

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3690803号

(P3690803)

(45) 発行日 平成17年8月31日(2005.8.31)

(24) 登録日 平成17年6月24日(2005.6.24)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 K 38/48

A 6 1 K 37/47

A 6 1 K 38/46

A 6 1 P 7/04

A 6 1 P 7/04

A 6 1 K 37/54

請求項の数 7 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平8-501807	(73) 特許権者	596072313
(86) (22) 出願日	平成7年6月14日(1995.6.14)		バーナリス(オックスフォード)リミテッド
(65) 公表番号	特表平10-501548		イギリス国 オックスフォード オーエツクス4 6エルワイ コーレイ, ワトリン
(43) 公表日	平成10年2月10日(1998.2.10)		グトン ロード (番地なし)
(86) 国際出願番号	PCT/GB1995/001388	(74) 代理人	100065248
(87) 国際公開番号	W01995/035117		弁理士 野河 信太郎
(87) 国際公開日	平成7年12月28日(1995.12.28)	(72) 発明者	ドーソン キース マーティン
審査請求日	平成10年12月25日(1998.12.25)		イギリス国、オーエツクス4 5エルワイ
審査請求日	平成14年10月18日(2002.10.18)		、オックスフォード カウリー、ウォトリントン
(31) 優先権主張番号	9412131.6		ロード(番地なし) プリティッシュ
(32) 優先日	平成6年6月17日(1994.6.17)		ユ バイオテック ファーマシューティカルズ
(33) 優先権主張国	英国(GB)		リミテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血栓崩壊性組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プラスミノゲン活性化因子及びトロンピンにより切断されて活性化されるプラスミノゲン類似体の組み合わせからなる血栓崩壊治療のための組成物。

【請求項2】

プラスミノゲン活性化因子及びトロンピンにより切断されて活性化されるプラスミノゲン類似体のそれぞれが、個別の単位投与量形態である請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

プラスミノゲン活性化因子およびトロンピンにより切断されて活性化されるプラスミノゲン類似体の両者が、単一の単位投与量形態である請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

単位投与量形態が、静脈内ボラス注射である請求項2又は3に記載の組成物。

【請求項5】

プラスミノゲン活性化因子がtPAである請求項1～4のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項6】

トロンピンにより切断されて活性化されるプラスミノゲン類似体が、P3が塩基性アミノ酸残基、P4が疎水性アミノ酸残基かつP1とP2のそれぞれが個々に非酸性アミノ酸残基であるP4-P3-Pro-Arg-P1-P2の切断部位配列を有し、該部位がArgとP1の間をトロンピンにより切断され得る請求項1～5のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項7】

10

20

トロンピンにより切断されて活性化されるプラスミノゲン類似体がBB-10153である請求項1～6のいずれか1つに記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

この発明は、1つもしくは複数の血栓を持つ、又はそれを生じる危険性のある患者に対する改良された血栓崩壊処置用製品及び方法に関する。詳しくは、本発明は天然のプラスミノゲン、及び天然のトロンピンによる切断でプラスミン活性を生じる非天然のプラスミノゲン類似体を活性化し得る剤の投与による血栓崩壊の複合治療に関する。

発明の背景

プラスミノゲン活性化因子

天然のプラスミノゲンを活性化し得る剤は公知であり、血栓崩壊の治療に用いられ、臨床試験中であるか、又はその目的のために提案されている。そのような化合物の例には、組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ及び繊維結合性唾腺プラスミノゲン活性化因子(DSPA)があげられる。tPA及びストレプトキナーゼを用いる静注処置は、急性心筋梗塞による死亡率を減ずるのに成功している。

この成功にもかかわらず、入手可能な剤には欠点があるために、血栓崩壊に重要な限界のあることが広く認識されている[Marder及びSherry、New England Journal of Medicine, 1989, 318:1513-1520参照]。例えば、tPAは体から急速に排出され、かつ臨床的に有用な投与量では血栓特異性が相対的に欠如する。急速なtPAのクリアランスは、該タンパク質が大量に静注点滴で投与されなければならないことを意味し、患者が病院に入るまで治療の開始を遅らせる。tPAの急速なクリアランスと関連したさらなる問題は、tPAの投与を停止した時に一般に生じる再灌流血管の再閉塞である。最後に、tPAの治療上の投与量の血栓特異性の相対的な欠如により、出血の危険性が生じる。出血の危険性は、現在の血栓崩壊剤が臨床的に有用な投与量では血栓に特異的でなく、かつ全身循環においてプラスミノゲンを活性化してプラスミンを生じるため、それらに共通の問題である。

ウロキナーゼも同様の急速な血漿クリアランスを有し、連続的な点滴による投与を必要とする。

tPAの急速なクリアランスを克服するため、その半減期を増大させる多くの試みがなされているが、臨床開発中のtPAの変異型はtPAの3-5倍の遅さで取り除かれるにすぎないらしい[Thromb. Haemostas. 66:569-574, 1991; Thromb. Haemostas. 70:307-312, 1993]; tPAの血漿半減期はヒトでは約5分である[Bounameauxら、"Contemporary issues in Haemostasis and Thrombosis" vol.1 p5-91, 1985. カレンらが編集、Churchill Livingstone]。これらtPA変異型はボラス(bolus)での投与及び/又は投与量の削減を可能にするかもしれないが、再閉塞を妨げるのに有効なだけ長く循環中に残留することはないと考えられる。それらはまた出血の危険性を大きく減少させることはないと考えられるが、その危険性は循環中の持続性のために増すかもしれない。

プラスミノゲン活性化因子の臨床効果を改良する別の方法は、抗凝固剤及び抗血小板剤を用いる補助治療を介するものである。ヘパリン及びアスピリンの補助使用でのtPAの治療効率の改良において、わずかながら成功がみられた。しかしながら、そのような治療法には、梗塞に関連した動脈の再疎通について失敗率15-20%、再閉塞率5-10%という限界がある。その結果、30日での再梗塞率は4-6%であり、患者の5-7%及び15-17%に心臓性ショック及び鬱血性心臓麻痺がそれぞれ起こり、死亡率は5-8%の範囲である[Am. J. Cardiol. 75:7-13 1995]。ヘパリン及びアスピリンの使用にもかかわらず、初期に血栓崩壊を失敗し、かつ再閉塞を生じたことは、進行中のトロンピン活性の結果であると考えられる。このため、より有効かつ選択的な剤が研究されている。ヒルジンはトロンピンの有効な阻害剤であり、動物モデルで血小板の沈着及び血栓形成の減少においてヘパリンより優れていることを示し[Circulation 79:657-665, 1989]、冠動脈血栓症のモデルで血栓崩壊を速くし、かつ再閉塞を減少させることがわかった[Circulation 83:1048-1056及びCirculation Research 70:829-834, 1992]。補助治療について、米国特許第4,944,943号は、tPAのような血栓崩壊剤とヒルジンが示唆された唯一の例である抗血栓剤の使用を開示している。米国特許第5,126,134号は、補助治療にtPAのようなプラスミノゲン活性化因子とヒルジ

10

20

30

40

50

ンの使用を開示している。しかしながら、tPAの補助剤としてのヒルジンを研究する3つの臨床試験が、出血の発生率が高いために1994年に中止された[Circulation 90:1624-30, 1631-37及び1638-42, 1994]。さらに、これらの試験は以前の水準より高いヘパリン投与量を研究し、それもまた出血発生率の増加に関連していることを見出した。したがって、トロンビン活性阻害剤を用いる補助的な抗血栓治療の強化は、結果として好ましくない出血の増加を生じさせられると思われる。

トロンビン活性可能なプラスミノゲン変異体

特許公報W091/09118及びW094/10318(ともにプリティッシュバイオ-テクノロジーリミテッド)は血栓症状の処置の新しい方法を記載しているが、それは天然の凝血カスケードにそれ自身関係する酵素、特にトロンビンによる切断で活性化され、プラスミン又はプラスミン様活性を生じるプラスミノゲン変異体の使用に基いている。そのような剤の1つの利点は、それらの血栓に対する特異性にある。活性は血栓部位で特に凝縮されるトロンビンにさらされて生じるので、血栓崩壊プラスミン活性は必要な場所で生じ、それにより系内の活性及び出血の危険性を減ずる。そのような化合物は抗血栓の効果をも有することが予期される。なぜなら、血栓形式の傾向は、その部位での剤のトロンビン切断で生じる血栓崩壊プラスミン活性により妨げられるからである。天然のGlu-プラスミノゲンは2.2日の血漿半減期を有しており[Thromb. Haemostas. 43:77-89 1980]、循環中の持続性の延長により、トロンビン活性可能なプラスミノゲンに、その作用の血栓選択性を補完するさらなる利点を与えている。

W091/09118及びW094/10318のトロンビン活性可能なプラスミノゲン変異体の有効性は、抗プラスミンに抵抗性を導入することを目的としたW094/03614(プリティッシュバイオ-テクノロジーリミテッド)に開示されているさらなる変異体、すなわちプラスミンの同起源のセリンプロテアーゼ阻害剤により高められるかもしれない。

発明の概要

この発明は、上記の種のトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体が、系内のプラスミン産生、したがって出血の危険性をあまり増大させずにtPAのようなプラスミノゲン活性化剤の血栓崩壊活性を増加させることができるという本願発明者の知見に基く。この知見は、プラスミノゲン活性化因子のポールの投与すなわち治療の早期開始を可能にし;必要なプラスミノゲン活性化因子の有効投与量を減少させることにより、出血の危険性を減少させ;血栓の再形成による開いた血管の再開塞の発生率を低下させることにより、より有効な新しい血栓崩壊治療の利用を可能にしている。

発明の詳細な説明

本発明によれば、血栓崩壊の治療における同時、個別又は連続使用のためのプラスミノゲン活性化因子及びトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体を含む製品が提供される。

本発明は、プラスミノゲン活性化因子及びトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体の有効量の同時、個別又は連続的な静注投与を含む、血栓崩壊又は抗血栓治療が必要な患者の処置方法をも含む。

本発明の別の態様によれば、：

- a) プラスミノゲン活性化因子を用いる血栓崩壊治療が進行中である患者の処置;及び/又は
- b) 該プラスミノゲン活性化因子を用いる血栓崩壊治療が進行中である患者に必要なプラスミノゲン活性化因子の有効投与量の削減;及び/又は
- c) プラスミノゲン活性化因子を用いる血栓崩壊治療が進行中である患者における出血の危険性の低減

のための剤の製造におけるトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体の使用が提供される。

そのような補助的抗血栓治療は、急性の血管疾患、例えば:心筋梗塞、卒中、変性狭心症、肺動脈塞栓症、深静脈血栓症、末梢動脈閉塞、体外循環、動静脈吻合及び他の静脈血栓形成の処置に用いられ、病理血栓の除去を促進させることができる。

用語“ プラスミノーゲン活性化因子 ”は、プラスミノーゲンを活性化し、プラスミン型の血栓崩壊活性を生じる化合物を意味する。そのような化合物の例は、tPA、DSPA、ウロキナーゼのようなプラスミノーゲンを直接切断してプラスミンを生じる化合物、及びプラスミノーゲンを切断してプラスミンを放出する能力を失わない配列の変化を有するこれらタンパク質の変異体、ならびにストレプトキナーゼのように、プラスミノーゲンと複合体を形成し、プラスミノーゲン分子の切断によるプラスミンの放出を可能にする構造変化を引き起こす、プラスミノーゲンを間接的に活性化する化合物を含む。

用語“ トロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体 ”は、トロンピンによる分子の切断でプラスミン又はプラスミン型活性を保持するプラスミンに実質的に同一な分子を放出する配列変化を有することによって、野性型プラスミノーゲンとは異なる分子を意味する。トロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体は、天然のプラスミノーゲンと比較すると、プラスミノーゲン活性化因子により非効率的に活性化される。トロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体は、野性型プラスミノーゲンと比較して、分子のトロンピン切断性及び切断生成物のプラスミン活性とともに影響しない、又はトロンピン切断及び切断生成物のプラスミン活性を保持しつつ分子にさらなる利益、例えばW094/03614に記載の抗プラスミン抵抗性を付与する変異を与える配列変化を有していてもよい。

トロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体は、上記のブリティッシュバイオ-テクノロジー特許公報に開示されている。トロンピンによる分子の切断でプラスミン活性を生じる変異は、野性型プラスミノーゲンの本来の切断部位に相当する分子中の位置に、又はそれに近い位置にあることが好ましい。それと関連して、プラスミノーゲンは、プラスミノーゲンが790アミノ酸のタンパク質であり、切断部位がArg(560)-Val(561)のペプチド結合であることを示したSottrup-Jensenらのタンパク質シーケンスの研究[Atlas of Protein Sequence and Structure(Dayhoff, M.O.編集5増補3,p95(1978))]の結果として番号付けされている。しかしながら、トロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体の合成において、中間体として有用な好適なプラスミノーゲンcDNAはForsgrenらにより単離されており[FEB Letters 213:254-260(1987)]、65番目の位置に余分なIleを持つ791残基のタンパク質をコードしている。この明細書では、プラスミノーゲンのアミノ酸番号は、ForsgrenのcDNAのそれに対応している。

本発明での使用に現在好ましいプラスミノーゲン活性化因子はtPAであるが、監督当局によりヒトの治療に是認される場合には、BM06.022[Martin.U.et al. Thromb.Haemostas.66:569-574, 1991]又はT103N.KHRR296-299AAAA[Paoni N.F.et al. Thromb.Haemostas.70:307-312,1993]として知られるような“ 第2世代tPAs ”が、より好ましいかもしれない。

本発明での使用に現在好ましいトロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体はW094/10318に開示されたそれらを含むが、それらはP3が塩基性アミノ酸残基、P4が疎水性アミノ酸残基かつP1'とP2'のそれぞれが個々に非酸性アミノ酸残基であるP4-P3-Pro-Arg-P1'-P2'の切断部位配列を有し、該部位はArgとP1'の間をトロンピンにより切断し得る。本発明での使用に特に好ましいトロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体は、W094/10318の実施例2に記載されているようにBB-10153であるが、これは野性型プラスミノーゲンと比較して、アミノ酸残基Pro(559)、Gly(560)がThr-Thr-Lys-Ile-Proで置換され、Val(562)がIleで置換され、トロンピンにより切断可能な切断ループを生じ;かつさらに2つのアミノ酸Glu606がLysに、Glu623がLysに置換し、2-抗プラスミンの結合が損なわれるプラスミノーゲン類似体である。

本発明の製品において、プラスミノーゲン活性化因子及びトロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体は、規制要件及び/又は製品の品質管理の理由で、単位投与量形態で、特に別々の静注ポラス注射用に個別包装されることが好ましい。標準的な注射用タンパク質製剤技術により、好適な単位投与量製剤の製造が可能である。tPAの単位投与量濃度は一般に0.05-1.5mg/kg体重、好ましくは0.1-0.5mg/kg体重の範囲にあり、トロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体の単位投与量濃度は一般に0.1-5mg/kg体重、好ましくは0.5-3mg/kgの範囲、より好ましくは2mg/kg体重であろう。

ヒトに対するトロンピン活性可能なプラスミノーゲン類似体BB-10153の最大投与量は、一

10

20

30

40

50

般に5mg/kg以下であろう。

また、製造に用いられる製剤技術により2つの成分の十分な安定化及び保存が可能であれば、本発明の製品はプラスミノゲン活性化因子及びトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体の混合物の単一の単位投与量を含んでいてもよい。

ヒトの患者の処置について、個々の治療上、tPAは当初3時間にわたる静注点滴により100mgを投与量として与えられていた。これは今では15mgの静注ボラスの投与、続いて30分にわたる0.75mg/kg体重の静注点滴(最大50mg)、次いで60分にわたる0.5mg/kgの点滴(最大35mg)からなる短縮した方式によって、取って替わられている[J. Am. Coll. Cardiol. 14:1566-1569, 1989及びN. Eng. J. Med. 329:673-682, 1993]。tPAは50mgの静注ボラス注射2回で有効であると最近報告されているが、単一の静注ボラスとしては有効でない[J. Am. Coll. Cardiol. 23:6-10, 1994]。長時間作用するtPA変異型であるレテプラゼ(reteplase)(BM06.022)は、1千万単位(MU)の静注ボラスを2回、その30分後に5MUを投与される[Am. J. Cardiol. 72:518-524, 1993]。

ストレプトキナーゼは、1時間にわたる静注点滴により150万単位の投与量として投与される。

投与するプラスミノゲン活性化因子及びトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体の有効投薬量は、現在の投薬量についての知識及びtPA投与量の可能な削減に基づいて、医師によって決定される。

発明者は、動物研究から、tPA投与量の3倍又はそれ以上の削減は、補助的なトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体BB-10153を用いて、両方の剤の静注ボラスとしての投与を一般に可能にすることを見い出している。同様の削減は、他のプラスミノゲン活性化因子を用いても予期される。したがって、トロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体の補助投与は、プラスミノゲン活性化剤の単一のボラスとしての投与を可能にするかもしれない。

現在のいずれの方法においてもtPAの最大投与量は100mgである。トロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体の共投与により、有効な全tPA投与量は80mg、好ましくは70mg、60mg、50mg、40mg、35mg、30mg、20mg又は10mgに減少できる。

トロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体の共投与により、有効な全レテプラゼtPA投与量は12MU、好ましくは10MU、8MU、7MU、6MU、5MU、4MU、3MU、2MU又は1.5MUに減少できる。同様の全投与量の削減は、T103N.KHRR296-299AAAAとして知られるものを含む他の“第2世代tPAs”にもなし得る。

トロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体の共投与により、有効な全ストレプトキナーゼ投与量は1.2MU、好ましくは1MU、0.8MU、0.7MU、0.6MU、0.5MU、0.4MU、0.3MU、0.2MU又は0.15MUに減少できる。

プラスミノゲン活性化因子及びトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体が静注ボラス注射によりそれぞれ別々に投与される場合、投与の順序は重要ではない。プラスミノゲン活性化因子を最初に、次いでトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体を投与することが好ましいかもしれない。

トロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体及びtPA剤が別々に投与される場合は、最初の剤の投与1-30分後、好ましくは約10分後、より好ましくは約5分後に最初の剤が投与されてよいと考えられる。

プラスミノゲン活性化因子及びトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体は、静注点滴によって、2つの成分を別々の供給源から、又は(その製造に用いられる製剤技術が、2つの成分の効力の十分な安定化及び保存を可能にしているならば)混合成分を単一の供給源から投与してもよい。

同時投与は、2つの物質を同時に投与し得る装置を用いて影響されてもよい。また、同時投与はトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体又はtPAのどちらかの一方を先に投与することを含むと考えられ、もう一方の成分をそのすぐ後に投与してもよい。この明細書中で“すぐに”は、最初の成分の投与後1分までのあらゆる時間を意味する。

また、プラスミノゲン活性化因子又はトロンビン活性可能なプラスミノゲン類似体の

10

20

30

40

50

一方を静注点滴によって投与し、もう一方を静注ボラス注射によって投与してもよい。本発明の1つの具体例を、以下の実施例により例証するが、この実施例は発明を制限するものではない。

実施例

トロンピン活性可能なプラスミノゲン類似体の製造

トロンピン活性可能なプラスミノゲン類似体BB-10153の設計、構造、発現及び精製はWO 94/10318に記載されている。

BB10153は、アミノ酸残基Pro(559)、Gly(560)がThr-Thr-Lys-Ile-Lys-Proで置換され、かつVal(562)がIleにより置換されてトロンピンにより切断可能な切断ループを生じ;さらにGlu606からLysへ及びGlu623からLysへの2つのアミノ酸置換が 2-抗プラスミンの結合を損なわせるプラスミノゲン類似体である。

10

静注tPA及びBB-10153の補助効果についての生物学的試験

tPA及びトロンピン活性可能なプラスミノゲンBB-10153の血栓崩壊活性は、大腿動脈中の血栓形成が銅線のコイル(銅は血栓形成の強力な刺激物である)の挿入によって誘導されるうさぎの動脈血栓モデルで測定した。血液流は、超音波フロープローブ(flow probe)メーターによりコイルのすぐ遠位でモニターした。

雄のニュージーランドホワイトラビット2.5-3.0kgを、17.5mg/mlのペントバルビトン溶液を35mg/kgの添加投与量で静注注射(耳の静脈)し麻酔にかけた。静脈カニューレを装着し、ペントバルビトン18mg/kg/hr(点滴速度2ml/hr)で実験の間中注入した。麻酔をかけたうさぎの気管にカニューレを挿入し、動物に人工的に呼吸させた。呼吸終期CO₂は6%に設定し、吹き込む空気は酸素を補給した。一方は麻酔注入、他方は試験化合物の濃縮塊投与のため、両方の頸静脈にカニューレを挿入した。左の頸動脈は血圧及び心拍を記録するためにカニューレを挿入した。

20

両肢からの大腿動脈は周辺組織から切り離し、確実に側枝を外した。腹壁切開を行ない、大動脈が回腸動脈に分岐する位置の上部で腹膜を開けた。フロープローブ(2SB Transonic)は、側回旋動脈及び浅腹壁動脈(浅腹壁より約2-3cm遠位)より遠位の左大腿動脈中に設置した。次いで、重炭酸塩約5mlを任意のアシドーシスを正すために与えた。血液サンプルを採取し、pH(7.35-7.45)及び血液ガスpO₂(100-120mmHg)及びpCO₂(35-45mmHg)を調べた。21径のニードルの周りに直径0.5mmのワイヤーを10回転させた銅コイルを血栓の誘導に用いた。コイルは、側回旋動脈のすぐ遠位で、右大腿動脈のカニューレ挿入によるフロープローブより近位の左大腿動脈中に置いた。コイルとプローブ間の枝を接合した。カニューレはコイルを右の回腸動脈、次いで大動脈に上げるのに用い、血液により左の回腸動脈、次いで大腿動脈に運ばせた。コイルは、最終的にピンセットを用いて固定した。血液流は、超音波フロープローブメーターにより大腿動脈中のコイルのすぐ遠位でモニターした。左大腿動脈を通る血液流は血管にコイルを置いて5分以内で停止し、流停止後30分で処置を開始した。複合治療には、BB-10153を静注濃縮塊の注射として最初に与え、その5分後にまた濃縮塊としてtPAを与えた。1.0mlの血液サンプルを分析前及び薬剤投与0.5、1、2、3及び4時間後の頸動脈から採取した。サンプルの血液凝固は、3.8%w/vのクエン酸三ナトリウム(10中1部)で阻止した。サンプルを14000回転/分で10分間回転し、次いで血漿を用いて出血タンパク質を測定した(方法参照)。

30

40

tPAの血栓崩壊活性

3mg/kgのtPA(アクチライズ(actilyse)、ベーリンガーインゲルハイムから購入)は、4/6の動物に長い再灌流を、残りの2匹に短い再灌流を生じた。1mg/kgのtPAは、2/8の動物に有意な再灌流を誘導したが、他の6匹では再灌流はなかった。0.3mg/kgのtPAはどんな有意な再灌流も誘導しなかった。

BB-10153の血栓崩壊活性

BB-10153は、4mg/kgまでの投与量で投与された時、閉塞した大腿動脈の再灌流を誘導しなかった。

tPA及びBB-10153の複合処置の血栓崩壊活性

tPAの血栓崩壊力は、BB-10153の共投与によりかなり増加した。1mg/kgのtPAと2mg/kgのBB

50

-10153の複合は、4/6の動物に長時間再灌流を誘導し、1匹に有意だがより短時間の再灌流を、1匹に短時間の流れを数回誘導した。このパターンは、3mg/kgのtPAにより生じるパターンに類似していた。0.3mg/kgのtPAと2mg/kgのBB-10153の複合は、3/4の動物に相当時間流れを誘導した。

血漿 2-抗プラスミン及びフィブリノーゲンレベルにおけるtPA及びBB-10153の効果

BB-10153の共投与によるtPAの血栓崩壊力の増加は、プラスミンの系内の生成に有意な増加を伴わなかった。3mg/kgのtPAは、コントロールの20%未満への血漿 2-抗プラスミン(2-PI)レベルの低下及びコントロールの約25%への血漿フィブリノーゲンレベルの低下により実証されるように、系内のプラスミンの生成をもたらした。1mg/kgのtPAは、2-PI及びフィブリノーゲンのレベルをそれぞれコントロールの約60%及び75%に低下させた。2mg/kgのBB-10153は、血漿 2-PI及びフィブリノーゲンのレベルに影響しなかった。1mg/kgのtPAと2mg/kgのBB-10153の複合は、1mg/kgのtPAだけで生じた系内プラスミン活性と比較して、小さな増加を生じたにすぎなかった。

0.3mg/kgのtPAは 2-PI及びフィブリノーゲンのレベルにほとんど影響せず、これは0.3mg/kgのtPAと2mg/kgのBB-10153の血栓崩壊複合で変化しなかった。

方法

出血タンパク質

全ての測定は、インストルメンテーションラボラトリーズのACL300R凝血計で行なった;凝血計はPC及び関連ソフトウェア(リサーチソフトウェア)を備えていた。凝血試験用の全試薬及びキットは、インストルメンテーションラボラトリーズより購入した。

2-抗プラスミン

アッセイは、凝血計に備えられた標準的なキットと抗プラスミン試験用の既定説明を用いて行なった。

フィブリノーゲン

Claussの方法の改良型を用いた[Clauss.A, Acta Haematol.17:237 1957]。校正血漿を用いて検量線(凝血時間に対するフィブリノーゲン濃度の逆数)をつくった。検量線用の血漿は、インストルメンテーションラボラトリーズ(IL)より得た。濃度は2.95、1.475、0.98、0.7375、0.59及び0.295g/l(ストックからの希釈率はストック、1:2、1:3、1:4、1:5及び1:10)。試験血液サンプル中のフィブリノーゲンは、トロンビンの時間アッセイの結果を用いて検量線から決定した(以下参照)。データ分析は、ACL300R凝血計で行なうためILが供給するリサーチソフトウェアを用いてPCで行なった。

トロンビンの時間

トロンピンを100mmolのCaCl₂で3NIHU/mlの濃度にする改良をして、標準的なキットを用いた。アッセイは研究モード(すなわち1凝血サイクル)の設定 - サンプル及び試薬量75µl、活性時間180秒、勾配間隔1秒、捕捉時間300秒、速度1200rpmで行なった。パスマツトデフ(Path matt.def)(S/RX100.S4.S4.閾値(3.50))を用いて、分析した。

フロントページの続き

- (72)発明者 ウッド ラーズ マイケル
イギリス国、オーエックス4 5エルワイ、オックスフォード カウリー、ウォトリントン ロード (番地なし) プリティッシュ バイオテック ファーマシューティカルズ リミテッド
- (72)発明者 カマー マイケル ビリスフォード
イギリス国、オーエックス4 5エルワイ、オックスフォード カウリー、ウォトリントン ロード (番地なし) プリティッシュ バイオテック ファーマシューティカルズ リミテッド

合議体

審判長 森田 ひとみ
審判官 福井 悟
審判官 谷口 博

- (56)参考文献 国際公開第94/1128 (WO, A1)
国際公開第94/10318 (WO, A1)
特表平8-504575 (JP, A)
特表平5-502373 (JP, A)
Journal of Biological Chemistry,
1994年6月10日、第269巻、第23号、pp15989-15992

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61K38/00-38/58