

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-508511

(P2009-508511A)

(43) 公表日 平成21年3月5日(2009.3.5)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)	
C 12 N 5/06 (2006.01)	C 12 N 5/00	Z NAE	4 B 02 4
A 61 K 35/34 (2006.01)	A 61 K 35/34		4 B 06 5
A 61 P 9/10 (2006.01)	A 61 P 9/10	1 O 1	4 C 08 7
A 61 P 9/00 (2006.01)	A 61 P 9/10		
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 9/00		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-531733 (P2008-531733)	(71) 出願人	591140123 アシスタンス ピュブリク-オピトード ウ パリ A S S I S T A N C E P U B L I Q U E - H O P I T A U X D E P A R I S フランス国, 75004 パリ, アベニュ - ビクトリア 3番地
(86) (22) 出願日	平成18年9月19日 (2006.9.19)		
(85) 翻訳文提出日	平成20年5月19日 (2008.5.19)		
(86) 國際出願番号	PCT/FR2006/002144		
(87) 國際公開番号	W02007/034069		
(87) 國際公開日	平成19年3月29日 (2007.3.29)		
(31) 優先権主張番号	0509557		
(32) 優先日	平成17年9月19日 (2005.9.19)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト平滑筋細胞の獲得方法およびヒト平滑筋細胞の適用

(57) 【要約】

本発明は、in vitroにおける、ある細胞集団の獲得方法に関するもので、これらは必須に、カルポニンおよびSM-MHCを発現している、ヒト筋生検細胞サンプルからの、もしくは、in vitroにおいて骨格筋細胞(hCMS)へと分化した複数のヒト筋生検細胞からの、ヒト平滑筋細胞(hCML)を含んでいる。本発明は、同方法により得られる単離平滑筋細胞を、ヒトに向けられた治療組成物として含んでいる組成物も、含む。本発明は、これらの単離平滑筋細胞の、複数のCMLの置き換えに向けられた治療組成物調製のための使用も、課題を持つ。特に、本発明は、これらの単離平滑筋細胞の、虚血の、癌の、もしくは、損傷された組織の再血管新生を必要としている全ての疾患の処置のための使用を、課題を持つ。最後に、本発明は、これらの単離平滑筋細胞の、活性成分による処置を必要としているヒトに向けられた治療組成物調製のための当該活性成分ベクターとしての使用を、課題を持つ。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

*In vitro*における、ヒト筋生検細胞サンプルからの、もしくは、*in vitro*において骨格筋細胞(hCMS)へと分化したヒト筋生検細胞からの、カルポニンおよびSM-MHCを発現しているヒト平滑筋細胞(hCML)を本質的に含んでいる細胞集団の獲得方法であって、これらヒト筋生検細胞が、CD31およびCD14、万一の場合、リンパ球マーカーBおよびTを発現しておらず、hCMSが、CD56、デスミン、ならびに、遺伝子MyoD、Myf5、およびミオゲニンから構成された遺伝子群内で選択された筋発生遺伝子を発現しており、多核筋管を発生させることができ、以降のステップ：

10

A) これら筋芽ヒト筋生検細胞を、VEGFを含んでいる培養培地において培養していき、この培養が、膀胱組織CML非存在下に実施されていき；

B) ステップA)において得られたhCMLの回収を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

CD56およびデスミンを発現しているhCMSが、遺伝子MyoD、Myf5、およびミオゲニンを発現することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

hCMSが、CD34およびCD14を発現しないことを特徴とする、請求項1もしくは2に記載の方法。

20

【請求項 4】

hCMSが、カルポニンおよびSM-MHCを発現しないことを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップA)において得られたhCMLが、カルポニンおよびSM-MHCを発現することを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップA)において得られたhCMLが、遺伝子MyoDを発現しないことを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 7】

ステップA)において、骨格筋細胞(hCMS)へと*in vitro*において分化したヒト筋生検細胞から得られたhCMLが、CD56およびデスミンを、ステップA)において使用された細胞hCMSよりも、有意に重要でない量で発現することを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

ステップA)において得られたhCMLが、Myf5およびミオゲニンを発現することを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

ステップA)において使用された培養培地が更に、PDGF-BB、IGF1、FGFb、HGF、TNF、TGF、ならびに、CMLの増殖もしくは分化上の役割を持ち得る全ての他の因子から構成された成長因子群内で選択された少なくとも1種の成長因子を含むことを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 10】

hCMLが、骨格筋細胞(hCMS)へと*in vitro*において分化したヒト筋生検細胞サンプルから得られ、hCMSが、以降のステップ：

a) 該筋生検のスライス；

b) 前記纖維および筋細胞の酵素的解離ならびに濾過によるこれら個々の細胞の分離；

c) こうして得られた筋起源細胞の、成長培地および/または分化培地存在下の接着細胞培養反応容器中の培養、次いで、万一の場合、1相もしくは複数相の拡大相；

50

d) 特異的細胞マーカー解析による、これら異なる培養段階において存在する細胞型の同定；

e) 探索された細胞型が、該細胞集団内で優勢な割合である間の培養段階の選択；

f) e) において選択された培養段階での細胞集団の回収；

g) 万一の場合、ステップ f) において回収された細胞の凍結

ステップを含んでいる方法により、ヒト筋生検細胞サンプルから得られていることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ b) において：

これらスライスの、培地 A における洗浄、次いで、これらスライスの、遊離化酵素存在下での酵素的解離；

こうして得られた個々の細胞の、篩上での濾過、次いで、遠心による分離；

こうして得られた細胞滓の、培地 B 内での洗浄

が実施され；

ステップ c) において：

ステップ b) において得られた細胞の、培養プレート上での、培地 C における、合流度約 20 ~ 50 % が得られるまでか、もしくは、第 1 筋管出現までの培養、次いで、これら細胞の、緩衝 PBS 、 SVF 、次いで、培地 C における洗浄、培地 C における、大きくされたプレート単位上での、もしくは、多段階での、培養が新たに実施され得、合流度約 90 % もしくは第 1 筋管出現を達成し；

培養培地 C の除去、および、これら細胞の回収前日、これの培地 D による置き換え；

こうして得られた細胞の、 PBS における、次いで、培地 A における洗浄
が実施され；

万一の場合、ステップ f) の終わりにおいて、こうして得られた細胞の、 0 . 5 % (P / V) でのヒト血清アルブミンを用いて補完された培地 A における濃縮；

ステップ g) において、ステップ f) においてこうして得られた細胞の、凍結が、 4 % (P / V) でのヒト血清アルブミンを用いて補完された培地 A において、および、 7 . 5 % (V / V) での DMSO において実施され、これらの 37 °C での解凍、次いで、培地 A における洗浄後、これらのこの培養培地内での懸濁；

これらのステップにおいて、これら培地 A 、 B 、 C 、および E が、以降：

培地 A : 修飾 MCD B 120 培地 (Hamら、 1988 年) : D - バリンによる L - バリン置換；フェノール赤 (レッド) およびチミジン除去；

培地 B : 培地 A + 20 % 照射牛胎児血清 + 抗生物質；

培地 C : 培地 B + FGFb (10 ng / mL) + 1 μM でのデキサメタゾン；

溶液もしくは培地 D : 磷酸緩衝化生理食塩水 (PBS)

である

ことを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

探求された hCMS 細胞型が、前記細胞集団の有意な割合である間の前記培養段階が、少なくとも 50 % の一般集団を代表して、 CD56 + 表現型細胞集団の出現により求められていることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも 50 % の一般集団を代表している前記 CD56 + 表現型細胞集団が更に、 CD10 + 、 CD13 + 、 デスミン + 、およびクラス 1 HLA から構成された表現型群において選択された、少なくとも 1 種の表現型、好ましくは少なくとも 2 種、 3 種、および 4 種の表現型を保有する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 hCML が、 in vitro において骨格筋細胞 (hCMS) へと分化したヒト筋生検細胞サンプルから得られ、ステップ A) において、 VEGF を含んでいる前記培養

10

20

30

40

50

培地が、D-バリンによるL-バリン置換、フェノール赤（レッド）除去、およびチミジン除去により修飾されたMCDB120培地であることを特徴とする、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記hCMLが、ヒト筋生検細胞サンプルから得られ、ステップA)において、VEGFを含んでいる前記培養培地が、M199培地であることを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

ステップA)において、前記培養培地が、10ng/mLのVEGFを含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項17】

前記hCMLが、直接得られたか、もしくは、以前hCMSへと分化したヒト筋生検が、個体のいずれかの筋領域内で採取された生検であることを特徴とする、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

複数の前記hCMLが、直接得られたか、もしくは、以前hCMSへと分化したヒト筋生検が、採取が実施されている個体の脚筋領域内で採取された生検であることを特徴とする、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項19】

前記hCMLが、直接得られたか、もしくは、以前hCMSへと分化したヒト筋生検が、採取が実施されている小児もしくは成人の個体の筋領域内で採取された生検であることを特徴とする、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

カルポニンおよびSM-MHCを発現することを特徴とする、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法により得られる、単離ヒト平滑筋細胞。

【請求項21】

請求項20に記載の、もしくは、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法により得られた、単離ヒト平滑筋細胞を、薬剤として含んでいる組成物。

【請求項22】

ヒトに向けられた治療組成物調製のための、請求項21に記載の組成物の使用。

30

【請求項23】

生検が起源とされている個体に向けられた治療組成物調製のための、請求項21もしくは22に記載の組成物の使用。

【請求項24】

CML置き換えに向けられた治療組成物調製のための、請求項22もしくは23に記載の組成物の使用。

【請求項25】

粥状（アテローム）硬化の、動脈炎の、慢性静脈疾患の、血管悪性形成の、特に血管腫瘍の予防にもしくは処置に向けられた治療組成物調製のための、請求項22～24のいずれか1項に記載の使用。

40

【請求項26】

化学療法によるかもしくは放射線療法による抗癌処置前にもしくは同時に投与される、癌の予防にもしくは処置に向けられた治療組成物調製のための、請求項22～24のいずれか1項に記載の使用。

【請求項27】

特に心臓もしくは下肢の虚血の予防にもしくは処置に向けられた治療組成物調製のための、請求項22～24のいずれか1項に記載の使用。

【請求項28】

活性成分による処置を必要としている疾患の予防にもしくは処置に向けられた治療組成物調製のための、前記CMLが前記活性成分を含有することを特徴とする、請求項22～

50

24のいずれか1項に記載の使用。

【請求項29】

静脈内によりもしくは移植により投与されるように向けられた治療組成物調製のための、請求項22～28のいずれか1項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、*in vitro*における、カルポニンおよびSM-MHCを発現しているヒト平滑筋細胞(hCML)を本質的に含んでいる細胞集団の、ヒト筋生検サンプルからの、もしくは、*in vitro*において骨格筋細胞(hCMS)へと分化したヒト筋生検サンプルからの、獲得方法に関する。本発明は、本方法により得られる単離平滑筋細胞を、ヒト用に向けられた治療成分として含んでいる組成物にも関する。本発明は更に、これら単離された平滑筋細胞の、平滑筋細胞を置き換えるように向けられた治療組成物を調製していくための使用に関する。特に、本発明は、これら単離された平滑筋細胞の、虚血の、癌の、もしくは、損傷した組織の再灌流を必要としているいずれの疾患をも処置していくための使用に関する。最後に、本発明は、これら平滑筋細胞の、これら活性成分を用いる治療を必要としているヒト用に向けられた治療組成物を調製していくための活性成分用ベクターとしての使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

これら平滑筋細胞(CML)およびこれら骨格筋細胞(CMS)が、血管、腸管、および膀胱において存在し、2タイプの細胞であり、臓器により使用され、機械的収縮機能を満たす。CMLの起源が複雑であり、これらの位置(ロケーション)に依る。実際、胚発生の間、これらCML前駆体が、3系統：間葉細胞、神経嵴細胞、もしくは、心外膜由来細胞からの起源たり得る。最近、末梢血において循環しているCML始原細胞の存在が、観察されている。実際、異なる動物モデルが、(i)新血管内膜形成、(ii)動脈移植生成もしくは粥状硬化プラーク形成を研究するのに使用されたが、骨髄細胞において含有された始原細胞が、これらのプロセスにおいて参画すること、ならびに、これらが、CMLへと分化することを示すことを可能にしている。

20

【0003】

成人において、骨格筋細胞修復が、筋繊維基底層下の状況での单核筋原細胞たる衛星(サテライト)細胞集団により、実施されている。しかし、この細胞集団が、不均一であると思われる。更に、他の万能細胞が、骨格筋から、フローサイトメトリーにより、これらのHoechst染料放出特性を使用しながら(1、2)、単離されたが、全ての血液細胞へと分化していくことができ、これらが、その骨髄が照射により破壊されているマウス中に移植されている場合である(2)。この細胞集団が、<<副集団>>(SP)として知られている。これが、マーカーSca1発現により、定義されている。しかしながら、これが、CD34、cKit、およびCD45を発現しない。これらの細胞が、デスミン+筋細胞へと、適切な培養条件(1)において分化できる。他の研究が、高い細胞の<<可塑性>>特性を有する骨格筋における前駆体細胞の存在を記載する(3)。これゆえ、骨格筋が、変動した万能特性を有する幾つかのタイプの幹細胞を含有するよう思われる。

30

【0004】

これらの幹細胞の分化特性およびこれらの培養におけるコントロール(制御)の画定が、これらの容易に単離された細胞を、処置、特に修復処置において使用するのを、可能とすると思われる。これらの細胞は、*ex vivo*において培養されたが、次いで、移植され得、血管病理(虚血後再灌流、粥状(アテローム)硬化、腫瘍血管安定化等)自家処置用細胞処置産物を構成していく。

40

【0005】

ラットSKMSの分化が既に、Hwang JH.らにより記載されており(4)、VEGF存在下に膀胱CMLとのCMSの同時培養に関与している方法を使用しており、こ

50

の方法は、SMAを発現している分化CMSを得るのを可能にしている。

【0006】

番号WO03/027281と共に公開された国際特許出願(Sakurada Kazuhirōら)に関するコメントも、なされ得、骨格筋間質組織を起源としている万能幹細胞集団の獲得を記載しており、神経、グリア細胞、心筋細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞、血液細胞、骨細胞、軟骨細胞、臍細胞、および肝細胞へと分化できる。

【0007】

番号WO01/94555と共に公開された国際特許出願(J.P.Marolleauら)に関するコメントも、なされ得、筋起源の特徴化された細胞集団の獲得方法およびこれらの使用を記載している。この文書が特に、細胞集団を、筋組織生検から、ヒトでの使用用の細胞療法産物調製のために、特に、移植による獲得方法を記載し、その優勢な細胞型が、CD56マーカーおよびクラスI HLAマーカーを発現し、心不全の医薬処置を潜在化させる。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

これゆえ、in vitroにおける、平滑筋細胞(CML)を本質的に含んでいる細胞集団の、特に、この集団を使用しながら処置されるべき個体もしくは患者からの筋組織サンプルからの、獲得方法を持つことが、望ましいと思われる。

20

【0009】

これが正に、本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0010】

これゆえ、第1態様における、本発明が、in vitroにおいて、ヒト筋生検サンプルからの、もしくは、in vitroにおいて骨格筋細胞(hCMS)へと分化したヒト筋生検からの、カルポニンおよび平滑筋ミオシン重鎖、ここで以後SM-MHCとして知られた、を発現しているヒト平滑筋細胞(hCML)を本質的に含んでいる細胞集団の獲得方法に関し、これらヒト筋生検細胞が、CD31およびCD14、万一の場合、リンパ球マーカーBおよびTを発現しておらず、hCMSが、CD56、デスミン、ならびに、遺伝子MyoD、Myf5、およびミオゲニンにより構成された遺伝子群から選択された筋発生遺伝子を発現しており、多核筋管を発生させることができ、以降のステップ：

30

A)これら筋芽ヒト筋生検細胞を、血管内皮成長因子(VEGF)、好ましくは、ヒトVEGFを含んでいる培養培地において培養していく、この培養が、好ましくは、膀胱CML非存在下に実施されていき；

B)ステップA)において得られたhCMLの回収を含むことを特徴とする。

【0011】

用語<<本質的に>>とは、表現<<本質的にヒト平滑筋細胞(hCML)を含んでいる>>において使用された場合、本明細書において、特に、少なくとも、50%、好ましくは、少なくとも、60%、70%、75%、および80%のhCMLを、得られた細胞集団全体に関して含有している集団を意味すると理解される。

40

【0012】

好ましくは、本発明に従っている方法が、CD56およびデスミンを発現しているhCMSが、遺伝子MyoD、Myf5、およびミオゲニンを発現することを特徴としている。

【0013】

好ましくは、本発明に従っている方法が、hCMSが、CD34およびCD14を発現しないことを特徴としている。

【0014】

好ましくは、本発明に従っている方法が、hCMSが、カルポニンおよびSM-MHC

50

を発現しないことを特徴としている。

【0015】

好ましくは、本発明に従っている方法が、ステップA)において得られたhCMLが、カルボニンおよびSM-MHCを発現することを特徴としている。

【0016】

好ましくは、本発明に従っている方法が、ステップA)において得られたhCMLが、遺伝子MyoDを発現しないことを特徴としている。

【0017】

好ましくは、本発明に従っている方法が、ステップA)においてin vitroにおいてヒト骨格筋細胞(hCMS)へと分化したヒト筋生検得られたhCMLが、CD56およびデスミンを、ステップA)において使用されたhCMSよりも、有意に少ない量で発現することを特徴としている。10

【0018】

好ましくは、本発明に従っている方法が、ステップA)において得られたhCMLが、Myf5およびミオゲニンを発現することを特徴としている。

【0019】

好ましくは、本発明に従っている方法が、ステップA)において使用された培養培地が更に、血小板由来成長因子ホモダイマー-BB(ホモダイマー-bbとも。PDGF-BB)、1型インシュリン成長因子(IGF1)、塩基性線維芽細胞成長因子(FGFb)、肝細胞成長因子(HGF)、腫瘍壞死因子(TNF)、TGF、ならびに、CMLの増殖もしくは分化における役割を持ち得る全ての他の因子からなっている成長因子群から選択された少なくとも1種の成長因子、好ましくはヒトのを含むことを特徴とする。20

【0020】

好ましくは、本発明に従っている方法が、hCMLが、ステップA)において、ヒト骨格筋細胞(hCMS)へとin vitroにおいて分化したヒト筋生検細胞サンプルから得られたことを特徴としており、hCMSが、以降のステップ：

a) 該筋生検のスライス；

b) 前記繊維および筋細胞の酵素的解離ならびに濾過によるこれら個々の細胞の分離；

c) こうして得られた筋細胞を、成長培地および/または分化培地存在下の接着細胞培養反応容器中の培養中に入れ、次いで、万一の場合、1相もしくは複数相の拡大相により伴われてあり；30

d) 特異的細胞マーカー解析による、これら異なる培養段階において存在する細胞型の同定；

e) 探索された細胞型が、該細胞集団の優勢な集団である間の培養段階を選んでいき；

f) e)において選択された培養段階において細胞集団を回収していき；

g) 万一の場合、ステップf)において回収された細胞の凍結

ステップを含んでいる方法により、ヒト筋生検細胞サンプルから得られていることを特徴とし、特に、該細胞療法産物調製のために選ばれるべき培養段階においてである。40

【0021】

前で言った方法の好ましいモードに従い、以降が実施される。

ステップb)において：

これらスライスを、培地Aにおいて、洗浄していき、次いで、これらスライスを、遊離化酵素存在下に酵素的に解離させ；

こうして得られた個々の細胞を、篩上で濾過、次いで、遠心により、分離していき；

こうして得られた細胞滓を、培地Bにおいて、洗浄していき；

ステップc)において：

ステップb)において、得られた細胞を、培養プレート上で、培地Cにおいて、50

合流度約20～50%が得られるか、もしくは、第1筋管出現まで培養していき、次いで、これら細胞を、磷酸緩衝化生理食塩水(PBS)、牛胎児血清(SVF)、次いで、培地Cにおいて、洗浄していき、ここで、培地Cにおける大きくされたもしくは多段階プレート単位(ユニット)上での培養が再び、実施され得、合流度約90%もしくは第1筋管出現を達成し；

培養培地Cを除去し、これら細胞を回収していく前の日、これを培地Dにより置き換えていき；

こうして得られた細胞を、PBSにおいて、次いで、培地Aにおいて洗浄していき；

万一の場合、ステップf)の終わりにおいて：

こうして得られた細胞を、0.5%(P/V)ヒト血清アルブミンを用いて補完された培地Aにおいて濃縮していき；

ステップg)において：

ステップf)においてこうして得られた細胞の凍結が、4%(P/V)ヒト血清アルブミンを用いて補完された培地Aにおいて、および、7.5%(V/V)DMSOにおいて実施され、これらを37において解凍していき、次いで、培地Aにおける洗浄後、これらをこの培養培地に懸濁させていき；

これらのステップにおいて、これら培地A、B、C、およびDが、番号WO01/94555と共に、2001年12月13日公開された国際特許出願(24および25ページ)において定義されたとおりの培地であり、つまり：

培地A：修飾MCDB120培地(Hamら、1988年)：D-バリンにより置換されたL-バリン；フェノール赤(レッド)およびチミジン除去；

培地B：培地A+20%照射牛胎児血清+抗生物質；

培地C：培地B+FGFb(10ng/mL)+1μMデキサメタゾン；

溶液D：磷酸緩衝化生理食塩水(PBS)

である。

【0022】

好ましくは、使用された抗生物質がゲンタマイシンであり、特に、50μg/mLにおいてであり、もしくは、ペニシリンおよびストレプトマイシンの混合物である(特に、それぞれ、100U/mlおよび100μg/mLにおいて)。

【0023】

更により好ましい実施形態において、本発明による方法が、該hCMLが、以前hCMSへと分化した、番号WO01/94555と共に公開された国際特許出願において記載されたような方法に従って得られたヒト筋生検細胞から得られており、本方法において、探索されたhCMS細胞型がその細胞集団の有意な割合である間の培養段階が、少なくとも、50%、好ましくは、少なくとも、60%、70%、75%、および80%の一般集団を代表して、CD56+表現型集団の出現により求められていることを特徴としている。

【0024】

好ましくは、該CD56+表現型細胞集団が、少なくとも、50%、好ましくは、少なくとも、60%、70%、75%、および80%の一般集団を代表して、更に、CD10+、CD13+、デスミン+、クラス1HLAから構成された表現型群において選択された、少なくとも1種の表現型、好ましくは、少なくとも2種、3種、および4種の表現型を保有し、クラス2HLAを発現していない。

【0025】

好ましい実施形態において、in vitroにおいて本発明に従って本質的にhCMLを含んでいる細胞集団を得ていく本方法が、本方法において、当該hCMLがin vitroにおいて骨格筋細胞(hCMS)へと分化したヒト筋生検細胞サンプルから得られており、ステップA)において、その培養培地がVEGFを含んでおり、MCDB120培地(in vitroにおいて、Cell Dev. Biol., 24, 833~8

10

20

30

40

50

44、1998年)であり、Hamらにより記載されたとおりであり、D-バリンによるL-バリンの置換、フェノール赤(レッド)およびチミジン除去により修飾されたことを特徴としている。

【0026】

好ましい実施形態において、in vitroにおいて本発明に従って本質的にhCMLを含んでいる細胞集団を得ていく本方法が、本方法において、当該hCMLがヒト筋生検細胞サンプルから得られており、ステップA)において、該培養培地がVEGFを含んでおり、M199培地(例えば、培地199、Gibco、Grand Island、NYのような)であることを特徴としている。

【0027】

好ましい実施形態において、in vitroにおいて本発明に従って本質的にhCMLを含んでいる細胞集団を得ていく本方法が、ステップA)において、該培養培地が10ng/mlのVEGFを含むことを特徴としている。

【0028】

同様に好ましい実施形態において、in vitroにおいて本発明に従って本質的にhCMLを含んでいる細胞集団を得ていく本方法が、当該hCMLが直接得られるかもしれません以前hCMSへと分化したヒト筋生検が、如何なる筋肉の領域からでも採取された生検であり、好ましくは、そのサンプルが採取された小児もしくは成人個体の脚筋からであることを特徴としている。

【0029】

もう1種別の態様において、本発明が、本発明の方法により得られる単離ヒト平滑筋細胞を含み、該単離ヒト平滑筋細胞が、カルポニンおよびSM-MHCを発現することを特徴としている。

【0030】

尚もう1種別の態様において、本発明が、ヒト筋生検サンプルからもしくは本発明の方法により骨格筋細胞へとin vitroにおいて分化したヒト筋生検から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞を含んでいる組成物に関し、薬剤として使用された。

【0031】

本発明が、ヒト筋生検サンプルからもしくは本発明の方法により骨格筋細胞へとin vitroにおいて分化したヒト筋生検から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の使用、あるいは、本発明に従いながら、ヒトでの使用用治療組成物調製のための薬剤としての本組成物の使用も含み、つまり、該方法のステップA)において培養された当該筋生検細胞が採取された個体を目的とした。

【0032】

好ましい実施形態において、該治療組成物が、CMLを、ヒトにおいて置き換えもしくは移植するよう向けられたり、好ましくは、自家置き換えもしくは移植である。

【0033】

好ましくは、該治療組成物が、癌の予防もしくは処置用に向けられており、好ましくは、抗癌化学療法もしくは放射線療法処置の前もしくはと同時に投与される。

【0034】

これは、通常血管に対して、腫瘍血管が構造的におよび機能的に異なるからである。腫瘍血管特異的マーカーの同定が、これらの血管を、通常血管系を破壊していくことなく、標的とするのを可能とすると思われる(抗血管新生療法)(5)。多くの研究が、腫瘍血管内皮細胞(CAE)における機能の変化を示している。そして、最近の結果が、血管周囲細胞(周細胞もしくはCML)が、表現型および機能の修飾(異常な形状、新たなマーカー発現、CAEとの低い会合、細胞質の伸びを持っており、深くその腫瘍実質中に浸透する)を、腫瘍微小環境において受け(6-8)、こうして、抗血管新生療法用の新たな標的となっていくことを示す。固形腫瘍のこれらの生理病理学的な特徴が、従来の細胞毒性療法および標的化療法のデリバリーおよび効率を妥協させる。新たな治療アプローチが、破

10

20

30

40

50

壊していくドラッグデリバリーを容易化させる前、腫瘍血管系を通常とするものと思われる（総説に関して（9）参照）。事実、最近の結果が、これら組み合わされた治療を使用しながら、該腫瘍血管系の安定化および通常化後、腫瘍後退効率を示す（10）。この腫瘍血管の安定化が、その腫瘍部位中にもしくは周囲にCMLを注入していくことにより、実施され得ると考えられる。

【0035】

この治療アプローチ（これら腫瘍血管を通常化させていくことに鑑みて、本発明の方法により得られるもしくは直接得られる単離ヒトCMLを注入していく）が好ましくは、化学療法もしくは放射線療法との組み合わせにおいてだけ実施されるべきである。この終わりに、<<治療窓>>が定義されなくてはならないが、CML注入がこれら抗癌処置の最大効果を可能とすると思われる間の期間である。10

【0036】

血管<<通常化>>が、より機能的なネットワークを確かにし、こうして、これら薬剤の局所的な拡散を高めていき、より均一な供給（デリバリー）を確かにし、ある特定の薬剤が作用するのが必要な腫瘍の酸素化を確かにする。これが、当該腫瘍におけるこれら薬剤のより速くより広い作用を可能にし、こうして、投与された用量の減少が予め、2次効果（副作用）の深刻さおよび頻度を抑制していく。最後に、これら作用のスピードおよび組み合わせが急速に、その増殖を限り、こうして、その腫瘍耐性現象がしばしば観察された。

【0037】

本明細書において提案された細胞療法が、現在の処置を置き換えるように向けられた新しいタイプの処置を構成しないが、現在提供されている化学療法もしくは放射線療法に対する補完および／または潜在的相乗効果として使用される。20

【0038】

好ましくは、また、該治療組成物が、虚血、特に、心臓もしくは下肢虚血の予防もしくは処置用に向けられている。

【0039】

多くの研究が、マウスおよびある幾つかのヒトのプロトコールにおいて実施されたが、骨髄細胞もしくはin vitroにおいて分化した細胞を注入していく後の虚血後再灌流の向上をハイライトしている（心臓もしくは下肢虚血）。現時点において、新生血管へのこれらの細胞の本当の統合が、問題とされているよう思われるが、観察された基本の効果が、本当である。更に、これらの過程（プロセス）におけるCMLの役割が、非常に重要たり得るであろう。最近の結果が、血管新生部位において、マウスへと、内皮細胞中にではなく、内皮周辺細胞中にだけ注入された骨髄細胞の分化を示す（11）。30

【0040】

これゆえ、より具体的には、本発明の1目的が、ヒト筋生検細胞サンプルからもしくは本発明の方法によりin vitroにおいて骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、腫瘍血管系もしくは虚血後再灌流<<通常化>>用に向けられた組成物のための使用である。

【0041】

しかしながら、これらの細胞が、粥状（アテローム）硬化、慢性静脈疾患、血管悪性形成（血管腫瘍のような）用の治療使用用に向けられた薬剤としても、使用され得るであろう。

【0042】

この理由で、本発明の目的が、ヒト筋生検細胞サンプルからもしくは本発明の方法によりin vitroにおいて骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、粥状（アテローム）硬化、動脈炎、慢性静脈疾患、もしくは血管悪性形成、特に血管腫瘍の予防もしくは処置用に向けられた治療組成物調製のための使用でもある。

【0043】

10

20

30

40

50

最後に、血管新生部位に向かってのこれらの転移特性により、これらの細胞が、薬剤、または、抗もしくは原血管新生因子のような治療活性成分をデリバリーしていくためのシャトルもしくはベクターとして使用され得る。

【0044】

これゆえ、もう1種別の特定の態様において、本発明の更なる目的が、ヒト筋生検細胞サンプルからもしくは本発明の方法により *in vitro* において骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、薬剤としての、つまり、治療活性成分もしくは化合物投与用ベクターとしての使用であり：

該単離ヒト平滑筋細胞が形質転換され、こうして、該活性成分もしくは治療化合物を発現できるようになり；もしくは

10

該単離ヒト平滑筋細胞が修飾されており、投与されるよう必要とされている該活性成分もしくは治療化合物を含有する
ことを特徴とする。

【0045】

本発明は、ヒト筋生検細胞サンプルからもしくは本発明の方法により *in vitro* において骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、活性成分もしくは治療化合物による処置を必要としている疾患の予防もしくは処置用に向けられた治療組成物調製のための使用も含み、これら細胞が、当該活性成分もしくは当該治療化合物を発現できるか、または、当該活性成分もしくは当該治療化合物を含有している。

20

【0046】

好ましくは、ヒト筋生検細胞からもしくは本発明の方法により *in vitro* において骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、治療組成物調製のための使用が、当該組成物が、静脈内経路により、もしくは、移植により、投与されることを特徴としている。

【0047】

続く図面および実施例のキャプションが、如何なる方法においても、その範囲を限定していくことなく、本発明を例示するよう向けられている。

【実施例】

【0048】

方法

細胞培養

臍帯血において含有された前駆体から *ex vivo* において分化した CML が得られ、上記したとおりであった(16)。これらが、I型ラット尾コラーゲン(60 μg / mL、SIGMA)上で、20%の牛胎児血清(SVF)、25 mMのHepes緩衝液(Gibco)、抗生物質、抗真菌剤溶液(Gibco)、および、10 ng / mLでの組み換えhVEGF(R&D Systems)を用いて補完されたM199培地(Gibco)において、37において、5%CO₂を含有している雰囲気において、培養された。該培養培地が、1週に2回、変えられている。本CMSが、以前記載されたとおり(12)培養された。筋管への細胞の分化を誘導させるために、80~90%での細胞の培養培地が、2%SVF、25 mM Hepes、ならびに、抗生物質および抗真菌剤溶液(Gibco)を用いて補完された培地へと変えられた。

40

【0049】

免疫細胞化学

これら細胞が培養において、スライド上で混合され(<<チャンバースライド>>、Lab-Techn、Poly Labo、ストラスブル、フランス)、冷90%アセトン溶液を用いて固定された。1次抗体が、使用された。マウス抗ヒトSMAモノクローナル抗体(1A4、DAKO)およびマウス抗ヒト平滑筋ミオシン重鎖モノクローナル抗体(SMM5-1、DAKO)。(DAKO) EnVision™ System過酸化酵素(DAB)キットが使用され、SMAおよびSM-MHCを明らかにした。これら

50

細胞が仕上げに、ヘマトキシリンを用いて逆染色された。

【0050】

フローサイトメトリー

ある1分取の細胞が直接、CD31(5.6E、Coulter)、CD45/CD14(2D1、MP9、Becton Dickinson)、CD56、およびCD90に対して向けられた抗体を用いて標識された。これら細胞が、抗デスミン抗体(D33、DAKO)を用いて、浸透試薬IntraprepTM(Coulter)を用いた浸透ステップ後、標識された。標識化後、これら細胞が、1%パラホルムアルデヒドを用いて固定され、フローサイトメトリー(FACStarフローサイトメーター、Becton Dickinson)により解析された。

10

【0051】

RT-PCR(逆転写ポリメラーゼチャーンリアクション)

合計RNAが、その供給元の説明書に従いながら、RNAXEL(登録商標)(EUROBIO、Les Ulis、フランス)を用いて抽出された。そのcDNA合成が、キット<<RT-PCR(AMV)用第1鎖cDNA合成キット>>(Boehringer Mannheim)を使用しながら、実施された。こうして、興味の対象のcDNA断片が、PCRにより、増幅することができた。該PCR混合物が、1X反応緩衝液、1.5mMのMgCl₂、0.2mMのデオキシヌクレオチド混合物、0.5単位のTaqポリメラーゼ、ならびに、0.2μMのセンスおよびアンチセンスプライマーを含有した。以降のプライマーが、該RT-PCRに使用された：

20

GAPDHセンス(配列ID番号：1)：5' - CCA TGG AGA AGG
CTG GGG - 3'

アンチセンス(配列ID番号：2)：5' - CAA AGT TGT CAT GG
A TGA CCC - 3'

カルポニンセンス(配列ID番号：3)：5' - AGA - AGT - ATG - ACC - ACC - AGC - 3'

アンチセンス(配列ID番号：4)：5' - TAG - AGC - CCA - ATG - AT
G - TTG - CG - 3'

SM22センス(配列ID番号：5)：5' - GCA - GTC - CAA - AAT -
TGA - GAA - GA - 3'

30

アンチセンス(配列ID番号：6)：5' - CTG - TTG - CTG - CCC - AT
T - TGA - AG - 3'

ミオゲニンセンス(配列ID番号：7)：5' - AGC - GCC - CCC - TCG -
TGT - ATG - 3'

アンチセンス(配列ID番号：8)：5' - TGT - CCC - CGG - CAA - CT
T - CAG - C - 3'

MyoDセンス(配列ID番号：9)：5' - CGG - CGG - CGG - AAC - T
GC - TAC - GAA - 3'

アンチセンス(配列ID番号：10)：5' - GGG - GCG - GGG - GCG - G
AA - ACT - T - 3'

40

Myf5センス(配列ID番号：11)：5' - ACC - ATG - GAT - CGG -
CGG - AAG - G - 3'

アンチセンス(配列ID番号：12)：5' - AAT - CGG - TGC - TGC - C
AA - CTG - GAG - 3'

VEGF-R1センス(配列ID番号：13)：5' - CGA - CCT - TGG - T
TG - TGG - CTG - ACT - 3'

アンチセンス(配列ID番号：14)：5' - CCC - TTC - TGG - TTG - G
TG - GCT - TTG - 3'

VEGF-R2センス(配列ID番号：15)：5' - AAC - AAA - GTC - G
GG - AGA - GGA - 3'

50

アンチセンス(配列ID番号:16) : 5' - T G A - C A A - G A A - G T A - G
C C - A G A - A G A - 3'

F R S センス(配列ID番号:17) : 5' - A G T - G T G - T G G - G G G - A
G A - T T C - T G - 3'

アンチセンス(配列ID番号:18) : 5' - T C T - C C C - T A G - C A A - C
A G - C C C - T A - 3'

【0052】

実施例1：始原細胞もしくは分化骨格筋細胞から、大量のヒトCMLを得るのを可能にしていく培養条件

A) 出発細胞集団：

本発明の方法は、1種の優勢な細胞型が平滑筋型細胞である細胞集団の獲得方法に関する。この方法は、直接筋生検細胞に、もしくは、CMSへの生検細胞の分化およびこれらの細胞の増幅の初期相後、適用され得る。これらの生検から筋生検およびCMSを得ていく条件ならびにこれらの表現型の特徴化が、番号WO01/94555と共に公開された国際特許出願(J.P.Marolleauら)において定義されている。更に、これら生検細胞が、CD31およびCD14を発現しない。

【0053】

数グラムの筋生検から開始して、数100,000,000のCMSを得るのが可能である。これらの細胞が、Myf5およびミオゲニンのような、CD56、デスミン、および筋発生遺伝子を発現する。しかしながら、これらが、CD34、CD14、ならびに、カルポニンおよびSM-MHCのようなCML特異的マーカーを発現しない。これらの細胞が、合着して、多核筋管を生じさせることができる。

【0054】

B) 平滑筋細胞への骨格筋細胞の分化：

該生検からの、もしくは、CMSへの分化後の細胞が、MCD BもしくはM199培地において、VEGF単独存在下に、もしくは、他の成長因子(PDGF-BB、IGF1、FGFb、HGF、もしくはTNF)と共に、培養される。

【0055】

使用された溶液および培地：

培地A：

修飾MCD B 120培地(Hamら、1988年)：L-バリンが、D-バリンにより置換、フェノール赤(レッド)およびチミジン除去。

培地B：

培地A + 20%照射牛胎児血清 + 抗生物質(50 μg/mLでのゲンタマイシンもしくはペニシリンに関して100U/I/mLもしくはストレプトマイシンに関して100 μg/mL)。

培地C：

培地B + FGFb(10ng/mL) + 1 μMデキサメタゾン。

溶液D：

磷酸緩衝化生理食塩水(PBS)(番号WO01/94555と共に公開された国際特許出願24および25ページ参照)。

培地E：

M199。

培地F：

M199 + 20%補体除去牛胎児血清 + Heps(Hepes、25mM) + 抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン)。そして、万一の場合、抗真菌剤(25 μg/mLでのフンギゾンのような、もしくは、上で指示したとおり)。

培地G：

培地F(M199 + SVF + Heps + 抗生物質) + VEGF(10ng/mL)。

10

20

30

40

50

培地 H :

培地 B (M C D B + S V F + 抗生物質 + デキサメタゾン) + V E G F (1 0 n g / m L)

異なる成長因子を含有している培地が、上記された。

【 0 0 5 6 】

C M S もしくは C M L への分化と関連した遺伝子発現が、培養の間、逆転写後ポリメラーゼチェーンリアクション (R T - P C R) 、フローサイトメトリー、および免疫細胞化学により、解析された。これゆえ、 V E G F を含有している培地 M 1 9 9 もしくは M C D B 1 2 0 における 1 ヶ月の培養後、これらの細胞が、メッセンジャー R N A 、および、 C M L に特異的な蛋白を発現する。こうして、これらが、カルポニンおよび S M - M H C を発現する。平行して、これらが、デスミンおよび C D 5 6 を、遙かに弱く発現し、もはや全く、 M y o D を発現しない。しかしながら、転写因子 M y f 5 およびミオゲニンの発現が、残る。

10

【 0 0 5 7 】

本発明者らが、これらの表現型の修飾が、異なる機能特性に至ることも、示している。

【 0 0 5 8 】

実施例 2 : 平滑筋細胞への骨格筋細胞の分化 :

筋生検細胞がまず、培養において、拡大のために、 F G F b を含有している培地において置かれ、上記されたとおりであった (1 2) 。これらの細胞の表現型を特徴化するために、フローサイトメトリーを使用しながらの解析 (F A C S) 、逆転写ポリメラーゼ鎖反応 (チェーンリアクション) (R T - P C R) 、および、免疫細胞化学が、実施された。 F A C S 解析が、殆どのこれらの細胞が、 C D 5 6 (8 0 . 3 0 + 1 9 . 5 0 %) 、デスミン (9 2 . 3 0 + 8 . 4 8 %) 、および C D 9 0 (9 1 . 3 2 + 1 0 . 1 9 %) に関して陽性であり、内皮マーカー C D 3 1 、単球マーカー C D 1 4 、および白血球マーカー C D 4 5 に関して陰性であることを示した (図 1 A) 。 R T - P C R 解析が、これら細胞が、 M y f 5 、 M y o D 、およびミオゲニンのような筋原性細胞に関連したマーカーを発現することを示した (図 1 B) 。これら細胞が、平滑筋細胞特異的マーカー S M 2 2 (図 1 B) および S M A (図 1 C) も発現する。しかし、ある特定のアイソフォームの平滑筋細胞が、骨格筋細胞を発達もしくは再生させていくことにおいて、検出されている (1 4 、 1 5) 。これらの細胞が、カルポニン (図 1 B) および S M - M H C (図 1 C) のような分化平滑筋細胞マーカーを発現しない。

20

【 0 0 5 9 】

これら細胞が次いで、培養において、 V E G F (1 0 n g / m L) を含有している培地において、置かれた。 7 日後、細胞形態における変化が、観察された (図 2 A) 。 R T - P C R 手法が使用され、遺伝子発現の変化を、培養の間、骨格筋細胞と平滑筋細胞との間で、比較した。この解析が、細胞から、培養において置いて後、 0 、 6 、 1 1 もしくは 1 2 、および 3 0 日に得られた R N A に関して実施され、その結果が、図 2 B において与えられている。これら培養条件がどうであれ、この培養期間全体を通して、 S M 2 2 、ミオゲニン、および M y f 5 をコードしている遺伝子が、同様のレベルにおいて発現されたことが、観察された。培養において F G F b と共に置かれた骨格筋細胞 (C M S) が全く、カルポニン発現を示さない。しかし、 V E G F を用いた培養 1 ヶ月後、これらの細胞が、カルポニン m R N A を発現し、同時にもはや、 M y o D を発現しない (国 2 B) 。 S M - M H C 発現が、これらの細胞が、平滑筋細胞表現型を採ったことを確かめる (国 2 C) 。平滑筋細胞 (C M L) における構造遺伝子発現における可変性により、受け入れられた意見は、細胞が分化 C M L として特徴化されるには、平滑筋と関連した幾つかのアイソフォームの構造遺伝子発現が、実証されている必要があるということである。これゆえ、 C M S における、 S M 2 2 、カルポニン、および S M - M H C 発現が、その培養におけるある特定の細胞が、分化 C M L のアイデンティティを採ったことの強い示唆である。最良の培養条件を画定させるために、 C M L の分化もしくは増殖を誘導させると知られた他の成長因子が、テストされた。これゆえ、 P D G F B B および / または F G F b お

30

40

50

よび／または HGF および／または TGF および／または IGF1 が、VEGF に加えられた培養条件が、テストされた。しかし、CMLへのCMSの分化への、もしくは、これらの増殖への有意な効果が全く、観察されなかった。

【0060】

Frid M.G.ら(13)が、成熟牛内皮が細胞を含有し、これが *in vitro*において、CML表現型を、分化転換過程により、獲得できることを示している。ここで、FACS解析により、培養における細胞が、内皮細胞(CE)により混入されていないことが、確認されている。これらが、CD31(図1A)のような内皮細胞に関連したマーカーを発現しない。更に、この観察された現象が、外部源からのCMLによる単純な混入でないとの仮説が、否定され得る。これは、全てのテストされた生検が、骨格筋ミオゲニン、MyoD、Myf5、およびデスミンに関連した遺伝子発現を示すが、平滑筋へと分化していくからである。

10

【0061】

実施例3：機能テスト

平滑筋細胞マーカーの獲得が必ずしも、これらの細胞が、成熟CMLへと分化できることを意味しない。

【0062】

A) I型コラーゲンゲルにおける培養(3Dにおける培養)

プロトコル：

I型コラーゲンゲルにおける培養(3Dにおける培養)(BD Biosciences, Bedford, MA)が、その供給元の推奨に従いながら、実施されたが、つまり、0.5mLの1mg/mLのI型ラット尾コラーゲン(Becton Dickinson)が、35mm直径の培養皿(Nunc, Fisher Scientific, Elancourt, France)中に注がれ、1時間37において、重合するよう放置された。合計400,000細胞(内皮細胞が筋細胞と混合されている場合、200,000の各型の細胞)が次いで、該ゲルの表面上で培養され、培養において24時間、異なる培養条件下に置かれた。血管ネットワーク形成が次いで、位相差顕微鏡および<<電荷組み合わせ>>ビデオカメラKappa CF11DSPを用いて観察された。

20

【0063】

結果(図3A～3C参照)：

30

それら自体を3Dコラーゲン構造において組織化させることができることを示す。これら細胞の能力が次いで、解析された。これら内皮細胞(CE)およびCMLが、互いに相互作用し、毛管型ネットワークを、*in vitro*において、3D培養において、形成することができる。CEと会合して毛管ネットワークを*in vitro*において形成できる、FGFbを用いて培養されたCMS、および、VEGFを用いて培養されたCMSの能力が、比較された。VEGFを用いて培養されたCMSが、CEと相互作用でき、コンパクトな管状ネットワークを形成していく一方(図3C)、FGFbを用いて培養されたCMSが、同一条件下においてCEと相互作用せず、全く血管ネットワークを形成しない(図3B参照)ことが、観察された。

40

【0064】

B) マトリゲル(matrige1)モデル

NOD-SCID免疫抑制マウスにおけるマトリゲル移植モデルにおける管型血管構造を形成できる各細胞型、FGFbを有するかもしくは VEGF を有する CMS の能力が、テストされた。

プロトコル：

J0: 0.2mLのMatrige1移植片(BD Biosciences)(0.5mg/mL FGFb含有)が、NOD-SCID免疫抑制マウスの背中において、皮下注射された。

J1: 午前中、これらマウスが、致死量を下回り、照射された(325rad)。午後、500,000細胞が、尾静脈経由で、静脈内注射された。

50

J 1 0 : これら動物が、犠牲にされ、該移植片が、回収され、パラフィン中において埋められた。H E S (ヘマリン、エオシン、サフラン) 染色が、なされ、審査された(拡大率4倍、40倍)。

【0065】

結果(図4A~4C参照) :

これらの結果が、3人の異なる患者起源の、もしくは、5人の異なる患者の生検からの、C M S に関して得られ、再現された。

【0066】

M a t r i g e l 移植において、V E G F を用いて培養された、C E とC M Lとの、もしくは、C E とC M Sとの投与が、多くの管型の構造体形成に至り、赤血球の存在が、光の下にショーアップされ、機能的な血管構造の存在を実証している(図4Bおよび4C)。逆に、F G F b と共に培養されたC E とC M Sとの投与が、如何なる管型構造形成にも至らず、非組織化された細胞凝集形成を引き起こす(図4A)。

10

【0067】

C) V E G F 存在下に培養されたC M S がもはや、多核筋管において合着しない(図5A ~ 5F 参照)

多核筋管への個々の筋芽細胞の合着が、C M S 終末分化を構成する。筋管形成が、C M S をF G F b もしくはV E G F と共に同一初期濃度において培養していき、次いで、これら培養条件を、2%牛胎児血清を有する培地に関して変更していくことにより、審査された。これらの条件において、筋管が、培養中に入れた10日後、現れた。F G F b と共に培養されたC M S に対して(図5B)、V E G F と共に培養されたC M S (図5D)が、C M L (図5F)のように、多核筋管へと合着していくことが、できない。こうして、これらの細胞が、多核筋管を形成できる能力を失ってしまった。

20

【0068】

D) V E G F が、血清応答因子F R S (<< s e r u m r e s p o n s e f a c t o r >> についてS R F とも命名) 発現を増加させていくことにより、C M L 表現型へのC M S 表現型の遷移を誘導していくことにおいて、関与している

V E G F が、体の成長の間および成人における血管形成の主要なレギュレーターである。V E G F に関する考えられるシグナル伝達経路を探るために、V E G F R 1 およびV E G F R 2 受容体発現が、C M S およびC M L において解析された。R T - P C R 解析が、C M S が、大量のV E G F R 2 を発現することを示した。しかし、これらの細胞が、V E G F を含有している培地において培養されている場合、V E G F R 2 発現の減少が、観察された(図6)。そして、これら培養条件が、何であれ、我々が、V E G F R 1 発現の検出を示していない。これゆえ、これらの結果が、V E G F により刺激されたC M L へのC M S の分化転換の媒介におけるV E G F R 2 の役割を、示唆する。F R S が、細胞成長および分化において関与していると知られている多くの細胞の早期応答遺伝子の、鍵となるレギュレーターである。ある幾つかの結果が、C M S もしくはC M L 株に拘束された1種もしくは複数種のF R S 共因子が、F R S と一緒に機能し得、株特異的遺伝子の転写を活性化させることを示唆する。C M L へのC M S の分化において参画している作用機序(メカニズム)を理解するために、F R S 発現が、V E G F 添加前後、これら細胞において比較された。C M S が、V E G F を含有している培地において培養されている場合、F R S m R N A 発現が、上昇したことが、観察された(図6)。

30

【0069】

40

【表1】

- 1: Gussoni E. et al. : Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999, 401:390-394.
- 2: Jackson KA. Et al. From the cover : hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS* 1999, 96:14482-14486.
- 3: Tamaki T. et al. : Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002 ; 157:571-577.
- 4: Hwang JH. et al. : Differentiation of stem cells isolated from rat smooth muscle. *Mol Cells* 2004 ; 17(1):57-61. 10
- 5: Benjamin L.E. et al. : Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999 ; 103:159-165.
- 6: Morikawa S. et al. : Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2002 ; 160:985-1000.
- 7: Berger M. et al. : Regulator of G protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood* 2004 epub le 30/09/04. 20
- 8: Bergers G. et al. : benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003 ; 111:1287-1295.
- 9: Jain R.K. : Normalizing of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005 ; 307:58-62.
- 10: Ganss R. et al. : Combination of T-Cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* 2002 ; 62:1462-1470.
- 11: Rajantie I. et al. : Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004 ; 104:2084-2086. 30
- 12: Menasché P, Hagège AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 1078-1083 (2003).
- 13: Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelium-mesenchymal transdifferentiation. In vitro analysis. *Circ. Res.* 90, 1189-1196 (2002). 40

【0070】

【表2】

- 14: Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ. Res.* 78, 188-195 (1996).
- 15: Woodcock-Mitchell J, Mitchell JJ, Low RB, Kieny M, Sengel P, Rubbia L, Skalli O, Jackson B, Gabbiani B. α -Smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 39, 151-166 (1998).
- 16: Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Contreras JO, et al. Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. *Cardiovas. Res.* 62, 176-184 (2004).

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1-1】FGFbを含有している培地において培養された骨格筋細胞の特徴化。（図1A）フローサイトメトリー解析が、これらの細胞が、CD56、デスミン、およびCD90を発現するが、CD31、CD14、およびCD45を発現しないことを示す。各ヒストグラムにおいて、その黒い線が、ネガティブコントロールの抗体を用いて標識された細胞に対応する。その破線が、各ヒストグラムに関して指示されたマーカーに対して特異的な抗体を用いて標識された細胞に対応する。これらのヒストグラムが、6サンプルの代表である。（図1B）RT-PCR解析。（図1C）免疫細胞化学解析による培養骨格筋細胞の特徴化。これら細胞が、抗IgGコントロール抗体、抗SMA抗体、もしくは抗SM-MHCを用いて標識され、次いで、過酸化酵素を用いてカップリングされた2次抗体を用いて標識化している。

【図1-2】FGFbを含有している培地において培養された骨格筋細胞の特徴化。（図1A）フローサイトメトリー解析が、これらの細胞が、CD56、デスミン、およびCD90を発現するが、CD31、CD14、およびCD45を発現しないことを示す。各ヒストグラムにおいて、その黒い線が、ネガティブコントロールの抗体を用いて標識された細胞に対応する。その破線が、各ヒストグラムに関して指示されたマーカーに対して特異的な抗体を用いて標識された細胞に対応する。これらのヒストグラムが、6サンプルの代表である。（図1B）RT-PCR解析。（図1C）免疫細胞化学解析による培養骨格筋細胞の特徴化。これら細胞が、抗IgGコントロール抗体、抗SMA抗体、もしくは抗SM-MHCを用いて標識され、次いで、過酸化酵素を用いてカップリングされた2次抗体を用いて標識化している。

【図2】（図2A）FGFbもしくはVEGFを含有している培地における骨格筋細胞（CMS）の形態学。（図2B）FGFbもしくはVEGFを含有している培地において培養されたCMSにおける、骨格筋および平滑筋細胞特異的遺伝子発現のRT-PCR解析。これら培養が回収され、RNAを、指示された異なる時間において調製した。RT-PCRが、実施され、そのPCR産物が、臭化工チジウムを含有しているアガロースゲル上で解析された。（図2C）VEGFを用いて1ヶ月間培養されたCMSにおける免疫標識化によるSM-MHC発現の検出。これら細胞が、抗IgGコントロール抗体もしくは抗SM-MHC抗体を用いて標識化され、次いで、過酸化酵素（ペルオキシダーゼ）とカップリングされた2次抗体を用いて標識化された。

【図3】位相差顕微鏡を用いて撮られた写真。これら内皮細胞（CE）およびこれら筋細胞が一緒に、コラーゲンゲル表面上で培養されている。24～48時間後、CEが、CMLと相互作用し、臍帯血前駆体の分化を起源としており（図3A）、もしくは、これら骨格筋細胞を培養していった後得られたCMLであり（図3C）、ネットワークを形成する。対照的に、CMSが、ネットワークを、これらの条件において、形成できない（図3B）。

)。

【図4】マトリゲル(Matrige1)セクション(区画)、HES標識化。骨格筋細胞から得られたCEおよびCMLの同時注入が、移植片における血管の溶血の形成に至り(図4B)、赤血球存在下である(全ての点が、これら矢印のレベルであり、図4Cが、より大きい拡大率である)。反対に、これらの同一条件において、CMSが、機能的な血管ネットワークを形成しない(図4A)。

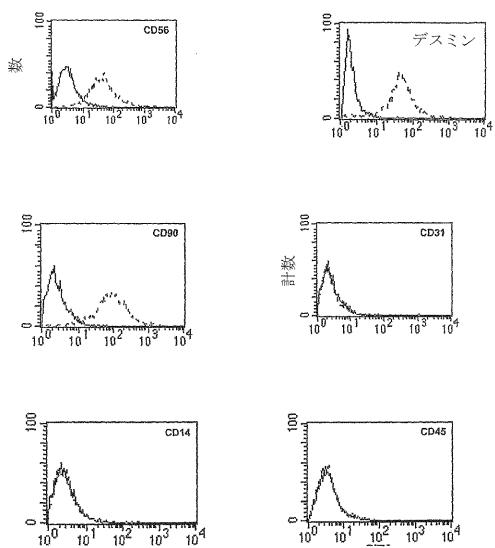
【図5】位相差顕微鏡を用いて撮られた、20%牛胎児血清(SVF)(図5A、5C、および5E)もしくは2%SVF(図5B、5D、および5F)を含有している培地において培養されたCMS(図5A～5D)およびCML(図5Eおよび5F)の写真。筋管への細胞形成を誘導させるために、80～90%合流に届いている細胞の培養培地が、2%SVFを用いて補完された培地に変えられている。筋管形成停止が、該培地へのVEGFの添加に関する(図5C～5F)。VEGF存在下に培養されたCMSが、多核筋管へと合着できない(図5D)。

【図6】CMLの分化の度合いが、VEGFR2の発現の減少および血清応答因子(FRS)の発現の増加と相關されている。FGFbもしくはVEGF存在下に培養されたCMSの3種の異なるサンプルのRT-PCR解析(1、2、および3)。内皮始原細胞(CPE)が、(16)において記載されたとおり得られたが、VEGF受容体(VEGFR)発現に関するポジティブコントロールとして、FRSに関するネガティブコントロールとして、使用されている。培養条件が何であれ、CMSおよびCMLが、VEGFR1を発現しない。CMSにおいて、VEGFが、VEGFR2発現を減少させるが、FRSmRNA発現を刺激する。

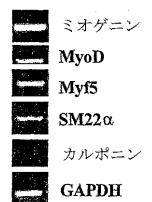
10

20

【図1-1】



【図1-2】



B



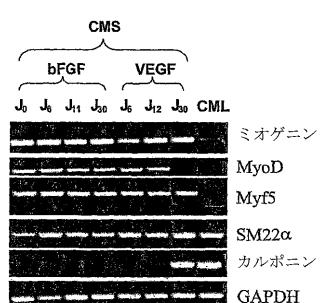
C

A

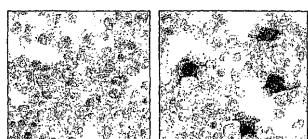
【図2】



A

ミオゲニン
MyoD
Myf5
SM22α
カルボニン
GAPDH

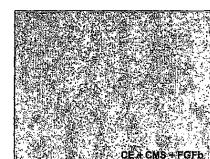
B



C



A



B

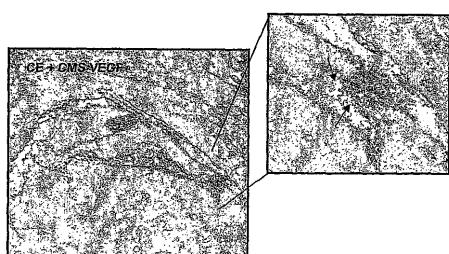


C

【図4】



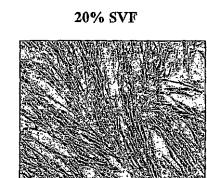
A



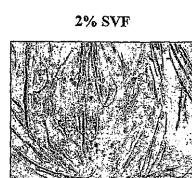
B

C

【図5】



A



B



CMS + VEGF

C



D



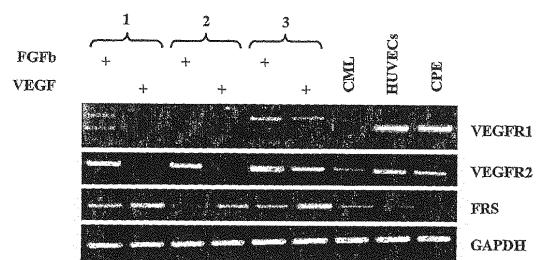
CML + VEGF

E



F

【図6】



【配列表】

[2009508511000001.xml](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/FR2006/002144									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/06											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> LE RICOUSSE-ROUSSANNE SOPHIE ET AL: "Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature." <i>CARDIOVASCULAR RESEARCH</i>, vol. 62, no. 1, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 176-184, XP002387433 ISSN: 0008-6363 cited in the application figure 1 figure 2 figure 5 page 179, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 180, right-hand column, paragraph 1 page 183, right-hand column, paragraph 1 ----- </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">20-22, 26,28,29</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-/-</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	LE RICOUSSE-ROUSSANNE SOPHIE ET AL: "Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature." <i>CARDIOVASCULAR RESEARCH</i> , vol. 62, no. 1, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 176-184, XP002387433 ISSN: 0008-6363 cited in the application figure 1 figure 2 figure 5 page 179, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 180, right-hand column, paragraph 1 page 183, right-hand column, paragraph 1 -----	20-22, 26,28,29		-/-	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	LE RICOUSSE-ROUSSANNE SOPHIE ET AL: "Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature." <i>CARDIOVASCULAR RESEARCH</i> , vol. 62, no. 1, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 176-184, XP002387433 ISSN: 0008-6363 cited in the application figure 1 figure 2 figure 5 page 179, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 180, right-hand column, paragraph 1 page 183, right-hand column, paragraph 1 -----	20-22, 26,28,29									
	-/-										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.									
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed											
T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 9 February 2007		Date of mailing of the international search report 01/03/2007									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Manu, Dominique									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2006/002144

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIMPER DAVID ET AL: "Smooth muscle progenitor cells in human blood." CIRCULATION, vol. 106, no. 10, 3 September 2002 (2002-09-03), pages 1199-1204, XP002387434 ISSN: 1524-4539 page 1201, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 figure 2 figure 4	20-25, 27-29
A	HWANG JI HYE ET AL: "Isolation of muscle derived stem cells from rat and its smooth muscle differentiation [corrected]." MOLECULES AND CELLS, vol. 17, no. 1, 29 February 2004 (2004-02-29), pages 57-61, XP002387435 ISSN: 1016-8478 cited in the application the whole document	1-19
A	QU-PETERSEN Z ET AL: "Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: Potential for muscle regeneration" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 157, no. 5, 27 May 2002 (2002-05-27), pages 851-864, XP002302343 ISSN: 0021-9525 page 857, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 1	1-19
A	HUARD J ET AL: "Muscle-derived cell-mediated ex vivo gene therapy for urological dysfunction" GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, vol. 9, no. 23, December 2002 (2002-12), pages 1617-1626, XP002370482 ISSN: 0969-7128 the whole document	1-19
A	WO 01/94555 A (ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE) 13 December 2001 (2001-12-13) cited in the application the whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2006/002144

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0194555	A 13-12-2001	AU	6612701 A	17-12-2001
		BR	0111497 A	06-04-2004
		CA	2411762 A1	13-12-2001
		EP	1292671 A1	19-03-2003
		FR	2810045 A1	14-12-2001
		JP	2003535586 T	02-12-2003
		US	2006088508 A1	27-04-2006
		US	2004043008 A1	04-03-2004

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°
PCT/FR2006/002144

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>LE RICOUSSE-ROUSSANNE SOPHIE ET AL: "Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature." CARDIOVASCULAR RESEARCH, vol. 62, no. 1, 1 avril 2004 (2004-04-01), pages 176-184, XP002387433 ISSN: 0008-6363 cité dans la demande figure 1 figure 2 figure 5 page 179, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1 page 180, colonne de droite, alinéa 1 page 183, colonne de droite, alinéa 1</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	20-22, 26,28,29

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant poser un doute sur une revendication de priorité ou clé pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indique)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
9 février 2007	01/03/2007
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3018	Fonctionnaire autorisé Manu, Dominique

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°
PCT/FR2006/002144

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>SIMPER DAVID ET AL: "Smooth muscle progenitor cells in human blood." CIRCULATION, vol. 106, no. 10, 3 septembre 2002 (2002-09-03), pages 1199-1204, XP002387434 ISSN: 1524-4539</p> <p>page 1201, colonne de gauche, alinéa 2 – colonne de droite, alinéa 1</p> <p>figure 2</p> <p>figure 4</p>	20-25, 27-29
A	<p>HWANG JI HYE ET AL: "Isolation of muscle derived stem cells from rat and its smooth muscle differentiation [corrected]." MOLECULES AND CELLS, vol. 17, no. 1, 29 février 2004 (2004-02-29), pages 57-61, XP002387435</p> <p>ISSN: 1016-8478</p> <p>cité dans la demande</p> <p>le document en entier</p>	1-19
A	<p>QU-PETERSEN Z ET AL: "Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: Potential for muscle regeneration" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 157, no. 5, 27 mai 2002 (2002-05-27), pages 851-864, XP002302343</p> <p>ISSN: 0021-9525</p> <p>page 857, colonne de gauche, alinéa 4 – colonne de droite, alinéa 1</p>	1-19
A	<p>HUARD J ET AL: "Muscle-derived cell-mediated ex vivo gene therapy for urological dysfunction" GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, vol. 9, no. 23, décembre 2002 (2002-12), pages 1617-1626, XP002370482</p> <p>ISSN: 0969-7128</p> <p>le document en entier</p>	1-19
A	<p>WO 01/94555 A (ASSISTANCE PUBLIQUE – HOPITAUX DE PARIS; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE) 13 décembre 2001 (2001-12-13)</p> <p>cité dans la demande</p> <p>le document en entier</p>	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale n° PCT/FR2006/002144
--

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0194555	A 13-12-2001	AU 6612701 A	17-12-2001
		BR 0111497 A	06-04-2004
		CA 2411762 A1	13-12-2001
		EP 1292671 A1	19-03-2003
		FR 2810045 A1	14-12-2001
		JP 2003535586 T	02-12-2003
		US 2006088508 A1	27-04-2006
		US 2004043008 A1	04-03-2004

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 P 43/00	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09	A 6 1 P 43/00	1 0 5
	C 1 2 N 15/00	A

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

(71) 出願人 508085796

アンスティテュ・デ・ヴェソー・エ・デュ・サン
INSTITUT DES VAISSEAUX ET DU SANG
フランス国、75010 パリ、リュ・ギ・パタン 8
8, rue Guy Patin, 75010 Paris, France

(74) 代理人 100110423

弁理士 曾我 道治

(74) 代理人 100084010

弁理士 古川 秀利

(74) 代理人 100094695

弁理士 鈴木 憲七

(74) 代理人 100111648

弁理士 梶並 順

(74) 代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(72) 発明者 ル・リクース、ソフィー

フランス国、94500 シャンピニイ、リュ・ミュセル・ビュルグ 56

(72) 発明者 ラカサーニュ、マリー - ノエル

フランス国、75018 パリ、リュ・ルトール 36

(72) 発明者 マロロー、ジャン - ピエール

フランス国、80000 アミアン、ブルヴァール・ジュール・ヴェルヌ 46

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11

4B065 AA90X AA93X AC20 CA44

4C087 AA01 AA02 AA03 BB47 BB64 CA04 MA66 MA67 NA14 ZA36

ZA44 ZA45 ZB21 ZB26