(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3929484号
(P3929484)
(45)発行日　平成19年6月13日(2007.6.13)　(24)登録日　平成19年3月16日(2007.3.16)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/81	(2006.01)	C07K	14/81	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
A61K 38/55	(2006.01)	A61K	37/64	
A61P 7/04	(2006.01)	A61P	7/04	

請求項の数 15　(全 43 頁)

(21)出願番号　特願平7-509258
(86)(22)出願日　平成6年9月12日(1994.9.12)
(65)公表番号　特表平9-502613
(43)公表日　平成9年3月18日(1997.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/010145
(87)国際公開番号　WO1995/007986
(87)国際公開日　平成7年3月23日(1995.3.23)
審査請求日　平成13年8月24日(2001.8.24)
(31)優先権主張番号　08/121,004
(32)優先日　平成5年9月14日(1993.9.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフオルニア・９４０８０－４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生
(72)発明者　ラザルス，ロバート・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア９４０３０、ミルブレイ、ヒルクレスト・ブールバード２３７番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】エコチンおよびその同族体を含む医薬的組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインおよびヒト白血球エラスターゼ（ＨＬＥ）より選択されるセリンプロテアーゼを阻害する、セリンプロテアーゼ阻害剤であって、該セリンプロテアーゼ阻害剤が、式ＩＶ：
Ｒ1-Ｓｅｒ-Ｔｈｒ-Ｐ1-Ｍｅｔ-Ａｌａ-Ｃｙｓ-Ｒ２（配列番号４）（ＩＶ）

［ここに、Ｐ１は、ＡｒｇおよびＬｙｓよりなる群から選択される天然のアミノ酸残基であり；
Ｒ１はエコチンのアミノ酸残基１～８１を示し；
Ｒ２はエコチンのアミノ酸残基８８～１４２を示す］
で示されるか、または医薬的に許容できるその塩であるセリンプロテアーゼ阻害剤。
【請求項２】
（１）式：
Ｃｙｓ-Ａｓｎ-Ｌｅｕ-Ｈｉｓ-Ａｒｇ-Ｌｅｕ-Ｇｌｙ-Ｇｌｙ-Ｌｙｓ-
Ｌｅｕ-Ｇｌｕ-Ａｓｎ-Ｌｙｓ-Ｔｈｒ-Ｌｅｕ-Ｇｌｕ-Ｇｌｙ-Ｔｒｐ-
Ｇｌｙ-Ｔｙｒ-Ａｓｐ-Ｔｙｒ-Ｔｙｒ-Ｖａｌ-Ｐｈｅ-Ａｓｐ-Ｌｙｓ-
Ｖａｌ-Ｓｅｒ-Ｓｅｒ-Ｐｒｏ-Ｖａｌ-Ｓｅｒ-Ｔｈｒ-Ｐ1-Ｍｅｔ-
Ａｌａ-Ｃｙｓ
（式中、Ｐ１はＡｒｇおよびＬｙｓより選択される天然のアミノ酸残基である）

によって表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
および
（２）（１）のポリペプチドの医薬的に許容し得る塩
よりなる群から選択される、第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、ヒト白血球エラスターゼ（ＨＬＥ）、カリクレインから選択されるセリンプロテアーゼを阻害できるセリンプロテアーゼ阻害剤。
【請求項３】
カルボキシおよびアミノ末端Ｃｙｓ残基がジスルフィド結合を形成する請求項２記載のセリンプロテアーゼ阻害剤。
【請求項４】
医薬的に許容しうる賦形剤および請求項１または２に記載の阻害剤を含有する組成物。
【請求項５】
血栓形成を阻害するためのものである請求項４記載の組成物。
【請求項６】
血栓溶解剤と組合せて投与される請求項５記載の組成物。
【請求項７】
抗凝固剤と組合せて投与される請求項５記載の組成物。
【請求項８】
組成物が第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインまたはＨＬＥを阻害するためのものである請求項４記載の組成物。
【請求項９】
請求項１または２記載の阻害剤をコードする分離されたＤＮＡ分子。
【請求項１０】
さらにＤＮＡ分子と作動可能に連結する発現制御配列を含む請求項９記載のＤＮＡ分子。
【請求項１１】
制御配列がそのベクターで形質転換した宿主細胞により認識されるものである請求項１０記載のＤＮＡ分子を含む発現ベクター。
【請求項１２】
プラスミドである請求項１１記載のベクター。
【請求項１３】
請求項１２記載のベクターで形質転換した宿主細胞。
【請求項１４】
セリンプロテアーゼ阻害物質をコードするＤＮＡ分子を宿主細胞中で発現させる方法であって、該阻害物質の発現に適する条件下に請求項１３記載の宿主細胞を培養する該方法。
【請求項１５】
さらに培養培地から阻害物質を回収することを含む請求項１４記載の方法。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
この発明はエコチンおよびエコチンの生物学的活性を持つその同族体、これら同族体をコードするＤＮＡ、および組換え物質、およびこれら同族体の製法に関する。本発明はさらに第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインまたはヒト白血球エラスターゼ（ＨＬＥ）の阻害を処方される疾患の処置のためのエコチンおよびその同族体を含む医薬的組成物に関する。
発明の背景
エコチン
エコチン（ｅｃｏｔｉｎ）は以前からセリンプロテアーゼである膵臓トリプシン（ウシ）、膵臓キモトリプシン（ウシ）、およびエラスターゼ（ブタ）を阻害することが知られている大腸菌の周縁細胞質蛋白質として特徴付けられ、哺乳類消化器管内に存在する外因性プロテアーゼからこの細菌を保護する役割を演じていると言われている（Ｃｈｕｎｇ，Ｃ．Ｈ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２５８巻：１１０３２～１１０３８［１９８３

年］）。これは大腸菌からの既知プロテアーゼ（たとえば、プロテアーゼＤｏ、Ｒｅ、Ｍｉ、Ｆａ、Ｓｏ、Ｌａ、Ｃｉ、Ｐｉまたは「プロテアーゼＩおよびＩＩ」と呼ばれるエステラーゼなど）はどれも阻害しない。さらに、カリクレイン、プラスミン、およびトロンビンを含む他の哺乳類セリンプロテアーゼおよび非哺乳類プロテアーゼであるパパイン（スルフヒドリルプロテアーゼ）、ペプシン（カルボキシルプロテアーゼ）、サブチリシン、およびテルモリシン（メタロープロテアーゼ）（Ｃｈｕｎｇ，Ｃ．Ｈ．など、前出）は阻害しないと報告されている。ＭｃＧｒａｔｈなど（ＭｃＧｒａｔｈ，Ｍ．Ｅ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６６巻：６６２０～６６２５頁［１９９１年］）はこの１４２アミノ酸残基で１６０９６Ｄａの阻害剤のクローニングおよび配列決定を報告し、切断可能なP_1～P_1'結合はＣｙｓ５０およびＣｙｓ８７が形成するジスルフィド結合ループ内に存在するＭｅｔ８４～Ｍｅｔ８５であることを報告した。これらの著者は一般に特定のセリンプロテアーゼ阻害剤のP_1残基はそのP_1残基側鎖とプロテアーゼの基質結合ポケットとの間に好ましい結合的相互作用が発生するようにそのプロテアーゼと適切に適合する必要があると指摘した。そこで、トリプシンはP_1にあるプラス帯電のＬｙｓおよびＡｒｇを求め、キモトリプシンはP_1にある大きい親水性のＴｙｒ、Ｐｈｅ、ＬｅｕおよびＭｅｔを求め、およびエラスターゼは小さい親水性のＬｅｕおよびＶａｌを求めることが知られているので、エコチンのようにたった一個の阻害剤がこれら３個全てのプロテアーゼを強力に阻害できるのは驚異に値する。このように著しく異なるP_1結合ポケットを持つこれら膵臓プロテアーゼを阻害するエコチンの能力は、プロテアーゼ３個全てにより明瞭に許容されるが、相当な結合エネルギーを発生するP_1のＭｅｔ残基に起因するとされている。膵臓プロテアーゼ３個に汎阻害を示し、P_1にＭｅｔを持つ、他のセリンプロテアーゼ阻害剤にはある種のカザール型阻害剤およびα_1－プロテイナーゼ阻害剤（時にはα_1－抗トリプシンとも呼ばれる）を含む。

α_1－プロテイナーゼ阻害剤のようなセルピン類（ｓｅｒｉｎ・ｐｒｏｔｅａｓｅ・ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ）は、血栓症、ショックおよび炎症における蛋白質分解を制御する治療的潜在能力の故に（Ｓｃｈａｐｉｒａ，Ｍ．など、Ｔｒｅｎｄｓ・Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｍｅｄ．、４巻：１４６～１５１頁［１９９１年］；Ｐａｔｓｔｏｎ，Ｐ．Ａ．など、、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６５巻：１０７８６～１０７９１頁［１９９０年］）、また、P_1残基での自然突然変異（Met^{358}－Arg^{358}；α_1－プロテイナーゼ阻害剤－ピッツバーグ）がプロテアーゼ阻害剤の特異性を劇的に変化させる故に（Ｓｃｏｔｔ，Ｃ．Ｆ．など、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、７７巻：６３１～６３４頁［１９８６年］）、種々のプロテアーゼを阻害する能力に対してよく特徴付けされている。P_1にＭｅｔ残基を持つα_1－プロテイナーゼ阻害剤は第Ｘａ因子（Ｔｒａｖｉｓ，Ｊ．など、Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．Ｈｏｐｐｅ－Ｓｅｙｌｅｒ、３６７巻：８３５～８５９頁［１９８６年］；たとえば８５７頁の表参照）；ならびに第ＸＩＩｆ因子（Ｓｃｏｔｔ，Ｃ．Ｆ．など、前出；６３２頁の表Ｉ参照）；およびカリクレイン（Ｓｃｏｔｔ，Ｃ．Ｆ．など、前出；Ｓｃｈａｐｉｒａ，Ｍ．など、前出、１４８頁の表４参照）には弱い阻害剤である。このような文献の記載とP_1Ｍｅｔを持つ他種プロテアーゼ阻害剤からの類推による推論とからエコチンが第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子またはカリクレインの良好な阻害剤であるとは予想しえなかったであろう。

第Ｘａ因子

第Ｘａ因子（ＦＸａ）はビタミンＫ依存性のグリコシル化セリンプロテアーゼであって、血液凝固カスケード（図１参照）および止血維持における（Ｄａｖｉｅ，Ｅ．Ｗ．など、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、３０巻：１０３６３～１０３７０頁［１９９１年］）、（Ｍａｎｎ，Ｋ．Ｇ．など、Ｓｅｍｉｎ．Ｈｅｍａｔｏｌ．、２９巻：２１３～２２６頁［１９９２年］）基本的役割を果たしている。これはそのチモーゲンである第Ｘ因子から血液凝固の内因系経路か外因系経路かいずれかの活性化によって形成され、また、第Ｖａ因子、Ca^{2+}と適当なホスホリピド表面との存在下に、プロトロンビナーゼ複合体を形成する。この複合体はトロンビンを生成し、究極的には安定なフィブリン凝塊の形成に到る。ＦＸａは両血液凝固経路に共通なので、ＦＸａの阻害を標的とする抗凝血剤はフィブリンの

豊富な血栓の形成を予防しうるし、血栓症の処置に有用性を持つと思われる。
第Ｘａ因子は生体内では少なくとも２種の異なる血漿プロテアーゼ阻害剤であるアンチトロンビンＩＩＩおよび組織因子経路阻害剤、により制御されている。アンチトロンビンＩＩ（ＡＴＩＩＩ）はヘパリンまたは他種のグリコサミノグリカンの存在下にＦＸａ、トロンビンおよび他種血漿プロテアーゼの迅速で不可逆的な阻害を引き起こすセルピンである（Ｂｊｏｒｋ，Ｉ．とＤａｎｉｅｌｓｓｏｎ，Å．、「プロテイナーゼ阻害剤（Ｂａｒｒｅｔｔ，Ａ．Ｊ．とＳａｌｖｅｓｅｎ，Ｇ．編）」中、４８９～５１３頁、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ［１９８６年］）。

ＡＴＩＩＩはＡｒｇ－ＳｅｒをＰ$_1$－Ｐ$_1$'残基に含む。ヘパリン介在ＡＴＩＩＩ阻害の機序はＡＴＩＩＩの配座変化か３重複合体形成かのいずれかを含むと思われている（Ｂｊｏｒｋ，Ｉ．とＤａｎｉｅｌｓｓｏｎ，Å．、前出）。

組織因子経路阻害剤（ＴＦＰＩ）は直列クニッツ・ドメイン３個を含む遅く強固に結合するＦＸａ阻害剤の蛋白質である。ＴＦＰＩはＦＸａ依存性の様式で組織因子・第ＶＩＩａ因子（ＴＦ・ＦＶＩＩａ）複合体も阻害する（Ｂｒｏｚｅ・Ｊｒ．，Ｇ．Ｊ．など、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２９巻：７５３９～７５４６頁［１９９０年］）。試験管内でのＴＦＰＩの性質を基にして、これはフィードバック機序によって組織因子が誘発する（外因系）血液凝固経路を制御していると思われている（Ｂｒｏｚｅ・Ｊｒ．，Ｇ．Ｊ．、Ｓｅｍｉｎ．Ｈｅｍａｔｏｌ．、２９巻：１５９～１６９頁［１９９２年］）。

アンチスタシンとダニ抗凝血ペプチドとは、近年に報告された外来性の強力なＦＸａ阻害剤２種である。アンチスタシンはメキシコのヒルであるＨ．ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓの唾液腺で発見された１１９残基蛋白質の強力なＦＸａ阻害剤である（Ｔｕｓｚｙｎｓｋｉ，Ｇ．Ｐ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６２巻：９７１８～９７２３［１９８７年］）。これは可逆的に遅く強固に結合する阻害剤で、その解離定数推定値は０．３１と０．６２ｎＭとの間にある（Ｄｕｎｗｉｄｄｉｅ，Ｃ．Ｔ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６４巻：１６６９４～１６６９９頁［１９８９年］）。ダニ抗凝血ペプチド（ＴＡＰ）はダニであるＯ．ｍｏｕｂａｔａの唾液腺由来の６０残基蛋白質であって、これもＦＸａを可逆的に、かつ強力に阻害し、解離定数が０．１８と０．５９ｎＭとの間にある（Ｊｏｒｄａｎ，Ｓ．Ｐ．など、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２９巻：１１０９５～１１１００［１９９０年］）。アンチスタシンとＴＡＰとは双方とも兎モデルでは静脈の血栓症を阻害する（Ｖｌａｓｕｋ，Ｇ．Ｐ．など、Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ・ａｎｄ・Ｈｅｍｏｓｔａｓｉｓ、６５巻：２５７～２６２頁［１９９１年］）。ＦＸａの活性部位をブロックした特殊なＦＸａ阻害剤であるＤＥＧＲ－ＦＸａをヒヒ敗血症モデルに点滴すると、播種性静脈内凝固（ＤＩＣ）は予防したが、しかしながらＤＥＧＲ－ＦＸａはショックも器官損傷も予防しなかった（Ｔａｙｌｏｒ・Ｊｒ．，Ｆ．Ｂ．など、Ｂｌｏｏｄ、７８巻：３６４～３６８頁［１９９１年］）。

第ＸＩ因子

第ＸＩ因子（ＦＸＩＩ）は単鎖ポリペプチド鎖（５９６アミノ酸）を持つ分子量８００００Ｄａのグリコプロテインであって、正常な血漿中には約３０μｇ／ｍＬ（４００ｎＭ）の濃度で存在する。これはセリンプロテアーゼのチモーゲンであって、活性化されて第ＸＩＩａ因子（ＦＸＩＩａ）になるためには３５３－３５４ペプチド結合の切断を必要とする。第ＸＩＩ因子は血液凝固の内因系経路における最初の酵素であって（図１参照）、ヒト血漿をガラス、結合組織またはコラーゲンのようなマイナス荷電の表面、エンドトキシンおよび種々の他の内在性または外来性成分との接触により自働的に活性化される。高分子量キニノーゲンの存在下、第ＸＩＩａ因子はプレカリクレインをカリクレインに活性化し、また第ＸＩ因子を第ＸＩａ因子に活性化し、形成したカリクレインは第ＸＩＩ因子をＦＸＩＩａにさらに活性化する（図１参照）。第ＸＩａ因子は次に第ＩＸａ因子を活性化し、これが第ＶＩＩＩａ因子の存在下に第Ｘ因子を活性化して第Ｘａ因子とする。第Ｘ

ａ因子はプロトロンビンを活性化してトロンビンとし、これがフィブリノーゲンを切断してフィブリンとし、究極的には安定なフィブリン凝塊の形成に到る。第ＸＩＩａ因子は第ＶＩＩ因子を活性化し、これが組織因子の存在下に第Ｘ因子を第Ｘａ因子に活性化するとされている。第ＸＩＩａ因子は補体経路を活性化し、また走化性因子ペプチドの生成により好中球を活性化する。

第ＸＩＩａ因子のさらなる蛋白質分解的な切断で２８０００Ｄａのプロテアーゼである第ＸＩＩｆ因子（β－ＦＸＩＩａ）を与えるアミノ端末部分の除去を起こすことができる。第ＸＩＩａ因子および第ＸＩＩｆ因子はプレカリクレインを活性化してカリクレインとすることができるが、しかしながら、ＦＸＩＩｆはもうマイナス荷電表面には結合できず、第ＸＩ因子の活性化については少なくとも１００倍は弱い。

セルピン族のプロテアーゼ阻害剤に属する天然起源のヒト蛋白質阻害剤であるＣ１阻害剤はＦＸＩＩａに不可逆的に結合し、一次的な生理学的阻害剤であり、血漿の阻害作用の＞９０％に相当する。Ｃ１阻害剤はそのP_2－P_1位にＡｌａ－Ａｒｇ残基を含む（下記α_1－プロテイナーゼ阻害剤－ピッツバーグと比較）。アンチトロンビンＩＩＩは第ＸＩＩａ因子も阻害できるが、しかしながら、阻害速度はトロンビンまたは第Ｘａ因子よりもかなり遅い。

第ＸＩＩａ因子の外来性阻害剤は多数が確認されている。カボチャはＣＭＴＩとも呼ばれる２９アミノ酸の小さな阻害剤を含むが、これは第ＸＩＩａ因子の阻害剤で、ＣＭＴＩ－ＩＩＩに対するK_iは３ｎＭであった（Ｗｙｎｎ，Ｒ．とＬａｓｋｏｗｓｋｉ・Ｊｒ．，Ｍ．、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．、１６６巻：１４０６～１４１０頁［１９９０年］）。この阻害剤（カボチャ種子Ｈａｇｅｍａｎ因子阻害剤とも呼ばれる）は血漿カリクレイン、膵臓カリクレインまたはトロンビンは阻害しないが、プラスミンおよび第Ｘａ因子は弱く阻害した（Ｈｏｊｉｍａ，Ｙ．など、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２１巻：３７４１～３７４６頁［１９８２年］）。ＣＭＴＩ族阻害剤のP_1残基はＡｒｇまたはＬｙｓである。これに加えて、トウモロコシはトリプシンと第ＸＩＩａ因子のみの阻害が公知である１１２残基阻害剤を含むが、このP_1残基はＡｒｇである（Ｍａｈｏｎｅｙ，Ｗ．Ｃ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２５９巻：８４１２～８４１６頁［１９８４年］）。

第ＸＩＩ因子のモノクローナル抗体（Ｃ６Ｂ７）の一つは大腸菌が誘発した敗血症ヒヒのモデルで観察される不可逆的な低血圧を予防し、無処置群と比較して生存期間を延長することが証明された。接触経路の活性化はＨＭＷＫの減少およびα_2－マクログロブリン－カリクレイン複合体の増加を明示した。しかしながら、血小板、フィブリノーゲンおよび第Ｖ因子水準の低下により証明される播種性静脈内血液凝固（ＤＩＣ）は予防しなかった（Ｐｉｘｌｅｙ，Ｒ．Ａ．など、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、９１巻：６１～６８頁［１９９３年］）。

ＡｒｇをP_1位に、ＡｌａをP_2位に含むα_1－プロテイナーゼ阻害剤の突然変異型の一つ（α_1－プロテイナーゼ阻害剤－ピッツバーグ）はＣ１阻害剤と比較してＦＸＩＩｆおよびカリクレインのさらに強い阻害剤であり、これらプロテアーゼに対する現在公知の天然阻害剤の中で最も強力であることが証明されている（Ｓｃｈａｐｉｒａ，Ｍ．など、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、８０巻：５８２～５８５頁［１９８７年］；Ｐａｔｓｔｏｎ，Ｐ．Ａ．など、前出）。この突然変異型で処置されたラットでは第ＸＩＩａ因子の注射による低血圧が部分的に予防された。

カリクレイン

プレカリクレインは分子量８００００Ｄａのポリペプチド単鎖からなるグリコプロテインであり、正常な血漿中には約５０μｇ／ｍＬ（６００ｎＭ）の濃度で存在する。血液中ではプレカリクレインの７５％はＨＭＷＫに結合して循環している。プレカリクレインはセリンプロテアーゼのチモーゲンであって、第ＸＩＩａにより活性化されてカリクレインを形成することができる。カリクレインはジスルフィド結合を通して連結している４３０００および３３０００～３６０００Ｄａのポリペプチド鎖２本からなる。カリクレインの軽鎖は酵素ドメインを含むが、一方、重鎖は血液凝固の表面依存的な活性化のために必要で

あるように思われる。
カリクレインはＨＭＷＫを切断してブラジキニン（強力な血管拡張剤および内皮細胞活性化剤）を形成し、プロウロキナーゼおよびプラスミノーゲン（フィブリン溶解性）を活性化し、表面結合ＦＸＩＩおよびＦＸＩＩａの相互活性化にフィードバックすることができる（図１参照）。加えて、カリクレインは好中球を刺激してエラスターゼの放出を起こすことができる。第ＸＩＩａ因子とカリクレインとは両者ともフィブリン分解を起こすプラスミン生成を導くことができる。
カリクレインの主たる生理学的阻害剤はＣ１阻害剤であって、不可逆的阻害を起こす。精製系では両蛋白質はカリクレインの異なる部位に結合するにも拘らずＨＭＷＫはＣ１阻害剤による阻害からカリクレインを保護することが明示されている。α_2－マクログロブリンは別種の主なカリクレイン阻害剤である。アンチトロンビン－ＩＩＩもカリクレインを阻害できるが、しかしヘパリン存在下でさえ、遅い。α_2－アンチプラスミンおよびα_1－プロテイナーゼ阻害剤はカリクレインの弱い阻害剤である。
カリクレインの外来性蛋白質阻害剤には血漿カリクレインならびにプラスミンおよび他種セリンプロテアーゼを可逆的に阻害する塩基性膵臓トリプシン阻害剤（ＢＰＴＩ、アプロチニン）を含み、ＢＰＴＩのP_1残基はＬｙｓである。ＢＰＴＩは急性膵臓炎患者の処置に使用されている（Ｆｒｉｔｚ，Ｈ．とＷｕｎｄｅｒｅｒ，Ｇ．、Ａｒｚｎｅｉｍ．－Ｆｏｒｓｃｈ．Ｄｒｕｇ・Ｒｅｓ．、３３巻：４７９～４９４頁［１９８３年］）。アプロチニンの使用とその接触経路への関与の可能性とは（下記）術後出血の軽減（Ｒｏｙｓｔｏｎ，Ｄ．、Ｂｌｏｏｄ・Ｃｏａｇ．Ｆｉｂｒｉｎｏｌ．、１巻：５５～６９頁［１９９０年］）および心肺バイパス手術について（Ｆｕｈｒｅｒ，Ｇ．など、Ｂｌｏｏｄ・Ｃｏａｇ．Ｆｉｂｒｉｎｏｌ．、３巻：９９～１０４頁［１９９２年］）に報告がある。同様に、大豆トリプシン阻害剤はブラジキニン生成を阻害し、エンドトキシンでラットに誘発した初期低血圧を阻害することが証明されている（Ｋａｔｏｒｉ，Ｍ．など、Ｂｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、９８巻：１３８３～１３９１頁［１９８９年］）。
ヒト白血球エラスターゼ
ヒト白血球エラスターゼ（ＨＬＥ）は好中球のアズール好性顆粒中に存在する豊富なセリンプロテアーゼである（Ｂｉｅｔｈ，Ｊ．Ｇ．、「マトリックス蓄積の制御（Ｍｅｃｈａｍ，Ｒ．Ｐ．編）」中、２１７～３２０頁、Ａｃａｄｅｍｉｃ・Ｐｒｅｓｓ、Ｏｒｌａｎｄｏ［１９８６年］；Ｓｔｅｉｎ，Ｒ．Ｌ．など、Ａｎｎｕ．Ｒｅｐ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、２０巻：２３７～２４６頁［１９８５年］）。これは結合組織蛋白質のプロテイン分解的分解および、たとえば気腫、慢性気管支炎、膀胱繊維症、リューマチ性関節炎、ＡＲＤＳおよび敗血症のような疾患の病因に関連するとされている（Ｇａｄｅｋ，Ｊ．Ｅ．とＰａｃｈｔ，Ｅ．Ｒ．、Ｌｕｎｇ、補：５５２～５６４頁［１９９０年］；Ｊａｎｏｆｆ，Ａ．、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．、３６巻：２０７～２１６頁［１９８５年］；Ｊａｎｏｆｆ，Ａ．、Ａｍ．Ｒｅｖ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｄｉｓ．、１３２巻：４１７～４３３頁［１９８５年］）。ＨＬＥの制御にはα_1－プロテイナーゼ阻害剤（Ｈｅｉｄｔｍａｎｎ，Ｈ．とＴｒａｖｉｓ，Ｊ．、「プロテイナーゼ阻害剤（Ｂａｒｒｅｔｔ，Ａ．Ｊ．とＳａｌｖｅｓｅｎ，Ｇ．編）」中、４４１～４５６頁、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ［１９８６年］）、種々の粘液に見出される１０７残基蛋白質である粘膜プロテイナーゼ阻害剤または分泌性白血球プロテイナーゼ阻害剤（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｒ．Ｃ．とＯｈｌｓｓｏｎ，Ｋ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８３巻：６６９２～６６９６頁［１９８６年］）、および乾癬皮膚から分離された５７残基蛋白質であるエラフィン（Ｗｉｅｄｏｗ，Ｏ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６５巻：１４７９１～１４７９５頁［１９９０年］）を含む天然産プロテアーゼ阻害剤の多数が介在している（Ｔｒａｖｉｓ，Ｊ．、Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．、８４巻補６Ａ：３７～４２頁［１９８８年］）。炎症性反応の間にＨＬＥは好中球から放出され、その阻害剤が酸化的に不活化されて病原的ＨＬＥ関連蛋白質分解の増加に到る。こうして、別種のＨＬＥ阻害剤はこの酵素の病因的濃度に関連する疾患を制御するために有用であろう（Ｔｒａｖｉｓ，Ｊ．、Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．、前出；Ｚｉｍｍｅｒｍａｎ，Ｍ．とＰｏｗｅｒｓ，Ｊ．Ｃ．、「エラ

スチンとエラスターゼ（Ｌａｄｉｓｌａｓ，Ｒ．編）」中、１０９～１２３頁、ＣＲＣ・Ｐｒｅｓｓ、Ｂｏｃａ・Ｒａｔｏｎ［１９８９年］）。
ＨＬＥはフィブリン分解経路において重要な蛋白質の活性化または分解を含むフィブリン分解の制御に関連するとされている（Ｍａｃｈｏｖｉｃｈ，Ｒ．とＯｗｅｎ，Ｗ．Ｇ．、Ｂｌｏｏｄ・Ｃｏａｇ．Ｆｉｂｒｉｎｏｌ．、１巻：７９～９０頁［１９９０年］）。これに加えて、ＨＬＥはＴＦＰＩを第一クニッツ・ドメインと第二クニッツ・ドメインとの間で切断し、この蛋白質が組織因子・第ＶＩＩａ因子または第Ｘａ因子を阻害する性能を著しく低下させる（Ｈｉｇｕｃｈｉ，Ｄ．Ａ．など、Ｂｌｏｏｄ、７９巻：１７１２～１７１９頁［１９９２年］）ことが証明された。ＨＬＥは限定された蛋白分解により第ＶＩＩ因子も不活化するかもしれない（Ａｎｄｅｒｓｓｅｎ，Ｔ．など、Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔａｓｉｓ、７０巻：４１４～４１７頁［１９９３年］）。ＨＬＥは、たとえばアンチトロンビンＩＩＩ、ヘパリン補因子ＩＩ、およびＣ１阻害剤のようなセルピン類も不活化できる。それ故、ＨＬＥの阻害は血液凝固、接触活性化、および補体経路の調節において重要な役割を演じるであろう（図１参照）。

疾病における接触活性化経路

接触活性化は炎症および血液凝固の制御の部分的原因となる表面媒介経路である。この経路に関連する蛋白質には第ＸＩＩ因子（Ｈａｇｅｍａｎ因子）、プレカリクレイン（Ｆｌｅｔｃｈｅｒ因子）、高分子量キニノーゲン（ＨＭＷＫ）およびＣ１阻害剤を含む（Ｓｃｈｍａｉｅｒ，Ａ．Ｈ．など、「止血および血栓症：基礎的原理と臨床的実践（Ｃｏｌｍａｎ，Ｒ．Ｗ．、Ｈｉｒｓｈ，Ｊ．、Ｍａｒｄｅｒ，Ｖ．、Ｓａｌｚｍａｎ，Ｅ．Ｗ．編）」中、１８～３３頁、Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ・Ｃｏ．Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ［１９８７年］）。この血漿プロテアーゼ系の関与が敗血症ショック、成人呼吸困難症候群（ＡＲＤＳ）、播種性静脈内血液凝固（ＤＩＣ）および他の種々の病状を含む種々の臨床的兆候に明確な役割を果たすことが示唆されている（Ｃｏｌｅｍａｎ，Ｒ．Ｗ．、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．、３２０巻：１２０７～１２０９頁［１９８９年］；Ｂｏｎｅ，Ｒ．Ｃ．、Ａｒｃｈ．Ｉｎｔｅｒｎ．Ｍｅｄ．、１５２巻：１３８１～１３８９頁［１９９２年］）。

敗血症ショック

敗血症ショックは米国の広範囲な治療施設におけるヒトの死因中で、最も通常のものである（Ｐａｒｉｌｌｏ，Ｊ．Ｅ．など、Ａｎｎ．Ｉｎｔ．Ｍｅｄ．、１１３巻：２２７～２４２頁［１９９０年］；Ｓｃｈｍｅｉｃｈｅｌ，Ｃ．Ｊ．とＭｃＣｏｒｍｉｃｋ，Ｄ．、ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌ．、１０巻：２６４～２６７頁［１９９２年］）。これは通常、局所的な感染病巣から始まり、血流に侵入する。敗血症とショックとの発生はグラム陰性、グラム陽性細菌またはカビ微生物のいずれによる感染症から起きることができる。これらの生物は全て共通の循環器系機能障害型を誘導すると思われる。最近、敗血症ショック処置の第一次手段として攻撃的液体注入療法が受け入れられている。適当な液体の補給は高い心臓排出量および低い血管抵抗に関連する。処置にも拘らず、敗血症ショックは全身的血管抵抗の極端な低下および一般的な血流分布障害を招く。攻撃的療法はショックおよび死亡を約５０％の症例で逆転する。非常に低い血管抵抗から起きる応答不良の低血圧は液体注入では直せない。敗血症ショックで死亡するこれら対象中、約７５％は継続的低血圧で、残りは多臓器不全で死亡する（図１参照）。
敗血症ショックにおける心排出量増加および血管拡張は炎症媒介物質の作用に起因する。敗血症ショック、ＤＩＣおよび低血圧に到る実際の事象はまだ解明されていないが、多数の生理学的系の種々の成分間の既知の相互作用は図１に示すように、接触経路の活性化が敗血症ショック、多臓器不全、および死に誘導するのであろう（Ｂｏｎｅ，Ｒ．Ｃ．、前出）ことを示唆している。内因系血液凝固の接触系および補体系は敗血症および敗血症ショック、殊に致命的な敗血症ショックの症例、では過剰に活性化される。接触系は致死的なショックの病因中で一定の役割を果たすと思われている、たとえばブラジキニン、ＦＸＩＩａ、ＦＸＩＩｆ、およびＣ５ａのような多数の血管拡張媒介物質多数の生成に関与することができる。ブラジキニン、ＦＸＩＩａ、ＦＸＩＩｆは低血圧の強力な誘発剤である

が、一方、Ｃ５ａは血管拡張および血管浸透性の誘発剤である。非致死的ショックの間にはＦＸＩＩ、プレカリクレインおよび高分子量キニノーゲンの濃度は著明に低下するが、致死的敗血症ショックの間には最も極端におのおの正常値の約３０％、５７％および２７％にまで低下する。これらの変化は敗血症病状がグラム陽性かグラム陰性か何れの細菌によって起きたかに拘らず認められる。接触活性化経路にはフィブリン沈着および溶解ならびに好中球の活性化開始、補体の活性化および血圧の調節も含む。

肝臓疾患、ＤＩＣ、慢性腎不全、および腎炎症候群ではプレカリクレイン濃度の低下が観察される。敗血症ショックでは、カリクレイン－キニン系の成分が欠乏し、この系の活性化を示唆する。心臓性ショックの場合にはこうではないことが敗血症ショックではカリクレイン－キニン系が重要であることを示唆している（Ｍａｒｔｉｎｅｚ－Ｂｒｏｔｏｎｓ，Ｆ．など、Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔａｓ．、５８巻：７０９～７１３頁［１９８７年］）。

ＡＲＤＳ

ＡＲＤＳは複雑な肺合併症で、毎年米国で１５００００人が罹患し、死亡率は大体５０％である。白血球、血小板および血液凝固のプロテイン分解的経路および補体がＡＲＤＳを媒介する。ＡＲＤＳには接触活性化経路の活性化およびＣ１阻害剤の欠乏を含む。敗血症誘発ＡＲＤＳは外傷誘発ＡＲＤＳと比較して、さらに重症のＤＩＣおよびフィブリン分解、フィブリン分解産物の増加およびＡＴＩＩＩ濃度の低下に到る（Ｃａｒｖａｌｈｏ，Ａ．Ｃ．など、Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．、１１２巻：２７０～２７７頁［１９８８年］）。

播種性静脈内血液凝固

播種性静脈内血液凝固（ＤＩＣ）は組織損傷および侵入微生物に反応して起きる疾患であって、フィブリンの広範囲な沈着およびフィブリノーゲン濃度低下に特徴付けられる（Ｍｕｌｌｅｒ－Ｂｅｒｇｈａｕｓ，Ｇ．、Ｓｅｍｉｎ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈｅｍｏｓｔａｓｉｓ、１５巻：５８～８７頁［１９８９年］）。プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の延長がある。ＤＩＣは種々の疾患の臨床的セッティング中に観察される（Ｆｒｕｃｈｔｍａｎ，Ｓ．Ｍ．とＲａｎｄ，Ｊ．Ｈ．、「循環器系疾患における血栓症（Ｆｕｓｔｅｒ，Ｖ．とＶｅｒｓｔｒａｅｔｅ，Ｍ．編）」中、５０１～５１３頁、Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ［１９９２年］）。

低血圧、ＤＩＣおよび好中球活性化はすべて第ＸＩＩａ因子、血漿キニノーゲンおよびカリクレインの相互作用によって開始する。これら蛋白質３種のいずれかが欠乏すると血小板、他種血液凝固因子および内皮細胞に起因する系内での余剰のために止血性疾患には到らない。

敗血症ショックおよび関連疾患については、種々のサイトカイン拮抗剤、Ｍａｂｓ（エンドトキシン、組織因子、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、好中球など）、キニン拮抗剤、殺菌性浸透圧増加蛋白質、ＰＡＦ拮抗剤、Ｃ１阻害剤、ＤＥＧＲ－ＦＸａ、活性化プロテインＣ、その他多数の手法を含む多数の治療手段が確認されている。この病気の複雑な性質のため、複数の薬剤または複数の経路に影響する薬剤を包含する手法が敗血症ショックの処置では成功するであろう（Ｓｃｈｍｅｉｃｈｅｌ，Ｃ．Ｊ．とＭｃＣｏｒｍｉｃｋ，Ｄ．前出）。

それ故、この発明の目的の一つはこれら経路に影響される疾患の処置用に血液凝固、接触活性化、フィブリン分解、炎症、補体活性化および低血圧の経路にあるプロテアーゼを可逆的に阻害する強力なセリンプロテアーゼ阻害剤を提供することにある。この発明のその他の目的の一つは第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、カリクレインおよびＨＬＥを阻害することのできる強力な阻害剤を提供することである。それに加えて、もう一つの目的は医薬的利用のためにこれら阻害剤の合成的製法を提供することである。これらおよびその他の目的はこの出願全体を考慮すれば、自明であると思われる。

発明の要約

本発明によって前記目的は達成され、そこで、ここに第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインおよびヒト白血球エラスターゼ（ＨＬＥ）から選択したセリンプロテアーゼ

を阻害することのできる組成物であって、エコチン類似体、エコチン同族体から選択した精製ポリペプチドおよび式Ｉ～Ｖ：

R^1-P^3-P^2-P^1-$P^{1'}$-$P^{2'}$-$P^{3'}$-R^2（配列番号１）　Ｉ

R^1-Ｓｅｒ-P^2-P^1-$P^{1'}$-$P^{2'}$-Ｃｙｓ-R^2（配列番号２）　ＩＩ

R^1-Ｓｅｒ-Ｔｈｒ-P^1-$P^{1'}$-Ａｌａ-Ｃｙｓ-R^2（配列番号３）　ＩＩＩ

R^1-Ｓｅｒ-Ｔｈｒ-P^1-Ｍｅｔ-Ａｌａ-Ｃｙｓ-R^2（配列番号４）　ＩＶ

R^1-Ｓｅｒ-Ｔｈｒ-Ｍｅｔ-$P^{1'}$-Ａｌａ-Ｃｙｓ-R^2（配列番号５）　Ｖ

［式中、P^3、P^2、P^1、$P^{1'}$、$P^{2'}$および$P^{3'}$は同一または相違し、天然産アミノ酸残基から選択されるが、但し、P^3、P^2、P^1、$P^{1'}$、$P^{2'}$および$P^{3'}$はそれぞれが同時にＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｍｅｔ、ＭｅｔおよびＡｌａおよびＣｙｓではないものとする。R^1はエコチンのアミノ酸残基１～８１またはその保存的アミノ酸置換または欠失体を示す。R^2はエコチンのアミノ酸残基８８～１４２またはその保存的アミノ酸置換体または欠失体を示す。およびその医薬的に許容しうる塩］から選択した精製アミノ酸配列を含むものが提供される。好適な組成物は式ＩＶで示され、ここでは、P^1はＭｅｔ以外の天然起源アミノ酸残基であり、R^1はエコチンのアミノ酸残基１～８１を示し、R^2はエコチンのアミノ酸残基８８～１４２を示す。さらに好ましくは本発明の一態様において式ＩＶのP^1はＡｒｇ、Ｌｙｓ、Ａｌａ、Ａｓｐ、およびＧｌｕから選択する。ＦＸＩＩ、カリクレインまたはＦＸａの阻害を所望する時には、最も好適なP^1はＡｒｇまたはＬｙｓである。ＨＬＥの阻害を所望する時には、最も好適なP^1はＭｅｔ、Ｖａｌ、ＬｅｕまたはＡｌａである。

別種の好適な組成物は式Ｖで示され、ここでは$P^{1'}$はＭｅｔ以外の天然起源アミノ酸残基であり、R^1はエコチンのアミノ酸残基１～８１を示し、R^2はエコチンのアミノ酸残基８８～１４２を示す。

本発明のさらに別種の態様では式ＶＩ：

H_2N-Cys-Asn-Leu-His-Arg-Leu-Gly-Gly-Lys-

Leu-Glu-Asn-Lys-Thr-Leu-Glu-Gly-Trp-

Gly-Tyr-Asp-Tyr-Tyr-Val-Phe-Asp-Lys-

Val-Ser-Ser-Pro-Val-P^3-P^2-P^1-$P^{1'}$-$P^{2'}$-Cys-OH

（配列番号６）　ＶＩ　またはその保存的アミノ酸置換体

［式中、P^3、P^2、P^1、$P^{1'}$および$P^{2'}$は同一または相異なり、天然産アミノ酸残基から選択される。およびその医薬的に許容しうる塩］で示されるアミノ酸配列が提供される。好ましくはP^3はＳｅｒであり、P^2はＴｈｒであり、P^1はＬｙｓ、Ａｒｇ、Ｍｅｔ、Ｖａｌ、ＬｅｕまたはＡｌａであり、$P^{1'}$はＭｅｔであり、$P^{2'}$はＡｌａである。

この発明の組成物は、好ましくは第Ｘａ因子に対して１ｎＭまたはそれ以下、最も好ましくは１００ｐＭまたはそれ以下のK_i値を持つ。

この発明の組成物は、好ましくは第ＸＩＩａ因子に対して１ｎＭまたはそれ以下、最も好ましくは１００ｐＭまたはそれ以下のK_i値を持つ。

この発明の組成物は、好ましくは血漿カリクレインに対して１ｎＭまたはそれ以下、最も好ましくは１００ｐＭまたはそれ以下のK_i値を持つ。

この発明の組成物は、好ましくはＨＬＥに対して１ｎＭまたはそれ以下、最も好ましくは１００ｐＭまたはそれ以下のK_i値を持つ。

別の態様において、本発明はエコチン類似体、エコチン同族体および式Ｉ～ＶＩで示され

る精製アミノ酸配列から選択したポリペプチドを含む組成物の蛋白質成分をコードする分離した核酸、好ましくはＤＮＡ、を含む組成物を包含する。本発明はさらにＤＮＡ分子に作動可能に結合する発現制御配列、発現ベクター、好ましくは制御配列がそのベクターで形質転換された宿主細胞により認識されるそのＤＮＡ分子を含むプラスミド、およびそのベクターで形質転換された宿主細胞を包含する。

本発明の発現ベクターはｐＢＲ３２２、ｐｈＧＨ１、ｐＨＢＯ４７５、ｐＲＩＴ５、ｐＲＩＴ２Ｔ、ｐＫＫ２３３-２、ｐＤＲ５４０、ｐＰＬ-ラムダから選択してもよいが、最も好適なベクターはｐｈＧＨ１である。

本発明の発現ベクターを含む好適な宿主細胞は大腸菌Ｋ１２の２９４株（ＡＴＣＣ３１４４６）、大腸菌ＪＭ１０１株、大腸菌Ｂ株、大腸菌Ｘ１７７６株（ＡＴＣＣ３１５３７）、大腸菌ｃ６００株、大腸菌Ｗ３１１０株（Ｆ-、ガンマ-、原栄養株、ＡＴＣＣ２７３２５）、バシラス・サチリス、サルモネラ・ティフィムリウム、セラチア・マルセッセンスおよび緑膿菌から選択してもよいが、最も好適な宿主細胞は大腸菌Ｗ３１１０株（ＡＴＣＣ２７３２５）または、たとえばそのプロテアーゼ欠失株２７Ｃ７のような、誘導物である。

本発明の組成物は前記アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸配列を分離または合成する工程、その核酸配列を適当な宿主中にその核酸配列を発現することのできる適当な発現ベクターに結合する工程、その核酸配列を結合した発現ベクターでその宿主を形質転換する工程、選択した核酸配列がコードする蛋白質を宿主が発現する核酸配列発現に適当な条件下に宿主を培養する工程、を含む製法により製造しうる。この製法において、結合工程はさらに宿主がアミノ酸配列を分泌するのに適当な分泌シグナルと作動可能にその核酸が結合するように適当な発現ベクターに核酸を結合するように計画してもよい。分泌シグナルはエコチン、ｓｔＩＩ、ｌａｍＢ、ヘルペスｇＤ、ｌｐｐ、アルカリホスファターゼ、インベルターゼ、およびアルファ因子のリーダー配列から構成される群からも選択しうるが、好ましくはエコチンまたはｓｔＩＩであり、最も好ましくはエコチンのリーダー配列である。

本発明はさらにここに記載する組成物およびエコチン自体の治療的応用にまで展開する。すなわち、本発明は医薬的に許容される添加剤およびエコチン、エコチン類似体、エコチン同族体、および精製された式Ｉ～ＶＩで示されるアミノ酸配列を含む医薬的組成物を含む。

これらの応用は、例えばこの医薬的組成物の医薬的有効量を哺乳類に投与することを含む哺乳類における血栓形成阻害法を含む。この医薬的有効量は約０．００１ｎＭと１．０ｍＭとの間でもありうるが、好ましくは約０．１ｎＭと１００μＭとの間であり、最も好ましくは約１．０ｎＭと５０μＭとの間である。これに加えて、この医薬的組成物は、たとえば組織プラスミノーゲンアクチベータ、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼおよびこれらの修飾体のようなフィブリン溶解剤または血栓溶解剤の投与前、投与後、または投与と同時に投与してもよい。あるいは、この医薬的組成物は抗凝固剤と組合せて投与してもよい。

これに加えるに、他の応用には、例えばこの医薬的組成物の医薬的有効量をその哺乳類に投与することを含む第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインまたはＨＬＥの処方が指示される哺乳類の処置法も含む。このような症状には炎症、敗血症ショック、低血圧、ＡＲＤＳ、ＤＩＣ、心肺バイパス手術および外科手術後の出血なども含む。

【図面の簡単な説明】

図１．接触、血液凝固、フィブリン溶解、炎症および補体経路を調節する代表的な酵素および媒介物質の模式図。エコチン、エコチン同族体および類似体により強力に阻害されるセリンプロテアーゼを四角で囲んだ。

図２．エコチンプラスミドで形質転換した大腸菌から得た精製エコチンおよび粗製周辺細胞質蛋白質のＳＤＳ－ＰＡＧＥ。レーン１．会合Ｍｒ値×10^{-3}で示す分子量マーカー。レーン２．精製組換えエコチン、４μｇ。レーン３～７．エコチン突然変異体培養物からの周辺細胞質内容物２５μＬ、サンプル製法は本文に記載する。レーン８．２７Ｃ７株対

照（プラスミド不含）。レーン９．野生型エコチン培養物からの周辺細胞質内容物２５μＬ。各サンプルは適用前にβ－メルカプトエタノールで還元し、クーマジーブルーでゲルを発色させた。

図３．ＦＸａに対するエコチンの見掛けの平衡阻害定数測定。種々のエコチン濃度での精製野生型エコチンによるＦＸａの阻害。阻害活性は平衡時阻害濃度における阻害速度と非阻害速度との比率（活性比率）で表す。ＦＸａ濃度は３．３ｎＭである。見掛けの平衡解離値は等式１のデータについて非線形回帰分析によって決定し、K_i*４７ｐＭの値を得た。図示のデータは独立した測定３回の典型値である。

図４．エコチンとＦＸａとの会合ならびにエコチン・ＦＸａ解離速度の測定。実験条件、曲線適合法、および速度定数測定は本文に記載する。図Ａ．エコチンとＦＸａとの会合速度定数の測定。曲線はデータの等式４への非線形回帰分析の結果である。図Ｂ．ＨＬＥ存在下（●）およびＨＬＥ不在下（▲）におけるエコチンのＦＸａからの解離速度の測定。曲線はデータの等式６への非線形回帰分析の結果であるが、測定された速度は遊離［ＦＸａ］に比例する。

図５．ＦＸａおよびトリプシンによるエコチンの切断および反応性部位決定。標品は本文記載の通り室温で１３９時間インキュベーションし、還元して、１６％トリシンゲル上移動させ、ＰＶＤＦ上にブロットした。レーン１．トリプシン。レーン２．ＦＸａ。レーン３および４．エコチンと各々トリプシンかＦＸａ。レーン５．エコチン。レーン６および７．各々ＬＫＢおよびＡｍｅｒｓｈａｍ社の分子量マーカーで、会合Ｍｒ値×10^{-3}で示す。レーン４の下部バンドのアミノ末端配列（～６．２ｋＤａ）はＭＡ－ＰＤＧＫＫＥＫ（配列番号７）であった。レーン４の上部バンドのアミノ末端配列（～８．２ｋＤａ）はＡＥＳＶＱ（配列番号８）であって、エコチンのアミノ末端に対応する。

図６．ゲル濾過によるエコチン・ＦＸａ複合体の分子量測定。溶離容積／空隙容積の比率（V_e／V_0）をエコチン・ＦＸａ複合体（●）と分子量標準（○）とについて分子量の対数に対してプロットした。実線はデータに適合する最小自乗値を示す。エコチン・ＦＸａ複合体を（エコチン）$_2$・（ＦＸａ）$_2$複合体として計算値分子量１２４２００によりプロットする。選定した分子量は括弧内に示す。

図７．エコチンの螢光滴定。トリプトファンの螢光に対するエコチンの螢光の比率をエコチン濃度に対してプロットした。励起は２８０ｎｍで放射は３４０ｎｍで行った。曲線はデータの等式９への非線形回帰分析を示す。

図８．正常ヒト血漿中での血液凝固時間の延長。血液凝固時間の延長倍数をＴＦによる導入をＰＴ検定（●）およびエラルゴ酸による導入をＡＰＴＴ検定（■）で示す。無阻害血液凝固時間はＰＴおよびＡＰＴＴでは各々４８秒および３１秒であった。

発明の詳細な説明

第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインおよびＨＬＥの阻害検定で種々の化合物を評価した結果、大腸菌の周辺細胞質蛋白質であるエコチンがこれら酵素の阻害剤の一つであることを発見した。エコチンをさらにテストして見掛け（K_i*）または真（K_i）の解離定数により親和性を測定した。エコチンは解離定数１７ｐＭ、会合速度定数１．３５×$10^6$$M^{-1}$$s^{-1}$および解離速度定数６．５×$10^{-5}$$s^{-1}$を持ち、第Ｘａ因子の既知の最強力な阻害剤であることが判明した。エコチンは活性化部分トロンボプラスチン時間検定およびプロトロンビン時間検定でおのおの血液凝固時間を０．３μＭと２μＭとで約１０倍に延長した。エコチンはヒト血漿プロテアーゼであるトロンビン、組織因子・ＦＶＩＩａ、ＦＸＩａ、活性化プロテインＣ、プラスミンまたは組織プラスミノーゲンアクティベータ（ｔ－ＰＡ）には効果的な阻害を示さなかった。しかしながら、エコチンは第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインおよびヒト白血球エラスターゼ（ＨＬＥ）をおのおのK_i値２５ｐＭ、４１ｐＭおよび３３ｐＭで強力に阻害した。各１０μＭのエコチンとＦＸａとのインキュベーションで（エコチン）$_2$・（ＦＸａ）$_2$複合体を得ることがゲル濾過により測定された。エコチン単独での２量体化は螢光滴定で測定され、K_d３９０ｎＭを示した。ＦＸａはｐＨ４．０でエコチンをＭｅｔ８４とＭｅｔ８５との間で徐々に切断する。

この発見に基づき種々のアミノ酸残基、殊にP^3-P^2-P^1-$P^{1'}$-$P^{2'}$位のものを置換した

エコチン同族体を組換え的に製造した。P_1Ｍｅｔ８４残基をＡｒｇかＬｙｓかで置換すると、各々K_i値４ｐＭか７ｐＭを持つＦＸａ阻害剤に到達した。このP_1ＡｒｇおよびＬｙｓ突然変異体はトロンビン、ＦＸＩａ、活性化プロテインＣ、プラスミン、ＦＸＩＩａ、血漿カリクレイン、ウシトリプシンおよびキモトリプシンも有意に阻害したが、組織因子・ＦＶＩＩａ、ｔ－ＰＡ、またはＨＬＥは阻害しなかった。

Ａ．定義

請求項および明細書で使用する用語は別段の記載がない限り下記に示す通りに定義されている。

用語「P_1およびP^1」はここでは互換的に使用され以前に定義した通り、基質または阻害剤の切断可能なペプチド結合に先行する位置を示す（Ｓｃｈｅｃｈｔｅｒ，Ｉ．とＢｅｒｇｅｒ，Ａ．、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．、２７巻：１５７～１６２頁［１９６７年］）；同様にP_1'およびP^1'は互換的で基質または阻害剤の切断可能なペプチド結合に後続する位置を示す。数字の増大は切断可能な結合の前方（たとえばP_2およびP^2など）および後方（たとえばP_2'およびP^2'など）に続く位置を示す。

エコチンはＭｃＧｒａｔｈなど、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６６巻：６６２０～６６２５頁（１９９１年）が報告した１４２アミノ酸残基配列を持つ大腸菌の周縁細胞質蛋白質を示す。この蛋白質では、P^3-P^2-P^1-P^1'-P^2'-P^3"は残基８２から８７までに相当し、各々Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｍｅｔ、Ｍｅｔ、ＡｌａおよびＣｙｓである。

エコチンの類似体は大腸菌以外の属や種に見出される蛋白質であって、進化論的にエコチンに関連し、実質的に同様な一次構造を持っており、第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインまたはＨＬＥに対して実質的に同様な阻害作用を示す。哺乳類の消化器官中に見出される他の種や属が多数、エコチンとは同一ではないとしても同じ機能を果たし、もっと同様な構造を持つ蛋白質を持っていることを期待するのは合理的である。本発明の技術を使用すれば、そのような類似体を確認し、精製し、特徴付け、生産することができるに違いない。好ましい類似体はエコチンのアミノ酸配列に対して少なくとも約７０％の相同性を持つ。さらに好ましくは、類似体はエコチンと同一のP^3-P^2-P^1-P^1'-P^2'アミノ酸配列を持つ。

エコチンの同族体は合成で得られる蛋白質であって、天然での存在は未知であり、エコチンに実質的に類似の一次構造を持ち、第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインまたはＨＬＥに対して実質的に同様な活性を示す。同族体は化学合成により直接に合成的にも取得しうるが、あるいは同族体アミノ酸配列をコードする核酸配列の構築、それに続く組換えＤＮＡ技術を使用する同族体の培養液中の大量生産を経て間接的にも取得しうる。化学的に合成した同族体は天然または非天然アミノ酸であるＬ－またはＤ－のα－アミノ酸をも含みうる。好ましくは、同族体はエコチンアミノ酸配列に対して少なくとも約７０％の相同性を持つ。

相同性を定義するに当り、エコチンのアミノ酸配列中の保存性アミノ酸の置換によるアミノ酸の置換で得られる蛋白質は同族体蛋白質であると考えることとする。保存性アミノ酸置換はＴａｙｌｏｒ，Ｗ．Ｒ．、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１８８巻：２３３～２５８頁（１９８６年）の２４０頁に掲示の表Ｉに挙げられたアミノ酸置換の組合せと定義する。略述すれば、保存性アミノ酸置換の最大の公認された範疇または組合せはプラス（Ｒ、Ｋ、Ｈ）、帯電（Ｄ、Ｅ、Ｒ、Ｋ、Ｈ）、極性（Ｔ、Ｓ、Ｎ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｗ、Ｙ）、微小（Ａ、Ｇ、Ｓ）、小（Ｐ、Ｖ、Ｃ、Ａ、Ｇ、Ｔ、Ｓ、Ｎ、Ｄ）、脂肪族（Ｌ、Ｉ、Ｖ）、親水性（Ｈ、Ｗ、Ｙ、Ｆ、Ｍ、Ｌ、Ｉ、Ｖ、Ｃ、Ａ、Ｇ、Ｔ、Ｋ）、および芳香族（Ｆ、Ｈ、Ｙ、Ｗ）を含む。範疇の詳細と別種範疇についてはこの参考文献を参照されたい。

これに加えて、同族体蛋白質内にアミノ酸の挿入や欠失も起きうる。本発明の好適な欠失はアミノ末端の残基１から始まり、Ｃｙｓ５０直前の残基４９に到るもの、および／またはカルボキシ末端の残基１４２から始まり、Ｃｙｓ８７直前の残基８８に到るものの逐次的な欠失の１個またはそれ以上である。

ここに用いるアミノ酸またはアミノ酸残基は別段の言及がないかぎり天然産のＬ－α－アミノ酸またはその残基を示す。アミノ酸について通常に使用する１字および３字表記法をここでも使用する（Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ａ．Ｌ．、「生化学」、第２版、７１～９２頁（１９７５年）、Ｗｏｒｔｈ・Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｎ．Ｙ．）。

「発現ベクター」は適当な宿主中でＤＮＡがコードする蛋白質の発現を起こすことのできる適当な制御配列と作動可能に結合するＤＮＡ配列を含むＤＮＡ構築物を示す。この制御配列は一般的に、転写を起こすプロモータ、転写を制御する所望的オペレータ配列、適当なｍＲＮＡリボソーム結合部位をコードする配列、および転写と翻訳の終結を制御する配列を含む。ベクターはプラスミド、ファージ粒子または「ファージミド（ｐｈａｇｅｍｉｄ）」または単なる有能なゲノム挿入物でもありうる。

適当な宿主中に形質転換するとベクターは複製し、宿主ゲノムとは独立に機能するか、または場合によっては、ゲノム自体の中に組込まれうる。本明細書中では、プラスミドが現在では最も普通に使用されるベクターの形態なので、「プラスミド」、「ベクター」および「ファージミド」は時によっては互換的に使用する。しかしながら、本発明はこのような均等な機能を示し、当業者に公知であるか公知になる、発現ベクターの別型をも含むように意図している。

「作動可能に結合」は、ＤＮＡまたはポリペプチド配列２個の間の関係を記載する時には、単にそれらが機能的には相互に関連があることを意味する。例えばもし、それがシグナル配列として機能し、最も可能性が高いのはシグナル配列の切断を含む成熟型蛋白質の分泌に関与するなら、そのプレ配列は作動可能にペプチドに結合している。もし、配列の転写を制御するならプロモータはコード配列に作動可能に結合している。もし、翻訳をさせるように位置しているなら、リボソーム結合部位はコード配列に作動可能に結合している。

ここに使用する略号は：ＦＸａ、第Ｘａ因子；ＦＸＩＩａ、第ＸＩＩａ因子；ＨＬＥ、ヒト白血球エラスターゼ；ＴＦ、組織因子；ＴＦＰＩ、組織因子経路阻害剤；ＡＴＩＩＩ、アンチトロンビンＩＩＩ；ＤＩＣ、播種性静脈内血液凝固；ＡＲＤＳ、成人呼吸困難症候群；ＨＭＷＫ、高分子量キニノーゲン；ＴＡＰ、ダニ抗凝血ペプチド；ＰＣＲ、ポリメラーゼ連鎖反応；ＭＵＧＢ、４－メチルウンベリフェリルｐ－グアニジノベンゾエート；ＴＮＣＴ緩衝液、５０ｍＭトリス、ｐＨ７．５、１５０ｍＭ－ＮａＣｌ、２ｍＭ－$CaCl_2$，０．００５％トリトンＸ－１００；ＣＨＡＰＳ、３－［（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－１－プロパンスルホン酸塩；ＰＢＳ、燐酸塩緩衝食塩水；ＳＤＳ、ドデシル硫酸ナトリウム；ＰＡＧＥ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動；ＴＦＡ、トロフルオロ酢酸；ＨＰＬＣ、高速液体クロマトグラフィー；ＢＡＰＡ、N^{α}－ベンゾイル－Ｌ－アルギニン－ｐ－ニトロアニリド；ＤＥＡＥ、ジメチルアミノエチル；ＰＶＤＦ、ポリビニリデンジフルオリド；ＰＴ、プロトロンビン時間；ＡＰＴＴ、活性化部分トロンボプラスチン時間；である。

Ｂ．有用性

前記の通り、ヒトの通常の病気は血管内の血栓および塞栓に到る凝血亢進状態と本質的に関連している。これらは静脈炎、梗塞および発作を起こす医学的罹患および発作および肺および心塞栓からの死亡率の主因である。このような患者の大きい百分率が前駆的危険因子を持たず、判明した原因なしに血管血栓静脈炎を起こし、続いて肺塞栓を起こす。血管血栓を形成する患者の中の他の者はこれら症候の素因を与えることが判明している基礎疾患を持っている。

これらの患者の中には通常は過剰な凝固を予防する、たとえばアンチトロンビンＩＩＩのような、因子の遺伝的または後天的な不全を持つものもいる。他の患者では、たとえば腫瘍体のように血流に機械的障害を持ち、低血流状態と血栓症に到る。原因は不明確だが、悪性腫瘍の患者では血栓現象の発生率が高い。現用の薬剤によるこの症状での抗血栓療法は危険であり、しばしば無効である。

アテローマ性動脈硬化症の患者には種々の理由から動脈血栓塞栓現象の素因がある。アテローマ性動脈硬化斑は血小板栓子および血栓のための病巣を形成し、血管狭窄および閉塞

を起こし、心筋および脳虚血疾患に到る。剥離した血栓は循環に放出され、他の器官、特に脳、四肢、心臓および腎臓などの梗塞を起こす。心筋梗塞後、弱く、機能の低下した心房室に凝血が形成されて、循環系に放出されて塞栓を起こす。このような動脈フィブリン形成を持つ患者は全て発作の危険が高く、抗血栓療法を要すると感じられる。
これに加え、急性心筋梗塞での血栓溶解療法は手法として確立されてきている（Ｃｏｌｌｅｎ，Ｄ．とＳｔｕｍｐ，Ｄ．（１９８８年）、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．、３９巻：４０５～４２３頁）。しかしながら、現在入手可能な血栓溶解剤は再閉塞、再潅流への抵抗、正常冠血流達成までの時間延長などから明らかなように、患者全員に有効なのではない。
たとえば人造合成心臓弁または腰部代替物のような人工的表面上をまたは体外潅流装置を通ってを血液が流れている患者は血小板栓子、血栓および塞栓発生の危険がある。人造心臓弁を施した患者を長期間抗凝血すべきことは標準的な手法である。
そこで、癌、アテローマ性動脈硬化症、冠状動脈疾患（ＰＴＣＡ、ＣＡＢＧ、後ＭＩなど）、不安定性狭心症、人工心臓弁を持つ患者、および発作、一過性虚血発作、深部血管血栓症、静脈炎または肺塞栓の病歴のある患者、などを含む大きな範疇の患者は一時的または長期間に抗血栓治療をすべき候補である。しかしながら、この治療法はしばしば無効であるか、またはそれ自体が不健全である。その理由の一部には利用可能な治療剤の数が少ないことがある。たとえばアスピリンのような現用の抗血小板薬は血小板のシクロオキシゲナーゼ誘導活性化のみを阻害し、しばしば治療には不適当である。入手可能な抗凝固剤はヘパリンとワーファリンとを含むが、これらは必ずしも効果的ではなく、しばしば出血の危険増加を含む副作用を持つことがあり、また、これら療法の監視に関連する問題点も持っている。
それ故、フィブリノーゲンからフィブリンの形成を有効に阻害する薬剤は凝血亢進状況で特徴付けられる疾患の多数を治療的に処置するためには部分的に有用である。
しかしながら、一般的な問題として、血栓塞栓性および炎症性疾患の管理において、本発明の組成物は注射投与用に医薬的に許容される添加剤との組成物中でも、たとえば経口投与用の錠剤、カプセル剤またはエリキシール剤のような製剤中でも使用しうる。本発明の製剤を使用する処置を要する動物には最適効果を表すであろう用量を投与することができる。用量と投与法は動物毎に異なり、医療当業者が認識するであろうように、体重、食餌、同時投与薬剤およびその他の因子に依存する。
ＦＸａは外因系および内因系経路の双方に関与しているので血液凝固手法では適当な標的である（図１参照）。外因系経路では、第Ｘ因子は組織因子、ホスホリピドおよびCa^{+2}の存在下にＦＶＩＩａによりＦＸａに変換される。内因系経路では、第Ｘ因子はＦＶＩＩＩ、ホスホリピドおよびCa^{+2}の存在下にＦＩＸａによりＦＸａにまで活性化される。どちらの活性化機序によっても、ＦＸａの重要な機能の一つはそのプロトロンビナーゼ複合体中への関与である。ＦＶａ、ホスホリピドおよびCa^{+2}と協力して、ＦＸａはプロトロンビンをトロンビンまで切断する触媒的部分として作用し、これがフィブリノーゲンからフィブリンを生成して、最終的にフィブリン凝塊に到る。こうして、たとえばエコチンおよびエコチン同族体のような薬剤によるＦＸａの阻害は様々な血栓症での臨床的処置の手法の一つを代表する。こうして、本発明のエコチンおよびエコチン同族体は血栓症の治療に有用である。さらに特定的には、血栓溶解、不安定性狭心症、深部血管血栓症、冠状動脈バイパス移植、経皮経管冠状血管形成術、およびＤＩＣのための付加的療法として本阻害剤は特に有用である。
本発明のエコチンおよびエコチン同族体はまた接触経路の活性化または好中球活性化の処置が指示される疾患（たとえば、炎症、血液凝固、フィブリン溶解、および補体活性化など）の処置にも有用である。さらに特定的には本阻害剤は、例えば敗血症または敗血症ショック、炎症、ＡＲＤＳ、ＤＩＣ、低血圧、心肺バイパス手術、および術後出血など、ＦＸＩＩａ、カリクレイン、ＦＸａおよびＨＬＥの阻害が指示される疾患の処置において特に有用である。
本発明のエコチンおよびエコチン同族体は短期または長期治療を要する臨床的状況におい

ても有用である。短期治療が指示されるものには長期治療のものよりより好適であると予想される。たとえば大腸菌のような細菌起源から誘導された外来蛋白質の医薬的使用は免疫源になりうるが、しかしながら、急性の処方には細菌蛋白質が使用される。このような蛋白質の例にはストレプトコッカス族から誘導した蛋白質であるストレプトキナーゼがあり、フィブリン溶解的に作用し、急性心筋梗塞の処置に普通に使用されている。本発明のエコチンおよびエコチン同族体は免疫反応を引出すこともありうるが、しかしながら、大腸菌は哺乳類の消化管には通常に存在し、エコチンは周辺細胞質に分泌されることができるのでわれわれは免疫されているかもしれない。ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）のエコチンおよびエコチン同族体への共有結合的付加は免疫源性および毒性を軽減し、その他の蛋白質で観察される半減期延長をするかも知れない（Ｋａｔｒｅ，Ｎ．Ｖ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１１４巻：２０９～２１３頁［１９９０年］；Ｐｏｚｎａｎｓｋｙ，Ｍ．Ｊ．など、ＦＥＢ、２３９巻：１８～２２頁［１９８８年］；Ａｂｕｃｈｏｗｓｋｉ，Ａ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２５２巻：３５８２～３５８６頁［１９７７年］）。

Ｃ．製造法

化学合成

エコチンおよびエコチン同族体製法の一つは蛋白質の化学合成と、それに続く天然配座すなわち、正しいジスルフィド結合を得るに適当な酸化条件下の処理である。これは当業者によく公知の方策を用いて達成される（Ｋｅｌｌｅｙ，Ｒ．Ｆ．とＷｉｎｋｌｅｒ，Ｍ．Ｅ．「遺伝子工学、原理と方法（Ｓｅｔｌｏｗ，Ｊ．Ｋ．編）」、Ｐｌｅｎｕｍ・Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．、１２巻、１～１９頁［１９９０年］；Ｓｔｅｗａｒｔ，Ｊ．Ｍ．とＹｏｕｎｇ，Ｊ．Ｄ．、「固相ペプチド合成」、Ｐｉｅｒｃｅ・Ｃｈｅｍｉｃａｌ・Ｃｏ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ［１９８４年］）。

本発明のポリペプチド、特に５０アミノ酸残基またはそれ以下を含むもの（式ＶＩ参照）は、固相ペプチド合成を使用しても製造しうる（Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ，Ｓｏｃ．、８５巻：２１４９頁［１９６４年］；Ｈｏｕｇｈｔｅｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８２巻：５１３２頁［１９８５年］）。固相合成は適切なペプチドのカルボキシ末端から開始し、まず、ＳｔｅｗａｒｔとＹｏｕｎｇ、前出、の２頁および４頁にある図１－１および１－２に図示されているように保護アミノ酸を適当な樹脂に結合する。

この発明のポリペプチドを合成するには、α－アミノ基を適当に保護したカルボキシル末端アミノ酸を、クロロメチル化したポリスチレン樹脂に結合する（ＳｔｅｗａｒｔとＹｏｕｎｇ、前出、１０頁、図１－４参照）。α－アミノ保護基を、例えば塩化メチレン中のトリクロロ酢酸（ＴＦＡ）などで除去後、例えばＴＥＡ中で中和して、次段の合成を準備する。

得られたα－アミノ－および、要すれば側鎖を保護したアミノ酸を次に順次に所望の順序で縮合により結合し、樹脂に結合した中間体化合物を得る。あるいは、いくつかのアミノ酸を互いに結合してペプチドを形成させてから、伸長中の固相ポリペプチド鎖に追加することもありうる。

アミノ酸２個の間、アミノ酸とペプチドとの間、またはペプチドとペプチドとの間の縮合反応は、たとえばアジド法、混合酸無水物法、ＤＣＣ（ジシクロヘキシルカルボジイミド）法、活性エステル法（ｐ－ニトロフェニルエステル法、ＢＯＰ［ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ－トリス（ジメチルアミノ）－ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート］法、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミドエステル法など）およびＷｏｏｄｗａｒｄのＫ試薬法などの通常の縮合法に従って実施することができる。固相法でペプチド鎖を伸長する場合には、ペプチドをＣ－末端アミノ酸で不溶性担体に結合する。不溶性担体としてはＣ末端アミノ酸のカルボキシ基と反応して結合を形成し、この結合が後に容易に切断されるもの、例えばハロメチル樹脂、たとえばクロロメチル樹脂およびブロモメチル樹脂のようなもの、ヒドロキシメチル樹脂、アミノメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂およびｔ－アルキルオキシカルボニルヒドラジド樹脂などを使用することができる。

種々のアミノ酸残基の反応性側鎖基を鎖が完全に結合されてその基を除去するまでその部位を適当な保護基で保護するのはペプチドの化学合成に共通である。そのものがカルボキシ基で反応している間のアミノ酸または断片上のα－アミノ基の保護、および続くα－アミノ保護基の選択的な除去でその位置で後続反応を起こさせることも共通である。それ故、合成工程の間にペプチド鎖内で所望の配列中に位置し、種々の側鎖保護基を持つ各種アミノ酸残基を含む中間体化合物が製造されることも共通である。これら保護基を次に実質的に同時に共通的に除去して所期の生成物が精製後に得られる。

α－およびε－アミノ側鎖基を保護するために利用可能な保護基はベンジルオキシカルボニル（Ｚと略称）、イソニコチニルオキシカルボニル（ｉＮＯＣ）、Ｏ－クロロベンジルオキシカルボニル［Ｚ（NO_2）］、ｐ－メトキシベンジルオキシカルボニル［Ｚ（ＯＭｅ）］、ｔ－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃ）、ｔ－アミルオキシカルボニル（Ａｏｃ）、イソボルニルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、２－（４－ビフェニル）－２－プロピルオキシカルボニル（Ｂｐｏｃ）、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）、メチルスルホニルエトキシカルボニル（Ｍｓｃ）、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、２－ニトロフェニルスルフェニル（ＮＰＳ）、ジフェニルホルフィノチオイル（Ｐｐｔ）、ジメチロホスフィノチオイル（Ｍｐｔ）などのようなものにより例示される。

カルボキシ基用の保護基としては、例えばベンジルエステル（ＯＢｚｌ）、シクロヘキシルエステル（Ｃｈｘ）、４－ニトロベンジルエステル（ＯＮｂ）、ｔ－ブチルエステル（Ｏｂｕｔ）、４－ピリジルメチルエステル（ＯＰｉｃ）などのようなものを例示することができる。アミノおよびカルボキシ基以外の官能基を持つ、たとえばアルギニン、システインおよびセリンのような特定のアミノ酸は必要に応じて適当な保護基で保護するのが好ましい。例えば、アルギニンのグアニジノ基はニトロ、ｐ－トルエンスルホニル、ベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、ｐ－メトキシベンゼンスルホニル、４－メトキシ－２，６－ジメチルベンゼンスルホニル（Ｍｄｓ）、１，３，５－トリメチルフェニルスルホニル（Ｍｔｓ）などのようなもので保護しうる。システインのチオール基はｐ－メトキシベンジル、トリフェニルメチル、アセチルアミノメチルエチルカルバモイル、４－メチルベンジル、２，４，６－トリメチルベンジル（Ｔｍｂ）などでも保護しうる；セリンのヒドロキシル基はベンジル、ｔ－ブチル、アセチル、テトラヒドロピラニルなどでも保護しうる。

ＳｔｅｗａｒｔとＹｏｕｎｇ、前出、はペプチドの製法に関する詳細な情報を提出した。α－アミノ基の保護はその１４～１８頁に記載され、側鎖の閉鎖は１８～２８頁に記載がある。アミン、ヒドロキシおよびスルフヒドリル官能基の保護基の表は１４９～１５１頁に記載がある。

所期のアミノ酸配列が完成後、中間体ペプチドを樹脂担体から、たとえば液体ＨＦと１個またはそれ以上のチオ含有捕捉剤のような、樹脂から切断するのみならず、残りの側鎖保護基をすべて切断する試薬による処理で外す。ＨＦによる切断後に蛋白質配列をエーテルで洗浄し、大量の希酢酸に移し、水酸化アンモニウムでｐＨを約８．０に調整して撹拌する。

好ましくはポリペプチド中の残基のアルキル化（例えばメチオニン、システインおよびチロジン残基のアルキル化）を避けるためにチオクレゾールおよびクレゾール捕捉剤の混合物を使用する。樹脂をエーテルで洗浄し、直ちに大量の希酢酸に移して分子間交差結合を削減する。２５０μＭ－ポリペプチド濃度を約２リットルの０．１Ｍ－酢酸溶液中に希釈する。溶液を次に撹拌し、ｐＨを約８．０に水酸化アンモニウムを使用して調整する。ｐＨ調整の後、このポリペプチドは所期配座の配置を取る。

遺伝子合成、クローニングおよび発現

一般的操作法　精製蛋白質およびそのアミノ酸配列から、エコチンまたはエコチン同族体を組換えＤＮＡ技術を使用しても製造しうる。これらの技術は簡単に言えば、エコチンまたはエコチン同族体をコードする遺伝子を取り、適当なベクターに挿入し、そのベクターを適当な宿主細胞に挿入し、この宿主細胞を培養してエコチンまたはエコチン同族体遺伝

子の発現を起こさせ、そしてそこで生成した蛋白質を精製することを目論むものである。いくらか特定的に言えば、エコチンかエコチン同族体かをコードするＤＮＡをクローニングし、好都合な宿主中で発現されうるように操作する。元のポリペプチドをコードするＤＮＡはゲノムライブラリー、エコチンまたはエコチン同族体を発現する細胞からのｍＲＮＡから誘導したｃＤＮＡから、またはそのＤＮＡ配列を合成的に構築することによって得ることができる（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．など、「分子クローニング」、２版、Ｃｏｌｄ・Ｓｐｒｉｎｇ・Ｈａｒｂｏｒ・Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｎ．Ｙ．［１９８９年］）。

次に元のＤＮＡを適当なプラスミドまたはベクターに挿入し、宿主細胞を形質転換するために使用する。一般に、宿主細胞と適合性のある種から誘導した複製配列および制御配列を含むプラスミドベクターはその宿主と関連して使用する。ベクターは通常、複製部位ならびに形質転換した細胞内で表現型の選択法を提供することができるような蛋白質をコードする配列を持っている。

例えば、大腸菌は大腸菌の一種から誘導したプラスミドである、ｐＢＲ３２２（Ｍａｎｄｅｌ，Ｍ．など、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、５３巻：１５４頁［１９７０年］）を使用しても形質転換しうる。プラスミドｐＢＲ３２２はアンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を含み、選択用の簡単な手段を提供する。その他のベクターは、たとえば発現時にしばしば重要になる種々のプロモータのような種々の異なる特徴を含む。例えば、プラスミドｐＫＫ２２３－３、ｐＤＲ７２０、およびｐＬ－ラムダはｔａｃ、ｔｒｐまたはP_Lプロモータを持つ発現ベクターを代表するもので、現在では購入可能である（Ｐｈａｒｍａｃｉａ・Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）。

エコチンまたはエコチン同族体の直接的発現　好適なベクターはｐＥｔ３である。このベクターは実施例１記載のようにして構築したもので、大腸菌用の複製開始点、アルカリホスファターゼプロモーター、エコチンシグナル配列および遺伝子、およびアンピシリン耐性遺伝子を含む。その他の好適なベクターはｐＢＯ４７５、ｐＲ１Ｔ５およびｐＲ１Ｔ２Ｔ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ・Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）である。これらのベクターは適当なプロモータに続いてＡ蛋白質のＺドメインを含み、このベクターに挿入された遺伝子を融合蛋白質として発現する。これらのベクターに関する詳細な検討は以下にも見出しうる。

その他の好適なベクターは標準的な技術を使用して実施例３に例示するようなベクターの適切な特性を組合せることによって構築することができる。この例では宿主間を往復できるようなファージおよび大腸菌のための複製開始点を含むベクターを使用して突然変異と発現との双方を加速した（Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ，Ｂ．など、Ｓｉｃｅｎｃｅ、２４３巻：１３３０～１３３６頁［１９８９年］；Ｗｅｌｌｓ，Ｊ．とＣｕｎｎｉｎｇｈａｍ，Ｂ，、ＷＯ９０／０４７８８、５／３／９０発行）。ベクターの適切な特性にはプロモータ、リボソーム結合部位、エコチンまたはエコチン同族体遺伝子または遺伝子融合（Ａ蛋白質のＺドメインおよびエコチンまたはエコチン同族体およびそのリンカー）、シグナル配列、抗生物質耐性標識、コピー数、および適当な複写開始点を含む。

エコチンはｔａｃプロモータとｌａｃI^q抑制因子遺伝子とを持つプラスミドを使用して大腸菌中で発現される。これで４００ｍｇ／Ｌまたはそれ以上のエコチンを発現できる誘導発現系ができる（ＭｃＧｒａｔｈ，Ｍ．Ｅ．など、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２２巻：１３９～１４２頁［１９９１年］）。

宿主細胞は原核生物でも真核生物でもよい。原核生物は元のポリペプチド、セグメント置換ポリペプチド、残基置換ポリペプチドおよびポリペプチド変種を製造するためのＤＮＡ配列のクローニングおよび発現のためには好適である。例えば、大腸菌Ｋ１２株２９４（ＡＴＣＣ３１４４６）を大腸菌Ｂ、大腸菌Ｘ１７７－６（ＡＴＣＣ３１５３７）、大腸菌ｃ６００およびｃ６００ｈｆｌ、大腸菌Ｗ３１１０（Ｆ－、ガンマ－、原栄養株／ＡＴＣＣ２７３２５）、たとえば枯草菌のようなバシラス属菌、およびたとえばサルモネラ・チフィムリウムまたはセラチア・マルセッセンスのようなその他の腸内細菌科および種々の緑膿菌種と同様に使用してもよい。好適な原核生物は大腸菌Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ２７３２５）である。原核生物によって発現される時、ポリペプチドは典型的にはＮ－末端メチ

オニンまたはホルミルメチオニンを含み、グリコシル化されていない。融合蛋白質の場合、Ｎ－末端メチオニンまたはホルミルメチオニンは融合蛋白質のアミノ末端または融合蛋白質のシグナル配列に存在する。これらの実例は、勿論例示であって、限定ではない。

原核生物に加え、たとえば酵母培養物のような真核生物または多細胞生物から誘導した細胞も使用しうる。原則的には、そのような細胞培養物はいずれも使用可能である。しかしながら、脊椎動物細胞には最も興味があり、培養液中の脊椎動物細胞の培養（組織培養）は再現性ある操作法になっている（「組織培養」、Ａｃａｄｅｍｉｃ・Ｐｒｅｓｓ、ＫｒｕｓｅとＰａｔｔｅｒｓｏｎ編［１９７３年］）。この有用な宿主細胞系の例はＶＥＲＯおよびＨｅＬａ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞系、Ｗ１３８、２９３、ＢＨＫ、ＣＯＳ－７およびＭＤＣＫ細胞系である。

特定的には、本発明の場合はエコチン遺伝子を、大腸菌染色体ＤＮＡと公表されたコード配列に基づく合成プライマーとを使用するＰＣＲによりクローンして（ＭｃＧｒａｔｈ，Ｍ．Ｅ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、前出；Ｌｅｅ，Ｈ．Ｒ．など、ＦＥＢＳ・Ｌｅｔｔ．２８７巻：５３～５６頁［１９９１年］）好都合な発現ベクターに挿入した。得られたプラスミドｐＥｔ３はエコチン遺伝子の転写をアルカリホスファターゼプロモータ（ＡＰ）の制御下に持ち、翻訳をトリプトファンのシャイン－ダルガルノ配列の制御下に持つ。内在性エコチンのシグナル配列はエコチンの大腸菌周辺細胞質への効率的分泌のために使用した。

遺伝子融合　前記操作の変形の一つではエコチンまたはエコチン同族体をコードする遺伝子とベクター中で他の蛋白質または別種蛋白質の断片をコードする遺伝子とを結合する遺伝子融合の使用を目論む。これで宿主細胞が製造する別種の蛋白質との融合物としてエコチンまたはエコチン同族体を得る。この「別種の」蛋白質はしばしば細胞から分泌されることのできる蛋白質またはペプチドとし、培養培地から所期蛋白質を分離精製できるようにして、所期の蛋白質が細胞内に残留する時に必要な宿主細胞破壊の必要性を排除する。あるいは、融合蛋白質は細胞内で発現されることもできる。高度に発現される融合蛋白質を使用することは有用である。

遺伝子融合の使用は、必須ではないが、大腸菌中の異種蛋白質の発現ならびにこれら遺伝子生産物の精製を促進する（Ｈａｒｒｉｓ，Ｔ．Ｊ．Ｒ．、「遺伝子工学（Ｗｉｌｌｉａｍｓｏｎ，Ｒ．編）」中、Ａｃａｄｅｍｉｃ、Ｌｏｎｄｏｎ、４巻：１２７頁［１９８３年］；Ｕｈｌｅｎ，Ｍ．とＭｏｋｓ，Ｔ．、Ｍｅｔｈｏｄｓ・Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１８５巻：１２９～１４３頁［１９９０年］）。ＩｇＧへのＡ蛋白質、またはより特定的にはＡ蛋白質のＺドメイン、との結合は融合蛋白質精製用に「親和性のハンドル」を提供するので、Ａ蛋白質融合はしばしば使用される（Ｎｉｌｓｓｏｎ，Ｂ．とＡｂｒａｈｍｓｅｎ，Ｌ．、Ｍｅｔｈｏｄｓ・Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１８５巻：１４４～１６１頁［１９９０年］）。

大腸菌中で直接に発現する時には異種蛋白質の多くが分解されるが、融合蛋白質として発現される時には安定であることが証明されている（Ｍａｒｓｔｏｎ，Ｆ．Ａ．Ｏ．、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．、２４０巻：１頁［１９８６年］）。

融合蛋白質として発現されたエコチンまたはエコチン同族体は正しい折りたたみであるか、または天然の構造を得るには折りたたみを要する。正しい折りたたみの融合蛋白質はセリンプロテアーゼ阻害剤として活性であって、有用である。より好適なものは正しい折りたたみの天然型蛋白質であって、当技術分野で公知の方法により融合蛋白質から取得できる。融合蛋白質は、たとえばメチオニンで切断する臭化シアノーゲンまたはＡｓｎとＧｌｙとの間で切断するヒドロキシルアミンのような試薬を使用して切断できる。標準的な組換えＤＮＡ方策を使用して、エコチンまたはエコチン同族体遺伝子の５’末端の直前にこれらのアミノ酸をコードするヌクレオチド塩基対を挿入してもよい。

あるいは、最近に綜説が出された融合蛋白質の蛋白質分解的切断も採用できる（Ｃａｒｔｅｒ，Ｐ．（１９９０）、「蛋白質精製：分子機構から大量生産法まで（Ｌａｄｉｓｃｈ，Ｍ．Ｒ．、Ｗｉｌｌｓｏｎ，Ｒ．Ｃ．、Ｐａｉｎｔｏｎ，Ｃ．Ｃ．とＢｕｉｌｄｅｒ，Ｓ．Ｅ．編）」中、Ａｍｅｒｉｃａｎ・Ｃｈｅｍｉｃａｌ・Ｓｏｃｉｅｔｙ・Ｓｙｍｐｏ

ｓｉｕｍ・Ｓｅｒｉｅｓ・Ｎｏ．４２７，Ｃｈ１３、１８１～１９３頁）。
たとえば第Ｘａ因子、トロンビン、サブチリシンおよびその突然変異体のようなプロテアーゼを融合蛋白質を切断するために使用した。典型的には使用したプロテアーゼによる切断に利用できるペプチド連結部は「他種の」蛋白質（たとえばＡ蛋白質のＺドメインなど）と目的蛋白質、たとえばエコチンまたはエコチン同族体などとの間に挿入する。組換えＤＮＡ方策を使用して、連結部をコードするヌクレオチド塩基対を他種蛋白質をコードする遺伝子または遺伝子断片との間に挿入する。次に正しい連結部を含み部分的に精製した融合蛋白質の蛋白質分解的切断はできたままの融合蛋白質または還元または変性した融合蛋白質について実施することができる。
融合蛋白質として発現された時は、この蛋白質は正しい折りたたみであってもなくてもよい。また、切断部位を含む特定のペプチド連結部はそのプロテアーゼに受容性があってもなくてもよい。これらの因子は、その融合蛋白質を変性して再折りたたみすべきか、また、もしそうならこれらの操作は切断前と切断後のいずれに採用するべきかを決定する。
変性および再折りたたみが必要な時には、典型的にはその蛋白質を、たとえばグアニジンＨＣｌのようなカオトロープ剤で処理し、次に目的蛋白質を再折りたたみして天然構造とするために、例えば還元および酸化されたジチオスレイトールまたはグルタチオンなどを適当な比率で含む適当なｐＨおよび温度の酸化還元緩衝液で処理する。
突然変異ＤＮＡの生産　前記の通り、今では元のエコチン分子に比較して、得られるべき蛋白質のアミノ酸配列に付加、欠失または変化をコードする突然変異エコチンまたはエコチン同族体ＤＮＡを生産するために採用しうる種々の技術が入手可能である。
例として挙げれば、エコチンをコードする発現ベクターについて、部位特異的突然変異（Ｋｕｎｋｅｌなど、Ｍｅｔｈｏｄｓ・Ｅｎｚｙｍｏｌ．、２０４巻：１２５～１３９頁［１９９１年］；Ｃａｒｔｅｒ，Ｐ．など、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ・Ｒｅｓ．、１３巻：４３３１頁［１９８６年］；Ｚｏｌｌｅｒ，Ｍ．Ｊ．など、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ・Ｒｅｓ．、１０巻：６４８７頁［１９８２年］）、カセット式突然変異（Ｗｅｌｌｓ，Ｊ．Ａ．など、Ｇｅｎｅ、３４巻：３１５頁［１９８５年］）、制限選択的突然変異（Ｗｅｌｌｓ，Ｊ．Ａ．など、Ｐｈｉｌｏｓ．Ｔｒａｎｓ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｌｏｎｄｏｎ・Ｓｅｒ・Ａ、３１７巻：４１５頁［１９８６年］）、またはその他の公知技術もエコチンＤＮＡについて実行しうる。次に突然変異ＤＮＡを元のＤＮＡの代わりに用いて前記発現ベクターに挿入する。突然変異ＤＮＡを持つ発現ベクターを含む宿主細菌の成長で突然変異エコチン（すなわち、エコチンの類似体または同族体）が生産され、本文に記載するようにして分離できる。
特定的には、本件の場合、P_1残基のＭｅｔ８４をＡｒｇ、Ｌｙｓ、Ａｌａ、ＧｌｕまたはＡｓｐで置換したエコチンの突然変異体数種は野生型エコチンに匹敵する濃度で発現される突然変異体を与えた（図２）。エコチン発現プラスミドを含む大腸菌２７Ｃ７株の培養ではふりまぜフラスコ中で低燐酸最小培地内で２０時間３７℃で成育させた。ＳＤＳ－ＰＡＧＥに基づいて、全周辺細胞質蛋白質の～１５％がエコチン同族体であると推算される（図２参照）。
精製および特性付け　エコチンおよびエコチン同族体の精製および特性付けは当該技術の標準法によっても実施しうる。本件の場合、組換えエコチンは１０Ｌ発酵槽中で成育した大腸菌の周辺細胞質からＤＥＡＥセファロース、逆相Ｃ１８樹脂、スーパーデックスサイズ排除樹脂、およびＱ－セファロース上のクロマトグラフィーにより精製した。この方法を用いて湿った細胞ペースト１００ｇ当り約６５０ｍｇのエコチンを分離した。組換えエコチンおよびエコチン突然変異体または同族体を振盪フラスコからトリプシン親和性カラムクロマトグラフィーとそれに続く逆相Ｃ１８ＨＰＬＣによっても精製した。このトリプシン親和性／Ｃ１８ＨＰＬＣ方式をエコチンおよびエコチン突然変異体の精製に使用すると培養液リットル当り～１ｍｇの分離蛋白質を与えた。Ｍ８４Ｒ突然変異体およびＭ８４Ｋ突然変異体は固定化トリプシンによるP_1（ＬｙｓまたはＡｒｇ）におけるエコチン切断のため、培養液リットル当り～０．１ｍｇしか得られなかった。切断された蛋白質はＨＰＬＣにより無傷の物質から容易に分離された。

精製組換えエコチンは質量スペクトルデータ（実測値１６０９９．３ａｍｕ、計算値１６０９９．５ａｍｕ）および公表されているアミノ酸分析値に基づけば内在性エコチンと同一であると思われる。精製エコチンはＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図２、第２レーン）および逆相ＨＰＬＣによれば、均質性は＞９５％であると思われる。精製Ｍ８４Ｒ、Ｍ８４Ｋ、Ｍ８４Ａ、Ｍ８４ＤおよびＭ８４Ｅ同族体の質量スペクトル分析はいずれも各蛋白質の理論質量計算値から２ａｍｕ以内の質量を示した。突然変異体のアミノ酸分析値は配列から算出したものとは実験誤差の範囲内であった。

Ｄ．分析法

一般的な活性検定法　常用の酵素阻害検定をマイクロタイター形式で実施し、Ｂｉｏｍｅｔａｌｌｉｃｓ・ＤｅｌｔａＳｏｆｔＩＩ・ＳＬＴソフトウエアを組込んだマッキントッシュＳＥ電子計算機が制御するＳＬＴ・ＥＡＲ３４０ＡＴプレート読取機上で吸光度変化を監視した。ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ・ｖ２．１．４（Ｓｙｎｅｒｇｙ・Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて非線形回帰分析を行った。

エコチンの活性および定量化はあらかじめバースト滴定によって定量しておいたトリプシンを使用して実施した（後記参照）。トリプシン阻害は次の条件下に測定した：１０ｎＭ－トリプシン、１０Ｘトリプシン緩衝液（５００ｍＭ－トリス、ｐＨ８．０、１００ｍＭ－$CaCl_2$）２５μＬおよび阻害剤と水とで全容積２００μＬとする。室温で１５分間インキュベーションした後、２．５ｍＭ－Ｓｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａ５０μＬを添加し、４０５ｎｍでの吸光度を記録した。

ＦＸａの阻害は次の条件下に測定した：５ｎＭ－ヒトＦＸａ、１０Ｘ・ＴＮＣＴ緩衝液（５００ｍＭ－トリス、ｐＨ７．５、１．５Ｍ－ＮａＣｌ、２０ｍＭ－$CaCl_2$、０．５％トリトンＣ－１００）２５μＬおよび阻害剤と水で全容積を２００μＬとする。室温で１５分間インキュベーションした後、２．５ｍＭ－Ｓｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａ５０μＬを添加し、４０５ｎｍでの吸光度を記録した。

Ｎ－末端配列分析、質量スペクト分析、およびアミノ酸分析　１２０Ａ・ＰＴＨアミノ酸分析機を装着したＡｐｐｌｉｅｄ・Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓの４７０Ａ型気相配列決定機によりＰＶＤＦ膜上で直接逐次エドマン分解を行った。ＰＴＨアミノ酸ピークは３０００型データシステムのＮｅｌｓｏｎ分析機で積分し、データ分析はＨｅｎｚｅｌなどの方法（Ｈｅｎｚｅｌ，Ｗ．Ｊ．など、Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｇｒ．、４０４巻：４１～５２頁［１９８７年］）に従ってＤｉｇｉｔａｌ・Ｅｑｕｉｐｍｅｎｔ・ＳｕｓｔｅｍのＶａｘ１１／７８５型で実施した。

電磁スプレー質量スペクトルはＳｃｉｅｘ・ＡＰ－ＩＩＩ型３重四重極質量スペクトロメータに５ｋＶで作動するイオンスプレーインターフェースを装着して得て、ポリプロピレングリコール溶液で補正した。

蛋白質標本は減圧下に定常沸点６Ｎ－ＨＣｌ蒸気でＭｉｌｌｉｐｏｒｅ・Ｐｉｃｏｔａｇシステム中、１１０℃で２０時間加水分解した。加水分解産物はＳａｖｅｎｔ・ｓｐｅｅｄ・ｖａｃ・濃縮機中で真空蒸発し、ニンヒドリン検出機を装着したＢｅｃｋｍａｎ・６３００型アミノ酸分析機で分析した。

平衡阻害定数の測定　エコチンおよびその突然変異体によりテストされた酵素阻害に対する見掛けのK_i値（K_i*）を次のとおりに測定した。すべての反応は２５℃で実施した。トリプシンの貯蔵溶液を以前に報告されたＭＵＧＢによる活性部位バースト滴定（Ｊａｍｅｓｏｎ，Ｇ．Ｗ．など、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．、１３１巻：１０７～１１７頁［１９７３年］）によって、励起波長３５５ｎｍと放射波長４６０ｎｍにおけるＦｌｕｏｒｏｓｋａｎ・ＩＩプレート読取り機を使用して定量した。データはＤｅｌｔａ・Ｓｏｆｔ・ＩＩ・Ｆｌ・ｖ３．３１ソフトウエア（ＢｉｏＭｅｔａｌｌｉｃｓ）を使用してマッキントッシュＳＥ２０に集めた。次に活性部位滴定をしたトリプシンを使用して、エコチンの活性部位をＢＡＰＡを基質として定量した。化学量論１：１を仮定した（Ｃｈｕｎｇ，Ｃ．Ｈ．など、前出）。第Ｘａ因子、第ＸＩＩａ因子、血漿カリクレインまたはＨＬＥを次にエコチンを標準とする活性部位滴定により定量した。再び化学量論１：１を仮定した。これに加えてＨＬＥ濃度を以前に報告された（Ｂｅａｔｔｙ，Ｋ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈ

ｅｍ．、２５５巻：３９３１～３９３４頁［１９８０年］）方法により、ＨＬＥ活性部位を滴定するために補正して貯蔵しておいたα$_1$－プロテイナーゼ阻害剤を用いて定量した。エコチンおよびα$_1$－プロテイナーゼ双方の阻害剤を用いて定量して同じＨＬＥ活性部位濃度を測定した。ＦＸａの基質はＳｐｅｃｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａ（０．５ｍＭ）、ＦＸＩＩａ（０．５ｍＭ）および血漿カリクレインの基質はＳ２３０２（０．５ｍＭ）、ＨＬＥの基質はＭｅＯＳｕｃ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｖａｌ－ｐＮＡ（０．４ｍＭ）であった。アミノ酸分析、ブラドフォード分析（Ｂｒａｄｆｏｒｄ，Ｍ．Ｍ．、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、７２巻：２４８～２５４頁［１９７６年］）、またはトリプシン、エコチン、ＦＸａ、ＦＸＩＩａ、血漿カリクレインおよびＨＬＥに対する活性部位滴定により測定した蛋白質濃度の比較は良好な一致を示した。

酵素の濃度に匹敵する各濃度のエコチンで有意な阻害が認められたので、Ｍｉｃｈａｅｌｉｓ－Ｍｅｎｔｏｎ動力学は働かない。それ故、見掛けの平衡解離値（K_i*）は強固に結合する阻害剤のために誘導された方法を用いて算出した（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｊ．Ｆ．、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ、１８５巻：２６９～２８６頁［１９６９年］；Ｂｉｅｔｈ，Ｊ．、「プロテイナーゼ阻害剤（Ｆｒｉｔｚ，Ｈ．、Ｔｓｃｈｅｓｃｈｅ，Ｈ．、Ｇｒｅｅｎｅ，Ｌ．Ｊ．とＴｒｕｓｃｈｅｉｔ，Ｅ．編）」中、４６３～４６９頁、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ・Ｙｏｒｋ［１９７４年］）。データは非線形回帰分析により等式１に適合させてK_i*値を算出した。

$$\alpha = 1 - \frac{[E_o] + [I_o] + K_i^* - \sqrt{([E_o] + [I_o] + K_i^*)^2 - (4 \bullet [E_o] \bullet [I_o])}}{2 \bullet [E_o]} \quad (1)$$

ここに、αは活性比率（安定状態の阻害速度を非阻害速度で割った商）であり、［E_0］は全酵素濃度であり、［I_0］は全エコチン濃度である。阻害剤および基質は同じ部位に競合するので、真のK_i値はK_i*と式：$K_i = K_i^* / (1 + [S] / K_m)$の関係にある。ここに、$K_m$は基質に対するＭｉｃｈａｅｌｉｓ定数であり、［Ｓ］は基質濃度である。

ａ．Ｘａ因子　種々の濃度（０から８．７ｎＭ最終濃度）の定量化済エコチンまたはエコチン突然変異体をヒトＦＸａ（１から５ｎＭ最終濃度）を含有するＴＮＣＴ緩衝液全容積１８０μＬ中でインキュベーションして各３回K_i*値を測定した。室温で１時間インキュベーションして酵素・阻害剤複合体が平衡に達した後に、５ｍＭ－Ｓｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａを２０μＬ添加し、４０５ｎｍの吸光度の変化を観察して生成物形成の安定状態速度を測定した。この条件下のＳｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａとＦＸａとのK_mはＬｉｎｅｗｅａｖｅｒ－Ｂｕｒｋｅプロットの線形回帰分析により０．２３ｍＭであると算出された。ＦＸａによるエコチンの阻害に対するK_i*測定値は３回算出され、５４±２１ｐＭであった。平衡条件下でのエコチンによるＦＸａの阻害は図３に示す。それ故に、ＦＸａに対するエコチンの結合のK_i値は１７±７ｐＭであると算出された。エコチン突然変異体のK_i値を表Ｉに示す。

ｂ．ＸＩＩａ因子　定量化済エコチンを種々の希釈率（０から８０ｎＭ最終濃度）で緩衝液（５０ｍＭ－トリス、ｐＨ７．５、２０ｍＭ－ＮａＣｌ、２ｍＭ$CaCl_2$および０．００５％トリトンＸ－１００）全容積１８０μＬ中で、ヒトＦＸＩＩａ（１２．５ｎＭ－最終濃度）とインキュベーションすることによってK_i*値を３回算出した。室温で１時間インキュベーションして酵素・阻害剤複合体が平衡に達した後に、５ｍＭ－Ｓ２３０２を２０μＬ添加し（最終濃度０．５ｍＭ）、４０５ｎｍの吸光度変化を観察して生成物形成の安定状態速度を測定した。この条件下でＳ２３０２に対するＦＸＩＩａによるK_mはＬｉｎｅｗｅａｖｅｒ－Ｂｕｒｋｅプロットの線形回帰分析により０．１２５ｍＭであると算出された。

ＦＸＩＩａによるエコチンの阻害のK_i*測定値は３回算出して１２４±２６ｐＭであり、これから計算したK_i値は２５±５ｐＭであった。

ｃ．血漿カリクレイン　定量化済エコチンを種々の希釈率（０から１６ｎＭ最終濃度）で緩衝液（５０ｍＭ－トリス、ｐＨ７．５、２０ｍＭ－ＮａＣｌおよび０．００５％トリトンＸ－１００）全容積１８０μＬ中で、ヒト血漿カリクレイン（１．３または４．３ｎＭ

－最終濃度）とインキュベーションすることによってK_i*値を３回算出した。室温で１時間インキュベーションして酵素・阻害剤複合体が平衡に達した後に、５ｍＭ－Ｓ２３０２を２０μＬ添加し（最終濃度０．５ｍＭ）、４０５ｎｍの吸光度変化を観察して生成物形成の安定状態速度を測定した。この条件下でＳ２３０２に対する血漿カリクレインによるK_mはＬｉｎｅｗｅａｖｅｒ－Ｂｕｒｋｅプロットの線形回帰分析により０．１６５ｍＭであると算出された。

ヒト血漿カリクレインによるエコチンの阻害に対するK_i*測定値は３回算出して１７５±２０ｐＭ（血漿カリクレイン＝１．３ｎＭ）および１５１±２０ｐＭ（血漿カリクレイン＝４．３ｎＭ）であり、これから計算したK_i値はおのおの４４±６ｐＭおよび３８±５ｐＭであった。ヒト血漿カリクレインによるエコチンの阻害に対するK_i平均値は４１±８ｐＭであった。

ｄ．ＨＬＥ　エコチン（０から５ｎＭ最終濃度）を０．１Ｍ－トリスＨＣｌ、ｐＨ７．５、０．５Ｍ－ＮａＣｌおよび０．００５％トリトンＸ－１００中で、ＨＬＥ（０．８６ｎＭ）と2時間インキュベーションした。ＭｅＯＳｕｃ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｖａｌ－ＭＣＡ（配列番号９）を添加し（最終濃度０．０８ｍＭ）、反応をＬａｂｓｙｓｔｅｍｓのＦｌｕｏｌｏｓｃａｎ・ＩＩプレート読み取り機で観察した。励起波長は３５５ｎｍであり、放射波長は４６０ｎｍであった。データはＤｅｌｔａ・Ｓｏｆｔ・ＩＩＦｌ・ｖ３．３１ソフトウエア（ＢｉｏＭｅｔａｌｌｉｃｓ）を使用してマッキントッシュＳＥ２０に集めた。ＨＬＥによるＭｅＯＳｕｃ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｖａｌ－ＭＣＡ（配列番号９）に対するこの条件下でのK_mはＬｉｎｅｗｅａｖｅｒ－Ｂｕｒｋｅプロットの線形回帰分析により０．１５ｍＭであると算出された。

ＨＬＥによるエコチンの阻害に対するK_i*測定値は５０ｐＭであり、これから計算したK_i値は３３ｐＭであった。

表Ｉ　エコチンおよびP_1突然変異体のＦＸａ因子との動力学的定数

エコチンの突然変異体	K_i(pM)[a]	$k_{on}\times10^{-6}(M^{-1}s^{-1})$[b]	k_{off} (s^{-1})[c]
野生型	１７±７	1.35±0.08	6.5×10^{-5}(2.2×10^{-5})
Ｍ８４Ｒ	４	0.28±0.01	(1.0×10^{-6})
Ｍ８４Ｋ	７	0.68±0.02	(4.5×10^{-6})
Ｍ８４Ａ	３９００	0.17±0.01	(6.6×10^{-4})
Ｍ８４Ｄ	１７７００	N.D.[d]	N.D.
Ｍ８４Ｅ	８２１０	0.07	(5.7×10^{-4})

ａ野生型K_iは測定３回の平均を示し、突然変異体K_i値は測定１回の値である。

ｂ測定３回の平均を示すが、Ｍ８４Ｅは測定１回の値である。

ｃ括弧内の値は（K_i）・（k_{on}）から算出したものである。

ｄＮ．Ｄ．、測定せず。

ＦＸａ会合速度定数の測定　エコチンのＦＸａとの会合速度は次の通りに算出した。時間０に、エコチン（７ｎＭ最終濃度）をＦＸａ（５ｎＭ最終濃度）およびＴＮＣＴ緩衝液に添加して全容積３．０ｍＬとした。その直後から、１５０μＬつづを一定間隔で１０分間にわたって取出し、５ｍＭ－Ｓｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａ５０μＬを含むマイクロタイターウェルに添加した。ウェルの吸光度を４０５ｎｍで観察した。各ウェルについて各

データの組の初期直線部分を用いて初速を算出した。遊離酵素濃度対時間をプロットして、曲線を等式４に適合させた。k_{on}値を非線形回帰分析により算出した。
酵素と可逆的阻害剤との会合速度は等式２で与えられる：

$$\frac{-d[E]}{d(t)} = k_{on} \bullet [E] \bullet [I] - k_{off} \bullet [E \bullet I] \qquad (2)$$

Ｅ・Ｉ複合体の解離が無視できる反応の初期相の間に測定したので、等式２の第２項は無視できる。それ故、会合速度は等式３で与えられる：

$$\frac{-d[E]}{d(t)} = k_{on} \bullet [E] \bullet [I] \qquad (3)$$

$E_0 \neq I_0$の時にはこれを積分して等式４を得る：

$$[E] = [E_o] - \frac{[I_o] \bullet [E_o] \bullet (e^{\{([I_o]-[E_o]) \bullet k_{on} \bullet t\}} - 1)}{[I_o] \bullet e^{\{([I_o]-[E_o]) \bullet k_{on} \bullet t\}} - [E_o]} \qquad (4)$$

ここに［Ｅ］は時間ｔにおける遊離酵素濃度であり、［E_0］および［I_0］は各々酵素および阻害剤の初期濃度である。エコチンに対するＦＸａによる会合速度定数は遊離酵素を時間の関数として測定し、データを非線形回帰分析により等式４に適合させて算出する。エコチンに対するＦＸａによるk_{on}＝（１．３５±．０８）×$10^6 M^{-1} s^{-1}$値を計算する（図４Ａ）。エコチン突然変異体のk_{on}値は表Ｉに示す。

ＦＸａ解離速度定数の算出　エコチン・ＦＸａ複合体の解離速度定数はＨＬＥを使用して複合体から放出された遊離エコチンを捕捉して測定した。ＦＸａ（１０μＭ）をＴＮＣＴ緩衝液中でエコチン（１２．５μＭ）の存在または不在下に１時間インキュベーションし、ＨＬＥ（５００ｎＭ）含有または不含のＴＮＣＴ緩衝液で１０００倍に希釈した。適量（１８０μＬ）を時々取出し、遊離ＦＸａの初速を５ｍＭ－Ｓｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａ２０μＬによって４０５ｎｍで測定した。生成物の曲線（遊離ＦＸａ対時間）を等式６に適合させた。k_{off}値は非線形回帰分析により算出した。
ＦＸａからのエコチンの解離速度定数を測定するために、エコチンを捕捉して再会合を予防するために５０倍過剰のＨＬＥを含む緩衝液で複合体を１０００倍に希釈した。ＨＬＥ不在下には、ＦＸａによるエコチンの再会合はあまりに急速なので、遊離ＦＸａは殆ど検出されない（図４Ｂ）。解離の進行状況は時間とともに増加する遊離ＦＸａに起因するＳｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａ加水分解速度の増加として観察した。ＨＬＥは再会合を予防したので、Ｅ・Ｉ複合体の解離速度は等式５で与えられる：

$$\frac{d[E]}{d(t)} = k_{off} \bullet [E \bullet I] \qquad (5)$$

これを積分すると等式６が得られる：

$$[E] = [E \bullet I]_0 \bullet (1 - e^{-k_{off} \bullet t}) \qquad (6)$$

ここに［Ｅ］は時間ｔにおける遊離［ＦＸａ］であり、［Ｅ・Ｉ］$_0$は時間０における複合体濃度であり、k_{off}は一次解離速度定数である。等式６に非線形回帰分析により適合させた時間依存性Ｅ・Ｉ複合体解離曲線を図４Ｂに示す。測定したエコチンでの解離速度定数は表Ｉに示す。
特異性検定　次の検定法を使用して種々のプロテアーゼに対するエコチンおよびＭ８４ＫおよびＭ８４Ｒ突然変異体の特異性をテストした。エコチン、Ｍ８４Ｋ、Ｍ８４Ｒ（各１００ｎＭ）または対照ブランクを室温で各酵素と～１時間インキュベーションした。検査した酵素（酵素濃度、緩衝液、基質）は：ＦＸａ（１．２ｎＭ、緩衝液Ａ、０．７ｍＭ－Ｓｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａ）、トロンビン（３．７ｎＭ、緩衝液Ａ、０．７ｍＭ－Ｓ２３６６）、ＴＦ・ＦＶＩＩａ（１２．０ｎＭ、緩衝液Ｂ、０．７ｍＭ－Ｓ２３６６）、ＦＸＩａ（１．２ｎＭ、ＢＳＡ１ｍｇ／ｍＬ含有緩衝液Ａ、０．７ｍＭ－Ｓ２３６６）、活性化プロテインＣ（４．３ｎＭ、緩衝液Ａ、０．７ｍＭ－Ｓ２３６６）、プラスミン

（１５ｎＭ、緩衝液Ａ、１ｍＭ－Ｓ２２５１）、単鎖ｔ－ＰＡ（１５ｎＭ、緩衝液Ａ、２．５ｍＭ－Ｓ２２８８）、ＸＩＩａ因子（１０ｎＭ、緩衝液Ａ、０．５ｍＭ－Ｓ２３０２）、血漿カリクレイン（１０ｎＭ、緩衝液Ａ、０．５ｍＭ－Ｓ２３０２）、ＨＬＥ（１７ｎＭ、０．１Ｍ－トリス、ｐＨ７．５、０．５Ｍ－ＮａＣｌおよび０．００５％トリトンＸ－１００、０．４２ｍＭ－ＭｅＯＳｕｃ－ＡＡＰＶ－ｐＮＡ［配列番号９］）、ウシトリプシン（１０ｎＭ、緩衝液Ａ、０．２５ｍＭ－Ｓｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａ）およびウシキモトリプシン（１０ｎＭ、緩衝液Ａ、１ｍＭ－Ｓｕｃ－ＡＡＰＦ－ｐＮＡ［配列番号１０］）であった。緩衝液Ａは５０ｍＭ－トリス、ｐＨ７．５、１００ｍＭ－ＮａＣｌ、２ｍＭ－$CaCl_2$および０．００５％トリトンＸ－１００を含む。緩衝液Ｂは５０ｍＭ－トリス、ｐＨ７．５、１００ｍＭ－ＮａＣｌ、１０ｍＭ－$CaCl_2$、０．５％ＢＳＡ、６０ｎＭ－$TF_{1\sim243}$および１ｍＭ－ＣＨＡＰＳを含む。４０５ｎｍでの吸光度初期変化を基質添加後に観察した。阻害剤および／または酵素を不含の対照も検定して、各々非阻害速度および背景基質加水分解速度を評価した。

エコチンの活性と特異性をより完全に研究するために、エコチンおよびP_1置換突然変異体Ｍ８４ＲおよびＭ８４Ｋを血漿に見出される他のヒトセリンプロテアーゼ数種により検定した。ＦＸａに加えて、エコチンはＦＸＩＩａおよびカリクレインならびにＨＬＥ（前出）を強力に阻害したが、トロンビン、ＴＦ・ＦＶＩＩａ、ＦＸＩａ、活性化プロテインＣ、プラスミンまたはｔ－ＰＡには殆どまたは全く阻害が認められなかった（表ＩＩ）。P_1残基をＡｒｇかＬｙｓかのどちらかに変換することでＦＸａ阻害剤よりもわずかに強力な突然変異体に到った（表Ｉ）。しかしながら、これらの突然変異体はトロンビン、ＦＸＩａ、活性化プロテインＣおよびプラスミンにも有意な阻害を示した。ＦＸＩＩａとカリクレインはまだ強力に阻害した。しかしながら、プラス荷電のＡｒｇまたはＬｙｓのP_1位への導入はＨＬＥの阻害を効果的に低減させた（表ＩＩ）。エコチン、Ｍ８４Ｒ突然変異体またはＭ８４Ｋ突然変異体はいずれもＴＦ・ＦＶＩＩａまたはｔ－ＰＡを阻害しなかったが、一方ではウシトリプシンおよびキモトリプシンは表ＩＩに示す阻害剤全てによって強力に阻害された。

表ＩＩ　エコチン、Ｍ８４ＲおよびＭ８４Ｋ突然変異体による選択されたプロテアーゼの活性百分率[a]

プロテアーゼ	エコチン	Ｍ８４Ｒ	Ｍ８４Ｋ
第Ｘａ因子	0	1	2
トロンビン	９８	4	１６
ＴＦ/第ＶＩＩａ因子	９９	８７	９２
第ＸＩａ因子	７９	5	１２
活性化プロテインＣ	９９	５０	６５
プラスミン	１００	１０	9
ｔ－ＰＡ	１００	１００	１００
第ＸＩＩａ因子	0	1	0
カリクレイン	0	1	2
ＨＬＥ	0	８８	８５
トリプシン	0	0	0
キモトリプシン	0	0	1

a　阻害検定条件は前記した。

エコチンのＦＸａによる切断および活性部位決定　エコチンがＦＸａにより切断されるかどうか決定するために、酵素と阻害剤とを一緒にｐＨ４および７．５で本質的に以前の報告（ＭｃＧｒａｔｈ，Ｍ．Ｅ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、前出）のようにしてインキュベーションした。時々反応混合物の適量を取出して１６％トリシンゲル上のＳＤＳ－ＰＡＧＥに付した。これらのゲルを次にポリビニリデンジフルオライド（ＰＶＤＦ）膜上に電気ブロッティングし、膜を０．１％クーマジーブルーＲ－２５０の５０％メタノール溶液中で３０秒間染色し、脱色し、目的バンドを処理して配列決定した。
エコチンのＦＸａとの相互作用はある試験管内の条件下に酵素による阻害剤の低速な切断をもたらした。図５はエコチンのトリプシンによるおよびＦＸａによるｐＨ４．０で１３９時間内の切断量を図示する。この阻害剤はこれら条件下ではトリプシンによる切断にはＦＸａよりも感受性が低いと思われる。ｐＨ７．５で行った同じ実験はトリプシンとＦＸａとの間の同様な関係を示したが、中性的なｐＨで起きる切断量はｐＨ４．０で起きるものよりもずっと少なく、加水分解の方が優先していた（データは提示していない）。矢印は後にブロッティングおよび配列決定をしたバンドを示す。得られたＮ－末端配列（図５）はＦＸａはエコチンをＭ８４とＭ８５との間で切断することを示した。
エコチン・ＦＸａ複合体の分子量決定　直列に結合したＴＳＫ・Ｇ３０００ＳＷ－ＸＬカラム２個でＨＰＬＣを使用してサイズ排除クロマトグラフィーを行って、２１４ｎｍで観察した。カラムを５０ｍＭ－Ｂｉｓ－トリス、０．５Ｍ－ＮａＣｌ、ｐＨ６．５で平衡させ、流速０．５ｍＬ／分で流した。カラム補正のために使用した分子量標準（M_r）はカンショβ－アミラーゼ（２００００）、ウシガンマグロブリン（１５８０００）、ウシ血清アルブミン（６８０００）、ヒトＦＸａ（４６０００）、ニワトリ卵アルブミン（４４０００）、エコチン二量体（３２２００；下記参照）、ヒトガンマインターフェロン二

量体（２９０００）、ウマミオグロブリン（１７０００）、チトクロームＣ（１２５００）であった。これら標準物質はＳｉｇｍａ、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ・ＭａｎｎｈｅｉｍおよびＢｉｏｒａｄから購入した。ガンマインターフェロンはＧｅｎｅｎｔｅｃｈからのものである。エコチンは１４０μＭを用いた。エコチンとＦＸａと（各々１０μＭ）をＴＮＣＴ緩衝液中、室温で１０分間インキュベーションしてから注入した。エコチン・ＦＸａ複合体の分子量は分子量の対数に対する空隙容積と溶離容積との比率（Ｖｅ／Ｖｏ）のプロットを線形回帰分析から算出した。分子量の対数に対するＶｅ／Ｖｏのプロット（図６）から算出したエコチン・ＦＸａ複合体の分子量は１３９０００で、この複合体はエコチン二量体（下記を参照）１モルとＦＸａ２モルとから構成されることを示唆する。（エコチン）$_2$・（ＦＸａ）$_2$の分子量計算値は１２４２００である。ＦＸａはその分子量４６０００の近辺で溶離したが、エコチンは分子量３２２００の二量体として溶離した。エコチン一量体は分子量計算値１６０９９を持つ。

蛍光滴定によるエコチン二量体の解離定数決定　エコチンの濃度による蛍光の変化の研究は２８０ｎｍで励起し、３４０ｎｍで放射するＳＬＭ８０００型蛍光スペクトル光度計を用いて実施した。５０ｍＭ－トリス、ｐＨ７．５、１５０ｍＭ－ＮａＣｌ、２ｍＭ－ＣａＣｌ$_2$緩衝液でエコチン（１０μＭ）およびＬ－トリプトファン（４０μＭ）を順次に２倍希釈した。エコチンの蛍光とＬ－トリプトファンの蛍光との比率を使用して、エコチン二量体化に対する解離定数を算出した。

トリプトファン２個を含むエコチンの二量体化は希釈に伴う蛍光の変化をＬ－トリプトファンのものと比較して測定しながら追跡した。エコチン／Ｌ－トリプトファン蛍光比率に対する濃度に対してはシグモイドの依存性が観察されたが、これは２状態モデルを満足するものである（図７）。二量体（I_2）との平衡にあるエコチン一量体（Ｉ）の場合、

$I + I \Leftrightarrow I_2$　　平衡定数$K_d = [I]^2 / [I_2]$

全エコチン濃度（$[I_T]$）は$[I_T] = [I] + 2[I_2]$と定義する。

これら二式を結合し、I_Tで割ると等式７が得られる：

$$\text{モノマー比率} = [I] / [I_T] = \{-K_d + (K_d^2 + 8 \cdot K_d \cdot [I_T])^{1/2}\} / 4 \cdot [I_T] \quad (7)$$

何故なら

$$[I] / [I_T] = 1 - (Fl_X - Fl_M) / (Fl_D - Fl_M) \quad (8)$$

ここに、Fl_MおよびFl_Dはおのおのエコチン一量体と二量体との相対蛍光（エコチン蛍光／Ｌ－トリプトファン蛍光）であり、Fl_Xは観測された相対蛍光である。等式７と８とを結合すると等式９が得られる：

$$Fl_X = Fl_M + (Fl_D - Fl_M) \{-K_d + (K_d^2 + 8 \cdot K_d \cdot [I_T])^{1/2}\} / 4 \cdot [I_T] \quad (9)$$

データを等式９に非線形適合すると、エコチン二量体化のK_d計算値として３９０±１５０ｎＭを与える。

血液凝固検定および凝固時間延長　凝固時間測定はＡＣＬ３００型のＲｅｓｅａｒｃｈ・Ｃｏａｇｕｌａｔｉｏｎ分析機を用いて行った。プロトロンビン時間（ＰＴ）検定にはインキュベーション時間を１２０秒に、獲得時間は検定結果の期待値に依存して１２０から６００秒に設定した。ＴＦを発現する２９３細胞の膜（Ｐａｂｏｒｓｋｙ，Ｌ．Ｒ．など、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２８巻：８０７２～８０７７頁［１９８９年］）をあらかじめ$CaCl_2$と混合した。３７℃で２分間インキュベーション後に標品（血漿および阻害剤）および試薬（$CaCl_2$／ＴＦ）を自動的に混合した。凝固時間は目視で決定した。$CaCl_2$／ＴＦ添加前の阻害剤と血漿との全インキュベーション時間は～５分間であった。最終容積１６０μＬ中の最終濃度は７８ｎＭから７．８μＭ－エコチン、３．７μＭ－ＴＦ（蛋白質含量として０．９μｇ／ｍＬ）、２２．５ｍＭ－$CaCl_2$、および５０％血漿であった。

活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＴＴ）検定には、活性化時間を１２０秒、獲得時間を検定結果の期待値に依存して３００から６００秒に設定した。クエン酸添加正常ヒト血漿と阻害剤とを合わせてインキュベーションした。標本（血漿および阻害剤）と活性化剤（Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔａｔｉｏｎ・Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、エラルゴ酸／ホスホリピドｍｉｘ・Ｔｅｓｔ・Ｒｅａｇｅｎｔ）とを自動滴加し、３７℃で２分間インキュ

ベーションし、次に$CaCl_2$を添加して凝固時間を目視によって決定した。阻害剤と血漿との全インキュベーション時間は活性化剤添加前の約３分間であり、$CaCl_2$添加前の５分間であった。最終容積１６２μＬ中の最終濃度は０．５７ｎＭから５．７μＭ－エコチン、１５．３μｇ蛋白質／ｍＬ２９３細胞の膜、８．３μＭ－エラルゴ酸、８．３ｍＭ－$CaCl_2$、および３３．３％血漿であった。

ＡＰＴＴおよびＰＴの各検定では、野生型エコチンは～０．３μＭと～２μＭの濃度で凝固時間を１０倍延長した（図８）。ＡＰＴＴ検定の用量－作用曲線は殊に急峻で、０．２から０．３μＭまでの範囲内のみで凝固時間は１．５倍から～１０倍に延長した。ＰＴ検定の用量－作用曲線はかなりなだらかで、同じ凝固時間延長を示すには０．２から２μＭの範囲が必要であった。

結果　エコチンのクローニング、発現および精製からエコチンは強力な抗凝固剤であり、現在までに発見されている中で最強力な可逆的ＦＸａ阻害剤であることが証明された。エコチンはＦＸａを平衡解離定数（K_i）１７ｐＭで阻害する。これに加えて、エコチンはＦＸＩＩａ、血漿カリクレインおよびＨＬＥを平衡解離定数おのおの２５ｐＭ、４１ｐＭ、および３３ｐＭで強力に阻害する。エコチンとこれらプロテアーゼとの結合親和性が高いのでこれらの値は強力に結合する阻害剤用に報告された方法を使用して決定した（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｊ．Ｆ．、前出；Ｂｉｅｔｈ，Ｊ．、前出）。エコチン（Ｉ）のこれら酵素（Ｅ）による可逆的な阻害を反応式Ａに示すが、これから等式１を誘導した。

反応式Ａ

$$E + I \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} E{\bullet}I$$

エコチンとＦＸａとの会合は急速で、会合速度定数（k_{on}）は$1.35\times10^{6}M^{-1}s^{-1}$である。エコチンのＦＸａに対する親和性が極めて高いので、エコチン・ＦＸａ複合体の解離はエコチンに高い親和性をもって結合する（前出）ＨＬＥ過剰の存在下に測定した。ここでは、ＨＬＥは解離した遊離エコチンを捕捉し、ＦＸａとの再会合を予防した。ＨＬＥ不在下でのk_{off}の直接測定は遊離ＦＸａの量が少な過ぎて正確な測定ができないので、この方法を使用して解離速度定数（k_{off}）$6.5\times10^{5}s^{-1}$を得た。このデータは観測されている平衡解離定数（K_i）をさらに確認した。k_{off}／k_{on}で決定されるK_iで得られた値は４８ｐＭであって、平衡条件下に測定された値のたった３倍に過ぎない。

活性部位滴定に基づいて、高濃度（＞１００・K_i）のエコチンによるこれら酵素の阻害では生成したＥ・Ｉ複合体が化学量論的、すなわちプロテアーゼ対エコチンのモル比が１：１であることが発見された。平衡および動力学的定数算出に使用した方法では、これら複合体がエコチンおよびプロテアーゼ１分子づつを含むと仮定している（反応式Ａ）。高濃度でのＦＸａ（１０μＭの範囲）によるエコチンの相互作用はゲル濾過クロマトグラフィーによってエコチン２分子とＦＸａ２分子とから構成される四量体複合体に対応する分子量で溶離することが証明された（図６）。エコチンは以前にトリプシンと同じような化学量論で複合体を形成することが観察されている（Ｃｈｕｎｇ，Ｃ．Ｈ．、前出）。この複合体生成機序を反応式Ｂに示す。

反応式Ｂ

$$\begin{array}{ccc} & I \rightleftharpoons E{\bullet}I & E{\bullet}I \\ & + & \searrow \\ E & \downarrow I \quad \downarrow I & E_2{\bullet}I_2 \\ & + & \nearrow \\ & I_2 \rightleftharpoons E{\bullet}I_2 & E \end{array}$$

ゲル濾過クロマトグラフィーのデータ（図６）は反応式Ｂを支持し、エコチンは濃度１４０μＭで二量体を形成することを証明するが、ＦＸａ単独での二量体形成の証拠は得られていない。高濃度で観測されたこの四量体複合体は同様にエコチン二量体へのＦＸａ分子２個の逐次付加に由来する。この反応式はさらにエコチンの螢光データ（図６）からの証拠に基づいても支持される。エコチンはトリプトファン２個を含み、少なくともその一つ

が希釈による螢光強度変化を行う。二状態一量体／二量体モデル（２Ｉ⇔Ｉ$_2$）へのデータの適合はエコチン二量体化のK_d値として約３９０ｎＭを与えた。この値は幾つかの理由で重要である。これらの実験はエコチン二量体化のK_d以上の濃度で実施しているので、エコチンの二量体にＦＸａ２分子が結合するとの観察を支持する（図６）。さらにその上、平衡および動力学的な測定はエコチン二量体化のK_dよりも低い濃度範囲で行っているので、反応式Ａおよび等式１でこれらの値を算出するために使用した仮定は有効である。エコチン・ＦＸａ複合体のエコチンまたは別のエコチン・ＦＸａ複合体への親和性は測定していないが、K_dがエコチン二量体化で観察したものと類似であろうと仮定するのは合理的である。

ｐＨ４におけるエコチンのＦＸａとの相互作用はこの阻害剤のＭ８４とＭ８５との間での遅い切断をもたらす。これはＦＸａではトリプシンよりも急速に（図５）起きる。どちらの酵素でもｐＨ７．５では切断は殆ど観測されない。これらの結果はＭ８４がトリプシン、キモトリプリンおよびブタ膵臓エラスターゼでのエコチンのP_1活性部位であることを証明している以前のデータと一致する（ＭｃＧｒａｔｈ，Ｍ．Ｅ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、前出）。この阻害剤が切断されるとの観察は、酵素を阻害しなくなることを意味するものではない。事実、しばしば切断された阻害剤が天然の阻害剤と同様に強力であることが見出される（Ｌａｓｋｏｗｓｋｉ，Ｍ．・Ｊｒ．とＫａｔｏ，Ｉ．、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、４９巻：５９３～６２６頁［１９８０年］）。

Ｘａ因子はトリプシン様セリンプロテアーゼであり、プロトロンビンおよびクロモーゲンペプチド（Ｌｏｔｔｅｎｂｅｒｇ，Ｒ．など、Ｍｅｔｈｏｄｓ・Ｅｎｚｙｍｏｌ．、８０巻：３４１～３６１頁［１９８１年］）を含む基質、およびＡＴＩＩＩ（Ｂｊｏｒｋ，ＩとＤａｎｉｅｌｓｓｏｎ，Å．、前出）、ＴＦＰＩ（Ｂｒｏｓｅ・Ｊｒ．，Ｇ．Ｊ．など、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、前出）、アンチスタシン（Ｄｕｎｗｉｄｄｉｅ，Ｃ．Ｔ．など、前出）、および最も蓋然的にはＴＡＰ（Ｄｕｎｗｉｄｄｉｅ，Ｃ．Ｔ．など、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、３１巻：１２１２６～１２１３１頁［１９９２年］）を含むその阻害剤はP_1位にＡｒｇを持つ。それ故、エコチンP_1残基で多数の突然変異体を製造してＦＸａ結合親和性ならびにその他のセリンプロテアーゼに対する特異性にいかなる効果があるかテストした。構築したエコチン突然変異体５個の中で２個（Ｍ８４ＲおよびＭ８４Ｋ）は野生型阻害剤よりもＦＸａ阻害の点ではわずかに強力であった（表Ｉ）。驚くべきことに、P_1残基をＡｓｐまたはＧｌｕに変換した時にさえＦＸａ活性に有意な阻害が観察されて、P_1以外の残基が結合に有意な寄与をしていることが示唆された。

エコチンも共有結合的に交差結合していることも予想される。これは当業者に普通に採用される同種官能的または異種官能的交差結合剤であることができる。あるいは、システインをエコチン遺伝子の突然変異により導入してエコチン同族体を形成し、これを次に酸化してジスルフィド結合を形成し、エコチンまたはエコチン同族体二量体とすることができる。これに加え、エコチンまたはエコチン同族体遺伝子２個の縦列コピーから構成される遺伝子融合も使用しうる。二量体を造るべきエコチン一量体はエコチンの同一または相違する同族体でありうる。交差結合エコチンまたはエコチン同族体二量体は力価、半減期、免疫源性またはその他の性質に関して一量体よりも改良された性質も持ちうる。

P_1Ｍｅｔ残基の代わりにＡｒｇかＬｙｓのいずれかでの置換はトロンビン、第ＸＩａ因子、プラスミンでの明瞭な阻害および活性化プロテインＣでの程度の少ない阻害により証明されるように特異性の広範な減少を招来する。予想通り、Ｍ８４ＲおよびＭ８４Ｋ突然変異体はＨＬＥを阻害しない（表ＩＩ）。そこで、効果全体としてはＨＬＥよりもＦＸａに対する特異性が増すが、テストした殆どの血漿プロテアーゼとの比較ではＦＸａへの特異性は減少する。同様な現象はトリプシン、ＨＬＥおよびキモトリプシンを強力に阻害するα１－プロテイナーゼ阻害剤であるP_1にＭｅｔを含むセルピンでも認められる。Ｍｅｔの代わりにＡｒｇをP_1位に持つ天然起源突然変異体であるα１－プロテイナーゼ阻害剤（Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ）はＨＬＥに対して１００００倍減少した阻害を示すが、トリプシンおよびトリプシン様プロテアーゼであるトロンビン、ＦＸａ、第ＸＩａ因子、カリ

クレイン、第ＸＩＩａ因子、ウロキナーゼおよび活性化プロテインＣにはより強力な阻害剤である（Ｔｒａｖｉｓ，Ｊ．など、前出；Ｓｃｏｔｔ，Ｃ．Ｆ．など、前出；Ｐａｔｓｔｏｎ，Ｐ．Ａ．など、前出；Ｈｅｅｂ，Ｍ．Ｊ．など、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６５巻：２３６５～２３６９頁［１９９０年］）。これに加えてクニッツ阻害剤ＢＰＴＩおよび七面鳥のオボムコイド第３ドメインからのカザール阻害剤の両者はP_1がＭｅｔの時にはＨＬＥを強力に阻害するが、P_1がＬｙｓである時にはその阻害は大きく減少し、トリプシンではその逆が見出されている（Ｂｅｃｋｍａｎｎ，Ｊ．など、Ｊ。Ｐｒｏｔ．Ｃｈｅｍ．、８巻：１０１～１１３頁［１９８９年］；Ｂｉｇｌｅｒ，Ｔ．Ｌ．など、Ｐｒｏｔ．Ｓｃｉ．、２巻：７８６～７９９頁［１９９３年］）。エコチンまたはそのP_1突然変異体およびＴＦ／ＦＶＩＩａまたは単鎖ｔ－ＰＡでは阻害は認められず、これらのプロテアーゼの活性部位は他のものとは明瞭に違うか、プロテアーゼの活性部位からの領域末端がエコチンの結合を阻害していることを示唆する。

血栓症は血液凝固、フィブリン溶解、血小板付着および凝集、および内皮相互作用を含む、一つの複雑な過程である（Ｂａｄｉｍｏｎ，Ｌ．など、Ｔｒｅｎｄｓ・Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｍｅｄ．、１巻：２６１～２６７頁［１９９１年］）。トロンビンはこの過程でフィブリノーゲンを切断してフィブリンとし、血小板を活性化し、血球壁と相互作用をするという中心的役割を果たす。トロンビン阻害剤を使用する血栓症の制御は広範に研究されているが、しかしながら、別の高性能な方策の一つはトロンビン形成を予防するためのＦＸａの阻害である。ＦＸａおよびトロンビンに対する合成または組換え阻害剤についての潜在的な抗凝固剤としての能力は種々の血液凝固検定で評価される（Ｈａｕｐｔｍａｎｎ，Ｊ．とＫａｉｓｅｒ，Ｂ．、Ｂｌｏｏｄ・Ｃｏａｇ．Ｆｉｂｒｉｎｏｌ．、４巻：５７７～５８２頁［１９９３年］）。最近の報告ではＦＸａ阻害剤がｔ－ＰＡ誘発血栓分解を増加し、動脈血栓症のイヌのモデルで再閉塞を予防した（Ｍｅｌｌｏｔ，Ｍ．Ｊ．など、Ｆｉｂｒｉｎｏｌｙｓｉｓ、７巻：１９５～２０２頁［１９９３年］）。また、ウサギのモデルでは静脈血栓症を予防した（Ｖｌａｓｕｋ，Ｇ．Ｐ．など、前出）。さらにその上、ＦＸａは全血凝塊の前駆凝固因子活性の測定において注目されている（Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇ，Ｐ．Ｒ．など、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、９１巻：１８７７～１８８３頁［１９９３年］）。それ故に、たとえばエコチンのような試薬によるＦＸａの阻害は種々の血栓性疾患の臨床的処置に対する魅力的な手法の一つを代表する。

試験管内凝固検定に基づく機能的に使用可能な濃度（約５００ｎＭ）では、エコチンのＦＸａとの相互作用はこの濃度はK_iよりもずっと大きいので本質的に不可逆的である（Ｂｉｅｔｈ，Ｊ．、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｅｄ．、３２巻：３８７～３９７頁［１９８４年］）。エコチンのＦＸａとの動力学的パラメータおよび血中ＦＸａ最高可能濃度約２００ｎＭに基づけば、ＦＸａの完全な阻害に要する時間は約７．４秒である（Ｂｉｅｔｈ，Ｊ．、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｅｄ．、前出）。これに加えて、エコチン・ＦＸａ複合体は試験管内で比較的安定で、半減期は約３時間である。明らかに多数の生物学的および生理学的因子がこの阻害には影響を与えるが、しかしながら、高親和性、高会合速度および低解離速度からエコチンは生体内で有意な役割を果たすことができると予測される。

接触活性化プロテアーゼであるカリクレインおよびＦＸＩＩａの阻害は、部分的には内因系凝固経路の活性を測定するＡＰＴＴ検定（図８）で観察された強力な抗凝固効果を説明するかもしれない。ＦＸＩＩからＦＸＩＩａへの表面活性化はＦＸＩａおよびカリクレインの生成を導く。ＦＸＩａはＦＩＸを活性化してＩＸａとし、これはＦＶＩＩＩの存在下にＦＸａの形成を導いて、究極的にはフィブリン凝塊に到る。カリクレインはさらにＦＸＩＩを活性化してＦＸＩＩａを生成し、増加させる（Ｓｃｈｍａｉｅｒ，Ａ．Ｈ．、など、前出）。それ故、ＦＸａ、ＦＸＩＩａおよびカリクレインの共通阻害を示す分子はＦＸａ単独を阻害するものよりも強力な抗凝固剤ともなりうる。エコチンはＴＦ・ＦＶＩＩａ活性を阻害しないので、ＦＸａの阻害のみを反映しているＰＴの結果は組織因子が開始する（外因系経路）血液凝固時間の倍数延長を示す。さらにその上に、カリクレインはプラスミノーゲンを活性化してプラスミンとし、高分子量キニノーゲンから強力な血管拡張剤であるブラジキニンの放出を触媒し、好中球活性化に関連付けられ、および補体活性化を

制御するようである（Ｓｃｈｍａｉｅｒ，Ａ．Ｈ．など、前出）。それ故、ＦＸＩＩａおよびカリクレインならびに、たとえばエコチンのようなこれらプロテアーゼの阻害剤は炎症およびフィブリン溶解ならびに凝固の制御にも重要な役割を果たしうる。接触活性化の主な臨床的兆候には敗血症、播種性静脈内血液凝固および成人呼吸困難症候群（Ｂｏｎｅ，Ｒ．Ｃ．、前出）を含む。

エコチンの生理学的役割は未知である。しかしながら、エコチンは既知の大腸菌プロテアーゼはいずれも阻害しないので、その周辺細胞質への局在は外来プロテアーゼから細胞を保護する役割を示すのかもしれない（Ｃｈｕｎｇ，Ｃ．Ｈ．など、前出）。哺乳類の消化管内に存在する膵臓酵素の阻害はこの仮説を支持する。ＦＸａならびに血漿カリクレインおよびＦＸＩＩａのエコチンによる強力な阻害は予期に反し、合理的に説明するのがより困難である。エコチンは既知の他種プロテアーゼ阻害剤のどれとも相同性がないので、そのＸ線結晶構造（ＭｃＧｒａｔｈ，Ｍ．Ｅ．、など、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、前出；Ｓｈｉｎ，Ｄ．Ｈ．など、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２９巻：１５７～１１５８頁［１９９３年］）がエコチン活性部位の性質およびＦＸａおよび他のセリンプロテアーゼに対する阻害機序の理解を深めるであろう。

Ｅ．医薬的組成物

治療的適用に使用されるべき本発明組成物の用量剤型は無菌でなけらばならない。無菌性は、たとえば０．２μ膜のような無菌濾過膜を通しての濾過によって容易に達成できる。蛋白質製剤は通常は凍結乾燥剤または水溶液剤として保存される。蛋白質製剤のｐＨは、典型的には約３と１１との間にあり、さらに好ましくは約５から９、最も好ましくは約７から８である。好適な投与経路は皮下注射による。

治療用蛋白質製剤は一般に、例えば静脈用溶液バッグまたは皮下注射針で穿孔できる栓を持つバイアルなどの無菌の通路孔を持つ容器に入れる。

治療的に有効な用量は試験管内（前記検定参照）または生体内法により決定してもよい。そのような検定技法に基づいて、治療的に有効な用量範囲を決定しうる。治療的に有効な用量範囲は当然に投与経路によって影響を受ける。皮下注射針による注射では用量が体液中に分配されると仮定しうる。他の投与経路については、エコチンまたはエコチン同族体について個々に薬理学でよく公知の方法により吸収効率を決定しなければならない。

治療用の用量は約０．００１ｎＭから約１．０ｍＭ、より好ましくは約０．１ｎＭから約１００μＭ、最も好ましくは約１．０ｎＭから約５０μＭの範囲でもありうる。

医薬的組成物としての典型的なエコチンまたはエコチン同族体の製剤は約０．５から５００ｍｇの化合物または化合物の混合物を遊離酸型または塩基型のいずれかまたは医薬的に許容しうる塩として含有する。これらの化合物または化合物の混合物は、次に薬剤学的慣例に従って生理学的に許容しうる基剤、担体、添加剤、結合剤、保存剤、または安定化剤などと混合する。これら組成物中の活性成分の量は処方される範囲内の適当な用量が得られるものである。

注射用の無菌組成物は通常の医薬的慣行に従って製剤化することができる。例えば、活性化合物を水または、たとえばゴマ油、ピーナツ油、綿実油などの天然起源の植物油または、たとえばオレイン酸エチルなどのような合成脂肪基剤その他のものも所望されうる。緩衝液、保存剤、抗酸化剤その他も承認されている医薬的慣行に従って混入することができる。

ここに本発明を必要に応じて特定的方法および物質を参照しながら説明した。これら特定的な方法および物質についての議論は、本発明の範囲を如何なる意味でも決して限定するものではなく、その範囲は本発明の目的を達成するために適当な如何なる、そして全ての物質および方法にも展開するものであることを理解すべきである。

実施例

物質

ヒト第Ｘａ因子、活性化プロテインＣ、トロンビン、第ＶＩＩａ因子および第ＸＩａ因子はＨａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ・Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．から購入した。ウシトリプシン、ウシキモトリプシン、トリトンＸ－１００、４－メチルウンベリフェリルｐ

－グアニジノベンゾエート（ＭＵＧＢ）およびＣＨＡＰＳはＳｉｇｍａからである。ヒト白血球エラスターゼ（ＨＬＥ）はＥｌａｓｔｉｎ・Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｉｎｃ．からである。ヒトプラスミンはＫａｂｉから購入した。ヒト第ＸＩＩａ因子およびヒト血漿カリクレインはＥｎｚｙｍｅ・Ｒｅｓｅａｒｃｈ・Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．から入手した。単鎖組織プラスミノーゲンアクチベータ（ｔ－ＰＡ）はＮ．Ｐａｏｎｉ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）から入手した。基質（提供元）は次の通り：Ｎ$^{\alpha}$－ベンゾイル－Ｌ－アルギニン－ｐ－ニトロアニリド（ＢＡＰＡ）（Ｂａｃｈｅｍ）；Ｓｐｅｃｔｒｏｚｙｍｅ・ｆＸａ（Ａｍｅｒｉｃａｎ・Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃａ）；Ｓ２３６６、Ｓ２３０２およびＳ２２８８（Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｘ）；Ｓ２２５１（ＫＡＢＩ）；ＭｅＯＳｕｃ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｖａｌ－ｐＮＡ（配列番号９）（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）；Ｓｕｃ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｈｅ－ｐＮＡ（配列番号１０）（Ｓｉｇｍａ）。組換えヒトＴＦ$_{1\sim 243}$は以前の報告の通り大腸菌中で製造し、精製した（Ｐａｂｏｒｓｋｙ，Ｌ．Ｒ．など、前出）。ＰｒｅｐｏｕｒｅｄポリアクリルアミドゲルはＮｏｖｅｘから購入した。分子量標準はＡｍｅｒｓｈａｍ（Ｒａｉｎｂｏｗ）およびＬＫＢ（ウマミオグロビンペプチド）からである。ＤＥＡＥ・ｆａｓｔ・ｆｌｏｗおよびＳｕｐｅｒｄｅｘ樹脂はＰｈａｒｍａｃｉａ・ＬＫＢ・Ｂｉｏｔｈｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．からである。シリカ吸着剤担体はＤａｖｉｓｏｎ・Ｃｈｅｍｉｃａｌｓから購入した。オリゴヌクレオチドは燐酸水素化学を用いて合成し（Ｆｒｏｅｈｌｅｒ，Ｂ．Ｃ．など、Ｎｕｃｌｅｉｃ・Ａｃｉｄ・Ｒｅｓ．、１４巻：５３９９～５４０７［１９８６年］）、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ＰＡＧＥ）で精製した。大腸菌ＸＬ１－ブルーＭＲＦ’はＳｔｒａｔａｇｅｎｅから購入した。制限酵素はＮｅｗ・Ｅｎｇｌａｎｄ・Ｂｉｏｌａｂｓからである。Ａｆｆｉｇｅｌ－１５はＢｉｏ－Ｒａｄから入手した。その他の試薬はすべて最高級で商業的に購入可能であった。

実施例１　エコチン遺伝子のクローニング

ＤＮＡ技術は特段の言及がない限り、すべて標準的操作に従って行った（Ｓａｍｂｒｏｏｋなど、前出）。エコチン遺伝子は大腸菌染色体ＤＮＡからポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用してクローニングした。報文中のエコチン遺伝子配列に基づいて、遺伝子の５’および３’末端に相補的なプライマー２個を設計し、加えてＸｂａＩおよびＢａｍＨＩ制限部位をコードした。このプライマーは次の配列を持っていた：５’－ＣＴＧＧＡＣＴＣＴＡＧＡＡＴＴＡＴＧＡＡＧＡＣＣＡＴＴＣＴＡＣＣＴＧＣＡＧＴＡ（配列番号１１）および５’－ＴＣＴＧＡＧＧＡＴＣＣＡＧＧＣＣＴＴＴＡＧＣＧＡＡＣＴＡＣＣＧＣＧＴＴＧＴＣＡＡＴ（配列番号１２）。このＰＣＲ反応はＰｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ・ｔｈｅｒｍｏｃｙｃｌｅｒを使用して大腸菌Ｗ３１１０株（ＡＴＣＣ２７３２５）染色体ＤＮＡ上でＡｍｐｌｉ－Ｔａｑポリメラーゼで次の条件下に実施した：変性９４℃、１分、アニーリング５０℃、２分および伸長７２℃、３分。３０サイクル後、反応物をフェノール／クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿し、ＸｂａＩおよびＢａｍＨＩで消化した。消化物を次に５％ポリアクリルアミドゲル上で８９ｍＭ－トリスホウ酸、１ｍＭ－ＥＤＴＡ、ｐＨ７．９中で電気泳動した、ゲルを臭化エチジウムで染色し、約５００塩基対のバンドを処理し、溶離した。このＰＣＲから得られた断片をＰｈＧＨ１に結合してエコチン発現ベクターｐＥｔ３を構成し（Ｃｈａｎｇ，Ｃ．Ｎ．など、Ｇｅｎｅ、５５巻：１８９～１９６頁［１９８７年］）、これからＸｂａＩ－ＢａｍＨＩ挿入物を取り出した。結合物の混合物でＷ３１１０から由来する大腸菌２７Ｃ７株を形質転換した後、アンピシリン耐性コロニーからのプラスミドＤＮＡを制限分析およびジデオキシ配列決定に付した（Ｓａｎｇｅｒ，Ｆ．、Ｎｉｃｋｌｅｎ，Ｓ．とＡ．Ｒ．Ｃｏｕｌｓｅｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７４巻：５４６３～５４６７頁［１９７７年］）。発現用に正しいエコチン配列をコードするプラスミド、ｐＥｔ３、で大腸菌２７Ｃ７株を再び形質転換した。

実施例２　組換えエコチンの発現および精製

２７Ｃ７・ｐＥｔ３の培養物を３７℃で３０時間通気しながら１０リットルの発酵槽中、アンピシリン１１０μｇ／ｍＬ、酵母エキス１１ｇ／Ｌ、水解カゼイン１１ｇ／Ｌ、１６

．４ｍＭ－K_2HPO_4、９．２ｍＭ－NaH_2PO_4、４７．４ｍＭ－$(NH_4)_2SO_4$、３．７ｍＭ－クエン酸ナトリウム、２２．１ｍＭ－ＫＣｌ、７．７ｍＭ－$MgSO_4$、１１０μＭ－$FeCl_3$、１５μＭ－$ZnSO_4$、１６．２μＭ－$CoCl_2$、１５．９μＭ－Na_2MoO_4、１７．６μＭ－$CuSO_4$、１７．７μＭ－H_3BO_3および１８．２μＭ－$MnSO_4$を含む培養液中で培養した。細胞密度に依存してグルコースを添加して過剰のグルコースを維持し、また嫌気性を避け、NH_4OHを添加してｐＨを７．４に維持した。収穫時の細胞密度は１１６OD_{550}であった。

組換えエコチンは次の通りに精製した。凍結細胞ペースト（４００ｇ）を２０ｍＭ－トリス、５ｍＭ－ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５の１０容中で解凍して浸透圧ショックに付し、４℃で１５分間撹拌した。細胞を１０８００×ｇで４５分間遠心分離して除き、上清液を０．４５ミクロン膜を通して濾過して透明にした。得られた周辺細胞質画分（３０００ｍＬ）を２０ｍＭ－トリス、５ｍＭ－ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５であらかじめ平衡化しておいたＤＥＡＥ－セファロースｆａｓｔ・ｆｌｏｗ５００ｍＬと混合し、４℃で一夜沈降させた。エコチンを含む上清液を次にデカンテーションし、０．４５ミクロン膜を通して濾過した。上清液の一部（５００ｍＬ）を０．１Ｍ－ＮａＣｌ濃度に調整し、ｐＨ７．４の燐酸塩緩衝食塩水（ＰＢＳ）中で平衡化したＸＫ５０Ｐｈａｒｍａｃｉａカラムシリカ吸着剤担体２００ｍＬ上に加えた。カラムをＰＢＳで洗浄し、７．５Ｍ－尿素、５０ｍＭ－トリス、５ｍＭ－グリシン、ｐＨ８．５で溶離した。シリカカラムの溶離液画分をＨＣｌでｐＨ３．０に調整し、０．１％ＴＦＡで平衡化したＶｙｄａｃ・Ｃ４逆相ＨＰＬＣカラム（１０×２５０ｍｍ）上に装填した。カラムを洗浄し、次に２５％から４０％アセトニトリル直線勾配で５０分間にわたって溶離した。ＳＤＳ・ＰＡＧＥによる分析後、エコチンを含む画分を集め、アセトニトリルを窒素気流下に蒸発した。得られた濃縮物を集め、５０ｍＭ－トリス、ｐＨ７．５と６℃で平衡化したＳｕｐｅｒｄｅｘカラム（Ｓ×２００、２６／６０）上、流速２ｍＬ／分でサイズ排除クロマトグラフィーに付した。この処理数回からのエコチンを含む画分を集め、エンドトキシン濃度を低下させるために５０ｍＭ－トリス、ｐＨ８．０で平衡化したＰｈａｒｍａｃｉａ・Ｑ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ・ＨＲカラム（１６×１００ｍｍ）上を通した。精製エコチンは－８０℃で貯蔵した。

実施例３　エコチン突然変異体

突然変異に使用したファージミドはエコチン遺伝子およびその天然のシグナル配列をコードする５０５塩基対のｐＥｔ３のＸｂａｌＩ／ＢａｍＨＩ断片をファージミドｐＡ４Ｇ３２にサブクローニングすることによって作製した。ファージミドｐＡ４Ｇ３２は初めはファージミドｐｈＧＨａｍ－ｇ３中の（Ｌｏｗｍａｎ，Ｈ．Ｂ．など、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、３０巻：１０８３２～１０８３８頁［１９９１年］）ヒト成長ホルモン配列の代わりにＡＰＰＩ配列（Ｃａｓｔｒｏ，Ｍ．など、ＦＥＢＳ・Ｌｅｔｔｅｒｓ、２６７巻：２０７～２１２頁［１９９０年］）をコードする合成遺伝子をサブクローニングすることによって構築した。ファージミドｐＡ４Ｇ３２はアルカリ性ホスファターゼのプロモータ、ｓｔＩＩ分泌シグナル（エコチンのサブクローンでは削除）、ｆ１およびｃｏｌＥ１複製開始部位、およびアンピシリン耐性遺伝子も含む。Ｍｅｔ８４をＡｒｇ、Ｌｙｓ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、またはＡｓｐに変化させるP_1位での部位指向突然誘発はＫｕｎｋｅｌが報告した指向オリゴヌクレオチド変異誘発法（Ｋｕｎｋｅｌ，Ｔ．Ａ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８２巻：４８８～４９２頁［１９８５年］）を使用して達成した。変異誘発後に得られたクローンをジデオキシ配列分析（Ｓａｎｇｅｒ，Ｆ．など、前出）により分析した。所期の突然変異をコードするファージミドで次に大腸菌２７Ｃ７株を形質転換し、次の通りに発現を点検した。各突然変異体の培養物１Ｌをカルベニシリン５０μｇ／ｍＬを含む（２７Ｃ７対照ではカルベニシリン不含）低燐酸最小培地（Ｃｈａｎｇ，Ｃ．Ｎ．、など、前出）１Ｌ中で３７℃で２０時間成育させた。遠心分離で細胞を収穫し、ペレットを１０ｍＭ－トリス、ｐＨ８．０、１ｍＭ－ＥＤＴＡ４ｍＬ中に再懸濁し、細胞に浸透圧ショックを与えて周縁細胞質内容物を得た。４℃で１時間撹拌後、懸濁液を遠心沈殿し、上清液を収穫した。これらの標品をトリプシン阻害検定法（データ不掲載）およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図２）によりエコチン発現について検定した。

突然変異体エコチン蛋白質は被ショック体からメーカーの指示書に従ってあらかじめ製造しておいたＡｆｆｉｇｅｌ－１５－トリプシン親和性カラム２．５ｍＬに結合させることによって精製した。このカラムを２０ｍＭ－トリス、ｐＨ７．５、５ｍＭ－$CaCl_2$で平衡させ、かつ洗浄し、１０ｍＭ－ＨＣｌで溶離した。阻害活性を示す画分を集め、１０×２５０ｍｍ２１８ＴＰ５１０・Ｖｙｄａｃ・Ｃ１８カラム（５ミクロン）、Ｗａｔｅｒｓシステム（５１０型ポンプ、２１４ｎｍにおける４９０Ｅ・ＵＶ検出器およびＷａｔｅｒｓ・Ｅｘｐｅｒｔ・Ｅａｓｅ３．０版、クロマトグラフィーソフトウエア）を用いる逆相ＨＰＬＣによりさらに精製した。装填および０．１％ＴＦＡ洗浄後、０．１％ＴＦＡを含有する１５％から６０％勾配のCH_3CNを使用してカラムから溶離した（０．５％／分、５ｍＬ／分、１分／画分）、エコチン突然変異体は～４０％CH_3CNで溶離した。活性画分を真空蒸発してCH_3CNを除き、４℃で貯蔵した。

＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊

ここに引用する文献は全て参考のために記載して明示したものである。

配列表

（１）一般的情報

（ｉ）出願人：　ジェネンテク，インコーポレイテッド

（ii）発明の名称：　エコチンおよびその同族体を含む医薬的組成物

（iii）配列の数：　１２

（iv）連絡先：

（Ａ）宛名：ジェネンテク，インコーポレイテッド

（Ｂ）通り：ポイント・サン・ブルーノ・ブールバード４６０番

（Ｃ）市：サウス・サン・フランシスコ

（Ｄ）州：カリフォルニア

（Ｅ）国：アメリカ合衆国

（Ｆ）ＺＩＰ：９４０８０

（ｖ）コンピューター解読書式：

（Ａ）媒体型：５．２５インチ，３６０Ｋｂフロッピーディスク

（Ｂ）コンピューター：ＩＢＭ ＰＣ適合

（Ｃ）オペレーティング・システム：ＰＣ－ＤＯＳ／ＭＳ－ＤＯＳ

（Ｄ）ソフトウエア：patin（ジェネンテク）

（vi）本出願のデータ：

（Ａ）出願番号：

（Ｂ）出願日：

（Ｃ）分類：

（vii）優先権主張出願のデータ：

（Ａ）出願番号：

（Ｂ）出願日：

（viii）弁理士／代理人 情報：

（Ａ）氏名：ウインター，ダリル・ビィー

（Ｂ）登録番号：３２，６３７

（Ｃ）参照／整理番号：８５９ＰＣＴ

（ix）電話連絡先情報：

（Ａ）電話番号：４１５／２２５－１２４９

（Ｂ）ファックス番号：４１５／９５２－９８８１

（Ｃ）テレックス：９１０／３７１－７１６８

（２）配列番号１の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：１４２アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号１：

```
Ala Glu Ser Val Gln Pro Leu Glu Lys Ile Ala Pro Tyr Pro Gln
 1               5                  10                  15

Ala Glu Lys Gly Met Lys Arg Gln Val Ile Gln Leu Thr Pro Gln
            20                  25                  30

Glu Asp Glu Ser Thr Leu Lys Val Glu Leu Leu Ile Gly Gln Thr
        35                  40                  45

Leu Glu Val Asp Cys Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Lys Leu Glu
    50                  55                  60

Asn Lys Thr Leu Glu Gly Trp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Val Phe Asp
65                  70                  75

Lys Val Ser Ser Pro Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Asp Gly
                80                  85                  90

Lys Lys Glu Lys Lys Phe Val Thr Ala Tyr Leu Gly Asp Ala Gly
            95                  100                 105

Met Leu Arg Tyr Asn Ser Lys Leu Pro Ile Val Val Tyr Thr Pro
        110                 115                 120

Asp Asn Val Asp Val Lys Tyr Arg Val Trp Lys Ala Glu Glu Lys
    125                 130                 135

Ile Asp Asn Ala Val Val Arg
140     142
```

（２）配列番号２の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：１４２アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号２：

Ala Glu Ser Val Gln Pro Leu Glu Lys Ile Ala Pro Tyr Pro Gln
1 5 10 15

Ala Glu Lys Gly Met Lys Arg Gln Val Ile Gln Leu Thr Pro Gln
20 25 30

Glu Asp Glu Ser Thr Leu Lys Val Glu Leu Leu Ile Gly Gln Thr
35 40 45

Leu Glu Val Asp Cys Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Lys Leu Glu
50 55 60

Asn Lys Thr Leu Glu Gly Trp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Val Phe Asp
65 70 75

Lys Val Ser Ser Pro Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Asp Gly
80 85 90

Lys Lys Glu Lys Lys Phe Val Thr Ala Tyr Leu Gly Asp Ala Gly
95 100 105

Met Leu Arg Tyr Asn Ser Lys Leu Pro Ile Val Val Tyr Thr Pro
110 115 120

Asp Asn Val Asp Val Lys Tyr Arg Val Trp Lys Ala Glu Glu Lys
125 130 135

Ile Asp Asn Ala Val Val Arg
140 142

（２）配列番号３の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：１４２アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（xi）配列：配列番号３：

Ala Glu Ser Val Gln Pro Leu Glu Lys Ile Ala Pro Tyr Pro Gln
1 5 10 15

Ala Glu Lys Gly Met Lys Arg Gln Val Ile Gln Leu Thr Pro Gln
20 25 30

Glu Asp Glu Ser Thr Leu Lys Val Glu Leu Leu Ile Gly Gln Thr
35 40 45

Leu Glu Val Asp Cys Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Lys Leu Glu
50 55 60

Asn Lys Thr Leu Glu Gly Trp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Val Phe Asp
65 70 75

Lys Val Ser Ser Pro Val Ser Thr Xaa Xaa Ala Cys Pro Asp Gly
80 85 90

Lys Lys Glu Lys Lys Phe Val Thr Ala Tyr Leu Gly Asp Ala Gly
95 100 105

Met Leu Arg Tyr Asn Ser Lys Leu Pro Ile Val Val Tyr Thr Pro
110 115 120

Asp Asn Val Asp Val Lys Tyr Arg Val Trp Lys Ala Glu Glu Lys
125 130 135

Ile Asp Asn Ala Val Val Arg
140 142

（２）配列番号４の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：１４２アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（xi）配列：配列番号４：

Ala Glu Ser Val Gln Pro Leu Glu Lys Ile Ala Pro Tyr Pro Gln
1 5 10 15

Ala Glu Lys Gly Met Lys Arg Gln Val Ile Gln Leu Thr Pro Gln
20 25 30

Glu Asp Glu Ser Thr Leu Lys Val Glu Leu Leu Ile Gly Gln Thr
35 40 45

Leu Glu Val Asp Cys Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Lys Leu Glu
50 55 60

Asn Lys Thr Leu Glu Gly Trp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Val Phe Asp
65 70 75

Lys Val Ser Ser Pro Val Ser Thr Xaa Met Ala Cys Pro Asp Gly
80 85 90

Lys Lys Glu Lys Lys Phe Val Thr Ala Tyr Leu Gly Asp Ala Gly
95 100 105

Met Leu Arg Tyr Asn Ser Lys Leu Pro Ile Val Val Tyr Thr Pro
110 115 120

Asp Asn Val Asp Val Lys Tyr Arg Val Trp Lys Ala Glu Glu Lys
125 130 135

Ile Asp Asn Ala Val Val Arg
140 142

（２）配列番号５の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：１４２アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（xi）配列：配列番号５：

```
Ala Glu Ser Val Gln Pro Leu Glu Lys Ile Ala Pro Tyr Pro Gln
 1               5                  10                  15

Ala Glu Lys Gly Met Lys Arg Gln Val Ile Gln Leu Thr Pro Gln
            20                  25                  30

Glu Asp Glu Ser Thr Leu Lys Val Glu Leu Leu Ile Gly Gln Thr
        35                  40                  45

Leu Glu Val Asp Cys Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Lys Leu Glu
    50                  55                  60

Asn Lys Thr Leu Glu Gly Trp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Val Phe Asp
65                  70                  75

Lys Val Ser Ser Pro Val Ser Thr Met Xaa Ala Cys Pro Asp Gly
            80                  85                  90

Lys Lys Glu Lys Lys Phe Val Thr Ala Tyr Leu Gly Asp Ala Gly
        95                  100                 105

Met Leu Arg Tyr Asn Ser Lys Leu Pro Ile Val Val Tyr Thr Pro
    110                 115                 120

Asp Asn Val Asp Val Lys Tyr Arg Val Trp Lys Ala Glu Glu Lys
125                 130                 135

Ile Asp Asn Ala Val Val Arg
140     142
```

（２）配列番号６の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：３８アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（xi）配列：配列番号６：

```
Cys Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Lys Leu Glu Asn Lys Thr Leu
 1               5                  10                  15

Glu Gly Trp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Val Phe Asp Lys Val Ser Ser
            20                  25                  30

Pro Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
        35                  38
```

（２）配列番号７の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：７アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（xi）配列：配列番号７：

```
Pro Asp Gly Lys Lys Glu Lys
 1               5       7
```

（２）配列番号８の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：５アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（xi）配列：配列番号８：
Ala Glu Ser Val Gln
1 5

（２）配列番号９の情報:
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：４アミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列：配列番号９：
Ala Ala Pro Val
1 4

（２）配列番号１０の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：４アミノ酸
（Ｂ）型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列：配列番号１０：
Ala Ala Pro Phe
1 4

（２）配列番号１１の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：３９塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列：配列番号１１：
CTGGACTCTA GAATTATGAA GACCATTCTA CCTGCAGTA 39

（２）配列番号１２の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：４１塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列：配列番号１２：
TCTGAGGATC CAGGCCTTTA GCGAACTACC GCGTTGTCAA T 41

【図１】

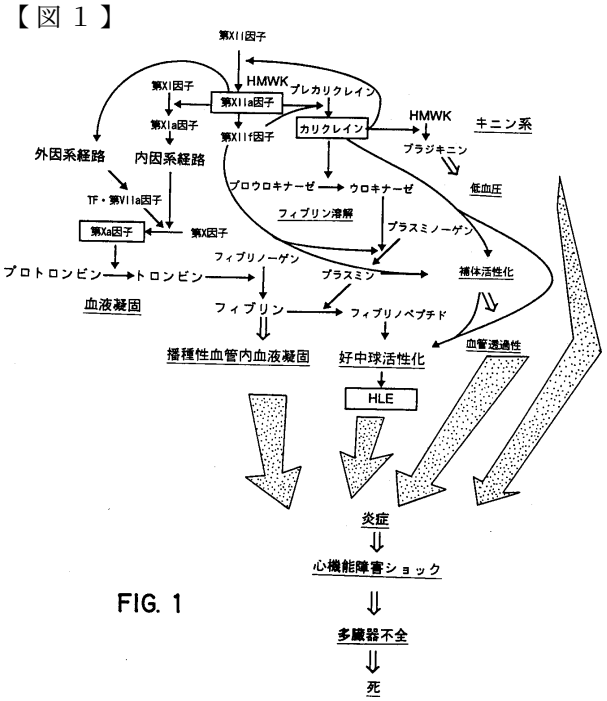

FIG. 1

【図２】

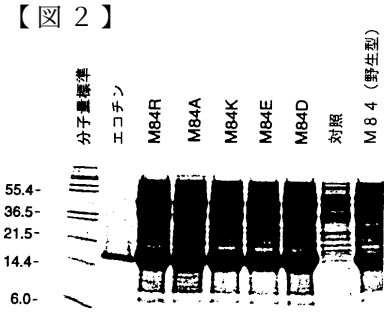

FIG. 2

【図５】

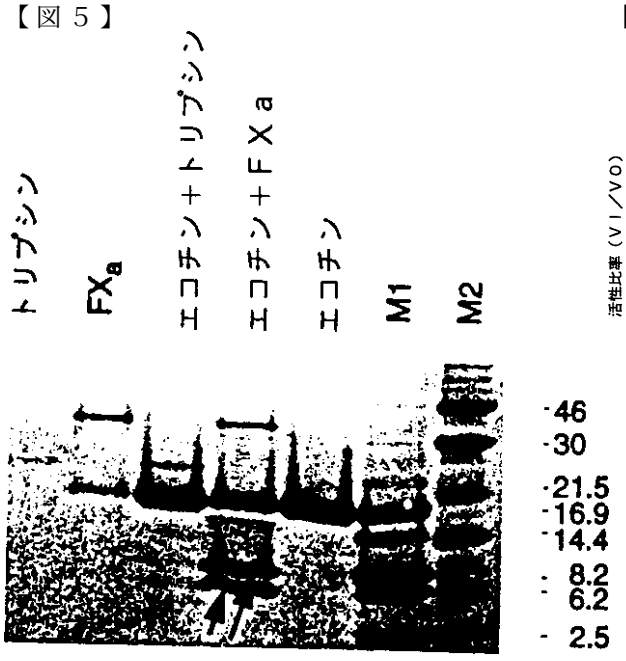

FIG. 5

【図３】

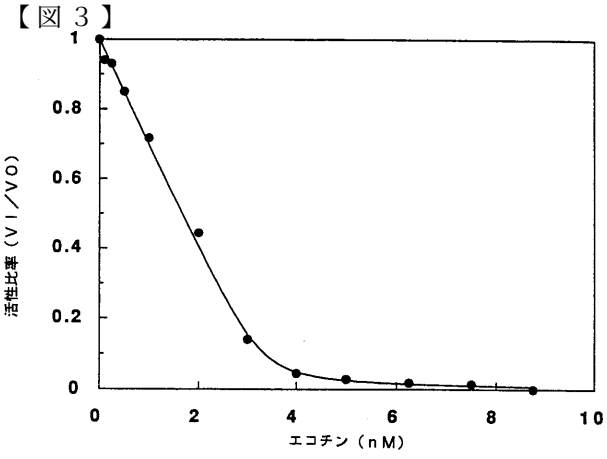

FIG. 3

【図４Ａ】

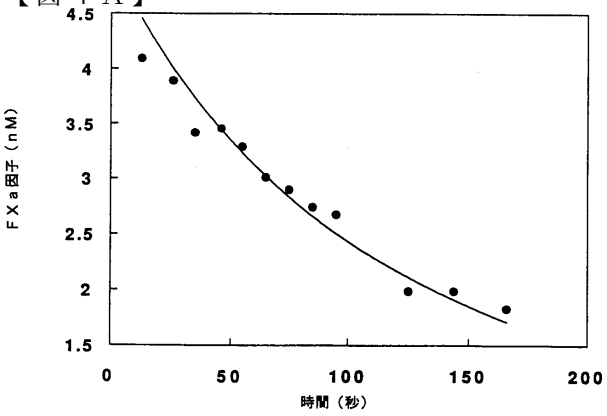

FIG. 4A

【図４Ｂ】

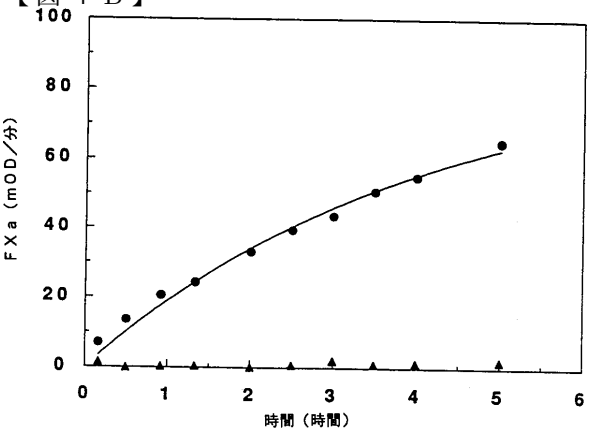

FIG. 4B

【図６】

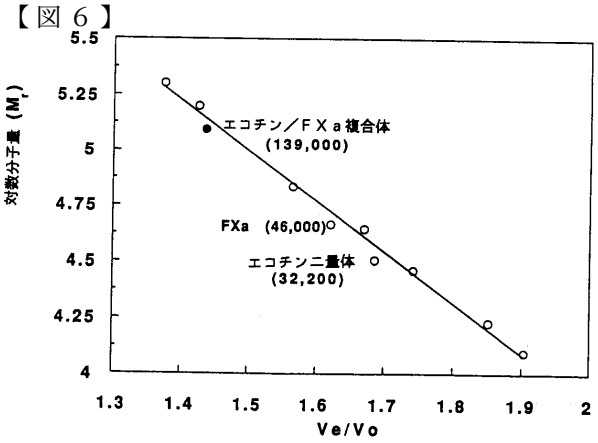

FIG. 6

【図７】

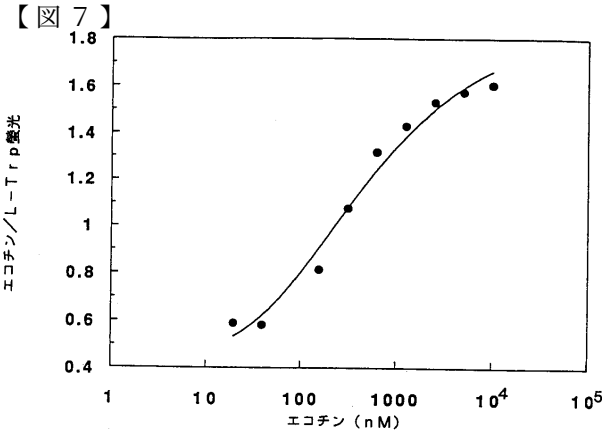

FIG. 7

【図８】

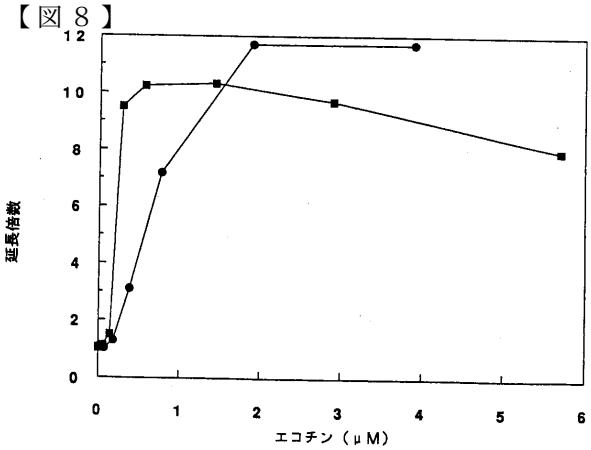

FIG. 8

フロントページの続き

(72)発明者　デニス，マーク・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア９４０７０、サン・カルロス、プリマス・アベニュー１２０番
(72)発明者　ウルマー，ジャナ・シーモア
アメリカ合衆国カリフォルニア９４９０３、サン・ラファエル、キーストーン・コート３４６番

審査官　飯室　里美

(56)参考文献　The Journal of Biological Chemistry, 1991, Vol.266, No.10, pp.6620-6625

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09
C07K 14/81
C12P 21/02
A61K 38/55
A61P 7/04
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDream2)