(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3584358号
(P3584358)
(45)発行日　平成16年11月4日(2004.11.4)　(24)登録日　平成16年8月13日(2004.8.13)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C07K 17/10	C07K 17/10
A61K 38/55	A61K 47/30
A61K 47/30	A61P 7/02
A61P 7/02	A61K 37/64

請求項の数 28　(全 16 頁)

(21)出願番号　特願平5-30212
(22)出願日　平成5年2月19日(1993.2.19)
(65)公開番号　特開平6-9700
(43)公開日　平成6年1月18日(1994.1.18)
審査請求日　平成12年2月4日(2000.2.4)
(31)優先権主張番号　92 01938
(32)優先日　平成4年2月20日(1992.2.20)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(73)特許権者　397008443
ベーリングヴェルケ　アー．ゲー．
ドイツ国　３５００１　マールブルグ　エミール－フォン－ベーリング　シュトラーセ　７６
(74)代理人　100065215
弁理士　三枝　英二
(74)代理人　100076510
弁理士　掛樋　悠路
(74)代理人　100086427
弁理士　小原　健志
(72)発明者　ライナー　ビショフ
フランス国　６７４００　イルキルシュ－グラファンスタダン　リュ　デ　ショム　３５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ポリエチレングリコール－ヒルジン結合体、その製造法及び血栓症の治療への使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

適当な無水溶媒中ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又はその誘導体を活性化し、活性化されたＰＥＧを回収し、該活性化されたＰＥＧとペプチドをカップリングさせる工程を含むポリエチレングリコール（又は誘導体）－ペプチド（ＰＥＧ－ペプチド）結合体（conjugate）の製造方法であって、該ペプチドがヒルジン又はその変異体の１つであること、および、ＰＥＧをカルボニルジイミダゾールである活性化剤によって活性化させ、活性化されたＰＥＧの回収を疎水性有機溶媒により活性化混合物から沈殿させることによって行うことを特徴とする製造方法。

【請求項２】

該疎水性有機溶媒が、非極性または僅かに極性のある非プロトン性の溶媒から選ばれることを特徴とする請求項１に記載の製造方法。

【請求項３】

該疎水性有機溶媒が、脂肪族エーテル及び炭化水素から選ばれることを特徴とする請求項１又は２に記載の製造方法。

【請求項４】

該疎水性有機溶媒が、エチルエーテル、ペンタン、ヘキサンまたはヘプタンから選ばれるもの、特にエチルエーテルであることを特徴とする請求項１から３のいずれかに記載の製造方法。

【請求項５】

該沈殿物を、次いで、濾過及び凍結乾燥することを特徴とする請求項１から４のいずれかに記載の製造方法。
【請求項６】
該活性化反応が、極性非プロトン性溶媒から選ばれる適当な無水溶媒中で行われることを特徴とする請求項１から５のいずれかに記載の製造方法。
【請求項７】
該無水溶媒が、ジオキサン、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシドまたはテトラヒドロフランから選ばれることを特徴とする請求項１から６のいずれかに記載の製造方法。
【請求項８】
ＰＥＧが、分子量が２，０００～１００，０００であって、ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールのC_1～C_6の脂肪族モノエステルから選ばれることを特徴とする請求項１から７のいずれかに記載の製造方法。
【請求項９】
ＰＥＧが、分子量が２，０００～５０，０００であって、ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールのC_1～C_6の脂肪族モノエステルから選ばれることを特徴とする請求項１から７のいずれかに記載の製造方法。
【請求項１０】
ＰＥＧ１モルに対し、活性化剤が５～５０モル使用されることを特徴とする請求項１から９のいずれかに記載の製造方法。
【請求項１１】
ＰＥＧ１モルに対し、活性化剤が１０～２０モル使用されることを特徴とする請求項１から９のいずれかに記載の製造方法。
【請求項１２】
ポリエチレングリコール（又は誘導体）－ヒルジン（ＰＥＧ－ヒルジン）結合体の製造方法であって：
ａ）適当な無水溶媒中でカルボニルジイミダゾールと反応させることによりポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又はその誘導体を活性化させる工程、
ｂ）活性化されたＰＥＧを、疎水性溶媒を用いて沈殿させることにより、回収する工程、
ｃ）わずかにアルカリ性の媒体中、ヒルジン又はその変異体と活性化されたＰＥＧとを縮合させる工程、及び
ｄ）得られた結合体を精製する工程
の各工程を包含する製造方法。
【請求項１３】
活性化反応が、極性非プロトン性溶媒から選ばれる適当な無水溶媒中で行われることを特徴とする請求項１２に記載の製造方法。
【請求項１４】
該適当な無水溶媒が、ジオキサン、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシドまたはテトラヒドロフランから選ばれることを特徴とする請求項１２又は１３に記載の製造方法。
【請求項１５】
該疎水性有機溶媒が、非極性または僅かに極性のある非プロトン性の溶媒から選ばれることを特徴とする請求項１２から１４のいずれかに記載の製造方法。
【請求項１６】
該疎水性有機溶媒が、脂肪族エーテル及び炭化水素から選ばれることを特徴とする請求項１２から１５のいずれかに記載の製造方法。
【請求項１７】
該疎水性有機溶媒が、エチルエーテル、ペンタン、ヘキサンまたはヘプタンから選ばれるもの、特にエチルエーテルであることを特徴とする請求項１２から１６のいずれかに記載の製造方法。

【請求項１８】
ＰＥＧ１モルに対し、カルボニルジイミダゾールが５～５０モル使用されることを特徴とする請求項１２から１７のいずれかに記載の製造方法。
【請求項１９】
ＰＥＧ１モルに対し、カルボニルジイミダゾールが１０～２０モル使用されることを特徴とする請求項１２から１７のいずれかに記載の製造方法。
【請求項２０】
得られた結合体を、以下の２つの連続する工程：即ち、
－反応していない過剰のＰＥＧを除去する陰イオン交換クロマトグラフィー及び
－残留する遊離ヒルジンから結合体を分離する逆相クロマトグラフィー
により精製することを特徴とする請求項１２から１９のいずれかに記載の製造方法。
【請求項２１】
ＰＥＧが、分子量が２，０００～１００，０００であって、ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールのC_1～C_6の脂肪族モノエステルから選ばれることを特徴とする請求項１２から２０のいずれかに記載の製造方法。
【請求項２２】
ＰＥＧが、分子量が２，０００～５０，０００であって、ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールのC_1～C_6の脂肪族モノエステルから選ばれることを特徴とする請求項１２から２０のいずれかに記載の製造方法。
【請求項２３】
ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又はその誘導体が、ヒルジンに対し、そのペプチドの末端アミン官能基とは異なる、ペプチドの少なくとも１つのアミン官能基に結合している、活性化剤であるカルボニルジイミダゾールによりＰＥＧを活性化させて得られる、ポリエチレングリコール（又は誘導体）－ヒルジン（ＰＥＧ－ヒルジン）結合体。
【請求項２４】
結合体の６０重量％以上が、抗トロンビン活性を有することを特徴とする請求項２３に記載の結合体。
【請求項２５】
ＰＥＧが、分子量が２，０００～１００，０００であって、ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールのC_1～C_6の脂肪族モノエステルから選ばれることを特徴とする請求項２３又は２４に記載の結合体。
【請求項２６】
ＰＥＧが、分子量が２，０００～５０，０００であって、ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールのC_1～C_6の脂肪族モノエステルから選ばれることを特徴とする請求項２３又は２４のいずれかに記載の結合体。
【請求項２７】
請求項１２から２２のいずれかに記載の製造方法によって得られる請求項２３から２６のいずれかに記載の結合体。
【請求項２８】
血栓症の治療のための、医薬物質としての請求項２３から２６のいずれかに記載の結合体。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、ポリエチレングリコール（又は誘導体）－ペプチド結合体（ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）、（以下、「ＰＥＧ－ペプチド」と略す。）、特に、ポリエチレングリコール（又は誘導体）－ヒルジン（ｈｉｒｕｄｉｎ）（ＰＥＧ－ヒルジン）結合体の製造方法に関する。
【０００２】
【従来の技術】

ポリエチレングリコールの様な化合物及びその誘導体（以下ＰＥＧと略す。）又はデキストランは、ヒトにおいて免疫原性がないことが知られており，薬物学的使用を目的とする蛋白質と合わせて使用することが、インビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ　）でこれら蛋白質の半減期を延長するために提案されている。

【０００３】

即ち、ペプチド、例えばヒルジンは、６５～６６アミノ酸を含有するペプチドの混合物の形態で医用ヒルの唾液腺にその主な供給源があり、非常に特異的且つ効果的なトロンビン阻害特性が知られているが、血流から直ぐに除去されてしまう。その半減期は、約１時間である。それゆえ、ヒルジンのインビボでの半減期を延ばすことは、特に血栓症の予防に使用するために有効である。

【０００４】

インビボにおける半減期を延ばすために、デキストラン－ヒルジン結合体が、ピー．クローズ（Ｐ．Ｃｒａｕｓｅ）によって作られた（ＥＰ－Ａ－０，３４５，６１６）。ラットにおいて、デキストラン－ヒルジンの半減期は、遊離のヒルジンの半減期に比べ、インビボで増加したが、デキストランとヒルジンとを結合する方法の収率が非常に低く、結合したヒルジンの活性の７０％以上が失なわれるのが観察される。

【０００５】

ＰＥＧ－ペプチド結合も知られており、また共有結合によって一般的に得られる。

【０００６】

ペプチドとＰＥＧのカップリングの方法はＰＥＧの活性化とペプチドと活性化したＰＥＧのペプチドとのカップリングという主たる２つのステップを包含する。

【０００７】

最初の活性化ステップが、一般に得られる結合体の最終収率を限定する。

【０００８】

確かに、従来の方法によって、活性化したＰＥＧを精製し回収するステップを必要とするＰＥＧ活性化方法が提案されているが、これは、収率が低い。

【０００９】

確かに、ベアウチャンプら（Ｂｅａｕｃｈａｍｐ　ｅｔ　ａｌ．）（アナリティカルバイオケミストリー（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）　１９８３，１３１，２５－３３）は、水に対する広範　（ｅｘｔｅｎｓｉｖｅ　）な透析と凍結乾燥によって活性化ＰＥＧを精製するステップを含む、ジオキサン中でカルボニルジイミダゾールとの反応によってＰＥＧを活性化する方法を開示している。

【００１０】

広範なので、この透析は工業的スケールに適用する場合に問題がある。更に、活性化したＰＥＧは、水溶液媒体中で不活性化され、それによって透析ステップによる活性化反応の収率を下げることになる。

【００１１】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、簡単で直ぐに使用でき工業的スケールに適用できるＰＥＧ－ペプチド結合体を製造する方法を提供することを目的とする。本発明は、更に、ヒルジンの少なくとも８０％がＰＥＧと結合し、得られる結合体が出発物質のヒルジンに比べて１００％近く活性を保持しているようなＰＥＧ－ヒルジン結合体を製造する方法を提供することを目的とする。

【００１２】

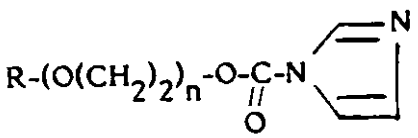
【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、以下のような方法を見出して本発明を完成した。

【００１３】

即ち、本発明の方法は、適当な無水溶媒中でＰＥＧを活性化し、ＰＥＧを回収する公知のステップ及びペプチドとの反応を含む。

【００１４】
ＰＥＧ、即ち、ポリエチレングリコール及びその誘導体は、主にポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールのＣ$_1$～Ｃ$_6$の低級脂肪族モノエーテル、ポリエチレングリコールの芳香族モノエーテルまたはモノエステル並びに単量体単位に関して総数のエチレングリコール単位の少なくとも９０％を含有するポリグリコール化（ｐｏｌｙｇｌｙｃｏｌａｔｅｄ）された誘導体を意味すると理解されるものである。
【００１５】
驚くべきことに、カルボニルジイミダゾール、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド及び２，３，５－トリクロロホルメート（２，３，５－ｔｒｉｃｈｌｏｒｏｆｏｒｍａｔｅ）から選ばれる試薬で活性化することによって活性化されたＰＥＧは、疎水性有機溶媒によって活性混合物から沈殿によって簡単に精製され、続くペプチドとの縮合ステップにおいても活性を維持することが見出された。
【００１６】
疎水性有機溶媒としては、例えば、脂肪族エーテル又は炭化水素を含む、非極性または僅かに極性のある非プロトン性の溶媒から選ばれる。
【００１７】
この疎水性有機溶媒として、エチルエーテル、ペンタン、ヘキサンまたはヘプタンから選択されるものが有利であり、特にエチルエーテルが好ましい。
【００１８】
活性化したＰＥＧは、濾過によって回収され凍結乾燥される。
【００１９】
ＰＥＧ活性化反応は、適当な無水溶媒中、好ましくは極性非プロトン性の溶媒中で行われるのが良い。
【００２０】
適当な無水溶媒としては、一般に、ジオキサン、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシドまたはテトラヒドロフランから選ばれる。
【００２１】
好ましくは、ＰＥＧは、活性化剤としてカルボニルジイミダゾールによって活性化される。
【００２２】
ＰＥＧの活性化において、ＰＥＧ１モルに対し、活性化剤は５～５０モル、好ましくは１０～２０モル使用される。
【００２３】
本発明の方法に使用されるＰＥＧは、分子量が２，０００～１００，０００、好ましくは２，０００～５０，０００が良く、ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールのＣ$_1$～Ｃ$_6$の低級脂肪族モノエステルから選ばれる。
【００２４】
従って、カルボニルジイミダゾールとの反応によって得られる活性化されたＰＥＧは、以下の一般式Ｉ：
【００２５】
【化１】



(I)

【００２６】
〔式中、Ｒは、水素原子、Ｃ$_1$～Ｃ$_6$のアルキル基又はカルボニルイミダゾール基、ｎは、約４５～２，４００を示す。〕

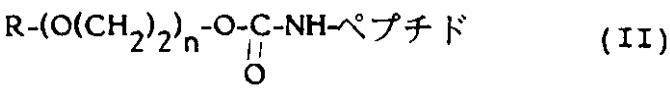
で表される。ペプチドとのカップリングは、ペプチドの遊離のアミノ官能基によりイミダゾール環を置換することによって僅かにアルカリ性で行われる。

【００２７】

このようにして得られる結合体は、以下の一般式ＩＩ：

【００２８】

【化２】



(II)

【００２９】

〔式中Ｒおよびｎは、上記に同じ。〕

で表される。

【００３０】

特に有利な方法として、本発明の方法は、ＰＥＧ－ヒルジン結合体の製造に使用される。

【００３１】

ヒルジンは、医用ヒルの唾液腺から抽出される天然のヒルジン、その天然変異体（ｖａｒｉａｎｔｓ、そのいくつかはＨＶ１、ＨＶ２及びＨＶ３と称されている）、並びに遺伝子工学によって産生され、抗トロンビン活性を有する変異体及びアナログ（ａｎａｌｏｇｓ）を意味すると理解される。

【００３２】

遺伝子工学によるこれらペプチドの製造は、特に、特許出願ＥＰ－Ａ－０，１５８，５６４、ＥＰ－Ａ－０，２００，６５５、ＥＰ－Ａ－０，２７３，８００及びＥＰ－Ａ－０，３３２，５２９中に記載されている。

【００３３】

ヒルジンは、ペプチド配列中に数個のリジン基を有している。活性化されたＰＥＧは、それゆえ、ランダムな方法でペプチドのＮ－末端官能基またはいずれかの異なるリジン基のアミン官能基に結合し得る。

【００３４】

しかし、予想外にも、活性化されたＰＥＧは、ヒルジンのＮ－末端アミンに結合しておらず、それによってペプチド単独の抗トロンビン活性に近い活性を有する結合体を得ることができる。

【００３５】

その結果、本発明は、また、ＰＥＧ－ヒルジン結合体の製造方法にも係り、この方法は：

ａ）適当な無水溶媒中でのカルボニルジイミダゾールとの反応によるＰＥＧの活性化、

ｂ）疎水性溶媒を用いての沈殿による活性化されたＰＥＧの回収、

ｃ）わずかにアルカリ性の媒体中、ヒルジン又はその変異体と活性化されたＰＥＧとの縮合及び

ｄ）得られた結合体の精製

の各工程を包含する。

【００３６】

活性化されたＰＥＧの製造及びペプチドとの縮合の工程ａ）、ｂ）及びｃ）は、上記に記載した条件に従って行われる。

【００３７】

ＰＥＧ－ヒルジン結合体の精製のステップｄ）は、一般に以下の２ステップのクロマトグラフィーによって行われる：

ｄ１）反応していない過剰のＰＥＧを除去する陰イオン交換クロマトグラフィー及びそれに続く

ｄ２）残留する遊離ヒルジンから結合体を分離する逆相クロマトグラフィー。
【００３８】
ｄ１）で用いられる陰イオン交換樹脂は、Ｄ－セファロース又はＱ－セファロースが有利であり、ｄ２）で行われる逆相（ｒｅｖｅｒｓｅｄ　ｐｈａｓｅ）は、ＲＰ３００又はＲＰ８相が有利である。
【００３９】
抗トロンビン活性を有して得られる結合したヒルジンの収率は、６０％以上である。
【００４０】
有利に、本発明の方法は、ヒルジン変異体ＨＶ２－Ｌｙｓ４７に使用される。
【００４１】
最後に、本発明は、上記に記載した方法によって得られるＰＥＧ－ヒルジン結合体及び血栓症の治療における治療薬としてのそれらの使用にも係る。
【００４２】
以下の実施例は、添付図面を参照して、活性化されたＰＥＧの製造、ＰＥＧ－ヒルジン結合体の製造及び得られた結合体の抗トロンビン活性について、本発明を例示することを目的としている。
【００４３】
【実施例】
実施例１　活性化されたＰＥＧモノメチルエーテル（５，０００）（ＭＰＥＧ５，０００）の製造
ＭＰＥＧ５，０００を活性化する反応は、すべて、無水媒体中で行う。それゆえ、まず、反応媒体の構成物中に存在するわずかな水も除去する。ＭＰＥＧ５，０００（メルク（Ｍｅｒｃｋ）　）及びＮ，Ｎ´－カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）（アルドリッチ（Ａｌｄｒｉｃｈ）　）の貯蔵は、水を捕獲するためにシリカゲルを含むデシケーター中で行う。５Ａのモレキュラーシーブ（プロラボ（Ｐｒｏｌａｂｏ）　）を、４００℃に加熱したオーブン中で乾燥させ、、その後温度を５０℃に下げた後、該モレキュラーシーブを５００ｍｌのジオキサン（ＳＤＳ）に加え、溶媒中に存在する水を捕獲する。
【００４４】
２５ｇ（約４ｍｍｏｌ）のＭＰＥＧを、８．１ｇ（約５０ｍｍｏｌ）のＣＤＩに加え、混合物を少なくとも２時間凍結乾燥する。乾燥した粉末を、５０ｍｌのジオキサンに加え、ＭＰＥＧ５，０００をＣＤＩで活性化させる反応を、撹拌しながら３７℃で２時間行う。ＭＰＥＧ５，０００分子は、たった１つの遊離のヒドロキシ基を有しているので、可能な活性化部位を１か所のみ有していることになる。
【００４５】
活性化されたＭＰＥＧ５，０００の回収は、エーテルを用いて沈殿させることによって行う。反応媒体中の温度が２０℃又はそれ以下になった時点で、２容量のエーテルを撹拌しながら加えると、ＭＰＥＧ５，０００は即座に沈殿するが、過剰のＣＤＩ及び反応中に遊離したイミダゾールは、溶液中に存在する。該溶液をワットマン（Ｗｈａｔｍａｎｎ）４４フィルターで濾過し、フィルターをエーテルで洗浄した後、凍結乾燥した活性化されたＭＰＥＧ５，０００の沈殿物を、５０ｍｌのジオキサン中に入れ、上述したようにエーテルで再沈殿させる。濾過後、活性化されたＭＰＥＧを、終夜凍結乾燥し、水分から防御するために、シリカゲルを含むデシケーター中で保存する。
【００４６】
実施例２　活性化されたＰＥＧ５０，０００の製造
ＰＥＧ５０，０００を活性化する反応は、すべて、無水媒体中で行う。全ての痕跡量の水を除去するために、ＰＥＧ５０，０００、ＣＤＩ及びジオキサンを、実施例１に記載したように処理する。
【００４７】
１９．２ｇ（約３８４μｍｏｌ）のＰＥＧ５０，０００を、１ｇ（約６ｍｍｏｌ）のＣＤＩに加え、混合物を少なくとも２時間凍結乾燥する。乾燥した粉末を、５０ｍｌのジオキ

サンに加え、ＰＥＧ５０，０００をＣＤＩで活性化させる反応を、攪拌しながら６０℃で１５時間行う。ＰＥＧ５０，０００の分子は、２つの遊離のヒドロキシ基を有している：それゆえ、ＰＥＧ５０，０００の１分子につき２つの可能な活性化部位がある。

【００４８】

活性化されたＰＥＧ５０，０００を、実施例１に記載したようにエーテルで沈殿させることによって回収する。１８．６ｇの活性化されたＰＥＧ５０，０００が回収される。

【００４９】

実施例３　ヒルジン－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７と活性化されたＭＰＥＧ（５，０００）とのカップリング

Ａ．ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７とＭＰＥＧ５，０００との結合（Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）

３ｇ（約０．５ｍｍｏｌ）の実施例１の活性化されたＭＰＥＧ５，０００と、１５ｍｇ（約２μｍｏｌ）のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を、１００ｍＭ　ホウ酸塩バッファー（ｂｏｒａｔｅ　ｂｕｆｆｅｒ）（ｐＨ８．４）２５ｍｌ中で混合する。反応媒体を攪拌しながら４℃で１２時間放置する。活性化されたＭＰＥＧ５，０００は、水と接触すると急速に活性を失うので、３ｇの活性化したＭＰＥＧ５，０００を、１２時間毎に順次反応媒体に４回加える。４度目の活性化されたＭＰＥＧ５，０００の添加の後、反応媒体を再度４℃で４８時間放置する。

【００５０】

Ｂ．ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７結合体の精製

ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７結合体の精製を以下の２段階で行なう：即ち、

ｉ）　陰イオン交換クロマトグラフィーによって、ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７及びｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７をカラムに吸着させ、遊離の保持されていない過剰のＭＰＥＧを除去する。

【００５１】

ｉｉ）　逆相カラムクロマトグラフィーによって、残存するｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を、ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７から分離する。

【００５２】

１．Ｑ－セファロースでの陰イオン交換クロマトグラフィー

直径１４ｍｍのバイオラッドカラム（Ｂｉｏｒａｄ　ｃｏｌｕｍｎ）に１０ｍｌの相（ｐｈａｓｅ）を注ぎ入れ、５０ｍｌの平衡化バッファー：１０ｍＭ　ホウ酸塩（ｂｏｒａｔｅ）で、流速１ｍｌ／分で平衡化する。全クロマトグラフィーを流速１ｍｌ／分で行う。Ａで得られたＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含有する反応媒体を、水で１０倍に希釈し、１０ｍＭホウ酸塩を含有する溶液とする。約２５０ｍｌの試料を得、これをＱ－セファロースカラムにかける。カラムを５０ｍｌの平衡化バッファーで洗浄し、溶出を１０ｍｌの１０ｍＭホウ酸塩バッファー（ｐＨ８．５）、１Ｍ　ＮａＣｌを用いて行い、カラムを平衡化バッファーで再度平衡化する。遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７及びＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含む２０ｍｌの試料が回収される。これは、溶出１０ｍｌとカラムの再平衡化の１０ｍｌとを合わせたものに相当する。

【００５３】

２．逆相ＲＰ３００でのクロマトグラフィー

全クロマトグラフィーを流速１ｍｌ／分で行う。アクアポアー（Ａｑｕａｐｏｒｅ）ＲＰ３００カラム（直径９５ｍｍ、長さ２５０ｍｍ（アプライドバイオシステムズ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）社））及びヒューレットパッカード社（Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ）ＨＰ１０９０ＨＰＬＣを使用する。

【００５４】

遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７及びＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含む１で得られた試料のｐＨを、１０ｍＭ　ＴＦＡ平衡化バッファー水溶液でｐＨ２に低下させる。これにより、最終容量が３５ｍｌになる。５ｍｌの試料を、ＲＰ３００カラムにインジェクトし、カラムを平衡化バッファーで洗浄することにより、試料中の塩を除去する。次

いで、溶出を１０ｍＭ　ＴＦＡを含有する０から１００％のアセトニトリルの４０分グラジエントで行い、その後カラムを１０～２０ｍｌの平衡化バッファーで洗浄する。蛋白質の溶出は、ＯＤを２１５ｎｍで測定することによってモニタリングする。操作は、７回行い、こうして３５ｍｌの試料をクロマトグラフィーにかける。クロマトグラムを、図１に示す。２つの画分が回収される：即ち、
－画分１は、リテンション時間が１５分であり、遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含有するピークに相当する。

【００５５】
－画分２は、リテンション時間が１９～２２分であり、ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含有するピークに相当する。

【００５６】
ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７（画分１）及びＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の溶出ピークの比較から、９５％以上のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７がＭＰＥＧ５，０００と結合していることが判る。

【００５７】
７回のクロマトグラフィーで得られる遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含有する７つの画分１を混合し、終夜凍結乾燥し、ＰＢＳバッファー中に入れる（表参照）。この操作を、ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含む７つの画分２についても同様に行う。

【００５８】
得られた結合体のＮ末端配列は、通常の方法で決定でき、その結果、活性化されたＭＰＥＧ５，０００は、ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の末端のアミン官能基に結合していないことを確認する。

【００５９】
実施例４　ヒルジン　ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７と活性化されたＰＥＧ５０，０００とのカップリング
Ａ．ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７とＰＥＧ５０，０００との結合
２ｇ（約４０μｍｏｌ）の実施例２の活性化されたＰＥＧ５０，０００と、２ｍｇ（約２８０ｎｍｏｌ）のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を、１００ｍＭ　ホウ酸塩バッファー（ｐＨ８．４）５ｍｌ中で混合する。反応媒体を攪拌しながら４℃で２４時間放置する。活性化されたＰＥＧ５０，０００は、水と接触すると急速に活性を失うので、１００ｍＭ　ホウ酸塩バッファー５ｍｌ中に含まれる２ｇの活性化したＰＥＧ５０，０００を、２４時間毎に順次反応媒体に４回加える。３６ｍｌのＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の溶液が回収される。

【００６０】
Ｂ．ＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７結合体の精製
ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の場合と同様に、ＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７結合体の精製を以下の２段階で行う：即ち、
ｉ）　陰イオン交換クロマトグラフィー、及び
ｉｉ）　逆相カラムクロマトグラフィー。

【００６１】
１．Ｑ－セファロースでの陰イオン交換クロマトグラフィー
直径１４ｍｍのバイオラッドカラムに１０ｍｌの相を注ぎ入れ、５０ｍｌの平衡化バッファー：１０ｍＭ　ホウ酸塩（ｐＨ８．５）で、流速１ｍｌ／分で平衡化する。全クロマトグラフィーを流速１ｍｌ／分で行う。Ａで得られるＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含有する反応媒体を、水で１０倍に希釈し、１０ｍＭホウ酸塩を含有する溶液とする。約３６０ｍｌの試料を得、これを３回にわけてＱ－セファロースカラムでのクロマトグラフィーにかける。１２０ｍｌの試料をＱ－セファロースカラムにかけ、カラムを５０ｍｌの平衡化バッファーで洗浄し、溶出を１０ｍｌの１０ｍＭホウ酸塩バッファー（ｐＨ８．５）、１Ｍ　ＮａＣｌで行い、カラムを平衡化バッファーで再度平衡化する。遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７及びＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含む４０ｍｌ

の試料が回収される。これは、溶出１０ｍｌとカラムの再平衡化の最初の３０ｍｌの和に相当する。

【００６２】

２．逆相リクロスフェアー（Ｌｉｃｈｒｏｓｐｈｅｒｅ）ＲＰ８でのクロマトグラフィー

全クロマトグラフィーを流速１ｍｌ／分で行う。５μリクロスフェアーＲＰ８カラム（直径４ｍｍ、長さ１２５ｍｍ（ヒューレットパッカード社））及びヒューレットパッカード社ＨＰ１０９０ＨＰＬＣを使用する。

【００６３】

遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７及びＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含む１で得られた試料のｐＨを、純粋なＴＦＡ２００μｌでｐＨ１．５に低下させる。カラムを１０ｍＭ　ＴＦＡ平衡化バッファー水溶液で平衡化する。２０ｍｌの試料を、ＲＰ８カラムにインジェクトし、カラムを平衡化バッファーで洗浄することにより、試料中の塩を除去する。溶出は、１０ｍＭ　ＴＦＡを含有する０から１００％のアセトニトリルの４０分グラジエントで行い、その後カラムを１０～２０ｍｌの平衡化バッファーで洗浄する。蛋白質の溶出は、ＯＤを２１５ｎｍで測定することによってモニタリングする。操作は、２回行い、こうして４０ｍｌの試料をクロマトグラフィーにかける。クロマトグラムを、図２に示す。２つの画分が回収される：即ち、

－画分１は、リテンション時間が１５分であり、遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含有するピークに相当する。

【００６４】

－画分２は、リテンション時間が２０～３０分であり、ＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含有するピークに相当する。

【００６５】

ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７（画分１）及びＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７（画分２）の溶出ピークの比較から、７０％以上のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７がＰＥＧ５０，０００と結合していることが判る。

【００６６】

２回のクロマトグラフィーで得られる遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含有する７つの画分１を混合し、終夜凍結乾燥し、ＰＢＳバッファー中に入れる。この操作を、ＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を含む２つの画分２についても同様に行う。

【００６７】

実施例５　得られた結合体の定量と活性

実施例３及び４で得られた結合体の定量を３種の異なる方法：

－逆相分析クロマトグラフィー（分析ＨＰＬＣ）、

－抗トロンビン活性試験及び

－アミノ酸分析

によって行った。

【００６８】

ａ）分析クロマトグラフィー

５μリクロスフェアーＲＰ８カラム（直径４ｍｍ、長さ１２５ｍｍ（ヒューレットパッカード社））及びヒューレットパッカード社ＨＰ１０９０ＨＰＬＣを使用する。流速は、全クロマトグラフィーの間１ｍｌ／分である。

【００６９】

ＲＰ８リクロスフェアーカラムを、平衡化バッファー：３０％アセトニトリル、１０ｍＭ　ＴＦＡ及び７０％水で平衡化する。５００μｌのＰＢＳに含有されている約２５μｇのＰＥＧ－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７をカラムにインジェクトし、平衡化バッファーでカラムを洗浄後、溶出を１０ｍＭ　ＴＦＡを含む３０から６５％アセトニトリル／水の４０分グラジエントで行い、その後カラムを平衡化バッファーで再度平衡化する。蛋白質の溶出は、蛋白質に特徴的なＯＤ２１５ｎｍを測定することによってモニタリングする。クロマトグラムに存在する溶出ピークの面積は、カラムにインジェクトした蛋白質の量に比例する。

上述の様な条件下でｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の既知量をクロマトグラフィーすることにより、溶出ピークとインジェクトされたｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の量とを相関させることができる。

【００７０】

ｂ）抗トロンビン活性

ヒルジンの活性を、トロンビン抑制試験によってアッセイする。この試験に使用する基質は、トロンビンによって切断され、４１０ｎｍで吸光を示す発色基　（Ｃｈｒｏｍｏｐｈｏｒｅ　）を遊離するクロモザイムＰＬ（Ｃｈｒｏｍｏｚｙｍ　ＰＬ）（トシル－グリシル－プロリル－リシン－４－ニトラニリドアセテート）である。

【００７１】

発色基の形成速度は、反応媒体中に存在する活性トロンビンの量に依存する。ヒルジンの存在下、トロンビンは抑制され、発色基の形成速度は、遅くなる。

【００７２】

活性試験に使用した物質

－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７：２．５ｍｇ／ｍｌ、氷上に保存

－トロンビン：カイネティックスバッファー中３．３μｇ／ｍｌ（ＩＵ／ｍｌ）、氷上に保存

－クロモザイムＰＬ（ベーリンガー）：６．６６ｍｇ／ｍｌ、室温で保存

－カイネティックスバッファー：５０ｍＭ　トリス－塩酸
０．１Ｍ　ＮａＣｌ
０．１％　ＰＥＧ　６，０００
ｐＨ　７．９
３７℃にサーモスタットで調整する。

【００７３】

反応は、水浴を用いて、３７℃にサーモスタットで調整したスペクトロフォトメーター中４１０ｎｍでモニターする。０～１００μｌのヒルジンを１ｍｌのプラスティックスペクトロメーターキュベット中でカイネティックスバッファー中５０μｌトロンビンと混合し、最終容量９８０μｌとする。キュベットをあらかじめ３７℃で３分間プレインキュベートし、ヒルジンをトロンビンに結合させる。２０μｌのクロモザイムを各キュベットに加え攪拌後、ＯＤを毎分３分間４１０ｎｍで測定する。結果はＯＤ／分で得られる。

【００７４】

ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の比活性（ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　）は公知であり（１５，０００ＡＴＵ／ｍｇ）、結合体の活性をアッセイすることにより、結合体の量が判る。

【００７５】

Ｃ）アミノ酸の分析

アミノ酸分析を、従来公知の方法によって行う。結合体を６Ｎ　ＨＣｌ蒸気で加水分解し、アミノ酸を５％ｎ－ヘプタン中２５４ｎｍで吸光するフェニルイソシアネート（ＰＩＴＣ）と結合させる。アミノ酸結合体をC_{18}逆相カラムにインジェクトし、種々の結合体を分離できるグラジエントを用いて溶出する。ＰＩＴＣとアミノ酸との結合及びクロマトグラフィーは、アプライドバイオシステムズ社　１３０Ａ　アミノ酸アナライザーを用いた。逆相カラムでのリテンション時間は、各アミノ酸結合体に特異的である。アミノ酸結合体の標準溶液によって、これらのリテンション時間を決定することができ、またｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の結合体の加水分解物中に存在するアミノ酸の量を決定することができる。ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７のアミノ酸構成は知られているので、このように分析したｒＨＶ

２－Ｌｙｓ４７の正確な量を決定することができる。

【００７６】

実施例３及び４の結合体について得られた結果を以下の表１に示す。

【００７７】

【表１】

表1

		定量（μｇ）		
実施例	容量（ｍｌ）	分析 HPLC	活性試験	アミノ酸 分析
3	17	8200	8000	9194
4	1．7	1688	1070	1208．8

【００７８】

これら２種の実施例において、活性試験は、分析ＨＰＬＣ又はアミノ酸分析によって得られる定量結果と同様の結果を与えるという事実により、明らかに、得られたＰＥＧ－ヒルジン結合体のほぼ１００％が活性を有する（実施例３では、８５から９８％、実施例４では、６３から８８％）ことが判る。

【００７９】

実施例６　ヒルジン　ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７並びにＭＰＥＧ５０，０００及びＰＥＧ５０，０００との結合体２種の阻害定数の測定

阻害定数の分析を、アール．エス．ストーン及びジェイ．ホフスティーンジ　（Ｒ．Ｓ．Ｓｔｏｎｅ　ａｎｄ　Ｊ．Ｈｏｆｓｔｅｅｎｇｅ、バイオケミストリー（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）、１９８６，２５，４６２８及びバイオケミストリー（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）、１９９１，４　，２９５－３００　）に記載の方法に従って行う。

【００８０】

ヒルジンは競合型の機構に従ってトロンビンを阻害する。阻害定数はそれゆえ以下のようにして計算できる。

【００８１】

$K_i = K_i' / (1 + S / K_M)$

K_i＝阻害定数

K_i'＝見掛けの阻害定数

K_M＝３．６３μＭ＝ミハエリス定数

Ｓ＝基質濃度

K_i'及びＳが測定できる。

【００８２】

結果を以下の表２に示す。

【００８３】

【表２】

表2

阻害物質	K_i'（pM）	K_i（pM）
rHV2-Lys47	29.30 1.77	1.03
MPEG5,000-rHV2-Lys47	28.78 1.43	1
PEG50,000-rHV2-Lys47	34.12 1.04	1.19

【００８４】
ＭＰＥＧ５，０００又はＰＥＧ５０，０００の結合は、ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７－トロンビン複合体における阻害定数に影響を及ぼさない。これらの結果により、ＰＥＧ－ヒルジン結合体は、遊離のヒルジンと同様の効果のあるトロンビン阻害物質であることが判る。
【００８５】
実施例７　インビボにおける薬物速度論的試験
遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７及びＰＥＧ－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７のラット血漿における半減期を測定するために、以下の２種の実験を行った：
－短期間の試験：ラットに麻酔がきいている最大５～６時間のみ続ける。
【００８６】
－長期間の試験：４８時間続け、ラットは試験の期間中意識がある。
【００８７】
実験において、３００ｇのスプラークドーレー種（Ｓｐｒａｑｕｅ　Ｄａｗｌｅｙ　ｓｔｒａｉｎ　）のラットを使用する。実験開始前５日間、ラットをそれぞれのケージに分け、１３時間の昼－夜周期に順応させ、水と食物を自由摂取させる。
【００８８】
血液試料を、血液４容量に対して１容量となるように３．２％クエン酸ナトリウム溶液をあらかじめ入れたプラスティックチューブに集める。
【００８９】
血漿を、採血から１０分以内に、室温で５分間４，０００ｇで遠心することにより調製する。血漿試料を－８０℃で保存する。使用した結合体は、短期間の試験においてはＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７、長期間の試験においてはＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７及びＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を使用する。
【００９０】
ａ）短期間の試験
各試験を２匹のラットで並行して行う。実験の日にラットにペントバルビタールナトリウム塩（５０ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内投与して麻酔をする。カテーテルを右の頸静脈に入れ、遊離形態（コントロール）又は結合した形態のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７　５００μｇを投与する。第２のカテーテルを、左の頸動脈に入れ、血液試料を集める。
【００９１】
血液試料は、ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７又はＰＥＧ－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７注射前（t_0）並びに注射後５分、１０分、２０分、１時間、２時間、４時間、５時間及び６時間後に集める。
【００９２】
ｂ）長期間の試験
各試験を２匹のラットで並行して行う。実験の日に、ラットの尾の血管に、遊離形態（コントロール）又は結合した形態のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を５００μｇ投与する。血液試料は、ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７又はＰＥＧ－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７注射前（t_0）並びに注射後５分、８時間及び２４時間後に尾の血管からエーテルでの緩やかな麻酔下で集める。こ

れら期間を除き、ラットは実験中全て意識がある。

【００９３】

ｃ）血漿試料の分析

短期間の試験において、遊離形態（コントロール）又は結合した形態のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の量を、ＥＬＩＳＡ試験及び活性試験によって決定する。キャリブレーション系列は、集められた試料と同じ様な条件にするために、t_0に集められた血漿で希釈したｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７又はＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の適切に定量された溶液で調製する。血漿試料は、カイネティックスバッファーで希釈され、ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の濃度が、キャリブレーションの範囲に入るようにする。長期間の試験においては、遊離または（ＭＰＥＧ５，０００及びＰＥＧ５０，０００と）結合したｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の量を、抗トロンビン活性試験によって決定する。これらの分析の結果は、短期間の試験については図３に、長期間の試験については図４に示す。ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７のＣ－末端の脱離（ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ ）が、血漿中で起こり、それにより、ＥＬＩＳＡ試験及び活性試験により得られる定量結果の差が説明される。事実、ＥＬＩＳＡ試験に用いた２種の抗体の１つは、ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７のＣ－末端部分を認識するので、活性が残っている脱離された分子を認識しなくなる。

【００９４】

しかしながら、ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を遊離の形態又はＭＰＥＧ５，０００と結合した形態で、同量をラットに注射した場合、ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の血漿濃度は、遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の場合に比べ、７～８倍高い。従って同一レベルの阻害を得るには、遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７よりも７～８倍少ない量のＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を注射すればよい。

【００９５】

図４に示した薬物速度論的結果により、ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の半減期は、ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７のそれと比較して増大していることが判る。一方、ＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の半減期は、上記２種のそれよりも、実質的に大きい。確かに、注射３時間後、注射前の最初に測定した活性と比較して、ＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７結合体で処置したラットで、５０％以上の抗トロンビン活性が、ＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７結合体で処置したラットで３０％の抗トロンビン活性が観察される。１０％未満の抗トロンビン活性が、遊離の形態のヒルジンをラットに注射した後８時間で測定される。

【００９６】

本発明によって製造されるＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の生産コストは、遊離のｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の生産コストに比べ、僅かに増加するだけなので、薬物学的にＭＰＥＧ５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を使用することは、ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７を使用するよりも、実質的にコストが減少できることになる。

【図面の簡単な説明】

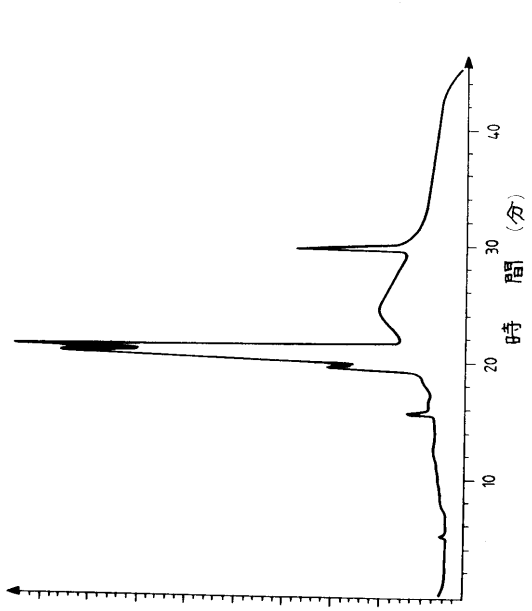
【図１】ＲＰ３００カラムでのＰＥＧモノエチルエーテル５，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７（ＭＰＥＧ－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７）のクロマトグラフィー後に得られるクロマトグラムを示す。蛋白質の溶出は、光学密度（ＯＤ）を２１５ｎｍで測定することにより経時的にモニターする。

【図２】リクロスフェアー（Ｌｉｃｈｒｏｓｐｈｅｒｅ）ＲＰ８カラムでのＰＥＧ５０，０００－ｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７のクロマトグラフィー後に得られるクロマトグラムを示す。蛋白質の溶出は、光学密度（ＯＤ）を２８０ｎｍで測定することにより経時的にモニターする。

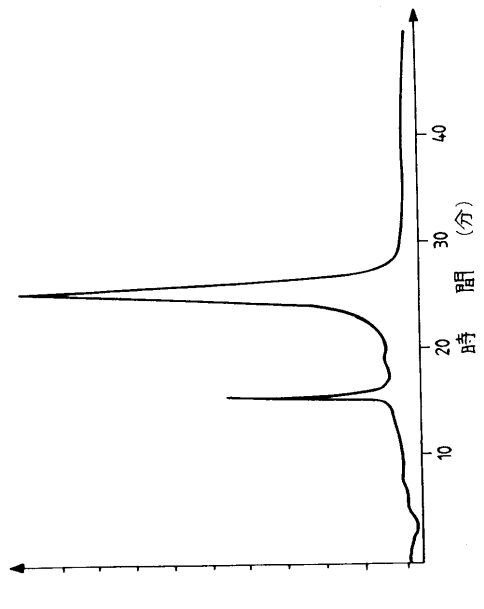
【図３】実施例７ｃに記載される短期間の試験の間の時間を横軸にとり、縦軸に遊離又は結合したｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７の血漿中の濃度を示すグラフである。

【図４】実施例７ｃで記載される長期間の試験の間の時間を横軸にとり、縦軸に遊離又は結合したｒＨＶ２－Ｌｙｓ４７のパーセンテージ活性を示すグラフである。

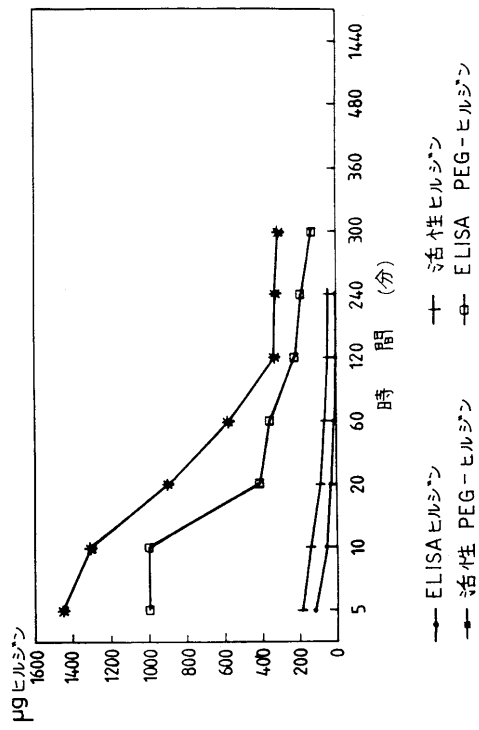
【図１】


10
20
30
40
時 間 (分)

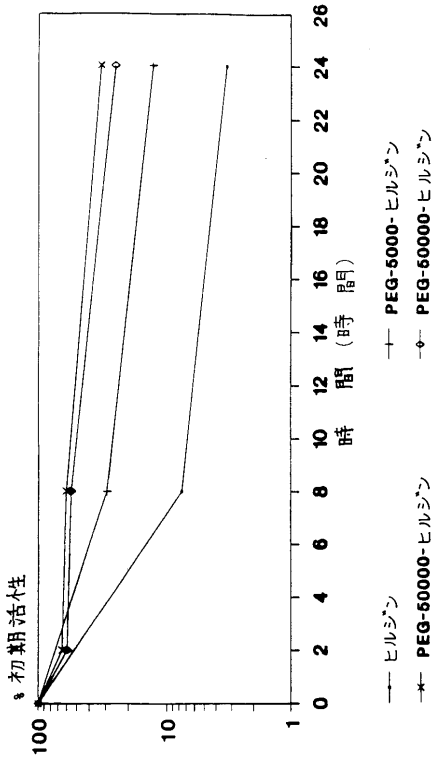
【図２】


10
20
30
40
時 間 (分)

【図３】


μg ヒルジン
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
20
60
120
240
300
360
480
1440
時 間 (分)
ELISA ヒルジン
活性 PEG-ヒルジン
活性ヒルジン
ELISA PEG-ヒルジン

【図４】


% 初期活性
100
10
1
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
時 間 (時 間)
ヒルジン
PEG-60000-ヒルジン
PEG-5000-ヒルジン
PEG-60000-ヒルジン

フロントページの続き

審査官　岩下　直人

(56)参考文献　特表平０２－５０４３４１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９１／００８２２９（WO，Ａ１）
特開昭６４－０７１４９０（ＪＰ，Ａ）
Beauchamp, Analytical Biochemistry, 131, pages 25-33

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C07K 17/10
A61K 38/55
A61K 47/30
A61P 7/02
EUROPAT(QUESTEL)