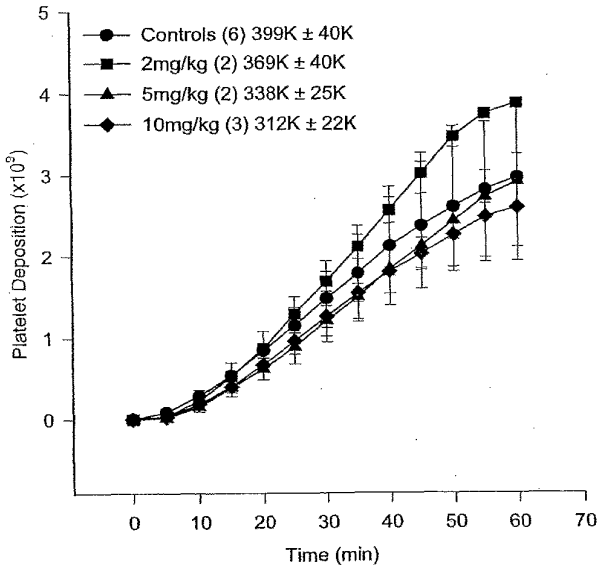
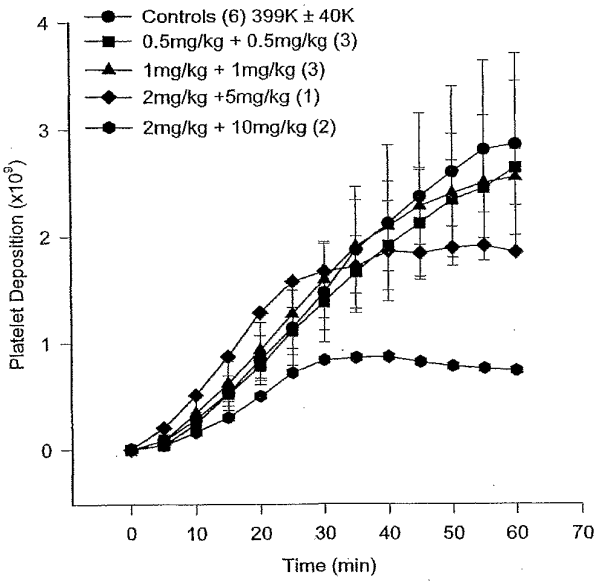

Controls (6) 399K ± 40K
2mg/kg (2) 369K ± 40K
5mg/kg (2) 338K ± 25K
10mg/kg (3) 312K ± 22K
Platelet Deposition (X10^5)
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
60
70
Time (min)

Figure 10


Controls (6) 399K ± 40K
0.5mg/kg + 0.5mg/kg (3)
1mg/kg + 1mg/kg (3)
2mg/kg +5mg/kg (1)
2mg/kg + 10mg/kg (2)
Platelet Deposition (X10^9)
0
1
2
3
4
0
10
20
30
40
50
60
70
Time (min)

【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
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/020091 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61P 7/02, A61K 31/727, 31/737, 31/715

(21) International Application Number: PCT/CA01/01287

(22) International Filing Date:
7 September 2001 (07.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/231,429 8 September 2000 (08.09.2000) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **HAMILTON CIVIC HOSPITALS RESEARCH DEVELOPMENT INC.** [CA/CA]; 711 Concession Street, Hamilton, Ontario L8V 1C3 (CA). **LEO PHARMA A/S** [DK/DK]; Industriparken 55, DK-2750 Ballerup DK-2750 Ballerup (DK).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **HIRSH, Jack** [CA/CA]; 21 Cottage Avenue, Hamilton, Ontario L8P 4G5 (CA). **JOHANSEN, Kristian** [DK/DK]; Sjoelundsparken 41, DK-3150 Haellebaek DK-3150 Haellebaek (DK). **WEITZ, Jeffery, I.** [CA/CA]; 54 Carlnke Road East, Ancaster, Ontario L9G 3L1 (CA).

(74) Agents: **VAN ZANT, Joan M.,** et al.; Ogilvy Renault, Suite 1600, 1981 McGill College Avenue, Montreal, Québec H3A 2Y3 (CA).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, 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, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

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

Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
21 November 2002

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 02/020091 A3

(54) Title: ANTITHROMBOTIC COMPOSITIONS

(57) Abstract: The invention relates generally to compositions and methods for preventing or inhibiting thrombin generation or activity.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 01/01287

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61P7/02 A61K31/727 A61K31/737 A61K31/715

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)
IPC 7 A61K

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 016 410 A (LAKARO BIOPHARMACEUTICAL INC) 5 July 2000 (2000-07-05) claims 1,3,14,15	1-23
X	EP 0 710 483 A (ALFA WASSERMANN SPA) 8 May 1996 (1996-05-08) claim 1	1-23
A	OFOSU, F. A.: "Modulation of the Enzymatic Activity of alpha-Thrombin by Polyanions: Consequences on Intrinsic Activation of Factor V and Factor VIII" HAEMOSTASIS, vol. 21, 1991, pages 240-247, XP008002640 abstract	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 April 2002	10/05/2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Beyss, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/CA 01/01287

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 1-23 relate to an extremely large number of possible productss. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the products claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to "low molecular weight heparin oligosaccharide" (see claim 2; p. 6 line 36, 37) and "low molecular weight dermatan sulfate oligosaccharide" (see claim 6; p. 8, line 11-18).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

rmation on patent family members

International Application No
PCT/CA 01/01287

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 1016410	A	05-07-2000	AU	6539599 A	06-07-2000
			EP	1016410 A1	05-07-2000
			JP	2000309538 A	07-11-2000
EP 0710483	A	08-05-1996	IT	BO940436 A1	09-04-1996
			AT	202282 T	15-07-2001
			DE	69521388 D1	26-07-2001
			DE	69521388 T2	11-10-2001
			DK	710483 T3	03-09-2001
			EP	0710483 A1	08-05-1996
			ES	2157277 T3	16-08-2001
			PT	710483 T	28-09-2001
			US	5686432 A	11-11-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,CO,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,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100086405
弁理士 河宮 治
(74)代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
(72)発明者 ジャック・ハーシュ
カナダ、エル８ピー・４ジー５、オンタリオ、ハミルトン、コテージ・アベニュー２１番
(72)発明者 クリスチアン・ヨハンセン
デンマーク、デーコー－３１５０ヘレベク、シエルンズスパーケン４１番
(72)発明者 ジェフリー・アイ・ワイツ
カナダ、エル９ジー・３エル１、オンタリオ、アンキャスター、カールク・ロード・イースト５４番

Ｆターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA26 EA27 MA02 MA03 MA04 MA05 NA05 ZA54
ZC20 ZC41 ZC48