

408129

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， 有 無主張優先權
 日本 1995年10月24日 300682/1995

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

產業上之應用領域

本發明係有關將人尿中之凝血調節素進行濃縮、純化之方法。凝血調節素係一種抗血液凝固物質，對血液凝固異常之相關疾病應具有預防及治療之效果。

以往技藝

凝血調節素(以下簡稱TM)是一種存在於血管內皮細胞之蛋白質，對高親和性之凝血酶(thrombin)受體(receptor)之蛋白質C之活性化具有促進作用。此凝血調節素首先由N.L.Esmon發現(J.Biol. Chem. 257: 859-864, 1982)。TM與凝血酶以1:1之比例結合，在Ca⁺²之存在下可使蛋白質C活化，並使與TM結合之凝血酶的血纖維蛋白原(fibrinogen)凝固作用、血小板活性化等所有之血液凝固活性幾乎完全消失。而且TM亦顯示與內生性肝素(heparin)相同之作用，亦已知具有促進抗凝血酶Ⅲ抑制凝血酶之活性，係一種具有潛力之可供臨床應用之新型藥劑。

人類TM當初係由H.H.Salem等人由胎盤中分離純化(J. Biol. Chem. 259: 12246-12251, 1984)，不適合作為大量製備TM之材料。雖然人類TM之遺傳基因構造已由鈴木等人鑑定(EMBO J., 6: 1891-1897, 1987)，但是由於TM含有多量糖鏈，因此由遺傳工程方法合成含有完全與天然型TM之糖鏈相同之產物相當困難。

其後，山本等人(J. Biochem. 113:433-440, 1993)及D.E. Jackson等人(Eur. J. Biochem. 221: 1079~1087, 1994)由人尿中純化TM，此結果顯示人尿是天然型

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(2)

TM適切的純化原料。

關於由尿中純化TM之方法，山本等人係使用QAE-Sephadex，抗TM單株抗體管柱、以凝血酶為配位體(ligand)之親和性管柱、Sephadex G-200等進行純化而得者，然而此方法必須使用單株抗體，相當煩雜。另外，D. E. Jackson等人則使用DEAE-Sepharose，以凝血酶為配位體之親和性管柱、逆相HPLC等進行純化，然而逆向HPLC之收率極差，因此使用HPLC進行大量純化之方法不適當而有其問題存在。又，青木等人(特開63-30423)，國廣等人(特開03-218399)則以新鮮尿為材料，採用離子交換層析法，凝血酶結合之親合性管柱、膠滲等方法純化TM。然而根據本發明人等之經驗，發現尿中之TM含量並不固定，特別是當尿中之TM含量低時，此方法則不夠理想。因此有必要發一種簡便而有效之TM純化方法。

發明解決之問題

有鑑於上述問題，本發明人等因而針對TM之純化方法進行檢討，以研究出不管尿中之TM含量如何均能獲得高度純化之TM的純化方法。

解決問題之方法

本發明人等為解決上述問題，經不斷深入研究之結果，發現使用羥基磷灰石作為吸着劑之層析法是一種純化凝血調節素(TM)極為有效之方法，因而完成本發明。

本發明係以使用羥基磷灰石作為吸着劑之層析法純化人尿中之凝血調節素為特徵之凝血調節素之純化方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(3)

本發明方法所使用之原料為含有人尿中凝血調節素之試料，可為原尿或經硫酸銨分畫後之濃縮物，其來源並無特別限制，但是較好是盡量使用經過陰離子交換層析，凝血酶結合之親和性層析等預先精製處理過之原料。

羥基磷灰石可使用市售之產品[例如生化學工業(株)、和光純藥(株)等公司之產品]。

又，原料量少時可使用製備用或分析用之HPLC，例如TSKgel HA-1000(東曹(株)公司)、KBC系管柱(高研公司)等。

羥基磷灰石填入管柱後先以調整為pH5-8、較好是pH6-7之1~30mM，較好是5~10mM之磷酸系緩衝液將管柱平衡。此時使用之平衡液可添加氯化鈣、氯化鈉、氯化鉀、氯化鎂等等塩類以提高效果。最好是使用1mM以下之氯化鈣。

其次為將用以取代前述緩衝液之原料添加至管柱，以同一緩衝液充分洗淨。待280nm之吸光度充分地降低後，以磷酸之直線梯度濃度洗提。TM之純化以使用5~300mM之梯度濃度較適當，TM最先溶出(磷酸濃度為50~100mM之範圍)，然後繼續溶出不純物。又，使用開放式管柱時，較好是使用細長之管柱，可得良好之分離效果。本工程純化完成後若尚含有雜質，可續採用膠滲法進行最後之純化。使用本發明之羥基磷灰石作為吸着劑進行管柱層析時，即使是使用比活性低之原料，純化後亦可獲得與使用高比活性原料時同等程度之純化產物，此乃其特點。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(4)

本發明方法亦可配合，例如，離子交換層析、凝血酶結合之親和性層析、膠濾層析等其他層析方法來純化人尿之凝血調節素。

又，有關各純化製程之TM活性係以下列方法測定。緩衝液A[含有0.1M氯化鈉、3.5mM氯化鈣之20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)]30 μ l，人類蛋白質C溶液[以緩衝液B(於緩衝液A中溶有0.1% BSA之溶液)調配之100 μ g/ml溶液]10 μ l，與試料或標準試料10 μ l混合後再添加人類凝血酶溶液(以緩衝液B調配之4U/ml溶液)50 μ l，然後於37 $^{\circ}$ C反應30分鐘。然後再添加人類抗凝血酶III溶液[以緩衝液C(含有0.1M氯化鈉、1mM氯化鈣之50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5))調配成50 μ g/ml之溶液]150 μ l、肝素溶液(以緩衝液C調配成2U/ml之溶液)50 μ l，於37 $^{\circ}$ C反應15分鐘。添加基質溶液[組套S-2366(第一化學(株))25mg溶於23.19ml之緩衝液C之溶液]600 μ l，於37 $^{\circ}$ C反應20分鐘，然後添加100 μ l之50%乙酸溶液停止反應。測定405nm之吸光值，根據標準試料之值算出試料中之TM含量。(標準試料係由兔子肺臟之TM以緩衝液B稀釋成2、5、10、20、40mU/ml使用)。

實施例

以下以實施例具體說明本發明之方法，但本發明並非受限於實施例。

實施例1

將以下兩批不同人尿原料各2000L進行純化，並比較其結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

將新鮮人尿 2000L 調整為 pH5.5，添加 0.5% (W/V) 幾丁聚糖 (Chitosan) 作為吸着劑並予攪拌。於 pH5.5 保持 30 分鐘，過濾，以水洗淨，然後將其懸浮於 5% 之硫酸銨溶液 (pH10.5) 中，於室溫攪拌 1 小時。過濾、洗淨、將吸着之成分溶出，然後以 60% 飽和度之硫酸銨溶液進行區分，回收沉澱部分。將所得沉澱溶於 20mM 之 Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0)，以同一緩衝液進行透析，然後加至以同一緩衝液預先平衡之 DEAE-Toyopearl 650M 管柱 (樹脂量 1.2L, 11.5×11cm) (東曹 (株) 公司)。以同一緩衝液洗淨管柱，然後以含有 0.3M 氯化鈉之相同緩衝液洗提。收集此洗提部分，以 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 稀釋 3 倍，添加氯化鈣使其最終濃度為 5mM。然後將其加至預先以含有 0.1M 氯化鈉、5mM 氯化鈣之 20mM 的 Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 平衡之 DIP-凝血酶結合之親和性管柱上 (樹脂量 40ml, 2.5×8cm)，以同一緩衝液洗淨，然後以含有 2M 氯化鈉、10mM EDTA 之 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 溶出。將溶出區分以含有 0.4mM 氯化鈣、0.9% 氯化鈉之 5mM 磷酸鈉緩衝液 (pH6.8) 進行透析，然後將其加至預先以相同緩衝液平衡之羥基磷灰石管柱 (樹脂量 20ml, 1.0cm×25cm) [生化學工業 (株)]。以同一緩衝液洗淨，然後進行 5~300mM 之磷酸鈉直線濃度梯度洗提，結果如第 1 圖 (Lot.1) 及第 2 圖 (Lot.2) 所示，TM 最先呈陡峭之波峯溶出，然後不純物再接着被溶出。將活性區分濃縮，然後加至預先以含有 0.9% 氯化鈉之 25mM 磷酸鈉緩衝液 (pH7.0) 平衡之 Sephacryl S-300 管柱 (樹脂量 80ml, 1.5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(6)

cm×90cm)[法瑪西亞(Pharmacia)公司],以同一緩衝液洗提。兩次之純化結果如表1所示。結果顯示,在使用羥基磷灰石管柱處理前之比活性低之原料經過上述純化處理後亦可獲得高比活性之產物。又,最終之純化產物經還原及非還原條件之SDS-PAGE(聚丙烯醯胺電泳)分析之結果如第3圖所示,圖中結果顯示任一Lot之TM均具有兩個接近之特徵展開帶(還原條件下之分子量約7萬左右)。

表 1

	總活性 (U)	回收率 (%)	比活性 (U/mg)	純化倍率 (倍)
羥基磷灰石管 柱層析處理前 (Lot.1)	5556	100	446.3	1.0
羥基磷灰石管 柱層析處理後 (Lot.1)	4483	81	1306.9	2.9
羥基磷灰石管 柱層析處理前 (Lot.2)	3071	100	28.7	1.0
羥基磷灰石管 柱層析處理後 (Lot.2)	2565	84	674.6	23.5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(7)

實施例 2

為了確認上述經純化之產物確實為 TM，因此分析調查其胺基酸組成及 N 端之胺基酸序列。又，胺基酸組成係採用 6N 鹽酸進行水解後以胺基酸分析儀(貝克曼公司製造)進行分析；N 端胺基酸序列係以蛋白質序列分析儀 473A [應用生物系統 (Applied Bio System) 公司製造] 進行分析。

胺基酸組成分析結果如表 2 所示，N 端胺基酸序列如下所示。此二結果均與已知報告相一致，確定上述之純化產物確實為人類 TM。

N 端之胺基酸之序列：Ala-Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln-

表 2

	純化 TM	參考值
Asx	47.0	47
Thr	18.2	19
Ser	23.2	24
Glx	55.1	50
Pro	49.6	43
Gly	50.8	46
Ala	52.7	52
Cys	N. D.	46
Val	24.6	25

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明（8）

Met	4.9	4
Ile	11.3	13
Leu	34.0	32
Tyr	9.5	10
Phe	16.5	16
Lys	3.0	3
His	11.0	12
Arg	17.2	20
Trp	N.D.	6

N.D.: 未檢出。

參考值：由 TM 之 Ala 1-Asp 468 部分之胺基酸序列計算而得之值。

(Asx: Asp+Asn, Glx: Glu+Gln)

發明之效果

根據本方法，不僅可容易地藉由吸着性之羥基磷灰石層析法以高倍率效果濃縮純化人尿中之凝血調節素，而且在使用低比活性之凝血調節素試料時亦可純化得比使用高比活性試料時更好之純化倍率。

圖之簡單說明

第 1 圖：於實施例 1 中，將含有人尿中凝血調節素之試料 (Lot.1) 經由羥基磷灰石吸着後，以磷酸鈉直線梯度濃度洗提凝血調節素之溶離圖。

第 2 圖：於實施例 1 中，使用 Lot.2 試料時依圖 1 同樣方

五、發明說明(9)

式操作之凝血調節素的溶離圖。

第3圖：實施例1製得之人尿中凝血調節素純化產物在還原及非還原條件下之SDS-聚丙烯醯胺電泳結果之照片，其中

第1列．為分子量標識品(94,67,43,30,20.1 kDa)，

第2列．TM(Lot.1)(還原)

第3列．TM(Lot.2)(還原)

第4列．TM(Lot.1)(非還原)

第5列．TM(Lot.2)(非還原)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：利用羥基磷灰石管柱純化人尿中凝
血調節素(thrombomodulin)之方法

本發明提供一種人尿中凝血調節素之純化方法，其特
徵為：使含有人尿中凝血調節素之試料溶液經填充有羥基
磷灰石之管柱在 pH5 至 8 條件下吸着凝血調節素，然後使用
磷酸之梯度濃度洗提使被吸着之凝血調節素自羥基磷灰石
解吸(desorption)。

採用此簡單操作可純化人尿中之凝血調節素，且即使
是純化凝血調節素含量低之原料時，亦可純化得比凝血調
節素含量高之原料時還高之純化倍率。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱：METHOD FOR PURIFYING HUMAN URINARY
THROMBOMODULIN BY USING HYDROXYAPATITE)
COLUMN

The present invention provides a method for purifying human urinary thrombomodulin by using hydroxyapatite column, which comprises passing a sample solution containing human urinary thrombomodulin through a hydroxyapatite column at a pH of from 5 to 8 to absorb the thrombomodulin, then eluting the thrombomodulin absorbed on the hydroxyapatite column with a gradient concentration of phosphoric acid to desorb the thrombomodulin.

The present invention permits human urinary thrombomodulin to be purified by a simple and practical procedure, while it enables even a starting material with a lowered content of thrombomodulin to be purified by greater purification rate than the one with a high content of thrombomodulin.

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：利用羥基磷灰石管柱純化人尿中凝
血調節素(thrombomodulin)之方法

本發明提供一種人尿中凝血調節素之純化方法，其特
徵為：使含有人尿中凝血調節素之試料溶液經填充有羥基
磷灰石之管柱在 pH5 至 8 條件下吸着凝血調節素，然後使用
磷酸之梯度濃度洗提使被吸着之凝血調節素自羥基磷灰石
解吸(desorption)。

採用此簡單操作可純化人尿中之凝血調節素，且即使
是純化凝血調節素含量低之原料時，亦可純化得比凝血調
節素含量高之原料時還高之純化倍率。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱：METHOD FOR PURIFYING HUMAN URINARY
THROMBOMODULIN BY USING HYDROXYAPATITE)
COLUMN

The present invention provides a method for purifying human urinary thrombomodulin by using hydroxyapatite column, which comprises passing a sample solution containing human urinary thrombomodulin through a hydroxyapatite column at a pH of from 5 to 8 to absorb the thrombomodulin, then eluting the thrombomodulin absorbed on the hydroxyapatite column with a gradient concentration of phosphoric acid to desorb the thrombomodulin.

The present invention permits human urinary thrombomodulin to be purified by a simple and practical procedure, while it enables even a starting material with a lowered content of thrombomodulin to be purified by greater purification rate than the one with a high content of thrombomodulin.

訂

線

88. 8. 10
年 月 日

修
補
充

408129 公 告 本

H3

第 85113059 號 專 利 申 請 案

申 請 專 利 範 圍 修 正 本

(88年 8月 10 日)

1. 一種人尿中凝血調節素之純化方法，其特徵為：使含有人尿中凝血調節素之試料溶液經填充有羥基磷灰石之管柱在 pH5 至 8 條件下吸着凝血調節素，然後使用磷酸之梯度濃度洗提使被吸着之凝血調節素自羥基磷灰石解吸 (desorption)。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，含有凝血調節素之試料係人尿原液或其硫酸銨區分濃縮物，或經由陰離子交換層析或凝血酶結合之親和性層析預先純化處理者。
3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，係與離子交換層析，凝血酶結合之親和性層析，以及膠濾層析等之至少一種以上之方法配合者。

附
件
一

88. 8. 10
年 月 日

修
補
充

408129 公 告 本

H3

第 85113059 號 專 利 申 請 案

申 請 專 利 範 圍 修 正 本

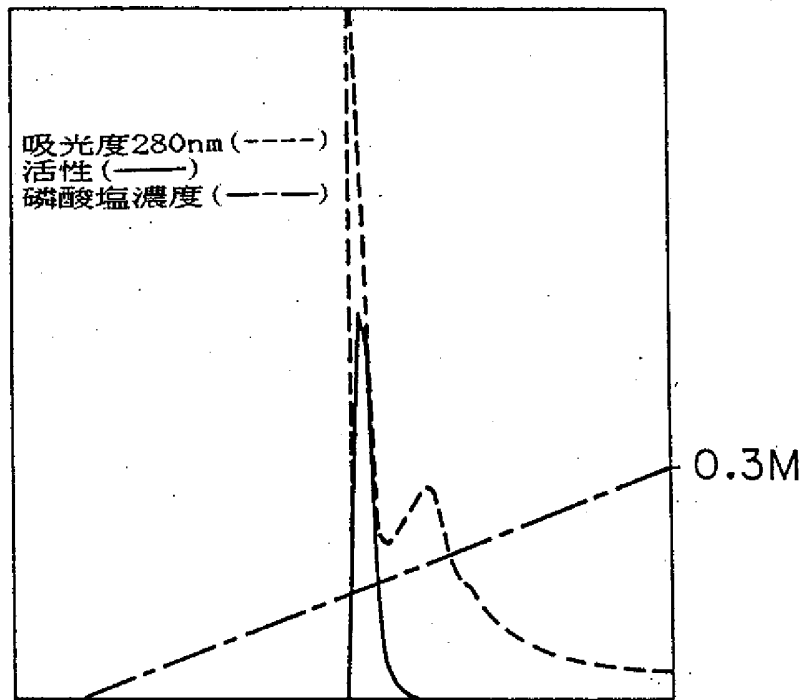
(88年 8月 10 日)

1. 一種人尿中凝血調節素之純化方法，其特徵為：使含有人尿中凝血調節素之試料溶液經填充有羥基磷灰石之管柱在 pH5 至 8 條件下吸着凝血調節素，然後使用磷酸之梯度濃度洗提使被吸着之凝血調節素自羥基磷灰石解吸 (desorption)。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，含有凝血調節素之試料係人尿原液或其硫酸銨區分濃縮物，或經由陰離子交換層析或凝血酶結合之親和性層析預先純化處理者。
3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，係與離子交換層析，凝血酶結合之親和性層析，以及膠濾層析等之至少一種以上之方法配合者。

附
件
一

408129

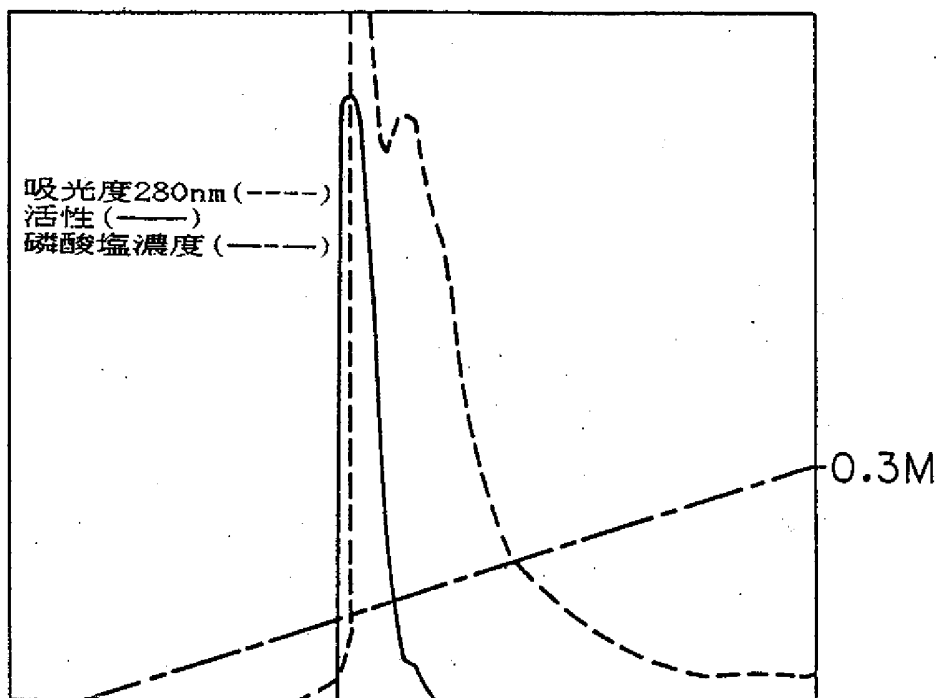
Lot.1



第1圖

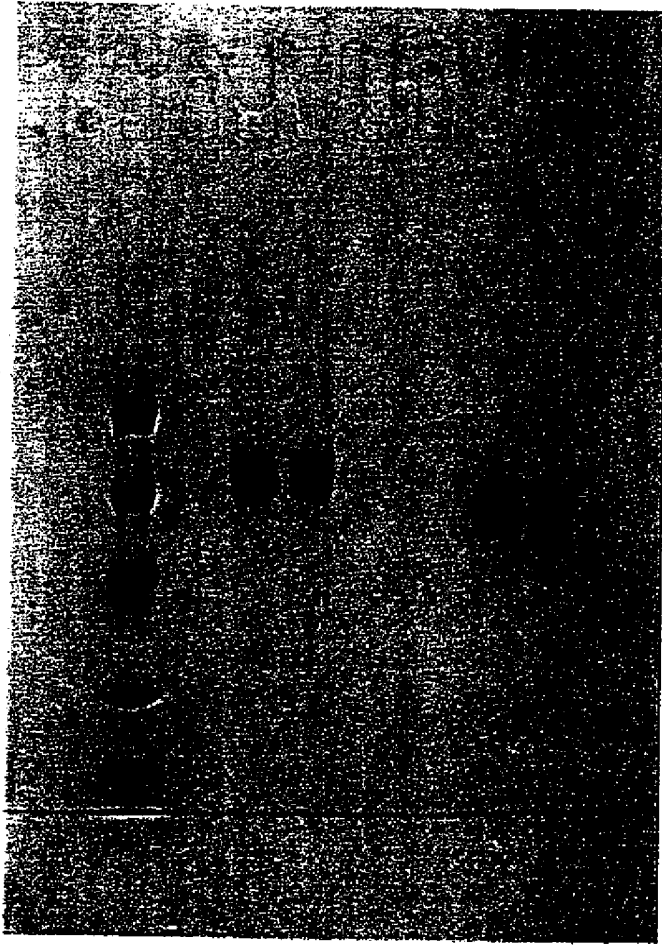
408129

Lot.2



第2圖

408129



第 3 圖