

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4046377号
(P4046377)

(45) 発行日 平成20年2月13日 (2008. 2. 13)

(24) 登録日 平成19年11月30日 (2007. 11. 30)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/43 (2006. 01)

A 6 1 K 37/48

A 6 1 P 7/04 (2006. 01)

A 6 1 P 7/04

C 0 7 K 1/18 (2006. 01)

C 0 7 K 1/18

C 0 7 K 14/745 (2006. 01)

C 0 7 K 14/745

A 6 1 K 37/465

請求項の数 3 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平8-237145

(22) 出願日 平成8年8月19日 (1996. 8. 19)

(65) 公開番号 特開平10-59867

(43) 公開日 平成10年3月3日 (1998. 3. 3)

審査請求日 平成15年8月7日 (2003. 8. 7)

特許法第30条第1項適用 平成8年2月20日 株式会社裕文社発行の「基礎と臨床第30巻第2号」に発表

前置審査

(73) 特許権者 000173555

財団法人化学及血清療法研究所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

(72) 発明者 友清 和彦

熊本県熊本市龍田町上立田130-8

(72) 発明者 矢野 寿

熊本県熊本市楠7丁目2-1 龍田メゾン後
福208号

(72) 発明者 今村 匡伸

熊本県菊池郡合志町豊岡2022-98

(72) 発明者 中野 祥晃

熊本県熊本市武蔵ヶ丘4-18 公団住宅4
-408

(72) 発明者 丸野 真一

熊本県菊池郡西合志町須屋1733-31

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固第V I I 因子の活性化方法及び該方法に基づく活性化血液凝固第V I I 因子の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 血液凝固第V I I 因子 (以下、F V I I と称することがある) を含有する溶液を陰イオン交換樹脂に展開し接触させ、(b) F V I I を活性化率が60%未満を維持しつつ活性化血液凝固第V I I 因子 (以下、F V I I a と称することがある) へ活性化し、(c) 0.5 mM以上の濃度のCa²⁺を含有する溶出緩衝液を用いて溶出して、(d) 該溶出液を溶液状態で静置 (熟成) し未活性体分子を完全に活性化させる工程を経てなる血液凝固第V I I 因子の活性化血液凝固第V I I 因子への活性化方法。

【請求項2】

上記陰イオン交換樹脂からの溶出時の溶出方法が段階的溶出法 (ステップワイズ溶出法) である請求項1に記載のF V I I の活性化方法。

【請求項3】

請求項1もしくは請求項2のいずれかに記載のF V I I の活性化方法に基づく工程を含むことを特徴とする活性化血液凝固第V I I 因子の製造方法。

以上

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本願発明は、血漿蛋白質の分野に関する。より詳細には、活性化血液凝固第V I I 因子 (以下、F V I I a と称することがある) の製造方法に関し、F V I I を含有する血漿画分

10

20

たは遺伝子組換え技術に基づいて作出されたF V I I 産生細胞培養上清から、陰イオン交換クロマトグラフィーによる処理及びそれに連続した液相中での活性化によって、夾雑蛋白質含量が低減されたF V I I aを、極めて簡便に生産し得るF V I I aの製造方法を提供するものである。

【0002】

【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】

F V I I はビタミンK依存性の血液凝固因子であり、外因系血液凝固の開始因子であることは広く知られている。他のビタミンK依存性凝固因子と同様にN末端から35残基までのアミノ酸配列に10個のカルボキシグルタミン酸(以下、G l aと称することがある)からなるG l a領域を有している(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, vol. 83, p.2412-2416, 1986)。F V I I は、in vitroにおいて、活性化血液凝固第X因子(以下、F X aと称することがある)、活性化血液凝固第I X 因子(以下、F I X aと称することがある)またはトロンビン(以下、F I I aと称することがある)によって、152A r g - 153I l e が加水分解され、一個のS - S結合で架橋されたH鎖とL鎖から構成される活性型F V I I すなわちF V I I aに変換されることが知られている(J. Biol. Chem., vol. 251, p.4797-4802, 1976)。また、最近、S a u l i u s等は生理的なF V I I 活性化酵素が活性化血液凝固第X因子であると報告した(Biochemistry, vol. 35, p.1904-1910, 1996)。

【0003】

血友病A及び血友病B患者に対する補充療法として、血液凝固第VIII因子(以下、F V I I Iと称することがある)及び血液凝固第I X 因子(以下、F I Xと称することがある)製剤の投与が行なわれている。しかし、当該治療法に伴いF V I I I及びF I Xに対する中和抗体(インヒビターと呼ばれることもある)の出現が問題視されている。このようなインヒビター患者の治療にF V I I aが有効であることは既に報告されており、現在、血漿由来F V I I a及び遺伝子組換え技術を応用した遺伝子組換え型F V I I aの開発が進められている(基礎と臨床, vol. 30, p.315-325, 1996; Haemostasis, vol. 19, p.335-343, 1989)

【0004】

酵素前駆体であるF V I I からF V I I aへの変換に関しては各種の試験が行なわれ、F V I I 活性化酵素であるF X a、F I X a及びF I I aが存在しない場合、F V I I aの関与によるF V I I の自己活性化反応が生じること、即ち次式で示される反応" $F V I I + F V I I a \rightarrow 2 F V I I a$ "で進行することが明らかにされている(Biochemistry, vol. 28, p.9331-9336, 1989)。

ところで、F V I I aの調製方法として、陰イオン交換樹脂を使用した活性化方法がある(Res.Disc., vol. 269, p.564-565, 1986)。この方法は、反応の詳細は明らかにされていないが、F V I I aを工業規模で生産するうえで極めて有効な方法である。しかしながら、陰イオン交換樹脂を使用したF V I I の活性化において問題となるのは、副産物としてF V I I のL鎖のN末端から38残基のアミノ酸が欠失したG l a領域欠失F V I I a(以下、G D - l e s s F V I I aと称することがある)が生成することにある。F V I I aの生体内での活性発現にはリン脂質及び組織因子との結合が必要であり、G l a領域はそのためには必須である。従って、G l a領域の存在しないG D - l e s s F V I I aはリン脂質及び組織因子との結合が極めて弱く、生物学的活性を有さずその存在の生理的意義はないものと考えられている(J. Biol. Chem., vol. 265, p.1890-1894, 1990; Thrombosis and Haemostasis, vol. 67, p.679-685, 1992)。

【0005】

これまで、陰イオン交換樹脂上での活性化はゲルにF V I I を展開した後、完全活性化させ、グラジエント溶出することにより、溶出段階で副産物のG D - l e s s F V I I aとF V I I aの等電点の差異を利用して分離する方法が報告されており、T h i m等はM o n o Qを使用した陰イオン交換クロマトグラフィーによる活性化反応においては産生された

G D - l e s s F V I I aは分離可能と述べている(B i o c h e m i s t r y , v o l . 2 7 , p . 7 7 8 5 - 7 7 9 3 , 1 9 8 8)。しかしながら、實際上その完全分離は極めて難しく、分離を厳密に行なえば工程間収率は著しく低減する。さらに、これまでに陰イオン交換樹脂上でのG D - l e s s F V I I aの産生機構に関する報告はなく、その制御を陰イオン交換樹脂上で行なうことは極めて困難であった。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

本願発明者等は活性化反応における上記問題点に鑑み、陰イオン交換樹脂上での活性化反応における副産物であるG D - l e s s F V I I aの産生を抑制するべく鋭意研究を重ね種々の検討を行なった結果、本願発明を完成するに至った。

本願発明は、陰イオン交換樹脂上における活性化反応を60%未満に抑制し、溶出したF V I I / F V I I a混合溶液を0.5 mM以上のC a ²⁺が存在する溶液中での液相中で熟成させ95%以上活性化させる方法をその技術の骨子とする。本願発明を適用すれば、活性化工程におけるF V I I からF V I I aの変換において生ずるG D - l e s s F V I I aの産生が抑制され、著しい工程間収率の上昇が可能となる。

【 0 0 0 7 】

以下、本願発明の詳細について説明する。

本願発明で用いられる出発物質は、 1 血漿または血漿を適当なクロマトグラフィー操作またはコーンのエタノール分離法もしくはその改良法を用いて調製されたF V I I 含有溶液または、 2 遺伝子組換え技術に基づいて作出されたF V I I 産生形質転換細胞より調製されるF V I I 及び/もしくはF V I I 誘導体含有溶液が対象となるが、最適な出発原料としては、血漿を陰イオンクロマトグラフィーで粗精製したG l a領域を有する蛋白溶液(P P S B画分)を抗F V I I モノクローナル抗体固定化アフィニティーゲルに展開し溶出したほぼF V I I のみを含有する溶液である。F V I I の精製は特に免疫吸着の原理に基づく方法に限定されるものではなく、F V I I を純化可能な方法であればいずれでもよい。

【 0 0 0 8 】

前記F V I I 画分を、陰イオン交換樹脂クロマトグラフィーに供する。陰イオン交換樹脂は陰イオン交換樹脂であれば特に限定されるものではないが、好適にはD E A E セファロースファーストフロウ(ファルマシア社)及びQセファロースファーストフロウ(ファルマシア社)等が使用され、F V I I 画分を樹脂と接触させる。この工程では種々の条件を採用することができ、上記リガンドとの接触はバッチ法または連続カラム法で実施することができるが、最適な態様としては、前記の陰イオン交換樹脂をクロマトグラフィーのカラムに充填し、試料を通液後、吸着した所望のF V I I を溶出させる。陰イオン交換樹脂からの溶出は0.5 mM以上のC a ²⁺を含む緩衝液を用いて段階的溶出法(ステップワイズ溶出法)により、溶出液中のF V I I / F V I I a混合溶液のF V I I aへの活性化率が60%以下になるように溶出する。

溶出液中の活性化率を制御するためには、陰イオン交換樹脂へのF V I I 展開量と樹脂内での滞留時間を調整すればよい。すなわち、樹脂へのF V I I 展開量及び樹脂内での滞留時間の増加は活性化率を増大させ、樹脂へのF V I I 展開量及び樹脂内での滞留時間の減少は活性化率を低下せしめる。

【 0 0 0 9 】

溶出後の熟成時間は、 1 溶出時のF V I I / F V I I aの混合比率、 2 F V I I / F V I I aの蛋白濃度によって決定される。溶出液中の蛋白濃度は陰イオン交換樹脂へのF V I I 展開量及びカラムサイズが決定されれば一定になる。好適には1.0 ~ 3.0 mg / ml が望ましく、そのように陰イオン交換樹脂への展開量及びカラムサイズを決定する。また、溶出時の活性化率は陰イオン交換樹脂へのF V I I 展開量が決定されれば、上述のごとく樹脂内での滞留時間を制御すればよい。また、熟成開始時のC a ²⁺濃度は0.5 mM以上が要求され、それ以下の濃度ではG D - l e s s F V I I aの産生が顕著になり、適正ではない。好適には1.0 ~ 10 mMの濃度範囲が使用される。熟成の終了は、F

10

20

30

40

50

V I I / F V I I aの混合溶液のF V I I aの活性化率が95%を越えた時点で、希釈操作によって蛋白濃度を減じ活性化反応速度を遅延させるか、またはpHを低下させ酵素反応を一時停止せしめることによって行なう。得られたF V I I a溶液は透析操作によって所望の製薬学的調合剤に処方すればよい。

【0010】

静脈内投与のための調合剤に対しては、組成物を、通常、生理学的に適合し得る物質例えば塩化ナトリウム、グリシン等を含み且つ生理学的条件に適合し得る緩衝されたpHを有する水溶液中に溶解する。また、長期安定性の確保の観点から、最終的剤型として凍結乾燥剤の形態を採ることも考慮され得る。なお、静脈内に投与される組成物のガイドラインは政府の規則、例えば「生物学的製剤基準」によって確立されている。

10

以下に、実施例を挙げて本願発明を具体的に説明するが、本願発明は何等これらに限定されるものではない。

【0011】

【実施例】

実施例の記述に先立ち、本願発明において使用されたF V I I 活性及びF V I I a含量の測定方法について概説する。

1) F V I I の生物学的活性

F V I I は血液凝固の開始因子である組織因子と結合し血液凝固を開始する。F V I I の定量方法は、検体をF V I I 欠乏血漿に添加後、一定時間インキュベーションした後、組織因子、リン脂質及び Ca^{2+} を含有したP T 試薬を添加しその凝固時間から算出する。

20

2) F V I I a含量の測定

F V I I a含量の測定にはS D S - P A G Eを使用する。F V I I (分子量50 k d a)は活性化すると1個のS - S 結合で結合した2本鎖に分かれる。H 鎖は分子量30 k d a、L 鎖は分子量20 k d a。還元系のS D S - P A G Eでは未活性体は分子量50 k d aの位置に、H 鎖は30 k d a、L 鎖は20 k d aの位置に確認される。検出されるバンドをデンストメーターで読み取り、分子量50 k d aのバンドを未活性化F V I I 含量%、H 鎖とL 鎖の含量の和をF V I I a含量%とした。活性化率はF V I I a含量をF V I I 含量とF V I I a含量の和で除した値を百分率(%)で表した。

【0012】

実施例 1

30

新鮮凍結血漿100リットルを冷融解し沈澱画分を遠心分離した上清を、陰イオン交換体(D E A E - セファデックス A - 50:ファルマシア社)カラムに通液し、20 mM クエン酸 / 0.1 M N a C l 緩衝液(pH 7.0)にて十分に洗浄し、20 mM クエン酸 / 0.5 M N a C l 緩衝液(pH 7.0)にてG l a ドメインを有するP P S B 画分を溶出した。

溶出液10リットルを50 mM T r i s / 150 mM N a C l / 5.0 mM C a C l₂緩衝液(pH 8.0)で予め平衡化した抗F V I I モノクローナル抗体固定化アフィニティゲルに展開し、50 mM T r i s / 2.5 M N a C l / 5.0 mM C a C l₂緩衝液(pH 8.0)で洗浄後、50 mM T r i s / 30 mM N a C l / 5.0 mM C a C l₂緩衝液(pH 8.0)でさらに洗浄し、50 mM T r i s / 30 mM N a C l / 10 mM E D T A 緩衝液(pH 7.4)で溶出してF V I I 画分を得た。該F V I I 画分を予め50 mM T r i s / 30 mM N a C l 緩衝液(pH 8.0)で充填されているウイルス除去膜(ペンベルグマイクロポラスメンブレン、旭化成)に展開し濾液を得た。得られた濾液のF V I I 純度は85%であった。

40

【0013】

上記0.2 mg / ml のF V I I 溶液50 ml を、予め50 mM T r i s / 30 mM N a C l 緩衝液(pH 8.0)で平衡化した内径5.0 mm、高さ5.0 cm のD E A E - セファロースファーストフロウ(ファルマシア社)カラムに線速300 cm / hr で展開し、さらに同線速下、上記緩衝液で所定の各種カラム容量洗浄し、吸着したF V I I / F V I I a を失活させるために50 mM 酢酸緩衝液(pH 3.5)で溶出した。溶出したF V I I / F V I I a 画分のS D S - P A G E 解析を行ない、表1の結果を得た。本結果は洗浄カラム

50

容量が70カラム容量を越えるとFVIIaの活性化率が66.4%を越え、GD-less FVIIaの産生が始まることを示している。

【0014】

【表1】

洗浄カラム容量	FVII量(%)	FVIIa量(%)	活性化率(%)	GD-lessFVIIa量(%)
10	62.0	26.5	29.9	ND
15	55.1	32.6	37.2	ND
30	53.6	38.4	41.7	ND
40	42.1	49.5	54.0	ND
70	30.1	59.4	66.4	2.5
120	10.6	80.5	88.4	4.4

10

NDは検出限界以下を意味する

20

【0015】

実施例2

実施例1と同様な操作でウイルス除去膜濾液として調製した0.2mg/mlのFVII溶液50mlを、予め50mM Tris / 30mM NaCl緩衝液(pH8.0)で平衡化した内径5.0mm、高さ5.0cmのDEAE-セファロースファーストフロー(ファルマシア社)カラムに線速300cm/hrで展開し、さらに同線速下、上記緩衝液で10倍カラム容量洗浄し、50mM Tris / 30mM NaCl / 2.0mM CaCl₂緩衝液(pH8.0)を用い各種線速で溶出した。溶出したFVII / FVIIa画分のSDS-PAGE解析を行ない、表2の結果を得た。本結果は溶出線速が100cm/hrを下回るとFVIIaの活性化率が62.8%を越え、GD-less FVIIaの産生が始まることを示している。

30

【0016】

【表2】

溶出線速 (cm/hr)	FVII量 (%)	FVIIa量 (%)	活性化率 (%)	GD-lessFVIIa量 (%)
400	71.3	23.8	25.0	ND
300	66.7	27.3	29.0	ND
250	63.1	32.8	34.2	ND
200	60.6	36.4	37.5	ND
150	51.8	41.1	44.2	ND
100	35.0	59.2	62.8	4.0
75	12.5	70.5	84.9	12.0
50	2.5	80.6	97.0	21.0

NDは検出限界以下を意味する

【0017】

実施例3

実施例1と同様な操作でウイルス除去膜濾液として調製した0.2mg/mlのFVII溶液70mlを、予め50mM Tris / 30mM NaCl 緩衝液(pH 8.0)で平衡化した内径5.0mm、高さ3.3cmのDEAE-セファロースファーストフロー(ファルマシア社)カラムに線速200cm/hrで展開し、さらに同線速下、上記緩衝液で10カラム容量洗浄後、50mM Tris / 30mM NaCl / 1.75mM CaCl₂ 緩衝液(pH 8.0)を用い線速150cm/hrで溶出した。溶出した濃度2.0mg/mlのFVII / FVIIa混合溶液をさらに液相中で10時間熟成させた。カラム溶出直後(熟成前)及び熟成後の成績を表3に示す。

結果は、実施例1、2とは陰イオン交換樹脂への展開量及びカラムサイズの異なる条件においても、溶出後の活性化率が60%以下ではGD-less FVIIaが産生されず、且つ熟成後もその産生が極めて抑制されていることを示している。

【0018】

【表3】

	FVII量 (%)	FVIIa量 (%)	活性化率 (%)	GD-lessFVIIa量 (%)	FVII力価 比活性(U/μg)
熟成前	42.8	53.8	55.7	ND	—
熟成後	1.5	95.1	98.4	0.87	39.2

NDは検出限界以下を意味する

【 0 0 1 9 】

実施例 4

実施例 1 と同様な操作でウイルス除去膜濾液として調製された 0.2 mg / ml の F V I I 溶液 35 ml を予め 10 mM T r i s / 100 mM N a C l 緩衝液 (pH 8.5) で平衡化した内径 5.0 mm、高さ 5.0 cm の Q - セファロースファーストフロウ (ファルマシア社) カラムに線速 300 cm / hr で展開し、さらに同線速下、上記緩衝液で各種カラム容量洗浄後、吸着した F V I I a を失活させるために 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) で溶出した。溶出した F V I I / F V I I a 画分の S D S - P A G E 解析を行ない、表 4 の結果を得た。本結果は洗浄カラム容量が 40 カラム容量を越えると F V I I a の活性化率が 61.3 % を越え、G D - l e s s F V I I a の産生が始まることを示している。

10

【 0 0 2 0 】

【表 4】

洗浄カラム容量	FVII量(%)	FVIIa量(%)	活性化率(%)	GD-lessFVIIa量(%)
5	89.4	6.9	7.2	ND
10	82.8	12.1	12.8	ND
20	72.9	22.2	23.3	ND
30	48.8	45.2	48.1	ND
40	36.3	57.5	61.3	2.0
70	25.4	67.6	72.7	4.5
120	11.5	74.9	86.7	5.7

20

NDは検出限界以下を意味する

30

【 0 0 2 1 】

実施例 5

実施例 1 と同様な操作でウイルス除去膜濾液として調製した 0.2 mg / ml の F V I I 溶液 35 ml を、予め 10 mM T r i s / 100 mM N a C l 緩衝液 (pH 8.5) で平衡化した内径 5.0 mm、高さ 5.0 cm の Q - セファロースファーストフロウ (ファルマシア社) カラムに線速 300 cm / hr で展開し、さらに同線速下、上記緩衝液で 10 倍カラム容量洗浄し、10 mM T r i s / 100 mM N a C l / 4.0 mM C a C l₂ 緩衝液 (pH 8.5) を用い各種線速で溶出した。溶出した F V I I / F V I I a 画分の S D S - P A G E 解析を行ない、表 5 の結果を得た。本結果は溶出線速が 108 cm / hr 以下になると F V I I a の活性化率が 62.7 % を越え、G D - l e s s F V I I a の産生が始まることを示している。

40

【 0 0 2 2 】

【表 5】

溶出線速 (cm/hr)	FVII量 (%)	FVIIa量 (%)	活性化率 (%)	GD-lessFVIIa量 (%)
300	70.3	22.5	24.2	ND
240	63.9	30.0	31.9	ND
180	42.5	37.4	46.8	ND
140	47.0	46.7	49.8	ND
108	33.6	56.4	62.7	9.2
45	4.5	82.2	94.8	16.0

NDは検出限界以下を意味する

【0023】

実施例 6

実施例 1 と同様な操作でウイルス除去膜濾液として調製した 0.2 mg/ml の F V I I 溶液 35 ml を、予め 10 mM T r i s / 100 mM N a C l 緩衝液 (pH 8.5) で平衡化した内径 5.0 mm、高さ 5.0 cm の Q - セファロースファーストフロウ (ファルマシア社) カラムに線速 300 cm/hr で展開し、さらに同線速下、上記緩衝液で 10 カラム容量洗浄後、10 mM T r i s / 100 mM N a C l / 4.0 mM C a C l₂ 緩衝液 (pH 8.5) で線速 180 cm/hr で溶出した。溶出した濃度 1.0 mg/ml の F V I I / F V I I a 混合溶液を液相中で 25 時間熟成させた。カラム溶出直後 (熟成前) 及び熟成後の成績を表 6 に示す。

結果は、実施例 3 と同様に陰イオン交換樹脂として Q - セファロースファーストフロウ (ファルマシア社) を使用しても、溶出後の活性化率が 60 % 以下では G D - l e s s F V I I a が産生されず、且つ溶出液熟成後もその産生が極めて抑制されていることを示している。

【0024】

【表 6】

	FVII量 (%)	FVIIa量 (%)	活性化率 (%)	GD-lessFVIIa量 (%)	FVII力価 比活性(U/μg)
熟成前	42.5	37.4	46.8	ND	—
熟成後	2.5	87.0	97.2	0.87	40.2

NDは検出限界以下を意味する

【0025】

実施例 7

実施例 3 と同様な操作で、D E A E - セファロースファーストフロウ(ファルマシア社)を使用し部分活性化後、液相で熟成し完全活性化させた Ca^{2+} 濃度 2.0 mM を含む 5.0 mg / ml 濃度の F V I I a 混合溶液を、 Ca^{2+} 濃度が 0.17 mM、0.50 mM、0.75 mM、1.0 mM、2.0 mM、蛋白質濃度が 0.4 mg / ml になるように 50 mM T r i s / 30 mM N a C l 緩衝液 (p H 8.1) で希釈し、9 で 88 時間インキュベートした。

インキュベート後の成績を表 7 に記載する。表 7 の成績は G D - l e s s F V I I a 産生の至適 Ca^{2+} 濃度が 0.5 mM 未満であることを示すと共に、F V I I a の G D - l e s s F V I I a への分解反応が 0.75 mM 以上の Ca^{2+} 濃度下で抑制されることをも示している。この結果は液相における G D - l e s s F V I I a 産生反応の Ca^{2+} 濃度の閾値を示すと共に、陰イオン交換樹脂からの溶出を Ca^{2+} を含む緩衝液で行なう場合、溶出時の G D - l e s s F V I I a の産生を抑制するためには溶出緩衝液の Ca^{2+} 濃度は 0.5 mM 以上必要であることを示している。

【 0 0 2 6 】

【表 7】

Ca^{2+} 濃度 (mM)	FVIIa 量 (%)	GD-less FVIIa 量 (%)
0.17	68.9	50.8
0.50	82.2	18.2
0.75	84.3	8.4
1.00	84.9	6.8
2.00	85.5	6.1

10

20

フロントページの続き

(72)発明者 緒方 洋一

熊本県熊本市帯山7丁目9-142

(72)発明者 寺野 剛

熊本県菊池郡西合志町須屋1548-2

審査官 榎本 佳予子

(56)参考文献 特開平05-345799(JP,A)

基礎と臨床, 1996年2月20日, Vol.30, No.2, p.315-326

Research Disclosure, 1986年, Vol.269, p.564-565, No.26960

Biochemistry, 1989年, Vol.28, No.24, p.9331-9336

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/43

C07K 1/18

C07K 14/745

BIOSIS(STN)

CA(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)

REGISTRY(STN)