

特許登録（抜粋）：抗血液凝固活性を持つオリゴペプチド

船越 崇行* 中野 宏俊** 溝上 寛**

(19)日本国特許庁 (JP) (12)特許公報 (B2) (11)特許番号

特許第416912 (P3416912)

(45)発行日 平成15年6月16日 (2003.6.16)

(24)登録日 平成15年4月11日 (2003.4.11)

記

出願国 日本： 日本国特許庁 (JP)

発明の名称 抗血液凝固活性を持つオリゴペプチド

(A) His-Asp-Thr-Leu-Ile-Arg (配列番号1)
(ヒスチジン⁺アスパルチル⁻スレオニル⁻ロイシール⁻イソロイシール⁻アルギニン)

(B) His-Asp-Thr-Gln-Pro-Arg-Val-Leu-Asp (配列番号2)
(ヒスチジン⁺アスパルチル⁻スレオニル⁻グルタミン⁺プロリン⁻アルギニン⁺バリン⁻ロイシール⁻アスパラギン⁻酸)
比較対照用ペプチド (Annexin-V由来の配列を有する抗凝固ペプチド)

(C) Asp-His-Thr-Leu-Ile-Arg (配列番号3)

(D) Ser-His-LeuArg-Lys-Val (配列番号4)

参考文献 Biochem. Biophys. Res. Commun., 1990年, 168, 125-134.
Nature, 1988年, 335, 726-730.
Peptide Chemistry, 1993年, 33, 149-152.

出願番号 特願平4-270152

出願日 平成4年10月8日 (1992.10.8)

公開番号 特開平6-116286

公開日 平成6年4月26日 (1994.4.26)

審査請求日 平成11年5月11日

特許番号 特許第3416912号 (3416912)

登録日 平成15年4月11日 (2003.4.11)

特許権者 000173555 財団法人・化学及血清療法研究所
000163006 興和株式会社

発明者 船越 崇行 九州看護福祉大学・看護学科
中野 宏俊 財団法人・化学及血清療法研究所
溝上 寛 財団法人・化学及血清療法研究所

代理人 100068700 弁理士 有賀 三幸

審査官 三元 美奈子

* 九州看護福祉大学看護福祉学部看護学科

**財団法人化学及血清療法研究所

— 特許の概要 —

(54)【発明の名称】 抗血液凝固活性を持つオリゴペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(A)又は(B)のいずれかのアミノ酸配列からなるオリゴペプチド。

(A) His-Asp-Thr-Leu-Ile-Arg (ヒスチジル-アスパルチル-スレオニル-ロイシル-イロイシル-アルギニン)

(B) His-Asp-Thr-Gln-Pro-Arg-Val-Leu-Asp (ヒスチジル-アスパルチル-スレオニル-グルタミン-プロリン-アルギニン-バリン-ロイシル-アスパラギン酸)

【請求項2】 化学的に合成されたものである請求項1記載のオリゴペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、抗血液凝固活性を持つオリゴペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】 血液凝固反応は、セリンプロテアーゼインヒビター系や、プロテインC / プロテインS / トロンボモジュリン系を代表とする数多くの抗凝固物質により制御されることが知られている。血液凝固連鎖反応(カスケード)における、その鍵となる重要な反応においては、リン脂質表面の部分が深く関与していると考えられ、このような部分と相互作用するペプチドは、血液凝固の生理学的または薬学的制御を可能ならしめる領域として重要と考えられ、その研究が期待されている。組織因子もまた同様に、膜リン脂質と結合することにより外傷部位での血液凝固を開始することが確認されており、血液凝固第VIIa因子 / 組織因子複合体(小文字のaは活性化された因子を意味する)は、高濃度の血漿リポプロテインにより複合体形成が阻止されることが知られている。

【0003】 血液凝固反応には、外因系凝固経路(extrinsic pathway)および内因系凝

固経路(intrinsic pathway)と呼ばれる別個の系が存在する。内因系凝固経路とは、血漿中に存在する因子によりトロンビン形成を導く反応を指し、その中間的反応としては、ファクターXIIaおよびカルシウムイオンにより触媒されてファクターIXがファクターIXaに活性化され、この活性化ファクターIXaが、ファクターVIIIa、ホスホリピッドおよびカルシウムイオンの存在下でファクターXを活性化する反応である。一方、外因系凝固経路とは、血漿因子並びに組織抽出物中に存在する成分から血液凝固反応を導く反応を指し、血液凝固因子のひとつであるファクターVIIaが組織因子およびカルシウムイオンの存在下でファクターXをXaに活性化する反応を指す。

【0004】 最近、ヒト胎盤から数種の血液凝固阻止因子が単離・同定され、これらは胎盤由来抗血液凝固蛋白質(アネキシン-V~II / PAP-I~IV)と命名された〔船越ら、Biochemistry 26, p5572 - 5578(1987)〕。アネキシン-Vは、この中でも最も量的に多く存在し、既に血液凝固阻止因子として報告されているカルフォペンデイン-I / CPB-I〔岩崎ら、J. Biochem. 102, p1261-1273(1987)〕および血管内抗凝固物質(Vasuculaer anticoagulant)〔Reutelings pergarら、Eur.J. Biochem. 151, p625-629(1985)〕と相同性が極めて高く、同一グループの物質であると考えられている。

【0005】 上記のアネキシン-Vは外因系および内因系のいずれの血液凝固反応も阻止することができ、カルシウムイオン存在のもとで陰イオン性リン脂質表面に特異的に結合する性質を有する。

【0006】 また、ヒト胎盤由来抗血液凝

固蛋白質をコードする塩基配列に関して、PP4、VAC、およびカルフォピンディン-IIのそれぞれについて既に報告されている〔Grundmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, p3708-3712 (1988) ; Maurer-Fogyら、Eur. J. Biochem. 174, p585-592 (1988) および岩崎ら、J. Biochem. 106, p43-49 (1989)〕。これらの蛋白質一次構造およびcDNA解析により、アネキシン-Vは、カルシウム依存性リン脂質結合蛋白質であるリポコルチン/カルパクチン/アネキシンファミリーに属する蛋白であることが示された。

【0007】このアネキシン-Vは、319アミノ酸から構成され、さらに4つの反復配列を有する。このアミノ酸配列については船越らにより報告されている〔Biochemistry 27, p6208-6276 (1988)〕。さらにアネキシン-Vの各反復配列は、リン脂質結合蛋白質に通常存在する2つの領域を含んでおり、そのひとつの領域は、KGXGTDEXXhhXhhXSR (Kはリジン、Gはグリシン、Tはトレオニン、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Sはセリン、Rはアルギニン、Xは任意のアミノ酸、hは疎水性アミノ酸を示す)の17アミノ酸からなる領域であり、このようなアミノ酸配列は、エンドネクシン (endonexin)、カレレクトリン (calelectrin) およびリポコルチン (lipocortins) のようなカルシウムイオン依存性膜結合蛋白質にも多くみられる配列である。もうひとつは、それぞれの反復配列のカルボキシ末端側にあたる6アミノ酸からなる疎水性の強い領域である。これらの2つの領域は、リン脂質との結合に直接関係するものと考えられる。

【0008】また、アネキシン-Vにおいては、カルシウムイオン非存在下では、この蛋白が全く抗凝固活性またはリン脂質結合性を示さないことから、カルシウムイオンまたはリン脂質結合部位が本蛋白質の作用部位に重

要な関係があると考えられる。

【0009】このような状況において、アネキシン-Vの作用部位のアミノ酸配列を有するオリゴペプチドが抗血液凝固活性を有することが既に報告されている〔Biochem. and Biophys. Res. Commun. 168, p125-134 (1990)〕。さらに、本発明者らは、アネキシン-Vのアミノ酸配列の中でも、配列番号3のアミノ酸配列をもつオリゴペプチドが優れた抗血液凝固活性を有することをみだし、先に特許出願した (特許平3-154811号)。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】このような抗血液凝固活性等の性質を持つアネキシン-Vのアミノ酸配列に由来する、さらに抗血液凝固活性に優れたオリゴペプチドを合成することは、DIC (汎発性血管内凝固症候群)等の血液疾患の治療・予防薬を開発するために重要である。従って、本発明の目的はアネキシン-Vの抗血液凝固活性部位に由来し、これに改良を加えることでさらに活性の強いオリゴペプチドを提供することにある。

【0011】

【問題を解決するための手段】本発明者は上記実情に鑑み、本発明者らが先に見いだしたアネキシン-Vアミノ酸配列由来のオリゴペプチドをもとに、このアミノ酸配列の一部を改良したオリゴペプチドを合成し、これらの抗血液凝固活性を測定したところ、下記に示すアミノ酸配列を有するペプチドが強い抗血液凝固活性を有することを見だし、本発明を完成した。

【0012】すなわち本発明は、下記 (A) または (B) のいずれかのアミノ酸配列からなるオリゴペプチドを提供するものである。
(A) His-Asp-Thr-Leu-Ile-Arg (配列番号1)
(B) His-Asp-Thr-Gln-Pro-Arg-Val-Leu-Asp (配列番号2)

【0013】本発明のオリゴペプチドは、アネキシン-Vのアミノ酸配列とその抗血液凝固活性に関する研究を進めていく中で、ヒスチジン残基を有する配列番号3のアミノ酸配列領域に特に着目し、この配列を一部改良することにより見いだされたものである。すなわち、ミエーレらによれば、アネキシン族のひとつであるリポコルチンIのフォスホリパーゼA₂阻害活性部位のひとつがHDMNKVLDLのアミノ酸配列の領域と報告されている〔ミエーレら、Lucio Miele et. al., Nature 335, p726-730(1988)〕。このアミノ酸配列と配列番号3の配列を比較し、また、さらに蛋白工学的にこれらを解析し、種々の観点から推察を繰り返した結果、本発明者らは、アネキシン-V由来の配列番号3のアミノ酸のうち、アミノ末端側のAsp-His-の配列を入れ替えHis-Asp-とすることで、さらに抗血液凝固活性が高くなるのではないかと推察した。また、C末端側のアミノ酸配列についても、ValやLeuのような疎水性アミノ酸を用いてペプチドを延長させることにより、リン脂質との結合がさらに容易になり、その結果、抗血液凝固活性を上げることができるのではないかと推察した。このような研究解析の末、本発明のオリゴペプチドとして下記オリゴペプチドAおよびBが合成された。

オリゴペプチドA (本発明品) : His-Asp-Thr-Leu-Ile-Arg (配列番号1)

オリゴペプチドB (本発明品) : His-Asp-Thr-Gln-Pro-Arg-Val-Leu-Asp (配列番号2)

【0014】また、これらオリゴペプチドのアミノ酸配列のベースとなった本来のアネキシン-V由来の配列を有するオリゴペプチドとしてオリゴペプチドDが合成された。さらに、本発明者らが先に見いだした公知のアネキシン-V由来オリゴペプチドを、比較対照用のペプチドとして合成した。

オリゴペプチドC : Asp-His-Thr-Leu-Ile-Arg (配列番号3)

オリゴペプチドD : Ser-His-Leu-Arg-Lys-Val (配列番号4)

【0015】これらの6アミノ酸からなるオリゴペプチドCおよびDのアネキシン-Vにおける領域は、アネキシン-Vのアミノ末端のメチオニンを1として数えて、それぞれ265~270番目および203~208番目の領域に相当する。

【0016】上記の4種のオリゴペプチドの抗血液凝固活性を、カオリン活性化血液凝固反応を用いて、血液凝固時間における遅延反応として測定した。その結果、公知のオリゴペプチドDおよび本発明者らが先に発明したオリゴペプチドCにおいて抗血液凝固活性があることが確認されたが、本発明のオリゴペプチドAおよびBでは、さらに高い抗血液凝固活性を示すことが確認された。詳細には、アネキシン-Vの203番目から208番目のアミノ酸にあたるオリゴペプチドCが、公知のオリゴペプチドDに比べて極めて強い抗血液凝固活性を有することが確認されたが、オリゴペプチドCの配列を一部改良することにより調製した本発明のオリゴペプチドAおよびBは、アネキシン-V配列由来の本来のアミノ酸配列を有するオリゴペプチドCよりさらに極めて強い抗血液凝固活性を示すことが見いだされた。一方、対照として、オリゴペプチドC中のヒスチジン(His)をアラニン(Ala)に置換したところ、この改変ペプチドにはもはや抗血液凝固活性を見いだすことはできなかった〔船越ら、Biochem. and Biophys. Res. Commun. 168, p125-134(1990)〕。

【0017】さらに、本発明のオリゴペプチドは、マウス肺塞栓モデルを用いた生体内での活性確認試験においても、抗血液凝固活性を示すことが確認された。

【0018】本発明においては、実質的な抗血液凝固作用部位として上記オリゴペプチドAまたはBのみを有し、他に抗血液凝固活性作用部位を有さないペプチドをも含むものである。

【0019】さらに、本発明においては、2つ以上の抗血液凝固作用部位を有するペプチドとして本発明で提供されるオリゴペプチドAまたはBのアミノ酸配列を複数個有するペプチド、さらには、オリゴペプチドAおよびBの双方のアミノ酸配列を有するペプチド等をも含むものである。

【0020】本発明のオリゴペプチドを製造する方法は特に限定されないが、例えばペプチド合成機を用いて容易に合成することができる。

【0021】

【発明の効果】本発明により、アネキシン-Vの抗血液凝固活性を示す最も重要な領域に由来し、本来の配列からなるペプチドよりさらに優れた改良型オリゴペプチドが、提供され、これらが非常に強い抗血液凝固活性を示すことが確認された。よって、このようなオリゴペプチドは、DIC（汎発性血管内凝固症候群）等を初めとした血液疾患に対して、有効な治療薬および予防薬の開発を可能にするものである。さらに、本発明のオリゴペプチドは、このような血液疾患の診断を行う際にも、診断薬の構成材料として利用されるため、該当疾患のより有効な診断方法をも可能にするものである。

【0022】以下、実施例に沿って本発明をさらに詳細に説明する。

【0023】

【実施例】

実施例1 オリゴペプチドの調製：

アネキシン-Vのアミノ酸配列の一部である、下記のオリゴペプチドCおよびDをペプチド

合成機を用いて調製した後、フッ化水素法により合成機から分離した。各ペプチドの精製は、逆相高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）により行い、HPLCおよびアミノ酸分析によりその精製度を確認した。

オリゴペプチドC：Asp-His-Thr-Leu-Ile-Arg（配列番号3）

オリゴペプチドD：Ser-His-Leu-Arg-Lys-Val（配列番号4）

【0024】さらに、下記のアミノ酸配列AおよびBからなるペプチドも同様に合成した。

オリゴペプチドA（本発明品）：His-Asp-Thr-Leu-Ile-Arg（配列番号1）

オリゴペプチドB（本発明品）：His-Asp-Thr-Gln-Pro-Arg-Val-Leu-Asp（配列番号2）

【0025】

試験例1 *in vitro*抗血液凝固活性：

実施例1で得たオリゴペプチドA～Dの抗血液凝固活性を下記の如くして測定した。まず、ウサギ脳セファリン（シグマ社）1バイアルを100mlの生理食塩水に懸濁し、これを1mlずつに分注し-20℃で保存した。このセファリン懸濁液と33 mMの塩化カルシウム溶液を各試験前に混合し、酸で十分に洗浄されたカオリン溶液（50 mM/mlの濃度になるように生理食塩水に溶解したもの）を添加し、各ペプチドによる内因系血液凝固の阻害を測定した。すなわち、20 μ lの血漿と20 μ lのテストサンプル〔50 mMのNaClを含む50 mMトリスー塩酸緩衝液（pH 7.9）に溶解したもの〕を10分間37℃にて保温し、カオリンを20 μ l添加し、さらに、塩化カルシウムセファリン混合液を60 μ l添加することにより各凝固時間を測定した。

【0026】終濃度1 mM～5 mMになるように各ペプチド溶液を調製し、これを血液に添加して凝固時間の遅延を調べた。結果を、

試料ペプチドを含まないコントロールの凝固時間との比（試料ペプチド/コントロール）として図1に示す（省略）。すなわち、オリゴペプチドCおよびDでは、添加するペプチドの濃度を増やすに従い、血液の凝固時間が長くなることが確認された。一方、本発明のオリゴペプチドAおよびBでは、添加するペプチドの濃度を増やすに従い、オリゴペプチドCおよびDと比べてもさらに優れた、極めて高い血液凝固遅延の効果があることが確認された。ちなみに、終濃度5mMで各ペプチドを添加した場合の各血液の凝固時間は、何も添加していないコントロールの凝固時間を基準として、オリゴペプチドDではその凝固

時間が約2倍に、オリゴペプチドCでは約6倍に遅延されることが確認された。また、本発明のオリゴペプチドAおよびBでは、終濃度5mMにおいて、血液凝固の遅延時間が、コントロールの約9倍以上に遅延されることが示された。終濃度5mMでの、本発明のオリゴペプチドAおよびBの凝固時間は、予め設定した測定時間内では凝固が起らず、正確な凝固時間を測定することが困難な程に高い活性を示した。終濃度4mMでの各オリゴペプチドでの抗血液凝固活性を測定した結果を時間で示すと表1の通りである。

【0027】

表1

試験群 (4mM)	ペプチドA	ペプチドB	ペプチドC	ペプチドD	コントロール
凝固時間 (秒)	325	492	198	120	71

【0028】

試験例2 *in vivo*抗血液凝固活性：

実施例1で得た本発明オリゴペプチドAおよびB並びにオリゴペプチドCの生体内での抗血液凝固活性は肺塞栓モデルマウスを用い、下記のようにして測定した。まず、精製されたオリゴペプチドA、BおよびCをそれぞれ生理食塩水に2～5mg/mlに調整した。

【0029】 ddY系雄性マウス（体重25～40g）に、上記オリゴペプチド溶液を20～50mg/kgになるように、10mg/kgの容量でそれぞれマウス尾静注により投与した。その後、30秒以内に血液凝固因子である組織因子（Tissue Factor：TF、リオプラスチン、持田製薬製、生理食塩水で1～5mg/mlに調製したもの）を30mg/kg投与した。TF投与後、マウスの経時的変化を観察し、死亡するまでの時間（生存時間）を測定した。このTFの投与も10mg/kgの容量で尾静注により行った。

【0030】本モデルでは、マウス静脈内

にTFが投与されると、TFは血流に乗って心臓からまず最初に肺へと送られる。そこで肺に血栓が形成され、呼吸が抑制されてマウスは死に至るものと考えられた。

【0031】その結果、本発明のオリゴペプチドAまたはBを事前に投与したマウスでは、50mg/kg投与群においては、TF投与マウスにおいて死亡が見られなかった。また、これより投与量が少ない、20～40mg/kgのオリゴペプチド投与群においても、投与量が多くなるごとに、死亡率が低くなるという結果が確認された。尚、本発明のオリゴペプチドBでは、40mg/kg投与群においても、TF投与マウスに死亡が見られなかった。一方、これに対して、本発明のオリゴペプチドを事前投与しなかった非投与のマウス（コントロール）では、TF投与後全て死亡が確認された。各オリゴペプチド投与群での結果を下記表2に示した。標柱の数値は、死亡マウス数/TF投与マウス数(死亡率)で示した。

【0032】

表2

ペプチド 投与量(mg/ml)	死亡マウス数 / Tissue Factor (TF) 投与マウス数 (死亡率, %)			
	ペプチドA	ペプチドB	ペプチドC	非投与(コントロール)
0	3 / 3 (100%)	3 / 3 (100%)	3 / 3 (100%)	3 / 3 (100%)
20	6 / 8 (75%)	3 / 3 (100%)	4 / 5 (80%)	—
30	6 / 9 (67%)	2 / 3 (67%)	3 / 6 (50%)	—
40	1 / 5 (20%)	0 / 3 (0%)	1 / 5 (20%)	—
50	0 / 5 (0%)	0 / 3 (0%)	0 / 5 (0%)	—