

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-520646

(P2016-520646A)

(43) 公表日 平成28年7月14日(2016.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 47/26 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/26	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 47/10 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/10	
<b>A 6 1 K 47/34 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/34	
<b>A 6 1 K 47/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-517743 (P2016-517743)	(71) 出願人	513250824 エフラナット リミテッド イスラエル国, 7 6 7 0 1 レホヴォット 7 オペンハイマー ストリート
(86) (22) 出願日	平成26年6月9日 (2014.6.9)	(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月3日 (2015.12.3)	(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(86) 国際出願番号	PCT/IL2014/050516	(74) 代理人	100202751 弁理士 岩堀 明代
(87) 国際公開番号	W02014/199373	(74) 代理人	100191086 弁理士 高橋 香元
(87) 国際公開日	平成26年12月18日 (2014.12.18)	(72) 発明者	マルガリート, イラナ イスラエル国, 5 2 2 8 1 1 0 ラマト ガン, 1 0 リマルト ストリート 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	61/832, 867		
(32) 優先日	平成25年6月9日 (2013.6.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 Gc-マクロファージ活性化因子を含む組成物およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、Gcマクロファージ活性化因子(GcMAF)を含む安定な医薬組成物に関する。本発明は、特に、マクロファージ活性化に関連する疾患を治療するためのGcMAFおよび少なくとも1種類の薬学的に許容される界面活性剤ならびに/または表面活性を有する合成水溶性ポリマーを含む保存安定な医薬組成物、ならびにその使用に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

安定な G c マクロファージ活性化因子 ( G c M A F ) またはその生物学的に活性のある変異体もしくは断片、ならびに界面活性剤および表面活性を有する合成水溶性ポリマーからなる群から選択される少なくとも 1 種類の薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

## 【請求項 2】

前記安定な G c M A F が、アミノ酸残基に結合した N - アセチルガラクトサミン基を有し、ヒト G c M A F および動物の G c M A F からなる群から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

10

## 【請求項 3】

前記安定な G c M A F が、アミノ酸残基に結合した N - アセチルガラクトサミン基を有するヒト G c M A F である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

前記安定な G c M A F が、配列番号 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

前記安定な断片が、前記 G c タンパク質のアミノ酸 4 0 0 ~ 4 3 5 に相当するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

前記安定な断片が、配列番号 4 または配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の医薬組成物。

20

## 【請求項 7】

前記安定な G c M A F が、約 1 0 0 n g / m l ~ 約 1 m g / m l の範囲の濃度で存在する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 8】

前記安定な G c M A F が、約 1 0 0 n g / m l ~ 約 3 0 0 μ g / m l の範囲の濃度で存在する、請求項 7 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

前記安定な G c M A F が、約 2 0 0 n g / m l ~ 約 3 0 μ g / m l の範囲の濃度で存在する、請求項 8 に記載の医薬組成物。

30

## 【請求項 10】

前記界面活性剤が、非イオン性界面活性剤、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤、および両性イオン性界面活性剤からなる群から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 11】

前記非イオン性界面活性剤が、ソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシアルキレン高級アルコールエーテル類、およびポリオキシアルキレン高級アルコールエステル類からなる群から選択される、請求項 10 に記載の医薬組成物。

40

## 【請求項 12】

前記非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビトールエステル類、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル類、ポリオキシエチレンドデシルエーテル類、オクチルグルコシド、およびアルキルマルトシドからなる群から選択される、請求項 10 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 13】

前記非イオン性界面活性剤が、ポリソルベート 8 0 ( T W E E N ( 登録商標 ) 8 0 ) 、ポリソルベート 6 0 ( T W E E N ( 登録商標 ) 6 0 ) 、ポリソルベート 2 0 ( T W E E N ( 登録商標 ) 2 0 ) 、 N - ドデシル - D - マルトシド、トリトン X - 1 0 0 、ブリジ 5 8 、およびポロキサマー 1 8 8 からなる群から選択される、請求項 10 に記載の医薬組

50

成物。

【請求項 14】

前記非イオン性界面活性剤が、ポリソルベート 80 (TWEEN (登録商標) 80) である、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

表面活性を有する前記合成水溶性ポリマーが、ポリビニルアルコール、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドブロックコポリマー、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、プロピレングリコールホモポリマー、およびポリオキシエチル化ポリオールからなる群から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 16】

さらに等張化剤を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記等張化剤が塩化ナトリウムである、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

さらに緩衝剤を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記緩衝剤が、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリス緩衝液、およびクエン酸緩衝液からなる群から選択される、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

さらに医薬担体または希釈剤を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 21】

溶液、懸濁液、乳濁液、粉末、錠剤、およびカプセル剤からなる群から選択される形態で製剤化される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

水溶液の形態で製剤化される、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

GcMAF、ポリソルベート 80、塩化ナトリウム、リン酸緩衝液、および水を含む組成物であって、前記組成物の pH が約 5 ~ 約 8 の範囲であり、GcMAF の濃度が約 100 ng/ml ~ 1 mg/ml の範囲である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 24】

マクロファージ活性化に関連する疾患または障害の治療に使用するための、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記対象がヒトである、請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記対象が動物である、請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

前記動物が犬である、請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

前記マクロファージ活性化に関連する疾患または障害が、癌、ウイルス性疾患、細菌感染症、自己免疫疾患、自閉症、および慢性疲労症候群からなる群から選択される、請求項 24 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 29】

前記医薬組成物が、非経口経路による投与に適している、請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

前記医薬組成物が、静脈内、筋肉内または皮下注射に適する、請求項 29 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

50

前記癌が、肉腫、癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮種 ( l y m p h a n g i o e n d o t h e l i o s a r c o m a )、悪性滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、カポジ肉腫、松果体腫、血管芽細胞腫、乏突起神経膠腫、黒色腫、神経芽細胞腫および網膜芽腫からなる群から選択される固形腫瘍である、請求項 28 に記載の医薬組成物。

【請求項 32】

マクロファージ活性化に関連する疾患または障害を治療する方法であって、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の治療有効量の安定な医薬組成物を、そのような治療を必要としている対象に投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Gcマクロファージ活性化因子 ( G c M A F ) を含む安定な医薬組成物に関する。本発明は、特に、マクロファージ活性化に関連する疾患を治療するための G c M A F および少なくとも 1 種類の薬学的に許容される界面活性剤ならびに / または表面活性を有する合成水溶性ポリマーを含む保存安定な医薬組成物、ならびにその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

マクロファージ活性化は、炎症の発達および免疫応答の調節に重要な役割を果たしている。炎症に関連するマクロファージ活性化は、B および T リンパ球ならびに血清ビタミン D 結合タンパク質 ( 「グループ固有の成分」 または G c タンパク質としても知られている ) の関与を必要としている。

【0003】

Gcタンパク質は、見かけの分子量が 52 k D a で、通常、ヒト血漿中のタンパク質の約 0.5% を構成するヒト血漿の  $\gamma$  - 2 マクログロブリン画分の多型糖タンパク質である。Gcタンパク質は、2 方向に枝分かれしたガラクトースおよびシアル酸末端を有する N - アセチルガラクトサミンで構成された三糖を保有する。このオリゴ糖を炎症に刺激された B リンパ球の誘導性膜性  $\alpha$  - ガラクトシダーゼで加水分解すると、マクロファージ活性促進因子が得られる。次に、マクロファージ活性促進因子を T リンパ球の膜状の N e u - 1 シアリダーゼで加水分解すると、マクロファージ活性化因子 ( G c M A F ) が得られる。固定化された  $\alpha$  - ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼでの精製 G c タンパク質の段階的な処理も、GcMAF を生成することが示された。

【0004】

GcMAF は、殺腫瘍性の役割を有することが示されている。癌患者における血清 Gc タンパク質が癌細胞から分泌された血清  $\alpha$  - N - アセチルガラクトシダーゼ ( ナガラゼ ( N a g a l a s e ) ) によって脱グリコシル化されるため、癌患者における GcMAF 活性は消失または低下することが実証された。その結果、脱グリコシル化 Gc タンパク質は GcMAF に変換されず、マクロファージの活性化が低下または消滅した。黒色腫、前立腺癌、結腸直腸癌、または転移性乳癌を有する癌患者に外因性 GcMAF を投与すると、活性マクロファージの不足を克服することによって GcMAF の治療効果が示された ( Y a m a m o t o e t a l . , 2 0 0 8 , I n t . J . C a n c e r , 1 2 2 ; 4 6 1 - 4 6 7 ; Y a m a m o t o e t a l . , T r a n s . O n c o l . 2 0 0 8 , 1 : 6 5 - 7 2 ) 。マクロファージ活性化に対する同様の効果が、GcMAF で治療された H I V 感染患者および大理石骨病患者で観察された。

【0005】

米国特許第 5 , 1 7 7 , 0 0 2 号は、マクロファージ活性化因子を生成するプロセスで

10

20

30

40

50

あって、ヒトのグリコシル化グループ固有の成分を、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはシアリダーゼ、 $\beta$ -マンノシダーゼもしくはそれらの混合物と組み合わせた $\alpha$ -ガラクトシダーゼとインビトロで接触させることと、マクロファージ活性化因子を取得することと、を含むプロセスを開示している。米国特許第5,177,002号は、マクロファージ活性化をそれを必要としている個体において誘導するための方法であって、このように生成されたヒトマクロファージ活性化因子を個体に投与することを含む方法をさらに開示している。

【0006】

WO 93/07288は、有力なマクロファージ活性化因子の生成プロセスであって、動物のビタミンD結合タンパク質をインビトロで(i) $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、または(ii)シアリダーゼ、 $\beta$ -マンノシダーゼもしくはそれらの混合物と組み合わせた $\alpha$ -ガラクトシダーゼと接触させるプロセスを開示している。WO 93/07288は、マクロファージを活性化するための方法であって、このように調製したマクロファージ活性化因子を動物に投与することを含む方法をさらに開示している。

10

【0007】

WO 96/40903は、パキユロウイルスベクターを介したビタミンD結合タンパク質(Gcタンパク質)およびその小ドメイン(ドメインIIIとも呼ばれる)のクローニングについて開示している。固定化した $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼでクローン化Gcタンパク質およびクローン化ドメインIIIを処理すると、それぞれ、マクロファージ活性化因子のGcMAFcおよびCdMAFcをもたらした。WO 96/40903は、癌、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症および骨粗鬆症の治療のためのマクロファージ活性化因子の使用について開示している。

20

【0008】

WO 2012/137199は、癌またはHIV感染患者を治療するための、グリコシダーゼ酵素を実質的に欠くマクロファージ活性化因子(MAF)含有医薬組成物およびその使用方法について開示している。

【0009】

Pihlら(Basic & Clin Pharm & Toxicol., 2010, 107: 853 - 860)は、精製された血漿由来ヒトGcタンパク質に対して行われた前臨床毒性試験について開示しており、5%マルトースの存在下でリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中約10mg/mlの濃度のGcタンパク質が、アクチン結合能力を完全に保持し、Gcタンパク質の量に有意な変化なく4年間安定であると判明したことを示している。

30

【0010】

Paciniら(Cancer Immunol. Immunother., 2011, 60: 479 - 485)は、ニワトリ胚漿尿膜(CAM)アッセイにおいてPGE<sub>1</sub>に刺激された血管形成を阻害するそれらの効力について異なるGcMAFc調製物を評価し、15日間、25°Cでの保存により、GcMAFcの効力が約50%減少したことを示した。

【0011】

GcMAFcの化学的安定性および生物学的活性を維持するGcMAFcの保存安定な医薬組成物に対する必要性が、未だ満たされていない。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、Gcタンパク質由来のマクロファージ活性化因子(GcMAFc)および少なくとも1種類の薬学的に許容される界面活性剤ならびに/または表面活性を有する合成水溶性ポリマーを含み、保存時の安定性が改善された医薬組成物を提供する。本発明は、さらに、マクロファージ活性化と関連する疾患または障害を治療する方法であって、前記安定な医薬組成物をそのような治療を必要としている対象に投与することを含む方法を提供する。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0013】

本発明は、G c M A F水溶液を低濃度で、4 で保存するかまたは凍結融解した場合に、G c M A Fの化学的安定性および生物学的活性が著しく失われるという知見に部分的に基づく。

## 【0014】

ヒト血清アルブミン(H S A)、アルギニン、および糖アルコールのマンニトールなどのポリペプチドの従来薬学的に許容される安定剤は、単独で添加しても、組み合わせて添加しても、G c M A Fの水溶液(30 μg/ml未満)におけるG c M A Fの安定化に本質的に無効であることをこれから開示する。

10

## 【0015】

本発明の発明者らは、低濃度のG c M A Fを有する水溶液に薬学的に許容される界面活性剤を添加すると、保存時の化学的安定性および生物学的活性の喪失の問題が克服されることを予想外にも発見した。例えば、1 μg/mlのG c M A Fの水溶液に非イオン性界面活性剤を添加すると、4、25、さらには37での最大3ヶ月間の保存中にG c M A Fの化学的安定性が維持された。本発明の発明者らはさらに、非イオン性界面活性剤が、低濃度、例えば、1 μg/mlのG c M A F溶液の1回または複数回の凍結融解サイクル後に、溶液中のG c M A Fの維持を可能にすることを明らかにした。

## 【0016】

さらに、マクロファージの活性化によって測定した場合に、非イオン性界面活性剤が、低濃度のG c M A F溶液の長期保存中にG c M A Fの化学的安定性を維持するだけでなく、かかる保存中にG c M A Fの生物学的活性を保持することを開示する。

20

## 【0017】

本発明の発明者らは、さらに、イオン性界面活性剤および表面活性を有する水溶性ポリマーが、長期保存中にG c M A Fを安定化するのに有効であることを明らかにした。しかし、ヒアルロン酸またはアルギン酸塩などの多糖類は、G c M A Fに対して著しい安定化効果を発揮しなかった。したがって、本発明の組成物は、低濃度(約100 ng/ml~約1 mg/ml)のG c M A Fの液体製剤として製剤化された場合に、4での長期保存後、すなわち、少なくとも6ヶ月後にもG c M A Fの化学的安定性および生物学的活性を維持するので非常に有利である。また、本発明の組成物は、G c M A Fの取り扱いおよび送達を単純化し、融解時にG c M A Fの化学的安定性に本質的にほとんどまたは全く影響なく本組成物を凍結でき、したがって、さらに融解直後に本組成物を使用する必要性を回避できる。

30

## 【発明の効果】

## 【0018】

第一の態様によれば、本発明は、安定なもしくは安定化されたG c マクロファージ活性化因子(G c M A F)またはその生物学的に活性のある変異体もしくは断片と、界面活性剤および水溶性ポリマーからなる群から選択される少なくとも1種類の薬学的に許容される賦形剤と、を含む医薬組成物を提供する。

## 【0019】

いくつかの実施形態によれば、安定なG c M A Fは、独立してアミノ酸残基に結合したN-アセチルガラクトサミン基を有するヒトG c M A Fおよび動物のG c M A Fからなる群から選択される。一実施形態によれば、安定なG c M A Fは、アミノ酸残基に結合したN-アセチルガラクトサミン基を有するヒトG c M A Fである。追加の実施形態によれば、安定なG c M A Fは、配列番号1~3のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態によれば、安定なG c M A F断片は、G c タンパク質のアミノ酸400~435に対応するアミノ酸配列を含む。さらに別の実施形態によれば、安定なG c M A F断片は、配列番号4または配列番号5に記載のアミノ酸配列からなる。

40

## 【0020】

追加の実施形態によれば、安定なG c M A Fは、組成物が液体形態である場合には、約

50

100 ng/ml ~ 約1 mg/ml の範囲の濃度で存在するか、あるいは G c M A F は、組成物が液体形態である場合には、約100 ng/ml ~ 約300 µg/ml、さらには約200 ng/ml ~ 約300 µg/ml、さらには約200 ng/ml ~ 約1 µg/ml の範囲の濃度で存在する。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。特定の実施形態によれば、G c M A F は、組成物が液体形態である場合には、約200 ng/ml ~ 約1 µg/ml の範囲の濃度で存在する。

【0021】

さらなる実施形態によれば、界面活性剤は、非イオン性界面活性剤、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤および両性イオン性界面活性剤からなる群から選択される。

10

【0022】

いくつかの実施形態によれば、非イオン性界面活性剤は、ソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシアルキレン高級アルコールエーテル類、およびポリオキシアルキレン高級アルコールエステル類からなる群から選択される。非イオン性界面活性剤の例としては、ポリオキシエチレンソルビトールエステル、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンドデシルエーテル、オクチルグルコシド、およびアルキルマルトシドが挙げられるが、これらに限定されない。さらに別の実施形態によれば、非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート80 (T W E E N (登録商標) 80)、ポリソルベート60 (T W E E N (登録商標) 60)、ポリソルベート20 (T W E E N (登録商標) 20)、N - ドデシル - D - マルトシド、トリトン X - 100、ブリジ58、ポロキサマー188、チロキサポール、ステアリン酸 P E G - 40、NP - 40、プルロニック (商標) F - 68、およびポロキサマー4070 からなる群から選択される。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。特定の実施形態によれば、非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート80 (T W E E N (登録商標) 80) である。

20

【0023】

さらなる実施形態によれば、水溶性ポリマーは、表面活性を有する合成水溶性ポリマーである。さらなる実施形態によれば、表面活性を有する合成水溶性ポリマーは、ポリビニルアルコール、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドブロックコポリマー、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、ポリ - 1, 3 - ジオキソラン、ポリ - 1, 3, 6 - トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸のコポリマー、プロピレングリコールホモポリマー、およびポリオキシエチル化ポリオールからなる群から選択される。例示的な実施形態によれば、表面活性を有する水溶性ポリマーはポリビニルアルコールである。

30

【0024】

さらなる実施形態によれば、本医薬組成物は、さらに等張化剤を含むことができる。特定の実施形態によれば、等張化剤は塩化ナトリウムである。

【0025】

さらなる実施形態によれば、本医薬組成物は、さらに緩衝剤を含むことができる。緩衝剤の例としては、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリス緩衝液、およびクエン酸緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0026】

さらに別の実施形態によれば、本医薬組成物は、さらに薬学的に許容される担体または希釈剤を含むことができる。特定の実施形態によれば、担体は水である。

【0027】

さらに別の実施形態によれば、本医薬組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、粉末、錠剤、およびカプセル剤からなる群から選択される形態で製剤化される。特定の実施形態によれば、本組成物は、水溶液の形態で製剤化される。例示的な実施形態によれば、本医薬組成物は、G c M A F、ポリソルベート80、塩化ナトリウム、リン酸緩衝液、および水を含

50

み、組成物のpHが約5～約8の範囲であり、組成物中のGcMAFの濃度は約100ng/ml～約1mg/ml、あるいは約100ng/ml～約300μg/ml、さらには約200ng/ml～約30μg/ml、さらには約200ng/ml～約1μg/mlの範囲である。それぞれの可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【0028】

別の態様によれば、本発明は、マクロファージの活性化に関連する疾患または障害を治療するための方法であって、そのような治療を必要としている対象に本発明の原理に従って治療有効量の医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0029】

いくつかの実施形態によれば、対象はヒトまたは動物である。特定の実施形態によれば、動物は、イヌなどのペット動物である。

10

【0030】

さらなる実施形態によれば、マクロファージの活性化に関連する疾患または障害は、癌、ウイルス性疾患、細菌感染症、自己免疫疾患、自閉症、および慢性疲労症候群からなる群から選択される。それぞれの可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【0031】

さらなる実施形態によれば、安定なGcMAFは、独立してアミノ酸残基に結合したN-アセチルガラクトサミン基を有するヒトGcMAFまたは動物のGcMAFである。特定の実施形態によれば、GcMAFは、アミノ酸残基に結合したN-アセチルガラクトサミン基を有するヒトGcMAFである。さらなる実施形態によれば、GcMAFは、配列番号1～3のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態を表す。

20

【0032】

さらなる実施形態によれば、本医薬組成物は、非経口によって、または経口投与経路によって投与される。特定の実施形態によれば、本医薬組成物は、静脈内、筋肉内または皮下投与経路によって投与される。それぞれの可能性は、本発明の別の実施形態を表す。

【0033】

別の態様によれば、本発明は、マクロファージの活性化に関連する疾患または障害の治療に使用するための本発明の原理に従った医薬組成物を提供する。

【0034】

本発明のこれらのおよび他の実施形態は、以下の明細書、実施例および特許請求の範囲に関連してより良く理解されるであろう。

30

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1A】ヒト血清アルブミン(HSA)、TWEEN(登録商標)80またはその両方の存在下または非存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンブロットを示す。図1Aは、PBS単独でまたはTWEEN(登録商標)80、HSAもしくはその両方を含むPBSで希釈し、その後、免疫プロットングのために4～12%のポリアクリルアミドゲル上にロードしたGcMAF試料のウエスタンブロット分析を示す。

【図1B】図1Bは、PBS単独でまたはTWEEN(登録商標)80、HSAもしくはその両方を含むPBSで希釈し、4で1週間インキュベートし、その後、免疫プロットングのために4～12%のポリアクリルアミドゲル上にロードしたGcMAF試料のウエスタンブロット分析を示す。PBSで希釈し、その直後に免疫プロットングを行ったGcタンパク質を対照として使用した。

40

【図2A】アルギニン、HSA、TWEEN(登録商標)80、もしくはマンニトールの非存在下または存在下でのPBSで希釈するか、またはクエン酸緩衝液で希釈したGcMAFのウエスタンブロットを示す。試料を希釈直後にロードするか(図2A)、または免疫プロットングの前に37で1週間(図2B)、25で2週間(図2C)、37で1ヶ月間(図2D)、もしくは37で3ヶ月間(図2E)インキュベートした。対照として、Gcタンパク質の試料をPBS(図2A～2E)またはTWEEN(登録商標)

50



80を含むPBS(図2E)で希釈し、すぐに免疫プロットを行った。

【図2B】アルギニン、HSA、TWEEN(登録商標)80、もしくはマンニトールの非存在下または存在下でのPBSで希釈するか、またはクエン酸緩衝液で希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか(図2A)、または免疫プロットの前には37で1週間(図2B)、25で2週間(図2C)、37で1ヶ月間(図2D)、もしくは37で3ヶ月間(図2E)インキュベートした。対照として、Gcタンパク質の試料をPBS(図2A~2E)またはTWEEN(登録商標)80を含むPBS(図2E)で希釈し、すぐに免疫プロットを行った。

【図2C】アルギニン、HSA、TWEEN(登録商標)80、もしくはマンニトールの非存在下または存在下でのPBSで希釈するか、またはクエン酸緩衝液で希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか(図2A)、または免疫プロットの前には37で1週間(図2B)、25で2週間(図2C)、37で1ヶ月間(図2D)、もしくは37で3ヶ月間(図2E)インキュベートした。対照として、Gcタンパク質の試料をPBS(図2A~2E)またはTWEEN(登録商標)80を含むPBS(図2E)で希釈し、すぐに免疫プロットを行った。

【図2D】アルギニン、HSA、TWEEN(登録商標)80、もしくはマンニトールの非存在下または存在下でのPBSで希釈するか、またはクエン酸緩衝液で希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか(図2A)、または免疫プロットの前には37で1週間(図2B)、25で2週間(図2C)、37で1ヶ月間(図2D)、もしくは37で3ヶ月間(図2E)インキュベートした。対照として、Gcタンパク質の試料をPBS(図2A~2E)またはTWEEN(登録商標)80を含むPBS(図2E)で希釈し、すぐに免疫プロットを行った。

【図2E】アルギニン、HSA、TWEEN(登録商標)80、もしくはマンニトールの非存在下または存在下でのPBSで希釈するか、またはクエン酸緩衝液で希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか(図2A)、または免疫プロットの前には37で1週間(図2B)、25で2週間(図2C)、37で1ヶ月間(図2D)、もしくは37で3ヶ月間(図2E)インキュベートした。対照として、Gcタンパク質の試料をPBS(図2A~2E)またはTWEEN(登録商標)80を含むPBS(図2E)で希釈し、すぐに免疫プロットを行った。

【図3A】異なる濃度のTWEEN(登録商標)80の非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか(図3A)、または免疫プロット前に37で1週間インキュベートした(図3B)。対照として、Gcタンパク質の試料を、PBS(図3A)またはTWEEN(登録商標)80を含むPBS(図3Aおよび3B)で希釈し、すぐに免疫プロットを行った。

【図3B】異なる濃度のTWEEN(登録商標)80の非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか(図3A)、または免疫プロット前に37で1週間インキュベートした(図3B)。対照として、Gcタンパク質の試料を、PBS(図3A)またはTWEEN(登録商標)80を含むPBS(図3Aおよび3B)で希釈し、すぐに免疫プロットを行った。

【図4A】非イオン性界面活性剤のTWEEN(登録商標)80、TWEEN(登録商標)20、ポロキサマー188、およびN-ドデシル-D-マルトシドの非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を、免疫プロット前に4で一晩(図4A)、37で1週間(図4B)、または37で1ヶ月間(図4C)インキュベートした。0.005%のTWEEN(登録商標)80を含むPBSで希釈し、その直後に免疫プロットを行ったGcタンパク質の試料を対照として使用した。

【図4B】非イオン性界面活性剤のTWEEN(登録商標)80、TWEEN(登録商標)20、ポロキサマー188、およびN-ドデシル-D-マルトシドの非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を、免疫プロット前に4で一晩(図4A)、37で1週間(図4B)、または37で1

10

20

30

40

50

ヶ月間（図4C）インキュベートした。0.005%のTWEEN（登録商標）80を含むPBSで希釈し、その直後に免疫プロットを行ったGcタンパク質の試料を対照として使用した。

【図4C】非イオン性界面活性剤のTWEEN（登録商標）80、TWEEN（登録商標）20、ポロキサマー188、およびN-ドデシル-D-マルトシドの非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を、免疫プロット前に4で一晚（図4A）、37で1週間（図4B）、または37で1ヶ月間（図4C）インキュベートした。0.005%のTWEEN（登録商標）80を含むPBSで希釈し、その直後に免疫プロットを行ったGcタンパク質の試料を対照として使用した。

10

【図5A】TWEEN（登録商標）80、ブリジ（登録商標）58、トリトンX-100、PEG4000、もしくはトレハロースの非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか（図5A）、または免疫プロット前に37で1週間（図5B）、もしくは37で1ヶ月間（図5C）インキュベートした。0.005%のTWEEN（登録商標）80を含むPBSで希釈し、その直後に免疫プロットを行ったGcタンパク質の試料を対照として使用した。

【図5B】TWEEN（登録商標）80、ブリジ（登録商標）58、トリトンX-100、PEG4000、もしくはトレハロースの非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか（図5A）、または免疫プロット前に37で1週間（図5B）、もしくは37で1ヶ月間（図5C）インキュベートした。0.005%のTWEEN（登録商標）80を含むPBSで希釈し、その直後に免疫プロットを行ったGcタンパク質の試料を対照として使用した。

20

【図5C】TWEEN（登録商標）80、ブリジ（登録商標）58、トリトンX-100、PEG4000、もしくはトレハロースの非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか（図5A）、または免疫プロット前に37で1週間（図5B）、もしくは37で1ヶ月間（図5C）インキュベートした。0.005%のTWEEN（登録商標）80を含むPBSで希釈し、その直後に免疫プロットを行ったGcタンパク質の試料を対照として使用した。

30

【図6A】非イオン性界面活性剤のTWEEN（登録商標）80、TWEEN（登録商標）20、ポロキサマー188、およびN-ドデシル-D-マルトシドの非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか（図6A）、または免疫プロット前に37で1ヶ月間インキュベートした（図6B）。0.005%のTWEEN（登録商標）80を含むPBSで希釈し、その直後に免疫プロットを行ったGcタンパク質の試料を対照として使用した。

【図6B】非イオン性界面活性剤のTWEEN（登録商標）80、TWEEN（登録商標）20、ポロキサマー188、およびN-ドデシル-D-マルトシドの非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFのウエスタンプロットを示す。試料を希釈直後にロードするか（図6A）、または免疫プロット前に37で1ヶ月間インキュベートした（図6B）。0.005%のTWEEN（登録商標）80を含むPBSで希釈し、その直後に免疫プロットを行ったGcタンパク質の試料を対照として使用した。

40

【図7】凍結融解後のGcMAFのウエスタンプロットを示す。TWEEN（登録商標）80の非存在下または存在下で、PBSで希釈したGcMAFに凍結/融解を1サイクル行い、次いで免疫プロット前に様々な期間、4または室温（RT）でインキュベートした。対照として、Gcタンパク質の試料を、PBSまたは0.005%のTWEEN（登録商標）80を含むPBSで希釈し、その直後に免疫プロットを行った。

50

【図 8】3 サイクルの凍結融解後の G c M A F のウエスタンブロットを示す。T W E E N (登録商標) 80 の非存在下または存在下で、P B S で希釈した G c M A F 試料に凍結融解を 3 サイクル行い、その後に免疫プロットングを行った。

【図 9 A】T W E E N (登録商標) 80、ヒアルロン酸、ポリビニルアルコール (P V A)、アルギン酸塩、カゼイン、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S)、またはポリビニルピロリドン (P V P) の非存在下または存在下で、P B S で希釈した G c M A F のウエスタンブロットを示す。試料を希釈直後にロードするか (図 9 A)、または免疫プロットングの前に 37 °C で 1 週間 (図 9 B) もしくは 37 °C で 2 週間 (図 9 C) インキュベートした。対照として、G c タンパク質の試料を 0.005% の T W E E N (登録商標) 80 を含む P B S で希釈し、その直後に免疫プロットングを行った。

【図 9 B】T W E E N (登録商標) 80、ヒアルロン酸、ポリビニルアルコール (P V A)、アルギン酸塩、カゼイン、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S)、またはポリビニルピロリドン (P V P) の非存在下または存在下で、P B S で希釈した G c M A F のウエスタンブロットを示す。試料を希釈直後にロードするか (図 9 A)、または免疫プロットングの前に 37 °C で 1 週間 (図 9 B) もしくは 37 °C で 2 週間 (図 9 C) インキュベートした。対照として、G c タンパク質の試料を 0.005% の T W E E N (登録商標) 80 を含む P B S で希釈し、その直後に免疫プロットングを行った。

【図 9 C】T W E E N (登録商標) 80、ヒアルロン酸、ポリビニルアルコール (P V A)、アルギン酸塩、カゼイン、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S)、またはポリビニルピロリドン (P V P) の非存在下または存在下で、P B S で希釈した G c M A F のウエスタンブロットを示す。試料を希釈直後にロードするか (図 9 A)、または免疫プロットングの前に 37 °C で 1 週間 (図 9 B) もしくは 37 °C で 2 週間 (図 9 C) インキュベートした。対照として、G c タンパク質の試料を 0.005% の T W E E N (登録商標) 80 を含む P B S で希釈し、その直後に免疫プロットングを行った。

【図 10 A】T W E E N (登録商標) 80、T W E E N (登録商標) 20、ポロキサマー 188、N - ドデシル - D - マルトシド、およびポリビニルアルコール (P V A) の非存在下または存在下で、P B S で希釈した G c M A F のウエスタンブロットを示す。試料を希釈直後にロードするか (図 10 A) または 37 °C で 1 週間インキュベートした (図 10 B)。0.005% の T W E E N (登録商標) 80 を含む P B S で希釈し、その直後に免疫プロットングを行った G c タンパク質の試料を対照として使用した。

【図 10 B】T W E E N (登録商標) 80、T W E E N (登録商標) 20、ポロキサマー 188、N - ドデシル - D - マルトシド、およびポリビニルアルコール (P V A) の非存在下または存在下で、P B S で希釈した G c M A F のウエスタンブロットを示す。試料を希釈直後にロードするか (図 10 A) または 37 °C で 1 週間インキュベートした (図 10 B)。0.005% の T W E E N (登録商標) 80 を含む P B S で希釈し、その直後に免疫プロットングを行った G c タンパク質の試料を対照として使用した。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本発明は、G c 由来のマクロファージ活性化因子 (G c M A F) と、薬学的に許容される界面活性剤および表面活性を有する薬学的に許容される合成水溶性ポリマーからなる群から選択される薬学的に許容される賦形剤と、を含む安定な医薬組成物を提供する。本発明は、G c M A F 水溶液を低濃度で、4 °C で保存した場合に、G c M A F の化学的安定性および生物学的活性が著しく失われるという知見に部分的に基づく。作用の任意の機構に縛られることなく、界面活性剤の安定効果は、タンパク質 - 界面活性剤の直接相互作用および疎水性ドメインの結合に起因し得る G c M A F の凝集および / もしくは分解および / もしくは容器表面への吸着の防止または減少の結果であり得る。

【0037】

G c タンパク質および G c M A F

ビタミン D 結合タンパク質 (D B P) とも命名された G c タンパク質は、見かけの分子量が 52 k D a で、特定のオリゴ糖が結合している血漿タンパク質である。G c タンパク

10

20

30

40

50

質は、当業者に公知の任意の方法により血清または血漿から精製できる。高純度の G c タンパク質は、25 - ヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> - セファロースアフィニティークロマトグラフィーにより血清または血漿から単離できる。G c タンパク質はまた、アクチンに対する G c タンパク質の結合特異性を利用するアクチン - アガロースアフィニティークロマトグラフィーによっても精製できる。

【0038】

あるいは、G c タンパク質は、G c タンパク質または G c タンパク質小ドメイン (ドメイン I I I) をコードする単離された c D N A から取得できる。G c タンパク質および G c ドメイン I I I のクローニングならびに発現は、本明細書に完全に記載されるように参照により組み込まれる米国特許第 6, 410, 269 号に記載された。そこに記載された方法では、ヒト G c タンパク質をコードする全長 c D N A を単離するためにはバクテリオファージ g t 11 (クロンテック社、カリフォルニア州パロアルト) 中のヒト肝臓 c D N A ライブラリーを使用し、タンパク質発現には昆虫細胞におけるバキュロウイルス発現系を使用している。しかし、G c タンパク質またはその活性断片をコードする c D N A を発現させるには、哺乳動物細胞系が好ましい。好ましくは、発現は、G c タンパク質またはその活性ドメインが正しくグリコシル化されるように真核細胞中で行われる。当技術分野で公知の任意のこのような細胞系、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、B H K 細胞、ヒト胎児腎臓 H E K 293 細胞および出芽酵母が使用されてもよい。したがって、任意の真核生物発現ベクターが使用でき、それらには p C I - N E O、p W E 3、p c D N A 3.1 および p C M 182 が含まれるが、これらに限定されない。選択された細胞系へのベクターの挿入は、増幅の有無に関わらず、例えば、エレクトロポレーションによって、T r a n s F e c t i n などの脂質トランスフェクションにより、または当業者に公知の任意の化学的方法によって行うことができる。トランスフェクションは一過性のまたは安定な発現をもたらすことができ、両方の形態は所望の G c タンパク質またはその断片を得るのに適切である。活性 M A F の前駆体である発現タンパク質は、その後、細胞から抽出するか、または当技術分野で公知の任意の方法によって増殖培地から収集することができる。

10

20

【0039】

G c タンパク質は、ゲル電気泳動分析によって実証できるような 2 つの主要な表現型：G c 1 および G c 2 に現れる多型タンパク質である。G c 1 および G c 2 遺伝子の配列をコードする全ヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列が報告されている (C o o k e t a l . , 1985 . J . C l i n . I n v e s t . 76 : 2420 ; Y a n g e t a l . , 1985 . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 82 7994)。G c 1 は、1 つのアミノ酸残基の変化により 2 つのバンド (「速い」および「遅い」) として電気泳動で移動する G c 1 f および G c 1 s サブタイプにさらに分けられる。

30

【0040】

G c 1 タンパク質は、ヒト G c タンパク質の主要なサブタイプである。G c 1 タンパク質は、ガラクトースおよびシアル酸 (G c 1 f 中) またはガラクトースおよびマンノースもしくはシアル酸 (G c 1 s 中) の末端を有するコアタンパク質に結合した N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c) で構成された分岐状三糖を保有している。G c 2 は、末端ガラクトース部分に連結されたコア G a l N A c を有する単純なグリコシル化パターンを有する。G c 1 f オリゴ糖は、炎症刺激された B 細胞の膜状の - ガラクトシダーゼによって加水分解されて、マクロファージ活性促進因子をもたらす。次に、T 細胞のシアリダーゼ (ノイラミニダーゼとしても知られている) によって加水分解されて、マクロファージ活性化因子 (G c M A F) をもたらす。動物、例えば、マウスまたはイヌの D B P は、末端ガラクトースを有する N - アセチルガラクトサミンで構成された二糖を保有する。B 細胞単独の - ガラクトシダーゼによるこの二糖類の加水分解は、有力な M A F (G c M A F と命名されている) を生成する。

40

【0041】

本明細書で使用する用語「G c タンパク質」または「ビタミン D 結合タンパク質」は、

50

ヒトまたは動物の G c タンパク質を指し、グリコシル化形態、例えば、G c 1、G c 2、G c 1 f、G c 1 s および G c 1 s \* を含む全ての遺伝子型および多型体、ならびに生物学的に活性のある変異体およびその断片を指す。本明細書で使用する用語「生物学的に活性のある」変異体または断片は、脱グリコシル化の際に G c M A F 変異体または断片を生成する G c タンパク質の任意の変異体または断片を指し、このように生成された G c M A F 変異体または断片は、マクロファージを活性化でき、アミノ酸残基、典型的にはスレオニンに連結された N - アセチルガラクトサミン基を有する。

【 0 0 4 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G c タンパク質は、配列番号 1 ~ 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列（それぞれ、G c 1 f、G c 1 s および G c 2）を含むか、またはそれらからなる。これらのアミノ酸配列中の N - アセチルガラクトサミン基は、成熟 G c タンパク質の 4 1 8 位または 4 2 0 位のスレオニンに連結されている。

10

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用する用語「断片」は、G c タンパク質の全長アミノ酸配列よりも、例えば、配列番号 1 ~ 3 の G c タンパク質の 4 5 8 個のアミノ酸よりも少ないアミノ酸を有する G c タンパク質の全長アミノ酸配列の任意の部分（一部）を指し、その一部は、なおもアミノ酸残基、典型的にはスレオニンに連結された N - アセチルガラクトサミン基を含み、なおもマクロファージ活性化の活性を保持している。典型的には、全長タンパク質の一部は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質である。「ペプチド」とは、5 0 個以下のアミノ酸からなるアミノ酸配列を意味する。「ポリペプチド」とは、一般に 5 0 個を上回るアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を意味する。「タンパク質」とは、1 つまたは複数の共有結合ポリペプチド鎖を意味する。用語ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質は、本明細書を通して互換的に使用される。

20

【 0 0 4 4 】

G c タンパク質断片は、成熟 G c タンパク質の多型のそれぞれのアミノ酸 4 0 0 ~ 4 3 5 に対応するアミノ酸配列を含んでよい。あるいは、G c 断片は、成熟タンパク質のアミノ酸 3 7 5 ~ 4 5 8 に対応する G c タンパク質ドメイン I I I であり得る。

【 0 0 4 5 】

成熟 G c タンパク質のアミノ酸 3 7 5 ~ 4 5 8 に対応する G c 断片ドメイン I I I は、配列番号 4 または配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる。これらのアミノ酸配列における N - アセチルガラクトサミンは、4 4 位または 4 6 位のスレオニンと結合している。

30

【 0 0 4 6 】

G c タンパク質の生物学的に活性のある変異体または断片は、対象に投与された場合に、変異体または断片ポリペプチドが天然ポリペプチドと同じ治療効果を有するような天然ポリペプチドの所望の生物学的活性を保持していなければならない。すなわち、変異体または断片ポリペプチドは、天然ポリペプチドについて観察されたものと同様の方法で、医薬組成物中の治療活性成分として機能する。用語「変異体」は、天然 G c タンパク質または天然 G c タンパク質の断片のいずれかの変異体を指し、1 つまたは複数のアミノ酸置換、挿入、もしくは欠失を有する天然のポリペプチド配列の断片または全長を含む。

40

【 0 0 4 7 】

G c タンパク質の生物学的に活性のある変異体は、一般に、G c タンパク質の全長アミノ酸配列と少なくとも 5 0 %、好ましくは少なくとも 6 0 %、より好ましくは少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、および最も好ましくは約 9 9 % の配列同一性を有し、比較のためのベースとして役立つ。あるいは、生物学的に活性のある変異体は、G c タンパク質のドメイン I I I と少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、および最も好ましくは約 9 9 % の配列同一性を有し、比較のためのベースとして役立つ。用語「配列同一性」は、変異体のアミノ酸配列の特定の連続したセグメントを参照分子のアミノ酸配列と整列させ、比較した場合に基準となる変異体ポリペプチドおよびポリペプチド分子内に見られる同一のアミノ酸残基を指す。2 つのアミノ酸配列間のパーセント

50

配列同一性は、同一のアミノ酸残基が両方の配列に生じる位置の数を決定して、マッチした位置の数を取得し、マッチした位置の数をセグメント内の位置の総数で割って、参照分子と比較し、その結果に100を乗じて、配列同一性のパーセンテージを取得することによって計算される。

#### 【0048】

アミノ酸配列同一性のパーセンテージを考慮する場合、いくつかのアミノ酸残基は、タンパク質機能の特性に影響を与えない保存的アミノ酸置換の結果として異なってもよい。これらの場合において、パーセント配列同一性は、保存的に置換されたアミノ酸における類似性のために上方に調整することができる。したがって、配列内のアミノ酸の置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択されてもよい。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが含まれる。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。正に帯電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが含まれる。負に帯電した（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。このような置換は、保存的置換として知られている。

10

#### 【0049】

本明細書の上記および本明細書に完全に記載されたかのように参照により組み込まれる米国特許第5,177,002号に開示されているように、特定のグリコシダーゼ酵素を用いたいくつかのオリゴ糖の段階的な除去により、Gcタンパク質は非常に強力なマクロファージ活性化因子（GcMAF）に変換される。GcMAFは、参照により本明細書に組み込まれるWO2012/137199に開示されているように、イオン交換クロマトグラフィー、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー、および/または疎水性クロマトグラフィー、例えば、フェニルセファロースクロマトグラフィーによってさらに精製できる。

20

#### 【0050】

##### GcMAF組成物

液体製剤における低濃度でのポリペプチドの安定性は、例えば、製剤のpHおよび/またはイオン強度、保存温度、凍結-融解の反復サイクル、容器への吸着、および処理の間などの機械的せん断力への曝露などの要因により影響を受ける可能性がある。凝集体形成および生物学的活性の喪失はまた、物理的な攪拌ならびに溶液中および保存バイアル内の液体-空気界面でのポリペプチド分子の相互作用の結果として生じ得る。攪拌の結果として、タンパク質は凝集し、粒子を形成し、最終的には他の吸着タンパク質と沈殿し得る。

30

#### 【0051】

本発明の医薬組成物は、賦形剤として薬学的に許容される界面活性剤を含むことができる。用語「界面活性剤」（表面活性剤としても知られる）は、2種類の液体間、または液体と固体の間、または気体と液体の間の表面張力（または界面張力）を低下させる任意の薬剤を含む。界面活性剤は、洗浄剤、湿潤剤、乳化剤、発泡剤、および/または分散剤として作用し得る。界面活性剤は、エマルジョンの形態で組成物中の油と水を結合している乳化剤であり得る。本発明で用いられる界面活性剤には、ヒト用または動物用の医薬に有用である任意の非イオン性、陰イオン性、陽イオン性、両性イオン性、および両性の薬学的に許容される界面活性剤が含まれる。

40

#### 【0052】

非イオン性界面活性剤には、ソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシアルキレン高級アルコールエーテル類、およびポリオキシアルキレン高級アルコールエステル類が含まれるが、これらに限定されない。したがって、非イオン性界面活性剤には、ポリソルベート80（TWEEN（登録商標）80）、ポリソルベート60（TWEEN（登録商標）60）およびポリソルベート20（TWEEN（登録商標）20）などのポリオキシエチレンソルビトールエステル類、チロキサポール；トリトンX-100などのポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類、NP-

50

40などのポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル類、ブリジ58などのポリオキシエチレンドデシルエーテル類、オクチルグルコシド、およびn-ドデシル-D-マルトシドなどのアルキルマルトシド；ポロキサマー4070；ポロキサマー188；ならびにステアリン酸ポリオキシシル40が含まれる。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。TWEEN（登録商標）およびポロキサマー界面活性剤は、ヒトに使用するためにFDAに認可されているので好ましい。

【0053】

非イオン性界面活性剤には、脂肪族アルコールエトキシレート（アルキルポリエチレングリコール類）、アルキルフェノールポリエチレングリコール類、アルキルメルカプタンポリエチレングリコール類、脂肪アミンエトキシレート類（アルキルアミノポリエチレングリコール類）、脂肪酸エトキシレート類（アシルポリエチレングリコール類）、ポリプロピレングリコールエトキシレート類（プルロニック（商標）、例えば、プルロニックF-68）、脂肪酸アルキロールアミド類、（脂肪酸アミドポリエチレングリコール類）、N-アルキルポリヒドロキシ脂肪酸アミド、N-アルコキシポリヒドロキシ脂肪酸アミド、スクロースエステル類、ソルビトールエステル類およびポリグリコールエーテル類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、脂肪酸アルカノールアミド、シヨ糖脂肪酸エステル類、グリセロールモノオクタノエート、グリセロールジオクタノエートおよびグリセロールトリオクタノエートも含まれ得るが、これらに限定されない。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。

【0054】

陰イオン界面活性剤には、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム、スルホン酸ジオクチルナトリウムを含む、アルキル硫酸塩、オレフィン硫酸塩、エーテル硫酸塩、モノグリセリドスルフェート、スルホン酸アルキル、スルホン酸アリアル、オレフィンスルホネート、アルキルスルホスクシネート、アリアルスルホスクシネートが含まれるが、これらに限定されない。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。

【0055】

陽イオン界面活性剤には、ステアリルアミン、トリエタノールアミンオレエート、塩化ベンゼトニウムを含む、ベンザルコニウム塩類、ポリオキシアルキレンアルキルアミン類、アルキルアミン類、アルカノールアミン脂肪酸エステル類、第四級アンモニウム脂肪酸エステル類、ジアルキルアンモニウム塩類、アルキルピリジニウム塩類が含まれるが、これらに限定されない。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。

【0056】

両性界面活性剤には、例えば、（2-ココイル-2-イミダゾリニウムヒドロキシド-1-カルボキシエチルオキシ-2-ナトリウム塩などの）イミダゾリン系両性界面活性剤、（アルキルベタイン、アミドベタイン、およびスルホベタインなどの）ベタイン系界面活性剤、およびアシルメチルタウリンが含まれる。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。

【0057】

界面活性剤は、組成物の総重量の約0.001重量%～約10重量%の量で、あるいは組成物の総重量の約0.001重量%～約0.5重量%の量で、または約0.001重量%～約0.2重量%の量で、または約0.001重量%～約0.05重量%の量で本発明の医薬組成物中に存在する。

【0058】

本明細書および特許請求の範囲を通じて使用される用語「約」は、示された値±10%を意味する。

【0059】

本発明の組成物は、水溶性ポリマーを含むことができる。水溶性ポリマーは、表面活性を有する合成ポリマーであり得る。用語「表面活性」は、2種類の液体間、もしくは液体と固体の間、もしくは気体と液体の間の表面張力（または界面張力）を低下または排除す

るための薬剤の活性を指す。表面活性を有する水溶性ポリマーには、ポリビニルアルコール、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）、ポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、およびポリオキシエチル化ポリオールが含まれるが、これらに限定されない。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。特定の実施形態によれば、表面活性を有する水溶性ポリマーは、ポリビニルアルコールまたはポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマーである。

【0060】

水溶性ポリマーは、半合成ポリマーでもあり得る。半合成水溶性ポリマーの例としては、水溶性セルロース誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースが挙げられる。

【0061】

水溶性ポリマーは、本組成物の総重量の約0.001重量%から約5重量%の範囲、あるいは本組成物の総重量の約0.001重量%~約0.5重量%の範囲、さらにあるいは約0.01重量%~約0.2重量%の範囲の量で本組成物中に存在する。

【0062】

本発明の医薬組成物は、さらに薬学的に許容される担体を含むことができる。用語「担体」は、治療化合物と共に投与される希釈剤またはビヒクルを指す。このような医薬担体は、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、およびゴマ油などの石油、動物、植物または合成起源のものを含む、水および油類などの無菌の液体類、ポリエチレングリコール類、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒であり得る。医薬組成物が静脈内投与される場合には、水が好ましい担体である。生理食塩水および水性デキストロースおよびグリセロール溶液も、特に注射用溶液のための液体担体として使用することもできる。

【0063】

本医薬組成物は、さらに塩化ナトリウムまたはデキストロースを含むが、これらに限定されない浸透圧の調整のための薬剤を含み得る。塩化ナトリウムは、特に約25mM~約300mMの量で、注射用製剤に適する本発明の医薬組成物の浸透圧を維持するために用いられる。

【0064】

本医薬組成物は、さらに緩衝剤を含むことができる。「緩衝剤」とは、再構成されたときに、溶液製剤または凍結乾燥製剤のpH値を調整するために組成物に添加される薬剤（複数可）を意味する。液体組成物のpHは、主に、ポリペプチド凝集体形成に対するその効果を介して、その中に含まれるポリペプチドの安定性に影響することを理解されたい。したがって、本発明の組成物中に存在する緩衝剤の量は、GcMAFの安定性のための至適pHに依存する。この至適pHの決定は、当技術分野において一般的に利用可能な方法を用いて達成することができる。

【0065】

本発明の組成物に含めることができる代表的な緩衝剤は、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリス緩衝液およびクエン酸緩衝液である。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。GcMAFの安定性が維持されるように、緩衝剤は、溶液のpH値を調整する。本組成物のpH値は、約5~約8の範囲であることが好ましい。本組成物中の緩衝剤の最終濃度は、約1mM~約100mMの範囲である。

【0066】

本医薬組成物は、さらに安定剤を含むことができる。本明細書で使用する用語「安定剤」は、GcMAFの化学構造および/もしくは生物学的活性または本発明のその任意の変異体もしくは断片を維持する賦形剤を指す。

【0067】

本発明の実施に有用な安定剤には、例えば、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グ

10

20

30

40

50



ルタミン酸、もしくはグリシンなどのアミノ酸類、またはカゼインもしくはアルブミンなどのタンパク質類が含まれる。あるいは、安定剤は、糖または糖アルコールであってよい。例えば、トレハロース、フルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、ラクトース、スクロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプンならびにセルロース誘導体、例えば、ヒドロキシエチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースを含む、単糖類、二糖類、もしくは多糖類、または水溶性グルカンなどの任意の糖が使用できる。糖アルコールは、-OH基を有するC4-C8炭化水素として定義され、例えば、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、ズルシトール、キシリトール、およびアラビトールを含む。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。上記の糖類または糖アルコール類は、個々にまたは組み合わせて使用してもよい。好ましくは、糖または糖アルコールの濃度は、約1w/v%~約15w/v%、より好ましくは約2w/v%~約10w/v%である。安定剤はまた、グリセリンまたはプロピレングリコールなどの多価アルコールであってよい。

10

**【0068】**

追加の安定剤は、メチオニン、EDTAまたは二ナトリウム塩などのその塩の1種であり得、それぞれ、メチオニンの酸化に対してポリペプチドを保護することが知られている。

**【0069】**

本発明の医薬組成物は、液体として製剤化することができる。液体組成物はそのまま保存できるか、または凍結状態で保存するか、または対象への投与に適する液体形態または他の形態に後で再構成するための乾燥形態で保存することができる。用語「乾燥形態」は、凍結乾燥(freeze drying)(すなわち、凍結乾燥(lyophilization))、噴霧乾燥、または空気乾燥のいずれかによって乾燥される液体組成物を指す。例えば、GcMAFは、注射用蒸留水、緩衝液、生理食塩水などの適切な水性溶媒に溶解でき、そこに界面活性剤および/または水溶性ポリマー、ならびに必要に応じて緩衝剤、塩、および安定化剤を加えることができ、このようにして得られた溶液をフィルターに通して濾過することにより滅菌できる。その後、この溶液を4、もしくは-20で保存するか、または凍結乾燥して、凍結乾燥組成物を得ることができる。

20

**【0070】**

本発明の医薬組成物は、「安定な」または「安定化された」組成物である。用語「安定な」または「安定化された」組成物は、本明細書に開示されるような界面活性剤および/または水溶性ポリマーの非存在下で調製された組成物と比較して、保存安定性が増加した組成物を指す。この保存安定性の増加は、典型的には、後の使用のためにその形態で直接保存された液体製剤で観察されるが、安定性の増加はまた、凍結状態で保存されて使用前に融解される液体製剤で得られるか、または使用前に液体形態または他の形態へ後で再構成するために凍結乾燥形態、空気乾燥形態、もしくは噴霧乾燥形態などの乾燥形態で調製された製剤で得られる。好ましくは、本発明の組成物は、本組成物が静菌剤と互換性がある場合には、液体形態で保存安定性が増加した利便性、再構成なしの投与の容易さ、および予め充填されているためにすぐに使用できる注射器もしくは容器に製剤を供給する能力、または複数回投与用の製剤として最大限に活用するために液体形態で保存される。本発明の組成物は、好ましくは2~8で少なくとも1ヶ月間、あるいは、2~8で少なくとも2ヶ月、3ヶ月、4、5、または少なくとも6ヶ月間安定である。あるいは、本発明の組成物は、37で少なくとも1週間、または37で少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも2ヶ月、または少なくとも3ヶ月間安定である。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。本発明の組成物の安定性は、保存前、すなわちGcMAFの生成直後、および保存後に、界面活性剤および/または水溶性ポリマーを含む液体組成物中のGcMAFのタンパク質含有量を測定することによって決定できる。したがって、安定な組成物は、保存前、すなわちGcMAFの生成直後のGcMAFの量と比較して、2~8での1ヶ月間保存した後のGcMAFタンパク質量の少

30

40

50

なくとも50%、あるいは保存前のGcMAF量と比較して2~8で1ヶ月間保存した後のGcMAFタンパク質量の少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、または少なくとも97%を有する液体組成物を意味する。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。本発明の組成物中のGcMAFは、「安定」であるか、または「安定化」されている。用語「安定な」または「安定化」されたGcMAFは、界面活性剤および/または水溶性ポリマーを欠く組成物と比較して、本明細書で詳述した界面活性剤および/または水溶性ポリマーを含む組成物において保存安定性、例えば、化学的安定性が増加したGcMAFを指す。

#### 【0071】

本医薬組成物は、必要に応じて、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、およびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などのキレート剤を少量含むこともできる。

#### 【0072】

注射または注入などの選択された経路を介して対象に投与するために、本医薬組成物は、安全で無菌でなければならず、GcMAFの所望の治療活性を保持しなければならない。

#### 【0073】

本発明の医薬組成物は、溶液、懸濁液、またはエマルジョン、すなわち、水中油型エマルジョン、油中水型エマルジョン、マイクロエマルジョンまたはナノエマルジョンなどの液体として製剤化できる。本医薬組成物は、非経口投与経路または経口投与経路を含む任意の方法によって投与前に液体、懸濁液、またはエマルジョンに再構成できる凍結乾燥粉末などの乾燥形態で調製できる。安定化された医薬組成物は、好ましくは膜濾過により滅菌され、密封されたバイアルもしくはアンプルなどの単位用量または複数回用量の容器に保存される。製剤のそれぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。

#### 【0074】

本医薬組成物は、錠剤、カプセル剤、および徐放製剤などの形態をとることもできる。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。本医薬組成物は、トリグリセリド、微結晶性セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなどの従来の結合剤および担体と共に坐剤として製剤化できる。

#### 【0075】

経口投与のための製剤、例えば、錠剤およびカプセル剤は、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの医薬品グレードなどの標準的な担体を含むことができる。適切な医薬担体の例は、E. W. Martinによる「レミントンの薬学」に記載されている。そのような組成物は、対象への適切な投与のための形態を提供するために、適切な量の担体と共に、好ましくは実質的に精製された形態で治療有効量のGcMAFを含む。

#### 【0076】

##### GcMAFの使用

本発明は、マクロファージ活性化に関連する疾患または障害を治療するための方法であって、本発明の原理に従って、治療有効量の安定な医薬組成物をそのような治療を必要としている対象に投与することを含む方法を提供する。

#### 【0077】

一実施形態によれば、対象はヒトである。さらなる実施形態によれば、対象は、家庭内のペット動物などの動物である。特定の実施形態によれば、ペット動物はイヌである。

#### 【0078】

「治療有効量」とは、マクロファージ活性化に関連する疾患もしくは障害の治療または予防に有用な量である。

#### 【0079】

本発明の医薬組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、動脈内および腹腔内注射または注入などの非経口投与経路を介して投与できる。あるいは、本医薬組成物は、局所的、経鼻投与

10

20

30

40

50

、または経口投与により投与できる。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。例示的な実施形態では、本医薬組成物は、注射により、好ましくは、筋肉内または皮下注射により投与できる。

【0080】

治療を必要としている領域に局所的に本発明の医薬組成物を投与することが望ましい。これは、例えば、限定するものではないが、手術中の局所注入、例えば、外科手術後の創傷包帯と組み合わせた局所適用、注射、カテーテル、坐薬、医療用パッチまたはインプラントによって達成することができ、前記インプラントは、多孔性、非多孔性、またはゼラチン状材料である。いくつかの実施形態によれば、投与は、腫瘍もしくは新生物または新生物発生前の組織の部位に、例えば、注射器による直接注射によって行うことができる。

10

【0081】

いくつかの実施形態によれば、GcMAFは、約50ng/注射～約1000ng/注射の用量で投与できる。

【0082】

いくつかの実施形態によれば、マクロファージ活性化に関連する疾患または障害は、癌、ウイルス性疾患、細菌感染症、自己免疫疾患、および慢性疲労症候群からなる群から選択される。

【0083】

さらなる実施形態によれば、本発明の医薬組成物により治療される癌には、肉腫、癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮種 (lymphangiomas)、悪性滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、カボジ肉腫、松果体腫、血管芽細胞腫、乏突起神経膠腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽腫などの固形腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。さらなる実施形態によれば、治療されるべき癌は、白血病などの非固形腫瘍である。

20

【0084】

さらなる実施形態によれば、治療されるべきウイルス性疾患には、例えば、薬剤耐性株を含むヒト免疫不全ウイルス1および2 (HIV-1およびHIV-2)、ヒトT細胞白血病ウイルス1および2 (HTLV-1およびHTLV-2)、呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、ヒトパピローマウイルス (HPV)、アデノウイルス、B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、エプスタイン・バン・ウイルス (EBV)、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、サイトメガロウイルス (CMV)、単純ヘルペスウイルス1および2 (HSV-1およびHSV-2)、ヒトヘルペスウイルス8 (HHV-8、カボジ肉腫関連ウイルスとしても知られている)、および黄熱病ウイルスを含むフラビウイルス、デングウイルス、日本脳炎および西ナイルウイルス、インフルエンザウイルスなどのウイルスに関連する疾患が含まれる。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。

30

40

【0085】

さらに別の実施形態によれば、細菌感染症には、黄色ブドウ球菌 (メチシリン耐性およびメチシリン感受性)、表皮ブドウ球菌、スタフィロコッカス・ヘモリチカス、スタフィロコッカス・サブロフィチカス、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス、スタフィロコッカス・キャピティス、スタフィロコッカス・カブラエ、スタフィロコッカス・サッカロリチカス、スタフィロコッカス・シミュランス、スタフィロコッカス・ワーネリー、スタフィロコッカス・ホミニス、スタフィロコッカス・インターメディウス、スタフィロコッカス・シュードインターメディウス、およびスタフィロコッカス・リリカス (Staphylococcus lyricus) を含むブドウ球菌、化膿性連鎖球菌、ストレブ

50

トコッカス・アガラクティエ、ストレプトコッカス・ディスガラクティエの亜種、ストレプトコッカス・アンギノサス、ストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・ボビス、およびストレプトコッカス・ミュータンスを含む連鎖球菌、フェカリス菌およびエンテロコッカス・フェシウムを含む腸球菌、淋菌、および髄膜炎菌を含むナイセリア種、クロストリジウム・ディフィシレを含むクロストリジウム種、百日咳菌を含むボルデテラ種、炭疽菌を含むバチルス種、ジフテリア菌を含むコリネバクテリウム種からなる群から選択される細菌によって引き起こされる感染症が含まれる。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。

#### 【0086】

さらなる実施形態によれば、自己免疫疾患は、関節リウマチ、強直性脊椎炎、クローン病、乾癬、全身性エリテマトーデス（SLE）、湿疹、痛風、炎症性腸疾患、および多発性硬化症からなる群から選択される。それぞれの可能性は、本発明の別々の実施形態である。

10

#### 【0087】

本発明の医薬組成物はまた、自閉症を治療するのに有用であり得る。

#### 【0088】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態をより完全に例示するために提示される。これは、決して、本発明の広い範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。当業者なら、本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示された原理の多くの変形および修正を容易に考案することができる。

20

#### 【0089】

##### 実施例 1

GcMAF 安定性に対するポリソルビタン（ポリソルベート 80）およびヒト血清アルブミンの影響

様々な期間の溶液中の GcMAF の安定性を決定するために、いくつかの安定剤を GcMAF 溶液に添加して、GcMAF の量を評価した。

#### 【0090】

以前に記載された（Yamamoto et al., 2008, Cancer Immunol. Immunother. 57: 1007 - 1016）ように、GcMAF を調製した。簡単に述べると、25-ヒドロキシビタミン D3-親和性クロマトグラフィーを用いて、Gcタンパク質をヒト血清または血漿から精製した。精製した Gc を、固定化した -ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、GcMAF を形成した。GcMAF を滅菌のために 0.22 ミクロンフィルターを通して濾過し、以下の添加剤のうちの 1 種を含む pH 7.5 の PBS に、最終濃度が 200 ng/ml になるまで希釈した：0.2% のポリソルベート 80（TWEEN（登録商標）80）、600 ng/ml のヒト血清アルブミン（HSA）、またはその両方。溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える 2 ml のガラスバイアルに無菌的に 1 ml アリコートで充填し、4 で維持した。Gc または GcMAF の検出を、4 ~ 12% ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量 2.6 ng の Gc または GcMAF をロードすることによって、時間 0 および 1 週間後にウエスタンブロット分析によって行った。ゲルを電気泳動し、ニトロセルロース（NC）膜に移し、ポリクローナルウサギ抗 Gc 抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体でプローブし、化学発光検出を行った。

30

40

#### 【0091】

図 1 A は、0 時点（希釈試料を調製した日）に行ったウエスタンブロット分析を示す。図に示すように、GcMAF は全ての試料において検出されるが、TWEEN（登録商標）80 の存在下で希釈した試料は、PBS 単独でまたは PBS と HSA で希釈した試料よりも強いバンド強度を示した。PBS で希釈した市販の Gcタンパク質（Calbiochem 社）を対照として使用し、PBS で希釈した GcMAF と同様の強度を示した。

#### 【0092】

図 1 B は、1 週間 4 で放置した GcMAF または Gc 試料のウエスタンブロット分析

50

を示す。T W E E N (登録商標) 80を含むG c M A F試料は、新たに希釈した市販のG c タンパク質によって得られるものと同様の強いバンド強度を示した。P B Sで希釈したG c M A F試料は、T W E E N (登録商標) 80を含むP B Sで希釈したG c M A F試料によって得られるものと比較して弱い強度を示した。H S Aを含むP B Sで希釈したG c M A F試料は、P B S単独で希釈したG c M A F試料よりも強い強度を示したが、T W E E N (登録商標) 80を含むG c M A F試料よりも低い強度を示した。したがって、4で1週間保存した後に、0.2%の濃度のT W E E N (登録商標) 80は溶液中でG c M A Fを維持することが判明し、この非イオン性界面活性剤はG c M A F安定性を維持するのにH S Aよりも効果的であることが示された。

#### 【0093】

G c M A F試料をポリプロピレンバイアル中で保存した場合に、同様のバンド強度が得られた。

#### 【0094】

##### 実施例2

##### 異なる期間、異なる温度でのG c M A Fの安定性

上記の実施例1に記載したように、G c M A Fを調製した。簡単に説明すると、25-ヒドロキシビタミンD3-親和性クロマトグラフィーを用いて、G c タンパク質をヒトの血清または血漿から精製した。精製したG c タンパク質を、固定化 - ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、G c M A Fを形成した。G c M A Fを、滅菌のために0.22ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、最終濃度が200ng/mlになるまで異なる緩衝液：pH7.5のP B SまたはpH5.5のクエン酸塩緩衝液で希釈した。P B S溶液はまた、以下の添加剤のうちの1種を含んでいた：0.01% T W E E N (登録商標) 80、600ngのH S A、または50μgのア르기ニン。全ての溶液を、2%のマニトールの存在下または非存在下で調製した。次いで、この溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える2mlのガラスバイアルに1mlアリコートで無菌的に充填し、異なる温度(4、25、および37)に保った。試料を、4~12%ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量2.6ngのG c タンパク質またはG c M A Fをロードすることによって、異なる期間、ウエスタンブロット分析により分析した。ゲルを電気泳動し、NC膜に移し、ポリクローナルウサギ抗G c抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体でプローブし、化学発光検出を行った。

#### 【0095】

図2Aは、0時点(希釈試料を調製した日)で行ったウエスタンブロット分析を示す。全てのG c M A F試料は、標準的な市販のG c タンパク質(C a l B i o c h e m社)と比較して、同様の強度の可視バンドを示した。

#### 【0096】

図2Bは、37で1週間インキュベートしたG c M A F試料のウエスタンブロット分析を示す。P B S単独中、4でインキュベートしたG c M A F試料も評価した。図に示すように、G c M A F試料をT W E E N (登録商標) 80を含むP B Sで希釈した場合に、強い強度が観察された。これらG c M A F試料について観察された強度は、新たに希釈したG c 試料によって得られたものと同様であった。ヒト血清アルブミン(H S A)は、G c M A F安定性を維持する際に、T W E E N (登録商標) 80よりも活性がないことが示された。

#### 【0097】

図2Cは、25で2週間インキュベートしたG c M A F試料のウエスタンブロット分析を示す。P B S単独中、4でインキュベートしたG c M A F試料も評価した。図に示すように、G c M A F試料をT W E E N (登録商標) 80を含むP B Sで希釈した場合に、強い強度が観察された。これらのG c M A F試料について観察された強度は、新たに希釈した市販のG c 試料によって得られたものと同様であった。ヒト血清アルブミン(H S A)は、G c M A F安定性を維持する際に、T W E E N (登録商標) 80よりも活性がな

10

20

30

40

50

いことが示された。

【0098】

図2Dおよび図2Eは、新たに希釈したGc試料と比較して、37で1ヶ月間(図2D)または3ヶ月間(図2E)インキュベートしたTWEEN80含有GcMAF試料のウエスタンブロット分析を示す。図に示すように、TWEEN(登録商標)80の存在下でインキュベートしたGcMAF試料は、新たに希釈したGcタンパク質について観察されたものと同様の高い強度を示した。37でのインキュベーションの3ヶ月後(4で24ヶ月にほぼ等しい)でさえ、高いバンド強度が取得された。

【0099】

ELISAを、96ウェルプレートにGCまたはGcMAF試料を吸着させ、ウサギポリクローナル抗Gc抗体、続いてHRP結合ヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、吸光度を検出することにより行った。37で3.5ヶ月間インキュベートした0.01%のTWEEN(登録商標)80含有試料の吸光度は、新たに希釈したGcタンパク質(210ng/ml)の吸光度と同じであった。

10

【0100】

生物活性試験を、RAW264.7マウスマクロファージ細胞株における過酸化水素( $H_2O_2$ )の放出を測定することにより行い、GcMAF(0.2ng/ $\mu$ l)による刺激後のマクロファージ活性化を決定した。GcMAFを含まない対照と比較して、2倍以上の値を活性があると見なした。過酸化水素(>2倍)の放出は、37で3.5ヶ月間インキュベートしたTWEEN(登録商標)80(0.01%)含有GcMAF試料において観察された。

20

【0101】

実施例3

GcMAF安定性に対する異なる濃度のTWEEN(登録商標)80の影響

上記の実施例1に記載したように、GcMAFを調製した。簡単に説明すると、Gcタンパク質を、25-ヒドロキシビタミンD3-親和性クロマトグラフィーを用いて血清または血漿から精製した。精製したGcタンパク質を、固定化した-D-ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、GcMAFを形成した。GcMAFを滅菌のために0.22ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、これを、0~0.01%の範囲の異なる濃度の非イオン性界面活性剤TWEEN(登録商標)80を含むpH7.5のPBSで最終濃度が200ng/mlになるまで希釈した。この溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える2mlのガラスバイアルに無菌的に1mlアリコートで充填し、37に保った。これらの試料を、4~12%ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量2.6ngのGcまたはGcMAFをロードすることによって、異なる時点でウエスタンブロット分析によって行った。ゲルを電気泳動し、NC膜に移し、ポリクローナルウサギ抗Gc抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、化学発光検出を行った。

30

【0102】

図3Aは、0時点(希釈した試料を調製した日)に行ったウエスタンブロット分析を示す。全ての試料は、標準的な市販のGcタンパク質(Calbiochem社)と比較して、同様の強度を示した。

40

【0103】

図3Bは、37で1週間インキュベートしたGcMAFまたはGc試料のウエスタンブロット分析を示す。TWEEN(登録商標)80含有GcMAF試料(0.001%の濃度でも)が、新たに希釈したGcタンパク質によって得られたものと同様の強度で明確な可視バンドを示した。PBS単独(界面活性剤の非存在下)で調製したGcMAF試料は、標準的なGcタンパク質と比較して非常に弱い強度を示した。したがって、0.001%以上の濃度のTWEEN(登録商標)80は、溶液中のGcMAFを維持するのに、ひいては、その安定性を保持するのに非常に有効である。

【0104】

50

## 実施例 4

G c M A F 安定性に対する様々な非イオン性界面活性剤の影響

上記の実施例 1 に記載したように、G c M A F を調製した。簡単に説明すると、G c タンパク質を、25 - ヒドロキシビタミン D 3 - 親和性クロマトグラフィーを用いて血清または血漿から精製した。精製した G c タンパク質を、固定化した - ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、G c M A F を形成した。G c M A F を滅菌のために 0.22 ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、これを、以下に示した濃度の非イオン性界面活性剤の非存在下または存在下で、pH 7.5 の P B S で最終濃度が 200 ng / ml になるまで希釈した：T W E E N (登録商標) 80 (0.005%)、T W E E N (登録商標) 20 (0.005%、0.01%または0.02%)、ポロキサマー 188 (0.02%、0.1%または0.2%) および N - ドデシル - D - マルトシド (0.01%、0.02%または0.05%)。この溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える 2 ml のガラスバイアルに無菌的に 1 ml アリコートで充填し、逆さの位置で 37 に保つか、または 4 に保った。これらの試料 (2 組づつ) を、4 ~ 12 % ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量 2.6 ng の G c または G c M A F をロードすることによって、異なる時点でウエスタンブロット分析によって分析した。ゲルを電気泳動し、N C 膜に移し、ポリクローナルウサギ抗 G c 抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、化学発光検出を行った。

10

20

30

40

50

## 【0105】

図 4 A は、4 で一晩インキュベートした後に行ったウエスタンブロット分析を示す。界面活性剤の非存在下でインキュベートし、4 で一晩おいた後にほとんど検出できなかった試料を除いて、全ての試料は標準的な市販の G c タンパク質 (C a l b i o c h e m 社) と比較して同様の染色強度を示した。

## 【0106】

図 4 B は、37 で 1 週間インキュベートした G c M A F または G c 試料のウエスタンブロット分析を示す。(試験した濃度全てにおいて) 非イオン性界面活性剤の存在下でインキュベートした G c M A F 試料は、新たに希釈した G c タンパク質によって得られたものと同様の染色強度を示した。P B S 単独で調製し、界面活性剤の非存在下でインキュベートした G c M A F 試料は、これらの条件下では検出されなかった。

## 【0107】

図 4 C は、37 で 1 ヶ月間インキュベートした G c M A F または G c 試料のウエスタンブロット分析を示す。(試験した濃度全てにおいて) 非イオン性界面活性剤の存在下でインキュベートした G c M A F 試料は、新たに希釈した G c タンパク質によって得られたものと同様の染色強度で明確な可視バンドを示した。(界面活性剤の非存在下で) P B S 単独でインキュベートした G c M A F 試料は可視バンドを示さなかった。したがって、ポリソルベート 20、N - ドデシル - D - マルトシドまたはポロキサマー 188 などの非イオン性界面活性剤は、37 で 1 ヶ月間保存した場合であっても、溶液中の G c M A F を維持するのに非常に有効であり、したがって、これらの非イオン性界面活性剤は、G c M A F 安定性を保持するのに有用である。

## 【0108】

## 実施例 5

G c M A F 安定性に対する非イオン性界面活性剤および他の安定剤の影響

上記の実施例 1 に記載したように、G c M A F を調製した。簡単に説明すると、G c タンパク質を、25 - ヒドロキシビタミン D 3 - 親和性クロマトグラフィーを用いて血清または血漿から精製した。精製した G c タンパク質を、固定化した - ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、G c M A F を形成した。G c M A F を滅菌のために 0.22 ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、これを、以下に示した濃度の非イオン性界面活性剤：T W E E N (登録商標) 80 (0.005%)、トリトン X 100 (0.06%もしくは0.12%)、ブリジ (登録商標) 58 (0.015%もし

くは0.05%)の非存在下もしくは存在下で、または安定剤トレハロース(1%もしくは2%)およびPEG4000(1%もしくは3%)の存在下で、pH7.5のPBSで最終濃度が200ng/mlになるまで希釈した。この溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える2mlのガラスバイアルに無菌的に1mlアリコートで充填し、逆さの位置で37に保った。これらの試料(2組づつ)を、4~12%ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量2.6ngのGcまたはGcMAFをロードすることによって、異なる時点でウエスタンブロット分析によって分析した。ゲルを電気泳動し、NC膜に移し、ポリクローナルウサギ抗Gc抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、化学発光検出を行った。

#### 【0109】

図5Aは、0時点(希釈した試料を調製した日)に行ったウエスタンブロット分析を示す。界面活性剤の非存在下でインキュベートし、ほとんど検出できなかった試料を除いて、全ての試料は標準的な市販のGcタンパク質(Calbiochem社)と比較して同様の染色強度を示した。

#### 【0110】

図5Bは、37で1週間インキュベートしたGcMAFまたはGc試料のウエスタンブロット分析を示す。(試験した濃度全てにおいて)非イオン性界面活性剤の存在下でインキュベートしたGcMAF試料は、新たに希釈したGcタンパク質によって得られたものと同様の強度の明確な可視バンドを示した。(界面活性剤の非存在下で)PBS単独でインキュベートしたGcMAF試料は検出されず、トレハロースまたはPEG4000の存在下でインキュベートした試料は、ほぼ検出できなかった。

#### 【0111】

図5Cは、37で1ヶ月間インキュベートしたGcMAFまたはGc試料のウエスタンブロット分析を示す。(試験した濃度全てにおいて)非イオン性界面活性剤の存在下でインキュベートしたGcMAF試料は、新たに希釈したGcタンパク質によって得られたものと比較して、ほんの少しの弱い強度で明確な可視バンドを示した。(界面活性剤の非存在下で)PBS単独で、またはトレハロースもしくはPEG4000を添加してインキュベートしたGcMAF試料は、試験した濃度の全てにおいてこれらの実験条件下では検出されなかった。したがって、非イオン性界面活性剤、例えば、トリトンX-100およびブリジ58は、37で1ヶ月間保存した場合であっても、GcMAF安定性を維持することが判明した。トレハロースまたはPEG4000は、ほとんど効果がないことが判明した。

#### 【0112】

##### 実施例6

##### 高濃度のGcMAFの安定性に対する非イオン性界面活性剤の影響

上記の実施例1に記載したように、GcMAFを調製した。簡単に説明すると、Gcタンパク質を、25-ヒドロキシビタミンD3-親和性クロマトグラフィーを用いて血清または血漿から精製した。精製したGcタンパク質を、固定化した-D-ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、GcMAFを形成した。GcMAFを滅菌のために0.22ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、これを、以下の異なる濃度の非イオン性界面活性剤を含むpH7.5のPBSで最終濃度が2.5μg/mlになるまで希釈した：TWEEN(登録商標)80(0.005%)、TWEEN(登録商標)20(0.005%)、ポロキサマー188(0.05%)およびドデシルマルトシド(0.01%)。この溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える2mlのガラスバイアルに無菌的に1mlアリコートで充填し、逆さの位置で37に保った。これらの試料(2組づつ)を、4~12%ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量5ngのGcまたはGcMAFをロードすることによって、異なる時点でELISAおよびウエスタンブロット分析によって分析した。ゲルを電気泳動し、NC膜に移し、ポリクローナルウサギ抗Gc抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、化学発光検出を行った。

10

20

30

40

50



## 【0113】

図6Aは、0時点(試料を調製した直後)に行ったウエスタンブロット分析を示す。全ての試料は標準的な市販のGcタンパク質(Calbiochem社)と比較して同様の染色強度を示した。

## 【0114】

図6Bは、37℃で1ヶ月インキュベートしたGcMAFまたはGc試料のウエスタンブロット分析を示す。非イオン性界面活性剤の存在下でインキュベートしたGcMAF試料は、新たに希釈したGcタンパク質によって得られたものと同様の染色強度で明確な可視バンドを示した。(界面活性剤の非存在下で)PBS単独でインキュベートしたGcMAF試料は、新たに調製した標準的なGcまたは界面活性剤含有GcMAF試料と比較して非常に弱い染色を示した。

10

## 【0115】

96ウェルプレートにGcまたはGcMAF試料を吸着させ、ウサギポリクローナル抗Gc抗体、続いてHRP結合ヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、吸光度を検出することによりELISAを行った。非イオン性界面活性剤の存在下で、37℃で1ヶ月間インキュベートしたGcMAFの試料は、時間0の試料と同様の吸光度を示した。界面活性剤の非存在下で、PBS中でインキュベートしたGcMAFは、濃度の著しい減少(時間0でシグナルの39%)を示した。

## 【0116】

## 実施例7

非イオン性界面活性剤の存在下または非存在下で融解した後のGcMAF安定性に対する時間および保存温度の影響

上記の実施例1に記載したように、GcMAFを調製した。簡単に説明すると、Gcタンパク質を、25-ヒドロキシビタミンD3-親和性クロマトグラフィーを用いて血清または血漿から精製した。精製したGcタンパク質を、固定化したD-ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、GcMAFを形成した。GcMAFを滅菌のために0.22ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、これを、pH7.5のPBSまたは0.005%のTWEEN(登録商標)80を含むPBSで最終濃度が200ng/mlになるまで希釈した。この溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える2mlのガラスバイアルに無菌的に1mlアリコートで充填し、-20℃で凍結させた。これらの試料(2組づつ)を融解し、室温または4℃で一晩保ち、4~12%ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量2.6ngのGcまたはGcMAFをロードすることによって、異なる時点でウエスタンブロット分析によって分析した。ゲルを電気泳動し、NC膜に移し、ポリクローナルウサギ抗Gc抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、化学発光検出を行った。

20

30

## 【0117】

図7は、ウエスタンブロット分析の結果を示す。TWEEN(登録商標)80を含むGcMAF試料は、室温で一晩保存し、融解させた後でさえ、TWEEN(登録商標)80を含む新しいGc試料の強度と同じ染色強度を示したが、PBS単独中で融解し、室温で一晩保存した試料では検出されなかった。PBSで調製したGcMAFを融解直後にポリアクリルアミドゲル上にロードした場合でさえ、GcMAFバンドの強度の有意な減少が認められた(時間0;図7)。界面活性剤の非存在下で、5時間室温でまたは4℃でGcMAFを保存すると、GcMAFバンド強度がさらに減少し、短い期間のインキュベーション後でさえ、(TWEEN(登録商標)80などの非イオン性界面活性剤の非存在下で)GcMAFが不安定であることが示された。したがって、凍結を行った場合には、GcMAFへのTWEEN(登録商標)80の添加は、融解後のGcMAFの安定性を維持することが示された。

40

## 【0118】

## 実施例8

GcMAFの凝集体/二量体形成に対するポリソルベート80の影響

50

上記の実施例 1 に記載したように、G c M A F を調製した。簡単に説明すると、G c タンパク質を、25 - ヒドロキシビタミン D 3 - 親和性クロマトグラフィーを用いて血清または血漿から精製した。精製した G c タンパク質を、固定化した - ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、G c M A F を形成した。G c M A F を滅菌のために 0 . 22 ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、これを、p H 7 . 5 の P B S または 0 . 005 % の T W E E N (登録商標) 80 を含む P B S で最終濃度が 6 μ g / m l になるまで希釈した。これらの試料に凍結融解を 3 サイクル行くと、凝集体形成が増加した。これらの試料 (2 組づつ) を 4 ~ 12 % ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量 75 n g の G c M A F をロードすることによって、ウエスタンブロット分析により分析した。ゲルを電気泳動し、N C 膜に移し、ポリクローナルウサギ抗 G C 抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、化学発光検出を行った。

10

## 【0119】

図 8 は、0 . 005 % T W E E N (登録商標) 80 を含む P B S で調製した試料が、約 52 k D a の M W の高い強度のバンドおよび約 100 k D a の M W (おそらく分子の二量体) の非常にかすかなバンドを示したことを示している。T W E E N (登録商標) 80 の非存在下で調製した試料は、同じ強度の 52 k D a のバンドを示したが、約 100 k D a の高い M W バンドはより強かった。これらの結果は、T W E E N (登録商標) 80 が、G c M A F の凝集体 / 二量体形成を減少させることができることを示す。

20

## 【0120】

## 実施例 9

G c M A F 安定性に対するイオン性界面活性剤、水溶性ポリマーおよび他の安定化剤の影響

上記の実施例 1 に記載したように、G c M A F を調製した。簡単に説明すると、G c タンパク質を、25 - ヒドロキシビタミン D 3 - 親和性クロマトグラフィーを用いて血清または血漿から精製した。精製した G c タンパク質を、固定化した - ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、G c M A F を形成した。G c M A F を滅菌のために 0 . 22 ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、これを、以下に示した濃度の界面活性物質の存在下で p H 7 . 5 の P B S で最終濃度が 200 n g / m l になるまで希釈した：T W E E N (登録商標) 80 (0 . 005 % )、S D S (0 . 02 % )、ポリビニルピロリドン (P V P) k 90 (0 . 2 % )、ポリビニルアルコール (30 ~ 70 k D )、カゼインナトリウム (0 . 2 % )、アルギン酸ナトリウム (0 . 2 % )、およびヒアルロン酸 (0 . 15 % )。この溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える 2 m l のガラスバイアルに無菌的に 1 m l アリコートで充填し、逆さの位置で 37 に保った。これらの試料 (2 組づつ) を 4 ~ 12 % ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量 2 . 6 n g の G c または G c M A F をロードすることによって、異なる時点でウエスタンブロット分析により分析した。ゲルを電気泳動し、N C 膜に移し、ポリクローナルウサギ抗 G C 抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、化学発光検出を行った。

30

## 【0121】

図 9 A は、0 時点 (試料を調製した直後) に行ったウエスタンブロット分析を示す。弱いシグナルを示したカゼイン含有試料を除いて、全ての試料は、標準的な市販の G c タンパク質 (C a l b i o c h e m 社) と比較して同様の染色強度を示した。

40

## 【0122】

図 9 B は、37 で 1 週間のインキュベーション後の G c M A F のウエスタンブロット分析を示す。非イオン性界面活性剤 T W E E N (登録商標) 80、イオン性界面活性剤 S D S または表面活性ポリマー P V A を含む G c M A F 試料は、新たに希釈した G c タンパク質によって得られたものと同様の強度の明確な可視バンドを示した。P B S 単独またはアルギン酸ナトリウムを含む P B S で調製した G c M A F 試料は、可視バンドを示さなかった。ヒアルロン酸、P V P またはカゼインの存在下で調製した試料は、著しく弱いバン

50

ドを示した。したがって、表面活性を有していない水溶性ポリマーのPVPは、GcMAFの安定化にはあまり効果的ではないことが判明した。

【0123】

図9Cは、37で2週間のインキュベーション後のGcMAFのウエスタンブロット分析を示す。非イオン性界面活性剤TWEEN(登録商標)80、イオン性界面活性剤SDSまたは表面活性ポリマーPVAを含むGcMAF試料は、新たに希釈したGcタンパク質によって得られたものと同様の強度の明確な可視バンドを示した。PBS単独またはアルギン酸ナトリウムもしくはヒアルロン酸を含むPBSで調製したGcMAF試料は、可視バンドを示さなかった。PVPまたはカゼインを含むPBSで調製した試料は、新たに希釈したGcタンパク質バンドよりも著しく弱いバンドを示した。

10

【0124】

これらの結果は、イオン性界面活性剤SDSがGcMAF安定性を維持するのに非常に有効であることを示している。表面活性を有する水溶性ポリマーPVAも、GcMAF安定性を維持するのに有効であることが示された。しかしながら、多糖類、ヒアルロン酸、およびアルギン酸塩は、溶液中のGcMAFを維持するのにあまり有効ではないことが示された。

【0125】

実施例10

TWEEN(登録商標)80の存在下でのGcMAFの生物活性

上記の実施例1に記載したように、GcMAFを調製した。簡単に説明すると、Gcタンパク質を、25-ヒドロキシビタミンD3-親和性クロマトグラフィーを用いて血清または血漿から精製した。精製したGcタンパク質を、固定化した-ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、GcMAFを形成した。GcMAFを滅菌のために0.22ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、これを、0.005%のTWEEN(登録商標)80を含むpH7.5のPBSで最終濃度が200ng/mlまたは1μg/mlになるまで希釈した。この溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える2mlのガラスバイアルに無菌的に1mlアリコートで充填し、0、1、3、6、および12ヶ月間-20で(直位置)、または0、1、3、および6ヶ月間4で逆さの位置で保った。保存終了時に、これらの試料を生物活性試験により分析した。

20

【0126】

RAW264.7マウスマクロファージ細胞株における過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)の放出を測定し、GcMAFによる刺激後のマクロファージ活性化を決定することにより生物活性試験を行った。GcMAFを含まない対照と比較して2倍以上の値を活性と見なした。(2倍を上回る)過酸化水素の放出が、上述の時点で試験した全てのGcMAF試料において観察され、GcMAFが、4では少なくとも6ヶ月間または-20での凍結時には12ヶ月間、その生物学的活性を維持することが示された。

30

【0127】

実施例11

GcMAFの化学的および生物学的安定性に対する非イオン性界面活性剤またはPVAの影響

40

上記の実施例1に記載したように、GcMAFを調製した。簡単に説明すると、Gcタンパク質を、25-ヒドロキシビタミンD3-親和性クロマトグラフィーを用いて血清または血漿から精製した。精製したGcタンパク質を、固定化した-ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと順次インキュベートし、GcMAFを形成した。GcMAFを滅菌のために0.22ミクロンフィルターを通して濾過した。次いで、これを、以下に示した濃度の賦形剤を含むpH7.5のPBSで最終濃度が200ng/mlになるまで希釈した：TWEEN(登録商標)80(0.005%)、TWEEN(登録商標)20(0.005%)、ポロキサマー188(0.05%)、N-ドデシル-D-マルトシド(0.01%)、および表面活性を有する水溶性ポリマーのPVA(0.2%)。この溶液を濾過し、ゴム栓およびアルミニウムキャップを備える2mlのガラスバイアルに無菌的に

50

1 ml アリコートで充填し、逆さの位置で37 に保った。これらの試料(2組づつ)を、4~12%ポリアクリルアミドゲル上のレーン当たり総量2.6 ngのGcまたはGcMAFをロードすることによってウエスタンブロット分析により分析した。ゲルを電気泳動し、NC膜に移し、ポリクローナルウサギ抗Gc抗体、続いてアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ抗体をプローブにして、化学発光検出を行った。

【0128】

図10Aは、(試料を調製した直後)の時点0で行ったウエスタンブロット分析を示す。全ての試料は、標準的な市販のGcタンパク質(Calbiochem社)と比較して同様の染色強度を示した。

【0129】

図10Bは、37 で1週間インキュベートしたGcMAFまたはGc試料のウエスタンブロット分析を示す。示した非イオン性界面活性剤またはポリマーPVAの存在下でインキュベートしたGcMAF試料は、新たに希釈したGcタンパク質によって得られたものと同様の強度の明確な可視バンドを示した。(界面活性剤の非存在下で)PBS単独中でインキュベートしたGcMAF試料は、新たに調製した標準的なGcまたは界面活性剤の存在下でインキュベートしたGcMAF試料と比較して有意に弱い染色を示した。

10

【0130】

RAW264.7マウスマクロファージ細胞株における過酸化水素( $H_2O_2$ )の放出を測定し、GcMAFによる刺激後のマクロファージ活性化を決定することにより生物活性試験を行った。GcMAFを含まない対照と比較して2倍以上の値を活性と見なした。(2倍を上回る)過酸化水素の放出が、37 で1週間後に非イオン性界面活性剤およびポリマーを含むGcMAF試料において観察され、GcMAFがその生物学的活性を維持することが示された。

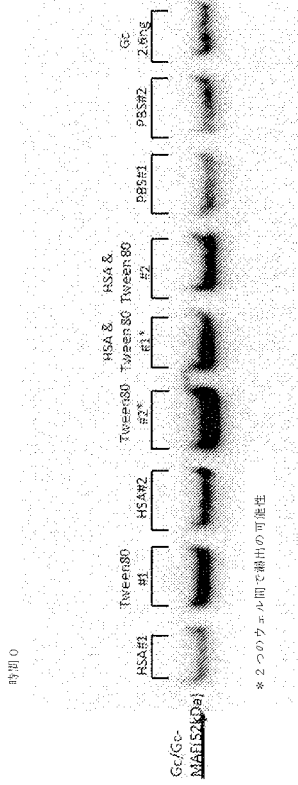
20

【0131】

本発明が、特に図示し、上記で説明してきたものに限定されないことは当業者なら理解するであろう。むしろ、本発明の範囲は、特許請求の範囲によって定義される。

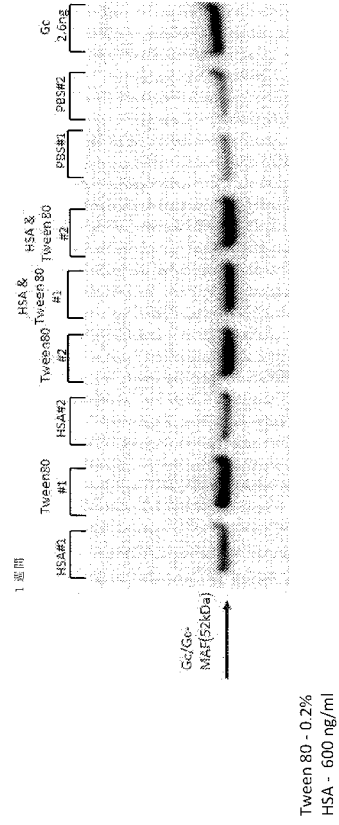
【 図 1 A 】

4℃でのGcMAFの安定性



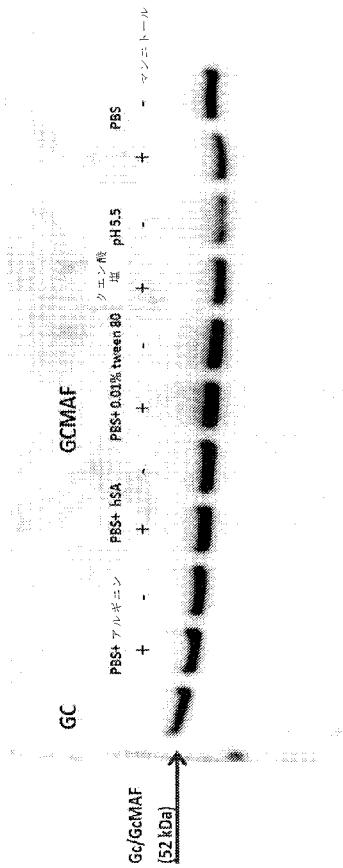
【 図 1 B 】

1週間



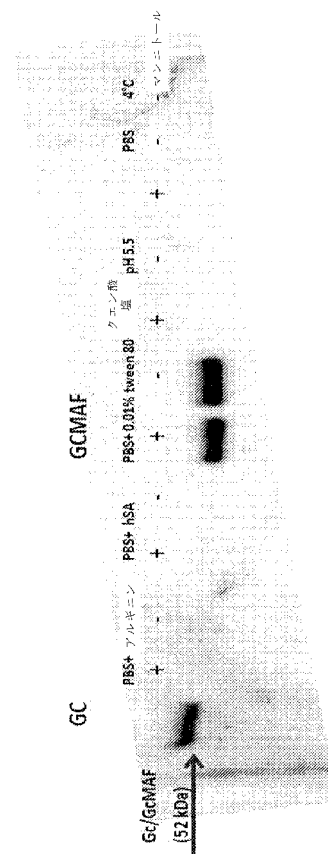
【 図 2 A 】

GcMAFの安定性  
時間 0



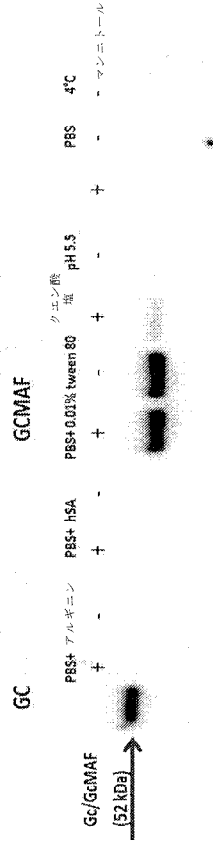
【 図 2 B 】

GcMAFの安定性  
3.7℃で1週間



【 2 C 】

GcMAFの安定性  
25℃で2週間



【 2 D 】

GcMAFの安定性  
37℃で1ヶ月間



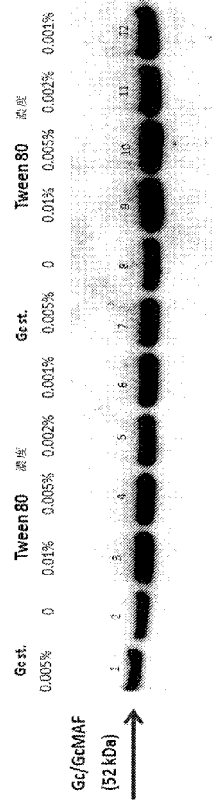
【 2 E 】

GcMAFの安定性  
37℃で3ヶ月間



【 3 A 】

GcMAFの安定性  
時間 0





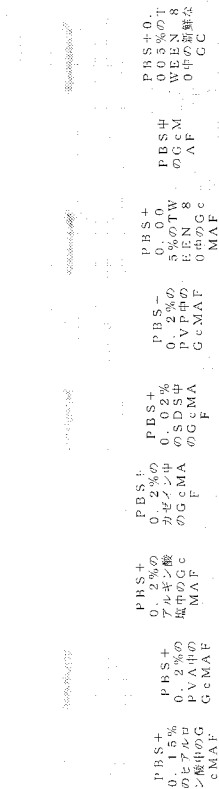






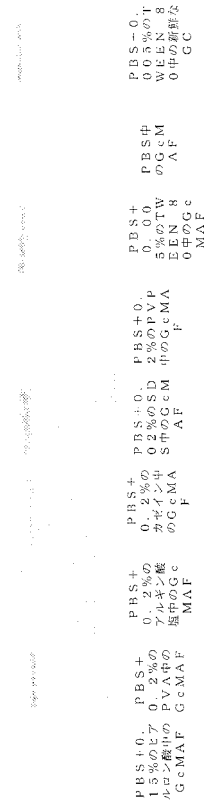
【 図 9 B 】

GcMAFの安定性  
37℃で1週間



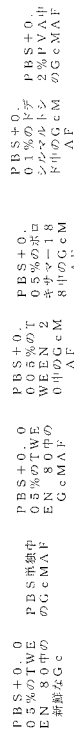
【 図 9 C 】

GcMAFの安定性  
37℃で2週間



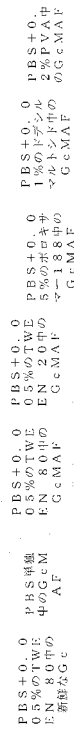
【 図 10 A 】

GcMAFの安定性  
時間0



【 図 10 B 】

GcMAFの安定性  
37℃で1週間



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IL2014/050516
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC (2014.01) A61K 38/19, A61K 47/08, A61K 47/30  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>  Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC (2014.01) A61K  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases consulted: THOMSON INNOVATION, CAPLUS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, Google Scholar Search terms used: GcMAF, surfactant, polysorbate, maltoside, Triton, X-100, Brij 58, sodium dodecyl sulphate, Poloxamer 188, TWEEN 80, TWEEN 20, polyvinyl pyrrolidone, Polyvinylpyrrolidone, polyvidone, povidone soluble polymer, stability, storage		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 9307288 A1 YAMAMOTO NOBUTO 15 Apr 1993 (1993/04/15) page 13 lines 7-18, claim 28	1-32
Y	Yamamoto N. et al. Immunotherapy for Prostate Cancer with Gc Protein-Derived Macrophage-Activating Factor, GcMAF1 (2008) Translational Oncology Volume 1, Issue 2, Pages 65-72. DOI 10.1593/tlo.08106 Retrieved from the internet on 21.8.2014: <a href="http://www.transonc.com/article/S1936-5233(08)80008-3/pdf">http://www.transonc.com/article/S1936-5233(08)80008-3/pdf</a> 31 Jul 2008 (2008/07/31) the whole document	1-32
Y	Chang B. S et al. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants (1996) Journal of Pharmaceutical Sciences Volume 85, Issue 12, pages 1325-1330. DOI: 10.1021/js960080y 31 Dec 1996 (1996/12/31) table 1, 2, fig 3, page 1327 right column last para	1-14,16-32
Y	WO 2004006948 A1 LEK PHARMACEUTICALS; VUKMIROVIC ANDREJA; ROZMAN TANJAS; SVETEK JELKA; PARIS ALENKA 22 Jan 2004 (2004/01/22) examples, claims	1-9,15-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 24 Aug 2014		Date of mailing of the international search report 25 Aug 2014
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Facsimile No. 972-2-5651616		Authorized officer HOROWITZ Anat Telephone No. 972-2-5651689

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2014/050516

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4647454 A INTER YEDA LTD 03 Mar 1987 (1987/03/03) examples, claims	1-9,15-32
A	Manning M.C et al. Stability of protein pharmaceuticals: an update (2010) Pharmaceutical Research, Vol. 27, No. 4, DOI: 10.1007/s11095-009-0045-6 Retrieved from the internet on 21.8.2014; <a href="http://static.springer.com/sgw/documents/1345446/application/pdf/PHARMRES_Stability+of+Protein+Pharmaceuticals.pdf">http://static.springer.com/sgw/documents/1345446/application/pdf/PHARMRES_Stability+of+Protein+Pharmaceuticals.pdf</a> 30 Apr 2010 (2010/04/30) pages 556-558	1-32

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/IL2014/050516

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
WO 9307288 A1	15 Apr 1993	WO 9307288 A1	15 Apr 1993
		AT 161580 T	15 Jan 1998
		AU 2594692 A	03 May 1993
		AU 8654191 A	30 Mar 1992
		CA 2092720 A1	01 Mar 1992
		CA 2092720 C	14 Dec 1999
		CA 2119773 C	07 Dec 1999
		DE 69128535 D1	05 Feb 1998
		DE 69128535 T2	20 May 1998
		DE 69220375 D1	17 Jul 1997
		DE 69220375 T2	22 Jan 1998
		EP 0546096 A1	16 Jun 1993
		EP 0546096 A4	27 Apr 1994
		EP 0546096 B1	29 Dec 1997
		EP 0607186 A1	27 Jul 1994
		EP 0607186 A4	15 Mar 1995
		EP 0607186 B1	11 Jun 1997
		ES 2111002 T3	01 Mar 1998
		JP H06503716 A	28 Apr 1994
		JP 2596491 B2	02 Apr 1997
		JP H06510908 A	08 Dec 1994
		JP 2808047 B2	08 Oct 1998
		US 5177001 A	05 Jan 1993
		US 5177002 A	05 Jan 1993
		US 5326749 A	05 Jul 1994
		WO 9204459 A1	19 Mar 1992
WO 2004006948 A1	22 Jan 2004	WO 2004006948 A1	22 Jan 2004
		AR 040600 A1	13 Apr 2005
		AT 330623 T	15 Jul 2006
		AU 2002368075 A1	02 Feb 2004

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/IL2014/050516

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		AU 2002368075 B2	05 Jul 2007
		CA 2492470 A1	22 Jan 2004
		CA 2492470 C	28 Aug 2012
		CN 1638791 A	13 Jul 2005
		CN 100425283 C	15 Oct 2008
		DE 60212728 D1	03 Aug 2006
		DE 60212728 T2	28 Jun 2007
		EP 1536822 A1	08 Jun 2005
		EP 1536822 B1	21 Jun 2006
		ES 2268166 T3	16 Mar 2007
		JP 2006501193 A	12 Jan 2006
		JP 4979191 B2	18 Jul 2012
		MX PA05000661 A	19 Aug 2005
		SI 21257 A	29 Feb 2004
		US 2005238720 A1	27 Oct 2005
		US 8648175 B2	11 Feb 2014
US 4647454 A	03 Mar 1987	AR 229778 A1	17 Mar 1983
		AU 1234383 A	17 Mar 1982
		BE 897276 A1	17 Mar 1983
		CA 1209473 ( A1	17 Mar 1982
		EP 0089245 A2	17 Mar 1982
		ES 8500062 A1	17 Mar 1982
		IL 65277 A	17 Mar 1982
		JP S5910598 A	17 Mar 1982

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 9/20 (2006.01)	A 6 1 K 9/20	
A 6 1 K 9/48 (2006.01)	A 6 1 K 9/48	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 3/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/02	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	Z N A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 シャハル, マイケル

イスラエル国, 7 5 6 9 3 5 6 リション レジオン, 2 4 ノブ ストリート

(72) 発明者 スベタ, リフシツ

イスラエル国, 7 6 8 0 4 マズケレット バチャ, 4 0 ナティヴ ハシャヤロット ストリート

(72) 発明者 シュピツァー, アヤ

イスラエル国, 7 4 0 0 4 3 5 ネス ジヨナ, 8 / 1 8 ハパーデジム ストリート

F ターム(参考) 4C076 AA11 AA12 AA17 AA22 AA29 AA36 AA53 BB11 BB13 BB15  
BB16 CC01 CC07 CC21 CC27 CC32 CC35 DD08F DD09F DD23D  
DD26Z DD41Z DD43Z DD51Z DD69F DD69Q EE06A EE23A EE59Q FF11  
FF63  
4C084 AA02 AA03 BA34 BA44 DA02 MA01 MA17 MA22 MA23 MA35  
MA37 MA43 NA03 ZA02 ZB07 ZB08 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35  
ZC21 ZC61