



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C08B 37/08, A61K 31/715</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/28351</p> <p>(43) 国際公開日 1999年6月10日(10.06.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00023</p> <p>(22) 国際出願日 1998年1月8日(08.01.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/347071 1997年12月2日(02.12.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 新日本薬業株式会社 (SHIN NIPPON YAKUGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本石町3丁目3番16号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 今成登志男(IMANARI, Toshio)[JP/JP] 戸井田敏彦(TOIDA, Toshihiko)[JP/JP] 〒263 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33 千葉大学薬学部内 Chiba, (JP) リンハルト ロバート ジェイ(LINHARDT, Robert J.)[US/US] 52242 アイオワ州 アイオワシティー アイオワ大学薬学部内 Iowa, (US)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, NZ, US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 不利にならない開示又は発明の新規性の喪失の例外に関する陳述</p>	
<p>(54)Title: PERSULFATED CHONDROITIN SULFATES, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND ANTICOAGULANTS CONTAINING THE SAME AS THE ACTIVE INGREDIENT</p> <p>(54)発明の名称 過硫酸化コンドロイチン硫酸、その製造方法及びそれを有効成分として含有する抗血液凝固剤</p> <p>(57) Abstract Novel compounds different from heparin and having a high anticoagulant activity. These compounds are persulfated chondroitin sulfates having at least 3.5, on average, O-sulfate groups per disaccharide repeating unit or pharmacologically acceptable salts thereof. These compounds can be produced by reacting a chondroitin sulfate salt with sulfur trioxide in an aprotic solvent at 30 to 50 °C by regulating the molar ratio of the free hydroxyl groups in the chondroitin sulfate salt to the sulfur trioxide of 1:10 to 1:20.</p>		

(57)要約

高い抗血液凝固活性を有する、ヘパリンとは異なる新規な化合物及びその製造方法が開示されている。本発明の化合物は、二糖繰返し単位中にO-硫酸基を平均3.5個以上有する過硫酸化コンドロイチン硫酸又は薬理的に許容できるその塩である。本発明の化合物は、コンドロイチン硫酸の塩と三酸化硫黄を非プロトン性溶媒中で、30℃～50℃の温度下で、コンドロイチン硫酸塩中の遊離水酸基と三酸化硫黄とのモル比を1:10ないし1:20として反応させることにより製造することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュー・ジールランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	

明細書

過硫酸化コンドロイチン硫酸、その製造方法及びそれを有効成分として含有する抗血液凝固剤

技術分野

5 本発明は、過硫酸化コンドロイチン硫酸、その製造方法及びそれを有効成分として含有する抗血液凝固剤に関する。

背景技術

ヘパリンは、臨床の現場で術前、術後の血栓症予防薬として広く用いられている医薬品である。しかしながら、出血傾向や血小板減少など重篤な副作用がヘパリンの長期使用にみられ、現在これに代わる医薬品の開発が急務である。最近種々の天然多糖およびその化学的誘導体の抗血液凝固活性が調べられ、医薬品としての可能性が探索されている。

一方、コンドロイチン硫酸はグリコサミノグリカンといわれる複合糖質の一種で、N-アセチルガラクトサミンとグルクロン酸が $\rightarrow 3\text{GalNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcA } \beta 1 \rightarrow$ の繰返し単位を構成する直鎖の酸性多糖である。平均的に二糖当たり1個の硫酸エステルを有し、普通N-アセチルガラクトサミンの4位、あるいは6位の水酸基が硫酸化されている。この多糖は通常プロテオグリカンとしてタンパク質中のセリンあるいはトレオニン残基に橋渡し構造 (GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser/Thr) を介して結合したプロテオグリカンとして見出される。細胞外マトリックス、あるいは細胞表面に存在し、細胞間情報伝達を担う分子の一つと想定されている。生体内でコンドロイチン硫酸は止血機構の一部を担っているものと考えられているが、ヘパリンなどに比べて抗凝固活性が弱いために医薬品として用いられる機会は少ない。

二糖単位当たり2ないし3個の硫酸エステルをもつコンドロイチン硫酸が、抗血液凝固活性を示すことは既に報告されている (Bourin, M. et al., J. Biol. Chem., 265, 15424-5431 (1990))。化学的に硫酸化されたこれらの過硫酸化コンドロイチン硫酸は、ヘパリンに含まれるイズロン酸とは構造的にも、コンホメーションも異なるグルクロン酸残基を有していることも事実である (Qiu, G., e

t al., Biol. Pharm. Bull., 102, 721-726 (1997); Casu, B. Semin. Thromb. Haemost., 17S, 9-14 (1991)。

しかしながら、従来の過硫酸化コンドロイチン硫酸でも、抗血液凝固活性がヘパリンに比べて不十分である。

5 発明の開示

従って、本発明の目的は、高い抗血液凝固活性を有する、ヘパリンとは異なる新規な化合物及びその製造方法を提供することである。

10 本願発明者は、鋭意研究の結果、従来の過硫酸化コンドロイチン硫酸よりも繰返し単位当りの硫酸基の数が多いコンドロイチン硫酸の製造方法を新に開発することにより、このような過硫酸化コンドロイチン硫酸を初めて提供し、かつ、該過硫酸化コンドロイチン硫酸がヘパリンと比較しても遜色のない、高い抗血液凝固活性を有していることを見出し、本発明を完成した。

15 すなわち、本発明は、二糖繰返し単位中にO-硫酸基を平均3.5個以上有する過硫酸化コンドロイチン硫酸又は薬理学的に許容できるその塩を提供する。また、本発明は、コンドロイチン硫酸の塩と三酸化硫黄を非プロトン性溶媒中で、30°C~50°Cの温度下で、コンドロイチン硫酸塩中の遊離水酸基と三酸化硫黄とのモル比を1:10ないし1:20として反応させる、過硫酸化コンドロイチン硫酸の製造方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸を有効成分として含有する抗血液凝固剤を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸を血液に添加することを含む、血液の凝固を防止する方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸の抗血液凝固剤としての用途を提供する。

25 本発明により、遊離水酸基の硫酸化率が従来よりも高められた新規な過硫酸化コンドロイチン硫酸が提供された。本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸は優れた抗血液凝固活性、特に優れたIIa因子阻害活性を有し、副作用の強いヘパリンの代替品として有用である。

図面の簡単な説明

図1は、原料コンドロイチン硫酸(a)、0°Cで三酸化硫黄と反応させた過硫酸

化コンドロイチン硫酸 (b) 及び 40°C で三酸化硫黄と反応させた本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸 (c) についてのグラジエント PAGE の結果を示す図である。

図 2 は、原料コンドロイチン硫酸 (A) 及び実施例 1 で調製した本発明の完全
5 O-硫酸化コンドロイチン硫酸 (B) の IR スペクトルを示す。

図 3 は、原料コンドロイチン硫酸 (A)、0°C で三酸化硫黄と反応させた過硫酸化コンドロイチン硫酸 (B) 及び 40°C で三酸化硫黄と反応させた本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸 (C) についての一次元 ^1H NMR の結果を示す。

図 4 は、完全 O-硫酸化コンドロイチン硫酸の二次元 DOF-COSY (A) 及び NOESY (B)
10) スペクトルの結果を示す。

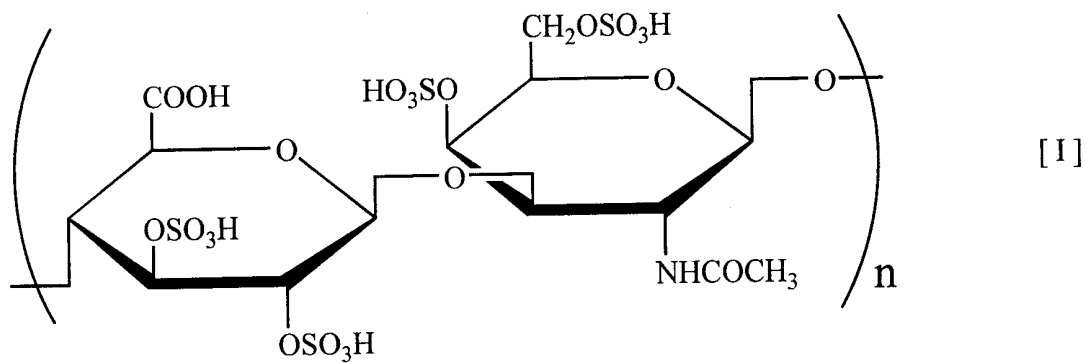
図 5 は、従来の過硫酸化コンドロイチン硫酸 (A) 及び本発明の完全 O-過硫酸化コンドロイチン硫酸 (B) の立体構造の平衡状態を示す。

図 6 は、コンドロイチン硫酸の二糖単位中の硫酸基の数と、抗凝固活性との関係を示す。

15 発明を実施するための最良の形態

上述のように、コンドロイチン硫酸は N-アセチルガラクトサミンとグルクロン酸が $\rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcA}\beta 1\rightarrow$ の繰返し単位を構成する直鎖の酸性多糖であり、この二糖繰返し単位中に硫酸化可能な水酸基が 4 個存在する。生体中に見出されるコンドロイチン硫酸では、これら 4 個の水酸基のうちの平均 1 個の水酸基が硫酸エステルとなっている。本発明のコンドロイチン硫酸は、二糖繰返し単位中の
20 4 個の水酸基のうち、平均して 3.5 個以上、好ましくは 3.8 個以上、最も好ましくは 4 個の水酸基が硫酸エステルとなっている。二糖繰返し単位中の硫酸基の数が平均して 3.5 個以上、好ましくは 3.8 個以上、最も好ましくは 4 個であることにより、従来の過硫酸化コンドロイチン硫酸よりも顕著に抗血液凝固活性が高くなる。
25

二糖繰返し単位中の 4 個の水酸基が全て硫酸エステルとなっている、最も好ましい本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸は下記式 [1] で示される。



二糖繰返し単位の繰返し数（式[I]中のn）は、特に限定されないが、10～50程度が好ましく、さらに好ましくは20～30である。

本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸は、薬理的に許容できる塩の形態にあつてもよい。このような塩として、ナトリウム塩やカリウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、アルミニウム塩等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸は、コンドロイチン硫酸の塩と三酸化硫黄を非プロトン性溶媒中で、30℃～50℃の温度下で、コンドロイチン硫酸塩中の遊離水酸基と三酸化硫黄とのモル比を1：10ないし1：20として反応させることにより製造することができる。

出発原料となるコンドロイチン硫酸塩としては、有機アミン塩が好ましく、特にトリアルキル（特に炭素数1～6の低級アルキル）アミン塩、とりわけ、トリブチルアミン塩が好ましい。コンドロイチン硫酸の有機アミン塩は、例えば、ウシの軟骨等から調製されたコンドロイチン硫酸ナトリウム塩（市販品を使用可）を、陽イオン交換樹脂にかけた後、有機アミンを加え、凍結乾燥により濃縮することにより容易に調製することができる。ここで用いることができる陽イオン交換樹脂は何ら限定されるものではなく、例えば市販品であるDowex 50W X8（ダウ・ケミカル社製）やSP Sepharose HP（ファルマシア社製）等を用いることができる。また、陽イオン交換後のコンドロイチン硫酸に加えられる有機アミンの量は、コンドロイチン硫酸に含まれる酸性基（カルボキシル基又は硫酸基）1モルに対して1～1.2モル程度が好ましい。

次いで、得られたコンドロイチン硫酸の塩と三酸化硫黄を非プロトン性溶媒中

で、30℃～50℃の温度下で、コンドロイチン硫酸塩中の遊離水酸基と三酸化硫黄とのモル比を1：10ないし1：20として反応させる。ここで、好ましい非プロトン性溶媒としてN，N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。反応温度は、30～50℃であり、好ましくは、37～43℃であり、最も好ましくは約40℃である。コンドロイチン硫酸塩中の遊離水酸基と三酸化硫黄とのモル比は1：10ないし1：20であり、好ましくは1：13ないし1：17であり、最も好ましくは約1：15である。反応時間は約30分以上、好ましくは30分～2時間、さらに好ましくは45～90分間である。

なお、三酸化硫黄は、これ単独でコンドロイチン硫酸塩と反応させてもよいが、予めピリジンのような環状アミンと三酸化硫黄とを反応させて複合体を形成し、これをコンドロイチン硫酸塩と反応させてもよい。この場合の環状アミンと三酸化硫黄との反応条件は、例えば次の通りである。すなわち、発煙硫酸を蒸留し、流出するSO₃ガスを冷却する。アスベスト状を呈したSO₃に対し、冷却下、環状アミンを滴下し、液状になった後、常温に戻し、もはや発煙を観察しなくなるまで滴下を続ける。

上記方法により、本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸が生成する。反応は蒸留水を加えることにより停止させることができる。また、得られた粗生成物は、酢酸ナトリウムで飽和した冷エタノールで沈殿させ、遠心分離により回収することができる。さらに、回収された生成物を蒸留水に溶かし、水に対して透析後、凍結乾燥することにより精製することができる。

本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸は、抗血液凝固剤としてヘパリンと同様に用いることができる。用量は、症状や使用態様に応じて適宜選択されるが、例えば、血液体外循環時における灌流血液の凝固防止に用いる場合、ヘパリン国際単位として1000～3000単位を前投与し、開始後1時間あたり500～1500単位を間欠的に投与することができる。適用の際の組成としては例えば、生理食塩液又は注射用蒸留水を加えて1ml当り1000単位となるように用時溶解して用いることができる。

本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸は、生体の構成成分であるコンドロイチン硫酸由来であり、また、硫酸基も毒性を有さないから、その毒性は低く、ヘパリンよりも毒性が低いと考えられる。

実施例

5 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例1 過硫酸化コンドロイチン硫酸の製造

ウシ気管軟骨由来のコンドロイチン硫酸ナトリウム塩 100 mg を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W X8) にかけて、この際、カラムサイズ 1 cm (内径) × 15 cm (長さ) のカラムを用い、流速 1.0 ml/分、水で溶離した。次いでトリブチルアミン 100 μl を加え、凍結乾燥により濃縮してコンドロイチン硫酸トリブチルアミン塩を得た。得られたコンドロイチン硫酸トリブチルアミン塩 10 mg を 0.8 ml の N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解した。一方、
10 発煙硫酸を蒸留し、流出する SO₃ ガスを冷却し、アスベスト状を呈した SO₃ に対し、冷却下、環状アミンを滴下し、液状になった後、常温に戻し、もはや発煙を観察しなくなるまで滴下を続けることにより得られたピリジン・三酸化硫黄複合体を、上記コンドロイチン硫酸トリブチルアミン塩 DMF 溶液に、三酸化硫黄がコンドロイチン硫酸の遊離水酸基の 15 倍モルとなる量加えた。40°C で 1 時間反応させた後、蒸留水 1.6 ml を加え反応を止めた。また、粗生成物は酢酸ナトリウムで飽和した冷エタノール (3 倍量) で沈殿させ、遠心分離により回収した。得られた完全 O-硫酸化コンドロイチン硫酸は再蒸留水に溶かし、透析で塩を除いた後、凍結乾燥にて回収した。

一方、比較のため、コンドロイチン硫酸トリブチルアミン塩と三酸化硫黄との反応温度が 0°C であることを除いて上記と同じ操作を行い、水酸基の硫酸化が不完全な部分硫酸化コンドロイチン硫酸を得た。また、以下の実施例においては、
25 原料として用いたコンドロイチン硫酸 (硫酸化処理なし) についても調べた。

実施例2 過硫酸化コンドロイチン硫酸の性質

(1) 分子量の測定

それぞれのコンドロイチン硫酸の平均分子量はグラジエント（濃度勾配）PAGEにより算出した。測定はEdens等の方法（Edens, R. E. et al., J. Pharm. Sci., 81, 823-827 (1992)）により、12-22%のグラジエントミニゲルを用い、アルシアンブルーで染色を行った。各レーンには20 μ gのコンドロイチン硫酸をアプ
5 ライした。それぞれのコンドロイチン硫酸の相対的な分子量はGPC-HPLCにおける溶出位置によって確認した。溶離液には50 mM酢酸ナトリウム(pH 7.4, 流速1 ml/min)を用い、検出は206 nmにおける吸光度で行った。

結果を図1に示す。図1中、レーンaは原料として用いたコンドロイチン硫酸（硫酸化処理なし）についての結果を示し、レーンbは0°Cで三酸化硫黄と反応
10 させた部分硫酸化コンドロイチン硫酸についての結果を示し、レーンcは40°Cで三酸化硫黄と反応させた本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸についての結果を示す。レーンdはオリゴサッカライド分子量マーカー（4 μ g）を示す。コンドロイチン硫酸の硫酸化によって分子量はほとんど変化しないが、若干の分子量増加が観察された。また、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）（Toida, T.,
15 Biochem. J., 322, 499-506 (1997)）によっても硫酸化による若干の分子量増加が観察された。これらの結果は、原料のコンドロイチン硫酸に新たな硫酸基の導入を示唆するばかりでなく、本硫酸化反応に対して原料のコンドロイチン硫酸中のグリコシド結合が安定であることも示している。上記の方法により測定された分子量の範囲は10,000~20,000であった。

20 (2) 硫酸基含量の分析

硫酸基の定量を行うコンドロイチン硫酸は分画分子量12,000の透析チューブで蒸留水に対する徹底的な透析、凍結乾燥を行った後、五酸化ニリン存在下、デシケーターで2日間乾燥させた。硫酸基の定量は酸化した後、東ソー(株)製のC
M-8伝導度検出器を使ってHPLCで測定した。

25 その結果、二糖繰返し単位中の硫酸基の数は、原料のコンドロイチン硫酸が1、0°Cで硫酸化した過硫酸化コンドロイチン硫酸が2.5~3.3、40°Cで硫酸化した本発明の過硫酸化コンドロイチン硫酸が4であり、上記した本発明の方法により、コンドロイチン硫酸中の遊離水酸基が全て硫酸化されたことが確認され

た。

(3) IRスペクトル

固体サンプルの赤外線吸収スペクトルを日本分光(株)製のFT/IR-230を用いて測定した。乾燥した臭化カリウム 500 μ g にグリコサミノグリカン 100 μ g を混合し、直径 3 mm の錠剤を作製し、スペクトロメーターにセットした。

得られた IR スペクトルを図 2 に示す。図 2 中、A は、原料コンドロイチン硫酸の IR スペクトル、B は実施例 1 で調製した本発明の完全 O-硫酸化コンドロイチン硫酸の IR スペクトルを示す。図 2 は、全てのコンドロイチン硫酸に含まれる水酸基がアキシアル硫酸エステルに変化していることを示している。1240, 820-850 カイザーの強い吸収はそれぞれ S=O, C=O-S の伸縮振動に帰属される。

同様に 2900, 1440, 1380, 1100 カイザーにおける C-O-H 変角振動に帰属される信号は完全 O-硫酸化コンドロイチン硫酸のスペクトル中で減少していることが明らかである。図 2 B 中のピーク 1 は、O-H 伸縮振動、ピーク 2 は O-H 変角振動、ピーク 3 は S=O 伸縮振動、ピーク 4 は C-O-S 変角振動及びアキシアル C-O-SO₃ の伸縮振動を示す。なお、IR スペクトルの帰属については Casu, B. et al., Carbohydr. Res., 63, 13-27 (1978); Orr, S. F. D., Biochim. Biophys. Acta, 14, 173-181 (1954); Bychkov, S. M., Biol. Med., 92, 680-683 (1981); 及び Sanderson, P. N. et al., Biochem. J., 243, 175-181 (1987) を参考にした。

(4) 旋光度

乾燥したサンプルの一部を秤量し、濃度が 5 mg/ml になるように蒸留水に溶かして旋光度を測定した。測定は日本分光(株)製の DIP-140 を用いて、ナトリウム D 線で測定した。

その結果、旋光度は原料コンドロイチン硫酸が -30 度であったのに対し、完全 O-硫酸化コンドロイチン硫酸では -8 度であった。このことは、完全 O-硫酸化コンドロイチン硫酸の立体構造が、原料のコンドロイチン硫酸と比べて変化していることを示している。

(5) ¹H NMR スペクトル

過硫酸化コンドロイチン硫酸 (2 mg) を重水 (99.9%) 0.5 ml に溶かし、凍結乾燥を繰り返し、交換可能なプロトンを除いた。サンプルは陰圧で五酸化ニリン存在下のデシケーターに入れ、室温で一晩放置した。完全に乾燥したサンプルは重水 (99.96%) 0.5 ml に溶かし、0.45 mm のシリンジフィルターを通して NMR チューブ (外径 5.0 mm × 長さ 25 cm, pp-528; Wilmad Glass Co., Buena, NJ) に入れた。一次元及び二次元 NMR の測定はチューニング可能な 5 mm のフィールドグラジエントプローブと標準の JEOL ソフトウェアを装備した日本電子(株)製の GSX500A スペクトロメーターを用いて、NOE スペクトルは 303K で、その他の測定は 333K で行った。HOD のシグナルは一次元スペクトルでは 3 s、二次元スペクトルでは 1.5 s の間に前飽和させることで削除した。二次元スペクトルでは、観測幅 2000 Hz で、サンプリングデータポイントが 1024 得られるように 512 回の積算を行い、タイムドメインデータはゼロフィリング (データマトリックスサイズ、1K × 1K) した後、シフトしたサイン-ベルウィンドウ関数を使って、二次元 double quantum filtered (DQF)-COSY, NOESY 及び TOCSY の為に増幅した。二次元 TOCSY 及び NOESY の測定では 150, 250, 及び 500 ms をミキシングタイムとして行った結果、100 ms の MLEV-17 mixing sequence を用いることとした。

¹H NMR スペクトルの結果を図 3 に示す。図 3 中、A は原料コンドロイチン硫酸についての結果、B は 0°C で三酸化硫黄と反応させて調製した過硫酸化コンドロイチン硫酸 (二糖繰返し単位中の平均硫酸基数: 3.2) についての結果、C は本発明の完全 O-硫酸化コンドロイチン硫酸についての結果を示す。原料のコンドロイチン硫酸のスペクトルが硫酸化度に若干の不均一性を示している。すなわち、N-アセチルガラクトサミン 4 位あるいは 6 位のどちらかが硫酸化された部分構造の、混合物であることが明らかである。0°C で調製した過硫酸化コンドロイチン硫酸は、予期されたとおり (Maaroufi, R.M. et al., *Thromb. Res.*, 59, 174-758 (1995); Bartolucci, G. et al., *Carbohydr. Res.*, 276, 401-408 (1995)) 構造不均一性は原料のコンドロイチン硫酸に比べて増していた。この構造不均一性の増加は N-アセチルガラクトサミン 4 位、6 位の硫酸化だけではなく、不完全なグルクロン酸残基の 2 位、3 位の硫酸化を示唆している。驚くこと

に、40°Cで調製したコンドロイチン硫酸の¹H NMR スペクトルが、他の化学的に硫酸化した試料、あるいは原料に比べて非常に単純なものであった。これは明らかに硫酸化における不均一性の減少、すなわち糖鎖水酸基の完全O-硫酸化を意味している。図4には、完全O-硫酸化コンドロイチン硫酸の二次元¹H NMR スペクトル、DQF-COSY および NOESY スペクトルを示す。図4中の上側のパネル中の各クロスピークはそれぞれ次のものを示す。a, GalNpAc H-3/H-4; b, GlcAp H-1/H-2; c, GlcAp H-2/H-3; d, GlcAp H-3/H-4; e, GalNpAc H-1/H-2; f, GlcAp H-4/H-5; g, GalNpAc H-5/H-6。また、下側のパネル中の各クロスピークはそれぞれ次のものを示す。a, GalNpAc H-1/H-3; b, GalNpAc H-1/GlcAp H-4; c, GalNAc H-4/H-5; d, GalNpAc H-4/GlcAp H-5; e, GalNpAc H-4/H-6; f, GlcAp H-3/H-5。これらのスペクトルから、硫酸化による糖リングプロトンの低磁場シフトが明らかである。スカラー結合および核オーバーハウザー効果から、4.87 ppmのピークはN-アセチルガラクトサミンのH-1、4.57 ppmのシグナルがGlcAのH-4であると帰属され、この結果は全ての水酸基が完全に硫酸化されていることを示している。化学シフト及び結合定数を表1に示す。カープラスの式によれば、グルクロン酸の隣接するプロトン間の二面角は180度ではなく60-70度となり、グルクロン酸のコンホメーションが⁴C₁から¹C₄に変化していることを示している(図5)。なお、図5中、X²=SO₃⁻、X³=H、又はX²=H、X³=SO₃⁻を示し、S u gは糖(N-アセチルガラクトサミン)を示す。

表1 完全O-硫酸化コンドロイチン硫酸の化学シフト (ppm) 及び結合定数 (Hz)

残基	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	N-Ac
ブローブ温度	J1,2	J2,3	J3,4	J4,5	J5,6		
GalNpAc							
333K	4.88	4.11	4.11	5.02	4.05	4.30	2.17
	7.1	n.d.*	n.d.	1.5>	6.1		
303K	4.86	4.10	4.10	5.02	4.06	4.29	2.16
	7.4	n.d.	n.d.	1.5>	6.2		
GlcAp							
333K	5.00	4.59	4.94	4.59	4.23	-	-
	5.9	n.d.	1.5>	1.5>			
303K	4.97	4.53	4.94	4.55	4.20	-	-
	1.5>	1.5>	1.5>	1.5>			

*, 測定不可

実施例3 抗血液凝固効果

正常ヒト血漿 (NHP)は健常なボランティアから採取した。抗 Xa 因子活性は Coatest LMW heparin/heparin kit (Chromogenix, Molndal, Sweden) を使って測定した。コンドロイチン硫酸、過硫酸化コンドロイチン硫酸誘導体及び低分子化ヘパリン標準品は希釈した正常ヒト血漿に溶かした。2.9 mM Chromogenic Xa substrate S-2732 (Suc-Ile-Glu(γ -Piperidyl)-Gly-Arg-pNA) を含んだ 50 mM Tris, 7.5 μ M EDTA 緩衝液 (pH 8.4) 200 μ l にサンプルを含んだ血漿 25 μ l 及

びウシ Xa 因子 (1.25/ml) 200 μ l を加えて 37°C で 8 分間インキュベーションした後、20% 酢酸 200 μ l を加えた。Xa 因子活性を 405 nm の吸光度により測定した。

5 抗 IIa 因子活性はコンドロイチン硫酸あるいは過硫酸化誘導体の水溶液 50 μ l、トリス緩衝液 (pH 8.3) 850 μ l、正常ヒト血漿 30 μ l、及びヒトロンビン (1.2 NIH units/ml) を混合し、37°C で 30 秒間インキュベートした後、1.9mM Chromogenic TH (ethylmalonyl-Pro-Arg-p-nitroanilide hydrochloride) を加え、IIa 因子活性を 405 nm における吸光度により測定した。測定は instrumentation (Lexington, MA) から購入した ACL 300 plus を用い、対照には U.S. Pharmacopeial Convention (Rockville, MD) の USP Heparin reference Standard
10 (K-3) を用いた。

結果を図 6 に示す。図 6 中、四角は抗 IIa 因子活性を示し、丸は抗 Xa 因子活性を示す。図 6 に示すように、完全 O-硫酸化によって IIa 因子阻害活性は劇的に上昇した。一方、抗 Xa 因子活性は硫酸化に伴い若干上昇はしているものの、IIa 因子に対する程のものではなかった。この結果は Xa 因子に対する阻害活性上昇
15 が単に硫酸基導入による非特異的な陰電荷上昇に起因するものと考えられる。

請求の範囲

1. 二糖繰返し単位中にO-硫酸基を平均3.5個以上有する過硫酸化コンドロイチン硫酸又は薬理的に許容できるその塩。
2. 二糖繰返し単位中にO-硫酸基を平均3.8個以上有する請求項1記載の過硫酸化コンドロイチン硫酸又は薬理的に許容できるその塩。
3. 二糖繰返し単位中にO-硫酸基を平均4個有する請求項2記載の過硫酸化コンドロイチン硫酸又は薬理的に許容できるその塩。
4. コンドロイチン硫酸の塩と三酸化硫黄を非プロトン性溶媒中で、30℃～50℃の温度下で、コンドロイチン硫酸塩中の遊離水酸基と三酸化硫黄とのモル比を1:10ないし1:20として反応させる、過硫酸化コンドロイチン硫酸の製造方法。
5. 前記反応温度が37～43℃であり、前記モル比が1:13ないし1:17である請求項4記載の方法。
6. 前記反応温度が40℃であり、前記モル比が1:15である請求項5記載の方法。
7. 前記塩は有機アミン塩である請求項4ないし6のいずれか1項に記載の方法。
8. 請求項1ないし3のいずれか1項に記載の過硫酸化コンドロイチン硫酸を有効成分として含有する抗血液凝固剤。

Statement concerning non-perjudicial disclosure or exception to lack of novelty

不利にならない開示又は新規性の喪失の例外に関する陳述

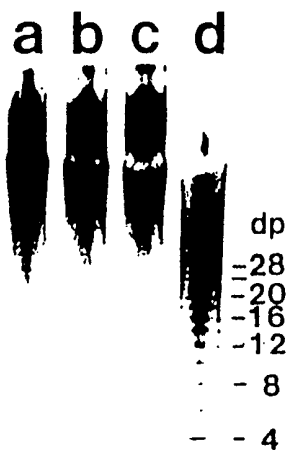
開示の日：1997年7月10日及び1997年8月5日
Date of Disclosure: July 10, 1997 and August 5, 1997

開示の場所：〒663 日本国兵庫県西宮市甲子園九番町11-68 武庫川女子大学薬学部
Place of Disclosure: School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University,
11-68, Koshienkyubancho, Nishinomiya-shi, Hyogo, 663 Japan

開示の種類：学会及びその要旨集
Type of Disclosure: learned society and publication of its abstract

学会の名称：日本糖質学会 第19回糖質シンポジウム
Name of Learned Society: Japanese Society of Carbohydrate Research, XIXth Japanese
Carbohydrate Symposium

1/6



☒ 1

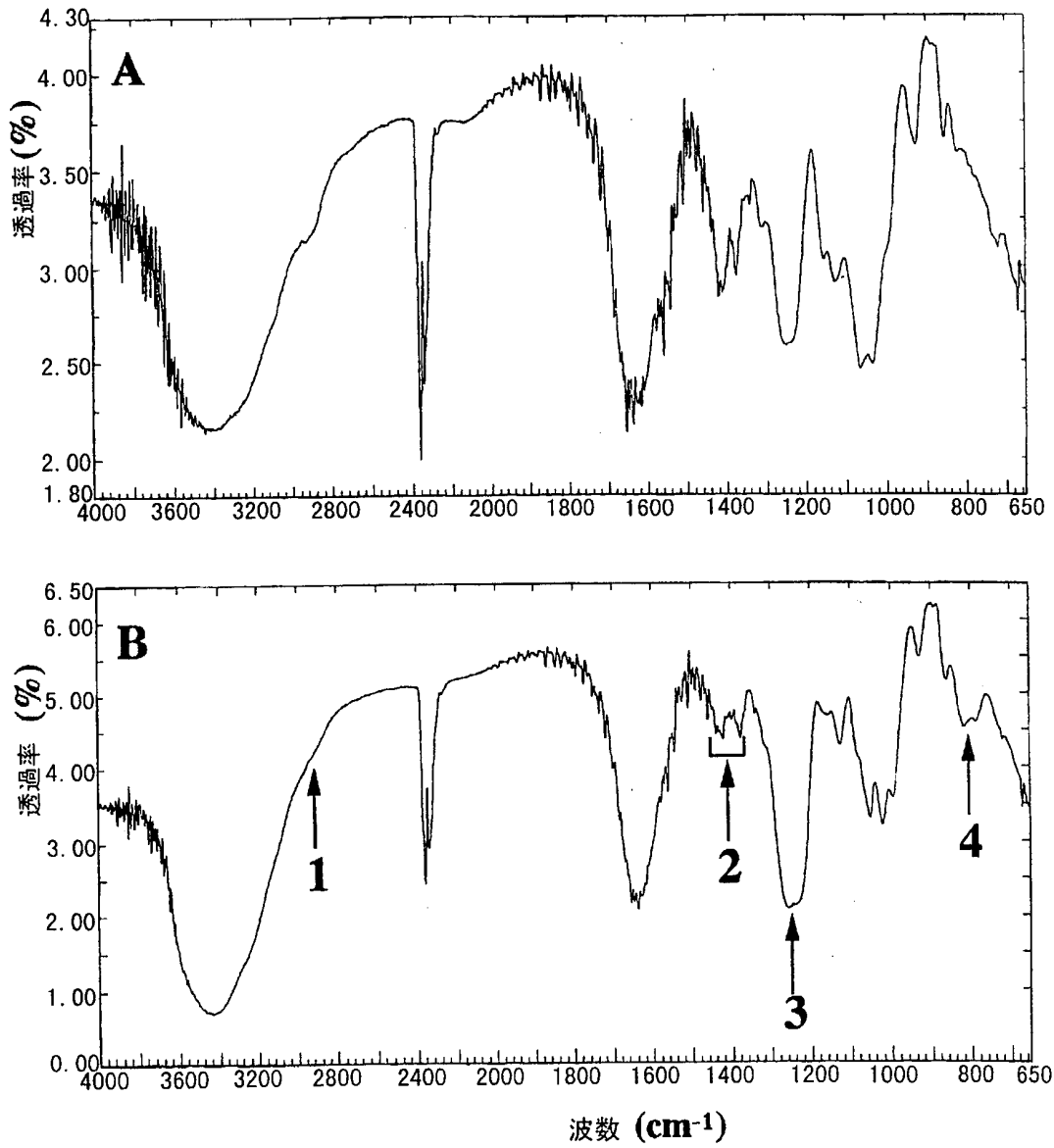
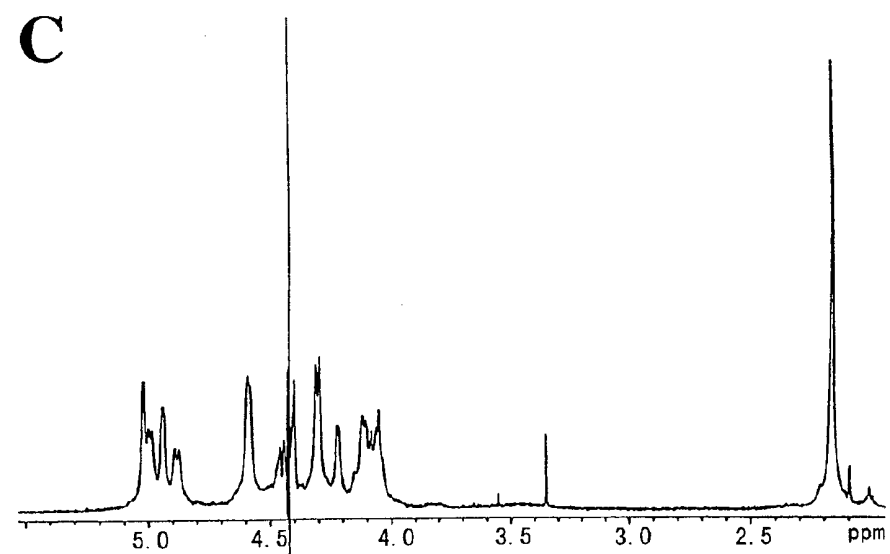
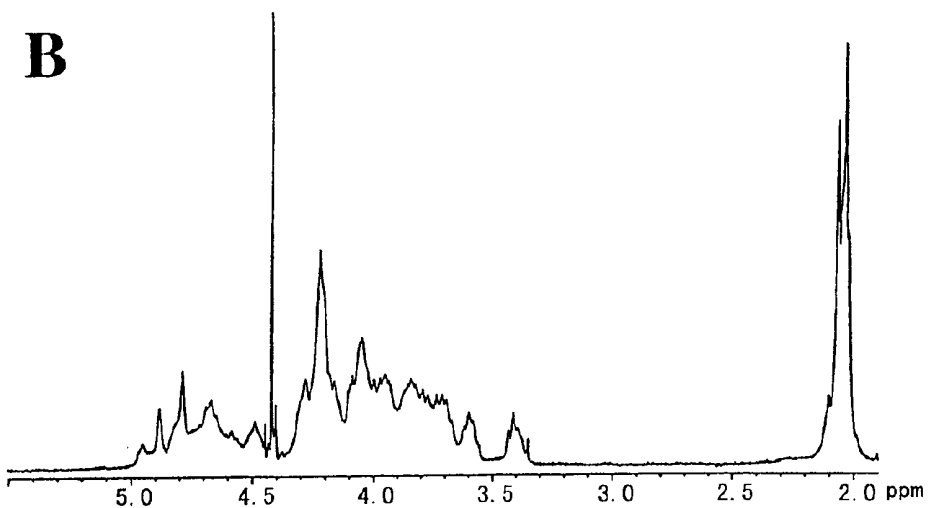
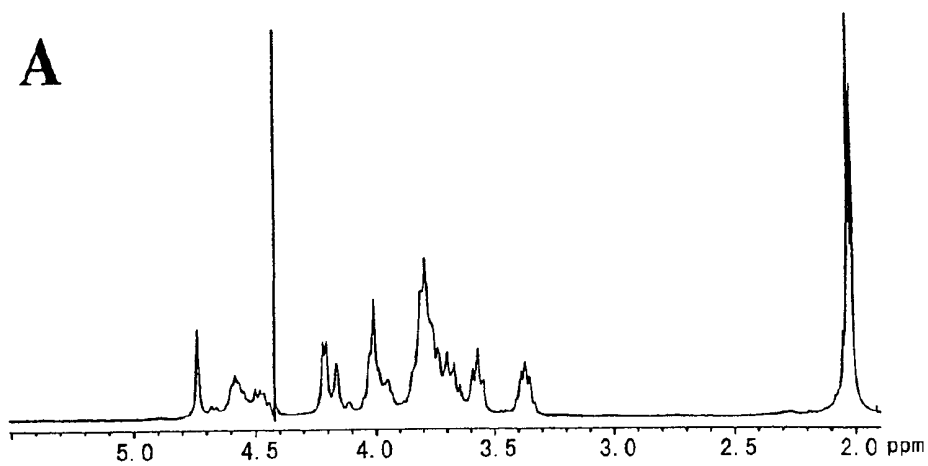


図 2

3/6



☒ 3

4/6

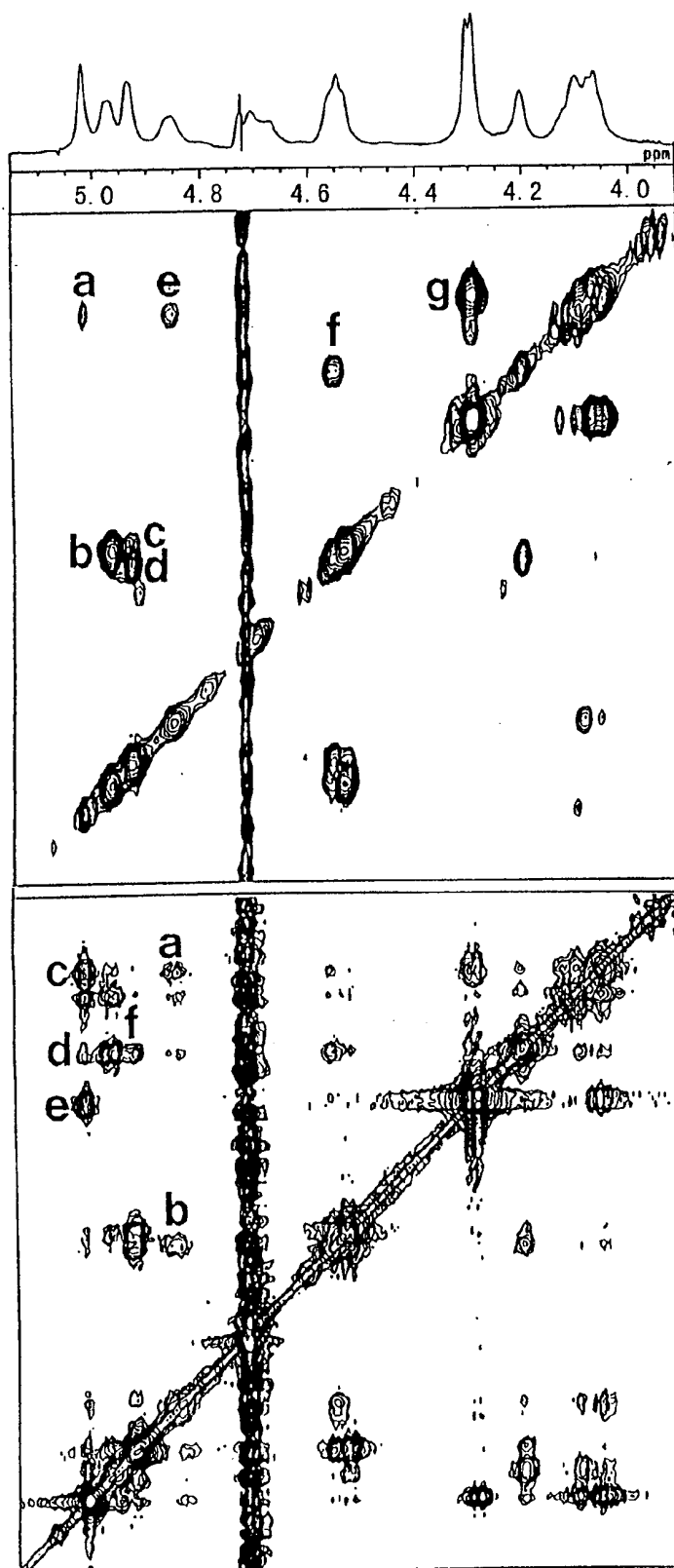
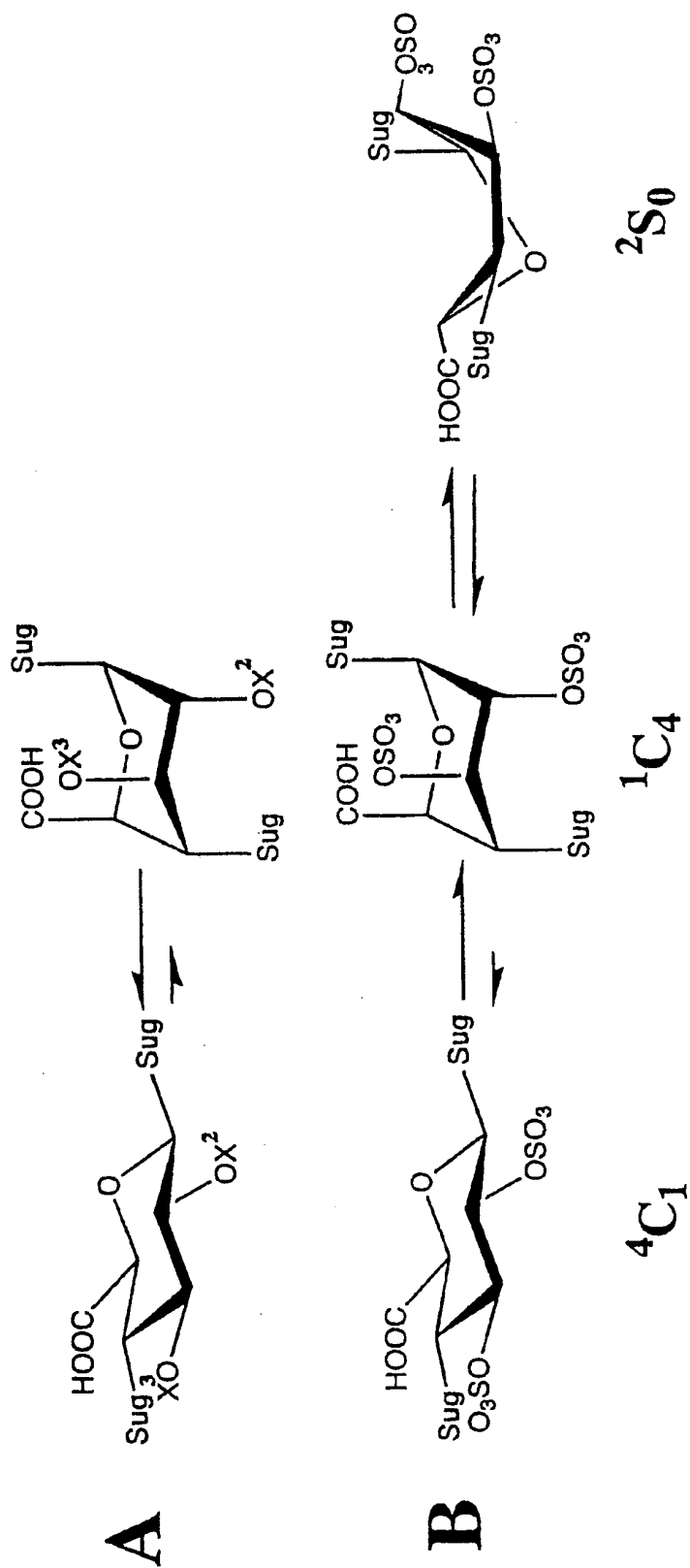


図 4



5

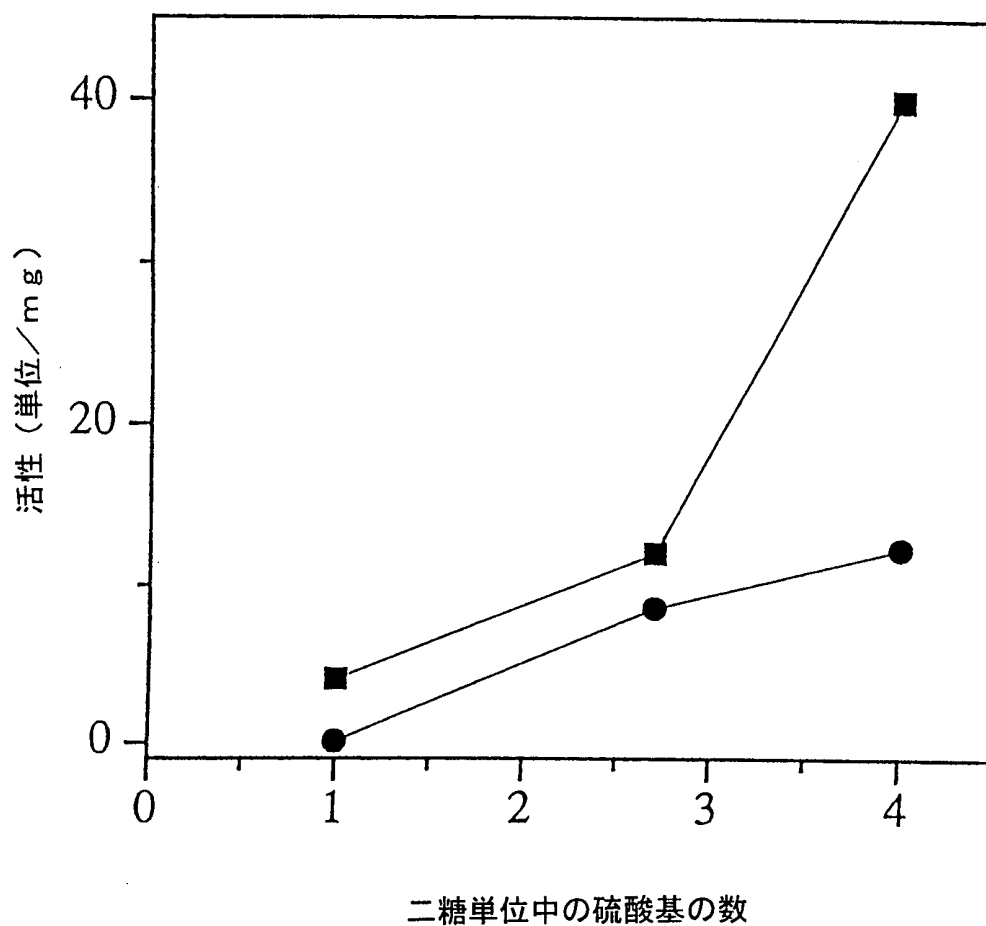


図6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00023

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C08B37/08, A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C08B37/08, A61K31/715

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-301771, A (Shiseido Co., Ltd.), November 19, 1996 (19. 11. 96) (Family: none)	1-8
A	JP, 61-47701, A (Seikagaku Corp.), March 8, 1986 (08. 03. 86) (Family: none)	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
March 11, 1998 (11. 03. 98)

Date of mailing of the international search report
March 24, 1998 (24. 03. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) <p style="text-align: center;">Int. Cl^o C08B37/08, A61K31/715</p>				
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) <p style="text-align: center;">Int. Cl^o C08B37/08, A61K31/715</p>				
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの				
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)				
C. 関連すると認められる文献				
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号		
A	J P, 8-301771, A (株式会社資生堂), 19.11月.1996 (19.11.96), (ファミリーなし)	1-8		
A	J P, 61-47701, A (生化学工業株式会社), 8.3月.1986(08.03.86), (ファミリーなし)	1-8		
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。				
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願				
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献				
国際調査を完了した日 <p style="text-align: center;">11.03.98</p>	国際調査報告の発送日 <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">24.03.98</p>			
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">弘 實 謙 二</p>	<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%; text-align: center;">4 C</td> <td style="width:50%; text-align: center;">7 4 3 3</td> </tr> </table>	4 C	7 4 3 3
4 C	7 4 3 3			
電話番号 03-3581-1101 内線 3452				