

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年6月16日(16.06.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/124331 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 38/16 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/045102

(22) 国際出願日: 2021年12月8日(08.12.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2020-203449 2020年12月8日(08.12.2020) JP

(71) 出願人: 再生ファーマ株式会社 (SAISEI PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5700012 大阪府守口市大久保町三丁目3番8号 Osaka (JP).

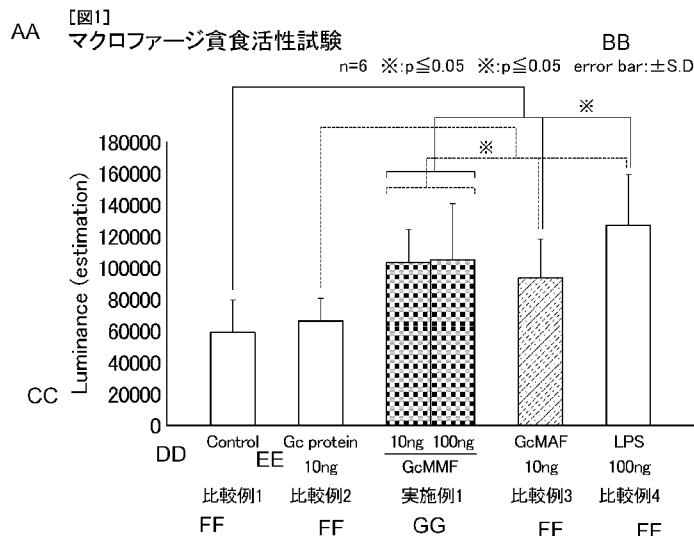
(72) 発明者: 乾 利夫 (INUI, Toshio); 〒5700012 大阪府守口市大久保町三丁目3番8号 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 安富国際特許事務所 (YASUTOMI & ASSOCIATES); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原3丁目5番36号 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: MACROPHAGE ACTIVATOR

(54) 発明の名称: マクロファージ活性化剤



AA Macrophage phagocytic activity test
BB error bar: ±S.D
CC Luminance (estimation)
DD Control
EE Gc protein
FF Comparative example
GG Example

(57) Abstract: The present invention provides a macrophage activator comprising Gc protein by a simple process. This macrophage activator comprises Gc protein to which no N-acetylgalactosamine is attached.

(57) 要約: 簡便なプロセスでGcプロテインからなるマクロファージ活性化剤を提供する。N-アセチルガラクトサミンが付加されていないGcプロテインを含む、マクロファージ活性化剤。

[続葉有]

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：マクロファージ活性化剤

技術分野

[0001] 本発明は、マクロファージ活性化剤に関する。

背景技術

[0002] マクロファージは白血球の一種であり、皮膚、肺、腸および脳など、体のあらゆる組織に存在する。マクロファージは自然免疫と獲得免疫の両方において重要なはたらきを持つことが知られている。自然免疫においては、好中球とともに生体に侵入した異物を貪食し、マクロファージ内に地区されたタンパク質分解酵素やリパーゼにより消化する。獲得免疫においては、貪食した異物由来の分子を細胞表面に抗原として提示し、ヘルパーT細胞を活性化する。さらに、マクロファージは炎症性疾患、動脈硬化、肥満、がんなどの様々な病態の形成に関与することが知られている。

[0003] G c プロテインは血漿中に存在するタンパク質であり、ビタミンDに結合することからビタミンD結合タンパク質とも称される。G c プロテインはマクロファージを活性化する能力を有するが、従来、マクロファージの活性化のためにはG c プロテインの翻訳後に付加される糖鎖構造が重要であるとされていた。G c プロテインは418位または420位のスレオニン（Th r）に、G a l N A c（N-アセチルガラクトサミン）にシアル酸とガラクトースが結合した3糖からなるO型糖鎖が結合した状態で発現される。G a l N A cにシアル酸もしくはガラクトースが結合した状態、あるいは418位または420位のスレオニンにG a l N A cが結合しない状態では、マクロファージを活性化できないとされていた。そこで、特許文献1～2ではG c プロテインに β -ガラクトシダーゼやシアリダーゼを作用させ、シアル酸とガラクトースを除去する方法を開示している。

[0004] G c プロテインを特定の細胞で組換え発現すると418位または420位のスレオニン（Th r）にG a l N A cのみが結合したG c プロテインを製造

できる（特許文献3）。しかし、使用できる細胞種が限定されていた。また、Gcプロテインの糖鎖構造とマクロファージの活性化能との関係は十分に明らかにされてはいなかった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表平6－510908号公報

特許文献2：特表平11－511962号公報

特許文献3：国際公開WO2019／117295号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、簡便なプロセスでGcプロテインからなるマクロファージ活性化剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、Gcプロテインの糖鎖構造とマクロファージの活性化能との関係を検討した結果、マクロファージの活性化能のために、Gcプロテインの418位または420位のThrにおけるN－アセチルガラクトサミンは必須ではないことを見出し、本発明の完成に至った。

[0008] すなわち、本発明は、N－アセチルガラクトサミンが付加されていないGcプロテインを含む、マクロファージ活性化剤に関する。

[0009] 前記Gcプロテインが、ヒト、ウシ、ヤギ、またはマウスの血清または乳からの精製物であることが好ましい。

[0010] N－アセチルガラクトサミンが付加されていないアミノ酸が、配列番号1における418位または420位のスレオニンであることが好ましい。

[0011] また、本発明は、前記マクロファージ活性化剤を含む、抗癌用、抗感染症用、抗自己免疫疾患用、抗自閉症用、抗炎症性疾患、抗脳・神経変性疾患、皮膚改善用、または心臓病治療用の医薬組成物に関する。

[0012] また、本発明は、GcプロテインをN－アセチルガラクトサミニダーゼと接

触させる工程を含む、マクロファージ活性化剤の製造方法に関する。

[0013] 前記製造方法は、N－アセチルガラクトサミニダーゼと接触させる工程の前に、Gcプロテインをノイラミニダーゼと接触させる工程を含むことが好ましい。

発明の効果

[0014] 本発明のマクロファージ活性化剤に含まれるGcプロテインにはN－アセチルガラクトサミンが付加されておらず、簡便な酵素処理により製造することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]マクロファージ貪食活性試験の結果を示す。

[図2A]NO産生試験の結果を示す。

[図2B]NO抑制試験の結果を示す。

[図3]TNF－ α 抑制試験の結果を示す。

[図4]M2分化能評価試験の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0016] <<マクロファージ活性化剤>>

Gcプロテインは哺乳動物の血漿や乳などの体液中に存在するタンパク質であり、ビタミンDに結合することからビタミンD結合タンパク質とも称される。Gcプロテインは、血漿や乳などの体液中では418位または420位のスレオニン(Thr)に、GalNAc(N－アセチルガラクトサミン)にシアル酸とガラクトースが結合した3糖からなるO型糖鎖が結合した形態で存在し、この形態はマクロファージを活性化する能力を有しないとされている。一方、418位または420位のスレオニンにGalNAcのみが結合した形態がマクロファージを活性化する能力を有することが知られており、GcMAF(Gc protein-derived macrophage activating factor)と称されている。これに対し、本発明のマクロファージ活性化剤は、N－アセチルガラクトサミンが付加されていないGcプロテインを含むことを特徴とする。

[0017] <G c プロテイン>

G c プロテインとしては、哺乳類由来であれば特に限定されず、例えば、ヒト、ウシ、ヤギ、マウス由来のものが挙げられるが、人間に投与したときに免疫反応を生じさせないために、ヒト由来が好ましい。

[0018] 具体的なG c プロテインとしては、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列と 85 %以上の配列同一性を示すポリペプチド、または、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列において 1 または複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換および／または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

[0019] 配列番号 1 に示すアミノ酸配列との配列同一性は、90 %以上であることが好ましく、95 %以上であることがより好ましく、98 %以上であることがさらに好ましく、99 %以上であることが特に好ましい。

[0020] 配列番号 1 に示したアミノ酸配列において、欠失、挿入、置換および／または付加されるアミノ酸の数は、68 個以下であることが好ましく、45 個以下であることがより好ましく、22 個以下であることがさらに好ましく、9 個以下であることがさらにより好ましく、特に好ましくは4 個、3 個、または2 個以下である。

[0021] N－アセチルガラクトサミンが付加されていないアミノ酸の位置は特に限定されないが、G c プロテインのアミノ酸配列中のスレオニンであることが好ましく、配列番号 1 における418 位または420 位のスレオニンであることが好ましい。

[0022] <血清、乳>

G c プロテインは、前記哺乳類の乳または血清などの体液に含まれるものを用いることができる。G c プロテインを含んだ乳や血清のまま使用することもでき、乳や血清からG c プロテインを精製して使用することもできる。

[0023] 血清は、哺乳類から採取された血液から調製されたものであれば特に限定されない。血清は常法により調製することができる。また、血清は、他人の血清を用いることによる免疫応答リスクや感染リスクを低減するために、本発

明のマクロファージ活性化剤が投与される患者自身の血液から調製されたものを用いることができる。また、健康な他人の血液から調製されたものを用いることもできる。

[0024] 血清からG c プロテインを精製する方法としては、例えば、血清からアルブミン等を除去し、ビタミンD結合性カラムによりG c プロテインを吸着して溶出し、透析を行う方法が挙げられる。

[0025] 乳は、分娩後所定日数の間にのみ分泌される初乳であることが好ましい。乳からのG c プロテインを精製する場合、例えば、水分量を減少させ、カゼインおよび脂肪を除去することにより精製することができる。

[0026] <遺伝子組み換え>

G c プロテインは、遺伝子組み換えにより発現されたタンパク質であってもよい。G c プロテインを遺伝子組み換えにより発現する方法としては、G c プロテインをコードする遺伝子を導入した宿主細胞を培養する方法や、G c プロテインをコードする遺伝子を含む無細胞発現系を使用する方法が挙げられる。宿主細胞は特に限定されず、ストレプトマイセス属、ロドコッカス属、エシェリヒア属、バチルス属、シュードモナス属、ブレヴィバクテリウム、ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属、サッカロマイセス属、クルイベロマイセス属などの微生物や、高等真核生物の細胞が挙げられる。高等真核生物の細胞としては、ヒト、ハムスター、ニワトリ、昆虫由来の細胞が挙げられ、具体的な細胞株としてはCHO細胞、HeLa細胞、HEK293細胞、sf9細胞、DT40細胞等が挙げられる。細胞培養の方法は、浮遊培養であっても付着培養であってもよいが、浮遊培養が好ましい。また、不純物の混入を避けるために無血清培地を用いることが好ましい。

[0027] <酵素処理>

G c プロテインにN-アセチルガラクトサミンが付加されている場合、N-アセチルガラクトサミンを除去することにより、本発明におけるG c プロテインを得ることができる。N-アセチルガラクトサミンの除去方法は特に限定されないが、酵素処理により行うことが好ましい。使用する酵素としては

、エンドー α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、エキソ α -N-アセチルガラクトサミニダーゼが挙げられる。

[0028] エンドー α -N-アセチルガラクトサミニダーゼとしては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のもの、ビフィドバクテリウム ロンガム (*Bifidobacterium longum*) 由来のもの、ストレプトコッカス ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) 由来のもの、ウシ肝臓 (*bovine liver*) 由来のものなどがあげられる。市販されたものとしては、例えば、MERCK 社のカタログ# 324716などが挙げられる。エンドー α -N-アセチルガラクトサミニダーゼは単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0029] また、N-アセチルガラクトサミンにシアル酸が結合している場合、エンドー α -N-アセチルガラクトサミニダーゼによるN-アセチルガラクトサミンの切断効果が低下するため、あらかじめシアル酸を切断しておくことが好ましい。シアル酸の切断は、Gcプロテインにシアリダーゼ処理を行うことにより行える。

[0030] シアリダーゼとしては、例えば、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 由来のもの、レンサ球菌 (*Streptococcus 6646K*) 由来のもの、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) 由来のもの、アースロバクター・ウレアファシエンス (*Arthrobacter ureafaciens*) 由来のものなどがあげられる。市販されたものとしては、例えば、SIGMA-ALDRICH社の製品番号 (SIGMA Prod. Nos.) N2876、N2133、N2904、N3001、N5631、生化学バイオビジネス社のコード番号 (Code Number) 120052、BioLabs社のカタログ番号 (Catalog #) P0720L、P0720Sなどがあげられる。シアリダーゼは単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0031] Gcプロテインとエンドー α -N-アセチルガラクトサミニダーゼまたはシ

アリダーゼとの接触は、十分な量の酵素を用いて十分な時間接触させることにより、それ以上実質的に酵素反応が進行しない程度まで行うのが好ましい。エンドー α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの使用量は、Gcプロテイン1 μ gに対して1～500mUが好ましく、100～200mUがより好ましい。シアリダーゼの使用量は、Gcプロテイン1 μ gに対して1～500mUが好ましく、10～200mUがより好ましい。いずれの酵素を用いる場合も、酵素処理の温度は35～39℃が好ましい。酵素処理時間は60～200分間が好ましい。

[0032] 酵素処理は、任意で緩衝液の存在下で行ってもよい。そのような緩衝液としては、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などが挙げられる。

[0033] 酵素処理後は、熱処理により、酵素を失活させてもよい。熱処理条件は、酵素を失活させることができる限り特に限定されないが、例えば、60℃付近の温度で、約10分間加熱する。また、酵素処理後は、ビタミンD結合性カラム、ゲルろ過カラム、限外ろ過等を組み合わせることによりGcプロテインから酵素を除去してもよい。

[0034] 酵素処理は、固相に固定した酵素（固定化酵素）を用いて行うこともできる。酵素を固相に固定させる方法は、当業者に知られており、例えば、エンドー α -N-アセチルガラクトサミニダーゼまたはシアリダーゼを、シアンプロマイドなどのカップリング剤により、アガロースビーズに固定することができる。酵素が固定化された固相にGcプロテインを適用することにより酵素反応を行える。固定化酵素を用いることにより、酵素処理後、酵素を熱処理により失活させることなく回収でき、夾雑物（熱処理により失活した酵素などのタンパク質等）を除去できる。

[0035] 以上の方法で得られるGcプロテインは、さらに、凍結乾燥して、固体ないし粉体状としてもよい。また、GcプロテインからのN-アセチルガラクトサミンの除去は、レクチンとの結合性の有無により確認できる。レクチンとしては、*Wisteria floribunda*由来のレクチン、*Helix pomatia*由来のレクチンが挙げられる。Gcプロテインがレク

チンと結合しない場合、N-アセチルガラクトサミンが除去されたと判断できる。

[0036] <マクロファージ活性化能>

マクロファージ活性化能は、マクロファージの貪食能を測定することにより評価できる。マクロファージの貪食能の測定は、Gcプロテインをマクロファージの培養液に添加し、そのマクロファージに蛍光ラテックスビーズ、ザイモザンなどの試験物質を貪食させ、貪食したマクロファージの割合や、貪食された試験物質の粒子数を計算することにより行う。貪食したマクロファージの割合や貪食された試験物質の粒子数が、比較対照よりも多いときにマクロファージ活性化能があると判断できる。マクロファージ細胞株としては、例えばRAW264.7、NR8383、J774.1などを使用できる。

[0037] 本発明のマクロファージ活性化剤は、マクロファージによるNO産生を増大しないことが好ましい。NO産生能は、マクロファージにマクロファージ活性化剤を添加し、24時間程度静置した後のNO産生量を測定することにより評価できる。NO産生量は、例えば、実施例に記載したGriess法により測定できる。

[0038] 本発明のマクロファージ活性化剤は、マクロファージによるNO産生を抑制することが好ましい。NO産生の抑制能は、マクロファージに、マクロファージ活性化剤とリポポリサッカライド(LPS)などのNO産生刺激剤を添加し、24時間程度静置した後のNO産生量を測定することにより評価できる。マクロファージによるNO産生を抑制することは、抗炎症作用があることを意味する。

[0039] 本発明のマクロファージ活性化剤は、マクロファージによるTNF- α の産生を増大しないことが好ましい。TNF- α の産生能は、マクロファージにマクロファージ活性化剤、リポポリサッカライド(LPS)などのNO産生刺激剤、およびIFN- γ を添加し、24時間程度静置した後のTNF- α 産生量を測定することにより評価できる。TNF- α 産生量は、例えば、実

施例に記載したELISA法により測定できる。マクロファージによるTNF- α の産生を増大しないことは、抗炎症作用があることを意味する。

[0040] 本発明のマクロファージ活性化剤は、M2型マクロファージへの分化能を有していてもよい。M2型マクロファージへの分化能は、マクロファージにマクロファージ活性化剤を添加し、24時間程度静置した後の、マクロファージにおけるマーカー遺伝子の発現量を測定することにより評価できる。マーカー遺伝子としては、例えばARG-1を用いることができる。マーカー遺伝子の発現量は、例えば、実施例に記載した、固定化した細胞の蛍光顕微鏡による観察により評価できる。一般的に、マクロファージの分化型として炎症性のM1型と抗炎症性のM2型が知られている。本発明のマクロファージ活性化剤の投与により抗炎症反応を促進できると考えられる。

[0041] <<医薬組成物>>

本発明の医薬組成物は、前記マクロファージ活性化剤を含む、抗癌用、抗感染症用、抗自己免疫疾患用、抗自閉症用、抗炎症性疾患、抗脳・神経変性疾患、皮膚改善用、または心臓病治療用の医薬組成物であることを特徴とする。

[0042] <組成>

医薬組成物は、マクロファージ活性化剤に加えて、適宜、薬学的に許容しうる担体を配合してもよい。薬学的に許容し得る担体としては、例えば希釈剤、安定剤、保存剤、緩衝剤等が挙げられる。

[0043] 医薬組成物の形態は特に制限されず、注射用組成物、経口組成物、点眼組成物、輸液組成物、点鼻組成物、点耳組成物、坐剤、経腸栄養組成物が挙げられる。これらの中でも、注射用組成物が好ましい。注射の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、腹腔内注射などが挙げられ、筋肉内注射が好ましい。経口組成物の形態としては、散剤、顆粒剤、錠剤（舌下錠などを含む）、カプセル剤、丸剤、腸溶剤、内用液剤（懸濁剤、乳剤、シロップ剤などを含む）、吸入剤などが挙げられる。

[0044] 医薬組成物の投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、投与方法など

により異なるが、典型的な例としては、例えば、医薬組成物に含まれるタンパク質の総量として、1回の投与あたり、体重1kgあたり、0.1mg～4.0mgが好ましく、0.2mg～2.0mgがより好ましく、0.3mg～1.3mgがさらに好ましい。

[0045] 医薬組成物を上記の1回あたりの投与量で投与する場合の、投与間隔および投与回数は、週1～2回の投与間隔で、全12～24回投与することが挙げられる。また、投与初期（例えば、1～2ヶ月間）に週2回投与し、その後週1回投与してもよい。

[0046] <適応症状>

医薬組成物は、抗癌用、抗感染症用、抗自己免疫疾患用、抗自閉症用、抗炎症性疾患、抗脳・神経変性疾患、皮膚改善用、心臓病治療用に好適に使用できる。

[0047] 癌とは、癌腫、肉腫、その他の悪性腫瘍のいずれをも含むものであり、例えば、皮膚癌、気管支癌、肺癌、非小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、舌癌、咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、肝癌、脾臓癌、腎臓癌、腎細胞癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、ウィルムス腫瘍、悪性黒色腫、髄膜腫、神経芽腫、骨肉腫、カポジ肉腫、リンパ腫、白血病などが挙げられる。なお、癌は、これら悪性腫瘍の他、その転移をも含む。

[0048] 感染症としては、例えば、ウイルス感染症、細菌感染症などが挙げられ、具体的には、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）、HIV感染症、エイズその他、B型肝炎、C型肝炎、ヘルペス、インフルエンザ、肺炎、結核、EBウイルス感染症などが挙げられる。

[0049] 自閉症は、他人との社会的関係の形成の困難さ、言葉の発達の遅れなどを特徴とする行動の障害である。

[0050] 炎症性疾患は、物理的刺激、化学的刺激、微生物の感染に対して起こす生体の防御反応のうち炎症によって生じる疾患である。また、本発明の医薬組成物は、自然免疫の異常によって炎症反応が自然に生じ、起こり臓器障害に至る自己炎症性疾患に対しても有効である。

[0051] 脳・神経変性疾患としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症、レビー小体型認知症などが挙げられる。

[0052] 皮膚改善としては、皮膚の美白化、色素沈着の抑制若しくは改善、角質除去若しくは角質ターンオーバー促進、老化防止、しわ抑制若しくは改善、保湿化、再生、脱毛症の治療若しくは予防などが挙げられる。

[0053] 心臓病としては、うっ血性心不全、不整脈、狭心症、心筋梗塞などが挙げられる。

[0054] <<医薬部外品用組成物>>

マクロファージ活性化剤は、必要に応じて補助剤等を配合することにより、医薬部外品用組成物とすることができる。該医薬部外品用組成物は、溶液状、懸濁液状、シロップ状、顆粒状、クリーム状、ペースト状、ゼリー状等の種々の形態をとり得るものであり、必要に応じ、所望の形状に成形することもできる。医薬部外品用組成物はいずれも常法により製造できる。

[0055] 医薬部外品用組成物におけるG cタンパク質の使用量は、特に限定されるものではないが、上記医薬組成物の場合の投与量と同じもの、あるいは、上記を参考にして適宜設定したものを採用することができる。

[0056] <<食品組成物>>

マクロファージ活性化剤は、必要に応じて補助剤や、甘味料、香辛料、調味料、防腐剤、保存料、殺菌剤、酸化防止剤などの飲食品に通常用いられる各種添加剤を適宜配合することにより食品組成物とすることができる。該食品組成物は、溶液状、懸濁液状、シロップ状、顆粒状、クリーム状、ペースト状、ゼリー状等の種々の形態をとり得る。

[0057] 食品組成物におけるG cタンパク質の使用量は、特に限定されるものではないが、上記医薬組成物の場合の投与量と同じもの、あるいは、上記を参考にして適宜設定したものを採用することができる。

[0058] 食品組成物は、いわゆる健康食品、健康飲料、機能性食品、栄養機能食品、健康補助食品、栄養補助食品（サプリメント）、特別用途食品、特定保健用食品等とすることができる。

[0059] <<マクロファージ活性化剤の製造方法>>

本発明のマクロファージ活性化剤の製造方法は、GcプロテインをN-アセチルガラクトサミニダーゼと接触させる工程を含むことを特徴とする。N-アセチルガラクトサミニダーゼ、および接触条件については、マクロファージ活性化剤に関して上述した通りである。

[0060] 本発明のマクロファージ活性化剤の製造方法は、N-アセチルガラクトサミニダーゼと接触させる工程の前に、Gcプロテインをノイラミニダーゼと接触させる工程を含んでいてもよい。ノイラミニダーゼ、および接触条件については、マクロファージ活性化剤に関して上述した通りである。

実施例

[0061] (1) Gcプロテインの精製（製造例1）

SST II（新血清分離剤入り）採血管（13mm×100mm）（#367528, BD）に回収したヒト血液を遠心分離（4℃、3,000rpm、10min）することにより血清成分を得た。

[0062] その後、BioLogic LP Coreシステム（#731-8300, BIO RAD）を用いて以下の3つのカラムに通すことで血清からGcプロテインを分離・精製した。すなわち、Blue Sepharose 6 Fast Flow（#17094801, GE Healthcare）を用いて血清中からアルブミン等を除去した。続いて、回収したアルブミン除去済みの血清をビタミンD結合性カラムに通すことで、Gcプロテインをカラムに吸着させた。これをグアニジン塩酸塩[6M]（#077-02435, Wako）で溶出させて回収した。

[0063] 回収した溶液はSnakeskin Dialysis Tubing, 3.5 K MWCO, 35mm I.D.（#88244, Thermo Fisher SCIENTIFIC）を用いてSPB[2mM, 5L]中で透析（4℃、15h）することで脱塩を行った。その後、Bio-Scale Mini CHT Type II Cartridge（#7324332, BIO RAD）に通すことで精製を行った。

[0064] 回収した溶液を最後にVivaspin Turbo 4, 10kDa, PES, 25pc (#VS04T01, sartorius) を用いて濃縮 (4℃, 7,500rpm, 10min) することで最終回収物Gcプロテインとした。ポリクローナルウサギ抗ヒトGcグロブリン (#A002102-2, Dako) による抗原抗体反応と電気泳動によりGcプロテインの回収確認を行った。

[0065] (2) N-アセチルガラクトサミンが付加されていないGcプロテイン (GcMMF) の作製 (製造例2)

Gcプロテインの418または420番目のスレオニン残基に結合する糖鎖を切断するため、ノイラミニダーゼ (#N2876-6U, MERCK) とエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (#324716, MERCK) の2種類の酵素を使用した。

[0066] Gcプロテイン [10 μ g] に対してノイラミニダーゼ [200mU] と保温 (37℃, 180min) することでGalNAcに結合しているシアル酸を除去した。続いてシアル酸を切断したGcプロテインをエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ [1600mU] と保温 (37℃, 120min) することでスレオニン残基とGalNAc間の結合を切断した。酵素切断が完了しているかの確認にはWisteria floribunda Lectin, Biotin (#B-1355, Funakoshi), Lectin from Helix pomatia (#L6512-1MG, SAJ) を用いた抗原抗体反応を使用した。このようにして得られた、N-アセチルガラクトサミンが付加されていないGcプロテインをGcMMFと称する。

[0067] 続いてGcMMFから切断に使用した酵素を除去した。酵素除去には、Gcプロテインの回収時と同様に低圧クロマトグラフィーを用いて、ビタミンD結合性カラムとBio-Scale Mini CHT Type II Cartridge (#7324332, BIO RAD) に通すことで酵素除去を行った。こうして得られた溶液はVivaspin Turbo

4, 10 kDa, PES, 25 pc (#VS04T01, sartorius) を用いて限外濾過 (4℃, 7, 500 rpm, 5–10 min) することで最終回収物とした。

[0068] この際にも *Wisteria floribunda* Lectin, Biotin と Lectin from *Helix pomatia*, Polyclonal Rabbit Anti-Human Gc-Globulin による抗原抗体反応で確認を行った。また電気泳動後のゲルを CBB ステインワン Super (Ready To Use) (#11642-31, nacalaitesque) で染色し、酵素除去ができているか確認した。

[0069] (3) マクロファージ貪食活性試験 (実施例 1、比較例 1～4)

本試験での希釈は、全て D-MEM (–) in 1% PS を使用した。

[1日目]

2代目まで D-MEM in 10% FBS, 1% PS で継代した RAW264.7 cell (#EC91062702-F0, KAC) を D-MEM (–) in 1% PS で回収し 1×10^6 cells/ml となるように希釈した。それを 96 ウェル黒クリアボトム平底 TC 処理済プレート (#353219, FALCON) に 100 μ l ずつ播種し、保温 (37℃, 5% CO₂, 15 h) した。

[0070] [2日目]

種々の活性化剤 (GcMMF [10 ng, 100 ng] (実施例 1)、Gc プロテイン [10 ng] (比較例 2)、GcMAF [10 ng] (比較例 3)、LPS [100 ng] (比較例 4)) を 10 μ l 添加し、穏やかにピペティングで懸濁した。なお、Gc プロテインとしては、製造例 1 で精製されたものを使用した。GcMAF としては、国際公開 WO2013/038997 号に記載の方法で、ヒト血清から精製された Gc プロテインを β ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼで処理して得られるタンパク質を使用した。また、活性化剤を添加しないものを比較例 1 とした。その後保温 (37℃

, 5%CO₂, 180min) することで、マクロファージを活性化させた。保温後、Latex-Beads IgG-FITC Solutionを10μl添加し、穏やかにピペティングで懸濁した。操作終了後、アルミホイルで遮光し保温(37℃, 5%CO₂, 24h) することでマクロファージにLatex-Beadsを貪食させた。

[0071] [3日目]

3日目における実験操作は全て遮光条件下で行った。保温終了後、培地を除去し1級メタノール(#136-01837, Wako)を100μl加え、10min静置した。その後メタノールを除去し、5min風乾させた。風乾終了後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Ca, Mg不含、液体)(#14249-95, nacalaitesque)100μlで2回洗浄を行った。その後蛍光顕微鏡(#BZ-X710, KEYENCE)に96-well black plateをセットし、撮影を行った。

[0072] 3日目の蛍光顕微鏡観察・撮影では、×20倍レンズを用いて、位相差画像、蛍光画像(フィルタキューブ:BZ-Xフィルタ GFP), Merge画像の計3枚の画像を撮影した。撮影箇所は事前に設定した3-4か所と定めた。しかし、RAW264.7 cellは半接着性の細胞であることから、実験操作(メタノール固定等)で剥がれたり、凝集したりすることがある。その際は定めた撮影地点から異常なポイントを除くようにして撮影を行った。

[0073] 撮影した位相差観察画像、蛍光観察画像、Merge画像のうち、蛍光観察画像を用いて、BZ-X Analyzerでデータ処理を行った。最初に、撮影したControl群の蛍光画像を用いてHybrid Cell Countを行い、蛍光カウント数、蛍光輝度(積算)を測定した。この際に、蛍光標識に用いるしきい値を設定し、データ処理条件を保存した。この保存した処理条件を用いて、撮影した蛍光画像すべてにMacro Cell Countを行った。

[0074] 蛍光強度を図1に示す。実施例1のGcMMFは、比較例3のGcMAFと

同等のマクロファージ活性化能を示した。この結果から、GcMAFによるマクロファージ活性化にはGalNAc糖鎖は必須ではないことが明らかとなった。

[0075] (4) NO産生／抑制試験（実施例2～3、比較例5～13）

本実験におけるNO産生量の測定は、Griess法を用いて行った。

[1日目]

2代目までD-MEM in 10%FBS, 1%PSで継代したRAW264.7 cell (#EC91062702-F0, KAC)を回収し、 5×10^6 cells/mlとなるように希釈した。それを24-well細胞培養プレート(#VTC-P24, AS ONE)にD-MEM in 10%FBS, 1%PSで1mlずつ播種し、保温(37℃, 5%CO₂, 15h)した。

[0076] [2日目]

(NO産生試験の場合)

ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Ca, Mg不含、液体)(#14249-95, nacalaitesque)1mLで各wellの洗浄を行い、D-MEM(-) in 1%PSを1mLアプライした。その後、種々の活性化剤(GcMMF [10ng, 100ng] (実施例2)、Gcプロテイン [10ng] (比較例6)、GcMAF [10ng] (比較例7)、LPS [100ng] (比較例8))を100μl添加し、保温(37℃, 5%CO₂, 15h)した。また、活性化剤を添加しないものを比較例5とした。

[0077] (NO抑制試験の場合)

ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Ca, Mg不含、液体)(#14249-95, nacalaitesque)1mLで各wellの洗浄を行い、D-MEM(-) in 1%PSを1mLアプライした。その後、種々の活性化剤(GcMMF [10ng, 100ng] (実施例3)、LPS [100ng] (比較例10)、Gcプロテイン [10ng] (比較例11)、

GcMAF [10 ng] (比較例12)、グルコサミン [10 mM] (比較例13)) を100 μ l 添加し、保温 (37℃, 5%CO₂, 15 h) した。また、活性化剤を添加しないものを比較例9とした。ここで、Control 群 (比較例9) 以外の全ての群にLPS [100 ng] を同時添加し、NO抑制のポジティブコントロールとしてグルコサミンを終濃度10 mMとなるように加えた。

[0078] [3日目]

各wellの培養上清をそれぞれ全量エッペンチューブに回収し、よくボルテックスミキサーで攪拌した。その後各エッペンチューブから回収した培養上清を100 μ l ずつ96well セルカルチャープレート (#TR5003, True Line) にアプライした。ここにGriess試薬を100 μ l ずつ添加し遮光条件下で保温 (r. t, 5-10 min) を行ってからマイクロプレートリーダー (#infinite M200, TECAN) で吸光度 (550 nm) を測定した。検量線として亜硝酸ナトリウムを用いた。

[0079] NO産生試験結果を図2Aに示し、NO抑制試験結果を図2Bに示す。実施例2~3のGcMMFは、比較例7、比較例12のGcMAFと同様にNO産生能は示さず、NO抑制能のみ示した。

[0080] (5) TNF- α 抑制試験 (実施例4、比較例14~18)

TNF α Mouse Uncoated ELISA Kit with plates (#88-7324-22, eBioscience) を使用して試験を行った。下記のプロトコルもキットの内容に沿って作製した。

[0081] [1日目]

2代目までD-MEM in 10%FBS, 1%PSで継代したRAW264.7 cell (#EC91062702-F0, KAC) を回収し0.4 $\times$ 10⁶ cells/mlとなるように希釈した。それを24-well細胞培養プレート (#VTC-P24, AS ONE) にD-MEM in

10%FBS, 1%PSで1mlずつ播種し、保温(37℃, 5%CO₂, 15h)した。

[0082] [2日目]

ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Ca, Mg不含、液体)(#14249-95, nacalai tesque)1mLで各wellの洗浄を行い、D-MEM(-)in 1%PSを1mLアプライした。その後、種々の活性化剤(GcMMF[10ng, 100ng](実施例4)、クルクミン[20mM]in DMSO(比較例15)、Gcプロテイン[10ng](比較例16)、GcMAF[10ng, 100ng](比較例17)、LPS[1μg]+IFN-γ[10ng](比較例18))を100μl添加し、保温(37℃, 5%CO₂, 24h)した。また、活性化剤を添加しないものを比較例14とした。ここで、全サンプル群にLPS[1μg]+IFN-γ[10ng]を添加し、TNF-α抑制のポジティブコントロールとして、クルクミン[10mM]in DMSOを各wellに2μlずつ添加した。

[0083] 上記操作に加えて、キャプチャー抗体inコーティングバッファーを作製し、付属の96wellプレートに100μlずつ添加した。その後プレートを密封し、保温(4℃, Shaking, 15h)した。

[0084] [3日目]

96wellプレートの溶液を捨て、wash buffer[250μl]で計3回洗浄を行った。洗浄後、作製した1×ELISA/ELISPOTを各wellに200μlずつ添加しプレートを密封して保温(r.t, 60min)した。(保温中にStandard(1000 pg/ml)の作製と24h刺激後の培養上清の回収を行った。)

[0085] 保温終了後、1×ELISA/ELISPOTを除去しwash buffer[250μl]で1度洗浄を行った。その後Standardをプレート上で希釈し、24h刺激後の培養上清を100μlずつ添加し保温(4℃, 15h)した。(ブランクには1×ELISA/ELISPOTを100

μl 添加した。)

[0086] [4日目]

各wellの溶液を除去し、wash buffer [250 μl] で5回洗浄した後、TNF-α 1×DetAbを100 μlずつ添加し、プレートを密封して保温 (r. t, 60 min) した。(保温中にAvidin-HRPを準備した。)

[0087] 保温終了後、wash buffer [250 μl] で3回洗浄を行った後、Avidin-HRPを100 μlずつ添加し、プレートを密封して保温 (r. t, 30 min) した。保温終了後、溶液を捨てwash buffer [250 μl] で7回洗浄を行った。その後、1×TMBを100 μlずつ添加しさらに保温 (r. t, 15 min) を行った。(この間にSTOP Solutionを作製した。)

[0088] 保温終了後、STOP Solutionを100 μlずつ添加し、マイクロプレートリーダー (#infinite M200, TECAN) で吸光度 (450 nm (reference 570 nm)) を測定した。

[0089] TNF-α抑制試験結果を図3に示す。実施例4のGcMMFは、比較例17のGcMAFと同様にTNF-α抑制能は示さなかった。

[0090] (6) M2分化能評価試験 (実施例5、比較例19~22)

[1日目]

2代目までD-MEM in 10%FBS, 1%PSで継代したRAW264.7 cell (#EC91062702-F0, KAC) をD-MEM (#044-29765, Wako) in 1%PSで回収し 1×10^6 cells/mlとなるように希釈した。それを96ウェル黒クリアボトム平底TC処理済プレート (#353219, FALCON) に100 μlずつ播種し、保温 (37°C, 5%CO₂, 15 h) した。

[0091] [2日目]

種々の活性化剤 (GcMMF [10 ng, 100 ng] (実施例5)、Gcプロテイン [10 ng] (比較例20)、GcMAF [10 ng] (比較例

21)、IL-4 [50 ng] + IL-13 [50 ng] (比較例22)) を10 μ l 添加し、穏やかにピペティングで懸濁した。また、活性化剤を添加しないものを比較例19とした。その後、保温(37°C, 5%CO₂, 24 h)した。(ポジティブコントロールは、IL-4 [50 ng] + IL-13 [50 ng] (比較例22))

[0092] [3日目]

保温終了後、培地を除去し1級メタノール(#136-01837, Wako) 100 μ l を加え、10 min 静置した。その後メタノールを除去し、5 min 風乾させた。風乾終了後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Ca, Mg 不含、液体)(#14249-95, nacal aisquesque) 100 μ l で2回洗浄を行った。その後0.1%BSA in PBSを150 μ l ずつ添加し、保温(r. t, 15 h)を行った。

[0093] [4日目]

PBS [100 μ l] で3回洗浄を行い、anti-h/m Arginase1 Antibodyを30 μ l ずつ添加した後保温(r. t, 30 min)を行った。その後、PBS [100 μ l] で3回洗浄を行いマイクロプレートリーダーで蛍光強度(ex: 488 nm, em: 530 nm)を測定した。

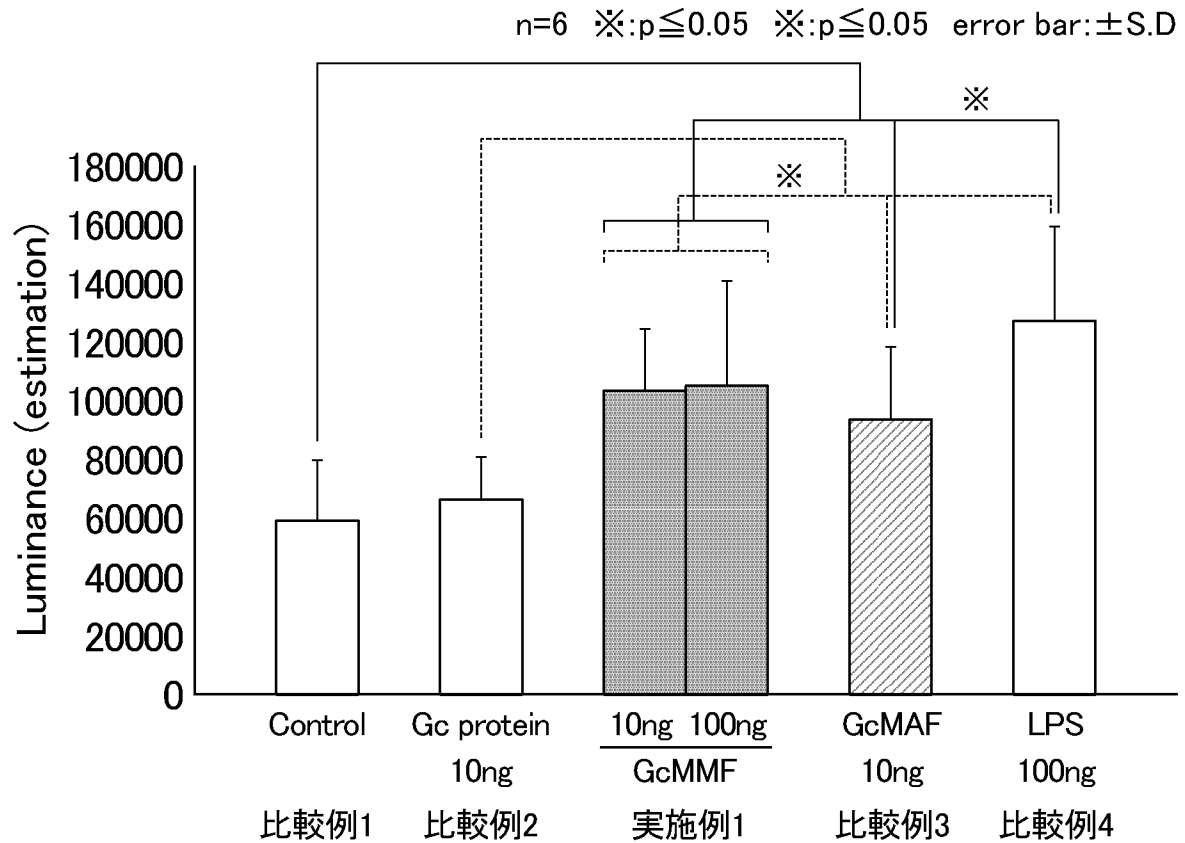
[0094] 蛍光強度を図4に示す。実施例5のGcMMFは、比較例21のGcMAFと同等の弱いM2型文化能を示した。

請求の範囲

- [請求項1] N－アセチルガラクトサミンが付加されていないG c プロテインを含む、マクロファージ活性化剤。
- [請求項2] 前記G c プロテインが、ヒト、ウシ、ヤギ、またはマウスの血清または乳からの精製物である、請求項1に記載のマクロファージ活性化剤。
- [請求項3] N－アセチルガラクトサミンが付加されていないアミノ酸が、配列番号1における418位または420位のスレオニンである、請求項1または2に記載のマクロファージ活性化剤。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれかに記載のマクロファージ活性化剤を含む、抗癌用、抗感染症用、抗自己免疫疾患用、抗自閉症用、抗炎症性疾患、抗脳・神経変性疾患、皮膚改善用、または心臓病治療用の医薬組成物。
- [請求項5] G c プロテインをN－アセチルガラクトサミニダーゼと接触させる工程を含む、マクロファージ活性化剤の製造方法。
- [請求項6] N－アセチルガラクトサミニダーゼと接触させる工程の前に、G c プロテインをノイラミニダーゼと接触させる工程を含む、請求項5に記載の製造方法。

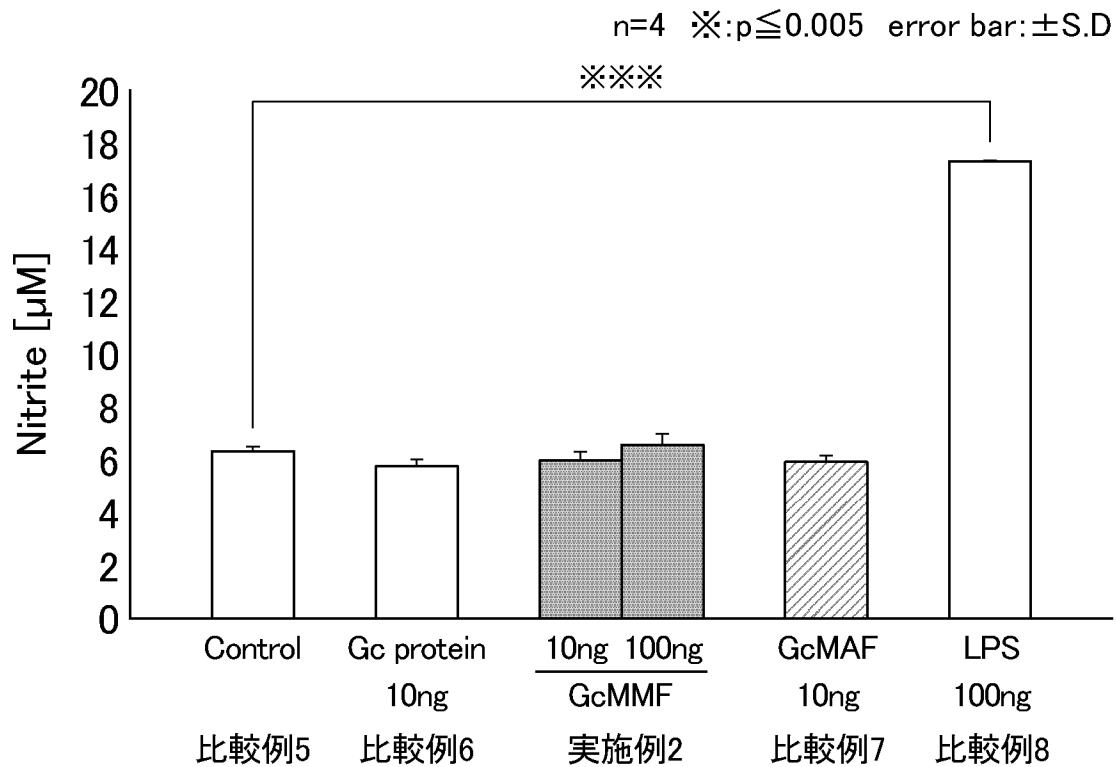
[図1]

マクロファージ貪食活性試験

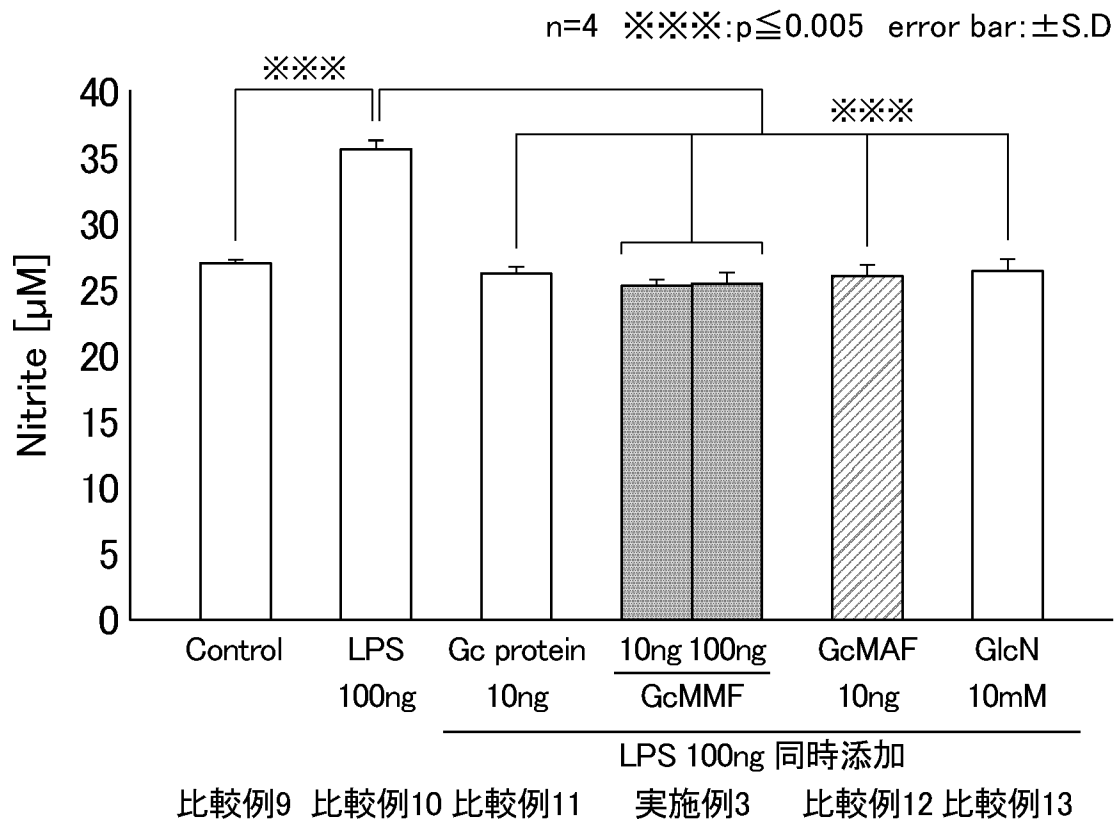


[図2A]

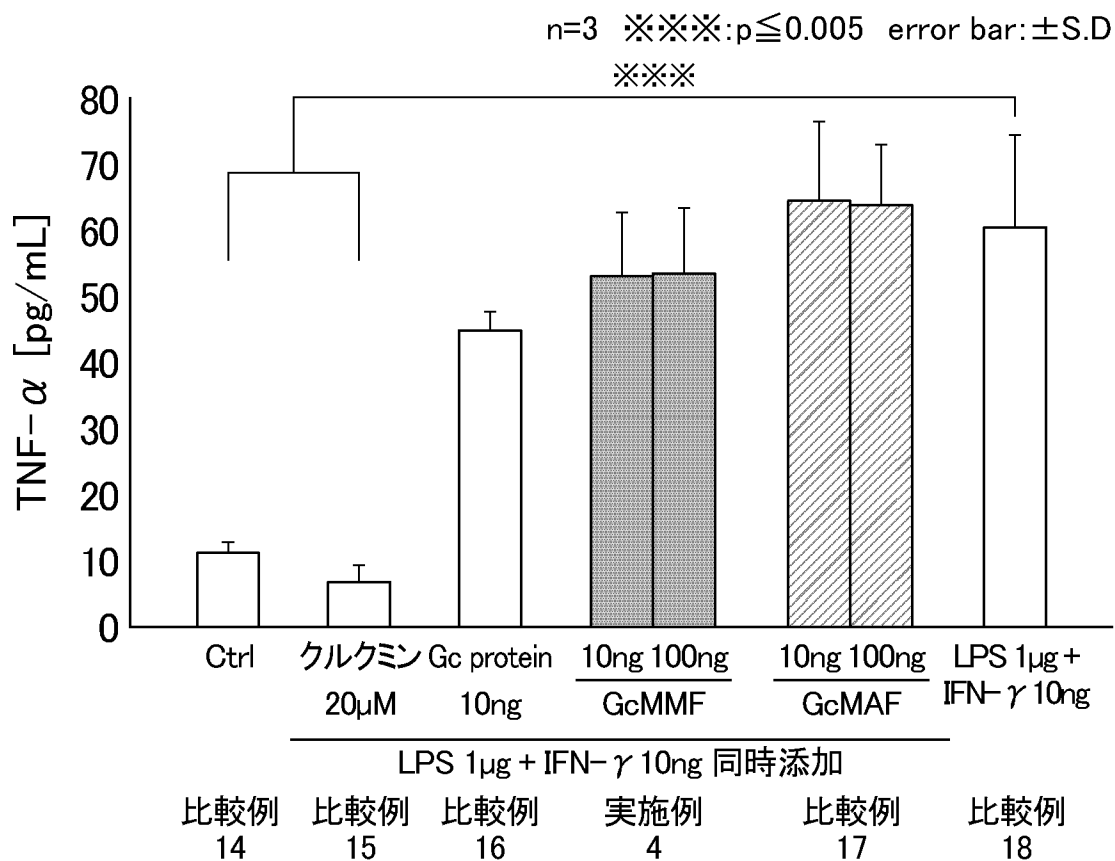
NO産生試験



[図2B]
NO抑制試験

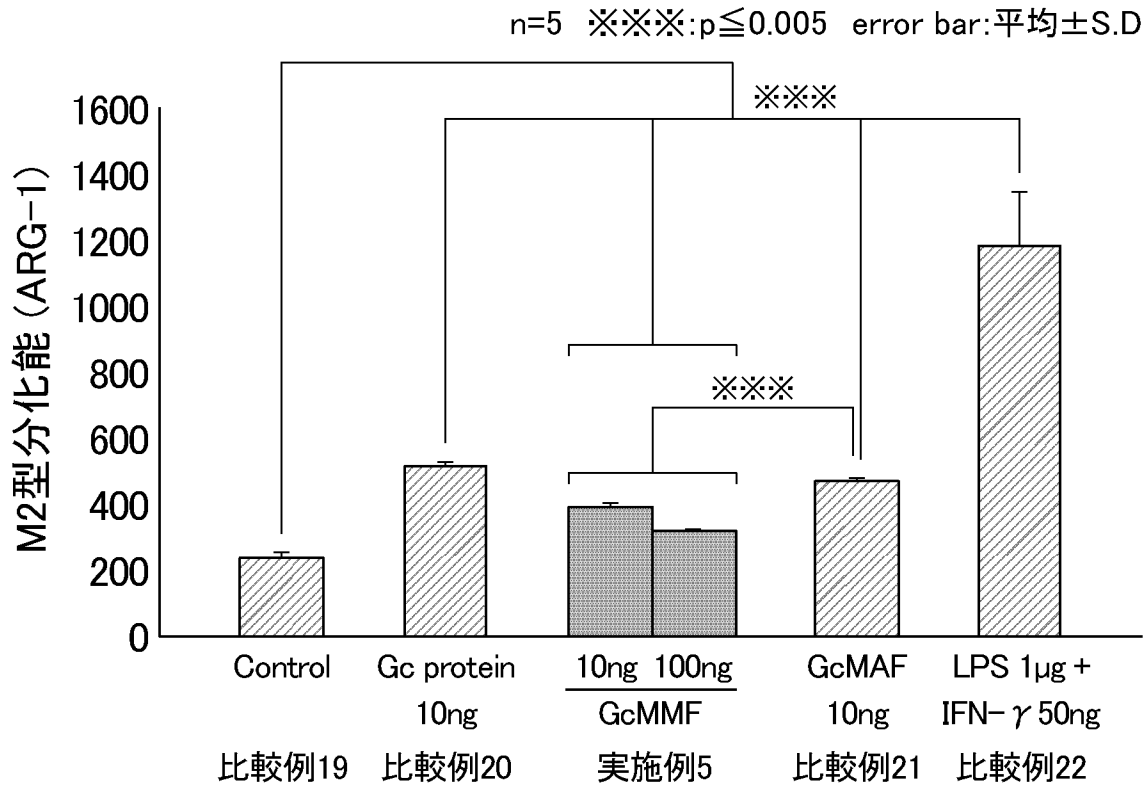


[図3]
TNF- α 抑制試験



[図4]

M2分化能評価試験



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/045102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16(2006.01)i; **A61P 9/00**(2006.01)i; **A61P 17/00**(2006.01)i; **A61P 25/00**(2006.01)i; **A61P 29/00**(2006.01)i; **A61P 31/00**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **A61P 37/02**(2006.01)i; **C07K 14/47**(2006.01)i; **C12P 21/02**(2006.01)i
 FI: A61K38/16; A61P35/00; A61P31/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P17/00; A61P9/00; A61P37/02; C12P21/02 Z; C07K14/47 ZNA

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K38/16; A61P9/00; A61P17/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P31/00; A61P35/00; A61P37/02; C07K14/47; C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/117295 A1 (FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RES AND INNOVATION AT KOBE) 20 June 2019 (2019-06-20) examples	1-6
A	JP 2014-511857 A (EFRANAT LTD) 19 May 2014 (2014-05-19) examples	1-6
A	WO 2012/029954 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA) 08 March 2012 (2012-03-08) examples 1-8	1-6
A	JP 2001-508544 A (YAMAMOTO, Nobuto) 26 June 2001 (2001-06-26) abstract	1-6
A	YAMAMOTO, Nobuto et al. Immunotherapy for prostate Cancer with Gc Protein-Derived Macrophage-Activating Factor, GcMAF. Translational Oncology. 2008, vol. 1, no. 2, pp. 65-72 abstract	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 February 2022

Date of mailing of the international search report

15 February 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/045102

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/045102

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
WO	2019/117295	A1	20 June 2019	EP	3725883	A1
				example		
				CN	111527210	A
JP	2014-511857	A	19 May 2014	US	2014/0030215	A1
				example		
				US	2015/0361151	A1
				WO	2012/137199	A1
				EP	2694088	A1
				AU	2012240945	A
				CA	2832487	A
				IL	228732	D
				CN	103547280	A
WO	2012/029954	A1	08 March 2012	EP	2612921	A1
				examples 1-8		
JP	2001-508544	A	26 June 2001	US	5776671	A
				abstract		
				US	5620846	A
				US	6410269	B1
				US	5998132	A
				US	5985545	A
				US	2002/0055140	A1
				US	2006/0014143	A1
				WO	1998/030906	A1
				WO	1996/040903	A1
				EP	1340815	A2
				EP	1443112	A2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 38/16(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i FI: A61K38/16; A61P35/00; A61P31/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P17/00; A61P9/00; A61P37/02; C12P21/02 Z; C07K14/47 ZNA																				
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K38/16; A61P9/00; A61P17/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P31/00; A61P35/00; A61P37/02; C07K14/47; C12P21/02 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年										
日本国実用新案公報	1922-1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																			
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																			
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																			
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2019/117295 A1（公益財団法人神戸医療産業都市推進機構）20.06.2019（2019 - 06 - 20） 実施例</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2014-511857 A（エフラナット リミテッド）19.05.2014（2014 - 05 - 19） 実施例</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2012/029954 A1（国立大学法人徳島大学）08.03.2012（2012 - 03 - 08） 実施例 1 - 8</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2001-508544 A（山本 信人）26.06.2001（2001 - 06 - 26） 要約</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>YAMAMOTO, Nobuto et al., Immunotherapy for prostate Cancer with Gc Protein-Derived Macrophage-Activating Factor, GcMAF, Translational Oncology, 2008, Vol. 1, No. 2, p. 65-72 abstract</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	A	WO 2019/117295 A1（公益財団法人神戸医療産業都市推進機構）20.06.2019（2019 - 06 - 20） 実施例	1-6	A	JP 2014-511857 A（エフラナット リミテッド）19.05.2014（2014 - 05 - 19） 実施例	1-6	A	WO 2012/029954 A1（国立大学法人徳島大学）08.03.2012（2012 - 03 - 08） 実施例 1 - 8	1-6	A	JP 2001-508544 A（山本 信人）26.06.2001（2001 - 06 - 26） 要約	1-6	A	YAMAMOTO, Nobuto et al., Immunotherapy for prostate Cancer with Gc Protein-Derived Macrophage-Activating Factor, GcMAF, Translational Oncology, 2008, Vol. 1, No. 2, p. 65-72 abstract	1-6
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																		
A	WO 2019/117295 A1（公益財団法人神戸医療産業都市推進機構）20.06.2019（2019 - 06 - 20） 実施例	1-6																		
A	JP 2014-511857 A（エフラナット リミテッド）19.05.2014（2014 - 05 - 19） 実施例	1-6																		
A	WO 2012/029954 A1（国立大学法人徳島大学）08.03.2012（2012 - 03 - 08） 実施例 1 - 8	1-6																		
A	JP 2001-508544 A（山本 信人）26.06.2001（2001 - 06 - 26） 要約	1-6																		
A	YAMAMOTO, Nobuto et al., Immunotherapy for prostate Cancer with Gc Protein-Derived Macrophage-Activating Factor, GcMAF, Translational Oncology, 2008, Vol. 1, No. 2, p. 65-72 abstract	1-6																		
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																				
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献																				
国際調査を完了した日 03.02.2022		国際調査報告の発送日 15.02.2022																		
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 濱田 光浩 4U 3763 電話番号 03-3581-1101 内線 3439																		

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/045102

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2019/117295	A1	20.06.2019	EP	3725883	A1	
				Example			
				CN	111527210	A	
JP	2014-511857	A	19.05.2014	US	2014/0030215	A1	
				Example			
				US	2015/0361151	A1	
				WO	2012/137199	A1	
				EP	2694088	A1	
				AU	2012240945	A	
				CA	2832487	A	
				IL	228732	D	
				CN	103547280	A	
WO	2012/029954	A1	08.03.2012	EP	2612921	A1	
				Example 1-8			
JP	2001-508544	A	26.06.2001	US	5776671	A	
				abstract			
				US	5620846	A	
				US	6410269	B1	
				US	5998132	A	
				US	5985545	A	
				US	2002/0055140	A1	
				US	2006/0014143	A1	
				WO	1998/030906	A1	
				WO	1996/040903	A1	
				EP	1340815	A2	
				EP	1443112	A2	