

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4804598号
(P4804598)

(45) 発行日 平成23年11月2日(2011.11.2)

(24) 登録日 平成23年8月19日(2011.8.19)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 47/36	(2006.01)	A 61 K 47/36
A 61 K 38/22	(2006.01)	A 61 K 37/24
A 61 K 47/42	(2006.01)	A 61 K 47/42
A 61 P 3/02	(2006.01)	A 61 P 3/02 102
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P 43/00 101

請求項の数 3 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平8-536621

(86) (22) 出願日

平成8年5月29日(1996.5.29)

(65) 公表番号

特表平11-506446

(43) 公表日

平成11年6月8日(1999.6.8)

(86) 国際出願番号

PCT/US1996/007920

(87) 国際公開番号

W01996/038167

(87) 国際公開日

平成8年12月5日(1996.12.5)

審査請求日 平成15年5月29日(2003.5.29)

審判番号 不服2008-16592(P2008-16592/J1)

審判請求日 平成20年6月30日(2008.6.30)

(31) 優先権主張番号 08/454,964

(32) 優先日 平成7年5月31日(1995.5.31)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500137976

アベンティス・ファーマスティカルズ・
インコーポレイテッド
アメリカ合衆国ニュージャージー州088
07. ブリッジウォーター. コーポレイト
ドライブ55

(73) 特許権者 507133968

オステオサ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 テキサス州 78229
サン アントニオ スウィート 201
バブコック ロード 2040

(74) 代理人 100059959

弁理士 中村 稔

(74) 代理人 100067013

弁理士 大塚 文昭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】骨の成長を刺激する纖維芽細胞成長因子の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

骨膜の骨組織の形成を強化するための医薬組成物であつて、154個のアミノ酸を有するFGF-1を含み、前記FGF-1において、3個のシステイン残基が、セリン残基により置換されていることを特徴とする医薬組成物。

【請求項2】

更に、ヘパリン又はヘパリンフラグメントを含む請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記FGF-1が、少なくとも0.1mg/mlの量で存在し、前記ヘパリン又はヘパリンフラグメントが、少なくとも50単位/mlの量で存在する請求項1又は2に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の属する分野

本発明は、例えば、骨粗鬆症、変形性骨炎、骨石化症及び歯周病などの骨組織を含む病理的な状態の予防及び治療、骨折の修復並びに骨部欠陥の治療に用いる治療薬として纖維芽細胞成長因子を使用することに関する。

発明の背景

生きている骨組織は、骨マトリックス及び無機質の再吸収と沈積のプロセスにより継続的に再生される。この時間的及び空間的な繋がったプロセス、期間的な骨再生は、主として

20

2細胞群、破骨細胞と骨芽細胞によって達成される。該再生プロセスは、破骨細胞が骨髄、又は骨表面への循環から補充され、骨の円盤状ポケットを除去するときに始まる。続いて、該骨マトリックス及び無機質は、骨髄から再吸収された骨表面に補充された一組の骨芽細胞によって置き換えられる。異常な骨細胞機能を伴う病理的な状態は、骨粗鬆症であり、骨量の減少及び骨脆弱性の増加により特徴付けられる疾患である。これらの変化は、破骨細胞の補充と活性の増加、しばしば、骨芽細胞の補充と活性の低下を伴う結果である。破骨細胞又は骨芽細胞の過剰又は不十分な細胞群の展開は、サイトカインと呼ばれる、対応する特定のタンパク質因子の欠乏又は過剰に起因するものである。

サイトカインは、その生物学的特性及びその固有のアミノ酸配列により特定されてきた。それぞれのサイトカインは他のサイトカインから区別する特性の固有のスペクトルを示す。一般に、該サイトカインは特定のタイプの細胞の成長及び/又は分化を刺激する。また、幾つかのサイトカインも破壊を目的に癌性細胞を標的にすることができる。

サイトカインの例を挙げると挙げると、顆粒状コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒状マクロファージCSF (GM-CSF)、マクロファージCSF (M-CSF)、インターロイキン-1ベータ、インターロイキン-3、インターロイキン-6、インターフェロンガンマ、腫瘍因子、リンフォトキシン、白血病阻害因子、纖維芽細胞成長因子、変換性成長因子アルファ、及び変換性成長因子ベータがある。

多くの公知サイトカインは血液細胞を刺激する。数種の成長調節サイトカイン、例えば、M-CSF、変換性成長因子アルファ、インターロイキン-1、及び腫瘍壞死因子は、骨髄単核細胞増殖に対する刺激を示す。サイトカイン、例えば、インターロイキン-1 (IL-1)、腫瘍壞死因子 (TNF) 及びインターロイキン-6 (IL-6) は、破骨細胞形成及び分化に影響を得るけれども (Mundyの論文 (1990年) Trends Endo. Metab. 1: 307-311頁)、これらの因子は具体的な破骨細胞成長調節因子ではない。

骨の崩壊及び再吸収に影響を与える因子に関する入手可能な多くの情報はあるが、情報は新しい骨の形成を実際に刺激することができる因子に関するものに限られている。骨自体は、骨細胞の成長及び/又は分化を刺激できる能力がある因子を含んでいる。したがって、骨組織の抽出物は、骨の構造的基本状態を維持する構造的タンパク質のみならず、骨細胞を刺激して増殖させる生物学的活性骨成長因子を含んでいる。骨細胞の増殖を刺激することが知られている骨で見い出された成長因子は、変換性成長因子、インシュリン様成長因子 (インシュリン様成長因子I及びインシュリン様成長因子II)、塩基性纖維芽細胞成長因子 (bFGF) 及び骨形態形成タンパク質 (BMPs) である。また、これらの因子は、非骨細胞タイプの増殖を引き起こす。

纖維芽細胞成長因子 (FGF) 群は少なくとも 9 種の構造的に関連するタンパク質 (FGFs 1-9) を有し、その中で最も知られているのは、酸性FGF (aFGF; FGF-1) 及び塩基性FGF (bFGF; FGF-2) である。この群の構成タンパク質は、中胚葉及神経外胚葉由来のほとんどの細胞において有糸分裂誘発を刺激し、血管形成、神経突起伸長、ニューロン生存及び筋原細胞分化などを含む他の生物学的プロセスに影響する。一般に、FGFはヘパリンに高親和性を有し (これらの命名法が定められる前は、幾つかのFGFはヘパリン結合性成長因子-1、-2などと呼ばれていた。)、かつ多くは (すべてではない)、纖維芽細胞の有糸分裂誘起物質である。FGF群のタンパク質は、コア配列内におおよそ25~55%アミノ酸配列の同一性を有し、かつ若干のFGFは、このコア配列外側のC-末端、N-末端、又は双方に重要な延長部を有する。この構造的相同性は、公知のFGFをコードする該 9 種の異なる遺伝子が共通な先祖の遺伝子に由来することを示唆している。

該FGF群の 9 種の公知タンパク質に加えて、付加的な複雑さが、单一の遺伝子由来のFGFの数種の分子形態の発生からもたらされる。例えば、aFGF (FGF-1) の主要な翻訳生成物は 155 残基からなる。しかし、天然の供給源 (例えば、牛の脳) で見いだされたFGF-1の最も長い形態は 154 残基からなる。FGF-1のこの154残基形態は、前記155残基形態のNH₂-末端メチオニンが欠けており、アセチル化アミノ末端を有する。インビボ又は精製過程におけるタンパク質分解プロセスは FGF-1の小さな活性形態を生成し、それではアミノ末端15 (des 1-15) 又は21 (des 1-21) アミノ酸のいずれかが欠失している。これまで明確に規定し

10

20

30

40

50

たように、FGF-1は、FGF-1の該154残基形態及びそれより短いもの、その生物学的活性形態を指し、例えば、アミノ末端15 (des 1-15) 又は21 (des 1-21) アミノ酸が欠失している前記形態がある。歴史的に、FGF-1の154残基形態は -内皮細胞成長因子 (-ECGF) と呼ばれており、前記des 1-15形態はaFGFと呼ばれ、かつdes 1-21形態は -ECGFと呼ばれていた。成長因子のこの群について用語の標準化が行なわれる前は、また数種の追加的用語が同じタンパク質に適用されており、その中には眼部由来成長因子及びヘパリン結合性成長因子が含まれていた。また、bFGF (FGF-2) の類似形態も記載されていた。切断された形態に加えて、また、bFGFの伸長形態が記載されており、これは、bFGFの155残基形態を作り出すATG翻訳開始コドンの上流に位置する数種の異なるGTGコドンで翻訳が開始されることにより生じるものである。これらの代わりとなる全ての形態はFGF群を規定する構造的相同性のコア領域を含んでいる。

10

報告されている開発状況

bFGFに関する骨原生の役割がインビトロの研究に基づき示唆されている (Hauschkaらの論文., J. Biol. Chem 261:12665-12674頁, 1986年; Globusらの論文., Endocrinology 123:98-105頁, 1988年; Canalisらの論文, J. Clin. Invest. 81:1572-1577頁, 1988年; McCarthyらの論文, Endocrinology 125:2118-2126頁, 1989年; Noffらの論文., FEBS Lett., 250:619-621頁, 1989年)。しかし、bFGFのインビオ投与に関するレポートはこれまで1報のみである (Mayaharaらの論文., Growth Factors 9:73-80頁, 1993年)。ヒトbFGFのラットに対する静脈投与は、骨内膜の新しい骨形成を示した。骨膜の骨形成の増加は証明されなかった。同様な組織の骨原生の潜在性が、ヒトaFGFの静脈内投与の後に見られた。

20

本発明の要約

本発明は、骨量が不適切で病理学的な状態に苦しめられている、又は骨あるいは歯の組織における欠陥の修復を行なっている患者を治療する方法に関するものである。該方法は、ある種の纖維芽細胞成長因子又はその誘導体を含む医薬組成物を、骨芽細胞及び/又はその前駆体の増殖及び/又は分化を刺激し、骨の同化作用を促進する量で、投与することを含むものである。該FGFは部分的に適用し骨膜の骨形成を刺激するのが好ましい。それにかわりFGF-1の全身的な投与により、骨内膜の骨形成の促進を図るのも好ましい。本発明の実施において好ましい纖維芽細胞成長因子はFGF-1及びFGF-2であり、かつ最も好ましいのは全長FGF-1 (ECGF) 、FGF des 1-21 (ECGF) 、及び分子間又は分子内ジスルフィド結合を形成することができないアミノ酸により置き換えられた、少なくとも1個のシステイン残基を有するFGFの誘導体である。

30

他の、かつさらなる目的、特徴及び利点は、添付の図面とともに参照する場合に、開示の目的で記載されている本発明の好ましい実施態様の次の記載から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

図1は、顕微鏡写真により示される、WIST腫瘍細胞と隣接するヌードマウスの頭蓋冠における新しい骨の成長である。

図2は、酸性FGF (パネルA) 及び塩基性FGF (パネルB) の投与後に、顕微鏡写真により示される、マウスの頭蓋冠における新しい骨膜の骨の成長である。

図3は、頭蓋冠における骨の成長に関する酸性及び塩基性FGFの効果を示す。

図4は、aFGFに対する骨の成長の時間応答を示す。

40

図5は、aFGFに対する骨膜増殖及び骨芽細胞分化に関するaFGFの経時的応答を示す。

図6は、頭蓋冠の骨形成に関するaFGF及びbFGFの効果の投与量応答を示す。

図7は、卵巣切除ラットにおける脛骨に関する日投与の効果を示す。

図8は、卵巣切除ラットにおける脊柱骨比重に関するaFGFの日投与の効果を示す。

図9は、メトキシフルラン投与に続く、血清フッ化物の水準を示す。

図10は、ラットにおける骨比重に関するaFGFのサイクル投与の効果を示す。

図11は、卵巣切除ラットにおける骨量に関するaFGFの効果を示す。

図12は、MG63細胞に関する、野生型FGF-1及びFGF-1無システィン変異形態の増殖活性の比較を示す。

図13は、新しい骨形成に関するFGF-1及びFGF-1の無システィン変異形態の効果の比較を示す。

50

す。

好ましい実施態様の記載

本発明の好ましい態様は、骨の形成、好ましくは骨膜の骨の形成を刺激する方法を提供する。この方法は、骨量が不十分である病理学的な状態の治療、又は骨又は歯組織における欠陥を修繕する際に有用である。一の実施態様において、本発明の方法及び組成物は、局部適用し、骨膜の骨形成を強化し、皮質の骨における正味の増加促進に特に有用である。本発明は、一部精製した、並びに実質的に同質な形態の天然纖維芽細胞成長因子、ならびに合成、又は組み換え調製纖維芽細胞成長因子、その生物学的に活性なフラグメント、及びその医薬として許容できる塩、及び誘導体の使用を含むものである。

定義:

明細書中で「実質的に精製された」を、天然状態で通常伴われている化合物（他のタンパク質又はペプチド、炭水化物、脂質）を実質的に含んでいないタンパク性物質として定義される「実質的に同質な」の意味で使用する。最も好ましいのは、それがポリペプチドを意味することであり、該ポリペプチドはグリコシル化されていても、グリコシル化されていなくともよい。そして、それは、単一の分子量及び/又は複数分子量の組み合わせ、クロマトグラフィー応答、溶出プロフィール、アミノ酸組成及び配列、並びに生物学的活性で特徴付けられるものである。「実質的に精製された」とは、他の化合物を伴う人工又は合成混合物を除外することを意味しない。また、この用語は、生物学的活性に干渉しない不純物の存在、及び例えば、不完全な精製又は医薬として許容し得る配合物の調合に起因するものの存在を許容することを排除することを意味しない。

用語「動物」は、制限するものではないが、哺乳動物、例えば犬、猫、馬、牛、豚、ラット、マウス、猿及びヒトなどである。

用語「生物学的に活性なポリペプチド」とは、天然のポリペプチド自体、その生物学的に活性な類似体を意味し、該類似体は合成的に製造されたポリペプチド及びその類似体、並びに天然で、医薬として許容し得る塩、及び医薬として許容し得るその誘導体を含む。また、用語「生物学的に活性なポリペプチド」は、その生物学的に活性なフラグメント、並びに生物学的に活性なその類似体を含む。異なる形態があってもよい。これらのバリエーションは、同一の生物学的な機能のタンパク質をコードする構造遺伝子の核酸配列はにおける相違により特徴付けることができる。

用語「生物学的に活性な配列類似体」は、1又は複数のアミノ酸置換、欠失、付加又は置換などがある天然及び非天然類似体を含む。1以上の本来の生物学的活性の特質を残す誘導体をもたらす、すべてのこのように対立性バリエーション、修飾、及び類似体は、本発明の範囲内にある。

本発明の範囲に含まれる類似体の例を挙げると、分子間又は分子内ジスルフィド結合を形成することができない、例えばセリンのようなアミノ酸により置換された、1以上のシステイン残基を有するFGF-1である。適当なアミノ酸置換及び1以上のシステイン残基が欠けたFGF-1類似体の調製が、米国特許第5,223,483号及び第5,312,911号に開示されており、その全内容を引用により本明細書の内容とする。

用語「FGF-1」は、FGF-1酸性成長因子（また、ECGF として知られている。）の前記154残基の形態、des 1-15形態及びdes 1-21形態（ECGF として知られている。）を含む。FGF-1は当該技術分野で公知の方法により調製することができる。本発明において使用するFGF-1を、例えば、その内容を引用により本明細書の内容とする米国特許第4,868,113号に開示されている組換え技術により調製するのが好ましい。

本発明を実施する際に有用なポリペプチドを精製するために、天然の供給源から得た又は組換え調製の後に、クロマトグラフィー法を、例えば、加圧下で微細粒子樹脂を含む小径カラムで行い、分離の有効性を強化することができる。例えば、高圧液体クロマトグラフィーである。

濃縮及び塩の除去は本発明で採用するある種のクロマトグラフィー又は分離技術で、一般に使用される工程である。

イオン交換又は他のイオン強度に依存する技術を採用する場合、一般に塩の除去が必要で

10

20

30

40

50

ある。塩の除去は、例えば、透析又はゲル濾過により、又は制御細孔ガラス (CPG) クロマトグラフィーにより行なうことができる。

また、多くのゲル濾過及び濃縮技術を使用する。ある種の市販材料が特に有用である。

Sephacryl, Sephadex及びBio-Gelがゲル濾過媒体の例であり、これらはタンパク質の分離及び精製に通常使用されるものであり、かつその物理的特性により特徴付けられるものである。

本発明は、纖維芽細胞成長因子、好ましくはFGF-1、bFGF及びWISH細胞から単離された塩基性FGFの新規な形態を、骨格量の減少、又は不全あるいは欠陥のある骨形成を伴う骨疾患の治療に使用する方法を含む。酸性FGF及び塩基性FGFは、骨芽細胞表現型及びその前駆体を有するヒト細胞の成長を刺激する。一の実施態様において、本発明は、骨芽細胞増殖の異常な水準低下により特徴付けられるヒト及び動物の病気の治療方法を提供する。10

本発明の治療対象に有効な纖維芽細胞成長因子の投与は、局部、非経口的な、静脈、筋肉、皮下、直腸又は他の適当な手段とすることができます。投与される量は、年齢、体重、もしあれば同時に行なわれる治療、治療される骨の病理学的な特性などに依存する。本発明の治疗方法は、液性溶液、懸濁液、エリキシル又は殺菌液形態のような形態で、纖維芽細胞成長因子を投与することができる。適切な担体には、希釈液又は充填剤、殺菌液性媒体、及び各種の非毒性有機溶媒がある。該組成物を、粉末、液性懸濁液又は溶液、注射溶液、エリキシル、シロップなどのような形態で調剤することができ、医薬として許容できる配合物を提供するために、ヒト血清アルブミン、糖類（制限するものではないが、ヘパリン、又はヘパリンフラグメントのようなグルコソアミングリカンを含む。）又はアミノ酸、抗菌剤、及び保存剤などのような1種以上の安定剤を含んでいてもよい。どのような不活性担体であっても使用することが好ましい。例えば、生理食塩水又はリン酸緩衝生理食塩などであり、すなわち、本発明の方法において使用される因子が適當な溶解特性を有するようなすべての担体である。また、不活性化骨粉末、ヒドロキシアパタイト、又はフィブリンシーラントを使用して、本発明を実施することもできる。20

特定の担体、及び活性化合物と担体との割合を、タンパク質因子の溶解性及び化学的特性、投与の具体的様式、及び標準的医薬プラクティスにより決める。非経口的投与を行なうため、水性アルコール媒体、又はゴマ又はピーナツオイルに入れたこれらの因子の溶液、又は懸濁液、又は溶解性の医薬として許容し得る塩の水溶液を用いることができる。

本発明の方法を実施する投与管理は、改良が行なわれ、かつその後、症状を改善する最小有効水準が得られるまで、最大の治療的応答を保証するものである。投与量は、年齢、重症度、体重、及び患者の他の状態により変化し得るが、注射可能な形態で、体重を基準に、通常約0.1mg/kg～約500mg/kg、好ましくは1mg/kg～約250mg/kg、かつ最も好ましいのは約5mg/kg～約100mg/kgである。もちろん、このような投与量を分割して与えることもできる。投与の他の形態では、均等な又は調節した投与量を投与経路により与えることができる。30

次の実施例は、纖維芽細胞成長因子 - の単離、精製、及び生物学的活性の測定、骨の欠陥、損傷の病理学的状態の予防及び治療に用いる治療薬としての使用を記載したものであり、そのような明示の記載が無い限り、限定することを意図するものではない。

実施例 1

骨肉腫細胞及び骨芽細胞に関する纖維芽細胞成長因子の増殖効果のアッセイ

MG-63ヒト骨肉腫細胞及びMC3T3骨細胞に関する纖維芽細胞成長因子の増殖効果を、トリチウム化チミジンの細胞DNAへの取り込みを測定することにより評価した。

American Type Culture Collection (Rockville, MD) から入手したMG-63ヒト骨肉腫細胞を、胎児牛血清 (FBS) 10%を加えたイーグル最小必須培地 (EMEM) で培養した。Dr. T. Suda (昭和大学, 東京) から提供を受けたMC-3T3E1マウス骨芽細胞を、FBS10%を加えた改良型イーグル培地 (MEM) で培養した。すべての培養物を、37℃で、空気中にCO₂ 5%を含む湿潤環境中に維持した。

MG-63及びMC3T3細胞を、それぞれFBS10%を加えたEMEM又はMEMを用い、96穴プレート中に 5×10^3 細胞 / 100 μl / 穴となるように植えつけた。約18～24時間インキュベートした後40

、これらの細胞をリン酸緩衝食塩水200 μ l / 穴で洗浄し、無血清、BSA0.1%含有EMEM及びMEMを50 μ l / 穴、供給し、かつBSA0.1%を含むDMEM/F12で希釈した成長因子活性を活性を有する試料を50 μ l / 穴加えた。基線コントロール (BSA0.1%を含むDMEM/F12 50/50、50 μ l / 穴)、並びに陽性コントロール (FBS20%を含むDMEM/F12 50/50、50 μ l / 穴)を、試験試料と並行に各プレートで実施した。前記試料及びコントロールを加えた約44時間後、前記細胞を [メチル³H]チミジン1 μ Ci / 穴を4時間適用した。4時後、PHD細胞回収機 (Cambridge Technology, Watertown, MA) を用いて細胞を回収し、濾紙上ですすいだ。濾紙上に残った放射能活性を、液体シンチレーションカウンター (Beckman, Fullerton, CA) を用いて「cpm」として測定した。

各試料の増殖活性 (同様に実施する。)を、下記の式を用い、陽性コントロールによって生じる³Hチミジンの取り込みの刺激のパーセンテージとして、表現した。 10

(試料cpm - 基線コントロールcpm)

(陽性コントロールcpm - 基線コントロールcpm) $\times 100$

実施例 2

WISH細胞由来の生物学的に活性な延伸bFGFの精製

A インビボにおける腫瘍の成長

ヒト羊水腫瘍細胞 (2×10^7) を14匹の4週齢雄ヌードマウスの大腿部骨幹付近の後脚内に注射した。固体腫瘍を該動物から3~5週後に単離した。この時、放射線及び組織学的な評価により、新しい骨の成長の形跡が見られた。10匹のマウスにおいて、腫瘍が前記骨表面に密接に付着していた。新らしい骨の成長は、葉状構造というよりも、織物状構造により容易に認識され、腫瘍塊付近の骨膜の骨表面上に広がっていた。固体腫瘍を骨から除去し、続くタンパク質精製のために液体窒素内で急速に凍結した。量的組織形態測定のために、前記細胞 (1×10^7 細胞 / 0.2ml PBS) をヌードマウス (n=8) の頭蓋冠上の皮下に注射した。2週間後、該マウスを調べた。6匹で、腫瘍が骨表面に密接に付着していた。骨試料を調製する組織学的方法は、下記実施例3に記載したものである。これらのマウスの頭蓋冠上に広範囲の新しい骨形成が見られ (図1)、かつ頭蓋冠の骨の断面領域は 96 ± 37 (S.D.) %増加していた。 20

B. 伸長bFGFの単離及び精製

腫瘍保持マウスの大腿骨から単離した固体腫瘍組織25gを、液体窒素中で粉碎し、抽出緩衝液125ml中で、4、72時間攪拌することにより抽出した。該緩衝液は、10mM EDTA、50mM Tris-HCl (pH7.0)、1.5M NaCl、25mM benzamidine、ロイペプチド1 μ g/ml、アプロチニン1 μ g/ml、及び1mM PMSF (100%イソプロパノールに溶解)を含み、最終pHを7.0に調整したものである。72時間後、該抽出物を6000rpmで20分間、4で遠心分離した。その上清を除き、-70で凍結した。 30

最初の抽出から得た不溶性沈殿の二次抽出を、先に記載したのと同じ緩衝液中で、新しい抽出緩衝液を前記ペレットに加え、その混合物を4でさらに24時間、攪拌した。この時間経過後、該抽出物を6000rpmで20分間、4で遠心分離した。第一及び二次抽出から得た上清を合わせ、15,000gの高速で、1時間、4で遠心分離した。該上清を除き、10mM Tris-HCl、0.1M NaCl、pH7.0の溶液を用いて透析した。タンパク質濃縮物を、吸光度280及び260nmにより測定した。 40

4.8x30cmカラムにヘパリンSepharose CL-6Bを充填し、かつ0.1M NaCl、10mM Tris-HClを含む緩衝液 (pH7) を用いて平衡にした。最終的な抽出物 (ほぼ200ml) を前記カラムにかけた。該カラムを同じ緩衝液で洗浄し、0.4~3.0M NaClの直線的勾配により溶出した。12mlの画分を回収した。各画分の部分試料を、実施例1に記載したMG-63及びMC3T3増殖アッセイにより試験した。MG-63増殖活性を有する画分が1.5M NaClで溶出し、先に記載したのと同じ条件下でヘパリン-Sepharose上で再度クロマトグラフィーを行なった。MG-63増殖活性を有する画分が1.8M NaClで溶出した。これらの画分 (34-44) をプールし、0.05% CHAPSに調節し ((3-[(3-コルアミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパン-スルホネート、穏やかな双極性洗浄剤)、50mMリン酸ナトリウム (pH6.0)、0.05% CHAPS溶液 50

で透析した。該透析物を、50mMリン酸ナトリウム (pH6.0) 、0.05% CHAPSの溶液で、0から1.0M NaClの濃度勾配により、MonoS FPLCカラムでクロマトグラフィーにかけた。TFA. 0.8 mlずつの画分を集めた。MG-63陽性画分 (26~32) をプールし、C4又はC18 HPLCカラムに注入し、0.1% TFAの溶液で、7%~63%のアセトニトリルの濃度勾配により、クロマトグラフィーにかけた。生物学的な活性を測定するため、該物質10%をC18 RPHPLCカラムに入れ、かつその画分を中性化溶液に回収した。該中性溶液は24mM重炭酸アンモニウム (pH 8) 、0.1% BSA、ヘパリン, 2 μg/ml及びCHAPS0.01%を含むものである。

37%アセトニトリルで溶出するタンパク質に、SDS-PAGE (15%ゲル) を行い、かつニトロセルロース膜にトランスプロットした (0.45 μm, Schleicher & Schuell, Keene, NH)。オンラインModel 120A PTH分析機を備えたApplied Biosystems Model 477Aタンパク質配列決定装置を使用し、自動化エドマン分解により、アミノ酸配列を決定した。

WISH細胞から単離され、精製されたポリペプチドのアミノ酸配列は、同一ではないが、bFGFのアミノ酸配列と類似していた。この新規な配列は、塩基性FGFのこれまで未知であった伸長形態を規定するものであることが明らかになった。この伸長bFGFは、bFGFの公知の18kD形態のN-末端MAAGSIT (配列番号: 2) を延ばす付加的アミノ酸配列GSRPGAGT (配列番号: 1) を有するものである。

実施例 3

骨成長におけるポリペプチドの効果のインビオアッセイ

骨の成長に関するポリペプチド因子の効果を、各群当たり4~5匹の雄ICR Swiss白マウス (4~6週齢、体重13~26g) を使用して試験した。該ポリペプチド又はコントロールビヒクルを通常のマウスの右頭蓋冠上の皮下組織に注射した。試験した該ペプチドは、WISH腫瘍細胞から得た粗製抽出物であり、該抽出物は、実施例2記載のように単離したbFGFの伸長形態、塩基性FGF-1、酸性FGF-1を含むFGF-1を含んでいる。これらの試験タンパク質を、単独又はヘパリンとともに注射した。

他に特定しない限り、前記コントロールビヒクルは、BSA 1%を加えたPBSとした。ヘパリンは、1回あたり50単位 / mlで投与した。該動物は14日で殺処理し、組織形態測定により骨の成長を測定した。

計量用骨試料から近接組織を除去し、10%緩衝ホルマリンで24~48時間固定し、14%EDTAで1~3週間脱石灰し、グレード化アルコールを通して処理し、かつパラフィンワックスに包埋した。頭蓋冠及び大腿骨の3 μm切片を調製した。骨形成及び骨再吸収に関する、腫瘍、腫瘍抽出物又は、酸性又は塩基性FGFを含む纖維芽細胞成長因子の効果の組織形態測定評価を行なうために、典型的な切片を選択した。切片をカメラ明視アタッチメントを用いて測定し、デジタル化プレート上の顕微鏡像を直接記録した。骨の変化が、200 μm離して回収された各切片上に、4前後、1×1 mm領域が、頭蓋冠の注射された側、及び注射されない側の双方で測定された。新しい骨を、葉状構造よりもむしろ織物構造により特定し、かつ破骨細胞及び骨芽細胞を特徴的組織形態により特定した。組織形態測定ソフトウェアを使用し、デジタイザ入力を処理し、細胞計数を行い、特徴的領域又は外辺部を測定した。

通常、新しく形成された骨の石化が起こったか否を同定するために、また、動物にテトラサイクリンを二回投与 (25mg/kg i.p.) した後、頭蓋冠骨試料を用いた。テトラサイクリンを、活性な骨形成部位に加え、時間-組織マーカーとして機能させ、骨形成速度を計算し、石化を評価した。これらの骨試料を先に記載したように固定し、グレード化アルコールで処理し、非石化状態で、メタクリリートベースプラスチック中に埋包して保存した。切片を5 μm間隔で切断し、石化の程度及びテトラサイクリン取り込みを評価した。これらの実験の結果を実施例4に記載した。

実施例 4

骨の成長に関する纖維芽細胞成長因子の効果のインビオアッセイ

骨の成長に関するポリペプチド因子の効果を、各群当たり4~5匹の雄ICR Swiss白マウス (4~6週齢、体重13~26g) を使用して試験した。該ポリペプチド又はコントロールビヒクルを通常のマウスの右頭蓋冠上の皮下組織に注射した。試験した該ペプチドは、実

10

20

30

40

50

施例2に記載したようにWISH腫瘍細胞から得た伸長bFGF、全長(155残基)纖維芽細胞成長因子-1及び塩基性FGFであった。これらの試験タンパク質を、単独又はヘパリンとともに注射した。

一の実験において、前記コントロールビヒクルは、BSA1%を加えたPBSとした。ヘパリンは、1回あたり50単位/mlで投与した。表1は、(含まれる場合には、)3日間、一日4回下記のいずれかを注射した結果をまとめたものである。ビヒクル単独、ヘパリンを加えたビヒクル、IGF1 5μg、又はIGF2 5μg、aFGF¹¹ 1μgとヘパリン、WISH細胞の第1("WISH粗製物")及び第2("WISH一部精製、pp")の抽出物である。該動物は14日で殺処理し、組織形態測定により骨の成長を測定した。

1 本明細書中のaFGF又はFGF-1を使用する全ての実験では、前記タンパク質の154アミノ酸形態(またECGF- という。)を用いた。前記用語aFGF及びFGF-1は本明細書及び添付を通して相互に交換して使用できる。

表1b

	PBS +BSA n=5	PBS+ BSA+ ヘパリン n=5	IGF-1 5μg /注入 n=5	IGF-2 5μg /注入 n=5	aFGF+ ヘパリン 1μg /注入 n=5	WISH 粗製 n=5	WISH pp n=4
最大新生 骨幅 %	12.3 ±1. 8	14.4 ±4. .1	19.9 ±2. 6	17.4 ±1. .4	55.1 ±9.4. a	13.4 ±1. .5	13.7 ±1. .6
新生骨 (%総骨)	1.8±0. 5	2.6±0. 8	3.2±0. 6	3.3±0. 8	20.3±3.5 a	2.2±0. 6	2.9±0. 7
骨芽細胞 (%骨膜表面)	20.7±7. 0	25.3±4. 5	20.4±2. 1	30.2±1. 5	93.0±3.5 a	29.2±6. 9	34.3±6. 9
破骨細胞 /mm ² 骨領域	7.9±1. 8	6.4±2. 2	9.7±0. 9	8.8±1. 0	10.5±2.6	8.1±2. 8	8.5±2. 0
髄領域 (%総量)	6.8±2. 2	4.5±1. 7	6.0±1. 3	6.6±1. 6	4.9±1.2	6.4±1. 3	7.2±0. 9

a PBS+BSA+ヘパリンと比較した統計的有意差, p<0.001 (Bonferroni t-検定)

b 平均 ± S.E.として表わされたデータ

表1に示されているように、マウスの頭蓋冠上にヘパリンとともに注射したFGF-1は、新しい骨膜の骨形成を誘導することができた。この実験において、他の処置ではコントロールと関連して有為な新しい骨形成を生じさせなかった。ヘパリンなしで、注射されたWISH抽出物の増殖活性成分は、わずかFGF 10~100ngと同じであろう。処置されたグループのいずれにも、骨の再吸収が増加したという証拠はなかった。

骨の成長に関するFGFの効果及び骨の成長の刺激に関するヘパリンの効果をさらに試験するため、容量10μlとして、ヘパリン有り又は無しの双方で、FGF-1 1μg又はbFGF 1μgを、各処置群当たり5匹のICR Swiss白雄マウス(4~6週齢)に、頭蓋冠上に一日あたり4回、3日間投与した。コントロールビヒクルはPBSにBSA 0.1%加えたものとした。ヘパリンを、50単位/mlの量で投与した。デメクロサイクリン(25mg/kg)をIPで、4、8及び12日に与え、骨の形成速度を計算し、かつ石化を評価した。

10

20

30

40

50

該マウスを14日で殺処理し、頭蓋冠の後半部を処理し、パラフィンに埋包した。頭蓋冠の前半部、脛骨及び大腿部骨幹端及び腰椎骨を非石化の状態でプラスチックに包埋した。aFGF及びbFGFを受けるマウスは、頭蓋冠上部表面上に広く新しい骨の形成を示した。大腿部骨幹端又は腰椎骨に何の効果も検出されなかった。最近形成された新しい骨は表面層を形成している。それは、十分に石化され、デメクロサイクリンラベルの拡散吸収、典型的な織物状骨を示した。

表 2**

	総骨領域 (mm ²)	最大新生骨幅 (% 従前量.)	% 新生骨膜の骨	% 新生骨内膜の骨	骨芽細胞 (% 骨膜表面)	破骨細胞 /mm ² 骨領域	% 従前の骨における髄空間
PBS	0.76±.06	26± 3	3.6±0.5	0	33± 5	20.3± 3.3	7.1±2.1
PBS+ヘパリン	0.79±.02	26± 2	4.0±0.8	0	35±10	14.8± 6.2	6.6±1.6
aFGF	0.98±.05	62±10*	20.4±6.1*	3.9± 1.4	71.2±10	10.7± 1.6	4.25±1.0
aFGF+ヘパリン	1.04±.02	74± 5*	29.1±4.2*	1.3± 0.9	76.8± 9.7*	18.7± 3.6	8.27±2.0
bFGF	1.26±.06	122±20*	59.6± 9.3*	24.2± 6.3*	81.8±10	19.4± 2.2	2.97±1.0
bFGF+ヘパリン	1.12±.06	118±20*	46.9± 2.7*	1.1± 1.1	88.7± 4.3*	33.0± 4.4	5.62±2.2

** 平均Mean ± S.E.

*コントロールと比較した統計的に有為な差 p< 0.01

表2及び3は、aFGF及びbFGFの双方が、ヘパリンが有る場合も、無い場合も、新しい骨の形成を刺激し、骨芽細胞表面領域、骨膜の骨領域及び総骨領域を増加させることを示している。しかし、bFGFにより達成される頭蓋冠下の新しい骨の増加(%新しい骨内膜の骨)は、ヘパリンにより阻害される(図3)。

ヘパリンとともに与えた酸性FGF 1 μg/一注入による刺激に続く骨変化の時間経過を試験した。該実験計画は、8匹の動物にそれぞれの時点で注射したことを除き、前記のとおりである。4匹にはビヒクルを単独で、4匹にはFGF-1及びヘパリンを注射した。これらのマウスを、3, 7, 14, 21及び36日に殺処理し、骨の変化を、少なくとも200 μm離して少なくとも2種の水準で測定した。

10

20

30

40

表3

時間 (日)	総骨領域 (mm ²)	新生骨領域 %従前量	骨芽細胞 (% 骨膜表面)	増殖細胞幅 (μm)	骨芽細胞 /mm ² 骨領域
aFGF					
3	0.85±0.04	2.0±0.5	45±10	23.7±2.8a	18±3
7	1.06±0.06	13.2±2.9a	78±10	21.7±3.1a	12±3
14	1.16±0.03a	32.1±3.0a	92±4a	15.5±1.8a	25±6
21	1.40±0.07a	52.4±7.9a	90±4a	11.8±2.1	22±3
36	1.50±0.12a a	64.1±8.5	46±16	10.9±1.9	10±5
コントロール					
3	0.83±0.06	0.1±0.1	36±11	5.7±1.5	20±7
7	0.88±0.03	1.8±0.4	35±6	11±2.1	18±6
14	0.89±0.06	3.6±1.2	34±13	4.0±0.9	17±5
21	0.95±0.04	5.0±1.9	29±6	4.6±0.6	7±2
36	1.09±0.06	10.5±2.3	28±7	2.8±0.5	15±5

a コントロールからの統計的な差、 p < 0.01

表3から読み取ることができるように、FGF-1は、処置を3日間適用した後、21日間続く、骨形成の確認された刺激を生じさせた(図4)。最初の応答は、処置後わずか3日後に生じる、骨芽細胞の分化及びマトリックスの形成を伴う細胞増殖である。試験した時間のいずれにおいても、破骨細胞形成の増加を示す証拠はなかった。

また、ヘパリン(50単位/ml)の付与を伴う又は伴わないFGF-1又は塩基性FGFの0.5, 5.0, 50及び500ng/一注入による1日、4回の投与に続く、骨の変化の投与量応答を試験した。各処置群は、4匹のSwiss ICR白雄マウス(4~6週齢)を含む。7匹のビヒクル単独(PBS+0.1% BSA)及び7匹のビヒクル及びヘパリン投与して、この14匹をコントロールとして用いた。

前記マウスを14日で殺処理し、頭蓋冠を前記のように調製した。図6に示すように、酸性FGF及び塩基性FGFの双方が、ナノグラムの範囲でインビボで活性であったことが示されている。骨の応答は、単独で投与された場合、ヘパリンでは変わらないが、ヘパリンは頭蓋冠の非注射サイドにおいて、特にaFGF及びbFGFの双方の効果を増強した。

図2は、FGF-1及びbFGFの双方が、急速に石化的された上部骨膜表面上の新しい織物状の骨の広い形成を生じさせる。塩基性FGF-1は、注射されたサイドにおいて頭蓋冠の厚さを100%以上、最大限に増加させ、また頭蓋冠の下面に新しい骨の形成を誘導した。ヘパリンはaFGFの効果を向上させた。aFGF及びbFGFのいずれもが、骨の再吸収及び破骨細胞の数を増加させなかった。時間経過及び投与量応答の研究において、aFGF及びヘパリンは初期に活性はあるが、一時的な織維芽細胞応答を生じさせた。骨芽細胞増殖は3~21日目にかけて明らかであった。36日に、上部骨膜表面に並んだ骨芽細胞は正常に戻り、かつ最も後に形成された骨は明らかに葉状であった。該効果は、50ng/一注入で最大応答を有する、投与量依存性である。

実施例 5

卵巣切除ラットにおけるFGF-1の全身的投与のインビボ効果

卵巣切除ラットをヒト月経閉止後骨粗鬆症の動物モデルとして許容する。月経閉止の女性

10

20

30

40

50

において見られるものと類似するエストロゲン不足に関連する急性骨減損の動物モデルにおける、骨格組織に対するaFGFの全身的投与効果を評価するために、雌Sprague-Dawleyラット(250g)に偽手術又は外科的卵巣切除を行なった。手術後7日経過後、ラットにビヒクル(PBS), aFGF(0.2mg/kg i.v. 尾静脈)又はエストロゲン(160μg/kg s.c.)のいずれかを28日間投与した。終了前に、全てのラットにテトラサイクリン及びデメクロシリンを一回量投与し、骨形成及び石化を評価した。脛骨及び腰椎骨を取り出し、固定し、処理し、組織形態測定評価を行なうため脱石灰化及び非脱石灰化した。

海綿状骨領域(組織領域の%として表わす。)を、脛骨の骨幹端及び腰椎骨の脱石灰化切片を計量した。ビヒクル処置卵巣切除ラットと比較した場合、脛骨の二次海綿化の領域における骨の範囲は、偽手術され、ビヒクル又はaFGFを投与されたラット、及び卵巣切除され、FGF-1又はエストロゲンを投与されたラットでは、有為に増加した(図7)。海綿状骨領域における類似の、しかし有為ではない変化が、腰椎骨において観察された(図8)。これらのデータは、FGF-1がエストロゲン不足に伴う二次スponジ化における海綿状骨減損をブロックすることを示している。加えて、骨膜の骨形成が、FGF-1処置偽手術ラットにおいて増加した。

脛骨及び腰椎切片の量的評価により、aFGFを毎日投与することにより、腰椎、脛骨骨幹及び脛骨骨端において、新しい織物状骨形成を誘導することが明らかである。非脱石灰切片の評価は、aFGFが僅かしか石灰化されていない新しい骨を作り出すことを明らかにした。この石化の欠陥は、フッ素含有ガス麻酔に毎日さらされたことによる、フッ化物の蓄積の結果のようである。これは、これらのラットで観察された血清フッ化物の増加により支持されている(図9)。

FGF-1のサイクル投与に対する骨格の応答を測定するために、Sprague-Dawleyラット(250g)に偽手術又は外科的卵巣切除のいずれかを施し、手術から2月経過後にビヒクル又はFGF-1いずれかの投与を開始した。この処置を手術から2月後に開始したが、その理由は脛骨骨幹端における海綿状骨のほぼ50%が、この時間によるエストロゲン不足に応答して失われるからである。

ラットに、ビヒクル又はFGF-1のいずれかを注射により、無処置期間6日に続き3日間、毎日投与した(0.5mg/kg/日 i.v.)。この処置を3回繰り返した。ラットを28日目に殺処理した。該殺処理の前に、ラットにテトラサイクリン及びデメクロシクリンの一回量を投与した。脛骨、大腿骨及び腰椎骨を組織形態測定及び二重エネルギーX線吸光度分析を行なうために取り出した。

骨無機質密度(BMD)、骨量の評価をLunar DEXAを用いて測定した。BMDは、ビヒクルで処置した群と比べ、aFGFで処置したラットの脛骨骨幹端、腰椎骨及び大腿骨において増加していた。これらのデータは、FGF-1処置ラットにおける脛骨及び大腿骨骨幹端における組織形態測定分析により測定された海綿状骨面積の増加により確認された。量的評価は、FGF-1のサイクル全身投与が、長い骨幹(腰椎骨又は脛骨骨端ではない。)における織物状骨形成を誘導する。テトラサイクリンのラベリングの評価は、aFGFに対する応答で形成された新しい骨が普通に石化していることをしめしている。血清フッ化物をこれらのラットで評価した。これらのデータは、aFGFが、確立された、進行性骨減少症のモデルにおいて、骨量を維持し、かつ増加させることができることを示している。

実施例 6

加齢卵巣切除ラットにおける全身的なFGF-1投与の効果

確立された閉経後の骨粗鬆症は、海綿状及び皮質骨量、低骨転換率、及び腰椎海綿状骨の連結性の低下などで特徴付けられる疾患である。これらの変化に対するFGF-1の潜在的な効果を評価するため、FGF-1を全身的に28日間、加齢卵巣切除ラットに投与した。このラットは、確立された皮質及び海綿状骨減少症、低骨転換率、及び腰椎海綿状骨の連結性の低下の動物モデルである。8匹の10月齢の加齢し繁殖を終了したSprague-Dawleyラットに偽手術又は外科的な卵巣切除のいずれかを施した。手術後6月、ビヒクル又はFGF-1を卵巣切除ラットに投与した(0.2mg/kg/日 i.v.)。偽手術をしたラットにはビヒクルのみを与えた。全ての注射はイソフルラン麻酔のもとで行なった。各処置群のラットの半分は、

10

20

30

40

50

処置後28日で殺処理した。残りの半分は、処置を施すことなくさらに28日間生かし、FGF-1処置の長期の結果を調べた。殺処理する前に、すべてのラットに、骨における経時組織マーカーとしてカルセイングリーンを2回注射し、骨の形成速度を計算した。大腿骨、脛骨及び腰椎骨をDEXA及び組織形態測定分析を行なうために、実施例5に記載されているように分離した。生体機序分析を実施するために、単離された腰椎骨を材料試験装置において、一定の圧縮速度で圧縮し、破碎した。破碎を、負荷変形量曲線が、最大圧縮強度を達成した後に低下するポイントで行なった。

DEXA分析により、FGF-1処置が、28日で、大腿骨、脛骨及び腰椎骨に少量の、しかし十分な増加をもたらすことが明らかになった。長い骨において、この増加は、骨幹及び骨幹端において証明されるものであり、皮質及び海綿状骨の双方で増加を示す。腰椎海綿状骨の連結性は、FGF-1処置ラットで28及び58日で増加するようである。これらの変化は、FGF-1処置ラットから得た腰椎における腰椎圧縮強度の増加に現れるであろう。これらのデータは、FGF-1の全身投与が皮質及び海綿状骨の双方を増加させ、確立された閉経後骨減少症の動物モデルにおいて、腰椎海綿状骨連結性及び強度を増加させることを示している。

実施例 7

骨肉腫細胞におけるFGF-1の無システィン形態の増殖効果のアッセイ

FGF-1の類似体をシスティン残基3個をセリン残基と置き換えることにより調製した。MG-63ヒト骨肉腫に対する無システィンFGF-1類似体の増殖効果を、本質的に実施例1に記載したと同じ、細胞DNAへのトリチウム化チミジンの取り込みを測定することにより評価した。FGF-1の無システィン形態は、ヘパリンの存在下における野生型FGF-1と相関的に、MG 63細胞に関し増殖活性を強化した。また、ヘパリンなしの該類似体の活性は、野生型FGF-1の活性よりも著しく高いものであった。

実施例 8

骨の成長に対するFGF-1の無システィン形態の効果のインビオアッセイ

骨膜骨成長の刺激に関するFGF-1の無システィン形態の効果を、本質的に実施例3及び4に記載したように、マウスで行なった。野生型FGF-1及び無システィン類似体を、3種の異なる濃度で、マウスの頭蓋冠に関し試験した。1日に4回の皮下注射で、3日間、右骨膜骨上に投与し、該マウスを14日で殺処理した。その担体は、牛血清アルブミン0.1%を含むリン酸緩衝食塩水とした。野生型FGF-1に関連して、調製した無システィンFGF-1類似体は、頭蓋冠の上部骨膜表面上で、特に2000ng/日の投与量で、骨形成の刺激を増強した。同様に示された活性を得る域値ではあるが、前記無システィン類似体に対する応答強度は、実質的に、より高い投与量水準における野生型タンパク質よりも大きかった。

当業者は容易に本発明を評価し、本発明を適用してその対象を実施することができ、かつ前記目的及び利点、並びにその固有の特性を得ることができる。本明細書中に記載されているペプチド、抗体、方法、手順及び技術は、好ましい実施態様の代表例を提供した、すなわち例示を意図しており、本発明の範囲を制限することを意図するものではない。本発明の変更及び他の使用は、当業者が想到するものであり、それは本発明の精神の範囲内に含まれ、添付の請求の範囲の領域に規定されるものである。

配列表

配列番号1に関する情報

(i) 配列の記載の特徴：

(A) 配列の記載の長さ： 8アミノ酸

(B) 配列の記載の型： アミノ酸

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子型： ペプチド

(iii) 仮説： なし

(v) フラグメント配列の記載の型： N-末端

(xi) 配列の記載： 配列番号1

10

20

30

40

Gly Ser Arg Pro Gly Ala Gly Thr

1

5

配列番号2に関する情報

(i) 配列の記載の特徴：

(A) 配列の記載の長さ： 7アミノ酸

(B) 配列の記載の型： アミノ酸

(D) トポロジー： 直鎖状

(iii) 分子型： ペプチド

(iii) 仮説： なし

(v) フラグメント配列の記載の型： N-末端

(xi) 配列の記載： 配列番号2

Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr

1

5

10

【図1】



FIG. 1

【図2】

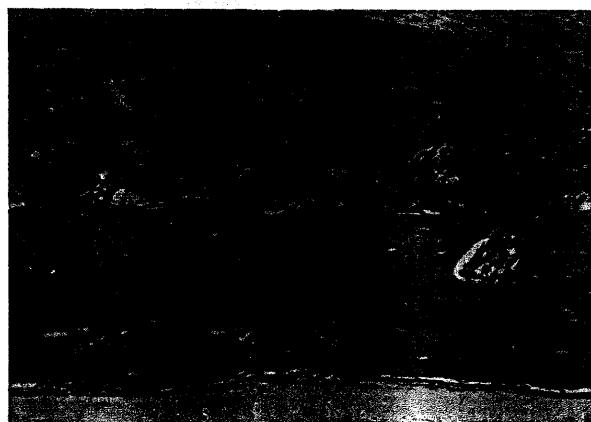


FIG. 2

【図3】

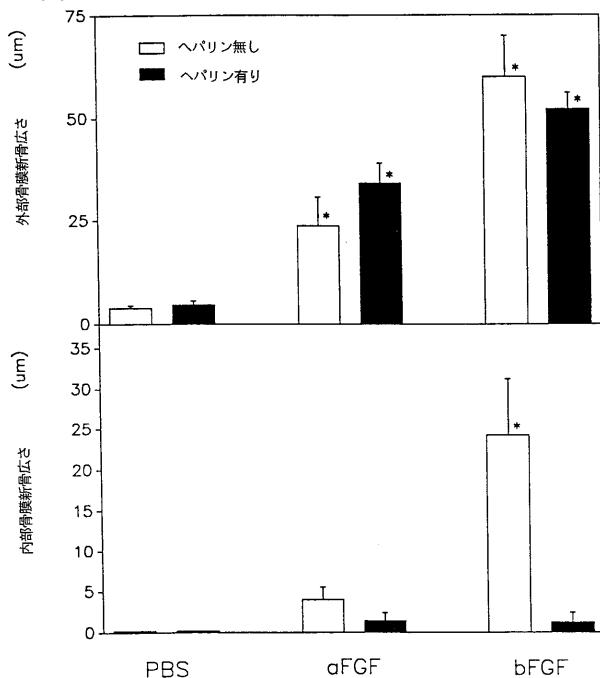


FIG. 3

【図4】

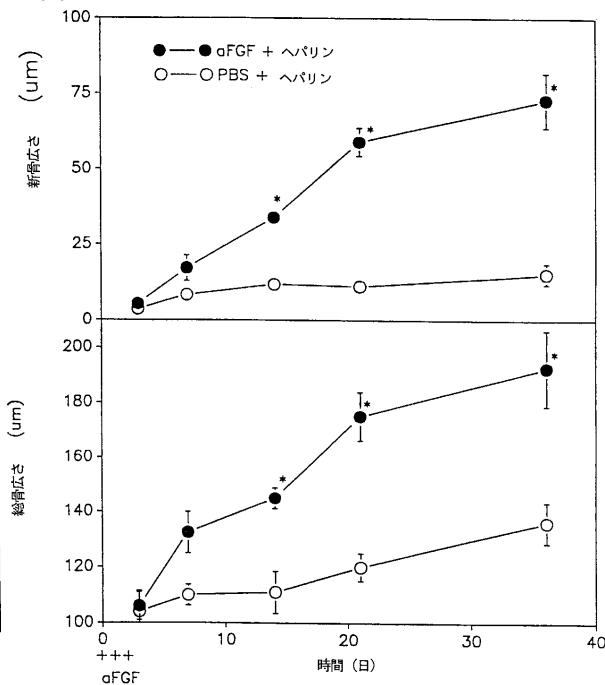


FIG. 4

【図5】

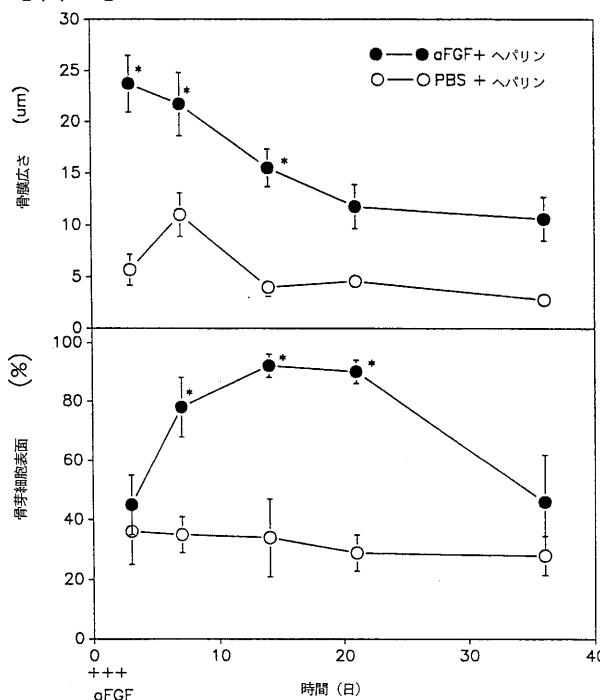


FIG. 5

【図6】

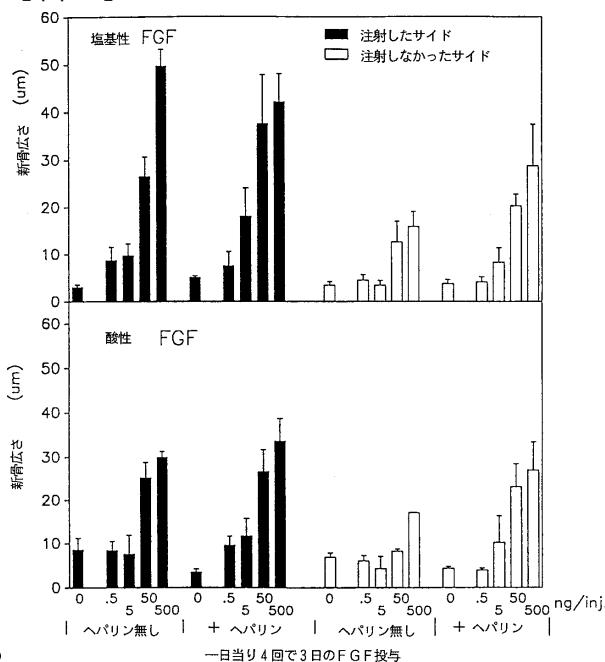


FIG. 6

【図 7】

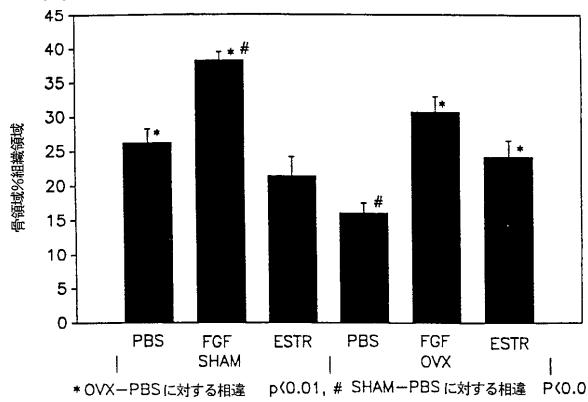


FIG. 7

【図 9】

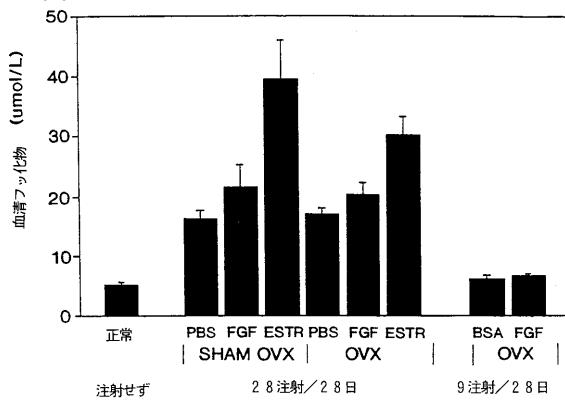


FIG. 9

【図 10】

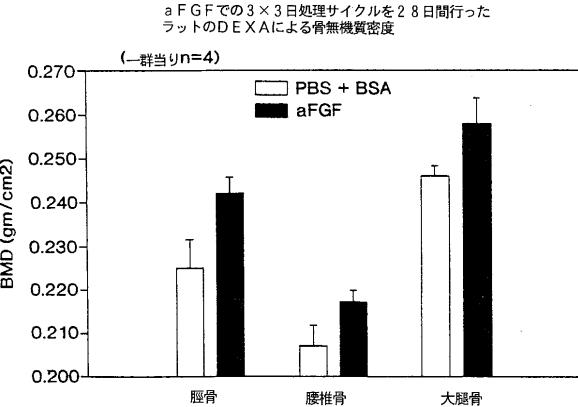


FIG. 10

【図 8】

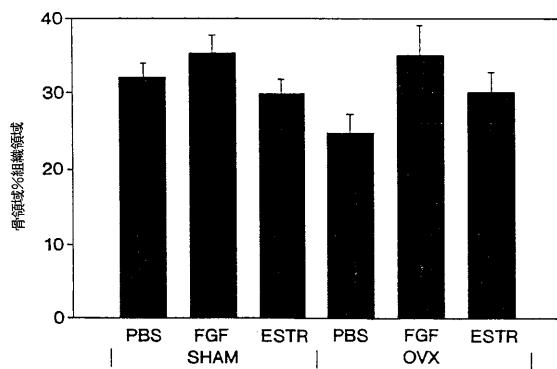


FIG. 8

【図 11】

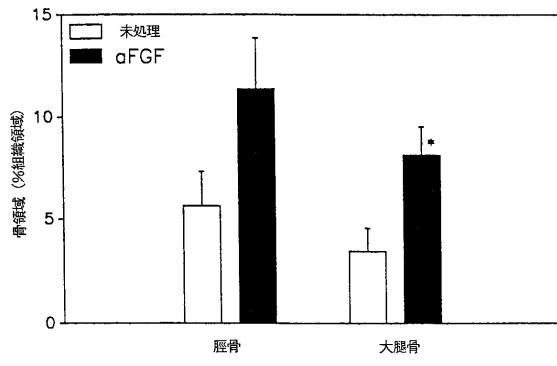


FIG. 11

【図 12】

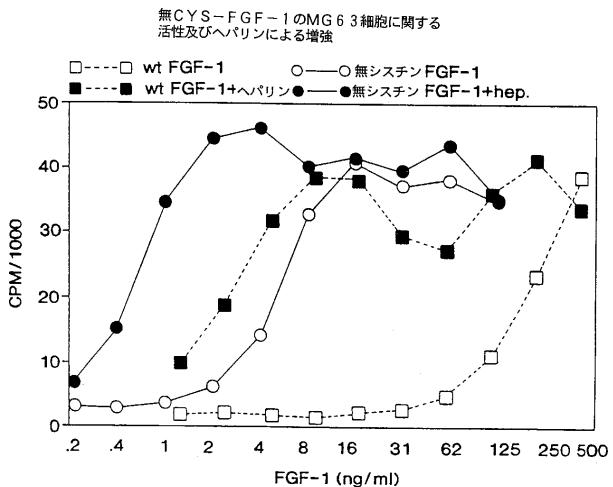


FIG. 12

【図 1 3】

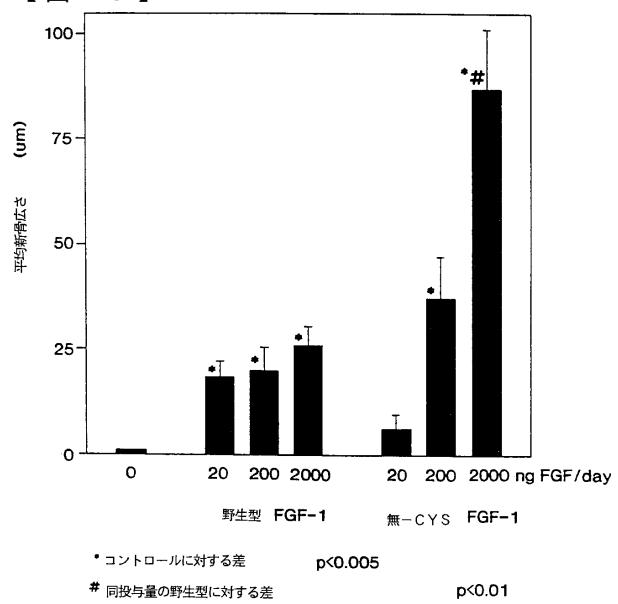


FIG. 13

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 07K 14/50 (2006.01) A 61P 43/00 107
C 07K 14/50

(74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
(72)発明者 ダンスタン コリン アール
アメリカ合衆国 テキサス州 78240 サン アントニオ ターリー ゲート 6359
(72)発明者 イズビッカー エリズビータ
アメリカ合衆国 テキサス州 78240 サン アントニオ アップル グリーン 7738
(72)発明者 マンディー グレゴリー
アメリカ合衆国 テキサス州 78230 サン アントニオ モーガンズ クリーク 3719
(72)発明者 バージェス ウィルソン
アメリカ合衆国 メリーランド州 20877 ゲイザーズバーグ シダー アベニュー 13
(72)発明者 ジェイエ マイケル シー
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19038 グレンサイド ノース リンウッド アベニュー
- 142

合議体

審判長 星野 紹英
審判官 上條 のぶよ
審判官 大久保 元浩

(56)参考文献 特開平5-124975 (JP, A)
特開平2-484 (JP, A)
特開平5-132426 (JP, A)
特開平4-5227 (JP, A)
特開平4-246359 (JP, A)
特表平6-503358 (JP, A)
特表平7-500741 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A61K38/22, A61K47/36, A61P19/00
CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN)