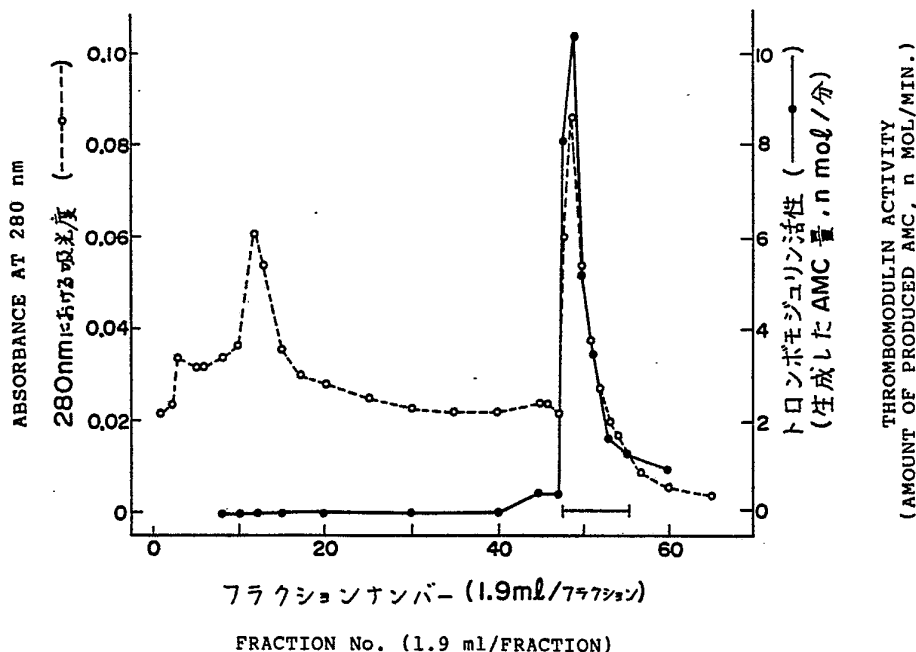


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類⁴ A61K 35/42, 37/02, C07K 15/06	A1	(11) 国際公開番号 WO 87/ 00050 (43) 国際公開日 1987年1月15日 (15. 01. 87)
(21) 国際出願番号 PCT/JP86/00330 (22) 国際出願日 1986年6月27日 (27. 06. 86) (31) 優先権主張番号 特願昭 60-140139 (32) 優先日 1985年6月28日 (28. 06. 85) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA)(JP/JP) 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 鈴木宏治 (SUZUKI, Koji)(JP/JP) 〒514 三重県津市鳥居町191-2番地 Mie, (JP) 山本修司 (YAMAMOTO, Shuji)(JP/JP) 〒417 静岡県富士市大淵168-27番地 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 旭化成工業株式会社 特許部 (PATENT DEPARTMENT, ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 〒100 東京都千代田区有楽町1丁目1番2号 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 OH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE HAVING BLOOD COAGULATION CONTROLLING ACTIVITY

(54) 発明の名称 血液凝固制御作用を有する新たな生理活性物質



(57) Abstract

A novel physiologically active substance having an amino acid sequence of Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln- as an amino acid sequence starting from the second amino acid from the amino terminal. The active substance is obtained from human lung and has an anti-coagulating effect, an effect of preventing agglutination of thrombocytes, and an effect of dissolving thrombus without causing hemorrhage or anaphylaxis shock, thus being effectively usable for treating various diseases of circulatory organs.

(57) 要約

本発明の生理活性物質は、アミノ末端から2番のアミノ酸からのアミノ酸配列としてPro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln-のアミノ酸配列を含有する生理活性物質である。本発明の生理活性物質は、ヒト肺から得られ、抗血液凝固作用、血小板凝集抑制作用及び血栓溶解作用を有するが、出血やアナフィラキシーショックなどの副作用を示さないので種々の循環器系の疾患の治療に有効に用いることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	NL	マリー
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MR	モーリタニア
BB	バルバドス	GB	イギリス	MF	マラウイ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NL	オランダ
BR	ブラジル	IT	イタリア	NO	ノルウエー
BG	ブルガリア	JP	日本	RO	ルーマニア
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SD	スーダン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SE	スウェーデン
CH	スイス	LI	リヒテンシュタイン	SN	セネガル
CN	カメルーン	LK	スリランカ	SU	ソビエト連邦
DE	西ドイツ	LU	ルクセンブルグ	TD	チャード
DK	デンマーク	MC	モナコ	TG	トーゴ
FI	フィンランド	MG	マダガスカル	US	米国

明 細 書

血液凝固制御作用を有する新たな生理活性物質
技術分野

- 5 本発明は、血液凝固制御作用を有する新たな生理活性物質に関する。更に詳しくは本発明は血栓溶解作用、抗血液凝固作用及び血小板凝集抑制作用を有し、循環器系の疾患の治療に有用な新規生理活性物質であるヒト由来のトロンボモジュリン(以後屢々ヒトトロンボモジュリンと称す)に関する。
- 10

背景技術

- 現在、血栓溶解剤として用いられているものには、ストレプトキナーゼやウロキナーゼがあり、また、プラスミノーゲン・アクチベーターが開発中である。また、抗
- 15 血液凝固剤としては、ヘパリンやワーファリンが用いられている。さらに、血小板凝集抑制剤としては、アスピリン、スルフィンピラゾン、ジピリダモール等が使われている。

- 現在、これらの血栓溶解剤、抗血液凝固剤および血小板凝集抑制剤は、それぞれ別個に、あるいは併用して、例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作等の循環器系の疾患の治療および予防に用いられている。
- 20

- 25 ところで、血液凝固機構において重要な役割を演じて

いるビタミンK依存性の蛋白質としてプロテインCが知られているが、近年、このプロテインCの活性化を著しく促進する物質が家兎肺より分離精製され、トロンボモジュリンと命名された〔エヌ・エル・エスモン (N. L. Esmon) ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem.), 257巻, 859頁, 1982年〕。

5 活性型プロテインCは、生体内で血液凝固系補酵素の活性型第V因子、および活性型第Ⅷ因子を失活化させ、また、血栓溶解作用を有するプラスミノゲン・アクチベーターの産生に参与していることが知られている (鈴木宏治, 医学のあゆみ, 第125巻, 901頁, 1983年)。このようにして、プロテインCはトロンビンにより活性化されて活性型プロテインCとなり、抗血液凝固作用および血栓溶解作用を示すが、このとき、トロンビンのコファクターとして、トロンボモジュリンが存在すると、この

10 活性型プロテインCの生成反応は著しく進む〔シー・ティー・エスモン (C. T. Esmon) ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 78巻, 2249頁, 1981年〕。すなわち、トロンボモジュリンは、プロテインCの活性化を促進し、それによって抗血液凝固作用および血栓溶解作用を示す活性型プロテインCを大量に生成させることになるので、トロンボモジュリンは生体における抗血液凝固および血栓溶解

15

20

に大きく寄与するものである。

ここで注意すべきことは、トロンピンは、上記したようにプロテインCを活性化する能力を有するが、その一方フィブリノーゲンを活性化してフィブリンに変換したり、
5 血小板を凝集するなどの作用を有することである。

このトロンボモジュリンはトロンピンと強く結合し、トロンピンの上記の作用を直接阻害する〔シー・ティー・エスモン (C. T. Esmon) ら、ザ・ジャーナル・オブ・
10 バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 257巻, 7944頁, 1982年 及び エヌ・エル・エスモン (N. L. Esmon) ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.),
258巻, 12238頁, 1983年〕。すなわち、トロンボモジュリンは血栓溶解作用の他に、上記したフィブリン形成阻
15 害を通じて血液凝固を阻害し、抗血液凝固作用を有し、さらに血小板凝集をも抑制するものである。また、最近、ヒト胎盤より上記トロンボモジュリンと類似の作用を有する蛋白質性物質が報告された〔特開昭60-199819号及びエッチ・エッチ・サーレム (H. H. Salem) ら、
20 ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 259巻, 12246頁, 1984年〕が、アミノ酸配列がわかるほどまでには精製されていない。

現在用いられている血栓溶解剤、抗血液凝固剤および血小板凝集抑制剤等の循環器系疾患治療用薬剤は、併用
25 して用いられる場合が多く、また、治療に際し必要な効

果を得るには、大量に投与しなければならず、出血等の副作用が出現することがある。かかる実情から、少量でも効果があり、一剤で抗血液凝固作用ならびに血小板凝集抑制作用があるだけでなく、血栓溶解作用も有する薬剤が望まれている。

すでに報告されている前述の家兎のトロンボモジュリンは、この点においては画期的な薬剤になり得ると期待されるが、これを循環器系疾患治療用薬剤として人体に投与すると、いわゆるアナフィラキシーショックを起こす可能性がある。なぜならば、トロンボモジュリンはペプチドを含有しているので、トロンボモジュリンが該トロンボモジュリンの由来でない動物に投与されると、このトロンボモジュリンは抗原として働き、抗体を産生せしめるからである。この理由から、トロンボモジュリンを人体に投与しようとするならば、ヒト由来のトロンボモジュリンの使用が非常に望ましい。しかしながら、これまで高純度のヒトトロンボモジュリンは得られていなかった。

発明の開示

20 本発明は抗血液凝固作用、血小板凝集抑制作用、血栓溶解作用等を有する生理活性物質であるヒト由来のトロンボモジュリンを提供することを目的とする。

即ち、本発明によれば、下記の性質を有することを特徴とする血液凝固制御作用を有する生理活性物質が提供

される。

(a) 分子量

105,000 ± 10,000 (還元後のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による測定値として)

5 (b) 安定性

(1) 60 °C、30分で安定

(2) 100 °C、10分で失活せず

(3) pH2~10で安定

(4) 1 % SDS処理で安定

10 (5) 6 M尿素処理で安定

(6) 6 M塩酸グアニジン処理で失活せず

(7) 3 M KSCN処理で失活せず

(8) 1 % 2-メルカプトエタノール処理で失活する

(c) 活性

15 (1) トロンビンのコファクターとしてプロテインCを活性化する。

(2) トロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの変換を阻害し血液凝固を実質的に阻害する。

(3) トロンビンの血小板凝集作用を実質的に阻害する。

20 (d) 化学的構造

アミノ末端より2番目のアミノ酸からのアミノ酸配列が

Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln

であるペプチドを含有する。

本発明の生理活性物質はアミノ末端より2番目のアミノ酸からのアミノ酸配列が下記のアミノ酸配列であるという特徴を有する。

Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln-

- 5 (但し、Proはプロリン残基、Alaはアラニン残基、Gluはグルタミン酸残基、Glnはグルタミン残基、Glyはグリシン残基及びSerはセリン残基を表わす)。

尚、本発明の生理活性物質のアミノ末端アミノ酸はアラニン、セリン又はグリシンである。

- 10 本発明の生理活性物質はまた、還元処理後のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定値で分子量105,000 ±10,000を有し、前述の如く種々の化学的及び物理的安定性を示すという特徴を有する。

- 更に本発明の生理活性物質は(1)トロンビンのコファクターとしてプロテインCを活性化する;(2)トロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの変換を阻害し血液凝固作用を実質的に阻害する;及び(3)トロンビンの血小板凝集作用を実質的に阻害するという特徴を有する。

- 本発明の生理活性物質の物理化学的性質の測定方法について、以下に説明する。なお、本発明の生理活性物質の力価測定は、合成基質、Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA(Boc及びMCAはそれぞれt-ブトキシカルボニル基及び4-メチルクマリル-7-アミドの略称である)を用い
- 20

る公知のプロテインC測定法にしたがった〔ワイ・オーノ
(Y. Ohno)ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー
(J. Biochem.)、90巻、1387頁(1981年)〕。すなわち、0.
5 μ MのプロテインC及び80 nMのトロンビンを含有する反
5 応液に本発明物質を含む水溶液5 μ l (0~0.01 A₂₈₀/ml)
を加え、0.15 M NaCl、2.5 mM CaCl₂、1mg/ml 牛血清
アルブミンを含む20 mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.4)を加
え、全量を30 μ lとする。得られた混合物を37℃で15分
間反応させてプロテインCを活性化した後に2 μ Mのアン
10 チトロンビンIIIを10 μ l 及び10U/ml のヘパリンを含有
する水溶液を10 μ l 加え37℃で15分間加温して反応を停
止させる。得られた反応混合物に、前述の合成基質Boc
-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA〔財団法人蛋白質研究奨励会
ペプチド研究所(日本)製(Peptide Institute)〕200 μ Mを
15 含む20mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.4)250 μ l を加え、37
℃で10分間反応させた後、20%酢酸0.5ml を加えて反応
を停止させ、遊離してきたAMC(7-アミノ-4-メチルー
クマリン)の濃度を励起波長380nm、発光波長440nmで蛍
光分光光度計により測定する。得られた蛍光強度を既知
20 濃度のAMCの蛍光強度と比較して、遊離したAMC量を求め
る。このAMC量はサンプル中のトロンボモジュリン活性
の強さに依存するのでトロンボモジュリン活性は1分間
当りに生成するAMC量で表わす。

ここで、プロテインCはヒト血漿から鈴木らの方法で

精製した〔鈴木(Suzuki)ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、258巻、1914頁、1983年〕。また、ヒトロンピンはランドブラッド(Lundblad)らの方法で精製した〔ランドブラッド(Lundblad)ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Commun.) 66巻、482頁、1975年〕。

(a) 分子量測定法

ユー・ケー・レムリ(U.K. Laemmli)の方法〔ネイチャー(Nature)、227巻、680頁、(1970年)〕にしたがって、2-メルカプトエタノール処理した試料をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供する。標準分子量キット(スウェーデン国ファルマシア社製)を用いて分子量検量線を作成し、活性測定とクーマシー・ブリリアント・ブルーR-250による染色により本発明の活性物質の泳動位置を確認し、この位置を上記分子量検量線と比較することにより分子量を決定する。

(b) 安定性試験法

(1) 本発明の生理活性物質を $0.006 \text{ A}_{280}/\text{mL}$ (1mL当り波長280nmにおける吸光度が0.006である濃度)含有する0.1 M食塩を含む0.02 Mトリス・塩酸緩衝液(pH7.5)を60℃、30分加熱処理する。

(2) 上記(1)と同じ緩衝液を調製して100℃に加熱して、50%失活する時間を求める。

(3)本発明物質を $0.09A_{280}/m\ell$ の濃度で、 0.1 M NaCl 、 0.02 M グリシン、 1 mM ベンズアミジン塩酸、 $0.1\%(v/v)$ Triton X-100、 5 mM CaCl_2 、 $pH2$ の溶液で2時間半処理する。また、同じ組成であるが $pH10$ を有する溶液で別途
5 処理する。

(4) $0.007\text{ A}_{280}/m\ell$ の濃度の本発明物質を含有する 1% (w/v)SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)及び 0.1 M NaCl を含む 0.02 M トリス・塩酸緩衝液($pH7.5$)で、室温において2時間半処理後、 0.1 M NaCl 、 $1\text{ mg}/m\ell$ ウシ血清アルブ
10 ミンを含む 0.02 M トリス・塩酸緩衝液($pH7.5$)で100倍に希釈して、ただちに活性を測定する。

(5) $1\%(w/v)$ SDSの替わりに 6 M 尿素を用いる他は、前記(4)と同様な処理を行なう。

(6) $1\%(w/v)$ SDSの替わりに 6 M 塩酸グアニジンを用い
15 る他は、前記(4)と同様な処理を行なう。

(7) $1\%(w/v)$ SDSの替わりに 3MKSCN を用いる他は、前記(4)と同様な処理を行なう。

(8) $1\%(w/v)$ SDSの替わりに $0.1\%(v/v)$ 及び $1.0\%(v/v)$ 2-メルカプトエタノールを用いる他は、全く前記(4)と同様な処理を行なって、メルカプトエタノール処理の影響を調べる。
20

(C)活性評価法

(1)トロンビンのコファクターとしてプロテインCを活性化することは以下の方法によって評価する。

すなわち、0.1 M NaCl、3.6 mM CaCl₂、10mg/ml
ウシ血清アルブミンを含む0.02M トリス・塩酸緩衝液(pH
7.5)に50 μg/mlのプロテインC、5 nMのトロンビンお
よび5 nMのトロンボモジュリンを加えて37℃で反応させ
5 る。反応を300 μg/mlのアнтиトロンビンIII(米国シ
グマ社製)および5 mM EDTAで停止して、生成した活性
型プロテインCの量を前述の合成基質を用いる方法で測
定する。

(2)トロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリン
10 への変換を阻害し血液凝固を実質的に阻害することはハ
インリッヒ アメルング(Heinrich Amelung)社(西独)製
のコアギュロメーターKC-10を用いて血液凝固時間を測
定することによって調べる。すなわち、5 mM CaCl₂、0.
1 M NaClを含む0.05 Mトリス・塩酸緩衝液(pH7.5)に、3
15 0 μgのフィブリノーゲン(米国シグマ社製、フラクショ
ンI)を加え、これに0~50nMのトロンボモジュリンを加
え、次いで、全量が0.4mlになるように10nMのトロンビ
ンを加えて凝固時間を測定する。

(3)トロンビンの血小板凝集作用を実質的に阻害する
20 ことはSIENCO社(米国)製のプレートレット アグリゴメ
ーター(Platelet aggregometer)を用いて評価する。す
なわち、30万cells/μlの血小板溶液(Platelet Rich
Plasma, P.R.P.)250 μlに1単位のトロンビン(約0.4 μg)
を加えると血小板が凝集するが、トロンビンを加える前

に本発明の生理活性物質を加えたときの血小板凝集反応を観察する。

(d) 化学的構造

本発明の生理活性物質のアミノ酸配列は以下のよう
5 して分析する。

精製したヒトロンボモジュリンを0.1 % (v/v) ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液で室温で16時間透析してアミノ酸配列用分析試料とする。アプライドバイオシステムズ社 (米国) 製アミノ酸シーケンシングアナライザー (モデル470A) を用い、
10 ー (モデル470A) を用い、アール・エム・ヘウイック (R.M. Hewick) らの方法 (ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、256巻、7990頁、1981年) に準じて、N末端側より順次エドマン分解を行なう。遊離してくるフェニルチオヒダントイン・アミノ酸を、
15 クス社 (米国) 製高速液体クロマトグラフィー用装置 (SP 8100) 及び米国デュポン社製ゾルパックスODSカラムを用いて分析を行ない、アミノ酸配列を決定する。

本発明の生理活性物質はヒト肺から抽出精製することによって得ることができる。ヒト肺としては肺疾患以外
20 の原因により死亡した成人ヒトから病理解剖によって得られる肺、即ち肺組織の正常なヒト肺が用いられる。ヒト肺からの本発明の生理活性物質の抽出は肺を細片に切り、ホモジナイズした後適当な溶媒を用いて行なうことができる。得られた抽出物は、通常の公知の方法を用い

る精製に供して本発明の生理活性物質を精製することができる。本発明の生理活性物質の精製法としては通常の蛋白質の精製に使用される方法、たとえば、担体による吸着法、イオン交換法、分別沈殿法、ゲルろ過法、電気泳動法、各種アフィニティクロマトグラフィー、特異抗体を用いた方法等が挙げられ、これらを単独または組み合わせて使用できる。

具体的な分離精製方法の一例を挙げれば、ヒト肺をホモゲナイザーで処理後、得られたペレットを Triton X-100等の界面活性剤で処理して、トロンボモジュリンを遊離させて抽出する。

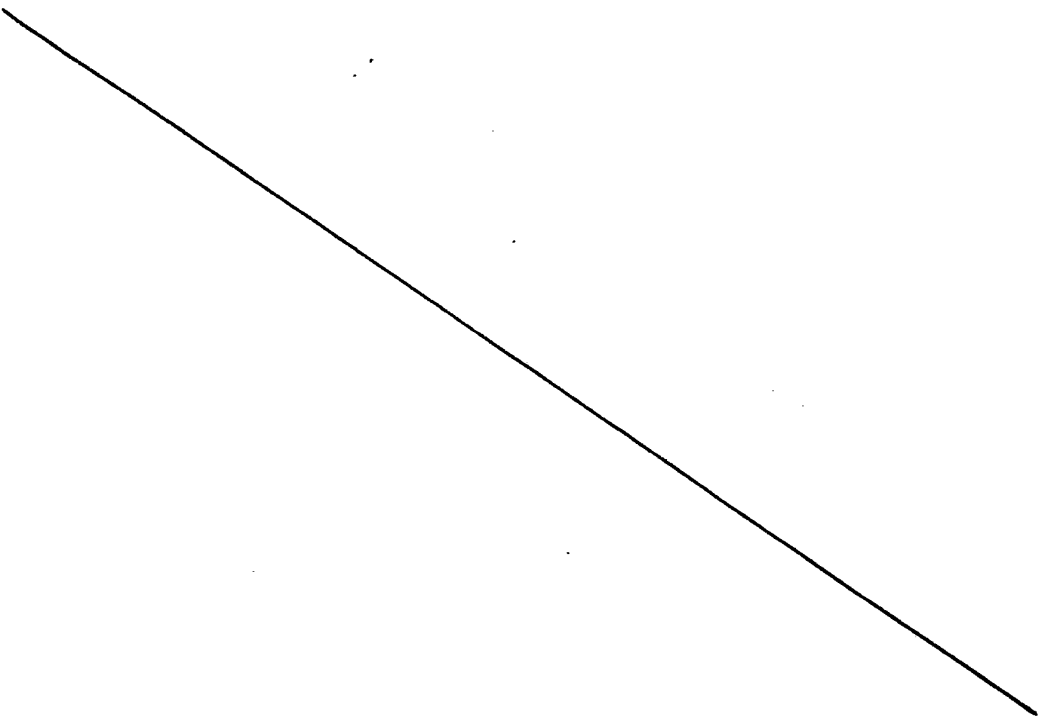
次いで、得られた抽出物をジイソプロピルホスフォロトロンビン(以下屢々DIP-トロンビンと称す)アガロースカラムに通し、0.3 M NaClを含む洗浄液でカラムを洗浄後、1 M NaClを含む溶出液で溶出させ、透析後、透析液をさらにDIP-トロンビン・アガロースカラムに通し、0.4 M NaClを含む洗浄液で洗浄後、1 M NaClを含む溶出液で溶出させ、透析後、再び第2回目のDIP-トロンビン・アガロースと全く同じ条件で、DIP-トロンビン・アガロースカラムでの精製をさらに2回くり返す。かくして本発明の生理活性物質は実質的に純粋な形で得ることができる。

本発明の生理活性物質は抗血液凝固作用、血小板凝集抑制作用及び血栓溶解作用を有するので例えば、心筋梗

塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作等の循環器系の疾患の治療および予防に用いることができる。本発明の生理活性物質を上記の疾患の治療
5 に用いる際には薬剤として使用可能な担体と混合することができる。即ち、本発明の生理活性物質の有効量を適当な量の担体と混ぜて、患者に効果的に投与するのに適した医薬組成物を調製することができる。

本発明の生理活性物質は注射剤などとして用いることができる。注射剤として用いる場合は、ショ糖、グリセリン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどの増粘剤、各種無機塩のpH調整剤などを添加剤として加えることができる。
10

本発明の生理活性物質の成人1回当りの投与量は年令、性別、体重、症状などにより異なるが、一般に約0.1~
15 200mgであり、一日当り一回または必要に応じて数回投与する。



発明を実施するための最良の形態

本発明をより詳細に記述するために実施例により説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例にのみ限定されるものではない。

5 実施例 1

病理解剖によって得られたヒト肺約800gをはさみで約1 cm四方程度の大きさに細切りした後、得られた組織片に1mMのDMP (Diisopropyl fluorophosphate)を含む4℃に冷却した500mlの生理食塩水を加え、ワーリングブレンダーを用いて4℃で5分間、ホモジナイズした。ホモジナイズ後、混合物を氷中で5分間冷却した。次に混合物を更に4℃で5分間、ホモジナイズし氷中で5分間冷却した。上記のホモジナイズ及び冷却操作を更に3回くり返した。得られたホモジェネートを12,000gで4℃において30分間遠心分離にかけて上澄液とペレットに分け、ペレットを集めた。これに0.5%(v/v)トリトンX-100、0.25M蔗糖、1mMベンズアミジン塩酸、0.5 mM CaCl_2 を含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)100mlに懸濁し、ワーリングブレンダーを用いて4℃で5分間、5回ホモジナイズして抽出した。

得られた抽出物を35,000g、10℃で60分間遠心分離にかけて上澄液を集めた。エヌ・エル・エスモン(N.L.Esmon)ら〔ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 257巻, 859頁, 1982年〕の

方法にしたがって作成したDIP-トロンビン〔ジイソプロ
ピルホスフォロトロンビン(diisopropylphosphoro-
thrombin)〕を、ピー・クオトレカサス(P. Cuatrecasas)
の方法〔ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミ
5 ストリー(J. Biol. Chem.), 245巻、3059頁, 19
70年〕にしたがってブロムシアン化したアガロースに
結合させて、DIP-トロンビン-アガロースを作成した。

次にDIP-トロンビン-アガロースを2.5cmφx10 cm の
大きさのカラムに充填してDIP-トロンビン-アガロース
10 カラムを作成し、室温で0.1 M NaCl, 0.5 mM CaCl₂,
1mMベンズアミジン塩酸, 0.5%(v/v) Lubrol PX (半井
化学薬品製、日本)を含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液
(pH 7.5)でカラムを平衡化した。次いで、上記の抽出上
澄液をカラムに通過させた。カラムを0.3 M NaCl, 0.5mM
15 CaCl₂、1 mM ベンズアミジン塩酸、0.5%(v/v) Lubrol PX
を含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄した後、
1 M NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM ベンズアミジン塩酸 0.5%
(v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液(pH
7.5)で溶出した。溶出によって得られる各フラクション
20 について前記の方法でトロンボモジュリン活性を測定し
た。同時に島津製作所(日本)製スペクトロフォトメータ
ーUV-240を用いて各フラクションの波長280nmにおける
吸光度(A₂₈₀)を測定した。

トロンボモジュリン活性のある画分を回収し、0.1 M

- NaCl、0.5 mM CaCl₂、0.05%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)で透析する。得られた透析液を2回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した。即ち、透析液を1.5cmφ×10
- 5 cmの大きさのDIP-トロンビン-アガロースカラムに通し、0.4 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄後、さらに0.4 M NaCl、0.1 mM EDTA、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄し、次
- 10 いで1 M NaCl、0.5 mM EDTA、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)で溶出した。トロンボモジュリン活性のある画分を回収し、さらに0.1 M NaCl、0.05%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)で透析する。得られた透析液を3回目
- 15 のDIP-トロンビン-アガロースのカラムに通過させた。カラムの大きさ、洗浄条件び溶出条件は、2回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーの条件と全く同じ条件で行なった。尚、溶出して得られるフラクションは2 mlずつ集めた。
- 20 この第3回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーの溶出パターンを第1図に示す。フラクションナンバー72番目から82番目までを回収し、0.1 M NaCl、0.05%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)で透析後、0.9cmφ×8 cmの大

きさのDIP-トロンビン-アガロースカラムに通した。

0.35 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス・塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄後、1 M

NaCl、0.5 mM EDTA、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 M

5 トリス・塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出した。溶出して得られるフラクションは1.9 mlずつ集めた。

この第4回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーの溶出パターンを第2図に示す。フラクションナンバー48番目から56番目までを回収した。

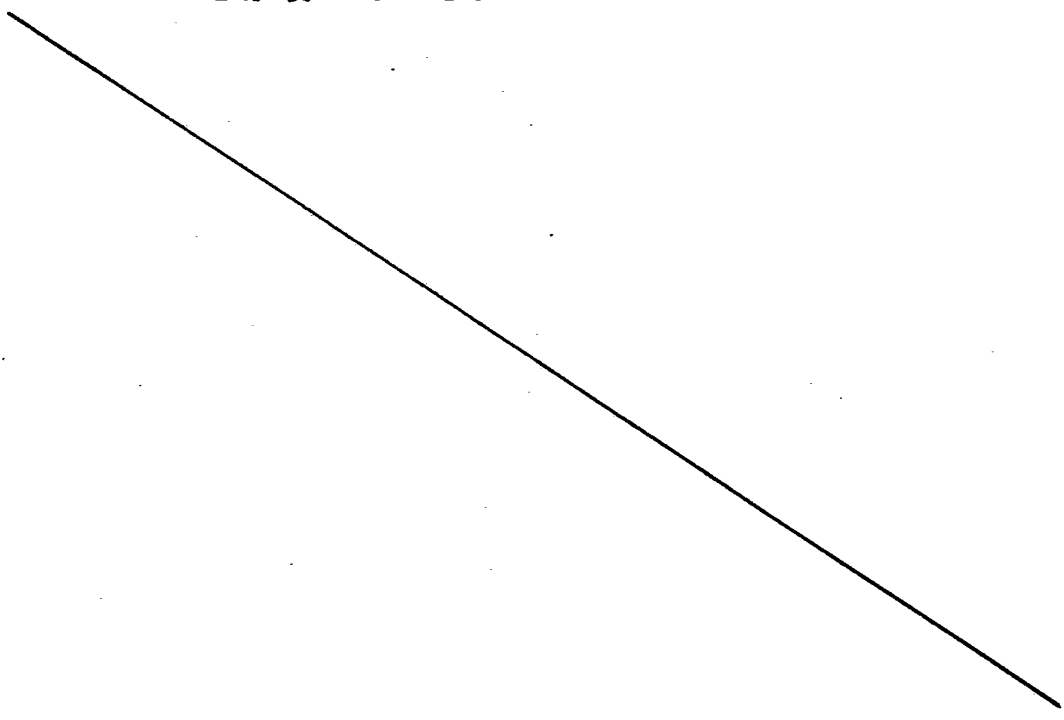
10 このようにして精製されたトロンボモジュリンを含むフラクションの吸光度から、精製されたトロンボモジュリンの分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならい10.0($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$, 280 nm = 10.0)と規定してそれに基づき精製トロンボモジュリンの量を計算したところ約50

15 0 μgであった。尚、得られた精製トロンボモジュリン面分を5-10%のグラジェントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ単一バンドのみ確認された。得られたトロンボモジュリンは-80℃で凍結保存した。

20 得られた精製ヒトトロンボモジュリンの一部を0.1 % (v/v) SDS水溶液に対して室温で16時間透析してアミノ酸配列用分析試料として用い、前述の化学的構造の分析法により分析を行ない、アミノ酸配列を決定した。その結果、N末端より2番目のアミノ酸からのアミノ酸配

列は下記のとおりであった。

Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln

- 得られた精製ヒトロンボモジュリンの一部を用いて
スパックスマンらの方法にしたがって日立835型アミ
5 ノ酸アナライザー(日立製作所製、日本)を用いてアミノ
酸組成分析を行なった〔スパックスマン (Spackman)
ら、アナリアティカル・ケミストリー (Anal.Chem.)
30巻,1190頁,1958年〕。結果を第1表に示す。なお、参
考までに、ヒト胎盤由来の本物質のアミノ酸組成の結果
10 を文献〔エッチ・エッチ・サーレム (H.H.Salem) ら、
ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー
(J. Biol. Chem), 259巻,12246頁,1984年〕に記載のデー
ターより、同じ基準で計算したものを比較のために第1
表に併記したが、本発明のアミノ酸組成分析の結果と一
15 致しなかった。このことは本発明の肺由来のロンボモ
ジュリンと先行文献の胎盤由来のものとが異なる物質で
あることを示唆している。
- 

第 1 表

	アミノ酸	組 成 (%)	
		本 発 明	参 考 文 献 ※
5	アスパラギン酸	8.1	9.1
	スレオニン	6.0	4.4
	セリン	7.9	7.4
	グルタミン酸	6.8	12.5
	プロリン	6.5	5.9
10	グリシン	11.0	14.1
	アラニン	8.3	8.8
	バリン	8.4	6.3
	メチオニン	1.4	1.6
	イソロイシン	5.4	3.4
15	ロイシン	10.4	8.8
	チロシン	2.8	2.8
	フェニルアラニン	3.2	2.9
	ヒスチジン	2.7	2.2
	リジン	3.6	5.0
20	アルニギン	5.1	4.7
	システイン	2.5	測定せず

※ ヒト胎盤由来のトロンボモジュリンのアミノ酸組成を文献〔エッチ・エッチ・サーレム (H.H.Salem) ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 259 巻, 12246 頁, 1984 年〕に記載のデータより組成比に計算しなおしたもの。

更に得られたトロンボモジュリンについて、前述の分子量測定法及び安定性試験法に従い分子量及び安定性について調べたところ以下の結果が得られた。

(a) 分子量

10 本発明の生理活性物質は、 $105,000 \pm 10,000$ の位置に染色バンドを示し、かつその位置に移動した物質はプロテイン C 活性化能を示した。

(b) 安定性

(1) 0.1 M 食塩を含む 0.02 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した本発明物質 ($0.006 A_{280}/\text{ml}$) を 60°C 、30 分加熱処理したが、活性の低下は認められなかった。

(2) 上記 (1) と同じ濃度の本発明物質を含む緩衝液を 100°C に加熱して、50% 失活する時間を求めたところ、約 9 分だった。

20 (3) 本発明物質を $0.09 A_{280}/\text{ml}$ の濃度になるよう 0.1 M NaCl, 0.02 M グリシン、1 mM ペンツァミジン-HCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 5 mM CaCl_2 、pH 2 の溶液に加え 2 時間半処理したところ、約 70% の活性が残存した。
また、同じ組成を有するが、pH 10 である溶液で処理したところ、活性の低下は認められなかった。

25

(4)本発明物質を $0.007 \text{ A}_{280}/\text{ml}$ の濃度で、1%(w/v)SDSを含む0.1 M NaClを含む0.02Mトリス・塩酸緩衝液(pH7.5)で、室温において2時間半処理後、0.1 M NaCl、1 mg/mlウシ血清アルブミンを含む0.02 Mトリス・塩酸緩衝液(pH7.5)で100倍に希釈して、ただちに測定したところ、活性の低下は認められなかった。

(5)1%(w/v)SDSの替わりに6 M尿素を用いる他は、全く前記(4)と同様な処理を行なって、6 M尿素処理の影響を調べたところ、活性の低下は認められなかった。

10 (6)1%(w/v)SDSの替りに6 M 塩酸グアニジンを用いる他は、全く前記(4)の同様な処理を行なって、6 M 塩酸グアニジン処理の影響を調べたところ、残存活性は約40%であった。

15 (7)1%(w/v)SDSの替わりに3 M KSCNを用いる他は、全く前記(4)と同様な処理を行なって、3 M KSCN処理の影響を調べたところ、残存活性は約40%であった。

(8)1%(w/v)SDSの替わりに2-メルカプトエタノールを用いる他は、全く前記(4)と同様な処理を行なって、メルカプトエタノール処理の影響を調べたところ、メルカプトエタノールの濃度が0.1%(w/v)の場合の残存活性は約2%、1%(v/v)の場合は、残存活性は0%であった。

(c)活性

(1)プロテインC活性化作用

25 トロンビンのコファクターとしてプロテインCを活性化作用について前述の活性評価法によって調べた。

結果を第3図に示すが、トロンボモジュリン無添加(B)では、活性型プロテインCの生成は認められなかった(点線)が、トロンボモジュリンを添加する(A)と、反応時間と共にプロテインCが増大した(実線)。

5 (2)抗血液凝固作用

トロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの転換を阻害し、血液凝固を実質的に阻害する作用について前述の活性評価法により調べた。結果を第4図に示す。図中、点線は用いた緩衝液のみで測定した結果で、実線
10 がトロンボモジュリン添加試料の測定値であるが、トロンビンにくらべ、トロンボモジュリンの量が多くなるにしたがって、血液凝固時間が延長されることが確認された。

(3)血小板凝集抑制作用

15 トロンビンの血小板凝集抑制作用を実質的に阻害する作用について前述の活性評価法により調べた。その結果30万cells/ μ lの血小板溶液(Platelet Rich Plasma、P. R.P.)250 μ lに1単位のトロンビン(約0.4 μ g)を加えると凝集したが、トロンビンを加える前にその加えるト
20 ロンビンと等モル以上の本発明のトロンボモジュリンを加えておくと、血小板の凝集が起きなかった。

応用例1

本発明の生理活性物質	10 mg
精製ゼラチン	20 mg

マンニトール	100 mg
塩化ナトリウム	7.8 mg
リン酸ナトリウム	15.4 mg

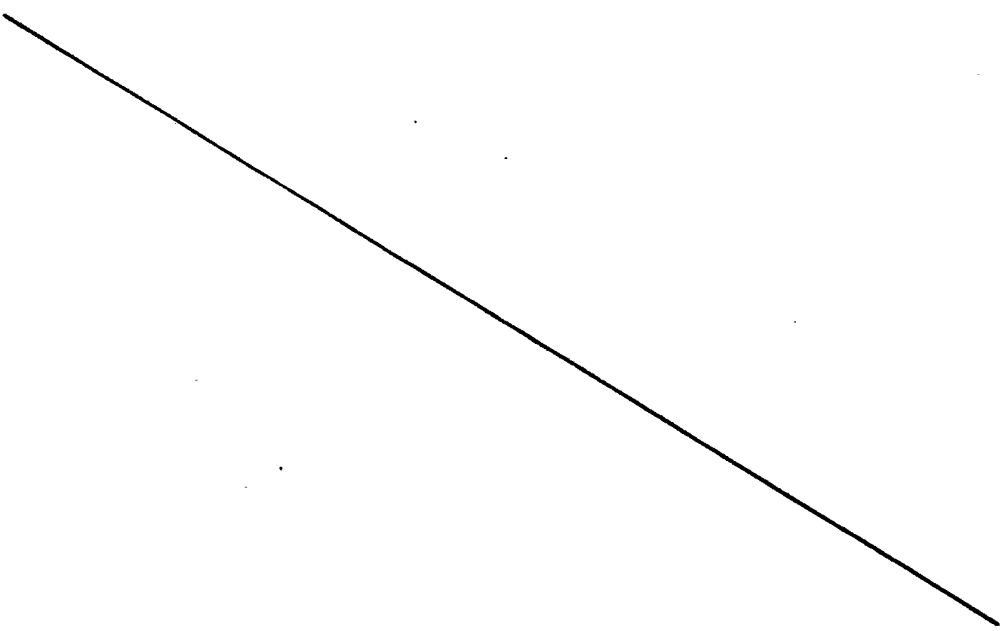
上記成分を注射用蒸留水2mℓに溶解し、無菌バイアル
5 に入れ、-35℃で2時間予備凍結し、-35℃真空度0.075
Torrで35時間一次乾燥し、次いで30℃、真空度0.03
Torrで5時間二次乾燥して、注射用バイアルを製造した。

得られた組成物は、投与直前に生理食塩水もしくはブ
ドウ糖注射液500mℓに溶解して点滴静注するのに用いら
10 れる。

応用例 2

本発明の生理活性物質	2.5 mg
アルブミン	5 mg
マンニトール	25 mg
15 塩化ナトリウム	1.95 mg
リン酸ナトリウム	3.85 mg

上記成分にて、応用例 1 と実質的に同様の方法により
注射用バイアルを製造した。



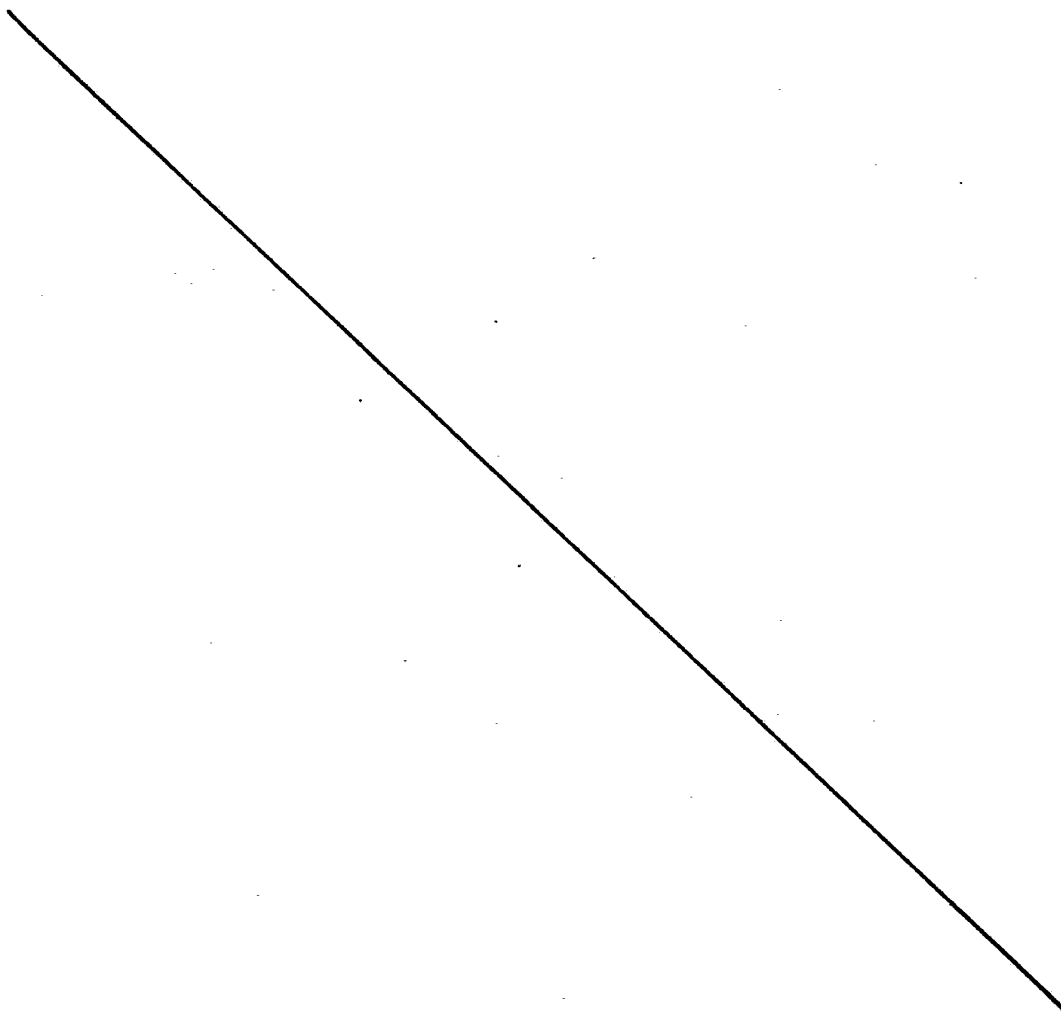
図面の簡単な説明

第1図は実施例1において第3回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーの溶離のパターンを示すグラフである。

- 5 第2図は実施例1において第4回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーの溶離のパターンを示すグラフである。

第3図はトロンボモジュリン存在下及び非存在下における活性型プロテインCの生成経過を示すグラフである。

- 10 第4図はトロンボモジュリン量と血液凝固時間の関係を示すグラフである。



産業上の利用可能性

本発明の生理活性物質は、抗血液凝固作用、血小板凝集抑制作用、血栓溶解作用を併せ持ち副作用の少ない循環器系疾患治療用薬として極めて有用な物質である。

- 5 また、このような医薬用途以外に、たとえば、人工血管、人工臓器等の材料に結合させて、血栓の形成を防止する薬剤として用いることができる。

請求の範囲

1. 下記の性質を有することを特徴とする血液凝固制御作用を有する生理活性物質。

(a) 分子量

- 5 105,000 $\pm$ 10,000 (還元後のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定値として)

(b) 安定性

- (1) 60℃、30分で安定
(2) 100℃、10分で失活せず
10 (3) pH2~10で安定
(4) 1%(v/v) SDS処理で安定
(5) 6 M 尿素処理で安定
(6) 6 M 塩酸グアニジン処理で失活せず
(7) 3 M KSCN処理で失活せず
15 (8) 1%(v/v) 2-メトルカプトエタノール処理で失活する

(c) 活性

- (1) トロンビンのコファクターとしてプロテインCを活性化する。
20 (2) トロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの変換を阻害し、血液凝固を実質的に阻害する。
(3) トロンビンの血小板凝集作用を実質的に阻害する。

(d) 化学的構造

アミノ末端より2番目のアミノ酸からのアミノ酸配列

が

Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln

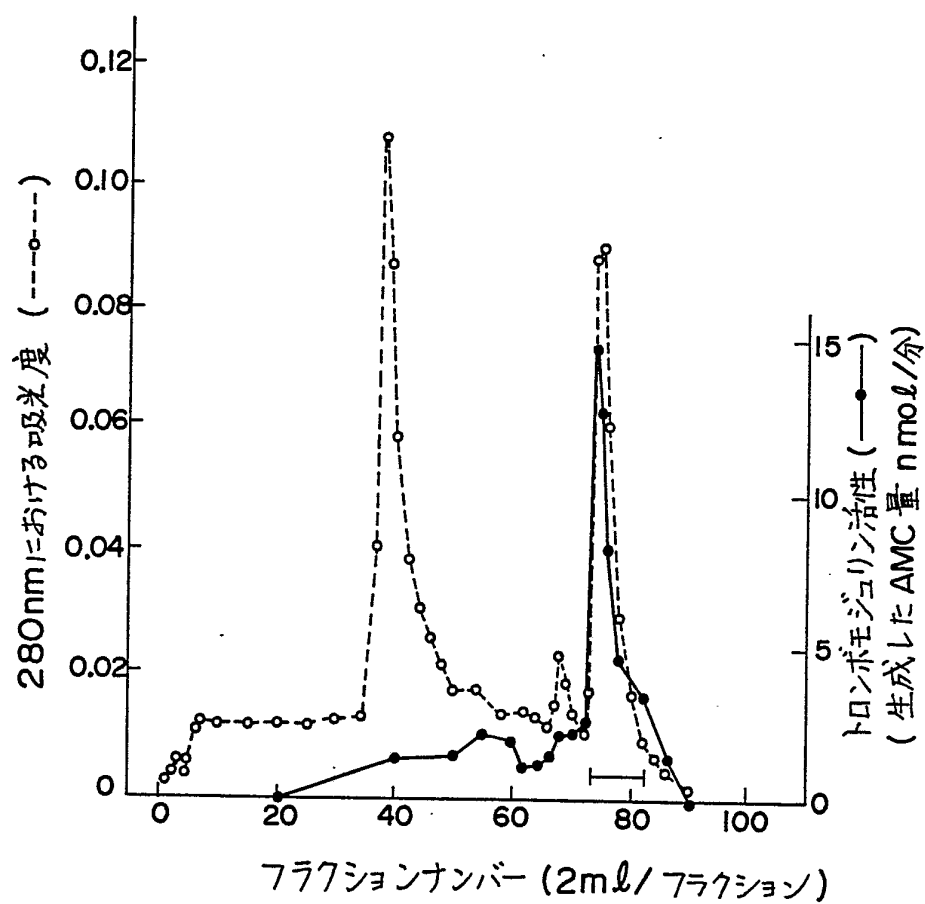
であるペプチドを含有する。

(但し、Proはプロリン残基、Alaはアラニン残基、

- 5 Gluはグルタミン酸残基、Glnはグルタミン残基、Glyはグリシン残基及びSerはセリン残基を表わす)。

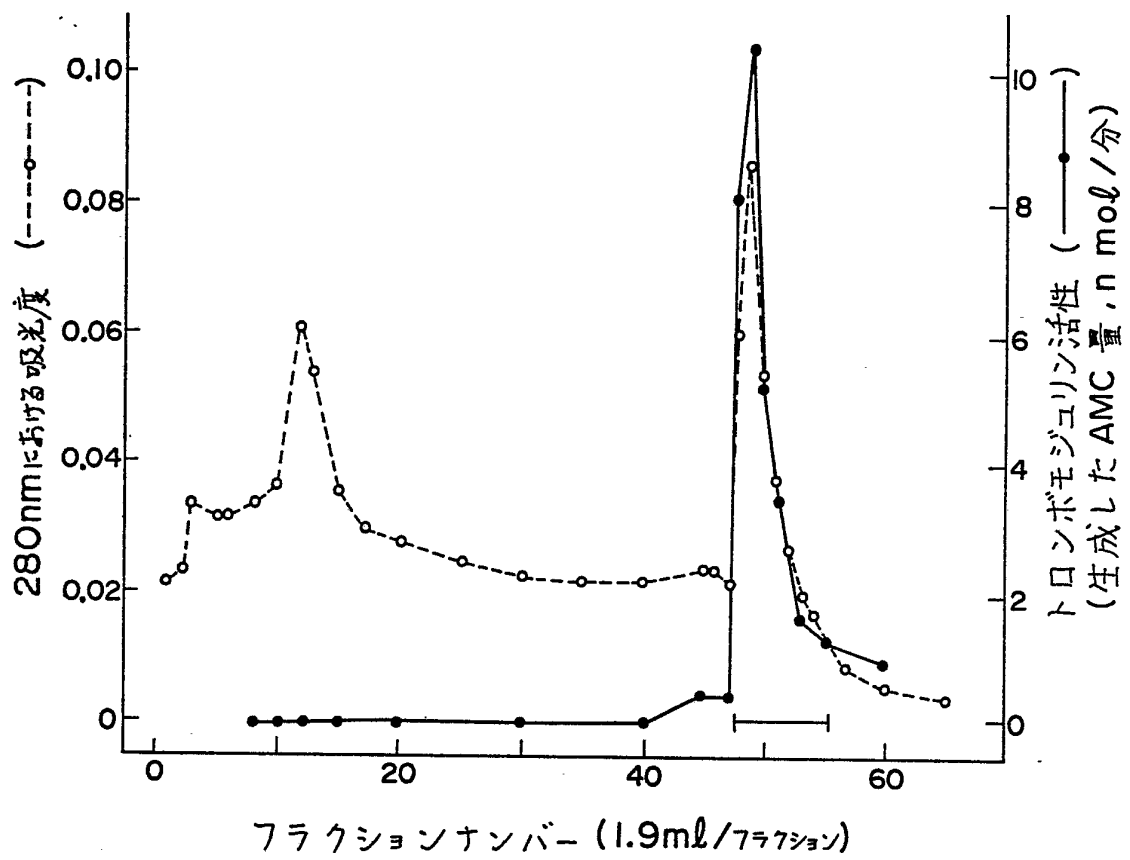
$1/4$

FIG. 1



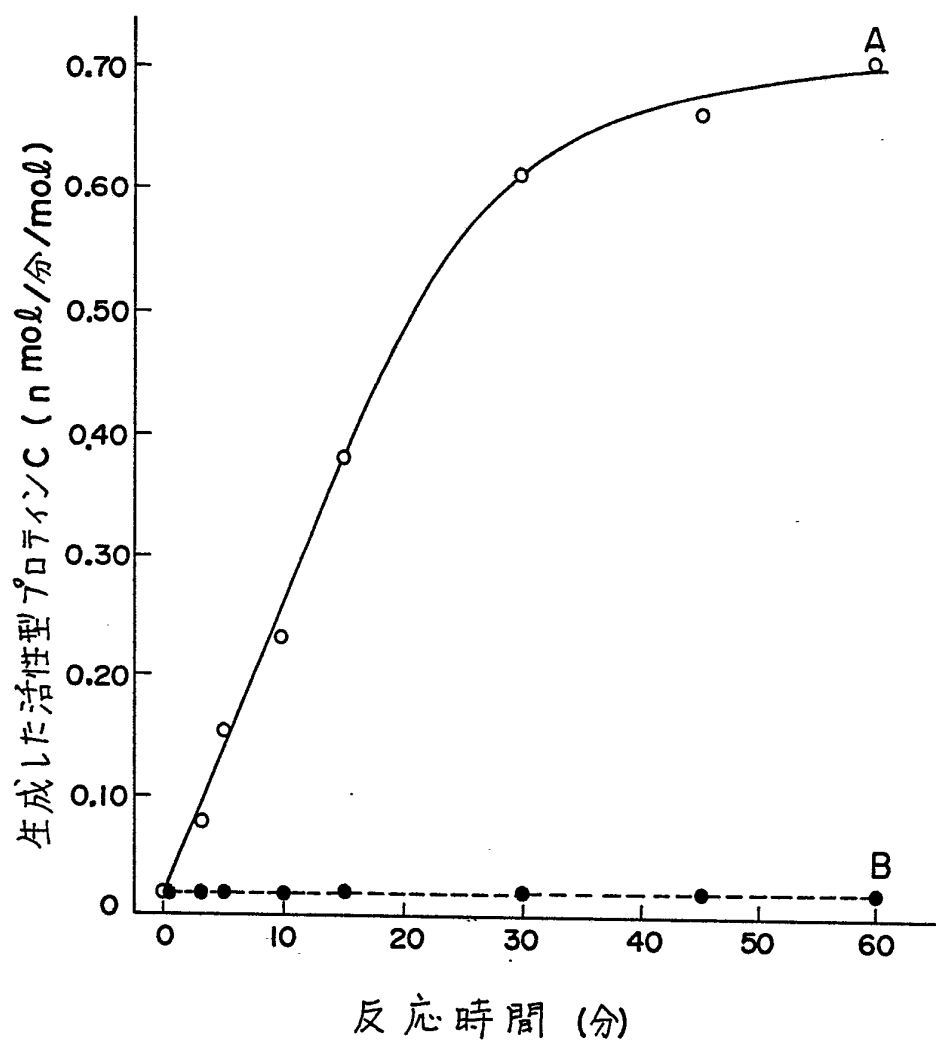
$2/4$

FIG. 2



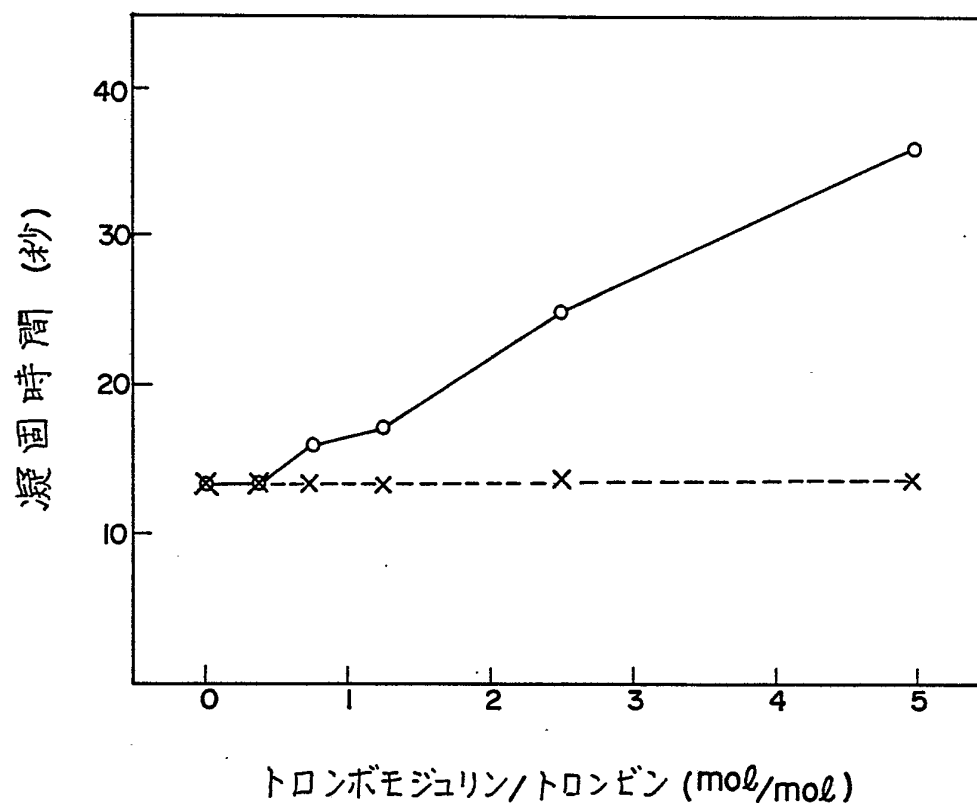
$\frac{3}{4}$

FIG. 3



$\frac{4}{4}$

FIG. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP86/00330

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ³		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl ⁴ A61K35/42, A61K37/02, C07K15/06		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	A61K35/42, A61K37/02, C07K15/06	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category [*]	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
[*] Special categories of cited documents: ¹⁵ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "g" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ²		Date of Mailing of this International Search Report ²
September 22, 1986 (22.09.86)		October 6, 1986 (06.10.86)
International Searching Authority ¹		Signature of Authorized Officer ²⁰
Japanese Patent Office		

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. A61K35/42, A61K37/02, C07K15/06		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	A61K35/42, A61K37/02, C07K15/06	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
※引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 22.09.86	国際調査報告の発送日 06.10.86	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 水 野 昭 宜	4C 7138