

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-175143

(P2009-175143A)

(43) 公開日 平成21年8月6日(2009.8.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 27/62 (2006.01)	G O 1 N 27/62 V	2 G O 4 1
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 S	4 C O 8 4
G O 1 N 27/64 (2006.01)	G O 1 N 27/64 B	4 C O 8 6
C O 8 B 37/10 (2006.01)	C O 8 B 37/10	4 C O 9 0
A 6 1 K 31/726 (2006.01)	A 6 1 K 31/726	
審査請求 有 請求項の数 25 O L (全 91 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-4460 (P2009-4460)	(71) 出願人	504346293
(22) 出願日	平成21年1月13日 (2009.1.13)		モメンタ ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2003-576923 (P2003-576923) の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ウェスト ケンドール ストリート 675
原出願日	平成15年3月11日 (2003.3.11)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/363, 240		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成14年3月11日 (2002.3.11)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	60/383, 903	(72) 発明者	ベンカタラマン ガネッシュ
(32) 優先日	平成14年5月28日 (2002.5.28)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベッドフォード コンコルド ロード 215
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/393, 973		
(32) 優先日	平成14年7月5日 (2002.7.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(特許庁注：以下のものは登録商標)		最終頁に続く	

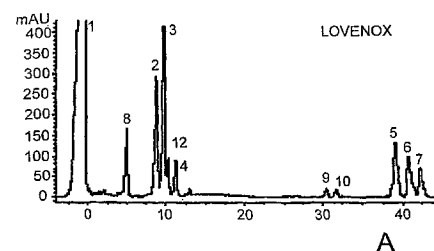
(54) 【発明の名称】 硫酸化多糖類の分析

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 不均一な硫酸化多糖類集団の分析およびモニタリング方法。

【解決手段】 多糖類を含む組成物試料を分析する方法であって、試料の構造特徴が以下から選択される一つまたは複数の一次産出物を決定することによって提供される方法：a. 一つまたは複数の成分糖または二糖の存在または；b. ブロック成分が、複数の糖または多糖で構成される成分である、一つまたは複数のブロック成分の存在または量；c. 糖の代表物が、検出可能性を増強するように改変された糖である、一つまたは複数の糖の代表物の存在または量；d. 三次元構造の指標、または三次元構造に関連したパラメータの存在または量；およびe. 改変された糖が、調製物を作製するために用いられる開始材料に存在するが、調製物を産生する際に変化した糖である、一つまたは複数の改変糖の存在または量。

【選択図】 図1 A



【特許請求の範囲】

【請求項1】

組成物の構造特徴を提供して、それによって組成物を分析する段階を含む、多糖類を含む組成物を含む試料を分析する方法。

【請求項2】

構造特徴が、以下から選択される一つまたは複数の一次産出物を決定することによって提供される、請求項1記載の方法：

- a. 一つまたは複数の成分糖または二糖の存在または量；
- b. ブロック成分が、複数の糖または多糖で構成される成分である、一つまたは複数のブロック成分の存在または量；
- c. 糖の代表物が、検出可能性を増強するように改変された糖である、一つまたは複数の糖の代表物の存在または量；
- d. 三次元構造の指標、または三次元構造に関連したパラメータの存在または量；および
- e. 改変された糖が、調製物を作製するために用いられる開始材料に存在するが、調製物を産生する際に変化した糖である、一つまたは複数の改変糖の存在または量。

10

【請求項3】

構造特徴が、以下から選択される一つまたは複数の二次産出物を決定することによって提供される、請求項1記載の方法：

- a. 総電荷；
- b. 電荷／質量比；
- c. 電荷密度；
- d. 配列；
- e. 活性部位の位置；および
- f. 多分散性。

20

【請求項4】

構造特徴が、MALDI-MS、ESI-MS、CE、HPLC、FPLC、蛍光測光法、ELISA、NMR UV、色素産生アッセイ法、比色アッセイ法、他の分光光度技術からなる群より選択される一つまたは複数の方法によって決定される、請求項1記載の方法。

【請求項5】

組成物が、ヘパリン、合成ヘパリン、およびLMWHからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

30

【請求項6】

組成物が一つまたは複数のタグをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項7】

組成物が、抗体、レクチン、またはタンパク質をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】

組成物が完全または不完全に消化される、請求項1記載の方法。

【請求項9】

組成物が化学的に消化される、請求項8記載の方法。

【請求項10】

組成物が酵素的に消化される、請求項8記載の方法。

40

【請求項11】

酵素的消化がヘパリン分解酵素によって行われる、請求項10記載の方法。

【請求項12】

ヘパリン分解酵素が、ヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼならびにその機能的に活性な変種および断片からなる群より選択される、請求項11記載の方法。

【請求項13】

化学的消化が、 H_2O_2 、 Cu^+ および H_2O_2 、亜硝酸イソアミル、亜硝酸、ベンジルエステル、またはアルカリ処理からなる群より選択される化学物質によって行われる、請求項9記

50

載の方法。

【請求項 14】

以下の段階をさらに含む、請求項1記載の方法：

- a. それぞれの組成物の構造特徴を決定するために複数の組成物を分析する段階；
- b. それぞれの組成物の生物活性を検出する段階；
- c. 組成物の構造特徴を検出された生物活性と比較する段階；および
- d. 生物活性を構造特徴またはその成分と関連させる段階。

【請求項 15】

生物活性が、望ましくない細胞成長または増殖；細胞遊走、接着、または活性化；脈管新生；血管新生；凝固；および炎症プロセスのような細胞活性に及ぼす作用からなる群より選択される、請求項14記載の方法。

10

【請求項 16】

生物活性に、抗第Xa因子活性、抗第IIa因子活性、FGF結合、プロタミン中和、またはPF4結合が含まれる、請求項14記載の方法。

【請求項 17】

特定の適応のためのヘパリン、合成ヘパリン、またはLMWH調製物を設計するために相関情報を用いることをさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項 18】

特定の適応が、腎障害、癌、炎症、アルツハイマー病、自己免疫、股関節骨折を含む骨折、および移植からなる群より選択される、請求項17記載の方法。

20

【請求項 19】

ヒトまたは動物被験体が、血栓症のような凝固関連疾患、心血管疾患、血管疾患、もしくは心房細動；偏頭痛、アテローム性動脈硬化症；自己免疫疾患もしくはアトピー障害のような炎症障害；アレルギー；喘息、気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、もしくは肺再灌流損傷のような呼吸器障害；癌もしくは転移障害；眼の血管形成障害のような血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎；アルツハイマー病からなる群より選択される病態を有するか、そのリスクがあるか、もしくはそれらから回復途中であるか、または、外科技法、臓器移植、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、経皮冠動脈介入（PCI）、ステント留置、血管形成術、冠動脈バイパス移植手術（CABG）を受けているかもしくは受けたことがある、請求項17記載の方法。

30

【請求項 20】

特定の適応に、細胞増殖もしくは増殖；脈管新生；血管新生；細胞遊走、接着、または活性化；および炎症プロセスのような細胞活性が含まれる、請求項17記載の方法。

【請求項 21】

以下の段階を含む、生物学的同等性を決定する方法：

- a. 第一の組成物の構造特徴を提供または決定する段階；
- b. 第一の組成物の生物学的利用能を提供または決定する段階；
- c. 第二の組成物の構造特徴を提供または決定する段階；
- d. 第二の組成物の生物学的利用能を提供または決定する段階；および
- e. 第一の組成物および第二の組成物の構造組成および生物学的利用能を比較して、このように組成物の生物学的同等性を決定する段階。

40

【請求項 22】

生物学的利用能が、以下を含む方法によって決定される、請求項20記載の方法：

- a. 一つまたは複数の被験体における組成物の吸収特性を決定する段階；および
- b. 一つまたは複数の被験体における組成物の消失特性を決定する段階。

【請求項 23】

被験体がヒトもしくは動物被験体または実験動物である、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

以下を含む、多糖類薬物を分析する方法：

- a. 予め選択した患者反応の第一のレベルを有する薬物の第一のバッチに関する、第一の

50

構造特徴を決定する段階；

- b. 予め選択した患者反応の第二のレベルを有する薬物の第二のバッチに関する、第二の構造特徴を決定する段階；および
- c. 第一と第二の構造特徴決定を比較して、予め選択した患者反応レベルを有する薬物の性質間の相関の有無を決定する段階。

【請求項 25】

多糖類薬物がヘパリン、合成ヘパリン、またはLMWHである、請求項24記載の方法。

【請求項 26】

予め選択した患者反応が、薬物に対する陰性または陽性反応の予め選択したレベルである、請求項24記載の方法。

【請求項 27】

望ましくない患者反応が比較的高レベルである薬物の第一のバッチの構造特徴を決定する段階、望ましくない患者反応が比較的低レベルである薬物の第二のバッチの構造特徴を決定する段階、および患者反応の高レベルまたは低レベルに相関した一次または二次産出物を選択する段階を含む、請求項24記載の方法。

【請求項 28】

以下を含む、多糖類の混合集団を含む組成物を分析する方法：

- a. 組成物または組成物を含む試料を提供する段階；および
- b. 以下の一つまたは複数であるか否かを決定して、それによって組成物を分析する段階：
組成物において、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ が予め選択した範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ が予め選択した範囲で存在する； $\Delta UH_{NS,6S}$ が予め選択した範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ が予め選択した範囲で存在する； ΔUH_{NS} が予め選択した範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ が予め選択した範囲で存在する； $\Delta UH_{NAc,6S}$ が予め選択した範囲で存在する；または $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその混合物が予め選択した範囲で存在する。

【請求項 29】

以下の段階を含む、多糖類の混合集団を含む組成物を分析する方法：

- a. 組成物または組成物を含む試料を提供する段階；および
- b. 以下の一つまたは複数であるか否かを決定して、それによって組成物を分析する段階：
組成物において、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ が15～85モル%の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ が0.1～20モル%の範囲で存在する； $\Delta UH_{NS,6S}$ が0.1～20モル%の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ が0.1～10モル%の範囲で存在する； ΔUH_{NS} が0.1～10モル%の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ が0.1～5モル%の範囲で存在する； $\Delta UH_{NAc,6S}$ が0.1～15モル%の範囲で存在する；または $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ またはその混合物が0.1～20モル%の範囲で存在する。

【請求項 30】

決定する段階に、一つまたは複数の非天然の糖が0.1～5モル%、0.1～2.5モル%、または0.1～1モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

決定する段階に、ピーク9が0.1～5モル%、0.1～2.5モル%、または0.1～1モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項 32】

決定する段階に、ピーク10が0.1～5モル%、0.1～2.5モル%、または0.1～1モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項 33】

決定する段階に、ピーク11が0.1～10モル%、1～5モル%、または2～4モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項 34】

多糖類がグリコサミノグリカンである、請求項29記載の方法。

【請求項 35】

グリコサミノグリカンがHLGAGである、請求項34記載の方法。

【請求項 36】

HLGAGが未分画ヘパリンである、請求項35記載の方法。

【請求項 37】

HLGAGが分画ヘパリンである、請求項35記載の方法。

【請求項 38】

分画ヘパリンがLMWHである、請求項37記載の方法。

【請求項 39】

LMWHがエノキサパリンである、請求項38記載の方法。

10

【請求項 40】

LMWHがダルテパリンである、請求項38記載の方法。

【請求項 41】

LMWHがアルデパリンである、請求項38記載の方法。

【請求項 42】

LMWHがセルトパリンである、請求項38記載の方法。

【請求項 43】

LMWHがパルナパリンである、請求項38記載の方法。

【請求項 44】

LMWHがチンザパリンである、請求項38記載の方法。

20

【請求項 45】

LMWHがナドロパリンである、請求項38記載の方法。

【請求項 46】

LMWHがレビパリンである、請求項38記載の方法。

【請求項 47】

LMWHがフォンダパリヌクスである、請求項38記載の方法。

【請求項 48】

決定が以下の段階を含む、請求項29記載の方法：

- a. 任意にHLGAGを分画する段階；
- b. 少なくとも一つの薬剤によってHLGAGを消化する段階；および
- c. 消化したHLGAGの分子量を決定する段階。

30

【請求項 49】

薬剤が酵素である、請求項48記載の方法。

【請求項 50】

酵素がヘパリン分解酵素である、請求項49記載の方法。

【請求項 51】

ヘパリン分解酵素が、ヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼ、ならびにその機能的に活性な変種および断片からなる群より選択される、請求項50記載の方法。

【請求項 52】

薬剤が化学物質、例えば、 H_2O_2 、 Cu^+ および H_2O_2 、亜硝酸イソアミル、亜硝酸、ベンジルエステル、またはアルカリ処理からなる群より選択される化学物質である、請求項48記載の方法。

40

【請求項 53】

決定する段階に、以下であるか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法：
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ が組成物において15～85モル%の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ が0.1～20モル%の範囲で存在する； $\Delta UH_{NS,6S}$ が0.1～20モル%の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ が0.1～10モル%の範囲で存在する； ΔUH_{NS} が0.1～10モル%の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ が0.1～5モル%の範囲で存在する； $\Delta UH_{NAc,6S}$ が0.1～15モル%の範囲で存在する；および $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$

50

またはその混合物が0.1～20モル％の範囲で存在する。

【請求項54】

決定する段階に、以下の二つ、三つ、四つ、五つ、六つ、または七つであるか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法：組成物において、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ が15～85モル％の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ が0.1～20モル％の範囲で存在する； $\Delta UH_{NS,6S}$ が0.1～20モル％の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ が0.1～10モル％の範囲で存在する； ΔUH_{NS} が0.1～10モル％の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ が0.1～5モル％の範囲で存在する； $\Delta UH_{NAC,6S}$ が0.1～15モル％の範囲で存在する；または $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ またはその混合物が0.1～20モル％の範囲で存在する。

10

【請求項55】

決定する段階に、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ が45～80モル％、50～75モル％、55～70モル％、または60～65モル％の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項56】

決定する段階に、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ が2～15モル％、5～10モル％、または6～9モル％の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項57】

決定する段階に、 $\Delta UH_{NS,6S}$ が5～18モル％、7～15モル％、または10～12モル％の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項58】

決定する段階に、 $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ が0.5～7.5モル％、1～5モル％、または1.5～3モル％の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

20

【請求項59】

決定する段階に、 ΔUH_{NS} が1～7モル％、2～5モル％、または3～4モル％の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項60】

決定する段階に、 $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ が0.1～5モル％、0.5～3モル％、または1～2.5モル％の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項61】

決定する段階に、 $\Delta UH_{NAC,6S}$ が0.1～12モル％、0.5～10モル％、または1～6モル％の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

30

【請求項62】

決定する段階に、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ またはその混合物が1～15モル％、2～10モル％、3～8モル％、または5～7％の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる、請求項29記載の方法。

【請求項63】

試料が、ヒトまたは動物被験体、実験動物、細胞、または市販の多糖類調製物、例えばUFHもしくはLMWH、例えばエノキサパリンに由来する、請求項28記載の方法。

【請求項64】

市販の多糖類調製物がUFHまたはLMWHである、請求項63記載の方法。

40

【請求項65】

LMWHがエノキサパリン、ダルテパリン、アルデパリン、セルトパリン、パルナパリン、チンザパリン、ナドロパリン、レビパリン、またはフォンダパリヌクスである、請求項64記載の方法。

【請求項66】

細胞または被験体における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターする段階が含まれる、請求項28記載の方法。

【請求項67】

産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定する段階が含まれる、請求項1記載の方法。

50

【請求項 68】

決定の結果としてバッチを選択する段階をさらに含む、請求項67記載の方法。

【請求項 69】

決定結果を予め選択された値、例えば参照標準値と比較する段階をさらに含む、請求項68記載の方法。

【請求項 70】

試料の一つまたは複数の生物活性を検出する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 71】

測定される生物活性に、望ましくない細胞成長または増殖；細胞遊走、接着、または活性化；脈管新生；血管新生；凝固；HIT性向；および炎症プロセスのような細胞活性に及ぼす作用が含まれる、請求項70記載の方法。

10

【請求項 72】

測定される生物活性に、抗第Xa因子活性、抗第IIa因子活性、FGF結合、プロタミン中和、またはPF4結合が含まれる、請求項70記載の方法。

【請求項 73】

一つまたは複数の生物活性を試料の構造特徴に相関させる段階をさらに含む、請求項70記載の方法。

【請求項 74】

生物活性を構造特徴に相関させる情報を有する参照標準値を作製する段階をさらに含む、請求項70記載の方法。

20

【請求項 75】

以下の段階を含む、LMWH調製物の活性レベルを予測する方法：

- a. LMWH調製物の構造特徴を決定する段階；
- b. 決定された構造特徴を請求項74記載の参照標準値と比較して、それによってLMWH調製物の活性レベルを予測する段階。

【請求項 76】

活性が、望ましくない細胞成長または増殖；細胞遊走、接着、または活性化；脈管新生；血管新生；凝固；および炎症プロセスのような細胞活性に及ぼす作用からなる群より選択される、請求項75記載の方法。

【請求項 77】

活性が、抗第Xa因子活性、抗第IIa因子活性、FGF結合、プロタミン中和、またはPF4結合からなる群より選択される、請求項75記載の方法。

30

【請求項 78】

以下の段階を含む、選択された生物活性を有するヘパリンの試料を分析する方法：

- a. 試料を提供する段階；および
- b. 選択された活性に相関することが知られている成分が試料中に存在するか否かを決定して、それによって試料を分析する段階。

【請求項 79】

成分レベルを決定する段階をさらに含む、請求項78記載の方法。

【請求項 80】

測定される生物活性に、望ましくない細胞成長または増殖；細胞遊走、接着、または活性化；脈管新生；血管新生；凝固；および炎症プロセスのような細胞活性に及ぼす作用が含まれる、請求項78記載の方法。

40

【請求項 81】

測定される生物活性に、抗第Xa因子活性、抗第IIa因子活性、FGF結合、プロタミン中和、またはPF4結合が含まれる、請求項78記載の方法。

【請求項 82】

$U_{2S}H_{NS,6S}$ の存在が、PF4結合活性の指標である、請求項78記載の方法。

【請求項 83】

$U_{2S}H_{NS,6S}$ が、0.1～100モル%の範囲で存在する、請求項82記載の方法。

50

【請求項 84】

$\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその混合物の存在が抗第Xa因子活性の指標である、請求項78記載の方法。

【請求項 85】

$\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ またはその混合物が、0.1~100モル%の範囲で存在する、請求項84記載の方法。

【請求項 86】

試料が、ヒトまたは動物被験体、実験動物、細胞、または市販の多糖類調製物、例えばUFHまたはLMWH、例えばエノキサパリンに由来する、請求項78記載の方法。

10

【請求項 87】

ヒトまたは動物被験体が、外科的介入、例えば血管形成術、ステント留置、心肺バイパス技法、組織または臓器移植、冠動脈再生術、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、PCI、および人工器官置換手術を受けているか、受けるリスクがあるか、またはそれらから回復途中である、請求項86記載の方法。

【請求項 88】

ヒトまたは動物被験体が、血液またはGFRまたは尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNレベルによって測定した場合に異常な腎機能を有する患者である、請求項86記載の方法。

【請求項 89】

ヒトまたは動物被験体が、ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症を有するかまたは有するリスクがある、請求項86記載の方法。

20

【請求項 90】

ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症がHITである、請求項89記載の方法。

【請求項 91】

ヒトまたは動物被験体が、過体重または肥満、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の過体重である被験体である、請求項86記載の方法。

【請求項 92】

ヒトまたは動物被験体が、極めて痩せているかもしくは虚弱である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の低体重であるか、または免疫不全症を罹患している、請求項86記載の方法。

30

【請求項 93】

免疫不全症がHIV/AIDSである、請求項92記載の方法。

【請求項 94】

ヒト被験体が小児患者である、請求項86記載の方法。

【請求項 95】

ヒトまたは動物被験体が妊娠している、請求項86記載の方法。

【請求項 96】

ヒトまたは動物被験体が脊髄または硬膜外血腫を有する患者である、請求項86記載の方法。

40

【請求項 97】

ヒト被験体が人工心臓弁を有する患者である、請求項86記載の方法。

【請求項 98】

ヒトまたは動物被験体がATIII欠損または異常を有する、請求項86記載の方法。

【請求項 99】

ヒトまたは動物被験体が第Xa因子欠損または異常を有する、請求項86記載の方法。

【請求項 100】

細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターする段階をさらに含む、請求項78記載の方法。

【請求項 101】

50

産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定する段階が含まれる、請求項78記載の方法。

【請求項102】

決定の結果としてバッチを選択する段階をさらに含む、請求項101記載の方法。

【請求項103】

測定結果を予め選択した値、例えば参照標準値と比較する段階をさらに含む、請求項78記載の方法。

【請求項104】

以下の段階を含む、LMWHの試料を分析する方法：

a. 試料を提供する段階；および

b. 非天然の糖、例えば改変糖が試料に存在するか否かを決定して、それによって試料を分析する段階。

【請求項105】

非天然の糖がp9、p10、およびp11からなる群より選択される、請求項104記載の方法。

【請求項106】

非天然の糖がピーク9を含む、請求項105記載の方法。

【請求項107】

非天然の糖がピーク10を含む、請求項105記載の方法。

【請求項108】

非天然の糖がピーク11を含む、請求項105記載の方法。

【請求項109】

試料が、ヒトまたは動物被験体、実験動物、細胞、または市販の多糖類調製物、例えばUFHまたはLMWH、例えばエノキサパリンに由来する、請求項105記載の方法。

【請求項110】

ヒトまたは動物被験体が、血栓症のような凝固関連疾患、心血管疾患、血管疾患、もしくは心房細動；偏頭痛、アテローム性動脈硬化症；自己免疫疾患またはアレルギーのような炎症障害；アレルギー；喘息、気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、もしくは肺再灌流損傷のような呼吸器障害；癌もしくは転移障害；眼の血管形成障害のような血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎；アルツハイマー病からなる群より選択される病態を有するか、そのリスクがあるか、もしくはそれから回復途中であるか、または、外科技法、臓器移植、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、経皮冠動脈介入（PCI）、ステント留置、血管形成術、冠動脈バイパス移植手術（CABG）を受けているかもしくは受けたことがある、請求項109記載の方法。

【請求項111】

ヒトまたは動物被験体が、血液または尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNレベルによって測定した場合に異常な腎機能を有する患者である、請求項109記載の方法。

【請求項112】

ヒトまたは動物被験体が、ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症、例えばHITを有するかまたは有するリスクがある、請求項109記載の方法。

【請求項113】

ヒトまたは動物被験体が、過体重または肥満、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の過体重である被験体である、請求項109記載の方法。

【請求項114】

ヒトまたは動物被験体が、極めて痩せているかもしくは虚弱である、例えば20、30、40、50ポンドもしくはそれ以上の低体重であるか、または免疫不全症を罹患している被験体である、請求項109記載の方法。

【請求項115】

ヒト被験体が小児患者である、請求項109記載の方法。

【請求項116】

ヒトまたは動物被験体が妊娠している、請求項109記載の方法。

【請求項 1 1 7】

ヒトまたは動物被験体が脊髄または硬膜外血腫を有する患者である、請求項109記載の方法。

【請求項 1 1 8】

ヒト被験体が人工心臓弁を有する患者である、請求項109記載の方法。

【請求項 1 1 9】

細胞または被験体における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターする段階をさらに含む、請求項104記載の方法。

【請求項 1 2 0】

産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定する段階が含まれる、請求項104記載の方法。

【請求項 1 2 1】

決定の結果としてバッチを選択する段階をさらに含む、請求項120記載の方法。

【請求項 1 2 2】

決定結果を、予め選択した値と比較することをさらに含む、請求項121記載の方法。

【請求項 1 2 3】

予め選択した値が参照標準値である、請求項122記載の方法。

【請求項 1 2 4】

20%未満もしくはそれに等しい部分が<2000 Da種であり、68%を超えるもしくはそれに等しい部分が2000~8000 Da種であり、かつ18%未満もしくはそれに等しい部分が>8000 Da種である多糖類集団、または市販のエノキサパリン調製物において認められるものと同じ多糖類集団であって、好ましくは平均分子量が約4500 Daである多糖類集団が試料に含まれる、請求項104記載の方法。

【請求項 1 2 5】

試料が約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する、請求項104記載の方法。

【請求項 1 2 6】

試料のpHが5.5~7.5である、請求項104記載の方法。

【請求項 1 2 7】

試料の一つまたは複数の成分がタグを付けられるか、または標識される、請求項104記載の方法。

【請求項 1 2 8】

以下の段階を含む、試料または被験体を分析する方法：

- a. 試料を提供する段階；
- b. $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその断片もしくは複数の断片からなる群より選択される一つまたは複数の成分が試料中に存在するか否かを決定する段階；および
- c. 任意に、成分または複数成分のレベルを測定して、それによって被験体をモニターする段階。

【請求項 1 2 9】

試料が被験体に由来する、請求項128記載の方法。

【請求項 1 3 0】

試料がヒトもしくは動物被験体または実験動物に由来する、請求項129記載の方法。

【請求項 1 3 1】

被験体にヘパリンを投与する前に、基準値を確立する段階をさらに含む、請求項128記載の方法。

【請求項 1 3 2】

$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ ； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ ； $\Delta UH_{NS,6S}$ ； $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ ； ΔUH_{NS} ； $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ ；または $\Delta UH_{NAC,6S}$ が試料中に存在するか否かを決定する段階をさらに含む、請求項128記載の方法。

【請求項 1 3 3】

10

20

30

40

50

ピーク9、ピーク10、またはピーク11の一つまたは複数の成分が試料中に存在するか否かを決定する段階をさらに含む、請求項128記載の方法。

【請求項134】

ヘパリンがUFHを含む、請求項128記載の方法。

【請求項135】

ヘパリンがLMWHを含む、請求項128記載の方法。

【請求項136】

ヘパリンが抗第Xa因子活性を有するLMWHを含む、請求項128記載の方法。

【請求項137】

LMWHが、M118、M115、M411、M108、M405、M312、エノキサパリン；ダルテパリン；セルトパリン；アルデパリン；ナドロパリン；パルナパリン；レビパリン；チンザパリン、またはフォンダパリヌクスからなる群より選択される、請求項135記載の方法。

【請求項138】

試料が体液を含む、請求項128記載の方法。

【請求項139】

体液が血液を含むか、または血液に由来する、請求項138記載の方法。

【請求項140】

体液が尿を含む、請求項138記載の方法。

【請求項141】

予め選択された時間間隔で段階a～cを1回または複数回反復することをさらに含む、請求項128記載の方法。

【請求項142】

予め選択した時間間隔が2～24時間毎、4～12時間毎、6～10時間毎、または連続的モニタリングである、請求項141記載の方法。

【請求項143】

細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターする段階をさらに含む、請求項128記載の方法。

【請求項144】

産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定する段階が含まれる、請求項128記載の方法。

【請求項145】

決定の結果としてバッチを選択する段階をさらに含む、請求項144記載の方法。

【請求項146】

決定結果を予め選択した値と比較する段階をさらに含む、請求項128記載の方法。

【請求項147】

予め選択された値が参照標準値である、請求項146記載の方法。

【請求項148】

決定が以下の段階を含む、請求項128記載の方法：

- a. 試料を精製する段階；
- b. 任意に試料を分画する段階；
- c. 試料に少なくとも一つの薬剤を接触させる段階；および
- d. 消化した試料の構造特徴を決定する段階。

【請求項149】

薬剤が酵素である、請求項148記載の方法。

【請求項150】

酵素がヘパリン分解酵素である、請求項149記載の方法。

【請求項151】

ヘパリン分解酵素が、ヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼならびにその機能的に活性な変種および断片からなる群より選択される、請求項150記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 5 2】

薬剤が化学物質である、請求項151記載の方法。

【請求項 1 5 3】

薬剤が、 H_2O_2 、 Cu^+ および H_2O_2 、亜硝酸イソアミル、亜硝酸、ベンジルエステルまたはアルカリ処理からなる群より選択される化学物質である、請求項152記載の方法。

【請求項 1 5 4】

決定する段階が以下の段階を含む、請求項128記載の方法：

- a. 任意に試料を精製する段階；
- b. 成分の一つまたは複数に対して特異的な試薬に試料を接触させる段階；；および
- c. 成分に対する抗体の結合を検出して、それによって成分の存在を決定する段階。

10

【請求項 1 5 5】

成分の一つまたは複数に対して特異的な試薬がペプチド、タンパク質、レクチン、または抗体である、請求項154記載の方法。

【請求項 1 5 6】

決定が、 $\Delta UH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$ 、 $\Delta UH_{NS, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S}$ 、 $\Delta UH_{NS, 6S}GH_{NS, 3S}$ 、またはその断片もしくは複数の断片からなる群より選択される一つまたは複数の成分が、0.1~20モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階を含む、請求項154記載の方法。

【請求項 1 5 7】

ヒトまたは動物被験体が、血栓症のような凝固関連疾患、心血管疾患、血管疾患、もしくは心房細動；偏頭痛、アテローム性動脈硬化症；自己免疫疾患またはアトピー障害のような炎症障害；アレルギー；喘息、気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、もしくは肺再灌流損傷のような呼吸器障害；癌もしくは転移障害；眼の血管形成障害のような血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎；アルツハイマー病からなる群より選択される病態を有するか、そのリスクがあるか、もしくはそれから回復途中であるか、または、外科技法、臓器移植、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、経皮冠動脈介入（PCI）、ステント留置、血管形成術、冠動脈バイパス移植手術（CABG）を受けているかもしくは受けたことがある、請求項130記載の方法。

20

【請求項 1 5 8】

ヒトまたは動物被験体が、血液または尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNレベルによって測定した場合に異常な腎機能を有する患者である、請求項130記載の方法。

30

【請求項 1 5 9】

ヒトまたは動物被験体が、ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症、例えばHITを有するかまたは有するリスクがある、請求項130記載の方法。

【請求項 1 6 0】

ヒトまたは動物被験体が、過体重または肥満、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の過体重である被験体である、請求項130記載の方法。

【請求項 1 6 1】

ヒトまたは動物被験体が、極めて痩せているかもしくは虚弱である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の低体重であるか、または免疫不全症を罹患している被験体である、請求項130記載の方法。

40

【請求項 1 6 2】

ヒト被験体が小児患者である、請求項130記載の方法。

【請求項 1 6 3】

ヒトまたは動物被験体が妊娠している、請求項130記載の方法。

【請求項 1 6 4】

ヒトまたは動物被験体が脊髄または硬膜外血腫を有する患者である、請求項130記載の方法。

【請求項 1 6 5】

50

ヒト被験体が人工心臓弁を有する患者である、請求項130記載の方法。

【請求項166】

20%未満もしくはそれに等しい部分が<2000 Da種であり、68%を超えるもしくはそれに等しい部分が2000~8000 Da種であり、かつ18%未満もしくはそれに等しい部分が>8000 Da種である多糖類集団、または市販のエノキサパリン調製物において認められるものと同じ多糖類集団であって、好ましくは平均分子量が約4500 Daである多糖類集団が試料に含まれる、請求項116記載の方法。

【請求項167】

多糖類、例えばLMWHが約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する、請求項166記載の方法。

【請求項168】

試料のpHが5.5~7.5である、請求項166記載の方法。

【請求項169】

試料の一つまたは複数の成分がタグを付けられるか、または標識される、請求項128記載の方法。

【請求項170】

以下の段階を含む、試料を分析する方法：

- a. 試料を提供する段階；
- b. 抗第IIa因子活性に関連することが知られている一つまたは複数の構造特徴産出物が試料中に存在するか否かを決定する段階；および
- c. 任意に、成分または複数の成分のレベルを決定して、それによって試料または被験体を分析する段階。

【請求項171】

試料が被験体に由来する、請求項170記載の方法。

【請求項172】

被験体がヒトもしくは動物被験体または実験動物である、請求項171記載の方法。

【請求項173】

被験体が抗第IIa因子活性を有するヘパリンを投与されている、請求項170記載の方法。

【請求項174】

抗第IIa因子活性に関連した構造特徴産出物が、一つまたは複数の他の二糖単位と共に $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、または $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ の少なくとも一つを含む多糖類である、請求項170記載の方法。

【請求項175】

被験体にヘパリンを投与する前に成分または複数の成分の基準値を確立する段階をさらに含む、請求項170記載の方法。

【請求項176】

細胞または被験体における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターする段階をさらに含む、請求項170記載の方法。

【請求項177】

被験体の実験動物である、請求項176記載の方法。

【請求項178】

産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定する段階が含まれる、請求項170記載の方法。

【請求項179】

決定の結果としてバッチを選択する段階をさらに含む、請求項178記載の方法。

【請求項180】

決定の結果を予め選択した値と比較する段階をさらに含む、請求項170記載の方法。

【請求項181】

予め選択した値が参照標準値である、請求項179記載の方法。

【請求項182】

ヘパリンがUFHを含む、請求項170記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 183】

ヘパリンがLMWHを含む、請求項170記載の方法。

【請求項 184】

ヘパリンが抗第IIa因子活性を有するLMWHを含む、請求項170記載の方法。

【請求項 185】

LMWHが、M118、M115、M411、M108、M405、M312、エノキサパリン；ダルテパリン；セルトパリン；アルデパリン；ナドロパリン；バルナパリン；レビパリン；チンザパリン、およびフォンダパリヌクスからなる群より選択される、請求項184記載の方法。

【請求項 186】

試料が体液を含む、請求項170記載の方法。

10

【請求項 187】

体液が血液を含むか、または血液に由来する、請求項186記載の方法。

【請求項 188】

体液が尿を含む、請求項186記載の方法。

【請求項 189】

予め選択された時間間隔で段階a～cを1回または複数回反復する段階をさらに含む、請求項170記載の方法。

【請求項 190】

予め選択した時間間隔が2～24時間毎、4～12時間毎、6～10時間毎、または連続的である、請求項189記載の方法。

20

【請求項 191】

決定が以下の段階を含む、請求項170記載の方法：

- a. 試料を精製する段階；
- b. 任意に試料を分画する段階；
- c. 試料を少なくとも一つの薬剤に接触させる段階；
- d. 消化した試料の構造特徴を決定する段階。

【請求項 192】

薬剤が酵素である、請求項191記載の方法。

【請求項 193】

酵素がヘパリン分解酵素である、請求項192記載の方法。

30

【請求項 194】

ヘパリン分解酵素が、ヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼ、ならびにその機能的に活性な変種および断片からなる群より選択される、請求項193記載の方法。

【請求項 195】

薬剤が、例えば H_2O_2 もしくは Cu^+ および H_2O_2 による酸化的解重合、亜硝酸イソアミルもしくは亜硝酸による脱アミノ切断、またはアルカリ処理もしくはヘパリナーゼによるヘパリンのベンジルエステルを用いた β -脱離切断からなる群より選択される化学物質である、請求項191記載の方法。

【請求項 196】

決定する段階が以下の段階を含む、請求項191記載の方法：

40

- a. 任意に試料を精製する段階；
- b. 成分の一つまたは複数に対して特異的な抗体に試料を接触させる段階；；および
- c. 成分に対する抗体の結合を検出する段階
- d. それによって成分の存在を決定する段階。

【請求項 197】

ヒトまたは動物被験体が、血栓症のような凝固関連疾患、心血管疾患、血管疾患、もしくは心房細動；偏頭痛、アテローム性動脈硬化症；自己免疫疾患またはアレルギー障害のような炎症障害；アレルギー；喘息、気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、もしくは肺再灌流損傷のような呼吸器障害；癌もしくは転移障害；眼の血管形成障害のよ

50

うな血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎；アルツハイマー病からなる群より選択される病態を有するか、そのリスクがあるか、もしくはそれから回復途中であるか、または、外科技法、臓器移植、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、経皮冠動脈介入（PCI）、ステント留置、血管形成術、冠動脈バイパス移植手術（CABG）を受けているかもしくは受けたことがある、請求項191記載の方法。

【請求項 1 9 8】

ヒトまたは動物被験体が、血液または尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNレベルによって測定した場合に異常な腎機能を有する患者である、請求項191記載の方法。

【請求項 1 9 9】

ヒトまたは動物被験体が、ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症、例えばHITを有するかまたは有するリスクがある、請求項191記載の方法。

【請求項 2 0 0】

ヒトまたは動物被験体が、過体重または肥満、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の過体重である被験体である、請求項191記載の方法。

【請求項 2 0 1】

ヒトまたは動物被験体が、極めて痩せているかもしくは虚弱である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の低体重であるか、または免疫不全症を罹患している被験体である、請求項191記載の方法。

【請求項 2 0 2】

ヒト被験体が小児患者である、請求項191記載の方法。

【請求項 2 0 3】

ヒトまたは動物被験体が妊娠している、請求項191記載の方法。

【請求項 2 0 4】

ヒトまたは動物被験体が脊髄または硬膜外血腫を有する患者である、請求項191記載の方法。

【請求項 2 0 5】

ヒト被験体が人工心臓弁を有する患者である、請求項191記載の方法。

【請求項 2 0 6】

細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターする段階をさらに含む、請求項191記載の方法。

【請求項 2 0 7】

産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定する段階が含まれる、請求項191記載の方法。

【請求項 2 0 8】

決定の結果としてバッチを選択する段階をさらに含む、請求項207記載の方法。

【請求項 2 0 9】

決定結果を予め選択した値と比較する段階をさらに含む、請求項191記載の方法。

【請求項 2 1 0】

予め選択された値が参照標準値である、請求項209記載の方法。

【請求項 2 1 1】

20%未満もしくはそれに等しい部分が<2000 Da種であり、68%を超えるもしくはそれに等しい部分が2000~8000 Da種であり、かつ18%未満もしくはそれに等しい部分が>8000 Da種である多糖類集団、または市販のエノキサパリン調製物において認められるものと同じ多糖類集団であって、好ましくは平均分子量が約4500 Daである多糖類集団が試料に含まれる、請求項191記載の方法。

【請求項 2 1 2】

多糖類、例えばLMWHが約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する、請求項211記載の方法。

【請求項 2 1 3】

試料のpHが5.5~7.5である、請求項211記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1 4】

試料の一つまたは複数の成分がタグを付けられるか、または標識される、請求項191記載の方法。

【請求項 2 1 5】

以下の段階を含む、試料または被験体を分析する方法：

- a. 試料を提供する段階；
- b. 一つまたは複数の非天然の糖、例えば改変糖が試料中に存在するか否かを決定する段階；および
- c. 任意に、非天然の糖のレベルを決定して、それによって被験体をモニターする段階。

【請求項 2 1 6】

分析する段階が、試料または被験体におけるLMWHをモニターする段階である、請求項215記載の方法。

【請求項 2 1 7】

試料が被験体に由来する、請求項215記載の方法。

【請求項 2 1 8】

被験体がヒトもしくは動物被験体または実験動物である、請求項217記載の方法。

【請求項 2 1 9】

LMWHがエノキサパリンである、請求項216記載の方法。

【請求項 2 2 0】

非天然の糖がベンジル化されている、請求項215記載の方法。

【請求項 2 2 1】

非天然の糖がピーク9およびピーク10の一つまたは複数を含む、請求項215記載の方法。

【請求項 2 2 2】

試料が体液を含む、請求項215記載の方法。

【請求項 2 2 3】

体液が血液を含むか、または血液に由来する、請求項222記載の方法。

【請求項 2 2 4】

体液が尿を含む、請求項222記載の方法。

【請求項 2 2 5】

予め選択された時間間隔で段階a～cを1回または複数回反復することをさらに含む、請求項215記載の方法。

【請求項 2 2 6】

決定が以下の段階を含む、請求項215記載の方法：

- a. 試料を精製する段階；
- b. 任意に試料を分画する段階；
- c. 試料を少なくとも一つの薬剤に接触させる段階；および
- d. 消化した試料の物理化学特性、例えば分子量を決定する段階。

【請求項 2 2 7】

薬剤が酵素である、請求項226記載の方法。

【請求項 2 2 8】

酵素がヘパリン分解酵素である、請求項227記載の方法。

【請求項 2 2 9】

ヘパリン分解酵素が、ヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼならびにその機能的に活性な変種および断片からなる群より選択される、請求項228記載の方法。

【請求項 2 3 0】

薬剤が、化学物質、例えば H_2O_2 もしくは Cu^+ および H_2O_2 による酸化的解重合、亜硝酸イソアミルもしくは亜硝酸による脱アミノ切断、またはアルカリ処理もしくはヘパリナーゼによるヘパリンのベンジルエステルを用いた β -脱離切断からなる群より選択される化学物質である、請求項226記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 3 1】

決定する段階が以下の段階を含む、請求項215記載の方法：

- a. 任意に試料を精製する段階；
- b. 成分の一つまたは複数に対して特異的な抗体に試料を接触させる段階；；および
- c. 成分に対する抗体の結合を検出する段階；
- d. それによって成分の存在を決定する段階。

【請求項 2 3 2】

ヒトまたは動物被験体が、血栓症のような凝固関連疾患、心血管疾患、血管疾患、もしくは心房細動；偏頭痛、アテローム性動脈硬化症；自己免疫疾患またはアトピー障害のような炎症障害；アレルギー；喘息、気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、もしくは肺再灌流損傷のような呼吸器障害；癌もしくは転移障害；眼の血管形成障害のような血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎；アルツハイマー病からなる群より選択される病態を有するか、そのリスクがあるか、もしくはそれから回復途中であるか、または、外科技法、臓器移植、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、経皮冠動脈介入（PCI）、ステント留置、血管形成術、冠動脈バイパス移植手術（CABG）を受けているかもしくは受けたことがある、請求項215記載の方法。

10

【請求項 2 3 3】

ヒトまたは動物被験体が、血液または尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNレベルによって測定した場合に異常な腎機能を有する患者である、請求項215記載の方法。

20

【請求項 2 3 4】

ヒトまたは動物被験体が、ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症、例えばHITを有するかまたは有するリスクがある、請求項215記載の方法。

【請求項 2 3 5】

ヒトまたは動物被験体が、過体重または肥満、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の過体重である被験体である、請求項215記載の方法。

【請求項 2 3 6】

ヒトまたは動物被験体が、極めて痩せているかもしくは虚弱である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の低体重であるか、または免疫不全症を罹患している被験体である、請求項215記載の方法。

30

【請求項 2 3 7】

免疫不全症がHIV/AIDSである、請求項236記載の方法。

【請求項 2 3 8】

ヒト被験体が小児患者である、請求項215記載の方法。

【請求項 2 3 9】

ヒトまたは動物被験体が妊娠している、請求項215記載の方法。

【請求項 2 4 0】

ヒトまたは動物被験体が脊髄または硬膜外血腫を有する患者である、請求項215記載の方法。

【請求項 2 4 1】

ヒト被験体が人工心臓弁を有する患者である、請求項215記載の方法。

40

【請求項 2 4 2】

細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターすることをさらに含む、請求項215記載の方法。

【請求項 2 4 3】

産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定する段階が含まれる、請求項215記載の方法。

【請求項 2 4 4】

比較の結果としてバッチを選択する段階をさらに含む、請求項243記載の方法。

【請求項 2 4 5】

50

決定結果を予め選択した値と比較する段階をさらに含む、請求項215記載の方法。

【請求項 2 4 6】

予め選択された値が参照標準値である、請求項245記載の方法。

【請求項 2 4 7】

20%未満もしくはそれに等しい部分が<2000 Da種であり、68%を超えるもしくはそれに等しい部分が2000~8000 Da種であり、かつ18%未満もしくはそれに等しい部分が>8000 Da種である多糖類集団、または市販のエノキサパリン調製物において認められるものと同じ多糖類集団であって、好ましくは平均分子量が約4500 Daである多糖類集団が試料に含まれる、請求項215記載の方法。

【請求項 2 4 8】

多糖類、例えばLMWHが約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する、請求項247記載の方法。

【請求項 2 4 9】

試料のpHが5.5~7.5である、請求項247記載の方法。

【請求項 2 5 0】

試料の一つまたは複数の成分がタグを付けられるか、または標識される、請求項215記載の方法。

【請求項 2 5 1】

タグを含むLMWH組成物。

【請求項 2 5 2】

タグが検出可能な電磁放射線を放出する、請求項251記載の組成物。

【請求項 2 5 3】

タグが、蛍光標識、質量分析法と適合する質量標識、¹⁸O、イットリウム、³H、親和性標識、pH感受性標識、および放射性標識からなる群より選択される、請求項251記載の組成物。

【請求項 2 5 4】

以下の段階を含む、タグを含むLMWHの有無に関して試料を評価する方法：

- a. 試料を提供する段階；
- b. 任意に試料を精製する段階；および
- c. 試料中のタグの有無を決定して、それによって試料中のLMWHの有無を評価する段階。

【請求項 2 5 5】

タグのレベルを決定する段階をさらに含む、請求項254記載の方法。

【請求項 2 5 6】

試料が被験体、例えばタグを含むLMWHを投与されているヒトもしくは動物被験体または実験動物に由来する、請求項254記載の方法。

【請求項 2 5 7】

LMWHが、M118、M115、M411、M108、M405、M312、エノキサパリン；ダルテパリン；セルトパリン；アルデパリン；ナドロパリン；パルナパリン；レビパリン；チンザパリン、およびフォンダパリヌクスからなる群より選択される、請求項254記載の方法。

【請求項 2 5 8】

試料が体液である、請求項254記載の方法。

【請求項 2 5 9】

体液が、血液、血漿、および尿からなる群より選択される、請求項258記載の方法。

【請求項 2 6 0】

以下の一つまたは複数を含む、請求項254記載の方法を行うためのキット：タグ、タグを多糖類に結合させるための化合物、および標準物質、例えば多糖類またはタグを付けた多糖類。

【請求項 2 6 1】

抗第IIa因子活性と抗第Xa因子活性の比が増加または減少したLMWH調製物。

【請求項 2 6 2】

以下の段階を含む、予め選択された生物活性を有する、または有しないLMWH調製物を産

10

20

30

40

50

生する方法：

- a. ヘパリンの一つまたは複数のアリコートを提供する段階；
- b. 任意に、ヘパリンを分画する段階；
- c. 活性を生じるように設計された条件でヘパリンのアリコートを改変する段階；および
- d. 任意に、消化されたアリコートを精製する段階。

【請求項 2 6 3】

所望の生物活性が、細胞増殖もしくは増殖；細胞遊走、接着、または活性化；脈管新生；血管新生；凝固；および炎症プロセスのような細胞活性に及ぼす作用からなる群より選択される、請求項262記載の方法。

【請求項 2 6 4】

所望の生物活性が、抗第IIa因子活性、抗第Xa因子活性、血小板第4因子結合、FGF結合、またはプロタミンによる中和に対する感受性である、請求項262記載の方法。

【請求項 2 6 5】

所望の生物活性が抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性である、請求項262記載の方法。

。

【請求項 2 6 6】

改変する段階が、FHまたはUFHを化学的または酵素的に消化することによって行われる、請求項262記載の方法。

【請求項 2 6 7】

酵素的消化が一つまたは複数のヘパリン分解酵素を用いて行われる、請求項266記載の方法。

【請求項 2 6 8】

ヘパリン分解酵素が、ヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼならびにその機能的に活性な変種および断片からなる群より選択される、請求項267記載の方法。

【請求項 2 6 9】

化学的消化が、 H_2O_2 もしくは Cu^+ および H_2O_2 による酸化的解重合、亜硝酸イソアミルもしくは亜硝酸による脱アミノ切断、またはアルカリ処理もしくはヘパリナーゼによるヘパリンのベンジルエステルを用いた β -脱離切断からなる群より選択される化学物質によって行われる、請求項266記載の方法。

【請求項 2 7 0】

請求項262記載の方法によって調製されたLMWH調製物。

【請求項 2 7 1】

請求項262記載の方法によって調製された抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性を有するLMWH調製物。

【請求項 2 7 2】

所望の生物活性に関してLMWH調製物を試験する段階をさらに含む、請求項262記載の方法。

【請求項 2 7 3】

抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性の異なる比を有する二つまたはそれ以上のLMWH調製物のパネル。

【請求項 2 7 4】

以下を含む、被験体を治療する方法：

- a. 抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性の異なる比を有する二つまたはそれ以上のLMWH調製物のパネルを提供する段階；
- b. 所望の比を有するLMWH調製物を選択する段階；および
- c. LMWH調製物の治療的有効量の一つまたは複数の用量を被験体に投与する段階。

【請求項 2 7 5】

被験体がヒトまたは動物被験体である、請求項274記載の方法。

【請求項 2 7 6】

10

20

30

40

50

被験体におけるLMWHレベルをモニターする段階をさらに含む、請求項274記載の方法。

【請求項 2 7 7】

被験体におけるLMWHレベルを経時的に繰り返しモニターする段階をさらに含む、請求項274記載の方法。

【請求項 2 7 8】

LMWH調製物の用量を調節する段階をさらに含む、請求項274記載の方法。

【請求項 2 7 9】

LMWH調製物の投与に応じて、被験体の状態をモニターする段階をさらに含む、請求項274記載の方法。

【請求項 2 8 0】

10

被験体の状態を経時的にモニターする段階をさらに含む、請求項274記載の方法。

【請求項 2 8 1】

被験体の状態の経時的な変化に基づいて異なるLMWH調製物を投与する段階をさらに含む、請求項274記載の方法。

【請求項 2 8 2】

高い抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性を有する、請求項244記載のLMWH調製物の治療的有效量の一つまたは複数の用量を投与する段階、被験体の状態をモニターする段階、次に高い抗第Xa因子活性のみを有する請求項244記載のLMWH調製物の治療的な量の一つまたは複数の用量を投与する段階を含む、患者における凝固を阻害する方法。

【請求項 2 8 3】

20

LMWH調製物の構造特徴を提供または決定する段階をさらに含む、請求項274記載の方法。

【請求項 2 8 4】

被験体の状態をLMWHの構造特徴に相関させる段階をさらに含む、請求項283記載の方法。

【請求項 2 8 5】

減少したPF4結合活性を有する請求項274記載の組成物の治療的有效用量を被験体に投与することを含む、HITであると既に診断された被験体を治療する方法。

【請求項 2 8 6】

20%未満もしくはそれに等しい<2000 Da種、68%を超えるもしくはそれに等しい2000~8000 Da種、および18%未満もしくはそれに等しい>8000 Da種を含み、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性の双方を有するLMWH組成物であって、抗第Xa因子活性がプロタミンによって>50%中和され、かつ抗第IIa因子活性がプロタミンによって>70%中和される、LMWH組成物。

30

【請求項 2 8 7】

約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する、請求項286記載のLMWH組成物。

【請求項 2 8 8】

pHが5.5~7.5である、請求項286記載のLMWH組成物。

【請求項 2 8 9】

15~85モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ ；0.1~20モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NS}$ ；0.1~20モル%の範囲で存在する $\Delta UH_{NS,6S}$ ；0.1~10モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ ；0.1~10モル%の範囲で存在する ΔUH_{NS} ；0.1~5モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ ；0.1~15モル%の範囲で存在する $\Delta UH_{NAC,6S}$ ；および0.1~20モル%の範囲で存在する $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ を含む、請求項286記載のLMWH組成物。

40

【請求項 2 9 0】

非天然の糖を含まないか、または実質的に含まない、請求項286記載のLMWH組成物。

【請求項 2 9 1】

30 IU/mgより大きい抗第IIa因子活性をさらに含む、請求項286記載のLMWH組成物。

【請求項 2 9 2】

非天然の糖を実質的に含まず、20%未満もしくはそれに等しい<2000 Da種、68%を超

50

えるもしくはそれに等しい2000～8000 Da種、および18%未満もしくはそれに等しい>8000 Da種を含み、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、LMWH。

【請求項 2 9 3】

約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する、請求項292記載のLMWH組成物。

【請求項 2 9 4】

pHが5.5～7.5である、請求項292記載のLMWH組成物。

【請求項 2 9 5】

15～85モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ ；0.1～20モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NS}$ ；0.1～20モル%の範囲で存在する $\Delta UH_{NS,6S}$ ；0.1～10モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ ；0.1～10モル%の範囲で存在する ΔUH_{NS} ；0.1～5モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ ；0.1～15モル%の範囲で存在する $\Delta UH_{NAC,6S}$ ；および0.1～20モル%の範囲で存在する $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ を含む、請求項292記載のLMWH組成物。

10

【請求項 2 9 6】

30 IU/mgより大きい抗第IIa因子活性をさらに含む、請求項292記載のLMWH組成物。

【請求項 2 9 7】

エノキサパリンと比較して非天然の糖が濃縮され、20%未満もしくはそれに等しい<2000 Da種、68%を超えるもしくはそれに等しい2000～8000 Da種、および18%未満もしくはそれに等しい>8000 Da種を含み、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、LMWH。

【請求項 2 9 8】

エノキサパリンと比較して、5%、10%、または20%多い非天然の糖を有する、請求項297記載のLMWH。

20

【請求項 2 9 9】

非天然の糖がピーク9または10に関連した糖である、請求項298記載のLMWH。

【請求項 3 0 0】

約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する、請求項297記載のLMWH組成物。

【請求項 3 0 1】

pHが5.5～7.5である、請求項297記載のLMWH組成物。

【請求項 3 0 2】

15～85モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ ；0.1～20モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NS}$ ；0.1～20モル%の範囲で存在する $\Delta UH_{NS,6S}$ ；0.1～10モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ ；0.1～10モル%の範囲で存在する ΔUH_{NS} ；0.1～5モル%の範囲で存在する $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ ；0.1～15モル%の範囲で存在する $\Delta UH_{NAC,6S}$ ；および0.1～20モル%の範囲で存在する $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ を含む、請求項297記載のLMWH組成物。

30

【請求項 3 0 3】

30 IU/mgより大きい抗第IIa因子活性をさらに含む、請求項297記載のLMWH組成物。

【請求項 3 0 4】

以下の段階を含む、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ ； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ ； $\Delta UH_{NS,6S}$ ； $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ ； ΔUH_{NS} ； $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ ； $\Delta UH_{NAC,6S}$ ；および $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ からなる群より選択される一つまたは複数の成分糖に関して、予め選択した値からの予め選択した範囲のバッチ間変動を有するLMWH調製物の一つまたは複数のバッチを作製する方法：

40

- a. 所望の値を選択する段階；
- b. UFHのアリコートを提供する段階；
- c. 任意に、アリコートを分画する段階；
- d. アリコートにおける成分レベルを決定する段階；および
- e. 所望の値からの予め選択した範囲の変動より少ないバッチまたは複数のバッチを選択する段階。

【請求項 3 0 5】

予め選択した変動が2.5%未満、より好ましくは2%未満、または1%未満である、請求項304記載の方法。

【請求項 3 0 6】

50

p1に関して予め選択した変動が3%未満、2%未満、または1%未満である、請求項304記載の方法。

【請求項 3 0 7】

p2に関して予め選択した変動が16%未満、15%未満、11%未満、10%未満、5%未満、1%未満である、請求項304記載の方法。

【請求項 3 0 8】

p3に関して予め選択した変動が8%未満、4%未満、2%未満、1%未満である、請求項304記載の方法。

【請求項 3 0 9】

p4に関して予め選択した変動が22%未満、15%未満、10%未満、5%未満、1%未満である、請求項304記載の方法。

【請求項 3 1 0】

p5に関して予め選択した変動が、3%未満、2%未満、1%未満である、請求項304記載の方法。

【請求項 3 1 1】

p6に関して予め選択した変動が、10%未満、5%未満、2%未満、1%未満である、請求項304記載の方法。

【請求項 3 1 2】

p7に関して予め選択した変動が90%未満、75%未満、50%未満、25%未満、10%未満、5%未満である、請求項304記載の方法。

【請求項 3 1 3】

p8に関して予め選択した変動が12%未満、10%未満、8%未満、5%未満、4%未満、2%未満である、請求項304記載の方法。

【請求項 3 1 4】

以下の段階を含む、p1～p8からなる群より選択される一つまたは複数の成分糖に関して、予め選択された値からの予め選択した範囲より小さいバッチ間変動、例えば2.5%未満、より好ましくは2%未満、または1%未満のバッチ間変動を有するLMWH調製物の一つまたは複数のバッチを作製する方法：

- a. 値を選択する段階；
- b. UFHまたはLMWHのアリコートを提供する段階；
- c. アリコートを沈殿させる段階；
- d. 任意に、アリコートにイオン交換プロセスを行う段階；
- e. 所望の値が得られるような条件でアリコートを薬剤に接触させる段階。

【請求項 3 1 5】

薬剤が、ヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、およびその機能的に活性な変種および断片からなる群より選択されるヘパリン分解酵素である、請求項314記載の方法。

【請求項 3 1 6】

薬剤が化学物質である、請求項314記載の方法。

【請求項 3 1 7】

化学物質が、 H_2O_2 、 Cu^+ および H_2O_2 、亜硝酸イソアミル、亜硝酸、ベンジルエステル、またはアルカリ処理からなる群より選択される、請求項316記載の方法。

【請求項 3 1 8】

p1～p8からなる群より選択される一つまたは複数の成分のモル%が、バッチのそれぞれに関して、予め選択した変動より小さく変動する、LMWH調製物の多数のバッチを含む組成物。

【請求項 3 1 9】

予め選択した変動が2.5%未満、2%未満、または1%未満である、請求項318記載の組成物。

【請求項 3 2 0】

p9～p10からなる群より選択される一つまたは複数の成分に関するバッチのそれぞれの糖プロフィールが、予め選択した変動より小さく変動する、LMWH調製物の多数のバッチを含む組成物。

【請求項 3 2 1】

予め選択した変動が2.5%未満、2%未満、または1%未満である、請求項320記載の組成物。

【請求項 3 2 2】

請求項281記載の方法によって調製されたLMWH調製物の多数のバッチを含む組成物。

【請求項 3 2 3】

請求項314記載の方法によって調製されたLMWH調製物を含む組成物。

10

【請求項 3 2 4】

多糖類を同定する要素、多糖類の一つまたは複数の成分を同定する要素、および成分のモル%の範囲を同定する要素を有する記録。

【請求項 3 2 5】

記録がコンピューター読み取り可能な記録である、請求項324記載の方法。

【請求項 3 2 6】

多糖類がUFHまたはLMWHである、請求項324記載の方法。

【請求項 3 2 7】

以下の段階を含む、特定の適応において用いるためのヘパリンの安全性または適切性を決定する方法：

20

- a. ヘパリンの構造特徴を提供する段階；
- b. 参照構造特徴を提供する段階；
- c. ヘパリンが許容可能であるか否かを決定する段階。

【請求項 3 2 8】

ヘパリンが許容可能であるか否かを決定する段階が、ヘパリンの構造特徴を参照構造特徴と比較することによるものであり、予め選択された類似性の指標を満足すればヘパリンが安全または適切である、請求項327記載の方法。

【請求項 3 2 9】

参照構造特徴が一つまたは複数の望ましくない作用に関連している、請求項327記載の方法。

30

【請求項 3 3 0】

参照構造特徴が一つまたは複数の所望の作用に関連している、請求項327記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、米国法第35条119(e)項の下で、その内容全てが参照として本明細書に組み入れられる、2002年7月5日に提出された米国特許出願第60/393,973号、2002年5月28日に提出された米国特許出願第60/383,903号、および2002年3月11日に提出された米国特許出願第60/363,240号に対する優先権を主張する。

40

【0002】

発明の分野

本発明は、硫酸化多糖類の不均一な集団の分析およびモニタリングに関連した方法および産物に関する。特に、低分子量ヘパリン産物を含む治療的ヘパリン産物、ならびにこれらの産物を分析およびモニターする方法を記述する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

凝固は、哺乳類における正常な止血の維持に関与する生理的経路である。血管損傷が起こる状況では、凝固経路が刺激されて凝血を形成し、血液の損失を防止する。血管の損傷

50

が起こった直後に、血小板は損傷部位で凝集し始め、出血を防止するために物理的な栓を形成する。さらに、損傷した血管は収縮して、その領域への血流を減少させ、フィブリンが凝集して不溶性のネットワークまたは凝血を形成し、これが破裂した領域を覆う。

【0004】

凝固経路の不均衡が凝固過剰に向けてシフトすると、それによって、血栓傾向が起こり、これはしばしば、心臓発作、脳卒中、深部静脈血栓症、心筋梗塞、不安定アンギナ、および急性冠動脈症候群として現れる。さらに、塞栓が血栓から離れて、それによって脳卒中または一過性の虚血性発作を含む肺動脈塞栓症または脳血管塞栓症が起こりうる。凝固経路の不均衡に関連した障害を治療するための現行の治療は、多くのリスクを伴い、注意深く制御されなければならない。

10

【0005】

内因性の起源から単離された複雑な硫酸化多糖類であるヘパリンおよび低分子量ヘパリン (LMWH) は、止血の強力な調節物質である。肥満細胞によって産生される高度にリン酸化されたヘパリン様グリコサミノグリカン (HLGAG) であるヘパリンは、広く用いられる臨床抗凝固剤であって、最初の生体高分子薬の一つであり、少数の炭化水素薬物の一つである。ヘパリンおよびそれに由来する分子は、多様な臨床状況、特に深部静脈血栓および肺動脈塞栓症、動脈血栓症、ならびに急性冠動脈症候群様心筋梗塞および不安定アンギナの予防および治療を含む血栓塞栓障害において用いられる強力な抗凝固剤である。ヘパリンおよびLMWHは、凝固カスケードの多数の成分と相互作用して、凝固プロセスを阻害する。ヘパリンは主に、二つのメカニズムを通してその作用を誘発するが、そのいずれも、ポリマーに含まれる特異的五糖配列、 $H_{NAc/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ とアンチトロンビンII I (AT-III) との結合を伴う。最初にAT-IIIが五糖に結合すると、第Xa因子の阻害を媒介するタンパク質の構造変化を誘導する。第二に、トロンビン (第IIa因子) も同様に五糖/AT-III結合部位の近位の部位でヘパリンに結合する。AT-III、トロンビン、およびヘパリン間の三成分複合体の形成によって、トロンビンが不活化される。AT-III五糖-結合部位のみを必要とするその抗第Xa因子活性とは異なり、ヘパリンの抗第IIa因子活性は大きさに依存して、AT-III、トロンビン、およびヘパリンの三成分複合体を効率よく形成するためには、抗第Xa因子活性に関与する五糖単位他に糖単位1~13個を必要とする。ヘパリンはまた、内皮細胞からの組織因子経路阻害剤 (TFPI) の放出を媒介する。ヘパリンの共因子であるTFPIは、第X因子に直接結合してこれを阻害するセリンプロテアーゼである。TFPIは、特にヘパリンと同時に投与すると、強力な抗血栓薬である。

20

30

【0006】

ヘパリンの抗凝固特性の他に、哺乳類におけるその複雑さおよび広い分布により、ヘパリンはさらに広範囲の生物活性に関係する可能性があるという示唆がなされた。細胞表面および細胞外マトリクスの双方に存在するヘパリン様のグリコサミノグリカンは、グルコサミンとウロン酸 (イズロン酸またはグルクロン酸のいずれか) からなる二糖反復単位からなる、長さが多様な複雑な多糖類群である。HLGAGの高度の複雑性は、その多分散性および二つの異なるウロン酸成分が可能であることに由来するのみならず、二糖単位の四つの位置での異なる改変に由来する。三つの位置、すなわち、ウロン酸のC2、およびグルコサミンのC3、C6位をO-硫酸化することができる。さらに、グルコサミンのC2位は、N-アセチル化またはN-硫酸化することができる。併せると、これらの改変によって、理論的に32個の二糖単位が起こりえて、そのためにHLGAGは、DNA (4塩基) またはタンパク質 (アミノ酸20個) よりおそらく情報に富むであろう。起こりうる構造変種がこのように巨大であることによって、HLGAGは、血管新生

40

(Sasisekharan, R., Moses, M. A., Nugent, M. A., Cooney, C. L. & Langer, R. (1994) Proc Natl Acad Sci U S A 91, 1524-8, embryogenesis (Binari, R. C., Staveley, B. E., Johnson, W. A., Godavarti, R., Sasisekharan, R. & Manoukian, A. S. (1997) Development 124, 2623-32; Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V., Siegfried, E., Stam, L. & Selleck, S. B. (1999) Nature 400, 276-80.;および Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N. & Michelson, A. M. (1999) Development 126, 3715-23)

10

ならびにアルツハイマー病における β -繊維の形成

(McLaurin, J., Franklin, T., Zhang, X., Deng, J. & Fraser, P. E. (1999) Eur J Biochem 266, 1101-10.および Lindahl, B., Westling, C., Gimenez-Gallego, G., Lindahl, U. & Salmivirta, M. (1999) J Biol Chem 274, 30631-5)

を含む数多くの多様な生物学的プロセスに関与することができる。

【0007】

ヘパリンは、多様な臨床状況において非常に有効であり、他の多くの状況において用いられる可能性があるが、ヘパリン治療に関連した副作用も多く多様である。抗凝固は、65年以上ものあいだ未分画ヘパリン(UFH)の主な臨床適応であった。s.c.投与後のその一貫性のない薬物動態のために、UFHは、そのかわりに静脈内注射によって投与されている。さらに、UFHの非特異的血漿タンパク質結合に関連した多くの副作用のために、抗凝固剤としてUFHを適用することはできない。

20

【0008】

ヘパリン誘発血小板減少症(HIT)のような副作用は、様々なタンパク質の結合ドメインを提供するUFHの長鎖に主に関連している。HITは、抗体、通常ヘパリン-血小板第4因子(PF4)複合体に対するIgGの結果である免疫媒介血小板減少症である。注射されたヘパリンは、血漿中に通常存在する低レベルのPF4に結合して、血小板の表面に結合する高分子複合体を形成する。患者によっては、ヘパリン/PF4複合体に対する抗体が産生される。これらの抗体が存在する場合、血小板の表面上のヘパリン/PF4複合体に結合して、血小板表面上のFc受容体とクロスリンクし、それによって血小板の活性化を引き起こす。血小板が活性化されると、さらなるPF4を含む前凝固物質を放出する。ヘパリンの存在下で後者が放出されると、血小板の活性化をさらに増加する。活性化された血小板は、凝血の形成に関与するか、または脾臓によって除去される。血小板の活性化は、ヘパリンが除去されると停止するが、抗体は通常、4~6週間のあいだ検出可能である。

30

【0009】

臨床的に、HIT患者は典型的に、一般的にヘパリン治療の開始後5~11日目に血小板数の減少を示す。血小板数は、50%まで、通常20~150($\times 10^3$ 個/mm³)のレベルまで低下する。この血小板減少症は、紫斑病または出血よりむしろ血栓症に関連する；深部静脈塞栓症および肺動脈塞栓は、最も一般的な合併症である。動脈血栓症が起こる頻度は低いが、通常、脚の大血管、脳の動脈、および内臓の動脈に起こる。ヘパリン治療を受けている患者の20%がヘパリン誘発血小板抗体を産生し、3%に血小板数の減少を認め、および1%またはそれ未満が血栓合併症を経験すると推定されている。ヘパリン誘発血小板減少症の他に報告された臨床症状には、皮下ヘパリン投与による局所皮膚病変、発熱性輸血反応に類似した急性全身反応、および一過性の包括的健忘症が含まれる。

40

【0010】

他の副作用には、頭蓋内出血、出血、内部/外部出血、肝酵素(ASTおよびALT)レベルの上昇、および注射部位での皮膚反応が含まれる。このために、UFHの有効な代用体とし

50

ての低分子量ヘパリン（LMWH）の産生および利用が急増した。そのより予測可能な薬理作用、副作用の減少、持続的な抗血栓活性、および良好な生物学的利用能により、ヘパリンの代用体としてのLMWHに対して注目が集まっているが、現在のところ、それらの構造を決定することは技術的に実現不可能であるため、ヘパリンとLMWHの構造的不均一性のために、その活性を特定の構造または構造モチーフに相関させる手段はなく、被験体におけるLMWHレベルをモニターするために信頼できて容易に利用できる手段はない。そして市販のLMWH調製物の全てがプロタミンによって完全には中和されないことから、予想外の反応が、極端な副作用を有する可能性があり、エノキサパリンと他のLMWHの抗第Xa因子活性は、 ≤ 2 mgプロタミン/100 IU抗第Xa因子LMWHによって約40%の程度に中和されるに過ぎない。抗第IIa因子活性は、 ≤ 2 mgプロタミン/100 IU抗第Xa因子LMWHによって約60%の程度に中和されるに過ぎない。（一方、UFHの抗第Xa因子および抗第IIa因子活性は、 ≤ 2 mgプロタミン硫酸/100 IU抗第Xa因子UFHによってほぼ完全に（ $>90\%$ ）中和される）。

10

【0011】

典型的にブタ腸粘膜から単離されるこれらの多糖類の薬学的調製物は、長さおよび組成に関して不均一である。そのため、典型的な調製物のごく一部が抗凝固活性を有するに過ぎない。最善の場合、ヘパリンまたはLMWHの薬学的調製物における多糖鎖の大部分は不活性であるが、最悪の場合、これらの鎖は血漿タンパク質と非特異的に相互作用して、ヘパリン治療に関連した副作用を誘発する。したがって、UFHの抗凝固活性および他の所望の活性を保持するが、副作用が減少した新規LMWHを開発することが重要である。LMWHは、本質的にその鎖の大きさおよび多様性が減少しているために、著しく少ない非特異的血漿タンパク質結合を示す。しかし、現在臨床において利用可能であるLMWHも全て、UFHと比較して低下した抗第IIa因子活性を有する。この低下した活性のために、類似の抗凝固活性を得るためには（UFHと比較して）より大量のLMWHが必要であり、UFH活性、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）またはトロンビン凝固時間（TCT）に関する標準的な試験は、それらが読出しに関して主に抗第IIa因子活性に依存することから有用ではない。LMWHレベルをモニターするために最も広く用いられている試験は、抗第Xa因子活性試験であるが、これはアンチトロンビンIII（ATIII）レベルが十分である被験体に依存し、このような被験体は必ずしも多くはない。この試験はかなり費用が高く（軽く100.00ドルを超える）、一般的に分析のために試料を外部の研究所に送らなければならないことから、日常的または容易に利用可能ではない。その結果、LMWHの利用はこれまでのところ、血栓症の予防に大きく限定され、その治療には限定されず、これを投与することができる患者集団は限定されており、中でも、小児患者、血液および尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、糸球体濾過速度（GFR）、またはBUN（血液中の尿素窒素レベル）によって測定した異常な腎機能患者、ならびに心疾患介入患者集団は除外される。望ましくない作用のリスクを増加させることなく、LMWHの長所をより広い患者集団に提供するためには、モニタリング法の改善が必要である。さらに、モニタリングが改善されれば、その疾患の経過を通して患者の病態に合わせた治療コースを行うことができ、例えば凝血が形成される前に患者に投与される薬物調製物は、凝血が形成された直後または凝血が形成された長期間後に患者に投与される薬物調製物とは異なりうるであろう。

20

30

【0012】

UFHより程度は低いものの、LMWHは、多分散性で構造が明確でない微小不均一性であり、このように固有のばらつきを有する。現行のLMWH調製法は標準化されておらず、組成および有効性がバッチ間で実質的に異なる可能性がある調製物が得られる。

40

【0013】

ヘパリンの分子、構造、および活性のばらつきの特徴を調べる試みにおいて、ヘパリン調製物を分析するためにいくつかの技術が研究されている。勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）および強イオン交換HPLC（SAX）が、ヘパリン調製物の定性的および定量的分析のために用いられている。勾配PAGE法は、分子量を決定するためには有用となりうるが、これは分離能の欠如を有し、特に同一の大きさを有する異なるオリゴ糖を分離することができない。紫外線吸光度による検出に依存するSAX-HPLCはしばしば、構造的に重

50

要なヘパリン由来オリゴ糖の少量を検出するには感度が不十分である。ヘパリンおよび他のグリコサミノグリカン进行分析の現在の技術は不十分であることから、任意の程度のバッチ間一貫性を有するLMWH調製物を作製すること、または所定のバッチの有効性を予測することはこれまでのところ不可能であった。

【発明の概要】

【0014】

本発明は、硫酸化多糖類、例えば、ヘパリン、例えばUFH、LMWH、および合成ヘパリンの不均一な集団进行分析する方法、ならびに所望の特性、例えば、所望の活性を有しおよび／または望ましくない特性、例えば望ましくない副作用が減少した硫酸化多糖類を作製する方法の発見に一部基づいている。このように、本発明は、硫酸化多糖類の不均一な集団の分析およびモニタリングに関連した方法および産物、例えば不均一な硫酸化多糖類集団の構造特徴および活性を分析してこのように定義する新規方法に関する。低分子量ヘパリン産物を含む治療的ヘパリン産物、ならびにこれらの産物を産生、分析、およびモニターする方法を記述する。

10

【0015】

一つの局面において、本発明は、試料、例えば多糖類を含む組成物を分析する方法を提供する。一つの態様において、組成物はさらに、一つまたは複数のタグ、抗体、レクチン、またはタンパク質を含む。

【0016】

本明細書において用いられる「多糖類」とは、互いに結合した単糖類からなるポリマーである。多くの多糖類において、多糖類の基本的な構築ブロックは、実際には反復または非反復となりうる二糖単位である。このように、多糖類に関連して用いる場合の単位は、多糖類の基本的構築ブロックを指し、これらには単量体構築ブロック（単糖類）または二量体構築ブロック（二糖類）が含まれる。多糖類には、ヘパリン様グリコサミノグリカン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、およびその誘導体または類似体、キチンの誘導体および類似体、例えば6-O硫酸化カルボキシシルメチルキチン、フェリヌス・リンテウス（*phellinus linteus*）から単離された免疫原性多糖類、PI-88（酵母ピチア・ホルスチイ（*Pichia holstii*）の発酵によって産生された高分子量コアから精製したホスホマンナムの硫酸化に由来する高度硫酸化オリゴ糖の混合物）およびその誘導体と類似体、ワクチン用の多糖類抗原、ならびにカルシウムスピルラン（青-緑藻類であるスピルリナ・プラテンシス（*spirulina platensis*）から単離されたCa-SPおよびその誘導体と類似体が含まれるがこれらに限定されない。

20

30

【0017】

本発明に従う多糖類は、多糖類、例えばヘパリン、合成ヘパリンまたはLMWH調製物の混合集団となりうる。本明細書において用いられるように、「多糖類の混合集団」は、多糖類の多分散混合物である。「多分散」または「多分散性」という用語は、平均分子量数（Mn）で除した組成物の重量平均分子量（Mw）を指す。未分画ヘパリンと様々なLMWHの多分散性は、多分散性を決定する方法と同様に既知である。多分散性がほぼ1である組成物はより均一であり、含まれる異なる多糖類はより少ない。例として、長さおよび組成が異なる多様な多糖類を含む未分画ヘパリンの調製物は、多分散性が約1.5～2.0である。

40

【0018】

いくつかの態様において、試料は、ヒトまたは動物被験体、実験動物、細胞、または他の市販の多糖類調製物、例えばエノキサパリン（Lovenox（商標））、ダルテパリン（Fragmin（商標））、セルトパリン（Sandobarin（商標））、アルデパリン（Normiflo（商標））、ナドロパリン（Fraxiparin（商標））、バルナパリン（Fluxum（商標））、レビパリン（Clivarin（商標））、チンザパリン（Innohep（商標））もしくはLogiparin（商標））、またはフォンダパリヌクス（Arixtra（商標））が含まれるがこれらに限定されないUFHまたはLMWHに由来する。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、外科的介入、例えば、血管形成術、ステント留置、心肺バイパス技法、組織または臓器移植、冠動脈再生術、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、PC

50

I、および人工器官置換手術を受けているか、受けるリスクがあるか、またはそれらから回復途中である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、血液、GFRまたは尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNレベルによって測定した異常な腎機能を有する患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症、例えばHITを有するまたはそのリスクを有する。ヒトまたは動物被験体は過体重、または肥満である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の過体重である被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、極めて痩せたまたは虚弱である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の低体重である被験体である、または免疫欠損症、例えばHIV/AIDSを有する被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は小児患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は妊娠している。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は脊髄または硬膜外血腫を有する患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、人工心臓弁を有する患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体はATIII欠損症または異常を有する。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は第Xa因子欠損症または異常を有する。

10

【0019】

いくつかの態様において、方法は、細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターすることをさらに含む。いくつかの態様において、方法には、産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定することが含まれる。いくつかの態様において、方法にはさらに、決定の結果としてバッチを選択することが含まれる。いくつかの態様において、方法にはさらに、決定結果を予め選択した値、例えば参照標準値と比較することが含まれる。

20

【0020】

好ましい態様において、組成物は消化される、例えば化学的および／または酵素的に消化される、例えば不完全または完全に消化される。酵素的消化は、ヘパリン分解酵素、例えばヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼまたは機能的に活性なその変種および断片によって行われる。化学的消化は、化学物質、例えば酸化的解重合、例えば、 H_2O_2 または Cu^+ および H_2O_2 による酸化的解重合、脱アミノ切断、例えば亜硝酸イソアミルまたは亜硝酸による脱アミノ切断、 β -脱離切断、例えばベンジルエステルおよび／またはアルカリ処理による β -脱離切断によって行われる。

30

【0021】

いくつかの態様において、試料には、20%未満もしくはそれに等しい部分が <2000 Da種である、68%を超えるもしくはそれに等しい部分が $2000\sim8000$ Da種である、および18%未満もしくはそれに等しい部分が >8000 Da種である多糖類集団、または市販のエノキサパリン調製物において認められるものと同じ多糖類集団であって、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、多糖類集団が含まれる。いくつかの態様において、試料は約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する。いくつかの態様において、試料はpHが5.5~7.5である。いくつかの態様において、試料の一つまたは複数の成分はタグを付けられている、または標識されている。

【0022】

組成物は、モル%に関して記述されるが、組成物はまた、AUC（曲線下面積）またはAUC%に関して記述してもよく、それらも本発明の範囲内であることは当技術分野において十分に理解される。いくつかの態様において、組成物は化学的および／または酵素的に、不完全または完全に消化される。酵素的消化は、ヘパリン分解酵素、例えばヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼまたは機能的に活性なその変種および断片によって行われる。化学的消化は、化学物質、例えば酸化的解重合、例えば、 H_2O_2 または Cu^+ および H_2O_2 による酸化的解重合、脱アミノ切断、例えば亜硝酸イソアミルまたは亜硝酸による脱アミノ切断、 β -脱離切断、例えばベンジルエステルおよび／またはアルカリ処理による β -脱離切断によって行われる。一つの態様において、組成物はHLGAGであり、組成物の分析には、任意にHLGAGを分画すること、HLGAGを化学

40

50

的または酵素的に消化すること、および消化されたHLGAGの分子量を決定することによって、一つまたは複数の成分の存在を決定することが含まれる。

【0023】

方法には、多糖類の構造特徴を提供することによって多糖類を含む試料を分析することが含まれる。本明細書において用いられる構造特徴は、例えば、多糖類の単糖および二糖構築単位の同一性および数に関する情報、総電荷（「真の電荷」または「全電荷」とも呼ばれる）、電荷密度、分子の大きさ、電荷対質量比、およびイズロン酸および／またはグルクロン酸含有の有無のような物理化学特性と共に、単糖と二糖構築ブロックの関係、ならびにとりわけこれらの構築ブロックに関連した活性部位に関する情報を意味する。構造特徴は、以下から選択される一つまたは複数の一次産出物を決定することによって提供することができる；

一つまたは複数の成分糖または二糖の存在または量；本明細書において用いられるように、「成分糖」は、多糖類を構成する糖類を指す。成分糖には、単糖、二糖、三糖等が含まれ、同様に、天然に通常認められる糖のみならず、とりわけ下記で定義する非天然の改変糖が含まれる；

「ブロック成分」が複数の糖または多糖で構成される、一つまたは複数のブロック成分の存在または量；

「糖代表物」が、化学的改変、とりわけ酵素的または化学的消化のような方法によって改変された糖を含む、検出能を増強するように改変された糖類である、一つまたは複数の糖類代表物の存在または量；

三次元構造の指標または三次元構造に関連したパラメータ、例えば活性、例えば構造モチーフまたは結合部位の存在または量、例えば多糖類をクロスリンクさせることによって、例えば直線配列に隣接しない特定の糖をクロスリンクさせることによって産生された構造の存在または量；または

改変糖類が調製物を構成するために用いられる開始材料に存在する糖類であるが、調製物の産生において変化している、例えば切断によって改変された糖である、一つまたは複数の改変された糖の存在または量。

【0024】

好ましい態様において、二次産出物を用いることによって多糖類をさらに分析することができ、これには以下の一つまたは複数の含まれる：総電荷；電荷／質量比、電荷密度、配列、一つまたは複数の活性部位の位置；および多分散性。ヘパリンのような多糖類の「総電荷」は、二糖の平均分子量（500）によって質量を除して、その数に二糖あたりの平均電荷（2.3）を乗じることによって；または一つもしくはそれ以上の一次産出物、例えば存在する単糖および二糖構築ブロックの同一性および数に基づく電荷を計算することによって、計算することができる。「電荷／質量比」は、総電荷量を多糖類の質量で除することによって計算することができる。「電荷密度」は、総電荷を糖類の長さの平均値で除することによって計算することができる。「配列」は、共有結合した成分糖類の直線状配列を意味し、当技術分野で既知の方法、例えば本明細書に開示の方法、ならびにその全文が参照として本明細書に組み入れられる、国際公開公報第00/65521号、国際公開公報第02/23190号、Venkataraman（1999）；Shriverら（2000a）；Shriverら（2000b）；およびKiserら（2001）に開示される方法によって決定することができる。「活性部位の位置」は、特定の成分多糖類と所定の活性との相関を意味する。好ましい態様において、構造特徴は、MALDI-MS、ESI-MS、CE、HPLC、FPLC、蛍光測定法、ELISA、色素産生アッセイ法、比色アッセイ法、NMR、および他の分光光度技術からなる群より選択される一つまたは複数の方法によって決定される。

【0025】

本明細書に記述の方法および組成物のいくつかは、一次産出物の一つ、例えば一つまたは複数の成分糖または二糖の量を用いて記述される。しかし、上記の産出物のいずれも、本明細書に記述の方法において実際に引用される産出物および組成物の代わりに用いることができる。と理解される。

【0026】

もう一つの局面において、本発明は、多糖類薬剤、例えばヘパリン、合成ヘパリン、またはLMWHを分析する方法を特徴とする。方法には以下が含まれる：

第一の構造特徴、例えば予め選択した患者の反応の第一のレベル、例えば薬物に対する陰性または陽性反応の予め選択したレベルを有する薬物のバッチに関して、本明細書に記述の任意の構造特徴を提供または決定する段階；

第二の構造特徴、例えば予め選択した患者の反応の第二のレベル、例えば薬物に対する陰性または陽性反応の予め選択したレベルを有する薬物の第二のバッチに関して、本明細書に記述の任意の構造特徴を提供または決定する段階；

薬物の特性、例えば化学または構造特性を、患者の反応の予め選択されたレベルに関連させるために第一および第二の構造決定を比較する段階。例えば、望ましくない作用が比較的高レベルである薬物のバッチの構造を決定することができ、望ましくない作用が比較的低レベルである薬物のバッチの構造を決定することができ、その後、薬物の特性を望ましくない作用と関連させるために二つのバッチの構造決定因子を比較することができる。いくつかの方法において、方法には、患者の反応の高レベルまたは低レベルと関連した特性を有する薬物のバッチを選択または廃棄することがさらに含まれる。

10

【0027】

本明細書において用いられるように、「バッチ」は、1回の操作で産生される如何なるものの量、例えば1回の操作で全て産生された化合物の量を意味する。「薬物のバッチ」とは、1回の操作、例えば1回のプロセスで産生された薬物の量である。

20

【0028】

本発明は一部、硫酸化多糖類の異種集団の構造特徴および活性を分析してこのように定義する新規方法に関する。本発明は、ヘパリンの活性を予測するおよびヘパリンのレベルをモニターするために用いることができる、容易に測定される重要な構造モチーフを同定するために、構造を機能に関連させる方法（組成分析法（CAM）と呼ぶ）を提供する。本発明の方法を利用して、インビボでの活性および生物学的利用能が増加しているが、所望の程度のバッチ間一貫性を維持するヘパリン、合成ヘパリン、および低分子量ヘパリンのような多糖類調製物を標準化するための糖プロフィールを作製することができる。本発明は、市販のLMWHの現在の世代と比較して特性が増強された多糖類、特にLMWHの新規の信頼できる一貫した調製物と共に、そのような調製物を調製する方法を提供する。

30

【0029】

一つの局面において、本発明は、多くの成分、例えば $I/GH_{NAC,6S}$ 、 $I/GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GH_{NS,6S}$ 、 $GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、 $I/GH_{NS,6S}I/GH_{NS,3S}$ 、 $I/GH_{NS,6S}I/GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、 $I/GH_{NS,6S}I/GH_{NS,3S}$ 、またはその組み合わせと共に非天然、例えば改変糖の存在を検出することを含む、試料、例えば本明細書に記述の組成物の構造特徴を分析する方法である。これらの特徴は、そのまま（例えば、その分子量および配列を測定することによって、またはNMR等によって）検出することができ、またはその誘導体、例えば $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその組み合わせと共に非天然の、例えば改変糖を検出することによって間接的に検出することができる。本明細書において用いられるように、「非天然糖」は、本質的にヘパリンにおいて通常存在しない構造を有する糖を指す。本明細書において用いられるように、「改変糖」は、精製技法のような、LMWHを作製するために用いられる方法の結果としてLMWHにおいて起こりうる、本質的に多糖類に通常存在しない構造を有する天然の糖に由来する糖を意味する。本方法の結果は、組成物の糖プロフィールを表す値の組である。

40

【0030】

本明細書において用いられるように、「p1」または「ピーク1」は、 $\Delta UH_{2S}H_{NS,6S}$ を指し；「p2」または「ピーク2」は、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ ；「p3」または「ピーク3」は $\Delta UH_{NS,6S}$ ；「p4」または「ピーク4」は、 $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ ；「p5」または「ピーク5」は ΔUH_{NS} ；「p6」または「ピーク6」は $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ ；「p7」または「ピーク7」は $\Delta UH_{NAC,6S}$ ；「p8」または「

50

ピーク8」は集合的に、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、または $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ を指す。「p9」または「ピーク9」および「p10」または「ピーク10」はそれぞれ、ピーク9および10に関連した非天然糖を指す。「 ΔU 」という命名法は、不飽和ウロン酸（ヘパリナーゼの溶解作用の結果として4-5位で導入された二重結合を有するイズロン酸（I）またはグルクロン酸（G））を意味する。二重結合の導入によって、立体異性体IとUとの区別が消失して、したがって ΔU と呼ばれる： Δ は二重結合を指し、UはそれらがIまたはGのいずれかに由来しうることを意味する。このように、本明細書において用いられるように、「 ΔU 」は、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ が、 $I_{2S}H_{NS,6S}$ と $G_{2S}H_{NS,6S}$ の双方を含み、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ が $I_{2S}H_{NS}$ と $G_{2S}H_{NS}$ の双方を含むように等、IとGの双方を表す。本発明の組成物は、異なる構築ブロックのモル%として記述されるが、それらはまたAUC%、重量%として、または本発明の範囲内の他の既知の用語によって記述されうことは、当技術分野において周知である。

【0031】

本発明のさらなる態様は、試料、例えばグリコサミノグリカン（GAG）、HLGAG、UFH、FH、またはLMWHのような、多糖類の混合集団を含む組成物を分析するために本明細書に記述の方法を用いることに関する。本発明の方法には、とりわけ組成物を提供すること、および以下の一つまたは複数、例えば二つ、三つ、四つ、五つ、六つ、または七つが予め選択した範囲； $I/G_{2S}H_{NS,6S}$ （例えば、15～85モル%）； $I/G_{2S}H_{NS}$ （例えば、0.1～20モル%）； $I/GH_{NS,6S}$ （例えば、0.1～20モル%）； $I/G_{2S}H_{NAC,6S}$ （例えば、0.1～10モル%）； I/GH_{NS} （例えば、0.1～10モル%）； $I/G_{2S}H_{NAC}$ （例えば、0.1～5モル%）； $I/GH_{NAC,6S}$ （例えば、0.1～15モル%）；および／または $I/GH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、または $I/GH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその組み合わせ（例えば、0.1～20モル%）に存在するか否かを決定する段階；その代表的な構築ブロック、例えば $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ 、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}$ 、 $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ 、 ΔUH_{NS} 、 $I/G_{2S}H_{NAC}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、または $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ を測定することによって、それによって組成物を分析することが含まれる。いくつかの態様において、方法には、上記の全てが予め選択した範囲に存在するか否かを決定することが含まれる。本明細書において用いられるように、「予め選択した範囲」には、これより少ない範囲の全てが含まれ、それらも満足する。

【0032】

いくつかの態様において、方法には、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ が45～80モル%、50～75モル%、55～70モル%、または60～65モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0033】

いくつかの段階において、方法には、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ が2～15モル%、5～10モル%、または6～9モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0034】

いくつかの態様において、方法には、 $\Delta UH_{NS,6S}$ が、5～18モル%、7～15モル%、または10～12モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0035】

いくつかの段階において、方法には、 $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ が、0.5～7.5モル%、1～5モル%、または1.5～3モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0036】

いくつかの段階において、方法には、 ΔUH_{NS} が、1～7モル%、2～5モル%、または3～4モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0037】

いくつかの段階において、方法には、 $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ が、0.1～5モル%、0.5～3モル%、または1～2.5モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0038】

いくつかの段階において、方法には、 $\Delta UH_{NAC,6S}$ が、0.1～12モル%、0.5～10モル%、または1～6モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0039】

いくつかの段階において、方法には、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ またはその混合物が、1~15モル%、2~10モル%、3~8モル%、または5~7モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0040】

もう一つの態様において、本発明には、非天然の糖が、試料中、例えば本明細書に記載の組成物中に予め選択された範囲、一般的に0.1~5モル%、0.1~2.5モル%、0.1~1モル%の範囲で存在するか否かを決定することが含まれる。いくつかの態様において、本発明の方法には、ピーク9の非天然の糖が0.1~5モル%、0.1~2.5モル%、または0.1~1モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。いくつかの態様において、本発明には、ピーク10の非天然の糖が0.1~5モル%、0.1~2.5モル%、または0.1~1モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。いくつかの態様において、本発明には、ピーク11が0.1~10モル%、1~5モル%、または2~4モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

10

【0041】

このように、もう一つの局面において、本発明には、試料を提供する段階、非天然の糖、例えば改変された糖が試料中に存在するか否かを決定することによって、試料を分析する方法が含まれる。非天然の糖は、ピーク9、ピーク10および／またはピーク11となりうる。

【0042】

いくつかの態様において、方法にはさらに、望ましくない細胞増殖もしくは増殖、細胞遊走、接着、または活性化、血管新生、血管新生、凝固、HIT性向、および炎症プロセスのような細胞活性に及ぼす作用のような、試料の一つまたは複数の生物活性を検出する段階が含まれる。いくつかの態様において、生物学的活性は、抗第Xa因子活性；抗第IIa因子活性；FGF結合；プロタミン中和；および／またはPF4結合である。

20

【0043】

いくつかの態様において、方法にはまた、一つまたは複数の生物活性を試料の構造特徴に相関させることが含まれうる。いくつかの態様において、方法にはまた、生物活性を構造特徴に相関させる情報を有する参照標準値を作製することが含まれうる。この参照標準値は、例えば試料、例えばLMWH調製物の活性レベルを予測するために用いることができる。このように、もう一つの局面において、本発明は、LMWH調製物の構造特徴を決定して、決定した構造特徴を本明細書に記述の参照標準値と比較することによって、LMWH調製物の活性レベルを予測する方法を提供する。活性は、細胞増殖もしくは増殖、細胞遊走、接着、または活性化、脈管新生、血管新生、凝固、および炎症プロセスのような細胞活性に及ぼす作用となりうる。いくつかの態様において、活性は抗第Xa因子活性、抗第IIa因子活性、FGF結合、プロタミン中和、および／またはPF4結合である。

30

【0044】

もう一つの局面において、本発明はまた、選択された活性と相関することが知られている成分が試料中に存在するか否かを決定することによって、選択された生物活性を有するヘパリンの試料を分析する方法を提供する。方法にはさらに、成分のレベル、例えば成分のモル%またはAUC%を決定する段階が含まれうる。活性は、細胞増殖もしくは増殖、細胞遊走、接着、または活性化、脈管新生、血管新生、凝固、および炎症プロセスのような細胞活性に及ぼす作用、抗第Xa因子活性、抗第IIa因子活性、FGF結合、プロタミン中和、および／またはPF4結合となりうる。いくつかの態様において、 $U_{2S}H_{NS}$ 、 $U_{2S}H_{NAC,6S}$ 、 $U_{2S}H_{Na}$ 、および／または $U_{2S}H_{NS,6S}$ が例えば0.1~100モル%の範囲で存在すれば、PF4結合活性を示している。いくつかの態様において、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその混合物が0.1~100モル%の範囲で存在すれば、抗第Xa因子活性を示している。

40

【0045】

好ましい態様において、方法にはさらに、それぞれの組成物の構造特徴を決定するため

50

に複数の組成物を分析すること；それぞれの組成物の生物活性を検出すること；検出された生物活性と組成物の構造特徴を比較すること；および生物活性を構造特徴またはその成分、例えば該構造特徴の一次または二次産出物に相関させることが含まれる。本明細書において用いられるように、「複数」は二つまたはそれ以上を意味する。生物活性は、例えば、望ましくない細胞増殖もしくは増殖、細胞死（壊死またはアポトーシス）、細胞遊走、接着、または活性化、脈管新生、血管新生、凝固、および炎症プロセスのような細胞活性に及ぼす作用となりうる。好ましい態様において、生物活性には、抗第Xa因子活性、抗第IIa因子活性、FGF結合、プロタミン中和、TFPI放出、および／またはPF4結合の一つまたは複数が含まれうる。

【0046】

いくつかの態様において、生物活性-構造相関情報を用いて、特定の適応、例えば腎障害、自己免疫、血栓症のような凝固関連疾患、心血管疾患、血管疾患、または心房細動；偏頭痛、アテローム性動脈硬化症；自己免疫疾患またはアトピー障害のような炎症障害；喘息、気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、もしくは肺再灌流損傷のような呼吸器障害；癌もしくは転移障害；眼の血管新生障害のような血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎、アルツハイマー病のために、ヘパリン、合成ヘパリン、またはLMWH調製物を設計することができる；または外科技法、臓器移植、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、経皮冠動脈介入（PCI）、ステント留置、血管形成術、冠動脈バイパス移植手術（CABG）を受けようとする、または受けた人。特定の適応には、細胞成長または増殖；脈管新生；血管新生；細胞遊走、接着、または活性化；および炎症プロセスのような細胞活性が含まれうる。

【0047】

もう一つの局面において、本発明は、バッチの糖プロファイル値の一つまたは複数が予め選択された範囲より小さい変動を示す、多糖類調製物の一つまたは複数のバッチを作製する方法に関する。もう一つの局面において、本発明は、それぞれのバッチの糖プロファイル値の一つまたは複数が予め選択した所望の糖プロファイルからの予め選択した範囲より小さい変動を示す、多糖類調製物の多数のバッチを含む組成物に関する。いくつかの態様において、方法には、産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定する段階、および決定の結果としてバッチを選択する段階が含まれる。いくつかの態様において、方法には、測定結果を予め選択された値、例えば参照標準値と比較する段階が含まれうる。他の態様において、方法にはさらに、例えば構造特徴の決定結果に基づいて、投与すべきバッチの用量を調節する段階が含まれうる。このように、もう一つの局面において、本発明は、試料、例えばエノキサパリン（Lovenox（商標））、ダルテパリン（Fragmin（商標））、セルトパリン（Sandoarin（商標））、アルデパリン（Normiflo（商標））、ナドロパリン（Fraxiparin（商標））、パルナパリン（Fluxum（商標））、レビパリン（Clivarin（商標））、チンザパリン（Innohep（商標）またはLogiparin（商標））、またはフォンダパリヌクス（Arixtra（商標））が含まれるがこれらに限定されないグリコサミノグリカン（GAG）、HLGAG、UFH、FH、またはLMWHのような多糖類の混合集団を含む組成物を含む試料を分析すること、および以下の一つまたは複数が予め選択した範囲に存在するか否かを決定すること： $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ 、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}$ 、 $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ 、 ΔUH_{NS} 、 $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ 、 $\Delta UH_{NAc,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ 、または $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ ；および／または $I/GH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $I/GH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその組み合わせ；それによって組成物に関する参照標準を決定することによって、組成物、例えば薬物に関する参照標準値を決定する方法に関する。いくつかの態様において、方法には、前述の全て、例えばピーク1、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ （例えば、15～85モル%）；ピーク2、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ （例えば、0.1～20モル%）；ピーク4、 $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ （例えば、0.1～10モル%）；ピーク6、 $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ （例えば、0.1～5モル%）；および／またはピーク8、 $I/GH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $I/GH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその混合物（例えば、0.1～20モル%）が予め選択した範囲内に存在するか否かを決定する段階が含まれる。一つ

10

20

30

40

50

の態様において、患者に投与される用量または量は、例えば抗第Xa/IIa因子活性レベルを維持するために、例えば抗第Xa因子活性の100 IUの用量を維持するために、存在するピーク8のレベルに基づいて調節する。

【0048】

一つの態様において、本発明は、組成物を分析して、混合物における成分の一つまたは複数の生物学的同等性および／または生物学的利用能を決定することによって、薬物に関する参照標準を決定する方法に関する。本明細書において用いられるように、「生物学的同等性」は、薬学的同等物または薬学的代用物における活性成分または活性部分が、「類似の条件で同じモル用量で投与した場合に薬物作用部位で利用可能となる割合および程度に有意な差が存在しないこと」を意味する。

10

【0049】

本明細書において用いられるように、「生物学的利用能」は、「活性成分または活性部分が医薬品から吸収されて、作用部位で利用できるようになる速度および程度」である。血流に吸収されることを意図しない化合物の場合、生物学的利用能は、活性成分または活性部分が作用部位で利用できるようになる速度および／または程度を反映すると意図される測定によって評価してもよい。薬物動態学的見通しから、所定の製剤に関する生物学的利用能データは、溶液、懸濁液、皮下または静脈内投与剤形に関する生物学的利用能データと比較した場合に、全身循環に吸収される経口投与量の相対的分画の推定量を提供する。生物学的利用能試験は、薬物の分布、排泄、吸収に及ぼす栄養の影響、用量比例性、および／または活性部分および適当であれば不活性部分の薬物動態の直線性に関連した他の薬物動態情報を提供する可能性がある。生物学的利用能データはまた、透過性ならびに全身前酵素および／または輸送体（例えば、p-糖タンパク質）の影響のような全身循環に入る前の薬物物質の特性に間接的に関する情報も提供する可能性がある。経口投与した医薬品の生物学的利用能は、全身循環から採取した試料において、活性成分および／または活性部分および適当であればその活性代謝物の濃度を経時的に測定することによって得られる全身曝露プロファイルを作製することによって示してもよい。

20

【0050】

いくつかのインビボおよびインビトロ法を用いて、製品の質の生物学的利用能を測定して、生物学的同等性を確立することができる。これらには、薬物動態、薬動力学、臨床およびインビトロ試験が含まれる。

30

【0051】

本明細書において用いられるように、「薬物動態」は、医薬品からの薬物物質の全身循環への放出と共に、生理的変数（例えば、胃内容排出、運動度、pH）によって測定した排泄、分布容積、および吸収の動態を意味する。薬物動態は、血液、血漿、および／または血清のような入手できる生物学的マトリクスにおいて評価してもよい。薬物動態の測定にはまた、AUC、活性の用量依存性、最高血漿レベル、最高までの時間、分布半減期、および最終半減期が含まれてもよい。

【0052】

本明細書において用いられるように、「薬動力学」は、骨密度測定およびカリパー全身脂肪を含む全身評価；肺機能試験、呼気中二酸化窒素、肺撮像を含む呼吸器評価；心モニタリング、歩行時血圧、ホルターモニタリング、遠隔測定、ECG、バイタルサイン、心撮像を含む心血管評価；脳電図、精神機能試験、精神運動機能試験、薬物動態EEGを含む神経系評価；聴力試験、聴覚鼻腔計、眼圧、デジタル網膜造影を含むENT評価；ならびに胃pHモニタリング、内視鏡、撮像、および／または胃運動度を含む消化管評価を用いて、臨床薬物反応において多様性を引き起こす要因を明らかにすることを意味する。

40

【0053】

このように、一つの局面において、本発明は、生物学的同等性を決定する方法に関する。方法には、以下のいくつかまたは全てが含まれる：第一の組成物の構造特徴を提供または決定する段階；第一の組成物の生物学的利用能を提供または決定する段階；第二の組成物の構造特徴を提供または決定する段階；第二の組成物の生物学的利用能を提供または決

50

定する段階；および第一と第二の組成物の構造組成と生物学的利用能を比較する段階。いくつかの態様において、生物学的利用能は、一つまたは複数の被験体、例えばヒトもしくは動物被験体または実験動物において組成物の吸収特性を決定すること；および一つまたは複数の被験体、例えばヒトもしくは動物被験体または実験動物において組成物の排泄特徴を決定することによって決定される。

【0054】

本発明にはまた、多糖類を投与した被験体をモニターする方法が含まれる。現在まで、ヘパリンおよびHLGAG調製物を投与した被験体は、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）またはトロンビン凝固時間（TCT）を調べることによってモニターされている。しかし、この試験は大部分がフィブリノーゲンおよび第VIII因子のような被験体に内因性の他の物質の活性および利用率に依存しており、このように実際のレベルの正確な指標を示さない可能性がある。さらに、この試験はまた、有意な抗第IIa因子活性の存在にも依存し、これは当技術分野で現在既知のLMWHには実質的に存在しない。ヘパリンを投与したが、不適当なaPTT反応を示す患者は、抗第Xa因子アッセイ法を用いて評価することができる。定量的抗第Xa因子アッセイ法は、ループス抗凝固物質または第XII因子および接触因子（プレカリクレインおよび高分子量キニノーゲン）の欠損に関連する可能性があるaPTT延長を有する患者においてヘパリンをモニターするために必要である；現在の抗第Xa因子アッセイ法は費用が高く、長時間を要し、容易に利用できないことから、抗第Xa因子レベルを追跡する新しい方法が必要である。

【0055】

このように、本発明はまた、投与される多糖類の成分の一つまたは複数のレベルをモニターする段階を含む、多糖類を投与した被験体をモニターする方法にも関する。一つの態様において、本発明は、単一の成分レベルをモニターする方法に関する。さらなる態様において、本発明は、多糖類の生物活性に関連した成分レベルをモニターすることに関する。もう一つの態様において、本発明は、抗第IIa因子活性または抗第Xa因子活性に相関する多糖類の成分レベルをモニターすることを含む、多糖類を投与した被験体をモニターすることに関する。他の局面において、方法には、活性、例えばPF4結合に相関する多糖類の一つまたは複数の成分のレベル、例えば血清レベルをモニターすることによって、多糖類、例えばLMWHを投与した被験体をモニターすることが含まれる。本発明の方法には、ヘパリナーゼ消化を予め行わずに血漿中のヘパリンの六糖および八糖分画をモニターすることが含まれる；より小さい分画は、ヘパリナーゼまたは化学消化物質のような、本明細書に記述の物質によって試料を処理した後にモニターしてもよい。

【0056】

このように、もう一つの局面において、本発明は、抗第Xa因子活性を有するヘパリンに関して試料または被験体、例えば、被験体からの試料を分析する方法を提供する。いくつかの態様において、試料は、体液、例えば血液または血液由来液体、または尿を含む。いくつかの態様において、ヘパリンは、UFHまたはLMWH、例えば抗第Xa因子活性を有するLMWH、M118、M115、M411、M108、M405、M312、エノキサパリン；ダルテパリン；セルトパリン；アルデパリン；ナドロパリン；パルナパリン；リビパリン；チンザパリン；またはフォンダパリヌクスを含む。方法には、以下のいくつかまたは全てが含まれる：試料、例えば被験体から、例えばヒトもしくは動物被験体または実験動物からの試料を提供する段階； $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその断片もしくは複数の断片からなる群より選択される一つまたは複数の成分が試料中に存在するか否かを決定する段階；および任意に、成分または複数の成分レベルを測定する段階。いくつかの態様において、段階は、例えば予め選択した間隔、例えば2～24時間毎、4～12時間毎、6～10時間毎の連続的なモニタリングで繰り返される。いくつかの態様において、方法にはまた、基準値、例えば被験体にヘパリンを投与する前に成分または複数の成分に関する基準値を確立することが含まれる。いくつかの態様において、方法にはまた、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ 、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}$ 、 $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ 、 ΔUH_{NS} 、 $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ 、または $\Delta UH_{NAC,6S}$ が試料中に存在するか否かを決定する段階が含まれる。いくつかの

態様において、方法はさらに、ピーク9、ピーク10またはピーク11の一つまたは複数の成分が試料中に存在するか否かを決定する段階を含む。いくつかの態様において、方法には、細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターすることが含まれる。いくつかの態様において、方法にはまた、産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定することが含まれる。いくつかの態様において、方法にはまた、測定の結果としてバッチを選択することが含まれる。いくつかの態様において、方法にはまた、測定結果を、予め選択された値、例えば参照標準値と比較することが含まれる。

【0057】

いくつかの態様において、決定する段階には、試料を精製する段階；任意に試料を分画する段階；試料を少なくとも一つの薬剤に接触させる段階；および消化した試料の構造特徴を決定する段階が含まれる。薬剤は、酵素、例えばヘパリン分解酵素、例えばヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼ、ならびに機能的に活性なその変種および断片、または化学物質、例えば H_2O_2 、 Cu^+ および H_2O_2 、亜硝酸イソアミル、亜硝酸、ベンジルエステル、またはアルカリ処理となりうる。

【0058】

いくつかの態様において、決定する段階には、任意に試料を精製する段階；一つまたは複数の成分に対して特異的な試薬、例えばペプチド、タンパク質、レクチン、または抗体に試料を接触させる段階；および成分に対する抗体の結合を検出する段階が含まれる。いくつかの態様において、決定には、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその断片もしくは複数の断片からなる群より選択される一つまたは複数の成分が0.1~20モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0059】

いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、外科的介入、例えば血管形成術、ステント留置、心肺バイパス技法、組織または臓器移植、冠動脈再生手術、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、PCI、および人工器官置換手術を受けている、受けるリスクがある、またはそれから回復途中である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、血液、GFR、または尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNレベルによって測定された異常な腎機能を有する被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症、例えばHITを有するかまたは有するリスクがある。ヒトまたは動物被験体は、過体重、または肥満である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の過体重である被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、極めて痩せたまたは虚弱である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の低体重である被験体である、または免疫欠損症、例えばHIV/AIDSを有する被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は小児患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は妊娠している。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は脊髄または硬膜外血腫を有する患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、人工心臓弁を有する患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体はATIII欠損症または異常を有する。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は第Xa因子欠損症または異常を有する。

【0060】

いくつかの態様において、方法はさらに、細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターすることを含む。いくつかの態様において、方法には、産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定することが含まれる。いくつかの態様において、方法には、測定の結果としてバッチを選択することがさらに含まれる。いくつかの態様において、方法には、決定結果を予め選択した値、例えば参照標準値と比較することがさらに含まれる。

【0061】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、試料には、20%未満もしくはそれに等しい部分が<2000 Da種である、68%を超えるもしくはそれに等しい部分が2000~8000 Da種である、および18%未満もしくはそれに等しい部分が>8000 Da種である多糖類集団、または市販のエノキサパリン調製物において認められるものと同じ多糖類集団であって、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、多糖類集団が含まれる。いくつかの態様において、試料は約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する。いくつかの態様において、試料はpHが5.5~7.5である。いくつかの態様において、試料の一つまたは複数の成分はタグを付けられている、または標識されている。

【0062】

もう一つの局面において、本発明は、試料または被験体を分析する方法、例えば抗第IIa因子活性を有するヘパリンを有する被験体をモニターする方法を提供する。いくつかの態様において、試料は、体液、例えば血液または血液由来液体、または尿を含む。いくつかの態様において、ヘパリンは、UFHまたはLMWH、例えば抗第Xa因子活性を有するLMWH、M118、M115、M411、M108、M405、M312、エノキサパリン；ダルテパリン；セルトパリン；アルデパリン；ナドロパリン；パルナパリン；リビパリン；チンザパリン；またはフォンダパリヌクスを含む。方法には、以下のいくつかまたは全て、典型的に全てが含まれる：試料、例えば被験体、例えばヒトもしくは動物被験体または実験動物からの試料を提供する段階；および抗第IIa因子活性に関連することが知られている一つまたは複数の構造特徴産出物が試料に存在するか否かを決定する段階；および任意に、成分または複数の成分レベルを決定する段階。いくつかの態様において、一つまたは複数の段階を、例えば予め選択した間隔、例えば2~24時間毎、4~12時間毎、6~10時間毎、または連続的に繰り返す。

【0063】

いくつかの態様において、抗第IIa因子活性に関連した構造特徴産出物は、一つまたは複数の他の二糖単位と共に、 $\Delta \text{UH}_{\text{NAC}, 6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}, 6\text{S}}$ 、 $\Delta \text{UH}_{\text{NS}, 6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}, 6\text{S}}$ 、 $\Delta \text{UH}_{\text{NAC}, 6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}}$ 、または $\Delta \text{UH}_{\text{NS}, 6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}}$ の少なくとも一つを含む多糖類である。いくつかの態様において、方法はさらに、被験体にヘパリンを投与する前に成分または複数の成分に関する基準値を確立することを含む。いくつかの態様において、方法はさらに、細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターすることをさらに含む。いくつかの態様において、方法には、産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定することが含まれる。いくつかの態様において、方法には、測定の結果としてバッチを選択することがさらに含まれる。いくつかの態様において、方法にはさらに、予め選択した値、例えば参照標準値と測定結果とを比較することが含まれる。

【0064】

いくつかの態様において、決定する段階には、試料を精製する段階；任意に試料を分画する段階；試料を少なくとも一つの薬剤に接触させる段階；および消化した試料の構造特徴を決定する段階が含まれる。薬剤は、酵素、例えばヘパリン分解酵素、例えばヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼ、ならびに機能的に活性なその変種および断片、または化学物質、例えば H_2O_2 、 Cu^+ および H_2O_2 、亜硝酸イソアミル、亜硝酸、ベンジルエステル、またはアルカリ処理となりうる。

【0065】

いくつかの態様において、決定する段階には、任意に試料を精製する段階；一つまたは複数の成分に対して特異的な試薬、例えばペプチド、タンパク質、レクチン、または抗体に試料を接触させる段階；および成分に対する抗体の結合を検出する段階が含まれる。いくつかの態様において、決定には、 $\Delta \text{UH}_{\text{NAC}, 6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}, 6\text{S}}$ 、 $\Delta \text{UH}_{\text{NS}, 6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}, 6\text{S}}$ 、 $\Delta \text{UH}_{\text{NAC}, 6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}}$ 、 $\Delta \text{UH}_{\text{NS}, 6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}}$ 、またはその断片もしくは複数の断片からなる群より選択される一つまたは複数の成分が0.1~20モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

【0066】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、外科的介入、例えば血管形成術、ステント留置、心肺バイパス技法、組織または臓器移植、冠動脈再生手術、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、PCI、および人工器官置換手術を受けている、受けるリスクがある、またはそれから回復途中である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、血液、GFR、または尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNレベルによって測定された異常な腎機能を有する被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症、例えばHITを有するかまたは有するリスクがある。ヒトまたは動物被験体は、過体重、または肥満である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の過体重である被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、極めて痩せたまたは虚弱である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の低体重である被験体である、または免疫欠損症、例えばHIV/AIDSを有する被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は小児患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は妊娠している。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は脊髄または硬膜外血腫を有する患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、人工心臓弁を有する患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体はATIII欠損症または異常を有する。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は第Xa因子欠損症または異常を有する。

10

【0067】

いくつかの態様において、方法はさらに、細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターすることを含む。いくつかの態様において、方法には、産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定することが含まれる。いくつかの態様において、方法には、測定の結果としてバッチを選択することがさらに含まれる。いくつかの態様において、方法には、決定結果を予め選択した値、例えば参照標準値と比較することがさらに含まれる。

20

【0068】

いくつかの態様において、試料には、20%未満もしくはそれに等しい部分が<2000 Da種である、68%を超えるもしくはそれに等しい部分が2000~8000 Da種である、および18%未満もしくはそれに等しい部分が>8000 Da種である多糖類集団、または市販のエノキサパリン調製物において認められるものと同じ多糖類集団であって、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、多糖類集団が含まれる。いくつかの態様において、試料は約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する。いくつかの態様において、試料はpHが5.5~7.5である。いくつかの態様において、試料の一つまたは複数の成分はタグを付けられている、または標識されている。

30

【0069】

もう一つの局面において、本発明は、試料または被験体を分析する方法、例えば、試料または被験体におけるLMWHをモニターする方法を提供する。方法には、以下のいくつかまたは全て、典型的に全てが含まれる：試料、例えば被験体、例えばヒトまたは動物被験体、もしくは実験動物からの試料を提供する段階；および一つまたは複数の非天然の糖、例えば改変糖が試料中に存在するか否かを決定する段階；および任意に、非天然の糖のレベルを決定する段階が含まれる。いくつかの態様において、LMWHは、エノキサパリンである。いくつかの態様において非天然の糖は、ベンジル化されている。いくつかの態様において、非天然の糖は、一つまたは複数のピーク9および10を含む。いくつかの態様において、試料は体液、例えば血液または血液に由来する体液、または尿を含む。いくつかの態様において、一つまたは複数の段階を、例えば予め選択した間隔、例えば2~24時間毎、4~12時間毎、6~10時間毎、または連続的に繰り返す。

40

【0070】

いくつかの態様において、決定する段階には、試料を精製する段階；任意に試料を分画する段階；試料を少なくとも一つの薬剤に接触させる段階；および消化した試料の構造特徴を決定する段階が含まれる。薬剤は、酵素、例えばヘパリン分解酵素、例えばヘパリナ

50

ーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼ、ならびに機能的に活性なその変種および断片、または化学物質、例えば H_2O_2 、 Cu^+ および H_2O_2 、亜硝酸イソアミル、亜硝酸、ベンジルエステル、またはアルカリ処理となりうる。

【0071】

いくつかの態様において、決定する段階には、任意に試料を精製する段階；一つまたは複数の成分、例えばペプチド、タンパク質、レクチン、または抗体に対して特異的な試薬に試料を接触させる段階；および成分に対する抗体の結合を検出する段階。いくつかの態様において、決定には、 $\Delta \text{UH}_{\text{NAC}, 6\text{S}} \text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}, 6\text{S}}$ 、 $\Delta \text{UH}_{\text{NS}, 6\text{S}} \text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}, 6\text{S}}$ 、 $\Delta \text{UH}_{\text{NAC}, 6\text{S}} \text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}}$ 、 $\Delta \text{UH}_{\text{NS}, 6\text{S}} \text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}}$ 、またはその断片もしくは複数の断片からなる群より選択される一つまたは複数の成分が0.1~20モル%の範囲で存在するか否かを決定する段階が含まれる。

10

【0072】

いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、外科的介入、例えば血管形成術、ステント留置、心肺バイパス技法、組織または臓器移植、冠動脈再生手術、整形外科手術、股関節骨折のような骨折の治療、股関節置換、膝関節置換、PCI、および人工器官置換手術を受けている、受けるリスクがある、またはそれから回復途中である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、血液、GFR、または尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNレベルによって測定された異常な腎機能を有する被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、ヘパリンまたはLMWHの投与に関連した合併症、例えばHITを有するかまたは有するリスクがある。ヒトまたは動物被験体は、過体重、または肥満である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の過体重である被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、極めて痩せたまたは虚弱である、例えば20、30、40、50ポンドまたはそれ以上の低体重である被験体である、または免疫欠損症、例えばHIV/AIDSを有する被験体である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は小児患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は妊娠している。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は脊髄または硬膜外血腫を有する患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は、人工心臓弁を有する患者である。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体はATIII欠損症または異常を有する。いくつかの態様において、ヒトまたは動物被験体は第Xa因子欠損症または異常を有する。

20

30

【0073】

いくつかの態様において、方法はさらに、細胞または被験体、例えば実験動物における存在、組織分布、空間的分布、時間的分布、または保持時間をモニターすることを含む。いくつかの態様において、方法には、産物の一つまたは複数のバッチの構造特徴を決定することが含まれる。いくつかの態様において、方法には、測定の結果としてバッチを選択することがさらに含まれる。いくつかの態様において、方法には、決定結果を予め選択した値、例えば参照標準値と比較することがさらに含まれる。

【0074】

いくつかの態様において、試料には、20%未満もしくはそれに等しい部分が<2000 Da種である、68%を超えるもしくはそれに等しい部分が2000~8000 Da種である、および18%未満もしくはそれに等しい部分が>8000 Da種である多糖類集団、または市販のエノキサパリン調製物において認められるものと同じ多糖類集団であって、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、多糖類集団が含まれる。いくつかの態様において、試料は約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する。いくつかの態様において、試料はpHが5.5~7.5である。いくつかの態様において、試料の一つまたは複数の成分はタグを付けられている、または標識されている。

40

【0075】

もう一つの局面において、本発明は、以下の段階を含む、多糖類薬物、例えばヘパリン、合成ヘパリン、またはLMWHを分析する方法に関する：

a. 予め選択した患者反応の第一のレベル、例えば薬物に対する陰性または陽性反応の

50

予め選択したレベルを有する薬物の第一のバッチに関して、第一の構造特徴、例えば、本明細書に記述の任意の構造特徴を決定する段階；

b. 予め選択した患者反応の第二のレベル、例えば薬物に対する陰性または陽性反応の予め選択したレベルを有する薬物の第二のバッチに関して、第二の構造特徴、例えば、本明細書に記述の任意の構造特徴を決定する段階；および

c. 薬物の特性、例えば化学または構造特性と、予め選択した患者反応のレベルとの相関の有無を決定するために第一と第二の構造特徴決定値を比較する段階。

【0076】

本明細書において用いられるように、「予め選択した患者反応」は、それが陽性または陰性反応であるかによらず、対象となる任意の反応を意味する。例えば、患者の陽性反応は、抗凝固、腫瘍の退縮、血栓症、例えば深部静脈血栓症のような合併症の発生を伴わない外科的介入、不安定アンギナおよび／または非Q波心筋梗塞の虚血合併症が発生しないこと、深部静脈血栓症の軽減、および急性疾患の際に運動を重度に制限されたことによる血栓塞栓合併症が発生しないことであってもよい。患者の陰性反応は、硬膜外または脊髄血腫；出血；血小板減少症；血清アミノトランスフェラーゼの上昇；局所刺激、疼痛、血腫、斑状出血、および紅斑；貧血；斑状出血；発熱；悪心；浮腫；末梢浮腫；呼吸困難；混乱；下痢；肺炎；心房細動；心不全；肺浮腫；注射部位局所反応（すなわち、皮膚の壊死、結節、炎症、毛細血管出血）；全身性アレルギー反応（すなわち、そう痒症、蕁麻疹、アナフィラキシー様反応）；水疱性発疹；紫斑病；血小板増加症；血栓を伴う血小板減少症；高脂血症；顕著な高トリグリセリド血症を伴う高脂血症；運動失調、運動性の減少、チアノーゼ；および昏睡であってもよい。

【0077】

もう一つの局面において、本発明は、望ましくない患者反応のレベルが比較的高い薬物の第一のバッチの構造特徴を決定して、望ましくない患者反応のレベルが比較的低い薬物の第二のバッチの構造特徴を決定して、高いまたは低いレベルの患者反応に相関した一次または二次産出物を選択することによって、患者を治療するために用いられる、より安全でより変動の少ないLMWHを選択することに関する。本明細書において用いられるように、「望ましい患者反応」は、とりわけ、上記の予め選択された陽性患者反応を指す。本明細書において用いられるように、「望ましくない患者反応」は、上記のように陰性患者反応のような望ましくない患者の反応を指す。

【0078】

本発明はまた、色素産生試薬およびELISA技術が含まれるがこれらに限定されない当技術分野で既知のアッセイ技術を用いてLMWHの活性成分のより精製型をアッセイすることに基づく「ベッドサイド」のモニタリング系の開発にも関する。

【0079】

もう一つの局面において、本発明は、投与される多糖類の成分の一つまたは複数のレベルをモニターすることを含む、多糖類を投与した被験体をモニターすることによって、肥満患者、小児患者、血液および尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、GFRまたはBUNによって測定した腎機能異常患者、ならびに心介入患者集団のように、LMWH治療から除外されている患者を治療する方法に関する。もう一つの局面において、本発明は、投与された多糖類の成分の一つまたは複数のレベルをモニターすることを含む、多糖類を投与した被験体をモニターすることによって、LMWHの合併症を有する患者を治療する方法に関する。もう一つの局面において、本発明は、陰性患者反応に関連した一次または二次産出物の低レベルを有するまたは有しないLMWHを選択することによって、陰性患者反応のリスクが上昇したために、LMWH治療からこれまで除外されていた患者を治療するためにLMWHを選択することに関する。本発明はさらに、一つまたは複数の非天然糖成分を含むLMWH組成物に関する。好ましい態様において、非天然の糖成分は、ピーク9、10および11に関連した糖であってもよい。関連する局面において、本発明は、好ましくは被験体の体液において、非天然の糖のレベルに関して被験体をモニターすることを含む、非天然の糖成分を有するLMWHを投与した被験体をモニターする方法に関する。

【0080】

本発明はまた、エノキサパリン（Lovenox（商標））、ダルテパリン（Fragmin（商標））、セルトパリン（Sandobarin（商標））、アルデパリン（Normiflo（商標））、ナドロパリン（Fraxiparin（商標））、パルナパリン（Fluxum（商標））、レビパリン（Clivarin（商標））、チンザパリン（Innohep（商標）またはLogiparin（商標））、またはフォンダパリヌクス（Arixtra（商標））が含まれるがこれらに限定されないグリコサミノグリカン（GAG）、HLGAG、UFH、FH、またはLMWHのような多糖類の混合集団を含む組成物の安全性を決定する方法に関する。

【0081】

本発明はまた、特定のヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンの作用機序をさらに理解して、硫酸化多糖類の不均一集団におけるヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンの一つまたは複数の構造特徴および活性を分析して定義することによって、それを他のヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンと区別する方法に関する。

【0082】

本発明はまた、特定のヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンの特定の個々の成分の作用機序をさらに理解して、それによって特定の成分の構造特徴および活性を分析および定義することによって、それを他のヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンから区別する方法に関する。本発明はさらに、中でも、Keiserら、Nat. Med. 7、123～8（2001）に開示される方法のようなチップに基づく特異的アフィニティアッセイ法を用いて、疾患状態または陰性患者反応に関連するタンパク質または他の分子に結合するヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンの成分を特異的に同定する方法に関する。様々なタンパク質に対するヘパリン断片の結合を評価するチップに基づくアプローチは、血漿および他のタンパク質のアレイをアッセイして、結合パートナーを評価するために容易に用いられる可能性がある。

【0083】

本発明はまた、特定の成分の構造特徴および活性ならびに特定の疾患の治療においてそれらの成分が有する作用を分析および明らかにすることによって、特定のヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンの特定の個々の成分の作用機序を理解することによって、止血の調節物質以外の領域において用いられるヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンの治療的有用性を広げる方法にも関する。

【0084】

本発明はまた、特定の成分の構造特徴および活性ならびに特定の疾患の治療においてそれらの成分が有する作用を分析および明らかにすることによって、これらの疾患に対する活性が増強した組成物を設計することによって、止血の調節物質以外の領域において用いられるヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンの治療的有用性を広げる方法にも関する。一つの態様において、方法には、例えば特定の活性に関連した構造特徴の有無、例えば特定の活性に関連した構造特徴の予め選択した範囲に基づいて、ヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンを選択することが含まれる。一つの態様において、方法には、血小板減少症、例えばヘパリン誘発血小板減少症（HIT）のリスクがあると決定された患者、例えば免疫欠損、例えばAIDS、HIV、遺伝性免疫不全または環境もしくは医学物質（例えば、化学療法剤または放射線治療）によって引き起こされた免疫不全を有する患者を治療するためにヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンの組成物を設計することが含まれる。ヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリン組成物は、そのような被験体を治療するために設計することができ、例えばPF4結合が減少し、例えば以下の一つまたは複数の量が減少し、例えば以下の一つまたは複数の予め選択した範囲と比較して減少している組成物を設計することができる：ピーク1、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ （例えば、約60モル%未満、例えば15～30モル%）；ピーク2、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ （例えば、約5モル%未満、例えば1.8～3.5モル%）；ピーク4、 $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ （例えば、約2モル%未満、例えば0.1～1.0モル%）；および／またはピーク6、 $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ （例えば、約2モル%未満、例えば0.1～0.5モル%）。好ましくは、組成物は以下の全ての減少量を有する：ピーク1： $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ ；ピーク2： $\Delta U_{2S}H_{NS}$ ；ピーク4： $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ ；および／またはピーク6： $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ 。

【0085】

本発明はまた、より大きさの小さい、かつ／または血栓に到達および治療できる増加した抗第IIa因子活性を有する新規LMWHを設計することによって、凝血に結合した血栓を治療するためのヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンの治療的有用性を広げることに関する。

【0086】

本発明はまた、エノキサパリン (Lovenox (商標))、ダルテパリン (Fragmin (商標))、セルトパリン (Sandobarin (商標))、アルデパリン (Normiflo (商標))、ナドロパリン (Fraxiparin (商標))、パルナパリン (Fluxum (商標))、レビパリン (Clivarin (商標))、チンザパリン (Innohep (商標) または Logiparin (商標))、またはフォンダパリヌクス (Arixtra (商標)) が含まれるがこれらに限定されないグリコサミノグリカン (GAG)、HLGAG、UFH、FH、またはLMWHのような多糖類の混合集団を含む組成物の特定の成分の構造特徴および活性を分析および定義することによって、そして望ましい活性を有する成分に関して濃縮して、望ましくない活性を有する成分を希釈することによって、選択的なモニタリングを行うことができ、そして実際に製造することができる、高い活性を有する、抗第Xa因子活性と抗第IIa因子活性の双方を有する、力価を測定可能である、十分に特徴が調べられている、中和可能である、HITの減少を含むより少ない副作用、魅力的な薬物動態、および／または減少したPF4結合のような特徴を含むがこれらに限定されない理想的な産物プロファイルを有するヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンを設計する方法に関する。本明細書において用いられるように、「望ましい活性」は、所定の適応にとって有益な活性、例えば、とりわけ本明細書において定義した陽性患者反応を指す。 「望ましくない活性」には、所定の適応にとって有益でない活性、例えばとりわけ、本明細書において定義した陰性患者反応が含まれてもよい。所定の活性は、特定の適応にとっては望ましくないが、他の適応、特に先に述べたように急性または外傷の状況においては望ましい抗第IIa因子活性のように、一つの適応に関して所望の活性であるが、もう一つの適応にとって望ましくない活性であってもよい。

【0087】

本発明はまた、抗第Xa因子活性が、内部グルコサミン上に重要な3-Oスルフェート基を有する少なくとも五糖を必要とすること、抗第IIa因子活性がより長い糖を必要とし、五糖とトロンビン結合部位との位置方向が重要であることに基づく合理的設計を用いて、異なるまたは理想的な抗第IIa因子活性を有する新規ヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンを設計する方法にも関する。方法には、PF4結合の減少には、ピーク1、2、4および6の存在の減少を必要とし、例えばこれらのピークの存在はUFHと比較して減少している、例えばこれらのピークの存在はピーク1に関して約60モル%未満、例えば15~30モル%；ピーク2に関して約5モル%未満、例えば、1.5~3.5モル%；ピーク4に関して約2モル%未満、例えば0.1~1.5モル%、および／またはピーク6に関して約2モル%未満、例えば0.1~0.5モル%であることに基づく合理的設計を用いて、新規ヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンを設計することが含まれる。

【0088】

本発明はまた、本発明の方法によって作製された新規ヘパリン、例えば任意にモニターすることができる、高い活性を有する、抗第Xa因子活性と抗第IIa因子活性の双方を有する、力価測定可能、十分に特徴が調べられていること、中和可能であること（例えば、プロタミンによって）、減少したHITを含む減少した副作用、および／または魅力的な薬物動態のような特徴が含まれるがこれらに限定されない所望の産物プロファイルを有する新規ヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリン、ならびに異なるまたは増強された抗第IIa因子活性を有する新規ヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリンにも関する。このように、一つの局面において、本発明には、抗第IIa因子活性と抗第Xa因子活性の比が増加または減少したLMWH調製物、例えば本明細書に記述の方法によって作製されたLMWH調製物が含まれる。もう一つの局面において、本発明には、抗第IIa因子活性と抗第Xa因子活性の比が異なる二つまたはそれ以上のLMWH調製物のパネル、例えば本明細書に記述の方法によって作製されたLMWH調製物が含まれる。

【0089】

一つの局面において、本発明には、予め選択された生物活性を有するまたは有しないLMWH調製物を産生する方法が含まれる。方法には、以下のいくつかまたは全てが含まれる：
一つまたは複数のアリコートのヘパリンを提供する段階；任意にヘパリンを分画する段階；活性を生じるように設計された条件でヘパリンのアリコートを改変する段階；および任意に消化されたアリコートを精製する段階。いくつかの態様において、所望の生物活性は、細胞成長または増殖；細胞遊走、接着、または活性化；脈管新生；血管新生；凝固；および炎症プロセスのような細胞活性に対する作用である。いくつかの態様において、所望の生物活性は抗第IIa因子活性、抗第Xa因子活性；血小板第4因子結合；FGF結合；またはプロタミンによる中和に対する感受性である。いくつかの態様において、所望の生物活性は抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性である。いくつかの態様において、アリコートは、FHまたはUFHを化学的または酵素的に消化することによって、例えば一つまたは複数のヘパリン分解酵素、例えばヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、ヘパリナーゼIV、ヘパラナーゼまたは機能的に活性なその変種および断片によって行われる。いくつかの態様において、化学的消化は、化学物質、例えば酸化的解重合、例えば、 H_2O_2 または Cu^+ および H_2O_2 、脱アミノ切断、例えば亜硝酸イソアミルまたは亜硝酸による脱アミノ切断、ベンジルエステルによる β -脱離切断および／またはアルカリ処理からなる群より選択される化学物質によって行われる。いくつかの態様において、方法にはまた、所望の生物活性に関してLMWH調製物を試験することが含まれる。

【0090】

もう一つの局面において、本発明にはまた、本明細書に記述の方法によって調製されたLMWH調製物、例えば抗第IIa因子活性と抗第Xa因子活性を有するLMWH調製物が含まれる。

【0091】

もう一つの局面において、本発明は、20%未満またはそれに等しい <2000 Da種、68%より多いまたはそれに等しい $2000\sim8000$ Da種、および18%未満またはそれに等しい >8000 Da種を含み、好ましくは平均分子量が約4500 Daである抗第IIa因子活性と抗第Xa因子活性の双方を有するLMWH調製物を提供し、抗第Xa因子活性は、プロタミンによって $>50\%$ 中和可能であり、抗第IIa因子活性はプロタミンによって $>70\%$ 中和可能である。いくつかの態様において、LMWH組成物は、約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する。いくつかの態様において、LMWH組成物のpHは5.5～7.5である。いくつかの態様において、LMWH組成物は、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ を15～85モル%； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ を0.1～20モル%； $\Delta UH_{NS,6S}$ を0.1～20モル%； $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ を0.1～10モル%； ΔUH_{NS} を0.1～10モル%； $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ を0.1～5モル%； $\Delta UH_{NAC,6S}$ を0.1～15モル%；および $\Delta U_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ を0.1～20モル%の範囲で含む。いくつかの態様において、LMWH組成物は、非天然の糖を含まないまたは実質的に含まない。いくつかの態様において、LMWH組成物は30 IU/mgより大きい抗第IIa因子活性をさらに含む。

【0092】

もう一つの局面において、本発明は、非天然の糖、例えばピーク9および10に関連した糖を実質的に含まず、20%未満またはそれに等しい <2000 Da種、68%より多いまたはそれに等しい $2000\sim8000$ Da種、および18%未満またはそれに等しい >8000 Da種を含み、好ましくは平均分子量が約4500 DaであるLMWHを提供する。いくつかの態様において、LMWH組成物は約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する。いくつかの態様において、LMWH組成物はpH 5.5～7.5を有する。いくつかの態様において、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ を15～85モル%； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ を0.1～20モル%； $\Delta UH_{NS,6S}$ を0.1～20モル%； $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ を0.1～10モル%； ΔUH_{NS} を0.1～10モル%； $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ を0.1～5モル%； $\Delta UH_{NAC,6S}$ を0.1～15モル%；および $\Delta U_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ を0.1～20モル%の範囲で含む。いくつかの態様において、LMWH組成物は、非天然糖を含まないまたは実質的に含まない。いくつかの態様において、LMWH組成物は30 IU/mgより大きい抗第IIa因子活性をさらに含む。

【0093】

もう一つの局面において、本発明は、エノキサパリンと比較して濃縮された、例えばエ

ノキサパリンより5%、10%、または20%より多い非天然の糖、例えばピーク9、10、11または12に関連した糖を有し、20%未満またはそれに等しい<2000 Da種、68%より多いまたはそれに等しい2000~8000 Da種、および18%未満またはそれに等しい>8000 Da種を含み、好ましくは平均分子量が約4500 DaであるLMWHを提供する。いくつかの態様において、LMWH組成物は約100 IU/mgの抗第Xa因子活性を有する。いくつかの態様において、LMWH組成物はpH 5.5~7.5を有する。いくつかの態様において、LMWH組成物は $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ を15~85モル%； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ を0.1~20モル%； $\Delta UH_{NS,6S}$ を0.1~20モル%； $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ を0.1~10モル%； ΔUH_{NS} を0.1~10モル%； $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ を0.1~5モル%； $\Delta UH_{NAc,6S}$ を0.1~15モル%；および $\Delta U_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ を0.1~20モル%の範囲で含む。いくつかの態様において、LMWH組成物は30 IU/mgより大きい抗第IIa因子活性をさらに含む。

10

【0094】

他の局面において、本発明は、エノキサパリン（Lovenox（商標））、ダルテパリン（Fragmin（商標））、セルトパリン（Sandobarin（商標））、アルデパリン（Normiflo（商標））、ナドロパリン（Fraxiparin（商標））、パルナパリン（Fluxum（商標））、レビパリン（Clivarin（商標））、チンザパリン（Innohep（商標）またはLogiparin（商標））、またはフォンダパリヌクス（Arixtra（商標））が含まれるがこれらに限定されない、バッチ間変動がより小さいグリコサミノグリカン（GAG）、HLGAG、UFH、FH、またはLMWHのような多糖類の混合集団を含む組成物に関する。

【0095】

他の局面において、本発明は、抗第Xa因子活性をプロタミンによって完全に中和することができる、例えば抗第Xa因子活性を $\geq 50\%$ 中和することができるグリコサミノグリカン（GAG）、HLGAG、UFH、FH、またはLMWHのような多糖類の混合集団を含む組成物に関する。

20

【0096】

他の局面において、本発明は、抗第IIa因子活性を完全に中和することができる、例えば抗第IIa因子活性を $\geq 70\%$ 中和することができるグリコサミノグリカン（GAG）、HLGAG、UFH、FH、またはLMWHのような多糖類の混合集団を含む組成物に関する。

【0097】

他の局面において、本発明は、組成物がより低いPF4結合配列を有する、グリコサミノグリカン（GAG）、HLGAG、UFH、FH、またはLMWHのような多糖類の混合集団を含む組成物に関する。

30

【0098】

他の局面において、本発明は、組成物を作製するプロセスが、確実により低いPF4結合配列を有するように最適にされている、グリコサミノグリカン（GAG）、HLGAG、UFH、FH、またはLMWHのような多糖類の混合集団を含む組成物に関する。いくつかの態様において、組成物には、UFHと比較してピーク1、ピーク2、ピーク4および／またはピーク6の減少量、例えばピーク1、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ （例えば、約50モル%未満、例えば15~30モル%）ピーク2、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ （例えば約5モル%未満、例えば1.8~3.5モル%）；ピーク4、 $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ （例えば、約2モル%未満、例えば0.1~1.0モル%）および／またはピーク6、 $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ （例えば、約2モル%未満、例えば0.1~0.5モル%）が含まれる。

40

【0099】

他の局面において、本発明は、15~20単糖単位を含み、任意にATIIIに対する結合親和性（Kd）が1~60 nM、抗第Xa因子活性が5~30 nM（IC50）、および／または抗第IIa因子活性が0.5~100または500 nM（IC50）を超える超低分子量ヘパリン（ULMWH）を含む、本発明の方法によって作製された組成物に関する。これらのULMWHはまた、プロタミンによる中和に対して感受性であってもよく、および／またはPF4に対する結合親和性を実質的に含まなくてもよい。

【0100】

他の局面において、本発明は、平均分子量が1500~3000 Daであって、抗第Xa因子活性が94~150 IU/mgの範囲、好ましくは125~150 IU/mg、より好ましくは140~150 IU/mgの

50

範囲であって、抗第IIa因子活性が ≤ 10 IU/mg、好ましくは ≤ 5 IU/mgであって、および抗第Xa因子-抗第IIa因子活性比が10:1より大きい、好ましくは25:1より大きく、任意に糖単位2~26個を有するヘパリンの少なくとも一つの硫酸化多糖類を含むLMWHを含む、本発明の方法によって作製された組成物に関する。

【0101】

他の局面において、本発明は、タグを含むLMWH組成物に関する。いくつかの態様において、タグは検出可能な電磁放射線を放出する。いくつかの態様において、タグは蛍光標識、質量分析法に適合する質量標識、⁰¹⁸、イットリウム、^{3H}、親和性標識、pH感受性標識、または放射性標識である。もう一つの局面において、本発明は、試料を提供する段階；任意に試料を精製する段階；および試料中のタグの存在を測定する段階を含む、タグを含むLMWHの存在に関して試料を評価する方法を提供する。いくつかの態様において、方法にはまたタグのレベルを決定する段階が含まれる。いくつかの態様において、試料はタグを含むLMWHを投与される被験体、例えば本明細書に記述のヒトもしくは動物被験体または実験動物である。いくつかの態様において、LMWHは、M118、M115、M411、M108、M405、M312、エノキサパリン、ダルテパリン、セルトパリン、アルデパリン、ナドロパリン、パルナパリン、リビパリン、チンザパリン、またはフォンダパリヌクスである。いくつかの態様において、試料は体液、例えば血液、血漿、および／または尿である。もう一つの局面において、本発明には、以下の一つまたは複数を含む、本明細書に記述のLMWHの存在に関して試料を評価する方法を行うためのキットが含まれる：タグ、タグを多糖類に結合させる化合物、および標準物質、例えば多糖類またはタグを付けた多糖類。

【0102】

本発明はまた、マーカーまたはタグを含むLMWH組成物にも関する；好ましい態様において、本発明は、ELISAまたは色素産生アッセイ法を用いて検出することができるマーカーまたはタグを含むLMWHに関する。好ましい態様において、マーカーまたはタグは抗体、蛍光標識、質量分析法に適合性の質量標識、親和性標識、放射性標識、UV標識、NMR標識、ESRもしくはEPRスピン標識、または他の発色団であってもよい。さらに好ましい態様において、マーカーまたはタグは、生物活性を有するLMWHの成分に結合してもよい。関連する局面において、本発明は、好ましくは被験体の体液において、マーカーまたはタグの存在および／またはレベルに関して被験体をモニターする段階を含む、マーカーまたはタグを有するLMWHを投与した被験体をモニターする方法に関する。本発明はさらに、そのようなマーカーまたはタグを検出するためのキットに関する。

【0103】

本発明の組成物は、天然資源に由来してもよく、または合成であってもよい。いくつかの態様において、天然資源はブタ腸粘膜である。

【0104】

組成物は、いくつかの態様においてインビボ輸送のために調製してもよい。例えば、調製物は、吸入、経口、皮下、静脈内、腹腔内、経皮、口腔内、舌下、非経口、筋肉内、鼻腔内、気管内、眼内、膈内、直腸内、経皮、および／または舌下輸送のために調製してもよい。

【0105】

任意に、組成物には一つまたは複数の添加剤が含まれてもよい。添加剤には、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、またはコンドロイチン硫酸が含まれるがこれらに限定されない。

【0106】

本発明のいくつかの態様において、調製物は特定の量のヘパリンが含まれる。例えば、調製物は80~100モル%のヘパリン、60~80モル%のヘパリン、40~60モル%のヘパリン、または20~40モル%のヘパリンが含まれてもよい。ヘパリンは、例えばLMWH、天然のヘパリン、ヘパリン硫酸、バイオテクノロジーに由来するヘパリン、化学改変ヘパリン、合成ヘパリン、またはヘパリン類似体であってもよい。

【0107】

他の局面において、本発明は、本発明の組成物を用いて疾患を治療または予防する方法

に関する。例えば、本発明には、被験体が、血栓症のような凝固関連疾患、心血管疾患、血管疾患、もしくは心房細動；偏頭痛、アテローム性動脈硬化症；自己免疫疾患またはアトピー障害のような炎症障害；アレルギー；喘息、気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、もしくは肺再灌流損傷のような呼吸器障害；癌もしくは転移障害；眼の血管形成障害のような血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎；アルツハイマー病；股関節骨折のような骨折からなる群より選択される障害を有するもしくはリスクがある、または外科療法、臓器移植、整形外科手術、股関節置換、膝関節置換、経皮冠動脈介入（PCI）、ステント留置、血管形成術、冠動脈バイパス移植手術（CABG）を受けているかもしくは受けたことがある、被験体における病態を治療または予防する方法が含まれる。本発明の組成物は、疾患を治療または予防するために有効量で疾患の一つまたは複数を含むまたは発症するリスクを有する被験体に投与する。

10

【0108】

他の局面において、本発明は、疾患状態の変化に関して増強した活性を有する、例えばPF4結合が減少したもう一つのLMWHを投与するより、特定の疾患状態にとって増強した活性を有する、例えば高レベルの抗第Xa因子または第IIa因子活性を有するLMWHを患者に投与することによって、患者の治療の経過において異なる相で特異的産物プロファイルを有する異なるおよび特異的新規LMWHを用いて、疾患を治療または予防する方法に関する。

【0109】

いくつかの局面において、本発明は、被験体、例えばヒトまたは動物被験体を治療する方法を提供する。方法には、以下のいくつかまたは全てが含まれる：抗第IIa因子活性と抗第Xa因子活性の異なる比を有する二つまたはそれ以上のLMWH調製物のパネルを提供する段階；所望の比を有するLMWH調製物を選択する段階；およびLMWH調製物の治療的有效量の1回または複数回の用量を被験体に投与する段階。

20

【0110】

いくつかの態様において、方法には、被験体においてLMWHレベルをモニターすること、例えば被験体におけるLMWHレベルを経時的に繰り返しモニターすることが含まれる。いくつかの態様において、方法には、LMWH調製物の用量を調節することが含まれる。いくつかの態様において、方法には、LMWH調製物の投与に反応して被験体の状態をモニターすることが含まれる。いくつかの態様において、方法は被験体の状態を一定期間モニターする。いくつかの態様において、方法には、経時的な被験体の状態の変化に基づいて異なるLMWH調製物を投与することが含まれる。もう一つの局面において、本発明は、高い抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性を有する本明細書に記述のLMWH調製物の治療量の1回または複数回の用量を投与して、被験体の状態をモニターした後、高い抗第Xa因子活性のみを有する本明細書に記述のLMWH調製物の治療量の1回または複数回の用量を投与することによって、患者における凝固を阻害する方法を特徴とする。いくつかの態様において、方法には、LMWH調製物の構造特徴を提供または決定すること、および任意に被験体の状態をLMWHの構造特徴に相関させることが含まれる。

30

【0111】

もう一つの局面において、本発明は、減少したPF4結合活性を有する本明細書に記述の組成物の治療的有效量を被験体に投与することを含む、HITと既に診断された被験体を治療する方法を提供する。

40

【0112】

もう一つの局面において、本発明は、特定の適応において用いるためのヘパリンの安全性または適切性を決定する方法を提供する。方法には、以下のいくつかまたは全て、典型的に全てが含まれる：ヘパリンの構造特徴を提供する段階；参照構造特徴を提供する段階；例えばヘパリンの構造特徴を参照構造特徴と比較することによって、ヘパリンが許容されるか否かを決定する段階；予め選択した類似性の指標を満足すれば、ヘパリンは安全または適している。いくつかの態様において、参照構造特徴は、一つまたは複数の望ましい作用に関連している。好ましい態様において、ヘパリンの安全性または適切性は、試料に存在するピーク1、2、4および／または6のレベルに基づいて決定される；例えば、ピーク

50

1、2、4および／または6の一つまたは複数のレベルがより低いバッチは、より高いレベルのバッチより安全である。

【0113】

もう一つの局面において、本発明は、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ 、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}$ 、 $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ 、 ΔUH_{NS} 、 $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}$ 、および $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ からなる群より選択される一つまたは複数の成分糖に関して予め選択した値からの予め選択した範囲のバッチ間変動を有するLMWH調製物の一つまたは複数のバッチを作製する方法を提供する。方法には、以下のいくつかまたは全て、典型的に全てが含まれる：所望の値を選択する段階；UFHのアリコートを提供する段階；任意にアリコートを分画する段階；アリコートにおける成分レベルを決定する段階；および所望の値からの変動が予め選択した範囲より少ないバッチまたは複数のバッチを選択する段階。いくつかの態様において、予め選択した変動は2.5%未満、より好ましくは2%未満、または1%未満である。いくつかの態様において、p1に関する予め選択した変動は、3%未満、2%未満、または1%未満である。いくつかの態様において、p2に関して予め選択した変動は16%未満、15%未満、11%未満、10%未満、5%未満、1%未満である。いくつかの態様において、p3に関して予め選択した変動は、8%未満、4%未満、2%未満、1%未満である。いくつかの態様において、p4に関して予め選択した変動は、22%未満、15%未満、10%未満、5%未満、1%未満である。いくつかの態様において、p5に関して予め選択した変動は3%未満、2%未満、または1%未満である。いくつかの態様において、p6に関して予め選択した変動は10%未満、5%未満、2%未満、1%未満である。いくつかの態様において、p7に関して予め選択した変動は90%未満、75%未満、50%未満、25%未満、10%未満、5%未満である。いくつかの態様において、p8に関して予め選択した変動は、12%未満、10%未満、8%未満、5%未満、4%未満、2%未満である。

【0114】

もう一つの局面において、本発明は、p1～p8からなる群より選択される一つまたは複数の成分糖に関して、予め選択した値から予め選択した範囲より小さいバッチ間変動を有する、例えば2.5%未満、より好ましくは2%未満、または1%未満であるLMWH調製物の一つまたは複数のバッチを作製する方法を提供する。方法には、以下のいくつかまたは全て、典型的に全てが含まれる：値を選択する段階；UFHまたはLMWHのアリコートを提供する段階；アリコートを沈殿させる段階；任意に、アリコートにイオン交換プロセスを行う段階；および所望の値が得られる条件でアリコートを薬剤に接触させる段階。いくつかの態様において、薬剤は、ヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIII、および機能的に活性なその変種および断片からなる群より選択されるヘパリン分解酵素である。いくつかの態様において、薬剤は化学物質、例えば H_2O_2 、 Cu^+ および H_2O_2 、亜硝酸イソアミル、亜硝酸、ベンジルエステル、またはアルカリ処理からなる群より選択される化学物質である。もう一つの局面において、本発明は、本明細書に記述の方法によって調製されたLMWH調製物の多数のバッチを含む組成物を提供する。もう一つの局面において、本発明は、本明細書に記載の方法によって調製されたLMWH調製物を含む組成物を提供する。

【0115】

もう一つの局面において、本発明は、それぞれのバッチに関して、p1～p8からなる群より選択される一つまたは複数の成分のモル%の変動が予め選択した変動より小さい、例えば、2.5%未満、より好ましくは2%未満、または1%未満であるLMWH調製物の多数のバッチを含む組成物を提供する。

【0116】

もう一つの局面において、本発明は、p9～p10からなる群より選択される一つまたは複数の成分のバッチのそれぞれの糖プロファイルの変動が、予め選択した変動より小さい、例えば2.5%未満、より好ましくは2%未満、または1%未満である、LMWH調製物の多数のバッチを含む組成物を提供する。

【0117】

もう一つの局面において、本発明はまた、例えばLMWHの糖プロファイルに応じて、投与

されるLMWHのバッチの用量を調節する方法を提供する。例えば、用量は、ピーク、例えばピーク1、2、4、6および／または8のレベルに応じて調節してもよい。好ましい態様において、バッチの用量は、バッチに存在するピーク8のレベルに基づいて調節する。

【0118】

もう一つの局面において、本発明は、多糖類、例えばUFHまたはLMWHを特定する要素、多糖類の一つまたは複数の成分を同定する要素、および成分のモル%の範囲を同定する要素を有する、記録、例えばコンピューター読み取り可能な記録を提供する。

【0119】

本発明の限度のそれぞれは、本発明の様々な態様を含みうる。したがって、如何なる一つの要素、または要素の組み合わせも含む本発明の限界のそれぞれも、本発明のそれぞれの局面に含まれうると予想される。

【0120】

詳細な説明

本発明は、治療的治療のための、多糖類、特にヘパリンおよびLMWHのような硫酸化多糖類および改善された組成物を分析およびモニターする方法における有意な進歩を含む。例えば、本明細書に記述の方法を用いて、UFHおよびLMWHのようなHLGAGを含む硫酸化GAGの組成物を分析できること、ならびにとりわけ調製物の組成および構造を示し、組成物の活性を予測するために用いることができる「構造特徴」として本明細書において呼ばれる一次および二次産出物の組を作製できることが発見された。さらに、この情報を用いてLMWH組成物の産生を標準化して、それによってバッチ間変動がより少ないLMWHおよび望ましい活性と望ましくない活性の比が改善されたLMWHを得ることができる。例えば、高い抗第Xa因子活性を有する多糖類は、肺動脈塞栓症、急性心筋梗塞または不安定アングナのような凝固障害および心血管疾患を治療するために特に有用である。さらに、PF4結合が減少した多糖類が望ましい。

【0121】

同様に、低い抗第Xa因子活性を有する多糖類は、アテローム性動脈硬化症、呼吸器障害、癌もしくは転移、炎症障害、アレルギー、血管新生障害、および／または肺、腎臓、心臓、腸、脳、もしくは骨格筋虚血-再灌流損傷を治療するために特に有用であることも発見されている。呼吸器障害には、喘息、気腫、および成人呼吸窮迫症候群（ARDS）が含まれるがこれらに限定されない。血管新生障害には、眼の血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎が含まれるがこれらに限定されない。このように、外科技法を受ける準備をしている、外科技法を受けている、または回復途中である、または組織もしくは臓器移植を受けている被験体を治療するために特に有用となるであろう化合物を作製することが可能である。外科技法には、心肺バイパス手術、冠動脈再生術、整形外科手術、人工器官置換手術、股関節骨折を含む骨折の治療、PCI、股関節置換、膝関節置換、およびステント留置または血管形成術が含まれるがこれらに限定されない。

【0122】

同様に、高い抗第IIa因子活性を有する多糖類は、有用な治療特性を有することが発見されている；例えば、肺内輸送系を通して輸送されると、高い抗IIa活性を有する多糖類の作用発現が迅速であることは、急性疾患を治療するために有用である。このように、本発明は、急性心症候群および心筋梗塞の治療に用いるために高い抗第IIa因子活性を有する組成物に関する。

【0123】

これまで、高い抗第IIa因子活性は、治療目的にとって望ましくないと考えられてきた。その結果、多糖類調製物は、低い抗第IIa因子活性に基づいて選択されてきた可能性がある。本発明の組成物には、配列に関係なく、より高いまたはより低い抗第IIa因子活性のいずれかを有するように設計された多糖類組成物が含まれる。本発明の組成物には、高い抗第IIa因子活性と配列特異的な低い抗第IIa因子活性とを有するように設計された多糖類組成物およびこれらの組成物を用いる方法が含まれる。例えば、より高い抗第IIa因子活性を有する組成物（例えば、M118およびM312）は、動脈血栓症（ST上昇、MIおよび急性

冠動脈症候群（ACS））のような適応にとって、より低い抗第IIa因子活性を有するLMWHより強力である。

【0124】

「多糖類」は、互いに結合した単糖類からなるポリマーである。多くの多糖類において、多糖類の基礎となる構築ブロックは実際は、反復してもしなくてもよい二糖単位である。このように、多糖類に関して用いる場合の単位は、多糖類の基礎構築ブロックを指し、これには単量体構築ブロック（単糖）または二量体構築ブロック（二糖）が含まれる。

【0125】

いくつかの多糖類は治療活性を有することが判明している。特に、ヘパリンは広く用いられる臨床抗凝固剤である。ヘパリンは主に、二つのメカニズムを通してその作用を発揮し、その双方が、ポリマー内に含まれる特異的な五糖配列 $H_{NAc/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ に対するアンチトロンビンIII（AT-III）の結合を含む。第一に、AT-IIIが五糖に結合すると、第Xa因子の阻害を媒介するタンパク質の構造的変化を誘導する。第二に、トロンビン（第IIa因子）も同様に、五糖AT-III結合部位の近傍の部位でヘパリンに結合する。AT-III、トロンビンおよびヘパリンの三元複合体の形成によって、トロンビンが不活化される。AT-III五糖結合部位のみを必要とするその抗第Xa因子活性とは異なり、ヘパリンの抗第IIa因子活性は大きさに依存し、AT-III、トロンビン、およびヘパリン三元複合体を効率的に形成するために少なくとも18糖単位を必要とする。さらに、ヘパリンはまた、循環系の内側に並ぶ内皮に対するヘパリンの結合を通してTFPIの放出を制御する。凝固カスケードの外因性経路の調節物質であるTFPIの都合のよい放出も同様に、さらなる凝固を引き起こす。ヘパリンは、抗凝固特性の他に哺乳類におけるその複雑さおよび広い分布を有することから、広範囲のさらなる生物活性に関与する可能性があるとして唆されている。

【0126】

ヘパリンは、様々な臨床状況において非常に有効であり、他の多くにおいて用いられる可能性があるが、ヘパリン治療に関連した副作用は多く、多様である。ヘパリン誘発血小板減少症（HIT）のような副作用は、様々なタンパク質の結合ドメインを提供する未分画ヘパリン（UFH）の長鎖に主に関連している。このために、UFHに対する有効な代替体として低分子量ヘパリン（LMWH）が生成および利用されるようになった。その結果、鎖長が短く、副作用がより少ない新規LMWHを作製するために、多くの戦略が設計された。ヘパリンの最も活性の強い生物学的断片を構成するLMWHを設計することが特に重要である。多糖類の生物活性部分の例には、ヘパリンのAT-III結合ドメインの五糖、ヘパリンのFGF結合ドメインの四糖、 $I/GH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GUH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $I/GUH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、または $I/GUH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ が含まれるがこれらに限定されない。他の局面において、望ましくない生物活性、例えばPF4結合を有する、またはそれに関連した部分が減少したLMWH、例えば $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ （ピーク1）； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ （ピーク2）； $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ （ピーク4）；および／または $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ （ピーク6）を設計することが重要である。

【0127】

LMWHと類似の構造および機能的特性を有する硫酸化多糖類調製物を構築したところ、抗第Xa因子活性と抗第IIa因子活性を有すると共にTFPIの放出を促進することが判明している。これらの属性のために、これらの新規硫酸化多糖類調製物の構造を、有用な活性と関連させて評価することができるであろう。下記に示すように、本発明の新規硫酸化多糖類調製物は、UFHおよび他のLMWHと比較して、抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性の増加または第IIa因子活性の減少のみならず、TFPI放出を示す。これらの新規LMWHは同様に、ピーク8のより高いモル%を含む。同様に、ピーク8のモル%は、抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性に比例相関することも判明している。同様に、新規多糖類はPF4結合活性が減少していることも示されている。これらの新規LMWHは、より低いモル%の $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ （ピーク1）； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ （ピーク2）； $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ （ピーク4）；および／または $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ （ピーク6）を有する。

【0128】

本発明における多糖類（例えば、四糖、三糖、二糖等）のモル%は、試料中の多糖類の

モル数の百分率を指し、この場合1モルは 6.02×10^{23} 分子である。言い換えれば、モル%はまた、単に、試料中に存在する分子数で除した多糖類の分子数に100を乗じたものである。

【0129】

同様に、ヘパリン配列の非還元末端における四糖の存在によって高い抗第IIa因子活性が得られることも発見されている。過去には、四糖のこの位置によって、低い抗第IIa因子活性を有する組成物が得られるであろうと考えられた。本明細書において、ヘパリン配列の非還元末端における四糖の顕著な量と、高い抗IIa活性を有する組成物が開発されている。

【0130】

したがって、本発明は、ピーク8によって示される四糖断片のような有用な特徴の有用な量を含む硫酸化多糖類の組成物およびピーク8を含む組成物を用いる治療法に関する。

【0131】

不均一なヘパリン配列集団を含む多糖類混合物を、温度、溶媒、および酵素に関して本明細書において記述した条件を変化させることによって、特定の大きさのヘパリンに分画することができる。この技法によって得られたLMWHは、抗凝固に関して高い活性を有し、ピーク1によって示される高度硫酸化二糖の少量を有する(<70モル%)。一般的に、より高い分子量および/またはより高い電荷分画は、より高温で、エタノールまたはアセトンのような極性溶媒の少量によって沈殿する。温度を低下させる、および/または極性溶媒の量を増加させても、より低い分子量、より低い電荷、およびより高い抗凝固活性を有する分画が沈殿する可能性がある。本明細書に開示の方法を用いて、沈殿パラメータは、所望の産物に適合する調製物を得るために、当業者によって不当な実験を行うことなく変更してもよい。

【0132】

選択的沈殿後、第二の分画、LMWH分画を処理して、先に定義したピーク8によって示される四糖の特定の量を含む硫酸化多糖類調製物を産生する。処理段階は、硫酸化多糖類調製物において有用な濃縮四糖を生じるために酵素または化学的消化を含んでもよい。一つの態様において、分画は消化されて、消化に用いる酵素はヘパリナーゼIまたは機能的に活性なその変種もしくは断片である。もう一つの態様において、分画は消化されて、消化に用いる酵素はヘパリナーゼIIまたは機能的に活性なその変種もしくは断片である。もう一つの態様において、分画は消化されて、消化に用いる酵素はヘパリナーゼIIIまたは機能的に活性なその変種もしくは断片である。もう一つの態様において、分画は消化されて、消化に用いられる酵素は、一つまたは複数のヘパリナーゼI、II、III、IVおよびヘパラナーゼまたは機能的に活性なその変種もしくは断片の混合物である。「ヘパリナーゼ」という用語は、一般的に天然のヘパリナーゼの他に機能的に活性なその変種および断片を含むように用いられ、これにはとりわけ、細菌および組み換え型ヘパリナーゼI、II、III、IV、およびヘパラナーゼが含まれる。米国特許第6,217,863,B1号および係属中の出願第09/384,959号および第09/802,285号を含む、いくつかの特許および特許出願は、ヘパリナーゼの有用な改変ならびに変種および断片を記述している。用いるヘパリナーゼの濃度および用いられる期間(部分的または完全な消化)に応じて、特定の分子量および/または電荷のヘパリンが得られる。制限的に解釈されないが例として、ヘパリナーゼ1モル等量によるヘパリンの部分消化によって、より長い消化時間の反応の場合より高い分子量および/または高い電荷の分画が得られるであろう。同様に、ヘパリナーゼのモル等量を増加させることによって、ヘパリナーゼのより低いモル等量を用いる場合より低い分子量および/または低い電荷を有する分画が得られるであろう。いくつかの態様において、特定の分子量、電荷、および/または生物活性のヘパリンを得るために、ヘパリナーゼ濃度および消化の長さを、本明細書に記述のように、塩、温度、および溶媒組成と

10

20

30

40

50

組み合わせて用いることができる。

【0133】

または、選択的沈殿後、LMWH分画を化学的に分解して、濃縮された硫酸化多糖類調製物を産生してもよい。分画は、 H_2O_2 または Cu^+ および H_2O_2 による酸化的解重合、亜硝酸イソアミルまたは亜硝酸による脱アミノ切断、 β -脱離切断、アルカリ処理またはヘパリナーゼによるヘパリンのベンジルエステルによる β -脱離切断が含まれるがこれらに限定されない群より選択される方法を用いて化学分解することができる。

【0134】

または、四糖／ピーク8含有配列を合成によって産生してもよい。多糖類を合成する方法の例には、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、2001年1月23日に提出された「Solid- and Solution-phase Synthesis of Heparin and Other Glycosaminoglycans」と題する米国特許出願第60/263,621号、および1999年10月6日にObadiah J. PlanteおよびPeter H. Seebergerによって提出された「Synthesis Of Oligosaccharides In Solution And On The Solid Support」と題する米国特許出願第09/413381号が含まれる。

【0135】

硫酸化多糖類は、いくつかの態様において実質的に純粋であってもよい。本明細書において用いられるように、「実質的に純粋」という用語は、多糖類がその意図する使用のために実際のおよび適当な程度に他の物質を本質的に含まないことを意味する。特に、多糖類は実質的に純粋であって、その宿主環境の他の生物学的成分を実質的に含まない、例えば薬学的調製物を産生するために有用であるために、例えば宿主環境から他の生物学的構成成分の20%、15%、10%、5%、2%、または1%未満を有する。

【0136】

場合によっては、組成物には、実質的に純粋であるか否かによらず、一つまたは複数のヘパリン分子のような他の化合物が含まれてもよい。本明細書において用いられるように、「ヘパリン」という用語は、ヘパリン様構造および機能的特性を有する多糖類を指す。ヘパリンには、天然のヘパリン、低分子量ヘパリン(LMWH)、ヘパリン、バイオテクノロジーによって調製されたヘパリン、化学改変ヘパリン、合成ヘパリン、およびヘパラン硫酸が含まれるがこれらに限定されない。「バイオテクノロジーによるヘパリン」または「バイオテクノロジーによって調製されたヘパリン」は、化学改変されている多糖類の天然資源から調製され、Raziら、Bioche. J. 1995、7月15日；309(Pt 2)：465～72に記述されるヘパリンを含む。化学改変ヘパリンは、Yatesら、Carbohydrate Res (1996) 11月20日；294：15～27に記述され、当業者に既知である。合成ヘパリンは当業者に周知であり、Petitou, M.ら、Bioorg Med Chem. Lett. (1999)、4月19日；9(8)：1161～6に記述される。天然のヘパリンは、天然資源(ブタ腸粘膜のような)に由来するヘパリンである。

【0137】

本発明の組成物はまた添加剤と共に調製してもよい。本明細書において用いられる「添加剤」は担体分子であってもよい。これらの添加剤は、生物活性を有しても有しなくてもよい。添加剤が生物活性を誘発する場合、活性は相補的であってもよい。すなわち、硫酸化多糖類調製物と同じ治療目的にとって有用となる可能性がある。添加剤はまた、腫瘍細胞の増殖阻害のようないくつかの特定の機能を有してもよいが、一般的に、添加剤は凝固カスケードに対して矛盾する作用を有しないことが好ましい。これらの添加剤は、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、およびコンドロイチン硫酸のような多糖類および／またはアルブミンのようなタンパク質であってもよい。他の添加剤は当業者に既知である。

【0138】

下記に示すように、本発明に従って産生された硫酸化多糖類は、先行技術のヘパリンおよびLMWH調製物に対して改善された機能的特性を有する。特定の最小量の構造特徴産物、例えば四糖 $I/GH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ ($\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ として表される) $I/GH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ ($\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ として表される)； $I/GH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ ($\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ として表される)；または $I/GH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ ($\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ として表される) (

または関連化合物)は、これらの組成物が劇的に改善された治療特性を有することから都合がよい。特定の最大量の構造特徴産出物を有する組成物、例えば $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ (ピーク1) ; $\Delta U_{2S}H_{NS}$ (ピーク2) ; $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ (ピーク4) ; および/または $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ (ピーク6) を調製できることは、これらの組成物がPF4結合の減少を有し、これがHITを引き起こす可能性を低下させることから都合がよい。このように、本発明の組成物には、エノキサパリンのような市販のLMWH調製物のそれと非常に類似の構造特徴を有する改善された、例えば望ましい要素の負荷、望ましい要素の増加、望ましくない要素の減少、望ましくない要素の消失、および/またはバッチ間変動の減少を有する調製物が含まれてもよい。

【0139】

本発明の方法において有用な多糖類の構造は、当業者に既知の技術を用いて同定することができる。いくつかの多糖類の配列は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、2000年4月24日に提出された米国特許出願第09/557,997号および第09/558,137号、ならびにVenkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. & Sasisekharan, R. (1999) Science 286, 537~42に記載される特性符号化命名法/質量分析スキーム (PEN-MALDI)、シーケンシング方法論を用いて同定されている。これらの技術を用いて、多糖類の特徴は、用いる実験上の拘束と一致する如何なる手段によっても同定することができる。分子量は、質量分析を含むいくつかの方法によって決定してもよい。多糖類の分子量を決定するために質量分析を用いることは、当技術分野で周知である。質量分析は、生成された断片の重量を報告する際のその精度 (± 1 ダルトン) のため、そして同様に必要な試料濃度がpMでよいことから、多糖類の特徴を調べるための強力なツールとして用いられている。例えば、マトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) は、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、Rhomborg, A.J. ら、PNAS USA 95: 4176~4181 (1998) ; Rhomborg, A.J. ら、PNAS USA 95, 12232~12237 (1998) ; およびErnst, S. ら、PNAS USA 95, 4182~4187 (1998) のような出版物において多糖類の断片の分子量を同定するために記述されている。イオンスプレー-MS、高速原子衝撃質量分析 (FAB-MS) および衝突活性化解離質量分析 (CAD) のような、当技術分野で既知の他のタイプの質量分析も同様に、多糖類断片の分子量を同定するために用いることができる。

【0140】

質量分析データは、天然資源から単離された、またはさらに処置を行わずに合成された、または多糖類が酵素もしくは化学物質による分解を受けた後の多糖類成分に関する情報を確認するための貴重なツールとなる可能性がある。多糖類の分子量を同定した後、これを他の既知の多糖類の分子量と比較してもよい (例えば、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許出願第09/557,997号、および第09/558,137号の方法を用いて)。これらの特許出願に示されるように、分子量を比較する一つの技術は、質量の線を生じて、未知の多糖類の分子量を質量の線と比較して、同じ分子量を有する多糖類の亜集団を決定することである。「質量の線」は、情報データベースであり、好ましくは多糖類の分子量に基づいて独自の配列を有するそれぞれの起こりうるタイプの多糖類に関する情報を保存するグラフまたはチャートの形である。質量分析データは1Daの精度で断片の質量を示すことから、長さは質量の線上の一つの質量を調べることによって断片に独自に割付される可能性がある。さらに、二糖類より長い特定の長さの断片において、質量に最小で4.02 Daの差異が存在することが質量の線から決定される可能性があるが、これは酢酸基2個 (84.08 Da) が硫酸基 (80.06 Da) に置換されたことを示している。したがって、多糖類断片の多くの硫酸基および酢酸基を、質量分析データからの質量から決定してもよく、そのような数を多糖類断片に割付してもよい。ポリマーの特徴を十分に調べるために、分子量の他に、多糖類の他の特性を決定してもよい。

【0141】

好ましい態様において、毛細管電気泳動 (CE) を用いて二糖/四糖構築ブロックを同定する。CEは、いくつかの理由からオリゴ糖分析においてSAX HPLCより優れている。CEは、層流 (LCの場合と同様に) に起因するピークの平坦化がないという事実により、従来のLCより有意に精度が高く正確である。CEを用いることによって、ヘパリナーゼ消化後の二糖

およびオリゴ糖の100%の質量バランスが可能となる。その結果、ヘパリンの多くの臨床特徴に關与するより発生率の低いオリゴ糖の全てを分離することが可能となる。さらに、CEは、LCと比較して、必要な糖の注入量が20~100倍少ない(500 fmolまたはそれ未満対毛細管LCの場合の少なくとも10 pmols)。同様に、多数の理論的プレートにより、CEの分離力は、短期間の泳動時間で硫酸塩の同一数を含む独自の産物(異性体)を分離することができるLCより高い。このように、CEを用いることによって、ヘパリンを構成する構築ブロック32個全てを分離することが可能となる。

【0142】

CEはまた、MALDI MSを含む、他の分析方法論に対する相補性に関してさらなる程度の柔軟性を提供する。さらなる態様において、本発明の方法は、生物情報科学を用いて反復して構造情報を誘導するために、CE分離および分析の後にオフラインのMALDI MS分析を用いることに関する。

10

【0143】

最後に、本発明の方法には、オリゴ糖の構造特徴に関する知見を確認することと組み合わせ、MALDI-MS、ESI-MS、CEおよびNMRを含むいくつかの技術を用いることが含まれる。本発明の方法によって、ヘパリンと、特定の治療的利用のために肝要である様々な3-O-硫酸化糖を含む様々なLMWHとの双方のCE電気泳動図において生じる全ての糖産物を単離、同定、および割付することができる。

【0144】

本発明の方法のさらなる長所は、感度である；本方法は、濃度範囲0.2~1 mg/mlまでのヘパリン試料を検出して特徴を調べることが可能である。

20

【0145】

多糖類試料の特徴を調べた後、活性をインビトロまたはインビボで評価してもよい。硫酸化多糖類調製物の活性を決定する方法を評価して下記の実施例に示す。これらの調製物はピーク8のより高いモル%を有することが判明した。ピーク8のモル%は、四糖のモル%が抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性の双方に比例相関することから、抗凝固活性の良好な予測因子であることが示された。さらに、実施例においてさらに記述したインビボ実験は、抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性と共に、TFPI放出の増加を示した。したがって、本発明の組成物は、ピーク8の含有量と共に生物学的に重要であることが証明される可能性がある他の断片、例えばPF4結合に関連している $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ (ピーク1)； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ (ピーク2)； $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ (ピーク4)；および/または $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ (ピーク6)に従って構築および評価してもよい。試料中のこれらの断片のモル量は、望ましい活性の指標であり、下記のように疾患の治療のために組成物および方法において用いることができる。さらに、これらの断片のモル量を用いて、直接的な生物アッセイ法を行う必要なく、所定のヘパリン化合物がどのような生物活性または活性レベルを有するかを予測してもよい；このように、方法は、より一貫して高い品質の産物を確保しながら能率化された製造およびコスト削減の双方に対する方法を提供する。

30

【0146】

この情報を用いて、例としての目的に限られ制限すると解釈されない以下の方法によって、生物学的同等性を同様に決定してもよい。第一に、参照標準物質を選択して、薬物の組成および生物活性に関する情報、例えばどのようにして用いられ、体内から排泄されるかを提供または決定する。それらは、本発明の方法を含む如何なる方法によっても決定することができる。参照標準物質は、既に特徴が調べられた組成物であってもよく、または新しい参照標準物質を決定してもよい。例としてLMWH調製物を検討すると、参照標準には、体内への調製物の吸収；体からの調製物の排泄速度；および調製物の構造特徴に関する情報が含まれるであろう。同じ情報を、一つまたは複数の標的組成物に関して提供または決定して、二つ(またはそれ以上)を比較する；生物学的同等性は、両者の分散によって決定する。このように、本発明はまた、生物学的同等性を決定する方法にも関する。

40

【0147】

組成物は、被験体に治療的に投与してもよい。本明細書において用いられるように、「

50

被験体」は、ヒトまたは、ヒト以外の霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、もしくは齧歯類のようなヒト以外の脊椎動物である。

【0148】

本発明の組成物は多くの治療的有用性を有し、一般的にヘパリン、LMWHまたは合成ヘパリン治療が有用な治療であると同定されている如何なるタイプの疾患の治療に用いてもよい。例えば、本発明には、被験体が血栓症のような凝固関連疾患、心血管疾患、血管疾患、もしくは心房細動；偏頭痛、アテローム性動脈硬化症；自己免疫疾患またはアトピー障害のような炎症障害；アレルギー；喘息、気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、もしくは肺再灌流損傷のような呼吸器障害；癌もしくは転移障害；眼の血管形成障害のような血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎；アルツハイマー病；股関節骨折のような骨折からなる群より選択される障害を有するもしくはリスクがある、または外科技法、臓器移植、整形外科手術、股関節置換、膝関節置換、経皮冠動脈介入（PCI）、ステント留置、血管形成術、冠動脈バイパス移植手術（CABG）を受けているかもしくは受けたことがある、治療および予防方法が含まれる。

【0149】

このように、本発明は、LMWH治療が有用である多様なインビトロ、インビボおよびエクスビボ法において有用である。例えば、LMWH組成物は、癌細胞の増殖および転移を阻害する、血管新生を防止する、脈管新生を防止する、および乾癬を防止するために有用である。これらの障害のそれぞれは当技術分野において周知であり、例えば、参照として本明細書に組み入れられる、「Harrison's Principles of Internal Medicine」（マグローヒル

【0150】

凝固経路における不均衡が過剰な凝固に向けてシフトする場合、結果は、血栓傾向の発生であり、これはしばしば心臓発作、脳卒中、深部静脈血栓症、急性冠動脈症候群、不安定アンギナ、および心筋梗塞として現れる。本明細書において用いられる「凝固関連疾患」は、局所炎症を特徴とする病態を指し、これによって、組織への血液供給の中断または減少が起こる可能性があり、これは、例えば、心筋梗塞または脳梗塞、または末梢血管疾患の場合に認められるような組織への血液供給に関与する血管の遮断の結果として、または心房細動もしくは深部静脈血栓症のような病態に関連した塞栓形成の結果として起こる可能性がある。凝固障害には、心血管疾患および脳虚血のような血管疾患が含まれるがこれらに限定されない。

【0151】

方法は、心血管疾患を治療するために有用である。心血管疾患には、急性心筋梗塞、不安定アンギナ、急性冠動脈症候群および心房細動が含まれるがこれらに限定されない。心筋梗塞は、時にアテローム性動脈硬化症によって既に狭窄した冠動脈の血栓による閉塞の後に起こる冠動脈血流の突然の減少によって起こる病態である。そのような損傷は、喫煙、高血圧症、および脂肪蓄積のような要因によって産生または促進される可能性がある。急性アンギナは、一過性の心筋虚血による。この障害は通常、だるさ、圧迫、締め付けられる、息苦しい、または胸骨下の締め付け感に関連する。事例は通常、運動または感情によって引き起こされるが、安静時にも起こりうる。

【0152】

心房細動は、感情的ストレスの結果または手術、運動、もしくは急性のアルコール中毒後に一般的に生じる一般的な不整脈の形である。持続的な型の心房細動は一般的に、心血管疾患患者に起こる。心房細動は、表面ECG上で別々のP波を示さない無秩序な心房活性を特徴とする。

【0153】

手術、麻酔を受ける、および長期間の病床または他の無活動の患者はしばしば、深部静脈血栓症または下肢および／または骨盤の深部血管の凝固であるDVTとして知られる病態に対して感受性がある。この凝固は、静脈血をポンプで送るために必要な下肢の筋活動が存在しないこと（うっ血）、局所血管損傷、または高凝固状態によって起こる。この病態

は、血液凝固が肺に移動すれば、「肺動脈塞栓」が起こるまたはそうでなければ心血管循環を妨害して生命に危険となりうる。一つの治療法は、抗凝固剤の投与を必然的に伴う。

【0154】

UFH、またはLMWHのような生体物質が乾燥粒子としての吸入後に迅速に吸入されることは、心筋梗塞、急性冠動脈症候群、および／または静脈血栓塞栓症の治療において非常に貴重となりうる。UFHの静脈内投与は、ワルファリンの経口投与と併用して静脈血栓塞栓症の治療に広く用いられている。しかし、有効性が改善され、リスクが減少したことから、LMWHは、静脈血栓塞栓症の治療におけるUFH静脈内投与に対する代用法としてますます用いられている。ヘパリン治療の有効性は、治療の最初の24時間以内に重要な治療レベル（例えば、抗第Xa因子活性および／または抗第IIa因子活性によって測定される可能性が
10

【0155】

本発明の方法は、脳虚血を治療するためにも有用である。脳虚血発作または脳虚血は、脳への血液供給が阻害されるある種の虚血病変である。脳への血液供給のこのような中断は、内因性の遮断または血管そのものの閉塞、離れた閉塞起源、不適切な脳内血流が起こる灌流圧の低下もしくは血液粘度の増加、またはくも膜下腔もしくは脳内組織における血管の破裂を含む様々な原因から起こる可能性がある。脳虚血によって、一過性もしくは永続的な欠損が起こる可能性があり、脳虚血を経験した患者における神経損傷の重症度は、
20

虚血事象の強度および期間に依存する。一過性の虚血発作（TIA）は、脳への血流がごく短時間中断され、しばしば24時間以内に消失する一時的な神経欠損を引き起こす発作である。TIAの症状には、顔または四肢のしびれまたは虚脱、言葉を明瞭に話すことができない、および／または他人の言うことを理解できない、視力喪失または視力不明瞭、およびめまい感が含まれる。脳卒中とも呼ばれる永続的な脳虚血発作は、血栓または血栓塞栓症のいずれかに起因する脳への血流のより長期間の中断によって引き起こされる。脳卒中は、ニューロンの喪失を引き起こし、これによって典型的に、改善する可能性があるものの完全には寛解しない神経学的欠陥が起こる。血栓塞栓発作は、血栓または塞栓による頭蓋外または頭蓋内血管の閉塞によって起こる。脳卒中が血栓または塞栓によって引き起こされたかを区別することはしばしば難しいことから、これらのメカニズムのいずれかによって引き起こされた脳卒中を指す場合には「血栓塞栓症」という用語が用いられている。本発明の方法はまた、人工器官手術後に発症する可能性がある血栓塞栓合併症の治療および
30

【0156】

本発明の組成物はまた、被験体が、血栓症のような凝固関連疾患、心血管疾患、血管疾患、もしくは心房細動；偏頭痛、アテローム性動脈硬化症；自己免疫疾患またはアトピー障害のような炎症障害；アレルギー；喘息、気腫、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、もしくは肺再灌流損傷のような呼吸器障害；癌もしくは転移障害；眼の血管形成障害のような血管新生障害、骨粗鬆症、乾癬、および関節炎；アルツハイマー病；股関節骨折のような骨折からなる群より選択される障害を有するもしくはリスクがある、または
40

外科技法、臓器移植、整形外科手術、股関節置換、膝関節置換、経皮冠動脈介入（PCI）、ステント留置、血管形成術、冠動脈バイパス移植手術（CABG）を受けているかもしくは受けたことがある、被験体を治療または予防するために有用である。

【0157】

本発明の組成物はまた、嚢胞性線維症、喘息、アレルギー、気腫、および成人呼吸窮迫症候群（ARDS）のような呼吸器疾患を含む炎症またはアレルギー障害；肺再灌流損傷；肺、腎臓、心臓、および腸管の虚血再灌流損傷；ならびに肺の腫瘍増殖および転移の治療において有用である。

【0158】

嚢胞性線維症は呼吸器系に影響を及ぼす慢性進行性疾患である。嚢胞性線維症の一つの
50

重篤な結末は、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）肺感染症であり、これだけで嚢胞性線維症における罹患率および死亡率のほぼ90%を占める。嚢胞性線維症を治療する治療法には、病原性感染症を治療するための抗菌剤が含まれる。

【0159】

喘息は、炎症、気道狭窄、および吸入物質に対する気道反応性の増加を特徴とする呼吸器系の障害である。喘息はしばしばアトピーまたはアレルギー症状に関連するが必ずしもそうとは限らない。喘息にはまた、運動誘発喘息、気管支刺激剤に対する気管支収縮反応、遅延型過敏症、自己免疫脳脊髄炎、および関連障害が含まれてもよい。アレルギーは一般的にアレルゲンに対するIgE抗体産生によって引き起こされる。気腫は肺胞中隔の破壊による末端細気管支に対して遠位の気室の膨張である。気腫は、エラスターゼによる肺損傷から生じる。ヘパリンのような生体活性物質は、このエラスターゼ誘発損傷を阻害することができる。成人呼吸窮迫症候群とは、重度の心房低酸素症を伴う多様な観念形態の多くの急性のデフューズ（defuse）性の浸潤性肺病変を含む用語である。ARDSの最もよくある原因の一つは敗血症である。治療可能な他のタイプの炎症疾患は、難治性潰瘍性大腸炎、クローン病、非特異的潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、および間質性膀胱炎である。

10

【0160】

いくつかの態様において、本発明の方法は硫酸化多糖類を用いる急性血栓塞栓性脳卒中の治療に向けられる。急性脳卒中は、脳への血液供給の中断である虚血事象に起因する神経損傷を含む医学症候群である。

【0161】

脳卒中を治療するための、単独または他の治療物質と併用した場合の硫酸化多糖類調製物の有効量は、脳卒中に起因するインビボ脳損傷を減少するために十分な量である。脳損傷の減少は、本発明の治療を行わなければ血栓塞栓性脳卒中を経験する被験体において起こるであろう脳への損傷の任意の予防である。いくつかの生理的パラメータを用いて、例えば治療前の患者、無処置脳卒中患者、または血栓溶解物質単独によって治療した脳卒中患者のパラメータと比較して、より小さい梗塞のサイズ、限局的脳血流の改善、および頭蓋内圧の低下を含む脳損傷の減少を評価してもよい。

20

【0162】

薬学的硫酸化多糖類調製物は、凝固関連疾患を治療するために、単独または他の治療物質と併用して用いてもよい。凝固関連疾患を治療するために有用な治療物質の例には、抗凝固物質、抗血小板物質、および血栓溶解物質が含まれる。

30

【0163】

抗凝固物質は、血液成分の凝固を防止して、このように凝血形成を予防する。抗凝固剤には、ヘパリン、ワルファリン、クマジン、ジクマロール、フェンプロクモン、アセノクマロール、エチルビスクマセレート、ヒルジン、ビバラルチン、および他の直接的なトロンビン阻害剤、およびインダンジオン誘導体が含まれるがこれらに限定されない。

【0164】

抗血小板物質は、血小板の凝集を阻害して、しばしば一過性の虚血発作または卒中を経験した患者における血栓塞栓発作を予防するために用いられる。抗血小板物質には、アスピリン、チクロピジンおよびクロピドグレルのようなチエノピリジン誘導体、ジピリダモール、ならびにスルフィンピラゾンと共にRGD模倣体が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0165】

血栓溶解剤は、血栓塞栓発作を引き起こす凝血を溶解する。血栓溶解物質は、急性静脈血栓塞栓症および肺動脈塞栓症の治療に用いられており、当業者に周知である（例えば、Hennekensら、*J. Am. Coll Cardiol.* : 25（補足7）、18S~22S（1995）；Holmesら、*J. Am Coll Cardiol.* : 25（補足7）、10S~17S（1995））。血栓溶解物質には、プラスミノゲン、 α 2-アンチプラスミン、ストレプトキナーゼ、アンチストレプラーゼ、TNK、組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）、およびウロキナーゼが含まれるがこれらに限定されない。本明細書において用いられる「tPA」には、天然のtPAおよび組み換え型tPAと共

50

に天然のtPAの酵素または線維素溶解活性を保持するtPAの改変型が含まれる。tPAの酵素活性は、プラスミノーゲンをプラスミンに変換する分子の能力を評価することによって測定することができる。tPAの線維素溶解活性は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、Carlsonら、Anal. Biochem. 168:428~435 (1988) によって記述される精製凝血溶解アッセイ法およびBennett, W.F.ら、1991、上記によって記述されるその改変型のような、当技術分野において既知の任意のインビトロ凝血溶解活性によって決定してもよい。

【0166】

一つの態様において、硫酸化多糖類調製物は血管新生を阻害するために用いられる。硫酸化多糖類調製物が血管新生を阻害する有効量を、その治療を必要とする被験体に投与する。本明細書において用いられる血管新生とは、新しい血管の不適当な形成である。「血管新生」はしばしば、内皮細胞が内皮の分裂誘発物質である増殖因子群を分泌して、内皮細胞の伸長および増殖を引き起こし、それによって新しい血管が形成される腫瘍において起こる。血管新生マイトゲンのいくつかは、内皮細胞増殖因子に関連するヘパリン結合ペプチドである。血管新生の阻害は、動物モデルにおいて腫瘍の退縮を引き起こし、治療的抗癌剤としての利用を示唆している。血管新生を阻害する有効量は、腫瘍の中へと増殖しつつある血管数を減少させるために十分な硫酸化多糖類調製物の量である。この量は、腫瘍および血管新生の動物モデルにおいて評価することができ、その多くは当技術分野において既知である。

10

【0167】

硫酸化多糖類調製物はまた、眼科疾患に関連した血管新生を阻害する場合にも有用である。もう一つの態様において、硫酸化多糖類調製物は乾癬を治療するために投与される。乾癬は慢性炎症によって引き起こされる一般的な皮膚科疾患である。

20

【0168】

硫酸化多糖類含有組成物はまた、癌細胞の増殖および転移を阻害する可能性がある。このように、本発明の方法は、被験体における腫瘍細胞の増殖、血管新生または転移を治療および／または予防するために有用である。本明細書において用いられるように、「予防」および「予防する」という用語は、生物作用、例えば癌または腫瘍細胞の血管新生、増殖または転移を完全または部分的に阻害することのみならず、生物作用、例えば癌または腫瘍細胞の血管新生、増殖または転移の如何なる増加も阻害することを指す。

30

【0169】

癌または腫瘍には、胆管癌；脳癌；乳癌；頸癌；絨毛癌；結腸癌；子宮内膜癌；食道癌；胃癌；上皮内新生物；白血病；リンパ腫；肝癌；肺癌（例えば、小細胞癌および非小細胞癌）；黒色腫；神経芽腫；口腔癌；卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；直腸癌；肉腫；皮膚癌；精巣癌；甲状腺癌；および腎癌と共に他の癌および肉腫が含まれるがこれらに限定されない。

【0170】

癌治療を必要とする被験体は、癌が発症する確率が高い被験体であってもよい。これらの被験体には、例えばその存在が癌の発症のより高い可能性と相関関係を有することが証明されている遺伝的異常を有する被験体、およびタバコ、アスベスト、もしくは他の化学毒素のような癌を引き起こす物質に曝露された被験体、または癌のためにこれまで治療を受けて現在見かけ上寛解している被験体が含まれる。

40

【0171】

癌治療を受けている患者に投与する場合、多糖類粒子は、他の抗癌剤を含むカクテルで投与してもよい。多糖類組成物はまた、制吐剤、放射線保護剤等のような放射線療法の副作用を治療する物質を含むカクテルで投与してもよい。

【0172】

治療を必要とする被験体はまた、血液および／または尿中のRFI、尿素、クレアチニン、リン、糸球体濾過速度（GFR）、または血中尿素窒素（BUNレベル）によって測定した、腎不全を含む異常な腎機能を有する被験体であってもよい。特定の測定は以下の通りであ

50

る：

【0173】

腎不全指数（RFI）—mEq/Lで表し、以下のように計算する：

（尿中ナトリウム、mEq/L）／（（尿中クレアチニン、mg/dL）／（血漿中クレアチニン、mg/dL））。RFI≤1は、腎前性窒素血症を示す；RFI=1～3は確定的ではないが、通常尿細管壊死を示し、RFI≥3は、急性尿細管壊死を示している。

【0174】

尿の比重-

これは、尿試料がどれほど濃縮されているかの測定値である。水の比重は1.000である。希釈した尿試料の比重は1.020未満（しばしば1.010未満）である。濃縮された尿試料は比重が1.030または1.040であろう。

10

【0175】

血中尿素窒素（BUN）-

これは、腎臓によって排泄されたタンパク質代謝物である（これは懸念される毒素の一つである）。正常な患者では、BUNは25程度である。腎不全におけるBUNのよい目標は、60～80である。しばしば診断時、BUNは150、200、または300を超える。

【0176】

クレアチニン-

これは、もう一つのタンパク質代謝物である（これはBUNの場合より食事中的タンパク質摂取量に依存しない）。正常なクレアチニンは2.0未満である。腎不全の場合の良好な目標はクレアチニン4.5またはそれ未満である。BUNおよびクレアチニンは、経時的にそして異なる治療に反応して追跡してもよい（いくつかの他のパラメータと共に）。

20

【0177】

リン-

カルシウム／リンバランスは、腎不全において、不全の腎臓がリンを排泄することができないことと共にその後に起こるホルモンの変化によって崩れるようになる。カルシウムとリンのレベルが高すぎる場合、体の軟組織が炎症的で不快な無機質沈着物を生じるであろう。同様に骨も弱化するであろう。

【0178】

カリウム-

不全腎臓は、カリウムを効率よく保存することができず、補足が必要となる可能性がある。

30

【0179】

赤血球沈層容積／ヘマトクリット-

これは、赤血球の量の測定値である。より詳しく説明すると、これは血液中で赤血球が占める割合を表す。赤血球の産生を刺激するホルモンは、腎臓によって産生される。不全腎臓は、このホルモンを正常量で産生せず、貧血が起こりうる。貧血はしばしば、腎毒素を処置するために必要な余分の液の投与によって悪化する。

【0180】

糸球体濾過速度（GFR）-

この試験は、腎臓がどのように上手く血液から老廃物および過剰な液体を除去するかの測定である。これは、年齢、体重、性別、および体格を用いて血清中のクレアチニンレベルから計算してもよい。正常なGFRは、年齢に従って変化して、高齢被験体では減少する。GFRの正常値は、90またはそれ以上である。GFR 60未満は、腎臓が適切に働いていない兆候である。GFR 15未満は、おそらく腎不全を示している。

40

【0181】

異常な腎機能／不全に関連した障害には、末期腎炎、腎結石、虚血性腎疾患、高血圧性腎症、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎、および腎高血圧症が含まれるがこれらに限定されない。

【0182】

50

本発明の硫酸化多糖類を含む組成物の有効量を、そのような治療を必要とする被験体に投与する。有効量は、細胞増殖もしくは転移に所望の減少が起こる、または他の医学的に許容されない副作用を引き起こすことなく凝固もしくは他の治療的利益を予防する量である。そのような量は、単なる日常的な実験によって決定することができる。投与様式に応じて1 ng/kg～100 mg/kgの範囲の用量が有効であると考えられる。無傷の硫酸化多糖類の有効な割合は、単なる日常的な実験によって決定してもよい。絶対量は多様な要因に依存し（投与が、他の治療方法、投与回数、ならびに年齢、身体的状態、体格および体重を含む個々の患者のパラメータに関連するか否かを含めて）、日常的な実験によって決定することができる。一般的に、最大用量、すなわち、健全な医学的判断に従って、最高の安全な用量を用いることが好ましい。投与様式は、吸入、経口、皮下、静脈内、腹腔内、経皮、口腔内、舌下、非経口、筋肉内、鼻腔内、気管内、眼内、腔内、直腸内、経皮、および／または舌下を含む如何なる医学的に許容される様式であってもよい。

10

【0183】

本発明のいくつかの局面において、硫酸化多糖類を含む組成物の有効量は、障壁を通過する腫瘍細胞の浸潤を防止するために有効な量である。癌の浸潤および転移は、トランスフォームした細胞がそれによって細胞外マトリクス（ECM）の中に浸潤して遊走し、接着非依存性の増殖特性を獲得する細胞接着特性の変化を伴う複雑なプロセスである。Liotta, L.A.ら、Cell 64:327～336 (1991)。これらの変化のいくつかは、局所接着で起こり、これは膜に会合した骨格および細胞内シグナル伝達分子を含む細胞／ECM接触点である。転移疾患は、腫瘍細胞の播種性病変がその増殖および繁殖を支持する組織に播種されると起こり、腫瘍細胞の二次的伝播は、癌の大部分に関連した罹患率および死亡率に関与している。このように、本明細書において用いられる「転移」という用語は、原発腫瘍部位から離れた腫瘍細胞の浸潤および遊走を指す。

20

【0184】

腫瘍細胞にとっての障壁は、インビトロでの人工的な障壁またはインビボでの天然の障壁であってもよい。インビトロ障壁には、マトリゲルのような細胞外マトリクスコーティングメンブレンが含まれるがこれらに限定されない。このように、LMWH組成物は、Parish, C.R.ら、「A Basement-Membrane Permeability Assay which Correlates with the Metastatic Potential of Tumour Cells.」、Int. J. Cancer (1992) 52:378～383によって詳細に記述されるマトリゲル浸潤アッセイ系において、腫瘍細胞浸潤を阻害するか否かに関して試験することができる。マトリゲルは、IV型コラーゲン、ラミニン、bFGFに結合して局在するペルレカンのようなヘパラン硫酸プロテオグリカン、ビトロネクチンと共にトランスフォーミング増殖因子（TGF）、ウロキナーゼタイプのプラスミノゲン活性化因子（uPA）、組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）、および1型プラスミノゲン活性化因子阻害剤（PAI-1）として知られるセルピンを含む、再構成された基底膜である。転移に関する他のインビトロおよびインビボアッセイ法は先行技術において記載されており、例えば参照として本明細書に組み入れられる、1999年8月10日に公表された米国特許第5,935,850号を参照されたい。インビボ障壁は、被験体の体に存在する細胞障壁を指す。

30

【0185】

本発明の硫酸化多糖類は、任意に薬学的に許容される担体において調製してもよい。組成物はさらに、特殊な輸送装置に調製してもよい。このように、本発明のいくつかの態様において、組成物は、静脈内、皮下、経口、エアロゾル、または他の粘膜輸送型のために特に調製してもよい。いくつかの態様において、組成物は、下記のように持続的放出装置に調製してもよい。

40

【0186】

一般的に、治療目的のために投与する場合、本発明の処方物を薬学的に許容される溶液に加える。そのような調製物は日常的に、塩、緩衝剤、保存剤、適合性の担体、アジュバント、および任意に他の治療成分の薬学的に許容される濃度を含んでもよい。

【0187】

本発明の組成物は、そのまま（未加工）、または約学的に許容される塩として投与して

50

もよい。医薬品として用いる場合、塩は薬学的に許容されなければならないが、薬学的に許容されない塩を便宜上用いてその薬学的に許容される塩を調製してもよく、それらも本発明の範囲に含まれる。そのような薬理学的および薬学的に許容される塩には、以下の酸から調製されるものが含まれるがこれらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、蟻酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸。同様に、薬学的に許容される塩は、カルボン酸基のナトリウム、カリウム、またはカルシウム塩のようなアルカリ金属、またはアルカリ土類塩として調製することができる。

【0188】

適した緩衝剤には以下が含まれる：酢酸および塩（1～2モル％w/v）；クエン酸および塩（1～3モル％w/v）；ホウ酸および塩（0.5～2.5モル％w/v）；ならびにリン酸および塩（0.8～2モル％w/v）。適した保存剤には、塩化ベンザルコニウム（0.003～0.03モル％w/v）；クロロブタノール（0.3～0.9モル％w/v）；パラベン（0.01～0.25モル％w/v）；およびチメロサル（0.004～0.02モル％w/v）が含まれる。

【0189】

本発明は、医学的に用いるために、一つまたは複数の薬学的に許容される担体、および任意に他の治療成分と共に硫酸化多糖類調製物を含む薬学的組成物を提供する。本明細書において用いられ、下記により詳しく説明する「薬学的に許容される担体」という用語は、ヒトまたは他の動物への投与に適した一つまたは複数の適合性の固体もしくは液体増量剤、希釈剤、または封入物質を意味する。本発明において、「担体」という用語は、適用を容易にするために活性成分が配合される、天然または合成の有機または無機成分を指す。薬学的組成物の成分はまた、本発明の硫酸化多糖類および互いに、所望の薬学的有効性を実質的に損なう相互作用がないように混合されうる。

【0190】

非経口投与に適した組成物は、レシピエントの血液と等張となりうる多糖類の滅菌水性調製物を含むと都合がよい。用いてもよい許容される媒体および溶媒は、水、リンゲル液、および等張塩化ナトリウム溶液である。さらに、慣例的に滅菌の固定油が溶媒または懸濁媒体として用いられる。この目的に関して、合成モノまたはジグリセリドを含む如何なる商標の固定油を用いてもよい。さらに、オレイン酸のような脂肪酸を注射可能調製物において用いる。皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内等の投与に適した担体制剤は、「Remington's Pharmaceutical Sciences.」、マック出版社、イーストン、ペンシルバニア州に認められるであろう。

【0191】

多様な投与経路が利用可能である。選択される特定の様式は、当然、選択される硫酸化多糖類の特定の割合、治療される特定の病態、および治療の有効性にとって必要な用量に依存するであろう。本発明の方法は、概して、医学的に許容される如何なる投与様式を用いて実践してもよく、すなわち臨床的に許容されない副作用を引き起こすことなく、生物作用の有効レベルを生じる如何なる様式も意味する。

【0192】

治療に用いる場合、硫酸化多糖類調製物の有効量は、所望の表面、例えば、粘膜、全身に硫酸化多糖類を輸送する如何なる様式によっても被験体に投与することができる。本発明の薬学的組成物を「投与すること」は、当業者に既知の如何なる手段によって行ってもよい。好ましい投与経路には、吸入、経口、皮下、静脈内、腹腔内、経皮、口腔内、口腔内、舌下、非経口、筋肉内、鼻腔内、気管内、眼内、腔内、直腸内、経皮、および／または舌下が含まれるがこれらに限定されない。

【0193】

経口投与の場合、化合物（すなわち、硫酸化多糖類調製物）は、活性化合物（複数）を当技術分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に調製することができる。そのような担体によって、本発明の化合物は、治療すべき被験体が経口摂

10

20

30

40

50

取するための、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー、懸濁剤等として調製することができる。経口で用いるための薬学的調製物は、固体賦形剤として得ることができ、任意に得られた混合物をすりつぶし、望ましければ、錠剤または糖衣錠のコアを得るために、適した補助剤を加えた後、顆粒混合物を加工する。適した賦形剤は、特に、乳糖、蔗糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖；例えばトウモロコシデンプン、小麦デンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、カルボキシメチルセルロース、および／またはポリビニルピロリドン（PVP）のようなセルロース調製物のような増量剤である。望ましければ、クロスリンクしたポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはアルギン酸ナトリウムのようなその塩のような崩壊剤を加えてもよい。任意に、経口調製物はまた、内因性の酸性状態を中和するために生理食塩液もしくは緩衝液中で調製してもよく、または如何なる担体も含まずに投与してもよい。

10

【0194】

糖衣錠のコアは適したコーティングと共に提供される。この目的のために、濃縮された糖溶液を用いてもよく、これは任意にアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボルゲル、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適した有機溶媒または溶媒混合物を含んでもよい。活性化化合物の用量を同定するためまたは異なる組み合わせの特徴を示すために、染料または色素を錠剤または糖衣錠のコーティングに加えてもよい。

【0195】

経口で用いることができる薬学的調製物には、ゼラチン製のプッシュフィットカプセルと共に、ゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールのような可塑剤製の軟密封カプセルが含まれる。プッシュフィットカプセルは、乳糖のような増量剤、デンプンのような結合剤、および／またはタルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ならびに任意に安定化剤との混合物において活性成分を含みうる。軟カプセルにおいて、活性化化合物は、脂肪油、液体パラフィン、または適した液体ポリエチレングリコールのような適した液体に溶解または懸濁してもよい。さらに、安定化剤を加えてもよい。経口投与のために調製されたミクロスフェアも同様に用いてもよい。そのようなミクロスフェアは、当技術分野で十分に定義されている。経口投与のための製剤は全て、そのような投与に適した用量でなければならない。

20

30

【0196】

口腔内投与の場合、組成物は、慣例的に調製された錠剤またはロゼンジの形であってもよい。

【0197】

吸入投与の場合、本発明に従って用いられる化合物は、適した噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適した気体を用いて、加圧バックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形で都合よく輸送してもよい。加圧式エアロゾルの場合、投与単位は、一定量を輸送するための弁を提供することによって決定してもよい。化合物と乳糖またはデンプンのような適した粉末基剤との粉末混合物を含む、例えばインヘラーまたは吸入器において用いるためのゼラチン製のカプセルまたはカートリッジを調製してもよい。さらに、吸入治療のための乾燥粉末製剤も本発明の範囲内である。そのような乾燥粉末製剤は、その全教示が参照として本明細書に組み入れられる、国際公開公報第02/32406号に開示されるように調製してもよい。

40

【0198】

化合物を全身輸送することが望ましい場合、化合物は、注射、例えばボーラス注射または連続的注入による非経口投与のために調製してもよい。注射用製剤は、保存剤を添加した単位投与剤形、例えばアンプルまたは多用量容器の形であってもよい。組成物は、油性もしくは水性媒体における懸濁液、溶液、または乳液のような形をとってもよく、懸濁剤、安定化剤、および／または分散剤のような処方物質を含んでもよい。

50

【0199】

非経口投与のための薬学的製剤には、水溶性型の活性化合物の水溶液が含まれる。さらに、活性化合物の懸濁液を、適当な油性注射用懸濁液として調製してもよい。適した親油性溶媒または媒体には、ゴマ油のような脂肪油、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームが含まれる。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランのような懸濁液の粘度を増加させる物質を含んでもよい。任意に、懸濁液はまた、適した溶解剤、または非常に濃縮された溶液を調製することができるように化合物の溶解度を増加させる物質を含んでもよい。

【0200】

または、活性化合物は、使用前に適した媒体、例えば滅菌発熱物質不含水に溶解するための粉末剤形であってもよい。

【0201】

化合物はまた、例えばカカオバターまたは他のグリセリドのような通常の坐剤基剤を含む、坐剤または浣腸のような直腸または腔内組成物の形に調製してもよい。

【0202】

これまでに記述された調製物の他に、化合物はまた、デポー調製物として調製してもよい。そのような長時間作用型製剤は、適したポリマーもしくは疎水性材料（例えば、許容される油中の乳剤として）、またはイオン交換樹脂と共に、または難溶性の誘導体として、例えば難溶性の塩として調製してもよい。

【0203】

薬学的組成物はまた、適した固体またはゲル相の担体または賦形剤を含んでもよい。そのような担体または賦形剤の例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールのようなポリマーが含まれるがこれらに限定されない。

【0204】

適した液体または固体の薬学的調製物剤形は、例えば、吸入のための水性または生理食塩液溶液、微小封入、渦巻き型、微小金粒子へのコーティング、リポソームに含める、霧状にする、エアロゾルにする、皮膚に埋め込むためのペレットにする、皮膚にひっかき傷を形成させる鋭利な物体の上で乾燥させた形である。薬学的組成物にはまた、その調製物において、崩壊剤、結合剤、コーティング剤、膨張剤、潤滑剤、着香料、甘味料、または溶解剤のような賦形剤および添加剤および／または補助剤が上記のように習慣的に用いられる、顆粒、粉剤、錠剤、コーティング錠、（マイクロ）カプセル、坐剤、シロップ剤、乳剤、懸濁液、クリーム、滴下剤、または活性化合物の放出を遅らせる調製物が含まれる。薬学的組成物は、多様な薬物輸送系において用いるために適している。薬物輸送に関する方法の簡単な概要に関しては、参照として本明細書に組み入れられる、Langer、Science 249:1527~1533 (1990) を参照されたい。

【0205】

組成物は慣例的に、単位投与剤形の形であってもよく、薬学の技術分野において周知の如何なる方法によって調製してもよい。方法には全て、活性化硫酸化多糖類を、一つまたは複数の補助成分を構成する担体に会合させる段階が含まれる。一般的に、組成物は、多糖類を液体担体、細分された固体担体またはその両者に均一および十分に会合させ、その後必要に応じて産物を成形することによって調製される。

【0206】

その他の輸送系には、定時放出、遅延放出、または徐放性輸送系が含まれる。そのような系によって、本発明の硫酸化多糖類の反復投与を回避することができ、被験体および医師に対する利便性が増加する。多くのタイプの放出輸送系が利用でき、当業者に既知である。それらには、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ポリ無水物およびポリカプロラク톤のようなポリマーに基づく系；コレステロール、コレステロールエステル、および脂肪酸のようなステロール、またはモノ、ジ、およびトリグリセリドのような中性脂肪；ヒ

10

20

30

40

50

ドロゲル放出系；シアル酸系；ペプチドに基づく系；ロウコーティング；通常の結合剤および賦形剤を用いる圧縮錠、部分融合インプラント等が含まれる。特定の例には：(a) 多糖類が、米国特許第4,452,775号（Kent）；第4,667,014号（Nestorら）；ならびに第4,748,034号および第5,239,660号（Leonard）において認められる、マトリクス内の形で含まれる腐食系、ならびに（b）米国特許第3,832,253号（Higuchiら）および第3,854,480号（Zaffaroni）において認められる、ポリマーを通して制御された速度で活性化合物が透過する拡散系、が含まれるがこれらに限定されない。さらに、ポンプに基づくハードウェア輸送系を用いることができ、そのいくつかは埋め込みのために適合される。

【0207】

癌治療を受ける患者に投与する場合、硫酸化多糖類組成物は、他の抗癌剤を含むカクテルにおいて投与してもよい。組成物はまた、制吐剤、放射線保護剤等のような治療の副作用を治療する物質を含むカクテルにおいて投与してもよい。

【0208】

本発明の化合物と同時投与することができる抗癌剤には、アシビシン；アクリルビシン；塩酸アコダゾール；アクロニン；アドリアマイシン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン；酢酸アメタントロン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマスタット；ベンゾデパ；ビカルタミド；塩酸ビスアントレン；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナールナトリウム；プロピリミン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチメル；カルボプラチン；カルムスチン；塩酸カルビシン；カルゼレシン；セデフィンゴール；クロラムブシル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリビン；クリスナトールメシレート；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルビシン；デシタビン；デキソルマプラチン；デザグアニン；デザグアニンメシレート；ジアジコン；ドセタキセル；ドキソルビシン；塩酸ドキソルビシン；ドロロキシフェン；クエン酸ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；ズアゾマイシン；エダトレキセート；塩酸エフロルニチン；エルサミトルシン；エンロプラチン；エンプロメート；エピプロピジン；塩酸エピルビシン；エルプロゾール；塩酸エソルビシン；エストラムスチン；エストラムスチンリン酸ナトリウム；エタニダゾール；エトポシド；リン酸エトポシド；エトプリン；塩酸ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フルオクスリジン；リン酸フルダラビン；フルオロウラシル；フルオロシタビン；ホスキドン；ホストリエシンナトリウム；ゲンシタビン；塩酸ゲンシタビン；グレベク；ヘルセプチン；ヒドロキシウレア；塩酸イダルビシン；イフォスファミド；イルモフォシン；インターフェロン α -2a；インターフェロン α -2b；インターフェロン α -n1；インターフェロン α -n3；インターフェロン β -1a；インターフェロン γ -1b；イプロプラチン；塩酸イリノテカン；酢酸ランレオチド；レトロゾール；酢酸リュープロリド；塩酸リアロゾール；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；塩酸ロソキサントロン；マソプロコール；メイタンシン；塩酸メクロレタミン；酢酸メゲストロール；酢酸メレンゲストロール；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メソトレキセート；メソトレキセートナトリウム；メトプリン；メツレデバ；ミチンドミド；ミトカルシン；ミトクロミン；ミトジリン；ミトマルシン；マイトマイシン；ミトスパー；ミトタン；塩酸ミトキサントロン；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマプラチン；オキシスラン；パクリタキセル；ペガスパルガーゼ（Pegaspargase）；ペリオマイシン；ペンタムスチン；硫酸ペプロマイシン；ペルフォスファミド；ピボプロマン；ピボスルファン；塩酸ピロキサントロン；プリカマイシン；プロメスタン；ポリフィメルナトリウム；ポリフィロマイシン；プレドニムスチン；塩酸プロカルバジン；ピューロマイシン；塩酸ピューロマイシン；ピラゾフリン；リボプリン；リツキシシン；ログレチミド；サフィンゴール；塩酸サフィンゴール；セムスチン；シムトラゼン；スパルフォセートナトリウム；スパルソマイシン；塩酸スピロゲルマニウム；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；スロフェヌール；タリソマイシン；テコガランナトリウム

10

20

30

40

50

；テガフル；塩酸テロキサントロン；テモボルフィン；テニボシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテバ；チアゾフリン；チラパザミン；塩酸トポテカン；クエン酸トレミフェン；酢酸トレストロン；リン酸トリシリピン；トリメトレキセート；グルクロン酸トリメトレキセート；トリプトレリン；塩酸ツブプロゾール；ウラシルマスタード；ウレデバ；バプレオチド；ベルテボルフィン；硫酸ビンブラスチン；硫酸ビンクリスチン；ビンデシン；硫酸ビンデシン；硫酸ビネピジン；硫酸ビングリシネート；硫酸ビンリユーロシン；酒石酸ビノレルビン；硫酸ビンロシジン；硫酸ビンゾリジン；ボロゾール；ゼニプラチン；ジノスタチン；塩酸ゾルピシンが含まれるがこれらに限定されない。

【0209】

10

硫酸化多糖類組成物はまた、ターゲティング分子に結合させてもよい。ターゲティング分子は、特定の細胞または組織に対して特異的であって、硫酸化多糖類を細胞または組織に向けるために用いることができる任意の分子または化合物である。好ましくは、ターゲティング分子は、癌細胞または腫瘍と特異的に相互作用する分子である。例えば、ターゲティング分子は、腫瘍抗原を認識して特異的に相互作用するタンパク質または如何なるタイプの分子であってもよい。

【0210】

腫瘍抗原には、Melan-A/MART-1、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPPIV)、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質 (ADAbp)、シクロフィリンb、結腸直腸関連抗原 (CRC) -CO17-1A/GA733、癌胎児抗原 (CEA)、およびその免疫原性エピトープCAP-1およびCAP-2、et v6、am11、前立腺特異抗原 (PSA) およびその免疫原性エピトープPSA-1、PSA-2、およびPSA-3、前立腺特異膜抗原 (PSMA)、T細胞受容体/CD3ζ鎖、MAGE腫瘍抗原ファミリー (例えば、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGE腫瘍抗原ファミリー (例えば、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、フェトプロテイン、E-カドヘリン、カテニン、p120ctn、gp100^{Pmel11}、PRAME、NY-ESO-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7、cdc27、線腫様多発結腸ポリープタンパク質 (APC)、フォドリン、P1A、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2およびGD2ガングリオシド、ヒト乳頭腫ウイルスタンパク質のようなウイルス産物、Smad腫瘍抗原ファミリー、Imp-1、EBV-コード核抗原 (EBNA) -1、およびc-erbB-2が含まれるがこれらに限定されない。

20

30

【0211】

MHCクラスIおよびMHCクラスII分子のいずれかまたは双方に結合する腫瘍抗原の例については、以下の参考文献を参照されたい：

Coulie, *Stem Cells* 13:393-403, 1995; Traversari ら、*J. Exp. Med.* 176:1453-1457, 1992; Chaux ら、*J. Immunol.* 163:2928-2936, 1999; Fujie ら、*Int. J. Cancer* 80:169-172, 1999; Tanzarella ら、*Cancer Res.* 59:2668-2674, 1999; van der Bruggen ら、*Eur. J. Immunol.* 24:2134-2140, 1994; Chaux ら、*J. Exp. Med.* 189:767-778, 1999; Kawashima ら、*Hum. Immunol.* 59:1-14, 1998; Tahara ら、*Clin. Cancer Res.* 5:2236-2241, 1999; Gaugler ら、*J. Exp. Med.* 179:921-930, 1994; van der Bruggen ら、*Eur. J. Immunol.* 24:3038-3043, 1994; Tanaka ら、*Cancer Res.* 57:4465-4468, 1997; Oiso ら、*Int. J. Cancer* 81:387-394, 1999; Herman ら、*Immunogenetics* 43:377-383, 1996; Manici ら、*J. Exp. Med.* 189:871-876, 1999; Duffour ら、*Eur. J. Immunol.* 29:3329-3337, 1999; Zorn ら、*Eur. J. Immunol.* 29:602-607, 1999; Huang ら、*J. Immunol.* 162:6849-6854, 1999; Boël ら、*Immunity* 2:167-175, 1995; Van den Eynde ら、*J. Exp. Med.* 182:689-698, 1995; De Backer ら、*Cancer Res.* 59:3157-3165, 1999; Jäger ら、*J. Exp. Med.* 187:265-270, 1998; Wang ら、*J. Immunol.* 161:3596-3606, 1998; Aarnoudse ら、*Int. J. Cancer* 82:442-448, 1999; Guilloux ら、*J. Exp. Med.* 183:1173-1183, 1996; Lupetti ら、*J. Exp. Med.* 188:1005-1016,

10

20

1998; Wölfel ら、Eur. J. Immunol. 24:759-764, 1994; Skipperper ら、J. Exp. Med. 183:527-534, 1996; Kang ら、J. Immunol. 155:1343-1348, 1995; Morel ら、Int. J. Cancer 83:755-759, 1999; Brichard ら、Eur. J. Immunol. 26:224-230, 1996; Kittlesen ら、J. Immunol. 160:2099-2106, 1998; Kawakami ら、J. Immunol. 161:6985-6992, 1998; Topalian ら、J. Exp. Med. 183:1965-1971, 1996; Kobayashi ら、Cancer Research 58:296-301, 1998; Kawakami ら、J. Immunol. 154:3961-3968, 1995; Tsai ら、J. Immunol. 158:1796-1802, 1997; Cox ら、Science 264:716-719, 1994; Kawakami ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6458-6462, 1994; Skipper ら、J. Immunol. 157:5027-5033, 1996; Robbins ら、J. Immunol. 159:303-308, 1997; Castelli ら、J. Immunol. 162:1739-1748, 1999; Kawakami ら、J. Exp. Med. 180:347-352, 1994; Castelli ら、J. Exp. Med. 181:363-368, 1995; Schneider ら、Int. J. Cancer 75:451-458, 1998; Wang ら、J. Exp. Med. 183:1131-1140, 1996; Wang ら、J. Exp. Med. 184:2207-2216, 1996; Parkhurst ら、Cancer Research 58:4895-4901, 1998; Tsang ら、J. Natl Cancer Inst 87:982-990, 1995; Correale ら、J Natl Cancer Inst 89:293-300, 1997; Coulie ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7976-7980, 1995; Wölfel ら、Science 269:1281-1284, 1995; Robbins ら、J. Exp. Med. 183:1185-1192, 1996; Brändle ら、J. Exp. Med. 183:2501-2508, 1996; ten Bosch ら、Blood 88:3522-3527, 1996; Mandruzzato ら、J. Exp. Med. 186:785-793, 1997; Guéguen ら、J. Immunol. 160:6188-6194, 1998; Gjertsen ら、Int. J. Cancer 72:784-790, 1997; Gaudin ら、J. Immunol. 162:1730-1738, 1999; Chiari ら、Cancer Res. 59:5785-5792, 1999; Hogan ら、Cancer Res. 58:5144-5150, 1998; Pieper ら、J. Exp. Med. 189:757-765, 1999; Wang ら、Science 284:1351-1354, 1999; Fisk ら、J. Exp. Med. 181:2109-2117, 1995; Brossart ら、Cancer Res. 58:732-736, 1998; Röpke ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14704-14707, 1996; Ikeda ら、Immunity 6:199-208, 1997; Ronsin ら、J. Immunol. 163:483-490, 1999; Vonderheide ら、Immunity 10:673-679, 1999

10

20

30

これらの抗原と共に他の抗原は、PCT出願第PCT/US98/18601号に開示されている。

【 0 2 1 2 】

実施した実験に関する以下の説明は例であって、請求される本発明の範囲を制限しない。

【 0 2 1 3 】

実施例

40

実施例1：ヘパリンの構造的特徴に関する組成分析法の開発

ヘパリン調製物の構造分析のためにいくつかの技術が利用されている。勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）および強イオン交換HPLC（SAX）は、これまでヘパリン調製物の定性的および定量的分析のために用いられている（Liu ら、Glycobiology 5：765～774、1995；Turnbull ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96：2698～2703、1999；Merry ら、J. Biol. Chem. 274：18455～18462、1999）。勾配PAGE法は、分子量を決定するために有用であるが、しばしばヘパリン調製物の微細な構造に関する情報を提供することができない。SAX-HPLCは、紫外線吸収または放射活性による検出に依存するが、しばしば、構造的に重要なヘパリン由来オリゴ糖の少量を検出するためには感度が不十分である。

【 0 2 1 4 】

50

毛細管電気泳動（CE）は、高い分離力を有する非常に感度のよい方法論であり、ヘパリン硫酸様グリコサミノグリカン（HLGAG）オリゴ糖の特徴を調べるために用いられている。さらに、CEは、HLGAG複合体オリゴ糖の二糖組成物の特徴を調べるために酵素消化と共に用いられている。例えば、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、2000年4月24日に提出された米国特許出願第09/557,997号および第09/558,137号を参照されたい。オフラインまたはオンライン質量分析のいずれかと組み合わせると、CEは、HLGAG二糖およびオリゴ糖の構造特徴を調べて定量するために強力なツールである。

【0215】

本発明の方法によって、類似のアプローチを用いてUFHおよびLMWHの構造特徴を完成させることが可能である。異なる起源からのUFHsのみならずLMWHの正確な組成を決定することは、機能を構造に相関させる最初の重要な段階である。これは、UFHおよびLMWHの現在の製造の現場では、品質管理を提供するために、機能的アッセイ法（例えば、抗第Xa因子アッセイ法）およびおおよその物理的特徴付けを用いることから特に重要である。ヘパリンの構造特徴に関する適当なツールを開発すれば、ヘパリンの分析にとってより正確なツールを提供するであろう。

【0216】

この技術、すなわち、組成分析法（CAM）を用いてヘパリンの二糖および四糖ならびにより高次の構築ブロックを定量することができる。さらに、この技術を用いて、様々なヘパリンおよびLMWG調製物の構造と機能のあいだの重要な相関を提供することができ、このように、所望の活性プロフィールを有する組成物を作製するために必要なガイダンスを提供する。

【0217】

材料および方法

UFHは、セルサス・ラボラトリーズ（Celsus Laboratories、シンシナティ、オハイオ州）から購入し、保存液のモル濃度は、12,000 Daの平均分子量に基づいて計算した。二糖標準物質は、シグマケミカルズ（Sigma Chemicals、セントルイス、ミズーリ州）から購入した。ヘパリナーゼI、IIおよびIIIは既に記述したように産生した（Ernstら、Biochem. J. 315:589~597（1996）；Pojasekら、Biochemistry 39:4012~4019（2000））。

【0218】

UFHに、ヘパリナーゼI、IIおよびヘパリナーゼIIIで構成される酵素カクテルによる完全な解重合を行った。10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 濃度のUFHの H_2O 溶液9 μl を、25 mM酢酸ナトリウム、100 mM塩化ナトリウム、5 mM酢酸カルシウム緩衝液、pH 7.0においてヘパリナーゼI、IIおよびIIIをそれぞれ100 nMからなる酵素カクテル1 μl によって37°Cで12時間消化した。CE試料は、消化物1 μl を H_2O 9 μl によって希釈することによって調製した。質量分析は、先に概要したパラメータを用いて得て、プロトン化（RG） $_{19}\text{R}$ およびその亜硝酸由来六糖配列 $\text{I}_{25}\text{H}_{\text{NS}},_{6\text{S}}\text{I}_{25}\text{H}_{\text{NS}},_{6\text{S}}\text{I}_{25}\text{Man}_{6\text{S}}$ との複合体に関するシグナルを用いて外部から校正した。

【0219】

結果

UFHを用いたCAMの開発

CAMの開発に向けての第一段階として、本発明者らは、市販のUFHを分析した。UFHに、フラボバクテリウム・ヘパリナム（*Flavobacterium heparinum*）からのヘパリナーゼI、II、およびIIIで構成される酵素カクテルによる完全な解重合化を行う。ヘパリナーゼカクテルによるUFHの消化によって、水の消失によるグリコシド結合の切断が起こり、それによってポリマー鎖が分解する。非還元末端で $\Delta^{4,5}$ 不飽和ウロン酸を有する得られた産物は、UV光を容易に吸収して、その λ_{max} 232 nmで表面的に（facially）モニターすることができる。

【0220】

CAM技術の正確度および精度を測定するために、UFHを1試料あたり2本ずつ消化して、それぞれの試料をCEによって独立して分析した。さらに、実験を、それぞれの試料に関して

10

20

30

40

50

2回繰り返し、UFHに関して4回の読みを得た。重要なことは、この全ての分析にナノグラムの開始材料のみを用い、確実に最小の材料が消費されるようにした。CEによるUFHの酵素的消化に起因する種の分離によって異なる種8個が出現し、これらは、容易に定量することができた（図1）。ブタ腸粘膜に由来するUFHの毛細管電気泳動軌跡。10 ng/ml濃度のUFH 9 μ lを、ヘパリナーゼI、IIおよびIIIそれぞれ100 nMからなる酵素カクテル1 μ lによって37℃で12時間消化した。CE試料は、ヘパリンの最終濃度が1.0 ng/nLとなるように、消化物をH₂Oによって希釈することによって調製した。このCE試料57 nLをCEに注入した。ピーク8個、p1～p8のそれぞれを回収して、回収したピークの純度はCEに再注入することによってチェックして、その質量をオフラインMALDI質量分析によって測定した。p1～p7の同一性は、その移動時間を標準的な市販の二糖の移動時間とマッチさせることによってさらに確認した。p1は、このように、三硫酸化二糖 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ として確認された。p2、p3およびp4は二硫酸化二糖であり、p5、p6およびp7は、一硫酸化二糖である。p8は、本明細書において「p8」または「ピーク8」として呼ばれる、以下の一つまたは複数を含む四または五硫酸化、非／モノアセチル化四糖として決定された： $\Delta NH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ ； $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ ； $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ ；または $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 。類似のように、エノキサパリン、およびダルテパリンのような他のLMWH試料に存在するピーク（本明細書において記述したピーク8個の他に）も同様に特徴が調べられている。1～8と表示される種を採取して特徴を調べた。第一に、それぞれの不明物の質量を、既に記述された米国特許第5,607,859号に記述されるようにオフラインMALDI MSによって評価した。さらに、不明物の同一性を確認するために、採取したピークを脱塩して、CE上で再度泳動させ、既知の標準物質との同時移動によって同定した。

【0221】

これまでの構造研究およびヘパリナーゼの基質特異性について知られていることと一致して、不明物8個中7個（8個中p1～p7）が二糖であると同定された。種p1は、ヘパリンの主な二糖構築ブロックである $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ として同定された。不明のp2～p4はしたがって、二硫酸化二糖異性体、 $\Delta U_{2S}H_{NS}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}$ 、 $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ であると同定された。最後に、p5～p7は、一硫酸化二糖 ΔUH_{NS} 、 $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ 、 $\Delta UH_{NAC,6S}$ として同定された。重要なことは、あるとしても非常にわずかであるが、非硫酸化二糖（ ΔUH_{NAC} ）をUFHにおいて検出できたことである。

【0222】

二糖7個の特徴付けの他に、本発明者らはまた、不明なp8の構造特徴を完成させた。PEN-MALDIシーケンシングアプローチ（Venkataramanら、Science 286：537～42（1999））を用いたこのオリゴ糖の単離およびシーケンシングから、p8が以下の一つまたは複数を含む四または五硫酸化非／モノアセチル化四糖であることが示された： $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ ； $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ ； $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ ；または $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 。p1～p8のヘパリンにおけるモル％を定量するためには、それぞれの種に関する反応因子（RF）を決定する必要がある。それぞれの種に関するRFを得るために、p1～p8の標準物質の既知濃度をCEに注入して、これを用いてそれぞれに関するRFを決定した（表1）。次に、本発明者らは、これらのRFsを用いて、ヘパリンにおけるそれぞれの糖単位のモル％を決定した（表1）。ヘパリンのモル％組成の分析から、ポリマー鎖のほとんど（>50モル％）が三硫酸化二糖、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ からなることが示される。UFH鎖の別の ≥ 20 モル％は、二硫酸化二糖の異なる異性体からなり、ピーク8の一硫酸化二糖および四糖に多少関与している。

【0223】

（表1）UFHに関する組成分析表

化合物	AUC	% 相対的 AUC	反応因子 (RF)	補正濃度	モル %
p1	14639	62.1	1	62.1	66.1
p2	2050.9	8.7	0.893	7.8	8.3
p3	3088.1	13.1	0.829	10.9	11.6
p4	707.2	3	0.823	2.5	2.6
p5	1249.4	5.3	0.601	3.2	3.4
p6	895.8	3.8	0.405	1.5	1.6
p7	235.7	1.0	0.572	0.6	0.6
p8	707.2	3	1.768	5.3	5.6

10

【0224】

図1に示すように酵素カクテルによって消化したUFHのCEスペクトルのそれぞれのピークに関して、曲線下面積（AUC）を測定した。それぞれの糖に関して計算した反応因子を用いて、酵素消化物におけるその補正相対濃度を計算した。最後の欄は、UFHの構築ブロックのそれぞれのモル百分率を示す。UFHの<1モル%を占める非硫酸化糖は、この組成分析表を作製するにあたって考慮に入れない。本明細書において示すように、本発明の方法によって示されるようにこの組成分析表の作製は、CEによって分析したヘパリン消化物の濃度または重量に依存しない。

20

【0225】

縦の1列目は、p1～p8に関して測定したAUCを示す。2列目は、%相対的AUCを示す。%相対的AUCにRFを乗じると、補正相対濃度またはピーク1に関するp1～p8の%相対的AUCを生じる。次に、これらを二糖p1～p7および四糖p8のモル%を得るために標準化する。

【0226】

機器の再現性を確認して、組成分析消化物が実際に完全であるか否かを確認するために、実験を行った。移動時間およびモル%の決定には、毛細管に注入した試料の量（大きさが三次数異なる）または試料に添加した酵素カクテルの量（酵素100 nMから1 μ M）によらず、試料のあいだでほとんど変動を認めなかった（表2）。併せて考慮すると、これらの結果は、CAMが、UFHの組成を決定するために厳密で感度がよく、しかも正確な方法論であることを示している。

30

【0227】

（表2）

試料	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8
UFH 1/1 1 μ l EC	66.1	8.3	11.7	2.6	3.4	1.6	0.6	5.6
UFH 1/2 1 μ l EC	66.1	8.4	11.5	2.7	3.3	1.5	0.5	5.8
UFH 2/1 1 μ l EC	66.0	8.5	11.8	2.8	3.4	1.8	0.4	5.5
UFH 2/2 1 μ l EC	66.4	8.3	11.5	2.6	3.5	1.9	0.3	5.4
UFH 3/1 5 μ l EC	65.7	8.3	11.4	2.7	3.6	2.0	0.4	5.9
UFH 3/2 5 μ l EC	65.9	8.6	11.5	2.5	3.5	2.0	0.4	5.6

10

【0228】

CEによって行われたUFHの組成分析を用いて、LMWHの異なるバッチを厳密に比較することができる。UFHを酵素カクテル（EC）1 μ lまたは5 μ lのいずれかによって消化した。それぞれの試料を1試料あたり2本ずつ消化して、それぞれの消化物をCEによって1試料あたり2本ずつ分析した。全ての試料において、二糖p1～p7は、同じ移動時間を有した。同じ試料の2本ずつの分析の比較（UFH1/1とUFH1/2、UFH2/1とUFH2/2、およびUFH3/1とUFH3/2）から、装置の良好な再現性が存在することが示される。UFH1/1またはUFH1/2とUFH2/1またはUFH2/2のいずれかの比較により、泳動間の変動は最小であることが示される。EC 1 μ lによって消化したUFHをEC 5 μ lによって消化したUFHと比較したところ、酵素量を増加させても、二糖のプロフィールは認識可能に変化せず、図1に示すようにEC 1 μ lを用いて完全な消化が得られることを示している。

20

【0229】

LMWH調製物へのCAMの拡張

CAMがUFHの酵素由来成分を分離できること、およびUFHの全体的な組成の正確な評価を提供できることを考慮して、本発明者らは、LMWHの構造分析にこれを応用しようとした。その全てが現在臨床で用いられている異なる三つのLMWH、すなわちチンザパリン、アルデパリン、およびエノキサパリンを用いた（表3）。三つのLMWHおよびUFHの組成の比較から、その構造に明確な差が存在すること、最も顕著に三硫酸化二糖p1、二硫酸化二糖p2およびp3、ならびに四糖p8のモル％に差が存在することが示される。

30

【0230】

（表3）UFHと市販のLMWHの二糖組成および抗第Xa因子活性の比較

糖	エノキサパリン 全体の%	ダルテパリン 全体の%	UFH 全体の%
p1	63.6	62.1	66.1
p2	8.3	4.3	8.3
p3	11.3	9.8	11.6
p4	2.0	2.6	2.6
p5	3.5	1.4	3.4
p6	1.8	1.2	1.6
p7	1.9	5.4	0.6
p8	6.4	9.5	5.6
p9	0.5	0	0
p10	0.7	0	0
p11	0	3.7	0
抗第Xa因子活性(IU/mg)	100	150	130
抗第IIa因子活性(IU/mg)	25	60	130
分子量(Da)	4,200	6,000	12,000

10

20

【0231】

抗凝固機能の指標としてのピーク8

8の定量を用いて抗凝固機能を予測できるか否かを調べるために、本発明者らは、UFHおよびLMWHの抗第Xa因子活性または抗第IIa因子活性を、p8含有量に対してプロットした。UFH、バイオゲルP10カラムによってサイズ分画したUFH、本発明者らの研究所で生成したLMWH、および市販のLMWHの抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性をプロットしたところ、調製物の抗第Xa／IIa因子活性値とp8のモル%のあいだに比例相関があることを示している。このように、ヘパリンおよびLMWHの抗凝固活性と抗血栓活性は、その化学組成から推定することができる。抗第Xa因子活性の場合、p8含有量は、活性と非常に良好な相関を示した($r^2=0.8$) (図2)。抗第IIa因子活性をp8含有量に対してプロットしたところ、さらに良好な相関($r^2=0.9$)を認めた。重要なことに、この相関は、UFHまたはLMWHの起源およびLMWHを生成する手段にかかわらず保持される。このように、これらの結果は、CAMによって同定される特定の構造モチーフ、例えばピーク8を用いて抗第Xa因子活性と抗第IIa因子活性の双方を予測することができることを示している。

30

【0232】

第二世代のLMWHの作製

上記の所見に基づき、本発明者らは、インビトロでの抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性が増加したLMWHを作製することが可能であるか否かを調べた。これらの活性は、LMWH調製物のp8含有量を最適にすることによって増加できると論じる。この可能性を調べるために、本発明者らは、制御された条件でヘパリナーゼによってUFHを消化して、酵素消化の結果としてp8含有量をモニターした。消化が完全であると判断した後、LMWHをサイズ分画によって精製して、その分子量を評価し、抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性を決定した。これらの新しいLMWHのインビトロプロフィールを、エノキサパリン、チンザパリン、およびアルデパリンのプロフィールと比較した(表3)。

40

【0233】

50

特に、二つの異なる消化および分離条件では、わずかに異なるLMWHが生成された。前者を今後第二世代M118と呼び、後者を第二世代M215と呼ぶ。両者の分子量測定を行ったところ、M118が分子量5,000 Daを有するのに対し、M215の分子量は4,500 Daであることが示された（表4）。重要なことは、双方は多分散性1.0を有することが判明したが、これらのLMWHはいずれもUFHと共に他のLMWHより不均一性が低かった。さらに、表5に示すように、両者のCAM分析から、それらが他のLMWHよりピーク8のより高い重量%を有することが示され、このように、本発明者らは、これらの化合物がいずれも他のLMWHより高い抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性を有するはずであると予測するであろう。

【0234】

（表4）ミメオンのLMWHと他のLMWHとの生物活性の比較。MLMWHは、非常に高い（>100 IU/mg）抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性を有する。

	第Xa因子 (IU/mg)	第IIa因子 (IU/mg)	第Xa因子/ 第IIa因子	IC ₅₀ , 第IIa因子	分子量 (Da)
M115	250	200	1.25	25.6	5000
M411	200	130	1.5	38.0	4500
エノキサパリン	100	25	4.0	236	4200
アルデパリン	93	60	1.5	98.3	5000

【0235】

表5：既存のLMWHおよびヘパリンの分子プロファイルの比較

M115とM411の活性のインビトロ評価は、予想されるように、M115とM411がより高い抗第Xa因子活性を有することを示した。M115は、330 IU/mgの抗第Xa因子活性を測定し、これはUFHの2倍以上高く、既存のLMWHより少なくとも3倍高い。M411はまた第Xa因子の強力な阻害剤であり、その活性はUFHのほぼ1.5倍であり、既存のLMWHの約2倍の強さであった。重要なことに、M115およびM411はいずれもそれぞれ、200 IU/mgおよび130 IU/mgという有意な抗第IIa因子活性を有した。これは、4～10倍低い抗第IIa因子活性を示す既存のLMWHとは対比をなす。これらの結果は、トロンビン活性化に関するこれらの化合物のIC₅₀を測定することによって確認して拡大した。併せて考慮すると、これらの結果は、より高いp8含有量を有するLMWHを設計することによって、活性が増加したLMWHを作製することが可能であることを示している。

【0236】

実施例2：M115およびM411は、s.c.投与後の第IIa因子および第Xa因子の薬物動態において他のヘパリンより優れている

M115およびM411は、UFHまたは他のLMWHと比較してIU/mgで表記した場合にインビトロ抗第Xa因子および抗第IIa因子活性が顕著に増加した。雄性ニュージーランドウサギを用いた一連の薬物動態実験は、このことをインビボで確認した。これらの実験において、UFHまたはLMWH（M115およびM411）のいずれかをウサギに皮下注射によって投与した。次に、抗第Xa因子または抗第IIa因子活性を追跡することによって薬物動態パラメータを決定した。

【0237】

方法

体重2.5～3.0 kgの雄性ニュージーランドウサギを薬物動態試験に用いた。ケタミン（40 mg/kg）およびキシラジン（5 mg/kg）によって麻酔した後、24ゲージのテフロンカテーテルを中心耳介動脈に挿入した。カテーテルを、等張生理食塩液を満たしたヘパリンキャップに接続した。ヘパリン溶液を1および3および6 mg/kgでウサギに皮下注射した。異なる四つのヘパリン（UFH、アルデパリン、エノキサパリン、およびF1）を本試験に含めた。注射後0、5、10、30分、1、2、3、4、6、8、10、12、14、18、24時間に血液0.2 mlを採取した。各採取において採取した最初の血液0.2 mlを捨てた。血液試料をクエン酸ナトリウム水溶液（3.8モル%；1/9、v/v）において採取して2000×gで20分間遠心して、得られ

た血漿を瞬間凍結して、アッセイするまで-80℃で保存した。

【0238】

試薬（コーテストヘパリンキット、S2238基質、トロニン）は全てクロモゲニクス（Chromogenix、ディアファーマグループインク、オハイオ州）から購入した。抗第Xa因子アッセイ法を用いて、血漿LMWHレベルをモニターした。TeienおよびLieのアミド溶解法（Thrombosis Res. 10:399~410、1977）に改変を加えて、色素産生基質としてS-2222（ディアファーマグループインク、オハイオ州）を用いて、コーテストヘパリン試験キットによって抗第Xa因子アッセイを行った。詳細な技法は他所で記述された（Liuら、PNAS 94:1739~1744、1997）。未知試料におけるLMWH濃度は、0~0.7 IU/mlの範囲で直線であるLMWHに関する第一の国際標準に由来する校正曲線を比較することによって計算した（ $r^2 > 0.99$ ）。結果は抗第Xa因子IU/mgにおいて表記し、その後μg/mlによって表記した。抗第IIa因子アッセイ法は、S2238を基質として用いることによって同様に行った。第Xa因子およびIIa因子アッセイ法はいずれも、自動凝固装置（Coag-A-Mate MTX II、オルガノンテクニカダーラム、NC27712）によって実施した。

【0239】

結果

3 mg/kgの同等の用量で、血漿中に存在する抗第Xa因子活性を追跡することに由来する薬物動態パラメータは、M118の生物学的利用能がUFHまたは他のLMWHのいずれかより約3~4倍高いことを示した（図3）。M115は、UFHと比較して同等の吸収（ka）および排泄（ke）速度定数を示し、増加した生物学的利用能は、他のヘパリンと比較してM115のより高い固有の抗第Xa因子活性（IU/mg）によるものであることを示している（データは示していない）。この知見は、M115のインビトロ活性と一致する。このように、M115の吸収および排泄は他のヘパリンと同様に効率的である。その結果、同じ用量を動物に投与すると、かなり高い血漿抗第Xa因子活性が得られる。

【0240】

（表6）s.c.投与後の血漿中抗第Xa因子薬物動態

	UFH	M115	エノキサパリン	ダルテパリン
Ka	0.25	0.16	0.43	0.45
Ke	0.16	0.12	0.31	0.23
t _{1/2a} (hr)	2.85	5.27	1.67	1.73
t _{1/2e} (hr)	4.65	8.20	2.25	3.41
AUC(IU*hr/ml)	7.97	34.24	7.26	9.97
C _{max} (IU/ml)	0.51	3.53	1.20	2.00
t _{max} (hr)	5.16	11.87	2.76	3.20
MRT(AUMC/AUC)	6.22	9.96	5.01	5.73

【0241】

血漿中の抗第IIa因子活性を抗第Xa因子薬物動態と相関させることができるか否かを調べるために、UFHおよびLMWHに関する血漿中の抗第IIa因子薬物動態も同様に確立した。インビトロ抗第IIa因子活性において認められた差と一致して、血漿中抗第IIa因子薬物動態結果は、他のヘパリンと比較してM115およびM411に関してかなり高い生物学的利用能を示した。これは、エノキサパリンまたはUFHをM115およびM411のいずれかと比較した場合に特に当てはまる。エノキサパリンに関して、認められた有意差はエノキサパリンが固有に低い抗第IIa因子活性（M115に関する~250 IU/mgと比較して~25 IU/mg）を有するという事実に帰因しうる。UFHの場合、その増加した多分散性によってより速く消失するいくつかのより大きい多糖類断片が投与されて、生物学的利用能が減少する。

【0242】

実施例3：M115およびM411は動脈血栓症のより強力な阻害剤である

動脈血栓症の形成は、血小板の活性化および凝集に大きく依存する。活性化トロニン（第IIa因子）は、血小板凝集の強力な活性化因子であることが知られており、したがっ

て高い抗第IIa因子活性を含む分子は、動脈血栓症形成のより強力な阻害剤となるはずである。本発明者らは、M115およびM411がラット動脈血栓症モデルを用いてより顕著な抗血栓作用を生じるか否かを調べた。

【0243】

方法

動脈血栓症モデルは本質的に記述通りに軽微な改変を加えて実施した。体重350～400 gの雄性スプレージ-ドーリー系ラットをケタミン（80 mg/kg）およびキシラジン（10 mg/kg）によって麻酔した。右側の頸動脈を注意深く周辺組織から単離した（約2 cm）。超音波流計（トランスソニックフローメーター、ニューヨーク）に接続した血管周囲プローブを頸動脈の下周囲に置いて血流速度をモニターした。実験は、生理食塩液またはヘパリン溶液0.2 mlを陰茎静脈から注射することによって開始した。注射の正確に1分後に、50モル%FeCl₃に浸した濾紙片（直径6 mm、ホワットマン#5）を単離した頸動脈の上に留置した。濾紙を15分後に除去した。実験は、FeCl₃処置の1時間後に終了して、頸動脈（2 cm）を切除した。血栓（形成されれば）を採取して、湿重量を測定した。血流が完全に停止するまでの時間である総閉塞時間（TOT）と共に血栓重量を記録した。

【0244】

結果

図4は、ラット動脈血栓症モデルにおけるヘパリンの抗血栓活性と共に血栓重量を示す。血栓は、1時間の血栓誘導期間の終了時に重量を測定した。異なる用量の異なるヘパリンの関数としての総閉塞時間および血栓重量を図4に示す。0.5 mg/kgでは、UFHは対照群の17分と比較して総閉塞時間（TOT）を約27分へと延長した。UFHおよびエノキサパリンの作用と類似の抗血栓作用を得るために必要なF1の用量は、かなり低いことが注目される。エノキサパリンに関してはわずかに弱い阻害を認めた（TOT=23分）。この血栓形成の阻害はまた最終的な血栓重量においても認められた。

【0245】

対照的に、0.5 mg/kgの同じ用量で、M115は動脈の閉塞を完全に予防した。この場合、血流速度は、60分の観察期間において0に達したことがなかった。これはまた、60分の終了時に有意に減少した血栓重量によって反映される。0.3 mg/kgでは、本質的に同じ反応を認め、すなわち完全な閉塞は起こらず、有意に減少した血栓重量を60分以内に認めた。0.1 mg/kgでは、M115処置群のTOTおよび血栓重量は、UFHおよびエノキサパリンの0.5 mg/kgについて認められたものと同等になった。M411はまた、M115より弱いものの、そのインビトロでのわずかに減少した抗第IIa因子活性から予想されるように、動脈血栓形成の極めて強力な阻害剤であった。このように、より高い抗第IIa因子活性は、動脈血栓形成のより強力な阻害に関連する。さらに、M115およびM411の増加した強度は、その都合のよい薬物動態、特に生物学的利用能と共にそのインビトロ活性と一貫する。

【0246】

実施例4：s.c.投与したM155およびM411は、血漿TFPI活性の増加に関連する

蓄積された証拠から、複雑な組織因子（TF）活性化第VIIa因子（FVIIa）がインビボでの動脈血栓症の重要な開始物質であることが示される。TFPIは、組織因子凝固経路の強力な阻害剤であり、これは第Xa因子の触媒活性を中和して、第Xa因子の存在下で第VIIa因子-TF複合体のフィードバック阻害によって、その機能を発揮する。UFHおよびLMWHは、その十分に研究されたATIIIの阻害活性促進能の他に、内皮細胞からTFPIを放出する。この機能はさらに、ヘパリンとLMWHの全体的な抗凝固活性および抗血栓活性に劇的に貢献する。実際に、LMWHはTFPIをより効率的に血液中に放出して、それによってUFHと比較して好ましい抗凝固機能を促進することが知られていることが試験により判明した。薬理学的なUFHおよびLMWHの全体的な機能におけるTFPI放出の重要性を考慮して、本発明者らは、インビボでTFPI放出に及ぼすM115およびM411の影響を測定しようとした。本発明者らは、M115およびM411、UFH、またはモデルLMWHとしてのダルテパリンのs.c.投与後の血漿中のTFPI活性を測定した。放出プロファイルを確立するために、様々な時点で採取した血漿試料を調べた。

10

20

30

40

50

【0247】

方法

ヘパリンを1回s.c.投与後のウサギ血漿中のTFPI活性は、2段階比色アッセイ法によって決定した。簡単に説明すると、第一段階において、試験試料の希釈液を飽和濃度の第VII因子／第IIa因子複合体と共にインキュベートした。第二段階において、残留第VIIa因子-TF触媒活性の基質として、高濃度の第X因子を反応混合物に加え、生成された第Xa因子を特異的色素産生基質（アメリカンディアグノスティカインク（American Diagnostica Inc.）、コネチカット州）によって測定する。405 nmでの吸光度を読み取った。製造元（アメリカンディアグノスティカインク）によって提供された標準血漿について直線校正曲線を得た。試験試料は全て5モル%希釈液でアッセイした。結果は、プールしたウサギ血漿におけるTFPI活性の百分率として表記する。

10

【0248】

結果

異なるヘパリンを3 mg/kgでs.c.投与後のTFPI放出プロファイルを、図5に示す。TFPIの放出は、色素産生アッセイ法によって決定すると、血漿TFPI活性の百分率増加によって反映される。F1処置によって、有意に高いレベルのTFPI活性が得られ、これも同様に他のヘパリン処置より長い時間持続することに注目される。

【0249】

UFHおよびダルテパリンと比較すると、M115またはM411のいずれかのs.c.投与は、循環中へのTFPIのより顕著な放出に関連する。ピークTFPI活性はs.c.投与後約4時間で達する。TFPI活性はまた、UFH処置動物からの血漿においても、程度は少ないものの上昇する。意外にも、LMWHであるダルテパリンは血漿TFPI活性の最小の増加を示したに過ぎなかった。この実験からの結果は、M115またはM411の投与は、UFHまたはダルテパリンより優れた内皮からのTFPIの動員に関連することを示唆している。

20

【0250】

実施例5：M115またはM411は、UFHより強力な抗凝固剤である

抗凝固は、65年以上にわたってUFHの主な臨床適応であった。s.c.投与後のその誤った薬物動態により、UFHはその代わりに静脈内注射によって投与されてきた。さらに、抗凝固剤としてのUFHの適応は、UFHとの非特異的な血漿タンパク質結合に関連した多くの副作用によって妨害されている。したがって、UFHの抗凝固活性を保持するが、副作用が減少した新規LMWHを開発することが重要である。LMWHは、本質的にその減少した鎖の長さおよび多様性のために、顕著に少ない非特異的血漿タンパク質結合を示す。しかし、現在臨床で利用可能なLMWHは全て、UFHと比較して減少した抗第IIa因子活性を有する。この減少した活性のために、類似の抗凝固活性を得るためには（UFHと比較して）より高用量のLMWHが必要である。その結果、LMWHの使用はこれまで血栓症の予防に大きく限定されて、その治療には用いられてこなかった。

30

【0251】

方法

本明細書において報告した第二世代のLMWHは、多くの理由から独特である。第一にM115およびM411はUFHより低い分子量を有し、LMWHに関して許容される分子量範囲に存在するが、これらの分子は、質量に基づいてUFHまたは他のLMWHと比較して2～4倍高い抗第Xa因子および抗第IIa因子活性を有する。さらに、典型的なLMWHと比較すると、M115およびM411はいずれも濃縮された抗第Xa因子活性と共に5～10倍高い抗第IIa因子活性を有する。M115およびM411の抗凝固剤としての効率を、従来のUFHの効率と比較した。これを調べるために、ラット尾の出血時間アッセイを行った。出血時間は、記述されるラットモデルに軽微な改変を加えて決定した。詳しく述べると、体重350～400 gの雄性Sprague-Dawley系ラットを用いた。55 mg/kgのペントバルビタールの腹腔内注射を麻酔に用いた。生理食塩液またはヘパリン溶液をラットの陰茎静脈から注射した。注射1分後、ラット尾をカミソリの刃で先端から2 cmのところで切断した。出血した尾を、しみが血液を含まなくなるまで30秒毎にホワットマン#3濾紙に吸わせて、その時間を記録した。

40

50

【0252】

結果

M115またはM411はいずれも、このモデルにおいてはるかにより強力な抗凝固作用を示し、その抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性の増加と一致した。0.5 mg/kgでは、sgL-1処置ラットの出血時間は、UFHの20分と比較して60分を超えた。0.3 mg/kgでは、出血時間はUFHと同等となり、0.1 mg/kgでは出血時間は基準レベルに戻った。同様に、M411を処置したラットは、UFHを処置したラットより顕著に長い出血時間を示した。

【0253】

実施例6：抗第Xa因子および抗第IIa因子活性の異なる比を有するLMWHのパネルの作製

当技術分野で現在既知のLMWH治療に関連した欠点の一つは、被験体に合わせて個別にLMWH治療を調節できないことである。現在まで、当技術分野で既知のLMWHを調製する方法はそのような調製物を産生するために不適切であったことから、十分に特徴が調べられ、バッチ間で一貫している調製物はない。本発明の方法によって、所望の特性を有するLMWHの一貫した予測可能な組成物、例えば所定の比の抗第Xa因子活性：抗第IIa因子活性を有するLMWH調製物を調製することができる。この方法を用いて、他の特徴の中でも様々な程度の抗第IIa因子および抗第Xa因子活性を有するLMWH調製物のパネルを産生することができる。この方法は、抗第IIa因子活性または抗第Xa因子活性を操作することに限定されず、本明細書に開示して請求される方法を用いることによって、他の所望の特徴、例えば超低分子量、PF4結合、プロタミン中和、FGF結合等を有するLMWH調製物を産生することに拡大することができる。次に、本発明の方法によって作製された組成物を用いて、被験体の治療をその状態に合わせて調節することができる；例えば、凝血の治療において高い抗第Xa因子／抗第IIa因子活性を有するLMWH調製物を治療サイクルの初期に投与して、後に抗第Xa因子活性のみを有するLMWH調製物に切り替えることが有利であるかも知れない。

【0254】

方法

「格子状の表」技法を用いて多様な構造特徴を有する多くのLMWH調製物を作製した。制限的であると意味しない格子状の表の一例を下記に示す。これは上から下まで格子状の表を下に移動させ、それぞれの列において利用可能な選択肢の任意の一つを選択することによって用いられる。それぞれの選択肢は、案内であると意図され、当業者は、下記に示すそれらのあいだおよびそれらを超える選択肢が本発明の範囲に含まれることを理解するであろう。格子状の表を用いる特定の例を下記に示す。一例として、10 mg/ml濃度のUFHから開始してもよく、MgCl₂によって沈殿し、段階1および2に関する極性溶媒として用いるためにメタノールを選択する等。一つの欄に留まる必要はない；選択肢の選択は得られた組成の構造特徴に影響を及ぼす可能性がある。

【0255】

開始材料	未分画ヘパリン	エノキサパリン	ダルデパリン	他のLMWH
開始材料の濃度	1 mg/ml	10 mg/ml	100 mg/ml	1 g/ml
塩のタイプ	NaCl	Na-酢酸塩	MgCl ₂	他の塩
段階1および2において用いる極性溶媒	アセトン	エタノール	メタノール	他の溶媒
用いた極性溶媒の量	0.1V (1V=ヘパリン水溶液の容積)	1 V	2 V	10 V
段階1の反応時間	1 時間	6 時間	12 時間	24 時間
段階2の反応時間	1 時間	6 時間	12 時間	24 時間
段階3の反応時間	1 時間	6 時間	12 時間	24 時間
段階1の反応温度	0C	4C	10C	室温
段階2の反応温度	0C	4C	10C	室温
段階3の反応温度	10C	室温	37C	45C
解重合物質 (酵素 / 化学物質 / γ線照射の ようなエネルギー源)	ヘパリナーゼ I	ヘパリナーゼ II	ヘパリナーゼ III	ヘパリナーゼ IV または哺乳類 ヘパリナーゼ

10

20

【0256】

エノキサパリン由来LMWH化合物の合成

段階1：エノキサパリン100 mgを水10 mlに溶解して10 mg/ml濃度を得た。NaCl 100 mgをこの溶液に加えた。溶液のpHを6.7に調節した。200標準濃度エタノール5 mlをこの混合物に加えた。溶液を4℃で24時間維持した。沈殿した残渣（MLP）を4000 rpmで15分間の遠心によって除去した。エタノール20 mlを上清に加えて、混合物を4℃で24時間維持した。24時間の終了時に形成された沈殿物（MLS）を4000 rpmで15分間の遠心によって分離する。これを一晩凍結乾燥すると、MLSの乾燥粉末60 mgが得られる。

30

【0257】

段階2：MLS 100 mgをpH 6.7の50 mM酢酸カルシウム緩衝液10 mlに溶解した。ヘパリナーゼII 10 mgおよびヘパリナーゼIII 1 mgからなる酵素カクテルをこの混合物に加え、溶液を37℃で4時間維持した。2時間終了時に形成された沈殿物を4000 rpmで15分間の遠心によって除去した。消化したMLSの上清をサイズ排除クロマトグラフィーカラムにおいて脱塩した。

【0258】

段階3：先に説明した方法によって消化したMLS 100 mgを長さ1 m、直径10 cmのP10サイズ排除カラムにローディングした。500 mM酢酸アンモニウム緩衝液を流出緩衝液として用いた。溶出液は232 nmでのUV吸収によって追跡した。初回の空隙容量後にピーク3 mlを回収した。0.1単位より多い吸収を生じたピークを回収した。それらを等しい10分画に分けた。次に、異なる分画を水から凍結乾燥してアンモニウム重炭酸塩を除去した。次に、それらを、記述のアッセイ法によって構築ブロックおよび機能的特徴（抗第Xa因子および抗第IIa因子活性）に関してアッセイした。分画3および分画7（M108およびM405と呼ばれる）の特徴を下記の表に記載する。

40

【0259】

UFH由来LMWH化合物の合成

段階1：UFH 100 mgを水10 mlに溶解して10 mg/ml濃度を得た。NaCl 100 mgをこの溶液

50

に加えた。溶液のpHを6.7に調節した。200標準濃度エタノール3 mlをこの混合物に加えた。溶液を4℃で12時間維持した。沈殿した残渣（MUP）を4000 rpmで15分間の遠心によって除去する。エタノール10 mlを上清に加えて、混合物を4℃で24時間維持した。24時間の終了時に形成された沈殿物（MUS）を4000 rpmで15分間の遠心によって分離する。これを一晚凍結乾燥すると、MUSの乾燥粉末60 mgが得られる。

【0260】

段階2：MUS 100 mgをpH 6.7の50 mM酢酸カルシウム緩衝液10 mlに溶解した。ヘパリナーゼII 5 mgおよびヘパリナーゼIII 5 mgからなる酵素カクテルをこの混合物に加え、溶液を37℃で4時間維持した。2時間終了時に形成された沈殿物を4000 rpmで15分間の遠心によって除去した。消化したMUSの上清をサイズ排除クロマトグラフィーカラムにおいて脱塩した。

10

【0261】

段階3：先に説明した方法によって消化したMUS 100 mgを、長さ1 mで直径10 cmのP10サイズ排除カラムにローディングした。500 mM酢酸アンモニウム緩衝液を流出緩衝液として用いた。溶出液は232 nmでのUV吸収によって追跡した。初回の空隙容量後にピーク3 mlを回収した。0.1単位より多い吸収を生じたピークを回収した。それらを等しい10分画に分けた。次に、異なる分画を水から凍結乾燥してアンモニウム重炭酸塩を除去した。次に、それらを、記述のアッセイ法によって構築ブロックおよび機能的特徴（抗第Xa因子および抗第IIa因子活性）に関してアッセイした。分画2および分画4（M115およびM411と命名する）の特徴を下記の表に記載する。

20

【0262】

結果

上記の方法を用いて以下のLMWH組成物を調製して特徴を調べた：

【0263】

（表7）新規LMWH組成物、CE分析によって決定したAUC

AUC %	M108	M405	M115	M411
p1	60.9	61.9	53.8	54.0
p2	6.8	8	5.7	6.6
p3	14.7	10.4	18.5	18.7
p4	2.7	1.6	3.4	3.5
p5	1.6	4.3	0.4	0.5
p6	2.3	3.9	1.4	1.6
p7	4.4	5.8	9	8.9
p8	6.1	2.6	8.1	6.2
p9	0.3	0.7		
p10	0.2	0.6		
抗第Xa因子 (IU/mg)	150	80	250	200
抗第IIa因子 (IU/mg)	130	0	200	130
分子量 (Da)	5000	2200	5000	4500

30

【0264】

（表8）新規LMWH組成物、所定の成分のモル%

40

モル %	M108	M405	M115	M411
p1	62.7	67.0	55.3	56.7
p2	6.3	7.7	5.2	6.2
p3	12.6	9.3	15.8	16.3
p4	2.3	1.4	2.9	3.0
p5	1.0	2.8	0.2	0.3
p6	1.0	1.7	0.6	0.7
p7	2.6	3.6	5.3	5.3
p8	11.1	5.0	14.7	11.5
p9	0.3	0.8	250	200
p10	0.2	0.6		
抗第Xa因子 (IU/mg)	150	80	250	200
抗第IIa因子 (IU/mg)	130	0	200	130
分子量(Da)	5,000	2200	5000	4500

10

【0265】

本発明者らは、先に述べた特定の実施例においてM108、M405、M115、およびM411を作製するために上記の「格子状の表」技法を用いた。これらは、多数のパラメータを変化させることによって複雑な開始材料から得られた複雑な分子であると理解される。産物の組成は多数のパラメータによって影響を受けることから、異なるパラメータを異なるように調節すること、および産物のプロフィールをモニターすることによって、当業者はM108、M405、M115、およびM411と類似の産物を調製することができるであろう。

20

【0266】

変更できるパラメータには、以下が含まれるがこれらに限定されない：

- 1) 開始材料：特に、UFH、FH、またはエノキサパリン（Lovenox（商標））、ダルテパリン（Fragmin（商標））、セルトパリン（Sandobarin（商標））、アルデパリン（Normiflo（商標））、ナドロパリン（Fraxiparin（商標））、バルナパリン（Fluxum（商標））、レビパリン（Clivarin（商標））、チンザパリン（Innohep（商標）またはLogiparin（商標））のような他のLMWH調製物。
- 2) 塩（タイプ、濃度）：MgおよびCaのような二価金属のような塩（例えば、 $MgCl_2$ 、酢酸カルシウム等）。
- 2) 酵素（ヘパリナーゼI、II、III、IV、ヘパラナーゼ、変異体ヘパリナーゼ、およびこれらの酵素の異なる組み合わせ）
- 3) 温度
- 4) インキュベーション時間

30

【0267】

本発明の方法は、異なる特徴を有するLMWH調製物を作製するために用いられている。例えば、プロタミンの添加によって抗第Xa因子活性が $\geq 50\%$ および抗第IIa因子活性が $\geq 70\%$ 中和されるように、プロタミンによって完全に中和されるLMWH調製物を作製することができる。図6、7、および8において認められうるように、新規LMWH調製物M118およびM312（M115およびM411と類似のように調製される）はいずれも、UFHまたはエノキサパリンのいずれかより抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性のプロタミン中和に対して感受性がある。さらに、表9に認められうるように、PF4結合活性がより低いLMWH調製物が作製されており、これらの調製物は、PF4結合に関連する成分1、2、4および6の量がより少ない；図9も参照されたい。PF4結合はヘパリン誘発血小板減少症（HIT）に関連していることから、PF4結合が減少したLMWH組成物は非常に望ましいであろう。

40

【0268】

PF4結合は、Maccaranaらのフィルター結合アッセイ法を用いてアッセイした。簡単に説明すると、 3H -放射標識ヘパリン1 μg を、トリス緩衝液（130 mM NaCl、50 mM トリス塩酸、pH 7.3）10 μl において様々な量の非放射活性LMWHの存在下でPF4 1 μg と共に37°Cで10分間インキュベートする。次に、トリス緩衝液を加えて容量を300 μl にして、試料を真

50

空装置上で緩衝液によって平衡にした硝酸セルロースフィルターの中に通過させる。フィルターを130 mM NaCl、50 mMトリス塩酸5 mlによって2回洗浄して、結合した材料を2 M NaCl、50 mMトリス塩酸の5 mlによって2回溶出した。平均すると、99%より多い放射標識材料が2 M NaCl、50 mMトリス塩酸によって濾紙から除去された。

【0269】

様々なLMWHに関するPF4結合親和性を評価するために、フィルター結合アッセイ法によって採取したデータのスキッチャード分析を用いた。データに関して最もよく適合する線およびグラフでの等式を決定した。これらの線の勾配は、 $1/Kd(1)$ および $1/Kd(2)$ と同等であり、最初の線のx切片はタンパク質上の結合部位の数を表し ($n1$)、第二の線のx切片は $n1+n2$ であり、ここで $n2$ は $Kd(2)$ を有する結合部位の数である。

10

【0270】

(表9) 同等の抗第Xa因子活性の副作用に関する比較

糖の成分	エノキサパリン	M118	M312
全体 (mg)	100	32.0	48.4
p1 (mg)	63.5	18.9	29.7
p2 (mg)	7.2	1.8	3.3
p4 (mg)	2.1	0.4	0.9
p6 (mg)	2.0	0.1	0.3
抗第Xa因子 (IU)	100	100	100
分子量 (Da)	4,200	5,000	4,500

20

【0271】

これらの結果から明らかであるように、方法は、異なる比およびレベルの抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性、プロタミン中和、FGF結合、ならびにPF4結合を含む、望ましいほぼ如何なる特徴も有するLMWH調製物を作製するため用いることができる。

【0272】

実施例7：低いバッチ間変動を有するLMWH調製物

当業者に現在既知であるUFHおよびLMWH調製物の大きい欠点の一つは、組成および活性の双方におけるその大きい変動である。このために、LMWHまたはUFH治療が適応される患者集団が限定され、例えば中でも異常な腎機能患者は除外された。異常な腎機能は、血液および尿中の尿素、クレアチニン、リン、GFR、またはBUNによって測定する。既知のLMWH調製物の投与はしばしば、不正確な試験に基づいて適当な用量を設定するための試行錯誤のアプローチであり、術後の出血のような望ましくない重度の副作用が起こりうる。低いバッチ間変動と所望の構造特徴を有するLMWH調製物を作製する方法を有することが非常に望ましい。本発明の方法によって、そのような調製物を作製することができる。

30

【0273】

方法

いくつかのエノキサパリン調製物を、ヘパリナーゼを含む酵素カクテルによって解重合した。次に、得られた消化物の毛細管電気泳動 (CE) をアジレントCE装置において負のモードで行った。市販のエノキサパリンのバッチ3個において認められる二糖構築ブロックを下記の表に示す。組成は、エノキサパリンの構築ブロックのモル%として表記する。この表は、構成構築ブロックのモル%として組成を教示する。言い換えれば、エノキサパリン1モルは、二糖構築ブロック1のX1モル%、二糖構築ブロック2のX2モル%、構築ブロック「N」のXNモル%で構成される。 $X1+X2+\dots+Xn=100$ である。変動は、三つの値の平均値をとり、最大の変動を平均値によって除することによって計算した。

40

【0274】

(表10) エノキサパリンのバッチ間変動、モル%

糖	エノキサパリン バッチ 1	エノキサパリン バッチ 2	エノキサパリン バッチ 3	変動 (%)
p1	60.8	63.5	63.6	4
p2	7.0	7.2	8.3	17
p3	11.8	10.8	11.3	9
p4	2.5	2.1	2.0	23
p5	3.6	3.5	3.5	3
p6	1.8	2.0	1.8	11
p7	5.4	4.3	1.9	91
p8	6.6	5.8	6.4	13
p9	0.2	0.4	0.5	82
p10	0.3	0.4	0.7	86

10

【0275】

上記の表は、市販のエノキサパリン（Lovenox（商標））のバッチ間変動が実質的であることを示している。この問題を軽減するために、本発明の方法は、品質管理法を提供することによってこの問題を軽減する。

【0276】

結果

20

制限的であることを意味しない本発明の方法の応用の一つの例は、以下の通りである。第一に、例えば所望のレベルで所望の活性を有する標準的な調製物に基づいて、望ましい参照構造特徴、モル%または活性を選択する。表10のデータを用いて、抗第Xa因子活性を最大限にして、許容される値の範囲をピーク8のモル%に関して、例えば6.5モル%を選択する。本発明の範囲において、製造されたそれぞれのバッチのエノキサパリンに、本発明の分析法を行って、8というモル%を決定した。所望の範囲の所定の変動内に入るエノキサパリンのバッチが容認されるであろう；範囲に入らないバッチは拒絶されるであろう。この場合も、一例として表10からのデータをとると、所望のモル%が6.5である場合、許容される変動は5%であり、ピーク8の四糖のモル%が 6.5 ± 0.3 であるバッチのみが許容されるであろう。このように、バッチ1および3は許容されるが、バッチ2はp8のレベルが不十分である（そしてこのように抗第Xa因子活性レベルが不十分である）として拒絶されるであろう。

30

【0277】

本発明の方法のさらなる応用には、開始材料、例えばブタ腸粘膜ヘパリンの構造特徴を決定することが含まれる。この開始材料は、屠殺場において単離され、しばしば標準的な品質管理技術によって監視されていない。開始材料の品質、例えば構造特徴および活性が、許容されるLMWH調製物を産生するために十分であることを確保するために、上記の方法を用いる。開始材料が一貫するようにこの品質管理を技法の最初に加えることは、バッチ間変動を減少させるために役立ち、このように、拒絶されるバッチ数を減少させ、時間およびお金を節約し、改善された産物が得られるであろう。

40

【0278】

実施例8：被験体のモニタリング

ヒトもしくは動物被験体または実験動物のような被験体におけるLMWH調製物を追跡およびモニターすることができることは、これらの調製物の研究および治療応用をいずれも大きく強化するであろう。今日まで、モニタリング法は、上記のように多くの欠点を有する活性アッセイ法に依存していた。

【0279】

方法

被験体、例えばヒトもしくは動物被験体または実験動物にLMWH調製物を投与後、試料または複数の試料を様々な期間でその被験体から採取する。試料は、血液または尿を含むが

50

これらに限定されない如何なる体液ともなりうる。次に、試料を、米国特許第5,843,786号に開示される方法のような、当技術分野で既知の適当な方法によって精製する；精製法は、試料のタイプに依存するであろう。制限することを意味しないが一例として、試料は血液である。濾過または遠心によって全ての細胞を除去した後、さらなる濾過を用いて高分子量混入物を試料から除去してもよい。試料はさらに、精製して当技術分野で慣例的に既知のイオン交換法によって中性混入物を除去してもよい。次に、試料を当技術分野で既知の方法を用いて誘導体化してもよい。最後に、試料を上記の方法を用いて処置して、多糖類を解重合してから、分析、例えばCE、MALDI-MS、および／またはPEN-MALDIを行う。試料はまた、試料中のLMWHレベルを定量するために参照物質と比較してもよい。

【0280】

制限的であることを意味しない一例として、方法は以下の通りである。ヘパリンまたはLMWHのs.c.またはi.v.注射後、血液または尿試料を選択した時点で採取した。試料をマイクロ-DEAEカラム（ファルマシア-バイオテック（Pharmacia-Biotech））に結合させて精製し、10 mMリン酸塩、0.1 M NaCl、pH 6.0の緩衝液によって洗浄し、10 mMリン酸塩、1 M NaCl、pH 6.0によって溶出した。次に、試料をさらに精製して、マイクロコン-3スピンカラム上で濃縮してから、酵素消化および組成分析を行った。

【0281】

次に、試料に、ヘパリナーゼI、IIおよびヘパリナーゼIIIからなる酵素カクテルによって完全な解重合を行った。10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 濃度のUFH水溶液9 μl を、25 mM酢酸ナトリウム、100 mM塩化ナトリウム、5 mM酢酸カルシウム緩衝液、pH 7.0において各100 nMのヘパリナーゼI、II、IIIからなる酵素カクテル1 μl によって37°Cで12時間消化した。CE試料は、消化物1 μl をH₂O 9 μl によって希釈することによって調製した。試料は50 mMトリス／リン酸塩、10 μM 硫酸デキストラン、pH 2.5の泳動緩衝液によって逆極性でのCEによって分析した。結果を図10に示す。この方法を用いて、LMWH調製物を被験体において経時的にモニターすることができ、結果を、図11および12に示すように時間に対してプロットする。

【0282】

実施例9：タグをつけたLMWH調製物

ヒトもしくは動物被験体または実験動物のような被験体においてLMWH調製物を追跡してモニターできることは、これらの調製物の研究および治療応用をいずれも大きく強化するであろう。LMWH調製物に組み入れたマーカーまたはタグを用いることは、モニタリング、定量、および検出を有意に容易にする。

【0283】

方法

本明細書に開示の方法または当技術分野で既知の方法のいずれかによってLMWHの調製後、標識をLMWHの構成成分の一つまたは複数に結合させる。そのような標識は、蛍光体（Morellら、Electrophoresis (1998) 19 (15) : 2603~11；Anumulaら、Glycobiology (1998) 8 (7) : 685~94；Sudorら、Anal. Chem. (1997) 69 (16) : 3199~204；Biggeら、Anal. Biochem. (1995) 230 (2) : 229~38；Franzら、J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2001) 12 (12) : 1254~61；Drummondら、Proteomics (2001) 1 (2) : 304~10；Arakiら、J. Chromatogr. B Biomed. Sci. (2001) 753 (2) : 209~15；Liuら、Anal. Biochem (1993) 211 (2) : 250~7）；ビオチン（Imaiら、FEBS Lett. (2002) 510 (3) : 201~5）；放射活性同位元素（Collardら、Anal. Biochem (1997) 247 (2) : 448~50）；質量標識；抗原性部分、または当技術分野で既知の他の適した標識となりうる。好ましくは、標識は、LMWHの活性成分に結合させる。

【0284】

このように標識されたLMWHは、当技術分野で既知の方法によって検出および定量することができる。制限的であることを意味しないが一例として、ヒトもしくは動物被験体または実験動物を、タグを含むLMWH調製物によって治療する。次に、試料を被験体から採取する。米国特許第5,843,786号に開示される条件のような当技術分野で既知の適当な条件で

、試料に精製を行う。次に、当技術分野で既知の適当な方法論を用いてタグを検出する。例えば、蛍光タグをLMWH調製物に組み入れる場合、Arakiら、J. Chromatogr. B Biomed. Sci (2001) 753 (2) : 209~15に記述されるように蛍光検出技法を利用してもよい。

【0285】

前述の明細書は、当業者が本発明を実践することができるために十分であると見なされる。実施例は本発明の一つの局面の単なる説明であると見なされ、他の機能的に同等の態様も本発明の範囲に含まれることから、本発明は、提供された実施例による範囲に限定されない。本明細書に示し記述した改変に加えて本発明の様々な改変は、前述の説明から当業者に明らかとなり、それらも添付の請求の範囲に含まれる。本発明の長所および目的は、本発明のそれぞれの態様に必ずしも含まれない。

10

【0286】

本出願において引用した全ての参考文献、特許、および特許出願はその全文が参照として本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0287】

【図1A】エノキサパリン (Lovenox (商標)) の毛細管電気泳動 (CE) プロフィール。異なる構築ブロックを、異なるピークに対応する1、2、3などに表示する。

【図1B】エノキサパリンから単離して、その純度を確認するためにCEに再度注入したピーク1のCEスペクトル。

【図2】UFHの抗第IIa因子 (2A) および抗第Xa因子 (2B) 値、バイオゲルP10カラムによってサイズ分画したUFH、本明細書に記載のように生成したLMWH、ならびに市販のLMWHの線プロットである。抗第Xa/IIa因子値と、分子のピーク8モル%含有量とのあいだに比例相関を認める。

20

【図3】ウサギに3 mg/kgを皮下投与したM118、UFH、エノキサパリンおよびM312の血漿中抗第Xa因子の薬物動態のグラフである。

【図4A】異なる用量と共に異なるヘパリン (UFH、エノキサパリン、M118、およびM312) の関数としての総閉塞時間を表す棒グラフである。

【図4B】UFH、エノキサパリン、M118、およびM312の異なる用量でのヘパリン処置の関数としての血栓重量を表す棒グラフである。血栓は、1時間血栓誘導期間の終了時に重量を測定した。

30

【図5】異なるヘパリンを3 mg/kgで皮下投与した後のTFPI放出プロフィールの線プロットである。TFPIの放出は、色素産生アッセイ法によって決定すると、血漿中のTFPI活性の%増加によって反映される。

【図6】抗第Xa因子活性の関数としての様々なLMWH (UFH、エノキサパリン、M118、およびM312) およびUFHのインビトロプロタミン中和の折れ線グラフである。M118、M312、およびUFHは、ヘパリン/LMWH 100 IUあたり ≤ 2 mgを用いて中和されたのに対し、エノキサパリンは、エノキサパリン100 IUあたり ≥ 3 mgを用いてもその抗第IIa因子活性がなおも約60%残っていた。

【図7】抗第IIa因子活性の関数としての様々なLMWH (エノキサパリン、M118、およびM312) およびUFHのインビトロでのプロタミン中和の折れ線グラフである。M118、M312、およびUFHは、ヘパリン/LMWH 100 IUあたり ≤ 2 mgを用いて中和されたのに対し、エノキサパリンは、エノキサパリン100 IUあたり ≥ 3 mgを用いてもその抗第IIa因子活性がなおも約40%残っていた。

40

【図8】エノキサパリン、M118およびM312のインビボプロタミン中和の棒グラフである。

【図9】LMWH調製物におけるPF4結合成分 (ピーク1、2、4および6) の量とPF4結合性向との比例関係を示す折れ線グラフである。

【図10A】血液中のLMWHのCEプロフィールである。

【図10B】尿中の同じLMWHのCEプロフィールである。

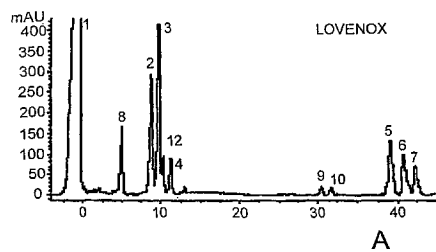
【図11A】投与前、投与後5分 (中央のパネル) および投与後30分 (下のパネル) における血漿中のエノキサパリンのCEプロフィール。

50

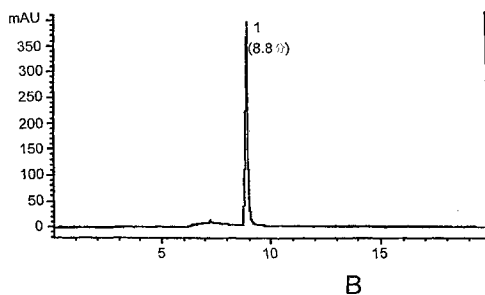
【図 1 1 B】ピーク1、2、3、および4の存在を示す、エノキサパリン投与後の様々な時点での尿中のエノキサパリンのCEプロフィール。

【図 1 2】尿中のヘパリンおよびLMWH（エノキサパリン、および他のLMWH）の異なる構築ブロックのクリアランスを示す折れ線グラフを時間の関数として追跡した。構築ブロックの％は、特定の時点で認められた総構築ブロックの分画としての構築ブロックp1（ピーク1）、p8（ピーク8）、またはp5（ピーク5）の％を指す。

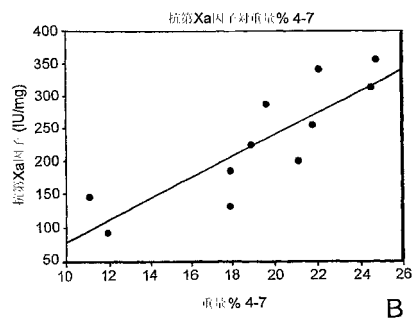
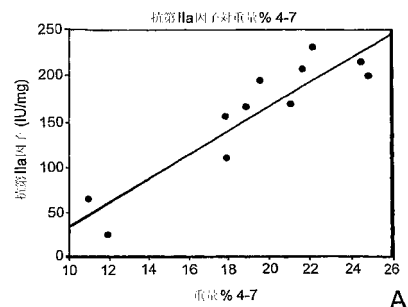
【図 1 A】



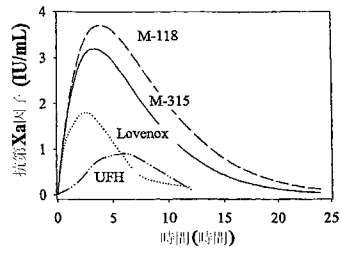
【図 1 B】



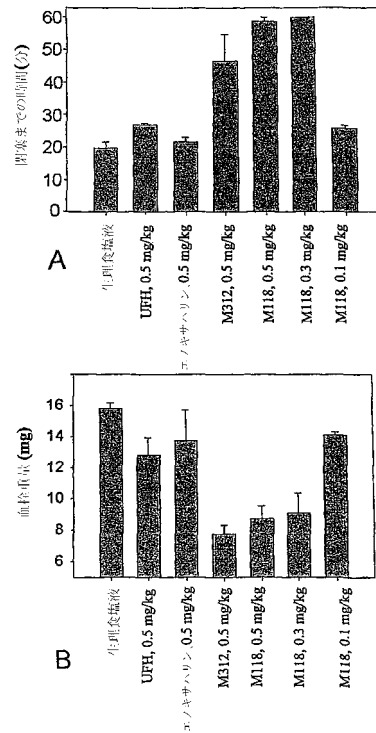
【図 2】



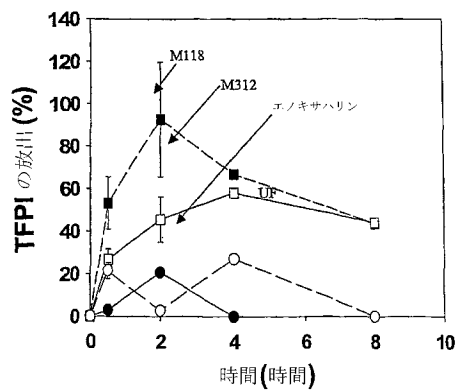
【図 3】



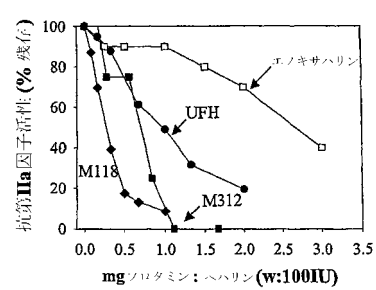
【図 4】



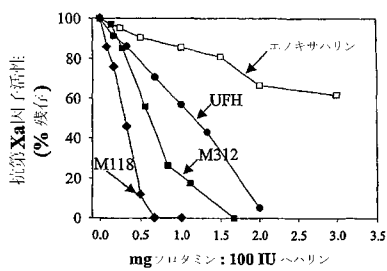
【図 5】



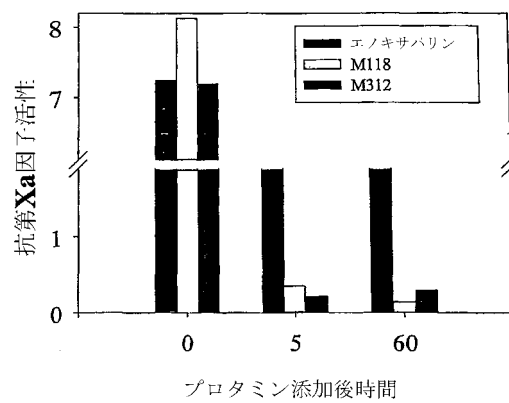
【図 7】



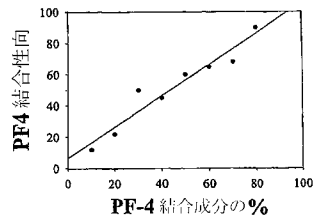
【図 6】



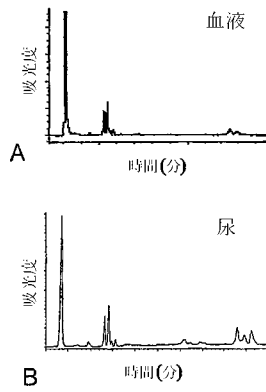
【図 8】



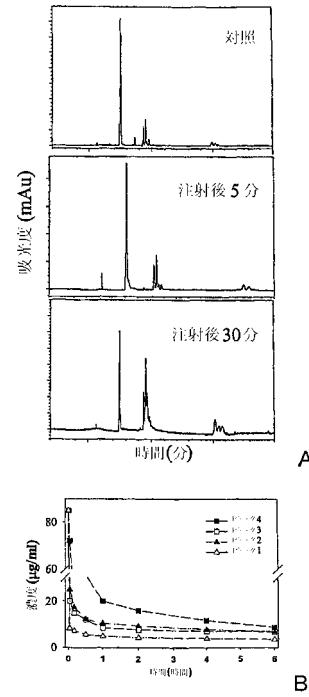
【図 9】



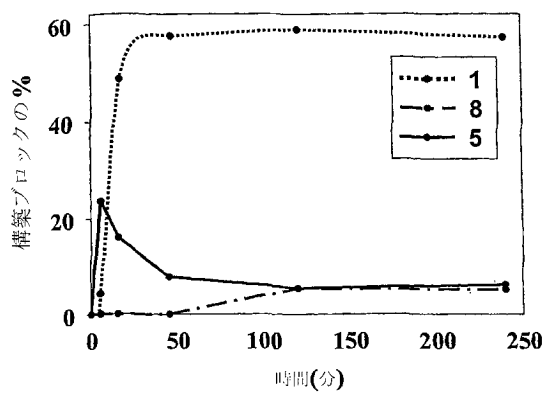
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【手続補正書】

【提出日】平成21年2月10日(2009.2.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物の構造特徴を提供して、それによって組成物を分析する段階を含む、多糖類を含む組成物を含む試料を分析する方法。

【請求項 2】

以下の段階を含む、生物学的同等性を決定する方法：

- 第一の組成物の構造特徴を提供または決定する段階；
- 第一の組成物の生物学的利用能を提供または決定する段階；
- 第二の組成物の構造特徴を提供または決定する段階；
- 第二の組成物の生物学的利用能を提供または決定する段階；および
- 第一の組成物および第二の組成物の構造組成および生物学的利用能を比較して、このように組成物の生物学的同等性を決定する段階。

【請求項 3】

以下を含む、多糖類薬物を分析する方法：

- 予め選択した患者反応の第一のレベルを有する薬物の第一のバッチに関する、第一の構造特徴を決定する段階；
- 予め選択した患者反応の第二のレベルを有する薬物の第二のバッチに関する、第二の構造特徴を決定する段階；および
- 第一と第二の構造特徴決定を比較して、予め選択した患者反応レベルを有する薬物の性質間の相関の有無を決定する段階。

【請求項 4】

以下を含む、多糖類の混合集団を含む組成物を分析する方法：

- 組成物または組成物を含む試料を提供する段階；および
- 以下の一つまたは複数であるか否かを決定して、それによって組成物を分析する段階：組成物において、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ が予め選択した範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ が予め選択した範囲で存在する； $\Delta UH_{NS,6S}$ が予め選択した範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ が予め選択した範囲で存在する； ΔUH_{NS} が予め選択した範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ が予め選択した範囲で存在する； $\Delta UH_{NAc,6S}$ が予め選択した範囲で存在する；または $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ 、またはその混合物が予め選択した範囲で存在する。

【請求項 5】

以下の段階を含む、多糖類の混合集団を含む組成物を分析する方法：

- 組成物または組成物を含む試料を提供する段階；および
- 以下の一つまたは複数であるか否かを決定して、それによって組成物を分析する段階：組成物において、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ が15～85モル％の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ が0.1～20モル％の範囲で存在する； $\Delta UH_{NS,6S}$ が0.1～20モル％の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$ が0.1～10モル％の範囲で存在する； ΔUH_{NS} が0.1～10モル％の範囲で存在する； $\Delta U_{2S}H_{NAc}$ が0.1～5モル％の範囲で存在する； $\Delta UH_{NAc,6S}$ が0.1～15モル％の範囲で存在する；または $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 、 $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ またはその混合物が0.1～20モル％の範囲で存在する。

【請求項 6】

以下の段階を含む、選択された生物活性を有するヘパリンの試料を分析する方法：

- 試料を提供する段階；および

b. 選択された活性に相關することが知られている成分が試料中に存在するか否かを決定して、それによって試料を分析する段階。

【請求項 7】

以下の段階を含む、LMWHの試料を分析する方法：

- a. 試料を提供する段階；および
- b. 非天然の糖、例えば改変糖が試料中存在するか否かを決定して、それによって試料を分析する段階。

【請求項 8】

以下の段階を含む、試料または被験体を分析する方法：

- a. 試料を提供する段階；
- b. $\Delta UH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$ 、 $\Delta UH_{NS, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$ 、 $\Delta UH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S}$ 、もしくは $\Delta UH_{NS, 6S}GH_{NS, 3S}$ 、またはその断片もしくは複数の断片からなる群より選択される一つまたは複数の成分が試料中に存在するか否かを決定する段階；および
- c. 任意に、成分または複数成分のレベルを測定して、それによって被験体をモニターする段階。

【請求項 9】

以下の段階を含む、試料を分析する方法：

- a. 試料を提供する段階；
- b. 抗第IIa因子活性に関連することが知られている一つまたは複数の構造特徴産出物が試料中に存在するか否かを決定する段階；および
- c. 任意に、成分または複数の成分のレベルを決定して、それによって試料または被験体を分析する段階。

【請求項 10】

以下の段階を含む、試料または被験体を分析する方法：

- a. 試料を提供する段階；
- b. 一つまたは複数の非天然の糖、例えば改変糖が試料中に存在するか否かを決定する段階；および
- c. 任意に、非天然の糖のレベルを決定して、それによって被験体をモニターする段階。

【請求項 11】

タグを含むLMWH組成物。

【請求項 12】

以下の段階を含む、タグを含むLMWHの有無に関して試料を評価する方法：

- a. 試料を提供する段階；
- b. 任意に試料を精製する段階；および
- c. 試料中のタグの有無を決定して、それによって試料中のLMWHの有無を評価する段階。

【請求項 13】

抗第IIa因子活性と抗第Xa因子活性の比が増加または減少したLMWH調製物。

【請求項 14】

以下の段階を含む、予め選択された生物活性を有する、または有しないLMWH調製物を産生する方法：

- a. ヘパリンの一つまたは複数のアリコートを提供する段階；
- b. 任意に、ヘパリンを分画する段階；
- c. 活性を生じるように設計された条件でヘパリンのアリコートを改変する段階；および
- d. 任意に、消化されたアリコートを精製する段階。

【請求項 15】

抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性の異なる比を有する二つまたはそれ以上のLMWH調製物のパネル。

【請求項 16】

以下を含む、被験体を治療する方法：

- a. 抗第IIa因子活性および抗第Xa因子活性の異なる比を有する二つまたはそれ以上のLMWH

調製物のパネルを提供する段階；

- b. 所望の比を有するLMWH調製物を選択する段階；および
- c. LMWH調製物の治療的有効量の一つまたは複数の用量を被験体に投与する段階。

【請求項 1 7】

20%未満もしくはそれに等しい<2000 Da種、68%を超えるもしくはそれに等しい2000~8000 Da種、および18%未満もしくはそれに等しい>8000 Da種を含み、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、抗第Xa因子活性および抗第IIa因子活性の双方を有するLMWH組成物であって、抗第Xa因子活性がプロタミンによって>50%中和され、かつ抗第IIa因子活性がプロタミンによって>70%中和される、LMWH組成物。

【請求項 1 8】

非天然の糖を実質的に含まず、20%未満もしくはそれに等しい<2000 Da種、68%を超えるもしくはそれに等しい2000~8000 Da種、および18%未満もしくはそれに等しい>8000 Da種を含み、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、LMWH。

【請求項 1 9】

エノキサパリンと比較して非天然の糖が濃縮され、20%未満もしくはそれに等しい<2000 Da種、68%を超えるもしくはそれに等しい2000~8000 Da種、および18%未満もしくはそれに等しい>8000 Da種を含み、好ましくは平均分子量が約4500 Daである、LMWH。

【請求項 2 0】

以下の段階を含む、 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ ； $\Delta U_{2S}H_{NS}$ ； $\Delta UH_{NS,6S}$ ； $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$ ； ΔUH_{NS} ； $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ ； $\Delta UH_{NAC,6S}$ ；および $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ からなる群より選択される一つまたは複数の成分糖に関して、予め選択した値からの予め選択した範囲のバッチ間変動を有するLMWH調製物の一つまたは複数のバッチを作製する方法：

- a. 所望の値を選択する段階；
- b. UFHのアリコートを提供する段階；
- c. 任意に、アリコートを分画する段階；
- d. アリコートにおける成分レベルを決定する段階；および
- e. 所望の値からの予め選択した範囲の変動より少ないバッチまたは複数のバッチを選択する段階。

【請求項 2 1】

以下の段階を含む、p1~p8からなる群より選択される一つまたは複数の成分糖に関して、予め選択された値からの予め選択した範囲より小さいバッチ間変動、例えば2.5%未満、より好ましくは2%未満、または1%未満のバッチ間変動を有するLMWH調製物の一つまたは複数のバッチを作製する方法：

- a. 値を選択する段階；
- b. UFHまたはLMWHのアリコートを提供する段階；
- c. アリコートを沈殿させる段階；
- d. 任意に、アリコートにイオン交換プロセスを行う段階；
- e. 所望の値が得られるような条件でアリコートを薬剤に接触させる段階。

【請求項 2 2】

p1~p8からなる群より選択される一つまたは複数の成分のモル%が、バッチのそれぞれに関して、予め選択した変動より小さく変動する、LMWH調製物の多数のバッチを含む組成物。

【請求項 2 3】

p9~p10からなる群より選択される一つまたは複数の成分に関するバッチのそれぞれの糖プロファイルが、予め選択した変動より小さく変動する、LMWH調製物の多数のバッチを含む組成物。

【請求項 2 4】

多糖類を同定する要素、多糖類の一つまたは複数の成分を同定する要素、および成分のモル%の範囲を同定する要素を有する記録。

【請求項 2 5】

以下の段階を含む、特定の適応において用いるためのヘパリンの安全性または適切性を決定する方法：

- a. ヘパリンの構造特徴を提供する段階；
- b. 参照構造特徴を提供する段階；
- c. ヘパリンが許容可能であるか否かを決定する段階。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/727 (2006.01)	A 6 1 K 31/727	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 25/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/16 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/16	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
C 0 8 B 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
	C 0 8 B 37/00 H	

1. テフロン

- (72)発明者 サシセックハーラン ラム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー 2 1 3 0
- (72)発明者 サンダラム マリカージュン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 アシュランド キャプテン イームズ サークル 3 5 1
- (72)発明者 シュライバー ザカリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン アpartment 1 1 クイーンズベリー ス
トリート 9 8
- (72)発明者 キ イーウェイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 チャールズタウン スイート 5 1 1 1 エイト ストリ
ート 4 2

F ターム(参考) 2G041 CA01 DA04 DA05 FA10

4C084 AA17 NA14 ZA011 ZA021 ZA081 ZA151 ZA161 ZA331 ZA361 ZA441
ZA451 ZA541 ZA591 ZA601 ZA621 ZA891 ZA961 ZA971 ZB071 ZB111
ZB131 ZB151 ZB261
4C086 AA01 AA02 EA26 EA27 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA08
ZA15 ZA16 ZA33 ZA36 ZA44 ZA45 ZA54 ZA59 ZA60 ZA62
ZA89 ZA96 ZA97 ZB07 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26
4C090 AA09 BA62 BA68 BD41 DA09 DA23

专利名称(译)	硫酸多糖的分析		
公开(公告)号	JP2009175143A	公开(公告)日	2009-08-06
申请号	JP2009004460	申请日	2009-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	动量制药公司		
申请(专利权)人(译)	动量制药公司		
[标]发明人	ベンカタラマンガネッシュ サシセックハーランラム サンダラムマリカージュン シュライバーザカリー キイーウェイ		
发明人	ベンカタラマン ガネッシュ サシセックハーラン ラム サンダラム マリカージュン シュライバー ザカリー キ イー-ウェイ		
IPC分类号	G01N27/62 G01N33/53 G01N27/64 C08B37/10 A61K31/726 A61K31/727 A61K45/00 A61P7/02 A61P9/10 A61P9/06 A61P25/06 A61P37/00 A61P17/02 A61P37/08 A61P11/06 A61P11/00 A61P11/16 A61P35/00 A61P35/04 A61P27/02 A61P9/14 A61P19/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P19/08 C08B37/00 G01N33/66 G01N33/86		
CPC分类号	A61P11/00 A61P11/06 A61P11/16 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P25/06 A61P25/28 A61P27/02 G01N33/66 G01N33/86 G01N2400/10 G01N2400/40 Y10T436/143333 Y10T436/17 Y10T436/24		
FI分类号	G01N27/62.V G01N33/53.S G01N27/64.B C08B37/10 A61K31/726 A61K31/727 A61K45/00 A61P7/02 A61P9/10 A61P9/06 A61P25/06 A61P9/10.101 A61P37/00 A61P17/02 A61P37/08 A61P11/06 A61P11/00 A61P11/16 A61P35/00 A61P35/04 A61P27/02 A61P9/14 A61P19/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P19/08 C08B37/00.H		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/DA05 2G041/FA10 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA081 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA331 4C084/ZA361 4C084/ZA441 4C084/ZA451 4C084/ZA541 4C084/ZA591 4C084/ZA601 4C084/ZA621 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA26 4C086/EA27 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA08 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA44 4C086/ZA45 4C086/ZA54 4C086/ZA59 4C086/ZA60 4C086/ZA62 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C090/AA09 4C090/BA62 4C090/BA68 4C090/BD41 4C090/DA09 4C090/DA23		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/363240 2002-03-11 US 60/383903 2002-05-28 US 60/393973 2002-07-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种分析和监测硫酸多糖异质种群的方法。一种分析包含多糖的组合物样品的方法，其中所述样品的结构特征通过确定一种或多种选自以下的初级产物来提供：a. 一种或多种糖或二糖成分的存在或量；或b. 一种或多种嵌段成分的存在或量，其中嵌段成分是

由多种糖或多糖组成的成分； c。糖的代表。 一种或多种糖的代表物的存在或数量，该糖已被修饰以增强可检测性； d。三维结构的指示，或与三维结构相关的参数的存在或 量； 和e。一种或多种改性糖的存在，其中所述改性糖存在于用于制备所述制剂的原料中，但是其是在制备所述制剂中被改变的糖。 数量 [选型图]图1A

