

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5251516号  
(P5251516)

(45) 発行日 平成25年7月31日(2013.7.31)

(24) 登録日 平成25年4月26日(2013.4.26)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>C 0 7 K 1 4 / 7 8</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	C 0 7 K 1 4 / 7 8	Z N A	
<b>A 6 1 K 3 8 / 0 0</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A 6 1 K 3 7 / 0 2		

請求項の数 9 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2008-550109 (P2008-550109)	(73) 特許権者	311002067 J N C株式会社 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
(86) (22) 出願日	平成19年12月12日(2007.12.12)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/073910	(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一
(87) 国際公開番号	W02008/075589	(74) 代理人	100131392 弁理士 丹羽 武司
(87) 国際公開日	平成20年6月26日(2008.6.26)	(72) 発明者	梅田 靖人 日本国熊本県水俣市野口町1-1 チッソ 株式会社 水俣研究所内
審査請求日	平成22年10月8日(2010.10.8)	(72) 発明者	高崎 真一 日本国神奈川県横浜市金沢区大川5-1 チッソ株式会社 横浜研究所内 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2006-344553 (P2006-344553)		
(32) 優先日	平成18年12月21日(2006.12.21)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2007-116349 (P2007-116349)		
(32) 優先日	平成19年4月26日(2007.4.26)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 血小板凝集惹起物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(1)で示されるペプチドフラグメント(成分A)を有するポリペプチドを有効成分とする血小板凝集惹起剤。

$$-(\text{Pro-X-Gly})_n-$$
 (1)

(式中、XはProまたはHypであり、nは20~5000の整数である。)

【請求項2】

ポリペプチドが、円二色性スペクトルにおいて、波長220~230nmに正のコットン効果を示し、波長195~205nmに負のコットン効果を示す、請求項1に記載の血小板凝集惹起剤。

【請求項3】

ポリペプチドが、10,000~500,000,000の範囲の分子量を有する、請求項1または2に記載の血小板凝集惹起剤。

【請求項4】

アスピリンの共存下でも血小板凝集を惹起し得る、請求項1~3のいずれか一項に記載の血小板凝集惹起剤。

【請求項5】

ペプチドフラグメント(成分A)が、式(2)で示されるペプチドユニット(成分B)および式(3)で示されるペプチドユニット(成分C)からなるペプチドフラグメントであって、成分Bと成分Cとの割合(成分B/成分C、モル比)が、95/5~0/100の

範囲である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の血小板凝集惹起剤。

- (Pro - Pro - Gly) - (2)

- (Pro - Hyp - Gly) - (3)

【請求項 6】

ポリペプチドが、さらに、式 (4) で示されるペプチドユニット、式 (5) で示されるペプチドユニット、およびそれらから選ばれた 1 種以上のペプチドユニットからなるペプチドフラグメントから選ばれた 1 種以上 (成分 D) を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の血小板凝集惹起剤。

- (Y<sub>1</sub> - Y<sub>2</sub> - Gly) - (4)

- (Pro - Z<sub>1</sub> - Gly - Z<sub>2</sub> - Ala - Gly) - (5)

(式中、Y<sub>1</sub>は Asp または 位にカルボキシル基を有していてもよい Glu であり、Y<sub>2</sub>は Pro または Hyp であり、Z<sub>1</sub>は Gln、Asn、Leu、Ile、Val または Ala であり、Z<sub>2</sub>は Ile または Leu である。)

【請求項 7】

ペプチドフラグメント (成分 A) と、式 (4) で示されるペプチドユニット、式 (5) で示されるペプチドユニット、およびそれらから選ばれた 1 種以上のペプチドユニットからなるペプチドフラグメントから選ばれた 1 種以上 (成分 D) の割合 (成分 A / 成分 D、モル比) が、99 / 1 ~ 30 / 70 の範囲である、請求項 6 に記載の血小板凝集惹起剤。

【請求項 8】

ポリペプチドが、0.01 ~ 1000 μm の範囲の粒子径を有する、請求項 1 ~ 7 記載の何れか 1 項に記載の血小板凝集惹起剤。

【請求項 9】

ポリペプチドが、10 ~ 10,000 mPa · s の範囲の粘度を有し、その際の粘度がポリペプチド 1 重量 % 水溶液、20 の条件で E 型粘度計により測定された値である、請求項 1 ~ 8 記載の何れか 1 項に記載の血小板凝集惹起剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血小板の機能評価に用いることができる血小板凝集惹起物質に関する。

【背景技術】

【0002】

血小板は、出血時の止血作用に不可欠な生体内物質であるが、その機能が過剰に働いた場合には、血栓を形成し、ひいては心筋梗塞や脳梗塞などの重篤な疾病の原因となる。反対に、血小板が機能しない場合には出血傾向を誘導する。したがって、血液中の血小板の機能評価 (血小板凝集能の測定) を行いその状態を把握することは、健康管理や治療を遂行する上で重要なことである。

【0003】

一般に血小板凝集能の測定は、低ズリ速度下で多血小板血漿にコラーゲンなどの凝集惹起物質を添加することにより血小板凝集を惹起させ、この凝集に伴って上昇する透過度を測定することにより行われている。

【0004】

血小板凝集能の測定に使用されるコラーゲンは、動物由来のものが使用されるのが一般的であるが、人工的に合成されたコラーゲンにも血小板凝集を惹起するものが知られている。

【0005】

非特許文献 1、2 および 3 には、3 重螺旋構造を有するポリペプチド - (Gly - Pro - Hyp)<sub>10</sub> -、およびこのポリペプチドを架橋し 4 次構造とした物質が開示され、さらに、それらの物質の血小板凝集惹起活性が開示されている。

【0006】

前述の非特許文献に開示されたポリペプチド - (Gly - Pro - Hyp)<sub>10</sub> - は血小

10

20

30

40

50

板凝集惹起活性が弱く、血小板凝集能の測定に使用し得ないものであった。

一方、このポリペプチドを架橋し4次構造とした物質は、前述のポリペプチドに比べ高い血小板凝集惹起活性を有し、血小板凝集能の測定に使用し得るものである。しかしながら、この物質を得るためには、脱保護とアミノ酸の結合とを繰返すペプチド合成反応を行わなければならない、さらに架橋反応も必要であった。これらの反応は、それが繰返される度に目的とする反応生成物の収率が低下する。最終的に収率の低下はコストの上昇を招く。

【0007】

【非特許文献1】THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1994 May13 ;269(19):13899-18903

【非特許文献2】The Biochemcial Journal 1995;306;337-344

【非特許文献3】Cardiovascular Reseach1999;41;450-457

【発明の開示】

【0008】

人工的に合成されたコラーゲンであれば、従来血小板凝集の惹起物質として用いられてきた動物由来のコラーゲンに比べ、再現性、安定性、保存性などの点において有利であると考えられる。しかしながら、非特許文献1、2および3に記載の合成コラーゲンにおいては、収率が低く、コストが高いなどの課題があった。また、血小板凝集惹起活性においても、構造によっては十分な活性が得られないものもあった。

【0009】

また、血栓形成の予防を目的としてアスピリンが服用されることがあるが、アスピリンの血中における存在は、コラーゲンをはじめとする血小板凝集惹起物質の機能を損ない、アスピリン服用者の血小板凝集能の測定を甚だ困難なものとしている。前述のように、血小板の機能評価(血小板凝集能の測定)は、健康管理や治療を遂行する上で不可欠なものであり、アスピリンの共存下であっても有効に血小板凝集を惹起する物質が求められていた。

【0010】

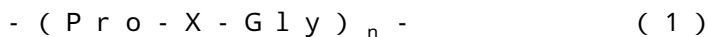
本発明者らは、前述の従来技術の問題点に鑑み鋭意研究を重ねた。その結果、本発明に用いる式(1)で表されるポリペプチドは、-(Pro-Hyp-Gly)-のトリゴマーを溶媒中で重合させるだけで得られることから、反応工程が最小限で済み、収率、コストの面で有利なこと、血小板凝集能の測定に十分に使用可能なレベルの血小板凝集惹起活性を有すること、さらには、アスピリンの共存下であっても血小板凝集を有効に惹起し得ることなどを見出し、本発明を完成させた。

【0011】

即ち、本発明は下記の(1)~(8)の構成を有する。

【0012】

(1)式(1)で示されるペプチドフラグメント(成分A)を有するポリペプチドを有効成分とする血小板凝集惹起物質。



(式中、XはProまたはHypであり、nは20~5000の整数である。)

(2)ペプチドフラグメント(成分A)が、式(2)で示されるペプチドユニット(成分B)および式(3)で示されるペプチドユニット(成分C)からなるペプチドフラグメントであって、成分Bと成分Cとの割合(成分B/成分C、モル比)が、95/5~0/100の範囲である、前記第1項記載の血小板凝集惹起物質。



(3)ポリペプチドが、さらに、式(4)で示されるペプチドユニット、式(5)で示されるペプチドユニット、およびそれらから選ばれた1種以上のペプチドユニットからなるペプチドフラグメントから選ばれた1種以上(成分D)を有する、前記第1項または第2項に記載の血小板凝集惹起物質。

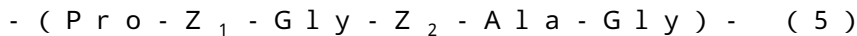
10

20

30

40

50



(式中、 $Y_1$ はAspまたは位にカルボキシル基を有していてもよいGluであり、 $Y_2$ はProまたはHypであり、 $Z_1$ はGln、Asn、Leu、Ile、ValまたはAlaであり、 $Z_2$ はIleまたはLeuである。)

(4) ペプチドフラグメント(成分A)と、式(4)で示されるペプチドユニット、式(5)で示されるペプチドユニット、およびそれらから選ばれた1種以上のペプチドユニットからなるペプチドフラグメントから選ばれた1種以上(成分D)の割合(成分A/成分D、モル比)が、99/1~30/70の範囲である、前記第3項に記載の血小板凝集惹起物質。

10

(5) ポリペプチドが、円二色性スペクトルにおいて、波長220~230nmに正のコットン効果を示し、波長195~205nmに負のコットン効果を示す、前記第1項~第4項の何れか1項に記載の血小板凝集惹起物質。

(6) ポリペプチドが10,000~500,000,000の範囲の分子量を有する、前記第1項~第5項記載の何れか1項に記載の血小板凝集惹起物質。

(7) ポリペプチドが、0.01~1000 $\mu$ mの範囲の粒子径を有する、前記第1項~第6項記載の何れか1項に記載の血小板凝集惹起物質。

(8) ポリペプチドが、10~10,000mPa $\cdot$ sの範囲の粘度を有し、その際の粘度がポリペプチド1%水溶液、20の条件でE型粘度計により測定された値である、前記第1項~第7項の何れか1項に記載の血小板凝集惹起物質。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】実験例2における血小板凝集能測定結果。

【図2】実験例3における血小板凝集能測定結果。

【図3】実験例4における血小板凝集能測定結果。

【図4】実験例4における血小板凝集能測定結果。

【図5】実験例5における血小板凝集能測定結果。

【図6】実験例5における血小板凝集能測定結果。

【図7】実験例6における血小板凝集能測定結果。

【図8】実験例6における血小板凝集能測定結果。

【図9】実験例7における血小板凝集能測定結果。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明においては各種アミノ酸残基を次の略号で記述する。

Ala: L-アラニン残基

Arg: L-アルギニン残基

Asn: L-アスパラギン残基

Asp: L-アスパラギン酸残基

Cys: L-システイン残基

Gln: L-グルタミン残基

Glu: L-グルタミン酸残基

Gly: グリシン残基

His: L-ヒスチジン残基

Hyp: L-ヒドロキシプロリン残基

Ile: L-イソロイシン残基

Leu: L-ロイシン残基

Lys: L-リジン残基

Met: L-メチオニン残基

Phe: L-フェニルアラニン残基

40

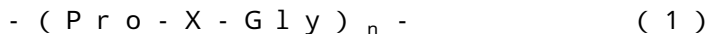
50

Pro : L - プロリン残基  
 Sar : サルコシン残基  
 Ser : L - セリン残基  
 Thr : L - トレオニン残基  
 Trp : L - トリプトファン残基  
 Tyr : L - チロシン残基  
 Val : L - バリン残基

また、本明細書においては、常法に従って、アミノ末端またはN末端を左側に、カルボキシ末端またはC末端を右側に位置させて記述する。

【0015】

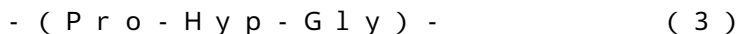
本発明の有効成分であるポリペプチド（以下「有効成分ポリペプチド」と言うことがある。）は、式（1）で表されるペプチドフラグメント（成分A）を含有しているポリペプチドであれば特に限定されない。



繰り返し数（n）は20～5000の整数であり、血小板凝集惹起活性および構造（3重螺旋）の安定性の面から、20～3000の整数であることが好ましい。

【0016】

式（1）のXは、ProまたはHypである。したがって、ペプチドフラグメント（成分A）は、式（2）で示されるペプチドユニット（成分B）のみからなる場合、式（3）で示されるペプチドユニット（成分C）のみからなる場合、そしてペプチドユニット（成分B）とペプチドユニット（成分C）からなる場合がある。

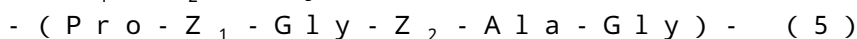


【0017】

本発明において、ペプチドフラグメント（成分A）を構成する成分Bと成分Cとの割合（成分B / 成分C、モル比）は、特に限定されるものではないが、血小板凝集惹起活性および構造（3重螺旋構造）の安定性の面から、95 / 5～0 / 100の範囲であることが好ましく、より好ましくは、50 / 50～0 / 100の範囲であり、さらに好ましくは10 / 90～0 / 100の範囲である。なお、本発明においてHypは、4Hyp（例えば、trans-4-ヒドロキシ-L-プロリン）残基である。

【0018】

さらに、有効成分ポリペプチドは、式（4）で示されるペプチドユニットから選ばれた1種以上を含むものであっても良く、式（5）で示されるペプチドユニットから選ばれた1種以上を含むものであっても良く、さらには、式（4）で示されるペプチドユニットおよび式（5）で示されるペプチドユニットから選ばれた1種以上のペプチドユニットからなるペプチドフラグメントを含むものであってもよい。



【0019】

式（4）において、Y<sub>1</sub>はカルボキシル基を有するアミノ酸残基（例えば、カルボキシル基を有する - アミノ酸残基など）であってもよく、具体的にはAsp、Gluなどが挙げられ、本発明においては、Aspまたは 位にカルボキシル基を有していてもよいGluである。Y<sub>2</sub>はProまたはHypである。

【0020】

式（5）において、Z<sub>1</sub>はGln、Asn、Leu、Ile、ValまたはAlaであり、より好ましくは、Gln、Asn、Leu、Val、Alaであり、更に好ましくはGln、Leuである。Z<sub>2</sub>は、IleまたはLeuであり、好ましくはIleである。

【0021】

Z<sub>1</sub>とZ<sub>2</sub>との組合せは特に限定されるものではなく、例えば、Z<sub>1</sub>がGln、Asn、Leu、Ile、ValおよびAlaから選択された一種（例えば、Gln又はLeu

10

20

30

40

50

)であり、 $Z_2$ がIleである組合せや、 $Z_1$ がGln、Asn、Leu、Ile、ValおよびAlaから選択された一種(例えば、Gln又はLeu)であり、 $Z_2$ がLeuである組合せが挙げられる。

**【0022】**

ペプチドフラグメント(成分A)と、式(4)で示されるペプチドユニット、式(5)で示されるペプチドユニット、およびそれらから選ばれた1種以上のペプチドユニットからなるペプチドフラグメントから選ばれた1種以上(成分D)の割合(成分A/成分D、モル比)は特に限定されるものではないが、血小板凝集惹起活性および構造(3重螺旋構造)の安定性の面から、99/1~30/70の範囲であることが好ましく、より好ましくは99/1~50/50の範囲であり、さらに好ましくは99/1~70/30の範囲である。

10

**【0023】**

有効成分ポリペプチドは、その物理的および生物学的性質を損なわない範囲であれば、他のアミノ酸残基やペプチド残基を含んでいてもよい。

**【0024】**

有効成分ポリペプチドは、血小板凝集の惹起を阻害しない限り、無機酸(塩酸、硫酸など)、有機酸(酢酸、乳酸、マレイン酸、シュウ酸、クエン酸など)、金属(ナトリウム、カリウムなど)、有機塩基(トリメチルアミン、トリエチルアミンなど)との塩であってもよい。本発明に使用するポリペプチドの塩化合物は、単独または二種類以上の組合せであってもよい。

20

**【0025】**

有効成分ポリペプチドは、円二色性スペクトルにおいて、波長220~230nmに正のコットン効果を示し、波長195~205nmに負のコットン効果を示すものであることが好ましい。このようなコットン効果を示す有効成分ポリペプチドを用いれば、実用十分な活性を有する血小板凝集惹起物質が得られる。なお、コットン効果とは、旋光性物質において特定の波長で左右の円偏光に対する吸収係数が異なるために起こる現象をいう。

**【0026】**

有効成分ポリペプチドは3重螺旋構造をとり得る。その3重螺旋構造を形成しているポリペプチド鎖は、直線状または1以上の分岐を有していてもよい。分岐を有する場合、分岐点以降に3重螺旋構造が形成されていてもよく、更に、その3重螺旋構造の後ろに分岐を有していてもよい。

30

**【0027】**

有効成分ポリペプチドの分子量は特に限定されるものではないが、血小板凝集惹起活性および構造(3重螺旋構造)の安定性の面から、10,000~500,000,000の範囲であることが好ましい。

**【0028】**

有効成分ポリペプチドの粒子径は特に限定されるものではないが、血小板凝集惹起活性へ影響の面から、動的光散乱法粒径分布測定装置またはレーザー回折/散乱式粒径測定装置で測定した径が、0.01~1000 $\mu$ mの範囲であることが好ましい。

**【0029】**

有効成分ポリペプチドの粘度は、血小板凝集惹起活性へ影響の面から、1重量%水溶液、20 $^{\circ}$ Cの条件でE型粘度計による測定された値で10~10,000mPa $\cdot$ sの範囲であることが好ましい。

40

**【0030】**

有効成分ポリペプチドは、前述のペプチドフラグメント(A成分)のみからなるものであってもよいが、本発明の効果を損なわない範囲において、それ以外に以下のようなアミノ酸残基やアルキルレンを含むものであってもよい。

**【0031】**

アミノ酸残基としては、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Hyp、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Sar、

50

Ser、Thr、Trp、Tyr、Valから選択された少なくとも1種のアミノ基、またはそれらが数個結合したペプチド残基が挙げられる。

【0032】

アルキレンは、直鎖状、分岐状の何れであってもよく、特に限定されるものではないが、具体的には炭素数1~18のアルキレンが挙げられ、実用的には炭素数2~12のアルキレンである。

【0033】

本発明の血小板凝集惹起物質は、本発明の効果を損なわない範囲であれば、有効成分ポリペプチド以外の物質を含むものであってもよい。その他の物質は、保存性、取扱い易さ、活性の安定性、などを考慮して選定すればよく、特に限定されるものではないが、例えば、後述のような保存溶媒を挙げることができる。

10

【0034】

以下、有効成分ポリペプチドの製造方法について詳述する。

有効成分ポリペプチドは、何れの方法により得られたものであってもよい。しかしながら、有効成分ポリペプチドは、ペプチドフラグメントを溶媒中において縮合すれば重合が進み、脱保護とアミノ酸結合とを繰返すことなく得られることから、有効成分ポリペプチドを構成するアミノ酸からなるペプチドフラグメントを用いて溶媒中において縮合反応を行う方法が好ましく用いられる。

【0035】

本発明でいうところのペプチドフラグメントとは、3残基~90残基のペプチドフラグメントのことである。有効成分ポリペプチドの製造に使用できるペプチドフラグメントとしては、たとえば下記のペプチドフラグメントを挙げることができる。

20

【0036】

NO.1: (Pro - Pro - Gly)。

NO.2: (Pro - Hyp - Gly)。

NO.3: (Asp - Pro - Gly)。

NO.4: (Asp - Hyp - Gly)。

NO.5: (Glu - Pro - Gly)。

NO.6: (Glu - Hyp - Gly)。

NO.7: (Pro - Gln - Gly - Ile - Ala - Gly)。

NO.8: (Pro - Asn - Gly - Ile - Ala - Gly)。

NO.9: (Pro - Leu - Gly - Ile - Ala - Gly)。

NO.10: (Pro - Ile - Gly - Ile - Ala - Gly)。

NO.11: (Pro - Val - Gly - Ile - Ala - Gly)。

NO.12: (Pro - Ala - Gly - Ile - Ala - Gly)。

NO.13: (Pro - Gln - Gly - Leu - Ala - Gly)。

NO.14: (Pro - Asn - Gly - Leu - Ala - Gly)。

NO.15: (Pro - Leu - Gly - Leu - Ala - Gly)。

NO.16: (Pro - Ile - Gly - Leu - Ala - Gly)。

NO.17: (Pro - Val - Gly - Leu - Ala - Gly)。

NO.18: (Pro - Ala - Gly - Leu - Ala - Gly)。

但し、oは1~10の整数である。

30

40

【0037】

NO.19: (Asp - Pro - Gly)<sub>p</sub> - (Pro - Gln - Gly - Ile - Ala - Gly)<sub>q</sub>

NO.21: (Asp - Pro - Gly)<sub>p</sub> - (Pro - Asn - Gly - Ile - Ala - Gly)<sub>q</sub>

NO.22: (Asp - Pro - Gly)<sub>p</sub> - (Pro - Leu - Gly - Ile - Ala - Gly)<sub>q</sub>

NO.23: (Asp - Pro - Gly)<sub>p</sub> - (Pro - Ile - Gly - Ile - Ala -

50

G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.24 : ( A s p - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - V a l - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.25 : ( A s p - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - A l a - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.26 : ( A s p - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - G l n - G l y - L e u - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.27 : ( A s p - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - A s n - G l y - L e u - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.28 : ( A s p - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - L e u - G l y - L e u - A l a - 10  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.29 : ( A s p - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - I l e - G l y - L e u - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.30 : ( A s p - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - V a l - G l y - L e u - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.31 : ( A s p - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - A l a - G l y - L e u - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.32 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - G l n - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.33 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - A s n - G l y - I l e - A l a - 20  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.34 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - L e u - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.35 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - I l e - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.36 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - V a l - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.37 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - A l a - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.38 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - G l n - G l y - L e u - A l a - 30  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.39 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - A s n - G l y - L e u - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.40 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - L e u - G l y - L e u - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.41 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - I l e - G l y - L e u - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.42 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - V a l - G l y - L e u - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.43 : ( A s p - H y p - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - A l a - G l y - L e u - A l a - 40  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.44 : ( G l u - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - G l n - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.45 : ( G l u - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - A s n - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.46 : ( G l u - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - L e u - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.47 : ( G l u - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - I l e - G l y - I l e - A l a -  
 G l y ) <sub>q</sub>  
 NO.48 : ( G l u - P r o - G l y ) <sub>p</sub> - ( P r o - V a l - G l y - I l e - A l a - 50



- G l y )<sub>q</sub>  
 NO.49 : ( G l u - P r o - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - A l a - G l y - I l e - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.50 : ( G l u - P r o - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - G l n - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.51 : ( G l u - P r o - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - A s n - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.52 : ( G l u - P r o - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - L e u - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.53 : ( G l u - P r o - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - I l e - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub> 10  
 NO.54 : ( G l u - P r o - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - V a l - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.55 : ( G l u - P r o - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - A l a - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.56 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - G l n - G l y - I l e - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.57 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - A s n - G l y - I l e - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.58 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - L e u - G l y - I l e - A l a - G l y )<sub>q</sub> 20  
 NO.59 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - I l e - G l y - I l e - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.60 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - V a l - G l y - I l e - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.61 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - A l a - G l y - I l e - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.62 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - G l n - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.63 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - A s n - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub> 30  
 NO.64 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - L e u - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.65 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - I l e - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.66 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - V a l - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 NO.67 : ( G l u - H y p - G l y )<sub>p</sub> - ( P r o - A l a - G l y - L e u - A l a - G l y )<sub>q</sub>  
 但し、pは1～10の整数であり、qは1～10の整数である。 40

## 【0038】

このうち、有効成分ポリペプチドの製造には、No. 1またはNo. 2のペプチドフラグメントは必ず用いられる。No. 3からNo. 67のペプチドフラグメントは適宜使用すればよい。さらに、上記以外のペプチドフラグメントも、本発明の効果を損なわない範囲であれば使用することができる。

## 【0039】

さらに、有効成分ポリペプチドの製造には、No. 1またはNo. 2のペプチドフラグメントと、No. 3からNo. 67のペプチドフラグメント、さらにはそれら以外のペプチドフラグメントとが予め結合したペプチドフラグメントを用いてもよい。

## 【0040】

上記ペプチドフラグメントにおける o、p、q、および縮合反応に用いられるペプチドフラグメントのそれぞれの割合は特に限定されるものではなく、所望する有効成分ポリペプチドの成分 B と成分 C との割合や、成分 A と成分 D との割合に基づいて決定される。

【0041】

但し、縮合反応の容易さ、ペプチドフラグメントの入手の容易さから、o、p、および q は独立して 1 ~ 10 の整数であることが好ましく、さらに好ましくは 1 ~ 5 の整数であり、特に好ましくは 1 である。

【0042】

上記 No. 1 から No. 67 に示したペプチドフラグメントは、既知の固相合成法または液相合成法を用いて得ることができる。

10

【0043】

これらのペプチドフラグメントの縮合反応は、通常、溶媒中で行われる。溶媒は、原料となるペプチドフラグメントを溶解（一部または全部を溶解）または懸濁可能なものであればよく、通常、水または有機溶剤が使用できる。具体的には、水、アミド類（ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ヘキサメチルホスホリアミドなど）、スルホキシド類（ジメチルスルホキシドなど）、窒素含有環状化合物（N-メチルピロリドン、ピリジンなど）、ニトリル類（アセトニトリルなど）、エーテル類（ジオキサン、テトラヒドロフランなど）、アルコール類（メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコールなど）、およびこれらの混合溶媒などである。これらの溶媒のうち、水、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドが好ましく使用される。

20

【0044】

ペプチドフラグメントの反応は、脱水剤（脱水縮合剤）の存在下で行うことが好ましい。脱水縮合剤と縮合助剤との存在下で反応させると、二量化や環化を抑制しつつ円滑に縮合反応が進む。

【0045】

脱水縮合剤は、前記溶媒中で脱水縮合を効率よく行える限り特に限定されるものではなく、例えば、カルボジイミド系縮合剤 [ ジイソプロピルカルボジイミド (DIPI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC=WSC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (WSC·HCl)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) など ]、フルオロホスフェート系縮合剤 [ O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン化合物塩 (BOP) ] など ]、ジフェニルホスホリルアジド (DPPA) が例示できる。

30

【0046】

これらの脱水縮合剤は単独で又は二種以上組み合わせて混合物として使用できる。好ましい脱水縮合剤は、カルボジイミド系縮合剤 [ 例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 ] である。

40

【0047】

縮合助剤は、縮合反応を促進する限り特に制限されず、例えば、N-ヒドロキシ多価カルボン酸イミド類 [ 例えば、N-ヒドロキシコハク酸イミド (HONSu)、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド (HONB) などの N-ヒドロキシジカルボン酸イミド類 ]、N-ヒドロキシトリアゾール類 [ 例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) などの N-ヒドロキシベンゾトリアゾール類 ]、3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン (HOObt) などのトリアジン類、2-ヒドロキシイミノ-2-シアノ酢酸エチルエステルが例示でき

50

る。

【0048】

これらの縮合助剤も単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。好ましい縮合助剤は、N-ヒドロキシジカルボン酸イミド類 [HONSu など]、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール又はN-ヒドロキシベンゾトリアジン類 [HOBt など] である。

【0049】

脱水縮合剤と縮合助剤とは適当に組み合わせて使用することが好ましい。脱水縮合剤と縮合助剤との組合せとしては、例えば、DCC-HONSu (HOBt または HOOBt)、WSCl-HONSu (HOBt または HOOBt) が例示できる。

【0050】

脱水縮合剤の使用量は、ペプチドフラグメントの総量1モルに対して、通常、水を含まない非水系溶媒を用いる場合0.7~5モル、好ましくは0.8~2.5モル、さらに好ましくは0.9~2.3モル(例えば1~2モル)の範囲である。水を含む溶媒(水系溶媒)においては、水による脱水縮合剤の失活があるので、脱水縮合剤の使用量は、ペプチドフラグメントの総量1モルに対して、通常、2~500モル、好ましくは5~250モル、さらに好ましくは10~125モルの範囲である。

【0051】

縮合助剤の使用量は、溶媒の種類に関係なく、ペプチドフラグメントの総量1モルに対して、通常、0.5~5モル、好ましくは0.7~2モル、さらに好ましくは0.8~1.5モルの範囲である。

【0052】

上記縮合反応においては、反応系のpHを調節してもよく、反応に関与しない塩基を添加してもよい。pHの調節は、通常、無機塩基(水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなど)、有機塩基、無機酸(塩酸など)や有機酸を用いて行うことができ、通常、反応溶液が中性付近(pH=6~8程度)にpH調整される。縮合反応に関与しない塩基としては、第三級アミン類、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミンなどのトリアルキルアミン類、N-メチルモルホリン、ピリジンなどの複素環式第三級アミン類などが例示できる。このような塩基の使用量は、通常、ペプチドフラグメントの総モル数の1~2倍程度の範囲から選択できる。

【0053】

以上のようにして得られたポリペプチドには、反応に用いた試薬が残存している。これは有効成分ポリペプチドの血小板凝集惹起活性や血小板自体の機能に影響するため、透析法、カラム法、限外ろ過法等の既知の手法を用いて残存している試薬を除去することが好ましい。また、ポリペプチドの安定性および取扱いの容易さから考えると、反応溶媒を保存溶媒に置換することが好ましい。反応溶媒から目的とする保存溶媒への置換は、透析法においては、目的とする保存溶媒を透析外液として使用することにより、カラム法においては、目的とする保存溶媒を移動相として用いることにより置換することができる。

【0054】

保存溶媒としては、得られた有効成分ポリペプチドの物理的性質および生物的性質の変化を抑えられるものであれば特に限定されない。例えば、水、生理食塩水、弱酸から弱アルカリに緩衝能を有するバッファーを挙げることができる。但し、血小板自体の機能や血液凝固因子に影響を与える物質を含有しないことが好ましい。例えば、血小板自体の機能に影響を与える物質としては、血漿中のカルシウムイオンをキレートするエチレンジアミン4酢酸、クエン酸ナトリウム等のキレート剤、血小板の機能を低下させる抗血小板薬、さらには血小板の活性化物質が挙げられる。また、血液凝固因子に影響を与える物質としては、抗凝固処理してある血液や多血小板血漿の凝固を促進させるカルシウムイオンを含有する物質などが挙げられる。

【0055】

有効成分ポリペプチドは血小板凝集惹起活性を有する。したがって、それを含有する本

10

20

30

40

50

発明の血小板凝集惹起物質は、血小板凝集能の評価に用いることができる。血小板の凝集能の測定方法は、惹起物質を用いる方法であれば特に限定されない。例えば、血小板の凝集の程度を吸光度（透過率）で判定する吸光度法（透過光法）、白金電極間の電気抵抗の変化として捉えるインピーダンス法、粒子計測器を用いて血小板凝集に参与しない単一血小板の数から血小板凝集の程度を推定する粒子算定法、散乱光を用いる散乱光法、またフィルターを用いるマイクロメッシュフィルター法などにもちいることができる。

#### 【0056】

現在、臨床においては透過光法が汎用されている。透過光法は、遠心分離により多血小板血漿（以下「PRP」ということがある）を得た後、さらに遠心分離により乏血小板血漿（以下「PPP」ということがある）を得る。PRP中の血小板数を20～40万/μLに調整し、一定量のPRP（200～500μL）とPPPを円柱状のキュベットに入れ37に加温し、マグネチックスターラーで攪拌しながら惹起物質を加え、その後、凝集に伴い増加するPRPの透過性を、PPPを対照として分光光度計で測定するのが原理である。血小板凝集の評価としては、透過光変化率の最大値、また血小板凝集曲線の最大変化率などがもちいられるが、低濃度から高濃度にいたる2～3種類の濃度を用いる方法などがある。通常、2種の濃度を用いる検査が多用されており、市販されているコラーゲンでは、低濃度は0.2～1μg/ml（終濃度）であり、高濃度は2～4μg/ml（終濃度）である。

#### 【0057】

本発明の血小板凝集惹起物質を透過光法で用いる場合、濃度の調整を除いては、上記の従来操作をそのまま用いることが可能である。本発明の血小板凝集惹起物質の濃度を調整する場合、希釈液は、水、生理食塩水、また保存液と同組成のバッファーから任意に選択することができるが、好ましくは水または生理食塩水である。水で希釈した溶液は、0.05μg/mlの終濃度において、市販されているコラーゲン（MCメディカル社製）2μg/mlと同等の血小板凝集の惹起能を有している。

#### 【0058】

本発明の血小板凝集惹起物質は、市販のコラーゲンと比べ十分に高い血小板凝集惹起活性を有しており、架橋する必要性がない。また、本発明に使用する有効成分ポリペプチドは未架橋であるため、残存する架橋剤が血小板自体の機能に与える影響が無いことより、正確に血小板凝集能の評価が可能である。更に、架橋の必要性がないことより、工程を大幅に削減することも可能である。

#### 【0059】

本発明の血小板凝集惹起物質は、血小板への粘着能を有することより、血小板の粘着能の評価および流動下で血小板のコラーゲンへの粘着の確認試験等に用いることも可能である。血小板の凝集能を測定する方法は、BAUMGARTNER法、陰性電荷を有するガラスビーズ管法などが知られているが、血管内皮下組織を用いない方法であれば限定されず、例えば、コラーゲンをガラスビーズ等にコートしたコラーゲンコート・ビーズ法などが挙げられる。また、流動下で血小板のコラーゲンへの粘着を確認する方法は、ガラス等のチャンパー内にコラーゲンをコートしたフローチャンパー法、また毛細管等の内面にコートしての使用などが挙げられる。コラーゲンのビーズ等への固定化方法は、共有結合により固定化する方法、および共有結合を介さないで固定化させる方法から任意に選択できる。

#### 【実施例】

#### 【0060】

以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 【0061】

##### 実験例1：ポリペプチドの合成

液相法で合成したPro-Hyp-Glyで示されるペプチドフラグメント1gを20mLの10mMリン酸塩緩衝液（pH7.4）に溶解し、4℃まで冷却した。これに4mLの473m

10

20

30

40

50

g の 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール、3.35 g の 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - カルボジイミド塩酸塩を加え、4 で 2 時間、その後 20 まで加温し 4 6 時間攪拌した。反応終了後、反応液に超純水を加えて 2 倍に希釈し、この溶液を透析用セルロースチューブ ( ビスケース社製 UC 27 - 32 - 100 ) に入れ、純水 2 L に対して 4 8 時間透析した。その際純水は 6 時間以上の間隔を空け 4 回交換した。

透析後、溶液を水で 50 倍 ( 容積比 ) に希釈し、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー ( 高速液体クロマトグラフィー : アジレント社製 1100 シリーズ、カラム : ショウデックス製 OHPak SB-806m HQ、流速 : 1.0 mL/min、移動相 : 20 mM リン酸カリウム緩衝液 ( pH 3.0 ) / メタノール = 8 / 2 ( 容積比 ) ) に供したところ、分子量が 10,000 ~ 500,000, 000, 000 の範囲にポリペプチドのピークが認められた。

10

#### 【 0062 】

一方、透析後、溶液を水で 60 倍 ( 容積比 ) に希釈し、円二色性スペクトル ( 日本分光製 円二色性分散計 J - 820、光路長 1mm ) を測定したところ、225 nm に正のコットン効果、198 nm に負のコットン効果が確認された。

#### 【 0063 】

##### 実験例 2

被験者 A より 3.8 重量 % クエン酸ナトリウム 0.5 ml を含んでいる真空採血管を用いて 4.5 ml 採血し、よく混和して抗凝固処理を行った。次いで、この抗凝固処理された血液を 100 g で 15 分間遠心分離を行った後、上澄みを回収して PRP を得た。更に、2000 g で 15 分間遠心分離を行い、上澄みを回収して PPP を得た。凝集能の評価は、血小板凝集測定装置 Easy TRACER ET - 800 ( 東京光電株式会社 ) を用い、凝集惹起物質添加前の PRP の透過率を 0 %、PPP の透過率を 100 % とし、実験例 1 で調製したポリペプチド溶液を添加してからの透過率の経時変化を記録することにより行った。ポリペプチド溶液を、ポリペプチドの終濃度がそれぞれ 2  $\mu$ g/ml になるように添加し、透過率の経時変化を記録した。また、コントロールとして市販されているコラーゲン ( MC メディカル社 ) の凝集惹起物質を、コラーゲンの終濃度が 2  $\mu$ g/ml になるように添加し、透過率の経時変化を記録した。結果を図 1 に示す。

20

#### 【 0064 】

##### 実験例 3

被験者 B から 4.5 ml 採血し、この血液を用いたことと以外は実験例 2 に記載の方法に準じて血小板の凝集能の評価を実施した。結果を図 2 に示す。

30

#### 【 0065 】

##### 実験例 4

被験者 C から 4.5 ml 採血し、この血液を用いたことと、ポリペプチドの終濃度を 2.0  $\mu$ g/ml、0.25  $\mu$ g/ml、比較のコラーゲンの終濃度を 2.0  $\mu$ g/ml、0.25  $\mu$ g/ml とした以外は実験例 2 に記載の方法に準じて血小板の凝集能の評価を実施した。結果を図 3、4 に示す。

#### 【 0066 】

##### 実験例 5

被験者 D から 4.5 ml 採血し、この血液を用いたことと、ポリペプチドの終濃度を 2.0  $\mu$ g/ml、0.25  $\mu$ g/ml、0.05  $\mu$ g/ml、0.02  $\mu$ g/ml、比較のコラーゲンの終濃度を 2.0  $\mu$ g/ml、0.25  $\mu$ g/ml とした以外は実験例 2 に記載の方法に準じて血小板の凝集能の評価を実施した。結果を図 5、6 に示す。

40

#### 【 0067 】

##### 実験例 6

被験者 A から 13.5 ml 採血し、この血液を用いたことと、ポリペプチドの終濃度を 0.05  $\mu$ g/ml、0.025  $\mu$ g/ml、0.015  $\mu$ g/ml、比較のコラーゲンの終濃度を 2.0  $\mu$ g/ml、0.25  $\mu$ g/ml とした以外は実験例 2 に記載の方法に準じて血小板の凝集能の評価を実施した。結果を図 7、図 8 に示す。

#### 【 0068 】

50

## 実験例7：アスピリン存在下、非存在下における血小板凝集測定

## 1) ポリペプチドの合成

液相法で合成したPro-Hyp-Glyで示されるペプチドフラグメント1gを20mLの10mMリン酸塩緩衝液(pH7.4)に溶解し、4℃まで冷却した。これに4.73mgの1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、3.35gの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩を加え、4℃で2時間、その後20℃まで加温し46時間攪拌した。反応終了後、反応液を透析用セルロースチューブ(ビスケース社製UC27-32-100)に入れ、純水2Lに対して48時間透析した。その際純水は6時間以上の間隔を空け4回交換した。

透析後、溶液を生理食塩水で100倍(容積比)希釈した。この100倍希釈溶液をフィルター濾過(0.2μm アドバンテック東洋 酢酸セルロース膜 25CS020AS)したのち、更に生理食塩水で50倍(容積比)希釈した。50倍希釈後のこの溶液中のポリペプチドの濃度を、吸光度法(波長:215nm)により求めたところ、0.29 μg/mlであった。

【0069】

## 2) 血小板凝集測定

血小板凝集の測定には、アスピリン処理したPRP(アスピリン処理PRP)とアスピリン処理がされていないPRP(非アスピリン処理PRP)を用いた。PRPは実験例2で得られたPRPを用い、これにアスピリン(アセチルサリチル酸、和光純薬工業製、特級試薬)を生理食塩水を用いて希釈した10mMアスピリン溶液を1/10量(容積比)加え、37℃で30分間加温しアスピリン処理PRPとした。また、実験例2で得られたPRPに生理食塩水を1/10量(容積比)加え、37℃で30分間加温し非アスピリン処理PRPとした。

【0070】

凝集能の評価は、血小板凝集測定装置Easy TRACER ET-800(東京光電株式会社)を用い、凝集惹起物質添加前のPRPの透過率を0%、PPPの透過率を100%とし、本実験例で調製したポリペプチド溶液を添加してからの透過率の経時変化を記録することにより行った。

ポリペプチド溶液(ポリペプチド濃度:0.29 μg/ml)22 μlを、200 μlのアスピリン処理PRPと200 μlの非アスピリン処理PRPのそれぞれに添加し、透過率の経時変化を記録した。次いで、コントロールとして、天然コラーゲンであるモリヤ産業製コラーゲンリエージェント“ホルム”(1mg/ml)を付属の希釈液で10倍(容積比)希釈した後、さらに生理食塩水で5倍(容積比)希釈した溶液(コラーゲン濃度20 μg/ml)を、200 μlのアスピリン処理PRPと200 μlの非アスピリン処理PRPのそれぞれに添加し、透過率の経時変化を記録した。結果を図9に示す。

【0071】

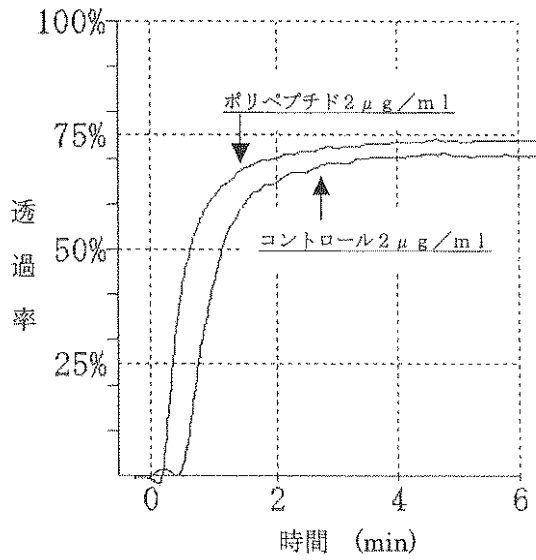
天然コラーゲンを凝集惹起物質として用いた場合、非アスピリン処理PRPでは血小板の凝集が見られるものの、アスピリン処理PRPでは血小板の凝集は認められなかった。それに対し本実験例のポリペプチドを用いた場合には、その濃度が天然コラーゲンの1/70ほどであっても、アスピリン処理PRP、非アスピリン処理PRPともに血小板の凝集が認められた。

【産業上の利用可能性】

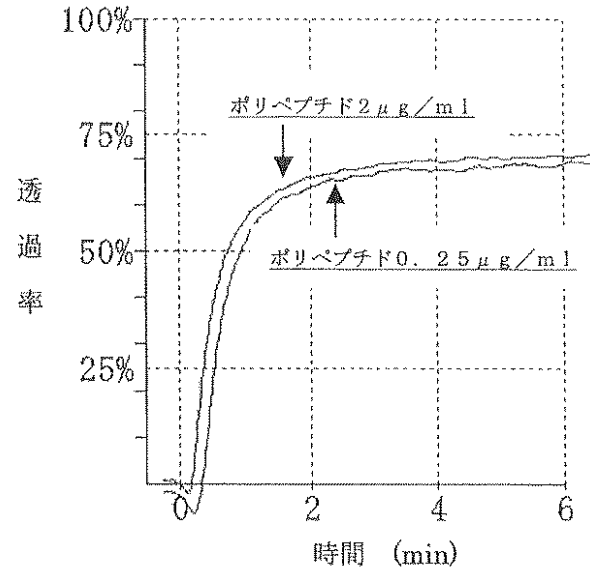
【0072】

本発明のトロンピン変異体は血管壁に存在するヘパリン様物質(ヘパラン硫酸)、トロンボモジュリン及び/またはインテグリンへの親和性が顕著に低下し、且つ高い抗血栓能を有しているため、血栓症などの治療に副作用なく効果的に用いることができる。

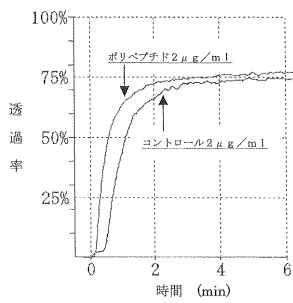
【図1】



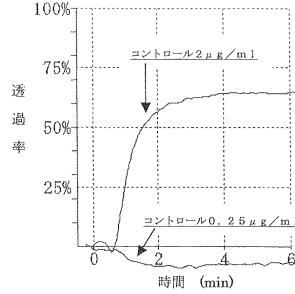
【図3】



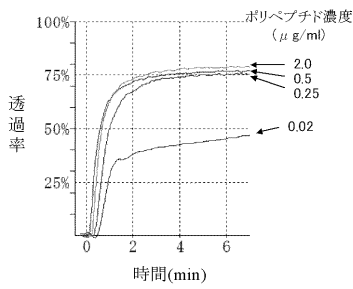
【図2】



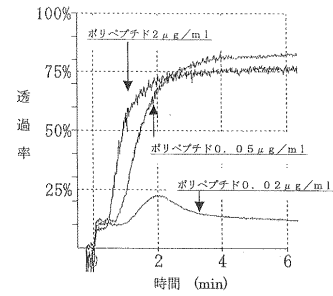
【図4】



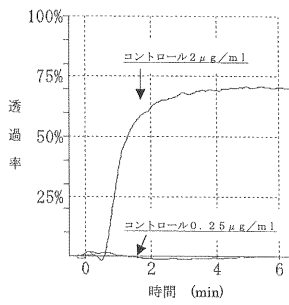
【図5】



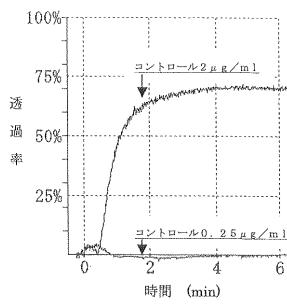
【図7】



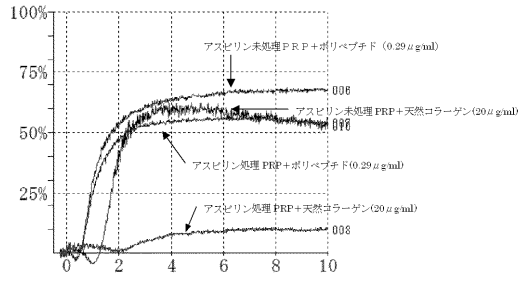
【図6】



【図8】



【図9】



【配列表】

0005251516000001.app



## フロントページの続き

(72)発明者 竹林 貴史

日本国東京都千代田区大手町二丁目2番1号 チッソ株式会社内

(72)発明者 川合 隆博

日本国熊本県水俣市野口町1-1 チッソ株式会社 水俣研究所内

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 特開2005-126360(JP,A)

特開2005-060550(JP,A)

特開2005-060315(JP,A)

特開2005-060314(JP,A)

特開2005-053878(JP,A)

特開2005-058499(JP,A)

特開2005-206542(JP,A)

特表2002-537270(JP,A)

特開2004-350677(JP,A)

J Biol Chem, 1994, Vol.269, No.19,p.13899-903

Cardiovasc Res, 1999, Vol.41, No.2, p.450-7

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

CA/REGISTRY(STN)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

Science Direct