(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3735921号
(P3735921)
(45)発行日　平成18年1月18日(2006.1.18)　(24)登録日　平成17年11月4日(2005.11.4)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/745	(2006.01)	C07K	14/745	
A61K 9/127	(2006.01)	A61K	9/127	
A61K 49/00	(2006.01)	A61K	49/00	A
A61P 7/04	(2006.01)	A61P	7/04	
A61P 7/08	(2006.01)	A61P	7/08	

請求項の数 9　(全 11 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8-21482
(22)出願日　平成8年2月7日(1996.2.7)
(65)公開番号　特開平9-208599
(43)公開日　平成9年8月12日(1997.8.12)
審査請求日　平成14年11月25日(2002.11.25)

(73)特許権者　000006725
三菱ウェルファーマ株式会社
大阪府大阪市中央区平野町２丁目６番９号
(74)代理人　100080791
弁理士　高島　一
(72)発明者　松田　寛
大阪市都島区都島中通３丁目５番４４号
株式会社ミドリ十字　都島工場内
(72)発明者　上出　佳永子
大阪市都島区都島中通３丁目５番４４号
株式会社ミドリ十字　都島工場内
(72)発明者　天辻　康夫
大阪府枚方市招提大谷２丁目２５番１号
株式会社ミドリ十字　中央研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＧＰＩｂ・脂質複合体およびその用途

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＧＰＩｂ又はＧＰＩｂα鎖もしくはvWF結合領域を含むその断片と官能基を有する脂質とが共有結合した結合体、および脂質を含有する複合体。
【請求項２】
複合体がリポソームの形態である請求項１記載の複合体。
【請求項３】
請求項１記載の複合体を含有する血小板代用剤。
【請求項４】
標識物質および請求項１記載の複合体を含有する診断薬。
【請求項５】
薬物および請求項１記載の複合体を含有する薬物含有組成物。
【請求項６】
ＧＰＩｂ又はＧＰＩｂα鎖もしくはvWF結合領域を含むその断片と官能基を有する脂質とが共有結合した結合体。
【請求項７】
ＧＰＩｂα鎖断片がＧＰＩｂα鎖の膜貫通部位を欠失したものである請求項１記載の複合体。
【請求項８】
ＧＰＩｂα鎖断片がＧＰＩｂα鎖の膜貫通部位を欠失したものである請求項６記載の結合

体。
【請求項９】
請求項１記載の複合体を有効成分とする血管障害、血管損傷、血栓症の予防・治療剤。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明はＧＰＩｂ・脂質複合体およびその用途に関する。さらに詳しくは、血管損傷部位の検査、診断および治療に有効に利用されうるＧＰＩｂ・脂質複合体およびその用途に関する。
【０００２】
【従来の技術】
血小板膜表面には各種糖蛋白（ＧＰ）が存在しており、血小板機能の発現に関与している。ＧＰＩｂもこの血小板膜糖蛋白の一種であり、フォンヴィルブランド因子（ｖＷＦ）の受容体として機能している。ＧＰＩｂはα鎖およびβ鎖がジスルフィド結合した、分子量１６０，０００のヘテロ二量体である。
【０００３】
血管損傷が起きると、速やかに血小板が当該部位に粘着し、凝集などの反応を通じて血小板血栓を形成する。血小板血栓の形成にはｖＷＦが粘着性蛋白として重要な役割を果たすが、この時ＧＰＩｂは受容体としてｖＷＦと結合し、当該血管損傷部位における、その後のｖＷＦを介した血小板の粘着・凝集反応を活性化あるいは促進する機能を有すると考えられている。また、ｖＷＦとＧＰＩｂの結合は、損傷血管における止血の機能の他に、病的血栓の形成にも関与している。従って、ＧＰＩｂは血管損傷部位の検査や診断ならびに病的血栓の検出、さらには治療において有効に利用されることが期待される。
【０００４】
【発明が解決しようとする課題】
しかしながら、単離したＧＰＩｂを用いても、上述したような生理活性を人為的に発現させることはできなかった。すなわち、ＧＰＩｂを医薬あるいは試薬として実用化するためには何らかの製剤的工夫が必要であった。
【０００５】
【課題を解決するための手段】
本発明者らはこのような状況下、鋭意研究を行った結果、ＧＰＩｂと特定の脂質との結合体および通常の脂質とを含有する脂質複合体を調製することによって、はじめてその生理活性を発現できることを見出し、本発明を完成するに到った。
【０００６】
すなわち本発明は、
（１）ＧＰＩｂと官能基を有する脂質との結合体および脂質とを含有する複合体、
（２）複合体がリポソームの形態である上記（１）記載の複合体、
（３）上記（１）記載の複合体を含有する血小板代用剤、
（４）標識物質および上記（１）記載の複合体を含有する診断薬、
（５）薬物および上記（１）記載の複合体を含有する薬物含有組成物、および
（６）ＧＰＩｂおよび官能基を有する脂質との結合体に関する。
【０００７】
（Ｉ）ＧＰＩｂと官能基を有する脂質との結合体（ＧＰＩｂ結合体）
▲１▼ＧＰＩｂ
本発明で使用するＧＰＩｂとしては、ＧＰＩｂそのもののほか、そのα鎖、ｖＷＦ結合領域、すなわちＧＰＩｂα鎖〔Ｈｉｓ（１）－Ｔｈｒ（３０２）〕断片等のＧＰＩｂ断片であってもよい。また、ＧＰＩｂと同程度のｖＷＦ結合能を有していれば、その類似体、変異体、修飾体、誘導体、糖鎖付加物であっても本発明の範疇に包含される。さらにこれらは膜貫通部位を欠失していてもよい。本発明において、より好ましいのはこの膜貫通部位を欠失したものである。

【０００８】
具体的には、ＷＯ９２／１６２２５、ＷＯ９３／１３７８４、ＷＯ９３／１６７１２、特開平１－１００１９６、特開平１－２２１３９４および特表平５－５０３７０８等で開示されたＧＰＩｂ関連物質が例示される。例えば、ＧＰＩｂ、ＧＰＩｂα鎖およびＧＰＩｂα鎖断片として、Ｈｉｓ（１）－Ａｌａ（３０２）、Ｈｉｓ（１）－Ａｒｇ（２９３）、Ａｌａ（１６５）－Ｌｅｕ（１８４）、Ｇｌｎ（１８０）－Ｐｈｅ（１９９）、Ｈｉｓ（１９５）－Ｌｅｕ（２１４）、Ａｓｎ（２１０）－Ｖａｌ（２２９）、Ｇｌｕ（２２５）－Ａｌａ（２４４）、Ｔｈｒ（２４０）－Ｔｙｒ（２５９）、Ａｓｎ（６１）－Ｔｈｒ（７５）、Ｇｌｎ（７１）－Ｓｅｒ（８５）、Ｔｈｒ（８１）－Ｌｅｕ（９５）、Ｇｌｎ（９７）－Ａｒｇ（１１１）、Ｌｅｕ（１３６）－Ｌｅｕ（１５０）、Ａｓｎ（２１０）－Ａｌａ（２２４）、Ｇｌｎ（２２１）－Ａｓｐ（２３５）およびＳｅｒ（２４１）－Ａｓｐ（２５５）等が例示される。
置換体として、Ｈｉｓ（１）－Ａｌａ（３０２）からなるＧＰＩｂα鎖断片において、Ｇｌｙ（２３３）またはＭｅｔ（２３９）を各々Ｖａｌに置換したもの等が例示される。
【０００９】
ＧＰＩｂの調製方法に特別の制限はなく、血小板膜から抽出・単離する方法、細胞培養による方法、遺伝子工学的に産生する方法等が挙げられる。
【００１０】
▲２▼官能基を有する脂質
官能基を有する脂質中、ＧＰＩｂと直接または間接的に結合可能な官能基としては、アミノ基（NH_2 基）、カルボキシル基（ＣＯＯＨ基）、チオール基（ＳＨ基）およびアルデヒド基（ＣＨＯ基）等が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではなく、ＧＰＩｂ分子と直接または間接的に結合反応を生じうるものであればどのようなものでもよい。
【００１１】
脂質の種類としては、リン脂質、糖脂質、脂肪酸、グリセライドおよびコレステロール等、両親媒性のものであれば特に限定されない。
【００１２】
官能基を有する脂質の具体例として、リン脂質ではホスファチジルエタノールアミン（以下、ＰＥとする）、ホスファチジルチオエタノール（例えば、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルチオエタノール等）が例示される。また間接的にＧＰＩｂと結合させる場合には、架橋剤（いわゆるスペーサー、リンカー）を予め結合したものも利用できる。このような架橋剤としては、例えば、ジカルボン酸、アミノカルボン酸、ビスマレイミド化合物、ビスハロカルボニル化合物、ハロカルボニルマレイミド化合物、ジチオマレイミド、ジチオカルボン酸およびマレイミドカルボン酸等が例示される。これらは炭素鎖がC_{2-10}であることが好ましい。
当該架橋剤を結合したリン脂質として、ＰＥ－Ｎ－カルボニルアミン、例えば、ＰＥ－Ｎ－カプロイルアミン、ＰＥ－Ｎ－ドデカニルアミン、ＰＥ－Ｎ－グルタリルアミン等；ＰＥ－Ｎ－カルボニル、例えば、ＰＥ－Ｎ－サクシニル、ＰＥ－Ｎ－グルタリル（ＮＧＰＥ）、ＰＥ－Ｎ－ドデカニル（ＮＤＰＥ）等；ＰＥ－Ｎ－ジチオアシレート、例えば、ＰＥ－Ｎ－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート等；ＰＥ－Ｎ－マレイミドアシレート、例えば、ＰＥ－Ｎ－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート；ＰＥ－Ｎ－ビオチニル等が例示される。
脂肪酸としては、炭素数１２～１８のものが挙げられ、飽和脂肪酸でも、不飽和脂肪酸でもよい。例えば、パルミチン酸、オレイン酸およびラウリン酸等が例示される。
これらの脂質は反応性を高めるために、酸ハライド、酸無水物および活性エステル体の形態でもよい。
【００１３】
▲３▼ＧＰＩｂ結合体の調製
ＧＰＩｂと官能基を有する脂質とは、直接的にまたは間接的、すなわち架橋剤を介して化学的に結合させることができる。本発明においてより好ましいのは間接的に結合させる態

様である。
ＧＰＩｂと官能基を有する脂質との混合比は、モル比で１：１～１：２０程度、好ましくは１：１～１：１０程度である。
【００１４】
化学的結合においては、場合に応じて公知の縮合剤あるいは官能基の活性化剤を用いることができる。縮合剤および活性化剤として、カルボジイミド類、例えば、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣＩ）等、サクシンイミド類として、例えば、Ｎ－ヒドロキシサクシンイミド、Ｎ－ヒドロキシスルホサクシンイミド（ＮＨＳＳ）等、チオール基の交換反応に用いるものとして、例えば、５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）、２，２’－ジチオビスピリジン等が例示される。二価性架橋剤としては、同反応性のものとして、例えば、ジメチルアジピンイミデート、ジスクシンイミジルスベレート等、異反応性のものとして、例えば、スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート、Ｎ－（６－マレイミドカプロイルオキシ）サクシンイミド、Ｎ－サクシンイミジル－６－マレイミドヘキサノエート等が例示される。
【００１５】
直接的に結合する具体的方法には、ＰＥのアミノ基とＧＰＩｂのカルボキシル基をカルボジイミドで結合させる方法、ＧＰＩｂの糖鎖を酸化してアルデヒド基とし、これとＰＥのアミンでシッフベース結合する方法、ＧＰＩｂのＳＨ基と末端にＳＨ基を有するリン脂質（例えば、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルチオエタノール等）を酸化状態でジスルフィド結合させる方法、糖脂質を酸化してアルデヒド基を得て、ＧＰＩｂのアミノ基を結合する方法および脂肪酸をＧＰＩｂのアミノ基と結合する方法等が挙げられる。
間接的に結合する具体的方法には、ＰＥのアミノ基と架橋剤（ジカルボン酸）の一方のカルボキシル基をアミド結合し、もう一方のカルボキシル基とＧＰＩｂのアミノ基をアミノ結合する方法、ＰＥのアミノ基と架橋剤（アミノカルボン酸）のカルボキシル基をアミド結合し、同架橋剤のアミノ基とＧＰＩｂのカルボキシル基をアミド結合する方法、ＰＥのアミノ基と架橋剤（アミノカルボン酸）のカルボキシル基をアミド結合し、同架橋剤のアミノ基とＧＰＩｂの糖鎖を酸化して生成したアルデヒド基をシッフベース結合する方法、ＰＥのアミノ基と架橋剤（ジチオカルボニル化合物）のカルボキシル基をアミド結合し、架橋剤のジチオ部分とＧＰＩｂのチオール基を反応させてジスルフィド結合する方法、ＰＥのアミノ基と架橋剤（ジチオマレイミド化合物）を結合させた後に、ＧＰＩｂのチオール基を反応させることによりジスルフィド結合する方法、ホスファチジルチオエタノールのチオール基とＧＰＩｂのチオール基とを架橋剤（ビスマレイミド化合物、ビスハロカルボニル化合物およびハロカルボニルマレイミド化合物等）を用いて還元アルキル化により結合する方法およびＰＥのアミノ基と架橋剤（マレイミドカルボン酸）のカルボキシル基をアミド結合し、架橋剤のマレイミド部分とＧＰＩｂのアミノ基を反応させる方法等の公知の手法が例示される。
【００１６】
ＧＰＩｂ結合体の調製は界面活性剤の存在下で行ってもよい。界面活性剤は官能基を有する脂質を可溶化するものであれば特に制限はないが、ＧＰＩｂの構造に影響を及ぼさないために非イオン性界面活性剤を用いる。
特に臨界ミセル濃度（ＣＭＣ）が高い方、例えば１ｍＭ以上のＣＭＣを有するものが好ましい。具体的には、オクチルグルコシド（ｎ－オクチル－β－Ｄ－グルコシド）、オクチルチオグルコシド、（ｎ－オクチル－β－Ｄ－チオグルコシド）－３－〔（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ〕プロパン硫酸（ＣＨＡＰＳ）およびＮ，Ｎ－ビス（３－Ｄ－グルコンアミドプロピル）デオキシコラミド（ｄｅｏｘｙ－ＢＩＧＣＨＡＰ）等が例示される。
その混合比は脂質：界面活性剤として、０．０１：１～０．１：１程度（モル比）が好ましい。

【００１７】
（II）ＧＰＩｂ結合体と脂質との複合体（ＧＰＩｂ脂質複合体）
上記結合体と脂質との複合体は、脂質複合体として公知の形態をとることができる。例えば、リポソーム、ミセル、脂肪乳剤等が挙げられるが、特にリポソームの形態をとることが好ましい。
▲１▼脂質
ここで使用される脂質は単独で、または他の脂質と混合して脂質複合体（例えば、リポソーム）の形態をとりうるものであれば特に限定されない。そのような脂質としては、リン脂質、糖脂質、コレステロール、脂肪酸およびこれらの誘導体等が挙げられる。
当該複合体を形成するための脂質は、生理的に許容され、そして代謝されうる無毒の脂質であればいずれも本発明に用いることができる。
【００１８】
リン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、ジセチルホスフェート、カルジオリピンおよびリゾホスファチジルコリン等が挙げられる。また、これらの脂質は大豆油または卵黄など天然の材料から抽出・精製したものでも、それらを水素添加して構成脂肪酸を飽和化したもの（水素添加リン脂質）でも、また更に構成脂肪酸を特定の脂肪酸、例えば、パルミチン酸またはミリスチン酸に置き換えたもの（ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルグリセロール等）であってもよい。具体的には、精製卵黄レシチン、水素添加精製大豆レシチン、卵黄由来ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジステアリルホスファチジルコリンおよびジミリスチルホスファチジルコリン等が例示される。
【００１９】
糖脂質としては、例えば、セラミド、セレブロシド、スフィンゴシン、サルファチド、ガングリオシド類およびグリセロ糖脂質類等が挙げられる。
【００２０】
脂肪酸としては、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、ミスチリン酸、パルミチン酸およびステアリン酸等が挙げられる。
脂質誘導体としては、ホスファチジルエタノールアミンおよび脂肪酸のポリオキシエチレン誘導体、脂肪酸およびコレステロールの多糖誘導体等が挙げられる。具体的には、ジステアリル－Ｎ－（モノメトキシポリエチレングリコールサクシニル）ホスファチジルエタノールアミン、ポリオキシエチレンパルミチン酸エステル、Ｎ－〔２－（ステアロイルカルボキシアミノ）エチル〕カルバモイルメチルマンナンおよびＮ－〔２－（コレステリルカルボキシアミノ）エチル〕カルバモイルメチルプルラン等が例示される。
【００２１】
▲２▼複合体化
ＧＰＩｂ：脂質の混合比としては、モル比で１：１０～１：１０００程度、好ましくは１：５０～１：２００程度である。
【００２２】
脂質複合体（例えば、リポソーム）の調製は、例えば、界面活性剤除去法、水和法、超音波法、逆相蒸留法、凍結融解法、エタノール注入法、押出し法（ｅｘｔｒｕｓｉｏｎ法）および高圧乳化法等で行うことができる。
界面活性剤除去法としては、ゲル濾過、透析および限外濾過等が一般的に用いられる。
なお、ＧＰＩｂと脂質との複合体化は、ＧＰＩｂと官能基を有する脂質との結合後に行う方法、すなわちＧＰＩｂ結合体を調製後に、脂質複合体にする方法がより好ましい。ただし、（Ｉ）▲２▼の官能基を有する脂質と（II）▲１▼の脂質からなる脂質複合体（リポソーム）を調製後に、ＧＰＩｂを添加して、官能基を有する脂質とＧＰＩｂを結合させることにより、ＧＰＩｂ・脂質複合体を調製することも可能である。
ＧＰＩｂ・脂質複合体の単離・精製は遠心分離およびゲル濾過等の自体公知の手段にて行

うことができる。
【００２３】
以下に、具体例として、ＧＰＩｂ・脂質複合体の製法を説明する。
（ｉ）ＧＰＩｂ結合体を調製後に、脂質複合体とする方法
ＧＰＩｂ、脂質〔(II)▲１▼〕および界面活性剤で可溶化した官能基を有する脂質〔(II)▲２▼〕を適当な水性溶媒中で混合し、まず、ＧＰＩｂと官能基を有する脂質とを結合させた後に、界面活性剤を除去することによりＧＰＩｂ・脂質複合体を形成させる。
なお、ＧＰＩｂと官能基を有する脂質を界面活性剤の存在下に混合して、ＧＰＩｂ結合体を調製した後に、更に脂質を混合し、界面活性剤を除去する手法によってもよい。
未反応のＧＰＩｂ、脂質等を分離除去して精製品を得る。
界面活性剤の定義は、前記と同義である。また、その混合比は、脂質：界面活性剤として０．００１：１～０．１：１（モル比）程度である。
（ii）脂質複合体（リポソーム）を調製後にＧＰＩｂを結合させる方法
官能基を有する脂質〔（Ｉ）▲２▼〕および脂質〔(II)▲１▼〕を有機溶媒、例えば、クロロホルム、エタノール等に溶解・混合した後に、有機溶媒を除去して、脂質薄膜を調製する。適当な水性溶媒を加えて、振盪あるいは攪拌等の公知の手法により、脂質複合体を形成する。さらに、ＧＰＩｂを添加して、ＧＰＩｂと官能基を有する脂質とを結合させる。
未反応のＧＰＩｂ、脂質等を分離除去して精製品を得る。
【００２４】
得られたＧＰＩｂ・脂質複合体における脂質に対するＧＰＩｂの割合は、脂質１重量部に対して、０．０１～１０重量部、好ましくは０．１～５重量部である。
【００２５】
得られたＧＰＩｂ・脂質複合体の粒子径は約５０～５００ｎｍ、好ましくは約１００～４００ｎｍである。
【００２６】
ＧＰＩｂ・脂質複合体（例えば、リポソーム）の構造としては、マルチラメラベシクル（ＭＬＶ）、スモールユニラメラベシクルおよびラージユニラメラベシクル等が挙げられる。さらに、ＰＥＧ、プルローニック等親水性ポリマー（誘導体）で被覆したものも挙げられる。
【００２７】
得られたＧＰＩｂ・脂質複合体は、次いで要すれば、生理的に許容される水溶液で洗浄し、除菌濾過、分注を行い、液状製剤、ペレット状および懸濁状製剤として調製する。
【００２８】
製剤化は医薬品の製法において広く公知の方法に準ずる。また、本製剤は液状製剤を凍結させた後、減圧下で乾燥させ、凍結乾燥製剤としても提供される。
なお、凍結乾燥する場合は保護剤として、単糖類（例えば、ブドウ糖等）、二糖類（例えば、蔗糖等）等を配合してもよい。
【００２９】
本発明の製剤にはアルブミン、デキストラン、ビニル重合体、ゼラチンおよびヒドロキシルエチル澱粉から選ばれた高分子物質を安定化剤として配合してもよい。
【００３０】
当該高分子は、薬物と共に当該脂質複合体内の空隙に取り込まれていてもよいし、また薬物を取り込んだ脂質複合体製剤に添加配合（すなわち、リポソーム外に添加・配合）してもよい。もちろん脂質複合体の内外ともに配合してもよいことはいうまでもない。
【００３１】
当該安定化剤の添加量は脂質１重量部に対して、０．５～１０重量部、好ましくは１～５重量部である。
【００３２】
(III)ＧＰＩｂ・脂質複合体の医薬としての用途

本発明のＧＰＩｂ・脂質複合体は、標識物質（いわゆるマーカー）を封入することにより診断薬としての態様を取ることができる。
このような標識物質としては、ＲＩ（放射性同位元素）、ＭＲＩ用常磁性金属、Ｘ線造影用ヨウ素化合物および蛍光物質等が挙げられる。
【００３３】
ＲＩとしては、例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{99m}Ｔｃ、^{123}Ｉ、^{131}Ｉ、^{87m}Ｓｒ、^{113m}Ｉｎおよび^{197}Ｈｇ等が挙げられる。
ＭＲＩ用常磁性金属としては、例えば、クロム（Ｃｒ）、ガドリニウム（Ｇｄ）、マンガン（Ｍｎ）、鉄（Ｆｅ）、コバルト（Ｃｏ）、ニッケル（Ｎｉ）、プラセオジウム（Ｐｒ）、ネオジウム（Ｎｄ）、サマリウム（Ｓｍ）、イッテルビウム（Ｙｂ）、テルビウム（Ｔｂ）、ジスプロシウム（Ｄｙ）、ホルミウム（Ｈｏ）、エルビウム（Ｅｒ）および銅（Ｃｕ）等の常磁性金属原子の２価または３価イオンが挙げられ、なかでも、好ましいのは、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウムおよび鉄等のイオンである。
Ｘ線造影用ヨウ素化合物は、公知のＸ線造影剤として知られているものを利用できる。具体的には、アジピオドン、アミドトリゾ酸、イオダラム酸、イオパノ酸、イオベンザム酸、イオボダート、チロパノ酸、イオピドール、イオピドン、プロピリオドン、ヨーダミドまたはその塩（例えば、ナトリウム塩、メダルミン塩等）が例示される。
蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）およびカルボキシフルオレセイン（ＣＦ）等が例示される。
【００３４】
これらの標識物質は、公知の方法によって脂質複合体（リポソーム）に封入することができる。例えば、そのまま、塩の形態あるいはエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）およびジエチレントリアミノ五酢酸（ＤＴＰＡ）等のキレート化剤により、キレート化して脂質複合体中に封入することができる。
具体的に^{99m}Ｔｃの場合、過テクネチウム酸ナトリウム、テクネチウムポリリン酸塩および^{99m}ＴｃＤＴＰＡ等を用いることができる。
【００３５】
本発明のＧＰＩｂ脂質複合体には、血管損傷部位への集積性を有するために、薬物含有組成物（薬物運搬体）としての態様を取ることもできる。
このような薬物としては、血管損傷部位へ集積させることによって生理学的、薬理学的に有効であるものであれば特に制限はなく、例えば、止血剤、血管収縮剤、抗炎症剤、血栓溶解剤、抗血液凝固剤、抗血小板剤等が挙げられる。
止血剤としては、カルバゾクロム、血液凝固因子（ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸ）、トロンビン、抗プラスミン剤（例えば、イプシロン－アミノカプロン酸、トラネキサム酸）、硫酸プロタミン、エタンシラート、フィトナジオンおよび結合型エストロゲン（例えば、エストロン硫酸ナトリウム、エワイリン硫酸ナトリウム）等が例示される。
血管収縮剤としては、ノルアドレナリン、ノルフェネリン、フェニレフリン、メタラミノール、メトキサミン、プロスタグランジンF_1 α、プロスタグランジンF_2 αおよびトロンボキサンA_2 等が例示される。
抗炎症剤としては、ステロイド系抗炎症剤（テキサメサゾン、ハイドロコルチゾン、プレドニゾロン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾロン等）、非ステロイド系抗炎症剤（インドメタシン、アセメタシン、フルルビプロフェン、アスピリン、イブプロフェン、フルフェナム酸、ケトプロフェン等）等が例示される。
血栓溶解剤としては、プラスミン、組織プラスミノーゲンアクティベーター、ウロキナーゼ等、またはその前駆体や誘導体等が例示される。
抗血液凝固剤としては、ヘパリン等の酸性ムコ多糖類や、クマリン系抗凝固薬、ヒルジン等の天然抽出物やその誘導体、トロンボモジュリンや活性プロテインＣ等の生理活性物質等が例示される。
抗血小板剤としては、アスピリン、チクロピジン、シロスタゾール、プロスタサイクリン

等が例示される。
これらの薬物は公知の方法によって脂質複合体に封入する。
【００３６】
本発明のＧＰＩｂ・脂質複合体は、ＧＰＩｂとして、１日当たり０．００１～１０００ｍｇ程度を投与することができる。その投与量は患者の性別、年齢、症状等に応じて適宜増減できる。
【００３７】
本発明のＧＰＩｂ・脂質複合体は、より好ましくは非経口的に投与される。具体的には、血管内（動脈内・静脈内）への注射、持続点滴、皮下投与、局所投与あるいは筋肉内投与等が例示される。
【００３８】
本発明のＧＰＩｂ・脂質複合体を含む医薬組成物としては、血小板代用剤、血管障害、血管損傷および血栓症等の予防・治療等の医薬品、あるいはｖＷＦ欠損症等を診断するための診断薬、生物学的・医学的な試薬、血小板凝集抑制剤・抗血栓剤のスクリーニング用の試薬等がある。血管損傷部位および血栓形成部位の検査用診断薬あるいは治療剤としても有用である。
【００３９】
【実施例】
以下、本発明をより詳細に説明するために実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。
実施例１
（１）活性化ＮＧＰＥの調製
ＮＧＰＥ５００μｇに、１ｗ／ｖ％オクチルグルコシド／０．０２Ｍ　２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸〔ＭＥＳ〕緩衝液（０．１５Ｍ　ＮａＣｌ含有、ｐＨ５．０）５００μｌを添加した。０．２５Ｍ　ＥＤＣＩ／同ＭＥＳ緩衝液１２５μｌおよび０．１Ｍ　ＮＨＳＳ／同ＭＥＳ緩衝液１２５μｌを添加し、室温で１０分間インキュベーションした。アミコン３０（分画分子量３０，０００）を用いて、０．５ｗ／ｖ％オクチルグルコシド／０．０５Ｍ　２－〔４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジニル〕エタンスルホン酸〔ＨＥＰＥＳ〕緩衝液（０．１１Ｍ　ＮａＣｌ含有、ｐＨ８．０）に対して限外濾過した。
【００４０】
（２）ＧＰＩｂリポソームの調製
ＣＨＯ細胞を用いて遺伝子工学的に産生したＧＰＩｂα鎖断片〔Ｈｉｓ（１）～Ａｒｇ（２９３）、分子量４５，０００〕３ｍｇを、０．０５Ｍ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（０．１１Ｍ　ＮａＣｌ含有、ｐＨ８．０）に溶解し、この溶液に、ＰＣ溶液〔卵黄ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）４６．４ｍｇ、コレステロール１１．６ｍｇ、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）９．６ｍｇおよびオクチルグルコシド２５０．６ｍｇを、同ＨＥＰＥＳ緩衝液６８０μｌに溶解したもの〕を添加した。さらに、（１）で調製した活性化ＮＧＰＥを添加した。
なお、ＥＰＣ：コレステロール：ＤＰＰＧ：ＧＰＩｂの混合比（モル比）は１００：５０：２０：１、ＥＰＣ：オクチルグルコシドの混合比（モル比）は０．０７：１、活性化ＮＧＰＥ：ＧＰＩｂの混合比（モル比）は１０：１となるように調製した。
３７℃にて、４時間インキュベーションし、リポソームを調製した。ゲル濾過（担体：セファデックスＧ－７５）により、オクチルグルコシドを除去した。
ＣｓＣｌ密度勾配法による超遠心分離を行って、ＧＰＩｂリポソームを回収した。その条件は以下の通りである。すなわち、試料１ｍｌにＣｓＣｌ　１５００ｍｇを溶解し、４０％ＣｓＣｌ　１ｍｌおよび生理食塩水０．２ｍｌを重層し、５５，０００ｒｐｍで３０分間遠心分離を行った。
調製したＧＰＩｂリポソームのＰＣ濃度は、１．３６５ｍｇ／ｍｌであり、蛋白濃度は０．９７８ｍｇ／ｍｌ、平均粒子径は３２８ｎｍであった。

【００４１】
実施例２
リン脂質１重量部に対して、ＣＦが０．１重量部となるように添加し、実施例１に準じて製剤化を行い、ＣＦを配合したＧＰＩｂ・脂質複合体を調製した。
【００４２】
実施例３
リン脂質１重量部に対して、血液凝固因子ＦＶＩＩＩが０．１重量部となるように添加し、実施例１に準じて製剤化を行い、ＦＶＩＩＩを配合したＧＰＩｂ・脂質複合体を調製した。
【００４３】
実施例４
リン脂質１重量部に対して、プロスタグランジンF_1 αが０．０１重量部となるように添加し、実施例１に準じて製剤化を行い、プロスタグランジンF_1 αを配合したＧＰＩｂ・脂質複合体を調製した。
【００４４】
実施例５
実施例のＮＧＰＥの代わりにＮＤＰＥを用いる以外は、実施例１に準じて製剤化を行い、ＧＰＩｂリポソームを調製した。
【００４５】
比較例１
ＧＰＩｂを結合しなかった以外は、実施例１と同様の手順でリポソームを得た。
【００４６】
実験例１
ＧＰＩｂリポソームの凝集能を確認した。実施例１において調製したＧＰＩｂリポソーム（2×10^{12}個／ｍｌ）、ｖＷＦ（５０μｇ／ｍｌ）、リストセチン（１ｍｇ／ｍｌ）の存在下に、１０分間反応させ、散乱光凝集メーターを用いて測定した。
また、同じ系を用いて、ｖＷＦ抗体（５０μｇ／ｍｌ）またはＧＰＩｂ抗体（５０μｇ／ｍｌ）の添加によるＧＰＩｂリポソームの凝集能の影響を調べた。併せて、リストセチン非存在下での効果を確認した。
また、比較例１において調製したＧＰＩｂを結合しないリポソーム（2×10^{12}個／ｍｌ）、ｖＷＦ（５０μｇ／ｍｌ）、リストセチン（１ｍｇ／ｍｌ）の存在下に、１０分間反応させ、散乱光凝集メーターを用いて測定した。
結果を表１に示す。
【００４７】
実験例２
実施例２～５で調製された各種ＧＰＩｂ・脂質複合体を実験例１に準じて凝集能を確認した。その結果いずれの製剤ともリストセチン存在下で、ｖＷＦと特異的に反応し、凝集塊を形成した。
【００４８】
【表１】

GPIb リポソーム	vWF	リストセチン	その他の添加物	凝集塊
2×10^{12}個/ml	50μg/ml	1mg/ml	なし	形成
2×10^{12}個/ml	50μg/ml	1mg/ml	vWF抗体 50μg/ml	形成せず
2×10^{12}個/ml	50μg/ml	1mg/ml	GPIb抗体 50μg/ml	形成せず
2×10^{12}個/ml	50μg/ml	なし	なし	形成せず
GPIbを結合しないリポソーム 2×10^{12}個/ml	50μg/ml	1mg/ml	なし	形成せず

【００４９】
ＧＰＩｂリポソームはリストセチン存在下で、ｖＷＦと特異的に反応し、凝集塊を形成した。この凝集はｖＷＦ抗体またはＧＰＩｂ抗体を添加することにより完全に抑制した。リストセチン非存在下では、凝集は起こらなかった。一方、ＧＰＩｂを結合しないリポソームではリストセチン存在下で凝集塊を形成しなかった。
従って、上記ＧＰＩｂリポソームはｖＷＦに結合でき、凝集塊も形成することが可能である。また、このことからＧＰＩｂリポソームは血小板代用剤として有用であることが判明した。

【００５０】
【発明の効果】
本発明のＧＰＩｂ・脂質複合体はｖＷＦと結合することができ、また、凝集を形成することができることから、血小板代用剤、血管障害、血管損傷および血栓症等の予防・治療等の医薬品として、あるいはｖＷＦ欠損症等を診断するための診断薬、生物学的・医学的な試薬、血小板凝集抑制剤・抗血栓剤のスクリーニング用の試薬等として、幅広い実用化の可能性を有するものと期待される。また、本発明のＧＰＩｂ・脂質複合体は、血管損傷部位に特異的に集積する性質を有することから、血管損傷部位および血栓形成部位の検査用診断薬あるいは治療剤としても極めて有用である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A61K 38/00 (2006.01) Ａ６１Ｋ 37/02

(72)発明者 今川 昂
大阪市都島区都島中通３丁目５番４４号 株式会社ミドリ十字 都島工場内
(72)発明者 池田 康夫
東京都豊島区巣鴨４－３４－２
(72)発明者 村田 満
埼玉県新座市畑中１－９－４６

審査官 阪野 誠司

(56)参考文献 特表平０４－５０６５１８（ＪＰ，Ａ）
特表平１０－５０３１９９（ＪＰ，Ａ）
特開平０１－１００１９６（ＪＰ，Ａ）
特開平０１－２２１３９４（ＪＰ，Ａ）
特表平０７－５０２７４４（ＪＰ，Ａ）
特開平０５－５０３７０８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９２／０１６２２５（WO，Ａ１）
国際公開第９３／０１６７１２（WO，Ａ１）
Biochem Biophys Res Commun, １９８０年, 97(1), 133-8
BLOOD, １９９６年, 88(10suppl), 52B
Proc Natl Acad USA, １９８７年, 84, 5615-9

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 14/00-16/46
JICSTファイル(JOIS)
EUROPAT(QUESTEL)
PubMed
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)