

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5860401号
(P5860401)

(45) 発行日 平成28年2月16日(2016.2.16)

(24) 登録日 平成27年12月25日(2015.12.25)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	Z N A B
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C O 7 K	14/47	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	37/04	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	

請求項の数 7 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-531976 (P2012-531976)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月2日(2011.9.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/070048
 (87) 国際公開番号 W02012/029954
 (87) 国際公開日 平成24年3月8日(2012.3.8)
 審査請求日 平成25年3月4日(2013.3.4)
 (31) 優先権主張番号 特願2010-197485 (P2010-197485)
 (32) 優先日 平成22年9月3日(2010.9.3)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

前置審査

(73) 特許権者 300032112
 森田薬品工業株式会社
 東京都中央区日本橋室町4丁目5番1号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100144794
 弁理士 大木 信人
 (72) 発明者 堀 均
 徳島県徳島市南常三島町2丁目1番地 国立大学法人徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規Gcグロブリンガラクトース脱糖体の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(i)~(iii):

(i) 脱ガラクトースしており、かつN-アセチルガラクトサミンに対してシアル酸が結合してなる糖鎖構造を有する、ヒト血漿または血清に由来する1fサブタイプのGcグロブリンのガラクトース脱糖体;

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号1で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにシアル酸が結合している糖鎖構造を有する、ヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体; および

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらに -マンノースが結合している糖鎖構造を有する、ヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 からなる群より選択される、一または複数のヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 を含む、マクロファージを活性化するための医薬組成物。

【請求項2】

さらに、脱ガラクトースしており、かつN-アセチルガラクトサミンからなる糖鎖構造を有する、ヒト血漿または血清に由来する2サブタイプのGcグロブリンのガラクトース脱糖体、および、

10

20

配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造を有する、ヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 からなる群より選択される、一または複数のヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 を含む、請求項1に記載のマクロファージを活性化するための医薬組成物。

【請求項3】

以下の(i)~(iii)：

(i) 脱ガラクトースしており、かつN-アセチルガラクトサミンに対してシアル酸が結合してなる糖鎖構造を有する、ヒト血漿または血清に由来する1fサブタイプのGcグロブリンのガラクトース脱糖体；

10

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号1で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにシアル酸が結合している糖鎖構造を有する、ヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体；および

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらに - マンノースが結合している糖鎖構造を有する、ヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 からなる群より選択される、一または複数のヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 を含む、血管新生を阻害するための医薬組成物。

20

【請求項4】

さらに、脱ガラクトースしており、かつN-アセチルガラクトサミンからなる糖鎖構造を有する、ヒト血漿または血清に由来する2サブタイプのGcグロブリンのガラクトース脱糖体、および、

配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造を有する、ヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、

からなる群より選択される、一または複数のヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 を含む、請求項3に記載の血管新生を阻害するための医薬組成物。

【請求項5】

30

以下の(i)~(iii)：

(i) 脱ガラクトースしており、かつN-アセチルガラクトサミンに対してシアル酸が結合してなる糖鎖構造を有する、ヒト血漿または血清に由来する1fサブタイプのGcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号1で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにシアル酸が結合している糖鎖構造を有する、ヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体；および

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらに - マンノースが結合している糖鎖構造を有する、ヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 からなる群より選択される、一または複数のヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 を含む、癌を治療するための医薬組成物。

40

【請求項6】

さらに、脱ガラクトースしており、かつN-アセチルガラクトサミンからなる糖鎖構造を有する、ヒト血漿または血清に由来する2サブタイプのGcグロブリンのガラクトース脱糖体、および、

配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造

50

を有する、ヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 かなる群より選択される、一または複数のヒトGcグロブリンのガラクトース脱糖体、
 を含む、請求項5に記載の癌を治療するための医薬組成物。

【請求項7】

請求項1～6のいずれか1項記載の医薬組成物であって、ヒト血漿または血清ならびにヒトGcグロブリンが該医薬組成物を投与される被験体の血漿または血清に由来する、上記医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血漿または血清に由来するGcグロブリンのガラクトース脱糖体を製造する方法および当該脱糖体を有効成分として含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

怪我をしたとき、動物は自然に治癒する能力を持っている。このとき、血清中の糖タンパク質であるGcグロブリンは、炎症反応によって脱糖され、生体内で最終的にN-アセチルガラクトサミンを糖鎖構造に持つGcMAFへと変換される。このGcMAFがマクロファージを活性化させる。すなわち、Gcグロブリンは、GcMAFの前駆体として機能する（非特許文献1）。

【0003】

GcMAFは、マクロファージ活性化作用および/または抗血管新生機構を介して様々な腫瘍形成を抑制または遅延させ、また形成腫瘍に対しては増殖抑制作用を示すことが報告されている（非特許文献2-11、特許文献1）。

【0004】

GcMAFが有する抗腫瘍効果が明らかになるに伴いその臨床応用が期待されるが、未だに治療薬として開発がなされていないのが現状である。

【0005】

その理由のひとつには、原料となる規格化されたGcグロブリンを集めることの難しさがあげられる。

【0006】

ヒトGcグロブリンには、ガラクトース、シアル酸、マンノース、N-アセチルガラクトサミンの糖鎖が付いているとされるが、少なくとも(1f, 1sおよび2)の3種類のサブタイプが存在している。そして、1のタイプには糖が3つ、2のタイプには糖が2つあるとされる。さらに、ヒト血清中には両親から1種類ずつのGcグロブリン種が含まれるので、これだけでも、ヒト個人に存在するタイプは、(1f, 1f)、(1f, 1s)、(1f, 2)、(1s, 1s)、(1s, 2)、(2, 2)の6通り、さらに詳しく云えば(1f, 1f)、(1s, 1s)、(2, 2)のホモタイプと(1f, 1s)、(1f, 2)、(1s, 2)のヘテロタイプの亜種が存在する。

【0007】

各サブセットについて、マクロファージ活性化に関連する糖鎖の構造が明らかにされている。1fの1タイプでは418と420番目にスレオニンが位置し、418または420番目のいずれかのスレオニンにN-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにガラクトースおよびシアル酸の糖が結合している。1sの1タイプでは418と420番目にスレオニンが位置し、418または420番目のいずれかのスレオニンにN-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにガラクトースおよびマンノースが結合している。2タイプでは418番目にスレオニンがみられ、この位置にN-アセチルガラクトサミンが結合し、さらにガラクトースが結合している（非特許文献12, 13）。

【0008】

このうち、1f1fタイプのヒト血清Gcグロブリンの脱糖の反応については明らかに

10

20

30

40

50

されており、すなわち、生体内で炎症が起こると、Bリンパ球の - ガラクトシダーゼの活性化が起こり、これによって脱ガラクトースされたGcグロブリンが、さらにT細胞のシアリダーゼによって脱シアル酸され、N - アセチルガラクトサミン末端のみを持つGcMAFとなる。

【0009】

上記のとおりヒト血清中には、少なくとも3種類のGcグロブリンサブセットが含まれており、また全てのサブセットについてその脱糖反応の過程が明らかにされているわけではない。先に述べたGcMAFは1f, 1fのホモタイプのみを使って製造されるのみである。このため、集められた血清、血漿タンパク質、またはGcグロブリンを用いて、大量かつ容易に、すなわち規格化された方法によって、GcMAFを製造する技術は確立されておらず、当該分野においてはGcMAFを製造するための新たな手法が求められていた。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特表2003-532682号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Yamamoto N. ̄、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8539 - 8543 (1991).

20

【非特許文献2】Yamamoto N. ̄、Int. J. Cancer., 122(2), 461 - 7 (2008).

【非特許文献3】Yamamoto N. ̄、Transl. Oncol., 1(2), 65 - 72 (2008).

【非特許文献4】Yamamoto N. ̄、Cancer Immunol. Immunother., 57(7), 1007 - 16 (2008).

【非特許文献5】Yamamoto N. ̄、Cancer Res., 57, 2187 - 92 (1997)

【非特許文献6】Koga ̄、Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 220, 20 - 6 (1999)

30

【非特許文献7】Korbelik ̄、Br. J. Cancer. 75, 202 - 7 (1997)

【非特許文献8】Yamamoto ̄、Cancer Res., 56, 2827 - 31 (1996)

【非特許文献9】橋谷進ら、日本口腔科学会雑誌、46(5):532(1997)

【非特許文献10】Kiser, O. ̄、Neoplasia, 5:32 - 40 (2003)

【非特許文献11】Onizuka S ̄、Pancreas 28(3):317 - 319 (2003)

【非特許文献12】Mohamad S. B. ̄、Anticancer Res., 23(6A), 4451 - 7, 2003.

40

【非特許文献13】Nagasawa H. ̄、Anticancer Res., 24(5C), 3361 - 6, 2004.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、集められた血清、血漿タンパク質、またはGcグロブリンより、容易に製造することができ、かつGcMAFとして利用可能なGcグロブリン誘導体を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

50

本発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意検討した結果、Gcグロブリンのサブセットに関係なく、Gcグロブリンに α -ガラクトシダーゼを作用させて得られるガラクトース脱糖体が、GcMAFとして利用可能であること、あるいは*in vivo*または*in vitro*で活性化させることによって簡単にGcMAFへと変換できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0014】

すなわち、本発明は以下の特徴を有する。

【0015】

[1] 血漿または血清に由来するGcグロブリンと α -ガラクトシダーゼを反応させて、該Gcグロブリンのガラクトース脱糖体を製造する方法。

10

【0016】

[2] Gcグロブリンが血漿または血清より単離または粗精製されたものである、[1]の方法。

【0017】

[3] さらに、製造されたガラクトース脱糖体をリンパ球またはリンパ球の培養上清と接触させるステップを含む、[1]または[2]の方法。

【0018】

[4] [1]～[3]のいずれかの方法によって製造された、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体。

【0019】

[5] 以下の(i)～(iv)：

(i) [4]のGcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号1で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにシアル酸が結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらに α -マンノースが結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体；および

(iv) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体、
からなる群より選択される、一または複数のGcグロブリンのガラクトース脱糖体、を含む、マクロファージを活性化するための医薬組成物。

20

30

【0020】

[6] 以下の(i)～(iv)：

(i) [4]のGcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号1で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにシアル酸が結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらに α -マンノースが結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体；および

(iv) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体、
からなる群より選択される、一または複数のGcグロブリンのガラクトース脱糖体、を含

40

50

む、血管新生を阻害するための医薬組成物。

【0021】

[7] 以下の(i)~(iv)：

(i) [4]のGcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号1で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにシアル酸が結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらに - マンノースが結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体；および

(iv) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体、

からなる群より選択される、一または複数のGcグロブリンのガラクトース脱糖体、を含む、癌を治療するための医薬組成物。

【0022】

[8] [5]~[7]のいずれかの医薬組成物であって、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体が該医薬組成物を投与される被験体の血漿または血清に由来するGcグロブリンを材料として製造されたものである、上記医薬組成物。

【0023】

[9] 癌を治療する方法であって、以下の(i)~(iv)：

(i) [4]のGcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号1で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにシアル酸が結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらに - マンノースが結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体；および

(iv) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体、

からなる群より選択される、一または複数のGcグロブリンのガラクトース脱糖体、を癌患者に投与することを含む、上記方法。

【0024】

[10] Gcグロブリンのガラクトース脱糖体が、該ガラクトース脱糖体を投与される癌患者の血漿または血清に由来するGcグロブリンを材料として製造されたものである、[9]の方法。

【0025】

[11] 癌患者における癌の治療に使用するための、以下の(i)~(iv)：

(i) [4]のGcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号1で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにシアル酸が結合している糖鎖構造を有する、Gcグロブリンのガラクトース脱糖体；

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラク

10

20

30

40

50

トサミンが結合しており、このN - アセチルガラクトサミンに対してさらに - マンノースが結合している糖鎖構造を有する、G c グロブリンのガラクトース脱糖体；および (iv) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N - アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造を有する、G c グロブリンのガラクトース脱糖体、

からなる群より選択される、一または複数のG c グロブリンのガラクトース脱糖体。

【0026】

[12] [11]のG c グロブリンのガラクトース脱糖体であって、該ガラクトース脱糖体が該ガラクトース脱糖体を投与される癌患者の血漿または血清に由来するG c グロブリンを材料として製造されたものである、上記G c グロブリンのガラクトース脱糖体。

10

【0027】

[13] 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N - アセチルガラクトサミンが結合しており、このN - アセチルガラクトサミンに対してさらに - マンノースが結合している糖鎖構造を有する、G c グロブリンのガラクトース脱糖体；または配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ該配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N - アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造を有する、G c グロブリンのガラクトース脱糖体。

【0028】

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2010-197485号の明細書および / または図面に記載される内容を包含する。

20

【発明の効果】

【0029】

本発明により、G c グロブリンのサブタイプに関係なく、容易に製造することができ、かつG c M A Fとして利用可能なG c グロブリンガラクトース脱糖体を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、C B B 染色した精製物(1 f 1 f G c X)のS D S - P A G E 電気泳動像を示す。P：ポジティブコントロール(G c タンパク質：シグマ社)、G c X：プレG c M A F 精製物(1 f 1 f G c X)、M：マーカー

30

【図2】図2は、ヒト抗G c グロブリン抗体を用いたプレG c M A F 精製物(1 f 1 f G c X)のウェスタンブロットの結果を示す。一次抗体：抗ヒトG c グロブリン(10,000倍希釈,1時間室温にて反応させた)。二次抗体：抗ウサギH R P - I g G (10,000倍希釈,1時間室温にて反応させた)。感光30秒。P：ポジティブコントロール(G c タンパク質：シグマ社)、G c X：プレG c M A F 精製物(1 f 1 f G c X)、M：マーカー

【図3 - 1】図3 - 1は、P N A レクチンを用いたプレG c M A F 精製物(1 f 1 f G c X)のウェスタンブロットの結果を示す。一次抗体：P N A レクチン(10,000倍希釈,1時間室温にて反応させた)。二次抗体：ストレプトアビジン(10,000倍希釈,1時間室温にて反応させた)。感光1分間。G c：G c グロブリン；G c X：プレG c M A F 精製物(1 f 1 f G c X)。

40

【図3 - 2】図3 - 2は、H P A レクチンを用いたプレG c M A F 精製物(1 f 1 f G c X)のウェスタンブロットの結果を示す。一次抗体：H P A レクチン(10,000倍希釈,1時間室温にて反応させた)。二次抗体：ストレプトアビジン(10,000倍希釈,1時間室温にて反応させた)。感光1分間。M A F：精製G c M A F；G c X：プレG c M A F 精製物(1 f 1 f G c X)。

【図4 - 1】図4 - 1は、プレG c M A F 精製物(1 f 1 f G c X)のマクロファージ貪食活性化能を示す特性図である。

【図4 - 2】図4 - 2は、腹腔非付着細胞との予備培養を行ったプレG c M A F 精製物(

50

1 f 1 f G c X) のマクロファージ貪食活性化能を示す特性図である。

【図4-3】図4-3は、原料である1 f 1 fタイプのG cグロブリン(1 f 1 f G c)のマクロファージ貪食活性化能を示す特性図である。図中、*印は実験2の結果を示す。

【図5-1】図5-1は、プレG c M A F精製物(1 s 1 s G c X)のマクロファージ貪食活性化能を示す特性図である。図中、*印は実験2の結果を示す。

【図5-2】図5-2は、原料である1 s 1 sタイプのG cグロブリン(1 s 1 s G c)のマクロファージ貪食活性化能を示す特性図である。図中、*印は実験2の結果を示す。

【図6-1】図6-1は、プレG c M A F精製物(2 2 G c X)のマクロファージ貪食活性化能を示す特性図である。図中、*印は実験2の結果を示す。

【図6-2】図6-2は、原料である2 2タイプのG cグロブリン(2 2 G c)のマクロ

10

ファージ貪食活性化能を示す特性図である。図中、*印は実験2の結果を示す。
【図7】図7は、プレG c M A F精製物(1 f 1 f G c X)による抗癌効果を示す特性図である。数値およびエラーバーはn=3-4で行った実験のmean±SEMを示す。図中、黒は2mm以上の大きさまで成長した腫瘍の数を示し、白は2mm未満の大きさの腫瘍の数を示す。また、図中のアスタリスク(*)および(**)はBonferroniの多重比較検定により、無処置群に対する有意な減少(p<0.05)および(p<0.01)をそれぞれ示す。

【図8】図8は、各プレG c M A F精製物(2 2 G c X、1 s 1 s G c X、1 f 1 f G c X)による抗癌効果を示す特性図である。数値およびエラーバーはn=3-4で行った実験のmean±SEMを示す。図中、黒は2mm以上の大きさまで成長した腫瘍の数を示し、白は2mm未満の大きさの腫瘍の数を示す。また、図中のアスタリスク(***)はBonferroniの多重比較検定により、無処置群に対する有意な減少(p<0.001)を示す。

20

【図9】図9は、1 fサブタイプのG cグロブリンのアミノ酸配列(配列番号1)を示す。

【図10】図10は、1 sサブタイプのG cグロブリンのアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図11】図11は、2サブタイプのG cグロブリンのアミノ酸配列(配列番号3)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本発明は、G cタイプに関係なく、簡単につくれ、かつ、G c M A Fとして利用可能な、あるいは簡単にG c M A Fに変換する機能を持つG cグロブリンのガラクトース脱糖体(プレG c M A F)の製造方法に関する。

30

【0032】

本発明方法は、血漿または血清に由来するG cグロブリンと -ガラクトシダーゼを反応させる工程を含む。

【0033】

本発明において利用できるG cグロブリンは、血漿、好ましくは血清に由来する。G cグロブリンは血清中に300~500mg/l程度含有され、血清タンパク中で20番目に多いタンパク質とされる。したがって、血漿または血清を利用することによって、効率的かつ大量にG cグロブリンを得ることができる。

40

【0034】

G cグロブリンは、血漿または血清中に含まれる形態であっても良いし、あるいは粗精製物の形態であっても、単離された形態であっても良い。「粗精製物の形態」とは、実質的に純粋なG cグロブリンとされたものではなく、不純物を含んだ状態をいう。ここで「実質的に純粋」とは、95%以上、好ましくは99%以上の純度を意味する。また、「単離された形態」とは、95%以上、好ましくは99%以上の純度を意味する。好ましくは、単離された形態である。

【0035】

血漿または血清よりG cグロブリンを単離・精製する方法は、タンパク質精製に通常用いられる公知の方法、例えば、硫酸塩析、有機溶媒(エタノール、メタノール、アセトン

50

等)による沈殿分離、イオン交換クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、吸着カラムクロマトグラフィー、基質または抗体などを利用したアフィニティークロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー、精密ろ過、限外ろ過、逆浸透ろ過等の濾過処理など、を1つまたは複数を適宜組み合わせ用いて精製することができる。好ましくは、アクチン結合カラム、25-ヒドロキシ-ビタミンD₃結合カラム、抗Gcグロブリン抗体結合カラムなどのアフィニティカラムに血漿または血清をアプライし特異的にGcグロブリンを結合させて、別のタンパク質を適当な洗浄液で遊離させ、その後、適当な溶出液でGcグロブリンを溶出する。また、25-ヒドロキシ-ビタミンD₃結合樹脂によるバッチ式で行うこともできる。樹脂にGcグロブリンを吸着させ、洗浄後、酢酸緩衝液あるいはグアニジン液などで溶出させる。溶出液は、セントリコンなどを使用して緩衝液を置換、濃縮することができる。なお、25-ヒドロキシ-ビタミンD₃は、25位が水酸化されているビタミンD₃であって、Gcグロブリンに対する特異的結合力が極めて高く、これを用いることによって血漿または血清中のGcグロブリンを高い純度で分離、精製することができる。また、血漿よりGcグロブリンを透析する方法が公知であり(例えば、特表2005-508892)、本発明においては当該方法を利用することもできる。

10

【0036】

また、本発明において利用できるGcグロブリンには、遺伝子組換え技術(例えば、特表平11-511962)を用いて人工的に製造されたGcグロブリン、すなわちGcグロブリンをコードする核酸を用いて適切な宿主細胞で組み換え的に発現させて得られるものも含まれる。Gcグロブリンのアミノ酸配列は公知であり、GenBank等のデータベースに登録されており、これらの配列情報を利用することができる。

20

【0037】

本発明において利用できる -ガラクトシダーゼは、いずれの生物由来のものであってもよく、あるいは -ガラクトシダーゼをコードする核酸を用いて適切な宿主細胞で組み換え的に発現させて得られる組換え酵素でもよい。 -ガラクトシダーゼは、粗精製形態、精製形態、固定化形態などの任意の形態を採ることが可能である。粗精製形態には、例えば細胞培養からの処理物(例えば、抽出物、凍結乾燥物など)が含まれる。また、市販の -ガラクトシダーゼ(例えばGrade III from Bovine Liver (SIGMA))を利用することもできる。固定化形態とは、適当な固相に固定された状態を意味する。このような固相の材料としては、例えば、セルロース、ニトロセルロースなどのセルロース誘導体、セファロース、アガロース、金属、ガラス、セラミック、樹脂など(これらに限定されない)が挙げられる。固相の形状および材質は特に限定されるものではない。

30

【0038】

脱糖反応は、20~60分、好ましくは35~42分、より好ましくは37.5分にて、0.5~5時間、好ましくは、0.5~2時間、Gcグロブリンに -ガラクトシダーゼを作用させることにより行う。反応pHは、pH5~pH11、好ましくは中性域とする。脱糖反応のステップは、バッチ方式で行っても良いし、連続方式で行っても良い。

【0039】

Gcグロブリンにおけるいずれのサブタイプにおいても、糖鎖の中心であるN-アセチルガラクトサミンにガラクトースがO-グリコシド結合している共通の構造を有する。したがって、いずれのGcグロブリンサブタイプを用いたとしても、 -ガラクトシダーゼを作用させることによって、ガラクトース脱糖体を誘導することができる。以下、本発明において、当該ガラクトース脱糖体を「プレGcMAF」と記載する。したがって、「プレGcMAF」には、1fサブタイプに由来する-(SA)-GalNAc糖鎖構造を有するもの、1sサブタイプに由来する-(MAN)-GalNAc糖鎖構造を有するもの、および/または2サブタイプに由来する-GalNAc糖鎖構造を有するものが、材料として用いた血漿または血清中に含まれるサブタイプに応じて任意の組み合わせで含まれ得る。

40

50

【0040】

本発明において、プレGcMAFは、Gcグロブリンサブタイプの種類に応じて、以下の構造を有する。

【0041】

1fサブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAFは、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらにシアル酸が結合している糖鎖構造を有する。

【0042】

1sサブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAFは、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2で表されるアミノ酸配列における418または420番目のいずれかのスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合しており、このN-アセチルガラクトサミンに対してさらに -マンノースが結合している糖鎖構造を有する。

10

【0043】

2サブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAFは、配列番号3で表されるアミノ酸配列を含み、かつ配列番号3で表されるアミノ酸配列における418番目のスレオニンに、N-アセチルガラクトサミンが結合している糖鎖構造を有する。

【0044】

本明細書において、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列にはそれぞれ、各アミノ酸配列に、1~数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入を有し、かつGcグロブリンタンパク質の活性・機能を有するタンパク質をコードするアミノ酸配列も含まれる。ただし、ここで各アミノ酸配列において上記糖鎖構造を有する418または420番目のスレオニンは保存されている。「Gcグロブリンタンパク質の活性・機能」としては公知のものが挙げられ、ビタミンD₃と結合して、ビタミンD₃を目的の組織に運ぶキャリアータンパク質としての機能や、細胞の分裂、形態変化および運動などの調節に関するアクチンの重合を調節する機能（F-アクチンの脱重合促進とG-アクチンの再重合の阻止作用など）や、上記のとおりGcMAFへと変換されマクロファージを活性化する機能などが挙げられる。各機能の検出および測定方法は、公知の手法により行うことができる。「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個、あるいは1個または2個である。

20

30

【0045】

また、本明細書において、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列にはそれぞれ、各アミノ酸配列とBLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information)(米国国立生物学情報センターの基本ローカルアライメント検索ツール)等(例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータ)を用いて計算したときに、90%、95%、99%、またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、好ましくは当該アミノ酸列からなり、かつGcグロブリンタンパク質の活性・機能を有するタンパク質をコードするアミノ酸配列も含まれる。ただし、ここで各アミノ酸配列において上記糖鎖構造を有する418または420番目のスレオニンは保存されている。

40

【0046】

ここで、「同一性」とは、2つのアミノ酸配列にギャップを導入して、またはギャップを導入しないで整列させた場合の、最適なアライメントにおいて、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合(パーセンテージ)を意味する。同一性は、当業者に周知の方法、配列解析ソフトウェア等(例えばBLAST、FASTAなどの公知のアルゴリズム)を使用して求めることができる。

【0047】

50

プレGcMAFは、材料中に複数のGcグロブリンサブタイプが含まれていたとしても、一律に一種類の酵素（ α -ガラクトシダーゼ）のみを用いて製造することができ、サブタイプに応じて酵素の種類を変える必要がないために、迅速かつ大量に、また一方で患者に対して個別的に、プレGcMAFを製造することができる。

【0048】

製造されたプレGcMAFは、さらなる精製工程に供しても良い。当該精製工程においては、プレGcMAFがGcグロブリンと同じ性質を持つことから、上記Gcグロブリンの精製に用いられる方法を適宜用いて行うことができる。

【0049】

下記実施例にて詳述するように、本発明のプレGcMAFは材料として用いるGcグロブリンサブタイプの種類に応じて、マクロファージを活性化する作用が相違する。ここで「マクロファージを活性化する作用」とは、マクロファージの貪食能（特にFcレセプターを介する貪食能）や活性酸素産生能および抗原提示作用を高める作用を意味する。なお、本明細書において、「マクロファージの貪食能」を「マクロファージの貪食活性」と記載する場合があるが、これらの用語は相互互換的に用いることができる。1fサブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAFそれ自体では、GcMAFと異なりマクロファージを活性化する作用を有していない。1fサブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAFは、リンパ球、特にTリンパ球と接触させることによって、GcMAFへと変換されマクロファージを活性化する作用を得ることができる。実際、1fサブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAFをリンパ球と接触させることによって、上清中にマクロファージを活性化する作用が得られる。あるいは、1fサブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAFは患者生体内へ投与されることによって、患者生体内のリンパ球と接触して、GcMAFへと変換されマクロファージを活性化する作用を得ることができる。一方、1sサブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAFおよび2サブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAFでは、それ自体単独でマクロファージを活性化作用を有し、その作用はリンパ球と接触させても保持される。

【0050】

このようにして作製されたプレGcMAFは様々な疾患・障害を治療および予防するための医薬組成物の有効成分として利用することができる。

【0051】

当該医薬組成物に含まれるプレGcMAFは、血漿または血清を材料として製造される。また、当該医薬組成物を投与される被験体と同一のGcグロブリンサブセットを含む血漿または血清を材料として製造することができる。さらに好ましくは、当該医薬組成物に含まれるプレGcMAFは、当該医薬組成物を投与される被験体自身の血漿または血清を材料として製造されたものである。被験体自身の血漿または血清を材料として利用することによって、製造されたプレGcMAFや当該血漿または血清に含まれるタンパク質および/またはその誘導体を、ウイルス感染症伝搬、不規則抗体の産生、発熱・アナフィラキシーなどの問題を生じることなく、被験体に投与することができる。本発明において、「被験体」はヒトおよび非ヒト哺乳動物が含まれるが、好ましくはヒトである。

【0052】

また、当該医薬組成物に含まれるプレGcMAFは、上記リンパ球等または当該細胞の培養液と接触させていなくても良いし、上記リンパ球等または当該細胞の培養液と接触させることによって活性化された状態（すなわち、GcMAFへと変換された状態）であっても良い。

【0053】

当該医薬組成物を用いて治療し得る疾患・障害としては、例えば、マクロファージの活性化や血管新生の阻害によって治療し得ることが公知である、または治療し得る可能性がある疾患や障害が挙げられ、創傷治癒、アレルギー疾患、自己免疫疾患、治療薬による副作用、癌、癌以外の血管新生疾患などが挙げられるが、これらに限定されない。「癌」としては、黒色腫、転移、腺癌、肉腫、胸腺腫、リンパ腫、肺腫瘍、肝臓腫瘍、結腸腫瘍、

10

20

30

40

50

腎臓腫瘍、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮腫瘍、胸部腫瘍、前立腺腫瘍、腎性腫瘍、卵巣腫瘍、脾臓腫瘍、脳腫瘍、精巣腫瘍、骨腫瘍、筋腫瘍、胎盤の腫瘍、胃性腫瘍など（これらに限定されない）が挙げられる。「癌以外の血管新生疾患」としては、糖尿病性網膜症、水晶体後繊維増殖症、トラコーマ、新血管形成緑内障、乾癬、免疫性炎症（例えば、慢性関節リュウマチ、全身性紅斑性狼瘡、甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、全身性脈管炎、硬皮症、シェーグレン症候群、サルコイドーシス、原発性胆管性肝硬変、自己免疫疾患など）、非免疫性炎症、アテローム性動脈硬化症および過剰創傷修復などが挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 5 4 】

本発明の医薬組成物は、経口投与または非経口投与（例えば、静脈内投与、動脈内投与、注射による局所投与、腹腔または胸腔への投与、皮下投与、筋肉内投与、舌下投与、経皮吸収または直腸内投与など）によって投与することができる。

10

【 0 0 5 5 】

また、本発明の医薬組成物は、投与経路に応じて適当な剤形とすることができる。具体的には注射剤、懸濁剤、乳化剤、軟膏剤、クリーム剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、細粒剤、トローチ錠、直腸投与剤、油脂性坐剤、水溶性坐剤等の各種製剤形態に調製することができる。

【 0 0 5 6 】

これらの各種製剤は、通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、浸潤剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、着色料、香味剤、および安定化剤などを用いて常法により製造することができる。

20

【 0 0 5 7 】

賦形剤としては、例えば、乳糖、果糖、ブドウ糖、コーンスターチ、ソルビットおよび結晶セルロース、滅菌水、エタノール、グリセロール、生理食塩水、緩衝液などが、崩壊剤としては、例えば澱粉、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、炭酸カルシウム、クエン酸カルシウム、デキストリン、炭酸マグネシウムおよび合成ケイ酸マグネシウムなどが、結合剤としては、例えばメチルセルロースまたはその塩、エチルセルロース、アラビアゴム、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースおよびポリビニルピロリドンなどが、滑沢剤としては、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコールおよび硬化植物油などが、安定化剤としては、例えばアルギニン、ヒスチジン、リジン、メチオニンなどのアミノ酸、ヒト血清アルブミン、ゼラチン、デキストラン 40、メチルセルロース、亜硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウムなどが、その他の添加剤としては、シロップ、ワセリン、グリセリン、エタノール、プロピレングリコール、クエン酸、塩化ナトリウム、亜硝酸ソーダおよびリン酸ナトリウムなどがそれぞれ挙げられる。

30

【 0 0 5 8 】

また本発明の医薬組成物は、通常用いられている手法、例えば除菌フィルターを通す等によって、無菌的に作製することができる。

【 0 0 5 9 】

本発明の医薬組成物の投与量は、患者の年齢、体重、疾患の重篤度などの要因によって変化し得るが、プレGcMAFを、1回の投与につき体重1kgあたり0.4~4000ng、好ましくは20~2000ngの範囲から適宜選択される量を投与することができる。

40

【 0 0 6 0 】

本発明の医薬組成物の効果は、*in vivo*の系であれば、当該医薬組成物の投与前後における疾患部位の寛解、増悪、治癒などを評価することによって行うことができる。たとえば、創傷治癒効果については、医薬組成物の投与前後における創傷サイズおよび/またはケロイド形成を評価することによって行うことができる。本発明の医薬組成物の投与によって、創傷サイズおよび/またはケロイド形成が縮小していることが確認できる。また当該医薬組成物の抗腫瘍効果については、医薬組成物の投与前後における皮膚塊の測定、X線などを用いた一般的な腫瘍サイズおよび/またはケロイド形成を評価することに

50

よって行うことができる。本発明の医薬組成物の投与によって、皮膚塊や腫瘍サイズおよび/またはケロイド形成が縮小していることが確認できる。さらに、糖尿病性網膜症においては、医薬組成物の投与前後における網膜病巣を診断・評価することによって行うことができる。本発明の医薬組成物の投与によって、網膜病巣の改善、進行の欠如などが確認できる。なお、本発明の医薬組成物の効果の確認は、G c M A F投与による効果確認において、通常用いられている方法によって行うことができる。

【0061】

一方、*in vitro*の系では、プレG c M A Fの効果は、マクロファージの活性化作用によって評価することができる。一般的に、G c M A Fによるマクロファージの活性化作用は、マウス腹腔細胞を取り出し、無血清培地で予備培養を行い、付着細胞と非付着細胞に分け、その付着細胞にG c M A Fを加えて3時間培養した細胞で貪食活性を調べることによって確認することができる(Nagasawa H.ら、(2004)上掲)。上記のとおり、1 sサブタイプまたは2サブタイプのG c グロブリンに由来するプレG c M A Fの場合は、プレG c M A F自体がマクロファージの活性化作用を有するために、上記の手法を用いてプレG c M A Fの効果の評価することができる。一方、1 fサブタイプのG c グロブリンに由来するプレG c M A Fの場合は、プレG c M A F自体がマクロファージの活性化作用を有さないために、上記の手法を用いて評価することはできない。そこで、非付着細胞にプレG c M A Fを加え2時間培養した後、当該培養液を付着細胞に加えて3時間培養した細胞で貪食活性を調べることによって確認することができる。

【0062】

本発明は、さらに本発明の医薬組成物を用いた上記疾患・障害の治療および予防方法を包含する。

【0063】

本発明におけるプレG c M A Fは、血清のG c グロブリンからガラクトースのみを外したG c グロブリンである。1 sサブタイプまたは2サブタイプに由来する場合には、G c M A Fと同様に利用することができ、1 fサブタイプに由来するものであっても生体内環境では効率よく簡単にG c M A Fへと変換しG c M A Fと同様に利用することができる。このため、G c M A F同様、プレG c M A Fを患者に投与することによって、マクロファージの活性化作用や血管新生阻害作用、さらに患者の抵抗性や修復力の増強が期待できる。

【0064】

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものでない。

【実施例】

【0065】

実施例1：精製G c グロブリンを原料としたプレG c M A Fの合成と分取

(I) 血清からのG c グロブリンの回収

1 f 1 fサブタイプのG c グロブリンを有するヒトより採血した血液20 mlを、室温で30分静置後、4、10分間遠心分離(3000 rpm)し、血清10.3 mlを得た。

【0066】

血清3.5 mlにSTE緩衝液(pH 7.4, Tris·HCl 6.05 g, EDTA·2Na 0.56 g, NaCl 8.77 g, SDW 1000 ml, TRITON-100 1 ml)を3.5 ml加えて全量を7.0 mlとし、これを準備した25(OH)VD₃(徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部の堀研究室で合成)を結合したアフィニティカラム(10 mm x 80 mm)に0.4 ml/minで流した。さらに、STE緩衝液を90分間流した後、6 Mのグアニジン塩酸塩を2.0 ml/minで流して、溶出したタンパク質含有溶液約20 mlを回収した。回収液は、片側をクリップで留めた透析膜に注入して、反対側もクリップで留め、浮きをつけて5 mMリン酸緩衝液(リン酸ナトリウム緩衝液(SPB))4 L中に浮かべて透析を行った。透析開始

から90分後、180分後、さらに270分後に透析液を交換した。3回目は一夜透析とした。

【0067】

透析後、液を集めて、準備したヒドロキシアパタイトカラム (BioRad Bio-Scale™ Mini CHT Type III, 40 μM Cartridge, Catalog # 732-4332, LOT NO. B012409B) に 0.2 ml/min で流した。その後、5 mM リン酸緩衝液 (SPB) を 2.0 ml/min で流して洗浄し、ベースラインが落ち着いたところで、200 mM リン酸緩衝液 (SPB, pH 7.0) につないでグラジエントを行い、Gc グロブリン含有溶液としてほぼ 9 ml を回収した。これを、準備した centricon (MILLIPORE, Lot NO. R0DA20931, 30000 MVCO) に入れ、回収用チャップを付けて、アングルローターを取り付けた遠心器で 10 分間、遠心分離 (3900 G) して、精製 Gc グロブリン 742.67 μg / 300 μl を得た。

10

【0068】

なお、1s1s または 22 のサブタイプの Gc グロブリンを有するヒトからも、上記と同様の方法を用いて、精製 Gc グロブリンを得ることができた。

【0069】

(II) Gc グロブリンからのプレ Gc MAF の合成と濃縮

精製 Gc グロブリンの 25 μg に、10 mU / μl の - ガラクトシダーゼ (Grade III from Bovine Liver, SIGMA, Lot NO. 54H7025, G1875) 25 μl を加え、さらに 100 mM SPB (pH 7.0) 165 μl を加えて全量 200 μl とし、37.5 °C で 1 時間インキュベーションした。反応液を 25 (OH) VD₃ 結合ビーズ (徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部の堀研究室で合成) 1.0 g を加えた 2.0 ml のエッペンチューブに移し、4 °C にて 1 時間振とうした後、4 °C、2 分間遠心分離 (13,000 rpm) し、上澄み液を除いた。沈殿物に STE 緩衝液 0.5 ml を加えて 60 秒間振とうして、4 °C、2 分間遠心分離 (13,000 rpm) し上澄み液を除いた。この操作を 3 回繰り返した。次に、溶出液として 0.4 ml の 6 M グアニジン塩酸塩を加え 60 秒間振とうし、2 分間遠心分離 (13,000 rpm) した。これを 3 回繰り返す、液をあわせてプレ Gc MAF 含有抽出液とした。

20

30

【0070】

得られたプレ Gc MAF 含有抽出液を、準備した microcon (MILLIPORE, Lot NO. R9DN95311, 10000 MVCO) に入れ、回収用チャップを付けて、4 °C にて 10 分間、遠心分離 (13,500 rpm) して、10 mM SPB で緩衝液置換を行い、20 μl のプレ Gc MAF 精製物 (1f1fGcX) を得て、以下の実施例に用いた。

【0071】

実施例 2 : プレ Gc MAF 精製物 (1f1fGcX) の物性検査

(I) プレ Gc MAF 精製物 (1f1fGcX) の SDS-PAGE (CBB 染色) によるタンパク質の可視化、ヒト抗 Gc グロブリンを用いたウェスタンブロットおよび HPLC 解析

40

ビスニコニン酸 (BCA) タンパク質測定キット (PIERCE, Reagent A [Lot NO. HH106101, PROD # 23223], Reagent B [Lot NO. CE49183, PROD # 23224]) でプレ Gc MAF 精製物 (1f1fGcX) のタンパク質濃度を測定したところ、17.1 μg / 20 μl となった。

【0072】

また、SDS-PAGE のクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色像でタンパク質の可視化を行ったところ、分子量 56 kDa 付近に 1 本の濃いバンドがみられた (図 1)。

50

【0073】

このバンドは、ヒト抗Gcグロブリン抗体を用いたウェスタンブロットにおいて陽性反応を示したことから、Gcグロブリン誘導体であることが確認された(図2)。

【0074】

また、プレGcMAF精製物(1f1fGcX)のタンパク質バンドが単一バンドであったことから、HPLCによるタンパク質分析(280nm)を行ったところ、保持時間12.554minのシグマ社製のGcグロブリンピークに一致した。

【0075】

(II)プレGcMAF精製物(1f1fGcX)のPNAレクチン、HPAレクチンを用いたウェスタンブロッティング

10

プレGcMAF精製物(1f1fGcX)の糖鎖構造を調べるため、目的バンド(分子量56kDa付近の濃いバンド)のPNAレクチンを用いたウェスタンブロッティングを行った結果、精製GcグロブリンはPNAレクチンで染まったが、プレGcMAF精製物(1f1fGcX)はPNAレクチンでは染まらなかった(図3-1)。また、目的バンドのHPAレクチンを用いたウェスタンブロッティングを行った結果、精製GcMAF(徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部の堀研究室で合成)はHPAレクチンで染まったが、プレGcMAF精製物(1f1fGcX)の分子量56kDa付近のバンドはHPAレクチンでは染まらなかった(図3-2)。

【0076】

以上の結果より、GcグロブリンはGal-(SA)-GalNAc糖鎖構造、また、GcMAFはGalNAc糖鎖構造であるが、プレGcMAF精製物(1f1fGcX)の糖鎖構造はいずれにも属さないことが明らかとなった。

20

【0077】

実施例3-1:プレGcMAF精製物(1f1fGcX)によるマクロファージ貪食活性への影響(in vitro)

in vitroにおけるマウス腹腔マクロファージのFcレセプターを介するヒツジ赤血球(SRBC)の貪食試験において、Gcグロブリンはマクロファージの貪食活性に影響を与えないが、GcMAFはマクロファージの貪食活性を上昇させることが知られている(N.Yamamoto, N.P.Willett and D.D.Lindsay. Inflammation 1994;18(3):311-322.; N.Yamamoto, S.Homma and I.Millman. J.Immunol.1991;147:273-280.)。この知見に基づいて、1f1fサブタイプのGcグロブリンに由来するプレGcMAF精製物(1f1fGcX)の、マクロファージの貪食活性に及ぼす影響を調べた。

30

【0078】

プレGcMAF精製物のマクロファージの貪食活性に及ぼす影響は以下の手順で評価した。

【0079】

<実験1>

8週齢のICRマウス(雌)の腹腔にPBS 10mlを注入して腹腔内混合細胞を取り出し、4、1,000rpmで15分間遠心した。集めた細胞をRPMI1640培地で 1.0×10^6 細胞/mlに調節し、カバーグラスを沈めたプレートに 5.0×10^5 細胞/wellになるように500μlずつ播種した。当該細胞にRPMI培地を500μl加えて、37.5で1時間予備培養して、マクロファージをカバーグラスに定着させた。その後、上清を除き、付着したマクロファージ層を洗浄して、新しいRPMI培地を加えて37で15時間培養した。

40

【0080】

この準備したマクロファージ層に、それぞれ10ngのプレGcMAF精製物、10ngの精製GcMAF(徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部の堀研究室で合成)、または1μgのLPS(シグマ社)を加えて、37、3時間培養した。続いて、マクロファージに、IgGをコートした0.5%SRBCを加えて90分間貪食させた後、マクロファージを固定、ギムザ染色した。その後、顕鏡して貪食されたSRBCをカウント

50

して貪食指数 (ingestion index) を算出し、マクロファージの貪食活性を評価した。

【 0 0 8 1 】

< 実験 2 >

実験 1 の予備培養時の上清を回収し、回収した上清液約 1 m l に 1 0 n g のプレ G c M A F 精製物を加えて、3 7 ° C、1 時間培養した。その後、培養物を遠心分離して培地に含まれる非付着細胞を除き、この処理液を実験 1 と同様に準備したマクロファージ層に培養液として加えて、3 7 ° C、3 時間培養した。続いて、マクロファージに、I g G をコートした 0 . 5 % S R B C を加えて 9 0 分間貪食させた後、細胞を固定、ギムザ染色した。その後、顕鏡した後、貪食された S R B C をカウントして貪食指数 (ingestion index) を算出し、マクロファージの貪食活性を評価した。

10

【 0 0 8 2 】

なお、「コントロール」としてはマウス腹腔から抽出した腹腔液の上清 (上記実験 1 の予備培養時の上清に該当) を用いた。

【 0 0 8 3 】

プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) を用いた、実験 1 の結果を図 4 - 1 に、実験 2 の結果を図 4 - 2 に示す。

【 0 0 8 4 】

実験 1 において、貪食指数の平均 (n = 3) は、コントロール群に対して G c M A F 投与群では上昇したが、プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) 投与群においては変化がなかった (図 4 - 1)。コントロール群に対する有意差検定 (t - t e s t) を行った結果、G c M A F 投与群は $p = 0.0040$ ($p < 0.01$)、LPS 投与群は $p = 0.0017$ ($p < 0.01$) と、それぞれ有意差が見られたが、プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) 投与群は $p = 0.1595$ で有意差は見られなかった。

20

【 0 0 8 5 】

実験 2 において、マクロファージの平均貪食指数 (n = 3) はコントロール群に対して、腹腔非付着細胞との予備培養を行ったプレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) の投与群は上昇した (図 4 - 2)。コントロール群に対する有意差検定 (t - t e s t) を行った結果、腹腔非付着細胞との予備培養を行ったプレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) の投与群は $p = 0.0009$ ($p < 0.01$) と有意差がみられた。プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) はマクロファージの貪食活性に直接的な影響を及ぼさないが、腹腔非付着細胞との予備培養を行ったときにはマクロファージの貪食活性を上昇させた。

30

【 0 0 8 6 】

なお、原料である 1f1f タイプの Gc グロブリンは、実験 1 および 2 のいずれにおいても、マクロファージ貪食活性を上昇させなかった (図 4 - 3)。

【 0 0 8 7 】

以上の結果より、プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) は腹腔非付着細胞と共存させることによって、すなわち、生体内環境において、GcMAF 様のマクロファージ貪食活性化能を示すことが明らかとなった。

【 0 0 8 8 】

実施例 3 - 2 : プレ G c M A F 精製物 (1 s 1 s G c X) によるマクロファージの貪食活性への影響 (i n v i t r o)

40

1s1s のサブタイプの Gc グロブリンに由来するプレ G c M A F 精製物を、実施例 1 と同様の方法で作製し (以下、「プレ G c M A F 精製物 (1 s 1 s G c X) 」と記載)、実施例 3 - 1 の実験 1、実験 2 と同様の手順で、プレ G c M A F 精製物 (1 s 1 s G c X) がマクロファージの貪食活性に及ぼす影響を調べた。

【 0 0 8 9 】

結果を図 5 - 1、ならびに図 5 - 2 に示す。

【 0 0 9 0 】

図 5 - 1 に示すとおり、実験 1 の結果、マクロファージの平均貪食指数 (n = 4) は、コントロール群に対して G c M A F 投与群およびプレ G c M A F 精製物 (1 s 1 s G c X) 投

50

与群において上昇した。コントロール群に対する各群の有意差検定 (t - t e s t) を行った結果、G c M A F 投与群は $p=0.0238$ ($p<0.05$)、プレG c M A F 精製物 (1 s 1 s G c X) 投与群は $p=0.0463$ ($p<0.05$) と、それぞれ有意差が見られた。また、実験 2 において、マクロファージの平均貪食数 ($n=4$) はコントロール * 群に対してプレG c M A F 精製物 (1 s 1 s G c X) 投与群 (1 s 1 s G c X *) において上昇した。コントロール * 群に対する有意差検定 (t - t e s t) を行った結果、プレG c M A F 精製物 (1 s 1 s G c X) 投与群 (1 s 1 s G c X *) は $p=0.0396$ ($p<0.05$) と有意差がみられた。

【 0 0 9 1 】

一方、図 5 - 2 に示すとおり、原料である 1s1s タイプの Gc グロブリンは、実験 1 および 2 のいずれにおいても、貪食活性の上昇を示さなかった。

【 0 0 9 2 】

以上の結果より、プレG c M A F 精製物 (1 s 1 s G c X) は GcMAF 様のマクロファージ貪食活性化能を示すことが明らかとなった。また、プレG c M A F 精製物 (1 s 1 s G c X) の GcMAF 様のマクロファージ貪食活性化能は、腹腔非付着細胞と共存させることによって、すなわち、生体内環境においても低下しないことが明らかとなった。

【 0 0 9 3 】

実施例 3 - 3 : プレG c M A F 精製物 (2 2 G c X) によるマクロファージの貪食活性への影響 (i n v i t r o)

22 のサブタイプの子グロブリンに由来するプレG c M A F 精製物を、実施例 1 と同様の方法で作製し (以下、「プレG c M A F 精製物 (2 2 G c X) 」と記載)、実施例 3 - 1 の実験 1、実験 2 と同様の手順で、プレG c M A F 精製物 (2 2 G c X) がマクロファージの貪食活性に及ぼす影響を調べた。

【 0 0 9 4 】

結果を図 6 - 1、ならび図 6 - 2 に示す。

【 0 0 9 5 】

図 6 - 1 に示すとおり、実験 1 の結果、マクロファージの平均貪食指数 ($n=4$) は、コントロール群に対して G c M A F 投与群およびプレG c M A F 精製物 (2 2 G c X) 投与群において上昇した。コントロール群に対する各群の有意差検定 (t - t e s t) を行った結果、G c M A F 投与群は $p=0.0214$ ($p<0.05$)、プレG c M A F 精製物 (2 2 G c X) 投与群は $p=0.0319$ ($p<0.05$) と、それぞれ有意差が見られた。また、実験 2 において、マクロファージの平均貪食数 ($n=4$) はコントロール * 群に対してプレG c M A F 精製物 (2 2 G c X) 投与群 (2 2 G c X *) において上昇した。コントロール * 群に対する有意差検定 (t - t e s t) を行った結果、プレG c M A F 精製物 (2 2 G c X) 投与群 (2 2 G c X *) は $p=0.0254$ ($p<0.05$) と有意差がみられた。

【 0 0 9 6 】

一方、図 6 - 2 に示すとおり、原料である 22 タイプの Gc グロブリンは、実験 1 および 2 のいずれにおいても、貪食活性の上昇を示さなかった。

【 0 0 9 7 】

以上の結果より、プレG c M A F 精製物 (2 2 G c X) は GcMAF 様のマクロファージ貪食活性化能を示すことが明らかとなった。また、プレG c M A F 精製物 (2 2 G c X) の GcMAF 様のマクロファージ貪食活性化能は、腹腔非付着細胞と共存させることによって、すなわち、生体内環境においても低下しないことが明らかとなった。

【 0 0 9 8 】

実施例 4 : プレG c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) の血管新生阻害活性 (i n v i v o)

プレG c M A F 精製物が G c M A F と同様に血管新生阻害活性を示すかについて、鶏胚漿尿膜法 (C A M 法) による i n v i v o 血管新生阻害活性を調べた。

【 0 0 9 9 】

< 実験 >

孵卵 0 日目の鶏受精卵を孵卵器で 37 . 6 、 4 日間培養し、気室上方部と鶏卵側部の

10

20

30

40

50

卵殻の2ヶ所に錐で穴をあけ、鶏卵側部の穴から約4 mlの卵白を吸引除去した。次いで、気室上方部の穴にシリコンスポイトをあてて吸引し、卵殻膜から卵黄のうや胚を剥離した後、鶏卵側部の穴をオプサイトでシールした。次に、気室上方部の穴の卵殻を一部除去して卵殻膜を露出させ、気室上方部にステンレス製のキャップをかぶせて39℃で24時間培養した。培養後、絨毛尿膜(CAM)が2~3 mmになっていることを確認してシリコンリングをCAMの中心に置き、精製GcMAF(徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部の堀研究室で合成)およびプレGcMAF精製物(1 f 1 f Gc X)を投与して39℃で1日、次いで39.5℃で1日間培養した。培養後、卵殻を取り除いてイントラリポス約1 mlをCAMに注入し、CAM上に成長した毛細血管の数や大きさを目視にて判定し、障害が見られた鶏卵数を実験に使用した全体数で割り、血管新生阻害率を算出した。

10

【0100】

<結果>

100 ng GcMAFの*in vivo*血管新生阻害率は20%であり、ポジティブコントロールのTX-1934(徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部の堀研究室で合成)(阻害率30%)と比較してやや弱い阻害活性を示した。

【0101】

一方、同じ用量(100 ng)のプレGcMAF精製物(1 f 1 f Gc X)の阻害率は23%、10 ngのプレGcMAF精製物(1 f 1 f Gc X)では31%であり(コントロール群との間に有意差を示す($p < 0.05$))、TX-1934(阻害率25%)よりもやや強い阻害活性を示した。

20

【0102】

この結果より、プレGcMAF精製物(1 f 1 f Gc X)はGcMAFに比べてやや強い血管新生阻害活性を有することが示された。

【0103】

実施例5-1:血清からのプレGcMAFの簡易合成とその物性検査

血清から直接、プレGcMAF精製物の合成が可能か否かを調べるため、準備した血清50 μ l(1 f 1 f サブタイプを有するヒトに由来する)に175 μ lの100 mM SPBおよび10 mU/ μ lの α -ガラクトシダーゼ(Grade III from Bovine Liver, SIGMA, Lot NO.54H7025, G1875)25 μ lを加えて37.5℃にて1時間インキュベートした。得られた反応物を準備した25(OH)VD₃結合ビーズ(徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部の堀研究室で合成)1.0 gを入れた2.0 mlのエッペンチューブに移し、4℃にて1時間振とうした。4℃にて2分間、遠心分離(13,000 rpm)し上澄み液を除いた後、沈殿物をSTE緩衝液0.5 mlを用いて60秒間振とうして洗浄し、さらに4℃にて2分間遠心分離(13,000 rpm)し上澄み液を除いた。この操作を3回繰り返した後、0.5 mlの5.0 M 酢酸緩衝液を加え60秒間振盪し、Gcグロブリン誘導体を溶出し、2分間遠心分離(13,000 rpm)し、溶出液を取り出す。この操作を3回繰り返す、溶出液をあわせて、microcon(MILLIPORE, Lot NO. R9DN95311, 10000 M VCO)を用いて10 mM SPB緩衝液で置換し、プレGcMAFの粗精製物(2)21.64 μ g/29 μ lを得た。

30

40

【0104】

プレGcMAFの粗精製物(2)のSDS-PAGE(CBB染色)によるタンパク質の可視化では、計3つのバンドが見られた。ヒト抗Gcグロブリンを用いたウェスタンブロットを行った結果、Gcグロブリンに相当する、最も濃いバンド(分子量56 kDa付近)のみに陽性反応が認められた。その他の2つバンドは陽性反応を示さなかった。

【0105】

CBB染色の結果よりWindows用汎用画像処理パッケージWinRoofを用いて目的バンドの染色濃度を1.0としたとき、それぞれのバンドの染色濃度・バンド面積を測定し、目的バンド値/全バンド値 \times 100%を目的バンドの純度として求めた結果を

50

表 1 に示す。目的バンドの純度は 66.11% であった。

【表 1】

項目番号	濃度	面積	濃度×面積
1	1.0000	18096.48	18096.48
2	0.6084	14264.01	8678.22
3	0.3152	1904.48	600.29

目的バンドの純度=18096.48/(18096.48+8678.22+600.29)

10

【0106】

血清から簡易法により得られた粗精製物(2)にはプレGcMAFが含まれるが、夾雑物として血清由来のタンパク質も含まれる。

【0107】

実施例5-2: プレGcMAF粗精製物(2)のPNAレクチン、HPAレクチンを用いたウェスタンブロッティング

陽性反応を示すバンドでのPNAレクチン、HPAレクチンを用いたウェスタンブロットを行なった結果、上記実施例2と同様に、GcグロブリンおよびGcMAFに該当する染色バンドが見られなかった。

【0108】

また、1s1sサブタイプまたは22サブタイプを有するヒトの血清から簡易法により得られた粗精製物を用いて、上記と同様にウェスタンブロッティングを行った結果、1s1sサブタイプについてはGcグロブリンおよびGcMAFに該当する染色バンドが見られなかった。22のサブタイプではPNAレクチンを用いたウェスタンブロットを行なった結果、Gcグロブリンに該当する染色バンドが見られなかった。

20

【0109】

この結果は、1s1sサブタイプまたは22サブタイプを有するヒトの血清から簡易法により得られた粗精製物にもプレGcMAFが含まれることを示唆する。

【0110】

実施例6: プレGcMAF製造例とその物性検査

(I) 血清からのプレGcMAF合成とプレGcMAFの精製

準備した血清1.0ml(1f1fサブタイプを有するヒトに由来する)にSTE緩衝液1.0mlおよび10mU/μlの - ガラクトシダーゼ(Grade III from Bovine Liver, SIGMA, Lot NO. 54H7025, G1875)150μl加えて37.5にて1時間インキュベートした。

【0111】

反応液に10mlのSTE緩衝液を加えて、準備した25(OH)VD3結合ビーズ(徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部の堀研究室で合成)のアフィニティカラム(10mm×80mm)に0.4ml/minで流した。さらに、STE緩衝液を5分間流した後、6Mのグアニジンを加えたSTE緩衝液(pH7.4)を2.0ml/minで流して、溶出してくるGcグロブリン誘導体 約25mlを回収した。回収液は、片側をクリップで留めた透析膜に移して、反対側もクリップで留め、浮きをつけて5mmリン酸緩衝液(SPB)4Lの中に浮かべて透析を行った。透析開始から90分後、180分後および270分後に透析液を変えて、3回目は一夜透析とする。

40

【0112】

(II) ヒドロキシアパタイトカラム処理での二次精製とその物性検査

試薬などの混入物を除くため、透析後の液を集め、準備したヒドロキシアパタイトカラム(BioRad Bio-Scale™ Mini CHT Type III, 40μM Cartridge, Catalog #732-4332, Lot NO. B012409B)に0.2ml/mlでサンプルを流した。その後、5mM S

50

P B 緩衝液を 2.0 ml/min で流して洗浄し、ベースラインが落ち着いたところで、200 mM S P B 緩衝液 (pH 7.4) につないでグラジエントを行った。G c グロブリンのほぼ 9 ml を回収した。これを、準備した centricon (MILLIPORE, Lot NO. R0DA20931, 30000 MVCO) にサンプルを入れ、回収用チャップを付けて、アングルローターを取り付けた遠心器で 10 分間、遠心分離 (3990 G) して、200 µl の最終精製物を得た。このタンパク質濃度は B C A 法で 200.6 µg / 200 µl であった。

【0113】

最終精製物は SDS - PAGE (CBB 染色) によるタンパク質の可視化で単一のバンドであることが確認でき、ヒト抗グロブリンによるウェスタンブロットでそのバンドは陽性反応を示した。

10

【0114】

実施例 7 : LLC (Lewis lung carcinoma cells) 肺転移マウスにおけるプレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) の腫瘍生育の制御

5 週齢の C 5 7 B L / 6 マウスを最低 7 日間馴化させたのち、 2×10^5 個の LLC を尾部静脈から注入した。7 日後のマウスを無処置群 (対照群) と陽性対照群 (G c M A F の 4 ng / kg / 日投与) および治療群 (プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) の 0.04 µg / kg / 日および 0.4 µg / kg / 日投与の 2 群) の 4 群に無作為に分けた。薬剤は 10 日間 i . p . 投与した後、11 日目にマウスを屠殺し、肺に形成された腫瘍結節の数 (全数および 2 mm 未満と 2 mm 以上の大きさの数) を集計し、プレ G c M A F 精製物による腫瘍生育の抑制効果を調べた。

20

【0115】

結果を図 7 に示す。

【0116】

各群 (n = 3 または 4) での肺に形成された腫瘍結節の数 (平均値 ± S E M) は、対照群に対して治療群 (上記実施例 1 で製造したプレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) を投与された 2 群) において大きく減少した。当該腫瘍結節数の減少について、Bonferroni の多重比較検定を行った結果、治療群は対照群に対して有意差を示した (* p < 0.05)。したがって、プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) を 0.04 µg / kg または 0.4 µg / kg で投与することによって、有意な抗がん活性を示すことが明らかとなった。

30

【0117】

さらに、図 7 に示すとおり、治療群においては 2 mm 以上の大きさまで成長した腫瘍結節の数が、プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) の用量に依存して減少しており、プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) 投与により、腫瘍結節の成長が抑制されることが観察された。通常、腫瘍は 3 mm³ (腫瘍径約 2 mm) 以上の大きさまで成長すると、腫瘍中心部の酸素濃度が低下するため血管新生が誘導される。治療群で観察される腫瘍結節の成長抑制は、プレ G c M A F 精製物 (1 f 1 f G c X) が腫瘍組織での血管新生を抑制し、腫瘍の生育を阻害することを示唆する。また、治療群においては、2 mm 未満の腫瘍結節数の減少が観察されたが、これは血管から肺組織に一次着床した癌細胞が、着床した腫瘍からさらに二次転移することが抑制されていることを示唆する。

40

【0118】

実施例 8 : LLC (Lewis lung carcinoma cells) 肺転移マウスにおけるタイプ別のプレ G c M A F 精製物による腫瘍生育の制御

5 週齢の C 5 7 B L / 6 マウスを最低 7 日間馴化させたのち、 2×10^5 個の LLC を尾部静脈から注入した。7 日後にマウスを、無処置群 (対照群) および治療群 (1 f 1 f G c X、1 s 1 s G c X または 2 2 G c X 投与群、各々 0.4 µg / kg の 10 日間 i . p . 投与 (各プレ G c M A F 精製物は上記実施例 1、3 - 2、3 - 3 で製造したもの)) の 4 群に無作為に分けた。薬剤は 10 日間 i . p . 投与した後、11 日目にマウスを屠殺し、肺に形成された腫瘍結節の数 (全数および 2 mm 未満と 2 mm 以上の大きさの数) を

50

集計し、各プレGcMAF精製物の投与による腫瘍育成の抑制効果を調べた。

【0119】

結果を図8に示す。各群(n = 3 - 4)の肺に形成された平均腫瘍結節数の±SEMとして示す。

【0120】

治療群の平均腫瘍結節数は無処置群に対して大きく減少する傾向を示し、治療群の対照群に対するBonferroniの多重比較検定を行った結果、プレGcMAF精製物(1f1fGcX)、プレGcMAF精製物(1s1sGcX)およびプレGcMAF精製物(22GcX)は有意な腫瘍結節数の減少を示した(***) (p < 0.001)。これは上記実施例1~3-3に示した、各プレGcMAF精製物のマクロファージ活性化能の結果と同様の傾向を示す。

10

【0121】

また、2mm以上の腫瘍結節に目を向けると、プレGcMAF精製物では肺がん無処置群より少なく、プレGcMAF精製物(1f1fGcX)およびプレGcMAF精製物(1s1sGcX)では個数0であり、プレGcMAF精製物(22GcX)では個数1となった。これらの結果は、これらのプレGcMAF精製物(1f1fGcX、1s1sGcX、22GcX)が腫瘍組織での血管新生を抑制し、腫瘍の生育を阻害することを示唆する。

【産業上の利用可能性】

【0122】

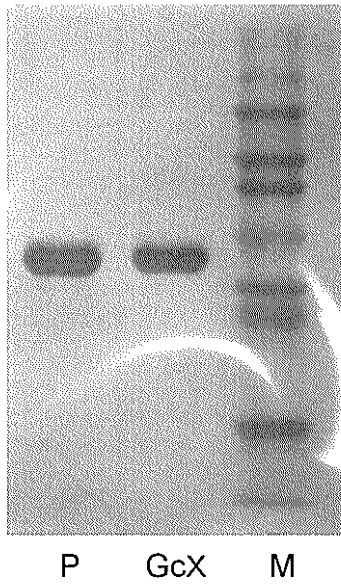
本発明により、Gcグロブリンのサブタイプに関係なく、容易に製造することができ、かつGcMAFとして利用可能なGcグロブリンガラクトース脱糖体を提供することができる。このため、GcMAF同様、Gcグロブリンガラクトース脱糖体を患者に投与することによって、マクロファージの活性化作用や血管新生阻害作用、さらに患者の抵抗性や修復力の増強など様々な疾患や障害を治療又は予防するために利用することができる。

20

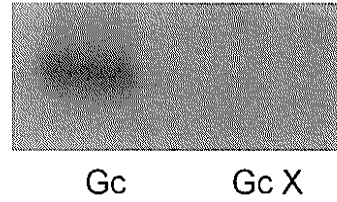
【0123】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

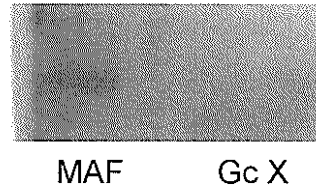
【図1】



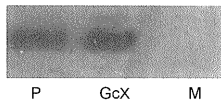
【図3-1】



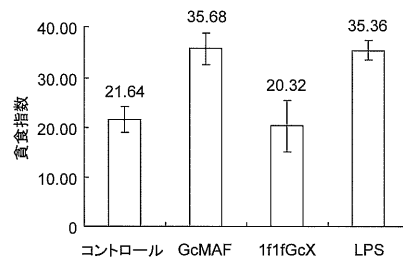
【図3-2】



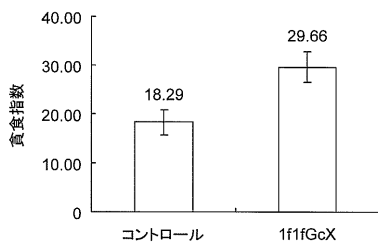
【図2】



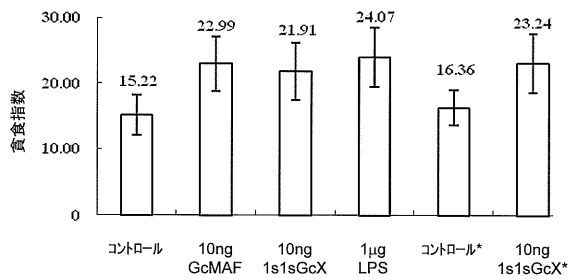
【図4-1】



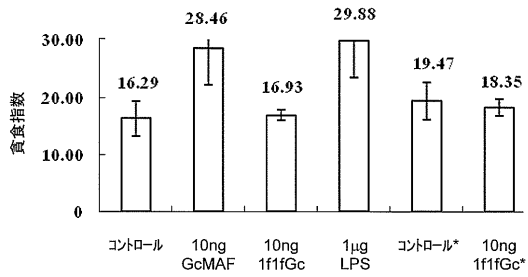
【図4-2】



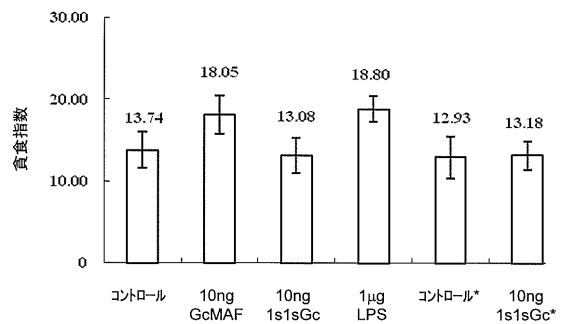
【図5-1】



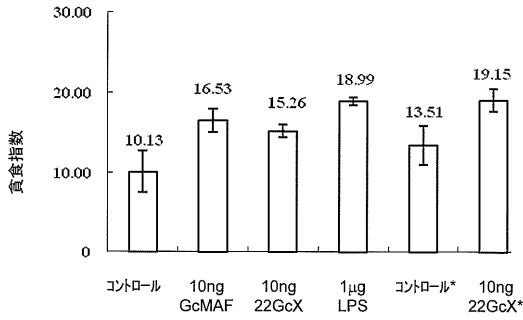
【図4-3】



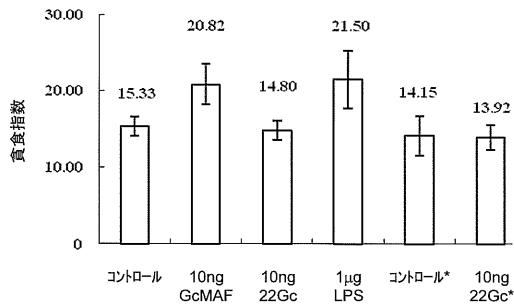
【図5-2】



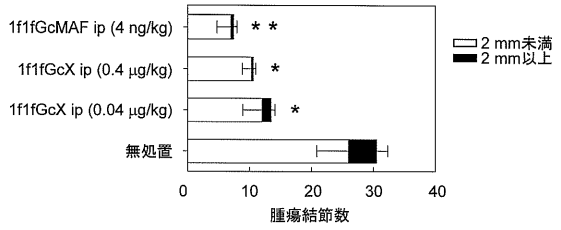
【 図 6 - 1 】



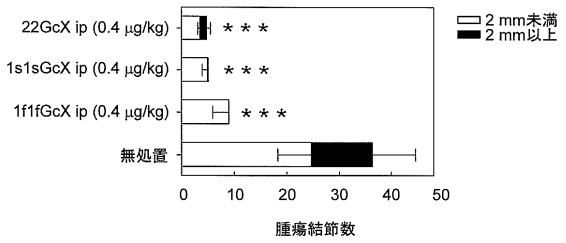
【 図 6 - 2 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

GC*1F allele
 NH2-
 LERGRDYENKVKCFESHG 20
 KEDFTSLSLVLYSRKFPSTG 40
 FEQVSQLVKEVVSLEACCA 60
 EGADPDCYDTRTSALSASKSC 80
 ESNSPPFVHPGTAECCTKEG 100
 LERKLCMAALKHQPEFPTY 120
 VEPTNDEICEAFKDPKEYA 140
 NQFMWEYSTNYEQAPLSLLV 160
 SYTKSYLSMVGSCCTSASPT 180
 VCFLKERLQKHLSTLTL 200
 NRVCSQYAAAGKKSRLSNL 220
 IKLAQKVPTADLEDVPLAE 240
 DITNILSKCCESASEDCMAK 260
 ELPEHTVKLCDNLSTKNSKF 280
 EDCQEKATAMDFVCTYFMP 300
 AAQLPELDPVRLPTNKDVCD 320
 PGNTRKMDKYTFELSRTHL 340
 PEVFLSKVLEPTLKSLEGCC 360
 DVEDSTTCFNAKGPLLKEL 380
 SSFIDKGQELCADYSENTFT 400
 EYKKLAERLAKLPEATPT 420
 ELAKLVNKRSDFASNCCSIN 440
 SPPLYCDSEIDAELKNIL 458
 -COOH

【 図 10 】

GC*1S allele
 NH2-
 LERGRDYENKVKCFESHG 20
 KEDFTSLSLVLYSRKFPSTG 40
 FEQVSQLVKEVVSLEACCA 60
 EGADPDCYDTRTSALSASKSC 80
 ESNSPPFVHPGTAECCTKEG 100
 LERKLCMAALKHQPEFPTY 120
 VEPTNDEICEAFKDPKEYA 140
 NQFMWEYSTNYEQAPLSLLV 160
 SYTKSYLSMVGSCCTSASPT 180
 VCFLKERLQKHLSTLTL 200
 NRVCSQYAAAGKKSRLSNL 220
 IKLAQKVPTADLEDVPLAE 240
 DITNILSKCCESASEDCMAK 260
 ELPEHTVKLCDNLSTKNSKF 280
 EDCQEKATAMDFVCTYFMP 300
 AAQLPELDPVRLPTNKDVCD 320
 PGNTRKMDKYTFELSRTHL 340
 PEVFLSKVLEPTLKSLEGCC 360
 DVEDSTTCFNAKGPLLKEL 380
 SSFIDKGQELCADYSENTFT 400
 EYKKLAERLAKLPEATPT 420
 ELAKLVNKRSDFASNCCSIN 440
 SPPLYCDSEIDAELKNIL 458
 -COOH

【 図 1 1 】

GC*2 allele
NH2-
LERGRDYEKKNKVCKEFSHLG 20
KEDFTLSLSLVYSRKFPSTG 40
FEQVSQLVKEVVSLEACCA 60
EGADPCYDTRTSALSASCS 80
ESNSPPVHPGTAECCTKEG 100
LERKLCMAALKHQPEPTY 120
VEPTNDEICEAFKDKPEYA 140
NQFMWEYSTNYGQAPLSLV 160
SYTKSYLSMVGSCCTSASPT 180
VCFKLERLQKHLSLLTLS 200
NRVCSQYAAAGKKSRLSNL 220
IKLAQVPTADLEDVPLAE 240
DITNILSKCCESAEDCMAK 260
QLQPHTVKLCNLSKNSKP 280
EDCCQKRTAMDVFCTYFMP 300
AAQLPELPDVELPTNKDVC 320
PGNTKVMKYTFELSRRTL 340
PEVFLSKVLEPTLKSLECC 360
DVEDSTTCFNAKGPLKDL 380
SSFIDKGNELCADYSENTFT 400
EYKKLAERLAKLPDTPK 420
ELAKLVNLRSDFAFNCCSIN 440
SPPLYCNSEINAELKNIL 458
-COOH

【 配列表 】

0005860401000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(72)発明者 宇都 義浩
徳島県徳島市南常三島町2丁目1番地 国立大学法人徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究
部内

(72)発明者 竹内 亮太
京都府京都市下京区白楽天町522番1 四条烏丸クロスマーク707号室

(72)発明者 中川 美典
岡山県総社市泉14-60

(72)発明者 寺田 弘
東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内

(72)発明者 廣田 慶司
東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表平06-503716(JP,A)

Mol. Immunol., 1996年, vol.33, no.15, pp.1157-1164

日本薬学会年会要旨集, 2006年, vol.126, no.3, pp.51(P28[R]am-114)

Anticancer Res., 2004年, vol.24, no.5C, pp.3361-3366

Anticancer Res., 2005年, vol.25, no.6A, pp.3689-3695

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 21/00-21/02

C07K 14/00-14/825

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed