

(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2013-538864  
(P2013-538864A)

(43) 公表日 平成25年10月17日(2013.10.17)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C07K 5/08</b> (2006.01)	C07K 5/08	Z N A
<b>C07K 7/06</b> (2006.01)	C07K 7/06	4 B 0 6 5
<b>C12N 5/07</b> (2010.01)	C12N 5/00	4 H 0 4 5
		2 0 2 Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2013-532197 (P2013-532197)	(71) 出願人	591001248 ソルヴェイ (ソシエテ アノニム) ベルギー・B-1120・ブリュッセル・ リュ・ドゥ・ランスペーク・310
(86) (22) 出願日	平成23年10月6日 (2011.10.6)	(74) 代理人	100092093 弁理士 辻居 幸一
(85) 翻訳文提出日	平成25年6月5日 (2013.6.5)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 賢男
(86) 國際出願番号	PCT/EP2011/067481	(74) 代理人	100084663 弁理士 稲田 篤
(87) 國際公開番号	W02012/045824	(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治
(87) 國際公開日	平成24年4月12日 (2012.4.12)	(74) 代理人	100119013 弁理士 山崎 一夫
(31) 優先権主張番号	10187069.9		
(32) 優先日	平成22年10月8日 (2010.10.8)		
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	10187070.7		
(32) 優先日	平成22年10月8日 (2010.10.8)		
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生物活性アミノ酸配列及びその使用

## (57) 【要約】

機能性ペプチド中の生物活性配列としてのアミノ酸配列 H a r - G l y - A s p ( h R G D ) の使用。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞接着、細胞増殖及び／又は細胞分化を促進するための、機能性ペプチド中の生物活性配列としてのアミノ酸配列 H a r - G l y - A s p ( h R G D ) の使用。

## 【請求項 2】

前記機能性ペプチド部分が、G h R G D 、 Y h R G D 、 Y G h R G D 、 G G G G h R G D 、 A l a - h R G D 、 G A B A - h R G D 、 6 - アミノバレリックアミド - h R G D 、 h R G D S 、 h R G D Y 、 h R G D F 、 h R G D K 、 h R G D V 、 h R G D T 、 h R G D W P 、 h R G D F K 、 h R G D Y K 、 h R G D S P 、 h R G D S P K 、 h R G D S Y 、 h R G D N P 、 h R G D T P 、 h R G D S P 、 G h R G D S 、 G h R G D Y 、 G h R G D F 、 G h R G D S Y 、 G h R G D S P 、 G h R G D S P K 、 Y h R G D S 、 G h R G D T P 、 G h R G D S P K 、 G h R G D S P 、 G h R G D K 、 G G G G h R G D S 、 G h R G D N P 及びそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも 1 つの配列、特に h R G D S 、 G h R G D S 、 G h R G D S Y 、 A l a - h R G D 、 G A B A - h R G D 、 6 - アミノバレリックアミド - h R G D 及び h R G D W P 、より具体的には A l a - h R G D 、 G A B A - h R G D 、 6 - アミノバレリックアミド - h R G D 及び h R G D W P 、もっとも具体的には h R G D W P を含む、請求項 1 に記載の使用。

10

## 【請求項 3】

前記機能性ペプチド部分が自己集合性ペプチド部分に共有結合している、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

20

## 【請求項 4】

前記自己集合性ペプチド部分が、シート、コイルドコイル らせん構造又はペプチド三重らせん構造に自己集合することができる、請求項 3 に記載の使用。

## 【請求項 5】

前記機能性ペプチド部分が、ポリマー、特に生体適合性ポリマー、より具体的には熱応答性ポリマーに共有結合している、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 6】

前記機能性ペプチド部分が、チオエーテル、アミノ、アミド、エステル及びエーテル結合からなる群から選択される結合を介して前記ポリマーに結合している、請求項 5 に記載の使用。

30

## 【請求項 8】

ハイドロゲル、好ましくは細胞培養のためのハイドロゲルの調製における、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 9】

H a r - G l y - A s p ( h R G D ) 配列を含むハイドロゲル。

## 【請求項 10】

前記 h R G D 配列がハイドロゲル足場の一部である、請求項 9 に記載のハイドロゲル。

## 【請求項 11】

前記 h R G D 配列が細胞接着、細胞増殖及び／又は細胞分化を促進する、請求項 9 又は 10 に記載のハイドロゲル。

40

## 【請求項 12】

自己集合性ペプチド部分及び／又はポリマー、特に自己集合性ペプチド部分及び／又は生体適合性ポリマー、より具体的には自己集合性ペプチド部分及び／又は熱応答性ポリマーをさらに含む、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載のハイドロゲル。

## 【請求項 13】

前記 h R G D 配列が、場合によっては結合又はさらなるペプチド配列を介して前記ペプチド部分又はポリマーの少なくとも 1 つに共有結合している、請求項 12 に記載のハイドロゲル。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

50

**【0001】**

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる、いずれも2010年10月8日に出願された欧州特許出願第10187070.7号及び第10187069.9号の利益を主張する。

**【0002】**

本発明は、生物活性アミノ酸配列ならびに、特に細胞接着、細胞増殖及び/又は細胞分化を促進するための、機能性ペプチド中のその使用に関する。

**【背景技術】****【0003】**

生物活性又は生物学的に活性なペプチド（又はアミノ酸）配列は当技術分野において公知である。生物活性配列は、ECM成分、細胞接着分子、細胞表面受容体、成長因子、サイトカイン、ケモカインなどをはじめとする多様な範囲の天然のタンパク質及びペプチドのいずれに由来することもできる。たとえば、-RGD-配列は、フィブロネクチン中に見られるプロトタイプ細胞認識配列であり、インテグリンによって認識され、細胞付着を媒介することがよく知られている。インテグリン媒介細胞付着は、細胞の移動、成長、分化及びアポートシスに影響し、それらを調節する。

10

**【0004】**

-RGD-のような、細胞接着、細胞増殖及び/又は細胞分化を促進する生物活性アミノ酸配列の利用可能性にもかかわらず、特に薬物送達又は細胞及び組織培養の分野において、特定の細胞タイプを考慮して、又は特定の条件において、改善された性質を示す新たな配列が絶えず求められている。

20

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

したがって、本発明の目的は、細胞接着、細胞増殖及び/又は細胞分化を促進するのに特に有利な性質を有する生物活性アミノ酸配列を提供することである。

**【課題を解決するための手段】****【0006】**

したがって、本発明は、細胞接着、細胞増殖及び/又は細胞分化を促進するための、機能性ペプチド中の生物活性配列としてのアミノ酸配列Harr-Gly-Asp(hRGD)の使用に関する。

30

**【0007】**

本発明者らは、実に驚くべきことに、このアミノ酸配列が主に改善された細胞接着及び細胞増殖を示すということを見いだした。特に、本アミノ酸配列は、特に酵素的分解に対するより強い抵抗力により、より長い半減期を示す。本アミノ酸配列はまた、特定の細胞系統に対してより高い親和力を示す。

**【0008】**

「生物活性配列」又は「生物学的に活性な配列」とは、特定の生物学的機能、ここでは細胞接着（もしくは細胞付着）、細胞増殖及び/又は細胞分化（もしくは細胞表現型の誘発）の促進を有するアミノ酸配列をいう。例示的な細胞分化は、多能性又は全能性細胞、たとえば幹細胞から専用の細胞タイプ、たとえば骨細胞、筋細胞、インスリン分泌細胞などへの転換である。

40

**【0009】**

本明細書において使用される語「アミノ酸」（Xaa）とは、少なくとも1つのNR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>基、好ましくはNH<sub>2</sub>基及び少なくとも1つのカルボキシル基を含む任意の化合物をいう。本発明のアミノ酸は、天然のアミノ酸又は非天然のアミノ酸、天然由来又は合成であることができる。天然のアミノ酸は、グリシンを除き、キラルな炭素原子を含有する。別段指示されない限り、L配置の天然アミノ酸を含有する化合物が好ましい。アミノ酸は、たとえばアラニン（Ala）、アミノ酪酸（GABA）、5-アミノ吉草酸、グリシン（Gly又はG）、フェニルグリシン、アルギニン（Arg又はR）、ホモアルギニ

50

ン (H a r 又はh R ) 、アラニン (A l a 又はA ) 、バリン (V a l 又はV ) 、ノルバリン 、ロイシン (L e u 又はL ) 、ノルロイシン (N l e ) 、イソロイシン (I l e 又はI ) 、セリン (S e r 又はS ) 、イソセリン 、ホモセリン (H s e ) 、トレオニン (T h r 又はT ) 、アロトレオニン 、メチオニン (M e t 又はM ) 、エチオニン 、グルタミン酸 (G l u 又はE ) 、アスパラギン酸 (A s p 又はD ) 、アスパラギン (A s n 又はN ) 、システイン (C y s 又はC ) 、シスチン 、フェニルアラニン 、チロシン (T y r 又はY ) 、トリプトファン (T r p 又はW ) 、リジン (L y s 又はK ) 、ヒドロキシリジン (H y l ) 、ヒスチジン (H i s 又はH ) 、オルニチン (O r n ) 、グルタミン (G l n 又はQ ) 、シトルリン 、プロリン (P r o 又はP ) 及び4 - ヒドロキシプロリン (H y p 又はO ) から選択することができる。

10

## 【0010】

本明細書において使用される語「ペプチド」はペプチド及びペプチド類似物を含む。ペプチド類似物は天然のアミノ酸及び非天然のアミノ酸を含む。ペプチド類似物はまた、グリコシル化のような修飾を含むこともできる。すべてのアミノ酸はL又はD異性体であることができる。ペプチド又はペプチド類似物はまた、天然由来のアミノ酸と同様に機能するアミノ酸模倣体を含むこともできる。ペプチドはまた、修飾されたR基又は修飾されたペプチド主鎖を有するアミノ酸類似物から形成されることもできる。ペプチド類似物は通常、アミド結合とは異なる少なくとも1つの結合、たとえばウレタン、尿素、エステル又はチオエステル結合をペプチド配列中に含む。本発明のペプチド又はペプチド類似物は、直鎖状、環式又は分岐鎖状であることができ、好ましくは直鎖状である。

20

## 【0011】

「機能性ペプチド部分」とは、生物活性配列を含むペプチド部分、したがって、生物学的活性を示すペプチド部分をいう。

## 【0012】

本発明において、アミノ酸配列H a r - G l y - A s p (h R G D ) は、そのものが、細胞接着、細胞増殖及び/又は細胞分化を促進する、機能性ペプチド部分の生物活性配列に相当することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0013】

【図1】1、3及び7日後の、オクタペプチド、h R G D 及びR G D 修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲルの光学顕微鏡写真である。

30

【図2】1、3及び11日後の、オクタペプチド、h R G D 及びR G D 修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲルの蛍光光学顕微鏡写真である。

【図3】1日後の、オクタペプチド、h R G D 及びR G D 修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲルの光学顕微鏡写真である。

【図4】1及び3日後の、オクタペプチド、h R G D 及びR G D 修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲルの蛍光光学顕微鏡写真である。

【図5】オクタペプチド、R G D 及びh R G D 修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲル中、0、1、2、3、5、7、10及び14日後の細胞数である。

40

## 【発明を実施するための形態】

## 【0014】

特定の実施形態において、アミノ酸配列H a r - G l y - A s p (h R G D ) はまた、細胞接着、細胞増殖及び/又は細胞分化を促進する、機能性ペプチド部分のより長い生物活性配列の一部であることもできる。

## 【0015】

この特定の実施形態の第1の態様において、h R G D 配列は、そのN末端 (N H<sub>2</sub>) に共有結合したさらなるアミノ酸を含んでもよい。生物活性配列は、たとえば、(X a a)<sub>n</sub> - h R G D 配列 (式中、X a aは、任意の天然又は非天然のアミノ酸であり、nは1~10である) から選択されてもよい。n個のX a aアミノ酸は同じであってもよいし異なってもよい。そのような配列の好適な例は、G h R G D 、Y h R G D 、Y G h R G D 、G

50

GGGhRGD、Ala-hRGD、GABA-hRGD及び6-アミノバレリックアミド(aminovalericamide)-hRGDである。

【0016】

この特定の実施形態の第2の態様において、hRGD配列は、そのC末端(COOH)に共有結合したさらなるアミノ酸を含んでもよい。生物活性配列は、たとえば、hRGD-(Xaa)<sub>m</sub>配列(式中、Xaaは、任意の天然又は非天然のアミノ酸であり、mは1~10である)から選択されてもよい。m個のXaaアミノ酸は同じであってもよいし異なってもよい。そのような配列の好適な例は、hRGDS、hRGDY、hRGDF、hRGDK、hRGDV、hRGDT、hRGDWP、hRGDYK、hRGDFK、hRGDSP、hRGDSPK、hRGDSY、hRGDNP、hRGDTP及びhRGDP、特にhRGDWPである。

10

【0017】

この特定の実施形態の第3の態様においては、上記第1及び第2の態様を組み合わせてもよく、hRGD配列は、そのN及びC末端両方に共有結合したさらなるアミノ酸を含み、すなわち(Xaa)<sub>n</sub>-hRGD-(Xaa)<sub>m</sub>(式中、Xaaは、任意の天然又は非天然のアミノ酸であり、nは1~10であり、mは1~10である)である。そのような配列は、たとえば、GhRGDS、GhRGDY、GhRGDF、YhRGD、GhRGDSY、GhRGDSP、GhRGDSPK、YhRGDS、GhRGDTP、GhRGDSPK、GhRGDSP、GhRGDK、GGGGhRGDS、GhRGDNP及びそれらの組み合わせ、特にGhRGDS、GhRGDSYからなる群から選択されてもよい。

20

【0018】

したがって、本発明はまた、細胞接着、細胞増殖及び/又は細胞分化を促進するための、機能性ペプチド中の、GhRGD、YhRGD、YhRGD、GGGGhRGD、Ala-hRGD及びGABA-hRGD、6-アミノバレリックアミド-hRGD、hRGDS、hRGDY、hRGDF、hRGDK、hRGDV、hRGDT、hRGDW、hRGDFK、hRGDYK、hRGDSP、hRGDSPK、hRGDSY、hRGDNP、hRGDTP及びhRGDSP、GhRGDS、GhRGDY、GhRGDF、GhRGDSY、GhRGDSP、GhRGDSPK、YhRGDS、GhRGDTP、GhRGDSPK、GhRGDSP、GhRGDK、GGGGhRGDS、GhRGDNP及びそれらの組み合わせからなる群から選択される生物活性配列、特にhRGDS、GhRGDS、GhRGDSY、Ala-hRGD、GABA-hRGD、6-アミノバレリックアミド-hRGD及びhRGDWP、より具体的にはAla-hRGD、GABA-hRGD、6-アミノバレリックアミド-hRGD及びhRGDWP、もっとも好ましくはhRGDWPの使用に関する。

30

【0019】

さらなる特定の実施形態において、場合によってはさらなるアミノ酸をそのN及び/又はC末端に含むhRGD配列はまた、そのN末端においてメルカプトプロピオン酸(Mpr)に結合していることもできる。そのようは配列は、Mpr-(Xaa)<sub>n</sub>-hRGD-(Xaa)<sub>m</sub>(式中、Xaaは、互いに独立して選択される任意の天然又は非天然のアミノ酸であり、nは0~10であり、mは0~10である)と読むことができる。なおさらなる実施形態において、2つのメルカプトプロピオン酸部分が、特にジ硫黄結合を介して共有結合していくてもよい。そのようは配列は一般に、(Xaa)<sub>m</sub>-DGH-R-(Xaa)<sub>n</sub>-Mpr-Mpr-(Xaa)<sub>n'</sub>-hRGD-(Xaa)<sub>m'</sub>(式中、(Xaa)は、互いに独立して選択される任意の天然又は非天然のアミノ酸であり、n及びn'は、独立して、0~10の範囲であり、m及びm'は、独立して、0~10の範囲である)と読める。

40

【0020】

本発明において、機能性ペプチド部分は、hRGD配列を含む生物活性配列に一致することができる。機能性ペプチド部分はまた、hRGD配列を含む生物活性配列に加えて、

50

さらなるアミノ酸を含むこともできる。

【0021】

特に好ましい実施形態にしたがって、機能性ペプチド部分は、少なくとも1つ以上のh R G D配列、たとえば2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は10のh R G D配列、好ましくは少なくとも1つ以上のh R G D W P配列、たとえば2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は10のh R G D W P配列を含む。この特に好ましい実施形態において、機能性ペプチド部分は、先に定義した生物活性配列の前、後又は間にさらなるアミノ酸を含んでもよい。

【0022】

h R G D W P配列及びそれらの派生物は、細胞外マトリックス中で細胞接着タンパク質を模倣する利点を提供し、その後、細胞表面上のインテグリンタンパク質に結合することができる。

【0023】

本発明の第1の態様において、生物活性アミノ酸配列H a r - G 1 y - A s p (h R G D)を含む機能性ペプチド部分は自己集合性ペプチド部分に共有結合している。

【0024】

「自己集合性ペプチド」とは、自己集合することができるペプチド、すなわち、多くのランダムな立体配座を有する非自己集合性ペプチドドメインとは対照的に、特異的に画定された立体配座へとフォールディングするドメインを画定するペプチドをいう。自己集合性アミノ酸配列は当技術分野において公知であり、本発明にしたがって、シート、コイルドコイルらせん構造、ペプチド三重らせん構造又はそれらの組み合わせへと集合することができるペプチド配列が好ましい。

【0025】

コイルドコイル構造へと自己集合することができるペプチド部分は、たとえば、らせんコイルドコイル構造を提供するペプチドアミノ酸配列である。これは、ペプチド一次配列の両親媒性パターンに依存する三次構造である。この実施形態のペプチド部分は、多様な疎水性及び極性残基を含み、通常、少なくとも10のアミノ酸で構成されている。たとえば、らせんペプチド部分は、すべての極性残基をらせんの一面に有し、すべての疎水性残基をらせんの他方の側に有するように設計されている。このらせんが、2つ以上のらせん鎖の一部を形成し、コイルドコイル構造を形成することができる。らせんどうしは疎水性相互作用を介して会合し、コイルドコイルを形成する。ペプチド部分の配列は、たとえば、ロイシンジッパー配列であることができる。

【0026】

シートへと自己集合することができるペプチド部分は、ペプチド鎖に対して垂直な分子間水素結合によって安定化されたシートを提供する。自己集合は、鎖の間の水素結合相互作用を通して起こる。鎖は、ほぼ完全に伸長した立体配座にある主鎖を有する一定の長さのポリペプチド鎖である。シート構造は、平行又は逆平行鎖から形成することができる。この実施形態のシートの例は、アミロイド様構造へと自己集合することができるペプチド部分である。シートへと自己集合することができるペプチド部分は一般に、少なくとも5つ又は6つのアミノ酸を含む。

【0027】

本発明のこの第1の態様の好ましい実施形態にしたがって、自己集合することができるペプチド部分は、ペプチドが好適な条件において提供されるとき、ハイドロゲルを形成することができる。ハイドロゲルとは、多量の水及び生物学的流体を吸収する能力を有する親水性化合物、通常はポリマーの三次元ネットワークである。ネットワークは、化学的架橋（共有結合的、イオン的）によって形成されることもできるし、物理的架橋（絡み合い、結晶子、水素結合）によって形成されることもできる。一般に、ハイドロゲルは、ゲルの質量に対して少なくとも20質量%の水を含むことができる三次元構造である。ハイドロゲルによる水の吸収は、結果として、その寸法の有意な増大、すなわち有意な膨張を生じさせる。

10

20

30

40

50

## 【0028】

本発明のこの第1の態様のもう1つの好ましい実施形態にしたがって、シートへと自己集合することができるペプチド部分は、疎水性アミノ酸と荷電アミノ酸とを交互に含むオクタペプチド部分である。疎水性アミノ酸は、多くの場合、フェニルアラニン (Phe又はF)、トリプトファン (Trp又はW)、チロシン (Tyr又はY)、イソロイシン (Ile又はI)、アラニン (Ala又はA)、ロイシン (Leu又はL)、バリン (Val又はV) 及びノルロイシン (Nle) からなる群、特にフェニルアラニン (Phe又はF)、トリプトファン (Trp又はW)、チロシン (Tyr又はY)、イソロイシン (Ile又はI) 及びノルロイシン (Nle) からなる群から選択される。荷電アミノ酸は、通常、アルギニン (Arg又はR)、アスパラギン酸 (Asp又はD)、グルタミン酸 (Glu又はE)、リジン (Lys又はK) 及びヒスチジン (His又はH) からなる群、特にアルギニン (Arg又はR)、アスパラギン酸 (Asp又はD)、グルタミン酸 (Glu又はE) 及びリジン (Lys又はK) からなる群から選択される。

10

## 【0029】

オクタペプチド部分は、たとえば、F E F K F E F K、F E F E F K F K、F D F K F D K、F D F D F K F K、F E F R F E F R、F E F E F R F R、Y D Y K Y D Y K、Y D Y D Y K Y K、Y E Y R Y E Y R、Y E Y K Y E Y K、Y E Y E Y K Y K、W E W K W E W K、W E W E W K W K、W D W K W D W K、W D W D W K W K からなる群から選択されてもよい。もっとも好ましくは、アミノ酸配列はF E F K F E F K又はF E F E F K F Kである。

20

## 【0030】

本発明の第2の態様において、生物活性アミノ酸配列H a r - G 1 y - A s p (hRGD)を含む機能性ペプチド部分は、ポリマー、特に生体適合性ポリマー、より具体的には熱応答性ポリマーに共有結合している。

## 【0031】

「生体適合性ポリマー」とは、生体と適合性であるポリマーをいう。好適な例は、ポリエステル類、たとえばポリ乳酸 (PLA)、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリ(乳酸-*c*o-グリコール酸) (PLGA)、ポリヒドロキシアルカノエート類、たとえばポリ(ヒドロキシブチレート-*c*o-バレート) (PHBV)、ポリカプロラクトン類、ポリアクリルアミド類、たとえばポリヒドロキシアクリルアミド (pHPMA)、ポリ無水物、ポリイミド、ポリ無水物-*c*o-イミド及び多糖類、たとえばキトサンである。

30

## 【0032】

「熱応答性ポリマー」とは、温度の上昇又は低下のような外部熱的刺激に暴露されると、立体配座変化のような物理的变化を受けるポリマーをいう。熱的刺激に応答して物理的变化を受ける熱応答性ポリマーの能力が、当技術分野において、これらのポリマーをスマート材料のカテゴリーに分類する。

## 【0033】

水溶液中の大部分のポリマーの行動とは反対に、熱応答性ポリマーは、高温でより水不溶性、すなわちより疎水性になる。可溶性から不溶性への上記相転移を提供する温度は、当技術分野において、一般に中性pHの脱イオン水中で測定される下限臨界共溶温度 (LCST) と指定されている。特に好適な熱応答性ポリマーは、LCSTが約32であると測定されているポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)又はPNIPAAmである。他の特に好適な熱応答性ポリマーはPNIPAAmコポリマーである。PNIPAAmコポリマーは、NIPAAm及び親水性又は疎水性モノマーから選択される少なくとも1つの他のモノマーを含むコポリマーである。好適な親水性モノマーは、たとえば、N-メタクリロイル-トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミド、ヒドロキシエチルアクリルアミド、ヒドロキシプロピルメタクリルアミド (HPMA)、N-アクリルアミド-1-デオキシソルビトール、ヒドロキシルエチルメタクリレート、ヒドロキシプロピルアクリレート、ヒドロキシフェニルメタクリレート、2-ヒドロキシプロピルアクリレート、4-ヒドロキシブチルメタクリレート、2-メタクリルオキシエチルグルコシド、ポリ(エチ

40

50

レングリコール)モノメチルエーテルモノメタクリレート、ビニル-4-ヒドロキシブチルエーテル及びそれらの誘導体(ポリ(エチレングリコール)含有モノマーが特に好適である)ならびにヒドロキシプロピルメタクリルアミド(H P M A)である。好適な疎水性モノマーは、アミド基のアミン窒素が1つ以上のアルキル残基で置換されているアクリルアミドモノマー、たとえば、N-イソプロピルアクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N,N-ジエチル(メタ)アクリルアミド、N-メチルメタクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-プロピルアクリルアミド、N-ブチルアクリルアミド、N-オクチル(メタ)アクリルアミド、N-ドデシルメタアクリルアミド、N-オクタデシルアクリルアミド、プロピル(メタ)アクリレート、デシル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレート、オクチルトリフェニルメチルアクリルアミド、ブチルトリフェニルメチルアクリルアミド、オクタデシルトリフェニルメチルアクリルアミド、フェニルトリフェニルメチルアクリルアミド、ベンジルトリフェニルメチルアクリルアミド及びそれらの誘導体に由来する。

#### 【0034】

熱応答性ポリマーは、ハイドロゲルの調製、より具体的にはスマートハイドロゲル、すなわち環境に敏感なハイドロゲルの調製に使用することができる。これらのスマートハイドロゲルは、圧力、pH、温度又はイオン強度のような環境刺激に応答して可逆性の体積変化を受けることができ、生物医学及び薬学分野、特に細胞及び組織培養の分野において使用されるのに特に適したものとなっている。

#### 【0035】

本発明のこの第2の特定の態様において、生物活性アミノ酸配列H a r - G l y - A s p (h R G D)を含む機能性ペプチド部分は、好ましくは、好ましくはチオエーテル、アミノ、アミド、エステル及びエーテル結合からなる群から選択される結合を介してポリマーに共有結合している。そのような結合は、直接的に、すなわち、ポリマーの原子と機能性ペプチドの原子との間の共有結合であることもできるし、間接的に、すなわち、結合基を介するものであることもできる。結合基の好適な例は、とりわけ、直鎖状又は分岐鎖状のアルカン類、特に炭素原子1~10個を含むポリメチレン基である。結合基の他の例は、たとえば、ポリエーテル基、たとえばポリエチレングリコール(PEG)である。

#### 【0036】

本発明の第3の態様において、h R G D配列を含む機能性ペプチド部分は、自己集合性ペプチド及びポリマーの両方、特に自己集合性ペプチド及び生体適合性ポリマーの両方、より具体的には自己集合性ペプチド及び熱応答性ポリマーの両方に共有結合している。

#### 【0037】

さらなる実施形態において、本発明はまた、ハイドロゲル、好ましくは細胞培養のためのハイドロゲルの調製において細胞接着、細胞増殖及び/又は細胞分化を促進するための、機能性ペプチド中の生物活性配列としてのアミノ酸配列H a r - G l y - A s p (h R G D)の使用に関する。

#### 【0038】

本発明はまた、h R G D配列を含むハイドロゲル、特に、h R G D配列がハイドロゲル足場の一部であるハイドロゲルに関する。「ハイドロゲル足場」とは、ハイドロゲル構造に通じる物質、すなわち、ハイドロゲル構造を生じさせるポリマー又は自己集合性ペプチドを含む物理的実体をいう。前記ハイドロゲルにおいて、先に定義したh R G D配列は、好ましくは、細胞接着、細胞増殖及び/又は細胞分化を促進する。

#### 【0039】

さらなる好ましい実施形態において、本発明のハイドロゲルはさらに、先に定義した自己集合性ペプチド部分及び/又はポリマーを含む。なおさらなる好ましい実施形態において、h R G D配列は、場合によっては結合及び/又はさらなるペプチド配列を介して、先に定義した自己集合性ペプチド部分又はポリマーの少なくとも1つに共有結合している。したがって、本発明は、h R G D配列ならびに自己集合性ペプチド部分及び/又はポリマー、特に自己集合性ペプチド部分及び/又は生体適合性ポリマー、より具体的には自己集

合性ペプチド部分及び／又は熱応答性ポリマーを含むハイドロゲルに関する。

【0040】

本ハイドロゲルは、細胞及び組織培養に特に適しており、たとえば、改善された細胞接着及び細胞増殖を提供する。本ハイドロゲルは、たとえば、細胞、好ましくは纖維芽細胞、軟骨細胞もしくは幹細胞を培養するために、又は再生医学のために使用することができる。

【0041】

本ハイドロゲルは、二次元又は三次元細胞培養システムにおいて使用することもできる。

【0042】

参照により本明細書に組み込まれる特許、特許出願及び刊行物の開示が用語を不明瞭にし得る程度に本出願明細書の記載と矛盾する場合、本出願明細書の記載が優先するものとする。

【0043】

以下、本発明を、その範囲を限定することなくさらに説明する。

【実施例】

【0044】

実施例1

以下、(h) RGDとは、RGD、hRGD又はそれらの混合物を使用することができる

10

【0045】

1.1 保護されたオクタペプチドの合成

オクタペプチド Phe - Glu - Phe - Lys - Phe - Glu - Phe - Lys (F E F K F E F K) は、A. Maslovskis et al., Macromo 1. Symp., 296, 248 - 253 (2010) に開示されているようにして、ChemTech ACT 90ペプチド合成装置上、溶媒としてのN-メチル-2-ピロリドン (NMP) 及び標準的な固相ペプチドプロトコルを使用して合成することができる。

【0046】

オクタペプチドはまた、液相法 (Z / Boc / OTBu 又は Fmoc / Boc / OTBu 手法) において合成することもできる。この特定の場合においては、N末端位置の保護基の脱保護中でさえ、側保護基が配列上に残り、それにより、Z - Phe - Glu (OTBu) - Phe - Lys (Boc) - Phe - Glu (OTBu) - Phe - Lys (Boc) - OH が得られる。

【0047】

1.2 保護されたオクタペプチドのエステル化

このエステル化工程は、文献: P. Jouin et al., J. Org. Chem., 54, 3, 617 - 626, 1989 にしたがって実施した。Z - Phe - Glu (OTBu) - Phe - Lys (Boc) - Phe - Glu (OTBu) - Phe - Lys (Boc) - OH 5.0 g (32 mmol) 及び炭酸セシウム 5.3 g を N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 500 ml 中に導入した。ヨードエタン (EtI) 5.5 ml を加え、溶液を 48 ℃ で 2 時間加熱した。塩のろ過及び DMF の部分的蒸発ののち、濃縮物を 2.5% KHSO<sub>4</sub> 500 ml に注加し、ろ過し、水洗し、最後に温かいエタノール 500 ml で洗浄した。真空下 (45 ℃) 乾燥させたのち、Z - Phe - Glu (OTBu) - Phe - Lys (Boc) - Phe - Glu (OTBu) - Phe - Lys (Boc) - OEt に相当する固体 4.7 g を得た。収率 = 84%。

【0048】

1.3 保護されたオクタペプチドエチルエステルの水素化分解

Z - Phe - Glu (OTBu) - Phe - Lys (Boc) - Phe - Glu (OTBu) - Phe - Lys (Boc) - OEt 2.1.6 g (13.6 mmol) を N, N-

20

30

40

50

ジメチルホルムアミド (DMA) 215 ml 中に溶解した。溶液を窒素で数回フラッシュしたのち、Pd/Si 14.5 g (2 質量%) を加えた。水素の導入によって水素化分解を開始した。2 時間の反応ののち、懸濁液を 0.45 μm フィルタに通し、Pd/Si を DMA によって洗浄した。H-Phe-Glu(OtBu)-Phe-Lys(Boc)-Phe-Glu(OtBu)-Phe-Lys(Boc)-OEt に相当する集めた溶液を、さらに精製することなく次の工程に使用した。収率は定量的であった。

## 【0049】

実施例 2：保護された Mpr-hRGDWP の合成

S-トリチル (又はトリフェニルメチル) メルカプトプロピオニルホモアルギニルグリシン (Mpr(トリチル)-Har-Gly-OH) 7.3 g (12.0 mmol) を、ピリジン 1 ml を含有する N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 75 ml 中に溶解した。ひとたび溶液を -10 ± 5 ℃ に冷却したならば、塩化ピバロイル (PivCl) 1.6 g を加えた。5 ~ 10 分の活性化ののち、N-トリメチルシリルアセトアミド (TMA) 6.1 g を含有する DMF 10 ml 中に可溶化した O-t-ブチルアスパラギルトリプロテファニルプロリン (Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH) 6.3 g (12.7 mmol) を加えた。その後、反応混合物を室温に戻した。

## 【0050】

反応の完了の HPLC 制御ののち、水 16.4 ml を加えた。部分的濃縮ののち、メタノール 35 ml によって希釈した濃縮物を 2.5% 水性 NaHCO<sub>3</sub> 155 ml に注加した。析出物を水で数回洗浄し、真空下に乾燥させた。Mpr(Trt)-Har-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH に相当するオフホワイト色の生成物 10.6 g を得た。収率 = 87%。

## 【0051】

実施例 3

## 3.1 保護された Mpr-hRGDWP とオクタペプチドとのカップリング

Mpr(Trt)-Har-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH 13.9 g (13.2 mmol)、p-トルエンスルホン酸 2.5 g 及びヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) 6.2 g を、N, N-ジメチルホルムアミド (DMA) 中 H-Phe-Glu(OtBu)-Phe-Lys(Boc)-Phe-Glu(OtBu)-Phe-Lys(Boc)-OEt (12 mmol) の溶液に加えた。ひとたび溶液が得られたならば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 2.7 g を室温で加えた。少なくとも 8 時間かく拌したのち、反応混合物を 2.5% 水性 KHSO<sub>4</sub> 300 ml に注加した。ろ過ののち、析出物をエタノール (270 ml) によって 3 回洗浄し、真空下 45 ℃ で乾燥させた。配列 Mpr(Trt)-Har-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-Phe-Glu(OtBu)-Phe-Lys(Boc)-Phe-Glu(OtBu)-Phe-Lys(Boc)-OEt に相当するオフホワイト色の固体 26.3 g を得た。収率 = 72%。

## 【0052】

## 3.2 保護された Mpr-hRGDWP - オクタペプチドの最終的脱保護

次いで、Mpr(Trt)-Har-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-Phe-Glu(OtBu)-Phe-Lys(Boc)-Phe-Glu(OtBu)-OEt 5 g (1.9 mmol) を、TFA 100 ml、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100 ml、トリイソプロピルシラン ((iPr)<sub>3</sub>SiH) 9 ml、水 2.2 ml 及び EtOH 2.2 ml を含有する溶液に導入した。約 1 時間の反応ののち、反応混合物を冷たいイソプロピルエーテル (IPE) 200 ml に注加した。ろ過し、IPE によって数回洗浄したのち、ペプチドを真空下 (45 ℃) 乾燥させた。Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Glu-Phe-Lys-OEt に相当するオフホワイト色のペプチド 3 g を得た。収率 = 88%。

## 【0053】

この配列の純度を高めるために、分取 HPLC、次いで凍結乾燥を使用することもでき

10

20

30

30

40

50

る。

【0054】

実施例4：保護されたMpr-RGDPの合成

4.1 Z-Arg-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OHの合成

Z-Arg-Gly-OH 3.4 g (10.0 mmol)を、ピリジン0.86 mlを含有するジクロロメタン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) / N,N-ジメチルアセトアミド(DMA) (1/1)混合物80 ml中に溶解した。ひとたび溶液を-10±5に冷却したならば、塩化ビバロイル(PivCl) 1.3 gを加えた。5~10分の活性化ののち、N-トリメチルシリルアセトアミド(TMA) 5.29 gを含有する $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0.3 ml中に可溶化したAsp(OtBu)-Trp-Pro 5.21 g (10.6 mmol)を加えた。その後、反応混合物を室温に戻した。

【0055】

反応の完了のHPLC制御ののち、水10 mlを加えた。部分的濃縮ののち、メタノール30 mlで希釈した濃縮物を2.5%水性 $\text{NaHCO}_3$  140 mlに注加した。析出物を水で数回洗浄した。

【0056】

Z-Arg-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OHに相当する得られた湿潤な生成物9.1 gをアセトニトリル/水/メタノール(容量比79/20/1)の沸騰混合物約200 mlに加えた。固体を可溶化したのち、溶液を徐々に冷ました。この冷まし工程中、2.5%水性 $\text{NaHCO}_3$  340 mlを注加した。白色固体の出現ののち、懸濁液をさらに0で少なくとも10時間かく拌した。ろ過及びアセトニトリル/水(1/2) 100 mlによる数回の洗浄ののち、ペプチドを真空下(45)乾燥させた。Z-Arg-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OHに相当するオフホワイト色のペプチド(含水率5%) 6 gが得られた。収率=70%。

【0057】

4.2 H-Arg-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OHの合成

Z-Arg-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH 20.0 g (22.2 mmol)を、37%水性HCl 1.85 mlを含有するメタノール/水(95/5)混合物240 ml中に溶解した。溶液を窒素で数回フラッシュしたのち、Pd/Si 23.6 g (2質量%)を加えた。水素の導入によって水素化分解を開始した。2時間の反応ののち、懸濁液を0.45 μmフィルタに通し、Pd/Siをメタノール/水(95/5)混合物によって洗浄した。集めたろ液を真空下に濃縮し、さらに共沸濃縮によって水をアセトニトリルによって置換した。析出物をろ過し、洗浄し、真空下に乾燥させた。H-Arg-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH.HClに相当するオフホワイト色の粉末(含水率1.8%) 13.1 gを得た。収率=85%。

【0058】

4.3 Mpr(Trt)-Arg-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OHの合成

H-Arg-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH.HCl 8.08 g (11 mmol)を、45で、8.0~8.5の範囲のpH( $\text{KHCO}_3$ バッファ)の水/ジオキサン(1/2)混合物150 mlに加えた。5等分したMpr(Trt)OSu 5 g (10.4 mmol)を規則的間隔で上記溶液に加えた。HPLCによる反応の完了の制御ののち、反応混合物を水400 mlに注加し、ジオキサン画分を真空下に蒸発させた。懸濁液のろ過ののち、実施例4.1に記載されたプロトコルにしたがって湿潤な固体を処理して、Mpr(Trt)-Arg-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH(保護されたMpr-RGDP)を得た。収率=74%。

【0059】

実施例5

5.1 保護されたMpr-RGDPとオクタペプチドとのカップリング

次いで、実施例3.2において使用されたプロトコルにしたがって、Mpr(Trt)

10

20

30

40

50

- Arg - Gly - Asp (OtBu) - Trp - Pro - OH を H - Phe - Glu (OtBu) - Phe - Lys (Boc) - Phe - Glu (OtBu) - Phe - Lys (Boc) - OEt にカップリングした。収率 = 74%。

【0060】

5.2 保護された Mpr - RGDP - オクタペプチドの最終的脱保護

次いで、保護された Mpr - hRGDP - オクタペプチドの脱保護のために実施例 3.2 において使用されたプロトコルにしたがって、保護された Mpr - RGDP - オクタペプチドを脱保護した。収率 = 87%。

【0061】

この配列の純度を高めるために、分取 HPLC、次いで凍結乾燥を使用することもできる。

【0062】

実施例 6：ハイドロゲル調製

6.2 プロトコル I

6.2.1 2D 細胞培養

オクタペプチド 16.3 mg 及び hRGD - オクタペプチド 7.3 mg 又は RGD - オクタペプチド (オクタペプチド / (h)RGD - オクタペプチドモル比 80 / 20) 6.6 mg を 90 の蒸留水 1 ml 中に 3 時間かけて溶解した。冷ましたのち、試料を細胞培養ウェルプレートに移し、37 で 12 時間インキュベートした。その後、試料を、細胞培地 (DMEM Gibco、Invitogen) により、その培地をゲル上で 8 回交換しながら 10 分間洗浄した。試料を 37 のインキュベータに戻して一晩置き、翌日、洗浄を繰り返した。試料を再びインキュベータに入れて一晩置き、翌日、ゲルの表面に細胞を接種した。

【0063】

6.2.2 3D 細胞培養

オクタペプチド 16.3 mg 及び hRGD - オクタペプチド 7.3 mg 又は RGD - オクタペプチド (オクタペプチド / (h)RGD - オクタペプチドモル比 80 / 20) 6.6 mg を、蒸留水と 1 × ダルベッコリン酸緩衝食塩水との 90 の混合物 (比 70 / 30) 1 ml 中に 3 時間かけて溶解した。冷ましたのち、試料 500 μl を、0.5 M NaOH 溶液 40 μl とともに各細胞培養ウェルプレートに入れ、かく拌した。その後、培地中に懸濁させた細胞 100 μl をウェルに加え、かく拌した。その後、細胞培地 100 μl をウェル中のゲルの上に加え、ウェルプレートをインキュベータに入れた。

【0064】

6.1 プロトコル II

2 N NaOH 125 μl をダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM) 5.1 ml に加えた。溶液を激しく振とうし、オクタペプチド / (h)RGDP - オクタペプチド混合物 (質量比 80 / 20) を含有するジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液 (濃度ペプチド 200 mg / DMSO 1 ml) 715 μl に素速く加えた。すぐに形成したゲルを 3 分間振とうした。得られたゲルを、5 μm 膜上、ダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM) 15 ml によって 4 回洗浄した。洗浄したゲルを、2D 細胞培養に直接使用するか、又は、その後、バイアルに移し入れ、DMEM (ゲル量の 5 ~ 10%) によってわずかに希釈し、数分間振とうするかした。その後、懸濁したゲルを培養フラスコに移し入れ、3D 細胞培養のための細胞を接種した。

【0065】

実施例 7：細胞培養

以下の実験においては、3つのハイドロゲル、すなわち、自己集合性オクタペプチド FEFKEFFK に基づくハイドロゲル、RGD 修飾オクタペプチド (Mpr - RGDP - FEFKEFFK) に基づくハイドロゲル及び hRGD 修飾オクタペプチド (Mpr - hRGDP - FEFKEFFK) に基づくハイドロゲルを比較した。

【0066】

10

20

30

40

50

光学顕微鏡を使用して細胞形態及び細胞付着を観察した。

【0067】

7.1.2D実験

7.1.1 細胞形態

ゲル表面上のヒト皮膚纖維芽細胞（HDF）の細胞付着性を試験した。図1は、1、3及び7日後に撮られた、オクタペプチド、hRGD及びRGD修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲルの光学顕微鏡写真を示す。

【0068】

これらの写真から、FEFKFEFKハイドロゲル表面に接種された細胞が培養1、3及び7日後に丸みのある形態を示したということが見てとれる。7日間の培養期間中、hRGD修飾ハイドロゲル表面には広範囲な細胞伸長が観察されたが、RGD修飾ハイドロゲル表面に接着した細胞は、1日目と3日目との間で相対的に伸長が小さい細胞形態を示した。これらの光学顕微鏡写真から、hRGDW P-FEFKFEFKハイドロゲル上の細胞伸長がRGDW P-FEFKFEFKハイドロゲル上の細胞伸長に比べて優れているということが見てとれる。

10

【0069】

7.1.2 細胞生存度

ハイドロゲル表面上のHDFの細胞生存度を、光学顕微鏡により、生死染色を使用して目視的に分析した。酵素的反応を介して達成される細胞内エステラーゼ活性により、カルセインAM（非蛍光性）をカルセイン（強蛍光性）に転換した。この強蛍光カルセインを生細胞内に保持して、緑色の蛍光を生成させた。死細胞の損傷した膜は、EthD-1溶液が核酸に結合して、それにより、死細胞中で赤色の蛍光を生成することを許した。図2は、1、3及び11日後に撮られた、オクタペプチド、hRGD及びRGD修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲルの蛍光顕微鏡写真を示す。生細胞に対応する緑色の蛍光は写真中では淡いグレーに見える。赤色の蛍光は観察されなかった。

20

【0070】

蛍光顕微鏡写真は、FEFKFEFKハイドロゲル上の細胞の大部分が、培養7日目までに丸みのある形態を示すようになることを示す。非常に少数の死細胞しか記録されなかった。対照的に、画像は、培養1日目及び3日目のうち、hRGD修飾ハイドロゲル上に接種されたHDFが、RGD修飾ゲル上に接種されたものに比べて大きく伸長した形態を示すことを明らかにした。これらの結果は、実施例7.1.1において提示された光学顕微鏡画像と十分に相關したものである。1日置きの培地交換が、細胞増殖を促進するのに十分な栄養素を提供した。その結果、非常に少数の死細胞しか検出されなかった。

30

【0071】

7.2.3D実験

2D実験と同様に、ヒト皮膚纖維芽細胞（HDF）の行動を分析した。

【0072】

7.2.1 細胞形態

実施例7.1.1と同様に、ゲル表面上のヒト皮膚纖維芽細胞（HDF）の細胞形態を試験した。図3は、1日後に撮られた、オクタペプチド、hRGD及びRGD修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲルの光学顕微鏡写真を示す。

40

【0073】

FEFKFEFKハイドロゲル中に封入された細胞が培養1日後に丸みのある形態を示したということが明らかである。hRGD修飾ハイドロゲル内には広範囲な細胞伸長が観察されたが、RGD修飾ハイドロゲル中に埋め込まれた細胞は、1日目で、相対的に伸長が小さい細胞形態を示した。非修飾ハイドロゲルと修飾ハイドロゲルとの間で細胞形態の有意な差が認められた。これらの光学顕微鏡写真から、hRGDW P-FEFKFEFKハイドロゲル内の細胞伸長がRGDW P-FEFKFEFKハイドロゲル内の細胞伸長よりも優れているということが見てとれる。

50

【0074】

### 7.2.2 細胞生存度

実施例 7.1.2 と同様に、生死染色を使用して、ゲル内に封入された H D F の細胞生存度を目視的に分析した。図 4 は、1 及び 3 日後に撮られた、オクタペプチド、h R G D 及び R G D 修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲルの蛍光光学顕微鏡写真を示す。生細胞に対応する緑色の蛍光は写真中では淡いグレーに見える。死細胞に対応する赤色の蛍光が、オクタペプチドに対応する写真中に見られる（丸で囲んだ点）。

#### 【0075】

これらの蛍光顕微鏡写真は、F E F K F E F K ハイドロゲル内に封入された細胞の大部分が、培養 3 日目までに丸みのある形態を示すようになることを示す。1 日目、死細胞が観察された。3 日目、細胞生存度は改善し、したがって、死細胞は少数しか検出されなかった。対照的に、1 日目と 3 日目との間に、h R G D 修飾ハイドロゲル内に埋められた H D F は、R G D 修飾ハイドロゲル内に埋められた H D F に比べて非常に伸長した形態を示すということが見てとれる。

#### 【0076】

### 7.2.3 細胞増殖

血球計を使用する細胞計数法を実施して、3 D 培養システム中の H D F の細胞増殖を定量化した。図 5 は、オクタペプチド、R G D 及び h R G D 修飾オクタペプチドに基づくハイドロゲル中、それぞれ 0、1、2、3、5、7、10 及び 14 日後の細胞数を示す。

#### 【0077】

最高の細胞数及び生細胞の割合は h R G D 修飾ハイドロゲル中で観察された。最低の細胞数は非修飾 F E F K F E F K システム中で観察された。R G D 修飾ハイドロゲル中の細胞数は時間とともに着実に増加したが、生存の割合及び細胞増殖の程度は変動した。h R G D ハイドロゲルと R G D 修飾ハイドロゲルとの間の大きな差は、一部には、ゲル間の剛性の差に対する細胞応答によるものと考えられる。集められたレオロジーデータは、3 つのハイドロゲルの強度及び シート含量の明確な差を示す（表 1 を参照）。

#### 【0078】

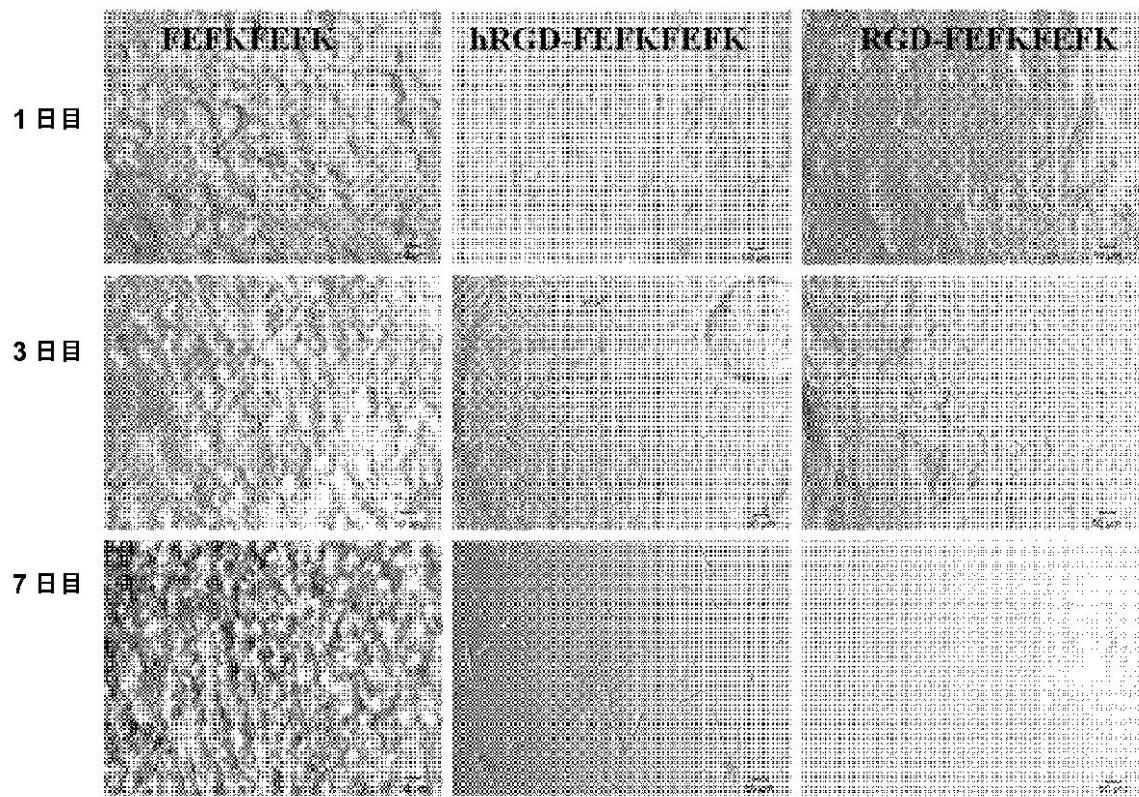
#### 【表 1】

表 1

	レオロジー
FEFKFEFK ハイドロゲル	約 1000 Pa
RGD 修飾ハイドロゲル	約 2000~3000 Pa
hRGD 修飾ハイドロゲル	約 10000 Pa

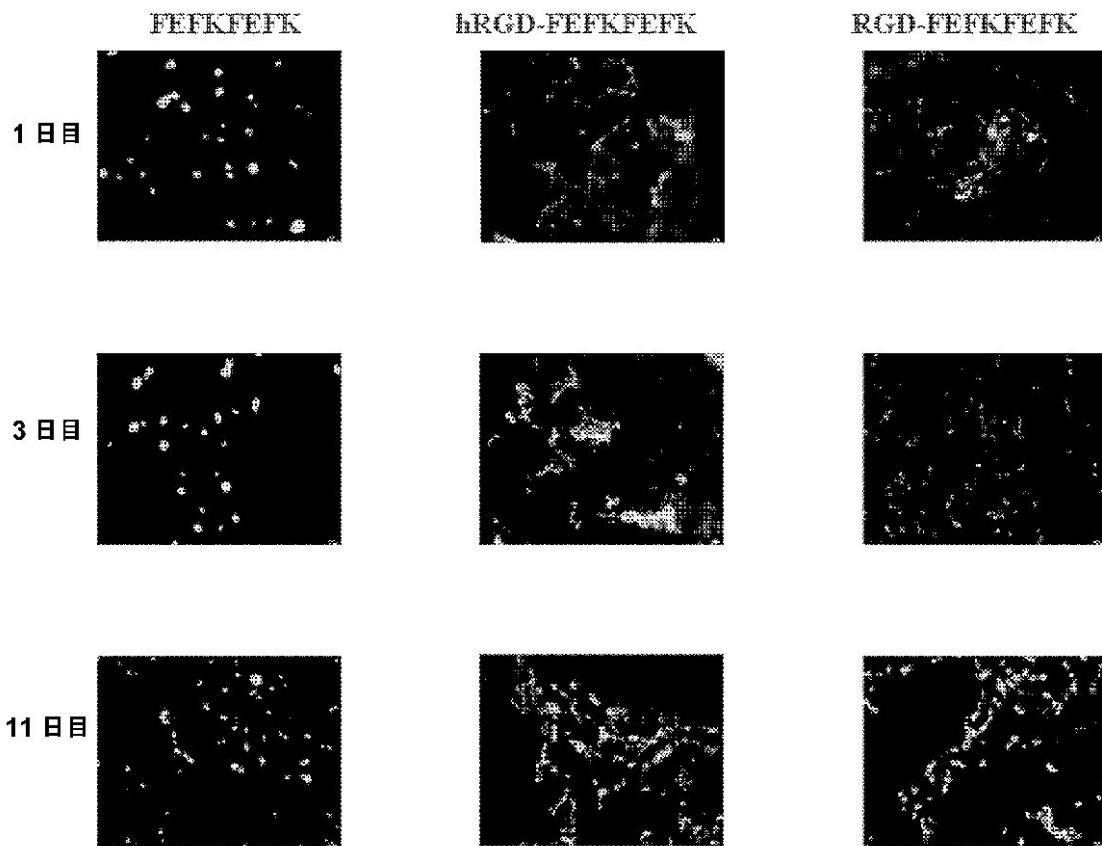
【図1】

図1



【図2】

図2



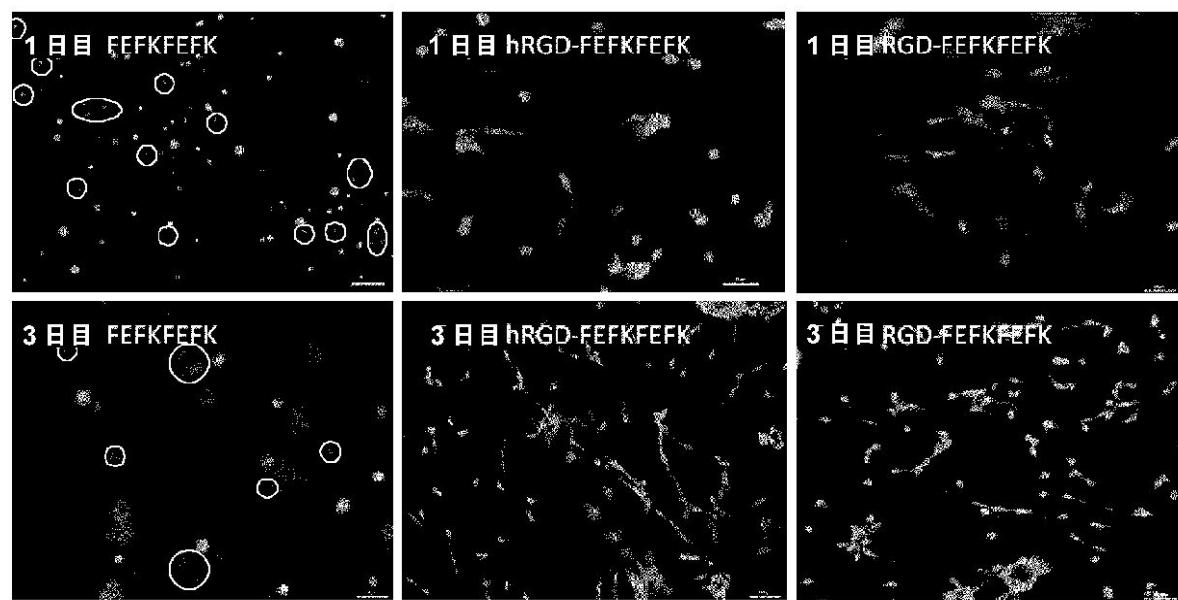
【図3】

図3



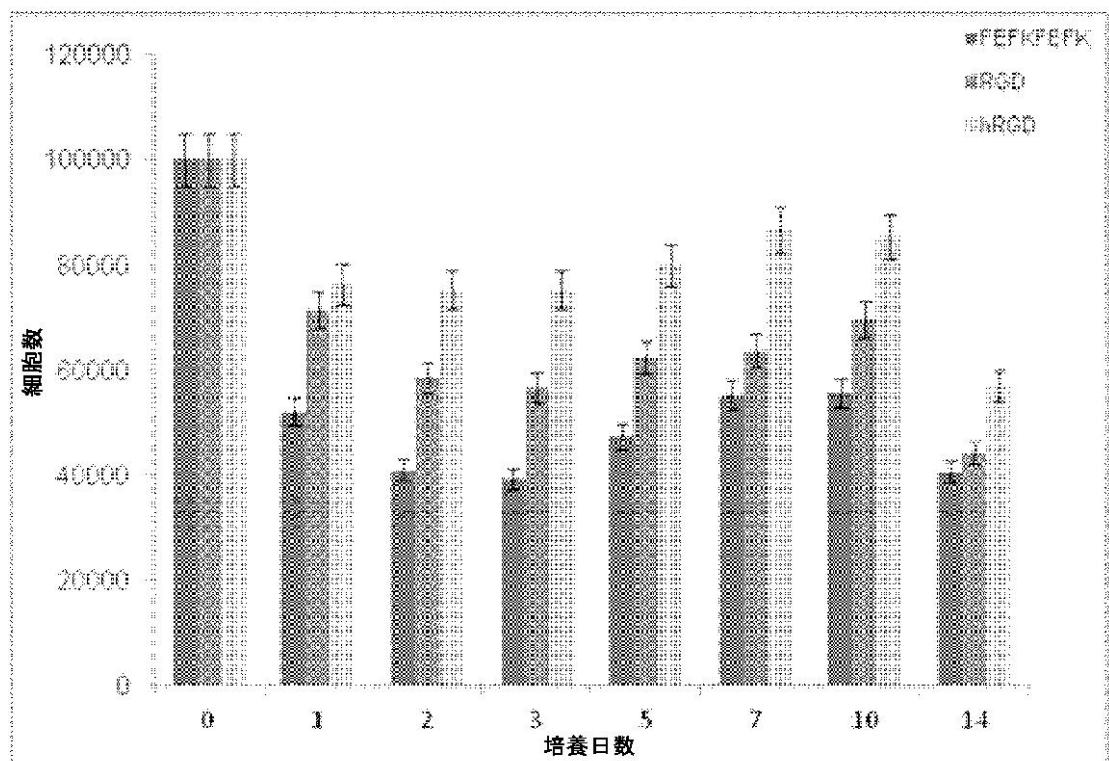
【図4】

図4



【図5】

図5



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/067481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C07K5/10 C07K7/06  
ADD.

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)  
C07K

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, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 677 276 A (DICKERSON KENNETH T [US] ET AL) 14 October 1997 (1997-10-14) abstract column 3, lines 1-55 column 6, lines 12-23 examples 1,5 ----- HIRANO YOSHIAKI ET AL: "Synthesis of Arg-Gly-Asp-Ser mimetic oligopeptides and evaluation of their cell-attachment activity", PEPTIDE SCIENCE, PROTEIN RESEARCH FOUNDATION, MINOO, JP, vol. 37, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 333-336, XP009155200, ISSN: 1344-7661 the whole document in particular table 1 and page 336 ----- -/-	1,2,5,6, 8-13
X		1,2

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier 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.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

10 January 2012

06/02/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thumb, Werner

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/067481

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002/160471 A1 (KISIDAY JOHN [US] ET AL) 31 October 2002 (2002-10-31) paragraphs [0003], [0004], [0006], [0015], [0018] tables 1,2 ----- LIXIN MI ET AL: "Self-Assembling Protein Hydrogels with Modular Integrin Binding Domains", BIOMACROMOLECULES, vol. 7, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 38-47, XP55016066, ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm050157p abstract ----- KEUN-HONG PARK ET AL: "Enhancement of the adhesion of fibroblasts by peptide containing an Arg-Gly-Asp sequence with poly(ethylene glycol) into a thermo-reversible hydrogel as a synthetic extracellular matrix", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 27, no. 4, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 227-231, XP019231094, ISSN: 1573-6776, DOI: 10.1007/S10529-004-8297-Z abstract ----- US 2008/032934 A1 (ELLIS-BEHNKE RUTLEDGE [US] ET AL) 7 February 2008 (2008-02-07) abstract -----	1-6,8-13 1-6,8-13 1-6,8-13 1-6,8-13
A		
1		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/067481

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5677276 A	14-10-1997	US 5677276 A	14-10-1997	WO 9620002 A1 04-07-1996
US 2002160471 A1	31-10-2002	CA 2344954 A1	06-08-2002	US 2002160471 A1 31-10-2002
US 2008032934 A1	07-02-2008	CA 2722465 A1	06-11-2008	EP 2150268 A1 10-02-2010
		JP 2010526779 A	05-08-2010	US 2008032934 A1 07-02-2008
		WO 2008134544 A1	06-11-2008	

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100136249

弁理士 星野 貴光

(72)発明者 ジャニン ローラン

ベルギー ベー1090 ジェッテ アヴェニュー ド ラルブル バロン 126 ベーペー  
13

(72)発明者 カレンズ ロラン

ベルギー ベー8700 ティールト ベデファールトストラート 56

(72)発明者 ムサ ワファ

フランス エフ-06300 ニース ブールヴァール ド リキエ 44

Fターム(参考) 4B065 AA90X BD25 BD39 CA17 CA24 CA44

4H045 AA10 AA20 AA30 BA12 BA13 BA14 BA15 EA34 FA33