

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6336487号  
(P6336487)

(45) 発行日 平成30年6月6日(2018.6.6)

(24) 登録日 平成30年5月11日(2018.5.11)

(51) Int.Cl. F I  
**C O B B 37/00 (2006.01)**  
 C O B B 37/00 Q  
 C O B B 37/00 H

請求項の数 16 (全 28 頁)

|               |                               |           |                         |
|---------------|-------------------------------|-----------|-------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2015-553989 (P2015-553989)  | (73) 特許権者 | 515201291               |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年12月20日(2013.12.20)       |           | マリノヴァ プロプライエタリー リミテッド   |
| (65) 公表番号     | 特表2016-505083 (P2016-505083A) |           | オーストラリア国, タスマニア 7170    |
| (43) 公表日      | 平成28年2月18日(2016.2.18)         |           | , ケンブリッジ, ケネディ・ドライブ 249 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/AU2013/001504             | (74) 代理人  | 100107766               |
| (87) 国際公開番号   | W02014/113836                 |           | 弁理士 伊東 忠重               |
| (87) 国際公開日    | 平成26年7月31日(2014.7.31)         | (74) 代理人  | 100070150               |
| 審査請求日         | 平成28年10月20日(2016.10.20)       |           | 弁理士 伊東 忠彦               |
| (31) 優先権主張番号  | 61/756,570                    | (74) 代理人  | 100091214               |
| (32) 優先日      | 平成25年1月25日(2013.1.25)         |           | 弁理士 大貫 進介               |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           |                         |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 処理方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的分子として多糖類、および発熱物質を含む海藻抽出物を処理する方法であって、  
 前記発熱物質を不活性化するため、前記抽出物を有効量の酸化剤および塩基と接触させるステップ、および／または

濾過により前記発熱物質を除去するステップ、  
 を含み、前記抽出物の発熱性の減少をもたらす、方法。

【請求項 2】

前記抽出物を有効量の以下：界面活性剤、活性炭、ゼオライトのうちの1つ以上と接触させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抽出物を有効量の酸化剤、塩基、および界面活性剤と接触させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

標的分子として多糖類、および発熱物質を含む海藻抽出物を処理する方法であって、  
 前記発熱物質を不活性化するため、前記抽出物を有効量の活性炭および塩基と接触させるステップ、および／または

濾過により前記発熱物質を除去するステップ、  
 を含み、前記抽出物の発熱性の減少をもたらす、方法。

【請求項 5】

10

20

前記抽出物を有効量の以下：酸化剤、界面活性剤、ゼオライトのうちの1つ以上と接触させることをさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記酸化剤が、過酸化物であり、

前記過酸化物が、少なくとも30%（w/w、過酸化物の質量対多糖類の質量に基づく）の量で使用される、請求項1、2、3または5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記界面活性剤が、生物系界面活性剤である、請求項2、3、5または6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記界面活性剤が、非イオン性界面活性剤である、請求項2、3、5または6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記界面活性剤が、少なくとも50%（w/w、界面活性剤の質量対多糖類の質量に基づく）の量で使用される、請求項2、3、5または6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記塩基が、7.0超かつ12.5未満のpHをもたらすのに十分な量で使用される、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記活性炭またはゼオライトが、少なくとも10%（w/w、吸着剤の質量対多糖類の質量）の量で使用される、請求項2または5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

多糖類に対する回収率が、少なくとも30%である、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

多糖類に対する回収率が、少なくとも60%である、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

少なくとも50%の発熱物質が除去され、かつ／または不活性化される、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

少なくとも99%の発熱物質が除去され、かつ／または不活性化される、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記多糖類が、硫酸化多糖類、任意にフコイダンまたはウルバンである、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2013年1月25日に出願された米国仮特許出願第61/756,570号の利益を主張し、その明細書の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

技術

本発明は、海藻などの海洋生物からの抽出物を処理するための方法に関する。より具体的には、本発明は、創傷管理および外科手術に使用するための非経口医薬組成物の製造に有用な、実質的に発熱因子を含まない抽出物の生成に関する。

【背景技術】

【0002】

フコイダンおよびウルバンなどの多糖類成分を含む、様々な海藻生物の生物学的活性を

10

20

30

40

50

示すために多大な量の作業が費やされてきた。フコイダンは、多くの種の褐藻の細胞壁に見られる硫酸化多糖類である。インビトロ研究は、フコイダンが抗癌、抗血管新生 (Maruyama H, Tamauchi H, Hashimoto M, Nakano T. Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of Undaria pinnatifida. In Vivo 2003; 17 (3): 245-249、Haneji K, Matsuda T, Tomita M et al. Fucoidan extracted from cladophoron okamuranus tokida induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. Nutr. Cancer 2005; 52 (2): 189-201、Liu JM, Bignon J, Haroun-Bouhedja F et al. Inhibitory effect of fucoidan on the adhesion of adenocarcinoma cells to fibronectin. Anticancer Res. 2005; 25 (3B): 2129-2133、Koyanagi S, Tanigawa N, Nakagawa H, Soeda S, Shimeno H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. Biochem. Pharmacol. 2003; 65 (2): 173-179、Alekseyenko TV, Zhanayeva SY, Venediktova AA, et al. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea Fucus evanescens brown alga. Bull. Exp. Biol. Med. 2007 Jun; 143 (6): 730-2、Nagamine T, Hayakawa K, Kusakabe T, et al. Inhibitory effect of fucoidan on Huh7 hepatoma cells through downregulation of CXCL12. Nutr. Cancer 2009; 61 (3): 340-7)、抗ウイルス (Lee JB, Hayashi K, Hashimoto M, Nakano T, Hayashi T. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of Undaria pinnatifida (Mekabu). Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 2004 Sep; 52 (9): 1091-4、Hayashi K, Nakano T, Hashimoto M, Kanekiyo K, Hayashi T. Defensive effects of a fucoidan from brown alga Undaria pinnatifida against herpes simplex virus infection. Int. Immunopharmacol. 2008 Jan; 8 (1): 109-16.)、および免疫調節作用 (Raghavendran HR, Srinivasan P, Rekha S. Immunomodulatory activity of fucoidan against aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. Int. Immunopharmacol. 2011 Feb; 11 (2): 157-63) を有することを示す。これらの作用は、ナチュラルキラー細胞を刺激することにより、および細胞増殖に関与するAP-Iを下方制御することによりもたらされる。フコイダンは、神経保護 (Do H, Pyo S, Sohn EH. Suppression of iNOS expression by fucoidan is mediated by regulation of p38 MAPK, JAK/STAT, AP-1 and IRF-1, and depends on up-regulation of

10

20

30

40

50

scavenger receptor B1 expression in TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ -stimulated C6 glioma cells. J. Nutr. Biochem. 2009 Jul 1; Luo D, Zhang Q, Wang H, et al. Fucoidan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro. Eur. J. Pharmacol. 2009 Sep 1; 617 (1-3): 33-40.、放射線防護 (Byon YY, Kim MH, Yoo ES, et al. Radioprotective effects of fucoidan on bone marrow cells: improvement of the cell survival and immunoreactivity. J. Vet. Sci. 2008 Dec; 9 (4): 359-65)、および抗潰瘍 (Choi JI, Raghavendran HR, Sung NY, et al. Effect of fucoidan on aspirin-induced stomach ulceration in rats. Chem Biol Interact. 2010 Jan 5; 83 (1): 249-54) 特性も示す。

#### 【0003】

他の研究では、フコイタンは、抗凝血 (Colliec S, Fischer AM, Tapon-Bretaudiere J, et al. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. Thromb. Res. 1991 Oct 15; 64 (2): 143-54、Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan. Blood Coagul. Fibrinolysis. 2009 Aug 18)、および抗血栓 (Church FC, Meade JB, Treanor RE, Whinna HC. Antithrombin activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III, and thrombin. J. Biol. Chem. 1989 Feb 25; 264 (6): 3618-23) 作用を示し、抗凝血剤と共に摂取する場合、相加的作用を有し得る。

#### 【0004】

フコイタンはまた、外科手術後の癒着を予防することにおいても特に有望性を示してきた。Cashmanらの研究 (Cashman JD, Kennah E, Shuto A, Winternitz, Springate CMK, Fucoidan Film Safely Inhibits Surgical Adhesions in a Rat Model, J. Surg. Res. 2011 Dec 171 (2): 495-503) は、いくつかの化合物を試したが、フコイタンを最も安全かつ最も有効であると特定した。フコイタン付加膜は、対照膜と比較して癒着スコアを約90%減少させた。合計50%~100%の動物が、癒着を有する全対照膜動物と比較して、0.33%~33% w/wのフコイタン膜付加で癒着がなかった。約30mgフコイタン/体重kgに相当する33% w/wフコイタン膜からは有害作用は観察されなかった。

#### 【0005】

フコイタンは、創傷管理、および特に火傷の治癒に有用であることも提案されている。Sezerらの研究 (Sezer AD, Hatipoglu F, Cevher E, Ogurtan Z, Bas AL, and Akbuga J, Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: Preparation and in vitro/in vivo evaluation, AAPS Pharm. Sci. Tech. 2007 June; 8 (2): E94-E101) を参照。これらの著者は、ウサギの火傷モデルにおいて、経皮乳頭形成の再生が最も良好である

10

20

30

40

50

、上皮再形成が最も良好である、および創傷の閉鎖が最も速いことがフコイダン－キトサン膜処置群において見出されたことを示した。

#### 【0006】

ウルバン（フコイダンに類似する）は、緑藻類から抽出され、臨床用途における可能性を有する。例えば、ウルバンは、薬物送達ビヒクルとして、また免疫調節因子としての生体材料の製造における足場としてかなり有望である。

#### 【0007】

海洋生物から抽出した多糖類が多様で臨床的に重要な用途において使用の可能性を有することは、前述から明らかであろう。これらの分子の利益の活用における大きな問題は、抽出物中の発熱物質の存在である。疾患の兆候が非経口投与、創傷もしくは外科部位への直接適用、または体内移植を必要とする場合、これらの多糖類抽出物の使用は、発熱因子により誘発された発熱、毒素ショック、およびさらには死の危険に関連するため、禁忌である。

10

#### 【0008】

「グラム陰性菌内毒素」に対立するものとして「細菌性発熱因子」は、多くの異なる物質の一般記述用語となった。しかしながら、発熱性物質は、一部のグラム陽性菌、マイコバクテリア、真菌、および同様にウイルスにより生成され得るが、グラム陰性菌により生成される発熱因子、すなわち、内毒素は、薬学および医療用インプラント分野にとって重要性を持つ。

#### 【0009】

先行技術は、医薬品に使用するために溶液の発熱物質を除去するための様々な方法を開示している。多くの方法が発熱物質の破壊に依存する。しかしながら、そのような方法は、多くの場合、溶液中の所望の分子の損傷または破壊をもたらす。これは、特に所望の分子が天然に誘導される場合にそうである。

20

#### 【0010】

発熱物質除去の他の方法は、クロマトグラフィーおよび濾過などの手段による発熱物質の物理的除去を対象とする。そのような方法は、不安定な分子を含む溶液の処理には明らかに好適であるが、これらの方法を商業的規模の量を処理するように拡大するには大きな問題が生じる。多くの場合、工業規模の分離方法は、媒体の費用、および媒体を常に交換または再生する必要性により経済的に実現可能ではない。特に海藻抽出物は分離媒体の閉塞または汚れを生じる残留物および沈殿物を含んでいることが知られている。

30

#### 【0011】

海藻抽出物によるさらなる問題は、多くの場合処理中に生じる望ましくない褐色の変色が存在することである。この変色は、アルカリ条件の使用により生じると考えられ、典型的には、最終製品まで持続する。抽出物がヒトへの注入可能組成物として製剤化される場合、投与前の注入液の視覚検査を容易にするために、無色の溶液が特に好ましい。

#### 【0012】

本発明の態様は、発熱性および／または着色を減少させるように海藻抽出物を処理するための改善された方法を提供することにより、先行技術の問題を克服する、または軽減することである。さらなる態様は、既存の処理方法の代替を提供することである。

40

#### 【0013】

文献、作用、材料、デバイス、物品等の論考は、単に、本発明の内容を提供する目的のために本明細書に含まれる。本出願の各主張の優先日前に存在したため、これらの問題のいずれかまたは全ては、本発明に関する分野における先行技術の基本原理の一部を形成する、または共通の一般知識であることを示唆しない、または表さない。

#### 【発明の概要】

#### 【0014】

第1の態様では、本発明は、標的分子および発熱物質を含む海藻抽出物を処理する方法を提供し、本方法は、発熱物質を不活性化するステップ、および／または発熱物質を除去するステップを含み、本方法は、抽出物の発熱性の減少をもたらす。本方法は、抽出物を

50

有効量の以下：酸化剤（過酸化剤など）、界面活性剤（非イオン性界面活性剤など）、塩基（水酸化剤など）、活性炭、ゼオライトのうちの1つ以上と接触させることを含む得る。

【0015】

標的分子は、多糖類、好ましくは、フコイダンまたはウルバンなどの多糖類であってよい。

【0016】

本方法内の好ましい組み合わせは、(i) 酸化剤と塩基、(ii) 酸化剤、塩基、および界面活性剤、(iii) 活性炭と塩基を含む。

【0017】

別の態様では、本発明は、実質的に発熱物質除去された海洋生物抽出物を提供する。処理された抽出物は、LALにより決定するとき、約100 EU/mg未満の発熱物質レベルを有し得、かつ／またはウサギ発熱性試験に合格できる。抽出物は、本明細書に記載される方法によって生成され得る。

【0018】

薬剤的に許容される賦形剤と組み合わせ、本明細書に記載される、実質的に発熱物質除去された海洋生物抽出物を含む医薬組成物も提供する。

【0019】

本発明のさらなる態様は、病態の治療または予防を必要とする哺乳類に、本明細書に記載される生体材料の医薬組成物を投与すること、または移植することを含む、病態を治療する、または予防するための方法である。

【0020】

別の態様は、医薬品における本明細書に記載される医薬組成物または生体材料の使用を提供する。本明細書に記載される実質的に発熱物質除去された海洋生物抽出物、または病態を治療もしくは予防するための薬剤の製造における、本明細書に記載される医薬組成物の使用も提供する。

【発明を実施するための形態】

【0021】

この説明を考慮すると、当業者は、本発明が様々な代替実施形態および代替用途においてどのように実施されるか明らかであろう。しかしながら、本発明の様々な実施形態が本明細書において記載されるが、これらの実施形態が単に例として提示され、制限するものではないことを理解する。このため、この様々な代替実施形態の説明は、本発明の範囲または幅を制限するものと解釈されるべきではない。さらに、利点または他の態様の記述は、特定の例示的な実施形態に適用され、特許請求の範囲によって網羅される全ての実施形態に必ずしも適用されない。

【0022】

本明細書の説明および特許請求の範囲を通して、用語「備える (comprise)」ならびに「備える (comprising)」および「備える (comprises)」などの本用語の変形は、他の付加物、成分、整数、またはステップを排除することを意図しない。

【0023】

本明細書を通して、「一実施形態 (one embodiment)」または「1つの実施形態 (an embodiment)」への言及は、実施形態に関して記載される特定の特徴、構造、または特性が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。よって、本明細書全体の様々な箇所における句「一実施形態では」または「1つの実施形態では」の出現は、全てが必ずしも同じ実施形態を指すわけではないが、そうである場合がある。

【0024】

第1の態様では、本発明は、標的分子および発熱物質を含む海藻抽出物を処理する方法を提供し、本方法は、発熱物質を不活性化するステップ、および／または発熱物質を除去

10

20

30

40

50

するステップを含み、本方法は、抽出物の発熱性の減少をもたらす。

【0025】

出願者は、海藻および海洋動物の抽出物が効率的に発熱物質除去され、ヒトへの使用を安全にすることを見出した。重要なことに、および予想外に、除去および不活性化は、抽出物中に存在する活性標的分子に対してわずかな有害作用しかもたらさないことを示した。さらに、標的分子の回収は、商業的に許容可能であることが示された。

【0026】

一実施形態では、標的分子は、多糖類、好ましくは硫酸化多糖類である。一実施形態では、多糖類は、フコイダンまたはウルバンである。

【0027】

前述の背景技術のセクションから理解されるように、この発見は、当該技術分野において大きな前進であり、フコイダンおよびウルバンなどの海洋生物の活性分子のインビボ医療用途、および同時に薬学的製剤または医療用インプラントの作製におけるこれらの活性物質の常用使用の可能性のより完全な調査を可能にする。

【0028】

本方法の一実施形態では、発熱物質を不活性化するステップは、抽出物を、有効量の以下：酸化剤、界面活性剤、塩基、活性炭、ゼオライトのうちの1つ以上と接触させることを含む。

【0029】

理論に制限されることなく、本方法が酸化剤の使用を含む場合、酸化剤が発熱物質を不活性化するように作用することが提案される。しかしながら、発熱性の減少に有効であった酸化剤のレベルが抽出物の多糖類分子に対して実質的に有害な変化を誘発しなかったことに留意する。いくつかの実施形態では、フコイダン分子またはウルバン分子は、実質的に生物学的活性を維持する。本明細書で使用される、用語「生物学的に活性」は、生物学的分子に対する構造的および／または機能的変化を誘発する、または生物学的系もしくはは経路における変化を誘発する、または生体材料として作用する、または生物学的系において薬物送達物質として作用する任意の能力を指す。

【0030】

通常、酸化剤は、分子酸素、オゾン、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、および他の無機過酸化物、フッ素 ( $\text{F}_2$ )、塩素 ( $\text{Cl}_2$ )、および他のハロゲン、硝酸 ( $\text{HNO}_3$ ) および硝酸化合物、硫酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )、ペルオキシ二硫酸 ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_8$ )、ペルオキシ硫酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_5$ )、亜塩素酸塩、塩素酸、過塩素酸、および他の類似ハロゲン化合物、次亜塩素酸塩および他の次亜ハロゲン酸化合物（家庭用漂白剤 ( $\text{NaClO}$ ) を含む）、六価クロム化合物（クロム酸および重クロム酸ならびに三酸化クロム、塩化クロム酸ピリジニウム ( $\text{PCC}$ )、およびクロム酸塩／二クロム酸塩化合物など）、過マンガン酸塩化合物 ( $\text{KMnO}_4$ 、過ホウ酸ナトリウム、亜酸化窒素 ( $\text{N}_2\text{O}$ )、酸化銀 ( $\text{Ag}_2\text{O}$ )、四酸化オスミウム ( $\text{OsO}_4$ )、トレンス試薬、および 2, 2'-ジピリジルジスルフィド ( $\text{DPS}$ ) を含む。

【0031】

一実施形態では、酸化剤は、過酸化物、オゾン、または分子酸素などの酸素系酸化剤である。一実施形態では、酸化剤は、過酸化水素である。酸化反応を増強するために、第二鉄イオンなどの触媒が酸化反応混合物に含まれてよい。過酸化物を使用する利点は、海藻類に多くの場合見られる有色色素複合体が漂白され、それによって、実質的に透明な溶液をもたらすことである。

【0032】

過酸化物の量は、種および抽出物の純度に依存し得るが、約 10%～約 100% ( $w/w$ 、過酸化物の質量対多糖類の質量に基づく) の範囲が有効であることが見出されている。本明細書に開示される実験研究は、許容可能な発熱因子減少レベルが触媒として 1% のクエン酸第二鉄の存在下で約 30% の水酸化物（フコイダンの  $w/w$ ）で達成され得ることを示す。したがって、本方法の一実施形態では、過酸化物の量は、約 30% ( $w/w$ )

10

20

30

40

50

を超える。

### 【0033】

出願者は、海藻抽出物の界面活性剤処理の有効性も示す。理論によって決して制限されないが、発熱物質は界面活性剤によって可溶化され、可溶化された物質がより容易に不活性化される（例えば、酸化剤により）か、または除去される（例えば、濾過により）ことが提案される。界面活性剤は、生物系界面活性剤、多くの場合、細胞成分を可溶化するために生化学で使用される種類のもの、および他の天然に存在する分子であってよい。界面活性剤は、3-（N，N-ジメチルミリスチルアンモニオ）プロパンスルホネート、3-（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩双極性イオン洗剤、ASB-14、Br i j（登録商標）58平均 $M_n$ 、約1124、Glycine max（大豆） $\geq 99\%$ からのL- $\alpha$ -リゾホスファチジルコリン、凍結乾燥粉末、Br i j（登録商標）58主成分：エイコサエチレングリコールヘキサデシルエーテル、Br i j（登録商標）L23溶液30%（w/v）、Br i j（登録商標）L23主成分：トリコサエチレングリコールドデシルエーテル、C7BzO、CHAPS、CHAPSOなどの、組織培養に有用なものであってよい。コール酸、デオキシコール酸、ジギトニン、グリココール酸、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム $\geq 98\%$ 、ヘキサエチレングリコールモノドデシルエーテル、IGEPA L CA-630、ドデシル硫酸リチウム、N-デカノイル-N-メチルグルカミン、N-ドデシル-N，N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、N-ノナノイル-N-メチルグルカミン、Nonidet P-40、オクチルD-グルコピラノシド、オクチル $\alpha$ -D-グルコピラノシド、オクチル $\beta$ -D-1-チオグルコピラノシド、Pluronic F-68、ポリオキシエチレン（20）、ポリソルベート20、ポリソルベート80、サポニン、コール酸ナトリウム水和物、デオキシコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、グルココール酸ナトリウム水和物、タウロデオキシコール酸ナトリウム水和物、Tween20、Tween40、Tween80、タウロコール酸ナトリウム塩水和物、Triton X-100、Triton X-114、ウルソデオキシコール酸、n-ドデシル $\beta$ -D-マルトシド、n-ドデシル $\beta$ -D-マルトシド。

### 【0034】

界面活性剤は、2-シクロヘキシルエチル $\beta$ -D-マルトシド、3-（4-tert-ブチル-1-ピリジニオ）-1-プロパンスルホネート、3-（N，N-ジメチルミリスチルアンモニオ）プロパンスルホネート、3-（1-ピリジニオ）-1-プロパンスルホネート、3-（ベンジルジメチルアンモニオ）プロパンスルホネート、3-（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホネート、3-[N，N-ジメチル（3-パルミトイルアミノプロピル）アンモニオ]-プロパンスルホネート、5-シクロヘキシルペンチル $\beta$ -D-マルトシド、ASB-14、ASB-C80、シクロヘキシルメチル $\beta$ -D-マルトシド、デシル $\beta$ -D-グルコピラノシド、デシル $\beta$ -D-マルトピラノシド、デシル $\beta$ -D-1-チオマルトピラノシド、デシル $\beta$ -D-マルトシド、ジメチルデシルホスフィンオキシド、ジメチルエチルアンモニウムプロパンスルホネート、塩化ドデシルトリメチルアンモニウム、EMP I GEN（登録商標）BB洗剤、塩化ヘキサデシルピリジニウム一水和物、ヘキサエチレングリコールモノデシルエーテル、イソプロピル $\beta$ -D-1-チオガラクトピラノシド、イソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド、Lutrol（登録商標）OP 2000、MEGA-8、N，N-ビス[3-（D-グルコンアミド）プロピル]デオキシクロルアミド、N-デカノイル-N-メチルグルカミン、N-ドデシル-N，N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、N-ラウロイルサルコシン、N-ノナノイル-N-メチルグルカミン、ノナエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノドデシルエーテル、ポリ（無水マレイン酸-alt-1-デセン）、3-（ジメチルアミノ）-1-プロピルアミン誘導体、モノラウリン酸ポリオキシエチレン（20）ソルビタン、タウロデオキシコール酸ナトリウム水和物 $\geq 95\%$ 、スクロースモノデカノエート、n-ヘプチル $\beta$ -D-チオグルコピラノシドなどの、膜およびタンパク質の可溶化に



有用なものであってよい。

#### 【0035】

界面活性剤は、非イオン性界面活性剤であってよい。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、 $n$ モルのエチレンオキシド（ $n$ は約12であってよい）でエトキシ化されたアルコールC12-15、アルキルアルコールポリエトキシレート非イオン性界面活性剤G12 A12、ドデカノールエトキシレート非イオン性洗剤、ドデシルアルコール、エトキシ化直鎖アルコール、ラウリルポリエチレングリコールエーテル、ポリエチレングリコールモノドデシルエーテル、ラウリン酸アルコールエトキシレートであり、代表的な形態はTeri c G12 A12（ICI Chemicals）または等価物である。

#### 【0036】

一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ソルビタンモノラウレートのポリオキシエチレン誘導体であるポリソルベートである。一実施形態では、界面活性剤は、Tweenシリーズ（または等価物）のうちの1つであり、一実施形態では、Tween 80（Sigma Aldrich）または等価物である。

#### 【0037】

一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、親水性ポリエチレンオキシド鎖（任意に、約9.5エチレンオキシド単位を有する）、および芳香族炭化水素親油基または疎水基を有するものである。炭化水素基は、4-（1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル）-フェニル基であってよい。界面活性剤は、Tritonシリーズ（Supelco）のうちの1つ、またはPluronicシリーズ（BASF）などの等価物である、特にTriton X-100であってよい。

#### 【0038】

界面活性剤は、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、および90%（w/w、界面活性剤の質量対多糖類の質量に基づく）の量で使用され得る。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、発熱因子負荷において10倍の減少をもたらすことができる少なくとも約50% w/wの量で使用される。

#### 【0039】

特に、75% w/w比率で添加されたTeri c（登録商標）G12 A12、Tween（登録商標）20、およびTriton（登録商標）X100は、有用なレベルの発熱因子減少をもたらした。

#### 【0040】

界面活性剤を使用するさらなる利点は、最大100%の多糖類収率がいくつかの実施形態において得られる可能性があることである。

#### 【0041】

本方法は、抽出物を塩基と接触させることを含み得る。決して理論に制限されることなく、塩基は発熱物質を不活性化するように作用することが提案される。アルカリ条件（すなわち、 $pH > 7$ ）の利用が、海洋生物抽出物の発熱物質除去において示された。好適な塩基は、金属酸化物、水酸化物、アルコキシド、およびアンモニアを含み得る。抽出物の工業規模の処理に関して、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、および水酸化カルシウムなどの容易にアクセス可能であり、費用効率が良い塩基が好適であり得る。一実施形態では、 $pH$ は、約10.5～約11.0の数値に調節される。

#### 【0042】

一実施形態では、塩基は、好ましくは約0.5モルの溶液において水酸化ナトリウムである。その実施形態では、少なくとも約50 mLの溶液の量で使用され得る50 mLの容量が1グラム当たりの多糖類に添加される。50 mLが使用された場合には、発熱性負荷における許容可能な減少が見られた。高レベルの水酸化物（50 mLの0.1 M水酸化ナトリウム）は、50%の減少をもたらした。

#### 【0043】

活性炭およびゼオライトは、存在する少なくともある割合の発熱物質を吸着するのに十

10

20

30

40

50

分な量で抽出物に添加される。少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、および50%（w/w、吸着剤の質量対多糖類の質量に基づく）の量を使用され得る。少なくとも約10% w/wの量が発熱因子負荷の減少をもたらすことが示された。

#### 【0044】

酸化剤、界面活性剤、塩基、活性炭、およびゼオライトの使用は、単独で、または5つの任意の組み合わせで、または任意の4つの任意の組み合わせで、または任意の3つの任意の組み合わせで、または任意の2つの任意の組み合わせであってよいことを理解すべきである。

#### 【0045】

好ましい組み合わせは、酸化剤と塩基のものである。様々な時間の間、様々な温度での多糖類質量の10~200%（w/w、多糖類に対するMOH）の範囲の量のMOH（M=NaまたはKの場合）、およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（多糖類に対して10%~100% w/w過酸化化物）による処理を含む実験は、相乗的に大幅な発熱因子の減少をもたらすように作用することが示された。

#### 【0046】

一実施形態では、塩基の量は、約7.0~約12.5のpHをもたらすのに十分である。好ましい組み合わせは、酸化剤、塩基、および界面活性剤のものである。過酸化水素とTeri c-G12A12の組み合わせは、連続過酸化化物処理よりも低い発熱因子負荷をもたらさなかったが、塩基（水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウムなどの添加により、低発熱因子レベルへの相乗効果をもたらした。

#### 【0047】

さらに好ましい組み合わせは、活性炭と塩基のものである。酸性およびアルカリ条件の両方で活性炭を試験し、アルカリ条件に関して発熱因子負荷の大幅な減少が観察されたが、酸性に関しては観察されなかった。

#### 【0048】

方法が発熱物質を除去するステップを含む場合、方法は、抽出物を以下のうちの1つ以上：活性炭、ゼオライト、発熱物質に実質的に特異的に結合することが可能なリガンドと結合させるステップと、結合した発熱物質を標的分子から実質的に分離するステップとを含む。当業者は、分離が達成され得る多くの方法に精通している。例えば、所定の量の抽出物が槽内で処理され、結合された発熱物質が複合体を沈降または凝結させることにより標的分子から分離される場合、バッチ処理方法を利用することができる。あるいは、結合された発熱物質は、遠心分離法により、または磁気ビーズ分離手段により分離することができる。

#### 【0049】

一実施形態では、発熱物質に実質的に特異的に結合することが可能であるリガンドは、ポリミキシンBである。

#### 【0050】

Preparative Chromatography (Edited by H. Schmidt-Traub et al, Second Edition, 2012, Wiley-VCH Weinheim) のテキストに示されるように（その内容は、参照により本明細書に組み込まれる）、標準的な分取クロマトグラフィー法は、当業者に既知である。

#### 【0051】

本発明の方法は、様々な分子量の多糖類分画を得るために、加水分解ステップ、および任意に、分画ステップを含み得る。同じ多糖類源の様々な分子量分画の生物活性に対して検証を行い、顕著な相違を見出した。高分子量のフコイダンの分画は、肝臓線維症の阻害において、未分画の粗フコイダンより有効であることが分かった（Nakazato et al; Attenuation of N-nitrosodiethylamine-induced liver fibrosis by high-molecul

10

20

30

40

50

ar-weight fucoidan derived from Cladosiphon okamuranus. J. Gastroenterol. Hepatol. 2010; 25: 1692-1701)。別の研究は、マウスにおいて、3つの異なるフコイダンの分画を比較した(Shimizu et al; Proportion of murine cytotoxic T-cell is increased by high-molecular weight fucoidan extracted from Okinawa Mozuku (Cladosiphon okamuranus) J. Health Sci. 2005; 51: 394-397)。この研究は、低分子量フコイタンを与えられた動物と比較して、高分子量のフコイタン分画を与えられた動物の脾臓においてCD8の発現が大幅に増加した、差次的免疫作用を示した。

10

#### 【0052】

加水分解は、部分的または完全であってよく、酸性条件、酵素処理、または当業者に既知の任意の他の手段によって達成することができる。

#### 【0053】

分画は、例えば、クロマトグラフィー手段(例えば、セファロースなどのサイズ排除樹脂の使用により)、または限外濾過などの周知の方法により達成することができる。

#### 【0054】

あるいは、本方法は、既に加水分解され、かつ／または分画された多糖類の調製物に適用することができる。

#### 【0055】

20

有利に、本方法のいくつかの実施形態は、多糖類の商業的に望ましい収率を提供し、同時に、尚も効率的に発熱物質除去された生成物を提供する。収率は、約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%を超えてよい。一実施形態では、収率は約30%を超える。別の実施形態では、収率は、約60%を超える。前述の収率は、回収された多糖類の重量に基づき表されるが、生物学的活性または他のパラメータは適所に使用され得ることを理解する。

#### 【0056】

出願者は、発熱因子負荷を尚も99%減少させながら、キログラム量の乾燥フコイタン生成物を使用して標的フコイダンの商業的に有用な回収を示すことにより、本発明の方法の拡張性のさらなる利点を示した。本明細書の実施例20を参照。いくつかの実施形態では、本方法は、出発材料として、少なくとも約0.1kg、0.5kg、1kg、2kg、3kg、4kg、5kg、6kg、7kg、8kg、9kg、10kg、20kg、30kg、40kg、50kg、60kg、70kg、80kg、90kg、または100kgの乾燥多糖類を利用することができる。

30

#### 【0057】

発熱物質の不活性化または除去は、当業者に既知の任意の方法によって測定することができる。他の好適な試験は、Limulus Amebocyte Lysate (LAL) アッセイである。Associates of Cape Cod Incorporated (MA) が販売する「Chromo-LAL」キットなどのいくつかのキットが利用可能である。この試験では、共凍結乾燥されたLALおよび基材試薬をマイクロプレート内で試験試料と混合し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で、読取装置内でインキュベートした。吸光度測定値をChromo-LALの添加後、経時的に収集し、好適なソフトウェアにより分析した。試料が特定の吸光度(開始OD)に達するのに要する時間(開始時間)が計算され、標準内毒素のログ開始時間とログ濃度との間の線形相関を示す標準曲線が生成された。標準曲線の内毒素濃度の最大範囲は、 $0.005 \text{ EU/mL} \sim 50 \text{ EU/mL}$ である。アッセイの感度( $\lambda$ )は、標準曲線に使用された最低濃度として定義される。この試験の最大感度は、 $0.005 \text{ EU/mL}$ である。

40

#### 【0058】

未知の試料の対応する開始時間の内毒素濃度は、開始時間 v s 標準濃度のログ-ログプロット、または開始時間のログ v s 標準濃度のログの算術プロットである標準曲線から読

50

み取られる。例示的な標準曲線について生成されたログーログ線方程式は、 $Y = -0.2X + 3.14$ であり、式中、 $Y = \text{ログ開始時間}$ であり、 $X = \text{ログ内毒素濃度}$ である。平均開始時間が1630秒の未知の試料における内毒素の濃度は、開始時間をそのログ値である3.212に変換し、 $X$ について方程式を解き、 $X$ の真数を取り、濃度を得ることにより計算されるだろう。

〔数1〕

$$X = (Y - 3.14) / -0.2$$

$$X = (3.212 - 3.14) / -0.2$$

$$X = -0.36$$

$$\text{真数}(-0.36) = 0.44 \text{ EU/mL (または EU/mg)}$$

10

【0059】

典型的には、LALにより測定される、海藻抽出物の内毒素レベルは、5,000～10,000 EU/mgである。本発明の発熱物質除去法は、約9000、8000、7000、6000、5000、4000、3000、2000、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1 EU/mg未満のレベルに内毒素を減少させることができる。

【0060】

発熱物質の不活性化または除去を示すのに有用である別の試験は、米国薬局方ウサギ発熱因子試験 (USP <151>) である。ウサギ発熱因子試験は、定性的に発熱因子を検出するためのインビボ試験である。ウサギは、ヒトと類似する発熱因子耐性を有するため、ウサギにおける体温の変化を観察することにより、発熱因子の存在を決定することが可能である。この方法は、非細菌性内毒素発熱因子ならびに細菌性内毒素を検出することができる。

20

【0061】

適切な量の生成物を投与された際に、ウサギがそのそれぞれの対照温度を超える0.5℃以上の個々の温度上昇を示さない場合、生成物は発熱因子不在の要件を満たす。いずれかのウサギが0.5℃以上の個々の温度上昇を示す場合、試験は他の5匹のウサギを使用して継続される。8匹のウサギのうちの3匹以下が0.5℃以上の個々の温度上昇を示す場合、かつ8匹の個々の最大温度上昇の合計が3.3℃を超えない場合、検査中の材料は、発熱因子不在の要件を満たす。

30

【0062】

本方法の一実施形態では、処理された抽出物を注入することにより、ウサギはそれぞれの対照温度を超える0.5℃以上の個々の温度上昇を呈さない。一実施形態では、さらに5匹のウサギを使用して試験が継続される場合、処理された抽出物を注入することにより、8匹のウサギのうちの3匹以下が0.5℃以上の個々の温度上昇を示し、かつ8匹の個々の最大温度上昇の合計が3.3℃を超えない。

【0063】

LALおよびUSPウサギ発熱因子試験の両方が非経口製剤の安全性の検証に容認できるとして米国食品医薬品局により認識されている。

40

【0064】

本方法のいくつかの実施形態では、少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.9%、99.99%、または99.999%の発熱物質が除去され、かつ／または不活性化される。一実施形態では、米国食品医薬品局、または欧州医薬品庁、またはオーストラリア医薬品局 (Australian Therapeutic Goods Administration)、またはカナダ保健省などの政府規制機関の要件は本願の出願日において指定されているため、発熱物質は、これらの機関に容認されるレベルに除去され、かつ／または不活性化される。好ましくは、本方法は、少なくとも約50%、90%、または99%の除去および

50

／または不活性化をもたらす。一実施形態では、本方法により生成されたフコイダン組成物は、USPウサギ発熱因子試験および／またはLAL試験に合格できる組成物を生成することが可能である。一実施形態では、本方法は、LALにより測定される、約100 EU/mL未満の発熱因子レベルを有する溶液を生成することが可能である。

#### 【0065】

海洋生物抽出物は、褐藻 (Phaeophyceae) 綱、コンブ (Laminariales) 目 (例えば、翅藻科 (Akkesiphycaceae)、チガイソ科 (Alariaceae)、ツルモ科 (Chordaceae)、スジメ (Costariaceae)、コンブ科 (Laminariaceae)、レッソニア科 (Lessoniaceae)、およびニセツルモ科 (Pseudochordaceae))、またはヒバマタ (Fucales) 目 (例えば、ビフルカリオスダセア科 (Bifurcariopsdaceae)、ドウルビラエアセア科 (Durvillaeaceae)、ヒバマタ科 (Fucaceae)、ヒマンサラセア科 (Himanthallaceae)、ホルモシラセア科 (Hormosiraceae)、ノセイセア科 (Notheiaceae)、ホンダワラ科 (Sargassaceae)、およびセイロコッカセア科 (Seirococcaceae)) の褐藻から得ることができる。コンブ (Laminariales) 目海藻の例としては、ウンダリア (Undaria) 属 (これらに限定されないが、ワカメ (Undaria pinnatifida)、またはアラリア・エスクレンタ (Alaria esculenta)、サッコリザ・ポリサッカライド (Saccorhiza polysaccharides)、ヒロメ (Undaria undarioides)、アオワカメ (Undaria peterseniana) などの関連種)、およびコンブ (Laminaria) 種 (ラミナリア・ディジタータ (Laminaria digitata)、ラミナリア・ヒペルボレア (Laminaria hyperborean)、ラミナリア・オクロロイカ (Laminaria ochroleuca)、ラミナリア・サッカリナ (Laminaria saccharina)、ラミナリア・アガーディ (Laminaria agardhii)、ラミナリア・アングスタータ (Laminaria angustata)、ラミナリア・ボンガルディナ (Laminaria bongardina)、ラミナリア・クネイフォリア (Laminaria cuneifolia)、ラミナリア・デンティゲラ (Laminaria dentigera)、ラミナリア・エフェメラ (Laminaria ephemera)、ラミナリア・ファルロウィ (Laminaria farlowii)、ラミナリア・グロエンランディカ (Laminaria groenlandica)、ラミナリア・ジャポニカ (Laminaria japonica)、ラミナリア・ロングクルリス (Laminaria longicruris)、ラミナリア・ニグリプス (Laminaria nigripes)、ラミナリア・オンテルメディア (Laminaria ontermedia)、ラミナリア・パリダ (Laminaria pallida)、ラミナリア・プラチメリス (Laminaria platymeris)、ラミナリア・サッカリナ (Laminaria saccharina)、ラミナリア・セトケリ (Laminaria setchellii)、ラミナリア・シンクライリ (Laminaria sinclairii)、ラミナリア・ソリダングラ (Laminaria solidungula)、およびラミナリア・ステノフィラ (Laminaria stenophylla) など) の種が挙げられる。ヒバマタ目海藻類の例としては、これらに限定されないが、フカス・ベシクロサス (Fucus vesiculosus)、フカス・セラノイド (Fucus ceranoides)、フカス・カロニ (Fucus chalonii)、フカス・コットーニ (Fucus cottonii)、フカス・ディスティシャス (Fucus distichus) フカス・エバネセス (Fucus evanescens)、フカス・ガードネリ (Fucus gardneri)、フカス・ネレイデウス (Fucus nereideus)、フカス・セラタス (Fucus serratus)、フカス・スペルモフォラス (Fucus spermophorus)、フカス・スピラリス (Fucus spiralis)、

10

20

30

40

50

フカス・テンド (*Fucus tendo*)、およびフカス・ビルソイド (*Fucus virsoides*) などのヒバマタ属の種が挙げられる。

【0066】

褐藻類の他の目は、アスコセイラ (*Ascosseirales*)、ムチモ (*Cutleriales*)、ウルシグサ (*Desmarestiales*)、アミジグサ (*Dictyotales*)、ディスコスポランギウム (*Discosporangiales*)、シオミドロ (*Extocarpales*)、イシゲ (*Ishigeales*)、ネモデルマ (*Nemodermatales*)、オンスロウィア (*Onslowiales*)、イソガワラ (*Ralfsiales*)、カヤモノリ (*Scytosiphonales*)、シトタムヌス (*Scytothaminales*)、クロガシラ (*Sphacelariales*)、ケヤリモ (*Sporochneales*)、ウスバオオギ (*Syringodermatales*)、ティロプテリス (*Tilopteridales*)、および *Incerta sedis* を含む。

【0067】

特定の褐藻類は、アスコセイラ (*Ascosseira*)、カトレリア (*Cutleria*)、ミクロゾニア (*Microzonina*)、ザナルディニア (*Zanardinia*)、アスロクロアディア (*Arthrocladia*)、デスマレスチア (*Desmarestia*)、ヒマントサル (*Himantothallus*)、フェウラスム (*Phaeurism*)、ジクチオテリス (*Dictyopteris*)、ジクチオタ (*Dictyota*)、ジロファス (*Dilophus*)、ジストロミウム (*Distromium*)、グロソフォラ (*Glossophora*)、ホモエオストリカス (*Homoeostrichus*)、ロボフォラ (*Lobophora*)、ロボスッピラ (*Lobospirra*)、ニューハウシア (*Newhousesia*)、パチジクチオン (*Pachydictyon*)、パジナ (*Padina*)、パトグロサム (*Spatoglossum*)、スティポポジウム (*Stypopodium*)、タオニア (*Taonia*)、ゾナリア (*Zonaria*)、スコレスビエラ (*Scoresbyella*)、コリストカルプス (*Choristocarpus*)、ディスコスポランジウム (*Discosporangium*)、アシネトスポラ (*Acinetospora*)、フェルドマンニア (*Feldmannia*)、ゲミノカルプス (*Geminocarpus*)、ヒンクシア (*Hinckesia*)、ポゴトリクム (*Pogonotrichum*)、ピラエラ (*Pylaiella*)、アデノキスティス (*Adenocystis*)、セピジウム (*Caepidium*)、ユトリキュリジウム (*Utriculidium*)、アクロトリックス (*Acrothrix*)、アスコセロフィラ (*Ascosseirophila*)、アスペロコッカス (*Asperococcus*)、オウストロフィラム (*Austrofilum*)、コルダリア (*Chordaria*)、クラドシフォン (*Cladosiphon*)、コリカス (*Corycus*)、デラマレア (*Delamarea*)、ジクチオシフォン (*Dictyosiphon*)、エラキスタ (*Elachista*)、オイデス (*Eudesme*)、キラウディア (*Giraudia*)、ゴノネマ (*Gononema*)、ハロスリックス (*Halothrix*)、ハプログロイア (*Haplogloia*)、ヘカトネマ (*Hecatonema*)、ヘテロサンダーセラ (*HeterosaunderSELLA*)、ヒュミア (*Hummia*)、イシュモプレア (*Isthmoplea*)、ラミナリオコラックス (*Laminariocolax*)、ラミナイオネマ (*Laminarionema*)、リーセシア (*Leathesia*)、レプトネマテラ (*Leptonematella*)、リトシフォン (*Litosiphon*)、ミクロスポンジウム (*Microspongium*)、ミクロシファー (*Mikrosyphar*)、マイエロフィカス (*Myelophycus*)、マイリオグロエア (*Myriogloea*)、マイリオネマ (*Myrionema*)、マイリオトリキア (*Myriotrichia*)、パペンフッシエラ (*Papenfussiiella*)、ペトロスポンジウム (*Petrospongium*)、プリュロクラジア (*Pleurocladia*)、ポリトレタス (*Polytretus*)、プロセラキスタ (*Proselachista*)、プロテクトカルプス (*Prote*

10

20

30

40

50

ctocarpus)、パンクタリア (Punctaria)、クロモズク (Sauvageaugloia)、ソランセラ (Soranthera)、ソロカルプス (Sorcarpus)、スペルマイオクヌス (Spermaiochnus)、スファエロトリキア (Sphaerotrichia)、サメズグサ (Stictyosiphon)、ヤドリミドロ (Streblonema)、ヨコジマノリ (Striaria)、シチャポビア (Stschapovia)、フトモズク (Tinocladia)、コルダリオプシス (Chordariopsis)、アステロクラドン (Asterocladon)、シオミドロ (Ectocarpus)、ククキア (Kuckuckia)、メソスポラ (Mesospora)、アステロトリキア (Asterotrichia)、ナンカイシオミドロ (Bachelotia)、ビフルカリオプシス (Bifurcariopsis)、ダービリア (Durvillaea)、アスコフィラム (Ascophyllum)、フカス (Fucus)、ヘスペロフィクス (Hesperophycus)、ペルベチア (Pelvetia)、ペルベチオプシス (Pelvetiopsis)、シルベチア (Silvetia)、クシフォフォア (Xiphophora)、ヒマンサリア (Himanthalia)、ホルモシラ (Hormosira)、ノセイア (Nothelia)、アンソフィカス (Anthophycus)、アキシラリエラ (Axillariella)、ビフルカリア (Bifurcaria)、ビフルカリオプシス (Bifurcariopsis)、カルポグロッサム (Carpoglossum)、カウロシスティス (Caulocystis)、コッコフォラ (Coccophora)、シストフォラ (Cystophora)、シストセイラ (Cystoseira)、ハリドリス (Halidrys)、ヒジキ (Hizikia)、ホルモフィサ (Hormophysa)、ジョロモク (Myagropsis)、マイオグロプシス (Myogropsis)、マイリオデスマ (Myriodesma)、サルガッサム (Sargassum)、タービナリア (Turbinaria)、シストファエラ (Cystophaera)、マルギナリエラ (Marginariella)、フィロスポラ (Phyllospora)、セイロコッカス (Seirococcus)、イシゲ (Ishige)、コンブモドキ (Akkesiphycus)、アラリア (Alaria)、オーレオフィカス (Aureophycus)、ドルエリア (Druehlia)、オーアラリア (Eualaria)、ヒロメ (Hirome)、レッソニオプシス (Lessoniopsis)、プルロフィカス (Pleurophycus)、テリョゴフォラ (Pterygophora)、ウンダリア (Undaria)、ウンダリエラ (Undariella)、ウンダリオプシス (Undariopsis)、コルダ (Chorda)、アガラム (Agarum)、コスタリア (Costaria)、ジクチオネウラム (Dictyoneurum)、サラッシオフィラム (Thalasssiophyllum)、アースロサムナス (Arthrothamnus)、コスツラリア (Costularia)、シマセレ (Cymathere)、フェジチア (Feditia)、ギガント (Gigantea)、ラミナリア (Laminaria)、マクロシスティス (Macrocystis)、ネレオシスティス (Nereocystis)、ペラゴフィカス (Pelagophycus)、ペラゴフィカス×マクロシスティス (Pelagophycus × Macrocystis)、フィコカスタナム (PhycoCastanum)、フィラリエラ (Phyllariella)、ポリシデア (Polyschidea)、ポステルシア (Postelsia)、シュードレッソニア (Pseudolessonia)、サッカリナ (Saccharina)、ストレプトフィロプシス (Streptophyllopsiis)、エクロニア (Ecklonia)、エクロニオプシス (Eckloniopsis)、エグレギア (Egregia)、エイセニア (Eisenia)、レッソニア (Lessonia)、シュードコルダ (Pseudochorda)、ネモデルマ (Nemoderma)、オンスロウィア (Onslowia)、ベロスファセラ (Verosphacella)、ネオラルフシア (Neoralfsia)、バシスポラ (Basispora)、ハパロスポンギジオン (Hapalospongidion)、ジョンソニア (Jonssonia)、リソデルマ (Lithoderma)、ミリオネモブシ

10

20

30

40

50

ス (*Myrionemopsis*)、ペトロデルマ (*Petroderma*)、ポルテリ  
 ネマ (*Porterinema*)、シュードリソデルマ (*Pseudolithoderma*)、  
 イソガアラ (*Ralfsia*)、ムラチドリ (*Chnoospora*)、フクロ  
 ノリ (*Colpomenia*)、ヒドロクラスラス (*Hydroclathrus*)、ペ  
 タロニア (*Petalonia*)、ロゼンビゲア (*Rosenvingea*)、*Scyt*  
*osiphon*、ボンダネラ (*Bodanella*)、コエロクラジア (*Coelocla*  
*dia*)、ヘリバウジエラ (*Heribaudiella*)、ファエオストロマ (*Phaeostroma*)、  
 アステロネマ (*Asteronema*)、シトサムヌス (*Scytothamnus*)、  
 ステレオクラドン (*Stereocladon*)、スプラキニジ  
 ウム (*Splachnidium*)、クラドステファス (*Cladostephus*)、  
 スファセラリア (*Sphacelaria*)、スファセラ (*Sphacella*)、アレ  
 ソクラダス (*Alethocladus*)、ハロプテリス (*Halopteris*)、ス  
 ティポカウロン (*Stypocaulon*)、オーストロネレイア (*Austroner*  
*eia*)、ペロチア (*Bellotia*)、カルボミトラ (*Carpomitra*)、エン  
 シオサリア (*Encyothalia*)、ネレイア (*Nereia*)、ペリスポロキヌ  
 ス (*Perisporochnus*)、ペリサリア (*Perithalia*)、スポロキ  
 ネマ (*Sporochnema*)、スポロキナス (*Sporochnus*)、トマクロプ  
 シス (*Tomaculopsis*)、シンゴデルマ (*Syngoderma*)、ハロシフ  
 ォン (*Halosiphon*)、マソノフィカス (*Masonophycus*)、フィラ  
 リオプシス (*Phyllariopsis*)、サッコリザ (*Saccorhiza*)、シ  
 チャポビア (*Stschapovia*)、ハプロスポラ (*Haplospora*)、ファ  
 エオシフォニエラ (*Phaeosiphoniella*)、ティロプテリス (*Tilop*  
*teris*)、ネオレピオネウマ (*Neolepioneuma*)、アナリパス (*Ana*  
*lipus*)、およびファエオストロフィオン (*Phaeostrophion*) の種を  
 含む。

10

20

## 【0068】

特定の褐藻類は、アデノシスティス (*Adenocystis*)、アラリア (*Alaria*)、  
 アスコフィラム (*Ascophyllum*)、コルダ (*Chorda*)、クラド  
 シフォン (*Cladosiphon*)、デスマレスチア (*Desmarestia*)、ジ  
 クチオタ、ダービリア、エクロニア、シオミドロ、エグレギア、フカス、  
 ハリドリス、ヒ  
 マンサリア、ホルモシナ (*Hormosina*)、レセシア (*Lethesia*)、レッ  
 ソニア (*Lessonia*)、マクロシスティス、ネレオシスティス、パジナ (*Padi*  
*na*)、ペラゴフィカス、ペルバチア (*Pelvatia*)、ピライエラ (*Pilaie*  
*lla*)、ポステルシア、サッカリザ (*Saccorhiza*)、サルガッサム、スファセ  
 ラリア、およびタービナリアの種を含む。

30

## 【0069】

他の好適な海洋生物は、緑藻類およびウニおよびナマコなどの棘皮動物を含む。緑藻類  
 の例としては、アオサ種 (*Ulva* sp)、アオノリ種 (*Enteromorpha*  
 sp)、ミル種 (*Codium* sp)、イワツタ種 (*Caulerpa* sp)、およ  
 びハリマラ種 (*Halimala* sp) が挙げられる。

40

## 【0070】

1つの実施形態では、抽出物は、ワカメ (*Undaria pinnatifida*)  
 、フカス・ベシクロス (*Fucus vesiculosus*)、またはアオサ種から  
 供給される。

## 【0071】

フコイダンは、ツルモ (*Chorda filum*)、オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*)、ワカメ、ネバリモ (*Leathesia dif*  
*formis*)、アスコフィラム・ノドサム (*Ascophyllum nodosum*)、クロメ (*Ecklonia kurome*)、ペルヴェチアファスチジアタ (*Pelvetia fastigiata*)、モツキチャソウメン (*Saundersella*

50



s i m p l e x)、またはナガマツモ (C h o r d a r i a f l a g e l l i f o r m i s) にも由来し得る。

【0072】

よって、抽出物は、任意の褐藻もしくは緑藻、または任意の刺皮動物から供給され得る。

【0073】

海洋生物が植物である場合、抽出物は、植物全体、または葉、茎、胞子、もしくはこれらの組み合わせの植物の任意の部分から供給され得る。抽出物の調製用の出発材料は、新鮮な、凍結、または乾燥材料であってよい。

【0074】

抽出物は、浸軟、滲出、煎出、抽出、還流下、超音波の補助による抽出、溶媒相間に分配することにより補助される抽出、および共溶媒を用いた、または用いない超臨界抽出などの手順を使用して調製され得る。海藻の酸または塩基処理は、本発明の方法のための出発材料として有用な抽出物を形成するためにも使用され得る。一実施形態では、本方法は、炭水化物の単離のため、特に多糖類の単離のためである。多糖類は、アルギン酸塩、または硫酸化多糖類であってよい。

【0075】

一実施形態では、硫酸化多糖類は、フコイダンまたはフコイダン誘導体である。本発明の文脈において、用語「フコイダン」は、多くの海洋植物および動物に見られる種類の硫酸化 $\alpha$ -L-フカンを意味するものとする。

【0076】

一実施形態では、硫酸化多糖類は、ウルバンまたはウルバン誘導体である。本発明の文脈において、用語「ウルバン」は、様々な程度の硫酸化ラムノース、キシロース、グルクロン酸、およびイズロン酸残基からなる緑藻類からの硫酸化細胞壁成分を意味するものとする。

【0077】

加えて、用語「フコイダン」および「ウルバン」は、その生物学的に活性な断片、誘導体、または類似体をさらに含む。より大きな分子の分解（例えば、加水分解）により生成されたフコイダンまたはウルバンの断片も含まれる。分解は、個別に単離されても、されなくてもよい、分解されたフコイダンまたはウルバンを得るために、酸、塩基、熱、または酵素で処理することにより達成することができる。フコイダンおよびウルバンは、化学的に変更されてもよく、これらに限定されないが、硫酸化、ポリ硫酸化、アセチル化、エステル化、およびメチル化を含む修飾を有し得る。

【0078】

一実施形態では、本方法は、石綿、リポ多糖体一解毒酵素、グアニジン塩酸、硫酸アンモニウム、クロマトグラフィー樹脂、A c t i c l e a n e n d o t o x、不活化ヒスタミン、もしくはT r i t o nシリカ、または本出願の出願日に市販されている任意の他の発熱物質除去フィルタの使用を必要とするステップがない。

【0079】

一態様では、本発明は、実質的に発熱物質除去された海洋生物抽出物を提供する。好ましくは、抽出物は、L A Lにより決定される約100 EU/mL未満の発熱物質レベルを有し得、かつ／またはウサギ発熱性試験に合格できる。

【0080】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される方法により生成された抽出物を提供する。

【0081】

一実施形態では、抽出物は、少なくとも一部、本明細書に開示される方法により生成される。本発明の方法は、発熱物質の減少および／または除去のための他のステップで拡大することができることを理解する。

【0082】

10

20

30

40

50

処理された抽出物は、フコース、ガラクトース、ラムノース、キシロース、ウロン酸、重金属汚染、硫酸化、アセチル化、対イオン、および水を含む、分子量、炭水化物含量など、含まれる多糖類の純度および様々な特性に関して分析され得る。これらに限定されないが、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、元素組成分析、レーザー光散乱（LLS）、誘導結合プラズマ質量分析（ICP-MS）、紫外線-可視分光法（UV-Vis）、およびGC-MSを含む、多糖類試料を特徴付けるために、いくつかの分析技法を使用することができる。いくつかの実施形態では、処理された抽出物中のフコイダンは、未処理のフコイダンと比較した場合、前述の特性のうちの1つ以上に対して実質的に類似する。

#### 【0083】

別の態様では、本発明は、薬剤的に許容される賦形剤と組み合わせて、本明細書に記載される方法により生成された多糖類を含む医薬組成物を提供する。例示的な賦形剤は、炭水化物、無機塩、抗菌剤、抗酸化剤、界面活性剤、緩衝剤、酸、塩基、およびこれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。注入可能組成物に好適な賦形剤は、水、アルコール、ポリオール、グリセリン、植物油、リン脂質、および界面活性剤を含む。糖などの炭水化物、アルジトール、アルドン酸、エステル化糖、および／または糖ポリマーなどの誘導体化された糖が賦形剤として存在し得る。具体的な炭水化物賦形剤は、例えば、単糖類（フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなど）、二糖類（ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオースなど）、多糖類（ラフィノース、メレチトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプンなど）、およびアルジトール（マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール（グルシトール）、ピラノシルソルビトール、ミオイノシトールなど）を含む。賦形剤は、クエン酸、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウム、硝酸カリウム、第1リン酸ナトリウム、第2リン酸ナトリウム、およびこれらの組み合わせなどの無機塩または緩衝剤も含み得る。

#### 【0084】

本発明の組成物は、微生物の成長を防止または阻止するための抗菌剤も含み得る。本発明に好適な抗菌剤の非限定的な例としては、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、塩化セチルピリジニウム、クロロブタノール、フェノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀、チメロソール（thimerosal）、およびこれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0085】

組成物は、酸化を阻害し、それによって、フコイダンまたは調製物の他の成分の劣化を防止するために抗酸化剤を含み得る。本発明に使用するのに好適な抗酸化剤は、例えば、アスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、次亜リン酸、モノチオグリセロール、没食子酸プロピル、ポリフェノール、重亜硫酸ナトリウム、ホルムアルデヒドスルホキシル酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、およびこれらの組み合わせを含む。

#### 【0086】

界面活性剤は、賦形剤として存在し得る。例示的な界面活性剤は、「Tween 20」および「Tween 80」などのポリソルベート、ならびにF68およびF88（BASF）などのプルロニクス；ソルビタンエステル；レシチンおよび他のホスファチジルコリンなどのリン脂質、ホスファチジルエタノールアミン、脂肪酸、ならびに脂肪族エステルなどの脂質；コレステロールなどのステロイド；EDTAなどのキレート剤；ならびに亜鉛および他のそのような好適なカチオンを含む。

#### 【0087】

酸または塩基は、組成物中の賦形剤として存在し得る。使用され得る酸の非限定的な例としては、塩酸、酢酸、リン酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、ギ酸、トリクロロ酢酸、硝酸、過塩素酸、リン酸、硫酸、フマル酸、およびこれらの組み合わせからなる群から選択されるそれらの酸が挙げられる。好適な塩基の例としては、これらに限定されないが、水

10

20

30

40

50

酸化ナトリウム、酢酸ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、酢酸アンモニウム、酢酸カリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、クエン酸ナトリウム、ギ酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、フマル酸カリウム、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される塩基が挙げられる。

#### 【0088】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される方法により生成された多糖類を含む生体材料を提供する。ウルバンは、生物学的セメント（例えば、骨セメント）として、または新しい組織の成長を容易にするための3次元の足場を形成するために使用され得る。さらに、ウルバンは、生分解性ヒドロゲルとして使用され得、薬物送達ビヒクルとして潜在的に有用である。その文脈において、ウルバンは、例えば、生分解性ヒドロゲルを得るために、ラジカル重合性基を移植することにより官能化され得る。

10

#### 【0089】

本発明の発熱物質除去されたフコイダンは、1つ以上の臨床用途もしくは無菌エキスピボ用途において、特に、凝集、線維素溶解の調節因子として、抗癌剤として、抗ウイルス剤として（特に出願者の公開国際特許出願第WO/2011/100805号を参照、その内容は、参照により本明細書に組み込まれる）、または血液幹細胞もしくは他の種類の幹細胞移動剤（mobilizing agent）として利用性を有する。

#### 【0090】

本発明の発熱物質除去されたフコイダン抽出物が利用性を有し得る他の臨床適応は、炎症を含む。フコイダンは、セレクチン遮断活性、スカベンジャー受容体遮断、および炎症細胞の蓄積の調節を介して作用し得る。急性および慢性炎症状態は、喘息、アレルギー皮膚炎、心臓血管疾患、虚血後炎症、および他の感染または病変後の炎症を含む。

20

#### 【0091】

発熱物質除去されたフコイダン抽出物は、癌患者の幹細胞を保護するために、放射線および化学療法補助剤の文脈において、幹細胞移動剤として作用し得る。抽出物は、直接的な抗癌剤または補助的な抗癌剤として有用であり得る。障害を取り去るための治療用途がさらに想定される。特に、エタノールもしくは他の薬剤、またはヘリコバクターピロリおよびクロストリジウム・ディフィシレなどの感染に起因する胃の病態が想定される。

#### 【0092】

ヘルペスウイルス感染（HSV1、HSV2、およびこれらの薬物耐性株）、サイトメガロウイルス（HCMV）、インフルエンザウイルス、HIVの治療を含む抗ウイルス用途がさらに想定される。局所または経口送達は、これらの状況において典型的であろうが、いくつかのヘルペス感染は、注入または他の方法を介して部位に直接適用することが必要とされ得る。

30

#### 【0093】

単核細胞、NK細胞、および樹状細胞などの免疫細胞の数および活性を含む、フコイダンが免疫機能を増強する能力を考えると、免疫調節を伴う病態も適している可能性がある。フコイダンは、抗病原性または抗癌作用をもたらすために、これらの細胞の活性を増強することが知られている。

#### 【0094】

さらに想定される使用は、外科手術用途における癒着を予防するための抗癒着療法である。

40

#### 【0095】

さらに想定される使用は、凝集、グルコース代謝、マトリックスタンパク質代謝回転の調節、ならびにエキスピボおよびインビボの両方の他の酵素プロセスに関連するものを含む酵素機能の調節においてである。本発明のフコイダン抽出物は、TGF $\beta$ およびそれらの受容体などの成長因子の活性を調節するためにも採用され得る。

#### 【0096】

本発明の発熱物質除去された抽出物は、神経疾患（アミロイド蓄積に依存するものを含む）、凝固障害（抗血栓、血栓溶解、または抗凝固物質もしくは凝固亢進を含む）、なら

50

びに血友病、局所化粧用クリーム、歯科用途、眼科用途において、およびPセレクトイン撮像用の放射能マーカーの担体として使用され得る。さらに、本発明の発熱物質除去されたフコイダン抽出物は、抗生物質もしくは他の活性剤用の離型剤または担体として使用され得る。

#### 【0097】

発熱物質除去された抽出物は、好適な方法により身体に、および臨床医によって必要または適切と思われる任意の身体の一部に送達され得る。

#### 【0098】

したがって、本発明は、本明細書に記載される組成物を使用して、ヒトおよび他の哺乳類におけるそのような病態を治療する方法を提供する。

10

#### 【0099】

本発明は、ここで、以下の非限定的な実施例を参照することによりさらに完全に説明される。

#### 【0100】

##### 実施例1：ワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去

出発材料は、天然炭水化物（約50%～27.5%のフコース、22.5%のガラクトース）、硫酸塩（26%）、アセチル部分（3%）、および対イオン（8%）を含む、フコイダンに関して前に約87%に精製された凍結乾燥生成物であった。

#### 【0101】

この方法に使用される全ての水は、使用前に発熱物質除去フィルタを通して濾過された。全ての機器を使用前に消毒し、発熱物質除去された水で洗浄した。

20

#### 【0102】

2.86kgの凍結乾燥されたフコイダン生成物を、50倍（143L）の0.05M NaOHに溶解した。

#### 【0103】

溶解は、最初に約114.4LのDI水（すなわち、143Lの80%）を反応槽内に設置することにより行われた。5.94kgのNaOHをDI水に添加し、143LのDI水の残りを添加した。次いで、混合しながら、固体フコイダン（2.86kg）を添加した。全ての固体が完全に溶解されるまで混合しながら、溶液を40℃に加熱した。次いで、溶液を、10分間40℃に維持した。

30

#### 【0104】

3kgのSpeedplus濾過助剤（Dicalite, PA）を溶液に添加し、圧力濾過機を使用して濾過を行った。180Lの濾液を回収し、新しい反応槽に移した。

#### 【0105】

2.6LのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（50%w/w）を濾液に添加し、混合している間、溶液を1時間、60℃に維持した。次いで、溶液を45℃に冷却し、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（36%w/w）でpHを10.0～10.5に調節した。10.44の最終pHに達した。

#### 【0106】

公称カットオフが30kDaの、77ft<sup>2</sup>の膜（Synder Filtration, CA）を使用して、pHを調節した溶液を限外濾過した。

40

#### 【0107】

UF機器を組み立て、45～50℃の100LのDI水当り150mlのNaOClの溶液（pH10～11）を30分間再循環させることにより消毒した。機器を少なくとも200Lの発熱物質除去されたDI水で洗浄した。フコイダン溶液を保持液槽に添加し、保持液が元の容量の約20%に濃縮されるまで限外濾過を行った。限外濾過ステップを通して、供給圧は2.0バール、保持液圧は1.0バールに維持された。浸透液流束を12.5L/分で開始し、限外濾過の終わりには10.8L/分に降下した。

#### 【0108】

次いで、発熱物質除去されたDI水（160L）を使用して、濃縮したフコイダン溶液（40L）を透析濾過した。供給圧を2.0バール、保持液圧を1.0バールに維持した

50

。浸透液流束は、20分かけて10.9 L/分から7.5 L/分に低下した。

【0109】

次いで、 $H_2SO_4$ でpHを8に調節し、さらに4容量(160 L)の発熱物質除去されたDI水で透析濾過を継続した。供給圧を2.0 バール、保持圧を1.0 バールに維持した。浸透液流束は、27分の透析濾過にわたって、7.5 L/分から6.0 L/分に低下した。

【0110】

次いで、溶液を40 Lの容量まで濃縮した。

【0111】

濃縮物を新しいCuno 1 DEPL発熱物質除去フィルタに通し、後に凍結乾燥させた。合計1820 gの固体を回収した。凍結乾燥した生成物を、Comil 032スクリーンを通して粉碎した。

【0112】

プロセス収率は63%であると計算された。90%の発熱因子の減少(LALにより測定された)が見られた。

【0113】

実施例2：ゼオライトと接触させ、続いて限外濾過することによりワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン(15.00 g)を300 mLの蒸留水に溶解し、ガラスファイバフィルタを通して濾過した。蒸留水を用いて濾液を300 gにした。40 mLのフコイダン溶液のアリコート、蒸留水で100 mLに希釈し、0.2 gのゼオライトを添加した。ガラスファイバフィルタを通して濾過する前に、懸濁液を14時間攪拌した。次いで、40 mLの最終容量に濃縮し、凍結乾燥させる前に、濾液を、Amicon攪拌式セルを通して限外濾過し、保持液を100 mLの蒸留水で洗浄した。

1%の発熱因子の減少(LALにより測定された)が見られた。

【0114】

類似するが、ゼオライト接触ステップがないプロセスでは、92.5%のフコイダン収率をもたらし、発熱因子の減少はなかった。

【0115】

実施例3：低レベルのアルカリおよび活性炭と接触させ、続いて限外濾過によりワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン(15.00 g)を300 mLの蒸留水に溶解し、ガラスファイバフィルタを通して濾過した。蒸留水を用いて濾液を300 gにした。40 mLのフコイダン溶液のアリコートを、0.5%のNaOHで100 mLに希釈し、0.2 gの活性炭を添加した。ガラスファイバフィルタを通して濾過する前に、懸濁液を14時間攪拌した。次いで、40 mLの最終容量に濃縮し、凍結乾燥させる前に、濾液を、Amicon攪拌式セルを通して限外濾過し、保持液を100 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄した。66%の発熱因子の減少(LALにより測定された)が見られた。

【0116】

実施例4：界面活性剤と接触させ、続いて限外濾過することによりワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン(10.00 g)を、300 mLの発熱物質除去された水に溶解した。ガラスファイバフィルタを通して溶液を濾過し、透明な褐色の溶液(約280 mL)を得た。

【0117】

75 gのフコイダン溶液のアリコートを蒸留水で150 mLに希釈し、1.8 gのTeriC(登録商標)G12A12を添加した。ガラスファイバフィルタを通して濾過する前に、懸濁液を1時間攪拌した。次いで、40 mLの最終容量に濃縮し、凍結乾燥させる前に、濾液を、Amicon攪拌式セルを通して限外濾過し、保持液を100 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄した。93%の発熱因子の減少(LALにより測定された)が見られた。

10

20

30

40

50

## 【0118】

75 g のフコイダン溶液のアリコート蒸留水で150 mLに希釈し、1.8 g の Tween（登録商標）20を添加した。ガラスファイバフィルタを通して濾過する前に、懸濁液を1時間攪拌した。次いで、40 mLの最終容量に濃縮し、凍結乾燥させる前に、濾液を、Amicon攪拌式セルを通して限外濾過し、保持液を100 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄した。

## 【0119】

75 g のフコイダン溶液のアリコート蒸留水で150 mLに希釈し、1.8 g の Triton（登録商標）X100を添加した。ガラスファイバフィルタを通して濾過する前に、懸濁液を1時間攪拌した。次いで、40 mLの最終容量に濃縮し、凍結乾燥させる前に、濾液を、Amicon攪拌式セルを通して限外濾過し、保持液を100 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄した。

10

## 【0120】

実施例5：低レベルの過酸化物質と接触させ、続いて限外濾過によりワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（6.00 g）を、250 mLの蒸留水に溶解した。0.5 M NaOHを分配する自動滴定装置を使用して、pHを7.00に維持した。溶液を攪拌しながら、ホットプレート上で90℃に加熱し、次いで、3.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加した。1時間後、反応は4.37 mLのアルカリを消費した。ガラスファイバフィルタを通して濾過する前に、溶液を一晩室温で放置した。次いで、50 mLに濃縮し、凍結乾燥させる前に、濾液を、Amicon攪拌式セルを通して濾過し、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄した。

20

## 【0121】

83%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が見られた。

## 【0122】

実施例6：第二鉄触媒の存在下で過酸化物質と接触させ、続いて限外濾過することによりワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（10.00 g）を、250 mLの蒸留水に溶解した。0.5 M NaOHを分配する自動滴定装置を使用して、pHを7.00に維持した。溶液を攪拌しながら、ホットプレート上で60℃に加熱し、次いで、10.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>および0.1 gのクエン酸Fe111を添加した。4時間後、14.92 mLのアルカリが消費された。ガラスファイバフィルタを通して濾過する前に、溶液を一晩室温で放置した。次いで、50 mLに濃縮し、凍結乾燥させる前に、濾液を、Amicon攪拌式セルを通して濾過し、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄した。

30

## 【0123】

94%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が見られた。

## 【0124】

実施例7：第二鉄触媒の存在下で高レベルの過酸化物質と接触させ、第2の過酸化物質で処理し、続いて限外濾過することによりワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（10.00 g）を、250 mLの蒸留水に溶解した。0.5 M NaOHを分配する自動滴定装置を使用して、pHを7.00に維持した。溶液を攪拌しながら、ホットプレート上で60℃に加熱し、次いで、10.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>および0.1 gのクエン酸Fe111を添加した。2時間後、12.10 mLのアルカリが消費された。さらに5.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加した。10時間後、合計15.23 mLのアルカリが消費された。ガラスファイバフィルタを通して濾過する前に、溶液を一晩室温で放置した。次いで、50 mLに濃縮し、凍結乾燥させる前に、濾液を、Amicon攪拌式セルを通して限外濾過し、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄した。

40

## 【0125】

99%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が見られた。

50

## 【0126】

実施例8：第二鉄触媒および界面活性剤の存在下で高レベルの過酸化物と接触させ、続いて限外濾過によりワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（10.00g）を、250mLの蒸留水に溶解した。0.5M NaOHを分配する自動滴定装置を使用して、pHを7.00に維持した。溶液を攪拌しながら、ホットプレート上で70℃に加熱し、次いで、10.0mLの30%w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>および0.1gのクエン酸Fe111を添加した。1時間後、12.22mLのアルカリが消費された。ガラスファイバフィルタを通して濾過する前に、溶液を冷却し、一晚室温で放置した。Amicon攪拌式セルを通して限外濾過する前に、125mLの濾液のアリコートをし、2.0gのTeriic（登録商標）G12A12で1時間処理した。30mLに濃縮し、凍結乾燥させる前に、保持液を170mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄した。

10

## 【0127】

99%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が見られた。

## 【0128】

実施例9：高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（2.00g）を、40℃に温めながら100mLの0.5M NaOHに溶解した。10分後、固体を遠心分離により分離し、破棄した。ガラスファイバフィルタを通して上清を濾過し、3時間、50mLのアリコートを60℃に加熱した。次いで、反応混合物を、発熱物質除去された蒸留水で100mLに希釈し、Amicon攪拌式セルを通して5mLの濃度に限外濾過した。次いで、保持液を75mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、5mLに濃縮し、凍結乾燥させた。

20

## 【0129】

>99%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が見られた。

## 【0130】

実施例10：低レベルの過酸化物および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりワカメから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（2.00g）を、40℃に温めながら100mLの0.5M NaOHに溶解した。10分後、固体を遠心分離により分離し、破棄した。ガラスファイバフィルタを通して上清を濾過し、50mLのアリコートを、3時間、60℃の1.00mLの30%w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理した。次いで、反応混合物を、発熱物質除去された蒸留水で100mLに希釈し、Amicon攪拌式セルを通して5mLの濃度に限外濾過した。次いで、保持液を75mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、5mLに濃縮し、凍結乾燥させた。

30

## 【0131】

>99%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が見られた。

## 【0132】

実施例11：低レベルの過酸化物および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりエクロニア・マキシマから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

40

フコイダン（8.00g）を、45℃に温めながら400mLの0.5M NaOHに溶解した。10分後、1時間、65℃の4.00mLの30%w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で溶液を処理した。次いで、ガラスファイバフィルタを通して、反応混合物を濾過した。濾液のpHを、50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で13.0から10.5に調節し、次いで、Amicon攪拌式セルを通して限外濾過し、20mLの容量に濃縮した。次いで、保持液を50mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、20mLに再濃縮した。50mLの洗浄および再濃縮をさらに2回繰り返した。次いで、最終濃縮された保持液を凍結乾燥させた。

## 【0133】

実施例12：低レベルの過酸化物および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりフカス・ベシクロススから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

50

フコイダン（6.3 g）を、45℃に温めながら300 mLの0.5 M NaOHに溶解した。反応混合物を65℃に加熱し、1時間、2.00 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理した。次いで、ガラスファイバフィルタを通して、反応混合物を濾過した。濾液のpHを、50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で11.7から11.0に調節し、次いで、Amicon攪拌式セルを通して限外濾過し、20 mLの容量に濃縮した。次いで、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、20 mLに再濃縮した。50 mLの洗浄および再濃縮をさらに2回繰り返した。次いで、最終濃縮された保持液を凍結乾燥させた。

【0134】

>99%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が見られた。

【0135】

実施例13：高レベルの過酸化物および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりアスコフィラム・ノドサムから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（15.00 g）を、40℃に温めながら735 mLの0.5 M NaOHに溶解した。反応混合物を遠心分離し、Dicalite濾過助剤を通して上清を濾過した。濾液を60℃に加熱し、30.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で1時間処理した。次いで、ガラスファイバフィルタを通して、pH10.0の反応混合物を濾過した。次いで、Amicon攪拌式セルを通して濾液を限外濾過し、30 mLの容量に濃縮した。次いで、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、30 mLに再濃縮した。50 mLの洗浄および再濃縮をさらに2回繰り返した。次いで、最終濃縮された保持液を凍結乾燥させた。

【0136】

実施例14：低レベルの過酸化物および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりアラリア・エスクレンタから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（4.0 g）を、40℃に温めながら200 mLの0.5 M NaOHに溶解した。反応混合物を遠心分離し、Dicalite濾過助剤を通して上清を濾過した。濾液を60℃に加熱し、5.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で30分間処理した。次いで、ガラスファイバフィルタを通して、pH10.7の反応混合物を濾過した。次いで、Amicon攪拌式セルを通して濾液を限外濾過し、30 mLの容量に濃縮した。次いで、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、30 mLに再濃縮した。50 mLの洗浄および再濃縮をさらに2回繰り返した。次いで、最終濃縮された保持液を凍結乾燥させた。

【0137】

実施例15：低レベルの過酸化物および高レベルアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりエクロニア・ラジアタから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（4.0 g）を、40℃に温めながら200 mLの0.5 M NaOHに溶解した。反応混合物を遠心分離し、Dicalite濾過助剤を通して上清を濾過した。濾液を60℃に加熱し、2.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で30分間処理した。次いで、ガラスファイバフィルタを通して、pH10.7の反応混合物を濾過した。次いで、Amicon攪拌式セルを通して濾液を限外濾過し、30 mLの容量に濃縮した。次いで、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、30 mLに再濃縮した。50 mLの洗浄および再濃縮をさらに2回繰り返した。次いで、最終濃縮された保持液を凍結乾燥させた。

【0138】

実施例16：低レベルの過酸化物および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりサルガッサム・フシフォルメ（Sargassum fusiforme）から精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（4.0 g）を、40℃に温めながら200 mLの0.5 M NaOHに溶解した。反応混合物を遠心分離し、Dicalite濾過助剤を通して上清を濾過した。濾液を70℃に加熱し、0.7 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で30分間処理した。次いで、ガラスファイバフィルタを通して、反応混合物を濾過した。次いで、Amicon攪

10

20

30

40

50



拌式セルを通して濾液を限外濾過し、30 mLの容量に濃縮した。次いで、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、30 mLに再濃縮した。50 mLの洗浄および再濃縮をさらに2回繰り返した。次いで、最終濃縮された保持液を凍結乾燥させた。

【0139】

実施例17：低レベルの過酸化物質および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりオオウキモ（*Macrocystis pyrifera*）から精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（2.0 g）を、40℃に温めながら200 mLの0.5 M NaOHに溶解した。次いで、反応混合物を65℃に加熱し、1.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で30分間処理した。次いで、ガラスファイバフィルタを通して、反応混合物を濾過した。次いで、Amicon攪拌式セルを通して濾液を限外濾過し、30 mLの容量に濃縮した。次いで、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、30 mLに再濃縮した。50 mLの洗浄および再濃縮をさらに2回繰り返した。次いで、最終濃縮された保持液を凍結乾燥させた。

10

【0140】

実施例18：低レベルの過酸化物質および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりオキナワモズクから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

フコイダン（4.0 g）を、40℃に温めながら200 mLの0.5 M NaOHに溶解した。反応混合物を遠心分離し、dicalite濾過助剤を通して上清を濾過した。濾液を65℃に加熱し、2.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で30分間処理した。次いで、ガラスファイバフィルタを通して、反応混合物を濾過した。次いで、Amicon攪拌式セルを通して濾液を限外濾過し、30 mLの容量に濃縮した。次いで、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、30 mLに再濃縮した。50 mLの洗浄および再濃縮をさらに2回繰り返した。次いで、最終濃縮された保持液を凍結乾燥させた。

20

【0141】

実施例19：低レベルの過酸化物質および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりアオサ種から精製されたウルバンの発熱物質除去。

ウルバン（2.0 g）を、55℃に温めながら150 mLの0.5 M KOHに溶解した。濾液を65℃に加熱し、6.0 mLの30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で60分間処理した。次いで、反応混合物を50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>でpH 12.1からpH 7.8に中和した。次いで、Amicon攪拌式セルを通して濾液を限外濾過し、30 mLの容量に濃縮した。次いで、保持液を50 mLの発熱物質除去された蒸留水で洗浄し、30 mLに再濃縮した。50 mLの洗浄および再濃縮をさらに3回繰り返した。次いで、0.2 μmのフィルタを通して最終濃縮保持液を濾過し、凍結乾燥させた。

30

【0142】

>99%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が見られた。

【0143】

実施例20：フカス・ベシクロススから精製されたフコイダンの発熱物質除去。

出発材料は、天然炭水化物（約60.1%～54.0%のフコース、3.0%のガラクトース）、硫酸塩（27.5%）、および対イオン（7.5%）を含む、フコイダンに関して前に約95%に精製された、凍結乾燥生成物であった。

40

【0144】

この方法に使用された全ての水は、使用前に蒸留によって精製された。全ての機器を使用前に消毒し、精製水で洗浄した。

【0145】

1.99 kgの凍結乾燥されたフコイダン生成物を、50倍（100 L）の0.04 M KOHに溶解した。

【0146】

溶解は、最初に約100 Lの精製水を反応槽内に設置することにより行われた。4 Lの50% KOHを精製水に添加し、溶液を60℃に加熱した。次いで、混合しながら、固

50

体フコイダン（1.99 kg）を添加した。全ての固体が完全に溶解されるまで、混合している間、溶液を60℃に維持した。溶液は11.9のpHに達した。

【0147】

0.5 Lの $H_2O_2$ （50%）を濾液に添加し、混合している間、溶液を1時間、65℃に維持した。次いで、溶液のpHを、 $H_2SO_4$ （50% w/w、3.35 L）で11.9から9.5に調節した。9.8の最終pHに達した。次いで、溶液を45℃に冷却した。

【0148】

公称カットオフが5 kDaの、各々78 ft<sup>2</sup>の3つの膜（Koch, MA）を使用して、pH調節した溶液を限外濾過した。

10

【0149】

UF機器を組み立て、100 Lの0.05% w/w KOHの溶液、続いて、45～50℃の100 Lの100 ppm NaOClの溶液、そして最後に100 Lの0.1% w/w  $H_2O_2$ の溶液を、各々15分間再循環することにより消毒した。次いで、機器を少なくとも200 Lの精製水で洗浄した。フコイダン溶液を保持液槽に添加し、保持液が元の容量の約30%に濃縮されるまで限外濾過を行った。限外濾過ステップを通して、保持液圧は50 psiに維持された。浸透液流束を2.0 L/分で開始し、限外濾過の終わりには1.6 L/分であった。

【0150】

次いで、精製水を使用して（1回分10 Lで120 L）、濃縮したフコイダン溶液（30 L）を透析濾過した。保持液圧は50 psiに維持された。浸透液流束は、7分にわたって1.5 L/分に留めた。

20

【0151】

次いで、溶液を22 Lの最終容量まで濃縮した。

【0152】

次いで、濃縮物を凍結乾燥させた。合計820 gの固体を回収した。

【0153】

プロセス収率は41%であると計算された。99%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が見られた。

【0154】

30

実施例21：低レベルの過酸化物および高レベルのアルカリと接触させ、続いて2段階限外濾過によりフカス・ベシクロスから精製されたフコイダンの発熱物質除去および分画

50℃に温めながら、フコイダン（50 g）を、2 Lの1% w/w  $H_2SO_4$ に溶解した。この温度で反応混合物を1時間攪拌した。50% w/w NaOHを添加することにより、溶液のpHを1.2から4.0に上げた。

【0155】

さらに50 gの固体NaOHを添加し、10分かけて反応混合物を65℃に加熱した。 $H_2O_2$ （26 mL、30% w/w）を添加し、反応混合物をさらに1時間攪拌した。

【0156】

40

50% w/w  $H_2SO_4$ を添加することにより、溶液のpHを12.0から10.5に下げ、一晚冷却し、次いで、Advantec AMI UHP攪拌式セルを使用して限外濾過した。

【0157】

30 kDa膜を使用して、最初に反応混合物を500 mLに濃縮し、次いで、保持液（>30 kDa分画）を500 mLの蒸留水で洗浄し、500 mLに再濃縮した。洗浄／再濃縮をさらに3回繰り返した。透過物（<30 kDa分画）は、濃縮、続いて、4回の洗浄および再濃縮の同じ手順を受けたが、今回は、10 kDa膜を使用した。最終保持液（両方とも10～30 kDaおよび>30 kDa分画）を回収し、凍結乾燥させた。

【0158】

50

98%の発熱因子の減少（LALにより測定された）が両分画において見られた。

【0159】

実施例22：低レベルの過氧化物および高レベルのアルカリと接触させ、続いて限外濾過によりワカメからのフコイダンの原位置単離、精製、および発熱物質除去。

海藻（5.0g、ワカメ）を、前に55℃に加熱された100gの0.5%w/w  $H_2SO_4$ に懸濁した。得られたpH1.8の懸濁液を、50℃で4時間攪拌し、次いで、珪藻土で覆われたセルロースフィルタを通して濾過した。次いで、10%w/w NaOHを用いて濾液のpHを11.0に上げ、攪拌しながら溶液を45℃に加熱した。この溶液に、0.5mLの30%w/w  $H_2O_2$ を添加し、10%w/w NaOHを添加することにより、溶液のpHをpH10.9超に維持した。1時間後、溶液を加熱から取り外し、10%w/w  $H_2SO_4$ でpHを5.01に下げた。次いで、50mLに濃縮し、凍結乾燥させる前に、冷却した溶液を、Amicon攪拌式セルを通して濾過し、保持液を50mLの発熱物質除去された蒸留水で3回洗浄した。精製された白色のフコイダンの10.8%の単離された収率を得た。

10

【0160】

本発明はいくつかの別個の態様に関して説明され、ある特定の実施形態および／または好ましい特徴が各態様に対して開示されてきたが、様々な実施形態または優先物（*preferences*）のいずれかが任意の態様と併用して実施することが可能であることが想定されることを理解されたい。さらに、任意の所与の態様の特徴は、任意の他の態様の特徴と共に実施することができる。

20

【0161】

本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、他の実施形態に含まれるいくつかの特徴を含むが、他の特徴を含まないが、異なる実施形態の特徴の組み合わせは、当業者によって理解されるように、本発明の範囲内であり、異なる実施形態を形成することが意図される。

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ドラガー, チャールズ  
オーストラリア国, タスマニア 7008, ニュー タウン, ウェンドーヴァー プレイス 7
- (72)発明者 フィットン, ジャネット ヘレン  
オーストラリア国, タスマニア 7170, ケンブリッジ, ケネディ・ドライブ 249
- (72)発明者 ガーディナー, ヴィキーマン  
オーストラリア国, タスマニア 7170, ケンブリッジ, ケネディ・ドライブ 249
- (72)発明者 ストリンジャー, ダミエン  
オーストラリア国, タスマニア 7170, ケンブリッジ, ケネディ・ドライブ 249
- (72)発明者 カーピニエック, サミュエル  
オーストラリア国, タスマニア 7170, ケンブリッジ, ケネディ・ドライブ 249

審査官 伊藤 幸司

- (56)参考文献 特表2002-530440 (JP, A)  
国際公開第2011/088267 (WO, A1)  
特表2010-519383 (JP, A)  
特開昭58-118518 (JP, A)  
DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES Endotoxins:Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation, Third Edition, 2007年, 167, pp.301-327

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C08B 37/00  
CAplus/REGISTRY (STN)