

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-519234
(P2010-519234A)

(43) 公表日 平成22年6月3日(2010.6.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4C085
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4H045
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-550243 (P2009-550243)
 (86) (22) 出願日 平成20年2月21日 (2008.2.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年10月13日 (2009.10.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/001369
 (87) 国際公開番号 W02008/101700
 (87) 国際公開日 平成20年8月28日 (2008.8.28)
 (31) 優先権主張番号 102007010306.0
 (32) 優先日 平成19年2月22日 (2007.2.22)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 505468059
 エバーハルト・カールス・ユニバーシタット
 テュービンゲン ユニバーシタットス
 クリニックム
 ドイツ国 72076 テュービンゲン
 ガイスヴェーク 3
 (74) 代理人 100077012
 弁理士 岩谷 龍
 (72) 発明者 ランガー, ハラルト
 ドイツ国 72074 テュービンゲン,
 ドルフシュトラーセ 8
 (72) 発明者 ガヴァッツ, マイクラト
 ドイツ国 72076 テュービンゲン,
 ヴァルトハウザーシュトラーセ 76

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療・診断効果を有する二重特異性融合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、コラーゲンに結合する第1のポリペプチドと、内皮前駆細胞に結合する第2のポリペプチドとを含む二重特異性融合タンパク質に関する。本発明はまた、血管および/または組織の病変を治療するための医薬組成物を製造するための二重特異性融合タンパク質の使用に関する。

【選択図】 なし

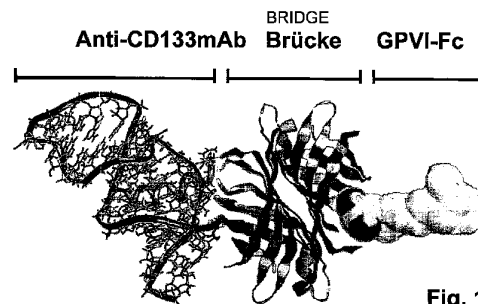


Fig. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) コラーゲンに結合する第 1 のポリペプチドと、
(b) 内皮前駆細胞に結合する第 2 のポリペプチドと
を含む二重特異性融合タンパク質。

【請求項 2】

第 1 のポリペプチドが、コラーゲン抗体、コラーゲン受容体、およびそれらの機能断片を含む群から選ばれるペプチドを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

コラーゲン受容体が、血小板の糖タンパク質 V I (G P V I)、ジスコイジン領域受容体 1 (D D R - 1)、ジスコイジン領域受容体 2 (D D R - 2) およびそれらの機能断片を含む群から選ばれることを特徴とする、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

第 1 のポリペプチドが、二量化ポリペプチドと結合した、G P V I の細胞外部分、D D R - 1 の細胞外部分、D D R - 2 の細胞外部分、またはそれらの機能断片を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

二量化ポリペプチドが、免疫グロブリンの F c 領域、または F c 領域の二量化機能を有するその断片もしくは変異体を有することを特徴とする、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

第 1 のポリペプチドが添付の配列表における配列番号 3、5 または 7 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

第 2 のポリペプチドが抗原 C D 1 3 3 に結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

第 2 のポリペプチドが C D 1 3 3 に対する抗体またはその機能断片であることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の融合タンパク質を含み、医薬的に許容される少なくとも 1 種の担体を含んでもよく、さらに医薬的かつ / または診断的活性物質を含んでもよい、医薬用かつ / または診断用組成物。

【請求項 11】

コラーゲンが露出している組織および血管の病変を治療するための医薬用かつ / または診断用組成物を調製するための、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の融合タンパク質の使用。

【請求項 12】

血管病変の内皮再生のための、請求項 11 に記載の融合タンパク質の使用。

【請求項 13】

血管および / または組織が、冠血管、脳への供給血管、四肢への供給血管、結合組織、骨、およびコラーゲンを含有する任意の血管または組織を含む群から選ばれることを特徴とする、請求項 11 または 12 に記載の融合タンパク質の使用。

【請求項 14】

組成物がバルーン付きカテーテルによる投与のために調製されることを特徴とする、請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の使用。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

融合タンパク質の調製プロセスであって、

- (a) (i) 可溶性糖タンパク質 V I (G P V I)、可溶性ジスコイジン領域受容体 1 (D D R - 1) および可溶性ジスコイジン領域受容体 2 (D D R - 2) を含む群より選ばれたポリペプチドおよび (i i) C D 1 3 3 に対する抗体を準備するステップと、
 - (b) 架橋剤を用いて G P V I、D D R - 1 または D D R - 2 のアミノ基および抗体のアミノ基を修飾するステップと、
 - (c) G P V I、D D R - 1 または D D R - 2 を還元するステップと、
 - (d) 還元した G P V I、D D R - 1 または D D R - 2 とステップ (b) で修飾した抗体とを結合させるステップと
- を含む融合タンパク質の調製プロセス。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血管または組織の病変を治療/診断するための、治療効果および診断効果を有する二重特異性融合タンパク質に関する。本発明はさらに、前記融合タンパク質をコードする核酸分子、前記融合タンパク質または核酸分子を含む医薬用かつ診断用組成物、血管/組織の病変を治療するための医薬組成物を調製するための前記融合タンパク質または核酸分子の使用、ならびに急性または慢性の血管疾患を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

心臓血管系の血管の損傷は、特に血管内へのステントすなわちステントグラフト移植の結果として生じる。このようなステントグラフトは、他の疾患または事象により影響を受けた血管内へ、周囲組織や器官への血液の供給を確保する目的で挿入するものである。

20

【0003】

生理学的状態では、血液は閉鎖系である血管内を循環し、血流の停止や周囲組織への出血は見られない。言うまでもないが、血管壁が損傷すると血管壁の完全性が失われ、続いて周囲組織への出血が起こる。これを防ぐために、血小板と可溶性血漿成分とが結合し、損傷を封じて出血を止める効果のある止血用の血栓を形成する。血管に病変が生じると、止血に必要な様々な細胞機序および生化学的機序が直ちに動き出す。内皮もまた、血漿リポタンパクの浸透性、白血球の接着、ならびに血栓形成促進/阻害因子および血管刺激物質の分泌を調節することによって、動脈の止血において中心的な役割を果たす。

30

【0004】

内皮は、血栓が形成される内皮下層から血流を隔てる単層の血管内膜を形成している。血管壁の内皮が損傷し、内皮下マトリックスが露出した場合、止血の過程において、循環している血液中の潜在血小板が、露出したコラーゲンに接着する。この初期接着プロセスは血小板の細胞膜糖タンパク質受容体であるインテグリンによって制御され、接着の結果、血小板は形が変化し、活性化され、貯蔵顆粒から成分が放出される。このプロセスで、血小板の糖タンパク質 V I (G P V I) が露出したコラーゲンと直接的に相互作用し、結合を安定させる。G P V I は、最も重要なコラーゲン受容体として、コラーゲンとのより強固な直接結合を媒介するだけでなく、接着に必要な他の受容体の活性化を媒介する。血小板が接着した後、止血の次のステップである凝集が起こり、さらに血小板が蓄積して血栓をもたらす。

40

【0005】

したがって、糖タンパク質 V I (G P V I) は、血小板表面に存在するコラーゲン受容体として血小板の活性化に決定的な役割を果たすが、同時に心筋梗塞の危険因子でもある。G P V I を持たない血小板は、コラーゲンに接着せず、活性化能力や凝集力は顕著に低減される。

【0006】

このような血栓の発生により、組織への血液供給はもはや保証されず、その結果、血栓より末梢部に位置する組織で虚血状態が生じることがある。

50

【 0 0 0 7 】

狭心症、心筋梗塞等の心血管疾患は、現在でも世界の死因の約3分の1を占めている。これらの疾患では、虚血の影響を受けた冠状動脈の迅速な再かん流が、心筋の損傷を防ぐために極めて重要である。

【 0 0 0 8 】

冠状動脈中の血流が減少すると、筋細胞に不可逆的な損傷が生じ、それによって心筋の機能代謝が停止し、その結果ついには壊死およびアポトーシスにより細胞破壊が起こる。

【 0 0 0 9 】

上述したように、経皮経管血管形成とステント移植とを組み合わせたものが、正常な冠循環の再建または治療を目的として、現在行われている。ステント移植の後、血管内の自由な血流が事実上再び確保されるが、生理学的条件において循環する血球と内皮下マトリックスとの間で障壁の役割を果たしている血管内皮は、損傷したままである。したがって、血小板の接着とそれに続く血栓形成、およびその結果として起こる急性心筋梗塞は、ステント移植後の主な合併症と言える。

10

【 0 0 1 0 】

血管の閉塞により虚血状態にあった領域の再かん流では、酸素を豊富に含んだ血液が供給される。その結果、細胞損傷が制限される一方、このプロセスは心筋の持続的な損傷に関係している。経皮経管冠状動脈形成、冠状動脈ステント移植、レーザーアブレーション血管形成等の介入療法または血栓溶解、繊維素溶解等の薬剤を用いた抗血栓療法が、心筋梗塞の急性治療として現在行われている。いずれの治療法も目的は同じであり、閉塞した血管をできるだけ早く再び開通させ、虚血組織の強制再かん流を目指すものである。

20

【 0 0 1 1 】

現在、移植後徐々に放出される薬剤をコートしたステントも使用されており、放出される薬剤によって治療する血管の内皮再生が遅れることから、ステント血栓症はこの方法における極めて重大な合併症である。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 2 】

したがって、本発明の目的は、動脈硬化のプラークびらんを予防するために内皮の完全性を維持する新規な薬剤を提供し、従来技術の短所を克服することである。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

本発明によれば、この目的は、(a) コラーゲンに結合する第1のポリペプチドと、(b) 内皮前駆細胞に結合する第2のポリペプチドを含む二重特異性融合タンパク質によって達成される。

【 0 0 1 4 】

このようにして、発明の基をなす目的は完全に達成される。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 5 】

本発明において、「融合タンパク質」は、従来技術において知られた分子生物学的または化学的プロセスによって *in vitro* でも *in vivo* でも調製できるハイブリッドタンパク質または人工タンパク質を意味するものと理解される。

40

【 0 0 1 6 】

前駆細胞は、一般に成体幹細胞から派生したものであり、再生能力については幹細胞の特性を持つ一方、他方では将来の機能領域に固定されているが、この「固定」はまだ可逆的なものである。また、血液中で循環している、内皮細胞へ分化する能力を持った細胞は、「内皮前駆細胞」と呼ばれる。このような内皮前駆細胞は特殊な細胞表面タンパク質を有しており、その細胞表面タンパク質に結合するポリペプチドによって捕捉される。

【 0 0 1 7 】

本明細書で、「ポリペプチド」は、少なくとも2つのアミノ酸がつながってできた任意

50

の鎖を意味するものと理解される。また、「ポリペプチド」は、ポリペプチドと同様にいくつものアミノ酸がつながってできたタンパク質も含む。安定した形状の完全な分子のみを「タンパク質」と呼ぶ場合もあり、この場合「ポリペプチド」や「ペプチド」は、安定した3次元構造を持たないより短いアミノ酸鎖を意味するものとして理解される。しかしながら、これらの用語間で明確な境界を引くことはできないため、本明細書では、「ポリペプチド」は、上述の定義によりタンパク質をも含むことを明示しておきたい。

【0018】

したがって、融合タンパク質は、たとえば1種以上の化学試薬または遺伝子組換え技術によってポリペプチドを2つ（またはそれ以上）連結することによって調製できる。一方、本発明の融合タンパク質をコードする慣用の発現ベクターの使用により、該融合タンパク質を生成できる。これらの発現ベクターは適切な細胞へ導入され、次いで融合タンパク質が生成される。

10

【0019】

本願発明者らは、本発明の融合タンパク質を用いて、露出したコラーゲンの表面にCD34⁺幹細胞を補充できることを、自らの研究で実証できた。さらにまた、本願発明者らは、露出したコラーゲンに幹細胞を補充することによって、幹細胞が一定期間後には成熟内皮細胞へと成熟し、損傷した組織に内皮再生をもたらすことが可能であることを実証した。

【0020】

したがって、本発明の融合タンパク質を用いれば、損傷した血管、または損傷もしくは他の影響によって表面にコラーゲンを放出または露出している任意の組織において、幹細胞とのコロニー形成およびその内皮細胞への成熟を利用した治療により、内皮再生および修復を行うことができる。その結果、ステント移植や化学物質による、血管を損傷する反応を防いだり、あるいはそのような反応が生じた後、それらを成功裡に治療することが可能となる。

20

【0021】

現在約27種類のコラーゲンが知られている。コラーゲンは体内のタンパク質総重量の4分の1を占め、割合としてはタンパク質中で最も多い。コラーゲンはそれぞれ、互いにしっかりと巻きついた3本の同一または異なるアルファ鎖から構成される。

【0022】

内皮前駆細胞は骨髄由来の細胞であり、血管の修復および止血への関与が明らかな大型の非白血球細胞集団として循環している。本発明の二重特異性コンストラクトを使用し、流動条件下で、損傷したヒト組織へ幹細胞を補充することができた。

30

【0023】

融合タンパク質の利点はさらに、たとえばバルーン付きカテーテルを使用して直接投与することができること、あるいは幹細胞の投与前に幹細胞集団と共培養できることであり、すなわち冠動脈ステントの困難かつ高価なコーティングを必要としないことである。したがって、本発明の融合タンパク質は、損傷した血管の病変に幹細胞を補充するための極めて有効なツールであり、したがって、動脈硬化性疾患を治療するための有効な治療概念を示すものである。

40

【0024】

一実施形態において、コラーゲン結合性の第1のポリペプチドは、コラーゲン抗体、コラーゲン受容体、およびそれらの機能断片を含む群から選ばれることが好ましい。とりわけコラーゲン受容体は、血小板の糖タンパク質V_I (GPVI)、ジスコイジン領域受容体1 (DDR-1)、ジスコイジン領域受容体2 (DDR-2) およびそれらの機能断片を含む群から選ばれることが好ましい。

【0025】

上述したように、受容体GPVIは、血小板における最も重要なコラーゲン受容体である。GPVIは、血小板の凝集、分泌、形状変化および活性化を可能にする。ヒトGPVIは、20個のアミノ酸からなるシグナル配列、247個のアミノ酸からなる細胞外領域

50

、21アミノ酸長の膜貫通領域、および51アミノ酸長の細胞質尾部を含む。

【0026】

ジスコイジン領域受容体1(DDR-1)および2(DDR-2)は、チロシンキナーゼ受容体であり、受容体細胞外領域のジスコイジン領域が特徴である。ジスコイジン領域受容体は、細胞外のジスコイジン領域、膜貫通領域、長い膜近傍領域および細胞内のキナーゼ領域から構成される。これらとコラーゲンとの結合については、従来技術(たとえば、Vogel et al. "The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen", Mol. Cell (1997) 1:13-23参照)に記載されている。DDR-1は913個のアミノ酸を含み、うち細胞外領域には19~416位のアミノ酸が含まれる。DDR-2は855個のアミノ酸を含み、22~399位のアミノ酸が細胞外領域を構成している。

10

【0027】

本発明の融合タンパク質は、露出したコラーゲンに対し、前記第1のポリペプチドである前記受容体または受容体断片を介して結合する。内皮前駆細胞すなわち特殊な幹細胞は、前記融合タンパク質に含まれる前記第2のポリペプチドを介して、露出したコラーゲンに補充される。具体的には、内皮前駆細胞が、自体の有するCD133等の特殊な表面抗原を介して、該抗原を認識する融合タンパク質のポリペプチドと結合することにより補充される。このように補充された幹細胞は、一定の培養期間後には内皮細胞へと成熟するため、損傷した組織が再生される。その結果、コラーゲンの露出はなくなり、血小板も接着しなくなる。

20

【0028】

一実施形態において、第1のポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域と結合した、GPVIの細胞外部分、DDR-1の細胞外部分、DDR-2の細胞外部分、またはそれらの機能断片を有することが好ましい。

【0029】

ここで、たとえば従来技術として開示されている可溶性GPVIを使用できることが利点として挙げられる。このような可溶性ヒトGPVIの調製については、Massberg et al. "Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo", FASEB J. 2004; 18: 397-399に明確に記載されており、これを参照されたい。可溶性GPVIは、免疫グロブリンFc領域と結合した二量体形のみ、コラーゲンに対する親和性を示す。この可溶性GPVIを作製するために、ヒトGPVIの細胞外部分をクローニングし、ヒト免疫グロブリンFc領域と結合させた。このGPVI-Fcタンパク質(以下可溶性GPVI-Fcと呼ぶ)は、たとえばアデノウイルスを用いることにより、ヒトHeLa細胞株で発現させることができる。この可溶性GPVI-Fcを用いて、in vitroおよびin vivoでコラーゲンへの接着を実証することができた。

30

【0030】

本発明の融合タンパク質の機能を実現するために、可溶性GPVIの完全なアミノ酸配列すなわち可溶性GPVIと同一のアミノ酸配列を用いる必要がないことは、当業者には言うまでもないことである。本発明の融合タンパク質は、その第1のポリペプチドが可溶性GPVIの一部または配列変異体を有し、該一部または配列変異体が減弱していてもGPVIの結合機能を維持していれば、その機能を果たす。周知のように、タンパク質構成アミノ酸は、4つのクラスすなわち極性アミノ酸、非極性アミノ酸、酸性アミノ酸および塩基性アミノ酸に分類される。ある極性アミノ酸と別の極性アミノ酸、たとえばグリシンとセリンとを交換しても、一般に、対応するタンパク質の生物活性には変化がまったくないか、あったとしてもごくわずかの変化にすぎない。したがって、このようなアミノ酸交換が生じてても、本発明の融合タンパク質の機能の大部分は影響を受けない。こうした背景

40

50

の下、本発明はさらに、第1のポリペプチドとして、前記アミノ酸クラスのうち1つに属する1つ以上のアミノ酸が同じクラスに属する別のアミノ酸と交換されている、可溶性GPVIの変異体である融合タンパク質をも包含する。これに関連して、このような配列変異体は、可溶性GPVIのアミノ酸配列と約70%、より好ましくは約80%、最も好ましくは約90~95%程度の相同性を有することが好ましい。

【0031】

「Fc」は「結晶性断片」を意味する。この断片は、IgG分子をパイン消化することにより、2つのFab断片とともに得られる。Fc領域は、対になったCH2領域およびCH3領域から構成され、ヒンジ領域を含み、また二量化機能に關与する免疫グロブリン部分を含む。市販品によるヒトFc-DNAまたはマウスFc-DNA、すなわち市販のcDNAライブラリからPCRによって単離されるか、または既にプラスミド内でクローニングされた形で市販されている(たとえばInvitrogen, San Diego, USAから入手可能)ものが、本発明において好ましく使用できる。

10

【0032】

該Fc領域の断片または変異体も、場合によって減弱していても抗体の二量化機能を有している限り、本発明の第1のポリペプチドの機能を損うことなく使用できることは言うまでもない(Fcの断片または変異体にも同様に適用可能な、上記GPVIの断片または変異体に関する説明を参照のこと)。

【0033】

これに関連して、補体結合領域およびFc受容体結合領域が変異し、免疫系の活性化が大幅に低減されるかまたはまったく起こらないようなFc領域の変異体または合成されたFc断片が、好ましく用いられる。したがって、標的突然変異誘発によりたとえば331位のプロリンがセリンと交換され、234~237位のテトラペプチドLeu-Leu-Gly-GlyがAla-Ala-Ala-Alaと交換されているFcフラグメントを用いることができる。

20

【0034】

また別の実施形態では、第1のポリペプチドが添付の配列表における配列番号3、5または7のアミノ酸配列を有することが好ましい。

【0035】

配列番号3のアミノ酸配列はヒトGPVIの細胞外領域を表し、その全配列は配列番号1に再現されている。

30

【0036】

配列番号5のアミノ酸配列はヒトDDR-1の細胞外領域を表し、その全配列は配列番号4に再現されている。また、配列番号6のアミノ酸配列は、DDR-2配列を表し、その細胞外領域は配列番号7に示されている。

【0037】

これに関連して、融合タンパク質は、添付の配列表における配列番号2のヌクレオチド配列を有する核酸分子部分にコードされる第1のポリペプチドを含んでもよい。

【0038】

配列番号2のヌクレオチド配列は、ヒトGPVIをコードするヌクレオチド配列を表す。

40

【0039】

配列番号2のヌクレオチド配列のみならず、遺伝暗号の縮重により、同じポリペプチドをコードする変異体もまたコラーゲン受容体の細胞外領域の調製に適していることは、言うまでもない。可能なコドン数がアミノ酸数より大きいために、このような遺伝暗号の縮重が起こることが知られている。ほとんどのアミノ酸には1つを超えるコドンがあり、たとえばアルギニン、ロイシンおよびセリンは最大6つのコドンによってコードされる。通常、3番目のコドンは、部分的にまたは完全に交換できる。こうした背景の下、遺伝暗号の縮重により、添付の配列表における配列番号2のヌクレオチド配列とは個々のヌクレオチドは異なるものの同様にGPVIおよびDDR-1またはDDR-2の細胞外領域をコ

50

ードする核酸分子にコードされる第1のポリペプチドを含む融合タンパク質が提供される。このような変異体は、配列番号2のヌクレオチド配列と約70%、より好ましくは約80%、最も好ましくは約90~95%の相同性を有することが好ましい。

【0040】

また別の実施形態では、第2のポリペプチドがCD133に対する抗体またはその機能断片であることが好ましい。

【0041】

抗原CD133は、造血幹細胞、内皮前駆幹細胞、および一部の上皮細胞上で発現する。したがって、該抗原はこれらの幹細胞のマーカーであり、これについては従来技術（たとえばYin et al. "CD133: A novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells", Blood (1997) 90:5002-5012を参照）に十分に記載されている。したがって、この抗原を認識する抗体を介して、すなわち融合タンパク質の第2のポリペプチドへの結合により、この抗原を含む幹細胞もまた、コラーゲンに補充できる。

10

【0042】

したがって、たとえば抗CD133抗体またはその機能断片を用いることが可能であり、これらはたとえばMiltenyi Biotech社（ドイツ・Bergisch Gladbach）製の抗CD133抗体（クローンW6B3C1）またはAbcam社（英国・ケンブリッジ）製のCD133抗体等のように、現在市販されている。

20

【0043】

抗体W6B3C1は、網膜芽細胞腫細胞株WERI-RB-1を用いてマウスに免疫付与することにより得られた。

【0044】

本発明の目的においては、CD133に対する任意の抗体またはその機能断片を使用できることは言うまでもない。適切な抗原を使用することによって、当技術分野における従来技術（たとえばハイブリドーマ技術、KohlerおよびMilsteinによる "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature (1975) 256:495-7参照）を使用して、さらなる新規な抗CD133抗体を作製することができる。

30

【0045】

本発明において、抗体の「機能断片」は、由来元である抗体全体と同じ機能すなわち結合特異性を有する任意の抗体部分を意味する。

【0046】

従来技術で既知のマウス抗CD133抗体から、このヒト化抗体をまず得て、これを用いて融合コンストラクトを調製できることは言うまでもない。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子の超可変領域（CDR: complementarity-determining region（相補性決定領域））配列とマウス免疫グロブリン遺伝子のCDR配列とが交換されている組換え抗体である。マウスモノクローナル抗体の抗原特異性は、このヒト化によってヒト抗体に伝達される。このようにして、受容生物内でこれらの分子に対する完全な耐性が生じ、結果として、ヒト抗マウス抗体反応が回避される。このような抗体はキメラ抗体とも呼ばれる。

40

【0047】

別の実施形態において、第1のポリペプチドを第2のポリペプチドに連結するさらなるペプチド要素が、融合タンパク質内で提供される。この方法により、この2つのポリペプチドを架橋またはリンカーによっても連結することができ、それぞれのポリペプチドの機能性すなわち各々の結合部位の認識特異性も同時に保持される。

【0048】

本発明はさらに、請求項1~6のいずれかに記載の融合タンパク質を含み、医薬的に許

50

容される少なくとも1種の担体を含んでもよく、さらに医薬的かつ/または診断的活性物質を含んでもよい、医薬用かつ/または診断用組成物に関する。

【0049】

さらに添加剤を含んでもよい、診断的かつ医薬的に許容される担体は、従来技術において公知であり、たとえばKibbe A.による“Handbook of Pharmaceutical Excipients” Third Edition, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press 2000に記載されている。本発明によれば、添加剤は、診断または治療における本発明の組成物の使用に好ましい任意の化合物または組成物を含み、塩、結合剤、およびその他製剤に通常使用される物質がこれに該当する。

10

【0050】

本発明はさらに、血管の病変を治療するための医薬用かつ/または診断用組成物を調製するための前記融合タンパク質の使用に関し、該血管および/または組織は、冠血管、脳への供給血管、四肢への供給血管、結合組織、骨、およびコラーゲンを含有する任意の血管または組織を含む群から選ばれる。

【0051】

本発明によって調製され、本発明による融合タンパク質を含む組成物は、血管または組織の病変によって引き起こされる疾患（病変のために血栓を形成する内皮下層が露出し、血栓形成に至る可能性のある）を治療するための極めて有効なツールを提供する。

【0052】

これに関連して、一実施形態では、本発明の組成物がバルーン付きカテーテルによる投与のために調製されることが好ましい。

20

【0053】

あるいは、該組成物または融合タンパク質が、幹細胞の投与前に該細胞と共培養されることが好ましい。

【0054】

これは、冠状動脈のステントに困難かつ高価なコーティングを施すプロセスが回避されるという利点を有する。

【0055】

本発明はさらに、融合タンパク質の調製プロセスであって、(a)可溶性糖タンパク質VI(GPVI)およびCD133に対する抗体を準備するステップと、(b)架橋剤を用いてGPVIおよび抗体のアミノ基を修飾するステップと、(c)GPVIを還元するステップと、(d)還元したGPVIとステップ(b)で修飾した抗体とを結合させるステップとを含む融合タンパク質の調製プロセスに関する。

30

【0056】

具体的には、本発明の調製プロセスにおける架橋剤は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオン酸エステル(SPDP)であることが好ましい。

【0057】

あるいは、従来技術において公知である他の任意の架橋剤または結合プロセス、たとえばチオエーテル架橋剤または組換えDNA技術による結合を用いることもできる。

40

【0058】

本発明による調製プロセスは、診断/治療の目的または使用に適した融合タンパク質を提供できる。

【0059】

上述した特徴および以下で具体的に説明する特徴が、個々に挙げた特定の組合せだけでなく、本発明の状況から逸脱することなく他の組合せまたは単独で使用できることは言うまでもない。

【0060】

本発明を、以下の実施例および図においてより詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

50

【0061】

【図1】本発明による二重特異性コンストラクトの一実施形態を示す図であり、該コンストラクトはコラーゲンと幹細胞抗原CD133とに対するものである。

【0062】

図2は、可溶性コラーゲン受容体GPVIとCD133に対する抗体とからなる特異的GPVI/CD133コンストラクトを用いて露出したコラーゲンに内皮前駆細胞(EPC)を補充することにより、*in vitro*で内皮細胞が発生することを示す。

【図2a】静的接着アッセイ

【図2b】動的アッセイ

【図2c】内皮コロニーの形成

【図2d】CD31およびCD146のマーカー発現

【図2e】vWF/エンドグリンの発現

【図2f】電子顕微鏡によるWeibel-Palade体の検出

【図2g】GPVI-CD133による、固定化したコラーゲンに対するEPCの強い特異的接着(フィブロネクチンに対する接着との比較)

【図2h】CXCL7と比較してより効果的なGPVI-CD133による、EPCのコラーゲンへの補充。

【0063】

図3は、GPVI-CD133コンストラクトが、インビボで血管病変にEPCを補充し、組織の完全性の回復を強化することを示す。

【図3a】試験動物の頸動脈の損傷およびDCF染色したEPCの注入

【図3b】試験動物の頸動脈の損傷およびDCF染色したEPCの注入

【図3c】DCF染色した組織切片の2光子顕微鏡像

【図3d】ヒト α 1u配列に対する組織切片の*in situ*ハイブリダイゼーション

【図3e】HE染色した内皮細胞；ヒト α 1u配列に対する*in situ*ハイブリダイゼーション

【図3f】GPVI-CD133による顕著な内膜中膜比減少効果

【実施例】

【0064】

血管病変に骨髄幹細胞を補充するための二重特異性タンパク質/モノクローナル抗体コンストラクトの調製

材料および方法

試薬

BioColl 分離溶液はBiochrom AG社(ドイツ・ベルリン)から、また内皮細胞用基礎培地(EBM)はCambrex Bio Science社(ニュージャージー州・イストラザフォード)の“Bullet Kit”(EGM)を市販品として入手した。コラーゲンI、コラーゲンIII、ラミニン、ピトロネクチン、フィブリノゲンおよびフィブロネクチンはBD Science社(ドイツ・ハイデルベルク)から、ヒトVEGFはPeprotech社(ニュージャージー州・ロッキーヒル)から、またマウス抗vWF1次抗体およびAlexaFluor 488ファロイジンはChemicon社(カリフォルニア州・テメキュラ)から市販品を入手した。DAPI、Cy3標識2次抗体(ヤギ抗マウス)および“Cell Tracker Vybrand DiD”は、Molecular Probes/Invitrogen社(ドイツ・カールスルーエ)から市販品を入手した。

【0065】

CD34⁺細胞およびCD133⁺細胞の単離および培養

ヒトCD34⁺細胞およびCD133⁺細胞は、Langらの記載(“Transplantation of a combination of CD133⁺ and CD34⁺ selected progenitor cells from alternative donors”, British Journal of Haem

10

20

30

40

50

matology 2004; 124: 72-79)に従ってヒトの臍帯血から単離し、培養した。ドナー細胞は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF) $1 \times 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ の投与により5日間刺激して動員し、白血球除去血輸血1~3プロセスにより回収した。自動分離装置CLINIMACS (Miltenyi Biotec社、ドイツ・ベルギヒグラヂパッハ)を用いて、抗CD34⁺または抗CD133⁺抗体でコートしたマイクロビーズにより前駆細胞を選択した。細胞の分離の前後に、抗CD34⁺、抗CD133⁺、抗CD3⁺、抗DC19⁺および抗CD45⁺抗体で細胞集団を染色し、FACSCalibur装置(Becton Dickinson社、ドイツ・ハイデルベルク)の蛍光活性化細胞選別装置(FACS)を用いて分析した。

【0066】

GPVI-CD133⁺mABコンストラクトの調製

露出したコラーゲンに対する幹細胞の接着を達成するため、二重特異性コンストラクト(融合タンパク質)を調製した。このために、可溶性GPVI-Fcおよび抗CD133モノクローナル抗体を使用した。可溶性GPVIは、前述の通りに調製した。これに関しては、GPVIコンストラクトの調製について明示的に言及している上記Massbergらの刊行物を参照されたい。簡単に言えば、GPVIの細胞外領域をヒトFc領域に融合させた。このためのFcは、ヒトの心臓cDNAライブラリ(Clontech社、米国・カリフォルニア州パロアルト)から増幅した。ポリメラーゼ連鎖反応のプライマーペアおよび諸条件は、Massbergらによる引用刊行物に記載されている。PCR断片はNotI/HindIIIによってクローニングし、pADTrack CMVプラスミドを作成した。ヒトGPVIの細胞外領域をクローニングするために、培養した巨核球(RNeasy Mini Kit、Qiagen社、ドイツ・ヒルデン)から全RNAを単離した。逆転写後、生成したcDNA100ngを鋳型として、ヒトGPVIのPCR増幅を行った(プライマーおよびPCR条件に関しては、引用刊行物を参照のこと)。PCR断片がBglII/NotIによってpADTrack CMV Fcプラスミドへとクローニングされ、その結果、特異的ヒンジ領域を含むヒトFc領域と融合したGPVIのヒト細胞外領域を含むプラスミドが得られた。

【0067】

CD133反応性モノクローナル抗体(mAB)W6B3C1は、6週齢の雌性Balb/cマウス(Charles River WIGA社、ドイツ・ズルツフェルト)に対し、網膜芽細胞腫細胞株WERI-RB-1で免疫付与することによって作製した。このモノクローナル抗体のCD133特異性は、英国で開催された第7回国際白血球会議で確認済である(Buhring et al. "CD133 Cluster Report. In: Leucocyte Typing VII. White Cell Differentiation Antigens." Mason D et al., (eds.), Oxford University Press, Oxford, 2002, 622-623を参照のこと)。

【0068】

2つのタンパク質を結合させるために、ヘテロ2官能性試薬SPDP(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオン酸エステル)を、Carlssonらの方法("Protein Thiolation and Reversible Protein-Protein Conjugation", Biochem. J. 173:723 (1978))に従って使用した。これを行うため、2つのタンパク質のアミノ基を、SPDPを用いて修飾した。修飾したGPVIタンパク質は、DTT(ジチオスレイトール)で還元し、SPDPで修飾した非還元CD133抗体と結合させた。結合混合物は、Superdex S200カラムを用いたゲル濾過により精製した。

【0069】

このように得られた二重特異性コンストラクトを図1に示す。

【0070】

静的・動的接着アッセイ

10

20

30

40

50

静的接着

静的条件において、融合タンパク質存在下および非存在下で様々な細胞外マトリックスタンパク質に対する前駆細胞の接着を測定するため、96ウェルプレートにコラーゲンI、フィブリノゲン、フィブロネクチンまたはビトロネクチン(各10 μ g/ml)で一晩コートした。さらに、コラーゲンIでコートした96ウェルプレートを、融合タンパク質(10 μ g/ml)とともに1時間前インキュベートした。コンストラクトの個々の構成要素は、合わせてまたは単独で、負の対照として利用した。次いで、前駆細胞を加え、1時間インキュベートした。タイロッド緩衝液を用いて洗浄ステップを注意深く3回繰り返した後、残った接着前駆細胞を位相差顕微鏡検査により計数した。

【0071】

動的接着

顕微鏡のスライドガラスをコラーゲンI(10 μ g/ml)でコートし(Langer et al., "ADAM 15 is an adhesion receptor for platelet GPIIb-IIIa and induces platelet activation", Thromb. Haemost. 2005; 94:555-561を参照)、フローチャンバー(Oligene社、ドイツ・ベルリン)に挿入した。次いで、融合タンパク質(10 μ g/ml)を30分間かけてコラーゲンの表面に加えた。個々の構成要素を合わせてまたは単独で実験を行い、負の対照とした。タイロッド-HEPES緩衝液(HEPES 2.5mmol/l; NaCl 150mmol/l; KCl 1mmol/l; NaHCO₃ 2.5mmol/l; NaH₂PO₄ 0.36mmol/l; グルコース5.5mmol/l; BSA 1mg/ml, pH 7.4; CaCl₂ 1mmol/l; MgCl₂ 1mmol/lを含有、いずれもSigma社、ドイツ・タウフキルヘンより入手)に懸濁した細胞を、せん断速度2,000s⁻¹でかん流させた。実験はすべてリアルタイムで録画し、オフラインで評価した。

【0072】

コロニー形成アッセイおよびフローサイトメトリー

CD34⁺前駆細胞を以下の様々な条件下でヒトコラーゲンI上に播種した: GPVI-CD133コンストラクト(10 μ g/ml)、該コンストラクトの2つの構成要素(負の対照)、および正の対照としてのフィブロネクチン(Becton Dickinson社、ドイツ・ハイデルベルク)の添加・非添加。

細胞は、いずれの場合も、5%の加熱不活化したウシ胎仔血清、5.0ng/mlの上皮成長因子、0.2 μ g/mlのヒドロコルチゾン、0.5 μ g/mlの血管内皮成長因子、10ng/mlの塩基性繊維芽細胞因子、20ng/mlのR3インスリン様成長因子1、および1 μ g/mlのアスコルビン酸(PromoCell社、ドイツ・ハイデルベルク)を含む内皮細胞用成長培地MV2中で数日間培養した。48時間後、非接着細胞を除去した。4日目に、内皮コロニー形成単位(コロニー数/10⁶細胞)を計測した。細胞はPBSで洗浄、再懸濁し、ポリグロビン(Bayer Vital社、ドイツ・レバークーゼン)とともに15分間インキュベートした。さらに洗浄し、FITC標識した抗CD31抗体(クローン5.6; Beckman Coulter社、ドイツ・クレーフェルト)および抗CD164抗体(クローン128018; R&D Systems社、ドイツ・ヴィースバーデン)とともに室温で30分間インキュベートした。さらに1度洗浄した後、細胞をFACSCantoフローサイトメーター(Becton Dickinson社、ドイツ・ハイデルベルク)で分析した。

【0073】

透過電子顕微鏡検査および免疫蛍光顕微鏡検査

内皮前駆細胞(EPC)(2 \times 10⁸/ml)を、GPVI-CD133⁺mAbでコートしたウェル内の培地MV2(PromoCell社)中で8日間培養した。また、位相差コントロールを毎日行った。次いで、細胞をKarnovsky液で固定し、四酸化オスミウムで後固定を行い、グリシジル・エーテルに包埋した後、顕微鏡検査を行った。

10

20

30

40

50

【0074】

免疫蛍光顕微鏡検査用には、上記培養した細胞を蛍光標識抗体でインキュベートした。各インキュベーションステップ間で、細胞をPBSで注意深く洗浄した。幹細胞は、2%のホルムアルデヒド液中で20分間固定した。次いで、細胞を3%グリシンで洗浄し、抗vWF1次抗体(ヒト; 5 µg/ml)を含むPBSとともに30分間インキュベートした。ウシ血清アルブミン(3%)を用いて非特異性結合を阻害した(1時間)。その後、2次抗体(ヤギ抗マウス; 5 µg/ml)を加え、さらに30分間反応させた。さらにローダミン・ファロイジン(5 µg/ml; 細胞骨格の検出)およびDAPI(5 µg/ml; 細胞核の検出)を加え、30分間反応させた。試料は、標準的な免疫蛍光顕微鏡検査によって分析した。

10

【0075】

頸動脈の結紮および生体顕微鏡検査によるEPC接着の検査

*in vivo*での前駆細胞の補充におけるGPVI-CD133コンストラクトの効果調べるために、既に記載されている通りに(Massberg et al., "A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation", *J. Exp. Med.* 196: 887-896 (2002)参照)生体顕微鏡検査を行った。実験の前に、EPCを5-カルボキシフルオレセインジアセタートスクシンイミジルエステル(DCF)で染色し、GPVI-CD133コンストラクト(10 µg/ml)または該コンストラクトの2つの構成要素(各10 µg/ml)とともに30分間インキュベートした。野生型C57BL6/Jマウス(Charles River Laboratories社)にミダゾラム(体重1kg当たり5mg; Ratiopharm社)、メドトミジン(体重1kg当たり0.5mg; Pfizer社)およびフェンタニル(体重1kg当たり0.05mg; Curamed/Pharam社)を腹腔内注射することによって麻酔をかけた。ポリエチレンカテーテル(Portex)を右側頸静脈へ挿入し、上記蛍光標識したEPC(5 × 10⁵/ml)を静脈内へ注入した。右側頸動脈を露出し、血管損傷を誘導するために、carotid fork近傍を5分間強く結紮した。血管損傷の前後における、蛍光標識したEPCと損傷した血管壁との相互作用を可視化するため、100Wの落射HBO水銀ランプを備えたZeiss AxioTech顕微鏡(20×水浸レンズ、W 20×/0.5; Carl Zeiss MicroImaging社)を使用して、右側頸動脈の*in situ*生体ビデオ顕微鏡検査を行った。血管壁と最初に接触した後、表面移動速度が平均速度より顕著に遅い細胞、または強固に接着した細胞を、結合EPCと定義した。接着したEPCの数は、10秒間移動しない細胞、または内皮表面から離れなかった細胞を計数することにより測定した。この数を内皮表面1mm²当たりの細胞数として表す。

20

30

【0076】

2光子顕微鏡検査

2光子顕微鏡検査は、van Zandvoortらが既に"Two-photon microscopy for imaging of the atherosclerotic vascular wall: a proof of concept study", *J. Vasc. Res.* 41: 54-63 (2004)に記載したものと実質的に同様に実施した。簡単に言えば、マウスを生体顕微鏡検査後に犠死させ、頸動脈を注意深く摘出し、PBSで洗浄後パラフィンに包埋し、4 µm切片を調製した。次いで、切片を染色し、BioRad 2100MPを用いた2光子レーザー走査顕微鏡(TPLSM)法によって分析した。

40

【0077】

ブタ損傷血管に対するEPC接着の*ex vivo*検査

幹細胞を単離し、Vybrant DiDで20分間標識した後、EBM培地に再懸濁した。ヒト静脈を*ex vivo*フローに加えた。栄養上の理由から、該血管は培地に困

50

まれた状態に置かれた。バルーン付きカテーテルによって血管に損傷を与え、次いで、G P V I - C D 1 3 3 m A b コンストラクトで30分間コートした。次いで、E P C を該静脈に2時間通し、血管の損傷領域に細胞を接着させた。次いで、自然な生理的せん断応力下での接着安定性をテストするために、高いせん断速度条件下、静脈を37 °C の E B M で24時間十分に洗浄した。その後、バイオリクターから血管を取り出し、4% P F A で24時間固定し、細胞補充を *in situ* ハイブリダイゼーションによって分析した。

【0078】

損傷血管内皮再生の *in vivo* 検査

野生型 C 5 7 B L 6 / J マウスを、*in vivo* 接着の検査と同様の手順で処置した（上記参照）。E P C ($5 \times 10^5 / \text{ml}$) を G P V I - C D 1 3 3 コンストラクト ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$) または該コンストラクトの2つの構成要素を合わせたもの（各 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）で2時間処理し、右側頸静脈の傷を塞いだ。その後も動物は生きていた。2週間後、動物を犠死させ、頸動脈から試料を採取した。内皮細胞の再生を、ヘマトキシリン・エオシン (H E) 染色によって調べた。さらに E l a s t i c a v a n G i e s o n 染色を行った。局所的な再生機序とヒト E P C が誘導する回復とを区別するために、ヒト細胞に特異的な *alu* 配列を使用して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

【0079】

パラフィン切片の免疫組織化学検査

マウス血管からのパラフィン切片を使用して、免疫組織化学検査を行った。切片の顕微鏡用スライドをキシレン (C a r l R o t h 社、ドイツ・カールスルーエ) で脱パラフィン処理し、エタノール濃度を下げることによって (100%, 90%, 70%, 50%) 再水和を行った。次いで、この顕微鏡用スライドを、P B S で十分に洗浄した。さらに、0.1% T r i t o n X - 1 0 0 (F l u k a C h e m i e 社、スイス・ブックス) 含む P B S 溶液を用いて膜透過を、次いで1% B S A (ウシ血清アルブミン) 溶液 (S i g m a A l d r i c h 社、米国・セントルイス) を用いてブロッキングを、それぞれ20分間実施した。次いで、顕微鏡用スライドを、抗 v W F 1 次抗体 ($2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$) (C h e m i c o n 社、米国・テメキュラ) とともに4 °C で12時間インキュベートした。その後、ヤギ抗ウサギ2次抗体 ($5 \mu\text{g} / \text{ml}$) (M o l e c u l a r P r o b e s / I n v i t r o g e n 社 (ドイツ・カールスルーエ) および $0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の D A P I (C a r l R o t h 社、ドイツ・カールスルーエ) を室温で加え、さらに120分間反応させた。顕微鏡用スライドは、P B S で十分に洗浄し、蒸留水で洗い流し、乾燥した後、カイザーゼラチン (M e r c k 社、ドイツ・ダルムシュタット) で封入し、分析した。

【0080】

新生内膜の測定

雄性 N O D / S C I D マウスは、前述の手順と同様の手順により処置した（「頸動脈の結紮」参照）。頸動脈結紮の代わりに、ワイヤーを用いて損傷を与えた。あらかじめ G P V I - C D 1 3 3 コンストラクト ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$) または該コンストラクトの2つの構成要素を合わせたもので (各 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$) 30分間処理した E P C ($5 \times 10^5 / \text{ml}$) を尾静脈に注射し、傷を塞いだ。動物は生きたままにしておいた。14日後または21日後に動物を犠死させ、頸動脈から試料を採取した。これをパラフィンブロックに包埋し、近位端から遠位端へと $5 \mu\text{m}$ の切片を作製した。c a r o t i d f o r k 下の10切片を使用して、プラーク形成の定量化を行った。断面の新生内膜は、画像解析ソフトウェア (Z e i s s 社) を使用して測定した。新生内膜は、内弾性板に隔てられた領域と内腔領域との差として、一匹ごとに測定した。中膜は、同様の方法で、具体的には内弾性板に隔てられた領域と外弾性板に隔てられた領域との差として測定した。結果を、新生内膜を中膜で除した内膜/中膜比で表す。

【0081】

二重超音波造影による血管抵抗係数の測定

動物に麻酔をかけ、既に記載されている通りに (M a s s b e r g e t a l . ,

10

20

30

40

50

“ A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation ”, J. Exp. Med. 196: 887 - 896 (2002) 参照)、二重超音波造影によって頸動脈を可視化した。簡単に言えば、収縮期最大血流速度 V_{sys} と拡張期血流速度 V_{dia} とを測定した。頸動脈の抵抗係数は、 V_{sys} と V_{dia} との差を V_{sys} で除した値として測定した。

【0082】

データおよび統計値の提示

各群の平均値を、分散分析 (ANOVA) またはステューデントの t 検定を用いて比較した。データを、平均値 ± 標準偏差として示す。 $P < 0.05$ は統計的に有意と見なした。

10

【0083】

結果

骨髄由来のヒト幹細胞を使用し、まず固定化コラーゲン I に対する EPC の接着を、静的接着アッセイ、およびフローチャンバーモデルを用いた動脈せん断条件下でのアッセイによって調べた。

【0084】

静的接着アッセイでは、96 ウェルプレートのコラーゲン I でコートし、記載の生成物 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) とともに1時間インキュベートした。次いで、EPC (CD34⁺ 細胞) を加え、60分間のインキュベートを行い、PBSで洗浄した。コラーゲン表面に GPVI-CD133 コンストラクト (「GPVI-CD133」, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えてインキュベートすると、コラーゲンのみの場合と比較して、接着は5倍に (図2a 参照; 静的モデル)、またフローチャンバー ($2, 000 \text{ 秒}^{-1}$) (図2b) においては10倍に増大した。該コンストラクトの2つの個々の構成要素 (各 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を用いた場合には、接着の増加は見られなかった。4回行った実験の平均値および標準偏差を示す。* は、図2aでは $p = 0.021$ 、図2bでは $p = 0.025$ を意味する。この結果より、コンストラクトが生理学的フロー条件下でさらに効率的であることを意味する。さらに、さらなる実験から、GPVI-CD133 コンストラクトによって増加した EPC の接着は、フィブロネクチンと比較して、固定化コラーゲンに特異的であることを実証できた (図2g 参照)。

20

30

【0085】

いずれの図においても、コンストラクトの使用を「GPVI-CD133」、2つの構成要素の使用を「GPVI+CD133」で示す。

【0086】

EPC の走化性および細胞外マトリックス構成要素に対する接着が、ケモカイン CXCL7 によって顕著に増大し得ることが、最近実証された。これに関して、さらなる実験から、GPVI-CD133 コンストラクトによって、CXCL7 よりもさらに効率良く、固定化コラーゲンに EPC を補充できることを実証できた (図2h 参照)。

【0087】

結合した EPC は、内皮層に融合し、血管完全性の回復に寄与する。そこで、引き続き実験を行い、コンストラクトの使用後に細胞が内皮細胞への分化能を失っていないことを実証した。さらに、コンストラクトへの曝露後、EPC が小さく丸味のある外観から内皮細胞特有の形へと急速に形態学的変化を遂げることが観察された。コンストラクトを用いて EPC を培養すると、個々の構成要素 (負の対照) を用いた場合と比較して、EPC の内皮コロニー形成能が4日目以降顕著に増大し、正の対照であるフィブロネクチンを用いた場合と同程度であった (図2c 参照; 使用した細胞 10^6 個当たりのコロニー数)。独立した3~5回の実験の平均値 ± 標準偏差を示す。* は $p = 9.001$ に相当する。

40

【0088】

さらに、発生する細胞が、内皮表面マーカーである細胞マーカー CD31 および CD146 に対して陽性であることを、フローサイトメトリーを用いて実証することができた (

50

図2d参照)。さらにまた、発生する細胞を染色すると、成熟内皮細胞マーカーであるvWF/エンドグリンおよびファロイジンに対して陽性であった。検出には、標準的な免疫蛍光顕微鏡検査または共焦点免疫蛍光顕微鏡検査を用いた(図2e参照)。さらにまた、コンストラクトを用いてEPCを8日間培養すると、成熟内皮細胞の典型的特徴であるWeibel-Palade体が透過電子顕微鏡検査において明確に検出された(図2fに矢印で示す;約300nm×60nm;拡大率×80,000)。未処理のCD34⁺では、Weibel-Palade体は見られなかった。

【0089】

これらの結果を*in vivo*で確認するために、損傷頸動脈を有するマウスモデルおよび生体免疫蛍光顕微鏡検査を使用した。左頸動脈に強く損傷を与える前に、DCFで染色したEPCを右頸静脈から注入し、損傷前、5分後および30分後のEPC接着を調べた。GPVI-CD133コンストラクト(「GPVI-CD133」, 10μg/ml)を用いて細胞をあらかじめインキュベートすると、コンストラクトの2つの構成要素(各10μg/ml)が個々に存在する場合と比較して、接着するEPCの数は顕著に増加した(図3aおよび図3b参照)。*は、 $p = 0.038$ (強固な接着)、 $p = 0.025$ (一時的接着)を意味する。

10

【0090】

これらの検査の後、頸動脈を摘出し、2光子顕微鏡検査を行った。赤色の核を有する緑色(DCFで染色された)細胞の明らかな蓄積が、内弾性板の内腔側にある露出領域で観察された(図3c)。

20

【0091】

これらの結果をヒトと同等のシステムに適用するために、*ex vivo*フローモデルを使用した。このために、ブタの血管で2時間のかん流を行った後、EPCを使用する前に、バルーン付きカテーテルで損傷を与えた。次いで、血管を固定し、ヒトに特異的な配列を用いた*in situ*ハイブリダイゼーションによって、細胞の補充を調べた。GPVI-CD133コンストラクトの使用によって、幹細胞の補充を顕著に増加させることができた。増加の程度は、損傷のない血管のおよそ50倍(図示せず)、コンストラクトを使用していない損傷血管のおよそ25倍、またコンストラクトの2つの構成要素が個々に存在する場合のおよそ10倍であった(図3d)。*はコンストラクトの2つの個々の構成要素との比較における $p < 0.001$ を意味する。

30

【0092】

損傷を受けたマウス動脈を、二重特異性コンストラクトで処理したEPCに曝露すると、*ex vivo*で8日(データ示さず)、*in vivo*で14日にわたって、内皮細胞の産生が観察された。しかし、2つの個々の構成要素で処理したEPCに曝露した後は、このような産生は見られなかった(図3e;HE染色)。投与した細胞による効果と局所的な再生機序による効果とを区別するために、免疫不全のNOD/SCIDマウスにヒトEPCを投与した。次いで、Aluプローブを使用して*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。この特異的Aluプローブは、ヒトのAlu繰り返し配列のコンセンサス配列に対応しており、異種移植においてヒト細胞に限定した検出を可能にする。そこで、頸動脈の損傷および細胞投与の14日後に、マウスを犠牲させた。染色に対して陽性であった腔内細胞を、ヒト細胞由来の細胞と判定した。これらの結果から、血管病変の新生内皮細胞は、本質的に外部から注入されたEPC由来であることがわかる。

40

【0093】

さらに、*in vivo*での血管再生におけるGPVI-CD133の機能的な重要性を評価するために、ワイヤーによる損傷後の新生内膜の形成について調べた。損傷から2週間後、内膜/中膜比および血管抵抗係数の低下傾向が観察された。これは、二重超音波造影術によって判定されたが、統計的に有意ではなかった(データ示さず)。GPVI-CD133の投与が、頸動脈損傷の3週間後に内膜/中膜比を顕著に低下させることは、血管再生における所期の効果を示すものであり、特筆すべきことである(図3f参照)。これらの実験でも、コンストラクト(GPVI-CD133)または個々の構成要素を合わ

50

せたもの (GPVI + CD133) を投与した。図 3 f において、「*」は対照と比較して $p = 0.03$ であることを意味し、 $n = 5 \sim 6$ 、1 匹当たり 10 切片の分析を行った。

【0094】

要約すると、発明者らは、本発明の融合タンパク質（以上および以下で「コンストラクト」とも呼ばれる）を用いることで、*in vitro*、*in vivo*、およびヒトの血管内で、露出したコラーゲン表面および損傷を受けた血管上に EPC（すなわち CD34⁺ 幹細胞）を蓄積させることが可能であることを実証できた。発明者らはさらに、該幹細胞を該融合タンパク質とともにより長く培養することによって、成熟内皮細胞への分化を *in vitro* で実現できることを実証できた。

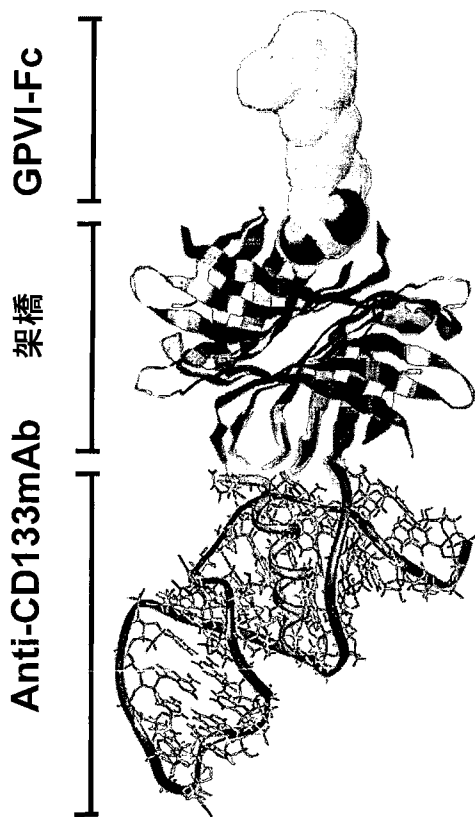
【0095】

この結果から、損傷した血管/組織に対する可能な治療法として、該当する血管に、たとえばカテーテルによって融合タンパク質またはその変異体を挿入できること、またはこれらを投与前に幹細胞とともに培養できることがわかる。

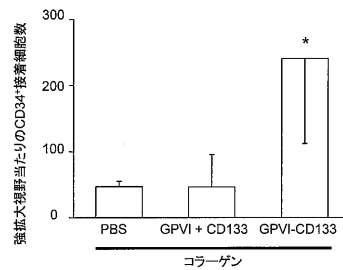
【0096】

この結果から、本発明の融合タンパク質を用いることで、循環している内皮前駆細胞をコラーゲンに富む血管病変上に捕捉できることが示され、*in vitro*、*in vivo*、いずれの実験においても実証された。さらにまた、この融合タンパク質は、内皮前駆細胞（EPC）の内皮細胞へ分化を増大させ、血管病変の内皮再生を増大させる。

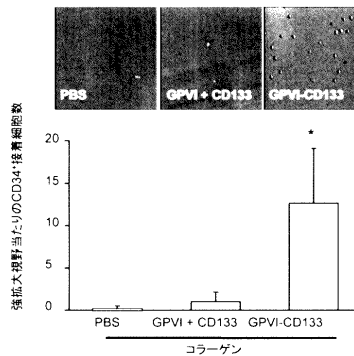
【図 1】



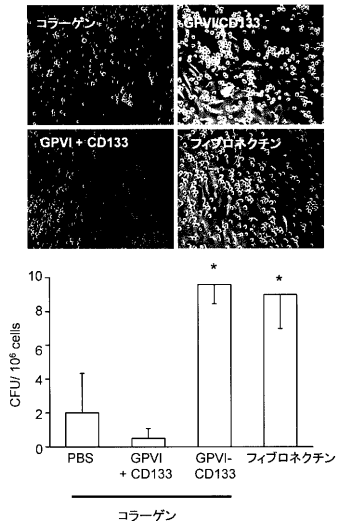
【図 2 a】



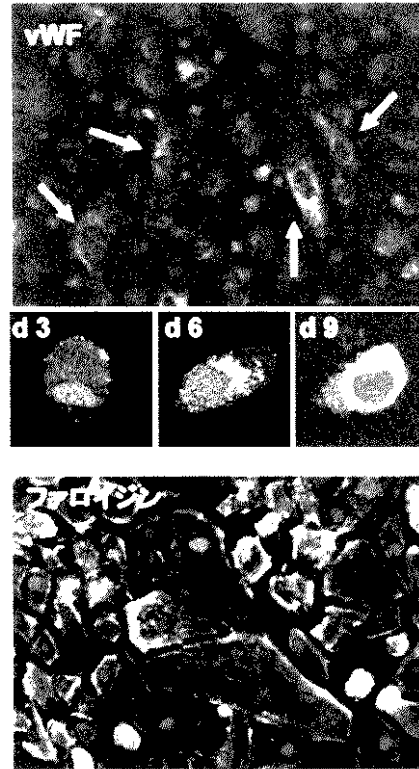
【図 2 b】



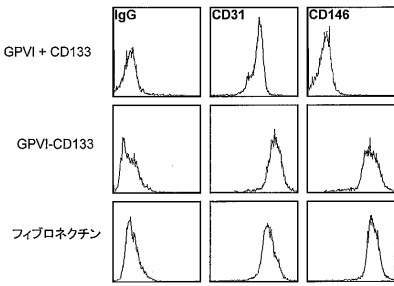
【 図 2 c 】



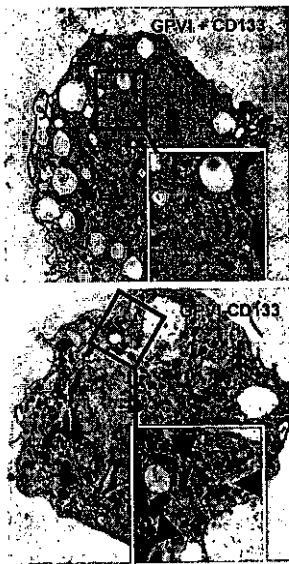
【 図 2 e 】



【 図 2 d 】



【 図 2 f 】



【 図 2 g 】

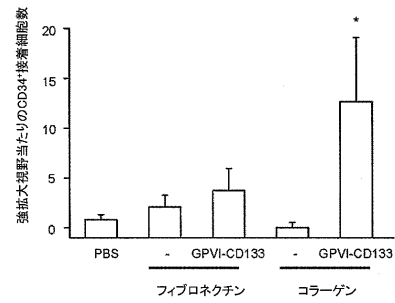
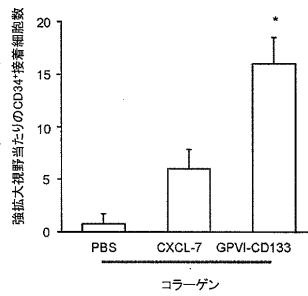


Fig. 2f

【 図 2 h 】



【 図 3 a 】

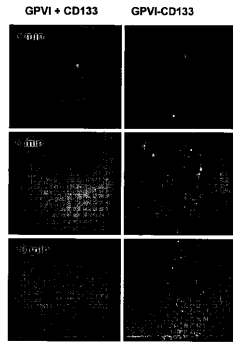
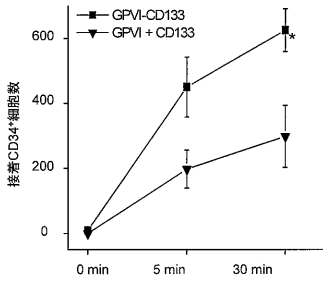
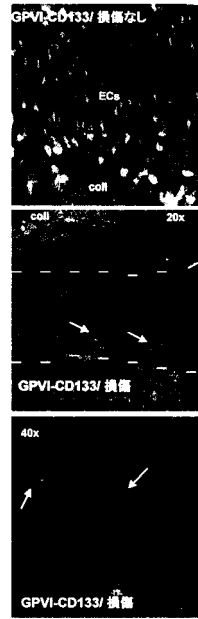


Fig. 3a

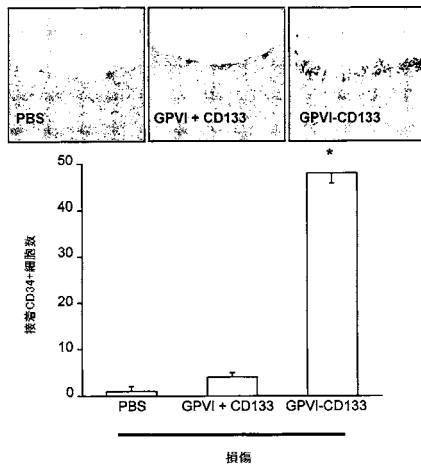
【 図 3 b 】



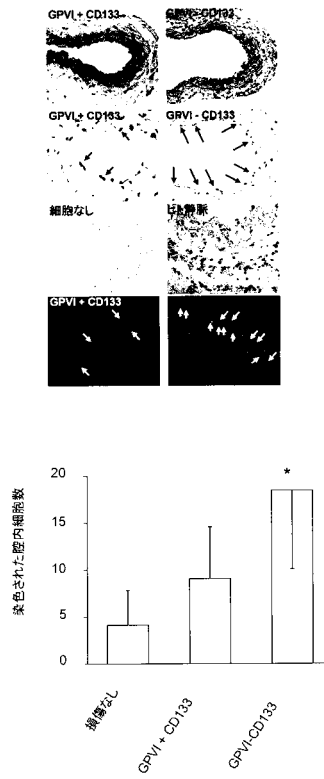
【 図 3 c 】



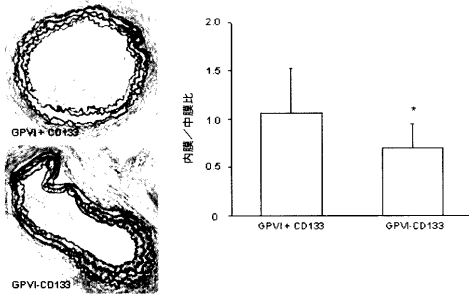
【 図 3 d 】



【 図 3 e 】



【 図 3 f 】



【 配列表 】

2010519234000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/001369

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 A61P9/00		
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) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANGER H ET AL: "Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro" CIRCULATION RESEARCH, vol. 98, no. 2, February 2006 (2006-02), pages e2-e10, XP002524825 US ISSN: 0009-7330 the whole document -/-	1-4,6,7, 9,11-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
24 April 2009	02/06/2009	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Kukoika, Florian	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2008/001369

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DAUB KARIN ET AL: "Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 20, no. 14, December 2006 (2006-12), pages E1935-E1944, XP002524547 ISSN: 1530-6860 the whole document</p>	1-4,6,7, 9,11-13
X	<p>LEV ELI I ET AL: "Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 96, no. 4, October 2006 (2006-10), pages 498-504, XP008105491 ISSN: 0340-6245 the whole document</p>	1-4,6,7, 9,11-13
X	<p>MASSBERG STEFFEN ET AL: "Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 203, no. 5, 15 May 2006 (2006-05-15), pages 1221-1233, XP002524548 ISSN: 0022-1007 the whole document</p>	1-4,6,7, 9,11-13
X	<p>WO 00/06195 A1 (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA [US]; HALL FREDERICK L [US]; GORDON ERLINA M) 10 February 2000 (2000-02-10) page 6, line 8 - page 7, line 26; claims 1,5,7,8,16,18,21,76 page 39, line 1 - line 20</p>	1,2,9-14
X	<p>EP 1 314 780 A1 (TERUMO CORP [JP]) 28 May 2003 (2003-05-28) paragraphs [0001] - [0014]; claims 1-5; example 1</p>	1,2,9-14
X	<p>ISHIKAWA TETSUYA ET AL: "Establishment of a functionally active collagen-binding vascular endothelial growth factor fusion protein in situ." ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 26, no. 9, September 2006 (2006-09), pages 1998-2004, XP002524549 ISSN: 1524-4636 the whole document</p>	1,2,9-14
	-/-	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/001369

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DUMONT B ET AL: "Chimeric Fc Receptors Identify Ligand Binding Regions in Human Glycoprotein VI" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 361, no. 5, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 877-887, XP024951330 LONDON, GB ISSN: 0022-2836 [retrieved on 2006-09-01] the whole document	1-15
Y	MASSBERG STEFFEN ET AL: "Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo." THE FASEB JOURNAL: OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 18, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 397-399, XP002524551 ISSN: 1530-6860 the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/001369

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0006195	A1	10-02-2000	AU 758483 B2	20-03-2003
			AU 5328699 A	21-02-2000
			CA 2337979 A1	10-02-2000
			EP 1100535 A1	23-05-2001
			JP 2002521044 T	16-07-2002
			NZ 509804 A	25-07-2003
			US 2002164719 A1	07-11-2002
			US 6387663 B1	14-05-2002
EP 1314780	A1	28-05-2003	AU 7873701 A	25-02-2002
			WO 0214505 A1	21-02-2002
			US 2004053368 A1	18-03-2004

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/001369

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
INV. A61K47/48 A61P9/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE		
Researchierter Mindestpräzisionsstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
A61K		
Researchierte, aber nicht zum Mindestpräzisionsstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LANGER H ET AL: "Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro" CIRCULATION RESEARCH, Bd. 98, Nr. 2, Februar 2006 (2006-02), Seiten e2-e10, XP002524825 US ISSN: 0009-7330 das ganze Dokument	1-4,6,7, 9,11-13
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Researchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Researchenberichts
24. April 2009		02/06/2009
Name und Postanschrift der internationalen Researchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentstein 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Kukolka, Florian

Formblatt PCT/ISA210 (Blatt 2) (April 2006)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/001369

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	<p>DAUB KARIN ET AL: "Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells."</p> <p>THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, Bd. 20, Nr. 14, Dezember 2006 (2006-12), Seiten E1935-E1944, XP002524547 ISSN: 1530-6860 das ganze Dokument</p>	1-4,6,7, 9,11-13
X	<p>LEV ELI I ET AL: "Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix."</p> <p>THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, Bd. 96, Nr. 4, Oktober 2006 (2006-10), Seiten 498-504, XP008105491 ISSN: 0340-6245 das ganze Dokument</p>	1-4,6,7, 9,11-13
X	<p>MASSBERG STEFFEN ET AL: "Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo."</p> <p>THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd. 203, Nr. 5, 15. Mai 2006 (2006-05-15), Seiten 1221-1233, XP002524548 ISSN: 0022-1007 das ganze Dokument</p>	1-4,6,7, 9,11-13
X	<p>WO 00/06195 A1 (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA [US]; HALL FREDERICK L [US]; GORDON ERLINA M) 10. Februar 2000 (2000-02-10) Seite 6, Zeile 8 - Seite 7, Zeile 26; Ansprüche 1,5,7,8,16,18,21,76 Seite 39, Zeile 1 - Zeile 20</p>	1,2,9-14
X	<p>EP 1 314 780 A1 (TERUMO CORP [JP]) 28. Mai 2003 (2003-05-28) Absätze [0001] - [0014]; Ansprüche 1-5; Beispiel 1</p>	1,2,9-14
X	<p>ISHIKAWA TETSUYA ET AL: "Establishment of a functionally active collagen-binding vascular endothelial growth factor fusion protein in situ."</p> <p>ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY, Bd. 26, Nr. 9, September 2006 (2006-09), Seiten 1998-2004, XP002524549 ISSN: 1524-4636 das ganze Dokument</p>	1,2,9-14

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (April 2005)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/001369

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DUMONT B ET AL: "Chimeric Fc Receptors Identify Ligand Binding Regions in Human Glycoprotein VI" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 361, Nr. 5, 1. September 2006 (2006-09-01), Seiten 877-887, XP024951330 LONDON, GB ISSN: 0022-2836 [gefunden am 2006-09-01] das ganze Dokument	1-15
Y	MASSBERG STEFFEN ET AL: "Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo." THE FASEB JOURNAL: OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, Bd. 18, Nr. 2, Februar 2004 (2004-02), Seiten 397-399, XP002524551 ISSN: 1530-6860 das ganze Dokument	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/001369

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0006195	A1	10-02-2000	AU 758483 B2	20-03-2003
			AU 5328699 A	21-02-2000
			CA 2337979 A1	10-02-2000
			EP 1100535 A1	23-05-2001
			JP 2002521044 T	16-07-2002
			NZ 509804 A	25-07-2003
			US 2002164719 A1	07-11-2002
			US 6387663 B1	14-05-2002
EP 1314780	A1	28-05-2003	AU 7873701 A	25-02-2002
			WO 0214505 A1	21-02-2002
			US 2004053368 A1	18-03-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)		C 0 7 K 16/18	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 9/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 9/10 (2006.01)		A 6 1 P 9/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		A 6 1 P 9/10	
		G 0 1 N 33/53	Y

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ブーリンク, ハンス - ヨルク

ドイツ国 7 2 0 7 6 テューピングエン, アイヒェンヴェク 4

(72)発明者 スクテラ, トーマス

ドイツ国 7 2 0 7 0 テューピングエン, ブルザガーセ 2

(72)発明者 ユング, ゲンドラム

ドイツ国 7 2 1 0 8 ロッテンブルク - ヴェン - デルシャイム, シュヴァブシュトラッセ 3 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 HA01

4C085 AA13 AA14 CC22 CC23 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA23 EA50 FA40

FA74

专利名称(译)	具有治疗/诊断作用的双特异性融合蛋白		
公开(公告)号	JP2010519234A	公开(公告)日	2010-06-03
申请号	JP2009550243	申请日	2008-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	霍特国际商学院有史以来宇宙卡尔斯巴德达谢伊大学蒂宾根达谢伊聂申购时间		
申请(专利权)人(译)	埃伯哈德卡尔斯巴德宇宙乳木果达蒂宾根大学乳木果达认购聂时间		
[标]发明人	ランガーハラルト ガヴァッツマイナート ブーリンクハンスヨルク スクテラトーマス ユンググンドラム		
发明人	ランガー,ハラルト ガヴァッツ,マイナート ブーリンク,ハンス-ヨルク スクテラ,トーマス ユング,グンドラム		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/09 C07K16/46 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/18 A61K39/395 A61P9/00 A61P9/10 G01N33/53		
CPC分类号	A61K47/6811 A61K47/6849 A61P19/08 C07K14/705 C07K16/2896 C07K2319/33		
FI分类号	C07K19/00 C12N15/00.ZNA.A C07K16/46 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/18 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P9/00 A61P9/10 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/HA01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA23 4H045/EA50 4H045/FA40 4H045/FA74		
优先权	102007010306 2007-02-22 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及双特异性融合蛋白，其包含 (a) 与胶原结合的第一多肽，和 (b) 与内皮前体细胞结合的第二多肽。此外，公开了药物组合物，其包含本发明的融合蛋白，以及使用该融合蛋白的方法，特别是用于治疗或预防血管和组织损伤的方法。

