

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

日 本 國 (地 區) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☒ 有 ☐ 無主張優先權

1996年9月12日 特 願 平 8-265318 (主 張 優 先 權)

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明之技術領域

本發明係有關一種使用對應於補體成分C1q之球狀部位之受體的新穎血液凝集因子XII之活化方法。

習知技術

血漿血管舒緩素-激肽(kallikrein-kinin)系係生成具有種種生理活性之激肽類之一連串的生體內反應。此種血漿血管舒緩素-激肽系與體內之其他各種酵素反應，例如：血管緊張肽原酶-血管緊縮素系(renin-angiotensin)，血液凝集系，纖溶系，補體系，以前列腺素、白三烯、血小板凝集素為中心之花生四烯酸階梯式反應系(cascade)及兒茶酚胺(catecholamine)等具有密切關聯性，與生體之機能調節有很深切的關係。

作為血漿血管舒緩素-激肽系生成物之血管舒緩激肽(bradykinin)等激肽類除了具有因末梢血管擴張所伴隨的降壓、血管透過性亢奮、平滑肌收縮或鬆弛、發痛、白血球之釋出及兒茶酚胺由副腎皮質之游離作用等種種生理活性外，已知尚可作為包括過敏反應在內之炎症反應的介體，其在生體內存在之意義很大。因此，具有抑制激肽類之作用或阻礙其生成之物質，則有作為抗炎症劑、鎮痛劑、抗過敏劑等醫藥品之可行性。

血漿血管舒緩素-激肽系之一連串反應的引發階段為血液凝集因子XII(F XII)之活化。在生體內，由於組織受傷害或侵害刺激等而使F XII活化，由於此活化而導致血漿血管舒緩素-激肽系進行一連串之酵素反應。亦即，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

被活化的 F XII(活性型血液凝集因子 XII: F XIIa)再作用於同時存在於血漿中之血漿血管舒緩素原而轉換成活性型酵素之血漿血管舒緩素，接著，此血漿血管舒緩素再作用於血漿中之高分子激肽原而產生具有如前述種種生理活性之血管舒緩激肽。

F XII之活化反應並非僅限血漿血管舒緩素-激肽系之引發反應，對於生體內其他種種機能調節系，例如：血液凝集系、纖溶系、血管緊張肽原酶-血管緊縮素系、補體系、花生四烯酸階梯式反應等在作為控制引發階段之反應上亦具有非常重要的角色。已知 F XII在具有陰性電荷之異種表面上可被活化。此類異種表面可例舉如高嶺土、玻璃、矽藻土、硫酸葡聚糖、膠原、酸性粘多糖等，但是生體內實際存在之 F XII之活化物質則尚未鑑定出。

發明欲解決的問題

本發明之目的係為更忠實地表現生體內實際之 F XII活化反應，藉由鑑定生體內之 F XII活化物質而提供一種與以往使用具有陰性電荷之異種表面之方法相異的新穎 F XII活化方法。

解決問題而採之手段

本發明人等對於生體內存在之 F XII活化物質經過不斷地深入研究，結果發現存在於細胞膜上之對應於補體成分 C1q 之球狀部位之受體蛋白質係 F XII之活化物質。本發明人等乃基此發現而完成本發明。

本發明係有關使用對應於補體成分 C1q 之球狀部位之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(3)

受體(以下簡稱為 gClqR)之 F XII 活化方法及由該物質所構成之 F XII 活性劑。補體乃大約 20 種血清蛋白質之總稱，係作為種種免疫反應、過敏反應之媒介物質，占有重要之角色，通常在血液中係以不活化型存在，但是若被抗原抗體複合物、細菌或動物細胞之膜成分等活化後則會顯示溶血・溶菌反應、促進貪食作用、促進炎症等種種生物活性。補體系之活化係由於與上述活化物質接觸使補體成分 Cl 活化，然後藉此開始此系列之活化。Clq 為 Cl 之三種次成分中的一種，對於淋巴球、單核球、巨噬細胞、嗜中性白血球、嗜酸性白血球、成纖細胞、血小板、內皮細胞、滑膜細胞等種種細胞具有結合活性，顯示此等細胞膜上具有受體存在，且已被分離・鑑定。

本發明係一種使用對應於上述補體成分 Clq 之球狀部位之受體蛋白質(gClqR)之 F XII 活化方法。本發明方法係一種更能忠實地顯現出生體內實際之 F XII 活化反應之有效方法。本發明所使用之 gClqR 可由包括人類在內的各種動物之內皮細胞、淋巴球、單核球、巨噬細胞、嗜中性白血球、嗜酸性白血球、成纖細胞、血小板、滑膜細胞等之細胞中分離・精製而得。此等細胞不僅可使用由生體成分而得的正常細胞，而且亦可使用經由培養增殖的細胞或使癌化的培養細胞。gClqR 之分離・精製可採用一般膜蛋白質精製時所使用的方法，例如：一般常使用經由界面活性劑使細胞膜溶化後再使用各種層析法等予以精製的方法。尤其是使用 gClqR 或高分子激肽原等經不溶化處理後作為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

擔體之親和性層析法，由於係利用它與 gClqR 在生化學上之親和力，故分離能力較高，可與其他膜蛋白質藉特異性親和力而分離，為有效的方法。

又，利用基因工程所製造的重組 gClqR 亦可使用於本發明之 FXII 活化方法中。利用此種基因工程之技術，可容易地製得均勻且雜質蛋白質甚少的產物，例如根據 Ghebrehiwet 等之方法 [J. Exp. Med. 179 卷、1809-1821 頁 (1994 年)] 等可製造重組 gClqR。

關於本發明 FXII 活化方法之反應，只要視目的之需要作適當之設定即可，除了實質上僅含有 FXII 之反應外，另外尚可例舉如：使用含有 FXII 之一般動物血漿之反應、具有血漿血管舒緩素-激肽系之構成成分的 FXII、血漿血管舒緩素原及高分子激肽原等組合之再構成系等。使用本發明 gClqR 之 FXII 活化方法已確認對鋅離子有依存性關係，因此上述任何一種反應較好係在鋅離子共存下進行。為了設定最佳反應條件，除添加氯化鈉等塩類及緩衝劑外，反應中尚可適當地添加該領域中慣用的白蛋白或糖類等添加劑。關於本發明 FXII 活化方法之反應條件，可依實施者之目的，而對例如 gClqR、FXII、其他精製蛋白質、添加劑等之濃度、pH 值、反應溫度、反應時間等進行檢討而設定之。

依照本發明之 FXII 活化方法當然可測定 FXII 之活化程度，只要依照該領域慣用之定量方法定量所生成的 FXIIa 即可。此等 FXIIa 之定量法於文獻中亦多有記載，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(5)

實施者僅採用自認最好的方法即可，一般常用之F XIIa定量法，可例舉如利用F XIIa之酵素活性測定法。此方法為對F XIIa使用基質測定之方法，除血漿血管舒緩素原、血液凝集因子XI或胞漿素等天然基質之外，亦可使用D-Pro-Phe-Arg-pNA、D-Leu-Gly-Arg-pNA、N-Benzoyl-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA·鹽酸鹽及甲基酯等顯色合成基質或Boc-Glu(OBz)-Gly-Arg-MCA、Boc-Glu-Gly-Arg-MCA等螢光合成基質等之方法，由於此等方法簡便，常被使用。關於上述本發明反應之構成成分、反應條件、F XIIa生成量之測定方法等僅為實施本發明而記載之一個例子而已，本發明並非受此例所限定者。

實施本發明之形態

使用本發明gClqR之F XII活化方法在種種試驗中均可實施。如上所述，F XII之活化反應在控制血漿血管舒緩素-激肽系、血液凝集系、纖溶系等多種生體機能調節系之引發階段反應上占有非常重要的角色，因此向來為闡明此等生體內之調節機構，乃對F XII活化進行多種研究。例如：①闡明F XII活化反應在病理・生理上之意義、②研究存在於生體內抑制F XII活化反應之內因性物質、③研究激肽釋出、內因系血液凝集、胞漿素原活性化、補體系等種種生體反應與F XII活性化之關係。對於此等試驗・實驗而言，能更忠實地再現・反映出在生體內實際之F XII活化反應之本發明方法應是非常有用的方法。

又，有關對於與F XII活化有關之血漿血管舒緩素-激

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(6)

肽系、血液凝集系、纖溶系、血管緊張肽酶原-血管緊縮素系、補體系、花生四烯酸階梯式反應等具有阻礙或促進作用之藥劑目前亦正在進行開發中。例如：血漿血管舒緩素-激肽系之阻礙物質對於其最終生成物血管舒緩激肽之生成具有阻礙作用，可用作抑制因血管舒緩激肽所誘發之疼痛、炎症、過敏等之藥劑，亦即可用作鎮痛劑、抗炎劑、抗過敏劑等之醫藥品。關於此種藥劑之活性測定法・篩選法，若利用與生體內較近似之反應系，則對於發現具有適切作用機序之較好藥劑之可能性可大為提高，因此具有此特徵之本發明方法亦可應用在上述藥劑之活性測定法中，其有用性非常高，尤其是測定作用於gClqR以抑制F XII活化之藥劑的活性時，本發明之方法是必須的。

例如，上述藥劑之活性的具體測定法可例舉如：①使用動物血漿測定被檢物質對血管舒緩素生成之阻礙活性的測定法（日本特公平4-14000號公報）、②使用動物血漿測定被檢物質對於F XIIa生成之阻礙・促進活性的測定法（日本特開平7-51097號公報）、③使用再構成之血漿血管舒緩素-激肽系測定被檢物質對於生成F XIIa、血管舒緩素或血管舒緩激肽之阻礙・促進活性之測定法（特開平7-51098號公報）等。

實施例

以下藉實施例對本發明作更詳細之說明。又，以下之實施例僅為對本發明作具體說明之一具體例子而已，本發明並不限於下述之實施例。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(7)

實施例 1 (gClqR之製備)

在下列之 F XII 活化試驗中，係使用源自人類臍帶靜脈之內皮細胞 (HUVEC) 經分離、精製之 gClqR 或重組 gClqR。重組 gClqR 係使用根據上述 B. Ghebrehiwet 等之方法 (J. Exp. Med. 179 卷、1809-1821 頁 (1994 年) 製得之產物。又，gClqR 係由 HUVEC 依下述之方法精製而得，並供作 F XII 活化試驗。

將經過可溶化處理之 HUVEC 膜蛋白質區分用含有 159 mM 氯化鈉、2 mM 苯甲基磺醯氟、1 μ M 抑肽酶、1 μ M 胃蛋白酶抑制素 (pepstatin)、0.1% Triton X-100 及含 50 μ M 氯化鋅之 10 mM 黑佩斯 (Hepes) 緩衝液進行透析，然後添加至高分子激肽原・親和性層析管柱中。管柱經充分洗淨後用 0.1 M 甘胺酸-塩酸 (pH 2.5) 溶出，分取各 0.5 ml。各溶出液用 1 M 三塩酸緩衝液 (pH 9.0) 將 pH 值調整至 7.0，然後用溶出液之蛋白檢出監控器及生物素化高分子激肽原進行點標繪圖分析，而得精製之 gClqR。

實施例 2 (F XII 之活化試驗 1)

將 20 μ g/ml 之 F XII、32 μ g/ml 之重組 gClqR 及 0.6 mM 之 S-2222 (對於 F XIIa 之合成基質：N-苯甲醯基-L-異白胺醯基-L-麩胺醯基-甘胺醯-L-精胺醯-p-硝基醯替苯胺・塩酸塩及甲基酯) 放置於黑佩斯緩衝液 (10 mM 黑佩斯、137 mM 氯化鈉、11 mM D-葡萄糖、4 mM 氯化鉀、1 mg/ml 牛血清白蛋白、1 mM 氯化鈣、50 μ M 氯化鋅、pH 7.4) 中，在 25°C 進行反應。為小心起見，黑佩斯緩衝液在使用前用 (4-苯脒基)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

甲磺鹽氟[APMSF]處理，使混入白蛋白中之蛋白酶類不活化。藉由依FXII活化所產生的FXIIa之酵素作用，可使p-硝基苯胺由合成基質S-2222釋出，因此測定此p-硝基苯胺之釋出量即可定量FXIIa之生成量。p-硝基苯胺呈現黃色，可以在405nm測定其吸光度，此吸光度用分光光度計隨時間監控，測定FXIIa之生成量，結果之一如第1圖所示。

實施例3 (FXII之活化試驗2)

將各種濃度之重組gClqR、 $1\mu\text{g/ml}$ 之FXII、 $1\mu\text{g/ml}$ 之高分子激肽原、 $1\mu\text{g/ml}$ 之血漿血管舒緩素原及 0.6mM 之S-2302(對血漿血管舒緩素之合成基質：H-D-脯胺鹽基-L-苯基丙胺酸基-L-精胺酰-p-硝基鹽替苯胺·二塩酸塩)置於與上述相同經APMSF處理之黑佩斯緩衝液中，在 25°C 進行反應。在此試驗中，以血管舒緩素生成量作為FXII之活化指標予以測定之。亦即，FXII若活化轉換成被活化的FXIIa，則FXIIa與血漿血管舒緩素原作用而轉換成具有酵素活性之血漿血管舒緩素，經由測定此一血管舒緩素之生成量即可得知FXII被活化的程度。血管舒緩素之生成量可經由測定血管舒緩素催化合成基質S-2302之水解作用，所產生之黃色p-硝基苯胺釋出量，依照上述相同之方法，用分光光度計隨時間監控而求得，結果之一如第2圖所示。

發明之功效

實施例2之試驗係將gClqR與精製過的FXII進行混

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(9)

合反應後測定F XII活化之結果。由第1圖之結果得知，作為F XIIa生成量指標之由合成基質釋出的p-硝基苯胺之發色量係隨反應時間而增加，可以確認gClqR具有使F XII活化之作用。由gClqR引起之F XII活化反應若無鋅離子存在，則幾乎無活性化反應。又，已知存在血漿中存在有內因性之C1抑制劑，對F XII活化之抑制作用具有濃度依存相關性。

又，實施例3之試驗係由F XII、血漿血管舒緩素原及高分子激肽原而構成的血漿血管舒緩素-激肽系之再構成系，將血管舒緩素生成量作為F XII活化之指標而予以測定的結果。如第2圖之結果所示，gClqR對於F XII活化呈視濃度依存性。與實施例2之反應相同，若無鋅離子存在則無活性化。在此F XII活化反應中係使用一定量之gClqR，當使F XII之濃度發生改變時，血管舒緩素生成量會依F XII用量而增加。又，當使用由HUVEC精製而得的gClqR代替重組gClqR時亦確認有相同的F XII活化作用，由此得知gClqR之糖化部位並不影響F XII之活性化。

由上所述得知，對應於補體成分C1q之球狀部位之受體(gClqR)對F XII具有活化作用，為一種生體內實際存在的F XII活化物質。因此，使用此種gClqR之本發明F XII活化方法可使生體內實際的F XII活化反應忠實地再現。反映，係一種與一般使用具有陰性電荷之異種表面的方法相異之新穎F XII活化方法。如「實施本發明之形態」所述，關於F XII活化反應之種種研究，以及與F XII活化或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(10)

與以此作為引發階段之血漿血管舒緩素-激肽系等生體內反應相關之藥劑活性的測定法・篩選法等，均可利用本發明之F XII活化方法作為更近似於生體內反應系之測定方法，因此深具產業上之可利用性。

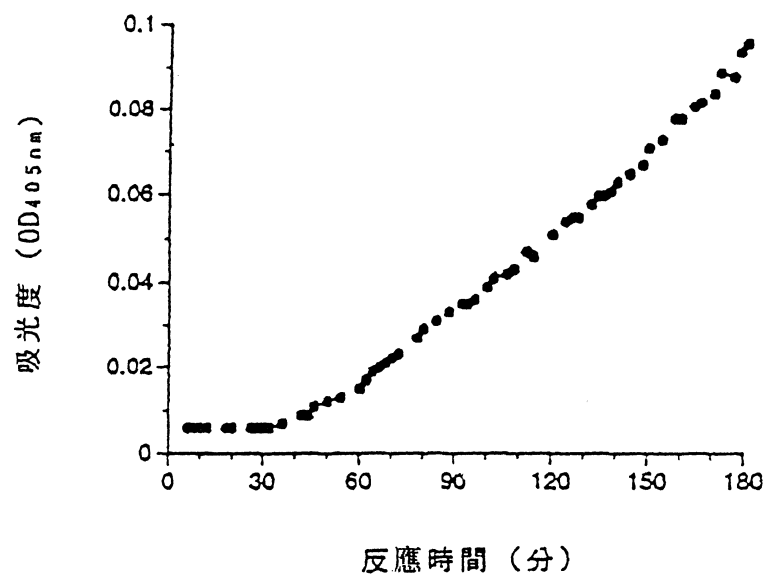
圖式之簡單說明

第1圖為將F XII與gClqR進行混合反應，隨時間測定藉由gClqR對F XII活化之結果。

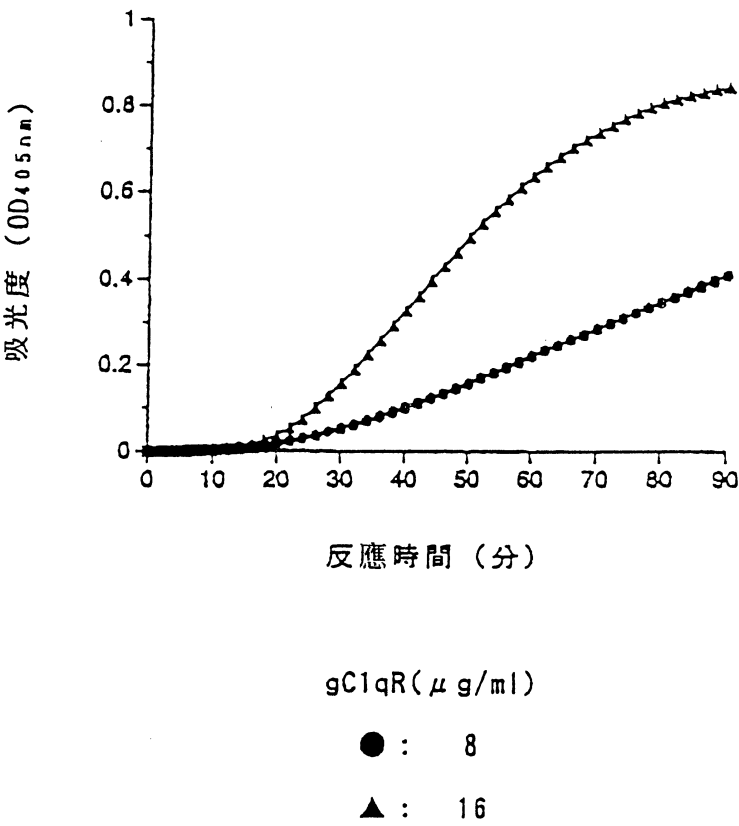
第2圖為使用由F XII、血漿前血管舒緩素原及高分子激素原再構成之血漿血管舒緩素-激肽系，測定藉由gClqR對F XII活化之結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

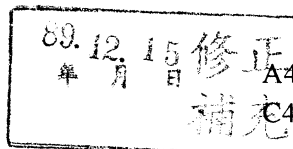


第 1 圖



第 2 圖

申請日期	86. 9. 6
案 號	86112901
類 別	C12Q 1/56



521089

公告本

(以上各欄由本局填註)

附件二

第 86112901 號 發明專利說明書 修正本
專利申請案 新 型 (89 年 12 月 15 日)

一、發明 名稱	中 文	使用對應於補體成分Clq之球狀部位之受體之血液凝集因子XII之活化方法
	英 文	ACTIVATION METHOD OF BLOOD COAGULATION FACTOR XII THROUGH THE USE OF A RECEPTOR FOR GLOBULAR HEAD OF Clq
二、發明 創作人	姓 名	1. 芝山洋二 2. 艾倫 P. 卡布藍
	國 籍	1. 日本國 2. 美國
	住、居所	1. 日本國兵庫縣加東郡社町木梨字川北山442-1 日本臟器製藥株式會社 生物活性科學研究所內 2. 美國·南卡羅蘭那州29425·查爾斯頓·羅根街17號
三、申請人	姓 名 (名稱)	日本臟器製藥股份有限公司
	國 籍	日本國
	住、居所 (事務所)	日本國大阪市中心區平野町2丁目1番2號
	代 表 人 姓 名	小西甚右衛門

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝

訂

線

附件四

四、中文發明摘要（發明之名稱：使用對應於補體成分Clq之球狀部位之受體之血液凝集因子XII之活化方法）

10年9月26日 修正 補充

本發明之目的係為更忠實地表現生體內實際之F XII活化反應，藉由鑑定生體內之F XII活化物質而提供一種與以往使用具有陰性電荷之異種表面之方法相異的新穎F XII活化方法。

本發明為使用對應於補體成分Clq之球狀部位之受體（gClqR）的F XII活化方法及由該物質構成之F XII活化劑。本發明所使用之gClqR可為由各種動物之內皮細胞等細胞經過分離・精製而得者，或是利用基因工程所製造的重組gClqR。

英文發明摘要（發明之名稱：ACTIVATION METHOD OF BLOOD COAGULATION FACTOR XII）

Blood coagulation factor XII (FXII) is activated using a receptor for globular heads of the complement component Clq. The receptor (gClqr) is a protein and provides a more faithful in vitro reproduction of the actual FX-II-activating reaction which occurs in living organisms. The protein receptor, gCLqR may be obtained in at least substantially pure or isolated form by recombinant genetic engineering techniques or by isolation from animal cell membranes to which the complement component Clq binds. The receptor may be separated, purified, or isolated from cell membranes. The activation of the blood coagulation factor XII may be conducted in: 1) an animal plasma, 2) a reconstituted plasma kallikrein-kinin system, or 3) an at least substantially pure blood coagulation factor XII. The activation with the receptor is preferably conducted in the presence of zinc ions. FXII may be subjected to an activation reaction with the isolated or at least substantially purified receptor for globular heads of Clq. In the presence of a pharmaceutical to evaluate or measure the pharmaceutical's inhibiting or promoting action towards the plasma kallikrein-kinin system, blood coagulation system, fibrinolysis system renin-angiotensin system, complement system, or arachidonate cascade. The drug screening may include evaluation of a compound's utility as an anti-inflammatory agent, an antiallergic agent, or an analgesic.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

90年9月6日 修正
補充

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：_____）

使用 gClqR 之本發明之 F XII 活化方法係一種可忠實地再現・反映生體內之實際 F XII 活化反應的新穎 F XII 活化方法是一種與以往使用具有陰性電荷之異種表面不同的方法。因此，關於 F XII 活化反應之種種研究，以及與 F XII 活性化或與以此作為引發階段之血漿血管舒緩素-激肽系等之生體內反應相關之藥劑活性的測定法・篩選法等，均可利用本發明之 F XII 活化方法作為更近似於生體內反應之測定方法，因此深具產業上之可利用性。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

英文發明摘要（發明之名稱：_____）

訂

線

91.12.17 修正
年 月 日 補充

第 86112901 號專利申請案

申請專利範圍修正本

(91 年 12 月 17 日)

1. 一種將血液凝集因子 XII 活化成血液凝集因子 XIIa 之活化方法，其特徵為在鋅離子存在下使用一種對應於補體成分 Clq 之球狀部位的受體進行該活化者；該 Clq 之胺基酸序列如下：

```
lhtdgdka fv dflsdei kee rkiqkhk tlp kmsggwelel
ngteaklv rk vagekitv tf ninnsipptf dgeee psqqg
kveeqepelt stpnfvvevi knddgkka lv ldchypedev
gqedeaesdi fsirevsfqs tgesewk dtn ytlntdsldw
alydhlm dfl adrgvdntfa delvelsta l ehqeyitfle
dlksfvksq
```

2. 一種將血液凝集因子 XII 活化成血液凝集因子 XIIa 之活化劑組成物，以含有對應於補體成分 Clq 之球狀部位的受體為主要成分，而該 Clq 之胺基酸序列如下：

```
lhtdgdka fv dflsdei kee rkiqkhk tlp kmsggwelel
ngteaklv rk vagekitv tf ninnsipptf dgeee psqqg
kveeqepelt stpnfvvevi knddgkka lv ldchypedev
gqedeaesdi fsirevsfqs tgesewk dtn ytlntdsldw
alydhlm dfl adrgvdntfa delvelsta l ehqeyitfle
dlksfvksq
```

附件
1