(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
2002 年12 月19 日 (19.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/100441 A2

(51) 国際特許分類⁷: A61K 48/00, 38/00, 45/00, A61P 43/00 // A61K 38/18

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/05485

(22) 国際出願日: 2002 年6 月4 日 (04.06.2002)

(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2001-174919 2001 年6 月8 日 (08.06.2001) JP

(71) 出願人 *(米国を除く全ての指定国について)*: 株式会社ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台１丁目２５番１１号 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 *(米国についてのみ)*: 濱田 洋文 (HAMADA,Hirofumi) [JP/JP]; 〒064-0959 北海道 札幌市 中央区宮ヶ丘２-１-３０-６０２ Hokkaido (JP). 伊藤 克礼 (ITO,Yoshinori) [JP/JP]; 〒064-0921 北海道 札幌市 中央区南２１条西１５丁目１−１−４０９ Hokkaido (JP). 山内 昭彦 (YAMAUCHI,Akihiko) [JP/JP]; 〒064-0804 北海道 札幌市 中央区南４条西１４丁目 ライオンズマンション医大前６０２号 Hokkaido (JP). 森川 雅之 (MORIKAWA,Masayuki) [JP/JP]; 〒063-0001 北海道 札幌市 西区山の手１条２丁目６-６ Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町１−１−１ 関鉄つくばビル６階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 *(国内)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 *(広域)*: ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 第１７条*(2)(a)*に基づく宣言；要約なし；国際調査機関により点検されていない発明の名称。

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 02/100441 A2

(54) Title: METHOD FOR TREATMENT OF VASCULAR REGENERATION

(54) 発明の名称: 血管再生療法

(57) Abstract:

明細書

血管再生療法

技術分野

本発明は、アンギオポエチンを血管新生遺伝子の前に発現または投与させることにより正常な血管新生を促進させる遺伝子治療に関する。

背景技術

近年、血管新生を誘導する増殖因子を用いた虚血疾患に対する治療の関する研究が進められている。例えば、心筋梗塞や急性虚血肢に対して、線維芽細胞増殖因子2（FGF2）（Baffour, R. et al., J. Vasc. Surg. 16(2):181-91, 1992）や内皮細胞増殖因子（endothelial cell growth factor; ECGF）（Pu, L. Q. et al., J. Surg. Res. 54(6):575-83, 1993）の投与による治療効果が調べられている。より最近では、血管内皮増殖因子／血管透過性因子（vascular endothelial growth factor; VEGF / vascular permeability factor; VPF）が、心筋虚血および肢虚血の動物モデルにおいて、血管形成を促進することが示されている（Takeshita, S. et al., Circulation 90(5 Pt 2):II228-34, 1994; Takeshita, S. et al., J. Clin. Invest. 93(2):662-70, 1994）。

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)は血管内皮細胞に特異的な増殖因子またVPF (Vascular Permeability Factor)血管透過性亢進因子として1989年に報告され現在VEGF A, B, C, D, Eに分類されている。VEGF Aはさらに6種類のサブタイプに分けられそのうち可溶性のVEGF121, 165が特に強い血管増殖能を持つとされ現在臨床応用されている。その作用は胎生期の血管形成にも関与し低酸素のもと増強され、さらにはNOの合成、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞の遊走にまで幅広い作用が報告されている。また一方で、VEGFの過剰発現は血管新生シ

グナルのバランスを崩し、血管腫様の脆弱毛細管を形成する可能性が考えられる（Carmeliet, P., Nature Med. 6, 1102-1103 (2000)）。また、VEGFをin vivoで血管壁へ遺伝子導入した場合、血管腫様の内皮増殖により新生内膜の顕著な肥厚をもたらし、赤血球の血管外遊出（extravasation）を引き起こし得る（Yonemitsu, Y., et al., Lab. Invest. 75, 313-323 (1996)）。またレトロウイルスを用いて心筋に恒常的にVEGFを過剰発現させた場合でも同様の病理所見が観察されている（Lee, R. J., et al., Circulation 102, 898-901 (2000)）。

主幹動脈が急性に閉塞することにより発症する急性重症虚血肢は主に血栓性閉塞に起因し、血管新生治療の対象となる重要な虚血疾患の一つで、急性重症虚血肢の後期治療の成績は極めて不良であり、多くの場合肢切断に至る。さらに肢切断に至った患者の生命予後も不良であり、１年生存率は50％と低い。このため胚性幹細胞（VEGF受容体Flk-1陽性細胞）から血管を再生する手法が研究されている（Yamashita,J et al Nature 408(2):92-96, 2000）。血管は内皮細胞と壁細胞（ペリサイトと平滑筋細胞）から成り、生体内では血管新生と退縮という動的な恒常性が維持されている。現在のところ、萌出(sprouring)、分岐(Branching)、融合(fusion), 嵌入(intussusception)などの複雑な変化がどのような分子機構で派生し、内皮細胞が移動(migration)、離解(detachment)、接着(adhesion)などをタイミング良く機能的に実現するのかは明らかになっていない（須田年生 実験医学5月号 19 (7):826-829 (2001)）。

また、血管新生を誘導する増殖因子を用いたヒト遺伝子治療の臨床試験が開始され、これを重症の虚血肢の血管新生治療に対して臨床応用する研究が進められている。内皮細胞特異的な増殖因子である血管内皮増殖因子／血管透過性因子（VEGF/VPF）はこの目的にかなう治療遺伝子と見なされている。閉塞性動脈硬化症やバージャー病に代表される末梢性血管疾患は、歩行時疼痛（間歇性跛行）、安静時疼痛、下肢の組織障害（壊死）などの臨床症状を示す。現在、末梢血管閉塞による安静時疼痛や虚血性潰瘍のある患者に対する有効な治療はなく、血管拡張

術および外科的血行再建術が困難な場合、下肢切断が余儀なくされている。そこで、血管新生因子による側副血行路形成による新しい治療法－治療的血管新生(Therapeutic angiogenesis)－が提唱された。

実際、IsnerらはVEGF遺伝子を用いた血管新生を報告し、プラスミドベクターを用いたヒトへの遺伝子導入において比較的良好な治療効果が報告されている（Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998)）。Isnerらは２つの異なった遺伝子治療臨床研究、１）カテーテルによる血管壁へのVEGF遺伝子導入、２）注射器によるVEGF遺伝子の筋肉内への投与、を開始している。特に、後者では、70-80％の救肢率が報告されている。また血管内遺伝子導入および筋肉内遺伝子導入は、臨床試験においていかなる免疫反応による毒性も示さず、すでに100人以上の患者の治療が終了し、良好な成績が報告されている。VEGFの筋中遺伝子投与の有害な副作用や毒性レベルについては、現在のところほとんど報告がない。しかしながら、最近の報告によれば、トランスジェニック（Thurston, G., et al., Science 286, 2511-2514 (1999)）またはアデノウイルス（Thurston, G., et al., Nature Med. 6, 460-463 (2000)）によるVEGFの過剰発現が、遺伝子を導入された動物において異常な血管形成を起すこと、さらにプラスミドによる筋中へのVEGF遺伝子導入が、ヒトの虚血肢において一過的な浮腫を起すことが示されている（Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998) Baumgartner, I., et al., Ann Intern Med.;132,880-884,(2000)）。

これまでに、VEGF単独投与による血管新生治療の欠点である血管透過性の亢進を改善する具体的かつ実用的な方法は全く知られていなかった。

発明の開示

本発明は、遺伝子治療または薬物治療においてVEGF単独投与による血管新生治

療の欠点である血管透過性の亢進を防止するために、アンギオポエチンをVEGFの前に投与することにより、浮腫の副作用が起こらず、高い血管新生誘導効果が得られる方法を提供する。

VEGFファミリーと同様に血管内皮に特異的に作用する調節因子としてアンギオポエチン１（Ang1）およびアンギオポエチン２(Agn2)とその受容体Tie2が知られている。アンギオポエチンはTie-2チロシンキナーゼ受容体のリガンドであり血管新生の際の血管成熟に関与しているとされ、現在知られているサブタイプは4種類で1，2がTie-2レセプターに結合する。Ang2はAng1の内在性のアンタゴニストとして働くことが推定されている(Saito,T.N.; Nature, Vol 376, 70-74, (1995))。Ang２はVEGFの働きにより選択的に誘導されることも知られている（Oh,H., et al., J.Biol. Chem., 274,15732-15739（1999））。Ang1のVEGFとの違いは血管内皮細胞の増殖能がなく、血管周皮細胞の結合に関与し、VEGFにみられる血管透過性の亢進が認められない点である。血管新生において内皮－周皮細胞の相互作用が重要な調節機構として働くことが知られている。周皮細胞は内皮細胞と接着することにより内皮細胞の分化や増殖抑制に働く。この機構にはTGF-βの活性化や囲い込みによる物理的バリアの形成が関与していると考えられている（D'Amore, et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,86:4544+4548（1989））。

本発明者等はKou-Gi Shyuらによるアンギオポエチンの効果検討の報告で、プラスミドpAng1またはpAng2をウサギモデルに投与しpAng1でAG score、血流、血管径、Capillary density の改善をみたとの報告がある（Kou-Gi Shyu Circulation. 98, 2081-2087(1998)）ことを参考にして、VEGFの働きが開始される前に、周皮細胞間の相互作用をあらかじめ誘導することの新生血管形成に対する有効性を独自に推定し実験をはじめ、その有効性を実証した。

一方、Thurstonらはアデノウイルスベクターを用いたアンギオポエチン1の導入がVEGFによる透過性亢進をおさえることをEvans Blueを用いた血管透過性評価モデルで示している(Gavin Thurston Nature Med, Vol 6,No 4, 460-463, (2000

))。しかしながら別の研究によるとプラスミドpAng1とpVEGFのウサギモデルへの同時投与による評価の結果、pVEGFプラスミド単独投与との差はほとんどないことが知られている。（Chae JK , Arterio Thromb Vasc Bio. 20, 2573-2578(2000))

本発明者等は両遺伝子の発現時期に注目し、アンギオポエチンをVEGF投与の前に投与することにより、浮腫の副作用が起こらず、高い血管新生誘導効果が得られる局所投与手順を見いだした。

即ち、アンギオポエチンをVEGFの前に投与することにより、浮腫の副作用が起こらず、高い血管新生誘導効果が得られる方法に関し、より具体的には、

（１）アンギオポエチンをコードするベクターまたはアンギオポエチンを血管新生遺伝子をコードするベクターまたは血管新生遺伝子がコードする蛋白投与前に投与処置することを特徴とした局所投与治療方法、

（２）局所投与が筋肉内投与である、（１）に記載の方法、

（３）血管新生遺伝子がVEGF121または165である、（１）または（２）に記載の方法、

（４）アンギオポエチンがアンギオポエチン1である、（１）から（３）のいずれかに記載の方法を、提供するものである。

なお、本発明において「血管新生遺伝子」とは血管構成に関与する細胞の発生、遊走、増殖、成熟に直接、あるいは間接的に関わる遺伝子を意味する。

本発明者等は比較的安全性の高いプラスミドベクターを使用し、且つあらかじめAngiopoietin-1を、次いでVEGF165をウサギの下肢虚血モデルに筋肉内注射することにより血管透過性の少ない血管新生を鋭意検討し、治療効果を実証した。治療対象疾患としては、例えば１）末梢の血管疾患、閉塞性動脈硬化症など、２）心疾患、狭心症・心筋梗塞など、３）腎疾患、腎炎など、４）肺疾患、神経疾患等があげられるが、その他血管新生の誘導が有効な疾患であれば特に制限はない。治療対象は虚血組織以外にも、厳密には必ずしも虚血組織とは言えなくても

、機能の良い血管が新たに形成または再編成されることで治療効果が得られるような病態や疾病をすべて含んでも良い。たとえば腎炎、糖尿病性の腎症。難治性の潰瘍。骨髄炎などの難治性の慢性ないし急性の感染。脳神経外科領域のモヤモヤ病、その他の脳神経外科領域の血管性疾患などがあげられる。投与部位となる筋肉は骨格筋、心筋、平滑筋、など、筋肉の種類を問わない。さらに投与部位は、筋肉に限定されない。皮膚（表皮、真皮）、動脈、静脈（門脈を含む）、リンパ管、腎臓、漿膜、骨膜、結合組織、骨髄、などへの投与を含む。局所投与により治療効果を実質的に実現する方法は、ベクターないし蛋白の直接投与、ないし、キャリア及び担体を用いた投与が挙げられる。担体は、生理的に許容できるもので、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的にはコラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体などがあげられる。更に担体はこれらの生理的に許容される材料の混合組成物でも良い。注入手段は通常の医療用注射器または、体外および体内に留置される持続注入器などの工業製品があげられる。用いるベクターは生理的に許容されるベクターならば特に制限はなく、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター、あるいは非ウイルスベクターも含めて、どんなベクターでも利用しうる。またベクターはベクターにより処理された患者自身の細胞の形態で利用することを含む。

図面の簡単な説明

図１は、プラスミドpCAccの構成を示す図である。

図２は、プラスミドpCAhVEGFの構成を示す図である。

図３は、プラスミドpCAhAng1の構成を示す図である。

図４は、ウサギ下肢虚血モデルに対する遺伝子導入のプロトコールを示す図で

ある。

図５は、虚血側のウサギ陰嚢を示す写真である。これらの写真から、V群では陰嚢浮腫と静脈拡張が遺伝子投与後のDay 15に生じたが、Ang1前投与はVEGFによって誘導される陰嚢浮腫を予防したことが示された。

図６は、6つの投与スケジュール群のDay 60での選択的内腸骨血管造影写真である。（A）、対照；（B）、V群；（C）、A群；（D）、A+V群；（E）、V-A群；（F）、A-V群。

図７は、虚血大腿筋におけるアルカリホスファターゼ染色によって多数の毛細血管ECが認められた代表的な顕微鏡写真である。（A）、対照；（B）、V群；（C）、A群；（D）、A+V群；（E）、V-A群；（F）、A-V群：バー＝50μm。EC＝内皮細胞。

図８は、虚血大腿筋における平滑筋細胞α-アクチン染色によって平滑筋細胞に覆われた細動脈が認められた代表的な顕微鏡写真である。（A）、対照；（B）、V群；（C）、A群；（D）、A+V群；（E）、V-A群；（F）、A-V群：バー＝50μm。

発明を実施するための最良の形態

実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

なお、本実施例においては、以下の文献に基本的に従って実験を行った。

１、 Satoshi Takeshita , J.Clin.Invest., Vol 93, 662-670, 199.

２、 Yukio Tsurumi, Circulation.1996;94: 3281-3290. ウサギ下肢モデルを確立しpVEGFの投与によってAG score、BPR、Capillary densityが改善されるのを示した。さらに上記に血流改善もとりいれた評価方法。

３、 Iris Baumgartner, Ann Intern Med.2000;132, 880-884. 実際９０人にpVEGFを投与し下肢の浮腫についての評価方法。

４、 Kou-Gi Shyu Circulation.1998;98, 2081-2087. pAng1またはpAng2をウサギモデルに投与しpAng 1でAG score,血流、血管径、Capillary densityの改善についての評価方法。

５、 Gavin Thurston Nature Med, Vol 6,No 4, 2000, 460-463.

６、 G.Thurston , Science, Vol 286, 1999, 2511-2514. Evans Blueを用いた血管透過モデルでアデノを用いたAng1の導入がVEGFによる 透過性亢進をおさえる改善についての評価方法。

７、 Lioubov Poliakova , J Thorac Cardiovasc Surg 1999;118, 339-347. アデノによるVEGFを導入したウサギモデルの陰嚢サイズと下腿周径の変化を経時的評価方法。

また、本実施例においては、データは平均±SEMとして表した。統計比較はANOVAに続いてBonferroni／Dunn検定を用いて行った。p＜0.05の値を統計学的に有意とみなした。

［実施例１］ 使用プラスミド

（１）VEGFをコードするDNAは、ヒトグリオーマU251細胞から抽出したRNAを鋳型として、#1191：CCGGAATTCACCATGAACTTTCTGCTGTCT（配列番号：１）、および#1192：CGCGGATCCTCACCGCCTCGGCTTGTCACA（配列番号：２）のプライマーを用いてRT-PCRで得た。得られたDNA断片をEcoRI/BamHIで切って、pBluescriptSKII+のEcoRI/BamHIサイトへクローニングし、プラスミドを得た。このプラスミドの塩基配列を確認したあと、EcoRI/BamHI断片をきりだし、pCAcc（図１）のEcoRI/BglIIへクローニングし、pCAhVEGF（図２）を得た。対照ベクターpCAcc（Yoshidaら、1997）は、以前に報告されたpCAGGS（Niwaら、1991）に由来する。

（２）アンギオポエチン１（GenBankのHSU83508(U83508)）をコードするDNAは、ヒト骨髄細胞（骨髄穿刺して得た細胞のうち、ディシュに付着する細胞、いわゆる骨髄ストローマ細胞）から抽出したRNAを鋳型として、#1435：GAAGATCTATGACA

GTTTTCCTTTCCTTTG（配列番号：３）、および#1436：GAAGATCTCAAAAATCTAAAGGTCGAATCA（配列番号：４）のプライマ—を用いてRT-PCRで得た。得られたDNA断片をBglIIで切断して、pBluescriptSKII+のBglIIサイトへクローニングし、プラスミドを得た。このプラスミドの塩基配列を確認したあと、BglII断片をきりだし、pCAcc（図１）のBglIIサイトへクローニングし、pCAcchAng1a（図３）を得た。クローニングしたDNA断片の塩基配列を配列番号：５示す。

また、pCAcchAng1aのアンギオポエチンcDNA断片を鋳型にして、#1641：GGGAATTCACCATGACAGTTTTCCTTTCCTTTGCTTTC（配列番号：６）、および#1638：AGCTCCTGGATTATATATGTTTGACG（配列番号：７）のプライマーを用いてPCRを行なった。これで得られた断片をEcoRIで切って、pCAcchAng1aのEcoRI断片と入れ替えた。これによりコザックコンセンサス配列を持つヒトアンギオポエチンcDNAを発現するpCAcchAng1を得た。クローニングしたDNA断片の塩基配列を配列番号：８示す。

［実施例２］　動物モデル

New Zealand white rabbit (male,3.0-3.5kg)を使用した。ケタラール（三共）3ml＋キシラジン（第一製薬）1mlによる麻酔導入後、左大腿部鼠径靭帯より膝にかけて皮切をおき大腿動脈を露出した。分枝を全て結紮切離し大腿動脈を切除した。これを10日おいたものを慢性下肢虚血モデル、すなわちウサギ下肢虚血モデル（Takeshita ,S. J.Clin.Invest., Vol 93, 662-670, 1994）とした。比較検討は3群について行われモデル作成日(OPE day)の10日後(Day 10)、もしくは10日後(Day 10)と15日後(Day 15)にプラスミドの筋肉内投与を行った。投与方法は各々のプラスミド500ugをPBS 2.5mlに溶解し虚血側の大腿内側に小切開をおき内側広筋、内転筋、半膜様腱筋（内側広筋に２ケ所、内転筋に２ケ所、半膜様筋に１ケ所）に直接注入した。27G針によって一ケ所に500ul、計5箇所にゆっくりとおこなった。

動物モデルをプラスミドの投与スケジュール（図４）に従って以下の6群に分

けた。

1. 対照ウサギ（C群）、Day 10にプラセボ（pCAcc）を500μg投与（n＝8）。

2. VEGF単独（V群）、Day 10にVEGFを500μg投与（n＝10）。

3. Ang1単独（A群）、Day 10にAng1を500μg投与（n＝7）。

4. A+V群、Day 10にAng1とVEGFの両方をそれぞれ500μg投与（n＝7）。

5. A-V群、Day 10にAng1を500μg投与した後、Day 15にVEGFを500μg投与（n＝10）。

6. V-A群、Day 10にVEGFを500μg投与した後、Day 15にAng1を500μg投与（n＝7）。

［実施例３］　浮腫評価

VEGFの主な副作用の一つである浮腫を陰嚢面積（Scrotum size)、下肢周径を測定することにより評価した。患側陰嚢をDay 10, 15, 20, 40にデジタルカメラにて撮影しDay 10の面積を100%としその変化をみた。下肢周径も同様に患側膝下の周径をDay 10, 15, 20, 40に測定しその変化をみた。

VEGF単独投与による浮腫の代表的所見を図５に示すが、これには静脈拡張を伴う陰嚢面積の増加が認められる。プラスミドDNAを投与したすべての群で、陰嚢浮腫は壊死などの炎症性変化の後に起こったものではなかった。Day 10にプラスミドDNAの筋肉内注射を行う前の平均陰嚢サイズは7.14±1.06cm^{2}であり、Day 10の値と比較した陰嚢サイズの変化率を表１に示した。

【表１】

	陰嚢サイズ（%）			
	10日	15日	20日	40日
対照	100	101.6±2.7	101.5 ± 4.1	103.3±2.8
V群	100	140.1±11.1[b]	111.2 ± 5.8	107.7±1.8
A群	100	94.6±1.5	98.4 ± 3.3	98.0±5.5
A+V群	100	115.5±6.1	107.1 ± 4.0	97.6±5.1
V-A群	100	117.9±4.4[a]	110.8 ± 7.5	118.4±8.6
A-V群	100	98.4±2.0	94.5 ± 3.7	94.4±5.1

[a]p＜0.05（対照群との比較）、[b]p＜0.01（対照群との比較）である。

Day 15には、V群（140.1±11.1%、[a]p＜0.01）およびV-A群（117.9±4.4%、[a]p＜0.05）で、C群（101.6±2.7%）に比べて浮腫の統計学的に有意な増加が認められた。V群とV-A群では浮腫サイズの増加がDay 20, 40にも続いていたが、これらの増加の有意性は境界域であった。この実験でA-V群には試験期間を通じて陰嚢サイズの増加は認められなかった。以上の結果は、V群およびV-A群では遺伝子注入後10日間という短い期間にわたって全身浮腫が生じたことを示している。これに対して、アンジオポエチン-1を前投与するとVEGFによって誘導される全身浮腫が予防されたように思われる。さらに、後肢下部における局所浮腫の指標として後肢周囲長の変化も評価した。A-V群には限局性浮腫の増加は認められなかったが、V群、A+V群およびV-A群ではC群と比較して限局性浮腫の増加が認められた。

［実施例４］　新生血管密度測定

Day 10, 40に患側のAlkaline Phosphatase染色による内腸骨動脈血管造影を施行、血管新生の評価をAngiographic score (AG score)として評価した。血管造影は麻酔導入後、右内頚動脈より2.7 Frのインフュージョンカテーテルを挿入し患側の内腸骨動脈に選択的に挿入した。ニトロール0.25mg注入の後、造影剤３ml（造影剤３mlを５秒間で注入）による血管造影を行った。AG scoreは大腿部に5mm

四方のグリッドを5mm間隔に置いて血管がグリッド内にある場合1とし、なければ0とした。AG scoreは血管があるグリッドの総数／グリッド総数とした。

Day 10には、C群、V群、A群、A+V群、A-V群およびV-A群の間にAG scoreの差はなかった（それぞれ0.08±0.02、0.11±0.02、0.07±0.04、0.08±0.03、0.07±0.02および0.08±0.02）。しかしDay 40には、V群、A群およびA-V群のAG scoreは対照群よりも高かった（C群：0.29±0.05、V群：0.64±0.05[a]、A群：0.52±0.03[a]、A-V群：0.58±0.02[a]；[a]p＜0.01）（表２）。5つの投与群の間に有意差は認められなかった。図６に示した代表的な血管造影所見は、この6群における大腿内側での新生血管形成の差を数および内径に関して示している。実際に、尾部臀動脈の近位側の内径に関してはA-V群の方が対照群よりも大きかった（C群：0.77±0.02mm、A-V群：1.01±0.03mm[a]；[a]p＜0.01）（表２）。さらに、A-V群の血管内腔はV群（0.76±0.05mm）に比べて大きく（p＜0.01）、アンジオポエチン-1の前投与がより太い血管の形成をもたらした可能性が示唆された。また、V群では血管形成数が多い傾向が認められ、A-V群では大腿中部に形成された血管内径が太い傾向が認められた。

【表２】

	AGスコア	動脈径（mm）
対照	0.29 ± 0.05	0.77 ± 0.02
V群	0.64 ± 0.05[a]	0.76 ± 0.05
A群	0.52 ± 0.03[a]	0.85 ± 0.08
A+V群	0.49 ± 0.06	0.90 ± 0.05
V-A群	0.50 ± 0.07	0.90 ± 0.04
A-V群	0.58 ± 0.02[a]	1.01 ± 0.03[a, b]

AG scoreは、血管造影scoreを示す。[a]p＜0.01（対照群との比較）、[b]p＜0.01（V群との比較）である。

［実施例５］ 血圧比測定

Day 10, 40に施行。両側後頸骨動脈をドップラーによって探し、血圧を測定。患側圧／健側圧をBPR (Blood Pressure Ratio)とし体循環の指標とした。

血行動態の改善は、選択的血管造影、腓腹部血圧（CBP）および安静時血流（RBF）により、Day 10, 40に評価した。具体的には、以前の記載の通りに（Takeshitaら、1994）、血圧計に接続したドップラー流量計（Datascope、Montvale、NJ）とカフを用いて、Day 10, 40に各モデルの両側後肢で腓腹部体血圧（CBP）を測定した。各モデルに対して、虚血肢／正常肢の収縮期CBPの比としてCBP比を評価した。

プラスミドDNAの筋肉内注射（Day 10）の前には全群間にCBP比の差はなく、重症虚血が術側後肢に生じたことが示された。しかしDay 40のCBP比は、A-V群（86.0±8.1%、[a]p＜0.01）がC群（51.7±6.9%）よりも有意に高かった（表３）。

局所組織における血液潅流の改善に関する評価も行った。具体的には、内転筋である大内側筋および半膜様筋に経皮的プローブ（P-430、LASERFLO BPM^2、Vasamedics、St. Paul、Minnesota）を装着することにより、Day 10, 40に虚血肢の安静時血流（RBF）を調べた。虚血肢のRBFは上記の領域の4箇所での平均ピーク速度と定義し、RBF比はDay 40のRBFをDay 10の値で割ったものと定義した。Day 10には術側肢のRBFに関して6群間に差はみられなかった。Day 40の血流予備能の変化を表３に示す。Day 40のRBFとDay 10のRBFとの比の算出値から、A-V群（234.8±12.5%、[a]p＜0.01）ではC群（139.6±10.4%）に比べて有意な改善が認められたが、他の群における血液潅流の程度はA-V群よりも低かった。

【表３】

	CBP比（%）	局所RBF比（%）
対照	51.7 ± 6.9	139.6 ± 10.4
V群	68.4 ± 5.6	187.6 ± 24.5
A群	67.6 ± 5.7	207.8 ± 20.5
A+V群	82.7 ± 8.8	193.3 ± 26.6
V−A群	72.4 ± 13.8	169.0 ± 24.2
A−V群	86.0 ± 8.1[a]	234.8 ± 12.5[a]

CBP比は腓腹部血圧比を示し、局所RBF比は安静時局所血流比を示す。[a]p＜0.01（対照群との比較）である。

［実施例６］　組織血流測定

組織血流計を用いてDay 10, 40に施行。患側内側広筋２ケ所、内転筋２ケ所の組織血流を測定し合計値をDay 10を100%とし評価した(BPM2)。BPR、BPM2ではControl群にくらべAng1前投与群で有意に改善がみられた。

［実施例７］　VEGF蛋白の測定

VEGFの血清中濃度を、Day 0, 10, 15, 20, 40に固相酵素免疫アッセイ（ELISA）ヒトVEGFイムノアッセイキット（Techne Corp.、Minneapolis、MN）を用いて測定した。本アッセイの感度は9.0pg／mLであった。いずれの群でもVEGFの蛋白レベルは中程度に過ぎず、Day 15にはすべての実験群で高くても10～30pg／mlであった。

［実施例８］　組織学的評価

Day 40に、組織分析のために虚血肢から内転筋のブロック試料を2つ採取した。1つの試料は毛細血管密度の測定用のアルカリホスファターゼ染色のため、OCTコンパウンド中に包埋した後に液体窒素中で急速凍結し、もう1つの試料は細動

脈密度の測定用の平滑筋細胞α-アクチン染色のため、ホルマリン中で48時間浸漬固定を行った後にパラフィン包埋を行った。クリオスタットで多数の凍結切片を作製し（10μm厚）、以前の記載の通りに（Ziadaら、1984）、毛細血管内皮細胞を検出する目的でインドキシル-テトラゾリウム法を用いてアルカリホスファターゼ染色を行った。毛細血管密度は$1mm^2$当たりの平均毛細血管数と定義した。免疫組織化学に関しては、平滑筋α-アクチン抗体（1A4、Dako Japan、Tokyo、Japan）を一次抗体として用いて、ビオチン化抗マウス血清とペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを用いるHISTFINE SAB-PO Kit（Nichirei、Tokyo、Japan）によって検出した。細動脈を同定して毛細血管や細静脈と区別する目的で、3つの異なる切片から15の異なる顕微鏡視野を選択し、陽性平滑筋細胞を同じやり方で算定した。細動脈密度は視野1つ当たりの平均細動脈数として表した。

毛細血管（直径10μm未満）レベルの新生血管形成として毛細血管密度（毛細血管数／mm^2）を評価した。この密度はA-V群が高かった（C群：169.9±8.5、A-V群：273.2±25.8[a]、[a]$p<0.01$、C群との比較）（表４）。アルカリホスファターゼ染色切片の代表的な顕微鏡写真を図７に示す。血管中膜でのα-アクチンの免疫組織化学染色により、血管新生の後期に生じる、直径10～50μmの範囲の明確な血管である細動脈レベルの新生血管形成が認められた。A+V群およびA-V群における細動脈密度（細動脈数／視野）は対照群よりも有意に高かった（C群：4.8±0.5、A+V群：10.4±1.7[a]、A-V群：12.4±1.4[a]、[a]$p<0.01$）が、V群（6.1±0.8）およびA群（6.3±1.3）における増加の有意性は境界域であった（表４）。さらに、A-V群における増加はV群（[b]$p<0.01$）およびA群（[a]$p<0.01$）よりも大きかった。α-アクチン染色切片の代表的な顕微鏡写真も図８に示している。アルカリホスファターゼ染色および平滑筋細胞α-アクチン染色を用いた以上の定量分析から、サイトカインの併用、特にアンジオポエチン-1の前投与により、単独投与スケジュールよりも多くの機能的な血管の形成が得られたことが示された。

【表４】

	毛細血管密度（毛細血管数/mm2）	動脈密度（細動脈数/視野）
対照	169.9 ± 8.5	4.8 ± 0.5
V群	228.0 ± 3.2	6.1 ± 0.8
A群	237.2 ± 16.6	6.3 ± 1.3
A+V群	242.7 ± 22.8	10.4 ± 1.7[a]
V-A群	234.6 ± 13.1	8.6 ± 0.9
A-V群	273.2 ± 25.8[a]	12.4 ± 1.4[a, b, c]

[a]p＜0.01（対照群との比較）、[b]p＜0.01（V群との比較）、[c]p＜0.01（A群との比較）である。

治療的血管新生では、虚血病変に十分な血流を供給するために機能的な血管の生成が必要である。しかし、いくつかの研究により、臨床試験で広く用いられているVEGFを、機能的血管新生を促進するために単独で用いた場合の価値は明確でないことが示されている。

この点の考察に関しては2つの理由が考えられる。第一に、狭窄や閉塞は主動脈で生じて末梢虚血の誘因となり、転写因子である低酸素誘導因子-1（HIF-1）の発現および活性化を招く。HIF-1の発現は、一酸化窒素合成酵素およびVEGFなどをコードするものをはじめとする多くの血管新生性遺伝子の転写増加を招き、血管新生カスケードが進行する（Royenら、2001）。VEGF遺伝子産物のみの投与によって機能的な血管形成が実現するか否かははっきりしていない。最近のある研究は、VEGFは毛細血管の出芽を刺激するように思われるが、この反応は側副流の有意な改善にはつながらないと言及している（Hersheyら、2001）。さらに、ウサギ後肢虚血における虚血病変のHIF-1α／VP16投与による改善を検討したある研究では、VEGF遺伝子のみの投与よりも改善効果が大きかったことが示されている（Vincentら、2000）。第二に、虚血性疾患の治療にVEGF遺伝子を用いた多くの臨床試験の評価がなされ、好ましい結果が報告されているものの、有意な改善が示されなかった研究もいくつかある（Rajagopalanら、2001）。実際に本実

施例では、VEGF単独投与は毛細血管数の増加を誘導したが、血行動態は改善されず、血管成熟も媒介されないことが示された。以上の研究を蓄積した結果として、この治療によって臨床的に有益な血管新生または動脈新生が得られるのであれば、増殖因子併用療法またはマスタースイッチ遺伝子の理解をさらに深めることが必要である（Blauら、2001；Carmeliet、2000；Simonsら、2000）。

本実施例では、Ang1の前投与が、Ang1やVEGFの単独投与または他の投与スケジュールよりも、血行動態、血管新生後期における血管成熟、および血漿漏出に対する血管保護を改善する効果が大きいことが示された。本発明者等のデータから、Ang1の前投与による刺激によって血管新生が早期、後期ともに促進されて血管成熟をもたらし、それが血行動態と血管保護の改善の原因となったという可能性が示唆される。

このモデルでAng1の前投与が早期、後期ともに血管新生の促進をもたらした機序としては2つが考えられる。第一に、外因性Ang1遺伝子によって生じた流血中の内皮前駆細胞（CEP）がVEGF誘発性血管新生を増強する可能性がある。CEPは出生後の血管新生の原因となり（Asaharaら、1999）、最近の1件の研究ではAng1遺伝子の投与がVEGF投与に比べてCEPの移動を延長したことが報告されている（Hattoriら、2001）。アデノウイルスベクターによるマウスでのVEGF165の過剰発現はCEPの末梢血液への移動を引き起こし、これはDay 2にピークを迎え、Day 14までには対照レベルに回復した。これに対して、Ang1の過剰発現はCEPレベルの上昇をもたらし、そのピークはDay 7～14にあり、Day 28までに対照レベルに回復した。したがって、VEGF遺伝子とAng1遺伝子の併用療法によって得られる血管新生の効果は、これらの2つの遺伝子の投与によって生じるCEP移動の各ピークが同じ時期に起こることから、Ang1を前投与した場合に高くなると考えられる。さらに、Yamashitaらは、ECと壁細胞（周皮細胞および血管平滑筋細胞）が共通の前駆細胞に由来する可能性があることを示した（Yamashitaら、2000）。彼らはVEGFはECの分化には必要であるが、壁細胞の分化は外因性増殖因子とは独立して起

こりうると結論している（Yamashitaら、2000）。したがって、Day 15まで外因性VEGFがない状態でAng1遺伝子の前投与を行うことにより、CEPおよび流血中壁前駆細胞（CMP）から構成される流血中前駆細胞（CP）の移動を促進することが可能と考えられる。Ang1前投与スケジュールにおけるCP集団のCMP比は、VEGF投与（CEPを増加させる）の時期が他の併用よりも遅く、より多くの成熟血管の生成をもたらすため、他の投与スケジュールによるものに比べて高いと思われる。第二に、Ang1遺伝子の前投与に続いてVEGF遺伝子を投与することにより、重要な血管新生誘発因子であるAng2の明らかな遺伝子スイッチングが刺激され、新生血管形成が増強される可能性がある。Ang2の発現は成体の血管新生に必要であり、この因子は血管新生部位で初期に役割を果たす（Malsonpierreら、1997）。また、Mandriotaらは、Ang2 mRNAレベルがVEGF投与によって上昇し、Ang1投与によって低下することを示している（Mandriotaら、1998）。以上の所見を総合すると、Ang1遺伝子前投与スケジュールでは、他の併用スケジュールよりも明瞭に内因性Ang2への血管新生性スイッチングが起こり、Ang2の発現によって血管新生がより長期的に促進される可能性が示唆される。同時投与スケジュールにおけるAng2の発現は、VEGFとAng1がこの遺伝子の発現に相反する影響を及ぼすため、より低いと考えられる。また、後投与スケジュールでは、Ang1の投与がDay 15となるため、Ang2の発現期間は前投与の場合よりも短いと考えられる。

本発明者等は陰嚢サイズを用いてVEGF誘発性浮腫を評価した。ウサギの陰嚢は体幹から隔たっていて組織支持が弱く、結合組織間隙が大きいために血管外浸出液の蓄積が起こりやすいことから、陰嚢サイズの変化率は浮腫を評価する感度が高い。本実施例では、浮腫を予防したのは前投与スケジュールのみであった。Ang1は内皮細胞の周囲のマトリックスおよび細胞との強固な接着を促進し、種々の刺激によって生じる血管透過性の予防をもたらしたと思われる（Thurstonら、1999）。Ang1が接着を誘導する分子機構に関してはさらに解明を要するが、Ang1はインテグリンを介して細胞接着を直接支持しうることが最近の研究で示されてい

る（Carlsonら、2001）。Thurstonらは、アデノウイルスベクターによるラットへのAng1遺伝子導入から48時間以内に血管漏出に対する抵抗性が生じ、これは同じモデルで7日後にVEGFを注入して確認されたと報告している（Thurstonら、2000）。実際に、本発明者等の所見は、VEGFによって誘導される血管透過性を前投与スケジュールが阻止したことを示している。これに対して、他の投与スケジュールでは、Ang1によって誘導される透過抵抗性が生じてVEGFによる血管透過性を予防するだけの時間がないために、浮腫が生じた。

以上をまとめると、VEGFとAng1の3種類の併用スケジュールのうち、虚血病変で効果的な改善を示したのはAng1遺伝子の前投与スケジュールのみであった。本実施例では、Ang1遺伝子の前投与によって、虚血肢の血圧の有意な上昇、虚血病変における血流の改善、成熟血管の形成、さらに浮腫の予防がもたらされた。このため、Ang1遺伝子投与による準備刺激は、VEGF遺伝子療法における治療的血管新生に有用と思われる。

産業上の利用の可能性

本発明によって、アンギオポエチンをVEGFの前に投与することにより、浮腫の副作用が起こらず、高い血管新生誘導効果が得られる方法が提供された。このことから、VEGF単独投与による血管新生治療の欠点である血管透過性の亢進を防止できる遺伝子治療が可能となった。

請求の範囲

１．　アンギオポエチンをコードするベクターまたはアンギオポエチンを血管新生遺伝子をコードするベクターまたは血管新生遺伝子がコードする蛋白投与前に投与処置することを特徴とした局所投与治療方法。

２．　局所投与が筋肉内投与である、請求項１に記載の方法。

３．　血管新生遺伝子がVEGF121または165である、請求項１または２に記載の方法。

４．　アンギオポエチンがアンギオポエチン1である、請求項１から３のいずれかに記載の方法。

図1

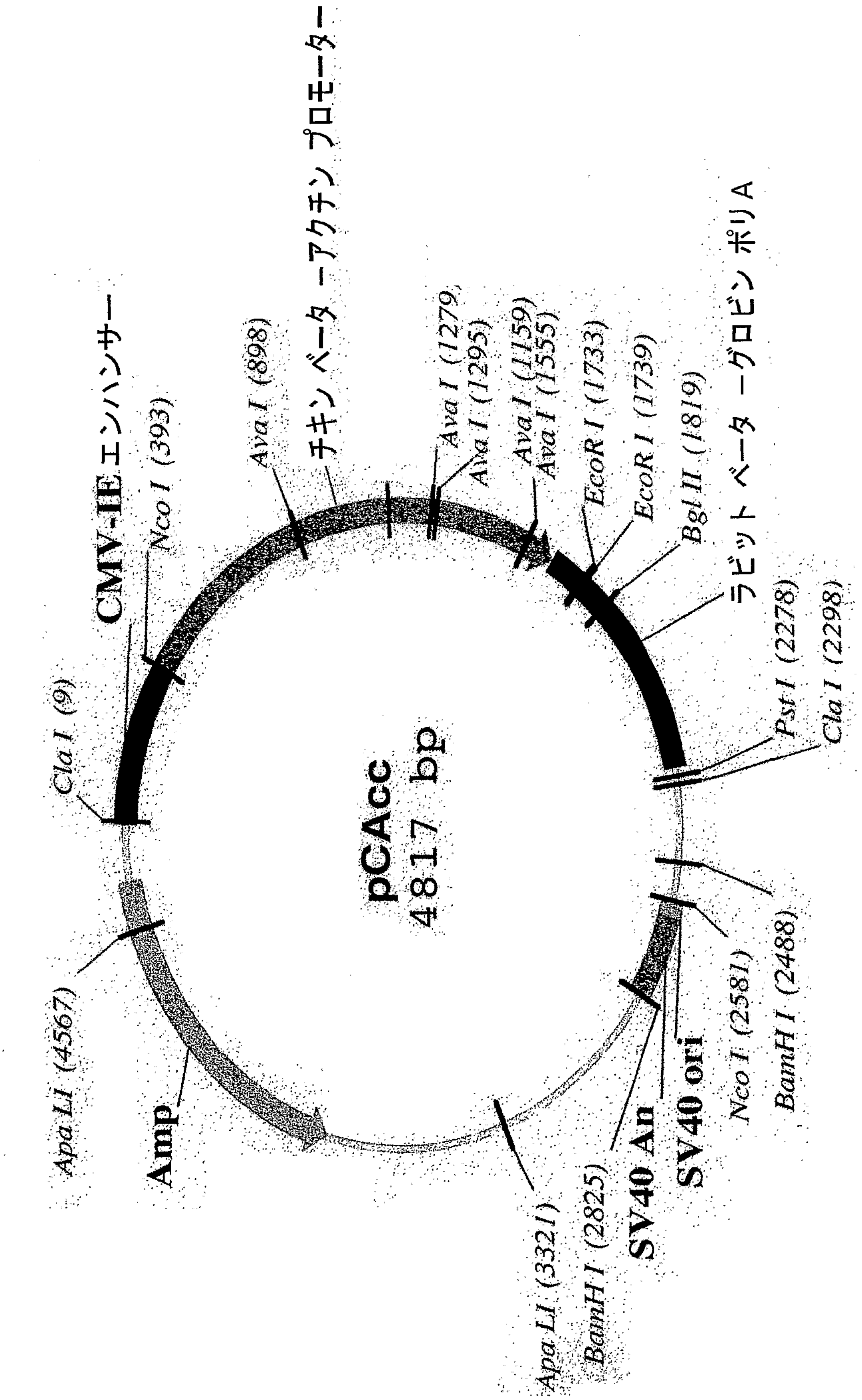

CMV-IE エンハンサー
Cla I (9)
Nco I (393)
Ava I (898)
チキン ベータ ーアクチン プロモーター
Ava I (1279)
Ava I (1295)
Ava I (1159)
Ava I (1555)
EcoR I (1733)
EcoR I (1739)
Bgl II (1819)
ラビット ベータ ーグロビン ポリA
Pst I (2278)
Cla I (2298)
pCAcc
4817 bp
BamH I (2488)
Nco I (2581)
SV40 ori
SV40 An
BamH I (2825)
Apa LI (3321)
Amp
Apa LI (4567)

図2

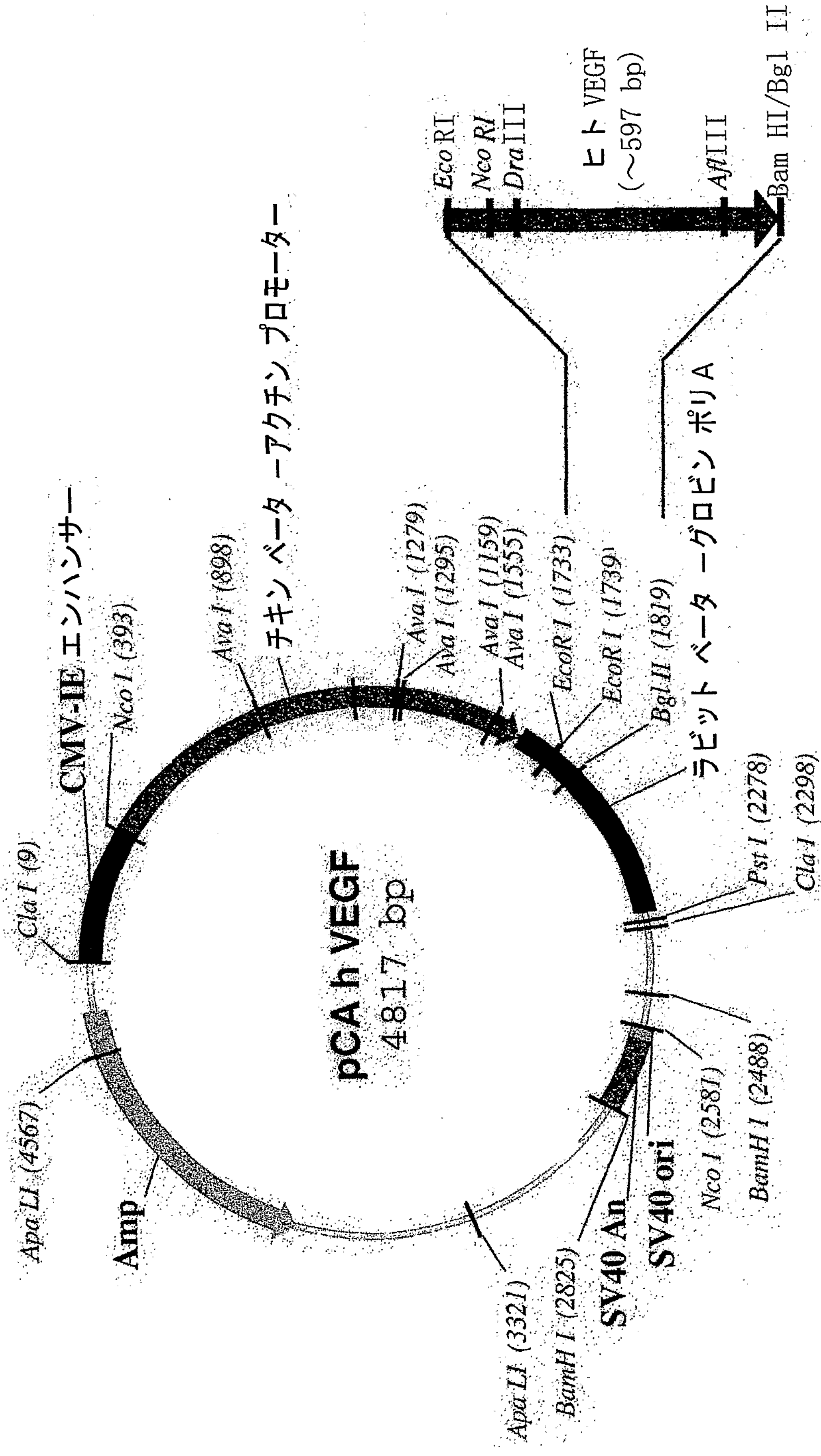

pCA h VEGF
4817 bp
CMV-IE エンハンサー
チキン ベータ ーアクチン プロモーター
ラビット ベータ ーグロビン ポリA
ヒト VEGF
(～597 bp)
EcoRI
NcoRI
DraIII
AflIII
Bam HI/Bgl II
Cla I (9)
Nco I (393)
Ava I (898)
Ava I (1279)
Ava I (1295)
Ava I (1159)
Ava I (1555)
EcoR I (1733)
EcoR I (1739)
Bgl II (1819)
Pst I (2278)
Cla I (2298)
BamH I (2488)
Nco I (2581)
SV40 ori
SV40 An
BamH I (2825)
Apa LI (3321)
Amp
Apa LI (4567)

図３

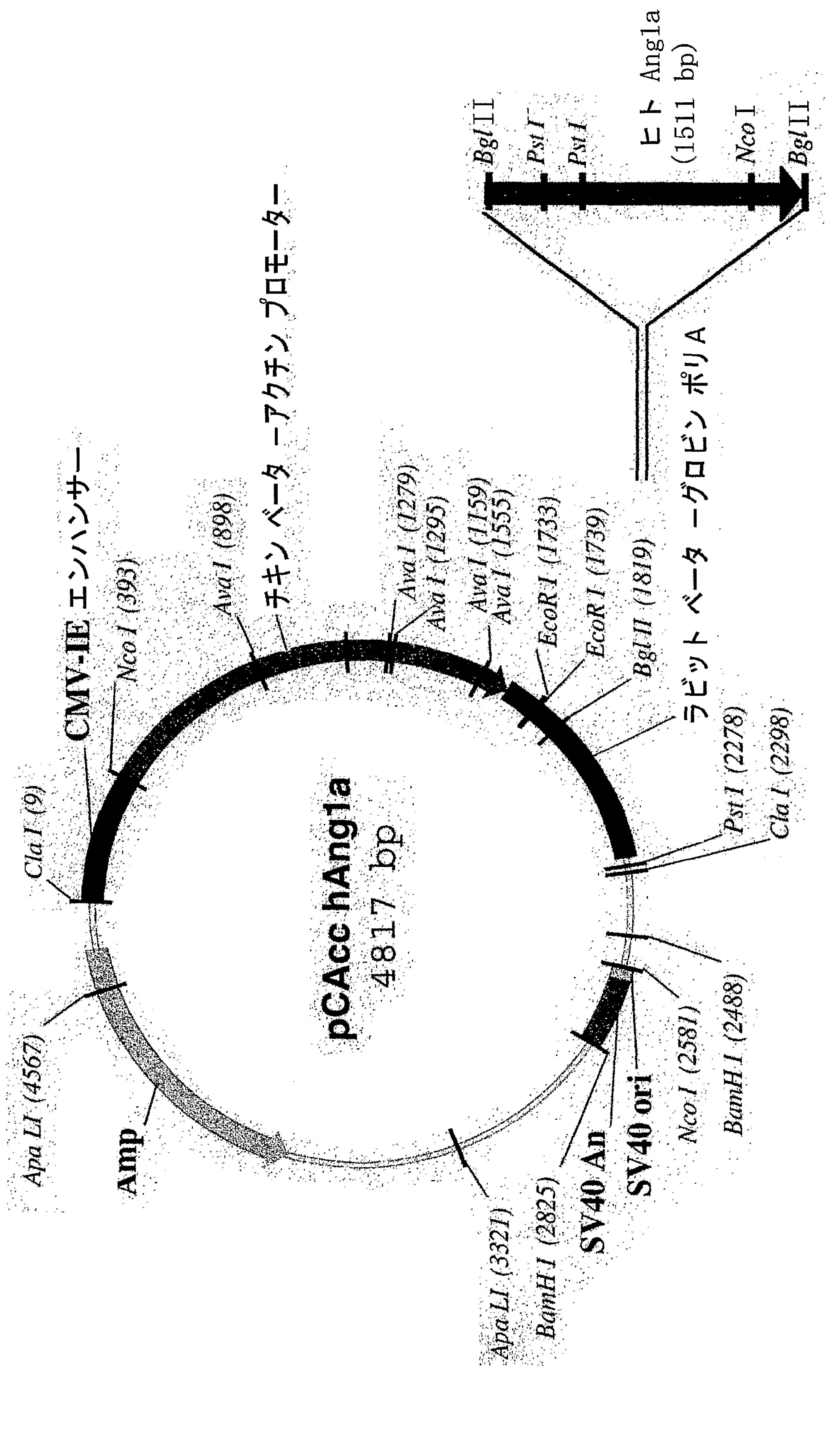

pCAcc hAng1a
4817 bp
Cla I (9)
CMV-IE エンハンサー
Nco I (393)
Ava I (898)
チキン ベータ ーアクチン プロモーター
Ava I (1279)
Ava I (1295)
Ava I (1159)
Ava I (1555)
EcoR I (1733)
EcoR I (1739)
Bgl II (1819)
ラビット ベータ ーグロビン ポリA
Pst I (2278)
Cla I (2298)
BamH I (2488)
Nco I (2581)
SV40 ori
SV40 An
BamH I (2825)
Apa LI (3321)
Amp
Apa LI (4567)
BglII
Pst I
Pst I
ヒト Ang1a
(1511 bp)
Nco I
BglII

図４

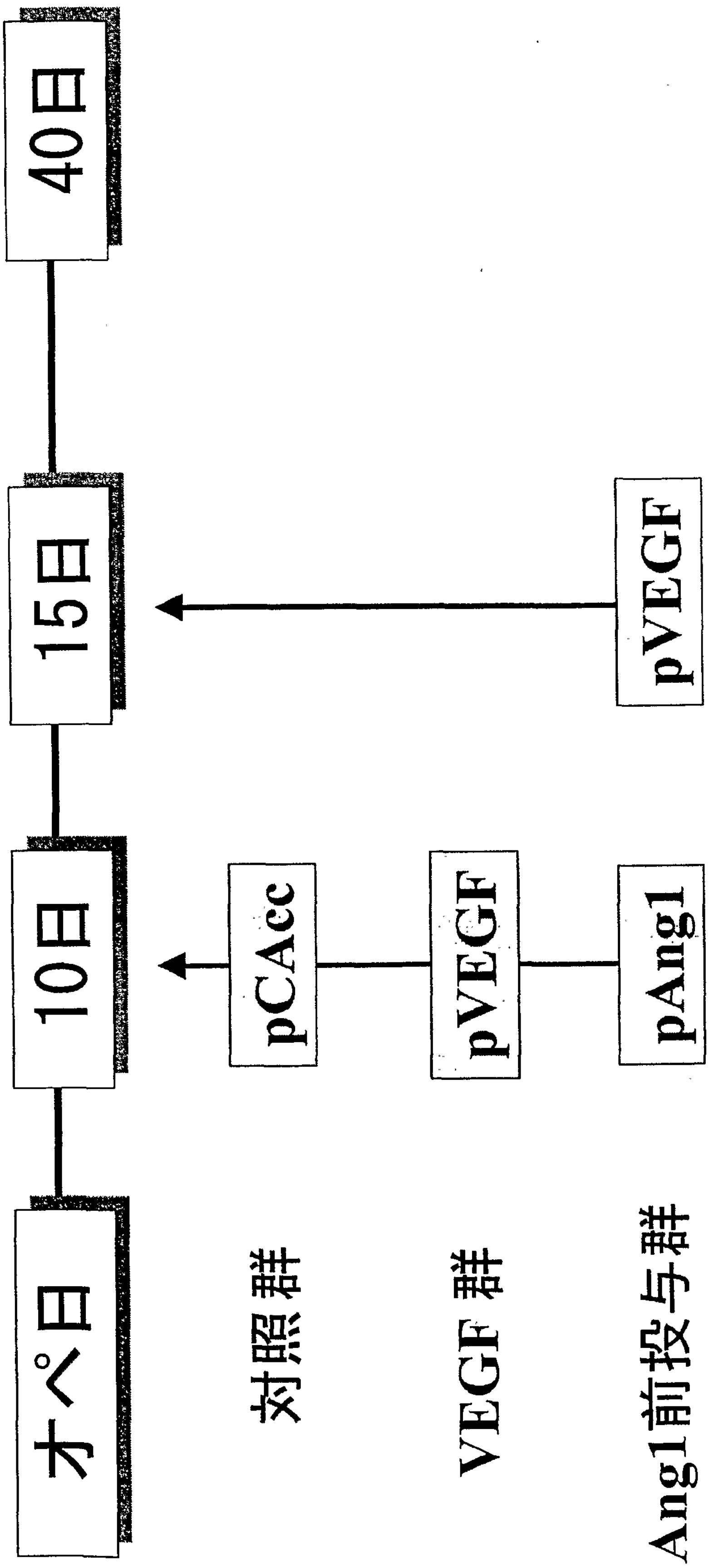


図5

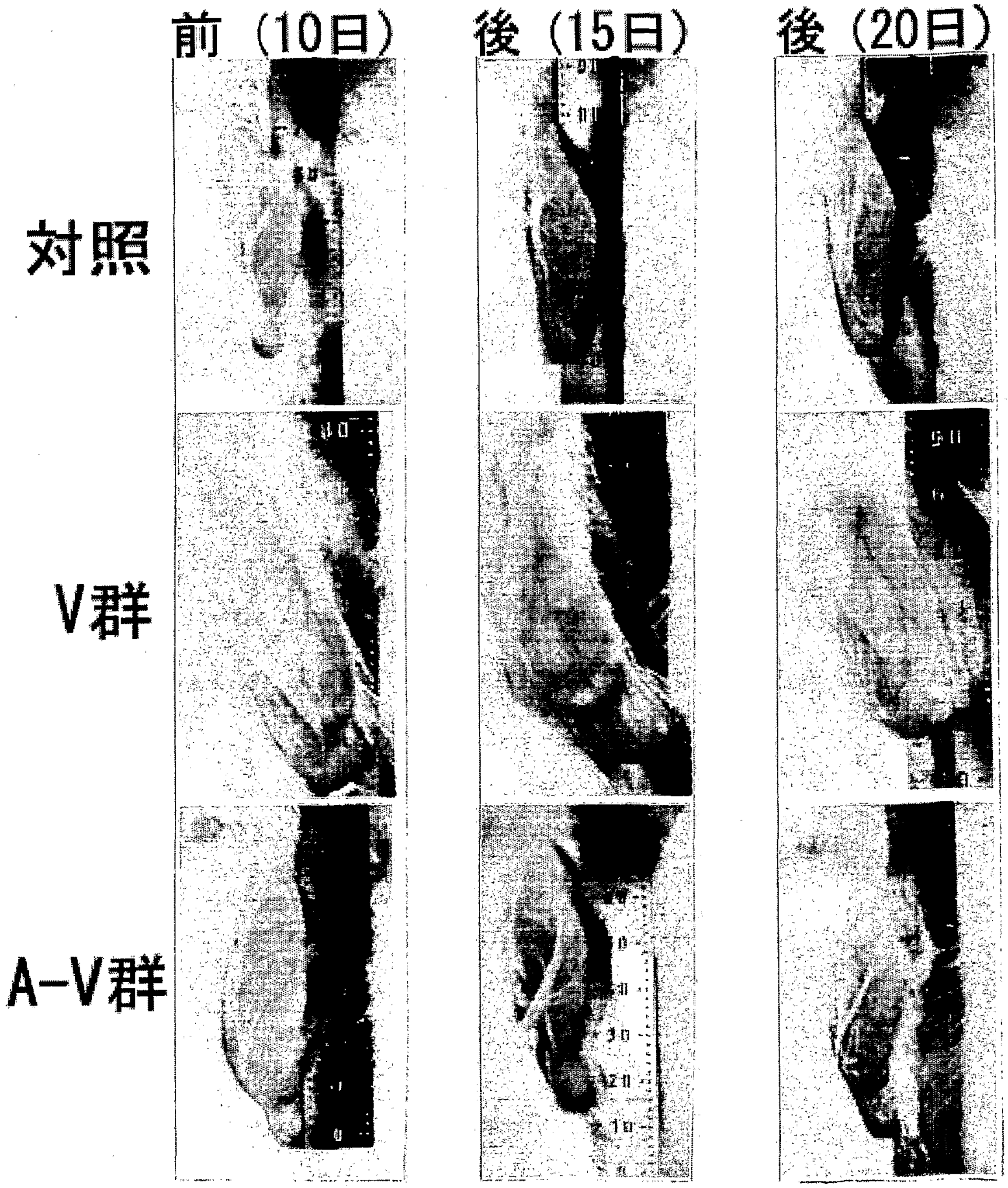


図 6

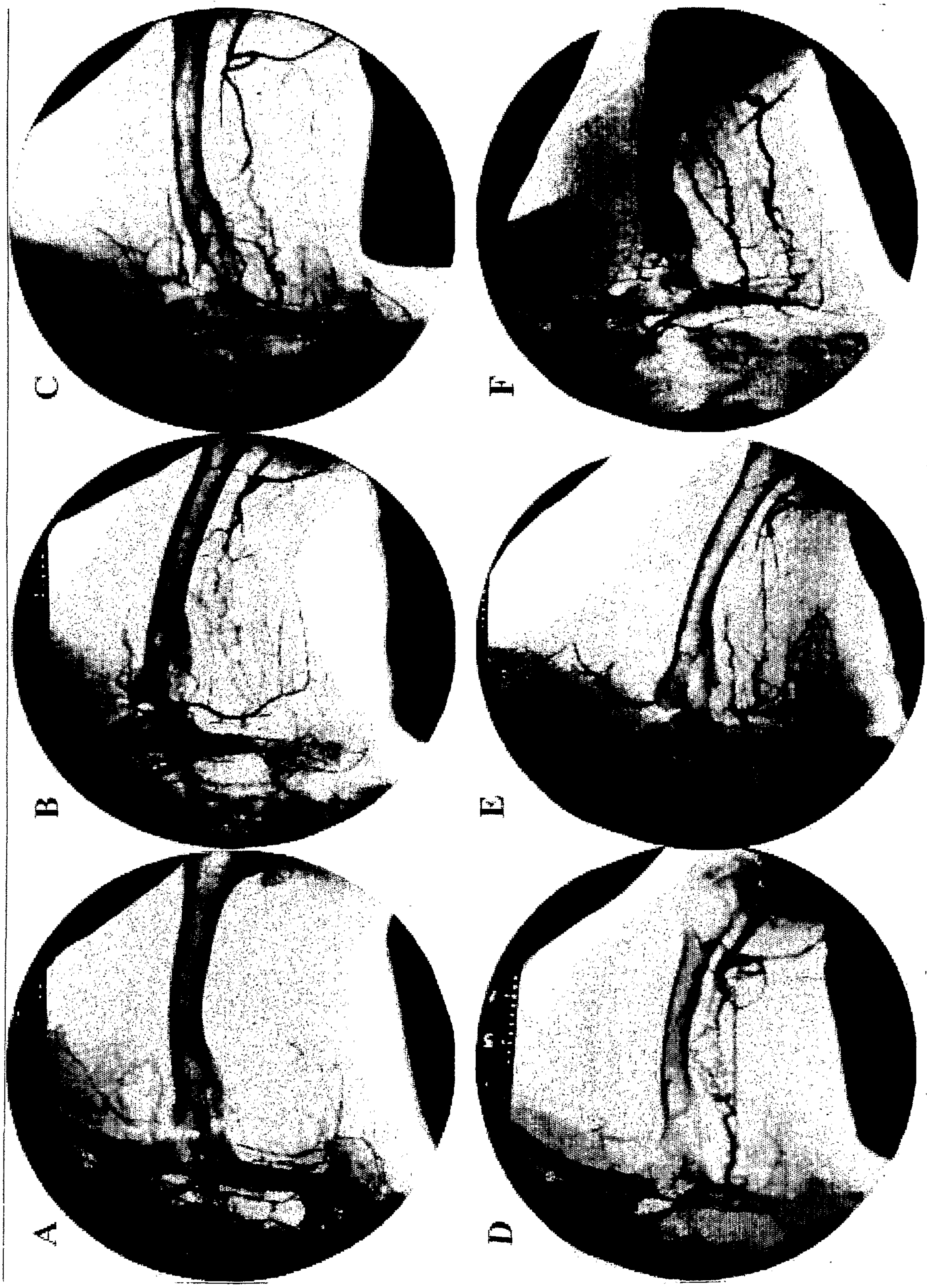


図7

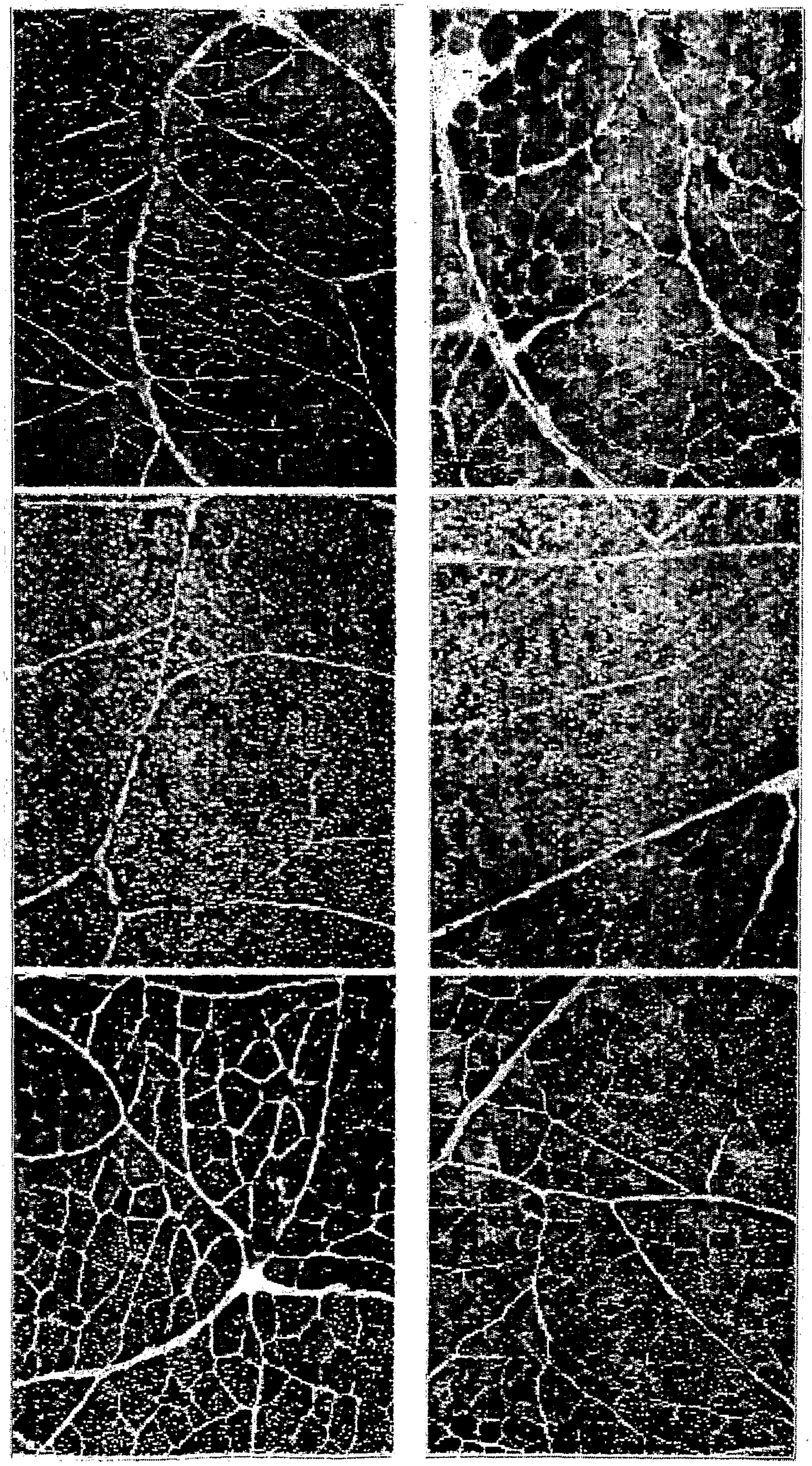
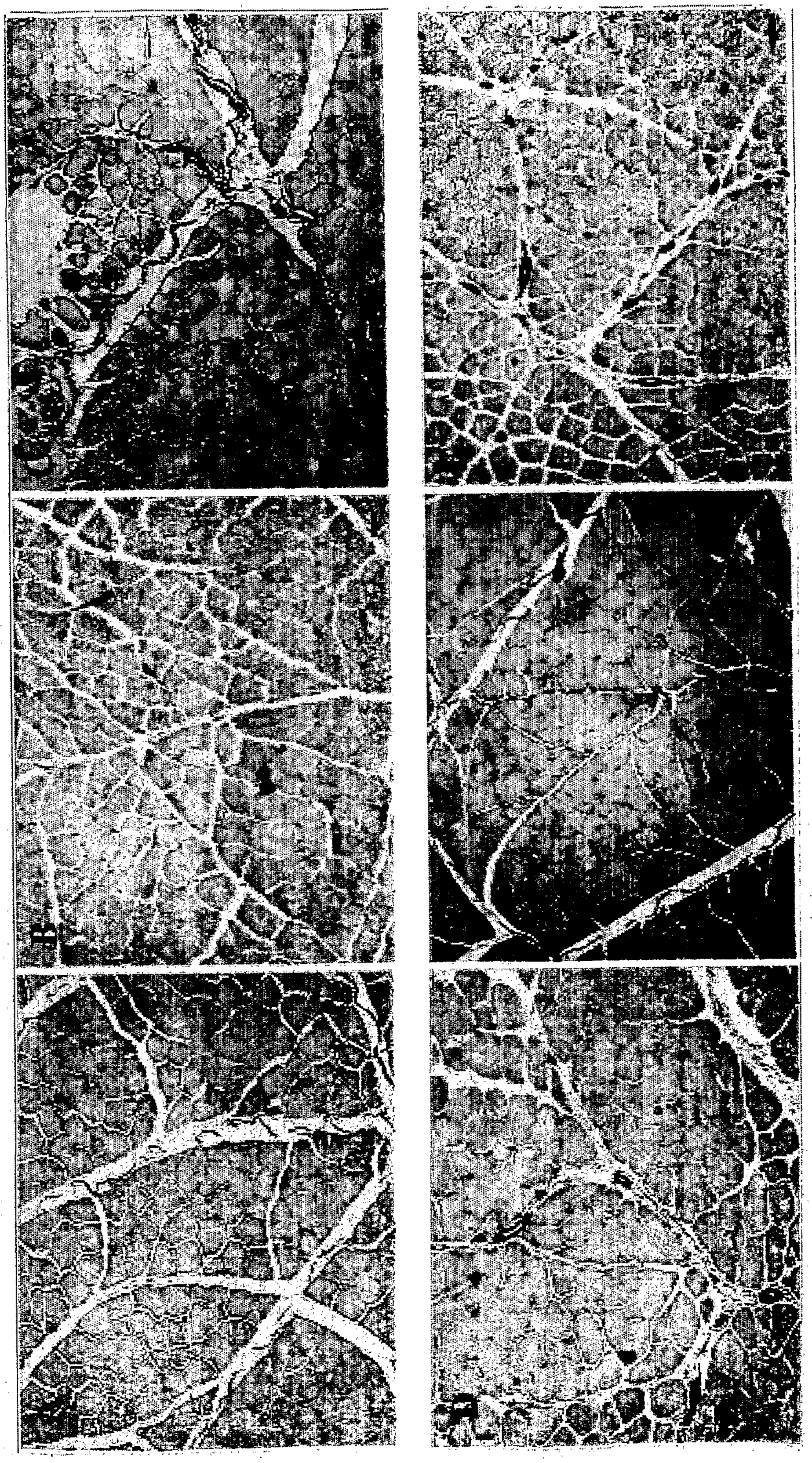


図8



SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> The method of vascular regeneration therapy

<130> D3-A0104P

<140>
<141>

<150> JP 2001-174919
<151> 2001-06-08

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 1

ccggaattca ccatgaactt tctgctgtct 30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 2

cgcggatcct caccgcctcg gcttgtcaca 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 3

gaagatctat gacagttttc ctttcctttg 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 4

gaagatctca aaaatctaaa ggtcgaatca 30

<210> 5

<211> 1508

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

agatctatga cagttttcct ttcctttgct ttcctcgctg ccattctgac tcacataggg 60

tgcagcaatc agcgccgaag tccagaaaac agtgggagaa gatataaccg gattcaacat 120 gggcaatgtg cctacacttt cattcttcca gaacacgatg gcaactgtcg tgagagtacg 180

acagaccagt acaacacaaa cgctctgcag agagatgctc cacacgtgga accggatttc 240

tcttcccaga aacttcaaca tctggaacat gtgatggaaa attatactca gtggctgcaa 300

aaacttgaga attacattgt ggaaaacatg aagtcggaga tggcccagat acagcagaat 360

gcagttcaga accacacggc taccatgctg gagataggaa ccagcctcct ctctcagact 420

gcagagcaga ccagaaagct gacagatgtt gagacccagg tactaaatca aacttctcga 480

cttgagatac agctgctgga gaattcatta tccacctaca agctagagaa gcaacttctt 540

caacagacaa atgaaatctt gaagatccat gaaaaaaaca gtttattaga acataaaatc 600

ttagaaatgg aaggaaaaca caaggaagag ttggacacct taaaggaaga gaaagagaac 660

cttcaaggct tggttactcg tcaaacatat ataatccagg agctggaaaa gcaattaaac 720

agagctacca ccaacaacag tgtccttcag aagcagcaac tggagctgat ggacacagtc 780

cacaaccttg tcaatctttg cactaaagaa ggtgttttac taaagggagg aaaaagagag 840

gaagagaaac catttagaga ctgtgcagat gtatatcaag ctggttttaa taaaagtgga 900

atctacacta tttatattaa taatatgccg gaacccaaaa aggtgttttg caatatggat 960

gtcaatgggg gaggttggac tgtaatacaa catcgtgaag atggaagtct agatttccaa 1020

agaggctgga aggaatataa aatgggtttt ggaaatccct ccggtgaata ttggctgggg 1080

aatgagttta tttttgccat taccagtcag aggcagtaca tgctaagaat tgagttaatg 1140

gactgggaag ggaaccgagc ctattcacag tatgacagat tccacatagg aaatgaaaag 1200

caaaactata ggttgtattt aaaaggtcac actgggacag caggaaaaca gagcagcctg 1260

atcttacacg gtgctgattt cagcactaaa gatgctgata atgacaactg tatgtgcaaa 1320

tgtgccctca tgttaacagg aggatggtgg tttgatgctt gtggcccctc caatctaaat 1380

ggaatgttct atactgcggg acaaaaccat ggaaaactga atgggataaa gtggcactac 1440

ttcaaagggc ccagttactc cttacgttcc acaactatga tgattcgacc tttagatttt 1500

tgagatct 1508

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

gggaattcac catgacagtt ttcctttcct ttgctttc 38

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

agctcctgga ttatatatgt ttgacg 26

<210> 8

<211> 1511

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gaattcacca tgacagtttt cctttccttt gctttcctcg ctgccattct gactcacata 60

gggtgcagca atcagcgccg aagtccagaa aacagtggga gaagatataa ccggattcaa 120

catgggcaat gtgcctacac tttcattctt ccagaacacg atggcaactg tcgtgagagt 180

acgacagacc agtacaacac aaacgctctg cagagagatg ctccacacgt ggaaccggat 240

ttctcttccc agaaacttca acatctggaa catgtgatgg aaaattatac tcagtggctg 300

caaaaacttg agaattacat tgtggaaaac atgaagtcgg agatggccca gatacagcag 360

aatgcagttc agaaccacac ggctaccatg ctggagatag gaaccagcct cctctctcag 420

actgcagagc agaccagaaa gctgacagat gttgagaccc aggtactaaa tcaaacttct 480

cgacttgaga tacagctgct ggagaattca ttatccacct acaagctaga gaagcaactt 540

cttcaacaga caaatgaaat cttgaagatc catgaaaaaa acagtttatt agaacataaa 600

atcttagaaa tggaaggaaa acacaaggaa gagttggaca ccttaaagga agagaaagag 660

aaccttcaag gcttggttac tcgtcaaaca tatataatcc aggagctgga aaagcaatta 720

aacagagcta ccaccaacaa cagtgtcctt cagaagcagc aactggagct gatggacaca 780

gtccacaacc ttgtcaatct ttgcactaaa gaaggtgttt tactaaaggg aggaaaaaga 840

gaggaagaga aaccatttag agactgtgca gatgtatatc aagctggttt taataaaagt 900

ggaatctaca ctatttatat taataatatg ccggaaccca aaaaggtgtt ttgcaatatg 960

gatgtcaatg gggaggttgg actgtaata caacatcgtg aagatggaag tctagatttc 1020

caaagaggct ggaaggaata taaaatgggt tttggaaatc cctccggtga atattggctg 1080

gggaatgagt ttatttttgc cattaccagt cagaggcagt acatgctaag aattgagtta 1140

atggactggg aagggaaccg agcctattca cagtatgaca gattccacat aggaaatgaa 1200 aagcaaaact ataggttgta tttaaaaggt cacactggga cagcaggaaa acagagcagc 1260

ctgatcttac acggtgctga tttcagcact aaagatgctg ataatgacaa ctgtatgtgc 1320

aaatgtgccc tcatgttaac aggaggatgg tggtttgatg cttgtggccc ctccaatcta 1380

aatggaatgt tctatactgc gggacaaaac catggaaaac tgaatgggat aaagtggcac 1440

tacttcaaag ggcccagtta ctccttacgt tccacaacta tgatgattcg acctttagat 1500

ttttgagatc t 1511

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT
(PCT Article 17(2)(a), Rules 13*ter*.1(c) and 39)

Applicant's or agent's file reference D3-A0104P	**IMPORTANT DECLARATION**	Date of mailing *(day/month/year)* 17 September, 2002 (17.09.02)
International application No. PCT/JP02/05485	International filing date *(day/month/year)* 04 June, 2002 (04.06.02)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 08 June, 2001 (08.06.01)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC Int.Cl^7 A61K48/00, 38/00, 45/00, A61P43/00//A61K38/18		
Applicant DNAVEC Research Inc.		

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(a), that **no international search report will be established** on the international application for the reasons indicated below.

1. ☒ The subject matter of the international application relates to:
   - a. ☐ scientific theories.
   - b. ☐ mathematical theories.
   - c. ☐ plant varieties.
   - d. ☐ animal varieties.
   - e. ☐ essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes.
   - f. ☐ schemes, rules or methods of doing business.
   - g. ☐ schemes, rules or methods of performing purely mental acts.
   - h. ☐ schemes, rules or methods of playing games.
   - i. ☒ methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
   - j. ☐ methods for treatment of the animal body by surgery or therapy.
   - k. ☐ diagnostic methods practised on the human or animal body.
   - l. ☐ mere presentations of information.
   - m. ☐ computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art.
2. ☐ The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:
   ☐ the description ☐ the claims ☐ the drawings
3. ☐ The failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions prevents a meaningful search from being carried out :
   - ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
   - ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.
4. Further comments:

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/203 (July 1998)

特　許　協　力　条　約

PCT

国際調査報告を作成しない旨の決定

(法第８条第２項、法施行規則第42条、第50条の3第
〔ＰＣＴ17条(2)(a)、ＰＣＴ規則13の3.1(c)、39〕

出願人又は代理人の書類記号　Ｄ３－Ａ０１０４Ｐ	重要決定	発送日(日.月.年)　17.09.02
国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０２／０５４８５	国際出願日(日.月.年)　０４．０６．０２	優先日(日.月.年)　０８．０６．０１
国際特許分類（ＩＰＣ）　Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ４８／００，３８／００，４５／００，Ａ６１Ｐ４３／００　／／　Ａ６１Ｋ３８／１８		
出願人（氏名又は名称）　株式会社ディナベック研究所		

この出願については、法第８条第２項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定に基づき、次の理由により国際調査報告を作成しない旨の決定をする。

１．[x] この国際出願は、次の事項を内容としている。
- ａ．[ ] 科学の理論
- ｂ．[ ] 数学の理論
- ｃ．[ ] 植物の品種
- ｄ．[ ] 動物の品種
- ｅ．[ ] 植物及び動物の生産の本質的に生物学的な方法（微生物学的方法による生産物及び微生物学的方法を除く。）
- ｆ．[ ] 事業活動に関する計画、法則又は方法
- ｇ．[ ] 純粋に精神的な行為の遂行に関する計画、法則又は方法
- ｈ．[ ] 遊戯に関する計画、法則又は方法
- ｉ．[x] 人の身体の手術又は治療による処置方法
- ｊ．[ ] 動物の身体の手術又は治療による処置方法
- ｋ．[ ] 人又は動物の身体の診断方法
- ｌ．[ ] 情報の単なる提示
- ｍ．[ ] この国際調査機関が先行技術を調査できないコンピューター・プログラム

２．[ ] この国際出願の次の部分が所定の要件を満たしていないので、有効な国際調査をすることができない。
[ ] 明細書　　[ ] 請求の範囲　　[ ] 図面

３　[ ] ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書Ｃ（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際調査をすることができない。
[ ] 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。
[ ] 磁気ディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

４．附記

名称及びあて名 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） 冨永　保	４Ｐ	３１２４
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９２		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２０３（１９９８年７月）