

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4051099号  
(P4051099)

(45) 発行日 平成20年2月20日(2008.2.20)

(24) 登録日 平成19年12月7日(2007.12.7)

(51) Int.Cl.

F I

C O 8 B 37/00 (2006.01)

C O 8 B 37/00 H

C O 8 B 37/10 (2006.01)

C O 8 B 37/10

A 6 1 K 31/727 (2006.01)

A 6 1 K 31/727

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 17/00 (2006.01)

A 6 1 P 17/00

請求項の数 14 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-31489

(22) 出願日 平成9年1月31日(1997.1.31)

(65) 公開番号 特開平10-218902

(43) 公開日 平成10年8月18日(1998.8.18)

審査請求日 平成16年1月19日(2004.1.19)

(73) 特許権者 000195524

生化学工業株式会社

東京都千代田区丸の内一丁目6番1号

(74) 代理人 110000257

特許業務法人志成特許事務所

(74) 代理人 100068065

弁理士 長谷川 一

(74) 代理人 100077436

弁理士 松田 寿美子

(72) 発明者 石原 雅之

東京都立川市一番町4-19-2-601

(72) 発明者 吉田 圭一

東京都東村山市恩多町4-14-12

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低分子化ヘパリン、その製造法及び医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

グリコサミノグリカン分解酵素による分解と高速液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた二糖分析により得られる下記構造式で表される二糖体組成において(A)及び(B)の規定を充たし、且つ(C)及び(D)に規定する物性を有することを特徴とする低分子化ヘパリン。

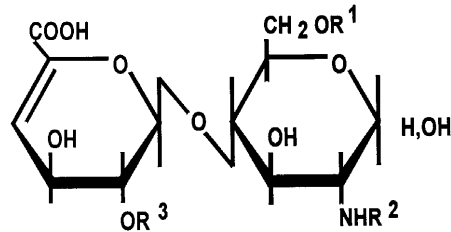
(A) Di-tri(U, 6, N)Sのモル%が65%以上(但し、Di-tri(U, 6, N)Sは、式中において、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ が $SO_3^-$ であることを意味する。)

(B) Di-di(U, N)Sのモル%が27.1%~32.6%(但し、Di-di(U, N)Sは、式中において、 $R^1$ がH、 $R^2$ 及び $R^3$ が $SO_3^-$ であることを意味する。)

(C) APTT活性及び抗トロンビン活性の少なくとも一方が標準ヘパリンに比して2%以下

(D) 平均分子量が1,000~4,500Da(ダルトン)

## 【化 1】



## 【請求項 2】

10

請求項 1 に記載の二糖体組成において、Di - US を実質的に含有しないことを特徴とする請求項 1 に記載の低分子化ヘパリン。

(但し、Di - US は、上記構造式中において  $R^1$  が H、 $R^2$  が  $-COCH_3$ 、 $R^3$  が  $SO_3^-$  であることを意味する。 )。

## 【請求項 3】

平均分子量が 1,000 ~ 3,500 Da であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の低分子化ヘパリン。

## 【請求項 4】

塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) の細胞増殖活性に対する促進効果及び抑制効果の少なくともいずれかの効果が、標準ヘパリンに比して 50 % 以上であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の低分子化ヘパリン。

20

## 【請求項 5】

標準ヘパリンに対する抗トロンビン活性及び APTT 活性が、0 抗トロンビン活性 / APTT 活性 0.5 であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の低分子化ヘパリン。

## 【請求項 6】

塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) の細胞増殖活性に対する促進効果が標準ヘパリンに比して実質的に 0 % であり、かつ抑制効果が 60 % 以上であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の低分子化ヘパリン。

## 【請求項 7】

30

抗トロンビン活性及び APTT 活性が標準ヘパリンに比して、1 % 以下であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の低分子化ヘパリン。

## 【請求項 8】

下記工程を含むことよりなる低分子化ヘパリンの製造法。

工程：

(a) ヘキサミンとウロン酸の繰り返し構造を基本骨格とするヘパリンの構成ウロン酸の 2 位の硫酸基を 2 ~ 85 % 部分的脱硫酸化し、

(b) 次に酸化剤により 2 位に硫酸基を有しないウロン酸を 2 位と 3 位の炭素原子間で開裂した後、

(c) 上記開裂された糖残基において、ヘパリンの切断処理を行うこと。

40

## 【請求項 9】

工程 (b) において、2 位に硫酸基を有しないウロン酸の 2 位と 3 位の炭素原子間で開裂した後、さらに開裂したヘパリンの末端に生じたアルデヒド基を還元処理することを特徴とする請求項 8 に記載の低分子化ヘパリンの製造法。

## 【請求項 10】

工程 (c) の切断処理が、酸又はアルカリによる処理であることを特徴とする請求項 8 又は 9 に記載の低分子化ヘパリンの製造法。

## 【請求項 11】

部分的脱硫酸化反応がアルカリの存在下行われ、該アルカリ濃度を調整することによりヘパリンの平均分子量を制御することを特徴とする請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載

50

の低分子化ヘパリンの製造法。

【請求項 1 2】

部分的脱硫酸化反応はアルカリ存在下、凍結乾燥処理によって行われ、該アルカリ濃度が 0.01 ~ 0.1 Nであることを特徴とする請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の低分子化ヘパリンの製造法。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の低分子化ヘパリンを有効成分として含有することを特徴とする b F G F 活性抑制剤又は b F G F 活性維持促進剤。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の低分子化ヘパリンを有効成分として含有することを特徴とする創傷、腫瘍、血管狭窄、炎症又はケロイドの治療剤。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗血液凝固活性はほとんど有さず、特定の生物活性を有する低分子化ヘパリン、その製造法並びに当該低分子化ヘパリンを有効成分とする b F G F 活性抑制剤又は b F G F 活性維持促進剤等に関する。

【0002】

【従来の技術】

特異的生物活性を有する硫酸化多糖を提供するために、従来より様々な研究がなされて来ており、その一例に硫酸化多糖を選択的に脱硫酸化する方法がある。従来、ヘパリンから選択的に脱硫酸化を行う方法としては、ジメチルスルホキシド (DMSO)、N,N-ジメチルホルムアルデヒド (DMF) またはピリジン等の非プロトン性溶媒中 (USOV A. et al. Carbohydr. Res., 18, 336(1971))、または少量の水あるいはメタノールを含む DMSO 中 (Nagasawa K. et al. Carbohydr. Res., 58, 47(1977), Nagasawa K. et al. J. Biochem., 86, 1323, (1979)) で行うソルボリシスがあり、このソルボリシスの反応機構は、非プロトン性溶媒中での三酸化硫黄とアミンの複合体による硫酸化反応の逆反応であることが知られている。このソルボリシス反応は、その反応条件をコントロールすることにより、ヘパリンの N-硫酸基を選択的に脱硫酸化することはできるが、第 1 級水酸基 (グルコサミン残基の 6 位水酸基) 又は第 2 級水酸基 (ウロン酸残基の 2 位水酸基) に結合している O-硫酸基を脱離させることはできなかった。

20

30

【0003】

一方、ヘパリンの第 1 級水酸基に結合した硫酸基を特異的に脱硫酸化する方法として、N-メチルトリメチルシリル-トリフルオロアセトアミド (MTSFA) を用いる方法がある (Ishihara, M. et al. J. Biochem., 118, 1255(1995))。また、第 2 級水酸基に結合した硫酸基を特異的に脱硫酸化する方法として、ヘパリンをアルカリで処理し凍結乾燥させることにより、ヘパリンのウロン酸残基の 2 位の水酸基を脱硫酸化することが提案され (Jaseja, M. et al. Can. J. Chem., 67, 1449, (1989))、米国特許第 5,296,471 号には、この方法によってウロン酸残基の 2 位の水酸基を 99% 脱硫酸化するとともに、グルコサミン残基の 3 位の硫酸基の 75% に脱硫酸化が起こること、さらに、2 価のカルシウムイオンや銅イオンの存在下で、この脱硫酸化は制御できることが示されている。しかしながら上記の選択的脱硫酸化法は、いずれも糖鎖の低分子化は引き起こさないことを明記している。

40

【0004】

特異的生物活性を有する硫酸化多糖を提供するための方法として、硫酸化多糖の低分子化も行われている。その一つとして、ヘパリンに過ヨウ素酸ナトリウムを作用させ、非硫酸化ウロン酸の 2 位と 3 位 (C2 - C3) の炭素原子間での切断を行うことにより、ヘパリンの血液に対する抗凝固活性を変性し得ることが知られている。また、ヘパリンのリボタンパク質リパーゼ遊離活性における過ヨウ素酸酸化の効果についての報告 (Casu, B. et al., Arzneimittel Forsch/Drug Res., 36 637-642, (1986)) があり、この方法では、ヘパリンは過

50

ヨウ素酸で酸化開裂され、次いで水素化ホウ素で低分子化されることなく還元されている。この方法により得られた生成物は、アンチトロンビンIII (AT III) との結合能力は消失しているが、リポタンパク質リパーゼの遊離活性は変化していない。

【0005】

また、ヘパリンはpH 5.3、4 で24時間、過ヨウ素酸塩による酸化処理を施すことにより、全ての非硫酸化ウロン酸でそのC2 - C3炭素原子間での切断が起こり開裂する。そしてさらに、弱酸又は弱アルカリで加水分解処理することによって鎖が切断され、著しく低分子化されることも知られている (Fransson, L.A. et al., Carbohydr. Res., 80, 131-145, (1980))。同様に特表平6 - 506685号公報には、過ヨウ素酸酸化、還元処理したヘパリンの有する血管平滑筋細胞増殖抑制活性を利用した医薬品への応用が記載されている。

10

【0006】

更に、特開昭63 - 278901号公報には、ヘパリンに過ヨウ素酸ナトリウムを作用させ、アルカリで低分子化した後、生じたアルデヒド基を還元する各操作条件が記載され、この方法により得られる物質は、分子量4,800 - 9,000に相当する下記二糖単位の繰り返し構造をもつ14 - 30糖鎖を含んでいることが示されている。

IdoA - 2S (GlcA - 2S) - GlcNS又は、

IdoA - 2S (GlcA - 2S) - GlcNAc

(ただし、IdoA: イズロン酸、GlcA: グルクロン酸、GlcNS: N - 硫酸化グルコサミン、GlcNAc: N - アセチル化グルコサミンである。GlcNSあるいはGlcNAcの6位は硫酸化されている場合も多い。)

20

【0007】

そして、ヘパリンを低分子化することにより得られたこれらの硫酸化多糖は、AT IIIとの結合能力を失い、抗血液凝固活性は消失しているが、平滑筋細胞増殖抑制、組織修復促進、動脈硬化予防、ショック状態の改善、癌転移予防等の生理活性は保持されていることが記載されている。

【0008】

任意の構造と分子量を有する硫酸化多糖の開発は、好ましい生理活性を有する医薬品の創造に際し重要である。特に、ヘパリンは様々な生理活性物質と特異的な分子量と構造をもつドメインを介して相互作用することが知られており、例えば、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (以下bFGFと略記する) と相互作用し、その安定化と細胞増殖活性を促進するところのヘパリンの低分子化により生じる硫酸化多糖は、N - 硫酸化されたグルコサミンと2位が硫酸化 (2 - O - 硫酸化) されたイズロン酸の二糖体構造に富んだ10 - 12糖以上 (分子量3,500 - 4,000ダルトン以上) の糖鎖である (Ishihara M. et al. Glycobiology, 4, 451(1994))。

30

【0009】

一方、酸性繊維芽細胞増殖因子 (以下aFGFと略記する) やFGF - 4 (カポシ肉腫FGF) の活性維持・促進には、bFGFの場合に適した物性に加えてより多くのN - 硫酸化グルコサミンの6位が硫酸化されている必要がある (Ishihara M. Glycobiology, 4, 817, (1994))。しかしながら、8糖以下のサイズのオリゴ糖鎖は繊維芽細胞増殖因子 (以下FGFと略記する) の活性を促進する活性は持たず、むしろ抑制活性を持つ。したがって、特異的構造を有する任意の分子量の硫酸化多糖は、特異的な生理活性を維持し、且つ、他の多くの生理活性物質との相互作用から生じる望ましくない生理活性を抑制することが期待される。

40

【0010】

FGFと多糖類を使用した組成物としては、例えば、FGFと抗ウィルス活性を有する硫酸化多糖及び賦形剤からなる医薬品組成物 (特開平6 - 80583号公報)、FGFとL - イズロン酸2硫酸及びN - スルホ - D - グルコサミンからなり、8 - 18糖で構成されるFGFと結合性を有するオリゴ糖を含有する組成物 (特開平5 - 148305号公報)、FGFムテインとグリコサミノグリカンとの複合体あるいはこれらを配合した組成物 (

50

特開平 2 - 4 0 3 9 9 号公報) 及び F G F と選択的に 6 位の硫酸基 ( 6 - O - 硫酸 ) が脱硫酸化された選択的 6 - O - 脱硫酸化ヘパリンを配合した組成物 ( W O 9 6 / 0 1 2 7 8 ) 等があげられる。これらのうち、特開平 6 - 8 0 5 8 3 号公報に記載の医薬組成物において、医薬組成物として使用されている硫酸化多糖としては、カラーギナン、ヘパリン、デキストラン硫酸、アガロース型硫酸化多糖等があげられているが、低分子化や脱硫酸化されたものは記載されておらず、その医薬組成物は抗ウィルス活性の共働作用による増強を目的としている。

#### 【 0 0 1 1 】

また、特開平 5 - 1 4 8 3 0 5 号公報の組成物では、脱硫酸化されていない特定構造のオリゴ糖が使用され、特開平 2 - 4 0 3 9 9 号公報の組成物では天然のグリコサミノグリカンを使用しており、いずれも低分子化や脱硫酸化処理が施されたものではない。さらに、従来の低分子化方法により得られた硫酸化多糖は分子量が一定ではなく、低分子から高分子にかけて幅広い分子量分布を持ち、様々な分子量を持つ硫酸化多糖の混合物であるので、当該混合物から目的分子量の硫酸化多糖を得るためには複雑なカラムによる分画が必要であった ( Ishihara M. et al. J. Biol. Chem., 268, 4675-4683, (1993) ) 。

#### 【 0 0 1 2 】

##### 【 発明が解決しようとする課題 】

所望の生理活性に優れた医薬品開発のためには、生体内での様々な活性を制御するのに有用な、抗血液凝固活性がより低く、しかも生体物質との親和性が失われていない任意の分子量をもった硫酸化多糖が求められているが、このような特性を持つ任意の分子量の硫酸化多糖を簡単な操作により得る方法は知られておらず、従来の複雑なカラムワークが必要とされる精製法は実用性がなく工業的に実施することは極めて困難であり、更に得られた硫酸化多糖の分子量分布幅は広がった。

本発明は、上記特性を持つ任意の分子量の硫酸化多糖であるヘパリン及び該ヘパリンを簡便に製造する方法を提供するものである。なお、以下の説明中、ヘパリンは硫酸化多糖と表記されることもある。

#### 【 0 0 1 3 】

##### 【 課題を解決するための手段 】

本発明者らは、出血活性などの副作用が少なく、かつ硫酸化多糖本来の生物活性をより特異的に発現させることを目的とし、硫酸化多糖の構造特異性と分子量選択性に優れた調製法を鋭意検討した結果、硫酸化多糖の構成ウロン酸の 2 位の硫酸基を脱硫酸化 ( 2 - O - 脱硫酸化 ) し、次いで酸化剤によりウロン酸の 2 位と 3 位の炭素原子間で開裂後、当該開裂部位において糖鎖を切断する処理を行うことよりなる低分子化方法において、該脱硫酸化を調整することにより特異的構造を有し、任意の分子量を有する低分子化された硫酸化多糖を選択的に調製し得ること、並びにこの方法で得られた硫酸化多糖は上記所望の特性を満たす事を見出し本発明を完成するに至った。

#### 【 0 0 1 4 】

すなわち本発明の要旨は、グリコサミノグリカン分解酵素による分解と高速液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた二糖分析により得られる請求項 1 に記載の構造式で表される二糖体組成において ( A ) 及び ( B ) の規定を充たし、且つ ( C ) 及び ( D ) に規定する物性を有することを特徴とする低分子化ヘパリン

( A )  $Di - tri ( U, 6, N ) S$  のモル % が 6 5 % 以上 ( 但し、  $Di - tri ( U, 6, N ) S$  は、式中において、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  が  $SO_3^-$  であることを意味する。 )

( B )  $Di - di ( U, N ) S$  のモル % が 2 7 . 1 % ~ 3 2 . 6 % ( 但し、  $Di - di ( U, N ) S$  は、式中において、 $R^1$  が H、 $R^2$  及び  $R^3$  が  $SO_3^-$  であることを意味する。 )

( C ) A P T T 活性及び抗トロンビン活性の少なくとも一方が標準ヘパリンに比して 2 % 以下

( D ) 平均分子量が 1 , 0 0 0 ~ 4 , 5 0 0 D a ( ダルトン )

に存し、この低分子化ヘパリンは b F G F の働きを抑制する活性、あるいは促進する活性

と抑制する活性を共に発現することが出来る。なお、本願明細書において標準ヘパリンは、後述する物性により定義された標準ヘパリンを意味する。

【0015】

本発明の他の要旨は、下記工程：(a)ヘキソサミンとウロン酸の繰り返し構造を基本骨格とするヘパリンの構成ウロン酸の2位の硫酸基を2～85%部分的脱硫酸化し、(b)次いで酸化剤により2位に硫酸基を有しないウロン酸を2位と3位の炭素原子間で開裂した後、(c)上記開裂された糖残基において、ヘパリンの切断処理を行うことよりなる低分子化されたヘパリンを製造する方法に存し、また、本発明の更なる要旨は、当該低分子化ヘパリンを有効成分として含有するbFGF活性抑制剤又はbFGF活性維持促進剤に存する。

10

【0016】

【発明の実施の形態】

以下に本発明の実施の形態について説明する。本発明の低分子化ヘパリンは、グリコサミノグリカン分解酵素による分解と高速液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた後述の二糖分析により得られる下記構造式で表される二糖体組成において(A)及び(B)の規定を充たし、且つ(C)及び(D)に規定する物性を有することよりなる。

(A) Di-tri(U, 6, N)Sのモル%が65%以上(但し、Di-tri(U, 6, N)Sは、式中において、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ が $SO_3^-$ であることを意味する。)

(B) Di-di(U, N)Sのモル%が27.1%～32.6%(但し、Di-di(U, N)Sは、式中において、 $R^1$ がH、 $R^2$ 及び $R^3$ が $SO_3^-$ であることを意味する。)

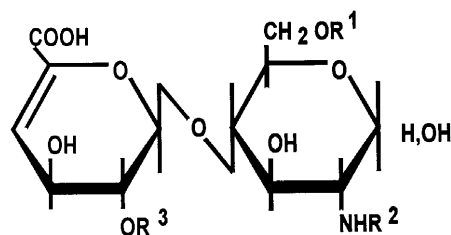
20

(C)APT活性及び抗トロンビン活性の少なくとも一方が標準ヘパリンに比して2%以下

(D)平均分子量が1,000～4,500Da(ダルトン)

【0017】

【化1】



30

【0018】

本発明における上記硫酸化多糖の二糖体組成は、後述する実施例に記載の二糖分析法による測定値から算出したものであり、また分子量は実施例に記載の分子量測定法による測定値である。更にAPT活性及び抗トロンビン活性は実施例に記載のAPT及び抗トロンビン活性の測定法による測定値である。

そして、二糖体組成は試験法1に記載の酵素消化による二糖分析により得られる特定が可能な構造を持つ不飽和二糖の量(Di-0S、Di-NS、Di-6S、Di-US、Di-di(6, N)S、Di-di(U, N)S、Di-di(U, 6)S、Di-tri(U, 6, N)Sのモル%の合計)を100%として、上記特定の構造を持つ二糖の割合を示したものであり、当該数値は酵素消化前の硫酸化多糖の硫酸化を反映するものである。

40

【0019】

なお、本願明細書中において、二糖体組成の表記は、下記を意味する。

【表1】

表-1

## 二糖体組成

## 構造式の置換基

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
ΔD1-0S	H	COCH <sub>3</sub>	H
ΔD1-6S	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	COCH <sub>3</sub>	H
ΔD1-NS	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
ΔD1-US	H	COCH <sub>3</sub>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
ΔD1-di(6,N)S	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
ΔD1-di(U,N)S	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
ΔD1-di(U,6)S	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	COCH <sub>3</sub>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
ΔD1-tri(U,6,N)S	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

10

## 【0020】

また、上記略号の示す構造は以下のとおり表記されることもある。

Di-0S: HexA1 4HexNAc、Di-6S: HexA1 4HexNAc(6S)、Di-NS: HexA1 4HexNS、Di-US: HexA(2S)1 HexNAc、Di-di(6,N)S: HexA1 4HexNS(6S)、Di-di(U,N)S: HexA(2S)1 4HexNS、Di-di(U,6)S: HexA(2S)1 4HexNAc(6S)、Di-tri(U,6,N)S: HexA(2S)1 4HexNS(6S)。

20

上記式中、HexAは不飽和ウロン酸、HexNAcはN-アセチルヘキソサミン、HexNSはN-硫酸化ヘキソサミン、カッコ内は硫酸基の結合位置を示す。

## 【0021】

本発明の上記低分子化ヘパリンはD-グルコサミン(ヘキソサミン)とD-グルクロン酸(ウロン酸)の繰り返し構造を基本骨格とする多糖であり、D-グルコサミンはN-硫酸化又は6-O-硫酸化のうちの一方あるいは両方がなされていることが好ましいが、これに限定はされない。D-グルクロン酸は2-O-硫酸化されていることが好ましいが、これに限定はされない。

30

## 【0022】

本発明の低分子化硫酸化多糖は、ヘキソサミンとウロン酸の繰り返し構造を基本骨格とする硫酸化多糖の構成ウロン酸の2位の硫酸基を部分的脱硫酸化する工程、次いで酸化剤により2位が硫酸化されていないウロン酸を2位と3位の炭素原子間で開裂する工程、当該開裂部位において糖鎖の切断処理する工程からなる方法により取得されるので、以下その製造工程に従って説明する。

## 【0024】

本発明における原料硫酸化多糖の部分的脱硫酸化反応は、硫酸化多糖を構成する硫酸化ウロン酸のうち、2位の硫酸基を脱硫酸化する方法であれば特に限定されず実施されるが、より低分子化された硫酸化多糖を目的とする場合にはアルカリを使用する方法、特に、ヘパリン等の原料硫酸化多糖をアルカリ溶液に溶解した後、直ちに凍結して凍結乾燥を行う部分的脱硫酸化法が好ましい。アルカリ溶液への溶解は、好ましくは氷冷(0)~室温(24)で行われるが、特に限定されるものではない。アルカリによる部分的脱硫酸化を行う場合は、その凍結乾燥処理した後、1~2.5M、好ましくは2Mとなるようにアルカリに再溶解し、その後、酸好ましくは弱酸、さらに好ましくは酢酸によって、pHを8~10に調整した後、直ちに蒸留水に対して1日以上、好ましくは2日間透析を行い、凍結乾燥あるいはエタノール沈殿法によって部分的に脱硫酸化することが好ましい。当該脱硫酸化に使用するアルカリは特に限定はされないが、好ましくは例えば水酸化ナトリウ

40

50

ム、水酸化カリウムなどのアルカリ金属水酸化物、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウムなどのアルカリ土類金属水酸化物、その中でも水酸化ナトリウムを使用することが特に好ましい。

原料硫酸化多糖の脱硫酸化の程度は、目的とする低分子化多糖の物性により異なるが、通常構成ウロン酸の2-O-硫酸基の2%~85%、好ましくは5~50%、更に好ましくは7~45%が部分的に脱硫酸化処理される。

#### 【0025】

本発明においては、アルカリによる硫酸化多糖の部分的脱硫酸化の際、そのアルカリ濃度を調整することによって脱硫酸化の割合を制御し、その結果硫酸化多糖の開裂処理後の低分子化された硫酸化多糖の分子量を任意の範囲に維持することが出来る。

10

当該脱硫酸化処理におけるアルカリの濃度は原料硫酸化多糖の種類、目的とする分子量及び脱硫酸化に使用するアルカリの種類によって異なり、画一的に決められないが、比較的高濃度のアルカリを使用すればより低分子化された硫酸化多糖を取得することができる。例えば部分的脱硫酸化に使用するアルカリとして最も好ましい形態である水酸化ナトリウムを使用した場合、0.2N以上の濃度で1,000Da未満、0.1Nで約1,200Da、0.05Nで約2,500Da、0.025Nで約4,500Da、0.0125Nで約5,000Daの平均分子量の硫酸化多糖を製造することが可能である。

しかしながら、アルカリが高濃度過ぎると必要以上に低分子化され、望ましくない副反応を併起する恐れがあり、他方低濃度過ぎると目的とする程度の低分子化が生じないので好ましくない。通常、アルカリは、0.01~0.5N、好ましくは0.01~0.2Nの濃度で使用され、温度等他の反応条件等を考慮しこの濃度範囲で適宜選定される。

20

#### 【0026】

本発明においては、部分的脱硫酸化した後、次いで酸化剤によるウロン酸残基の開裂処理を行う(工程:b)が、酸化剤によるウロン酸残基の開裂は、2位が硫酸化されていないウロン酸残基の2位と3位の炭素原子間の結合を切断して開裂する方法であれば特に限定されない。

当該方法における酸化剤としては、過ヨウ素酸化合物や過酸化水素などがあげられるが、過ヨウ素酸化合物、その中でも特に過ヨウ素酸ナトリウムが好ましい。過ヨウ素酸ナトリウムを酸化による開裂処理に使用する際は、0.01~0.3M、好ましくは0.05~0.2Mの濃度で、部分的に脱硫酸化処理を施した硫酸化多糖濃度0.5%~10%、好ましくは1~7%、pHは3~7、好ましくは4~5、温度は0~37℃、好ましくは0~10℃、さらに好ましくは4℃の条件下で1日以上、好ましくは3日間処理を施す。処理後、過剰の過ヨウ素酸ナトリウムを、100~500mMのエチレングリコールあるいはグリセリンなどを添加することによって分解する。その後、必要に応じて、蒸留水による透析を行ったり、さらに凍結乾燥あるいはエタノール沈殿法などの方法を用いて部分的にウロン酸の2位が脱硫酸化された硫酸化多糖の過ヨウ素酸酸化生成物を得ることも可能である。

30

#### 【0027】

また、過ヨウ素酸化合物を酸化剤として使用した場合は、過ヨウ素酸酸化によって該開裂硫酸化多糖の末端に生じたアルデヒド基は還元処理を施すことが好ましい。例えば0.1~0.5M、好ましくは0.2Mの水素化ホウ素ナトリウムを含むpH8.5~9.5の1~20%、好ましくは5~10%の過ヨウ素酸酸化生成物(W/V)溶液を4~3時間反応させることによって還元することが好ましい。さらには過剰の水素化ホウ素ナトリウムを反応液のpHを4~5に調節することによって分解し、1~2.5M、好ましくは2Mのアルカリに再溶解してpH9~10に調整し、蒸留水による透析によって過ヨウ素酸酸化還元生成物のナトリウム塩を得ることが好ましい。

40

#### 【0028】

本発明においては、上記酸化的開裂処理、次いで必要に応じ還元処理が施された硫酸化多糖は、開裂された糖残基において切断処理が施される(工程:c)。

上記硫酸化多糖の切断処理は、開裂したウロン酸残基部で特異的に切断を行う方法であれ

50



ば限定はされないが、例えば酸又はアルカリによる処理が好ましい。例えば、酸としては硝酸、硫酸、塩酸等の無機酸、アルカリとしては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等のアルカリ金属及びアルカリ土類金属の水酸化物が好ましいが、希硫酸を用いる方法が最も好ましい。希硫酸を用いる場合、前記酸化剤による開裂の過程で生成したウロン酸残基が開裂された多糖を、希硫酸によってpHを1～3、好ましくはpH2に調整し、40～80℃、好ましくは50～70℃で2時間以上加熱する。

#### 【0029】

この処理方法によって生成した低分子化された硫酸化多糖を回収する方法としては、例えば、上記のように切断処理後、反応物を水酸化ナトリウムによってpH9～10に調整し、蒸留水に対して透析を行った後、凍結乾燥あるいはエタノール沈殿法などによってそのナトリウム塩を得ることができる。

10

この様な回収方法により、分子量分布幅が狭く、所望の分子量に制御された硫酸化多糖を得ることが可能であるが、さらに必要ならばクロマトグラフィーや限外濾過などの分画処理を行い、より狭い分子量分布幅の画分を得ることも可能である。

#### 【0030】

本発明方法で得られる低分子化硫酸化多糖の分子量は8,000Da以下、通常1,000～8,000Daであるが、反応処理条件、分画操作を適宜組み合わせることにより、その使用目的に応じた所定の分子量を有する低分子化硫酸化多糖を取得することが可能である。例えば、硫酸化多糖のbFGF活性を促進或いは抑制する活性を利用するための当該硫酸化多糖は、その平均分子量としては3,500～6,000Daが好ましく、4,000～4,500Daであることがより好ましい。

20

当該低分子化硫酸化多糖は安全性の面から、APTT活性及び抗トロンビン活性の少なくともどちらか一方が標準ヘパリンに比して2%以下であることが好ましい。さらにbFGF活性を促進する活性が後記実施例に記載のbFGF活性促進及び抑制効果の測定法で測定した際に標準ヘパリンに比して50%以上であることが好ましく、60%以上であることがさらに好ましい。

#### 【0031】

又、硫酸化多糖のbFGF活性を抑制する活性を利用するための当該硫酸化多糖は、その平均分子量としては1,000～3,500Daであることが好ましいが、2,000～3,000Daであることがより好ましい。

30

当該低分子化硫酸化多糖は安全性の面から、APTT活性及び抗トロンビン活性の少なくともどちらか一方が標準ヘパリンに比して2%以下であることが好ましく、APTT活性と抗トロンビン活性の双方が1%以下であることがより好ましい。さらにbFGF活性を促進する活性及び抑制する活性が後記実施例に記載のbFGF活性促進及び抑制効果の測定法で測定した際に標準ヘパリンに比してそれぞれ50%以上であることが好ましく、それぞれ60%以上であることがさらに好ましい。

#### 【0032】

更に、本発明においては、切断処理後の反応生成物を分画処理することにより、目的とする用途に適合した特定範囲の分子量を有する硫酸化多糖を所定量含有する画分を取得することも出来る。

40

即ち、硫酸化多糖のbFGF活性を促進或いは抑制する活性を利用するためには、硫酸化多糖画分として平均分子量3,500～6,000Daの硫酸化多糖を含有し、且つその硫酸化多糖を、重量換算で50%（重量%）以上含有することが好ましく、60%（重量%）以上含有することがさらに好ましい。また、当該画分としての平均分子量は3,500～5,500Daが好ましく、4,000～5,000Daであることが更に好ましい。

#### 【0033】

また、硫酸化多糖のbFGF活性を抑制する活性を利用するための硫酸化多糖画分としては、平均分子量1,000～3,500Daの硫酸化多糖を50%（重量%）以上含有す

50

ることが好ましく、60%（重量%）以上含有することがさらに好ましい。また、当該画分の平均分子量は1,500～3,000Daが好ましく、2,000～3,000Daであることがさらに好ましい。

#### 【0034】

本発明が提供する低分子化硫酸化多糖は、標準ヘパリンと比較して抗血液凝固活性が低く、特に、抗血液凝固活性を表す抗トロンビン活性とAPTT活性が低い特性を呈するものである。特に好ましい硫酸化多糖は、後記実施例に記載の抗トロンビン活性測定法による測定値と、APTT活性測定法による測定値の少なくとも一方が、標準ヘパリンと比較して2%以下である。さらにより好ましいものは、抗トロンビン活性、APTT活性が共に標準ヘパリンと比較して1%以下であり、両活性が0 抗トロンビン活性/APTT活性 0.5であるところの抗トロンビン活性が低いものは、医薬組成物に用いた場合出血活性が低いことが期待され有用である。

10

#### 【0035】

本発明の低分子化硫酸化多糖は、その分子量或いは適用濃度に応じてbFGF活性を促進したり抑制したりする特性を有している。即ち、上記平均分子量3,500Da～6,000Da及び1,000～3,500Daの低分子化硫酸化多糖とこれらの硫酸化多糖を含有する上記画分は、bFGF活性を抑制する活性に優れ、実施例中の試験法に記載のbFGF活性測定方法による抑制効果を測定した結果、bFGF2ng/mlに対して当該硫酸化多糖50～100μg/mlの濃度では、標準ヘパリンと比較して40%以上、好ましくは50%以上当該増殖因子活性を抑制する活性を保持している。特に、上記平均分子量3,500～6,000Daの硫酸化多糖及び当該硫酸化多糖を含有し且つ平均分子量4,000～4,500Daの画分は、上記当該増殖因子活性を抑制する活性を、上記濃度条件下において60%以上保持しており、さらに優れている。

20

#### 【0036】

また、平均分子量3,500～6,000Daの硫酸化多糖及び該硫酸化多糖を含有する平均分子量4,000～4,500Daの画分は、bFGF活性測定方法による活性促進効果を測定した結果、bFGF2ng/mlに対して当該硫酸化多糖0.5～5μg/mlの濃度において、促進効果を保持しており、当該促進効果は標準ヘパリンと比較して50%以上、好ましくは60%以上保持している。

#### 【0037】

本発明は、上記低分子化硫酸化多糖の有するbFGF活性を促進或いは抑制する性質を利用し、該硫酸化多糖を有効成分として含有するbFGF活性促進剤及び活性抑制剤を提供するとともに、bFGF活性促進剤をbFGFと混合して医薬組成物とすることにより、bFGFの細胞増殖活性がより促進された医薬を提供する。

即ち、本発明の医薬組成物は、本発明の低分子化硫酸化多糖或いは該硫酸化多糖を含有する画分を有効成分として含有するものである。

30

#### 【0038】

本発明のbFGF活性維持促進効果を有する硫酸化多糖は、生体に投与することにより、bFGFの活性を安定化し、例えば、創傷治癒促進などに有用である。bFGFを含有する本発明医薬組成物により当該因子活性を促進することによって、例えば糖尿病患者で多発する床ずれ等の治療及び予防に有用である。また、内因性のbFGFが十分に産出されている患者や部位を治療する場合、必ずしも外部からbFGFを投与する必要はなく、有効成分として本発明の硫酸化多糖のみを含有する医薬組成物でも十分に目的を達成できる。また本発明のbFGF活性抑制効果を有する硫酸化多糖は、腫瘍、血管狭窄、炎症、ケロイド等の治療や予防に有用である。

40

#### 【0039】

本発明の低分子化硫酸化多糖からなるbFGF活性維持促進剤及びbFGF活性抑制剤、又は上記のbFGFを含有するbFGF活性維持促進組成物を生体内外に投与する際の剤型及び投与経路としては、対照となる疾患の性質や重篤度に応じて適宜選択することができる。例えば、それらをそのまま、又は他の薬理的に許容され得る担体、賦形剤、希釈剤

50

等と共に医薬組成物（例えば、注射剤、錠剤、カプセル剤、液剤、軟膏等、ゲル剤）として、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、犬、ネコ、ウマ等）に対して、非経口的又は経口的に安全に投与することができる。

#### 【0040】

本発明の医薬組成物の有効成分である低分子化硫酸化多糖の配合量並びに投与量は、その製剤の投与方法、投与形態、使用目的、患者の具体的症状、患者の体重などに応じて個別に決定されるべき事項であり、特に限定はされないが、低分子化硫酸化多糖の臨床投与量として1日当たり概ね $100\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 程度を例示することができる。また、上記製剤の投与間隔は1日1回程度でも可能であり、1日2～4回、又はそれ以上の回数に分けて投与することもできる。また、例えば点滴などにより連続的に投与することも可能である。

10

#### 【0041】

なお、本発明の医薬組成物の有効成分である低分子化硫酸化多糖は、後述する実施例において細胞に対する毒性は見られなかった。ヘパリンのマウス（雄、雌）における急性毒性試験によるLD50は、経口投与で $5,000\text{mg}/\text{kg}$ 以上、皮下又は腹腔内投与で $2,500\text{mg}/\text{kg}$ 以上、静注で $1,000\text{mg}/\text{kg}$ 程度であることが知られている。本発明の医薬組成物の有効成分である低分子化硫酸化多糖は、APTT活性、抗トロンビン活性が標準ヘパリンと比較して共に2%未満と極めて低いため、このことから本発明の医薬組成物の有効成分である硫酸化多糖の安全性は高い。

20

#### 【0042】

##### 【実施例】

本発明を以下に実施例により具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限りこれらに限定されるものではない。

なお、本発明のそれぞれの硫酸化多糖の同定及び活性評価は以下の方法に基づいて行った。

#### 【0043】

##### 試験法1

##### 〔酵素消化による二糖分析〕

硫酸化多糖の硫酸基の位置の分析は、次のようにして行った。すなわち、それぞれの硫酸化多糖を酵素消化し、生成した不飽和二糖（前記構造式：化1）を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した〔新生化学実験講座3、糖質II（東京化学同人刊、1991）p49～62に記載の「2・8グリコサミノグリカン分解酵素とHPLCを組み合わせた構造解析」参照〕。各不飽和二糖のピーク面積を計算して、全面積に対するピーク面積をパーセントとして表した。

30

#### 【0044】

(1) 硫酸化多糖及び硫酸化多糖の切断処理により生成した低分子化硫酸化多糖の分解酵素による消化

新生化学実験講座3、糖質II p54～59に記載の方法により、硫酸化多糖あるいは低分子化硫酸化多糖 $1.0\text{mg}$ を $2\text{mM}$ 酢酸カルシウムを含む $20\text{mM}$ 酢酸ナトリウム（ $\text{pH}7.0$ ） $220\mu\text{l}$ に溶解して、 $20\text{mU}$ のヘパリナーゼ、 $20\text{mU}$ のヘパリチナーゼI及びIIを加えて、 $37^\circ\text{C}$ で2時間反応させた。

40

#### 【0045】

(2) HPLCによる分析

硫酸化多糖又は低分子化硫酸化多糖の分解酵素による消化を行った後の溶液 $50\mu\text{l}$ を、HPLC（医理化、モデル852型）を用いて分析した。イオン交換カラム（Dionex社、CarboPac PA-1カラム $4.0\text{mm} \times 250\text{mm}$ ）を使用し、 $232\text{nm}$ での吸光度を測定した。4～12糖スタンダードを基準とし（Yamada, et al., J.Biol.Chem., 270, 8696-8706, (1995)）、流速 $1\text{ml}/\text{分}$ で、塩化リチウムを用いたグラジエント系（ $50\text{mM}$ ～ $2.5\text{M}$ ）を用いる方法に準拠した（Kariya, et al. Comp. Biochem. Physiol., 103B, 473, (1992)）。

50

## 【 0 0 4 6 】

## 試験法 2

## [ 分子量測定 ]

硫酸化多糖の切断処理により生成した低分子化硫酸化多糖の 3 % 溶液 1 0  $\mu$  l を H P L C によるゲルろ過で分析した。カラムは T S K g e l - ( G 4 0 0 0 + G 3 0 0 0 + G 2 5 0 0 ) P W X ( 東ソー、7 . 8 mm  $\times$  3 0 cm ) を用い、溶離液に 0 . 2 M 塩化ナトリウムを使用して、1 . 0 m l / 分の流速で展開した。低分子化硫酸化多糖の検出には示差屈折計 ( 島津製作所、A I D - 2 A ) を用いた。表 - 2 における重量平均分子量はヘパリンの分子量標準品を対照にして求めた ( Kaneda et al. Biochem. Biophys. Res. Comm., 220 PP . 108-112 ( 1996 ) ) 。

10

標準ヘパリンの分子量の測定は光散乱法を用いて行った ( Nagasawa et al., J. Biochem. 8 1, 989-993, ( 1977 ) ) 。

## 【 0 0 4 7 】

## 試験法 3

## [ b F G F 活性維持促進効果と活性抑制効果の測定 ]

b F G F 活性促進効果測定のため、1 0 % の牛血清を含んだ D M E M 培地 ( Life Technologies 社製 ) で継代維持された A 3 1 細胞 ( B A L B / c 3 T 3 ) を、1  $\mu$  g / m l のテストサンプルを含む 1 0 0  $\mu$  l の I T S + ( Collaborative Research 社製 )、2 0 m M N a C l O <sub>3</sub>、2 n g / m l ヒト組み換え b F G F ( h r b F G F ) ( 生化学工業 ( 株 ) 製 ) を含んだ S O <sub>4</sub><sup>2-</sup> フリー D M E M と共に 9 6 - マルチウェルカルチャープレートにプレートした。3 日間の培養後、2 0  $\mu$  l のセルタイター 9 6 A Q ノンラジオアクティブ細胞増殖アッセイ溶液 ( 生化学工業 ( 株 ) 製 ) を各ウェルに添加し、3 7  $^{\circ}$  C で 2 時間培養後、4 9 0 n m での吸光度を測定することにより、それぞれのウェルの細胞増殖を定量した。表 - 3 において、1  $\mu$  l / m l の標準ヘパリンを加えた時の細胞増殖促進を 1 0 0 とし、加えない時を 0 とした。

20

## 【 0 0 4 8 】

また b F G F 活性抑制効果測定のためには、上記細胞を 8 0  $\mu$  g / m l のテストサンプルを含む 1 0 0  $\mu$  l の I T S +、2 n g / m l の h r b F G F を含んだ D M E M とともに 9 6 - マルチウェルカルチャープレートにプレートし、3 日間の培養後、同様にそれぞれのウェルの細胞増殖を定量した。表 - 3 において、8 0  $\mu$  g / m l の標準ヘパリンを加えた時の細胞増殖抑制を 1 0 0 とし、加えない時を 0 とした。

30

## 【 0 0 4 9 】

## 試験法 4

## [ A P T T 及び抗トロンビン活性の測定 ]

A P T T の測定のため、ラットの下大動脈より 3 . 2 % クエン酸 1 / 1 0 容量で採血し、血液を 1 , 0 0 0  $\times$  g、1 0 分間遠心分離し得た血漿 1 0 0  $\mu$  l と様々な濃度の各サンプル 1 0 0  $\mu$  l とを測定用カップに入れ、3 7  $^{\circ}$  C で 1 分間保温した。その後、あらかじめ 3 7  $^{\circ}$  C に保温しておいたアクチン ( 商品名 : ( 株 ) ミドリ十字 ) 1 0 0  $\mu$  l を添加し、さらに 2 分間保温した。次いで、3 7  $^{\circ}$  C に保温しておいた 0 . 0 2 M C a C l <sub>2</sub> 溶液 1 0 0  $\mu$  l を添加し、この時より凝固がおこるまでの時間を血液凝固自動測定装置 ( K C - 1 0 A : アメルング社製 ) で測定した。表 - 3 において、標準ヘパリンの A P T T 活性を 1 0 0 とした時の低分子化硫酸化多糖の A P T T 活性を示した。

40

## 【 0 0 5 0 】

抗トロンビン活性の測定のため、上記当該ラット血漿 1 0 0  $\mu$  l と様々な濃度の各サンプル 1 0 0  $\mu$  l とを測定用カップに入れ、3 7  $^{\circ}$  C で 1 分間保温した。その後、3 7  $^{\circ}$  C に保温したトロンビン ( 1 0 U / m l ) 1 0 0  $\mu$  l を添加し、この時より凝固が起こるまでの時間を上記血液凝固自動測定装置で測定した。表 - 3 において、標準ヘパリンの抗トロンビン活性を 1 0 0 とした時の抗トロンビン活性を示した。

## 【 0 0 5 1 】

本明細書における標準ヘパリン

50

標準ヘパリンは、牛小腸由来のヘパリンが好ましく、以下に示す物性のヘパリンを標準ヘパリンとする。

(1) 上記試験法 1 に記載の二糖分析法による測定値から算出した二糖体組成が表 - 1 に記載の標準ヘパリンの数値、即ち、 $Di - OS : 4.3\%$ 、 $Di - NS : 2.3\%$ 、 $Di - 6S : 0.5\%$ 、 $Di - US : 1.4\%$ 、 $Di - di(6, N)S : 6.9\%$ 、 $Di - di(U, N)S : 27.5\%$ 、 $Di - di(U, 6)S : 0\%$ 、 $Di - tri(U, 6, N)S : 57.1\%$ であり、ウロン酸 2 位脱硫酸化率 0%を示す(%はすべてモル%比を表す)。

(2) 抗血液凝固活性が  $160 IU / mg$  である。

(3) 平均分子量が  $12,000 \sim 13,000 Da$  である。

10

#### 【0052】

##### 実施例 1 (製造例)

##### 1. 硫酸化多糖の部分的脱硫酸化

ヘパリンナトリウム塩(重量平均分子量： $12,200 Da$ 、Syntex 社製：以下当該ヘパリンを標準ヘパリンとした)  $500 mg$  を、 $0.4$ 、 $0.2$ 、 $0.1$ 、 $0.05$ 、 $0.025$  及び  $0.0125 N$  の水酸化ナトリウム水溶液並びに蒸留水各  $10 ml$  で溶解し、凍結乾燥した。その生成物は続いて、 $10 ml$  の  $1 M$  水酸化ナトリウム溶液で溶解し、 $20\%$  酢酸溶液で  $pH 9$  に調節した後、蒸留水に対して 2 日間透析し、再び凍結乾燥することにより部分的に 2 位の硫酸基を脱硫酸化したヘパリン(部分的 2 - O - 脱硫酸化ヘパリン)のナトリウム塩が得られた。ヘパリンの上記部分的 2 - O - 脱硫酸化処理前と処理後の酵素消化による二糖分析値から算出した二糖体組成及び 2 - O - 脱硫酸化率を表 - 2 に示す。

20

#### 【0053】

##### 【表 2】

表 - 2  
二糖体組成 (%)

	$\Delta$ Di-							2-O- 脱硫酸化率
	OS	NS	6S	US	(6,N)S	(U,N)S	(U,6)S	(U,6,N)S
標準ヘパリン	4.3	2.3	0.5	1.4	6.9	27.5	0	57.1
0.4N NaOH	5.1	25.3	1.8	2.1	51.6	5.8	0	8.3
0.2N NaOH	6.7	21.9	3.1	0	46.1	6.8	0	15.4
0.1N NaOH	10.9	14.7	2.3	1.6	24.5	12.5	1.8	31.7
0.05N NaOH	11.1	8.9	2.4	1.7	15.1	20.4	0.6	39.8
0.025N NaOH	8.3	5.4	2.3	1.7	10.8	22.5	0.7	48.3
0.0125N NaOH	5.0	4.6	0.9	1.5	8.9	26.7	0.2	52.2

\*表内の数値は全て%を示す。また、NaOH濃度は部分的脱硫酸化に用いたNaOHの濃度である。

【 0 0 5 4 】

2. 部分的脱硫酸化ヘパリンの酸化開裂

得られた部分的 2 - O - 脱硫酸化ヘパリンのそれぞれを、過ヨウ素酸ナトリウムの存在下

10

20

30

40

50

で酸化した。この反応は、それぞれの部分的 2 - O - 脱硫酸化ヘパリン 5 %、0 . 1 M の過ヨウ素酸化ナトリウム、5 0 m M の酢酸ナトリウムを含んだ p H 5 の溶液中で、4 、3 日間酸化処理して行った。酸化処理後、過剰の過ヨウ素酸を最終濃度 2 5 0 m M のグリセリンを加えることで還元し、蒸留水に対して透析し、部分的に 2 - O - 脱硫酸化したヘパリンの過ヨウ素酸酸化生成物を得た。この酸化反応処理時に生成したアルデヒド基は、0 . 2 M の水素化ホウ素ナトリウムを含んだ p H 9 の該酸化ヘパリン ( W / V ) 1 0 % 溶液を 4 、3 時間反応させることで還元した。過剰な水素化ホウ素ナトリウムは、反応液の p H を希塩酸で 5 に調節し、3 0 分間室温で放置することで分解し、再び水酸化ナトリウムで p H を 9 に調節した後、蒸留水への透析と凍結乾燥により、過ヨウ素酸酸化・還元生成物のナトリウム塩を得た。

10

【 0 0 5 5 】

### 3 . ウロン酸残基の開裂による低分子化

次いで、それぞれの過ヨウ素酸酸化・還元生成物のナトリウム塩を希硫酸で p H 2 に調節し、6 0 で 3 時間加熱することにより、酸化還元反応を受けたウロン酸残基の定量的解重合によるヘパリンの段階的低分子化を達成した。それぞれ得られた低分子化硫酸化多糖は、水酸化ナトリウムで p H 9 に調節した後、1 , 0 0 0 M W c u t o f f の透析チューブ ( S p e c t r u m 社製 ) を用いて、蒸留水に対する透析と凍結乾燥により、それぞれ低分子化硫酸化多糖のナトリウム塩を得た。上記試験法に従い、ゲル浸透クロマトグラフィーにより各々の硫酸化多糖の平均分子量を測定しその結果を表 - 3 に記載した。

【 0 0 5 6 】

20

### 4 . b F G F 活性促進、抑制効果及び A P T T 、抗トロンビン活性の測定

表 - 2 に記載の標準ヘパリン及び当該標準ヘパリンから得られた低分子化硫酸化多糖のそれぞれについて、上記試験法によりその b F G F 活性促進効果及び活性抑制効果並びに A P T T 及び抗トロンビン活性を調べた。その結果を表 - 3 に記載した。

【 0 0 5 7 】

【表 3 】

表－ 3

標準ヘパリンを100%とした生理活性(%)と平均分子量(Da)

硫酸化多糖	bFGF活性		抗血液凝固活性		平均分子量 (Da)
	促進 (%)	抑制 (%)	APTT 活性(%)	抗トロンビン 活性(%)	
標準ヘパリン	100	100	100	100	12,000*
0.4N NaOH	0	0	0	0	<1,000
0.2N NaOH	0	0	0	0	<1,000
0.1N NaOH	0	0	0.36	0	1,200
0.05N NaOH	0	60	0.90	0.20	2,500
0.025N NaOH	70	70	2.00	1.00	4,500
0.0125N NaOH	80	70	2.65	2.60	5,000
0.00625N NaOH	80	70	2.65	2.50	6,000

\*標準ヘパリンの分子量は光散乱法による測定値である。

NaOH濃度は部分的脱硫酸化に用いたNaOHの濃度である。

【 0 0 5 8 】

また、得られた低分子化硫酸化多糖について、上記試験法による二糖分析の測定値から二糖体組成を算出し、その結果を表 - 4 に記載した。

【 0 0 5 9 】

【表 4】

10

20

30



表－４

## 二糖体組成 (%)

NaOH濃度	ΔDi-							
	OS	NS	6S	US	(6, N) S	(U, N) S	(U, 6) S	(U, 6, N) S
0.1N	0	0	0	0	0	28.8	0	71.2
0.05N	0	0	0	0	0	31.2	0	68.8
0.025N	0	0	0	0	0	32.6	0	67.4
0.0125N	0	0	0	0	0	27.1	0	72.9
0 N	0	0	0	0	0	26.7	0	73.3

10

[注] 表内の数値は全て%を示す。

NaOH濃度は部分的脱硫酸化に用いたNaOHの濃度である。

20

## 【 0 0 6 0 】

## 実施例 2 ( 製剤例 )

## ( 1 ) 注射剤

1 前記製造例において製造した低分子化硫酸化多糖から H P L C により調製した平均分子量 4 , 5 0 0 D a 及び 2 , 5 0 0 D a の低分子化硫酸化多糖 ( 3 0 m g / m l ) を、終濃度 5 m g / m l となるように 5 % マンニトール水溶液に溶解し、これを無菌濾過した後、2 m l ずつアンプルに分注して 2 種類の注射剤を製造した。

30

2 前記の平均分子量 4 , 5 0 0 D a の低分子化硫酸化多糖 ( 3 0 m g / m l ) を、終濃度 1 0 0 μ g / m l となるように 5 % マンニトール水溶液に溶解し、これを無菌濾過した後、2 m l ずつアンプルに分注して注射剤を製造した。

## 【 0 0 6 1 】

3 前記の平均分子量 4 , 5 0 0 D a の低分子化硫酸化多糖 ( 3 0 m g / m l ) を、b F G F と共に終濃度 1 0 0 μ g / m l 、b F G F が 1 μ g / m l となるように 5 % マンニトール水溶液に溶解し、これを無菌濾過した後、2 m l ずつアンプルに分注して注射剤を製造した。

40

## 【 0 0 6 2 】

## ( 2 ) 錠剤

1 前記の平均分子量 4 , 5 0 0 D a 及び 2 , 5 0 0 D a の低分子化硫酸化多糖の凍結乾燥物 1 0 0 m g 、乳糖 6 7 0 m g 、バレイショデンブ 1 5 0 m g 、結晶セルロース 6 0 m g 及び軽質無水ケイ酸 5 0 m g を混合し、これにヒドロキシプロピルセルロース 3 0 m g をメタノールに溶解した溶液 ( ヒドロキシプロピルセルロース 1 0 重量 % ) を添加して練合造粒した。次にこれを径 0 . 8 m m のスクリーンで押し出して顆粒状にし、乾燥した後、ステアリン酸マグネシウム 1 5 m g を添加して圧縮成型し、2 種類の 2 0 0 m g の錠剤を製造した。

## 【 0 0 6 3 】

50

2 前記の平均分子量4,500Daの低分子化硫酸化多糖の凍結乾燥物5mg、乳糖700mg、バレイショデンプン150mg、結晶セルロース60mg及び軽質無水ケイ酸50mgを混合し、これにヒドロキシプロピルセルロース30mgをメタノールに溶解した溶液(ヒドロキシプロピルセルロース10重量%)を添加して練合造粒した。次にこれを径0.8mmのスクリーンで押し出して顆粒状にし、乾燥した後、ステアリン酸マグネシウム15mgを添加して圧縮成型し、200mgの錠剤を製造した。

【0064】

3 前記の平均分子量4,500Daの硫酸化多糖画分の凍結乾燥物5mg、bFGF2μg、乳糖700mg、バレイショデンプン150mg、結晶セルロース60mg及び軽質無水ケイ酸50mgを混合し、これにヒドロキシプロピルセルロース30mgをメタノールに溶解した溶液(ヒドロキシプロピルセルロース10重量%)を添加して練合造粒した。次にこれを径0.8mmのスクリーンで押し出して顆粒状にし、乾燥した後、ステアリン酸マグネシウム15mgを添加して圧縮成型し、200mgの錠剤を製造した。

【0065】

(3) カプセル剤

1 前記の平均分子量4,500Da及び2,500Daの低分子化硫酸化多糖の凍結乾燥物100mg、バレイショデンプン150mg、軽質無水ケイ酸50mg、ステアリン酸マグネシウム10mg及び乳糖765mgを均一に混合し、この混合物を200mgずつ分取して硬カプセルに充填して、2種類のカプセル剤を製造した。

2 前記の平均分子量4,500Daの低分子化硫酸化多糖の凍結乾燥物5mg、バレイショデンプン150mg、軽質無水ケイ酸50mg、ステアリン酸マグネシウム10mg及び乳糖860mgを均一に混合し、この混合物を200mgずつ分取して硬カプセルに充填してカプセル剤を製造した。

3 前記の平均分子量4,500Daの低分子化硫酸化多糖の凍結乾燥物5mg、bFGF2μg、バレイショデンプン150mg、軽質無水ケイ酸50mg、ステアリン酸マグネシウム10mg及び乳糖860mgを均一に混合し、この混合物を200mgずつ分取して硬カプセルに充填してカプセル剤を製造した。

【0066】

(4) 軟膏剤

1 前記の平均分子量4,500Da及び2,500Daの低分子化硫酸化多糖の凍結乾燥物100mg、鉱油4g、石油ゼリー8g、混合メチル/プロピルパラバン60mg、非イオン性界面活性剤1g及び精製水30gを均一に混合し、この混合物を容器に充填して2種類の軟膏剤を製造した。

2 前記の平均分子量4,500Daの低分子化硫酸化多糖の凍結乾燥物5mg、鉱油4g、石油ゼリー8g、混合メチル/プロピルパラバン60mg、非イオン性界面活性剤1g及び精製水30gを均一に混合し、この混合物を容器に充填して軟膏剤を製造した。

3 前記の平均分子量4,500Daの低分子化硫酸化多糖の凍結乾燥物5mg、bFGF2μg、鉱油4g、石油ゼリー8g、混合メチル/プロピルパラバン60mg、非イオン性界面活性剤1g及び精製水30gを均一に混合し、この混合物を容器に充填して軟膏剤を製造した。

【0067】

【発明の効果】

本発明によれば、任意の分子量を持ち一定構造で特定の生物活性を有するヘキシサミンとウロン酸の繰り返し構造を基本骨格とする低分子化硫酸化多糖を提供することができ、該低分子化硫酸化多糖は、それを構成する所定割合の二糖体組成割合からなり、且つ所定範囲の平均分子量を有することで特徴付けられるが、これらは、標準ヘパリンに比し低い抗血液凝固活性を呈し、また、bFGF活性を促進或いは抑制する活性も保持しているので、該硫酸化多糖はbFGF活性を制御し、抗血液凝固活性が低い医薬品組成物として利用することが可能である。更に、本発明では、硫酸化多糖の2-O-脱硫酸化されるウロン酸量の制御、つまりその脱硫酸化処理条件を制御するという簡単な方法によりこの任意の

10

20

30

40

50

分子量を有する低分子化硫酸化多糖の製造を可能とするものであり、工業的製造法として利するところが大である。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(72)発明者 荻谷 豊  
神奈川県横浜市港北区綱島西 2 - 3 - 2 - 6 0 9

審査官 原田 隆興

(56)参考文献 特開昭 6 3 - 2 7 8 9 0 1 ( J P , A )  
国際公開第 9 6 / 0 0 6 8 6 7 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C08B 37/00  
A61K 31/727  
A61P 9/00  
A61P 17/00  
A61P 35/00  
C08B 37/10  
BIOSIS(STN)  
CAplus(STN)  
EMBASE(STN)  
MEDLINE(STN)  
JMEDPlus(JDream2)  
JST7580(JDream2)  
JSTPlus(JDream2)