

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3663550号

(P3663550)

(45) 発行日 平成17年6月22日(2005.6.22)

(24) 登録日 平成17年4月8日(2005.4.8)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 K 38/43

A 6 1 K 37/465

A 6 1 K 38/46

A 6 1 K 37/54

請求項の数 6 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願平6-503715	(73) 特許権者	オウクラホウマ、メディカル、リサーチ、 ファウンデーション
(86) (22) 出願日	平成5年5月12日(1993.5.12)		アメリカ合衆国オウクラホウマ州7310
(65) 公表番号	特表平7-508029		4、オウクラホウマ・シティ、エヌ・イー
(43) 公表日	平成7年9月7日(1995.9.7)		・スアーティーンズ・ストリート 825
(86) 国際出願番号	PCT/US1993/004493		番
(87) 国際公開番号	W01993/023074	(74) 代理人	弁理士 真田 雄造
(87) 国際公開日	平成5年11月25日(1993.11.25)	(74) 代理人	弁理士 中島 宣彦
審査請求日	平成12年5月2日(2000.5.2)	(72) 発明者	モリセイ、ジェイムズ、エイチ
(31) 優先権主張番号	882, 202		アメリカ合衆国オウクラホウマ州7311
(32) 優先日	平成4年5月13日(1992.5.13)		8、オウクラホウマ・シティ、ウエスト・
(33) 優先権主張国	米国(US)		ユーバックス 228番
(31) 優先権主張番号	021, 615		最終頁に続く
(32) 優先日	平成5年2月19日(1993.2.19)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】 血液凝固のための切断組織因子とF▲V I I ▼aまたはF▲V I I ▼アクチベーター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の成分として切断組織因子を、第2の成分として切断組織因子と組合せて過度の出血を制御または停止させることになる因子VII aの血漿水準を生じさせるのに有効な物質を包含し、

第2の成分は、

(a) 因子VII a、または

(b) リン脂質と組合された因子X aと、リン脂質と組合された因子IX aと、トロンビンと、因子XII aと、リン脂質と組合された、Oxyuranus Scutellatusの毒液からのF VIIアクチベーターとより成る群から選択される、患者の内生因子VIIの因子VII aへの変換を促進するアクチベーター

である、

持続または過度の出血を持つ患者の処置のための組成物。

【請求項2】

第1の成分が患者への投与量において、血漿1ml当たり切断組織因子100ng～50μgの濃度を生じさせるのに有効な量であり、第2の成分は投与において、血漿1ml当たり因子VII a 20ng～700μgの水準を生じさせるのに有効な量である、請求の範囲第1項に記載の組成物。

【請求項3】

さらに薬学的に受け入れられる担体を包含し、切断組織因子は100ng～50μg/担体mlの濃

10

20

度にあり、アクチベーターは1～10 µg/担体mlの濃度にある、請求の範囲第1項に記載の組成物。

【請求項4】

切断組織因子と因子VII aとが患者への局所投与のために薬学的に受け入れられる担体中にあり、切断組織因子が100ng～50 µg/担体mlの濃度にある、因子VII aが1～10 µg/担体mlの濃度にある、請求の範囲第1項に記載の組成物。

【請求項5】

切断組織因子と因子VII aとを、それらの投与量が血漿1ml当たり切断組織因子100ng～50 µgと、血漿1ml当たり因子VII a20ng～10 µgの血漿水準とを与えるように処方する、請求の範囲第4項に記載の組成物。

【請求項6】

切断組織因子が10～50 µg/mlの濃度にある、請求の範囲第4項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は出血の処置のための組成物と方法とに関する。

背景技術

米国政府は国立衛生研究所によってJames H.Morrisseyに授与した補助金R01 HL 44225によって、この発明において幾つかの権利を所有している。

この発明は、James H.MorrisseyとPhilip C.Compとの両名により1992年5月13日に出願された“Treatment of Bleeding with Modified Tissue Factor in Combination with F VII a”と題する米国特許出願第07/882,202号の一部継続出願である、1993年2月19日出願の“Treatment of Bleeding with Modified Tissue Factor in Combination with an Activator of F VII”と題する米国特許出願第08/021615号の継続出願である。

血液凝固はトロンビン、即ち血小板の凝集を誘発し、フィブリノーゲンをフィブリンに開裂する、そしてそれが血小板栓を安定化する蛋白質分解酵素の生産から起こる。血液中に循環している多くの酵素前駆体および補因子前駆体はこの過程においていくつかの段階を通じて相互作用をし、その間において、順次又は同時に、活性化された形に変換され、最終的には、因子V aとイオン性カルシウムと血小板との存在の下、活性化された因子X (f X a) によりトロンビン前駆体からトロンビンへの活性化をもたらす。

因子Xは名付けて外因性経路と内因性経路と言う2つの経路のいずれかにより活性化することができる。内因性経路即ち表面介在活性化経路は、因子XIIが因子XII aに活性化されて開始して蛋白質前駆体が開裂されて活性プロテアーゼを形成し、それが因子XIを因子XI aに変換し、それがカルシウムの存在の下で因子IXを因子IX aに変換させると言う一連の反応から成っている。因子IXとXとはまた活性化された因子VII (因子VII a; f VII a) と組合された組織因子 (TF) により外因性経路をへても活性化できる。活性化された因子IXはカルシウムとリン脂質 (血小板) と因子VIII aとの存在の下で因子Xを因子X aに活性化する。

生理学的に、凝固に関与する主要な経路は外因性経路であると信じられていて、その本質的段階は組織因子介在の、因子VIIの因子VII aへの活性化である。組織因子は蛋白質とリン脂質成分とを持つ総合体膜糖蛋白質である。それは種々な組織及び種から単離され、分子量42,000～53,000を持つと報告された。組織因子を暗号化するDNA及び蛋白質の表現の方法は例えばGenentech, Inc. によるヨーロッパ特許出願第0 278 776号中及びJ.H.Morrissey等、Cell 50,129-135 (1987) によって報告されている。

因子VII aとその本質的な補因子TFとの複合体は凝血カスケードの最も強力である既知の引き金である。因子VIIは血漿中に0.5 µg/ml血漿の濃度で存在する。反対に、因子VII aは血漿中大約1ng/mlの痕跡的水準で存在する。従って、因子VIIは正常では因子VII aより著しく過剰である。因子VII aは血漿中約2時間の比較的長い半減期で循環している。このことは活性化された凝固酸素の間では異常な性状であり、典型的には血漿中の種々なプロテアーゼ抑制因子により急速に不活性化される。

10

20

30

40

50

A型血友病は活性凝固因子VIIIの不存在又は因子VIIIに対する抑制因子の存在により特徴付けられている。B型血友病は活性因子IXの不存在により特徴付けられる。両型の血友病は重大な損傷または死となり得る出血の素質を持っている。在来ではいずれかの型の血友病をもつ患者は出血を止めるために血漿濃縮物の注入により処置された。その濃縮物に伴う問題は多く、特に感染、最近ではHIVによる感染である。因子濃縮物を処理する方法はウイルスを不活性化しなければならないので、高度に精製した因子VIIIまたは因子IXを、これらの問題回避のために導入した。しかし、何人かの患者には高力価の、因子VIIIに対する抑制抗体が発生した。それゆえ、それらの患者はもはや在来の因子VIII置換療法で処置することはできない。

HednerとKisiel, J. Clin. Invest. 71, 1836-1841 (1983) によって記述されているように、
精製された、天然に生成された因子VII aは、因子VIII:cに対し高力価の抗体をもつA型
血友病患者に投与でき、これ等の患者の止血を回復できる。Brinkhous等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1382-1386 (1989) により報告されたように、組み換え因子VII a (rF VII a) は血友病並に von Willebrand病犬に投与し、A型並にB型血友病犬の出血を止めることはできるが von Willebrand病犬の出血は止められない。Telgt 業、Thrombosis Res, 56, 603-609 (1989) は、高い水準で、rF VII aはカルシウムとリン脂質の存在の下、しかしTFの不存在の下で因子Xの直接の活性化により作用すると信じられると報告した。Teitel, Thrombosis and Haemostasis 66 (5), 559-564 (1991) は、血友病処置における効能には、トロンビン前駆体複合体濃縮物中の重要な成分は因子VII aであると報告した。

Hender, "Experience with Recombinant Factor VII a in Haemophiliacs" in Biotechnology of Plasma Proteins Lenfant, Mannucci, Sixma, eds., Curr. Stud. Hematol. Blood Transf. No. 58, 63-68 (1991), はトロンビン前駆体複合体濃縮物の使用(出血の50-60%だけに有効)並に血漿誘導(pF VII a)と組み換え因子VII a (rF VII a)を評論している。pF VII aの適量10-15 µg/kgは何人かのA型血友病患者に有効であった。犬及び家兎における安全性研究では組み換え因子VII aは150 µg/kgまでの適量では安全であって有効であることが示された。多くの患者は又手術と出血合併症の間54-90 µg/kgまでの適量を用いて処置に成功した。

Gringeri等は、rF VII aによる血友病の処置は、2-3時間間隔で適量75 µg/kg)でさえ、常に有効と言うわけでないことを報告した。筆者は、そのような場合には、多分より多量の適量とより頻繁な注入および/または抗繊維素溶解素薬物の仕随使用が必要であろうことを示した。rF VII aは近年米国において、血友病、特に在来の因子VIIIまたは因子IX置換療法からは利益が受けられない、抑制因子を持つ患者における血友病に対し、臨床試験中である。近年採用されているrF VII a投与量は典型的にはrF VII a 45-90 µg/体重kgで2-4時間毎に繰り返される。これ等の投与量はF VII 約0.5 µg/mlまたはF VII a約1 ng/mlの正常血漿濃度に比較して極端に高い循環rF VII a約4 µg/mlの水準を達成するために設計されている。

O'Brien等、J. Clin. Invest. 82, 206-211 (1988) は、apo-TF, 正常の脂質結合TF等蛋白質の脱脂質調製物が因子VIIIに対し抗体をもつ動物での出血を正常化するのに用いることができるかもしれないと報告した。精製apo-TFは、リン脂質膜中に入らない限り不活性であるゆえに、apo-TFを注入することの理論的基礎は、それが自発的にそして優先的に、暴露された膜表面に、特に負傷箇所での損傷された細胞中に受け入れられるという仮説である。後での研究は血友病の処置に置ける精製apo-TFの使用に伴う危険があることを示した。apo-TFは自然に多種の型の脂質膜中に入り込み、凝固を所望していない箇所では活性になり、その結果血栓病または散在性の脈管内血管新生(DIC)をもたらす。事実、O'Brien等はapo-TFを受けた動物の幾つかでDICの証拠を報告し、SakaiとKisiel, Thromb. Res. 60, 213-222 (1990) は最近、apo-TFは血漿リポ蛋白質と自然に結合し、活性TFを形成することを示した。この後者の現象は、活性TFの静脈内投与がDICの有効な誘発因子であることを示した多くの研究のゆえに、関心の理由である。

最近、精製蛋白質を用い試験管内で測定されるような、因子VII aに対してある補因子機

10

20

30

40

50

能を保有する、可溶性の切断型のTF (tTF) が報告された。

しかしこの型のTFは、Paborsky等、J.Biol.Chem.266:21911-21916 (1991) により報告されたように、正常の血漿により試験された場合凝血促進剤活性が殆ど持たない故に、この型のTFはTFの代替物としては捨てられた。

James H.Morrisseyにより1991年4月10日出願された“Quantitative Clotting Assay for Activated Factor VII”と題する、米国特許出願第07/683,682号中で述べられているごとく、tTFが先行技術において凝血促進活性を欠いていると報告された理由は、tTFが因子VII aに対し補因子機能を保有しているにも拘らず、因子VIIの因子VII aへの変換を促進する能力を失ったからである。その結果、tTFは、ほんの痕跡水準の因子VII aしか含有していない正常の血漿と比較して、非常に高い水準の因子VII aと一緒にのみ血漿を凝固できる。

10

それ故本発明の目的は重大な出血症例えば、高力価の抗因子VIII抗体を持つ血友病を含む血友病の処置のための方法および組成物を提供することにある。

比較的安全で、商業的量で生産できる、出血症をもつ患者の処置のための方法と組成物とを提供することはその他の本発明の目的である。

発明の要約

出血症例えば血友病または肝臓の硬変に結びついた出血症の処置のために、因子VII a (F VII a) と組合わせた切断組織因子、組織因子の隔離された細胞外領域、(tTF) または因子VII aのアクチベータと組合わせた切断組織因子、例えば因子X a/リン脂質、因子IX a/リン脂質、トロンビン、因子XII aまたはOxyuranus scutellatusの毒液からの因子VII アクチベータ/リン脂質の組合わせた切断組織因子を投与することができることを発見した。tTFとF VII aとの両者の最少有効適量は出血を止めるための両者単独の投与量より有意で驚くべき程少ない。

20

実施例は正常並びに血友病の犬における安全性と効能と示す。

【図面の簡単な説明】

図1aは、tTFとF VII aと (ng/ml) を加えた場合 (黒三角) またはF VII aのみ (ng/ml) を加えた場合 (黒丸) の因子VIII-欠損血漿に関する希釈トロンボプラスチン凝固時間 (秒) のグラフである。

図1bは、tTFとF VII aと (ng/ml) を加えた場合 (黒三角) またはF VII aのみ (ng/ml) を加えた場合 (黒丸) における、正常血漿に関する希釈トロンボプラスチン凝固時間 (秒) のグラフである。

30

発明の詳細な説明

切断組織因子 (tTF) は患者例えば血友病患者における過剰の出血に関する因子VII a療法のための補助薬として用いられている。tTFはF VII aとの組合わせでまたは内生F VIIを活性化してF VII aを形成させる組成物で、あるいはF VII aの直前または直後に投与される。ここで用いたごとく、“F VII a”はF VII aまたはF VIIのF VII aへのアクチベータの何れかの投与を言う。F VII aの最少有効適量はtTFにより、混合物の血栓形成性を本来の形のVII aとTFとの混合物と比較して、減少させる一方で、非常に減少する。

F VII aにtTFを加えた組合わせを用いることの、tTFのみより優れた有利さ並びにその必要性は、tTFが予め形成したF VII aの存在の下でのみ、凝血を促進することに活性であることである。F VII aにtTFを加えた組合わせを用いることの、F VII aのみより優れた有利さは、F VII aはtTFが存在しない時よりtTFの存在の下で血漿の凝固に約22倍も強力であることである。さらに、F VII aのみによるように、tTFに加えてF VII aの複合体は、tTFそれ自体が脂質膜中に入っていないなくとも負に荷電したリン脂質例えばホスファチジルセリンの存在の下で、著しく増大した速さで因子Xを活性化する。通常には負に荷電したリン脂質は細胞の細胞質膜の内部小葉中に封鎖されていて、それ故、細胞が損傷あるいは、血小板の場合には、血小板が表面活性化を受けない限り、細胞表面にさらされることはない。それ故、負に荷電したリン脂質は、細胞崩壊および/または血小板活性化を起こす程充分に傷害を経験した解剖学的部位における細胞表面で優先的に暴露されるであろう。このことは、tTFとF VII aとの複合体は試験管的研究から、止血を与える必要のある傷害部

40

50

位において優先的に凝血を促進するのに活性であることが予測されることを意味する。さらにそれ自体またはF VII aとの複合体におけるtTFは可溶性の存在にとどまっていて、脂質膜中に入り込むようにならない。このことは、それは血栓症の危険を減少させて循環から比較的速くなるであろうことを意味する。これらの性状の故に、tTFとF VII aとの複合体は、野生型の注射が引き起し得るような、DICに至る血液凝固システムの全身的活性化を引き起さないであろう。これらの試験管内の結果は以下に述べる正常および血友病犬における生体内研究からの結果と一致する。

tTFに加えてF VII aの組合わせはA型血友病、B型血友病、先天的または後天的の何か他の血液凝固因子の欠損または血小板傷害の処置に有用であろう。その組合わせにより処置できる他の患者には重篤な外傷をこうむっている患者、術後の出血または硬変をもつ患者

10

切断組織因子

ここに用いる如く“切断組織因子”とは、リン脂質膜表面に結合せず、従って、1992年4月9日に出願された国際出願第PCT/US92/02898号に相当する、1991年4月10日出願の米国特許願第07/683,682号に記載の如く、この教えはここに組込まれている、f VIIのf VII aへの変換を支持しない、唯細胞外領域のみを持つ可溶性の組織因子である。好ましい態様においては、切断組織因子は哺乳動物細胞系統例えばCHO-KI細胞、American Type Culture Collection CCL61、を用いる細胞培養中、試験管内で生産される組み換え蛋白質である。これらの細胞は商業的に入手できる発現 (expressin) 媒介動物に保因されている人組織因子CDNAの突然変異型を安定的に移入されていて、アミノ酸1-219 [Morrissey

20

等、Thromb.Res.52:247-261 (1988) 中に記載されているTF9-5B7を用いて、培養媒質から精製される。単クローン抗体生産のためのハイブリドーマは腹水増殖により増殖でき、単クローン抗体 (MAbs) はMorrissey等、Thromb.Res.52:247-261 (1988) に記載の如くm Ab精製のためのBio Rad MAPS IIシステムを用い、腹水液から精製できる。

TF9-5B7はAffigelTM ビーズに結合されている。TF219の精製中は界面活性剤は使用しない。遠心分離により細胞残骸除去の後、濃縮された原液の添加により培養媒質をTris・HCl 25mMとナトリウムEDTA (pH7.4) 10mMとアジ化ナトリウム0.1%にする。非特異的にアガロースビーズに結合している蛋白質を除去するために培養媒質を4℃で4時間、予めグリシンエチルエステルで化学的に封鎖したAffigelTM-10ビーズと共に静かに攪拌する。GEE-AffiGelビーズを焼結ガラスロトを通してのろ過により除去し、その上澄液を4℃で一

30

夜、AffiGelビーズに結合したMab TF9-5B7と共に (典型的にはビーズ2ml) 攪拌する。TF9-5B7-AffiGelビーズを焼結ガラスロト上に集め、そのビーズをそのロト上TBS-EDTA (TBS=100mM NaCl, 50mM Tris・HCl pH7.4, 0.02%アジ化ナトリウム; TBS-EDTA=含有EDTA 10mMのTBS) 100mlで洗浄する。それからそのビーズをクロマトグラフィーカラムに移し、TBS40ml、次いで1M NaCl pH7.4, アジ化ナトリウム0.02%より成る溶液40mlで洗浄する。それから切断TFを、100mMグリシンHCl pH2.5を用い、1M Tris塩基57μlを含有する試験管中に集める1ml画分 (酸性グリシン緩衝液を直に中和するため) で溶離させる

40

。蛋白質を含有する画分はBCA蛋白質検定 (Pierce) を用いて検出し、集合させ、TBSに対して透析し、それから-70℃で貯蔵する。蛋白質濃度は標準的方法例えば既知濃度の牛血清アルブミン標準に基くBCA検定 (Pierce Chemical Co.) を用いて測定する。組換え切断TFの生産のためには、細胞を典型的には、10%鉄-補足仔牛血清で補足したDulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (HyClone Laboratories, Logan, Utah) 中、ローラービンの中で集密に増殖させる。集密形に達した時培養物を2%血清を含有するDMEMに移し、その後培養媒質を毎4日ごとに集める。

切断組織因子 (tTF) のヌクレオチドとアミノ酸配列とをそれぞれSEQ.ID No:1および2として以下に示す。切断組織因子蛋白質は予測される膜間並びに細胞形質領域がかけている。蛋白質のこのバージョンはRuf等, Thromb.Haemost.62,347 (要約) (1989) およびRuf

50

等, J. Biol. Chem. 266:2158-2166 (1991) により報告されているように補因子活性は保持している。この切断型の組織因子は因子VIIのVII aへの変換を支持することはできず、因子VIIによる妨害のない、因子VII aに関する特異的な凝固検定中に用いることを可能にする。

血漿中のF VIIの大部分は不活性の酵素前駆体の形にあり、そしてtTFは因子VIIのVII aへの変換を促進することに選択的に欠落している故に、tTFは正常の血漿に対し極端に僅かしか凝結促進剤活性を持っていない。tTFは蛋白質の膜一係留領域にかけているので、野生型apo-TFでは可能であるごとき、暴露されたリン脂質表面中に入込むことになる能力に欠けている。F VIIのF VII aへの変換におけるtTFの欠損は以前には認識されていなかったが、正常の血漿について試験した場合の極端に低い凝血促進前駆体活性は血友病での出血を制御するための治療剤としてそれを受入れることが出来ないようにした。

切断組織因子と野生型組織因子との間の本質的な差異は、切断組織因子が最早脂質膜表面につながとめられないということである。従って、最早因子VIIの因子VII aへの変換を刺激しないがF VII aの補因子活性は保有している、本質的には同等な可溶性の型の組織因子を生成させるためには、切断組織因子調製のための他の方法を用い得ることが期待される。その方法には、膜間領域から予測される細胞外領域を分離するための、野生組織因子の化学的および/または酵素的切断を含む。組換え人TFはCalbiochem Corporationから入手できる。アミノ酸219につづく停止コドンの正確な位置づけは、機能的切断TFを作るには本質的なものではないと信じられ、アミノ酸219の近くの停止コドンの他の配置が、出血疾病の処理として役立つF VII aと結合した能力について本質的に同等な生成物をもたらすことが予測される。

活性化された因子VII

因子VIIはFair, Blood 62, 784-791 (1983) による記述のように調製できる。Hagen等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2412-2416 (1986) により報告された人因子VII cDNA配列は、翻訳されたアミノ酸配列SEQ. ID. No: 4と一緒にSEQ. ID. No: 3の如く以下に示される。1-60のアミノ酸配列は分泌前に細胞により取除かれているpre-pro/リーダー配列に相当する。成熟F VIIポリペプチド鎖はアミノ酸61-466から成っている。F VIIはアルギニン-212とイソロイシン-213の間の単一ポリペプチド結合の開裂によりF VII aに変換される。F VIIは試験管内で、精製蛋白質の、Affi-GelTM 15ビーズ (Bio-Rad) 上に固定されている因子X aと一緒に保温することによりf VII aに変換される。変換は減数 (reduce) された試料のSDS-ポリアクリルアミド ゲル電気泳動により監視される。f VII a調製物中の遊離の因子X aは、50mM EDTA存在の下、最終濃度0.2mMの、色原体基質メトキシカルボニル-D-シクロヘキシルグリシル-グリシル-アルギニン-p-ニトロアニリドアセタート (SpectrozymeTM F X a, American Diagnostica, Greenwich, CT) により検出できる。組換えf VII aもまたNovo Biolabs (Danbury, CT) から購入できる。

生体内におけるF VII aの形成

あるいはまた、F VII aは切断組織因子投与時またはその僅か前に、生体内で形成できる。好ましい態様では、内生のF VIIはVII aのアクチベーター例えばリン脂質 (PCPS) と組合わせた因子X aによりF VII aに変換される。

生体内の因子VIIのアクチベーターにはF X a/PCPSとF IX a/PCPSとトロンビンとF XII aと、PCPSと組合わせた、Oxyuranus scutellatusの毒液からのF VIIアクチベーターとが含まれる。これらのものは切断組織因子と組合わせなくても、試験管内でF VIIをF VII aに活性化することが示されている。

F X aとトロンビン: Radcliffe, R. と Nemerson, Y. (1975)。活性化された因子Xとトロンビンによる因子VIIの活性化と制御: 因子VIIの単結合鎖型の単離と特徴づけ。J. Biol. Chem. 250:388-395。この論文はF X aによるF VIIの活性化が、リン脂質が存在する場合、促進されることを指摘している。

F IX aとF X a: Masys, D. R. Bjaj, s. p. および Rapaport, S. I. (1982)。活性化されている因子IXとXとによる人因子VIIの活性化。Blood 60:1143-1150。この論文は因子IX aとX aとの両者による因子VIIの活性化と、リン脂質が両反応を促進する事実とを記述している

10

20

30

40

50

。

生体内におけるF X aとリン脂質:Giles,A.R.,Mann,K.G.およびNesheim,M.E. (1988)。因子X aとホスファチジルコリン-ホスファチジルセリン小胞との組合せは生体内で因子VII Iを迂回する。Br.J.Haematol.69:491-497。この論文は血友病犬におけるF X a/PCPSの因子VIII迂回活性を記述している。それは因子VIIの活性化に関しては取扱っていない。

F XII a:Kisiel,W.,Fujikawa,K.およびDavie,E.W. (1977)。牛因子VII (プロコンバーチン)の因子XII a (活性化されているHageman因子)による活性化。Biochemistry 16:4189-4199。F VII a (リン脂質なし)による牛F VIIの活性化を記述。

F VIIの蛇毒液アクチベーター:Nakagaki,T.,Lin,P.およびKisiel,W (1992)。Oxyuranus scutellatus (タイパン蛇)の毒液からプロトロンビンアクチベーターによる人因子VII 10
の活性化。Thromb.Res.65:105-116。この論文は、リン脂質と組合せて、試験管内で因子VIIをVII aに活性化することになる、この蛇毒液からの酵素の単離を記述している。

生体内におけるX a/PCPSについてのF VIIのVII aへの活性化もまた直接に測定された。

一般に因子VIIアクチベーターは1~10 μ g/担体mlの適量で投与される。

リン脂質は多くの型で提供できるが、好ましい型はホスファチジルコリン/ホスファチジルセリン小胞 (PCPS) としてである。PCPS小胞の調製とX a/PCPSの投与方法とはGiles等 (1988) で記述されていて、その教えは特にここに組込まれている。他のリン脂質調製物も、それがF X aによるF VIIの活性化を促進する限りPCPSと代り得る。有効性と、従って、最適組成並に投与量とは以下記載のように監視できる。

チンパンジーにおける生体内のF VII aの水準を上げる、X a/PCPSの高効果の投与量は体重kg当りF X a26pmol+PCPS40pmdであった。その投与量はF VII aの内生水準において18 20
倍の増大 (146ng/mlに) をもたらした。やっと検出される効果を、犬でより少ない投与量を用いて観察したが、その場合、体重kg当りF X a12pmol+PCPS19pmolの注入で内生F VII aの水準において3倍増大した。従って体重kg当りF X a最少12pmol、好ましくは体重kg当り26pmolのF X aの投与量が有用であろう。体重kg当りPCPS最少19pmol、好ましくは体重kg当り40pmolであるPCPS投与量が同様に有用である。

どんな注入可能なF VIIアクチベーターの有効性も静脈内投与の後、アクチベーターの全量注入 (bolus infusion) 後種々な時間 (2,5,10,20,30,60,90および120分) でクエン酸塩添加血液試料を採血し、その血液試料から血小板の乏しい血漿を調製することにより監視できる。内生F VII a量はそのクエン酸塩添加血漿試料中で、われわれのtTF基礎のF VI 30
I a凝固検定により測定できる。内生F VII aの所望の水準は精製F VII aとtTFとの共注入に関して示された血漿F VII aの目標水準と同じであろう。従ってF VIIの他のアクチベーターも生体内で血漿試料のtTF-基礎F VII aの検定により、過度の実験なしに、F VII aの発生と、望ましい水準のF VII aの生成のために調節された投与量とを試験できよう。そしてF VIIアクチベーターの適当な投与量 (所望の水準の内生F VII aを生む) を、推奨する量のtTFと組合せて用いることができる。

F VII aの水準における持続的な上昇を与えるため服用は頃合を見計らって行うことができる。好ましくは服用は、所望の止血効果が達されるまで2時間毎に行い、そして出血を制御するに必要なように繰返される。生体内のF VII aの半減期は、種々な治療様式と個 40
個の患者によって変り得るであろうが、約2時間であると報告されている。従って与えられた処置様式における血漿中のF VII aの半減期はtTF基礎の凝固検定により法定すべきであろう。

tTFとF VII aとの組合せ物の投与

tTFとVII aとは、好ましい態様においては薬学的に受け入れられる担体例えば生理食塩水または緩衝されている生理食塩水を用い注入により投与する。tTFとVII aとはまた在来の局所基剤例えばペトロラタムまたは水基礎のゲルを用いての直接適用によるか、あるいはエーロゾルスプレーとしての何れかによって局所的に投与することもできる。

tTFは、全身的に投与された場合には血漿中に有効水準100ng/ml~50 μ g/ml、または好ましい水準1~10 μ g/mlあるいは60~600 μ g/体重kg、あるいは局所投与の場合には、有効水準10~50 μ g/mlまたは好ましい水準10~50 μ g/mlを生み出すのに効果的な薬用量で投与 50

される。

F VII aは血漿中に、有効水準20ng/ml～10 μg/ml (1.2～600 μg/kg) または好ましい水準40ng/ml～4 μg/ml (2.4～240 μg/kg)、あるいは局所投与の場合は1～10 μg F VII a/mlの水準を作り出すのに有効な薬用量で投与される。

F VII aアクチベーターは前記の如く有効水準のF VII aを血漿中に作り出すのに有効な薬用量で投与される。しかし、内生F VIIから変換されるF VII aの最大量は約700ng/mlである。

一般に、tTFとFVII aとは、10 μg tTF/血漿mlまでと、40ng～4 μg/血漿mlとの水準を作り出すように投与される。血友病患者には、tTFとF VII aとは10 μg tTFまでと、100～300ng F VII a/mlとの水準を作り出すように投与される。硬変を持つ患者に対してはtTFは同量で、1 μg F VII a/ml血漿を投与する。 10

tTFはFVIIのF VII aへの変換を刺激するから、それは高められた因子VII a水準と共でのみ機能的であるであろう。従ってtTFはF VII a治療法と協力してまたは何か他の理由で高いF VII a水準をもつ患者でのみ有効な止血剤であることが予期される。

この組合せにより処置できる他の状況には、整形外科の手術後、脳手術または脳障害、血小板減少症の2次の出血ならびに血小板機能障害を含む、微小血管系からの手術出血、皮膚移植用片採取部位の出血、手術後出血を含む。

実施例1. 正常犬におけるtTFとF VII aとの安全性

3頭のビーグル種犬をtTFまたはtTFプラスF VII aの何れかで処置した。

犬#5533を静脈内全量注入により、適用量60 μg tTF/kg体重で、tTFのみにより処置した。ELISA研究は0時間において血漿中1.23 μg tTF/mlを示した。この犬ではtTFの半減期は2.2時間であつた。 20

犬#5534もまた静脈内全量注入により適用量41 μg/kg体重で、tTFのみにより処置した。血液量60ml/kgを仮定して、この血液中0.67 μg tTF/mlの水準を作り出していただろう。ELISA研究は0時間において血漿中0.60 μg tTF/mlを示した。tTFの半減期はこの犬においては1.3時間であつた。

犬#5734は静脈内全量注入により、適用量41 μg tTF/kg体重とNovo組み換え因子VII a/kg体重で、F VII aと組合せたtTFで処理した。ELISA研究は0時間において血漿中0.51 μg tTF/mlを示した。この犬においてtTFの半減期は2段階(1時間、つづいて3.0時間)であつた。 30

犬は全て健康で活発のままだつた。凝固システムの血液試験はフィブリノーゲン水準または血小板数で有意の減少を示さず、フィブリン分解生成物の測定できる増加も示さなかつた。白血球数および赤血球数がそうであつたように、プロトロンビン時間APTT時間も正常であつた。従ってtTF単独またはF VII aと一緒にtTF何れかの投与は測定できる散在性の脈管内凝固または他の検出できる凝血異常症を起さなかつた。

完全な剖検が、切断組織因子および因子VII aを受けた動物に対し行われた。静脈、動脈内または毛細血管内に血栓症の証拠は見出せなかつた。心筋梗塞または脳梗塞(卒中)に関して、総体的および顕微鏡的検査で証拠はなかつた。

実施例2. F VII aと組合せたtTFによる血友病血漿の凝固時間の試験管内矯正

改変されたプロトロンビン試験(PT)を希釈されたトロンボプラスチンについて(トロンボプラスチンが希釈されない限り、血友病患者は正常のPTである故に)、正常または先天的な因子VIII欠損(A型血友病)血漿を用いて行なつた。Sigma Chemical Co.家兎脳トロンボプラスチンをTBS/0.1%BSA/家兎脳セファリン(Sigma Chemical Co.)によつて1:500に希釈した。 40

12×75mmガラス試験管を37℃水浴中で予め温めた。

希釈トロンボプラスチンを加え(0.1ml) 2分間以上37℃まで温めておいた。

血漿試料(0.1ml)を加え、正確に30秒温めた。

予め温めた25mM CaCl₂(37℃に)を加え、凝固時間を手動傾斜(tilt)管法により測定した。

その結果は図1aおよびbに示した。図1aは、tTF(1 μg/ml)と種々な濃度のF VII a (ng 50

/ml) を添加した場合 (黒三角) あるいは種々な濃度のF VII a単独 (ng/ml) を加えた場合 (黒丸) の、因子VII-欠損血漿についての希釈トロンボプラスチン凝固時間 (秒) のグラフである。図1bはtTF (1 μ g/ml) と種々な濃度のF VII a (ng/ml) を加えた場合 (黒三角) または種々な濃度のF VII a単独 (ng/ml) を加えた場合 (黒丸) の、正常血漿に関する、希釈トロンボプラスチン凝固時間 (秒) のグラフである。何等F VII aまたはtTF も加えない血友病患者血漿の凝固時間は88.5秒で、それは上の水平点線により示されている。F VII aまたはtTFを加えない正常血漿の凝固時間は53.0秒で、下の水平点線により示されている。tTFの添加なしで血友病患者血漿の凝固時間88.5秒は808ng F VII a/血漿mlで正常の血漿の凝固時間にまで低下される。tTFを加えて (1 μ g/mlで)、血友病患者血漿の凝固時間は36.8ng F VII a/血漿mlで正常血漿のそれにまで低下した。

10

従って、血漿中1 μ /ml tTFの存在の下では、tTFを添加しない場合より22倍も低いF VII aの添加水準で、血友病患者血漿の持続凝固時間の矯正を達成した。更にその上、tTFはF VII aの添加なしでは血友病患者血漿の持続凝固時間の矯正はできなかった。

実施例3:血友病犬の処置におけるtTFとF VII aとの組み合わせの効力

Brinkhous等、Proc,Natl,Acad,Sci,USA 82,8752-8756 (1985),Graham等、J.Exp.Med.90,97-111 (1949), およびBrinkhous等、Ann,N.Y.Acad.Sci,370,191-204 (1981) により記述されているごとく、血友病犬の群体はChapel HillのUniversity of North Carolinaで開発された。犬はA型血友病を持っている。試験 (二次小皮出血時間) を出血傾向測定のために用いた。

改良された足指爪出血時間 (toenail bleeding time) (BT) を注入調製物の出血効果の試験に用いる。前脚の足を37°Cの等張生理食塩水中に入れて温め、足爪を切り取って末端基質のみを露出させる。出血している爪を37°Cの等張生理食塩水中におき、出血の停止までの時間を一時BTとして記録する。2~4時間立って、その部分を、血塊とできるだけ少ない爪基質を除去するためにそる。足をふたたび37°Cの生理食塩水にいれる。押し出された血の不連続の流れが見られる。処置をしない血友病犬については、出血は典型的には30分乃至それ以上続く。出血停止までのこの時間を二次BTとして記録する。正常犬については、一次BTは2~5分、二次BTは5分以内である。血友病犬については、一次BTは正常犬のそれと同じであるが、二次BTは15分より長い。

20

犬#V02には低適用量のF VII a,6 μ g FVII a/体重kg,を与え、その量はほんの弱い止血効果だけを与えるように設計したものである。15分間の平衡状態の後、二次小皮出血時間は2分30秒で測定され、自然に5分15秒の間再出血した。再出血の誘発:9分20秒出血時間、再び自然に15分間再出血、そこで更に出血するのを防止するため爪を焼灼した。この犬に置ける静脈切開部位からの出血と滲出とを停止するのは困難であって、F VII a投与後も続いた。

30

結果は、F VII aのこの適量量は非常に弱い止血効果しか持たないことを示している。それで、その犬は42 μ g tTF/体重kgを投与された。15分の平衡状態の後、二次小皮出血時間を50秒で測定され、それは自然には再出血しなかった。これは、その動物がF VII a単独を受けた場合により劇的に短時間であった。再出血を誘発するためのガーゼを用いた血塊の拭き去りは僅かに35秒の出血を起こし、引続再出血は見られなかった。前足の静脈における2つの静脈切開部位からの滲出もまた引続くtTFの注入で停止した。

40

この結果は低適用量のF VII aと組み合わせたtTFが優れた止血効果を持つことを示した。2日後同じ犬にF VII aなしで42 μ g tTF/体重kgを投与した (tTFとF VII aとの半減期は約2時間であるから、血漿から何れの物質も除去されたことを確実にするのに十分以上である)。15分の平衡状態の後、二次小皮出血時間は15分以上であり、焼灼により停止しなかった。

その結果は、tTF単独では測定出切る程の止血効果かがないことを示した。

それからその犬は6 μ g F VII a/体重kgを投与された。15分の平行状態の後、二次小皮出血時間を3分15秒で測定され、再出血はなかった。ガーゼによる血塊の拭き去りは3分間の再出血を起こし、引続く再出血は、見られなかった。

この結果は再び、低適用量F VII aと組み合わせたtTFが非常に良好な止血効果を持つこと

50

を示した。

実施例4:止血を防止する因子F VII aを発生するための、リン脂質小胞 (PCPS) と組み合わせた因子X aの注入

3頭のチンパンジーがGiles等(1988)により記述された如く、この教えはここに組み入れられている、F X a/PCPSの全量注射を用いて注入された。簡短には因子X a/pcpsは静脈内に注入された。最高の適用量を受けたチンパンジーは体重kg当たり26pmol F x a+40pmol PCPSを受けた。注入後次の時間に血漿が採られ、それは以下に示す血漿F VII aの水準を与えた。

血漿

		<u>F V I I a (n g / m l)</u>	10
注入前		8 . 0	
2 分 注入後		2 4 . 6	
5 "	"	6 5 . 4	
1 0 "	"	1 2 5 . 5	
1 5 "	"	1 4 6 . 5	20
2 0 "	"	1 3 2 . 0	
2 0 "	"	1 0 1 . 8	
6 0 "	"	4 3 . 6	
9 0 "	"	4 . 4	

この結果は、因子X a/PCPSと組合されたtTFの注入が因子VII aの水準を非常に増大させることを示している。

本発明の変態様と変形、過度な出血の処置のための方法と組成物とは前記の詳細な説明から明らかであろうし、添付の請求事項の範囲にあるものとする。

連統一覧表

(1) 一般資料

(i) 出願人:Morrissey,James H.Comp,Philip C.

(ii) 発明の名称:血液凝固のための切断組織因子とF VII aまたはF VIIアクチベーター

(iii) 配列数:4

(iv) 通信場所:

(A) 居住者:Richards,Medlock & Andrews

(B) 街:1201 Elm Street,Suit 4500

(C) 市:Dallas

(D) 州:Texas

(E) 国:US

(F) 郵便番号:75270-2197

(v) コンピュータ読取り形式

(A) 媒体形式:フロッピーディスク

(B) コンピューター:IBM PC compatible

(C) 演算システム:PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア:PatentIn Release #1.0,Version #1.25

(vi) 現在の出願データ:

10

20

30

40

50

- (A) 出願番号
- (B) 出願日
- (C) 分類
- (vii) 前の出願データ
- (A) 出願番号:US 07/882202
- (B) 出願日:1992年5月13日
- (vii) 前の出願データ
- (A) 出願番号:US 08/021615
- (B) 出願日:1993年2月19日
- (viii) 弁理士／代理人 資料: 10
- (A) 名前:Trujillo,Doreen Y.
- (B) 登録番号:35,719
- (C) 参考資料／事件整理番号:OMRF B34290CIPC/PCT
- (ix) 通信資料:
- (A) 電話:214-939-4500
- (B) ファックス:214-939-4600
- (2) SEQ ID NOに関する資料:1:
- (i) 配列特性:
- (A) 長さ:795塩基対
- (B) 型:核酸 20
- (C) 撚り:2重
- (D) トポロジー:リニア
- (ii) 分子型:cDNA
- (iii) 仮定:ナシ
- (iv) ANTI-SENSE:NO
- (vi) 起源:
- (A) 生物:ホモサピエンス
- (F) 組織:繊維芽細胞
- (ix) 特徴
- (A) 名／キー:CDS 30
- (B) LOCATION;34..786
- (C) 他の資料:生成物=“切断組織因子”
- (D) 配列記述:SEQ ID NO:1:
- (xi) 配列記述:SEQ ID NO:1

CGTTCGCTC GATCTCGCCG CCAACTGGTA GAC ATG GAG ACC CCT GCC TGG CCC	54
Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro	
1 5	
CGG GTC CCG CGC CCC GAG ACC GCC GTC GCT CGG ACG CTC CTG CTC GGC	102
Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly	
10 15 20	
TGG GTC TTC GCC CAG GTG GCC GGC GCT TCA GGC ACT ACA AAT ACT GTG	150
Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val	
25 30 35	
GCA GCA TAT AAT TTA ACT TGG AAA TCA ACT AAT TTC AAG ACA ATT TTG	198
Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu	
40 45 50 55	
GAG TGG GAA CCC AAA CCC GTC AAT CAA GTC TAC ACT GTT CAA ATA AGC	246
Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser	
60 65 70	
ACT AAG TCA GGA GAT TCG AAA AGC AAA TGC TTT TAC ACA ACA GAC ACA	294
Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr	
75 80 85	
GAG TGT GAC CTC ACC GAC GAG ATT CTC AAG GAT GTG AAG CAG ACG TAC	342
Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr	
90 95 100	
TTG GCA CCG GTC TTC TCC TAC CCG GCA GGG AAT CTC CAG AGC ACC GGT	390
Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly	
105 110 115	
TCT GCT GGG GAG CCT CTG TAT GAG AAC TCC CCA GAG TTC ACA CCT TAC	438
Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr	
120 125 130 135	
CTG GAG ACA AAC CTC GGA CAG CCA ACA ATT CAG AGT TTT GAA CAG GTG	486
Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val	
140 145 150	
GGA ACA AAA GTG AAT GTG ACC GTA GAA GAT GAA CGG ACT TTA GTC AGA	534
Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg	
155 160 165	
AGG AAC AAC ACT TTC CTA AGC CTC CGG GAT GTT TTT GGC AAG GAC TTA	582
Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu	
170 175 180	
ATT TAT ACA CTT TAT TAT TCG AAA TCT TCA AGT TCA GGA AAG AAA ACA	630
Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr	
185 190 195	
GCC AAA ACA AAC ACT AAT GAG TTT TTG ATT GAT GTG GAT AAA GGA GAA	678
Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu	
200 205 210 215	
AAC TAC TGT TTC AGT GTT CAA GCA GTG ATT CCC TCC CGA ACA GTT AAC	726
Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn	
220 225 230	
CGG AAG AGT ACA CAC AGC CCG GTA GAG TGT ATG GGC CAG GAG AAA GGG	774
Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly	
235 240 245	
GAA TTT AGA GAA TAAGAATTC	795
Glu Phe Arg Glu	
250	

(2) SEQ ID NO:2に関する資料:

(i) 配列特性:

(A) 251 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) トポロジー: linear

(ii) 分子型: 蛋白質

10

20

30

40

50

(xi) 配列記述:SEQ ID NO:2:

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala
 20 25 30
 Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 35 40 45
 Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
 50 55 60
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 65 70 75 80
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 85 90 95
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 100 105 110
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
 115 120 125
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 130 135 140
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 145 150 155 160
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 165 170 175
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 180 185 190
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 195 200 205
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 210 215 220
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
 225 230 235 240
 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu
 245 250

10

20

30

(2) SEQ ID NO:3に関する資料

(i) 配列特性:

(A) 長さ:1440塩基対

(B) 型:核酸

(C) 撚り:2重

(D) トポロジー:リニア

(ii) 分子型:cDNA

(iii) 仮説:ナシ

(iv) アンティ・センス:ナシ

(vi) 起源:

(A) 生物:ホモサピエンス

(F) 組織型:血液

(ix) 特徴:

(A) 名/キー:CDS

(B) ロケーション:36...1433

40

50

(D) 他の資料:/生成物 = “組織因子”
 /注 = “人因子VIII cDNAの暗号部分”
 /引用 = ([1])

(xi) 配列記述:SEQ ID NO:3:

TCAACAGGCA GGGGCAGCAC TGCAGAGATT TCATC	ATG GTC TCC CAG GCC CTC	53	
	Met Val Ser Gln Ala Leu		
	1 5		
AGG CTC CTC TGC CTT CTG CTT GGG CTT CAG GGC TGC CTG GCT GCA GGC		101	
Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala Gly			
	10 15 20		
GGG GTC GCT AAG GCC TCA GGA GGA GAA ACA CGG GAC ATG CCG TGG AAG		149	10
Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr Arg Asp Met Pro Trp Lys			
	25 30 35		
CCG GGG CCT CAC AGA GTC TTC GTA ACC CAG GAG GAA GCC CAC GGC GTC		197	
Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val			
	40 45 50		

CTG CAC CGG CGC CGG CGC GCC AAC GCG TTC CTG GAG GAG CTG CGG CCG	245	
Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro		
55 60 65 70		
GGC TCC CTG GAG AGG GAG TGC AAG GAG GAG CAG TGC TCC TTC GAG GAG	293	
Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu		
75 80 85		
GCC CGG GAG ATC TTC AAG GAC GCG GAG AGG ACG AAG CTG TTC TGG ATT	341	
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile		
90 95 100		
TCT TAC AGT GAT GGG GAC CAG TGT GCC TCA AGT CCA TGC CAG AAT GGG	389	
Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly		10
105 110 115		
GGC TCC TGC AAG GAC CAG CTC CAG TCC TAT ATC TGC TTC TGC CTC CCT	437	
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro		
120 125 130		
GCC TTC GAG GGC CGG AAC TGT GAG ACG CAC AAG GAT GAC CAG CTG ATC	485	
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile		
135 140 145 150		
TGT GTG AAC GAG AAC GGC GGC TGT GAG CAG TAC TGC AGT GAC CAC ACG	533	
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr		
155 160 165		
GGC ACC AAG CGC TCC TGT CGG TGC CAC GAG GGG TAC TCT CTG CTG GCA	581	20
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala		
170 175 180		
GAC GGG GTG TCC TGC ACA CCC ACA GTT GAA TAT CCA TGT GGA AAA ATA	629	
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile		
185 190 195		
CCT ATT CTA GAA AAA AGA AAT GCC AGC AAA CCC CAA GGC CGA ATT GTG	677	
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val		
200 205 210		
GGG GGC AAG GTG TGC CCC AAA GGC GAG TGT CCA TGG CAG GTC CTG TTG	725	
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu		30
215 220 225 230		
TTG GTG AAT GGA GCT CAG TTG TGT GGG GGG ACC CTG ATC AAC ACC ATC	773	
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile		
235 240 245		
TGG GTG GTC TCC GCG GCC CAC TGT TTC GAC AAA ATC AAG AAC TGG AGG	821	
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg		
250 255 260		
AAC CTG ATC GCG GTG CTG GGC GAG CAC GAC CTC AGC GAG CAC GAC GGG	869	
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly		
265 270 275		
GAT GAG CAG AGC CGG CGG GTG GCG CAG GTC ATC ATC CCC AGC ACG TAC	917	40
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr		
280 285 290		

GTC CCG GGC ACC ACC AAC CAC GAC ATC GCG CTG CTC CGC CTG CAC CAG Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln 295 300 305 310	965	
CCC GTG GTC CTC ACT GAC CAT GTG GTG CCC CTC TGC CTG CCC GAA CGG Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg 315 320 325	1013	
ACG TTC TCT GAG AGG ACG CTG GCC TTC GTG CGC TTC TCA TTG GTC AGC Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser 330 335 340	1061	
GGC TGG GGC CAG CTG CTG GAC CGT GCC GCC ACG GCC CTG GAG CTC ATG Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met 345 350 355	1109	10
GTG CTC AAC GTG CCC CGG CTG ATG ACC CAG GAC TGC CTG CAG CAG TCA Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser 360 365 370	1157	
CGG AAG GTG GGA GAC TCC CCA AAT ATC ACG GAG TAC ATG TTC TGT GCC Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala 375 380 385 390	1205	
GGC TAC TCG GAT GGC AGC AAG GAC TCC TGC AAG GGG GAC AGT GGA GGC Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly 395 400 405	1253	
CCA CAT GCC ACC CAC TAC CGG GGC ACG TGG TAC CTG ACG GGC ATC GTC Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val 410 415 420	1301	20
AGC TGG GGC CAG GGC TGC GCA ACC GTG GGC CAC TTT GGG GTG TAC ACC Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr 425 430 435	1349	
AGG GTC TCC CAG TAC ATC GAG TGG CTG CAA AAG CTC ATG CGC TCA GAG Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu 440 445 450	1397	
CCA CGC CCA GGA GTC CTC CTG CGA GCC CCA TTT CCC TAGCCCA Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro 455 460 465	1440	30

(2) SEQ ID NO:4に関する資料

(i) 配列特性

(A) 長さ:466 アミノ酸

(B) 型:アミノ酸

(D) トポロジー:linear

(ii) 分子型:蛋白質

(xi) 配列記述:SEQ ID NO:4

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1 5 10 15
 Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
 20 25 30
 Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
 35 40 45
 Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
 50 55 60
 Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
 65 70 75 80
 Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 85 90 95
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
 115 120 125
 Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
 130 135 140
 Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
 145 150 155 160
 Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
 165 170 175
 Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
 180 185 190
 Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
 195 200 205
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
 210 215 220
 Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
 245 250 255
 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
 260 265 270
 Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
 275 280 285
 Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
 325 330 335
 Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
 340 345 350

10

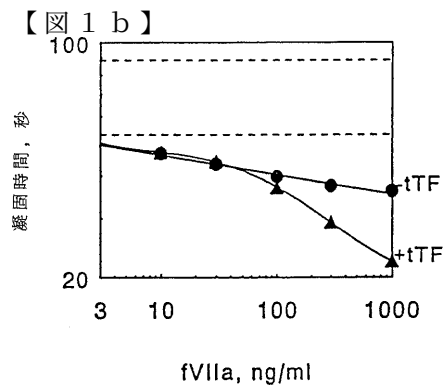
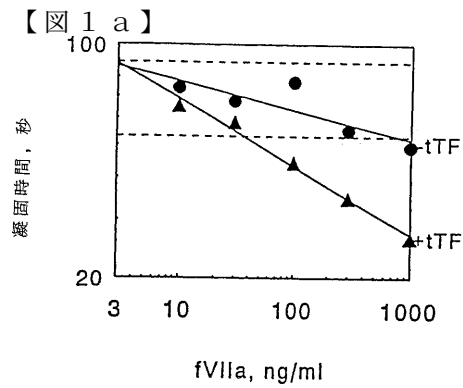
20

30

40

Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
 355 360 365
 Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
 370 375 380
 Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
 385 390 395 400
 Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
 405 410 415
 Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
 420 425 430
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
 435 440 445
 Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
 450 455 460
 Phe Pro
 465

10



フロントページの続き

(72)発明者 カム, フィリップ、シー
アメリカ合衆国オクラホマ州73118、オクラホマ・シティ、シルヴァ・レイク・ドライヴ 9805番

審査官 安川 聡

(56)参考文献 特表昭58-500994 (JP, A)
Ruf, W. et al, Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor, J. Biol. Chem., 1991年, Vol.266, No.4, p.2158-66

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61K 38/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE(STN)