

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7397440号
(P7397440)

(45)発行日 令和5年12月13日(2023.12.13)

(24)登録日 令和5年12月5日(2023.12.5)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 K	38/18 (2006.01)	A 6 1 K	38/18
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08
C 0 7 K	14/33 (2006.01)	C 0 7 K	14/33
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195
		Z N A	
請求項の数 10 (全42頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号 特願2019-543282(P2019-543282)		(73)特許権者 500467264	
(86)(22)出願日 平成30年2月9日(2018.2.9)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ	
(65)公表番号 特表2020-508984(P2020-508984 A)		ザ ユニバーシティ オブ アーカンソー	
(43)公表日 令和2年3月26日(2020.3.26)		アメリカ合衆国、アーカンソー、リトル	
(86)国際出願番号 PCT/US2018/017665		ロック、 ノース ユニバーシティ アベ	
(87)国際公開番号 WO2018/148573		ニユー 2 4 0 4	
(87)国際公開日 平成30年8月16日(2018.8.16)		(73)特許権者 598041566	
審査請求日 令和3年2月9日(2021.2.9)		学校法人北里研究所	
(31)優先権主張番号 62/457,410		東京都港区白金5丁目9番1号	
(32)優先日 平成29年2月10日(2017.2.10)		(74)代理人 100094569	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		弁理士 田中 伸一郎	
前置審査		(74)代理人 100109070	
		弁理士 須田 洋之	
		(74)代理人 100119013	
		弁理士 山崎 一夫	
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 コラーゲン結合薬剤組成物およびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ドメインリンカーによって連結された2つのコラーゲン結合ドメインと、治療薬剤リンカーによって前記コラーゲン結合ドメインの少なくとも1つに連結されたFGFポリペプチドを含む、骨形成を促進するためのコラーゲン結合治療薬剤であって、前記コラーゲン結合治療薬剤が、コラゲナーゼ活性を欠き、前記2つのコラーゲン結合ドメインの一方が、配列番号:1 - 14のポリペプチドから成る群から選択され、他方のコラーゲン結合ドメインが、配列番号:15 - 30のポリペプチドから成る群から選択される、前記コラーゲン結合治療薬剤。

【請求項2】

前記2つのコラーゲン結合ドメインが一緒になって、配列番号:40 - 47のポリペプチドのいずれか1つ、配列番号:40 - 47のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド、および配列番号:40 - 47のいずれか1つの連続する少なくとも8つのアミノ酸のフラグメントから成る群から選択されるポリペプチドを含む、請求項1に記載のコラーゲン結合治療薬剤。

【請求項3】

前記ドメインリンカーが、ポリペプチドを含む、請求項1～2のいずれか1項に記載のコラーゲン結合治療薬剤。

【請求項4】

前記ドメインリンカーが、配列番号:48 - 55のポリペプチド、または配列番号:48 - 55

のポリペプチドのいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチドから成る群から選択されるポリペプチドを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のコラーゲン結合治療薬剤。

【請求項5】

前記治療薬剤リンカーが、ポリペプチドを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のコラーゲン結合治療薬剤。

【請求項6】

前記FGFのC末端が、前記治療薬剤リンカーによって前記コラーゲン結合ドメインのN末端と連結される、請求項1～5のいずれか1項に記載のコラーゲン結合治療薬剤。

【請求項7】

請求項1～6に記載のコラーゲン結合治療薬剤のいずれか1つおよび医薬担体を含む、骨形成を促進するための医薬組成物。

【請求項8】

骨形成を促進するための医薬の製造における、請求項1～6に記載のコラーゲン結合治療薬剤のいずれか1つまたは請求項7に記載の医薬組成物の使用。

【請求項9】

前記医薬が、骨の症状を治療するためのものである、請求項8に記載の使用。

【請求項10】

前記骨の症状が、骨折、骨粗しょう症、歯周欠損、または他の骨欠損から成る群から選択される、請求項9に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(連邦政府支援研究に関する記載) 本発明は、米国立衛生研究所のグラント番号GM103450およびGM103429により政府の支援を受けて達成された。合衆国政府は本発明において一定の権利を有する。

(関連出願の相互引用) 本出願は、米国仮特許出願62/457,410(2017年2月10日出願(前記の内容は参照によってその全体が本明細書に含まれる))に関して優先権を主張する。

(配列表) 本出願はEFS-Webにより電子出願され、テキスト形式の電子提出配列表を含む。当該テキストファイルは、“2018-02-09_5965-00084_ST25.txt”の表題の配列表(2018年2月9日作成)を含み、サイズは72,312バイトである。本テキストファイルに含まれる配列表は本出願の部分であり、参照によってその全体が本明細書に含まれる。

(技術分野)

【背景技術】

【0002】

コラーゲンは、多様な動物組織の細胞外間隙で見出される主要な構造タンパク質である。コラーゲンは、例えば皮膚、靱帯および腱のような線維性組織で見出され得る。コラーゲンはまた骨、軟骨、角膜、血管および筋組織で豊富である。

異常または損傷コラーゲンは、いくつかの病的状態(創傷およびコラーゲン症(collagenopathy)を含む)の基礎を成す。コラーゲン症は、コラーゲン構造またはコラーゲン形成が正常ではない多くの疾患を表す。この疾患グループは、骨欠損、血管欠損および皮膚欠損を含む広域症状をもたらす。これらの疾患の多くは利用可能な治療をもたないか、または効果的でない治療しかもたない。

コラーゲンを標的とする薬剤はまた、種々の動物組織または特定組織内の複数の部分部位へ治療薬をデリバリーするために有望な薬剤である。特定の治療薬剤が必要とされる対象の体内の複数部位への効果的な治療薬デリバリーは成長分野である。標的誘導デリバリーシステムは、治療薬剤が必要とされる部位において当該薬剤が最も活性を有し、一方、望ましくない毒性および副作用をもたらし得る当該治療薬剤のオフサイト作用を最小化することを可能にする。体内の特定の部位へ治療薬剤を誘導するために標的誘導リボソーム

10

20

30

40

50

またはポリペプチド（例えば抗体）を使用することは成功をもたらすことが証明されたが、一方、追加のデリバリー薬剤が必要とされる。したがって、損傷若しくは正常コラーゲンを有する組織を治療するために、またはそのような組織へ適切な治療薬をデリバリーするために用いることができる、コラーゲンを標的とする新規な薬剤が当業界で希求されている。

【発明の概要】

【0003】

ある特徴では、コラーゲン結合薬剤が提供される。当該コラーゲン結合薬剤は、ドメインリンカーによって連結された2つのコラーゲン結合ドメインを含むことができる。当該2つのコラーゲン結合ドメインは、配列番号:1 - 47のポリペプチドのいずれか1つ、配列番号:1 - 47の1つの変種、または配列番号:1 - 47のポリペプチドの1つのフラグメントから選択できる。配列番号:1-39は、多様な細菌種のColGおよびColHタンパク質の個々のコラーゲン結合ドメイン（すなわちColG s3a、ColG s3b、ColH s3）を規定する。配列番号:40 - 47は、多様な再菌種のColGタンパク質で見出されるタンデムコラーゲン結合ドメインを規定する。図5もまた参照されたい。本発明のコラーゲン結合薬剤はさらにまた、治療薬剤リンカーによってコラーゲン結合薬剤に連結された治療薬剤を含むことができる。当該治療薬剤は以下から選択できる：FGF、副甲状腺ホルモン（PTH）、PTH/PTHrP受容体アゴニスト、PTH/PTHrP受容体アンタゴニスト、骨形成タンパク質（BMP）、G-CSF、BMP-2、BMP-3、抗スクレロスチン抗体、成長ホルモン、IGF-1、VEGF、TGF- β 、KGF、TGF- β 、TGF- β 1、TGF- β 受容体、CT、GH、GM-CSF、EGF、PDGF、セリプロロール、アクチビン、および結合組織増殖因子。

別の特徴では、医薬組成物が提供される。当該医薬組成物は、本明細書に記載されるコラーゲン結合薬剤のいずれかおよび医薬担体を含むことができる。

さらに別の特徴では、ある状態を治療する方法がまた提供される。当該方法は、本明細書に記載されるコラーゲン結合薬剤または医薬組成物のいずれかを当該状態の治療に有効な量で対象に投与する工程を含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1A】図1Aは、*C.ヒストリチウム*（*C.histoliticum*）によって分泌されるコラゲナーゼの模式図を示す。

【図1B】図1Bは、当該タンデムコラーゲン結合ドメインの構造の擬似二回転対称を示す。

【図1C】図1Cは、当該二回転軸が当該ページ面に対して垂直であることを示す。コラーゲンとの結合に不可欠な残基が強調されている（ColGS3aは黄色、ColGS3bは青色）。

【図2A】図2Aは、分析用サイズ排除クロマトグラフィーによって決定されたpCaの関数としてのタンデムCBDの見かけの分子量を示す。

【図2B】図2Bは、SAXS散乱プロファイルに基づくpCa3、4および5におけるタンデムCBDの分子エンベロープを示す。

【図3】図3は、I型コラーゲンの自家集合に対するコラーゲン結合の影響を示す。

【図4】図4Aは、SAXS散乱プロファイルに基づくミニコラーゲンに対するタンデムCBDの分子エンベロープを示す。図4Bおよび4Cは、タンデムコラーゲン結合ドメインとコラーゲン原線維との結合のモデルを示す。

【図5】図5は、細菌のタンデムコラーゲン結合ドメイン（配列番号:40 - 47）の配列アラインメントを示す。コラーゲンと結合する残基は青色で強調されている。カルシウム結合残基は赤色で、構造的に重要な残基は緑色で示されている。

【図6】図6は、実施例2で用いられる、4つのコラーゲン結合塩基性線維芽細胞増殖因子構築物の調製のためのスキームを示す。

【図7】図7は、bFGFおよびCB-bFGFの*in vitro*分裂増殖（proliferation）活性を示す。bFGFおよびCB-bFGFによる骨膜間葉系細胞の分裂増殖の用量依存誘発。細胞数は処置後3日間定量された。データは平均 \pm S.E.として示される（ $n=8$ ）。

10

20

30

40

50

【図 8】図 8A - 8F は、bFGF および CB-bFGF をロードしたポリ (pro-Hyp-Gly)₁₀ を注射した後の 3D 微細 CT 分析を示す。回復から 4 週間後の PBS (図 8A)、bFGF (図 8B)、bFGF-CBD (H) (図 8C)、bFGF-PKD-CBD (図 8D)、bFGF-CBD-CBD (図 8E) (図 8F) で処置された、マウスの骨折大腿骨の 3D 微細 CT 画像。赤色：新たに形成された骨、灰色：既存骨。スケールバーは 3mm を示す。

【図 9 A - B】図 9A - 9B は、大腿骨骨折部位への bFGF および CB-bFGF をロードしたポリ (pro-Hyp-Gly)₁₀ を注射してから 4 週間後のラット大腿骨の 3D 微細 CT 分析を示す。図 9A は仮骨体積 (mm³) を示すグラフであり、図 9B は骨無機質の含有量を示すグラフである。データは平均 ± S.E. として示される (n = 8)。グラフの棒線上の小文字は以下のように規定される：a はコントロールグループと比較して P < 0.05、b は bFGF グループと比較して P < 0.05、c は bFGF-CBD (H) グループと比較して P < 0.05、d は bFGF-PKD-CBD グループと比較して P < 0.05、e は bFGF-CBD (G) グループと比較して P < 0.05。

10

【図 10】図 10A - 10F は、骨折治癒 14 日目の代表的なヘマトキシリンおよびエオシン染色切片を示す。PBS (図 10A)、bFGF (図 10B)、bFGF-CBD (ColH s3) (図 10C)、bFGF-PKD-CBD (ColH s2b-s3) (図 10D)、bFGF-CBD (ColG s3b) (図 10E) および bFGF-CBD-CBD (s3a-s3b) (図 10F) で処理された、回復から 14 日後のマウスの骨折大腿骨の組織学画像。スケールバー = 500 μm。

【図 11】H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂ (配列番号:60) の HPLC プロファイルを示す。HPLC グラジエント：60 で 30 分間の 0.05% TFA 中の 10 - 40% CH₃CN。

【図 12 - 1】図 12-1 は、バシルス (*Bacillus*) およびクロストリジウム (*Clostridium*) 科のいくつかの M9B 細菌コラゲナーゼのアラインメントを示す配列アラインメントである (配列番号:1 - 39 を参照されたい)。青色で示される残基はコラーゲン結合活性のために重要であり、緑色で示される残基は構造維持またはタンパク質折畳みのために重要である。これらの両方はまた最上段および最下段の配列に対して強調される。赤色で示される残基は Ca²⁺ 結合に不可欠であり、橙色で示される残基は Ca²⁺ 結合残基の位置決めに不可欠である。

20

【図 12 - 2】図 12-2 は、バシルス (*Bacillus*) およびクロストリジウム (*Clostridium*) 科のいくつかの M9B 細菌コラゲナーゼのアラインメントを示す配列アラインメントである (配列番号:1 - 39 を参照されたい)。青色で示される残基はコラーゲン結合活性のために重要であり、緑色で示される残基は構造維持またはタンパク質折畳みのために重要である。これらの両方はまた最上段および最下段の配列に対して強調される。赤色で示される残基は Ca²⁺ 結合に不可欠であり、橙色で示される残基は Ca²⁺ 結合残基の位置決めに不可欠である。

30

【発明を実施するための形態】

【0005】

非限定的に例で、本発明者らは細菌のタンデムコラーゲン結合薬剤の高解像構造を初めて報告する。遺伝子重複および融合から生じるタンデムコラーゲン結合薬剤の擬似対称性配置は、前記薬剤がコラーゲン原線維の固有のニッチを認識してコラーゲンの分解を促進することを可能にする。タンデムコラーゲン結合薬剤の構造はまた、同方向のコラーゲン分子間でくさびで留めることができることを示す。以前に認識された、コラーゲンのねじれ不足領域に対するコラーゲン結合ドメインの優先性と一緒になって前記構造は、タンデムコラーゲン結合薬剤が細菌コラゲナーゼ (ColG) の照準をコラーゲン原線維の損傷領域に合わせることを示唆する。タンデムコラーゲン結合薬剤とコラーゲンとの相互作用態様に関するこの新しい知識に基づいて、本発明者らは新規なコラーゲン結合薬剤を開示する。前記新規な結合薬剤を用いて組織内の損傷コラーゲンを治療するか、または非損傷若しくは損傷コラーゲンを含む組織に治療薬を特異的に標的誘導することができる。本明細書で提供されるタンデムコラーゲン結合薬剤は、2つのコラーゲン原線維を架橋することによってコラーゲンとのより堅固な結合を可能にすることができる。本明細書に記載するコラーゲン結合薬剤のこの新規な結合相互作用は、新規でかつ予想に反する治療薬の使用を提供する。コラーゲン分子のこの増進された結合親和性および交差結合は、ある種の適用

40

50

についてこれらタンデムコラーゲン結合薬剤を対応するその単一結合薬剤よりも有効にすることができる。適用には皮膚適用が含まれ得る。

【0006】

ある特徴では、コラーゲン結合薬剤が提供される。コラーゲン結合薬剤は、ドメインリンカーによって連結された2つのコラーゲン結合ドメインを含むことができる。本明細書で用いられるように、“コラーゲン結合ドメイン”はコラーゲンと結合するポリペプチドを指す。いくつかの実施態様では、コラーゲン結合ドメインは、500 μ M、100 μ M、10 μ M、1 μ M、500 nM、100 nM、10 nM、1 nM、または0.1 nM未満のKdでコラーゲンと結合することができる。コラーゲン結合ドメインがコラーゲンと結合するか否かの決定は、例えば米国特許公開2010/0129341（前記は参照によってその全体が本明細書に含まれる）に記載されたように実施することができる。簡単に記せば、コラーゲン結合ドメインをコラーゲンとともに結合緩衝液中でインキュベートし、続いて混合物をフィルターに通す（当該フィルターはコラーゲン結合ドメインを通過させるがコラーゲンを封鎖し、したがってコラーゲンと結合する物質をせき止める）。続いて混合物をコラーゲン結合ドメインの存在についてアッセイする。コラーゲンの非存在下でろ過が実施されたときと比較して、適切にはコラーゲン結合ドメインの少なくとも80%、85%、90%、95%、98%またはより適切には少なくとも99%がこのアッセイのフィルターによって保持される。

【0007】

コラーゲン結合ドメインは細菌のコラーゲン結合ドメインであり得る。コラーゲン結合ドメインは、とりわけ細菌のColGタンパク質（Matsushita et al., (1999) J.Bacteriol. 181:923-933）、または細菌のColHタンパク質（Yoshihara et al., (1994) J.Bacteriol. 176: 6489-6496）に由来するタンパク質であり得る。図1に示すように、ColGは、多様な細菌種（クロストリジウム種を含む）で見出されるクラスIコラゲナーゼである。ColHもまた、多様な細菌種（クロストリジウム種を含む）で見出されるクラスIIコラゲナーゼである。コラーゲン結合ドメインはまた、配列番号:1 - 39で提供されるポリペプチドのいずれか1つであり得る（前記配列番号は、多様な細菌種（例えばクロストリジウムおよびバシルス種）のコラーゲン結合ドメインを規定する）。当業者は、これらコラーゲン結合タンパク質ファミリー（すなわちColGおよびColH）の他のメンバーも本明細書に記載される組成物および方法で有用であり得ることを認識しているであろう。

適切には、当該コラーゲン結合薬剤はコラゲナーゼ活性を欠く。“コラゲナーゼ活性”は、コラーゲンを劣化させるまたは破壊するポリペプチドの能力を指す。例えば、図1Aに示すように、ColGおよびColHタンパク質はコラゲナーゼモジュールを有し、前記モジュールは、これらタンパク質がコラーゲンを劣化させるかまたは破壊することを可能にするいくつかのサブドメインを含む。いくつかの実施態様では、コラーゲン結合薬剤は、これらのまたは類似のコラゲナーゼモジュールを欠く。

【0008】

コラーゲン結合薬剤は2つのコラーゲン結合ドメインを含むことができ、前記ドメインは同じタイプのコラーゲン結合ドメインであっても、異なるタイプのコラーゲン結合ドメインであってもよい。例えば、図1Aに例示するように、細菌のColGタンパク質は2つのタイプのコラーゲン結合ドメイン、s3aコラーゲン結合ドメインおよびs3bコラーゲン結合ドメインを有する。細菌のColHタンパク質は、s3ドメインとして知られているただ1つのコラーゲン結合ドメインを有する。したがって、本開示のコラーゲン結合薬剤の2つのコラーゲン結合ドメインは、ともにColG s3aドメインでも、ともにColG s3bドメインでも、ともにColH s3ドメインでも、またはその任意の組合せでもよい。さらにまた、本開示のコラーゲン結合薬剤の2つのコラーゲン結合ドメインは、同じ細菌種または異なる細菌種に由来し得る。例えば、コラーゲン結合ドメインの1つはクロストリジウム・ヒストリチウム（*Clostridium histolyticum*）のColG s3bであることができ、一方、他のコラーゲン結合ドメインはブレビバシルス・ブレビス（*Brevibacillus brevis*）のColG s3bドメインであることができる。

本開示のコラーゲン結合薬剤の2つのコラーゲン結合ドメインは、配列番号:1 - 47のポ

リペプチドのいずれか1つまたは図5および12に示すそれらポリペプチドから選択され得る。配列番号:1 - 39は、多様な細菌種のColGおよびColHタンパク質に由来する個々のコラーゲン結合ドメイン（すなわちColG s3a、ColG s3b、ColH s3）を規定する。配列番号:40 - 47は、多様な細菌種のColGタンパク質で見出されるタンデムコラーゲン結合ドメインを規定する。図5もまた参照されたい。

【0009】

本発明のコラーゲン結合ドメインは配列番号:1 - 47のポリペプチドの変種でもよい。本明細書で用いられるように、“野生型”という用語は当業者が理解している技術用語であり、あるポリペプチドの天然に存在する当該ポリペプチドの典型的な形態を意味し、“変種”または“変異体”形と区別される。本明細書で用いられるように、“変種”、“変異体”または“誘導体”は、参照タンパク質またはポリペプチド分子と異なるアミノ酸配列を有するポリペプチド分子を指す。変種は、参照分子と対比してアミノ酸残基の1つ以上の挿入、欠失または置換を有することができる。変種または変異体には参照分子のフラグメントが含まれ得る。例えば、コラーゲン結合ドメイン変種は、“野生型”コラーゲン結合ドメインポリペプチドと対比して少なくとも1つのアミノ酸残基の1つ以上の挿入、欠失または置換を有することができる。多様な細菌種の“野生型”コラーゲン結合ドメインのポリペプチド配列は、配列番号:1 - 47として提示されている。これらの配列は参照配列として用いられ得る。

ポリペプチドにおける“欠失”は、1つ以上のアミノ酸の欠如を生じる、アミノ酸配列における変化を指す。欠失は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、または前記を超えるアミノ酸残基を除去する。欠失には、内部欠失および/または末端欠失（例えば参照ポリペプチドのN-末端切詰め、C-末端切詰めまたは両方）が含まれ得る。

20

ポリペプチドにおける“挿入”および“付加”は、1つ以上のアミノ酸残基の付加を生じる、アミノ酸配列における変化を指す。挿入または付加は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、または前記を超えるアミノ酸残基を指すことができる。コラーゲン結合ドメインの変種は、N-末端挿入、C-末端挿入、内部挿入、またはN-末端挿入、C-末端挿入および内部挿入の任意の組合せを有することができる。

【0010】

変種コラーゲン結合ドメインおよび薬剤に関して、“%配列同一性”、“パーセント同一性”または“%同一性”という語句は、標準化アルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2つのアミノ酸配列間において適合する残基のパーセンテージを指す。アミノ酸配列のアラインメント方法は周知である。いくつかのアラインメント方法は保存的アミノ酸置換を考慮する。そのような保存的置換（下記でより詳しく説明する）は概して置換部位の電荷および疎水性を温存し、したがってポリペプチドの構造（したがって機能）を温存する。アミノ酸配列のパーセント同一性は当業界で知られているように決定できる（例えばU.S. Patent No. 7,396,664（参照によってその全体が本明細書に含まれる））を参照されたい）。よく使われる無料で利用できる配列比較アルゴリズム一式が、米国生物工学情報センターのベーシックローカルアラインメントサーチツール（BLAST）によって提供され、前記はNCBI（Bethesda, Md.）を含むいくつかの供給源からそのウェブサイトで利用することができる。BLASTソフトウェア一式は、“blastp”を含む多様な配列分析プログラムを含んでいる（blastpは既知のアミノ酸配列を多様なデータベースの他のアミノ酸配列とアラインメントするために用いられる）。

40

ポリペプチドの配列同一性は、完全な規定された（例えば特定の配列番号によって規定された）ポリペプチド配列の全長にわたって測定できるか、またはより短い長さにわたって、例えばより大きな規定されたポリペプチド配列から得られるフラグメントの全長にわたって測定することができ、前記フラグメントは、連続する例えば少なくとも15、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも70または少なくとも150残基である。そのような長さは単なる例示であり、表、図面または配列表で本明細書に示す配列によって支持されるいずれのフラグメント長もパーセンテージ同一性を測定

50

できる長さの記載のために用い得ることは理解されよう。

本明細書に記載されるように、変種コラーゲン結合ドメインおよび薬剤は、配列番号:1 - 47のいずれか1つと少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%配列同一性を有することができる。

【0011】

本明細書で意図する変種コラーゲン結合ドメインおよび薬剤のポリペプチド配列は、参照アミノ酸配列と対比して保存的アミノ酸置換を含むことができる。例えば、変種コラーゲン結合ドメインおよび薬剤は、参照分子と対比して保存的アミノ酸置換を含むことができる。“保存的アミノ酸置換”は、参照ポリペプチドの特性との干渉がもっとも小さいと予想される、あるアミノ酸の異なるアミノ酸による置換である。換言すれば、保存的アミノ酸置換は参照配列の構造及び機能を実質的に温存する。保存的アミノ酸置換は概ね、(a)置換領域のポリペプチドバックボーンの構造(例えばベータシートまたはアルファヘリックスの立体配置)、(b)置換部位の分子の荷電または疎水性、および/または(c)側鎖の大きさを維持する。

10

本明細書に記載する開示変種コラーゲン結合ドメインおよび薬剤は、参照ポリペプチドによって示される1つ以上の機能的または生物学的活性を有することができる(例えば、野生型コラーゲン結合ドメインおよび薬剤(すなわち配列番号:1 - 47(図5および12参照))によって示される1つ以上の機能的または生物学的活性)。適切には、開示の変種コラーゲン結合ドメインおよび薬剤は、参照ポリペプチド(すなわち配列番号:1 - 47(図5および12参照))のコラーゲン結合活性の少なくとも20%、40%、60%、80%、または100%を保持する。

20

【0012】

図5は、配列番号:40 - 47として含まれている細菌のいくつかのコラーゲン結合ドメインの配列アラインメントを示す。この配列アラインメントから分るように、これらのタンパク質は比較的少ない量の配列同一性を有するが、それらはいずれも同様な態様でコラーゲンと結合することが予想され、同様な立体配置を有すると考えられる。したがって、図5に示されるポリペプチド(すなわち配列番号:40 - 47)またはそのコラーゲン結合ドメイン、変種若しくはフラグメントのいずれかを、本明細書に記載する組成物および方法で用いることができる。図5および12では、コラーゲン結合活性のために重要なアミノ酸残基は青色で強調される。カルシウム結合残基は青色で、構造的に重要な残基は緑色で示される。このアラインメントに基づけば、ポリペプチドのコラーゲン結合活性に実質的に影響を及ぼすことなく、多様なアミノ酸残基の変更(すなわち置換、欠失など)が可能なのは当業者には直ちに明白となる。例えば、黒色で示されたアミノ酸残基は、ポリペプチドのコラーゲン結合活性に実質的に影響を及ぼすことなく改変し得ることは当業者には理解されよう。当業者はまた、参照コラーゲン結合ドメインまたは薬剤における置換が、他の細菌種に由来する他のコラーゲン結合ドメインまたは薬剤中の同じ位置に存在するまた別のアミノ酸残基を基にし得ることを理解しよう。例えば、996位で、表示のコラーゲン結合ドメインはチロシン(Y)またはフェニルアラニン(F)残基を有する。したがって、図5の配列アラインメントから明白である1つの例示的改変は、コラーゲン結合ドメインまたは薬剤のY966F置換である。同様な改変を図5に示される配列アラインメントの各位置で実施することができよう。

30

40

配列番号:1 - 39はまた図5に示されないコラーゲン結合ドメインを含み、これらのいくつかは図12に含まれている。しかしながら、当業者は、これらのポリペプチド配列を図5および12に示されるポリペプチド配列とアラインメントして、追加の変種がこれら追加のコラーゲン結合ドメインに対して生じ得たものを決定できよう。したがって、ポリペプチドは、本明細書に提供するコラーゲン結合ポリペプチドと85%、88%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%または99%アミノ酸同一性を有する。変種ポリペプチドはなおコラーゲンと結合する能力を有する。

【0013】

本発明のコラーゲン結合ドメインは、配列番号:1 - 47の完全長バージョンまたは配列番

50

号:1 - 47のフラグメントであり得る。前記フラグメントは、配列番号:1 - 47のいずれか1つの連続する少なくとも8、16、32、64、100または100を超えるアミノ酸を有する。本明細書で用いられるように、“フラグメント”は、参照配列と配列が同一のアミノ酸配列の一部であるが、ただし参照配列よりも短い。フラグメントは、少なくとも1アミノ酸少ない、参照配列の完全長までを含むことができる。いくつかの実施態様では、フラグメントは、参照ポリペプチド（すなわち配列番号:1 - 47）の連続する少なくとも8、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100を超えるアミノ酸残基を含むことができる。フラグメントは、好ましくは分子の一定の領域から選択することができる。“少なくともフラグメント”という用語は完全長のポリペプチドを包含する。コラーゲン結合ドメインまたは薬剤のフラグメントは、完全長のコラーゲン結合ドメインまたは薬剤（すなわち配列番号:1 - 47）のアミノ酸配列の連続する部分を含むか、または本質的に前記から成る。フラグメントは、完全長のコラーゲン結合ドメインまたは薬剤と対比してN-末端切詰め、C-末端切詰め、またはその両方の切詰めを含むことができる。N-末端および/またはC-末端切詰めは、参照配列（すなわち配列番号:1 - 47）の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸残基の除去を含むことができる。

【0014】

本明細書で意図されるコラーゲン結合ドメインまたは薬剤はさらにまた、in vitroまたはin vivoで改変して非アミノ酸部分を含むことができる。これらの改変には以下が含まれ得るが、ただしこれらに限定されない：アシル化（例えばO-アシル化（エステル）、N-アシル化（アミド）、S-アシル化（チオエステル））、アセチル化（例えば、タンパク質のN-末端またはリジン残基へのアシル基の付加）、ホルミル化、リポイル化（例えばリポ酸、C8官能基の結合）、ミリストイル化（例えばミリスチン酸、C14飽和酸の結合）、パルミトイル化（例えばパルミチン酸、C16飽和酸の結合）、アルキル化（例えばアルキル基、例えばメチルのリジンまたはアルギニン残基への付加）、イソプレニル化またはプレニル化（例えばイソプレノイド基、例えばファルネソールまたはゲラニルゲラニオールの付加）、C-末端のアミド化、グリコシル化（例えばグリコシル基のアスパラギン、ヒドロキシリジン、セリンまたはスレオニンへの付加、糖タンパク質を生じる）。グリケーション（糖の非酵素性結合とされる）とは異なり、ポリシアリル化（例えばポリシアル酸の付加）、グリピエーション（例えばグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー形成）、ヒドロキシル化、ヨウ素化（例えば甲状腺ホルモンのヨウ素化）、およびホスホリル化（例えばリン酸基の通常はセリン、チロシン、スレオニンまたはヒスチジンへの付加）は他の可能な改変の代表である。

【0015】

2つのコラーゲン結合ドメインは、ある細菌種由来のColGまたはColHコラーゲン結合ドメインであり得る。いくつかの実施態様では、2つのコラーゲン結合ドメインは、配列番号:1 - 39のポリペプチドのいずれか1つ、配列番号:1 - 39のいずれか1つと少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%配列同一性を有する1つのポリペプチド、または配列番号:1 - 39のいずれか1つの連続する少なくとも8、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100を超えるアミノ酸の1つのフラグメントであり得る。

2つのコラーゲン結合ドメインは、ある細菌種のColG s3bドメインおよびある細菌種のColG s3aドメイン、s3cドメイン、またはColH s3ドメインであり得る。いくつかの実施態様では、コラーゲン結合ドメインの一方は、配列番号:15 - 30のポリペプチドのいずれか1つ、配列番号:15 - 30のいずれか1つと少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%配列同一性を有する1つのポリペプチド、または配列番号:15 - 30のいずれか1つの連続する少なくとも8、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100を超えるアミノ酸の1つのフラグメントであることができ、ここで他方のコラーゲン結合ドメインは、配列番号:1 - 14および31 - 39のポリペプチドのいずれか1つ、配列番号:1 - 14および31 - 39のいずれか1つと少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、

98%または99%配列同一性を有する1つのポリペプチド、または配列番号:1 - 14および31 - 39のいずれか1つの連続する少なくとも8、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100を超えるアミノ酸の1つのフラグメントであり得る。

【0016】

2つのコラーゲン結合ドメインは両方ともある細菌種のColG s3bドメインであり得る。いくつかの実施態様では、2つのコラーゲン結合ドメインは、配列番号:15 - 30のポリペプチドのいずれか1つ、配列番号:15 - 30のいずれか1つと少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%配列同一性を有する1つのポリペプチド、または配列番号:15 - 30のいずれか1つの連続する少なくとも8、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100を超えるアミノ酸の1つのフラグメントであり得る。

10

2つのコラーゲン結合ドメインは、ある細菌種のColG s3aドメイン、s3bドメイン、またはColH s3ドメインから選択され得る。いくつかの実施態様では、2つのコラーゲン結合ドメインは、配列番号:1 - 14および31 - 39のポリペプチドのいずれか1つ、配列番号:1 - 14および31 - 39のいずれか1つと少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%配列同一性を有する1つのポリペプチド、または配列番号:1 - 14および31 - 39のいずれか1つの連続する少なくとも8、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100を超えるアミノ酸の1つのフラグメントであり得る。

2つのコラーゲン結合ドメインは、細菌のColGタンパク質に由来するタンデムコラーゲン結合ドメインであり得る。いくつかの実施態様では、コラーゲン結合薬剤は、配列番号:40 - 47のポリペプチドのいずれか1つ、配列番号:40 - 47のいずれか1つと少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%配列同一性を有する1つのポリペプチド、または配列番号:40 - 47のいずれか1つの連続する少なくとも8、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100を超えるアミノ酸の1つのフラグメントであり得る。

20

【0017】

コラーゲン結合薬剤は、ドメインリンカーで連結された2つのコラーゲン結合ドメインを含むことができる。本明細書で用いられるように、“ドメインリンカー”は共有結合および/またはリンカー若しくはスペーサー部分を含むことができる。例えば、2つのコラーゲン結合ドメインは、例えばペプチド結合若しくは化学的交差結合を介して直接的に、または例えばリンカー若しくはスペーサーポリペプチドを介して間接的に連結され得る。有用なドメインリンカーは、ポリペプチド、アミノ酸、核酸とともにホモ官能性リンカーまたはヘテロ官能性リンカーを含む。2つのコラーゲン結合ドメイン間で共有結合の形成を促進できる特に有用な共役試薬は、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルおよび/またはマレイミドを含むことができる。

30

ドメインリンカーはまたスペーサーポリペプチドを含むことができる。スペーサーポリペプチドは任意の長さでよく、伝統的または非伝統的アミノ酸を含むことができる。例えば、スペーサーポリペプチドは1 - 100アミノ酸長でよく、適切には、スペーサーポリペプチドは、コラーゲン結合薬剤の2つのコラーゲン結合ドメインがコラーゲン結合を媒介できるように少なくとも2、3、5、10、15、20、25または25を超えるアミノ酸長である。スペーサーポリペプチドは、配列番号:48 - 55のポリペプチドのいずれか1つ、GSTタグ、SerリンカーまたはGlyリンカーを含むことができる(ただしこれらに限定されない)。

40

いくつかの実施態様では、ドメインリンカーはタグ系を含むことができる。タグ系は高親和性で互いに結合することができる任意の薬剤グループを含む。いくつかのタグ系が当業界で周知であり、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、またはジオキシゲニン(DIG)系を含む(ただしこれらに限定されない)。いくつかの実施態様では、前記タグ系はビオチン/アビジンまたはビオチン/ストレプトアビジンを含む。

ドメインリンカーは、配列番号:48 - 55のポリペプチドのいずれか1つ、または配列番

50

号:48 - 55のポリペプチドのいずれか1つと少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%配列同一性を有する1つのポリペプチドを含むことができる

【0018】

本発明のコラーゲン結合薬剤はさらにまた、治療薬剤リンカーによってコラーゲン結合薬剤と連結された治療薬剤を含むことができる。本明細書で用いられるように、“治療薬剤”は、任意の適切な医薬または他の活性な薬剤を含むことができる。前記薬剤には、骨発生プロモーター、抗菌剤、抗炎症剤、ポリペプチド（例えば組換えタンパク質、サイトカインまたは抗体）、小分子化学物質、ホルモン、増殖因子、ポリヌクレオチド、炭水化物、脂質、または前記の任意の組合せが含まれる（ただしこれらに限定されない）。適切には、治療薬剤は、骨の成長を促進させ、炎症を低下させ、コラーゲンの安定化を促進させることができる。適切には、治療薬剤は、その治療効果がコラーゲンまたは損傷コラーゲン領域に存在するものである。治療薬剤には以下が含まれ得る（ただしこれらに限定されない）：FGF、副甲状腺ホルモン（PTH）、PTH/PTHrP受容体アゴニスト、PTH/PTHrP受容体アンタゴニスト、骨形成タンパク質（BMP）、G-CSF、BMP-2、BMP-3、抗スクレロシン抗体、成長ホルモン、IGF-1、VEGF、TGF- β 、KGF、TGF- β 、TGF- β 1、TGF- β 受容体、CT、GH、GM-CSF、EGF、PDGF、セリプロロール、アクチビンおよび結合組織増殖因子。また別には、本発明はまた細胞療法を補助することができる。細胞療法は外因性幹細胞の投与に焦点を当てる。取り組みの1つは、病巣にこれら細胞をデリバリーすることであり、ラミニンをCBDに結合させることができよう。固着コラーゲン結合剤を施された細胞は病巣を求め、損傷部位に長期間とどまって修復を助けることができる。PTH/PTHrP受容体アゴニストおよびPTH/PTHrP受容体アンタゴニストはWO 2013/090770に記載されている（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。適切なFGFタンパク質にはbFGF（FGF-2）、FGF-4、またはFGF-10（配列番号:56を参照されたい）が含まれる（ただし前記に限定されない）。

【0019】

PTH/PTHrP受容体アゴニストポリペプチドセグメントは、合成ポリペプチドでも天然に存在するポリペプチドでもよい。そのようなポリペプチドはポリペプチドの部分でもよく、または1つ以上の変異を含んでいてもよい。変異は、野生型PTH/PTHrPと比較して当該PTH/PTHrP受容体を良好にも不良にもすることがある。PTH/PTHrP受容体のアゴニスト活性はWO2013/090770に記載されているようにアッセイすることができ、当業者にはcAMP刺激アッセイによって知られている。アゴニストは当該記載アッセイではcAMP合成を刺激するであろう。適切には、アゴニストは、野生型PTH(1-34)の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%または110%若しくは120%にも受容体活性を活性化することができる。PTH/PTHrP受容体アゴニストポリペプチドセグメントはPTHまたはPTHrPポリペプチドセグメントである。PTHの1つのヒトアイソフォームは配列番号:62である。PTHrPの1つのヒトアイソフォームは配列番号:57である。ヒトアイソフォームが提供されているが、他の非ヒト由来アイソフォームも同様に使用できることは当業者には理解されるであろう。そのような非ヒト由来アイソフォームはヒトPTH/PTHrP受容体と相互作用することができ、逆もまた同様である。PTH/PTHrP受容体アゴニストポリペプチドセグメントは、配列番号:62の残基1 - 33であるか、または前記を含むことができる（PTH（配列番号:57）の残基1 - 33）。PTH/PTHrP受容体アゴニストポリペプチドセグメントはPTH（配列番号:62）の残基1 - 34であるか、または前記を含むことができる。他の実施態様では、前記はPTH（配列番号:62）の残基1 - 34のフラグメントである。他の実施態様では、PTH/PTHrP受容体アゴニストポリペプチドセグメントはPTH（配列番号:62）の残基1 - 84であるか、または前記を含むことができる。他の実施態様では、PTH/PTHrP受容体アゴニストポリペプチドセグメントは、PTH（配列番号:62）の残基1 - 14またはPTH（配列番号:62）の残基1 - 7であるか、または前記を含むことができる。アゴニストとしてPTH受容体との結合に不可欠のアミノ酸はPTHのアミノ酸1、2および5である。さらに他の実施態様では、PTH/PTHrP受容

10

20

30

40

50

体アゴニストは、他の任意の種のPTHまたはPTHrPポリペプチドセグメントである。

【0020】

PTH/PTHrP受容体アンタゴニストは、ある実施態様ではPTH(7-34) (すなわちPTH (配列番号:62) の残基7 - 34) を含むことができる。別の実施態様では、前記アンタゴニストは、PTH (配列番号:62) の残基7 - 33であるかまたは前記を含む。他の実施態様では、前記アンタゴニストは配列番号:57の残基7 - 34のフラグメントである。別の実施態様では、PTH/PTHrP受容体アンタゴニストは、PTH(7-14) (すなわちPTH (配列番号:62) の残基7 - 14) を含む。別の実施態様では、PTH/PTHrP受容体アンタゴニストはPTH/PTHrPの((-1) - 33)を含む。別の実施態様では、PTH/PTHrP受容体アンタゴニストは、N-末端伸長を有するPTHの残基1 - 14を含む。PTHへのN-末端伸長の付加またはPTHの活性なN-末端フラグメントは、PTHペプチドをアンタゴニストに転換する。N-末端伸長は長さが1、2、3、4、5または5を超えるアミノ酸であることができる。N-末端伸長のアミノ酸が何であるかは典型的には重要ではない。ある実施態様では、PTH/PTHrP受容体アンタゴニストは、そのN-末端にGly-Ser伸長を有するPTHの残基1 - 33 (配列番号:58) を含む。別の実施態様では、PTH/PTHrP受容体アンタゴニストは、PTHrP(7-34) (すなわち配列番号:57の残基7 - 34) または配列番号:57の残基7 - 34のフラグメントを含む。別の実施態様では、PTH/PTHrP受容体アンタゴニストはマウスTIP(7-39)を含む (以下を参照されたい: Hoare S R, Usdin T B. 2002. Specificity and stability of a new PTH1 receptor antagonist, mouse TIP(7-39). Peptides 23:989-98)。融合タンパク質で用いることができる他のPTH/PTHrP受容体アンタゴニストもまたHoareらの論文に開示されている。PTH/PTHrP受容体アンタゴニストは、配列番号:62の残基1 - 34に由来する少なくとも8、10、12または12を超えるアミノ酸のフラグメントであり得る。他の実施態様では、PTH/PTHrP受容体アンタゴニストは、別の種のPTH/PTHrP受容体アンタゴニストポリペプチドであり得る。

【0021】

ある実施態様では、治療薬剤またはPTH/PTHrP受容体アゴニスト若しくはアンタゴニストポリペプチドセグメントは、融合タンパク質のコラーゲン結合ポリペプチドのN-末端側にある。すなわち、2つのポリペプチドセグメントは各々N-末端およびC-末端を有し、コラーゲン結合ポリペプチドのN-末端は、直接的にまたは間接的に、例えば治療薬剤リンカーポリペプチドセグメント (例えばPKD、グリシンまたはセリンリンカー) を介して治療薬剤またはPTH/PTHrPアゴニスト若しくはアンタゴニストポリペプチドのC-末端に連結される。

“治療薬剤リンカー” は共有結合および/またはリンカー若しくはスペーサー部分を含むことができる。例えば、コラーゲン結合薬剤および治療薬剤は、例えばペプチド結合若しくは化学的交差結合を介して直接的に、または例えばリンカー若しくはスペーサーポリペプチドを介して間接的に連結され得る。有用な治療薬剤リンカーは、ポリペプチド、アミノ酸、核酸とともにホモ官能性リンカーまたはヘテロ官能性リンカーを含む。2つのコラーゲン結合ドメイン間で共有結合の形成を促進できる特に有用な共役試薬は、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルおよび/またはマレイミドを含むことができる。

【0022】

治療薬剤リンカーはまたスペーサーポリペプチドを含むことができる。スペーサーポリペプチドは任意の長さでよく、伝統的または非伝統的アミノ酸を含むことができる。例えば、スペーサーポリペプチドは1 - 100アミノ酸長でよく、適切には、スペーサーポリペプチドは、コラーゲン結合薬剤の2つのコラーゲン結合ドメインがコラーゲン結合を媒介できるように少なくとも2、3、5、10、15、20、25または25を超えるアミノ酸長である。スペーサーポリペプチドは、コラゲナーゼ由来のPKD (多発性嚢胞腎) ドメイン、GSTタグ、Hisタグ、SerリンカーまたはGlyリンカーを含むことができる (ただしこれらに限定されない)。いくつかの実施態様では、治療薬剤リンカーはタグ系を含むことができる。タグ系は高親和性で互いに結合することができる任意の薬剤グループを含む。いくつかのタグ系が当業界で周知であり、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、

またはジオキシゲニン（DIG）系を含む（ただしこれらに限定されない）。いくつかの実施態様では、前記タグ系はビオチン/アビジンまたはビオチン/ストレプトアビジンを含む。治療薬剤は、治療薬剤リンカーによってコラーゲン結合薬剤のN-末端またはC-末端に連結され得る。治療薬剤がポリペプチドを含む実施態様では、治療薬剤のC-末端またはN-末端が、治療薬剤リンカーによってコラーゲン結合薬剤のN-末端またはC-末端に連結され得る。さらにまた、同じまたは異なる薬剤を、2つ以上の治療薬剤リンカーによってコラーゲン結合薬剤のN-末端およびC-末端の両方に連結することができる。

【0023】

本明細書に記載するコラーゲン結合薬剤のいずれかを含む医薬組成物が提供される。当該医薬組成物は医薬担体、賦形剤、または希釈剤（すなわち薬品）を含むことができ、それらは、それらに暴露される細胞または動物に対して用いられる投薬量または濃度で非毒性である。医薬品はしばしばpH緩衝水溶液で存在する。医薬担体の例には以下が含まれる：緩衝剤（例えばリン酸、クエン酸および他の有機酸）；抗酸化剤（アスコルビン酸を含む）；低分子量（10残基未満）ポリペプチド；タンパク質（例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えばポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；単糖類、二糖類、および他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む）；キレート剤（例えばEDTA）；糖アルコール（例えばマンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えばナトリウム）；および/または非イオン性界面活性剤（例えばTWEENTM商標の界面活性剤、ポリエチレングリコール（PEG）、およびPLURONICSTM界面活性剤）。

【0024】

ある状態を治療する方法もまた提供される。当該方法は、本明細書に記載するコラーゲン結合薬剤または医薬組成物のいずれかを当該状態の治療に有効な量で対象に投与する工程を含むことができる。“状態”には、創傷（慢性および急性）、副甲状腺機能亢進、毛の症状（過剰な毛の増殖または毛の消失）、コラーゲン症、および骨の症状が含まれ得る。骨の症状は、骨折、骨粗しょう症、歯周欠損、または他の骨欠損を含む。コラーゲン症は、骨形成不全（OI）、スティックラー症候群、エーレルス-ダンロー症候群、アルポート症候群、キャフィー病、および限局性コラーゲンまたは軟骨損傷を含むが、ただしこれらに限定されない。これらの疾患の多くは、ねじれ不足または部分的にねじれないコラーゲンをある種の組織で生じる遺伝的欠陥によって引き起こされる。

例えばコラーゲン症（例えば骨形成不全、スティックラー症候群）、骨粗しょう症またはコラーゲン欠損のために個体に骨折の高リスクをもたらす他の疾患による骨減少は、骨同化ペプチドに連結させたコラーゲン結合薬剤の投与によって治療され得よう。コラーゲン結合薬剤は、コラーゲンの形態発生が異常な部位へ当該骨同化薬剤を誘導することができる、したがって骨折を予防することができる。

例えばエーレルス-ダンロー症候群IV型、アルポート症候群のような欠陥、またはコラーゲン形成不全のために血管破裂が生じやすい他の疾患による脈管脆弱には、脈管の増殖または修復を刺激するペプチドを含むコラーゲン結合薬剤を投与することができる。コラーゲン結合薬剤は当該ペプチドをコラーゲン損傷を有する領域に誘導するであろう（これらの領域は損傷血管を有する可能性が高い）。当該治療薬剤は損傷部位で増殖および修復を刺激し、血管破裂を予防するであろう。

例えばエーレルス-ダンロー症候群、キャフィー病のような異常、またはコラーゲン欠損による皮膚の弱体化が超弾性をもたらす他の疾患による皮膚の脆弱性は、打ち身を起こしやすくし創傷治癒を低下させる。皮膚および上皮増殖因子を治療薬剤として供することができる。前記は、コラーゲン結合薬剤に連結され損傷コラーゲンの領域にデリバリーされるとき、皮膚の増殖および修復を刺激し、皮膚委縮線条を予防し（preventin striae）、治癒を改善するであろう。

【0025】

副甲状腺機能亢進の治療方法もまた本明細書で提供され、前記方法は、例えばPTHに連

10

20

30

40

50

結されたコラーゲン結合薬剤を副甲状腺機能亢進の治療の必要がある対象に投与することによる。ある実施態様では、対象に投与されるPTHは異なる種に由来するPTHであり得る。毛の増殖に対するPTHアゴニストおよびアンタゴニストの作用はほぼ15年にわたって研究されてきた。PTHは、PTH関連ペプチド（PTHrP）（通常皮膚線維芽細胞によって産生される）に関する共通の受容体を有する。PTHrPはケラチノサイトの分裂増殖/分化に影響を及ぼし、毛周期を調整する。毛の増殖効果についての試験の大半はPTHアンタゴニストにより実施されてきた。なぜならば、初期の試験はこれらアンタゴニストが最も有効な薬剤であることを示したからである。注射および外用処方物の両方が、化学療法誘発脱毛症の動物モデルおよびSKH-1無毛マウスで試験されてきた。毛の増殖に対するPTHアンタゴニストの効果の部分は毛包のジストロフィー退行期への移行であり、前記は毛包を化学療法による損傷から保護する。しかしながら、IGIファーマシューティカルによる化学療法誘発脱毛症に対する外用PTHアンタゴニストの臨床試験は、効果が限定的であったためにフェーズ2で中止された。したがって、脱毛症治療の新規組成物が希求される。

10

別の特徴では、毛の症状（過剰な毛の消失または毛の増殖）を治療する方法が提供される。前記方法は、毛の増殖を誘発または毛の消失を停止するための治療が必要な対象に、PTH/PTHrP受容体アゴニストに連結されたコラーゲン結合薬剤を投与する工程を含むことができる。当該方法は脱毛症の個体に適用でき、前記脱毛症には化学療法誘発脱毛症だけでなく、円形脱毛症、男性型脱毛症、多嚢胞性卵巣症候群によって引き起こされる脱毛症または他の毛の消失が含まれる。組成物は局所的にまたは外用として投与されて毛の消失を治療することができる。

20

別の特徴では、脱毛処理後の毛の増殖または再生を遅くする方法が提供され、前記方法は、PTH/PTHrP受容体アンタゴニストに連結されたコラーゲン結合薬剤を対象に投与することによる。ある実施態様では、コラーゲン結合薬剤+PTHアンタゴニスト組成物は局所的、外用的に適用される。コラーゲン結合薬剤+PTHアンタゴニストは脱毛処理後に適用されて、毛の再生を予防または遅くすることができる。

【0026】

本発明の対象は、任意の哺乳動物、適切には人間、家畜化動物（例えばイヌ、ネコ、ウマ、乳牛、ブタ）またはマウス若しくはラットであり得る。症状を治療することまたは治療には、症状の少なくとも1つの徴候の緩和、症状の更なる進行の軽減若しくは緩慢化、症状の非罹患領域への拡大の軽減若しくは緩慢化が含まれる。対象を治療するということは、ある疾患に罹患しているかまたは当該疾患を発症するリスクがある対象に利益を付与する任意のタイプの治療を指し、前記には対象の当該症状（例えば1つ以上の徴候）の改善、当該疾患の進行の遅延、徴候の開始の遅延または徴候の進行の緩慢化などが含まれる。

30

本明細書で用いられる有効な量または治療的に有効な量は、ある状態、異常または症状を治療するために対象に投与されたときに、（上記に定義した）治療を達成するために十分である組成物の量を意味する。治療的に有効な量は、当該化合物、処方若しくは組成、当該疾患およびその重篤度、並びに治療されるべき対象の年齢、体重、健康状態および応答性にしたがって変動するであろう。

本明細書に記載する組成物（すなわちコラーゲン結合薬剤および医薬組成物）は、当業者に公知の任意の手段によって投与でき、前記手段には、経口、外用、鼻内、腹腔内、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、髄腔内、経皮、鼻咽頭、病巣内、腫瘍内、皮内、または経粘膜吸収が含まれるが、ただしこれらに限定されない。したがって組成物は、摂取可能、注射可能、外用または座薬処方物として処方することができる。組成物はまた、リボソームまたは時宜放出ベヒクルでデリバリーすることができる。本発明による対象への組成物の投与は、用量依存態様で有益な作用を示すことができる。したがって、広い制限範囲内では、組成物をより大量に投与すれば、少量の投与よりも有益な生物学的効果の増大が予想される。さらにまた、有効性も毒性が観察されるレベルより低い投薬量で期待される。

40

【0027】

与えられた任意の事例で投与される具体的な投薬量は、当業者に周知のように、投与される1つの若しくは複数の組成物、治療若しくは抑制されるべき疾患、対象の状態、およ

50

び他の関連する医学的因子（組成物の活性または対象の応答を改変する可能性がある）にしたがって調整されるであろう。例えば、特定の対象のための具体的な用量は、年齢、体重、一般的健康状態、食生活、投与のタイミングおよび態様、排泄速度、併用される医薬、および治療が適用される当該疾患の重篤度に左右される。与えられた患者のための投薬量は、通例的考慮にしたがい、例えば本明細書に記載する組成物と既知薬剤との弁別的活性を、例えば適切な通例的薬理学プロトコルの手段により慣例的に比較することによって決定できる。

ある対象のための最大投薬量は、望ましくないまたは容認し得ない副作用を引き起こさない最高の投薬量である。個々の治療レジメンに関する変数の数は大きく、相当な範囲の用量が予想される。投与ルートもまた投薬量の要件に影響を与えるであろう。組成物の投薬は、無治療と比較して治療される症状を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、または100%を超えて改善するであろう。

本明細書に記載する有効な投薬量は総量を指す。すなわち、2つ以上の組成物が投与される場合、有効な投薬量は投与される総量に一致する。組成物は、単一用量としてまたは分割用量として投与できる。例えば、組成物は、4時間、6時間、8時間、12時間、1日、2日、3日、4日、1週間、2週間または3週間以上離して、2回以上投与できる。

本明細書に記載するコラーゲン結合薬剤または医薬組成物は、治療される症状を効果的に改善するために、対象に1回または2回以上投与することができる。適切な投薬量の範囲は、数百マイクログラムの有効成分の規模であり約0.01から10mg/kg/日、好ましくは約0.1から1mg/kg/日の範囲である。投与に必要とされる有効成分の正確な量は医師の判断に左右され、各対象に固有であり得る。本明細書に記載のコラーゲン結合薬剤または医薬組成物の治療的に有効な量は、とりわけ投与スケジュール、組成物が他の治療薬剤と併用して投与されるか否か、受容者の状況および健康状態、並びに当該組成物の治療活性に左右されることは当業者には明白であろう。

【0028】

本開示は、本明細書に示す成分の構築物、配合または方法工程の特定された詳細に限定されない。本明細書に開示する組成物および方法は、後に続く開示に照らして、当業者に明白な多様な態様で作り出され、実施され、用いられ、実行され、および/または形成され得る。本明細書で用いられる語句および用語は記述することのみを目的とし、特許請求の範囲を限定するとみなされるべきではない。本文および特許請求の範囲で多様な構造または方法工程を示すために用いられる順序を示す表示（例えば第一、第二および第三）は、いずれか特定の構造若しくは工程、またはそのような構造若しくは工程に対するいずれか具体的な順序若しくは構成の表示と解されることを意図しない。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書で特段に指定しない限りまたは明らかに文脈に矛盾しない限り任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供される、任意のかつ全ての例または例示の言葉（例えば“such as（例えば）”）の使用は、単に開示を容易にすることを意図し、特段に規定しない限り本開示の範囲の制限を全く示唆しない。本明細書のいずれの言葉もおよび図面に示すいずれの構造も、特許請求されていない任意の成分が開示の内容の実施に不可欠であることを示していると解されるべきではない。“including（含む）”

、“comprising（含む）”、または“having（有する）”という用語およびその変型の本明細書での使用は、その後に示される成分およびその等価物が追加の成分とともに包含されることを意味する。一定の成分を“including（含む）”、“comprising（含む）”、または“having（有する）”として列挙される実施形態はまた、それら一定の成分から“cosisting of（本質的に成る）”およびそれら一定の成分から“consisting of（成る）”ことが意図される。

【0029】

本明細書で値の範囲の列挙は、本明細書で特段に指定しない限り、当該範囲に入るそれぞれ別々の値を個々に指す省略方法として供することを単に意図し、それぞれ別々の値は、本明細書であたかも個々に列挙されたかのごとく本明細書に取り込まれる。例えば、濃度範囲が1%から50%と記載される場合、例えば2%から40%、10%から30%、または1

10

20

30

40

50

%から3%などの値がこの指定にはっきりと列挙されることが意図される。前記は具体的に意図されるものの単なる例であり、最低値から最高値の間のかつ最低値および最高値を含む全ての可能な数値の組合せが本開示にはっきりと記載されているとみなされるべきである。具体的に量または量の範囲を列挙するために“about(約)”という語を使用することは、列挙された量に非常に近い値、例えば、製作公差、測定実施における装置および人間によるエラーなどのために生じ得る値が、当該量に含まれることを示すことが意図される。量を指す全てのパーセンテージは特段の指示がなければ重量による。

いずれの参考文献も(本明細書に引用された非特許文書または特許文書を含む)従来技術を構成するということを容認するものではない。特に、特段の記載がなければ、本明細書におけるいずれの文書への言及も、これらの文書のいずれかが米国または任意の他の国における技術で共通の一般的知識の部分形成するということを容認するものではないことは理解されるであろう。当該参考文献のいずれの考察もそれらの著者が主張するものを記述し、本出願人は、本明細書に引用された文書の一切の正確さおよび適切性に反駁する権利を留保する。特段の明白な指示がなければ、本明細書に引用された全ての参考文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる。引用された参考文献で見出されるいずれかの定義および/または記載に何らかの相違が存在する場合には、本開示が優先するであろう。

10

文脈による特段の規定または指示がなければ、“a”、“an”および“the”という用語は“1つ以上”を意味する。例えば、“a protein”または“a RNA”は“1つ以上のタンパク質”または“1つ以上のRNA”とそれぞれ解釈されるべきである。

20

本明細書で用いられるように、“about(約)”、“approximately(概数で)”、“substantially(実質的には)”および“significantly(有意には)”は、当業者には理解され、さらにそれらが用いられる文脈に応じてある程度変動するであろう。前記用語が用いられる文脈を与えられた当業者にとって明らかではないこれらの用語が使用される場合、“about”および“approximately”は、該当用語のプラスまたはマイナス10%以下を意味し、さらに“substantially”および“significantly”は当該用語のプラスまたはマイナス>10%を意味するであろう。

以下の実施例は例示のみを意図し、本発明の範囲または添付の特許請求の範囲における制限として意図されない。

【実施例1】

30

【0030】

擬似二回転対称を有するタンデムコラーゲン結合ドメインの活性および結合メカニズム

クロストリジウム・ヒストリチウムは、病毒因子(高度に活性なコラーゲナーゼCol1G(クラスI)およびCol1H(クラスII)を含む)を分泌して、動物組織に侵入する。マルチドメインCol1Gがそのタンデムコラーゲン結合ドメイン(CBD)を利用してそれ自身を不溶性コラーゲンに固着させた後、後に続く階層型基質の分解は進行性切断および原線維の再編を必要とする。本実験では、カルシウム結合CBDの構造が1.9 Åの解像度で提示される($R_{work} = 15.0\%$; $R_{free} = 19.6\%$)。CBDの擬似二回転編成は、Col1Gが55 Å離れたコラーゲン分子間でくさびで留めて原線維の再編および進行性切断を強力に補助することを可能にするであろう。実際、前記は、タンデムCBD:コラーゲンの0.1:1から0.5:1の分子比でコラーゲン線維の形成を加速した。1:1以上の分子比では、タンデムCBDは原線維の形成を遅らせた。コラーゲン分子間に留め釘を取り付ける(toggle)ために、より堅固な結合のC-側CBDが結合を開始することができる(前記は、[(Pro-Hyp-Gly)₁₀]₃との1:1複合体を形成するタンデムCBDの小角X線散乱(SAXS)によって示された)。その後、より弱い結合のN-側CBDがうつ伏せのコラーゲン分子をしっかりとつかみ、もっとも堅固な既知の原線維結合を提供できる。タンデムCBDの立体配置変化はカルシウム依存性であり、サイズ排除クロマトグラフィーおよびSAXSで測定されたように3-6の範囲のpCaで協調性である。pCa>5では、タンデムCBDは、細菌からの分泌がより容易である伸長構造をとる。3より大きい宿主pCa²⁺では、結晶構造で観察されるコンパクトな構造が採用される。本明細書に記載する結合及び活性化様式は、部位指定薬剤デリバリーベヒクル開発の

40

50

先導に役立つであろう。

使用略語：CBD、コラーゲン結合ドメイン；MALDI-TOF-MS、飛行時間質量分析のマトリックス支援レーザー脱離/イオン化時間；DLS、ダイナミック光散乱；SAXS、小角X線散乱。

【0031】

クロストリジウム・ヒストリチウム（16S rRNA遺伝子の比較に基づいてハテワヤ・ヒストリチウム（*Hathewayia histolyticum*）に再分類されるべきであると最近提唱された）は、筋壊死時に広範囲の組織損傷を引き起こすコラゲナーゼを産生する（Lawson and Rainey 2015）。これらの酵素のうちもっとも顕著なもの、ColG（クラスI）およびColH（クラスII）は、N-末端コラゲナーゼモジュール（s1）、1つまたは2つの多発性嚢胞腎（PKD）様ドメイン、および1つから3つのC-末端コラーゲン結合ドメイン（CBD）を含むマルチドメイン酵素であり（図1A）、コラーゲン分解における役割の分配が提唱された（Fields 2013）。

ColG(s3a、s3b)およびColH（s3）のC-末端ドメインは約120アミノ酸から成るホモログである。当該ドメインは可溶性のコラーゲン性ペプチドおよび不溶性のコラーゲン原線維と結合する。コラーゲン原線維との結合におけるそれらの役割は、その階層性構造破壊に不可欠である（Matsushita, Jung et al.1998, Matsushita, Koide et al.2001）。完全長ColGまたはColHからCBDを切詰めることは、コラーゲン原線維を分解するそれらの能力を無力化する。そのような酵素は可溶性コラーゲンまたは変性コラーゲン（ゼラチン）を分解できるだけである。変異誘導およびコラーゲン結合試験はs3bの結合表面をマッピングしたが、一方、NMRおよびSAXS試験は、s3bがミニコラーゲンのねじれ不足領域と単一方向で結合することを示した（Philominathan, Koide et al.2009, Philominathan, Koide et al.2012）。最近、高速原子間力顕微鏡法はリアルタイムでコラーゲンを破壊するColGの能力を示した（Watanabe-Nakayama, Itami et al.2016）。分解時に、ColGはC-末端からN-末端へコラーゲン原線維に沿って前進的に移動して原線維を破壊する。ColGもまた、より秩序が乱れたコラーゲン原線維領域を優先的に標的とした。秩序が乱れた領域へのColGの進行性および優先性について構造に関する洞察が記載されている。

細菌コラゲナーゼは、完全な触媒活性およびコラーゲン結合機能の両方でカルシウムを要求する。細菌コラゲナーゼの活性化は、リンカーとの Ca^{2+} の結合が引き金となる。ヘリックスからβシートへのドメインの再編を必要とする（Wilson, Matsushita et al.2003, Philominathan, Matsushita et al.2009, Spiriti and van der Vaart 2010, Sides, Liyanage et al.2012, Bauer, Wilson et al.2013, Bauer, Janowska et al.2015）。完全長のapo-ColGは、 Ca^{2+} 濃度が低い（ $0.2\text{--}0.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ ）細菌内部では比較的可撓性であって、酵素のより容易な分泌を可能にすると期待される（Wilson, Matsushita et al.2003）。分泌に際して、リンカーはECM中で Ca^{2+} （約1.2mM）とキレートして硬直した構造をとる。前記はColGについては示されていないが、SAXSおよび制限的タンパク質分解を用いて明示されたように、 Ca^{2+} のキレートは、完全長ColHがより可撓性の低いコンパクトな構造をとるために実際に引き金となる（Ohbayashi, Matsumoto et al.2013）。

【0032】

クロストリジウムのコラゲナーゼは、創傷の壊死組織除去法として何年も用いられ成功してきた。最近、ColGおよびColHの混合物が、例えばデュピュイトラン病で見出される過剰な結合組織造成の治療における使用で承認された（Gaston, Larsen et al.2015）。さらにまた、当該酵素は、種々のタイプの結合組織造成の治療（Duarte, Correia et al.2014）および移植のための脾臓小島の単離（McCarthy, Breite et al.2011）に潜在的能力を示した。結合組織の除去のための完全長のコラゲナーゼの治療的使用に加えて、非触媒性セグメントが、投薬量の減少および副作用の最小化のために標的誘導薬剤デリバリーに用いられる。最初に、ニシらは標的誘導セグメント（s2b-s3）と増殖因子との融合タンパク質を開発した。注射されたとき、融合タンパク質は10日まで注射部位で活性を維持し

た (Nishi, Matsushita et al.1998)。s3と副甲状腺ホルモンとの融合タンパク質 (PTH-CBD) が、骨粗しょう症の治療のために (Ponnappakkam, Katikaneni et al.2011, Ponnappakkam, Katikaneni et al.2011, Ponnappakkam, Katikaneni et al.2012)、脱毛症の予防および治療のために (Katikaneni, Ponnappakkam et al.2012, Katikaneni, Ponnappakkam et al.2014, Katikaneni, Ponnappakkam et al.2014, Katikaneni, Seymour et al.2015) 開発されている。全身的適用は、血液がアクセス可能な再生コラーゲンへのs3の明白な標的誘導能力に基づく (Stratford, Vu et al.2014)。親和性がより低いs3はin vivoでの全身性薬剤デリバリーベヒクルとして有効であるが、より堅固なコラーゲン結合剤s2b-s3は、コラーゲン系骨移植材料とともに損傷部位に適用されるとき創傷治癒適用でより有効である (An, Lin et al.2015, Fujimaki, Inoue et al.2015, Saito, Uchida et al.2015, Uchida, Matsushita et al.2015)。ここで我々はカルシウム存在下でのタンデムCBDの結晶構造を報告する。我々はまた、ゲルろ過およびSAXSの結果に基づいて、コラーゲン基質とのその結合および相互作用様式並びにカルシウムの役割を提案する。

【0033】

材料と方法

生産、精製、結晶化および構造決定

C.ヒストリチウムから得られた個々のs3a、s3bとともにタンデムCBDを、以前に記載された方法を用いてグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)-融合タンパク質として発現させた (Matsushita, Jung et al.1998)。タンデムCBDの結晶を成長させるために適切な初期条件を高処理スクリーン (Hampton Research Crystal Screen HT) によって確認した。当該初期条件を用い、その後の結晶化をハンギングドロップ法によって実施した。タンデムCBDの結晶 (3mMカルシウム (21 - 26% PEG3350、HEPES pH 7.5、37) の存在下で入手) は斜方晶系であり (空間群、 $P2_12_12_1$)、以下の格子パラメータを有する $a = 51.5$ 、 $b = 54.7$ 、 $c = 92.0$ 。結晶は37で24時間以内に成長したが、4、16および24では成長しなかった。結晶は温度感受性で、低温では耐えることができなかった。したがって、回折データは社内のX線施設において室温で1.9の解像度で収集し、Cu K 照射でRigaku 007ジェネレーターを用いた。データセットはd*TREK (Pflugrath 1999) で処理した (表1)。構造は分子交換プログラムMolRep (CCP4パッケージ) で解析した。検索モデルとしてs3b (PDB code 2o8o) を用いた (Murshudov, Vagin et al.1997)。1個のタンデムCBDが非対称ユニットで見出された。したがって V_M は $2.5^3/\text{Da}$ で、溶媒含有量は50%であった (Matthews 1968)。タンデムCBDの精錬はRefmac_6.1.13を用いて実施した (Murshudov, Vagin et al.1997)。各CBDがTLS群として作用する原子鎖を維持するためにTLS拘束を適用した。バビネットスケリングをバルク溶媒精錬に用いた。 R_{free} のモニターのためにデータの5%を取りおいた。MIFit (McRee 1999) を用いて、モデルを各精錬サイクル間で手動で調整した。代替立体配置をLys818、Glu945、Tyr970、およびArg1005のために構築した。Procheckプログラム (Laskowski, Macarthur et al.1993) を用いて得た最終構造のためのラマチャンドランプロットは、コア領域において残基の91%を、追加的に許容された領域において残基の9%を示したが、豊富に許容されたまたは非許容領域においては何も示さなかった。最終精錬統計は表1に示される。

【0034】

表1：データ収集統計

10

20

30

40

データ収集統計		
波長 (Å)	1.5419	
温度 (K)	298	
解像範囲(Å) ^a	19.7–1.90 (1.97–1.90)	
空間群	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
単位格子寸法 (Å)		
a (Å)	51.5	10
b (Å)	54.7	
c (Å)	92.0	
単位格子角 (°)	α、β、γ = 90	
全反射	89,473	
重複性	4.47 (4.27)	
完全性(%) ^a	94.8 (94.2)	
R _{meas} (%) ^{a, b}	7.1 (49.2)	
I/σ I ^b	11.2 (2.9)	
精錬統計		
固有反射	18,987	20
溶媒分子	211	
R _{work} (%)	15.0 (25.5)	
R _{free} (%) ^{b, c}	19.6 (26.8)	
平均B値 (Å ²)	37.68	
R _{free} を基準にしたESU (Å)	0.13	
平均二乗偏差		
結合距離 (Å)	0.011	
結合角 (°)	1.87	30
キラル中心 (Å ³)	0.17	
平面群 (Å)	0.01	
B-因子拘束		
主鎖結合 (Å ²)	3.81	
主鎖角 (Å ²)	4.72	
側鎖結合 (Å ²)	6.84	
ロングレンジB-因子 (Å ²)	12.3	
ラマチャンドラン統計		
もっとも好ましい領域 (%)	90.9	
許容領域 (%)	9.1	40

^a $R_{meas} = \frac{1}{N} \sum_{hkl} \{N(hkl)/N(hkl)-1\}^{1/2} |I(hkl) - \bar{I}(hkl)| / \bar{I}(hkl)$

^b 最高解像度のデータは括弧内に示される

^c 精錬から排除された5%のデータ

【 0 0 3 5 】

小角X線散乱

小角X線散乱 (SAXS) のために適切な緩衝条件は不連続ネイティブPAGEを用いて確認した。pCa分析のために、タンデムCBDを10mM HEPES-Na (pH 7.5)、100mM NaCl、および2%グリセロールに対して平衡化した。pCaは合計0.2mMのEGTAで維持し、pCa値を3、4、5および6にするためにCaCl₂を添加した。与えられたpCaを得るために必要な

Ca^{2+} の量はMAXCHELATORを用いて決定した (Bers, Patton et al.2010)。タンデムCBD:[(POG)₁₀]₃複合体分析のために、前記複合体を50mM HEPES-Na (pH 7.5)、100mM NaCl、および2mM CaCl_2 に対して平行化した。[(POG)₁₀]₃は5mM酢酸に7.5mg/mLの濃度で溶解し、4 で24時間保存した。続いてペプチドをタンデムCBDと混合した。タンデムCBD対ミニ-コラーゲンのモル比は1:2であった。測定は各サンプルにつき3つの濃度シリーズで実施した。当該pCaシリーズについて、pCa 4および5および6で用いたタンデムCBDの濃度は1、3および5mg/mLであった。pCa 3では、用いた濃度シリーズは2、4および6mg/mLであった。[(POG)₁₀]₃との複合体では、用いた濃度シリーズは1、3および5mg/mLであった。全てのSAXSデータは、バークレーナショナルラブ (Berkley National Lab) のアドバンスドライトソース (Advanced Light Source) で10 で収集した (SIBYLSビームライン、12.3.1)。全てのデータ処理は、ATAS 2.6.1ソフトウェアパッケージのPrimusqtを用いて達成された。各pCaのCBDについて、凝集または検出器飽和によって影響を受けなかった濃度グラジエントから得られた暴露データを無限希釈まで外挿した。回転半径 (R_g)、最大直径の決定とともに外挿データのアブイニシヨ形状再現は、Primusqtのダンミフ (dammif) 機能を用いて実施された。各回の最後に計算された 値は、計算による散乱曲線と実験による散乱曲線との間の一致を示した。当該pCaシリーズで、各形状の 値は0.8と1.2の間の範囲である。[(POG)₁₀]₃との複合体では、値は0.8である。

【0036】

コラーゲン原線維形成

コラーゲン分子の自家集合に対するタンデムCBD添加の影響は、37 で450nmにおける光学密度の増加として濁度を測定することによってモニターされた。氷上で、2mg/mLのラットコラーゲン溶液を40mM HEPES緩衝液 (pH7.5) (300mM NaCl、2mM CaCl_2 添加) で最終濃度0.5mg/mL (2.4 μM) に希釈した。次の工程で、コラーゲン結合ドメインを以下のモル濃度比で添加した: 0.1:1、0.2:1、0.3:1、0.5:1、1:1、2:1、3:1、5:1。濁度測定は96ウェルプレートで分光光度計Filter Max F5 (Molecular Devices) を用いて1分間隔で実施した。濁度曲線から以下のパラメーターが概算された: 遅滞期の終わりの t_{lag} -時間、最大濁度、および最大原線維成長速度。

分析用サイズ排除クロマトグラフィー

サイズ排除クロマトグラフィーをHPLC系で室温で実施した。HPLC系には、記載のように0.5mL/分の流速でスーパーデックス75カラム (1 x 30cm (Pharmacia)) が備えられた (Wilson, Matsushita et al.2003)。分子質量標準物質として以下のタンパク質を用いた: ウシ血清アルブミン (67.0kDa)、ニワトリオボアルブミン (43.0kDa)、およびリボヌクレアーゼA (13.7kDa (Pharmacia))。測定は三重に実施した。

コラーゲン性ペプチドとの結合の定量的分析

BIACORE装置 (Biacore, Uppsala, Sweden) を用い表面プラズモン共鳴によって、多様なCBDタンパク質とコラーゲン性ペプチドとの結合を測定した。前記装置は、記載されたようにペプチド (Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂) を固定したセンサーチップ (CM5 (Biacore)) を有する (Wilson, Matsushita et al.2003)。

コラーゲン原線維結合アッセイ

3つのCBD (s3a、s3b、およびs3as3b) のコラーゲン線維に対する結合親和性を分析した。最初に、10mgのブタの皮膚線維 (Nippi, Inc, Japan) を0.2nmのスピンカラムに入れ、200mM NaClおよび5mM CaCl_2 を補充した50mM Tris-HCl (pH7.5) で洗浄した。続いて、0.5mg/mLのBSA (内部コントロール) および種々の濃度 (2.5から20mg/mL) のタンデムCBDを含むタンパク質混合物20 μL (上記緩衝液で平衡化されている) を加え、線維と十分に混合した。室温で30分間インキュベートした後、未結合のタンデムCBDを含む上清を収集し、SDS-PAGEを用いて定量した。この工程のために、等体積の未使用タンパク質混合物をコントロールとして用いた。電気泳動後に、クーマシーブリリアントブルーR-250でタンパク質を染色し、タンパク質の相対量をImageJソフトウェア (バージョン1.4.2; National Institutes of Health) によって概算した。これらの概算を基

準にして、各CBDについて検定曲線を作成し、前記を用いて各上清のCBD量を定量した。三重にアッセイすることによって得られた結果をスキャチャードプロットで分析し、各CBDについて解離定数 (K_d) および結合部位の数 (B_{max}) を得た。

【0037】

結果と考察

タンデムCBDの構造の説明

s3aおよびs3bから成るタンデムCBDの結晶構造は1.9 Åの解像度で解析された。s3bセグメントは以前に記載されているが、s3aセグメントは本論文で初めて記載される。s3aおよびs3bはともに、非常に類似するβ-サンドイッチ「ジェリー-ロール」(10個のβ-鎖を含む)を採用する。これらCBDは、塩架橋および水素結合相互作用によって安定化される擬似二回転対照によって関係する。擬似対称軸(図1Bでページの面に対して垂直である)は、タンデムCBDのコラーゲン結合ポケットを55 Å離れるように配置する。各ドメインは2つの Ca^{2+} をキレートし、すなわち、記載されたように一方の Ca^{2+} は双五角錐構造で結合し、他方は反四角柱構造で結合する(Bauer, Wilson et al.2013)。電子密度は、Glu792とPro793との間のプロピル-cis-ペプチド結合、およびGlu899とAsn992との間の非プロピル-cis-ペプチド結合の観察を可能にした。110の等価C原子を土台にするオーバーレイは、s3aおよびs3bは0.9 Åのr.m.s.d.を共有し、ループでのみ顕著に逸脱する(1.1-2.5 Åのr.m.s.d)ことを示す。両CBDのループは最高のB-因子値を示し、一方、β-シート残基は低いB-因子値を示した。予想されるとおり、 Ca^{2+} と相互作用する残基のB-因子値はとりわけ最低である。s3aの平均温度因子は結晶充填のためにs3bよりも低い。holo-s3b(PDBコード4HPK)の以前に報告された構造では、プロテアーゼ感受性で高度に活動的なループ960-968は観察されなかった(Philominathan, Koide et al.2009, Sides, Liyanage et al.2012, Bauer, Wilson et al.2013)。ここに提示する構造では、このループの動力学は結晶充填接触によって抑制される。その他の点では、単独s3bおよびタンデムCBD中のs3bは互いに実質的に同一である(Cα r.m.s.d.0.6 Å)。

【0038】

タンデムCBDの Ca^{2+} 誘発形質転換

細菌と宿主のECM内部の Ca^{2+} 濃度の相違は、宿主中に細菌のコラーゲナーゼを効率的に分泌するために利用できよう。クロストリジウムの細胞内 Ca^{2+} 濃度は、大腸菌(*Escherichia coli*)のそれ($0.2 - 0.3 \times 10^{-6} M$)とおそらく類似し(Holland, Jones et al.1999)、前記濃度は Ca^{2+} に対するタンデムCBDの見かけの K_d より十分に低い(図2A)。しかしながら、細胞外組織液は約1.2mMの濃度で Ca^{2+} を含む(Maurer and Hohenester, 1997)。サイズ排除クロマトグラフィーでモニターすれば、s3a-s3bのドメイン再オリエンテーションは Ca^{2+} によって誘発される協調的事象であり、SAXSデータはこの構造的変化の大きさを裏付けた(図2B)。5以下のpCa(10 μM)では、SAXSで演繹されるタンデムCBDのエンベロープは棒状形をとる(図2B)。エンベロープの隆起は、SAXSでβ-ヘリックスリンカーが出現する態様に類似する(Sides, Liyanage et al.2012)。pCa = 6では、s3bのβ-鎖A'もまた展開してリンカーの活動性を大きく増加させる(Sides, Liyanage et al.2012)。 Ca^{2+} 濃度を増加させるとき、タンデムCBDは着実によりコンパクトな形状をとる(図2B)。pCa = 4(100 μM)では、形状は結晶構造に類似するが、ただしs3aのリンカーが活動性を維持していることを示唆するでっぱりを例外とする。pCa = 3(1mM)では、形状はタンデムCBDの結晶構造と良好に一致する。SAXS演繹エンベロープでモデル化されたドメイン再編は、12残基長のリンカーを有するs3bで実施された観察と一致する。s3aとs3bとの間のリンカーは、β-ヘリックスからβ-シートへの二次構造形質転換を経ることが示され、これは Ca^{2+} 結合によって誘発され、ドメイン間のより堅固な接触をもたらす(Wilson, Matsushita et al.2003, Sides, Liyanage et al.2012)。s3bのβ-鎖A'は展開してリンカーの活動性を大きく増加させる(Sides, Liyanage et al.2012)。自由エネルギーシミュレーションは、カルシウムイオンはcis-ペプチド結合を熱力学的に安定化させるだけでなく、その形成もまた触媒することを示した(Spiriti and van der Vaart 2010)。カルシウム依存構造変化は、サイズ排除クロマトグラフィーおよ

びSAXSによって完全長ColHについてモニターされた (Ohbayashi, Matsumoto et al.2013)。タンデムCBDについての発見を拡大すれば、完全長ColGおよびColHもまたCa²⁺誘発ドメイン再編を経ることはありそうなことである。細菌内の活動的ColGおよびColHは急速な分泌を可能にし宿主に最大の損傷を誘発する。

【 0 0 3 9 】

ミニコラーゲン-タンデムCBD相互作用

我々の結果は、タンデムCBDとコラーゲン原線維またはミニコラーゲンとの間の固有の相互作用を示唆する。コラーゲン原線維は、三重ヘリックス状トロポコラーゲンのジグザグ配列によって構築され、前記は水に不溶性である。一方、合成コラーゲン性ペプチドまたはミニコラーゲン (自然のままのトロポコラーゲンの構造を模倣し水溶性である) は、個々のコラーゲン-タンパク質相互作用の研究に用いられてきた。ミニコラーゲンの使用はまたCBD-コラーゲン相互作用の定量的分析を可能にする。K_d値が不溶性コラーゲン原線維およびミニコラーゲンに対して多様な形態のCBDについて評価され、それらは良好な一致を見た (Matsushita, Koide et al.2001)。タンデムCBDは、被検CBDの中で最も堅固に (約 ~ のK_d)、さらにs3aの合計またはs3b単独よりもはるかに堅固に (約100 μM のK_d) コラーゲン原線維と結合する。しかしながら、タンデムCBDは、s3bと同じ堅固さでのみミニコラーゲンと結合する。タンデムCBDは、固定されたミニコラーゲン密度が高いとき協調的な結合を示す。タンデムCBD:ミニコラーゲンにおけるSAXSの結果はまた1 : 1複合体を提示した。ミニコラーゲンに対しs3aおよびs3bの結合親和性が与えられるならば、タンデムCBDのs3bセグメントは、[(POG)₁₀]₃のC-末端と単一方向で結合し (Philominathan, Koide et al.2009, Philominathan, Koide et al.2012, Bauer, Wilson et al.2013)、したがって前記はそのようなものとしてエンベロープでモデル化された (図2B)。

S3aはs3bよりも低い堅固さでコラーゲンと結合し、おそらくs3aが保存チロシン残基の1つを失っているというのがその理由であろう。CBD配列をアラインメントしたとき、3つのTyr残基 (s3bの970、994および996) は良好に保存され、これら残基のいずれかの変異導入はミニコラーゲンとの結合を低下させた (Wilson, Matsushita et al.2003)。代わってタンデムCBDの配列をアラインメントしたとき、N-側CBDとC-側CBDの相違が浮かび上がった。N-側CBDではTyr996の等価物は良好には保存されなかったが、C-側CBDでは3つ全てのTyr残基が良好に保存された (図2B、図5)。s3aもまた保存されたTyr970等価物を欠き、代わってSer851がその位置を占めた。s3aの近傍のHis848がこの残基近くのほぼ同じ空間を占め、より低い程度ながらその役割を満たすことができた。CBDの遺伝子重複は、明らかに、原線維の表面でこのドメイン型が動けなくなるのを防ぐために877位の機能的な重要性を低下させることを必要とした。CBDドメインは余分の - 鎖 (- 鎖A') およびドメイン間相互作用によって位置決めされる。 - 鎖A' はs3aおよびs3bの両方に存在するが、それはs3には存在せず、したがって複数のCBDを有するコラーゲナーゼにとっては特異である。余分の - 鎖は非保存側鎖相互作用によって安定化され、このことは遺伝子重複は比較的最近の事象であったことを示唆する。

CBDとミニコラーゲンの観察された1:1複合体は、より強いs3b結合が結合を開始させることを示す。この提唱メカニズムは、タンデムCBDがs3b単独とちょうど同じ堅固さでミニコラーゲンと結合するという観察によって支持される。それにもかかわらず、タンデムCBDはs3b単独よりも堅固にコラーゲン原線維と結合する (Toyoshima, Matsushita et al.2001)。s3bは結合を開始させ中心的な役割を果たすが、s3aは、55 離れたコラーゲン分子間で生じる間隙への挿入で補助的であるがなお中枢的役割を果たす。CBDは並んで横たわって1つのトロポコラーゲン分子と結合し得ると提唱されたが (Eckhard and Brandstetter 2011)、我々の構造はこの態様の可能性は低いことを示唆する。

ColGとは異なり、ColHは2つのPKD様ドメイン (s2aおよびs2b) を有し、ただ1つのCBD (s3) のみを有する。それ自体コラーゲン結合物質ではないが、s2bはコラーゲンに対するs3の親和性を強化する (Matsushita, Jung et al.1998)。s3aはコラーゲン結合物質であるが、s3aは弱い相互作用の供給源とし機能することによってs2bと同様に働くこと

ができる。前記相互作用は、当該セグメントが、全体的なより堅固なコラーゲン結合部位に寄与するとともに日和見的結合部位を求めて単一トロポコラーゲンをスキャンすることを可能にする。タンデムPKDおよびタンデムCBDセグメントの開発は、ColGおよびColHがコラーゲン線維中の種々のニッチを潜在的に探索することを可能にした。

【0040】

コラーゲン原線維-タンデムCBD相互作用

擬似二回転対称は当該分子の向かい合う末端のコラーゲン結合表面の向きを定め、タンデムCBDが同方向の向きを有する2つのコラーゲン分子と結合することを可能にする（図1B）。コラーゲンは、450nmにおける吸収の変化によってモニターすることができるプロセスで自家集合してコラーゲン原線維を形成する。コラーゲン結合分子（例えばs3b）はコラーゲンと結合し、原線維形成を遅らせる（Okano-Kosugi, Matsushita et al.2009）。しかしながら、タンデムCBDは、2つのコラーゲン分子間でそれ自体をくさびで留めることができるように見えるので、原線維の自家集合を促進するその能力を試験した。コラーゲン原線維形成におけるタンデムCBDの影響を究明するために、タンデムCBDとコラーゲンの混合物の濁度をモニターした（図3）。注目すべきことには、タンデムCBD対コラーゲンの比は、線維形成前の遅滞期時間に著しい影響を有する。タンデムCBDが存在しないとき（コントロール）、原線維形成の遅滞期時間は19分で、以前の観察と一致する（Okano-Kosugi, Matsushita et al.2009）。タンデムCBD：コラーゲン比が0.1:1では、遅滞期時間は15分に減少する。タンデムCBDの濃度がコラーゲンの割合と比較して相対的に高いとき、遅滞期時間は増加する。タンデムCBD：コラーゲン比が5:1では、遅滞期時間は31分である。CBDの割合が低い場合の原線維成長は、タンデムCBDの割合が高いサンプル（吸収は0.005であった）と比較してはるかに高い0.0217の吸収をもたらす。遅滞期時間に対する影響はコラーゲン原線維の厚さに反比例した。タンデムCBD：コラーゲンの0.1:1および0.2:1の混合物は、コラーゲン原線維コントロールよりも約14%厚い原線維をもたらす。5:1比では、厚さはコントロールよりも2%低い。低濃度では、タンデムCBDはコラーゲンアラインメントを助け、したがってコラーゲン自家集合のための核の形成を促進する。CBD対コラーゲンのこの2つの比の範囲の自家集合に対する外見的に反対の影響は、最近明らかにされたように（Watanabe-Nakayama, Itami et al.2016）、どのようにしてColGが集合を解除しコラーゲン原線維を破壊するかを理解するための重要な手掛かりを提供することができる。

【0041】

ColGによるコラーゲン分解

高速原子間力顕微鏡法によってリアルタイムでモニターされたColGによるコラーゲン原線維の加水分解は以下を明らかにした：（1）原線維間におけるコラーゲン分子の相互作用はコラーゲナーゼ分子の嵌合を防ぐ；（2）ColGにさらされるとき、コラーゲン分子は他の原線維上で再編される；（3）無秩序なD-周期性はコラーゲン原線維をColGによる分解に感受性にする；（4）ColGはC-末端からN-末端に前進的に移動する；（5）パス（pass）毎に、ColGはコラーゲン原線維の厚さを均等にトリミングする。タンデムCBDの構造はColGの作用に何らかの手掛かりを与える。

ドメインの向き合う面における割目の場所が与えられるならば、我々は以下のコラーゲン結合様式を提案する：（i）タンデムCBDは線維間の間隙をくさびで留める（図4B）；（ii）タンデムCBDは損傷または再形成コラーゲン線維で見出される割目をくさびで留める（図4C）。線維間の間隙に留め釘を取り付けるために必要な努力はあたかもColGが引き止められているかのように見えるかもしれない。原線維形成を促進するタンデムCBDの能力は、どのようにColGがコラーゲン原線維を再編したかを説明することができた。コラーゲン原線維のD-周期性の機械的破壊はColG結合のためのポケットを導入することができる。原線維が最外側のトロポコラーゲンを除去することによって損傷されるならば、CBDは露出したトロポコラーゲン間でそれ自体をくさびで留めることができよう。そのような作用は、タンデムCBDを用いて損傷コラーゲンに薬剤を標的誘導し得るという興味深い可能性を生じる。また別には、タンデムCBDは2つの原線維間をくさびで留めることができ

るかもしれない。1つの原線維から別の原線維までの表面对表面距離の中央値は皮膚では約3.2nmである (Kuwaba, Kobayashi et al.2001)。皮膚の線維間隙のほぼ15%が約6nmの大きさであるはずである。これらの結果は、タンデムCBDは損傷組織へ薬剤を付着させるために有用であり得ることを示唆する。いったんコラーゲン分子間をくさびで留めたら、ColGのC - 末端からN-末端への前進性移動はおそらくコラゲナーゼモジュールによって駆動され、したがって均等にトリミングされたコラーゲン原線維が生成される (Eckhard and Brandstetter 2011, Eckhard, Schonauer et al.2011)。

細菌のタンデムコラーゲン結合ドメインの高解像構造が初めて報告される。CBDの擬似対称性編成 (遺伝子重複および融合から生じる) は、CBDがコラーゲン原線維の固有のニッチを認識してコラーゲンの分解を促進することを可能にできよう。タンデムCBDの構造は、それが同方向の向きを有するコラーゲン分子間をくさびで留める得ることを示す。前記構造は、以前に確認されたコラーゲンのねじれ不足領域に対するCBDの優先性と一緒になって、タンデムCBDはコラーゲン原線維の損傷領域にColGを誘導することを示唆する。そのような標的誘導はまた、タンデムCBDが損傷部位に薬剤を堅固に付着させる新規な薬剤標的誘導の道を開く。

【 0 0 4 2 】

実施例1の参考文献

An, B., Y.S.Lin and B.Brodsky (2015)."Collagen interactions: Drug design and delivery." *Adv Drug Deliv Rev*.

Bauer, R., K.Janowska, K.Taylor, B.Jordan, S.Gann, T.Janowski, E.C.Latimer, O. Matsushita and J.Sakon (2015)."Structures of three polycystic kidney disease-like domains from *Clostridium histolyticum* collagenases ColG and ColH." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71(Pt 3): 565-577.

Bauer, R., J.J.Wilson, S.T.L.Philominathan, D.Davis, O.Matsushita and J.Sakon (2013)."Structural Comparison of ColH and ColG Collagen-Binding Domains from *Clostridium histolyticum*." *Journal of Bacteriology* 195(2): 318-327.

Bers, D.M., C.W.Patton and R.Nuccitelli (2010)."A Practical Guide to the Preparation of Ca²⁺ a Buffers." *Calcium in Living Cells* 99: 1-26.

Duarte, A.S., A.Correia and A.C.Esteves (2014)."Bacterial collagenases - A review." *Crit Rev Microbiol*.

Eckhard, U.and H.Brandstetter (2011)."Polycystic kidney disease-like domains of clostridial collagenases and their role in collagen recruitment." *Biol Chem* 392(11): 1039-1045.

Eckhard, U., E.Schonauer, D.Nuss and H.Brandstetter (2011)."Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis." *Nat Struct Mol Biol* 18(10): 1109-1114.

Fields, G.B.(2013)."Interstitial collagen catabolism." *J Biol Chem* 288(13): 8785-8793.

Fujimaki, H., G.Inoue, K.Uchida, M.Miyagi, W.Saito, A.Sato and M.Takaso (2015)."Elevation of Microglial Basic Fibroblast Growth Factor Contributes to Development of Neuropathic Pain after Spinal Nerve Ligation in Rats." *Spine (Phila Pa 1976)*.

Gaston, R.G., S.E.Larsen, G.M.Pess, S.Coleman, B.Dean, B.M.Cohen, G.J.Kaufman, J.P.Tursi and L.C.Hurst (2015)."The Efficacy and Safety of Concurrent Collagenase *Clostridium Histolyticum* Injections for 2 Dupuytren Contractures in the Same Hand: A Prospective, Multicenter Study." *J Hand Surg Am* 40(10): 1963-1971.

Holland, I.B., H.E.Jones, A.K.Campbell and A.Jacq (1999)."An assessment of the role of intracellular free Ca²⁺ in *E.coli*." *Biochimie* 81(8-9): 901-907.

Katikaneni, R., T.Ponnappakkam, O.Matsushita, J.Sakon and R.Gensure (2014)." 50

10

20

30

40

50

Treatment and prevention of chemotherapy-induced alopecia with PTH-CBD, a collagen-targeted parathyroid hormone analog, in a non-depilated mouse model." *Anticancer Drugs* 25(1): 30-38.

Katikaneni, R., T.Ponnappakkam, A.Seymour, J.Sakon and R.Gensure (2014). "Parathyroid hormone linked to a collagen binding domain promotes hair growth in a mouse model of chemotherapy-induced alopecia in a dose-dependent manner." *Anticancer Drugs* 25(7): 819-825.

Katikaneni, R., T.Ponnappakkam, H.Suda, S.Miyata, J.Sakon, O.Matsushita and R.C.Gensure (2012). "Treatment for chemotherapy-induced alopecia in mice using parathyroid hormone agonists and antagonists linked to a collagen binding domain." *Int J Cancer* 131(5): E813-821.

Katikaneni, R., A.W.Seymour, R.Gulati, T.Ponnappakkam and R.C.Gensure (2015). "Therapy for Alopecia Areata in Mice by Stimulating the Hair Cycle with Parathyroid Hormone Agonists Linked to a Collagen-Binding Domain." *J Investig Dermatol Symp Proc* 17(2): 13-15.

Kuwaba, K., M.Kobayashi, Y.Nomura, S.Irie and Y.Koyama (2001). "Elongated dermatan sulphate in post-inflammatory healing skin distributes among collagen fibrils separated by enlarged interfibrillar gaps." *Biochem J* 358(Pt 1): 157-163.

Laskowski, R.A., M.W.MacArthur, D.S.Moss and J.M.Thornton (1993). "Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures." *Journal of Applied Crystallography* 26: 283-291.

Lawson, P.A. and F.A.Rainey (2015). "Proposal to restrict the genus *Clostridium* (Prazmowski) to *Clostridium butyricum* and related species." *Int J Syst Evol Microbiol*.

Matsushita, O., C.M.Jung, J.Minami, S.Katayama, N.Nishi and A.Okabe (1998). "A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase." *J Biol Chem* 273(6): 3643-3648.

Matsushita, O., T.Koide, R.Kobayashi, K.Nagata and A.Okabe (2001). "Substrate recognition by the collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* class I collagenase." *J Biol Chem* 276(12): 8761-8770.

Matthews, B.W. (1968). "Solvent content of protein crystals." *J Mol Biol* 33(2): 491-497.

McCarthy, R.C., A.G.Breite, M.L.Green and F.E.Dwulet (2011). "Tissue dissociation enzymes for isolating human islets for transplantation: factors to consider in setting enzyme acceptance criteria." *Transplantation* 91(2): 137-145.

McRee, D.E. (1999). "XtalView/Xfit--A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density." *J Struct Biol* 125(2-3): 156-165.

Murshudov, G.N., A.A.Vagin and E.J.Dodson (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53(Pt 3): 240-255.

Nishi, N., O.Matsushita, K.Yuube, H.Miyanaka, A.Okabe and F.Wada (1998). "Collagen-binding growth factors: production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12): 7018-7023.

Ohbayashi, N., T.Matsumoto, H.Shima, M.Goto, K.Watanabe, A.Yamano, Y.Kato, K.Igarashi, Y.Yamagata and K.Murayama (2013). "Solution structure of clostridial collagenase h and its calcium-dependent global conformation change." *Biophys J* 104(7): 1538-1545.

Okano-Kosugi, H., O.Matsushita, S.Asada, A.B.Herr, K.Kitagawa and T.Koide (2011). "Collagen-binding domain of clostridial collagenase h and its calcium-dependent global conformation change." *Biophys J* 101(12): 2153-2161.

10

20

30

40

50

- 009). "Development of a high-throughput screening system for the compounds that inhibit collagen-protein interactions." *Anal Biochem* 394(1): 125-131.
- Pflugrath, J.W. (1999). "The finer things in X-ray diffraction data collection." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(Pt 10): 1718-1725.
- Philominathan, S.T., O.Matsushita, R.Gensure and J.Sakon (2009). "Ca²⁺-induced linker transformation leads to a compact and rigid collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* collagenase." *FEBS J* 276(13): 3589-3601.
- Philominathan, S.T.L., T.Koide, K.Hamada, H.Yasui, S.Seifert, O.Matsushita and J.Sakon (2009). "Unidirectional Binding of Clostridial Collagenase to Triple Helical Substrates." *Journal of Biological Chemistry* 284(16): 10868-10876. 10
- Philominathan, S.T.L., T.Koide, O.Matsushita and J.Sakon (2012). "Bacterial collagen-binding domain targets undertwisted regions of collagen." *Protein Science* 21(10): 1554-1565.
- Ponnappakkam, T., R.Katikaneni, E.Miller, A.Ponnappakkam, S.Hirofumi, S.Miyata, L.J.Suva, J.Sakon, O.Matsushita and R.C.Gensure (2011). "Monthly administration of a novel PTH-collagen binding domain fusion protein is anabolic in mice." *Calcif Tissue Int* 88(6): 511-520.
- Ponnappakkam, T., R.Katikaneni, T.Nichols, G.Tobin, J.Sakon, O.Matsushita and R.C.Gensure (2011). "Prevention of chemotherapy-induced osteoporosis by cyclophosphamide with a long-acting form of parathyroid hormone." *J Endocrinol Invest* 34(11): e392-397. 20
- Ponnappakkam, T., R.Katikaneni, H.Suda, S.Miyata, O.Matsushita, J.Sakon and R.C.Gensure (2012). "A single injection of the anabolic bone agent, parathyroid hormone-collagen binding domain (PTH-CBD), results in sustained increases in bone mineral density for up to 12 months in normal female mice." *Calcif Tissue Int* 91(3): 196-203.
- Saito, W., K.Uchida, O.Matsushita, G.Inoue, H.Sekiguchi, J.Aikawa, H.Fujimaki and M.Takaso (2015). "Acceleration of callus formation during fracture healing using basic fibroblast growth factor-kidney disease domain-collagen-binding domain fusion protein combined with allogenic demineralized bone powder." *J Orthop Surg Res* 10: 59. 30
- Sides, C.R., R.Liyanage, J.O.Lay, S.T.L.Philominathan, O.Matsushita and J.Sakon (2012). "Probing the 3-D Structure, Dynamics, and Stability of Bacterial Collagenase Collagen Binding Domain (apo- versus holo-) by Limited Proteolysis MALDI-TOF MS." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 23(3): 505-519.
- Spiriti, J. and A. van der Vaart (2010). "Mechanism of the calcium-induced trans-cis isomerization of a non-prolyl peptide bond in *Clostridium histolyticum* collagenase." *Biochemistry* 49(25): 5314-5320.
- Stratford, R., Jr., C.Vu, J.Sakon, R.Katikaneni, R.Gensure and T.Ponnappakkam (2014). "Pharmacokinetics in rats of a long-acting human parathyroid hormone-collagen binding domain peptide construct." *J Pharm Sci* 103(2): 768-775. 40
- Toyoshima, T., O.Matsushita, J.Minami, N.Nishi, A.Okabe and T.Itano (2001). "Collagen-binding domain of a *Clostridium histolyticum* collagenase exhibits a broad substrate spectrum both in vitro and in vivo." *Connect Tissue Res* 42(4): 281-290.
- Uchida, K., O.Matsushita, N.Nishi, G.Inoue, K.Horikawa and M.Takaso (2015). "Enhancement of periosteal bone formation by basic fibroblast-derived growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase." *J Tissue Eng Regen Med*. 50

Watanabe-Nakayama, T., M.Itami, N.Kodera, T.Ando and H.Konno (2016)."High-speed atomic force microscopy reveals strongly polarized movement of clostridial collagenase along collagen fibrils." Sci Rep 6: 28975.

Wilson, J.J., O.Matsushita, A.Okabe and J.Sakon (2003)."A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation ." Embo Journal 22(8): 1743-1752.

【実施例 2】

【0043】

クロストリジウム・ヒストリチウムクラスIのタンデムコラーゲン結合ドメインを融合させた塩基性線維芽細胞増殖因子による骨折治癒時の骨形成の加速

骨折部位における組換え塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の保持の増加は、骨折治癒時の骨形成を加速させる。我々は、以前にbFGF並びに多発性嚢胞腎ドメイン (PKD ; s2b) およびクロストリジウム・ヒストリチウムクラスIIコラゲナーゼ (ColH) 由来コラーゲン結合ドメイン (CBD ; s3) から成る融合タンパク質を構築し、融合タンパク質とコラーゲン様ペプチド、ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀ (配列番号:59) の組合せが、骨折部位で間葉系細胞の分裂増殖および仮骨形成を誘発することを報告した。C.クロストリジウムはまた、クラスIコラゲナーゼ (ColG) (C-末端にタンデムCBD (s3aおよびs3b) を有する) を産生することが知られている。まず初めに、我々は、コラゲナーゼペプチド (H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂ (配列番号:60)) に対する2つのクロストリジウムコラゲナーゼに由来する4つのコラーゲンアンカーの結合親和性を、表面プラズモン共鳴によって調べ、タンデムCBD (s3a-s3b) がコラーゲン性ペプチドに対して最も高い親和性を有することを明らかにした。続いて、我々は、bFGFおよび単一CBD (bFGF-s3b) またはタンデムCBD (bFGF-s3a-s3b) から成る融合タンパク質を構築して、それらの生物学的能力を以前の融合構築物 (bFGF-s2b-s3) の能力と比較した。骨折モデルによる試験は、bFGF-s3a-s3bが間葉系細胞の分裂増殖および骨形成を誘発するために最も高い能力を提示することを示した。総合すれば、より高いコラーゲン結合親和性を有するコラーゲンアンカーは、bFGFがより高い生物学的活性を示すように働く。したがって、ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-(CBD)₂複合物は、当該臨床環境で骨の骨折治癒を促進する潜在能力を有するように思われる。

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は血管形成特性を有する有糸分裂促進タンパク質であり、初期骨修復時の骨再形成に必要とされる (1 ; 2) 。組換えヒトbFGFは、骨粗しょう症の動物モデルで骨の骨折および欠損の再生に有効性を示した (3 ; 4) 。最近の2つの臨床試験で、bFGFによる治療は、骨切り術および脛骨骨折部位における骨癒合を加速させた (5 ; 6) 。これらの試験の所見はbFGFが骨の再形成および再生を促進することを強く示すが、外因的に添加されたbFGFは骨欠損部位から急速に拡散する。

クロストリジウム・ヒストリチウム (病理学的ガス壊疽菌) は、2つのクラスのコラゲナーゼ (クラスI、ColGおよびクラスII、ColH) を分泌する。これらの酵素は一般的には触媒ドメイン (s1) 、多発性嚢胞腎ドメイン (PKD、s2 (配列番号:61)) およびコラーゲン結合ドメイン (CBD、s3) を含む。しかしながら、C-末端のコラーゲンアンカーのPKDおよびCBDのコピー数はColGとColHで相違し、それぞれs2-s3a-s3bおよびs2a-s2b-s3である (7 ; 8) 。我々は以前に、bFGFおよびColH由来CBD (bFGF-s3) またはPKD-CBD (bFGF-s2b-s3) から成る融合タンパク質は、コラーゲンシートにローディングしたとき自然のままのbFGFと比較してラットの大腿骨で骨形成を加速することを示した (9) 。高密度コラーゲンシートと一緒にしたとき、bFGF-s2b-s3は骨形成をbFGF-s3よりも強く促進した (10) 。bFGF-s2b-s3をコラーゲン様ペプチドポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀ (配列番号:59) と一緒にしたときもまた、マウスの骨の骨折モデルでbFGF単独と比較してより強く骨形成が誘発された (11) 。より最近の研究では、ガレクチンおよびColG由来タンデムCBD (s3aおよびs3b) から成る融合タンパク質は、ColH由来PKDおよびCBD (s2bおよびs3) と融合させた対応するタンパク質よりも高いコラーゲン結合活性を示した (12) 。これらの発見に基づいて、我々は、ColGのタンデムCBDを含むbFGF融合タンパク質

10

20

30

40

50

は、コラーゲン結合活性の強化により骨折部位でのbFGFの保持を増大させ、改善された骨形成および骨折修復をもたらすであろうと推測した。

そこで、我々は、多様なコラーゲンアンカーとミニコラーゲンとの間の解離定数をin vitroで評価した。それら結果にしたがって、我々は、bFGFおよびColG由来の単一CBD (bFGF-s3b) またはタンデムCBD (bFGF-s3a-s3b) から成る融合タンパク質を構築し、これら融合タンパク質の骨形成能力を以前に構築した2つの融合タンパク質 (bFGFおよびColH由来コラーゲンアンカーから成る) とともに調べた。

【 0 0 4 4 】

材料と方法

ミニコラーゲンペプチドおよびコラーゲン様ポリペプチド

ミニコラーゲンペプチド、H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂ (配列番号:60) を、Rink-アミド樹脂 (Novabiochem, San Diego, CA) 上でN-(9-フルオレニル)メトキシカルボニル(Fmoc)-系方法によって合成した。各サイクルで、Fmoc-アミノ酸 (5当量 (Novabiochem)) をN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド (5当量 (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)) およびN,N'-ジメチルホルムアミド中の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (5当量 (Wako Pure Chemical)) の存在下で90分間反応させた。Fmoc脱保護はDMF中の20% (v/v) ピペリジンによって20分間実施した。ペプチド切断および脱保護工程は、標準的なトリフルオロ酢酸 (TFA) スカベンジャーカクテル (TFA: m-クレゾール: チオアニソール: 水: エタンジチオール, 82.5: 5: 5: 5: 2.5 (v/v)) を用いる処理によって室温で4時間実施した。ペプチドはHPLCによって精製し、HPLCは、Cosmosil 5C18-AR-IIカラム (20 x 250mm (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)) でCH₃CN水を用いて実施した (両方とも0.05% (v/v) TFAを含む)。生成物の純度はRP-HPLCで確認し、前記HPLCは、Cosmosil 5C18-AR-IIカラム (4.6 x 250mm (Nacalai Tesque)) でCH₃CN水のリニアグラジエントを用いて実施した (両方とも0.05% (v/v) TFAを含む)。質量分光分析はBruker Autoflex III MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) を用いて実施した。H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂ (配列番号:60): C₁₅₉H₂₃₂N₄₄O₅₂ ([M+H]⁺) についてのMS(MALDI-TOF)m/z計算値は3590.7で実験値は3590.6であった。H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂ (配列番号:60) のHPLCプロフィールは図11に示される。コラーゲン様ポリペプチド、ポリ (Pro-Hyp-Gly)₁₀ (配列番号:59) は業者 (PHG Co., Ltd., Hyogo, Japan) から入手した (13)。

クロストリジウムコラゲナーゼ、ColGおよびColHに由来するコラーゲンアンカー

C.クロストリジウムクラスIIコラゲナーゼColHに由来するCBD (s3) およびPKD-CBD (s2b-s3) を以前に記載されたように精製した (14)。C.クロストリジウムクラスIコラゲナーゼColGに由来するCBD (s3b) およびCBD-CBD (s3a-s3b) を以前に記載されたように精製した (17)。

コラーゲン性ペプチドとのコラーゲンアンカーの結合の定量的分析

ミニコラーゲンペプチドとのコラーゲンアンカーの結合を、BIACORE装置 (Biacore, Uppsala, Sweden) を用い以前に報告された態様と同じ態様で表面プラズモン共鳴によって測定した (15)。簡単に記せば、ペプチドを0.1mg/mLの濃度で10mM酢酸ナトリウム (pH6.0) 中で溶解し、製造業者が推奨する標準的なアミンカップリング手順を用いてCM5センサーチップ (Biacore) に共有結合により固定した。共鳴は、流速20 μL/分で25 以下の溶液中で測定した: 10mM HEPESナトリウム (pH7.4)、150mM NaCl、1mM CaCl₂ および0.005% Tween-20。各結合工程の後で、0.1 M HClの180-sパルスによりチップを再生させた。見かけの解離定数の値K_D(app)を、最小二乗法により以下の等式に直接適合させて8つのタンパク質濃度 (100nM - 300 μM) について平衡結合データから計算した:

$$cRU = cRU_{\max} \times [\text{タンパク質}] / (K_D + [\text{タンパク質}]) \quad (\text{Eq.1})$$

式中、cRUは、エタノールアミンで封鎖した偽共役フローセルを用いてバルク屈折インデックス誤差について修正した平衡応答であり、[タンパク質]は分析物の濃度であり、K_Dは

解離定数である。

コラーゲン結合bFGF

4つのコラーゲン結合bFGF融合タンパク質（CB-bFGF）をこの試験に用いた（図6）。2つの融合タンパク質、bFGF-s3およびbFGF-s2b-s3を以前に記載したように調製した（10）（前記融合タンパク質はbFGFおよびColH由来のCBDまたはPKD-CBDから成る）。bFGF-s3b（ColG）を調製するために、発現プラスミドpCHG115のDNAをリンカー領域でBamHIおよびEcoRIで消化し、BglIIおよびEcoRIで前処理したhbFGF-コードDNAフラグメントに連結した（pCHG115 DNAはGSTとC-末端コラーゲン結合ドメイン（s3b（ColG））との間で融合タンパク質をコードする）。大腸菌DH5⁺を前記連結混合物で形質転換し、得られたプラスミド（pCHG115-hbFGF）のヌクレオチド配列をSangerの配列決定によって確認した。大腸菌BL21 CodonPlus RIL（Agilent Technologies, Santa Clara, CA）を前記プラスミドで形質転換しGST-bFGF-s3b融合タンパク質を発現させた。融合タンパク質を精製し、GST部分を以前に記載されたように切断した（10）。bFGFおよびColG由来のタンデムCBDから成る別の融合タンパク質（bFGF-s3a-s3b）を別の発現プラスミドpCHG112を用いて同じ態様で生成した。

【0045】

分裂増殖アッセイ

以前に記載されたように（9）、骨膜を10週齢のウィスター（Wistar）ラットの遠位大腿骨から収集し、続いて0.2%のI型コラーゲナーゼ（Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan）により37℃で2時間消化した。消化サンプルを40μmフィルターに通して有核細胞の単一細胞懸濁物を得た。以下を含む6ウェル培養プレートに前記細胞懸濁物を 1×10^4 細胞/cm²で播種した：10%ウシ胎児血清、100U/mLペニシリンおよび100μg/mLストレプトマイシンを補充した - 最少必須培地（ - MEM）。プレートを5% CO₂雰囲気下で37℃で7日間インキュベートし、続いて、0.25%トリプシンおよび1mM EDTAで5分間処理することによって0継代（P0）細胞をプレート表面から剥がした。細胞を収集し、96ウェルプレートに 1.25×10^3 細胞/ウェルで播種した。続いて、bFGF、bFGF-s3（ColH）、bFGF-s2b-s3（ColH）、bFGF-s3b（ColG）、またはbFGF-s3a-s3b（ColG）を含む - MEMを前記培養上清に0（コントロール）、0.1、および10pMの濃度で添加した。処理2日後に、細胞の分裂増殖を評価した。評価に水溶性テトラゾリウム（WST）アッセイキット（Cell Count Reagent SF; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan）を、製造業者のプロトコルおよび以前に記載の手順（9）にしたがって用いた。

骨折モデル

大腿骨骨折モデルを9週齢C57BL/6Jマウスを用いて作出した。マウスには標準的なげっ歯類用固形飼料（CRF-1（Oriental Yeast, Tokyo, Japan））を与え、管理された環境条件下（温度、23±2℃；湿度、55±10%；照明、12時間点灯/消灯サイクル）で、ニッポンチャールズリバーラボラトリーズ（Nippon Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan)）のセミバリアー系に収容した。まず初めに、無菌的条件下で左膝の膝蓋骨近傍の中央矢状面寄りに4mmの切開を作出した。顆内切痕にドリルで0.5mmの穴を開けた後、0.2mmのタングステンガイドワイヤーを髄内管に逆戻りに挿入し、ワイヤー鋸（直径0.22mm）を用い側方アプローチにより大腿骨切片を取り除いた。骨折を固定するために、ガイドワイヤーを除去した後でステンレススチールのネジ（直径0.5mm）を髄内管に挿入した。骨折作出後に直ちに以下を骨折部位に注入した：PBS（コントロール）、0.058nmoleのbFGF、bFGF-s3、bFGF-s2b-s3、bFGF-s3b、またはbFGF-s3a-s3bを含むポリ（Pro-Hyp-Gly）₁₀（配列番号:59）（各処置でn=8）。bFGFの用量は以前の試験（11）の結果により決定した。全ての動物の処置は、北里大学動物倫理委員会のガイドラインにしたがった。

新しい骨の体積および骨の無機質含有量の定量

コントロールおよび処置領域における新しい骨の体積および骨の無機質含有量を定量するために、骨折処置から4週間後にサクリファイスしたマウスから大腿骨を取り出し、4%パラホルムアルデヒド中で48時間4℃で保存した。大腿骨をPBSに移し、inspeXio SMX-

10

20

30

40

50

90CTマイクロフォーカスX線CT系 (Shimadzu, Tokyo, Japan) を以下の設定で用いて画像化した: 加速電圧、90kV; 電流、110mA; ボクセルサイズ、20 lm/ピクセル; およびマトリックスサイズ、1024 x 1024。新しい骨の体積および骨の無機質含有量は、以前に記載されたように (14; 16)、Tri-3D-Bon三次元 (3D) 画像分析ソフトウェア (Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) を用い、中央大腿骨 (midfemur) の問題の10mm領域 (500スライス) で大腿骨のマイクロCT画像により定量した。骨の無機質含有量は、マイクロCT画像における大腿骨サンプルの測定密度をヒドロキシアパタイト (HA) 検定曲線のものと比較することによって概算した。前記検定曲線は、200、300、400、500、600、700および800mg HA/cm³を用いて調製されたファントム画像から作成されたデータをプロットすることによって構築された。新しい骨は300mg/cm³以上の閾値道度を有すると定義された。

10

組織学評価

骨形成におけるポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b (ColG) の影響を調べるために、骨折発生から14日後にコントロールおよび処置動物から大腿骨を摘出した。前記大腿骨サンプルを20%EDTA溶液で28日間脱無機質化し、続いて残余組織をパラフィンに包埋した。当該大腿骨を前額面で長軸に沿って切片 (3 μm) を作成し、得られた切片を形態学的分析のためにヘマトキシリンおよびエオシン (HE) で染色した。

統計分析

PBS (コントロール)、bFGF、bFGF-s3、bFGF-s2b-s3、bFGF-s3bおよびbFGF-s3a-s3bの間の相違を、フィッシャーの最小有意差 (LSD) 試験で一元配置分散分析用いて調べた。有意であるレベルを $p < 0.05$ と設定した。全ての統計分析をSPSSソフトウェア (バージョン19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)) を用いて実施した。

20

【 0 0 4 6 】

結果

コラーゲンアンカーの結合親和性

4つのコラーゲンアンカーのミニコラーゲンペプチド、H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂ (配列番号:60) に対する解離定数を表面プラズモン共鳴によって測定した (表2)。s2b-s3 (PKD-CBD (ColH)) は、s3単独 (CBD (ColH)) と比較してより低いK_d値を示したが、s3b (CBD (ColG)) およびs3a-s3b (CBD-CBD (ColG)) の値は、ColHアンカーの値より約10倍低かった。ColG由来アンカーは、ColH由来アンカーよりも堅固にコラーゲン性ペプチドと結合すると予想できる。

30

【 0 0 4 7 】

表2: 多様なコラーゲンアンカーの結合親和性

コラーゲンアンカー	K _d (10 ⁻⁵ M)	比
ColGS3aS3b	4.46 ± 0.45	0.100
ColGS3b	4.54 ± 0.15	0.102
ColHS2bS3	44.5 ± 0.55	1.00
ColHS3	75.2 ± 0.41	1.69

40

表2に関して、アンカータンパク質はHBS-Ca緩衝液に 1×10^{-7} M から 3×10^{-4} M の範囲の濃度で溶解した。コラーゲン性ペプチド、H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂ (配列番号:60) との結合は表面プラズモン共鳴によって測定した。データは、材料と方法のセクションに記載の等式に最小二乗法によって直接適合させ、見かけの解離定数 (K_D) および不確かさについて値を計算した。

融合タンパク質のin vitro生物学的活性

4つのCB-bFGFの生物学的活性を、ラット骨膜間葉系細胞のin vitro分裂増殖を測定することによって評価した (図7)。0.1pMのbFGF-s3a-s3b (ColG) で処理してから2日後に、培養骨膜間葉系細胞の数は、コントロール (-MEM) 処理グループと比較して有意に増加した。対照的にbFGF、bFGF-s3 (ColH)、bFGF-s2b-s3 (ColH)、またはbF

50

GF-s3b (ColG) 処理細胞では有意な増加は検出されなかった。しかしながら、bFGFまたはCB-bFGFの濃度を1または10pMに増加させたとき、細胞数は、-MEM処理グループと比較して全ての形態の増殖因子で有意に増加した。

CB-bFGF/poly(Pro-Hyp-Gly)₁₀複合物質によって誘発されるin vitro仮骨形成

ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀ゲルをPBS、bFGF (コントロール)、または4つの調製CB-bFGFの1つと混合し、マウス的大腿骨の骨折部位に適用した。4週間回復させた後、骨折部位の仮骨形成をマイクロCT画像分析によって評価した(図8A - 8F)。PBSを注射した骨折部位と比較して、仮骨体積および骨無機質含有量は、bFGFまたはCB-bFGF融合タンパク質と組合わせてポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀で処置した部位で有意に高かった(図9、 $P < 0.05$)。しかしながら、注目すべきは、bFGF-s2b-s3 (ColH)、bFGF-s3b (ColG) およびbFGF-s3a-s3b (ColG) は、bFGFと比較してより高い仮骨体積および骨無機質含有量をもたらした(図9、 $P < 0.05$)。当該3つの融合タンパク質の中で、bFGF-s3a-s3b (ColG) はもっとも高い骨修復有効性を示し、その仮骨体積および骨無機質含有量は他の全てのグループのものよりも有意に高かった(図9、 $P < 0.05$)。

組織形態計測所見

ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b (ColG) が新規な骨の形成を加速するメカニズムを解明するために、マウス大腿骨骨折モデルで軟仮骨の形成が初めて検出されてから2週間後に、処置した骨折部位の組織学的な評価を実施した。コントロールグループと比較して、bFGF-s2b-s3 (ColH)、bFGF-s3b (ColG) またはbFGF-s3a-s3bのいずれかで処置した骨折部位で大きな仮骨が観察された(図10A - 10F)。注目すべきは、bFGF-s3a-s3b-処置によって形成された仮骨は、他の処置グループで観察されたものよりもはっきりと大きかった(図10A - 10F)。この所見は、ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀/bFGF-s3a-s3b (ColG) は、骨折治癒の初期段階で骨膜細胞の分裂増殖を加速することを示した。

【0048】

考察

クロストリジウムのコラゲナーゼはそのC-末端にコラーゲンアンカーを有する。当該アンカーはコラーゲン原線維および三重ヘリックス構造を有するコラーゲン性ペプチドと結合するが、変性コラーゲン(ゼラチン)とは結合しない(17)。アンカーは2つのタイプのドメイン、PKDおよびCBDで形成される(前者は後者の結合を強化する)。前記酵素は多様なコピー数のPKDおよびCBDで形成されるコラーゲンアンカーを有する。以前に我々は、コラーゲン担体(高密度コラーゲンシート/粉末または脱無機質骨マトリックス)およびアンカー融合bFGF(bFGF-PKD-CBD)で形成された複合物質の仮骨誘発能を示した(前記アンカーは、クロストリジウム・ヒストリチウムクラスIIコラゲナーゼ(ColH)由来PKDおよびCBDの各々の単一コピーで形成されている)(14; 16)。最近、我々はコラーゲン担体の代わりにコラーゲン性ペプチドゲルを用いることを試みた。なぜならば、コラーゲン性ペプチドは注射によってより容易に適用できるからである。加齢マウスの骨折モデルでは、ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀およびbFGF-PKD-CBDで形成された新規な複合物質は、ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀およびbFGFで形成されたものよりも強く骨形成を誘発した(11)。したがって、我々は、多様な結合親和性を有するアンカーをコラーゲン性ペプチドに切り換えることによってこの複合物質の効能を最適化できると推測することができた。

多様なアンカーとペプチド担体(ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀)との結合親和性を概算するために、我々は、表面プラズモン共鳴アッセイのためのリガンドとしてより長いコラーゲン性ペプチド、H-Gly-Pro-Arg-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₁₂-NH₂を合成した。前記ペプチドで最初のトリプレット、Pro-Arg-Glyは当該ペプチドの水溶性および三重ヘリックス構造を保つために導入された。ペプチドはセンサーチップにN-末端で固定されるので、N-末端近くの変化は結合に顕著には影響しないと予想しても差し支えないであろう。このペプチドに対して単一CBD (ColG s3b) は、より短いコラーゲン性ペプチド (G(POG)₈) に対して以前に報告(15)されたK_D値 ($4.54 \pm 0.15 \times 10^{-5}$ M) と同様なK_D値 ($5.72 \pm 0.473 \times 10^{-5}$ M) を提示し、ここで実施した定量的分析が再現性を有することを示した。クラスI酵素 (ColG) に由来するコラーゲンアンカー (s3a-s3bおよびs3b) は、クラスII酵素 (

ColH)に由来するもの(s2b-s3およびs3)よりもこのペプチドに対して顕著に高い親和性を示し、前者が当該ペプチド担体に対して後者よりも適切なアンカーであることを示唆した。追加されたCBD(s3a)の存在はこの合成ペプチドに対するColG s3bの結合を有意には強化せず、このアッセイに用いられたペプチドはなお短すぎて2つのCBDの同時結合を許容できないことを示唆した。また別の可能性は、S3aとコラーゲンペプチドとの間の結合は見かけの K_D 値で反映されるには弱すぎるということである。より長いコラーゲン性ペプチドを用いる結合アッセイおよび/または小角X線回折試験はこの問題の解決に必要であろう。

有効性が結合親和性と相関すると仮定するならば、コラーゲン性ペプチドと組み合わせたときにColGアンカー融合bFGFを用いてより大きな仮骨形成を期待できよう。したがって、我々は、上記に記載のアンカーの1つを有するCB-bFGFを調製した。各CB-bFGF構築物のbFGF部分が完全であることを確認するために、細胞分裂増殖アッセイをin vitroで実施した。4つのCB-bFGFおよびbFGFは用量依存態様で細胞の分裂増殖を促進した。このことは、bFGFが多様なアンカー部分にもかかわらず活性を有することを示している。bFGF-CBD-CBD(s3a-s3b)の比活性は、低濃度(0.1 - 1.0pM)では他のCB-bFGFよりもわずかに高いように思われ、これは、間葉系細胞によって生成されたコラーゲンに対するこのCB-bFGFの結合に起因しているのかもしれない。

続いて、ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀および4つのCB-bFGFのいずれかで形成された複合物質の骨発生潜在能力を、マウスの大腿骨骨折モデルを用いて比較した。ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀で形成されたゲル様担体と組み合わせたとき、bFGF-CBD(ColG)およびbFGF-CBD-CBD(ColG)は、bFGF、bFGF-PKD-CBD(ColH)、またはbFGF-CBD(ColH)と比較して、2週間で大きな軟仮骨形成および骨折治癒時に有意に大きな仮骨を誘発した。被験物質の中では、bFGF-CBD-CBD(ColG)が最高の仮骨体積および骨無機質含有量をもたらした。

コラーゲンアンカーの結合親和性は、対応する融合タンパク質の骨発生活性に影響を与え得る。なぜならば、標的分子の欠損部位からの急速な拡散はそれらの骨発生潜在能力を制限するであろう(10)。以前に我々は、bFGF-PKD-CBD(ColH)が、bFGF-CBD(ColH)と比較してコラーゲン担体に対しより高い結合親和性を有し、より強い骨形成を誘発することを示した(10)。本試験で用いたコラーゲンアンカーの中では、ColG CBDは、コラーゲン性ペプチドに対してColHアンカーよりも約10倍高い親和性を示した。この発見はin vivoの結果と一致する(in vivoでは、ColGアンカーと融合させたbFGFは、ColHアンカー融合bFGFと比較して、コラーゲン性ペプチドと組み合わせたときにより効果的に骨発生を加速した)。

総合すれば、骨発生潜在能力は、少なくとも我々が調べた範囲では、コラーゲンアンカーの結合親和性と相関するように思われる。さらに、コラーゲン様ポリペプチド、ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀と一緒に導入したとき、タンデムCBD(ColG)は、骨折部位でのbFGF保持時間を最も増加させ、したがって骨形成を加速させるということもまた確実であるように思われる。これらの結果は、ポリ(Pro-Hyp-Gly)₁₀と組み合わせたbFGF-CBD-CBD(ColG)は臨床環境において骨修復の刺激のために有望な治療物質であることを示唆する。

以前の研究は、増殖因子とCBDとの融合タンパク質は、自然のままの増殖因子と比較して優れた生物学的活性を有することを示した(18; 19)。例えばHanら(18)は、フォン・ビルブランド因子由来CBDを含む骨形態発生タンパク質は、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1のin vitroアルカリホスファターゼ活性を増強させることを報告した。bFGFは骨膜間葉系細胞を刺激するので(9; 10; 16)、我々は、ラット骨膜間葉系細胞を用いてbFGFおよびいくつかのCB-bFGF融合タンパク質の分裂増殖能力を調べ、bFGF-CBD-CBDは、1pMの低い濃度で調べたタンパク質では最も高い細胞分裂増殖活性を刺激することを示した。総合すれば、この試験の所見は、bFGF-CBD-CBDは高いコラーゲン結合親和性および生物学的活性(骨折治癒時の仮骨形成を刺激する能力を含む)の両方を有することを示した。

C. クロストリジウムクラスIコラーゲナーゼColGのタンデムCBDを含む、組換えコラーゲ

10

20

30

40

50

ン結合bFGF融合タンパク質は、マウス大腿骨の骨折部位にコラーゲン様ペプチド、ポリ(P ro-Hyp-Gly)₁₀と一緒に注射されるとき骨形成を強く誘発した。bFGF-CBD-CBD/ポリ(P ro-Hyp-Gly)₁₀の高い骨発生特性は、この複合物質が臨床環境において骨折治癒を促進する潜在能力を有することを示唆する。

【 0 0 4 9 】

実施例2の参考文献

- [1] Khan SN, Bostrom MP, Lane JM: Bone growth factors. *Orthop Clin North Am* 2000;31:375-388.
- [2] Ueno M, Urabe K, Naruse K, Uchida K, Minehara H, Yamamoto T, Steck R, Gregory L, Wullschlegel ME, Schuetz MA, Itoman M: Influence of internal fixator stiffness on murine fracture healing: two types of fracture healing lead to two distinct cellular events and FGF-2 expressions. *Exp Anim* 2011;60:79-87.
- [3] Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama I, Hiyama Y, Nakamura T, Kuzutani K, Tamura M, Kurokawa T, Nakamura K: Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res* 1998;16:654-659.
- [4] Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, Matsumoto T: Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 1994;135:774-781.
- [5] Kawaguchi H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Matsushita T, Nakamura T, Mizuno K, Nakamura T, Nakamura K: Local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone repair: a dose-escalation prospective trial on patients with osteotomy. *J Orthop Res* 2007;25:480-487.
- [6] Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Sato K, Matsushita T, Nakamura K: A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 2010;25:2735-2743.
- [7] Bauer R, Wilson JJ, Philominathan ST, Davis D, Matsushita O, Sakon J: Structural comparison of ColH and ColG collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum*. *J Bacteriol* 2013;195:318-327.
- [8] Bauer R, Janowska K, Taylor K, Jordan B, Gann S, Janowski T, Latimer EC, Matsushita O, Sakon J: Structures of three polycystic kidney disease-like domains from *Clostridium histolyticum* collagenases ColG and ColH. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2015;71:565-577.
- [9] Uchida K, Matsushita O, Naruse K, Mima T, Nishi N, Hattori S, Ogura T, Inoue G, Tanaka K, Takaso M: Acceleration of periosteal bone formation by human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:1737-1743.
- [10] Uchida K, Matsushita O, Nishi N, Inoue G, Horikawa K, Takaso M: Enhancement of periosteal bone formation by basic fibroblast-derived growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Tissue Eng Regen Med* 3-18-2015.
- [11] Sekiguchi H, Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Saito W, Aikawa J, Tanaka K, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M: Acceleration of bone formation during fracture healing by poly(pro-hyp-gly)₁₀ and basic fibroblast growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A* 2016;104:1372-1378.
- [12] Fukata Y, Itoh A, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Matsushita O, Nishi N:

10

20

30

40

50

Direct cytotoxic effect of galectin-9 localized on collagen matrices on human immune cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:1892-1901.

[13] Kishimoto T, Morihara Y, Osanai M, Ogata S, Kamitakahara M, Ohtsuki C, Tanihara M: Synthesis of poly(Pro-Hyp-Gly)(n) by direct poly-condensation of (Pro-Hyp-Gly)(n), where n=1, 5, and 10, and stability of the triple-helical structure. *Biopolymers* 10-15-2005;79:163-172.

[14] Saito W, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Sekiguchi H, Aikawa J, Fujimaki H, Takaso M: Acceleration of callus formation during fracture healing using basic fibroblast growth factor-kidney disease domain-collagen-binding domain fusion protein combined with allogenic demineralized bone powder. *J Orthop Surg Res* 2015;10:59.

[15] Wilson JJ, Matsushita O, Okabe A, Sakon J: A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. *EMBO J* 4-15-2003;22:1743-1752.

[16] Saito W, Uchida K, Ueno M, Matsushita O, Inoue G, Nishi N, Ogura T, Hattori S, Fujimaki H, Tanaka K, Takaso M: Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:3049-3055.

[17] Matsushita O, Koide T, Kobayashi R, Nagata K, Okabe A: Substrate recognition by the collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* class I collagenase. *J Biol Chem* 3-23-2001;276:8761-8770.

[18] Han X, Zhang W, Gu J, Zhao H, Ni L, Han J, Zhou Y, Gu Y, Zhu X, Sun J, Hou X, Yang H, Dai J, Shi Q: Accelerated postero-lateral spinal fusion by collagen scaffolds modified with engineered collagen-binding human bone morphogenetic protein-2 in rats. *PLoS One* 2014;9:e98480.

[19] Shiozaki Y, Kitajima T, Mazaki T, Yoshida A, Tanaka M, Umezawa A, Nakamura M, Yoshida Y, Ito Y, Ozaki T, Matsukawa A: Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4. *Int J Nanomedicine* 2013;8:1349-1360.

本発明の好ましい態様は、下記の通りである。

〔１〕ドメインリンカーによって連結された２つのコラーゲン結合ドメインと、治療薬剤リンカーによって前記コラーゲン結合ドメインの少なくとも１つに連結された治療薬剤を含むコラーゲン結合治療薬剤であって、前記コラーゲン結合薬剤が、コラゲナーゼ活性を欠き、前記２つのコラーゲン結合ドメインの各々が、配列番号：１－３９のポリペプチドのいずれか１つ、配列番号：１－３９のいずれか１つと少なくとも９０％の配列同一性を有するポリペプチド、および配列番号：１－３９のいずれか１つの連続する少なくとも８つのアミノ酸のフラグメントから成る群から選択される、前記コラーゲン結合治療薬剤。

〔２〕前記治療薬剤が、FGF、副甲状腺ホルモン（PTH）、PTH/PTHrP受容体アゴニスト、PTH/PTHrP受容体アンタゴニスト、骨形成タンパク質（BMP）、G-CSF、BMP-2、BMP-3、抗スクレロシン抗体、成長ホルモン、IGF-1、VEGF、TGF- β 、KGF、TGF- β １、TGF- β 受容体、CT、GH、GM-CSF、EGF、PDGF、セリプロロール、アクチビン、および結合組織増殖因子から成る群から選択される、前記〔１〕に記載のコラーゲン結合薬剤。

〔３〕前記コラーゲン結合ドメインの１つが、配列番号：１５－３０のいずれか１つのポリペプチド、配列番号：１５－３０のいずれか１つと少なくとも９０％の配列同一性を有するポリペプチド、および配列番号：１５－３０のいずれか１つの連続する少なくとも８つのアミノ酸のフラグメントから成る群から選択され、他方のコラーゲン結合ドメインが、配列番号：１－１４および３１－３９のいずれか１つのポリペプチド、配列番号：１－１４および３１－３９のいずれか１つと少なくとも９０％の配列同一性を有するポリペプチド、または配列番号：１－１４および３

10

20

30

40

50

1 - 39のいずれか1つの連続する少なくとも8つのアミノ酸のフラグメントから成る群から選択される、前記〔1〕又は〔2〕に記載のコラーゲン結合薬剤。

〔4〕前記2つのコラーゲン結合ドメインが、配列番号:15 - 30のいずれか1つ、配列番号:15 - 30のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド、および配列番号:15 - 30のいずれか1つの連続する少なくとも8つのアミノ酸のフラグメントから成る群から選択される、前記〔1〕～〔3〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

〔5〕前記2つのコラーゲン結合ドメインが、配列番号:1 - 14および31 - 39のいずれか1つのポリペプチド、配列番号:1 - 14および31 - 39のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド、または配列番号:1 - 14および31 - 39のいずれか1つの連続する少なくとも8つのアミノ酸のフラグメントから成る群から選択される、前記〔1〕～〔4〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

10

〔6〕前記コラーゲン結合薬剤が、配列番号:40 - 47のポリペプチドのいずれか1つ、配列番号:40 - 47のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド、および配列番号:40 - 47のいずれか1つの連続する少なくとも8つのアミノ酸のフラグメントから成る群から選択されるポリペプチドを含む、前記〔1〕～〔5〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

〔7〕前記ドメインリンカーが、ポリペプチドを含む、前記〔1〕～〔6〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

〔8〕前記ドメインリンカーが、配列番号:48 - 55のポリペプチドのいずれか1つ、または配列番号:48 - 55のポリペプチドのいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチドから成る群から選択されるポリペプチドを含む、前記〔1〕～〔7〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

20

〔9〕前記治療薬剤が、ポリペプチド、ホルモン、増殖因子、サイトカイン、小分子、ポリヌクレオチド、炭水化物、および脂質から成る群から選択される、前記〔1〕～〔8〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

〔10〕前記治療薬剤が、ポリペプチドを含む、前記〔1〕～〔9〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

〔11〕前記治療薬剤が、FGF、副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH/PTHrP受容体アゴニスト、およびPTH/PTHrP受容体アンタゴニストから成る群から選択される、前記〔1〕～〔10〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

30

〔12〕前記治療薬剤リンカーが、ポリペプチドを含む、前記〔1〕～〔11〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

〔13〕前記治療薬剤のC末端が、前記治療薬剤リンカーによって前記コラーゲン結合薬剤のN末端と連結される、前記〔10〕～〔12〕のいずれか1項に記載のコラーゲン結合薬剤。

〔14〕前記〔1〕～〔13〕に記載のコラーゲン結合薬剤のいずれか1つおよび医薬担体を含む、医薬組成物。

〔15〕ある状態を治療する方法であって、前記〔1〕～〔13〕に記載のコラーゲン結合薬剤のいずれか1つまたは前記〔14〕に記載の医薬組成物を、前記状態の治療に有効な量で対象に投与する工程を含む、前記方法。

40

〔16〕前記対象が、哺乳動物である、前記〔15〕に記載の方法。

〔17〕前記哺乳動物が、ヒトである、前記〔16〕に記載の方法。

〔18〕前記状態が、副甲状腺機能亢進、毛の症状(過剰な毛の増殖または毛の消失)、コラーゲン症、創傷、骨の症状、脊椎固定、虚血性心疾患、抹消神経障害および脊椎損傷から成る群から選択される、前記〔15〕～〔17〕のいずれか1項に記載の方法。

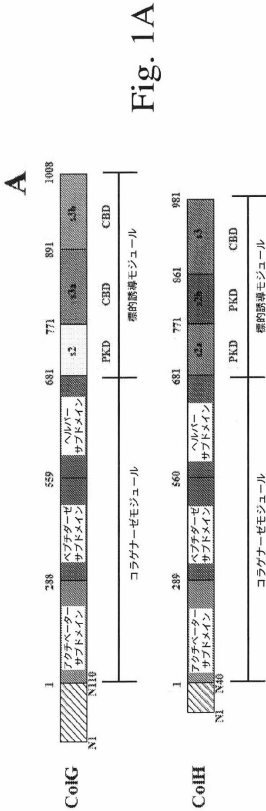
〔19〕前記状態が、骨形成不全、スティックラー症候群、エーレルス-ダンロー症候群、アルポート症候群、キャフェイ病、および限局性コラーゲンまたは軟骨損傷から成る群から選択されるコラーゲン症を含む、前記〔15〕～〔17〕のいずれか1項に記載の方法。

〔20〕ある状態を治療するための医薬の製造における、前記〔1〕～〔14〕のいずれか1項に記載の組成物の使用。

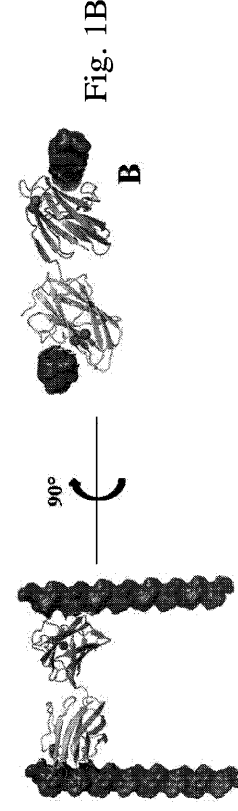
50

【図面】

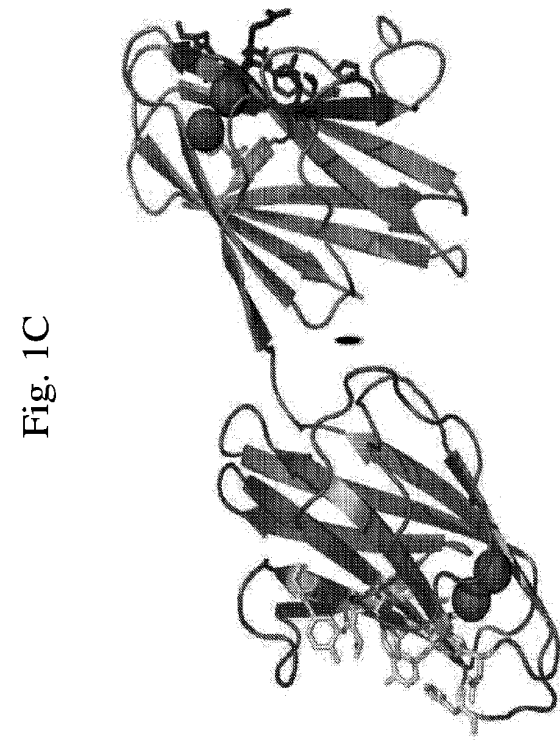
【図 1 A】



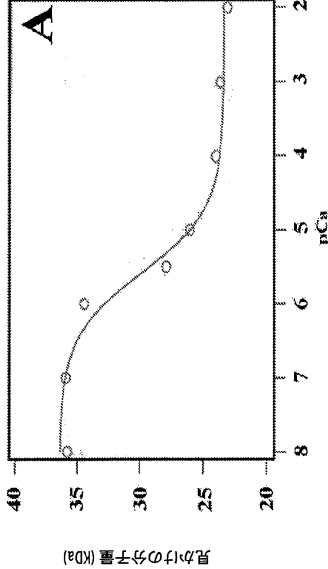
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 2 A】



【図 2 B】



10

20

30

40

50

【 図 2 B 】

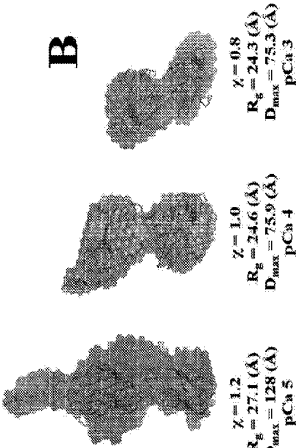
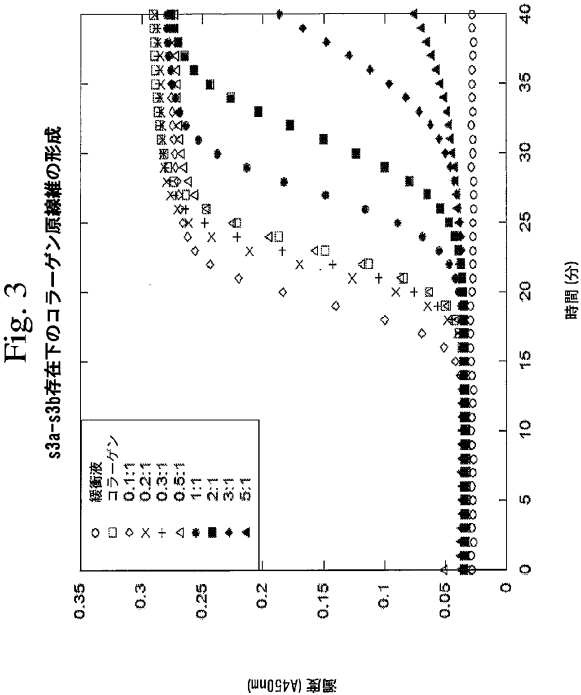


Fig. 2B

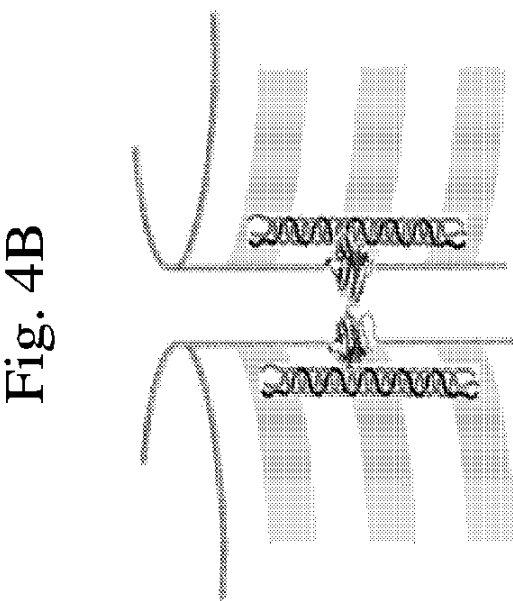
【 図 4 A 】



【 図 3 】



【 図 4 B 】



10

20

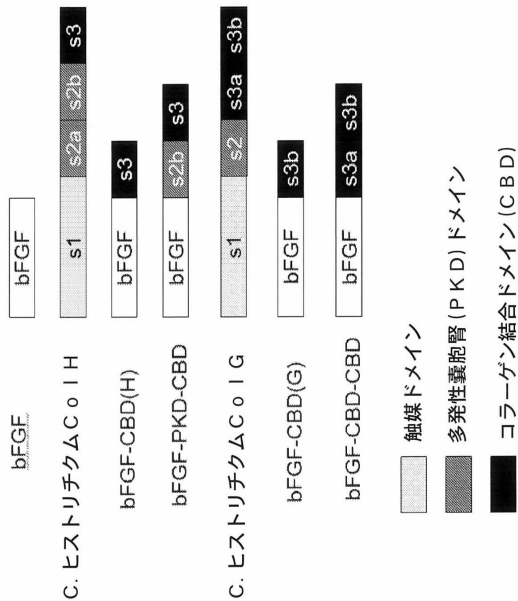
30

40

50

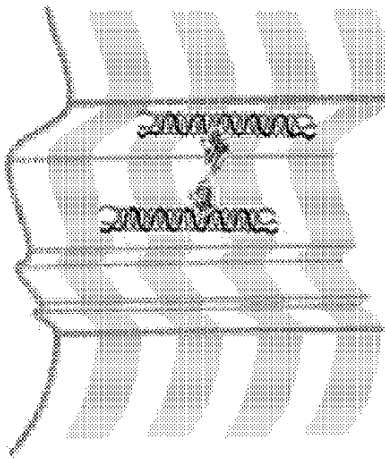
【図 6】

Fig. 6



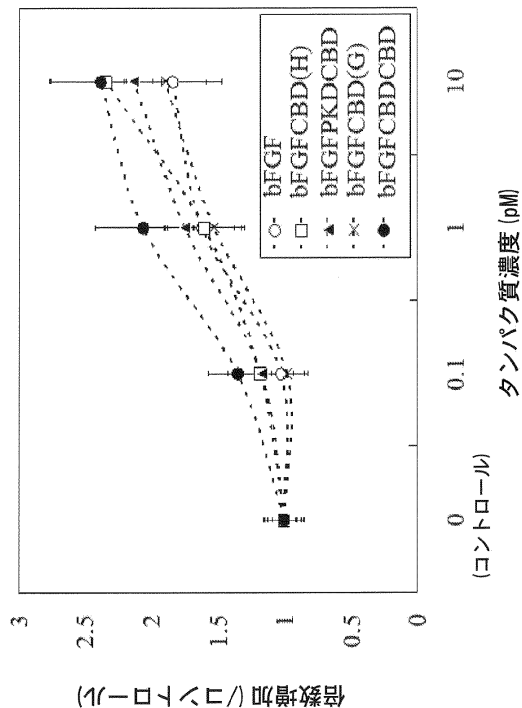
【図 4 C】

Fig. 4C



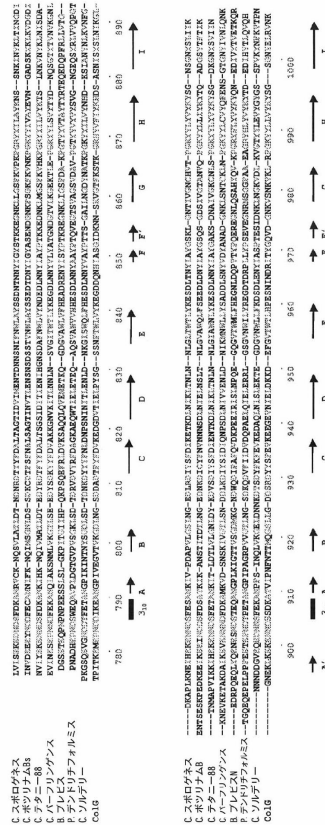
【図 7】

Fig. 7



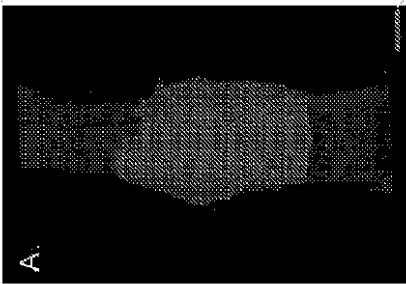
【図 5】

Fig. 5



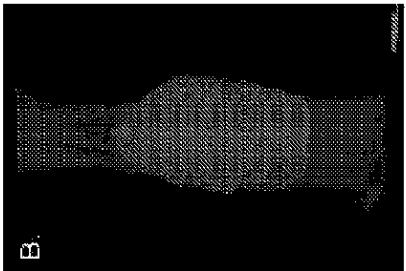
【図 8 A】

Fig. 8A



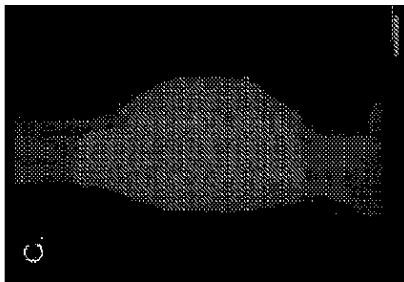
【図 8 B】

Fig. 8B



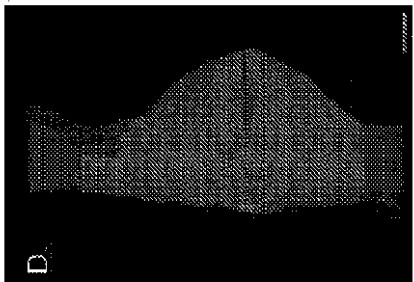
【図 8 C】

Fig. 8C



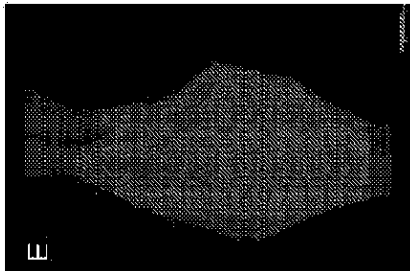
【図 8 D】

Fig. 8D



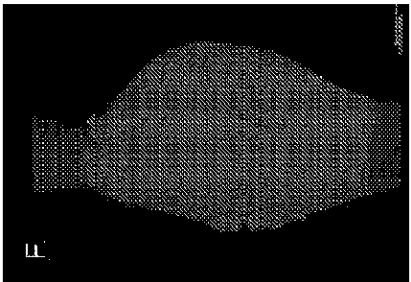
【図 8 E】

Fig. 8E



【図 8 F】

Fig. 8F



10

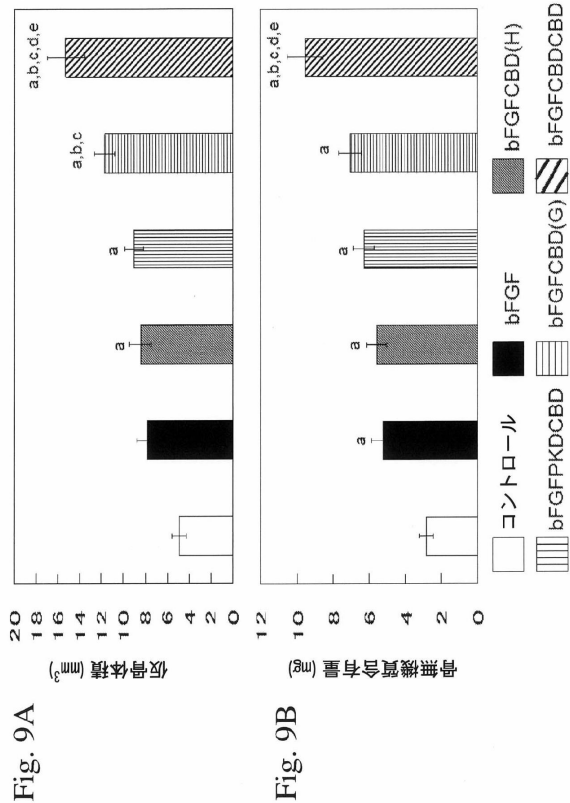
20

30

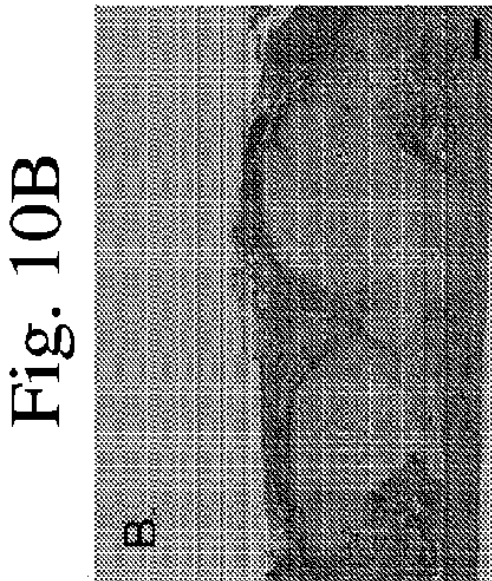
40

50

【図 9 A - B】

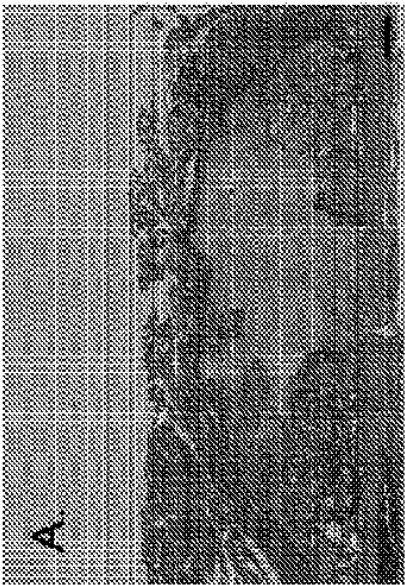


【図 10 B】



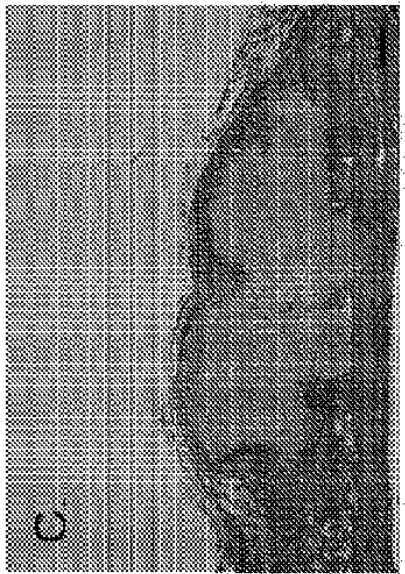
【図 10 A】

Fig. 10A



【図 10 C】

Fig. 10C



10

20

30

40

50

【 1 0 D 】

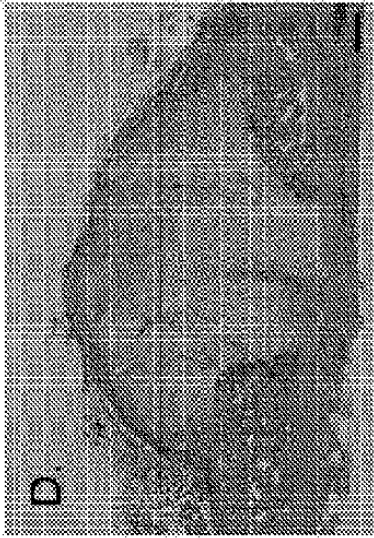


Fig. 10D

【 1 0 E 】

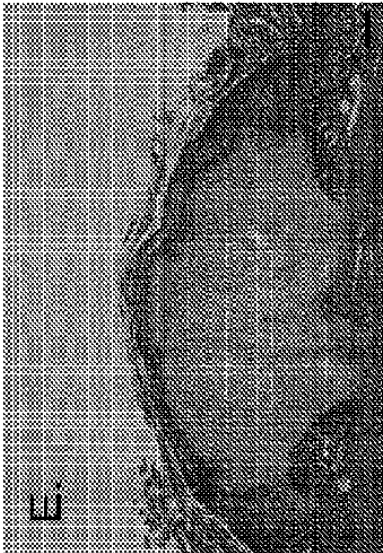


Fig. 10E

【 1 0 F 】

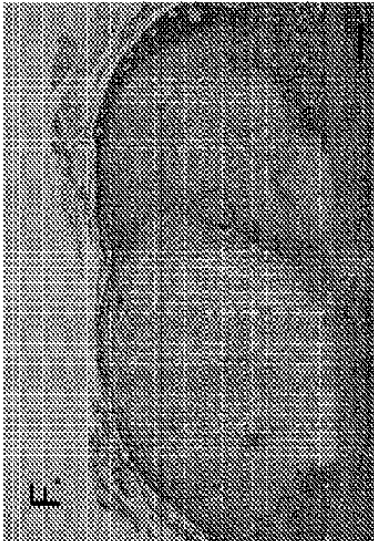


Fig. 10F

【 1 1 】

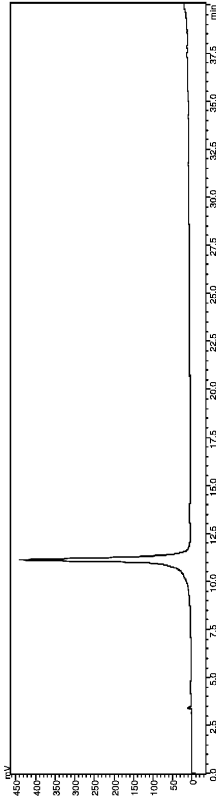


Fig. 11

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

F I

C 0 7 K 19/00

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766

弁理士 松田 七重

(72)発明者 サコン ジョシュア

アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 7 0 1 ファイエットビル スカイライン ドライブ 2 0 7

(72)発明者 ローザー ジェフリー

アメリカ合衆国 テキサス州 7 5 5 0 3 テクサーカナ ランシャー ドライブ 5

(72)発明者 バウアー ライアン

アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 7 0 1 フェイエットビル ノース レバレット アベニュー
1 5 0 0 # 1 1 3

(72)発明者 ヤノフスカ カタルジーナ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 5 1 4 チャペルヒル エレン プレイス 4

(72)発明者 田中 啓友

千葉県松戸市新松戸4 - 1 9 1 # 3 0 2

(72)発明者 松下 治

岡山県岡山市北区東古松3 - 3 - 1 0 アパートメント 8 0 1

(72)発明者 内田 健太郎

東京都大田区西六郷4 - 6 - 2 4 アパートメント 1 0 0 8

審査官 堂畑 厚志

(56)参考文献 特表2 0 1 5 - 5 1 3 3 1 2 (J P , A)

J Biomed Mater Res A , 2014年 , Vol. 102, Issue 6 , p. 1737-1743

Biochim Biophys Acta , 2014年 , Vol. 1840, Issue 6 , p. 1892-1901

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 4 7 /

A 6 1 K 3 8 /

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)