

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4680329号  
(P4680329)

(45) 発行日 平成23年5月11日(2011.5.11)

(24) 登録日 平成23年2月10日(2011.2.10)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 K 38/48 (2006.01)** A 6 1 K 37/547  
**A 6 1 P 7/02 (2006.01)** A 6 1 P 7/02  
**A 6 1 P 9/00 (2006.01)** A 6 1 P 9/00  
**A 6 1 P 43/00 (2006.01)** A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 9 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平10-545904	(73) 特許権者	505408756
(86) (22) 出願日	平成10年3月24日(1998.3.24)		カーディオム ファーマ コーポレイション
(65) 公表番号	特表2001-518933(P2001-518933A)		カナダ国 ブイ6ティー 1ゼット3 プリテイッシュ コロンビア, バンクーバー, アグロノミー ロード 6190, 6ティーエイチ フロアー
(43) 公表日	平成13年10月16日(2001.10.16)	(74) 代理人	100068526
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/005732		弁理士 田村 恭生
(87) 国際公開番号	W01998/042358	(74) 代理人	100100158
(87) 国際公開日	平成10年10月1日(1998.10.1)		弁理士 鮫島 睦
審査請求日	平成17年3月23日(2005.3.23)	(74) 代理人	100138900
(31) 優先権主張番号	60/042, 533		弁理士 新田 昌宏
(32) 優先日	平成9年3月24日(1997.3.24)	(74) 代理人	100162684
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 呉 英燦
(31) 優先権主張番号	60/062, 549		
(32) 優先日	平成9年10月20日(1997.10.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管障害の治療方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血管閉塞性障害および動脈血栓性塞栓障害のヒト患者を治療するための医薬組成物であって、活性成分として用量 0.01 mg/kg/hr ~ 0.05 mg/kg/hr の活性化プロテイン C のみを連続注入で該患者に投与するための医薬組成物。

【請求項 2】

血管閉塞性障害または血栓性塞栓障害が血栓性発作である請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3】

該患者に活性成分として 0.01 mg/kg/hr ~ 0.03 mg/kg/hr の活性化プロテイン C のみを投与するための請求項 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4】

該患者に活性成分として 0.024 mg/kg/hr の活性化プロテイン C のみを投与するための請求項 3 記載の医薬組成物。

【請求項 5】

活性化プロテイン C がヒト活性化プロテイン C である請求項 4 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

活性化プロテイン C が 12 時間 ~ 36 時間の連続注入で投与される請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 7】

活性化プロテイン C が 24 時間の連続注入で投与される請求項 6 記載の医薬組成物。

## 【請求項 8】

活性化プロテイン C がヒト活性化プロテイン C である請求項 7 記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

活性成分として  $0.024 \text{ mg/kg/hr}$  の活性化プロテイン C のみを投与するための請求項 8 記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 発明の分野

本発明は、医療技術、特に活性化プロテイン C による血管障害の治療に関する。

## 発明の背景

プロテイン C は、セリンプロテアーゼであり、凝固カスケードにおいて  $V_a$  および  $VIII_a$  因子を失活させることにより恒常性の制御において役割を果たす天然の抗凝固薬である。ヒトプロテイン C は、*in vivo* では主として肝臓において 461 アミノ酸の 1 本鎖ポリペプチドとして生成される。この前駆体分子は、1) 42 アミノ酸のシグナル配列を開裂させ、2) 1 本鎖チモーゲンの 155 位のリジン残基と 156 位のアルギニン残基が蛋白分解により除去され、該分子の 2 本鎖形（すなわち、155 アミノ酸残基の軽鎖が、262 アミノ酸残基のセリンプロテアーゼ含有重鎖とジスルフィド架橋を介して結合）を形成し、3) 該軽鎖の最初の 42 アミノ酸中のクラスターとなった 9 個のグルタミン酸残基がビタミン K 依存性にカルボキシル化して 9 個の  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸残基を生じ、4) 4 部位で炭化水素が結合（1 つは軽鎖中、3 つは重鎖中）することを含む多様な翻訳後修飾を受ける。重鎖は、Asp 257、His 211、および Ser 360 のよく確立されたセリンプロテアーゼ三つ組残基を含む。最後に、循環 2 本鎖チモーゲンは、*in vivo* において、カルシウムイオンの存在下、リン脂質表面でトロンビンにより活性化される。活性化は重鎖の N-末端のドデカペプチドを除去することにより生じ、酵素活性を有する活性化プロテイン C (aPC) が生じる。

他のタンパク質とともに、プロテイン C はおそらく血液凝固の最も重要な下方調節物質 (down-regulator) として機能する。すなわち、プロテイン C 酵素系が主要な生理学的抗凝固機序であることを意味する。

凝固系は、チモーゲンの活性セリンプロテアーゼへの逐次活性化により、最終的に酵素トロンビンを生成し、これにより限定蛋白分解を介して血漿フィブリノーゲンを不溶性ゲルのフィブリンに変換することを含む連鎖反応として最もよく考察されている。凝固カスケードにおける 2 つの鍵となる出来事は、凝固 IX a 因子による凝固 X 因子の凝固 X a 因子への変換、および凝固 X a 因子によるプロトロンビンのトロンビンへの変換である。これら反応はいずれも、細胞表面、最も顕著には血小板表面で生じる。これら反応にはいずれも補助因子が必要である。この系における主な補助因子、V および VIII 因子は比較的不活性な前駆体として循環しているが、トロンビンの最初の数分子が形成されると、トロンビンはフィードバックして、限定蛋白分解を介して該補助因子を活性化する。活性化  $V_a$  および  $VIII_a$  補助因子はともに、プロトロンビンのトロンビンへの変換と、X 因子の X a 因子への変換を約 5 オーダー (order) 促進する。活性化プロテイン C は、それが加水分解し、不可逆的に破壊する 2 つの血漿タンパク質基質を圧倒的に好む。これら血漿タンパク質基質は凝固  $V_a$  および  $VIII_a$  補助因子の活性化形である。活性化プロテイン C は不活性前駆体、凝固 V および VIII 因子を最小限しか分解しない。イヌにおいて活性化プロテイン C は、主な生理学的繊維素溶解酵素の組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) の循環レベルを急激に増加させることがわかっている。活性化プロテイン C は *in vitro* においてヒト全血中のフィブリンの分解を増強することが示されている。したがって、活性化プロテイン C はヒトにおける *in vivo* の繊維素溶解に対する重要な補助物質であるといえる。

今日、血栓性発作 (卒中) を含む血管閉塞に利用できる有効な治療法はほとんどない。発作発現から 3 時間以内に投与する、tPA を用いる治療は、最近 FDA により承認された。ヘパリンまたは経口抗凝固剤のいずれかを用いる発作の治療は、時として有効であるが、梗塞を起こした脳領域に出血をもたらす危険性が高い。

10

20

30

40

50

ヒヒ (baboon) モデルにおける血栓性閉塞または血栓性塞栓症の治療に組換え a P C ( r - a P C ) を使用することが、Griffinらの米国特許第5084274号に記載されている。Griffinは、血栓性閉塞を治療するための  $0.2 \text{ mg / kg / hr} \sim 1.1 \text{ mg / kg / hr}$  の範囲の用量レベルをクレームした。しかしながら、出願人は、これら用量レベルが r - a P C の毒性レベルよりかなり高い範囲にあることをみいだした。例えば、非ヒト霊長類における前臨床毒性試験は、r - a P C の96時間注入の安全性が約  $0.05 \text{ mg / kg / hr}$  の最高用量に限られることを示している。したがって、Griffinらが開示した最低用量レベル、すなわち、 $0.2 \text{ mg / kg / hr}$  は、出願人がヒトについて確立した毒性用量より4倍高いレベルである。すなわち、Griffinが開示した最低用量レベルは梗塞を生じた脳領域に出血を起こすことにより、発作に伴う神経学的欠損を悪化させる危険性が高いであろう。したがって、Griffinらの開示を考慮しても、依然として、a P C によるヒトの動脈血栓形成の有効な療法を確認する必要がある。

10

先の研究者らの開示に反して、出願人は r - a P C を用いる低用量療法のみが血栓性発作の治療に有用であることを発見した。a P C の投与は、微小血管および大血管を閉塞させる動脈血栓の局所的広がりを抑制することにより、発作によって生じる神経学的欠損を減少させる。

#### 発明の要約

本発明は、血管閉塞性障害および動脈血栓性塞栓障害のヒト患者の治療方法であって、用量約  $0.01 \text{ mg / kg / hr} \sim 0.05 \text{ mg / kg / hr}$  の活性化プロテインCを該患者に投与することを含む方法を提供する。

20

本発明は、用量約  $0.01 \text{ mg / kg / hr} \sim 0.05 \text{ mg / kg / hr}$  を投与するのに適した活性化プロテインCを約  $5 \text{ mg} \sim 20 \text{ mg}$  含む単位用量容器を含む、連続注入による投与に適した単位用量剤形も提供する。

#### 発明の詳細な説明

本明細書に開示し、クレームしているように、本発明の目的において、下記の用語は以下に定義する通りである。

a P C すなわち活性化プロテインCは、組換えまたは血漿由来のプロテインCを表す。a P C にはヒトプロテインCが含まれ、好ましいが、a P C にはプロテインCの蛋白分解活性、アミド分解活性、エステル分解活性、および生物(抗凝固またはプロフィブリノリティック)活性を有する他の種または誘導體も含まれる。プロテインC誘導體の例は、Gerlitzら、米国特許第5453373号、およびFosterら、米国特許第5516650号(これらの内容は本明細書の一部を構成する)に開示されている。

30

A P T T - 活性化部分トロンボプラスチン時間。

A U - アミド分解単位。

H P C - ヒトプロテインCチモーゲン。

M E A - 2 - アミノエタノール。

t P A - 組織プラスミノゲンアクチベーター。

r - H P C - 組換えヒトプロテインCチモーゲン。

r - a P C - 当業者によく知られ、Yan、米国特許第4981952号、およびCottingham、WO 97/20043(これらの内容は本明細書の一部を構成する)に記載の技術により、in vitroもしくはin vivoでプロテインCチモーゲンを活性化するか、または例えば、チモーゲンとしてヒト腎293細胞からの分泌を含む、原核細胞、真核細胞、またはトランスジェニック動物由来のプロテインCの活性化形を直接分泌させ、次いで精製し、活性化することにより製造される組換え活性化プロテインC。

40

連続的注入 - 血管内への溶液の導入が、ある特定の期間、実質的にとぎれずに連続していること。

ボラス注射 - 約120分間までの時間をかけて限定された量(ボラスと呼ぶ)の薬剤を注射すること。

投与に適した - 治療剤として投与するのに適した、好ましくは凍結乾燥a P C から調製された製剤または溶液。

50

チモーゲン - 蛋白分解酵素の酵素的に不活性な前駆体。本明細書で用いているプロテインCチモーゲンとは、分泌された、不活性形の1本鎖または2本鎖のプロテインCをいう。

出願人は、非ヒト類人猿における前臨床毒性試験が、r - a P Cの96時間注入の安全性が最高用量約0.05 mg / kg / hrに限定されることを示していることをみいだした。これらデータは、先行技術からは予期できないことである。事実、以前の前臨床および臨床試験に基づいたヒトに対するr - a P Cの用量レベルは、上記毒性試験で確立された毒性範囲より高い。

本発明は、血管閉塞性障害および動脈血栓性塞栓障害のヒト患者の治療方法であって、用量約0.01 mg / kg / hr ~ 約0.05 mg / kg / hrの活性化プロテインCを該患者に投与することを含む方法を提供する。低用量レベルの活性化プロテインCの投与は、高用量レベルに関連するであろう付随する出血の問題を伴わずに血栓性発作を治療するのに有用である。さらに、本発明は、ヒト臨床試験に組換えヒトタンパク質C ( r - a P C ) を用いるr - a P Cの血漿中濃度の測定について示している(実施例1)。

本発明は、イヌの閉塞性冠動脈血栓症モデルにおける完全閉塞冠動脈の再還流に対するr - a P Cの静脈内投与の効果も示している(実施例2)。驚くべきことに、コントロールの動物6頭ではまったく血管の再還流がみられなかったのに対し、r - a P Cで処理した動物6頭中5頭に血管の再還流がみられた。

本発明は、血栓性発作、末梢動脈血栓症、心臓または末梢動脈由来の塞栓、急性心筋梗塞、および冠動脈疾患を含む血管閉塞性障害または動脈血栓性塞栓性障害の、活性化プロテインCによる治療に関する。

a P Cは、医薬的に有用な組成物を製造するための知られた方法に従って製剤化することができる。a P Cは、約1 ~ 約48時間の連続注入に適した用量を注射することにより、有効な形で血流中に確実に供給されるように非経口的に投与されるのが好ましい。より好ましくは、a P Cの適切な用量は約4 ~ 約36時間の連続注入により投与されよう。さらに好ましくは、a P Cの適切な用量は、約12 ~ 約24時間の連続注入により投与されよう。より好ましくは、適切な用量のa P Cは約24時間の連続注入により投与されよう。a P Cの投与は発作の診断後できるだけ速やかに開始されよう。

投与されるa P Cの量は、約20 mg / 70 kg / 24 hr ~ 約84 mg / 70 kg / 24 hrと等価な約0.01 mg / kg / hr ~ 約0.05 mg / kg / hrである。用量レベルは24時間あたりのある特定の量として確定されるが、これは用量レベルを明示するものであって、必ずしも24時間注入に限定するものではなく、種々の時間、例えば、約1時間 ~ 約48時間の連続注入を含んでよいことを当業者は認識するであろう。より好ましくは、a P Cの投与量は、約0.01 mg / kg / hr ~ 約0.04 mg / kg / hr (約20 mg / 70 kg / 24 hr ~ 約67 mg / 70 kg / 24 hr)である。より好ましいa P Cの投与量は、約0.01 mg / kg / hr ~ 約0.03 mg / kg / hr (約20 mg / 70 kg / 24 hr ~ 約50 mg / 70 kg / 24 hr)であろう。a P Cの最も好ましい投与量は、約0.024 mg / kg / hr (約40 mg / 70 kg / 24 hr)である。

あるいはまた、a P Cは、約5分 ~ 約30分間にわたりボラス注射として1時間あたり適切な用量の部分が注射され、次いで、適切な用量が約23時間 ~ 約47時間の連続注入により投与されることにより、24時間 ~ 48時間にわたって適切な用量が投与されることになる。

先に示したように、上記a P Cの用量レベルはGriffinらの示したものと大きく異なる。Griffinは血栓性閉塞を治療するために0.2 mg / kg / hr ~ 1.1 mg / kg / hrの範囲の用量レベルをクレームした。これに対して、本明細書でクレームしている用量レベルは、この用量の10分の1と等価、すなわち、約0.01 mg / kg / hr ~ 約0.05 mg / kg / hrの範囲である。血栓性閉塞において投与すべきa P Cの最も好ましい用量レベルは、本明細書に記載のごとく約0.024 mg / kg / hrであろう。本明細書に示した0.024 mg / kg / hrの最も好ましい用量レベルはGriffinがク

10

20

30

40

50

レームした最も低い用量レベルより8倍低く、Griffinがクレームした最も高い用量レベルより44倍低い。

#### 製造例 1

##### ヒトプロテインCの製造

組換えヒトプロテインC (rHPC) は、Yanの、米国特許第4981952号 (この内容は本明細書の一部を構成する) に記載されているような当業者によく知られた技術によりヒト腎293細胞を用いて製造される。ヒトプロテインCをコードしている遺伝子は、Bangらの、米国特許第4775624号 (この内容は本明細書の一部を構成する) に開示され、クレームされている。293細胞中でヒトプロテインCを発現させるのに用いるプラスミドはBangら、米国特許第4992373号 (この内容は本明細書の一部を構成する) に開示されたプラスミドpLPCであった。プラスミドpLPCの構築は、欧州特許公開公報第0445939号、およびGrinnellら (1987)、Bio/Technology 5:1189-1192 (この内容は本明細書の一部を構成する) にも記載されている。簡単には、該プラスミドを293細胞にトランスフェクトし、次いで、安定な形質転換体を同定し、継代培養し、無血清培地で増殖させる。発酵後、精密ろ過により無細胞培地を得た。

10

Yanの、米国特許第4981952号 (この内容は本明細書の一部を構成する) の技術を適合させることにより培養液からヒトプロテインCを分離した。不純物を除いた培地をEDTAの4mM溶液とし、次いで、陰イオン交換樹脂 (Fast-FlowQ, Pharmacia) に吸着させた。4カラム容量の20mMトリス、200mM NaCl (pH 7.4)、および2カラム容量の20mMトリス、150mM NaCl (pH 7.4) で洗浄し、次いで、結合した組換えヒトプロテインCチモーゲンを20mMトリス、150mM NaCl、10mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4) で溶出した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で判断した溶出タンパク質の純度は溶出後95%以上であった。

20

該タンパク質のさらなる精製は、該タンパク質溶液をNaClの3M溶液とし、次いで20mMトリス、3M NaCl、10mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4) で平衡化した疎水性相互作用樹脂 (Toropearl Phenyl 650M, TosoHaas) に吸着させた。CaCl<sub>2</sub>を含まない平衡緩衝液2カラム容量で洗浄した後、組換えヒトプロテインCを20mMトリス (pH 7.4) で溶出した。

残留カルシウムを除去して活性化するために溶出タンパク質を調製した。組換えヒトプロテインCを金属アフィニティカラム (Chelex-100, Bio-Rad) に通してカルシウムを除去し、再度陰イオン交換体 (fast Flow Q, Pharmacia) に結合させた。これら両カラムを直列に配列し、20mMトリス、150mM NaCl、5mM EDTA (pH 6.5) で平衡化した。タンパク質を流した後、Chelex-100カラムを同じ緩衝液1カラム容量で洗浄し、次いで、それをつながりから外した。陰イオン交換カラムを平衡緩衝液3カラム容量で洗浄し、次いで、0.4M NaCl、20mMトリス-アセテート (pH 6.5) で溶出した。組換えヒトプロテインCおよび組換え活性化プロテインC溶液のタンパク質濃度の吸光度をUV 280nmで測定した (それぞれ、 $E^{0.1\%} = 1.85$  または  $1.95$ ) 。

30

#### 製造例 2

##### 組換えヒトプロテインCの活性化

ウシトロニンピンを、4 で、50mM HEPES (pH 7.5) の存在下で、活性化CH-Sepharose 4B (Pharmacia) とカップリングさせた。カップリング反応はトロニンピン約5000単位/mL樹脂を用いてカラムにすでに充填した樹脂上で行った。トロニンピン溶液をカラムに約3時間循環させ、次いでMEAを0.6mL/L循環溶液の濃度に加えた。MEA含有溶液をさらに10~12時間循環させて、樹脂上の非反応アミンが確実に完全にブロックされるようにした。ブロッキング後、トロニンピンがカップリングした樹脂を10カラム容量の1M NaCl、20mMトリス (pH 6.5) で洗浄して非特異的に結合したタンパク質をすべて除去し、活性化緩衝液で平衡化し、次いで活性化反応に用いた。

40

精製rHPCをEDTAの5mM溶液とし (あらゆる残留カルシウムをキレート化するために)、20mMトリス (pH 7.4) または20mMトリス-アセテート (pH 6.5

50

)で2 mg/mLの濃度に希釈した。本物質を37℃で50 mM NaCl、および20 mM トリス (pH 7.4) または20 mM トリス - アセテート (pH 6.5) を用いて平衡化したトロンピンカラムに通した。流速を、rHPCとトロンピン樹脂の接触時間が約20分間となるように調整した。排出液を回収し、速やかにそのアミド分解活性をアッセイした。該物質がaPCの確立された標準品と比べて比活性(アミド分解)がないときは、rHPCが完全に活性化されるようにトロンピンカラムを再生した。次いで、該物質を上記20 mM 緩衝液 (pHが7.4~6.0のどこかの) で1:1に希釈し(自己分解を防ぐにはより低いpHが好ましい)、次の加工工程を待つ間、aPCを低濃度に維持した。

浸出したトロンピンのaPC物質からの除去は、aPCを、150 mM NaClを含む活性化緩衝液(20 mM トリス (pH 7.4)、または好ましくは、20 mM トリス - アセテート (pH 6.5))で平衡化した陰イオン交換樹脂(Fast Flow Q, Pharmacia)と結合させることにより達成される。トロンピンをカラムに通し、20 mM 平衡緩衝液の2~6カラム容量で洗浄中に溶出する。結合aPCを5 mM トリス - アセテート (pH 6.5) または20 mM トリス (pH 7.4) 中の0.4 M NaClを用いる階段勾配により溶出した。より大容量でカラムを洗浄することにより、ドデカペプチドのより完全な除去が促された。このカラムから溶出した物質を凍結溶液中(-20℃)または凍結乾燥粉末として保存した。

aPCのアミド分解活性(AU)は、Beckman DU-7400ジヨードアレイ分光光度計を用い、Kabi Vitrumから購入した合成基質H-D-Phe-Pip-Arg-p-ニトロアニリド(S-2238)からのp-ニトロアニリンの放出により測定した。活性化プロテインC 1単位を、405 nmにおけるp-ニトロアニリンに対する吸光係数 $9620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用い、25℃、pH 7.4で1分間にp-ニトロアニリン $1 \mu\text{mol}$ を放出させるのに必要な酵素の量と定義した。

活性化プロテインCの抗凝固活性は活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)凝固アッセイにおける凝固時間の延長を測定することにより決定された。標準曲線は、希釈緩衝液(1 mg/mL ラジオイムノアッセイグレードBSA、20 mM トリス (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.02%  $\text{NaN}_3$ )中で、プロテインCの濃度範囲125-1000 ng/mLで作製し、試料はこの濃度範囲内の数希釈に調製した。各試料キュベットに、冷ウマ血漿50  $\mu\text{L}$ 、および再構成した活性化部分トロンボプラスチン時間試薬(APTT試薬、Sigma)50  $\mu\text{L}$ を加え、37℃で5分間インキュベーションした。インキュベーション後、各キュベットに適切な試料または標準品50  $\mu\text{L}$ を加えた。試料または標準品の代わりに希釈緩衝液を用いて基礎凝固時間を決定した。各試料または標準品に37℃の30 mM  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{L}$ を加えた時にフィブrometer (CoA Screener Hemostasis Analyzer, American Labor)のタイマーをスタートさせた。試料中の活性化プロテインC濃度は標準曲線の直線回帰方程式から計算した。本明細書で報告した凝固時間は、標準曲線試料を含め、最低3回反復した平均である。

上記説明により当業者は血栓性発作の治療に利用するaPCを製造することができる。

#### 実施例 1

##### aPCのヒト血漿レベル

ヒト患者6人に対し、aPCを $1 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{hr}$ または約 $0.025 \text{ mg} / \text{kg} / \text{hr}$ で、24時間にわたりi.v.注入した。投与したaPCは、水2 mLで再構成し、pH 6.5に調整したaPC 10 mg、5 mM トリス酢酸緩衝液、および100 mM 塩化ナトリウムを含む凍結乾燥製剤であった。

aPCの血漿濃度はイムノキャプチャーアミド分解アッセイを用いて測定した。クエン酸抗凝固剤、およびaPCの可逆的インヒビターであるベンズアミジンの存在下で血液を回収した。マイクロタイタープレートに固定したaPC特異的ネズミモノクローナル抗体、C3により血漿から酵素を捕捉した。洗浄によりインヒビターを除去し、オリゴペプチド色素産生基質を用いてアミド分解活性またはaPCを測定した。37℃で16~20 hインキュベーションした後、405 nmで吸光度を測定し、重点直線曲線適合アルゴリズム

10

20

30

40

50

によりデータを分析した。a P C 濃度は 0 - 1 0 0 n g / m L の濃度範囲の標準曲線から推定した。アッセイの定量限界は 1 . 0 n g / m L であった。a P C 用量レベルおよび血漿濃度を約 2 4 時間で測定した。血漿範囲は 2 n g / m L ~ 1 0 0 n g / m L 以下である。好ましい血漿範囲は約 2 0 n g / m L ~ 8 0 n g / m L である。最も好ましい血漿範囲は約 3 0 n g / m L ~ 約 6 0 n g / m L であり、約 5 0 n g / m L がさらにより好ましい。このように、0 . 0 2 4 m g / k g / h r の用量が、2 4 時間で、高用量レベルに付随する出血の問題を伴わずに血栓性発作を治療するのに最も好ましい血漿濃度 5 0 n g / m L を生じる。

## 実施例 2

### イヌの閉塞性冠動脈血栓症モデルにおける再還流の誘導

イヌ 1 2 頭 ( 1 7 - 2 2 k g 、雄雌いずれか、Butler Farms ) をペントバルビタールナトリウム ( 3 0 m g / k g 、 i . v . ) で麻酔し、部屋の空気で換気した。血圧測定、薬剤投与、および血液サンプリングのため、それぞれ頸動脈、大腿静脈、および頸静脈にカニューレを取り付けた。左開胸術を行い、心臓を心膜クレードル中に浮遊させ、左回旋冠動脈 ( L C C A ) の 2 c m 断片を、第一主斜 ( main diagonal ) 分岐の近位で単離した。冠動脈血流量を測定し、血管損傷を生じ、致命的な狭窄をもたらすため、L C C A にそれぞれ、電磁石流量プローブ、刺激電極、および外部オクルダー ( occluder ) を取り付けた。血管損傷は、血管の内膜側に刺激電極 ( 陰極 ) を接触させて取り付け、陰極を 1 0 0 μ A d . c . の電流で刺激することにより生じさせた ( 回路は皮下部位に陽極を置くことにより完成した ) 。損傷電流を 6 0 分間続け、次いで血管が閉塞するしないに関わらず電流を止めた。血管は血管損傷開始から約 6 0 分間で完全閉塞に達した。完全血管閉塞の 3 0 分後 ( 3 0 分間の冠動脈血流量がゼロ ( 0 ) となった ) 、a P C 2 . 0 m g / k g / h r またはトリス緩衝液 ( p H 7 . 4 、ピークル群 ) 2 0 m L の連続的静脈内注入を 2 時間行った。標本の追跡を、L C C A 損傷の開始時点から始めて 4 時間行った。動脈血圧、心拍数、および冠動脈血流量を求め、分析した。実験を通して種々の時点で血液試料を得、全血凝固時間 ( Hemochron 801 ) を測定し、歯肉テンプレート出血時間を Simplate II 出血時間装置を用いて測定した。血漿プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 ( P A I - 1 ) を測定するため、実験を通して二組目の血液試料 ( クエン酸化 ) を回収した。血漿 P A I - 1 レベルは、IMUBIND ( 登録商標 ) 血漿 P A I - 1 E L I S A キット ( American Diagnostica ) を用いて測定した。すべてのデータ ( 平均 ± S E M で示す ) について、一重 A N O V A を用いて統計的に差があるかを分析し、次いで、p < 0 . 0 5 のレベルの有意性について Student-Neuman-Keuls 分析を行った。再還流および開通性の発生率について、Fisher ' s Exact 検定を用い p < 0 . 0 5 のレベルで分析した。

a P C 2 . 0 m g / k g / h r の連続注入により 2 時間の薬剤注入終了までに A P T T 全血凝固時間に 6 倍の増加がみられた ( 表 1 ) 。試験終了までに A P T T は正常値に戻り始めた。トロンビン凝固時間やテンプレート出血時間には認め得る影響はなかった。結果を表 1 に示す。

10

20

30

表 1

麻酔したイヌにおける凝固およびテンプレート出血時間に対する a P C の影響

処置	パラメータ	投与前	注入 60 分後	注入 120 分後	終了時
ピークル a (n=6)	トロンビン 時間 (秒)	36 ± 1	38 ± 4	33 ± 1	34 ± 1
	A P T T (秒)	100 ± 6	95 ± 5	89 ± 10	91 ± 10
	テンプレー ト出血時間 (秒)	132 ± 15	182 ± 14	152 ± 15	159 ± 13
a P C * (n=6)	トロンビン 時間 (秒)	33 ± 1	34 ± 1	34 ± 1	34 ± 1
	A P T T (秒)	96 ± 6	573 ± 237	670 ± 209	138 ± 13
	テンプレー ト出血時間 (秒)	199 ± 41	272 ± 84	204 ± 20	193 ± 39

10

20

30

ピークル群に用いる投与計画はトリス緩衝生理食塩水 20 mL の 2 時間注入であり、a P C ( 2 . 0 m g / k g / h r x 2 h ) 投与は完全血管閉塞後 30 分に開始した。

\* ピークル群に対するレベル  $p < 0 . 0 5$  の統計的差を示す。各値は平均 ± S E M を示す。

表 2 は完全閉塞冠動脈の再還流に対する a P C の静脈内投与の影響を示す。冠動脈の完全血栓性閉塞までの時間は、ピークル処理および a P C 処理の 2 群間で、それぞれ  $66 \pm 7$  および  $62 \pm 6$  分と同様であった。ピークル投与群の血管 6 本では再還流がみられなかったの対し、a P C 処理群の血管 6 本のうち 5 本で再還流がみられ、a P C 処置群における再還流までの時間は  $128 \pm 17$  分であった。a P C 処置群における冠動脈血流量は、対応するピークル処置群より有意に大きく、a P C 処置群では再還流期間中に  $13 . 7 \pm 2 . 7$  mL / 分、および血流容積は  $1069 \pm 623$  mL (これはこの群の血栓症前の冠動脈流量の約 60 ~ 70 % の回復を示す)。a P C に曝露した血管 5 本のうち 3 本は 4 時間実験の終了時に依然として開放していた。このように、データは、a P C がイヌモデルにおける閉塞性冠動脈血栓症の治療に有効であることを示す。

40



表2

イヌ冠動脈血栓症モデルにおける冠動脈血流量の回復に対する a P C の影響

パラメータ	ビークル (n=6)	a P C (n=6)
閉塞までの時間 (分)	66 ± 7	62 ± 6
血栓塊 (mg)	10.8 ± 2.1	8.2 ± 1.2
再還流の出現率	0	5/6*
再還流までの時間 (分)	0	128 ± 17*
血管開放@ 試験終了時	0/6	3/5
再還流時 C B F (mL/分)	0	13.7 ± 2.7*
再還流容量 (mL)	0	1069 ± 623

\* ビークル群に対するレベル  $p < 0.05$  の統計的差を示す。各値は平均 ± S E M を示す。

各試験を通して得られた血液試料から、a P C の静脈内注入とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 ( P A I - 1 ) の循環レベルに有意な相関があることがわかった。a P C の静脈内注入の終了までに、血漿 P A I - 1 レベルは 80% 低下した。a P C の注入を中止すると血漿 P A I - 1 レベルは注入前のレベルに戻り始めた。

このイヌモデルにおけるこれら用量レベルはヒトについてクレームした用量レベルより高いようであるが、出願人は、イヌのヒト活性化プロテイン C に対する感受性が特に低いことをみだしてあり、したがって、クレームした用量レベルはヒトでは適切である。

10

20

30

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/064,765

(32)優先日 平成9年11月7日(1997.11.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 グリネル, ブライアン・ダブリュー

アメリカ合衆国46220 インディアナ州インディアナポリス、イースト・セブンティファースト  
・ストリート3625番

(72)発明者 ハウイー, ダニエル・シー

アメリカ合衆国46234 インディアナ州インディアナポリス、レイクリッジ・ドライブ4524  
番

(72)発明者 ジャクソン, チャールズ・ブイ

アメリカ合衆国46256 インディアナ州インディアナポリス、リーワード・ブルバード99  
21番

審査官 小柳 正之

(56)参考文献 特開平02-073022(JP,A)

特開平01-238536(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00 ~ 48