

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-203747

(P2004-203747A)

(43) 公開日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 37/02 Z N A

2 G O 4 5

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/36

4 C O 7 6

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/48

4 C O 8 4

A 6 1 P 1/02

A 6 1 P 1/02

4 H O 4 5

A 6 1 P 3/14

A 6 1 P 3/14

審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-371193 (P2002-371193)

(22) 出願日 平成14年12月24日 (2002.12.24)

(71) 出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(74) 代理人 100081400

弁理士 大野 彰夫

(74) 代理人 100092716

弁理士 中田 ▲やす▼雄

(74) 代理人 100115750

弁理士 矢口 敏昭

(74) 代理人 100119622

弁理士 金原 玲子

(72) 発明者 山本 真一

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 破骨細胞形成抑制因子を含有する治療剤

(57) 【要約】

【課題】 血中滞留性の優れた破骨細胞抑制因子含有治療剤を提供すること。

【解決手段】 破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor: OCIF)、その類縁体及びその変異体からなる群から選択される1又は2以上の物質 (OCIF物質)、及び、多糖及びその誘導体からなる群から選択される1又は2以上の物質 (多糖物質) からなる複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症の予防又は治療剤。

【選択図】 なし。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor: OCIF)、その類縁体及びその変異体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (OCIF 物質)、及び、多糖及びその誘導体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (多糖物質) からなる複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症の予防又は治療剤。

【請求項 2】

OCIF 物質がヒト成熟体 OCIF 単量体及び / 又は 2 量体である、請求項 1 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 3】

ヒト成熟体 OCIF が配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号第 + 1 番乃至第 380 番までを含むことからなる、請求項 2 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 4】

OCIF 物質及び多糖物質が分子比 1 : 1 乃至 1 : 10 で結合しており、且つ、多糖物質がデキストラン硫酸又はその塩でありことを特徴とする、請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載の予防又は治療剤。

【請求項 5】

デキストラン硫酸の平均分子量が 1200 乃至 20000 であることを特徴とする、請求項 4 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 6】

デキストラン硫酸の平均分子量 1800 乃至 6000 であることを特徴とする、請求項 5 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 7】

OCIF 物質及び多糖物質が分子比 1 : 1 乃至 1 : 8 で結合しており、且つ、多糖物質がデキストラン硫酸又はその塩でありことを特徴とする、請求項 4 乃至 6 のいずれか一つに記載の予防又は治療剤。

【請求項 8】

OCIF 物質及び多糖物質が分子比 1 : 1 乃至 1 : 5 で結合しており、且つ、多糖物質がデキストラン硫酸又はその塩でありことを特徴とする、請求項 7 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 9】

多糖物質と複合体を形成していない遊離の OCIF 物質と比較して、ヘパリン吸着力が低いことを特徴とする、請求項 1 乃至 8 のいずれか一つに記載の予防又は治療剤。

【請求項 10】

ヘパリン吸着力が下記工程 [a] 乃至 [f] により測定されることを特徴とする、請求項 9 に記載の予防又は治療剤：

[a] 0.1 乃至 0.8 M の塩化ナトリウムを含有する低イオン強度の緩衝液で、ヘパリンが固定化された担体が充填されたカラムを平衡化する工程；

[b] [a] 記載の緩衝液に被検試料を溶解せしめたものを前記カラムへ添加し、次いで溶出画分 A を回収する工程；

[c] [a] 記載の緩衝液で前記カラムを洗浄し、溶出画分 B を回収する工程； [d] 1 乃至 2 M の塩化ナトリウムを含有する高イオン強度の緩衝液で前記カラムを洗浄し、溶出画分 C を回収する工程；

[e] 溶出画分 A 乃至 C 中に存在する OCIF 物質及び多糖物質からなる複合体の量 (それぞれ (a)、(b)、(c) という) を、該 OCIF 物質に特異的に結合する抗体を用いた酵素免疫アッセイ (enzyme immunoassay) により測定する工程；

[f] 下記式により、ヘパリン吸着力を算出する工程。

10

20

30

40

(c)

$$\text{ヘパリン吸着力} = \frac{\text{ヘパリン吸着力}}{(a) + (b) + (c)}$$

【請求項 1 1】

ヘパリン吸着力が 0.7 以下であることを特徴とする、請求項 1 0 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 1 2】

ヘパリン吸着力が 0.6 以下であることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の予防又は治療剤。 10

【請求項 1 3】

下記 [x] を下記 [y] で除算することにより得られる免疫学的検出率が 0.5 乃至 1.2 であることを特徴とする、請求項 1 乃至 1 2 のいずれか一つに記載の予防又は治療剤：
[x] O C I F 物質に特異的に結合する抗体を使用する酵素免疫アッセイ (enzyme immunoassay) により、O C I F 物質を標準物質として測定される、被検資料中に含まれる O C I F 物質の分子数；

[y] (i) ウシ血清アルブミンを標準物質としてロウリー (Lowry) 法により測定されるタンパク質量及び (ii) O C I F 物質の分子量に基づいて算出される、被検試料中に含まれる O C I F 物質の分子数。 20

【請求項 1 4】

酵素免疫アッセイが、ハイブリドーマ O I - 1 9 (F E R M B P - 6 4 2 0) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 1 9 又はハイブリドーマ O I - 2 6 (F E R M B P - 6 4 2 1) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 2 6 が固相化された抗体として、ハイブリドーマ O I - 4 (F E R M B P - 6 4 1 9) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 4 がパーオキシダーゼにより酵素標識された移動相中の抗体としてそれぞれ使用される E L I S A (enzyme-linked immunosorbent assay) である、請求項 1 3 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 1 5】

免疫学的検出率が 0.6 乃至 1.1 であることを特徴とする、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の予防又は治療剤。 30

【請求項 1 6】

免疫学的検出率が 0.7 乃至 1.1 であることを特徴とする、請求項 1 5 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 1 7】

下記工程 [i] 乃至 [i i i] を含むことからなる、破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor: O C I F)、その類縁体及びその変異体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (O C I F 物質)、及び、多糖又はその誘導体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (多糖物質) からなる複合体を調製する方法により得られる該複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症の予防又は治療剤； 40

[i] O C I F 物質を多糖物質と接触させる工程；

[i i] p H 9.5 乃至 12 の条件下において保温する工程；

[i i i] 遊離の多糖物質を除去する工程。

【請求項 1 8】

工程 [i i] にて、p H 10 乃至 11 の条件下において保温することを特徴とする、請求項 1 7 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 1 9】

工程 [i i i] にて、ゲル濾過により遊離の多糖物質を除去することを特徴とする、請求項 1 7 又は 1 8 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 2 0】

骨代謝異常症が、一次性骨粗鬆症、内分泌骨粗鬆症、パジェット病、固形腫瘍に起因する高カルシウム血症、多発性骨髄腫、特発性高カルシウム血症、ステロイド投与に起因する骨減少症、腎臓機能不全に伴う骨減少症、外科手術、消化器疾患に伴う骨減少症、慢性関節リウマチ、慢性関節リウマチによる骨減少症、慢性関節リウマチによる骨及び関節破壊、ムチランス型リウマチ、変形性関節症、歯周骨喪失、癌の骨転移、腎性骨異常栄養症及び骨減少症からなる群から選択される一つである、請求項 1 乃至 19 のいずれか一つに記載の予防又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor: 以下、「OCIF」という。: WO 96 / 26217 号公報参照)、その類縁体及びその変異体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (以下、「OCIF 物質」という。)、及び、多糖及びその誘導体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (以下、「多糖物質」という。)) からなる複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症の予防又は治療剤、OCIF 物質及び多糖物質が 1 : 1 乃至 1 : 10 の分子比で結合しており且つ多糖物質がデキストラン硫酸又はその塩である前記複合体 (以下、「OCIF 物質及びデキストラン硫酸からなる複合体」という。)) を有効成分として含有する骨代謝異常症の予防又は治療剤、OCIF 物質及び多糖物質を接触させ、次いで pH 9.5 乃至 12 の条件下で保温し、次いで遊離の多糖物質を除去することからなる、OCIF 物質及び多糖物質からなる複合体の製造方法により得られる OCIF 物質及び多糖物質からなる複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症の予防又は治療剤等に関する。

【0002】

【従来の技術】

骨は生体内カルシウムの約 99% を保持し、骨形成と骨吸収による血中カルシウム濃度の恒常性の維持に重要な役目を果たしている。骨吸収の過程で主な働きを担う破骨細胞が異常に形成又は活性化されると骨吸収が促進して血中カルシウム濃度が上昇し高カルシウム血症となる。癌が骨に転移するとサイトカイン類の分泌が異常となり高カルシウム血症を呈することが知られているが、この過程においても破骨細胞による骨吸収促進が血中カルシウム濃度の上昇をもたらしている。(非特許文献 1) 癌性高カルシウム血症を伴う癌患者の予後は概して不良である。

【0003】

また、慢性関節リウマチ等のリウマチや変形性関節症においては、破骨細胞の異常な形成又は活性化が骨や関節に見られる諸症状の主要な原因のひとつとして知られている。(非特許文献 2) 慢性関節リウマチ等のリウマチや変形性関節症は激しい痛みを伴うため患者の生活に著しい不利益をもたらす。

【0004】

さらに、閉経後の女性ホルモン分泌低下や加齢により骨吸収と骨形成の平衡が骨吸収側へ継続的に傾斜した場合、骨密度が低下し骨粗鬆症を発症するが、この際にも骨吸収を担うのは破骨細胞である。骨粗鬆症の危険性が高い高齢患者が骨折した場合は寝たきりとなる可能性が高く、社会的な課題となっている。(非特許文献 3)

従来、これらの病態に対してはエストロゲン等のホルモン補充療法や破骨細胞の活動を抑制するビスフォスフォネート類及びカルシトニン類などの治療剤が使用されてきた。(非特許文献 4) しかし、ホルモン類は発癌危険性を高める上、子宮内膜症の誘発や性器からの異常出血等の副作用の懸念がある。(非特許文献 5) ビスフォスフォネート類はカルシウムと結合し易いので骨に蓄積されることが知られているが、骨の強度をどの程度改善しているのかに疑問を持つ研究者もあり、腎障害の危険性も報告されている。(非特許文献 6) カルシトニン類は骨密度の上昇が一過性であり、休薬によるリバウンドやヒト以外の動物に由来する汎用カルシトニンのヒト体内における免疫原性又は抗原性の発現及び抗体出現による薬効の低下が指摘されてきた。(非特許文献 7) 血中カルシウム濃度上昇の要

10

20

30

40

50

因である骨吸収は破骨細胞が担っているが、これらの既存の薬剤はいずれも破骨細胞の形成を抑制する作用は持たず、高カルシウム血症および骨代謝異常症の根本的な治療を行なうのに十分な薬剤とは言い難い。

【0005】

OCIFは破骨細胞前駆細胞が破骨細胞への分化及び成熟破骨細胞による骨吸収活性を阻害する内因性蛋白質として知られている(特許文献1)。OCIFはオステオプロテゲリン(osteoprotegerin:以下、「OPG」という。:特許文献2)の別名でも知られている。OCIFにより骨吸収の主役である破骨細胞自体の形成及び成熟破骨細胞による骨吸収活性を抑制することができれば、骨吸収に起因する上記疾病を根本的に治療することが可能となるものと期待された。しかし、OCIFは等電点が9付近にある塩基性蛋白質であり、循環血液中からは速やかに消失する。

10

【0006】

特許文献3には、OCIFと多糖類又はその誘導体を混合することにより、OCIFの血中滞留性を改善し、その薬効を高める手法が開示されている。

【0007】

【特許文献1】

国際公開96/26217号パンフレット

【特許文献2】

国際公開97/23614号パンフレット

【特許文献3】

国際公開00/24416号パンフレット

20

【非特許文献1】

ボディ(Jean-Jacques Body)「キャンサー サプリメント(CANCER Supplement)、2000年、88巻、p.3054-3058

【非特許文献2】

ラモスら(E. Romas, et al.)「ボーン(Bone)」、2002年、30巻、p.340-346

【非特許文献3】

フォートレル(Bruno Fautrel)とガルマン(Francis Guillemin)「カレント オピニオン イン リューマトロジー」、2002年、14巻、p.121-126

30

【非特許文献4】

イクバル(Mohammad M. Iqbal)とソブハン(Tanveer Sobhan)「ミズーリ メディシン」、2002年、99巻、p.19-23

【非特許文献5】

ホワイト(Joyce Penrose White)とシリング(Judith S. Schilling)「クリニカル エクセレンス フォー ナース プラクティショナー(Clinical Excellence for Nurse Practitioners)、2000年、4巻、p.277-285

【非特許文献6】

グリーン(Jonathan R. Green, et al.)「ファーマコロジー アンド トキシコロジー(Pharmacology and Toxicology)」、1997年、80巻、p.225-230

40

【非特許文献7】

ポーセルら(S. L. Porcel, et al.)「アレルゴロギア エト イムノパソロギア(Allergologia et Immunopathologia)」、2000年、28巻、p.243-245

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

発明者らは、骨代謝異常症の予防又は治療剤として有用な物質であるOCIFの血中滞留性を更に改善するべく鋭意研究を行った結果、OCIF及び多糖の誘導体であるデキストラン硫酸をアルカリ性条件下で処理することにより得られた、OCIF及び多糖の誘導体であるデキストラン硫酸の複合体の血中滞留性が、従来公知のOCIF及びデキストラン硫酸からなる組成物のそれと比較して、有意に改善されていることを見出した。

50

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、

(1)

破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor : O C I F)、その類縁体及びその変異体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (O C I F 物質)、及び、多糖及びその誘導体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (多糖物質) からなる複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症の予防又は治療剤、

(2)

O C I F 物質がヒト成熟体 O C I F 単量体及び / 又は 2 量体である、(1) に記載の予防又は治療剤、 10

(3)

ヒト成熟体 O C I F が配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号第 + 1 番乃至第 3 8 0 番までを含むことからなる、(2) に記載の予防又は治療剤、

(4)

O C I F 物質及び多糖物質が分子比 1 : 1 乃至 1 : 1 0 で結合しており、且つ、多糖物質がデキストラン硫酸又はその塩でありことを特徴とする、(1) 乃至 (3) のいずれか一つに記載の予防又は治療剤、

(5)

デキストラン硫酸の平均分子量が 1 2 0 0 乃至 2 0 0 0 0 であることを特徴とする、(4 20) に記載の予防又は治療剤、

(6)

デキストラン硫酸の平均分子量 1 8 0 0 乃至 6 0 0 0 であることを特徴とする、(5) に記載の予防又は治療剤、

(7)

O C I F 物質及び多糖物質が分子比 1 : 1 乃至 1 : 8 で結合しており、且つ、多糖物質がデキストラン硫酸又はその塩でありことを特徴とする、(4) 乃至 (6) のいずれか一つに記載の予防又は治療剤、

(8)

O C I F 物質及び多糖物質が分子比 1 : 1 乃至 1 : 5 で結合しており、且つ、多糖物質が 30 デキストラン硫酸又はその塩でありことを特徴とする、(7) に記載の予防又は治療剤、

(9)

多糖物質と複合体を形成していない遊離の O C I F 物質と比較して、ヘパリン吸着力が低いことを特徴とする、(1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載の予防又は治療剤、

(1 0)

ヘパリン吸着力が下記工程 [a] 乃至 [f] により測定されることを特徴とする、(9) に記載の予防又は治療剤：

[a] 0 . 1 乃至 0 . 8 M の塩化ナトリウムを含有する低イオン強度の緩衝液で、ヘパリンが固定化された担体が充填されたカラムを平衡化する工程；

[b] [a] 記載の緩衝液に被検試料を溶解せしめたものを前記カラムへ添加し、次いで 40 溶出画分 A を回収する工程；

[c] [a] 記載の緩衝液で前記カラムを洗浄し、溶出画分 B を回収する工程；[d] 1 乃至 2 M の塩化ナトリウムを含有する高イオン強度の緩衝液で前記カラムを洗浄し、溶出画分 C を回収する工程；

[e] 溶出画分 A 乃至 C 中に存在する O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体の量 (それぞれ (a)、(b)、(c) という) を、該 O C I F 物質に特異的に結合する抗体を用いた酵素免疫アッセイ (enzyme immunoassay) により測定する工程；

[f] 下記式により、ヘパリン吸着力を算出する工程、

(c)

$$\text{ヘパリン吸着力} = \frac{\text{-----}}{(a) + (b) + (c)}$$

(1 1)

ヘパリン吸着力が 0 . 7 以下であることを特徴とする、(1 0) に記載の予防又は治療剤、

(1 2)

ヘパリン吸着力が 0 . 6 以下であることを特徴とする、(1 1) に記載の予防又は治療剤 10

(1 3)

下記 [x] を下記 [y] で除算することにより得られる免疫学的検出率が 0 . 5 乃至 1 . 2 であることを特徴とする、(1) 乃至 (1 2) のいずれか一つに記載の予防又は治療剤：

[x] O C I F 物質に特異的に結合する抗体を使用する酵素免疫アッセイ (enzyme immunoassay) により、O C I F 物質を標準物質として測定される、被検資料中に含まれる O C I F 物質の分子数；

[y] (i) ウシ血清アルブミンを標準物質としてロウリー (Lowry) 法により測定されるタンパク質量及び (i i) O C I F 物質の分子量に基づいて算出される、被検試料中に含まれる O C I F 物質の分子数、 20

(1 4)

酵素免疫アッセイが、ハイブリドーマ O I - 1 9 (F E R M B P - 6 4 2 0) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 1 9 又はハイブリドーマ O I - 2 6 (F E R M B P - 6 4 2 1) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 2 6 が固相化された抗体として、ハイブリドーマ O I - 4 (F E R M B P - 6 4 1 9) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 4 がパーオキシダーゼにより酵素標識された移動相中の抗体としてそれぞれ使用される E L I S A (enzyme-linked immunosorbent assay) である、(1 3) に記載の予防又は治療剤、

(1 5)

免疫学的検出率が 0 . 6 乃至 1 . 1 であることを特徴とする、(1 3) 又は (1 4) に記載の予防又は治療剤、 30

(1 6)

免疫学的検出率が 0 . 7 乃至 1 . 1 であることを特徴とする、(1 5) に記載の予防又は治療剤、

(1 7)

下記工程 [i] 乃至 [i i i] を含むことからなる、破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor : O C I F)、その類縁体及びその変異体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (O C I F 物質)、及び、多糖又はその誘導体からなる群から選択される 1 又は 2 以上の物質 (多糖物質) からなる複合体を調製する方法により得られる該複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症の予防又は治療剤： 40

[i] O C I F 物質を多糖物質と接触させる工程；

[i i] p H 9 . 5 乃至 1 2 の条件下において保温する工程；

[i i i] 遊離の多糖物質を除去する工程、

(1 8)

工程 [i i] にて、p H 1 0 乃至 1 1 の条件下において保温することを特徴とする、(1 7) に記載の予防又は治療剤、

(1 9)

工程 [i i i] にて、ゲル濾過により遊離の多糖物質を除去することを特徴とする、(1 7) 又は (1 8) に記載の予防又は治療剤、及び、 50

(2 0)

骨代謝異常症が、一次性骨粗鬆症、内分泌骨粗鬆症、パジェット病、固形腫瘍に起因する高カルシウム血症、多発性骨髄腫、特発性高カルシウム血症、ステロイド投与に起因する骨減少症、腎臓機能不全に伴う骨減少症、外科手術、消化器疾患に伴う骨減少症、慢性関節リウマチ、慢性関節リウマチによる骨減少症、慢性関節リウマチによる骨及び関節破壊、ムチランス型リウマチ、変形性関節症、歯周骨喪失、癌の骨転移、腎性骨異常栄養症及び骨減少症からなる群から選択される一つである、(1)乃至(1 9)のいずれか一つに記載の予防又は治療剤、に関する。

【 0 0 1 0 】

10

【発明の実施の形態】

本発明の O C I F、その類縁体又はその変異体は、W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号公報若しくは W O 9 7 / 2 3 6 1 4 号公報に記載された方法により、動物の組織、動物の体液若しくは動物細胞の培養液等からタンパク質として抽出精製された天然型として、又は O C I F、その類縁体若しくはその変異体をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターで形質転換された動物細胞や大腸菌等の宿主細胞が生産する遺伝子組換え型として、取得することができる。

【 0 0 1 1 】

本発明の O C I F、その類縁体及びその変異体の起源は特に限定されないが、好適にはヒト、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等の哺乳動物又はニワトリ、ガチョウ、シチメンチョウ等の鳥類由来であり、より好適にはヒトである。

20

【 0 0 1 2 】

また、本発明の O C I F 及びその類縁体は、一本鎖のポリペプチドとして生産されるが、非還元条件下における S D S - P A G E による分子量は約 6 0 0 0 0 又は約 1 2 0 0 0 0 であり (W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号公報参照)、好適には、非還元条件下における S D S - P A G E による分子量約 1 2 0 0 0 0 の 2 量体である。

【 0 0 1 3 】

さらに、本発明における O C I F、その類縁体又はその変異体は、シグナルペプチドを含む前駆体型ポリペプチド及びその成熟体の両方を包含する。シグナルペプチドを含む前駆体 O C I F のうち好適なものは、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列の全長すなわちアミノ酸番号第 - 2 1 番乃至第 3 8 0 番からなるヒト前駆体 O C I F である。シグナルペプチドを含まない成熟体 O C I F のうち好適なものは、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列のアミノ酸番号第 1 番乃至第 3 8 0 番からなるヒト成熟体 O C I F である。これらのうち、ヒト成熟体 O C I F がより好適である。

30

【 0 0 1 4 】

また、成熟型 O C I F、その類縁体又はその変異体を宿主細胞 (特に、大腸菌のような原核細胞) 内において組換タンパク質として発現させる場合、そのような成熟体のアミノ末端にメチオニンを付加することができる (W O 9 7 / 2 3 6 1 4)。メチオニンが付加された成熟型 O C I F、その類縁体又はその変異体は、成熟型 O C I F、その類縁体又はその変異体をコードするポリヌクレオチドの 5 ' - 末端に A T G (A U G) 配列からなるトリプレット・ヌクレオチドを付加せしめたヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入し、得られた組換発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換すれば、該形質転換宿主細胞の培養物より常法に従って精製単離することができる。加えて、アミノ末端にメチオニンを有する成熟体 O C I F、その類縁体又はその変異体には、該メチオニンに隣接する位置であり且つ該メチオニンよりカルボキシ末端側に 1 つ又は 2 つ以上のアミノ酸が挿入されてもよい。

40

【 0 0 1 5 】

本発明において、O C I F 類縁体とは、ヒト O C I F c D N A をプローブとする、ストリンジェントな条件 (6 0 乃至 7 0 、 6 × S S C) 下におけるハイブリダイゼーションにより、動物細胞、体液又は組織由来の c D N A ライブラリーよりクローニングされ得る c

50

DNAにコードされたタンパク質であり、そのようなOCIF類縁体としてOCIF2、OCIF3、OCIF4、OCIF5（いずれも、WO96/26217号公報参照）、ヒト以外の動物由来のOCIF等を例示することができる。そのようなOCIF類縁体は、該OCIF類縁体をコードするcDNAを含有する発現ベクターで形質転換された宿主細胞の培養物から、当業者に周知の方法に従って抽出、精製及び／又は単離することができる（WO96/26217号公報参照）。本発明における好適なOCIF類縁体は、OCIFの有する生物活性の少なくとも一部を検出され得る程度に保持している。

【0016】

本発明において、OCIF変異体とは、ヒトOCIFと1又は2以上のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入され且つOCIF活性の少なくとも一部を検出され得る程度に保持しているタンパク質を意味する。そのようなOCIF変異体は、OCIF又はその類縁体をコードするヌクレオチドに、PCR法、遺伝子組換え法、又は、制限酵素等のエキソ型ヌクレアーゼ若しくはエンド型ヌクレアーゼを用いた切断法により、1又は2以上のヌクレオチドの置換、欠失、付加及び／又は挿入を行い、次いで得られたヌクレオチド変異体を挿入した発現ベクターで動物細胞又は大腸菌等の宿主細胞を形質転換し、次いで該宿主細胞の発現するタンパク質画分から常法に従って精製することにより、得ることができる。

【0017】

また、ヒトOCIFのアミノ酸配列のカルボキシ末端から相当部分を欠失させた、短鎖型OCIFにもOCIF本来の生物活性を保持している分子が知られている（WO96/26217号公報及びWO97/23614号公報参照）。本発明のOCIF変異体には、OCIF活性の少なくとも一部を有する短鎖型OCIFも包含される。

【0018】

さらに、OCIFは免疫グロブリンのFcドメイン等との融合タンパク質としても活性を保持している例が知られており（WO97/23614号公報参照）、本発明のOCIF変異体にはそのようなOCIFの融合タンパク質も包含される（WO97/23614号公報、WO2001/17543号公報及びWO2001/18203号公報参照）。

【0019】

また、OCIFは水溶性ポリマー（ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコール共ポリマー、カルビキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール）等の化学修飾を受けることによりその生物活性が改善されることが知られており、本発明のOCIF変異体はそのような化学修飾OCIFをも包含する。OCIF、その類縁体又はその変異体上の1個所又は2箇所以上において化学修飾を受けてもよい。化学修飾OCIF又はその変異体としては、ポリエチレングリコールが結合したOCIF又はその変異体（誘導体）を例示することができる（WO97/23614号公報参照）。

【0020】

このような本発明のOCIF変異体としては、OCIF-C19S、OCIF-C20S、OCIF-C21S、OCIF-C22S、OCIF-C23S、OCIF-DCR1、OCIF-DCR2、OCIF-DCR3、OCIF-DCR4、OCIF-DDD1、OCIF-DDD2、OCIF-CL、OCIF-CC、OCIF-CDD2、OCIF-CDD1、OCIF-CCR4、OCIF-CCR3、OCIF-CBst、OCIF-CSph、OCIF-CBsp、OCIF-CPst（以上、WO96/26217号公報参照）、muOPG[22-401]-Fc、muOPG[22-194]-Fc、muOPG[22-185]-Fc、muOPG[22-180]-Fc、muOPG[22-401]、muOPG[22-401]C195、muOPG[22-401]C202、muOPG[22-401]C277、muOPG[22-401]C319、muOPG[22-401]C400、muOPG[22-185]、muOPG[22-194]、muOPG[22-200]、muOPG[22-212]、muOPG[22-293]、muOPG[22-355]、huOPG[22-401]-Fc、huOPG[22-201]-Fc、huOPG[22-401]-Fc P26A、huOPG[22-401]-FcY28F、huOPG[22-401]、huOPG[

10

20

30

40

50

27-401]-Fc、huOPG[29-401]-Fc、huOPG[32-401]-Fc、MuOPG met[22-194]、MuOPG met[22-194] 5kPEG、MuOPG met[22-194]20kPEG、HuOPG met[22-194]P25A、HuOPG met[22-194]P25A 5kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 20kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 31kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 57kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 12kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 20k分岐PEG、huOPG met[22-194]P25A 8kPEG **ダイマー**、huOPG met[22-194]P25A **ジスルフィド架橋**(以上、WO97/23614号公報参照)、OPG[22-194]-Fc、OPG[22-201]-Fc、OPG[22-194]-Fc Δ C、OPG[22-201]-Fc Δ C、OPG[22-194]-FcG₁₀、metFc Δ C-OPG[22-194](WO2001/17543号公報参照)、OPG[22-194]-Fc Δ C、OPG[22-194]-FcG₁₀、Fc Δ C-OPG[22-194]、metFc Δ C-OPG[22-194]、metFc Δ C-22-194、OPG[22-194]-Fc、OPG[22-194]-Fc Δ C metOPG[22-194]、metOPG[22-201]、OPG[22-293]、OPG[22-401]、metFc Δ C-22-194(WO2001/18203号公報参照)等を例示することができ、好適には、OCIF-C19S、OCIF-C20S、OCIF-C21S、OCIF-C22S、OCIF-C23S、OCIF-D 20 CR1、OCIF-DCR2、OCIF-DCR3、OCIF-DCR4、OCIF-DD1、OCIF-DDD2、OCIF-CL、OCIF-CC、OCIF-CDD2、OCIF-CDD1、OCIF-CCR4、OCIF-CCR3、OCIF-CBst、OCIF-CSph、OCIF-CBsp、OCIF-CPst、muOPG[22-401]-Fc、muOPG[22-194]-Fc、muOPG[22-185]-Fc、muOPG[22-180]-Fc、muOPG[22-401]C195、muOPG[22-401]C202、muOPG[22-401]C319、muOPG[22-401]C400、uOPG[22-194]、muOPG[22-200]、muOPG[22-212]、muOPG[22-293]、muOPG[22-355]、huOPG[22-401]-Fc、huOPG[22-201]-Fc、huOPG[22-401]-Fc 20 P26A、huOPG[22-401]-Fc Y28F、huOPG[22-401]、huOPG[27-401]-Fc、huOPG[29-401]-Fc、huOPG[32-401]-Fc、MuOPG met[22-194]5kPEG、MuOPG met[22-194]20kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 5kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 20kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 31kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 57kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 12kPEG、HuOPG met[22-194]P25A 20k分岐PEG、huOPG met[22-194]P25A 8kPEG **ダイマー**、huOPG met[22-194]P25A **ジスルフィド架橋**、OPG[22-194]-Fc、OPG[22-201]-Fc、OPG[22-194]-Fc Δ C、OPG[22-201]-Fc Δ C、OPG[22-194]-FcG₁₀、metFc Δ C-OPG[22-194]、OPG[22-194]-Fc Δ C、OPG[1-194]-FcG₁₀、Fc Δ C-OPG[22-194]、metFc Δ C-OPG[22-194]、metFc Δ C-22-194、OPG[22-194]-Fc、OPG[22-194]-Fc Δ C metOPG[22-194]、metOPG[22-201]、OPG[22-293]、OPG[22-401]、metFc Δ C-22-194等を例示することができる。

【0021】

本発明のOCIF、その類縁体又はその変異体は翻訳後修飾を受けていてもよく、例えば 50

糖鎖が付加していてもよい。糖鎖が付加したOCIF、その類縁体又はその変異体としては、動物細胞が生産する組換え型OCIF、その類縁体又はその変異体、動物組織等から単離された天然型のOCIF又はその類縁体を例示することができる。糖鎖が付加した組換え型OCIF、その類縁体及びその変異体の生産に適した動物細胞としては、チャイニーズ・ハムスター・オヴァリー（Chinese Hamster Ovary：以下、「CHO」という。）、COS細胞等の哺乳動物細胞を例示することができる（Yasuda, H., et al., Endocrinology, 139,1329-1337(1998)）。ちなみに、糖鎖が付加していない、遺伝子組換え型のOCIF、その類縁体及びその変異体の生産に適した細胞としては、大腸菌等の原核細胞等を例示することができる。

【0022】

本発明において、多糖とは、単糖がグリコシド結合することにより生じる重合体（グルカン）であり、好適には構成単糖が2種類以上からなるヘテロ多糖（ヘテログリカン）である。本発明において、多糖誘導体とは、多糖の有する化学構造の一部が他の分子で置換された物質を指し、好適には多糖のエステルであり、より好適には多糖の硫酸エステルである。天然型の多糖としてはデキストラン等を、天然型の多糖誘導体としてはヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、カラギーナン、ペクチン、ヘパリン等の酸性多糖をそれぞれ例示することができ、合成型の多糖誘導体としてはデキストラン硫酸（dextran sulfate：DS）等の酸性多糖を例示することができ、より一層好適な多糖誘導体はデキストラン硫酸である。

【0023】

本発明において、多糖又はその誘導体はその塩をも包含する。最も好適なデキストラン硫酸の塩は、デキストラン硫酸ナトリウムである。デキストラン硫酸ナトリウムとしては、デキストラン硫酸ナトリウムイオウ5（名糖産業（株）製）、デキストラン硫酸ナトリウム5000、デキストラン硫酸ナトリウム10000（ともに、和光純薬（株）製）等を例示することができる。本発明においては、これらデキストラン硫酸の塩もデキストラン硫酸の意味に包含される。

【0024】

デキストラン硫酸の分子量は次のようにして算出される；

1) デキストランの分子量の測定

デキストランの極限粘度（極限粘度の測定法は、第十三改正、日本薬局方 解説書、廣川書店刊（1998）、デキストラン40の項参照）より、下記の佐藤の式により算出することができる（第十三改正、日本薬局方 解説書、廣川書店刊（1998）、デキストラン40の項参照）。

$$\text{極限粘度} = 9.00 \times 10^{-4} \times \text{分子量}^{0.50}$$

2) イオウ含量の測定

日本薬局方（第十四改正、じほう刊（2001）、デキストラン硫酸イオウ5の項参照）記載の方法によりデキストラン硫酸上のイオウ含量を重量％として測定した。

【0025】

デキストランの構成単位であるグルコースの分子量は本来180であるが、デキストラン分子中ではグルコースどうしが α -1,6結合しているため、デキストラン分子中のグルコースの実質的な分子量は180から水1分子分の分子量を差し引いた値、すなわち162である。

【0026】

デキストラン硫酸においては、上述のようなデキストラン分子中のグルコースの有する水素1原子が SO_3Na （1グラム当量103）に置換されるているので、イオウの置換度（以下、単に「置換度」という。）は下記式により表される。

$$\text{イオウ含量（重量％）} = \{ 32 \times \text{置換度} \div (162 + 102 \times \text{置換度}) \} \times 100$$

3) デキストラン硫酸の分子量の算出

上述の通りデキストランの構成単位であるグルコースの実質的な分子量は162であるので、下記式によりデキストラン硫酸の分子量を算出することができる。

10

20

30

40

50

分子量 = デキストランの分子量 × (162 + 102 × 置換度) ÷ 162

デキストラン硫酸は一定の分子量分布を有していることが知られており、本発明においては、デキストラン硫酸の平均分子量をもってその分子量に代える。

【0027】

本発明において好適に使用されるデキストラン硫酸ナトリウムイオウ5（名糖産業（株）製の、上記2）に従って算出されたイオウ置換度（平均値 ± 標準偏差）は約 0.32 ± 0.01（n = 7）であり、上記1）乃至3）に従って算出された分子量（平均値 ± 標準偏差）は約 1950 ± 70（n = 7）である。同じく好適なデキストラン硫酸であるデキストラン硫酸ナトリウム5000（和光純薬（株）製）は分子量約 5000 であり、同じくデキストラン硫酸ナトリウム10000（和光純薬（株）製）は分子量約 10000 である。 10

【0028】

本発明において使用される多糖物質の平均分子量は、特に限定されるものではないが、好適な多糖物質である、デキストラン硫酸の平均分子量は通常 1500 乃至 12000 の範囲であり、より好適には 1800 乃至 6000 である。

【0029】

本発明の多糖物質は、そのまま使用してもよいが、精製、分画したものを使用してもよい。

【0030】

なお、本発明において、多糖物質は、細胞内又は生体内において翻訳後修飾として O C I F 物質に内在性に付加される各種糖鎖を包含しない。 20

【0031】

本発明の提供する O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体における O C I F 物質と多糖物質の分子比は、O C I F 物質あるいは多糖物質の種類、該複合体を調製する際の条件等に依存するものであり、特に限定されるものではない。本発明の好適な態様である O C I F 物質及びデキストラン硫酸からなる複合体における、O C I F 物質とデキストラン硫酸の分子比は、通常、本発明の O C I F 物質：多糖物質 = 1：1 乃至 1：10 であり、好適には 1：1 乃至 1：8 であり、より好適には 1：1 乃至 1：5 であり、より一層好適には 1：1.1 乃至 1：4.5 である。

【0032】

上述の通り、O C I F は 2 量体を形成することが知られており（W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号公報参照）、O C I F 物質は、ホモ又はヘテロ 2 量体や、単量体 3 つ以上からなるホモ又はヘテロ多量体であり得るが（U S 6 3 6 9 0 2 7 号公報等参照）、本発明における当該分子比は、O C I F 物質単量体（モノマー）1 分子当たりの多糖物質の分子数として計算される。 30

【0033】

本発明の複合体中の O C I F 物質に結合している多糖物質の分子数は、好適には次のようにして算出され得る。すなわち、フェノール硫酸法（本発明の他の個所に詳述）により、被検試料中の中性糖、あるいは複合体化していない O C I F 物質原体を含む対照試料中の中性糖を測定する。次いで、被検試料中の中性糖量から対照試料中の中性糖量を差し引くことにより、被検試料中の O C I F 物質に結合した多糖物質量を算出する。得られた数値を下記 [i] 又は [i i] に供する。 40

[i] 得られた数値を多糖物質の平均分子量で除算することにより、被検試料中の O C I F 物質に結合した多糖物質の（総）分子数を算出する。

[i i] 得られた数値を該複合体中のタンパク質量（mg）で除算し、得られた数値（すなわち、O C I F 物質 1 mg あたりの多糖物質の量）から、O C I F 物質の分子量及び多糖物質の平均分子量に基づいて、O C I F 物質 1 分子当たりの多糖物質の分子数を算出する。

【0034】

本発明の複合体中に存在する O C I F 物質の分子数は、複合体形成していない、遊離の O 50

ＣＩＦ物質原体を標準物質とする免疫学的なアッセイ（酵素免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡなど）により好適に決定され得る（本発明の他の個所に詳述）。

【００３５】

本発明において、「分子数」とは「分子の数」又は「モル数（mole）」を意味する。

【００３６】

本発明のＯＣＩＦ物質及び多糖物質からなる複合体は、ＯＣＩＦ物質及び多糖物質を水溶液中にて保温すること等により得ることができる。両者を水溶液中で保温する場合、ＯＣＩＦ、その類縁体及びその変異体の水溶液中の濃度範囲は、上限が０．１乃至０．５ｍＭ、下限が０．００１乃至０．０５ｍＭであり、好適には０．０１乃至０．２ｍＭ、より好適には０．０５乃至０．１ｍＭである。ＯＣＩＦの場合、水溶液の濃度範囲の上限は１０乃至５０ｍｇ／ｍｌ、下限は０．１乃至５ｍｇ／ｍｌであり、好適な範囲は１乃至２０ｍｇ／ｍｌ、より好適な範囲は５乃至１０ｍｇ／ｍｌである。

【００３７】

多糖又はその誘導体の該水溶液中の濃度範囲は、上限が０．１乃至０．５Ｍ、下限が０．００００５乃至０．０５Ｍであり、好適には０．００５乃至０．２５Ｍ、より好適には０．０５乃至０．１Ｍである。デキストラン硫酸ナトリウムイオウ５（ＤＳ５）の場合、水溶液中の濃度範囲は上限が２００ｍｇ／ｍｌ乃至１０００ｍｇ／ｍｌ、下限が０．１乃至１００ｍｇ／ｍｌであり、好適な範囲は１０乃至５００ｍｇ／ｍｌ、より好適な範囲は１００乃至２００ｍｇ／ｍｌである。

【００３８】

該水溶液のｐＨは、上限がｐＨ１１乃至１２、下限がｐＨ９．５乃至１０であり、好適な範囲はｐＨ１０乃至１１である。該水溶液を保温する温度は、上限が１０乃至５０、下限が０乃至４であり、好適な範囲は４乃至３７であり、より好適な範囲は４乃至１０である。

【００３９】

本発明のＯＣＩＦ物質及び多糖物質からなる複合体は、ＯＣＩＦ物及び多糖物質が、共有結合（例えば、シッフ塩基形成）、イオン結合、配位結合等の化学的結合、及び／又は、疎水性的相互作用、水素結合、静電的相互作用、親和性結合等の非化学的結合により互いに結合したものである。

【００４０】

該複合体は、遊離の多糖物質を含有していない。

【００４１】

遊離の多糖又はその誘導体を除去する方法としては、通常、精製、単離及び分画の操作に適用される手段であれば特に限定されるものではないが、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過（分子ふるい）クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、結晶化、塩析、限外濾過等を挙げることができ、好適にはゲル濾過クロマトグラフィー（以下、単に「ゲル濾過」という。）、限外濾過等を挙げることができる。

【００４２】

前記ゲル濾過におけるカラムや移動相などの諸条件は、ＯＣＩＦ物質を含有する画分から遊離の多糖物質を分離することが可能な限りにおいて特に限定を受けるものではなく、ＯＣＩＦ物質の分子量及び種類、多糖物質の分子量及び種類、該複合体の分子量などを考慮して適宜選択され得る。

【００４３】

また、本発明のＯＣＩＦ物質及び多糖物質からなる複合体は、等電点の測定、糖含量の測定、抗体による定量等により、原料であるＯＣＩＦ物質と区別することができる。

【００４４】

等電点は等電点電気泳動により常法に従って測定することができる。ＯＣＩＦは塩基性タンパク質でありその等電点はｐＨ９付近に観測されるが、デキストラン硫酸の如き多糖物質が結合すると等電点が低下するので、ＯＣＩＦ物質とＯＣＩＦ物質及び多糖物質からな

る複合体を区別することが可能である。

【0045】

糖含量はフェノール硫酸法による中性糖の定量法を用いて好適に測定することができる。多糖物質が結合したOCIFの糖含量は元のOCIFの糖含量に比して増加するので、OCIF物質とOCIF物質及び多糖物質からなる複合体を区別することが可能である。

【0046】

本発明の多糖物質と特異的に結合する抗体を用い、OCIF物質及び多糖物質からなる複合体中に含有される多糖物質の量を測定することにより、OCIF物質とOCIF物質及び多糖物質からなる複合体を区別することができる。

【0047】

OCIF物質、及び、OCIF物質及び多糖物質からなる複合体は、従来公知のタンパク質測定法によりタンパク質量として測定され得る。そのようなタンパク質測定法には、ロウリー法 (Lowry, O.H., et al., Protein Measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 143, p265-275(1951))、銀染色法、紫外吸収 (λ 280 nm) 測定法、BCA法等が含まれ、好適にはロウリー法である。

【0048】

また、OCIF物質、及び、OCIF物質及び多糖物質からなる複合体は、OCIF物質と特異的に結合する抗体を用いた各種の免疫学的なアッセイにより検出又は測定され得る。免疫学的なアッセイに適した抗ヒトOCIFモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマOI-19 (FERM BP-6420)の生産する抗体OI-19、ハイブリドーマOI-4 (FERM BP-6419)の生産する抗体OI-4、ハイブリドーマOI-26 (FERM BP-6421)の生産する抗体OI-26等を例示することができる (WO99/15691号公報参照)。ハイブリドーマOI-19又はOI-4の生産する抗体はOCIF単量体 (モノマー) 体及び2量体 (ホモダイマー) と結合し、ハイブリドーマOI-26の生産する抗体はOCIF2量体 (ホモダイマー) と特異的に結合する。このような抗体を用いて当業者に周知の方法により免疫学的なアッセイを行うことができる (WO99/15691号公報参照)。免疫学的なアッセイとしては、酵素免疫アッセイ (enzyme immunoassay: 以下、「EIA」という。)、放射能免疫アッセイ (radio immunoassay)、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、サンドイッチEIA等を例示することができ、好適にはELISAを挙げることができる。本発明の好適なELISAにおいては、抗体OI-19又は抗体OI-26が固相化された抗体として、抗体OI-4が酵素標識された移動相中の抗体としてそれぞれ使用される。本発明において酵素標識に用いられる好適な酵素はパーオキシダーゼ (peroxidase: 以下、「POD」という。) である。

【0049】

なお、抗体OI-4を生産するハイブリドーマOI-4は、平成9年10月16日に、日本国茨城県つくば市東町1-1-3の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (現、日本国茨城県つくば市東町1-1-1中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター) へOI-4として国内寄託され、受託番号FERM P-16473を付与された後、平成10年7月13日に国際寄託へ移管され、受託番号FERM BP-6419を付与された。

【0050】

抗体OI-19を生産するハイブリドーマOI-19は、平成9年10月16日に、日本国茨城県つくば市東町1-1-3の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (現、日本国茨城県つくば市東町1-1-1中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター) へOI-19として国内寄託され、受託番号FERM P-16474を付与された後、平成10年7月13日に国際寄託へ移管され、受託番号FERM BP-6420を付与された。

【0051】

抗体OI-26を生産するハイブリドーマOI-26は、平成9年10月16日に、日本

10

20

30

40

50

国茨城県つくば市東町 1 - 1 - 3 の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現、日本国茨城県つくば市東町 1 - 1 - 1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター）へ O I - 26 として国内寄託され、受託番号 F E R M P - 16475 を付与された後、平成 10 年 7 月 13 日に国際寄託へ移管され、受託番号 F E R M B P - 6421 を付与された。

【0052】

また、本発明の O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体を、ヘパリン親和性に基づいて更に特徴付けることが可能である。

【0053】

ヘパリンは、D - グルコサミン、D - グルクロン酸、L - イズロン酸、から成る多糖の N - 硫酸、N - アセチル及び O - 硫酸置換体であり、ムコ多糖の中では硫酸基を最も多く含有する。ヘパリンはヒト又はヒト以外の哺乳動物に由来するものであれば特に限定されないが、好適にはブタ腸粘膜由来のヘパリンである。ヘパリン親和性の測定にはヘパリンが固相化された担体を用いることができ、そのような担体としてブタ腸粘膜由来のヘパリンが固相化されたアガロースゲルビーズ等を好適に示すことができる。また、そのような担体が充填されたカラムはヘパリン親和性の測定により好適であり、最適には H i T r a p H e p a r i n H P C o l u m n、H i P r e p 16 / 10 H e p a r i n、H e p a r i n S e p h a r o s e (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) である。該カラムには、ブタ腸粘膜由来のヘパリンが固相化されたアガロースゲルビーズが約 2 乃至 10 m g / m l ゲルの密度で充填されている。また、該カラムは p H 5 乃至 10 において通常用いられる緩衝液に対して安定であり、該カラムに吸着させたタンパク質は塩化ナトリウム、塩化カリウム又は硫酸アンモニウムを用いた 1 . 5 乃至 2 M までの連続的あるいは段階的なグラジエント溶離により回収され得る (H a k a n s s o n, S., et al., Protein Sci., 10, 2138-2139, (2001) : Tan, M., et al., Carcinogenesis, 22, 295-300, (2001) : Peterson, C. B., et al., J. Biol. Chem., 260, 610-615, (1985) : Garke, G., et al., J. Chromatogr. B, 737, 25-38, (2000) 参照)。

【0054】

O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体のヘパリン親和性は、タンパク質の糖又はその誘導体に対する親和性を測定する従来公知の方法により測定され得るが、好適には、温和な条件下又は過酷な条件下でヘパリン又はヘパリンが固相化された担体に結合するか又は結合しない該複合体の量を測定してそれらを比較することにより行うことができる。温和な条件とは、通常タンパク質のカラムクロマトグラフィーにおいて温和と解釈される条件であれば特に限定されないが、例えば、イオン強度が相対的に低い条件等である。過酷な条件とは、通常タンパク質のカラムクロマトグラフィーにおいて過酷と解釈される条件であれば特に限定されないが、例えば、イオン強度が相対的に高い条件等である。イオン強度は強酸塩により調整され、好適には塩化ナトリウムにより調整される。

【0055】

ヘパリンが固相化された担体が充填されたカラムを用いる場合、例えば、該カラムを予め温和なイオン強度が相対的に低い緩衝液で平衡化し、次いで O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体をイオン強度が相対的に低い緩衝液に溶解せしめて該カラムへ添加し、次いで非吸着画分（画分 A）を回収する。次いで該カラムへイオン強度が相対的に低い緩衝液を添加して溶出画分（画分 B）を回収する。次いでイオン強度が相対的に高い緩衝液を該カラムへ添加して溶出画分（画分 C）を回収することができる。本発明においては、画分 A、B 及び C に中に含まれる O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体の量をそれぞれ測定し、次いで 3 つの値（それぞれ（a）、（b）、（c））を合計した値で（c）を除算することにより得られる値を「ヘパリン吸着力」という。例えば、次の工程によりヘパリン吸着力を好適に算出することが可能である：

[a] 0 . 1 乃至 0 . 8 M の塩化ナトリウムを含有する低イオン強度の緩衝液で、ヘパリンが固相化された担体が充填されたカラムを平衡化する工程；

[b] [a] 記載の緩衝液に被検試料を溶解せしめたものを前記カラムへ添加し、次いで

10

20

30

40

50

溶出画分 A を回収する工程；

[c] [a] 記載の緩衝液で前記カラムを洗浄し、溶出画分 B を回収する工程； [d] 1 乃至 2 M の塩化ナトリウムを含有する高イオン強度の緩衝液で前記カラムを洗浄し、溶出画分 C を回収する工程；

[e] 溶出画分 A 乃至 C 中に存在する O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体の量（それぞれ（ a ））、（ b ））、（ c ）という）を、該 O C I F 物質に特異的に結合する抗体を用いた酵素免疫アッセイ（enzyme immunoassay：E I A）により測定する工程；

[f] 下記式により、ヘパリン吸着力を算出する工程。

(c)

$$\text{ヘパリン吸着力} = \frac{\text{---}}{(a) + (b) + (c)}$$

10

前記工程 [e] における複合体の量の測定方法は、該 O C I F 物質に特異的に結合する抗体を用いた E I A であれば得に限定されないが、例えば、ハイブリドーマ O I - 19 (F E R M B P - 6420) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 19 又はハイブリドーマ O I - 26 (F E R M B P - 6421) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 26 が固相化された抗体として、ハイブリドーマ O I - 4 (F E R M B P - 6419) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 4 がパーオキシダーゼで酵素標識された移動相中の抗体としてそれぞれ使用される E L I S A を例示することができる。当該 E L I S A は O C I F 物質が O C I F である場合に好適であり、O C I F 物質がヒト成熟体 O C I F（すなわち、配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号第 + 1 番乃至第 380 番からなるポリペプチド）である場合により好適である。

20

【 0056 】

このような方法、とりわけ好適な E L I S A により測定される O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体のヘパリン吸着力は、通常 0 . 7 以下であり、好適には 0 . 6 以下であり、より好適には 0 . 5 以下である。なお、ヘパリン吸着力は、ヘパリンが固相化された担体の種類や測定条件に依存して変化し得る。

【 0057 】

30

本発明の提供する O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体を、O C I F 物質と特異的に結合する抗体を用いて測定される免疫学的検出率に基づいて更に特徴付けることができる。本発明において、免疫学的検出率とは、O C I F 物質に特異的に結合する抗体を使用する酵素免疫アッセイ（enzyme immnoassay：E I A）により、該 O C I F 物質を標準物質として測定される、被検資料中に含まれる該 O C I F 物質の分子数（X）を、（ i ）ウシ血清アルブミンを標準物質としてロウリー（Lowry）法により測定されるタンパク質量及び（ i i ）該 O C I F 物質の分子量に基づいて算出される、被検試料中に含まれる該 O C I F 物質の分子数（Y）で除算することにより得られる数値（X ÷ Y）を意味する。

【 0058 】

タンパク質量の測定とそれに基づいて O C I F 物質の分子数を算出する方法は特に限定されないが、例えば、ロウリー法に基づいて下記 [1] 乃至 [4] 工程を経て好適に行うことができる；

40

[1] 20 乃至 60 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 濃度のウシ血清アルブミンを標準物質として検量線を作成する工程；

[2] タンパク質濃度が 20 乃至 60 $\mu\text{g} / \text{ml}$ となるよう希釈した被検試料のタンパク質濃度を測定する工程；

[3] 前記工程 [2] で測定されたタンパク質濃度及び前記工程 [1] で作成された検量線より、被検試料中に含有される該 O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体のタンパク質量を算出する工程；

[4] 前記工程 [3] で算出されたタンパク質量及び該 O C I F 物質の分子量より被検試

50

料中に含まれる該 O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体の分子数を算出する工程。

【 0 0 5 9 】

免疫学的検出率の測定に適用される酵素免疫アッセイは特に限定されないが、例えば、ハイブリドーマ O I - 1 9 (F E R M B P - 6 4 2 0) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 1 9 又はハイブリドーマ O I - 2 6 (F E R M B P - 6 4 2 1) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 2 6 が固相化された抗体として、ハイブリドーマ O I - 4 (F E R M B P - 6 4 1 9) により生産される抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 4 がパーオキシダーゼにより酵素標識された移動相中の抗体としてそれぞれ使用される E L I S A (enzyme-linked immnosorbent assay) により下記工程 [1] 乃至 [3] を経て好適に行うことができる；

10

[1] 既知濃度の単離された O C I F 物質を用いて検量線を測定する工程；

[2] 被検試料を前記 E L I S A に供する工程；

[3] 前記工程 [2] の測定値及び前記工程 [1] で作成された検量線より、被検試料中に含まれる該 O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体のタンパク質量を算出する工程；

[4] 前記工程 [3] で算出されたタンパク質量及び該 O C I F 物質の分子量より被検試料中に含まれる該 O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体の分子数を算出する工程。

【 0 0 6 0 】

なお、前記 E L I S A の工程 [3] において算出されるタンパク質量を、前記ロウリー法に基づく工程 [3] において算出されるタンパク質量で除算することによっても、同じく免疫学的検出率をも算出し得る（実施例 7 参照）。

20

【 0 0 6 1 】

当該 E L I S A は、O C I F 物質が O C I F である場合により好適であり、O C I F がヒト成熟体 O C I F（すなわち、配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号第 + 1 番乃至第 3 8 0 番からなるポリペプチド）である場合により一層好適である。

【 0 0 6 2 】

このようにして算出される、O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体の免疫学的検出率は通常 0 . 5 乃至 1 . 2 であり、好適には 0 . 6 乃至 1 . 1 以上であり、より好適には 0 . 7 乃至 1 . 1 以上である。なお、該免疫学的検出率は、タンパク質量の測定方法、E I A の種類、E I A に適用されるモノクローナル抗体等に依存して変化し得る。

【 0 0 6 3 】

30

本発明の O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体における、O C I F 物質と多糖物質の結合は安定であり、例えば、一度ゲルろ過することにより得られた該複合体画分（I）を再度ゲルろ過に供し、次いで該複合体含有画分（I I）を回収し、次いで画分（I）又は（I I）のタンパク質含量及び糖含量を測定することによりその安定性を確認することができる。画分（I）又は（I I）は必要に応じて限外ろ過膜等を用いて濃縮することができる。また、画分（I I）を再度のゲルろ過に供して該複合体画分（I I I）を得、同様に結合安定性を確認することが可能である。タンパク質含量の好適な測定法は前記ロウリー法であり、糖含量の好適な測定法は前記フェノール硫酸法である。

【 0 0 6 4 】

さらに、本発明の O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体は血中滞留性に優れる。該複合体の血中滞留性は、それらの血中又は血清濃度の増減により確認することができる。該複合体の血中又は血清濃度は、例えば、ヒト又はヒト以外の動物の血管内に該複合体を投与し、一定時間経過後、該動物より血液又は血清を採取し、次いで前述の如き、該 O C I F 物質に特異的に結合する抗体を用いた酵素免疫アッセイ（E L I S A など）により測定することができる。

40

【 0 0 6 5 】

本発明の提供する O C I F 物質及び多糖物質からなる複合体は、O C I F を適用し得る疾患（W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号公報、W O 9 7 / 2 3 6 1 4 号公報等参照）、すなわち骨代謝異常症と総称される疾患群の予防又は治療に有効である。

【 0 0 6 6 】

50

本発明において、骨代謝異常症とは、実質的な骨量の減少を特徴とするあらゆる疾患であり、骨代謝異常症を治療するかあるいは予防するためには骨吸収又は骨吸収速度を抑制する必要がある。そのような本発明の骨代謝異常症には、一次性骨粗鬆症（老人性骨粗鬆症、閉経後骨粗鬆症及び特発性若年性骨粗鬆症）、内分泌骨粗鬆症（甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能亢進症、クッシング症候群及び末端肥大症）、性機能低下に伴う骨粗鬆症（下垂体機能低下症、Klinefelter症候群及びTurner症候群）、遺伝性及び先天性形態の骨粗鬆症（骨形成不全、ホモシスチン尿症、メンケス症及びライリー-デイ症候群）、重力負荷軽減又は四肢の固定や不動化による骨減少症、パジェット病、骨髄炎、骨喪失による感染性病巣、固形腫瘍（乳癌、肺癌、腎臓癌、前立腺癌等）に起因する高カルシウム血症、血液学的悪性疾患（多発性骨髄腫、リンパ腫及び白血病）、特発性高カルシウム血症、甲状腺機能亢進症又は腎臓機能不全に伴う高カルシウム血症、ステロイド投与に起因する骨減少症、他の薬物（メトトレキサート及びシクロスポリンA等の免疫抑制剤、ヘパリン及び抗てんかん薬）投与に起因する骨減少症、腎臓機能不全に伴う骨減少症、外科手術、消化器疾患（小腸障害、大腸障害、慢性肝炎、胃切除、原発性胆汁性肝硬変及び肝硬変）に伴う骨減少症、慢性関節リウマチ等の各種リウマチによる骨減少症、慢性関節リウマチ等の各種リウマチによる骨破壊及び関節破壊、ムチランス型リウマチ、変形性関節症、歯周骨喪失、癌の骨転移（骨溶解性転移）、外傷性負傷、ゴシェ病、鎌状赤血球貧血、全身性紅性狼創若しくは非外傷性負傷に伴う骨壊死又は骨細胞死、腎性骨異栄養症等の骨異栄養症、低アルカリフォスファターゼ血症、糖尿病に伴う骨減少症、栄養障害又は摂食障害に伴う骨減少症、その他の骨減少症等が包含される。また、本発明における骨代謝異常症は、前記固形腫瘍、癌の骨転移（骨溶解性転移）又は血液学的悪性疾患による悪液質をも包含する（特開2000-178200号公報参照）。

10

20

30

40

50

【0067】

本発明の提供するOCIF物質及び多糖物質からなる複合体を有効成分として含有する医薬組成物は、ヒト又はヒト以外の動物に対し、経口又は非経口により安全に投与され得る。医薬としての投与形態は、疾患の種類、疾患の程度、症状、年齢、性別、体重等に応じて適宜選択することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤は経口投与され、注射剤は単独で若しくはブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与されるか又は単独で筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与され、貼付剤は経皮投与され、点鼻剤は経鼻投与され、粘膜適用剤は経粘膜投与若しくは口腔内投与され、坐剤は直腸内投与される。これらの製剤は、常法に従い、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、着色剤、pH緩衝剤、防腐剤、ゲル化剤、界面活性剤、コーティング剤等、医薬の製剤分野において通常使用し得る公知の補助剤を用いて製剤化することができる。

【0068】

錠剤の形態に成形するには、担体として当該分野で公知のものを広く使用できる。そのような担体としては、例えば、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、澱粉、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤；水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、澱粉液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤；乾燥澱粉、アルギン酸ナトリウム、寒天末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、澱粉、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤；第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤；グリセリン、澱粉等の保湿剤；澱粉、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤；精製タルク、ステアリン酸塩、硼酸末、ポリエチレングリコール等の潤沢剤等を挙げることができる。また、錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠等とすることができる。

【0069】

丸剤の形態に成形するには、担体として当該分野で公知のものを広く使用できる。そのような担体としては、例えば、ブドウ糖、乳糖、カカオバター、澱粉、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤；アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤；ラミナラン寒天等の崩壊剤等を挙げることができる。

【0070】

坐剤の形態に成形するには、担体として当該分野で公知のものを広く使用できる。そのような担体としては、例えば、ポリエチレングリコール、カカオバター、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセリド等を挙げることができる。

【0071】

注射剤として調製される場合には、液剤及び懸濁剤は殺菌され、且つ血液と等張であることが好ましい。これら液剤、乳剤および懸濁剤の形態に成形するには、希釈剤として当該分野で公知のものを広く使用でき、例えば、水、エタノール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げることができる。なお、この場合、血液との等張性を保つのに十分な量の食塩、ブドウ糖、グリセリン等を医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤、pH調整剤、安定化剤、可溶化剤等を添加してもよい。注射剤は凍結乾燥品であってもよい。

10

【0072】

また、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤、他の医薬等を含有せしめてもよい。

20

【0073】

また、本発明の医薬組成物中に含まれるOCIF物質及び多糖物質からなる複合体の量は、特に限定されるものではないが、通常0.1乃至70重量%であり、好適には1乃至30重量%である。

【0074】

このような本発明の医薬組成物は、骨代謝異常症の予防又は治療剤として好適に使用され得る。また、本発明の提供するOCIF物質及び多糖物質からなる複合体は、このような骨代謝異常症の予防又は治療用の医薬組成物を製造するために使用され得る。

【0075】

本発明の提供するOCIF物質及び多糖物質からなる複合体の投与量は、症状、年齢、体重、投与形態、剤形等に依存するが、通常成人に対して1日当たり、投与量の上限が30乃至1000mg、下限が0.001乃至0.03mgであり、好適な範囲は0.03乃至30mgである。また、1日あたりの投与量の上限は1乃至20mg/kg、下限は0.01乃至0.5μg/kg、好適な範囲は0.5μg/kg乃至1mg/kgである。

30

【0076】

本発明の提供するOCIF物質及び多糖物質からなる複合体の投与回数は、投与形態、剤形等に依存するが、数日に1回、1日1回、又は1日数回である。

【0077】

本発明は、上述の如き投与経路、投与形態、投与量及び/又は投与回数で、本発明の提供する複合体をヒト又はヒト以外の動物へ投与されることを特徴とする、骨代謝異常症の予防又は治療方法をも提供する。

40

【0078】

【実施例】

以下に、実施例及び試験例を挙げ、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1. OCIF及びデキストラン硫酸からなる複合体の調製(I)

1a) OCIFの調製

ヒト組換えOCIF(2量体)はWO96/26217号公報の実施例に従って取得した。

【0079】

50

すなわち、まず、WO 96 / 26217号公報の実施例11において得られた形質転換大腸菌 p B K / 01F10 (日本国茨城県つくば市東1丁目の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (現在の、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター) に国際寄託され F E R M B P - 5267を付与された。)より、シグナルペプチドを含むヒト O C I F のコード配列を含有するプラスミドベクター p B K O C I F を取得した。次いで、WO 96 / 26217号公報の実施例14記載の方法に従って、p B K O C I F を制限酵素 S a l 1 及び E c o R 5 で消化した後、O C I F をコードする断片を回収し精製し、次いで平滑末端化した。得られた断片を予め平滑末端化した発現ベクター p c D L - S R α 296 (Molecular and Cellular Biology, 8, p466-472(1998))へ挿入し、得られた組換え発現ベクターで大腸菌株 D H 5 α (GIBCO BRL) を形質転換し、所望の形質転換株 p S R α O C I F を得た。

10

【0080】

エレクトロポレーション法により、C H O デヒドロ葉酸還元酵素 (dehydrofolate reductase: 以下、「d h f r」という。)欠損株 (以下、「C H O d h f r - 」という。)を前記 p S R α O C I F 及び p B A d D S V (d h f r 発現ベクター: WO 92 / 01053号公報参照)で共トランスフェクション (co-transfection) し、次いで d h f r 発現株を選抜した。さらに、O C I F を高発現している株を選抜した結果、O C I F 高生産クローンが得られた。該クローンを培養し、C H A P S を 0.1% 濃度に添加した後フィルターでろ過し、ヘパリン・セファロース F F カラム (ファルマシア・バイオテック社製) クロマトグラフィー、次いでブルー 5 P W カラム (トーソー (株) 製) クロマトグラフィーに供した。所望のヒト O C I F を含む画分を S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果、非還元条件下においては分子量約 60000 及び分子量約 120000 のバンドのみが検出された (WO 96 / 26217号公報の実施例14参照)。

20

【0081】

得られたヒト O C I F 100 μg に、100分の1容量の25%トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid: 以下「T F A」という。)を添加した後、0.1% T F A を含む30%アセトニトリルで平衡化した逆相カラム P R O T E I N - R P (直径2.0mm×長さ250mm: ワイエムシー (株) 製) に添加し、30%乃至55%のアセトニトリル直線的濃度勾配を50分間かけて作製し、0.1ml/分の流速で溶出させ、2つのピーク画分をそれぞれ別個に分取した。、非還元条件下における S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動において分子量約120000のバンドのみが検出される画分を、組換え型ヒト O C I F (2量体) 画分として、以下の実施例に供した (WO 96 / 26217号公報の実施例17及び18参照)。

30

1b) O C I F 及びデキストラン硫酸からなる複合体の調製

1a) で得られた組換え型ヒト O C I F (2量体) を、0.15M塩化ナトリウムを含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) へ、1.5、2、5、6.5、10、12.5、20又は50mg/mlの濃度に溶解せしめた。この水溶液に、デキストラン硫酸ナトリウムイオウ5 (名糖産業 (株) 製: 以下、「D S 5」という。) を、終濃度40、100、130、150、200、400、500、510、又は1000mg/mlとなるように溶解し、水酸化ナトリウムを添加してpH10、10.5又は11に調整した。得られた水溶液を、4、7、25又は37にて、1、3、6、18、24、48、72、96、144、168又は288時間保温した。

40

【0082】

保温後の水溶液4mlを、0.3M塩化ナトリウムを含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6) で予め平衡化したゲルろ過カラム S u p e r d e x 200pg (カラム内径16mm×長さ60cm: 排除限界分子量130万: A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) へ添加し、該緩衝液により流速2ml/minで溶出させた。紫外分光光度計を用いてλ280nmの吸収をモニターし、保持時間約28乃至36分の溶出液を分取した。組換え型ヒト O C I F (2量体) と結合していない遊離の D S 5 は保持時間約50乃至70分に溶出された。上記ゲル濾過は室温にて行った。

50

【 0 0 8 3 】

得られた組換型ヒトOCIF（2量体）及びDS5からなる複合体（以下、「OCIF及びDS5からなる複合体」という。）を含有する画分を-60にて凍結保存した。

【 0 0 8 4 】

なお、本実施例に記載された各処方の反応条件を下記の表1にまとめた。

【 0 0 8 5 】

【 表 1 】

処方名	DS5 濃 度 (mg/ml)	OCIF 濃 度 (mg/ml)	温 度 (℃)	pH	保温時間 (時間)
処方1	130	6.5	4	10.5	18
処方2	510	6.5	4	10.5	18
処方3	130	6.5	4	11	18
処方4	130	6.5	4	10.5	72
処方5	500	5	4	10.5	144
処方6	130	6.5	4	10.5	48
処方7	130	6.5	4	10.5	144
処方8	130	6.5	4	10.5	288
処方9	400	20	4	10.5	18
処方10	200	10	4	10.5	18
処方11	100	5	4	10.5	18
処方12	40	2	4	10.5	18
処方13	1000	12.5	4	10.5	18
処方14	1000	50	4	10.5	18
処方15	400	2	4	10.5	144
処方16	1000	5	4	10.5	18
処方17	1000	2	4	10.5	18
処方18	150	5	37	10.5	1
処方19	150	5	37	10.5	3
処方20	150	5	37	10.5	6
処方21	150	5	37	10.5	24
処方22	150	5	7	10.5	168
処方23	150	5	4	10	144
処方24	150	5	25	10	24

10

20

30

40

50

処方25	130	6.5	4	10.5	24
処方26	150	5	37	10	24
処方27	150	5	4	10.5	144
処方28	150	5	4	11	24
処方29	150	5	4	10.5	24
処方30	150	1.5	4	10.5	72
処方31	130	6.5	25	10.5	1
処方32	130	6.5	25	10.5	3
処方33	130	6.5	25	10.5	6
処方34	130	6.5	25	10.5	24
処方35	130	6.5	25	10.5	168
処方36	130	6.5	25	10.5	288
処方37	150	5	4	10.5	96
処方38	150	5	4	10.5	288
処方39	130	6.5	25	10.5	18
処方40	130	6.5	37	10.5	18

10

20

1c) 天然型ヒトOCIFの調製

WO96/26217号公報の実施例1乃至4に記載の方法に従って、ヒト胎児肺繊維芽細胞IMR-90(ATCC-CCL186)より天然型(非組換型)ヒトOCIFを得ることが可能である。また、1a)記載の逆相カラムクロマトグラフィーにより、天然型ヒトOCIF(2量体)を取得することができる。

30

実施例2. OCIF及びデキストラン硫酸からなる複合体の調製(II)

実施例1a)において得られた組換型ヒトOCIF(2量体)を、0.15M塩化ナトリウムを含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)へ、5mg/mlの濃度に溶解せしめた。この水溶液に、分子量5000のデキストラン硫酸ナトリウム(和光純薬(株)製：以下、「DS5000」という。)を、終濃度150mg/mlとなるように溶解し、水酸化ナトリウムを添加してpH10.5に調整した。得られた水溶液を4にて24時間保温した。

【0086】

保温後の水溶液4mlを、0.3M塩化ナトリウムを含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6)で予め平衡化したゲルろ過カラムSuperdex200pg(カラム内径16mm×長さ60cm：排除限界分子量130万：Amersham Pharmacia Biotech社製)へ添加し、該緩衝液により流速2ml/minで溶出させた。紫外分光高度計を用いてλ280nmの吸収をモニターし、保持時間約28乃至36分の溶出液を分取した。組換型ヒトOCIF(2量体)と結合していない遊離のDS5000は保持時間約40乃至65分に溶出された。上記ゲル濾過は室温にて行った。

40

【0087】

得られた組換型ヒトOCIF(2量体)及びDS5000の複合体(以下、「OCIF/DS5000複合体」という。)を含有する画分を-60にて凍結保存した。

【0088】

なお、本実施例に記載された処方の反応条件を下記の表2にまとめた。

50

【 0 0 8 9 】

【 表 2 】

処方名	DS5000 濃 度 (mg/ml)	OCIF 濃 度 (mg/ml)	温 度 (℃)	pH	保温時間 (時間)
処方41	150	5	4	10.5	24

10

参考例 1 . OCIF 及びデキストラン硫酸ナトリウムからなる組成物の調製

実施例 1 において得られた組換え型ヒト OCIF (2 量体) を、0.15 M 濃度の塩化ナトリウム及び 0.01 % のポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) へ、0.25 mg/ml の濃度に溶解せしめた。この水溶液に、実施例 2 記載の DS5000 (和光純薬 (株) 製) 又は分子量 10000 のデキストラン硫酸ナトリウムである DS10000 (和光純薬 (株) 製: 以下、「DS10000」という。) を、終濃度 1 又は 4 mg/ml となるように溶解し、水酸化ナトリウムを添加して pH 7 に調整した。得られた水溶液を 4 にて 24 時間保温した。

20

【 0 0 9 0 】

得られた組換え型ヒト OCIF (2 量体) 及び DS5000 又は DS10000 からなる組成物は速やかに下記試験例 1 へ供した。

なお、本参考例に記載された各参考処方の反応条件を下記の表 3 にまとめた。

【 0 0 9 1 】

【 表 3 】

処方名	デキストラン硫酸		OCIF	温 度	pH	保温時間
	種 類	濃 度 (mg／ml)	濃 度 (mg／ml)	(℃)		(時間)
参考処方 1	DS 5000	4	0. 2 5	4	7	2 4
参考処方 2	DS10000	1	0. 2 5	4	7	2 4

30

40

実施例 3 . 等電点の測定

実施例 1 において得られた組換え型ヒト OCIF (2 量体) 及び実施例 1 記載で得られた OCIF 及び DS5 からなる複合体 (処方 22) を、等電点電気泳動ゲル IEF PAGE mini (pH 範囲 3 乃至 10: 岩城硝子 (株) 製) に添加し、IEF pH 3 - 7 buffer kit (Technical Frontier Co. 製) を泳動用緩衝液として次の電圧を印加することにより電気泳動を行った: 100 V にて 1 時間、次いで 200 V にて 1 時間、次いで 500 V にて 30 分間。電気泳動終了後、ゲルをクマシーブルー染色した。

【 0 0 9 2 】

その結果、OCIF の等電点は約 pI 9 であり、一方 OCIF 及び DS5 からなる複合体

50

(処方22)の等電点は約pI 6.5であった。

実施例4. OCIF及びデキストラン硫酸からなる複合体におけるOCIF及びデキストラン硫酸の分子比の算出

本実施例において用いられた抗ヒトOCIFモノクローナル抗体は、WO99/15691号公報記載の方法により作製された。すなわち、精製したモノマー型及びホモダイマー型OCIFを抗原として、Balb/cマウスに免疫した後、同マウスを解剖して摘出した脾臓から分離した脾臓細胞をマウスミエローマ細胞P3x63-AG8.653と細胞融合させた。得られたハイブリドーマのうち、抗ヒトOCIF抗体を産生しているものをOCIFを固相化した酵素免疫測定法により選択した。更に限外希釈法によるクローニングを3~5回繰り返すことにより安定な抗体生産ハイブリドーマを樹立した。これら抗体生産ハイブリドーマをそれぞれ培養し、Balb/cマウスの腹腔内に移植した。2週間後、蓄積した腹水を採取し、プロテインAカラム(ファルマシア社)を用いたクロマトグラフィーによる精製を行うことにより、モノマー型OCIF及びホモダイマー型OCIFを等しく認識するOI-19抗体あるいはOI-4抗体、またホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識するOI-26抗体を得て、以下の実験に用いた。

10

1) パーオキシダーゼで標識した抗ヒトOCIFモノクローナル抗体OI-4原液の調製
当該抗体の酵素標識は、EZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxidase Kit(ピアース社製)を用い、該キットのプロトコルIIに従って行った。

【0093】

20

WO99/15691号公報に記載の方法に従って精製された抗ヒトOCIFモノクローナル抗体OI-4(ハイブリドーマOI-4(FERM BP-6419)により生産される。)を10mMリン酸緩衝液(pH7.6)を用いて1mg/mlとなるように希釈したもの1mlに、上記キットに添付されたN-スクシニミジル S-アセチルチオアセテートを、ジメチルフォルムアミドにて使用直前に10mg/mlとなるように溶解したもの4μlを添加し、室温にて30分間保温した。ここに、予め5mgのヒドロキシルアミン塩酸塩を上記キットに添付されたMaleimide Conjugation Buffer 100μlへ使用直前に溶解した溶液20μlを添加した後、室温にて2時間保温した。当該反応液を、予め30mlのMaleimide Conjugation Bufferで平衡化した、上記キットに添付されたポリアクリルアミド脱塩カラム(容積10ml)へ付し、Maleimide Conjugation Bufferで溶出し、0.5mlずつ分取した。当該抗体を含む7乃至10番目の画分を合併した。ここに、上記キットに添付されたEZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxidase 5mgを500μlの蒸留水に溶解したもの100μlを添加し、室温にて1時間保温した後、等容のグリセロールを添加し、-20℃にて保存した。

30

【0094】

最終的に得られた溶液を、パーオキシダーゼで標識した抗ヒトOCIFモノクローナル抗体OI-4(以下、「POD-OI-4」という。)の原液とした。2) OCIFの定量
実施例1及び2に記載の各処方におけるOCIF量を、抗OCIFモノクローナル抗体を用いたELISA法により測定した。

40

【0095】

96穴マイクロタイタープレート(Maxisorp: NUNC社製)上の各ウェルに、WO99/15691号公報に記載の方法に従って得られた抗ヒトOCIFモノクローナル抗体OI-26(ハイブリドーマOI-26(FERM BP-6421)により生産される。)を0.1M炭酸水素ナトリウム溶液へ5μg/mlとなるように溶解せしめたもの100μlを分注し、シールして4℃にて1晩静置した。

【0096】

0.1%ポリソルベート20を含有するPBS(pH7.4)250μlで、各ウェルを3回洗浄した。

50

【0097】

希釈緩衝液（組成：0.2 M Tris - 塩酸、40 % Block Ace（大日本製薬（株）より購入）、0.1 % ポリソルベート 20 : pH 7.4）20 μ l を各ウェルへ添加し、室温にて20分間保温した。

被検試料を希釈緩衝液を用いて適宜希釈した。検量線作成のための標準溶液には既知濃度のOCIFを含有する希釈緩衝液を、対照には希釈緩衝液を、それぞれ用いた。各被検試料50 μ l を各ウェルへ分注した。

【0098】

各ウェルに、1) で得られたPOD-OI-4の原液を[0.2 M Tris - 塩酸、40 % Block Ace（大日本製薬（株）より購入）、0.1 % ポリソルベート 20 (pH 7.4)] で1500倍希釈したもの50 μ l を添加し、室温にて2時間静置した。 10

【0099】

反応後、0.1 % ポリソルベート 20 を含有するphosphate buffered saline（以下、「PBS」という。：pH 7.4）250 μ l で、各ウェルを4回洗浄した。

【0100】

0.1 M クエン酸と0.2 M リン酸水素 2 ナトリウムを混合し、基質溶解液とした（pH 4.5）。

【0101】

OPD錠（和光純薬（株）製）13 mg に基質溶解液32.5 ml 及び過酸化水素水6.5 μ l を加えて溶解することにより得られた基質液100 μ l を各ウェルへ添加し、アルミホイルで遮光し室温にて15分間静置した。 20

【0102】

硫酸50 ml に精製水250 ml を混合することにより得られた反応停止液50 μ l を各ウェルへ添加した。

【0103】

攪拌振とう器（タイターミキサーMB-1：Japan Trika社製）を用いて穏やかに攪拌した後、マイクロプレートリーダー（SPECTRA FLUOR：TECAN社製）を用いて波長 λ 490 nmにおける試料溶液の吸光度を測定した。

【0104】

標準溶液を用いて作成した検量線より、被検試料中のOCIF含有量を算出した。 30

3) デキストラン硫酸の定量

実施例1及び2に記載の各処方におけるデキストラン硫酸量を、フェノール硫酸法により中性糖として測定した。

【0105】

10乃至60 μ g/ml 範囲の既知濃度のDS5（名糖産業（株）製）又はDS5000（和光純薬（株）製）を希釈溶液（組成：0.01 M クエン酸、0.3 M 塩化ナトリウム、0.01 % ポリソルベート 80 水溶液：pH 6.0）に溶解し標準溶液とした。標準溶液、試料溶液及び希釈溶液各0.2 ml を試験管へ分注した。

【0106】

該試験管へ50 mg/ml フェノール水溶液0.2 ml を分注し、速やかに攪拌した。 40

【0107】

60 の水浴中で20秒間保温した後、濃硫酸1.0 ml を添加して速やかに攪拌した。

【0108】

室温にて10分間静置した後再度攪拌し、室温にて20分間静置した。

【0109】

分光光度計（UV-240：島津製作所（株）製）を用い、波長 λ 490 nmにおける各ウェルの吸光度をそれぞれ測定した。

【0110】

ヒトOCIFはそれ自体に糖鎖が結合している。そこで、上記測定で得られたOCIF及 50

びデキストラン硫酸の複合体中の中性糖含量の値から、同様に測定した原料のOCIFの中性糖含量の値を差し引くことにより、OCIFに結合したデキストラン硫酸の量を算出した。

4) OCIF及びデキストラン硫酸の複合体におけるOCIF並びにデキストラン硫酸の分子比の算出

上記3)で得られた各処方におけるデキストラン硫酸の量を上記2)で得られた各処方におけるOCIFの含有量で除算することにより、OCIF 1mgに結合しているデキストラン硫酸の量を算出した。

【0111】

次いで、ヒトOCIF単量体を分子量60000、DS5を分子量1950、DS5000を分子量5000、DS10000を分子量10000として、各処方におけるOCIF単量体とデキストラン硫酸の分子比を、OCIF単量体1分子当たりのデキストラン硫酸の分子数として算出した。

【0112】

結果を下記表4に示す。

【0113】

【表4】

処方名	複合体中のデキストラン硫酸の量 ($\mu\text{g}/\text{mg O C I F}$)	複合体中の、単量体としてのO C I F 及びデキストラン硫酸の分子比	
処方1	48.7	1 : 1.5	
処方2	100.2	1 : 3.1	10
処方3	39.7	1 : 1.2	
処方4	62.0	1 : 1.9	
処方5	136.4	1 : 4.3	
処方6	60.7	1 : 1.9	
処方7	58.5	1 : 1.8	
処方8	60.3	1 : 1.9	
処方9	67.7	1 : 2.1	20
処方10	94.3	1 : 2.9	
処方11	63.6	1 : 2.0	
処方12	60.8	1 : 1.9	
処方13	144.9	1 : 4.5	
処方14	116.4	1 : 3.6	
処方15	126.9	1 : 4.0	
処方16	145.0	1 : 4.5	30
処方17	116.5	1 : 3.6	
処方18	46.0	1 : 1.4	
処方19	61.0	1 : 1.9	
処方20	68.3	1 : 2.1	
処方21	110.7	1 : 3.4	
処方22	100.3	1 : 3.1	
処方23	65.8	1 : 2.1	40
処方24	58.2	1 : 1.8	

処方25	43.8	1:1.4	
処方26	80.1	1:2.5	
処方27	61.8	1:2.0	
処方28	57.1	1:1.8	
処方29	69.3	1:2.2	
処方30	77.1	1:2.4	
処方31	34.5	1:1.1	10
処方32	53.0	1:1.7	
処方33	47.4	1:1.5	
処方34	62.2	1:2.0	
処方35	96.2	1:3.0	
処方36	122.5	1:3.9	
処方37	67.8	1:2.1	
処方38	69.5	1:2.4	20
処方39	78.0	1:2.5	
処方40	98.4	1:3.1	
処方41	161.2	1:1.9	

実施例5．OCIF及びDS5からなる複合体の結合安定性

OCIF及びDS5からなる複合体のゲル濾過による分離とそれに続く濃縮を繰り返した後、実施例4の3)に記載の方法に準じて該複合体中のデキストラン硫酸の量を測定した。 30

1) 保温

WO96/26217号公報に記載の方法に従って得られた組換え型ヒトOCIF(2量体)を、0.15M塩化ナトリウムを含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)へ、5mg/mlの濃度に溶解せしめた。この水溶液にDS5を終濃度150mg/mlとなるように溶解し、水酸化ナトリウムを添加してpH10.5に調整した。得られた水溶液を4℃にて7日間保温した。

2) ゲルろ過(1回目)

保温後の水溶液を実施例1に記載の方法でゲルろ過した。保持時間約28乃至36分の溶出液を分取した。OCIFと結合していないDS5は保持時間約50乃至70分に溶出された。溶出液中のタンパク質量を実施例7の1)に記載のロウリー(Lowry)法により、また溶出液の糖含量を実施例4の3)に記載のフェノール硫酸法によりそれぞれ測定した。 40

3) ゲルろ過(2回目)

2)で回収された溶出液を、セントリプレップ(YM-30、30,000MWカットオフ:アミコン社製)2本に分け、遠心分離装置(himacCT60:日立製作所(株)製)を用いて2000rpmにて20分間遠心操作を行った。セントリプレップのろ過膜にてろ過されなかった分画を回収した。回収された溶液を2)に記載の方法で再度ゲルろ過し、保持時間約28乃至36分の溶出液を分取した。溶出液のタンパク質濃度及び糖含量を2)に記載の方法によりそれぞれ測定した。 50

4) ゲルろ過 (3 回目)

3) で回収された溶出液を、セントリプレッブ (Y M - 30、30, 000 MW カットオフ: アミコン社製) 2 本に分け、遠心分離装置 (h i m a c C T 60: 日立製作所 (株) 製) を用いて 2000 rpm にて 20 分間遠心操作を行った。セントリプレッブのろ過膜にてろ過されなかった分画を回収した。回収された溶液を前記 2) に記載の方法で再度ゲルろ過し、保持時間約 28 乃至 36 分の溶出液を分取した。溶出液のタンパク質濃度及び糖含量を前記 2) に記載の方法によりそれぞれ測定した。

【0114】

結果を下表 5 に示す。

【0115】

【表 5】

10

ゲルろ過 複合体中の、単量体としての O C I F
及びデキストラン硫酸の分子比

1 回目	1 : 2. 2
2 回目	1 : 2. 3
3 回目	1 : 2. 1

20

表 5 に示す通り、本実施例において製造された O C I F 及び D S 5 からなる複合体中の O C I F 及び S 5 の結合は、本実施例の条件下において安定であることが示された。

実施例 6 . O C I F 及び D S 5 からなる複合体のヘパリン吸着力

1) O C I F 及びデキストラン硫酸からなる複合体のヘパリンカラムへの吸着

以下のカラム操作は全て 4 ml / min の流速で行った。

【0116】

ヘパリンカラム (H i T r a p H e p a r i n H P c o l u m n、L o t . 289 212, A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) を、0.7 M 濃度の塩化ナトリウムを含有する 10 mM リン酸ナトリウム・カリウム緩衝液 (pH 7.0 : 以下、「リン緩衝液」という。) 5 ml で予め平衡化した。次いで、実施例 1 に記載の処方 6 乃至 8、処方 22、24、25 及び 27 のいずれか一つを、タンパク質濃度 (実施例 7 の 1) に記載の方法により測定) が 0.1 mg / ml となるように前記リン酸緩衝液を用いて希釈し、前記カラムへ添加した後、溶出液 [A] 1 ml を分取した。次いで、前記カラムにリン酸緩衝液 5 ml を添加し、溶出液 [B] 5 ml を分取した。次いで、前記カラムに 2.0 M 濃度の塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 4 ml を添加し、溶出液 [C] 4 ml を分取した。

30

2) ヘパリンカラム溶出液中の O C I F の定量

40

96 穴マイクロタイタープレート (M a x i s o r p : N U N C 社製) 上の各ウェルへ、抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 19 (F E R M B P - 6420) を 0.1 M 濃度の炭酸水素ナトリウム水 (pH 9.6) へ 10 µg / ml となるように溶解せしめたもの 100 µl を分注し、次いでシールした後 4 にて一晩保温した。抗体溶液をデカントにより除去し、各ウェルに 300 µl のブロッキング緩衝液 (50% B l o c k A c e : 大日本製薬 (株) より購入) を添加し、室温にて 2 時間保温した。S E R A W A S H E R (B i o T e c 社製、MW - 96R) を用いて、0.1% ポリソルベート 20 を含有する P B S (pH 7.4) 300 µl で各ウェルを 3 回洗浄した。

【0117】

1) で得られた溶出液 [A]、[B] 又は [C] を、希釈緩衝液 (組成: 0.2 M T r i

50

s - 塩酸、40% Block Ace、10 µg/ml 濃度のマウス免疫グロブリン G、0.1% ポリソルベート 20 (pH 7.4) を用いて適宜希釈して 120 µl とし、等容の精製水を添加して混合した。対照として、既知濃度の OCIF 2 量体溶液を希釈緩衝液で適宜希釈して 120 µl とし、等容に精製水を加えて混合した。

【0118】

このようにして得られた被検試料のうち 100 µl を各ウェルに添加し、攪拌振盪器 (マイクロプレートミキサー NS-P: 井内盛栄堂 (株) 製) を用いて、穏やかに振盪しつつ室温にて 2 時間保温した。次いで、SERA WASHER を用いて、0.1% ポリソルベート 20 を含有する PBS (pH 7.4) 300 µl で各ウェルを 6 回洗浄した。次いで、実施例 4 の 1) で得られた POD-OI-4 の原液を抗体希釈液 (組成: 0.2 M Tris - 塩酸、25% Block Ace: 大日本製薬 (株) より購入、10 µg/ml マウス免疫グロブリン G、0.1% ポリソルベート 20、pH 7.4) で 10000 倍希釈したもの 100 µl を添加し、前記攪拌振盪器を用いて穏やかに振盪しつつ、室温にて 2 時間保温した。次いで、SERA WASHER を用いて、0.1% ポリソルベート 20 を含有する PBS (pH 7.4) 300 µl で各ウェルを 6 回洗浄した。

10

【0119】

各ウェルに基質溶液 (TMB soluble reagent: Scyteck 社製) 100 µl を添加し、前記攪拌振盪器を用い穏やかに振盪しつつ、室温にて 10 乃至 15 分間保温した。各ウェルに反応停止液 (TMB stop buffer: Scyteck 社製) 100 µl を添加した。

20

【0120】

攪拌振盪器を用い、約 1 分間で穏やかに振盪した後、マイクロプレートリーダー (SPECTRA THERMO: TECAN 社製) を用いて波長 λ 450 nm における各ウェルの吸光度を測定した。濃度既知の OCIF 溶液を用いて作成した検量線から、ヘパリンカラム溶出液中の OCIF 濃度を算出した。

【0121】

1) で得られた溶出液 [A]、[B] 及び [C] 中に含まれる OCIF 及び DS5 からなる複合体の量で溶出液 [C] 中に含まれる OCIF 及び DS5 からなる複合体の量を除算することにより得られた数値を、ヘパリン吸着力として表 6 にまとめた。

【0122】

対照として、実施例 1 において取得された OCIF 原体についても同様の測定を行い、ヘパリン吸着力を算出した。

30

【0123】

【表 6】

処方名	ヘパリン吸着力
処方 6	0.451
処方 7	0.183
処方 8	0.153
処方 22	0.264
処方 24	0.072
処方 25	0.611
処方 27	0.141
OCIF	0.998

40

実施例 7. OCIF 及び DS5 からなる複合体の免疫学的検出率の算出

1) タンパク質量の測定

実施例 1 に記載の処方 6 乃至 8、処方 22、24、25 及び 27 のいずれか一つを、タンパク質濃度が約 0.1 mg/ml となるよう前記リン酸緩衝液を用いて希釈し、ロウリー

50

法に準じてタンパク質量を測定した。

【0124】

硫酸銅（ⅠⅠ）五水和物（和光純薬工業（株）製）0.2 gを水へ溶解せしめ、終容積50 mlとした。酒石酸ナトリウム二水和物（和光純薬工業（株）製）0.4 gを水へ溶解せしめ、終容積50 mlとした。炭酸ナトリウム（和光純薬工業（株）製）20 gを水に溶解せしめ、終容積100 mlとした。

【0125】

0.4 g / dl 硫酸銅溶液、0.8 g / dl 酒石酸ナトリウム溶液及び炭酸ナトリウム溶液を、1 : 1 : 2の容積比率で使用直前に混合した。（以下、「A液」という。）

ラウリル硫酸ナトリウム（ナカライテスク（株）製）10 gを水へ溶解せしめ、終容積200 mlとした（以下、「B液」という。）。

【0126】

水酸化ナトリウム（和光純薬工業（株）製）3.2 gを使用直前に水へ溶解せしめ、終容積100 mlとした（以下、C液という。）

A液、B液およびC液を、1 : 2 : 1の容積比率で使用直前に混合した。

【0127】

フォーリン・チオカルトフェノール試薬（和光純薬工業（株）製）および水を、1 : 5の容積比率で使用直前に混合した。

【0128】

クエン酸三ナトリウム二水和物（和光純薬工業（株）製）2.76 g、クエン酸一水和物（和光純薬工業（株）製）0.13 g、塩化ナトリウム17.5 g及びポリソルベート800.1 gを水へ溶解せしめ、終容積1 Lとした（pH 6.9、以下、「希釈液」という。）

【0129】

希釈液9.5 mlを、タンパク質定量用ウシ血清アルブミン標準溶液（bovine serum albumin：以下「BSA」という。：ピアース社製）の2 mg / ml水溶液500 µlへ加えた（以下、100 µg / ml標準溶液）。希釈液3.5 ml、3 ml、2.5 ml又は2 mlを、100 µg / ml標準溶液1.5 ml、2 ml、2.5 ml又は、3 mlへそれぞれ加えた（以下、30 µg / ml標準溶、40 µg / ml標準溶、50 µg / ml標準溶、60 µg / ml標準溶液）。希釈液3 mlを、60 µg / ml標準溶液1.5 mlへ加えた（以下、20 µg / ml標準溶液）。

【0130】

被検試料は、タンパク質濃度として約40 µg / mlとなるよう、希釈液で適宜希釈した。

【0131】

標準溶液（20 µg / ml標準溶液、30 µg / ml標準溶液、40 µg / ml標準溶液、50 µg / ml標準溶液、又は、60 µg / ml標準溶液）、希釈された被検試料（n = 3）および対照（希釈液）各1 mlを試験管に採取し、アルカリ性銅試液1 mlを加えて直ちに混合した。室温で正確に10分間放置したのち、希フォーリン・チオカルトフェノール試液0.5 mlを加えて直ちに混合した。室温にて30分間放置したのち、水を対照とし、ブランク、標準溶液および試料溶液の波長750 nmにおける吸光度（absorbance）を層長10 mmの石英セルを用いて、紫外可視分光光度計（Lambda 20：パーキンエルマー社製）により測定した。標準溶液を用いて作製した検量線より、被検試料中のタンパク質量をBSA換算値として算出した。

2) ELISAによる免疫学的測定

実施例1に記載の処方6乃至8、処方22、24、25及び27のいずれか一つを、タンパク質濃度が約0.1 mg / mlとなるよう前記リン酸緩衝液を用いて希釈し、実施例6に記載のELISA法によりタンパク質量をそれぞれ測定した。

3) 免疫学的検出率の算出

2)においてELISAにより測定されたタンパク質量を、1)においてロウリー法によ

り測定されたタンパク質量で除算した値を、免疫学的検出率として表 7 にまとめた。

【 0 1 3 2 】

対照として、実施例 1 において取得された O C I F 原体についても同様の測定を行い、免疫学的検出率を算出した。

【 0 1 3 3 】

なお、2) において E L I S A により測定されたタンパク質量を O C I F の分子量で除算することにより得られる O C I F 物質の分子数を、1) においてロウリー法により測定されたタンパク質量を O C I F の分子量で除算することにより得られる O C I F の分子数で除算することにより、同じく免疫学的検出率を算出することができる。

【 0 1 3 4 】

結果を表 7 にまとめた。

【 0 1 3 5 】

【 表 7 】

10

処方名	(E L I S A 法による測定値) / (L o w r y 法による測定値)
-----	--

処方 6	1. 0 7	20
処方 7	0. 7 4	
処方 8	0. 8 8	
処方 2 2	1. 0 6	
処方 2 4	1. 0 2	
処方 2 5	0. 8 7	
処方 2 7	1. 0 4	
O C I F	1. 0 6	30

試験例 1 . O C I F 及びデキストラン硫酸からなる複合体の血中滞留性

1) 実験動物への注射剤の投与と採血

ウィスター系雌性ラット 5 週齢 (体重約 1 0 0 g) を 1 晩絶食させた。

【 0 1 3 6 】

実施例 1 に記載の処方 1 乃至 4 0、実施例 2 に記載の処方 4 1 並びに参考例 1 に記載の参考処方 1 及び 2 のいずれか一つを、0 . 0 1 % ポリソルベート 8 0 を含有する P B S (p H 7 . 4) で適宜希釈して注射剤とし、2 m l / 体重 k g となるようにラット尾静脈内に単回投与した。投与後 6 時間経過した時点でラット心臓より採血した。

40

2) 血清の分画と O C I F の定量

血液を室温にて 3 0 分静置することにより凝固させた後、直径 1 0 c m ローターを使用した 1 4 0 0 0 r p m 3 分間の遠心分離により血清を上清として得た。

3) 血清中の O C I F の定量

9 6 穴マイクロタイタープレート (M a x i s o r p : N U N C 社製) 上の各ウェルに、抗ヒト O C I F モノクローナル抗体 O I - 1 9 (W O 9 9 / 1 5 6 9 1 号公報参照参照 : F E R M B P - 6 4 2 0) を 0 . 1 M 炭酸水素ナトリウム溶液へ 1 0 μ g / m l となるように溶解せしめたもの 1 0 0 μ を分注し、シールして 4 にて 1 晩静置した。次いで、抗体溶液をデカントにより除去し、各ウェルに 3 0 0 μ l のブロッキング緩衝液 (5 0 % B l o c k A c e : 大日本製薬 (株) より購入) を添加し、室温 2 時間静置した。次

50

いで、0.1%ポリソルベート20を含有するPBS (pH 7.4) 300 μ lで、各ウェルを3回洗浄した。次いで、被検血清20 μ lに、精製水100 μ l及び希釈緩衝液(組成: 0.2 M Tris - 塩酸、40% Block Ace: 大日本製薬(株)より購入)、10 μ g/ml マウスイムノグロブリンG、0.1%ポリソルベート20: pH 7.4) 120 μ lを添加、混合した。対照として、20 μ lの蒸留水に、水100 μ l及び既知濃度のOCIF 2量体を含有する希釈緩衝液120 μ lを添加して混合した。これらの被検試料100 μ lを各ウェルに添加し、室温にて2時間保温した。次いで、0.1%ポリソルベート20を含有するPBS (pH 7.4) 300 μ lで、各ウェルを6回洗浄した。次いで、各ウェルに、実施例4の1)で得られたPOD-OI-4の原液を[0.2 M Tris - 塩酸、25% Block Ace (大日本製薬(株)より購入)、10 μ g/ml マウスイムノグロブリンG、0.1%ポリソルベート20 (pH 7.4)]で1000倍希釈したもの100 μ lを添加し、室温にて2時間保温した。次いで、0.1%ポリソルベート20を含有するPBS (pH 7.4) 300 μ lで、各ウェルを6回洗浄した。次いで、各ウェルに、基質溶液(TMB soluble reagent: Scytek社製)100 μ lを添加し、室温にて10乃至15分間保温した。次いで、各ウェルに反応停止液(TMB stop buffer: Scytek社製)100 μ lを添加した。攪拌振とう器(マイクロプレートミキサーNS-P: 井内盛栄堂(株)製)を用いて穏やかに攪拌した後、マイクロプレートリーダー(SPECTRA THERMO: TECAN社製)を用いて波長 λ 450 nmにおける各ウェルの吸光度を測定した。

10

20

【0137】

標準溶液を用いて作成した検量線より、被検血清中のOCIF濃度を算出した。

【0138】

1)で調製した各注射剤中のOCIF濃度を、血清の場合と同様に測定することにより、単位体重当たりのOCIFの投与量(mg/kg)として算出した。

4)各処方血中の滞留性

前記2)で得られた血清中のOCIF及びDSからなる複合体の量を、前記3)記載の方法に従って測定した。

【0139】

結果を表8にまとめた。

【0140】

30

【表8】

処方	投与量 (OCIF mg/kg)	血清中濃度 (OCIF ng/ml)	補正血清中濃度* (OCIF ng/ml)	
処方1	0.5	213		
処方2	0.5	350		
処方3	0.5	191		10
処方4	0.5	370		
処方5	0.5	305		
処方6	0.5	209		
処方7	0.5	371		
処方8	0.5	571		
処方9	0.5	164		
処方10	0.5	174		20
処方11	0.5	235		
処方12	0.5	249		
処方13	0.5	177		
処方14	0.5	271		
処方15	0.5	313		
処方16	0.5	359		
処方17	0.5	269		30
処方18	0.6	400	351	
処方19	0.4	526	614	
処方20	0.4	553	760	
処方21	0.1	132	611	
処方22	0.6	752	651	
処方23	0.5	340		
処方24	0.5	830		40
処方25	0.5	165		

処方26	0.5	574		
処方27	0.5	584		
処方28	0.5	228		
処方29	0.5	231		
処方30	0.5	620		
処方31	0.5	338		
処方32	0.5	774		10
処方33	0.5	879		
処方34	0.5	667		
処方35	0.2	318	795	
処方36	0.1	114	570	
処方37	0.5	535		
処方38	0.4	631	789	
処方39	0.5	366		20
処方40	0.5	423		
処方41	0.4	423	508	
参考処方1	0.5	75		
参考処方2	0.5	24		

***補正血清中濃度は、単位体重当たりのOCIFの投与量を0.5mg/kgに換算したときの血清中濃度。**

30

表8に示す通り、0.5mg/体重kgを投与した場合の、投与後6時間の血清中濃度は、従来公知の参考処方1と比較して、2.2乃至11.7倍高かった。

【0141】

【発明の効果】

本発明の提供する、OCIF物質及び多糖物質からなる複合体を含有する骨代謝異常症の予防又は治療剤は、血中滞留性に優れ、骨粗鬆症、高カルシウム血症、癌の骨転移、慢性関節リウマチ等のリウマチによる骨減少、ステロイド投与による骨減少、多発性骨髄腫、腎臓疾患に伴う減少又は高カルシウム血症、腎性骨異常栄養症、変形性関節症等の予防又は治療に有用である。

40

【0142】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

⟨110⟩ Sankyo Company, Limited

10

⟨120⟩ A therapeutic agent comprising osteoclastogenesis inhibitory factor

⟨130⟩ 2002132SW

20

⟨140⟩

⟨141⟩

⟨160⟩ 1

30

⟨170⟩ PatentIn version 2.1

⟨210⟩ 1

⟨211⟩ 401

⟨212⟩ PRT

40

⟨213⟩ Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> (-21)..(-1)

<223> Inventor: Yamamoto Shinichi ; Okada Junichi

Inventor: Kurihara Atsushi ; Numazawa Taku

10

Inventor: Kondo Junichi ; Tsuda Eisuke

Inventor: Mochizuki Shinichi ; Miyazaki Hideki

Inventor: Nishi Hirotaka

<220>

<221> mat_peptide

20

<222> (+1)..(+380)

<223>

<400> 1

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile

-20

-15

-10

30

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp

-5

-1 1

5

10

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr

15

20

25

40

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro

[illegible]

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
 190 195 200

Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
 205 210 215

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
 220 225 230 235

10

Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln
 240 245 250

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
 255 260 265

20

Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
 270 275 280

Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys
 285 290 295

30

Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
 300 305 310 315

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser
 320 325 330

Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr
 335 340 345

40

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu

350

355

360

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys

365

370

375

10

Leu

380

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/04	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	B
// C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	

- (72)発明者 岡田 純一
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
- (72)発明者 栗原 厚
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
- (72)発明者 沼沢 琢
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
- (72)発明者 近藤 淳一
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
- (72)発明者 津田 英資
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
- (72)発明者 望月 伸一
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
- (72)発明者 宮崎 秀樹
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
- (72)発明者 西 宏高
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 DA36 FB03 FB06 FB07
4C076 CC14 CC21 CC27 EE30 EE59
4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 NA12 ZA672 ZA812
ZA962 ZA972 ZB152 ZB262 ZC212
4H045 BA10 CA40 EA20

专利名称(译)	含有破骨细胞生成抑制因子的治疗剂		
公开(公告)号	JP2004203747A	公开(公告)日	2004-07-22
申请号	JP2002371193	申请日	2002-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
[标]发明人	山本真一 岡田純一 栗原厚 沼沢琢 近藤淳一 津田英資 望月伸一 宮崎秀樹 西宏高		
发明人	山本 真一 岡田 純一 栗原 厚 沼沢 琢 近藤 淳一 津田 英資 望月 伸一 宮崎 秀樹 西 宏高		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K47/36 A61K47/48 A61P1/02 A61P3/14 A61P13/12 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 C07K14/47 G01N33/15 G01N33 /53 G01N33/543 G01N33/577		
FI分类号	A61K37/02.ZNA A61K47/36 A61K47/48 A61P1/02 A61P3/14 A61P13/12 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/577.B C07K14/47 A61K38/00 A61K38/16 A61K47/50 A61K47/61		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 4C076/CC14 4C076 /CC21 4C076/CC27 4C076/EE30 4C076/EE59 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/NA12 4C084/ZA672 4C084/ZA812 4C084/ZA962 4C084 /ZA972 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZC212 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20		
代理人(译)	矢口俊明		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供包含在血液中具有优异保持性的破骨细胞生成抑制因子的治疗剂。ŽSOLUTION：骨代谢障碍的预防或治疗剂包含一种或两种或多种物质[破骨细胞生成抑制因子物质 (OCIF 物质)]，选自OCIF，其类似物及其突变体和一种或两种或多种物质 (多糖物质) 选自多糖及其衍生物作为活性成分。Ž

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 47/36	A 6 1 K 47/36	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 C O 8 4
A 6 1 P 1/02	A 6 1 P 1/02	4 H O 4 5
A 6 1 P 3/14	A 6 1 P 3/14	
審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 41 頁) 最終頁		

(21) 出願番号	特願2002-371193 (P2002-371193)	(71) 出願人	000001856
(22) 出願日	平成14年12月24日 (2002.12.24)		三井株式会社
			東京都中央区日本橋本町3丁目5番
		(74) 代理人	100081400
			弁理士 大野 彰夫
		(74) 代理人	100082716
			弁理士 中田 ▲やす▼雄
		(74) 代理人	100115750
			弁理士 矢口 敬昭
		(74) 代理人	100119622
			弁理士 金原 玲子
		(72) 発明者	山本 真一
			東京都品川区江東区1丁目2番8号