

(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2004-528089

(P2004-528089A)

(43) 公表日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00	A 6 1 L 27/00	V 4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/22	A 6 1 L 27/00	C 4 C 0 8 1
A 6 1 K 45/00	A 6 1 L 27/00	G 4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/48	A 6 1 L 27/00	Q
A 6 1 P 29/00	A 6 1 L 27/00	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-580977 (P2002-580977)	(71) 出願人	598157421
(86) (22) 出願日	平成14年4月17日 (2002. 4. 17)		ユニバーシティ・オブ・シェフィールド
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月16日 (2003. 10. 16)		University of Sheff ield
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/001713		イギリス、エス10・2ティエヌ、シェフ ィールド、ウエスタン・バンク、ファース ・コート
(87) 国際公開番号	W02002/083176	(71) 出願人	501486198
(87) 国際公開日	平成14年10月24日 (2002. 10. 24)		セルトラン リミテッド
(31) 優先権主張番号	0109348.3		イギリス国 エス10 2ティエヌ シ ェフィールド、 ウエスタン バンク、 ファース コート (番地なし)
(32) 優先日	平成13年4月17日 (2001. 4. 17)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	0109347.5		
(32) 優先日	平成13年4月17日 (2001. 4. 17)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】メラニン細胞刺激ホルモン (MSH) を含む生体適合材料および形成方法

(57) 【要約】

本発明は、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH) レセプターリガンドを含む、組織操作および/または外科的手順において使用するためのビヒクルを提供する。このビヒクルは、人工関節、移植植物、マトリクス、ステント、ガーゼ、包帯、プラスター、生分解性マトリクスまたはポリマー性フィルムであり得る。本発明はまた、本発明のビヒクルを形成する方法を提供し、このようなビヒクルを使用するためのMSHのカッピング方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

メラニン細胞刺激ホルモン(MSH)レセプターリガンドを含む、組織操作および/または外科的手順において使用するためのビヒクル。

【請求項 2】

前記ビヒクルが、人工器官、移植体、マトリクス、ステント、ガーゼ、包帯、プラスタ、生分解性マトリクス、またはポリマーフィルムである、請求項 1 に記載のビヒクル。

【請求項 3】

前記 MSH レセプターリガンドが、MSH、またはその機能性フラグメントである、請求項 1 または 2 に記載のビヒクル。

10

【請求項 4】

前記レセプターリガンドが、MSH の構造改変体を含むペプチドであり、そして MSH レセプター結合機能を有する、請求項 1 または 2 に記載のビヒクル。

【請求項 5】

前記 MSH レセプターリガンドが、固定化されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

【請求項 6】

前記 MSH レセプターリガンドが、タンパク分解性切断によって放出される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

【請求項 7】

MSH レセプターリガンドに対して近位のタンパク分解性切断部位を含む、請求項 6 に記載のビヒクル。

20

【請求項 8】

MSH レセプターリガンドが、リンカーによってビヒクルに連結されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

【請求項 9】

前記リンカーが、ポリエチレングリコール(PEG)リンカーである、請求項 8 に記載のビヒクル。

【請求項 10】

MSH レセプターリガンドと関連し、MSH レセプターリガンドにカップリングまたは連結するカリックスアーレンをさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

30

【請求項 11】

プラズマ処理された表面をさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

【請求項 12】

急性炎症性上皮障害または慢性炎症性上皮障害の処置において使用するための、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

【請求項 13】

MSH レセプター結合リガンドを、上皮表面に送達するのに使用するための、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

40

【請求項 14】

細胞が結合し得る細胞キャリア表面をさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

【請求項 15】

前記細胞キャリア表面が、ケラチノサイト；メラノサイト、皮膚上皮細胞、気管支上皮細胞、膀胱上皮細胞、角膜上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、単球、胃腸粘膜上皮細胞および口腔粘膜上皮細胞のいずれかまたはこれらの組み合わせを用いる使用に適切である、請求項 14 に記載のビヒクル。

【請求項 16】

50

軟骨修復；骨修復；筋肉修復；神経修復；結合組織修復；血管修復；膀胱修復における使用のための、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

【請求項 17】

前記ビヒクルが、美容術の組織操作を必要とする患者に塗布および/または移植されるために適合される、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

【請求項 18】

前記ビヒクルが、治療的な組織操作を必要とする患者に塗布および/または移植されるために適合される、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載のビヒクル。

【請求項 19】

請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載のビヒクルを形成する方法であって、以下の工程： 10

- i) リンカーを介して、MSHペプチドを表面にカップリングする工程；
 - ii) MSHペプチドを、カリックスアーレンまたはカリックスアーレン処理した表面に結合する工程；
 - iii) MSHペプチドをプラズマ処理した表面に固定化する工程；
- の 1 つ、またはこれらの工程の組み合わせを包含する、方法。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法であって、工程 (i) が、以下の工程；

- i) 結合剤およびMSHレセプターリガンドを提供する工程；
 - ii) MSHレセプターと該結合剤とが結合するのに適切な条件を提供する工程；および
 - iii) 接触する結合された分子を、処理されるべき細胞表面に接触させる工程 20
- の 1 つ、またはこれらの工程の組み合わせを包含する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記リンカーが、ポリエチレングリコール (PEG) を含む、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

細胞培養表面を調製する方法であって、以下：

- i) 少なくとも 1 つの有機モノマーを提供する、工程；
 - ii) 前記モノマーのプラズマを作製する、工程；および
 - iii) MSH が結合し得る細胞培養表面を提供するために、該プラズマで表面をコーティングする、工程 30
- を包含する、方法。

【請求項 23】

前記有機モノマーが、アルキルアミン、ブチルアミン、ヘプチルアミンまたはプロピルアミンのようなアミンである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

治療的手術または美容的手術を必要とする患者に、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載のビヒクルを投与する工程を包含する、処置の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】 40

(発明の分野)

本発明は、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH) を含む、治療的組織操作/外科的手順または美容的組織操作/外科的手順に使用するためのビヒクル、およびこのようなビヒクルを使用するための MSH のカップリング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

ドナーの組織および/または器官の不足と組み合わせ、身体部分の置換術の必要性は、組織操作産物の製造に繋がる。

【0003】 50

組織操作は、新興科学であり、多くの臨床外科および美容外科の分野と関連している。より具体的には、組織操作は、損傷した組織および/または疾患した組織の、置換術および/または回復および/または修復（例えば、美容目的かあるいは組織および/または器官を機能的状態に戻すため）に関する。例えば、（そして限定の目的ではない）組織操作は、静脈潰瘍または糖尿病性潰瘍に起因する挫傷、熱傷、または治癒のための組織不全の結果生じる創傷を修復するための皮膚片の提供に有用である。

【0004】

組織操作はまた、関節炎のような変性疾患に起因する関節の置換術、種々の環境原因（例えば、喫煙、ダイエット）および/または動脈弁/心臓弁の置換術を含む、先天性心臓疾患の結果としての損傷に起因する冠状動脈の置換術、器官移植、胃潰瘍の修復、骨粗鬆症のような疾患を処置するための骨組織の置換術、障害を介する神経筋疾患または神経筋損傷の結果としての筋肉および神経の置換術ならびに泌尿器疾患に対抗するための膀胱物質（bladder material）の置換術の間に実行される。

10

【0005】

残念なことに、インビボでの細胞/組織の培養は、組織操作が直面する問題の一部のみを表す。多くの例において、培養における細胞増殖は、成功の主な障害ではない。適切なビヒクルを介する細胞/組織の移動によって、細胞/組織は、さらに多くの課せられた問題を示す、処置されるべき患者に組み込まれる。限定の目的ではなく、例示としての適切なビヒクルとしては、培養ウエア、人工器官、移植体、3次元マトリクス支持体、細胞外マトリクスタンパク質でコーティングした包帯、絆創膏またはプラスチックが挙げられ得る。

20

【0006】

置換組織の移動に適切なビヒクルは、それらが組織操作に有用である場合、特定の要求を満足させるべきである。典型的には、移動ビヒクルは、以下の特徴を有する：

- i) 移動ビヒクルが、細胞がしっかりと接着し得る表面を提供すること；
- ii) 移動ビヒクルが、接着された細胞の、接着表面によって妨害されない増殖および分裂を可能にすること；
- iii) 適切な場合、移動ビヒクルが、接着された細胞の分化（または未分化）状態に影響を及ぼさない接着表面を提供すること；
- iv) 移動ビヒクルは、滅菌状態および免疫学的にサイレントな状態で細胞を維持すること；
- v) 移動ビヒクルは、毒性が、患者に対して最小限であること；
- vi) 移動ビヒクルは、細菌疾患またはウイルス疾患を伝達しないこと；ならびに
- vii) 移動ビヒクルは、接着された細胞が容易に脱離し得る表面を提供し、そしてその結果置換術、回復または修復を必要とする組織部位に侵入する。

30

【0007】

他の外科的手順は、細胞移送の状況において使用されないビヒクルに頼っており、そのビヒクルは、実質的には細胞を含み得ない。限定する目的ではなく、例示の目的として、このビヒクルは、炎症を軽減するための絆創膏またはデバイスであり得、例えば、火傷損傷、静脈下腿潰瘍、糖尿病性潰瘍または乾癬もしくは湿疹のような炎症性皮膚疾患の創傷治癒の状況において使用される。

40

【0008】

皮膚細胞（ケラチノサイト、メラノサイトおよび線維芽細胞）によるMSH自己分泌産生は、内因性防御機構の一部であり、細胞が炎症および酸化的ストレスの期間に生存することを補助する。

【0009】

MSHは、下垂体、腸および皮膚において産生される13個のアミノ酸ペプチドである。色素細胞におけるメラニン形成制御におけるMSHの役割は、最も公知である。MSHの色素外作用の理解は、近年急速に発展している。多くの研究は、可視的な色素沈着が、皮膚におけるMSHのわずかな生理学的な役割を示すのみであり得ることを示唆する。以前は、メラノサイトのみがMSHに応答すると考えられていた。現在は、MSHに対する応

50

答能力は、色素を産生し得る細胞だけではなく、皮膚の多くの細胞によって共有されていると考えられている。さらに、メラノサイト、皮膚上皮細胞、気管支上皮細胞、膀胱上皮細胞、角膜上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞および単球のような多くの異なる細胞型が、MSHについてのメラノコルチン-1レセプター(MC-1R)を保有する。

【0010】

創傷を修復するための組織操作のアプローチは、従来の処置と比較して有意な治療利点を示すことに疑いはない。しかし、いくつかの問題がなお現在未解決である。特に、組織操作された物質が臨床的に使用される場合に生じる、炎症の最初の期間の間に細胞を保護するためのアプローチを開発することが必要である。この初期炎症応答は、移植術の最初の数日間における多くの物質の破壊および欠失について応答し得ると考えられる。有害な炎症応答はまた、冠状動脈ステントおよび人工器官のような外科的デバイスが使用される場合、および自家細胞(autologous cell)が体内に再び導入される場合でさえしばしば観察される。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

(発明の記載)

本発明によって、MSHレセプターリガンドを含む組織操作/外科的手順に使用するためのビヒクルが提供される。

20

【0012】

用語、ビヒクルは、組織操作/外科的手順に使用するための任意の構造物またはデバイスとして定義され得る。限定の目的ではなく、例示の目的で、この用語は、人工器官、移植物、マトリクス、ステント、ガーゼ、絆創膏、プラスター、生分解性マトリクス；またはポリマーフィルムを含む。

【0013】

好ましくは、このビヒクルは、患者に送達された場合に、最小限の患者毒性を有し、そして好ましくない反応を誘発しない。

【0014】

MSHレセプターリガンドは、MSHまたはMSHの機能性フラグメントを含む別のペプチドに適しており、例えば、それはMSHの機能性フラグメントであり得る。あるいは、このレセプターリガンドは、MSHの構造改変体を含むペプチドおよびMSHレセプター結合機能を有するペプチドであり得る。用語、機能性フラグメントは、MSHから誘導された任意のペプチドを含む(例えば、MSHの6アミノ酸フラグメントおよび3アミノ酸フラグメントは、同一の生物学的効果を達成し得る)。

30

【0015】

用語、構造改変体は、同一の生物学的活性を保持する配列改変体を含むか、または増加された生物学的活性を有する(例えば、13アミノ酸長であるMSHのような特に強力なペプチドが存在する)。表1に、MSH全長配列(番号6のMSH全長配列は、特に強力なペプチドである)およびフラグメント配列を列挙する。

40

【0016】

(表1 MSH全長配列およびフラグメント配列)

【0017】

【表1】

使用されるアミノ酸の3文字表記

アラニン	Ala	グルタミンまたは グルタミン酸	Glx	フェニルアラニン	Phe
アルギニン	Arg	グリシン	Gly	プロリン	Pro
アスパラギン	Asn	ヒスチジン	His	セリン	Ser
アスパラギン酸	Asp	イソロイシン	Ile	トレオニン	Thr
アスパラギンまたは アスパラギン酸	Asx	ロイシン	Leu	トリプトファン	Trp
システイン	Cys	リジン	Lys	チロシン	Tyr
グルタミン酸	Glx	メチオニン	Met	バリン	Val
ノルロイシン	Nle				

10

L = 左旋性 (示されない限り、全てのアミノ酸立体配座)

D = 右旋性 (アミノ酸がL配座ではないことが示される)

Ac = アセチル

MSH 全長配列

1. α -MSH Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Typ-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂
2. α -MSH (遊離酸) Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Typ-Gly-Lys-Pro-Val-OH
3. (Des-アセチル)- α -MSH H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Typ-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂
4. (ジアセチル)- α -MSH Ac-Ser(Ac)-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Typ-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂
5. (Nle₄)- α -MSH Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Typ-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂
6. (Nle₄, D-Phe₇)- α -MSH Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Typ-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

20

MSH フラグメント配列

7. (Ac-Nle₄, Gln₅, D-Phe₇, D-Trp₉)- α -MSH (4-10) Ac-Nle-Gln-His-D-Phe-Arg-D-Trp-Gly-NH₂
8. (Ac-Cys₄, D-Phe₇, Cys₁₀)- α -MSH (4-13) Ac-Cys-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys-Lys-Pro-Val-NH₂
9. α -MSH (11-13) H-Lys-Pro-Val-NH₂
10. α -MSH (11-13) 遊離酸 H-Lys-Pro-Val-OH
11. アセチル- α -MSH (11-13) Ac-Lys-Pro-Val-NH₂
12. アセチル-(D-Lys₁₁, D-Val₁₃)- α -MSH (11-13) Ac-D-Lys-Pro-D-Val-NH₂
13. アセチル-(D-Val₁₃)- α -MSH (11-13) Ac-Lys-Pro-D-Val-NH₂
14. α -MSH (10-13) H-Gly-Lys-Pro-Val-OH
15. α -MSH (10-13) H-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂
16. アセチル- α -MSH (10-13) Ac-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

30

本発明はまた、前述の任意のペプチドのペプチド模倣活性を含むビヒクルを含む。すなわち、同一の生物学的活性を伝達するが、これらのペプチドと同一の構造を有する必要はない。

40

【0018】

本発明の1つの実施形態において、ビヒクルは、固定化されたMSHを含む。代替の実施形態において、MSHは、タンパク分解性切断によってゆっくりと放出される。

【0019】

(MSHのタンパク分解性切断および放出)

支持体の生体適合材料表面からのMSHペプチドフラグメントの局所的な送達方法は、MSHペプチドに近位である、エンドペプチダーゼ/プロテイナーゼ/タンパク質分解性切断の組みこみによって示唆される。プロテイナーゼ活性は、移植されたデバイスを取り囲む宿主組織から生じ、酵素媒介性切断および生理活性なMSHペプチドフラグメントの放出を容易にする。従って、引き続きMSHペプチドと宿主組織レセプターとの間のレセプター媒介性相互作用が可能となる。

50

【0020】

M S H ペプチドの近位にある単一のタンパク分解性切断部位が示唆されるが、所定の部位に設計されたアミノ酸配列は、潜在的に大きく：a) 所定のタンパク分解性酵素に有効な、異なるタンパク分解性切断部位の数に起因し、そしてb) この関係において潜在的に作用し得る組織酵素の数に起因する。従って、2つの例が、設計方法論を示すために以下に説明される：1) マトリクスメタロプロテイナーゼ I (M M P 1 : 線維芽細胞コラゲナーゼ) について、そして2) プラスミン (フィブリン/フィブリノゲン切断) について。これらの例のそれぞれの場合において、放出される M S H ペプチドフラグメントは、M S H 1 1 ~ 1 3 (L y s - P r o - V a l) または M S H 1 0 ~ 1 3 (G l y - L y s - P r o - V a l) に基づく。

10

【0021】

(スキーム1 : プロテアーゼ切断部位の例)

【0022】

【数1】

MMP1

P3 P2 P1= P1' P2' P3'

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

1. 支持体表面 :---\W\W\W\W\---Ala-Pro-Gly=Leu-Lys-Pro-Val (ネイティブ
プロテアーゼ切断部位)

2. 支持体表面 :---\W\W\W\W\---Ala-Pro-Gly=Gly-Lys-Pro-Val (ネイティブ
MSHテトラペプチド配列)

20

【0023】

【数2】

プラスミン

3. 支持体表面 :---\W\W\W\W\---Arg=Val-Lys-Pro-Val (ネイティブプロテアーゼ切断部位)

4. 支持体表面 :---\W\W\W\W\---Arg=Gly-Lys-Pro-Val (ネイティブ MSHテトラペプチド
配列)

5. 支持体表面 :---\W\W\W\W\---Arg=Ala-Lys-Pro-Val (ネイティブプロテアーゼ切断部位)

30

プロテアーゼ切断部位は = によって示される。

【0024】

プロテアーゼ切断命名 (例えば、P 1 / P 1 ') は、上記の配列に示される。

【0025】

上記のスキームにおいて、生理活性の M S H テトラペプチドは、放出される。しかし、任意の M S H ペプチド配列 (表 1 に詳述される) は、タンパク分解性放出のための候補生理活性ペプチドである。

【0026】

プロテアーゼ切断部位が、ネイティブ (例えば、M M P 1、実施例 1) として上に示される場合、M S H 1 0 ~ 1 3 配列は、この C 末端に放出される。この場合、M S H 1 0 位のアミノ酸は、(G l y がネイティブとして) ネイティブではないが、類似の化学特性を持つ置換されたアミノ酸は、P 1 ' 位に存在する (例えば、A l a、L e u または V a l - すなわち、疎水性 (h y d o p h o b i c i t y) を保持する)。ネイティブの M S H 1 0 ~ 1 3 テトラペプチド配列が上に示される場合 (例えば、M M P 1、実施例 2)、この切断部位は、プロテアーゼに対して全体的にネイティブではない。さらに、類似の特性を有するアミノ酸は、P 1 切断部分 (例えば、A l a / V a l 対 G l y、類似の脂肪族側鎖アミノ酸を使用して疎水性を保持する) に置換されている。M M P 1 によって特異的に切断される場合、これは、宿主組織レセプターによる引き続く相互作用のためにネイティブの M S H 1 0 ~ 1 3 ペプチドを放出する。

40

50

【0027】

M S H 配列に連結するプロテアーゼ切断部位に共通な一般的な設計は、M S H 生理活性ペプチド放出機能を満たすための多数の推定アミノ酸配列を生じる。従って、非常に多くの切断部位 / M S H 配列の組み合わせを列挙する代わりに、限定的な数の通常の組織プロテアーゼが示唆され、このことから、本発明者らは、隣接 M S H ペプチドを放出する潜在能力についての候補酵素と関連することを予想する。従って、特定の M S H 配列に連結したプロテアーゼ切断配列の個々の設計は、各プロテアーゼ / M S H ペプチドの組み合わせについて存在する。

【0028】

本発明の1つの実施形態において、M S H (またはその構造フラグメントもしくは機能フラグメント) は、随伴性の細胞接着と関連しない。例えば、M S H ペプチドは、急性または慢性の炎症性上皮障害の処置のための絆創膏 / 包帯、またはビーズと関連し得る。従って、絆創膏またはビーズへの適用は、慢性潰瘍 (糖尿病、非治癒性静脈潰瘍または動脈潰瘍または床ずれ)、火傷損傷 (例えば、小児科の火傷) または炎症性皮膚疾患 (ここで、過剰な炎症は、例えば、乾癬および湿疹のような状態の寄与因子として見られる) の処置のために使用され得る。これらの用途において、絆創膏 / 包帯が治癒などの速度を増加させることが適度に予想され得る炎症の範囲を減少させるのに使用されることが認識される。細胞の引き続く適用は、治癒を加速させるかまたは創傷の閉鎖を達成するための処置の一部として伴っても伴わなくてもよい。ビーズ上に固定された M S H ペプチドは、例えば、鼻粘膜 (花粉症の処置) 腸上皮 (過敏性腸症候群、クローン病およびセリアック病のような慢性炎症性状態) または気道上皮表面 (喘息) のような炎症に罹患する内蔵の上皮表面に送達するために使用され得る。あるいは、M S H ペプチドは、冠状動脈ステント、人工器官、心臓弁または任意のデバイスのような移植可能な物質またはデバイスと関連し得、このデバイスは、炎症を引き起こすデバイスの能力を減少することが望ましい場合に、体内に挿入される。

10

20

【0029】

本発明の代替的な実施形態において、M S H ペプチドはまた、随伴性細胞接着のための絆創膏または包帯と関連し得る。この方法は、慢性的な潰瘍および火傷の処置のための皮膚送達デバイスに適用され得、おそらく M S H ペプチドが随伴性細胞接着なしに固定化される適用の結果として生じる。このビヒクルは、細胞が結合され得る細胞キャリア表面 (例えば、表皮、ケラチノサイト、角膜上皮細胞、膀胱上皮細胞または腸上皮細胞接着のような上皮細胞表面) を含む。組織操作された心臓弁、再構築された肝臓、膀胱または冠状動脈ステントのような広範囲の移植可能な組織操作デバイスが、内皮細胞接着を促進させるような方法できるようにコーティングされる。これらのいずれかは、プロ炎症性サイトカインおよび酸化ストレスに対する応答において、M S H ペプチドの封入から、デバイス (および隣接細胞) 上の細胞を助けるという利点があり得る。

30

【0030】

好ましくは、本発明のビヒクルに関連する細胞は、M C - I R レセプターを保有し、M S H レセプターリガンドに接着する。

【0031】

本発明のなおさらなる好ましい実施形態において、前記ビヒクルは、哺乳動物起源の細胞、より好ましくは、ヒト起源の細胞を用いる使用にとって適切である。

40

【0032】

より好ましくは、前記細胞は、以下のような細胞型から選択される: ケラチノサイト; メラノサイト、皮膚上皮細胞、気管支上皮細胞、膀胱上皮細胞、角膜上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、単球、胃腸粘膜上皮細胞および口腔粘膜上皮細胞。

【0033】

本発明のビヒクルが、例えば、(限定の目的ではないが) 急性および / もしくは慢性ならびに / または軽度および / もしくは重度の皮膚創傷 (静脈性潰瘍および糖尿病性潰瘍を含む) ; および / または軟骨修復 ; および / または骨修復 ; および / または筋肉修復 ; およ

50

び／または神経修復；および／または結合組織修復；および／または血管修復；および／または膀胱修復への適用の前の、細胞が基質の表面上で増殖し得る臨床的適用において有用であることは、当業者に明らかである。

【0034】

本発明の代替の実施形態に従って、その表面がMSHレセプターリガンドと連結、カップリングまたは結合する点において特徴付けられる細胞キャリア表面を備える美容用のビヒクルが提供され、ここで、このビヒクルは、美容組織操作を必要とする患者に塗布および／または移植されるために適合される。

【0035】

本発明の代替の実施形態に従って、その表面がMSHレセプターリガンドと連結、カップリングまたは結合する点において特徴付けられる細胞キャリア表面を備える治療用のビヒクルが提供され、ここで、このビヒクルは、治療組織操作を必要とする患者に塗布および／または移植されるために適合される。

10

【0036】

本発明は、MSHレセプターリガンドを含むビヒクルを提供する。本発明のビヒクルへのMSHの導入は、炎症損傷に立ち向かうために、このビヒクルまたは構築物の中にMSHレセプターが細胞を保持するのを助けるかまたは、MSHレセプターの、このビヒクルまたは構築物上の移動を助け、その結果、現存の組織操作／外科用ビヒクルに有意な利点を提供する。

【0037】

組織操作された物質が臨床的に使用される際に起こる炎症の初期は、シクロスポリンのような免疫抑制剤の使用によって現在処置されている。シクロスポリンおよび他のこのようなステロイドは、全身的にか、または局所的に送達され得、そしてこれらを長期間の送達には不適切にする免疫系の重篤な減衰を伴う。都合の良いことに、MSHは、免疫系をブロックせず、長期間の送達に適している。

20

【0038】

好ましくは、MSHレセプターリガンドと本発明のビヒクルとの結合は、以下のひとつまたは任意の組み合わせによって達成される：

i) リンカー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）リンカー）を介する表面へのMSHペプチドのカップリング；

30

ii) MSHペプチドと、カリックスアーレン、またはカリックスアーレン処理された表面との結合；

iii) MSHペプチドのプラズマ重合された表面への固定化。

【0039】

(i) MSH連結分子)

RGDモチーフは、PEGに連結し得ることが知られている（例えば、Drumhellerら、1994）。スキーム2は、MSHとPEGとの連結を記載する。

【0040】

本発明のさらなる実施形態に従って、MSHレセプターリガンドが結合し得る表面を調製する代替の方法が提供され、その方法は、以下の工程を包含する：

40

i) 連結剤およびMSHレセプターリガンドを提供する工程；

ii) この薬剤とMSHレセプターリガンドとの連結に適切な条件を提供する工程；および

iii) 連結した分子を移動させ、処理すべき細胞表面と接触させる工程。

【0041】

本発明の好ましい方法において、この連結剤は、ポリエチレングリコールである。他の結合剤も利用可能であり、この目的のために使用され得る。

【0042】

(ii) カリックスアーレンおよびMSH（スキーム3参照）)

カリックスアーレンは、両親媒性分子であり、この一般的な構造は、脚上の分子鉢の構造

50

であり、その鉢の端にはヒドロキシル基が整列しておりそしてその脚は長鎖のアルキル基からなる。カリックスアーレンの異なる型およびそれらの製造方法の詳細な総説は、Bohmer, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 713-745 (この開示全体は、本明細書中で全ての目的のために参考として援用される)において与えられる。

【0043】

カリックスアーレンの鉢の端に並ぶヒドロキシル基は、親水性基材に強く結合し得ることが公知であり、また、カリックスアーレンがまた疎水性のペンダント脚をも有する場合、カリックスアーレンが基材に高度に撥水性の表面を与え得ることも知られている(WO97/39077を参照のこと)。疎水性表面は、多くの手段(親水性「モノマー」のプラズマ重合化によるものを含む)によって親水性にされ得る。

10

【0044】

本発明者らは、レゾルシナレン(resorcinarene)(X=H)およびピロガレン(pyrogallene)(X=OH)(ここでn=4)について最初に研究した。しかし、Xは、より広く変化し得(例えば、CH₂ZまたはOCH₂Z)、そしてnもまた6または8であり得る。ペンダントのY基は、本発明の化合物中の長鎖のアルキルまたはペルフルオロアルキルであるが、二重結合、三重結合、SR、OHまたはSHのような官能基の鎖の末端への組み込みがまたなされ得る^{1, 9}。Yはまた、長いポリエチレンオキシド鎖であり得る。

【0045】

このアプローチの主な利点は、処理の単純さと低い負荷であり、このことは、バルク物質に容易に適用し得ることを意味する。他の利点は、化合物が表面上で規則正しい単一層を形成する場合、固定された種/吸着された種は、より規定された環境にある(細胞表面を模倣するためにそれ自身が修飾され得る)。

20

【0046】

本発明のさらなる実施形態において、MSHレセプターリガンドに結合し得る、カップリングまたは連結したカリックスアーレンが提供される。

【0047】

本発明のなおさらなる実施形態において、MSHレセプターリガンドにカリックスアーレンをカップリングさせるか連結させる方法を提供し、その方法は、以下の工程を包含する

30

最初の例において、ペンダント鎖Yは、前に記載したようにOHを有する末端部分で官能化である。これらのOH基は、十分確立された合成技術に従ってNH₂に転換される。カリックスアーレン溶液による物質の簡単な処理は、この物質に、規則正しいアミン官能化の表面を提供する。

【0048】

あるいは、前に記載したカップリング技術および物質処理のために使用される全体の構築を使用して、カリックスアーレンとMSHとの事前のカップリングが行われ得る。

【0049】

同様に、カリックスアーレンは、鎖(tether)を介して単一のMSHによって官能化される。モノ官能化カリックスアーレンは、S. Saito, D. M. RudkevichおよびJ. Rebeck Jr, Org. Lett. 1999, 1(8), 1241-1244によって記載されるように合成され得、そしてアミノ官能化形態に転換され、これは、ポリエチレングリコールに繋がれたMSHによる容易な誘導を可能にする。

40

【0050】

この合成アプローチは、以下に示されるスキーム中でレゾルシナレンを作製するためになされる。ヒドロキシ末端化された化合物は周知であり、アルケン付加カリックスアーレンのように本発明者らによって合成される。

【0051】

十分に官能化され得るカリックスアーレンは、カリックスアーレンが表面に結合される前か後

50

のいずれかに鎖に結合され得る。このことは、NH₂形態が、MSHに付加されたポリエチレングリコールへのアミンの接着を介して連結されるということである。これは、他のアプローチと同じ技術である。

【0052】

両方の場合において、表面の官能化のレベルは、非官能性Y基を有するカリックスアーレンで、官能化されたカリックスアーレンを希釈することによって制御され得る。多官能性のカリックスアーレン（すなわち、カリックスアーレンあたり4つの接着部位を有する）は、スキーム4を参照のこと。

【0053】

(iii) プラズマ重合)

プラズマ重合は、超薄（例えば、約200nm）の架橋された重合体フィルムが、複雑な幾何学であり、制御可能な化学官能性を有する基材上に沈着されるのを可能にする技術である。結果として、物質の表面化学は、そのように処理された基材のバルク特性に影響を及ぼさずに修飾され得る。

【0054】

プラズマガスまたはイオン化されたガスは、通常、電場によって励起される。これらは、イオン、電子、中性化化学種（ラジカル化学種、準安定種、基底状態の種および励起状態の種）および電磁放射を含む、高反応性の化学環境である。低圧において、電子の温度がイオンおよび中性化化学種の温度と実質的に異なる領域（regime）が達成され得る。このようなプラズマは、「冷たい（cold）」プラズマまたは「非平衡」プラズマと呼ばれる。このような環境において、多くの揮発性有機化合物（例えば、揮発性アルコール、揮発性酸、揮発性アミン、または揮発性炭化水素）ニートまたは他のガス（例えば、アルゴン）と共に、プラズマおよび放電の下流と接触した両面のコーティングを重合化することが示されている（H. K. Yasuda, Plasma Polymerization, Academic Press, London 1985）。この有機化合物は、しばしば「モノマー」と呼ばれる。この沈着物はしばしば「プラズマポリマー」と呼ばれる。プラズマは、減圧したガス（モノマー）への電場の印加によって作製され得、そして維持され得る。広範囲のプラズマ反応器幾何学が記載されており、電力入力（マイクロ波、無線周波数、可聴周波など）の手段である。本明細書中で、本発明者らは、誘導的にカップリングされた（13.56MHz）RFプラズマの使用を記載するが、電力入力についての所定の数値、気圧流れ（gas pressure flow）などは、当業者によって他のプラズマ反応器/電力供給源に容易に適應され得る（図1を参照のこと）。

【0055】

このポリマー性フィルムは、揮発性有機化合物のプラズマから得られえる（10⁻² mbarの減圧および理想的には100未満で）。プラズマポリマー沈着において、一般的には、開始化合物またはイオン化されたガスの大量のフラグメンテーションが存在し、広範囲な得られるフラグメントまたは官能基が、その沈着物中に望まれずに組み込まれる。このような様式の重合化の利点としては、潜在的に以下が挙げられる：超薄ピンホールフリーフィルム沈着；プラズマポリマーは、広範囲の基材上に沈着し得る；このプロセスは、溶媒を必要とせず、プラズマポリマーは、汚染物質を含まない。低いプラズマ入力電力（低いプラズマ電力/モノマー流速の比）を使用することによって、高程度の官能基保持を有するフィルムを作成することが可能である。このような低電力/速度比の例は、2Wおよび2.0sccmの流速である。典型的な範囲は、1~10W、および1~5SCCMである。これは、分子構造の「保持」および沈着物の化学官能性が必要とされる場合に重要である。

【0056】

他の比較的低い比率が使用され得、これらは当業者に公知である。例えば、パルス波が使用される場合、対応する補正がプラズマ電力および流速に対して当業者に公知であるようになされる。当業者にとってはまた、反応器条件が反応器幾何学に依存して変化すること

10

20

30

40

50

もまた明らかである。

【0057】

あるいは、プラズマポリマー沈着は、プラズマまたはイオン化ガスをパルスすることによって形成され得る。プラズマは、単一のモノマー種または有機分子の組み合わせのいずれかから形成される。プラズマ重合化による表面のコーティングは、PCT公開 WO 00 / 78928 に開示される。

【0058】

引き続き細胞接着を伴わない例について、アミンコーティング化合物（不飽和であるか不飽和でない、一級アミン、二級アミンもしくは三級アミン）は、重合化（または別の分子と共重合化）されて、MSHが連結され得る安定なプラズマ重合化アミンプラットフォームを提供し得る。

10

【0059】

アミンのホモ重合化のために、不飽和であるか不飽和でない、一級アミン、二級アミンもしくは三級アミン（例えば、アリルアミン）が（かなり広範囲の条件下で）重合化され得る、MSHが連結され得る安定なプラズマ重合化アミンプラットフォームを提供し得る。MSHペプチドは、「リンカー」分子（例えば、PEG）に繋がれる。この分子は、MSHペプチドの共有結合的連結のために活性部位（部分）を含む。

【0060】

共重合化は、A. J. Beck, 1996 に記載される。好ましい方法は、エチレンオキシド（EO）様分子（例えば、トリグライム（triglyme）またはテトラグライム（tetraglyme））と少量のアミン含有化合物（例えば、ホモ重合化において上で同定された任意の化合物）とのプラズマ共重合化である。

20

【0061】

この戦略は、引き続きMSHフラグメントの連結のために、密度を制御された「反応性」アミン部位を有する、プラズマ重合された「EO様」プラットフォームを提供する。このプラズマ重合されたEO様プラットフォームは、一般的なタンパク質耐性特性を付与する（S. Beyerら、1997、Y. J. Yuら、2000およびG. P. Lopezら、1992）。これは、EO特徴から現れ、そして関連するMSH活性をより長期間維持する非特異的タンパク質吸着の程度を減少する。

【0062】

本発明のさらなる局面に従って、細胞培養表面を調製する方法が提供され、その方法は以下の工程を包含する：

30

- i) 少なくとも1つの有機モノマーを提供する工程；
- ii) この有機モノマーのプラズマを作製する工程；および
- iii) このプラズマで表面をコーティングし、MSHが結合し得る細胞培養表面を提供する工程。

【0063】

本発明の好ましい方法において、この有機モノマーは、以下から選択される：

- a) アルキルアミン、ブチルアミン、ヘプチルアミン、プロピルアミンなど由来のアミン。候補アミンは、100未満で十分な蒸気圧（すなわち、RTPで6.6 Paより高い、好ましくは約130 Pa）を持つ一級アミン、二級アミン、三級アミンである。

40

【0064】

- b) EO型表面は、テトラエチレングリコール、ジメチルエーテル（テトラグライム（tetraglyme））、テトラエチレングリコールジビニルエーテル、ジエチレンオキシドジビニルエーテルおよびトリエチレンオキシドモノアリルエーテルから選択される。

【0065】

本発明の1つの実施形態において、メラニン細胞刺激ホルモン（MSH）レセプターリガンドを含む、組織操作/外科手段における使用のためのビヒクルが提供され、ここでこのビヒクルは、これに取り囲まれるかまたはこれに塗布されるプラズマ重合によって得られ得る細胞キャリア表面を有する。

50

【0066】

本発明のさらなる実施形態において、組織操作/外科的手順においてM S Hレセプターリガンドを患者に投与する工程を包含する処置方法を提供する。

【0067】

本発明のさらなる実施形態において、皮膚再構築、膀胱再構築、角膜上皮移植片、インステント (i n - s t e n t) 再狭窄を防ぐための冠状動脈心臓疾患のためのステントのコーティング、コンタクトレンズコーティング、臀部交換術または心臓弁コーティングにおける使用のためのM S Hレセプターリガンドを提供する。

【0068】

好ましくは、M S Hレセプターリガンドは、ビヒクルと結合し、好ましくは、このビヒクルは細胞キャリア表面を含む。 10

【0069】

この結合は、任意の適切な手段によって達成され得る。好ましくは、M S Hレセプターリガンドは、リンカー (特に、ポリエチレングリコール (P E G) リンカー) を介して、カリックスアーレンを使用するM S Hの取り込み、またはプラズマ重合およびM S Hでのコーティングによってビヒクルと連結される。

【0070】

本発明のさらなる実施形態において、治療的手術または美容的手術を必要とする患者に、M S Hレセプターリガンドと結合した細胞キャリア表面を投与する工程を包含する処置方法を提供する。 20

【0071】

ここで、本発明は、例示の目的で、そして以下の表および図面を参照して記載される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0072】

(発明の詳細な説明)

(材料および方法)

固定化されたM S H上で培養される細胞は、上皮細胞、内皮細胞および神経冠由来細胞であり、従って、皮膚表皮ケラチノサイト、角膜上皮細胞、膀胱上皮細胞、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、骨芽細胞、破骨細胞である。皮膚表皮ケラチノサイトの培養についての詳細は、Chakrabartyら、1999に十分に与えられ、 30
他の上皮細胞、内皮細胞および神経冠胞は、科学文献において公開されるように、確立された培養方法論を使用して培養される。

【0073】

(固定化技術または吸着技術)

多くの異なるアプローチが、M S Hレセプターリガンドを組織操作に使用されるキャリア表面または他のこのような組織操作デバイスに連結、カップリングまたは結合するのに使用され得る。

【0074】

((i) P E G へのペプチド連結)

スキーム2に記載するとおり。 40

【0075】

このスキームは、タンパク分解的に切断可能な部分を挿入するために容易に適応され得る。これらの多くは、スキーム1に示すとおりに同定される。

【0076】

((i i) ヒドロキシ官能化されたカリックスアーレン (X = H、Y = (C H 2) 1 0 O H) の合成) :

濃塩酸 (3 . 2 m l) を、エタノール (3 0 m l) 中のレゾルシノール (1 . 9 7 g、1 7 . 9 m m o l) および 1 , 1 - ジメトキシ - 1 1 - ウンデカノール (4 . 1 5 g、1 7 . 9 m m o l) の攪拌溶液に0 で滴下した。この反応混合物を55 で18時間、アルゴン下で加熱した。冷却後、黄色に着色した溶液を水 (2 5 0 m l) に注いで、淡黄色の 50

沈殿物を得た。これを濾過によって回収し、温水（ $6 \times 100 \text{ ml}$ ）で洗浄し、乾燥してレゾルカレン（resorcarenene）を淡黄色固体（ 4.58 g 、 92% ）として得た（融点 $233 \sim 239$ ）。この粗製物質をメタノール/クロロホルムから再結晶化した（ 3.87 g 、 78% ）（融点 $237.5 \sim 238.5$ ）。利用可能な特徴付け。

【0077】

（エン-官能化カリックスアーレン（ $X = \text{H}$ 、 $Y = (\text{CH}_2)_8\text{CH} = \text{CH}_2$ ）の合成）

濃塩酸（ 3.2 ml ）を、エタノール（ 30 ml ）中のレゾルシノール（ 1.97 g 、 17.9 mmol ）および10-ウンデカノール（undecenal）（ 3.05 g 、 17.9 mmol ）の攪拌溶液に0 で滴下した。この反応混合物を55 で18時間、アルゴン下で加熱した。冷却後、黄色に着色した溶液を水（ 250 ml ）に注いで、淡黄色の沈殿物を得た。これを濾過によって回収し、温水（ $6 \times 100 \text{ ml}$ ）で洗浄し、乾燥してレゾルカレン（resorcarenene）を淡黄色固体（ 4.5 g 、 90% ）として得た。利用可能な特徴付け。

10

【0078】

スキーム7を参照。

【0079】

（(iii)コポリマー表面をプラズマ化するためのペプチドの連結）
（プラズマ重合）

エチレンオキシド「EO」様プラズマポリマーの生成およびアリルアミンとの共重合のための実験条件の概要。

20

【0080】

「EO様」PPの生成に使用されるモノマーは、テトラエチレングリコールジメチルエーテル（テトラグライム）またはテトラエチレングリコールジビニルエーテルである。

【0081】

適切な流速である $2 \sim 3 \text{ sccm}$ に達するために、モノマーは、水浴中で $80 \sim 90$ まで加熱される。これによって、プラズマ反応器中の約 $4 \sim 6 \times 10^{-2} \text{ mbar}$ の圧力が得られる。 $2 \sim 3 \text{ W}$ のプラズマ電力および20分の重合時間が使用される。これらの条件を使用して、PP（テトラエチレングリコールジメチルエーテル）の初期XPS結果は、 0.56 のO/C比および約 72% のエーテル官能性の%保持（カーブフィッティングより、C1sコアレベルである）を示す。これは、Lopezら（1992）によって報告される $0.4 \sim 0.48$ のO/C比と、非常に好都合に匹敵する（C1sカーブフィットが示されていないことに注意のこと）。

30

【0082】

これらの増加された揮発性、従ってモノマー流のより容易な制御に起因して、目的の他のモノマーは、ジエチレンオキシドジビニルエーテルおよびトリエチレンオキシドモノアリルエーテルである。これらの物質からのプラズマポリマーの生成は、Yura（2000）およびBeyerら（1997）による最近の研究の対象である。

【0083】

上記のモノマーの全ては、アリルアミンと共重合化されて、MSH/ペプチド固定化のための反応性アミン部位を提供し得る。共重合化は、Beckら（1996）によって以前に記載されるとおりである。

40

【0084】

PEG/MSH合成は、すでに記載されるとおりである（スキーム2）。スキーム5は、例としてMSHを使用して、PEG/ペプチド分子による表面アミンの置換反応を例示する。

【0085】

この反応の実現可能性に関連するいくつかの初期の結果が、ここで示される。プロモアセチルプロミドは、スキーム6に示されるように、アミンと同様の反応を経る。この反応は、スキーム5に示される反応について表面アミンの利用可能性を試験するために使用され

50

ている。

【0086】

このスキームの実現可能性は、ブromoアセチルブロミドを使用して実証されている。アリルアミンのPPにおける表面アミンとのブromoアセチルブロミドの反応の結果が、評価されている。この結果は、表2および3にまとめられる。

【0087】

(表2. アリルアミンPCPによるブromoアセチルブロミドの洗浄および反応についてのXPS結果の要約(全てのサンプルを、プラズマ重合の2日以内に調製した))

【0088】

【表2】

サンプル	N/C	O/C	Br/N
アリルアミン PP (01RF01)	0.20	0.04	
+ジクロロメタン (DCM) 5分	0.19	0.06	
+ブromoアセチルブロミド (DCM中10mM), DCM 5分	0.18	0.07	0.22
+ブromoアセチルブロミド (DCM中10mM), DCM 5分, H ₂ O 洗浄 (2×3分)	0.14	0.09	0.06

10

(表3. Br 3dコアレベルのピークフィットからの「物理吸着された(physisorbed)」および「固定化された」臭素の相対的寄与(全てのサンプルを、プラズマ重合の2日以内に調製した)。電荷は、285 eVにてC1sで補正された。

20

【0089】

【表3】

サンプル	'Physisorb' Br ⁺ (eV)	'Imm.' Br ⁻ (eV)
+ブromoアセチルブロミド (DCM中10mM), DCM 5分	61% (68.0)	39% (70.7)
+ブromoアセチルブロミド (DCM中10mM), DCM 5分, H ₂ O 洗浄 (2×3分)	39% (67.8)	61% (70.7)

30

ブromoアセチルブロミドとのPPの反応の際に、臭素は、PPの表面上でXPSによって検出される(Br/N = 0.22)。この結果は、この反応がおこるが、共有結合的に固定化された臭素と基材に物理吸着された臭素との間を区別するために注意が払われるべきであることを示す(本発明者らは、アリルアミンPPとのBr⁻の強力な電荷ベースの相互作用を予想することに注意のこと)。表2中のこのデータは、水による洗浄の際の吸着された臭素に対する固定化された臭素の比を変化させる点を例示する。現在、吸着された臭素は、洗浄の際に表面から完全に除去され得ないが、Br 3dコアレベルのピークフィットは、この相対量を区別するのを可能にする。

40

【0090】

上記の結果に加えて、本発明者らは、アリルアミンのPPとのPEG/シスチンの反応を実証し、この反応は、表面上のシスチン残基の連結を生じる(データは示さず)。

【0091】

(参考文献)

【0092】

【数3】

1. A J Beck, R F Jones, R D Short, *Polymer* 1996, 24 (37) 5537-5539, Plasma co-polymerisation as a route to the fabrication of new surface chemistries with controlled amounts of specific chemical functionality
2. S Beyer, W Knoll, H Ringsdorf, J Hann Wang, R B Timmons, P Sluka. *J Biomed Mater Res*, 1997, 36, 181. 'Reduced protein adsorption on plastics via direct deposition of triethylene glycol monoallyl ether' 10
3. Chakrabarty KH, Dawson RA, Harris P, Layton C, Babu M, Gould L, Phillips J, Leigh I, Green C, Freedlander E and Mac Neil S. (1999) Development of autologous human epidermal/dermal composites based on sterilised human allodermis for clinical use. *Brit J Dermatol.* 141, 811-823.
4. Drumheller PD, Ebert DL, Hubbell JA. Multifunctional poly(ethylene glycol) semi-interpenetrating polymer networks at highly selective adhesive substrates for bioadhesive peptide grafting. *Biotechnology and Bioengineering* 1994; 43:772-780. 20
5. Haycock JW, Rowe SJ, Cartledge S, Wyatt A, Ghanem G, Morandini R, Rennie IG and Mac Neil S, 2000. α -melanocyte stimulating hormone reduces impact of proinflammatory cytokine and peroxide generated oxidative stress on keratinocyte and melanoma cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 15629-15636.
6. Haycock JW, Wagner M, Moranbdini R, Ghanem G, Rennie IG and Mac Neil S. (1999) α -melanocyte stimulating hormone inhibits NF- κ B activation in human melanocytes and melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology* 113:560-566 30
7. Hedley SJ, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Morandini R, R Boeynaems JM, Ghanem G and Mac Neil S. (1998) Potential immunomodulatory role for α -MSH in normal human melanocytes and in melanoma cells. *British Journal of Dermatology* 138: 536-543. 40

【 0 0 9 3 】

【 数 4 】

8. Ichii-Jones Fm Lear JT, Heagerty AHM, Smith AG, Hutchinson PE, Osborne J, Bowers B, Jones PW, Davies E, Ollier WER, Thomson W, Yengi L, Bath J, Fryer AA and Strange RC. (1998) Susceptibility to melanoma: influence of skin type and polymorphism in the melanocyte stimulating hormone receptor gene. *Journal of Investigative Dermatology* 111: 218-221.
9. G P Lopez, B D Ratner, C D Tidwell, C L Haycox, R J Rapoza and T A Horbett, *J Biomed Mater Res*, 1992, **26**, 415. 'Glow discharge plasma deposition of tetraethylene glycol dimethyl ether for fouling resistant biomaterial surfaces. 10
10. Morandini R, Boeynaems JM, Hedley SJ, Mac Neil S and Ghanem G. (1998) Modulation of ICAM-1 expression by α -MSH in human melanoma cells and melanocytes. *Journal of Cell Physiology* 175: 276-282.
11. Y J Yu, R B Timmons, J S Jen and F E Molock. *Coll Surf B*, 2000, **18**, 235. 'Non fouling surfaces produced by gas phase pulsed plasma polymerisation of an ultra low molecular weight ethylene oxide containing monomer' 20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 4 】

【 図 1 】 なし

【 図 2 - 1 】 なし

【 図 2 - 2 】 なし

【 図 2 - 3 】 なし

【 図 3 】 なし

【 図 4 】 なし

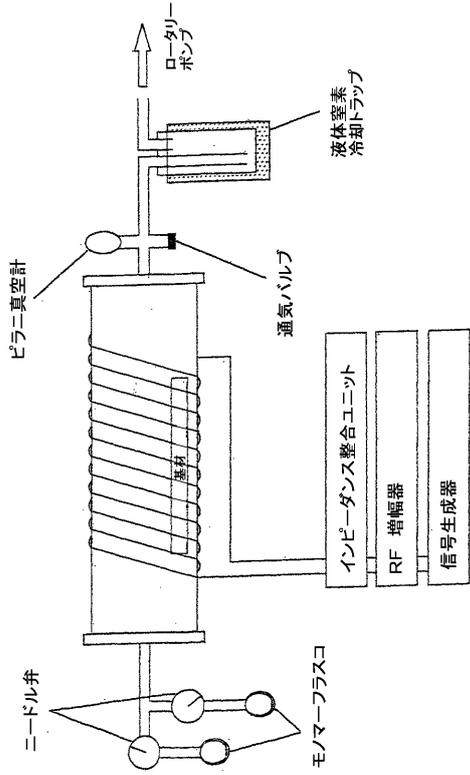
【 図 5 】 なし

【 図 6 】 なし

【 図 7 】 なし

【 図 1 】

Figure 1 - プラズマ重合装置の概略図



【 図 2 - 1 】

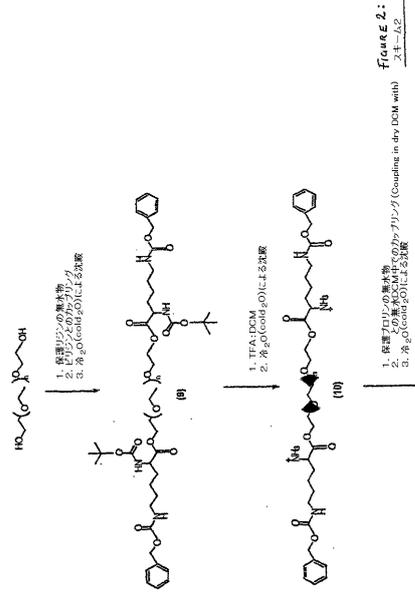


Figure 2: 1. 保護基の付加
2. PEGの末端基の活性化
3. PEGの末端基の活性化による反応

【 図 2 - 2 】

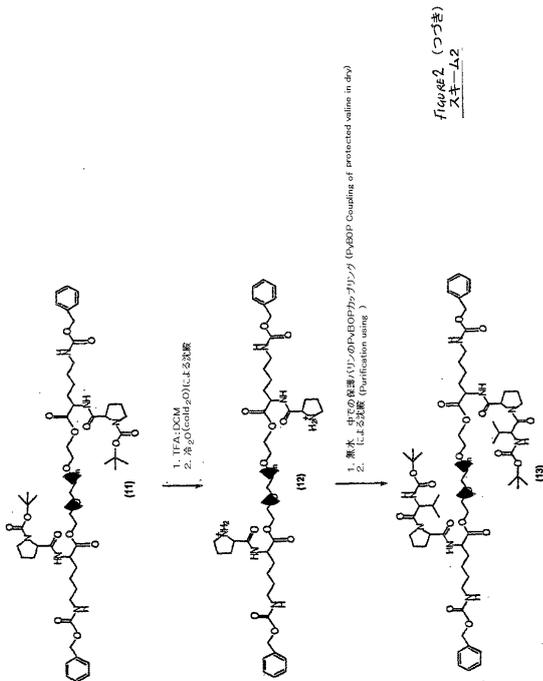


Figure 2: (つづき) スキーム2

【 図 2 - 3 】

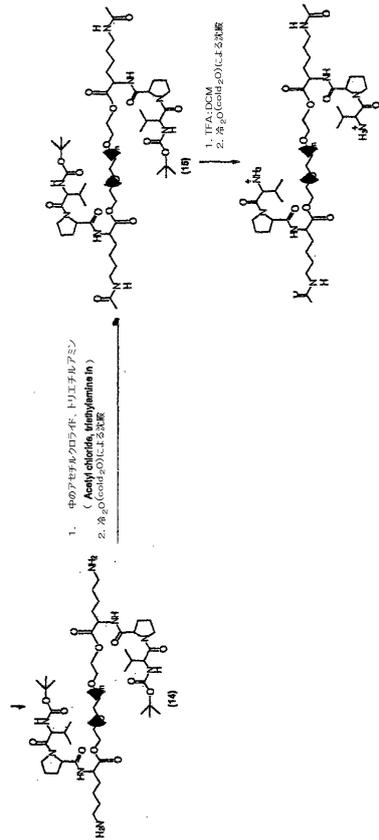
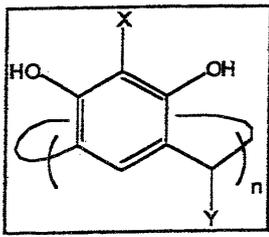


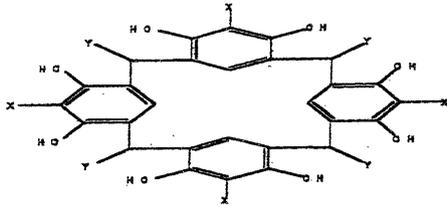
Figure 2: (つづき) スキーム2: PEGへのMESHペプチドフラグメントの連結

【 図 3 】

Figure 3
スキーム3:カリックスアレーン構造



n=4の場合



【 図 4 】

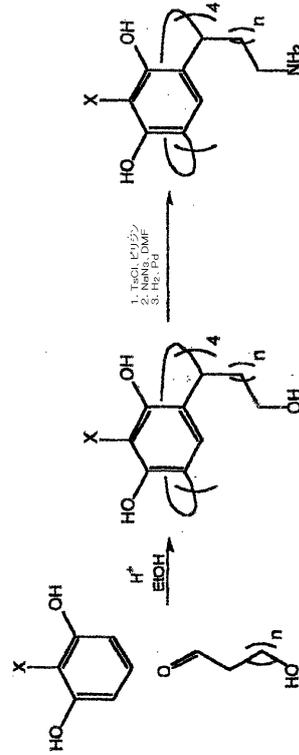
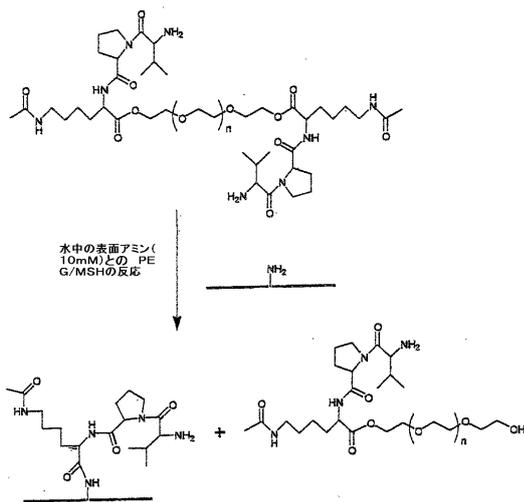


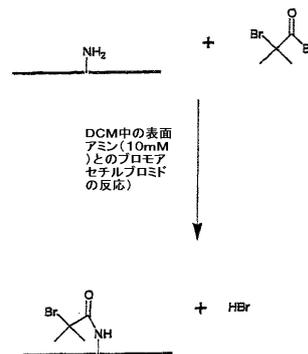
Figure 4
スキーム4: 単官能性カリックスアレーン(すなわち、カリックスアレーンあたり単一の酸素部)

【 図 5 】



スキーム5
FIGURE 5.

【 図 6 】



スキーム6
FIGURE 6

【 図 7 】

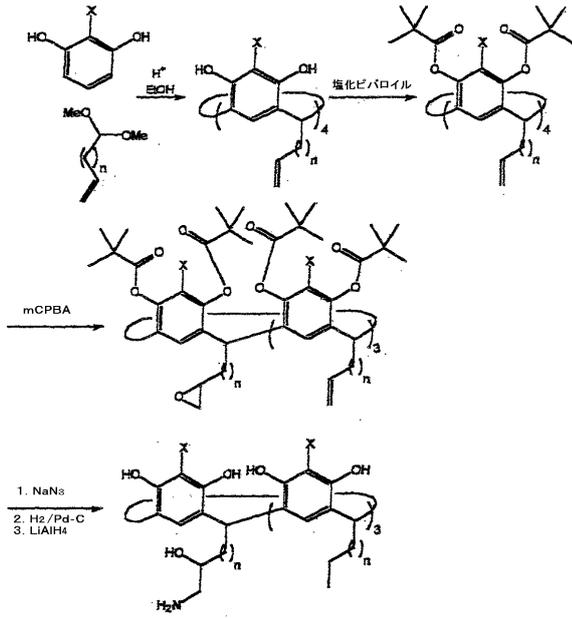


FIGURE 7
スキーム7.カリックスアレーン技術:実験詳細

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083176 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 47/00 Building, Brook Hill, Sheffield S3 7HF (GB). RYAN, Tony [GB/GB]; University of Sheffield, Department of Chemistry, Dainton Building, Brook Hill, Sheffield S3 7HF (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB02/01713
- (22) International Filing Date: 17 April 2002 (17.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0109348.3 17 April 2001 (17.04.2001) GB
0109347.5 17 April 2001 (17.04.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF SHEFFIELD [GB/GB]; Firth Court, Western Bank, Sheffield S10 2TN (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MACNEIL, Sheila [GB/GB]; Department of Engineering materials, Sir Robert Hadfield Building, Mappin Street, Sheffield S1 3JD (GB). SHORT, Rob [GB/GB]; Department of Engineering materials, Sir Robert Hadfield Building, Mappin Street, Sheffield S1 3JD (GB). HUNTER, Chris [GB/GB]; University of Sheffield, Department of Chemistry, Dainton Building, Brook Hill, Sheffield S3 7HF (GB). HAYCOCK, John [GB/GB]; Department of Engineering materials, Sir Robert Hadfield Building, Mappin Street, Sheffield S1 3JD (GB). WILLIAMS, Nick [GB/GB]; University of Sheffield, Department of Chemistry, Dainton
- (74) Agent: HARRISON GODDARD FOOTE; Belgrave Hall, Belgrave Street, Leeds LS2 8DD (GB).
- (81) Designated States (national): 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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, P1, 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) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/083176 A2

(54) Title: VEHICLE

(57) Abstract: The present invention provides a vehicle for use in tissue engineering and/or surgical procedures comprising a Melanocyte Stimulating Hormone (MSH) receptor ligand. The vehicle may be a prosthesis, implant, matrix, stent, gauze, bandage, plaster, biodegradable matrix, or polymeric film; the invention also provides a method of forming a vehicle of the invention.

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

VEHICLE**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to vehicles for use in therapeutic or cosmetic tissue engineering/ surgical procedures comprising Melanocyte Stimulating Hormone (MSH) and
5 to methods of coupling MSH for use in such vehicles.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The need for replacement body parts in combination with the shortage of donor tissue and/or
10 organs has led to the production of tissue engineered products.

Tissue engineering is an emerging science which has implications with respect to many
areas of clinical and cosmetic surgery. More particularly, tissue engineering relates to the
replacement and/or restoration and/or repair of damaged and/or diseased tissues, for
example for cosmetic purposes or to return the tissue and/or organ to a functional state. For
15 example, and not by way of limitation, tissue engineering is useful in the provision of skin
grafts to repair wounds occurring as a consequence of contusions, burns, or failure of tissue
to heal due to venous or diabetic ulcers.

Tissue engineering is also practised during replacement of joints because of degenerative
20 diseases such as arthritis, replacement of coronary arteries due to damage as a consequence
of various environmental causes (e.g., smoking, diet) and/or congenital heart disease
including replacement of arterial/heart valves, organ transplantation, repair of gastric ulcers,
replacement of bone tissue to treat diseases such as osteoporosis, replacement of muscle and
nerves as a consequence of neuromuscular disease or damage through injury and
25 replacement of bladder materials to counter urological disease.

Unfortunately, the culturing of cells/tissues *in vitro* represents only part of the problem
faced by tissue engineers. In many examples the growth of cells in culture is not the major
obstacle to success. It is the transfer of the cells/tissue via a suitable vehicle so that the
30 cells/tissue are incorporated into the patient to be treated which represents a further, more
taxing problem. By way of example and not by way of limitation a suitable vehicle may
include culture-ware, prostheses, implants, 3-dimensional matrix supports, extracellular
matrix protein coated dressing, bandages or plasters.

CONFIRMATION COPY

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

Vehicles suitable for the transfer of replacement tissue have to satisfy certain requirements if they are to be useful in tissue engineering. Transfer vehicles typically have the following characteristics;

- 5 i) they provide a surface to which cells may become securely attached;
 - ii) they allow attached cells to grow and divide unhindered by the attachment surface;
 - iii) where appropriate, they provide an attachment surface which does not influence the differentiated (or undifferentiated) state of the attached cells;
 - iv) they maintain cells in a sterile and immunologically silent status;
 - 10 v) they are minimally toxic to the patient;
 - vi) they do not transmit bacterial or viral disease; and
 - vii) they provide a surface from which attached cells may easily detach and subsequently invade the tissue site requiring replacement, restoration or repair.
- 15 Other surgical procedures rely upon vehicles which are not used in a cell transfer context and which may be substantially cell free. By way of example and by no means of limitation the vehicle may be a bandage or device to reduce inflammation and used in a wound healing context e.g., for burns injuries, venous leg ulcers, diabetic ulcers or in inflammatory skin diseases such as psoriasis or eczema.
- 20 MSH autocrine production by skin cells (keratinocytes, melanocytes and fibroblasts) is part of an intrinsic defence mechanism, assisting cells to survive periods of inflammation and oxidative stress.
- 25 MSH is a 13 amino acid peptide which is produced in the pituitary, gut and skin. It is best known for its role in the control of melanogenesis in pigmentary cells. Understanding of extra-pigmentary actions of MSH has developed rapidly in recent years. A number of studies suggest that visible pigmentation may only represent a small physiological role for MSH in skin. Previously only melanocytes were thought to respond to MSH. It now seems
- 30 that the ability to respond to MSH is shared by a number of cells in skin, not just those able to produce a pigment. Furthermore, a number of different cell types such as melanocytes, cutaneous epithelial cells, bronchial epithelial cells, bladder epithelial cells, corneal epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, smooth muscle cells and monocytes possess the melanocortin-1 receptor (MC-1R) for MSH.

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

There is little doubt that tissue engineered approaches to wound repair will present significant therapeutic benefits compared with existing treatments. Several issues however are as yet currently unresolved. In particular there is a need to develop approaches to
5 protect cells during the initial period of inflammation which occurs when tissue engineered materials are used clinically. The initial inflammatory response is thought to be responsible for the destruction and failure of many materials within the first few days of grafting. An adverse inflammatory response is also often observed when surgical devices such as coronary artery stents and prosthetic devices are used and even when autologous cells are
10 reintroduced into the body.

STATEMENTS OF THE INVENTION

According to the present invention there is provided a vehicle for use in tissue
15 engineering/surgical procedures comprising a MSH receptor ligand.

The term vehicle may be defined as any structure or device for use in tissue engineering/
surgical procedures. By way of example and not by way of limitation, the term includes a
prosthesis, implant, matrix, stent, gauze, bandage, plaster, biodegradable matrix, or
20 polymeric film.

Preferably the vehicle has minimal patient toxicity and does not elicit an unfavourable
reaction when delivered to a patient.

25 The MSH receptor ligand is suitably MSH or another peptide comprising a functional fragment of MSH, for example it may be a functional fragment of MSH. Alternatively, the receptor ligand may be a peptide comprising a structural variant of MSH and having MSH receptor binding function. The term functional fragment includes any peptide derived from MSH (eg 6 and 3 amino acid fragments of MSH can also achieve the same biological
30 effect).

The term structural variant includes sequence variants which retain the same biological activity, or have increased biological activity (eg a superpotent peptide exists which, like

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

MSH, is 13 amino acids long). Table 1 lists the MSH full length sequences (of which the MSH full length sequence number 6 is a super potent peptide) and fragment sequences.

Table 1 MSH full length and fragment sequences

5

Three letter amino acid code used

10	Alanine	Ala	Glutamine	Glx	Phenylalanine	Phe
	Arginine	Arg	Glycine	Gly	Proline	Pro
	Asparagine	Asn	Histidine	His	Serine	Ser
	Aspartic acid	Asp	Isoleucine	Ile	Threonine	Thr
	Asparagine	Asx	Leucine	Leu	Tryptophan	Trp
	Cysteine	Cys	Lysine	Lys	Tyrosine	Tyr
15	Glutamic acid	Glx	Methionine	Met	Valine	Val

Norleucine Nle

L = Laevo (all amino acid conformations unless indicated)

20 D = Dextro (indicated where amino acid is not of L conformation)

Ac = Acetyl

MSH full-length sequences

25	1. α -MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
	2. α -MSH (free acid)	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-OH
	3. (Des-acetyl)- α -MSH	H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
	4. (Diacetyl)- α -MSH	Ac-Ser(Ac)-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
30	5. (Nle ₄)- α -MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
	6. (Nle ₄ , D-Phe ₇)- α -MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂

MSH fragment sequences

35	7. (Ac-Nle ₄ , Gln ₅ , D-Phe ₇ , D-Trp ₉)- α -MSH (4-10)	Ac-Nle-Gln-His-D-Phe-Arg-D-Trp-Gly-NH ₂
	8. (Ac-Cys ₂ , D-Phe ₇ , Cys ₁₀)- α -MSH (4-13)	Ac-Cys-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys-Lys-Pro-Val-NH ₂
40	9. α -MSH (11-13)	H-Lys-Pro-Val-NH ₂
	10. α -MSH (11-13) free acid	H-Lys-Pro-Val-OH
	11. Acetyl- α -MSH (11-13)	Ac-Lys-Pro-Val-NH ₂
	12. Acetyl-(D-Lys ₁₁ , D-Val ₁₃)- α -MSH (11-13)	Ac-D-Lys-Pro-D-Val-NH ₂
	13. Acetyl-(D-Val ₁₃)- α -MSH (11-13)	Ac-Lys-Pro-D-Val-NH ₂
45	14. α -MSH (10-13)	H-Gly-Lys-Pro-Val-OH
	15. α -MSH (10-13)	H-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
	16. Acetyl- α -MSH (10-13)	Ac-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

The invention also includes vehicles comprising a peptidomimetic activity of any of the aforesaid peptides, i.e. materials that convey the same biological activity but do not necessarily have the same structure as these peptides.

5

In one embodiment of the invention, the vehicle comprises immobilised MSH. In an alternative embodiment the MSH is slowly released by proteolytic cleavage.

Proteolytic cleavage and release of MSH

10

A method for local delivery of MSH peptide fragments locally from a support biomaterial surface is suggested by incorporation of an endopeptidase / proteinase / proteolytic cleavage site proximal to the MSH peptide. Proteinase activity arising from the host tissue surrounding an implanted device would facilitate the enzyme-mediated cleavage and release of a bioactive MSH peptide fragment, thereby permitting subsequent receptor mediated interactions between MSH peptide and host tissue receptors.

15

A single proteolytic cleavage site proximal to the MSH peptide is suggested, however the amino acid sequence design for a given site is potentially large: a) due to the number of different proteolytic cleavage sites available for a given proteolytic enzyme and b) due to the number of tissue enzymes potentially able to act in this respect. Therefore two examples are explained below to illustrate the design methodology: 1) for matrix metalloproteinase I (MMP1: fibroblast collagenase) and 2) for plasmin (fibrin/fibrinogen cleavage). In each case the example MSH peptide fragment released is based on MSH 11-13 (Lys-Pro-Val) or MSH 10-13 (Gly-Lys-Pro-Val).

20

25

Scheme 1: Examples of protease cleavage sites

MMP1

P3 P2 P1= P1' P2' P3'

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

30

1. Support surface:---/~~~~~\---Ala-Pro-Gly=Leu-Lys-Pro-Val (Native protease cleavage site)
2. Support surface:---/~~~~~\---Ala-Pro-Gly=Gly-Lys-Pro-Val (Native MSH tetrapeptide sequence)

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

Plasmin

3. Support surface:--\V\V\V\V\--Arg=Val-Lys-Pro-Val (Native protease cleavage site)
4. Support surface:--\V\V\V\V\--Arg=Gly-Lys-Pro-Val (Native MSH tetrapeptide
5 sequence)
5. Support surface:--\V\V\V\V\--Arg=Ala-Lys-Pro-Val (Native protease cleavage site)

The protease cleavage site is indicated by =

The protease cleavage nomenclature (e.g. P1 / P1') is shown for sequence 1 above.

10

In the above scheme a bioactive MSH tetrapeptide is released. However any of the MSH peptide sequences (detailed in Table 1) would be candidate bioactive peptides for proteolytic release.

15

Where the protease cleavage site is indicated above as native (e.g MMP1, example 1) an MSH 10-13 sequence is released C-terminal to this. In this case the MSH 10 position amino acid is not native (as Gly is native), but a substituted amino acid with similar chemical properties is present in the P1' position (e.g. Ala, Leu or Val - ie. hydrophobicity maintained). Where a native MSH 10-13 tetrapeptide sequence is indicated above (e.g.

20

MMP1, example 2) the cleavage site is not entirely native to the protease. Again, an amino acid with similar properties has been substituted into the P1 cleavage position (e.g. Ala / Val verses Gly, maintaining the hydrophobicity using a similar aliphatic side-chained amino acid). If cleaved specifically by MMP1, this would release the native MSH 10-13 peptide for subsequent interaction with the host tissue receptors.

25

This common generic design of protease cleavage sites linked to the MSH sequences will result in a large number of putative amino acid sequences to fulfill an MSH bioactive peptide release function. Therefore instead of listing an exhaustive number of cleavage site/MSH sequence combinations, a limited number of common tissue proteases are suggested which we expect to be relevant as candidate enzymes for potential ability to
30 release adjacent MSH peptides. Individual designs for particular protease cleavage sequences linked to a particular MSH sequences would therefore exist for each protease/MSH peptide combination.

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

In one embodiment of the invention, MSH (or a structural or functional fragment thereof) is associated without concomitant cell attachment. In this instance, MSH peptides may be associated with bandages/dressings or beads for the treatment of acute or chronic inflammatory epithelial disorders. Thus applied to bandages or beads it could be used for the treatment of chronic ulcers (diabetic, non-healing venous or arterial ulcers or pressure sores), burns injuries (e.g. paediatric scalds) or inflammatory skin diseases (where excessive inflammation is viewed as being a contributory factor to the condition e.g. psoriasis and eczema). In these applications, it is envisaged that the bandage/dressing will be used to reduce the extent of the inflammation which may reasonably be expected to increase the rate of healing etc. Subsequent application of cells may/may not follow as part of a treatment to accelerate healing or achieve wound closure. MSH peptides immobilised on beads could be used for delivery to internal epithelial surfaces suffering from inflammation e.g. nasal mucosa (a treatment of hayfever) intestinal epithelia (for chronic inflammatory conditions such as irritable bowel syndrome, Crohns and Coeliac disease) or respiratory epithelial surfaces (for asthma). Alternatively MSH peptides may be associated with implantable materials or devices such as coronary artery stents, prostheses, heart valves or any device which is inserted into the body where reducing the ability of the device to cause inflammation would be desirable.

In an alternative embodiment of the invention, MSH peptides may also be associated with a bandage or dressing for concomitant cell attachment. This method may be applied to skin delivery devices for treatment of chronic ulcers and burns, possibly as a follow on from an application where MSH peptides are immobilised without concomitant cell attachment. The vehicle comprises a cell carrier surface to which a cell may become associated e.g., surfaces on which epithelial cells such as epidermal, keratinocytes, corneal epithelial cells, bladder epithelial cells or gut epithelial cells attach. A wide range of implantable tissue-engineered devices such as tissue engineered heart valves, reconstructed liver, bladder or coronary artery stents are coated in such a way as to promote endothelial cell attachment. Any of these could benefit from the inclusion of MSH peptides to assist cells on the devices (and adjacent cells) in their response to pro-inflammatory cytokines and oxidative stress.

Preferably a cell which becomes associated to the vehicle of the invention possesses the MC-1R receptor and attaches to the MSH receptor ligand.

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

In a yet further preferred embodiment of the invention said vehicle is suitable for use with cells of mammalian origin, and more preferably cells of human origin.

5 More preferably said cell is selected from cell types such as: keratinocytes; melanocytes, cutaneous epithelial cells, bronchial epithelial cells, bladder epithelial cells, corneal epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, smooth muscle cells, monocytes, gastrointestinal mucosal epithelial cells and oral mucosa epithelial cells.

10 It will be apparent to one skilled in the art, that the vehicle of the invention is useful in clinical applications where cells could be grown on surfaces of substrates prior to application to, for example and not by way of limitation, acute and/or chronic and/or minor and/or severe cutaneous wounds (including venous and diabetic ulcers); and/or cartilage repair; and/or bone repair; and/or muscle repair; and/or nerve repair; and/or connective tissue repair; and/or blood vessel repair; and/or bladder repair.

15 According to an alternative embodiment of the invention there is provided a cosmetic vehicle comprising a cell carrier surface characterised in that said surface is linked, coupled or associated with MSH receptor ligand, wherein said vehicle is adapted to be applied and/or implanted into a patient requiring cosmetic tissue engineering.

20 According to an alternative embodiment of the invention there is provided a therapeutic vehicle comprising a cell carrier surface characterised in that said surface is linked, coupled or associated with MSH receptor ligand, wherein the vehicle is adapted to be applied and/or implanted into a patient requiring therapeutic tissue engineering.

25 The invention provides a vehicle comprising an MSH receptor ligand. The introduction of MSH into a vehicle of the invention assists MSH receptor possessing cells within, or migrating over said vehicle or construct to withstand inflammatory damage and therefore provides significant advantages over existing tissue engineering/ surgical vehicles.

30 The initial period of inflammation which occurs when tissue engineered materials are used clinically is currently dealt with by the use of immunosuppressant drugs such as cyclosporin. Cyclosporin and other such steroids may be delivered systemically or topically and are associated with a severe dampening of the immune system which makes them unsuitable for

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

long term delivery. Advantageously, MSH does not block the immune system and is suitable for long term delivery.

Preferably the association of MSH receptor ligand to a vehicle of the present invention is achieved by one, or any of a combination of:

- i) coupling of MSH peptides to surfaces via linkers, for example, polyethylene glycol (PEG) linkers;
- ii) the association of MSH peptides with calixarenes or calixarene treated surface;
- iii) immobilisation of MSH peptides to a plasma polymerised surface.

10

i) **MSH Linking Molecules**

It is known that RGD motifs can be linked to PEG e.g. Drumheller et al, 1994. The Scheme 2 describes the linkage of MSH to PEG.

15

According to a further embodiment of the invention, there is provided an alternative method of preparing a surface to which MSH receptor ligand is capable of being associated with, comprising:

- i) providing a linking agent and MSH receptor ligand;
- ii) providing conditions suitable for linking said agent with MSH receptor ligand; and
- iii) bringing the linked molecule in contact with a cell surface to be treated.

20

In a preferred method of the invention said linking agent is polyethylene glycol. Other linking agents are available and can be used for this purpose.

25

ii) **Calixarenes and MSH (See scheme 3)**

Calixarenes are amphiphilic molecules whose general structure is that of a molecular bowl on legs with the rim of the bowl lined by hydroxyl groups and the legs consisting of long chain alkyl groups. A detailed review of the different types of calixarenes and their methods of manufacture is given in Bohmer, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 713-745, the entire disclosure of which is incorporated herein by reference for all purposes.

30

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

It is known that the hydroxyl groups lining the rim of the bowl of calixarenes can bond strongly to hydrophilic substrates and that if the calixarene also has hydrophobic pendant legs this can impart a highly water repellent surface to the substrate, see WO 97/39077. Hydrophobic surfaces may be rendered hydrophilic by a number of means, including by the
5 plasma polymerisation of a hydrophilic 'monomer'.

We have worked primarily with resorcinarenes (X = H) and pyrogallenes (X = OH) where n= 4. However, X can be varied more widely (such as CH₂Z or OCH₂Z), and n can also be 6
10 or 8. The pendant Y group is a long chain alkyl or perfluoroalkyl in our current compounds, but incorporation of functional groups such as double bonds, triple bonds, SR, OH or SH at the terminus of the chain can also be done.¹⁹ Y may also be a long polyethylene oxide chain.

The main advantages of this approach would be the simplicity and low loading of the
15 treatment which means that it could be readily applied to bulk materials. The other advantage is that if the compounds do form an ordered monolayer on the surface, then the immobilised/adsorbed species will be in a more defined environment (which itself could be modified, to mimic a cell surface).

20 In a further embodiment of the invention there is provided a calixarene associated, coupled or linked to a MSH receptor ligand.

In a yet further embodiment of the invention there is provided a method for coupling or linking a calixarene to a MSH receptor ligand comprising:

25 In the first instance, the pendant chains Y will be functionalised at the terminal positions with OH as previously described. These OH groups will be converted to NH₂ according to well established synthetic techniques. Simple treatment of material with a solution of calixarenes will provide an ordered, amine functionalised surface to the material.

30 Alternatively, prior coupling of the calixarene and MSH can be undertaken using the coupling technology described earlier, and the whole construct used for material treatment.

Similarly, the calixarenes will be functionalised with a single MSH via a tether. Monofunctionalised calixarenes can be synthesised as described by S. Saito, D. M. Rudkevich and J. Rebek Jr, Org. Lett. 1999, 1 (8), 1241-1244 and converted to an amino

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

functionalised form which will allow facile derivation with MSH tethered to polyethylene glycol.

The synthetic approaches would be to make the resorcinarenes in scheme shown below. The hydroxyl tailed compound is well known and has been synthesised by us, as is the alkene appended calixarene.

Fully functionalisable calixarenes which can be attached to tether either before or after calixarene binding to surface. That is, the NH₂ forms is linked through an amide attachment to polyethylene glycol which has been appended with MSH. This is the same technology as for the other approaches.

In both cases, the level of surface functionalisation can be controlled by diluting the functionalised calixarene with calixarenes which have non-functional Y groups. Polyfunctional calixarenes (i.e. with 4 attachment sites per calixarene) see scheme 4.

iii) **Plasma Polymerisation**

Plasma polymerisation is a technique which allows an ultrathin (eg ca.200nm) cross linked polymeric film to be deposited on a substrate of complex geometry and with controllable chemical functionality. As a consequence, the surface chemistry of materials can be modified, without affecting the bulk properties of the substrate so treated.

Plasmas or ionised gases are commonly excited by means of an electric field. They are highly reactive chemical environments comprising ions, electrons, neutrals (radicals, metastables, ground and excited state species) and electromagnetic radiation. At reduced pressure, a regime may be achieved where the temperature of the electrons differs substantially from that of the ions and neutrals. Such plasmas are referred to as "cold" or "non-equilibrium" plasmas. In such an environment many volatile organic compounds (eg volatile alcohols, volatile acids, volatile amines, or volatile hydrocarbons) neat or with other gases, eg Ar, have been shown to polymerise (H.K. Yasuda, Plasma Polymerisation, Academic Press, London 1985) coating both surfaces in contact with the plasma and those downstream of the discharge. The organic compound is often referred to as the "monomer". The deposit is often referred to as "plasma polymer". Plasma may be created and sustained

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

by the application of an electric field to a gas (monomer) of reduced pressure. A wide range of plasma reactor geometries have been described, and means of power input (microwaves, radiofrequency, audio etc.) Herein we describe the use of an inductively coupled (13.56MHz) RF plasma, but the numbers/values given for power input, gas pressure flow etc. may be readily adapted to other plasma reactors/power sources by those skilled in the art, please see Figure 1.

Thin polymeric films can be obtained from the plasmas of volatile organic compounds (at reduced pressure of 10^{-2} mbar and ideally less than 100°C). In plasma polymer deposition, there is generally extensive fragmentation of the starting compound or ionised gas and a wide range of the resultant fragments or functional groups are undesirably incorporated into the deposit. The advantages of such a mode of polymerisation potentially include: ultra-thin pin-hole free film deposition; plasma polymers can be deposited onto a wide range of substrates; the process is solvent free and the plasma polymer is free of contamination. By employing a low plasma input power (low plasma power/monomer flow rate ratio) it is possible to fabricate films with a high degree of functional group retention. An example of such a low power/rate ratio is 2W and a flow rate of 2.0sccm. A typical range would be 1-10W, and 1-5 SCCM). This is important where 'retention' of the molecular structure and chemical functionality of the deposit is required.

Other relatively low ratios may be used and are known to those skilled in the art. In the instance where a pulse wave is used corresponding corrections are made to the plasma power and-flow rate, as is known by those skilled in the art. It will also be apparent to one skilled in the art that reactor conditions will vary depending on reactor geometry.

Alternatively, plasma polymer deposits may be formed by pulsing the plasmas or ionised gases. Plasmas are formed either from single monomer species or a combination of organic molecules. The coating of surfaces by plasma polymerisation is disclosed in PCT application WO00/78928.

For those instances without subsequent cell attachment, amine-containing compounds (primary, secondary or tertiary amine, with or without unsaturation) can be polymerised (or copolymerised with another molecule) to provide stable plasma polymerised amine platforms onto which MSH can be linked.

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

For the homopolymerisation of amines, primary, secondary or tertiary amine, with or without unsaturation (e.g. allyl amine) can be polymerised (under a fairly wide range of conditions) to produce a plasma polymerised platform onto which MSH can be linked.
5 MSH peptides are tethered to a 'linker' molecule (e.g. PEG). This molecule will contain an active site (moiety) for the covalent linkage of the MSH peptide.

Copolymerisation is described in A.J. Beck, 1996. A preferred method is the plasma copolymerisation of an ethylene oxide (EO)-like molecule (e.g. triglyme or tetraglyme) with
10 a small amount of amine-containing compound (e.g., any of those identified above in homopolymerisation).

This strategy provides a plasma polymerised 'EO-like' platform with a controlled density of 'reactive' amine sites for the subsequent linking of the MSH fragment. The plasma
15 polymerised EO-like platform confers general protein-resistant properties (S. Beyer et al, 1997, Y.J. Yu et al, 2000 and G.P. Lopez et al, 1992). This arises from the EO-character and reduces the extent of non specific protein adsorption keeping the associated MSH active for longer.

20 According to a further aspect of the invention there is provided a method of preparing a cell culture surface comprising:

- i) providing at least one organic monomer;
- ii) creating a plasma of said organic monomer; and
- iii) coating the surface with said plasma to provide a cell culture surface to which MSH
25 is capable of being associated.

In a preferred method of the invention said organic monomer is selected from the following:

- a) Amines from allyl amine, butyl amine, heptyl amine, propyl amine etc. Candidate
30 amines would be primary, secondary or tertiary with sufficient vapour pressures below 100 degrees C (i.e. above 6.6 Pa at RTP, preferably about 130 Pa).

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

- b) EO-type surfaces would be selected from tetraethylene glycol, dimethyl ether (tetraglyme), tetraethylene glycol divinyl ether, diethylene oxide divinyl ether and triethylene oxide monoallyl ether.
- 5 In one embodiment of the invention there is provided a vehicle for use in tissue engineering/surgical procedures comprising a Melanocyte Stimulating Hormone (MSH) receptor ligand wherein said vehicle has integral therewith, or applied thereto, a cell carrier surface obtainable by plasma polymerisation.
- 10 In a further embodiment of the invention, there is provided a method of treatment comprising administering to a patient an MSH receptor ligand in tissue engineering/surgical procedures.
- In a further embodiment of the invention, there is provided MSH receptor ligand for use in
15 skin reconstruction, bladder reconstruction, corneal epithelial grafts, coating of stents for coronary heart disease to prevent in-stent restenosis, contact lens coating, hip replacement or heart valve coatings.
- Preferably the MSH receptor ligand is associated with a vehicle, preferably the vehicle
20 comprises a cell carrier surface.
- The association may be achieved by any appropriate means. Preferably the MSH receptor ligand is linked to the vehicle via linkers, especially polyethelene glycol (PEG) linkers, incorporation of MSH using calixarene, or by plasma polymerisation and coating with MSH.
25
- In a further embodiment of the invention, there is provided a method of treatment comprising administering to a patient in need of therapeutic or cosmetic surgery, a cell carrier surface which is associated with MSH receptor ligand.
- 30 The invention will now be described by way of example and with reference to the following tables and figures.

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**Materials and Methods**

5 Cells to be cultured on immobilised MSH will be epithelial, endothelial and neural crest derived cells, thus cutaneous epidermal keratinocytes, naso-gastro epithelial cells, intestinal epithelial cells, bronchial epithelial cells, corneal epithelial cells, bladder epithelial cells, embryonic stem cells, embryonic germ cells, haemopoietic stem cells, neural stem cells, osteoblasts, osteoclasts. For culture of cutaneous epidermal keratinocytes details are given
10 in full in Chakrabarty et al, 1999, other epithelial, endothelial cells and neural crest cells will be cultured using established culture methodologies as published the in scientific literature.

Immobilisation or Adsorption Technology

15 A number of different approaches can be used for the linkage, coupling or association of MSH receptor ligand on carrier surfaces used for tissue engineering or other such tissue engineering devices.

(i) Peptide linkage to PEG

As described in Scheme 2.

This scheme can be readily adapted to insert proteolytically cleavable moieties. A number of
25 these are identified as in Scheme 1.

(ii) Synthesis of hydroxy-functionalised calixarene (X = H, Y = (CH₂)₁₀OH):

30 Concentrated hydrochloric acid (3.2 ml) was added dropwise to a stirred solution of resorcinol (1.97 g, 17.9 mmol) and 1,1-dimethoxy-11-undecanol (4.15 g, 17.9 mmol) in ethanol (30 ml) at 0 °C. The reaction mixture was heated at 55 °C for 18 hours under argon. After cooling, the yellow coloured solution was poured into water (250 ml) to yield a pale yellow precipitate. This was collected by filtration, washed with warm water (6 x 100 ml) and dried to give resorcicarene as a pale yellow solid (4.58 g, 92%), m.p. 233-239 °C. The

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

crude material was recrystallised from methanol/chloroform (3.87 g, 78%) m.p. 237.5-238.5 °C. Characterisation available.

Synthesis of ene-functionalised calixarene (X = H, Y = (CH₂)₈CH=CH₂):

- 5 Concentrated hydrochloric acid (3.2 ml) was added dropwise to a stirred solution of resorcinol (1.97 g, 17.9 mmol) and 10-undecenal (3.05 g, 17.9 mmol) in ethanol (30 ml) at 0 °C. The reaction mixture was heated at 55 °C for 18 hours under argon. After cooling, the yellow coloured solution was poured into water (250 ml) to yield a pale yellow precipitate.
- 10 This was collected by filtration, washed with warm water (6 x 100 ml) and dried to give resorcicarene as a pale yellow solid (4.5 g, 90%). Characterisation available.

See scheme 7.

15 **(iii) Linkage of peptides to plasmas co-polymer surfaces**

Plasma Polymerisation

Summary of Experimental Conditions for Production of Ethylene Oxide 'EO' -like Plasma Polymer and Co-polymerisation with Allylamine.

- 20 Monomers that will be used for the production of 'EO-like' PPs are tetraethylene glycol dimethyl ether (tetraglyme) or tetraethylene glycol divinyl ether.

- 25 In order to achieve a suitable flow rate of 2-3 sccm, monomers are heated in a water bath to 80-90°C. This yields a pressure of approximately $4-6 \times 10^{-2}$ mbar in the plasma reactor. A plasma power of 2-3 W and polymerisation time of 20 minutes are employed. Using these conditions, initial XPS results of a PP(tetraethylene glycol dimethyl ether) have shown O/C ratios of 0.56 and a % retention of the ether functionality of ~ 72% (from curve fitting the C 1s core level). This compares very favourably with an O/C ratio of 0.4-0.48 reported by Lopez et al, (1992) (N.B. no C 1s curve fits were presented)

30

Other monomers which will be of interest, due to their increased volatility and hence easier control of monomer flow are diethylene oxide divinyl ether and triethylene oxide monoallyl

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

ether. The production of plasma polymers from these materials has been the subject of a recent study by Yu et al (2000) and Beyer et al (1997).

5 All of the above monomers may be co-polymerised with allylamine to provide reactive amine sites for MSH/peptide immobilisation. Copolymerisation is as described previously by Beck et al (1996).

10 PEG/MSH synthesis is as already described (Scheme 2). Scheme 5 illustrates the displacement reaction of a surface amine with the PEG/peptide molecule using MSH as an example.

15 Some initial results relating to the feasibility of this reaction are now presented. Bromoacetyl bromide undergoes a similar reaction with an amine as shown in Scheme 6. This reaction has been used to test the availability of surface amines for the reaction proposed in Scheme 5.

20 The feasibility of this scheme has been demonstrated using bromoacetyl bromide. The results of reaction of bromoacetyl bromide with surface amines in a PP of allylamine has been evaluated. The results are summarised in Tables 2 and 3.

Table 2. Summary of XPS results for washing and reaction of bromoacetyl bromide with Allylamine⁺PCPs (all samples prepared within 2 days of plasma polymerisation).

Sample	N/C	O/C	Br/N
Allylamine PP (01RF01)	0.20	0.04	
+ dichloromethane (DCM) 5mins	0.19	0.06	
+ bromoacetyl bromide (10mM in DCM), DCM 5mins	0.18	0.07	0.22
+ bromoacetyl bromide (10mM in DCM), DCM 5mins, H ₂ O wash (2×3min)	0.14	0.09	0.06

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

Table 3. Relative contributions of 'physisorbed' and 'immobilised' bromine from peak fit of Br 3d core level (all samples prepared within 2 days of plasma polymerisation). Charge corrected on C 1s @ 285 eV.

Sample	'Physisorb' Br (eV)	'Imm.' Br (eV)
+ bromoacetyl bromide (10mM in DCM), DCM 5mins	61% (68.0)	39% (70.7)
+ bromoacetyl bromide (10mM in DCM), DCM 5mins, H ₂ O wash (2×3min)	39% (67.8)	61% (70.7)

5

Upon reaction of the PP with bromoacetyl bromide, bromine is detected by XPS on the surface of the PP (Br/N = 0.22). The results indicate that the reaction has taken place although care must be taken to distinguish between covalently immobilised bromine and that which is physisorbed to the substrate (N.B. we expect a strong charge-based interaction of Br⁻ with the allylamine PP). The data in Table 2 illustrate this point, with a change in the ratio of immobilised to adsorbed bromine upon washing with water. While presently the adsorbed bromine cannot be fully removed from the surface upon washing, the peak fit of the Br 3d core level allows one to distinguish the relative amount of this.

10

In addition to the results shown above, we have demonstrated the reaction of PEG/Cystine with a PP of allylamine, which results in the linking of cystine residues upon the surface (data not shown).

15

20

25

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

REFERENCES:

1. A J Beck, R F Jones, R D Short, *Polymer* 1996, 24 (37) 5537-5539, Plasma co-polymerisation as a route to the fabrication of new surface chemistries with controlled amounts of specific chemical functionality
- 5 2. S Beyer, W Knoll, H Ringsdorf, J Hann Wang, R B Timmons, P Sluka. *J Biomed Mater Res*, 1997, 36, 181. 'Reduced protein adsorption on plastics via direct deposition of triethylene glycol monoallyl ether'
- 10 3. Chakrabarty KH, Dawson RA, Harris P, Layton C, Babu M, Gould L, Phillips J, Leigh I, Green C, Freedlander E and Mac Neil S. (1999) Development of autologous human epidermal/dermal composites based on sterilised human allodermis for clinical use. *Brit J Dermatol*. 141, 811-823.
- 15 4. Drumheller PD, Ebert DL, Hubbell JA. Multifunctional poly(ethylene glycol) semi-interpenetrating polymer networks at highly selective adhesive substrates for bioadhesive peptide grafting. *Biotechnology and Bioengineering* 1994; 43:772-780.
- 5 5. Haycock JW, Rowe SJ, Cartledge S, Wyatt A, Ghanem G, Morandini R, Rennie IG and Mac Neil S, 2000. α -melanocyte stimulating hormone reduces impact of proinflammatory cytokine and peroxide generated oxidative stress on keratinocyte and melanoma cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 15629-15636.
- 20 6. Haycock JW, Wagner M, Moranbdini R, Ghanem G, Rennie IG and Mac Neil S. (1999) α -melanocyte stimulating hormone inhibits NF- κ B activation in human melanocytes and melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology* 113:560-566
- 25 7. Hedley SJ, Gawkrödger DJ, Westman AP, Morandini R, R Boeynaems JM, Ghanem G and Mac Neil S. (1998) Potential immunomodulatory role for α -MSH in normal human melanocytes and in melanoma cells. *British Journal of Dermatology* 138: 536-543.
- 30

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

8. Ichii-Jones Fm Lear JT, Heagerty AHM, Smith AG, Hutchinson PE, Osborne J, Bowers B, Jones PW, Davies E, Ollier WER, Thomson W, Yengi L, Bath J, Fryer AA and Strange RC. (1998) Susceptibility to melanoma: influence of skin type and polymorphism in the melanocyte stimulating hormone receptor gene. *Journal of Investigative Dermatology* 111: 218-221.
9. G P Lopez, B D Ratner, C D Tidwell, C L Haycox, R J Rapoza and T A Horbett, *J Biomed Mater Res*, 1992, 26, 415. 'Glow discharge plasma deposition of tetraethylene glycol dimethyl ether for fouling resistant biomaterial surfaces.
10. Morandini R, Boeynaems JM, Hedley SJ, Mac Neil S and Ghanem G. (1998) Modulation of ICAM-1 expression by α -MSH in human melanoma cells and melanocytes. *Journal of Cell Physiology* 175: 276-282.
11. Y J Yu, R B Timmons, J S Jen and F E Molock. *Coll Surf B*, 2000, 18, 235. 'Non fouling surfaces produced by gas phase pulsed plasma polymerisation of an ultra low molecular weight ethylene oxide containing monomer'

20

25

30

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

CLAIMS

1. A vehicle for use in tissue engineering and/or surgical procedures comprising a Melanocyte Stimulating Hormone (MSH) receptor ligand.
5
2. A vehicle according to claim 1 wherein the vehicle is a prosthesis, implant, matrix, stent, gauze, bandage, plaster, biodegradable matrix, or polymeric film.
3. A vehicle according to claim 1 or claim 2 wherein the MSH receptor ligand is MSH,
10 or a functional fragment thereof.
4. A vehicle according to claims 1 or claim 2 wherein the receptor ligand is a peptide comprising a structural variant of MSH and having MSH receptor binding function.
- 15 5. A vehicle according to any of the preceding claims wherein the MSH receptor ligand is immobilised.
6. A vehicle according to any of the preceding claims 1 to 4 wherein the MSH receptor ligand is released by proteolytic cleavage.
20
7. A vehicle according to claim 6 comprising a proteolytic cleavage site proximal to the MSH receptor ligand.
8. A vehicle according to any of the preceding claims wherein MSH receptor ligand is
25 linked thereto by a linker.
9. A vehicle according to claim 8 wherein the linker is a polyethylene glycol (PEG) linker.
- 30 10. A vehicle according to any of the preceding claims further comprising a calixarene wherein the calixarene is associated, coupled or linked to the MSH receptor ligand.
11. A vehicle according to any of the preceding claims further comprising a plasma polymerised surface.

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

12. A vehicle according to any of the preceding claims for use in the treatment of acute or chronic inflammatory epithelial disorders.
- 5 13. A vehicle according to any of the preceding claims for use in the delivery of MSH receptor binding ligand to epithelial surfaces.
14. A vehicle according to any of the preceding claims further comprising a cell carrier surface to which a cell may become associated.
- 10 15. A vehicle according to claim 14 wherein the cell carrier surface is suitable for use with any or a combination of keratinocytes; melanocytes, cutaneous epithelial cells, bronchial epithelial cells, bladder epithelial cells, corneal epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, smooth muscle cells, monocytes, gastrointestinal mucosal epithelial cells and
15 oral mucosa epithelial cells.
16. A vehicle according to any of the preceding claims for use in cartilage repair; bone repair; muscle repair; nerve repair; connective tissue repair; blood vessel repair; bladder repair.
- 20 17. A vehicle according to any of the preceding claims wherein the vehicle is adapted to be applied and/or implanted into a patient requiring cosmetic tissue engineering.
18. A vehicle according to any of the preceding claims wherein the vehicle is adapted to
25 be applied and/or implanted into a patient requiring therapeutic tissue engineering.
19. A method of forming a vehicle of any of claims 1 to 18 comprising one, or any combination of the following steps:
- 30 i) coupling an MSH peptide to a surface via a linker;
ii) associating an MSH peptide with a calixarene or a calixarene treated surface;
iii) immobilisation of MSH peptides to a plasma polymerised surface.
20. A method according to claim 19 wherein step (i) further comprises one, or any combination of the following steps;

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

- i) providing a linking agent and MSH receptor ligand;
 - ii) providing conditions suitable for linking said agent with MSH receptor ligand; and
 - iv) bringing the linked molecule in contact with a cell surface to be treated.
- 5 21. A method according to claim 19 or claim 20 wherein the linker comprises polyethylene glycol (PEG).
22. A method of preparing a cell culture surface comprising:
- i) providing at least one organic monomer;
 - 10 ii) creating a plasma of said organic monomer; and
 - iii) coating the surface with said plasma to provide a cell culture surface to which MSH is capable of being associated.
23. A method according to claim 22 when the organic monomer is an amine such as allyl
- 15 amine, butyl amine, heptyl amine or propyl amine.
24. A method of treatment comprising administering to a patient in need of therapeutic or cosmetic surgery a vehicle of any of claims 1 to 18.

20

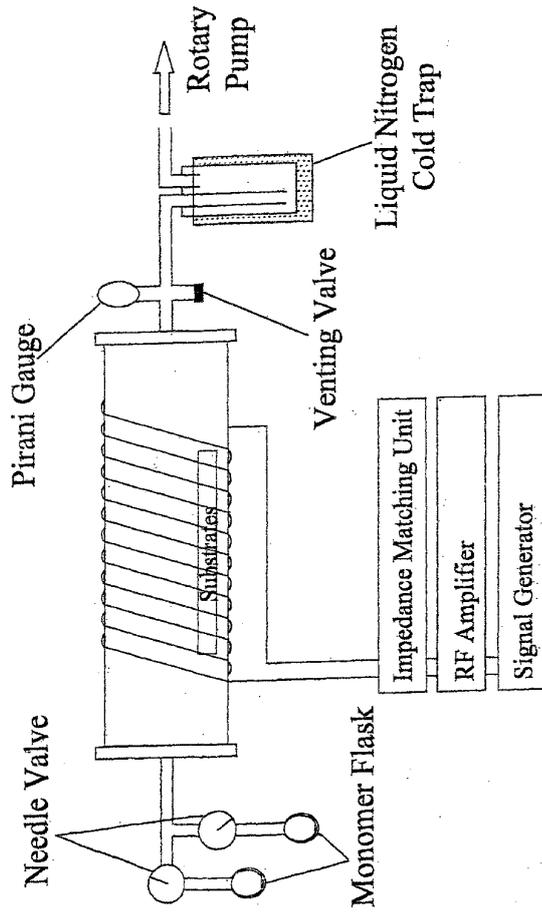
25

30

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

Figure 1 - Schematic diagram of the plasma polymerisation apparatus



1/9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

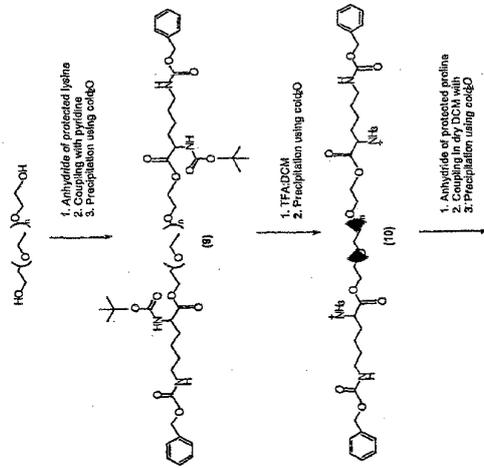


FIGURE 2:
SCHEME 2

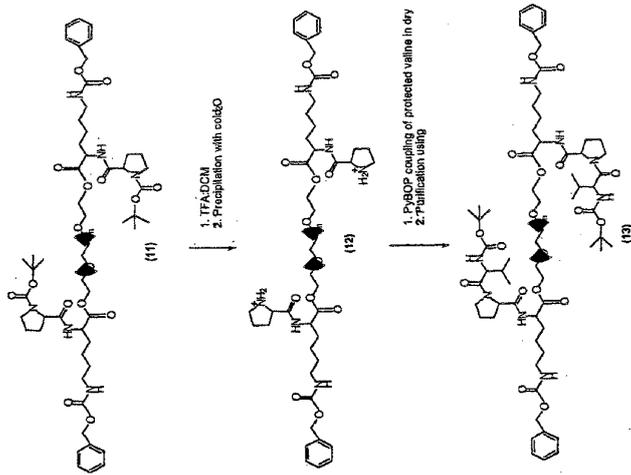
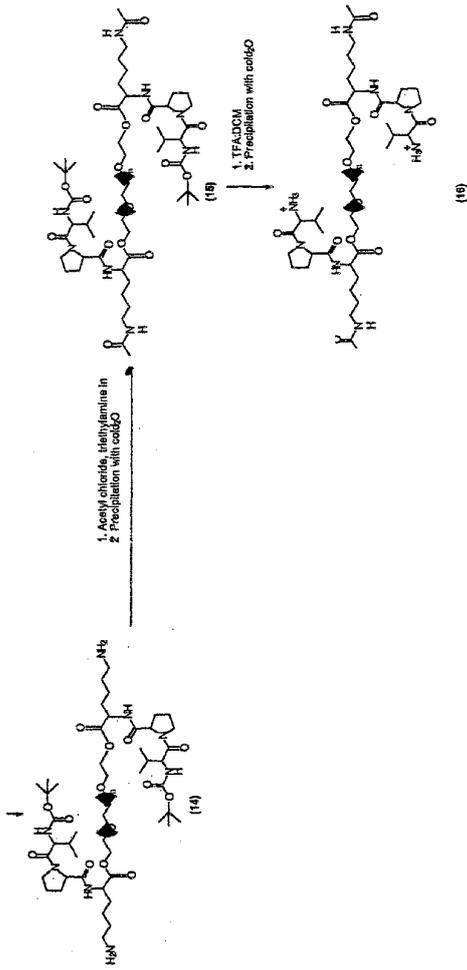


Figure 2 (continued)
SCHEME 2

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

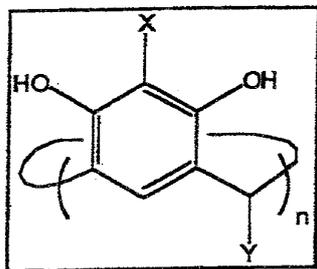


4/9

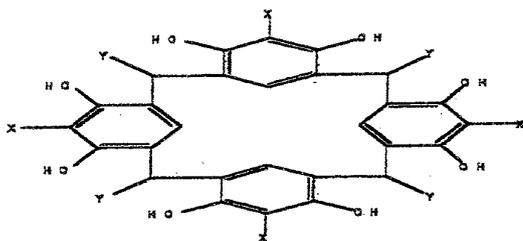
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIGURE 2: (CONTINUED)
Scheme 2: Linkage of MSH peptide fragment to PEG

FIGURE 3
Scheme 3: Calixarene Structures



For n = 4:



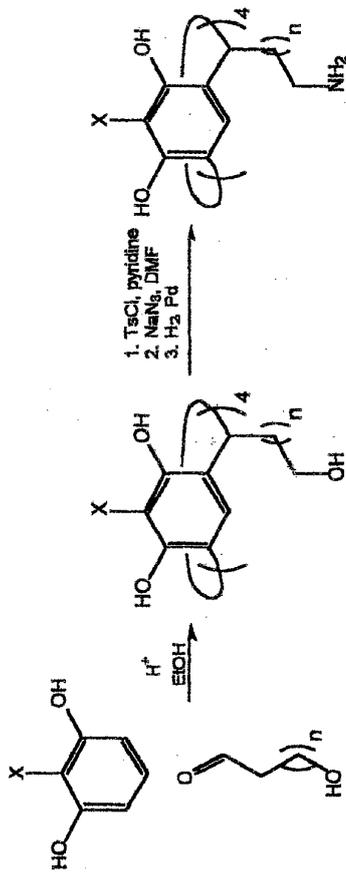
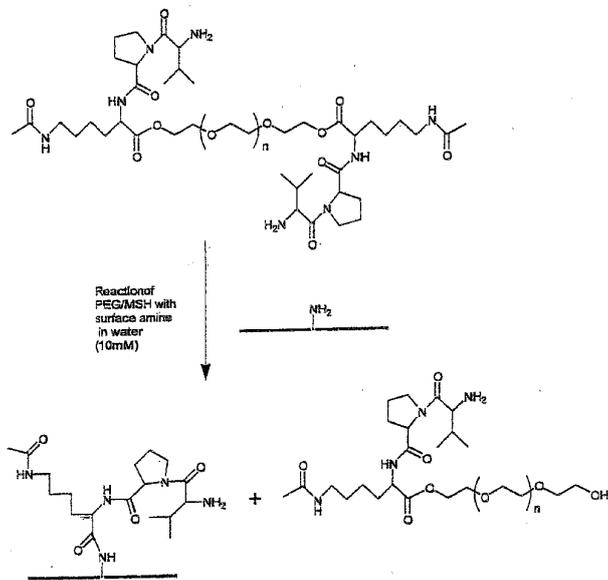
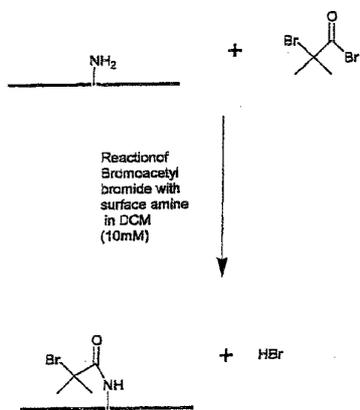


FIGURE 4
Scheme 4: Monofunctional calixarenes (i.e. a single attachment site pre calixarene):



SCHEME 5
FIGURE 5.



SCHEME 6
FIGURE 6

WO 02/083176

PCT/GB02/01713

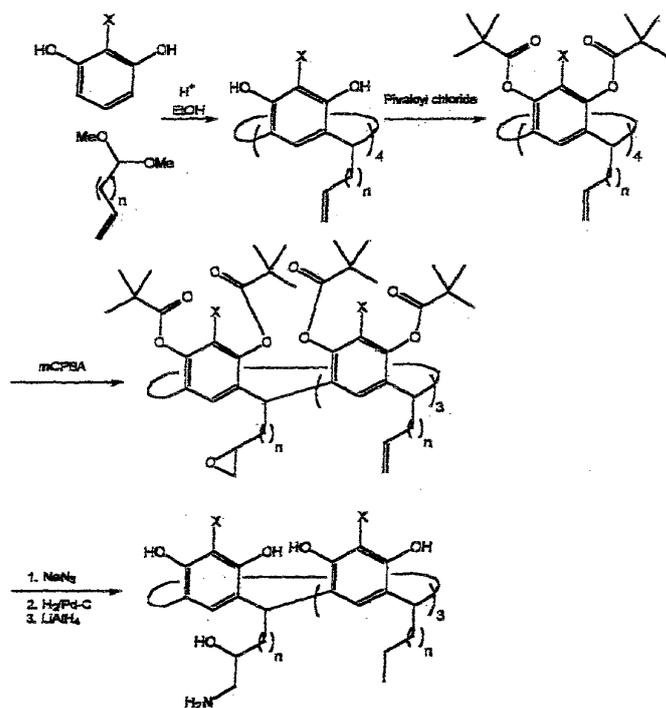


FIGURE 7
Scheme 7: Calixarene technology, experimental details.

【 国際公開パンフレット (コレクティブバージョン) 】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083176 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K 47/00** Chemistry, Dainton Building, Brook Hill, Sheffield S3 7HF (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB02/01713
- (22) International Filing Date: 17 April 2002 (17.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0109348.3 17 April 2001 (17.04.2001) GB
0109347.5 17 April 2001 (17.04.2001) GB
- (71) Applicants (for all designated States except US): **UNIVERSITY OF SHEFFIELD** [GB/GB]; Firth Court, Western Bank, Sheffield S10 2TN (GB). **CELTRAN LIMITED** [GB/GB]; Firth Court, Western Bank, Sheffield S10 2TN (GB).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **MACNEIL, Sheila** [GB/GB]; Department of Engineering materials, Sir Robert Hadfield Building, Mappin Street, Sheffield S1 3JD (GB). **SHORT, Rob** [GB/GB]; Department of Engineering materials, Sir Robert Hadfield Building, Mappin Street, Sheffield S1 3JD (GB). **HUNTER, Chris** [GB/GB]; University of Sheffield, Department of Chemistry, Dainton Building, Brook Hill, Sheffield S3 7HF (GB). **HAYCOCK, John** [GB/GB]; Department of Engineering materials, Sir Robert Hadfield Building, Mappin Street, Sheffield S1 3JD (GB). **WILLIAMS, Nick** [GB/GB]; University of Sheffield, Department of Chemistry, Dainton Building, Brook Hill, Sheffield S3 7HF (GB). **RYAN, Tony** [GB/GB]; University of Sheffield, Department of
- (74) Agent: **HARRISON GODDARD FOOTE**, Belgrave Hall, Belgrave Street, Leeds LS2 8DD (GB).
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI, GM, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, 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) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (48) Date of publication of this corrected version: 28 November 2002
- (15) Information about Correction: see PCT Gazette No. 48/2002 of 28 November 2002, Section II
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/083176 A2

(54) Title: VEHICLE

(57) Abstract: The present invention provides a vehicle for use in tissue engineering and/or surgical procedures comprising a Melanocyte Stimulating Hormone (MSH) receptor ligand. The vehicle may be a prosthesis, implant, matrix, stent, gauze, bandage, plaster, biodegradable matrix, or polymeric film. The invention also provides a method of forming a vehicle of the invention.

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083176 A3(51) International Patent Classification: A61K 47/48, (74) Agent: HARRISON GODDARD FOOTE; Belgrave
A61L 27/22, 31/04, 15/32, 27/38 Hall, Belgrave Street, Leeds LS2 8DD (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB02/01713

(22) International Filing Date: 17 April 2002 (17.04.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0109348.3 17 April 2001 (17.04.2001) GB
0109347.5 17 April 2001 (17.04.2001) GB(71) Applicants (for all designated States except US): UNI-
VERSITY OF SHEFFIELD [GB/GB]; Firth Court, West-
ern Bank, Sheffield S10 2TN (GB). CELLTRAN LIM-
ITED [GB/GB]; Firth Court, Western Bank, Sheffield S10
2TN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MACNEIL, Sheila
[GB/GB]; Department of Engineering materials, Sir Robert
Hadfield Building, Mappin Street, Sheffield S1 3JD (GB).
SHORT, Rob [GB/GB]; Department of Engineering
materials, Sir Robert Hadfield Building, Mappin Street,
Sheffield S1 3JD (GB). HUNTER, Chris [GB/GB];
University of Sheffield, Department of Chemistry, Dainton
Building, Brook Hill, Sheffield S3 7HF (GB). HAY-
COCK, John [GB/GB]; Department of Engineering
materials, Sir Robert Hadfield Building, Mappin Street,
Sheffield S1 3JD (GB). WILLIAMS, Nick [GB/GB];
University of Sheffield, Department of Chemistry, Dainton
Building, Brook Hill, Sheffield S3 7HF (GB). RYAN,
Tony [GB/GB]; University of Sheffield, Department of
Chemistry, Dainton Building, Brook Hill, Sheffield S3
7HF (GB).(81) Designated States (national): AI, 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, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, 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) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
14 August 2003

(15) Information about Correction:

Previous Correction:
see PCT Gazette No. 48/2002 of 28 November 2002, Sec-
tion IIFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/083176 A3

(54) Title: BIOMATERIALS COMPRISING A MELANOCYTE STIMULATING HORMONE (MSH), AND METHOD OF
FORMING(57) Abstract: The present invention provides a vehicle for use in tissue engineering and/or surgical procedures comprising a
Melanocyte Stimulating Hormone (MSH) receptor ligand. The vehicle may be a prosthesis, implant, matrix, stent, gauze, band-
age, plaster, biodegradable matrix, or polymeric film. The invention also provides a method of forming a vehicle of the invention.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internet Application No PCT/GB 02/01713
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K47/48 A61L27/22 A61L31/04 A61L15/32 A61L27/38		
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) IPC 7 A61K A61L		
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, PAJ, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, COMPENDEX		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRANCE R M ET AL: "Attachment of human keratinocytes to plasma co-polymers of acrylic acid/octa-1,7-diene and allyl amine/octa-1,7-diene" JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY, THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, CAMBRIDGE, GB, vol. 8, no. 1, 1998, pages 37-42, XP002158573 ISSN: 0959-9428 the whole document	1,2,11, 14,15, 22,23
X	WO 98 31316 A (CASTRO MUNOZLEDO FEDERICO ;CELADON SCIENCE LLC (US); KURI HARCUCHE) 23 July 1998 (1998-07-23) page 7, line 25-28; claims 1,7,11 -/-	1,2,14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 June 2003		Date of mailing of the international search report 23/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vadot, P

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 02/01713

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 00 78928 A (HADDOW DAVID ;MACNEIL SHEILA (GB); SHORT ROBERT (GB); UNIV SHEFFIE) 28 December 2000 (2000-12-28) A ASSOCIER AVEC UN DOC AVEC ACTIVITE CONNUE DE LA MSH SUR GUERISON abstract	22, 23
X	WO 00 72895 A (UNIV MICHIGAN) 7 December 2000 (2000-12-07) page 1, paragraph 2; claims 1-7,10	1, 3, 5, 12, 13, 17, 18, 24
X	EP 0 189 107 A (ADERHOLD DIETER) 30 July 1986 (1986-07-30) Page 7, line 68 page 4, column 6, line 5 Abstract page 3, column 4, line 61-68 -page 3, column 4, line 51-59	3-5, 12, 13, 16, 18
X	FR 2 691 465 A (PF MEDICAMENT) 26 November 1993 (1993-11-26) Title page 3, line 23-31; claims 1,21	1, 3-5, 8, 9, 12, 16, 17
X	FR 2 735 131 A (RECH DE PATHOLOGIE APPLIQUEE S) 13 December 1996 (1996-12-13) claims 1,5	3-5
X	WO 98 47489 A (PELLET MARC ;ROUME CHANTAL (FR); PHARMA BIOTECH (FR)) 29 October 1998 (1998-10-29) claim 15	1
X, P	WO 02 06316 A (ETEMAD MOGHADAM BIJAN ;HEDLEY MARY LYNNE (US); ZYCOS INC (US); AZI) 24 January 2002 (2002-01-24) page 8, line 6 -page AB; claims 6,9	1-4, 6-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/GB 02/01713	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/GB 02 01713

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 1,2,8,12,14,15,16,19,20,22 relate to an extremely large number of possible products/methods. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the products/methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the products/methods: list of vehicle comprising a MSH, functional fragment or structural variant of MSH, the MSH being linked to the vehicle by a PEG compound, calixarene or directly to the vehicle, after functionalization of this last one.

Present claims 17,18,20,22 relate to a product/methods defined by reference to a desirable characteristic or property, namely:
claim 17,18: "the vehicle is adapted to be applied and/or implanted into a patient."
claim 20: "providing conditions suitable for linking said agent" and "bringing the linked molecule in contact with a cell surface to be treated"
claim 22: "to provide a cell culture surface to which MSH is capable of being associated."

The claims cover all products/methods having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products/methods. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product/method by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the products/methods: list of vehicle comprising a MSH, functional fragment or structural variant of MSH, the MSH being linked to the vehicle by a PEG compound, calixarene or directly to the vehicle, after functionalization of this last one.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/GB 02 01713

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-5,8,9,12,13,16-21,24 (all partially)

A vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is immobilised to the vehicle and linked, via a linker, PEG, to the vehicle. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

2. Claims: 1-4,6,7,9,12,13,16-21,24 (all partially)

A vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is linked via a linker (PEG) to the vehicle and released by proteolytic cleavage. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

3. Claims: 1-5,8,10,12,13,16-20,24 (all partially)

A vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is immobilised to the vehicle and linked, via a linker, calixarene, to the vehicle. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

4. Claims: 1-4,6-8,10,12,13,16-20,24 (all partially)

A vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is linked via a linker (calixarene) to the vehicle and released by proteolytic cleavage. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

5. Claims: 1-5,12,13,16-18,24 (all partially)

A vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is immobilised and linked to the vehicle. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

6. Claims: 1-4,6,7,11-13,16-18,24 (all partially)

A vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is linked to the vehicle and released by proteolytic cleavage. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

International Application No. PCT/GB 02 01713

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. Claims: 1,2,3,4,5,11,12,13,16,17,18,19,22,23,
24 (all partially)

A plasma treated vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is linked to the vehicle and immobilised. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

8. Claims: 1,2,3,4,6,7,11,12,13,16,17,18,19,22,23,
24 (all partially)

A plasma treated vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is linked to the vehicle and released by proteolytic cleavage. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

9. Claims: 1,2,3,4,5,8,9,11,12,13,16,17,18,19,20,21,
24 (all partially)

A plasma treated vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is immobilised and linked, via a linker (PEG) to the vehicle. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

10. Claim : 1.2.3.4.6.7.8.9.11.12.13.16.17.18.19.20.21.24 (all partially)

A plasma treated vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is linked via a linker (PEG) to the vehicle and released by proteolytic cleavage. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives.

11. Claim : 1.2.3.4.5.8.9.12.13.14.15.16.17.18.20.21.24 (all partially)

A vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is immobilised and linked via a linker (PEG) to a cell, which is attached to the vehicle. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives. A method of preparing a cell culture surface.

International Application No. PCT/AS 02 01713

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/AS/ 210

12. Claim : 1.2.3.4.6.7.8.9.12.13.14.15.16.17.18.20.21.24 (all partially)

A vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is linked to a cell via a linker (PEG) and released by proteolytic cleavage from the vehicle. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives. A method of preparing a cell culture surface.

13. Claim : 1.2.3.4.5.11.12.13.14.15.16.17.18.22.23.24 (all partially)

A plasma treated vehicle is linked to a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is immobilised and linked to a cell which itself linked to the vehicle. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives. A method of preparing a cell culture surface.

14. Claim : 1.2.3.4.6.7.11.12.13.14.15.16.17.18.22.23.24 (all partially)

A plasma treated vehicle comprising a MSH or a functional fragment of MSH or a structural variant of MSH. The hormone is released by proteolytic cleavage from a cell which itself linked to the vehicle. A method of forming the vehicle comprising a MSH and derivatives. A method of preparing a cell culture surface.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 02/01713

Information on patent family members

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9831316 A	23-07-1998	AU 6242298 A	07-08-1998
		WO 9831316 A1	23-07-1998
		US 6541028 B1	01-04-2003
WO 0078928 A	28-12-2000	AU 5546400 A	09-01-2001
		CA 2375557 A1	28-12-2000
		CN 1357039 T	03-07-2002
		EP 1185621 A2	13-03-2002
		WO 0078928 A2	28-12-2000
		JP 2003503318 T	28-01-2003
		NO 20016184 A	21-02-2002
WO 0072895 A	07-12-2000	US 2001014674 A1	16-08-2001
		US 2002037566 A1	28-03-2002
		AU 5167200 A	18-12-2000
		WO 0072895 A1	07-12-2000
EP 0189107 A	30-07-1986	DE 3502099 A1	07-08-1986
		EP 0189107 A2	30-07-1986
		JP 61180722 A	13-08-1986
FR 2691465 A	26-11-1993	FR 2691465 A1	26-11-1993
FR 2735131 A	13-12-1996	FR 2735131 A1	13-12-1996
		AU 6309496 A	09-01-1997
		EP 0837881 A2	29-04-1998
		WO 9641815 A2	27-12-1996
		JP 11507661 T	06-07-1999
WO 9847489 A	29-10-1998	FR 2762318 A1	23-10-1998
		FR 2776516 A1	01-10-1999
		AU 741964 B2	13-12-2001
		AU 7436398 A	13-11-1998
		BR 9808933 A	01-08-2000
		CN 1256628 T	14-06-2000
		EP 0980240 A1	23-02-2000
		WO 9847489 A1	29-10-1998
		HU 0004297 A2	28-08-2001
		JP 2002500631 T	08-01-2002
		NO 995063 A	15-11-1999
		PL 336296 A1	19-06-2000
		RU 2198678 C2	20-02-2003
		US 6217893 B1	17-04-2001
		US 6475507 B1	05-11-2002
ZA 9803205 A	19-10-1998		
WO 0206316 A	24-01-2002	AU 7593001 A	30-01-2002
		EP 1303625 A2	23-04-2003
		WO 0206316 A2	24-01-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 47/48

A 6 1 P 29/00

A 6 1 K 37/32

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, KP, 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

(74) 代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 マクネイル, シェイラ

イギリス国 シェフィールド エス1 3ジェイディー, マッピン ストリート, サー ロバート ハッドフィールド ビルディング, デパートメント オブ エンジニアリング マテリア エルズ

(72) 発明者 ショート, ロブ

イギリス国 シェフィールド エス1 3ジェイディー, マッピン ストリート, サー ロバート ハッドフィールド ビルディング, デパートメント オブ エンジニアリング マテリア エルズ

(72) 発明者 ハンター, クリス

イギリス国 シェフィールド エス3 7エイチエフ, ブルック ヒル, ダイントン ビルディング, デパートメント オブ ケミストリー, ユニバーシティ オブ シェフィールド

(72) 発明者 ヘイコック, ジョン

イギリス国 シェフィールド エス1 3ジェイディー, マッピン ストリート, サー ロバート ハッドフィールド ビルディング, デパートメント オブ エンジニアリング マテリア エルズ

(72) 発明者 ウィリアム, ニック

イギリス国 シェフィールド エス3 7エイチエフ, ブルック ヒル, ダイントン ビルディング, デパートメント オブ ケミストリー, ユニバーシティ オブ シェフィールド

(72) 発明者 ライアン, トニー

イギリス国 シェフィールド エス3 7エイチエフ, ブルック ヒル, ダイントン ビルディング, デパートメント オブ ケミストリー, ユニバーシティ オブ シェフィールド

F ターム(参考) 4C076 AA71 AA72 BB21 BB31 CC04 CC18 CC19 CC30 CC41

4C081 AB01 AB02 AB11 AB12 AB13 AB18 AB19 CA151 CA181 CD26

CD34 DA02 DB07 DC03 EA05 EA15

4C084 AA02 AA17 BA44 DB27 MA32 MA56 MA63 NA10 NA12 ZA892

ZB112