(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
2016 年 5 月 12 日(12.05.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/072396 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/724 (2006.01) *A61K 47/36* (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01) *A61L 27/00* (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/080945

(22) 国際出願日: 2015 年 11 月 2 日(02.11.2015)

(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 2014-224265 2014 年 11 月 4 日(04.11.2014) JP

(71) 出願人: 国立大学法人　東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 寺内　正彦(TERAUCHI, Masahiko); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 国立大学法人　東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 池田　剛(IKEDA, Go); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号　国立大学法人　東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 田村　篤志(TAMURA, Atsushi); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号　国立大学法人　東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 山口　聰(YAMAGUCHI, Satoshi); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 国立大学法人　東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 原田　清(HARADA, Kiyoshi); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号　国立大学法人　東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 由井　伸彦(YUI, Nobuhiko); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号　国立大学法人　東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 伊藤　克博，外(ITO, Katsuhiro et al.); 〒1030025 東京都中央区日本橋茅場町２丁目１３番１１号　サンアイ茅場町ビル４階 Tokyo (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(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)）

WO 2016/072396 A1

(54) **Title**: AGENT FOR STABLY RETAINING BONE MORPHOGENETIC FACTOR, ACTIVATOR FOR BONE MORPHOGENETIC FACTOR, METHOD FOR STABLY RETAINING BONE MORPHOGENETIC FACTOR, METHOD FOR ACTIVATING BONE MORPHOGENETIC FACTOR, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, USE OF COMPLEX, AND BONE REGENERATION METHOD

(54) 発明の名称 : 骨形成因子安定保持剤、骨形成因子活性化剤、骨形成因子の安定保持方法、骨形成因子の活性化方法、医薬組成物、複合体の使用、及び骨の再生方法

(57) **Abstract**: An agent for stably retaining a bone morphogenetic factor, which comprises a sulfonated polyrotaxane that has both a cyclic molecule having a sulfate group and a linear molecule penetrating through a hollow part in the cyclic molecule and which can retain a bone morphogenetic factor stably; and an activator for a bone morphogenetic factor, which comprises a sulfonated polyrotaxane that has both a cyclic molecule having a sulfate group and a linear molecule penetrating through a hollow part in the cyclic molecule and which can activate a bone morphogenetic factor.

(57) 要約:　硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを含有し、骨形成因子を安定に保持する骨形成因子安定保持剤、及び硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを含有し、骨形成因子を活性化する骨形成因子活性化剤である。

明　細　書

発明の名称 ：

骨形成因子安定保持剤、骨形成因子活性化剤、骨形成因子の安定保持方法、骨形成因子の活性化方法、医薬組成物、複合体の使用、及び骨の再生方法

技術分野

[0001] 本発明は、骨形成因子安定保持剤、骨形成因子活性化剤、骨形成因子の安定保持方法、骨形成因子の活性化方法、医薬組成物、複合体の使用、及び骨の再生方法に関する。

背景技術

[0002] 従来より、骨再生分野では、移植骨の代替品としてポリ乳酸やβ－リン酸三カルシウム等の骨代替材料の利用が検討されている。しかし、前記ポリ乳酸は、強い免疫反応や炎症反応を惹起する場合があるという問題があり、また、前記β－リン酸三カルシウムは、無機材料であるために生体内吸収されずに停滞するといった問題があり、広範囲の骨再生技術の確立には至っていないのが現状である。

[0003] 骨形成を促進する成長因子である骨形成因子－２（Ｂｏｎｅ　Ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｅｔｉｃ　Ｐｒｏｔｅｉｎ－２、以下、「ＢＭＰ－２」ともいう。）は、強力に骨の形成を誘導することが知られており、近年、広く注目されている。しかし、前記ＢＭＰ－２は、生体環境下において分解及び失活が早く、非常に不安定であるという問題がある。また、前記ＢＭＰ－２は、広範囲の骨を再生させるには数ヶ月といった長期間を要するため、活性を維持するために多量のＢＭＰ－２を継続的に投与する必要がある。しかし、前記ＢＭＰ－２を多量に投与すると生体内で炎症作用や過剰反応により異常な骨が形成されるという問題が報告されている（例えば、非特許文献１参照）。

[0004] そのため、前記問題を解決するために、生体内環境下におけるＢＭＰ－２の不活性化を抑制し、ＢＭＰ－２による分化誘導効率に優れる、ＢＭＰ－２

に硫酸化多糖類であるヘパリンを添加し、ＢＭＰ－２／ヘパリン静電複合体を形成させるＢＭＰ－２の活性維持方法が提案されている（例えば、非特許文献２、非特許文献３、及び特許文献１参照）。

しかしながら、前記提案は、ヘパリンが抗凝固作用を有するため臨床応用することは困難であるという問題がある。

[0005] したがって、細胞毒性が少なく、抗凝固作用がないなどの安全性に優れ、かつ骨形成因子との複合体形成作用に優れる、骨形成因子を生体内で安定に保持することができる骨形成因子安定保持剤及び骨形成因子の安定保持方法、骨形成因子を活性化することができる骨形成因子活性化剤及び骨形成因子の活性化方法、骨を再生することができる医薬組成物、複合体の使用、並びに骨の再生方法の提供が強く望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２００８－７４７３２号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｚａｒａ ＪＮ ｅｔ ａｌ． Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇ． Ｐａｒｔ Ａ，１７（９－１０），１３８９－１３９９（２０１１）

非特許文献2：Ｔａｋａｄａ Ｔ ｅｔ ａｌ． Ｊ． Ｂｉｏｌ． Ｃｈｅｍ．，２７８（４４），４３２２９－４３２３５（２００３）

非特許文献3：Ｚｈａｏ Ｂ ｅｔ ａｌ． Ｊ． Ｂｉｏｌ． Ｃｈｅｍ．，２８１（３２），２３２４６－２３２５３（２００６）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、従来における前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、細胞毒性が少なく、抗凝固作用がないなどの安全性に優れ、かつ骨形成因子との複合体形成作用に優れる、骨形成因子を生体内で安定に保持することができる骨形成因子安定保持剤及び骨形成因

子の安定保持方法、骨形成因子を活性化することができる骨形成因子活性化剤及び骨形成因子の活性化方法、骨を再生することができる医薬組成物、複合体の使用、並びに骨の再生方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 前記課題を解決するための手段としては、以下のとおりである。即ち、

＜１＞ 硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを含有し、

骨形成因子を安定に保持することを特徴とする骨形成因子安定保持剤である。

＜２＞ 硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを含有し、

骨形成因子を活性化することを特徴とする骨形成因子活性化剤である。

＜３＞ 硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを少なくとも有する骨形成因子安定保持剤に、骨形成因子を作用させることにより、骨形成因子を骨形成因子安定保持剤に安定に保持させることを特徴とする骨形成因子の安定保持方法である。

＜４＞ 硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを少なくとも含有する骨形成因子活性化剤に、骨形成因子を作用させることにより、骨形成因子を活性化させることを特徴とする骨形成因子の活性化方法である。

＜５＞ 骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとを含有する、医薬組成物、特に、骨の再生に用いるための医薬組成物である。

＜６＞ 骨の再生に用いるための医薬品の製造における、骨形成因子と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとの複合体の使用である。

＜７＞ 対象における骨の再生方法であって、

前記対象に骨形成因子と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンと、を含有する組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、方法である。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、前記従来における諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、細胞毒性が少なく、抗凝固作用がないなどの安全性に優れ、かつ骨形成因子との複合体形成作用に優れる、骨形成因子を生体内で安定に保持することができる骨形成因子安定保持剤及び骨形成因子の安定保持方法、骨形成因子を活性化することができる骨形成因子活性化剤及び骨形成因子の活性化方法、骨を再生することができる医薬組成物、複合体の使用、並びに骨の再生方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、製造例１の中間生成物であるカルボキシエチル基で修飾されたポリロタキサン（以下、「ＣＥ－ＰＲＸ」ともいう）の重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

[図2]図２は、製造例１で得られた硫酸化ポリロタキサン－１の重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

[図3]図３は、製造例２で得られた硫酸化ポリロタキサン－２の重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

[図4]図４は、製造例３で得られた硫酸化ポリロタキサン－３の重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

[図5]図５は、製造例４で得られた硫酸化ポリロタキサン－４の重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

[図6]図６は、製造例５で得られた硫酸化ポリロタキサン－５の重水中で測定

した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

[図7]図７は、製造例６で得られた硫酸化ポリロタキサン－６の重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

[図8]図８は、製造例７で得られた硫酸化ポリロタキサン－７の重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

[図9]図９は、試験例１の相対ＡＬＰ活性量の測定結果を示す図である。

[図10]図１０は、試験例２のＡＬＰ活性量を測定したウエルの着色結果を示す図である。

[図11]図１１は、試験例３の相対ＡＬＰ活性量の測定結果を示す図である。

[図12]図１２は、試験例４のＡＬＰ活性量の測定結果を示す図である。

[図13]図１３は、試験例５のＢＭＰ－２抗体結合率の測定結果を示す図である。

[図14]図１４は、試験例６のＢＭＰ－２阻害剤添加時のＡＬＰ活性量の測定結果を示す図である。

[図15]図１５は、試験例７の細胞毒性の測定結果を示す図である。

[図16]図１６は、試験例８の硫酸化ポリロタキサンの抗凝固作用の測定結果を示す図である。

[図17A]図１７Ａは、試験例９のＢＭＰ－２未添加による石灰化の評価結果を示す図である。

[図17B]図１７Ｂは、試験例９のＢＭＰ－２添加による石灰化の評価結果を示す図である。

[図17C]図１７Ｃは、試験例９のヘパリンとＢＭＰ－２複合体による石灰化の評価結果を示す図である。

[図17D]図１７Ｄは、試験例９の硫酸化ポリロタキサンとＢＭＰ－２複合体による石灰化の評価結果を示す図である。

[図18]図１８は、試験例１０のＡＬＰ活性量の測定結果を示す図である。

[図19A]図１９Ａは、試験例１１のＢＭＰ－２を１０ｎｇ投与した頭蓋骨欠損モデルマウスの頭蓋骨のエックス線マイクロＣＴによる撮影画像を示す図である。

[図19B]図１９Ｂは、試験例１１のＢＭＰ－２を５０ｎｇ投与した頭蓋骨欠損モデルマウスの頭蓋骨のエックス線マイクロＣＴによる撮影画像を示す図である。

[図20A]図２０Ａは、試験例１２の硫酸化ポリロタキサンを投与したマウスにおける肝臓及び腎臓に対する毒性を調べたＡＳＴの結果を示す図である。

[図20B]図２０Ｂは、試験例１２の硫酸化ポリロタキサンを投与したマウスにおける肝臓及び腎臓に対する毒性を調べたＡＬＴの結果を示す図である。

[図20C]図２０Ｃは、試験例１２の硫酸化ポリロタキサンを投与したマウスにおける肝臓及び腎臓に対する毒性を調べたＢＵＮの結果を示す図である。

[図20D]図２０Ｄは、試験例１２の硫酸化ポリロタキサンを投与したマウスにおける肝臓及び腎臓に対する毒性を調べたＣＲの結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] （骨形成因子安定保持剤、骨形成因子活性化剤、骨形成因子の安定保持方法、骨形成因子の活性化方法、医薬組成物、複合体の使用、及び骨の再生方法）

本発明の骨形成因子安定保持剤、骨形成因子活性化剤、骨形成因子の安定保持方法、骨形成因子の活性化方法、医薬組成物、複合体の使用、及び骨の再生方法は、硫酸化ポリロタキサン、及び骨形成因子を含有し、必要に応じてさらにその他の成分を含む。

[0013] 本発明者らは、以下のことを知見した。

前記課題は、プラスの電荷を帯びる骨形成因子と、マイナスの電荷を帯びるヘパリンとが静電相互作用により複合体を形成することから、ヘパリンと同様の化学構造である硫酸基を環状分子に有することによりマイナスの電荷を帯びる硫酸化ポリロタキサンを含有することで、前記骨形成因子と前記硫

酸化ポリロタキサンとの複合体を形成することができることを知見した。

また、前記硫酸化ポリロタキサンは、前記硫酸基を有する環状分子と、前記環状分子の中空部を貫通する線状分子とを有するため、前記硫酸基を有する環状分子の自由度が高く、前記環状分子が前記線状分子上を移動することができるため、ヘパリンのような硫酸基の修飾位置が固定されている化合物と比較して、骨形成因子との複合体形成時の立体障害を緩和することで強く相互作用し、骨形成因子を生体内で安定に保持することができ、かつ骨形成因子を活性化することができることを知見した。

[0014] ＜硫酸化ポリロタキサン＞

前記硫酸化ポリロタキサン（以下、「SO_3－ＰＲＸ」ともいう）は、細胞毒性が少なく、抗凝固作用がないなどの安全性、及び骨形成因子との複合体形成作用を向上させるために含有されている。

[0015] 前記硫酸化ポリロタキサンとしては、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有するものであれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、１種単独で使用してもよいし、２種以上を併用してもよい。なお、硫酸化ポリロタキサンとは、環状分子に硫酸基が修飾したポリロタキサンをいう。

[0016] 前記硫酸化ポリロタキサンの数平均分子量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、２，０００～５００，０００が好ましく、１０，０００～１００，０００がより好ましい。なお、前記数平均分子量は、例えば、プロトン核磁気共鳴スペクトルから得られる化学組成から算出することができる。

[0017] －線状分子－

前記線状分子としては、前記環状分子の中空部を貫通することができれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、線状分子の両端部に、前記環状分子が脱離しないように作用する封鎖基で修飾された構造を有する。なお、「線状分子」の「線状」とは、直鎖であることを意味するが、線状分子上で前記環状分子が移動することができれば、分岐鎖を有してい

てもよい。

[0018] 前記線状分子の両端部以外の構成の数平均分子量としては、特に制限はなく、目的とする硫酸化ポリロタキサンの数平均分子量や、貫通させる環状分子の数に応じて適宜選択することができるが、５００～１，０００，０００が好ましく、５００～１０，０００がより好ましく、５００～６，０００が特に好ましい。前記数平均分子量が、５００未満であると、貫通している環状分子の脱離が発生しやすく、また、前記環状分子の貫通数を制御することが困難となる傾向にあり、１，０００，０００を超えると、溶解性が低下し、前記環状分子の貫通数の制御が困難となる傾向にある。なお、前記数平均分子量は、例えば、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（ＧＰＣ）測定やプロトン核磁気共鳴スペクトルから得られる化学組成から算出することができる。

[0019] 前記線状分子の両端部以外の構成としては、特に制限はなく、公知のポリロタキサンの構成を適宜選択することができ、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのブロック共重合体、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのランダム共重合体、ポリメチルビニルエーテル、ポリエチレンイミンなどが挙げられる。

前記線状分子の両端部以外の構成としては、市販品を用いてもよく、適宜合成したものを用いてもよい。

[0020] 前記線状分子の両端部以外の構成は、後述する環状分子との組合せに応じて適宜選択することが好ましく、例えば、前記環状分子がα－シクロデキストリンの場合には、ポリエチレングリコールとすることが好ましく、前記環状分子がβ－シクロデキストリンの場合には、ポリプロピレングリコール、若しくはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの共重合体とすることが好ましい。

[0021] 前記線状分子の両端部の封鎖基としては、前記線状分子の両端をキャップして前記環状分子の脱離を防止することができれば、特に制限はなく、目的

に応じて適宜選択することができ、例えば、Ｎ－ベンゾイルオキシカルボニル－Ｌ－チロシン；アミノ酸又はその誘導体；オリゴペプチド；蛍光分子などが挙げられる。これらの中でも、Ｎ－ベンゾイルオキシカルボニル－Ｌ－チロシンが好ましい。

[0022] 前記封鎖基を前記線状分子に結合させる方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができる。

[0023] －環状分子－

前記環状分子としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、シクロデキストリン、クラウンエーテル、カリックスアレンなどが挙げられる。これらは、１種単独で使用してもよいし、２種以上を併用してもよい。これらの中でも、シクロデキストリンが好ましい。

[0024] 前記シクロデキストリンとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、α－シクロデキストリン、β－シクロデキストリン、γ－シクロデキストリンなどが挙げられる。これらは、１種単独で使用してもよいし、２種以上を併用してもよい。これらの中でも、α－シクロデキストリンが好ましい。

[0025] 前記硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの前記線状分子に貫通されている前記環状分子の数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、平均５個～１，０００個が好ましく、平均１０個～２００個がより好ましく、平均２０個～５０個が特に好ましい。

[0026] 前記環状分子としては、少なくとも硫酸基で修飾されている。前記硫酸基を有することにより、前記硫酸化ポリロタキサンがマイナスの電荷を帯びることができ、後述する骨形成因子と静電相互作用することができる。

[0027] 前記硫酸基としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、スルホン酸、エチルスルホン酸、プロピルスルホン酸、ブチルスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、スルファミン酸（アミド硫酸）等に由来する構造単位、及びこれらの塩に由来する構造単位などが挙げられる。これらは、１種単独で使用してもよいし、２種以上を併用してもよい。これら

の中でも、エチルスルホン酸に由来する構造単位が好ましい。

[0028] 前記硫酸基としては、生理的ｐＨ環境で脱プロトン化し、前記硫酸化ポリロタキサンをマイナスの電荷を帯びることができれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、環状分子に直接修飾されていてもよく、リンカー及び他の置換基の少なくともいずれかを介して修飾されていてもよく、リンカー及び他の置換基の少なくともいずれかの繰り返し構造を有していてもよい。これらの中でも、リンカー及び他の置換基を介して修飾されていることが好ましく、リンカー及び他の置換基の繰り返し構造を介して修飾されていることがより好ましい。なお、リンカー及び他の置換基の両方を有する場合、前記環状分子に結合する順は、特に制限はなく、リンカー、他の置換基の順であっても、他の置換基、リンカーの順であってもよい。

前記リンカー及び前記他の置換基の少なくともいずれかの繰り返し数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、０～２０が好ましく、０～１０がより好ましく、０～３が特に好ましい。

[0029] 前記リンカーとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、カルバミン酸エステル結合（－Ｏ－ＣＯ－ＮＨ－）、アミド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）、エステル結合（－Ｏ－ＣＯ－）、カルボネート結合（－Ｏ－ＣＯ－Ｏ－）、エーテル結合（－Ｏ－）などが挙げられる。

前記他の置換基としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ベンジル基、エチレングリコール基、トリエチレングリコール基、ポリエチレングリコール基などが挙げられる。

[0030] 前記硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの硫酸基の修飾数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、平均１０個～４００個が好ましく、平均２０個～８０個がより好ましい。

[0031] 前記環状分子１分子あたりの硫酸基の修飾数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、平均０．１個～６個が好ましく、平均０．５個～３個がより好ましく、平均０．５個～１個が特に好ましい

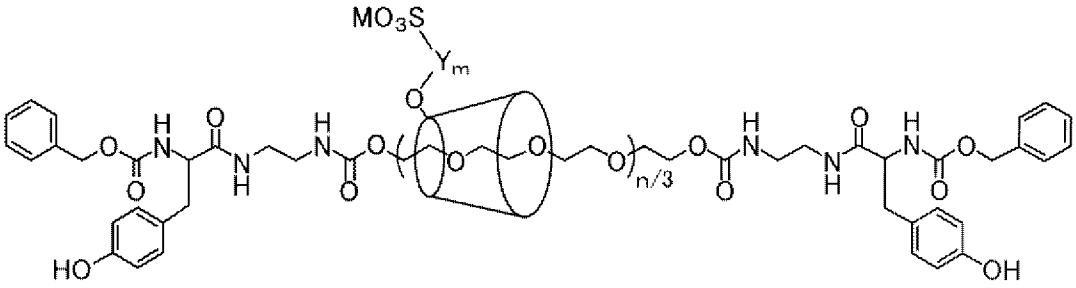
。

[0032] 前記環状分子を前記線状分子により貫通させる方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができる。

前記環状分子を硫酸基で修飾する方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができる。

[0033] 前記硫酸化ポリロタキサンの好ましい態様としては、例えば、下記一般式（Ｉ）で示される化合物、下記一般式（ＩＩＩ）で示される化合物などが挙げられる。

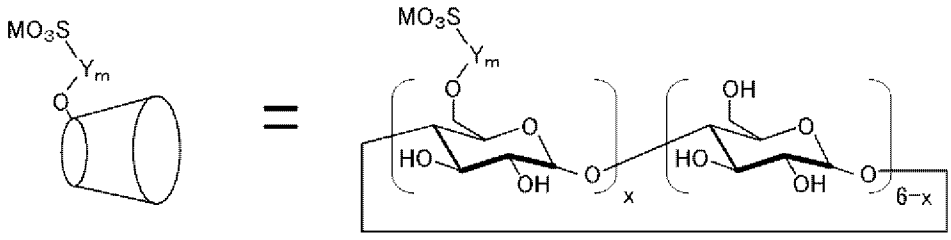
[0034] [化1]



一般式(I)

但し、前記一般式（Ｉ）中、前記環状分子が、下記一般式（ＩＩ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。

[化2]

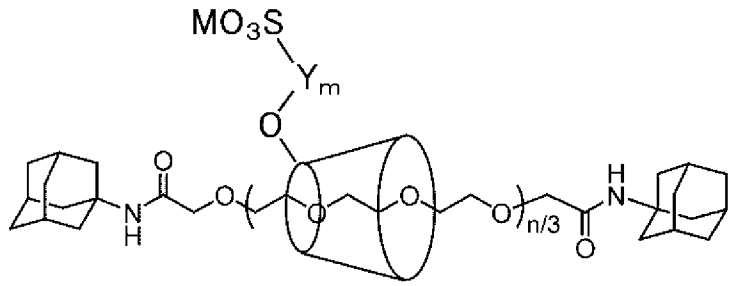


一般式(II)

但し、前記一般式（ＩＩ）中、Ｙは、Ｐ及びＱの少なくともいずれかを示し、Ｐは、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ベンジル基、エチレングリコール基、トリエチレングリコール基、又はポリエチレングリコール基を示し、Ｑは、カルバミン酸エステル結合（－Ｏ－ＣＯ－ＮＨ－）、

アミド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）、エステル結合（－Ｏ－ＣＯ－）、カルボネート結合（－Ｏ－ＣＯ－Ｏ－）、又はエーテル結合（－Ｏ－）を示し、ｍは、０～２０の整数を示し、ｘは、１～６の整数を示し、Ｍは、水素原子、ナトリウム原子、又はカリウム原子を示す。

[化3]

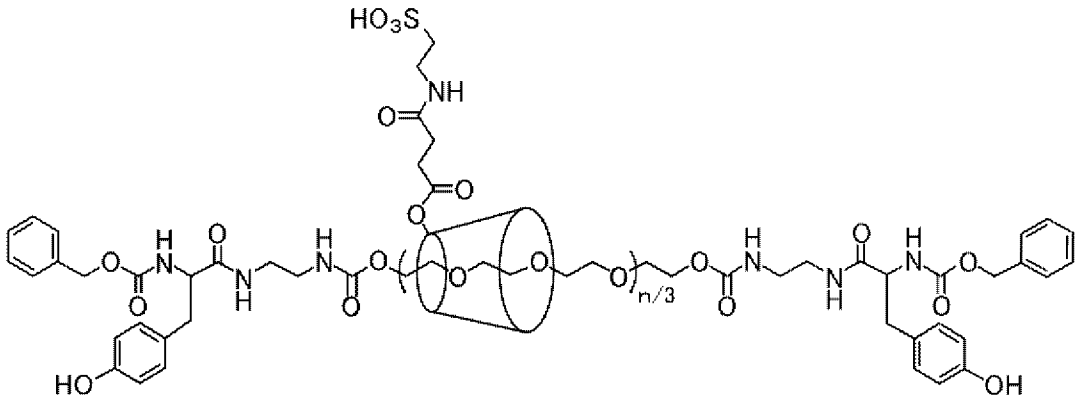


一般式(III)

但し、前記一般式（ＩＩＩ）中、前記環状分子が、前記一般式（ＩＩ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。

[0035] 前記一般式（Ｉ）で示される化合物である硫酸化ポリロタキサンのより好ましい態様としては、例えば、下記構造式（１－Ａ）～下記構造式（１－Ｅ）で示される硫酸化ポリロタキサンなどが挙げられる。

[0036] [化4]

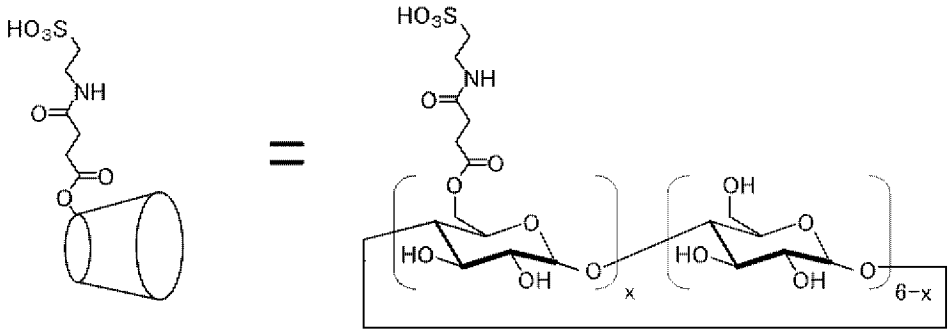


構造式(1－A)

但し、前記構造式（１－Ａ）中、前記環状分子が、下記式（Ａ）で表され

、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。

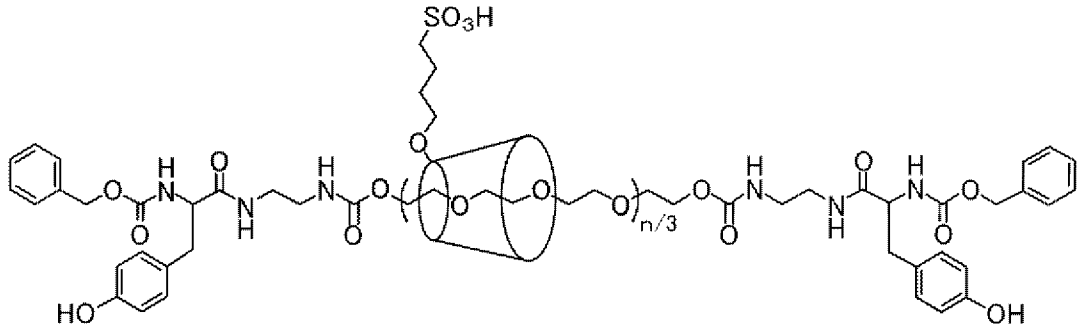
[化5]



式（Ａ）

但し、前記式（Ａ）中、ｘは、１～６の整数を示す。

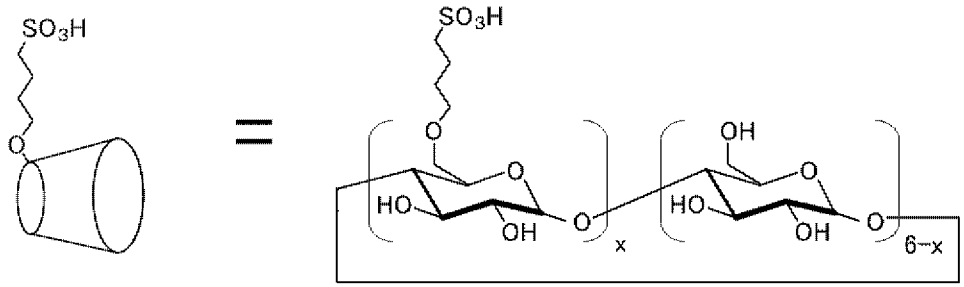
[0037] [化6]



構造式（１－Ｂ）

但し、前記構造式（１－Ｂ）中、前記環状分子が、下記式（Ｂ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。

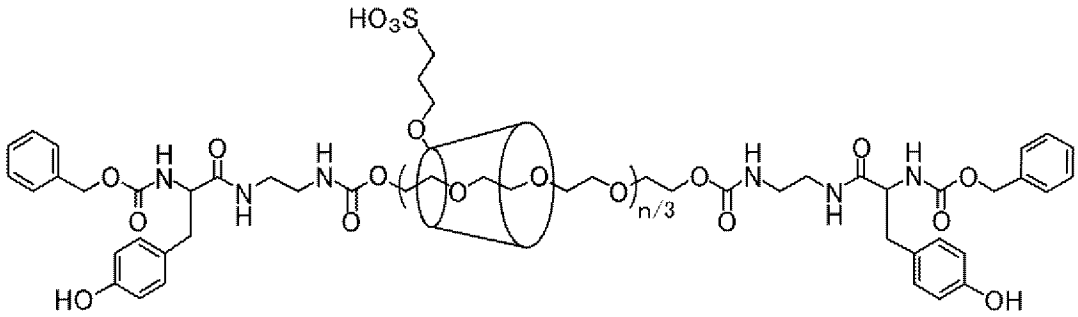
[化7]



式（Ｂ）

但し、前記式（Ｂ）中、ｘは、１～６の整数を示す。

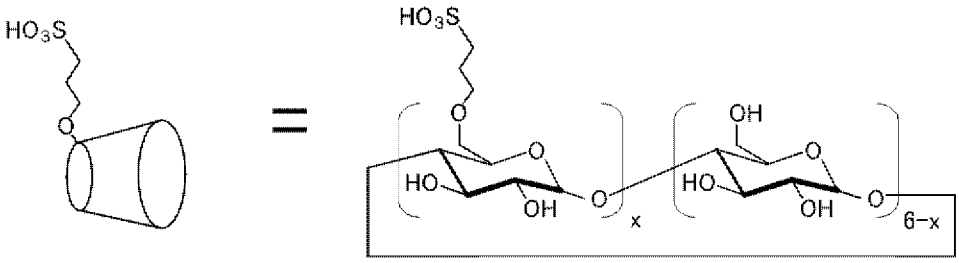
[0038] [化8]



構造式（１－Ｃ）

但し、前記構造式（１－Ｃ）中、前記環状分子が、下記式（Ｃ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。

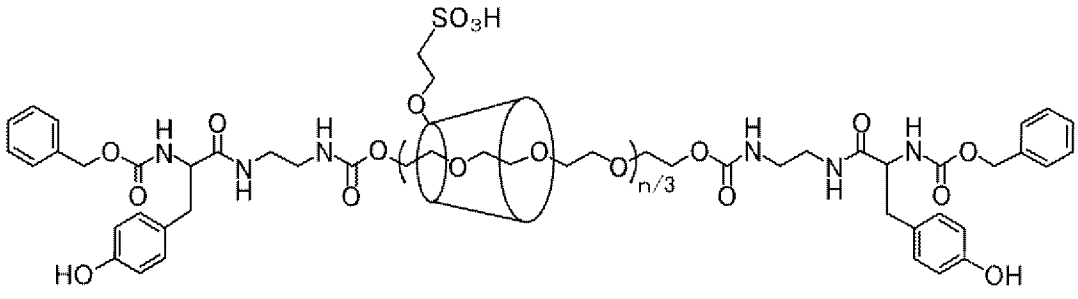
[化9]



式（Ｃ）

但し、前記式（Ｃ）中、ｘは、１～６の整数を示す。

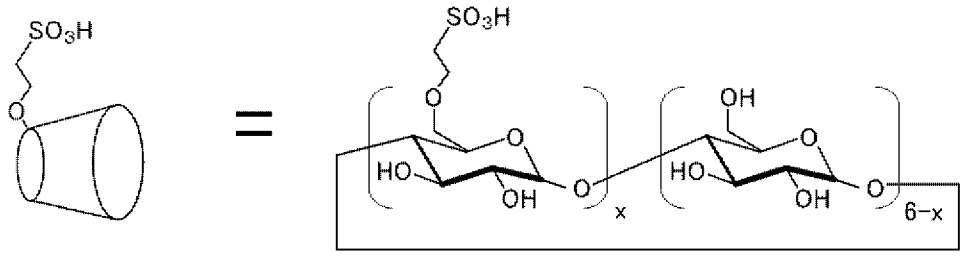
[0039] [化10]



構造式（１－Ｄ）

但し、前記構造式（１－Ｄ）中、前記環状分子が、下記式（Ｄ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。

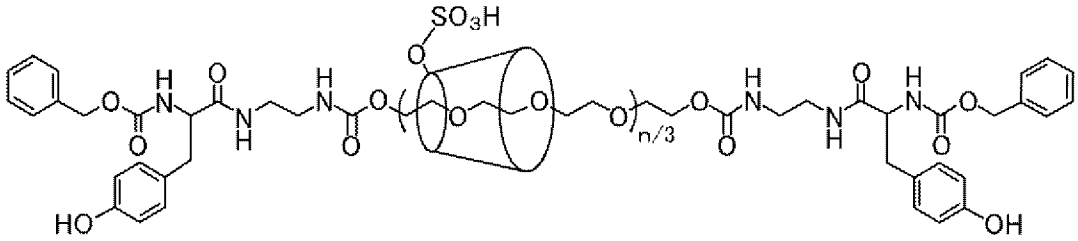
[化11]



式（D）

但し、前記式（Ｄ）中、ｘは、１～６の整数を示す。

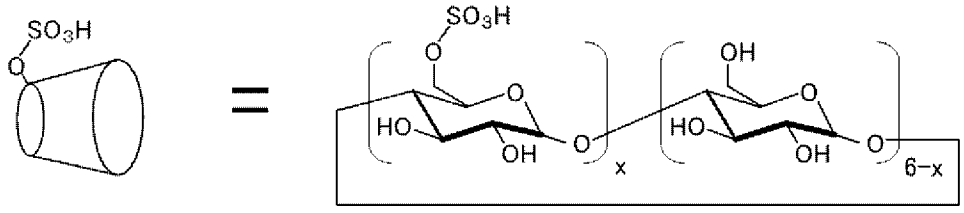
[0040] [化12]



構造式（１－Ｅ）

但し、前記構造式（１－Ｅ）中、前記環状分子が、下記式（Ｅ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。

[化13]



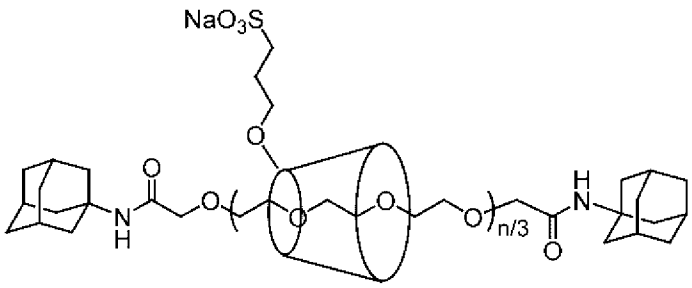
式（E）

但し、前記式（Ｅ）中、ｘは、１～６の整数を示す。

[0041] 前記一般式（ＩＩＩ）で示される化合物である硫酸化ポリロタキサンのより好ましい態様としては、例えば、下記構造式（１－Ｆ）で示される硫酸化ポリロタキサンなどが挙げられる。

[0042]

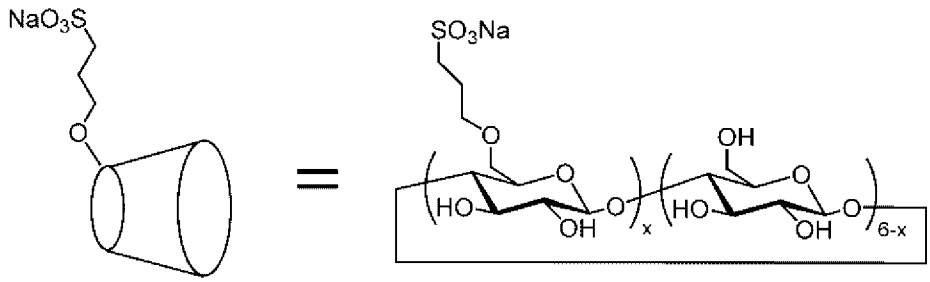
[化14]



構造式（１－Ｆ）

但し、前記構造式（１－Ｆ）中、前記環状分子が、下記式（Ｆ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。

[化15]



式（Ｆ）

但し、前記式（Ｆ）中、ｘは、１～６の整数を示す。

[0043] 前記構造式（１－Ａ）～前記構造式（１－Ｆ）で示される硫酸化ポリロタキサンの線状分子は、ポリエチレングリコールであり、環状分子は、エチルスルホン酸を化学修飾したα－シクロデキストリンである。

[0044] 前記構造式（１－Ａ）～前記構造式（１－Ｆ）中、「ｎ」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す（ｎは、１０～２５，０００の整数）。なお、構造式（１－Ａ）～（１－Ｆ）では、括弧内にポリエチレングリコールの繰返し単位を３つ記載しているため、「ｎ／３」と記載している。また、前記構造式（１－Ａ）～前記構造式（１－Ｆ）中、α－シクロデキストリ

ンはそれぞれ前記式（Ａ）～（Ｆ）で示され、前記構造式（１－Ａ）～前記構造式（１－Ｆ）中では１個のみ記載している。

[0045] また、前記式（Ａ）～（Ｆ）では、α－シクロデキストリンの一級ヒドロキシル基が、前記リンカー及び前記他の置換基の少なくともいずれかを介してエチルスルホン酸に由来する構造単位で修飾されている。なお、前記式（Ａ）～（Ｆ）では、前記置換基の修飾がｘ個（ｘ＝１～６）の場合を示している。

[0046] 前記構造式（１－Ａ）～前記構造式（１－Ｆ）で示される硫酸化ポリロタキサンは、後述する製造例１～７などの方法で好適に製造することができる。

[0047] 製造された硫酸化ポリロタキサンが、前記構造式（１－Ａ）～前記構造式（１－Ｆ）で示される構造を有するか否かは、適宜選択した各種の分析方法により確認することができ、例えば、プロトン核磁気共鳴分光法や赤外分光法により確認することができる。

なお、前記分析方法による測定値には、多少の誤差が生じることがあるが、当業者であれば、前記硫酸化ポリロタキサンが前記構造式（１－Ａ）～前記構造式（１－Ｆ）で示される構造を有することは容易に同定することが可能である。

[0048] 本発明の骨形成因子安定保持剤、骨形成因子活性化剤、及び医薬組成物における前記硫酸化ポリロタキサンの含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、骨形成因子全量に対して、０．１倍～１００，０００倍が好ましく、１０倍～１０，０００倍がより好ましく、１，０００倍～１０，０００倍がさらに好ましく、１，０００倍～５，０００倍が特に好ましい。

[0049] ＜骨形成因子＞

前記骨形成因子（Ｂｏｎｅ Ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｅｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎ、以下、ＢＭＰともいう）は、異所性骨誘導活性を示す物質であり、皮下組織、筋組織内などの未分化間葉系細胞に作用して、前記未分化間葉系細胞

を軟骨芽細胞、骨芽細胞などに分化させ、軟骨、骨などを形成させる活性タンパク質である。

[0050] 前記骨形成因子としては、特に制限はなく、プラスの電荷を有していれば、マイナスの電荷を有する硫酸化ポリロタキサンと静電相互作用により複合体を形成することができる。

[0051] 前記骨形成因子の等電点としては、プラスの電荷を有すれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、７．５～１０が好ましい。なお、ＢＭＰ－２の等電点は、８．３～８．５（Ｊ．Ｍ．Ｗｏｚｎｅｙ Ｐｒｏｇ． Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｓ． １９８９， １，２６７－２８０）であり、生理的環境下ではプラスの電荷を有する。

[0052] 前記骨形成因子としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、骨形成因子－２（ＢＭＰ－２）；骨形成因子－３；骨形成因子－４；骨形成因子－５；骨形成因子－６；骨形成因子－７（ＢＭＰ－７）；骨形成因子－８ａ；骨形成因子－８ｂ；骨形成因子－９；骨形成因子－１０；骨形成因子－１１；骨形成因子－１５；骨形成因子－２及び骨形成因子－６からなる骨形成因子ヘテロダイマー；骨形成因子－２及び骨形成因子－７からなる骨形成因子ヘテロダイマー；骨形成因子－４及び骨形成因子－７からなる骨形成因子ヘテロダイマー；ＯＩＦ（Ｏｓｔｅｒｏｉｎｄｕｃｔｉｖｅ ｆａｃｔｏｒ）；骨形成因子様タンパク質などが挙げられる。これらは、１種単独で使用してもよいし、２種以上を併用してもよい。これらの中でも、骨形成因子－２；骨形成因子－４；骨形成因子－７；骨形成因子－２及び骨形成因子－６からなる骨形成因子ヘテロダイマーが好ましく、骨形成因子－２、骨形成因子－７がより好ましい。前記骨形成因子としては、例えば、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．， ２６４， １３３７７， １９８９、特表平２－５００２４１号公報、特表平３－５０５０９８号公報、特表平４－５０２３３６号公報、特表平４－５０５１５１号公報、特開平５－８４０８１号公報、特開平５－８５９３９号公報などに詳述されている。

[0053] －生物種－

前記骨形成因子の生物種としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、サル、ハムスターなどが挙げられる。これらは、１種単独で使用してもよいし、２種以上を併用してもよい。

[0054] 前記骨形成因子の精製としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができ、例えば、チャイニーズハムスターの卵巣由来細胞等の哺乳類細胞；昆虫細胞などを使用した遺伝子工学的手法を用いることができる。

[0055] －細胞－

前記骨形成因子活性化剤が用いられる細胞としては、例えば、骨芽細胞、軟骨芽細胞、セメント芽細胞、骨髄由来間葉系幹細胞、歯根膜由来細胞などが挙げられる。

[0056] 前記骨形成因子の含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0057] ＜その他の成分＞

前記その他の成分としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、医薬的に許容され得る担体などが挙げられる。前記担体としても、特に制限はなく、例えば、形態等に応じて適宜選択することができる。

前記その他の成分の含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0058] ＜形態＞

前記骨形成因子安定保持剤の形態としては、特に制限はなく、例えば、シート、ビーズ、多孔質体などが挙げられる。

前記シートとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、不織布、フィルム、紙などが挙げられる。

前記ビーズとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、スチレンビーズ、メラミンビーズ、アクリルビーズ、アクリル－スチレンビーズ、ポリカーボネートビーズ、ポリエチレンビーズなどが

挙げられる。

前記多孔質体としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、スポンジ、ポリエステル多孔質体、ポリカーボネート多孔質体、ポリウレタン多孔質体などが挙げられる。

前記シート、前記ビーズ、及び前記多孔質体等の支持体を容器に入れて、硫酸化ポリロタキサンを含有する溶液で前記支持体を浸し、前記支持体に骨形成因子を添加することで、前記骨形成因子を長期間安定に保持することができる。

[0059] 前記骨形成因子活性化剤の形態としては、特に制限はなく、例えば、後述するような所望の作用させる方法に応じて適宜選択することができ、例えば、注射剤（溶液、懸濁液、用事溶解用固形剤等）、吸入散剤などが挙げられる。

[0060] 前記注射剤としては、例えば、前記骨形成因子活性化剤に、ｐＨ調整剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下用、筋肉内用、静脈内用等の注射剤を製造することができる。

前記ｐＨ調整剤及び前記緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

前記安定化剤としては、例えば、ピロ亜硫酸ナトリウム、ＥＤＴＡ、チオグリコール酸、チオ乳酸などが挙げられる。

前記等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖などが挙げられる。

前記局所麻酔剤としては、例えば、塩酸プロカイン、塩酸リドカインなどが挙げられる。

[0061] 前記医薬組成物の形態としては、特に制限はなく、例えば、シート、多孔質体などが挙げられる。

前記シートとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、不織布、フィルム、紙などが挙げられる。

前記多孔質体としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択すること

ができ、例えば、スポンジ、ポリエステル多孔質体、ポリカーボネート多孔質体、ポリウレタン多孔質体などが挙げられる。

[0062] ＜作用＞

前記骨形成因子活性化剤、及び医薬組成物を作用させる方法としては、特に制限はなく、例えば、前記骨形成因子活性化剤、及び医薬組成物の形態、患者の状態等に応じて、局所作用、全身作用のいずれかを選択することができる。例えば、局所作用としては、例えば、腫瘍切除等による骨欠損部の再建治療、唇顎口蓋裂患者への骨増生治療、歯科用インプラント埋入前の歯槽骨萎縮部への骨増生治療、頭蓋骨欠損部への骨増生治療などが挙げられる。

[0063] 前記骨形成因子活性化剤、及び医薬組成物の作用対象としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、サル、イヌ、ネコなどが挙げられる。

[0064] 前記骨形成因子活性化剤、及び医薬組成物の作用量としては、特に制限はなく、作用形態や、作用対象の年齢、体重、所望の効果の程度等に応じて適宜選択することができる。

[0065] 前記骨形成因子活性化剤、及び医薬組成物の作用時期としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記骨形成因子活性化剤、及び医薬組成物の作用回数としては、特に制限はなく、作用対象の年齢、体重、所望の効果の程度等に応じて、適宜選択することができる。

[0066] －用途－

前記骨形成因子安定保持剤としては、例えば、前記硫酸化ポリロタキサンが骨形成因子を安定に保持することができるため、骨形成因子の保存用、カラムクロマトグラフィー等のカラム用などに好適に用いることができる。

前記骨形成因子活性化剤としては、前記硫酸化ポリロタキサンが骨形成因子を活性化することができるため、例えば、医薬用などに好適に用いることができる。

前記骨形成因子の安定保持方法としては、前記骨形成因子と前記硫酸化ポ

リロタキサンとの複合体を形成させることで、骨形成因子を安定に保持することができる。前記骨形成因子と前記硫酸化ポリロタキサンとの複合体を形成させる条件としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記骨形成因子の活性化方法としては、前記骨形成因子と前記硫酸化ポリロタキサンとの複合体を形成させることで、骨形成因子を活性化することができる。前記骨形成因子と前記硫酸化ポリロタキサンとの複合体を形成させる条件としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記医薬組成物としては、前記骨形成因子と前記硫酸化ポリロタキサンとの複合体を形成させ、骨欠損部に埋入させることで、骨を再生することができるため、例えば、医薬用などに好適に用いることができる。

[0067] －医薬組成物－

前記医薬組成物は、骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとを含有することを特徴とする医薬組成物であり、より詳細には、骨の再生に用いるための医薬組成物である。言い換えれば、本発明は、骨の再生に用いるための医薬品の製造における、骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとの複合体の使用にも関する。また、本発明は、対象に前記医薬組成物を投与する工程を含む、骨を再生するための方法にも関する。

[0068] 前記医薬組成物の形態としては、上記のように様々な形態をとりうるが、骨欠損部に埋入させることを考慮すると、多孔質体の形態とすることが好ましい。例えば、骨形成因子タンパク質と硫酸化ポリロタキサンとを含むコラーゲンスポンジなどの多孔質体も、前記医薬組成物に含まれる。このような多孔質体は、骨再生用のインプラントとして利用することができる。前記多孔質体中における、骨形成因子タンパク質と硫酸化ポリロタキサンとの比率は、特に制限はなく、例えば、質量比で１：１，０００，０００～１：１の

間の任意の比率であることができ、環状分子１分子あたりの硫酸基の平均修飾数が約１（例えば０．９～１．１）の硫酸化ポリロタキサンの場合、質量比として１：１，０００以上、１：５，０００以上、もしくは１：１０，０００以上、例えば１：５，０００～１：１５，０００、特に１：１０，０００が好ましい。

実施例

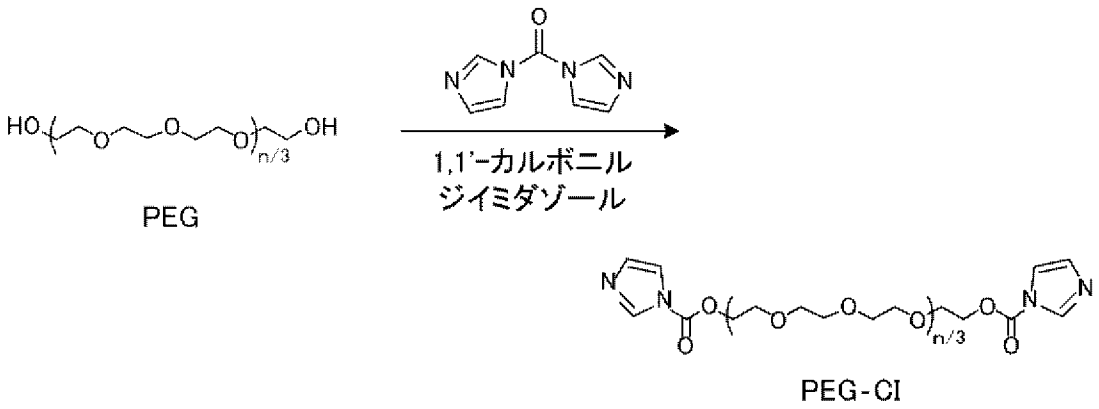
[0069] 以下に製造例及び試験例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの製造例、及び試験例に何ら限定されるものではない。なお、下記反応式の化合物中、「ｎ」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す（前記化合物では、カッコ内にポリエチレングリコールの繰返し単位を３つ記載しているため、「ｎ／３」と記載している）。

[0070] （製造例１：硫酸化ポリロタキサン－１の製造）

線状分子として、ポリエチレングリコール（シグマ－アルドリッチ社製、数平均分子量：４，５００、以下、「ＰＥＧ」ともいう）を２０ｇ、１，１’－カルボニルイミダゾール（シグマ－アルドリッチ社製）を９．９４ｇ量り取り、ナス型フラスコへ加えた。テトラヒドロフラン（関東化学株式会社製）を２００ｍＬ加え溶解し、下記反応式１に示すように、室温で２４時間撹拌し反応させた。前記反応後、ジエチルエーテルに反応溶液を滴下し、再沈殿させ、得られた沈殿物を濾過により回収した。前記再沈殿の操作を２回繰り返した後に、前記沈殿物を減圧乾燥することで、両端にカルボニルイミダゾールに由来する構造単位を有するＰＥＧ（以下、「ＰＥＧ－ＣＩ」ともいう）を１４．３ｇ得た。

（反応式１）

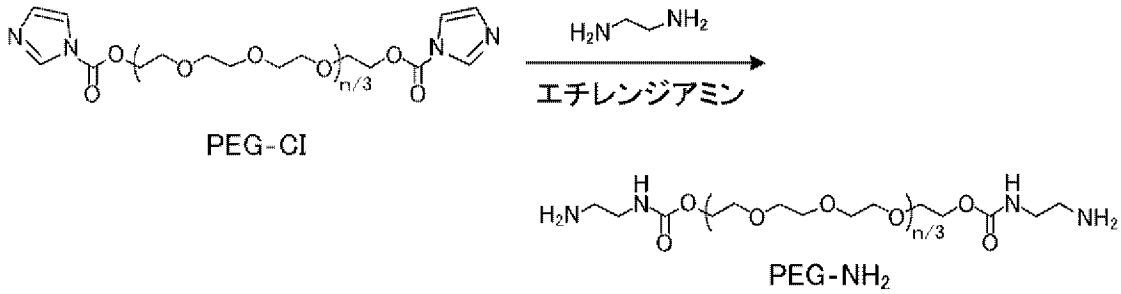
[化16]



[0071] 前記ＰＥＧ－ＣＩ １３．３ｇをナス型フラスコへ加え、テトラヒドロフラン（関東化学株式会社製）を５０ｍＬ加え溶解した。エチレンジアミン（和光純薬工業株式会社）を１２．５ｍＬ滴下し、下記反応式２に示すように、室温で２４時間撹拌し反応させた。前記反応後、ジエチルエーテルに反応溶液を滴下し、再沈殿させ、得られた沈殿物を濾過により回収した。前記再沈殿の操作を２回繰り返した後に、前記沈殿物を減圧乾燥することで両端に一級アミノ基を有するＰＥＧ（以下、「ＰＥＧ－NH_2」ともいう）を１２．８ｇ得た。

（反応式２）

[化17]



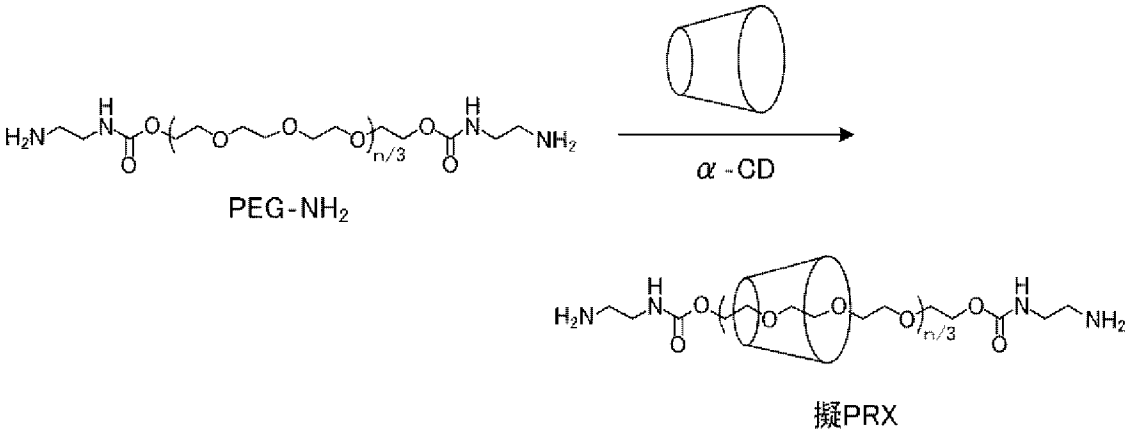
[0072] 前記ＰＥＧ－NH_2と、α－シクロデキストリン（商品名：デキシパールα－１００、塩水港精糖株式会社製、以下、「α－ＣＤ」ともいう）を用い、以下のようにして、擬ポリロタキサンを調製した。なお、下記α－ＣＤは、前記ＣＥ基の修飾数がｘ（ｘ＝１～６）の場合を示している。

前記α－ＣＤを４．９２ｇ量り取り広口瓶に加え、超純水１７．２ｍＬに溶解した。前記ＰＥＧ－NH_2を１．０５ｇ量り取り加え、下記反応式３に示

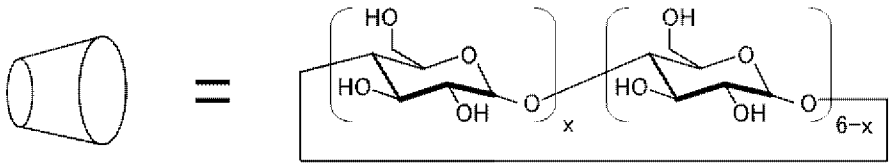
すように、室温で２４時間撹拌し反応させた。前記反応後、得られた沈殿物を遠心分離により回収した。回収した沈殿物を凍結乾燥することで擬ポリロタキサン（以下、「擬ＰＲＸ」ともいう）を得た。

（反応式３）

[化18]



[化19]



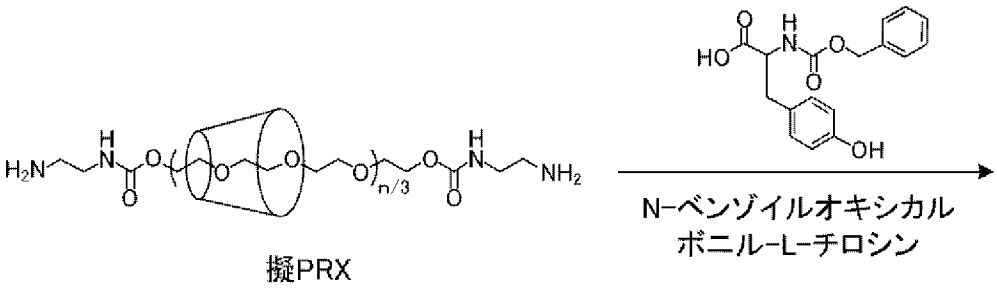
[0073] 前記擬ポリロタキサンの両端部を、以下のようにしてＮ－ベンゾイルオキシカルボニル－Ｌ－チロシン（シグマ－アルドリッチ社製）に由来する構造単位でキャッピングすることにより、複数のα－ＣＤを貫通させた線状分子の両端部に封鎖基を有するポリロタキサン（以下、「ＰＲＸ」ともいう）を得た。

Ｎ－ベンゾイルオキシカルボニル－Ｌ－チロシンを３．２ｇ、４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド（和光純薬工業株式会社製）（以下、「ＤＭＴ－ＭＭ」ともいう）を２．７９ｇ量り取りスクリュー管に加え、メタノール１４０ｍＬに溶解した溶液を得た。前記擬ポリロタキサンに対して、前記溶液を加え、下記反応式４に示すように、室温で２４時間撹拌し反応させた。前記反応後、得られた沈殿物を遠心分離により回収した。メタノール、超純水の順で前

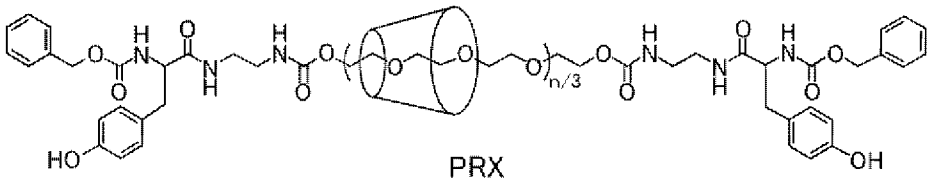
記沈殿物を洗浄し、未反応物を除去した。さらに、前記沈殿物をジメチルスルホキシド（関東化学株式会社製）に溶解し、超純水に滴下することで再沈殿させた。前記再沈殿を３回繰り返すことで精製した。回収した沈殿物に少量の超純水を加え、凍結乾燥することでポリロタキサン（以下、「ＰＲＸ」ともいう）を３．６２ｇ得た。

（反応式４）

[化20]



擬PRX



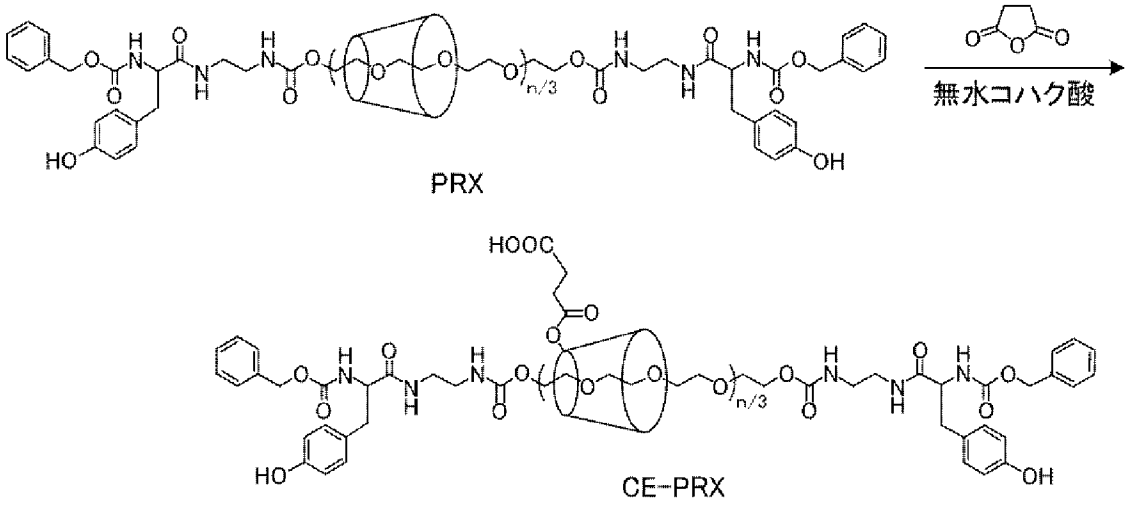
PRX

[0074] 前記ＰＲＸのα－ＣＤにカルボキシエチル基（以下、「ＣＥ基」ともいう）を以下のようにして導入し、水溶性のポリロタキサン（以下、「ＣＥ－ＰＲＸ」ともいう）を得た。

前記ＰＲＸを１５０ｍｇ量り取り、脱水ピリジン（関東化学株式会社製）１０ｍＬに溶解した。無水コハク酸（東京化成工業株式会社製）を１００ｍｇ加え、下記反応式５に示すように、室温で２４時間撹拌し反応させた。反応後、ジエチルエーテルに反応液を滴下し、再沈殿させ、得られた沈殿物を濾過により回収した。再沈殿の操作を２回繰り返した後に、減圧乾燥することで中間生成物であるＣＥ－ＰＲＸを１１６ｍｇ得た。

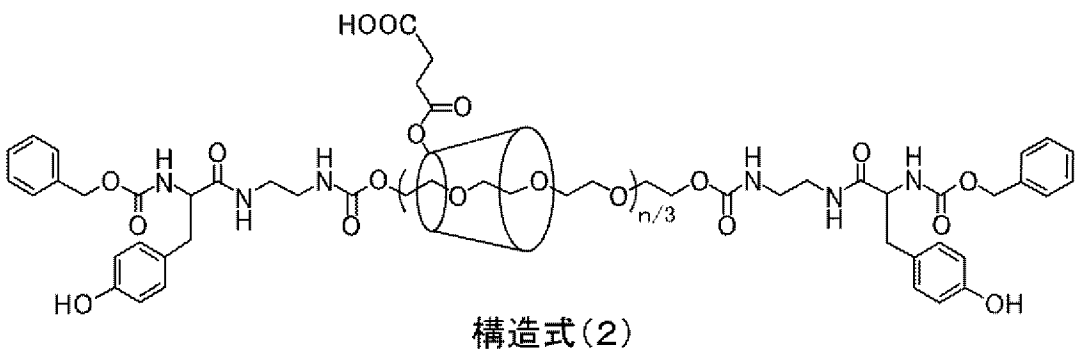
（反応式５）

[化21]



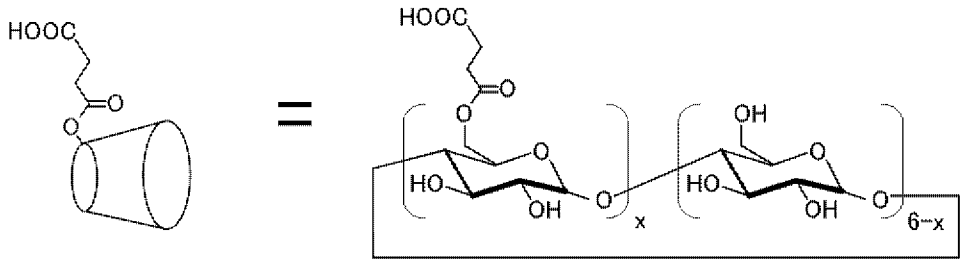
[0075] 得られたＣＥ－ＰＲＸについて、重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを図１に示す。プロトン核磁気共鳴スペクトルから、ＣＥ－ＰＲＸが下記構造式（２）で示される構造を有することが確認された。また、ＣＥ－ＰＲＸ１分子あたりのα－ＣＤの平均貫通数は２９、ＣＥ－ＰＲＸ１分子あたりのＣＥ基の修飾数は平均７７、α－ＣＤ１分子あたりのＣＥ基の修飾数は平均２．６、ＣＥ－ＰＲＸの数平均分子量は３６，９００であった。なお、下記構造式（２）中、「ｎ」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す（前記構造式（２）では、カッコ内にポリエチレングリコールの繰返し単位を３つ記載しているため、「ｎ／３」と記載している）。また、前記構造式（２）中、α－シクロデキストリンは下記式（２－Ａ）で示され、前記構造式（２）中では１個のみ記載している。前記式（２－Ａ）では、前記ＣＥ基の修飾数がｘ（ｘ＝１～６）の場合を示している。

[0076] [化22]



構造式(2)

[化23]



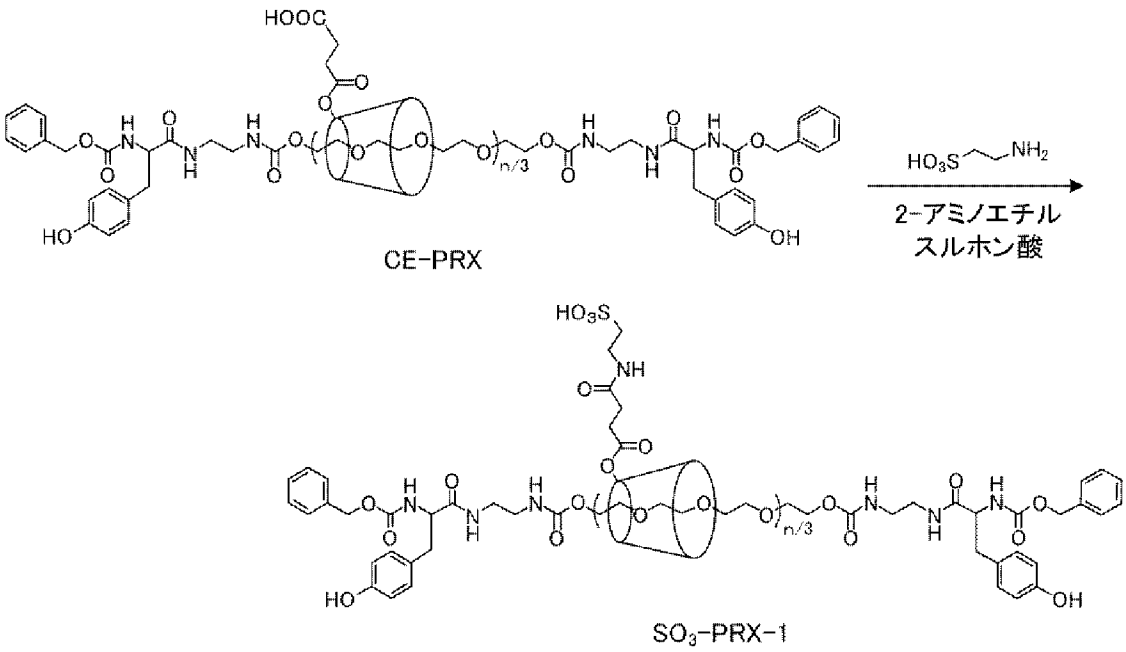
式（２－Ａ）

[0077] 前記ＣＥ－ＰＲＸのカルボキシエチル基に以下のようにしてエチルスルホン酸（２－アミノエチルスルホン酸）に由来する構造単位を導入し、硫酸基をエチルスルホン酸基（以下、「SO_3基」ともいう）として有する水溶性の硫酸化ポリロタキサン－１（以下、「SO_3－ＰＲＸ－１」ともいう）を合成した。

前記ＣＥ－ＰＲＸを１１６ｍｇ量り取り、超純水を１５ｍＬ加え、水酸化ナトリウム水溶液を添加し、溶液のｐＨを７に調整した。２－アミノエチルスルホン酸（東京化成工業株式会社製）を１４８ｍｇ、ＤＭＴ－ＭＭを２．０４ｇ加え、下記反応式６に示すように、室温で２４時間撹拌し反応させた。前記反応後、溶液を分画分子量３，５００の透析膜（商品名：スペクトラボア６、スペクトラム社製）に加え、超純水に対し３日間透析を行った。得られた溶液を凍結乾燥することでSO_3－ＰＲＸ－１を１５２ｍｇ得た。

（反応式６）

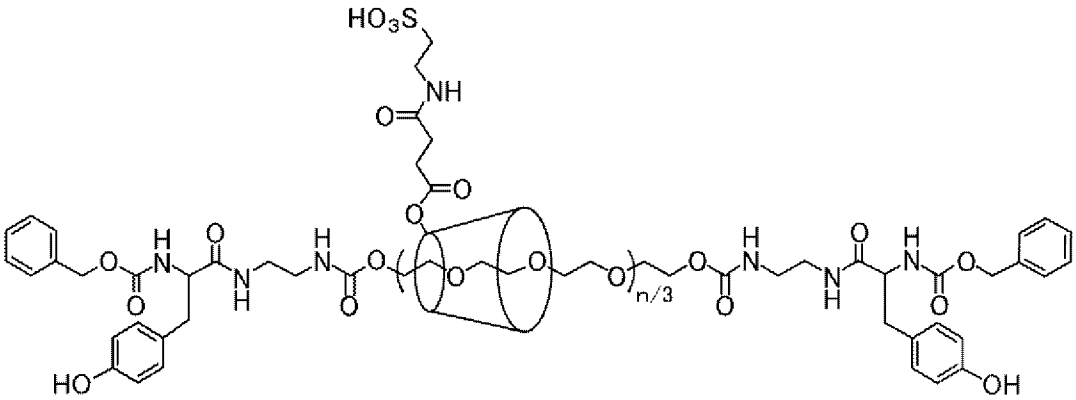
[化24]



[0078] 前記ＳＯ$_3$－ＰＲＸ－１について、重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを図２に示す。なお、ＳＯ$_3$－ＰＲＸ１分子あたりのα－ＣＤの平均貫通数は２９であり、ＳＯ$_3$－ＰＲＸ１分子あたりのＳＯ$_3$基の修飾数は２６．１、α－ＣＤ１分子あたりのＳＯ$_3$基の修飾数は０．９０１、ＳＯ$_3$－ＰＲＸの数平均分子量は３６，９００であった。

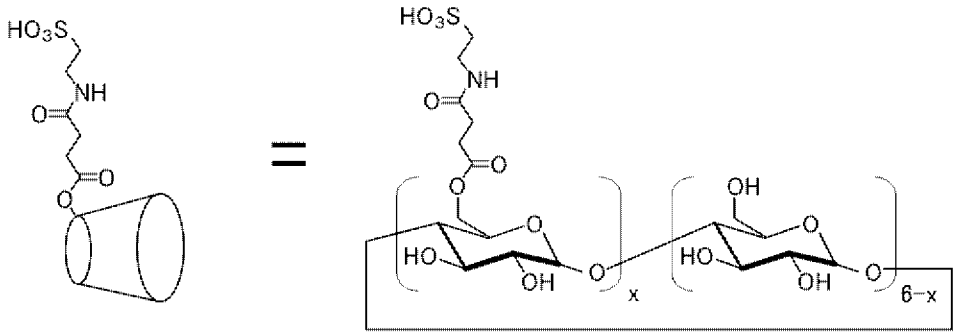
前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、ＳＯ$_3$－ＰＲＸ－１が下記構造式（１－Ａ）で示される構造を有し、表１に示す組成であることが確認された。なお、下記構造式（１－Ａ）中、「ｎ」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す（前記構造式（１－Ａ）では、カッコ内にポリエチレングリコールの繰返し単位を３つ記載しているため、「ｎ／３」と記載している）。また、前記構造式（１－Ａ）中、α－ＣＤは下記式（Ａ）で示され、前記構造式（１－Ａ）中では１個のみ記載している。また、前記式（Ａ）では、前記ＳＯ$_3$基の修飾がｘ（ｘ＝１～６）の場合を示している。

[化25]



構造式（１－Ａ）

[化26]



式（Ａ）

[0079] （製造例２、及び製造例３：硫酸化ポリロタキサン－２、及び硫酸化ポリロタキサン－３の製造）

製造例１と同様にして、無水コハク酸、２－アミノエチルスルホン酸の添加量を変化させることでＳＯ$_3$－ＰＲＸ１分子あたりのＳＯ$_3$基の修飾数の異なる硫酸化ポリロタキサン－２（以下、「ＳＯ$_3$－ＰＲＸ－２」ともいう）、及び硫酸化ポリロタキサン－３（以下、「ＳＯ$_3$－ＰＲＸ－３」ともいう）を合成した。得られたＳＯ$_3$－ＰＲＸ－２、及びＳＯ$_3$－ＰＲＸ－３について、前記プロトン核磁気共鳴スペクトルを用いて、重水中で５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルを測定した。ＳＯ$_3$－ＰＲＸ－２のプロトン核磁気共鳴スペクトルチャートを図３、及びＳＯ$_3$－ＰＲＸ－３のプロトン核磁気共鳴スペクトルチャートを図４に示す。前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、ＳＯ$_3$－ＰＲＸ－２、及びＳＯ$_3$－ＰＲＸ－３が前記構造式（１－

Ａ）で示される構造を有し、表１に示す組成であることが確認された。

[0080]（製造例４：硫酸化ポリロタキサン－４の製造）

硫酸化ポリロタキサン－４（以下、「SO_3－ＰＲＸ－４」ともいう）について、ＰＥＧを数平均分子量９，８００のポリエチレングリコール（シグマ－アルドリッチ社製）を軸ポリマーの原料として使用した以外は、製造例１と同様にして、SO_3－ＰＲＸ－４を得た。

得られたSO_3－ＰＲＸ－４について、前記プロトン核磁気共鳴装置を用いて、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルを重水中で測定した。SO_3－ＰＲＸ－４のプロトン核磁気共鳴スペクトルチャートを図５に示す。

前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、SO_3－ＰＲＸ－４が前記構造式（１－Ａ）で示される構造を有し、表１に示す組成であることが確認された。

[0081] [表1]

	構造式	PEGの分子量	SO_3-PRX1分子あたりのα－CDの平均貫通数	SO_3-PRX1分子あたりの硫酸基の平均修飾数	α-CD1分子あたりの硫酸基の平均修飾数	SO_3-PRXの数平均分子量	収量（mg）
SO_3-PRX-1	1-A	4,500	29	26.1	0.9	36,900	152
SO_3-PRX-2	1-A	4,500	29	46.6	1.6	39,000	77
SO_3-PRX-3	1-A	4,500	29	73.3	2.5	42,200	188
SO_3-PRX-4	1-A	9,800	25	30.1	1.2	38,500	71

[0082]（製造例５：硫酸化ポリロタキサン－５の製造）

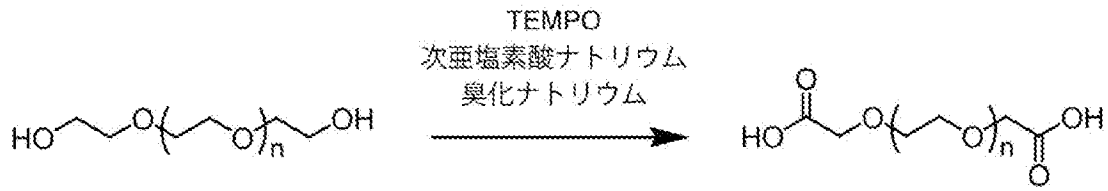
硫酸化ポリロタキサン－５（以下、「SO_3－ＰＲＸ－５」ともいう）について、数平均分子量４，５００のポリエチレングリコール（ＰＥＧ、シグマ－アルドリッチ社製）を軸ポリマーの原料として下記に従い合成した。

線状分子として、ポリエチレングリコールを２０ｇ、２，２，６，６－テトラメチルピペリジン－１－オキシル（東京化成工業株式会社製、以下、「ＴＥＭＰＯ」ともいう）を１．５３ｇ、臭化ナトリウム（和光純薬工業株式

会社製）を１．６ｇ量り取り、超純水２００ｍＬに溶解した。得られた溶液に次亜塩素酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社製）を４０ｍＬ加えた。水酸化ナトリウム水溶液を用いて溶液のｐＨを１１に調製後、下記反応式７に示すように、溶液を１時間、室温で撹拌し反応させた。前記反応溶液に、メタノールを１０ｍＬ加え反応を停止した後に、塩酸を加え溶液のｐＨを２に調製した。次に、ジクロロメタン（関東化学社製）を２００ｍＬ加え、抽出を行った。ジクロロメタンによる抽出を２回行った後に、溶液をジエチルエーテルに少量ずつ加え再沈殿を行った。得られた沈殿物をろ過により回収し、減圧乾燥することでＰＥＧ－ＣＯＯＨを１８．０９ｇ得た。

（反応式７）

[化27]

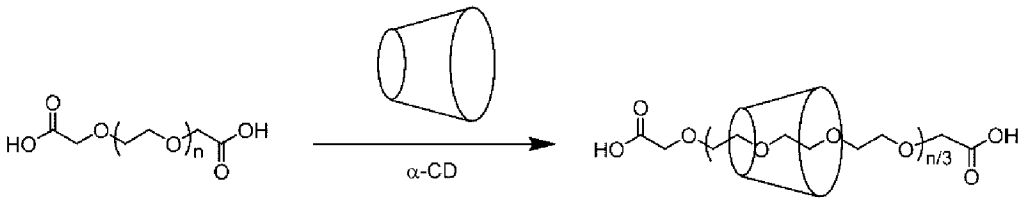


PEG PEG-COOH

[0083] 前記α－ＣＤを２０ｇ量り取り広口瓶に加え、超純水１３８ｍＬに溶解した。前記ＰＥＧ－ＣＯＯＨを２ｇ量り取り加え、下記反応式８に示すように、室温で２４時間撹拌し反応させた。前記反応後、得られた沈殿物を遠心分離により回収した。回収した沈殿物を凍結乾燥することで擬ＰＲＸ－ＣＯＯＨを１４．７９ｇ得た。

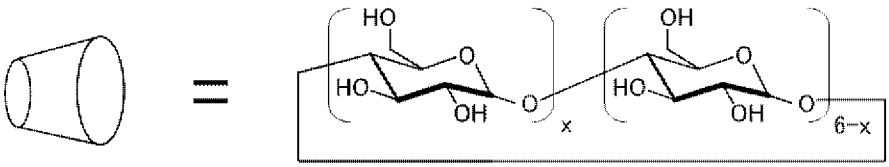
（反応式８）

[化28]



PEG-COOH 擬PRX-COOH

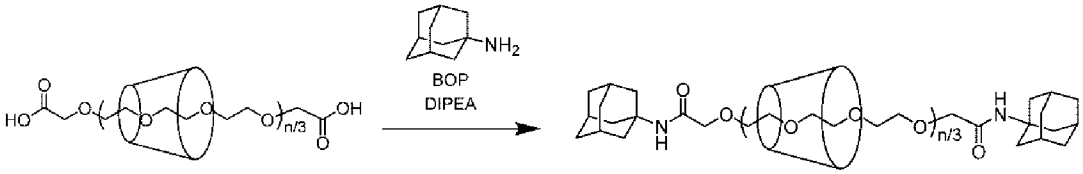
[化29]



[0084] 前記擬ＰＲＸ－ＣＯＯＨと１－アダマンチルアミン（和光純薬工業株式会社製）を２．６６ｇ、１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート（和光純薬工業株式会社製）（以下、「ＢＯＰ」ともいう）を４．８６ｇを広口瓶に量り取り、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（以下、「ＤＭＦ」ともいう）を１１８ｍＬ、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（和光純薬工業株式会社製）（以下、「ＤＩＰＥＡ」ともいう）を３ｍＬ加えた。下記反応式９に示すように、室温で２４時間撹拌し反応させた。前記反応後、得られた沈殿物を遠心分離により回収した。メタノール、超純水の順で前記沈殿物を洗浄し、未反応物を除去した。さらに、前記沈殿物をジメチルスルホキシドに溶解し、超純水に滴下することで再沈殿させた。前記再沈殿を４回繰り返すことで精製した。回収した沈殿物に少量の超純水を加え、凍結乾燥することでポリロタキサン（以下、「ＰＲＸ」ともいう）を７．３４ｇ得た。

（反応式９）

[化30]



擬PRX-COOH PRX

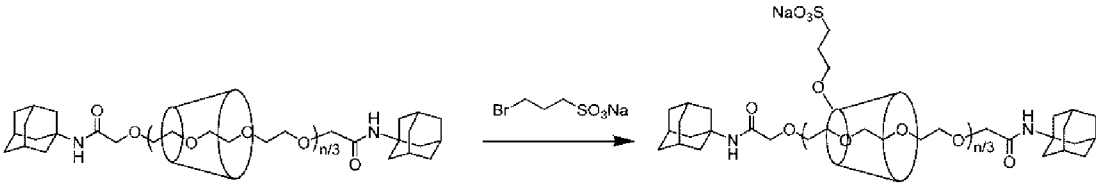
[0085] 前記ＰＲＸのα－ＣＤにスルホプロピル基（以下、「ＳＰＥ基」ともいう）を以下のようにして導入し、SO_3－ＰＲＸ－５を得た。

前記ＰＲＸを２５０ｍｇ量り取り、１規定の水酸化ナトリウム水溶液（関東化学株式会社製）１０ｍＬに溶解した。３－ブロモプロピルスルホン酸ナトリウム塩（東京化成工業株式会社製）を２．４５ｇ加え、下記反応式１０

に示すように、室温で２４時間撹拌し反応させた。反応後、ジエチルエーテルに反応液を滴下し、再沈殿させ、得られた沈殿物を濾過により回収した。前記反応後、溶液を分画分子量３，５００の透析膜（商品名：スペクトラボア６、スペクトラム社製）に加え、超純水に対し３日間透析を行った。得られた溶液を凍結乾燥することでSO_3－ＰＲＸ－５を２１３ｍｇ得た。

（反応式１０）

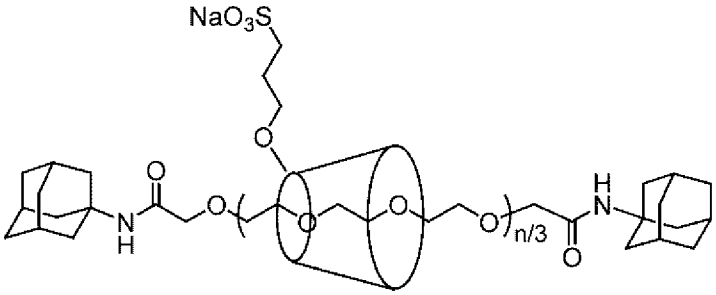
[化31]



[0086] 前記SO_3－ＰＲＸ－５について、重水中で測定した、５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを図６に示す。なお、SO_3－ＰＲＸ－５の１分子あたりのα－ＣＤの平均貫通数は２８．６であり、SO_3－ＰＲＸ－５の１分子あたりのSO_3基の平均修飾数は２７．８、α－ＣＤ１分子あたりのSO_3基の平均修飾数は０．９７、SO_3－ＰＲＸ－５の数平均分子量は３６，９００であった。

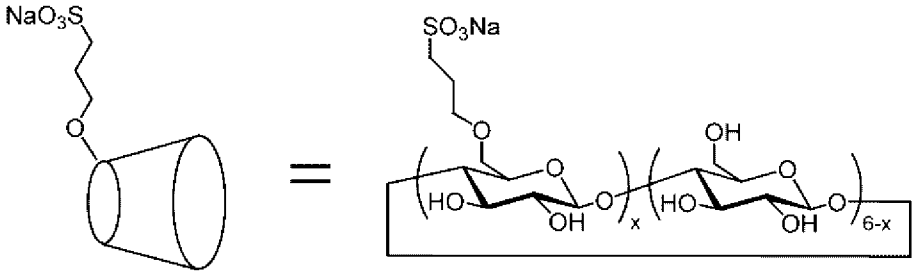
前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、SO_3－ＰＲＸ－５が下記構造式（１－Ｆ）で表される構造を有し、表２に示す組成であることが確認された。なお、下記構造式（１－Ｆ）中、「ｎ」はポリエチレングリコールの繰返し単位の数を示す（前記構造式（１－Ｆ）では、カッコ内にポリエチレングリコールの繰返し単位を３つ記載しているため、「ｎ／３」と記載している）。また、前記構造式（１－Ｆ）中、α－ＣＤは下記式（Ｆ）で表され、前記構造式（１－Ｆ）中では１個のみ記載している。また、前記式（Ｆ）では、前記SO_3基の修飾がｘ（ｘ＝１～６）の場合を示している。

[化32]



構造式（１－Ｆ）

[化33]



式（Ｆ）

[0087]（製造例６、及び製造例７：硫酸化ポリロタキサン－６、及び硫酸化ポリロタキサン－７の製造）

製造例５において、ポリエチレングリコール（シグマ－アルドリッチ社製、数平均分子量：４，５００）をポリエチレングリコール（ポリサイエンス社製、数平均分子量：２，２００）に変更した以外は、製造例５と同様にして、ＳＯ$_3$－ＰＲＸ－６を得た。

製造例５において、ポリエチレングリコール（シグマ－アルドリッチ社製、数平均分子量：４，５００）をポリエチレングリコール（シグマ－アルドリッチ社製、数平均分子量：９，８００）に変更した以外は、製造例５と同様にして、ＳＯ$_3$－ＰＲＸ－７を得た。

得られたＳＯ$_3$－ＰＲＸ－６、及びＳＯ$_3$－ＰＲＸ－７について、前記プロトン核磁気共鳴装置を用いて、重水中で５００ＭＨｚにおけるプロトン核磁

気共鳴スペクトルを測定した。SO_3－ＰＲＸ－６のプロトン核磁気共鳴スペクトルチャートを図７、SO_3－ＰＲＸ－７のプロトン核磁気共鳴スペクトルチャートを図８に示す。

前記プロトン核磁気共鳴スペクトルから、SO_3－ＰＲＸ－６、及びSO_3－ＰＲＸ－７が前記構造式（１－Ｆ）で表される構造を有し、表２に示す組成であることが確認された。

[0088] [表2]

	構造式	PEGの分子量	SO_3-PRX1分子あたりのα－CDの平均貫通数	SO_3-PRX1分子あたりの硫酸基の平均修飾数	α-CD1分子あたりの硫酸基の平均修飾数	SO_3-PRXの数平均分子量	収量（mg）
SO_3-PRX-5	1-F	4,500	28.6	27.8	0.97	36,900	213
SO_3-PRX-6	1-F	2,200	10.5	10.2	0.98	13,700	166
SO_3-PRX-7	1-F	9,800	39.7	41.8	1.05	53,800	173

[0089] （試験例１：アルカリフォスファターゼ活性化試験）

マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞（独立行政法人理化学研究所　ＣＥＬＬＢＡＮＫより入手）、以下、「ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１細胞」ともいう）を１．０×10^5ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで２４ウエルプレートに播種した。２４時間後、前記２４ウエルプレートに、リン酸緩衝食塩水（以下、「ＰＢＳ」ともいう）を希釈溶液として、ヒトリコンビナントＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ（ＨＵＭＡＮＺＹＭＥ社製）と以下の試料とを３７℃で２時間接触させた溶液を滴下した。７２時間培養後に各ウエルをＰＢＳで洗浄し、ＲＩＰＡ緩衝溶液（和光純薬工業株式会社製）を０．２ｍＬ加えてタンパク質を抽出した。骨形成初期マーカーであるアルカリフォスファターゼ（以下、「ＡＬＰ」ともいう）の産生量を商品名：Ｌａｂ　Ａｓｓａｙ　ＡＬＰ（和光純薬工業株式会社製）を用いて４０５ｎｍの吸光度をプレートリーダ（商品名：Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　ＦＣプレートリーダ、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製）を用いて測定し、定量した。また、タンパク質抽出量は商品名：Ｍｉｃｒｏ　ＢＣＡ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｋｉｔ（サーモフィッシ

ャーサイエンティフィック株式会社製）を用いて５６０ｎｍの吸光度をプレートリーダで測定し、総タンパク質を定量した。また、コントロール群として、ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ単体を使用し、前記ＢＭＰ－２のＡＬＰ活性量（ＡＬＰ産生量（ｎｍｏｌ）／総タンパク質量（μｇ））を１とした場合のＢＭＰ－２のＡＬＰ活性量に対する各ＡＬＰ活性量（倍）を算出した。結果を図９に示す。

＜試料＞

（１）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ

（２）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（３）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

（４）ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（５）SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

[0090] 図９に示すように、ＢＭＰ－２にSO_3－ＰＲＸ－１を複合化させることによって、ＢＭＰ－２単体よりもＡＬＰ活性が多く、成長因子活性が亢進されたことが示唆された。また、ヘパリン単体、SO_3－ＰＲＸ－１単体ではＡＬＰ活性の向上は確認されなかったことより、ＢＭＰ－２と、ヘパリン又は硫酸化ポリロタキサンとの複合体形成によりＡＬＰ活性を向上できることが示唆された。

[0091]（試験例２：アルカリフォスファターゼ染色試験）

前記試験例１で使用した試料について、前記試験例１と同様の操作により、各試料を７２時間培養後、培養液を除去し、ＰＢＳでウエルを２回洗浄した。次に、４％中性緩衝ホルムアルデヒド液を滴下し、１０分間静置した後、ＰＢＳでウエルを２回洗浄した。次に、ナフトールＡＳ－ＭＸリン酸塩（シグマ－アルドリッチ社製）が０．１ｍｇ／ｍＬ、及びレッドバイオレットＬＢ塩（シグマ－アルドリッチ社製）が０．６ｍｇ／ｍＬとなるように溶解した０．２Ｍトリス塩酸緩衝溶液を各ウエルに０．５ｍＬずつ滴下し、１５

分間静置した。次に、ＰＢＳでウエルを２回洗浄し、基質の着色を目視で観察した。結果を図１０に示す。なお、前記試料を含有しない未処理群として、ＰＢＳにおける基質の着色を図１０の左に示す。

[0092] 図１０に示すように、ＢＭＰ－２とSO_3－ＰＲＸ－１を複合化させた試料のウエルにおいては、ＢＭＰ－２のウエルよりも溶液の着色が強く、ＢＭＰ－２単体よりもＡＬＰの活性が亢進されていることが分かる。また、ヘパリン単体、SO_3－ＰＲＸ－１単体では未処理群と着色の程度が同等であり、ＢＭＰ－２と硫酸化ポリロタキサンとの複合体形成によりＡＬＰ活性を向上できることが示唆された。

[0093] （試験例３：様々な構造の硫酸化ポリロタキサンを使用した場合のアルカリフォスファターゼ活性化試験）

SO_3－ＰＲＸの化学構造がＢＭＰ－２による骨分誘導に与える影響を調べるため以下の試験を行った。前記試験例１で使用した試料を以下の試料に変更した以外は、試験例１と同様にＡＬＰ活性量を定量した。前記試験例１と同様に前記ＢＭＰ－２のＡＬＰ活性量（ＡＬＰ産生量（ｎｍｏｌ）／総タンパク質量（μｇ））を１とした場合のＢＭＰ－２のＡＬＰ活性量に対する各ＡＬＰ活性量（倍）を算出した。結果を図１１に示す。

＜試料＞

（１）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ

（２）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（３）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１０μｇ／ｍＬ

（４）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１００μｇ／ｍＬ

（５）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

（６）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－２　１０μｇ

／ｍＬ

（７）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－２　１００μｇ／ｍＬ

（８）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－２　１，０００μｇ／ｍＬ

（９）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－３　１００μｇ／ｍＬ

（１０）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－３　１，０００μｇ／ｍＬ

（１１）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－４　１０μｇ／ｍＬ

[0094] 図１１に示すように、SO_3－ＰＲＸ－１、SO_3－ＰＲＸ－２、及びSO_3－ＰＲＸ－３添加群では硫酸化ポリロタキサンの添加量を増加することで、ヘパリンより有意に高い活性を示すことが示唆された。また、SO_3－ＰＲＸ－１、SO_3－ＰＲＸ－２、及びSO_3－ＰＲＸ－３は、硫酸化ポリロタキサンの添加量が少なくても、ヘパリンと同等以上の活性を有しているため、抗凝固作用を有するヘパリンに代えて使用することができることが示唆された。SO_3－ＰＲＸ－１、SO_3－ＰＲＸ－２、及びSO_3－ＰＲＸ－３添加群の比較より、硫酸化ポリロタキサン１分子中に修飾された硫酸基数はＡＬＰ活性の向上に大きく影響せず、いずれの硫酸基修飾数においてもＡＬＰ活性が亢進されることが示唆された。また、軸ポリマーの分子量が異なるSO_3－ＰＲＸ－４の添加にＡＬＰ活性の向上が確認された。

[0095]（試験例４：ＢＭＰ－２の含有量を変更した場合のアルカリフォスファターゼ活性化試験）

ＢＭＰ－２の含有量を以下の試料のように変更したこと以外は、試験例１と同様にＡＬＰ活性量を定量した。結果を図１２に示す。

＜試料＞

（１）ＢＭＰ－２　２５ｎｇ／ｍＬ

（２）ＢＭＰ－２　２５ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

（３）ＢＭＰ－２　５０ｎｇ／ｍＬ

（４）ＢＭＰ－２　５０ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

（５）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ

（６）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

[0096] 図１２に示すように、硫酸化ポリロタキサンを含有する試料では、ＢＭＰ－２単体の試料と比較して、ＡＬＰ活性が亢進されることが示唆された。また、ＢＭＰ－２　５０ｎｇ／ｍＬと、ＢＭＰ－２　２５ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬとのＡＬＰ活性は同等であったことより、硫酸化ポリロタキサン添加により骨再生におけるＢＭＰ－２の使用量を低下できることが示唆された。

[0097]（試験例５：ＢＭＰ－２と硫酸化ポリロタキサンとの複合体形成の評価）

ＢＭＰ－２と硫酸化ポリロタキサンが静電相互作用による複合体を形成した場合、ＢＭＰ－２と硫酸化ポリロタキサンで覆われると考えられる。そこで、サンドイッチＥＬＩＳＡ法（商品名：ＥＬＩＳＡ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　Ｋｉｔ、ＰＥＰＲＯＴＥＣＨ社製）を用いて、以下のようにしてＢＭＰ－２と硫酸化ポリロタキサンとの複合体形成を抗体との結合量変化より評価した。

ＥＬＩＳＡ用９６ウエルプレートの各ウエルに、Ｃａｐｔｕｒｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ溶液を１μｇ／ｍＬずつ滴下し、室温にて一晩静置した。翌日、前記溶液を除去し、洗浄用Ｂｕｆｆｅｒ（０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳ）でプレートを４回洗浄したのち、Ｂｌｏｃｋ　ｂｕｆｆｅｒ（１％ＢＳＡ含有ＰＢＳ）を３００μＬずつ滴下、室温にて１時間静置した。１時間後、前記溶液を吸引し、洗浄用Ｂｕｆｆｅｒ（０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳ）で４回洗浄した。次に、各ウエルに、以下の試料を添加し

、室温で２時間静置した後、前記溶液を除去して、ＰＢＳでプレートを４回洗浄した。その後、ＢＭＰ－２標識のＤｅｔｅｃｔｉｏｎ　ａｎｔｉｂｏｄｙ溶液を各ウエルに滴下し、室温で１時間、静置した。前記溶液を除去し、洗浄用Ｂｕｆｆｅｒ（０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳ）でプレートを４回洗浄し、基質溶媒を添加することで発色させ、４０５ｎｍの吸光度をプレートリーダ（商品名：Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　ＦＣプレートリーダ、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製）で測定した。結果を図１３に示す。ＢＭＰ－２単体での検出吸光度を１００％とした場合の、各試料の吸光度の減少率により、ＢＭＰ－２とＢＭＰ－２抗体と結合率を評価することができる。すなわち、ＢＭＰ－２が複合体を形成することにより抗体認識部位が覆われるため、ＢＭＰ－２への抗体結合量が減少すると推測されることから、前記検出蛍光強度の減少率が大きいほど、ＢＭＰ－２表面の被覆率が高く、複合体の形成を推測できる。

＜試薬＞

（１）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ

（２）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（３）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

[0098] 図１３に示すように、ＢＭＰ－２とヘパリンとの複合体では、検出吸光度の減少が約１０％であった。一方、ＢＭＰ－２とSO_3－ＰＲＸとの複合体では、検出蛍光強度の減少が約５０％であった。以上の結果から、SO_3－ＰＲＸは、ヘパリンよりもＢＭＰ－２表面の被覆率が高いため抗体との結合量が減少したと考えられる。よってSO_3－ＰＲＸは、ヘパリンよりもＢＭＰ－２と強く相互作用し複合体を形成するが示唆された。

[0099] （試験例６：ＢＭＰ－２阻害剤共存下での成長因子活性の評価）

前記試験例１と同様にＢＭＰ－２阻害剤であるＮｏｇｇｉｎ共存下でのＡＬＰ活性量を定量した。前記試験例１と同様にＡＬＰ活性を評価し、Ｎｏｇ

ｇｉｎ無添加群のＡＬＰ産生量を１００％としたときの相対値で算出した。

＜試薬＞

（１）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ

（２）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　Ｎｏｇｇｉｎ　５０ｎｇ／ｍＬ

（３）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　Ｎｏｇｇｉｎ　１００ｎｇ／ｍＬ

（４）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（５）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　Ｎｏｇｇｉｎ　５０ｎｇ／ｍＬ　＋　ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（６）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　Ｎｏｇｇｉｎ　１００ｎｇ／ｍＬ＋　ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（７）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

（８）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　Ｎｏｇｇｉｎ　５０ｎｇ／ｍＬ＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

（９）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　Ｎｏｇｇｉｎ　１００ｎｇ／ｍＬ＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

[0100] 図１４に示すように、ＢＭＰ－２阻害作用を有するＮｏｇｇｉｎを培地中に添加することでＡＬＰ産生量はＮｏｇｇｉｎ濃度依存的に減少した。一方、SO_3－ＰＲＸとＢＭＰ－２との複合体では、ヘパリンとＢＭＰ－２との複合体よりも、Ｎｏｇｇｉｎ添加時のＡＬＰ産生量が高いことが分かる。本結果は、SO_3－ＰＲＸが、ＢＭＰ－２とＮｏｇｇｉｎとの相互作用を阻害することができることを示している。

[0101]（試験例７：硫酸化ポリロタキサンの細胞毒性の評価）

ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１細胞（独立行政法人理化学研究所　ＣＥＬＬ　ＢＡＮＫより入手）を用い、以下のようにして硫酸化ポリロタキサンの細胞毒性を評

価した。

前記ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１細胞を９６ウエルプレートに播種し（細胞数：１×１０^{4}個／９０μＬ／ウエル）、１０％ウシ胎児血清（Ｆｅｔａｌ　Ｂｏｖｉｎｅ　Ｓｅｒｕｍ、Ｇｉｂｃｏ社製）を含むイーグル最小必須培地（シグマ－アルドリッチ社製）中で、２４時間、３７℃で培養した。培地を９０μＬのイーグル最小必須培地に交換後、下記試料を１，０００μｇ／ｍＬの濃度で各ウエルに添加し、さらに３７℃で２４時間培養した。その後、商品名：Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８（株式会社同仁堂製）を１０μＬずつ各ウエルに添加し、さらに３７℃で１時間静置した。その後、プレートリーダ（商品名：Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　ＦＣプレートリーダ、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製）を用いて４５０ｎｍの吸光度を測定した。なお、試料の代わりにリン酸緩衝溶液を添加した細胞の吸光度を細胞生存率１００％として、以下のようにして細胞生存率（％）を算出した。結果を図１５に示す。

＜試料＞

（１）ヘパリン

（２）SO_3－ＰＲＸ－１（製造例１で作製）

（３）SO_3－ＰＲＸ－２（製造例２で作製）

＜細胞生存率の算出方法＞

細胞生存率（％）＝〔｛（試料を添加し、培養した細胞の吸光度）－（培養液のみの吸光度）｝／｛（リン酸緩衝溶液を添加し、培養した細胞の吸光度）－（培養液のみの吸光度）｝〕×１００

[0102] 図１５中、「□」は「ヘパリン」の結果を示し、「△」は「SO_3－ＰＲＸ－１」の結果を示し、「×」は「SO_3－ＰＲＸ－２」の結果を示す。

図１２に示すように、SO_3－ＰＲＸ－１、及びSO_3－ＰＲＸ－２は１６８時間の培養後も細胞生存率の低下を示さないのに対し、ヘパリンは細胞生存率の低下を示すことが明らかとなった。

この結果から、硫酸化ポリロタキサンは、細胞毒性の点から、ヘパリンよ

りも安全であることが示唆された。

[0103] （試験例８：硫酸化ポリロタキサンの抗凝固作用の評価）

ヘパリンはアンチトロンビンＩＩＩと複合体を形成し、Ｘａ因子の活性を阻害することで抗凝固作用を示す。そこで、抗凝固活性測定キット（商品名：テストチームヘパリンＳ、積水メディカル株式会社製）を用いて、以下のようにしてＸａ因子の活性を測定し、硫酸化ポリロタキサンの抗凝固作用を評価した。

[0104] 前記抗凝固活性測定キット付属のマニュアルに従い、血漿溶液：アンチトロンビンＩＩＩ溶液：緩衝液を１：１：８の体積比となるように混合し、検査溶液を調製した。検査溶液と各濃度に調製したSO_3－ＰＲＸ－１、又は各濃度に調製したヘパリンを９：１の体積比で混合し、９６ウエルプレートの各ウエルに５０μＬずつ加えた。各ウエルにＸａ因子溶液を２５μＬずつ加え、３７℃にて３０秒間加温した。各ウエルに基質液を５０μＬずつ加え、３７℃にて３分間静置した。その後に、４０５ｎｍの吸光度をプレートリーダ（商品名：Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　ＦＣプレートリーダ、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製）で測定した。結果を図１６に示す。

＜試料＞

（１）ヘパリン　０．００１μｇ／ｍＬ

（２）ヘパリン　０．０１μｇ／ｍＬ

（３）ヘパリン　０．１μｇ／ｍＬ

（４）ヘパリン　１μｇ／ｍＬ

（５）ヘパリン　１０μｇ／ｍＬ

（６）ヘパリン　１００μｇ／ｍＬ

（７）ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（８）SO_3－ＰＲＸ－１　０．００１μｇ／ｍＬ

（９）SO_3－ＰＲＸ－１　０．０１μｇ／ｍＬ

（１０）SO_3－ＰＲＸ－１　０．１μｇ／ｍＬ

（１１）SO_3－ＰＲＸ－１　１μｇ／ｍＬ

（１２）SO_3－ＰＲＸ－１　１０μｇ／ｍＬ

（１３）SO_3－ＰＲＸ－１　１００μｇ／ｍＬ

（１４）SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

[0105] 図１６に示すように、ヘパリンでは０．１μｇ／ｍＬ以上の濃度から徐々にＸａ因子活性が低下し、抗凝固作用を有することが示唆された。一方、硫酸化ポリロタキサン（SO_3－ＰＲＸ－１）は１，０００μｇ／ｍＬの濃度でもＸａ因子活性の低下が起こらず、抗凝固作用を示さないことが示唆された。すなわち、抗凝固作用を示さない硫酸化ポリロタキサンはヘパリンよりも生体内での安全性に優れると言える。

[0106] （試験例９：硫酸化ポリロタキサンとＢＭＰ－２複合体による石灰化の評価）

ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１細胞（独立行政法人理化学研究所　ＣＥＬＬ　ＢＡＮＫより入手）を１．０×10^5ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで２４ウエルプレートに播種した。２４時間後、１０ｍＭのβ－グリセロフォスフェート（シグマ－アルドリッチ社製）と５０μｇ／ｍＬのアスコルビン酸（シグマ－アルドリッチ社製）を添加した分化誘導培地に培地交換した。前記２４ウエルプレートに、ＰＢＳを希釈溶液として、以下の試料を３７℃で２時間接触させた溶液を滴下した。３日に一回培地とＢＭＰ－２溶液を交換し、２１日間培養した。

培養後、ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１細胞にエタノール溶液を加え２０分間、室温で静置することで細胞を固定し、１質量％アリザリンレッド溶液を加え、５分間、室温で静置した。ＰＢＳで３回洗浄した後に、顕微鏡（ＢＸ４１、オリンパス株式会社製）で観察を行った。なお、ＢＭＰ－２は、ヒトリコンビナントＢＭＰ－２（ＨＵＭＡＮＺＹＭＥ社製）を使用した。結果を図１７Ａ～図１７Ｄに示す。

＜試料＞

（１）ＰＢＳ（ＢＭＰ－２未添加）

（２）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ

（３）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（４）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－１　１，０００μｇ／ｍＬ

[0107] 図１７Ａ～図１７Ｄに示すように、（１）ＰＢＳ（ＢＭＰ－２未添加群）ではアリザリンレッドで染色される石灰化物が認められず、骨分化効率が低いことが示唆された。（２）ＢＭＰ－２添加群では点状にアリザリンレッドで染色される石灰化物が観察された。（３）ＢＭＰ－２＋ヘパリン添加群では、ＢＭＰ－２添加群と比較して大きな石灰化物が観察された。これに対して、ＢＭＰ－２＋SO_3－ＰＲＸ－１添加群ではウエル全面にアリザリンレッドで染色される石灰化物が観察され、骨分化効率が非常に高いことが分かる。よって、SO_3－ＰＲＸ－１はＢＭＰ－２による骨分化誘導を強力に亢進することが示唆された。

[0108] （試験例１０：アルカリフォスファターゼ活性化試験）

試験例１において、使用した試料を以下の試料に変更した以外は、試験例１と同様にして、ＡＬＰ活性量を定量した。各ＡＬＰ活性量（ＡＬＰ産生量（ｎｍｏｌ）／総タンパク質量（μｇ））を算出した。結果を図１８に示す。

＜試料＞

（１）ＰＢＳ（ＢＭＰ－２未添加）

（２）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ

（３）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　ヘパリン　１，０００μｇ／ｍＬ

（４）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－５　１，０００μｇ／ｍＬ

（５）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－６　１，０００μｇ／ｍＬ

（６）ＢＭＰ－２　１００ｎｇ／ｍＬ　＋　SO_3－ＰＲＸ－７　１，００

０μｇ／ｍＬ

[0109] 図１８に示すように、ＢＭＰ－２にSO_3－ＰＲＸ－５、SO_3－ＰＲＸ－６、及びSO_3－ＰＲＸ－７を添加した場合、いずれも有意にＡＬＰの産生量の増加が認められたことから、ＢＭＰ－２による骨分化誘導効率を亢進することが示唆された。

[0110] （試験例１１：頭蓋骨欠損モデルマウスの骨増生能の評価）

＜埋入用試料の調製＞

直径３．５ｍｍの生検トレパン（商品名：ＢＩＯＰＳＹ　ＰＵＮＣＨ、カイインダストリー株式会社製）を用いて、商品名：コラーゲンスポンジ　３５ｍｍディッシュ用（高研株式会社製）をくり抜いたものを移植用スポンジとした。下記の試料を超純水１５μＬに溶解し、移植用コラーゲンスポンジに浸潤させ、埋入用試料とした。

＜埋入用試料＞

（１）超純水

（２）ＢＭＰ－２　１０　ｎｇ／ｍＬ

（３）ＢＭＰ－２　１０　ｎｇ／ｍＬ　＋　ヘパリン　１００　μｇ／ｍＬ

（４）ＢＭＰ－２　１０　ｎｇ／ｍＬ　＋SO_3－ＰＲＸ－５　１００　μｇ／ｍＬ

（５）ＢＭＰ－２　１０　ｎｇ／ｍＬ　＋SO_3－ＰＲＸ－６　１００　μｇ／ｍＬ

（６）ＢＭＰ－２　１０　ｎｇ／ｍＬ　＋SO_3－ＰＲＸ－７　１００　μｇ／ｍＬ

（７）ＢＭＰ－２　５０　ｎｇ／ｍＬ

（８）ＢＭＰ－２　５０　ｎｇ／ｍＬ　＋　ヘパリン　５００　μｇ／ｍＬ

（９）ＢＭＰ－２　５０　ｎｇ／ｍＬ　＋SO_3－ＰＲＸ－６　５００　μｇ／ｍＬ

[0111] ５週齢の雄性ＩＣＲマウス（三協ラボサービス株式会社より購入）に三種混合麻酔薬（ドミトール（０．７５ｍｇ／ｋｇ）、ミダゾラム（４ｍｇ／ｋｇ）、ベトルファール（５ｍｇ／ｋｇ）を生理食塩水内で混和した溶液）を１０ｍＬ／ｋｇ量を皮下投与した。次に、実験用マウスの頭頂部切開予定部を剃毛した。背部からみて矢状縫合相当部のやや右側を矢状縫合に平行方向に１ｃｍ程度の皮膚切開を加えた。背部からみて左側頭蓋骨に直径３．５ｍｍの生検トレパン（商品名：ＢＩＯＰＳＹ　ＰＵＮＣＨ、カイインダストリー株式会社製）を用いて同形の穴を空けた。欠損部に前記埋入用試料を埋入した。皮膚切開部を４－０絹糸（商品名：滅菌済みブレートシルク、秋山製作所株式会社製）を用いて縫合した。メデトミジン拮抗薬（アンチセダン（０．７５ｍｇ／ｋｇ）を生理食塩水で希釈した溶液）１０ｍＬ／ｋｇを皮下投与し、試料埋入手術とした。

[0112] 術後７日間、１４日間、２１日間、及び２８日間経過したマウスを３．０質量％イソフルランによる吸入麻酔下で、エックス線マイクロＣＴ（装置名：Ｒ＿ｍＣＴ　ＦＸ、リガク株式会社製）を用いて、撮影条件を設定：ＦＯＶ　２０、撮影時間：１７秒間、管電圧：９０ｋＶ、管電流：１６０μＡとして撮影した。撮影した画像は３Ｄ　ｖｉｅｗｅｒを用いて画像解析を行った。

[0113] 図１９Ａ～図１９Ｂに埋入用試料移植後、経時的にエックス線マイクロＣＴを撮影した結果を示す。ＢＭＰ－２　１０ｎｇの埋入用試料（２）と比較して、ＢＭＰ－２に加え、SO_3－ＰＲＸ－５、SO_3－ＰＲＸ－６、又はSO_3－ＰＲＸ－７を１００μｇ添加して移植した埋入用試料（４）、（５）、又は埋入用試料（６）では、１４日間後より欠損部での顕著な骨形成が確認された。特に、ＢＭＰ－２　１０ｎｇ＋SO_3－ＰＲＸ－６移植群（埋入用試料（５））では、ＢＭＰ－２　５０ｎｇ移植群（埋入用試料（７））と同等の骨形成を示した。また、ＢＭＰ－２　５０ｎｇ移植群（埋入用試料（７））では２８日間後に欠損部全体を占める骨形成が確認されたのに対して、ＢＭＰ－２　５０ｎｇ＋SO_3－ＰＲＸ－５移植群（埋入用試料（９））では、

１４日間後より欠損部全体を占める骨形成が確認された。以上より、硫酸化ポリロタキサンの添加によりＢＭＰ－２の低濃度化、及び早期の骨形成が可能であることが示唆された。

[0114] （試験例１２：硫酸化ポリロタキサンを投与したマウスの血液生化学検査）

硫酸化ポリロタキサンの安全性評価として、移植実験で埋入した試料量と同等の試料をマウスに皮下投与し、主要な代謝、排泄組織である肝臓及び腎臓に対する毒性を調べた。５週齢の雄性ＩＣＲマウス（三協ラボサービス株式会社より購入）に下記の試料を皮下投与した。２４時間経過後、マウスより血液を採取し血漿を調製した。肝毒性の指標であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）、腎毒性の指標である血中尿素窒素（ＢＵＮ）、クレアチニン（ＣＲ）の濃度を測定した。

＜試料＞

（１）生理食塩水

（２）ヘパリン　３３．３　ｍｇ／ｋｇ

（３）SO_3－ＰＲＸ－５　３３．３　ｍｇ／ｋｇ

（４）SO_3－ＰＲＸ－６　３３．３　ｍｇ／ｋｇ

（５）SO_3－ＰＲＸ－７　３３．３　ｍｇ／ｋｇ

[0115] 図２０Ａ～図２０Ｄに各試料を投与し、２４時間経過した後のマウスの血液中のＡＳＴ、ＡＬＴ、ＢＵＮ、ＣＲ濃度を示す。ヘパリン、各硫酸化ポリロタキサンを投与した群のＡＳＴ、ＡＬＴ、ＢＵＮ、及びＣＲの濃度は生理食塩水投与群と有意な差は認められず、各硫酸化ポリロタキサンは、肝臓、及び腎臓に対する毒性がないことが示唆された。

[0116] 以上の結果から、硫酸化ポリロタキサンは、骨形成因子と複合体を形成して、骨形成因子を安定に保持することができることが分かった。

また、硫酸化ポリロタキサンは、骨形成因子と複合体を形成して、骨形成因子を活性化することができることが分かった。

[0117] 本発明の態様としては、例えば、以下のものなどが挙げられる。

＜１＞　硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを含有し、

骨形成因子を安定に保持することを特徴とする骨形成因子安定保持剤である。

＜２＞　硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを含有し、

骨形成因子を活性化することを特徴とする骨形成因子活性化剤である。

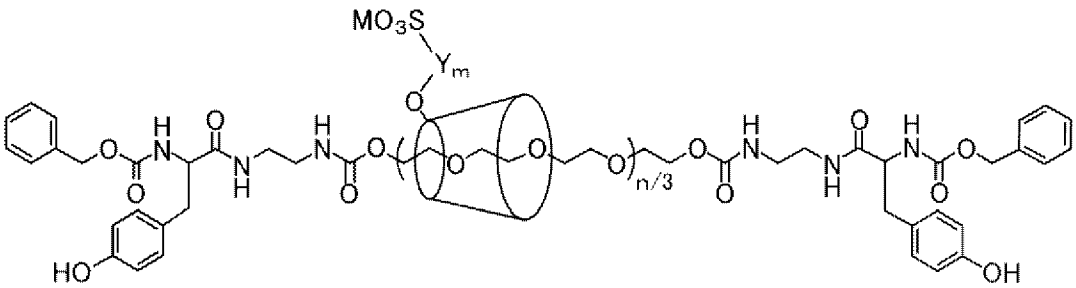
＜３＞　骨形成因子が、骨形成因子－２である前記＜２＞に記載の骨形成因子活性化剤である。

＜４＞　硫酸化ポリロタキサン中の環状分子が、α－シクロデキストリンであり、

硫酸化ポリロタキサン中の線状分子が、ポリエチレングリコールである前記＜２＞から＜３＞のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤である。

＜５＞　硫酸化ポリロタキサンが、下記一般式（ＩＩ）で示される化合物、及び下記一般式（ＩＩＩ）で示される化合物の少なくともいずれかである前記＜２＞から＜４＞のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤である。

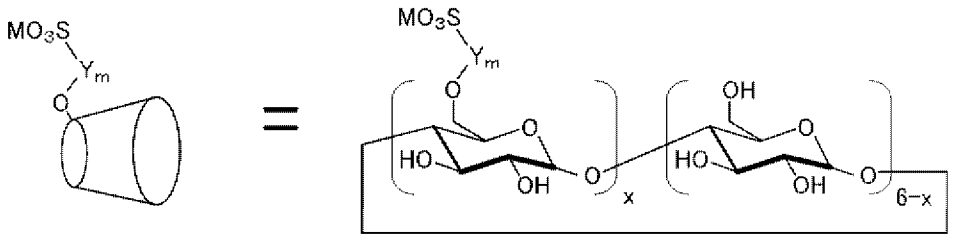
[化34]



一般式(I)

（但し、前記一般式（Ｉ）中、前記環状分子が、下記一般式（ＩＩ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す）

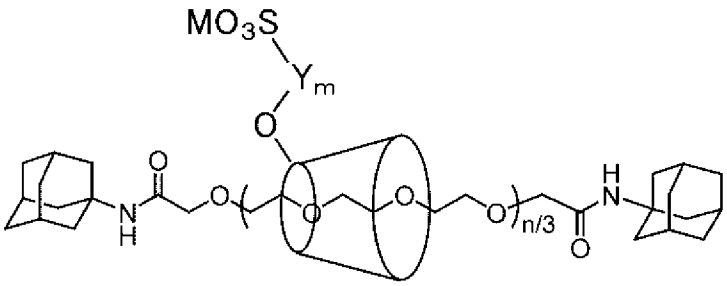
[化35]



一般式(II)

（但し、前記一般式（ＩＩ）中、Ｙは、Ｐ及びＱの少なくともいずれかを示し、Ｐは、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ベンジル基、エチレングリコール基、トリエチレングリコール基、又はポリエチレングリコール基を示し、Ｑは、カルバミン酸エステル結合（－Ｏ－ＣＯ－ＮＨ－）、アミド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）、エステル結合（－Ｏ－ＣＯ－）、カルボネート結合（－Ｏ－ＣＯ－Ｏ－）、又はエーテル結合（－Ｏ－）を示し、ｍは、０～２０の整数を示し、ｘは、１～６の整数を示し、Ｍは、水素原子、ナトリウム原子、又はカリウム原子を示す。）

[化36]



一般式(III)

（但し、前記一般式（ＩＩＩ）中、前記環状分子が、前記一般式（ＩＩ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。）

＜６＞　硫酸化ポリロタキサン中の線状分子の数平均分子量が、５００～６，０００である前記＜２＞から＜５＞のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤である。

＜７＞　硫酸化ポリロタキサンの環状分子中の硫酸基の平均修飾数が、硫酸化ポリロタキサンの環状分子１分子に対して、０．５～１である前記＜２＞から＜６＞のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤である。

＜８＞　硫酸化ポリロタキサンの含有量が、骨形成因子全量に対して、１，０００倍～１０，０００倍である前記＜２＞から＜７＞のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤である。

＜９＞　硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを少なくとも有する骨形成因子安定保持剤に、骨形成因子を作用させることにより、骨形成因子を骨形成因子安定保持剤に安定に保持させることを特徴とする骨形成因子の安定保持方法である。

＜１０＞　硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを少なくとも含有する骨形成因子活性化剤に、骨形成因子を作用させることにより、骨形成因子を活性化させることを特徴とする骨形成因子の活性化方法である。

＜１１＞　骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとを含有する、医薬組成物である。

＜１２＞　骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとを含有する、

骨の再生に用いるための医薬組成物である。

＜１３＞　前記骨形成因子タンパク質が、ＢＭＰ－２タンパク質、及びＢＭＰ－７タンパク質の少なくともいずれかである前記＜１１＞から＜１２＞のいずれかに記載の医薬組成物である。

＜１４＞　前記骨形成因子タンパク質と、前記硫酸化ポリロタキサンとが、コラーゲンスポンジ中に浸潤していることを特徴とする、前記＜１１＞から＜１３＞のいずれかに記載の医薬組成物である。

＜１５＞　骨の再生に用いるための医薬品の製造における、骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとの複合体の使用である。

＜１６＞　対象における骨の再生方法であって、

前記対象に骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンと、を含有する組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、方法である。

産業上の利用可能性

[0118]　本発明の骨形成因子安定保持剤、及び骨形成因子の安定保持方法では、硫酸化ポリロタキサンを含有することにより、骨形成因子を安定に保持することができるため、骨形成因子の保存用、カラムクロマトグラフィー等のカラム用などに好適に利用することができる。

また、本発明の骨形成因子活性化剤、及び骨形成因子の活性化方法では、硫酸化ポリロタキサンを含有することにより、骨形成因子を活性化することができるため、薬効の持続性、作用量や作用回数の低減も期待される。

請求の範囲

[請求項1] 硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを含有し、

骨形成因子を安定に保持することを特徴とする骨形成因子安定保持剤。

[請求項2] 硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを含有し、

骨形成因子を活性化することを特徴とする骨形成因子活性化剤。

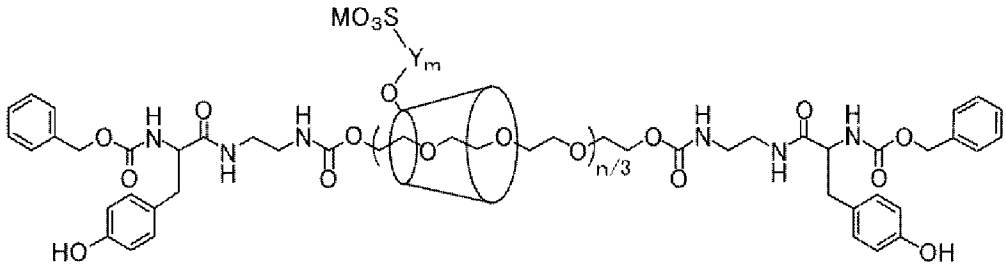
[請求項3] 前記骨形成因子が、骨形成因子－２である請求項２に記載の骨形成因子活性化剤。

[請求項4] 前記硫酸化ポリロタキサン中の前記環状分子が、α－シクロデキストリンであり、

前記硫酸化ポリロタキサン中の前記線状分子が、ポリエチレングリコールである請求項２から３のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤。

[請求項5] 前記硫酸化ポリロタキサンが、下記一般式（ｌ）で示される化合物、及び下記一般式（ｌｌｌ）で示される化合物の少なくともいずれかである請求項２から４のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤。

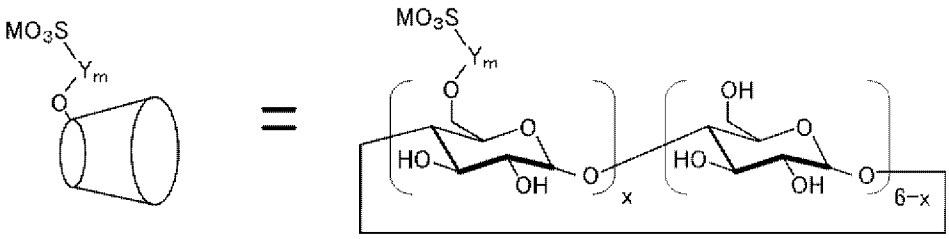
[化1]



一般式(I)

（但し、前記一般式（ｌ）中、前記環状分子が、下記一般式（ｌｌ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す。）

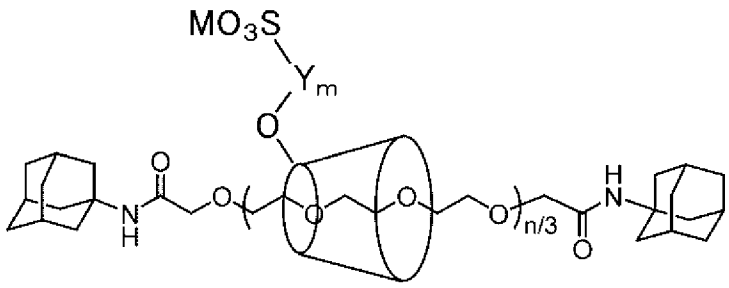
[化2]



一般式(II)

（但し、前記一般式（ＩＩ）中、Ｙは、Ｐ及びＱの少なくともいずれかを示し、Ｐは、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ベンジル基、エチレングリコール基、トリエチレングリコール基、又はポリエチレングリコール基を示し、Ｑは、カルバミン酸エステル結合（－Ｏ－ＣＯ－ＮＨ－）、アミド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）、エステル結合（－Ｏ－ＣＯ－）、カルボネート結合（－Ｏ－ＣＯ－Ｏ－）、又はエーテル結合（－Ｏ－）を示し、ｍは、０～２０の整数を示し、ｘは、１～６の整数を示し、Ｍは、水素原子、ナトリウム原子、又はカリウム原子を示す。）

[化3]



一般式(III)

（但し、前記一般式（ＩＩＩ）中、前記環状分子が、前記一般式（ＩＩ）で表され、硫酸化ポリロタキサン１分子あたりの環状分子の平均貫通数が１０個～１，０００個であり、ｎは、１０～２５，０００の整数を示す）

[請求項6] 前記硫酸化ポリロタキサン中の前記線状分子の数平均分子量が、５

００～６，０００である請求項２から５のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤。

[請求項7] 前記硫酸化ポリロタキサンの前記環状分子中の硫酸基の平均修飾数が、前記硫酸化ポリロタキサンの環状分子１分子に対して、０．５～１である請求項２から６のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤。

[請求項8] 前記硫酸化ポリロタキサンの含有量が、前記骨形成因子全量に対して、１，０００倍～１０，０００倍である請求項２から７のいずれかに記載の骨形成因子活性化剤。

[請求項9] 硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを少なくとも有する骨形成因子安定保持剤に、骨形成因子を作用させることにより、骨形成因子を骨形成因子安定保持剤に安定に保持させることを特徴とする骨形成因子の安定保持方法。

[請求項10] 硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンを少なくとも含有する骨形成因子活性化剤に、骨形成因子を作用させることにより、骨形成因子を活性化させることを特徴とする骨形成因子の活性化方法。

[請求項11] 骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとを含有する、医薬組成物。

[請求項12] 骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとを含有する、

骨の再生に用いるための医薬組成物。

[請求項13] 前記骨形成因子タンパク質が、ＢＭＰ－２タンパク質、及びＢＭＰ－７タンパク質の少なくともいずれかである請求項１１から１２のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項14] 前記骨形成因子タンパク質と、前記硫酸化ポリロタキサンとが、コ

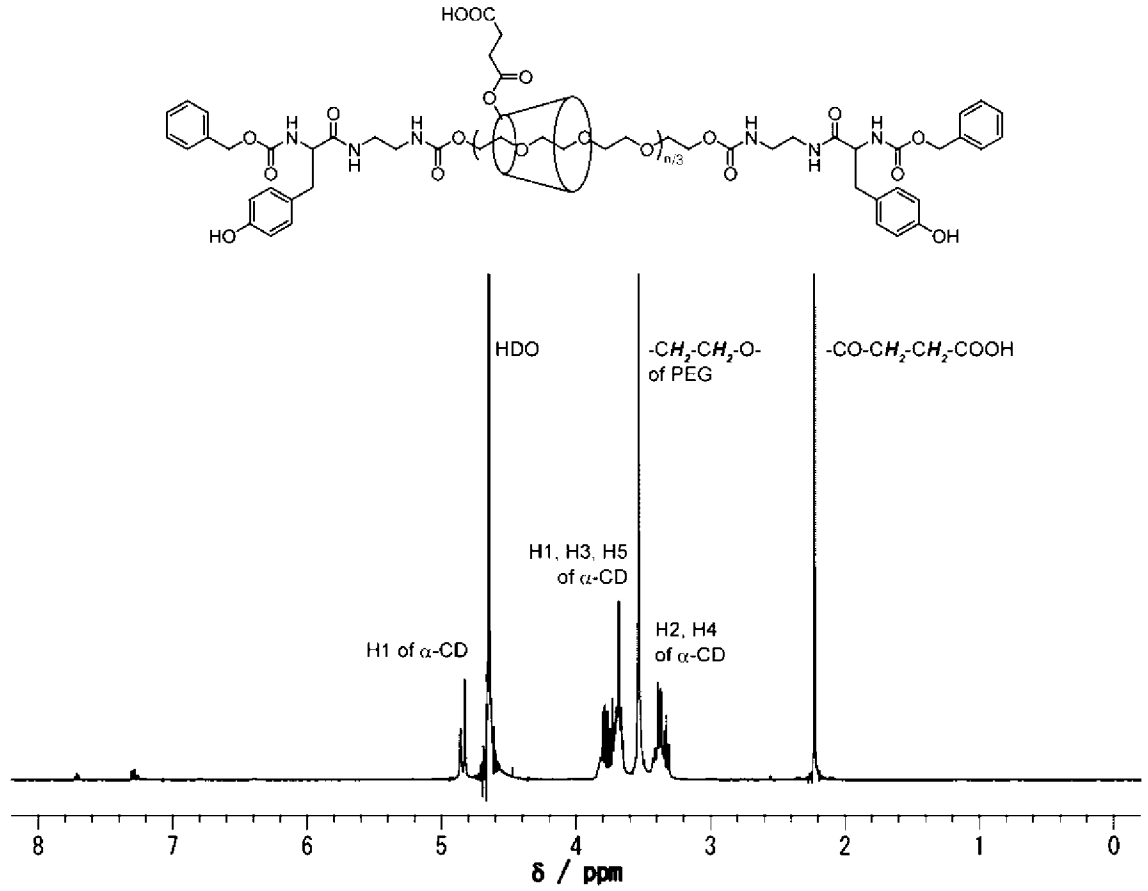
ラーゲンスポンジ中に浸潤していることを特徴とする、請求項１１から１３のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項15] 骨の再生に用いるための医薬品の製造における、骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンとの複合体の使用。

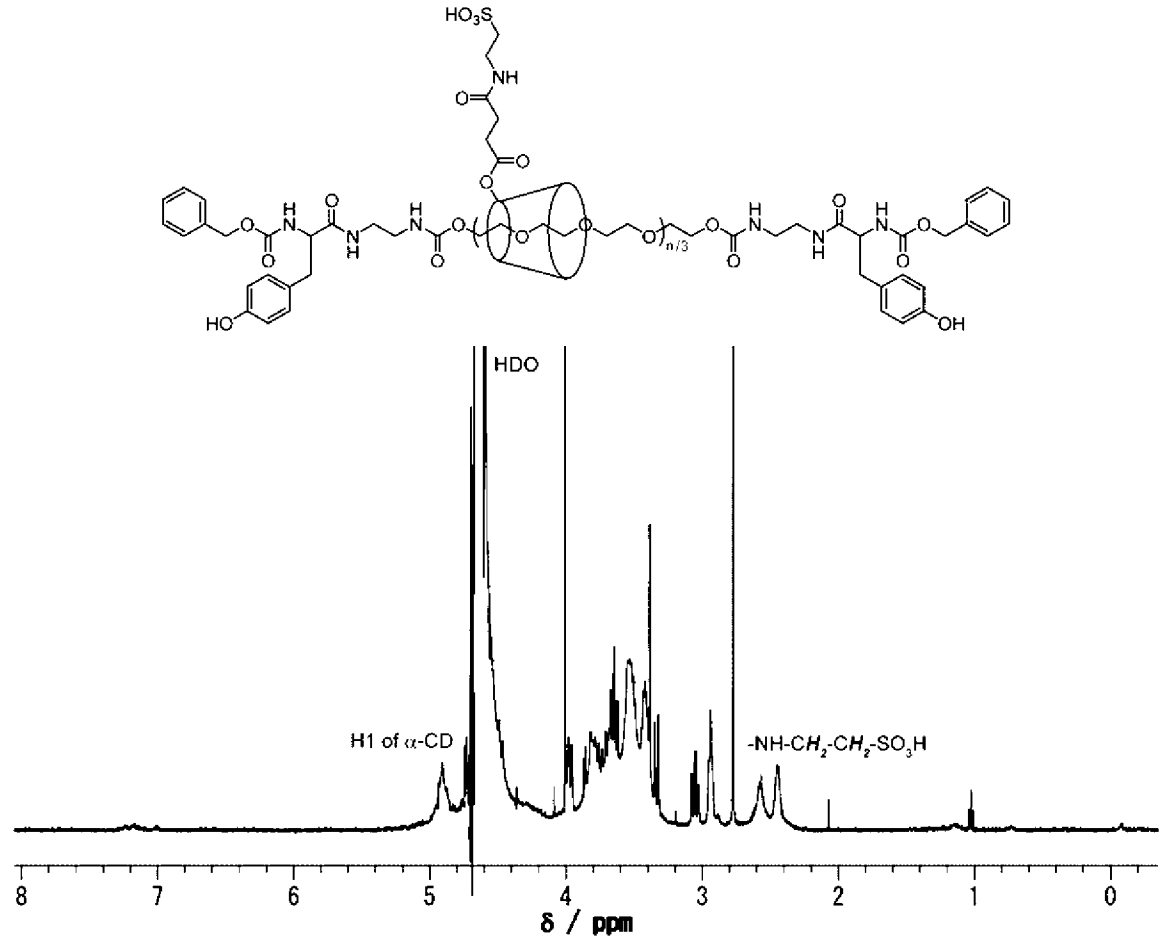
[請求項16] 対象における骨の再生方法であって、

前記対象に骨形成因子タンパク質と、硫酸基を有する環状分子、及び前記環状分子の中空部を貫通する線状分子を有する硫酸化ポリロタキサンと、を含有する組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、方法。

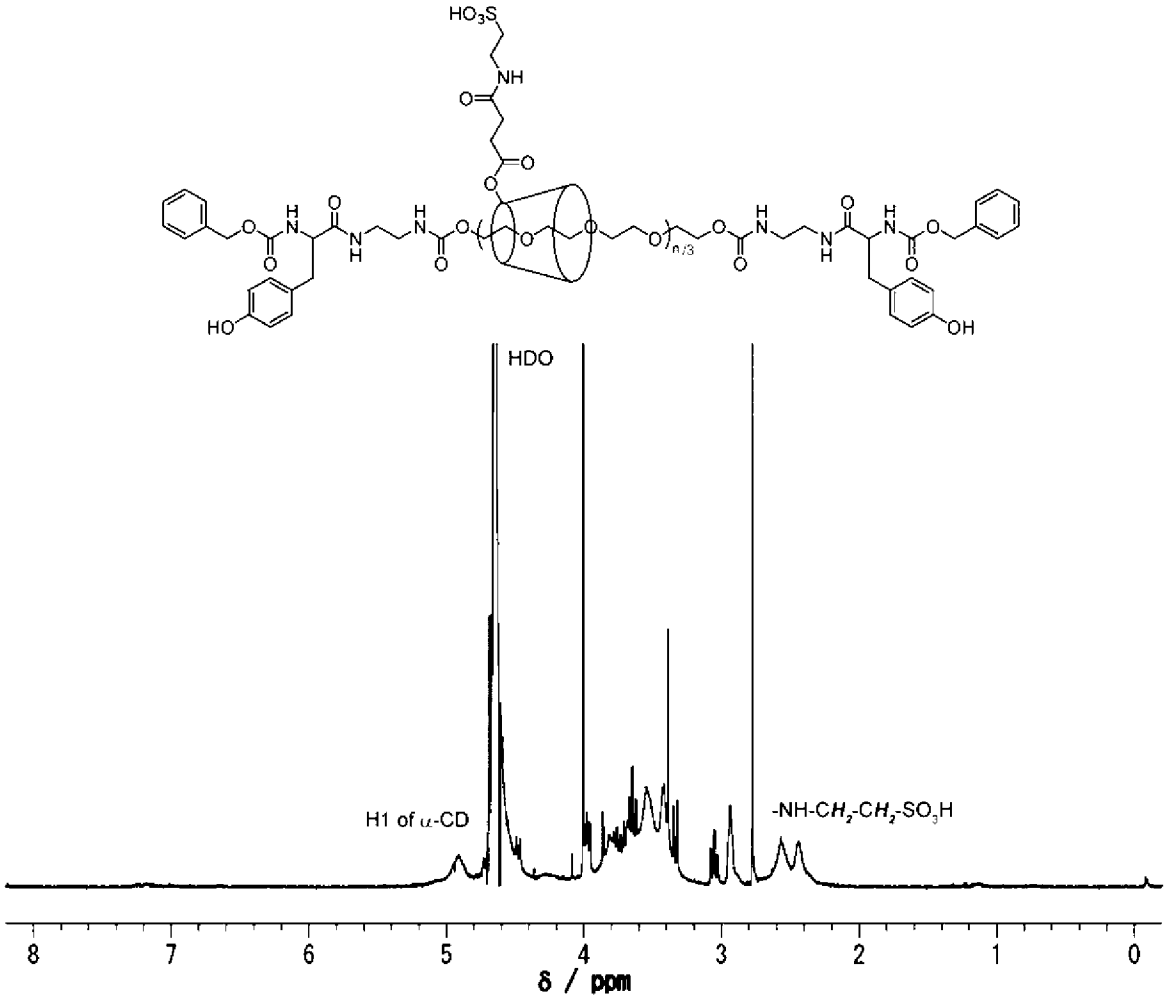
[図1]


HOOC
HO
OH
HDO
-CH2-CH2-O-
of PEG
-CO-CH2-CH2-COOH
H1, H3, H5
of α-CD
H2, H4
of α-CD
H1 of α-CD
8
7
6
5
4
3
2
1
0
δ / ppm

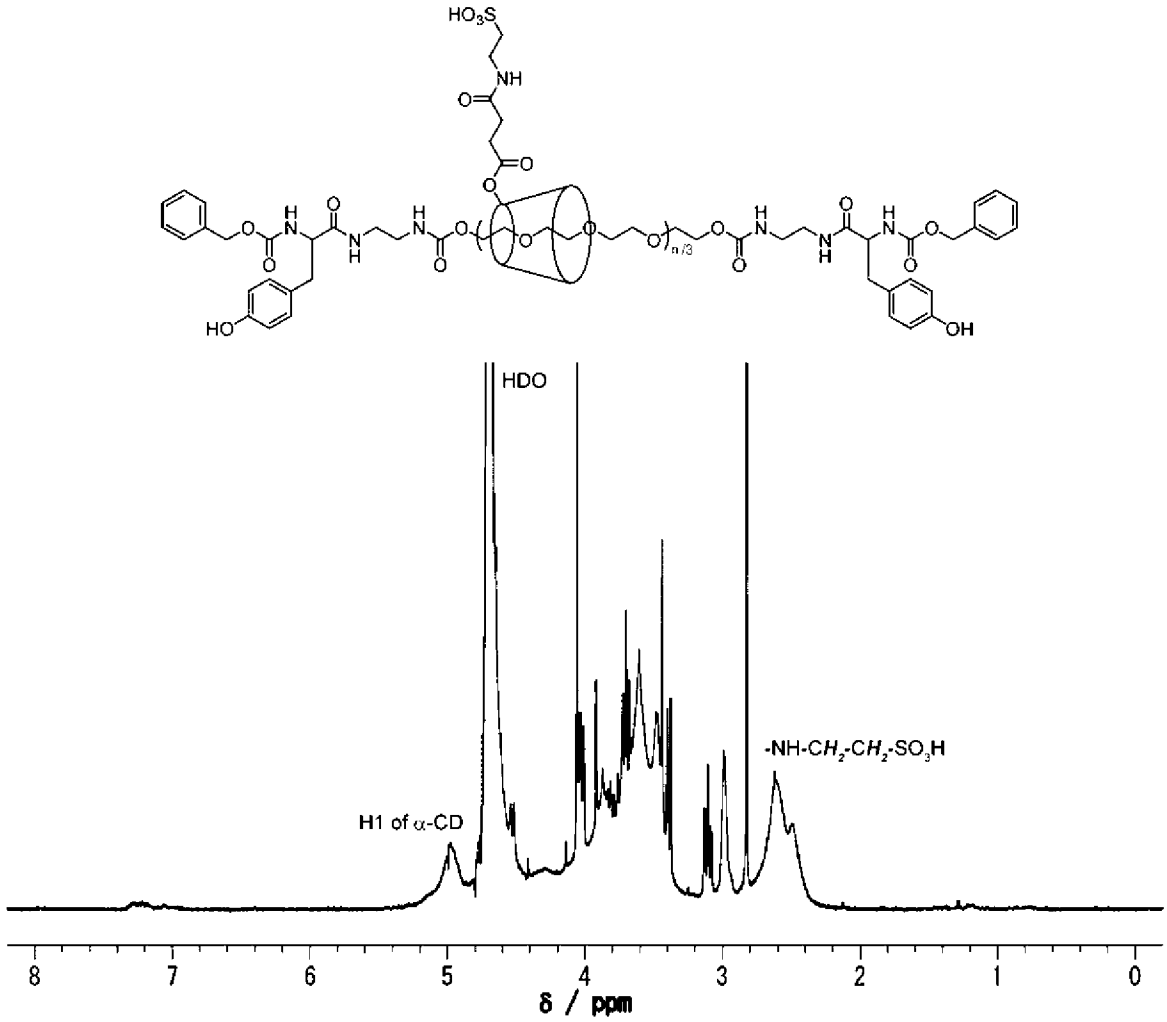
[図2]


HO3S
NH
HO
OH
HDO
H1 of α-CD
-NH-CH2-CH2-SO3H
8
7
6
5
4
3
2
1
0
δ / ppm

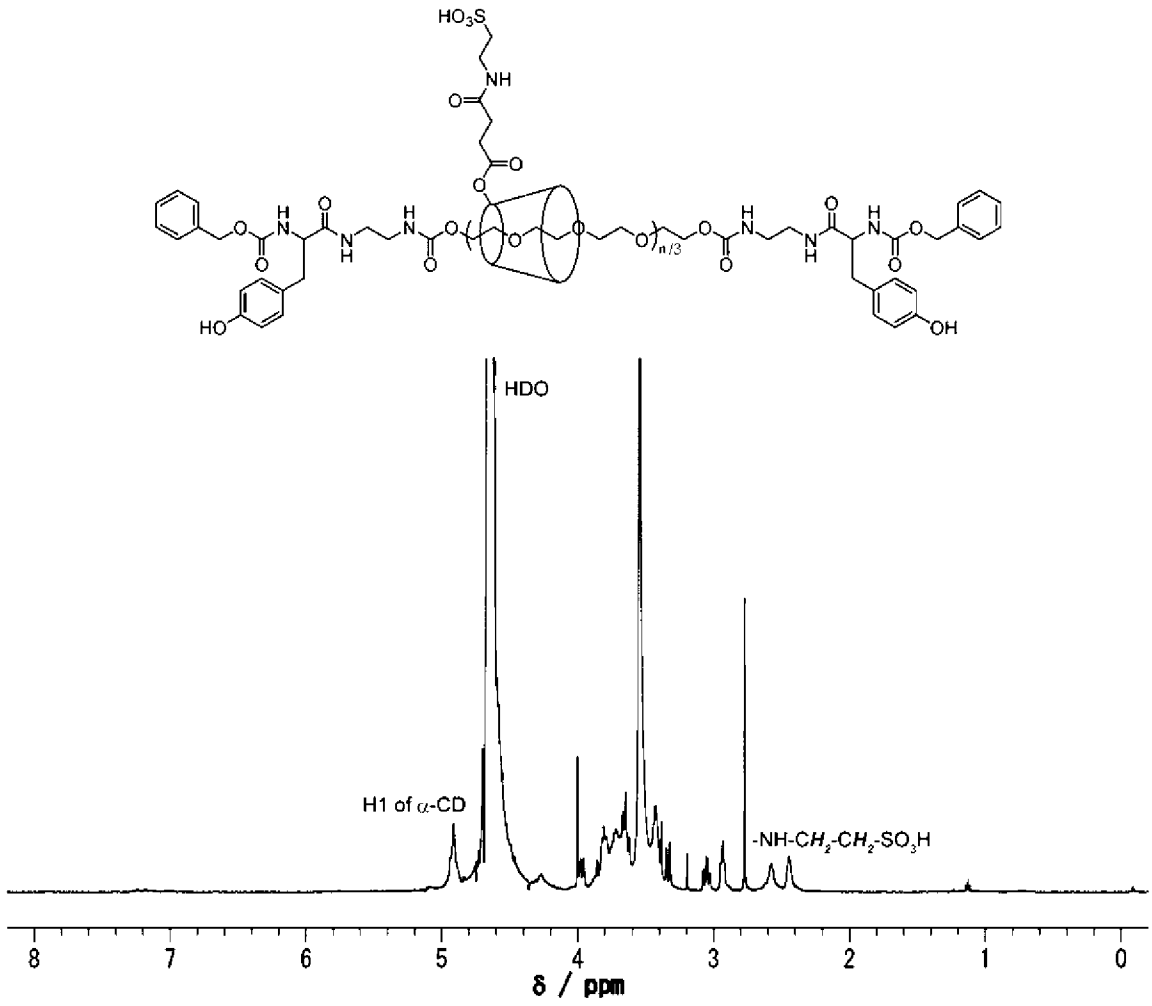
[図3]



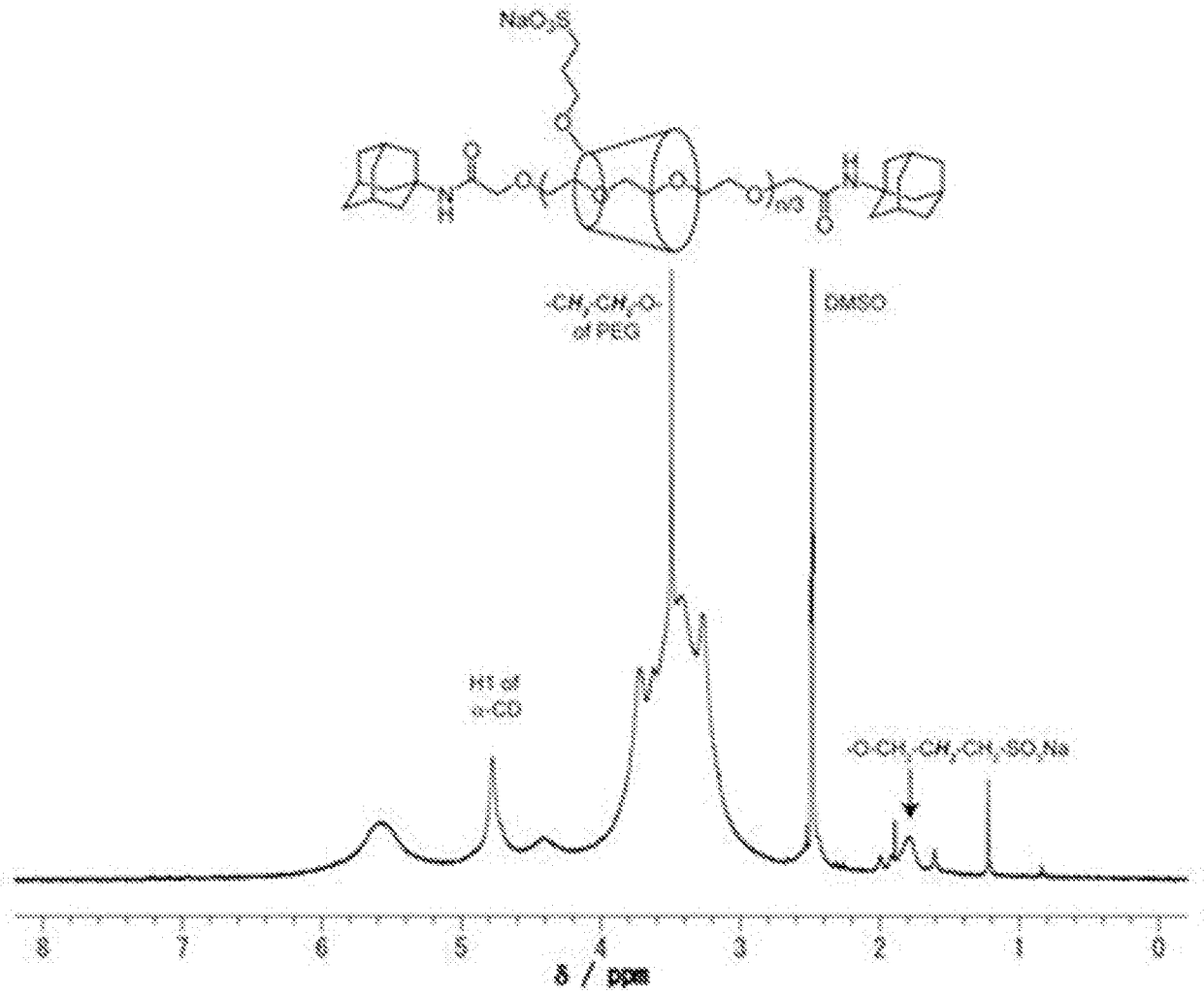
[図4]



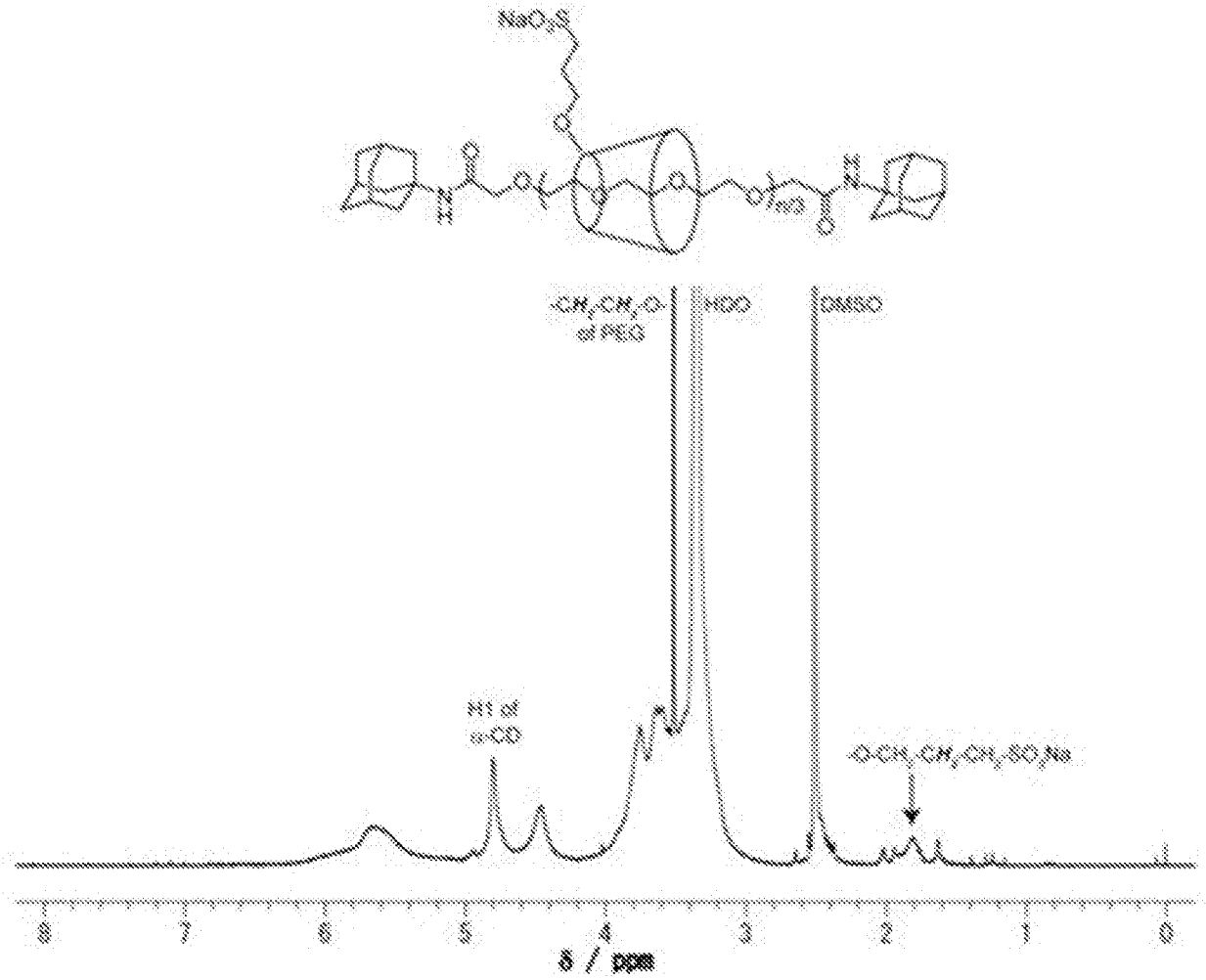
[図5]



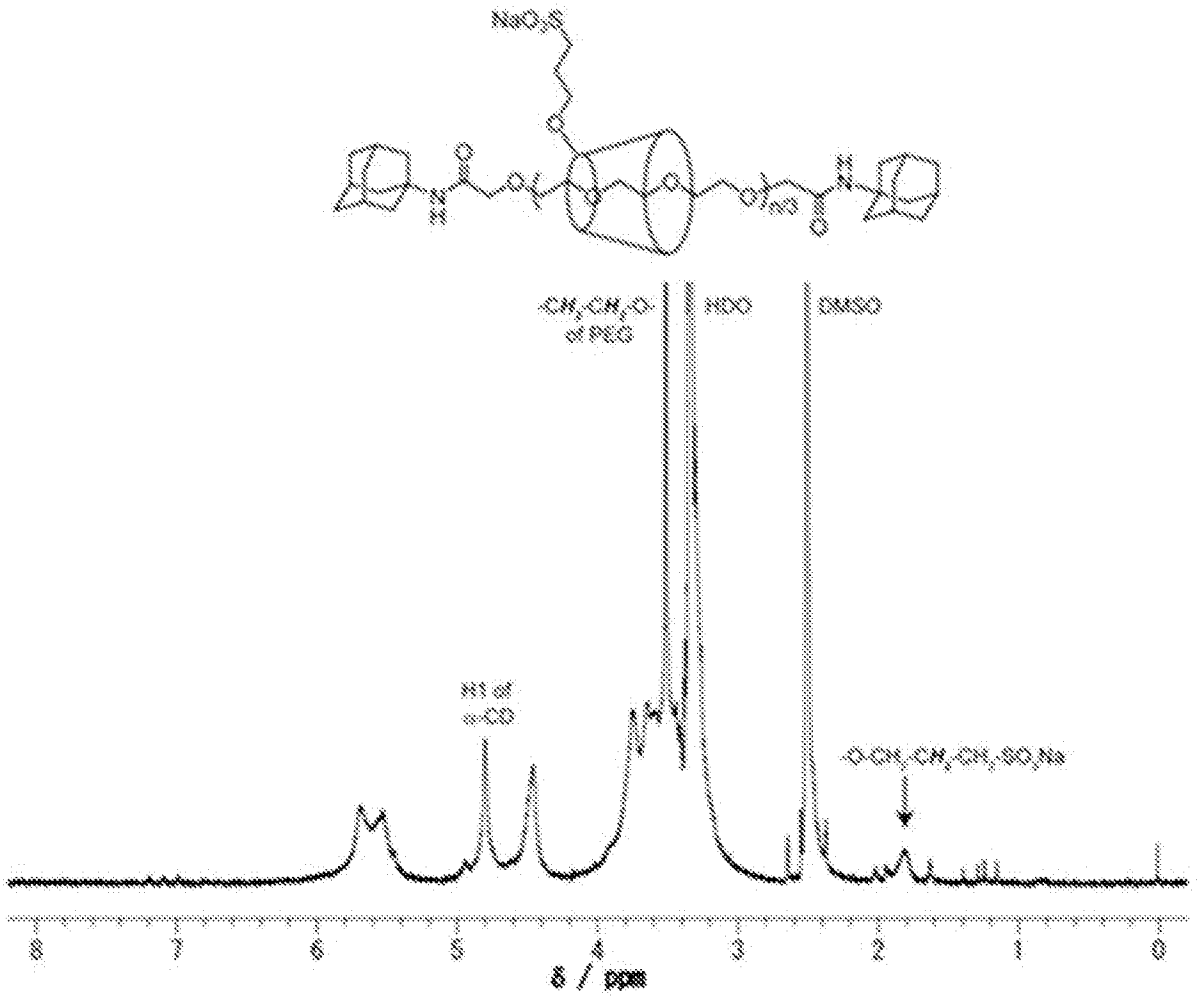
[図6]


-CH2CH2O-
of PEG
DMSO
H1 of
α-CD
-O-CH2-CH2-CH2-SO3Na
8
7
6
5
4
3
2
1
0
δ / ppm

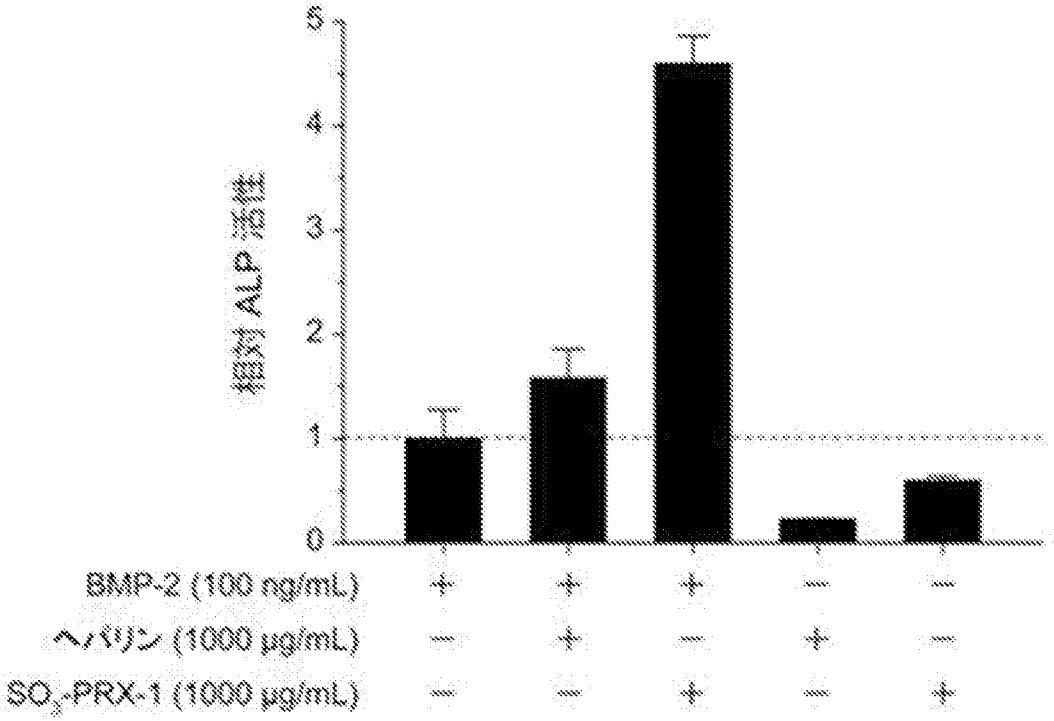
[図7]


NaO3S
-CH2CH2-O-
of PEG
HDO
DMSO
H1 of
=CO
-O-CH2-CH2-CH2-SO3Na
8
7
6
5
4
3
2
1
0
δ / ppm

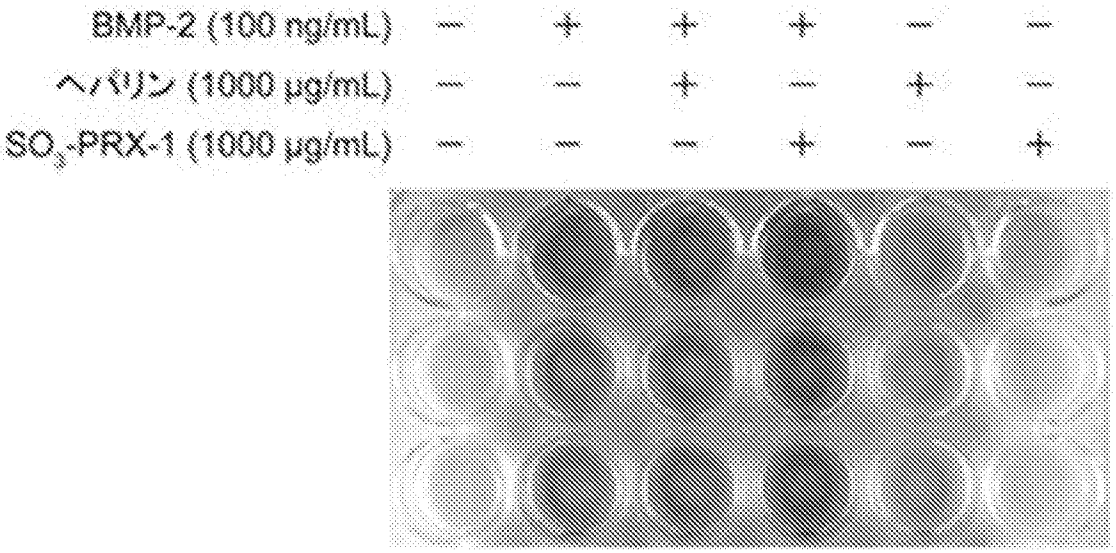
[図8]


NaO3S
-CH2CH2O- of PEG
HDO
DMSO
H1 of α-CD
-O-CH2CH2CH2SO3Na
8
7
6
5
4
3
2
1
0
δ / ppm

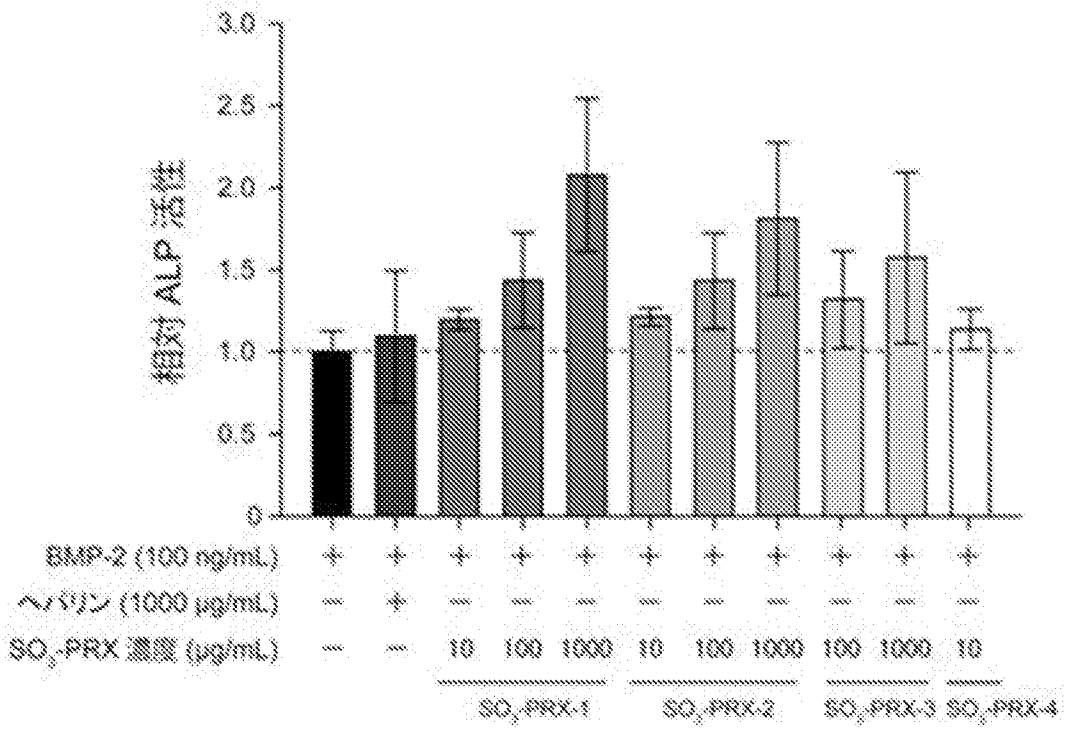
[図9]


相対 ALP 活性
0
1
2
3
4
5
BMP-2 (100 ng/mL) + + + − −
ヘパリン (1000 μg/mL) − + − + −
SO3-PRX-1 (1000 μg/mL) − − + − +

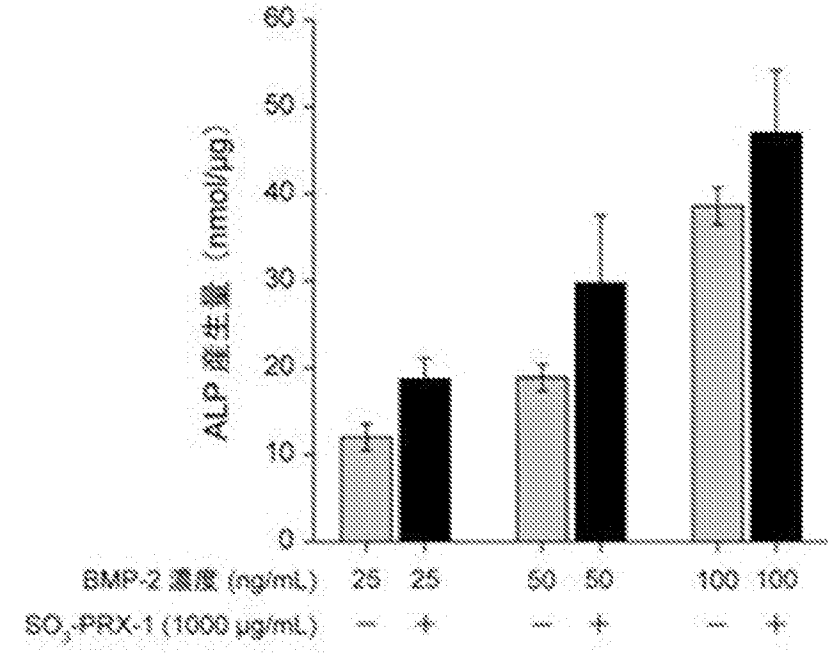
[図10]


BMP-2 (100 ng/mL) − + + + − −
ヘパリン (1000 μg/mL) − − + − + −
SO3-PRX-1 (1000 μg/mL) − − − + − +

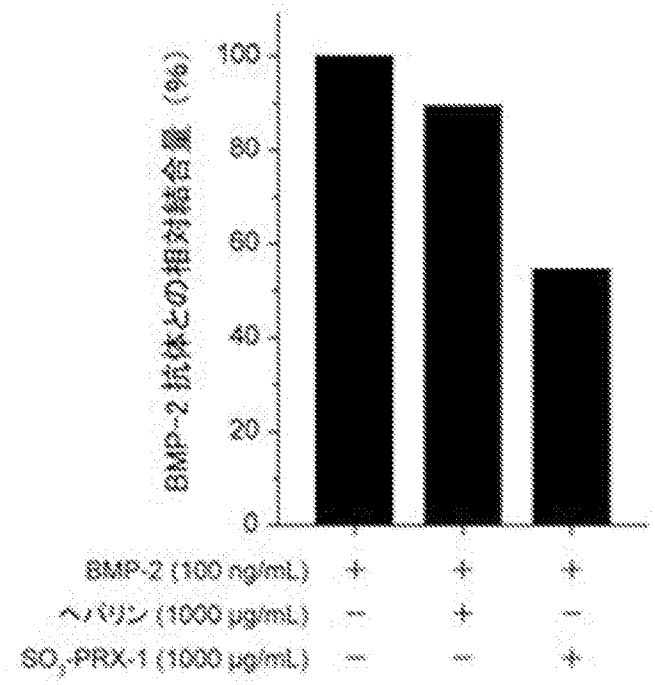
[図11]


相対 ALP 活性
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
BMP-2 (100 ng/mL) + + + + + + + + + + +
ヘパリン (1000 μg/mL) − + − − − − − − − − −
SO3-PRX 濃度 (μg/mL) − − 10 100 1000 10 100 1000 100 1000 10
SO3-PRX-1
SO3-PRX-2
SO3-PRX-3
SO3-PRX-4

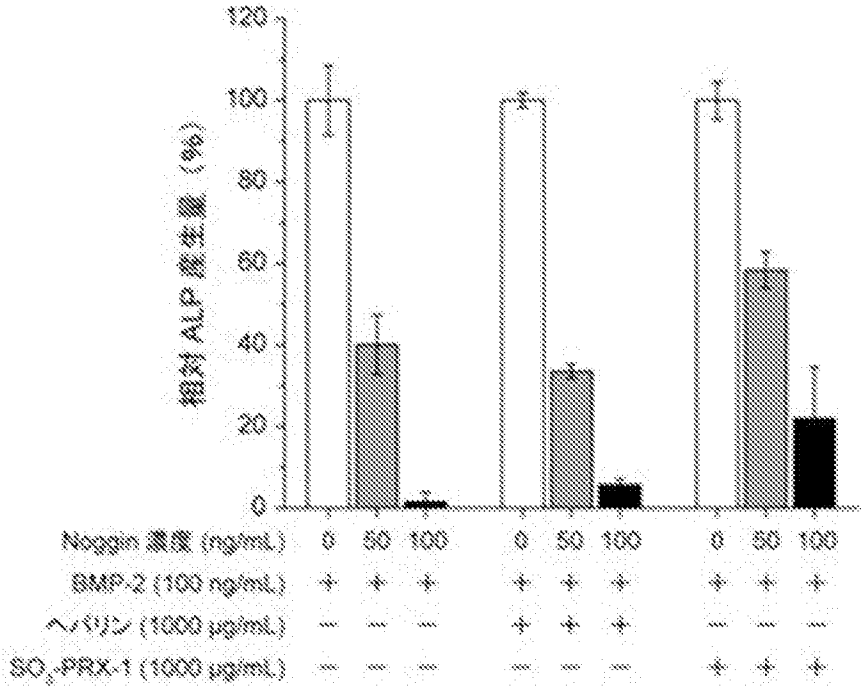
[図12]


ALP 産生量 (nmol/μg)
0
10
20
30
40
50
60
BMP-2 濃度 (ng/mL) 25 25 50 50 100 100
SO3-PRX-1 (1000 μg/mL) − + − + − +

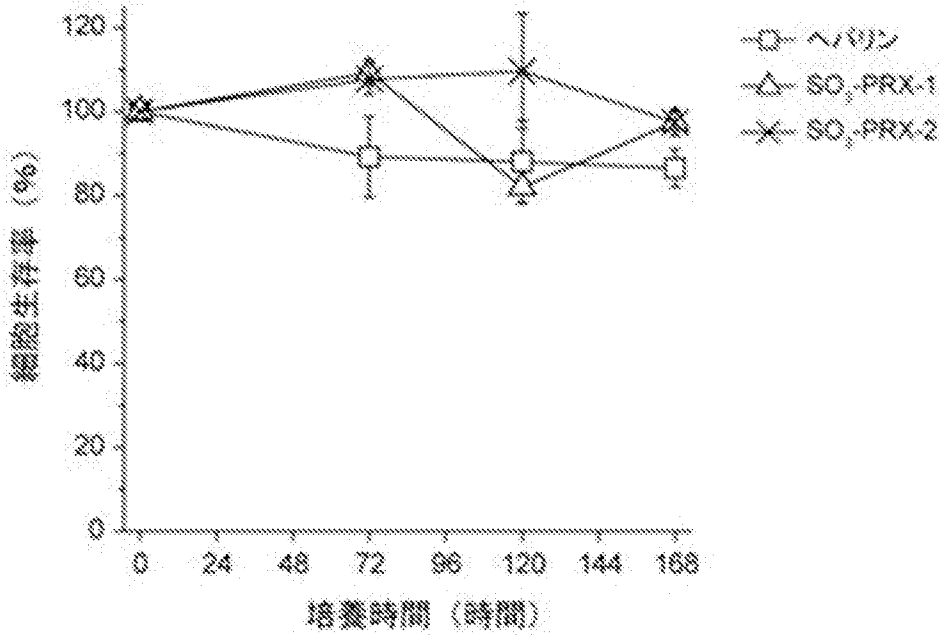
[図13]


BMP-2 抗体との相対結合量 (%)
0
20
40
60
80
100
BMP-2 (100 ng/mL) + + +
ヘパリン (1000 μg/mL) − + −
SO3-PRX-1 (1000 μg/mL) − − +

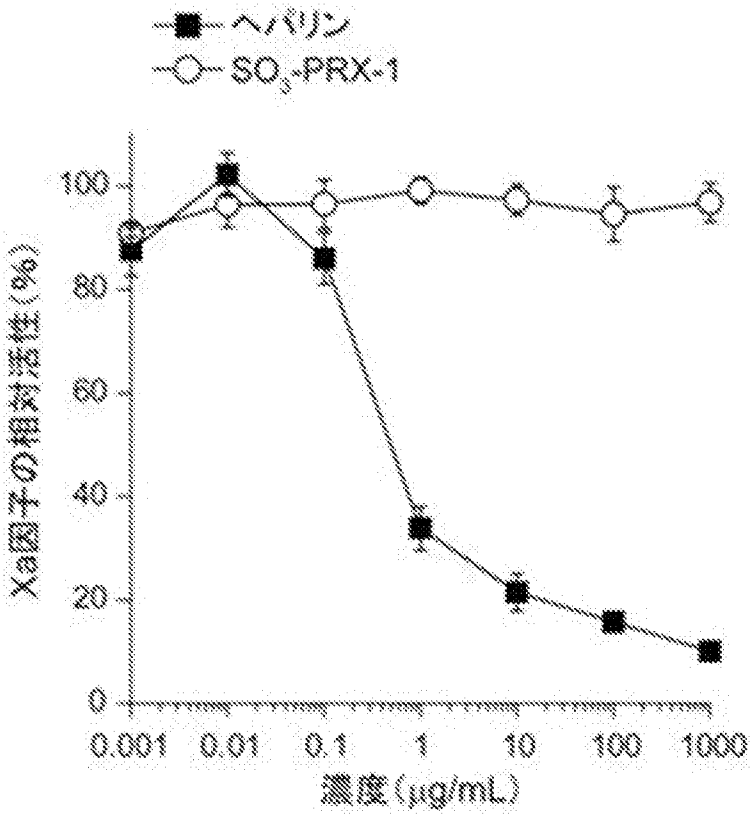
[図14]


相対 ALP 産生量（%）
120
100
80
60
40
20
0
Noggin 濃度 (ng/mL) 0 50 100 0 50 100 0 50 100
BMP-2 (100 ng/mL) + + + + + + + + +
ヘパリン (1000 μg/mL) − − − + + + − − −
SO3-PRX-1 (1000 μg/mL) − − − − − − + + +

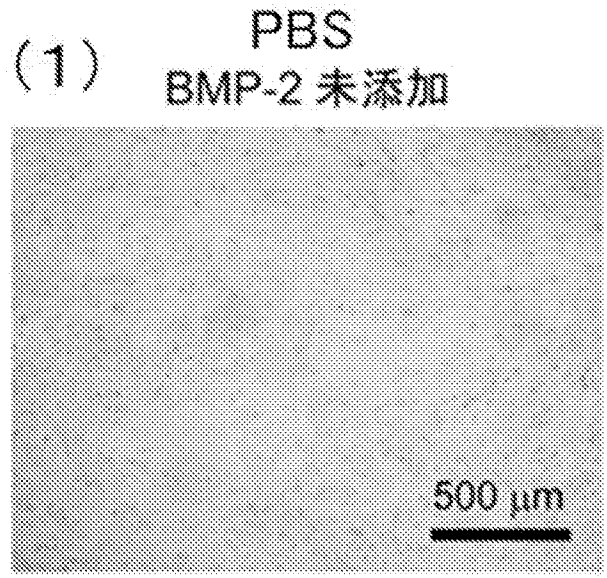
[図15]


ヘパリン
SO3-PRX-1
SO3-PRX-2
細胞生存率（%）
120
100
80
60
40
20
0
0 24 48 72 96 120 144 168
培養時間（時間）

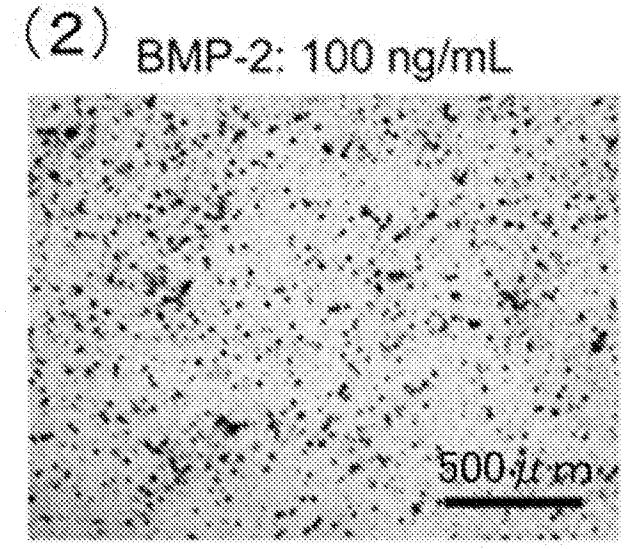
[図16]


ヘパリン
SO3-PRX-1
Xa因子の相対活性(%)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(μg/mL)

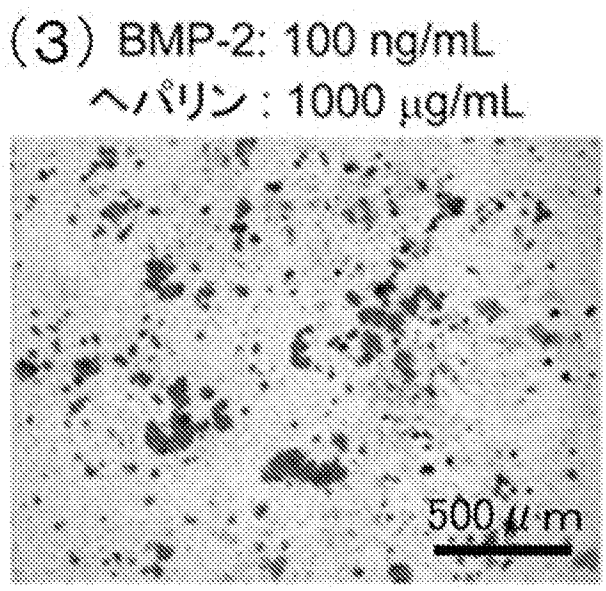
[図17A]


(1)
PBS
BMP-2 未添加
500 μm

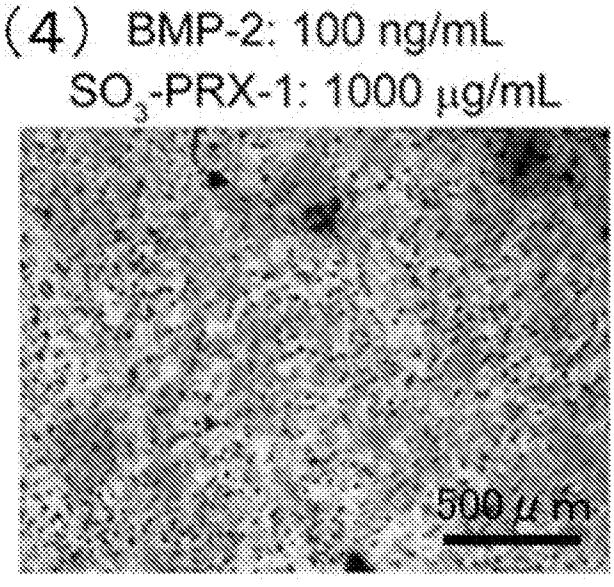
[図17B]



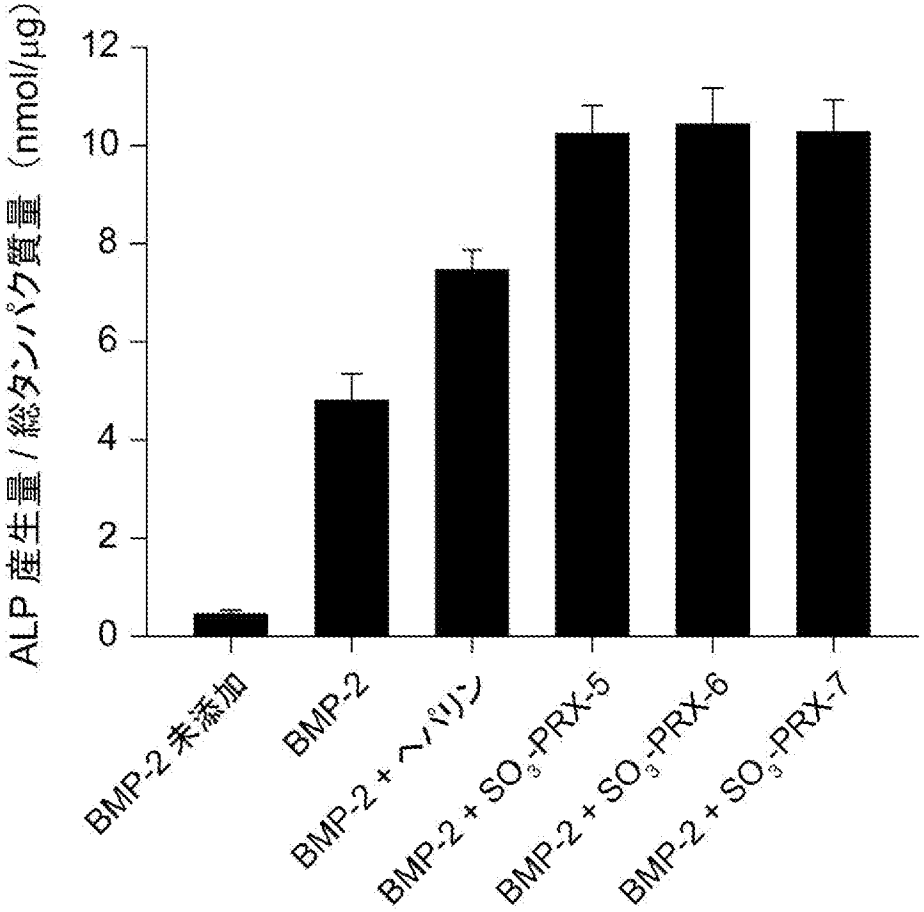
[図17C]



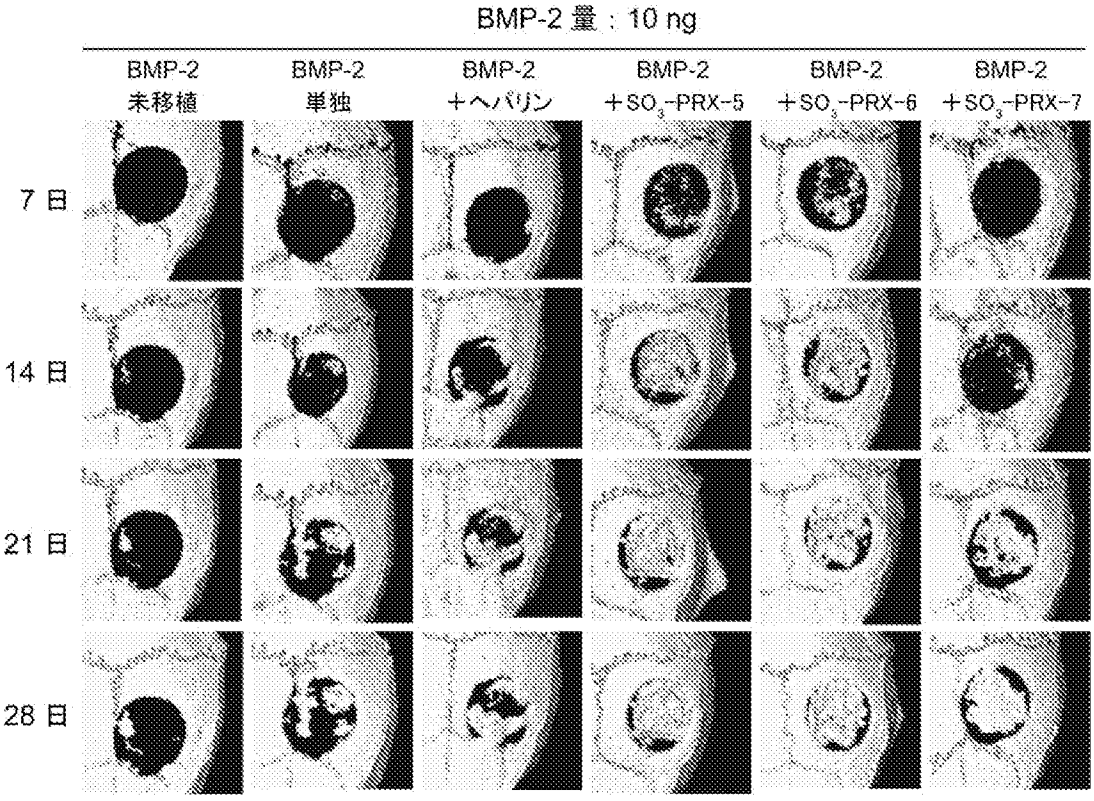
[図17D]



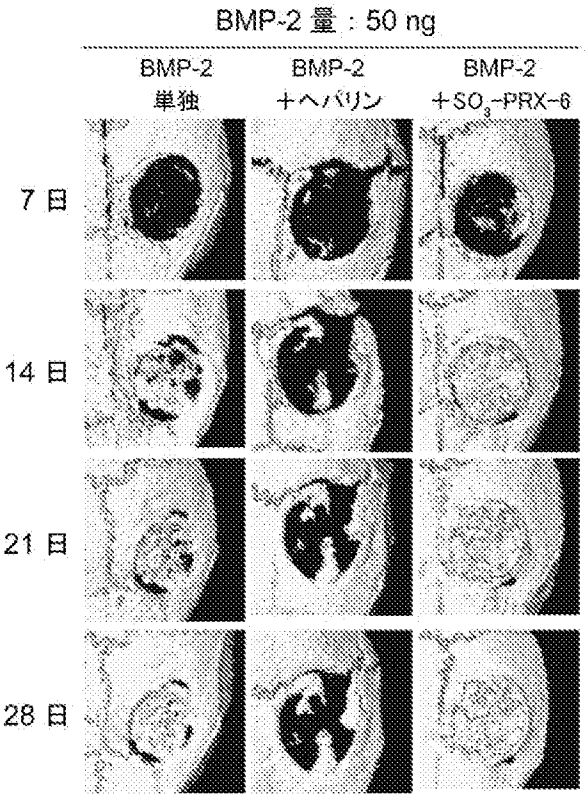
[図18]


ALP 産生量 / 総タンパク質量 (nmol/μg)
12
10
8
6
4
2
0
BMP-2 未添加
BMP-2
BMP-2 + ヘパリン
BMP-2 + SO3-PRX-5
BMP-2 + SO3-PRX-6
BMP-2 + SO3-PRX-7

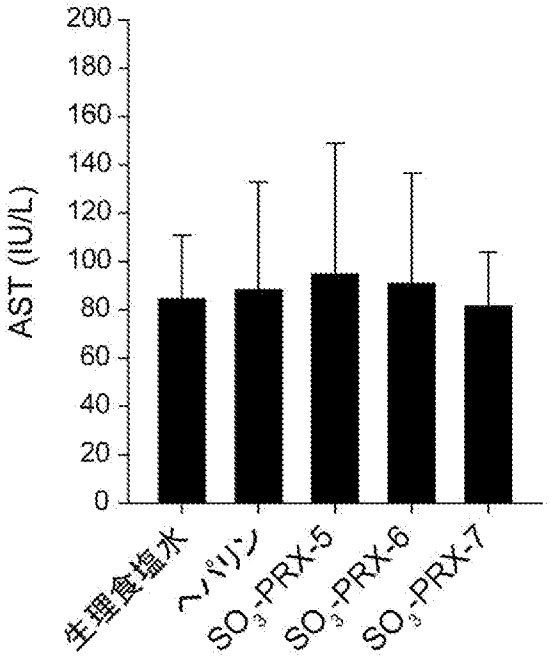
[図19A]


BMP-2 量 : 10 ng
BMP-2 未移植
BMP-2 単独
BMP-2 +ヘパリン
BMP-2 +SO3-PRX-5
BMP-2 +SO3-PRX-6
BMP-2 +SO3-PRX-7
7 日
14 日
21 日
28 日

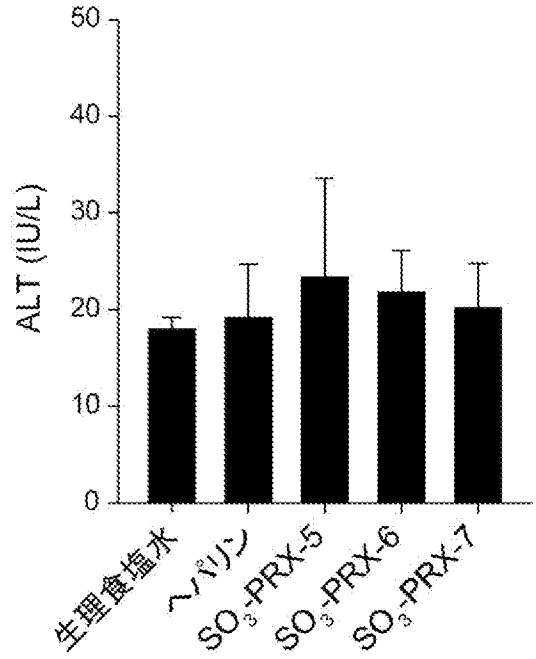
[図19B]


BMP-2 量：50 ng
BMP-2
単独
BMP-2
＋ヘパリン
BMP-2
＋SO3-PRX-6
7 日
14 日
21 日
28 日

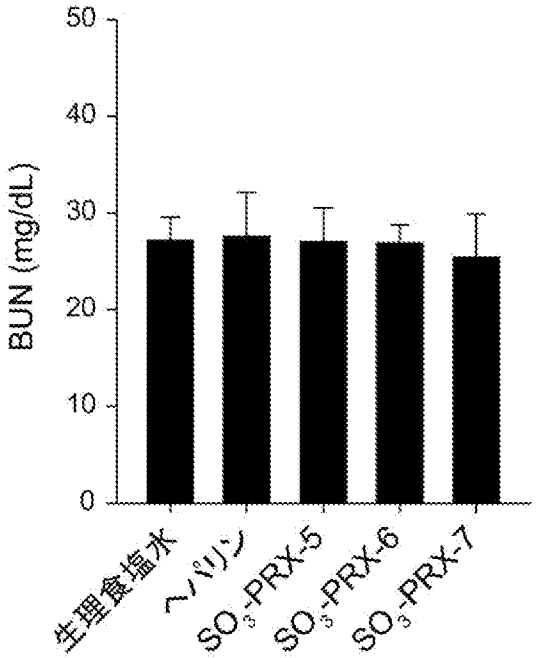
[図20A]


AST (IU/L)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
生理食塩水
ヘパリン
SO3-PRX-5
SO3-PRX-6
SO3-PRX-7

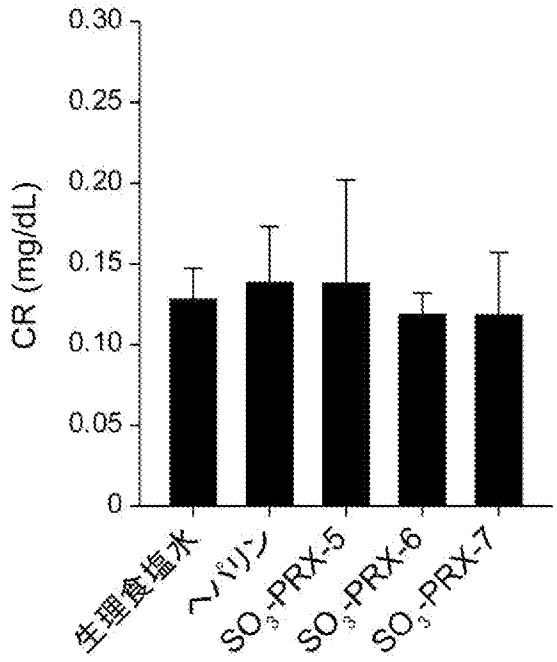
[図20B]


50
40
30
20
10
0
ALT (IU/L)
生理食塩水
ヘパリン
SO3-PRX-5
SO3-PRX-6
SO3-PRX-7

[図20C]


50
40
30
20
10
0
BUN (mg/dL)
生理食塩水
ヘパリン
SO3-PRX-5
SO3-PRX-6
SO3-PRX-7

[図20D]


0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
CR (mg/dL)
生理食塩水
ヘパリン
SO3-PRX-5
SO3-PRX-6
SO3-PRX-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/080945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K31/724(2006.01)i, *A61K38/22*(2006.01)i, *A61K47/34*(2006.01)i, *A61K47/36*(2006.01)i, *A61L27/00*(2006.01)i, *A61P19/00*(2006.01)i

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)
A61K31/724, A61K38/22, A61K47/34, A61K47/36, A61L27/00, A61P19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-215508 A (PG Research Co., Ltd.), 30 September 2010 (30.09.2010), claims; paragraph [0041] & WO 2009/001551 A1	1-16
Y	HETTIARATCHI MH et al., Heparin microparticle effects on presentation and bioactivity of bone morphogenetic protein-2., Biomaterials, 2014.05, Vol.35, p.7228-7238	1-16
Y	PARK HD et al., In vitro biocompatibility assessment of sulfonatedpolyrotaxane-immobilized polyurethane surfaces, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003, Vol.66,No.3, p.596-604	1-16

☒ 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	Date of mailing of the international search report
02 December 2015 (02.12.15)	22 December 2015 (22.12.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/080945

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KATAOKA T, Local and network structure of thermoreversible polyrotaxane hydrogels based on poly(ethylene glycol) and methylated alpha-cyclodextrins., THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, 2006, Vol.110, p.24377-24383	5
Y	WO 2013/147301 A1 (Ube Industries, Ltd.), 03 October 2013 (03.10.2013), paragraphs [0023], [0024] & US 2015/0051390 A1 paragraphs [0055], [0056] & EP 2832766 A1 & CN 104204035 A & KR 10-2015-0005557 A	5
Y	WO 2009/057790 A1 (Katayama Chemical Industries Co., Ltd.), 07 May 2009 (07.05.2009), claims 1, 10 & JP 2011-16723 A	14
Y	JP 2009-544411 A (The Regents of the University of California), 17 December 2009 (17.12.2009), claims 1, 28 & US 2009/0324669 A1 claims 1, 28 & WO 2008/013900 A2 & EP 2046361 A2	14
A	WO 2012/029863 A1 (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 08 March 2012 (08.03.2012), & US 2013/0157303 A1 & EP 2612919 A1	1-16
A	Yoshiko MIURA et al., "Inhibition of Amyloid Aggregation by Polymers Containing Glycosaminoglycan Sulfonate Side Groups", Japanese Journal of Polymer Science and Technology, 2012.01, vol.69, no.1, pages 47 to 53	1-16
A	JOUNG Y K et al., Synthesis and anticoagulant activity of anionic polyrotaxanes with heparin-like activity, Polymer Preprints, Japan 53th SPSJ Annual Meeting, 2004.05.10, Session ID: IIJ18	1-16
A	Shin TOMOKIYO et al., "Polyrotaxane de Kakyo sareta Azobenzene Gan'yu Ekisho Polymer no Hikari Yuki Soten'i", Polymer Preprints, Japan, 09 May 2014 (09.05.2014), vol.63, no.1, 2441 to 2442, 1Ph106	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/080945

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	TERAUCHI K et al., Supramolecular Polyelectrolyte Complexes of Bone Morphogenetic Protein-2 with Sulfonated Polyrotaxanes to Induce Enhanced Osteogenic Differentiation., Macromolecular Bioscience, Vol.15, 2015.03.23, p.953-964	1-16

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０８０９４５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/724(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/36(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i

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））

Int.Cl.　A61K31/724, A61K38/22, A61K47/34, A61K47/36, A61L27/00, A61P19/00

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

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１５年

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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

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
Y	JP 2010-215508 A (株式会社ＰＧリサーチ) 2010.09.30, 特許請求の範囲、【００４１】 & WO 2009/001551 A1	１－１６
Y	HETTIARATCHI MH et al., Heparin microparticle effects on presentation and bioactivity of bone morphogenetic protein-2., Biomaterials, 2014.05, Vol.35, p.7228-7238	１－１６

☑　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矛盾するものではなく、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	国際調査報告の発送日
０２．１２．２０１５	２２．１２．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｕ　９２１７
山村　祥子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４３９

C（続き）．　関連すると認められる文献

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
Y	PARK HD et al., In vitro biocompatibility assessment of sulfonatedpolyrotaxane-immobilized polyurethane surfaces, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003, Vol.66,No.3, p.596-604	１－１６
Y	KATAOKA T, Local and network structure of thermoreversible polyrotaxane hydrogels based on poly(ethylene glycol) and methylated alpha-cyclodextrins., THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, 2006, Vol.110, p.24377-24383	５
Y	WO 2013/147301 A1 (宇部興産株式会社) 2013.10.03, ［００２３］、［００２４］ & US 2015/0051390 A1, [0055] [0056] & EP 2832766 A1 & CN 104204035 A & KR 10-2015-0005557 A	５
Y	WO 2009/057790 A1 (片山化学工業株式会社) 2009.05.07, 請求項１，１０ & JP 2011-16723 A	１４
Y	JP 2009-544411 A (ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・カリフォルニア) 2009.12.17, 請求項１，請求項２８ & US 2009/0324669 A1 クレーム１，クレーム２８ & WO 2008/013900 A2 & EP 2046361 A2	１４
A	WO 2012/029863 A1 (住友ベークライト株式会社) 2012.03.08, & US 2013/0157303 A1 & EP 2612919 A1	１－１６
A	三浦佳子他，硫酸化糖鎖高分子によるグリコサミノグリカンモデルポリマーの合成とアミロイド阻止機能，高分子論文集，2012.01, Vol.69,No.1, p.47-53	１－１６
A	JOUNG Y K et al., Synthesis and anticoagulant activity of anionic polyrotaxanes with heparin-like activity, Polymer Preprints, Japan　53th SPSJ Annual Meeting, 2004.05.10, Session ID: IIJ18	１－１６
A	友清紳他，ポリロタキサンで架橋されたアゾベンゼン含有液晶ポリマーの光誘起相転移，Polymer Preprints, Japan, 2014.05.09, Vol.63,No.1, 2441-2442　1Ph106	１－１６

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

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
ＰＸ	TERAUCHI K et al., Supramolecular Polyelectrolyte Complexes of Bone Morphogenetic Protein-2 with Sulfonated Polyrotaxanes to Induce Enhanced Osteogenic Differentiation., Macromolecular Bioscience, Vol.15, 2015.03.23, p.953-964	１－１６