

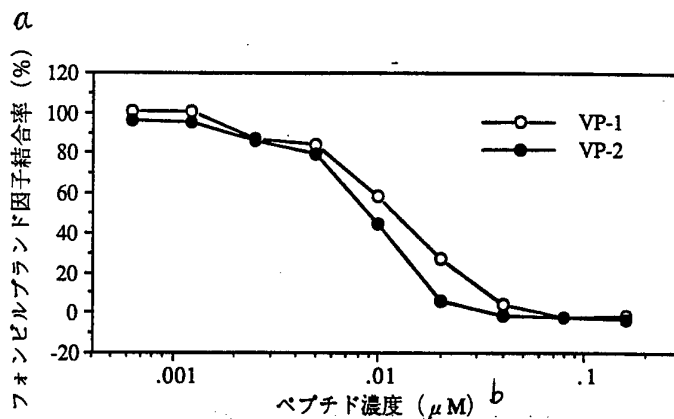


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類⁶ C07K 14/46, A61K 38/17</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 95/09183</p> <p>(43) 国際公開日 1995年4月6日 (06.04.95)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01583 (22) 国際出願日 1994年9月27日 (27. 09. 94)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平5/241666 1993年9月28日 (28. 09. 93) JP 特願平6/2691 1994年1月14日 (14. 01. 94) JP 特願平6/128518 1994年6月10日 (10. 06. 94) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 福地直之 (FUKUCHI, Naoyuki) [JP/JP] 石井康一 (ISHII, Koichi) [JP/JP] 開田健一 (KAIDA, Kenichi) [JP/JP] 小林 幹 (KOBAYASHI, Tsuyoshi) [JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title : PEPTIDE AND ANTITHROMBOTIC AGENT

(54) 発明の名称 ペプチド及び抗血栓剤



a ... von Willebrand factor binding rate

b ... Peptide concentration

(57) Abstract

A peptide is obtained from a venom derived from *Vipera palestina* by screening various venoms for peptides that inhibit the binding of Von Willebrand factors with platelets even in a low concentration thereof and do not cause platelet aggregation. The obtained peptide has two different peptide chains and its molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis is about 25 kD and about 15 kD, respectively, under nonreducing and reducing conditions.

(57) 要約

フォンビルブランド因子の血小板への結合を低濃度で阻害し、かつ、血小板凝集惹起作用を示さないペプチドを種々の蛇毒からスクリーニングした結果、異なる2本のペプチド鎖からなり、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が、非還元条件では約25キロダルトンであり、還元条件では約15キロダルトンであるペプチドをビペラ・パレスチナ由来の蛇毒から得た。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KH	韓国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

- 1 -

明細書

ペプチド及び抗血栓剤

技術分野

本発明は、血中のフォンビルブランド因子 (von Willebrand factor) と血小板との結合を阻害する活性を有するペプチド及びそれを含有する抗血栓剤に関し、詳しくは、ビペラ・パレスチナ (*Vipera palestinae*) 由来の蛇毒中から得たペプチドに関する。

背景技術

心筋梗塞、脳血栓を始めとするいわゆる血栓症の発症には、血小板が深く関与していることが広く知られている（「血小板」；山中、山崎編；医学書院、p158-163(1991)）。近年、このような血栓症に至る初期反応と考えられる血小板の血管内皮下組織への粘着に、血中タンパク質の1つであるフォンビルブランド因子 (von Willebrand factor) と血小板表面上の糖タンパク質 I b (glycoprotein Ib) との結合が重要であることが示されている (J. P. Cean et al., J. Lab. Clin. Med., 87, 586-596 (1976))。

これらの2種のタンパク質の結合は、通常の状態では起こらず、生体内で高いずれ応力のかかった状態にのみ起こることが知られている (T. T. Vincent et al., Blood, 65, 823-831 (1985))。さらにこの結合を生体外で観察する方法として、抗生物質であるリストセチン (ristocetin) (M. A. Howard, B. G. Firkin, Thromb. Haemostasis, 26, 362-369 (1971))、蛇毒由来のタンパク質であるボトロセチン (botrocetin) (M. S. Read et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75, 4514-4518 (1978)) 等の物質を用いた方法が広く用いられている。これらの物質を血小板浮遊液に添加することにより血小板の凝集が起こるが、この凝集はフォンビルブランド因子と糖タンパク質 I b の結合に依存するものである (前記 M. A. Howard, B. G. Firkin, M. S. Read et al)。

前記の凝集に対する阻害作用を示す物質としては、例えばオーリントリカルボ

ン酸 (Aurin tricarboxylic acid) 等がある (M. D. Phillips et al., Blood, 72, 1989-1903 (1988))。本物質は、動物実験において抗血栓性を示すことが報告されており、フォンビルブランド因子の血小板への結合を阻害することにより、抗血栓作用が得られることが示されている (J. Strony et al., Circulation, 81, 1106-1114 (1990))。また、両タンパク質の結合を阻害する物質としてはフォンビルブランド因子あるいは糖タンパク質 I b の部分フラグメントペプチド等が報告されている (Y. Fujimura et al., J. Biol. Chem., 261, 381-385 (1986)、K. Titani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 5610-5614 (1987))。

さらに、蛇毒中より単離されたペプチドに同様の活性を持つものがあることは、W09208472号国際公開パンフレット、Pengら (M. Peng et al., Blood, 81, 2321-2328 (1993)) により示されている。

W09208472号国際公開パンフレットでは、クロタルス・ホリダス・ホリダス (*Crotalus horridus horridus*)、セラステス・セラステス (*Cerastes cerastes*) 由来の蛇毒より得られるフォンビルブランド因子の血小板への結合を阻害するペプチドを示している。

しかし動物実験におけるデータは示されておらず、ペプチド性物質の血中半減期の短さを考えれば、インビトロにおいてさらに活性の高いものが、動物実験においての有効性が高いと考えられる。さらにW09208472号国際公開パンフレットによれば、前記2種の蛇毒より得たペプチドの他、ビペラ・ルセリ・ルセリ (*Viper a russeli russeli*)、シュードセラステス・パーシカス (*Pseudocerastes persicus*) からも同様の活性を指標として活性ペプチドを得ているが、比活性については明らかでない。さらに同パンフレットではこの他数種の蛇毒中に、血小板凝集を阻害する活性があることを示しているが、蛇毒中の血小板凝集阻害活性はすでに多くの報文に示されており (C-M. Teng, T-F. Hung, Platelet, 2, 77-87 (1991)、B. H. Chao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 8050-8054 (1989))、さらにこれら毒素の示す血小板凝集阻害が、フォンビルブランド因子の血小板への結合阻害を介したものであるかどうかの根拠が示されていない。

Pengら (M. Peng et al., Blood, 81, 2321-2328 (1993)) により報告されているエクス・カリナタス (*Echis carinatus*) 由来のペプチドについては、本明細書

の実施例 2 に示した通り、低濃度ではフォンビルブランド因子の血小板への結合阻害を介した血小板凝集阻害が起こるが、高濃度では血小板凝集惹起作用が観察された。Pengらのデータに示されている、動物実験での血小板減少は、この高濃度での血小板凝集惹起作用が引金となり、血栓が生じることがその一因であることが推定される。

前記のように報告された蛇毒由来の、フォンビルブランド因子の血小板への結合阻害活性を示すペプチドの他、以前より同様の分子量を示し血小板への作用を有するペプチドがいくつか報告されている。ラトルスネークレクチン (rattlesnake lectin) は、血小板、赤血球の凝集を引き起こすことが示されており (J. Hirabayashi et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 2320-2326 (1991))、またボトロセチンは血小板には結合せずフォンビルブランド因子に結合することが示されている (Y. Fujimura et al., *Biochemistry*, 30, 1957-1964 (1991))。また、トリメレスラス・アルボラブリス (*Trimeresurus albolabris*) 由来の蛇毒より得られたアルボアグレギン (alboaggregin) は、非常に強い血小板凝集活性を持つことが示されている (M. Peng et al., *Biochemistry*, 30, 11529-11537 (1991))。最近の研究により、これらのペプチドの構造は前述のクロタルス・ホリダス・ホリダス由来のペプチド (W09208472号国際公開パンフレット) と、アミノ酸配列に高い相同性があることが明らかである (J. Hirabayashi et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 2320-2326 (1991)、E. Yoshida et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 1386-1392 (1993)、Y. Usami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 928-932 (1993))。

以上の知見から、これらのペプチドとアミノ酸配列の相同性の高いペプチドが蛇毒中に広く存在していることが推定されるが、その作用は多種多様である。その中で特にフォンビルブランド因子の血小板への結合をより低濃度で阻害し、高濃度において血小板凝集惹起作用を示さないものを発見することが大きな課題であり、生体内で著効を示す、血小板の内皮下組織への粘着阻害を特徴とする抗血栓薬を提供するためには不可欠である。

本発明は上記観点からなされたものであり、抗血栓薬として有効な薬剤を得るために、フォンビルブランド因子の血小板への結合を低濃度で阻害し、血小板凝

集惹起作用を示さないペプチドを提供することを課題とする。

発明の開示

本発明者は、上記課題を解決するために、血小板のリストセチン凝集を強く阻害する活性、およびフォンビルブランド因子 (von Willebrand factor) の血小板への結合を阻害する活性のあるもの数点を、蛇毒から選りだし、活性成分についての検討を行なったところ、分子量的に非常に多様なペプチドに活性が存在することが示された。このうち分子量約25キログルトンの活性ペプチドを含む3点の蛇毒から活性ペプチドの精製、単離を行い、血小板に対する活性を検討した。得られたペプチドの中には、強いリストセチン凝集阻害活性を示す他に、血小板凝集を惹起する活性を併せ持つタイプのものも存在したが、ビペラ・パレスチナ (*Vipera palestinae*) 由来のペプチドは、高濃度においても血小板凝集惹起を示さないことを見だし、本発明に至った。

すなわち本発明は、ビペラ・パレスチナの蛇毒より得られるペプチドであって、フォンビルブランド因子と血小板との結合を阻害する活性を有するペプチドである。さらに本発明は、このペプチド及び/又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する抗血栓剤を提供する。

以下に、本発明を詳細に説明する。

< 1 >フォンビルブランド因子と血小板との結合を阻害する活性を有するペプチド

本発明のフォンビルブランド因子と血小板との結合を阻害する活性を有するペプチド (以下、「本発明のペプチド」という) は、ビペラ・パレスチナの蛇毒より得られる。

ビペラ・パレスチナの蛇毒は、ビペラ・パレスチナから直接採取してもよく、市販のものを用いてもよい。これらから、ゲル濾過、イオン交換、吸着、逆相等の各種カラムクロマトグラフィーや、アフィニティーカラムクロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、向流分配等の方法を組み合わせて精製することにより、フォンビルブランド因子の血小板への結合を阻害する少なくとも2種類のペプチド

を得ることが出来る。

上記のようにして得られるペプチドは、いずれもSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動において、非還元状態では約25キロダルトンの分子量を示す。一方、還元状態、例えば1%メルカプトエタノール存在下で加熱したものでは、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動において、約15キロダルトンの分子量の位置に、異なる2本のペプチドのバンドが観察される。このことから、本発明のペプチドは、約15キロダルトンの異なるペプチド鎖 (α 鎖および β 鎖) よりなる二量体である。

本発明のペプチドの構造は、例えば本ペプチドを還元ピリジルエチル化し、逆相クロマトグラフィー等の方法を用いてそれぞれのペプチド鎖を分離し、それぞれのペプチド鎖、あるいはリジルエンドペプチダーゼ等のプロテアーゼや化学的な切断法により分解後、分離した部分ペプチドを、アミノ酸分析装置等の機器、あるいは常法のアミノ酸配列逐次分析法を用いてアミノ酸配列の分析が出来る。

後記実施例に示したように、上記のようにして、本発明のペプチドのうちの1つ (VP-1) は、配列表配列番号1、2に示したN末端アミノ酸配列を有する2本鎖ペプチドからなり、他の1つ (VP-2) は、配列番号5、6に示したアミノ酸配列を有する2本鎖ペプチドからなる新規ペプチドであることがわかった。

さらに、これらVP-1およびVP-2は、血小板のリストセチン凝集阻害活性、および、フォンビルブランド因子の血小板への結合に対する阻害活性を有する。この活性は、高濃度でも血小板凝集を引き起こさないものとしては、これまで知られているもの以上に強い。

VP-1の α 鎖と β 鎖のN-末端のアミノ酸配列は、配列番号1、2に示したとおりであり、 α 鎖については少なくともN末端から32アミノ酸残基まで、 β 鎖については少なくともN末端から30アミノ酸残基までは、VP-2の各々のペプチドと完全に一致する。尚、VP-2に関しては、 α 鎖についてはN-末端から52番目までのアミノ酸配列、 β 鎖については43番目までのアミノ酸配列を、配列番号3、4に示した。さらに、 α 鎖の全アミノ酸配列及び β 鎖の大部分のアミノ酸配列を配列番号5、6に示した。

このように、VP-1及びVP-2は類似の構造を有していると考えられるが、実施例に示したようにイオン交換クロマトグラフィーで分離することができることから、

同一のペプチドではない。いずれにしても、本発明のペプチドは上記の配列を有するものに限定されるものではなく、フォンビルブランド因子の血小板への結合に対する阻害活性を有するペプチドが、ビペラ・パレスチナの各々の個体に存在することが容易に推定され、それらは本発明の範囲に含まれるものである。

以上の知見は、本発明により初めて明らかになったものであり、本発明のペプチドが高濃度でも血小板凝集を引き起こさないことは、未精製の蛇毒中に検出される活性からは予測できないものである。さらに、本発明のペプチドは、これまで報告されている蛇毒由来ペプチド以上に、高い比活性で血小板のリストセチン凝集、およびフォンビルブランド因子の血小板への結合を阻害する。

< 2 > 本発明の医薬組成物

本発明の医薬組成物は、上述したような本発明のペプチドの有する作用を利用したものであり、本発明のペプチド及び／又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する抗血栓剤である。

ペプチド又はその塩は、1種又は2種以上の混合物として使用してもよい。また、本発明のペプチド以外の抗血栓作用を有する物質を含有していてもよい。この場合、本発明のペプチドがその医薬組成物中の主成分でなくてもよい。さらに、通常製剤に用いるその他の材料、例えば血清アルブミン等のタンパク質、緩衝作用、浸透圧調整のための塩、担体、賦型剤などの成分を配合してもよい。

剤型としては、錠剤、カプセル剤、細粒剤、シロップ剤、座薬、軟膏剤、注射剤、点眼剤等を挙げることができる。投与方法は、静脈内投与、皮下投与、経口投与の他、点眼、経腸等のいずれであってもよい。

動物あるいはヒトに投与する場合の投与量は、本発明のペプチド及び／又はその薬学上許容される塩の量として、通常 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲で所期の効果が期待でき、この範囲のうち、もっとも優れた薬効が得られる量を選択できる。

図面の簡単な説明

図1は、TSKgel-CM-5PWカラムを用いたVP-1、VP-2のイオン交換クロマトグラムで

ある。斜線で示した部分は、それぞれVP-1、VP-2を示す。

図2は、TSKgel-DEAE-5PWを用いたVP-1のイオン交換クロマトグラムである。

図3は、TSKgel-DEAE-5PWを用いたVP-2のイオン交換クロマトグラムである。

図4は、TSKgel-CM-5PWを用いたEC-1、EC-2、EC-3、EC-4のイオン交換クロマトグラムである。

図5は、TSKgel-CM-5PWを用いたTA-3のイオン交換クロマトグラムである。

図6は、TSKgel-CM-5PWを用いたTA-1、TA-2のイオン交換クロマトグラムである。

図7は、TA-1、TA-2、TA-3、EC-3、VP-1、VP-2それぞれの血小板凝集惹起活性を示す図である。

図8は、VP-2の α 鎖のアミノ酸配列及び酵素消化断片を表わす。

図9は、VP-2の β 鎖のアミノ酸配列及び酵素消化断片を表わす。下線を付した箇所は、さらなる1～3個のアミノ酸残基が存在する可能性がある。

図10は、VP-1によるリストセチン凝集阻害を示す図である。

図11は、VP-2によるリストセチン凝集阻害を示す図である。

図12は、VP-1、VP-2によるフォンビルブランド因子の血小板に対する結合阻害活性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施例を説明する。

実施例1

<1> 蛇毒中からのフォンビルブランド因子の血小板への結合阻害活性の検出

フォンビルブランド因子の血小板への結合阻害を測定するために、下記(1)に示したリストセチン凝集法阻害試験、および下記(2)に示した放射性同位体(^{125}I)標識したフォンビルブランド因子を用いた血小板への結合阻害試験を行った。

(1) 健常人より採血した新鮮血液に1/10容の3.8%クエン酸ナトリウムを添加し、これを900rpmで15分間遠心して得たヒト多血小板血漿 (platelet rich plasma :

PRP) に、2%パラホルムアルデヒドを溶解した20mMリン酸緩衝液 (pH7.4) を含む0.15M塩化ナトリウム水溶液を同容加え、4℃で一晩静置保存し、固定化血小板を得た。保存後、遠心分離により血小板を回収し、20mMリン酸緩衝液 (pH7.4) を含む0.15M塩化ナトリウム水溶液で2回洗浄した。洗浄後、同溶液に固定化血小板を懸濁し、保存した。

このように調製したホルマリン固定化血小板懸濁液に測定サンプルを加え、これにヒト血漿 (終濃度0.12%)、リストセチン硫酸塩 (シグマ社製) (終濃度0.5 mg/ml) を順次加え、振盪攪拌後血小板の凝集に対する阻害活性の有無を肉眼で観察した。

(2) ^{125}I 標識化フォンビルブランド因子の固定化血小板への結合阻害試験を、Chopekらの方法 (M. W. Chopek et al., Biochemistry, 25, 3146-3155 (1986)) を踏襲して行なった。すなわち、上記(1)の方法により調製した固定化血小板懸濁液に、測定サンプル、リストセチン硫酸塩 (シグマ社製) および ^{125}I 標識化フォンビルブランド因子を加え、室温にて30分間反応させた。

その後、反応液を20%蔗糖溶液に重層した後、12000rpm、5分間の遠心分離により固定化血小板画分を捕集し、 γ カウンター (ARC301B、アロカ社製) により放射能を測定することにより、結合したフォンビルブランド因子量を求めた。過剰量の非標識フォンビルブランド因子添加時の結合を非特異的結合とし、サンプル無添加時の結合を最大結合とした。

上記の方法により、市販の蛇毒凍結乾燥品 (シグマ社製) 中から求める阻害活性を持ち、入手が容易であった以下の7点を選びだし、活性物質の特定化を行なった。

- ①ビペラ・パレスチナ (*Vipera palestinae*)
- ②エクス・カリナタス (*Echis carinatus*)
- ③トリメレスラス・アルボラブリス (*Trimeresurus albolabris*)
- ④トリメレスラス・フラボビリディス (*Trimeresurus flavoviridis*)
- ⑤ナジャ・ハジェ (*Naja haje*)
- ⑥ナジャ・ニベア (*Naja nivea*)

⑦クロタルス・アドマンテウス (Crotaurus admanteus)

< 2 > 蛇毒中の活性物質の分子量の測定

上記< 1 >で選択した各々の蛇毒凍結乾燥品10mgを、1.5mlの0.9%の塩化ナトリウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) 1.5mlに溶解し、同緩衝液を溶媒としたセファデックスG-75ゲル濾過クロマトグラフィー (セファデックスG-75、ファルマシア社製、直径26mm、長さ90mm) で分離した。流速は0.5ml/分とし、5mlずつフラクションチューブを用いて分取した。

活性は< 1 >に示したものと同様の方法を用いて測定し、表1に活性の溶出位置 (溶出体積) 及び推定される分子量を示した。

表 1

蛇毒の由来	溶出位置	推定される およその分子量
ビペラ・パレスチナ	380-430ml	25000
エクス・カリナタス	380-430ml	25000
トリメレスラス・アルボラブリス	380-430ml	25000
	300-340ml	50000
トリメレスラス・フラボビリディス	260-300ml	100000
ナジャ・ハジェ	230-280ml	100000以上
ナジャ・ニベア	260-300ml	100000
クロタルス・アドマンテウス	260-300ml	100000

以上の結果から、これまでに報告されている (W09208472号国際公開パンフレット、M. Peng et al., Blood, 81, 2321-2328 (1993)) 分子量約25キロダルトンのペプチド以外にも、非常に多種多様な、フォンビルブランド因子の血小板への結合阻害を示すペプチドが存在することが明らかとなった。

< 3 > ビペラ・パレスチナからの活性ペプチドの単離

ビペラ・パレスチナ由来の蛇毒 (シグマ社製) 50mgを、20mMトリス塩酸緩衝液

(pH7.4)を含む0.15M塩化ナトリウム水溶液(2.8ml)に溶解後、不溶物を遠心除去(15000rpm、5分)し、セファデックスG-75(ファルマシア社製)を用いたゲル濾過クロマトグラフィー(直径2.6cm、長さ90cm)を、上記と同一の緩衝液を用い、流速0.5ml/分で行なった。

各フラクションについて、<1>に示した阻害活性の測定を行い、活性物質の含まれる画分(溶出容量390-430ml)をYM10(アミコン社製)を用いた限外濾過により濃縮後、50mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.5)に溶媒置換した。得られた濃縮液を、TSK-gel CM-5PW(東ソー社製、直径7.5mm、長さ75mm)を用いたイオン交換クロマトグラフィーを2回に分けて行ない、活性ピークをそれぞれ分取し、溶出時間の早いピークをVP-1、遅いピークをVP-2とした(図1)。溶出条件はA溶媒:50mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.5)、B溶媒:0.5M酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.4)を用い、(A:B)の比が(60:40)から20分間で(30:70)になるように直線濃度勾配溶出を行なった。

さらに、それぞれのサンプルについて分取した画分を、セントリコン-10(アミコン社製)を用いて濃縮し、TSK-gel DEAE-5PW(東ソー社製、直径7.5mm、長さ75mm)を用いたイオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製を行なった。溶出条件はA溶媒:50mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH9.0)、B溶媒:0.5M酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.4)を用い、(A:B)の比が(100:0)から20分間で(50:50)になるように濃度勾配溶出を行なった(図2、図3)。

以上のようにして単離されたVP-1、VP-2はそれぞれ最終的にセントリコン-10(アミコン社製)を用いて濃縮し、生理的食塩水溶液とした。

比較例1 エキス・カリナタスからの活性ペプチドの単離

エキス・カリナタス由来の蛇毒(シグマ社製)25mgを、20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)を含む0.15M塩化ナトリウム水溶液(1ml)に溶解後、不溶物を遠心除去(15000rpm、5分)した後、セファデックスG-75を用いたゲル濾過クロマトグラフィー(直径2.6cm、長さ90cm)を、上記と同一の緩衝液を用い、流速0.5ml/分で行なった。

実施例1と同様にフォンビルブランド因子の血小板への結合阻害試験を行い、

活性画分（溶出容量390-410ml）をセントリプレップ-10（アミコン社製）を用いた限外濾過により濃縮後、50mM酢酸アンモニウム緩衝液（pH4.5）に溶媒置換した。濃縮液について、TSK-gel CM-5PW（東ソー社製、直径7.5mm、長さ75mm）を用いたイオン交換クロマトグラフィーを2回に分けて行ない、活性ピークをそれぞれ分取した。

活性ピークは4種類存在し、溶出時間の早いピークから順にEC-1、EC-2、EC-3、EC-4とした（図4）。さらにこの4つの活性画分を、セントリコン-10（アミコン社製）を用いて濃縮し、溶出溶媒として20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.4）を含む塩化ナトリウム濃度勾配（1.5M-0M/20分間）を用いた、TSK-gel Phenyl-5PW（東ソー社製、直径4.6mm、長さ75mm）による吸着クロマトグラフィーによりさらに精製し、4種類それぞれを単一な活性ペプチドとして得た。ここで得た活性ペプチドのうちの1つが、そのクロマトグラフィー上の挙動及び活性からPengらが報告しているエキセチン（Echicetin）（M. Peng et al., Blood, 81, 2321-2328 (1993)）であると考えられる。

比較例2 トリメレスラス・アルボラプリスからの活性ペプチドの単離

トリメレスラス・アルボラプリス由来の蛇毒（シグマ社製）50mgを、20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.4）を含む0.15M塩化ナトリウム水溶液（1.4ml）に溶解後、不溶物を遠心除去（15000rpm、3分）した後、セファデックスG-75を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（直径2.6cm、長さ90cm）を、上記と同一の緩衝液を用い、流速0.5ml/分で行なった。

実施例1と同様にフォンビルブランド因子の血小板への結合阻害試験を行い、2つの活性画分（溶出容量300-350mlと390-440ml）をそれぞれセントリプレップ-10（アミコン社製）を用いた限外濾過により濃縮後、50mM酢酸アンモニウム緩衝液（pH4.5）に溶媒置換した。

それぞれの活性画分の濃縮液について、TSK-gel CM-5PW（東ソー社製、直径7.5mm、長さ75mm）を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行ない、前半の活性画分からは活性ペプチドTA-3を（図5）、後半の活性画分からは活性ペプチドTA-1、TA-2（図6）をそれぞれ単一なペプチドとして得た。溶出条件はA溶媒：50mM酢

酸アンモニウム緩衝液 (pH4.5)、B溶媒:0.5M酢酸アンモニウム緩衝液 (pH6.4)を用い、(A:B)の比を(100:0)から20分間で(0:100)になるように濃度勾配溶出を行なった。

実施例2 活性ペプチドの諸性質

<1> 蛇毒ペプチドのリストセチン凝集阻害作用と血小板凝集惹起活性の検討

実施例1及び比較例1、2で単離した活性ペプチドのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を常法に従って行なった。その結果、それぞれの活性ペプチドは、表2に示した通り分子量約14~17キロダルトンの異なる2本の(TA-3は異なる4本の)ペプチド鎖よりなるペプチドであることがわかった。

表2

ペプチドの名称	推定されるおよその分子量	
	非還元下	還元下
VP-1, -2	25000	15000, 15000
EC-1, -2, -3, -4	27000	14000, 15000
TA-1, -2	25000	14000, 15000
TA-3	46000	14000, 15000, 15000, 17000

上記のペプチドは、いずれも5 μ g/mlの濃度以下で、実施例1に示した固定化血小板のリストセチン凝集を阻害した。そこで、実施例1と同様の方法で調製した多血小板血漿 (platelet rich plasma) にこれらのペプチドを加えたときの作用を観察した。測定はHematracer-801 (二光バイオサイエンス社製)を用い、キュベット中に100 μ lの多血小板血漿を入れ、スターラーバーを用いて37 $^{\circ}$ Cで3分間攪拌後、11.1 μ lのペプチド溶液を加え、透過光を観察することにより凝集の経時変化を観察した。

図7にペプチドの濃度と10分間の最大凝集率を示した。図7に示した通り、TA-1、TA-2は低濃度で非常に強い凝集活性を、またTA-3およびEC-1、EC-2、EC-3、

EC-4 (EC-3のみ図示、EC-1、EC-2、EC-4も同様の活性を有する)は、より高濃度で血小板凝集惹起活性を示した。一方、VP-1、VP-2は、高濃度においても血小板凝集惹起活性を示さなかった。これらの事実から、分子量、固定化血小板のリストセチン凝集阻害活性という点で類似しているこれらのペプチドが、血小板凝集惹起活性という点で異なる挙動を示すことが明らかになった。

< 2 > 本発明のペプチドの構造

ビペラ・パレスチナから実施例1に示した方法で得られた活性ペプチドVP-1、VP-2は、等電点電気泳動によりpI値がそれぞれ7.0、7.2であることが分かった。さらに、VP-2のアミノ酸配列の決定を次のようにして行なった。まず、VP-2 100 μ gを0.5Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.5)、10mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA \cdot Na₂) を含む7M塩酸グアニジン水溶液100 μ lに溶解後、4-ビニルピリジン (1 μ l)、トリ-n-ブチルフォスフィン (2 μ l) を加え、室温で一晩反応させて還元ピリジルエチル化を行なった。

上記反応液を、TSKgel-Phenyl-5PW-RP (東ソー社製、直径4.6mm、長さ75mm) のカラムを用いた液体クロマトグラフィーに供し、VP-2を構成する2本のペプチド鎖を分離した。溶出は、流速を1ml/minとし、0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル31%から52% (20分間) までの濃度勾配溶出により行なった。溶出時間の早い方をVP-2 α 鎖、遅い方をVP-2 β 鎖と名付けた。これらを凍結乾燥後、30%アセトニトリルに溶解し、プロテインシーケンサー470A (アプライドバイオシステム社製) を用いてアミノ末端からのアミノ酸配列の解析を行なった。

また、上記のようにして得られた還元ピリジルエチル化ペプチドを、0.5Mトリス塩酸 (pH8.5)、10mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む7M塩酸グアニジン (25 μ l) に溶解後、37°Cで1時間放置した後、終濃度が2M塩酸グアニジン、0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.5)、2mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムとなる反応液中で、リジルエンドペプチダーゼ (和光純薬社製) 2 μ gによる消化反応を、37°Cで2時間行なった。

上記消化反応による消化断片を、さらに逆相カラム (SSC-VP-318、センシユー科学社製、直径4.6mm、長さ250mm) を用いた高速液体クロマトグラフィーにより

分離、分取し、それぞれのアミノ酸配列の解析を、プロテインシーケンサー470A（アプライドバイオシステム社製）を用いて行なった。

また、プロテイナーゼGlu-C（ベーリンガーマンハイム社製）によるペプチドの断片化、アミノ酸配列の解析も、上記と同様の方法により行なった。

上記のようにして明らかにしたVP-2 α 鎖のアミノ酸配列を配列番号5に、VP-2 β 鎖のアミノ酸配列を配列番号6に示した。さらに、VP-2 α 鎖の酵素消化断片とそのアミノ酸配列を図8に、VP-2 β 鎖の酵素消化断片とそのアミノ酸配列を図9に示した。図8、9において、Kはリジルエンドペプチダーゼ消化によるフラグメントの一部を、EはプロテイナーゼGlu-C消化によるフラグメントの一部を示した。

ところで、通常行われているアミノ酸配列決定法の精度は完全なものではなく、ある程度アミノ酸残基の欠失や他のアミノ酸残基との混同等の読み誤りが生じやすく、本明細書に示したアミノ酸配列中にもこのような読み誤りが含まれている可能性は否定しがたい。しかしながら、そのような読み誤りが含まれていたとしても、配列番号3～6に示した配列は、生理活性や分子量などの性質と併せて本発明のペプチドを特定するには十分であると考えられる。

尚、VP-2 α 鎖のアミノ酸配列において確実性がより高いと考えられる部分の配列（N末端から52アミノ酸残基）を配列番号3に示す。

一方、VP-2 β 鎖は、配列番号6において、60番目のリジンと61番目のチロシンとの間に1～3個の不明なアミノ酸が存在する可能性があり、また、100番目のリジンと101番目のスレオニンとの間も1～3個の不明なアミノ酸が存在する可能性がある。VP-2 β 鎖のアミノ酸配列において確実性がより高いと考えられる部分の配列（N末端から43アミノ酸残基）を配列番号4に示す。

VP-1についても同様に還元ピリジルエチル化後、アミノ末端のアミノ酸配列の解析を行なった。その結果を、配列番号1、2に示す。以上の結果から、VP-1は、少なくともN-末端部分においてはVP-2と同一のアミノ酸配列を有することがわかった。

さらに、ピリジルエチル化して得たVP-1の各々の鎖由来のペプチドについて、リジルエンドペプチダーゼ消化を行い、得られた消化フラグメントと、VP-2由来

の消化フラグメントとの逆相高速液体クロマトグラフィーにおける溶出位置の比較を行った。その結果、 α 鎖由来の1つのフラグメントに違いがみられ、アミノ酸配列分析の結果、VP-1ではVP-2の110番目のグリシンがグルタミン酸に、122番目のリジンがアスパラギンに置換していることが分かった。

< 3 > 本発明ペプチドの血小板に対する活性

ビペラ・パレスチナから得られたVP-1、VP-2について、< 1 >に示した方法と同様にHematracer-801（二光バイオサイエンス社製）を用いて、多血小板血漿（platelet rich plasma）の種々の凝集に対する阻害活性を測定した。凝集原としては、リストセチン（終濃度1.2mg/ml）、ボトロセチン（1 μ g/ml）、ADP（3 μ M）、コラーゲン（10 μ g/ml）を用い、多血小板血漿に各ペプチドを添加後、3分間37 $^{\circ}$ Cで攪拌後上記の凝集原を加え、サンプルを加えないコントロール群に対する凝集阻害率を測定した。

このうちリストセチン凝集に対するVP-1、VP-2の阻害活性をそれぞれ図10、図11に示した。VP-1、VP-2はリストセチン凝集に対し、ともに2.5 μ g/mlで90%以上の阻害を示し、W09208472号国際公開パンフレットに記載されたクロタルス・ホリダス・ホリダス由来のペプチドCHH-B（3 μ g/mlで約30%阻害）より強い阻害活性を持つことがわかった。また、ボトロセチン凝集に対しても、両ペプチドともにほぼ同様の濃度において阻害活性を示した。一方、VP-1、VP-2ともADP、コラーゲン凝集に対しては20 μ g/mlの濃度においても阻害を示さず、リストセチン凝集、ボトロセチン凝集等、フォンビルブランド因子と糖タンパク質Ib（Glycoprotein Ib）の結合に依存する凝集を特異的に阻害するものであることが示された。

さらに、上記2つのタンパク質の結合に対する阻害作用を明らかにするため、実施例1に述べた方法を用いて、 125 Iラベル化したフォンビルブランド因子の血小板への結合阻害を測定した。この結果、図12に示した通り、VP-1、VP-2ともに、濃度依存的にフォンビルブランド因子の血小板への結合を阻害した。50%結合阻害濃度（IC₅₀）はいずれのペプチドとも0.008-0.016 μ Mであり、W09208472号国際公開パンフレット記載のCHH-B（IC₅₀：0.1-0.2 μ M）に比べ、より低濃度でフォンビルブランド因子と糖タンパク質Ibの結合を阻害するペプチドであることが

示された。

産業上の利用可能性

本発明により得られるペプチドは、血栓症の発症に深く関与するフォンビルブランド因子の血小板への結合を阻害する。この活性は、従来知られている物質よりも、より低い濃度で発現する。また、このペプチドは、高濃度でも血小板凝集を惹起しないので、抗血栓薬として有用である。

- 17 -

配列表

配列番号：1

配列の長さ：32

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp	Gln	Asp	Cys	Pro	Ser	Asp	Trp	Ser	Ser	His	Glu	Gly	His	Cys	Tyr
1				5				10					15		
Lys	Val	Phe	Arg	Leu	Phe	Lys	Thr	Trp	Glu	Glu	Ala	Glu	Lys	Phe	Cys
			20					25					30		

配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp	Cys	Pro	Ser	Asp	Trp	Ser	Ser	His	Glu	Gly	His	Cys	Tyr	Lys	Val
1				5				10					15		
Phe	Asn	Leu	Asp	Lys	Thr	Trp	Ala	Asp	Ala	Glu	Lys	Phe	Cys		
				20				25					30		

配列番号：3

配列の長さ：52

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

- 18 -

配列

Asp Gln Asp Cys Pro Ser Asp Trp Ser Ser His Glu Gly His Cys Tyr
 1 5 10 15
 Lys Val Phe Arg Leu Phe Lys Thr Trp Glu Glu Ala Glu Lys Phe Cys
 20 25 30
 Met Gln Gln Val Asn Gly Trp His Leu Ala Ser Ile Glu Ser Val Glu
 35 40 45
 Glu Ala Asn Phe
 50

配列番号 : 4

配列の長さ : 43

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Cys Pro Ser Asp Trp Ser Ser His Glu Gly His Cys Tyr Lys Val
 1 5 10 15
 Phe Asn Leu Asp Lys Thr Trp Ala Asp Ala Glu Lys Phe Cys Thr Glu
 20 25 30
 Gln Val Ser Gly Gly His Leu Leu Ser Leu Lys
 35 40

配列番号 : 5

配列の長さ : 132

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

- 19 -

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

配列番号 : 6

配列の長さ : 125

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Cys Pro Ser Asp Trp Ser Ser His Glu Gly His Cys Tyr Lys Val
 1 5 10 15
 Phe Asn Leu Asp Lys Thr Trp Ala Asp Ala Glu Lys Phe Cys Thr Glu
 20 25 30

- 20 -

Gln Val Ser Gly Gly His Leu Leu Ser Leu Lys Ser Thr Glu Glu Val
35 40 45

Asp Phe Met Ile Lys Leu Val Phe Pro Ile Leu Lys Tyr Asp Leu Ile
50 55 60

Trp Ile Gly Leu Ser Asn Phe Trp Arg Asp Cys His Trp Gly Trp Ser
65 70 75 80

Asp Gly Val Lys Leu Asp Tyr Lys Ala Trp Ser Asp Ile Pro Asp Cys
85 90 95

Tyr Val Ala Lys Thr Val Asp Tyr Gln Trp Leu Leu Arg Asp Cys Ser
100 105 110

Arg Thr Tyr Lys Phe Ile Cys Lys Ser Arg Val Pro Arg Arg Arg
115 120 125

請求の範囲

1. ビペラ・パレスチナの蛇毒より得られるペプチドであって、フォンビルブランド因子と血小板との結合を阻害する活性を有するペプチド。
2. 異なる2本のペプチド鎖からなり、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が、非還元条件では約25キロダルトンであり、還元条件では約15キロダルトンである請求項1記載のペプチド。
3. 前記2本のペプチド鎖のうち、一方は配列表配列番号1に示すアミノ酸配列をN末端に有し、他方は配列番号2に示すアミノ酸配列をN末端に有する請求項2記載のペプチド。
4. 前記2本のペプチド鎖のうち、一方は配列表配列番号3に示すアミノ酸配列をN末端に有し、他方は配列番号4に示すアミノ酸配列をN末端に有する請求項2記載のペプチド。
5. 前記2本のペプチド鎖のうち、一方は配列表配列番号5に示すアミノ酸配列を有し、他方は配列番号6に示すアミノ酸配列を有する請求項2記載のペプチド。
6. 請求項1～5のいずれか一項に記載のペプチド及び／又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する抗血栓剤。

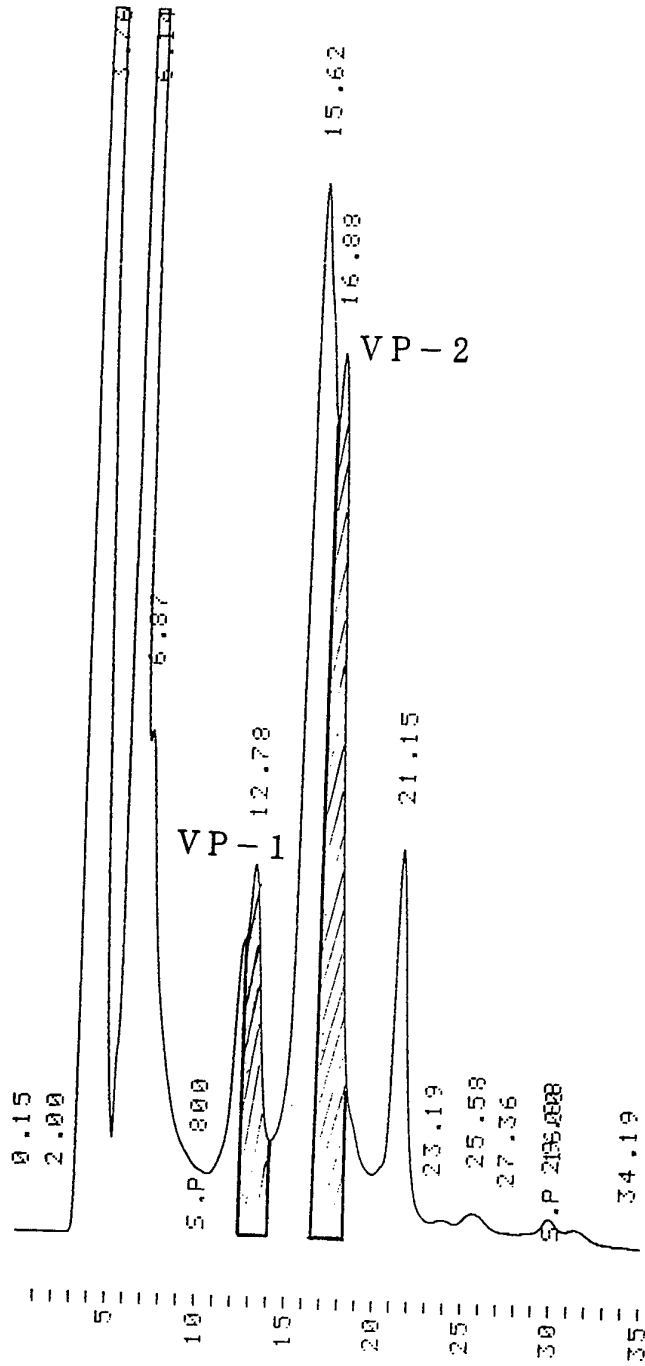
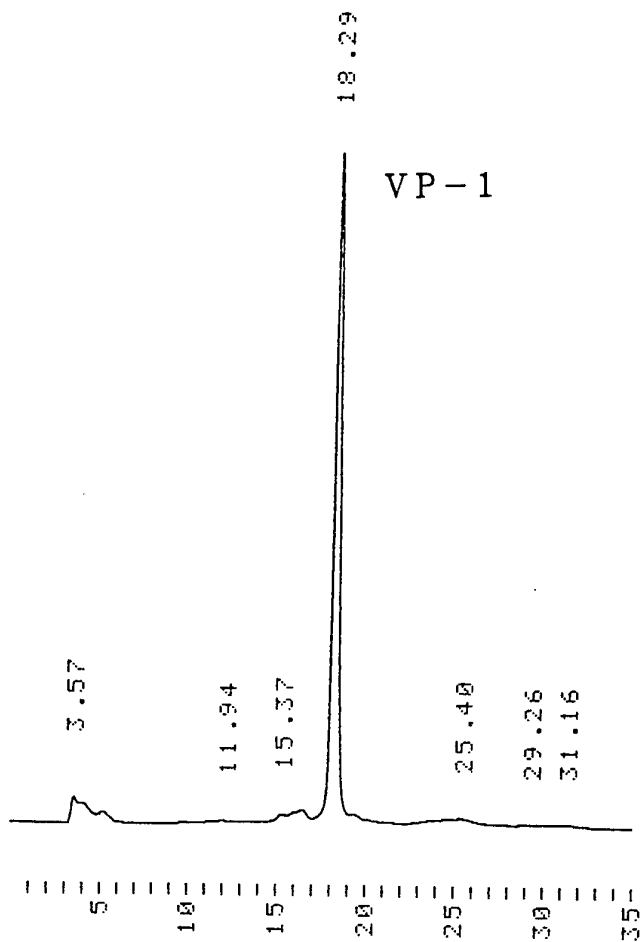


図 1

2 / 12



☒ 2

3/12

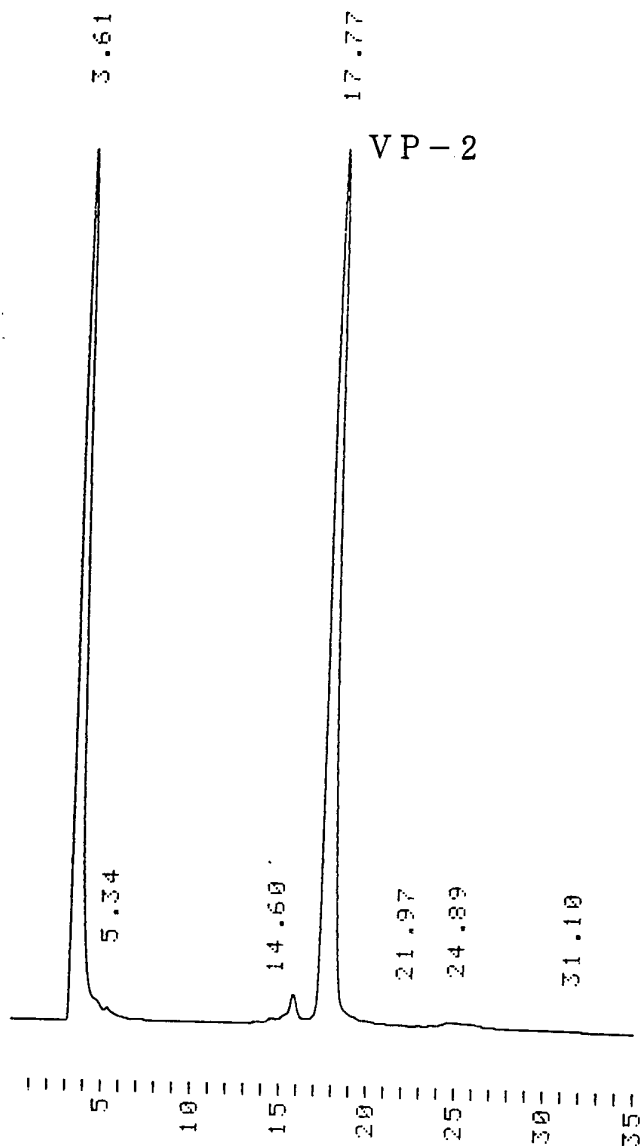


图 3

4/12

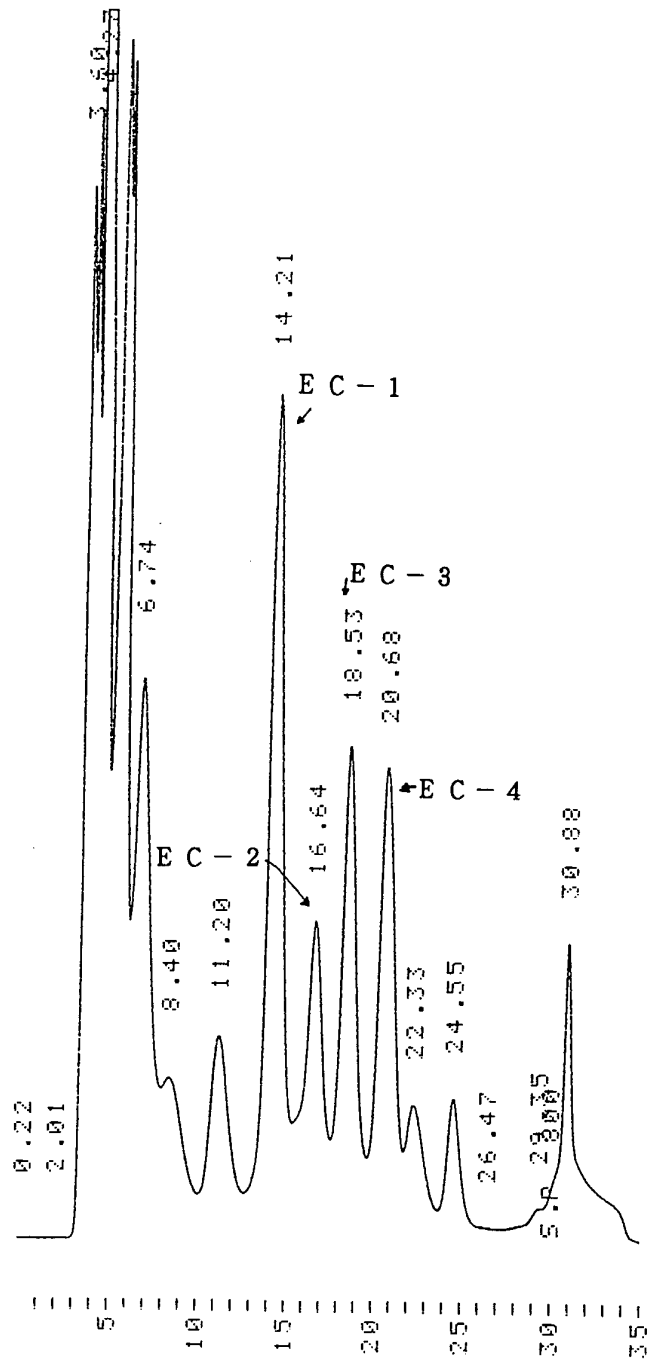
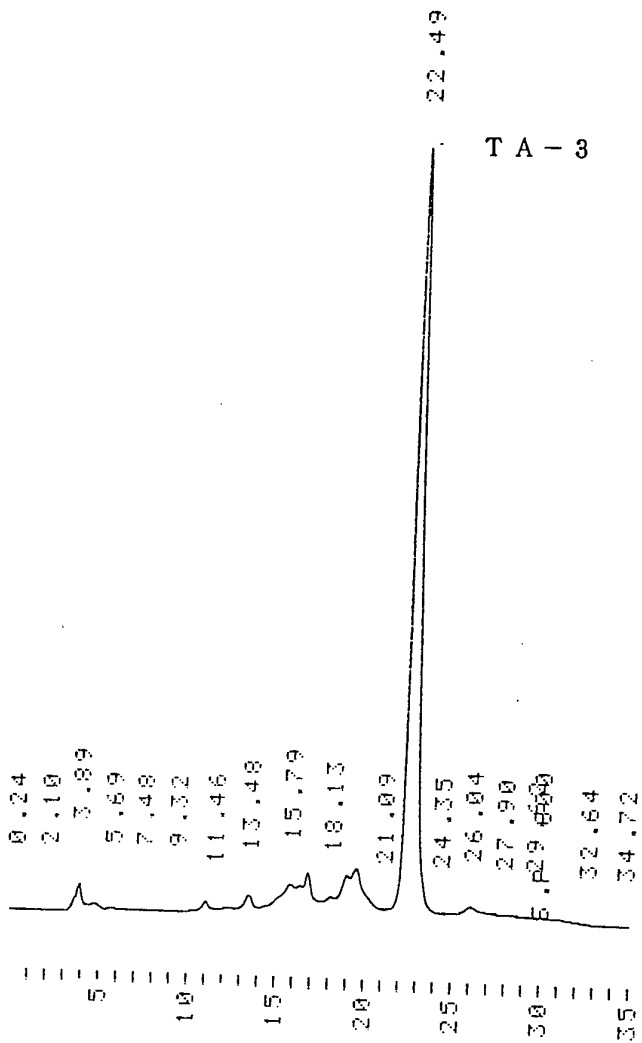


图4

5 / 12



5

6/12

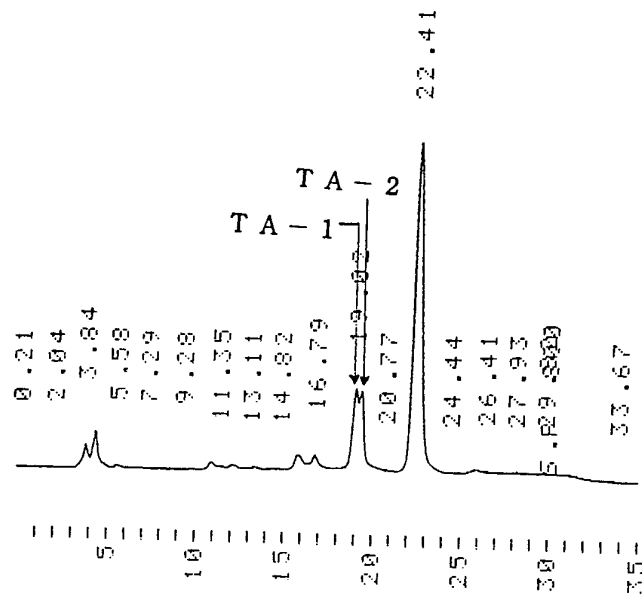


図6

7/12

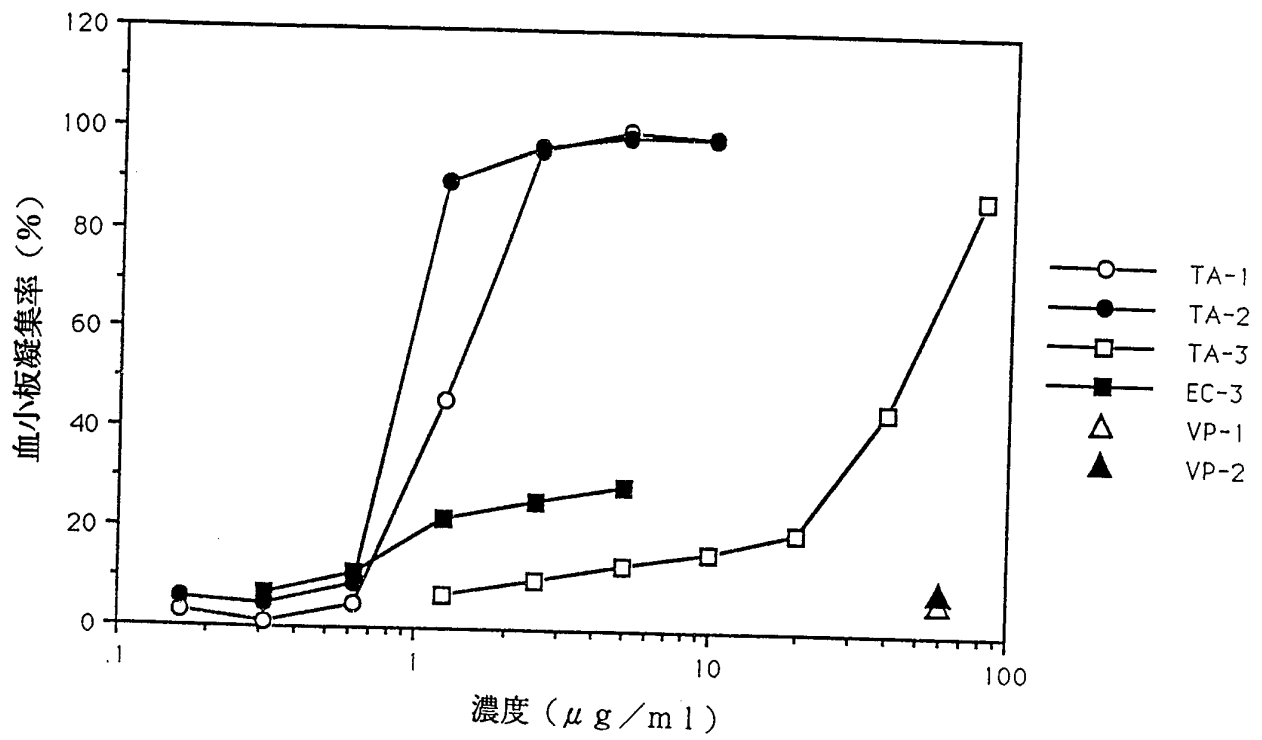


図7

1 DQDCPSDWS¹¹ SHEGHCYK²¹ VFR³¹ LFK⁴¹ TWEEAEK⁵¹ FCM⁶¹ QQVNGWHLASIESVEEANFVAELVSKTLIKSKYHA
 N-term DQDCPSDWS¹¹ SHEGH²¹ K9V³¹ FR⁴¹ LFK⁵¹ K11FCM⁶¹ QQVNGWHLASIESVEEANFVAELV→ K8YHA*
 K4DQDCPSDWS¹¹ SHEGHCYK²¹ K2TWEEAEK³¹ K3TLIK⁴¹

E1a DQDCPSDWS¹¹ SHE²¹ E5KFCM³¹ QQV→ E1b ANFVAE⁴¹
 E6 GHCYK²¹ VFR³¹ LFK⁴¹ TWEEAEK⁵¹ E4LVSKTLIKSKYHA*

69 71 WIGLRDQSER⁸¹ QQCS⁹¹ SHWTDGSAV¹⁰¹ SYETV¹¹¹ TYTK¹²¹ C¹³¹ FGLNKDKGYLEWVTLPCEDKIPFICKSWVP
 WIGLRDQSER⁸¹ QQCS⁹¹ SHWTDGSAV→ K1YTK¹⁰¹ K10GYLEWVTLPCEDK¹¹¹ K6SWVP
 WIGLRDQSE⁸¹ E2RQ⁹¹ QCS¹⁰¹ SHWTDGSAV¹¹¹ SYE E3TV¹²¹ TYTK¹³¹ C¹⁴¹ FGLNKDKGYLE K7IPFICK
 E7WVTLPCEDKIPFICKSWVP

☒ ∞

1 DCPDWSSEHGHCYKVFNLDKKTWADAEKFCFTEQVSGGHL³¹SLKSTEEVDFM⁵¹IKLVFPI⁶¹LK__YDLI
 VP-2β鎖
 N-term DCPDWSSEHGHCYKVFNLDKKTWADAEKFCFTEQVSGG⁴¹HL⁵¹SLKSTEEVDFMI⁶¹KLVFPI⁶¹LK__YDLI*
 K8FCFTEQVSGGHL⁴¹SLK K11LVFPI⁶¹LK

65 71 81 91 101 111 121
 WIGLSNFWRDCHWGWS⁸¹DGVKLDYKAWSD¹⁰¹IPDCYVAK¹¹¹_TVDYQWLLRDCSRTYK¹²¹FICKSRVPRRR
 WIGLSNFWRDCHWGWS⁸¹DGVK K6AWS¹⁰¹DI¹¹¹PDCYVAK K3FICK
 K2LDYK K10TVDYQWLLRDCSRTYK K1SRVPRRR

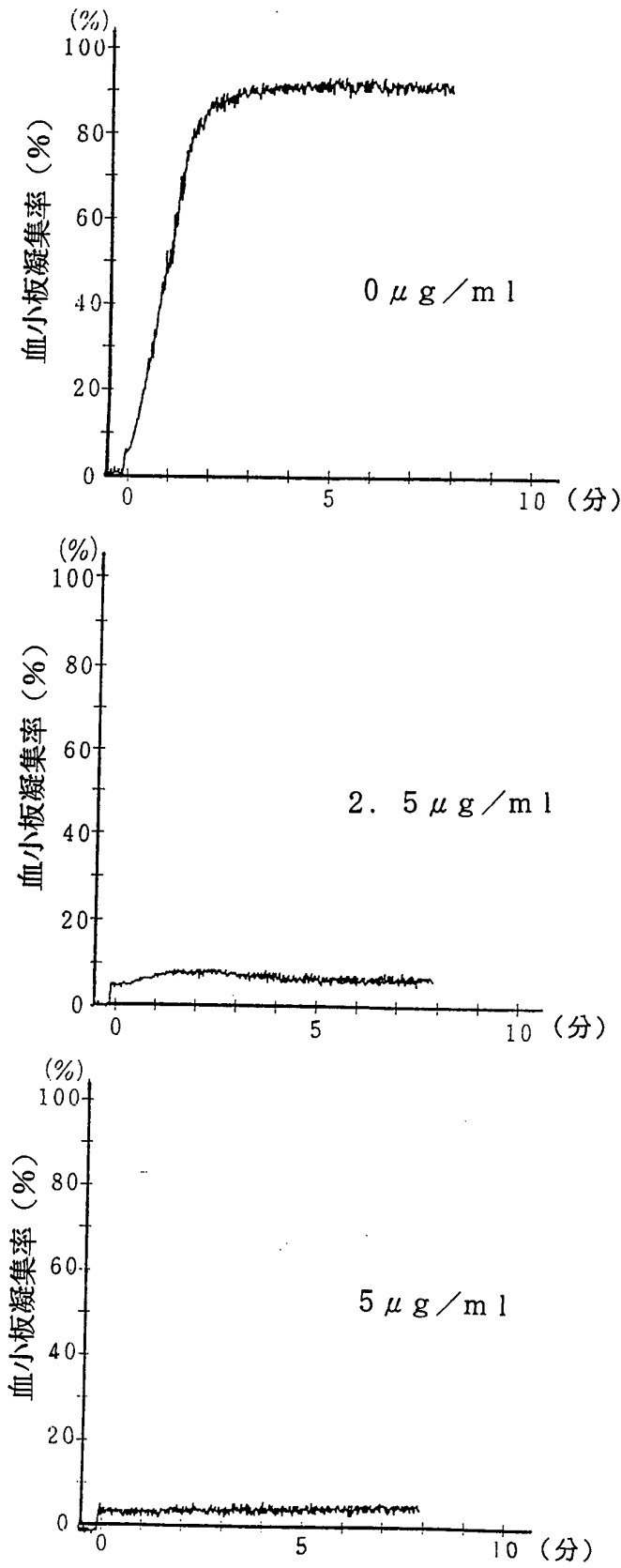


图10

11/12

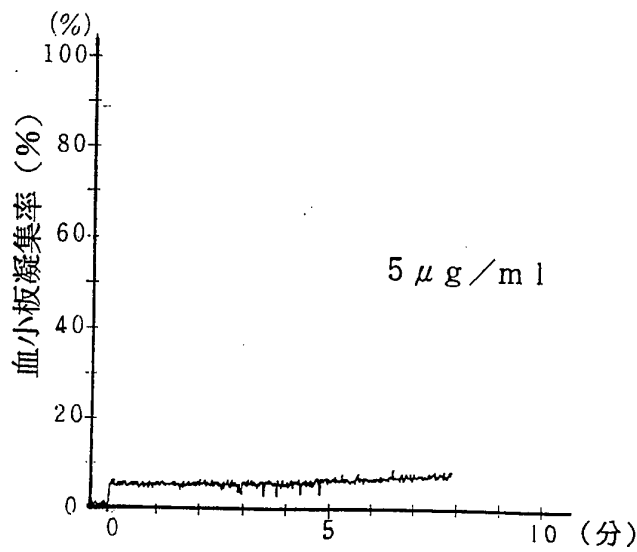
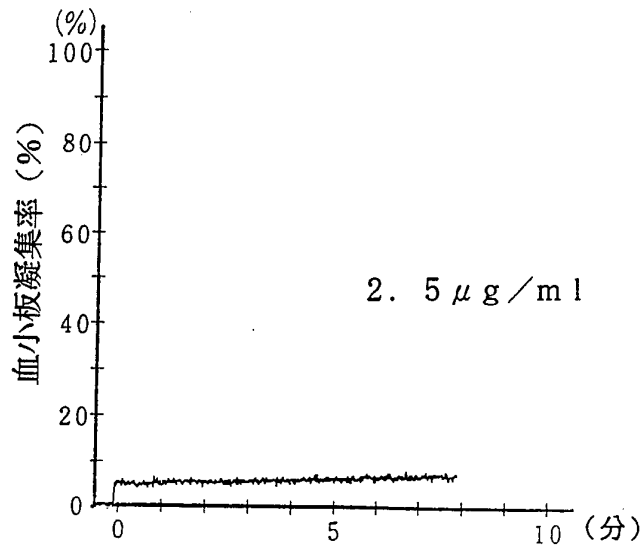
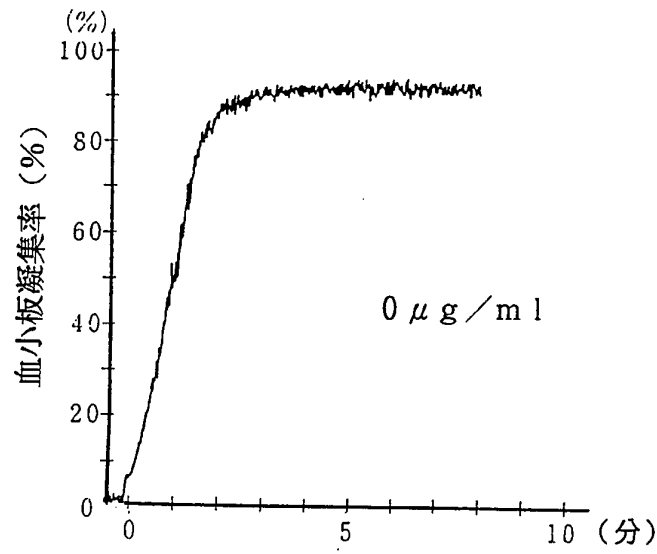


图 11

12/12

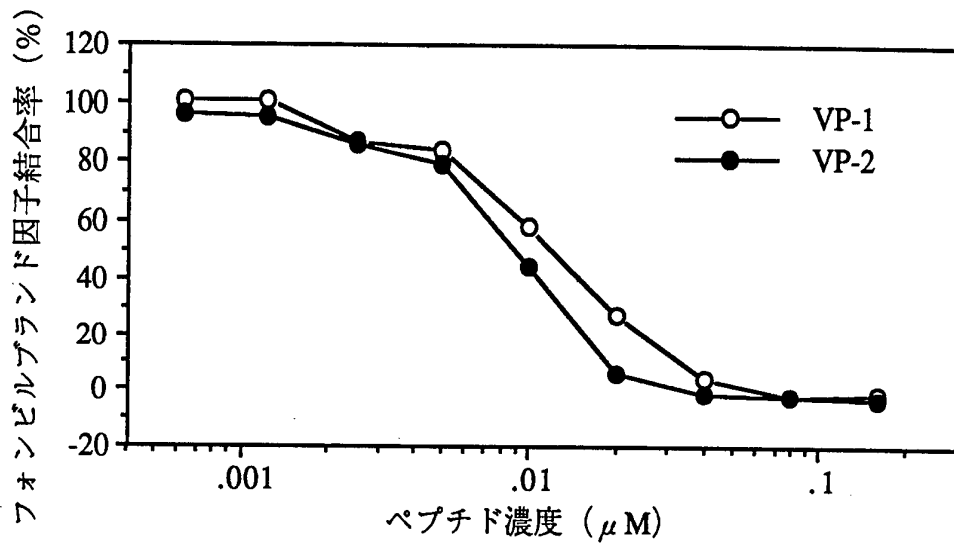


図12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01583

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. C1 ⁶ C07K14/46, A61K38/17 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. C1 ⁵ C07K15/08, 15/12, 13/00, A61K37/02 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) CAS ONLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A1, 9208472 (Cor Therapeutics, Inc.), May 29, 1992 (29. 05. 92) & EP, A1, 557442 & JP, A, 6-504765 & US, A, 5342830	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search December 8, 1994 (08. 12. 94)		Date of mailing of the international search report December 27, 1994 (27. 12. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl⁶ C07K14/46, A61K38/17		
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. Cl⁵ C07K15/08, 15/12, 13/00, A61K37/02		
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		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ONLINE		
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
X	WO, A1, 9208472 (Cor Therapeutics, Inc.), 29. 5月. 1992 (29. 05. 92) &EP, A1, 557442 & JP, A, 6-504765 &US, A, 5342830	1-6
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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」 先行文献ではあるが、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	国際調査報告の発送日	
08. 12. 94	27. 12. 94	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 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) 前田 憲彦	4 H 8 3 1 8
	電話番号 03-3581-1101 内線	3443