

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6662503号
(P6662503)

(45) 発行日 令和2年3月11日(2020.3.11)

(24) 登録日 令和2年2月17日(2020.2.17)

(51) Int.Cl.		F I	
C08B	37/00 (2006.01)	C08B	37/00 H
C07H	11/00 (2006.01)	C07H	11/00
A61K	31/737 (2006.01)	A61K	31/737
A61K	31/7024 (2006.01)	A61K	31/7024
A61P	9/00 (2006.01)	A61P	9/00

請求項の数 13 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-561110 (P2019-561110)	(73) 特許権者	000122298
(86) (22) 出願日	平成30年12月18日(2018.12.18)		王子ホールディングス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2018/046537		東京都中央区銀座4丁目7番5号
(87) 国際公開番号	W02019/124363	(74) 代理人	110000796
(87) 国際公開日	令和1年6月27日(2019.6.27)		特許業務法人三枝国際特許事務所
審査請求日	令和1年11月15日(2019.11.15)	(72) 発明者	石川 傑
(31) 優先権主張番号	特願2017-244051 (P2017-244051)		東京都中央区銀座四丁目7番5号 王子ホ
(32) 優先日	平成29年12月20日(2017.12.20)		ールディングス株式会社内
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	審査官	伊藤 幸司

早期審査対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリ硫酸ペントサン及びポリ硫酸ペントサンを含む医薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ウロン酸含量が7.0質量%～15.0質量%であり、かつアセチル基含量が0質量%～1.62質量%であるポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

【請求項2】

ウロン酸含量が7.5質量%～13.0質量%である請求項1に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

【請求項3】

重量平均分子量が5000以下である請求項1又は2に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

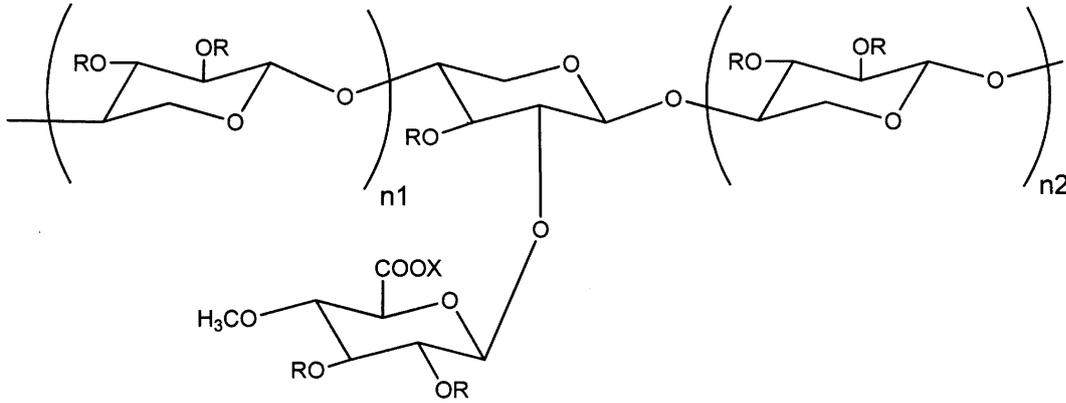
【請求項4】

アセチル基含量が0～0.3質量%である請求項3に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

【請求項5】

一般式IIで表される構造を有する請求項1～4のいずれか1項に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

【化 1】



一般式 I I

一般式 I I 中、R はそれぞれ独立に、水素原子、 $-COCH_3$ 、 $-SO_3X^1$ であり、一分子中少なくとも 1 つの R は $-SO_3X^1$ であり、 X^1 は、水素原子又は一価もしくは二価の金属であり、X は、水素原子又は一価もしくは二価の金属であり、n 1 及び n 2 はそれぞれ独立に 0 以上 30 以下の整数を表し、n 1 及び n 2 の少なくとも一方は 1 以上の整数である。

【請求項 6】

R がそれぞれ独立に水素原子又は $-SO_3X^1$ である請求項 5 に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

【請求項 7】

X^1 がナトリウムである請求項 5 又は 6 に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含む医薬。

【請求項 9】

FGF-2 の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療のための請求項 8 に記載の医薬。

【請求項 10】

FGF-2 の機能の異常亢進に起因する疾患が、癌、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、あるいは心臓の形成異常、血管の形成異常又は骨格の形成異常である請求項 9 に記載の医薬。

【請求項 11】

膀胱炎又は関節炎の予防及び / 又は治療のための請求項 9 に記載の医薬。

【請求項 12】

注射剤である請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物を含む pH 緩衝剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリ硫酸ペントサン及びポリ硫酸ペントサンを含む医薬に関する。

【背景技術】

【0002】

塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2 又は b-FGF) は、異常血管新生が関与する、腫瘍、関節炎などの疾患に関与することが知られている (特許文献 1)。FGF-2 はヘパリン結合性増殖因子でありヘパリン硫酸と結合することによって細胞の FGF-2 受

10

30

40

50

容体と結合する。

【0003】

F G F - 2 を不活性化する物質の1つとしてポリ硫酸ペントサンが知られており、ポリ硫酸ペントサンによる血管新生の阻害などが報告されている（非特許文献1～3）。ポリ硫酸ペントサンは、F G F - 2 に結合して、F G F - 2 のヘパラン硫酸との結合を阻害すると考えられている。

ポリ硫酸ペントサンが実際に腫瘍の増殖を阻害することも報告されている（特許文献2，非特許文献4）。

【0004】

ポリ硫酸ペントサンは、広葉樹（例えばブナ）から得られるキシランの化学的硫酸化により生成される。また、ポリ硫酸ペントサンは、 β -D-キシロピラノースが直鎖に結合した硫酸化直鎖多糖からなり、キシロピラノース約10ユニット毎に4-O-メチルグルクロン酸、すなわちウロン酸を有する（特許文献3、4）。特許文献5には、市販のポリ硫酸ペントサン（SP-54）を分画して、低分子量のポリ硫酸ペントサンを得る製法により、ウロン酸含量が4.3～6%のポリ硫酸ペントサンを得た記載がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第2013/186857

【特許文献2】特開平3-20225号公報

【特許文献3】国際公開第2010/000013

【特許文献4】特表2009-532467号公報

【特許文献5】特開昭61-197601号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Gonzalez et al. Biol. Pharm. Bull. 2001; 24; 2; 151-154

【非特許文献2】S. SWAIN et al. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES. 1993; 698; 63-67

【非特許文献3】G. Zugmaier et al. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES. 1999; 886; 243-248

【非特許文献4】G. Zugmaier et al. Journal of the National Cancer Institute. 1992; 84; 22; 1716-1724

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は医薬用途あるいはpH緩衝剤用途に好ましい活性を有する新規ポリ硫酸ペントサンを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記の課題を解決するために鋭意検討を行った結果、本発明者らは、従来のポリ硫酸ペントサンと比較してF G F - 2 とヘパラン硫酸との結合の阻害活性が高いポリ硫酸ペントサンを見出し、さらに、このポリ硫酸ペントサンがpH緩衝剤としても機能しうることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものである。

具体的には、本発明は、以下<1>～<13>を提供するものである。

【0009】

<1>ウロン酸含量が7.0質量%～15.0質量%であり、かつアセチル基含量が0質

10

20

30

40

50

量% ~ 2.0 質量%であるポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

< 2 > ウロン酸含量が 7.5 質量% ~ 13.0 質量%である < 1 > に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

< 3 > 重量平均分子量が 5000 以下である < 1 > 又は < 2 > に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

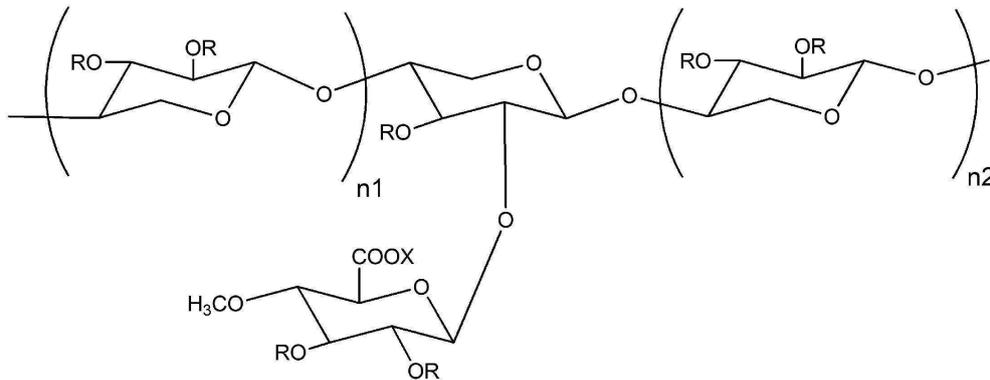
< 4 > アセチル基含量が 0 ~ 0.3 質量%である、 < 3 > に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

< 5 > 一般式 I I で表される構造を有する、 < 1 > ~ < 4 > のいずれかに記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物

10

【 0 0 1 0 】

【 化 1 】



20

一般式 I I

【 0 0 1 1 】

一般式 I I 中、R はそれぞれ独立に、水素原子、 $-COCH_3$ 、 $-SO_3X^1$ であり、一分子中少なくとも 1 つの R は $-SO_3X^1$ であり、 X^1 は、水素原子又は一価もしくは二価の金属であり、X は、水素原子又は一価もしくは二価の金属であり、n1 及び n2 はそれぞれ独立に 0 以上 30 以下の整数を表し、n1 及び n2 の少なくとも一方は 1 以上の整数である。

30

< 6 > R がそれぞれ独立に水素原子又は $-SO_3X$ である < 5 > に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

< 7 > X がナトリウムである < 5 > 又は < 6 > に記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物。

< 8 > < 1 > ~ < 7 > のいずれかに記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含む医薬。

< 9 > FGF-2 の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療のための < 8 > に記載の医薬。

< 10 > FGF-2 の機能の異常亢進に起因する疾患が、癌、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、あるいは心臓の形成異常、血管の形成異常又は骨格の形成異常である < 9 > に記載の医薬。

40

< 11 > 膀胱炎又は関節炎の予防及び / 又は治療のための < 9 > に記載の医薬。

< 12 > 注射剤である < 8 > ~ < 11 > のいずれかに記載の医薬。

< 13 > < 1 > ~ < 7 > のいずれかに記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物を含む pH 緩衝剤。

【 0 0 1 2 】

別の観点からは、本発明により、

< 1 > ~ < 7 > のいずれかに記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物の有効量をヒトまたは動物に投与する工程を

50

含む F G F - 2 の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療方法 ;
 F G F 2 の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療のための医薬の製造のための、 < 1 > ~ < 7 > のいずれかに記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物の使用 ;
 F G F - 2 の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療のための、 < 1 > ~ < 7 > のいずれかに記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物の使用 ; 及び
 F G F - 2 の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療のための医薬としての使用のための < 1 > ~ < 7 > のいずれかに記載のポリ硫酸ペントサンもしくはその薬学的に許容される塩又はそれらの薬学的に許容される溶媒和物

10

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明により F G F - 2 とヘパラン硫酸との結合の阻害活性が高いポリ硫酸ペントサンが提供される。本発明のポリ硫酸ペントサンは、癌や関節炎などの、F G F - 2 の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療のための医薬として有用である。また、本発明のポリ硫酸ペントサンは、p H 緩衝剤として使用することもできる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】ポリ硫酸ペントサンのウロン酸含量が F G F - 2 とヘパラン硫酸との結合の阻害活性に与える影響を示す図である。

20

【図 2】ポリ硫酸ペントサンのアセチル基含量が F G F - 2 とヘパラン硫酸との結合の阻害活性に与える影響を示す図である。

【図 3】ポリ硫酸ペントサンのウロン酸含量と、1 0 0 m g / 1 0 0 m L の溶液の滴定において p H 6 から 4 に調整するために要する 0 . 0 1 N 塩酸水溶液の量 (m L) との関係を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 5 】

以下において、本発明について詳細に説明する。以下に記載する構成要件の説明は、代表的な実施形態や具体例に基づいてなされることがあるが、本発明はそのような実施形態に限定されるものではない。

30

本明細書において、「有効成分として含む」とは、主要な活性成分として含むという意味であり、効果を奏する程度に含有するという意味である。

本明細書において、「予防及び / 又は治療」とは、「予防」、「治療」、又は「予防及び治療」を意味する。例えば、「予防及び / 又は治療のための医薬」は、予防剤としてのみ機能していてもよく、治療剤としてのみ機能していてもよく、予防剤及び治療剤としての機能を同時に有していてもよい。

【 0 0 1 6 】

< ポリ硫酸ペントサン >

ポリ硫酸ペントサンは、キシロオリゴ糖の水酸基の少なくとも 1 つを硫酸化することで得られる化合物である。本明細書においては、ポリ硫酸ペントサンには、ポリ硫酸ペントサンの塩ならびにポリ硫酸ペントサンの溶媒和物及びポリ硫酸ペントサンの塩の溶媒和物も含まれる。ポリ硫酸ペントサン塩は、薬学的に許容される塩であることが好ましく、例えば、ポリ硫酸ペントサンナトリウム、ポリ硫酸ペントサンカリウム、ポリ硫酸ペントサンカルシウム等を挙げることができる。溶媒和物は薬学的に許容される溶媒和物であることが好ましく、溶媒としては、例えば水を挙げることができる。

40

【 0 0 1 7 】

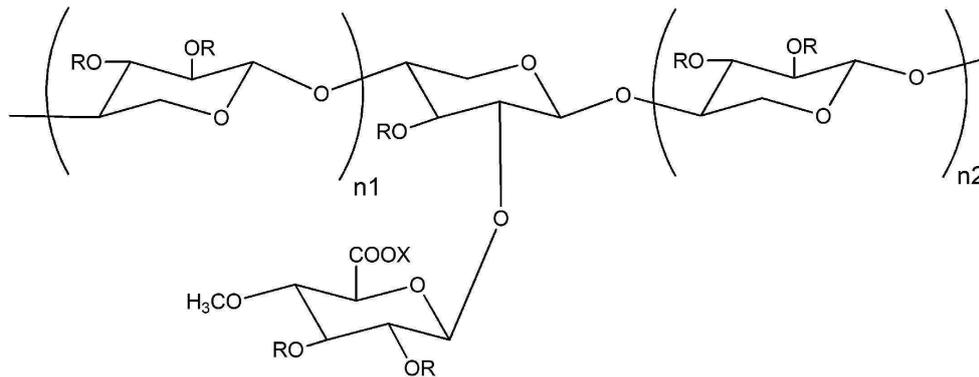
ポリ硫酸ペントサンは、一般式 I I で表される構造を有するものである。なお、ポリ硫酸ペントサンは一般式 I I で表される構造を 1 つ含むものであってもよく、一般式 I I で表される構造を 2 つ以上含むものであってもよい。一般式 I I で表される構造を 2 つ以上

50

含む場合、一般式 I I で表される構造は、ポリ硫酸ペントサンの繰り返し単位を表す構造となる。

【 0 0 1 8 】

【 化 2 】



一般式 I I

10

【 0 0 1 9 】

一般式 I I において、R はそれぞれ独立に、水素原子、 $-COCH_3$ 、 $-SO_3X^1$ であり、一分子中少なくとも 1 つの R は $-SO_3X^1$ である。X¹ は、水素原子又は一価もしくは二価の金属であり、水素原子、ナトリウム、カリウム又はカルシウムであることが好ましく、ナトリウム、カリウム又はカルシウムであることがより好ましく、ナトリウムであることが特に好ましい。X は、水素原子又は一価もしくは二価の金属であり、ナトリウム、カリウム又はカルシウムであることが好ましく、ナトリウムであることが特に好ましい。また、n₁ 及び n₂ はそれぞれ独立に 0 以上 12 以下の整数を表し、n₁ 及び n₂ の少なくとも一方は 1 以上の整数である。

20

一般式 I I において、n₁ + n₂ は 1 ~ 10 が好ましく、2 ~ 8 がより好ましく、3 ~ 6 がさらに好ましい。

【 0 0 2 0 】

一般式 I I で表される構造の末端であって、一般式 I I で表される構造に結合していない部分は、 $-OR$ となっていればよい。すなわち、一般式 I I の左末端 (n₁ 側) には $-OR$ が結合し、一般式 I I の右末端 (n₂ 側) には $-R$ が結合していればよい。特に一般式 I I の左末端 (n₁ 側) には $-OR^1X$ が結合し、一般式 I I の右末端 (n₂ 側) には $-R^1X$ が結合していることが好ましい。ここで、R¹X は水素原子又は $-SO_3X^1$ であり、X¹ は、水素原子又は一価もしくは二価の金属であり、水素原子、ナトリウム、カリウム又はカルシウムであることが好ましく、ナトリウム、カリウム又はカルシウムであることがより好ましく、ナトリウムであることが特に好ましい。

30

【 0 0 2 1 】

上記一般式において、X は一価もしくは二価の金属であることが好ましく、医薬的に許容されるポリ硫酸ペントサンの塩であることが好ましい。例えば、X はナトリウム、カリウム又はカルシウムであることが好ましく、この場合、ポリ硫酸ペントサンの塩は、ポリ硫酸ペントサンナトリウム、ポリ硫酸ペントサンカリウム、ポリ硫酸ペントサンカルシウムとなる。中でも、ポリ硫酸ペントサンの塩は、ポリ硫酸ペントサンナトリウムであることが特に好ましい。

40

【 0 0 2 2 】

本発明のポリ硫酸ペントサンは、ウロン酸含量が 7.0 質量% ~ 15.0 質量% である。本発明のポリ硫酸ペントサンのウロン酸含量は、7.5 質量% ~ 14.0 質量% であることが好ましく、7.7 質量% ~ 13.0 質量% であることがより好ましい。なお、上記の割合は一分子中で満たしている必要はなく、個々の分子の混合物全体としてのポリ硫酸ペントサンとして満たされていればよい。

【 0 0 2 3 】

本発明のポリ硫酸ペントサンは、n₁、n₂ の値、置換基 R の種類や置換度が互いに異

50

なる一般式 I I で表される個々の分子からなる混合物であってもよい。

【 0 0 2 4 】

ポリ硫酸ペントサンは、キシロオリゴ糖を硫酸化した構造を有する。本発明のポリ硫酸ペントサンは、酸性キシロオリゴ糖を硫酸化することで得られたものであることが好ましい。ここで、キシロオリゴ糖を硫酸化した構造を有するキシロオリゴ糖のうち、中性キシロオリゴ糖は、キシロオリゴ糖中に、ウロン酸を含まないものである。酸性キシロオリゴ糖は、キシロオリゴ糖 1 分子中の少なくともいずれかのキシロース単位に、少なくとも 1 つのウロン酸が結合したものである。すなわち、酸性キシロオリゴ糖は、キシロオリゴ糖 1 分子中に少なくとも 1 つ以上のウロン酸残基を側鎖として有するものである。キシロオリゴ糖 1 分子中に含まれるウロン酸残基の数は、カルバゾール硫酸法や四ホウ酸ナトリウムを使用した比色法で測定することができる。ポリ硫酸ペントサンにおけるウロン酸含量（質量％）は、実施例に記載のように、上記カルバゾール硫酸法により求めた、所定量のポリ硫酸ペントサン中のウロン酸残基の数から算出した値とする。

10

【 0 0 2 5 】

本発明のポリ硫酸ペントサンの硫黄含量は、10.0 質量％以上であることが好ましく、12.0 質量％以上であることがより好ましく、15.5 質量％以上であることがさらに好ましく、16.5 質量％以上であることが特に好ましい。また、ポリ硫酸ペントサン中に含まれる硫黄含量は、20.0 質量％以下であることが好ましい。ここで、ポリ硫酸ペントサン中に含まれる硫黄含量は、日本薬局方に記載されている酸素フラスコ燃焼法にて測定される値である。

20

【 0 0 2 6 】

公知のポリ硫酸ペントサンはウロン酸残基とともにアセチル基（ $-COCH_3$ ）が結合したキシロース単位を一定量含んでいると考えられる（例えば国際公開第 2014/114723 号参照）。一方、本発明のポリ硫酸ペントサンのアセチル基含量は、0 ~ 2.0 質量％であり、0 ~ 1.0 質量％であることが好ましく、0 ~ 0.4 質量％であることがより好ましく、0 ~ 0.3 質量％であることがさらに好ましく、実質的に 0 質量％であることが特に好ましい。アセチル基含量が 0 ~ 2.0 質量％であるポリ硫酸ペントサンを得るために本発明のポリ硫酸ペントサンは後述の脱アセチル化工程を経て製造されることが好ましい。

【 0 0 2 7 】

ポリ硫酸ペントサン中のアセチル基含量は、 1H -NMR 測定におけるピークの積分比から算出することができる。具体的には、まず、特定量のポリ硫酸ペントサンと特定量の内標準物質とを含む 1H -NMR 測定溶液を用いて 1H -NMR 測定を行なう。得られるスペクトルにおいて内標準物質の特定の基のピークと、アセチル基のピークとの積分比を比較して、溶液中のアセチル基モル量を求める。その後、アセチル基モル量に 43 を乗じたものを別に得られる平均分子量で割った値から質量％を求めることができる。

30

【 0 0 2 8 】

本発明のポリ硫酸ペントサンの重量平均分子量（ M_w ）は、特に限定されるものではないが、例えば、5000 以下であってもよく、4000 以下であってもよく、3900 以下であってもよく、3800 以下であってもよく、3750 以下であってもよい。この場合、ポリ硫酸ペントサンの重量平均分子量（ M_w ）の下限値は 1000 であることが好ましい。

40

【 0 0 2 9 】

ポリ硫酸ペントサンの数平均分子量（ M_n ）は、特に限定されるものではないが、例えば、5000 以下であってもよく、4000 以下であってもよく、3900 以下であってもよく、3800 以下であってもよく、3750 以下であってもよい。この場合、ポリ硫酸ペントサンの数平均分子量（ M_n ）の下限値は 300 であることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

本発明のポリ硫酸ペントサンの重量平均分子量（ M_w ）と数平均分子量（ M_n ）は、GPC（ゲルパ - ミエーションクロマトグラフィー）により測定することができる。GPC

50

カラムとしては、ワイエムシ社製のYMC-Pack Diol-300とYMC-Pack Diol-60を連結して用いることができる。また、GPCの条件としては、例えば、下記の条件を採用する。

溶離液：25mMリン酸2水素カリウム / 25mMリン酸水素2カリウム / 50mM塩化カリウム水溶液

流速：0.7mL / 分

測定温度：40

検出器：示差屈折率検出器

【0031】

本発明のポリ硫酸ペントサンの分散度は、1.00以上1.6以下であることが好ましく、1.00以上1.5以下であることがより好ましい。また、ポリ硫酸ペントサンの分散度は、1.00以上1.4以下であることも好ましい。ここで、ポリ硫酸ペントサンの分散度(D)は以下の式で算出される。

分散度(D) = 重量平均分子量(Mw) / 数平均分子量(Mn)

【0032】

後述の製造方法で得られるポリ硫酸ペントサンは、純度が高く、分子量分布が狭い傾向が見られる。また、後述の製造方法で得られるポリ硫酸ペントサンは、品質安定性に優れている。

【0033】

<ポリ硫酸ペントサンの用途：医薬>

本発明のポリ硫酸ペントサンは、医薬、食品、化粧品、その他の組成物の成分として用いることができる。

特に、本発明のポリ硫酸ペントサンは医薬の有効成分として有用である。

医薬の例としては、FGF-2の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療のための医薬が挙げられる。

【0034】

FGF-2(塩基性線維芽細胞増殖因子)は増殖因子の1つであり、種々の細胞から分泌される。発生段階では細胞増殖や分化に深く関与する。生体においては、組織修復時に高い発現が認められる。また、FGF-2は異常血管新生に関与し血管内皮細胞に対する強い増殖、遊走促進作用を有する。これらの機能によりFGF-2は、腫瘍等の疾患に関与することが知られている。FGF-2は血管新生を促進して骨破壊を促すため、慢性関節リウマチにおける病態に関与する中心的分子であることも明らかになっている。FGF-2は、例えば、腎臓がんなど、血管の多い腫瘍において特にFGF-2の血清濃度が高いことが報告されており、その他前立腺がん、乳がん、肺がん等、様々な腫瘍にも存在する。

【0035】

FGF-2がFGFの受容体(FGFR)に結合することにより各種サイトカインや受容体遺伝子が発現誘導される。FGF-2はヘパリン結合領域を持ち、ヘパリンやヘパラン硫酸と結合する。細胞から分泌されたFGF-2は、FGFRとの結合の際、まず細胞外マトリックスのヘパラン硫酸に結合し、濃縮され、プロテアーゼからの保護を受けると考えられている。そのため、FGF-2とヘパラン硫酸との結合を阻害する活性はFGF-2の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療の効果を判断するための指標となる。

【0036】

実施例で示すように、ポリ硫酸ペントサンは、FGF-2とヘパラン硫酸との結合を阻害する活性を有し、この活性はポリ硫酸ペントサンにおけるウロン酸含量が7.0質量%~15.0質量%かつアセチル基含量が0~2.0質量%であるときに高い。したがって、本発明のポリ硫酸ペントサンはFGF-2の機能の異常亢進に起因する疾患の予防及び / 又は治療に特に有用である。

【0037】

F G F - 2 の機能の異常亢進としては、具体的には F G F - 2 による異常血管新生が挙げられる。F G F - 2 の機能の異常亢進は、一つの指標として血清中の F G F - 2 濃度の増加などにより判断することができる。

F G F - 2 の機能の異常亢進に起因する疾患の具体例としては、腫瘍、関節炎等の慢性炎症、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、膀胱炎等の炎症性疾患、あるいは心臓の形成異常、血管の形成異常又は骨格の形成異常、乾癬、加齢性黄班変性症、歯周病、強皮症、新生血管性緑内障などが挙げられる。

【 0 0 3 8 】

本発明のポリ硫酸ペントサンは、膀胱炎、特に、間質性膀胱炎の予防及び/又は治療のための医薬の有効成分としても有用である。

10

【 0 0 3 9 】

本発明の医薬の投与形態は特に制限されず、経口的、非経口的に投与することができる。好ましくは、非経口的に、注射あるいは点滴等により静脈内に投与すればよい。

本発明の医薬は、有効成分であるポリ硫酸ペントサンのみからなってもよいが、好ましくは、ポリ硫酸ペントサンに対して、適宜の薬理的及び製剤学的に許容し得る添加物を加え、当業者に周知な形態の製剤として提供してもよい。

薬理的及び製剤学的に許容し得る添加物としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし溶解補助剤、等張化剤、緩衝剤、pH調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を用いることができる。

20

【 0 0 4 0 】

経口投与に適する製剤の例としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、液剤、又はシロップ剤等を挙げることができる。非経口的に投与する製剤としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、吸入剤、又は貼布剤等を挙げることができる。経口投与、あるいは経皮又は経粘膜投与に適する製剤には、薬理的、製剤学的に許容し得る添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。また、フロン、ジエチルエーテル、又は圧縮ガス等の噴射剤；ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、メチルセルロース、ポリイソブチレン、ポリブテン等の粘着剤；木綿布又はプラスチックシート等の基布等の製剤用添加物を用いて製剤を製造してもよい。

30

【 0 0 4 1 】

注射あるいは点滴用に適する製剤には、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成し得る溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；リン酸塩（リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等）、クエン酸塩、酢酸塩などの緩衝剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を添加してもよい。

40

後述するように、本発明のポリ硫酸ペントサンはウロン酸含量がより少ないポリ硫酸ペントサンと比較してpH緩衝能が高いため、本発明のポリ硫酸ペントサンを液剤、注射剤、点滴剤等として提供する場合などにpHの調整が必要である場合において、pH調整剤の使用が不要であるか、又は使用量を低減することが可能である。

【 0 0 4 2 】

本発明の医薬の投与量は特に制限されず、投与形態や、患者の年齢、疾患の程度や症状、体重等の条件に応じて適宜選択することができる。例えば静脈内、皮下又は筋肉内投与の場合には、成人1日あたり、有効分量として0.1~20mg/kg、好ましくは0

50

． 2 ~ 10 mg / kg を投与すればよい。

【 0 0 4 3 】

< ポリ硫酸ペントサンの用途：抗凝固剤 >

本発明のポリ硫酸ペントサンは抗凝固剤の有効成分として用いることができる。

本発明のポリ硫酸ペントサンを含む抗凝固剤は、医薬として供する他に、例えば、医療器材又は医療材料の表面処理剤として用いることができる。例えば、埋め込み型人工臓器、人工血管、カテーテル、ステント、血液バッグ、コンタクトレンズ、眼内レンズ、手術用補助器具の表面処理剤として用いることができる。医薬組成物を医療器材又は医療材料の表面に固定する方法としては、例えば、医療器材又は医療材料に医薬組成物を接触させておき、そこへ放射線を照射する方法等が挙げられる。

10

【 0 0 4 4 】

< ポリ硫酸ペントサンの用途：pH緩衝剤 >

実施例で示すように、発明のポリ硫酸ペントサンはウロン酸含量がより少ないポリ硫酸ペントサンと比較してpH緩衝能が高い。そのため、発明のポリ硫酸ペントサンはpH緩衝剤として使用することができる。本発明のポリ硫酸ペントサンはpH4 ~ 6の範囲で緩衝作用を有する。例えば注射剤はpH4未満で、患者に痛みを感じさせる。本発明のポリ硫酸ペントサンは注射剤中で、医薬の有効成分であるとともにpH調整剤として機能することができる。本発明のポリ硫酸ペントサンは安定化や腐敗予防の観点からpH4 ~ 6に維持する必要のある食品、医薬、その他の任意の組成物においても用いることができる。

本発明のポリ硫酸ペントサンがpH緩衝剤として含まれている水溶液等の組成物中のポリ硫酸ペントサンの濃度は10 ~ 500 mg / mLであることが好ましく、50 ~ 300 mg / mLであることがより好ましい。

20

【 0 0 4 5 】

< ポリ硫酸ペントサンの製造方法 >

本発明のポリ硫酸ペントサンは、一例として、植物由来原料から酸性キシロオリゴ糖を得る第1工程と酸性キシロオリゴ糖からポリ硫酸ペントサンを得る第2工程とともに脱アセチル化工程を含むポリ硫酸ペントサンの製造方法により得ることができる。ここで、第1工程は植物由来原料を解重合する工程を含む。植物由来原料の解重合工程と、硫酸化工程とがこの順であることにより、ポリ硫酸ペントサンを効率良く製造することができる。

ポリ硫酸ペントサンの製造方法はさらに脱アセチル化工程を含んでいてもよい。脱アセチル化工程を含むことにより、低アセチル基含量のポリ硫酸ペントサンを製造することができる。

30

【 0 0 4 6 】

[植物由来原料]

酸性キシロオリゴ糖は、植物由来原料を解重合することで得ることができる。植物由来原料としては、例えば、木材由来原料、種子由来原料、穀物由来原料、果実由来原料等を挙げることができる。また、植物由来原料としては、コットンリントーヤコットンリント等のコットン、ケナフや麻、ラミー、稲ワラ等の草本系植物等を用いることもできる。植物由来原料としては、上述した各由来原料を組み合わせて使用してもよい。

【 0 0 4 7 】

中でも、植物由来原料としては、木材由来原料を用いることが好ましい。木材由来原料としては、例えば、針葉樹や広葉樹のような木材原料を挙げることができる。木材由来原料としては、針葉樹及び広葉樹から選択される少なくとも1種を用いることが好ましく、広葉樹を用いることがより好ましい。なお、木材由来原料として、針葉樹と広葉樹を混合したものをを用いてもよい。また、木材由来原料としては、樹皮を用いてもよい。

40

【 0 0 4 8 】

広葉樹としては、ブナ、ユーカリ・グロブラス、ユーカリ・グランディス、ユーカリ・ユーログランディス、ユーカリ・ペリータ、ユーカリ・ブラシアーナ、アカシア・メランシ等を挙げることができる。針葉樹としては、スギ、ヒノキ、マツ、ヒバ、ツガ等が挙げられる。

50

【 0 0 4 9 】

木材由来原料の容積重は、 450 kg/m^3 以上 700 kg/m^3 以下であることが好ましく、 500 kg/m^3 以上 650 kg/m^3 以下であることがより好ましい。木材由来原料の容積重を上記範囲内とすることにより、酸性キシロオリゴ糖の生産効率をより高めることができる。

【 0 0 5 0 】

木材由来原料は、上述した木材を破砕した木材チップであることが好ましい。植物由来原料として木材チップを用いることにより、植物由来原料の解重合を効率よく進めることができ、酸性キシロオリゴ糖の生産効率を高めることができる。

【 0 0 5 1 】

[第 1 工程]

(解重合工程)

第 1 工程は植物由来原料を解重合する工程を含む。植物由来原料を解重合する工程では、植物由来原料を化学的及び / 又は物理的に分解し、酸性キシロオリゴ糖を生成させることができる。化学的及び / 又は物理的に分解する工程としては、例えば、加熱処理工程、アルカリ処理工程、酸処理工程、酵素処理工程、イオン液体処理工程、触媒処理工程等が挙げられる。中でも、解重合する工程は、加熱処理工程又は酵素処理工程であることが好ましく、加熱処理工程であることがより好ましい。また、加熱処理工程は、加熱加圧工程であつてもよい。

解重合工程は、非アルカリ性条件下 ($\text{pH} 9$ 以下、好ましくは $\text{pH} 8$ 以下) で行なわれることが好ましい。

【 0 0 5 2 】

加熱処理工程は、植物由来原料を溶液の存在下で加熱する工程である。このような加熱処理工程では植物由来原料が加水分解されるため、加熱処理工程は加水分解処理工程や前加水分解処理工程と呼ばれることがある。加熱処理工程で用いる溶液は水であることが好ましく、植物由来原料に対する水の割合 (質量比) は $1 : 1 \sim 1 : 10$ であることが好ましい。植物由来原料に対する水の割合を上記範囲内とすることにより加水分解反応を効率よく進行させることができる。なお、加熱処理工程で用いられる水は、植物由来原料とは別に添加した水分であつてもよいが、その一部は植物由来原料に元々含まれる水分であつてもよい。

【 0 0 5 3 】

加熱処理工程では、植物由来原料と水の他に、他の薬品を添加してもよい。他の薬品としては、例えば、アルカリ、酸、キレート剤を挙げることができる。また、スケール防止剤や、ピッチコントロール剤、イオン液体といった多糖の解重合を直接的・間接的に補助する薬品を添加してもよい。

【 0 0 5 4 】

加熱処理工程は、植物由来原料を水の存在下で加熱する工程であるが、この際の加熱温度 (液温) は、 30 以上であることが好ましく、 50 以上であることがより好ましく、 75 以上であることがさらに好ましく、 90 以上であることがよりさらに好ましく、 100 以上であることが特に好ましく、 120 以上であることが最も好ましい。また、加熱温度 (液温) は、 300 以下であることが好ましく、 250 以下であることがより好ましく、 200 以下であることがさらに好ましい。

【 0 0 5 5 】

加熱処理工程における処理時間は処理温度に応じて適宜決定することができる。処理時間は、例えば、 5 分以上であることが好ましく、 10 分以上であることがより好ましく、 20 分以上であることがさらに好ましい。なお、下記式で表される P ファクターは加熱処理時の温度と時間の積であり P ファクターを好ましい範囲内に調整することが好ましい。

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

【数 1】

$$P = \int_{t_0}^t \frac{k_{H1(T)}}{k_{100^\circ\text{C}}} \cdot dt = \int_{t_0}^t \text{Exp} \cdot \left(40.48 - \frac{15106}{T} \right) \cdot dt$$

【 0 0 5 7 】

上記式において、PはPファクターを表し、Tは絶対温度（+273.5）を表し、tは加熱処理時間を表し、 $K_{H1(T)} / K_{100}$ はグリコシド結合の加水分解の相対速度を表す。

10

【 0 0 5 8 】

加熱処理工程では、Pファクターを200以上とすることが好ましく、250以上とすることがより好ましく、300以上とすることがさらに好ましい。なお、Pファクターは1000以下であることが好ましい。加熱処理工程ではPファクターを適宜調整することで酸性キシロオリゴ糖の平均重合度ひいては分子量を所望の範囲内とすることができ、これにより、得られるポリ硫酸ペントサンの分子量を調整することができる。

【 0 0 5 9 】

加熱処理工程では、植物由来原料を含む溶液のpHは9以下であることが好ましく、8以下であることがより好ましく、7以下であることがさらに好ましい。すなわち、加熱処理工程は、非アルカリ性条件下で行うことが好ましい。なお、上記のpHの値は、加熱処理を行う前の溶液のpHである。

20

【 0 0 6 0 】

加熱処理工程では、原料由来の酸が解離し、少なくとも一部で酸加水分解が行われてもよい。植物原料由来の酸としては、例えば、酢酸やギ酸等の有機酸を挙げることができる。この場合、酸加水分解後の植物由来原料を含む溶液のpHはさらに低下することとなる。

【 0 0 6 1 】

ポリ硫酸ペントサンの製造方法においては、最初の工程として加熱処理工程を設けることが好ましい。これにより、酸性キシロオリゴ糖の生産効率を高めることができ、さらにはポリ硫酸ペントサンの製造効率を高めることができる。最初の工程として加熱処理工程を設けることにより、従来法と比較して酸性キシロオリゴ糖を得るまでの工程数を大幅に削減することができる。また、最初の工程として非アルカリ性条件下で加熱処理工程を設けることにより、酸性キシロオリゴ糖にヘキセンウロン酸が置換することがなく、着色が抑制された酸性キシロオリゴ糖を効率よく生産することができる。

30

【 0 0 6 2 】

解重合工程は加熱処理工程であることが好ましいが、加熱処理工程以外の工程を採用することもできる。例えば、解重合工程が酵素処理工程である場合は、解重合工程は植物由来原料と酵素を混合する工程を含む。酵素としては、例えば、ヘミセルラーゼ等を用いることができる。具体的には、商品名セルロシンHC100（エイチビィアイ社製）、商品名セルロシンTP25（エイチビィアイ社製）、商品名セルロシンHC（エイチビィアイ社製）、商品名カルタザイム（クラリアント社製）、商品名エコパルプ（ローム・エンザイム社製）、商品名スミチーム（新日本化学工業社製）、パルプザイム（ノボノルディクス社製）、マルチフェクト720（ジェネンコア社）などの市販の酵素製剤や、トリコデルマ属、テルモミセス属、オウレオバシヂウム属、ストレプトミセス属、アスペルギルス属、クロストリジウム属、バチルス属、テルモトガ属、テルモアスクス属、カルドセラム属、テルモモノスポラ属などの微生物により生産されるキシラナーゼを使用することができる。

40

【 0 0 6 3 】

酵素処理工程では、植物由来原料と水を混合した溶液に酵素を添加する。この際の溶液

50

の温度は、10 以上90 以下であることが好ましく、30 以上60 以下であることがより好ましい。なお、溶液の温度は、用いる酵素の至適温度に近い温度であることが好ましい。また、溶液のpHも酵素の活性が高まるような範囲に調整することが好ましく、例えばpHを3以上10以下に調整することが好ましい。

【0064】

また、解重合工程がアルカリ処理工程や酸処理工程である場合は、植物由来原料と、アルカリ溶液又は酸溶液を混合する工程を含む。アルカリ処理工程では、水酸化ナトリウムや水酸化カリウムを添加することが好ましい。また、酸処理工程では、塩酸、硫酸、酢酸等を添加することが好ましい。なお、この場合も適宜加熱や加圧を行ってもよい。

【0065】

解重合工程が、酵素処理工程、アルカリ処理工程及び酸処理工程から選択される少なくともいずれかである場合は、該処理工程の後に、さらに圧搾工程、抽出工程、加熱工程、濾過工程、分離工程、精製工程、濃縮工程、脱塩工程等が設けられる場合がある。また、該処理工程の後に、低分子化工程を設ける必要がある場合もある。なお、その他の工程としては、特開2003-183303号公報に記載された工程を挙げることができ、これらの内容は本明細書に取り込まれる。

【0066】

(濾過工程)

第1工程は、上述した解重合工程の後にさらに濾過工程を含んでもよい。濾過工程では、植物由来原料の固形分と、固形分を除く溶液に分離される。具体的には、解重合工程の後に濾過工程を設けることにより、パルプ原料となる固形分と、濾液に分離される。なお、パルプ原料となる固形分は、後工程として蒸解工程等を経ることでセルロース原料(溶解パルプ)となる。

【0067】

回収した濾液は、ガス層と液層に分けることができる。ガス層には、フルフラール類が多く含まれるため、これらを回収することでフルフラール類を単離することができる。一方、液層には、酸性キシロオリゴ糖や中性キシロオリゴ糖を含むヘミセルロースが多く含まれている。後述する工程において、この液層に含まれる酸性キシロオリゴ糖を分離精製することができる。

【0068】

(分離精製工程)

第1工程は、上述した解重合工程の後にさらに分離精製工程を含んでもよい。第1工程が上述した濾過工程を含む場合、分離精製工程は、濾過工程の後に設けられることが好ましい。

第1工程では、解重合する工程の直後に分離精製工程を設けてもよいが、解重合する工程の後に濾過工程を設け、得られた濾液から酸性キシロオリゴ糖を分離精製する工程を設けることが好ましい。なお、濾過工程は分離精製工程の一部として設けられていてもよいし、分離精製工程とは独立した1工程として設けられていてもよい。分離精製工程は、酸性キシロオリゴ糖を分離精製する工程である。濾過工程で得られた濾液には、酸性キシロオリゴ糖の他に中性キシロオリゴ糖などが含まれているため、分離精製工程はこれらの他の糖類を除去する工程でもある。

【0069】

分離精製工程では、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過、イオン交換処理、NF膜処理、UF膜処理、RO膜処理、活性炭処理等の方法を採用することが好ましい。分離精製工程では、上記方法を複数組み合わせを行うことも好ましい。中でも、分離精製工程においてイオン交換クロマトグラフィーを行うことにより、酸性キシロオリゴ糖を選択的に分離精製することができる。イオン交換クロマトグラフィーでは、酸性キシロオリゴ糖を吸着することにより、糖液(濾液)から酸性キシロオリゴ糖を主に取り出すことができる。具体的には、糖液をまず強陽イオン交換樹脂にて処理し、糖液中の金属イオンを除去する。次いで、強陰イオン交換樹脂を用い

10

20

30

40

50

て糖液中の硫酸イオンなどを除去する。そして、弱陰イオン交換樹脂で処理し、酸性キシロオリゴ糖を樹脂に吸着させる。樹脂に吸着した酸性オリゴ糖を、低濃度の塩（ NaCl 、 CaCl_2 、 KCl 、 MgCl_2 など）によって溶出させることにより、夾雑物の少ない酸性キシロオリゴ糖液を得ることができる。

【0070】

（濃縮工程）

第1工程は、さらに濃縮工程を含んでもよい。濃縮工程は、例えば、濾過工程の後であって、分離精製工程の前に設けられることが好ましい。このような濃縮工程を設けることにより、分離精製工程をより効率良く行うことができ、ポリ硫酸ペントサンの生産効率を高めることができる。

【0071】

濃縮工程としては、例えば、NF膜、限外濾過膜、逆浸透膜等を用いた膜処理工程や、エバポレーション等を用いた濃縮工程等を挙げることができる。

【0072】

濃縮工程では、酸性キシロオリゴ糖の含有量が、濃縮液の全質量に対して10%以上80%以下となるように濃縮することが好ましく、20%以上60%以下となるように濃縮することが好ましい。

【0073】

<脱水工程>

第1工程で得られる酸性キシロオリゴ糖は、酸性キシロオリゴ糖液として得てもよいが、脱水工程を経ることにより、酸性キシロオリゴ糖濃縮物や酸性キシロオリゴ糖粉末として得てもよい。酸性キシロオリゴ糖粉末を製造する場合は、分離精製工程の後に、さらに粉末化工程を設けることが好ましい。本発明において、脱水工程を設けることにより、後述する硫酸化工程における硫酸化を効率よく進めることができる。

【0074】

粉末化工程では、分離精製工程で得られた酸性キシロオリゴ糖液を、例えば、スプレードライヤー、凍結乾燥機、熱風乾燥機、水溶性の有機溶媒等を用いて処理することにより、酸性キシロオリゴ糖粉末を得ることができる。

【0075】

[第2工程]

（硫酸化工程）

第1工程で得られた酸性キシロオリゴ糖を第2工程において硫酸化することでポリ硫酸ペントサンを得ることができる。すなわち、第2工程は硫酸化工程を含む。

硫酸化に供される酸性キシロオリゴ糖の平均重合度は、最終生成物として得られるポリ硫酸ペントサンの分子量によって適宜調整することが好ましい。

【0076】

酸性キシロオリゴ糖の平均重合度は、酸性キシロオリゴ糖の全糖量を、還元糖量で除すことで算出することができる。全糖量を算出する際には、まず、キシロオリゴ糖液を50

に保ち、15000rpmにて15分間遠心分離を行う。その後、上清液の全糖量をフェノール硫酸法（「還元糖の定量法」学会出版センター発行）にて定量する。この際、使用する検量線はD-キシロース（和光純薬工業）を用いて作成する。また、還元糖量は、ソモジーネルソン法（「還元糖の定量法」学会出版センター発行）にて定量する。この際にも、使用する検量線はD-キシロース（和光純薬工業）を用いて作成する。

【0077】

硫酸化工程では、酸性キシロオリゴ糖液に硫酸又は硫酸誘導体を加え、硫酸化を行う。硫酸誘導体としては、例えば、三酸化硫黄・ピリジン錯体やクロロスルホン酸等を挙げることができる。この際、酸性キシロオリゴ糖液の濃度は、0.1質量%以上20質量%以下であることが好ましく、このような濃度の酸性キシロオリゴ糖液に硫酸を0.1質量%以上50質量%以下となるように添加することが好ましい。硫酸を添加した後の酸性キシロオリゴ糖液のpHは1以上9以下であることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0078】

(硫酸化後精製工程)

第2工程は、硫酸化の後に、硫酸化後精製工程をさらに含んでもよい。このような硫酸化後精製工程を設けることにより、純度の高いポリ硫酸ペントサンを得ることができる。

【0079】

硫酸化後精製工程では、例えば、遠心分離、膜濾過、透析、水溶性有機溶媒処理、活性炭処理等の方法を採用することが好ましい。中でも、水溶性有機溶媒処理及び活性炭処理は、硫酸化されたポリ硫酸ペントサンを選択的に分離精製することができるため、好ましく用いられる。

【0080】

(粉末化工程)

第2工程では、硫酸化されたポリ硫酸ペントサンは、ポリ硫酸ペントサン溶液として得てもよいが、粉末化工程を経ることにより、ポリ硫酸ペントサン粉末として得てもよい。ポリ硫酸ペントサン粉末を製造する場合は、硫酸化後精製工程の後に、さらに粉末化する工程を設けることが好ましい。

【0081】

粉末化工程としては、硫酸化後精製工程で得られたポリ硫酸ペントサン溶液を、例えば、スプレードライヤー、凍結乾燥機、熱風乾燥機、水溶性の有機溶媒等を用いて処理することにより、ポリ硫酸ペントサン粉末を得ることができる。

【0082】

上述したような第2工程を経ることで、ポリ硫酸ペントサンが得られる。ここで得られるポリ硫酸ペントサンの硫黄含量は、ポリ硫酸ペントサンの全質量に対して10質量%以上20質量%以下が好ましい。ポリ硫酸ペントサンの硫黄含量は、日本薬局方一般試験法の酸素フラスコ燃焼法などにより測定できる。

【0083】

[脱アセチル化工程]

ポリ硫酸ペントサンの製造の際には脱アセチル化を行なうことが好ましい。脱アセチル化工程は解重合工程の後のいずれかの段階であることが好ましい。脱アセチル化工程により、ポリ硫酸ペントサンが有するアセチル基含量を低減させることができる。具体的には、脱アセチル化工程は、酸性キシロオリゴ糖等の、植物由来原料をもとに得られた物質を含む溶液(本明細書においては、「酸性キシロオリゴ糖等を含む溶液」とも呼ぶ。)をpH11以上とするために塩基を添加する工程である。脱アセチル化工程においては、解重合後に得られる溶液、濾過工程で得られた濾液、分離精製工程後かつ硫酸化工程前の酸性キシロオリゴ糖を含む溶液、又は硫酸化工程後の酸性キシロオリゴ糖(ポリ硫酸ペントサン)を含む溶液等がpH11以上とされていればよい。これらのうち、分離精製工程後かつ硫酸化工程前の酸性キシロオリゴ糖を含む溶液をpH11以上とした場合には、安定した品質でアセチル基含量が低減したポリ硫酸ペントサンを得ることができ、また、アセチル基が結合していた部位も硫酸化することができるため、硫酸化の効率、ひいてはポリ硫酸ペントサンの製造効率を向上させることが可能である。また、硫酸化工程後の酸性キシロオリゴ糖(ポリ硫酸ペントサン)を含む溶液をpH11以上とした場合には、精製工程を効率化することができる。酸性キシロオリゴ糖等を含む溶液は水溶液であることが好ましい。本明細書において酸性キシロオリゴ糖を含む溶液を酸性キシロオリゴ糖液ということもある。

【0084】

脱アセチル化工程で適用されるpHは11~14であることが好ましく、12~13がより好ましい。脱アセチル化工程に付される溶液は、0.5時間以上pH11以上で維持することが好ましく、1.0時間以上pH11以上で維持することがより好ましく、2.0時間以上pH11以上で維持することがさらに好ましく、3.0時間以上pH11以上で維持することが特に好ましい。特にpHが12未満のときは1.0時間以上維持することが好ましい。特に好ましい条件としてはpH12~13で3時間以上維持する条件を挙

10

20

30

40

50

げることができる。

【0085】

上記のpHに維持する間、上記溶液は、攪拌されていることが好ましい。上記のpHに維持する間の温度条件は特に限定されないが、室温であることが好ましい。

【0086】

脱アセチル化工程においては、脱アセチル化工程に付される溶液（酸性キシロオリゴ糖を含む溶液等）に塩基が添加されればよい。添加される塩基は目的のpHが達成できる限り特に限定されないが、水酸化ナトリウムが好ましい。

【0087】

脱アセチル化工程は、上記のpHでの維持後、塩基の添加によりpH11以上となった溶液を、pH11未満に調整するpH調整工程を含んでいてもよい。pH調整工程では、例えば、pH9以下、pH8以下、pH7以下、pH6以下、pH5以下、pH4以下等に調整されればよい。調整は酸の添加により行なわれればよい。酸としては塩酸が挙げられる。

10

【0088】

脱アセチル化工程は、上記pH調整工程の後に脱塩工程を含むことも好ましい。脱塩は例えば透析膜やNF膜を用いて行なうことができる。

【0089】

脱アセチル化工程は、さらにその後の処理のために生成物を粉末化する工程を含んでいてもよい。

20

【0090】

[その他の工程]

(分子量調整工程)

上述した第1工程と第2工程の間に、分子量調整工程をさらに含んでもよい。ポリ硫酸ペントサンの製造方法が脱アセチル化工程を含むとき、分子量調整工程は脱アセチル化工程の前であってもよく、後であってもよい。分子量調整工程では、第1工程で得られる酸性キシロオリゴ糖の分子量を調整する。例えば、分子量調整工程では、酸性キシロオリゴ糖を低分子化することができる。

【0091】

分子量調整工程では、例えば、酸処理やアルカリ処理、酵素処理、NF膜処理、UF膜処理、RO膜処理、ゲル濾過処理、活性炭処理、イオン交換処理、電気透析処理等を行うことにより、重量平均分子量が1000以上5000以下のポリ硫酸ペントサンを得ることができる。また、分子量調整工程では、膜処理等を行うことにより、所望の重量平均分子量であるポリ硫酸ペントサンを選択的に回収する方法を採用してもよい。

30

【0092】

(分子量調整後分離精製工程)

ポリ硫酸ペントサンの製造方法は、分子量調整工程の後に、分子量調整後分離精製工程をさらに含んでもよい。分子量調整後分離精製工程としては、例えば、ゲルろ過、イオン交換処理、NF膜処理、UF膜処理、RO膜処理、電気透析処理、活性炭処理、水溶性有機溶媒処理、クロマトグラフィー処理等を挙げることができる。このような分子量調整後分離精製工程を設けることにより、分子量調整工程で得られた所望の分子量を有する酸性キシロオリゴ糖を選択的に回収することができ、分子量分布の狭いポリ硫酸ペントサンを効率よく得ることができる。

40

【実施例】

【0093】

以下に製造例を挙げて本発明の特徴をさらに具体的に説明する。以下の製造例に示す材料、使用量、割合、処理内容、処理手順等は、本発明の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。したがって、本発明の範囲は以下に示す具体例により限定的に解釈されるべきものではない。

【0094】

50

< 酸性キシロオリゴ糖 (1) の製造 >

木材 チップ (広葉樹) 10 質量部に対して、水を 50 質量部添加し、165 で 3 時間加熱処理を行った。その後、スクリーンプレス (新菱製作所製 : 250 × 1000 S P H - E N) にて固液分離を行い、濾液を回収した。濾液をミクロンレート 1 μ m のバッグフィルター (I S P フィルターズ社製) で濾過し、活性炭 (三倉化成社製 : P M - S X) を 5 質量部添加して 50 で 2 時間処理した後、更にミクロンレート 0 . 2 μ m のセラミックフィルター (日本ポール社製) で活性炭ごと濾過し、清澄な濾液を回収した。清澄濾液を逆浸透膜 (日東電工社製 : N T R - 7 4 5 0) で 20 倍に濃縮して濃縮糖液を得た後、その濃縮糖液を、S V 1 . 5 で強カチオン樹脂 (三菱化学社製 : P K - 2 1 8)、弱アニオン樹脂 (三菱化学社製 : W A 3 0)、強カチオン樹脂 (三菱化学社製 : P K - 2 1 8)、弱アニオン樹脂 (三菱化学社製 : W A 3 0) からなる 4 床 4 塔式のイオン交換樹脂に通液し、2 塔目及び 4 塔目の弱アニオン樹脂に酸性キシロオリゴ糖を吸着させ、その後 50 m M 塩化ナトリウム水溶液を S V 1 . 5 で 2 塔目及び 4 塔目に通液することにより、酸性キシロオリゴ糖溶液を回収した。得られた酸性キシロオリゴ糖溶液に、p H 1 3 となるように水酸化ナトリウムを添加し、室温で 3 時間攪拌して脱アセチル化を行った。得られた液に、p H 5 未満となるように塩酸を添加し透析膜 (S P E C T R U M 社製 : スペクトラ / ポア 7 C E 膜 M W C O 1 0 0 ~ 5 0 0) で脱塩を行った後、凍結乾燥機 (E Y E L A 社製) を用いて粉末化した。

【 0 0 9 5 】

< 中性キシロオリゴ糖の製造 >

木材 チップ (広葉樹) 10 質量部に対して、水を 50 質量部添加し、165 で 3 時間加熱処理を行った。その後、スクリーンプレス (新菱製作所製 : 250 × 1000 S P H - E N) にて固液分離を行い、濾液を回収した。濾液をミクロンレート 1 μ m のバッグフィルター (I S P フィルターズ社製) で濾過し、活性炭 (三倉化成社製 : P M - S X) を 5 質量部添加して 50 で 2 時間処理した後、更にミクロンレート 0 . 2 μ m のセラミックフィルター (日本ポール社製) で活性炭ごと濾過し、清澄な濾液を回収した。清澄濾液を逆浸透膜 (日東電工社製 : N T R - 7 4 5 0) で 20 倍に濃縮して濃縮糖液を得た後、その濃縮糖液を、S V 1 . 5 で強カチオン樹脂 (三菱化学社製 : P K - 2 1 8)、弱アニオン樹脂 (三菱化学社製 : W A 3 0)、強カチオン樹脂 (三菱化学社製 : P K - 2 1 8)、弱アニオン樹脂 (三菱化学社製 : W A 3 0) からなる 4 床 4 塔式のイオン交換樹脂に通液することにより、中性キシロオリゴ糖液を回収した。得られた中性キシロオリゴ糖液に、p H 1 3 となるように水酸化ナトリウムを添加し、室温で 3 時間攪拌して脱アセチル化を行った。得られた液に、p H 5 未満となるように塩酸を添加し透析膜 (S P E C T R U M 社製 : スペクトラ / ポア 7 C E 膜 M W C O 1 0 0 ~ 5 0 0) で脱塩を行った後、凍結乾燥機 (E Y E L A 社製) を用いて粉末化した。

【 0 0 9 6 】

< ポリ硫酸ペンタサンナトリウムの製造 1 >

(比較例 1)

100 m L セパラブルフラスコに N , N - ジメチルホルムアミド 25 m L、三酸化硫黄・ピリジン錯体 12 . 4 g 及び前述の方法で製造した中性キシロオリゴ糖粉末 1 . 5 g を加えて 40 で 3 時間反応を行った。冷却後、得られた反応混合物を 500 m L のエタノール中に滴下し、生成した沈殿物をろ別し、水 30 m L を加えて溶かした。この液に水酸化ナトリウム溶液を加えて p H が 10 になるように調整した。この液を 500 m L のエタノール中に滴下して得られた析出物をろ別した。その後、析出物を 30 m L の水を加えて溶解し、活性炭を加えて攪拌した後ろ過した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥機 (E Y E L A 社製) を用いて粉末化した。

【 0 0 9 7 】

(比較例 2)

比較例 1 の中性キシロオリゴ糖粉末 1 . 5 g に代えて、中性キシロオリゴ糖粉末 1 . 125 g と酸性キシロオリゴ糖 (1) 0 . 375 g の混合物を用いる以外は比較例 1 と同様

10

20

30

40

50

にしてポリ硫酸ペンタサンナトリウムを得た。

【0098】

(実施例1)

比較例1の中性キシロオリゴ糖粉末1.5gに代えて、中性キシロオリゴ糖粉末0.375gと酸性キシロオリゴ糖(1)1.125gの混合物を用いる以外は比較例1と同様にしてポリ硫酸ペンタサンナトリウムを得た。

【0099】

(実施例2)

比較例1の中性キシロオリゴ糖粉末1.5gに代えて、酸性キシロオリゴ糖(1)1.5gを用いる以外は比較例1と同様にしてポリ硫酸ペンタサンナトリウムを得た。

10

【0100】

<物性値>

実施例1, 2及び比較例1, 2のポリ硫酸ペンタサンのウロン酸含量、平均分子量、硫黄含量を以下の通り測定した。

(ウロン酸含量)

実施例及び比較例のポリ硫酸ペンタサンナトリウム約10mgを量り取り、蒸留水に溶かして正確に25mLとした。この液1mLを試験管に取り、氷水中で冷却しながら0.025M四ほう酸ナトリウム・硫酸溶液5mLを加えて混和し、水浴で10分間加熱した。直ちに氷冷中で冷却し、カルバゾール試液0.2mLを加えて混和し、水浴で15分間加熱した後、放冷して試料溶液とした。別に、濃度が10~100µg/mLのグルクロン酸標準原液を調製し、同様の操作を行なって標準溶液とした。蒸留水1mLを用いて同様に操作したものを対照液として、波長530nmにおける吸光度を測定した。標準溶液の吸光度から検量線を作成し、実施例及び比較例のグルクロン酸量(g)を求めた。以下の式よりウロン酸含量(質量%)を求めた。定量値がマイナスとなる場合は0%とみなした。

20

ウロン酸含量(質量%)

= グルクロン酸量(µg) / (ポリ硫酸ペンタサンナトリウムの秤取量 × 1 / 25) / 10

【0101】

(硫黄含量)

日本薬局方に記載の酸素フラスコ燃焼法にて硫黄含量を測定した。

30

(平均分子量)

本発明のポリ硫酸ペンタサンの重量平均分子量(Mw)は、GPC(ゲルパ-ミエーションクロマトグラフィー)により測定することができる。GPCカラムとしては、ワイエムシ社製のYMC-Pack Diol-300とYMC-Pack Diol-60を連結して用いることができる。また、GPCの条件としては、例えば、下記の条件を採用する。

溶離液: 25mMリン酸2水素カリウム / 25mMリン酸水素2カリウム / 50mM塩化カリウム水溶液

流速: 0.7mL / 分

測定温度: 40

検出器: 示差屈折率検出器

40

【0102】

<FGF-2とヘパラン硫酸との結合の阻害活性>

実施例及び比較例のポリ硫酸ペンタサン10mgを生理食塩水10mLに溶解し、ピオチン化ヘパラン硫酸と混合して37で15分撪拌した。ブランクとして、生理食塩水のみをピオチン化ヘパラン硫酸と混合したサンプルも用意した。これらの溶液をFGF-2固定化プレートに添加し、37で15分プレート撪拌した。溶液を捨て、0.1% Tween 20 / PBSで3回ウェルを洗浄した後、アビジン-HRP溶液を添加して37で30分プレート撪拌した。溶液を捨て、0.1% Tween 20 / PBSで3

50

回ウェルを洗浄した後、HRP用基質を添加し、室温で5分程度発色させた。反応停止液を添加し、攪拌した後、波長450nmの吸光度(A450nm)を測定した。以下の式で阻害率を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left(\frac{A_{450\text{nm}}(\text{ブランク}) - A_{450\text{nm}}(\text{ポリ硫酸ペントサン})}{A_{450\text{nm}}(\text{ブランク})} \right) \times 100$$

ビオチン化ヘパラン硫酸、FGF-2固定化プレート、アビジン-HRP溶液、HRP用基質は、Heparan Degrading Enzyme Assay Kit (タカラバイオ社) に付属しているものを用いた。また、Tween 20、PBS、反応停止液は、Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfic Acid (タカラバイオ社) に付属しているものを用いた。

結果を表1及び図1に示す。

【0103】

【表1】

	比較例1	比較例2	実施例1	実施例2
ウロン酸含量 (質量%)	0.00	1.64	7.94	12.61
平均分子量	2053	2168	2487	2781
硫黄含量 (質量%)	15.34	15.09	14.33	13.28
FGF 阻害率 (%)	81.8	90.8	94.5	95.4

【0104】

表1及び図1に示す結果からウロン酸含量7.0質量%~15.0質量%のポリ硫酸ペントサンナトリウムは、高いFGF阻害率を示していることがわかる。

【0105】

< 酸性キシロオリゴ糖(2)の製造 >

木材チップ(広葉樹)10質量部に対して、水を50質量部添加し、165℃で3時間加熱処理を行った。その後、スクリーブレス(新菱製作所製:250×1000SPH-EN)にて固液分離を行い、濾液を回収した。濾液をミクロンレート1µmのバッグフィルター(ISPフィルターズ社製)で濾過し、活性炭(三倉化成社製:PM-SX)を5質量部添加して50℃で2時間処理した後、更にミクロンレート0.2µmのセラミックフィルター(日本ポール社製)で活性炭ごと濾過し、清澄な濾液を回収した。清澄濾液を逆浸透膜(日東電工社製:NTR-7450)で20倍に濃縮して濃縮糖液を得た後、その濃縮糖液を、SV1.5で強カチオン樹脂(三菱化学社製:PK-218)、弱アニオン樹脂(三菱化学社製:WA30)、強カチオン樹脂(三菱化学社製:PK-218)、弱アニオン樹脂(三菱化学社製:WA30)からなる4床4塔式のイオン交換樹脂に通液し、2塔目及び4塔目の弱アニオン樹脂に酸性キシロオリゴ糖を吸着させ、その後50mM塩化ナトリウム水溶液をSV1.5で2塔目及び4塔目に通液することにより、酸性キシロオリゴ糖溶液を回収した。得られた酸性キシロオリゴ糖溶液を凍結乾燥機(EYELA社製)を用いて粉末化した。

【0106】

< 酸性キシロオリゴ糖(3)の製造 >

酸性キシロオリゴ糖(1)の製造の脱アセチル化をpH11で1時間とした以外は同様に処理して酸性キシロオリゴ糖(3)を得た。

【0107】

< 酸性キシロオリゴ糖(4)の製造 >

酸性キシロオリゴ糖(1)の製造の脱アセチル化をpH11で2時間とした以外は同様に処理して酸性キシロオリゴ糖(4)を得た。

【0108】

< 酸性キシロオリゴ糖(5)の製造 >

酸性キシロオリゴ糖(1)の製造の脱アセチル化をpH12で1時間とした以外は同様に

に処理して酸性キシロオリゴ糖(4)を得た。

【0109】

<ポリ硫酸ペンタサンナトリウムの製造2>

(比較例3)

比較例1の中性キシロオリゴ糖粉末1.5gに変えて、酸性キシロオリゴ糖(2)1.5gを用いる以外は比較例1と同様にしてポリ硫酸ペンタサンナトリウムを得た。

【0110】

(実施例3~5)

比較例1の中性キシロオリゴ糖粉末1.5gに代えて、それぞれ酸性キシロオリゴ糖(3)~(5)1.5gを用いる以外は比較例1と同様にして、実施例3~5のポリ硫酸ペンタサンナトリウムを得た。

【0111】

<物性値、及びFGF-2とヘパラン硫酸との結合の阻害活性>

実施例3~5及び比較例3のポリ硫酸ペンタサンの、ウロン酸含量及び平均分子量を実施例1と同様に測定した。また、実施例2~5及び比較例3のポリ硫酸ペンタサンのアセチル基含量を以下の手順で求めた。

3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム 2,2,3,3-d4 (ISOTEC社) 35mgを重水(関東化学社)に溶解し、25mLメスフラスコを用いてメスアップし、内標準溶液を作製した。実施例及び比較例のポリ硫酸ペンタサンナトリウムを30mg秤量し、内標準溶液1mLに溶解してNMR用溶液を調製した。得られた溶液をNMRサンプルチューブ(関東化学社)に移し、FT-NMR(JNM-LA400:日本電子社)により¹H-NMR測定を行った。内標準物質のトリメチルシリル基ピーク及びポリ硫酸ペンタサンナトリウムのアセチル基ピークの積分比より、アセチル基含量を算出した。

実施例2~5及び比較例3のポリ硫酸ペンタサンの、ウロン酸含量、平均分子量、及びFGF-2とヘパラン硫酸との結合の阻害活性を実施例1と同様に測定した。結果を表2及び図2に示す。

【0112】

【表2】

	比較例3	実施例3	実施例4	実施例5	実施例2
平均分子量	2211	2356	2325	2129	2781
ウロン酸含量(質量%)	11.03	11.40	11.42	10.83	12.61
アセチル基含量(質量%)	2.74	1.62	0.87	0.22	0.00
FGF阻害率(%)	87.8	94.4	92.2	91.0	95.4

【0113】

<保存安定性>

実施例2、4及び比較例3のポリ硫酸ペンタサンナトリウムを100mg/mLの濃度となるように精製水に溶解し、スクリーバイアルで密栓して、40℃にて、1週間及び2週間保存した時の溶液性状を目視で確認した。

【0114】

【表3】

		実施例2	実施例4	比較例3
アセチル基含量(質量%)		0.00%	0.87%	2.74%
溶液の性状	初期	無色透明	無色透明	無色透明
	40℃ 1週間	無色透明	無色透明	微黄色透明
	40℃ 2週間	微黄色透明	微黄色透明	黄色透明

【0115】

表 2 及び図 2 に示す結果からアセチル基含量 2.0%未満のポリ硫酸ペンタサリウムの FGF 阻害率は 90%を超えており、高い阻害率を示していることがわかる。また、表 3 からアセチル基含量が低いポリ硫酸ペンタサリウム水溶液は室温より高い温度で保存したときの着色が少なく、安定性が高いことがわかる。

【 0 1 1 6 】

(ポリ硫酸ペンタサンの pH 緩衝作用)

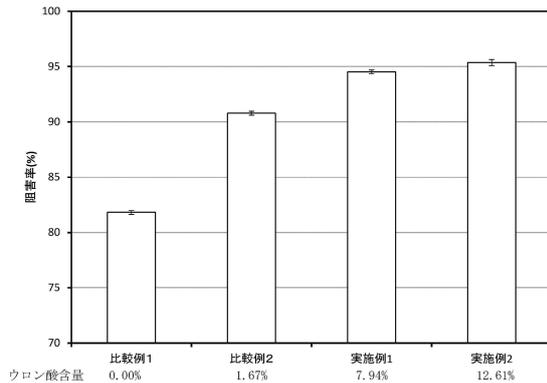
実施例 1、2 及び比較例 1、2 のポリ硫酸ペンタサン 100 mg を水に溶解し、正確に 100 mL とした。この溶液を自動滴定装置 (東亜ディーケーケー) により、0.01 N 水酸化ナトリウム水溶液 (関東化学) を用いて pH 10 に調整した。その後、同じく自動滴定装置により、0.01 N 塩酸水溶液 (関東化学) を用いて滴定を行い、pH 6 から 4

10

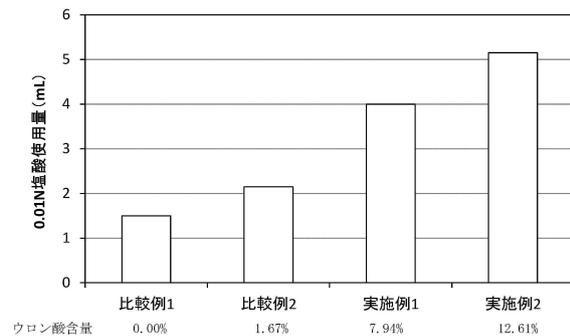
結果を図 3 に示す。

図 3 に示す結果から、実施例のポリ硫酸ペンタサンは pH 4 ~ 6 での緩衝作用が高いことがわかる。

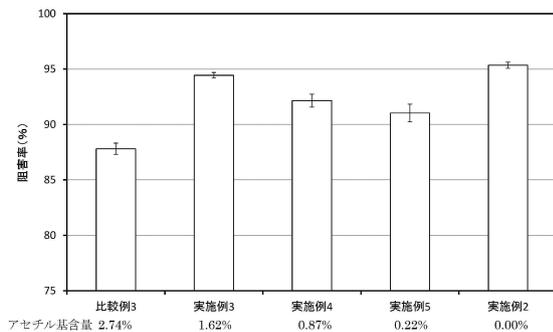
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

(56)参考文献 特開昭60-063203(JP,A)
 特許第6225321(JP,B2)
 国際公開第2014/114723(WO,A1)
 特開昭61-197601(JP,A)
 特開2013-177433(JP,A)
 特開2015-038061(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C08B
 C07H
 A61K
 A61P
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CPlus/REGISTRY(STN)