



## 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 5 C07K 7/06, A61K 37/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 94/05696</p> <p>(43) 国際公開日 1994年3月17日 (17.03.1994)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01262 (22) 国際出願日 1993年9月7日 (07. 09. 93)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平4/238624 1992年9月7日 (07. 09. 92) JP 特願平5/203962 1993年8月18日 (18. 08. 93) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 新日本製鐵株式会社 (NIPPON STEEL CORPORATION) [JP/JP] 〒100-12 東京都千代田区大手町二丁目6番3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) 佐藤吉美 (SATO, Yoshimi) [JP/JP] 林 良雄 (HAYASHI, Yoshio) [JP/JP] 片田 淳 (KATADA, Jun) [JP/JP] 〒211 神奈川県川崎市中原区井田1618 新日本製鐵株式会社 先端技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号虎ノ門中多ビル2F Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, KR, US, 欧州特許 (BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, NL, SE).</p>	<p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title : NOVEL PEPTIDE, AND ANTITHROMBOTIC AGENT, ANTICOAGULANT FOR EXTRACORPOREAL CIRCULATION, CELL FUSION INHIBITOR, CANCER METASTASIS INHIBITOR, PROTECTIVE FOR PLATELET PREPARATION FOR TRANSFUSION AND PACK OF PLATELET PREPARATION FOR TRANSFUSION</p> <p>(54) 発明の名称 新規ペプチドとそれを用いた血小板凝集抑制剤、体外循環用血液凝固抑制剤、細胞接着阻害剤、ガン転移阻害剤、輸血用血小板製剤保護剤及び輸血用血小板製剤パック</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention provides a novel peptide derivative comprising RGD as the basic skeleton and having antithrombotic, anti-coagulant and cell fusion inhibiting effects. The invention provides also an antithrombotic agent which is efficacious against thrombosis and thrombolus during or after thrombolytic therapy and which can prevent the recurrence of such diseases and myocardial infarction, and anticoagulant for extracorporeal circulation which can inhibit clotting as the principal cause of thrombus during extracorporeal circulation, a cell fusion inhibitor, a cancer metastasis inhibitor, and a protective for a platelet preparation for transfusion, each containing the above derivative as the active ingredient. The invention further provides a pack of a platelet preparation for transfusion containing the derivative.</p>		

(57) 要約

RGDを基本骨格として有する血小板凝集阻害作用、血液凝固阻害作用及び細胞接着阻害作用とを有する新規ペプチド誘導体を見出した。

そして、当該ペプチド誘導体の上記の効果に着目して、当該ペプチド誘導体を有効成分として含む、血栓崩壊治療中と治療後の血小板血栓症、血栓閉塞症に対して有効な、更には再閉塞や心筋梗塞の予防も可能な血小板凝集抑制剤；体外循環時の血栓形成の主原因である血液凝固を抑制し得る体外循環用血液凝固抑制剤；細胞接着阻害剤、ガン転移阻害剤及び輸血用血小板製剤保護剤を創製した。

また、パック中に輸血用血小板製剤中に当該ペプチド誘導体を含ませたことを特徴とする輸血用血小板製剤パックをも本発明は企図したものである。

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のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェッコスロヴァキア	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	ES	スペイン	LU	ルクセンブルグ	SD	スウーデン
BG	ブルガリア	FI	フィンランド	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	TG	トゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュー・ジーランド	VN	ヴェトナム

## 明 細 書

新規ペプチドとそれを用いた血小板凝集抑制剤、体外循環用血液凝固抑制剤、細胞接着阻害剤、ガン転移阻害剤、輸血用血小板製剤保護剤及び輸血用血小板製剤パック。

### 技術分野

本発明は血小板凝集抑制作用を有する新規ペプチド等、並びに当該ペプチド等を有効成分として含む血小板凝集抑制剤、体外循環用血液凝固抑制剤、細胞接着阻害剤、ガン転移阻害剤及び輸血用血小板製剤保護剤並びにパック中の輸血用血小板製剤中に当該ペプチド等を含ませたことを特徴とする輸血用血小板製剤パックに関する。

### 背景技術

血液中において、血小板は、損傷した血管の表面に相互に吸着して、出血を防止するという大きな役割を演じている。

しかしながら、病的な環境下においては、血小板の凝集は血栓が形成される主要な原因となり、この血栓が原因で血管が閉塞することが知られている。そしてこの閉塞は、組織や臓器への酸素や栄養分の十分な供給を妨げ、これが心筋梗塞や脳卒中に代表される循環器の虚血性疾患の重大な原因となる。そして、今日においてかかる虚血性疾患は癌に次ぐ死亡率を示し、大きな社会問題になっている。

外科手術時における人工心肺の使用や腎不全患者の腎透析のように、体外への血液の循環を伴う医学的処置を行う場合、血液が

体外に循環する際にも血小板活性化と血小板凝集に起因する血液凝固が起こることがあり、これらの処置を実施する上で大きな障害となっている。

よって、これらの血栓あるいは血液凝固を防止することは、上記虚血性疾患の発生、あるいは安全な体外循環の実施のためには非常に重要な事項である。

ところで血小板は、血管損傷等により露出される内皮下組織に存在するコラーゲン等の結合組織蛋白質や血漿中に存在するトロンビン等の血小板膜受容体への結合によって活性化される。また、血小板内に存在するアデノシンジホスフェイト (ADP)、アドレナリン、セロトニン、トロンボキサン (TX) A<sub>2</sub>等の放出による自己分泌的な膜受容体への結合によっても活性化される。そして、フィブリノーゲン受容体を構成する2種の糖蛋白質ユニットが細胞表面に提示され、会合し、受容体複合体 (gp IIb IIIa) を形成することによって、フィブリノーゲン架橋を介する凝集が惹起される。

かかる gp IIb 及び gp IIIa を先天的に欠如した血小板無力症 (thrombasthenia) においては、血小板凝集能が認められない。よって、gp IIb IIIa 複合体のフィブリノーゲンとの結合が血小板凝集において必須であることは明らかである (Ruoslahti et al., Science, 238, 491(1987))。

上記の gp IIb IIIa 複合体の性質に着目して、血小板の凝集を抑制して血栓の生成を妨げようとする試みがなされている。

例えば、コラー (Coller) らは、gp IIb IIIa 複合体に対するモノクローナル抗体の F(ab')<sub>2</sub> フラグメントに強力な血小板凝

集抑制作用があることを報告しており (Blood, 68, 783, (1986))、かかる作用を利用して、血小板凝集抑制剤の開発が可能であることを明らかにしている。

しかしながら、当該モノクローナル抗体は、確かに血小板凝集を抑制する治療薬としての潜在性は認められる。しかしながらその反面、それ自体が高分子蛋白質であるため、繰り返し投与する場合は、当該モノクローナル抗体自体に作用する抗体が産生されることが懸念される。

従って、g p IIb IIIa 複合体に対するアンタゴニストとして性質を有し、かつ免疫原性のない低分子化合物を有効成分とする血小板凝集抑制剤の開発が期待されている。

また、g p IIb IIIa 複合体とフィブリノーゲンの結合に関する研究も精力的に行われている。すなわち、Ruoslahti らによる一連の研究により導かれた、細胞接着分子に共通のアミノ酸配列である、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (R G D) の発見 (Ruoslahti et al., Nature, 309, 30-33(1984)) に始まって、R G D 配列を認識するレセプターの研究により、今日では g p IIb IIIa 複合体は、R G D 配列を認識するインテグリンファミリーに属する受容体であり (Phillips et al., Blood, 71, 831-843(1988))、当該複合体とフィブリノーゲンとの結合においては、特にフィブリノーゲン分子中に存在する 2 つの R G D F ( -フェニルアラニン) 配列を認識して結合することが明らかにされている (Andrieux et al., J. Biol. Chem., 264, 9258-9265(1989)) 。

さらに、フィブリノーゲンと同様に R G D 配列を有する、フォンビルブランド因子、フィブロネクチン、ビトロネクチンやトロ

ンボスポンジンも g p II b III a 複合体と結合することが知られている (Pytela et al., Science., 231, 1559(1986) あるいは、Ce 11, 42, 439, (1985))。

かかる知見から、R G D 配列を含む合成ペプチドが g p II b III a 複合体とフィブリノーゲンの結合を阻害して血小板の凝集を抑制することが予想され、現実には 400  $\mu$ M の合成ペプチド G R G D S P が、A D P で活性化された血小板の凝集を完全に阻害したことが報告されている (Plow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 8057-8061(1985))。また R G D S については、46-50  $\mu$ M の濃度で濃度依存的に 80~90% の血小板の凝集を阻害することが判明しており、さらにペプチド R G D F は、R G D S の 4~5 倍強い血小板凝集抑制活性を示すことが判明している (Plow et al., Blood, 70, 110-115(1987) あるいは、Harfinest et al., 71, 132-136(1988))。

R G D ペプチドを有するテトラペプチド誘導体に関しては、特開平 1-190699 号公報、特開平 2-62892 号公報、E P O 422937 A1 号公報、及び米国特許 4952562 号に記載されている。ペプチドからなる誘導体に関してはさらに、特開昭 63-215696 号公報に記載されている。また、R G D ペプチドの環状構造の誘導体については、特開平 3-118331 号公報、及び特開平 2-62892 号公報あるいは W O 91/01331 号公報に記載されている。

なお、現在輸血は全血輸血はまれで、各々の血液成分を用途に応じて選択して輸血する成分輸血が行われている。かかる成分輸血用に用いられる輸血用の血小板製剤は献血によって得られた全血を製剤処理するか又はアフレーション法を用いた成分献血のい

ずれかの方法で調製される血液製剤のうちの一つである。そして、これらの血小板製剤は、製剤処理後すぐに、ポリオレフィン製又はポリ塩化ビニル製の特製の保存バックに入れられ、室温で振盪保存されるのが通常である。

また、細胞と細胞外基質蛋白質との接着が様々な病態と関連があることが近年明らかにされてきている。特に、ガン転移によるガン再発の機構と当該接着が密接に関連のあることが解明されつつある。

ガンは近年の診断法の確立による早期発見法及び手術法等の進歩により、外科的に切除できるケースが増えてきているが、その一方でガンによる死亡率は増加してきている。このような状況の大きな原因の一つとして、上記ガン細胞の転移による再発が挙げられる。ガンの転移を抑える物質を確立することができれば、上記のガンの再発をかなり予防し得ると考えられるが、現在有効なガンの転移を防ぐ薬剤は開発されていない。

ガン転移のメカニズムにはまだ不明の点が多いが、近年の研究により徐々に解明されつつある。すなわち、ガン転移は原発巣から血液及びリンパ球中へのガン細胞の離脱及び血液中、リンパ液中から組織中へのガン細胞の移動という2つの極めて重要なステップに分けることができる。そして、この両段階で血管の基底膜等を構成する細胞外基質蛋白質が細胞移動の足場を提供すると考えられている。

なお、上記血管基底膜には、フィブロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ラミニンをはじめとする様々なRGD配列を持つ細胞外基底蛋白質が存在しており、ガン細胞の細胞外基質蛋白質

質への接着に R G D 配列が非常に重要な役割を果たしている。それ故、この様なガン細胞と血管基底膜との接着を抑える化合物、特に R G D 類似化合物は、ガン細胞の血液中への離脱・血液中から血管外への移動を阻害することにより、ガン転移を抑制し得る可能性が指摘されている。

近年、高活性で生体内安定性の優れた薬剤を開発するために、R G D ペプチドを鍵化合物として、天然には存在しない構造を有する化合物へ誘導する合成研究が盛んに行われている (Hartman et al., J. Med. Chem., 35, 4640-4642(1992) あるいは Callahan et al., ibid, 35, 3970-3972(1992))。この様な化合物は蛋白分解酵素による影響を受け易い経口投与型の血小板凝集抑制剤として有用であるが、同時に、非天然構造への誘導に伴う毒性の発現や、体内において薬剤が消失せずに蓄積されてしまう等の副作用が予想され、安全性についての問題が強く懸念されている。

また、化合物の生体内安定性の向上は、血小板凝集抑制作用や血液凝固抑制作用の持続につながり、出血傾向を惹起する等、本来血小板の有する重要な生理作用を長時間にわたり停止させてしまう可能性がある。

特に体外循環時や外科手術時においては上記の血小板凝集抑制作用や血液凝固抑制作用の持続性が問題となる。例えば、実際に血液凝固を抑えるために投与されている生体由来の医薬品であるヘパリンにおいてさえも、その作用が適度な薬効時間を超えてしまい、出血傾向を惹起する重篤な副作用が報告されている [秋沢忠男ら、日本臨床、43巻、377-391 頁 (1985年)]。

従って、特に体外循環や外科手術時等において、血小板の凝集

能力を一時的にのみ抑える目的で血小板凝集抑制剤を使用する場合には、当該薬剤は血小板凝集抑制能力に優れていることが望ましいことは言うまでもないが、それと同時に使用目的に応じた適度な薬効時間を有し、なおかつ当該薬剤の失活後は副作用のない化合物に速やかに代謝される安全性に優れた特性を有することが必要である。前において述べたように、RGDペプチドそのものの有する血小板凝集抑制活性や血液凝固抑制活性は実用に耐えられるほど高くはない。しかしながら、このRGDペプチドはもともと生体内に存在する蛋白分解酵素によって、生体にとって安全でかつ有益なアミノ酸に分解される優れた特徴がある。

本発明者はこの特徴を大いに利用し、使用目的に応じた様々な生体での保持時間を有し、血小板凝集抑制能力又は血液凝固抑制能力に優れ、天然のペプチドに可能な限り近い構造を有し、かつ高活性である誘導ペプチドを造り出し、これを有効成分として含む血小板凝集抑制剤の提供を企図する。そして、さらに体外循環時や手術時等に適する副作用の少ない血液凝固抑制剤の提供を企図する。

また、前に記載した輸血用の血小板製剤において、現状では保存に伴って血小板の機能（血小板凝集能）の低下が著しく、有効な輸血を妨げる一つの要因となっている。このような保存に伴う血小板の機能の低下を防ぐような画期的な上記血小板製剤の保存法は現在なく、有効な保存法の確立は世界的な検討課題となっている。よって本発明は、上記ペプチド等を有効成分として含む輸血用血小板製剤保護剤の提供を企図する。

なお保存に伴う血小板の機能低下は、①採血、製剤処理、保存

時の様々な物理的刺激により起こる保存中の血小板活性化や凝集、②保存液のpHの低下等が主な原因と考えられている。これらのうち、pHの制御を目的とした保存液及び保存システムの改良は近年盛んに行われているが、十分な効果があるとはいえないのが現状である。

また、血小板凝集を抑えれば保存中の血小板の機能低下を抑制できるのではないかとの考えから、アスピリン、プロスタグランディン等従来から知られている血小板凝集抑制物質を保存血に添加する試みが実験室レベルではいくつか行われている。しかしながら、これらの化合物は体内での分解性が極めて悪く、当該化合物を含む血小板製剤を輸血すると全身の血液が固まりにくい状態が数時間以上続くという致命的な問題点があり、実用化には至っていない。

そこで、生分解性に優れ、安全でかつ強力な血小板凝集抑制活性を有する前記誘導ペプチドを輸血用血小板製剤に添加することで、保存に伴う血小板の凝集能力の低下や血小板数の減少を防ぐことができると考えた。すなわち、製剤パック中の血小板を保存中に保護する作用をもつ化合物を開発することも本発明の目的である。

さらに、本発明ペプチド等の細胞接着抑制作用に着目し、上記ペプチド等を有効成分として含む安全性に優れた細胞接着阻害剤及びガン転移阻害剤の提供をも企図する。

#### 発明の開示

体外循環に適した副作用の少ない血小板凝集抑制薬の開発には

、上記のごとく天然のペプチドに可能な限り近い構造を有することが必要である。そこで、本発明者は、実用に耐え得る高活性化化合物を得る際に、アミノ酸やビタミン等の副作用の少ない生体に有用な化合物をR G D様の配列に付加することによって、高活性で適度な作用時間を有するペプチド等を創製した。本ペプチド等が分解されると、当該付加部分は本来の有用な物質として生体に受け入れられる。すなわち、その構造中に生体内で速やかに分解されるペプチド骨格をほぼ完全に残しながら、高い血小板凝集抑制活性等を持ち、生体内での分解時間が概ね短く、かつ作用時間が異なる一群の化合物を見出した。また、これら一群の化合物を細胞接着阻害剤、ガン転移阻害剤及び輸血用血小板製剤保護剤の有効成分として用いることも可能であることを見出した。

即ち、本願は以下の事項をその要旨とするものである。

(1) 一般式



(式中、Aはアミノ酸、アミノ酸誘導体、ビタミン、ビタミン誘導体、ビタミン様作用物質、ビタミン様作用物質の誘導体、核酸の塩基、核酸の塩基の誘導体及びヒダントイン酢酸よりなる群の中から選ばれた化合物；Bはアミノ酸；Cは疎水性官能基を有するアミノ酸；Dは水酸基又はアミノ基を示す)

で表される、ペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩。

(2) Aにおけるアミノ酸若しくはアミノ酸誘導体が、プロリン、チオプロリン、ヒドロキシプロリン、デヒドロプロリン、2-オキソ-4-チアゾリジンカルボン酸、N-アルキルグリシン又は次の一般式



ロチン酸又はヒドロオロチン酸である、前記(1)記載のペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩。

(4) Bがセリン、グリシン、バリン、アラニン、スレオニン又はβ-アラニンである、前記(1)～(3)記載のペプチド若しくはペプチド誘導体又はそれらの塩。

(5) Cがトリプトファン若しくはフェニルアラニンである、前記(1)～(4)一つに記載されたペプチド若しくはペプチド誘導体又はそれらの塩。

(6) 前記(1)～(5)のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、血小板凝集抑制剤。

(7) 前記(1)～(5)のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、体外循環用血液凝固抑制剤。

(8) 前記(1)～(5)のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、細胞接着阻害剤。

(9) 前記(1)～(5)のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、ガン転移阻害剤。

(10)前記(1)～(5)のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、輸血用血小板製剤保護剤。

(11)前記(1)～(5)のいずれか一つに記載された輸血用血小板保護剤をパック中の輸血用血小板製剤中に含ませたことを特徴とす

る、輸血用血小板製剤パック。以下、本発明に関し詳細に説明する。

① 一般式 (I) において、A はアミノ酸、アミノ酸誘導体、ビタミン、ビタミン誘導体、ビタミン様作用物質、ビタミン様作用物質の誘導体、核酸の塩基、核酸の塩基の誘導体及びヒダントイン酢酸よりなる群の中から選ばれた化合物である。

a) 本発明において、アミノ酸とは分子内にアミノ基とカルボキシル基を有する分子のことをいう。

そして、当該アミノ酸又はアミノ酸誘導体 A として本発明において好ましいものとしては、プロリンを含むイミノ酸、分子内にペプチド結合 (ラクタム) を有するアミノ酸、トリプトファン、そしてこれらのアミノ酸の誘導体を挙げることができる。

なお、本発明ペプチド等を血小板凝集抑制剤又は体外循環用血液凝固抑制剤の有効成分として用いる場合において、A の部位にプロリンが存在することは、式 (I) に示すペプチド等 (以下、本発明ペプチド等と記載する。) の血小板凝集抑制活性及び血液凝固抑制活性を顕著に増幅させ得る故に好ましい。

さらに、A がプロリンである場合は当該プロリンのイミノ基を修飾すると本発明ペプチド等の血小板凝集抑制活性及び血液凝固抑制活性が、当該イミノ基を修飾しない場合に比べて低下することを本発明者は明らかにした。すなわち、実施例 16 の化合物と実施例 20 の化合物とを比較することによって、ここで述べているプロリンの存在による血小板凝集抑制活性増幅効果はプロリン中のイミノ基に起因することは明白である。従って、A がプロリン以外であってもイミノ基を有するアミノ酸であることによって、本

発明ペプチド等は高い血小板凝集抑制活性を示し得る。

プロリン誘導体としては、その環構造内に他のヘテロ原子を有するものや環に官能基が付加したものを挙げるができる。例えば具体的には、チオプロリン、ヒドロキシプロリン、デヒドロプロリン、オキソチアゾリジンカルボン酸、N-メチルプロリン、N-アセチルプロリン等を挙げるができる。

イミノ酸としては、好ましくはN-アルキルグリシンや環の大きさの異なる一般式(II)で示される環状イミノ酸を挙げるができる( $R_1$ は水素原子)。なお、N-アルキルグリシンのアルキル部分は、低級アルキル鎖であることが好ましい。具体的には、N-メチルグリシン(ザルコシン)、N-エチルグリシン、N-エチルグリシン、N-プロピルグリシン、N-イソプロピルグリシン等を挙げるができる。また、一般式(II)において、 $R_1$ が水素原子以外である場合、すなわちイミノ基が修飾されている場合には、本発明ペプチド等の血小板凝集抑制能力は低下する傾向にある。しかしながら当該修飾は、生体内における酵素によるペプチドのN端からの分解を遅らせる効果があり、分解速度の異なる誘導体の入手には必要なものである。かかる場合、 $R_1$ はアルキル基又はCO-アルキル基であるが、いずれも低級アルキル基又は低級CO-アルキル基であるのが好ましい。さらにpが0~5の整数であるものが適当な塩基性を有し、かつ立体障害性が低いという点で好ましい。

当該環状イミノ酸の環構造の大きさは、mを2~8の範囲で選択することが可能であるが、当該環自身の立体障害性を低く押さえることの必要性から、mは好ましくは2~5である。

また、一般式 (II) 中のカルボン酸の位置は、直接的には本発明ペプチド等の血小板凝集抑制活性には影響しないが、塩基性部位であるイミノ基の向きを考慮すれば、好ましくはイミノ基に隣接する2位をあげることができる。また、環と当該カルボニルの間にアルキル鎖を導入し得る。当該アルキル鎖の鎖数を示すnは0～6の範囲で選択し得るが、カルボニルからイミノ基までの適当な距離を保つ必要性を考慮すれば、好ましくは0～2である。

すなわち、当該環状イミノ酸の好ましい具体例としては、例えばL-2-アゼチジンカルボン酸、o-, m-, p-の各ピペリジンカルボン酸、ピロリジン-3-カルボン酸、ピロリジン-2-酢酸等を挙げることができる。

Aを血液中において酵素による分解を受け易い化合物とするか、当該分解を受け難い化合物にするかによって、本発明ペプチド等を有効成分として含む本発明血小板凝集抑制剤及び血液凝固抑制剤を使用目的に応じた作用時間を確保することができる。

主に、体外循環用血液凝固抑制剤を企図する場合には、Aを血液中において酵素による分解を受け易い化合物とすることにより、生体内での作用時間を短縮することが可能である。当該化合物としては、例えば4員環化合物のアゼチジンカルボン酸や5員環化合物のプロリンを挙げることができる。

上記以外の一般的な血小板凝集抑制剤を企図する場合には、逆にAを分解を受け難い化合物とすることにより、生体内での作用時間を延長することが可能である。当該化合物としては、例えば6員環化合物であるL-ピペコリン酸等を挙げることができる。

なお、一般式 (II) においてイミノ基が、イミド基に変わった構造 (ラクタム) であっても良い。かかる構造も、分解酵素に対する適度な安定性と高活性を有するペプチド化合物を与える。好ましくはピログルタミン酸や 2-アゼチジノン-4-カルボン酸などを挙げることができる。

A がトリプトファン又はその誘導体である場合も、本発明ペプチド等の血小板凝集抑制活性の向上が認められる。これは、トリプトファン中のインドール環による疎水的な作用によるものとの考えられる。

一般式 (III) で示されるトリプトファン誘導体において、R<sub>2</sub> は水素原子又はアルキル基、好ましくは水素原子又は低級アルキル基；R<sub>3</sub> は水素原子又はO-アルキル基、好ましくは水素原子又は低級O-アルキル基；R<sub>4</sub> は水素原子又はアルキル基、好ましくは水素原子又は低級アルキル基；R<sub>5</sub> は水素原子、アミノ基又はアミノアシル基である。アミノアシル基としては例えば、アミノアセチル基やアミノカプロリル基を代表的なものとして挙げることができる。

さらにAがヒダントイン酢酸である場合も活性の向上がみられる。

b) 本発明において、Aとして用いられるビタミンの種類はとくに限定されない。例えば、ニコチン酸、p-パントテン酸、ビオチン、プテロイルグルタミン酸等を挙げることができる。また、本発明においてビタミン様作用物質とは、その生理作用はビタミンに近いが、一般に、ことにヒト及び哺乳動物では必ずしも栄養素として外部から摂取する必要がない、すなわち生体内において自己

合成のできる一群の化合物をいう。具体的には、オロチン酸、リポ酸等を挙げることができる。

ビタミンもビタミン様作用物質もペプチド骨格に共有結合で結合していることを特徴とするが、ペプチド骨格に結合するために、相応する官能基を有することが必要で、その官能基としては、例えばカルボキシル基等を挙げることができる。また、相応する官能基を持たないビタミン等においても、簡単な処理で相応する官能基を誘導できるものであれば良い。当該例としては、ニコチン酸アミド分子内のアミドの加水分解によりカルボン酸を誘導する場合等を挙げることができる。これらのペプチド骨格との結合は、生体内に存在する酵素によって容易に分解され、その結果生体に有用なビタミン若しくはビタミン様作用物質又はその中間代謝産物或いは毒性の殆ど無い化合物に変わるようなものであれば良く、例えば、アミド結合、エステル結合等がある。

また、ビタミンやビタミン様作用物質の誘導體としては、これらの化合物の中間代謝物、あるいは生化学データブック（日本生化学会編、東京化学同人）等に記載されている関連化合物、あるいは部分的に1あるいは2箇所の構造を修飾した化合物であり、その例としては、5-ピリドキシン酸、ビオチンp-,L-スルホキシド、ビオチンスルホン、ビオシチン、プテロイン酸、10-ホルミルプテロイン酸、7,8-ジヒドロ葉酸、(-)L-H, 葉酸、ホモプロテイン酸、6-カルボキシプテリン、ジヒドロリポ酸、ビタミン様作用物質のオロチン酸の二重結合が還元されたヒドロオロチン酸などがある。

c)さらに、本発明における核酸の塩基またはその誘導體とは、一

般にヌクレオチドを構成する塩基成分およびその誘導体を指すが、上記ビタミンやビタミン様作用物質またはそれらの誘導体に関して述べたことと同様な構造的特徴を有するものである。好ましくはピリミジン誘導体等、例えば5-カルボキシメチルウラシル、5-カルボキシチオウラシル等を例示することができる。

② Bはアミノ酸であり、その種類は特に限定されない。しかしながら、立体障害の大きなアミノ酸あるいは酸性のアミノ酸は血小板凝集抑制活性、血液凝固抑制活性及び細胞接着抑制活性を低下させる傾向がある故に、比較的小さなアミノ酸がBとしては好ましく、例えばセリン、グリシン、バリン、アラニン、スレオニン又は $\beta$ -アラニンであるのが好ましい。特にセリンが高活性を示す故に好ましい。

③ Cは受容体に結合する疎水的ドメインとして、疎水性官能基を有するアミノ酸を指す。好ましくはトリプトファン又はフェニルアラニンを挙げるができる。

④ Dは水酸基又はアミノ基である。なお、Dが水酸基の場合はアミノ基の場合に比べ血小板凝集抑制活性、血液凝固抑制活性及び細胞接着抑制活性が高い傾向がある。しかし、作用時間はアミノ基である方が長く、目的に応じて選択することができる。

⑤ なお、体外循環用血液凝固抑制剤の有効成分として本発明ペプチド等を用いる場合には、これらの本発明ペプチド等は各々異なった半減期を有するという点が有利になる。

すなわち、血漿中での本発明ペプチド等の半減期の範囲は約10分から長いものでは4時間以上である。しかし、体内では速やかに分解される特性があるものが多く、本発明ペプチド等の大部分

の体内半減期は短すぎて特定できないもの（約2分以内）から10分以内である。従って、これらのペプチド等を体外循環に適用した場合には、装置内を循環している血液中では安定であるが、体内に入ると各種分解酵素により、すばやく生体に有益な化合物に分解されて血液凝固活性を失うという利点を有する。

よって、従来から問題とされている体外循環時の抗血栓剤ヘパリンによる出血傾向が増加する重篤な副作用を、ヘパリンを本発明のペプチド等で代替することで克服することが可能である。すなわち、本発明ペプチド等は体外循環用の血液凝固抑制剤の有効成分として非常に有用である。

さらに体外循環では、循環装置や使用目的に依って、血液凝固抑制剤の好ましい作用時間が異なるが、本発明ペプチド等各々の作用時間（半減期）の違いを利用すれば、体外循環時間の長さや使用目的の違いに応じて使い分けることが可能である。

本明細書において、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基、その他に関して略号で表示する場合、国際純正および応用化学連合（IUPAC）、国際生化学連合（IBU）の規定或いは該当分野における慣用記号に従うものとする。また、遺伝制御に直接関連のある $\alpha$ -アミノ酸に関して光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

以下にその例を示す。

A l a または A : アラニン  
A r g または R : アルギニン  
A s p または D : アスパラギン酸  
G l y または G : グリシン

Ser	または S	: セリン
Val	または V	: バリン
Thr	または T	: スレオニン
Trp	または W	: トリプトファン
Phe	または F	: フェニルアラニン
Pro	または P	: プロリン
Boc		: t-ブトキシカルボニル
Bu <sup>t</sup>		: t-ブチル
OBu <sup>t</sup>		: t-ブチルエステル
Mtr		: 4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼン スルフォニル
Pmc		: 2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-ス ルフォニル
Fmoc		: 9-フルオレニルメトキシカルボニル

本発明のペプチドおよびその類似化合物は、市販のアミノ酸を利用して、簡単な操作で容易に合成することができる。すなわち、ペプチド化学において通常用いられる方法、例えば、「ザ ペプチド (The Peptides)」第1巻〔Schroder and Luhke著, Academic Press, New York, U.S.A. (1966年)〕、「ペプチド合成の基礎と実験」〔泉屋信夫ら著、丸善(株) (1985年)〕等に記載されている方法によって製造することが可能であり、液相法及び固相法のいずれによっても製造できる。さらに、カラム法、バッチ法のいずれの方法も用いることができる。

ペプチド結合を形成するための縮合方法として、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、カルボジイミド法、カルボジイミド

ーアディティブ法、活性エステル法、カルボニルイミダゾール法、酸化還元法、酵素法、ウッドワード試薬Kを用いる方法等を例示することができる。なお、固相法での縮合反応は上記した方法のうち、酸無水物法、カルボジイミド法、及び活性エステル法が主な方法として挙げられる。

さらに、固相法でペプチド鎖を延長するときは、C末端アミノ酸を用いる有機溶媒に対して不溶な樹脂等の支持体に結合する。ここでは、アミノ酸を樹脂に結合させる目的で官能基を導入した樹脂や、樹脂と官能基の間にスペーサーを挿入したもの、更に条件によって種々の箇所切断できるハンドル (handle) と称する鎖を導入した樹脂を目的に応じて用いることもできる。このような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂などのハロメチル樹脂、オキシメチル樹脂、4-(オキシメチル)-フェニルアセトアミドメチル樹脂、4-(オキシメチル)-フェノキシメチル樹脂、C末アミド化用樹脂などを挙げる事ができる。

なお、これらの縮合反応を行なう前に、通常公知の手段によって当該縮合反応に関与しないカルボキシル基やアミノ基やアルギニン残基中のグアニジド基等の保護手段を施すことができる。また逆に当該縮合反応に直接関与するカルボキシル基やアミノ基を活性化することもできる。

保護手段に用いる保護基としては、有機化学の分野において通常用いられている保護基、例えば「プロテクティブ グループズ イン オーガニック シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis) [Greene著, John Wiley & Sons, Inc. (1981)]」等に記載されている保護基によって保護することが可能である。

セリン残基等の水酸基を含むアミノ酸残基中の水酸基の保護基としては、例えばt-ブチル基、ベンジル基、トリメチルシリル基、テトラヒドロピラニル基等を挙げることができる。

カルボキシル基の保護基としては、例えば、各種のメチルエステル、エチルエステル、ベンジンエステル、p-ニトロベンジンエステル、t-ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等の通常公知の保護基を挙げることができる。

アミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基等を挙げることができる。

アルギニン残基中のグアニジノ基の保護基としては、例えば、ニトロ基、トシル基、メシチレンスルフォニル基、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルフォニル基、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルフォニル基等を挙げることができる。

カルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、当該カルボキシル基に対応する酸無水物；アジド；ペンタフルオロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3ジカルボキシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール等との活性エステル等を挙げられる。

アミノ基の活性化されたものとしては、当該アミノ基に対応する磷酸アミド等を挙げることができる。

ペプチド合成の際の縮合反応は、通常溶媒中で行なわれる。当該溶媒としては、例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ピリジン、ジオキサソラン、テトラヒドロフラン、N-メチルピロリドン、水、メタノール等、又はこれらの混合物を挙げることができる。また、当該縮合反応の反応温度は、通常の場合と同様に、 $-30^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲で行なうことができる。

さらに、本発明のペプチド製造工程における保護基の脱離反応の種類は、ペプチド結合に影響を与えずに保護基を離脱させることができる限りにおいて、用いる保護基の種類に応じて選択することができる。例えば、塩化水素、臭化水素、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、又はこれらの混合物等による酸処理、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、ヒドラジン、ジエチルアミン、ピペリジン等によるアルカリ処理；液体アンモニア中におけるナトリウム処理やパラジウム炭素による還元；及びトリメチルシリルトリフラート、トリメチルシリルブロマイド等のシリル化処理等が挙げられる。なお、上記の酸又はシリル化剤処理による脱保護基反応においては、アニソール、フェノール、クレゾール、チオアニソール、エタンジチオールの如きカチオン補足剤を添加するのが脱保護基反応が効率的に実行されるという点において好ましい。

なお、固相法で合成した本発明ペプチドの固相からの切断方法も通常公知の方法に従う。例えば、上記の酸又はシリル化剤による処理等を当該切断方法として挙げることができる。

このようにして製造された本発明ペプチドに対しては、上記の

一連の反応の終了後に通常公知の分離、精製手段を駆使することができる。例えば、抽出、分配、再沈殿、再結晶、カラムクロマトグラフィー等によって、より純粋なかたちで本発明ペプチドを収得することができる。

また、本発明ペプチドは、製造工程における反応条件によって塩の形で得ることができる。ここで当該塩としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸塩類；ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸類；ナトリウム、カリウム、等のアルカリ金属塩；カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩類；アンモニウム、エタノールアミン、トリエチルアミン、ジシクロヘシルアミン等の有機アミン類等を挙げることができる。

上記で得た本発明ペプチド等を血小板凝集抑制剤、細胞接着阻害剤、ガン転移阻害剤又は輸血用血小板製剤保護剤（以下、血小板凝集抑制剤等と記載する）の有効成分として用いる場合には、本発明ペプチド等を固体若しくは液体の医薬用担体又は希釈剤と共に、すなわち賦形剤や安定剤等と共に含む製剤とするのが好ましい。当該医薬製剤において、前記有効成分の担体成分に対する割合は、1～90重量%の間で変動させることができる。当該製剤の剤形及び投与形態としては、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、丸剤若しくは液剤等の剤形にして用いることができる。またさらに、原末のまま経口投与することも可能であり、さらに、注射剤として、静脈内投与、筋肉内投与、又は皮下投与することもできる。なお、注射剤として用いる場合には、本発明ペプチド等を注射用の粉末として、用時調製することもできる。

経口、経腸もしくは非経口投与に適した有機又は無機の、さらに固体又は液体の医薬用に用いられる担体か希釈剤を、本発明血小板凝集抑制剤等を調製するために用いることができる。水、ゼラチン、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、動植物油脂、ベンジルアルコール、ガム、ポリアルキレングリコール、石油樹脂、やし油、ラノリンその他医薬に用いられる他の担体は全て、本発明の血小板凝集抑制剤の担体若しくは希釈剤として用いることができる。また、安定剤や湿潤剤や乳化剤を加えたり、浸透圧調製剤又はpH調整剤として塩を補助薬として、適宜用いることができる。

さらに、本発明血小板凝集抑制剤等は、種々の疾患の治療において、前記有効成分の他に、必要に応じて他の医薬として有効な成分、例えば他の種類の血小板凝集抑制成分等を含有させることもできる。

顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤又はカプセル剤の形態をとる場合には、前記有効成分を5～80重量%含有させるのが好ましい。液剤の場合には、前記有効成分を1～30重量%の割合で含有させるのが好ましい。さらに、非経口投与剤のうち、注射剤として用いる場合には、前記有効成分を1～10重量%の割合で含有させるのが好ましい。

臨床投与量は、経口投与の場合、成人に対し上記有効成分として、1日当たり500～1000mgを内服するのが好ましい。しかしながら、患者の年齢、症状等によって適宜投与量を増減させることもできる。前記の本発明の血小板凝集抑制剤は、1日1回投与も可能であるが、適当な間隔を2～3回に分けて投与することもで

きる。さらに、注射剤として用いる場合には、上記有効成分として、成人に対し1回当たり量1～数100mg投与するのが好ましい。

また、本発明ペプチド等には体内での高分解性を特徴とするものも含まれており、それらの化合物について、数時間から数日間連続して血中濃度を高く保つ必要がある場合には、点滴等の手段により持続的に注入すればよい。かかる場合、注入量は1時間当たり50～500mg/Kg程度が目安となるが、他の薬剤との併用時にはさらに使用量を減らすことも可能である。

なお、体外循環用に本発明ペプチド等を用いる場合には、上記の注射剤あるいは点滴剤の形態で用いることができる。投与場所及び投与量は、体外循環システムの違い、及びシステムの持続時間等により異なるが、例えば体外循環システムへの入口の部分から1時間当たり1～100mg/Kgを持続的に注入することができる。投与量は、単独投与においても、また他の薬剤との併用においても、分解酵素が多量に存在する体内に比べ、体外循環システム中では少量で有効である。

体外循環用血液凝固抑制剤として従来から用いられているヘパリンと本発明ペプチド等とを併用することにより、血液凝固に関係する血小板凝集・凝固系という二つの重要な経路を抑制し、より完全に血液凝固を抑制することができると考えられる。また、両者の相乗的効果も期待できるので、前述したような副作用が問題になっているヘパリンの使用量を減らすことができる。さらに、クエン酸や蛋白質分解酵素阻害剤（例えばフサン）、あるいはt-PAのような血栓溶解剤等と本発明ペプチド等との併用も有効で

あると考えられる。

次に、本発明輸血用血小板保護剤をパック中の輸血用血小板製剤中に含ませたことを特徴とする本発明輸血用血小板製剤パックにおいて、当該輸血用血小板製剤パックの形態は特に限定されない。すなわち、通常臨床において用いられる輸血用血小板製剤パックが採りうる全ての形態を採用することができる。具体的には、袋状、瓶状等の形態を採ることが可能である。また、それらの素材も特に限定されない。例えば、袋状の形態を採る場合には有効成分の吸着を可能な限り抑制し得るビニール素材、例えばポリ塩化ビニル、ポリオレフィン等を、また瓶状の形態を採る場合には、プラスチック素材もガラス素材も当該瓶の素材として用いることができる。また、本発明輸血用血小板保護剤は、本発明ペプチド等の量に換算して、血小板成分量に対して最終濃度で $1\mu\text{M}$ ～ $1\text{mM}$ 、好ましくは $10\mu\text{M}$ ～ $50\mu\text{M}$ 添加することができる。なお、通常輸血用血小板製剤パック中に添加される他の成分も本発明輸血用血小板保護剤と共に添加することができることは勿論である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、ヒト血漿中での合成ペプチドの安定性を示した図(1)であり、第2図は、ヒト血漿中での合成ペプチドの安定性を示した図(2)であり、第3図は、マウス体内での合成ペプチドの安定性を示した図であり、第4図は、ビーグル犬を用いた血小板凝集抑制活性及びプロトロンビン時間の検討図であり、第5図は、ビーグル犬を用いた人工透析モデル透析回路の模式図であり、第

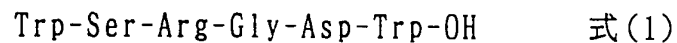
6 図は、ビーグル犬を用いた人工透析モデルにおける血液凝固効果を示した図であり、第 7 図は、保存に伴う血小板数の変化を示した図であり、第 8 図は、血小板凝集能の保存に伴う経時的変化を示した図であり、第 9 図は、HeLa細胞の各種細胞外基質蛋白質の接着に対する実施例 9 のペプチド等の影響について検討した図であり、第 10 図は、B16F10メラノーマ細胞の各種細胞外基質蛋白質の接着に対する実施例 9 のペプチド等の影響について検討した図である。

## 実施例

以下、実施例等により本発明をより具体的に説明する。しかしながら本実施例によって本発明の技術的範囲が限定解釈されるものではない。

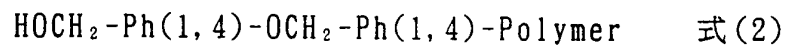
[化合物の合成]

[実施例 1]

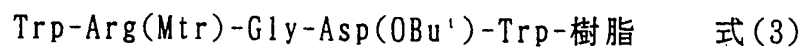


の合成：

p-alkoxybenzyl alcohol 型(式(2)) (Trpの導入量：0.87meq/g;BACHEM社製) 樹脂



の0.275g(0.25mmol)を反応容器に移し、DMAP存在下Fmoc-Trpを活性エステルで導入後、表1に示す振盪、濾過ステップを繰り返す、



を得た。

表 1

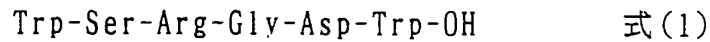
ステップ	試薬又は溶媒	使用量 (ml/step)	時間 (分)	回数
1.	DMF	30	1	6
2.	20%piperidine/DMF	6	2	1
3.	20%piperidine/DMF	6	20	1
4.	DMF	50	1	10
5.	Fmoc-amino-acidと HOBT/DMF(各3当量)	6	2 *	1
6.	DIPCD (3当量)**	6	120	1

\* : 振盪後除去することなく次のステップへ進む。

\*\* : diisopropylcarbodiimide

得られた保護ペプチド樹脂を0℃のトリフルオロ酢酸中で、m-クレゾール、エタンジチオール存在下、1M トリメチルシリルブロマイドと1M チオアニソールで1時間処理を行った。窒素気流中でトリメチルシリルブロマイドを留去後、樹脂を濾去し、濾液にジエチルエーテルを氷冷下において加え、樹脂から切断されたペプチドを粉末として得た。そして、当該粉末をジエチルエーテルで洗浄した。当該洗浄物をセファデックスG-10（ファルマシア社製）を支持体としたゲル濾過クロマトグラフィーにより脱塩し、これを凍結乾燥して粗ペプチドを得た。この粗ペプチドを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）〔カラム：ODS 5C<sub>18</sub>（

$\mu$  bondasphere,  $\phi$  20×150mm)、移動相：(A)0.1%TFA, (B)100%  
 $\text{H}_3\text{CN}/0.1\%\text{TFA}$ 、gradient：(A):(B)=80:20 から (A):(B)=70:30  
 、20分間、流速 17ml/min] にて精製し、更にセファデックス G  
 -25 を支持体とするゲル濾過により酢酸塩として、凍結乾燥す  
 ることにより表題のペプチド



を100mg 得た。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

本検出法ではトリプトファンは酸加水分解中に分解されるため  
 に検出できない。また、定量のために外部標準として用いたアミ  
 ノ酸は標準アミノ酸であるために、標準アミノ酸に含まれていな  
 いアミノ酸に関しても検出できない。

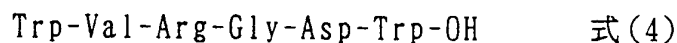
A s p	0.90 (1)
S e r	1.00 (1)
G l y	1.11 (1)
T r p	— (2)
A r g	1.03 (1)

#### H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR ( $\phi$  4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社  
 製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~  
 40%(60分) の gradient 溶出での分析 H P L C で、保持時間29.0分  
 の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値 806.3、実測値 806

[実施例 2]



の合成：

実施例 1 と同様の方法によって、表題のペプチドを 100mg を合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

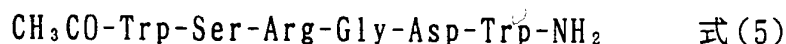
A s p	0 . 9 5 ( 1 )
V a l	1 . 0 7 ( 1 )
G l y	1 . 2 4 ( 1 )
T r p	- ( 2 )
A r g	1 . 0 0 ( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6 × 200mm)カラムを用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(40分)のgradient溶出での分析 H P L C で保持時間 24.0 分の単一ピークを示した。

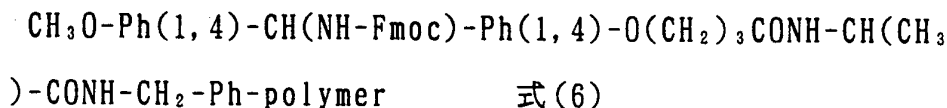
F A B - M S : M + H 計算値 818.4、実測値 814

[実施例 3]

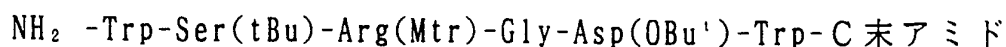


の合成：

C 末アミド化 (式(6))樹脂



樹脂 (Trp の導入量 : 0.6meq/g; BACHEM 社製) 0.45g (0.25mmol) を反応容器に移し、前記表 1 に示す振盪、濾過を経るステップを繰り返し、



化樹脂 式(7)を得た。この樹脂1当量に対して、3当量の無水酢酸をN-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT, 3当量)存在下に、ジメチルホルムアミド(DMF)中で縮合させ、  
CH<sub>3</sub>CO-Trp-Ser(tBu)-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBu')-Trp-C末アミド  
化樹脂 式(8)を得た。

得られた保護ペプチド樹脂を実施例1と同様の方法によって、表題のペプチドを20mg得た。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 9 5 ( 1 )
S e r	1 . 0 0 ( 1 )
G l y	1 . 1 4 ( 1 )
T r p	- ( 2 )
A r g	0 . 9 6 ( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR(φ4.6 × 200mm)カラム(ナカライテスク社製)を用い、流速1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(40分)のgradient溶出での分析H P L Cで保持時間25.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値847.4、実測値847

[実施例4]

5-Methoxyindole-3-acetyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(9)

の合成:

実施例1と同様の方法によって、表題のペプチドを100mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 8 9	( 1 )
S e r	1 . 0 0	( 1 )
G l y	1 . 1 2	( 1 )
T r p	-	( 1 )
A r g	0 . 9 9	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 × 200mm)カラムを用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(40分)のgradient溶出での分析H P L Cで保持時間28.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値807.3、実測値807

[実施例5]

2-Methylindole-3-acetyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(10)

の合成:

実施例1と同様の方法によって、表題のペプチドを100mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 8 8	( 1 )
S e r	1 . 0 0	( 1 )
G l y	1 . 1 2	( 1 )
T r p	-	( 1 )
A r g	0 . 9 9	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社製)を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(40分)のgradient溶出での分析H P L Cで保持時間28.5分の

単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値791.4、実測値791

[実施例6]

Indole-3-butanoyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(11)

の合成:

実施例1と同様の方法によって、表題のペプチドを100mg 合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0. 8 7	( 1 )
S e r	1. 0 0	( 1 )
G l y	1. 1 3	( 1 )
T r p	-	( 1 )
A r g	1. 0 1	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 ×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(40分) のgradient溶出での分析H P L Cで保持時間33.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値805.4、実測値805

[実施例7]

Indole-3-acetyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(12)

の合成:

実施例1と同様の方法によって、表題のペプチドを100mg 合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

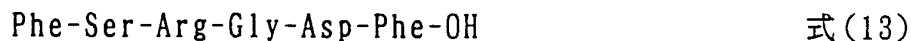
A s p	0 . 9 3	( 1 )
S e r	1 . 0 0	( 1 )
G l y	1 . 0 8	( 1 )
T r p	-	( 1 )
A r g	1 . 1 2	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(40分) の gradient 溶出での分析 H P L C で保持時間27.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値777.3、実測値777

[実施例 8]



の合成：

実施例 1 と同様の方法によって、表題のペプチドを100mg 合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	1 . 0 0	( 1 )
S e r	1 . 0 1	( 1 )
G l y	1 . 0 0	( 1 )
P h e	1 . 8 3	( 2 )
A r g	1 . 0 4	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～

40%(60分)のgradient溶出での分析HPLCで保持時間21.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値728.3、実測値728

〔実施例9〕

Orotyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(13)

の合成：

実施例1と同様の方法によって、表題のペプチドを100mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 8 6	( 1 )
S e r	1 . 0 0	( 1 )
G l y	1 . 2 6	( 1 )
T r p	-	( 1 )
A r g	1 . 0 0	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(60分)のgradient溶出での分析HPLCで保持時間20.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値758.3、実測値758

〔実施例10〕

Hydrooroetyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(14)

の合成：

実施例1と同様の方法によって、表題に示すペプチドを100mg合成した。

アミノ酸分析 (6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	1. 3 5 (1)
S e r	0. 8 7 (1)
G l y	1. 0 0 (1)
T r p	- (1)
A r g	0. 9 7 (1)

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) の gradient 溶出での分析 H P L C で保持時間20.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値760.3、実測値760

[実施例 1 1]

Pyroglutamyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(15)

の合成:

実施例 1 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを100mg 合成した。

アミノ酸分析 (6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0. 8 6 (1)
S e r	1. 0 0 (1)
G l u	1. 1 2 (1)
G l y	1. 2 2 (1)
T r p	- (1)
A r g	1. 1 3 (1)

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) のgradient溶出での分析HPLCで保持時間14.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値731.3、実測値731

[実施例 1 2]

Trp-Ala-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(16)

の合成:

実施例 1 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを100mg合成した。

アミノ酸分析 (6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 9 2 ( 1 )
A l a	1 . 0 0 ( 1 )
G l y	1 . 0 0 ( 1 )
T r p	- ( 2 )
A r g	1 . 1 3 ( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) のgradient溶出での分析HPLCで保持時間30.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値790.3、実測値790

[実施例 1 3]

Trp-βAla-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(17)

の合成:

実施例 1 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを100mg  
合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 9 0	( 1 )
$\beta$ A l a	-	( 1 )
G l y	1 . 0 0	( 1 )
T r p	-	( 2 )
A r g	1 . 0 7	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 ×200mm)カラム (ナカライテスク社  
製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～  
40%(60分) のgradient溶出での分析H P L Cで保持時間30.0分の  
単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値790.3、実測値790

[実施例 1 4]

Trp-Gly-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(18)

の合成:

実施例 1 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを100mg  
合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 9 0	( 1 )
G l y	2 . 0 6	( 2 )
T r p	-	( 2 )
A r g	1 . 0 0	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) のgradient溶出での分析HPLCで保持時間30.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値776.3、実測値776

[実施例15]

2-Oxo-4-thiazolidine carboxyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH

式(19)

の合成:

実施例1と同様の方法によって、表題に示すペプチドを100mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 9 0 ( 1 )
S e r	1 . 0 0 ( 1 )
G l y	1 . 0 6 ( 1 )
T r p	- ( 1 )
A r g	1 . 0 0 ( 1 )

H P L C分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) のgradient溶出での分析HPLCで保持時間24.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値749.3、実測値749

[実施例16]

Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH

式(20)

の合成：

p-alkoxybenzyl alcohol型(式(2)) (Trpの導入量：0.87meq/g; BACHEM社製) 樹脂0.275g(0.25mmol)を反応容器に移し、DAMPの存在下でFmoc-Trpを活性エステルでこれに導入した後、表1に示す振盪、濾過ステップを繰り返して、保護ペプチド樹脂  
Pro-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Arg(Pmc)-Gly-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Trp-O-Resin 式(21)  
を得た。

次に、得られた保護ペプチド樹脂を0℃のトリフルオロ酢酸中でm-クレゾール、エタンジチオール及びチオアニソール存在下に1時間処理を行った。エバポレーターでトリフルオロ酢酸を留去後に、樹脂を濾去し、濾液にジエチルエーテルを氷冷下に加え、樹脂から切断されたペプチドを粉末として得た。そして、当該粉末をジエチルエーテルで洗浄した。当該洗浄物をセファデックスG-10 (ファルマシア社製)を支持体としたゲルクロマトグラフィーにより脱塩し、これを凍結乾燥して粗ペプチドを得た。得られた粗ペプチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) [カラム：ODS 5C<sub>18</sub> (μbondasphere, 20×150mm)、移動相：(A)0.1%TFA, (B)100%CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA、gradientは、(A):(B)=90:10から(A):(B)=70:30、流速17ml/min]で精製し、更にセファデックスG-25 (ファルマシア社製)を支持体としたゲル濾過クロマトグラフィーにより酢酸塩とし、これを凍結乾燥することによりPro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OHで示される本発明ペプチドを40mg得た。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110℃)

A s p            0 . 8 5 ( 1 )

S e r	1 . 0 0	( 1 )
G l y	1 . 2 3	( 1 )
T r p	-	( 1 )
A r g	1 . 1 3	( 1 )
P r o	1 . 3 1	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラムを用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(60分)のgradient溶出での分析H P L Cで、保持時間18.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値717.3、実測値717

[実施例17]

(L-2-Azetidinecarboxyl)-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(22)

の合成：

実施例16と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 9 3	( 1 )
S e r	1 . 0 0	( 1 )
G l y	1 . 1 9	( 1 )
T r p	-	( 1 )
A r g	1 . 1 5	( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム(ナカライテスク社製)を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~

40%(60分)のgradient溶出での分析HPLCで保持時間18.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値703.3、実測値703

〔実施例18〕

(L-Pipecolinyl)-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(23)

の合成：

実施例16と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p 0 . 9 1 ( 1 )

S e r 1 . 0 0 ( 1 )

G l y 1 . 1 5 ( 1 )

T r p - ( 1 )

A r g 1 . 1 1 ( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム(ナカライテスク社製)を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分)のgradient溶出での分析HPLCで保持時間20.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値731.3、実測値731

〔実施例19〕

5-Hydantoinacetyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(24)

の合成：

実施例1と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

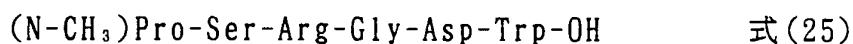
A s p	1 . 1 9	( 1 )
S e r	1 . 0 0	( 1 )
G l y	1 . 2 6	( 1 )
T r p	-	( 1 )
A r g	1 . 1 3	( 1 )

H P L C分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(60分) のgradient溶出での分析H P L Cで保持時間16.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値760.3、実測値760

[実施例20]



の合成:

実施例16と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 8 4	( 1 )
S e r	1 . 0 0	( 1 )
G l y	1 . 1 6	( 1 )
T r p	-	( 1 )
A r g	1 . 1 1	( 1 )

H P L C分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社

製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) のgradient溶出での分析HPLCで保持時間21.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値731.3、実測値731

[実施例 2 1]

ThioPro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(26)

の合成:

実施例 1 6 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 8 4 ( 1 )
S e r	1 . 0 0 ( 1 )
G l y	1 . 1 6 ( 1 )
T r p	- ( 1 )
A r g	1 . 1 1 ( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) のgradient溶出での分析HPLCで保持時間20.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値735.3、実測値735

[実施例 2 2]

(N-Acetyl)Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(27)

の合成:

実施例 1 6 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg

合成した。

アミノ酸分析 (6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

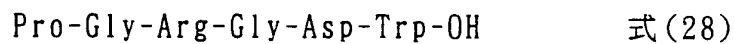
A s p	0 . 9 0 ( 1 )
S e r	1 . 0 0 ( 1 )
G l y	1 . 1 7 ( 1 )
T r p	- ( 1 )
A r g	1 . 1 0 ( 1 )
P r o	1 . 0 0 ( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(60分) のgradient溶出での分析H P L Cで保持時間22.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値759.3、実測値759

[実施例 2 3]



の合成：

実施例 1 6 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg合成した。

アミノ酸分析 (6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 8 4 ( 1 )
G l y	1 . 9 6 ( 2 )
T r p	- ( 1 )
A r g	1 . 0 6 ( 1 )
P r o	1 . 0 0 ( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) の gradient 溶出での分析 H P L C で保持時間20.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値687.3、実測値687

[実施例 2 4]

(4-hydroxy)Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(29)

の合成:

実施例 1 6 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg 合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	0 . 8 8 ( 1 )
S e r	0 . 9 3 ( 1 )
G l y	1 . 0 4 ( 1 )
T r p	- ( 1 )
A r g	1 . 0 0 ( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) の gradient 溶出での分析 H P L C で保持時間17.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値733.3、実測値733

[実施例 2 5]

(3,4-Dehydro)Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(30)

の合成

実施例 16 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg 合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

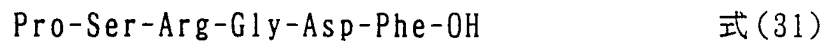
A s p	0 . 9 4 ( 1 )
S e r	0 . 9 4 ( 1 )
G l y	1 . 0 6 ( 1 )
T r p	- ( 1 )
A r g	1 . 0 0 ( 1 )

H P L C 分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) の gradient 溶出での分析 H P L C で保持時間20.0分の単一ピークを示した。

F A B - M S : M + H 計算値715.3、実測値715

[実施例 26]



の合成：

実施例 16 と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg 合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

A s p	1 . 0 4 ( 1 )
S e r	0 . 9 0 ( 1 )
G l y	1 . 0 4 ( 1 )
P h e	1 . 0 3 ( 1 )

Arg 1.00 (1)

Pro 1.08 (1)

#### HPLC分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) のgradient溶出での分析HPLCで保持時間17.0分の単一ピークを示した。

FAB-MS : M+H 計算値678.3、実測値678

[実施例27]

Sar-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH 式(32)

の合成:

実施例16と同様の方法によって、表題に示すペプチドを40mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110°C)

Asp 0.87 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.14 (1)

Trp - (1)

Arg 1.04 (1)

#### HPLC分析

Cosmosil 5C18-AR (φ 4.6×200mm)カラム (ナカライテスク社製) を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10～40%(60分) のgradient溶出での分析HPLCで保持時間17.5分の単一ピークを示した。

FAB-MS : M+H 計算値691.3、実測値691

〔試験例1〕本発明の化合物の血小板凝集抑制能  
合成ペプチドの活性測定

①PRPを用いたin vitroヒト血小板凝集

少なくとも2週間以上いかなる薬も服用していない健康な男性を被験者とした。採血は、19号の注射針と1/10容量の3.8%のクエン酸ナトリウム溶液を予め入れておいたプラスチックシリンジを用い、空腹時に下はく部の静脈から採血を行った。採血後速やかに、シリンジを軽く攪拌して両液を混合した。この血液を室温で15分間遠心分離し(1100rpm, 250g)、ブレーキをかけずに回転を止めた後、上清を駒込ピペットで取り、多血小板血漿(PRP)とし室温で保存した。遠心後の残りの血液をさらに室温で15分間遠心分離し(3500rpm, 1500g)、ブレーキをかけずに停止させた後の上清を取り、寡血小板血漿(PPP)とした。PRP調整後血小板数を計測し、血小板数が $2 \times 10^8$ /ml以上のものについてのみに以下に述べる実験を行った。

血小板の凝集は、8チャンネルの血小板凝集測定機(Hematrace r, Nikoh Bioscience, Tokyo, Japan)を用いてPRPの光の透過度の変化から測定した。まず、200 $\mu$ lのPPP, PRPをガラスキュベットに入れ、37 $^{\circ}$ Cでインキュベート後、透過度を測定しPPPの透過度を100%、PRPの透過度を0%とした。次に、生理食塩水またはサンプルを含む生理食塩水をPRPに10 $\mu$ l加え37 $^{\circ}$ Cで1分間インキュベートした後、さらに100 $\mu$ g/mlのコラーゲン溶液を10 $\mu$ l加え(終濃度5 $\mu$ g/ml)凝集を誘発し、以後7分間透過度を測定した。実験は、最初にコラーゲンとADPを用いて凝集が起こることを確認し、コラーゲンの最大凝集率が70

%以上のものについてのみ、実験に用いた。

サンプルは $2.2 \times 10^{-2}$  Mになるように生理食塩水に溶解し、これを基に2倍の希釈系列を調整し実験に用いた。生理食塩水に不溶のサンプルについては10%のDMSO (Dimethyl sulfoxide)を含む生理食塩水に溶解した。

結果は次のように計算する

$$\text{凝集抑制率} = \left( 1 - \frac{\text{サンプル添加時の最大凝集率}}{\text{生食のみ添加時の最大凝集率}} \right) \times 100 \quad \text{計算式(1)}$$

サンプルの濃度に対し凝集抑制率をプロットした図を作図し、この図から凝集を50%抑制する濃度 ( $IC_{50}$ ) を計算した。表2に各サンプルの $IC_{50}$ を示す。

表2 本発明ペプチドの血小板凝集抑制活性

ペプチドの種類	IC <sub>50</sub>
Trp-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例1)	6.3×10 <sup>-6</sup> M
Trp-Val-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例2)	8.3×10 <sup>-6</sup> M
CH <sub>3</sub> CO-Trp-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-NH <sub>2</sub> (実施例3)	1.0×10 <sup>-5</sup> M
5-Methoxyindole-3-acetyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例4)	1.1×10 <sup>-5</sup> M
2-Methylindole-3-acetyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例5)	2.2×10 <sup>-5</sup> M
Indole-3-butanoyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例6)	2.7×10 <sup>-5</sup> M
Indole-3-acetyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例7)	2.1×10 <sup>-5</sup> M
Phe-Ser-Arg-Gly-Asp-Phe-OH (実施例8)	6.7×10 <sup>-5</sup> M
Orotyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例9)	4.0×10 <sup>-6</sup> M
Hydroorotyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例10)	8.7×10 <sup>-6</sup> M
Pyroglutamyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例11)	5.7×10 <sup>-6</sup> M
Trp-Ala-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例12)	3.1×10 <sup>-5</sup> M
Trp-βAla-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例13)	1.2×10 <sup>-5</sup> M
Trp-Gly-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例14)	2.2×10 <sup>-5</sup> M
2-Oxo-4-thiazolidine carboxyl -Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例15)	2.8×10 <sup>-5</sup> M
Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例16)	8.7×10 <sup>-7</sup> M
(L-2-Azetidinecarboxyl)-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例17)	1.3×10 <sup>-6</sup> M
(L-Pipecolinyl)-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例18)	1.1×10 <sup>-5</sup> M
5-Hydantoinacetyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例19)	6.9×10 <sup>-6</sup> M
(N-CH <sub>3</sub> )Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例20)	1.1×10 <sup>-5</sup> M
Thiopropyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例21)	2.8×10 <sup>-5</sup> M
(N-Acetyl)Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例22)	1.3×10 <sup>-5</sup> M
Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例23)	5.5×10 <sup>-6</sup> M
(4-hydroxy)Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例24)	2.7×10 <sup>-5</sup> M
(3,4-Dehydro)Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例25)	1.6×10 <sup>-6</sup> M
Pro-Ser-Arg-Gly-Asp-Phe-OH (実施例26)	1.6×10 <sup>-6</sup> M
Sar-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (実施例27)	3.5×10 <sup>-6</sup> M
Arg-Gly-Asp-Ser-OH (比較例1)	4.6×10 <sup>-6</sup> M

この表 2 により、フィブリノーゲン分子中に存在するアミノ酸配列である R G D S に比べ（表 2、比較例 1）、R G D 配列の両端に Trp などの疎水性の基を持つ分子を導入することにより血小板凝集阻害活性が大きく上昇することが判明した。比較例として表 2 に挙げたフィブリノーゲン分子中のアミノ酸配列である R G D S - O H（ペプチド研究所（箕面市）より購入）に比べて、本発明ペプチドの血小板凝集抑制能力が著しく向上していることが判明した。

〔試験例 2〕 合成ペプチドの血漿中および生体内での安定性

（1）全血・血漿中での安定性評価

〔方法〕

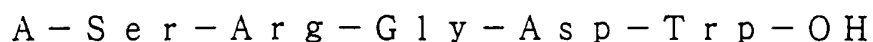
少なくとも 2 週間以上いかなる薬も服用していない健康な男性を被験者とし、採血を行なった。予め 1/10 容量の 3.8 % クエン酸ナトリウム溶液を入れておいたプラスチックシリンジを用い、空腹時に下はく部の静脈から血液を採取した。採血後速やかにシリンジを攪拌して両液を混合した。全血中での安定性は、この血液をそのまま用いて実験を行なった。一方、血漿中での安定性は、この血液を 10 分間遠心分離し（800g）、ブレーキをかけずに回転を止めた後の上清を血漿画分とし、実験を行なった。

試験管に全血又は血漿を 225  $\mu$ l 入れ、37°C に加温した。合成ペプチドは、生理食塩水（pH7.4）に溶解し 1 mM の溶液とした。この合成ペプチドの溶液を全血又は血漿に 25  $\mu$ l 添加し（最終濃度 100  $\mu$ M）、一定時間インキュベートした。インキュベート後、当該溶液を氷冷して分解反応を停止した。血漿はこのまま -20°C で凍結保存した。一方、全血は 2000g で 4°C で 5 分間遠心分離し

、上清のみを凍結保存した。

サンプルは、逆相のHPLCで分析を行なった。各合成ペプチドのピーク面積を計算し、ピーク面積の変化を指標に血液又は血漿中での安定性を評価した。

第1図～第3図は、一般式



で表されるペプチド及びその類似化合物（式中、Aはアミノ酸又はアミノ酸誘導体、ビタミン・ビタミン様作用物質又はそれらの誘導体、核酸の塩基又はその誘導体）の血漿中での安定性を比較した図である。また、表3はそれらの半減期をまとめたものである。

表3 ヒト血漿中での合成ペプチドの安定性  
各合成ペプチドの血漿中半減期

合成ペプチド	半減期
実施例9	240分以上
実施例18	120分以上
実施例16	74.5分
実施例1	11.5分
実施例11	240分以上

Aが天然のアミノ酸であり、かつ一級のアミノ基をもつトリプトファンの場合には非常に早い分解を受け、その半減期は11.5分であった。これに対してAが天然のアミノ酸であるが、二級のアミノ基（イミノ基）を持つプロリンの場合には、血漿中ではプロリンに比べて安定になり、半減期は74.5分であった。一方、同じ二級のアミノ基（イミノ基）を持つプロリン誘導体でも、ヘテロ環の炭素数あるいは側鎖の存在により、血漿中の安定性は大きく異なった。ヘテロ5員環構造を有するプロリンに対し、ヘテロ4員環構造を有するアゼチジンカルボン酸を導入した化合物は、半減期が49分でありプロリンよりも血漿中の分解性が高かった。これに対し、ヘテロ6員環構造を有するピペコリン酸を導入した化合物の血漿中での半減期は120分以上であり、非常に安定であった。

これに対し、Aにオロチン酸やピログルタミン酸など、ヘテロ環構造にカルボニル基を持つアミノ酸、核酸、ビタミン誘導体を導入した化合物は共に血漿中で極めて安定であり、半減期は240分以上であった。

全血中での安定性も血漿中での安定性とほぼ同様に傾向を示し、半減期にも違いは見られなかった。

このように、合成ペプチドの両端に導入する化合物を様々なものに変えることにより、血漿中での安定性の異なる様々な化合物を得ることができる。そして、このような血液中での安定性が異なる化合物は、例えば体外循環用血液凝固抑制剤への応用等を考えたときに、人工透析や人工心肺等の体外循環システムの違い・

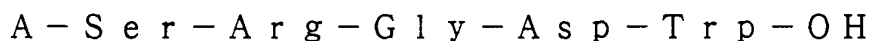
手術時の出血量の違い、等様々な状況の違いに応じた使い分けを可能にし、適用目的によって最適の化合物を適用できるという点で大きな意味があると考えられる。

(2) 生体内での安定性評価

〔方法〕

安定性の評価には、MCH (ICR) 系のマウス (オス、体重 28~32g) を用いた。各合成ペプチドを滅菌した生理食塩水に 10mM ~ 20mM の濃度で溶解した物をサンプル溶液とし、尾静脈からマウス 1 匹当たり 0.15ml ずつ静脈内投与を行なった (1 ~ 2 mg/mouse)。一定時間後に、腹部静脈からヘパリン処理した注射器で採血を行なった。採血後、血液はすぐに 4℃ で遠心分離し (1500g, 3 分)、上清を -20℃ で凍結保存した。各上清は、前述の血漿中での安定性評価の場合と同様に、逆相の HPLC で分析を行なった。

第 3 図及び表 4 は、一般式



で表されるペプチド及びその類似化合物 (式中、A はアミノ酸又はアミノ酸誘導体、ビタミン・ビタミン様作用物質又はそれらの誘導体、核酸の塩基又はその誘導体) の生体内での安定性について調べた結果を示している。

表 4 マウス体内での合成ペプチドの安定性

各合成ペプチドのマウス体内での半減期

合成ペプチド	半減期
実施例 9	10.1分
実施例18	3.3分
実施例16	2分以下
実施例 1	2分以下

Aにトリプトファン、プロリン等天然のL-アミノ酸を導入した化合物は、生体内での高分解性という特徴を有し、静脈内投与後、採血までの時間でほぼ完全に分解された（生体内半減期2分以下）。これに対し、プロリン類似物質であるアゼチジンカルボン酸を導入した化合物は半減期3.3分、ビタミン様作用物質であるオロチン酸を導入した化合物は半減期6.9分であり、天然のL-アミノ酸を導入した化合物に比べ、ある程度の高分解性を有し

ていた。

このように、前述の一般式で表されるペプチド性化合物は、全体的に生体内の高分解性という特徴を有している。これは、体外循環用血液凝固抑制剤への本発明ペプチド等の応用を考慮したときに、極めて意義深い点である。すなわち、これらの化合物は、体外で循環中には数分から数時間半減期を保ち血小板凝集を抑制するに対し、血液が体内に戻ると数分以内に分解される。つまり、体外循環システム中では抗血栓作用があるにもかかわらず、体内での止血時間延長作用がないという非常に優れた特徴を有する化合物である。

。

〔試験例 3〕 本発明ペプチド等に体外循環用血液凝固抑制剤としての有用性

(1) 本発明ペプチド等と現在抗凝固剤として用いられているヘパリンが体内でどの位の期間、分解あるいは排出されずに残り、その作用が持続するかを調べるために、ビーグル犬を用いた静脈内投与の実験を行った。

本発明ペプチド等は、血小板凝集を抑制する作用を有しているので、化合物を体内に静脈から投与した後、経時的に血液を採取し、各時点での血液の血小板凝集抑制活性を測定することで、当該ペプチド等が分解されずに体内どの位残存しているかを知ることができる。すなわち、当該ペプチド等の体内における安定性を推定することができる。

実験には、体重約10Kgの雄のビーグル犬を用いた。実施例 9 で得た本発明ペプチド等を生理食塩水に溶解し、とう側皮静脈より

21G の注射針を装着した注射筒を用いて投与した。投与前及び投与後、5, 15, 30, 60, 120, 180, 360分に無麻酔下でビーグル犬のとう側皮静脈から20G の注射針に延長チューブを装着したのものを用いて自然流血により、3.8%クエン酸ナトリウム1容、全血9容の割合で採血を行った。採取した血液は、1000rpm で10分間の遠心分離を行い、多血小板血漿 (PRP) を分取し、さらに3000rpm で15分間の遠心分離で乏血小板血漿 (PPP) を分取した。

血小板凝集能の測定は、上記のPRP を用い、コラーゲン及びADPによる血小板凝集をaggregometerで測定した。ADP及びコラーゲンの添加濃度は、ADPで最終濃度7.5 ~10.0  $\mu$ M、コラーゲンで最終濃度7.5 ~10.0  $\mu$ g/mlとした。

第4図のAは、実施例9の本発明ペプチド等をビーグル犬の体重1Kg当たり5mg投与した時の、血小板凝集活性の回復の時間経過を示す。凝集素は、10  $\mu$ g/mlのコラーゲンである。投与直後の5分後には血小板凝集は完全に抑制されるが、時間経過と共に血小板凝集活性の回復が見られ、45~60分後には完全に投与前のレベルにまで回復した。コラーゲンの濃度を変えた場合、あるいは凝集素としてADPを用いた場合にも全く同様の結果が得られた。このことは、当該ペプチド等が、長くても60分以内に体内で分解あるいは腎臓から体外に排出され、血液中の濃度が低下したことを示している。

(2) 現在抗凝固剤として用いられているヘパリンを、本発明ペプチド等に対する比較例として用いた。

しかしヘパリンは、血小板に対しては作用を持たない物質であり、上記(1)のような方法では、体内での安定性を測定すること

ができない。そこで、ヘパリンの主作用である抗凝固作用の変化を経時的に測定することで、体内における安定性を推定した。

実験は、生理食塩液に溶解したヘパリンを、上記(1)と同様の方法で静脈内に投与し、経時的に血液を採取し、PPPを調製した。

抗凝固作用の測定は常法に従い、上記のPPPを用いて、試験管内での血液凝固活性の指標であるプロトロンビン時間と活性化部分トロンボプラスチン時間を測定することで行った。それぞれの測定は、37℃で3分間のプレインキュベーション条件下で行った(AMELUNG KC-10A, バクスター株式会社製)。プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長(すなわち、凝固までの時間の延長)が投与後どれ位継続するかで、ヘパリンが体内からどれ位の速度で消失するかを知ることができる。

第4図のBは、ビーグル犬に体重1Kg当たり200Uのヘパリンを静脈内投与した時の、プロトロンビン時間の延長傾向の経時的変化を示した図である。ヘパリン投与直後には、プロトロンビン時間は投与前に比べ1.5～2.0倍にまで延長したが、時間を経るに従い、プロトロンビン時間は投与前のレベルに徐々に戻った。しかし、完全に投与前のレベルに回復するまでには、2～3時間を要した。活性化部分トロンボプラスチン時間についても同様の結果が得られた。このことは、ヘパリンは体内での分解あるいは体内からの排出が遅く、数時間はその作用が残存することを示している。

このようにして、従来から体外循環時の抗凝固剤として用いられているヘパリンに比べ、実施例9において調製した本発明ペプ

チド等は非常に早くその作用を消失した。このことは、人工透析等の体外循環システム使用終了後も出血傾向が数時間続くという問題点を有する現在の抗凝固剤であるヘパリンの欠点を補うものであり、かかるヘパリンに代わる新しい血液凝固抑制剤として当該ペプチド等が十分に期待できるものであることを示している。

### (3) ビーグル犬を用いた体外循環モデルでの実験

本発明ペプチド等が、体外循環システム中での血液凝固を抑制する作用があることを確認するため、体外循環モデルの一つであるビーグル犬の人工透析モデルを用いた実験を行った(Hamano, et al., Thromb. Res. 55(1989)438-449 を参照のこと)。

実験には、体重約10~12Kgのビーグル犬を用いた。ペントバルビタール(約30mg/Kg)で麻酔したビーグル犬の右後肢を切開し、大腿動脈と大腿静脈を露出させた。動脈及び静脈それぞれにカニューレを挿入し、第5図に示すような回路構造の実験用人工透析器(Kuraray, Osaka, Japan)に連結した。透析膜としては、中空糸膜型(RENAK-A, RA-04, 0.4m<sup>2</sup>, Kawasumi Laboratories, Tokyo)を使用した。大腿動脈と透析器の間には血液用のポンプを入れ、体外循環システムの中の血流量が常に25ml/minになるようにして実験を行った。

実験時の測定パラメーターは、①透析膜上流部での圧力(灌流圧)、②血小板粘着率、③全血凝固時間、の3項目である。①の圧力の測定は、第5図に示すように、透析回路中、透析膜上流部に組み込んだ圧力計を用いて行った。透析膜部位は異物との接触が多く、また狭い空間を血流が通るため、透析回路中で一番血液

凝固が起こりやすい部分であり、ここで血液凝固が起こると、透析膜が目詰まりを起こして上流部の血圧が上昇する。すなわちこの部分の灌流圧の変化は、透析回路での血液凝固の程度の指標となる。一方②、③については、透析部分への入口、出口の部分で一定時間おきに少量の血液をサンプリングし、常法に従い測定した。それぞれに血小板の機能（②）、血液凝固の機能（活性化の程度、③）が、実験の進行と共に、どのように変化するかを知るためのパラメーターである。

実験は回路装着後すぐに、動脈側（透析回路入り口側）から、生理食塩水に溶解した本発明ペプチド等の連続注入を開始した。注入量は10mg/ 個体又は30mg/ 個体であり、全量を1時間かけて徐々に注入した（注入量1 ml/min）。対照実験においては、生理食塩水のみを同様の方法で連続注入した。60分後に薬物の注入を中止し、以後180分まで、血液を循環させ上記のパラメーターについてさらに測定を継続した。ただし、圧力が500mmHgを越えたものについては、その段階で実験を終了した。

第6図に、実施例9の化合物の灌流圧上昇に対する抑制効果について調べた実験の結果を示す。横軸は薬物投与開始後の時間を、縦軸は灌流圧を示している。灌流圧は、回路装着直後には0 mmHgであり、血液凝固が起こるとこの値が大きくなる。生理食塩水のみ注入した対照群では、10分以降急激な灌流圧の上昇が認められ、25分で500mmHgを越え、測定不能となった。このように、薬剤を何も投与しないと、急速に透析回路中で、特に透析膜部位で血液の凝固が起こる。これに対し、実施例9の本発明ペプチド等を添加した場合には、明らかな血液凝固の抑制作用が見られた。

投与量が10mg/ 個体のときには、灌流圧の上昇の仕方が明らかに遅くなり、その効果は、注入終了後も持続した。さらに、薬剤投与量を30mg/ 個体に増加した場合には、薬物注入中はほとんど、灌流圧の上昇が見られなかった。

血小板凝集能、全血凝固時間についても灌流圧の上昇パターンとほぼ平行した変化を示した（図示せず）。すなわち、対照群では、時間と共に血小板凝集能の上昇、全血凝固時間の短縮が起こった。これは血小板が活性化され、さらに血液凝固系も活性化されていることを示しており、血液凝固が非常に起こりやすい状態であった。一方、実施例9の本発明ペプチド等を投与した例では、連続注入中、血液の粘着能がほぼ0%まで下がり、完全に血小板活性が抑制された状態であることが判明した。また、この期間全血凝集時間も有意に延長した。

このように本発明ペプチド等は、体外循環システム中での血液凝固をほぼ完全に抑制した。このことは、現在使用されているヘパリンの代替物として、本発明ペプチドが十分に使用可能であることが示されている。前述したように、ヘパリンは体外循環システム中での血液凝固を完全に抑える反面、体内からの排出速度が遅く、システム脱着後も数時間は、血液凝固を抑制し、出血傾向を助長してしまうという大きな欠点を有する。かかる点で本発明ペプチド等は、第4図に既に示したごとく、ヘパリンとは異なり体内での分解性が極めて良好で、注入を止めれば比較的速やかに血液凝固は薬物投与前の正常なレベルに回復するという利点を有する。また、本発明ペプチド等は極めて低毒性であることから、前記ヘパリンの欠点を補う全く新しい血液凝固抑制剤として極め

て有望である。

上記に示すように、本発明ペプチド等は生理食塩水あるいはクエン酸溶液に溶解して1時間当たり3mg程度を体外循環システムの入口付近から点滴等で連続注入すれば、十分な血液凝固効果が期待できる。実際にヒトに適用する際には、さらに投与量を減らすことも可能であると考えられる。

また、クエン酸溶液、ヘパリン、フサン、血栓溶解剤等の作用機序の全く異なる抗凝固剤と併用すれば、相乗的な効果が期待でき、両者の使用量を減らすことが可能であり、より安全性を高めることができる。

〔試験例4〕本発明ペプチド等の輸血用血小板製剤保護剤としての有用性

少なくとも2週間以上いかなる薬も服用していない健康な男性を被験者とした。採血は、目的とする最終濃度の10倍の濃度の合成ペプチドを3.8%クエン酸ナトリウム溶液に溶解した合成ペプチド溶液を1/10容量予めシリンジに入れておき、19号の注射針を用いて空腹時に、下はく部の静脈より行った。採血後、速やかにシリンジを軽く攪拌して、両液を混合した。この血液に、室温で15分間遠心分離(1100rpm, 250g)を施してブレーキをかけずに回転を止めた後、上清を駒込ピペットで取り、当該上清を血小板分画とした。さらに残りの血液を遠心分離し(3000rpm, 1000g)、上清を寡血小板血漿として保存した。

血小板分画は、ポリプロピレン製の試験管に入れ、通気性を確保するためにメンブレンフィルターで蓋をした後、振盪器にのせ、振幅20cm、振盪数2Hzの条件で振盪しながら室温で保存を行っ

た。以上の操作は全て無菌的に行い、保存中の細菌の増殖を防いだ。

一定時間保存後に血小板分画の一部を取り、血小板数を測定した後、最終濃度 $20\mu\text{g/ml}$ となるようにプロスタグランジンE1(シグマ社製)を加え、 $750\text{g}$ で10分間遠心分離を行い、上清を除去した後、プロスタグランジンE1を含むヘペスータイロード緩衝液で血小板を2回洗浄し、保護ペプチドを取り除いた。最後に、血小板を予め保存してあった寡血小板血漿に浮遊させ、一定時間インキュベートした後、前述した方法により血小板の凝集能を測定した。

第7図は、保存に伴う血小板数の変化を示した図である。生理食塩水のみ添加した対照群では、血小板数は保存時間にほぼ比例して減少した。これに対し、実施例9の化合物(式(14))を添加した群では、無添加の対照群に比べ有意な血小板数の減少に対する抑制効果が見られた。この保護効果は添加するペプチド濃度依存的であり、 $400\mu\text{M}$ を添加したときには72時間の保存中に血小板数の減少はほとんど見られなかった。

第8図は、血小板凝集能の保存に伴う経時的変化を示している。無添加の対照群では、72時間の保存で血小板の凝集活性は25%まで減少したが、実施例9の化合物(式(14))を添加した群では凝集活性の低下が有意に抑制された。この凝集活性の低下に対する抑制効果は、添加するペプチド化合物の濃度に依存しており、 $400\mu\text{M}$ を添加したときには72時間の保存後にも血小板の凝集活性は60~70%残存していた。

このように血小板分画に本発明ペプチド等を添加することによ

り、保存に伴う血小板数の減少、血小板凝集能の低下の抑制等の血小板保護作用が得られた。従来から知られている、RGDSやRGDF等のペプチド性化合物は、血小板分画に添加しても、血漿中の酵素の作用で数時間以内に分解されてしまうことが確認されており、これらの化合物が長時間の血小板保存時には使用できないのは明らかである。また、逆に非常に安定で体内に入っても容易に分解されない化合物は、輸血後に体内の全ての血小板の機能を抑制することになり、輸血の有効性を低下させてしまうことになる。その点、本発明ペプチド等は、血小板分画中での高安定性、体内での高分解性及び低毒性という特徴を有するという点で非常に優れた血小板保護剤であると考えられる。

また、本発明ペプチド等を酢酸塩やリン酸塩の形で投与することで、緩衝作用を付加し血小板分画の保存に伴うpHの変化を抑制するような効果も期待できる。さらに本発明ペプチド等の単独投与ではなく、アスピリン等の作用機作の異なる血小板凝集抑制薬との併用による効果も期待できる。

〔試験例5〕本発明ペプチド等のガン転移抑制剤としての有用性

(1)細胞外基質蛋白質としては、1型コラーゲン（岩城ガラス、type I-c）、4型コラーゲン（岩城ガラス、type IV）、フィブロネクチン（ヒト由来、岩城ガラス）、ビトロネクチン（ヒト由来、岩城ガラス）、ラミニン（マウスEHA肉腫由来、岩城ガラス）を用い、これらの細胞外基質蛋白質を吸着させたプラスチックプレートに対する細胞の接着を調べる実験を行った。

a) 細胞外基質蛋白質吸着プレートの作成法

コラーゲンは、塩酸でpH3.0に調節した生理食塩水で希釈し、

100  $\mu\text{g/ml}$ に調製した希釈溶液を吸着に使用した。一方、残りの3つの蛋白質はpH7.4のPBSで希釈し、20  $\mu\text{g/ml}$ に調製し使用した。

例えば1型コラーゲン吸着プレートを作成する際には、1型コラーゲンの希釈溶液を0.4ml ずつ24穴のプラスチックプレートに入れ、37°Cで一晩保温し、1型コラーゲンを吸着プレートに吸着させた。さらに、非特異的な細胞の吸着を防ぐために3%牛血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSを各穴に入れ、37°Cで1~2時間処理した。最後にPBSで3回洗浄し、1型コラーゲン吸着プレートとした。その他の細胞外基質蛋白質についても全く同様の方法で吸着プレートを作成した。

#### b)細胞接着阻害活性の測定法

本発明ペプチド等を血清を含まないEMEM培地(ニッスイ製)で希釈し、5 mM, 0.5 mM, 50  $\mu\text{M}$  及び5  $\mu\text{M}$ の希釈系列を作製した。上記の細胞外基質蛋白質吸着プレートに予め300  $\mu\text{l}$ の血清を含まないEMEM培地を入れておき、次に各穴に各濃度のペプチド溶液を100  $\mu\text{l}$  ずつ添加した。実験は、一つの濃度につき4穴を用いる4連で行った。ただし、ペプチド無添加の対照群としては、血清を含まないEMEM培地だけを100  $\mu\text{l}$  添加した。次に、HeLa細胞又はB16F10メラノーマ細胞等の浮遊液( $5 \times 10^6$  個/ml)を用意し、各穴に0.1ml ずつ添加した。プラスチックプレートを軽く水平にゆすり、攪拌後、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で1時間インキュベートした。

#### c)接着細胞数の測定

上記に従い、1時間のインキュベーションを行った後、各穴

の溶液を全て取り除き、さらにPBS で3回洗浄し、未接着の細胞を取り除いた。次に3%のパラホルムアルデヒド溶液を0.3ml ずつ各穴に添加し、室温で20分放置した。PBS で2回洗浄後、5%メチレンブルー溶液を添加し細胞を染色した。室温で20分後に、0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH8.5)でよく洗浄し、余分なメチレンブルーを全て取り除き、最後に1規定塩酸を0.3ml ずつ入れ、20分放置した。細胞から遊離してきたメチレンブルーの濃度を分光光度系を用い、600nm の光の吸光度で測定した。なお、この測定系では、細胞外基質蛋白質に付着した細胞数は600nm の吸光度に比例するので、正確な細胞数の測定が可能である。

(2)上記試験例(1)と同様の方法で、比較例の化合物RGDSの細胞接着に対する阻害効果を第9図、第10図はそれぞれHeLa細胞、B16F10メラノーマ細胞の各種細胞外基質蛋白質の接着に対する実施例9の化合物(式(14))及び比較例であるRGDSの影響を調べた結果である。これらの図から明らかのように、ラミニンへの細胞接着に対しては効果は殆ど見られなかったが、それ以外の細胞外基質蛋白質に対する細胞接着は、実施例1に示したペプチド(式(1))により濃度依存的に抑制された。そして、この効果は比較例のRGDSに比べ10~100倍強かった。ラミニンについては、従来からRGDの他に、

T y r - I l e - G l y - S e r - A r g

や

I l e - L y s - V a l - A l a - V a l

といった配列が細胞接着に関係しているといわれており、それぞれの配列に対し特異的な受容体(インテグリン)が存在している

。第9図及び第10図に示す実験でラミニンに対する細胞接着が殆ど阻害されなかったのは、HeLa細胞又はB16F10メラノーマ細胞の細胞表面にこのようなラミニン特異的な受容体が多く発現していたためと考えられる。

このように、本発明ペプチド等は様々なガン細胞の細胞外基質蛋白質に対する細胞接着を抑制する。このことは、これらのペプチド等がガン細胞の血管基底膜への接着を抑制し得るものであることを示しており、ガン転移抑制剤としての可能性を強く示唆している。また、毒性の高い現在の抗ガン剤とは異なり、極めて低毒性の本発明の化合物は長期にわたる服用に耐え得るものであり、今まで存在しなかった新しい分野の薬剤であるガン転移抑制剤として十分期待できるものである。

〔試験例6〕 急性毒性試験

本発明ペプチド等をマウスに100mg/Kgの割合で静脈投与を行ったが、何らの毒性も観察されなかった。

〔製剤例1〕

各実施例で得られた本発明ペプチド等100mgを生理食塩水100mlに溶解し、得られた溶液を無菌的に2.5ml容のアンプルに充填、封入し、注射液製剤とした。

〔製剤例2〕

各実施例で得られた本発明ペプチド500mg、結晶セルロース50mg、乳糖450mgからなる混合物に、エタノールと水の混液1mlを加え練合した。当該混合物を常法に従って造粒して顆粒剤とした。

### 産業上の利用可能性

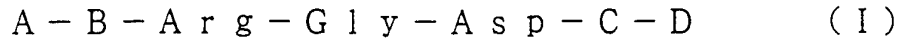
本発明により、血小板凝集阻害作用と血液凝固阻害作用とを有する新規ペプチド、並びに当該ペプチドを有効成分として含有する、血栓崩壊治療中と治療後の血小板血栓症、血栓閉塞症に対して有効な、更には再閉塞や心筋梗塞の予防も可能な血小板凝集抑制剤、及び体外循環時の血栓形成の主原因である血液凝固を抑制し得る血液凝固抑制剤が提供される。

また、本発明により、輸血用血小板製剤保護剤、細胞接着阻害剤、ガン転移阻害剤が提供される。

そしてさらに、本発明により、パック中に輸血用血小板製剤中に上記輸血用血小板製剤保護剤を含ませたことを特徴とする輸血用血小板製剤パックが提供される。

## 請 求 の 範 囲

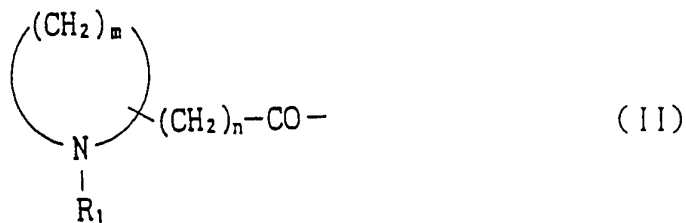
## 1. 一般式



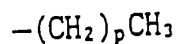
(式中、Aはアミノ酸、アミノ酸誘導体、ビタミン、ビタミン誘導体、ビタミン様作用物質、ビタミン様作用物質の誘導体、核酸の塩基、核酸の塩基の誘導体及びヒダントイン酢酸よりなる群の中から選ばれた化合物；Bはアミノ酸；Cは疎水性官能基を有するアミノ酸；Dは水酸基又はアミノ基を示す)

で表される、ペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩。

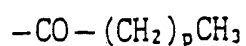
2. Aにおけるアミノ酸若しくはアミノ酸誘導体が、プロリン、チオプロリン、ヒドロキシプロリン、デヒドロプロリン、2-オキソ-4-チアゾリジンカルボン酸、N-アルキルグリシン又は次の一般式



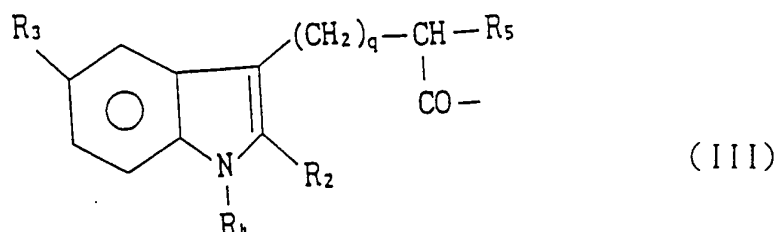
[式中、R<sub>1</sub>は、水素原子、一般式



又は一般式



(式中、 $p$  は 0 ～ 5 の整数である)、 $m$  は 2 ～ 5 の整数、 $n$  は 0 ～ 2 の整数である] で表されるイミノ酸誘導体、トリプトファン又は次の一般式



(式中の  $R_1$  は水素原子又はアルキル基、 $R_2$  は水素原子又は  $o$ -アルキル基、 $R_3$  は水素原子又は  $o$ -アルキル基、 $R_4$  は水素原子又はアルキル基、 $R_5$  は水素原子、アミノ基又はアミノアシル基、 $q$  は 0 ～ 3 の整数である) で表されるトリプトファン誘導体、ピログルタミン酸又は 2-アゼチジノン-4-カルボン酸である、請求の範囲第 1 項記載のペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩。

3. ビタミン様作用物質又はビタミン様作用物質の誘導体が、オロチン酸又はヒドロオロチン酸である、請求の範囲第 1 項記載のペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩。

4. B がセリン、グリシン、バリン、アラニン、スレオニン又は  $\beta$ -アラニンである、請求の範囲第 1 項乃至同第 3 項のいずれか一つに記載されたペプチド若しくはペプチド誘導体又はそれらの塩。

5. C がトリプトファン若しくはフェニルアラニンである、請求の範囲第 1 項乃至同第 4 項のいずれか一つに記載されたペプチド

若しくはペプチド誘導体又はそれらの塩。

6. 請求の範囲第1項乃至同第5項のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、血小板凝集抑制剤。

7. 請求の範囲第1項乃至同第5項のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、体外循環用血液凝固抑制剤。

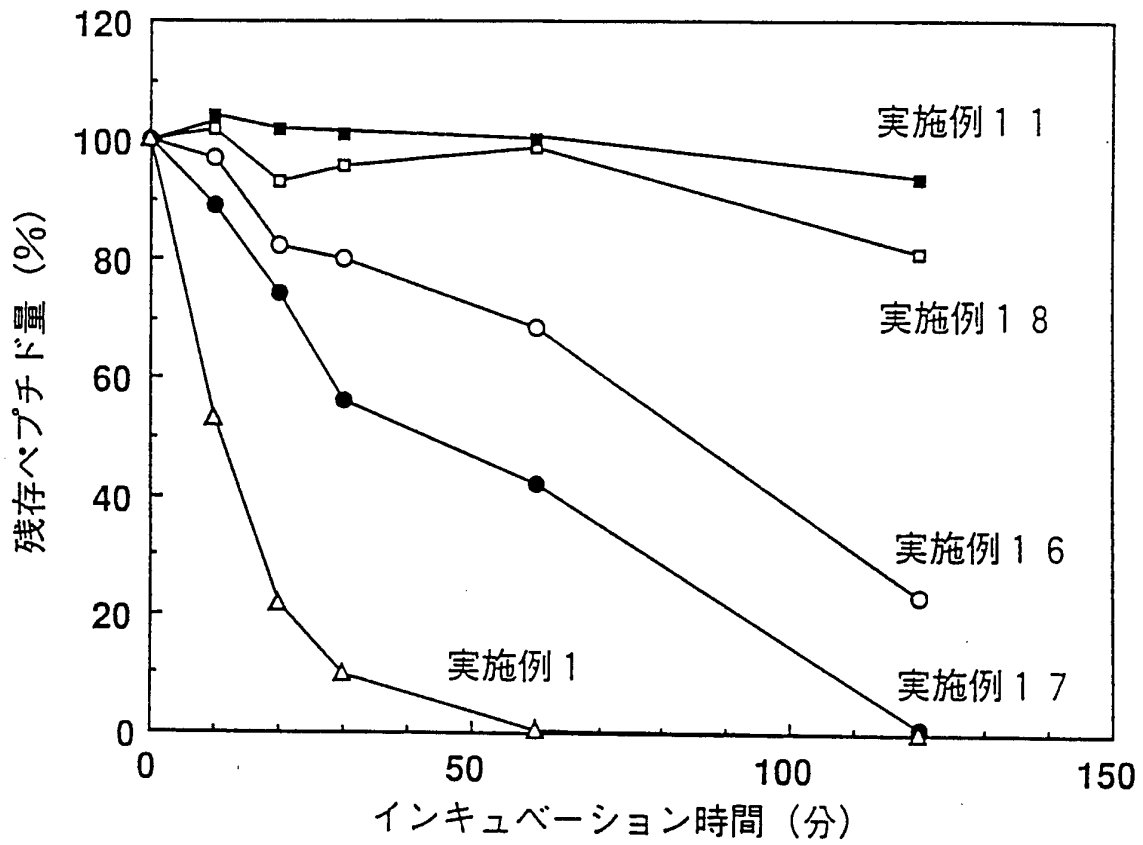
8. 請求の範囲第1項乃至同第5項のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、細胞接着阻害剤。

9. 請求の範囲第1項乃至同第5項のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、ガン転移阻害剤。

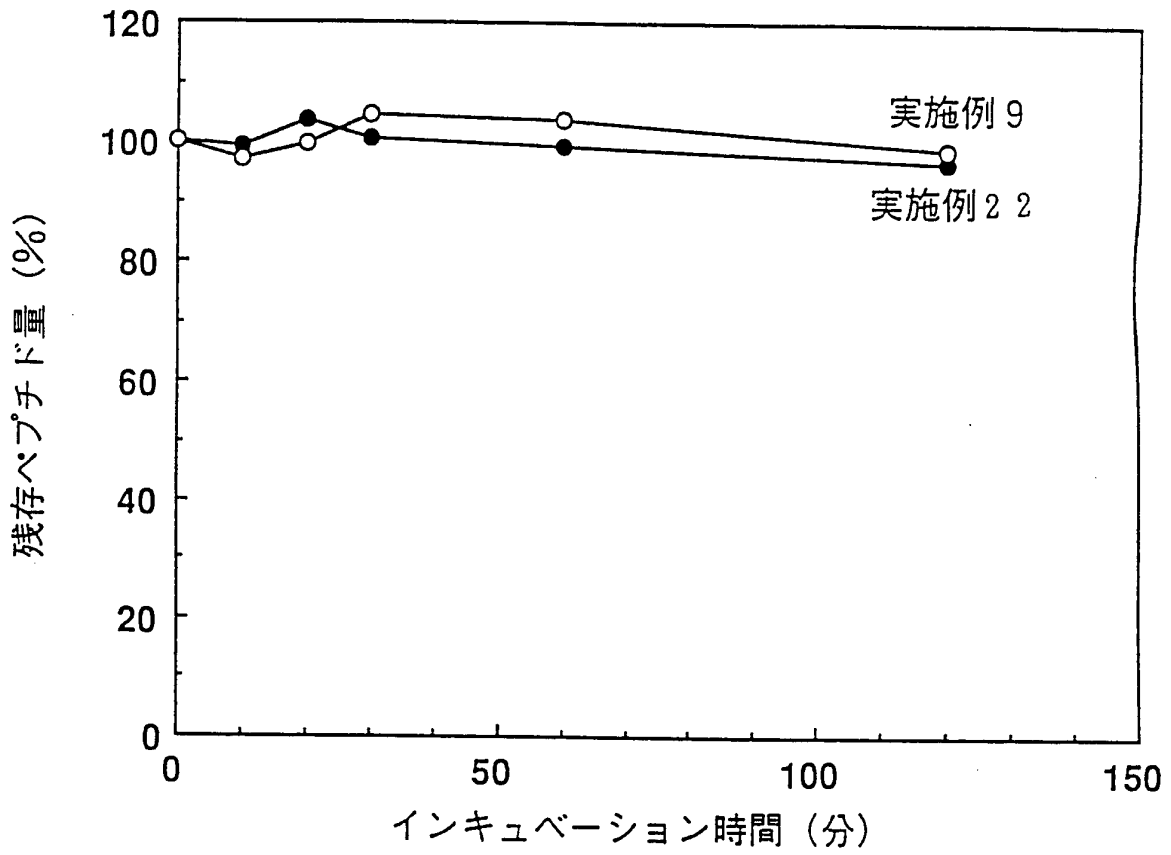
10. 請求の範囲第1項乃至同第5項のいずれか一つに記載されたペプチド、ペプチド誘導体又はそれらの塩を有効成分として含む、輸血用血小板製剤保護剤。

11. 請求の範囲第10項に記載された輸血用血小板保護剤をパック中の輸血用血小板製剤中に含ませたことを特徴とする、輸血用血小板製剤パック。

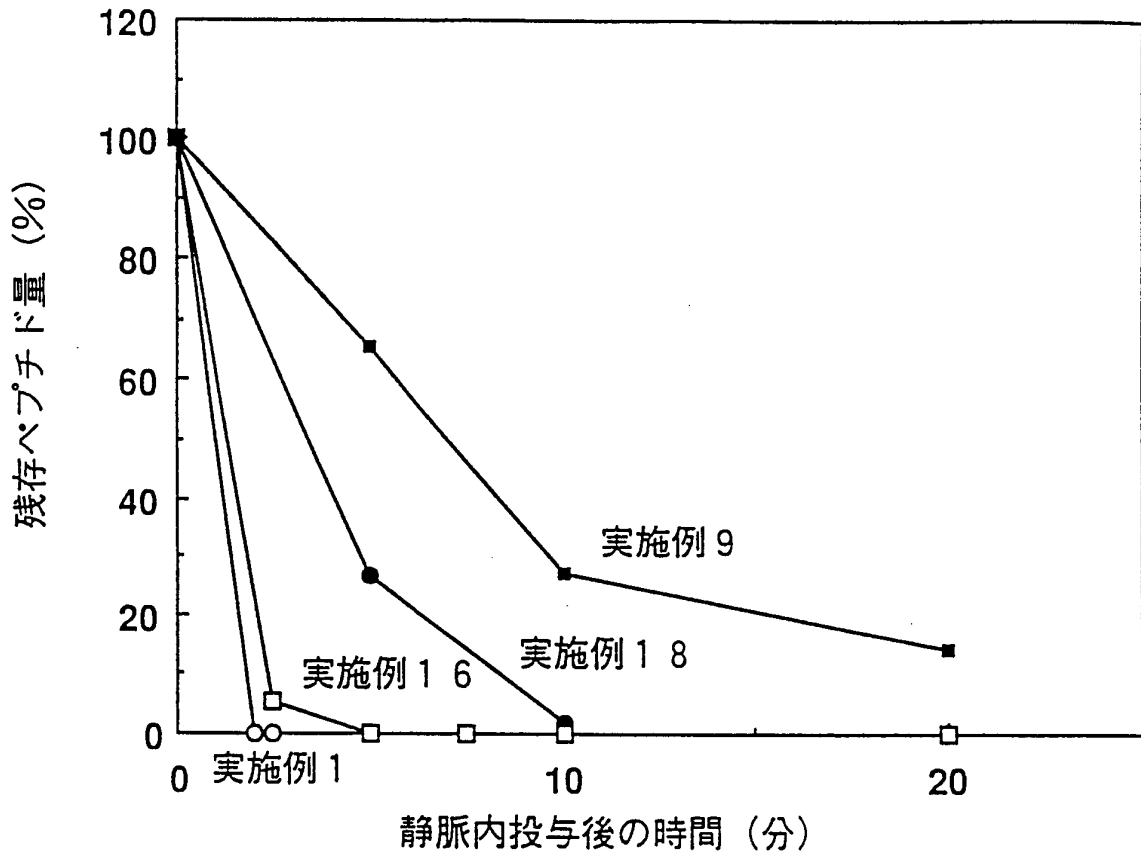
第 1 図 ヒト血漿中での合成ペプチドの安定性



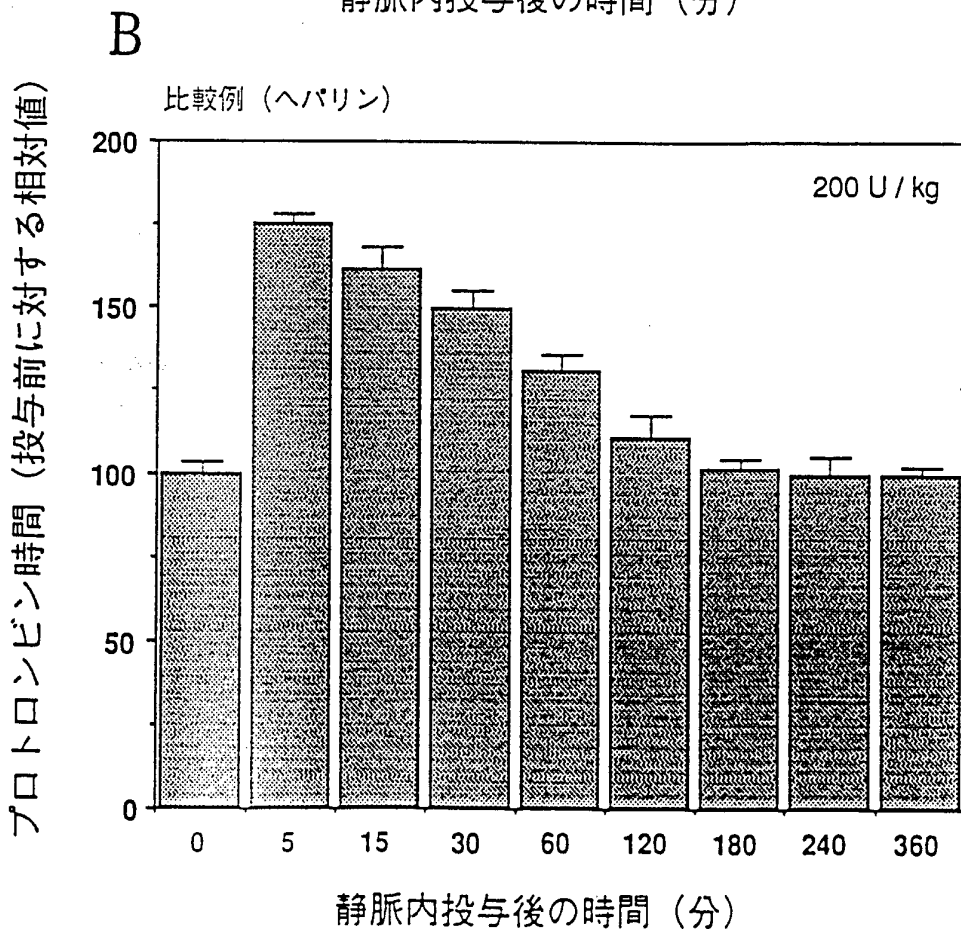
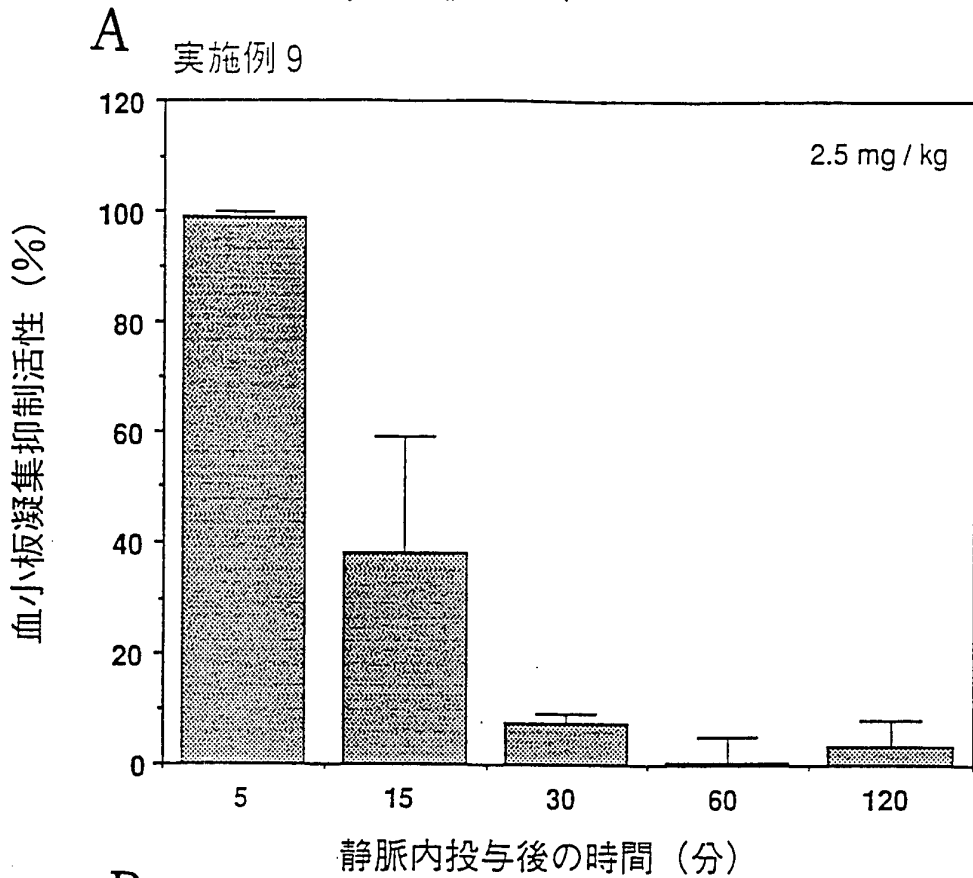
第 2 図 ヒト血漿中での合成ペプチドの安定性



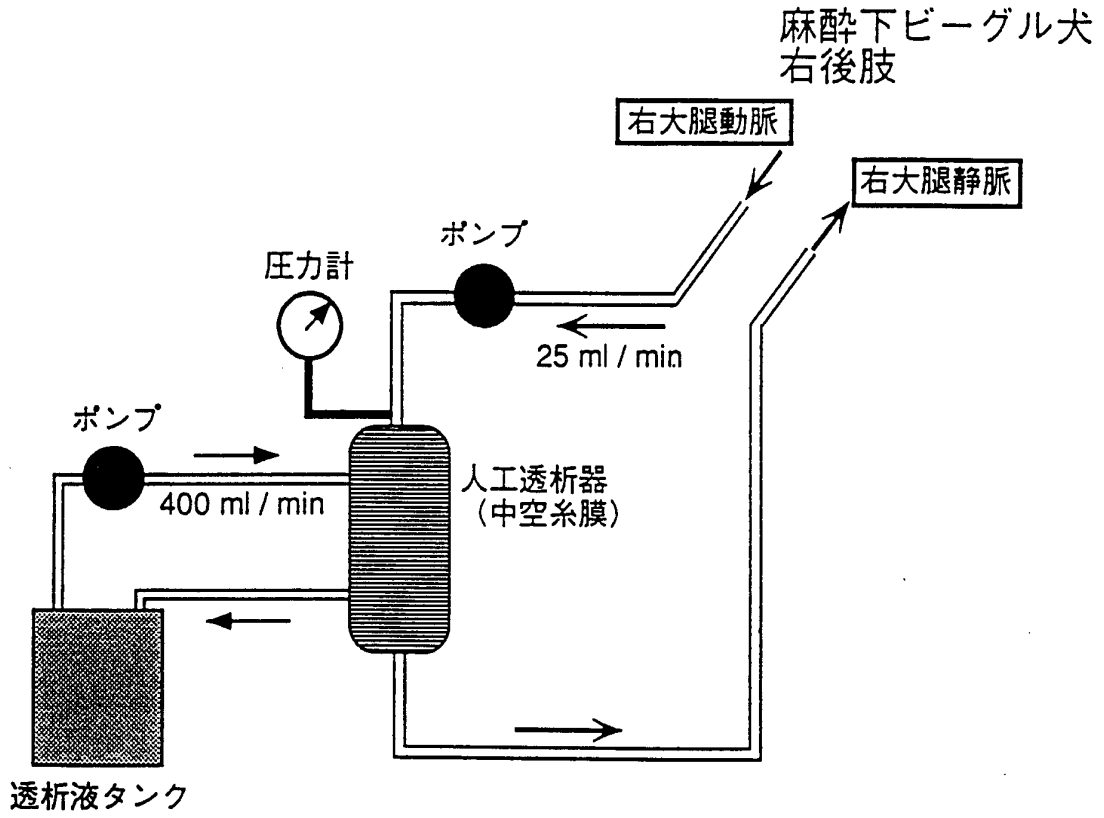
第 3 図 マウス体内での合成ペプチドの安定性



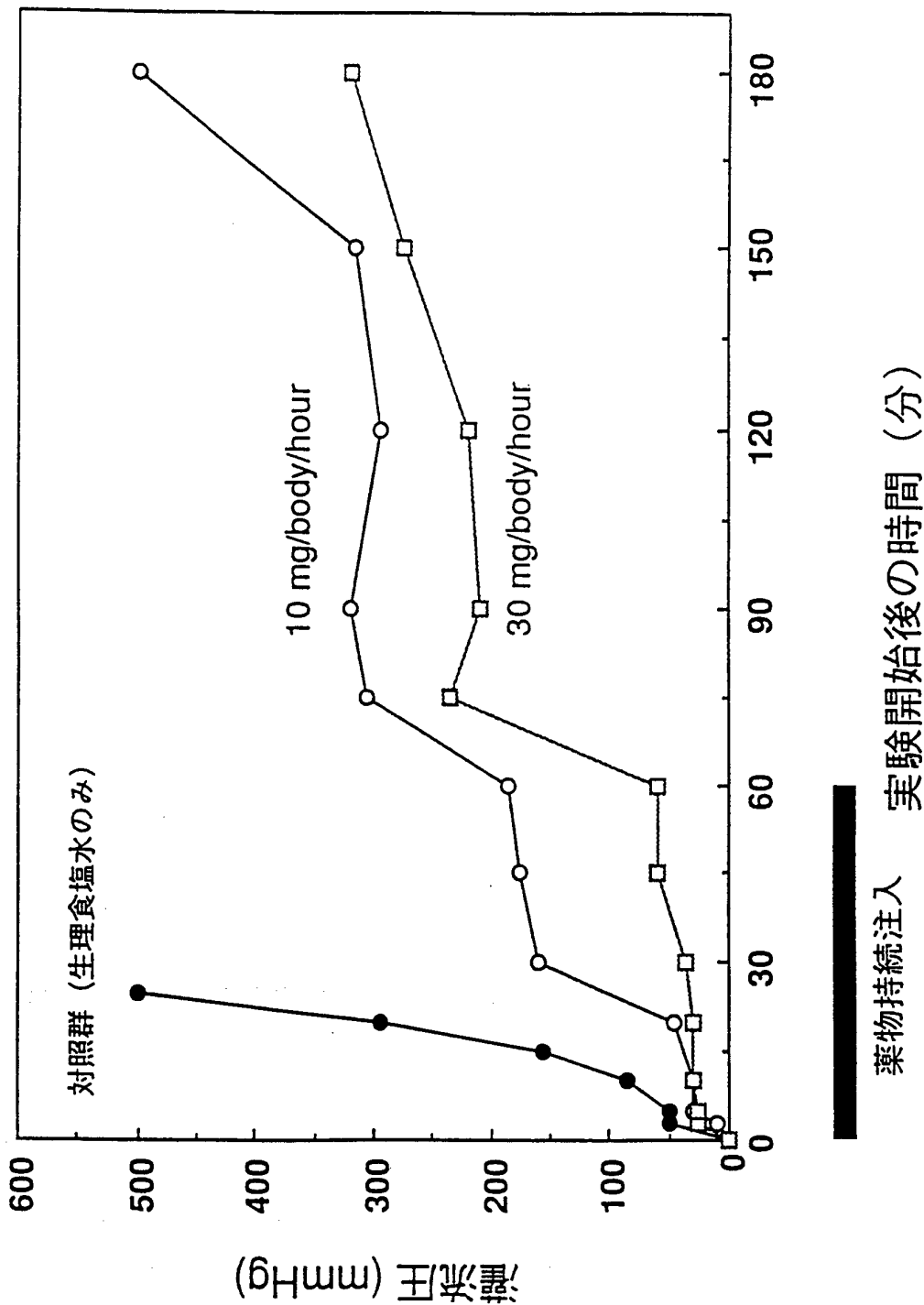
第4図 本発明の化合物のイヌ体内での作用時間  
ヘパリンとの比較



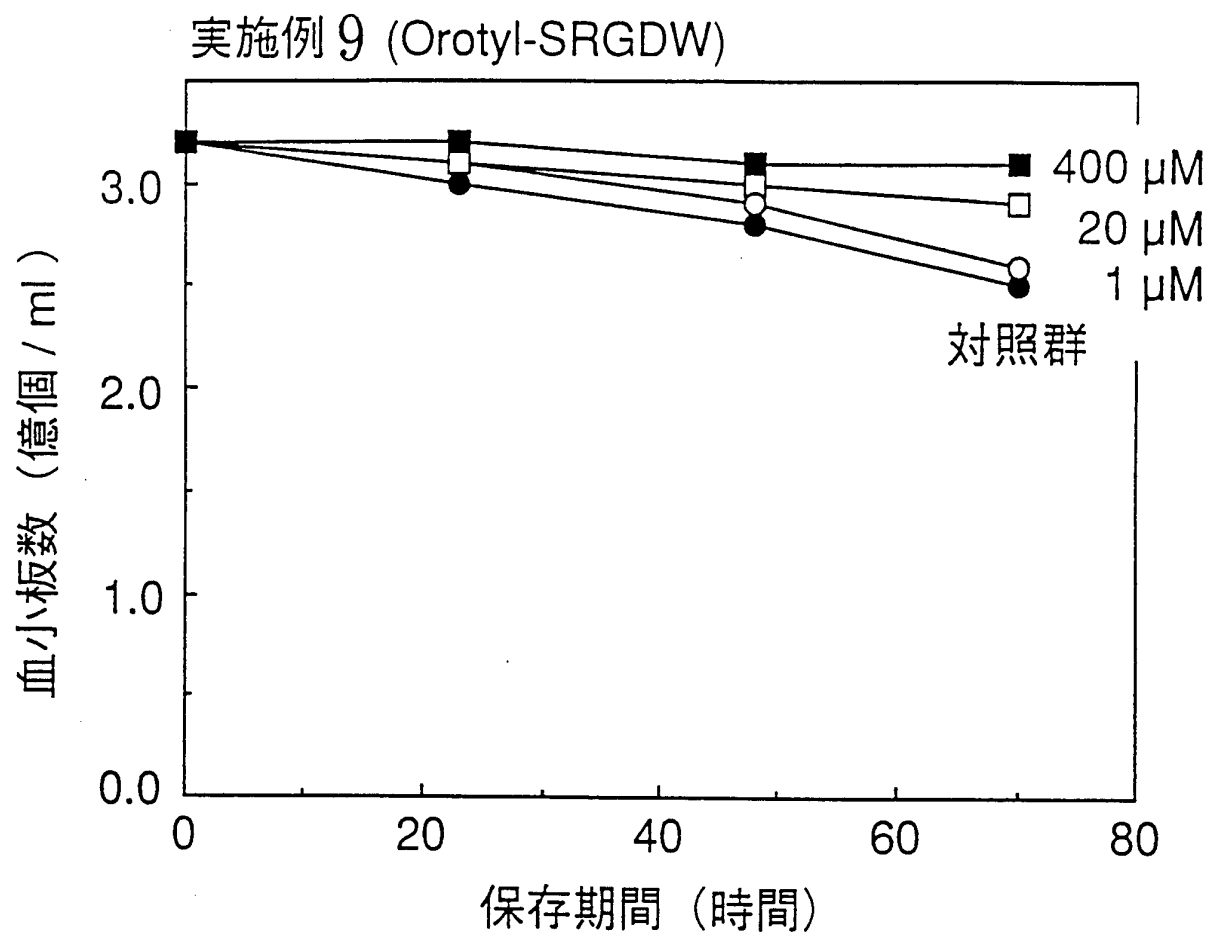
第5図 ビーグル犬を用いた人工透析モデル  
透析回路模式図



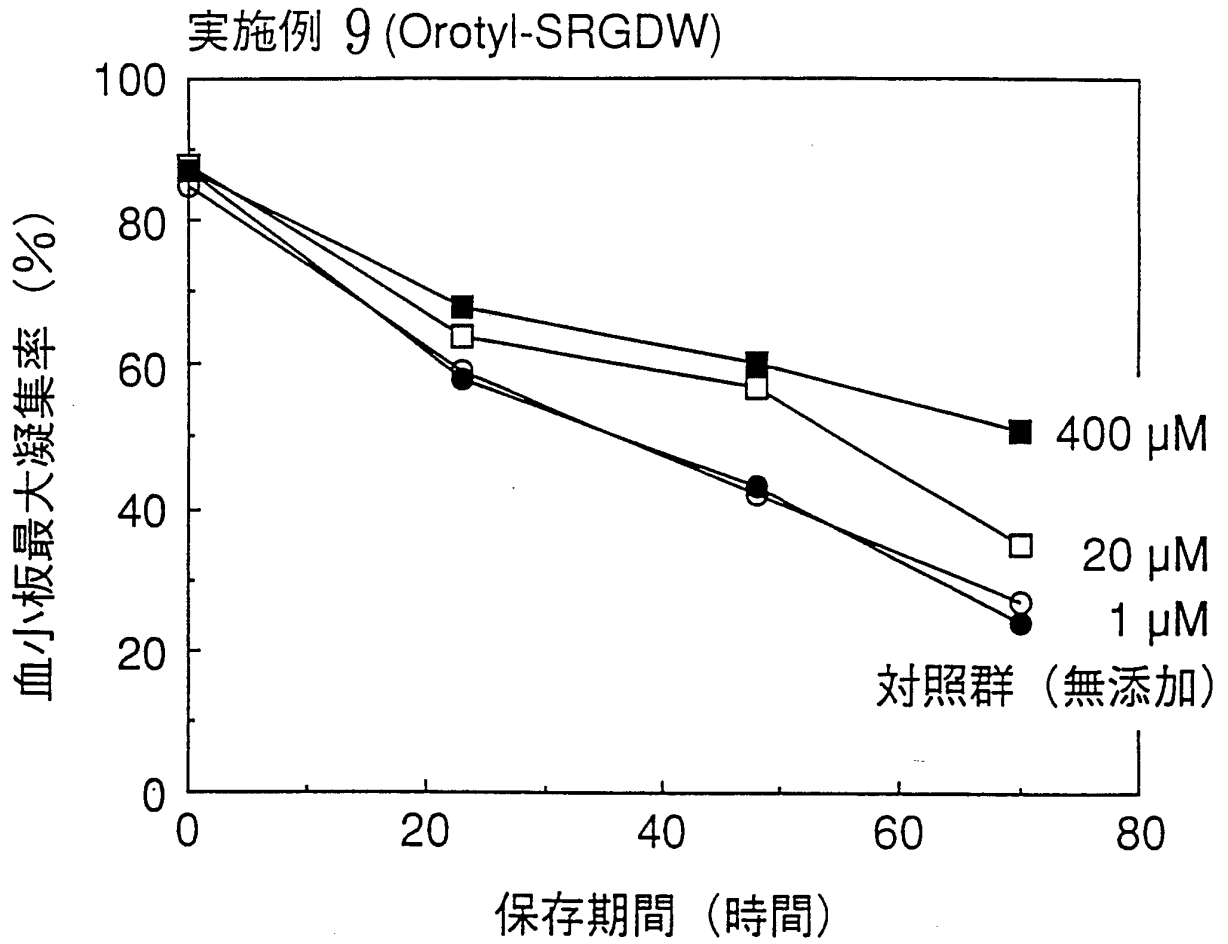
第6図 イヌを用いた人工透析モデルにおける血液凝固抑制効果



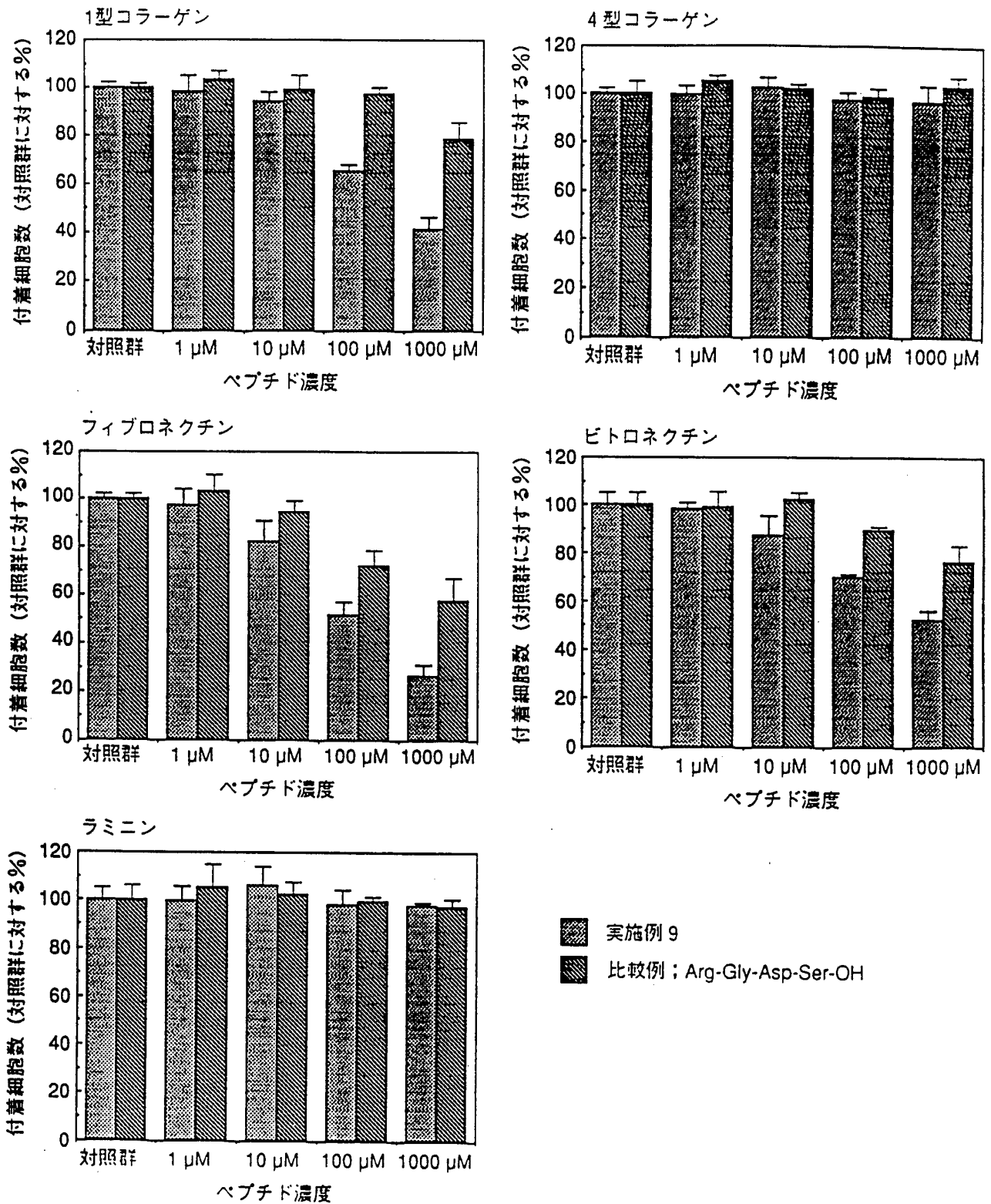
## 第7図 保存に伴う血小板数減少に対する保護効果



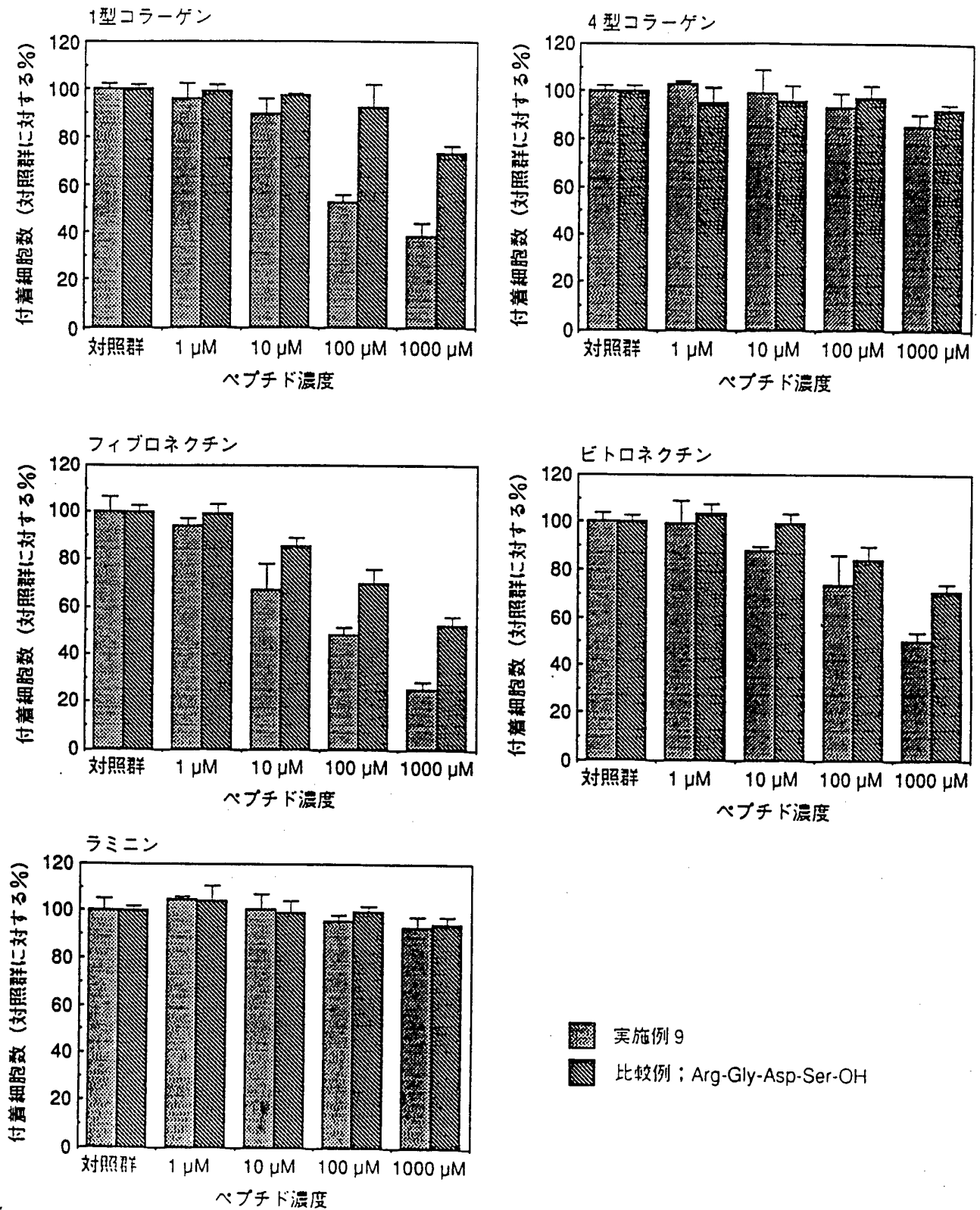
第 8 図 保存に伴う血小板凝集能低下に対する保護効果



第9図 Hela 細胞の各種細胞外気質蛋白質に対する接着



第10図 B16-F10 細胞の各種細胞外気質蛋白質に対する接着



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP93/01262

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
Int. Cl <sup>5</sup> C07K7/06, A61K37/02				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
Int. Cl <sup>5</sup> C07K7/00, A61K37/00				
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				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
<b>Category*</b>	<b>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</b>	<b>Relevant to claim No.</b>		
X	FEBS Lett., Vol. 291, No. 1 (1991), Monique Aumailley et al., "Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1" pp. 50-54	8, 9		
X	JP, A, 3-118398 (Merck & Co., Inc.), May 20, 1991 (20. 05. 91), Pages 3 to 5, 8 to 9 & EP, A, 410767 & US, A, 5061693	1-7, 10, 11		
X	JP, A, 63-215696 (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM)), September 8, 1988 (08. 09. 88), Pages 1 to 3 & EP, A, 275748 & US, A, 5100875	1-7, 10, 11		
<input checked="" 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> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; border:none;"> <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> </td> <td style="width:50%; border:none;"> <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>"&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<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>"&amp;" document member of the same patent family</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>"&amp;" document member of the same patent family</p>			
Date of the actual completion of the international search November 19, 1993 (19. 11. 93)		Date of mailing of the international search report December 21, 1993 (21. 12. 93)		
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

**Int. Cl<sup>5</sup> C07K7/06, A61K37/02**

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. Cl<sup>5</sup> C07K7/00, A61K37/00**

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	<b>FEBS Lett., 第291巻, 第1号(1991), Monique Aumailley, et al 「Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1」 pp. 50- 54</b>	<b>8, 9</b>
X	<b>JP, A, 3-118398(メルク エンド カムパニー インコー ポレーテッド),</b>	<b>1-7, 10, 11</b>

C類の続きにも文献が列挙されている。

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

**19. 11. 93**

国際調査報告の発送日

**21. 12. 93**

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**

C (続き). 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	<p>20. 5月. 1991 (20. 05. 91), 第3-5頁, 第8-9頁 &amp; EP, A, 410767 &amp; US, A, 5061693</p> <p>JP, A, 63-215696 (アンステイテュ ナショナル ドウ ラサントウ エドウ ラ ルシエルジエメデイカル (イーエヌエスエー エールエム)), 8. 9月. 1988 (08. 09. 88), 第1-3頁 &amp; EP, A, 275748 &amp; US, A, 5100875</p>	<p>1-7, 10, 11</p>