

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-62102

(P2014-62102A)

(43) 公開日 平成26年4月10日(2014.4.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/00 (2006.01)</b>	C07K 7/00	4C076
<b>A61K 38/00 (2006.01)</b>	A61K 37/02	4C084
<b>A61P 9/00 (2006.01)</b>	A61P 9/00	4C087
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61P 35/00	4H045
<b>A61P 19/08 (2006.01)</b>	A61P 19/08	

審査請求 有 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 124 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-229859 (P2013-229859)  
 (22) 出願日 平成25年11月5日 (2013.11.5)  
 (62) 分割の表示 特願2009-530404 (P2009-530404) の分割  
 原出願日 平成19年9月26日 (2007.9.26)  
 (31) 優先権主張番号 60/847,303  
 (32) 優先日 平成18年9月26日 (2006.9.26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596060697  
 マサチューセッツ インスティテュート  
 オブ テクノロジー  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021  
 39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア  
 ヴェニュー・77  
 (74) 代理人 100108855  
 弁理士 蔵田 昌俊  
 (74) 代理人 100109830  
 弁理士 福原 淑弘  
 (72) 発明者 堀井 章弘  
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 O  
 2446、ブルックリン、マリオン・スト  
 リート 25、ナンバー 47

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾自己組織化ペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】天然原料から誘導された産物に伴っている不都合な点を有さない生来の細胞環境の重要な特徴を模倣する細胞環境の創生を可能にする細胞培養および組織工学の目的のための合成の組成物および材料を提供する。

【解決手段】(a)疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が交互に設けられたドメインを含み、非修飾の状態、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を引き起こす第一のアミノ酸ドメイン；および(b)単体では自己組織化せず、少なくとも一つの最小の生物学的に活性のある配列を含む第2のアミノ酸ドメインを含む自己組織化ペプチドを提供する。当該自己組織化ペプチドは、ここにおいて「修飾自己組織化ペプチド」と記載される。本発明はまた、修飾自己組織化ペプチドを含む医薬組成物、キットおよびマトリクス、並びに前記組成物、キットおよびマトリクスの使用方法および製造方法を提供する。

【選択図】 図1B

図 1B

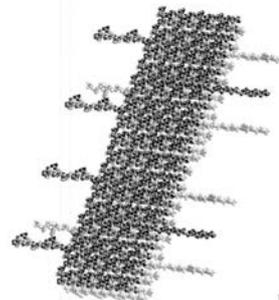


FIGURE 1B

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 交互の疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸を含み、非修飾の状態、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を引き起こす第一のアミノ酸ドメインと、

(b) 単体では自己組織化せず、少なくとも一つの最小の生物学的に活性のある配列を含む第 2 のアミノ酸ドメインとを含む自己組織化ペプチド。

## 【請求項 2】

第 2 のアミノ酸ドメインが少なくとも 2 つの最小の生物学的に活性のある配列を含む請求項 1 に記載のペプチド。

10

## 【請求項 3】

前記最小の生物学的に活性のある配列が、-PRGDSGYRGD-; -DGRGDSVAYG-; -ALKRQGRTLYGF-; -PFSSTKT-; -FLGFPT-; -KLTWQELYQLKYKGI-; -SKPPGTSS-; -STFTKSP-; -IKVAV-; -FHRRIKA-; -IKLLI-; -RGD-; -REDV-; -LKKTETQ- からなる群より選択される請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 4】

少なくとも一つの前記最小の生物学的に活性のある配列が、-RGD- を含む請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 5】

第 2 のアミノ酸ドメインが単体で生物学的に活性を有する請求項 1 に記載のペプチド。

20

## 【請求項 6】

第 2 のアミノ酸ドメインが第一のアミノ酸ドメインの C 末端と共有結合または非共有結合で接続されている請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 7】

第 2 のアミノ酸ドメインが第一のアミノ酸ドメインの C 末端と共有結合ペプチド結合またはアミノ酸リンカー基により共有結合性に接続されている請求項 6 に記載のペプチド。

## 【請求項 8】

当該アミノ酸リンカー基が少なくとも一つのグリシンを含む請求項 6 に記載のペプチド。

## 【請求項 9】

第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第 2 のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が少なくとも 2 アミノ酸長(6.9 オングストローム)である請求項 1 に記載のペプチド。

30

## 【請求項 10】

第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第 2 のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が少なくとも 2 アミノ酸長(13.8 オングストローム)である請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 11】

第一のアミノ酸ドメインが、アミノ酸配列: -RADA-; -IEIK-; または -FKFQ- の何れか 1 を少なくとも 2 回含む請求項 1 に記載のペプチド。

40

## 【請求項 12】

第一のアミノ酸ドメインが、以下のアミノ酸配列の何れか一つを含む請求項 1 に記載のペプチド; 配列番号 21 n-RADARADARADARADA-c; 配列番号 22 n-RADARGDARADARGDA-c; 配列番号 23 n-RADARADA-c; 配列番号 24 n-RARADADARADARADADA-c; 配列番号 25 n-RARADADA-c; 配列番号 26 n-AEAKAEAKAEAKAEAK-c; 配列番号 27 n-AEAKAEAK-c; 配列番号 28 n-RAEARAEARAEARAEA-c; 配列番号 29 n-RAEARAEA-c; 配列番号 30 n-KADAKADAKADAKADA-c; 配列番号 31 n-KADAKADA-c; 配列番号 32 n-AEAEAHAAHAEAEAHAAH-c; 配列番号 33 n-AEAEAHAAH-c; 配列番号 34 n-FEFEFKFKFEFEFEKFK-c; 配列番号 35 n-FEFKFEFK-c; 配列番号 36 n-LELELKLKLELELKLK-c; 配列番号 37 n-LELELKLK-c; 配列番号 38 n-AEAEAKAKAEAEAKAK-c; 配列番号 39 n-AEAEAEAEAKAK-c; 配列番号 40 n-AEAEAKAK-c; 配列番号 41 n-KAKAKAKAEAEAEAEA-c; 配列番号 42

50

n-AEAEAEAEAKAKAKAK-c; 配列番号43 n-RARARARADADADADA-c; 配列番号44 n-ADADADADARA RARAR-c; 配列番号45 n-DADADADARARARARA-c; 配列番号46 n-(ADADADADARARARAR)-c; 配列番号47 n-HEHEHKHKHEHEHKHK-c; 配列番号48 n-HEHEHKHK-c; 配列番号49 n-VEVEVEVEVEVEVEVEVEVE-c; 配列番号50 n-RFRFRFRFRFRFRFRFRFR-c; 配列番号51 n-FKFQFKFQFKFQ-c; 配列番号52 n-IEIKIEIK-c; 配列番号53 n-KLDLKLKLDLKLKLDL-c。

【請求項13】

第一のアミノ酸ドメインが、以下のアミノ酸配列の何れか一つを含む請求項12に記載のペプチド：配列番号21 -RAD ARAD ARADARAD A-; 配列番号51 -FKFQFKFQFKFQ-; 配列番号52 -IEIKIEIK-; 配列番号53 -KLDLKLKLDLKLKLDL-。

【請求項14】

第2のアミノ酸ドメインが、細胞接着たんぱく質のヘパリン結合ドメイン由来である請求項1に記載のペプチド。

【請求項15】

前記細胞接着たんぱく質が、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、コラーゲン、VEGF、FGFs、PDGF、HGF、TGF- およびBMPからなる群より選択される請求項14に記載のペプチド。

【請求項16】

前記ヘパリン結合ドメインが、式(I)または(II)：-XBBXB- または -XBBBXXB- (I) (H)で示される請求項14に記載のペプチド：ここで、XはF, I, L, P, M, W, Y, V, A, CおよびQからなる群より選択される疎水性のアミノ酸を表し、BはR, HおよびKからなる群より選択される正電荷のアミノ酸を表す。

【請求項17】

当該自己組織化ペプチドが、以下からなる群より選択される請求項1に記載のペプチド；配列番号1 AC(RADA)<sub>4</sub>GGPFSSTKT-CONH<sub>2</sub>；配列番号2 Ac(RADA)<sub>4</sub>GGFLGFPT-CONH<sub>2</sub>；配列番号3 AC(RADA)<sub>4</sub>GGALKRQGRGLYGF-CONH<sub>2</sub>；配列番号4 AC(RADA)<sub>4</sub>GPRGDSGYRGDS-CONH<sub>2</sub>；配列番号5 AC(RADA)<sub>4</sub>GGDGRGDSVAYG-CONH<sub>2</sub>；配列番号6 Ac(RADA)<sub>4</sub>GGFHRRIKA-CONH<sub>2</sub>；配列番号7 AC(RADA)<sub>4</sub>GPRGDSGYRGDSG-CONH<sub>2</sub>；配列番号8 Ac(RADA)<sub>4</sub>GGRGDSCONH<sub>2</sub>；配列番号9 Ac(RADA)<sub>4</sub>GGGGRGDSCONH<sub>2</sub>；配列番号10 Ac(RADA)<sub>4</sub>GGGGREDV-CONH<sub>2</sub>；配列番号11 Ac(RADA)<sub>4</sub>GGGKLTWQELYQLKYKGI-CONH<sub>2</sub>；配列番号12 Ac(RAD A)<sub>4</sub>GGSKPPGTSS-CONH<sub>2</sub>；配列番号13 ACIEIKIEIKIGGPRGSYRGDS-CONH<sub>2</sub>；配列番号14 ACIEIKIEIKIGPFSSTKT-CONH<sub>2</sub>；配列番号15 ACIEIKIEIKIGGSKPPGTS-CONH<sub>2</sub>；配列番号16 AcFKFQFKFQFKFQGPRGDSGYRGDS-CONH<sub>2</sub>；配列番号17 ACFKFQFKFQFKFQGGFHRRIKA-CONH<sub>2</sub>；配列番号18 Ac(RAD A)<sub>4</sub>GGSTFTKSP-CONH<sub>2</sub>；配列番号19 Ac(RAD A)<sub>4</sub>GGSIKV AVS-CONH<sub>2</sub>；および配列番号20 Ac(RADA)<sub>4</sub>GGSEIKLLIS-CONH<sub>2</sub>。

【請求項18】

当該自己組織化ペプチドが約5-9(5と9も含む)のpHの水性溶液中で正または負の総電荷を持つ請求項1に記載のペプチド。

【請求項19】

第一のアミノ酸ドメインが近中性であるか、または正電荷若しくは負電荷を有する請求項18に記載のペプチド。

【請求項20】

第2のアミノ酸ドメインが正電荷または負電荷を有する請求項18に記載のペプチド。

【請求項21】

前記溶液のpHが約6-8(6と8も含む)であるときに、第一のアミノ酸ドメインの電荷が-1から1である請求項19に記載のペプチド。

【請求項22】

前記水溶液のpHが約6-8(6と8も含む)であるときに、第2のアミノ酸ドメインの電荷が-2かそれ以下である請求項20に記載のペプチド。

【請求項23】

第一のアミノ酸ドメインが5-9(5と9も含む)の等電位点を有する請求項18に記載のペプチド。

10

20

30

40

50

**【請求項 2 4】**

当該自己組織化ペプチドが 8 または 8 以上の等電位点を有する請求項 1 8 に記載のペプチド。

**【請求項 2 5】**

当該溶液の pH が約 6 - 8 (6 と 8 を含む) であるときに、当該自己組織化ペプチドの総電荷が約 2 または 2 以上である請求項 1 8 に記載のペプチド。

**【請求項 2 6】**

単体で存在する場合、第 2 のアミノ酸ドメインは自己組織化せず、当該ペプチドが集合して巨視的な構造を形成するように、第一のアミノ酸ドメインの自己組織化を可能にする請求項 1 に記載の自己組織化ペプチド。

**【請求項 2 7】**

当該巨視的な構造がナノファイバーおよび/または シートを含む請求項 2 7 に記載の自己組織化ペプチド。

**【請求項 2 8】**

水溶液中で単独のペプチドとして存在するときに、当該ペプチドが自己組織化する請求項 1 に記載の自己組織化ペプチド。

**【請求項 2 9】**

水溶液中に単独のペプチドとして存在するときは自己組織化せず、水溶液中に非修飾の自己組織化ペプチドと共に存在するときは自己組織化する請求項 1 に記載の自己組織化ペプチド。

**【請求項 3 0】**

さらに、第 3 のアミノ酸ドメインを含む請求項 1 に記載の自己組織化ペプチド；ここで、当該第 3 のアミノ酸ドメインは、(a) 疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が交互に設けられたドメインを含み、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を引き起こす第一のアミノ酸ドメインと、(b) 単独では自己組織化しないが、第 1 のアミノ酸ドメインの集合により、巨視的な構造の形成を可能にする第 2 のアミノ酸ドメイン、のいずれかを含む。

**【請求項 3 1】**

疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が交互に設けられたドメインを含み、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を介在する 2 つのアミノ酸ドメインの間に、生物学的に活性のあるペプチドモチーフまたは生分子との相互作用のための標的部位を含むアミノ酸ドメインの直鎖のペプチド鎖を含む請求項 3 0 に記載の自己組織化ペプチド。

**【請求項 3 2】**

当該巨視的な構造がナノファイバーおよび/または シートを含む請求項 3 1 に記載の自己組織化ペプチド。

**【請求項 3 3】**

請求項 1 に記載の自己組織化ペプチドを含む溶液。

**【請求項 3 4】**

請求項 1 に記載の自己組織化ペプチドを含む医薬組成物。

**【請求項 3 5】**

ゲル化剤を実質的に含まず、生体内で自己組織化して巨視的な構造を形成する請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

**【請求項 3 6】**

当該巨視的な構造がナノファイバーおよび/または シートを含む請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

**【請求項 3 7】**

疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が交互に設けられたドメインを含み、相補的で、構造的に適合し、シートに自己組織化し、巨視的な構造を取る、追加の自己組織化ペプチドを更に含み、当該追加の自己組織化ペプチドが細胞接着または細胞生存の適合性を低下さ

10

20

30

40

50



。

## 【請求項 5 2】

当該グリコサミノグリカンがヘパリンまたはヘパラン硫酸である請求項 5 1 に記載のマトリクス。

## 【請求項 5 3】

当該マトリクスの表面に接着またはマトリクス内部に封入されている複数の細胞を更に含む請求項 4 2 に記載のマトリクス。

## 【請求項 5 4】

当該細胞が実質的に均質に当該マトリクス内部に分散している請求項 5 3 に記載のマトリクス。

10

## 【請求項 5 5】

当該細胞が、骨芽細胞、軟骨細胞、骨髄細胞、骨細胞、骨膜細胞、軟骨膜細胞、繊維芽細胞、間葉細胞、間葉系幹細胞、脂肪由来細胞、脂肪由来幹細胞、神経細胞、海馬細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、角質細胞、基底細胞、棘突起細胞、顆粒細胞、胚性幹細胞、卵巣細胞、膵臓細胞、子宮頸部細胞、肝細胞、包皮細胞、好中球、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞およびそれらの前駆細胞からなる群より選択される請求項 5 3 に記載のマトリクス。

## 【請求項 5 6】

当該マトリクスが 3 次元である請求項 4 2 に記載のマトリクス。

## 【請求項 5 7】

当該マトリクスが更に固体物を含む請求項 4 2 に記載のマトリクス。

20

## 【請求項 5 8】

当該固体物が無機塩である請求項 5 7 に記載のマトリクス。

## 【請求項 5 9】

当該無機塩がカルシウムおよび / またはリン酸である請求項 5 8 に記載のマトリクス。

## 【請求項 6 0】

当該無機塩が、リン酸カルシウム、三リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイトおよび炭酸カルシウムからなる群より選択される請求項 5 9 に記載のマトリクス。

## 【請求項 6 1】

当該固体物が約 1 0 0 - 5 0 0 ミクロン ( 100 と 500 を含む ) の範囲の孔径を有する請求項 5 7 に記載のマトリクス。

30

## 【請求項 6 2】

当該固体物がブロック状、円柱状、板状または顆粒状である請求項 5 7 に記載のマトリクス。

## 【請求項 6 3】

( i ) 当該自己組織化ペプチドを水溶液に溶解する工程と、 ( ii ) pH を調整する工程とを含む請求項 4 2 に記載のマトリクスを製造する方法。

## 【請求項 6 4】

( iii ) ゲル化剤を加える工程を更に含む請求項 6 3 に記載のマトリクスを製造する方法。

40

## 【請求項 6 5】

( i ) 当該自己組織化ペプチドを水溶液に溶解する工程と、 ( ii ) ゲル化剤を加える工程とを含む請求項 4 2 に記載のマトリクスを製造する方法。

## 【請求項 6 6】

( iii ) pH を調整する工程を更に含む請求項 6 5 に記載のマトリクスを製造する方法。

## 【請求項 6 7】

当該ゲル化剤が電解質である請求項 6 4 または 6 5 に記載の方法。

## 【請求項 6 8】

当該ゲル化剤が食塩、食塩水、PBS、細胞培養液または生物学的流体である請求項 6 7 に記載の方法。

50

- 【請求項 69】  
当該生物学的流体が血液またはリンパ液である請求項 67 に記載の方法。
- 【請求項 70】  
pH が約 5 - 9 (5 と 9 を含む) に調整されている請求項 63 または 66 に記載の方法。
- 【請求項 71】  
pH が約 6 - 8 (6 と 8 を含む) に調整されている請求項 70 に記載の方法。
- 【請求項 72】  
pH が約 5 - 7 (5 と 7 を含む) に調整されている請求項 71 に記載の方法。
- 【請求項 73】  
pH が約 5.7-5.8 (5.7 と 5.8 を含む) に調整されている請求項 72 に記載の方法。 10
- 【請求項 74】  
骨又は組織の欠損補填材としての請求項 42 に記載のマトリクスの使用方法。
- 【請求項 75】  
当該組織が、脳、皮膚、肝臓、膵臓、胃、腎臓、消化器、食道、心臓、筋肉、結合組織、軟骨、神経、脂肪または骨髄である請求項 74 に記載の方法。
- 【請求項 76】  
当該補填材が水溶液中の自己組織化ペプチドを含む請求項 74 に記載の方法。
- 【請求項 77】  
当該補填材が当該自己組織化ペプチドのハイドロゲルを含む請求項 74 に記載の方法。
- 【請求項 78】  
当該ハイドロゲルが、当該自己組織化ペプチドの水溶液とゲル化剤との混合により形成される請求項 77 に記載の方法。 20
- 【請求項 79】  
当該ゲル化剤が生物学的流体である請求項 78 に記載の方法。
- 【請求項 80】  
当該生物学的流体が血液またはリンパ液である請求項 79 に記載の方法。
- 【請求項 81】  
当該ハイドロゲルが、当該自己組織化ペプチドの水溶液の pH を調整することによる形成される請求項 77 に記載の方法。
- 【請求項 82】  
更に固体物を含む請求項 74 に記載の方法。 30
- 【請求項 83】  
当該固体物が無機塩である請求項 82 に記載の方法。
- 【請求項 84】  
当該無機塩がカルシウムおよび / またはリン酸である請求項 83 に記載の方法。
- 【請求項 85】  
当該無機塩が、リン酸カルシウム、三リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイトおよび炭酸カルシウムからなる群より選択される請求項 84 に記載の方法。
- 【請求項 86】  
前記固体物が、約 100 - 500 ミクロン (100 と 500 を含む) の孔径を有する請求項 82 に記載の方法。 40
- 【請求項 87】  
当該固体物がブロック状、円柱状、板状または顆粒状である請求項 82 に記載の方法。
- 【請求項 88】  
当該欠損が、損傷した組織、損傷した整形領域、骨欠損、骨隣接部、異所性の骨形成、虚血領域、心筋梗塞領域、末梢血管領域、脳梗塞領域または皮膚欠損である請求項 74 に記載の方法。
- 【請求項 89】  
請求項 1 に記載の自己組織化ペプチド、請求項 34 に記載の医薬組成物または請求項 42 に記載のマトリクスをそれを必要とする対象に対して投与することを含む細胞の分化ま 50

たは機能活性を増強する方法。

【請求項 9 0】

請求項 1 に記載の自己組織化ペプチド、請求項 3 4 に記載の医薬組成物または請求項 4 2 に記載のマトリクスを対象の体の部位または体内に導入することを含む対象を治療する方法。

【請求項 9 1】

当該部位が、整形領域、骨欠損部、骨隣接部、異所性の骨形成部、虚血領域、心筋梗塞領域、末梢血管領域、脳梗塞領域または皮膚欠損部である請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

(a)(i) 請求項 1 の自己組織化ペプチド、(ii) 請求項 3 4 の医薬組成物、または(iii) 請求項 4 2 のマトリクス；(b) 当該ペプチドの巨視的な構造への自己組織化を開始するための説明書；並びに(c) 細胞群、細胞または組織培養培地、あらかじめ定めた量の増殖因子、予め定めた量のイオンまたはその塩、当該自己組織化ペプチドを細胞培養のために準備するための説明書、ペプチドハイドロゲル構造の上または中で細胞を培養するための説明書、当該自己組織化ペプチドを対象に導入するための説明書、細胞培養を実施する容器、当該ペプチドを溶解する液体、注射器、ペプチドの自己組織化を開始するためのイオンまたはその塩、および 1 または 1 以上の増殖因子または分化因子からなる群より選択される少なくとも 1 の成分；を含む培養キット。

10

【請求項 9 3】

細胞を、請求項 1 の自己組織化ペプチド、請求項 3 4 の医薬組成物、または請求項 4 2 のマトリクスと接触させることと、当該マトリクスを細胞培養に適した条件下で細胞培養に適した時間に亘り維持することを含む細胞を培養する方法。

20

【請求項 9 4】

当該細胞が、当該マトリクスの表面上で培養される、および / または当該マトリクス内に封入されて培養される請求項 9 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の概要】

【0 0 0 1】

優先権情報

本出願は、35 U. S. C. 119(e)に基づき、2 0 0 6 年 9 月 2 6 日出願の米国仮出願 U. S. S.N. 60/847,303 による優先権を主張するものであり、当該出願内容は引用により本明細書に組み込まれる。

30

【0 0 0 2】

発明の背景

細胞外マトリックス (ECM) はタンパク質および多糖類の両方を含む巨大分子の多様なセットよりなり、これらは細胞が生体内において存在する 3 次元の環境を形成し、細胞間の空隙充填物を構成している。ECM はまた組織化されて基底層または基底膜として知られるシート様の層となる。身体の多くの領域において、基底膜は上皮細胞の層または管の下部に位置 (例えば内脾細胞ライニング血管) するか、または、筋肉細胞のような種々の型の個々の細胞を包囲して細胞層を相互から、または隣接する結合組織から隔たらせている場合が多い。

40

ECM は主に、局所的に分泌されて組立られ細胞層および組織の物理的構造を安定化させ支持している骨格となる分子よりなる。しかしながら、単に細胞の結合のための不活性な物質であるよりはむしろ、ECM は生物学的情報に富んだ環境を構成する。ECM およびそれに関連する (例えば局所的に分泌されるか、または何らかの別の場所から特定の部位に輸送される) 種々の生体分子が細胞の挙動および表現型の多くの特徴に大きく影響することにより、遊走および増殖のような過程を調節し、細胞の発生および分化に影響し、そして細胞の形状および機能に作用していることがわかっている。ECM の構造もその内部にある細胞により影響を受ける。即ち、細胞 - ECM 相互作用は生命にとって重要であることは明らかである。

50

有用な生物学的情報の大量のものがガラスまたはプラスチックのような伝統的な組織培養基体の上での細胞の育成に対して実施された実験から収集されているが、生来の細胞の環境をより正確に反映している培養系および材料を開発することに対する関心が増大している。このような材料は、細胞培養のためのみならず、組織修復および組織工学のため、例えば細胞、組織および/または人工臓器の生育のため、または、生体分子の製造のための細胞系バイオリアクター中における使用のためにも用途を有している。

### 【0003】

このような系を開発するために行われた多くのこれまでの研究では動物原料から得られたタンパク質およびペプチドのような材料の使用が行われていた。しかしながら、これらの材料は合成材料と比較して多くの不都合な点を有している。例えば、これらは疾患の伝染の危険性を高める。滅菌条件とされているもとで採取された場合であっても、汚染の危険性は高い。動物原料を使用する場合、材料をその後ヒト身体内に、例えば人工臓器中の成分として組織修復のために導入すれば、免疫原性の問題が生じる。さらにまた、材料の種々の調製品が一貫して再現性のある組成を有することは困難である場合がある。天然原料から単離した材料の既知成分に関して一貫性を達成することが可能である場合も、細胞の特性に影響する可能性がある未知の、おそらくは未同定の成分が確実に排除されるようにすることは困難または不可能である。さらにまた、これらの天然産物を採取、処理および/または再構成する過程において、これらは損傷を受けるか分解する可能性があり、従って潜在的にそれらが生来の細胞環境を複製する信頼性は低下する。

ECMにより提供される環境を模倣する材料の開発の別の方法は、組み換えDNA手法により種々のECM成分を生成することである。例えば、ECMタンパク質をコードする発言構築物は、原核細胞または真核細胞に導入することができ、分泌タンパク質の場合、興味あるタンパク質は細胞または培地より精製することができる。タンパク質はインビトロにて所望の比率で組み合わせることができる。疾病伝播の可能性の減少が起こり得るため、この取り組みもまた、いくつかの不利点を抱える。例えば純粋に合成の過程ではなく生物学的にタンパク質を製造する場合は、培養系由来の未確認の成分が高度に精製された調製品中にも存在する可能性が残存する。さらに、精製は時間と費用を要し、タンパク質の分解または変性をもたらす場合がある。

生来のECMは大部分がタンパク質およびプロテオグリカンよりなるが、種々の合成の非アミノ酸系の重合体に基づいた細胞培養および組織工学の材料の開発に多大な研究が投じられている。例えば脂肪族炭化水素は種々の組織工学用途に広範に使用されている。一般的に使用されている完全に合成の材料には、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ(乳酸コグリコール酸)(PLGA)、ポリ(エチレングリコール)、(PEG)、ポリ(プロピレングリコール)およびこれらのものや他のものの種々の共重合体が包含される。しかしながら、これらの材料も多くの不都合な点を有している。例えばこれらは数十ミクロンのオーダーの直径を有する繊維を形成し、これは生来のECM中に存在する繊維の直系よりはるかに大きい。さらにまた、このような材料から形成されたマトリックス内に細胞を導入するために必要とされる方法は細胞の生存性のための生理学的要件と容易には合致しない。

即ち、天然原料から誘導された産物に伴っている不都合な点を有さない生来の細胞環境の重要な特徴を模倣する細胞環境の創生を可能にする細胞培養および組織工学の目的のための合成の組成物および材料がなお必要とされている。例えば生来のECM成分により与えられるものに近似した生物学的に関連する刺激を細胞に提供する材料を開発することが望ましい。身体への移植を行う用途のためには、免疫または炎症応答の惹起が全く無いが最小限である組成物および材料および身体内で分解される組成物および材料の特別な必要性が存続している。さらにまた、所望な態様において細胞の特性および機能に影響する組成物および材料の必要性が当該分野で存続している。

### 発明の要旨

本発明は特にこのような必要性を意図している。本発明は自己組織化ではない別のドメインを取り込むことにより自己組織化ペプチドを修飾することができるがなお自己組織化

10

20

30

40

50

部分の組立を可能できるという発見を包含する。別のドメインは得られるペプチドに対して種々の特性を付与できる。好ましくは得られるペプチドは自己組織化してナノ繊維を形成し、そして好ましくは巨視的構造を形成する。ペプチドの自己組織化により形成される物質は特に細胞培養、組織工学および組織修復の分野において広範な用途を有する。

1つの特徴において、本発明は(a)自己組織化を媒介する第1のアミノ酸ドメイン、ここでドメインは、相補的であり構造的に適合性があり、そして未修飾形態で存在する場合には自己組織化して巨視的構造となる交互する疎水性および親水性のアミノ酸を含むもの；および、(b)単離された形態で自己組織化しない第2のアミノ酸；を含む自己組織化ペプチドを提供する。本発明の特定の実施形態においては、第2のアミノ酸ドメインは生物学的に活性なペプチドモチーフ、例えば天然に存在するタンパク質中に存在するペプチドモチーフ、または生体分子との相互作用のための標的部位を含む。本発明の特定の実施形態においては、天然に存在するタンパク質は細胞外マトリックスの成分、例えば基底膜の成分である。

本発明はさらに、自己組織化ペプチドを含む骨格、細胞培養、組織工学および組織修復等のために骨格を使用する方法、および、アミノ酸ドメインを選択する方法を提供する。

【0004】

第二の側面として、本発明は、修飾自己組織化ペプチドを含む溶液を提供する。

【0005】

第三の側面として、本発明は、修飾自己組織化ペプチドを含む医薬組成物を提供する。

【0006】

第四の側面として、本発明は、修飾自己組織化ペプチドを含むマトリックスを提供する。本発明の特定の実施形態として、マトリックスはゲルやハイドロゲルである。本発明は、骨や組織の補填材(例えば、組織工学や、組織修復の用途で)としてのマトリックスを製造し、使用方法も提供する。例えば、本発明では、前駆細胞の増殖および分化活性を増強することで整形分野の組織再生を拡張する修飾自己組織化ペプチドを含むマトリックスを記述している。このようなマトリックスはインビボ(生体内)で骨または組織の再生を促進するための補填材として使用できる。

【0007】

第五の側面として、本発明は、修飾自己組織化ペプチド、その溶液、その医薬組成物、またはそれから作られるマトリックスを、それを必要とする対象に対して投与することを含む、細胞の分化または機能活性を増強する方法を提供する。

【0008】

第六の側面として、本発明は、修飾自己組織化ペプチド、その溶液、その医薬組成物、またはそれから作られるマトリックスを、対象の体の部位または体内に導入することを含む、前記対象を治療する方法を提供する。本発明の特定の実施形態においては、当該部位とは、整形領域である、骨欠損である、骨隣接部である、異所性の骨形成である、虚血領域である、心筋梗塞領域である、末梢血管領域であり、脳梗塞領域である、あるいは皮膚欠損である。

【0009】

第七および最後の側面として、本発明は、修飾自己組織化ペプチド、その溶液、その医薬組成物、それから作られるマトリックスを含むキットおよびそのようなキットの使用法を提供する。

【0010】

本発明の実施形態の詳細は後述の図および特定の実施例の明細書に示される。本発明の他の特徴、対象および利点は、記述、図および請求項から明らかにされる。

【0011】

引用による組み込み

本出願は種々の特許および出版物を参考にしている。これらの内容は引用により本明細書に組み込まれる。

【0012】

10

20

30

40

50

- Clark A H, Ross-Murphy, S B, Structural and mechanical properties of biopolymer gels. Springer-Verlag, Berlin, 1987; Vol. 83, pp. 58-192 (85-86);
- Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Immunology. Current Protocols in Protein Science, and Current Protocols in Cell Biology, all John Wiley & Sons, N. Y., Edition July 2002; Sambrook, Russell, and Sambrook; Freshney, R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 4th ed., John Wiley & Sons, New York, 2000;
- Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10<sup>th</sup> Ed. McGraw Hill, 2001 ;
- Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins (The Guidebook Series), by Thomas Kreis, Ronald Vale Sambrook and Tooze Publication at Oxford Univ; 2<sup>nd</sup> edition, 1999; 10
- Havel, Editor. (1996) Spectroscopic methods for determining protein structure in solution. VCH Publishers, Inc., New York;
- Harlow, E., Lane, E., and Harlow, E., (Eds.) Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1998;
- Katzung, B. (Ed.) Basic and Clinical Pharmacology. McGraw-Hill/Appleton & Lange; 8th edition (Sep. 21 , 2000);
- Kandel, E., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., (eds.), Principles of Neural Science. 4th edition, McGraw Hill, 2000; 20
- Kreis T, Vale R (ed.). Guidebook of the extracellular, anchor and adhesion proteins, 2<sup>nd</sup> Edition. A Sambrook & Tooze publication at Oxford University Press, UK 1999;
- Schramm G. (1994) A practical approach to rheology and rheometry. Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe, Germany;
- Zhang, S. (2001) Molecular self-assembly. Encyclopedia of Materials: Science & Technology, Elsevier Science, Oxford, UK, pp. 5822-5829.
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001 ;
- The Cytokine Handbook. 4th Ed., A. Thomson, Michael T. Lotze, Angus W. Thomson, Lotze M. Academic Press, 2003; [00035] The Extracellular Matrix Factsbook, by Shirley Ayad, Ray Boot-Handford Academic Press; 2nd edition, 1998; 30
- Beck, K., Hunter, I., & Engel, J. (1990). "Structure and function of laminin : anatomy of a multidomain glycoprotein," FASEB J 4: 148-160;
- Bell, S. E., Mavila, A., Salazar. R., Bayless K. J., Kanagala, S., Maxwell S. A., Davis, G. E., (2001) "Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling," J. Cell Science, 1 :2755-2773;
- Binning, G. B., Quate, C. F., Gerber, Ch. (1986) "Atomic Force Microscope," Phys. Rev. Lett. , 12:930; 40
- Boeynaems, J. M., Pirroton, S. (1994) "Regulation of the vascular endothelium: signals and transduction mechanisms," R. G. Landes Company, Austin, USA;
- Brown, S. (1997) "Metal recognition by repeating polypeptides" Nat. Biotechnology, 15:269-292;
- Busse, R., Fleming, I. (2003) "Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces," Trends in Pharmacological Sciences, 24:24-29;
- Caplan, M.R., Moore, P., Zhang, S., Kamm, R. D., Lauffenburger, D. A. (2000) "Self-assembly of a beta-sheet oligopeptide is governed by electrostatic repuls 50

ion," *Biomacromolecules*, 1 :627-631 ;

Caplan, M. R., Schwartzfarb, E. M., Zhang, S., Kamm, R. D., Lauffenburger, D. A. (2002a) "Control of self-assembling oligopeptide matrix formation through systematic variation of amino acid sequence," *Biomaterials*, 23:219- 227;

Caplan, M. R., Schwartzfarb, E. M., Zhang, S., Kamm, R. D., Lauffenburger, D. A. (2002b) "Effects of systematic variation of amino acid sequence on the mechanical properties of a self-assembling, oligopeptide biomaterial," *J. Biomater. Sci. Polymer* 13: 225-236;

Carmeliet P. (2000) "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis" *Nat Med* 6:389-395;

Cassell, O. C., Hofer, S. O., Morrison, W. A., Knight, K. R. (2002) "Vascularization of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states," *Br. J. Plast. Surg.* , 55:603-610;

Charonis, A. S., Tsilibary, E. C., Yurchenco, P. D., & Furthmayr, (1985). "Binding of laminin to type IV collagen: a morphological study," *J. Cell Biol.* 100: 1848-1853;

Cines, E D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. S., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McRae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., Stern, D. M. (1998) "Endothelial cells in physiology and pathophysiology of vascular disorders," *Blood* 91 :3527-3561 ;

Colton, C. (1995) "Implantable biohybrid artificial organs," *Cell transplantation*, 4:415-436;

Davis, G. E., Black, S. M., Bayless, K. J. (2000) "Capillary morphogenesis during human endothelial cell invasion of three-dimensional collagen matrices," *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 36:513-19;

Davis, G. E., Bayless K. J., Mavila A. (2002) "Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices," *Anat. Rec* , 268:252-75;

Dorsett, Y. and Tuschl, T., (2004) *Nat Rev Drug Discovery*, 3:318-329;

Dziadek, M. & Timpl, R. (1985). "Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells," *Dev. Biol.* 111 :372-382;

Eiselt, P., Kim, B-S., Chacko, B., Isenberg, B., Peters, M. C, Greene, K. G., Roland, W. D., Loeb sack, A. B., Burg, K. J. L., Culberson, C. R., Halberstadt, C. R., Holder, W. D., Mooney, D. J. (1998) "Development of technologies aiding large tissue engineering," *Biotechnol. Prog*, 14: 134-40;

Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J. A., Furthmayr, H., Rhode, H., Timpl, R. (1981) "Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix" *J. Mol. Biol.* 150:97-120;

Engel, J. (1992). "Laminins and other strange proteins," *Biochemistry*, 31 : 10643-10651;

Fujiwara, S., Wiedeman, H., Timpl, R., Lustig, A., & Engel, J. (1984). "Structure and interaction of heparan sulfate proteoglycans from a mouse tumor basement membrane," *Eur. J. Biochem.* 143 : 145-157;

Gloe, T., Riedmayr, S., Sohn, H-Y., Pohl, U. (1999) "The 67-kDa Laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression," *J. Biol. Chem.* , 274: 15996-16002;

Graft, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Martin, G. R., Kleinman, H. K., Robey, F

10

20

30

40

50

- . A., & Yamada, Y. (1987). "Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis and receptor binding," *Cell* 48:989-996;
- Grant, D. S., Kinsella, J. L., Frideman, R., Auerbach, R., Piasecki, B. A., Yamada, Y., Zain, M., Kleinman, H. Y. (1992) "Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo," *J. Cell. Physiol* , 153 :614-25;
- Grant, D. S., Tashirom, K. I., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G. R., Kleinman, H. K. (1989) "Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro," *Cell* 58:933-43; 10
- Han Z C, Liu Y. (1999) "Angiogenesis: state of the art," *Int J. Hematol* 70:68-82;
- Hartgerink J D, Beniash E, Stupp S I. (2001) "Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers," *Science* 294: 1684-1688;
- Holmes T. C, De Lacalle, S., Su, X., Liu, G., Rich, A., Zhang, S. (2000) "Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide matrices," *PNAS*, 97:6728-6733;
- Iwamoto, Y., Robey, F. A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H. K., Robey, F. A., & Yamada, Y. (1987). "YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation," *Science* 238: 1 132-1 134; 20
- Kanemoto, T., Reich, R., Royce, L., Greatorex, D., Adler, S. H., Shiraishi, N., Martin, G. R., Yamada, Y., Kleinman, H. K. (1990) "Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production," *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA*, 87:2279-83;
- Kavanagh, G. M., Ross-Murphy, S. B. (1998) "Rheological characterization of polymer gels," *Prog. Polym. Sci. ,* 23:533-562;
- Kisiday, J., Jin, M., Kurz, B., Hung, H., Semino, C, Zhang, S., Grodzinsky, A. J. (2002) "Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9996-10001 ; 30
- Kisiday J D, Jin M, DiMicco M A, Kurz B, Grodzinsky A J., J. (2004) "Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self- assembling peptide matrices," *J. Biomech.* 37:595-604;
- Klein, G., Ekblom, M., Fleker, L., Timpl, R. & Ekblom, P. (1990). "Differential expression of laminin A and B chains during development of embryonic mouse organs," *Development* 1 10:823-837;
- Kleinman, H. K., Graf, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Schasteen, C. S., Yamada, Y., Martin, G. R., & Robey, F. A. (1989). "Identification of a second active site in laminin for promotion of cell adhesion and migration and inhibition of melanoma lung colonization," *Arch. Biochem. Biophys.* 272:39-45; 40
- Koliakos, G. G., Koliakos, K. K., Furcht, L. T., Reger, L. A., & Tsilibary, E. C. (1989). "The binding of heparin to type IV collagen: domain specificity with identification of peptide sequences from the alpha 1 (IV) and alpha 2(IV) which preferentially bind heparin," *J. Biol. Chem.* 264:2313-2323;
- Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Lawley T. J. (1988) "Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures, " *J Cell. Biol* , 107: 1589-98;
- Lendahl, U., et al., (1990) "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein," *Cell*, 60:585-595;
- Leon, E. J., Verma, N., Zhang, S., Lauffenburger, D. A., Kamm, R. D. (1998) 50

"Mechanical properties of a self-assembling oligopeptide matrix," *J. Biomater. Sci. Polymer Edition*, 9:297-312;

Lin H B et al. (1994) "Synthesis, surface, and cell-adhesion properties of polyurethanes containing covalently grafted RGD-peptides," *J. Biomed. Mater. Res.* 3 : 329-342;

Malinda, K. M., Nomizu, M., Chung, M., Delgado, M., Kuratomi, Y., Yamada, Y., Kleinman H. K. (1999) "Identification of laminin .alpha.1 and .beta.1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation and aortic sprouting," *FASEB*, 13:53-62;

Mann B K, West J L (2002) "Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res.* 60(1 ):86- 93; 10

Martin, G. R., & Timpl, R. (1987). "Laminin and other basement membrane components," *Annu. Rev. Cell. Biol.* 3:57-85;

Massia S P, Hubbell J A. (1991) "Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on non-adhesive glass and two polymeric biomaterials," *J. Biomed. Mater. Res.* 2: 223-242;

Nomizu, M., Yokohama, F., Suzuki, N., Okazaki, I., Nishi, N., Ponce, M. L., Kleinman, H. K., Yamamoto, Y., Nakagawa, S., Mayumi, T. (2001) "Identification of homologous biologically active sites on the N-terminal domain of laminin alpha chains," *Biochemistry*, 40: 15310-17; 20

Nomizu, M., Utani, A., Shiraishi, N., Kibbey, M. C, Yamada, Y., & Roller, P. P. (1992). "The all-D-conf[iota]guration segment containing the IKVAV sequence of laminin A chain has similar activities to the all-L-peptide in vitro and in vivo," *J. Biol. Chem.* 267: 14118-14121 ;

Nomizu, M., Kuratomi, Y, Song, S-Y., Ponce, M. L., Hoffmnan, M. P., Powell, S. K., Miyoshi, K., Otaka, A., Kleinman, H. K., & Yamada, Y. (1997). "Identification of cell binding sequences in mouse laminin al chain by systematic peptide screening," *J. Biol. Chem.* 272:32198-32205;

Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzman, R., Timpl, R., Beck, K., & Engel, J. (1987). "Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization," *Eur. J. Biochem.* 166: 1 1-19; 30

Ponce, M. L., Nomizu, M., Delgado, M. C, Kuratomi, Y., Hoffmnan, M. P., Powell, S., Yamada, Y., Kleinman, H. K., Malinda, K. M. (1999) "Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma 1 chain," *Circ. Res.* , 84:688-694;

Poschl, E., Mayer, U., Stetefeld, J., Baumgartner, R., Holak, T. A., Huber, R., & Timpl, R. (1996). "Site-directed mutagenesis and structural interpretation of the nidogen binding site of the laminin gamma 1 chain," *EMBO J.* 15:5154-5159 ; 40

Russell, P., Batchelor, D., Thornton, J. (2001) "SEM and AFM: complementary techniques for high resolution surface investigations," [www.veeco.com](http://www.veeco.com);

Sarikaya, M., Tamerler, C, Schwartz, D T, and Baneyx, F., (2004) "Materials Assembly and Formation Using Engineered Polypeptides," *Annu. Rev. Mater. Res.* 34 :373-408;

Sagnella S M, Kligman F, Anderson E H, King J E, Murugesan G, Marchant R E, Kottke-Marchant K. (2004) "Human microvascular endothelial cell growth and migration on biomimetic surfactant polymers," *Biomaterials* 25: 1249-1259;

Sakamoto, N., Iwahana, M., Tanaka, N. G., Osada, Y. (1991) "Inhibition of angiogenesis and tumor growth by a synthetic laminin peptide, CDPGYIGSR-NH2," *Canc* 50

er Res, 51 :903-906;

Sarnat, H., et al., (1998) "Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system," *Brain Research*, 20:88-94;

Schmedlen R H, Masters K S, West J L. (2002) "Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering," *Biomaterials* 23: 4325-4332;

Semino, C. E, Merok, J. R, Crane, G., Panagiotakos, G., Zhang, S. (2003) "Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide matrices," *Differentiation* 71 :262-270. 10

Semino, C. E., Kasahara, J., Hayashi Y. & Zhang, S. (2004) "Entrapment of migrating hippocampal neural cells in 3-D peptide nanofiber matrix," *Tissue Engineering* 10: 643-655;

Silva G A, Czeisler C, Niece K L, Harrington D, Kessler J, Stupp S I. (2004) "Selective differentiation of neuronal progenitor cells by high-epitope density nanofibers," *Scienceexpress*.

Skubitz, A. P., McCarthy J. B., Zhao, Q., Yi, X. Y., Furcht, L. T. (1990) "Definition of a sequence, RYVVLPR, within laminin peptide F-9 that mediates metastatic fibrosarcoma cell adhesion and spreading," *Cancer Res.*, 50:7612-22; 20

Stack, S., Gray, R. D., Pizzo, S. V. (1990). "Modulation of plasminogen activation and type IV collagenase activity by a synthetic peptide derived from the laminin A chain," *Biochemistry*, 30:2073-2077;

Tashiro, K., Sephel, G. C, Weeks, B., Sasaki, M., Martin, G. R., Kleinman, H. K., Yamada, Y. (1989) "A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth," *J. Biol. Chem.* , 264: 16174-82;

Tsilibary, E. C, Regel, L. A., Vogel, A. M., Koliakos, G. G., Anderson, S. S., Charonis, A. S., Alegre, J. N., & Furcht, L. T. (1990). "Identification of a multifunctional, cell-binding peptide sequence from the  $\alpha 1$  (NC1) of type IV collagen," *J. Cell Biol.* 111 : 1583-1591 ; 30

Tsilibary, E. C, Koliakos, G. G., Charonis, A. S., Vogel, A. M., Regel, L. A., & Furcht, L. T. (1988). "Heparin type IV collagen interactions: equilibrium binding and inhibition of type IV collagen self-assembly," *J. Biol. Chem.* 263: 19112-19118;

Timpl, R. (1989). "Structure and biological activity of basement membrane proteins," *Eur. J. Biochem.* 180:487-502;

Timpl, R. (1996). "Macromolecular organization of basement membranes," *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:618-624;

Whaley S R, English D S, Hu E L, Barbara P F, Belcher A M. (2000) "Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly," *Nature* 405:665-8; 40

Whitesides, G. M., Mathias, J. P., Seto, C. T. (1991 ) "Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures," *Science* 254: 1312;

Yamada, K. M. (1991). "Adhesive recognition sequences," *J. Biol. Chem.* 266: 12809-12812;

Yamada, Y., Kleinman, H. K. (1992). "Functional domains of cell adhesion molecules," *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:819-823;

Yasumitsu, T., Nomizu, M., Gullber, D., MacKrell, A. J., Keene, D. R., Yamad 50

a, Y., & Fessler, J. H. (1996). "Conserved neuron promoting activity in *Drosophila* and vertebrate laminin alpha 1," *J. Biol. Chem.* 271 : 18074-18081 ;

Yurchenco, P. D., Cheng, Y. S. (1993). "Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model," *J. Biol. Chem.* 268: 17286- 17299;

Yurchenco, P. D., O'Rear, J. J. (1994). "Basement membrane assembly," *Methods Enzymol.* 145:489-518.

Zhang, S., Lockshin, C, Herbert, A., Winter, E., Rich, A. (1992) "Zuotin, a putative Z-DNA binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*," *EMBO J.*, 11 :3787- 3796;

Zhang, S., Altman, M. (1999) "Peptide self-assembly in functional polymer science and engineering," *Reactive & Functional Polymers*, 41 :91-102.

Zhang, S. Holmes, T., Lockshin, C, Rich, A. (1993) "Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane," *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90:3334-3338;

Zhang, S., Holmes, T., DiPersio, M., Hynes, R. O., Su, X., Rich, A. (1995) "Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment," *Bio materials*, 16: 1385-1393.

#### 【 0 0 1 3 】

本発明の種々の態様のために有用な更なる情報は、米国特許出願公開第20050181973号にも記載されており、その内容は引用によりここに組み込まれる。仮に組み込まれた文献の何れかと本明細書の間には矛盾がある場合には、本明細書が制御するものとする。

#### 【 0 0 1 4 】

##### 定義

以下の定義が、発明を理解するのに用いられる。

#### 【 0 0 1 5 】

アミノ酸ドメイン：「アミノ酸ドメイン」とはペプチド結合により連結されたアミノ酸少なくとも2個の隣接する重合体を意味する。ドメインはペプチド結合1つ以上により別のアミノ酸またはアミノ酸ドメインに連結されていてよい。アミノ酸ドメインはペプチドのN末端またはC末端においてアミノ酸少なくとも2個を構成できるか、またはペプチドの中央のアミノ酸少なくとも2個を構成できる。

抗体：一般的に「抗体」という用語は免疫グロブリンを指し、これは本発明の種々の実施形態において天然であるか、または、完全または部分的に合成により製造されていてよい。抗体は天然の原料（例えばげっ歯類、ウサギ、ニワトリ（または卵）から、抗原または抗原をコードするコンストラクトで免疫化されている動物から精製したもの）から部分的に誘導されるか、または、完全に合成により製造されてよい。抗体は多くの免疫グロブリンのクラス、例えばヒトのクラス：I g G、I g M、I g A、I g DおよびI g Eの何れかであってよい。抗体はF a b '、F ( a b ' )<sub>2</sub>、s c F v ( 1 鎖可変 ) のフラグメントまたは抗原構築部位を保有している他のフラグメント、または組み換え製造された s c F v フラグメント、例えば組み換え製造フラグメントであってよい。例えば Allen, T., *Nature Reviews Cancer*, Vol. 2, 750 - 765, 2002 およびその参考文献を参照できる。好ましい抗体、抗体フラグメント、および/または抗原結合部位を含むタンパク質ドメインは例えばファージディスプレイ ( Winter G. et al., 1994, *Annu. Rev. Immunol.* 12 : 433 - 455, 1994 )、リボソームディスプレイ ( Hanes, J., and Pluckthun, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 94 : 4937 - 4942, 1997 ) 等のような手法を用いてインビトロで発生および/または選択してよい。本発明の種々の実施形態において、抗体は例えばげっ歯類起源の可変ドメインをヒト起源の定常ドメインに融合させることによりげっ歯類抗体の特異性を温存させた「ヒト化」抗体である。ヒト起源のドメインはこれが人間内で最初に合成されるという意味においてヒト

を直接の起源とする必要は無い。むしろ、「ヒト」ドメインは自身のゲノムがヒトの免疫グロブリン遺伝子を取り込んでいるげっ歯類において発生させてよい。例えば Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16:535-539 を参照できる。抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってよい。

約：本明細書においては、「約」という用語は測定値または数が示された数字の10%まで何れかの方向に偏ってよいことを意味する。

生物学的に活性なペプチドモチーフ：「生物学的に活性なペプチドモチーフ」とは適切な細胞型において細胞がペプチドと接触している場合に表現型の応答または変化を誘導するペプチドである。ペプチドは単離された形態またはより大型のポリペプチドまたは他の分子の部分として存在してよい。ペプチドが応答を示す能力は例えばペプチドの非存在下（例えばより大型のポリペプチド内に通常通り存在する場合にペプチドを突然変異または除去することによる）における関連のパラメーターを比較することにより測定してよい。本発明の種々の実施形態において、好ましい表現型の応答または変化は例えば細胞の展開、結合、接着、増殖、ECM分子の分泌の増強、または、特定の分化した細胞型に特徴的な表現型の発現を包含する。

生体分子：本明細書においては、「生体分子」とは生命体中に存在する分子に典型的な特徴を有するタンパク質、ペプチド、プロテオグリカン、脂質、炭水化物または核酸のような分子を指す。生体分子は天然に存在するか、または、人工（自然界に存在せず、自然界に存在する分子と同一ではない）であってよい。例えば人間の精神的過程から生じ、自然界に存在しない配列または修飾を有するタンパク質は人工生体分子とみなされる。

#### 【0016】

化学走性物質とは本明細書においては、物質が存在する部位に向かって細胞を収集する能力を有するその物質を指す。そのような細胞は例えば組織の形成または修復に寄与する（例えば成長因子を提供することによる）か、または免疫応答に寄与する能力を有する。

相補的：「相補的」とは巨視的骨格の繊維における隣接するペプチドから生じる親水性の残基の間のイオンまたは水素結合の相互作用を形成する能力を有することを意味する。ペプチド中の各親水性残基は隣接するペプチド上の親水性の残基と、水素結合するか、またはイオン対形成するか、または、溶媒に曝露される。対形成はまたファンデルワールス力が関与するものであってよい。

内皮細胞：「内皮細胞」という用語は当該分野で通常受け入れられている意味を与えられるものであり、即ち心臓、血管（毛細管を含む）およびリンパ管の空洞の内張りとなる細胞の最内層である。「内皮」および「血管内皮」という用語も本明細書においては互換的に使用する。

#### 【0017】

ゲル化剤：本明細書での「ゲル化剤」とは、修飾された自己組織化ペプチドをマトリクス（ゲルやハイドロゲルなど）に変化させるものである。ある実施例では、ゲル化前のペプチド溶液は非粘性液体であったり、粘性液体であったり、ゾル状態であったりする。ゲル化剤の例としては、電解液（例えばNaOH, KCl, NaCl, 生理食塩水（NaCl水溶液）、リン酸バッファー食塩水（PBS水溶液））、細胞培養培地（MEMのような哺乳類細胞培養培地等）、塩基性溶液（NaOH溶液等）や生物学的流体（血液、リンパ液など）があるが、これに限定されない。

#### 【0018】

単離された：本明細書においては、「単離された」とは、1)自然界において通常伴っている成分の少なくとも一部から分離され；2)人間の作業が関与する工程により調製または精製され；および/または3)自然界に存在しないことを意味する。

#### 【0019】

等浸透圧溶質：「等浸透圧溶質」とは形成される溶液（等浸透圧溶液）が、1分間超、好ましくは5分間超、さらに好ましくは10分間超、さらに好ましくは少なくとも1時間超の期間に渡り、細胞の生存性に適合する浸透圧または浸透性を有するように水溶液中に

溶解された非イオン化合物を意味する。一般的に好ましい等浸透圧溶液は細胞の細胞外または細胞内の環境（例えば組織培養用の培地、対象内等）の浸透圧に近似した浸透圧を有する。例えば等浸透圧溶液は  $290 \pm 10 \text{ mosm/kg H}_2\text{O}$  内の浸透圧を有してよい。好ましい等浸透圧溶質は炭水化物、例えば単糖類または2糖類を包含する。好ましい炭水化物の例はスクロース、グルコース、ガラクトース、フラクトース、リボース、マンノース、アラビノースおよびキシロースを包含する。さらに別の好ましい等浸透圧溶質はグリセロール、例えば5～20%（v/v）グリセロールのグリセロール水溶液である。

#### 【0020】

巨視的：「巨視的」とは、10倍以下の倍率下で目視可能であるために十分大型の寸法を有することを意味する。本発明の好ましい実施形態においては、巨視的構造は裸眼で目視可能である。巨視的構造は透明であってよく、そして2次元または3次元であってよい。二次元の場合、本発明の特定の実施形態においては、分子の単層より多いもの、例えば分子2層、3層またはこれ以上を包含する。典型的には、各寸法は少なくとも  $10 \mu\text{m}$  の大きさである。特定の実施形態においては、少なくとも2次元は少なくとも  $100 \mu\text{m}$ 、または少なくとも  $1000 \mu\text{m}$  の大きさである。多くの場合、少なくとも2次元は少なくとも  $1 \sim 10 \text{ mm}$  の大きさ、 $10 \sim 100 \text{ mm}$  の大きさまたはそれ以上である。該当する寸法は、例えば長さ、幅、深さ、広さ、高さ、半径、直径、円周であってよく、或は球、円筒、立方体等のような規則的な2または3次元の形状を有さない構造の場合は上記した何れかの近似値であってよい。他の該当する寸法も使用してよい。

マーカー：「マーカー」とは特定の細胞型、組織型、発生学的起源、分化状態または生理学的または代謝的な状態を示すか、または、特定の罹患または生理学的状態（例えば癌、清浄、形成不全）を示すか発見する、何れかの遺伝子または遺伝子産物（例えばタンパク質、ペプチド、mRNA）であってよい。マーカー遺伝子の発現水準または無発現は、検査対象である細胞または組織が特定の細胞型または組織型のものであるか、または特定の発生学的起源、分化状態、生理学的状態または代謝状態を有することを示すものであってよい。マーカー遺伝子の発現水準または無発現は、患者、臓器、組織または細胞の特定の生理学的または罹患状態を示すものであってよい。好ましくは発現または無発現はノーザンブロッティング、インサイチュハイブリダイゼーション、RT-PCR、配列決定、免疫化学、イムノブロッティング、オリゴヌクレオチドまたはcDNAマイクロアレイまたはメンブレンアレイ、タンパク質マイクロアレイ分析、質量分析等のような標準的な手法を用いて測定してよい。本発明の特定の実施形態においては、マーカー遺伝子の発現水準は定量可能である。種々のマーカーの発現はまた機能的試験により測定できる。例えばチトクロームP450遺伝子の発現（例えば肝細胞中）はP450タンパク質の存在に特徴的な反応を行う（例えば特定の基質を代謝する）細胞または細胞溶解物の能力を測定することにより評価できる。特定の細胞型を示すか識別する他のマーカーもまた使用してよい。例えば、特定の化合物の生産または取り込みをマーカーとして使用してよい。例えばLDLの取り込みまたは酸化窒素の生産は内皮細胞のために有用なマーカーである。マーカーについては後にさらに考察する。

#### 【0021】

マイクロファイバー：本明細書においては、「マイクロファイバー」という用語はマイクロスケールの寸法の直径を有する繊維である。典型的にはマイクロスケール繊維は  $1000 \mu\text{m}$  以下、 $500 \mu\text{m}$  以下、 $100 \mu\text{m}$  以下、 $50 \mu\text{m}$  以下、 $20 \mu\text{m}$  以下、 $10 \sim 20 \mu\text{m}$ 、 $5 \sim 10 \mu\text{m}$  の直径を有する。

#### 【0022】

マイクロスケール：本明細書においては、「マイクロスケール」とは一般的にマイクロメートルの単位で表示されることがより好都合である寸法を有する構造を指す。例えば「マイクロスケール構造」という用語は約  $500 \mu\text{m}$  以下、約  $100 \mu\text{m}$  以下、約  $50 \mu\text{m}$  以下、約  $20 \sim 50 \mu\text{m}$ 、約  $10 \sim 20 \mu\text{m}$ 、約  $5 \sim 10 \mu\text{m}$ 、または  $1 \sim 5 \mu\text{m}$  の寸法を有する構造を指す。当業者の知る通り、このような構造の長さはミリメートルに至る場合があるが、大部分の寸法はマイクロメートルの範囲内にある

ナノスケール：本明細書においては、「ナノスケール」という用語は一般的にナノスケール単位で表示されることが最も好都合である寸法を有する構造を指す。例えば「ナノスケール構造」または「ナノスケール骨格」という用語は約1  $\mu\text{m}$ 以下、例えば約500 nm以下、100 nm以下、約50 nm以下、約20 ~ 50 nm、約10 ~ 20 nm、約5 ~ 10 nm、または1 ~ 5 nm、約1 nm、または0.1 ~ 1 nmの寸法を有する構造を指す。範囲は両端を含む。該当する寸法は、例えば長さ、幅、深さ、広さ、高さ、半径、直径、円周であってよく、或は球、円筒、立方体等のような規則的な2または3次元の形状を有さない構造の場合は上記した何れかの近似値であってよい。構造の形状に応じて構造がナノスケール構造であるかどうかを決定するために他の該当する寸法を使用してもよい。当業者の知る通り、ナノスケール構造の寸法の1つ以上はナノメートル範囲に無くてもよい。例えばこのような構造の長さはミクロンの範囲以上に至ってもよい。しかしながら、一般的には大部分の寸法がナノメートルの範囲内にある。

最小の生物学的に活性のある配列：本明細書中で、「最小の生物学的に活性のある配列」とは、特定の生物学的な機能を持ちために最小な長さのペプチドの配列のことである。第1の例として、-SEIKLLIS-はラミニンの生物学的に活性のある配列であるが、-IKLLI-は細胞接着のみの機能を持つ配列である。従って、この場合-IKLLI-は「最小の生物学的に活性のある配列」である。第1の例として、-DGRGDSVAYG-は-RGD-を配列として持っている。-RGD-は細胞接着機能を持つ。しかし、-DGRGDSVAYG-は骨芽細胞分化の機能を持つ。従って、この場合、-DGRGDSVAYG-と-RGD-の両方とも「最小の生物学的に活性のある配列」と考えられる。本発明で理解されるように、修飾されたペプチドの2番目のアミノ酸ドメインは少なくとも一つの最小の生物学的に活性のある配列を有する。最小の生物学的に活性のある配列は元のたんぱく質配列の内、どのような長さにもなりうる。更に、最小の生物学的に活性のある配列のアミノ酸以外の2番目のアミノ酸ドメインは、親水性や総電荷の調整のために変更・追加可能である。特定の実施形態においては、最小の生物学的に活性のある配列は表2aに示されるどの配列でも良い。

#### 【0023】

ナノ繊維：本明細書においては、「ナノ繊維」という用語はナノスケールの寸法の直径を有する繊維を指す。典型的にはナノスケール繊維は500 nm以下の直径を有する。本発明の特定の実施形態によれば、ナノ繊維は100 nm以下の直径を有する。本発明の特定の別の実施形態によればナノ繊維は50 nm以下の直径を有する。本発明の特定の別の実施形態によればナノ繊維は20 nm以下の直径を有する。本発明の特定の別の実施形態によればナノ繊維は10 ~ 20 nm以下の直径を有する。本発明の特定の別の実施形態によればナノ繊維は5 ~ 10 nm以下の直径を有する。本発明の特定の別の実施形態によればナノ繊維は5 nm未満の直径を有する。範囲は両端を含む。

#### 【0024】

ナノスケール環境骨格：「ナノスケール環境骨格」という用語はナノ繊維を含む骨格を指す。本発明の特定の実施形態においては骨格を含む繊維の少なくとも50%がナノ繊維である。本発明の特定の実施形態においては骨格を含む繊維の少なくとも75%がナノ繊維である。本発明の特定の実施形態においては骨格を含む繊維の少なくとも90%がナノ繊維である。本発明の特定の実施形態においては骨格を含む繊維の少なくとも95%がナノ繊維である。本発明の特定の実施形態においては骨格を含む繊維の少なくとも99%がナノ繊維である。当然ながら、骨格は非繊維の構成成分、例えば水、イオン、成長および/または分化を誘導する薬剤、例えば成長因子、治療薬または他の成分も含んでよく、これらは骨格中の溶液中および/または骨格に結合して存在してよい。

天然に存在する：本明細書においては、「天然に存在する」とは自然界に存在することを意味する。ナノ繊維生体分子は、一般的に、自然界に存在する生物により合成され、そして、人間の作業により修飾されないか、または、そのような分子の分解産物である。人間の作業が関与する工程（例えば生命体が関与しない化学合成を介するか、または、人間の作業により操作された生命体またはそのような生命体の子孫が関与する工程を介する）により合成されるが、自然界に存在する生物により合成され、人間の作業により修飾さ

10

20

30

40

50

れていない分子と同一である分子もまた天然に存在する分子とみなされる。

ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質：本発明によれば、「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」はペプチド結合により相互に連結されたアミノ酸少なくとも2つの糸状物を含む。ペプチドは一般的に約2～200アミノ酸、より典型的には約6～64アミノ酸の糸状物となる。典型的には自己組織化ペプチドの自己組織化部分は約8～24、多くの場合約12～20または16～20アミノ酸である。ペプチドは個々のペプチドまたはペプチドの集合体を指す。本発明のペプチドは典型的にはわずか1つの天然のアミノ酸を含有するが、当該分野で知られている非天然のアミノ酸（即ち自然界には存在しないがポリペプチド鎖内に取り込まれることができる化合物；例えばURLがwww.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gifであるウェブサイトを参照でき、これは機能的イオンチャンネル内に良好に取りこまれた非天然のアミノ酸の構造を表示している）および/またはアミノ酸類縁体も代替としてよい。特に、Dアミノ酸を使用してもよい。さらにまた、本発明の種々の実施形態において、本発明のペプチド中のアミノ酸の1つ以上は例えばアシル基、炭水化物基、炭水化物鎖、ホスフェート基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、コンジュゲーションまたは官能性付与のためのリンカー等のような化学的実体を付加することにより改変または誘導体化してもよい。本発明の特定の実施形態においては、ペプチドは分枝鎖であり、その場合、各々がペプチド結合により連結されたアミノ酸少なくとも3個よりなるアミノ酸重合体少なくとも2つを含むが、2アミノ酸重合体そのものはペプチド結合によって連結されていない。

増殖剤および有糸分裂促進剤は本明細書においては互換的に使用し、細胞の増殖を増強する物質の能力を指す。プロテアーゼは本明細書においては、ペプチドおよびタンパク質のフラグメントを発生する等にタンパク質分子中のアミノ酸を連結しているペプチド結合を切断するタンパク質切断酵素である。プロテアーゼおよびプロテアーゼファミリーの大きな収集物が発見されており、これらのプロテアーゼが標的タンパク質を切断する特異的な部位も当該分野で知られている。一部の例示されるプロテアーゼはセリンプロテアーゼ、アスパルチルプロテアーゼ、酸プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ（例えばマトリメタロプロテアーゼ）、カルボキシペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、システインプロテアーゼ等を包含する。

再生：一般的に本発明の種々の実施形態において、組織の再生は、新しい組織（これは細胞または細胞の部分の何れかを意味する）の生成を含む傷害または変性または分解の過程よりも前の組織の状態の解剖学的または機能的な復元の何れかの特徴を含む。本発明の特定の実施形態においては新しい組織の生成は既存の細胞の成長も含む。例えば、内皮細胞の場合は、再生は新しい血管の形成または既存の血管の伸長または成長を包含する。ニューロンの場合は、再生は軸索または他のニューロン突起の成長を包含する。このような突起は細胞体から直接生じたものであってよく、或は、傷害により切断または損傷を受けた突起の伸長であってよい。新しい組織は以前に存在していた組織を置き換えてよい。本発明の特定の実施形態においては、新しい組織の生成は既存の細胞の分裂を包含する。

修復：一般的に本発明の種々の実施形態において、組織修復は損傷または変性の前の組織の状態の解剖学的または機能的な復元の何れかの特徴を含む。例えばこれは傷害により分離された組織の部分の間の物理的連続性の復元を包含する。好ましくは、物理的連続性のこのような復元は、傷害の前には存在しなかった型の組織、例えば瘢痕組織の明らかな分離を行わない組織の部分の再付加または再連結を包含する。即ち修復は、組織の欠陥の充足を包含し、これは瘢痕組織の形成によるのではなく例えば欠陥により分離された組織の部分の再付加による、および/または、損傷または変性に付された型の新しい組織の生育によるものである。修復は例えば新しい組織の生育または発生を包含するが必須ではない。即ち、再生は修復の1つの特徴とみなしてよいが、修復は新しい組織の生育の証拠を伴うことなく起こりえる。

#### 【0025】

イオンを実質的に非含有の溶液：「イオンを実質的に非含有の溶液」とはイオン（また

10

20

30

40

50

はその塩)が全く添加されていないか、イオン(またはその塩)の濃度が0.01または0.001 mM未満である溶液を意味する。

低分子：本明細書においては、「低分子」という用語は比較的小さい分子量を有し、そしてタンパク質、ポリペプチドまたは核酸ではない天然に存在する、または人工的に創生(例えば化学合成による)された有機の化合物を指す。典型的には、低分子は約1500 g/mol未満の分子量を有する。さらにまた、低分子は典型的には複数の炭素-炭素結合を有する。

#### 【0026】

特異的結合：本明細書においては、「特異的結合」という用語は標的分子(例えば標的ペプチド)および結合分子と称される場合のある2つの分子の間の物理的会合を指す。相互作用は典型的には結合分子により認識される標的ドメインのような標的分子の特定の構造的特長の存在に依存している。標的分子は結合分子により認識される標的ドメインより完全になるものであってよい。例えば結合分子が標的ドメインAを含有する標的分子に特異的である場合、遊離の標識されたAおよびそれに特異的な結合分子の両方を含有する反応系中の、標的ドメインAを含むポリペプチドの存在、または、遊離の未標識の標的ドメインの存在は、結合分子に結合する標識されたAの量を低減する。特異性は絶対的でなくてもよいが、一般的には結合が行われる観点のものを指す。何れかの所定の用途において適切な性能を示すための十分な程度の特異性を有する標的ドメインおよび結合分子を当業者は選択できる。特異性は標的分子に対する結合分子の親和性vs他の標的、例えば競合物質に対する結合分子の親和性のような、別の因子の観点において評価してよい。1つ以上の観点において結合分子の特異性が明らかになった後、これを他の、好ましくは同様の観点において特にその特異性を再評価することなく使用してよい。本発明の観点における好ましい結合分子は細胞表面に存在するタンパク質、細胞外環境中で身体内に存在するタンパク質(例えば細胞外マトリックスタンパク質、分泌された、または細胞表面のタンパク質、例えばプロテアーゼ、成長因子および血液中を循環するタンパク質)を包含する。本発明の特定の実施形態においては、結合分子は抗体である。自己組織化ペプチドと結合分子の間の相互作用の観点においては、本発明の特定の実施形態によれば、結合分子は、それが細胞外環境内で身体内に存在する他のペプチドまたはポリペプチドとよりも少なくとも2倍強力で標的分子と結合する場合に、特異的結合を示す。本発明の特定の実施形態によれば、それが細胞外環境内で身体内に存在する他のペプチドまたはポリペプチドとよりも少なくとも5倍強力で標的分子と結合する場合に、特異的結合を示す。本発明の特定の実施形態によれば、それが細胞外環境内で身体内に存在する他のペプチドまたはポリペプチドとよりも少なくとも10倍強力で標的分子と結合する場合に、特異的結合を示す。本発明の特定の実施形態によれば、それが細胞外環境内で身体内に存在する他のペプチドまたはポリペプチドとよりも少なくとも50倍強力で標的分子と結合する場合に、特異的結合を示す。本発明の特定の実施形態によれば、それが細胞外環境内で身体内に存在する他のペプチドまたはポリペプチドとよりも少なくとも100倍強力で標的分子と結合する場合に、特異的結合を示す。結合は結合の強度および特異性の程度のような特性が分子双方の特徴に依存している2分子間の相互作用が関与する過程であるため、何れかの分子は標的分子として、または、結合分子と指定されてよいとみなされる。

構造的に適合性がある：「構造的に適合性がある」とは構造の形成を可能にする十分一定のペプチド内距離を維持することができることを意味する。本発明の特定の実施形態においては、ペプチド内距離は4, 3, 2または1オングストローム未満である。ペプチド内距離のより大きい変動は十分な安定化力が存在すれば構造の形成を妨げない。この距離は分子モデリングに基づくか、または、以前に報告されている単純化された操作法(米国特許5,670,483)に基づいて計算してよい。この方法においては、ペプチド内距離は対の各アミノ酸の側鎖上の未分枝鎖の原子の数の合計を考慮して計算される。例えばリジン-グルタミン酸のイオン対のペプチド内距離は $5 + 4 = 9$ 原子であり、そして、グルタミン-グルタミンの水素結合対の距離は $4 + 4 = 8$ 原子である。原子当たり3オングストロームの変換ファクターを用いれば、リジン-グルタミン酸対およびグルタミン-グ

10

20

30

40

50

ルタミン対（例えば9 v s 8原子）を有するペプチドのペプチド内距離の変動は3オングストロームである。

被験体：被験体という用語は本明細書においては、例えば実験、診断および/または治療目的のために薬剤を送達すべき個体を指す。好ましい被験体は哺乳類、特に家畜哺乳類（例えばイヌ、ネコ等）、霊長類またはヒトである。

【0027】

実質的に均一に分布した：一般的に、ペプチド骨格カプセル化細胞の場合においては、「実質的に均一に分布した」という表現は細胞の大部分が相互に概ね等距離であることを指す。例えば、ある特定の時点（例えば骨格形成直後）において、骨格にカプセル化されている細胞の少なくとも50、60、70、80、90または100%の集団の中心が、最も近接した細胞（即ち集団中心が最も近接している細胞）の集団の中心から、500、100、50、20、10または1μM未満変動する距離分だけ離れている場合に、実質的に均一に分布しているとみなされる。或は、細胞はある特定の時点において骨格が等しい容量を有する連続した区分（例えば立方体）に分割された場合に、その区分の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%について、自らの中心が骨格の所定の容量内に含有される細胞の数が、その集団の中心がそのような容量内に含有される細胞の平均数と、細胞の平均数の50%未満、40%未満、30%未満、20%未満または10%未満だけ異なる場合に、実質的に均一に分布しているとみなされる。細胞が実質的に均一に分布している骨格はこの特性を長時間温存するか、または、細胞が初期には実質的に均一に分布していなかった骨格中で、細胞が最終的には実質的に均一に分布するようになる。

治療用の分子、化合物または薬剤：「治療用の分子、化合物または薬剤」とは、それを必要とする被験体に投与した場合に、疾患または望ましくない臨床状態の1つ以上を緩解し、疾患または臨床状態の重症度を低減し、疾患または望ましくない臨床状態の発生を防止するかその可能性を低減するか、または、被験体への単なる一般的栄養支援とは異なる態様において組織修復または再生を促進するような何れかの型の分子または分子の組み合わせである。治療用の分子は一般的には有効量、即ち臨床的に意味のある結果を達成するために十分な量で投与する。治療分子は低分子、生体分子等であることができる。例えば Goodman and GilmanのThe Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed., および Katzung, Basic and Clinical Pharmacologyを参照できる。

三次元の配置：「三次元の配置」とは三次元に存在することを意味する。三次元の配置を有する細胞は同じ単層内の全部分ではない。本明細書においては、単層はカプセル化された細胞の平均直径に等しい厚みを有系、そしてカプセル化された細胞少なくとも1つを含むペプチド骨格を横断する断面である。細胞の平均直径は細胞体の平均直径を測定することにより決定してよい。カプセル化された細胞は細胞の容量の少なくとも51%が単層内に含有される場合に単層の部分とみなされる。好ましくは骨格形成直後は、単層少なくとも1つはカプセル化された細胞75、50、25、20、15、10、5または1%（好適度の順）未満を含有する。より好ましくは、骨格形成直後はカプセル化細胞の75、50、25、20、15、10、5または1%（好適度の順）未満が同じ単層の部分である。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1A】図1A 代表的な自己組織化ペプチドRAD16-I（上）およびそのC末端において非自己組織化アミノ酸ドメイン(PRGDSGYRGDS: 配列番号4)を含むように修飾されたペプチドRAD16-I（下）を示す分子モデル。

【図1B】図1B ペプチドRAD16-1およびN末端にアミノ酸ドメイン(PRGDSGYRGDS: 配列番号4)を延長した修飾RAD16-1ペプチドを9:1で混合したもの（重量ベースで同じ濃度で溶解した場合の体積比ベースで）の自己組織化で生じた自己組織化ペプチドナノファイバーの2つのQ-シートテープの模式図。ナノファイバーテープから、配列(PRGDSGYRGDS: 配

10

20

30

40

50

列番号4)が飛び出している。一般に、修飾したアミノ酸ドメインはペプチドの集合体(ナノファイバーまたは巨視的な構造体)または表面の端から延長されている。他の配置もありうる。

【図1C】図1C 一般のペプチドハイドロゲルネットワーク(太実線)に、いくつかの生活性のあるペプチドモチーフ(短い細線)が基本ペプチドのアミノ酸末端より延長しているものの模式図。拡大図:積み重ねられた自己組織化ファイバー(太実線)と生活性のあるペプチドモチーフ(短い細線)が基本ペプチドのアミノ酸末端より延長している。

【図1D】図1D 本発明による修飾された自己組織化ペプチドの可能な配置の種々のものを示している。ドメインAは自己組織化アミノ酸ドメインである。ドメインBは非自己組織化アミノ酸ドメイン(修飾ドメイン)を示す。図に示す通り、修飾ドメインは自己組織化ドメインのNおよび/またはC末端に存在してよく、或は、2つの自己組織化ドメインの間に存在してよい。

【図2】図2 SEQ4ペプチドの質量分析器データ。

【図3】ハイドロゲル中のDNA量より算出された細胞数は、RAD 16-1に機能化ペプチドを加えたものは、RAD16-1単体または1型コラーゲンゲルに比較して、細胞増殖を促進することを示す。

【図4】図4 DNA量により規格化されたアルカリフォスファターゼ(ALP)活性。

【図5A-I】図5A-5I アルカリフォスファターゼ染色により、高いALP活性を確認される。

【図6】図6 培養培地に分泌されたオステオカルチンの結果は、機能化モチーフを有する自己組織化ペプチドが前駆骨芽細胞の分化を促進する潜在力を持つことを示している。

【図7】図7 機能化モチーフと自己組織化配列の間隔と細胞増殖の関係。図7は、機能化モチーフ(RGD)と自己組織化配列(RADA)の間隔は少なくとも2ペプチド結合(6.9オングストローム)分である必要がある。

【図8】図8 機能化ペプチドの混合比の影響。Y軸は、DNA量に比例する蛍光強度を示す。これは混合によって、RAD:DSGが99:1から67:33の広い範囲にわたって細胞増殖が増加することを示している。DSG100%ハイドロゲルでの減少は、DSGはRADに比較して低い強度のゲルを生成するため、機械的な特性の違いから生じていると考えられる。

【図9A-B】図9A-9B 異なった機能化ペプチドの濃度で培養された細胞の共焦点顕微鏡の3次元再構築像。図9AはDSGの割合が10%、図9BはDSGの割合が70%を示す。図9Aでは、細胞はペプチドマトリクス表面に存在するのに対し、図9Bでは細胞が300 $\mu$ mの深さまでマトリクスに進展している。このデータは、細胞の挙動が機能化ペプチドの比を変えることで制御できることを示している。

【図10】図10 RAD 16-1 1%溶液に0.1 N NaOH溶液を加えた時の等電位図と対応するレオロジデータ。

【図11】図11 自己組織化ペプチドAC(RADA)4GGFHRR1KA-CONH<sub>2</sub>(SEQ6)の構造。黒は、正電荷のアミノ酸を示し、灰色は負電荷のアミノ酸を示す。

【図12】図12 FHR溶液に0.1 N NaOH溶液を加えた時の等電位図と対応するレオロジデータ。

【図13A-D】図13A-13D 共焦点顕微鏡像の3次元再構築像。FHRペプチドが3次元的な細胞増殖を促進することを示す。

【図14】図14 DNA量より算出された細胞数により、細胞増殖へのFHRペプチドハイドロゲルの影響を測定。

【図15】図15 DNA量により規格化されたアルカリフォスファターゼ(ALP)活性により、分化へのFHRペプチドハイドロゲルの影響を測定。

【図16A-B】図16A-16B アルカリフォスファターゼ染色:RAD(図16A)、FHR(図16B)

。

【図17】図17 培養培地に分泌されたオステオカルチン。

【図18】図18 PFS 1%溶液に0.1 N NaOH溶液を加えた時の等電位図と対応するレオロジデータ。

10

20

30

40

50

- 【図19】図19 洗浄と培養中の増殖因子の保持率。
- 【図20】図20 bFGFの分子内電荷分布。 暗い部分は正電荷を示し、白い部分は負電荷を示す。
- 【図21A-F】図21A-21F 異なったペプチドマトリクス上に培養されたHUVEC像。上列：RAD-2P；下列：DGR-2P。
- 【図22】図22 増殖因子がゲル化前に混合された場合の増殖因子の保持率。
- 【図23A-C】図23A-23C 材料移植2週間後のラット頭骸骨のX線像。
- 【図24A-M】図24A-24M ハイドロゲル上でHUVECを2日間培養した蛍光共焦点顕微鏡像。緑は細胞核を、赤はアクチンファイバーを示す。コラーゲン、マトリゲル、PRGmx、KLTmx、FHRmx、PFSmxはRADと比較して高い細胞接着性を示す。マトリゲル上では、HUVECは、脈管形成能と対応すると考えられる、脈管状構造を示す。KLTmx上では、細胞はマトリゲルと類似の脈管状構造を示す。
- 【図25】図25 ペプチドナノファイバーマトリクス上で3日間培養されたHUVEC。
- 【図26A-F】図26A-26F ペプチドマトリクス上のビーズの1日後および2日後の蛍光顕微鏡像。緑は細胞核を、赤はアクチンファイバーを示す。白いバーが100 $\mu$ mを示す。1日後ではほとんどの細胞がビーズ上にある。2日後では、RADに比較し、コラーゲンおよびPRGmx、KLTmxゲルでは細胞はビーズから良く遊走している。マトリゲル上では、ハイドロゲルに遊走する細胞は非常に少ない。
- 【図27】図27 2日後にビーズから遊走した細胞数。細胞数は図26A-26Fの蛍光顕微鏡像で数えた。
- 【図28A-C】図28播種から2日後の蛍光共焦点顕微鏡再構築像。緑は生細胞を、赤は死細胞の核を示す。これらの像は、ハイドロゲル中での高い細胞生存率を示す。
- 【図29A-B】図29A-29B 3次元的培養中でのな脈管形成。緑は細胞核を、赤はアクチンファイバーを示す。図29Aは脈管内の空隙(矢印)を示す。図29Bは図29Aの点線部の断面を示す。脈管内の空隙は断面像でも示されている(点線で示される円)。
- 【図30A】図30A-30G 異なったハイドロゲルを乗せて孵卵した絨毛尿膜(CAM)の病理像。
- 【図30B】図30A-30G 異なったハイドロゲルを乗せて孵卵した絨毛尿膜(CAM)の病理像。
- 【図30C】図30A-30G 異なったハイドロゲルを乗せて孵卵した絨毛尿膜(CAM)の病理像。
- 【図30D】図30A-30G 異なったハイドロゲルを乗せて孵卵した絨毛尿膜(CAM)の病理像。
- 【図30E】図30A-30G 異なったハイドロゲルを乗せて孵卵した絨毛尿膜(CAM)の病理像。
- 【図30F】図30A-30G 異なったハイドロゲルを乗せて孵卵した絨毛尿膜(CAM)の病理像。
- 【図30G】図30A-30G 異なったハイドロゲルを乗せて孵卵した絨毛尿膜(CAM)の病理像。
- 【図31A-K】図31A-31K 異なったハイドロゲルへのHUVECの接着。
- 【図32A-F】図32A-32Jは、機能化ペプチドマトリクスでのADSCの3次元培養。
- 【図32G-J】図32A-32Jは、機能化ペプチドマトリクスでのADSCの3次元培養。
- 【図33】図33 機能化ペプチドマトリクスでのADSC培養の細胞密度。
- 【図34】図34 機能化ペプチドマトリクスでのADSC培養の細胞遊走深度。
- 【図35A-B】図35A-35B 培地への増殖因子の分泌。
- 【図36A-B】図36A-36B 修飾ペプチドマトリクス、その医薬組成物、それから作られるマトリクスの典型的な投与方法。図36Aは二つの区画からなる針を示す。ペプチド溶液とゲル化剤が注入の直前に混合される。図36Bは二つの区画からなる針を示す。ペプチド溶液と細胞懸濁液が注入の直前に混合される。
- 【0029】

10

20

30

40

50

## 本発明の詳細な説明と実施形態

### 1. 概要

新しい生物学的材料、特に細胞の成育、分化および生物学的機能に関する許容性物質として機能する生物学的に適合性のある材料の開発は、医療技術の進歩のため、および、細胞の生物学的特性を理解するために、広範な意味を有する。本発明は完全に合成の物質に典型的に備わっている利点を保有し、なおかつ天然原料に由来する物質の特定の望ましい特徴も保有している組成物を製造することが可能であるという認識を包含する。組成物は例えば細胞培養または組織工学、組織再生および/または修復を含む目的のため；および/または治療薬のような生物学的に活性な分子のための送達剤として、インビトロまたはインビボの何れかで使用できる。

イオン性または極性の自己相補性のペプチドの自己組織化を介して作成される生物学的に意味のある物質のクラスは以前に報告されている（例えば Zhang, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3334-3338, 1993; Zhang, S., et al., Biomaterials, 16, 1385-1393, 1995; 米国特許 5,955,343 および 5,670,483 参照）。ペプチドは相補的であり構造上適合性を有する。それらは荷電された残基が交互する正電荷および負電荷を含むことができる交互する親水性および疎水性のアミノ酸の反復単位を含む。一般的に、これらのペプチドは十分な濃度のイオン（例えば 1 価のカチオン）への曝露により自己組織化して種々の巨視的構造となり、これにより安定な巨視的多孔性マトリックスを形成する。マトリックスは種々の物理的形態、例えばリボン、テープ様構造、2次元または3次元の骨格等を形成できると推測される。好ましいマトリックスは典型的には直径 10~20 nm または 10~30 nm の規則正しく相互に織り込まれたフィラメントよりなり、直径（または他の該当する大きさ）50~100 nm のオーダーの孔径を有する。物質は典型的には約 99% 以上の水分含有量を有するヒドロゲルである。ペプチドの特定のものは自己組織化を起こして極めて高度に水和したナノ繊維を形成する（例えば 99.5~99.9% (1~5 mg/ml) 水）。ヒドロゲルはこのように極めて高い水分含有量を有するため、細胞はマトリックスの上または内部において培養された場合に自由に遊走でき、細胞相互の接触が生じる。このような環境はまたタンパク質およびシグナリング分子を含む低分子の拡散を可能にする。さらにまた、ヒドロゲルの特定のものは低い弾性率を有する。特に理論に制約されないが、低い弾性率は細胞-細胞の連絡を促進する。ヒドロゲルの性質は細胞培養および/または組織工学または修復のために研究されている多くの合成材料のものとは対照的であることが示唆されている。例えば、これらの材料の多くはマイクロファイバーを含み、そしてはるかに大きい孔径を有し、細胞およびその自然の環境との比較によれば適切な縮尺にはない環境を呈している。さらにまた、ヒドロゲルはゲル形成過程において細胞を播種および/または包埋する予備形成された構造ではなく、細胞をカプセル化するように形成される。

#### 【0030】

これらの材料の重要な特徴はそれらの特性および機械的強度が種々のペプチドパラメータの操作により制御できることである（Caplan et al., 2000; Caplan et al., 2000a, Caplan et al., 2002b）。例えば、ゲルの硬度はペプチド濃度と共に大きく上昇することがわかっている。ペプチドの配列、特徴および特性、および、自己組織化によりそれら如陸也；形成される構造は次のセクションでさらに考察する。

#### 【0031】

本発明者等および他の研究者等は、これらのペプチドの自己組織化により作成される構造は、細胞を構造の表面上で培養した場合に細胞の連結、生存性および生育を支援する能力があることを明らかにしている。さらにまた RAD16-I (AcN-RADARADARADARADA-CONH<sub>2</sub>) (配列番号 46) により形成されるペプチド構造はニューロンをその表面上で生育させた場合にニューライトの派生および機能的に活性なシナプスの形成のための基板として機能することが可能であった（Holmes, et al

10

20

30

40

50

、2000)。ペプチドゲルは内皮細胞の連結、遊走、増殖およびキャピラリー様構造の形成および少なくとも3週間の期間の生存を支援することがわかっている(WO 2003 096972参照)。コラーゲンまたはフィブリンゲルまたはマトリゲルのようなインビトロの血管形成の試験のために使用されている他の三次元の基板とは対照的に、この血管形成応答は外部より供給された血管形成因子の非存在下において、そして、アポトーシスまたはタンパク質分解性ゲル分解の顕著な兆候を伴うことなく、観察された。

さらにまた、細胞はペプチドヒドロゲル内部にカプセル化され、これにより細胞はペプチド骨格内の三次元の配置内におかれること、および、細胞はそのようにカプセル化されると生存性および機能を維持することが明らかになった(係争中の2001年2月6日出願の「組織細胞のペプチド骨格カプセル化およびその使用」と題された米国特許出願US 2001/009778, 2001、  
「ペプチドヒドロゲル内の肝細胞リプログラミングおよびその使用」と題されたUS 2001/0196942参照)。さらにまたKLD12 (ACN-KLDLKLKLKLKL - CONH2) (配列番号47)の自己組織化により形成されるヒドロゲル構造内にカプセル化された軟骨細胞はその形態を保持しており、プロテオグリカンおよびII型コラーゲンに富んだ軟骨様の機械的に着旺盛のECMを発生し、安定した軟骨細胞の表現型を示していた(Kisiday, et al., 2002)。RAD16-Iの自己組織化により作成されたペプチド骨格内にカプセル化された肝先祖細胞は肝細胞の表現型を示すマーカーを発現した(Semino et al., 2003)。このような結果は、自己組織化ペプチドゲルにより与えられるナノスケールの環境が細胞型の多様なセットの機能的活性を増強し、細胞の指令および分化した細胞の表現型の発現を可能にすることを示している。

細胞、組織工学等のための適当な環境を得るための研究においてこれまで使用されていた多くの天然および人工の材料とは異なり、本発明の材料はマイクロスケールではなくナノスケールで細胞と相互作用する。材料は種々の他の材料に典型的なマイクロファイバーではなくナノ繊維により形成される。特に理論に制約されないが、繊維のサイズが小さいことおよび/または材料の開放織込み構造が、細胞の成育のための独特の利点を与える態様において細胞の突起の伸長を促進し、栄養物質、老廃物等の拡散を可能にすると考えられる。材料を含むナノ繊維は弱い相互作用の分子の力により相補的な状態で自己組織化の間に秩序付けられる。しかしながら、それらは特定の用途のためには好ましい無秩序の状態であってもよい。換言すれば、繊維は秩序のある内部構造を有しているが、それらは相互に対する方向性または整列性を欠いていてもよい。例えば、繊維は相互に実質的に平行でなくてもよい。

#### 【0032】

後に記載する通り、本発明者等は今回、意外にも、自己組織化のための構造的要件に必ずしも合致しない別のアミノ酸ドメイン(これは本明細書においては、少なくとも3アミノ酸の長さであればペプチドドメインとも称する)を取り込むことにより前記した自己組織化ペプチドを広範に修飾することが、自己組織化して巨視的構造を形成するという修飾ペプチドの能力を排除することなく可能であることを発見した。例えば、自己組織化ペプチドは、例えば生物学的に活性なペプチドモチーフまたは結合分子との相互作用のための標的部位であることができる、非自己組織化アミノ酸ドメインを取り込むように修飾することができる。得られるペプチドは自己組織化ペプチドドメインおよび非自己組織化アミノ酸ドメインを含む。非自己組織化アミノ酸ドメインとは、後のセクションIIIにおいて記載する原則に従って設計された未修飾の自己組織化ペプチドの自己組織化をもたらす条件下(例えばイオン濃度、ペプチド濃度、pH、温度)において、単離されたペプチドとして存在する場合(即ち未修飾のペプチドに連結されていない場合)に自己組織化しないアミノ酸ドメインを意味する。「自己組織化しない」とはアミノ酸ドメインまたはペプチドがナノフィラメントまたはナノ繊維を形成しないか、巨視的構造を形成しないか、または、典型的にはシート、ナノ繊維または巨視的構造の何れかを形成しないことを意味する。

以下のセクションは本発明に従って修飾できる自己組織化ペプチドおよび自己組織化の

過程および/または組み立てられた構造の特徴を制御する方法を記載する。その後のセクションは本発明の方法および組成物、本発明の修飾された自己組織化ペプチドから形成された特徴を特性化する方法、細胞の表現型を評価するため、および、修飾のために使用されるアミノ酸ドメインを選択するための方法等を、詳述する。

## II. 自己組織化ペプチド、それより作成した構造、および使用方法

### A. ペプチド配列および巨視的構造

以前に記載された未修飾の自己組織化ペプチドは、相補的であり構造的に適合性がある分子のファミリーを含んでいる。ペプチドおよびその特性は米国特許 5,955,343 および 5,670,483、「組織細胞のペプチド骨格カプセル化およびその使用」と題された 2001 年 2 月 6 日出願の同時係争中の米国特許出願 09/778200 およびその他の文献に記載されている。これらの物質は種々の交互するパターンにおける親水性および疎水性のアミノ酸の反復単位よりなる。

このクラスの第 1 の分子、EAK16-III (AEA EAKAKAEAEAKAK、A、アラニン、E、グルタミン、および、K、リジン、配列番号 18)、即ち 16 アミノ酸ペプチドは、左利き Z-DNA への結合により最初に特徴付けられたコウボタンパク質ズオチン (zootin) 内のセグメントとして発見された (Zhang et al., 1992)。このペプチドに基づいて、アミノ酸配列を変化させ、周期的パターンに従うことにより、多数の自己組織化イオン性自己相補ペプチドが系統的に設計されている。好ましいペプチドは溶液 (例えば水溶液) 中で規則的な二次構造、例えばシート構造であると推測される。これはペプチドが 2 つの異なる表面、即ち 1 つは親水性であり、もう 1 つは疎水性であるものを含み、そして親水性の表面上に規則的な反復を有する相補イオン結合を形成するためと考えられている (Zhang, et al., 1999)。ペプチドの側鎖は 2 面、即ち荷電されたイオン側鎖を有する極性面および例えばアラニンまたは他の疎水性基を有する非極性の面に分配される。これらのイオン側鎖は正荷電および負荷電のアミノ酸残基が相補イオン対を形成できるという点において相互に自己相補である。従ってこれらのペプチドはイオン性の自己相補ペプチドと称される。

### 【0033】

相補イオン側鎖は数種類の基準、即ち基準 I、II、III、IV 等および混合基準に分類されている (Zhang, et al., 1999)。イオン性の残基が 1 正荷電および 1 負荷電の残基を交互させている (- + - + - + - +) 場合、ペプチドは「基準 I」と記載され; イオン性残基が 2 正荷電および 2 負荷電の残基を交互させている (- - + + - - + +) 場合、ペプチドは「基準 II」と記載され; イオン性残基が 4 正荷電および 2 負荷電の残基を交互させている (- - - - + + + +) 場合、ペプチドは「基準 IV」と記載される。上記した基準に合致するペプチドは本明細書においては未修飾の自己組織化ペプチドと称することにより、これらを上記した基準に合致せず、自己組織化でないペプチドドメインを含む本発明の自己組織化ペプチドと区別する。

多くの基準 I および II の自己相補ペプチド、例えば EAKA16-I (配列番号 6)、RADA16-I (配列番号 1)、RAEA16-I (配列番号 8) および KADA16-I (配列番号 10) は以前に分析されている (表 1)。これらのペプチドはまた RAD16-I、RAE16-I、KAD16-I 等とも称されている (即ち 4 アミノ酸モジュールの最後のアミノ酸は略記においては省略される)。16 アミノ酸を含有する基準 IV イオン性自己相補ペプチド、例えば EAK16-IV、KAE16-IV、DAR16-IV および RAD16-IV もまた検討されている。これらの自己組織化ペプチドにおける荷電された残基が上記した全体的パターンを変化させること無く適切に置換されれば (例えば正荷電のリジンが正荷電のアルギニンと置き換えられ、そして、負荷電のグルタメートが負荷電のアスパルテートと置き換えられる)、自己組織化の過程に対して本質的に影響はない。しかしながら、正荷電された残基であるリジンおよびアルギニンが負荷電の残基、例えばアスパルテートおよびグルタメートと置き換えられれば、ペプチドはもはや自己組織化して巨視的構造を形成できなくなるが、それらはなお塩の存在下にシート構造を形成できる。

10

20

30

40

50

水素結合を形成するアスパラギンおよびグルタミンのような他の親水性残基を荷電された残基の代替として、またはこれに追加してペプチド内に取り込んでよい。ペプチド内のアラニンがより疎水性の残基、例えばロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンまたはチロシンに変更されれば、これらのペプチドは自己組織化して増強された強度を有するペプチドマトリックスを形成する傾向が大きくなる。上記したペプチドと同様の組成および長さを有する一部のペプチドは  $\beta$ -シートではなくアルファヘリックスおよびランダムコイルを形成する。このようなペプチドは典型的には巨視的構造を形成しないが、構造形成が絶対的に排除されるわけではない。即ち、自己相補製に加えて、他の要因、例えばペプチドの長さ、分子間の相互作用の程度およびスタaggerアレイを形成する能力が巨視的構造の形成にとって重要であると考えられる。

本発明の特定の実施形態においてはアシル基 ( $\text{RCO}-$ 、式中Rは有機性の基)、例えばアセチル基 ( $\text{CH}_3\text{CO}-$ ) のような基または残基をペプチドのN末端に存在させることにより、さもなくば存在するかもしれない超過の正電荷中和する (例えばN末端アミノ酸の側鎖から生じるのではない電荷) を中和する。同様に、アミン基 ( $\text{NH}_2$ ) のような基を用いることにより、さもなくばC末端に存在するかもしれない超過の正電荷 (例えばC末端アミノ酸の側鎖から生じるのではない電荷) を中和してよく、即ち、C末端をアミド ( $-\text{CONH}_2$ ) に変換する。特に理論に制約されないが、末端のNおよびCの分子上の電荷の中和は自己組織化を促進する場合がある。他の適当な基は当業者が選択できる。

#### 【0034】

種々の条件下において、例えば水性のペプチド溶液への1価のカチオンの天下または1価のカチオンを含有する溶液へのペプチド溶液の導入により、ペプチドは自己組織化して巨視的構造を形成する。自己組織化の前に、ペプチドは1価のイオン (例えばカチオン) を実質的に含まない、または、そのようなイオンを低濃度のみ、例えば10、5、1、0.5または0.1 mM未満含有する溶液中に溶解してよい。自己組織化はペプチド溶液へのイオン性溶質の添加により、または、pHの変化により、開始または実質的に加速してよい。例えば5 mM ~ 5 Mの濃度のNaClはペプチドの組立を誘導し、数分以内に巨視的構造が形成される。より低濃度のNaClも組立を誘導するが、より低速度である。ペプチドの特定のものには有意な濃度のイオンの非存在下、pHに依存する過程においても自己組織化することができる。例えばペプチドの特定のものには約3.0のpHでは溶液中に残存するが、pHを上昇させると自己組織化する場合がある。

或は、自己組織化は、イオンを含有する溶液、例えば標準的なリン酸塩緩衝食塩水 (PBS)、組織培養培地、または生理学的な液体、例えば血液、脳脊髄液 (CSF) 等にペプチドを導入することにより開始してよい。即ちペプチドはインビボの位置において自己組織化できる。好ましいイオンは1価のカチオン、例えば $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ および $\text{Cs}^+$ である。好ましくはイオンの濃度は実質的に加速された自己組織化を誘導するためには少なくとも5、10、20または50 mMである。特定のペプチド配列および/または濃度および望ましい組立速度に基づいて、当業者は好ましいイオン濃度を選択できる。一般的に、得られる構造の強度はイオンの非存在下またはより低いイオン濃度における強度と比較してイオンの存在下で上昇する (ただしイオン濃度の上昇が強度上昇をもたらさないプラトーに達する場合がある)。

#### 【0035】

上記したとおり、好ましいペプチドは自己組織化してナノ繊維のネットワークを形成し、1 ~ 10 mg/mlの範囲で水に溶解した場合に99%より高値の水分含有量のヒドロゲルをもたらす (Zhang et al., 1993, Zhang et al., 1995, Leon et al., 1998, Holmes et al., 2000, Caplan et al., 2000, Caplan et al., 2002, Kisiday et al., 2002)。図1は走査電子顕微鏡 (SEM) で測定した場合の代表的ペプチド、RAD16-II (RARADADARARADADA、R、アルギニン、A、アラニン、D、アスパラギン酸) (配列番号4) ヒドロゲルの構造を示す。これよりわかる通り、材料は自己組織化して ~ 50 - 100 nmの直径の包囲部を形成する ~ 10 - 2

10

20

30

40

50

0 nmの相互に織り込まれた繊維となっている。ナノ繊維ネットワークはヒドロゲルの形成を起こし、好ましくは裸眼で観察でき、3次元であるサイズの巨視的構造を創生する。

【0036】

巨視的構造を形成するペプチドは8~200アミノ酸、8~64アミノ酸、8~36アミノ酸、または、8~16アミノ酸を含有する。12~16アミノ酸の長さを典型的に使用する。自己組織化の前のペプチドの濃度は例えば、0.1(0.1 mg/ml)~99.99%(999.9 mg/ml)の範囲であることができる。より好ましくは、自己組織化の前のペプチドの濃度は特に細胞培養および/または治療用途のためには、0.1(0.1 mg/ml)~10%(100 mg/ml)の範囲であることができる。本発明の特定の実施形態においては自己組織化の前のペプチドの濃度は、0.1(0.1 mg/ml)~5%(50 mg/ml)、または、0.5(50 mg/ml)~5%(50 mg/ml)の範囲であることができる。本発明の特定の実施形態においては自己組織化の前のペプチドの濃度は約5 mg/ml、約10 mg/ml、約15 mg/ml、または約20 mg/mlである。

10

【0037】

望まれる場合、マトリックスは「3次元」になる。例えば、あらかじめ定まった形状や体積に形作ることができる。マトリックスを希望した形や大きさにするために、ペプチド水溶液はあらかじめ形作られ型に導入され、本明細書中に記述されたようにイオンを加えることによりペプチドを自己組織化させマトリックスにすることができる。3次元であるマトリックスとは、マトリックスが単なる他の材料の平らなコーティング物質ではなく、少なくとも複数の細胞が埋め込まれるだけの厚みがあることである。

20

【0038】

所望により、ペプチド骨格は予め決められた形状または容量となるように形成してよい。所望の幾何学的特長または寸法を有する骨格を形成するためには、水性のペプチド溶液を所定の形状を有する成型金型内に入れ、そして本明細書に記載したとおりイオンを添加することにより骨格へのペプチドの自己組織化を誘導する。或は、金型内への溶液の投入の直前にペプチド溶液にイオンを添加してよいが、ただし、実質的に組立が起こる前に金型内に溶液を入れるように留意しなければならない。得られる材料の特徴、組立に必要な時間、および巨視的ペプチド骨格の幾何学的特長および寸法は、適用されるペプチド溶液の濃度および量、骨格の組立を誘導するために使用されるイオンの濃度、pH、特定の自己組織化ペプチドの配列、および、成型装置の寸法を含むパラメーターにより左右される。ペプチド骨格または骨格が身体内に移植される場合は、形状は意図される移植部位に基づいて選択してよい。骨格は本発明の種々の実施形態に応じて、薄層、例えば従来の組織培養の底面のコーティングまたは溶液中の浮遊物として存在してよい。層は数ミクロンの厚み、例えば10ミクロン、10~50ミクロン、50~100ミクロン、100~200ミクロンであることができる。層は複数のシート層を含んでよい。

30

【0039】

自己組織化ナノスケール骨格は様々な程度の硬度または弾性を有するように形成することができる。ペプチド骨格は標準的なコーン-プレートレオメーターで測定した場合、典型的には低い弾性率を有し、例えば1~10 kPaの範囲である。このような低い値は細胞の収縮の結果としての骨格の変形を可能にし、この変形は細胞-細胞の連絡のための手段を提供する。骨格の硬度はペプチド配列の変化、ペプチド濃度の変化およびペプチド長の変化を含む種々の手法により制御できる。高度を増大させるための他の方法も用いてよく、例えばビオチン分子をペプチドのアミノまたはカルボキシ末端に連結するか、または、アミノ末端とカルボキシ末端の間に連結させて後にこれらを交差結合してよい。

40

【表 1】

表 1 代表的な自己組織化ペプチド			
No.	名称	配列	形態
SEQ ID NO: 21	RADA16-I	n-RADARADARADARADA-c	I
SEQ ID NO: 22	RGDA16-I	n-RADARGDARADARGDA-c	I
SEQ ID NO: 23	RADA8-I	n-RADARADA-c	I
SEQ ID NO: 24	RAD16-II	n-RARADADARARADADA-c	II
SEQ ID NO: 25	RAD8-II	n-RARADADA-c	II
SEQ ID NO: 26	EAKA16-I	n-AEAKAEAKAEAKAEAK-c	I
SEQ ID NO: 27	EAKA8-I	n-AEAKAEAK-c	I
SEQ ID NO: 28	RAEA16-I	n-RAEARAEARAEARAEA-c	I
SEQ ID NO: 29	RAEA8-I	n-RAEARAEA-c	I
SEQ ID NO: 30	KADA16-I	n-KADAKADAKADAKADA-c	I
SEQ ID NO: 31	KADA8-I	n-KADAKADA-c	I
SEQ ID NO: 32	EAH16-II	n-AEAEAHAAEAEAAH-c	II
SEQ ID NO: 33	EAH8-II	n-AEAEAAH-c	II
SEQ ID NO: 34	EFK16-II	n-FEFEFKFKFEFEFKFK-c	II
SEQ ID NO: 35	EFK8-II	n-FEFKFEFK-c	I
SEQ ID NO: 36	ELK16-II	n-LELELKLKLELELKLK-c	II
SEQ ID NO: 37	ELK8-II	n-LELELKLK-c	II
SEQ ID NO: 38	EAK16-II	n-AEAEAKAKAEAEAKAK-c	II
SEQ ID NO: 39	EAK12	n-AEAEAEAEAKAK-c	IV/II
SEQ ID NO: 40	EAK8-II	n-AEAEAKAK-c	II
SEQ ID NO: 41	KAE16-IV	n-KAKAKAKAEAEAEAE-c	IV
SEQ ID NO: 42	EAK16-IV	n-AEAEAEAEAKAKAKAK-c	IV
SEQ ID NO: 43	RAD16-IV	n-RARARARADADADADA-c	IV
SEQ ID NO: 44	DAR16-IV	n-ADADADADARARARAR-c	IV
SEQ ID NO: 45	DAR16-IV*	n-DADADADARARARARA-c	IV
SEQ ID NO: 46	DAR32-IV	n-(ADADADADARARARAR)-c	IV
SEQ ID NO: 47	EHK16	n-HEHEHKHKHEHEHKHK-c	N/A
SEQ ID NO: 48	EHK8-I	n-HEHEHKHK-c	N/A
SEQ ID NO: 49	VE20*	n-VEVEVEVEVEVEVEVEVEVE-c	N/A
SEQ ID NO: 50	RF20*	n-RFRFRFRFRFRFRFRFRFRF-c	N/A
SEQ ID NO: 51	KFQ12	n-FKQFKQFKQFKQ-c	I
SEQ ID NO: 52	EIK8	n-IEIKIEIK-c	I
SEQ ID NO: 53	KLD12	n-KLDLKLKLDLKLKLDL-c	I

【 0 0 4 0 】

N / A は適用せずを意味する。

## 【0041】

\*これらのペプチドはNaClを含有する溶液中でインキュベートするとシートを形成するが、それらは自己組織化して巨視的構造を形成するとは観察されていない。

## 【0042】

ペプチドはLアミノ酸、Dアミノ酸、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸またはこれらの組み合わせを含んでよい。Lアミノ酸が骨格に存在する場合は、分解により、例えば培養中の細胞により、または宿主組織中の細胞により再使用してよいアミノ酸が生成する。本発明の特定の実施形態におけるペプチドの塩基性の単量体サブユニットは体内で天然に存在するLアミノ酸であるという事実は、多くの他の生体適合性の物質から化合物のこのクラスを差別化しており、特有の利点を与えるものである。ペプチドは化学合成されるか天然物または組み換え原料から精製してよく、そして、ペプチドのアミノおよびカルボキシ末端を保護しても保護しなくてもよい。ペプチド骨格は相互に相補であり構造的に適合性を有するペプチドの異なる分子種1つ以上から形成してよい。ミスマッチ対を含有するペプチド、例えば隣接するペプチドに由来する2つの同様に荷電した残基の反発性の対形成もまた、反発力がペプチド間の相互作用を安定化させることにより支配されれば構造を形成してよい。ペプチド骨格はまた、本明細書においては、ペプチドヒドロゲルまたはペプチドヒドロゲルすかとも称してよい。

10

ペプチド、例えば交差結合されることのできるペプチドおよび本発明の修飾された自己組織化ペプチドは標準的なf-moc化学を用いて合成してよく、そして高速液体クロマトグラフィーを用いて精製してよい。ペプチド骨格の形成は本明細書に記載する通り、イオンまたはその塩の添加により開始してよい。芳香族側鎖を有する疎水性残基はUV照射への曝露により交差結合してよい。交差結合の程度はUV光への曝露の所定の時間および所定のペプチド濃度により厳密に制御してよい。交差結合の程度は光分散、ゲル濾過または走査電子顕微鏡により、標準的な方法を用いて測定してよい。さらにまた、交差結合の程度はまたプロテアーゼによる消化の後の構造のHPLCまたは質量スペクトル分析により調べてもよい。材料の強度は交差結合の前後に測定してよい。

20

## 【0043】

未修飾の自己組織化ペプチドまたは本発明の修飾された自己組織化ペプチドの何れかから形成されたペプチドヒドロゲルは細胞および組織を培養するために種々の方法において使用してよい。細胞および組織はヒドロゲル構造の表面上で培養できる。特に理論に制約されないが、本発明者等はこのような環境は従来のプラスチックの組織培養皿のような合成の基板上の培養よりも天然の細胞の環境をより綿密に模倣していることを示唆している。ヒドロゲルが三次元の構造を形成する場合は、細胞は構造内に突起を伸長でき、或は、その内部に遊走できる。

30

細胞はまたヒドロゲル内にカプセル化できる。ペプチド構造内に細胞をカプセル化する場合、ペプチドおよび生細胞を、ペプチドが実質的に自己組織化しない条件下、細胞の生存性を支援する適切な濃度で等浸透圧の溶質を有する水溶液中でインキュベートしてよい。本発明の特定の実施形態においては、溶液は10、5、1または0.1mM未満の1価カチオン濃度を含有するか、または1価カチオンを実質的に非含有である。溶液はまた他のイオン種、例えば他のカチオンまたはアニオンを10、5、1または0.1mM未満含有するか、または実質的に非含有である。十分なイオン(例えば1価のカチオン)を溶液に添加することによりペプチドから巨視的構造、好ましくはシート巨視的構造への自己組織化を開始することにより、細胞は巨視的構造の形成によりカプセル化される。カプセル化された細胞は好ましくは三次元配置における巨視的構造内に存在する。溶液は所望の体積または形状の巨視的構造を確立するための寸法を有する所定の形状を有する成型金型内に入れてよい。

40

## 【0044】

本発明の特定の実施形態においては、添加イオンの濃度は少なくとも5、10、20または50mMである。適当なイオンには例えばLi<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>およびCs<sup>+</sup>が含まれる。一部の実施形態においては、等浸透圧溶質の濃度は以下の範囲：200~250

50

mM、250～270 mM、270～300 mM、300～400 mM、400～500 mM、500～600 mM、600～700 mM、700～800 mMまたは800～900 mMの1つに含まれる。適当な等浸透圧溶質は例えば炭水化物、例えばスクロース、マンニトール等である。他の等浸透圧溶質、好ましくは使用濃度において細胞に対して非毒性であるものも使用してよい。自己組織化はまたpHの変化（例えば低pHから高pHへの上昇）により起こすこともできる。

#### 【0045】

細胞および生体分子のような薬剤（例えば分化促進剤、増殖剤）、治療用化合物は自己組織化の前にペプチド溶液中に導入してよい。次に、自己組織化工程により細胞または分子をカプセル化する構造が形成される。構造内の細胞または分子の均一な分布を達成するためには、自己組織化の開始前に溶液を十分混合することが望ましい。ペプチド溶液に細胞または薬剤を混合すると即座に自己組織化が開始されたり加速されたりすることを回避するためには、実質的に無イオンまたは低濃度のみのイオンを含有する溶液中に細胞または薬剤を維持することが望ましい。このような場合、細胞は好ましくはペプチド溶液との混合の前にスクロースのような等浸透圧溶質中に維持する。ペプチド自体は細胞（例えば細胞ペレット）または薬剤を添加する等浸透圧溶液中に溶解してよい。得られた組成物を混合して細胞および/または薬剤のより均一な分布を達成し、その後、組成物をイオンに曝露する（例えばイオンを組成物に添加するか、または組成物をイオン含有溶液と混合する）。

10

#### 【0046】

細胞は、組織培養皿またはスライド、またはコラーゲン、マトリゲル等のような生物学的に誘導された物質でコーティングされている組織培養皿またはスライドのような、それらが従来の基板上で培養されている場合と同様の態様においてペプチドヒドロゲル構造の表面上で培養してよい。一般的に細胞は何れかの所望の水準のコンフルエント状態において培養できる。カプセル化された場合、細胞は好ましくは三次元の配置における巨視的構造内に存在する。細胞の密度は例えば $5 \times 10^3 / \text{ml} \sim 5 \times 10^4 / \text{ml}$ 、 $5 \times 10^4 / \text{ml} \sim 5 \times 10^5 / \text{ml}$ 、 $5 \times 10^5 / \text{ml} \sim 5 \times 10^6 / \text{ml}$ 、または、 $5 \times 10^6 / \text{ml} \sim 5 \times 10^7 / \text{ml}$ であってよい。他の範囲も使用してよい。培養の条件は生理学的条件に近似することが好ましい。例えば培地のpHは生理学的pHに近似するのが好ましく、好ましくはpH6～8、例えば約7～7.8、特にpH7.4である。生理学的温度範囲は約30～40である。哺乳類細胞は好ましくは約32～約38、例えば約35～約37の温度で培養する。

20

30

細胞は所望の細胞数および密度、細胞の増殖速度および所望の細胞のリプログラミングが起こるために必要な時間に応じて、何れかの適切な時間、ペプチド構造の上または内部で培養してよい。これらのパラメータは本発明を使用する特定の細胞および目的に応じて変動する。当業者はこれらのパラメータを変更でき、そしてそうすることの作用を観察することにより、構造の上または内部の培養物中に細胞を維持するための旨適時間を決定できる。本発明の特定の実施形態においては細胞は約3日間、7日間、14日間、21日間、28日間、56日間または90日間培養する。本発明の特定の実施形態においては細胞は1～3日間、4～7日間、8～14日間、15～21日間、22～28日間、29～56日間、または57～90日間培養する。より長期または短期の培養期間も使用してよい。

40

#### 【0047】

好ましくは細胞（表面上で培養またはまたはカプセル化の何れか）の少なくとも40、50、60、70、80、90または95%が巨視的骨格の形成後1、2、4、6週間以上、生存性を示す。別の好ましい実施形態においては、細胞の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または90%が巨視的骨格の形成後1日または1週間、生存性を示す。

#### 【0048】

一般的に、血管内皮細胞およびその前駆体、骨髓細胞、骨膜細胞、軟骨膜細胞、線維芽

50

細胞、骨格筋芽細胞または筋細胞、ニューロン細胞、海馬細胞、表皮細胞、非血管内皮細胞または平滑筋、ケラチノサイト、基底細胞、棘状細胞、顆粒細胞、胚性幹細胞、肺細胞、免疫系の細胞、卵巣細胞、膵臓細胞、頸部細胞、肝細胞または包皮細胞細胞を含む何れの細胞型も本発明に従って培養および/またはカプセル化できる。細胞は胚性、胎児性または成体の幹細胞、例えば上記した細胞型のいずれかに分化できる、またはそれを誘導できる幹細胞を包含する。

【0049】

細胞の原料は、胎児または成熟生物、特に哺乳類または樹立された細胞系統を包含してよい。多くの樹立された細胞系統は当該分野で知られており、その多くが American Type Culture Collection から入手できる（これらの細胞系統を説明する参考文献も呈示している [www.atcc.org](http://www.atcc.org) の URL のウェブサイト参照）。細胞および細胞系統を考察する場合、「誘導された」という表現は細胞が特定の原料から得られたものであること、または、細胞がその原料から得られた細胞の子孫であることを指す。例えば、肝誘導細胞は肝臓から得られた細胞、または、そのような細胞の子孫または継代物である。「子孫」という用語を本明細書において使用する場合、それは細胞分裂による即時の産物のみならず、後の細胞分裂の産物、即ち特定の細胞の継代物も指すものとする。細胞系統から誘導された細胞はその細胞システムのメンバーであるか、または、その細胞システムのメンバーである細胞の子孫または継代物である。臓器、組織、個体、細胞系統等より誘導された細胞はそれが得られた後にインビトロで修飾してよい。そのような細胞はなおもとの原料より誘導されたものとみなされる。

細胞を単離する方法は当該分野で知られている。個体から採取された細胞は培地中での増殖期間を設けるか、設けることなく使用してよい。或は、細胞は安定な細胞系統として培地中で増殖させてある細胞を使用してよい。本発明の特定の実施形態においては、例えば特定の治療用途（後述参照）においては、細胞は自系であるが、本発明の別の実施形態においては細胞は同種異系または異種である。非自系の細胞を使用する場合は、細胞を種々の方法で処理した後に身体内に導入することにより被験体による免疫系の応答の可能性を低減するか、または、その範囲を低減する。このような処理は例えば PCT/US00/20129 に記載されているように細胞の表面上の抗原を修飾、マスキングまたは排除することを包含する。

本発明の特定の実施形態においては、細胞を被験体、例えば患者から採取し、そしてクローン細胞系統をこれらの細胞の1つ以上から誘導する。クローン系統は限界希釈によるプレーティングまたは単細胞ソーティングにより得てよい。クローン細胞系統を得るための方法は当該分野でよく知られており、例えば Puck、T. T. および Marcus, P. I., J. (1956) *Experimental Medicine* 103, 653; Nias, A. H. W. and Lajtha, L. G. (1965) 「Clone size distribution in the study of inhomogeneity of growth rates in tissue culture」, *Cell Culture*, C. V. Ramakrishnan, ed. (Dr. W. Junk Publishers, Netherlands) および Leong, P. - M., Thilly, W. G., and Morgenthaler, S. (1985) 「Variance estimation in single-cell mutation assays: comparison to experimental Observation in human lymphoblasts at 4 gene loci」, *Mutat. Res.*, Jun - Jul; 150 (1 - 2): 403 - 10 に記載されている。細胞系統から得た細胞を本発明の実施において使用する。特定の患者の治療を意図する場合は、マッチしたドナーから得た細胞を好都合に使用してよい。個体から単離され細胞系統として維持されている細胞は本発明の実施において使用する前に標準的な細胞培養手法を含む何れかの適切な手法に従って培養してよい。

細胞を遺伝子的に改変した後に本発明において使用することが望ましい場合がある。外因性の遺伝子物質を細胞に導入するための多くの方法が当該分野で知られている（例えば

10

20

30

40

50

PCT/US00/20129参照)。このような方法は典型的には、核酸分子(例えばDNA)のような遺伝子物質を細胞内に導入することを包含し、ここでその核酸分子は細胞により発現されるべき産物をコードするものである。産物は例えば成長因子、他の遺伝子産物の発現を誘導する転写因子等のようなリプログラミング剤であることができる。本発明の特定の実施形態においては、細胞に選択可能なマーカーを導入することが望ましい。本発明の特定の実施形態においては、選択可能なマーカー(例えば薬剤耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子)または検出可能なマーカー(例えばGFP)をコードする遺伝子を組織特異的プロモーターの制御下に導入することが望ましい。次に検出可能なマーカーは、細胞またはその子孫がその組織に特徴的な特定の細胞の直系の経路に沿って分化、脱分化または相互分化したかどうかを調べる手段として使用してよい。マーカーはまた、免疫学的方法、FACS等、または当該分野でよく知られた別の方法を用いて、特定の経路に沿って分化、脱分化または相互分化した細胞を単離する手段として使用してよい。多くの選択可能および検出可能なマーカーが当該分野で知られている。さらに組織特異的、臓器特異的および直系特異的なプロモーターが知られている。遺伝子は当該分野で多くが知られている構成または誘導プロモーターの何れかの制御下に導入してよい。

#### 【0050】

細胞を培養または細胞をカプセル化している骨格は細胞の表現型に影響する種々の環境条件に付してよい。例えば骨格はECM成分の改変された合成をもたらす種々の明確化された、または予め設定された機械的な応力、例えば剪断応力、圧縮方法等に付してよい。例えばインビトロで培養された細胞によるタンパク質の分泌は流動、例えば脈流により改変することができる。ネイティブの関節軟骨内、および、組織工学コンストラクト内の細胞は複数の調節経路を経由して機械的刺激に応答する。このような刺激は改変された細胞内および細胞間のシグナリング、転写水準の改変、タンパク質翻訳、翻訳後修飾および細胞内および細胞外の巨大分子の合成をもたらす(Lee, et al., 2003)。

#### C. アミノ酸ドメインの付加による自己組織化ペプチドの修飾

本発明者等は自己組織化ペプチドが、前記したペプチド(表1で示されたような)が自己組織化する条件化(例えばイオン強度、ペプチド濃度、pH、温度)で単離された形態で存在する場合には自己組織化しないアミノ酸ドメインの付加により自己組織化ペプチドが修飾できるという予測できない柔軟性を発見した。さらにまた、本発明の好ましい実施形態においては、非自己組織化アミノ酸ドメインの付加は修飾されたペプチドが自己組織化して例えばナノ繊維、巨視的構造または両方の形成することを妨げない。好ましくは、修飾されたペプチドは自己組織化してナノ繊維よりなる巨視的構造を形成する。得られる構造は未修飾のペプチドの自己組織化から得られる構造よりも強度および/または安定性が小さいが、実施例に示すとおり目視による観察および/またはレオロジー実験によれば、ゲルの形成が起こることが確認される

即ち修飾されたペプチドを本明細書に記載した種々の目的のために使用してよい。本発明の目的のためには、上記したセクションに記載した構造的側面を有し、そのような特徴を欠いた部分を含まない自己組織化ペプチドは、未修飾の自己組織化ペプチドと称する。(未修飾の自己組織化ペプチドはペプチドへのアミノ酸の付加を包含しない上記した多くの方法のいずれかにおいて改変してよい。このように改変された自己組織化ペプチドは本明細書における用語の意味内では「修飾された」とは称さず、むしろ「改変された」または「誘導体化された」と称する。)本発明の修飾された自己組織化ペプチドは天然に存在する分子とは異なり、即ちそれらは天然には存在しないが、本発明のペプチドのアミノ酸ドメインの1つ以上は天然に存在する分子内に存在してよい。従ってこれらは「単離された」または「合成された」ものとみなされ、ペプチドの全体的配列が人間の介入無く天然に存在することはないことを意味する。

未修飾の自己組織化ペプチドを含むアミノ酸ドメインおよび未修飾の自己組織化ペプチドの構造的側面の1つ以上を欠いており、そのため未修飾の自己組織化ペプチドの自己組織化をもたらすような条件下で自己組織化してナノ繊維を形成したり、または巨視的構造を形成することのない第2のアミノ酸ドメインを包含するペプチドは、それが未修飾の自

己組織化ペプチドの自己組織化をもたらすような条件下で自己組織化（例えばナノ繊維、巨視的構造または好ましくは両方を形成）することが可能であれば、「修飾された自己組織化ペプチド」と称する。一般的に修飾された自己組織化ペプチドは第2のアミノ酸ドメインを含まないが同じ自己組織化部分を有する特定の未修飾の自己組織化ペプチドに相当することになる。本発明の特定の実施形態においては、修飾された自己組織化ペプチドの自己組織化が起こる条件は、相当する未修飾の自己組織化ペプチドが組み立てられる条件と同様である。本発明の別の実施形態においては、修飾された自己組織化ペプチドの自己組織化が起こる条件は相当する未修飾の自己組織化ペプチドが組み立てられる条件とは異なる。この場合、修飾された自己組織化ペプチドの自己組織化のための条件は異なる（非相当の）未修飾の自己組織化ペプチドが自己組織化する条件と同様である。

10

即ち本発明の修飾された自己組織化ペプチドは（a）自己組織化を媒介する第1のアミノ酸ドメイン、ここでドメインは、相補的であり構造的に適合性があり、そして自己組織化して巨視的構造となる交互する疎水性および親水性のアミノ酸を含むもの；および（b）単離された形態（即ち上記した未修飾の自己組織化ペプチドの組立をもたらす条件下において溶液中で唯一のペプチドとして存在する場合）で自己組織化しない第2のアミノ酸を含む。

#### 【0051】

好ましくは第2のアミノ酸ドメインはペプチドが組み立てられてナノ繊維および/または巨視的構造を形成するように第1のアミノ酸ドメインの組立を可能にする。本発明の好ましい実施形態においては、ペプチドはシートを形成する。

20

#### 【0052】

本発明の特定の実施形態においてはアミノ酸ドメインは少なくとも3アミノ酸、少なくとも4アミノ酸、少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸、少なくとも10アミノ酸以上、例えば15または16アミノ酸、20アミノ酸等である。本発明の特定の実施形態においては第一のアミノ酸ドメイン（自己組織化部位）は少なくとも3アミノ酸、少なくとも4アミノ酸、少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸、少なくとも10アミノ酸以上、例えば15または16アミノ酸、20アミノ酸等である。本発明の特定の実施形態においては第一のアミノ酸ドメイン（自己組織化部位）は少なくとも12から16アミノ酸である。本発明の特定の実施形態においては第2のアミノ酸ドメイン（非自己組織化部位）は少なくとも3アミノ酸、少なくとも4アミノ酸、少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸、少なくとも10アミノ酸以上、例えば15または16アミノ酸、20アミノ酸等である。しかしながら、本発明の特定の実施形態においては第2のアミノ酸ドメインの長さを20アミノ酸以下、18アミノ酸以下、16アミノ酸以下、12アミノ酸以下、10アミノ酸以下、8アミノ酸以下、6アミノ酸以下、4アミノ酸以下等に制限される。

30

ペプチドの自己組織化および非自己組織化部分のアミノ酸の特定の比率を維持することが望ましい場合がある。例えば本発明の特定の実施形態においては非自己組織化ドメインはペプチドのアミノ酸の総数の50%以下を構成することが望ましい場合がある。自己組織化部分は長さが12アミノ酸以上、例えば16アミノ酸以上であることが望ましい場合がある。特に非自己組織化ドメインが2つの自己組織化ドメインの間に存在する場合、非自己組織化ドメインにフランキングする自己組織化ドメインの各々は長さが8アミノ酸超、例えば12アミノ酸、16アミノ酸等であることが望ましい場合がある。

40

#### 【0053】

図1Aは代表的な自己組織化ペプチドRAD16-I（上）およびそのN末端において非自己組織化アミノ酸ドメインを含むように修飾されたペプチドRAD16-I（下）を示す分子モデルである。

図1Dは本発明による修飾された自己組織化ペプチドの可能な配置の種々のものを示している。ドメインAは自己組織化アミノ酸ドメインである。ドメインBは非自己組織化ア

50

ミノ酸ドメイン（修飾ドメイン）を示す。図に示す通り、修飾ドメインは自己組織化ドメインのNおよび/またはC末端に存在してよく、或は、2つの自己組織化ドメインの間に存在してよい。

#### 【0054】

アミノ酸ドメインはアミノ酸1つ以上または異なる分子実体であってよいリンカーまたは架橋を介して連結されてよい。リンカーは非自己組織化ドメイン（例えば後に記載する生物学的に活性なペプチドモチーフ）が巨視的構造の端部または表面から伸長できるようにしてよい。特に理論に制約されないが、これはペプチド構造の上または内部で培養された細胞との活性モチーフの相互作用を促進すると考えられる。グリシン（G）残基1つ以上、例えば1、2、3、4、5個等のグリシンよりなるリンカードメインを使用してよい。グリシンはそれが小型であり非極性の側鎖を有するため、自己組織化に対する実質的干渉の可能性を最小限にするために好ましい。アラニンおよび非極性側鎖を有する他のアミノ酸も使用できる。

10

#### 【0055】

実施例に記載した修飾されたペプチドは線状の鎖を与える伸長ペプチドの固相合成により作成されているが、修飾もふが側鎖にコンジュゲートまたは交差結合されるような変法も本発明に包含される。このようなコンジュゲーションまたは交差結合を行うための方法は当該分野でよく知られている。例えばシステイン残基（またはイオウ原子を含むように修飾された何れかのアミノ酸）を含有するペプチドをジスルフィド結合の形成によりイオウ原子を含有する第2のペプチドにカップリングすることができる。即ち、一般的に修飾された自己組織化ペプチドはペプチド結合により連結されたアミノ酸の単一の線状の重合体（好ましい構造）であってよく、または、アミノ酸の2つの重合体（各々がペプチド結合で連結されたアミノ酸の重合体）が共有結合的、または非共有結合的（例えばピオチン-アビジン相互作用による）に相互に連結されている分枝鎖の構造をとることもできる。

20

交差結合法の例は アミノ基および アミノ基を介して主にカップリングする基たるアルデヒド法、マレイミド-スルフィドリルカップリング化学（例えばマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）法）および過ヨウ素酸酸化法を包含する。さらに多くの交差結合剤が知られている。例示される交差結合剤は例えばカルボジイミド、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸（NHS-ASA）、2塩酸ジメチルピメリミデート（DMP）、ジメチルズベリミデート（DMS）、3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート（DTBP）等を包含する。コンジュゲーション法および交差結合剤に関する別の情報は一般的にはAmerican Chemical Society, Columbus OH, PO Box 3337, Columbus, OH, 43210の雑誌Bioconjugate Chemistryを参照できる。またURLがwww.piercecent.comを有するウェブサイト入手可能であり、本来は1994~95のPierce Catalogにおいて公開された「Cross-Linking」, Pierce Chemical Technical Libraryおよびそこで引用される参考文献、およびWong SS, Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, CRC Press Publishers, Boca Raton, 1991も参照できる。

30

40

#### 【0056】

2官能性の交差結合剤は反応性の基2個を有し、これにより標的基2個を共有結合する手段を提供する。化学交差結合試薬中の反応性の基は典型的にはスクシンイミジル基、マレイミドおよびヨードアセトアミドを含む官能基のクラスに属する。ヘテロコンジュゲートを形成するための多くの一般的なスキームでは通常は2または3段階の反応手順による1つの生体分子上のアミン基の第2の生体分子上のチオール基への間接的カップリングを行う。チオールの高い反応性および大部分の生体分子中においてそれが比較的稀であることは、チオール基を化学交差結合の制御のための良好な標的としている。何れの分子もチオール基を含有しない場合は、数種のチオール化方法の1つを用いて1つ以上を導入できる。次にチオール含有の生体分子をヘテロ2官能性交差結合剤、例えばスクシンイミジル

50

エステルおよびマレイミドまたはヨードアセトアミドの何れかの両方を含有する試薬を用いてアミン含有生体分子と反応させてよい。アミン-カルボン酸およびチオール-カルボン酸の交差結合も使用してよい。例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)を生体分子と反応させることにより通常は分子内またはタンパク質複合体のサブユニットの間に「ゼロ長」の交差結合を形成することができる。この化学操作においては交差結合剤は最終生成物中に取り込まれない。

#### 【0057】

数種の方法がチオールを生体分子に導入するために使用でき、例えば内在性のジスルフィドの還元並びにアミン、アルデヒドまたはカルボン酸の基のチオール基への変換が挙げられる。タンパク質中のシステインのジスルフィド交差結合はジチオスレイトール(DTT)、トリス-(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)またはトリス-(2-シアノエチル)ホスフィンにより還元してシステイン残基とすることができる。アミンはスクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)との反応、次いでDTTまたはTCEPを用いた3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルコンジュゲートの還元により間接的にチオール化することができる。アミンはスクシニミジルアセチルチオアセテートとの反応、次いで50mMヒドロキシルアミンまたはヒドラジンをを用いてほぼ中性のpHにおいてアセチル基を除去することにより間接的にチオール化できる。チオール非含有タンパク質内のトリプトファン残基は酸化してメルカプトトリプトファンとし、次にこれをヨードアセトアミドまたはマレイミドにより修飾することができる。

#### D. ペプチド混合物

本発明は種々の比において本発明の修飾された自己組織化ペプチド1つ以上に未修飾の自己組織化ペプチド1つ以上を混合することができること、および、未修飾および修飾された自己組織化ペプチドの両方を含む巨視的構造がこのような混合物から形成できることの認識を包含している。得られる構造は均質な自己組織化ペプチド(即ち100%単一のペプチド)の自己組織化により形成される構造と比較して特定の好都合な側面を有している。例えば上記したとおり、修飾された自己組織化ペプチドは相当する未修飾のペプチドから形成される構造よりも弱い巨視的構造をもたらす場合があり、即ち、それらはゲル性の低い特徴を有する場合がある。

#### 【0058】

しかしながら、修飾されたペプチドは所望の細胞表現型を誘導してよく、所望に応じて細胞の挙動を改変してよく、ECM分子の結合を所望に応じて改変するなどしてよい。未修飾および修飾された自己組織化ペプチドの複合物(ブレンド物とも称する)から形成される巨視的構造は未修飾のペプチドの自己組織化により形成された巨視的構造のものに似た機械的特性を有する場合があるが、細胞の挙動、表現方等に所望の態様で影響する能力を保有している。

#### 【0059】

一般的に、形成すべき巨視的骨格の所望の性質に応じて、広範な種類の未修飾ペプチドの修飾ペプチドに対する比を使用することができる。例えば未修飾ペプチドの修飾すべきペプチドに対する比は100:1、50:1、25:1、10:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:5、1:10、1:25、1:50、1:100等であることができる。これらの比は例示を目的として記載しており、限定を意図していない。実施例に記載する通り、9:1の比を多くのペプチドと共に試験した。ペプチドをモル基準または重量、ペプチド溶液の容基等を基準として混合することができる。ペプチドは乾燥形態で混合し、その後、混合ペプチド溶液を形成する

或は、各ペプチドを溶解し、そして得られた溶液を混合してもよい。本発明はまた種々の修飾された自己組織化ペプチドの所望の側面を組み合わせた巨視的構造が作成されるように未修飾の自己組織化ペプチドの添加を行うか行うことなく、複数の修飾された自己組織化ペプチドを混合することも包含する。種々の修飾された自己組織化ペプチドは、同じ天然に存在するタンパク質に由来するか、または、異なるタンパク質に由来する異なるアミノ酸ドメイン、または完全に人工のアミノ酸ドメイン等を含有してよい。

本発明の特定の実施形態においては修飾された自己組織化ペプチドは相当する未修飾ペプチドの組立をもたらすような条件下において溶液中の唯一のペプチドとして存在する場合には自己組織化しないが、未修飾の自己組織化ペプチドと組み合わせて存在する場合にはそのようなペプチドと共に自己組織化する。自己組織化により未修飾ペプチドと修飾ペプチドの両方の混合物、例えば主に未修飾のペプチドを含有する、好ましくは巨視的構造を形成するナノ繊維よりなる組成物が得られる。或は、組成物は何れの修飾ペプチドも含有しない一部のナノ繊維を含有するが、他のナノ繊維はそのようなペプチドを含有してよい。

#### 【0060】

##### E. 機能化モチーフ

一般的に広範な種類の異なるアミノ酸ドメインの何れも未修飾の自己組織化ペプチドに付加してよいが、ただし、追加されたドメインの存在が自己組織化（ナノ繊維、巨視的構造、または好ましくは両方の形成）を妨げてはならない。追加のドメインは得られるペプチドに対して多くの望ましい特性の何れかを付与してよい。例えば追加のドメインは生物学的な活性を媒介してよく、例えばペプチドの自己組織化により形成される骨格に接触した細胞の挙動に影響してよい。追加のドメインは天然に存在するまたは人工の生体分子、例えばECMタンパク質、細胞表面の分子、抗体等のいずれかに結合してよい。追加のドメインは金属、イオン等のような無機の物質に結合してよい。追加ドメインの存在は、ペプチドの自己組織化により生成される巨視的構造の材料特性（例えば強度、弾性等）を、未修飾の自己組織化により生成される巨視的構造の特性と比較して、改変する場合がある。即ち、非自己組織化ドメインを含むように自己組織化ペプチドを修飾することにより、巨視的構造の材料特性をユーザーの必要性に応じて調節することができる。例えば、身体内に移植するためには、移植の部位および/または移植片が交換すべき組織（例えば骨、結合組織、軟組織、例えば筋肉、眼の組織、固形臓器組織等）に応じて、異なる材料特性を有する材料を使用することが望ましい場合がある。以下のセクションは未修飾の自己組織化ペプチドに付加することができる例示的アミノ酸ドメインおよびその選択方法の非限定的な説明である。

#### 【0061】

表2aは、様々なシステムにおいて生物学的な活性があると知られている、種々の最小の生物学的に活性のある配列の例を示した表である。これらの配列のどれでも、「非修飾」自己組織化ペプチドに2番目のアミノ酸ドメインとして取り込んだり、用いたりすることができる。特定の実施形態において、2番目のアミノ酸ドメインは少なくとも一つの最小の生物学的に活性のある配列から構成される。特定の実施形態において、2番目のアミノ酸ドメインは少なくとも2つの最小の生物学的に活性のある配列から構成される。これらのどのような配列であっても、またそれ以外の配列であっても、実際に修飾ペプチドを合成することで、例えばシート、ナノファイバーおよび/または巨視眼的な構造をとるといった自己組織化の能力は、非修飾ペプチドが自己組織するような条件化で実際にテスト可能であることを理解されたい。そのようなテストは後述され、日常的に実施されている実験以上のものを要求しない。特定の実施形態において、シート、ナノファイバーおよび/または巨視眼的な構造に自己組織化する修飾ペプチドが選択される。

#### 【0062】

表2aに加えて、様々な追加の最小の生物学的に活性のある配列を、非修飾自己組織化ペプチドを修飾するための生物学的に活性のある配列として用いることができる。そのような配列は、ECMの組成、細胞接着分子、細胞表面レセプター、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン等といった幅広い範囲の天然に存在するたんぱく質やペプチドから由来する。例えば、-RGD-は、フィブロネクチンに見出される原型的な細胞認識配列で、インテグリンによって認識され、細胞接着を介在する。

【表 2 a】

-PRGDSGYRGD-	-DGRGDSVAYG-	-ALKRQGRPLYGF-
-PFSSTKT-	-FLGFPT-	-KLTWQELYQLKYKGI-
-SKPPGTSS-	-STFTKSP-	-IKVAV-
-FHRIKA-	-IKLLI-	-RGD-
-REDV-	-LKKTETQ-	

10

## 【 0 0 6 3 】

本明細書に示されるように、発明者は前述の最小の生物学的に活性のある配列を取り込んだ様々な修飾ペプチド（表2a）を創り、細胞有りまたは無しで細胞培養、組織再生や治療用途に用いることのできる巨視的な構造に組織化できるか評価した。驚くべきことに、マトリックス形成を妨げることなく、広範囲な修飾が可能であるが示された。発明者は、これらの新しい材料が、マウス前駆骨芽細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト脂肪幹細胞(ADSC)、ヒト間葉系幹細胞(MSC)の単層形成の支持、増殖、機能を評価した。上記の数々の最小の生物学的に活性のある配列を加えることによって、新しい生物学的活性がペプチドに付与され、それは修飾ペプチドから作成されたマトリックスの元で培養された細胞の振る舞いの変化として証明された。

20

【表 2 b】

表 2b. 典型的な修飾自己組織化ペプチド		
No.	配列	説明
SEQ ID NO.1	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGPFSSTKT-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO.2	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFLGFPT-CONH <sub>2</sub>	MP-1 (骨髄精製物)
SEQ ID NO.3	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGALKRQGRTLYGF-CONH <sub>2</sub>	骨成長ペプチド
SEQ ID NO.4	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>	繰り返し RGD 結合配列
SEQ ID NO.5	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGDGRGDSVAYG-CONH <sub>2</sub>	細胞接着ドメイン(オステオポンチン)
SEQ ID NO.6	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFHRIKA-CONH <sub>2</sub>	ヘパリン結合ドメイン
SEQ ID NO.7	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDSG-CONH <sub>2</sub>	繰り返し RGD 結合配列
SEQ ID NO.8	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGRGDSCONH <sub>2</sub>	RGD 結合シーケンス2個のリンカーのグリシンを有する
SEQ ID NO.9	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGRGDSCONH <sub>2</sub>	RGD 結合シーケンス4個のリンカーのグリシンを有する
SEQ ID NO.10	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGREDV-CONH <sub>2</sub>	フィブロネクチン/血管内皮細胞接着
SEQ ID NO.11	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGKLTWQELYQLKYKGI-CONH <sub>2</sub>	VEGF 相同ペプチド/VEGF レセプターに結合
SEQ ID NO.12	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSKPPGTSS-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO.13	AcIEIKIEIKIGGPRGSYRGDS-CONH <sub>2</sub>	繰り返し RGD 結合配列
SEQ ID NO.14	AcIEIKIEIKIGPFSSTKT-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO.15	AcIEIKIEIKIGGSKPPGTS-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO.16	AcFKFQFKFQFKFQGPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>	繰り返し RGD 結合配列
SEQ ID NO.17	AcFKFQFKFQFKFQGGFHRIKA-CONH <sub>2</sub>	ヘパリン結合ドメイン
SEQ ID NO.18	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSTFTKSP-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO.19	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSIKVAVS-CONH <sub>2</sub>	ラミニン(110 kDa ラミニンレセプターたんぱく質)
SEQ ID NO.20	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSEIKLLIS-CONH <sub>2</sub>	ラミニン (a3b1 および細胞表面ヘパリン)

## 【 0 0 6 4 】

繰り返しRGD結合配列(-PRGDSGYRGD-, 配列番号4: PRGmx, 配列番号7: DSG): RGDは、特にインテグリンと一緒に働く、細胞接着のためのキー結合配列である。-PRGDS- と -YRGDS- は天然のたんぱく質で最も頻りに現れるRGDモチーフである。-RGD- 結合は、たんぱく質の立体構造に影響する(Kantlehner et al, Chembiochem (2000) 1: 107-114)。RGD結合配列を繰り返すことで細胞接着の可能性を増加させ、効果的な立体構造をとる可能性を増す。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 5 】

破骨細胞および骨芽細胞およびの為の、オステオポンチンモチーフ(-DGRGDSVAYG-, 配列番号5: DGRmx)。オステオポンチンは、種によって264-301のアミノ酸によりなり、骨で骨芽細胞および破骨細胞により生成およびリン酸化され、また象牙芽細胞のセメント質生成の際にも生成される。またウロポンチン、骨シアロプロテイン(BSPI), 2aR, 2B7, eta-1, 44Kd 骨フォスフォプロテイン、分泌型フォスフォプロテインとも呼ばれる (Kreis and Vale, (1999) Guide book to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins, 2<sup>nd</sup> Edition, Oxford University Press. Oxford, UK)。オステオポンチンは、細胞接着、遊走、生存、NF-kB 活性、NO合成、カルシウム結晶精製を制御している。このたんぱく質に重要ないくつかのモチーフが発見されている。

10

## 【 0 0 6 6 】

骨成長ペプチド(-ALKRQGRPLYGF-, 配列番号3: ALKmx): 骨成長ペプチド (OGP) (ALKRQGRPLYGFGG)は局所の骨髄損傷に対するシステムの骨新生反応のメカニズムのキーファクターである。インビボ(生体内)で投与された場合、OGPは骨生成と造血を刺激する。C-末端の5アミノ酸のペプチド OGP (10-14)はOGP様の活性を有する最小のアミノ酸配列である。当然OGPの生理的な活性型である。OGPのTyr (10), Phe (12), Gly (13), Gly (14)は、OGP (10-14) 活性の根本である(Greenberg et al., J Cell Biochem. (1997) 65: 359-67; Chen et al., J Med Chem. (2002) 45: 1624-1632)。したがって、OGPの全長およびOGPの活性型が、骨細胞のためのテラーメードマトリクスの機能モチーフとして用いられた。

20

## 【 0 0 6 7 】

ファージディスプレイ選択骨髄ペプチド (-PFSSTKT-, 配列番号1: PFSmx, -SKPPGTSS-; 配列番号12: SKP, -STFTKSP-, 配列番号18: STF): Beckerと仲間は、7アミノ酸長のファージディスプレイを用いて骨髄ホーミングアッセイを選択した。彼らは、K, P, F, S, S, T, Tを抱負に含むペプチドのファミリーを見出だした。これらのペプチドは幹細胞に結合し、インビボで85%が骨髄に維持された(Nowakowski et al., "Bone marrow homing heptapeptides bears homology to CD84," Preventive Oncology & Intervention Strategies (Conference); Paris, February 9th to 12th, 2002)。骨髄に維持され更に原始的な幹細胞に結合するようなペプチドの一つは、リンパ球の表面に発現しているCD84のN末端に相同である(Palou et al., Tissue Antigens (2000) 55 : 118-127)。

30

## 【 0 0 6 8 】

ミエロペプチド (MPs) (-FLGFPT-, 配列番号2: FLGmx): ヒトと多くの動物の骨髄細胞は、ミエロペプチド (MPs)といわれる生制御的メディエーターペプチドを生成している。その一つMP-1 (Phe-Leu-Gly- Phe-Pro-Thr)は合成され、その生物学的活性は包括的に研究されている。この6アミノ酸ペプチドは、強烈な免疫制御活性を有する(Petrov et al., Biopolymers (1997) 43 : 139-146)。このペプチドはロシアで様々な病気の治療のための臨床研究に使用された(Petrov et al., Ann N. Y. Acad Sci. (1993) 685:351- 361)。MPは健康人および白血病のドナーから得られた骨髄細胞と末梢血液細胞の分化に影響を与えた。ヒトHL-60白血病セルラインに最終分化を引き起こした。MPは免疫制御だけでなく、異なったシステムおよび臓器で複雑な相互作用に関わっている(Petrov et al., Biosci Rep. (1995) 15, 1-14)。MP-1は、シクロフォスファミド(Cy)-処置マウスの抗体生成の量を減少させたが、正常な動物の抗体生成に影響を与えなかった(Mikhailova et al., Regul Pept. (2003) 114: 183- 187)。

40

## 【 0 0 6 9 】

ヘパリン結合モチーフ配列(-FHRRIKA-, 配列番号6: FHR)。フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、コラーゲン、VEGF, FGFs, PDGF, HGF, TGF- $\beta$ 、BMPといった細胞接着たんぱく質の接着モチーフ配列に、ヘパリン結合モチーフ配列がある。多くの配列は、-XBBXB- と-XBBBXXB-, (Xは非荷電または疎水性のアミノ酸 (F, I, L, P, M, W, Y, V, A, C, Q等)、Bは正電荷のペプチド (R, H, K)を示す)というヘパリン結合コンセンサス配列を維持している。ヘパリン結合モチーフ配列は- RGD-モチーフと相乗的に働き、

50

骨芽細胞の石灰化を促進する(Rezania A et.al, Biotechnol. Prog. 1999, 15, 19-32)。自己組織化ペプチドマトリクスに修飾ペプチドの機能モチーフとしてヘパリン結合モチーフを用いることで、ヘパリンまたはヘパラン硫酸をマトリクスに取り込むことができる。ヘパリンまたはヘパラン硫酸をマトリクスに取り込んだ自己組織化ペプチドマトリクスは、ヘパリン結合増殖因子の制御徐放に用いることができる。

#### 【0070】

ラミニン細胞接着ドメイン(-IKVAV-, 配列番号20: SIK; -IKLLS-, 配列番号21: SEI) : ラミニンは基底膜の主要な構成要素で、幹細胞の維持に重要と考えられている。-IKVAV- (SEQ20に含まれる) とIKLLS (SEQ21に含まれる) は、ラミニンの細胞接着ドメインとして知られている。これらは、細胞生存の維持、アポトーシスの減少、カプセル化された細胞のインシュリンの分泌の抑制に有効である(Laney et al., Biomaterials (2007) 28: 3004-3011)。

10

#### 【0071】

ヒト血清フィブロネクチンのIII-CSドメイン(-REDV-, 配列番号10: REDmx)。ヒト血清フィブロネクチンのIII-CSドメイン(REDV)は、血管内皮細胞の接着と進展を支持するShin et al., Biomaterials (2003) 24:4353-4364; Welsh et al., Biomaterials (2000) 1: 23-30)。

#### 【0072】

チモシン 4 のアクチン結合部(-LKKTETQ-, 配列番号9: LKKmx) : チモシン 4 のアクチン結合部(-LKKTETQ-)は、血管内皮細胞の遊走、接着、脈管形成、動脈状環形成、血管新生を促進する(Huff et al., FASEB Journal (2003) 17:2103-2105)。

20

#### 【0073】

フィブロネクチン細胞接着ドメイン(-RGD-, 配列番号4: PRGmx; 配列番号5: DGRmx; 配列番号7: DSG; 配列番号8: 2G; 配列番号9: 4G) : 1つのArg-Gly Asp (RGD)配列が、フィブロネクチンの10番目のIII型繰り返しユニットに存在している。RGDはフィブロネクチンだけでなく、ラミニン、骨シアロプロテイン、オステオポンチン、ビトロネクチンといった細胞外マトリクスたんぱく質に存在する。RGD配列は細胞接着に重要である。RGDモチーフのポリマーやアルギン酸ゲルへの固定化は、インビトロとインビボ(生体内)で骨形成を促進する(Alsberg E et.al, J Dent Res 80:2025-2029.DJ (2001))。

#### 【0074】

30

##### F. 生物学的に活性なペプチドモチーフ

既に発見された自己組織化ペプチドを修飾するという試みは、細胞の基底膜により与えられる微小環境の重要な側面を再生する完全に合成の物質を生成したいという要望により部分的には惹起されている。細胞の基底膜はラミニン、コラーゲンおよびプロテオグリカンにより主に構成される三次元のネットワークである。基底膜は上皮細胞のシートおよびチューブに伏在し、そして筋肉細胞、脂肪細胞およびシュワン細胞のような種々の型の個々の細胞を包囲している。特定の位置(例えば肺、腎臓の糸球体)においては、基底膜は細胞のシートを分離し、フィルターとして機能する。電子顕微鏡可視化の下においては、基底膜は2つの異なる層、即ち基底膜上に静置した細胞の基底原形質膜に隣接する電子透過性の層、および、その下部の電子緻密層を含むように観察できる。基底膜はまたより下部の層を伏在する結合組織に結合させる第3の層を含む場合がある。

40

構造成分としての重要性、細胞の連結の支援、および、種々の細胞、組織および臓器を分離する障壁として機能することのほかに、細胞に対してそれと相互作用する指示的な微小環境を与え、その機能をモジュレートする。細胞の極性、代謝、分化および遊走は基底膜によりモジュレートされる細胞機能の特徴の一部である。さらに、基底膜の分子は原形質膜および細胞内分子の構造的組織化に寄与することができる。基底膜分子はまた相互に相互作用する。

細胞機能のモジュレーションにおけるECMの役割は、血管および心室が下部の筋肉層から内皮細胞を分離する基底膜の最上部に位置する内側の内皮細胞を含んでいる血管系の範囲において特に興味深いものである。基底膜は血管形成のような過程において重要な役

50

割を果たすと考えられており、そしてその一体性は適切な血管の機能を維持するために重要である。内皮細胞の層および/または伏在する基底膜の損傷または変化はアテローム性動脈硬化症のような種々の疾患の過程において中心的役割を果たしていると考えられる。

基底膜のタンパク質内に存在する短ペプチドは細胞の連結、増殖、分化および遊走を含む重要な生物学的機能の種々に関するものとして発見されている (Iwamoto et al., 1987, Kleiman et al., 1989, Koliakos et al., 1989, Skubitz et al., 1990, Tsilibary et al., 1990, Sakamoto et al., 1991)。身体内の異なる ECM 分子の間の結合または ECM 分子と非 ECM 分子との間の結合を媒介するペプチド配列もまた発見されている。以下のセクションはこのようなペプチドモチーフを含有および/または相互作用する種々の基底膜分子の特徴を説明するものであり、そして血管系、内皮細胞および内皮基底膜の該当する特徴をさらに詳述するものである。

#### (i) ラミニン - 1

ラミニンは、および鎖を含有するヘテロ 3 量体のタンパク質ファミリーを示す。ラミニンは主に基底膜に位置するが、間葉コンパートメントにも存在する。ラミニンは支質マトリックスおよび上皮、内皮、筋肉および神経細胞の間の物理的結合を創生する。現在まで、少なくとも 11 種のラミニンのアイソフォーム (、および鎖の種々の組み合わせ) が発見されている。これら全てに共通なものは、ヘテロ 3 量体の組み立てにおいて中心的役割を果たすコイルドコイルドメインである。ラミニン - 1 が胚盤胞期よりも前のマウスの発生において生産される最早期のラミニンであり、臓器形成の間の上皮組織に寄与している (Dziadek & Timpl, 1985; Klein et al., 1990)。ラミニン - 1 (Mr = 900,000) は 1、1 および 1 サブユニットから形成され、これらが組み立てられて十字架様の構造になる (Engel et al., 1981)。これはニドジェンと複合体を形成し、準六角形のパターンおよび 3 次元の構造を有するネットワークをもたらす。複合体の形成はカルシウム、温度および濃度の態様において起こる (Yurchenco & Cheng, 1993)。

#### 【0075】

ラミニン - 1 は体幅相互作用または異なるアイソフォームの間の双方を含む重要な相互作用多数に関与している。これはまた細胞膜受容体を介したタンパク質複合体と細胞膜の間に架橋を形成する細胞外マトリックスの他のタンパク質と相互作用するか、或は、数種のインテグリンおよび非インテグリンの受容体を介して細胞と直接相互作用する (Kreis & Vale, 1999)。ラミニン - 1 に帰属する重要な生物学的機能には、細胞接着、細胞遊走、細胞分化および増殖の促進、ニューライト派生の増強、細胞形状の調節、および、種々の細胞型の細胞極性の樹立が包含される (Martin & Timpl, 1987, Timpl, 1980, Beck et al., 1990; Engel, 1992)。

#### (H) コラーゲン I V

コラーゲン性のタンパク質はその主要機能としての構造的役割を有する細胞外マトリックスタンパク質のスーパーファミリーを構成している。全てのコラーゲンは三重螺旋のコンホメーションを有するドメインを有する。このようなドメインは各々が (Gly - X - Y)<sub>n</sub> の反復配列モチーフを含有する 3 サブユニット (鎖) から形成される。

#### 【0076】

コラーゲン I V は基底膜の主要コラーゲン性成分であり、ラミニン、ニドジェンおよびヘパルスルフェートプロテオグリカンを含む他の基底膜成分との相互作用が関与するネットワーク構造を形成する (Kreis & Vale, 1999)。コラーゲン分子は 2 1 (I V) 鎖および 1 2 (I V) 鎖よりなる。コラーゲン I V は直接の低親和性相互作用によりラミニンを介して間接的に (Yurchenco & O'Rear, 1994, Charonins et al., 1985)、または、ラミニンに堅固に結合する約 150 Kda の糖タンパク質であるニドジェンにより媒介される強力な結合により (Pauls

son et al., 1987, Poschl et al., 1996)、細胞と相互作用すると考えられており、コラーゲンIVに対する結合部位も有している(Timpl, 1996)。IV型コラーゲンはまたヘパリンおよびヘパランスルフェートプロテオグリカンとも結合する(Yurchenco & O'Rear, 1994, Tsilibary et al., 1988, Koliakos et al., 1989, Fujiwara et al., 1984)。

#### 【0077】

ニドジェン。ニドジェン(以前は文献中でエンタクチンと称せられていた)は56残基の1モジュール(LE)によりラミニン-1鎖に結合する1ポリペプチド鎖よりなる(Poschl et al., 1996)。ニドジェンはまた別のエピトープを介してIV型コラーゲンと相互作用し、基底膜においてラミニン-1とIV型コラーゲンの間のリンカー分子として機能すると考えられている。さらに、ニドジェンはインテグリン分子を介した細胞連結部位として機能するRGD配列を含有している(Timpl, 1989)。

10

#### (iv)プロテオグリカン

プロテオグリカンは細胞の表面を含む種々の位置、細胞内囊胞の内部に存在するタンパク質のセットであり、細胞外マトリックスに取り込まれる。それらは共通の翻訳後の修飾、多糖類の特殊な型、グリコサミノグリカンのファミリーの存在により定義されて分類される。プロテオグリカンは1~数100個のグリコサミノグリカン鎖を担持した小型または大型のポリペプチド鎖(10~400kDa)よりなることができるコアタンパク質を含む巨大分子の多様なセットである。プロテオグリカンは多くの知られた活性を有している。中でも、他の細胞外マトリックスタンパク質と結合することにより細胞-細胞および細胞-マトリックスの相互作用を調節することがわかっている。細胞外マトリックスの組立および構造を調節し、そして保存および放出のコンパートメントとしての細胞外マトリックス内に拡散性分子を固定化する(Kreis & Vale, 1999)。

20

別の基底膜成分。上記したタンパク質のほかに、多くの他のタンパク質が基底膜中に存在し、意味のある役割を果たしている。それらにはパーレカン、アグリリン、B-40/SPARC、フィブリリン-1、フィブリリン-2が含まれる(Timpl 1996, およびその参考文献)。これらに関連する多くのタンパク質も発見されている。

血管系およびECM。血管内皮細胞は全身循環と軟組織との間の界面を与え、そして炎症、凝固および脂血を含む重要な過程に関与している。血管内皮細胞もまたアテローム性動脈硬化症~糖尿病性腎症に渡る多様なセットの病的状態において役割を果たしている。既存の血管の伸長および/または既存の血管からの新血管の形成(血管形成)は組織の修復および再生並びに胚の発生において本質的な役割を果たしている。一般的に、これらの過程には栄養および酸素を供給し老廃物を細胞から除去する三次元の血管ネットワークの形成が含まれる。血管形成は過去20年に渡り集中的な研究の対象となっている(Carmeliet, 2000, Han & Liu, 1999)。

30

#### 【0078】

血管化された三次元の構造の生成は今日では組織工学における主要な課題の1つとなっている(Eiselt et al., 1998)。細胞はそれらが血液供給の~100~200μm内に位置する場合にのみ栄養の拡散により生存を維持できる(Colton, 1995)。栄養および酸素が拡散により送達できる皮膚のような薄膜構造を超えた組織工学用途における使用のための人工血管ネットワーク(Cassell et al., 2002)または軟骨のような非血管の組織を創生する方法を開発することが望ましい。

40

血管の一般的構造は、薄膜である細胞外マトリックスの基底膜により伏在する平滑筋細胞から分離された細胞の単層を形成するコブルストーン形態を有する平板化された内皮細胞の内張りを含む(図8)。内皮細胞は血小板の接着に反発する負の外部電荷を有し、アンチトロンピンIIIに結合するグリコサミノグリカン並びに内皮細胞の抗凝固および線溶活性を促進する組織プラスミノゲン活性化物質を生産する。殆どの他の基底膜に共通して、血管の基底膜は主にラミニン-1、IV型コラーゲン、ニドジェンおよびプロテオ

50

グリカンよりなる。内皮細胞の挙動は基底膜との相互作用により影響されることは十分明らかにされている (Tsilibary et al., 1988, Tashiro et al., 1989, Grant et al., 1989, Skubitz et al., 1990, Sakamoto et al., 1991, Kanemoto et al., 1990, Grant et al., 1990, Nomizu et al., 1997, Ponce et al., 1999, Malina et al., 1999)。

#### (v)ヘパリン

ヘパリンとヘパラン硫酸(HS)は、コンドロイチン硫酸、ダーマタン硫酸、ケラタン硫酸などの炭水化物を含む複雑な糖類のグループであるグリコサミノグリカンの一種である。HSは細胞表面および細胞外マトリクスに遍在している。ヘパリンとヘパラン硫酸(HS)は、ヘパリン結合成長因子、細胞外マトリクス因子、セレクチン、プロテアーゼインヒビター、脂質タンパク質リパーゼのような様々なたんぱく質と相互作用し、それによって細胞増殖、分化、接着、遊走、発生の際の形態制御などの様々な動的な細胞の振る舞いに影響している。

10

#### 【0079】

ヘパリンとヘパリン結合増殖因子(VEGF, FGF, PDGF, HGF, TGF-、BMP)の強い親和性を利用して、ヘパリンやHSを組み込んだバイオマテリアルによる増殖因子の制御された徐放が研究されている (Ishihara et.al, J Biomed Mater Res 64A: 551-559, 2003)。

#### (vi)増殖因子

増殖因子は、細胞増殖・分化・成熟を促進する天然のたんぱく質である。多くの増殖因子が知られている。繊維芽細胞増殖因子(酸性FGF(FGF1)、塩基性FGF(FGF2))、血管内皮増殖因子(VEGF)、骨形成たんぱく質(bone morphogenic protein)、形質転換成長因子(TGF-), 神経成長因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮細胞増殖因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)。増殖因子は、インビトロの細胞培養に用いられるだけでなく、治療用途にも用いられる。EGFとFGFは創傷治療に用いられている。VEGFとHGFは、虚血疾患において血管新生の促進のために用いられている。BMPは骨再生の加速のために用いられている。増殖因子が組織再生の領域で用いられているにも関わらず、インビボ(生体内)でいつも成功するわけではない。その理由は急激な拡散と、生物学的な活性をインビボ(生体内)で維持するための増殖因子の半減期が短いためである。増殖因子の制御徐放と保持の様々な手法が研究されている (Ishihara et.al, J Biomed Mater Res 64A: 551-559, 2003)。

20

30

#### 【0080】

増殖因子は、総電荷と例えば図20で示されるような局所電荷分布を持っているたんぱく質である。増殖因子は、局所的な疎水性の反応領域も有している。従って、それぞれの増殖因子は、異なった総電荷、異なった局所電荷分布、異なった疎水性の反応領域を有する異なったアミノ酸配列に対し、異なった親和性を有している。自己組織化配列または機能化配列でのアミノ酸配列の違いによって、特定の増殖因子に対する親和性は異なり、従って修飾された自己組織化ペプチドマトリクスを増殖因子の制御徐放と保持に用いることができる。

#### 【0081】

#### (vii)内皮細胞の機能

内皮細胞の単層は、特に非血栓形成性の表面を与えることによる血流の促進、代謝産物に対する透過性障壁および輸送界面となること、炎症応答をモジュレートすること、血管平滑筋および心筋の収縮性をモジュレートすること、および、血管の張力および止血を調節することを含む複数の機能を有している (Boeynaems & Pirroton, 1994, Cines et al., 1998)。

内皮細胞は継続的に自身の基底膜を生成、分泌およびリモデリングし、そしてまた血管の張力および止血に寄与する血管作用性のオータコイド(Greek autosome self and akos-remedyより)も合成する。酸化窒素(NO)は最も知られた血管拡張剤の1つである。生物学的な系においては、NOはもう1つの反応生成物L-

40

50

シトルリンがあれば酸化窒素シンターゼの作用によりL-アルギニンから合成される。別の強力な血管拡張剤および血小板凝集抑制剤はプロスタサイクリン(プロスタグランジンI<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>とも称する)である。PGI<sub>2</sub>はエイコサノイドのファミリーに属し、プロスタサイクリン合成酵素によりプロスタグランジンH<sub>2</sub>(PGH<sub>2</sub>)を介してアラキドン酸から形成される。21アミノ酸ペプチドであるエンドセリン-1(ET-1)は血管収縮を促進することがわかっている。これらの3物質は(そして恐らくは他のものも)共に血管張力調節物質として機能する。

健全な内皮の欠如は血栓のような主要な血管の病態に寄与することがわかっている。例えば平滑筋内皮細胞の単層の破壊はアテローム性動脈硬化症のプラーク中に存在する脂質および他の物質の付着により起こる場合があり、そして/またはアテローム性動脈硬化症の患部の発生に寄与している(Cines et al., 1998)。内皮細胞のコンフルエントの単層の存在は血栓耐性を改善する場合がある。これはまた擬似内膜過形成のような他の疾患を、例えば平滑筋の収縮および/または増殖に寄与する可能性がある生物活性因子を放出する血小板の接着を防止することにより、防止すると考えられる。さらにまた平滑筋内皮細胞単層を形成する能力は血管形成術、カテーテル挿入等のような侵襲性の処置の後の内皮の一体性を回復するために有用である。従って、かなりの作業が現在、インビトロおよびインビボの両方における内皮細胞形成の研究に向けられている。

多くの研究者等は血管形成における細胞外マトリックスの役割を研究している。このような研究の多くではマトリゲル、Engelbreth-Holm-Swarmマウス腫瘍から得られた基底膜誘導材料またはコラーゲンのような細胞外マトリックス誘導材料に対するECの挙動の観察を行っている(Grant et al., 1989, Davis et al., 2000, Bell et al., 2001, Davis et al., 2002)。管形成のような血管形成の過程は2Dおよび3Dのシステムの両方において研究されている(Davis et al., 2000, Bell et al., 2001, Davis et al., 2002)。数種の合成ペプチドとのECの相互作用(Grant et al., 1989, Grant et al., 1992, Ponce et al., 1999, Nomizu et al., 2001)も検討されている。

#### G. 生物学的活性に関する試験

本セクションは候補ペプチドが生物学的に活性なペプチドモチーフを含むかそれよりなることを調べるために使用できる種々の試験を説明する。以下に記載する試験は例示を目的とするのみであり、そして当業者は目的の細胞型および細胞の挙動に応じて、種々の別の試験および本明細書に記載した試験の変法を選択して使用できる。これらの試験のいずれにおいても、可溶性ペプチドを対照として使用できる。ある範囲のペプチド濃度(基板結合、修飾された自己組織化ペプチドの部分としての存在の両方、または可溶性形態)を使用してよい。

さらにまた、細胞の表現型、細胞の生存性または増殖、細胞の表現型および/または細胞の機能的状態または種々の細胞の挙動の種々の指標の何れかを評価および/またはモニタリングすることが望ましい場合がある。当該分野で知られている通り、細胞の生存性、増殖を評価するため、および、細胞の挙動および表現方の種々の特徴を評価するための多くの方法がある。一般的に何れかの適切な方法を使用して本明細書に記載した条件下に細胞を培養することの作用を検査および評価してよい。さらにまた、細胞/ヒドロゲル組立て物の全体的組成および特性に対する細胞の作用をモニタリングしてよい。タンパク質含有量、強度等の側面を調べることができる。

(i) 細胞の生存性および増殖。

#### 【0082】

細胞の生存性は生体染料排出(例えばトリパンブルー排出)を調べることにより評価してよい。細胞分裂は光学顕微鏡で観察してよく、そして有糸分裂像の存在により示される。分裂に伴う細胞数の増大もまた、例えば血球計を用いて計数することにより、観察してよい。細胞の丸型化のような形態学的変化もまた分裂に伴う。DNA合成は種々の物質、例えば放射標識ヌクレオチド(例えば<sup>3</sup>[H]チミジン)、プロモデオキシウリジン(B

10

20

30

40

50

r d U ) 等の DNA への取り込みを検出および / または測定することによりモニタリングしてよい。多くの他の試験も使用可能である。例えば M T S 試験によれば、M T S 試薬 ( テトラゾリウム塩 ) を生存細胞に適用した場合、それは 4 9 0 n m の発光を伴いながら着色化合物 ( ホルマザン ) に変換される。L I V E / D E A D T M 生存性 / 細胞毒性試験キット ( M o l e c u l a r P r o b e s , カタログ番号 L - 3 2 2 4 ) のようなキットが広範に使用されている。増殖細胞核抗原 ( P C N A ) のような細胞の増殖を示すタンパク質に結合する抗体を用いた免疫染色もまた使用できる。アポトーシスを評価するための方法は当該分野でよく知られており、目視による検査、T U N E L、および、m R N A またはアポトーシスに伴うタンパク質、例えばカスパーゼの測定が包含される。

(U) 細胞の連結。

10

### 【 0 0 8 3 】

ペプチドの細胞連結促進活性を測定するための好都合な方法は、ペプチドをビーズ ( 例えばセファロースビーズ ) にコンジュゲートし、そして、細胞を官能性付与されたビーズの存在下、可溶性ペプチド添加または無添加でインキュベートすることである。非官能性付与ビーズを対照として使用できる。インキュベーションの後、E D T A 含有溶液による処理のような種々の方法を用いて細胞を脱着させ、染色し、そして顕微鏡 F A C S 等で分析することができる ( 詳細は N o m i z u 2 0 0 1 参照 ) 。同様の方法を用いて修飾および / または未修飾の自己組織化ペプチドを含む骨格への細胞の連結を試験することができる。

20

### 【 0 0 8 4 】

(Ui) 細胞の形態特徴および展開

細胞の展開には細胞型により異なる多くの形態学的側面が関与している。例えば、ヒト包皮線維芽細胞は典型的には展開時には伸長された多角形の細胞の形状をとり ( H e r n a n d H u b b e l l , 1 9 9 8 ) 、そして組織化された F アクチン張線維ネットワークをディスプレイする ( 後述参照 ) 。細胞の形態特徴は光学顕微鏡で評価でき、そして修飾 v s 未修飾の骨格上および / または競合する可溶性ペプチドの存在下または非存在下に展開する細胞に特徴的な形態をとる細胞の数を調べることができる。

(iv) 細胞骨格の組織化

特定のペプチドは細胞の形状および遊走に影響する細胞骨格の組織化に作用する。細胞内部の F アクチン張線維の組織化はローダミンコンジュゲートファロイジン染色により調べることができる ( H e r n a n d H u b b e l l , 1 9 9 8 ) 。例えばペプチド骨格上に培養した細胞を 4 %ホルムアルデヒド溶液中に固定し、透過性とし ( 例えば P B S 中 0 . 1 % トリトン X - 1 0 0 ) 、ローダミンコンジュゲートファロイジンとともにインキュベートし、再度固定する。次にそれらを例えばエピ蛍光顕微鏡を用いて顕微鏡的に可視化することができる。

30

### 【 0 0 8 5 】

(v) 細胞の遊走

本発明の修飾された自己組織化ペプチドを含む骨格を包含する種々の基板の上またはこれを通る細胞の遊走を定量するための多くの試験法が使用可能である。例えば、遊走は細胞を基板上、例えば修飾された自己組織化ペプチドを含む骨格上で、障壁の存在下に培養するフェンススタイル試験を用いて評価できる。障壁の位置を記録する。次に障壁を除去し、細胞を所定時間維持する。所定時間内に障壁を通る細胞の数を細胞遊走の測定値とする。数値は基板により異なる細胞の増殖を考慮して補正する。上記した方法の変法においては、後に除去する障壁により容器の領域を分離することにより異なる表面 2 つ以上を含む基板を作成できる。種々の表面への示差的遊走を評価できる。遊走はまた、平滑筋細胞 ( M a n n 2 0 0 2 ) およびヒト微小血管内皮細胞 ( H M V E C ) ( S a g n e l l a 2 0 0 4 ) について記載されている通り放射状テフロン ( 登録商標 ) フェンス遊走試験を用いて定量することもできる。

40

(vi) 細胞の分化、脱分化および相互分化。

### 【 0 0 8 6 】

50

これらの特徴は形態特徴を含む多くのパラメーターに基づいて評価できる。細胞の分化、脱分化および相互分化はまたマーカーとして知られている特定のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの存在を検出および/または測定することによっても評価してよい。後者の方法は広範に使用されており、多くの異なる細胞型に特徴的な細胞マーカーが識別されている。mRNAおよび/またはタンパク質の発現は当該分野で知られた手法で検出してよい。例えばmRNAはノーザンブロット、cDNAまたはオリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析、RT-PCR等を用いて検出し、定量してよい。タンパク質の発現は免疫ブロットング分析、免疫蛍光分析、FACS分析、ELISA分析等を用いて検出し、定量してよい。このような免疫学的手法はタンパク質に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用してよい。

10

マーカーの種類は膨大であり、新しいマーカーが日常的に発見されている。例えばネスチンは神経上皮ニューロン前駆体幹細胞中で発現される中間フィラメントタンパク質であり、その発現はニューロンの成熟と共に低減される(Lendahl 1990)。ネスチンは未成熟ニューロンのマーカーと考えられ、そしてネスチン陽性細胞はニューロンまたはグリアのいずれかに分化できる。NeuNは有糸分裂後の細胞中で発現されるニューロン特異的マーカーである(Sarnat 1998)。グリアフィブリルアレイ酸性タンパク質(GFAP)は伝統的なグリア星状細胞マーカーである。ベータIIIチューリンは別のニューロン特異的タンパク質である。CYP450タンパク質の発現は肝細胞に特徴的である。

20

#### 【0087】

本発明の範囲において特に重要なものは、血管内皮細胞尾を識別するため、および、血管内皮細胞の機能的活性を評価するために使用してよい。フォンビルブランド因子は血管内皮細胞の広範に認識されたマーカーである。血管内皮細胞に関する他のマーカーはCD31、DC102、CD106およびイソレクチンB4を包含する(Williams KS, 1995; 「Microvascular endothelium from a dipose tissue」Endothelial Cell Cultyre. Roy Bicknell(ed). Cambridge University Press. 1996)。本発明の特定の実施形態においては、ペプチド骨格は望ましくは血管形成を促進する。血管形成のマーカーは血管形成関連成長因子VEGF、アンジオポエチン1および2、およびそれらの受容体Flt-1、Flk-1、Tie2を包含する(Ferrara, 2001; Gale and Yancopoulos, 1999)。これらのマーカーの種々のものに結合する蛍光染料に直接コンジュゲートされたモノクローナル抗体は例えばDako, Chemicon等から入手可能である。

30

機能的試験はまた細胞の表現型または状態を評価するためにも使用できる。例えば、細胞が特定の細胞型に特徴的な特定の分子の取り込み、生産または分泌を行える、または特定の細胞型に特徴的な酵素的反応を行える能力を評価できる。実施例に記載する通り、低密度リポタンパク質(LDL)およびNOの放出は内皮細胞に特徴的である。

#### 【0088】

##### (vii) ECM成分の生産

ECM成分の生産に対する種々の候補となる生物学的に活性なペプチドモチーフ、活性な生体分子、環境パラメーター、例えば機械的力の適用等の影響を評価すること、および/または、そのような成分の生産を経時的にモニタリングすることは特に有利である。このための種々の方法が使用できる。実施例3に記載する通り、ウエスタンブロット(または他の免疫学的方法)を用いてECMタンパク質の生産を定量できる。組織学的分析のためには、プロテオグリカン成分であるグリコサミノグリカン(GAG)のトルイジンブルー染色を標準的操作法に従って実施できる。コラーゲンの付着は知られた手法を用いて測定できる(Ioannidis et al., Cell Tissue Res. 297: 141-147, 1999; Domm et al., Orthopade 29: 91-99, 2000)。細胞外タンパク質の生産は[3H]-プロリンの培地への添加により測定できる。放射標識プロリンは細胞により取り込まれ、そして新しく合成されるタンバ

40

50

ク質中に取り込まれる。放射標識培地中で一定時間（例えば16～24時間）の後、遊離の $[^3\text{H}]$ -プロリンを洗浄により除去する。細胞外タンパク質は例えば約60で一夜プロテイナーゼK溶液中でインキュベートすることにより消化し、消化タンパク質中に存在する放射能をシンチレーション計数により定量する。プロテオグリカンの生産は $[^3\text{H}]$ -プロリンの代わりに $[^{35}\text{S}]$ -スルフェートを培地に添加する以外は同様に測定できる。GAGの総蓄積は結合したDMMB染料の量の蛍光分析に基づいて測定できる（Chandrasekhar et al., Analytical Biochemistry 161(1):103-108, 1987）。

【0089】

(viii) 神経系の試験

神経系の組織（例えば神経、グリア細胞）のインビトロの培養、神経系の組織の修復および再生のために有用な材料を開発することは大変興味深いことである。神経組織の機能の指標となる種々のパラメーターを測定できる。例えばニューライトの派生はペプチド骨格の表面上で培養した単離細胞、例えばPC12細胞の顕微鏡観察（および場合によりデジタル画像処理）により評価できる（Holmes, et al., 2000）。このような細胞もまたカプセル化できる。別の方法は、ニワトリのような動物から摘出した脊髄神経節をカプセル化し、種々の時点において神経節から伸長するニューライトの平均の長さを測定することである（Schense and Hubbell, 1999; Schense J C, Bloch J., Aebischer P., and Hubbell J A (2000) Nature Biotechnology, 18:415-419）。シナプス形成は例えばHolmes, 2000に記載の通り評価することができる。神経伝達物質および神経伝達物質の合成に関与することがわかっている酵素の生産は神経組織の機能的活性を評価する別の手段を与える。

(ix) 内皮細胞の新芽形成

大動脈輪をラットのような動物から単離し、一定期間ペプチド骨格上で培養して新芽形成させ、その後固定して顕微鏡検査する大動脈輪試験を用いて候補の生物学的に活性なペプチドが血管形成の重要な特徴である内皮細胞新芽形成を誘導する能力を定量することができる（Malinda, 1999）。

【0090】

(x) 内皮細胞管形成

ペプチド骨格の表面上または内部にカプセル化してECを培養した後の細胞の組織化およびキャピラリー様の構造の形成は種々の時点において、例えば播種後2時間、8時間、12時間、24時間、3日、1週間および2週間の時点で、WO2003096972に記載の通り相関長を測定することにより定量できる。ヘマトキシリンおよびエオシン染色、Massone 3色、並びにアクチンに関する免疫染色により内皮細胞のクラスターの形成、新芽形成、キャピラリー様構造の形成を目視で評価できるようになる。キャピラリー様構造中の管腔の存在は目視により、および三次元画像化システムを含む自動画像化システムを用いることにより評価することができる。管形成の評価方法は当該分野で知られている（例えばDavis et al., 2000, Bell et al., 2001, Davis et al., 2002）。

H. 目的のアミノ酸ドメインの発見

本発明のペプチドの非自己組織化部分として使用してよい別のアミノ酸ドメインを発見するための1つの方法は細胞との相互作用、特定の分子への結合等が考えられる天然に存在するタンパク質の配列から誘導した合成ペプチドを系統的にスクリーニングすることである。この方法は上記したとおり多くの生物学的に活性なペプチドを発見するために使用されている。一般的に、一緒になって配列の全部分または大部分を包含している、場合により重複しているペプチドのセットを、インビトロで合成する。次に細胞または潜在的な結合分子を個々のペプチドと接触させ、そして細胞の応答、結合の程度等を評価する。ペプチドは検出を容易にするために標識することができる。

一般的に、例えば上記した特定のタンパク質を含む何れかの天然に存在するタンパク質

10

20

30

40

50

の配列から得られるペプチドをスクリーニングすることができ、生物学的に活性なペプチドモチーフ Y I G S R (配列番号 33) および R Y V V L P R (配列番号 35) を含むラミニン - 1 および生物学的に活性なペプチドモチーフ T A G S C L R K F S T M (配列番号 37) を有する I V 型コラーゲンを例示できる。これらのタンパク質、関連するタンパク質、他の目的のタンパク質 (例えば他の E C M タンパク質)、タンパク質をコードする遺伝子等の完全な配列は、National Center for Biotechnology Information (URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) を有するウェブサイト参照) から入手可能なもののような公的データベースにおいて、例えば Entrez 検索エンジンを用いながら、当業者は容易に特定することができる。データベースは遺伝子またはタンパク質の名称により、ヌクレオチド配列 (例えば Gene Bank を検索することにより) またはタンパク質配列によるなどして検索できる。例えば I V 型コラーゲンをコードする遺伝子は「コラーゲン」の用語を用いて Gene データベースを検索することにより発見することができる。検索結果の代表的で非限定的な部分的セットを付録 A に示す。結果には目的の候補アミノ酸ドメインを選択するもとなるタンパク質配列へのリンクが含まれる (リンクは除去されている)。付録 B は配列番号 33、配列番号 35 および配列番号 37 の配列を用いてタンパク質配列のデータベースを検索することにより得られた検索結果の非限定的なセットを示し、これらの配列に含まれるタンパク質を識別するアクセッション番号も含まれる。同様であるが同一ではない配列を含むタンパク質が容易に発見できる。

10

上記したとおり、目的の他のタンパク質は別の E C M タンパク質、例えば別の基底膜タンパク質を含む。異なる細胞型に対して特に適するペプチド骨格は、細胞型が典型的に担持または包含される E C M 中に存在することがわかっているタンパク質をスクリーニングすることにより作成してよい。例えば異なる細胞型が共通して含まれる基底膜はラミニン、コラーゲン等の異なるアイソフォームを含有する場合がある。アミノ酸ドメインは目的の何れかの細胞型の細胞外環境に存在するタンパク質から選択できる。理論に制約されないが、これらのタンパク質はその細胞型の培養のため、および/または、その型の細胞を含有することがわかっているかその型の細胞を移植または誘引することが望まれる部位において身体内に導入するために好ましいものである。

20

即ち、本発明は目的の細胞型に対するペプチド骨格の形成のための自己組織化ペプチドを設計するための方法を提供し、これは、その細胞型の細胞外環境 (例えば細胞型が天然に担持または包含される E C M または基底膜中) に存在する天然に存在するタンパク質に存在するアミノ酸ドメインを発見すること、ペプチドが細胞上に対する生物学的作用を示すかどうか調べるためにこれをスクリーニングすること (ペプチド骨格内に存在するか上記した別の態様で細胞の環境中に存在する場合)、修飾された自己組織化ペプチドの第 2 のアミノ酸ドメインとしてアミノ酸ドメインを利用すること、および、修飾された自己組織化ペプチドを含む骨格が細胞の成育のために良好かどうか、改変された細胞の表面型をもたらすかどうか等を調べるためにこれを試験すること、を包含する。スクリーニング段階は省略することができ、即ち、候補ペプチドは、所望により、生物学的作用についてそれをまず試験することなく、修飾された自己組織化ペプチドの部分として直接取り込むことができる。

30

40

別の方法は、ファージディスプレイ、細胞表面ディスプレイまたはリボソームディスプレイのようなペプチドライブラリを使用するディスプレイ手法を用いることである (Sarikaya 2004 およびその参考文献を参照)。ファージディスプレイおよび細胞表面ディスプレイはファージまたは細胞の表面上に天然に存在するキメラタンパク質を使用する。キメラタンパク質は一般的には天然に存在するファージまたは細胞の表面のタンパク質の全てまたは部分、および、ファージまたは細胞により発現される核酸によりコードされるランダムなペプチド配列を含有する第 2 のドメインを含有する。核酸の部分は典型的には種々の分子生物学の手法のいずれかによりランダム化された後にファージまたは細胞 (またはその前駆体) の内部に導入されるか、後に突然変異により改変されることができ。自身の表面上にキメラタンパク質の異なるバージョンを各々が発現しているファ

50

ージまたは細胞のライブラリを標的（例えばリガンド（固定化されていてよい）または細胞の集団）に接触させる。接触段階の後、キメラタンパク質を発現する弱く結合した細胞またはファージを洗浄除去し、強力に結合しているものを残存させる。工程を反復することにより堅固に結合しているものをリッチ化する（バイオパニング）。指向性の進化を実施する種々の方法も用いることができる。

#### 【0091】

有用なアミノ酸ドメインを発見するための別の方法は、既知の生物学的に活性なペプチドモチーフ、結合ペプチド等に対し、例えばアミノ酸1つ以上の置換により、限定された数量の突然変異を行うことである。これは出発配列と比較した場合に進歩した特性を有するペプチドを発見させる。本発明は1、2または3アミノ酸残基により本明細書に記載した配列とは異なる配列を有するアミノ酸ドメインの使用を包含する。

10

#### 1. 自己組織化ペプチドおよびそれを含む組成物の特性化

本発明の未修飾の自己組織化ペプチドまたは修飾された自己組織化ペプチドまたはその組成物の何れかにより形成される構造（例えばナノ繊維、巨視的構造、ヒドロゲル）は種々の生物物理学および工学的な手法を用いて特性化してよい。適当な手法は目視検査、円偏光二色性（CD）、動的光散乱、フーリエ変換赤外スペクトル分析（FTIR）、レオロジー試験、例えば振動レオメーター観察、原子力顕微鏡観察（AFM）、走査電子顕微鏡観察（SEM）および透過型電子顕微鏡観察（TEM）を包含する。例えば生物物理学的方法を用いてペプチド骨格内の  $\beta$ -シートの二次構造の程度を測定してよい。さらに、フィラメントおよび孔径、繊維の直径、長さ、弾性および容量区分を走査および透過型電子顕微鏡観察の定量的画像分析を用いて測定してよい。

20

#### 【0092】

ペプチド骨格はまた膨潤の程度、骨格形成に対するpHおよびイオン濃度の影響、種々の条件下での水和の程度、および、引張強度を測定する数種の標準的な機械的試験手法を用いて検査してよい。弾性率のようなパラメーターを測定できる。これらの方法により当業者等は後に記載するペプチドに対する種々の修飾および付加のどれが本発明の方法における使用に適するかを判断できる。実施例1は未修飾のペプチド（RAD16-I）、RAD16-Iの種々の修飾ペプチド誘導体、および、RAD16-Iと種々の修飾ペプチド誘導体の複合物から形成した構造（即ちRAD16-Iおよび修飾ペプチドの両方が存在する溶液から形成した構造）を特性化するために使用した種々の方法を記載している。

30

#### 【0093】

例えば本明細書に記載したレオロジー試験を用いて定量的な態様でゲル形成を評価することに加えて、またはその代替として、より定量的な評価法、例えば単純な目視的検査を使用できる。ゲル形成の再現性のある評価法は、マイクロ遠沈管のような組成物を含有する容器の側面に材料を攪拌して摺上がらせることによりペーパーリップを用いて組成物をプロービングすることを包含する（Sperinde, J C and Griffith LG, *Macromolecules* (200), 33:5476-5480)。組成物はそれがペーパーリップを捕獲すればゲル化を起こしたとみなすことができる。それ以上のゲル化またはゲル状態の可逆性は、別のプロービングにより評価できる。それ以上のゲル化はより強固で低粘度の材料をもたらす。

40

#### 【0094】

##### (i) レオメトリー

レオロジー測定はペプチド骨格の粘弾性を試験するために実施できる。例えば試料を振動応力または振動歪に付す振動レオメトリーは、例えば周波数の範囲内で制御された歪において試料を剪断する制御された歪レオメーターを用いて実施できる。使用できる種々のレオメーターは市販されている。レオメトリーの原理およびゲルへのその適用は例えばClark, 1987およびKavanagh & Ross Murphy, 1998に記載されている。

#### 【0095】

50

一般的にそのような試験の出力は  $G^*$ 、即ち複合基準である。この複合基準は以下の通り定義される： $G^*=G'+iG''$  [eq. 1]  $G^*=G'+iG''$  [等式 1] 本等式中、 $G'$  は材料の弾性 / 固体特性を示す蓄積基準である。 $G''$  は材料の粘性 / 液体特性を示す損失基準である。

振動レオメトリーにおいて、粘稠な溶液の場合、複合基準の粘性成分、損失基準 ( $G''$ ) は典型的には振動周波数が低減するに従って、そして蓄積基準  $G'$  が低値であれば低下する。ゲルについては、 $G'$  および  $G''$  は振動周波数に対して比較的一定である。例えば本発明の好ましい実施形態においては、動的周波数掃引試験により測定した場合、直線領域の周波数範囲にわたっては  $dG'/dw$  および  $dG''/dw$  の桁数は 2 未満、より好ましくは 1 未満であり、ここで  $G'$  および  $G''$  はパスカル (Pa) で測定し、 $w$  は  $rad/s$  の周波数を示す。周波数の範囲は例えば  $0.1 \sim 1 rad/s$ 、 $1 \sim 10 rad/s$  等であることができる。本発明の別の好ましい実施形態においては、動的周波数掃引試験により測定した場合、直線領域の周波数範囲にわたっては  $dG'/dw$  および  $dG''/dw$  の桁数は 0.5 未満、0.2 未満、または 0.1 未満であり、ここで  $G'$  および  $G''$  は Pa で測定し、 $w$  は  $rad/s$  の周波数を示す。

ゲルの場合、 $G'$  は典型的にはゼロより高値である。本発明の好ましい実施形態においては、本発明の修飾された自己組織化ペプチドの自己組織化により形成された組成物の  $G'$  は  $0.5 Pa$  以上である。本発明の他の好ましい実施形態においては、本発明の修飾された自己組織化ペプチドの自己組織化により形成された組成物の  $G'$  は動的周波数掃引試験を用いて直線領域において測定した場合、 $1.0 Pa$  以上、 $5 Pa$  以上、 $10 Pa$  以上、 $10 \sim 100 Pa$  または  $100 Pa$  超である。直線領域は得具  $0.1 \sim 1 rad/s$ 、 $1 \sim 10 rad/s$ 、または  $10 \sim 100 rad/s$  であってよい。このような測定を行う場合、動的歪掃引をまず材料に対して実施することにより試験の直線的な粘弾性の領域を設定して動的周波数掃引試験のための固定された歪を選択してよい。この直線的な粘弾性の範囲は一般的には一定の基準  $G'$  および  $G''$  により定義される。この範囲内の歪を選択することは信頼性のある結果を得るために重要である (Schramm, 1994)。例えば実施例 1 で試験したペプチド骨格の場合は、選択された歪は  $0.01$  (無次元) であり、全ての試験に適用した。

上記した説明は本発明を限定する意図はなく、単にその特定の実施形態に関するものである。実際、ゲルは「溶液中の是非に関わらず交差結合の相互作用 (共有結合または非共有結合) を生じてネットワークを形成する何れかの物質」として定義されており、物質は低応力下において材料の変形の点においてある程度の弾性特性を保持していると理解される (Scaling Concepts in Polymer Physics, Pierre-Gilles de Gennes, Cornell University Press (1979))。ヒドロゲルの場合、ネットワークはかなりの量の水を保持している。

#### (H) 原子間力顕微鏡

原子間力顕微鏡観察 (AFM) は試料の表面および試料をスキャンするために使用される顕微鏡の鋭利な先端の相互作用を測定することによりナノメートルの尺度まで表面構造の分解を可能にする技術である。AFM は小さい一定の力を維持しながら試料表面を通過して可撓性のカンチレバーの末端上の鋭利な先端を走査することを包含する。走査の動作は試料に対してラストパターンで先端を走査する (または先端に対して試料を走査する) 圧電管スキャナにより実施する。先端 - 試料の相互作用は典型的にはスプリット光ダイオード検出器内のカンチレバーの背部にレーザーを反射させることによりモニタリングされる。光検出器の出力電圧の差を検出することによりカンチレバーの偏向または振動振幅の変化を測定できる。

最も一般的に使用されている操作様式は 2 種類、即ち接触モード AFM および Tapping Mode TMAFM であり、これは空気中または液体の環境において実施される。接触様式 AFM は先端と試料の間の反発力を測定することにより操作される (Binnig et al., 1986)。機器は先端に僅かに接触する。Tapping Mode

T M A F Mにおいては、画像は吸引力の測定から誘導され、先端は試料に接触しない。自身の共鳴振動数において振動し、走査の間に表面上を僅かに「タッピング」する。T a p p i n g M o d e T M A F Mは、軟質で壊れやすく接着性の表面において、接触モードのA F Mの欠点である損傷を与えることなく測定を可能にすることから、本発明のペプチド骨格におけるナノ繊維の形成を評価するために特に適している。

#### J. 治療用途

本発明の修飾された自己組織化ペプチドの自己組織化によるか、または、本明細書に記載した修飾または未就職の自己組織化ペプチドの組み合わせの自己組織化により作成されたペプチド構造は種々の組織の欠陥および疾患を治療するために使用してよい。ペプチドヒドロゲル構造は表面上に生育するか内部にカプセル化されている細胞の有無に関わらず、例えば手術により、または、何れか他の適当な処置を用いて身体内に移植してよい。他の経路、例えば経口、経皮、筋肉内、静脈内および皮下の経路を使用してよい。当業者は適切な送達手法を選択できる。

一般的に本発明の方法および組成物は組織の傷害または損傷が関与する何れかの状況において有用である。このような傷害は手術、外傷、腫瘍、変性疾患または他の疾患または状態の結果として生じる。必ずしもではないが、傷害は細胞の死を伴う。方法および組成物は組織の構造的および/または機能的な一体性を回復するため、すなわち傷害の前に存在していた機能的または構造的な状態に組織を回復させるために有用である。特定の傷害は組織の再生または修復を妨害する物理的障壁を与える場合がある。このような障壁は壊死、空洞化または瘢痕組織の形成の領域を含む。本発明の特定の実施形態においては、傷害の部位において本明細書に記載した材料を導入することは、傷害または障壁の部位に近接する位置から傷害または障壁の部位から隔たった位置までの細胞または組織の成育を可能にする。

本発明の特定の組成物および方法は臓器の疾患または変性の作用を緩解するため、臓器または他の身体構造への損傷を修復するため、または、臓器または他の身体構造を形成するために使用してよい。このような臓器または身体構造は、例えば、血管組織、脳、神経組織、食道、ファローピウス管、心臓、腸、胆嚢、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、前立腺、膀胱、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿道、尿管、子宮および皮膚を包含する。

一般的に種々の装置を用いて傷害の部位に骨格材料を導入してよい。シリンジを用いた送達は1つの好都合な手法である。ペプチドはまた手術部位においてカテーテルによるか直接導入することもできる。本発明の特定の実施形態においては、ペプチドが未組立であるか、最小限にしか組立てられていないペプチド溶液（即ちゲルを形成していない溶液）を身体内に導入する。本発明の別の実施形態においては骨格の形成はインビトロで可能であり、そして組立てられた骨格を身体内に導入する。

細胞をカプセル化したペプチド骨格は種々の治療目的のために使用してよい。未組立のペプチドおよび細胞をインビトロで混合し、次に、投与後に構造を自己組織化させ、細胞をインビボでカプセル化してよい。上記したとおり、本発明の特定の実施形態においては、投与した溶液は10、5、1.0または0.1 mM未満のイオン（例えばカチオン）を含有するか、実質的にイオン（例えばカチオン）含有であり、そして等浸透圧溶質の濃度は少なくとも5、150または300 mMである。1つの実施形態においては、等浸透圧溶質の濃度は以下の範囲、即ち、200~250 mM、250~270 mM、270~300 mM、300~400 mM、400~500 mM、500~600 mM、600~700 mM、700~800 mMまたは800~900 mMの1つに含まれる。適当な等浸透圧溶質は例えば炭水化物、例えばスクロースである。

#### 【0096】

上記した細胞型の何れかを使用してよい。即ち血管内皮細胞に加えて、或はその代替として、本発明の組成物は種々の他の細胞型および/またはそのような細胞型の前駆体を包含する。細胞は自系または非自系であってよい。それらは同種異系または非同種異系であってよい。それらはそれらが導入される被験体と同じ種に由来、または異なる種に由来し

10

20

30

40

50

てよい。それらは胎児性または成熟性であってよい。

本発明の種々の実施形態において、自己組織化の前または後に、別の物質1つ以上をペプチド骨格に添加する。物質は多くの目的、例えば後述するものの何れかに対応するものである。骨格を身体内に移植する場合、生育中の細胞の突起または組織はそれらがペプチド骨格に占有されている区域内に伸長または生育するに従って物質と接触する。本発明の特定の実施形態においては物質は例えば拡散により、またはそれが経時的に分解するのに従って骨格から放出されることにより、骨格から放出される。特定のペプチド配列および/またはペプチド濃度およびパラメーター、例えば交差結合度を選択することにより物質の分解および放出の所望の速度を得てよい。物質は移植の部位またはその近傍において細胞および組織と接触および/または血流中に進入してより遠位まで移動してよい。添加できる物質は、例えば、感染症を治療するか危険性を低下させるための抗生物質または抗カビ剤、腫瘍を治療するための化学療法剤等を包含する。即ち、巨視的構造の原料となったペプチド溶液は治療活性化化合物または化学誘引剤を含んでよい。このような化合物の例は、天然または合成の低分子；核酸分子、例えばRNA干渉(RNAi)を媒介する核酸分子(Dorsett and Tuschi 2004, およびその参考文献)、例えば短干渉RNA(sRNA)または短ヘアピンRNA(shRNA)、リボザイムまたはプラスミド；ペプチドまたはタンパク質、例えばインテグリンまたは細胞接着分子；タンパク質、例えば抗体等を包含する。

10

本発明の特定の実施形態においては、ペプチド溶液またはそれから形成された巨視的構造は分化、脱分化または相互分化を増強または誘発する薬剤、例えば成長因子、例えば欠陥内皮成長因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、アンジオポエチン1または2、表皮成長因子、神経成長因子、トランスフォーミング増殖因子-、トランスフォーミング増殖因子-、腫瘍壊死因子、血小板誘導成長因子、インスリン様成長因子、酸性線維芽細胞成長因子、塩基性線維芽細胞成長因子、肝細胞成長因子、脳誘導神経親和性因子、ケラチノサイト成長因子、骨形態形成タンパク質または軟骨誘導因子を取り込む。成長因子および/または治療薬または化学誘引物質の組み合わせも使用してよい。ペプチドホルモンも使用してよい。天然に存在するペプチドまたは修飾されたバージョン、例えば心房性ナトリウム利尿ペプチドのようなペプチドも使用してよい。

20

【0097】

巨視的構造は細胞周期への再進入を誘導する薬剤を取り込んでよい。このような薬剤は自己組織化の開始前にペプチド溶液に、または、電解質溶液に添加してよい。このような場合、薬剤の濃度は組立てられた構造内部では実質的に均質であると考えられる。本発明の特定の実施形態においては、薬剤は細胞の添加の前または後にペプチド構造を共にインキュベートする培地に添加する。培地への添加の後、薬剤の一部は例えば拡散を介してペプチド構造に進入する。この過程は勾配をもたらず。構造の異なる領域の上または内部の細胞は細胞の位置における薬剤の濃度に応じて薬剤への異なる応答を示す。分解を誘発すること、遮蔽すること、発現を低減すること、または、細胞との分子の相互作用をブロックすることによりより組織の再生または修復に対して抑制的である分子の作用に対抗して作用する物質もまた取り込んでよい。

30

成長因子は典型的には約1fg/ml~1mg/mlの間の濃度において使用される。多くの場合、成長因子は低ナノモル範囲、例えば1~10nMの濃度で使用される。本発明の特定の実施形態においては、成長因子は従来技術において典型的に使用されていない、または、正常な条件下ではインビボで典型的には観察されない濃度において使用される。例えば、成長因子は作用をもたらすために典型的に必要な濃度よりも、または、インビボで典型的に存在する濃度よりも、5倍高値、10倍高値、20倍高値、100倍高値等の濃度において使用してよい。特定の所望の作用に応じて、特定の薬剤、例えば成長因子の旨適濃度を決定するために滴定実験を実施することができる。因子は精製された形態で、または、血清のような複合的生物学的混合物の成分として添加してよい。

40

【0098】

上記したとおり、組織の修復および再生は成長因子、細胞接着分子、インテグリン等の

50

因子を供給することにより増強できる。このような分子（または他のもの）を提供するための1つの方法は傷害の部位における細胞の送達である。細胞は再生を促進するかそれ以外の態様で再生を可能にする環境の創生に寄与する分子を生産する。種々の先祖細胞も有用である。これらの細胞型の何れかを骨格内に取り込んでよい。さらにまた、これらの細胞型（または他のもの）のいずれかは例えば再生促進因子の生産を増大させるように遺伝子的に修飾させた後に骨格内に取り込むことができる。

【0099】

遺伝子療法の手法を用いて所望の産物をコードする遺伝子の発現を増大させてよい。遺伝子療法は目的の細胞への目的の分子の合成のための鋳型を含む核酸の送達を包含する。核酸（または例えば逆転写により核酸から誘導された核酸）を細胞のゲノム内に取り込ませるか、または、エピソームとして細胞内に永久的に残存させてよい。しかしながら、遺伝子療法はまた核酸が送達される細胞内に一体化または永久的に残存することのない核酸の送達も包含する。このような方法は目的の分子の一時的または一過性の合成を可能にする。

所望の分子の合成のための鋳型を含む核酸を提供するベクターまたはビヒクルをペプチド骨格に取り込ませ、これから、傷害の部位または近傍において細胞によりそれらを取り込ませてよい。好ましくは、核酸は目的の細胞内で発現されるべき遺伝子のコーディング配列を包含し、そしてまた、適切な発現シグナル、例えばプロモーター、ターミネーター等を含むことにより、適切な発現を確保する。本発明の特定の実施形態においては、遺伝子が特定の細胞型の細胞内でのみ発現されるように発現シグナルは細胞型特異的である。

一般的に、ウィルス性または非ウィルス性のベクターを使用してよい。本発明の特定の実施形態においては、ベクターはニューロンに感染できるウィルスベクターである。例えばヘルペスウィルス、アデノウィルス、アデノ関連ウィルス、レトロウィルスまたはレンチウィルスを使用してよい。細胞への鋳型の送達において未損傷のウィルスを使用することは回避することが好ましい。即ち、DNAベクターまたは線状DNA分子を送達することが好ましい。これらのベクターは必須ではないが長末端反復等のウィルス配列を含んでよい。トランスフェクションに有用な広範な種類の薬剤のいずれかを用いて細胞による核酸の取り込みを増強してよい。このような薬剤は広範なカチオン性重合体および修飾されたカチオン性重合体、脂質等を含む。細胞型特異的なターゲティングリガンド、例えば目的の細胞型の上で発現される分子に特異的に結合するリガンドまたは抗体を遺伝子療法送達剤に結合させることによりその薬剤が特定の細胞型のみを導入されるようにしてよい。一般的に核酸および何れかの適切な遺伝子療法送達剤（例えばカチオン性重合体）を本明細書に記載した方法のいずれかにおいて骨格内に取り込んでよい。

本発明の特定の実施形態においては、治療上望ましい遺伝子の修飾を行ってよい。例えば固体が特定の遺伝子において突然変異を保有している場合、遺伝子療法目的のために先祖細胞内に遺伝子の野生型コピーを導入することが望ましい場合がある。本発明の特定の実施形態においては、特定の受容体、例えば成長因子受容体をコードする遺伝子を導入することにより特定の分化、脱分化または相互分化の能力を付与または増強することが望ましい場合があり、これは成長因子に細胞を応答させることにより行う。

治療目的のために投与されるべき細胞の数、異なる表現型の細胞の相対的比率、および/またはペプチド構造中の細胞の濃度は治療すべき特定の状態または傷害に対して適宜変更することができる。

本発明の特定の実施形態においては、例えばペプチド構造の上または内部において増殖および/または分化している血管内皮細胞および/またはその先祖細胞は構造から除去または抽出される。除去または抽出は適当な手段、例えば吸引ピペットを用いた除去、骨格の機械的破壊、インビトロでの構造の酵素的分解等により達成してよい。本発明の特定の実施形態においては、選択された方法は細胞の約10%、細胞の10%~25%、細胞の25%~50%、細胞の50%~75%、または細胞の75%~100%の除去または抽出をもたらす。何れかの好都合な範囲をもたらす方法を選択してよい。選択された方法は

細胞を使用する目的、必要な細胞の数等に応じたものである。本発明の特定の実施形態においては、除去または抽出された細胞の生存性は細胞の約10%、細胞の10%~25%、細胞の25%~50%、細胞の50%~75%、または細胞の75%~100%である。何れかの好都合な範囲をもたらす方法を選択してよい。選択された方法は細胞を使用する目的、必要な細胞の数等に応じたものである。

抽出された細胞はさらにペプチドヒドロゲル構造の上または内部において、または何れかの他の培養容器中、インビトロで培養してよい。抽出された細胞は適切な経路、例えば静脈内、皮下、経口、経皮、筋肉内または外科的に被験体に投与してよい。投与された細胞は組織、臓器または身体構造、例えば血管組織の不全を有する組織、臓器または身体構造に補給するために使用してよい。投与された細胞はタンパク質、例えば個体が欠損している酵素を供給してよい。投与された細胞を遺伝子的に修飾し、遺伝子療法を送達する手段として使用してよい。

本発明の自己組織化ペプチドは、例えば血管形成術のような処置の後に、傷害の部位において血管の内皮の層の形成を促進するために使用してよい。それらはまた、内皮化を促進するために例えば血管移植片またはステントのような装置のためのコーティング物質として使用してよい。別の方法においては、ペプチドは人工血管のような人工の導管の内面上に層を形成する。内皮細胞は一定期間ペプチドの自己組織化により形成された層の上で培養する。細胞はECM成分を分泌する。次に細胞を除去すると、細胞により合成されたECM分子を含有する未損傷の基底膜層が残る。次に人工の導管を宿主内に移植する。別の方法においては、導管は内皮細胞を除去することなく宿主に委嘱する。

本発明の自己組織化修飾ペプチドおよびそれを含有する構造は例えば末梢神経系における軸索および神経の再生を促進するために神経ガイドとして、またはその内部において使用できる。

#### 【0100】

本発明の自己組織化ペプチドおよび構造は、骨の再生および修復を骨芽細胞の結晶化の活動の促進および前駆骨芽細胞の分化の促進によって加速するために、使用することができる。

#### 【0101】

##### K. キット

本発明は細胞を培養するため、および/または、被験体の身体内に導入できるペプチド骨格を形成するために使用してよいキットを提供する。キットは乾燥または凍結乾燥形態、溶液、または組立または部分的組立の状態を提供してよい本発明の自己組織化ペプチド1つ以上を含む。キットはさらに、以下の要素、即ち、細胞の集団、細胞または組織の培養基、所定量の成長因子、所定量のイオンまたはその塩、細胞培養用の自己組織化ペプチドの調製のための取扱説明書、ペプチドヒドロゲル構造の上または内部において細胞を培養するため(例えば細胞をカプセル化するため)の取扱説明書、被験体に自己組織化ペプチドを導入するための取扱説明書、細胞培養を実施する容器、ペプチドを溶解できる液体、シリンジ、ペプチドの自己組織化を開始するためのイオンまたはその塩、成長因子または分化因子の1つ以上、組織培養用の培地、細胞(例えば血管内皮細胞)、対照ペプチド等の1つ以上を含んでよい。別の要素も含んでよい。

#### 【0102】

##### III. 本発明の様々な実施形態の要約(i) 修飾自己組織化ペプチド

上に一般的に記載および考察したように、本発明は以下を含む修飾自己組織化ペプチドを提供する：

(a) 交互の疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸を含み、非修飾の状態、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を引き起こす第一のアミノ酸ドメインと、

(b) 単体では自己組織化せず、少なくとも一つの最小の生物学的に活性のある配列を含む第二のアミノ酸ドメイン。

#### 【0103】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、第一のアミノ酸ドメインが、アミノ酸配列：-RADA-；-IEIK-；or -FKFQ-の少なくとも2回含む。ある実施形態では、第一のアミノ酸ドメインが、表1の何れか一つを含む。他の実施形態では、第一のアミノ酸ドメインが、-RADARAD ARADARADA-（配列番号21）；-FKFQFKFQFKFQ-（配列番号51）；-IEIKIEIK-（配列番号52）；-KLDLKLKLDLKL-（配列番号53）.のアミノ酸配列の何れか一つを含む。

【0104】

ある実施形態では、第2のアミノ酸ドメインが少なくとも2つの最小の生物学的に活性のある配列を有する。別の実施形態では第2のアミノ酸ドメインが少なくとも3つの最小の生物学的に活性のある配列を有する。さらに別の実施形態では最小の生物学的に活性のある配列が、表2から選択される。ある実施形態では、少なくとも最小の生物学的に活性のある配列の一つが、-RGD-を有する。

10

【0105】

ある実施形態では、第2のアミノ酸ドメインが第一のアミノ酸ドメインのC末端と共有結合または非共有結合で接続されている。他の実施形態では、第2のアミノ酸ドメインが第一のアミノ酸ドメインのC末端と共有結合ペプチド結合により接続されている。さらに他の実施形態では、第2のアミノ酸ドメインが第一のアミノ酸ドメインのC末端とアミノ酸リンカー基により接続されている。

【0106】

ある実施形態では、第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が少なくとも2アミノ酸長(6.9オングストローム)である。他の実施形態では、第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が約2アミノ酸長(6.9オングストローム)である。他の実施形態では、第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が2アミノ酸長(6.9オングストローム)未満である。

20

【0107】

ある実施形態では、第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が少なくとも4アミノ酸長(13.8オングストローム)である。他の実施形態では、第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が約4アミノ酸長(13.8オングストローム)である。他の実施形態では、第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が4アミノ酸長(13.8オングストローム)未満である。

30

【0108】

ある実施形態では、第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が少なくとも8アミノ酸長(27.5オングストローム)である。他の実施形態では、第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が約8アミノ酸長(27.5オングストローム)である。他の実施形態では、第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が8アミノ酸長(27.5オングストローム)未満である。

40

【0109】

ある実施形態では、第2のアミノ酸ドメインが少なくとも単体で生物学的に活性を有する

ある実施形態では、第2のアミノ酸ドメインが、細胞接着たんぱく質のヘパリン結合ドメイン由来である。ある実施形態では、細胞接着たんぱく質が、フィブロネクチン、ピトロネクチン、ラミニン、コラーゲン、VEGF、FGFs、PDGF、HGF、TGF-、BMPのグループ

50

から選ばれている、

他の実施形態では、ヘパリン結合ドメインが、式(Ⅰ)または(Ⅱ)で示される：(Ⅰ)-XBBXB-(Ⅱ)XBBBXXB-, Xは非荷電または疎水性のアミノ酸(F, I, L, P, M, W, Y, V, A, C, Q)、Bは正電荷のペプチド(R, H, K)から選択される

ある実施形態では、修飾自己組織化ペプチドは正または負の総電荷を有する。ある実施形態では、電荷は水溶液が約5-9のpHの範囲で現れる。他の実施形態では、自己組織化ペプチドが8以上の等電位点を有する。更に他の実施形態では、溶液のpHが約6-8の範囲である時に、自己組織化ペプチドの総電荷が約2以上である。

【0110】

ある実施形態では、第一のアミノ酸ドメインが近中性であるか、正電荷か負電荷を有する。ある実施形態では、その電荷が約5-9のpHの範囲で現れる。別の実施形態では、第一のアミノ酸ドメインが約6-8のpHの範囲で-1から1の間の電荷を持つ。更に他の実施形態では、第一のアミノ酸ドメインが5-9の範囲で等電位点を有する。

10

【0111】

ある実施形態では、第2のアミノ酸ドメインが正電荷か負電荷を有する。ある実施形態では、約5-9のpHの範囲でこの電荷が現れる。更に他の実施形態では、2のアミノ酸ドメインが約6-8のpHの範囲で-2かそれ以下の電荷を持つ。

【0112】

ある実施形態では、第2のアミノ酸ドメインが、単体では自己組織化しないが、ペプチドが巨視的な構造に集合するように、第一のアミノ酸ドメインの自己組織化を許可する。ある実施形態では、この巨視的な構造がナノファイバーおよび/またはシートを含む。

20

【0113】

ある実施形態では、ペプチドが溶液である時にそのペプチド単独で自己組織化する。ある実施形態では、溶液は水溶液である。

【0114】

更に他の実施形態では、溶液である時にそのペプチド単独では自己組織化しないが、非修飾の自己組織化ペプチドと一緒に溶液で自己組織化をする。

【0115】

更に他の実施形態では、下記を含む第3のアミノ酸ドメインを有する：(a) 交互の疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸を含み、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を引き起こす第一のアミノ酸ドメインと、(b) 単独では自己組織化しないが、第1のアミノ酸ドメインの集合により、巨視的な構造の形成を許可する第2のアミノ酸ドメイン。

30

【0116】

そのような修飾自己組織化ペプチド(第3のアミノ酸ドメインを有する)は、疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が交互に設けられたドメインからなり、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を介在する2つのアミノ酸ドメインの間に、生物学的に活性のある配列または生分子との相互作用のための標的箇所を含むアミノ酸ドメインの直鎖のペプチド鎖であってよい。

【0117】

ある実施形態では、修飾自己組織化ペプチドは表2のペプチドから選択される。

40

【0118】

ある実施形態では、修飾自己組織化ペプチドが、生物学的分子と、親和性を有するか、複合体を形成する、最小の生物学的に活性のある配列を有する。

【0119】

そのような生物学的分子は、たんぱく質やペプチド(ヘパリン、ヘパラン硫酸、増殖因子、等)、および/または細胞(骨芽細胞、軟骨細胞、骨髄細胞、骨細胞、骨膜細胞、軟骨膜細胞、繊維芽細胞、間葉細胞、間葉系幹細胞、脂肪由来細胞、脂肪由来幹細胞、神経細胞、海馬細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、角質細胞、基底細胞、棘突起細胞、顆粒細胞、胚性幹細胞、卵巣細胞、膵臓細胞、子宮頸部細胞、肝細胞、包皮細胞、好中球、リンパ

50

球、マクロファージ、樹状細胞またはそれらの前駆細胞のグループ)を含むが限定されない

(U) 医薬組成物

本発明は、本明細書に記載された、修飾自己組織化ペプチドを含む医薬組成物も提供する。

【0120】

本発明の修飾自己組織化ペプチド、および/またはこれを含む医薬組成物、および/またはこれを含むマトリクスは、体内に注入または外科的に移植することができる。ペプチド/医薬組成物/マトリクスは、径静脈、径筋肉、径動脈、径髄内、径髄腔内、経皮下、径脳室内といったの様々な経路で体内に注入することができる。特に意図された経路としては、径血液 および/またはリンパ液、および/または欠損部への直接の投与である。一般的に最適な投与の経路は、ペプチド/医薬組成物/マトリクスの性質(環境に対する安定性など)、欠損の位置、対象の状態(患者がそのような投与に耐えられるかなど)などの様々な要因に依存する。

10

【0121】

滅菌された注入可能な水または油の懸濁液は既知の適切な分散剤、湿潤剤、懸濁化剤を用いて処方される。滅菌された注入可能な準備は、1,3-ブタンジオールの溶液のような、無毒の希釈液や溶媒を用いた、滅菌された注入可能な溶液、懸濁液、エマルジョンである。そのような媒体や溶媒として、水、リンゲル液、U. S. P.、等張食塩水がある。この目的で合成のモノグリセリドやジグリセリドなどの組成の明確な油を用いることもできる。更にオレイン酸などの脂肪酸も注入剤の準備に用いることができる。

20

【0122】

注入可能な処方は、バクテリア除去フィルターによるろ過、滅菌水または他の滅菌溶液に溶解または分散できる滅菌剤の導入によって滅菌される。

【0123】

本発明の修飾自己組織化ペプチド、および/またはこれを含む医薬組成物、および/またはこれを含むマトリクスは、治療に効果的な量、重量、濃度で(注入または外科的な移植で)投与される。組成物は、投与に容易な単位で処方される。特定の患者あるいは臓器に対して、治療用途に効果的な量は、ペプチド/医薬組成物/マトリクスの性質および/または活性、対象の年齢、体重、健康状態、性、栄養状態、投与経路、ペプチド/医薬組成物/マトリクスの生分解率、治療の頻度、ペプチド/医薬組成物/マトリクスと一緒に用いられる追加の生物学的な活性のある薬剤などの様々なしかしこれらに限定されない要因に依存する。

30

【0124】

本発明の様々な医薬組成物の処方が意図される。例えば、ある実施形態では、医薬組成物は(注入のための)自己組織化ペプチド溶液である。ある実施形態では、医薬組成物は(注入または/かつ移植のための)修飾自己組織化ペプチドである。ある実施形態では、マトリクスはゲルかハイドロゲルである。

【0125】

ある実施形態では、本発明は、注入可能な修飾自己組織化ペプチド溶液を含む医薬組成物を提供する。ある実施形態では、組成物は、針または細いチューブでシリンジから欠損に導入される。ある実施形態では、組成物は、カテーテルによりシリンジから欠損に導入される(例えば径血管または内視鏡的送達)。ある実施形態では、医薬組成物は、ゲル化剤と、注入可能な修飾ペプチド溶液を注入の直前に混合するものを含む(例えば図36Aに、ペプチド溶液とゲル化剤がシリンジ/カテーテルの先端で、生体への注入直前に混合されるペプチド溶液とゲル化剤のシリンジ/カテーテルによる投与方法を示す)。

40

【0126】

ある実施形態では、本発明は、注入可能な修飾自己組織化ペプチド溶液を含む医薬組成物を提供する。ある実施形態では、組成物は、針または細いチューブでシリンジから欠損に導入される。ある実施形態では、組成物は、カテーテルによりシリンジから欠損に導入

50

される（例えば径血管または内視鏡的送達）。

【0127】

ある実施形態では、この医薬組成物はさらに一つ以上の増殖因子を有する。ある実施形態では、一つ以上の増殖因子が修飾自己組織化ペプチドに注入の前に事前混合される。ある実施形態では、事前混合された組成物が、滅菌されたシリンジや容器（保存瓶やバイアル等）に保存される。しかしながら、ある実施形態では、一つ以上の増殖因子とペプチド溶液は別に保存され、注入の直前に増殖因子溶液とペプチド溶液が混合される（例えば図36Aのような構成で）。

【0128】

ある実施形態では、この医薬組成物はさらに一つ以上の固体物（顆粒など）を有する。ある実施形態では、固体物が修飾自己組織化ペプチドに注入の前に事前混合される。ある実施形態では、事前混合された組成物が、滅菌されたシリンジや容器（保存瓶やバイアル等）に保存される。しかしながら、ある実施形態では、固体物とペプチド溶液は別に保存され、注入の直前に固体物とペプチド溶液が混合される（例えば図36Aのような構成で）。

10

【0129】

ある実施形態では、この医薬組成物はさらに生物学的分子（たんぱく質、ペプチドなど本明細書に記述の通り）を有する。ある実施形態では、生物学的分子が修飾自己組織化ペプチドに注入の前に事前混合される。ある実施形態では、生物学的分子は滅菌されたシリンジや容器（保存瓶やバイアル等）に保存される。しかしながら、ある実施形態では、生物学的分子とペプチド溶液は別に保存され、注入の直前に生物学的分子とペプチド溶液が混合される（例えば図36Aのような構成で）。

20

【0130】

ある実施形態では、この医薬組成物はさらに細胞を有する。ある実施形態では、細胞が修飾自己組織化ペプチドに注入の前に事前混合される。ある実施形態では、細胞は滅菌されたシリンジや容器（保存瓶やバイアル等）に保存される。しかしながら、ある実施形態では、細胞/細胞懸濁液とペプチド溶液は別に保存され、注入の直前に細胞/細胞懸濁液とペプチド溶液が混合される（例えば図36Bのような構成で）。

【0131】

ある実施形態では、この医薬組成物はさらに、疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が交互に設けられたドメインからなり、相補的で、構造的に適合し、シートに自己組織化し、巨視的な構造を取る、追加の自己組織化ペプチドを更に有し、追加された自己組織化ペプチドは細胞接着や細胞生存の適合性を低下させるようなアミノ酸を含まない、追加の非修飾自己組織化ペプチド（表1に示されるような）を有する。ある実施形態では、自己組織化ペプチドと追加の自己組織化ペプチドの比が約1:1、5:1、9:1、99:1である

30

ある実施形態では、保存されたペプチド溶液は酸性のpHである。ある実施形態では、保存されたペプチド溶液は投与前に近中性のpHに調整される。ある実施形態では、保存されたペプチド溶液は投与前に近中性のpHに調整され、滅菌されたシリンジや容器に保存される。ある実施形態では、pHは近中性のpHに調整液（例えばNaOHのような塩基性溶液）で調整される。

40

【0132】

ある実施形態では、医薬組成物が、ゲル化剤が実質的になく、生体内で自己組織化し、巨視的な構造（ナノファイバーおよび/またはシート）を形成する。ある実施形態では、そのような医薬組成物が、体液（血液、リンパ液など）との接触で自己組織化する。

【0133】

ある実施形態では、医薬組成物が、薬剤に受容される賦形剤を有する。典型的な薬剤に受容される賦形剤は、特定の投与および用量に適応した溶剤、分散溶媒、賦形剤、またはその他の液体、分散補助剤、懸濁補助剤、肥厚剤、乳化剤、保存剤、固体バインダー、潤滑剤など、を含む。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)に医薬組成

50

物を処方するための様々なキャリアと準備方法について開示されている。医薬組成物と相互作用し、任意の望ましくない生物学的効果を起こすような物質またはその誘導体以外の従来のキャリアを除いて、この使用は本発明の範囲である。

【0134】

ある実施形態では、薬剤に受容される賦形剤は、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、100%純粋である。ある実施形態では、賦形剤は、ヒトおよび動物で使用が認可されている。ある実施形態では、賦形剤はUnited States Food and Drug Administrationに認可されている。ある実施形態では、賦形剤は、米国薬局方 (USP)、ヨーロッパ薬局方 (EP)、イギリス薬局方、国際薬局方の基準を単体で / 組み合わせて満たす。

【0135】

本明細書で示した医薬組成物は、ヒトに投与するのに適した医薬組成物を指向しているが、熟練した専門家であれば、他の動物への投与へも一般的に適応させることができる。ヒトに投与するのに医薬組成物を他の動物への投与へ適応させる方法はよく理解されており、熟練した獣薬剤師であれば、そのような設計や変更を行なうことは通常である。

【0136】

(Hi) マトリクス

上述の通り、本発明は自己組織化ペプチドを含む本発明のマトリクスも提供する。ある実施形態では、マトリクスはゲルかハイドロゲルである。他の実施形態では、マトリクスが3次元である(例えば特定の形状を持つ)

ある実施形態では、マトリクスが更に追加の生物学的分子を有する。ある実施形態では、追加の生物学的分子が正または負の総電荷を有する。他の実施形態では、追加の生物学的分子がたんぱく質またはペプチドである。さらに他の実施形態では、追加の生物学的分子が成長因子か、自己組織化ペプチドである

ある実施形態では、追加の生物学的分子が、自己組織化ペプチドである。ある実施形態では、追加の生物学的分子が、修飾自己組織化ペプチド(表2aに示されたような)である。更に他の実施例では、追加の生物学的分子が、非修飾自己組織化ペプチド(表1に示されたような)である。

【0137】

ある実施形態では、追加の生物学的分子が増殖因子である。ある実施形態では、追加の生物学的分子がヘパリン結合増殖因子である。ある実施形態では、追加の生物学的分子が VEGF, FGFs, PDGF, HGF, TGF- $\alpha$ , BMPのグループの中から選択される。

【0138】

他の実施形態では、追加の生物学的分子がグリコサミノグリカンである。ある実施形態では、そのグリコサミノグリカンが、ヘパリンまたはヘパラン硫酸である。

【0139】

ある実施形態では、複数の細胞がマトリクスの表面に接着、またはマトリクス内部に封入されている。ある実施形態では、細胞が実質的に均質にマトリクス内部に分散している。ある実施形態では、細胞が、骨芽細胞、軟骨細胞、骨髄細胞、骨細胞、骨膜細胞、軟骨膜細胞、繊維芽細胞、間葉細胞、間葉系幹細胞、脂肪由来細胞、脂肪由来幹細胞、神経細胞、海馬細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、角質細胞、基底細胞、棘突起細胞、顆粒細胞、胚性幹細胞、卵巣細胞、膵臓細胞、子宮頸部細胞、肝細胞、包皮細胞、好中球、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞またはそれらの前駆細胞のグループから選択されている。

【0140】

ある実施形態では、マトリクスが更に固体物を含む。ある実施形態では、固体物が塩である。ある実施形態では、固体物が無機塩である。ある実施形態では、無機塩がカルシウムおよび / またはリン酸である。他の実施形態では、無機塩が、リン酸カルシウム、三リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイト、炭酸カルシウムのグループから選択される。

【0141】

ある実施形態では、固体物が、約100 - 500ミクロンの範囲の孔径を有する

他の実施形態では、固体物がブロック状、円柱状、板状、顆粒状である。

10

20

30

40

50

## 【0142】

## (iv) 本発明のマトリクスの製造法

本明細書で示されるとおり、本発明は本発明のマトリクスの製造法も提供する。例えば、ある実施形態では、(i)自己組織化ペプチドを水溶液に溶解する、(ii) pHを調整する工程を含むマトリクスの製造法を提供する。ある実施形態では、更に(iii)ゲル化剤を加える工程を含む。

## 【0143】

他の実施形態では、本発明は、(i)自己組織化ペプチドを水溶液に溶解すること、(ii)ゲル化剤を加えることを含むマトリクスの製造方法を提供する。ある態様においては、当該方法は、更に(iii) pHを調整することを含む。

10

## 【0144】

ある実施形態では、ゲル化剤が電解質である。ある実施形態では、ゲル化剤が食塩、食塩水、PBS、細胞培養液または生物学的流体（血液、リンパ液など）である。

## 【0145】

ある実施形態では、pHは酸性（pHが約2 - 3の範囲）から塩基性の間に調整されている。ある実施形態では、pHが約5 - 9の範囲に調整されている。ある実施形態では、pHが約6 - 8の範囲に調整されている。ある実施形態では、pHが約5 - 7の範囲に調整されている。ある実施形態では、pHが約6 - 8の範囲に調整されている。ある実施形態では、pHが約5 . 7 - 5 . 8の範囲に調整されている。

20

## 【0146】

## (v) 本発明の他の方法

本明細書中に記載されるように、本発明は、本発明の修飾自己組織化ペプチド、および/または自己組織化ペプチド、および/またはその医薬組成物、および/またはそれからなる骨および/または組織の欠損補填材として作られたマトリクスを用いた方法を提供する。「組織」は、何れかの外部または内部の体の組織を含む。組織には、脳、皮膚、肝臓、膵臓、胃、腎臓、消化器、食道、心臓、筋肉、結合組織、軟骨、神経、脂肪、骨髄が例示されるが、これに限定されるものではない。

## 【0147】

更に、本明細書中に記載されるように、本発明は、自己組織化ペプチド、あるいはその医薬組成物、あるいはそれから作られるマトリクスを投与することを含む、細胞の分化および機能的活性を増強する方法を提供する。

30

## 【0148】

更に、本明細書中に記載されるように、本発明は、自己組織化ペプチド、あるいはその医薬組成物、あるいはそれから作られるマトリクスを、対象の体の部位または体内の部位に導入することを含む、対象を治療する方法を提供する。ある実施形態では、特定の部位とは、部位整形領域である、骨欠損である、骨隣接部である、異所性の骨形成である、虚血領域である、心筋梗塞領域である、末梢血管領域であり、脳梗塞領域である、あるいは皮膚欠損である。

## 【0149】

## (vi) キット

本明細書中に記載されたように、本発明は、本発明の自己組織化ペプチド、その医薬組成物またはそれから作られるマトリクスを含むキットを提供する。キットは、通常適切な容器（フォイル、プラスチック、段ボール箱等）に提供される。ある実施形態では、本発明のキットは、本明細書に記載されて様な、一つかそれ以上の薬剤の賦形剤、薬剤の添加剤を含む。ある実施形態では、本発明のキットは、この本発明のマトリクス内に細胞を培養するために適切な投与を行なうための、目盛り付きのカップ、シリンジ、ニードル、洗浄補助具、などを含む。ある実施形態では、本発明のキットは、適切な投与や培養や、および/または適切な投与や培養のための準備の説明書を含む。

40

## 【0150】

例えば、ある実施形態において本発明は、(a)本発明の自己組織化ペプチド、またはそ

50

の医薬組成物、またはそれから作られるマトリクス、(b) ペプチドを巨視的な構造への自己組織化を開始するための説明書、(c) 細胞、組織培養培地、あらかじめ定まった量の増殖因子、定まった量のイオンまたは塩、自己組織化ペプチドを細胞培養に準備するための説明書、ペプチドハイドロゲルの上または中で細胞を培養する方法、自己組織化ペプチドを対象に導入する方法の説明書、細胞培養をするための容器、ペプチドを溶解する容器、注射器、ペプチドの自己組織化を始めるためのイオンや塩、一つまたはそれ以上の増殖因子または分化因子、を含む培養キットをを提供する。

【0151】

他の実施形態では、細胞を、本発明の自己組織化ペプチド、またはその医薬組成物、またはそれから作られるマトリクス、と接触させ、マトリクスを細胞培養に適した状態で、ある期間維持する、細胞培養方法を提供する。ある実施形態では、細胞が、マトリクスの表面上 および/またはマトリクス内に封入されて培養される。

10

【0152】

例証

下記の実施例は、発明を説明する目的であって、発明の範囲を限定する意図ではなく、また解釈されるべきではない。実際、本明細書中に記載したものに加えて、様々な改変やさらなる実施例が、実施例や引用された科学・特許文献を含むこの文書の全体から、この分野の専門家にとっては自明である。下記の実施例は、様々な実施形態および同等物においてこの発明の実施に適応できる、重要な追加情報、例証、手引きを含んでいる。

【0153】

20

実施例1 前駆骨芽細胞の増殖と分化への影響

近年高齢化のため、骨の老化および骨折は、患者のQOL(生活の質)および医療費の双方に重要な課題となっている。骨折は、主に骨粗鬆症に由来するが、同時に骨再生の低下によるものである。従って、バイオマテリアルの移植および組織工学的なアプローチによる骨再生の加速は興味をもたれている。また本骨芽細胞の石灰化の活動の促進および前駆骨芽細胞の分化の促進にも関心がもたれている。

【0154】

骨再生は表2に示される機能モチーフ(Synpep Corporation製)によって評価された。マウス前駆骨芽細胞 細胞ライン(MC3T3-E1)の増殖と分化への影響について、RAD16-1にモチーフを付加したものと、1型コラーゲンのハイドロゲルをコントロールとして比較された。増殖はDNA量の測定により、分化はアルカリフォスファターゼ(ALP)活性および分泌されたオステオカルチンの測定により評価された。アルカリフォスファターゼは骨分化の早期の分化マーカーとして知られている。分泌されたオステオカルチンは後期の骨分化マーカーとして知られ、骨石灰化と関係していることが知られている。

30

【0155】

図1は、Grant, G. A. ed.: Synthetic Peptides. A User's Guide, UWBC Biotechnical Resource Series (Burgess, R. R. Series Editor), Oxford University Press (1992) and Atherton, E. and Sheppard, R. C: Solid phase peptide synthesis A practical approach, IRL Press, Oxford (1989)に記載されたFmoc固層合成法によって合成された配列番号4のペプチドの質量分析のデータである。相対信号強度は、定量的ではないがピークに対応するペプチドの量に相関している(表3参照)。このデータはC-末端側に機能モチーフを設けることで、機能モチーフの配列を維持できることを示している。

40

【表 3】

分子量	相対信号強度	記述
2919.00	100	目的のペプチド(SEQ4) Ac-(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>
2762.76	15	N末端の "R" が無いペプチド Ac-ADA(RADA) <sub>3</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>
2349.58	8	N末端の "RADAR"が無いペプチド Ac-ADA(RADA) <sub>2</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>
2062.51	8	N末端の "RADARADA"が無いペプチド Ac-(RADA) <sub>2</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>
1460.93	28	目的のペプチド(SEQ4) (2重電荷信号) Ac-(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>

10

20

## 【0156】

典型的には、FmocやtBoc固層合成法といったペプチド合成法では、C-末端側から合成が開始される。ペプチド合成のほとんどの副産物は主に短いペプチドであり、これらが主な不純物の原因である。C-末端側に機能モチーフを設けることによって、自己組織化配列が短くなることはあっても、機能モチーフが短い材料は製造されない。自己組織化配列の1から数個のアミノ酸が欠けてもハイドロゲルとしての機能性には影響しない。それに対し、機能モチーフにおける1から数個のアミノ酸の欠損は、機能の欠損を引き起こす。従って、機能モチーフは、機能性を保証するためには、自己組織化配列に対し、C末端側に設ける必要がある。

## 【0157】

機能モチーフは、自己組織化配列の両側に設けることもできる。これにより、機能モチーフの濃度を増加させることができる。自己組織化配列の末端に設けられた機能モチーフは、同じアミノ酸配列（機能モチーフ）ものを設けることも、異なったアミノ酸配列（機能モチーフ）ものを設けることもできる。2つの異なったペプチドを合成するのにに対し、自己組織化配列の両側に異なった1つのペプチドを製造する方が安価である。

## 【0158】

1% RAD16 溶液 はRAD16-1(Puramatrix(TM), 3DM Inc./ BD Bioscience)として購入した。表2に示される機能化ペプチドは水に最終濃度が1% (w/v)となるように溶解された。機能化ペプチド溶液は1%PuraMatrix溶液と1:1で混合された(表4)。それぞれのペプチド溶液は組織培養用culture insert (10mm diameter, Millicell-CM, Millipore)に導入

され、静かに後述の維持培地を溶液の上に導入することによってハイドロゲル化された。ラット尾から抽出した1型コラーゲンゲル(BD Bioscience)が組織培養用culture insertに導入され、コントロールとされた。

30

40

【表 4】

表4 ハイドロゲルの構成物	
コード	ハイドロゲルの組成
RAD	1% RAD 16-1 ペプチド溶液
RAD2	RAD2 0.5% RAD16-1 ペプチド溶液
PFSmx	SEQ ID NO. 1 ペプチド溶液と 1 %RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
FLGmx	SEQ ID NO. 2 ペプチド溶液と 1 %RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
ALKmx	SEQ ID NO. 3 ペプチド溶液と 1%RAD 16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
PRGmx	SEQ ID NO. 4 ペプチド溶液と 1%RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
DGRmx	SEQ ID NO. 5 ペプチド溶液と 1 %RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
PRFmx	SEQ ID NO. 4 ペプチド溶液と 1% SEQ6 ペプチド溶液と 1 %RAD16-1 ペプチド溶液を1:1:2に混合したもの
COL	1型コラーゲンゲル

10

## 【 0 1 5 9 】

細胞培養と評価。MC3T3-E1はATCCより入手した。細胞は維持培地により維持培養された。維持培地として、 $\alpha$ -改変最小必須培地 ( $\alpha$ -MEM、Gibco)に10% ウシ血清 (FCS, gibco) と抗生物質 (penicillin/streptomycin) を添加したものをを使用した。培地は3日ごとに交換した。細胞は、 $2 \times 10^4$  個/wellの密度でハイドロゲル上に播種された。細胞はDay 0 から Day 2 まで維持培地で培養され、その後L-Ascorbic acid (Sigma) 50  $\mu$ g/ml と [beta]-glycerophosphate (Sigma) 10mM を添加した分化培地に変更された。培地は3日ごとに交換した。ゲル、細胞溶解液、培養培地が14日の培養後回収された。

20

## 【 0 1 6 0 】

細胞増殖は、PicoGreen dsDNA Kits (Molecular Probes). を用いてハイドロゲル中のDNA量から評価した。ALP活性はAlkaline Phosphatase Fluorescence Assay Kit (Sigma) を用いて定量的に計測した。Osteocalcinは細胞培養培地より、Mouse Osteocalcin EIA Kit (Biomedical Technologies Inc., MA) を利用して測定した。

30

## 【 0 1 6 1 】

細胞増殖の結果：DNA計量から算出された細胞数によって、機能化ペプチドをRAD16-1に有するものは、RAD16-1単体または1型コラーゲンに比較して細胞増殖を促進した (図 3)

アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性：機能化ペプチドのALP活性は、コントロール (RAD16-1単体、1型コラーゲン) に比較して同様又はそれ以上に高かった (図 4)。この結果は、アルカリフォスファターゼ染色 (図 5 A- 5 I) によって確認された。図 5 A- 5 I の暗い (青っぽい) 範囲が高いALP活性を示している。

## 【 0 1 6 2 】

培養培地中のオステオカルチン量：培養培地中のオステオカルチン量は、コントロールに比較して高い濃度であった (図 6)。これらの結果からは、機能モチーフを有する自己組織化ペプチドは、前駆骨芽細胞の分化を促進することを示している。機能化自己組織化ペプチドマトリクスは、骨芽細胞の増殖と分化を促進する潜在力を持っている。これらは、骨組織再生および骨代謝研究用のマトリクスとして有用であると考えられる。

40

## 【 0 1 6 3 】

PRGmx、DGRmx、PRFmx は-RGD- 接着モチーフを共通に持っている。これは、RGDモチーフが、増殖と分化を促進することを示している。-PRGDSGYRGDS モチーフを有するPRGmx とPRFmxは、他のペプチドに比較して、数倍以上高いオステオカルチン分泌を示している。一つの理由は、-DGRGDSVA YGに対して、RGDが細胞により良く提示されているからである。R

50

GDモチーフが自己組織化ファイバーに近いと、細胞表面とファイバーが干渉して、細胞のインテグリンがRGDに接続されない。

【 0 1 6 4 】

リンカーの長和の影響を機能化モチーフ (RGD) と自己組織化配列 (RADA) との間の距離を可変して評価した (表 5 - 7)。細胞はハイドロゲル上で7日間培養された。細胞増殖は、前述の実験と同様にハイドロゲル内のDNA量を測定して評価した。

【表 5】

No.	配列	記述
SEQ ID NO. 8	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGRGDSCONH <sub>2</sub>	2つのグリシンのリンカーを持つ RGD 結合配列
SEQ ID NO.9	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGRGDSCONH <sub>2</sub>	4つのグリシンのリンカーを持つ RGD 結合配列

10

【表 6】

No.	距離	
SEQ ID NO.8 (2G)	2 アミノ酸分 (ペプチド結合)	6.9 オングストローム
SEQ ID NO.9 (4G)	4 アミノ酸分 (ペプチド結合)	13.8 オングストローム A
SEQ ID NO.5 (DGRmx)	4 アミノ酸分 (ペプチド結合)	13.8 オングストローム A
SEQ ID NO.4 (PRGmx)	8 アミノ酸分 (ペプチド結合)	27.5 オングストローム A

20

30

【表 7】

コード	ハイドロゲルの組成
RAD	RAD 16-1 ペプチド溶液
RAD2	0.5% RAD16-1 ペプチド溶液
2G	1 % SEQ ID NO. 8 ペプチド溶液と 1 %RAD16-1 ペプチド溶液を 1:1に混合したもの
4G	1% SEQ ID NO. 9 ペプチド溶液と 1 %RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
PRGmx	1% SEQ ID NO. 4 ペプチド溶液と 1 %RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの

40

【 0 1 6 5 】

50

この結果を図7に示す。Y軸はDNA量と比例する蛍光強度を示している。これらの結果は、機能モチーフ(RGD)と自己組織化配列(RADA)の間の距離は少なくとも2アミノ基(6.9A)長以上ある必要があることを示している。4アミノ基(6.9A)長以上の距離がより望ましい。他の理由として、PRGDSGYRGDSGは複数のRGDモチーフを有しているため、3次元的な構造の中で細胞のインテグリンがRGDにモチーフにくっつく確率がより増していることがある。

【0166】

実施例2 機能化ペプチドの混合比の影響

自己組織化配列ペプチド(例 1%RAD16-1ペプチド溶液)と自己組織化配列(RADA)と機能化モチーフ(RGD)を有する機能化ペプチド(配列番号7)の混合比の影響を評価した(表8-9)。配列番号7は、N-末端に配列番号4と比較して疎水性を増すための追加のグリシンを持っている。配列番号4と配列番号7は同様の効果を持つと考えられる。

【表8】

表8		
No.	配列	記述
SEQ ID NO. 7	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDSG-CONH <sub>2</sub>	繰り返しRGD 接着配列

【表9】

表9 ハイドロゲルの構成	
コード	ハイドロゲルの構成
RAD	1% RAD16-1 ペプチド溶液
DSG	1% SEQ ID NO. 7 ペプチド溶液

【0167】

ハイドロゲルは、RADとDSGの混合比が100:0から0:100に変わるように準備された(図8)。細胞はハイドロゲル上で7日間培養された。細胞増殖は、実施例1と同様にハイドロゲル内のDNA量を測定して評価された。

【0168】

結果を図8に示す。Y軸はDNA量と比例する蛍光強度を示している。これは混合によって、RAD:DSGが99:1から67:33の広い範囲にわたって細胞増殖が増加することを示している。DSG100%ハイドロゲルでの減少は、DSGはRADに比較して低い強度のゲルを生成するため、機械的な特性の違いから生じていると考えられる。

【0169】

図9は、異なった機能化ペプチドの濃度で培養された細胞の共焦点顕微鏡の3次元再構築像である。図9AはDSGの割合が10%、図9BはDSGの割合が70%を示す。図9Aでは、細胞はペプチドマトリクス表面に存在するのに対し、図9Bでは細胞が300μmの深さまでマトリクスに進展している。

【0170】

実施例3 荷電機能モチーフを用いた3次元培養

前述の自己組織化ペプチドハイドロゲルは、細胞に対し、コラーゲンと同様の3次元的な生育のための人工的な細胞外マトリクス環境(ECM)を提供する。細胞を3次元的に播種する場合、粘性溶液の状態を維持するために、自己組織化ペプチド溶液は、低いpH(通常2-3)で保存する必要がある。しかし、生きている細胞を低いpH溶液に長い間混

合することは、細胞の生存に大きな影響を与える(多くのヒト細胞は pH2-3の環境では数分しか生きられない)。そこで、低いpHにある自己組織化ペプチド溶液と細胞を混合する場合、(1)細胞を播種したら、(2)直ちにpHを近中性(pH5-8)または塩基性にする。

【0171】

図10は、RAD 16-1 1%溶液に0.1 N NaOH溶液を加えた時の等電位図と対応するレオロジーデータを示す。pH 3.6の時に、粘性の液体がゲル化し、高いG' (硬さ), G'' (粘性)を示す。pHが増加すると、ゲルは粉々になり、ペプチドの沈殿を含む溶液になる。低いpHではペプチドはファイバーを形成して、ファイバーが溶液を粘性にする。pHが高くなり、等電位点に近づくとペプチドは電荷を失い、集合してゲルを構成する。同様のゲル形成が、塩を含んだ溶液(ゲル生成液や等張液)によりペプチドの電荷が隠蔽された場合にも起きる。一度ゲル形成すると、ファイバー構造が壊れると粉々になり、沈殿物を生じる。

10

【0172】

自己組織化ペプチドは、-RADA- や -KLDL-のように、[正電荷][疎水性][負電荷][疎水性]という繰り返し配列で構成され、等電位点は7(中性)に近く、細胞増殖を支持することで知られている。自己組織化ペプチドは、pHの観点では同様の振る舞いをする(例えば、pHが等電位点に近づくとペプチドファイバーの電荷を失い、ゲルを構成する)。例えば、-XBBXB- や -XBBBXXB-といったヘパリン結合コンセンサス配列は、両方とも高度に正電荷を帯びている。Xは電荷がないか疎水性、Bは正電荷のアミノ酸を示す。図11は、自己組織化ペプチドAC(RADA)4GGFHRR1KA-CONH2 (SEQ6) (表10)の構造を示す。黒は、正電荷のアミノ酸を示し、灰色は負電荷のアミノ酸を示す。

20

【表10】

表 10	
コード	ハイドロゲルの組成
FHR	SEQ ID NO. 6 ペプチド(Ac(RADA)4GGFHRR1KA CONH2) 溶液

【0173】

自己組織化配列にヘパリン結合モチーフを有する1% Ac(RADA)4GGFHRR1KA CONH2 (配列番号6) 溶液(コード: FHR)が比較された。図12は、FHR溶液にpH調整のため、0.1 N NaOH溶液を加えた時の等電位図と対応するレオロジーデータを示す。ペプチド分子の総電荷はpH<10では2より大きくなっている。pH 5.7まで溶液は粘液状態を維持する。このゲル化pHの移動、自己組織化ペプチドの追加モチーフにより導入された電荷によるものである。導入された電荷が、ペプチドが集合してゲル化するのを妨げている。従って、細胞とペプチド溶液をより中性に近いpHで混合することができる。完全な混合の後、塩を含んだ溶液(ゲル生成液や等張液)によりゲル化させることができる。

30

【0174】

ゲル化pHを中性域でのペプチド電荷の変更により行なうことは、重要である。なぜならば、もともとの自己組織化配列の自己組織化能と生物学的特性を失わずにできるからである。

40

【0175】

正電荷自己組織化ペプチドは、蒸留水に溶解できる。pHの調整(例えば、NaOHのような塩基性溶液を利用して)は、ペプチド溶液をゾル状態に維持できる(例えば、FHRペプチドではpH=5.7で)この場合、pHを安定化するための高濃度緩衝液の使用は避けるべきである。なぜならば緩衝塩の許容濃度以上の濃度は、ハイドロゲル生成を起こすからである(Caplan 2000, Caplan 2002a)。

【0176】

3次元培養の場合、塩分のない等張液に懸濁された細胞は、pH調整されたペプチド溶液と混合できる。塩を含んだ溶液(ゲル生成液や等張液)を加えることで、細胞を含んだハイ

50

ドロゲルを生成することができる。

【0177】

インビボ（生体内）での使用の場合、pH調整されたペプチド溶液は、細胞を含んだ溶液・懸濁液（例えば、幹細胞懸濁液、脂肪由来細胞懸濁液、骨髄細胞懸濁液）と混合することができる。ペプチド溶液は、細胞混合懸濁液や血液やリンパ液などの体液と接触することで、ハイドロゲルを生成できる。ペプチド溶液は、細胞懸濁液入りまたは無しで導入することができる。生体への導入時に、細胞は周辺の組織や血液から遊走されたり、また遊走したりする。

【0178】

3次元培養実験：実施例1に示されたのと同じプロトコルでMC3T3-E1細胞を得、播種した。細胞は遠心濃縮され、スクロース溶液(10%)に $4 \times 10^6$  cells/mlの濃度で混合された。FHRペプチドは水に溶解され1.0%溶液を得た。1% RAD 16-1 溶液は、RAD 16-1 (Puramatrix(TM), 3DM Inc./ BD Bioscience)として入手した。FHRペプチド溶液のpHはNaOH溶液により（例えば、細胞がより中性域で混合できるように）pH5.7に調整された。細胞溶液とペプチド溶液(FHR / RAD16-1)は、1:5で混合された。混合溶液はインサートに導入され、細胞培養培地がインサートに加えられ、ハイドロゲルを生成した。細胞は、維持培地（本文中に記載）で維持された。

【0179】

細胞の蛍光観察：14日の培養後、インサートはPBSにより洗浄され、Calcein AM 溶液(4 $\mu$ M, Invitrogen)により染色された。この染色液は480nmの光で励起した際に、生細胞を緑の蛍光で染色する。

【0180】

インサート内のRAD 16-1 と FHRハイドロゲルを共焦点顕微鏡で観察した。図13A-13Dは、蛍光像の3次元的再構築像を示す。明るい領域が細胞を示す。このデータは、FHRペプチドがRAD 16-1に比較して、より3次元的な細胞増殖を促進することを示している。図14-16A/Bに定量的な細胞増殖および分化への影響の測定結果を示す。分析手法は、ハイドロゲル生成に1%FHRペプチド溶液が用いられている以外実施例1と同じである。

【0181】

このペプチドマトリクスは、ペプチドファイバーが中性域で正に荷電しているため、3次元および2次元の細胞増殖を促進している。細胞は負に帯電しているため、細胞は正電荷のファイバーに吸着される。従って、このような影響はポリリジンのような他の正電荷の配列についても生じる可能性がある。

【0182】

図14-16A/Bは、図3-4と比較してFHRは更に前駆骨芽細胞の分化を促進する機能を持っていることを示している。しかし、図17と図6を比較すると、FHRの細胞分化の促進への影響はRGD配列を持っているPRGmxや PRFmxと比較すると強くない。

【0183】

図18は、PFS 1%溶液に0.1 N NaOH溶液を加えた時の等電位図と対応するレオロジーデータを示す。1% Ac(RADA)4GGSKPPGTSS-CONH2 溶液（コード：SKP, ペプチド配列 配列番号7）は、自己組織化配列と正電荷の機能モチーフで構成されるハイドロゲルである。等電位点は9.74でありpH 7 近傍まで正電荷を保つが、ゲルはpH 4.5 で生成する。これは、pH近傍での総電荷は+1であり、AC(RADA)4GGFHRR IKA CONH2 (FHR)の3以上に対し、小さいためと考えられる。ペプチドの総電荷は、細胞混合時に2以上である必要がある。混合時のpHは細胞への障害を最小化するためには6-8である必要がある。

【0184】

この配列は、ヘパリン結合配列であるため、ファイバーは細胞表面に多量に存在するヘパリン様分子に結合できる。ヘパリン結合モチーフは、細胞への特徴的な碇となる。この結合は、実施例1に示したような、他の結合モチーフ（RGDなど）と相乗的に、細胞増殖や分化のための生物学的刺激として働く。この効果は、前述の配列に限定されず、-XBBX BX-や -XBBBXXBX- 配列を含む他のモチーフでも働く。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 8 5 】

実施例 4 自己組織化ペプチドを用いたたんぱく質の保持およびデリバリー

前述のヘパリン結合モチーフを有する自己組織化ペプチドは、組織工学あるいは他の治療目的に対し、成長因子および、あるいはまた治療に用いられるたんぱく質の維持および、あるいはデリバリーに有用である。VEGF、FGF類、PDGF、HGF、TGF- およびBMPはヘパリンおよびヘパラン硫酸に吸着されることが知られている。ヘパリンまたはヘパラン硫酸とヘパリン結合ペプチド溶液と成長因子が混合された時、ペプチドはヘパリンまたはヘパラン硫酸に結合し、ヘパリンまたはヘパラン硫酸は成長因子と結合する。このようにして、成長因子はペプチドマトリクス中で長期間保持され、細胞を継続的に刺激し、ペプチドマトリクスの分解と共にゆっくりと放出される。例えば、ペプチドマトリクスが生体に移植され、生体に存在するヘパリンと成長因子が、移植されたマトリクスに供給されうる。

10

## 【 0 1 8 6 】

自己組織化ペプチドに正電荷または負電荷のモチーフを付加することは、組織工学あるいは他の治療目的に対し、成長因子および、あるいはまた治療に用いられるたんぱく質の維持および、あるいはデリバリーに有用である。VEGF、FGF類、PDGF、HGF、TGF- およびBMPは電氣的極性を有し、増殖因子およびペプチドマトリクスの局所的な電荷の分布に応じて正電荷または負電荷のマトリクスに結合性を持つ。Ac(RADA)<sub>4</sub>-GGDGRGDSVAYG-CO NH<sub>2</sub> (配列番号9)はそのようなペプチドの例の一つである。配列番号9自身、細胞結合機能を有している。自己組織化配列に正電荷または負電荷のモチーフを付加することで、元の自己組織化ペプチドの機能を維持しながら、たんぱく質の保持と生物学的な機能を同時に導入することができる。

20

## 【 0 1 8 7 】

他の可能性は、電荷を有する自己組織化ペプチドを用いることである。Ac(FKFQ)<sub>3</sub>-CONH<sub>2</sub> (配列番号51) は正電荷を有する分子で、同時に自己組織化能を有する。この方法は単純であるが、自己組織化配列そのものを変えるため、自己組織化ペプチドそのものの特性も変わってしまうことを避けられない。

## 【 0 1 8 8 】

自己組織化ペプチドを用いたたんぱく質保持とデリバリーへの影響を検討した(表11)。bFGFをモデルたんぱく質として用いた。異なった電荷状態を持つペプチドマトリクスのbFGFの保持はPBSで洗い流した後ELISAにより測定された。未結合のbFGFを洗い流した後、自己組織化ペプチドマトリクスに保持されたたんぱく質の保持の影響はHUVEC(ヒト臍帯静脈上皮細胞)の培養により評価された。

30

## 【表11】

No.	配列	記述	等電位点, 電荷
RAD16-I	Ac(RADA) <sub>4</sub> -CONH <sub>2</sub>		6.1, 中性
SEQ ID NO. 5	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGDGRGDSVAYG- CONH <sub>2</sub>	細胞接着ドメイン (オステオポンチン)	4.78, 負電荷
SEQ ID NO.6	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFHRIKA-CONH <sub>2</sub>	ヘパリン結合ドメイン	11.32, 正電荷
SEQ ID NO.51	Ac(FKFQ) <sub>3</sub> -CONH <sub>2</sub>	電荷を持つ自己組織化配列	10.30, 正電荷

40

## 【 0 1 8 9 】

電荷状況の異なるペプチドマトリクスは、表12のように選定された。RAD 16-1は中性

50

電荷の自己組織化配列である。配列番号5は、中性電荷の自己組織化配列を有するが、負電荷の細胞結合配列(-DGRGDSVAYG-)がリンカー配列を用いて結合されている。配列番号6は、中性電荷の自己組織化配列を有するが、正電荷のヘパリン結合配列(-FHRRIKA-)がリンカー配列を用いて結合されている。配列番号51は、正電荷の自己組織化配列からなる。  
【表12】

表 12 ハイドロゲルの構成物	
コード	ハイドロゲルの組成
RAD-2P	2% RAD16-1 ペプチド溶液
DGR-2P	2% SEQ ID NO. 5 ペプチド溶液
FHR-2P	2% SEQ ID NO. 6 ペプチド溶液
FKF-2P	2% SEQ ID NO. 51 ペプチド溶液

10

## 【0190】

表12に示されたペプチド溶液が、培養インサート(10mm diameter, Millicell-CM, Millicellipore)に導入し、PBSによりゲル化された。ゲル化後175ngのbFGFが溶解したPBSをインサートの内外にペプチドマトリクス上に添加し、一晚留置する。PBSでゲルを3回(2時間、9時間、12時間)吸着されなかったbFGFを洗い流した。その後、PBSを細胞培養維持培地(EGM-2-MV(Camblex)から添付されているbFGFやVEGFなどの増殖因子を除いたもの)に交換し、一日以上留置後、HUVECを $7.5 \times 10^4$ 個インサートに播種し、3日間培養した。

20

## 【0191】

ネガティブコントロールとして、bFGFを吸着させず、EGM-2-MV(Camblex)から添付されているbFGFやVEGFなどの増殖因子を除いた培地で培養したものを用意した。ポジティブコントロールとし、bFGFを吸着させず、EGM-2-MV(Camblex)に付されているbFGFやVEGFなどの増殖因子を加えたものを用意した。洗浄緩衝液(PBS)および細胞培養培地(EGM-2-MV)中のbFGF濃度がELISAにより測定された。洗浄緩衝液および細胞培養培地は、それぞれの測定時(洗浄時:2時間、9時間、12時間、細胞播種時(D0)、培養1日後(D1)、2日後(D2)、3日後(D3))成長因子の保持率は、測定されたbFGF量を積算することで算出された。

30

## 【0192】

結果を図19に示す。保持率は、KFQ-2P、FHR-2P、RAD-2P、DGR-2Pの順で高い。ハイドロゲルの電荷特性に対応して、たんぱく質の保持・放出プロファイルが異なっている。KFQ-2PとFHR-2Pは正電荷で、DGR-2Pは負電荷である。bFGFは正電荷の分子であるが、電荷分布は図20のように局所的になっている。従って、正電荷のマトリクスが正電荷のたんぱく質を吸引することはありうる。たんぱく質の放出率を上げることは、保持率を下げることに等価である。たんぱく質放出率もペプチドマトリクスの分子内電荷分布により制御可能である。

40

## 【0193】

図20は、bFGFの分子内電荷分布を示す。これらの結果から、たんぱく質の保持および放出プロファイルが、ペプチドマトリクスの電荷特性を変化することで制御可能であることを示している。このプロファイルは、たんぱく質およびペプチドマトリクスファイバーの分子内電荷分布といった、局所的な分子のアフィニティによって制御される。

## 【0194】

図21は、ペプチドマトリクスRAD-2PとDGR-2P上で3日間培養した細胞の蛍光顕微鏡像である。緑は細胞核を、赤はアクチンファイバーを示す。2日目まで細胞はbFGFを吸着

50

させたものおよびポジティブコントロール（増殖因子が添加された培地で培養したもの）では、ペプチドマトリクス上で維持されていた（図示無し）。しかし細胞接着と細胞の広がり、RAD-2PとDGR-2Pの両方で、ネガティブコントロールは勿論、ポジティブコントロールよりも優れていた。これは、マトリクスへの増殖因子の吸着がマトリクスへの細胞接着の維持に有効であることを示している。またこれはペプチドマトリクスへの成長因子の保持または固定化が液相で提供されるよりも効果が高いことを示唆している。

【0195】

ペプチドマトリクスに成長因子を取り込ませる方法は、前述以外の方法もある。図22は、bFGFをペプチド溶液に混合したのちゲル化させた場合を示す。この場合、ゲル化した後にbFGFを取り込ませた場合（例：図19）に比較し、非常に高い保持率を維持しており、同時にbFGFの放出率は小さくなっている。

10

【0196】

実施例5 機能化ペプチドのインビボ（生体内）アプリケーション

機能化ペプチドマトリクスの骨新生に対する効果の予備的なIn vivoの評価実験をラットで行なった。6週令の押すラットを評価に用いた（各条件につき、2つずつの試料を用意した）。

【0197】

ラット頭骸骨に左右対称に2箇所4mmの欠損部を設け、欠損部にそれぞれ下記の材料を充填した。欠損部に表13のハイドロゲルを充填した。またコントロールとして、何も材料を設けない欠損部を設けた。ベータ三リン酸カルシウム（TCP）は、合成の人工骨で比較対象として用いられた（図23Bに示されるように、TCPは、頭骸骨の右側に移植された（白い顆粒））

20

【表13】

表13 機能化ペプチドのインビボ(生体内)アプリケーション	
コード	ハイドロゲル
RAD	RADI6-1 ペプチド溶液
ALKmx	SEQ ID NO. 3 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの
PRGmx	SEQ ID NO. 4 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの
DGRmx	SEQ ID NO. 5 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの
TCP	$\beta$ TCP (ベータ3リン酸カルシウム:空孔率 70%)

30

【0198】

ペプチド溶液は欠損部に細胞無しで注入された。ペプチド溶液は、欠損部に存在する体液（血液・リンパ液など）に含まれる塩によって直ちにゲル化した

骨新生量の評価：各グループのラットは、2週間後および4週間後に、X線像を撮像後、頭骸骨を回収・固定した。脱灰、パラフィン包埋後、HE染色を行ない、獣病理医に欠損部内の組織の病理学的形態によって評価を依頼した。骨再生の程度は、1：80%以上、2：50%以上、3：X線上で再生弱 とスコア化した。

40

【0199】

2週間後の結果（表14および図23A-23C）からは、ALKmxとPRGmxは初期のステージで骨再生を促進することが示唆された（図23A-23Cは2週間後の頭骸骨のX線像を示す）。4週間後の結果（表15）からは、ペプチドマトリクスは骨再生を促進することが示唆された。これらの結果から、RAD16-IおよびSEQ3、SEQ4またはSEQ5を混合したものは骨再生を促進する骨補填材として使用することができることが示唆される。

【表 1 4】

	RAD	ALKmx	PRGmx	DGRmx	TCP	空隙
平均スコア	3.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0

【表 1 5】

	RAD	ALKmx	PRGmx	DGRmx	TCP	空隙
平均スコア	1.0	1.5	1.5	1.0	2.0	2.0

## 【0200】

ペプチドハイドロゲルは、ベータ三リン酸カルシウムやハイドロキシアパタイトといった人工骨と組み合わせて用いることができる。ベータ三リン酸カルシウムやハイドロキシアパタイトといった人工骨は、骨芽細胞が機能するための機械的に安定的な空間である空隙を提供することで骨再生を支持している。それらの空隙構造は60%以上の空隙率を有し、孔の直径が100-500 μmである。空隙のそれぞれが連通して細胞と血管の進展を可能にしている。人工骨の形状は数cmのブロックであったり、数cmの円筒形であったり、数cmのプレートであったり、数mmの顆粒であったりする。形状は、術者により、移植時に欠損部のサイズに応じて容易に適合させることができる。

20

## 【0201】

それらはまた、骨再生のためのカルシウムの源泉でもある。ペプチドハイドロゲルと人工骨の混合によって、骨芽細胞の生物学的および機械的両方の支持を提供することで、骨再生を促進する可能性がある。

30

## 【0202】

しかし中性域において、ゼロまたは弱い電荷しか持たないペプチドからなるペプチド溶液は、リン酸カルシウム、三リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイトといった塩基性塩と混合することはできない。これは、ゼロまたは弱い電荷しか持たないペプチド分子は、溶液のpHが強酸性である場合にのみ溶解するからである。このような酸性状態では、リン酸カルシウム、三リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイトといった塩基性塩はペプチド溶液に溶解してしまい、固体を維持できない。ペプチド溶液のpHを増すと、ペプチド溶液は脆弱なハイドロゲルになってしまい、人工骨との統合ができなくなる。

## 【0203】

実施例3で記述したように、FHR (SEQ6)のような正電荷のペプチド溶液は、ハイドロゲルになることなく、中性に近いpHに調整することができる。これにより、ペプチド溶液とリン酸カルシウム、三リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイトといった空隙性の塩基性塩と混合することができる。ペプチド溶液は低粘度溶液なので、空隙に侵入することができる。ペプチドが塩溶液(培養培地や血液などの体液)の影響で自己組織化した場合、ペプチドハイドロゲルと空隙を持つマトリクスが良く統合される。

40

## 【0204】

同様の効果が他のペプチド配列、例えば配列番号51(表16)でも得られる。配列番号51は中性pH域で正電荷を持ち、FKFは中性pH域で液相を保つ(Caplan 2002a)。FKFとリン酸カルシウム、三リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイトといった空隙性の塩基性塩と混合は可能である。塩溶液を添加することでハイドロゲルを生成できる(表17)。FKF

50

は、ハイドロゲルとなった時に、前駆骨芽細胞の増殖を支持する。正電荷の自己組織化ペプチド配列からなるハイドロゲルは、実施例3に示されたようにたんぱく質の保持に有益である。ペプチドが異なった電荷を持つ場合にも、正電荷のペプチドの量が多ければ、電荷を有するペプチド溶液の特性を保つ。従ってペプチドと人工骨の混合物も機能化ペプチドによって機能化可能である。

【表16】

表 16		
No.	配列	記述
SEQ ID NO 51	Ac(FKFQ) <sub>3</sub> -CONH <sub>2</sub>	電荷を持つ自己組織化配列

10

【表17】

表 17	
コード	ハイドロゲル組成
FKF	1% SEQ ID NO 51 ペプチド溶液

20

【0205】

実施例6 血管新生と脈管化のための機能化ペプチドマトリクス

血管新生と脈管化を促進することは、心筋梗塞、末梢血管障害、脳梗塞などの虚血障害の治療に莫大な可能性を持っている。血管新生と脈管化は、創傷治癒や骨再生といった組織再生においても重要な役割を担っている。また、皮膚、肝臓、膵臓、骨、筋肉などの3次元的な組織の構築にも重要である。血管構造を構成する、血管内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、繊維芽細胞などに適切な微小環境を提供することで、血管新生と脈管化を促進するマトリクスを開発することは重要である。

【0206】

いくつかの機能モチーフが血管新生を促進するとして知られている。例えば、チモシンのアクチン結合部位である4(-LKKTETQ-)は、血管内皮細胞の遊走および接着、脈管形成、動脈管芽形成、血管新生を促進する(Huff et al., FASEB Journal (2003) 17:2103-2105)。ヒト血清のフィブロネクチンのIII-CSドメイン(-REDV-)は、血管内皮細胞の接着と進展を支持する(Shin et al., Biomaterials (2003) 24:4353-4364; Welsh et al., Biomaterials (2000) 1:23-30)。VEGFVEGF結合インターフェース(-KLTWQELYQLKYKGI-)はVEGFのヘリックス領域17-25を模擬したもので、内皮細胞を増殖させVEGF依存の細胞シグナル経路を活性化し、インビトロで脈管形成を促進する(D'Andrea et al., PNAS (2005) 102:14215-14220)。

30

【0207】

機能化ペプチドマトリクスのHUVEC(ヒト臍帯静脈上皮細胞)への影響がゲル上の2次元培養で評価された。実験に用いられた自己組織化ペプチドを表18に示す。

40

【表 18】

表 18 血管新生および脈管化のための自己組織化ペプチド		
No.	配列	記述
RAD16-I	Ac(RADA) <sub>4</sub> -CONH <sub>2</sub>	
SEQ ID NO 9	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGLKKTETQ-CONH <sub>2</sub>	チモシンβ4のアクチン結合部位
SEQ ID NO 10	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGREDV-CONH <sub>2</sub>	フィブロネクチン/血内皮細胞接着
SEQ ID NO 4	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS CONH <sub>2</sub>	繰り返し RGD 接着配列
SEQ ID NO 11	Ac(RADA) <sub>4</sub> -GGGGKLTWQELYQLKY KGI-CONH <sub>2</sub>	VEGF 相同ペプチド/VEGF レセプターに結合
SEQ ID NO 6	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFHRIKA-CONH <sub>2</sub>	ヘパリン結合ドメイン
SEQ ID NO 1	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGPFSSTKT-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO 12	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSKPPGTSS-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング

10

## 【0208】

20

表 19 に示されたペプチド溶液が、培養インサート(10mm diameter, Millicell-CM, Millicellipore)に導入し、細胞培養培地(EGM-2-MV, Camblex)によりゲル化された。1型コラーゲンおよびマトリゲルがコントロールとして用いられた。HUVEC(ヒト臍帯静脈上皮細胞)を $8 \times 10^4$  個 インサートに播種し、7日間培養した。

【表 19】

表19 ハイドロゲルの構成物	
コード	ハイドロゲルの組成
RAD	1% RAD16-1 ペプチド溶液
LKKmx	1% SEQ ID NO 9 ペプチド溶液と1%RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
REDmx	1% SEQ ID NO 10 ペプチド溶液と1%RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
PRGmx	1% SEQ ID NO 4 ペプチド溶液と1%RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
KLTmx	1% SEQ ID NO 11 ペプチド溶液と1%RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
FHR	1% SEQ ID NO 6 ペプチド溶液
FHRmx	1% SEQ ID NO 6 ペプチド溶液と1%RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
PFS	1% SEQ ID NO 1 ペプチド溶液
PFSmx	1% SEQ ID NO 1 ペプチド溶液と1%RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
SKPmx	1% SEQ ID NO 12 ペプチド溶液と1%RAD16-1 ペプチド溶液を1:1に混合したもの
COL	1型コラーゲンゲル (0.25%)
MTG	マトリゲル

10

20

## 【0209】

図24A-24Mは、ハイドロゲル上でHUVECを2日間培養した蛍光共焦点顕微鏡像である。緑は細胞核を、赤はアクチンファイバーを示す。コラーゲン、マトリゲル、PRGmx、KLTmx、FHRmx、PFSmxはRADと比較して高い細胞接着性を示す。マトリゲル上では、HUVECは、脈管形成能と対応すると考えられる、脈管状構造を示す。KLTmx上では、細胞はマトリゲルと類似の脈管状構造を示す

30

結果を表20と図25に要約する。表19のハイドロゲルの内、選択されたものについて、3日培養後のウエル内のDNA量が評価された。DNA量は細胞数と比例している。図25は、コラーゲン、PRGmx と KLTmxゲルがRADに対し、統計的に高いDNA量が得られている。これらの結果は、元の自己組織化配列に結合された機能モチーフに依存して、機能化ペプチドマトリクスは非機能化ペプチドマトリクスよりも優位な血管内皮細胞接着性を有し、コラーゲンやマトリゲルといった天然由来のマトリクスと細胞形態において類似の機能を有することを示している。

40

【表 2 0】

表20 細胞接着と形態		
コード	細胞接着	脈管状形態
RAD	+	
LKKmx	+	
REDmx	+	
PRGmx	++++	
KLTmx	+++	+++
FHR	++	+
FHRmx	+++	
PFS	++	+
PFSmx	++++	
SKPmx	++	++
COL	++++	
MTG	+++	++++

凡例:(a) 細胞接着[+:弱い<20%); ++: 20-50%; +++: 50-70%; ++++: 密集に近い(>70%)]; (b) 脈管状形態 [+ は特徴の数を表す:分岐、細胞の細長化、環状の細胞配列、(弱い:+; 中程度:++; 強い:+++; 非常に強い:++++)].

## 【 0 2 1 0】

血管内皮細胞のハイドロゲルに対する遊走の効果が評価された。血管内皮細胞の遊走は、マトリクス中への血管の成長に重要である。HUVEC(ヒト臍帯静脈上皮細胞)が、コラーゲンコートされたデクストランビーズ(Cytodex3, microcarrier beads, Sigma)に播種され、表19に示される異なったハイドロゲルに移植された。

## 【 0 2 1 1】

図26A-26Fは、ペプチドマトリクス上のビーズの1日後および2日後の蛍光顕微鏡像である。緑は細胞核を、赤はアクチンファイバーを示す。白いバーが100 μmを示す。1日後ではほとんどの細胞がビーズ上にある。2日後では、RADに比較し、コラーゲンおよびPRGmx、KLTmxゲルでは細胞はビーズから良く遊走している。マトリゲル上では、ハイドロゲルに遊走する細胞は非常に少ない。

## 【 0 2 1 2】

図27は、2日後にビーズから遊走した細胞の数を示す。細胞数は蛍光顕微鏡像で数えた。前述の観察結果はグラフ上でも確認できた。

## 【 0 2 1 3】

3次元培養実験: HUVECがスクロース溶液(10%)に懸濁され、ペプチド溶液と混合された。細胞懸濁ペプチド溶液はインサート(10mm diameter, Millicell-CM, Millipore)に導入され、直ちに細胞培養培地(EGM-2-MV, Camblex)によりゲル形成された。ウェルに播種された細胞数は、 $1 \times 10^5$  cells/wellであった。図28は、播種から2日後の蛍光共焦点顕微鏡像である。緑は生細胞を、赤は死細胞の核を示す。これらの像は、ハイドロゲル中での高い細胞生存率を示す。PRGmx と KLTmxは細胞が進展した形態を示すが、これは細胞接着が良いことを示す。

## 【 0 2 1 4】

VEGF (20 ng/ml)が細胞培養培地に添加され、細胞は7日間培養された。蛍光共焦点顕微鏡により、PRGmxでは3次元的な脈管構造が観察された。図29A-29Bは再構築像を示す。

緑は細胞核を、赤はアクチンファイバーを示す。図29Aは脈管内の空隙（矢印）を示す。図29Bは図29Aの点線部の断面を示す。脈管内の空隙は断面像でも示されている（点線で示される円）

血管新生のインビボ（生体内）の実験を絨毛尿膜（CAM）を用いて行なった。有精卵の8日の孵卵後、直径10mm厚み1mmのハイドロゲルを鶏卵の絨毛尿膜に移植した。ハイドロゲルは表19から選択され、ゲルは移植前に作成された。12日目に、CAMは病理分析のために回収された。ハイドロゲル内部およびハイドロゲル下部の血管新生が病理断層像により評価された。

【0215】

図30A-30Gは、異なったハイドロゲルを乗せて孵卵した絨毛尿膜（CAM）の病理像を示す。RAD（図30A-B）、PRGmx（図30E）、コラーゲン（図30F）は、ハイドロゲルの内部および下部に血管新生を認めない。一方KLTmx（図30C-D）とマトリゲル（図30G）は、ゲル中の結合組織内部への血管新生を認める（黒矢印）。KLTmxでは、ゲルと絨毛尿膜との境界にも血管新生を認める（黒矢印）。

10

【0216】

実施例7 様々な自己組織化配列での機能化ペプチド

前述の実施例ではRAD16-1 ((RADA)4)が、自己組織化の基本構成ブロックとして用いられていた。基本となる自己組織化配列の変更により、ハイドロゲルの特性が制御できる。(IEIK)2は8つのアミノ酸からなる短い配列であるが、(RADA)4に比較して硬いゲルを生成する。それは、イソロイシン(I)がアラニン(A)よりもフレキシブルでないためである。更に硬いゲルが、自己組織化配列の繰り返しを(IEIK)3、(IEIK)4と伸ばすことによって得られる。

20

【0217】

前述の通り、(FKFQ)3は中性pH域で正電荷を持ち、中性pH域で溶液を保つ。

【0218】

(IEIK)2と(FKFQ)3に基づく機能化ペプチドが表21に示されるように合成された。表21のペプチドから生じるハイドロゲルを表22に示す。溶液は、機能化ペプチドまたは、機能化ペプチドと塩基性の繰り返し配列（配列番号54または配列番号55）を混合したものである。

30

【表21】

表 21 様々な自己組織化配列に基づく機能化ペプチド		
No.	配列	記述
SEQ ID NO. 52	Ac-IEIKIEIKI-CONH <sub>2</sub>	中性の自己組織化配列
SEQ ID NO.13	Ac-IEIKIEIKIGGPRGSYRGDS-CONH <sub>2</sub>	繰り返し RGD 結合配列
SEQ ID NO.14	Ac-IEIKIEIKIGGPFSSSTKT-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO.15	Ac-IEIKIEIKIGGSKPPGTS-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO. 51	Ac(FKFQ) <sub>3</sub> -CONH <sub>2</sub>	電荷を有する自己組織化配列
SEQ ID NO.16	Ac-FKFQFKFQFKFQGPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>	繰り返し RGD 結合配列
SEQ ID NO.17	Ac-FKFQFKFQFKFQGGFHRRIKA-CONH <sub>2</sub>	ヘパリン結合ドメイン

40

【表 2 2】

表22 ハイドロゲルの構成物	
コード	ハイドロゲルの組成
EIK	1% SEQ ID NO. 55 ペプチド溶液
EPRG	1% SEQ ID NO. 13 ペプチド溶液
EPRGmx	1% SEQ ID NO. 13 ペプチド溶液と EIK を1:1で混合したもの
EPFS	2% SEQ ID NO. 14 ペプチド溶液
EPFSmx	1% SEQ ID NO. 14 ペプチド溶液と EIK を1:1で混合したもの
ESKP	2% SEQ ID NO. 15 ペプチド溶液
ESKPmx	1% SEQ ID NO. 15 ペプチド溶液と EIK を1:1で混合したもの
FKF	1% SEQ ID NO. 54 ペプチド溶液
KPRG	1% SEQ ID NO. 16 ペプチド溶液
KPRGmx	1% SEQ ID NO. 16 ペプチド溶液と FKF を1:1で混合したもの
KFHRmx	1% SEQ ID NO. 17 ペプチド溶液と FKF を1:1で混合したもの

10

20

## 【 0 2 1 9】

全ての(FKFQ)3を基本とするペプチド溶液(FKF, KPRG, KPRGmx and KFHRmx)は中性域pHからpH8まで溶液を維持した。この特性は、細胞や、三リン酸カルシウムのような塩基性物質や、酸に敏感な薬剤(例えばたんぱく質や成長因子など)をペプチドハイドロゲルに導入する際に有用である。

## 【 0 2 2 0】

ハイドロゲルに対する細胞接着と細胞生存性をHUVEC(ヒト臍帯静脈上皮細胞)を用いて評価した。表22に示されるペプチド溶液が細胞培養インサート(10 mm diameter, Millicell-CM, Millipore)に導入され、細胞培養培地(EGM-2-MV, Camblex)によりゲル化された。HUVECは $8 \times 10^4$ 個インサートに播種され、3日間培養した。

30

## 【 0 2 2 1】

図31A-31Kは、HUVECの蛍光顕微鏡像を示す。緑は細胞核を、赤はアクチンファイバーを示す。

## 【 0 2 2 2】

基本の自己組織化ペプチドハイドロゲル(EIKとFKF)に比較して、繰り返しRGD接着配列を持つハイドロゲルはより高い細胞接着性を有する。この結果を表23に要約する。この結果は実施例5の表20に類似する。これは、ハイドロゲルの特性は、基本的な繰り返し配列を構成するアミノ酸や長さを変えることで制御できる一方で、基本的な繰り返し配列に関

40

【表 2 3】

表 23 細胞接着結果の要約	
コード	細胞接着
EIK	++
EPRG	++++
EPRGmx	+++
EPFS	+
EPFSmx	++
ESKP	+
ESKPmx	+
FKF	++
KPRG	++++
KPRGmx	+++
KFHRmx	+++

凡例: 細胞接着 [+;弱い(<20%); ++: 20-50%; +++: 50-70%;  
++++: ほぼ密集(>70%)]

10

20

## 【0 2 2 3】

## 実施例 8 幹細胞を支持するための機能化ペプチドマトリクス

現在、骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)、脂肪由来幹細胞(ADSC)などが細胞治療のために臨床研究が進んでいる。幹細胞治療において、細胞が移植組織の微小環境に定着するまで、細胞およびそのバイアビリティを維持することが第一に重要である。幹細胞治療においては細胞のバイアビリティを維持するのみならず、幹細胞の性質を維持することも重要である。例えば、骨再生や軟骨再生では、骨芽細胞や軟骨細胞への分化能を維持する必要がある。

30

## 【0 2 2 4】

一方、心筋梗塞や、末梢血管閉塞、脳梗塞など、虚血性疾患に対する幹細胞治療では、抗アポトーシスや血管新生を促進する増殖因子などのサイトカインの分泌能を維持するために、幹細胞性を維持することが重要である。

## 【0 2 2 5】

幹細胞の生存、分化能、および幹細胞性を維持するために、細胞治療において、一時的に幹細胞を維持するための微小環境を提供することが重要である。機能化ペプチドマトリクスは、幹細胞と混合し損傷組織に注入することが容易に行え、この目的に適していると考えられる。繰り返しRGD細胞接着配列、ヘパリン結合モチーフ、骨髄細胞接着モチーフは、これまでの骨芽細胞および血管内皮細胞など様々な細胞の生存の維持に有効であることが示されている。ラミニンは基底膜の主要構成成分で、幹細胞維持に重要であると考えられる。IKVAV (SEQ20に含まれる)と IKLLS (SEQ21に含まれる)は、ラミニン中の細胞接着モチーフとして知られている。これらのモチーフは、すい臓細胞の生存の維持、アポトーシスの抑制、インシュリンの分泌の促進に有用である(Laney et al., Biomaterials (2007) 28:3004-301 1)。

40

## 【0 2 2 6】

脂肪由来幹細胞(ADSC)を機能化ペプチドマトリクス(表24)内で3次元培養し、機能化自己組織化ペプチドマトリクスの細胞維持能の評価を行った。ADSCは10%スクロース溶液

50

に懸濁され、表25から選択されたペプチド溶液と混合された。細胞懸濁ペプチド溶液は、細胞培養インサート（直径10mm、Millicell-CM, Millipore）に導入され、細胞培養培地によって直ちにゲルを形成された。ADSCは各ウエル $4 \times 10^4$ 個播種された。

【表 2 4】

No.	配列	記述
RAD16-I	Ac(RADA) <sub>4</sub> -CONH <sub>2</sub>	
SEQ ID NO. 4	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS CONH <sub>2</sub>	繰り返し RGD 結合シーケンス
SEQ ID NO.6	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFHRRRIKA CONH <sub>2</sub>	ヘパリン結合ドメイン
SEQ ID NO.1	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGPFSSTKT CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO.12	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSKPPGTSS CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO.18	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSTFTKSP-CONH <sub>2</sub>	骨髄ホーミング
SEQ ID NO.19	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSIKVAVS-CONH <sub>2</sub>	ラミニン(110 kDa ラミニンレセプター たんぱく質)
SEQ ID NO.20	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSEIKLLIS-CONH <sub>2</sub>	ラミニン (a3b1 と細胞表面ヘパリン結合)

10

20

【表 2 5】

コード	ハイドロゲルの組成
RAD	1% RAD16-1 ペプチド溶液
PRGmx	1% SEQ ID NO. 4 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの
FHR	1% SEQ ID NO. 6 ペプチド溶液
FHRmx	1% SEQ ID NO. 6 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの
PFS	1% SEQ ID NO. 1 ペプチド溶液
PFSmx	1% SEQ ID NO. 1 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの
SKPmx	1% SEQ ID NO. 12 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの
STF	1% SEQ ID NO. 18 ペプチド溶液
STFmx	1% SEQ ID NO. 18 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの
SIK	1% SEQ ID NO. 19 ペプチド溶液
SIKmx	1% SEQ ID NO. 19 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの
SEI	1% SEQ ID NO. 20 ペプチド溶液
SEImx	1% SEQ ID NO. 20 ペプチド溶液と 1%RAD16-I ペプチド溶液を1:1に混合したもの

30

40

【 0 2 2 7】

表25で示されたペプチド溶液は、細胞培養インサート（直径10mm、Millicell-CM, M

50

illipore)に導入され、培養培地(DMEM-F12+10%FBS, Gibco)によってゲルを形成された。A DSCは各ウエル $4 \times 10^4$ 個播種され、7日間培養された。

【0228】

図32A-32Eは、7日間培養後の、蛍光共焦点顕微鏡の再構築拡張合焦像である。上段は、水平面の像、下段は対応する縦方向の断層像である。緑は細胞核、アクチンファイバーを赤で示す。細胞はマトリクスの上に播種したにもかかわらず、細胞はマトリクス内によく遊走している。

【0229】

図33は細胞の密度を示す。細胞密度は初期播種密度より増している(破線で示す)。これはADSCがマトリクス上と内部で増殖していることを示している。

10

【0230】

図34はペプチドマトリクス内への細胞の進達深度を示す。細胞は特にPRGmxハイドロゲルで深く遊走している。RADmxおよびFHRmxではPRGmxに対し進達深さは浅いが、深くに進展している細胞数の割合は多い。これらの結果は、自己組織化ペプチドマトリクスおよび機能化ペプチドマトリクスが、間葉系幹細胞の細胞生存を維持するのに有効な潜在性を示している。

【0231】

培養培地中に分泌された成長因子をELISA法を用いて評価した(図35A-35B)。幹細胞により分泌された増殖因子は、アポトーシスを抑制し、血管新生を促進することで、細胞治療の主要な要因と考えられている。特にHGFとVEGFはアポトーシス抑制と、血管新生に主要な因子と考えられている。コントロールとして通常の培養プレートで増殖したものを示す(コード:TCPにしめす)。FHRmxとRADにおいて、培養1日目から7日目に渡って、大幅なHGFの分泌の促進が見られた。VEGFについては、1日目の培養培地では全てのペプチドマトリクスでVEGF分泌の増加が見られた。

20

【0232】

他の実施例

前述は、本発明の特定の好ましいが限定されない実施形態の記述である。下記の請求項で定義されるとおり、本発明の精神と範囲を超えない範囲で、この分野の通常のスキルのものであれば、さまざまな変更を加えることができることが理解できる。

【図 1 A】

図 1A



RAD16-I



自己組織化アミノ酸ドメイン

非自己組織化アミノ酸ドメイン

----- RAD16-Iと同じ自己組織化配列

----- SEQ ID NO. 4固有の配列

FIGURE 1A

【図 1 B】

図 1B

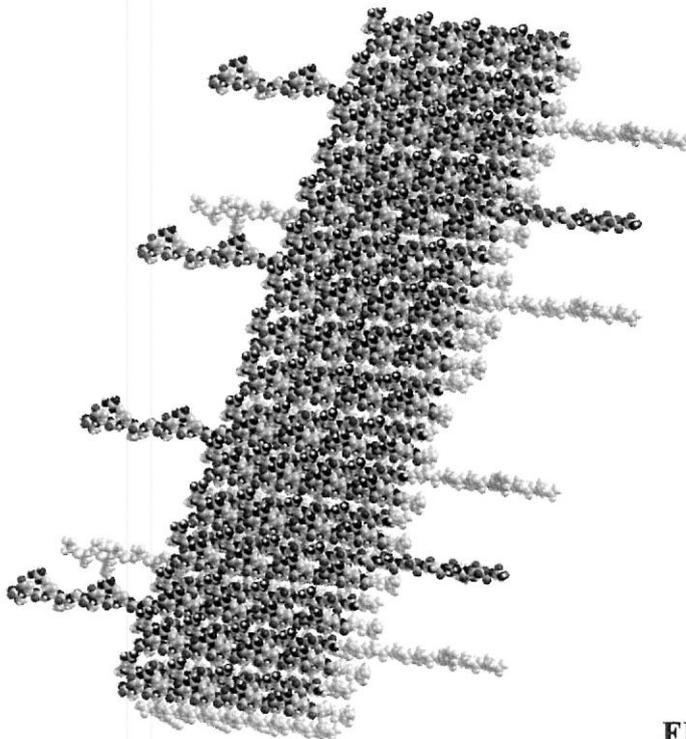


FIGURE 1B

【図 1 C】

図 1C

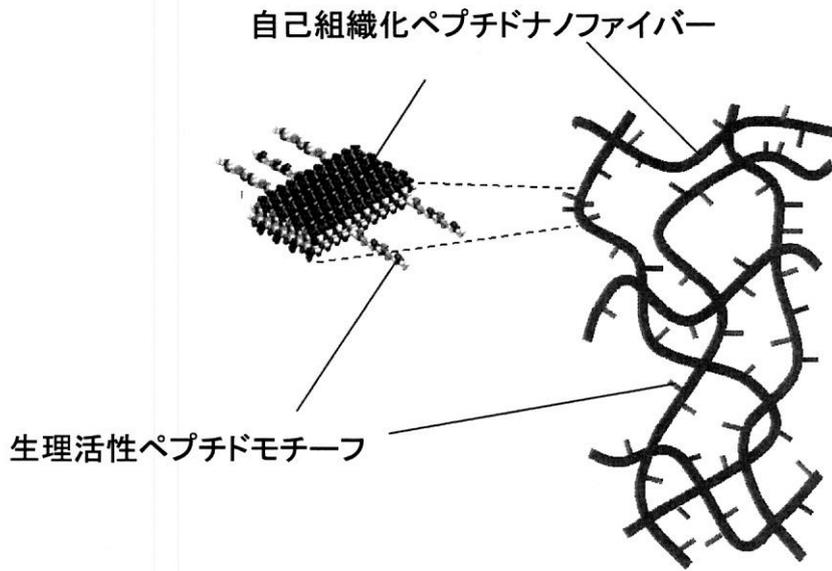


FIGURE 1C

【図 1 D】

図 1D

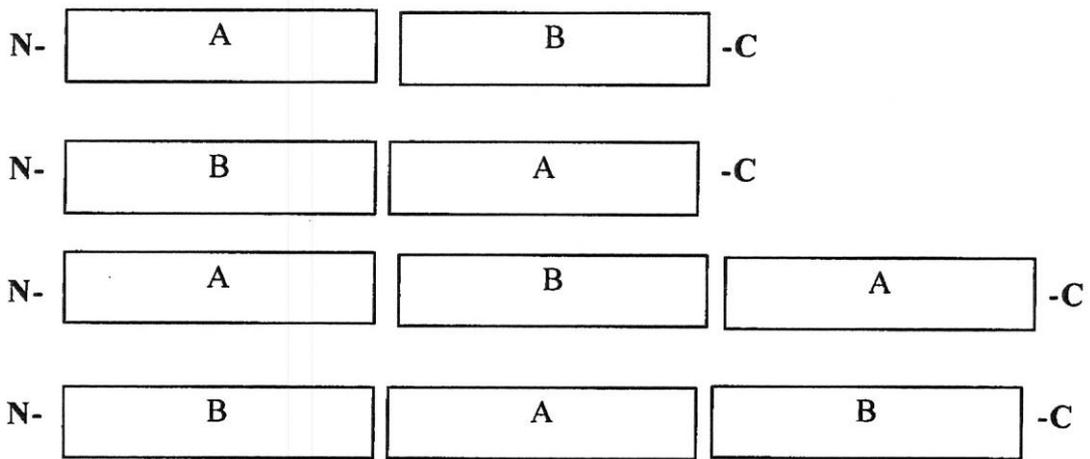


FIGURE 1D

【 図 2 】

図 2

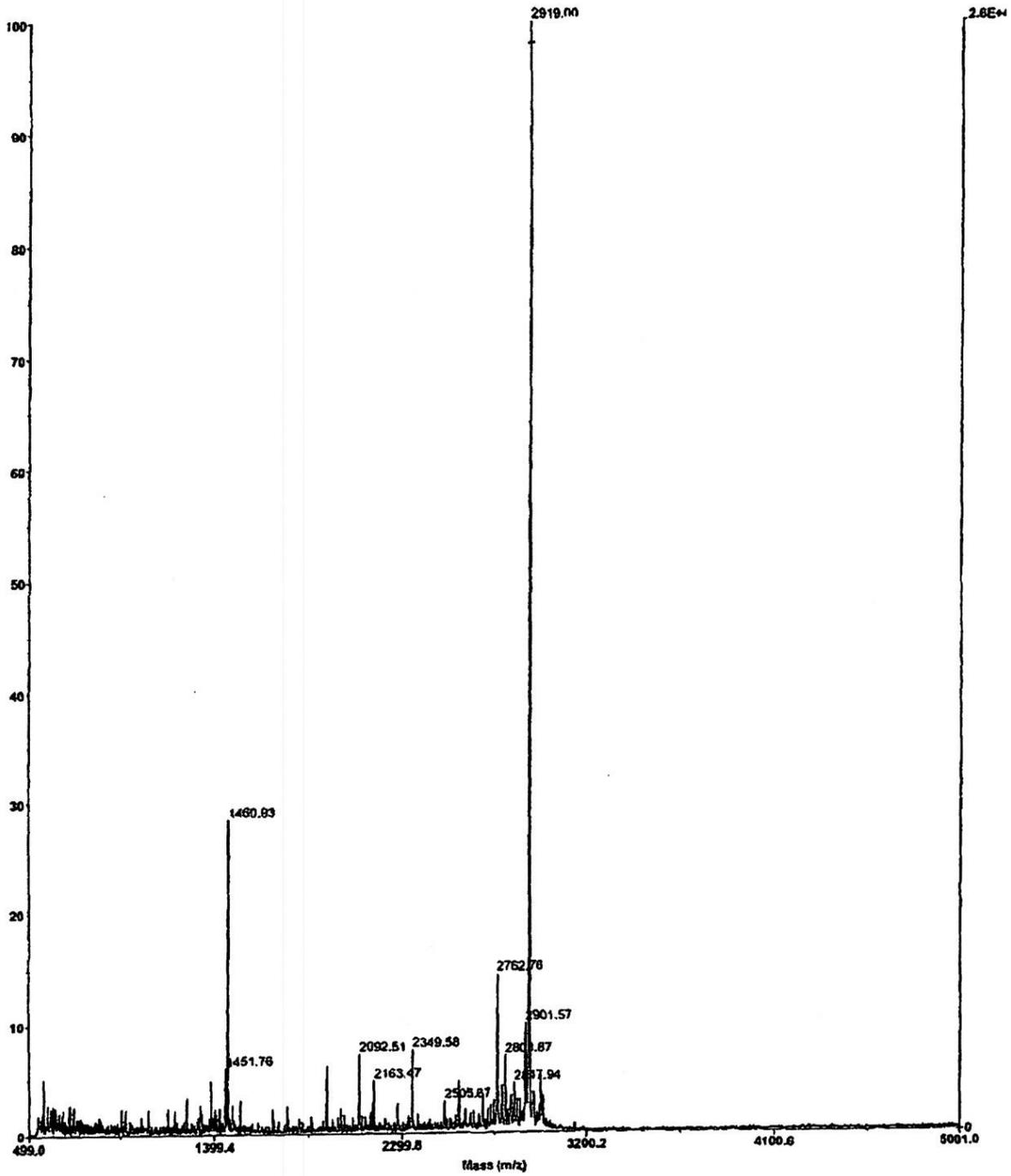


FIGURE 2

【 図 3 】

図 3

X10<sup>5</sup>

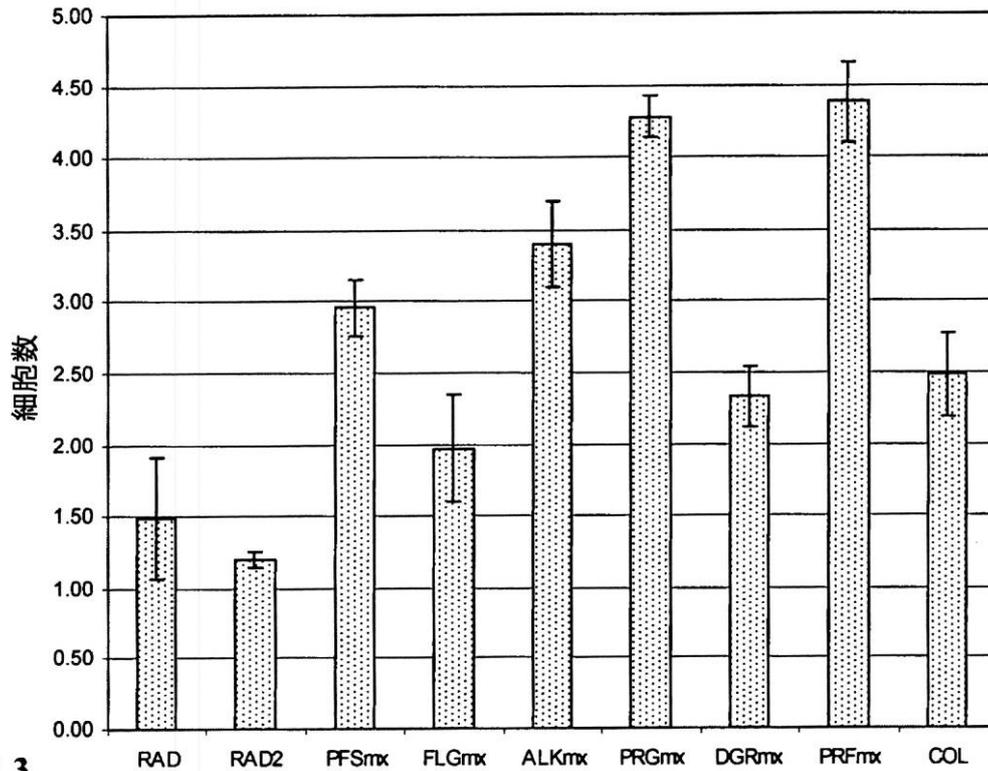


FIGURE 3

【 図 4 】

図 4

(units/uL)/DNA

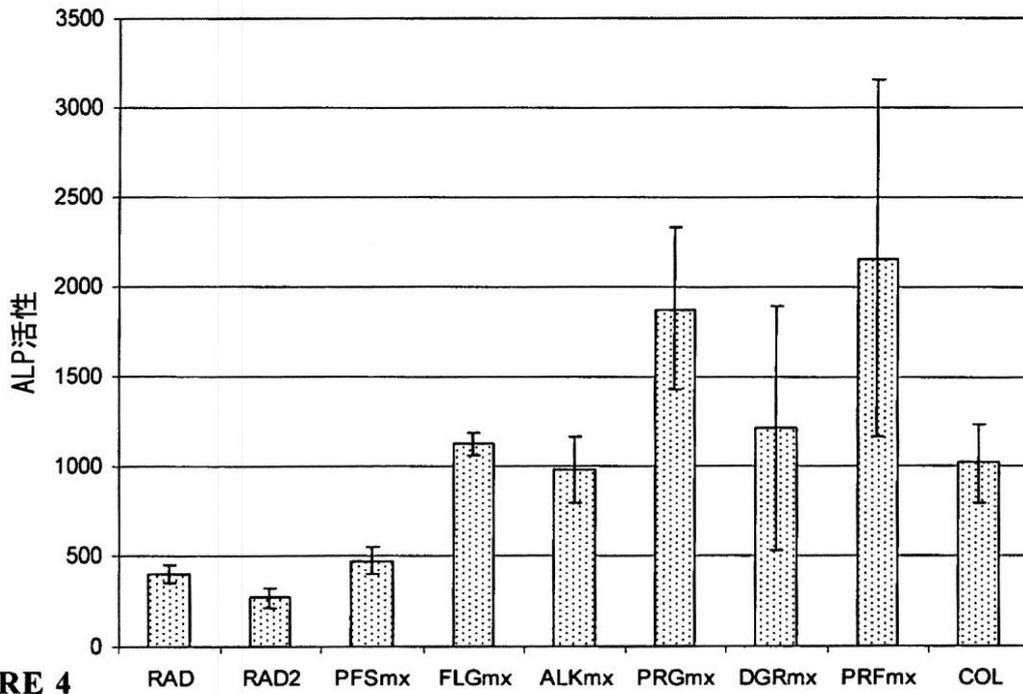
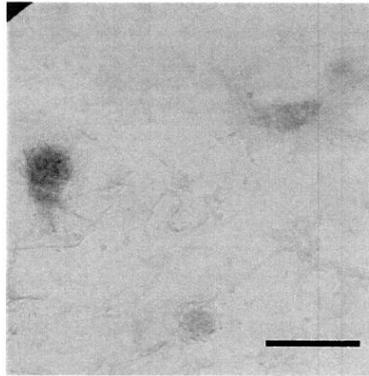


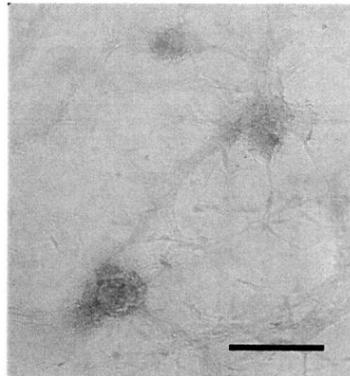
FIGURE 4

【 図 5 A - I 】

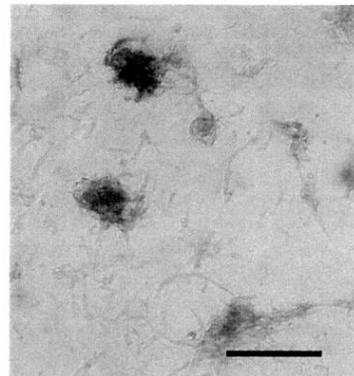
図 5A-I



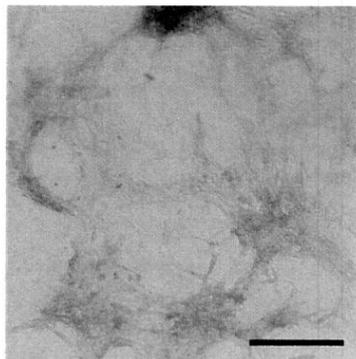
(A) RAD



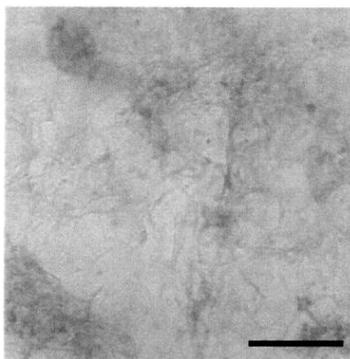
(B) RAD2



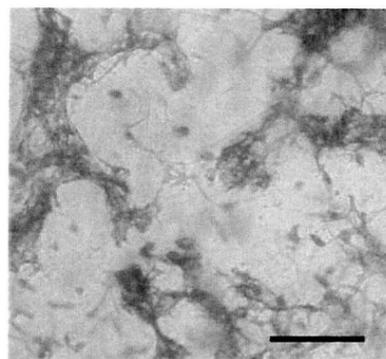
(C) PFSmx



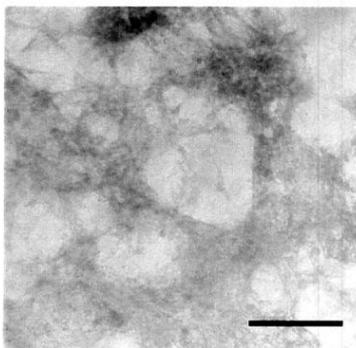
(D) FLGmx



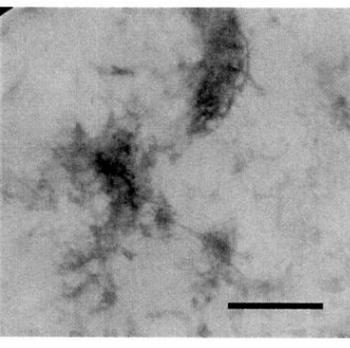
(E) ALKmx



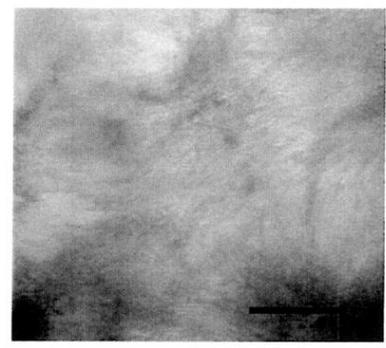
(F) PRGmx



(G) DGRmx



(H) PRFmx



(I) COLmx

スケール=200mm

FIGURES 5A-5I

【 図 6 】

図 6

オステオカルチン (ng/ml)

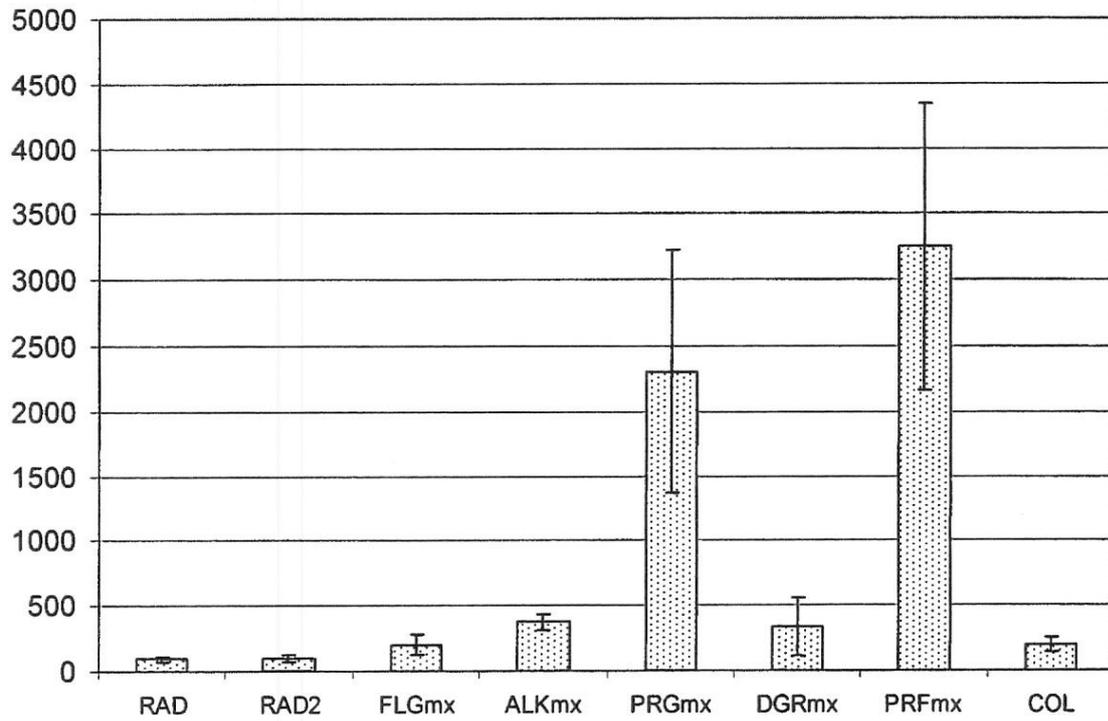


FIGURE 6

【 図 7 】

図 7

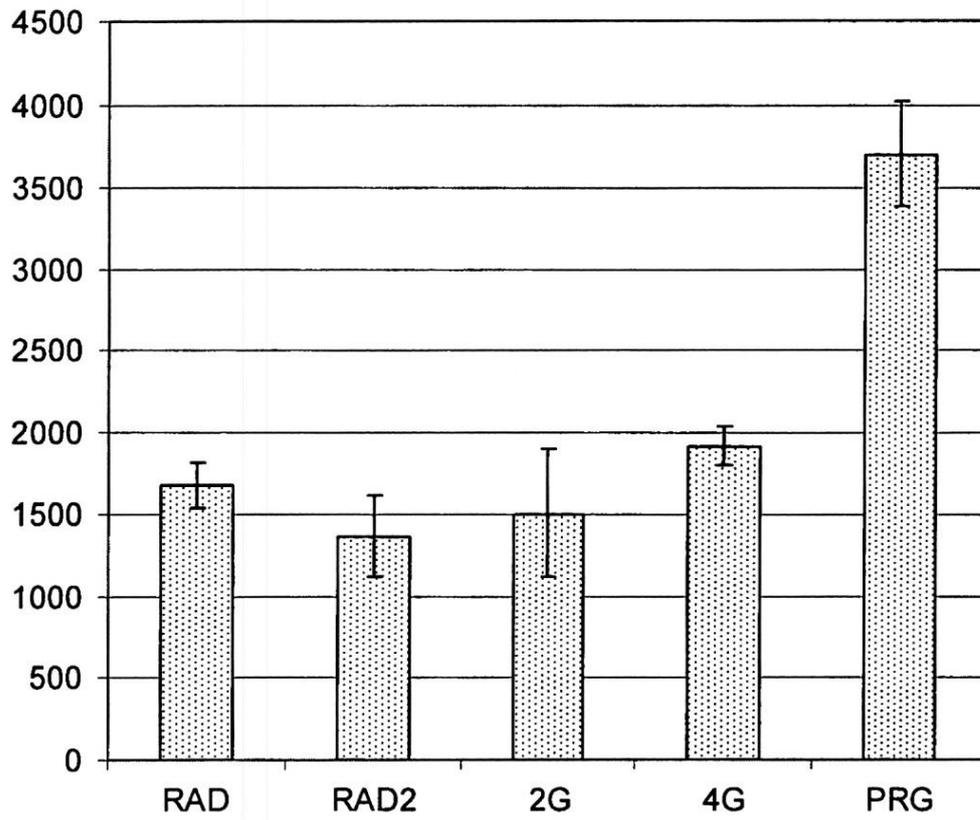


FIGURE 7

【 図 8 】

図 8

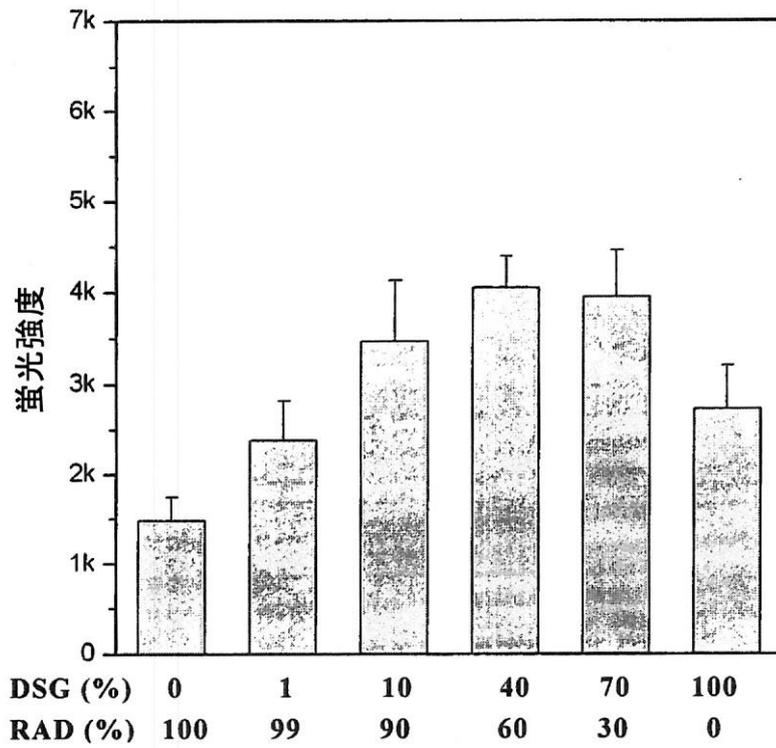
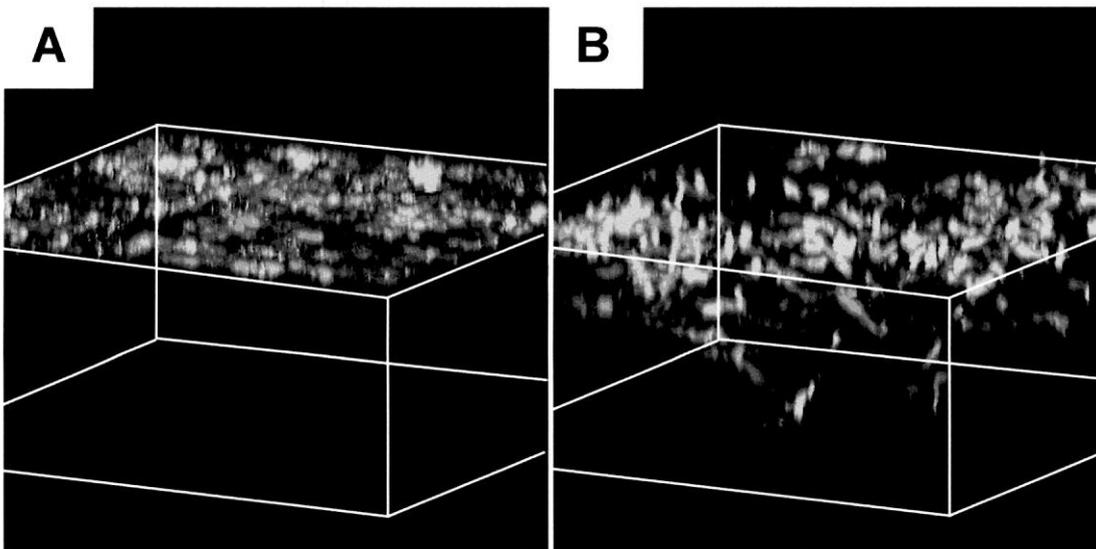


FIGURE 8

【 図 9 A - B 】

図 9A-B



FIGURES 9A-9B

スケール=100 $\mu$ m

【 図 1 0 】

図 10  
(電荷)

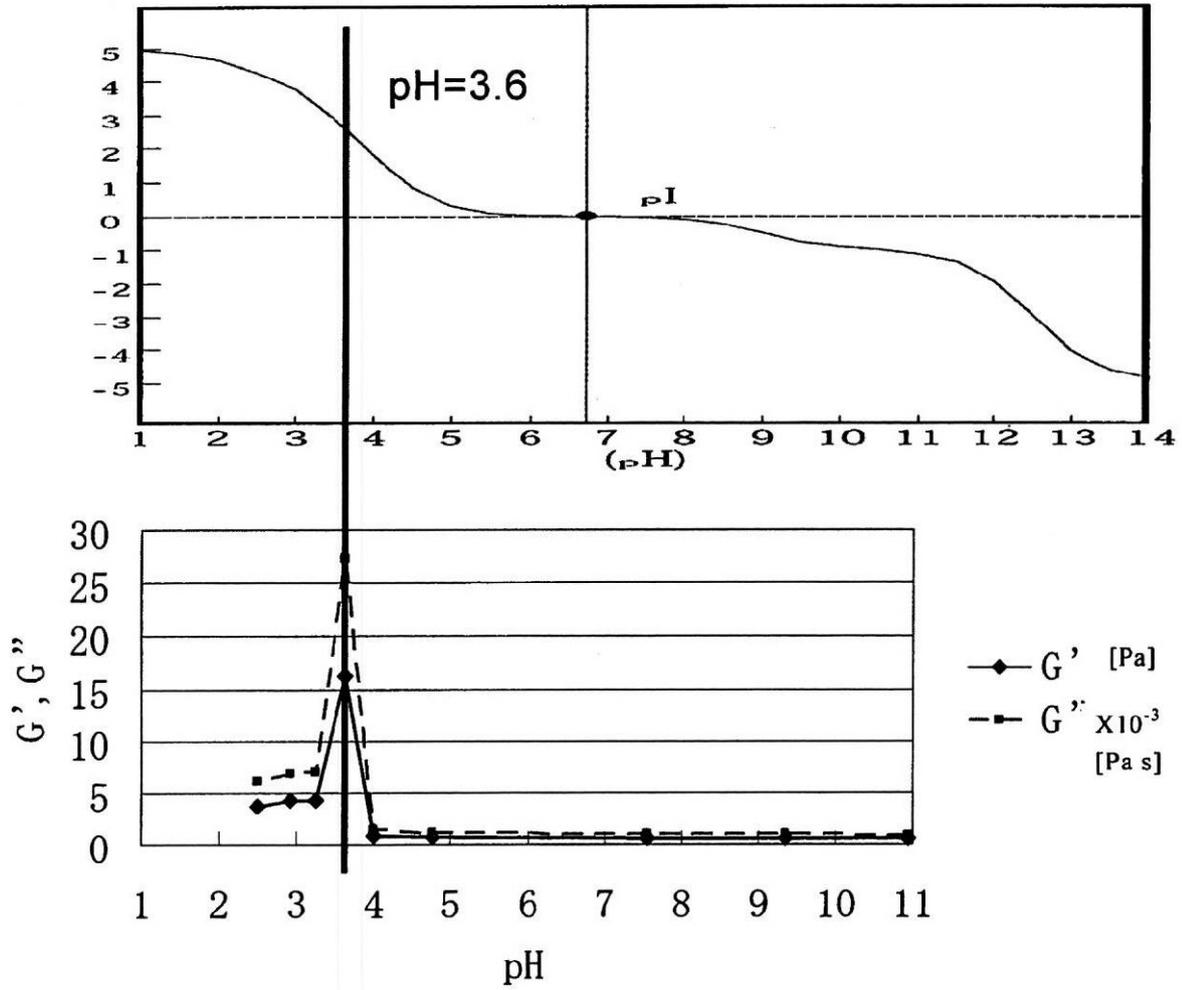


FIGURE 10

【 図 1 1 】

図 11

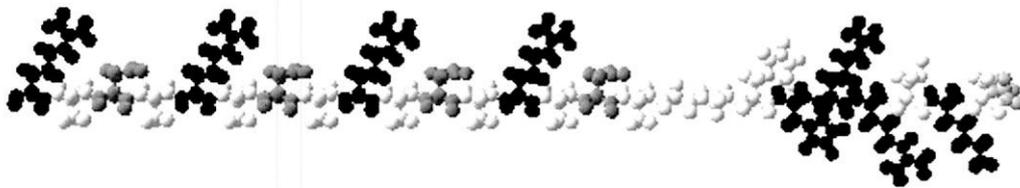


FIGURE 11

【 図 1 2 】

図 12

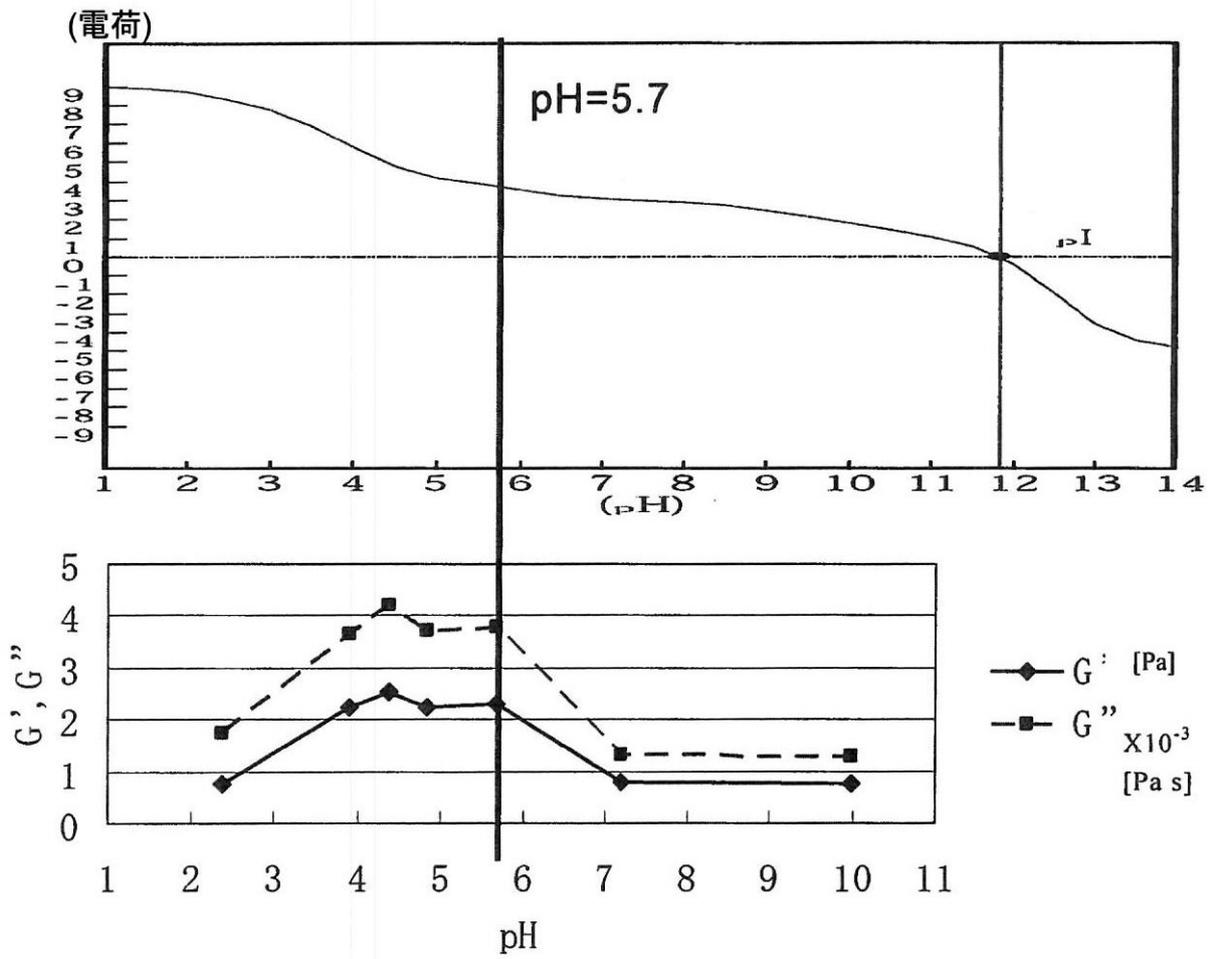


FIGURE 12

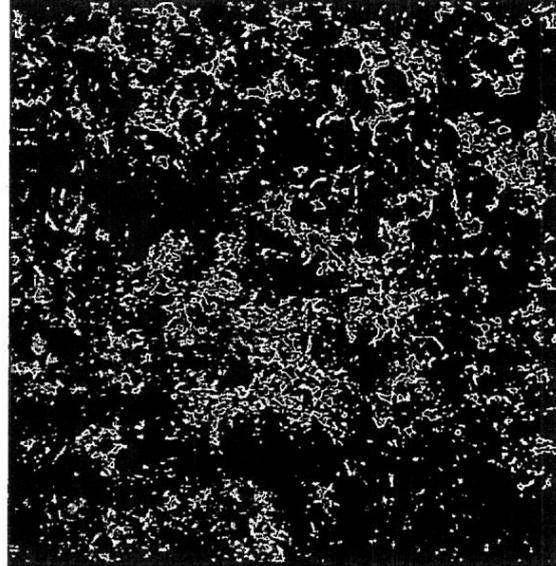
【図 13 A - D】

図 13A-D

上方図



(A) RAD16-1

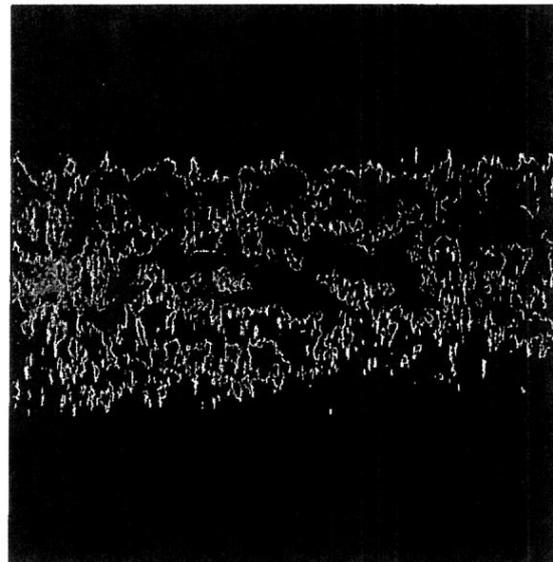


(B) FHR

側方図



(C) RAD16-1



(D) FHR

← 1400um →

FIGURES 13A-13D

【 図 1 4 】

図 14

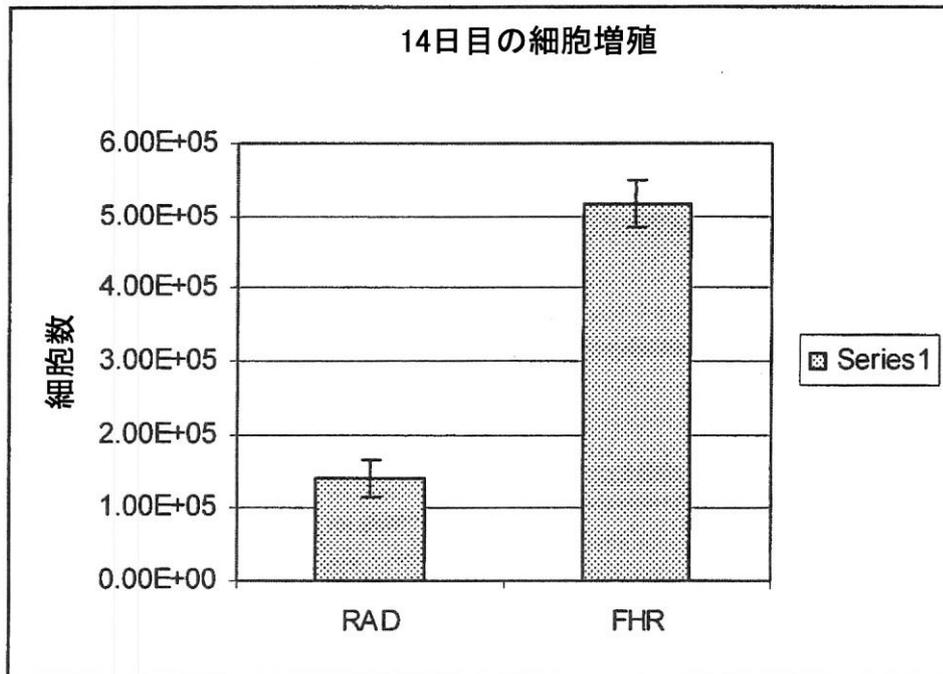


FIGURE 14

【 図 1 5 】

図 15

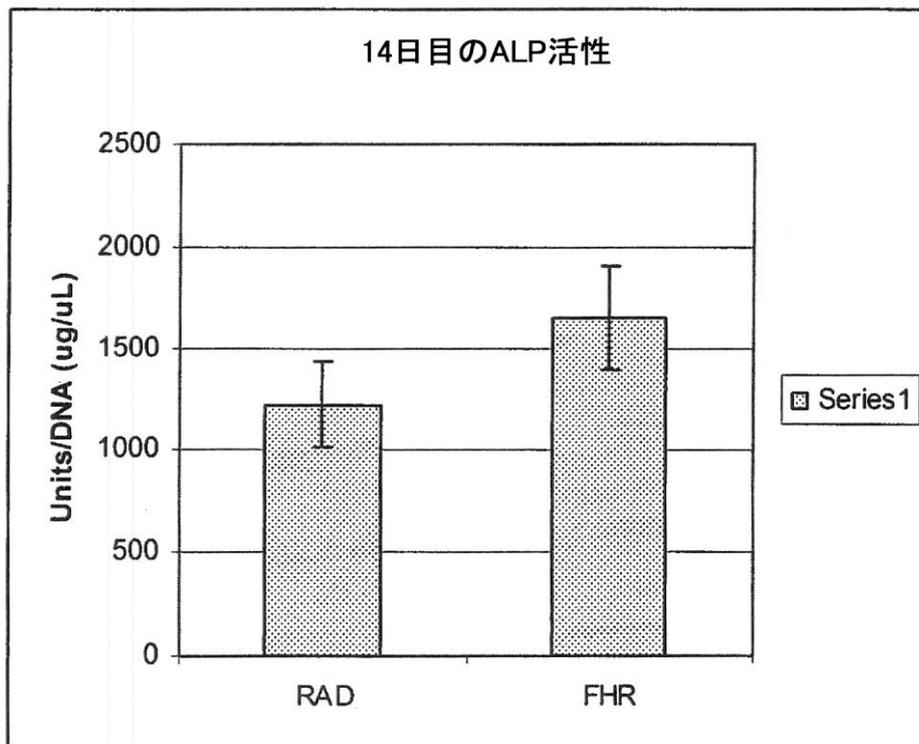
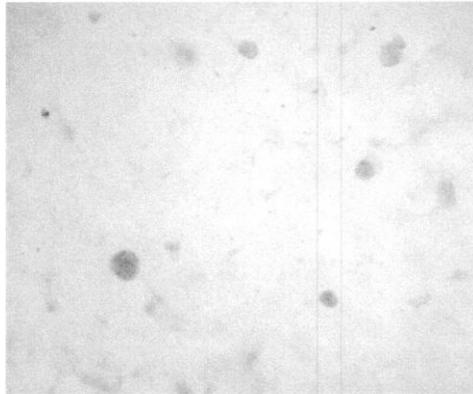


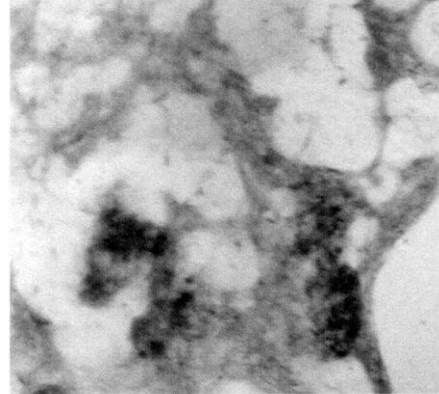
FIGURE 15

【 図 1 6 A - B 】

図 16A-B



(A) RAD



(B) FHR

FIGURES 16A-16B

【 図 1 7 】

図 17

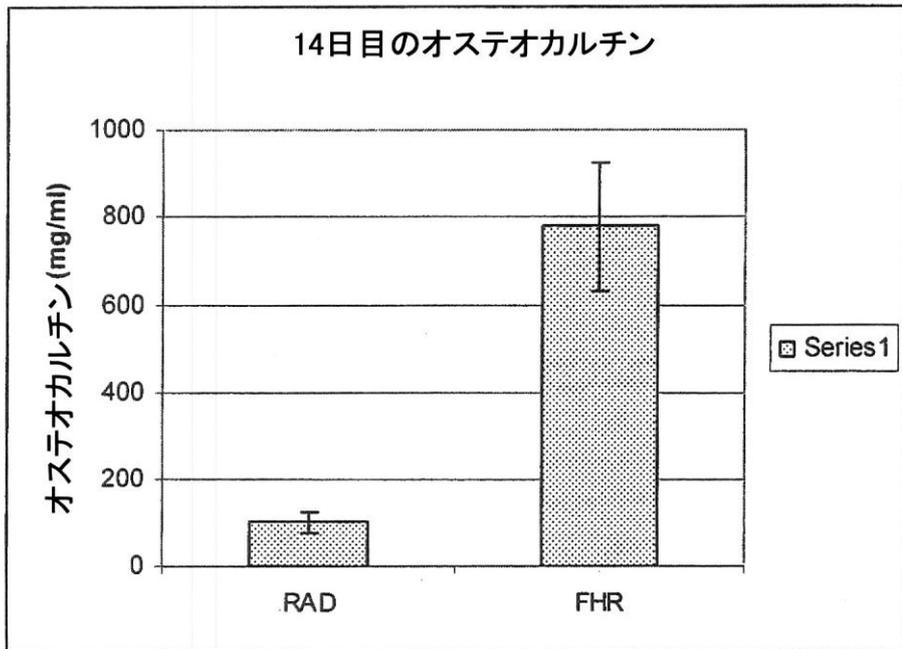


FIGURE 17

【 図 1 8 】

図 18

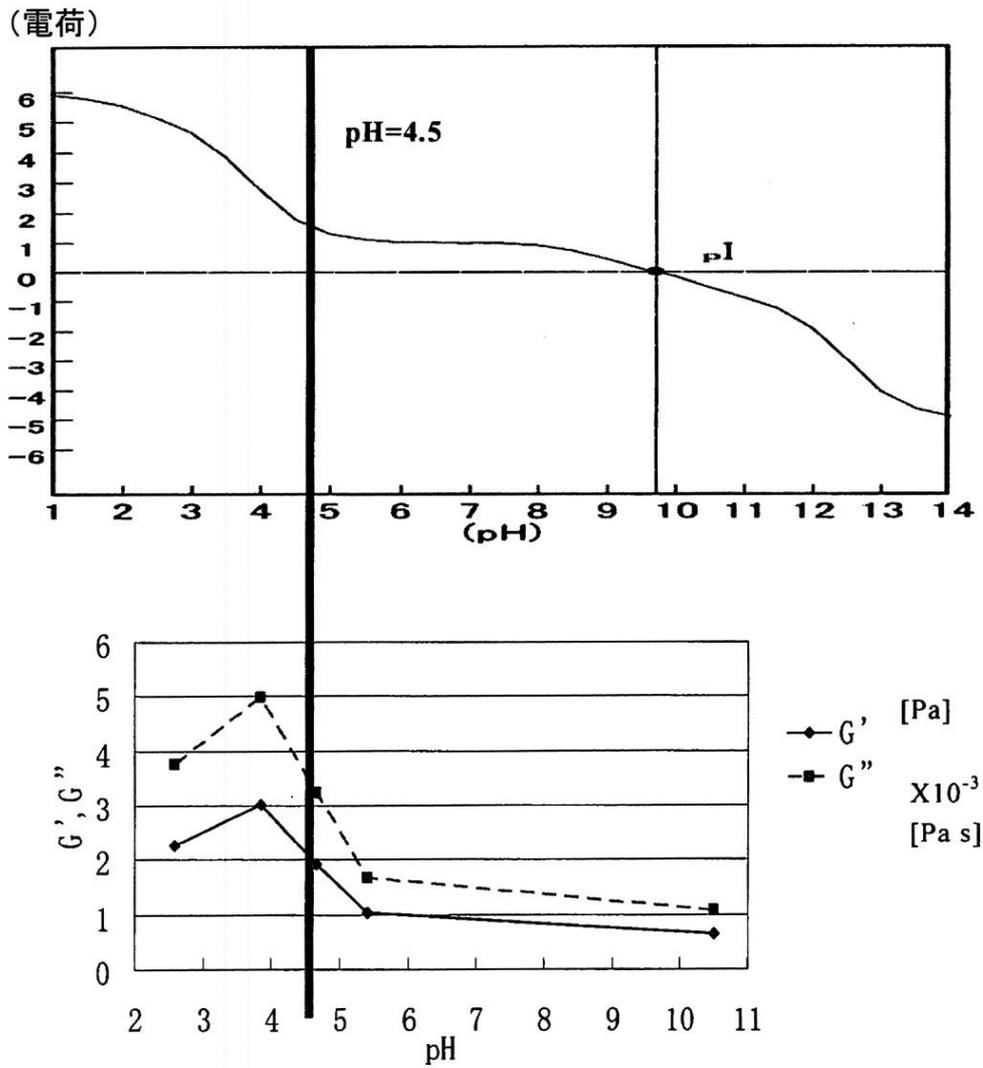


FIGURE 18

【 図 1 9 】

図 19

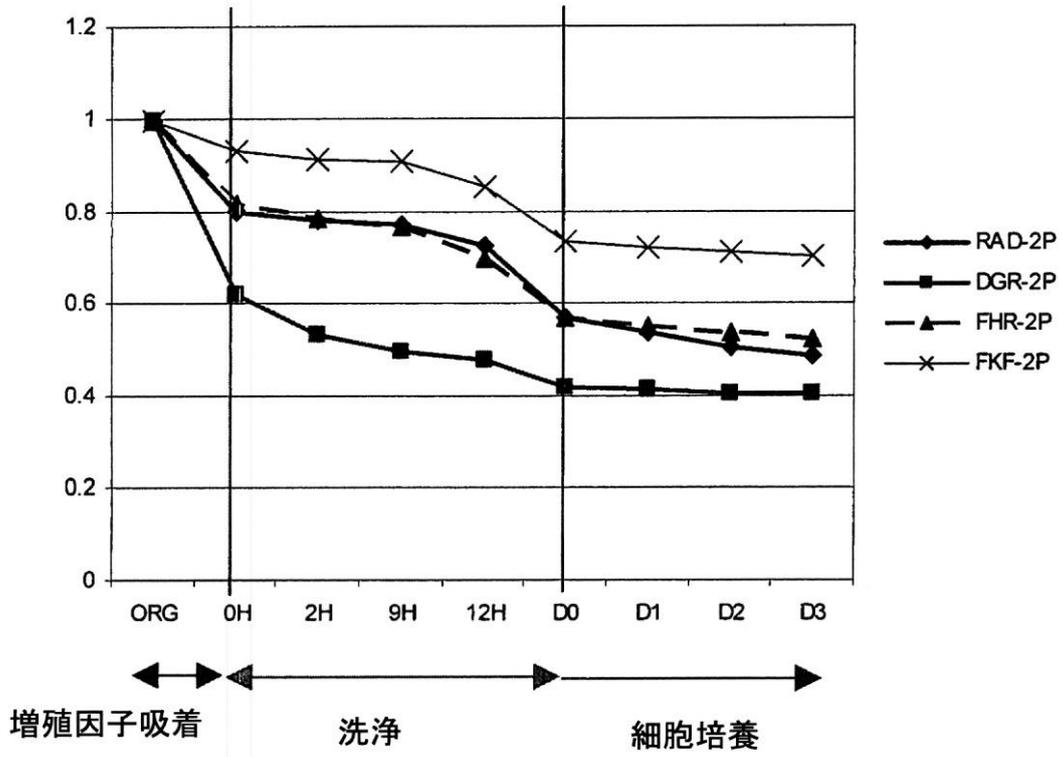


FIGURE 19

【 図 2 0 】

図 20

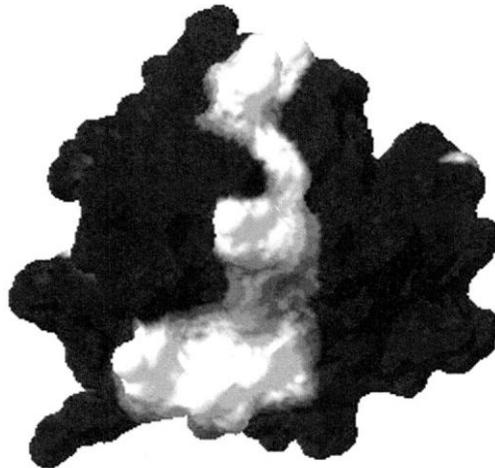
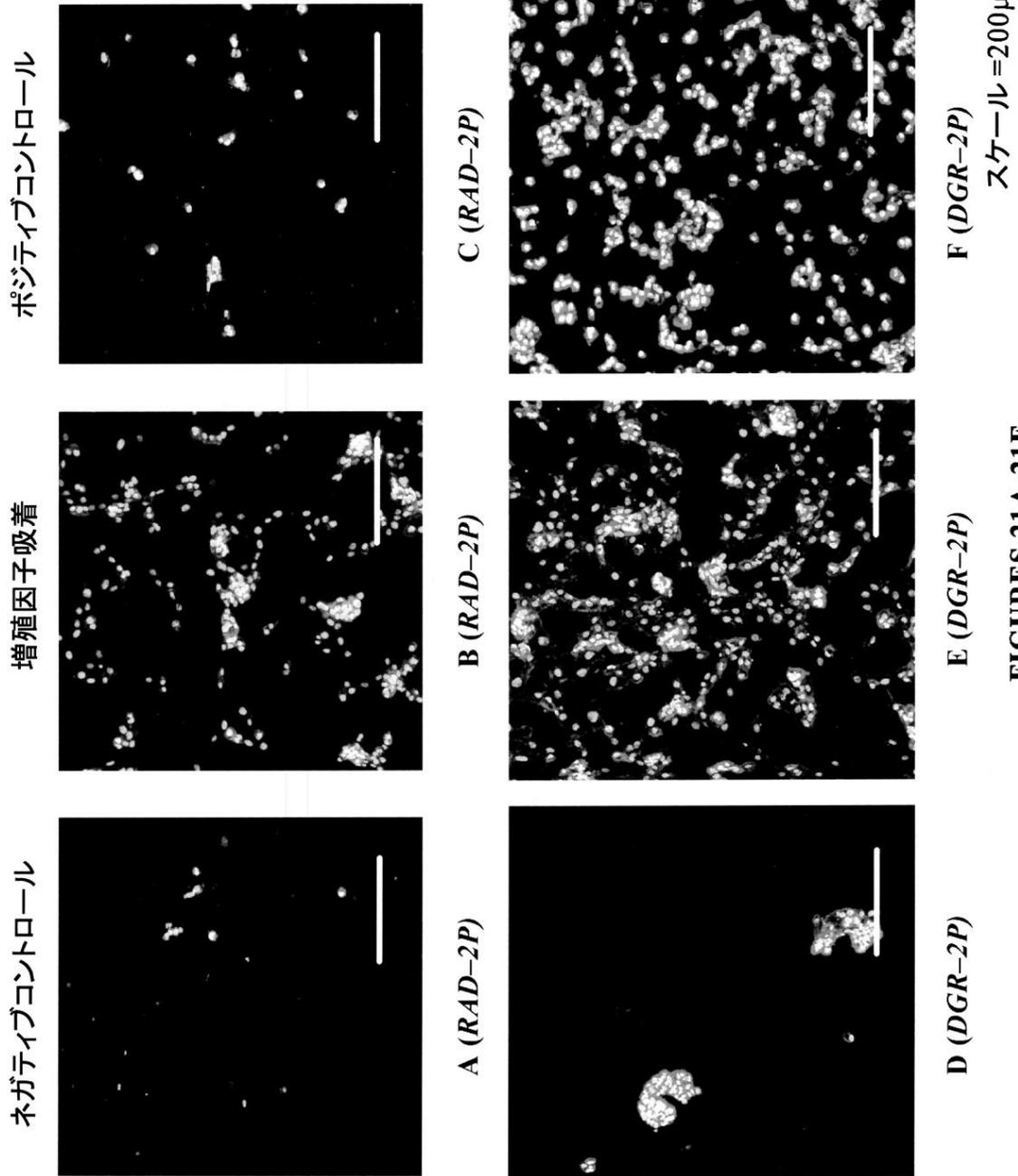


FIGURE 20

【 図 2 1 A - F 】

図 21A-F



FIGURES 21A-21F

【 図 2 2 】

図 22

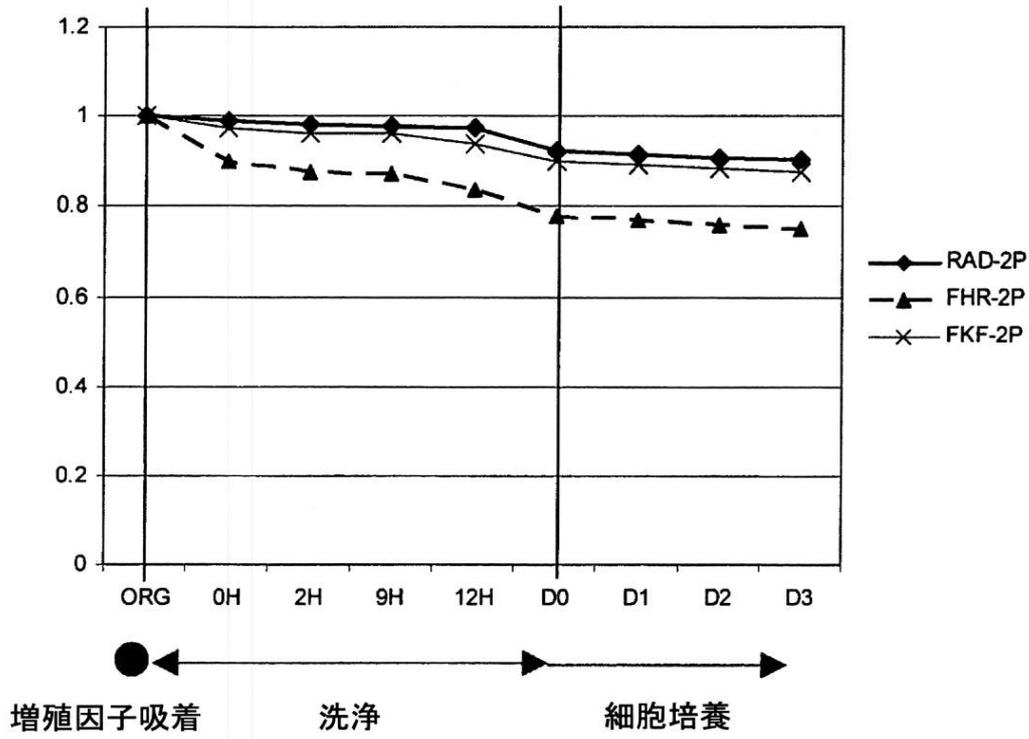
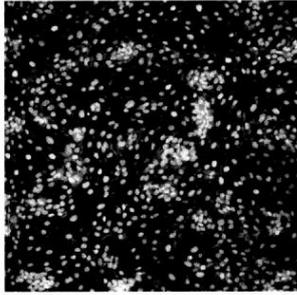


FIGURE 22

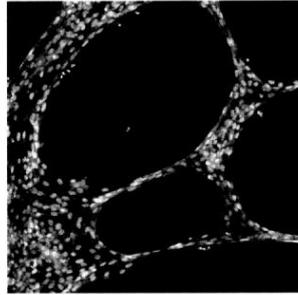


【 図 2 4 A - M 】

図 24A-M



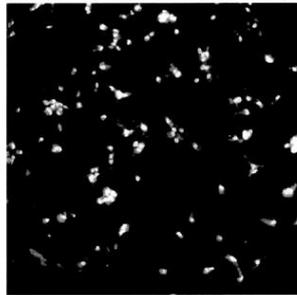
(A) コラーゲン



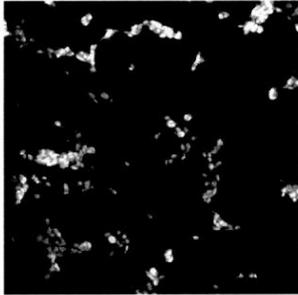
(B) マトリゲル



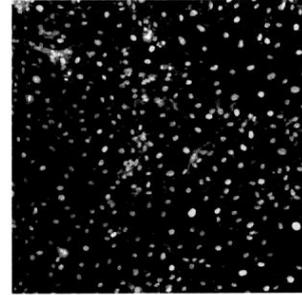
(C) RAD



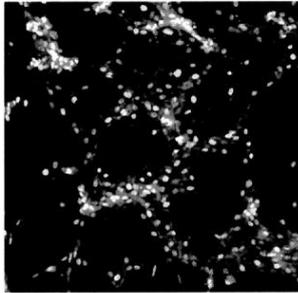
(D) LKKmx



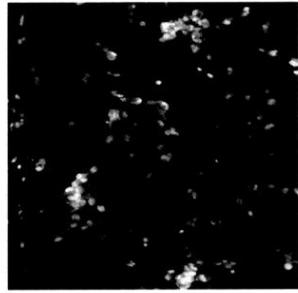
(E) REDmx



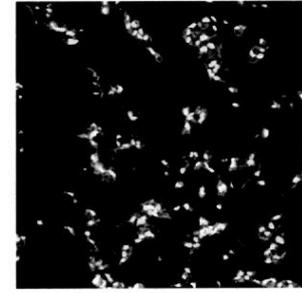
(F) PRGmx



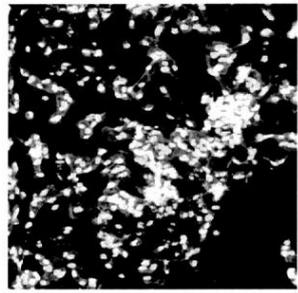
(G) KLTmx



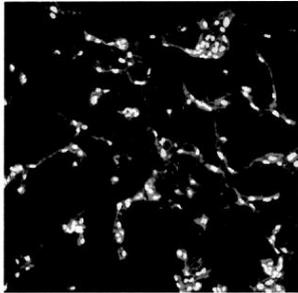
(H) RAD



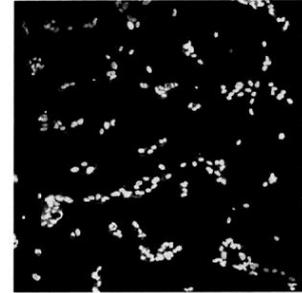
(I) FHR



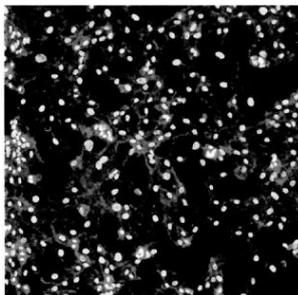
(J) FHRmx



(K) SKPmx



(L) PFS



—  
200μm

FIGURES 24A-24M

【 図 2 5 】

図 25

ペプチドナノファイバーマトリクス上のHUVECの3日間の培養

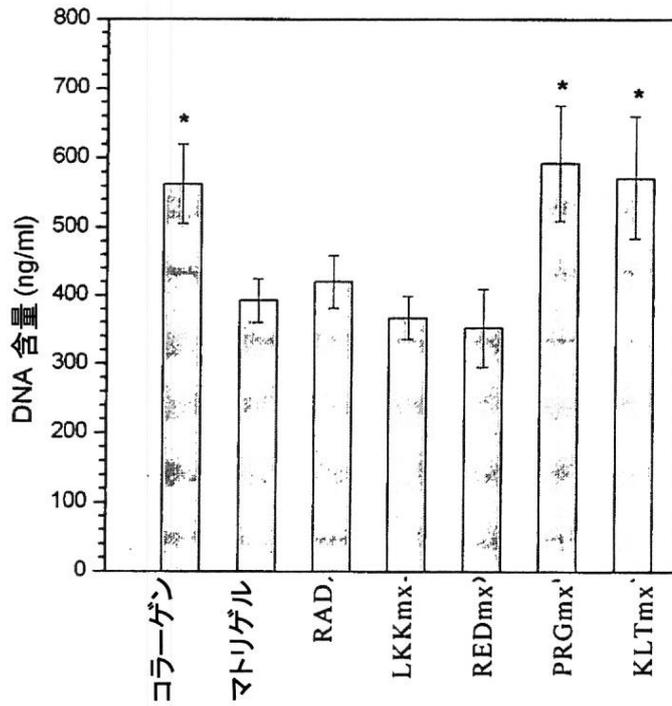
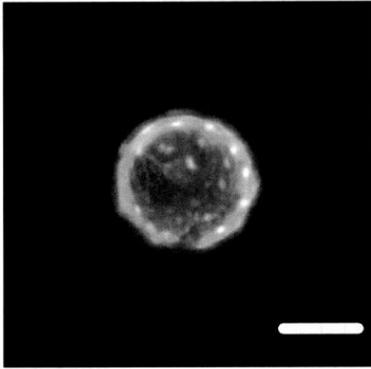


FIGURE 25

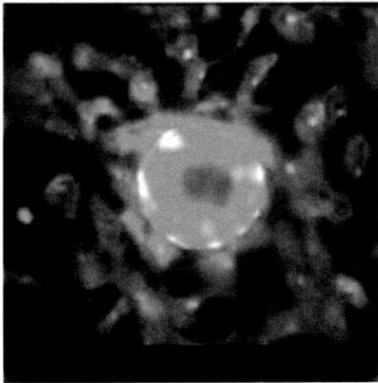
【図 26A - F】

図 26A-F

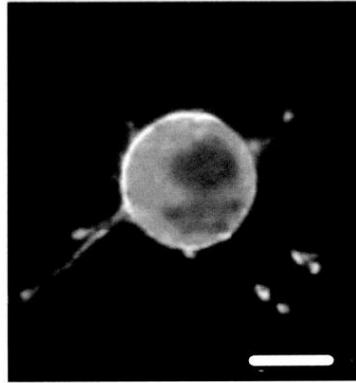
スケール = 100 $\mu$ m



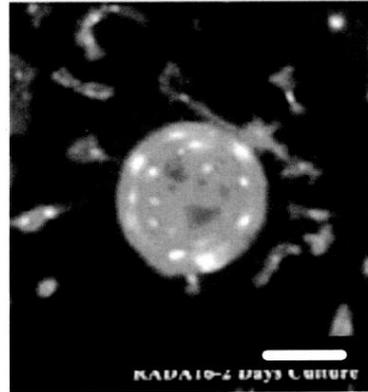
(A) 1日後



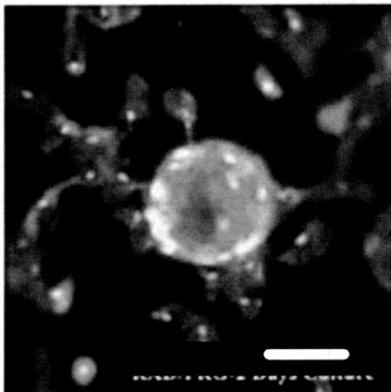
(B) コラーゲン、2日後



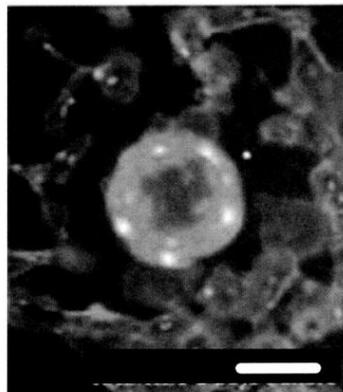
(C) マトリゲル、2日後



(D) RAD、2日後



(E) PRGmx、2日後



(F) KLTmx、2日後

FIGURES 26A-26F

【 図 2 7 】

図 27

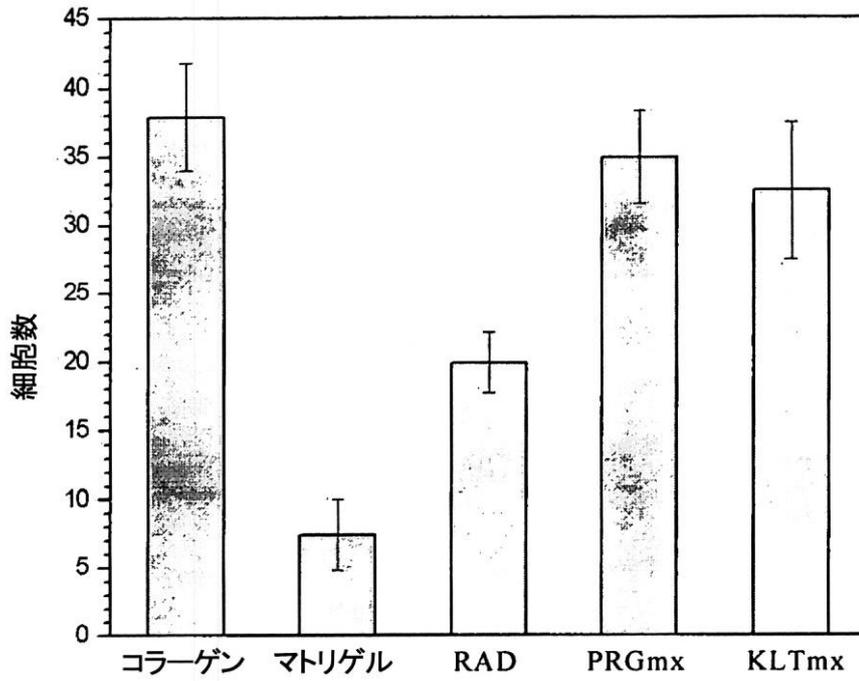
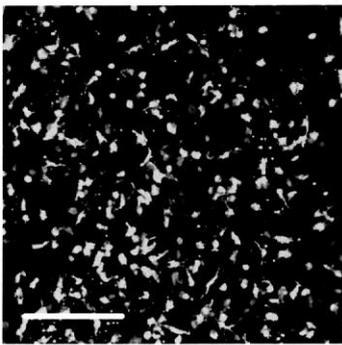


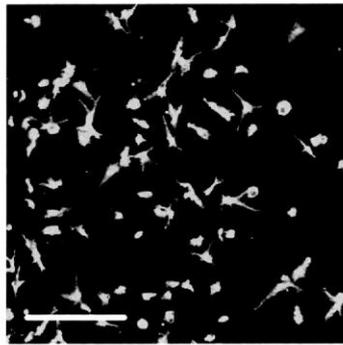
FIGURE 27

【 図 2 8 A - C 】

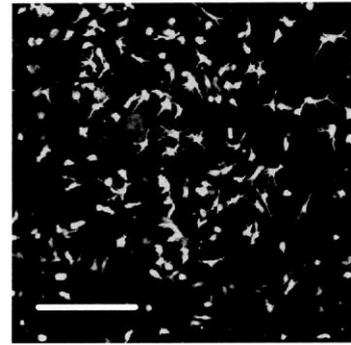
図 28A-C



(A) RAD



(B) PRGmx



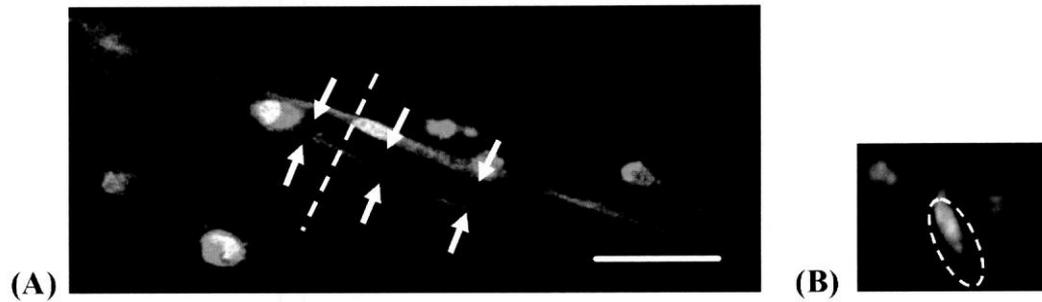
(C) KLTmx

スケール = 100 $\mu$ m

FIGURES 28A-28C

【 図 2 9 A - B 】

図 29A-B



スケール=50μm

FIGURES 29A-29B

【 図 3 0 A 】

図 30A

RAD

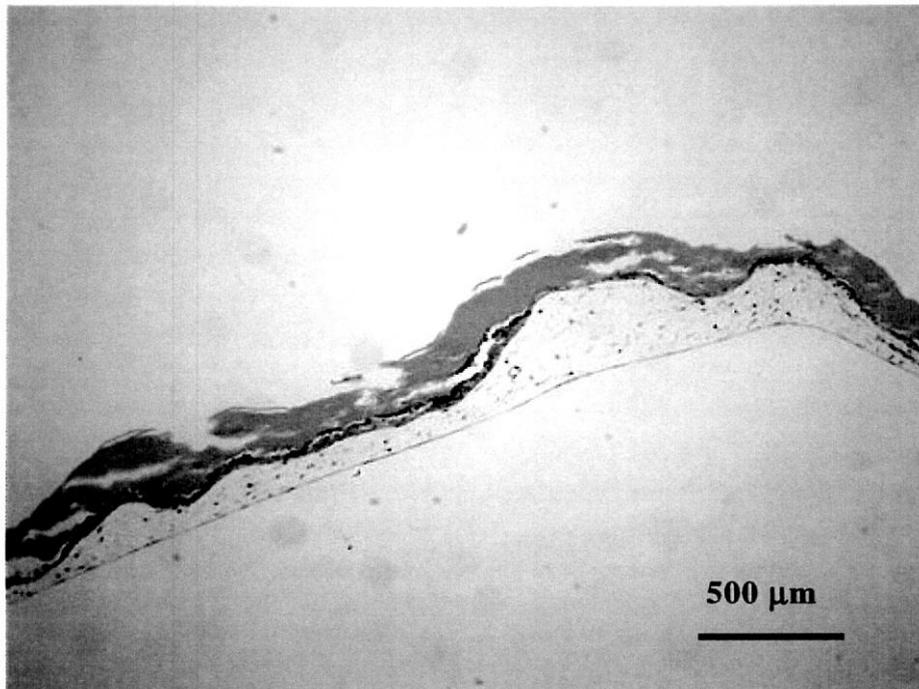


FIGURE 30A

【 図 3 0 B 】

図 30B

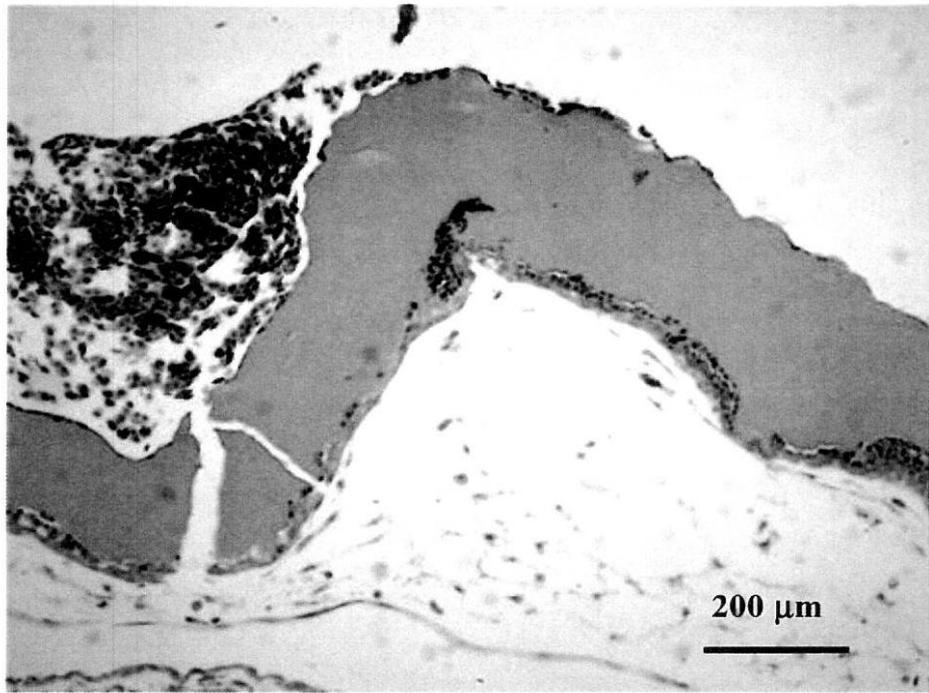


FIGURE 30B

【 図 3 0 C 】

図 30C

KLTmx



FIGURE 30C

【 図 3 0 D 】

図 30D

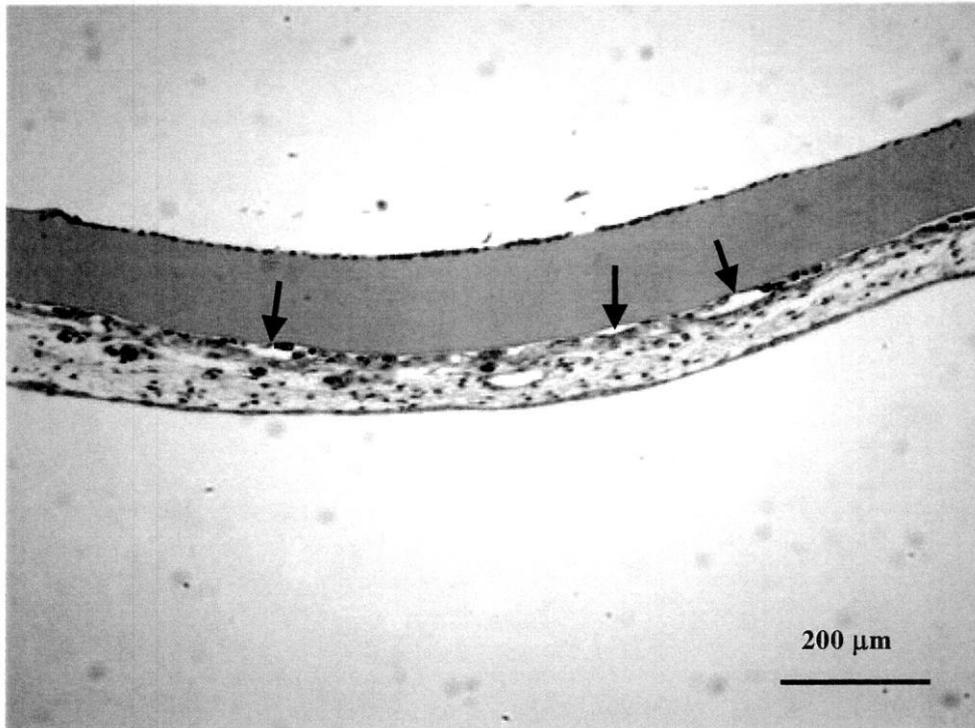


FIGURE 30D

【 図 3 0 E 】

図 30E PRGmx

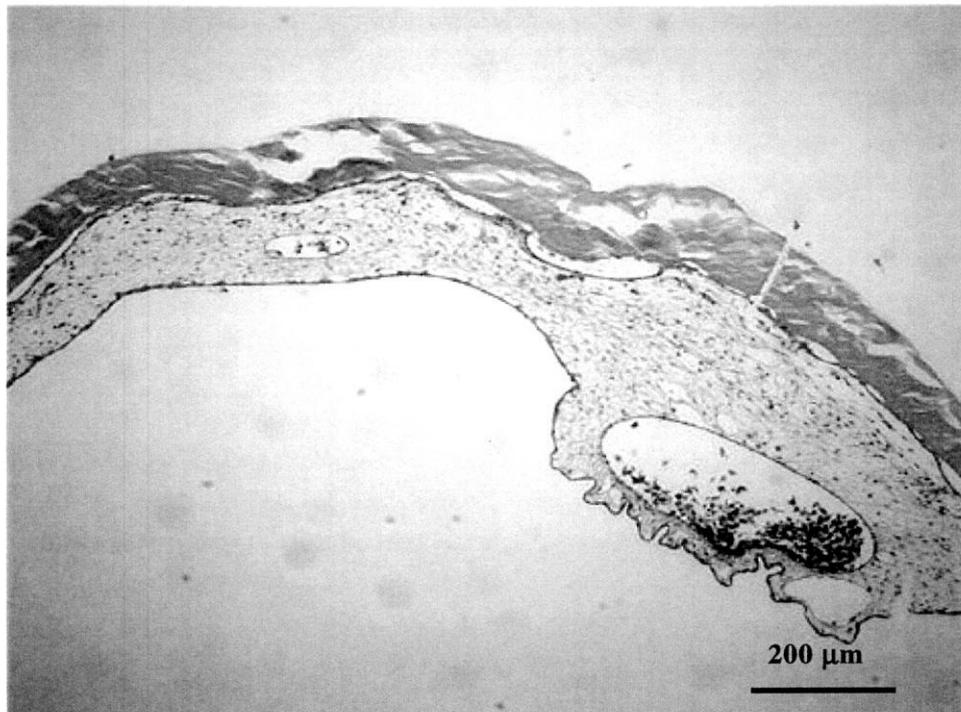


FIGURE 30E

【 図 3 0 F 】

図 30F コラーゲン

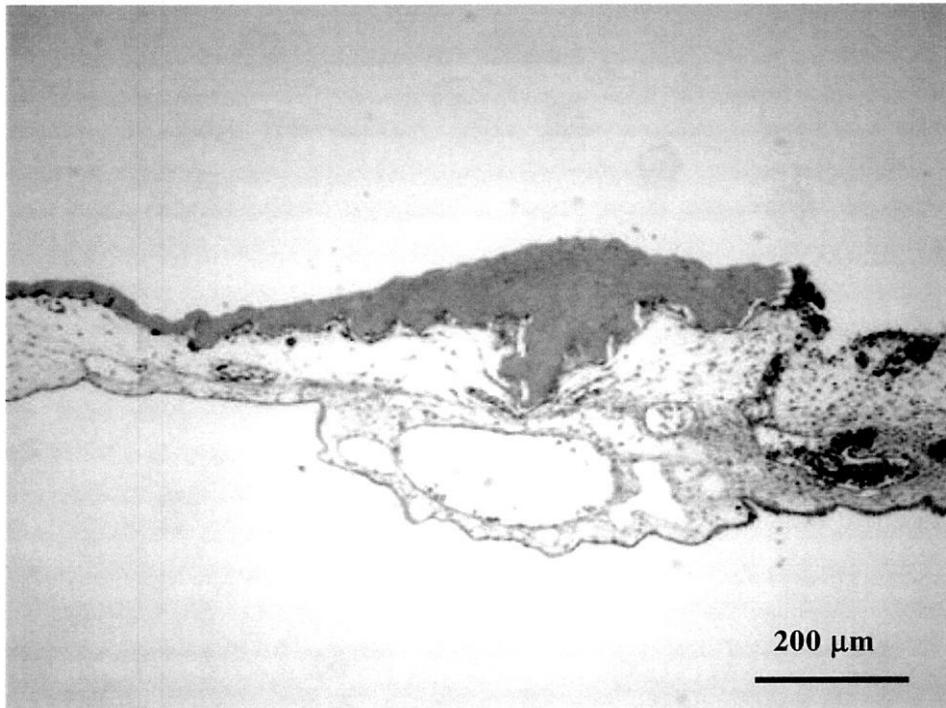


FIGURE 30F

【 図 3 0 G 】

図 30G

マトリゲル

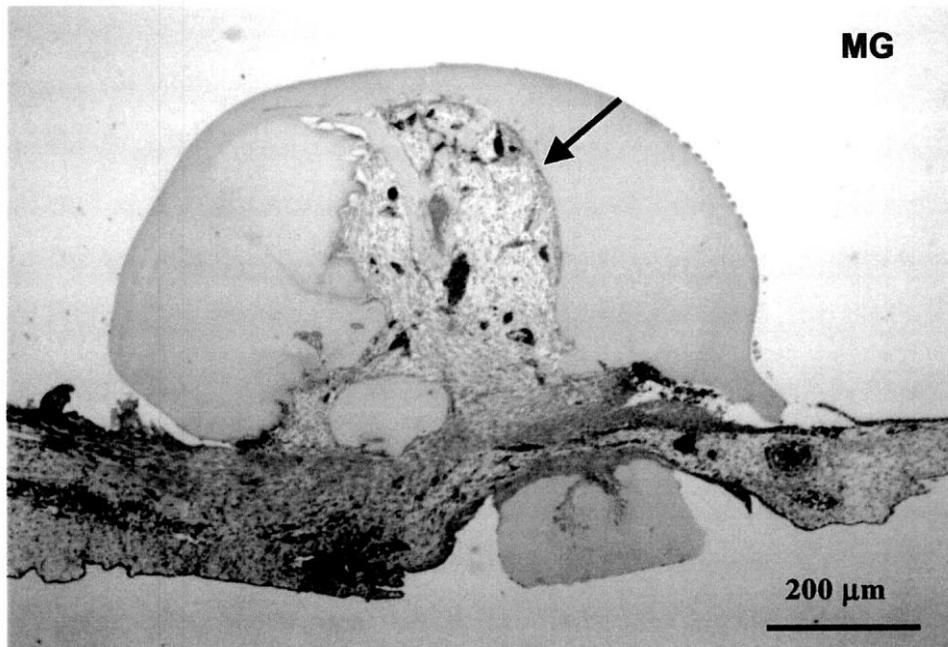
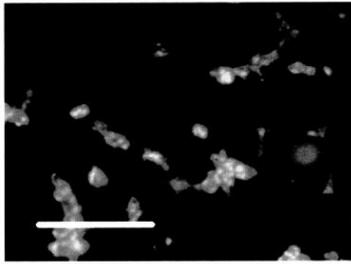


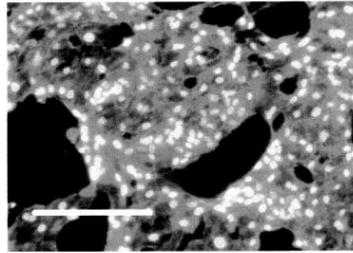
FIGURE 30G

【 図 3 1 A - K 】

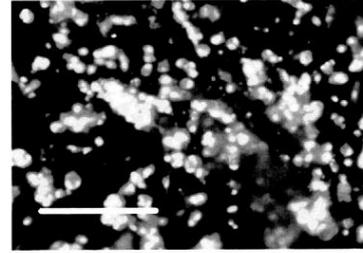
図 31A-K



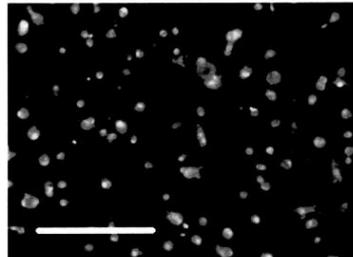
(A) EIK



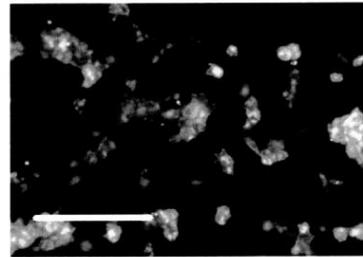
(B) EPRG



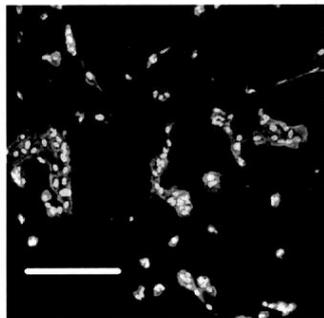
(C) EPRGmx



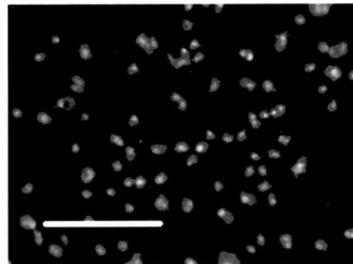
(D) EPFS



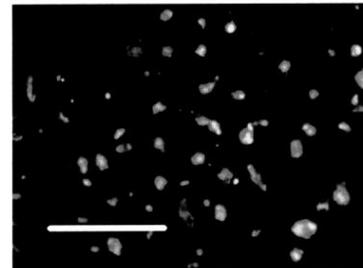
(E) EPFSmx



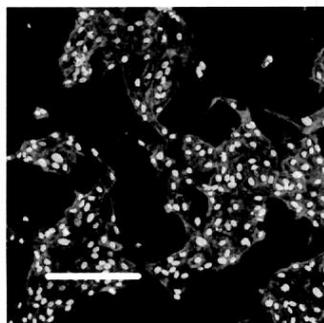
(H) FKF



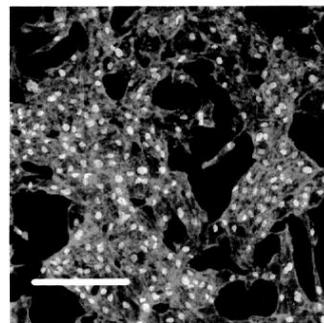
(F) ESKP



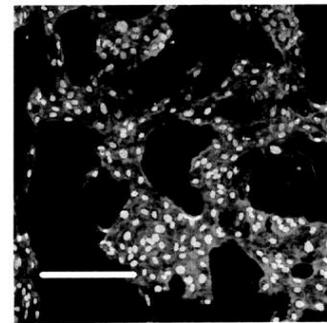
(G) ESKPmx



(I) KFHRmx



(J) KPRG



(K) KPRGmx

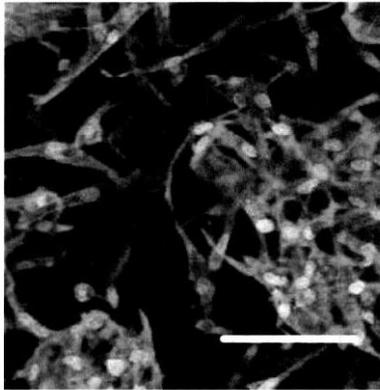
スケール=200μm

FIGURES 31A-31K

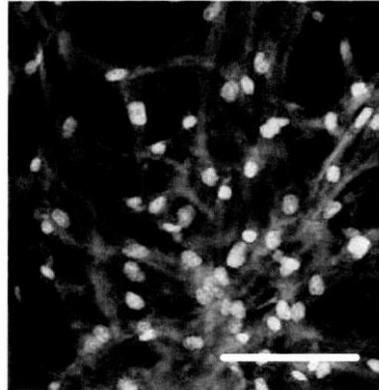
【図 3 2 A - F】

図 32A-F

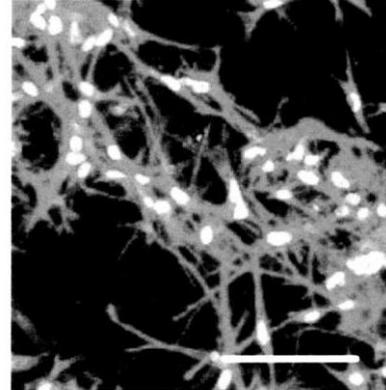
上視像



(A) RAD

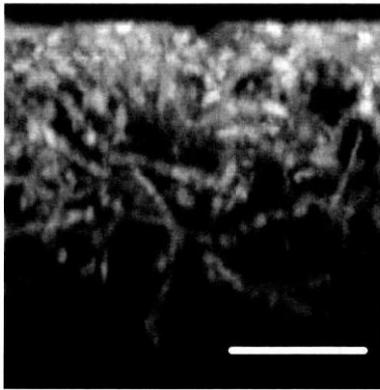


(B) PRGmx



(C) FHRmx

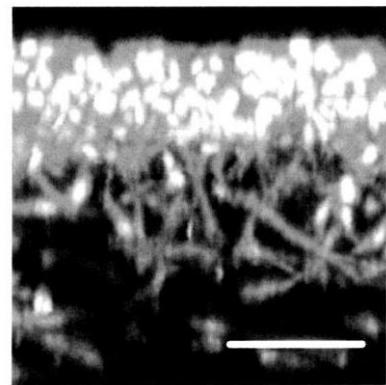
水平像



(D) RAD



(E) PRGmx



(F) FHRmx

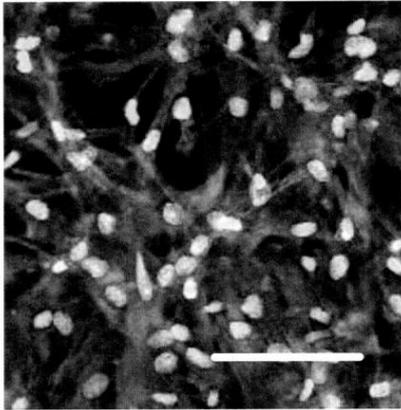
スケール=100 $\mu$ m

FIGURES 32A-32F

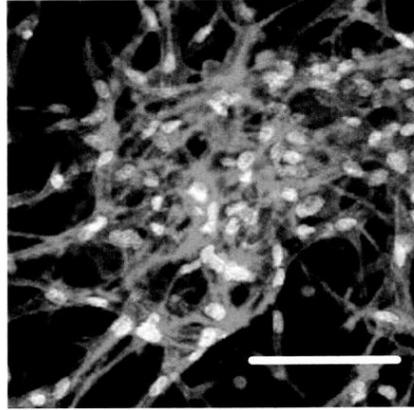
【 図 3 2 G - J 】

図 32G-J

上視像

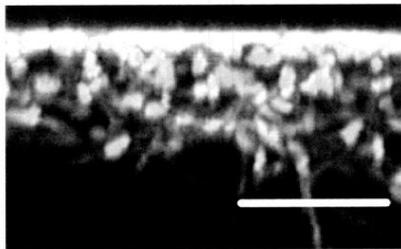


(G) PFSmx

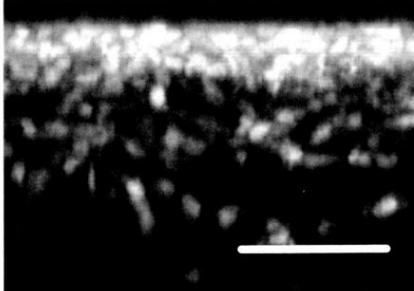


(H) SKPmx

水平像



(I) PFSmx



(J) SKPmx

スケール=100μm

FIGURES 32G-32J

【 図 3 3 】

図 33

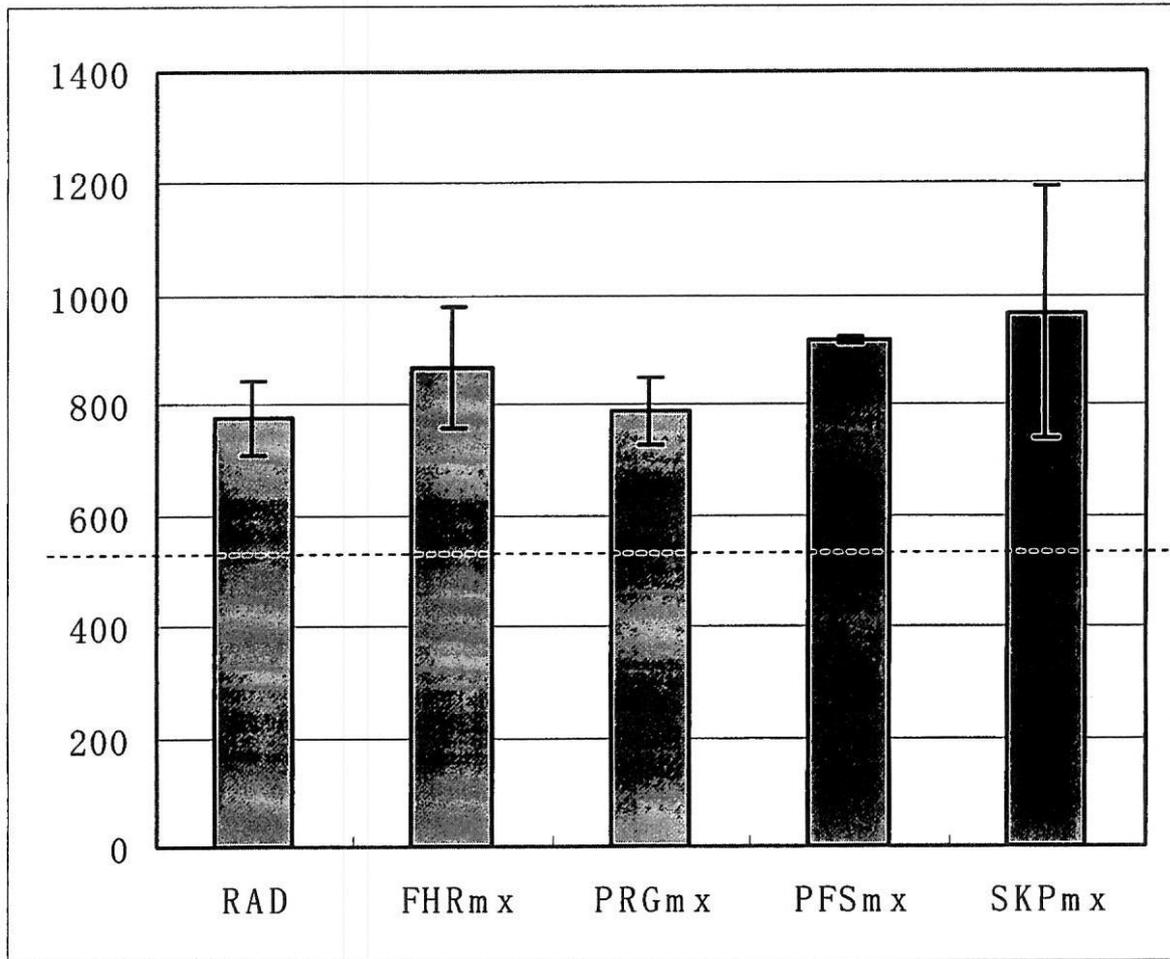
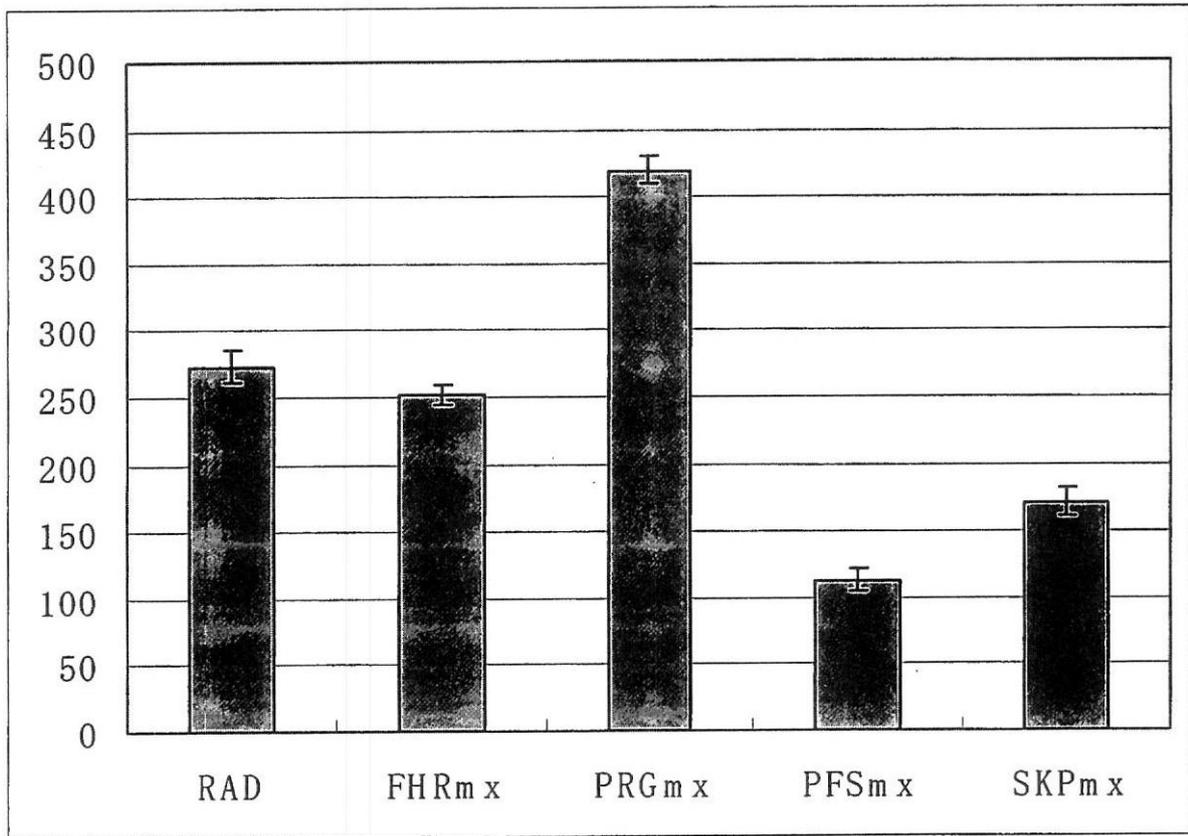


FIGURE 33

【 図 3 4 】

図 34

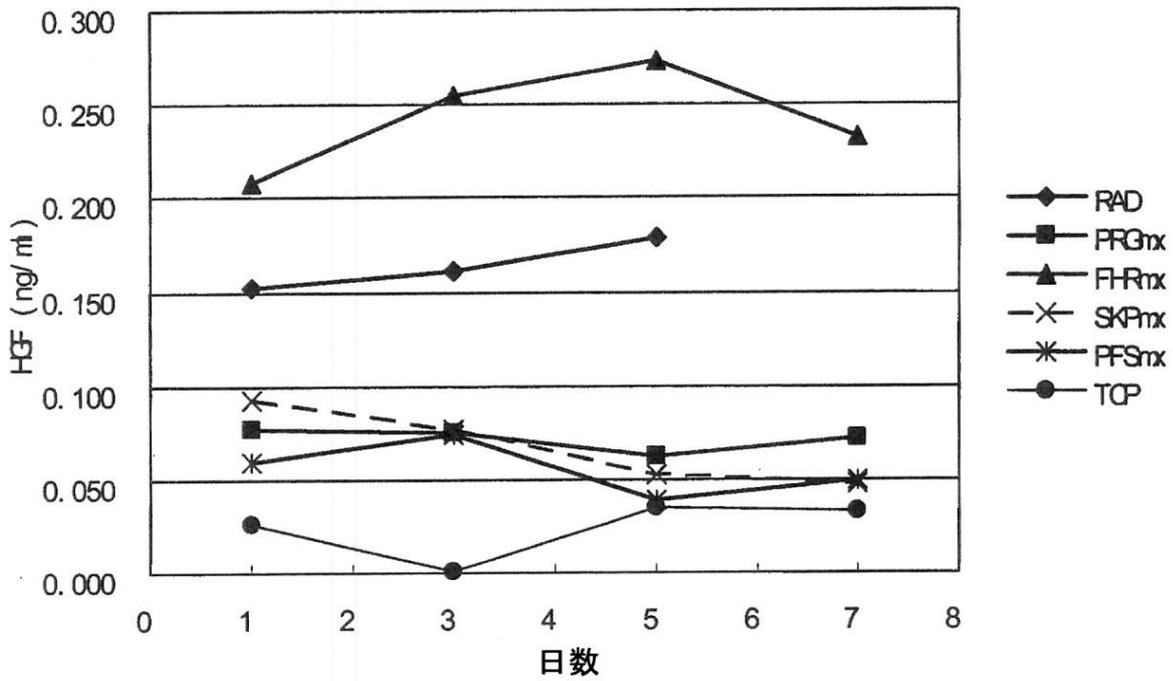


遊走深さ (um)

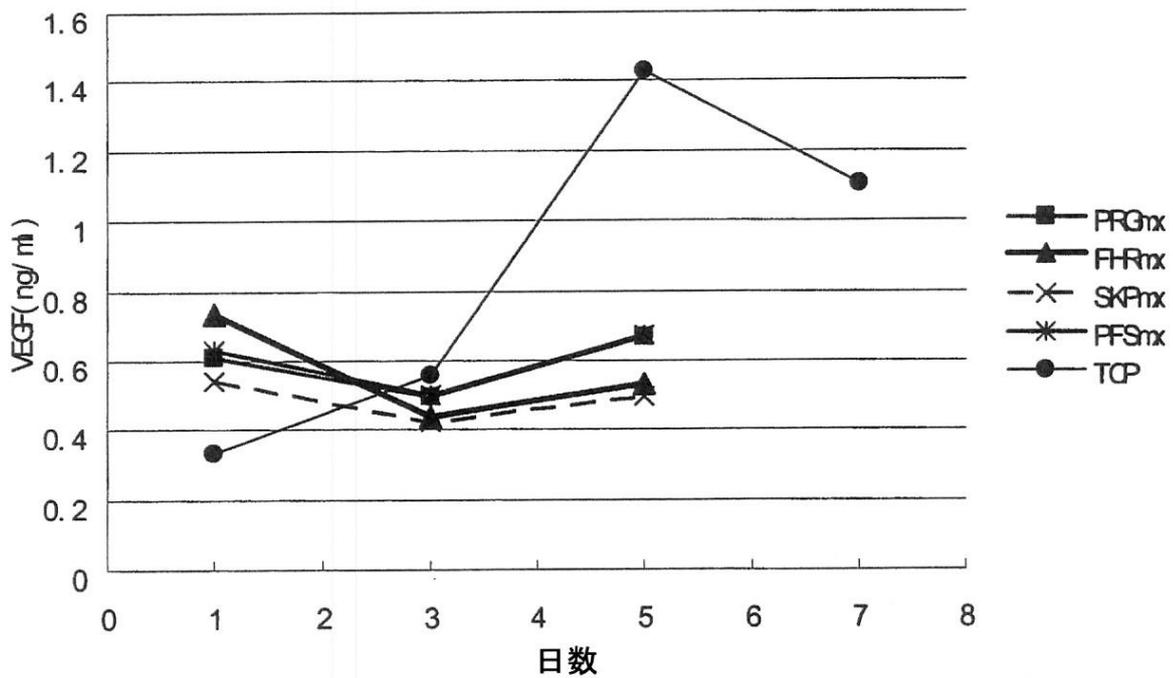
FIGURE 34

【 図 3 5 A - B 】

図 35A-B



(A)

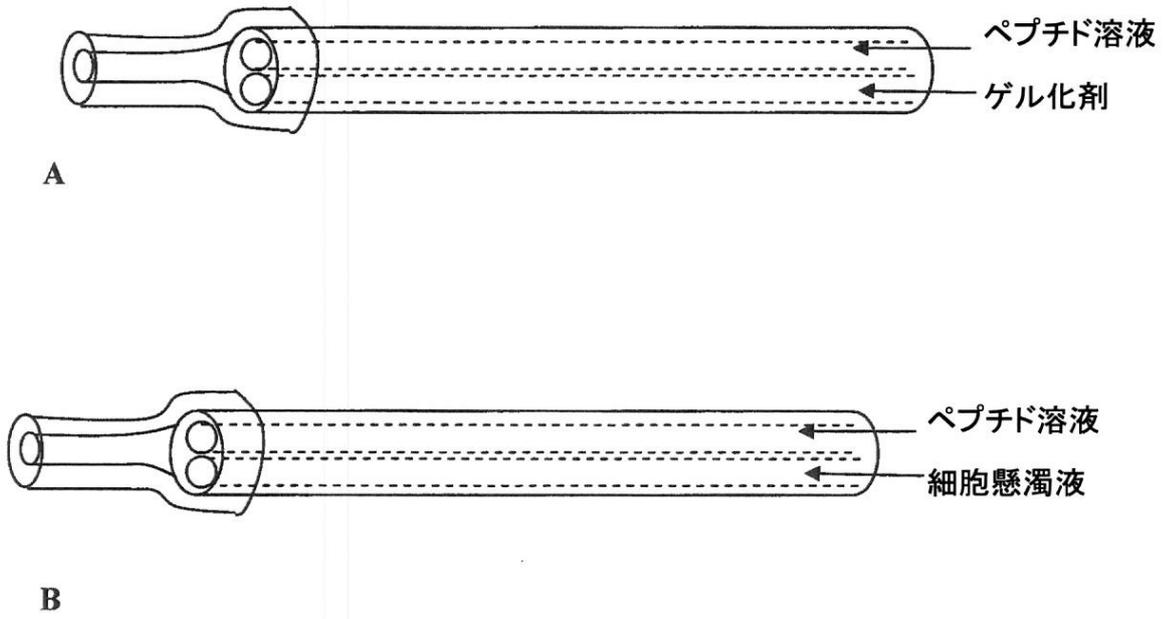


(B)

FIGURES 35A-35B

【図 36 A - B】

図 36A-B



FIGURES 36A-36B

【配列表】

2014062102000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年12月5日(2013.12.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 交互の疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸を含み、非修飾の状態、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を引き起こす第一のアミノ酸ドメインであって、アミノ酸配列 -FKFQ- (配列番号69) を少なくとも2回含む第一のアミノ酸ドメインと、

(b) 単体では自己組織化せず、少なくとも一つの最小の生物学的に活性のある配列を含む第2のアミノ酸ドメインと

を含み、

前記最小の生物学的に活性のある配列が、-PFSSTKT- (配列番号57)、-SKPPGTSS- (配列番号60)、-PRGDSGYRGD- (配列番号54)、-DGRGDSVAYG- (配列番号55)、-ALKRQGRTLYGF- (配列番号56)、-FLGFPT- (配列番号58)、-KLTWQELYQLKYKGI- (配列番号59)、-STFTKSP- (配列番号61)、-IKVAV- (配列番号62)、-FHRRIKA- (配列番号63)、-IKLLI- (配列番号64)、-REDV- (配列番号65)、および-LKKTETQ- (配列番号66) からなる群より選択される、自己組織化ペプチド。

【請求項2】

第2のアミノ酸ドメインが少なくとも2つの最小の生物学的に活性のある配列を含む請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

第2のアミノ酸ドメインが単体で生物学的に活性を有する請求項1に記載のペプチド。

【請求項4】

第2のアミノ酸ドメインが第一のアミノ酸ドメインのC末端と共有結合または非共有結合で接続されている請求項1に記載のペプチド。

【請求項5】

第2のアミノ酸ドメインが第一のアミノ酸ドメインのC末端と共有結合ペプチド結合またはアミノ酸リンカー基により共有結合性に接続されている請求項4に記載のペプチド。

【請求項6】

当該アミノ酸リンカー基が少なくとも一つのグリシン、好ましくは3つのグリシンを含む請求項5に記載のペプチド。

【請求項7】

第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が少なくとも2アミノ酸長(6.9オングストローム)である請求項1に記載のペプチド。

【請求項8】

第一のアミノ酸ドメインの最後のアミノ酸と、第2のアミノ酸ドメインの最小の生物学的に活性のある配列の最初のアミノ酸との距離が少なくとも4アミノ酸長(13.8オングストローム)である請求項1に記載のペプチド。

【請求項9】

第一のアミノ酸ドメインが、アミノ酸配列 n-FKFQFKFQFKFQ-c (配列番号51)を含む請求項1に記載のペプチド。

【請求項10】

第2のアミノ酸ドメインが、細胞接着たんぱく質のヘパリン結合ドメイン由来である請

求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 1 1】

前記細胞接着たんぱく質が、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、コラーゲン、VEGF、FGFs、PDGF、HGF、TGF- およびBMPからなる群より選択される請求項 1 0 に記載のペプチド。

【請求項 1 2】

手術、外傷、腫瘍、または変性疾患から生じる傷害を治療するために使用するための、請求項 1 ~ 1 1 の何れか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 1 3】

前記傷害が、血管組織、脳、神経組織、食道、ファローピウス管、心臓、腸、胆嚢、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、前立腺、膀胱、骨、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿道、尿管、子宮または皮膚に対するものである請求項 1 2 に記載のペプチド。

【請求項 1 4】

幹細胞の生存、分化能、または幹細胞性を維持する；  
幹細胞と組み合わせて注入したときに損傷領域を修復する；  
血管新生および脈管化を促進する；  
骨再生を促進する；および/または  
治療用タンパク質を保持および/またはデリバリーする

際に使用するための、請求項 1 ~ 1 1 の何れか 1 項に記載の自己組織化ペプチド。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 1 の何れか 1 項に記載の自己組織化ペプチドおよび薬学的に許容可能な賦形剤を含む薬学的組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 3 2】

他の実施例

前述は、本発明の特定の好ましいが限定されない実施形態の記述である。下記の請求項で定義されるとおり、本発明の精神と範囲を超えない範囲で、この分野の通常のスキルのものであれば、さまざまな変更を加えることができることが理解できる。

以下に、出願当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[ 1 ] (a) 交互の疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸を含み、非修飾の状態、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を引き起こす第一のアミノ酸ドメインと、

(b) 単体では自己組織化せず、少なくとも一つの最小の生物学的に活性のある配列を含む第 2 のアミノ酸ドメインとを含む自己組織化ペプチド。

[ 2 ] 第 2 のアミノ酸ドメインが少なくとも 2 つの最小の生物学的に活性のある配列を含む [ 1 ] に記載のペプチド。

[ 3 ] 前記最小の生物学的に活性のある配列が、-PRGDSGYRGD-；-DGRGDSVAYG-；-ALKRQGRTLYGF-；-PFSSTKT-；-FLGFPT-；-KLTWQELYQLKYKGI-；-SKPPGTSS-；-STFTKSP-；-IKVAV-；-FHRRIKA-；-IKLLI-；-RGD-；-REDV-；-LKKTETQ- からなる群より選択される [ 1 ] に記載のペプチド。

[ 4 ] 少なくとも一つの前記最小の生物学的に活性のある配列が、-RGD- を含む [ 1 ] に記載のペプチド。

[ 5 ] 第 2 のアミノ酸ドメインが単体で生物学的に活性を有する [ 1 ] に記載のペプチド。

[ 6 ] 第 2 のアミノ酸ドメインが第一のアミノ酸ドメインの C 末端と共有結合または非共有結合で接続されている [ 1 ] に記載のペプチド。



[ 1 8 ] 当該自己組織化ペプチドが約 5 - 9 (5と9も含む)のpH の水性溶液中で正または負の総電荷を持つ [ 1 ] に記載のペプチド。

[ 1 9 ] 第一のアミノ酸ドメインが近中性であるか、または正電荷若しくは負電荷を有する [ 1 8 ] に記載のペプチド。

[ 2 0 ] 第 2 のアミノ酸ドメインが正電荷または負電荷を有する [ 1 8 ] に記載のペプチド。

[ 2 1 ] 前記溶液の pH が約 6 - 8 (6と8も含む)であるときに、第一のアミノ酸ドメインの電荷が - 1 から 1 である [ 1 9 ] に記載のペプチド。

[ 2 2 ] 前記水溶液の pH が約 6 - 8 (6と8も含む)であるときに、第 2 のアミノ酸ドメインの電荷が - 2 かそれ以下である [ 2 0 ] に記載のペプチド。

[ 2 3 ] 第一のアミノ酸ドメインが 5 - 9 (5と9も含む)の等電位点を有する [ 1 8 ] に記載のペプチド。

[ 2 4 ] 当該自己組織化ペプチドが 8 または 8 以上の等電位点を有する [ 1 8 ] に記載のペプチド。

[ 2 5 ] 当該溶液の pH が約 6 - 8 (6と8も含む)であるときに、当該自己組織化ペプチドの総電荷が約 2 または 2 以上である [ 1 8 ] に記載のペプチド。

[ 2 6 ] 単体で存在する場合、第 2 のアミノ酸ドメインは自己組織化せず、当該ペプチドが集合して巨視的な構造を形成するように、第一のアミノ酸ドメインの自己組織化を可能にする [ 1 ] に記載の自己組織化ペプチド。

[ 2 7 ] 当該巨視的な構造がナノファイバーおよび/または シートを含む [ 2 7 ] に記載の自己組織化ペプチド。

[ 2 8 ] 水溶液中で単独のペプチドとして存在するときに、当該ペプチドが自己組織化する [ 1 ] に記載の自己組織化ペプチド。

[ 2 9 ] 水溶液中に単独のペプチドとして存在するときには自己組織化せず、水溶液中に非修飾の自己組織化ペプチドと共に存在するときには自己組織化する [ 1 ] に記載の自己組織化ペプチド。

[ 3 0 ] さらに、第 3 のアミノ酸ドメインを含む [ 1 ] に記載の自己組織化ペプチド ; ここで、当該第 3 のアミノ酸ドメインは、(a) 疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が交互に設けられたドメインを含み、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を引き起こす第一のアミノ酸ドメインと、(b) 単独では自己組織化しないが、第 1 のアミノ酸ドメインの集合により、巨視的な構造の形成を可能にする第 2 のアミノ酸ドメイン、のいずれかを含む。

[ 3 1 ] 疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が交互に設けられたドメインを含み、相補的で、構造的に適合し、自己組織化し、巨視的な構造を取る、自己組織化を介在する 2 つのアミノ酸ドメインの間に、生物学的に活性のあるペプチドモチーフまたは生分子との相互作用のための標的部位を含むアミノ酸ドメインの直鎖のペプチド鎖を含む [ 3 0 ] に記載の自己組織化ペプチド。

[ 3 2 ] 当該巨視的な構造がナノファイバーおよび/または シートを含む [ 3 1 ] に記載の自己組織化ペプチド。

[ 3 3 ] [ 1 ] に記載の自己組織化ペプチドを含む溶液。

[ 3 4 ] [ 1 ] に記載の自己組織化ペプチドを含む医薬組成物。

[ 3 5 ] ゲル化剤を実質的に含まず、生体内で自己組織化して巨視的な構造を形成する [ 3 4 ] に記載の医薬組成物。

[ 3 6 ] 当該巨視的な構造がナノファイバーおよび/または シートを含む [ 3 5 ] に記載の医薬組成物。

[ 3 7 ] 疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が交互に設けられたドメインを含み、相補的で、構造的に適合し、シートに自己組織化し、巨視的な構造を取る、追加の自己組織化ペプチドを更に含み、当該追加の自己組織化ペプチドが細胞接着または細胞生存の適合性を低下させるアミノ酸を含まない [ 3 4 ] に記載の医薬組成物。

[ 3 8 ] [ 1 ] に記載の自己組織化ペプチドと当該追加の自己組織化ペプチドが約 1 :



- [ 5 7 ] 当該マトリクスが更に固体物を含む [ 4 2 ] に記載のマトリクス。
- [ 5 8 ] 当該固体物が無機塩である [ 5 7 ] に記載のマトリクス。
- [ 5 9 ] 当該無機塩がカルシウムおよび / またはリン酸である [ 5 8 ] に記載のマトリクス。
- [ 6 0 ] 当該無機塩が、リン酸カルシウム、三リン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイトおよび炭酸カルシウムからなる群より選択される [ 5 9 ] に記載のマトリクス。
- [ 6 1 ] 当該固体物が約 1 0 0 - 5 0 0 ミクロン ( 100 と 500 を含む ) の範囲の孔径を有する [ 5 7 ] に記載のマトリクス。
- [ 6 2 ] 当該固体物がブロック状、円柱状、板状または顆粒状である [ 5 7 ] に記載のマトリクス。
- [ 6 3 ] ( i ) 当該自己組織化ペプチドを水溶液に溶解する工程と, ( ii ) pH を調整する工程とを含む [ 4 2 ] に記載のマトリクスを製造する方法。
- [ 6 4 ] ( iii ) ゲル化剤を加える工程を更に含む [ 6 3 ] に記載のマトリクスを製造する方法。
- [ 6 5 ] ( i ) 当該自己組織化ペプチドを水溶液に溶解する工程と, ( ii ) ゲル化剤を加える工程とを含む [ 4 2 ] に記載のマトリクスを製造する方法。
- [ 6 6 ] ( iii ) pH を調整する工程を更に含む [ 6 5 ] に記載のマトリクスを製造する方法。
- [ 6 7 ] 当該ゲル化剤が電解質である [ 6 4 ] または [ 6 5 ] に記載の方法。
- [ 6 8 ] 当該ゲル化剤が食塩、食塩水、PBS、細胞培養液または生物学的流体である [ 6 7 ] に記載の方法。
- [ 6 9 ] 当該生物学的流体が血液またはリンパ液である [ 6 7 ] に記載の方法。
- [ 7 0 ] pH が約 5 - 9 ( 5 と 9 を含む ) に調整されている [ 6 3 ] または [ 6 6 ] に記載の方法。
- [ 7 1 ] pH が約 6 - 8 ( 6 と 8 を含む ) に調整されている [ 7 0 ] に記載の方法。
- [ 7 2 ] pH が約 5 - 7 ( 5 と 7 を含む ) に調整されている [ 7 1 ] に記載の方法。
- [ 7 3 ] pH が約 5.7 - 5.8 ( 5.7 と 5.8 を含む ) に調整されている [ 7 2 ] に記載の方法。
- [ 7 4 ] 骨又は組織の欠損補填材としての [ 4 2 ] に記載のマトリクスの使用方法。
- [ 7 5 ] 当該組織が、脳、皮膚、肝臓、脾臓、胃、腎臓、消化器、食道、心臓、筋肉、結合組織、軟骨、神経、脂肪または骨髄である [ 7 4 ] に記載の方法。
- [ 7 6 ] 当該補填材が水溶液中の自己組織化ペプチドを含む [ 7 4 ] に記載の方法。
- [ 7 7 ] 当該補填材が当該自己組織化ペプチドのヒドロゲルを含む [ 7 4 ] に記載の方法。
- [ 7 8 ] 当該ヒドロゲルが、当該自己組織化ペプチドの水溶液とゲル化剤との混合により形成される [ 7 7 ] に記載の方法。
- [ 7 9 ] 当該ゲル化剤が生物学的流体である [ 7 8 ] に記載の方法。
- [ 8 0 ] 当該生物学的流体が血液またはリンパ液である [ 7 9 ] に記載の方法。
- [ 8 1 ] 当該ヒドロゲルが、当該自己組織化ペプチドの水溶液の pH を調整することによる形成される [ 7 7 ] に記載の方法。
- [ 8 2 ] 更に固体物を含む [ 7 4 ] に記載の方法。
- [ 8 3 ] 当該固体物が無機塩である [ 8 2 ] に記載の方法。
- [ 8 4 ] 当該無機塩がカルシウムおよび / またはリン酸である [ 8 3 ] に記載の方法。
- [ 8 5 ] 当該無機塩が、リン酸カルシウム、三リン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイトおよび炭酸カルシウムからなる群より選択される [ 8 4 ] に記載の方法。
- [ 8 6 ] 前記固体物が、約 1 0 0 - 5 0 0 ミクロン ( 100 と 500 を含む ) の孔径を有する [ 8 2 ] に記載の方法。
- [ 8 7 ] 当該固体物がブロック状、円柱状、板状または顆粒状である [ 8 2 ] に記載の方法。
- [ 8 8 ] 当該欠損が、損傷した組織、損傷した整形領域、骨欠損、骨隣接部、異所性の骨形成、虚血領域、心筋梗塞領域、末梢血管領域、脳梗塞領域または皮膚欠損である [ 7

4 ] に記載の方法。

[ 8 9 ] [ 1 ] に記載の自己組織化ペプチド、 [ 3 4 ] に記載の医薬組成物または [ 4 2 ] に記載のマトリクスをそれを必要とする対象に対して投与することを含む細胞の分化または機能活性を増強する方法。

[ 9 0 ] [ 1 ] に記載の自己組織化ペプチド、 [ 3 4 ] に記載の医薬組成物または [ 4 2 ] に記載のマトリクスを対象の体の部位または体内に導入することを含む対象を治療する方法。

[ 9 1 ] 当該部位が、整形領域、骨欠損部、骨隣接部、異所性の骨形成部、虚血領域、心筋梗塞領域、末梢血管領域、脳梗塞領域または皮膚欠損部である [ 9 0 ] に記載の方法。

[ 9 2 ] (a)(i) [ 1 ] の自己組織化ペプチド、(ii) [ 3 4 ] の医薬組成物、または(iii) [ 4 2 ] のマトリクス；(b) 当該ペプチドの巨視的な構造への自己組織化を開始するための説明書；並びに(c) 細胞群、細胞または組織培養培地、あらかじめ定めた量の増殖因子、予め定めた量のイオンまたはその塩、当該自己組織化ペプチドを細胞培養のために準備するための説明書、ペプチドハイドロゲル構造の上または中で細胞を培養するための説明書、当該自己組織化ペプチドを対象に導入するための説明書、細胞培養を実施する容器、当該ペプチドを溶解する液体、注射器、ペプチドの自己組織化を開始するためのイオンまたはその塩、および 1 または 1 以上の増殖因子または分化因子からなる群より選択される少なくとも 1 の成分；を含む培養キット。

[ 9 3 ] 細胞を、 [ 1 ] の自己組織化ペプチド、 [ 3 4 ] の医薬組成物、または [ 4 2 ] のマトリクスと接触させることと、当該マトリクスを細胞培養に適した条件下で細胞培養に適した時間に亘り維持することを含む細胞を培養する方法。

[ 9 4 ] 当該細胞が、当該マトリクスの表面上で培養される、および / または当該マトリクス内に封入されて培養される [ 9 2 ] に記載の方法。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 35/12	(2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 9/00	(2006.01)	C 0 7 K 9/00	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/78	(2006.01)	C 0 7 K 14/78	
A 6 1 K 38/17	(2006.01)	A 6 1 K 37/12	
A 6 1 K 38/22	(2006.01)	A 6 1 K 37/24	

(72)発明者 シュグアン・ジャン  
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 4 2 1、レキシントン、ボーカー・ストリート 2 5

(72)発明者 シュメイ・ワン  
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 1 4 3、サマービル、リンカーン・パークウェイ 3  
 6、ナンバー 2

(72)発明者 ファブリツィオ・ゲライン  
 イタリア国、ミラノ、アイ - 2 0 0 9 4 コルシコ、ピア・デッラ・レジステンツァ 1 5

Fターム(参考) 4C076 CC29 CC41 EE41M EE59 FF31  
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA41 CA59 DB52 MA02 NA12 NA13  
 NA14 ZA892 ZA962 ZB212 ZB262  
 4C087 AA01 AA02 BB63 MA02 NA05 ZA89 ZB21 ZC75  
 4H045 AA10 BA10 BA41 CA40 EA20 EA34 FA20 FA74

【外国語明細書】

2014062102000001.pdf