

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5484059号
(P5484059)

(45) 発行日 平成26年5月7日 (2014.5.7)

(24) 登録日 平成26年2月28日 (2014.2.28)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 L 27/00 (2006.01)

A 6 1 L 27/00 Z N A G

A 6 1 F 2/44 (2006.01)

A 6 1 F 2/44

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 35/12 (2006.01)

A 6 1 K 35/12

A 6 1 P 19/00 (2006.01)

A 6 1 P 19/00

請求項の数 12 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-530811 (P2009-530811)
 (86) (22) 出願日 平成19年10月5日 (2007.10.5)
 (65) 公表番号 特表2010-505482 (P2010-505482A)
 (43) 公表日 平成22年2月25日 (2010.2.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/008660
 (87) 国際公開番号 W02008/040557
 (87) 国際公開日 平成20年4月10日 (2008.4.10)
 審査請求日 平成22年10月4日 (2010.10.4)
 (31) 優先権主張番号 06021093.7
 (32) 優先日 平成18年10月6日 (2006.10.6)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 504439252
 エスシーアイエル テクノロジー ゲゼル
 シャフト ミット ペシュレンクテル ハ
 フツング
 S c i l T e c h n o l o g y G m b
 H
 ドイツ連邦共和国 マーティンスリート
 フラウンホーファーシュトラッセ 15
 Fraunhoferstrasse 1
 5, D-82152 Martinsr
 ied, Germany
 (74) 代理人 100061815
 弁理士 矢野 敏雄
 (74) 代理人 100099483
 弁理士 久野 琢也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脊髄核インプラント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D - R A P である軟骨分化・保持因子を含む、脊髄障害の治療のための脊髄核インプラントあるいは配合物。

【請求項 2】

インプラントが、椎間板を介して注入可能あるいは移植可能であることを特徴とする、請求項 1 に記載の脊髄障害の治療のための脊髄核インプラントあるいは配合物。

【請求項 3】

軟骨分化・保持因子が、軟骨形成モルフォゲンであることを特徴とする、請求項 1 あるいは 2 に記載の脊髄障害の治療のための脊髄核インプラントあるいは配合物。

【請求項 4】

軟骨分化・保持因子が、軟骨再生に対する同化活性を有することを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の脊髄障害の治療のための脊髄核インプラントあるいは配合物。

【請求項 5】

C D - R A P である軟骨分化・保持因子が、
 配列番号 1 による C D - R A P の成熟配列を含む軟骨細胞タンパク質、
の群から選択されることを特徴とする、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の脊髄障害の治療のための脊髄核インプラントあるいは配合物。

【請求項 6】

10

20

インプラントあるいは配合物が、担体を含むことを特徴とする、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の脊髄障害の治療のための脊髄核インプラントあるいは配合物。

【請求項 7】

インプラントあるいは配合物が、徐放機構を含むことを特徴とする、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の脊髄障害の治療のための脊髄核インプラントあるいは配合物。

【請求項 8】

軟骨分化・保持因子が、リボソーム中に封入されていることを特徴とする、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の脊髄障害の治療のための脊髄核インプラントあるいは配合物。

【請求項 9】

脊髄核インプラントが、髄核組織あるいは細胞を含むことを特徴とする、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の脊髄障害の治療のための脊髄核インプラントあるいは配合物。

【請求項 10】

脊髄障害の治療のための、C D - R A P である軟骨分化・保持因子を含む剤。

【請求項 11】

C D - R A P が請求項 2 から 5 までのいずれか 1 項に定義されている、請求項 10 に記載の脊髄障害の治療のための剤。

【請求項 12】

脊髄障害が、突発性の腰痛、椎間板ヘルニア、内部椎間板破壊、あるいは椎間板損傷、神経根障害、脊髄狭窄症、髄核ヘルニア由来の坐骨神経痛、坐骨神経痛、突発性脊柱側弯症あるいはミエロパシーであることを特徴とする、請求項 10 あるいは 11 の脊髄障害の治療のための剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は椎間円板の治療のための脊髄核インプラントに関し、且つ、特にそのための C D - R A P タンパク質の使用に関する。

【0002】

椎間円板（I V D）の変性は、機械的、遺伝的、および生物学的要因を含む多因子性の過程である。病態生理学的メカニズムは不明瞭なままであるにもかかわらず、椎間板の構造および機能にもたらされる変化はよく説明されている。関節軟骨とは異なって、I V D は様々な組織から構成されている。健康な I V D は線維性の線維輪（A F）によって囲まれているゼリー状の髄核（N P）を含有する完全に封入された無血管の器官であり、それは椎骨間の可動性およびクッションを提供する。髄核はそれぞれの椎間板の中央に位置し、且つ成人において高い割合のプロテオグリカン（P G）およびタイプ I コラーゲンを含有する細胞外マトリックスを生成する軟骨細胞で構成される。髄核は、高度に組織化され、同心円層板内に配向された、方向の揃ったコラーゲン線維および細胞外マトリックスからなる線維輪によって囲まれる。内部の線維輪は、外部よりも厚く、且つ層板状構造を欠いた線維軟骨性マトリックスを有する。薄い異質の領域、移行帯（T Z）が髄核から内部の輪を分けている。

【0003】

老化過程の間、該核のプロテオグリカン含有率の低下は、減少した水和作用、および椎間板高さの低下を含む変性の形跡、および脊椎の周りの構造上の増加した負荷をもたらす。生物学的なレベルでは、それは髄核細胞の正常な同化機能と異化機能との間の平衡失調を反映する。変性円板疾患（D D D）のいくつかの場合において、I V D の段階的な変性は機械的な不安定性によって引き起こされる。髄核において増加した負荷および圧力は、その細胞あるいは侵入マクロファージにより多量のサイトカインあるいは有害な量のメタロプロテイナーゼ（M M P s）の生成を惹起させる。D D D が進行するにつれ、有害なレベルのサイトカインおよび M M P s は細胞外マトリックスを劣化させ、そしてプロテオ

10

20

30

40

50

グリカンの破壊をもたらし、それによって水分保持能力を減少させて髄核の脱水症をみちびく。その次に髄核の柔軟性が低下し、そして線維輪の離層の結果になることがあり、最後には進行した内部のひびが周囲に向かって広がる。それらの変性は、より多い機械的不安定性およびサイトカイン生成の誘発をも引き起こし、それはDDDを進行させ、且つ椎間板が隆起し始め（椎間板ヘルニア疾患）、そして最終的に神経刺激および腰痛を伴って破裂する。

【0004】

残念ながら、椎間板に関わる腰痛のほとんどの現在の治療は、原因となっている変性過程を回復するよりも症状の緩和を得ることを目標としている。保存治療は身体的な測定、鎮痛薬、筋弛緩薬、非ステロイド系抗炎症薬、全身性コルチステロイド、硬膜外注射およびサイトカイン拮抗薬の注射の使用からなる。治療の後期段階において、変性椎間板の治療は、変性椎間板の除去、およびその椎間板の両側にある隣接した脊椎の融合、あるいは合成の椎間板材料によるその椎間板の置換のいずれかである。

10

【0005】

椎間板の置換あるいは融合は、正常な椎間板の高さ、生理学的あるいは機械的特性を回復せず、且つ手術部位あるいは隣接した椎間板のいずれかでさらなる症状をもたらし得る。従って、その変性の原因となっている細胞の障害を抑止あるいは転換し、且つ椎骨椎間板の生物学的機能を回復する将来的な治療方法が必要とされる。世界中の多くの研究者が変性椎間板を修復するための生物学的方法を探索している。

20

【0006】

化学的髄核分解剤、例えばキモパパインがIVDヘルニアの治療方法として過去に使用されていた。痛みの緩和はPGを分解させる能力に関連し、それによって椎間板内の圧力を減少させ、且つ患部の神経根圧迫を軽減する。しかしながら、関連した合併症、例えばアナフィラキシー、神経学的損傷、および感染症がキモパパインの使用を減少させた。より近年では、コンドロイチナーゼABC（C-ABC）が化学的髄核分解の代替として提案されており、なぜならそれはプロテアーゼ活性を欠き、且つより狭い基質スペクトルを有するからである。軟骨マトリックスの再生が、C-ABCでの治療の後、キモパパインでの治療よりも早く生じるにもかかわらず、椎間板の高さおよびPG含有率は著しく回復せず、且つIVDは変性した最適以下の生化学的特性を有したままであり、従って事象の変性カスケードを加速する（Tekegami et al., 2005; Masuda et al., 2004; Masuda and An, 2004）。

30

【0007】

WO2005/000283号およびその中の参考文献は、拮抗剤、例えばMMPの高親和性拮抗剤、高特異性サイトカイン拮抗剤、高特異性p38キナーゼ抑制剤、抗炎症薬、サイクリン化合物、増殖抑制剤あるいはアポトーシス抑制剤を椎間板患部に注入することを含む変性円板疾患の治療方法を記載する。それらの化合物は炎症誘発性のサイトカイン、MMPsの阻害、プロスタグランジンの調節、あるいは炎症誘発性の影響の低減によって、DDDの範囲内の異化作用過程を抑制するか、あるいは軟骨細胞の増殖またはアポトーシスを抑制すると考えられているが、しかし同化活性は記載されていない。

【0008】

WO2006/086105号は、転写因子、例えばNF- κ B、E2F、GATA-3およびSTATを標的とした転写因子阻害剤を使用した治療方法および/または椎間板の障害の逆行を記載している。

40

【0009】

WO2006/031376号は、単独あるいは追加の治療剤、例えばフィブリン、ヒアルロン酸、幹細胞、骨髄あるいは成長因子と組み合わせた、抗酸化薬の椎間板内への投与を含む変性円板疾患の治療方法を記載している。

【0010】

他の研究において、外因性の成長因子、例えば形質転換成長因子ベータ-1（TGF- β 1）、インスリン、例えば成長因子-1（IGF-1）、骨形態形成タンパク質-2（

50

BMP - 2)、成長分化因子 - 5 (GDF - 5) および骨形成タンパク質 (OP - 1) を椎間板内細胞に投与するか、あるいは椎間板を介して注入してプロテオグリカンおよびコラーゲンの合成を刺激してIVDの変性を遅らせ、あるいは逆行させている (Levicoff et al., 2005; Sobajima et al., 2004; Takegami et al., 2005; Kawakami et al., 2005)。しかしながら、それらの成長因子はかなり非特異性であり、骨形成遺伝子を誘発するリスクを有し、従って、望ましくない骨の形成を誘発し得る。この成長因子技術の適用の他の制限は、その外因性の成長因子の比較的短い生物学的半減期であり、それはそれらの送達の後、一過性の生物学的効果だけを可能にし得る。

【0011】

10

従って、本発明の課題は椎骨の円板の生物力学的特性を改善あるいは回復する、および/または椎骨の円板に影響する疾患のさらなる進行を抑制する髄核インプラントを提供することである。

【0012】

本発明の他の課題は、椎骨の円板に影響する疾患の進行を逆行させられる軟骨分化・保持因子を含む髄核インプラントを提供し、椎骨の円板の特性を回復する、あるいは該疾患のさらなる進行を抑制することである。

【0013】

本発明の他の課題は、IVD内の異化過程を犠牲にして同化過程を刺激することによって、軟骨のホメオスタシスを修正して、慢性状態、例えばDDDの治療のための新規の方法を提供することである。

20

【0014】

本発明の他の課題は、椎骨の円板の局在化した変性の治療のための軟骨分化・保持因子を含み、該軟骨分化・保持因子が患者に治癒のより良い機会、緩慢な疾患進行を提供し、および/または、他の点では患者の健康を改善する髄核インプラントを提供することである。

【0015】

他の課題は、椎間板の高さおよびIVD組織中のプロテオグリカン含有率を増加させる髄核インプラントを提供することである。

【0016】

30

本発明の他の課題は、軟骨の維持に加えて慢性状態、例えばDDDを治療するために、ヒト中の特定のサイトカインの活性の抑制および阻害を提供するための軟骨分化・保持因子を含む髄核インプラントを提供することである。

【0017】

本発明の他の課題は、最小限の侵襲工程によって、または内視鏡的に移植あるいは注入できる髄核インプラントを提供することである。

【0018】

本発明の他の課題は、治療剤のより持続したレベルあるいは徐放性を提供して該剤がより長い時間枠の間、変性IVDの部位で使用可能であることを確実にできる髄核インプラント送達系を提供することである。

40

【0019】

本発明の他の課題は、治療剤のより持続したレベルが提供できる送達系である髄核インプラントを提供することである。

【0020】

本発明の課題を解決するために、非抗体あるいは非受容体分子である軟骨分化・保持因子を含む髄核インプラントあるいは配合物を提供する。該インプラントは特に、椎間板を介して注入可能あるいは移植可能である。明確化のために、非抗体とは軟骨分化・保持因子が、抗体、例えばTNFアルファに対する単クローン性抗体、多クローン性抗体、あるいはキメラ抗体ではないことを意味する。受容体分子とは、炎症誘発性のサイトカイン、例えばTNF α 、それらの欠損形あるいはそれらの機能的等価物に対する高い特異性を

50

有する受容体分子を意味する。

【 0 0 2 1 】

本発明者らは、有効量の機能性生物分子の病理学的脊髄障害（例えばD D D）への適用による、病理学的脊髄障害、例えば変性円板疾患治療のための多くの方法を開発している。本発明によれば、1つの実施態様は、軟骨分化・保持因子を好ましくは1回あるいは繰り返し返して、治療に有効な量で注入することによって椎間板を介して投与する椎間円板の治療方法を含む。1つの実施態様において、軟骨分化・保持因子は軟骨にきわめて特異的なタンパク質、例えば、I V D細胞の分化および保持を刺激できる一方、望ましくない骨の形成を抑制できるC D - R A Pあるいはそれらの活性な断片の群から選択される。

【 0 0 2 2 】

前記の軟骨分化・保持因子、例えばC D - R A Pは、サイトカインおよびM M P sの活性を阻害し、および/または前記のサイトカインおよびM M P sの発現を減少させる一方、同化過程を刺激して変性組織、例えば線維軟骨の部分的あるいは完全な回復をもたらし、従って疾患の進行を逆行あるいは停止できる。その結果、軟骨分化・保持因子の注入は、椎間円板の老化過程を阻止することを補助する。従って、本発明は初期段階の変性椎間板の治療を可能にし、従って細胞外マトリックスの分解を阻止する。

【 0 0 2 3 】

さらには、軟骨分化・保持因子は、軟骨の劣化を緩和あるいは阻止し、且つ好ましくは、望ましくない骨の形成をしないでI V Dの構造および機能を保持あるいは改善する。

【 0 0 2 4 】

本発明の他の実施態様は軟骨分化・保持因子を、治療を必要とする哺乳類の脊髄障害の治療のための医薬組成物の製造に用いる使用に関する。

【 0 0 2 5 】

好ましい実施態様において、脊髄障害は突発性の腰痛、椎間板ヘルニア、内部円板破壊、あるいは円板損傷、神経根障害、脊髄狭窄症、髄核ヘルニア由来の坐骨神経痛、坐骨神経痛、突発性脊柱側弯症あるいはミエロパシーである。

【 0 0 2 6 】

本発明のさらに他の態様は、非抗体あるいは非受容体分子である軟骨分化・保持因子を含む脊髄核インプラントあるいは配合物、好ましくは椎間板を介して注入可能あるいは移植可能であるインプラントあるいは配合物を、治療を必要とする哺乳類の脊髄障害の治療のための医薬組成物の製造に用いる使用を含む。

【 0 0 2 7 】

本発明の目的では、用語"脊髄核インプラント"は、椎間円板、特に椎間円板の髄核（N P）に投与される器具あるいは製剤を意味する。好ましくは前記のインプラントはA Fを介して直接的に椎間円板に投与できる、あるいは椎間板のN P内に直接的に堆積できる。それを針あるいは最小限の侵襲で適用する他の手段を介して椎間板内に注入できる。それは、脊髄核インプラントが髄核、椎間板内の空間あるいは椎骨間の空間内に注入できる医薬製剤であることも意味する。該インプラントは軟骨分化・保持因子を含む固体、例えばスポンジあるいは固体担体であってよい。好ましくは、該インプラントはそれらの容易な適用ができる液体である。該インプラントは例えば、随意に他の薬剤、配合補助剤あるいは担体と共に、軟骨分化・保持因子を含む液体であってよい。より大きいサイズの担体材料の適用の場合には、椎間板の一部あるいは全部の除去が好ましいこともある。

【 0 0 2 8 】

本発明の目的では、用語"椎間板を介した投与"は、限定されずに、脊髄核インプラントの椎間円板内への、特に椎間円板のN P内への注入を含み、椎間円板は無損傷の椎間板、様々な段階の変性椎間板、ヘルニアのある椎間板、破裂した椎間板、離層した椎間板、あるいは亀裂の入った椎間板を含む。注入される容積がN Pに圧力を生じさせ得る場合、少なくとも一部分のN Pをインプラントの脊柱への注入あるいは適用に先だって除去できる。いくつかの場合において、除去される物質の容積は、適用される容積の約±20%の量である。用語、経椎間板的な投与は、上述のように、変性している、あるいは無傷の椎間

10

20

30

40

50

板の A F 内の N P への脊髄核インプラントの注入も含む。より大きいサイズの担体材料の適用の場合には、脊髄核インプラントの適用前に椎間板の一部あるいは全体の除去が必要とされることもある。さらには、それは外側ではあるが A F 壁に隣接している部位、あるいは隣接した脊椎骨本体の終板へのインプラントの提供を含み、これは A F の破壊、従って椎間板上の潜在的な負荷を避け得る。

【 0 0 2 9 】

用語"変性円板疾患 (D D D)"は、髄核内のプロテオグリカンおよび水含有率の進行性の損失によって部分的に特徴付けられる慢性の過程であり、それは多発性の障害、例えば突発性の腰痛、椎間板ヘルニア、内部椎間板破壊、あるいは椎間板損傷、神経根障害、脊髄狭窄症、髄核ヘルニア由来の坐骨神経痛、坐骨神経痛、突発性脊柱側弯症および / また

10

【 0 0 3 0 】

用語"軟骨分化・保持因子"は、分裂促進能力を有するが、しかし望ましくない骨の形成をしないで細胞の軟骨細胞に特異的な表現型を増加および / または保持するそれらの能力 (例えば同化作用) によって特徴付けられ得る、1つあるいはそれより多くの軟骨分化因子を意味する。軟骨細胞に特異的な特徴とは、例えばアグリカン、タイプ I I コラーゲン、S O X - 9 およびプロテオグリカンの生成である。軟骨形成のモルフォゲンは、椎間板細胞の脱分化あるいは線維の表現型を、より若い椎間板核細胞および健全な成人の椎間板に匹敵する線維軟骨の表現型に戻し得る。それは椎間板の輪の細胞および / または終板の細胞に対して同化効果も有する。軟骨分化・保持因子は好ましくは分泌される分子であり、従って自己分泌、パラ分泌あるいは内分泌の形で潜在的に作用し得る。

20

【 0 0 3 1 】

本発明によれば、"間葉系幹細胞 (M S C s)"は、非抗原感作の間葉系前駆細胞として多くの成熟した骨格組織中に存在する原始あるいは休止細胞集団である。M S C s は柔軟性があり、且つ軟骨、骨、脂肪、および他の組織を含むいくつかの成熟組織型に向かって、それらの休止細胞に与えられる環境および生物学的信号に依存して、分化する能力を有する。M S C s は骨髄、血液、筋組織および脂肪を含む多くの自家の源から得ることができ、それを採取して著しい採取部の罹患率あるいは免疫原性の可能性なくそれらの細胞を単離できる。

30

【 0 0 3 2 】

M S C s は N P 細胞あるいは A F 細胞、軟骨細胞、あるいは A F または N P 細胞のように機能し得る、あるいは細胞に分化できる、または機能性 N P および / または A F を作る、他の生きた細胞の前駆細胞であってよい。

【 0 0 3 3 】

ここで使用される"処置するあるいは処置"は、障害あるいは疾患に関連する症状の緩和、症状のさらなる進行あるいは悪化の一時停止、疾患あるいは障害の治療あるいは予防を意味する。

【 0 0 3 4 】

本発明は軟骨分化・保持因子、例えば M I A (メラノーマインヒビトリー活性因子) 族の要素、例えば C D - R A P が同化作用 (例えば脊柱内の線維軟骨の再生あるいは回復) によって脊髄障害に影響あるいは修正できる一方、脊髄円板内の異化の変性過程 (例えば細胞外マトリックスの変性) を制止あるいは抑制できるという知見に基づいている。

40

【 0 0 3 5 】

軟骨分化・保持因子の脊髄障害における前記の効果は驚くべきことであり、なぜなら椎間円板 (I V D) の軟骨は他の一般的な軟骨とは非常に異なるからである。

【 0 0 3 6 】

硝子軟骨が挙げられる関節軟骨と対比して、I V D の軟骨は特殊なタイプの軟骨である線維軟骨から成る。特に、I V D の A F は線維軟骨状であるとみなされ、且つ非常に配向したコラーゲン線維で構成される薄層で主として成る。該 N P は、非常に高い濃度のプロ

50

テオグリカンを有し、ランダムに配向しているより高い含有率のタイプⅠⅠコラーゲンを含有する。A Fの細胞は薄層の優勢なコラーゲン線維の方向に沿って配向を示している。最内のA FおよびN P領域の細胞は、より丸く、且つより多くのタイプⅠⅠおよびⅠⅤコラーゲンおよびプロテオグリカンを蓄積している。

【0037】

線維軟骨と他のタイプの軟骨、例えば関節ノ硝子軟骨との間には著しい物理的および化学的な違いがある(WO 2005/091960号およびその中の参考文献)。例えば線維軟骨はそのマトリックス中に多くのタイプⅠコラーゲンを主に輪の中に有する点異なる。軟骨線維、例えばⅠⅤⅠ軟骨からのタイプⅠⅠコラーゲンは、関節軟骨からのタイプⅠⅠコラーゲンよりも実質的に高いレベルの水酸化およびグリコシル化を有し、アグリカンはより高度に置換されている。それらの翻訳後修飾は線維軟骨コラーゲンおよびⅠⅤⅠの構造および物理的機能に影響する。線維軟骨状のⅠⅤⅠの出生前分化もまた、滑膜性の連結における関節軟骨のものとは異なる。該ⅠⅤⅠは、複雑な発生歴を有しており、且つ関節軟骨における等価物がない脊索誘導細胞を含有する。

【0038】

本発明まで、本発明の軟骨分化・保持因子、例えばC D - R A Pが試験管内あるいは生体内で線維軟骨あるいは線維軟骨細胞の変性を阻止する生物学的効果を有することを示されていなかった。本発明の軟骨分化・保持因子はⅠⅤⅠにおける軟骨同化を誘発し、且つ保持する(例えばプロテオグリカンおよびアグリカンの合成)一方、マトリックスの分解、異常プロテオグリカンおよびコラーゲンの合成を含む、変性の病因および軟骨の異化を部分的あるいは完全に制止、阻害あるいは逆行さえもさせる。

【0039】

アポトーシスを増加し、且つマトリックス分子合成を減らす異常円板変性は少なくとも部分的にサイトカイン、例えば軟骨細胞を同化から異化に切り替えることが示されているⅠⅠ-1によって媒介され、分子および形態学的なレベルでの軟骨の分解を含む。サイトカインおよびM M P sの活性の抑制は、椎間板変性および/または本発明によって媒介される前記のサイトカインおよびM M P sの発現の減少に関与することが知られ、それが正常な椎間板マトリックスの再合成を助け、且つ椎間板の細胞機能に影響する。それによって、軟骨分化・保持因子の注入は、変性椎間板の老化あるいは変性過程の制止あるいは逆行を助ける。従って、本発明は初期段階の変性椎間板の治療を可能にし、且つそれによって細胞外マトリックスの変性を防ぎ、且つⅠⅤⅠの構造および機能を保護する。

【0040】

好ましくは、本発明の軟骨分化・保持因子は非抗体且つ非受容体分子である。これは本発明によって使用される因子が抗体でも受容体分子でもないことを意味する。前記の軟骨分化・保持因子は、好ましくは非転写因子であるか(例えばS O X - 9ではない)、あるいは好ましくは細胞外タンパク質である。より好ましくは、前記の軟骨分化・保持因子は形質転換成長因子 β (T G F - β 、例えばT G F - β 1)、骨形成タンパク質(B M P)およびインスリン様成長因子(I G F)族タンパク質(例えばI G F - 1)の群から選択されない。B M Pタンパク質はW o z n e yらによって記載され(W o z n e y and R o s e n, 1998)、且つ例えばB M P - 2、B M P - 7、および成長および分化因子、例えばG D F - 5、G D F - 6およびG D F - 7を含む。

【0041】

好ましくは、軟骨分化・保持因子は軟骨形成モルフォゲン、より好ましくはタンパク質、好ましくは軟骨に特異的なタンパク質であり、軟骨再生(同化因子)および保持のための同化活性を有する軟骨形成モルフォゲンである。異化因子、例えばメタロプロテイナーゼ、アポトーシス因子、インターロイキン、プロスタグランジン、タンパク質分解および破壊酵素、酸素遊離基、窒素酸化物および髄核領域の劣化を誘発するフィブロンекチン断片と対照的に、同化因子は軟骨細胞に特異的な表現型の細胞を椎間円板内で増加する。好ましくは、軟骨形成モルフォゲンは、好ましくは軟骨組織に対して特異的な軟骨決定因子であり、軟骨の形成及び保持を制御する一方、骨の形成を避けるかあるいは抑制する。

【0042】

1つの実施態様において、軟骨分化因子は、80 kDa未満、好ましくは 30 kDa、より好ましくは 15 kDa、最も好ましくは10～15 kDaの分子量を有する。

【0043】

本発明によって使用される軟骨分化・保持因子は特に、細胞外マトリックスタンパク質、例えばプロテオグリカン、アグリカンおよび/またはコラーゲンの合成を誘発する因子である。さらに好ましくは、該因子はサイトカインおよびMMPsの量の減少をもたらす。

【0044】

1つの実施態様において、軟骨分化・保持因子はSH-3ドメインを有するタンパク質あるいはSH3様のドメインフォールドを採用するドメインを有するタンパク質、例えばCD-RAPの群から選択される。SH-3ドメインあるいはSH3様ドメインは例えばStoll et al. (Stoll et al., 2001b)内に記載され、且つKelley et al. (Kelley et al., 2000)内に発表された3D-PSSMウェブサーバによってSH-3フォールドの予測によって決定できる。Src相同領域と呼ばれるSH3ドメインもまた、多くの細胞内タンパク質内で見られるタンパク質分子である。これまでのところ、脊髄障害の治療に有用であると記載されたSH3ドメインタンパク質はなかった。

【0045】

他の実施態様において、軟骨分化・保持因子は、フィブロネクチン、フィブロネクチン断片および/または多プロリン配列に特異的に結合できるタンパク質であり、例えば文献(Stoll et al., 2001a; Homandberg and Hui, 1996; Homandberg et al., 1997)内に記載される。

【0046】

1つの実施態様において、軟骨分化・保持因子は、フィブロネクチンあるいはインテグリン結合ドメインを含む。軟骨分化・保持因子の細胞外タンパク質、例えばフィブロネクチン、フィブロネクチン断片並びにインテグリンへの結合は、例えばELISAによって測定できる。フィブロネクチン、それらの断片あるいはインテグリンをプラスチック表面に被覆し、そして軟骨分化・保持因子に暴露できる。結合している量を、軟骨分化・保持因子に対する、ペルオキシダーゼと連結した単クローン性抗体によって測定できる。インテグリン結合も、Bauerらによって記載されたように測定でき、ここで参照をもって開示されたものとする。

【0047】

好ましくは、軟骨分化・保持因子はa) CD-RAP (配列番号1)の成熟配列およびそれらの機能性断片あるいは変型物を含むあるいは有する軟骨細胞タンパク質、b) CD-RAPのC末端4システイン骨格、配列番号1の12～107のアミノ酸と少なくとも63%、好ましくは80%、より好ましくは90%のアミノ酸配列相同性を有するタンパク質、c) ここで定義される総称配列1～3 (配列番号2、3および4)のどれかを有するタンパク質の群から選択される。

【0048】

CD-RAPと同様の生物学的機能を有する機能性断片は、好ましくは配列番号1に示される配列の少なくとも20、特に少なくとも40、およびより好ましくは少なくとも50、最も好ましくは80の連続するアミノ酸の長さを有している。好ましくは、機能性断片は配列番号1の1～50、1～70、1～80、20～80、20～107の位置からのアミノ酸を含む。

【0049】

成熟CD-RAP配列 (配列番号1)

10

20

30

40

【化 1】

GPMPKLADRKLCADQEC SHPISMAVALQDYMAPDCRFLTIHRGQVVYVFS
 KLKGRGRFLFWGGSVQGDYYGDLAARLGYFPSSIVREDQTLKPGKVDVKT
 KWDFYCQ

【0050】

総称配列 1 (配列番号 02)

【化 2】

CX₄CX₁₇CX₁₂VX₁₁₋₁₃WX₇₋₁₈FX₄VX₂₁CX

10

【0051】

総称配列 2 (配列番号 03)

【化 3】

KXCXDXECX₁₁DX₃PDCX₁₂VX₂KLX₇₋₉WXGSX₅₋₁₃GYFPX₃V
 X₁₈DFXCX

【0052】

総称配列 3 (配列番号 04)

【化 4】

KXCXDX₂CX₈AX₂DX₃PDCRFX₅GXVX₅KLX₇WXGSVX₁₂G
 YFPX₂₂DFXCQ

20

[式中、

"X"はそれぞれの出現で独立して任意のアミノ酸を表し、且つ小文字の数字は任意のアミノ酸の数を表す。好ましくは"X"は独立して天然産出アミノ酸、および特に A、R、N、D、B、C、Q、E、Z、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y または V を表す。]

特に好ましくは、軟骨分化・保持因子は CD-RAP (軟骨由来レチノール酸感受性タンパク質) であり、MIA (メラノーマインヒビトリ活性)、OTOR (線維細胞由来タンパク質、FDP、MIA 様、MIAL) および分泌タンパク質の類に属する TANGO130 と名付けられている (Bosserhoff et al., 2004; Bosserhoff and Buettnner, 2003; Bosserhoff et al., 1997; WO00/12762 号)。CD-RAP あるいは MIA は、軟骨様分化に非常に特異的なマーカーである 130 のアミノ酸のタンパク質 (EP0710248 号、EP1146897 号、これらは参照をもってその全文が開示されたものとする) である。遺伝子発現は軟骨形成の始めから軟骨発達を通して活性化される (Dietz and Sandell, 1996; Sakano et al., 1999)。変形性関節症による軟骨損傷の場合、CD-RAP は疾患の開始に増加したレベルで発現し、そのとき強い同化効果が観察され、且つ一度疾患が悪化すると下落する (Saito et al., 2002)。

30

40

【0053】

ここで考えられるタンパク質は、原核あるいは真核宿主細胞内で完全または欠損形のゲノム DNA または cDNA から、あるいは合成 DNA から発現し得る。タンパク質を培地あるいは封入体から単離し、および/または再フォールディングして生物活性組成物を形成できる。CD-RAP の組み替えタンパク質精製のための例示的なプロトコルに関する、例えば EP0710248 号および Loughheed et al. (Loughheed et al., 2001) を参照。前記の単離されたタンパク質の活性 (例えば軟骨形成) をどう試験するかについての詳細な記載は、Tschundschild et al. および Stoll et al. (Tschundschild et al., 2001) を参照。

50

uren et al., 2005; Stoll et al., 2003)に記載され、ここで参照をもってその全文が開示されたものとする。軟骨誘導のための生物評価法は、E P 1 1 4 6 8 9 7号内の実施例2～5に記載され、ここで参照をもって開示されたものとする。実施例5は、軟骨誘導のためのマウスの異所移植評価を記載する。選択的に軟骨誘導および保持は、部分的あるいは全部の厚さの関節性軟骨修復モデルにおいて測定できる。

【0054】

本発明の1つの実施態様において、脊髄核インプラントはさらには1つあるいはそれより多くの追加的な活性剤、好ましくは抗異化剤（例えばT I M P - 1およびT I M P - 2）、マイトジェン（例えばI G F - 1、P D G F、E G F、F G F）、骨形態形成タンパク質、例えばG D F - 5、B M P拮抗物質、例えばノギンまたはコーディンおよび/または細胞内調整物質（例えばL M P - 1、S O X - 9）あるいはそれらの組み合わせを含む。抗異化剤の添加はさらに、軟骨分化・保持因子または軟骨形成モルフォゲンによって媒介されるマトリックス合成を、例えば分解性酵素の抑制によって増加させる。マイトジェン分子は、細胞の有糸分裂率を増加させ、且つ細胞が誘発され、従って軟骨分化・保持因子あるいは軟骨形成モルフォゲンの効果をさらに支持する椎間板の領域に依存してP G合成を様々な度合いに増加し得る成長因子である。軟骨分化・保持因子を細胞内調整物質と組み合わせることによって、軟骨分化・保持因子のアップレギュレーションおよび/またはP G合成が試験管内の実験で実現できる。

【0055】

他の実施態様において、脊髄核インプラントはさらには1つあるいはそれより多くの抗メタロプロテイナーゼ、サイクリン化合物、サイトカイン拮抗物質、T N F抑制剤、I L抑制剤、抗血管新生物質、タンパク質分解酵素の抑制剤、抗炎症薬を含み、インフリキシマブ(inflximab)、エタネルセプト(etanercept)、アダリムマブ(adalimumab)、ネアリモンマブ(nerelimonmab)、レナーサート(leranercept)およびその類、あるいはそれらの組み合わせを含む。

【0056】

他の実施態様において、脊髄核インプラントを、化学髄核分解剤、例えばC - A B CあるいはU S 2 0 0 5 / 0 0 3 1 6 6 6号内で記載されているものの注入あるいは適用の後、同時投与あるいは投与して、椎間板の長期的な構造損傷を防止する。

【0057】

好ましくは、脊髄核インプラントは椎間板を介して注入可能あるいは移植可能である。好ましくは、該注入は部分的であるか、または全身性ではない注入である。椎間板を介した注入あるいは移植の利点は、軟骨分化・保持因子のより高い濃度が使用できる一方、最小の全身毒性しか生じないことである。

【0058】

軟骨分化・保持因子あるいはI V D修復剤を、許容できる溶剤あるいはビヒクル、例えば限定されずに生理食塩水、滅菌水、リンガー溶液中で直接的に移植あるいは注入できる。好ましくはそれを椎間板内部あるいはN P空間内に投与する。投与は単独あるいは繰り返しの注入によって、好ましくは経皮注射あるいはカテーテルを介して経皮的に実施してよい。軟骨形成タンパク質、好ましくはC D - R A Pの椎間板内部への注入は、椎間円板の細胞を刺激してプロテオグリカン、アグリカンおよび/またはコラーゲン合成をアップレギュレートすることによって、椎間円板の高さを増加する。臨床的な適用は従って、最小の侵襲技術によって実施でき、著しくコストおよび他の方法、例えば部分的椎間板切除術あるいは脊椎椎体固定術に関連する合併症の尤度を削減する。

【0059】

本発明の脊髄核インプラントを椎間円板に加えることが可能である一方で、椎間円板の一部を除去し、そしてそれを本発明のインプラントで置換することも可能である。

【0060】

従って本発明は、例えば髄核摘出あるいは部分的な髄核摘出法において除去された量の

10

20

30

40

50

N Pの置換、あるいは年齢、怪我の理由で変性しているN Pあるいは本発明の髄核インプラントと同様のものの補充も提供する。変性している椎間板、または変性した椎間板あるいはそれらの一部を、レーザー、シェーバー、あるいは他の手術器具を用いた標準的な技術によって除去できる。

【0061】

変性椎間板は無傷あるいは破裂した椎間板であってよい。変性している椎間板は離層し、ひびを有し得るか、あるいはヘルニアになり得る。

【0062】

脊髄核インプラントを最小の侵襲安定化法によって結合できる。連続した刺激が望ましくない因子、例えば異化因子の生成をもたらす進行椎間板変性の重症の場合、最小の侵襲安定化法がさらに再生を助けられるか、あるいは変性した椎間板の進行を抑制できる。

10

【0063】

本発明の1つの実施態様において、該インプラントあるいは配合物はさらに担体あるいは薬物送達機構を含む。本発明で使用される担体あるいは薬物送達機構は生体適合性があり、毒性ではなく、且つ体内で炎症性反応を引き出さない。該担体はマトリックスあるいは足場構造を含んでよい。該担体は固体、液体、ゲル、ペースト、あるいは他の注入可能な形態であってよい。好ましくは、該担体はヒドロゲル、例えばWO 2005 / 113032号内に記載される、特に注入可能なヒドロゲル、硫酸ヒアルロン酸、高度に置換されたカルボキシメチルセルロースおよびそれらの塩、アルギネート、ヒドロキシプロピルアルギネート、キトサン、ヒドロキシエチルスターチ、コラーゲン、ゼラチン、反転熱性ゲル (reverse thermal gels) (例えばプルロニック F128)、キトサンベースの感熱性コポリマー (例えばキトサン - プルロニック (登録商標) ヒドロゲル)、多孔質シルク足場、複数の小球体、リポソーム配合物およびヒドロキシアパタイト繊維メッシュを含む。該担体はIVD細胞の内植、増殖および居所に適した細胞の適当な基材である。

20

【0064】

該担体はポリマー、例えばプルロニック、例えばプルロニック168、エチレン酸化物およびプロピレン酸化物のブロックコポリマー、例えばWO 2005 / 034800号内に記載されるものを含んでよい。

【0065】

30

好ましくは、該担体はコンドロイチン硫酸、ゼラチン、ヒアルロナンおよび/またはヒアルロン酸ナトリウムあるいはそれらの組み合わせを含んでよく、三元系のコポリマー、例えばゼラチン/コンドロイチン6硫酸/ヒアルロナン三元系コポリマーを含む。三元系コポリマーの製造は、Yang et al. (Yang et al., 2005) 内に記載されており、ここで参照をもってその全文が開示されたものとする。

【0066】

該担体は多血小板血漿、生分解性ゼラチンヒドロゲルを有する多血小板血漿、フィブリン/ヒアルロン酸複合体、因子封入ゼラチンヒドロゲル小球体、例えばポリマー、例えばオリゴ(ポリ(エチレングリセロール))フマレート、ポリラクチド(PLA)/ポリグリコール酸(PGA)およびポリイブシロンカプロラクトンを含む注入可能な生分解性ヒドロゲル複合体で構成されるフィブリンゲルを含んでよい。

40

【0067】

好ましくは、該担体はキトサン - グリセロールホスフェートあるいはそのままの血餅あるいはキトサン - グリセロールホスフェート溶液で安定化された血餅を含む。

【0068】

本発明の1つの実施態様において、脊髄核インプラントはさらに徐放機構、例えばヒドロゲル、多価陰イオン性ヒドロゲル、複数の小球体、リポソーム配合物およびヒドロキシアパタイト繊維メッシュを含む徐放機構を含む。該徐放機構は、特に制御された放出を可能にする。

【0069】

50

1つの実施態様において、徐放機構は、連続的な放出を提供し、他の実施態様においては、徐放機構は間欠的な放出を提供する。

【0070】

1つの実施態様において、軟骨分化・保持因子はリポソーム内に封入されている。該リポソームは結晶性溶液を超える利点を有しており、治療剤のより長い持続および適用部位でのより緩慢なクリアランスに加えて、椎間円板内の機械的な刺激を避けられ、それ故に治療に誘発される炎症を避けられる。

【0071】

治療用化合物および他の薬剤の送達効率改善のための1つの方法は、脂質構造、例えばリポソーム内への封入である。リポソームは一般に、典型的には水性媒体中に化合物を含むコアを有する密閉された脂質液滴を含む。特定の実施態様において、該化合物は化学的に脂質成分と結合しているか、あるいは単にリポソームの水性内部区画内に含有されている。

【0072】

本発明によって提供される軟骨分化・保持因子を含む医薬組成物あるいは脊髄核インプラントは、好ましくは再構成してリポソーム封入軟骨分化・保持因子を生成できる乾燥したリポソーム組成物として提供される。好ましくは、リポソーム調剤は水溶液中の再構成においてリポソーム封入された軟骨分化・保持因子を形成する乾燥再構成ビヒクル(DRVs)である。ここで使用されるリポソーム組成物は、例えば水の添加で分散して生物活性成分を含む多層板状のリポソーム配合物を形成する乾燥した顆粒品である。有利なことに、安定化の問題、例えば活性剤および/またはリポソームの凝集あるいは酸化は乾燥リポソームの使用によって避けられる。

【0073】

個々に存在する、あるいは混合物で、配合物において使用するのに適した脂質は、中性あるいは正に帯電した脂質、例えばコレステロール、ホスファチジルコリン、水素化ホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ジオレイルホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルグリセロール、ホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルコリン、ガングリオシド、セラミド、ホスファチジイルノシトール、リン酸、ジセチルホスフェート、ジミリスチン酸(dimyristol)ホスファチジルコリン、ステアリルアミン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロールおよび他の同様の脂質を含む。好ましくは、該脂質配合物は帯電している。該リポソーム配合物は典型的には少なくとも2つの脂質、例えばコレステロールおよびホスファチジルコリンの混合物であり、且つより普通には3つあるいはそれより多くの脂質の混合物である。

【0074】

他の実施態様において、本発明の軟骨分化・保持因子はペグ化されている。この修飾された軟骨分化・保持因子は非修飾の薬剤よりも長い生物学的半減期を有し、従って脊髄障害の医学治療のための薬剤の効率を改善できる。ペグ化はタンパク質のサイズを増加させ、安定性を改善し、タンパク質の溶解性を増加させ、タンパク質分解を低下させ、且つ投与頻度を減少させられる。さらには、タンパク質の凝集の傾向を低下できる。

【0075】

ペグ化はタンパク質上のアミノ基あるいはスルフヒドリル基と、ポリエチレングリコール(PEG)上の化学的反応性基(カーボネート、エステル、アルデヒドあるいはトレスレート(tresylate))との間の安定な共有結合を介して実現する。得られる構造は直鎖あるいは分岐鎖であり得る。PEG試薬は例えばRoberts et al. (Roberts et al., 2002)内に記載される。他のペグ化剤は限定されずに、メトキシポリ(エチレングリコール)(mPEG)、メチルPEO₁₂マレイミドPEG、アミン反応性メチルキャップポリエチレン酸化物(PEO)含有改質剤(メチルPEO_n-HNSエステル、n=4, 8, 12)である。

【0076】

他の実施態様において、本発明の脊髄核インプラントは髄核組織あるいは細胞、好ましくは間葉幹細胞（MSCs）から誘導される細胞を含む。

【0077】

供与体組織（例えば骨髄間質）から単離されたMSCsあるいは自己幹細胞は、3次元生分解性足場材料、例えばヒアルロン酸、シルク、コラーゲン、コラーゲン/ヒアルロナン足場、ヒドロゲル、キトサン、キトサンゲル、注入可能で架橋可能なポリマー製剤、分解性のポリマーゲルあるいは足場、ポリラクチド、ゼラチン/コンドロイチン6硫酸/ヒアルロナン足場、エステルあるいはヒアルロン酸の誘導体、例えばHyaff 11、ヒドロキシapatite繊維メッシュおよびフィブリングルーの中あるいは上で、軟骨分化・保持因子の単独あるいはそれらの細胞の髄核様細胞への分化を助け、且つ好ましくは酸素分圧の下でPG合成を刺激する他のモルフォゲンまたは成長因子、例えばIGF-1の類あるいはBMPsとの組み合わせでの存在下で培養できる。培養の方法は例えばHonda et al., 2000内に記載されており、ここで参照をもって開示する（Honda et al., 2004）。そのように培養された細胞あるいは新組織を、好ましくは足場材料と共に、その後、変性椎間板内に移植あるいは注入してNPの再生を実現する。

【0078】

単層培養において例えば試験管内の低酸素条件の下で、椎間円板のNP領域で生じるように、MSCsを単離および増加することも可能である。移植に進むMSCsを、IVD治癒を刺激するために必要である1つあるいはそれより多くの軟骨分化・保持因子で形質移入することができるか、あるいは前記の軟骨分化・保持因子（例えばCD-RAPあるいはそれらの活性断片）を含有する軟骨形成誘導媒体で刺激できる。好ましくは、前記の軟骨分化・保持因子、例えばCD-RAPタンパク質あるいはそれらの活性断片をコードする発現ベクターによって形質移入を実施する。形質移入された、および/または刺激されたMSCsあるいは培養されたMSCsを、好ましくは生体材料、例えばコラーゲン、アテロコラーゲンゲル、ゼラチン、アルギネート、ヒドロキシプロピルアルギネート、カルボキシメチルセルロース、あるいはヒドロエチルスターチ内に埋め込んで、注射、例えばインスリンマイクロ注射器（Sakai et al., 2005）あるいは他の適用機構によって変性椎間板内に移植できる。細胞密度は例えば 1×10^4 個/ml ~ 1×10^7 個/ml、好ましくは 1×10^5 個/ml ~ 1×10^6 個/mlであってよい。

【0079】

MSCsをアルギネート、ペレット、マイクロマスあるいは凝集細胞培養物中で、軟骨分化・保持因子の単独あるいはそれらの細胞のNP様細胞への分化を助ける他のモルフォゲンまたは成長因子、例えばTGF- β 類および/またはBMPs（例えばBMP-2）との組み合わせの存在下で培養してもよい。

【0080】

1つの実施態様において、送達機構はMSCsあるいはAF細胞を3-D多孔質シルク足場と組み合わせで含む。該多孔質シルク足場はカイコガから抽出されるシルクフィブロインから誘導されてよい。該細胞を未分化で増加でき、且つ軟骨分化・保持因子と共に培養することによって軟骨細胞に誘導できる。シルク足場を、直接的に、あるいは軟骨分化・保持因子に装填して、MSCsあるいはAFと共に接種でき、且つ軟骨分化・保持因子単独あるいは上述の他の因子との組み合わせに追加して、あるいはそれらを用いずに、媒体中で培養できる。カイコガの繭からのシルクフィブロイン足場は、例えばSofia et al. および Karageorgiou et al. (Sofia et al., 2001; Karageorgiou and Kaplan, 2005) 内に記載されるように抽出できる。

【0081】

1つの実施態様において、AF、NP、あるいはMSC細胞を、軟骨分化・保持因子のための少なくとも1つの遺伝子を用いて生体外で形質移入し、IVD治癒を刺激するのに必要とされる細胞および1もしくは複数のタンパク質の両方を提供でき、そして例えば単

10

20

30

40

50

層培養、アルギネートビーズあるいは3次元生分解性足場材料中での培養を用いて、あるいは用いないで、目標とする宿主組織内に再移植する。1つの実施例として、単離されたNP細胞を単層として接種し、次に例えば発現ベクターあるいはウィルス性の遺伝子治療ベクター、例えばアデノウィルスあるいはアデノ関連ウィルス(AAV)を含む軟骨分化・保持因子を用い、形質移入剤、例えばFuGene6試薬を使用して形質移入する。培養の数日後(例えば7日後)、細胞を継代させ、そしてアルギネート、例えば好ましくは約0.5~2%のアルギネート中に封入する。遺伝子の発現を標準的な方法、例えばRT-PCRあるいはELISAによって分析できる。アルギネートビーズ中のそれらの形質移入された髓核細胞をIVDの組織工学および変性円板疾患のための治療に使用できる。さらなる遺伝子治療法は例えばWells, 2004、Paul et al., 2003およびSobajima et al., 2004内に記載されている。

10

【0082】

1つの実施態様において、細胞、例えばNF細胞、MSCsあるいは好ましくはヒト由来の自己軟骨細胞を、IVD治癒の刺激に必要な軟骨分化・保持因子をコードする、例えば組み換え型シミアンウィルス40アデノウィルスベクターあるいはバキュロウィルスベクターを使用して一過的に不死化する。

【0083】

他の実施態様において、変性したヒトIVD細胞(例えばNP細胞)を、外因性因子、例えば軟骨分化・保持因子を運搬するアデノウィルスベクターで形質移入できる。次の段階で、次にそれらの修正した細胞を注入してIVD患部に戻す。

20

【0084】

本発明は、本発明の軟骨分化・保持因子を、治療を必要とする哺乳類、特にヒトにおける脊髄障害の治療のための医薬組成物の製造のための間葉幹細胞の培養に用いる使用にも関する。

【0085】

本発明を図および実施例によってさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】CD-RAPを含むリポソーム配合物の数日間にわたる安定性(三角)を説明する図である。リポソーム配合物の安定性を実施例3によって測定した。上の曲線(四角)は、緩衝液中、37℃でのCD-RAPの安定性を示し、それらの条件の下でのタンパク質の安定性を定量する。

30

【図2】フィブリン血餅系中の50μgのCD-RAPの、37℃で24時間後の固定化を示す。A: Tachotop(登録商標)、直径14mm、高さ4mm、Nycomed製; B: プタのタイプIコラーゲンスポンジ、BiomUp; C: 水和したHyaloFill-F。

【図3】CD-RAP(100ng/ml)での刺激で培養されたウサギIVD細胞のプロテオグリカン(GAG)誘導の、CD-RAPおよびBMP-2(n=3)の添加なしでのネガティブコントロールに対する割合(%)を示す図である。

【0087】

40

実施例

実施例1: 線維輪穿刺モデル

この実施例ではCD-RAPの注入がウサギの輪状穿刺モデルにおける椎間板高さの部分的な回復に効果的である。

【0088】

椎間板変性は若いニュージーランドシロウサギにおいて、特定の針ゲージを使用した椎間板の線維輪の穿刺によって誘導できる(Singh et al., 2005)。椎間板の背側の領域へのリドカイン注射による局所麻酔の準備の後、横向きの平面の放射線写真を撮って、IVDの高さの注射前の基線値を測定する。その後、該ウサギを横向きの腹臥位で置き、そして後外側後腹膜の進入路を使用して腰部IVDsを露出する。それぞ

50

れのウサギにおいて、AFを18G針で穿刺する。4、8および10週間後、該動物に緩衝食塩水（アルギニンリン酸またはPBS）、あるいはコントロールとしてのビヒクルリポソーム、あるいは2.5mg/ml～10mg/mlのCD-RAP（PBS中）のタンパク質溶液、あるいはリポソーム封入CD/RAP（2.5mg/ml）の髄核中への注射を受けさせる。該動物を8あるいは12週間（誘導および治療期間）追跡する。症状発現前の転帰を、腰部脊椎の核磁気共鳴映像法（MRI）走査によって分析し、画像処理ソフトウェアを使用した特注のプログラムを用いて測定したX線観察によって、IVDの高さをモニターし、そして%DHI（手術後のDHI/手術前のDHI×100）を計算する。IVDの組織分析のために、切片をヘマトキシリンエオシンおよびサフラニンOで染色する。群の中での違いを、一元配置分散分析（ANOVA）を使用して統計上の有意性に対して評価する。選択的なゆっくりとした進行および椎間板変性治療の再現性のある動物モデルは、Sobajima et al.（Sobajima et al., 2005）内に記載されているように、LipsonおよびMuirの典型的な"穿刺モデル"である。前記の穿刺法のために、ニュージーランドシロウサギのAFに切開を施す。それぞれのウサギは、1匹はCD-RAPで、他は食塩水あるいはビヒクルで治療された椎間板を有する。

10

【0089】

前記の輪状針穿刺モデルは、12週間の観察期間で円板の狭窄をもたらす。食塩水治療された椎間板は、椎間板の広範囲の変性を示す。しかしながら、%DHIは、食塩水あるいはビヒクルを注射された円板と比較して、CD-RAP群の維持された椎間板高さの傾向を明らかにする。組織分析は、コントロール群と比較してプロテオグリカン合成および変性変化に対する防御の増加を示す。

20

【0090】

実施例2：CD/RAP含有リポソームの調製

持続性リポソーム調剤の調製のため、750mgのホスファチジルコリンおよび250mgのコレステロールを、丸底フラスコ内の20mlのエタノール中に溶解した。該溶剤を回転蒸発器内で計量的に除去した。生成した薄い脂質膜を10mlの水中で再水和させ、室温での緩やかな攪拌によってリポソーム（脂質10%（質量/容積））を得た。ユニラメラベシクル（SUV）をおよそ100nmの直径で、次の音波処理によって調製した。300μlのSUVを250μlのCD-RAP溶液（420mM/lのArg/PO4中に3mg/ml pH7.5）と混合し、そして次に凍結乾燥させた。該タンパク質を封入している多重膜リポソーム（MLVs）を、蒸留水での溶解ケーキの再構成によって、乾燥した再構成ベシクルの適用直前に生成させた。この再水和は、約1.5μmあるいはそれより大きい平均直径を有するMLVs内への約50%あるいはそれより高い取り込み効率を、取り込み剤の化学的変質なくもたらした。

30

【0091】

実施例3：CD-RAPを含むリポソーム配合物の安定性

この実施例は、CD-RAPを含むリポソーム配合物の数日間にわたる安定性を説明する。リポソーム配合物の安定性を以下のように測定した：

120μgのCD-RAPを上述のように300μlのリポソーム分散液中で封入した。100μlの分割量を、300μlの二段蒸留水（bidestilled water）で希釈し、そして15分間、16000rcfでの遠心分離によって分離した。封入効率を測定するため、封入されていないCD-RAPをRP-HPLCによって標準曲線を使用して定量化した。再懸濁および遠心分離工程の6回の繰り返しは、遊離のCD-RAPの増加を示さなかった。

40

【0092】

その放出を7日の期間中、遠心分離（16000rcfで15分間）で分離された上澄み中の遊離のCD-RAP濃度を測定することによって記述した。それぞれの時点で、遊離のCD-RAPの量をRP-HPLCによって、標準曲線を使用して測定した。

【0093】

50

図1に示される結果は、50%より多い、高い封入効率を示す(時間0[d])。次の観察の間、7日間までの期間、37で約45%の封入の維持で平坦域に達し、従って再構成されたCD-RAPを含むリボソームの安定性を示す。

【0094】

実施例4: CD-RAP固定化インプラント

この実施例は足場に基づいたコラーゲンあるいはヒアルロン酸中のCD-RAP固定化インプラントを説明する。

【0095】

50 μ gのCD-RAPを125 μ l、20mMのKH₂PO₄、150mMのKCl、KOH、pH7.5、0.01%のツイーン80中で配合した。該溶液をコラーゲンスポンジ(A:Tachotop(登録商標)(A)、直径14mm、高さ4mm、Nycomed製; (B)ブタのタイプIコラーゲンスポンジ、BiomUp; または500 μ lのHyaффゲルとの混合物(再水和Hyalofill-F(C)、0.5mlの二段蒸留水中、30mg、3時間、5)中に浸透させ、CD-RAPを吸収させた。次に、その水を凍結乾燥によって除去した。

【0096】

コラーゲンあるいはHyaфф上に吸収されたCD-RAPの固定化速度論を測定するために、CD-RAP含浸試験片を500 μ lのウシ・フィブリン血餅(4.9mgのフィブリノーゲン、50mMのクエン酸ナトリウム中の0.3Uのトロンビン、150mMの塩化ナトリウム、10mMの塩化カルシウム、pH6.4)内に、Meyenburg et al. (Meyenburg et al., 2000)によって記載されるように固定した。その血餅をその後、2mlの受容媒体(ホスフェート緩衝食塩水、0.02%のツイーン80)によって完全に覆った。遊離のCD-RAPの量を24時間後にRP-HPLCによって標準曲線を使用して定量化した。

【0097】

図2に示される結果は、組み換え型CD-RAPタンパク質に対して強い結合特性を示す材料AおよびCを有する様々な生体材料の固定化効率における違いを示す。それらの結合特性を欠陥、例えば変性椎間板の部位内で、高い初期のCD-RAPのバーストを避け、且つ再生部位での長期間の維持を提供しながら、軟骨分化・保持因子の局所的な標的および保持に使用できる。

【0098】

実施例5: ヒトおよび動物の椎間円板細胞の単離

この実施例は、CD-RAPの軟骨細胞刺激および同化活性に対して特異的な細胞外マトリックス成分の製造におけるCD-RAPの効果を分析するために有用なIVD細胞の調製方法を説明する。

【0099】

ヒトの椎間板細胞を、変性円板疾患を有する患者の治療で実施された、椎間板切除術(dissectomy)によって回復したヒトの椎間板組織から単離できる。該試験片(髄核あるいは線維輪)をPBSで濯いで残留している血液あるいは細胞外マトリックスを除去する。その組織を切り刻んだ後、コラゲナーゼ溶液(0.5mg/ml、PBS中)を有する細胞外マトリックスから37、45分間、細胞を放出させ、そして細胞を遠心分離によって単離できる(Klagsburn, "Methods in Enzymology", Vol VIIを参照)。上澄み液の除去後、回収した細胞を、ウシ胎児血清を有するまたは有さないイーグル最小必須培地内の6ウェルプレート上で生長させる。

【0100】

ウシIVD細胞を動物組織から逐次の酵素の消化によって単離する。細胞を、10%のウシ胎児血清、25 μ g/mlのアスコルビン酸塩、360 μ g/mlのL-グルタミンおよび50 μ g/mlのゲンタマイシンを補ったDMEM/F12培地を、毎日培地を交換して、加湿雰囲気中、37で5%のCO₂を用いて、細胞が約80%の集密度に達するまで培養する。

10

20

30

40

50

【0101】

ウサギ IVD 細胞を動物組織から逐次の酵素の消化によって単離した。細胞を、10% の FCS、1% のペニシリン/ストレプトマイシン、および 50 ng/ml のアスコルビン酸を補った DMEM 培地中で、加湿雰囲気中、37 °C で 5% の CO₂ を用いて、細胞が約 90% の集密度に達するまで培養した。その後、それらを継代し、そしてさらに 7 日間培養する。

【0102】

実施例 6：アルギネートビーズ中での椎間円板細胞の培養

アルギネートビーズを、実施例 5 の IVD 細胞を有する 0.15 M NaCl 中の 60 μl、1.2% のアルギネートを 102 mmol/L の塩化カルシウム溶液の中に圧出することによって形成し、半固体のビーズを形成する。該ビーズを 2 回洗浄し、そして 1 ml の培地を有する 12 ウェルプレート内に設置する (Aota et al., 2005)。得られるアルギネートビーズを、プロテオグリカン合成およびアグリカン発現に対して CD-RAP の添加を用いて、あるいは用いないで、フィブロネクチン断片 (120 kDa の断片 (Chemicon, Cat. No. F1904)、ヒト血漿からの 70 kDa のフィブロネクチンタンパク質分解性断片 (Sigma, Cat. No. F0287)) の影響の分析に使用できる。

【0103】

実施例 7：IVD 細胞内でのアグリカンおよびプロテオグリカン合成の CD-RAP に媒介された誘導

この実施例は脊髄インプラントの使用を説明し、CD-RAP が IVD 細胞に添加されたとき、培養の間に著しく IVD 細胞のプロテオグリカン合成およびアグリカンの発現を増加することを実証する。

【0104】

実施例 5 の 7 日目の細胞を、プロテオグリカン合成およびアグリカンの発現を調査するために 24 ウェルプレート内に設置する。細胞を 7 日より多い日数の間、0.5 μM および 0.1 μM の 70 kDa のフィブロネクチン断片 (F0297 Sigma) を有する無血清培地中で培養する。プロテオグリカン合成およびアグリカンの発現に対する CD-RAP の影響を分析するために、種々の濃度の CD-RAP (1、5、10、20 μg/ml) を、フィブロネクチンを用いた培養の 2 日後に添加する。7 日後、アグリカンの発現を、ライトサイクラー分析 (Sybr Green) によって分析する。

【0105】

細胞をビーズから解放するために、55 mmol/L のクエン酸ナトリウム、30 mmol/L の Na₂EDTA、0.15 M の塩化ナトリウムを含有する pH 6.8 の緩衝液中で該ビーズを可溶化する。該細胞のペレットを洗浄し、そして RNA 抽出のための溶解緩衝液 (Qiagen) 中に再懸濁する。RNA の単離を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用して実施する。cDNA 合成を Invitrogen の Superscript II RT キットの指示書に従って実施する。β-アクチンをコントロールとして使用する。増幅のために使用されたプライマーは、以下のもの：a) ウシ β-アクチンプライマー 5' GGA AAT CGT CCG TGA CAT CAA 3' ; 5' AAG GAA GGC TGG AAG AGA GC 3' であり、アグリカンプライマーは、5' AAG AGA GCC AAA CAG CCG A 3' ; 5' CTG GTA GTC CTG GGC ATT GT 3' であった。

【0106】

プロテオグリカン合成を、Farndale et al. (Farndale et al., 1982) 内に記載された方法によるジメチルメチレンブルー (DMMB) 比色分析を使用して測定する。その培養培地をセントリコンフィルターで 10 ~ 20 分間、5000 rev/分 で濃縮できる。GAG 含有率を、20 μl の濃縮した培養培地、あるいは 200 μl の DMMB 溶液で希釈した培養培地を混合し、そして 525 ~ 530 nm

10

20

30

40

50

mの光学密度を測定することによって測定できる。標準化のために、コンドロイチン硫酸（コンドロイチン硫酸A 94%、ウシの気管、ICN）を使用できる。全ての測定の平均を、1マイクログラムあたりのDNAあるいは細胞数で計算する。

【0107】

実施例8：ウサギの椎間円板細胞内のプロテオグリカン誘導

実施例5によって単離されたウサギのIVD細胞が90%の集密度に達したとき、細胞を6ウェルプレート内に設置してプロテオグリカン合成を調査した。細胞を5日より長い間培養した。CD-RAPのプロテオグリカン合成への影響を分析するため、培地を1%のFCSに変更し、且つBMP-2（100ng/ml）を単独あるいはCD-RAP（100ng/ml）との組み合わせで該培地に添加した。5日後、プロテオグリカン合成を細胞培地の上澄み中で、実施例7に記載されたように、ジメチルメチレンブルー（DMMB）比色分析を使用して測定した。3つの独立した実験のGAG刺激の結果を図3にまとめる。それらのデータは、CD-RAPのBMP-2で刺激されたIVD細胞への添加が、培養されたウサギのIVD細胞においてGAGの増加をみちびくことを示す。

10

【0108】

ここで開示される全ての参考文献は、参照をもってその全体が特に開示されたものとする。

【0109】

好ましい実施態様が説明および記載されているが、当業者によれば、特許請求の範囲に定義されたそのより広い側面において本発明から逸脱することなく変更を行うことが可能であることが理解されるべきである。

20

【0110】

参考文献リスト

【表 1 - 1】

Aota,Y., An,H.S., Homandberg,G., Thonar,E.J., Andersson,G.B., Pichika,R., and Masuda,K. (2005). Differential effects of fibronectin fragment on proteoglycan metabolism by intervertebral disc cells: a comparison with articular chondrocytes. *Spine* 30, 722-728.

Bauer,R., Humphries,M., Fassler,R., Winklmeier,A., Craig,S.E., and Bosserhoff,A.K. (2006). Regulation of integrin activity by MIA. *J Biol Chem* 281, 11669-11677.

10

Bosserhoff,A.K. and Buettner,R. (2003). Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocyte differentiation. *Biomaterials* 24, 3229-3234.

Bosserhoff,A.K., Kondo,S., Moser,M., Dietz,U.H., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., Buettner,R., and Sandell,L.J. (1997). Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Dev. Dyn.* 208, 516-525.

20

Bosserhoff,A.K., Moser,M., and Buettner,R. (2004). Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO. *Gene Expr. Patterns.* 4, 473-479.

Dietz,U.H. and Sandell,L.J. (1996). Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* 271, 3311-3316.

Farndale,R.W., Sayers,C.A., and Barrett,A.J. (1982). A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect. Tissue Res.* 9, 247-248.

30

Homandberg,G.A. and Hui,F. (1996). Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 325-331.

Homandberg,G.A., Hui,F., Wen,C., Purple,C., Bewsey,K., Koepp,H., Huch,K., and Harris,A. (1997). Fibronectin-fragment-induced cartilage chondrolysis is associated with release of catabolic cytokines. *Biochem. J* 321 (Pt 3), 751-757.

【 0 1 1 1 】

40

【表 1 - 2】

Honda,M.J., Yada,T., Ueda,M., and Kimata,K. (2004). Cartilage formation by serial passaged cultured chondrocytes in a new scaffold: hybrid 75:25 poly(L-lactide-epsilon-caprolactone) sponge. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 1510-1516.

Karageorgiou,V. and Kaplan,D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474-5491.

Kawakami,M., Matsumoto,T., Hashizume,H., Kuribayashi,K., Chubinskaya,S., and Yoshida,M. (2005). Osteogenic protein-1 (osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7) inhibits degeneration and pain-related behavior induced by chronically compressed nucleus pulposus in the rat. *Spine* 30, 1933-1939.

10

Kelley,L.A., MacCallum,R.M., and Sternberg,M.J. (2000). Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol. Biol* 299, 499-520.

Levicoff,E.A., Gilbertson,L.G., and Kang,J.D. (2005). Gene therapy for disc repair. *Spine J* 5, 287S-296S.

20

Lougheed,J.C., Holton,J.M., Alber,T., Bazan,J.F., and Handel,T.M. (2001). Structure of melanoma inhibitory activity protein, a member of a recently identified family of secreted proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5515-5520.

Masuda,K. and An,H.S. (2004). Growth factors and the intervertebral disc. *Spine J* 4, 330S-340S.

Masuda,K., Oegema,T.R., Jr., and An,H.S. (2004). Growth factors and treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine* 29, 2757-2769.

30

Meyenburg,S., Lilie,H., Panzner,S., and Rudolph,R. (2000). Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system. Studies on the in vitro release behavior. *J Control Release* 69, 159-168.

Paul,R., Haydon,R.C., Cheng,H., Ishikawa,A., Nenadovich,N., Jiang,W., Zhou,L., Breyer,B., Feng,T., Gupta,P., He,T.C., and Phillips,F.M. (2003). Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease. *Spine* 28, 755-763.

Roberts,M.J., Bentley,M.D., and Harris,J.M. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Rev* 54, 459-476.

40

【 0 1 1 2 】

【表 1 - 3】

Saito,S., Kondo,S., Mishima,S., Ishiguro,N., Hasegawa,Y., Sandell,L.J., and Iwata,H. (2002). Analysis of cartilage-derived retinoic-acid-sensitive protein (CD-RAP) in synovial fluid from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg Br* 84, 1066-1069.

Sakai,D., Mochida,J., Iwashina,T., Watanabe,T., Nakai,T., Ando,K., and Hotta,T. (2005). Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine* 30, 2379-2387.

10

Sakano,S., Zhu,Y., and Sandell,L.J. (1999). Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein and type II collagen expression during fracture healing are potential targets for Sox9 regulation. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1891-1901.

Singh,K., Masuda,K., and An,H.S. (2005). Animal models for human disc degeneration. *Spine J* 5, 267S-279S.

Sobajima,S., Kim,J.S., Gilbertson,L.G., and Kang,J.D. (2004). Gene therapy for degenerative disc disease. *Gene Ther.* 11, 390-401.

20

Sobajima,S., Kompel,J.F., Kim,J.S., Wallach,C.J., Robertson,D.D., Vogt,M.T., Kang,J.D., and Gilbertson,L.G. (2005). A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine* 30, 15-24.

Sofia,S., McCarthy,M.B., Gronowicz,G., and Kaplan,D.L. (2001). Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 54, 139-148.

30

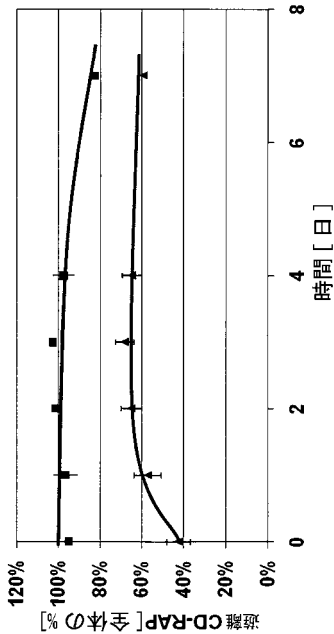
Stoll,R., Renner,C., Buettner,R., Voelter,W., Bosserhoff,A.K., and Holak,T.A. (2003). Backbone dynamics of the human MIA protein studied by (15)N NMR relaxation: implications for extended interactions of SH3 domains. *Protein Sci.* 12, 510-519.

【 0 1 1 3 】

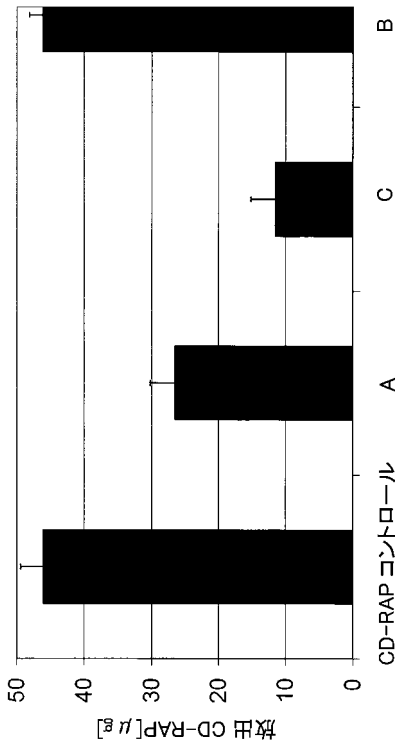
【表 1 - 4】

- Stoll,R., Renner,C., Zweckstetter,M., Bruggert,M., Ambrosius,D., Palme,S., Engh,R.A., Golob,M., Breibach,I., Buettner,R., Voelter,W., Holak,T.A., and Bosserhoff,A.K. (2001a). The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J.* 20, 340-349.
- Stoll,R., Renner,C., Zweckstetter,M., Bruggert,M., Ambrosius,D., Palme,S., Engh,R.A., Golob,M., Breibach,I., Buettner,R., Voelter,W., Holak,T.A., and Bosserhoff,A.K. (2001b). The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *Embo J* 20, 340-349. 10
- Takegami,K., An,H.S., Kumano,F., Chiba,K., Thonar,E.J., Singh,K., and Masuda,K. (2005). Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced in vitro chemonucleolysis. *Spine J* 5, 231-238.
- Tscheudschilsuren,G., Bosserhoff,A.K., Schlegel,J., Vollmer,D., Anton,A., Schnettler,R., Brandt,J., and Proetzel,G. (2005). Regulation of mesenchymal stem cell and chondrocyte differentiation by MIA. *Experimental Cell Research* 1-10. 20
- Wells,D.J. (2004). Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther.* 11, 1363-1369.
- Wozney,J.M. and Rosen,V. (1998). Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346, 26-37.
- Yang,S.H., Chen,P.Q., Chen,Y.F., and Lin,F.H. (2005). An in-vitro study on regeneration of human nucleus pulposus by using gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan tri-copolymer scaffold. *Artif. Organs* 29, 806-814. 30

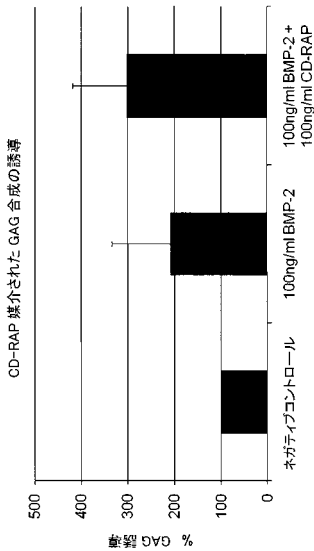
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【配列表】

0005484059000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 25/02 (2006.01) A 6 1 P 25/02

- (74)代理人 100112793
 弁理士 高橋 佳大
- (74)代理人 100128679
 弁理士 星 公弘
- (74)代理人 100135633
 弁理士 二宮 浩康
- (74)代理人 100114890
 弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
- (72)発明者 カロラ ドニー
 ドイツ連邦共和国 ミュンヘン エンゲルシュトラッセ 7
- (72)発明者 クラウス ヘラーブランド
 ドイツ連邦共和国 モーレンヴァイス (アイスマースツェル) ザンクト - ゲオルク - シュトラッセ 24
- (72)発明者 エリーザベト フステルト
 ドイツ連邦共和国 ゲルメリング ヴィッテルスバッハーシュトラッセ 7
- (72)発明者 ズザンネ ビッピッヒ
 ドイツ連邦共和国 ミュンヘン エッタールシュトラッセ 7
- (72)発明者 ライナー ジークル
 ドイツ連邦共和国 ブッフハイム グレーベンバッハヴェーク 45

審査官 川崎 洋祐

- (56)参考文献 特表2002-537229(JP,A)
 国際公開第00/012762(WO,A1)
 国際公開第2005/014071(WO,A1)
 特表2003-518021(JP,A)
 国際公開第2005/115438(WO,A1)
 国際公開第2005/120595(WO,A1)
 Weiner AL, Liposomes as carriers for polypeptides, Advanced Drug Delivery Reviews, 1989年 6月, Vol.3 No.3, pp.307-341

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 3 2 7
 A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 1 / 8 0
 A 6 1 K 3 3 / 0 0 - 3 3 / 4 4
 A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
 A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 4 8
 A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
 A 6 1 K 4 1 / 0 0 - 4 5 / 0 8
 A 6 1 K 4 8 / 0 0
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
 CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)