CAVELIER
ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02056452 00000002 Folios: 94
Fecha (AMD): 2002-09-12 18:28:35
Tramite : 002 PATENTES 0 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comerc
E. S. D.

Trámite : 002
Evento : 001
Actuación: 444

Referencia : Expediente No. 02.056.452
Solicitante : **SANKYO COMPANY, LIMITED**
Asunto : Solicitud de patente para **"COMPLEJO QUE COMPRENDE FACTOR INHIBIDOR DE OSTEOCLASTOGÉNESIS Y POLISACÁRIDO"**
Fecha de solicitud : 28 de junio de 2002.

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al oficio número 13481, notificado por fijación en lista del 25 de julio de 2002.

2. Mediante el oficio número 13481 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

2.1. **Cesión de inventores.** Presento junto con este escrito el documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por los inventores al solicitante, debidamente legalizado, junto con su respectiva traducción oficial.

2.2. **Copia Certificada.** Presento con este escrito copia certificada de la solicitud de patente japonesa número 2001-198985 del 29 de junio de 2001 junto con su respectiva traducción de su descripción, reivindicaciones y carátula, en la cual se basa la reivindicación de la prioridad.

2.3. **Cesión del derecho de prioridad.** Presento con este memorial el documento en que la sociedad Snow Brand Milk Products, la cual fue solicitante junto con la sociedad

3

CAVELIER
ABOGADOS

Sankyo Company, Limited de la solicitud de patente japonesa de la cual se reivindica prioridad, cede su derecho de prioridad a la sociedad Sankyo Company, Limited y la autoriza para que presente en Colombia como única solicitante la solicitud de patente de la referencia.

3. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Bogotá, 12 SEP 2002
Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

COLO 01579-801-001-1
MRE/MRE/
ID-000012/WPCL1579

4.

02280.08/HG /A

~~00~~ 97

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª Nº 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

CESION

Yo, (nosotros), abajo firmado (s)
Shinichi Yamamoto, Junichi Okada,
Atshshi Kurihara, Taku Numazawa,
Junichi Kondo, Eisuke Tsuda,
Shinichi Mochizuki, Hirotaka Nishi &
Hideki Miyazaki
domiciliado (s) en
c/o SANKYO CO.,LTD.,2-58 Hiromachi 1-chome
Shinagawa-ku, Tokio 140-8710,Japon

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la invención:
"Complejo que comprende factor inhibidor de osteoclastogenesis y polisacáride"

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin limitación, a favor de la sociedad SANKYO COMPANY, LIMITED

constituída y existente de conformidad con las leyes de Japón

domiciliada en 5-1, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo-ku, Tokio 103-8426, Japon

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned
Shinichi Yamamoto, Junichi Okada,
Atsushi Kurihara, Taku Numazawa,
Junichi Kondo, Eisuke Tsuda,
Shinichi Mochizuki, Hirotaka Nishi &
Hideki Miyazaki
of
c/o SANKYO CO., LTD., 2-58 Hiromachi 1-chome
Shinagawa-ku, Tokyo 140-8710, Japan

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:
"A Complex Comprising OCIF and Polysaccharide"

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour of
SANKYO COMPANY, LIMITED

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of Japan

domiciled in 5-1, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8426, Japan

all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent in the Republic of Colombia.

Dado y firmado hoy/Given and signed this _____

en/in _____

Shinichi Yamamoto

Firma Shinichi Yamamoto Signature

Junichi Okada — Atsushi Kurihara

Taku Numazawa — Junichi Kondo — Eisuke Tsuda

Shinichi Mochizuki — Hirotaka Nishi — Hideki Miyazaki

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODERE-343

4

98 ~~98~~

Registration No. 922 ~~0038~~

NOTARIAL CERTIFICATE

I, NOTARY, duly authorized, admitted and practising at Tokyo, Japan, DO HEREBY CERTIFY THAT:

The signatures that appear at the foot of foregoing document are the genuine and authentic signatures of Shinichi Yamamoto, Junichi Okada, Atsushi Kurihara, Taku Numazawa, Junichi Kondo, Eisuke Tsuda, Shinichi Mochizuki, Hirotaka Nishi and Hideki Miyazaki.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereto subscribed my name and affixed my seal of office.

JUL 5 2002

TOKYO LEGAL AFFAIRS BUREAU
NOTARY
1-1, 2CHOME UCHISAIWAICHO
CHIYODA-KU
TOKYO JAPAN

Akira Kitani

AKIRA KITANI
NOTARY

6

平成 14 年登簿第 922 号

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

   This public document

2. has been signed by Toshiaki HOUKIN
3. acting in the capacity of Director of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at **Tokyo**
6. JUL 5 2002
7. **by the Ministry of Foreign Affairs**
8. 02 – № 001892
9. **Seal/stamp:**
10. **Signature:**

Shinichi HAGIWARA

For the Minister for Foreign Affairs

TRADUCCIÓN OFICIAL 122/2002 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL **SHINICHI YAMAMOTO, JUNICHI OKADA, ATSHSHI KURIHARA, TAKU NUMAZAWA, JUNICHI KONDO, EISUKE TSUDA, SHINICHI MOCHIZUKI, HIROTAKA NISHI Y HIDEKI MIYAZAKI**, DOMICILIADOS EN c/o **SANKYO CO., LTD., 2-58 HIROMACHI 1-chome Shinagawa-ku, Tokio 140-8710, Japón** INVENTORES ÚNICO Y VERDADEROS DE LA INVENCIÓN: " **COMPLEJO QUE COMPRENDE FACTOR INHIBIDOR DE OSTEOCLASTOGENESIS Y POLISACÁRIDO**, DECLARA POR EL PRESENTE QUE CEDE DICHA INVENCIÓN A **SANKYO COMPANY, LIMITED**, EMPRESA ORGANIZADA Y EXISTENTE BAJO LAS LEYES DE JAPÓN, DOMICILIADA EN 5-1, NIHONBASHI HONCHO, 3-chome, Chuo-ku, Tokio 103-8426, Japón, JUNTO CON TODOS LOS DERECHOS INHERENTES Y QUE DICHA COMPAÑÍA QUEDA FACULTADA PARA SOLICITAR EN SU NOMBRE LA PATENTE CORRESPONDIENTE EN LA REPÚBLICA DE COLOMBIA.

DADO Y FIRMADO HOY (DATO EN BLANCO)

FIRMADO: SHINICHI YAMAMOTO FIRMADO: JUNICHI OKADA. ATSHUSHI KURIHARA, TAKU NUMAZAWA, JUNICHI KONDO, EISUKE TSUDA, SHINICHI MOCHIZUKI, HIROTAKA NISHI, HIDEKI MIYAZAKI.

REGISTRO 922

CERTIFICADO NOTARIAL

Yo, notario debidamente autorizado y practicante en Tokio, Japón, por el presente certifico que las firmas que aparecen al pie del documento precedente son las firmas genuinas y auténticas de

8

SHINICHI YAMAMOTO, JUNICHI OKADA, ATSHSHI KURIHARA, TAKU NUMAZAWA, JUNICHI KONDO, EISUKE TSUDA, SHINICHI MOCHIZUKI, HIROTAKA NISHI Y HIDEKI MIYAZAKI.

En testimonio de lo cual, he firmado y fijado mi sello oficial.

5 de julio de 2002. Firmado: Akira Kitani, notario

Sello: Oficina de Asuntos Jurídicos de Tokio, notario. 1-1, 2Chome Uchisaiwaicho, Chiyoda-Ku, Tokio, Japón.

CERTIFICADO

Por el presente se certifica que la firma que arriba aparece ha sido escrita por notario debidamente autorizado por la Oficina de Asuntos Jurídicos de Tokio y que el sello oficial que aparece sobre la misma es genuino. Fecha 5 de julio de 2002.

Toshiaki HOUKIN

DIRECTOR DE LA OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Japón .Este documento público
2. ha sido firmado por Toshiaki HOUKIN
3. quien actúa en su calidad de DIRECTOR DE LA OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO
4. lleva el sello/estampilla de (dato en blanco)

CERTIFICADO

5. en Tokio
6. el 5 de julio de 2002

9

7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. Número 02- No. 001892

9. Sello: MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPÓN

10. Firma: Shinichi HARIWARA, a nombre del Ministerio de Asuntos Exteriores.

COLO-01579-801-001-1

WPCL002G. ID 3677

Bogotá, 9 de septiembre de 2002.

Eduardo Calado N.

Eduardo Calado Noguera
"TRADUCTOR OFICIAL"
INGLES - ESPAÑOL INGLES
Res. 541 Febrero de 1999

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

Eduardo Calado

017620

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 SEP -9 P 1:15

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

CONO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PRECEDIENTE

Salvador Noguera

IDENTIFICADOS CON C.C. No(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 09 SEP 2002

REPUBLICA DE COLOMBIA
Juan Manuel Botero Cadena
Notario Sexto
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

104

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application: ２００１年　６月２９日

出願番号
Application Number: 特願２００１－１９８９８５

[ST.10/C]: ［ＪＰ２００１－１９８９８５］

出願人
Applicant(s): 三共株式会社
雪印乳業株式会社

２００２年　４月　９日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造

出証番号　出証特２００２－３０２５６５９

10

105
105
0102

【書類名】　特許願
【整理番号】　2001091KW
【あて先】　特許庁長官　殿
【国際特許分類】　A61K 38/19
C07K 14/52
【発明者】
【住所又は居所】　東京都品川区広町１丁目２番５８号　三共株式会社内
【氏名】　山本　真一
【発明者】
【住所又は居所】　東京都品川区広町１丁目２番５８号　三共株式会社内
【氏名】　岡田　純一
【発明者】
【住所又は居所】　東京都品川区広町１丁目２番５８号　三共株式会社内
【氏名】　栗原　厚
【発明者】
【住所又は居所】　東京都品川区広町１丁目２番５８号　三共株式会社内
【氏名】　沼沢　琢
【発明者】
【住所又は居所】　東京都品川区広町１丁目２番５８号　三共株式会社内
【氏名】　近藤　淳一
【発明者】
【住所又は居所】　栃木県河内郡南河内町祇園２－１３－１　ダイアパレス自治医大５番館４０７
【氏名】　津田　英資
【発明者】
【住所又は居所】　栃木県河内郡南河内町緑５丁目２２番６号
【氏名】　望月　伸一
【特許出願人】
【識別番号】　000001856

62

106
~~106~~
~~0103~~

【氏名又は名称】　三共株式会社

【特許出願人】

【識別番号】　000006699

【氏名又は名称】　雪印乳業株式会社

【代理人】

【識別番号】　100081400

【弁理士】

【氏名又は名称】　大野　彰夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】　010216

【納付金額】　21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】　明細書　1

【物件名】　要約書　1

【包括委任状番号】　9704937

【プルーフの要否】　要

13

【書類名】明細書

【発明の名称】ＯＣＩＦ及びデキストラン硫酸の複合体

【特許請求の範囲】

【請求項１】

破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体が、１：１乃至１：８の分子比で結合する、破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体。

【請求項２】

多糖類又はその誘導体がデキストラン硫酸である、請求項１に記載の複合体。

【請求項３】

デキストラン硫酸の平均分子量が１８００乃至６０００である、請求項２に記載の複合体。

【請求項４】

請求項１乃至３のいずれか一つに記載の複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症治療剤。

【請求項５】

破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体を混合して保温し、次いで遊離の多糖又はその誘導体を除去することを特徴とする、破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体の製造法。

【請求項６】

アルカリ性条件下において破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体を保温する、請求項５に記載の製造法。

【請求項７】

ｐＨ１０乃至１１の条件下において破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導

体を保温する、請求項６に記載の製造法。

【請求項８】

ゲル濾過により遊離の多糖又はその誘導体を除去することを特徴とする、請求項５乃至７のいずれか一つに記載の製造法。

【請求項９】

多糖又はその誘導体がデキストラン硫酸である、請求項５乃至８のいずれか一つに記載の製造法

【請求項１０】

請求項５乃至９のいずれか一つに記載の製造法により得られることを特徴とする、請求項１乃至３のいずれか一つに記載の複合体。

【請求項１１】

請求項１０に記載の複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症治療剤。

【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。：ＷＯ９６／２６２１７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以上の物質並びに多糖又はその誘導体が、１：１乃至１：８の分子比で結合する、破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体、該複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症治療剤、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体を混合して保温し、次いで遊離の多糖又はその誘導体を除去することを特徴とする、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体の製造法等に関する。

【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。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。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老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。

【０００５】

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。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。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おり、腎障害の危険性も報告されている。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。血中カルシウム濃度上昇の要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じゅうぶんな薬剤とは言い難い。

16

110

0107

110

【０００６】

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（ＷＯ９６／２６２１７号公報等参照）。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。

【０００７】

ＷＯ２０００／２４４１６号公報には、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。

【０００８】

【発明が解決しようとする課題】

発明者らは、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、本発明を完成した。

【０００９】

【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、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体が、１：１乃至１：８の分子比で結合する、破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体、

（２）

多糖類又はその誘導体がデキストラン硫酸である、（１）に記載の複合体、

（３）

12

デキストラン硫酸の平均分子量が１８００乃至６０００である、（２）に記載の複合体、

（４）

（１）乃至（３）のいずれか一つに記載の複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症治療剤、

（５）

破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体を混合して保温し、次いで遊離の多糖又はその誘導体を除去することを特徴とする、破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体の製造法、

（６）

アルカリ性条件下において破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体を保温する、（５）に記載の製造法、

（７）

ｐＨ１０乃至１１の条件下において破骨細胞形成抑制因子、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体を保温する、（６）に記載の製造法、

（８）

ゲル濾過により遊離の多糖又はその誘導体を除去することを特徴とする、（５）乃至（７）のいずれか一つに記載の製造法、

（９）

多糖又はその誘導体がデキストラン硫酸である、（５）乃至（８）のいずれか一つに記載の製造法、

（１０）

（５）乃至（９）のいずれか一つに記載の製造法により得られることを特徴とする、（１）乃至（３）のいずれか一つに記載の複合体、及び、

（１１）

（１０）に記載の複合体を有効成分として含有する骨代謝異常症治療剤、に関する。

【００１０】

【発明の実施の形態】

本発明のＯＣＩＦ、その類縁体又はその変異体は、ＷＯ９６／２６２１７号公報若しくはＷＯ９７／２３６１４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ＯＣＩＦ、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、得ることができる。

【００１１】

本発明のＯＣＩＦ、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ＯＣＩＦである。

【００１２】

また、本発明のＯＣＩＦ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ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分子量は約６００００又は約１２００００であり（ＷＯ９６／２６２１７号公報参照）、好適には分子量約１２００００の２量体である。

【００１３】

本発明において、ＯＣＩＦ類縁体とは、ヒトＯＣＩＦｃＤＮＡをプローブとするハイブリダイゼーション法により、動物細胞、体液又は組織由来のｃＤＮＡライブラリーより得ることができるポリヌクレオチド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、ヒトＯＣＩＦｃＤＮＡをプローブとしたハイブリダイゼーション法によりＯＣＩＦ類縁体をコードするｃＤＮＡを得、発現ベクターへ挿入し、該ベクターで宿主細胞を

形質転換し、発現させることにより、得ることができる（ＷＯ９６／２６２１７号公報参照）。

【００１４】

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活性を有す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、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。

【００１５】

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活性を有する短鎖型ＯＣＩＦも包含される。そのような短鎖型ＯＣＩＦのアミノ末端には、必要に応じて、メチオニンが付加され得る。

【００１６】

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号公報参照）。

【００１７】

また、ＯＣＩＦは水溶性ポリマー等の化学修飾を受けるとその活性に改善が見ら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。化学修飾ＯＣＩＦとしては、ポリエチレングリコールが結合したＯＣＩＦを例示することができる（ＷＯ９７／２３６１４号公報参照）。

20

114

0111
114

【００１８】

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］－Ｆｃ　Ｙ２８Ｆ、ｈｕＯＰＧ［２２－４０１］、ｈｕＯＰＧ［２７－４０１］－Ｆｃ、ｈｕＯＰＧ［２９－４０１］－Ｆｃ、ｈｕＯＰＧ［３２－４０１］－Ｆｃ、ＭｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］、ＭｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］５ｋ　ＰＥＧ、ＭｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］２０ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　５ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　２０ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　３１ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　５７ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　１２ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　２０ｋ　分岐ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　８ｋ　ＰＥＧ　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）等を例示する

a/

115
0112
115

ことができ、好適には、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、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　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］５ｋ　ＰＥＧ、ＭｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］２０ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　５ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　２０ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　３１ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　５７ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　１２ｋ　ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　２０ｋ　分岐ＰＥＧ、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　８ｋ　ＰＥＧダイマー、ＨｕＯＰＧ　ｍｅｔ［２２－１９４］Ｐ２５Ａ　ジスルフィド架橋である。

【００１９】

本発明のＯＣＩＦ、その類縁体及びその変異体には、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、動物組織等から単離された天然型のＯＣＩＦ等を例

示することができる。糖鎖が付加した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。）細胞等の哺乳動物細胞を例示することができる。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。

【００２０】

本発明において、多糖又はその誘導体とは、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）又はその誘導体であり、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）又はその誘導体である。具体的には、天然型の多糖又はその誘導体としては、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン酸、ヘパラン酸、ケラタン酸、カラギーナン、ペクチン、ヘパリン等を例示することができ、合成型の多糖又はその誘導体としては、デキストラン硫酸等を例示することができ、好適にはデキストラン硫酸である。

【００２１】

本発明において、デキストラン硫酸とはデキストラン硫酸又はその塩であり、好適に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１００００（ともに、和光純薬（株）製）等を例示することができる。

【００２２】

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）。

$$極限粘度＝９．００\times１０^{-4}\times分子量^{0.50}$$

23

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。

【００２３】

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。

【００２４】

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。

イオウ含量（重量％）＝｛32×置換度÷（162＋102×置換度）｝×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。

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。

【００２５】

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

2x

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５０００である。

【００２６】

本発明において使用される多糖又はその誘導体の平均分子量は、特に限定されるものではないが、好適な多糖又はその誘導体である、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。

【００２７】

本発明の多糖又はその誘導体は、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。

【００２８】

本発明の提供する、ＯＣＩＦ、その類縁体及びその変異からなる群から選択される１又は２以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体における両者の分子比は、本発明の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：多糖又はその誘導体＝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１：６であり、より一層好適には１：１乃至１：４である。

【００２９】

上述の通り、ＯＣＩＦは２量体を形成することが知られており（ＷＯ９６／２６２１７号公報参照）、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、本発明における当該分子比は、ＯＣＩＦ、その類縁体及びその変異からなる群から選択される１又は２以上の物質単量体（モノマー）１分子当たりの多糖又はその誘導体の分子数として計算される。

【００３０】

本発明の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

25

は２以上の物質並びに並びに多糖又はその誘導体の複合体は、両者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１０乃至５０ｍｇ／ｍｌ、下限が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。多糖又はその誘導体の該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。該水溶液のｐＨは、上限がｐＨ１１乃至１２、下限がｐＨ６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３７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。

【００３１】

本発明の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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体は、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以上の物質並びに多糖又はその誘導体が、共有結合、イオン結合、配位結合等の化学的結合、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。

【００３２】

該複合体は、遊離の多糖又はその誘導体を含有していない。

【００３３】

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。

120
~~120~~
~~0217~~

【００３４】

また、本発明の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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体は、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、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以上の物質と区別することができる。

【００３５】

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又はその誘導体が結合すると等電点が低下するので、ＯＣＩＦ、その類縁体又はその変異体と、それら及び多糖又はその誘導体の複合体を区別することが可能である。

【００３６】

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。多糖又はその誘導体が結合したＯＣＩＦの糖含量は元のＯＣＩＦに比して増加するので、ＯＣＩＦ、その類縁体又はその変異体と、それら及び多糖又はその誘導体の複合体を区別することが可能である。

【００３７】

本発明の多糖又はその誘導体と特異的に結合する抗体を用い、ＯＣＩＦ、その類縁体又はその変異体中、並びに、それら及び多糖又はその誘導体の複合体中に含有される多糖又はその誘導体を定量することにより、両者を区別することができる。

【００３８】

ＯＣＩＦ、その類縁体及びその変異体は、抗ＯＣＩＦモノクローナル抗体を用いたＥＬＩＳＡ法等を用いて測定することができる。該ＥＬＩＳＡに適した抗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、ハイブリドーマＯＩ－４（ＦＥＲＭ　ＢＰ－６４１９）の生産する抗体、ハイブリドーマＯＩ－２６（ＦＥＲＭ　ＢＰ－６４２１）の生産する抗体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常法に従ってＥＬＩＳＡ測定を行うことができる（ＷＯ９９／１５６９１号公報参照）。

【００３９】

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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体の、ヒト又は動物体内における血中滞留性は、ヒト又は動物に投与して一定時間が経過した後、血液を採取し、血液中又は血清中における、該複合体の濃度を、抗ＯＣＩＦモノクローナル抗体を用いた上述の如きＥＬＩＳＡ法等を用いて測定し、算出することが可能である（ＷＯ９９／１５６９１号公報参照）。

【００４０】

本発明の提供するＯＣＩＦ、その類縁体及びその変異からなる群から選択される１又は２以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体は、骨代謝異常症の予防又は治療に有効である。

【００４１】

本発明において、骨代謝異常症とは、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（メトトレキセ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である。

【００４２】

本発明のＯＣＩＦ、その類縁体及びその変異からなる群から選択される１又は２以上の物質並びに多糖又はその誘導体を含有する組成物は、ヒト又はヒト以外の動物に対し、医薬として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。

【００４３】

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、澱粉濾、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。

【００４４】

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。

【００４５】

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。

【００４６】

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

30

もよい。注射剤は凍結乾燥品であってもよい。

【００４７】

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。

【００４８】

これらの医薬製剤中に含まれる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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体の量は、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。

【００４９】

本発明の提供する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以上の物質並びに多糖又はその誘導体の複合体の投与量は、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。

【００５０】

本発明の提供する医薬の投与回数は、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。

【００５１】

【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の複合体の調製（Ｉ）

ＷＯ９６／２６２１７号公報記載の方法に従って得られた、分子量約１２０００００の遺伝子組換え型ヒト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（ｐＨ１０．５）へ、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、「ＤＳ５

125
125
0122

」という。）を、終濃度４０、１００、１３０、１５０、２００、４００，５１０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ｐＨ１０．５又は１１に調製した。得られた水溶液を４、７又は３７℃にて１、３、６、１８、２４、４８、７２、１４４又は２８８時間保温した。

【００５２】

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。ＯＣＩＦ２量体と結合していない遊離のＤＳ５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。

【００５３】

得られたＯＣＩＦ及びＤＳ５の複合体を含有する画分を－６０℃にて凍結保存した。

【００５４】

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。

【００５５】

【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	１００	５	４	１０．５	１８

32

処方５	１００	５	４	１０．５	７２
処方６	１００	５	４	１０．５	４８
処方７	１００	５	４	１０．５	１４４
処方８	１００	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	１０００	１２．５	４	１０．５	１８
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	１８

実施例２．ＯＣＩＦ及びデキストラン硫酸の複合体の調製（ＩＩ）

実施例１記載のヒト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（ｐＨ１０．５）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に調製した。得られた水溶液を４℃にて２４時間保温した。

【００５６】

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Ｓｕｐｅｒｄｅｘ

２００ｐｇ（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。ＯＣＩＦ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。

【００５７】

得られたＯＣＩＦ及びＤＳ５０００の複合体を含有する画分を－６０℃にて凍結保存した。

【００５８】

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。

【００５９】

【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２３	１５０	５	４	１０．５	２４

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

ＷＯ９６／２６２１７号公報の実施例２又は３記載の方法に従い、ＯＣＩＦ及びデキストラン硫酸ナトリウム（分子量５０００又は１００００）からなる組成物試料を調製した。

【００６０】

分子量約１２００００のヒトＯＣＩＦ（２量体）を、０．１５Ｍ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１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ１０．５）へ、０．２５ｍｇ／ｍｌの濃度に溶解せしめた。こ

3c

128

の水溶液に、実施例２記載のＤＳ５０００（和光純薬（株）製）又は分子量１０００００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４ｍｇ／ｍｌとなるように溶解し、水酸化ナトリウムを添加してｐＨ７に調整した。得られた水溶液を４℃にて２４時間保温した。

【００６１】

得られたＯＣＩＦ及びＤＳ５０００又はＤＳ１００００からなる組成物は速やかに下記試験例１へ今日した。

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。

【００６２】

【表３】

処方名	デキストラン硫酸 種類	濃度 (mg／ml)	ＯＣＩＦ 濃度 (mg／ml)	温度 (℃)	ｐＨ	保温時間 (時間)
参考処方１	DS 5000	4	０．２５	4	7	２４
参考処方２	DS10000	1	０．２５	4	7	２４

実施例３．等電点の測定

実施例１記載の遺伝子組換え型ヒトＯＣＩＦ（２量体）及び実施例１記載で得られたＯＣＩＦ及びＤＳ５の複合体（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、該装置の説明書の記載に従って所定の電圧を印加した。電気泳動終了後、ゲルをクマシーブルー染色した。

【００６３】

その結果、ＯＣＩＦの等電点は約ｐＩ９であり、一方ＯＣＩＦ及びＤＳ５の複合体（処方２２）の等電点は約ｐＩ６．５であった。

35

実施例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定量と両者の分子比の算出

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。

【００６４】

精製された抗ヒトＯＣＩＦ抗体（ＷＯ９９／１５６９１号公報参照）ＯＩ－４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－アセチルチオ酢酸を、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のヒドロキルアミン塩酸塩を上記キットに添付されたＭａｌｅｉｍｉｄｅ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ１００μｌ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。

【００６５】

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並びに参考例１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。

【００６６】

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、抗ヒトＯＣＩＦモノクローナル抗体ＯＩ－２６（ＷＯ９９／１５６９１号公報参照）を０．１ＭＮａHCO_3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。

【００６７】

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。

【００６８】

希釈緩衝液（組成：０．２ＭＴｒｉｓ－塩酸、４０％Ｂｌｏｃｋ　Ａｃｅ（雪印乳業（株）製）、０．１％ポリソルベート２０：ｐＨ７．４）２０μｌ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５０μｌを各ウェルへ分注した。

【００６９】

各ウェルに、１）で得られたＰＯＤ－ＯＩ－４の原液を［０．１ＭＴｒｉｓ－塩酸、４０％Ｂｌｏｃｋ　Ａｃｅ（雪印乳業（株）製）、０．１％ポリソルベート２０（ｐＨ７．４）］で１５００倍希釈したもの５０μｌを添加し、室温にて２時間静置した。

【００７０】

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。：ｐＨ７．４）２５０μｌで、各ウェルを４回洗浄した。

【００７１】

０．１Ｍクエン酸と０．２Ｍリン酸水素２ナトリウムを混合し、基質溶解液とした（ｐＨ４．５）。

39