



PCT

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6 C07K 14/745, 1/22, 16/18, C12P 21/02	A1	(11) 国際公開番号 WO00/00516 (43) 国際公開日 2000年1月6日(06.01.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03532 (22) 国際出願日 1999年6月30日(30.06.99) (30) 優先権データ 特願平10/199654 1998年6月30日(30.06.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒160-8515 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 長谷純宏(HASE, Sumihiro)(JP/JP) 〒659-0032 兵庫県芦屋市浜風町24-13 Hyogo, (JP) 若林弘行(WAKABAYASHI, Hiroyuki)(JP/JP) 〒160-8515 東京都新宿区四谷1丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.) 〒101-0032 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: NOVEL SUGAR CHAIN-BONDED THROMBOMODULIN-LIKE PEPTIDE (54)発明の名称 新規糖鎖結合トロンボモジュリン様ペプチド (57) Abstract A novel peptide having a β1-3-galactose-β1-3-galactose-β1-4-xylose glucuronate chain having been sulfated at the 3-position and exhibiting a thrombomodulin activity; medicinal compositions containing this peptide as the active ingredient; a therapeutic method with the use of the same; a method for separating the above peptide by affinity chromatography with the use of antiHNK-1 antibody; and an enzyme immunoassay method by using the antiHNK antibody.		

(57)要約

3 位が硫酸化されたグルクロン酸 β 1 - 3 ガラクトース β 1 - 3 ガラクトース β 1 - 4 キシロース鎖を有し、トロノボモジュリン活性を有する新規ペプチドおよびそれを有効成分とする医薬組成物およびこれを用いる治療方法を提供する。

また、該ペプチドの抗HNK-1抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる分離方法および抗HNK-1抗体を用いた酵素免疫学的測定法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レント	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノールウェー	YC ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国		

明 細 書

新規糖鎖結合トロンボモジュリン様ペプチド

技術分野

本発明は、新規な糖鎖を有するトロンボモジュリン活性を有する新規なペプチドに関する。さらに詳しくは、本発明は、そのペプチド鎖に3位が硫酸化されたグルクロン酸 β 1-3ガラクトース β 1-3ガラクトース β 1-4キシロース鎖（以下、3SAGGX鎖と略記する）を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチドに関する。

また、本発明は、抗ヒトナチュラルキラー細胞-1抗体（以下、抗HNK-1抗体と略記する）と特異的に結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチドに関する。

また、本発明は、このペプチドを有効成分として含有する医薬組成物またはこの医薬組成物を投与することからなる血栓症等の治療方法に関する。

また、本発明は、このペプチドの精製方法および検出方法に関する。

また、本発明は、このペプチドから遊離、精製した3SAGGX鎖およびその還元末端を修飾したものに關する。

背景技術

トロンボモジュリンはトロンビンを向凝固酵素から抗凝固酵素へと変換せしめるユニークな性質を持つ血管内皮表面に存在する蛋白質として、1981年エス

モン (E s m o n) ら (プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカ
デミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (P r o c e e d i n g
s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s
o f t h e U S A) 78, 2249-2254, 1981) により報告さ
5 れた。続く論文において、ウサギ肺組織よりの単離精製に成功し、これを報告し
た (ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (T h e J o u r
n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y) 257, 859-
864, 1982)。さらに、ヒトトロンボモジュリンの全DNA配列およ
びアミノ酸配列が報告され (エンボ・ジャーナル (E M B O J o u r n a l)
10 6, 1891-1897, 1987; バイオケミストリー (B i o c h e m i s
t r y) 26, 4350-4357, 1987)、各ドメインの役割が明らかに
されつつある。トロンボモジュリンはトロンビンと結合し、トロンビンの持つ血
液凝固作用を失わせしめ、トロンビン-トロンボモジュリン複合体はプロテイン
Cを活性化することにより抗凝固作用を示すとされている。すなわち、トロンボ
15 モジュリンは血液凝固阻害作用と線溶促進作用の両方の作用を発揮する可能性が
あり、臨床応用が期待されている。

従来、血液凝固能異常に係わる疾患の治療剤としては、抗血液凝固作用をもつ
たアンチトロンビン I I I やヘパリンが、一方、血栓溶解作用をもったウロ
キナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター等が使用
20 されている。しかしながら、これらの物質は、出血傾向等の副作用を有し、作用
が抗血液凝固あるいは血栓溶解のいずれかに偏っている。従って、この両方の作
用を発揮する可能性があるトロンボモジュリンあるいは基本的にトロンビンと親

和性を有しプロテインCの活性化を促進するというトロンボモジュリン活性を有したトロンボモジュリン様物質の臨床応用に期待が高まっている。

現在までに、このようなトロンボモジュリンあるいはトロンボモジュリン様物質については、以下の様な取得例が報告されている。なお、分子量については、

- 5 断りのない限りドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、SDS-PAGEと略記する）により、非還元状態での測定値を示した。

ピー・ダブリュー・マジェラス（P. W. Majerus）らは、ヒト胎盤よりトロンボモジュリンを精製し、分子量75Kと報告した（ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（The Journal of
10 Biological Chemistry）, 259, 12246-12251, 1984）。丸山らは、ヒト肺よりトロンボモジュリンを精製し、その性質は胎盤のものと同じであると報告した（ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（Journal of Clinical Investigation）, 75, 987-991, 1985）。さらに、鈴木らは、ヒト
15 血小板よりトロンボモジュリンを部分精製し、分子量を78Kと決めた上で、電気泳動上の挙動、トロンビンとの親和性およびプロテインCとの基質親和性より、血小板、胎盤および肺血管内皮細胞のトロンボモジュリンは互いに等しい性質を持つことを報告した（ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（The Journal of Biochemistry）, 104,
20 628-632, 1988）。

遺伝子工学的手法によるものとして、鈴木らはヒト肺cDNAライブラリーから、シグナルペプチドを含むヒトトロンボモジュリン前駆体の遺伝子をクローニ

ングし、全遺伝子構造を解明し、アミノ酸18個のシグナルペプチドに続く557残基のアミノ酸配列を明らかにしている（エンボ・ジャーナル（EMBO Journal）, 6, 1891-1897, 1987）。さらに、鈴木らは、遺伝子工学で作製したヒトロンボモジュリンは、天然の組織より精製したヒトロンボモジュリンと同じ活性を有すること（ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（The Journal of Biological Chemistry）, 264, 4872-4876, 1989）、また、ヒトロンボモジュリン活性はアミノ末端から345-462番目のアミノ酸残基に局限されており、その部分が一部でも欠けると活性を失うことを示した（ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（The Journal of Biological Chemistry）, 264, 10351-10353, 1989および第12回国際血栓止血学会抄録、334頁、演題番号1039、1989）。

また、トロンボモジュリン活性を有するトロンボモジュリン様物質としては、天然型としてヒト尿由来の可溶性トロンボモジュリン（特開昭63-30423号公報、特開昭63-146898号公報、特開平3-86900号公報、特開平3-218399号公報、ヤマモト（Yamamoto）ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（The Journal of Biochemistry）113, 433-440, 1993）等の公知のものがある。

遺伝子工学的手法によるものとして、細胞膜貫通領域および細胞質内領域を除去した可溶性トロンボモジュリン（特開平1-6219号公報、特開平2-255699号公報、特開平3-133380号公報、特開平3-259084号公

報、特開平4-210700号公報、特表平3-503757号公報、特表平4-505554号公報、EP474273号公報、WO91/04276号公報、WO91/05803号公報、WO91/15514号公報、WO92/00325号公報、WO92/03149号公報、WO93/15755号公報、土肥ら、日本薬学会、第113年会、講演要旨集3、演題番号30EM14-1、1993年）等が挙げられる。

ある種の疾患、病態において、血中あるいは尿中の可溶性トロンボモジュリン量が変動することが報告されており、疾患、病態のマーカーとしての有用性が示唆されている。例えば、播種性血管内凝固症候群（以下、DICと略記する）、全身エリテマトーデス、血栓性血小板減少性紫斑病、関節リウマチ、進行性強皮症、糖尿病、腎疾患、成人性呼吸窮迫症候群、肺血栓塞栓症等の肺疾患（臨床検査、33巻1643-1647頁、1989年）、妊娠中毒症（血液と脈管、19巻、490頁、1988年）、肝疾患（血液と脈管、20巻、407頁、1989年）、川崎病（日本血栓止血学会誌、3巻、343頁、1992年）、慢性糸球体腎炎（日本血栓止血学会誌、3巻、349頁、1992年）、定期的血液透析療法後（日本血栓止血学会誌、1巻、395頁、1990年）、加齢（日本血液学会誌、54巻、286頁、1991年）等で血中トロンボモジュリン量が増加することが報告されている。また、腎不全で尿中トロンボモジュリンが減少することが報告されている（臨床血液、31巻、1191頁、1990年）。

これらトロンボモジュリンあるいはトロンボモジュリン様物質には、そのアミノ酸配列から、N型糖鎖およびO型糖鎖が結合し得ると考えられている。しかし

ながら、実際に結合している糖鎖についての報告はほとんどなく、N型糖鎖についての知見が、新見等により発表されたにすぎない（医薬品研究、28巻、12号、863-873頁、1997年）。

トロンボモジュリンのO型糖鎖に関して極わずかに報告されているものとして
5 は、WO 91/04276号公報にはコンドロイチン及び／又はコンドロイチン硫酸を含む糖鎖を有する組換え可溶性トロンボモジュリンが、WO 91/05803号公報には硫酸化グリコサミノグリカンで修飾された組換え可溶性トロンボモジュリンが開示されており、特開平4-210700号公報には硫酸化グリコサミノグリカンが結合していない組換え可溶性トロンボモジュリンが開示
10 されている。

一方、ヤマモト（Yamamoto）らの、ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（The Journal of Biochemistry）113, 433-440, 1993およびナカノ（Nakano）らの、トロンボシス・アンド・ヘモスタシス（Thrombosis and Haemostasis）, 79, 331-337, 1998）にはヒト尿由来可溶性トロンボモジュリンにはコンドロイチン硫酸が存在しないことが記載されている。しかしながら、特にO型糖鎖の構造等詳細については十分に解析されていないのが現状である。

一方、3位が硫酸化されていないグルクロン酸 β 1-3ガラクトース β 1-3
20 ガラクトース β 1-4キシロース鎖は、グリコサミノグリカン鎖がペプチドに結合する際の結合領域として知られているが、グルクロン酸の3位が硫酸化された4糖のみの糖鎖については全く報告されていない。

発明の開示

従来より、トロンボモジュリンあるいはトロンボモジュリン様物質が有する血液凝固制御作用あるいは血小板凝集制御作用等を医薬に応用するために、より純度が高く精製可能で、投与した患者の血液、尿等の生体試料中で検出が容易なペ

5 プチドの提供が求められていた。

本発明の目的は、より純度が高く精製が可能であり、投与した患者の血液、尿等の生体試料中で検出が容易なトロンボモジュリン活性を有するペプチドおよびそれを有効成分として含有する医薬組成物を提供することである。

また、本発明の目的は、上記本発明のペプチドの精製方法、検出方法および検
10 出キットを提供することである。

本発明者等は、トロンボモジュリン様物質について鋭意研究を行っている際に、意外にもトロンボモジュリン様物質の中で抗HNK-1抗体と特異的に結合するものがあることを見出し、さらに研究を進めた結果、意外にも末端のグルクロン酸が硫酸化された、3 S A G G X鎖という新規糖鎖を有する新規トロンボ
15 モジュリン様ペプチドを単離することに成功した。また、該ペプチドが医薬として有用であることを見出した。さらに、この3 S A G G X鎖を有するトロンボモジュリン様物質を高純度に精製する方法および検出する方法を見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

本発明の第一の態様は、3 S A G G X鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有
20 するペプチドである。該ペプチドにおいて、水溶液に可溶性であるものが好ましく、また、非イオン性界面活性剤非存在下で水溶液に可溶性であるものがより好ましく、アミノ酸配列が配列番号1の1～494アミノ酸配列を有するペプ

チド、あるいは、配列番号2の1～498のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸の置換、付加、挿入および／または欠失を施すことにより得られるアミノ酸配列を有するペプチドがさらに好ましい。

本発明の第二の態様は、抗HNK-1抗体と特異的に結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチドである。該ペプチドにおいて、コンドロイチンおよび／またはコンドロイチン硫酸が結合したペプチドを実質的に含有しないペプチドが好ましい。該ペプチドにおいて、水溶液に可溶性であるものが好ましく、また、非イオン性界面活性剤非存在下で水溶液に可溶性であるものがより好ましく、アミノ酸配列が配列番号1の1～494アミノ酸配列を有するペプチド、あるいは、配列番号2の1～498のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸の置換、挿入、付加および／または欠失を施すことにより得られるアミノ酸配列を有するペプチドがさらに好ましい。

本発明の第三の態様は、3SAGGX鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチドあるいは抗HNK-1抗体と特異的に結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチドを有効成分として含有する医薬組成物である。該ペプチドにおいて好ましいものは本発明の第一の態様あるいは第二の態様と同様である。

本発明の第四の態様は、3SAGGX鎖を特異的に認識し結合する抗体によるアフィニティーを利用した分離方法により特徴づけられる、3SAGGX鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチドあるいは抗HNK-1抗体と特異的に結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチドの精製方法である。好ましい抗体は、抗HNK-1抗体であり、該抗体を結合した樹脂を用いた抗体

アフィニティーカラムを用いることが更に好ましい。

本発明の第五の態様は、3 S A G G X鎖を特異的に認識し結合する抗体を用いた、3 S A G G X鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチドあるいは抗HNK-1抗体と特異的に結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチド
5 の酵素免疫学的検出（以下、E I Aと略記する）方法および検出キットである。
好ましい抗体は、抗HNK-1抗体である。

本発明のさらなる態様としては、3 S A G G X鎖を糖ペプチドから遊離させ、精製した糖鎖およびその還元末端を修飾したものである。該糖鎖において、糖アルコールであるもの、あるいは還元末端にセリンが結合した糖ペプチドであるも
10 のが好ましい。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明明細書における用語について以下に説明する。

3 S A G G X鎖とは、3位が硫酸化されたグルクロン酸 β 1-3ガラクトース
15 β 1-3（ $\pm$ シアル酸 α 2-6）ガラクトース β 1-4キシロース鎖であり、末端から3番目のガラクトースにシアル酸が α 2-6結合したものと結合していないものの両方が含まれる。グルクロン酸にはいわゆるグリコサミノグリカン鎖は結合しておらず、4糖のみの構造である。このキシロースがトロンボモジュリン活性を有するペプチドの、配列番号1で表すとアミノ酸配列の472番目および
20 /または474番目のセリンの水酸基とOグリコシド結合をしていると考えられる。

トロンボモジュリン活性とは、トロンビンに結合し、トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用をいう。トロンビンに結合することは、例えばトロンビンをリガンドとした親和性カラムに吸着することで確認することができる。

トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用は、例えば特開平 3-21

- 5 8399号公報に開示されている、合成基質 Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCAを用いたトロンビン共存下でのプロテインC活性化能測定方法により確認することができる。また、トロンボモジュリン活性を有するペプチドをトロンボモジュリン様ペプチドと総称することがあり、トロンボモジュリン自体も含まれる。

- 10 3SAGGX鎖を特異的に認識し結合する抗体を用いた酵素免疫学的検出方法（以下、EIAと称することがある）とは、3SAGGX鎖を特異的に認識し結合する抗体をペルオキシダーゼやガラクトシダーゼなどの酵素と化学的に結合させた抗体で3SAGGX鎖を有するペプチドを検出するものである。3位が硫酸化されたグルクロン酸を抗原として特異的に認識し結合する抗体（例えば、
- 15 抗HNK-1抗体）が好ましい抗体として例示されるが、3SAGGX鎖を特異的に認識し結合する抗体であればいずれでも使用することができる。酵素反応により発色を呈する基質を加えて、その発色度から目的とする抗原の有無および量を測定する。基質は発色強度が酵素濃度および反応時間依存性があり、測定系に影響を与えないものであればいずれのものでも使用できる。また、必要に応じて、本発明のペプチドの3SAGGX鎖以外の部分を抗原として認識し結合する抗体を用いたEIAと組み合わせることにより、さらに精度高く測定をすることもできる。
- 20

抗HNK-1抗体とは、ヒトナチュラルキラー細胞の抗原であるCD57を特異的に認識し結合する抗体であり、3位が硫酸化されたグルクロン酸を特異的に認識して結合する。抗HNK-1抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として市販されているものを購入することができ（例えば、抗NKセル：

- 5 クローンサブクラス（マウス）IgM、製造・供給コスモバイオ社、Code No. IT-0289）、また、常法に従って作製することもできる。

- 本発明の3SAGGX鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチドは、3SAGGX鎖を有しておりトロンボモジュリン活性を有するものであれば天然由来であってもよいし組換え体で得られるものであってもよく、天然由来
- 10 のものがより好ましい。天然由来の場合はヒト由来でも動物由来であってもよく、ヒト由来のものがより好ましい。医薬に用いる好ましい例としては、可溶性トロンボモジュリンであり、例えば、配列番号1の1～494のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号2の1～498のアミノ酸配列を有するペプチドまたは該ペプチドに1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または
- 15 挿入を施すことにより得られるペプチドが好ましい。また、N末端にはヘテロジェネイティがあり、更にPhe-Proを有するペプチドも好ましい。組換え体の場合3SAGGX鎖とトロンボモジュリン活性に影響を与えない範囲で配列番号2の1～498のアミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入を施すことにより得られるアミノ酸配列を有するペ
- 20 プチドも本発明に含まれる。

本発明は、また、3SAGGX鎖を特異的に認識し結合する抗体を用いることによって精製、または検出するトロンボモジュリン活性を有するペプチドであ

る。

- 本発明の抗HNK-1抗体と特異的に結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチドは、抗HNK-1抗体と特異的に結合しトロンボモジュリン活性を有するものであれば天然由来であってもよいし組換え体で得られるものであってもよく、天然由来のものがより好ましい。天然由来の場合はヒト由来でも動物由来であってもよく、ヒト由来のものがより好ましい。医薬に用いる好ましい例としては、可溶性トロンボモジュリンであり、例えば、配列番号1の1～494のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号2の1～498のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましい。また、N末端にはヘテロジェネイティがあり、更に
- 5 よく、天然由来のものがより好ましい。天然由来の場合はヒト由来でも動物由来であってもよく、ヒト由来のものがより好ましい。医薬に用いる好ましい例としては、可溶性トロンボモジュリンであり、例えば、配列番号1の1～494のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号2の1～498のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましい。また、N末端にはヘテロジェネイティがあり、更に
- 10 Phe-Proを有するペプチドも好ましい。組換え体の場合3SAGGX鎖とトロンボモジュリン活性に影響を与えない範囲で配列番号2の1～498のアミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入を施すことにより得られるアミノ酸配列を有するペプチドも本発明に含まれる。また、コンドロイチンおよび／またはコンドロイチン硫酸が結合したペプチドを
- 15 実質的に含有しないペプチドが好ましい。

- 本発明の3SAGGX鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチドは、3SAGGX鎖を特異的に認識し結合する抗体によるアフィニティーを利用した分離方法により得ることができる。出発材料は特に問わないが、ヒトあるいは動物由来の、例えばヒト肺、ヒト胎盤、ヒト尿、ヒト血液等の天然物から、
- 20 陰イオン交換クロマトグラフィー、トロンビンを用いたアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィー等を用いた常法に従って精製したトロンボモジュリンや可溶性トロンボモジュリンあるいは遺伝子工学的

に作製した組換えトロンボモジュリンや組換え可溶性トロンボモジュリンに対し、さらに、該アフィニティーを利用した分離工程を行うことが好ましいが、常法による精製の前工程あるいは中工程として行うこともでき、必要に応じては複数回行うこともできる。また、必要に応じて、陽イオン交換クロマトグラ

5 フィー、疎水クロマトグラフィーあるいはハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー等を組み合わせることもできる。遺伝子工学的に作製する場合は、常法に従ってトロンボモジュリン活性を有するペプチドを発現するベクターにより宿主細胞を形質転換すればよい。さらにグルクロニルトランスフェラーゼ活性を有するペプチドを発現するベクターおよび／またはスルフォトランスフェラーゼ活性

10 を有するペプチド、例えばHNK-1 スルフォトランスフェラーゼを発現するベクターを、トロンボモジュリン活性を有するペプチドを発現するベクターと同時に宿主細胞に導入（コトランスフェクション）することも好ましい方法である。また、トロンボモジュリン活性を有するペプチドと、グルクロニルトランスフェラーゼ活性を有するペプチドおよび／またはスルフォトランスフェラーゼ活性を

15 有するペプチド、例えばHNK-1 スルフォトランスフェラーゼとを両方発現するベクターにより宿主細胞を形質転換することもできる。

3 S A G G X鎖を特異的に認識し結合する抗体は特に限定されないが、抗HNK-1 抗体であることが好ましく、モノクローナル抗体であることがさらに好ましい。また、3 S A G G X鎖を特異的に認識し結合する抗体によるアフィニ

20 ティーを利用した分離方法としては、該抗体をアガロース、セルロース、デキストラン等の担体に結合させ、カラム法やバッチ法等で行うことができ、特にカラム法が好ましい。

カラム法で行う場合、該抗体を担体に臭化シアンを用いて結合させ、カラムに充填し、試料溶液を通過させて3 S A G G X鎖を有しトロンボモジュリン活性を有するペプチドを吸着させる。続いて、吸着した該ペプチドと抗体のアフィニティーを減弱させる条件の溶出液を流して該ペプチドを溶出させる。必要に応じてトロンビンアフィニティークロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィーと組み合わせることもできる。

得られた本発明のペプチドは、 $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で10時間処理をすることによりウイルスを不活化する、あるいは、中空糸膜等でウイルスを除去して医薬品としてより適した状態にすることができる。

10 本発明のペプチドの作用および性質を以下に示す。

実験例1 実施例1のペプチドの構造解析

(1) 末端アミノ酸配列

実施例1で得られたペプチドをシー・エイチ・ダブリュー・ヒルス (C. H. W. H i r s) らの方法 (メソツツ・イン・エンザイムオロジー (M e t h o d
15 s i n E n z y m o l o g y (C. H. W. H i r s e d.), V o l. 11, 199-203, アカデミック・プレス (A c a d e m i c P r e s s), ニューヨーク (N e w Y o r k), 1967) に準じて還元カルボキシメチル化した後、脱塩し、アミノ酸配列分析用試料とした。

N末端アミノ酸配列分析は、気相アミノ酸配列自動分析装置 (アプライドバイ
20 オシシステムズ社製、470A型) により行い、カルボキシ末端 (以下、C末端と略記する) アミノ酸はヒドラジン分解法により決定し、C末端アミノ酸配列分析は、カルボキシペプチダーゼY処理して、遊離するアミノ酸を高速液体クロマト

グラフィーを用いたアミノ酸分析装置（日本分光社製）により定量分析することにより行った。

本発明実施例1のペプチドのN末端側およびC末端側のアミノ酸配列の分析結果を下に示す。

5 N末端：A l a - P r o - A l a - G l u - P r o - G l n - P r o - G l y -

G l y - S e r - G l n - C y s - V a l - G l u - H i s - A s p -

C y s - P h e - A l a - L e u - T y r - P r o - G l y - P r o -

A l a - T h r - P h e - L e u -

C末端：- V a l - G l y - L e u

10 この結果からわかる通り、実施例1で得られたペプチドのN末端アミノ酸配列は、これまで明らかにされているヒトトロノボモジュリンの報告と全く一致するが、C末端側のアミノ酸配列は、492～494番目のアミノ酸残基の部分に該当する。すなわち、実施例1のペプチドはヒトトロノボモジュリンのアミノ酸配列1～494のアミノ酸配列を有するペプチドであると考えられた。

15 (2) 糖鎖分析

実施例1で得られたペプチドをエヌ・クラヤ（N. K u r a y a）とエス・ハセ（S. H a s e）の方法（ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（The Journal of Biochemistry）, 112, 122-1

- 26, 1992) に準じて、ヒドラジン分解 (60℃、50時間) により糖鎖を切り出しN-アセチル化、ピリジルアミノ (以下、PAと略記する) 化を行い、糖鎖分析用試料 (PA化糖鎖) とした。さらに還元末端側 (アミノ酸との結合側) にキシロースを含むPA化糖鎖については、ゲル濾過クロマトグラフィー
- 5 および逆相クロマトグラフィーによって精製し、その構造を、エス・ハセ (S. Hase) のエキソグリコシダーゼ消化 (β -グルクロニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼを順次使用) と組み合わせた2次元糖鎖マップ法 (メソッヅ・イン・エンザイムオロジー (Methods in Enzymology (Ginsburg, V. ed.), Vol. 230, 225-237, アカデ
- 10 ミック・プレス (Academic Press), ニューヨーク (New York), 1994) に準じた分析法、メチル化分析法、質量分析法、およびNMR解析法によって解析した。

本発明実施例1のペプチドに結合したキシロースを含む糖鎖の分析結果を下に示す。なお、各単糖は、以下の様に略した。

- 15 $\text{SO}_4 - 3\text{GlcA}$: 3位が硫酸化されたグルクロン酸
- Gal : ガラクトース
- Sia : シアル酸
- Xyl : キシロース
- $\text{SO}_4 - 3\text{GlcA} \beta 1 - 3\text{Gal} \beta 1 - 3 (\pm \text{Sia} \alpha 2 - 6) \text{Gal} \beta 1$
- 20 $- 4\text{Xyl}$

この結果より、実施例1で得られたペプチドに結合した糖鎖のうち、キシロースを含む糖鎖構造は、グルクロン酸 $\beta 1 - 3$ ガラクトース $\beta 1 - 3$ ガラクトース

β 1-4 キシロースという四糖構造のみでペプチドに結合している点で新しい知見であり、さらにグルクロン酸の 3 位に硫酸基が結合している点においても、これまでに報告されていない新規な糖鎖であることが判明した。

さらに、実施例 1 で得られたペプチドを、ジェイ・スズキ (J. Suzuki) らの方法 (アグリカルチャル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry), 55, 283-284, 1991) に従い、4M トリフルオロ酢酸中、100℃ で 3 時間加熱後、遊離した単糖を PA 化し、イオン交換 HPLC で定量したところ、ペプチド 1 モルあたり 1 モルのキシロースが検出された。この結果より、キシロースを含む糖鎖は 3 S A G G X 鎖以外に確認されていないことから、ペプチド 1 モルあたり 1 モルの 3 S A G G X 鎖が結合していることがわかった。

(3) コンドロイチナーゼ処理

コンドロイチナーゼ処理により、SDS-PAGE での分子量およびトロンボモジュリン活性は変化しなかった。従って、実施例 1 のペプチドにはコンドロイチンおよび／またはコンドロイチン硫酸は結合していないことが改めて確認された。

実験例 2 実施例 1 で得られたペプチドの活性

トロンビンに対する親和性 (抗トロンビン作用)、トロンビン共存下でのプロテイン C 活性化能および抗血液凝固活性を、特開平 3-218399 号公報に記載された方法で測定した。

その結果、本発明のペプチドはトロンビンと結合し、その凝固活性を著しく抑

制する作用を有した。また、本発明のペプチドは、トロンビン共存下で著しいプロテインC活性化能を有していた。さらに、本発明のペプチドは、強力な血液凝固時間延長作用を示した。

実験例 3 マウスにおける急性毒性

- 5 5匹のd d Y系雄性マウスを用いて、実施例 1 または実施例 2 で得たペプチドを静脈内投与し、7 日後までの観察を行ったが、薬効用量において著明な毒性や死亡例は 1 例も認められなかった。

実験例 4 溶解性

- 10 実施例 1 または実施例 2 で得たペプチドは、室温において少なくとも 3 0 m g / m L の濃度まで蒸留水に溶解した。

- 以上の説明および実験から明らかなように、本発明のペプチドはトロンボモジュリン活性を有しており、さらに毒性も低いことから、例えば D I C、各種血栓症、末梢血管閉塞症、心筋梗塞、脑梗塞、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症、肝不全、腎不全など、血液凝固亢進に係わる疾患、の予防および治療に有効であると予想される。本発明のペプチドは、公知の天然あるいは組換えトロンボモジュリン様ペプチドと遜色ない活性を有している。
- 15

- 本発明のペプチドは、薬剤として一般的に用いられる適当な担体または媒体、例えば滅菌水や生理食塩水、植物油、無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、安定化剤または保存剤等と適宜組合せて、患者に効果的に投与するのに適した医薬用製剤、好ましくは注射剤に調製することができる。本発明のペプチドを注射剤として用いる場合には、一日 1 回ないし 6 回に分割して、一度にあるいは持続的に患者に投与される。その一日投与量は、
- 20

本発明のペプチド0.01～500mg、好ましくは0.05～10mgであるが、患者の年齢、体重、症状等に応じて適宜増減することができる。

さらに、本発明のペプチドは人工血管、人工臓器、カテーテルなどの医用器材の表面に架橋剤などを用いて結合・吸着させて使用することができる。これにより、医用器材表面での血液凝固を防ぐことができる。また、血液の体外循環時の凝固抑制剤として用いることもできる。

実施例

次に本発明ペプチド、その精製方法およびその検出方法を実施例により具体的に示すが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

10 実施例1 ヒト尿からの抗HNK-1抗原に特異的に結合する可溶性トロンボモジュリンの精製

フェノール等の防腐剤を使用して採取した健康な男子の新鮮尿100Lを、10%NaOHでpH8.5に調整し、析出した沈殿物を除去した。次いで、尿のpHを4M HClでpH5.5に調整した後、アクリロニトリル繊維で濾過し尿中のウロキナーゼを吸着除去し、通過尿を分画分子量4万の限外濾過膜を使用して脱塩濃縮した。pHを7.3に調整した後、60℃で15分間処理した。

0.068M NaClを含有する0.05Mリン酸緩衝液、pH6.5で予めコンディショニングしておいたDEAEセルロース（ワットマン社製）の300mLカラムに濃縮尿を通過させて活性画分を吸着させ、コンディショニングに使用したと同じ緩衝液750mLで洗浄した後、0.05M NaClを含

酢酸緩衝液、pH 4.0 で活性画分を溶出した。

溶出液は、分画分子量 3 万の限外濾過膜で濃縮し、2 M NaOH で pH 7.5 に調整し、0.1 M NaCl、1 mM ベンザミジン塩酸塩および 0.5 mM CaCl_2 を含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 で予め
5 コンディショニングした D I P-ートロンビン-アガロースの 2.5 mL カラムを通過させて活性画分を吸着させた。次いで、コンディショニングに使用したと同じ緩衝液 25 mL で洗浄した後、1 M NaCl、1 mM ベンザミジン塩酸塩および 0.5 mM EDTA を含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 で溶出
10 析後、再度前回と同様の条件にコンディショニングした D I P-ートロンビン-アガロースクロマトグラフィーで精製した。2 回目の D I P-ートロンビン-アガロースクロマトグラフィーにおいても同容のカラムを用い、コンディショニングで使用した緩衝液 10 mL で洗浄した後に、10 mL の 0.8 M NaCl、1 mM ベンザミジン塩酸塩および 0.5 mM CaCl_2 を含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 で洗浄し、1 M NaCl、1 mM ベンザミジン塩酸塩
15 塩酸緩衝液、pH 7.5 で洗浄し、1 M NaCl、1 mM ベンザミジン塩酸塩および 0.5 mM EDTA を含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 で活性画分を溶出した。

溶出液は、分画分子量 3 万の限外濾過膜で濃縮し、あらかじめ 0.14 M NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.0 でコンディショニングし
20 ておいた抗 HNK-1 抗体-アガロースの 2.5 mL カラムを通過させて本発明のペプチドを含有する活性画分を吸着させた。通過画分にもトロンボモジュリン活性画分が得られた。次いで、コンディショニングに使用したと同じ緩衝液 25

mLで洗浄した後、1 M NaCl、1 mMベンザミジン塩酸塩および0.5 mM EDTAを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液、pH 7.5で溶出し、この溶出液をコンディショニングに使用したと同じ緩衝液に対して透析し、本発明のペプチドを含有する活性画分を採取した。

- 5 以上の製造方法により、最終的に得られた本発明のペプチドを含有する活性画分は、SDS-PAGEで1バンドを示すペプチドとして単離された。

実施例2 抗HNK-1抗原と特異的に結合する組換え可溶性トロンボモジュリンの製造

- WO 92/00325号公報の方法に準じて組換え可溶性トロンボモジュリン
- 10 製造した。すなわち、ヒト胎盤cDNAライブラリーより釣り上げたDNAを利用してアミノ末端（以下、N末端と略記する）のアミノ酸配列がAla-Pro-A1aであるアミノ酸498残基よりなる可溶性トロンボモジュリンを発現するベクターを調製し、これをCHO細胞に組み込んだ後、遺伝子増幅を行って高発現株を得た。この高発現株の培養液をDIP-トロンビン-アガロースカラ
- 15 ムとゲル濾過により精製した。さらに、実施例1に記載した抗HNK-1抗体-アガロースカラムを用い、同様に本発明のペプチドを含有する活性画分を採取した。抗HNK-1抗体-アガロースカラム通過画分にもトロンボモジュリン活性画分が得られた。

実施例3 抗HNK-1抗体を用いたEIA

- 20 市販のEIA用プレートに、抗HNK-1抗体（コスモバイオ社、Code No. IT-0289）を炭酸緩衝液（pH 9.6）中2 µg/mLとなるように溶解したもの200 µLを添加してコートした。4℃で3時間以上放置し

5 した後、 $200\ \mu\text{L}$ の3%ウシ血清アルブミン-リン酸生食緩衝液でコートして4
 °Cで一晩放置してプレートのブロッキングを行った。プレートを洗浄後、3 S A
 G G X鎖を有しトロンボモジュリン活性を有するペプチドの標準溶液および検体
 10 $100\ \mu\text{L}$ を加え、 37°C で2時間反応させた。洗浄後にビオチン化抗HNK-
 1抗体 $100\ \mu\text{L}$ を加え、 37°C で2時間反応させた。洗浄後にアビジン-ペル
 オキシダーゼを $100\ \mu\text{L}$ 加えた。洗浄後、基質液としてo-フェニレンジアミ
 ン、0.024%過酸化水素を $100\ \mu\text{L}$ 加え、室温で10分間反応させた後、
 50 $50\ \mu\text{L}$ の1規定硫酸を加えて反応を停止した。マイクロプレートリーダーを用
 いて492 nmの吸光度を測定し、標準曲線から試料中の3 S A G G X鎖を有し
 10 トロンボモジュリン活性を有するペプチドの定量を行った。実施例1の本発明の
 ペプチドを含有する活性画分中に、該ペプチドが検出され、抗HNK-1抗体ア
 フィニティークロマトグラフィーの前後で蛋白質あたり約4倍に精製された。

実施例4 抗HNK-1抗体を用いたE I A

15 実施例1で精製した3 S A G G X鎖結合トロンボモジュリン $0.6\ \text{mg}/\text{kg}$
 を雄性ラットに静脈内投与した。投与1分後および投与60分後に尾静脈より採
 血し、血漿を分離した後、実施例3の方法に従って、3 S A G G X鎖を有しトロ
 ンボモジュリン活性を有するペプチドをE I Aで測定した。その結果、投与1分
 後には $16\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、投与60分後には $4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度を示した。

製剤実施例1

20	実施例1のペプチド	$10\ \text{mg}$
	精製ゼラチン	$50\ \text{mg}$

リン酸ナトリウム 34.8 mg

塩化ナトリウム 81.8 mg

マンニトール 25 mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10 mLとし、無菌濾過した後1.0
5 mLずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して凍結乾燥組成物を調製した。

製剤実施例2

実施例2のペプチド 20 mg

アルブミン 20 mg

リン酸ナトリウム 34.8 mg

10 塩化ナトリウム 81.8 mg

マンニトール 25 mg

上記の各成分を秤量し、製剤実施例1と同様の方法にて凍結乾燥製剤を調製した。

産業上の利用可能性

15 3SAGGX鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチドあるいは抗
HNK-1抗体と特異的に結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチ
ドは、該糖鎖に抗HNK-1抗体等の抗体が特異的に結合する。従って、3
SAGGX鎖を特異的に認識し結合する抗体、例えば抗HNK-1抗体によるア
フィニティーを利用した分離方法、例えば抗HNK-1抗体アフィニティーカラ
20 ムを用いることにより高純度に精製することができ、夾雑成分を含まない為医薬
として好ましい。また、3SAGGX鎖を特異的に認識し結合する抗体、例えば

抗HNK-1抗体を用いるトロンボモジュリン活性を有するペプチドの酵素免疫学的検出キットの標準物質として好ましい。

本発明のペプチドはトロンボモジュリン活性を有しており、さらに毒性も低いことから、例えばDIC、各種血栓症、末梢血管閉塞症、心筋梗塞、脳梗塞、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症、肝不全、腎不全など、血液凝固亢進に係わる疾患、の予防および治療に有効であると予想される。さらに、本発明のペプチドは人工血管、人工臓器、カテーテルなどの医用器材の表面に架橋剤などを用いて結合・吸着させて使用することができる。これにより、医用器材表面での血液凝固を防ぐことができる。また、血液の体外循環時の凝固抑制剤として用いることもできる。

また、本発明のペプチドは、3SAGGX鎖を特異的に認識し結合する抗体、例えば抗HNK-1抗体等を用いたEIAにより、トロンボモジュリン活性を有するペプチド濃度をモニタリングする必要がある場面、例えば精製時あるいはトロンボモジュリン活性を有するペプチドを投与した患者の血液、尿等の生体試料中で容易にかつ精度よく検出することが可能であり、副作用の発現を未然に防いだり軽減することや、より経済的に使用することができ、医薬として有用である。

また、本発明のペプチドを水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤存在下に水酸化ナトリウム等でアルカリ処理することで、3SAGGX鎖を糖アルコールとして遊離させることができる。あるいは、本発明のペプチドを還元カルボキシメチル化した後にプロテアーゼ、例えばアクチナーゼE（製造・供給科研製薬）、で消化して3SAGGX鎖がセリンに結合した糖ペプチドとして遊離させることがで

きる。遊離した糖アルコールあるいは糖ペプチドは、陰イオンクロマトグラフィあるいは3 S A G G X鎖を特異的に認識し結合する抗体、例えば抗HNK-1抗体のアフィニティーカラムを用いて精製することができ、さらにゲル濾過あるいはアミドカラム等を組み合わせることもできる。精製された糖アルコール

5 あるいは糖ペプチドは、3 S A G G X鎖を特異的に認識し結合する抗体、例えば抗HNK-1抗体を用いるトロンボモジュリン活性を有するペプチドの酵素免疫学的検出キットの標準物質として使用できる。

また、3 S A G G X鎖を特異的に認識し結合する抗体、例えば抗HNK-1抗体のアフィニティーを利用した分離方法、例えば抗HNK-1抗体アフィニ

10 ティーカラムを用いた3 S A G G X鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチドあるいは抗HNK-1抗体と特異的に結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチドの精製方法および3 S A G G X鎖を特異的に認識し結合する抗体、例えば抗HNK-1抗体を用いたE I Aによる3 S A G G X鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチドあるいは抗HNK-1抗体と特異的に

15 結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチドの検出方法および検出キットも有用である。本発明の3 S A G G X鎖を特異的に認識し結合する抗体、例えば抗HNK-1抗体を用いたE I Aとトロンボモジュリンの3 S A G G X鎖以外の部分、例えばアミノ末端から3 4 5～4 6 2番目のアミノ酸残基の部分を経験として認識し結合する抗体を用いたE I Aとを組み合わせることにより、健康人お

20 よび患者の血液、尿等の生体試料中で、本発明のペプチド、3 S A G G X鎖を有せずトロンボモジュリン活性を有するペプチドおよび3 S A G G X鎖を有しトロンボモジュリン活性を有しないペプチドを容易にかつ精度よく定量すること

が可能である。

請求の範囲

1. 3 位が硫酸化されたグルクロン酸 β 1 - 3 ガラクトース β 1 - 3 ガラクトース β 1 - 4 キシロース鎖を有し、トロンボモジュリン活性を有するペプチド。
- 5 2. アミノ酸配列が配列番号 2 の 1 ~ 4 9 8 のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、付加、挿入および／または欠失を施すことにより得られるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のペプチド。
3. アミノ酸配列が配列番号 1 の 1 ~ 4 9 4 のアミノ酸配列を有する請求項 1 または 2 に記載のペプチド。
- 10 4. 抗ヒトナチュラルキラー細胞 - 1 抗体と特異的に結合するトロンボモジュリン活性を有するペプチド。
5. コンドロイチンおよび／またはコンドロイチン硫酸が結合したペプチドを実質的に含有しない請求項 4 に記載のペプチド。
6. 前記ペプチドが天然由来ペプチドである請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載
- 15 載のペプチド。
7. 前記ペプチドが組換えペプチドである請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載のペプチド。
8. 請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含有する医薬組成物。
- 20 9. 3 位が硫酸化されたグルクロン酸 β 1 - 3 ガラクトース β 1 - 3 ガラ

クトース β 1-4 キシロース鎖を特異的に認識し結合する抗体によるアフィニティーを用いるトロンボモジュリン活性を有するペプチドの精製方法。

10. 前記抗体が抗ヒトナチュラルキラー細胞-1 抗体である請求項 9 に記載の精製方法。

5 11. 3 位が硫酸化されたグルクロン酸 β 1-3 ガラクトース β 1-3 ガラクトース β 1-4 キシロース鎖を特異的に認識し結合する抗体を用いるトロンボモジュリン活性を有するペプチドの酵素免疫学的検出方法。

12. 前記抗体が抗ヒトナチュラルキラー細胞-1 抗体である請求項 11 に記載の検出方法。

10 13. 抗ヒトナチュラルキラー細胞-1 抗体を有するトロンボモジュリン活性を有するペプチドの酵素免疫学的検出キット。

SEQUENCE LISTING

<110> Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Composition Containing Soluble Thrombomodulins

<130> PCT100

<141> 1999-06-30

<160> 2

<210> 1

<211> 494

<212> PRT

<213> human

<223> Xaa at 455 position is Val or Ala.

<400> 1

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu His Asp

1

5

10

15

Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln

	20		25		30										
Ile	Cys	Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Met	Thr	Val	Arg	Ser	Ser	Val
	35		40		45										
Ala	Ala	Asp	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Gly
	50		55		60										
Arg	Arg	Arg	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Pro	Gly	Cys	Gly	Asp
65			70						75					80	
Pro	Lys	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu	Arg	Gly	Phe	Gln	Trp	Val	Thr	Gly	Asp
			85						90					95	
Asn	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ser	Arg	Trp	Ala	Arg	Leu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala
			100						105					110	
Pro	Leu	Cys	Gly	Pro	Leu	Cys	Val	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr
			115						120					125	
Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Ile	Trp	Glu	Glu	Gln	Gln	Cys	Glu	Val	Lys	Ala
			130						135					140	
Asp	Gly	Phe	Leu	Cys	Glu	Phe	His	Phe	Pro	Ala	Thr	Cys	Arg	Pro	Leu
145				150						155				160	
Ala	Val	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Thr	Tyr	Gly
				165						170				175	
Thr	Pro	Phe	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Asp	Phe	Gln	Ala	Leu	Pro	Val	Gly
				180						185				190	
Ser	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Pro	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Met	Cys	Thr	Ala

195	200	205	
Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro Gly Ala			
210	215	220	
Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala			
225	230	235	240
Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln			
245	250	255	
Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp			
260	265	270	
Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr			
275	280	285	
Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His Arg			
290	295	300	
Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro Gln			
305	310	315	320
Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn			
325	330	335	
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe			
340	345	350	
Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr Ser Tyr			
355	360	365	
Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu Pro His			

370 375 380
Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys Asp
385 390 395 400
Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile Leu Asp
405 410 415
Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
420 425 430
Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys Ile Cys
435 440 445
Gly Pro Asp Ser Ala Leu Xaa Arg His Ile Gly Thr Asp Cys Asp Ser
450 455 460
Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro
465 470 475 480
Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
485 490

<210> 2

<211> 498

<212> PRT

<213> human

<223> Xaa at 455 position is Val or Ala.

<400> 2

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu His Asp
 1 5 10 15
 Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln
 20 25 30
 Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser Ser Val
 35 40 45
 Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly
 50 55 60
 Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp
 85 90 95
 Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn Gly Ala
 100 105 110
 Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr
 115 120 125
 Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys Ala
 130 135 140
 Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg Pro Leu
 145 150 155 160
 Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
 165 170 175

Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro Val Gly

180

185

190

Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala

195

200

205

Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro Gly Ala

210

215

220

Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala

225

230

235

240

Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln

245

250

255

Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp

260

265

270

Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr

275

280

285

Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His Arg

290

295

300

Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro Gln

305

310

315

320

Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn

325

330

335

Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe

340

345

350

Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr Ser Tyr

355

360

365

Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu Pro His

370

375

380

Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys Asp

385

390

395

400

Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile Leu Asp

405

410

415

Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe

420

425

430

Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys Ile Cys

435

440

445

Gly Pro Asp Ser Ala Leu Xaa Arg His Ile Gly Thr Asp Cys Asp Ser

450

455

460

Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro

465

470

475

480

Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val His Ser Gly

485

490

495

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03532

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K14/745, C07K1/22, C07K16/18, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K14/745, C07K1/22, C07K16/18, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), DDBJ/GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 63-301791, A (Washington University), 8 December, 1988 (08. 12. 88), Full text ; Fig. 3 & EP, 290419, A & AU, 8815629, A & US, 4912207, A & DE, 3855449, B	1-13
Y	THE Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 12 (March, 1998), Hiroshi Kitagawa, et al., "Molecular Cloning and Expression of Glucuronyltransferase I Involved in the Biosynthesis of the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans", p.6615-6618	1-13
Y	Carbohydrate Research, Vol. 255 (1994), Sandrine Rio, et al., "Synthesis of sulfated and phosphorylated glycopeptides from the carbohydrate-protein linkage region of proteoglycans", p.103-124	1-13
Y	Journal of Biochemistry, Vol. 113 (1993), Susumu Yamamoto, et al., "Urinary Thrombomodulin, Its Isolation and Characterization", p.433-440	5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"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
when the document is taken alone

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 September, 1999 (27. 09. 99)

Date of mailing of the international search report
12 October, 1999 (12. 10. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C07K14/745, C07K1/22, C07K16/18, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C07K14/745, C07K1/22, C07K16/18, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

DDBJ/GENESEQ

C. 関連すると認められる文献

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	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 63-301791, A (ワシントン エンバーシティー) 8.12月. 1988 (08.12.88) 全文, 図3 & EP, 290419, A & AU, 8815629, A & US, 4912207, A & DE, 3855449, B	1-13
Y	THE Journal of Biological Chemistry, 第273巻, 第12号. (3月.1998), Hiroshi Kitagawa, et.al. 「Molecular Cloning and Expression of Glucuronyltransferase I Involved in the Biosynthesis of the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans」, p.6615-6618	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 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」 国際出願日前の出願または特許であるが、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文献

国際調査を完了した日

27.09.99

国際調査報告の発送日

12.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

斉藤 真由美

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
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	関連する 請求の範囲の番号
Y	Carbohydrate Research, 第255巻(1994), Sandrine Rio, et. al., 「Synthesis of sulfated and phosphorylated glycopeptides from the carbohydrate-protein linkage region of proteoglycans」, p. 103-124	1 - 13
Y	Journal of Biochemistry, 第113巻(1993), Susumu Yamamoto, et. al., 「Urinary Thrombomodulin, Its Isolatio n and Characterization」, p. 433-440	5