(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2012-502072
(P2012-502072A)
(43)公表日　平成24年1月26日(2012.1.26)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 35/12	(2006.01)	A61K	35/12	4B065
A61P 9/10	(2006.01)	A61P	9/10	4C076
A61K 9/50	(2006.01)	A61K	9/50	4C084
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	4C087
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 93 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-526412 (P2011-526412)
(86)(22)出願日　平成21年9月11日 (2009.9.11)
(85)翻訳文提出日　平成23年5月11日 (2011.5.11)
(86)国際出願番号　PCT/EP2009/006620
(87)国際公開番号　WO2010/028846
(87)国際公開日　平成22年3月18日 (2010.3.18)
(31)優先権主張番号　08016137.5
(32)優先日　平成20年9月12日 (2008.9.12)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　303039785
バイオコンパティブルズ　ユーケー　リミテッド
英国・サリー州　ジーユー９　８キューエル・ファーナム・ウェイドン　レーン・ファーナム　ビジネス　パーク・チャップマン　ハウス
(74)代理人　110000338
特許業務法人原謙三国際特許事務所
(72)発明者　ヴァルラップ，クリスティーネ
ドイツ連邦共和国，６３７６２　グロースオストハイム，ミッテルヴェーグ　３８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＧＬＰ－１ペプチドまたはその類似体をコードし、分泌する、封入された細胞を用いた、急性心筋梗塞（ＡＭＩ）の処置

(57)【要約】
本願は、ＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアント、あるいはＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアントを含んでいる融合ペプチドをコードし、分泌する細胞、例えば、間葉系の幹細胞または間葉系の間質細胞あるいは任意のさらなる適切な細胞の、急性心筋梗塞（ＡＭＩまたはＭＩ）の処置のための、使用に関する。このＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアント、あるいはＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアントを含んでいる融合ペプチドをコードし、分泌する細胞は、処置される患者の免疫系の応答を防止するように、（球状の）マイクロカプセルに封入されている。また、本願は、これらの（球状の）マイクロカプセル、またはこれらの細胞もしくは（球状の）マイクロカプセルを含んでいる薬学的組成物の、急性心筋梗塞（ＡＭＩまたはＭＩ）の処置のための使用にも関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアント、あるいはＧＬＰ－１を含んでいる融合ペプチド、そのフラグメントまたはバリアントをコードし、分泌する細胞の、急性心筋梗塞（ＡＭＩまたはＭＩ）を処置するための医薬を調製するための、使用であって、
ＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアント、あるいはＧＬＰ－１を含んでいる融合ペプチド、そのフラグメントまたはバリアントをコードし、分泌する細胞が、処置される患者の免疫系の応答を防止するために、球状のマイクロカプセルに封入されている、使用。
【請求項２】
前記球状のマイクロカプセルが、好ましくは、球状のコアと、少なくとも１個の、表面を被覆する層とを含んでおり、
該球状のコアが、架橋されたポリマーと、ＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアント、あるいはＧＬＰ－１を含んでいる融合ペプチド、そのフラグメントまたはバリアントをコードし、分泌する細胞と、の混合物を含んでいるか、または該混合物からなり、
該少なくとも１個の、表面を被覆する層が、架橋されたポリマーを含んでいるか、または該架橋されたポリマーからなる、
請求項１に記載の使用。
【請求項３】
前記球状のマイクロカプセルの全直径が、約１２０μｍ～約８００μｍ、約１２０μｍ～約７００μｍ、約１５０μｍ～約６５０μｍ、約１６５μｍ～約６００μｍ、約１２０μｍ～約３００μｍ、約１５０μｍ～約２５０μｍ、約１６５μｍ～約２２５μｍ、または約１８０μｍ～約２００μｍであり、
該全直径には、約１８０、１８５、１９０、または２００μｍが含まれる、
請求項１または２に記載の使用。
【請求項４】
前記細胞が、ＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアント、あるいはＧＬＰ－１を含んでいる融合ペプチド、そのフラグメントまたはバリアントをコードし、分泌する、間葉系の幹細胞、間葉系の間質細胞、ヒトの間葉系の幹細胞、ヒトの間葉系の幹細胞に由来する分化した細胞、同種の細胞、または自己細胞である、
請求項１～３のいずれか１項に記載の使用。
【請求項５】
前記架橋されたポリマーが、バイオポリマーおよびアルギン酸塩を含んでいる群から選択される、請求項２～４のいずれか１項に記載の使用。
【請求項６】
前記コアの架橋されたポリマーおよび／または前記少なくとも１個の、表面を被覆する層の架橋されたポリマーが、化学的に同一のポリマーを同一の濃度または異なる濃度にて含んでおり、
さらに、該ポリマーが異なる分子量を有し得る、および／または該ポリマーが異なる様式にて架橋され得る、
請求項２～５のいずれか１項に記載の使用。
【請求項７】
前記球状のマイクロカプセルが、１個、２個、３個、４個、５個、５個～１０個、またはそれ以上の、表面を被覆する層を含んでいる、請求項１～６のいずれか１項に記載の使用。
【請求項８】
前記球状のマイクロカプセルが、ポリカチオンからなるさらなる外側の、表面を被覆する層を含んでいる、請求項１～７のいずれか１項に記載の使用。
【請求項９】
請求項１～８のいずれか１項に記載の使用であって、

前記ＧＬＰ－１が、
（ａ）ＧＬＰ－１の７～３５番目のアミノ酸を含んでいるペプチド、
（ｂ）ＧＬＰ－１の７～３６番目のアミノ酸を含んでいるペプチドまたはＧＬＰ－１（７－３６）アミド、
（ｃ）ＧＬＰ－１の７～３７番目のアミノ酸を含んでいるペプチド、
（ｄ）式ＩＩ：
【数１】

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

で表される配列を含んでいるペプチドであって、
Ｘａａ７はＬ－ヒスチジンであり；Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＬｙｓであり；Ｘａａ１６はＶａｌまたはＬｅｕであり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ１９はＴｙｒまたはＧｌｎであり；Ｘａａ２０はＬｅｕまたはＭｅｔであり；Ｘａａ２２はＧｌｙまたはＧｌｕであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２５はＡｌａまたはＶａｌであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２７はＧｌｕまたはＬｅｕであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３３はＶａｌまたはＬｙｓであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、Ｇｌｕ、ＡｓｎまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙであり；Ｘａａ３６はＡｒｇ、ＧｌｙまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｐｒｏ、Ｌｙｓ、アミドであるか、あるいは存在していない、ペプチド、
（ｅ）式ＩＩＩ：
【数２】

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa18-Tyr-Leu-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

で表される配列を含んでいるペプチドであって、
Ｘａａ７はＬ－ヒスチジンであり；Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＬｙｓであり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２２はＧｌｙまたはＧｌｕであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙであり；Ｘａａ３６はＡｒｇまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、ＧｌｕまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在していない、ペプチド、および
（ｆ）（ａ）～（ｅ）に示すペプチドのいずれかと少なくとも８０％の同一性を示すペプチド
からなる群より選択されるペプチドである、使用。
【請求項１０】
請求項１～８のいずれか１項に記載の使用であって、
前記ＧＬＰ－１の融合ペプチドまたはそのフラグメントもしくはバリアントが、成分（Ｉ）および成分（ＩＩ）を含んでおり、
該成分（Ｉ）のＮ末端は、
（ａ）ＧＬＰ－１（７－３５、７－３６または７－３７）の配列
（ｂ）配列番号１で表される配列
（ｃ）式ＩＩ：

【数３】

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-
Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-
Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

で表される配列を含んでいるか、該配列からなるペプチドであって、
Ｘａａ７はＬ－ヒスチジンであり；Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＬｙｓであり；Ｘａａ１６はＶａｌまたはＬｅｕであり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ１９はＴｙｒまたはＧｌｎであり；Ｘａａ２０はＬｅｕまたはＭｅｔであり；Ｘａａ２２はＧｌｙまたはＧｌｕであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２５はＡｌａまたはＶａｌであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２７はＧｌｕまたはＬｅｕであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３３はＶａｌまたはＬｙｓであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、Ｇｌｕ、ＡｓｎまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙであり；Ｘａａ３６はＡｒｇ、ＧｌｙまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｐｒｏ、Ｌｙｓ、アミドであるか、あるいは存在していない、ペプチド
（ｄ）式ＩＩＩ：

【数４】

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa18-Tyr-Leu-Glu-
Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Val-Xaa34-
Xaa35-Xaa36-Xaa37,

で表される配列を含んでいるか、該配列からなるペプチドであって、
Ｘａａ７はＬ－ヒスチジンであり；Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＬｙｓであり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２２はＧｌｙまたはＧｌｕであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙであり；Ｘａａ３６はＡｒｇまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、ＧｌｕまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在していない、ペプチド、または
（ｅ）（ａ）～（ｄ）に示す配列のいずれかの配列と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列
の配列からなるか、あるいは該配列を含んでいるペプチドの群から選択され、
該成分（ＩＩ）のＣ末端は、少なくとも９個のアミノ酸のペプチド配列、またはその機能的なフラグメントもしくはバリアントから選択される、使用。

【請求項１１】
前記ＧＬＰ－１の融合ペプチドの成分（ＩＩ）が、
（ａ）配列番号２２（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩ）、配列番号２７（ＤＦＰＥＥＶＡＩ）、配列番号２８（ＲＤＦＰＥＥＶＡ）、配列番号２９（ＲＲＤＦＰＥＥＶ）、配列番号３０（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩ）、配列番号３１（ＡＤＦＰＥＥＶＡ）、または配列番号３２（ＡＡＤＦＰＥＥＶ）で表される配列、あるいは配列番号２２、２７、２８、２９、３０、３１または３２と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、
を含んでいるペプチド配列、
（ｂ）配列番号２３（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬ）、配列番号２４（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬ）、配列番号３３（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬ）、または配列番号３４（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬ）で表される配列、あるいは配列番号２３、２４、３３または３４と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、
を含んでいるペプチド配列、および

（ｃ）配列番号２（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬＧ）、配列番号３（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬＧ）、配列番号３５（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬＧ）、または配列番号３６（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬＧ）で表される配列、あるいは配列番号２、３、３５または３６と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、
を含んでいるペプチド配列、
から選択される、請求項１０に記載の使用。
【請求項１２】
前記ＧＬＰ－１の融合ペプチドの成分（Ｉ）と成分（ＩＩ）とが、直接的に連結されているか、リンカー配列を介して連結されている、請求項１０または１１に記載の使用。
【請求項１３】
前記ＧＬＰ－１の融合ペプチドが、成分（Ｉ）および成分（ＩＩ）の代わりに、または成分（Ｉ）および成分（ＩＩ）に加えて、成分（ＩＩＩ）を含んでおり、
融合タンパク質に成分（Ｉ）および成分（ＩＩＩ）が存在する場合、成分（ＩＩＩ）が、成分（Ｉ）のＣ末端および／または成分（Ｉ）のＮ末端に連結されていてもよく、
融合タンパク質に成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ）が存在する場合、成分（ＩＩＩ）が、成分（ＩＩ）のＣ末端および／または成分（Ｉ）のＮ末端に連結されていてもよい、
請求項１０～１２のいずれか１項に記載の使用。
【請求項１４】
請求項１３に記載の使用であって、
成分（ＩＩＩ）が少なくとも４個のアミノ酸残基、少なくとも１０個のさらなるアミノ酸残基、少なくとも２０個のさらなるアミノ酸残基、または少なくとも３０個のさらなるアミノ酸残基を含んでおり、
成分（ＩＩＩ）が
（ａ）プログルカゴンにおけるＧＬＰ－２のＮ末端配列、
（ｂ）ＧＬＰ－１（５－３７、６－３７、または７－３７）の配列、
（ｃ）式ＩＩ：
【数５】

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

で表される配列を含んでいるペプチドであって、
Ｘａａ７はＬ－ヒスチジンであり；Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＬｙｓであり；Ｘａａ１６はＶａｌまたはＬｅｕであり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ１９はＴｙｒまたはＧｌｎであり；Ｘａａ２０はＬｅｕまたはＭｅｔであり；Ｘａａ２２はＧｌｙまたはＧｌｕであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２５はＡｌａまたはＶａｌであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２７はＧｌｕまたはＬｅｕであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３３はＶａｌまたはＬｙｓであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、Ｇｌｕ、ＡｓｎまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙであり；Ｘａａ３６はＡｒｇ、ＧｌｙまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｐｒｏ、Ｌｙｓ、アミドであるか、あるいは存在していない、ペプチド、
（ｄ）式ＩＩＩ：
【数６】

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa8-Tyr-Leu-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

で表される配列を含んでいるペプチドであって、
Ｘａａ７はＬ－ヒスチジンであり；Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ＩｌｅまたはＬｙｓであり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２２はＧｌｙまたはＧｌｕであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙであり；Ｘａａ３６はＡｒｇまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、ＧｌｕまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在していない、ペプチド、
（ｅ）（ａ）～（ｄ）に示す配列のいずれかの配列と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、および
（ｆ）配列番号４または５で表される配列、あるいは配列番号４または５と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含んでいる成分（ＩＩＩ）
から選択されることが好ましい、使用。
【請求項１５】
前記ＧＬＰ－１の融合ペプチドが、成分（ＩＶ）としての担体タンパク質、特にトランスフェリンまたはアルブミンをさらに含んでいる、請求項１０～１４のいずれか１項に記載の使用。
【請求項１６】
前記ＧＬＰ－１の融合ペプチドが、
配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号２６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４１、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、または配列番号４８で表される配列、あるいは、配列番号６、７、８、１０、１１、１２、２６、または３７～４８と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、
から選択されたペプチド配列を含んでいるか、該ペプチド配列からなる、請求項１～１５のいずれか１項に記載の使用。
【請求項１７】
前記球状のマイクロカプセルの前記コアにおける前記細胞が、抗アポトーシス因子、増殖因子、ＶＥＧＦ、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、抗血小板薬、抗凝固薬、および抗血栓薬からなる群より選択される因子をさらに分泌するようにさらに設計されている、ならびに／あるいは、
前記カプセルを通して処置的なレベルにて放出されるパラクリン因子としての内因性のタンパク質またはペプチドを分泌するようにさらに設計されており、
該内因性のタンパク質またはペプチドがＶＥＧＦ、ＩＬ６、ＩＬ８、ＧＤＮＦ、ＮＴ３、およびＭＣＰ１から選択される、
請求項１～１６のいずれか１項に記載の使用。
【請求項１８】
前記球状のマイクロカプセルが、心臓の組織へ直接的に注入することによって、または心臓組織の患部に供給する細動脈を通した血管内への送達によって、哺乳動物の急性心筋梗塞の患者または哺乳動物の急性心筋梗塞後の患者の心筋の患部に移植される、請求項１～１７のいずれか１項に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本願は、急性心筋梗塞（ＡＭＩまたはＭＩ）の処置のために、例えば間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞、またはいずれかのさらに適切な細胞のような細胞であって、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアントを含んでいる融合ペプチドをコードし、分泌する細胞の使用に関する。ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１、そのフラグメ

ントもしくはバリアントを含んでいる融合ペプチドをコードし、分泌する細胞は、処置される患者の免疫系の応答を防止するために、（球状の）マイクロカプセル内に封入されている。この出願はまた、これらの（球状の）マイクロカプセル、またはこれらの細胞もしくは（球状の）マイクロカプセルを含む薬学組成物の、急性心筋梗塞（ＡＭＩまたはＭＩ）の処置のための使用に関する。

【０００２】

心臓発作としてより一般に知られている、急性心筋梗塞（ＡＭＩまたはＭＩ）は、心臓部分への血液供給が中断されたときに起こる一般的な病状であり、最も典型的には損傷を受けやすいプラークの破裂に起因する。虚血または酸素欠乏の結果、心臓細胞の損傷を引き起こしたり、死をもたらしたりすることもある。ＡＭＩは、医学的な緊急事態であり、世界中の男性および女性の両方にとって主要な死亡原因である（例えば、Ｔｈｅ Ｗｏｒｌｄ Ｈｅａｌｔｈ Ｒｅｐｏｒｔ ２００４－Ｃｈａｎｇｉｎｇ Ｈｉｓｔｏｒｙ（ＰＤＦ）、Ｗｏｒｌｄ Ｈｅａｌｔｈ Ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ、１２０－４、ＩＳＢＮ ９２－４－１５６２６５－Ｘを参照のこと）。重要な危険要素は、アテローム冠動脈硬化心臓病および／もしくは狭心症、予備心臓麻痺もしくは心臓発作、異常な心拍もしくは失神のいずれかの予備症状、特に４０歳以上の男性および５０歳以上の女性のようなより年配者、喫煙、過度のアルコール消費、特定の薬物乱用、高い中性脂肪値、高いＬＤＬ（「低比重リポタンパク質」）および低いＨＤＬ（「高比重リポタンパク質」）、糖尿病、高血圧、肥満、ならびに慢性的に高いストレス状態のような、ある人における血管病の既往歴である。

【０００３】

心筋梗塞は、虚血性心臓疾患の一般的な提示である。ＷＨＯは、２００２年に、世界中の死亡の１２．６％が虚血性心臓疾患を原因とすると算出した（例えば、上記したＴｈｅ Ｗｏｒｌｄ Ｈｅａｌｔｈ Ｒｅｐｏｒｔ ２００４を参照のこと）。虚血性心臓疾患は、先進国において主要な死亡原因であり、発展途上国においては、ＡＩＤＳおよび下気道感染につぐ第３の死亡原因である（例えば、Ｃａｕｓｅ ｏｆ Ｄｅａｔｈ－ＵＣ Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｇｌｏｂａｌ Ｉｎｅｑｕａｌｉｔｙ、Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｇｌｏｂａｌ、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ａｎｄ Ｒｅｇｉｏｎａｌ Ｓｔｕｄｉｅｓ（ＣＧＩＲＳ） ａｔ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ、ｒｅｔｒｉｅｖｅｄ ｏｎ Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ７、２００６を参照のこと）。

【０００４】

米国において、心臓疾患は、主要な死亡原因であり、癌（悪性新生物）よりもさらに高い死亡率の死亡原因である（例えば、“Ｄｅａｔｈｓ ａｎｄ ｐｅｒｃｅｎｔａｇｅ ｏｆ ｔｏｔａｌ ｄｅａｔｈ ｆｏｒ ｔｈｅ １０ ｌｅａｄｉｎｇ ｃａｕｓｅｓ ｏｆ ｄｅａｔｈ：Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ”：２００２－２００３、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ、ｒｅｔｒｉｅｖｅｄ ｏｎ Ａｐｒｉｌ １７、２００７を参照のこと）。冠状動脈性心臓病は、米国において、１／５の死亡の原因となる。ある男性７，２００，０００人および女性６，０００，０００人は何らかの形の冠状動脈性心臓病と共存している。毎年１，２００，０００人が、（新規のまたは再発性の）冠動脈発作に苦しんでおり、その約４０％が発作の結果死亡している（例えば、Ｈｅａｒｔ Ａｔｔａｃｋ ａｎｄ Ａｎｇｉｎａ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｈｅａｒｔ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ（２００３）、ｒｅｔｒｉｅｖｅｄ ｏｎ Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ７， ２００６を参照のこと）。このことは、約６５秒毎に、冠動脈事象でアメリカ人が死亡していることを意味する。同様の統計が、ヨーロッパにおいても予想される。

【０００５】

疑わしい急性心筋梗塞の迅速な処置には、酸素、アスピリン、ニトログリセリン、および通常モルヒネ硫酸塩である鎮痛剤が含まれる。患者は、一般的に、心電図（ＥＣＧ、ＥＫＧ）、胸部Ｘ線、およびクレアチンキナーゼまたはトロポニンレベル（特に心筋の損傷

組織により放出される化学的指標である）の上昇を検出するための血液検査のような多くの診断試験を受ける。さらなる処置には、心臓への血流を阻害する凝結を分解するための投薬、または閉塞した冠動脈の拡張もしくはバイパス手術による血流の機械的回復のいずれかが含まれ得る。冠疾患集中治療室への入院は、異常心拍のような合併症の迅速で安全な処置を可能にする。

【０００６】

ＡＭＩは、急性冠動脈症候群の類型であり、最も頻度が高い（しかしながらいつもではない）冠動脈疾患の兆候である。最も一般的な起爆事象は、心外膜冠動脈におけるアテローム斑の破裂であり、これによりカスケードの凝結が引き起こされ、結果として動脈の完全な閉塞が起こることもある。アテローム性動脈硬化は、典型的には１０年以上かけて、動脈（この場合、冠動脈）の壁の斑にコレステロールおよび線維組織から徐々に形成される。血管造影において見られる血液流カラムの変則は、１０年間のアテローム性動脈硬化の進行の結果として、動脈内腔の狭小に反映される。斑は、不安定になり得、破裂し、さらに、典型的には数分以内に動脈を塞ぐ血栓（血塊）形成を促進し得る。深刻な斑の破裂は、環状血管構造において起こり、心筋梗塞および通常は下流の心筋の壊死を引き起こし得る。

【０００７】

障害のある血液が心臓の終わりまで十分長く流れた場合、虚血カスケードと呼ばれる段階を引き起こし、典型的には心臓細胞を死滅し（特に壊死が原因で）、再成長はしない。コラーゲンの傷跡がその場所に形成される。最近の研究は、アポトーシスもまた、心筋梗塞に続く組織損傷過程において役割を果たしていることが示唆されている（Ｋｒｉｊｎｅｎ ＰＡ、Ｎｉｊｍｅｉｊｅｒ Ｒ、Ｍｅｉｊｅｒ ＣＪ、Ｖｉｓｓｅｒ ＣＡ、Ｈａｃｋ ＣＥ、Ｎｉｅｓｓｅｎ ＨＷ．（２００２）．“Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｉｎ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｓｃｈａｅｍｉａ ａｎｄ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ”．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｐａｔｈｏｌ ５５（１１）：８０１－１１．ＰＭＩＤ １２４０１８１６を参照のこと）。結果として、患者の心臓は、普遍的に損傷を受け得る。虚血カスケードに形成された傷跡のある組織はまた、生命に危険を及ぼし得る不整脈の危険に患者をさらす。その後の組織損傷の拡大を減少させる処置は、ＡＭＩ後の心臓機能を改善し、長期間の患者の予後を改善させる点において顕著に有用であり得る。

【０００８】

現在は、ＭＩ後の心筋の再形成のために幹細胞を用いた処置についての重大な研究が多くなされている。心筋梗塞後の患者自身の骨髄由来の幹細胞を、左心室の心筋内に埋め込むことによって、幹細胞の処置を受けた患者は、プラシーボでは見られない、左心室駆出分画および拡張末期容積において向上が見られる。初期梗塞サイズが大きくなるにつれて、注入の効果は大きくなる。しかしながら、適切な処置法は未だ確立されていない。ＳＴ増強ＭＩにアプローチする処置としての前駆細胞注入の臨床試験が、進められている（例えば、Ｓｃｈａｃｈｉｎｇｅｒ Ｖ、Ｅｒｂｓ Ｓ、Ｅｌｓａｓｓｅｒ Ａ、Ｈａｂｅｒｂｏｓｃｈ Ｗ、Ｈａｍｂｒｅｃｈｔ Ｒ、Ｈｏｌｓｃｈｅｒｍａｎｎ Ｈ、Ｙｕ Ｊ、Ｃｏｒｔｉ Ｒ、Ｍａｔｈｅｙ ＤＧ、Ｈａｍｍ ＣＷ、Ｓｕｓｅｌｂｅｃｋ Ｔ、Ａｓｓｍｕｓ Ｂ、Ｔｏｎｎ Ｔ、Ｄｉｍｍｅｌｅｒ Ｓ、Ｚｅｉｈｅｒ ＡＭ；ＲＥＰＡＩＲ－ＡＭＩ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｏｒｓ（２００６）、“Ｉｎｔｒａｃｏｒｏｎａｒｙ ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ａｃｕｔｅ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ”、Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３５５（１２）：１２１０－２１、ＰＭＩＤ １６９９０３８４を参照のこと）。

【０００９】

この幹細胞アプローチに加えて、現在、ＡＭＩまたはＭＩを処置するための少なくとも３つの生体材料および組織工学的方法がある。しかしながら、これらのアプローチは、医学研究のまさに早期の段階であり、これらのアプローチに基づく適切な処置法を確立する前に、数多くの疑問と問題とが解決される必要がある。

【００１０】

この分野における第一の興味深いアプローチとしては、心不全の予防における、ポリマーの左心室抑制が挙げられる。第二のアプローチは、インビボ移植に続く、インビトロの人工心臓組織の利用である。

【００１１】

他のアプローチは、人工的な心臓組織の現場生成のために、細胞および／または足場の心筋への注入を伴う（例えば、Ｃｈｒｉｓｔｍａｎ ＫＬ、Ｌｅｅ ＲＪ．“Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ Ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ”．Ｊ Ａｍ Ｃｏｌｌ Ｃａｒｄｉｏｌ ２００６；４８（５）：９０７－１３．ＰＭＪＤ １６９４９４７９を参照のこと）。このアプローチの変型は、例えば、心筋細胞におけるアポトーシスの実行を妨げることによって、ＡＭＩまたはＭＩ後の心筋の維持を援助する因子を生成するための、細胞の注入である。この最終的なアプローチは、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）が、いくつかの非常に有望な効果を提供することによって示され、ＡＭＩまたはＭＩの処置に用いられ得る。このアプローチを実施する多くの最近の研究は、最も効果的な内分泌ホルモンの１つであるグルカゴン様ペプチドホルモン（ＧＬＰ－１）は、虚血および心不全において、潜在的に有益な作用を有していることを示している（Ｂｏｓｅ ＡＫ、Ｍｏｃａｎｕ ＭＭ、Ｃａｒｒ ＲＤ、Ｙｅｌｌｏｎ ＤＭ、Ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｓｃｈａｅｍｉａ－ｒｅｐｅｒｆｕｓｉｏｎ ｉｎｊｕｒｙ ｉｓ ａｔｔｅｎｕａｔｅｄ ｂｙ ｉｎｔａｃｔ ｇｌｕｃａｇｏｎ ｌｉｋｅ ｐｅｐｔｉｄｅ－１（ＧＬＰ－１）ｉｎ ｔｈｅ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｒａｔ ｈｅａｒｔ ａｎｄ ｍａｙ ｉｎｖｏｌｖｅ ｔｈｅ ｐ７Ｏｓ６Ｋ ｐａｔｈｗａｙ．Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ Ｄｒｕｇｓ Ｔｈｅｒ．２００７ Ａｕｇ；２１（４）：２５３－６；ａｎｄ Ｎｉｋｏｌａｉｄｉｓ ＬＡ、Ｍａｎｋａｄ Ｓ、Ｓｏｋｏｓ ＧＧ、Ｍｉｓｋｅ Ｇ、Ｓｈａｈ Ａ、Ｅｌａｈｉ Ｄ、Ｓｈａｎｎｏｎ ＲＰ．Ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｇｌｕｃａｇｏｎ－ｌｉｋｅ ｐｅｐｔｉｄｅ－１ ｉｎ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ａｃｕｔｅ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｌｅｆｔ ｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ ｄｙｓｆｕｎｃｔｉｏｎ ａｆｔｅｒ ｓｕｃｃｅｓｓｆｕｌ ｒｅｐｅｒｆｕｓｉｏｎ、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ、２００４ Ｍａｒ ２、１０９（８）：９６２－５を参照のこと）。

【００１２】

ＧＬＰ－１は、グルカゴン遺伝子に位置しており、よく研究された遺伝子である（例えば、Ｗｈｉｔｅ， Ｊ．Ｗ．ら、１９８６ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１４（１２）４７１９－４７３０を参照のこと）。高分子量前駆分子としてのプレプログルカゴン分子は、膵臓α細胞ならびに空腸および結腸Ｌ細胞において合成される。プレプログルカゴンは、１８０アミノ酸の長いプロホルモンであり、その配列は、グルカゴンに加えて、構造に関連する２つの配列を含む：グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）およびグルカゴン様ペプチド－２（ＧＬＰ－２）。プレプログルカゴン分子において、ＧＬＰ－１とＧＬＰ－２との間に、１７アミノ酸のペプチド配列（または、正しくはＣ末端ＰＲ切断部位に１５アミノ酸配列を付加した配列）である、介在ペプチド２（ＩＰ２）がある。ＩＰ２配列（前駆分子においてＧＬＰ－１とＧＬＰ－２との間に位置する）は、通常、ＧＬＰ－１の３７番目アミノ酸の後ろでタンパク質分解的に切断される。それゆえにプレプログルカゴンの各要素は、細胞および環境次第で、そのプロセシングされていない型において３７アミノ酸のペプチドである、ＧＬＰ－１（１－３７）を含む様々なペプチドに切断される。一般に、このプロセシングは、膵臓および小腸において起こる。ＧＬＰ－１（１－３７）配列はさらに、タンパク質分解的に活性型ＧＬＰ－１（７－３７）、３１アミノ酸処理型またはＧＬＰ－１（７－３６）アミドに処理される。したがって、ＧＬＰ－１（７－３７）の表示は、親ペプチドであるＧＬＰ－１のＮ末端から数えたときに、７番目より後ろ（または７番目を含む）から３７番目未満（または３７番目を含む）のアミノ酸残基を含む、該当するフラグメントを意味する。

【００１３】

ＧＬＰ－１は、消化管ホルモンであり、ベータ細胞においてアデニル酸シクラーゼおよ

びプロテインキナーゼ活性の刺激を含む作用を有する、最も効果的な内因性のインスリン刺激因子である。ＧＬＰ－１は、生理的に、消化管上部からの胃抑制ポリペプチドと共に、血糖値を低下させる内分泌ホルモンとして機能する。したがって、食物摂取に反応して分泌されるＧＬＰ－１は、血糖の調節に呼応して機能し、例えば、胃、肝臓、膵臓および脳において、複合的な効果を有する。結果として、グルカゴン様ペプチドＧＬＰ－１（７－３６）アミド、およびそのアミド化されていない類似体のＧＬＰ－１（７－３７）は、炭水化物代謝におけるこれらの潜在的な作用、および二型糖尿病を含む糖尿病の処置へのこれらの潜在的な適用のために、かなりの関心がよせられている。

【００１４】

さらに、ＧＬＰ－１は、急性心筋梗塞（ＡＭＩ）または心筋梗塞（ＭＩ）の処置において、有望な効果を示す。本明細書中に記載したように、ＧＬＰ－１は、付随的なグルコース注入を要求することなくグルコース取り込みを刺激する、インスリン刺激およびインスリン模倣の両方の特性と共に、自然に生じる内分泌物質である。Ｎｉｋｏｌａｉｄｉｓら（上述したＮｉｋｏｌａｉｄｉｓら、２００４）は、ＧＬＰ－１注入は、標準的な処置に加えたときに、ＡＭＩ患者および初期血管形成の成功後の深刻な心臓収縮機能障害を有する患者において局地的および全体的にＬＶ機能を向上させることを見出した。

【００１５】

初期の研究において、バックグラウンドの処置に加えて、ＡＭＩ患者１０人において、ＧＬＰ－１の安全で効果的な投与を、ＧＬＰ－１の注入７２時間の間（分あたり１．５μｇ／ｋｇ）試験し、およびコントロール患者１１人と比較して、初期血管形成成功後のＬＶ分画（ＥＦ）＜４０％を決定した（Ｎｉｋｏｌａｉｄｉｓら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ　２００４、１０９；９６２－９６５）。これらの実験の背景において、ＧＬＰ－１の利点は、ＡＭＩ部位または糖尿病の既往歴に無関係とみなされる。したがって、通常の処置に追加したとき、ＧＬＰ－１の注入は、ＡＭＩ患者および初期血管形成成功後の深刻な心臓収縮機能障害の患者において、局所的および全体的なＬＶ機能を向上させると思われる（上述したＮｉｋｏｌａｉｄｉｓら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ　２００４を参照のこと）。Ｎｉｋｏｌａｉｄｉｓらはまた、ＧＬＰ－１は、虚血事象後の仮死心筋からの回復を促進すると仮定した。実験的なイヌモデルにおいて、左心室冠動脈の閉塞からＧＬＰ－１を１０分で投与し、続いて２４時間再潅流した。これらの実験において、ＧＬＰ－１の投与は、インスリン刺激効果の原因となるが、高血糖症の原因とはならない（Ｎｉｋｏｌａｉｄｉｓら、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、Ｊａｎｕａｒｙ　２００５、３１２（１）、ｐｐ．３０３－８を参照のこと）。

【００１６】

他のアプローチによれば、インビボのＧＬＰ－１の役割、特にＧＬＰ－１（７－３６）の役割を、バリン　ピロリジン（ＶＰ）のようなＤＰＰ－ＩＶ抑制剤を、その分解を妨げる手段として用いて調査した（Ｂｏｓｅら、Ｄｉａｂｅｔｅｓ、Ｖｏｌ．５４、Ｊａｎｕａｒｙ　２００５、ａｎｄ　Ｂｏｓｅら、Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ　Ｄｒｕｇｓ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｙ、Ａｕｇｕｓｔ　２００７、２１（４）、ｐｐ．２５３－６を参照のこと）。

【００１７】

天然のＧＬＰ－１、特にＧＬＰ－１（７－３６）は、インビボでの半減期が短い。このＧＬＰ－１は、血漿中で、ＤＰＰ－ＩＶによって数分以内に残基８と９との間において迅速に分解され、結果として、不活性型のＮＨ２末端にて切断された代謝産物であるＧＬＰ－１（９－３６）となる。これに関連して、ＧＬＰ－１およびＶＰは、ＶＰまたは生理食塩水のグループと比較して、梗塞が顕著な減少を示し、インビボの心臓モデルにおいて虚血再潅流障害から心筋を保護するように思われた。対応するインビトロ研究において、ＧＬＰ－１およびＶＰで処理された心臓はまた、コントロールおよびＶＰグループと比較して、梗塞の大きさが顕著に縮小することを示した（上記したＢｏｓｅら、２００５および２００７も参照のこと）。

【００１８】
ＧＬＰ－１が、ＧＬＰ－１レセプターを発現する標的細胞に直接作用するだけでなく、もしかすると生存シグナル伝達経路のような生存因子の活性化を介してアポトーシスを抑制し、これにより心臓に直接的な保護効果を発揮し得ることを、さらなるデータが示唆した（Ｂｏｓｅら、Ｄｉａｂｅｔｅｓ、Ｖｏｌ．５４、Ｊａｎｕａｒｙ ２００５も参照のこと）。これに関連して、ＧＬＰ－１の主要な標的は膵島である。ここで、このホルモンはインスリンの分泌を刺激し、ベータ細胞の増殖および新生を促進し、ならびにグルカゴン分泌を抑制する。しかしながら、ＧＬＰ－１レセプターは膵島の外部にも発現し、ＧＬＰ－１は他の器官においても役割を果たす可能性が確認されている（Ａｈｒｅｎ Ｂ．ら、Ｈｏｒｍｏｎｅｓ ｅｔ ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍｅ、Ｄｅｃ ２００４、３６（１１－１２）、ｐｐ．８４２－５を参照のこと）。

【００１９】
ＧＬＰ－１は、インスリンを用いた場合と同程度に、左心室（ＬＶ）の機能、心筋のグルコース取込み、ならびに再潅流の間、ＧＬＵＴ－１およびＧＬＵＴ－４の移行を向上することが示されている。しかしながら、インスリンと比較して、ＧＬＰ－１のインスリンを刺激する作用は、周囲のグルコース濃度に有利に依存し、低血糖症のリスクを緩和する。ＧＬＰ－１はまた、正常な心臓に対して直接的な効果を有することが示されており、収縮性を減少させるが、Ａｋｔ－１に依存しないメカニズムを介した心筋のグルコース取込みを向上させ、インスリンの作用と区別することが可能である（Ｔｉｎｇｃｕｎ Ｚｈａｏら、Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、Ｖｏｌ． ３１７（３）、ｐｐ．１１０６－１１１３；Ｎｏ．３，２００６）。

【００２０】
ＧＬＰ－１はさらに、急性心筋梗塞および左心室機能障害の患者において、左心室（ＬＶ）機能を改善させることが示されている。ＧＬＰ－１は、ベータ細胞において、リン酸イノシトール３キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）の活性化を促進する。このキナーゼは、心筋の前状態と同様に、虚血／再潅流傷害の環境において、心筋保護に明確に結びつく（Ｂｏｓｅら、Ｄｉａｂｅｔｅｓ、Ｖｏｌ．５４、Ｊａｎｕａｒｙ ２００５；およびＴｉｎｇｃｕｎ Ｚｈａｏら、Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、Ｖｏｌ．３１７、ｐｐ．１１０６－１１１３；Ｎｏ．３、２００６）。

【００２１】
異なるアプローチにおいて、Ｈｕｉｓａｍｅｎら（Ｈｕｉｓａｍｅｎら、Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｆｒｉｃａ（Ｓｏｕｔｈ Ａｆｒｉｃａ）、Ｍａｒｃｈ－Ａｐｒｉｌ ２００８、１９（２）、ｐ．７７－８３を参照のこと）は、ＧＬＰ－１が、ＤＰＰ－ＩＶを抑制するＶＰの存在によって支援されたとき、梗塞縮小効果を有することを示した。ＧＬＰ－１は、正常な酸素の状態下における心臓または心臓細胞において、活性なＡｋｔ（プロテインキナーゼＢとも称される。）または細胞外調節キナーゼＥｒｋ１／２を直接的に活性化することはできなかったが、Ｔｈｒ（１７２）におけるＡＭＰ－活性化キナーゼ（ＡＭＰＫ）のリン酸化を向上させた。加えて、解糖酵素ホスホフルクトキナーゼ－２を、用量依存的に活性化した。虚血後の再潅流の間、ＡＭＰＫと同様に、ＰＫＢ／Ａｋｔのリン酸化の調節もまた明白であった。ＧＬＰ－１はそれゆえに、解糖を向上させることによって、低流虚血に対する心臓の保護を直接的に表す。

【００２２】
しかしながら、天然のＧＬＰ－１の使用は、本明細書中ですでに述べたように、インビボにおけるＤＰＰ－ＩＶによるその急速な分解のために、インビボでいくつかの問題の原因となる。さらに、ＧＬＰ－１は、腎排泄を受ける。これらの因子は、ペプチドＧＬＰ－１（７－３６）またはＮＨ２末端にて切断された代謝産物であるＧＬＰ－１（９－３６）に関する限り、インビボにおいて活性型部分であるという問題、さらに生理学的効果に関する限り、天然のＧＬＰ－１またはそのフラグメントの処置への適用において機能するか

どうかいう問題を引き起こす。

【００２３】

インビボにおけるその急速な分解のために、ＧＬＰ－１は、急性心筋梗塞、冠状動脈手術、脳神経節症状、または敗血症の患者において、集中治療室で潜在的に有用なように、短期間代謝調節のためだけに適したツールとして考えられていた。より長期間の代謝制御のために、ＧＬＰ－１レセプターのアゴニストのようなインクレチン模倣物が提案された（例えば、Ｎａｕｃｋ　Ｍ．Ａ．、Ｎｏｖ－Ｈｏｒｍｏｎｅｓ　ｅｔ　ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍｅ、Ｄｅｃ　２００４、３６（１１－１２）、ｐｐ．８５２－８を参照のこと）。

【００２４】

しかしながら、インビボでの分解が早いことに関わらず、ＧＬＰ－１は、冠状動脈性心臓病の処置、特にＡＭＩまたはＭＩの処置において、潜在的な薬剤として良い基剤を提供すると思われる。

【００２５】

それゆえに、様々な試みによって、天然に存在するＧＬＰ－１（ＧＬＰ－１（７－３７））の安定な（抗ＤＰＰ－ＩＶ）類似体が合成的に生成されている。特に、インビボにおいてＡｌａである第８番目の残基は、例えばＧｌｙ、ＳｅｒまたはＴｈｒのような他の残基に置き換えられた（Ｂｕｒｃｅｌｉｎ，　Ｒ．ら、（１９９９）　Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ　４８、２５２－２５８）。Ｇｌｙ８またはＧ８の類似体は、合成分子、および変異ポリペプチドを分泌するように遺伝的に組み換えた株細胞により生成されたものの両方について、広範囲に試験されている（Ｂｕｒｃｅｌｉｎ，　Ｒ．ら（１９９９）、Ａｎｎａｌｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　８７５：２７７－２８５）。そのインビボでの安定性を向上させるために、その生物活性を妥協することなく、様々な他の変形がＧＬＰ－１に加えられている。しかしながら、これらのアプローチの全ては、考慮する問題を含んでいるために、処置的に全く有意ではなかった。

【００２６】

それでもなお、これらのアプローチのうち、インビボにおいてＧＬＰ－１の長期間条件を許容するものはなかった。これは、本明細書中で議論したタンパク質の分解、ＧＬＰ－１の代謝、および生体内において典型的に生じる正常なタンパク質の分解のためである。それゆえに、現在では、ＧＬＰ－１を必要とする患者は、長期間にわたって、１または複数のＧＬＰ－１またはその類似体もしくはバリアントの投与を受けなければならない。その期間は、例えば、処置をうける病気に罹患した期間と同じか、またはさらにより悪く、人生の全期間のように長い。この期間において、インビボにおけるＧＬＰ－１の半減期が短いため、典型的に、投与を短い投与間隔にて行う。さらに、ＧＬＰ－１の投与量は、医師または患者自身のいずれかによって投与されなければならない。これは、患者およびその周囲にとって、重要な課題および負担に相当する。この問題を回避するために、ＧＬＰ－１をコードし、発現する核酸を含んでいる細胞を患者に提供することによって、ＧＬＰ－１は投与され得る。このような細胞の移植によって、移植された細胞からＧＬＰ－１が分泌されて標的部位にＧＬＰ－１が直接提供されるので、ＧＬＰ－１をインビボにてより長く供給することが保証される。

【００２７】

国際公開第９９／５３０６４号パンフレットは、公に利用可能な不死化された株細胞および分裂する細胞の初代培養物のような種々の細胞型に組み込まれることが可能な、多量体のＧＬＰ－１発現カセットを作製するための方法を開示する。例えば、哺乳動物のＣＮＳからのＥＧＦに反応する神経球、ｂＦＧＦに反応する神経前駆幹細胞が挙げられるが、実施された例では、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞が用いられている。移植されたトランスフェクトされた細胞は、糖尿病でないコントロールとほぼ同等にグルコースを調節することが可能であり、糖尿病マウスの処置にうまく用いられていることが記載されていた。しかしながら、この種の移植技術は、例えば糖尿病患者の機械的な処置の要求に適合しないが、ＡＭＩまたはＭＩ患者にうまく用いられている。

【００２８】
さらに、免疫系は、外来物質から器官を守るために、外来細胞を典型的に認識し、免疫応答を引き起こすことが当該技術分野において知られている。このため、ＧＬＰ－１、またはそのバリアントもしくは誘導体の何れかを発現する可能性のある細胞の移植は、器官における免疫応答を引き起こし得る。このような防御反応は、処置中の考慮すべきかつ望まない副反応の原因となり得、深刻な合併症を引き起こし、処置した器官の死滅さえも引き起こし得る。
【００２９】
この問題を回避する１つの方法は、例えば患者自身に由来する細胞のような、自己細胞の使用であり得、特にＧＬＰ－１（７－３６）であるＧＬＰ－１を一過的に発現するように遺伝子組み換えされる。このような方法は、しかしながら、特定の患者の細胞に典型的には制限され、使用前に、実験室における長期間の準備が必要となる。しかしながら、ＡＭＩまたはＭＩは、例えば効果的な医薬の短期間供給のように、心筋梗塞の後数分または数時間以内に処置されることが必要である。
【００３０】
要約すると、現在のところ、本技術分野で可能な、処置される患者において心筋梗塞発生直後に効果的な処置を提供し得る、効果的なＡＭＩまたはＭＩの処置法はない。言い換えると、従来の技術は、ＧＬＰ－１で知られている有益な効果の全範囲を反映した処置を提供できない。このようなＧＬＰ－１の効果として、ＧＬＰ－１ペプチドを繰り返し投与する必要がなく、および／または例えば移植したＧＬＰ－１を発現する異質な遺伝子型の細胞に対する望まない免疫応答なしに、例えば、虚血または酸素欠乏が原因の損傷および心臓組織の潜在的な死亡を強力に低減するための活性がある。
【００３１】
したがって、本発明の目的は、ＧＬＰ－１を基礎としたペプチド分子またはその類似体を用いた、ＡＭＩまたはＭＩの効果的な処置を提供することにあり、ＧＬＰ－１ペプチドを繰り返し投与する必要がなく、および／または望まない免疫応答を誘発する危険なしに、ＧＬＰ－１がインビボにおいて長期間連続して生物学的活性を有していることにある。
【００３２】
本発明の基礎を成す目的は、添付の特許請求の範囲により解決される。この目的は、特に、本発明に関連した、ＡＭＩもしくはＭＩまたはこれに関連する疾患の処置のために、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１を含んでいる融合ペプチド、そのフラグメントもしくはバリアントをコードし、分泌する、例えば間葉系の幹細胞または間葉系の間質細胞、またはさらに他の細胞の使用によって解決される。ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１を含んでいる融合ペプチド、そのフラグメントもしくはバリアントをコードし、分泌する細胞は、処置する患者の免疫系の応答を避けるために、（球状の）マイクロカプセルに封入されている。本発明に関連して、用語「～をコードする細胞」は、典型的には、「～をコードする核酸を有するまたは包含するように設計された細胞」を意味している。
【００３３】
本明細書中に記載した発明を解決させるために用いられる、ＡＭＩもしくはＭＩまたはこれに関連する疾患の処置のための、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１ペプチド融合ペプチド、そのフラグメントもしくはバリアントを含んでいるをコードし、分泌する細胞は、好ましくは、処置する患者の免疫系の応答を妨げるために、（球状の）マイクロカプセルに封入されている。本発明に関連して、このような（球状の）マイクロカプセルは、好ましくは、（球状の）コア（例えば球状または球状でない核）および少なくとも１つの表面を被覆する層を含んでおり、
・（球状の）コアは、架橋されたポリマーおよび細胞（の混合物）を含みまたはからなり、当該細胞は、例えば間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞、もしくはさらに他の細胞種であり、本発明において用いられ得る細胞は、上述したように、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１を含んでいる融合ペプチド、そのフ

ラグメントもしくはバリアントをコードおよび分泌し、かつ
・少なくとも１つの表面を被覆する層は、典型的な架橋されたポリマー（の混合物）を含む、または典型的な架橋されたポリマー（の混合物）からなる。

【００３４】

本明細書にて規定したような、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１の融合ペプチド、そのフラグメントもしくはバリアントをコードし、分泌する、ここで使用された細胞を含む、（球状の）マイクロカプセルの分子サイズは、典型的には、（球状の）マイクロカプセルの全直径に関連する。一般に、ここで使用される（球状の）マイクロカプセルの全直径は、特定の処置および投与形態に依存して、かなり考慮される。本発明に関連して、本明細書にて使用する（球状の）マイクロカプセルを、例えば、注入または移植によって、特定の投与部位に局所的に投与することよって、典型的には処置を行う。したがって、投与形態は、例えば、注入のためのカニューレの直径によって、本明細書にて使用する（球状の）マイクロカプセルの全直径を制限し得る。本明細書にて使用する（球状の）マイクロカプセルの全直径は、少なくとも１つの表面を被覆する層の厚さと同様に、（球状の）マイクロカプセルのコアの直径によって、さらに決定され、両方の直径は、典型的には少なくともお互いに部分的に依存し、もちろん（球状の）マイクロカプセルの全直径に影響を与える。

【００３５】

本明細書中に記載したＡＭＩまたはＭＩの疾患、およびこれに関連した疾患の処置のために、本出願の発明者らは、驚くべきことに、全直径（粒子サイズ）が約１５０μｍ～約８００μｍ、好ましくは約１２０μｍ～約７００μｍ、より好ましくは約１５０μｍ～約６５０μｍ、およびさらにより好ましくは約１６５μｍ～約６００μｍの（球状の）マイクロカプセルが用いられ得ることを見出した。特に、全直径（粒子サイズ）約１２０μｍ～約３００μｍ、より好ましくは約１５０μｍ～約２５０μｍ、さらにより好ましくは約１６５μｍ～約２２５μｍ、および最も好ましくは約１８０μｍ～約２００μｍの、（球状の）マイクロカプセル、例えば全直径が約１８０、１８５、１９０、または２００μｍの（球状の）マイクロカプセルが、ＡＭＩまたはＭＩの処置に有利である。このような全直径を含む（球状の）マイクロカプセルは、注入のために選択された心筋の部位に典型的に保持され、周囲の組織に移行しない。これにより、例えば虚血または酸素欠乏を原因とする損傷、および心臓組織の潜在的な死亡を強力に低減するような活性のように、ＧＬＰ－１について知られている有益な効果の全範囲を処置中に提供するために、十分な期間、継続的にＧＬＰ－１および／またはそのバリアントもしくは類似体の、注入部位における発現を提供し得る。

【００３６】

本明細書の文脈において、用語「球状の」は、その最も広義の意味が理解される。球状の粒子は、好ましくは球のような形状を有すると理解され、それにより、形状は、例えば（球状の）マイクロカプセルおよび／またはそのコアが楕円形状を有するように、左右対称または非対称であり得る。あまり好ましくない実施形態において、本発明により用いられるマイクロカプセルまたはコアは、本明細書における意味の範囲内において球状ではなくても良いが、例えば、マイクロカプセルの表面に突出したまたは侵入した部位を有する、任意の形状を有している。本発明の開示のいずこかにおいて述べられた「球状の」マイクロカプセルまたはコアは、同様に、「非球状」マイクロカプセルまたはコアを提供、準備、または使用し得る。

【００３７】

本発明にて規定した（球状の）マイクロカプセルは、好ましくは、（球状の）コアを含み（例えば、コアは球状であるまたは球状でない）、（球状の）コアは、架橋されたポリマーと、例えば間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞、またはさらに他の細胞（種）のような細胞（の混合物）とを含むまたはからなり、この細胞は、本発明に関連して用いられ、本発明にて規定したＡＭＩもしくはＭＩの疾患、またはこれに関連する疾患の処置のために、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１を含ん

でいる融合ペプチド、そのフラグメントもしくはバリアントをコードし、分泌する。

【００３８】

本発明に関連して、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアの典型的な架橋されたポリマーは、本発明に関連して用いられ得る、例えば、間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞、またはさらに他の細胞（種）のような細胞が、その溝に埋め込まれた足場構造を形成する。これらの細胞は足場構造に、個々にまたは典型的には集合体として埋め込まれ得る。この細胞の集合体は、例えば、約１０～約１００００個の細胞、約１０～約５００個の細胞、約１０～約１０００個の細胞、または約１０～約１００００個の細胞、より好ましくは１０～約１００個の細胞、または約１０～約１０００個の細胞が集合した細胞（のプール）である。好ましくは、（球状の）コアでは、架橋されたポリマーと本明細書にて規定したような埋め込まれた細胞とが均質になるように分配されている。好ましくは、足場構造および本明細書にて規定したような埋め込まれた細胞を含むコアを、以下に開示する方法に従って準備した。これに関連して、本発明に従って使用するための（球状の）マイクロカプセルを準備したとき、（球状の）マイクロカプセルに封入された、例えば、本発明に関連して用いられる、間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞、自己細胞または他の細胞（種）を、ポリマー基質中に完全に埋め込むことに、決定的な重要性がある。

【００３９】

例えば、本明細書にて規定したような、間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞、または他の細胞（種）のような、埋め込まれた細胞は、本発明に関連して（球状の）マイクロカプセルのために用いられ、架橋足場ポリマーに対して、約1×10^{5}、1×10^{6}または約1×10^{7}個の細胞／ｍｌ～約5×10^{8}個の細胞／ｍｌの濃度で、より好ましくは、約1×10^{5}、約1×10^{6}、または約1×10^{7}個の細胞／ｍｌ～約1×10^{8}個の細胞／ｍｌの濃度で、最も好ましくは、約1×10^{5}、約1×10^{6}、または約2×10^{7}個の細胞／ｍｌ～6×10^{7}個の細胞／ｍｌの濃度で、コア内に存在し得る。

【００４０】

（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞は、典型的には、上記で規定した（球状の）コアの直径に依存している。実施例として、全直径約１６０μｍの本発明の例示の（球状の）マイクロカプセルは、その（球状の）コアの中に埋め込まれた多くの細胞を含み、この細胞は、本明細書にて規定したようなように、例えば間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞、または他の細胞（種）であり、（球状の）コアあたり、およびそれゆえに（球状の）マイクロカプセルあたり、例えば、約１０～１００個の細胞、好ましくは約３０～８０個の細胞、約６０～７０個の細胞を含み得る。したがって、約６０，０００個の本発明の（球状の）マイクロカプセルの投与によって、典型的には、約３～４００万個の細胞を一度に処置の部位に供給する。

【００４１】

本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルのコアは、典型的には、本明細書中に規定したように、（球状の）マイクロカプセルの全直径の直径以下の直径（粒子サイズ）である。典型的には、本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルのコアの直径は、約５０μｍ～約２２０μｍ、好ましくは約１００μｍ～約２００μｍ、同様に好ましくは約１１５μｍ～約１８５μｍ、より好ましくは約１３０μｍ～約１７０μｍ、さらにより好ましくは約１４５μｍ～約１５５μｍであり、例えば約１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０または１５５μｍである。特に好ましくは、本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルのコアの直径は、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの全直径より小さく、かつ、好ましくは約１μｍ～約８０μｍ、より好ましくは約１５μｍ～約７０μｍ、および最も好ましくは約３０μｍ～約６０μｍである。言い換えると、本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルのコアの直径は、約５０μｍ、約６０μｍ、約７０μｍ、約８０μｍ、約９０μｍ、約１００μｍ、約１１０μｍ、約１２０μｍ、約１２５μｍ、約１３０μｍ、約１３５μｍ、約１４０μｍ、約１４５μｍ、約１５０μｍ、約１５５μｍ、約１６０μｍ、約１

６５μｍ、約１７０μｍ、約１７５μｍ、約１８０μｍ、約１８５μｍ、約１９０μｍ、約１９５μｍ、約２００μｍ、約２０５μｍ、約２１０μｍ、約２１５μｍ、または約２２０μｍでさえあり得、ここに記載した特定の値から選択されるいずれか２つのいずれかの範囲を含み得る。

【００４２】

本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルのコアは、本明細書にて規定したようなＡＭＩもしくはＭＩの疾患、またはこれに関連した疾患の処置のために、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１を含んでいる融合ペプチド、そのフラグメントもしくはバリアントをコードし、分泌する細胞を含んでいる。本発明に関連して、（球状の）コアに用いられる、例えば間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞、または他の細胞（種）のような細胞であって、コアの周囲に位置している細胞または足場構造から突出した細胞は、免疫系がこれらのマイクロカプセルを外来成分として認識し、それゆえに、これらのマイクロカプセルを免疫系が攻撃し、免疫学的な問題を招き得る。

【００４３】

この効果は、初期溶液中の細胞濃度を低くすることによって回避し得るが、本発明は、コアの細胞部分を増加させることによって、マイクロカプセルの有効性の向上を許容する。コア内の細胞濃度を高くすることによって、移植される合成マイクロカプセルの総量が少なくなる。例えば、より効果的なマイクロカプセルが、注入部位において機能し得る。（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コア内において高濃度の細胞を用いるとき、免疫学的問題を回避するために、本発明は、（球状の）コアに適用される少なくとも１つの表面を被覆する層を提供する。この表面を被覆する層がバリアとして機能し、これらの細胞が宿主の免疫系にに接触しないので、細胞がコアの周囲の非常に近くに位置しているとしても、この表面を被覆する層は免疫応答の発生を許容しない。この表面を被覆する層は、本明細書にて規定したような典型的な架橋されたポリマー（の混合物）によって、いずれの細胞も含むことなく、典型的には構成される。特に好ましい実施形態においては、上述した（球状の）コアは、少なくとも１つまたは１個以上の表面を被覆する層によって被覆され、例えば、１個、２個、３個、４個、５個、５～１０個、またはそれ以上の表面を被覆する層によって被覆され、より好ましくは、１個、２個または３個の表面を被覆する層、最も好ましくは、ただ１個の表面を被覆する層によって被覆されている。典型的には、各表面を被覆する層は、コアの周囲に均一な厚さで含まれる。本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルの表面を被覆する層の厚みは、ほぼ任意で変更してもよく、典型的には、約１～約８０μｍの範囲、より好ましくは約１５～約７０μｍの範囲、最も好ましくは約２０～約４０μｍの範囲であり、例えば約３０μｍである。

【００４４】

本明細書中で用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コア（および任意の（球状の）マイクロカプセルの少なくとも１つの表面を被覆する層）は、架橋されたポリマー（の混合物）を含むかまたはからなる。これに関連して、当該技術分野において知られている何れかの薬学的に受容され、封入に適した（架橋）ポリマーは、（球状の）コアの形成、さらに互いに独立して、本発明にて規定した（球状の）マイクロカプセルの少なくとも１つの表面を被覆する層の形成に用いることが可能である。好ましくは、一方では、外部から酸素および栄養を供給するために、その架橋状態において透過可能であり、他方では、コアの細胞によってコードされ、分泌されるペプチドがマイクロカプセルから患者の細胞または体液に拡散することを可能にするようなポリマーが用いられる。さらに、架橋されたポリマーは、基質を介して生体の免疫系の構成要素が侵入するのを防ぐ。一例として、ポリマーは、合成、半合成、および天然の水溶性（生）ポリマーのようなものが用いられ、例えば、タンパク質（例えば、コラーゲン、アルブミン等）、ポリアミノ酸（例えば、ポリ－Ｌ－リシン、ポリ－Ｌ－グルタミン酸等）、多糖、およびこれらの誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロース、硫酸セルロース、アガロース、褐藻類（例えば、ラミナリア（Ｌａｍｉｎａｒａｌｅｓ）、シオミドロ（Ｅｃｔｏｃａｒｐａｌｅｓ）、

ヒバマタ（Ｆｕｃａｌｅｓ）の種）のアルギン酸塩を含むアルギン酸塩、カラゲナン、ヒアルロン酸、ヘパリン、ならびに関連する硫酸グリコサミン、デキストランおよびその誘導体、キトサンおよびその誘導体）が用いられ得る。合成ポリマーはまた、例えば、脂肪族ポリエステル（例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシ酪酸塩等）、ポリアミド、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、熱可塑性ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリメチルメタクリレート、およびポリテトラフルオロエチレン等のようなものが用いられ得る。

【００４５】

さらに、ブロックポリマーとして、本明細書に従って、例えば２つ以上の上述したポリマーの組合せに由来するポリマーが用いられ得る。このようなブロックポリマーは、例えば、孔径、架橋状態、毒性、処理する生体適合性等のような、所望の性質を考慮して、当業者が選択し得る。ここで記載したポリマーの何れかは、本発明に関連して、「化学的に異なるポリマー」として定義され、例えば、これらのポリマーのそれぞれは、典型的には、ここに記載した他のいずれかのポリマーと同一のモル質量および構造を示さない。一方、「化学的に同一のポリマー」は、ポリマーが同一のモル質量および構造を示すことを意味する。

【００４６】

最後に、ここで記載したポリマーの混合物もまた本発明に包含され、そのような混合物を含むポリマーの総数は、例えば、本明細書で説明したような、所望の性質を考慮して、当業者が選択し得る。この点において、得られたポリマーの混合物の総モル質量と混合物中の単一のポリマーの相対的なモル比率とが、他のポリマーの混合物と同一であれば、ポリマーの混合物は、他のポリマーの混合物と化学的に同一である（「化学的に同一のポリマー」）とみなされ得る。

【００４７】

好ましくは、本明細書にて使用する（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コア（および任意の（球状の）マイクロカプセルの少なくとも１つの表面を被覆する層の）の架橋されたポリマー（の混合物）は、アルギン酸塩を含む、またはアルギン酸塩からなる。本発明において、（球状の）コア、および／または少なくとも１つの表面を被覆する層の形成のためのポリマーとして用いられる場合、アルギン酸塩は、その生体適合性および架橋特性のために、特に有利である。化学的観点から、アルギン酸塩は、β－Ｄマンヌロン酸およびα－Ｌ－グルロン酸の両方のヘテロポリマー領域で分離した、ホモポリマーグループ由来のアニオン多糖である。アルギン酸塩は水溶性であり、かつナトリウムおよびカリウムのような一価のカチオンの存在下において、高粘度溶液を形成する。架橋非水溶性ヒドロゲルは、二価、三価、または多価カチオン（カルシウム、バリウム、またはポリリシン）と単一のアルギン酸塩鎖との相互作用において形成される。好ましくは、精製したアルギン酸塩（例えば、ＤＥ　１９８　３６　９６０、参考として本明細書中に組み込まれた特定の開示）を封入に用い、より好ましくは、生理食塩水中のアルギン酸カリウムまたはアルギン酸ナトリウムを用いる。このようなアルギン酸塩は、典型的には、平均モル質量約２０ｋＤａ～約１００００ｋＤａを示し、より好ましくは、モル質量約１００ｋＤａ～約１２００ｋＤａである。本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルのコアおよび／または少なくとも１つの表面を被覆する層の形成に用いられるアルギン酸塩は溶液として供給されてもよく、より好ましくは水溶液として供給され、例えば約２～約５０ｍＰａ　ｓの範囲、より好ましくは約３～約１０ｍＰａ　ｓの範囲で用いられ得るアルギン酸塩の、粘度０．２％（ｗ／ｖ）水溶性アルギン酸塩溶液であり得る。アルギン酸塩を本発明において用いる場合、それらは、α－Ｌ－グルロン酸を豊富に含むことが好ましい。他の研究において、少なくとも５０％のα－Ｌ－グルロン酸（およびβ－Ｄ－マンヌロン酸は５０％以下）を含むアルギン酸塩が好ましい。より好ましくは、５０％～７０％のα－Ｌ－グルロン酸と、３０％～５０％のβ－Ｄ－マンヌロン酸を含むアルギン酸塩を用いることである。本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルの調製に適したアルギン酸塩は、特定の藻類種から抽出して得ることができる。このような、藻類種に

は、例えばラミナリア（Ｌａｍｉｎａｒａｌｅｓ）、シオミドロ（Ｅｃｔｏｃａｒｐａｌｅｓ）、ヒバマタ（Ｆｕｃａｌｅｓ）等のような褐藻類、およびアルギン酸塩を生成する他の藻類を含むが、これに限定されない。アルギン酸塩は、当業者に知られた何れかのアルギン酸塩の調製方法にしたがって、新鮮な藻類物質またはその乾燥物質から分離し得る。

【００４８】

ここで規定した（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアの調製に用いられる、ここで規定した架橋されたポリマーと、（球状の）マイクロカプセルの少なくとも１つの表面を被覆する層の調製に用いられる架橋されたポリマーとは、選択したポリマーおよび選択した濃度に関して、同一であっても異なっていてもよい。

【００４９】

第一の実施形態において、（球状の）コアおよび少なくとも１つの表面を被覆する層の調製に用いる架橋されたポリマーは、同一または異なる濃度で、化学的に同一のポリマーを含み得る。好ましくは、（球状の）コアおよび少なくとも１つの表面を被覆する層に存在するポリマーは、ここで規定したいずれかのポリマーから選択される非架橋されたポリマー溶液を用いて調製される。このポリマー溶液において、非架橋されたポリマーは、典型的には、非架橋されたポリマー濃度約０．１％（ｗ／ｖ）～約８％（ｗ／ｖ）で存在し、より好ましくは、非架橋されたポリマー濃度約０．１％（ｗ／ｖ）～約４％（ｗ／ｖ）であり、さらにより好ましくは、非架橋されたポリマー濃度約０．５％（ｗ／ｖ）～約２．５％（ｗ／ｖ）であり、最も好ましくは、非架橋されたポリマー濃度約１％（ｗ／ｖ）～約２％（ｗ／ｖ）である。ここで記載したアルギン酸塩を、本明細書にて使用する（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアの調製のためのポリマーとして用いる場合、および／または（球状の）マイクロカプセルの少なくとも１つの表面を被覆する層の調製のために用いる場合、（球状の）コアの調製のためのポリマー溶液の濃度、および（球状の）マイクロカプセルの少なくとも１つの表面を被覆する層の調製のためのポリマー溶液の濃度は、それぞれ独立して、非架橋されたポリマー濃度０．１～４％（ｗ／ｖ）、好ましくは、非架橋されたポリマー濃度０．４～２％（ｗ／ｖ）から選択することが可能である。両方の溶液のアルギン酸塩濃度は同一であってもよい。その代案として、本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアおよび少なくとも１つの表面を被覆する層の調製のために、異なる濃度でアルギン酸塩を用いてもよい。（球状の）コアおよび／または少なくとも１つの表面を被覆する層の調製のために用いられる非架橋されたポリマーは、好ましくは化学的に同一のポリマーを含み、より好ましくは同一の濃度であり、例えば、本明細書中に記載したポリマーの本明細書中に記載した濃度である。これに関連して、用語「％（ｗ／ｖ）」は、非架橋されたポリマーの濃度に関し、典型的には、例えば、適切な溶液（架橋前）中に非架橋されたポリマーを溶解させた後の、ポリマー溶液の総量に対する乾燥形態のポリマーの特定の量を基準として決定される。しかしながら、例えば、標準状態（室温、正常圧等）で流動性の粒状態で存在するようなポリマーを用いる場合のように、適している場合には、濃度を「％　ｖ／ｖ」濃度に対応する意味にもまた変更することが可能である。

【００５０】

第２の実施形態において、（球状の）コアおよび少なくとも１つの表面を被覆する層の調製のために用いられる架橋されたポリマーは、同一のまたは異なる濃度で化学的に異なるポリマーを含み得る。それゆえに、濃度およびポリマーは、（球状の）コアおよび少なくとも１つの表面を被覆する層のためにここで定義されたものから、互いに独立して別々に選択され得る。さらに、ポリマーは、例えば、天然のポリマー、合成ポリマー、および、例えばブロックポリマーのような、これらの組合せを含む、ここで定義されたポリマーから選択され得る。コアまたは少なくとも１つの表面を被覆する層のために用いられるポリマーの性質上の相違は、用いられるポリマーの分子量の違い、および／または同一のポリマーの異なる架橋等のためでもまたあり得る。

【００５１】

（球状の）マイクロカプセルが１つ以上の表面を被覆する層を含む場合、少なくとも１つの表面を被覆する層のそれぞれのポリマーは、同一であっても異なっていてもよく、例えば、各表面を被覆する層の架橋されたポリマーが、同一または異なる濃度で、化学的に同一または異なるポリマーを含んでいてもよく、例えば、本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルは、ここで規定したいずれかのポリマーからなる、ここで規定した少なくとも１つの表面を被覆する層と、例えば、ポリ－Ｌ－リシン、ポリ－Ｌ－グルタミン酸等のようなここで規定したポリアミノ酸のようなポリカチオンからなる、さらに外部の表面を被覆する層とを含んでいでもよい。同様に、異なる表面を被覆する層に用いられるポリマーの性質上の相違は、用いられるポリマーの分子量の相違、および／または同一のポリマーの異なる架橋等のためであり得る。

【００５２】

本明細書にて使用する（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアは、さらに細胞を含む。このような細胞は、典型的には、間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞のような幹細胞もしくは間質細胞、または他のいずれかの細胞（種）から選択され、本発明に関連して、ＡＭＩもしくはＭＩの疾患、またはこれらに関する疾患の処置に用いられ得る。このような細胞は、典型的には、以下に示すように、核酸、またはむしろ、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１を含んでいる融合ペプチド、そのフラグメントもしくはバリアントをコードする核酸を含むベクターで、細胞を安定的にトランスフェクトすることによって得ることができる。

【００５３】

ここで使用される（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに適した細胞は、全能性幹細胞、分化可能幹細胞、または多能性幹細胞を含む（未分化）幹細胞から選択してもよい。本文脈において用いられる幹細胞は、好ましくは、胚幹細胞、もしくは外胚葉、中胚葉、もしくは内胚葉由来の幹細胞、または（例えばヒト骨髄または脂肪組織由来の）（ヒト）間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞（ＭＳＣ、ｈＭＳＣ）、造血幹細胞、表皮幹細胞、神経幹細胞、およびの皮膚由来の線維芽細胞（筋線維芽細胞）を含む未成熟線維芽細胞等ような成年幹細胞を含む。これらの（未分化）幹細胞は、典型的には、例えば、結果として同一のコピーになる細胞分裂のように、対象な幹細胞分裂が可能である。幹細胞は、何れかの細胞型に形質転換する能力を維持している。さらに、幹細胞は、結果として幹細胞のコピーと、例えば分化細胞のように、幹細胞コピーと異なる他の細胞のコピーとになるように、非対称に分裂することが可能である。

【００５４】

本明細書にて使用する（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに適した、特に、間葉系の幹細胞または間葉系の間質細胞のような、本明細書にて規定したような幹細胞は、さらに、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアントの細胞保護効果をサポートする内因性栄養因子のセットを生成し得る。間葉系の間質細胞のこのパラクリン細胞保護メカニズムのための生物学的活性因子は、例えば、サイトカイン　ＧＲＯ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＭＣＰ－１、ならびに増殖因子ＶＥＧＦ、ＧＤＮＦ、およびニューロトロフィン３であり得る。特に好ましい実施形態において、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアにおける細胞は、それゆえに、カプセルを通して処置的なレベルにて放出されるパラクリン因子としての、ＶＥＧＦ、ＩＬ６、ＩＬ８、ＧＤＮＦ、ＮＴ３およびＭＣＰ１等から選択される内因性タンパク質またはペプチドを分泌する。

【００５５】

本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルのコアは、（分化した）細胞から選択される細胞を、代わりに含んでいてもよく、この細胞は、例えばここに記載した幹細胞または間質細胞から得られる細胞であり、例えば（成熟した）線維芽細胞、軟骨組織細胞（軟骨細胞）、骨組織細胞（骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞）、脂肪組織細胞（脂肪細胞）、もしくは平滑筋細胞のような結合組織ファミリーの細胞、リンパ前駆細胞を含む血液細胞、もしくは例えばＮＫ細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞もしくは樹状細胞のような血液細胞由来の細胞、一般的な骨髄前駆細胞、もしくは例えば樹状細胞、単球、マクロファージ、破

骨細胞、好中球、好酸球、好塩基球、血小板、巨核球もしくは赤血球のような骨髄前駆細胞由来の細胞、マクロファージ、星状細胞、希突起膠細胞等を含む神経細胞、もしくは上皮細胞、または表皮細胞が例として挙げられる。これらの分化した細胞は、典型的には、例えば結果として分化親細胞の同一のコピーが得られる細胞分裂のように、対象な細胞分裂が可能である。さらに、いくつかの場合において、これらの分化した細胞は、親細胞と、例えば、親細胞よりもさらに分化する細胞のように、親細胞とは異なる他の細胞との同一のコピーが結果として得られる、非対称な分裂も可能である。この代案として、いくつかの場合において、本明細書にて規定したような分化した細胞は、例えば、選択的分化因子を添加することによって、細胞分裂を必要とせずに、さらに分化することが可能であり得る。

【００５６】

さらに、本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞は、処置される患者から採取された細胞（自己の細胞）であってもよいし、同種の細胞から採取されたものであってもよい（例えば、インビトロにて培養された樹立細胞株（例えば、ＨＥＫ２９３細胞、ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞））。本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセル内の（球状の）コアに埋め込まれた表面を被覆する層によって、処置される患者による望まれない任意の免疫応答を引き起こすことなく、同種の細胞を用いることができる。

【００５７】

さらに、本発明にしたがって用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞は、本明細書にて規定したようなタイプの細胞（分化した細胞および／または分化していない細胞）の組合せであってもよい。本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアは、例えば、ヒトの間葉系の幹細胞またはヒトの間葉系の間質細胞を含んでいてもよい。これらの細胞の一部は、本明細書にて規定したようなタイプの細胞（例えば、（脂肪組織に移植するに適切な）脂肪細胞）にインビトロまたはインビボにて分化されてもよい。したがって、（例えば、特定のタイプの幹細胞に由来する）様々なタイプの細胞が、例えば共通の系譜を共有する、コアに配置されてもよい。

【００５８】

要するに、本発明にしたがって用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアを調製するに適切な細胞は、分化していない細胞から選択されてもよいし、分化した細胞から選択されてもよい。１実施形態によれば、本明細書にて規定したような分化していない細胞が好ましいことがある。このような分化していない細胞は、有利な特性を提供し得る。例えば、このような分化していない細胞は寿命がより長いので、例えば、本発明にしたがって用いられる（球状の）マイクロカプセルの効果を延長する（例えば、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドあるいはそれらのフラグメントまたはバリアントを発現し、分泌することができることを延長する）。他の実施形態において、本明細書にて規定したような分化した細胞が、本発明にしたがって用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアを調製するに好ましいことがある。これは、このような分化した細胞が、典型的に、これ以上増殖せず、このため、本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コア内にて望まれない任意の細胞増殖を引き起こさないからである。細胞の特異的な分化は、公知の方法にしたがい、選択した分化のための因子を前駆体細胞に添加することによって、当業者がインビトロにて実施し得る。好ましくは、本発明にしたがって用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞の大部分（少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９５％、および最も好ましくは少なくとも９９％）が、同一のタイプの細胞に属する。特に、本明細書にて規定したような間葉系の幹細胞は、インビトロにて、例えば、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞（脂肪の細胞（ｆａｔ　ｃｅｌｌｓ）など）、ニューロン様の細胞（脳細胞）に分化し得、本明細書にて用いてもよい。分化していない細胞または分化した細胞のどちらを本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプ

セルの（球状の）コアを調製するために使用するのかは、処置される疾患に具体的に必要とされるもの（例えば、患部、投与の様式、インプラントのために選択される組織など）に依存し得る。これらの基準を評価する当業者は、適切な細胞を選択し得る。

【００５９】

さらに、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアを調製するに適切な細胞は、不死化された細胞であってもよいし、不死化されていない細胞であってもよいが、不死化された細胞であることが好ましい。不死化された細胞を用いる場合、これらの細胞は、本明細書にて規定したような対称的な細胞分裂および／または非対称的な細胞分裂を行うことができる能力を保持していることが好ましい。本発明によれば、細胞は、寿命が正常な細胞（すなわち、不死化されていない細胞）の寿命の二倍を超える場合、不死であると規定される。インビトロの正常な二倍体細胞の最大の寿命は、細胞のタイプ（例えば、胎児の細胞対成体の細胞）および培養の条件に依存して変化する。インビトロの培養された正常な細胞の最大の寿命は、およそ６０～８０の集団倍加（population doublings）である。例えば、ケラチノサイトは、約８０回分裂することがあり、線維芽細胞は５０回よりも多く分裂することがあり、リンパ球は約２０回分裂することがある。正常な骨髄間質細胞は、３０～４０の集団倍加という最大の寿命を示すことがある。本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアを調製するために用いられる株細胞は、３５０の集団倍加を超えて継続的に増殖し得、若い細胞の正常な増殖速度の特徴を依然として維持し得るものが好ましい。

【００６０】

本明細書にて規定されたような本発明の（球状の）マイクロカプセルの、（球状の）コアを調製するための細胞を不死化するための方法は、周知であり、適宜、適用してもよい（例えば、国際公開第０３／０１０３０５号パンフレットまたは国際公開９８／６６８２７号パンフレット参照。これらの文献は、参考として本明細書に援用される。）。（国際公開第０３／０１０３０５号パンフレットにしたがった）典型的な方法は、例えば以下の（ａ）～（ｃ）の工程を包含している。

（ａ）当業者に公知の従来の標準的な細胞を培養する方法にしたがって、細胞を培養する工程（この細胞は、例えば、幹細胞であり、特に、ヒトの骨髄に由来する幹細胞（例えば、（ヒト）の間葉系の幹細胞（ＭＳＣ、ｈＭＳＣ））である。）、

（ｂ）ヒトのテロメラーゼ逆転写酵素（ｈＴＥＲＴ）の遺伝子またはそのバリアントの少なくともフラグメントを含んでいるレトロウイルスベクターを用いて、この細胞の培養物に対して形質導入を行う工程、

（ｃ）不死の株細胞を取得する工程。

【００６１】

上記（ｂ）の工程は、以下の（ｂ１）～（ｂ５）の工程によって実施される：

（ｂ１）パッケージングを行う株細胞を培養する工程（例えば、ＰＡ３１７細胞、ＰＧ１３細胞、Ｐｈｅｎｉｘ）。なお、このパッケージングを行う株細胞は、レトロウイルスベクターが産生される細胞である；

（ｂ２）レトロウイルスベクター（例えばモロニーマウス白血病ウイルス）をコンストラクトする工程。なお、このレトロウイルスベクターは、ヒトのテロメア反復（ｈＴＥＲＴ）の遺伝子またはそのバリアントの触媒サブユニットの少なくともフラグメント（より好ましくは、ｈＴＥＲＴのｃＤＮＡフラグメント、例えば、ｐＧＲＮ１４５（Geron Corporation）に由来する３４５２塩基対のＥｃｏＲＩフラグメント）を含んでいる；

（ｂ３）パッケージングを行う株細胞にこのレトロウイルスベクターをトランスフェクトする工程；

（ｂ４）パッケージングを行う株細胞に対して、このトランスフェクトした細胞を用いて形質導入する工程。これは、好ましくはレトロウイルスベクターと一緒に細胞を遠心することによって、行う；

（ｂ５）工程（ａ）にしたがって培養した細胞に対して、レトロウイルスベクターを含んでいる工程（ｂ４）のパッケージングを行う細胞を用いて形質導入する工程。不死化さ

れた株細胞は、工程（ａ）の細胞と比べて実質的に同一の特徴および特性を有している。結果としての挿入されたポリヌクレオチド配列（ヒトのテロメアのサブユニット（ｈＴＲＴ）の遺伝子に由来するポリヌクレオチド配列）は、転写され、そして翻訳されて、機能的なテロメラーゼを生じさせる。当業者は、コドンの縮重のせいで、多くのポリヌクレオチド配列が同一のテロメラーゼをコードするであろうことを認識する。さらに、野生型のテロメラーゼと実質的に同一な配列を有し、かつ野生型のテロメラーゼポリペプチドの機能を保持しているテロメラーゼのバリアント（例えば、野生型のテロメラーゼポリペプチドにおけるアミノ酸の保存的置換から生じたもの）が含まれる。

【００６２】

本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドおよびＧＬＰ－１融合ペプチドをコードし、分泌する、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞は、抗アポトーシス因子、増殖因子、ＶＥＧＦ、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、抗血小板因子、抗凝固因子、抗血栓薬、抗血管新生因、または心臓を保護する機能を示す任意のさらなる因子などからなる群より選択される因子をさらに分泌するように、さらに変更または設計されていてもよい。

【００６３】

特定の１実施形態によれば、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドおよびＧＬＰ－１融合ペプチドをコードし、分泌する、（球状の）マイクロカプセルのコアに埋め込まれた細胞は、エリスロポエチン（ＥＰＯ）をさらに分泌するように操作されていてもよい。（ＥＰＯ、エポエチンまたはプロクリット（ｐｒｏｃｒｉｔ）としても知られている）エリスロポエチンは、分子量がおよそ３４，０００ダルトンである酸性の糖タンパク質のホルモンであり、複数の形態（アルファ、ベータ、オメガ、アシアロを含む。）で生じる。エリスロポエチンは、赤血球細胞の生産を刺激する。エリスロポエチンは腎臓にて生産され、骨髄および他の場所における関係づけられた赤血球の前駆体の分裂及び分化を刺激する。一般に、エリスロポエチンは、身体が健康な状態で、存在する数の赤血球から十分な酸素を組織が受容する場合、血漿にて非常に低い濃度で存在する。この正常な低い濃度は、老化に伴い正常に失われる赤血球細胞の置換を刺激するに十分である。循環におけるエリスロポエチンの量は、低酸素症のような状態の下で、血液細胞による酸素の輸送が低減したときに増加する。低酸素症は、出血を通して多量の血液を喪失すること、放射線に対する過剰な曝露によって赤血球細胞が破壊されたこと、高度が高いために酸素の摂取が低減したこと、あるいは意識の喪失が長く続いたこと、または種々の形態の貧血もしくは虚血、によって引き起こされることがある。低酸素のストレスを受ける組織への応答において、エリスロポエチンは、骨髄における原始的な前駆体細胞が前赤芽球へ転換されることを刺激することによって、赤血球細胞の生産を増加させる。なお、前赤芽球は、その後、成熟して、ヘモグロビンを合成し、そして、赤血球として循環内に放出される。循環における赤血球細胞の数が、正常な組織の酸素需要量に必要とされるものよりも多い場合、循環におけるエリスロポエチンは低減される。エリスロポエチンは、赤血球の生産を誘導して貧血と戦うために、上記細胞に含まれるさらなる因子として用いられることが好ましい（例えば、Ｂｏｔｔｏｍｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｌａｎｃｅｔ Ｏｎｃｏｌ．３：１４５参照）。また、エリスロポエチンは、異常な止血によって、患者における出血を制御することに有用であることが示唆されている（例えば、米国特許第６，２７４，１５８号明細書参照）。

【００６４】

ヒトの組換えエリスロポエチン（ｒＨｕＥｐｏまたはエポエチン［アルファ］）は、エポゲン（ＥＰＯＧＥＮ（登録商標））（エポエチンアルファ、ヒトの組換えエリスロポエチン）（Ａｍｇｅｎ Ｉｎｃ．，Ｔｈｏｕｓａｎｄ Ｏａｋｓ，Ｃａｌｉｆ．）として、およびプロクリット（ＰＲＯＣＲＩＴ（登録商標））（エポエチンアルファ、ヒトの組換えエリスロポエチン）（Ｏｒｔｈｏ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ．，Ｒａｒｉｔａｎ，Ｎ．Ｊ．）として市販されている。ＥＰＯは、ＡＭＩまたはＭＩに罹患した患者においてヘマトクリット値を増加させ得る。エリスロポエチンのヘマトクリット値についての

正常な範囲は、女性の場合、３７～４８パーセントであり、男性の場合、４２～５２パーセントである（Ｃａｓｅ Ｒｅｃｏｒｄｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｈｏｓｐｉｔａｌ：ｎｏｒｍａｌ ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｖａｌｕｅｓ．（１９９２）Ｎ．Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２７：７１８参照）。もちろん、心臓血管系疾患（特に、腎不全）に罹患した患者においてヘマトクリット値を増加させるための、エリスロポエチンの使用の安全性および有効性は、さらに評価されなければならない。エリスロポエチンは、赤血球細胞の形成を誘導しないか、または被験体におけるヘマトクリットを増加させないであろう濃度または期間にて典型的に提供されることが好ましい。例えば、このような濃度は、約１ｐＭ～１０００μＭ未満であり、９００μＭ未満、７００μＭ未満、５００μＭ未満、３００μＭ未満、１００μＭ未満、または５０μＭ未満が挙げられる。他の実施形態において、エリスロポエチンは、被験体の体重に応じて投与される。エリスロポエチンは、被験体の体重の約１Ｕ／ｋｇ～１０，０００Ｕ／ｋｇ（７，５００Ｕ／ｋｇ未満、５，０００Ｕ／ｋｇ、２５００Ｕ／ｋｇ、１０００ Ｕ／ｋｇ、７５０Ｕ／ｋｇ、５００Ｕ／ｋｇ、２５０Ｕｇ／ｋｇ、１００Ｕｇ／ｋｇ、５０Ｕ／ｋｇ、２５Ｕ／ｋｇ、１０Ｕ／ｋｇ、５Ｕ／ｋｇ、または１Ｕ／ｋｇを含む。）の濃度にて典型的に提供されてもよい。これに関して、エリスロポエチンの血清濃度は、一般に、５～３０ｍＵ／ｍＬの範囲である。ＭＩまたはＡＭＩあるいはこれらに関連する他の疾患に罹患した患者に関して、エリスロポエチンは、症状、体重、性別および動物種などに応じて、５０～１００Ｕ／ｋｇの濃度のいずれかにて提供されることが好ましい。約１～１００ｍＵ／ｍＬの血中濃度を保持する処置の選択肢が好ましいことが一般に考えられる。また、エリスロポエチンは、生存者におけるヘマトクリットを増加させない濃度にて典型的に提供されることが好ましい。この場合、エリスロポエチンは、心筋梗塞の１、２または３時間以内に、単一用量にて長期間投与される。

【００６５】

さらなる特定の１実施形態によれば、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドおよびＧＬＰ－１融合ペプチドをコードし、分泌する、（球状の）マイクロカプセルのコアに埋め込まれた細胞は、ＶＥＧＦをさらに分泌するように設計されていてもよい。

【００６６】

別の特定の実施形態によれば、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドおよびＧＬＰ－１融合ペプチドをコードし、分泌する、（球状の）マイクロカプセルのコアに埋め込まれた細胞は、抗アポトーシス因子をさらに分泌するように設計されていてもよい。このような因子としては、限定されないが、ＡＰＣ（カスパーゼを動員するドメインを有するアポトーシスリプレッサー）、Ｂｃｌ－２、Ｂｃｌ－ｘＬ、Ｃｈｅ－１／ＡＡＴＦ、クラスタリン、インスリン、Ｍｃｌ－１、ＮＦ－ｋＢ依存性の抗アポトーシス因子、セロトニン、サバイビンが挙げられる。さらに、公知のアポトーシス因子を抑制する因子としての役割を果たし、このため、抗アポトーシス因子としてみなし得る任意の因子も含まれる。このような因子は、核酸によってコートされており、本明細書に規定したようなＧＬＰ－１ペプチドおよびＧＬＰ－１誘導ペプチドをコードしかつ分泌する細胞によって分泌されることが好ましい。これに関して、このような抗アポトーシス因子は、アポトーシス因子またはアポトーシスに関連するタンパク質の少なくとも１つを対象とし得る。このようなアポトーシス因子またはアポトーシスに関連するタンパク質としては、ＡＩＦ、Ａｐａｆ（例えばＡｐａｆ－１、Ａｐａｆ－２、Ａｐａｆ－３）、ｏｄｅｒ ＡＰＯ－２（Ｌ）、ＡＰＯ－３（Ｌ）、Ａｐｏｐａｉｎ、Ｂａｄ、Ｂａｋ、Ｂａｘ、Ｂｃｌ－２、Ｂｃｌ－ｘＬ、Ｂｃｌ－ｘＳ、ｂｉｋ、ＣＡＤ、カルパイン、カスパーゼ（例えばカスパーゼ１、カスパーゼ２、カスパーゼ３、カスパーゼ４、カスパーゼ５、カスパーゼ６、カスパーゼ７、カスパーゼ８、カスパーゼ９、カスパーゼ１０、カスパーゼ１１）、ｃｅｄ－３、ｃｅｄ－９、ｃ－Ｊｕｎ、ｃ－Ｍｙｃ、ｃｒｍ Ａ、チトクロムＣ、ＣｄＲ１、ＤｃＲ１、ＤＤ、ＤＥＤ、ＤＩＳＣ、ＤＮＡ－ＰＫＣＳ、ＤＲ３、ＤＲ４、ＤＲ５、ＦＡＤＤ／ＭＯＲＴ－１、ＦＡＫ、Ｆａｓ（Ｆａｓ－リガンド ＣＤ９５／ｆａｓ（レセプター））、ＦＬＩＣＥ／ＭＡＣＨ、ＦＬＩＰ、ホドリン、ｆｏｓ、Ｇ－アクチン、Ｇａｓ－２、ゲル

ゾリン、グランザイムＡ／Ｂ、ＩＣＡＤ、ＩＣＥ、ＪＮＫ、ラミンＡ／Ｂ、ＭＡＰ、ＭＣＬ－１、Ｍｄｍ－２、ＭＥＫＫ－１、ＭＯＲＴ－１、ＮＥＤＤ、ＮＦ－ｋａｐｐａＢ、ＮｕＭａ、ｐ５３、ＰＡＫ－２、ＰＡＲＰ、パーフォリン、ＰＩＴＳＬＲＥ、ＰＫＣｄｅｌｔａ、ｐＲｂ、プレセニリン、ｐｒＩＣＥ、ＲＡＩＤＤ、Ｒａｓ、ＲＩＰ、スフィンゴミエリナーゼ、単純ヘルペスからのｔｈｙｍｉｄｉｎｋｉｎａｓｅ、ＴＲＡＤＤ、ＴＲＡＦ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、トランスグルタミナーゼなどが挙げられる。

【００６７】

本明細書にて規定されたような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに含まれた細胞によってコードされ分泌される、ＧＬＰ－１ペプチドは、任意の公知のＧＬＰ－１ペプチドの配列から選択されてもよい。これに関して、神経を保護する因子ＧＬＰ－１は、プレプログルカゴンをコードする十分に研究されたグルカゴンの遺伝子に位置している（例えば、Ｗｈｉｔｅ，Ｊ．Ｗ．ｅｔａｌ．，１９８６ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１４（１２）４７１９－４７３０参照）。高分子量の前駆体分子としてのプレプログルカゴンは、膵臓のアルファ細胞、ならびに空腸および結腸のＬ細胞にて合成される。プレプログルカゴンは、１８０アミノ酸の長さを有するプロホルモンであり、その配列は、グルカゴンに加えて、関連する構造の２つの配列（グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）、およびグルカゴン様ペプチド－２（ＧＬＰ－２））を含んでいる。プレプログルカゴン分子において、ＧＬＰ－１とＧＬＰ－２との間は、１７アミノ酸のペプチド配列（あるいは、より正確に言えば、１５アミノ酸の配列およびＣ末端のＲＲ切断部位）である、介在ペプチド２（ＩＰ２）である。ＩＰ２の配列（前駆体分子においてＧＬＰ－１とＧＬＰ－２との間に位置する配列）は、通常、インビボにて、３７アミノ酸のＧＬＰ－１の後でタンパク質分解によって切断される。このため、プレプログルカゴン分子は、細胞および環境に応じて、種々のペプチド（ＧＬＰ－１（１－３７）（プロセスされていない形態の３７アミノ酸のペプチド）を含む。）に切断される。一般に、このプロセッシングは膵臓および腸にて起こる。ＧＬＰ－１（１－３７）の配列は、さらにプロセスされて、活性のあるＧＬＰ－１（７－３７）（プロセスされた３１アミノ酸の形態）になり得るか、または、さらに変性した産物であるＧＬＰ－１（７－３６）アミドになり得る。したがって、名称「ＧＬＰ－１（７－３７）」とは、親のペプチドであるＧＬＰ－１のＮ末端から数えたときに、問題となっているフラグメントが７番目のアミノ酸残基～３７番目までのアミノ酸残基を含んでいることを意味する（７番目のアミノ酸残基および３７番目のアミノ酸残基を含んでいる。）。ＧＬＰ－１（７－３６）のアミノ酸配列、ＧＬＰ－１（７－３７）のＧＬＰ－１（７－３６）アミドのアミノ酸配列は、式Ｉ（配列番号２５）にて与えられる。

【００６８】

【数１】

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-X (I)

【００６９】

ここで、ＸがＮＨ$_2$である場合、ＧＬＰ－１（７－３６）アミドを示すか、Ｘが存在しない場合、ＧＬＰ－１（７－３６）を示し、ＸがＧｌｙ－ＯＨである場合、ＧＬＰ－１（７－３７）を示す。

【００７０】

本発明の１実施形態によれば、ＧＬＰ－１ペプチドは、それ故、例えば本明細書にて規定されたような任意の公知のＧＬＰ－１ペプチドの配列から選択されてもよい。これに関して、ＧＬＰ－１ペプチドは、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によって分泌され得る。このため、これらの細胞が、ＧＬＰ－１ペプチドを発現し、分泌するように、（球状の）コアを調製する前に、本明細書にて規定されたようなＧＬＰ－１ペプチドをコードする核酸配列によってトランスフェクトされてもよい。好まし

くは、（球状の）マイクロカプセルに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得る、本明細書にて用いられるようなＧＬＰ－１ペプチドは、（ｗｔ）ＧＬＰ－１の７－３５のアミノ酸を含んでいるペプチド、またはこのペプチドと少なくとも８０％、９０％、９５％もしくはさらには９９％の同一性を示すペプチドからなる群より選択され得る。一般に、ＧＬＰ－１ペプチドは、（ｉ）（ｗｔ）ＧＬＰ－１の１－３７のアミノ酸を含んでいるペプチド、（ｉｉ）（ｗｔ）ＧＬＰ－１の７－３５、３６または３７のアミノ酸を含んでいるペプチド、（ｉｉｉ）ＧＬＰ－１（７－３６）アミド、および（ｉｖ）これらのペプチドのいずれかと少なくとも８０％、９０％、９５％またはさらには９９％の同一性を示すペプチド（修飾されたペプチドを含む。）、からなる群より選択されてもよい。これに関して、「修飾されたＧＬＰ－１ペプチド」は、（ｗｔ）ＧＬＰ－１の生物学的な機能を保持している任意のＧＬＰ－１のバリアントまたはＧＬＰ－１のフラグメント（組合せ（例えばバリアントのフラグメント）を含む。）を意味することが意図される。バリアントおよびフラグメントは、修飾されていないＧＬＰ－１の配列（例えば、ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７））が修飾されたものとして分類される。本発明の意義の範囲内において、フラグメントのバリアントの任意のものは、機能的でなければならず、例えば、修飾されていない（ＧＬＰ－１）ペプチドと同一または類似の生物学的活性を発揮しなければならない。用語「活性」は、生物学的活性（例えば、レセプターへの結合、レセプターの活性化、ＧＬＰ－１に対して公知の有利な効果の発揮を含んでいる生物学的活性の１つ以上）をいう。上述したＧＬＰ－１に対して公知の有利な効果は、例えば、従来技術にて記載されたようなＧＬＰ－１の効果と関連して本明細書で言及されたような、心臓組織の死の可能性および虚血または酸素の欠乏によって引き起こされたダメージ、を強力に低減する活性である。このような活性は、本明細書にて規定されたような天然に存在するＧＬＰ－１ペプチドおよびその任意のフラグメントまたはバリアントについての同一の条件にて比較され得る。好ましくは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドのバリアントまたはフラグメントは、ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）の少なくとも２５％の活性を発揮し、より好ましくは本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）の少なくとも５０％の（生物学的な）活性を発揮し、さらに好ましくは本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）の６０、７０、８０または９０％の（生物学的な）活性を発揮し、最も好ましくは本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）の少なくとも９５または９９％の（生物学的な）活性を発揮する。生物学的な活性は、例えば、２型糖尿病の動物モデルを用いた、好ましくは血糖値を低下させるインクレチンホルモンとしての活性を決定することができる、標準的なアッセイによって決定してもよい。

【００７１】

特に好ましい実施形態によれば、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ得る、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドは、そのＮ末端にて、本明細書にて規定したような（ネイティブな）ＧＬＰ－１（１－３７）の天然に存在する１～６のアミノ酸を含んでいない。さらに好ましくは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたは以下にて規定するようなＧＬＰ－１融合ペプチドは、そのＮ末端にて、本明細書にて規定したようなネイティブなＧＬＰ－１（１－３７）の配列の天然に存在する１、２、３、４、５および／または６のアミノ酸を含んでいない。この条件は、ＧＬＰ－１の７－３５、３６または３７のアミノ酸を含んでいるペプチド、ＧＬＰ－１（７－３６）アミド、および、これらのペプチドのいずれかと少なくとも８０％、９０％、９５％、またはさらに９９％の同一性を示すペプチド（修飾されたペプドを含む）からなる群より選択される、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドをいい、このようなＧＬＰ－１ペプチドを含んでいるＧＬＰ－１融合ペプチドをいう。しかし、この条件は、上述の本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドおよび本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドが、Ｎ末端（またはＣ末端）の配列の修飾、または、Ｎ末端（またはＣ末端）に融合されたさらなるアミノ酸もしくはペプチド（例えば、シグナルペプチドの配列および／またはリーダー

ペプチドの配列など）を含んでいることを排除しない。しかし、このようなＮ末端（またはＣ末端）の配列の修飾、および、Ｎ末端（またはＣ末端）に融合されたさらなるアミノ酸もしくはペプチドは、ｗｔＧＬＰ－１の１～６のアミノ酸の配列と異なっている。別の好ましい実施形態において、ホモログのＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）のＮ末端に結合した任意のアミノ酸は、ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）の６位における天然に存在するアミノ酸と対応しない。さらに好ましい実施形態によれば、ホモログのＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）のＮ末端に（直接的に）結合した任意のアミノ酸は、好ましくはＧＬＰ－１内のネイティブな順番にて、ネイティブなＧＬＰ－１の６位における天然に存在するアミノ酸、５位および６位における天然に存在するアミノ酸、４位、５位および６位における天然に存在するアミノ酸、３位、４位、５位および６位における天然に存在するアミノ酸、２位、３位、４位、５位および６位における天然に存在するアミノ酸、または１位、２位、３位、４位、５位および６位における天然に存在するアミノ酸と対応しない。特に好ましい実施形態によれば、ホモログのＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）のＮ末端に結合した任意のアミノ酸は、プレプログルカゴンの配列と対応しない。

【００７２】

ネイティブなＧＬＰ－１（特に、ＧＬＰ－１（７－３６））は、インビボでの半減期が短いので、頻繁に投与することが厳格に避けられる一般的な治療的処置、または長期間の投与が予想される一般的な治療的処置にて使用することが制限される。ＧＬＰ－１は、ＤＰＰ－ＩＶ（ジペプチジルペプチダーゼＩＶ）によって残基８と残基９との間で血漿にて迅速に数分以内に分解され、NH_2の末端にて切断された代謝産物である不活性なＧＬＰ－１（９－３６）が生じる。さらに、ネイティブなＧＬＰ－１は、通常、腎臓から排泄される。これらの要因は、ＧＬＰ－１（７－３６）またはNH_2の末端にて切断された代謝産物であるＧＬＰ－１（９－３６）のどちらのペプチドがインビボにて活性な部分であるのか、生理学的な効果がネイティブなＧＬＰ－１またはそのフラグメントによる処置への適用において発揮されるのかという問題を提起する。インビボにて迅速に分解された結果として、そして、インビボにて迅速に分解されることに起因して、ネイティブなＧＬＰ－１またはそのフラグメントは、短期間で代謝を制御するための適切なツール（急性のＡＭＩまたはＭＩの疾患あるいはこれらに関連する疾患に罹患した患者において有用である可能性がある集中的な処置を行うユニットなど）として使用してもよい。

【００７３】

このような素早い分解を避けるために、種々の試みがなされ、天然に存在するＧＬＰ－１（例えば、ＧＬＰ－１（７－３７））の（ＤＰＰ－ＩＶによる分解に対して）安定化された類似体が合成されている。特に、インビボではＡｌａである第８番目の残基が、別の残基（例えば、Ｇｌｙ、ＳｅｒまたはＴｈｒ）と置換された（Ｂｕｒｃｅｌｉｎ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ ４８，２５２－２５８）。Ｇｌｙ８（またはＧ８）の類似体は、合成された分子としてや、変異ポリペプチドを分泌するように遺伝子操作された株細胞によって産生された分子として、幅広くテストされている（Ｂｕｒｃｅｌｉｎ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．（１９９９），Ａｎｎａｌｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ８７５：２７７－２８５）。生物学的な活性を損なうことなく、インビボでの安定性を増強するために、種々の他の修飾がＧＬＰ－１（７－３７）などに導入されている。

【００７４】

このようなアプローチは、ＤＰＰ－ＩＶによる分解に対してＧＬＰ－１を安定化させること（例えば、ＧＬＰ－１ペプチドと一緒にＤＰＰ－ＩＶ阻害剤をさらに投与すること）によって、半減期が短いという問題を回避する。ＧＬＰ－１ペプチドと一緒にＤＰＰ－ＩＶ阻害剤をさらに投与することは、複雑であり、そして、ＤＰＰ－ＩＶ阻害剤がインビトロの系においてのみ効果的に用いられ得るので、通常、所望の長期間の処置をもたらさない。

【００７５】

それ故、代替的な実施形態によれば、（球状の）マイクロカプセルのコアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌されるＧＬＰ－１ペプチドは、ＧＬＰ－１融合ペプチドまたはそのバリアントもしくはフラグメントから選択してもよい。本明細書にて用いられるようなＧＬＰ－１融合ペプチドは、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌されてもよい。これに関して、本明細書にて規定したような、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞は、これらの細胞がＧＬＰ－１融合ペプチドをコードし、発現し、そして分泌するように、このコアを調製する前に、ＧＬＰ－１融合ペプチドをコードする核酸配列によって典型的にトランスフェクトされる。

【００７６】

好ましくは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドは、少なくとも２つの成分（例えば、成分（Ｉ）および成分（ＩＩ）、成分（Ｉ）および成分（ＩＩＩ）または成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））を有しており、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１の生物学的な活性を示すと同時に、（このような）Ｃ末端の伸長によってＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ）に対して安定性を典型的に付与する。本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ）は、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドの配列を典型的に含んでおり、配列番号１と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含んでいることが好ましく、配列番号１と少なくとも８５％の配列同一性を有する配列を含んでいることがより好ましく、配列番号１と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列を含んでいることがさらに好ましい。配列番号１は、ＧＬＰ－１（７－３７）のネイティブなアミノ酸配列（３１アミノ酸の長さ）を表し、哺乳動物の間で厳格に保存されている。特に好ましい実施形態によれば、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ）は、配列番号１と同一の配列を含んでいるか、配列番号１の３６および／または３７のアミノ酸が欠失した配列を含んでいる。

【００７７】

本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチド（または、より一般的に、融合ペプチドのフラグメントまたはバリアントを含んでいる任意のＧＬＰ－１ペプチド）の成分（ＩＩ）は、少なくとも９個のアミノ酸を有するペプチド配列を典型的に含んでいる。ＧＬＰ－１融合ペプチドは、その成分（ＩＩ）において、９～３０個のアミノ酸の長さの配列を典型的に含んでおり、９～２０個のアミノ酸の長さの配列を含んでいることが好ましく、９～１５個のアミノ酸の長さの配列を含んでいることが最も好ましい。一般的に言えば、成分（ＩＩ）内の配列が短くなることが好ましい場合がある。これは、より長い配列よりも、ＧＬＰレセプターに対する結合活性が優れているからである。成分（ＩＩ）の配列は、必須ではないが、好ましくは、ｐＨ７において中性であってもよいし、ｐＨ７において負に帯電してもよい。ＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩ）は、その配列においてプロリン残基を少なくとも１つさらに含んでいてもよい。プロリン残基は、βターンを形成する四量体のアミノ酸配列に含まれる一般的なアミノ酸である。したがって、ＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩ）は、βターン様の構造を形成し得る。βターンの構造は、タンパク質またはペプチドの二次構造の要素である。βターンの構造は４個のアミノ酸のストレッチ（ｓｔｒｅｔｃｈ）によって典型的に形成され、ペプチドまたはタンパク質の骨格の鎖の方向を反転する。ＧＬＰ－１融合ペプチドに存在する場合、プロリン残基は、ＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩ）に存在する四量体のβターンの配列モチーフの２位または３位に一般に位置しており、２位に位置することが好ましい。

【００７８】

本明細書にて規定するような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチド（あるいはより一般的に、融合ペプチドのフラグメントまたはバリアントを含む任意のＧＬＰ－１ペプチド）の成分（ＩＩ）は、ＶＡＩＡ、ＩＡＥＥ、ＰＥＥＶ、ＡＥＥＶ、ＥＥＬＧ、ＡＡＡＡ、ＡＡＶＡ、ＡＡＬＧ、ＤＦＰＥ、ＡＡＤＸ、ＡＸＤＸ、およびＸＡＤＸからなる群より選択

される配列モチーフを含んでいてもよい。このＸは、任意のアミノ酸（天然に存在するアミノ酸または修飾された天然でないアミノ酸）を表す。四量体のモチーフは、成分（ＩＩ）の配列において任意の位置に位置していてもよい。特に好ましい実施形態において、本発明の融合ペプチドの成分（ＩＩ）は、Ｎ末端の配列モチーフが成分（Ｉ）のＣ末端に連結されるペプチド配列である。このＮ末端の配列モチーフは、ＡＡ、ＸＡ、ＡＸ、ＲＲ、ＲＸ、およびＸＲからなる群より選択される。このＸは任意のアミノ酸（天然に存在するアミノ酸または修飾された天然でないアミノ酸）を表す。

【００７９】

本明細書にて規定されるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩ）として特に好ましいものは、ヒトまたはマウスのＩＰ－２の部分配列に対応する配列番号４８：X_1X_1ＤＦＰ$X_2X_2X_3X_4$に係る配列を含んでいるペプチド配列である。各X_1は、互いに独立して、任意の天然に存在するアミノ酸から典型的に選択され、アルギニン（Ｒ）またはアラニン（Ａ）であることが好ましく、アラニン（Ａ）であることがより好ましいが、存在していなくてもよい。各X_2は、互いに独立して、アスパラギン酸（Ｄ）またはグルタミン酸（Ｅ）から典型的に選択される。X_3およびX_4のそれぞれは、互いに独立して、任意の天然に存在するアミノ酸から典型的に選択され、アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）、イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、トレオニン（Ｔ）、またはバリン（Ｖ）であることが好ましい。また、X_4は存在していなくてもよい。

【００８０】

本明細書にて規定されるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩ）としてさらに好ましいものは、配列番号２２（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩ）、配列番号２７（ＤＦＰＥＥＶＡＩ）、配列番号２８（ＲＤＦＰＥＥＶＡ）、または配列番号２９（ＲＲＤＦＰＥＥＶ）、配列番号３０（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩ）、配列番号３１（ＡＤＦＰＥＥＶＡ）、または配列番号３２（ＡＡＤＦＰＥＥＶ）に係る配列を含んでいるペプチド配列であるか、配列番号２２、２７、２８、２９、３０、３１または３２と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含んでいるペプチド配列である（全てのペプチド配列を一文字のコードで表す。）。配列番号２２は、全長のＩＰ－２（介在ペプチド２）の部分配列であり、１５アミノ酸である全長のＩＰ－２配列のうちの、Ｎ末端の１０個のアミノ酸を含んでいる。ＩＰ－２は、本明細書にて用いるような成分（ＩＩ）の好ましい例である。したがって、本明細書にて規定したＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩ）に含まれる他のより有力な好ましい配列は、ＩＰ－２のより長い部分アミノ酸配列であり、例えば、ヒトに存在するＮ末端の１４個のアミノ酸配列（配列番号２３（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬ））、またはそのマウスの対応物（配列番号２４（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬ））、あるいは配列（（配列番号３３（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬ））または（配列番号３４（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬ））、または配列番号２３、２４、３３または３４と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列が挙げられる。ＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩ）に含まれる要素として最も好ましいものは、天然に存在するＩＰ－２配列の１５個全てのアミノ酸を有する全長のＩＰ－２配列であるか（配列番号２（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬＧ）、ヒト、または配列番号３（ＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬＧ）、マウス、または配列番号３５（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬＧ）、もしくは配列番号３６（ＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬＧ））、あるいは配列番号２、３、３５または３６と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列である。また、本発明の範囲において、ＩＰ２の哺乳動物のアイソフォーム（哺乳動物の中のＩＰ２の天然のバリアント）の全ても含まれる。成分（ＩＩ）に含ませられる配列は１よりも多いコピー数で提供されてもよく、例えば、２、３、またはそれよりも多くのコピー数のＩＰ２またはＩＰ２のフラグメントもしくはバリアントが提供されてもよい。

【００８１】

したがって、本明細書にて規定されるような、（球状の）マイクロカプセルの（球状の

）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌されたＧＬＰ－１融合ペプチドは、配列番号８（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬＧ）に係る配列、すなわち、ＧＬＰ－１（７－３７）がそのＣ末端にてマウスのＩＰ２とリンカー配列を介さずに連結しているもの、または配列番号１２（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬＧ）に係る配列、すなわち、ＧＬＰ－１（７－３７）がそのＣ末端にてヒトのＩＰ２とリンカー配列を介さずに連結しているもの、または配列番号３７（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬＧ）に係る配列、すなわち、ＧＬＰ－１（７－３７）がそのＣ末端にてＩＰ２とリンカー配列を介さずに連結しているもの、または配列番号３８（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＡＡＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬＧ）、すなわち、ＧＬＰ－１（７－３７）がそのＣ末端にてＩＰ２とリンカー配列を介さずに連結しているもの、あるいは、配列番号３９（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＦＡＥＥＶＡＩＡＥＥＬＧ）に係る配列、配列番号４０（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＡＡＡＡＶＡＩＡＥＥＬＧ）に係る配列、配列番号４１（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＡＡＤＡＡＡＡＶＡＩＡＡＡＬＧ）に係る配列、配列番号４２（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＦＰ）に係る配列、配列番号４３（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＦＰＥＥＶＡ）に係る配列、配列番号４４（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＡＥＥＬＧＲＲＨＡＣ）に係る配列、配列番号４５（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＦＡＥＥＶＡＩＶＥＥＬＧ）に係る配列、配列番号４６（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＡＡＡＡＶＡＩＶＥＥＬＧ）に係る配列、配列番号４７（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＡＡＤＡＡＡＡＶＡＩＶＡＡＬＧ）に係る配列、または配列番号４８（ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧＲＲＤＦＰＥＥＶＡＩＶＥＥＬＧＲＲＨＡＣ）に係る配列、すなわち、ＧＬＰ－１（７－３７）がそのＣ末端にてＩＰ２配列の特定の類似体またはバリアントとリンカー配列を介さずに連結しているもの、を含有しているか、または含んでいるか、あるいはこの配列からなることが好ましい。配列番号８、１２、および３７～４８と少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントまたはフラグメント、あるいはそれらのフラグメントまたはバリアントも、本発明に用いてもよい。これに関して、好ましいＧＬＰ－１融合ペプチドは、配列番号１３、１４、１９および２０に係る配列をさらに含んでいてもよい。

【００８２】

どのような理論にも縛られることなく、本発明の発明者らは、ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）の不安定性（例えば、本発明にしたがって用いる移植された（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によって、患者の周囲の組織へとインビボで分泌された場合の、ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）の不安定性）が、ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）の３次元的な構造が保護されていないことに起因しているとの結論を下した。プロテアーゼは、ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）ペプチドを切断し、このペプチドの生理学的な活性をインビボにて迅速に消失させる。ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）のＣ末端にペプチド配列を連結させることによって、ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）の構造は、酵素による消化に対する安定性を増加させる。例えば、一次構造と成分（ＩＩ）に剛性を与えることとによって形成されるβターンの構造要素が存在することに起因してさらなるＣ末端のペプチド配列が折り返される場合、このような安定性はさらに増加し得る。本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドは、βターンの構造要素を含んでいることが好ましいＣ末端のペプチドの伸長部分のおかげで、ＤＰＰ－ＩＶに対する向上した耐性を有することが見出された。Ｃ末端のペプチドは、標的細胞におけるレセプターに対して作用する前にＧＬＰ－１

（７－３５、３６または３７）から切断されることがないか、または、Ｃ末端のペプチドは酵素的に切断されて、インビボにてＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）を形成し得る。ＧＬＰ－１のレセプターの部位に結合されたＧＬＰ－１ペプチドの正確な形態に関係なく、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドは、神経を保護する活性な化合物としての機能を発揮する。一次構造がβターンを形成することから本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩ）にとって適切であると考慮されるＧＬＰ－１のペプチド配列は、適切な分光法など（例えば、円偏光二色性）または当業者にとって公知の他の方法によって容易に同定され得る。

【００８３】

本明細書にて規定されるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩ）および成分（Ｉ）は、直接的に連結されてもよいし、リンカー配列を介して連結されてもよい。好ましくは、両方の成分は互いに直接的に連結される。これらの成分がリンカー（またはスペーサー）を介して連結される場合、このリンカーはペプチドのリンカーであることが好ましい。ペプチドのリンカーは、１～１０個のアミノ酸の長さを典型的に有しており、１～５個のアミノ酸の長さを有していることが好ましく、１～３個のアミノ酸の長さを有していることがさらに好ましい。いくつかの場合では、リンカーの配列は、１１～５０個のアミノ酸を含んでいるより長いものであってもよい。ペプチドのリンカーは、種々の（天然に存在する）アミノ酸配列から構成されてもよい。ペプチドのリンカーは、連結される成分の間にある程度の構造的な柔軟性をもたらすことが好ましい。例えば、ペプチドのリンカーに種々のグリシン残基またはプロリン残基を含有させることによって、構造的な柔軟性を実現することができる。このリンカーの配列には、グリシン残基およびプロリン残基が少なくとも３０％で含まれていることが好ましく、少なくとも４０％で含まれていることがより好ましく、少なくとも６０％で含まれていることがさらに好ましい。好ましくは、特定の配列に関係なく、ペプチドのリンカーは免疫学的に不活性であり得る。

【００８４】

本明細書にて規定されるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチドは、成分（ＩＩＩ）をさらに含んでいてもよい。成分（ＩＩＩ）は、少なくとも４個のアミノ酸残基を通常含んでおり、少なくとも１０個のさらなるアミノ酸残基を含んでいることが好ましく、少なくとも２０個のアミノ酸残基を含んでいることがより好ましく、少なくとも３０個のアミノ酸残基を含んでいることが最も好ましい。機能的な用語において、成分（ＩＩＩ）は、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドの安定性をさらに向上することが意図される。成分（ＩＩＩ）は、ＧＬＰ－１（７－３７）の生物学的な活性とほぼ匹敵するＧＬＰ－１融合ペプチドの生物学的な機能を妨害しないことが期待される。一般的に言えば、本明細書にて規定したような成分（Ｉ）の任意のＣ末端の延長部分は、それが本明細書にて規定したような成分（ＩＩ）であるか、成分（ＩＩＩ）であるか、成分（ＩＩ）と成分（ＩＩＩ）との組合せであるかに関わらず、成分（Ｉ）（すなわち、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチド（例えばＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）、または本明細書にて規定したようなそのフラグメントもしくはバリアント）の安定性を向上する。

【００８５】

好ましくは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩＩ）は、任意の哺乳動物の生物体のＧＬＰ－２のアイソフォーム（哺乳動物の中のＧＬＰ－２の、天然に存在する他のバリアント）のＮ末端配列の少なくとも４個、好ましくは少なくとも１０個、より好ましくは少なくとも２０個のさらなるアミノ酸残基を含んでいる。このようなアイソフォームは、例えば、配列番号４および５に示したようなマウスまたはヒトのアイソフォームである。ＧＬＰ－２は、プログルカゴンの中に存在しており、炭水化物の代謝に関与している。本発明に関連して、用語「ＧＬＰ－２ペプチド」は、ＧＬＰ－２（１－３３、３４、または３５）を意味することが好ましい。「修飾されたＧＬＰ－２ペ

プチド」は、ＧＬＰ－２の任意のフラグメントまたはバリアント、あるいはＧＬＰ－２（１－３３、３４または３５）のフラグメントまたはバリアントを意味することが意図される。バリアントまたはフラグメントは、修飾されていない配列（例えば、ＧＬＰ－２（１－３３、３４または３５））の修飾として分類される。成分（Ｉ）（ＧＬＰ－１ペプチド）に含まれる生物学的に活性な配列と同様に、成分（ＩＩＩ）も、天然に存在する形態のＧＬＰ－２のバリアントまたはフラグメントを含んでいてもよい。また、成分（ＩＩＩ）は、ＧＬＰ－１（７－３７）の（Ｎ末端の）配列の少なくとも４個、好ましくは少なくとも１０個、より好ましくは少なくとも２０個のさらなるアミノ酸残基を含んでいてもよく、これに対応して、全ての哺乳動物のアイソフォーム、または本明細書にて開示したようなそれらの全ての機能的なフラグメントもしくはバリアントを含んでいる。一般的に言えば、成分（ＩＩＩ）は、任意の形態の、ＧＬＰ－１ペプチドまたは修飾されたＧＬＰ－１ペプチドを含んでいてもよい。このような任意の形態の、ＧＬＰ－１ペプチドまたは修飾されたＧＬＰ－１ペプチドは、ＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ）にとって適切なものとして本明細書に開示される。さらなる代替物において、成分（ＩＩＩ）は、ＧＬＰ－１（７－３７）とＧＬＰ－２とのキメラの形態を含んでいてもよい。キメラの形態は、ＧＬＰ－１（７－３７）およびＧＬＰ－２（またはフラグメントもしくはバリアント）を互いに接続し、次いで、このキメラの形態を成分（ＩＩＩ）としてＧＬＰ－１融合ペプチドに導入することによって製造され得る。好ましくは、キメラの形態は、ＧＬＰ－１（７－３７）の部分配列とＧＬＰ－２の部分配列とが一緒に連結されたものから構成されている。例えば、キメラの形態は、ＧＬＰ－１のＮ末端の５～３０個のアミノ酸とＧＬＰ－２のＣ末端の５～３０個のアミノ酸とを含んでいてもよいし、この逆であってもよい。例えば、ＧＬＰ－１（７－３７）の７または８～２２、２３、２４、２５、２６、２７または２８のアミノ酸と、ＧＬＰ－２の１５位、１６位、１７位、１８位、１９位、２０位、２１位、２２位、２３位または２４位～例えばＣ末端のアミノ酸配列とを含んでいてもよい。ＧＬＰ－２またはＧＬＰ－１（７－３７）の天然に存在する形態の修飾が成分（ＩＩＩ）として含まれる場合、成分（ＩＩＩ）は配列番号１、号４、または５の配列をそれぞれ含んでいるか、配列番号１、４または５のいずれかと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含んでいることが好ましい。

【００８６】

別の実施形態において、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（ＩＩＩ）は、成分（Ｉ）、（ＩＩ）または（ＩＩＩ）に関して本明細書に記載したような配列を複数含んでいてもよい。例えば、成分（ＩＩＩ）は、ＧＬＰ－１（７－３７）および／またはＧＬＰ－２を少なくとも２個（２コピー、３コピーまたは４コピーであることが好ましい。）含んでいてもよいし、配列番号１、４または５と少なくとも８０％の配列同一性を有する、少なくとも２コピーの配列を含んでいてもよい。また、成分（ＩＩＩ）は、本明細書にて開示したようなＧＬＰ－１（７－３７）またはＧＬＰ－２のキメラのバージョンを１コピーよりも多く含んでいてもよく、例えば、ＧＬＰ－１（７－３７）および／またはＧＬＰ－２または少なくとも８０％の配列同一性を有するその修飾物と一緒になったキメラのバージョンの組合せを最終的に形成する。また、本明細書にて規定されるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチドは、２個以上（好ましくは２個）の成分（ＩＩＩ）を含んでいてもよく、リンカーを介してまたは直接的に、（１）成分（ＩＩＩ）のＮ末端が成分（Ｉ）または（ＩＩ）のＣ末端と連結されていてもよいし、（２）成分（ＩＩＩ）のＣ末端が成分（Ｉ）のＮ末端と連結されていてもよい。成分（ＩＩＩ）が２個提供される場合、これらは同一であってもよいし、異なっていてもよい。

【００８７】

好ましい実施形態によれば、本明細書にて規定されるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌されたＧＬＰ－１融合ペプチドは、本明細書にて規定された成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ）を

含んでいてもよい。これらの成分の全てを含んでいる特定の実施形態は、配列番号６（Ｎ－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２（マウス）－ＲＲ－ＧＬＰ－１（７－３７）－Ｃ（本明細書ではマウスのＣＭ１とも称される。））、配列番号７（Ｎ－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２（マウス）－ＲＲ－ＧＬＰ２－Ｃ（本明細書ではマウスのＣＭ２とも称される。））、配列番号１０（Ｎ－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２（ヒト）－ＲＲ－ＧＬＰ－１（７－３７）－Ｃ（本明細書ではヒトのＣＭ１とも称される。））、および配列番号１１（Ｎ－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２（ヒト）－ＲＲ－ＧＬＰ－２－Ｃ（本明細書ではヒトのＣＭ２とも称される。））、あるいは配列番号６、７、１０もしくは１１またはそれらのフラグメントもしくはバリアントと少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、からなる群より選択されることが好ましい。（直接的に）言及した配列において、用語「Ｎ」および「Ｃ」は、これらの融合ペプチドのＮ末端およびＣ末端を示す。配列番号６、７、１０および１１に係る全ての配列は、ＩＰ２（成分（ＩＩ））のＣ末端においてＲＲのリンカー（２つのアルギニン残基）を含んでいる。また、このＲＲのリンカーは除かれていてもよい。配列番号６、７、１０または１１に係る実施形態のそれぞれにおける成分（Ｉ）はＧＬＰ－１（７－３７）である一方、（成分（ＩＩ）のＣ末端に連結されたこれらの実施形態のそれぞれにおける）成分（ＩＩＩ）はＧＬＰ－１（７－３７）またはＧＬＰ－２のどちらかである。これに関して、好ましいＧＬＰ－１融合ペプチドは、配列番号１５、１６、１７、１８および２６に係る配列をさらに含んでいてもよい。

【００８８】

本発明の別の好ましい実施形態において、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチドは、成分（Ｉ）に加えて、成分（ＩＩＩ）を含んでいる（本明細書にて規定したような任意の成分（ＩＩ）を含んでいない。）。この場合、この成分（ＩＩＩ）は、成分（Ｉ）のＣ末端および／または成分（Ｉ）のＮ末端に連結されている。成分（ＩＩＩ）は、成分（Ｉ）のＣ末端に位置していることが好ましい。成分（ＩＩＩ）が（そのＣ末端によって）成分（Ｉ）のＮ末端に連結されているのか、成分（ＩＩＩ）が（そのＮ末端によって）成分（Ｉ）のＣ末端に連結されているのかに関わらず、直接的に連結されてもよいし、リンカーの配列を介して間接的に連結されてもよい。リンカーの配列に関して、ＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ）と成分（ＩＩ）とを接続するリンカーに関するＧＬＰ－１融合ペプチドの本明細書の開示を参照する。

【００８９】

本発明の他の好ましい実施形態において、本明細書にて規定したような、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチドは、成分（Ｉ）および成分（ＩＩ）に加えて、成分（ＩＩＩ）を含んでいる。この場合、成分（ＩＩＩ）は、成分（ＩＩ）のＣ末端および／または成分（Ｉ）のＮ末端に連結されている。成分（ＩＩＩ）は、成分（ＩＩ）のＣ末端に位置していることが好ましい。成分（ＩＩＩ）が（そのＣ末端によって）成分（Ｉ）のＮ末端に連結されているのか、成分（ＩＩＩ）が（そのＮ末端によって）成分（ＩＩ）のＣ末端に連結されているのかに関わらず、直接的に連結されてもよいし、リンカーの配列を介して間接的に連結されてもよい。リンカーの配列に関して、ＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ）と成分（ＩＩ）とを接続するリンカーに関するＧＬＰ－１融合ペプチドの本明細書にて示された開示を再び参照する。

【００９０】

本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１融合ペプチドは、有効ペプチドの上述した成分の組合せ（すなわち、成分（Ｉ）と成分（ＩＩ）との組合せ、成分（Ｉ）と成分（ＩＩＩ）との組合せ、または成分（Ｉ）と成分（ＩＩ）と成分（ＩＩＩ）との組合せ）の何れかに加えて、成分（ＩＶ）としての担体タンパク質（特に、トランスフェリンまたはアルブミン）をさらに含んでいる。このような成分（ＩＶ）は、ＧＬＰ－１融合ペプチドの上述した成分の組合せ（すなわち、成分（Ｉ）および／または成分（Ｉ

Ｉ）、成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）、あるいは成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および／または成分（ＩＩＩ））のいずれかのＮ末端および／またはＣ末端に、直接的に連結されていてもよいし、本明細書にて規定したようなリンカーを用いて連結されていてもよい。

【００９１】

本発明の具体的な実施形態において、本明細書にて用いるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得る本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチド（すなわち、上記にて規定したようなＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１融合ペプチド）は、以下の式ＩＩ：

【００９２】

【数２】

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

【００９３】

で表されるアミノ酸配列を含んでいる修飾されたＧＬＰ－１ペプチドを成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）として含んでいる。

【００９４】

ここで、Ｘａａ７はＬ－ヒスチジンであり：Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、またはＬｙｓであり、Ｇｌｙであることが特に好ましく；Ｘａａ１６はＶａｌまたはＬｅｕであり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ１９はＴｙｒまたはＧｌｎであり；Ｘａａ２０はＬｅｕまたはＭｅｔであり；Ｘａａ２２はＧｌｙまたはＧｌｕであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２５はＡｌａまたはＶａｌであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２７はＧｌｕまたはＬｅｕであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３３はＶａｌまたはＬｙｓであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、Ｇｌｕ、ＡｓｎまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙであり；Ｘａａ３６はＡｒｇ、ＧｌｙまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｐｒｏ、Ｌｙｓ、アミドであるか、あるいは存在していない。これらのアミノ酸は、本明細書にて規定したようなＡＭＩまたはＭＩあるいはそれらに関連する疾患を処置するときに、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチドが、このペプチドを必要とする患者に投与される本明細書にて用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌される場合に、選択されることが好ましい。

【００９５】

あるいは、Ｘａａ７はＬ－ヒスチジン、Ｄ－ヒスチジン、デスアミノ－ヒスチジン、２－アミノ－ヒスチジン、３－ヒドロキシ－ヒスチジン、ホモヒスチジン、Ｎ－アセチル－ヒスチジン、α－フルオロメチル－ヒスチジン、α－メチル－ヒスチジン、３－ピリジルアラニン、２－ピリジルアラニンまたは４－ピリジルアラニンであり；Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｌｙｓ、Ａｉｂ、（１－アミノシクロプロピル）カルボン酸、（１－アミノシクロブチル）カルボン酸、（１－アミノシクロペンチル）カルボン酸、（１－アミノシクロヘキシル）カルボン酸、（１－アミノシクロペプチル）カルボン酸、または（１－アミノシクロオクチル）カルボン酸であり、Ｇｌｙであることが特に好ましく；Ｘａａ１６はＶａｌまたはＬｅｕであり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ１９はＴｙｒまたはＧｌｎであり；Ｘａａ２０はＬｅｕまたはＭｅｔであり；Ｘａａ２２はＧｌｙ、ＧｌｕまたはＡｉｂであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２５はＡｌａまたはＶａｌであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２７はＧｌｕまたはＬｅｕであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３３はＶａｌまたはＬｙｓであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、Ｇｌｕ、ＡｓｎまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙまたはＡｉ

ｂであり；Ｘａａ３６はＡｒｇ、ＧｌｙまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｐｒｏ、Ｌｙｓ、アミドであるか、あるいは存在していない。これらのアミノ酸は、本明細書にて規定したような、ＡＭＩまたはＭＩあるいはそれらに関連する疾患を処置するときに、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチドが、このペプチドを必要とする患者に直接的に提供される場合に、選択されることが好ましい。

【００９６】

本発明のさらに別の具体的な実施形態において、本明細書に記載した（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌されるような、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチド（すなわち、上記にて規定したようなＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１融合ペプチド）の、成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）は、以下の式ＩＩＩ：

【００９７】

【数３】

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa18-Tyr-Leu-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

【００９８】

で表されるアミノ酸配列を含んでいる、修飾されたＧＬＰ－１ペプチドを含んでいる。

【００９９】

ここで、Ｘａａ７はＬ－ヒスチジンであり；Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｌｙｓであり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２２はＧｌｙまたはＧｌｕであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙであり；Ｘａａ３６はＡｒｇまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、ＧｌｕまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在していない。これらのアミノ酸は、本明細書にて規定したようなＡＭＩまたはＭＩあるいはそれらに関連する疾患を処置するときに、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチドが、このペプチドを必要とする患者に投与される本明細書にて用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌される場合に、選択されることが好ましい。

【０１００】

あるいは、Ｘａａ７はＬ－ヒスチジン、Ｄ－ヒスチジン、デスアミノ－ヒスチジン、２－アミノ－ヒスチジン、－ヒドロキシ－ヒスチジン、ホモヒスチジン、Ｎ－アセチル－ヒスチジン、α－フルオロメチル－ヒスチジン、α－メチル－ヒスチジン、３－ピリジルアラニン、２－ピリジルアラニンまたは４－ピリジルアラニンであり；Ｘａａ８はＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｌｙｓ、Ａｉｂ、（１－アミノシクロプロピル）カルボン酸、（１－アミノシクロブチル）カルボン酸、（１－アミノシクロペンチル）カルボン酸、（１－アミノシクロヘキシル）カルボン酸、（１－アミノシクロペプチル）カルボン酸、または（１－アミノシクロオクチル）カルボン酸であり；Ｘａａ１８はＳｅｒ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２２はＧｌｙ、ＧｌｕまたはＡｉｂであり；Ｘａａ２３はＧｌｎ、Ｇｌｕ、ＬｙｓまたはＡｒｇであり；Ｘａａ２６はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３０はＡｌａ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３４はＬｙｓ、ＧｌｕまたはＡｒｇであり；Ｘａａ３５はＧｌｙまたはＡｉｂであり；Ｘａａ３６はＡｒｇまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在しておらず；Ｘａａ３７はＧｌｙ、Ａｌａ、ＧｌｕまたはＬｙｓであるか、アミドであるか、あるいは存在していない。これらのアミノ酸は、本明細書にて規定したような、ＡＭＩまたはＭＩあるいはそれらに関連する疾患を処置するときに、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチドが

、このペプチドを必要とする患者に直接的に提供される場合に、選択されることが好ましい。

【０１０１】

特に好ましい実施形態において、本明細書にて用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１（融合）ペプチド（すなわち、上記にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド）は、成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）が（修飾された）ＧＬＰ－１ペプチドを含んでいるものを用いる。この（修飾された）ＧＬＰ－１ペプチドは、ＧＬＰ－１（７－３５）、ＧＬＰ－１（７－３６）、ＧＬＰ－１（７－３６）－アミド、ＧＬＰ－１（７－３７）、またはそれらのバリアント、類似体もしくは誘導体から選択される。また、好ましくは、本明細書にて規定したような、ＡＭＩまたはＭＩあるいはそれらに関連する疾患を処置するときに、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチドが、このペプチドを必要とする患者に直接的に提供される場合、修飾されたＧＬＰ－１ペプチドを成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）に含んでいるＧＬＰ－１（融合ペプチド）が好ましく、この修飾されたＧＬＰ－１ペプチドは、上記ＧＬＰ－１ペプチドの８位にＡｉｂ残基を有しているか、７位に次の群から選択されるアミノ酸残基を有している：Ｄ－ヒスチジン、デスアミノ－ヒスチジン、２－アミノ－ヒスチジン、ヒドロキシ－ヒスチジン、ホモヒスチジン、Ｎ－アセチル－ヒスチジン、α－フルオロメチル－ヒスチジン、α－メチル－ヒスチジン、３－ピリジルアラニン、２－ピリジルアラニンおよび４－ピリジルアラニンからなる群。

【０１０２】

別の特に好ましい実施形態において、本明細書にて用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るＧＬＰ－１（融合）ペプチド（すなわち、上記にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド）は、式ＩＩおよび式ＩＩＩに係る本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチドの成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）の両方の実施形態が、ＧＬＰ－１（融合）ペプチドについて本明細書にて与えられた開示と組み合わせられ得るものを用いる。換言すれば、一般式ＩＩおよびＩＩＩは、成分（ＩＩ）、リンカー、製造のプロセスに関して本明細書に与えられた開示と組み合わせてもよい。

【０１０３】

本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド（このましくは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ））ならびにこれらのフラグメントおよびバリアントは、本明細書にて概説したようなタンパク質性の切断に対して（より好ましくは、ＤＰＰ－ＩＶに対して）保護されることが好ましい。したがって、

本明細書にて規定したような、このようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドならびにそれらのフラグメントおよびバリアント（特に、ＧＬＰ－１融合ペプチド）は、（成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）の部分としてのＧＬＰ－１融合ペプチドの場合）ＤＰＰ－ＩＶに対する耐性を示すＧＬＰ－１（例えば、ＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７））の配列を含んでいてもよい。これに関連して、ジペプチジルアミノペプチダーゼＩＶによる分解に対するペプチドの耐性を、例えば、以下の分解のアッセイによって決定してもよい：ペプチドのアリコートを、精製したジペプチジルアミノペプチダーゼのアリコートと一緒に３７℃で４～２２時間、ｐＨ７～８の適切なバッファにてインキュベートする（バッファはアルブミンではない。）。トリフルオロ酢酸を添加することによって酵素反応を終結させ、ペプチドの分解産物を、ＨＰＬＣまたはＬＣ－ＭＳの分析を用いて分離し、そして定量する。この分析を実施するための１つの方法は、混合物をＺｏｒｂａｘ３００ＳＢ－Ｃ１８（３０ｎｍのポア、５μｍの粒子）１５０×２．１ｍｍのカラムにアプライし、アセトニトリルの０．１％のトリフルオロ酢酸溶液の直線勾配を用いて（３０分かけてアセトニトリルを０％から１００％にする。）０．５ｍＬ／分の流速にて溶出することである。ペプチドおよびその分解産物を、２１４ｎｍ（ペプチド結合）

の吸光度または２８０ｎｍの吸光度（芳香族アミノ酸）によってモニターし、これらのピークの面積を積分することによって定量する。ＬＣ－ＭＳでは、分離したピークのＭＳスペクトルを決定することができ、ＬＣ－ＭＳを用いることによって分解のパターンを決定することができる。所定の時間におけるインタクトな化合物／分解した化合物のパーセンテージを、ＤＰＰ－ＩＶに対するペプチドの安定性を評価するために用いる。

【０１０４】

本明細書において、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド（好ましくは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ））ならびにそれらのフラグメントおよび／またはバリアントは、所定の時間におけるインタクトな化合物のパーセンテージに基づいて、ＧＬＰ－１（７－３７）の修飾されていないペプチドの配列よりも１０倍安定である場合、ＤＰＰ－ＩＶに対して安定化されていると規定される。したがって、ＤＰＰ－ＩＶに対して安定化されたＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド（好ましくは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ））は、ＧＬＰ－１（７－３７）などよりも、少なくとも１０倍安定であることが好ましく、少なくとも２０倍安定であることがより好ましい。安定性を、当業者に公知の任意の方法によって評価してもよい。例えば、テストするペプチドの溶液にＤＰＰ－ＩＶを添加して、このペプチドの分解（本明細書参照）を例えば所定の期間にわたって、分光法、ウエスタンブロット分析、抗体スクリーニングなどを用いて決定することによって、安定性を評価してもよい。

【０１０５】

同時に、ＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド（好ましくは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ））ならびにそれらのフラグメントおよび／またはバリアントは、例えばネイティブなレセプター（ＧＬＰ－１レセプター）に結合することによってＧＬＰ－１（７－３７）の効果を発揮する化合物として規定される。好ましくは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド、ならびにそれらのフラグメントおよび／またはバリアントは、ＧＬＰ－１レセプターに対する結合アフィニティーを有している。この結合アフィニティーは、天然に存在するＧＬＰ－１ペプチドの結合アフィニティーの少なくとも１０％に相当し、少なくとも５０％に相当することが好ましい。結合アフィニティーを、任意の適切な方法（例えば、表面プラズモン共鳴）によって決定してもよい。さらに、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（融合）ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド、ならびにそれらのフラグメントおよび／またはバリアントが、シグナルを細胞内に伝達する細胞外のレセプターに結合することによって、細胞内のｃＡＭＰの形成を誘発することが好ましい。

【０１０６】

別の好ましい実施形態によれば、本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したようなもの）ならびにＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））、および／またはＧＬＰ－１融合ペプチド全体は、これらのペプチドまたはタンパク質の配列の修飾された形態から選択されてもよい。種々の修飾された形態（特に、本明細書に記載したようなＧＬＰ－１融合ペプチド全体の修飾された形態）は、ＡＭＩまたはＭＩあるいはそれらに関連する疾患の処置において、本明細書にて用いられるような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得るか、あるいは直接的に用いられ得る。これらの修飾された形態を以下に開示し、より詳細に説明する。これらの修飾された形態は、例えば、本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチド（本明細書にて規定したようなものが好ましい。）のフラグメント、バリアントなど、ＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））のフラグメント、バリアントなど、および／またはＧＬＰ－１融合ペプチド全体のフラグメント、バリアントなどを含んでいる。これに関連して、これらのペプチドまたはタンパク質のフラグメントおよび／もしくはバリアントは、修飾されていないネイティブなアミノ酸配列の全長にわたって、それらのネイティブなペプチドまた

はタンパク質に対して少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％の配列同一性を有しており、少なくとも９０％の配列同一性を有していることが好ましく、少なくとも９５％の配列同一性を有していることがより好ましく、少なくとも９９％の配列同一性を有していることが最も好ましい。これを、それぞれの（コードする）核酸配列に対しても同様に適用してもよい。

【０１０７】

本明細書にて規定したような用語「配列同一性」は、配列を以下のように比較することを典型的に意味する。２つのアミノ酸配列の同一性のパーセンテージを決定するために、最適な比較を行うように配列を整列することができる（例えば、第１のアミノ酸配列の配列内にギャップを導入することができる。）。次いで、対応するアミノ酸の位置にてアミノ酸を比較することができる。第１の配列における所定の位置を占めるアミノ酸が、第２の配列における対応する位置を占めるアミノ酸と同一である場合、これらの分子はこの位置において同一である。２つの配列間の同一性のパーセンテージは、これらの配列によって共有される同一な位置の数の関数である。例えば、特定のペプチドが、規定された長さの参照ポリペプチドに対する特定の配列同一性を有することが言える場合、この同一性のパーセンテージは参照ペプチドに対して相対的に示される。それ故、１００アミノ酸の長さである参照ポリペプチドと５０％同一であるというペプチドは、この参照ポリペプチドの５０アミノ酸の部分と完全に同一である５０アミノ酸のポリペプチドであり得る。また、１００アミノ酸の長さのポリペプチドが参照ポリペプチドとその全長にわたって５０％の同一であるということもあり得る。もちろん、他のポリペプチドも同一の基準を満たす。２つの配列の同一性のパーセンテージのこのような決定を数学的なアルゴリズムを用いて行うことができる。２つの配列の比較に利用される数学的なアルゴリズムの非限定的な好ましい例は、Ｋａｒｌｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９３），ＰＮＡＳ ＵＳＡ，９０：５８７３－５８７７のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、ＮＢＬＡＴプログラムに組み込まれており、本発明のアミノ酸配列と所望の同一性を有する配列を同定するために用いることができる。比較のためのギャップが挿入されたアライメントを取得するために、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ，２５：３３８９－３４０２に記載されたような、ギャップが挿入されるＢＬＡＳＴ（Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ）を利用することができる。ＢＬＡＳＴおよびギャップが挿入されるＢＬＡＳＴのプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えばＮＢＬＡＳＴ））のデフォルトのパラメータを用いることができる。さらに、ギャップを空けるペナルティーが－１２（ギャップの１番目の０に関する。）であり、ギャップを拡張するペナルティーが－４（ギャップにおけるさらなる連続した各ゼロに関する。）であるデフォルトの（ＢＬＯＳＵＭ６２）のマトリクス（値－４～＋１１）を使用する、ジェネティックコンピューティンググループのＧＡＰ（グローバルアライメントプログラム）のバージョン９を用いて、これらの配列を整列させることができる。アライメントの後に、請求された配列におけるアミノ酸の数のパーセンテージとして一致の数を表すことによって、同一性のパーセンテージを算出する。２つのアミノ酸配列の同一性のパーセンテージを決定するための記載した方法は、核酸配列に対しても同様に適用することができる。本発明に関連して、用語「同一性」を用いたが、必要とされるか望まれるのであればどこであっても、用語「同一性」の代わりに用語「ホモロジー」を適用してもよい。

【０１０８】

本発明に関連して、本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは、本明細書にて規定したようなもの）の「フラグメント」、またはＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））の「フラグメント」、ならびに／あるいはＧＬＰ－１融合ペプチド全体の「フラグメント」は、典型的に、これらのペプチドまたはタンパク質ン任意のフラグメントをいう。典型的に、これらのフラグメントは、特にネイティブなペプチドまたはタンパク質の所望の生物学的な活性を保持するより短いペプチドであり、そのアミノ酸配列（またはそのコードされた核酸配列）に関して、ネイティブなペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列と比べて、Ｎ末端的に

切り詰められいる、Ｃ末端的に切り詰められている、および／または配列の内部にて切り詰められている。このような切詰は、アミノ酸のレベルにて生じてもよいし、対応する核酸のレベルにて生じてもよい。生物学的に機能的なフラグメントは、ペプチド分子のどちらかの末端から（ペプチドレベルまたはアミノ酸レベルにて）アミノ酸を除去し、生じたペプチドまたはタンパク質をＧＬＰ－１に関する本明細書にて規定したような生物学的な性質について試験することによって、容易に同定し得る。ネイティブなペプチドまたはタンパク質のＮ末端および／またはＣ末端から所望の時点で１つ以上のアミノ酸を除去するためのプロテアーゼを用いて、所望の生物学的な活性を保持するフラグメントを決定してもよい。結論として、フラグメントは、ペプチドの末端のアミノ酸の欠失、および／またはペプチドの配列内に位置するアミノ酸の欠失によって得られてもよい。

【０１０９】

さらに、本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したようなもの）の「バリアント」、またはＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））の「バリアント」、および／あるいはＧＬＰ－１融合ペプチド全体の「バリアント」は、ネイティブなタンパク質またはペプチドの配列のアミノ酸が交換されたタンパク質配列、またはそれをコードする核酸配列（またはそれらのフラグメント）を含んでいることが好ましい。その結果として生じた、本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したようなもの）（のバリアント）、ＧＬＰ－１融合ペプチド（のバリアント）、ＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））（のバリアント）、および／あるいはＧＬＰ－１融合ペプチド全体（のバリアント）は、１つ以上の変異を有する点（例えば、アミノ酸が１つ以上置換されている点、アミノ酸が１つ以上挿入されている点、および／またはアミノ酸が１つ以上欠失されている点）において、ネイティブなタンパク質またはペプチドの配列と異なるアミノ酸配列を有していることがある。好ましくは、これらのバリアント（ＧＬＰ－１のバリアント、ＧＬＰ－１融合ペプチド自体またはそれらの機能的なバリアントおよび／もしくはフラグメント）が有する生物学的な活性は、全長のＧＬＰ－１ペプチド、ＧＬＰ－１融合ペプチド、またはＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））の全長と比べて、ＧＬＰ－１に関する本明細書にて規定したような生物学的な活性（すなわち、ＧＬＰ－１について知られた有利な効果）とほぼ同一であるか、ＧＬＰ－１に関する本明細書にて規定したような生物学的な活性よりも向上している。このようなＧＬＰ－１について知られた有利な効果としては、例えば、虚血または酸素の欠乏によって引き起こされたダメージ、および心臓組織が死ぬ可能性を強力に低減する活性が挙げられる。

【０１１０】

本明細書にて規定したようなこのようなバリアントは、合成したバリアントをコードするＤＮＡ配列に変異を導入することによって作製することができる。また、最終的に得られたバリアントが、所望の生物学的な活性を保持しているのであれば、欠失、挿入および置換の任意の組合せが、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌されるＧＬＰ－１ペプチドに含まれていてもよい。明らかに、バリアントのペプチドをコードするＤＮＡに導入された変異は、リーディングフレームを変更してはいけないし、ｍＲＮＡの二次構造をもたらし得る相補的な領域を作製しないことが好ましい。

【０１１１】

したがって、本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したようなもの）のバリアント、ＧＬＰ－１融合ペプチドのバリアント、ＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））のバリアント、および／あるいはＧＬＰ－１融合ペプチド全体のバリアントは、本明細書に記載したようなネイティブなＧＬＰ－１ペプチドまたはネイティブなＧＬＰ－１融合ペプチドと比べて、アミノ酸配列のＮ末端またはＣ末端あるいは両方の末端に隣接するさらなるアミノ酸残基を含んでいてもよい。例えば、このようなバリアントは、ＧＬＰ－１ペ

プチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドのアミノ酸配列のＮ末端またはＣ末端あるいは両方の末端に隣接するさらなるアミノ酸残基を含んでいる、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドを含んでいてもよい。生じたＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドがプロテアーゼに対する耐性または安定性を保持し、かつ本明細書にて規定したように作用する能力を保持している限り、任意のこのような隣接する残基が「コア」ペプチドの基本的な特徴に影響を与えるか否かの決定を、ＧＬＰ－１について公知の有利な効果に基づいて通常の実験によって行うことができる。具体的に本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１を参照する場合の用語「～から本質的になる」は、特定されたＧＬＰ－１ペプチドの基本的な特徴に影響を与えない、さらなる隣接する残基が存在し得ることを意味する。この用語は、特定の配列内における置換、欠失または付加を典型的に包含していない。

【０１１２】

さらに、本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したようなもの）の「バリアント」、ＧＬＰ－１融合ペプチドの「バリアント」、またはＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））の「バリアント」、および／あるいはＧＬＰ－１融合ペプチド全体の「バリアント」は、ネイティブな配列と比較して、アミノ酸の保存的な置換を含んでいる分子のことをいうものであってもよい。同じクラスに由来するアミノ酸が互いに、交換される置換を保存的な置換と呼ぶ。特に、これらは、脂肪族側鎖、正または負に帯電した側鎖、側鎖またはアミノ酸における芳香族基、水素結合に参加することができる側鎖（例えばヒドロキシル基を有する側鎖）を有するアミノ酸である。これは、例えば、極性の側鎖を有するアミノ酸が、同様の極性のアミノ酸を有する別のアミノ酸と置換されること、または、例えば、疎水性の側鎖によって特徴付けられたアミノ酸が、同様の疎水性の側鎖を有する別のアミノ酸と置換されることを意味している。特に、３次元構造を変更しない配列の位置または結合の領域に影響を与えない配列の位置における、挿入および置換が可能である。挿入または欠失による３次元構造の変更は、例えば、ＣＤスペクトル（円偏光二色性スペクトル）を用いて容易に決定することができる（Ｕｒｒｙ，１９８５，Ａｂｓｏｒｐｔｉｏｎ，Ｃｉｒｃｕｌａｒ Ｄｉｃｈｒｏｉｓｍ ａｎｄ ＯＲＤ ｏｆ Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ，ｉｎ：Ｍｏｄｅｒｎ Ｐｈｙｓｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（ｅｄ．），Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ）。

【０１１３】

このように、本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したようなもの）のバリアント、ＧＬＰ－１融合ペプチドのバリアント、またはＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））のバリアント、および／あるいはＧＬＰ－１融合ペプチド全体のバリアントは、完全なＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したようなもの）、完全なＧＬＰ－１融合ペプチド全体、ＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））あるいはそれらのフラグメントと、実質的に類似する分子のことをいうものであってもよい。このようなバリアントのペプチドを、周知の方法を用いて簡便に作製してもよい。もちろん、このようなバリアントは、本明細書に記載したような、ネイティブなＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したようなもの）、ネイティブなＧＬＰ－１融合ペプチド、またはネイティブなＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））、および／あるいはネイティブなＧＬＰ－１融合ペプチド全体について公知の有利な効果に類似する効果を有している。このような有利な効果は、例えば、対応する天然に存在するＧＬＰ－１ペプチドのような、虚血または酸素の欠乏によって引き起こされたダメージおよび心臓組織が死ぬ可能性を強力に低減させるという、ＧＬＰ－１についての活性である。

【０１１４】

本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したよ

うなもの）のバリアント、ＧＬＰ－１融合ペプチドのバリアント、またはＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））のバリアント、および／あるいはＧＬＰ－１融合ペプチド全体のバリアントに含まれ得る、アミノ酸の保存的な置換のタイプは、異なる種の相同なタンパク質／ペプチドの間におけるアミノ酸の変化の頻度の分析に基づいてもよい。このような分析に基づけば、保存的な置換を、以下の５つのグループの１つの中での交換として本明細書にて規定してもよい。

【０１１５】

Ｉ　：小さく、脂肪性であり、非極性または微かに極性の残基：Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｐｒｏ、Ｇｌｙ；

ＩＩ　：極性であり、負に帯電した残基およびそれらのアミド：Ａｓｐ、Ａｓｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｎ；

ＩＩＩ：極性であり、正に帯電した残基：Ｈｉｓ、Ａｒｇ、Ｌｙｓ；

ＩＶ　：大きく、脂肪性であり、非極性の残基：Ｍｅｔ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｃｙｓ；

Ｖ　：大きい芳香族の残基：Ｐｈｅ、Ｔｒｙ、Ｔｒｐ。

【０１１６】

上述したグループ内において、以下の置換が、「高度に保存される」とみなされる：Ａｓｐ／Ｇｌｕ；Ｈｉｓ／Ａｒｇ／Ｌｙｓ；Ｐｈｅ／Ｔｙｒ／Ｔｒｐ；Ｍｅｔ／Ｌｅｕ／Ｉｌｅ／Ｖａｌ。半保存的な置換は、本明細書におけるグループ（Ｉ）～（ＩＶ）の２つの間にて交換することであると規定される。この場合、グループ（Ｉ）～（ＩＶ）は、本明細書におけるグループ（Ｉ）、グループ（ＩＩ）およびグループ（ＩＩＩ）を含むスーパーグループ（Ａ）、または本明細書におけるグループ（ＩＶ）およびグループ（Ｖ）を含むスーパーグループ（Ｂ）に限定される。置換は、遺伝的にコードされたアミノ酸に限定されないし、天然に存在するアミノ酸にさえも限定されない。本明細書の意義の範囲内における、同じ意義を有するアミノ酸残基の好ましいグループの好ましいアミノ酸の保存的な置換は、限定されないが、以下のとおりである。

【０１１７】

【表１】

アミノ酸	同じ意義を有する残基
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, (Thr), Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, (Thr), Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, (Thr), Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

【０１１８】
さらに、本明細書に記載したような、ＧＬＰ－１ペプチド（好ましくは本明細書にて規定したようなもの）のバリアント、ＧＬＰ－１融合ペプチドのバリアント、またはＧＬＰ－１融合ペプチドの単一の成分（特に、成分（Ｉ）、成分（ＩＩ）および成分（ＩＩＩ））のバリアント、および／あるいはＧＬＰ－１融合ペプチド全体のバリアントは、例えば、溶解度を向上させることを意図してなされたアミノ酸の置換（疎水性アミノ酸の親水性アミノ酸による置換）を含んでいてもよい。
【０１１９】
特に好ましい１実施形態において、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌され得る本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド（（ＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）に存在する）ＧＬＰ－１ペプチドが挙げられる。）は、ＧＬＰ－１ペプチドの７位、８位、１１位、１２位、１６位、２２位、２３位、２４位、２５位、２７位、３０位、３３位、３４位、３５位、３６位、または３７位に１つ以上の置換を有することを特徴としている。例えば、［Ａｒｇ３４－ＧＬＰ－１（７－３７）］という命名法は、３４位の天然に存在するリジンがアルギニンで置換されているという、ＧＬＰ－１類似体を示す。
【０１２０】
具体的には、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドあるいはＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）は、ＧＬＰ－１（７－３５、３６、３７または３８）のバリアントに対応し得る。このようなバリアントとしては、例えば、Ｇｌｎ９－ＧＬＰ－１（７－３７）、Ｔｈｒ１６－Ｌｙｓ１８－ＧＬＰ－１（７－３７）、およびＬｙｓ１８－ＧＬＰ－１（７－３７）、Ａｒｇ３４－ＧＬＰ－１（７－３７）、Ｌｙｓ３８－Ａｒｇ２６－ＧＬＰ－１（７－３８）－ＯＨ、Ｌｙｓ３６－Ａｒｇ２６－ＧＬＰ－１（７－３６）、Ａｒｇ２６，３４－Ｌｙｓ３８－ＧＬＰ－１（７－３８）、Ａｒｇ２６，３４－Ｌｙｓ３８－ＧＬＰ－１（７－３８）、Ａｒｇ２６，３４－Ｌｙｓ３８－ＧＬＰ－１（７－３８）、Ａｒｇ２６，３４－Ｌｙｓ３８－ＧＬＰ－１（７－３８）、Ａｒｇ２６－Ｌｙｓ３８－ＧＬＰ－１（７－３８）、Ａｒｇ２６－Ｌｙｓ３８－ＧＬＰ－１（７－３８）、Ａｒｇ３４－Ｌｙｓ３８－ＧＬＰ－１（７－３８）、Ａｌａ３７－Ｌｙｓ３８－ＧＬＰ－１（７－３８）、およびＬｙｓ３７－ＧＬＰ－１（７－３７）が挙げられる。より一般的に言えば、本明細書にて言及した任意のＧＬＰ－１のバリアント（特に、式ＩＩまたはＩＩＩに係るＧＬＰ－１のバリアント）は、３８位におけるＬｙｓ残基の付加によって修飾されてもよい。
【０１２１】
本明細書に記載したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドが、ＡＭＩまたはＭＩあるいはそれらに関連する疾患の処置において、直接的に投与される場合、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドあるいはＧＬＰ－１融合ペプチドの成分（Ｉ）および／または成分（ＩＩＩ）は、ＧＬＰ－１（７－３５、３６、３７または３８）のバリアントと対応してもよい。このようなＧＬＰ－１（７－３５、３６、３７または３８）のバリアントとしては、Ｇｌｎ９－ＧＬＰ－１（７－３７）、Ｄ－Ｇｌｎ９－ＧＬＰ－１（７－３７）、アセチル－Ｌｙｓ９－ＧＬＰ－１（７－３７）が挙げられる。
【０１２２】
本発明の特に好ましい実施形態において、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたは（成分（Ｉ）または成分（ＩＩＩ）に関する）ＧＬＰ－１融合ペプチドは、（修飾された）ＧＬＰ－１ペプチドである／（修飾された）ＧＬＰ－１ペプチドを含んでいる。このような（修飾された）ＧＬＰ－１ペプチドは、ＧＬＰ－１（７－３５）、ＧＬＰ－１（７－３６）、ＧＬＰ－１（７－３６）－アミド、ＧＬＰ－１（７－３７）、あるいはそれらのフラグメントまたはバリアントから選択される。
【０１２３】

インビトロにて制御するために、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドを、例えば従来の分離技術を用いて、これらのペプチドを発現する細胞から単離してもよい（そして、マイクロカプセルから単離してもよい。）。それ故、細胞を適切な条件（例えば、支持および栄養が挙げられる。）にてインビトロにて増殖しさせてもよい。そして、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌される場合、分泌されたタンパク質（すなわち、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド）またはそれらのフラグメントもしくはバリアントを、細胞外の培地から回収する。このため、細胞内にトランスフェクトするために設計された（ベクター）配列は、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドが分泌されることを可能にするシグナル（ペプチド）配列（下記参照）を含んでいることが好ましい。これに関連して、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞によってコードされ、分泌される場合、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドあるいはそれらのフラグメントまたはバリアントは、シグナル配列と自然に内因的に融合されてもよいし、コードする核酸配列を遺伝子操作の方法によってトランスフェクトして細胞内に導入した後に、シグナル配列と融合されてもよい。代替的な態様では、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドをコードするように設計された遺伝子配列は、このようなシグナル配列を含んでいない。この場合、細胞内に発現したＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドが典型的に分泌されず、細胞の溶解を含むプロセシングによって細胞から回収し得る。このような方法において、コード配列は、培地から生成物であるペプチドを効率的に抽出することを可能にする精製タグを含んでいてもよい。タグは単離されたＧＬＰ－１ペプチドを放出するために切断されてもよい。しかし、本発明にしたがって用いるような（球状の）マイクロカプセルの細胞が患者に移植され、そして、インビボにてこの細胞から本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドが発現し、分泌されて周囲の組織へ送達されることが必要とされるので、上述した代替的な態様は、このような（球状の）マイクロカプセルの細胞と典型的に無関係である。

【０１２４】

本明細書にて記載した実施形態または特徴のいずれかを、特に示さない限り、互いに組み合わせてもよい。

【０１２５】

本発明にしたがって用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞は、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドをコードし、分泌し、必要に応じて、本明細書にて規定したようなさらなる因子（抗アポトーシス剤、ＶＥＧＦなど）をコードし、分泌することが好ましい。これらのため、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドまたはそのフラグメントもしくはバリアントならびにさらなる因子は、少なくとも１つの核酸配列によってコードされる。これらの核酸配列は、典型的に、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアを調製する前に、細胞内にトランスフェクトされる。これらの核酸配列は、細胞内にて天然に存在してもよいし、（球状の）マイクロカプセルを調製する前に、細胞にトランスフェクトする技術によって細胞内に導入されてもよい。本発明によれば、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドをコードする任意の適切な核酸配列を用いてもよい。

【０１２６】

１実施形態によれば、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドあるいはそれらのフラグメントまたはバリアントをコードし、必要に応じて、本明細書にて規定したようなさらなる因子（抗アポトーシス剤、ＶＥＧＦなど）をコードする核酸配列を、任意の核酸配列から選択してもよく、（少なくとも１つの）ペプチドまたはタンパク質をコードするに適切な任意の核酸配列（すなわち、コード核酸配列（ｃｏｄｉｎｇ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ））から選択することがより好ましい。このよ

うなコード核酸配列としては、コードＤＮＡ（ｃｏｄｉｎｇ　ＤＮＡ）またはコードＲＮＡ（ｃｏｄｉｎｇ　ＲＮＡ）が挙げられる。コードＤＮＡは、例えば、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＤＮＡのオリゴヌクレオチドから選択される。コードＲＮＡは、例えば、（短い）ＲＮＡオリゴヌクレオチド、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）などから選択される。本発明に関連して、ｍＲＮＡは典型的に、いくつかの構造的な要素から構成されたＲＮＡである。構造的な要素としては、例えば、任意の５’－ＵＴＲ領域、上流に位置したリボソーマル結合領域、このリボソーマル結合領域に続く翻訳領域、任意の３’－ＵＴＲ領域、この３’－ＵＴＲ領域に続いて存在し得るポリＡテール（および／またはポリＣテール）が挙げられる。ｍＲＮＡは、モノシストロニックなＲＮＡであってもよいし、ジシストロニックなＲＮＡであってもよいし、マルチシストロニックなＲＮＡでさえもあってもよい。すなわち、ＲＮＡは、１個、２個、またはそれ以上の本明細書に記載したようなタンパク質またはペプチドのコーディング配列を保有している。ジシストロニックなＲＮＡまたはマルチシストロニックなｍＲＮＡにおけるこのようなコーディング配列は、少なくとも１個のＩＲＥＳ配列によって分離されていてもよい。

【０１２７】

また、少なくとも１つの核酸配列は、リボソーマルＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、またはウイルスのＲＮＡ（ｖＲＮＡ）であってもよい。さらに、少なくとも１つの核酸配列は、環状の核酸であってもよいし、線状の核酸であってもよいが、線状の核酸であることが好ましい。さらに、少なくとも１つの核酸配列は、一本鎖の核酸配列であってもよいし、二本鎖の核酸配列（本明細書の意義の範囲では、２個の一本鎖の核酸が非共有的に会合することから、核酸であるとみなしてもよい。）であってもよいし、部分的に二本鎖の核酸の核酸であってもよいし、部分的に一本鎖の核酸であってもよい。部分的に二本鎖の核酸の核酸および部分的に一本鎖の核酸は、少なくとも部分的に自己相補的である（これらの部分的に二本鎖の核酸または部分的に一本鎖の核酸の両方は、典型的に、より長い一本鎖の核酸およびより短い一本鎖の核酸によって形成されるか、長さがほぼ等しい２つの一本鎖の核酸によって形成される。ここで、一方の一本鎖の核酸が他方の一本鎖の核酸に対して部分的に相補的であり、これらの両方がこの領域にて二本鎖の核酸を形成する（すなわち、部分的に二本鎖の核酸または部分的に一本鎖の核酸）。

【０１２８】

遺伝コードの縮重によって、複数の核酸配列が、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドをコードし、必要に応じて本明細書にて規定したようなさらなる因子（抗アポトーシス剤、ＶＥＧＦなど）をコードしてもよい。本発明の好ましい実施形態によれば、本明細書にて規定したような細胞のトランスフェクションに用いる核酸配列は、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたは本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドおよびさらなる（機能的な）ヌクレオチド配列をコードする任意の核酸配列を含んでいてもよい。好ましくは、本発明において、本明細書にて規定したような細胞のトランスフェクションのために適した核酸配列は、（ａ）本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチド（特に、本明細書にて規定したような、完全なＧＬＰ－１のアミノ酸配列（ＧＬＰ－１（１－３７）または機能的なＧＬＰ－１（７－３５、３６または３７）（バリアント）の配列、あるいは任意の他のＧＬＰ－１ペプチド（ＧＬＰ－１融合ペプチドを含む。））をコードしてもよく、（ｂ）必要に応じて、（ａ）に係るＧＬＰ－１の配列のＮ末端においてプロテアーゼによって切断される配列をコードしてもよく、そして、必要に応じて、（ｂ）からの上流にシグナルペプチド配列をコードしてもよく、（ｃ）必要に応じて、本明細書に記載したようなさらなる因子をコードしてもよい。好ましくは、シグナル（ペプチド）配列は、以下にて規定したような配列から選択される。したがって、得られるアミノ酸配列は、（好ましくはＮ末端からＣ末端にかけて）シグナルペプチド配列、任意のプロテアーゼによって切断される配列、および本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドあるいはそれらのフラグメントまたはバリアント（および必要に応じて、本明細書にて規定したようなさらなる因子（抗アポトーシス剤、ＶＥＧＦなど））か

ら構成されてもよい。シグナルペプチド配列およびプロテアーゼによって切断される配列は、宿主細胞に対して（宿主細胞内のネイティブに存在する配列に対して）異種であることが好ましい。本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１（５－３７、６－３７、または７－３７）およびそれらのバリアントの場合、シグナルペプチド配列およびプロテアーゼによって切断される配列は、本明細書の条件の規定の範囲内におけるネイティブなＧＬＰ－１の１～６のアミノ酸と異なることが好ましい。

【０１２９】

本明細書にて規定したような核酸配列はベクターに含まれていてもよい。したがって、本発明にしたがって用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに埋め込まれた細胞は、本明細書の上記にて規定したような核酸を含んでいるベクターを含んでいてもよい。このベクターを用いて、本明細書にて規定したようなを細胞をトランスフェクトして、本発明にしたがって用いるような（球状の）マイクロカプセルを調製してもよい。典型的に、このようなベクター（特に発現ベクター）は、本明細書にて規定したような少なくとも１つの核酸配列を含んでいる。この少なくとも１つの核酸配列は、本明細書に記載したような、要素（ａ）をコードしており、必要に応じて要素（ｂ）および／または要素（ｃ）をコードしている。また、この少なくとも１つの核酸配列は、必要であれば、本明細書に記載したようなさらなる要素（例えば、コードされた要素（ａ）および任意のコードされた要素（ｂ）および／またはコードされた要素（ｃ）の発現を方向付けるために適した要素）をコードしており、必要に応じて、さらなる因子（抗アポトーシス因子、ＶＥＧＦなど）をコードしている。本明細書にて用いるようなあるクラスのベクターは、自律的に複製する染色体外のプラスミドを備えている。このようなプラスミドは、動物のウイルス（例えば、ウシのパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、またはＳＶ４０など）に由来する。本明細書にて用いるような次のクラスのベクターは、所望の遺伝子配列を宿主細胞の染色体内に組み込むことに依拠している。

【０１３０】

本発明にしたがって用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに細胞を埋め込む前に、この細胞にトランスフェクトされるに適したこのようなベクターは、典型的に、本明細書に記載したような要素（ａ）および任意の要素（ｂ）および／または（ｃ）をコードする少なくとも１つの核酸配列を適切な（空）ベクターに挿入することによって調製する。この核酸配列は、例えば、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドあるいはそれらのフラグメントまたはバリアントをコードしており、必要に応じて、本明細書にて規定したようなさらなる因子をコードしている。このような適切な（空）ベクターは当業者に公知であり、“Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ”（Ｅｄｓ．Ｐｏｕｗｅｌｓ Ｐ．Ｈ．ｅｔ ａｌ．Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ－Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ－Ｏｘｆｏｒｄ，１９８５，ＩＳＢＮ ０４４４ ９０４０１８）において概説されていることがある。また、適切な（空）ベクターは、当業者に公知の任意のベクター（プラスミド、ファージ、ウイルス（ＳＶ４０、ＣＭＶ、バキュロウイルス、アデノウイルス、シンドビスウイルスなど）、トランスポゾン、ＩＳエレメント、プラスミド、ファージミド、コスミド、線状のＤＮＡまたは環状のＤＮＡなど）を含んでいることも意図される。哺乳動物の細胞への組込みに関しては、線状のＤＮＡを典型的に用いる。本発明のために用いるベクターのタイプは、具体的な宿主細胞の要件に対応することが好ましい。本発明の核酸配列および／またはベクターが挿入され得る市販の適切な発現ベクターとしては、ｐＳＰＯＲＴ、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩＳＫ、バキュロウイルスの発現ベクターであるｐＢｌｕｅＢａｃ、および原核生物の発現ベクターであるｐｃＤＮＡＩＩが挙げられる。これらのベクタターは全て、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手することができる。

【０１３１】

本発明にしたがって用いられる（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに細胞を埋め込む前に、この細胞にトランスフェクトされるに適した本明細書にて規定したようなベクターは、典型的に、本明細書にて規定したような核酸配列と他の調節エレメントとを

組み合わせたものである。この調節エレメントは、例えば、コードされたアミノ酸配列の発現をコードするものである。このような調節エレメントは、例えば、（１）身体の組織または領域に特異的なものであり、（２）恒常的であり、（３）グルコースに応答するものであり、および／または（４）誘導可能なもの／調節かのうなものである。本明細書における調節エレメントは、（ベクターが自律的に複製する場合）調節配列および複製起点から選択されることが好ましい。本発明の範囲内における調節配列は、コードする核酸配列の転写および／または翻訳に対して影響を与える当業者に公知の任意のエレメントである。調節配列としては、プロモーター配列の他に、いわゆるエンハンサー配列が挙げられる。エンハンサー配列は、ＲＮＡポリメラーゼとＤＮＡとの相互作用を増強することによって、発現の増加を引き起こし得る。さらに、本発明のベクターの調節配列は、転写調節シグナルおよび翻訳開始シグナル、いわゆる「転写終結配列」、またはそれらの部分配列である。

【０１３２】

一般に、任意の天然に存在するプロモーターを、本明細書にて用いるような（球状の）マイクロカプセルを調製するために用いてもよい、細胞にトランスフェクトするに適切な発現ベクターに含まれてもよい。このようなプロモーターは、任意の、真核生物のプロモーター、原核生物のプロモーター、ウイルスのプロモーター、細菌のプロモーター、植物のプロモーター、ヒトのプロモーターまたは動物のプロモーター（例えば、哺乳動物のプロモーター）から選択され得る。適切なプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルスのプロモーター、ｌａｃＺプロモーター、ガル１０（ｇａｌ　１０）プロモーター、およびＡｃＭＮＰＶポリヘドラルプロモーター（ｃｏｓプロモーター、ｔａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｔｅｔプロモーター、ｔｒｐ－ｔｅｔプロモーター、ｌｐｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｌｐｐ－ｌａｃプロモーター、ｌａｃｌｑプロモーター、Ｔ７プロモーター、Ｔ５プロモーター、Ｔ３プロモーター、ｇａｌプロモーター、ｔｒｃプロモーター、ａｒａプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＳＰ６プロモーター、Ｉ－ＰＲプロモーター、またはＩ－ＰＬプロモーターなど）が挙げられるが、グラム陰性菌にて発見されるものが有利である。さらに、プロモーターは、グラム陽性のプロモーター（例えば、ａｍｙおよびＳＰＯ２）、酵母プロモーター（ＡＤＣ１、ＭＦａ、ＡＣ、Ｐ－６０、ＣＹＣ１、ＧＡＰＤＨなど）、または哺乳動物のプロモーターから取得されたものであってもよいし、ＣａＭキナーゼＩＩ、ネスチン、Ｌ７、ＢＤＮＦ、ＮＦ、ＭＢＰ、ＮＳＥ、ベーターグロビン、ＧＦＡＰ、ＧＡＰ４３、チロシンヒドロキシラーゼ、カイニン酸レセプターのサブユニット１、グルタミン酸レセプターのサブユニットＢに由来するプロモーターから取得されたものであってもよいし、ヒトのユビキチンプロモーターＢ（ｕｂｉＢヒューマン）、ヒトのフェリチンＨプロモーター（ＦｅｒＨ）から取得されたものであってもよい。哺乳動物のプロモーターとしては、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のプロモーター、筋肉に特異的なプロモーター（哺乳動物のマッスルクレアチンキナーゼ（ＭＣＫ）プロモーター、哺乳動物のデスミンプロモーター、哺乳動物のトロポニンＩ（ＴＮＮＩ２）プロモーターまたは哺乳動物の骨格のアルファアクチン（ＡＳＫＡ）のプロモーターが挙げられる。）、あるいは肝臓のタイプのピルビン酸キナーゼのプロモーター（特に、（－１８３～＋１２）または（－９６～＋１２）にわたるフラグメント）（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，（１９９１）．２６６：８６７９－８２．；Ｃｕｉｆ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ，（１９９２）．１２：４８５２－６１）；スポット１４のプロモーター（Ｓ１４、－２９０～＋１８）（Ｊｕｍｐ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，（１９９０）．２６５：３４７４－８）；アセチル－ＣｏＡカルボキシラーゼ（Ｏ’Ｃａｌｌａｇｈａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，（２００１）．２７６：１６０３３－９）；脂肪酸シンターゼ（－６００～＋６５）（Ｒｕｆｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，（２００１）．２８：２８）；およびグルコース６ホスファターゼ（ラットおよびヒト）（Ｓｃｈｍｏｌｌ，ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｆｔ，（１９９６）．３８３：６３－６；Ａｒｇａｕｄ，ｅｔ　ａｌ．，

Ｄｉａｂｅｔｅｓ，（１９９６）．４５：１５６３－７１）が挙げられる。特に、好ましいプロモーターは、ヒトまたは哺乳動物を起源とするものである。最後に、合成プロモーターを用いることが有利な場合がある。インビトロでの制御を目的として、本発明のベクターに含まれるようなプロモーター配列は、発現を調節するように誘導可能であってもよい。このような誘導は、例えば、栄養素または他の誘導剤が増殖培地に存在すること、または存在しないことによって、行われる。１例としては、バクテリオファージλのｐｌａｃ５から取得されたｌａｃオペロンが挙げられる。このｌａｃオペロンはＩＰＴＧによって誘導され得る。最後に、本明細書にて規定したようなプロモーターは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１をコードする核酸配列に連結されていてもよいし、必要に応じて、本明細書にて規定したようなさらなる因子（抗アポトーシス剤、ＶＥＧＦなど）に連結されていてもよい。この場合、このプロモーターは、ＧＬＰ－１をコードする核酸配列の５’「上流」に位置している。ヒトのユビキチンプロモーターＢ（ｕｂｉＢヒューマン）、ヒトのフェリチンＨプロモーター（ＦｅｒＨ）などのヒトのプロモーターを用いることが好ましい。

【０１３３】

本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１をコードする核酸配列の発現をアップレギュレートするためのエンハンサー配列は、本明細書にて規定したようなベクターまたは発現の別の構成要素であることが好ましい。このようなエンハンサー配列は、典型的に、ベクターの３’非翻訳領域に配置される。本明細書にて規定したようなベクターに使用されるようなエンハンサー配列は、任意の真核生物、原核生物、ウイルス、細菌、植物、ヒトまたは哺乳動物（哺乳動物の宿主）から取得され得るが、本明細書にて規定したような対応するプロモーターと関連していることが好ましい。本発明において最も有用なエンハンサー要素は、グルコースに応答するもの、インスリンに応答するもの、および／または肝臓に特異的なものである。エンハンサー要素としては、ＣＭＶエンハンサー（これは、例えば、ユビキチンプロモーター（Ｃｕｂｉ）に連結される。）、１つ以上のグルコースに応答する要素（肝臓のピルビン酸キナーゼ（Ｌ－ＰＫ）プロモーター（（－１７２～－１４２）のグルコースに応答する要素（Ｇ１ＲＥ）が挙げられる。）、および応答が増強されている修飾されたバージョン（Ｃｕｉｆ ｅｔ ａｌ．，ｓｕｐｒａ；Ｌｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，（１９９９）．２７４：２８３８５－９４）；補助的なＬ３ボックス（（－１７２～－１２６）を有するＬ－ＰＫのＧ１ＲＥ（Ｄｉａｚ Ｇｕｅｒｒａ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ，（１９９３）．１３：７７２５－３３）；補助的なＬ３ボックスを有する応答が増強されている修飾されたバージョンのＧ１ＲＥ；Ｓ１４（（－１４４８～－１４２２）の炭水化物に応答する要素（ＣｈｏＲＥ）、および低濃度のグルコースにて活性化される修飾されたもの（Ｓｈｉｈ ａｎｄ Ｔｏｗｌｅ，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，（１９９４）．２６９：９３８０－７；Ｓｈｉｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，（１９９５）．２７０：２１９９１－７；およびＫａｙｔｏｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，（１９９７）．２７２：７５２５－３１）；Ｓ１４の隣接する付属の因子の部位（－１４６７～－１４２２）を有するＣｈｏＲＥ［ｅｔ ａｌ．，ｓｕｐｒａ］；アルドラーゼ（＋１９１６～＋２３２９）（Ｇｒｅｇｏｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，（１９９８）．２７３：２５２３７－４３；Ｓａｂｏｕｒｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，（１９９６）．２７１：３４６９－７３）；および脂肪酸シンターゼ（－７３８２～－６９７０）（Ｒｕｆｏ，ｅｔ ａｌ．，ｓｕｐｒａ．）が挙げられる。エンハンサー要素は、インスリンに応答する要素、肝臓に特異的なエンハンサー要素、および筋肉に特異的なエンハンサーがより好ましい。インスリンに応答する要素は、例えば、グルコース６ホスファターゼのインスリンに応答する要素（（－７８０～－７２２）など）（Ａｙａｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，（１９９９）．４８：１８８５－９）である。肝臓に特異的なエンハンサー要素は、例えば、プロトロンビン（９４０～－８６０）（Ｃｈｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，（１９９１）２６６：１８９２７－３３）、およびアル

ファ１ミクログロブリン（－２９４５～－２５３９）（Ｒｏｕｅｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ，（１９９８）．３３４：５７７－８４）である。筋肉に特異的なエンハンサーは、哺乳動物のＭＣＫエンハンサー、哺乳動物のＤＥＳエンハンサー、および脊椎動物のトロポニンＩのＩＲＥ（ＴＮＩ ＩＲＥ、以下ではＦＩＲＥと称する。）のエンハンサーである。最後に、ＳＶ４０のエンハンサー配列も含まれてもよい。

【０１３４】

さらに、エンハンサー要素は、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１をコードする核酸配列の発現をアップレギュレートするために、本明細書にて規定したようなプロモーターと一緒に用いてもよい。例えば、このようなプロモーターとエンハンサーとの組合せとしては、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のプロモーターとＣＭＶのエンハンサー、ユビキチンのプロモーター（Ｃｕｂｉ）に連結されたＣＭＶのエンハンサーが挙げられる。また、ヒトの血清アルブミン（ＨＳＡ）のエンハンサー、ヒトのプロトロンビン（ＨＰｒＴ）のエンハンサー、アルファ１ミクログロブリン（Ａ１ＭＢ）のエンハンサー、およびアルドラーゼのイントロンのエンハンサーを含む、肝臓の特異的なエンハンサー要素の群を、これらのエンハンサー要素と対応するプロモーターと組み合わせて用いてもよい。ＨＳＡのエンハンサーを、ＣＭＶのプロモーターまたはＨＳＡのプロモーターの群から選択されるプロモーターと組み合わせて用いてもよい。ヒトのプロトロンビン（ＨＰｒＴ）、アルファ１ミクログロブリン（Ａ１ＭＢ）からなる群より選択されるエンハンサー要素をＣＭＶのプロモーターと組み合わせて用いてもよい。ヒトのプロトロンビン（ＨＰｒＴ）、アルファ１ミクログロブリン（Ａ１ＭＢ）からなる群より選択されるエンハンサー要素をアルファ１抗トリプシンのプロモーターと組み合わせて用いてもよい。

【０１３５】

さらに、本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルの構成要素として用いてもよい細胞にトランスフェクトするに適した本明細書にて規定したようなベクターは、転写シグナルおよび／または翻訳シグナル（転写を調節するシグナルおよび翻訳を開始するシグナルなど）を含んでいてもよい。転写シグナルおよび／または翻訳シグナルは、適切な宿主によって認識されるものであることが好ましい。転写シグナルおよび／または翻訳シグナルは、任意の真核生物、原核生物、ウイルス、細菌、植物から取得されたものであってもよいが、ヒトまたは動物（例えば、哺乳動物の宿主）から取得されたものであることとが好ましく、本明細書にて規定したような対応するプロモーターと関連することが好ましい。本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１をコードする核酸配列および任意のさらなる因子と関連する転写を調節するシグナルおよび翻訳を開始するシグナルを細胞が認識する限り、種々の転写を調節する配列および翻訳を調節する配列を宿主の性質に応じて使用してもよい。本発明のベクターにおける転写の調節および翻訳の調節のために、天然に存在するＧＬＰ－１をコードする核酸配列に隣接する５’領域を保持して、用いてもよい。この領域は、典型的に、転写の開始および翻訳の開始に関与する配列（ＴＡＴＡボックス、キャッピングされる配列、およびＣＡＡＴ配列など）を含んでいる。この領域は、少なくとも１５０塩基対の長さであることが典型的であり、約２００ｂｐの長さであることがより典型的であり、稀に約１～２ｋｂという異常な長さである。

【０１３６】

本明細書にて規定したようなベクターに適した転写の開始を調節するシグナルは、抑制を制御することができるもの、または活性化を制御することができるものから選択されてもよい。これによって、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１をコードする核酸配列および本明細書にて規定したような任意のさらなる因子の発現を調節することができる。このような制御可能な調節の技術の１つは、温度に感受性のある調節シグナルを使用することである。このような調節シグナルを用いれば、温度の変化によって発現を抑制したり、発現を開始したりすることができる。別の制御可能な調節の技術は、特定の化学物質に感受性のある調節シグナルを使用することである。これらの方法は、インビトロの処理（例えば、必要なコンストラクトを作製する場合）において用いることが好ましい。さらに、細胞外からのさらなる手段を全く用いることなく、インビボでの発現の抑制または活性化

の制御を可能にする、転写の開始を調節するシグナルを本明細書において用いてもよい。このようなシグナルを用いれば、例えば、封入された細胞において一過性の発現を得ることができる。このような転写シグナルおよび／または翻訳シグナルとしては、例えば、転写の終結を調節する配列（停止シグナル、およびポリアデニル化領域など）が挙げられる。さらに、転写の終結を調節する配列は、ＧＬＰ－１をコードする核酸配列を含んでいる本明細書にて規定したようなベクターの３’非翻訳領域に配置されていてもよい。適切な終結の配列としては、例えば、ウシの増殖ホルモン、ＳＶ４０、ｌａｃＺ、ＥＦ１アルファ、およびＡｃＭＮＰＶのポリヘドラルポリアデニル化のシグナルが挙げられ得る。

【０１３７】

本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルを作製するために用いてもよい細胞にトランスフェクトするに適した発現ベクターは、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１をコードする核酸配列および本明細書にて規定したような任意のさらなる因子を最適に発現させるための他の配列を含んでいてもよい。このような配列としては、シグナル（ペプチド）をコードする配列、発現産物の安定化をもたらす配列、制限酵素が認識する配列が挙げられる。シグナル（ペプチド）をコードする配列は、分泌されるタンパク質を膜の中または膜を通して通過させる、Ｎ末端に配置されるペプチド配列をコードしている。制限酵素が認識する配列は、制限エンドヌクレアーゼによって切断されるための部位を提供する。これらの材料の全ては公知であり、市販されている（例えば、Ｏｋａｙａｍａ（１９８３），Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，３：２８０参照）。

【０１３８】

本明細書にて規定したような「シグナル配列」は、約８～３０個のアミノ酸または１５～３０個のアミノ酸を典型的に含んでいるシグナル（ペプチド）配列であり、発現したＧＬＰ－１（融合）ペプチドのＮ末端に（ＧＬＰ－１の１～６のアミノ酸に関する本明細書の規定の範囲内において）位置しており、ＧＬＰ－１ペプチドが分泌されることを可能にする（すなわち、ＧＬＰ－１ペプチドが細胞マイを通過することを可能にする。）。このようなシグナル（ペプチド）配列としては、野生型のＧＬＰ－１の前駆体タンパク質と一般的に関連するシグナル配列（すなわち、全長のプログルカゴンの前駆体分子のシグナル配列）、この前駆体タンパク質と一般的に関連しないシグナル（ペプチド）配列が挙げられる。なお、この前駆体タンパク質と一般的に関連しないシグナル（ペプチド）配列は、野生型のＧＬＰ－１の前駆体タンパク質（すなわち、全長のプログルカゴンの前駆体分子のシグナル（ペプチド）配列）に対して異種である。本明細書にて規定したような「シグナル（ペプチド）配列」は、例えば、シグナルペプチド配列またはリーダー配列（例えば、分泌性のシグナル（およびリーダー）配列）であり得る。さらに、本明細書にて規定したようなシグナル（ペプチド）配列は、プロテアーゼ（例えば、シグナル（ペプチド）配列のプロテアーゼ）によって（ＧＬＰ－１）前駆体ペプチドが切断されることを提供することが好ましい。プロテアーゼによって（ＧＬＰ－１）前駆体ペプチドからシグナル（ペプチド）配列が切断されると、本明細書にて規定したような生物学的に活性なＧＬＰ－１ペプチドが産生される。このようなシグナル（ペプチド）配列は、切断のためのプロテアーゼによって認識される切断部位をコードする領域を一般に含んでいる。代替的な態様では、切断のためのプロテアーゼによって認識される切断部位をコードする領域は、シグナル（ペプチド）配列内に導入され得る。さらに、切断のためのプロテアーゼによって認識される切断部位をコードするさらなる配列がシグナル（ペプチド）配列に（１つ以上）付加されてもよい。

【０１３９】

本明細書にて規定したようなベクターによってコードされ得るシグナル（ペプチド）配列としては、例えば、分泌タンパク質（ＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１以外の分泌タンパク質など）および血清タンパク質に由来するシグナル（ペプチド）配列が挙げられる。ＧＬＰ－１以外の分泌タンパク質は、例えば、サイトカイン、凝固因子、免疫グロブリン、分泌性の酵素、またはホルモン（脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（ＰＡ

ＣＡＰ）／グルカゴンのスーパーファミリーを含む。）である。例えば、本明細書にて規定したようなシグナル（ペプチド）配列は、分泌性のマトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ヒトの分泌性のアルカリホスファターゼ（ＳＥＡＰ）、エキセンジンの前駆体（ｐｒｏ－ｅｘｅｎｄｉｎ）、ヘロデルミンの前駆体（ｐｒｏ－ｈｅｌｏｄｅｒｍｉｎ）、グルコース依存性のインシュリン分泌性ポリペプチド（ＧＩＰ）の前駆体、インスリン様増殖因（ＩＧＦ１）の前駆体、プレプログルカゴン、アルファ１抗トリプシン、インスリン様成長因子１、ヒトのファクターＩＸ、ヒトのリンホトキシンＡ（ジェンバンクアクセッション番号（Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　ｎｏ．）ＢＡＡ００００６４）、またはヒトのクラスタリン（ジェンバンクアクセッション番号ＡＡＰ８８９２７）に由来するものであり得る。分泌性のマトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）に由来するシグナル（ペプチド）配列は、例えば、ストロメライシンのリーダー配列である。エキセンジンの前駆体に由来するシグナル（ペプチド）配列は、例えば、エキセンジン－４の前駆体のリーダー配列である。本明細書にて規定したようなシグナル（ペプチド）配列の特別な例は、シグナルペプチダーゼ（フューリンまたは他のプロホルモンコンバターゼ（例えばＰＣ３））によって前駆体を切断するための、シグナルについてのコード領域を含んでいる。例えば、フューリン（ＰＡＣＥとしても知られている。米国特許第５，４６０，９５０号明細書参照。）または他のサブチリシン、エンテロキナーゼ（米国特許第５，２７０，１８１号明細書参照。）、およびキモトリプシンによって切断されるシグナル（ペプチド）配列を、本明細書にて規定したようなシグナル（ペプチド）配列に導入することができる。他のサブチリシンとしては、ＰＣ２、ＰＣ１／ＰＣ３、ＰＡＣＥ４、ＰＣ４、ＰＣ５／ＰＣ６、ＬＰＣ／ＰＣ７ＩＰＣ８／ＳＰＣ７およびＳＫＩ－１が挙げられる（Ｎａｋａｙａｍａ，　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｊ．，　３２７：６２５－６３５　（１９９７））。これらの文献のそれぞれの開示は、参考として本明細書に援用される。フューリンは、ユビキタスに発現するプロテアーゼであり、トランスゴルジに存在し、タンパク質の前駆体が分泌される前に、この前駆体をプロセスする。フューリンは、コンセンサス配列であるＡｒｇ－Ｘ－Ｌｙｓ－ＡｒｇまたはＡｒｇ－Ｘ－Ａｒｇ－Ａｒｇ、（Ｌｙｓ／Ａｒｇ）－Ａｒｇ－Ｘ－（Ｌｙｓ／Ａｒｇ）－ＡｒｇおよびＡｒｇ－Ｘ－Ｘ－Ａｒｇ（Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇなど）のＣＯＯＨ末端にて切断する。これらのアミノ酸配列は、プロテアーゼであるフューリンによって前駆体を切断するためのシグナルである。したがって、異種性のシグナル（ペプチド）配列は、シグナル（ペプチド）配列から編集されたコンセンサス配列（例えば、シグナルペプチダーゼによって切断される分泌タンパク質から編集されたコンセンサス配列）に合成的に由来するものであってもよい。

【０１４０】

本明細書にて規定したような調節配列に加えて、本明細書にて規定したような自律的に複製するベクターは、典型的に、複製起点を含んでいる。適切な複製起点としては、限定されないが、例えば、ＣｏｌＥ１、ｐＳＣ１０１、ＳＶ４０、ｐＭＰＩ　（ｏｒｉ　ｐＭＰＩ）およびＭ１３の複製起点が挙げられる。

【０１４１】

本明細書にて規定したような球状の）マイクロカプセルの細胞のＧＬＰ－１をコードする核酸配列および本明細書にて規定したような任意のさらなる因子を発現するに適した本明細書にて規定したようなベクターは、自殺遺伝子をさらに含んでいてもよい。本発明に関連して、「自殺遺伝子」は、本明細書にて用いられるような（球状の）マイクロカプセルによる処置法を停止できることが好ましい。このような処置法の停止は、特定の物質を投与して、（球状の）マイクロカプセルの（球状の）コアに含まれた自殺遺伝子を有する細胞を殺すことによって、行われる。換言すれば、本発明に適した自殺遺伝子は、ヒトまたは動物の身体に通常存在しない外因性の活性化因子を投与することによって活性化され得る。この場合、典型的には、自殺遺伝子は、細胞がアポトーシスのイベントを経験するカスケードを開始する。代替的な態様では、本発明に適した自殺遺伝子は、投与された無毒なプロドラック（ヒトまたは動物の身体に通常存在しない外因性のもの）を代謝し得る。無毒な外因性のプロドラッグの代謝によって、このプロドラッグが細胞に対して毒性を

有するようになることが好ましい。自殺遺伝子は、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチドのＧＬＰ－１ペプチドをコードするベクターと同一のベクターに含まれていてもよいし、代替的に、第２のベクターに含まれていてもよい。さらに、自殺遺伝子は、発現ベクターの構成要素としての本明細書にて言及したような任意の種類のコントロール要素および調節要素（プロモーター、エンハンサーなど）によって調節されてもよいし、天然に存在するコントロール要素および調節要素によって調節されてもよい。本発明に係る自殺遺伝子は、本明細書における制御メカニズムのいずれかを可能にするものが選択されることが好ましい。例えば、自殺遺伝子は、シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）、ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＵＰＲＴａｓｅ）、ＨＳＶチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－Ｔｋ）、テトラサイクリンの添加によって誘導され得る自殺遺伝子（細菌のＴｅｔリプレッサータンパク質（ＴｅｔＲ）など）から選択される。特定の実施例として、シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）が用いられ得る。シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）は、典型的に、種々の生物において存在し、５’フルオロシトシン（５－ＦＣ）を、一般的な化学療法剤である５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）に変換することができる。５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）は、生物に対する毒性が高い一方、そのプロドラッグである５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）は、細胞に対して毒性がない。５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）は、その後、細胞内のキナーゼによってリン酸化されると、細胞のＲＮＡ合成を抑制することができる。よって、プロドラッグである５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）は、特定の細胞の自殺を誘導するための優れたツールである。さらに、５－フルオロ－ｄＵＭＰが、抗葉酸剤として作用し、酵素チミジル酸シンターゼを阻害する。このチミジル酸シンターゼは、デオキシリボヌクレオチドのデノボ合成の経路においてｄＵＭＰのメチル化を触媒して、ｄＴＭＰをもたらす酵素である。このため、細胞内におけるＤＮＡ合成が阻害され得る。また、ＨＳＶ－１チミジンキナーゼ（ＡＴＰ：チミジン－５－ホスホトランスフェラーゼ）およびその対応するプロドラッグであるガンシクロビル（ＧＣＶ）を用いてもよい。グアノシンの類似体であるＧＣＶは、特異的にリン酸化され、ＤＮＡの合成における伸長を阻害し、これによって、細胞の自殺を引き起こす。

【０１４２】

ＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドおよび任意のさらなる因子をコードする本明細書にて規定したようなベクターまたは核酸を、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルを調製するために使用するに適した細胞にトランスフェクトすることは、当業者に公知の任意の方法によって実施してもよい（例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ参照）。ベクターを本明細書にて規定したような適切な細胞にトランスフェクトする場合、このベクターは、ＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドをコードする核酸を保有しているプラスミドＤＮＡの形態で存在することが好ましい。プラスミドＤＮＡは、環状のプラスミドＤＮＡであることが好ましい。適切なトランスフェクションの方法としては、限定されないが、例えば、エレクトロポレーション技術（改変されたエレクトロポレーション技術（例えば、ヌクレオフェクション）を含む。）、リン酸カルシウム技術（例えば、リン酸カルシウムによって共沈させる方法）、ＤＥＡＥデキストランの方法、リポフェクション法（例えば、トランスフェリンによって媒介されるリポフェクション法）が挙げられる。トランスフェクションは、改変されたエレクトロポレーション技術（例えば、ヌクレオフェクション）を用いて、本明細書にて規定したようなベクターを保有するプラスミドＤＮＡによって実施されることが好ましい。

【０１４３】

さらに、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドあるいはそれらのフラグメントまたはバリアントおよび本明細書にて規定したような任意の（optional）さらなる因子をコードする、本明細書にて規定したようなベクターまたは代替的に核酸は、例えばトランスフェクションのために、少なくとも１個の合成ポリマ

ーまたは天然ポリマー（例えばポリアミノ酸）と複合体化されてもよいし、少なくとも１個の合成ポリマーまたは天然ポリマーに抱合されてもよい。少なくとも１個のポリマーの構成要素は、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドあるいはそれらのフラグメントまたはバリアントおよび本明細書にて規定したような任意のさらなる因子をコードする、本明細書にて規定したようなベクターまたは代替的に核酸に共有的に結合されてもよい。本発明の意味において「抱合された」は、「化学的に結合されていること」を意味することが意図される。「化学的に結合されていること」は、共有結合または非共有結合を介して結合されていることを意味することが意図される。共有結合を利用してもよい一方、非共有結合がトランスフェクションのために好ましい。したがって、ポリマーの構成要素は、共有結合ではなく、複合体化によって（例えば、水素結合、静電気的な相互作用、疎水的相互作用などによって）融合ペプチドに連結されてもよい。

【０１４４】

本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドあるいはそれらのフラグメントまたはバリアントおよび本明細書にて規定したような任意のさらなる因子をコードする本明細書にて規定したようなベクターまたは代替的に核酸と結合するために本明細書にて用いるポリマーは、生理学的に受容可能なポリマーであり得る。このような生理学的に受容可能なポリマーとしては、水溶液または懸濁液に溶解し、薬学的に効果的な量で融合ペプチドを投与したときに、哺乳動物に対する負の影響（例えば副作用）を示さないポリマーが挙げられる。本発明にしたがって用いる生理学的に受容可能なポリマーは特に限定されない。このポリマーは、合成されたものであってもよいし、天然に存在するポリマー（例えばタンパク質）であってもよい。

【０１４５】

より一般に、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドまたはＧＬＰ－１融合ペプチドあるいはそれらのフラグメントまたはバリアントおよび本明細書にて規定したような任意のさらなる因子をコードする、本明細書にて規定したようなベクターまたは代替的に核酸と一緒に用いる合成ポリマーは、アルキレングリコール（ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコール（ＰＰＧ）、およびエチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマーなど）、ポリオキシエチル化されたポリオール、ポリオレフィンのアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリヒドロキシアルキルメタクリルアミド、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート（ポリヒドロキシエチレンメタクリレートなど）、ポリアクリレート、ポリサッカライド、ポリ（アルファ－ヒドロキシ酸）、ポリビニルアルコール、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、ポリビニルエチルエーテル、ポリビニルアセタール、ポリ乳酸のグリコール酸（ｐｏｌｙｌａｃｔｉｃ ｇｌｙｃｏｌｉｃ ａｃｉｄ）、ポリ乳酸、脂質ポリマー、キチン、ヒアルロン酸、ポリウレタン（ｐｏｌｙｕｒｅｔｈｙｎｅ）、ポリシアル酸、セルロースストリアセテート、セルロースニトレートおよびそれらの任意の組合せから選択されることが好ましい。

【０１４６】

また、本発明は、本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルを調製する方法を提供する。これらの（球状の）マイクロカプセルを、２つ以上の方法のステップにしたがって調製することが好ましい。方法のステップ（１）によれば、上述しようなコアを調製する。方法のステップ（２）によれば、方法のステップ（１）にしたがって調製したようなこのコアを、表面を被覆する１つ以上の層によって被覆する。さらに、任意のステップは、さらなる表面を被覆する層を調製するために、方法のステップ（２）を繰り替えすることを含んでいてもよい。好ましくは、方法のステップ（２）と同一のステップを、このようなさらなる表面を被覆する層のそれぞれに対して実施する。さらに、任意のステップは、球状のマイクロカプセルを調製した後に、洗浄を行うステップを含んでいてもよい。

【０１４７】

典型的に、本明細書にて開示したようなコアを、本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルを調製するための、方法のステップ（１）にしたがって調製する。このようなコアは、架橋されたポリマーと、ＧＬＰ－１ペプチドをコードし、分泌する細胞とから構成される。この細胞は、本明細書に開示したような方法にしたがってトランスフェクトされたものである。方法の工程（１）によれば、可溶形の上記ポリマー（例えば、可溶形のアルギン酸塩（例えば、アルギン酸カリウムまたはアルギン酸ナトリウムの生理食塩水の溶液））と、ＧＬＰ－１ペプチドをコードし、分泌する細胞との混合物（懸濁液）を典型的に調製する。この場合、混合物の濃度は、（球状の）コアについての本明細書にて規定したような濃度であることが好ましく、例えば、ポリマーの溶液１ｍＬ当たり、細胞が１×１０^{5}～６×１０^{7}個である。

【０１４８】

典型的な技術として、均質な細胞／ポリマーの懸濁液（例えば、細胞／アルギン酸塩の懸濁液）を、空気が注入されるスプレーのノズルによって圧縮してもよい。このノズルは、
共通の中心の周りに、同心円状の３つの輪（内側の流路、中間の流路、外側の流路（空気のリング））として同心円状に配置された３つの流路からなる。内径が１００μｍ～５０００μｍである内側の流路のために、中空の針を用いることが好ましい。中間の流路は、典型的に、６０μｍ～４０００μｍの内径を有しており、外側の流路（空気のリング）は、１００μｍ～５０００μｍの内径を有していることが好ましい。内側のチャンネルおよび外側のチャンネル（空気のリング）は、本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルのコアを調製するための方法のステップ（１）にて独占的に用いられる。したがって、単に、２つの流路（内側の流路および外側の流路）からなるスプレーのノズルも、方法のステップ（１）にて用いてもよい。典型的に、３つの流路を有する注入されるスプレーのノズルを用いる場合、中間の流路を通る物質はない。細胞／ポリマーの溶液の懸濁液は、典型的に、内側の流路を透り、１０μＬ／分～５ｍＬ／分の速度で圧縮され、この流路の出口において液滴となる。この液滴は、外側の流路（空気のリング）によって提供される、通常０．５Ｌ／分～１０Ｌ／分の速度の気流によって引き裂かれる。細胞および架橋されていないポリマーの溶液を含んでいる液滴を、架橋剤を含んでいる溶液（沈殿のための槽）に落下させる。この架橋剤を含んでいる溶液は、空気を注入されるスプレーのノズルの出口の約４ｃｍ～約６０ｃｍ下に位置している。液滴は滴下される間に丸くなることが好ましく、これによって、実質的に球状の形態となる。架橋剤によって上記ポリマーのイオン的な架橋がもたらされ、そして、（球状の）コアについての本明細書にて規定したような直径を有する、球状の（水に不溶性の）マイクロカプセルのコアが形成され始める。（球状の）マイクロカプセルのコアの直径は、方法のステップ（１）にて用いられる選択された流路の大きさおよび形状に依存する。アルギン酸塩をポリマーとして用いる場合、架橋剤を含んでいる溶液（沈殿のための槽）は、二価のカチオン（例えば、カルシウムイオンまたはバリウムイオン（５～１００ｍＭ）または他の二価のカチオン）あるいは多価のカチオンから構成されることが好ましい。さらに、沈殿のための槽は、バッファの物質（例えば、１ｍＭ～１０ｍＭのヒスチジン）および塩化ナトリウム（例えば、２９０ミリオスモル±５０ミリオスモル）を含んでいることが好ましい。アルギン酸塩以外の他のポリマーを用いる場合、当業者に公知の他の適切な架橋剤およびバッファを本明細書において用いてもよい。

【０１４９】

方法のステップ（１）は、本明細書にて規定したような、架橋されたポリマーと細胞戸から構成された、（球状の）マイクロカプセルのコアを提供する。方法のステップ（１）の後の任意の方法のステップは、洗浄を行うステップを含んでいてもよい。本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルのコアを、例えば、生理食塩水または他の適切な任意の洗浄溶液を用いて洗浄し、適宜、コアを、硫酸ナトリウム溶液にてインキュベートするが、米国特許第６，５９２，８８６号明細書にしたがって、硫酸ナトリウム溶液にてインキュベートすることが好ましい。この文献の開示は、参考として本明細

書に援用される。本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルのコアを沈殿のための槽および／または洗浄のための槽から分離することを、典型的に、遠心または他の任意の適切な方法によって実施する。

【０１５０】

方法のステップ（２）によれば、方法のステップ（１）によって調製した、本発明にしたがって用いられるような（球状の）マイクロカプセルのコアを、実質的に架橋されたポリマーである表面を被覆する層で被覆する。したがって、ステップ（１）によって調製した（球状の）マイクロカプセルのコアを、本明細書に開示したような架橋されていないポリマーを含んでおり、細胞を含んでいないポリマーの溶液に添加する。このポリマーは、本明細書にて規定したような濃度にて、架橋されていない形態で提供されることが好ましい。典型的には、ポリマーの溶液と（球状の）マイクロカプセルのコアとを含んでいるこの混合物を、本明細書に記載した空気が注入されるスプレーのノズルの内側の流路を、例えば、１５μＬ／分～２ｍＬ／分（好ましくは１０μＬ／分～５ｍＬ／分）の速度にて通して圧縮する。同時に、細胞を含んでいない純粋な架橋されていないポリマーの溶液（好ましくは、約０．１％～約４％（ｗ／ｖ）のポリマーを含んでいる溶液）（例えば、細胞を全く含んでいないアルギン酸塩の溶液）を、中間の流路を、典型的に１５μＬ／分～２ｍＬ／分（好ましくは１０μＬ／分～５ｍＬ／分）の速度にて通して圧縮する。これによって、上記コアと重合されていないポリマーの表面とを含んでいる液滴を、中間の流路の末端にて形成する。これらの液滴は、外側の流路（空気のリング）によって提供される気流によって引き裂かれる。この気流の速度は、通常、０．５Ｌ／分～１０Ｌ／分である。（球状の）マイクロカプセルのコアのポリマーの濃度、（球状の）マイクロカプセルのコアが添加されるポリマーの溶液のポリマーの濃度、および表面を被覆するポリマーの濃度は異なってもよい（本明細書参照）。方法のステップ（２）にしたがって調製した（球状の）マイクロカプセルのコアを含んでいる液滴を、本明細書にて規定したような架橋剤を含んでいる溶液（沈殿のための槽）に落下させる。この落下の間に、液滴が丸くなり、ほぼ球状の形状になることが好ましい。方法のステップ（１）と同様に、架橋剤はポリマーのイオン的な架橋をもたらす。これによって、本明細書にて規定したような直径を有する、水に不溶性の（球状の）マイクロカプセルが形成する。この（球状の）マイクロカプセルは、（球状の）マイクロカプセルの全直径（粒径）が約１００μｍ～約２００μｍであることが好ましく、全直径が約１１５μｍ～約１８５μｍであることがより好ましく、全直径が約１３０μｍ～約１７０μｍであることがさらに好ましく、全直径が約１４５μｍ～約１５５μｍ（例えば約１５０μｍ）であることが最も好ましい。方法のステップ（２）によって得られる（球状の）マイクロカプセルの全直径は、本明細書にて用いたような選択した流路の大きさおよび形状に依存する。表面を被覆する層を１個よりも多く有する、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセル（すなわち、本明細書にて規定したようなコアと２個、３個、４個、５個、５～１０個またはそれ以上の表面を被覆する層とを含んでいる（球状の）マイクロカプセル）を調製するために、方法のステップ（２）を必要な回数繰り返してもよい。これらのさらなる表面を被覆する層は、本明細書の直径の範囲内にて規定される。

【０１５１】

方法のステップ（２）の後に、１つ以上の任意の洗浄を行うステップを、本明細書にて規定したように行ってもよい。

【０１５２】

本発明のさらなる態様によれば、本発明は、動物（好ましくは哺乳動物）におけるＡＭＩまたはＭＩを処置する方法を提供する。それ故、このような処置の方法を、ヒトまたは脊椎動物の医学の分野において用いてもよい。本発明に関連して、用語「哺乳動物」は、任意の動物およびヒトを典型的に含んでいるが、ヒトおよび（哺乳動物であり、ヒトでない）動物を含んでいる群から選択されることが好ましいが、これらに限定されない。（哺乳動物であり、ヒトでない）動物としては、例えば、ブタ、ヤギ、ウシ、スワイン、イヌ、ネコ、ロバ、モンキー、エイプ、または齧歯類、雌牛、ウサギ、ヒツジ、ライオン、ジ

ャガー、ヒョウ、ラット、ブタ、バッファロー、イヌ、ロリス（ｌｏｒｉｓ）、ハムスター、モルモット、ダマジカ（ｆａｌｌｏｗ　ｄｅｅｒ）、ウマ、ネコ、マウス、オセロット、サーバル（ｓｅｒｖａｌ）が挙げられる。齧歯類としては、マウス、ハムスター、およびウサギが挙げられる。このような処置は、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルを、このマイクロカプセルを必要とする患者に投与することによって典型的に行われる。このような処置は、特に、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチド、本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１融合ペプチド、あるいはそれらのフラグメントまたはバリアントをコードし、分泌する、本発明に関連して用いてもよい本明細書にて規定したような細胞（例えば、間葉系の幹細胞、または間葉系の間質細胞、あるいは他の任意の細胞（タイプ））を、上記患者に投与することによって行われる。ここで、これらの細胞は、処置される患者の免疫系の応答を防止するために、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入されている。好ましくは、本発明の方法において用いるような（球状の）マイクロカプセルおよびその成分（例えば、コアのポリマーマトリクスのポリマーまたは表面の被覆）は、上記にて規定したようなものである。

【０１５３】

本発明に関連した処置は、虚血性心疾患または急性冠症候群の治療または予防、およびこれらに関連する状態の治療または予防を含んでいることが好ましい。このような疾患または状態としては、例えば限定されないが、ＡＭＩまたはＭＩ、ＳＴ、ＳＴ上昇型心筋梗塞（ＳＴＥＭＩ）、心筋症（虚血性心筋症を含む。）、不安定狭心症、うっ血性心不全および心室機能不全、心不全、内皮の機能不全による障害、任意の高血圧、あるいはそれらに関係する任意の疾患または状態が挙げられる。

【０１５４】

本明細書にて規定したようなＡＭＩまたはＭＩの治療または予防の方法（ＡＭＩまたはＭＩに関連する疾患または状態の治療または予防を含む。）は、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルを、これを必要とする患者に投与する工程、あるいはこのような（球状の）マイクロカプセルを含んでいる薬学的組成物をこれを必要とする患者に投与する工程を包含している。これを必要とする患者は、典型的に、例えば動物であるが、ヒトなどの哺乳動物であることが好ましい。本明細書の処置の方法の文脈における投与は、典型的に、「安全かつ効果的な」量の活性な作用物質（すなわち、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセル）にて行われる。本明細書にて用いる場合、「安全かつ効果的な量」は、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入されたこれらの細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの量であって、本明細書にて言及したような疾患または障害のポジティブな変更を顕著に誘導するに十分な量を意味する。しかし、同時に、「安全かつ効果的な量」は、深刻な副作用を回避するに十分少ない量でもあり、いわば、利益と危険性との間の理にかなった関係を可能にする。これらの制限の決定は、理にかなった医学的判断の範囲内にある。本発明に関連して、表現「安全かつ効果的な量」は、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの量であって、ＧＬＰ－１ペプチドを繰り返し投与する必要性、および／または、例えば、移植されたＧＬＰ－１を発現する同種の細胞に対する望まれない免疫応答の危険性がなく、ＧＬＰ－１についての公知の有益な効果（例えば、虚血または酸素の欠乏によって引き起こされたダメージおよび心臓組織が死ぬ可能性を強力に低減させる活性）を発揮するに適切な量を意味することが好ましい。本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの「安全かつ効果的な量」は、さらに、処置される特定の状態、処置される患者の年齢および健康状態、処置の期間、一緒に用いられる処置法の性質、用いる特定の薬学的に受容可能なキャリアおよび同様の要因に関連して、投与を行う医師の知識および経験の範囲内で変更される。

【０１５５】
通常、本発明の薬学的組成物に含まれるような（球状の）マイクロカプセルは、（球状の）マイクロカプセル１ｍＬにつき０．２μｇの本明細書にて規定したようなＧＬＰ－１ペプチドを１日当たり分泌する。したがって、用量の範囲は、例えば、分泌される生物学的に活性なＧＬＰ－１ペプチドが１日当たり約０．０１μｇ～２０ｍｇであるという範囲であってもよく（ただし、１～１００ｍｇの範囲というより高い量も考慮される。）、例えば、１日当たり約０．０１μｇ～１０ｍｇの範囲であり、０．０１μｇ～５ｍｇの範囲であることが好ましく、１日当たり約０．０１μｇ～１ｍｇの範囲であることがより好ましく、１日当たり約０．０１μｇ～５００μｇの範囲であることが最も好ましい。

【０１５６】
本明細書に記載した処置の方法に関連した投与は、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセル、あるいはこのような球状の）マイクロカプセルを含んでいる薬学的組成物を、処置される患者における特定の投与部位に提供することによって、典型的に、行われる。このような特定の投与部位は、典型的に、心臓の筋肉または心臓の筋肉、心筋または心筋組織であり、特に、梗塞の領域、周辺の領域、および／または梗塞の周囲の一帯（ｐｅｒｉｉｎｆａｒｃｔ　ｚｏｎｅ）（例えば、心電図検査またはＮＯＧＡの電気機械的なマッピング（ＮＯＧＡ　ｅｌｅｃｔｒｏｍｅｃｈａｎｉｃａｌ　ｍａｐｐｉｎｇ）またはＭＲＩなどの従来の手段によって検出されるような全ての部位）である。また、投与部位には、心臓の血管または心臓の周囲の血管が含まれる。このような血管は、例えば、心臓の筋肉または心臓の組織に供給する細動脈、心筋または心筋組織に供給する細動脈（特に、梗塞の領域、周辺の領域および／または梗塞の周囲の一帯に供給する細動脈）、心臓のＬＡＤ（ＬＡＤ＝左前下行枝（ＬＡＤ）冠動脈）、または他の冠動脈である。さらに、投与部位には、心臓の筋肉または心臓の組織の任意の表面（特に、梗塞の領域、周辺の領域および／または梗塞の周囲の一帯の任意の表面）が含まれる。このような表面は、限定されないが、梗塞が目視によって識別され得る開胸手術の後または間に、心外膜への注入によって処置されるものであり得る。梗塞の後に、組織は、迅速にゼリー状になり、物理的な完全性を失う。本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセル、あるいはこのような（球状の）マイクロカプセルを含んでいる薬学的組成物を、本明細書にて規定したような梗塞の液化したゼリー状の領域、または任意のさらなる領域に注入してもよい。

【０１５７】
心臓の血管、心臓の周囲の血管（例えば、心臓の筋肉または心臓の組織に供給する細動脈、心筋または心筋組織に供給する細動脈（特に、梗塞の領域、周辺の領域および／または梗塞の周囲の一帯に供給する細動脈）、心臓のＬＡＤ（ＬＡＤ＝左前下行枝（ＬＡＤ）冠動脈）、または他の冠動脈）に（球状の）マイクロカプセルを投与することによって、投与を行う場合、閉塞（ｏｃｃｕｌｓｉｏｎ）を抑制し、任意の塞栓性の効果を抑制する（例えば、心臓の梗塞、微小な梗塞を抑制する）、量および時間にて本発明の（球状の）マイクロカプセルを典型的に投与する。これは、例えば、投与される（球状の）マイクロカプセルを総量にて、例えば、約５，０００～約１，０００，０００個のビーズ、約１０，０００～約７５０，０００個のビーズ、約１０，０００～約５００，０００個のビーズ、約１０，０００～約２５０，０００個のビーズ、または約１０，０００～約１００，０００個のビーズ、例えば、約４０，０００～約１００，０００個のビーズ、例えば、約４０，０００個のビーズ、約５０，０００個のビーズ、約６０，０００個のビーズ、約７０，０００個のビーズ、約８０，０００個のビーズ、約９０，０００個のビーズまたは約１００，０００個のビーズ、例えば約３～４百万個の細胞に対応する約６０，０００個のビーズ、あるいは約１００，０００～約３００，０００個のビーズ、例えば、約１００，０００個のビーズ、約１５０，０００個のビーズ、約２００，０００個のビーズ、約２５０，０００個のビーズまたは約３００，０００個のビーズ、あるいはこれらの値の任意の２つによって形成された任意の範囲にて、投与することによって実現され得る。投与は、低

速度にて行うか、または時間をずらす様式（ｔｉｍｅ　ｓｔａｇｇｅｒｅｄ　ｍｏｄｅ）にて行うことが好ましい。例えば、最大で１０，０００，０００までのビーズが、梗塞を引き起こすことなく、左前下行枝（ＬＡＤ）冠動脈へ、緩やかに投与され得る。

【０１５８】

本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセル、あるいはこのような（球状の）マイクロカプセルを含んでいる薬学的組成物を、本明細書にて規定したような特定の投与部位に投与することを、異なる様式の投与を用いて行ってもよい。本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセル、あるいはこのような（球状の）マイクロカプセルを含んでいる薬学的組成物を、例えば、全身性に投与することも、局所的に投与することもできる。一般的な全身投与のための経路には、例えば、経皮的な経路または非経口的な経路が含まれ、例えば、静脈内への注入、皮下への注入、および／または動脈内への注入が含まれる。一般的な局所投与のための経路には、例えば、局所投与の経路や、経皮的な注入、筋肉内への注入、皮下への注入、心臓内への注入、心筋内への注入、および／または心膜への注入（ｐｅｒｉｃａｒｄｉａｌ　ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ）が含まれる。本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセル、あるいはこのような（球状の）マイクロカプセルを含んでいる薬学的組成物を、皮内的な経路、皮下的な経路、または筋肉内的な経路によって投与することが好ましく、心臓内への注入および／または心膜への注入によって投与することがより好ましい。

【０１５９】

上述した疾患または障害のいずれかの処置に適し得る投与の他の様式には、本明細書にて規定したような細胞の移植、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルの移植が含まれる（例えば、適切な薬学的なキャリアの添加によって適切な形態（ゲル、カプセル、錠剤の形態）にて剤形化されていることが好ましい。）。なお、このような細胞は、ＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアント、あるいはＧＬＰ－１、そのフラグメントまたはバリアントを含んでいる融合ペプチド、をコードしている。これらの細胞は、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入されている。本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された細胞は、インターベンションの手段によって、例えば、患部の領域へナビゲートして、心筋組織へのビーズの注入によってこのビーズを移植するカテーテルを用いて、心臓の患部（本明細書にて規定したような投与部位）に直接的に送達されてもよい。植込みは、急性心筋梗塞（ＡＭＩ）の後の通常の血管形成の間に、行うことができる。また、心臓の組織へ直接的に注入することによって、または患部の心臓組織へ供給する細動脈を通した血管内への送達によって、哺乳動物の急性心筋梗塞の患者または哺乳動物の急性心筋梗塞後の患者の、心筋の患部に移植してもよい。

【０１６０】

これに限定されないが、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１もしくはそのフラグメントもしくはバリアントを含んでいる融合ペプチドをコードおよび分泌し、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルに封入された本明細書にて規定したような細胞、または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルは、例えば適切な注射針を用いて注入することによって投与されてもよく、例えば細胞もしくは本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルを移植することによって投与されてもよく、好ましくは、本明細書にて規定したような、外科用メス、注射針等の手術器具を用いて、適した形状に作成してもよい。上述したような注射針は、１２～２６Ｇの大きさであってもよく、好ましくは１８～２２Ｇであってもよい。特定の実施例において、本発明の実施形態限定するとものではないが、ＡＭＩもしくはＭＩ、またはいずれかのこれに関係する疾患もしくは本明細書中に開示された疾患に苦しむ、その必要のある患者は、細胞または本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセル

の、本明細書にて規定したような投与部位への筋肉内注入または移植を受けてもよい。

【０１６１】

ＧＬＰ－１をコードし分泌する、その核内に埋め込まれた、本明細書にて規定された細胞を有する（球状の）マイクロカプセル、このような細胞、またはこれらの（球状の）マイクロカプセルを含む薬学的組成物を用いた、本明細書にて規定したようなＡＭＩまたはＭＩ疾患および障害の治療または予防は、結果として、ＧＬＰ－１の有益な効果をもたらす。このようなＧＬＰ－１がもたらす有益な効果として、例えば虚血または酸素欠乏による損傷、および心臓組織の潜在的死亡を（強力に）低減させるようなその活性がある。このような有益な効果には、例えばＡＭＩおよび初期血管形成成功後の深刻な収縮機能不全の患者における、局所的および全体的なＬＶ機能不全を向上させること等が含まれる。ＧＬＰ－１をコードし、分泌する（球状の）マイクロカプセルの、その場所における心臓保護効果は、特に、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）融合タンパク質の局所的分泌、および損傷箇所に連続して供給される他のパラクリン因子のためである。

【０１６２】

本発明者らの知識によれば、これに拘束されないが、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する（球状の）マイクロカプセルのその場での心臓保護効果は、直接的に心臓保護効果を発揮する潜在能力を有するＧＬＰ－１の性質を本発明が完全に利用するという事実に、少なくとも部分的に基づく。これに関連して、およびそのインクレチン作用に加えて、ＧＬＰ－１は、膵臓ベータ細胞のアポトーシスを減少させることが示されている。心臓におけるＧＬＰ－１レセプターの局在性、およびＧＬＰ－１がベータ細胞においてＰＩ３Ｋの活性化を促進する（事前状態と同様に、虚血／再潅流損傷の境遇において、心筋の保護に明確に結びつくキナーゼ）ことの証明は、それゆえに、虚血／再潅流の境遇におけるＧＬＰ－１の新規で独立した作用の仮定を可能にする。ＧＬＰ－１は、さらに、心筋細胞におけるｃＡＭＰレベルの上昇を引き起こし、その次に、プロテインキナーゼＡの活性化を引き起こす。ＧＬＰ－１は、ｃＡＭＰおよびＰＩ３Ｋによって媒介されるインスリン分泌細胞の抗アポトーシス作用を有している。ＰＩ３Ｋの活性化は、１４－３－３タンパク質に結合することによって、前アポトーシスペプチドＢＡＤのリン酸化および非活性化を導く。ＢＡＤは、Ｂｃｌ－２およびＢｃｌ－ｘｌへの結合からＢａｘを置換することが可能であり、結果として細胞死亡を引き起こすＢｃｌ－２ファミリーの前アポトーシスメンバーである。本発明者らのウエスタンブロットの結果は、ＧＬＰ－１によるセリン１３６におけるＢＡＤのリン酸化を証明した。それゆえに、使用したモデルにおいて、ＧＬＰ－１が心筋に対して直接的な抗アポトーシス効果を有するという、驚くべき結果が示された。さらに、ｃＡＭＰの上昇したレベルは、以前は、虚血心筋細胞において有害である考えられていた。それにも関わらず、生成されたｃＡＭＰの量は、抗アポトーシス経路に導くシグナル伝達経路の分岐の決定に役割を果たし得る。生成されたｃＡＭＰはまた、その作用を制限する特定の微小領域に位置し得、これは区画化として示される。ＧＬＰ－１が媒介するｃＡＭＰの上昇は（イソプロテレノールに匹敵）、このような区画化の提案を支援する、いずれの筋収縮または変弛緩効果の原因にもならない。Ｇタンパク質連結シグナル伝達は膨大な報告の主題になっており、プロテインキナーゼＡの時空的な調節は、ｃＡＭＰプールの枯渇の調節を含むとますます認識された。ＧＬＰ－１はまた、従来技術においては、何れの血流力学的変化も証明されなかったにもかかわらず、ラットにおいて、血圧および心拍の上昇を示した。このことは、投与量、供給方法、または種の違いによるものかもしれない。ＧＬＰ－１は、血圧および脈拍の集中制御に効果的であることが示されている。加えて、組み換えＧＬＰ－１は、以前は、ブタの心筋虚血モデルにおいて、ピルビン酸塩および乳酸塩の蓄積を阻害することが示されていたが、梗塞において全く減少を示さなかった。それにも関わらず、本発明者らは、驚くべきことに、本明細書に示すように、ＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１融合ペプチドによる心筋保護を証明し得た。結論として、本発明者らは、驚くべきことに、ブタ心臓において、初めてＧＬＰ－１の心臓保護効果を見出し、さらに、本明細書において規定した（球状の）マイクロカプセルの投与により何の免疫応答も表さず、二型糖尿病の処置において現在試験されている薬のクラスである、ＧＬＰ－１

アンタゴニストの潜在的な処置の可能性への新たな見識を見出した。

【０１６３】

さらに、本発明は、本発明にて規定した、細胞の使用を包含し、この細胞は、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアントを含んでいる融合ペプチドをコードおよび分泌し、本発明にて規定した（球状の）マイクロカプセル内に封入されており、例えば、好ましくはヒトのような哺乳動物である動物において、ＡＭＩまたはＭＩの処置のために用いられる薬学的組成物またはキットのような製品の製造のために用いられる。このような処置に用いられる細胞は、例えば間葉系の幹細胞もしくは間葉系の間質細胞、またはいずれかのさらなる細胞のような本発明にて規定した細胞であり得、本明細書の文脈において用いられる場合、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアントを含んでいる融合ペプチドをコードし、分泌する細胞であり、この細胞は、処置を受ける患者の免疫系の応答を回避するために、（球状の）マイクロカプセルに封入されている。

【０１６４】

本発明の他の局面は、本明細書にて規定したような細胞または（球状の）マイクロカプセルを含む薬学的組成物であり、当該細胞は、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアントを含んでいる融合ペプチドをコードおよび分泌し、本発明にて規定した（球状の）マイクロカプセルに封入されている。このような薬学的組成物は、ここに記載した疾患に苦しむ患者に適用することが可能であり、好ましくは、本発明にて規定した状態において、本発明にて規定した部位に投与し得る。

【０１６５】

本発明にて規定した細胞および（球状の）マイクロカプセルを含む薬学的組成物の調製は、参照としてその全てを本明細書中に組み込む、米国特許第４，６０８，２５１号明細書、米国特許第４，６０１，９０３号明細書、米国特許第４，５９９，２３１号明細書、米国特許第４，５９９，２３０号明細書、米国特許第４，５９６，７９２号明細書、および米国特許第４，５７８，７７０号明細書に例示されるように、当該技術分野において一般的によく理解されており、当該細胞は、ＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアント、またはＧＬＰ－１、そのフラグメントもしくはバリアントを含んでいる融合ペプチドをコードおよび分泌し、本発明にて規定した（球状の）マイクロカプセルに封入されている。

【０１６６】

典型的には、薬学的組成物は、液状溶液または懸濁液のいずれかのように注入可能に調製され、好ましくは、水（水状の物質）を含む、または乳化していてもよい。用語「水状の物質」は、少なくとも５０％　ｗ／ｗの水を含む物質として規定される。同様に、用語「水溶液」は、少なくとも５０％　ｗ／ｗの水を含む溶液として定義され、用語「水状の懸濁液」は、少なくとも５０％　ｗ／ｗの水を含む懸濁液として規定される。

【０１６７】

本発明にて規定した、痛みを受ける部位における、筋肉内、静脈内、皮膚もしくは皮下注射、またはいずれかの他の注射のために、本発明にて規定した細胞または（球状の）マイクロカプセルは、非経口投与型の水溶液であり、かつピロゲンフリーであり、適切なｐＨ、等張性、および安定性を有している。液状の薬学的組成物は、一般に、水のような液体媒体を含む。好ましくは、この液体媒体は、生理食塩水、デキストローズエタノールもしくは他の糖溶液、エチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールのようなグリコール、またはこれらの組合せを含む。さらなる例として、例えばリンゲル液またはラクトリンゲル液のような生理食塩水のような等張媒体が含まれる。

【０１６８】

本発明の薬学的組成物に、本発明にて規定した細胞または（球状の）マイクロカプセルの水溶液、および例えばバッファが含まれる場合、この（球状の）マイクロカプセルは、

典型的には薬学的組成物中に、濃度０．１ｍｇ／ｍｌまたは本明細書に記載した濃度で存在し、この薬学的組成物のｐＨは、通常、約２．０から約１０．０であり、好ましくは約７．０から約８．５である。

【０１６９】

他の構成要素を本発明の薬学的組成物に存在させることも可能である。このような追加の構成要素には、湿潤剤、乳化剤、抗酸化剤、充填剤、ｐＨ緩衝化剤（例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、またはマレイン酸緩衝液）、保存料、界面活性剤、安定剤、張性調整剤、偽剤、金属イオン、脂肪性媒体、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチン、またはタンパク質）、および／または両性イオン（例えば、ベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リシン、およびヒスチジンのようなアミノ酸）が含まれていてもよい。このような構成要素は、本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルのコアに埋め込まれた細胞特有の要求にしたがって、当業者が選択し、例えば、当該構成要素は、このような細胞に対して細胞毒性ではなく、その生存能力を確保するものであり得る。さらに、このような構成要素は、本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルのコアに埋め込まれた細胞によってすでにコードおよび分泌されたＧＬＰ－１ペプチドを安定化し得る。

【０１７０】

バッファに関して、好ましくは、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸塩、グリシルグリシン、ヒスチジン、グリシン、リシン、アルギニン、リン酸二水素ナトリウム、リン酸一水素二ナトリウム、リン酸ナトリウム、およびトリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン、ヘペス、ビシン、トリシン、リンゴ酸、琥珀酸塩、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、アスパラギン酸、またはこれらの混合物からなる群より選択される。これらの特定のバッファはそれぞれ、本発明の選択的な実施形態を構成する。

【０１７１】

本発明にて規定した細胞および／または本発明において用いられる（球状の）マイクロカプセルを含む薬学的組成物における、上述した全ての添加物の使用は、特に、これらの濃度範囲に関して当業者によく知られている。便宜上、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ、１９th ｅｄｉｔｉｏｎ、１９９５を参照した。

【０１７２】

本発明にて規定したＧＬＰ－１をコードし、分泌する細胞、および／または本発明にて規定した（球状の）マイクロカプセルを含む、本発明の薬学的組成物は、好ましくは、本明細書に記載した方法で、一般的な処置のために投与される。このような投与方法は、好ましくは投与形態に互換性があり、好ましくは本発明にて規定した活性構成要素を安全で効果的な量で含み、例えばこのような量は、安全であるが処置上効果的な量であるとみなされる量である。本発明の薬学的組成物と共に投与される（または要求により単独で投与される）、本発明にて規定したＧＬＰ－１をコードし、分泌する細胞、および／または本発明にて規定した（球状の）マイクロカプセルの量は、例えば患者の病気の深刻さを含む、処置の目的および疾患に依存する。適切な投与量範囲は、予め定められた期間内の、（本発明の薬学的組成物に含まれる）（球状の）マイクロカプセルから分泌されたＧＬＰ－１ペプチドの生物学的活性量に依存し、典型的な投与量範囲は、本発明にて規定したように、１日あたりほぼ１マイクログラムから数百マイクログラム（ＧＬＰ－１）程度である。

【０１７３】

本発明は、特に明示しない限り、本明細書に記載した実施形態および特徴の組合せをさらに含むことが可能であり、これらの特定の一実施形態に限定されるものではない。

【０１７４】

本発明を添付の図面にてさらに説明する。しかし、以下に示すような図面の内容に、本発明の範囲を限定することを意図していない。

【０１７５】

〔図面の簡単な説明〕

図１は、本発明において用いられた（球状の）マイクロカプセルの調製に用いられた細胞に含まれ得る、ａ～ｍのコンストラクトの例を示す限定されない概観図である（実施例１も参照のこと）。

【０１７６】

図２は、ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞およびＨＥＫ２９３細胞におけるそれぞれのＧＬＰ－１コンストラクトの一過性発現の結果、および一過性トランスフェクション後の活性型ＧＬＰ－１の結果を示す図である（実施例２）。単量体ＧＬＰ－１のコンストラクト（ＧＬＰ－１（７－３７）コピーを１つのみ有する）Ｎｏ．１０３およびＮｏ．３１７からは、ほんのわずかな活性型ＧＬＰ－１のレベルが検出された。ＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞内およびＨＥＫ２９３細胞内の両方の二量体ＧＬＰ－１のコンストラクトＮｏ．２１７（構成要素（Ｉ）および構成要素（ＩＩＩ）としてＧＬＰ－１（７－３７）を有する）において、非常に大きな発現の増加が観察された。

【０１７７】

図３は、ＧＬＰ－１を分泌する細胞からの細胞培養上清のウエスタンブロット分析を示す図である（実施例３も参照のこと）。レーン１：偽トランスフェクトされたｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞の上清に溶解した合成ＧＬＰ－１（７－３７）　１００ｎｇ；レーン２：コンストラクトＮｏ．２１７から二量体ＧＬＰ－１を分泌するｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞（クローン７９ＴＭ２１７／１３）の上清；レーン３：コンストラクトＮｏ．２１７から二量体ＧＬＰ－１を分泌するＡｔＴ２０細胞（クローン８１－Ａ－２１７／３）の上清；レーンＭ：着色済プロテインマーカー［ｋＤａ］。結果は、本明細書において規定したＧＬＰ－１（７－３７）を含有するペプチドおよびＣ末端付属物（図３の２および３）が、トランスフェクトされた株細胞から分泌され、ＧＬＰ－１（７－３７）の中分子エピトープに結合する抗ＧＬＰ－１抗体を使用して検出され得ることを示す。

【０１７８】

図４は、本発明において使用されたＧＬＰ－１ペプチドを用いて行った血漿安定性テスト（インビトロ）を表す図である。したがって、ＨＥＫ細胞を、コンストラクト（１）Ｎｏ．１０３　ＧＬＰ－１（７－３７）、（２）Ｎｏ．３１７　ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－１１　ＡＡ伸張、および（３）Ｎｏ．２１７　ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＧＬＰ－１（７－３７）で一過性トランスフェクトした。ＨＥＫ２９３細胞は、ジーンコンストラクトのための効果的な宿主である（実施例４も参照のこと）。

【０１７９】

図５は、コンストラクトＮｏ．２１７　ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＧＬＰ－１（７－３７）によって生成されるＧＬＰ－１ペプチドＣＭ１を分泌する、恒常的トランスフェクトしたｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞クローン７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５を用い、かつコントロールとして合成ＧＬＰ－１（７－３７）を用いて行った血漿動的安定性（インビトロ）を表す図である。結果は、独立した３回の実験から得られた。活性型ＧＬＰ－１を、ＧＬＰ－１（ａｃｔｉｖｅ）ＥＬＩＳＡ（Ｌｉｎｃｏ社製）を用いて測定した。

【０１８０】

図６は、以下に示すペプチドのウエスタンブロット解析を示す図である。以下の値が得られた：ＧＬＰ－１（７－３７）に対応するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１　（ＩＤ１ｓｙｎ）、３１ａａ、３．３ｋＤ；ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２に対応するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８（ＩＤ８　ｓｙｎ、ＣＭ３）、４６ａａ、５．１ｋＤ；ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＲＲ－ＧＬＰ２に対応するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．７（ＩＤ７ｒｅｃ、ＣＭ２）、８３ａａ、９．４ｋＤ；ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＲＲ－ＧＬＰ１（７－３７）に対応するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．６（ＩＤ６ｓｙｎ、ＣＭ１）、７９ａａ、８，７ｋＤ（実施例５も参照のこと）。

【０１８１】

図７は、バイオアッセイの株細胞１１１ＣＨＯ３４９／１８においてｃＡＭＰの増加を媒介するＧＬＰ－１レセプターの量反応曲線を示した図である。コンストラクトＮｏ．２

１７　ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＧＬＰ－１（７－３７）によって生成されたＣＭ１を分泌する７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５細胞を、順次希釈されたならし培地において刺激を行った。ｈＭＳＣ－ＴＥＲＴの親の株細胞において、検出可能なｃＡＭＰ反応は見られなかった。グラフは、独立した５回の実験から作成した。ｃＡＭＰバイオアッセイにおいて最大半量（ＥＤ５０）が生成されるペプチド量は、３５３ｐＭであることが決定された（実施例６も参照のこと）。

【０１８２】

図８は、一過性および恒常的な遺伝子発現に用いたベクターの例を示す。ベクターは、目的とする遺伝子（ＧＯＩ）のための１つのユニットと、自殺遺伝子ＨＳＶチミジンキナーゼと抵抗遺伝子ブラスチシジンとが融合した１つのユニットとの、２つの分離した転写ユニットからなる。第１の転写ユニットに対してヒトユビキチンＢプロモーターを用い、第２の転写ユニットに対してヒトフェリチンプロモーターを用いた（実施例９も参照のこと）。

【０１８３】

図９は、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルにおいて、予め不死化した後に用いられる細胞の特性を示す図である。図９Ａから理解できるように、不死化細胞はなお、その非不死化カウンターパート（左、右）として、脂肪細胞、骨細胞および軟骨細胞に分化し得る。不死化細胞は、線維芽細胞の形態を有し、大きさに関してより均一である。また、本明細書において用いた初代細胞に特有の、例えばＣＤ４４およびＣＤ１６６エピトープマーカーを用いたフローサイトメトリーによって示される不死化ＭＳＣ細胞としての粒度に関しても、より均一である。不死化細胞は、その非不死化カウンターパートとして、同一のＣＤマーカーを発現する（図９Ｂを参照のこと）。

【０１８４】

図１０は、Ｃ末端伸張ＧＬＰ－１アナログＣＭ１の抗アポトーシス有効性を示す図である。ＲＩＮ－５Ｆ細胞においてタンパク質生合成の阻害剤であるシクロヘキシミド（ＣＨＸ）の付加によって、終濃度１０μｇ／ｍｌおよび１００μｇ／ｍｌのそれぞれにおいて、アポトーシスは引き起こされる。二量体ＧＬＰ－１融合タンパク質ＣＭ１を生成する組み換え大腸菌が、異なる濃度で存在した結果、２４時間インキュベートした後に測定された細胞の生存力が顕著に上昇する（ｐ＜０．０１）。

【０１８５】

図１１は、ＡＭＩおよびＭＩの処置に用いられ、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する（球状の）マイクロカプセルを用いた本発明の概念の概略図である。例えば、間葉系の幹細胞、間葉系の間質細胞または同種細胞のような細胞を、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する、選択的透過性のアルギン酸塩基質形状の（球状の）薄いマイクロカプセル内に封入する。アルギン酸塩基質は、細胞がコードし、分泌するＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１融合タンパク質と同様に、封入された細胞に供給する酸素および栄養素透過する。一方、本明細書において示すように、この壁は、細胞および免疫系の構成要素は透過できない。図１１の左図は、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する（球状の）マイクロカプセルを用いた本発明の概念の概略図である。コアのビーズ（クリーム色）を含む細胞は、純粋なアルギン酸塩の層（灰色）によって囲まれている。図１１の右図は、インビトロでＧＬＰ－１をコードし、分泌する（球状の）マイクロカプセルである。

【０１８６】

図１２は、心臓の病理展開図である。図において、冠動脈には、（Ａ）アルギン酸塩のビーズ、または（Ｂ）本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）によって塞栓が形成されている（黒破線）。（Ａ）において、白で縁取られた断片が心臓表面の目に見える梗塞部分を表している一方で、非常にわずかな梗塞部分が（Ｂ）において見られる。

【０１８７】

図１３は、本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）により塞栓が形成された心臓表面のＬＶ梗塞部分の比率（％）を、アルギン酸塩のコントロールとの比較で示す図である。

【０１８８】
図１４は、本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）を用いたグループの回復を証明する、梗塞前、梗塞直後および梗塞４週間後の駆出率の比率（％）を示す図である。
【０１８９】
図１５は、動脈内細胞ビーズ供給（左から右）に一致し得る、管理梗塞後の梗塞区域（ＩＺ）領域、境界区域（ＢＺ）領域、および辺境のブタ心臓のＬＡＤ中央（左冠動脈前下行枝（ＬＡＤ））の組織部分を示す図である。
【０１９０】
図１６は、動脈内細胞ビーズ供給（左、全体、右：梗塞領域および遠隔領域を別々に）４週間後の梗塞組織および遠隔組織におけるＧＬＰ－１レセプターのウエスタンブロット解析を示す図である。実験により、荒地のブタのモデルにおいて、ＧＬＰ－１の使用について確固たる理論的根拠を確認した。梗塞４日後の心臓サンプルの、ウエスタンブロット法を用いた分析によって、ブタ心臓内の細胞が、ＧＬＰ－１レセプターを有すると判断した。図１６は、レセプターが確かに存在したことを示し（負荷コントロールとしてＧＡＰＤＨを使用）、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）、またはコントロールのアルギン酸塩の間だけでなく、梗塞区域または遠隔区域の間にも、顕著な差はなかったことを示している。
【０１９１】
図１７は、フォンウィルブラント因子（ｖｏｎ　Ｗｉｌｌｉｂｒａｎｄ　Ｆａｃｔｏｒ）の免疫化学を使用した組織部分を示す図である。この図は、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）の、心臓の血管形成における効果を示している。心臓の梗塞境界から遠隔領域までの部分を、フォンウィルブラント因子抗体染色プロトコールにより、この目的のために染色した。
【０１９２】
図１８は、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）を動脈内に供給した４週間後の血管形成効果の結果を示す図であり、図１７のフォンウィルブラント因子抗体染色プロトコールにより染色した（Ａ）全体、および（Ｂ）領域近傍を示す。血管密度の分析は、ＧＬＰ－１細胞ビーズを供給した心臓もまた、全体（図１８（Ａ））および領域近傍（図１８（Ｂ））のコントロールと比較して、顕著により多くの血管を含むことを示した。この傾向は、ＬＶ領域（ＬＶの頂点：３９．２５±７．５対６．８±２．２、Ｐ＝０．００２、およびＬＶの中間点：３４．５±３．８対１４．６±６．２、Ｐ＝０．０４）内に見られた。血管の大きさに関しては、コントロールグループとＧＬＰ－１細胞ビーズグループとの両方において、直径４～１０μｍの血管が最も多かった。
【０１９３】
図１９は、ビーズ供給の４週間後の組織部分を炎症性細胞浸潤のために染色し、ブタ心筋における炎症性細胞浸潤を証明する組織部分を示す図である。結果を図２０に示す。
【０１９４】
図２０は、ブタ心筋における炎症性細胞浸潤を証明する図１９の組織部分の結果をしめす図である。炎症性細胞浸潤のために染色したビーズ供給の４週間後の組織部分には、コントロールに対して、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）に、統計的により多い量の炎症細胞が見られた（図２０（Ａ）＆（Ｂ））。このことは、ｈＭＳＣ細胞によって生成されることが知られている単球走化性因子のような因子を放出するパラクリン効果が、これらの重要な細胞（単球および好中球）を梗塞領域に補給することの原因となることを提案する。
【０１９５】
図２１は、動脈内ビーズ供給４週間後のブタ心筋のＴＵＮＥＬ染色を示す図である。結果を図２２に示す。
【０１９６】

図２２は、図２１による動脈内ビーズ供給４時間後のブタ心筋のＴＵＮＥＬ染色の結果を示す図である。動脈内ビーズ供給４週間後の組織部分のＴＵＮＥＬ染色によるアポトーシスの評価によって、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）においては、コントロールと比較して統計的にアポトーシス細胞がより少ない（ＴＵＮＥＬ＋）ことが示された（図２２（Ａ）＆（Ｂ））。

【０１９７】

図２３は、本発明の（球状の）マイクロカプセルの内径および全直径を示した、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）１６０μｍ細胞ビーズの、明視野像（Ａ）および活性染色（Ｂ）の顕微写真の例を示す図である。

【０１９８】

本発明を、添付の実施例においてさらに説明する。しかしながら、以下に示す実施例の内容は、本発明の範囲の限定を意図するものではない。

【０１９９】

〔実施例〕

【０２００】

（実施例１）

＜遺伝子コンストラクトの生成＞

ＧＬＰ－１（７－３７）ｃＤＮＡのコード配列を、合成的に合成した。配列には、図１ａに示すＨｉｎｃｌｌおよびＥｃｏＲｌ部位が含まれる。別々に合成された図１ｂに示すｃＤＮＡは、ＧＬＰ－１（７－３７）のコード配列を含み、図１ｂに示すように、ＩＰ２ならびにＳｆｏｌ、ＥｃｏＲｌ、およびＸｂａｌの制限酵素認識部位のコード配列を含む。分泌経路にＧＬＰ－１を導くために、ストロメライシン３（アクセス番号：ＮＭ＿００５９４０）の異種シグナル配列を用いた。それゆえに、ストロメライシンシグナルおよびリーダー配列をコードするｃＤＮＡを、ヒトＲＮＡから逆転写ＰＣＲ増幅し、図１ａまたは図１ｂのコンストラクトに用い、図１ｃおよび図１ｄにそれぞれ示すコンストラクトを形成した。

【０２０１】

図１ａコンストラクトのＨｉｎｃｌｌ／ＥｃｏＲＩフラグメントを、図１ｄの配列のＳｆｏＩ部位にクローンし、図１ｅのコンストラクトを形成した。同様に、図１ｄのＥｃｏＲｌフラグメントを、真核発現プラスミドのＥｃｏＲｌ部位にクローンし、図１ｆに示すコンストラクトを生成した。図１ｂに示すコンストラクトのＨｉｎｃＩＩ／ＸｂａＩフラグメントを図１ｄに示すコンストラクトのＳｆｏＩ／ＸｂａＩ部位に繰り返しクローンし、図１ｇに示すコンストラクトを形成した。図１ｈは、ストロメライシンリーダー配列およびシグナル配列をコードする合成コドン最適化配列であり、内因性イントロン配列の短縮を中断し、ヒトＧＬＰ－１（７－３７）、ＩＰ２およびＧＬＰ－２（１－３５）をコードする配列に融合される。図１ｈのＤＮＡ配列は、配列番号１６であり、一方、配列番号１５もまた、翻訳ペプチドの配列を示す。

【０２０２】

また、図１ｉおよび１ｊの配列も合成した。それから、これらを使用して、図１ｊのＮａｅｌ／ＢｓｓＨＩＩフラグメントを図１ｈのＮａｅｌ／ＢｓｓＨＩＩ線状配列にクローンすることによって、図１ｋのコンストラクトを形成した。図１ｋのコンストラクトのＤＮＡ配列は、配列番号１４である一方で、配列番号１３もまた、その翻訳ペプチドの配列を示している。図１ｌのコンストラクトは、図１ｈの配列のＢｓｓＨｌｌ消化および再連結配列によって形成される。図１ｌコンストラクトのＤＮＡ配列は、配列番号１８である一方で、配列番号１７もまた、その翻訳ペプチドの配列を示している。図１ｍのコンストラストは、図１ｉの配列のＡｆｅｌ／ＢｓｓＨＩＩフラグメントを図１ｈのＡｆｅｌ／ＢｓｓＨＩＩ線状配列にクローンすることによって形成した。図１ｍのコンストラクトのＤＮＡ配列は、配列番号２０である一方で、配列番号１９もまた、その翻訳ペプチドの配列を示している。

【０２０３】

このコンストラクトは、当業者のルーチン技術を用いて生成し得る。

【０２０４】

（実施例２）

＜トランスフェクション、クローン選択、および動物細胞のＧＬＰ－１発現＞

細胞の供給元：ＨＥＫ２９３（ヒト胎児由来腎臓の株細胞、ＮＯ．ＡＣＣ３０５、ＤＳＭＺ細胞培養コレクション、ドイツ）、ＡｔＴ２０（マウスＬＡＦ１下垂体リンパ腺腫瘍の株細胞、Ｎｏ．８７０２１９０２、ヨーロッパ細胞培養コレクション、イギリス）、ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞は、Ｋａｓｓｅｍ教授（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌ ｏｆ Ｏｄｅｎｓｅ、デンマーク）によって生成され、提供された。

【０２０５】

異なるＧＬＰ－１コンストラクトを有するプラスミドＤＮＡ０．５～２μｇを、１０６の細胞にトランスフェクトするために用いたコンストラクトは、実施例１に記載のように生成した。ＨＥＫ２９３細胞を、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．１９９４ｆｆ Ｈａｒｖａｒｄ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｃｈｏｏｌ Ｖｏｌ２．，Ｕｎｉｔ ９．１）のＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓに記載された標準リン酸カルシウム共沈法によってトランスフェクトした。ＡｔＴ２０細胞は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ．ａｌ．１９９４ｆｆ，Ｈａｒｖａｒｄ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｃｈｏｏｌ Ｖｏｌ ２．，Ｕｎｉｔ ９．４）のＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓに記載されたＦｕＧｅｎｅ（Ｒｏｃｈｅ）を用いてトランスフェクトした。ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞のトランスフェクトを、電子パラメータおよび細胞型特異的溶液の組合せに基づいた非ウイルス法であるＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）技術（Ａｍａｘａ）を用いて行った。Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）装置（ｐｒｏｇｒａｍ Ｃ１７）およびＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）溶液ＶＰＥ－１００１の使用により、トランスフェクション効率は、＞６０％に達した。トランスフェクション４８時間後に、染色体にＤＮＡが安定に組み込まれた細胞クローンの選択を、選択因子ブラストシジン（２μｇ／ｍｌ）を培養培地に添加することによって行った。１２～１５日後、安定したトランスフェクトされた細胞クローンを単離し、特徴付けのために展開した。

【０２０６】

異なるＧＬＰ－１コンストラクトの一過性発現を、ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞およびＨＥＫ２９３細胞において測定した。ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞およびＨＥＫ２９３細胞の両方において、単量体ＧＬＰ－１コンストラクトＮｏ．１０３およびＮｏ．３１７（ＧＬＰ－１（７－３７）の１つのコピーのみを有する）では、わずかな活性型ＧＬＰ－１レベルしか検出されない一方で、二量体ＧＬＰ－１コンストラクトＮｏ．２１７（構成要素（Ｉ）および構成要素（ＩＩＩ）としてＧＬＰ－１（７－３７）を有する）では非常に大きな発現の増加が検出された。結果を図２に要約した。コンストラクトを、ＧＬＰ－１コンストラクトＮｏ．１５９（構成要素（ＩＩ）として４つのＩＰ２コピーを有する）に伸張することによって、さらなる顕著な上昇はなかった（図示せず）。ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞を異なるコンストラクトクローンでトランスフェクトした後、安定してＧＬＰ－１を発現するものを選択した。発現レベルを表１に示す。

【０２０７】

【表２】

表１

コンストラクト	細胞クローン	10^6個の細胞および１時間当たりの活性なGLP [pmol]
#103 $GLP1_{(7-37)}$	49TM113/13	0.4
#317 $GLP1_{(7-37)}$-IP2-11aa	71TM169/1	0.6
#217 $GLP1_{(7-37)}$-IP2-$GLP1_{(7-37)}$	79TM217/13	2.7

【０２０８】
（実施例３）
動物細胞から分泌されたＧＬＰ－１ペプチドのウエスタンブロット解析
ＧＬＰ－１を分泌する細胞からの細胞培養上清を、１０％～２０％勾配ＳＤＳ ＰＡＧＥ（１２０Ｖ、９０分）により分離し、半乾式ブロッティング（２．０ｍＡ／ｃｍ2、６０分）によってＰＶＤＦ膜（イモビロンＰ膜、０．４５ ｍｍ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ ＩＰＶＨ ００００１０）に転写した。メタノール固定およびブロッキング（３％ （ｗ：ｖ） ＢＳＡ， ０．１％ （ｖ：ｖ） Ｔｗｅｅｎ－２０ ｉｎ ＴＢＳ）の後、１μｇ／ｍｌの抗ＧＬＰ－１抗体（ＨＹＢ １４７－１２， Ａｎｔｉｂｏｄｙｓｈｏｐ）を用いて、４℃ ｏ／ｎで膜を免疫ブロットした。洗浄、および０．０２μｇ／ｍｌの検出抗体（抗マウスＩｇＧ、ＨＲＰ 結合、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ ＰＣ ２８５５－１１９７）を用いて、室温で４時間インキュベートした後、タンパク質の位置に化学発光検出を曝露した。
【０２０９】
ウエスタンブロット解析を、図３に示した（１：偽トランスフェクトしたＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞の上清に溶解した合成ＧＬＰ－１（７－３７）１００ｎｇ、２：コンストラクトＮｏ．２１７から二量体ＧＬＰ－１を分泌するｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞（クローン７９ＴＭ２１７／１３）の上清、３：コンストラクトＮｏ．２１７から二量体ＧＬＰ－１を分泌するＡｔＴ２０細胞（クローン８１－Ａ－２１７／３）の上清、Ｍ：染色済プロテインマーカー［ｋＤａ］）。結果として、ＧＬＰ－１（７－３７）およびＣ末端付加物（図３の２および３）を含むペプチドがトランスフェクトされた株細胞から分泌され、ＧＬＰ－１（７－３７）の中分子エピトープに結合する抗ＧＬＰ－１抗体を用いて検出できることが示された。
【０２１０】
（実施例４）
ヒト細胞から分泌されたＧＬＰ－１ペプチドのインビトロの血漿安定性
ＨＥＫ２９３およびｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞を、以下のペプチドをコードするＧＬＰ－１のバリアントに連結された異種ストロメライシンシグナル配列をコードするコンストラクトでトランスフェクトした：
１：ＧＬＰ－１（７－３７）（コンストラクトＮｏ．１０３）
２：１１ ＡＡで伸張したＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２（コンストラクトＮｏ．３１７）
３：ＧＬＰ１（７－３７）－ＩＰ２－ＧＬＰ１（７－３７）（コンストラクトＮｏ．２１７）
細胞から分泌されたＧＬＰ－１ペプチドまたは合成ＧＬＰ－１（７－３７）（Ｂａｃｈｅｍ）を含む細胞培養上清を、ジペプチジルペプチターゼ活性を含むヒト多血漿リンパ球と共に、３７℃、５％ CO_2 存在下で、３時間またはさらに６および９時間インキュベートした。偽トランスフェクトされた細胞上清における合成ＧＬＰ－１（７－３７）を、ＤＰＰ－ＩＶ活性のポジティブコントロールとして用い、ＤＰＰ－ＩＶの阻害剤（＃ＤＰＰ４，Ｂｉｏｔｒｅｎｄ）の添加によって抑制されることが示された。活性型ＧＬＰを、ＧＬＰ－１（Ａｃｔｉｖｅ）ＥＬＩＳＡ（＃ＥＧＬＰ－３５Ｋ、Ｂｉｏｔｒｅｎｄ）を用い、ＤＰＰ－ＩＶの低下、不活性型ＧＬＰ－１（９－３７）ペプチドを選択する、ＧＬＰ－１（７－３７）のＮ末端エピトープに結合する抗体を用いて測定した。
【０２１１】
結果を図４（ＨＥＫ２９３細胞）および図５（ＨＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞）に示した。ＨＥＫ２９３細胞およびｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞は共に、ジーンコンストラクトにおいて効果的な宿主である。トランスフェクトされた細胞の結果の番号は、１は、コンストラクトＮｏ．１０３からＧＬＰ－１（７－３７）を分泌する細胞の上清、２は、コンストラクトＮｏ．３１７からＩＰ２および１１アミノ酸によって伸張したＧＬＰ－１を分泌する細胞の上清、３は、コンストラクトＮｏ．２１７から二量体ＧＬＰ－１を分泌する細胞の上清

である。コンストラクト１が、合成ＧＬＰ－１と同様にＤＰＰ－ＩＶによって不活化される野生型ＧＬＰ－１を生成する一方で、Ｃ末端が伸張されたＧＬＰ－１型（図４の２および３、図５の３）は、変質により耐性がある。Ｃ末端が伸張されたＧＬＰ－１ペプチドは、インビトロのヒト血漿において顕著に安定性がある。二量体ＧＬＰ－１配列（３）を有するペプチドは、インビトロでＤＰＰ－ＩＶ変性に対してほぼ完全に安定である。

【０２１２】

（実施例５）

ｃＡＭＰ放出によって測定したＧＬＰ－１ペプチドのインビトロ生物活性

ＧＬＰ－１（７－３７）は、セカンドメッセンジャーｃＡＭＰを介して伝達するプロテインキナーゼＡの活性化を導くＧＬＰ－１レセプターに連結する７回膜貫通型のＧタンパク質を通してその生物学的作用を発揮する。ＧＬＰ－１の活性モードを干渉しないＣＭ１のＣ末端伸張を保証するために、インビトロバイオアッセイによって、異なる濃度のペプチドと共にインキュベートした後の株細胞が発現するＧＬＰ－１レセプターにおいてｃＡＭＰ増加を決定し、ＣＭ１生物活性を定量化した。本発明で用いた株細胞（クローン１１１ＣＨＯ３４９／１８）が発現したＧＬＰ－１レセプターは、ヒトＧＬＰ－１レセプターで安定的にトランスフェクトされたＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣）株細胞である。ペプチドの生物活性の輪郭を描く７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５細胞において生成されるＣＭ１の用量反応曲線を、図７に示す。ｃＡＭＰ生物活性において最大半量（ＥＤ５０）を産みだすペプチド量は、３５３ｐＭになることを測定した。

【０２１３】

（実施例６）

インビトロにおけるＧＬＰ－１ＣＭペプチドのヒト血漿安定性

合成ＧＬＰ－１ペプチド（配列番号ＮＯ：１ｓｙｎ、配列番号　ＮＯ：６ｓｙｎ、配列番号　ＮＯ：７ｒｅｃ、配列番号　ＮＯ：８ｓｙｎ）を濃度２０ｎｇ／ｍｌで、ヒト血漿と共に、３７℃、５％CO_2存在下で３時間インキュベートした。血漿のジペプチジルペプチダーゼ活性を、ＤＰＰ－ＩＶの阻害剤（＃ＤＰＰ４、Ｂｉｏｔｒｅｎｄ）により抑制した。活性型ＧＬＰをＧＬＰ－１（Ａｃｔｉｖｅ）ＥＬＩＳＡ（＃ＥＧＬＰ－３５Ｋ、Ｂｉｏｔｒｅｎｄ）を用いて測定した。

【０２１４】

天然のＧＬＰ－１（７－３７）（配列番号ＮＯ．１）と比較して、Ｃ末端が伸張したＧＬＰ－１ペプチドである配列番号Ｎｏ．６、ＮＯ．７およびＮＯ．８は、インビトロでヒト血漿において顕著な安定性がある。コントロールとして、ＤＰＰ－ＩＶの阻害剤を添加した実験から得られた結果を示す（右手側）。このコントロール実験において、ＧＬＰ－１活性は、完全に維持された。

【０２１５】

（実施例７）

＜プラスミド作成＞

一過性および恒常的遺伝子発現のためのベクターは、２つの分離した転写ユニットからなる。１つは、目的の遺伝子（ＧＯＩ）であり、１つは自殺遺伝子ＨＳＶチミジンキナーゼと抵抗遺伝子ブラスチシジンとの融合遺伝子である。第１の転写ユニットのために、ヒトユビキチンＢプロモーターを使用し、第２の転写ユニットのために、ヒトフェリチンプロモーターを使用した。プラスミドは、プラスミドｐＣＭ４に基づき、７９１９塩基対を有しており、概略的に図８に示す。

【０２１６】

図８に示すように、転写ユニット１は、以下の構成要素を含む；

ＣＭＶｅｎｈ：ｉｍｍｅｄｉａｔｅ　ｅａｒｌｙエンハンサーヒトサイトメガロウイルス

ｕｂｉＢ　ｈｕｍａｎ：ユビキチンプロモーターＢ

Ｓｔｒｏ－ＧＬＰ：融合遺伝子、ストロメライシンおよびＧＬＰＩコンストラクトのシグナルペプチドおよびリーダー配列をコード

ｏｒｉ　ｐＭＢＩ：大腸菌、複製の最小始点
Ｈｙｇｒｏ：ヒグロマイシンＢ、抵抗遺伝子
転写ユニット２は、以下の構成要素を含む；
ＳＶ　４０　ｅｎｈ：ＳＶ４０エンハンサー
ＦｅｒＨ：ネズミＥＦＩ遺伝子の５’ＵＴＲに結合するヒトフェリチンＨプロモーター
Ｔｋ－ｂｌａ：ヘルペス単ウイルス型１をコードする融合遺伝子、チミジンキナーゼ及びブラスチシジン抵抗遺伝子
一過性発現に、環状プラスミドを用いた。恒常的発現細胞クローンを選択するために、プラスミドを線状にし、バクテリア配列（ｐＭＢＩ始点およびハイグロマイシン遺伝子）を取り除いた。

【０２１７】
（実施例８）
＜間葉系の幹細胞株または間葉系の間質細胞株（ＭＳＣ）の生成＞
間葉系の幹細胞株は、以下の基準にしたがって、Ｋａｓｓｅｍ教授（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ　ｏｆ　Ｏｄｅｎｓｅ、デンマーク）（Ｓｉｍｏｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００２，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０ｍ，　５９２－５９６において発表された）により作成された。

【０２１８】
＜起源＞
生成した株細胞は、健康な男性ドナー（３３歳）の骨髄吸引物から単離した間葉系の幹細胞（ＭＳＣ）からなる。

【０２１９】
＜不死化＞
テロメラーゼ逆転写酵素のコード配列を導入することによって、細胞を不死化した。レトロウイルス形質導入を、ＧＣｓａｍレトロウイルスベクターをパッケージングすることによって行った。導入遺伝子の発現は、ＰＧ１３内のモロニーネズミ白血病ウイルス長末端反復によって駆動される。形質導入を培養９日目（ＰＤＬ　１２）に行った。株細胞は、２６０の集団倍加レベル（ＰＤＬ）まで培養する。

【０２２０】
挿入位置を、蛍光ハイブリッド形成法およびサザンブロットによって試験した。染色体５（５ｐ２３－３１）において、ｅｃｏｔｏｐｉｃｈＴＥＲＴのただ１つの挿入位置がある。分析をＰＤＬ１８６において行った。ギムザ結合および比較ゲノムハイブリダイゼーションは、ｈＭＳＣ－ＴＥＲＴが、ＰＤＬ９６においてどんな数値的または構造的な染色体異常も促進しないこと、さらに正常な二倍体オス核型を維持することを明らかにした。腫瘍形成を、皮下埋め込み６ヶ月後の免疫欠損マウスにおいて試験し、ＰＤＬ８０に対してネガティブなことが見出された。

【０２２１】
＜フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）解析＞
細胞を、標準成長培地において、８０％コンフルエンスになるまで培養した。細胞をトリプシン処理し、ＦＡＣＳｃａｎフローサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により大きさおよび粒度を検査した。表面マーカーによりトリプシン処理された細胞を調査するために、氷上で３０分間、蛍光色素に直接結合する抗体で染色した（ＦＩＴＣ結合マウス抗ヒトＣＤ４４モノクローナル抗体、＃ＣＢＬ１５４Ｆ、Ｃｙｍｂｕｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；フィコエリトリン結合マウス抗ヒトＣＤ１６６モノクローナル抗体、＃５５９２６３、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）。サンプルを洗浄し、ＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）による分析まで、１％パラホルムアルデヒドで固定した。

【０２２２】
＜特徴＞
不死化細胞は、その非不死化カウンターパートとして、いまだ脂肪細胞、骨細胞および

軟骨細胞に分化し得る（図９Ａを参照のこと）。不死化細胞は、線維芽細胞の形態を有しており、本明細書中で使用された初代の細胞を特徴付ける、例えば、ＣＤ４４およびＣＤ１６６エピトープマーカーを用いたフローサイトメトリーにより示されるように、死に至るＭＳＣ細胞と同様に、大きさおよび粒度に関してより均質である。不死化細胞は、その非不死化カウンターパートと同様に、同一のＣＤマーカーを発現する（図９Ｂ参照のこと）。

【０２２３】

＜培養＞

血清含有培地：７％　Ｅａｒｌｅｓ　ＭＥＭ
１０％　ＦＣＳ
２ｍＭ　Ｌ－グルタミン
１ｍＭ　ピルビン酸塩ナトリウム
１００Ｕ／ｍｌ　ペニシリン
０．１ｍｇ／ｍｌ　ストレプトマイシン

集団倍加は２６～３０時間の間である。

【０２２４】

＜トランスフェクションおよびクローン選択＞

１０６細胞をトランスフェクトするために、異なるＧＬＰ１コンストラクトを有する０．５～２μｇのプラスミドＤＮＡを用いた。ＨＥＫ２９３細胞を標準リン酸カルシウム共沈法によりトランスフェクトした。ＡｔＴ２０細胞を、ＦｕＧｅｎｅ（Ｒｏｃｈｅ）を用いてトランスフェクトした。

【０２２５】

ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞のトランスフェクションを、電子パラメータと細胞型特異的溶液との組合せに基づく非ウイルス法である、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）技術（ａｍａｘａ）を用いて行った。Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）装置（ｐｒｏｇｒａｍｍｅ　Ｃ１７）装置、およびＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）溶液ＶＰＥ－１００１を用いて、トランスフェクション効果が＞６０％に達した。

【０２２６】

トランスフェクションの４８時間後に、染色体にＤＮＡが安定的に組み込まれた細胞クローンの選択を、選択因子であるブラスチシジン（２μｇ／ｍｌ）を培養培地に添加することによって行った。１２～１５日後、安定的にトランスフェクトされた細胞クローンを単離し得、特徴付けのために展開させた。

【０２２７】

＜発現＞

異なるＧＬＰコンストラクトの一過性発現を、ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞およびＨＥＫ２９３細胞において測定した。ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞およびＨＥＫ２９３細胞の両方において、活性型ＧＬＰ－１レベルが、単量体ＧＬＰ１コンストラクトＮＯ．１０３（Ｓｔｒｏ－ＧＬＰ１（７－３７））およびＮｏ．３１７（１１ａａにより伸張したＳｔｒｏ－ＧＬＰ１（７－３７）－ＩＰ２）において見られ、発現の大幅な増加が、二量体ＧＬＰ１コンストラクトＮｏ．２１７（Ｓｔｒｏ－ＧＬＰ１（７－３７）－ＩＰ２－ＧＬＰ１（７－３７））において見られた。コンストラクトＮｏ．３１７の四量体ＧＬＰ１コンストラクトＮｏ．１５９（Ｓｔｒｏ－ＧＬＰ１（７－３７）－ＩＰ２　（４ｘ）－１１ａａ）への伸張は、結果として同様の活性である（図２もまた参照のこと）。トランスフェクションの後、異なるコンストラクトクローンを有するｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞から、安定的にＧＬＰ１を発現するものが選択された（図４および５、表４を参照のこと）。

【０２２８】

（実施例９）

＜封入＞

封入される培養細胞を、ＰＢＳ（ＰＡＡ、Ａｕｓｔｒｉａ）を用いて洗浄し、トリプシン／ＥＤＴＡ（ＰＡＡ、Ａｕｓｔｒｉａ）を用いて分離した。培地（細胞型に依存する、

例えばＲＰＭＩ、ＰＡＡ、Ａｕｓｔｒｉａ）を用いて、反応を即座に停止させ、細胞懸濁液を遠心分離した（１２００ｒｐｍで８分）。ペレットをＰＢＳ中に再懸濁し、細胞数を決定した。望ましい量である４×１０７個の細胞を再度遠心分離した（１２００ｒｐｍで８分間）。そこから吸引によりＰＢＳを完全に取り除き、５０μｌのペレットを、気泡がなく、５ｍＭ　１－ヒスチジンを使ってｐＨ７．４にした０．９％生理食塩水バッファ５０μｌ中に再懸濁した。この細胞懸濁液を、１．５～１．７％（ｖ／ｖ）アルギン酸ナトリウム溶液（約５ｍＰａ．Ｓの粘度のアルギン酸塩の０．２％（ｗ／ｖ）水溶液を室温で用いた）９００μｌ中に溶解させた。

【０２２９】

アルギン酸塩溶液に再懸濁された細胞を混合するために、溶液をカニューレを用いて１ｍｌシリンジ内に流し入れ、流し入れと流し出しとをゆっくりと繰り返す方法によって細胞を均一に混合した。結果として、４×１０７細胞／ｍｌの細胞濃度にした。

【０２３０】

直径約２００μｍのマイクロカプセルを生成するために、空気充填スプレーノズル中の内径１２０μｍのカニューレを用いた。開口２．０ｍｍのエアリングを、内部カニューレにネジ込んだ。この装置は、ＷＯ００／０９５６６に記載された装置を適合させたものである。均一化された細胞／アルギン酸塩溶液混合液を、上述したスプレーノズルを通してドリップした。この目的のために、この混合液を含む１ｍｌシリンジをｌｕｅｒ　ｃｏｎｎｅｃｔｏｒの手段を用いてカニューレ上に置いた。細胞／アルギン酸塩溶液の混合液を、５０μｌ／分の速度でカニューレを通して押し出した。気流はエアリングの外を通って、速度２．５Ｉ／分で運ばれた。スプレーノズルの下約１０ｃｍに構築されたバリウムを含む沈殿バス（２０ｍＭ　ＢａＣｌ、５ｍＭ　Ｌ－ヒスチジン、１２４ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０±０．１、２９０ｍＯｓｍｏｌ±３）中に、得られたマイクロカプセルを沈殿させた。バリウムを含む沈殿バス中に５分間滞留させた後、各ケース内において、ＰＢＳ　２０ｍｌを用いてマイクロカプセルを５回洗浄した。

【０２３１】

５００μｌの単層マイクロカプセルを、コアの代用と同様に、５００μｌの１．５～１．７％（ｗ／ｖ）アルギン酸塩溶液中に溶解させ、ここで均一に混合した。この懸濁液を１ｍｌシリンジ内に溶解させ、ｌｕｅｒ　ｃｏｎｎｅｃｔｏｒの手段によってスプレーノズルの内部溝（内径２００μｍ）に連結し、その中を通して速度５０μｌ／分で押し出した。１．５％～１．７％アルギン酸塩溶液を含む５ｍｌシリンジを、ｌｕｅｒ　ｃｏｎｎｅｃｔｏｒの手段によって第２の内部溝（内径７００μｍ）に連結し、その中を通して速度２５０μｌ／分で押し出した。気流は、速度２．９Ｉ／分でエアリングの外を通って運ばれた。得られたマイクロカプセルを、スプレーノズルの下約１０ｃｍに構築されたバリウムを含む沈殿バス（２０ｍＭ　ＢａＣｌ、５ｍＭ　Ｌ－ヒスチジン、１２４ｍＭ　ＮａＣＩ、ｐＨ７．０Ｉ０．１、２９０ｍＯｓｍｏｌ±３）中に沈殿させた。バリウムを含む沈殿バス中に５分間滞留させた後、各ケース内において、マイクロカプセルをＰＢＳ　２０ｍｌで４回洗浄し、さらに培地で１回洗浄した。全直径約１８０～２００μｍの二層のマイクロカプセル（アルギン酸塩層を含む）を、この手順で生成し、コアを含む細胞の内径を１２０～１５０μｍにした。

【０２３２】

コア内の細胞濃度は、約４×１０７細胞／ｍｌアルギン酸塩である。これにより、ビーズあたり約１００細胞を含むビーズを、０．００２～０．００４μｌ有する（球状の）マイクロカプセルが得られた。ＧＬＰ－１をコードし、分泌する（球状の）マイクロカプセルを、１時間あたり平均０．２ｆｍｏｌ活性ＧＬＰ－１で生成する。

【０２３３】

コア内のｈＴＥＲＴ－ＭＳＣが分泌する封入されたＧＬＰ－１を含む細胞ビーズの顕微鏡写真を図１０に示す。

【０２３４】

（実施例１０）

＜Ｃ末端を伸張したＧＬＰ－１の抗アポトーシス効果＞

Ｃ末端を伸張したＧＬＰ－１アナログＣＭ１の細胞を保護する効果を、ラットのインスリノーマの株細胞Ｒｉｎ－５Ｆを用いて、インビトロで試験した。９６ウエルあたり４００００個のＲｉｎ－５Ｆ細胞を播種し、１％Ｌ－グルタミンおよび１０％ウシ胎仔血清が補完されたＲＰＭＩ中において２日間培養した。大腸菌内で組み換え的に生成された二量体ＧＬＰ－１融合タンパク質ＣＭ１の異なる濃度での存在下において、タンパク質生合成の阻害剤であるシクロヘキシミド（ＣＨＸ）を添加することによって、無血清状態（１％Ｌ－グルタミンが補完されたＲＰＭＩ）に変化させた後にアポトーシスが引き起こされた。２４時間後の細胞生存能をＡｌａｍａｒＢｌｕｅを用いて定量した。１ｎＭ ＧＬＰ－１アナログＣＭ１の存在下でさえ、顕著な抗アポトーシス効果が観察された（ｐ＜０．０１）。結果を図１０に加えた。

【０２３５】

（実施例１１）

＜ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣの株細胞が生成するＧＬＰ－１のサイトカインのプロフィール＞

ＧＬＰ－１単独の細胞保護効果を調査するために、ＧＬＰ－１を分泌する株細胞である７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５の株細胞について、サイトカイン、ケモカインおよび増殖因子の分泌を試験した。

【０２３６】

この株細胞は、ヒト間質細胞由来であり、それゆえに特有のサイトカインのプロフィールを分泌する。３０の最も豊富なヒトサイトカイン、ケモカイン、および増殖因子を同時に測定するために、多重検査キット（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ ３０－ｐｌｅｘ）を用いた。サイトカインＩＬ－１ＲＡ、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－２Ｒ、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２（ｐ４０／ｐ７０）、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＰ－１０、ＥＧＦ、Ｅｏｔａｘｉｎ、ＦＧＦ－ｂａｓｉｃ、ＩＦＮ－ａ、ＩＦＮγ、ＧＭ ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、ＨＧＦ、ＭＩＧ、ＭＩＰ－ｂ、ＭＩＰ－１α、ＲＡＮＴＥＳ、およびＴＮＦαに関しては、発現が確認されなかった（各検体の検出限界は、２４時間で１０５細胞あたり２０ｐｇ）。検出レベルで発現したサイトカインを表１にまとめた。

【０２３７】

【表３】

表１：増殖因子である、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）、ニューロトロフィン－３（ＮＴ－３）、グリア株細胞に由来する神経栄養因子（ＧＤＮＦ）、およびサイトカインである、インターロイキン６（ＩＬ－６）、インターロイキン８（ＩＬ－８）および単細胞化学走化性タンパク質（ＭＣＰ－１）の発現レベル。各因子を、ＣＭ１を分泌する株細胞７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５の細胞培養上清において、ＶＥＧＦ　ＥＬＩＳＡ（＃ＥＬＨ－ＶＥＧＦ－００１、ＲａｙＢｉｏ）、ＮＴ－３　ＥＬＩＳＡ（＃ＴＢ２４３、Ｐｒｏｍｅｇａ）、ＧＤＮＦ　ＥＬＩＳＡ（＃ＴＢ２２１、Ｐｒｏｍｅｇａ）、ならびにヒトＩＬ－６、ＩＬ－８およびＭＣＰ－１　ＥＬＩＳＡキット（ＲａｙＢｉｏ）を用いて定量した。

増殖因子/サイトカイン [pg/10^6個の細胞および時間]	79TM217/18K5
VEGF	973.0±78.3
NT-3	20.9±3.5
GDNF	10.7±1.5
IL-6	378.4±4.0
IL-8	3608.7±53.8
MCP-1	16.8±0.1

【０２３８】

（実施例１２）

＜心筋虚血の治療および予防する、新規の細胞ビーズによる処置のための細胞ビーズの調製＞

急性心筋梗塞に冒された患者の心筋に埋め込むために、本明細書において規定したＧＬＰ－１をコードし、分泌する細胞、およびこれらの細胞を含む（球状の）マイクロビーズ（ＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標））を、優良製造規範（ＧＭＰ）に従って、本明細書において上述した実施例１～１１に示した実験に従って作成した。この実験の意図は、ＧＬＰ－１の心筋への局所的な供給を拡大することによって、心臓細胞の損傷を制限することにある。病気に冒された部位まで操縦し、心筋組織に注入することによってビーズを埋め込むためのカテーテルを用いた介入手段によって、ＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標）は、直接心臓の病気に冒された部位に供給され得る。埋め込みは、ＡＭＩ後の日常の血管形成の間に行われ得る。ｉｎ　ｓｉｔｕでのＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標）の心臓保護効果は、損傷部位に継続的に供給される、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）融合タンパク質および他のパラクリン因子の局所分泌のためである。

【０２３９】

この実験で使用したＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標）は、球形状のアルギン酸塩基質（直径１８０～２００μｍ）に埋め込まれたヒト間葉系の間質細胞株からなる。抗アポトーシス効果を有すると思われるＧＬＰ－１融合タンパク質を分泌するように、細胞を設計した。本明細書中に記載した生成工程中に、バリウムイオンとアルギン酸塩の架橋結合によって、細胞を包括するアルギン酸塩基質を生成した。アルギン酸塩自身は薬理学的な効果はないが、細胞に物理的な足場を提供し、患者の免疫系の攻撃からこれを保護する（図１１参照のこと）。それゆえに、アルギン酸塩は賦形剤とみなされる。アルギン酸塩基質は、細胞を適用箇所に局所的に制限し、細胞の自由な浮遊を妨げるため、患者の視点からは安全な成分と考えられる。これらの機能を適切に実行するために、ＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標）は、ＧＬＰ－１融合タンパク質を分泌する細胞を封

入したアルギン酸塩基質であるコアのビーズで構成される。コアのビーズは、すべての細胞の完全な封入を確証するために、純粋なアルギン酸塩からなる殻によってさらに囲まれている。

【０２４０】

アルギン酸塩中に封入され、ＧＬＰ－１融合タンパク質を分泌する細胞は、クローン７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５由来であり、製剤原料として規定される。この細胞は、本明細書にて規定したようなように、抗アポトーシスグルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）を生成するように遺伝子組み換えされた、ヒト間葉系の間質細胞（ｈＭＳＣ）である。親の株細胞は、正常な核型を有する腫瘍を形成しない株細胞である。株細胞７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５を、遺伝子組み換えされた親の株細胞を用いて、ＣｅｌｌＭｅｄ　ＡＧにおいて生成した。それゆえに、ＧＬＰ－１融合タンパク質をコードするプラスミドベクターによるトランスフェクションを行った。

【０２４１】

ＧＬＰ－１融合タンパク質は、天然のプレプログルカゴン遺伝子の相似に適合された二量体ＧＬＰ－１コンストラクトである。これは、分子量８．７ｋＤａの７９アミノ酸二量体ＧＬＰ－１／干渉ペプチド２（ＩＰ－２）／ＧＬＰ－１タンパク質であり、添付された配列リストの配列番号１０に対応する。

【０２４２】

天然のＧＬＰ－１と比較したＣ末端を伸張されたＧＬＰ－１融合タンパク質の利点は、高い発現レベルと、ジペプチジルペプチターゼＩＶによる自然発生的な分解に対する減少した感受性とである。融合タンパク質の生物活性は維持されている。安全性の理由から、使用するプラスミドは、ＧＬＰ－１融合タンパク質および自殺遺伝子の共発現を許容する。自殺遺伝子は、最も広く使用されている単純ヘルペスウイルス１型チミジンキナーゼ（ＨＳＶ１ｔｋ）をコードしている。この酵素は、細胞内において、無毒性プロドラッグであるＧａｎｃｉｃｌｏｖｉｒを毒性生成物に変化させるので、望まない細胞増殖の場合に、トランスフェクトされた細胞の破壊を許容する。それゆえに、変質細胞を含むＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標）で処置された患者に対するＧａｎｃｉｃｌｏｖｉｒの全身適用は、移植細胞の破壊を導く。株細胞７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５の特徴付けは、以下に示すＩＣＨ　Ｑ５Ｂの長所を考慮に入れて行った：

“ｒＤＮＡ由来のタンパク質生成物の生成のために用いた細胞における発現コンストラクトの分析”、および

“生物工学生成物／生物学的生成物の生成のために用いたＱ５Ｄ誘導および細胞基質の特徴づけ”、および

“質、遺伝子供給薬用生成物の臨床前および臨床局面における手本の記録”（ＥＭＥＡ２７３９７４／２００５）

【０２４３】

（実施例１３）

＜概念研究の証明：ブタにおけるＬＶ機能障害を防ぐための、遺伝子組み換えされた間葉系ストローマ幹細胞治療の初期の評価＞

背景：心不全（ＨＦ）は、診断から５年以内にほぼ５０％の患者が死亡するという、予後不良が伴う。グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）は、自然に発生する消化管内分泌ホルモンであり、インスリン分泌を刺激し、抗アポトーシス特性を有する。成功した初期の血管形成後のＧＬＰ－１の注入は、左心室収縮機能障害（ＬＶＳＤ）を低減させることが以前に示されている。本発明者らは、初期のＬＶ機能障害のブタモデルにおいて、ＭＩ時のＧＬＰ－１発現細胞の供給の延長がＬＶ機能を改善し、梗塞サイズを顕著に低減させると仮定した。

【０２４４】

以前の研究は、冠動脈のビーズ塞栓が、再生可能な梗塞を作り出すことを示している。梗塞の大きさおよび性質における局所的供給ＧＬＰ－１の効果を評価するために、ＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標）をコントロール（同サイズおよび同数の非ＧＬＰ

－１分泌ビーズ）と比較した。
【０２４５】
方法：本明細書中の実験１～１２に記載されたＧＬＰ－１を生成するために設計し、不死化したヒト間葉系の間質細胞を、免疫隔離するためにアルギン酸塩ビーズ内に封入した（ＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標））。これらのビーズは、ヨークシャ白ブタ（ｎ＝６）の左冠動脈前下行枝に選択的に供給され、コントロールグループには細胞を有さないアルギン酸塩ビーズを受け取らせた。介入４週間後に、梗塞表面領域の形態定量、および組織分析のために心臓を移植した。
【０２４６】
結果：急性死亡動物は、処置群で２個体であり、コントロール群で１個体であった。生存動物の両グループにおいて、経胸壁超音波心臓図検査により、穏やかなＬＶＳＤ（ＥＦ４０～４５％）の始まりを確認した。ＬＶ表面領域形態計測は、コントロールグループと比較して、処置グループにおいて梗塞領域の顕著な減少を示した（２１．８±４．８％対４．７±２．１％；ｐ＜０．０１８）。組織分析は、処置グループにおいて、同様の線維形成パターンを示し、炎症が穏やかに増した。さらなる研究は、ＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標）の効果を、カルシウム調節タンパク質、アポトーシスおよび血管形成を調査することを目的とする。
【０２４７】
結論：上述したように本発明に係るＧＬＰ－１（ＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標））を発現する間葉系の間質細胞を封入したアルギン酸塩の供給は、初期ＬＶ機能障害のブタモデルにおいて、梗塞サイズおよびＬＶＳＤを顕著に低減させた。
【０２４８】
実施例１３の結果を、図１２、１３および１４に示す。図１２は、アルギン酸塩ビーズ（Ａ）または本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）（Ｂ）により冠動脈に塞栓が形成された（黒破線）心臓の病理展開図を示す。（Ａ）において白で縁取られたフラグメントは、心臓表面における目に見える梗塞領域を表す一方で、（Ｂ）において見えるのは非常に小さな梗塞領域である。図１３は、心臓表面におけるＬＶ梗塞領域を、アルギン酸塩コントロールで塞栓形成されたものに対する、本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）で塞栓形成されたものの比率で示す。図１４は、本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）グループの回復を行った、塞栓形成前、塞栓形成直後、および塞栓形成の４週間後の突出フラグメントの割合を示す。
【０２４９】
（実施例１４）
＜左心室機能障害の動脈内モデル－ＧＬＰ－１レセプターの存在下での証明＞
ブタ心臓のＬＡＤ中央（ＬＡＤ＝左冠動脈前下行枝（ＬＡＤ））への選択的なｃａｔｈｅｔｉｓａｔｉｏｎによって、制御された梗塞をブタ心臓に生成した。組織学的に、心筋の３つに区別される区域が、心臓の異なる部位から得られた部分内に存在した（図１５参照のこと）：梗塞区域（ＩＺ）、境界区域（ＢＺ）、および遠隔区域（ＲＲ）。エオシン染色は、ＩＺにおいて低減し（図１５Ｃｉ）、境界区域ＢＺとＩＺとの間には厳密な境界があり（図１５Ｃｉｉ）、ＢＺおよび遠隔区域（ＲＲ）のエオシン染色は、同様であった（図１５Ｃｉｉｉ）。
【０２５０】
健康なブタモデルにおいて、ＧＬＰ－１の使用の強固な理論的根拠を確認するために、全直径６００μｍの、上述したような、ＧＬＰ－１（細胞ビーズ）をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）を準備した。この目的のために、間葉系の幹細胞（ＭＳＣｓ）を、以下のインフォームドコンセントを行った単一の３３歳の男性ドナーの骨髄から得た。初代の細胞を、ｈＴＥＲＴを含むレトロウイルスベクターを用いた安定的な形質導入に続いて不死化した（Ｓｉｍｏｎｓｅｎら、２００２）。介在ペプチドに結合する２つのＧＬＰ－１分子を含むＧＬＰ－１融合タンパク質を分泌する細胞を生成するために、ＧＬＰ－１をコードするプラスミド発現ベクターを、親の株細胞にト

ランスフェクトした。ＧＬＰ－１を分泌する細胞が封入されたアルギン酸塩基質を含むコアと、コアを囲む純粋なアルギン酸塩からなる選択的透過表面保護層とからなる６００μｍの球型アルギン酸塩基質のそれぞれに、約３３００個のＭＳＣを埋め込んだ。ＧＬＰ－１細胞ビーズを、使用するまで－８０℃のＤＭＳＯ中に保管した。リンゲル液を用いて洗浄することによってＤＭＳＯを除去した後、細胞ビーズをリンゲル液中に懸濁し、さらに冠動脈内注入の直前にさらに希釈した。

【０２５１】

さらなる実験のために、３個の細胞ビーズをブタの左冠動脈前下行枝（ＬＡＤ）に供給し、コントロールグループには、同一サイズの細胞を有さないアルギン酸塩ビーズを受け取らせた。４週間経過時に、梗塞した表面領域の形態計測、ならびにアポトーシス、血管形成、および炎症の分析のために心臓を移植した。

【０２５２】

ブタ心臓内にＧＬＰ－１レセプターが保持されているかを決定するために、梗塞形成４週間後の心臓サンプルにおいて、ウエスタンブロット法を用いて分析を行った。図１６は、レセプターが確かに存在すること示し（負荷コントロールとしてＧＡＰＤＨを用いた）、さらに、梗塞部分と遠隔部分とのいずれにおいても、細胞ビーズとアルギン酸塩コントロールとの間に顕著な差がないことを示した。さらに、経胸壁超音波心臓図検査により、両グループにおいて穏やかなＬＶＳＤの始まりを確認した。介入の４週間後、再び心エコー検査により、コントロールグループとは異なり、処置群（細胞ビーズ）においてはＬＶ機能が正常であることが立証された（ＥＦ：４９．７±１対４１．２±２．２、ｐ＜０．０１）。ＬＶ表面領域形態計測は、コントロールグループと比較して、処置（細胞ビーズ）グループにおける梗塞領域の顕著な減少を示した（４．７±２．１％対２１．８±４．８％；ｐ＜０．０１８）。組織学的分析は、処置グループにおいて炎症が高まったことを示し、コントロールグループと比較してＧＬＰ－１細胞ビーズグループの梗塞部分および境界部分において、ＴＵＮＥＬポジティブ細胞の顕著な減少を示し、さらに、梗塞部分と境界部分とにおいて、ｍｍ２あたりの血管数の平均が顕著に上昇したことを示した。結果として、ＧＬＰ－１を発現する間葉系の間質細胞を封入したアルギン酸塩（ＧＬＰ－１ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標））の供給は、初期のＬＶ機能障害のブタモデルにおいて、梗塞サイズを縮小し、ＬＶ機能を向上させる。このことは、アポトーシスの減少、血管形成の増加、および炎症細胞の上昇に関係づけられる。

【０２５３】

（実施例１５）

左心室機能障害の動脈内モデル－心臓における、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）のパラクリン効果の証明

＜アポトーシス＞

ＴＵＮＥＬポジティブ細胞を検出するために、製造者の使用説明書のとおりにＡｐｏｐＴａｇキット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、ＵＫ）を用いて、アポトーシスを検出した。ｖＷＦ抗原に対する抗体（Ａｂｃａｍ、ＵＫ）を用いて毛細血管周囲の内皮細胞の免疫組織化学染色を行い、ＭＡＣ３８７抗ヒト骨髄／組織球抗原抗体（Ｄａｋｏ、Ｄｅｎｍａｒｋ）を用いて顆粒球および単球の染色を行った。抗原の検索部位を露出させ、Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ　ＡＢＣ複合体（Ｖｅｃｔｏｒ、ＵＫ）をシグナルの増幅に用いた。製造者の使用説明書にしたがって、フラグメントをＤＡＢ基質と共にインキュベートした。最後に、蒸留水中においてスライドを洗浄し、Ｃａｒａｚｚｉヘマトキシリンをカウンター染色に用いた。

【０２５４】

分析のために、心筋の各エリア（梗塞部、境界部（梗塞部に直接隣接して存在する）、および遠隔部）内の５箇所の任意の視野において、ライカＤＣ３００Ｆカメラが装備されたライカＤＬＭＢ光学顕微鏡を用いて、顕微鏡写真を撮影した。実験状況を知らない観察者がＩｍａｇｅＪ分析ソフトウエア（ＮＩＨ）を用いて、細胞総数（ＴＵＮＥＬ）または心筋の領域（Ｍａｃ３８７および新生された導管）の割合として、ＴＵＮＥＬ、Ｍａｃ３

８７、およびｖＷｆ抗原ポジティブ細胞の数を、カウントした。
【０２５５】
全てのデータは平均を表している（±標準誤差）。処置グループ間の差を試験するために、Ｓｔｕｄｅｎｔｓ　ｔ－ｔｅｓｔを用いた。アポトーシス、血管形成、および炎症の決定のために、梗塞部、境界部または遠隔部と称した心筋の特定の領域からデータを得た。複合的な比較のために、ＡＮＯＶＡを行った。統計的優位性は、ｐ＜０．０５の値を考慮した。
【０２５６】
２つのグループ間におけるＴＵＮＥＬポジティブ細胞の数において、顕著な差があった（コントロール群、１４．３３±１．４１対処置群、７．６５±０．４０、ｐ＝０．００６３）。心筋の個々の領域に関して、ＧＬＰ－１細胞ビーズグループと比較してコントロールグループのＩＺおよびＢＺにおいて、より顕著にＴＵＮＥＬポジティブ細胞が観察された（コントロール群ＩＺ、４２．４６±４．２７対処置群ＩＺ、２２．８１±１．２４、ｐ＝０．００７２；コントロール群ＢＺ、０．４０±０．１１対処置群ＢＺ、０．１０±０．０３、ｐ＝０．０２）。ＲＲについては、２つのグループ間において、ＴＵＮＥＬポジティブ細胞の数に顕著な差は存在しなかった（コントロール群ＲＲ、０．１２±０．０５対処置群ＲＲ、０．０６±０．０２、ｐ＝ＮＳ）。各処置グループに関して、ＴＵＮＥＬポジティブ細胞数の平均は、領域間において顕著に変化した（両処置グループに関して、ｐ＜０．０００１）。Ｂｏｎｆｅｒｒｏｎｉの複合的比較用いてコントロールグループを試験し、ＩＺおよびＢＺにおけるＴＵＮＥＬポジティブ細胞数の平均間の差は、両グループにおいて顕著であったが（両グループに関して、ｐ＜０．０５）、ＢＺおよびＲＲにおけるＴＵＮＥＬポジティブ細胞数の平均間の差は、両グループにおいて顕著ではなかった。
【０２５７】
＜血管形成＞
梗塞、境界、および遠隔領域からの心臓フラグメントを、標準ｖｏｎ　Ｗｉｌｌｉｂｒａｎｄ　Ｆａｃｔｏｒ抗体染色手順により染色した（図１７参照のこと）。血管密度の分析は、ＧＬＰ－１細胞ビーズ（ＧＬＰ－１をコードし、分泌する、本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ））が供給された心臓は、コントロール全体（図１８（Ａ））および領域単位（図１８（Ｂ））と比較して、より顕著な血管をも含むことを示した。この傾向は、ＬＶの領域内で見られた（ＬＶの頂点：３９．２５±７．５対６．８±２．２；Ｐ＝０．００２およびＬＶの中間点：３４．５±３．８対１４．６±６．２；Ｐ＝０．０４）。血管の大きさに関して、コントロールグループとＧＬＰ－１細胞ビーズグループとの両方において、直径４～１０μｍと測定された血管が最も豊富であった。
【０２５８】
＜局所集中した炎症細胞数＞
動脈内ビーズ供給４週間後の組織学的フラグメントから浸透させた炎症細胞の染色は、コントロールと比較して、（ＧＬＰ－１）をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）において、統計学的により多量の炎症細胞を示した（図２０（Ａ）および（Ｂ））。このことは、ｈＭＳＣ細胞によって生成されることが知られている、単球化学走化性因子のような因子放出のパラクリン効果を提案し、これらの重要な細胞を梗塞領域に集中させる原因となる。
【０２５９】
＜抗アポトーシス＞
動脈内ビーズ供給の４週間後の組織学的フラグメントのＴＵＮＥＬ染色によるアポトーシスの評価は（図２１）、コントロール群と比較してＧＬＰ－１細胞ビーズ群において、統計的にアポトーシス細胞（ＴＵＮＥＬ＋）が少ないことを示した（図２２（Ａ）および（Ｂ））。
【０２６０】
（実施例１６）

＜冠動脈内注入のための１６０μｍの細胞ビーズの調製＞

全直径１６０μｍの、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）を、実施例１７に記載した冠動脈内注入のために上述した実施例１～１２にまとめた概要に従って調製した。評価のために作成する細胞ビーズの仕様を、表２に示した。顕微写真は、細胞ビーズの明視野像（図２３（Ａ））と染色された生存能（図２３（Ｂ））を示す。

【０２６１】

【表４】

表２

試験	結果
無菌状態	無菌
内毒素の含有量	< 0.05 I.U. / ml
マイコプラズマ	マイコプラズマなし
細胞のビーズの全直径の平均値(n=30)	160 ± 18 μm
コアの直径の平均値(n=30)	119 ± 13 μm
細胞のビーズ１００μL当たりの細胞のビーズの数	29 800
封入された細胞の生存能力	82 %
細胞のビーズ１個当たりの細胞の数	63
細胞のビーズ１００μL当たりの細胞の数	1.9×10^6
細胞のビーズ１００μL当たりのGLP-1の発現	3 pmol/h

【０２６２】

（実施例１７）

健康なブタの心臓の冠動脈への１６０μｍの細胞ビーズの冠動脈内供給

＜方法論＞

２５０ｍＬのラクトリンゲル液中に懸濁した、ＧＬＰ－１（細胞ビーズ）をコードし、分泌する全直径１６０μｍの本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）（１ｍＬあたり約６００細胞ビーズ）を５００μＬ用いて、動物４個体を処置した。一対の経路の冠動脈内注入カテーテルを、ビーズがＬＡＤの中間点に供給されるように、ＬＡＤのフラグメント７（第一の対角枝の直後）に配置した。注入カテーテルの末梢冠動脈流量を測定するために、Ｖｏｌｃａｎｏ　Ｃｏｍｂｏｗｉｒｅをガイドワイヤとして用いて実験中の位置を維持した。細胞ビーズを、シリンジポンプを用いて、動物１および２は４ｍＬ／分の速度で、動物３および４は２ｍｌ／分の速度で、５０ｍＬ等分で投与した。細胞ビーズは急速に沈殿しやすいので、細胞ビーズ懸濁液を頻繁に振動させた。２５ｍｌまたは５０ｍｌの定期的な間隔で投与を中止し、アデノシンを静脈内に投与することによって冠動脈流入の蓄積（ＣＦＲ）を測定した。アデノシンは、最大の冠動脈血管拡張の原因となり、注入前と注入後との血液流入速度ピークの平均（ＡＰＶ）の比率をＣＦＲで示す。これらの時点において、冠動脈血管造影法を用いて冠動脈血流もまた測定し、従来のＴＩＭＩスコアを用いて血管造影図から推定値をもとめた（ＴＩＭＩ－３　標準流、ＴＩＭＩ－２　緩慢流、ＴＩＭＩ－１　低速流、ＴＩＭＩ－０　流れなし）。心電図実験の間、虚血および不整脈の信号を継続的に監視した。

【０２６３】

＜結果の要約＞

実験１４、１５および１６の３つの実験全ては、工程てきに成功し、冠動脈経路内を介して、細胞ビーズを選択的に注入することが可能であることを証明した（表３を参照のこと）。第一の動物に、１２５ｍＬの細胞ビーズ懸濁液（５０％）を、虚血の前兆および流れの減少なし（ＴＩＭＩ３；ＣＦＲ１．４（ベースライン１．５））に投与することができた。しかしながら、細胞ビーズ懸濁液１４０～１４５ｍＬ（総量で５８％）の間においては、最終的に心室細動に至る、いくつかの心室性期外コンプレックスが見られた。

【０２６４】
ＧＬＰ－１（細胞ビーズ）をコードし、分泌する、本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）の完全量を、顕著な不整脈事象の発生なしに、動物２および３に投与することができた。動物２は、いくらかのＳＴ上昇およびＡＰＶおよびＣＦＲの減少を受けた。ＴＩＭＩフローは、２００ｍＬ注入後に末端ＬＡＤにおいて０であったが、対角枝においてはＴＩＭＩ　３の流れが維持された。２５０ｍＬの投与後、３０分間の待機時間があり、ＴＩＭＩフローが再び算定された。驚くべきことに、ＴＩＭＩ　０からＴＩＭＩ　１にいくらかの流れの回復があり、かつＡＰＶはわずかに上昇したことから、動脈床において、より末端へのビーズの再配分を暗示しているともいえる。

【０２６５】
動物３において、より緩やかな注入がより再配分の結果をもたらし、それゆえに動脈流減少の発生前に供給される細胞ビーズの絶対量をより多くするかを割り出すために、ＧＬＰ－１（細胞ビーズ）をコードし、分泌する、本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）を、２ｍＬ／分のより遅い注入速度で投与した。この動物において、ＳＴ上昇はなく、ＡＰＶおよびＣＦＲはより高い値で終了し、ＴＩＭＩフローは、２５０ｍＬの細胞ビーズ注入後のみわずかに流れが遅くなり、評価３であった。動物４には動物３と同様の処置を受けさせた。しかしながら、この動物においては、ビーズの７０％（１７５ｍＬの細胞ビーズ懸濁液）の注入後に流れがＴＩＭＩ　１まで減少し、虚血性ＥＣＧ変化を伴った。２００ｍＬの細胞ビーズ懸濁液の注入後、血流はさらにＴＩＭＩ　０に減少し、細胞ビーズの残りを注入した後もまた維持された。

【０２６６】
血圧は、４個体全ての動物において安定しており、細胞ビーズ注入の急速な効果が心臓の動作においては顕著には見られなかった。検死において、心臓を切開し、細胞ビーズが供給された領域を組織学的サンプルから分離した。心臓の前壁（ＬＡＤの潅流領域）は、全ての動物において物理的に堅く感じられ、虚血由来のいくつかの浮腫／仮死またはビーズによる梗塞形成が示唆される。標的領域のＨ＆Ｅ染色スライドの病理組織学的実験は、遠隔領域の動脈と反対に、いくつかの小さい動脈内（１００～１５０ミクロン）に細胞ビーズの存在を示した。末梢血単核球が存在しない単核球が、いくつかの細胞ビーズの中央に明確に視認され、現在の研究の実行可能性が強調された。

【０２６７】

【表５】

			投与量								
速度（mL/分）	測定	ベースライン	50	100	125	150	175	200	225	250	コメント
動物1	APV	23	11	28	21	†	†	†	†	†	
4	CFR	1.5	1.8	UNK	1.4	†	†	†	†	†	
	TIMI-フロー	3	3	3	3	†	†	†	†	†	
	STの上昇	X	X	X	PVCs						１４５ｍＬの注入時のＰＶＣｓおよびＶＦ
動物2	APV	22	17	13	6-7	8	-	9	-	9	
4	CFR	1.4	1.4	1.2	1.3	-	-	1.3	-	1.1	
	TIMI-フロー	3	3	1	2	1	-	0	-	0	ワイヤに血栓の可能性が見られた
	STの上昇	X	X								～７５mLにおけるSTE
動物3	APV	17	29	18	16	16	13	13	17	13	５０mLおよび２００mLの後にワイヤを再配置した。
2	CFR	3.1	1.2	-	-	1.1	-	1.6	-	-	ワイヤが移動したときの最終のCFRがなかった。
	TIMI-フロー	3	3	3	3	3	3	3	3	3	２５０mLでのわずかに遅い流れ
	STの上昇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	正常な流れ
動物4	APV	20	17	12	11	11	?	-	-	-	
2	CFR	1.8	1.3	1.6	-	1.5	-	-	-	-	
	TIMI-フロー	3	3	3	3	3	1	0	0	0	１７５mLの後に流れが低減した。
	STの上昇	X	X	X	X	X					１７５mLでの虚血

表３

【０２６８】

現在の実験において、本発明者らは、ＧＬＰ－１の融合タンパク質を発現するように遺

伝的に組み換えられた、有利に利用されたＭＳＣを有する。さらに、治療上の因子を含む分子の被覆物外への拡散を許容する一方で免疫防御を提供する、アルギン酸基質内に細胞は封入されている。加えて、アルギン酸被覆は、近年記述された、心筋腫瘍形成（Ｗｏｌｆｅら、２００９）ならびに石灰化および骨化の領域（Ｂｒｅｉｔｂａｃｈら、２００７）のような、移植されたＭＳＣｓの逆反応の阻止を支援し得る。最後に、本発明者らは、損傷を受けた心筋において、ＧＬＰ－１供給の後において、細胞ビーズコントロールと比較したＥＦの改善もまた証明した。

【０２６９】

本発明による、ＧＬＰ－１を発現する間葉系の間質細胞を封入したアルギン酸塩（ＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標））を供給する上述した実験による主要な実験結果は、初期のＬＶ機能障害のブタモデルにおいて、梗塞の大きさを縮小し、ＬＶ機能を向上させることである。これらの実験結果は、アポトーシスの減少、血管新生の増加、および炎症細胞浸潤の増加に結びつく。この実験結果は、本発明によるＧＬＰ－１を発現する間葉系の間質細胞を封入したアルギン酸塩（ＧＬＰ－１　ＣｅｌｌＢｅａｄｓ（登録商標））は、損傷した心筋の処置、ならびにＡＭＩ、ＭＩおよびこれらに関連した障害の処置に対して有用であることを示唆する。

【図面の簡単な説明】

【０２７０】

【図１】図１は、本発明において用いられた（球状の）マイクロカプセルの調製に用いられた細胞に含まれ得る、ａ～ｍのコンストラクトの例を示す限定されない概観図である（実施例１も参照のこと）。

【図２】図２は、ｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞およびＨＥＫ２９３細胞におけるそれぞれのＧＬＰ－１コンストラクトの一過性発現の結果、および一過性トランスフェクション後の活性型ＧＬＰ－１の結果を示す図である（実施例２）。単量体ＧＬＰ－１のコンストラクト（ＧＬＰ－１（７－３７）コピーを１つのみ有する）Ｎｏ．１０３およびＮｏ．３１７からは、ほんのわずかな活性型ＧＬＰ－１のレベルが検出された。ＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞内およびＨＥＫ２９３細胞内の両方の二量体ＧＬＰ－１のコンストラクトＮｏ．２１７（構成要素（Ｉ）および構成要素（ＩＩＩ）としてＧＬＰ－１（７－３７）を有する）において、非常に大きな発現の増加が観察された。

【図３】図３は、ＧＬＰ－１を分泌する細胞からの細胞培養上清のウエスタンブロット分析を示す図である（実施例３も参照のこと）。レーン１：偽トランスフェクトされたｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞の上清に溶解した合成ＧＬＰ－１（７－３７）　１００ｎｇ；レーン２：コンストラクトＮｏ．２１７から二量体ＧＬＰ－１を分泌するｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞（クローン７９ＴＭ２１７／１３）の上清；レーン３：コンストラクトＮｏ．２１７から二量体ＧＬＰ－１を分泌するＡｔＴ２０細胞（クローン８１－Ａ－２１７／３）の上清；レーンＭ：着色済プロテインマーカー［ｋＤａ］。結果は、本明細書において規定したＧＬＰ－１（７－３７）を含有するペプチドおよびＣ末端付属物（図３の２および３）が、トランスフェクトされた株細胞から分泌され、ＧＬＰ－１（７－３７）の中分子エピトープに結合する抗ＧＬＰ－１抗体を使用して検出され得ることを示す。

【図４】図４は、本発明において使用されたＧＬＰ－１ペプチドを用いて行った血漿安定性テスト（インビトロ）を表す図である。したがって、ＨＥＫ細胞を、コンストラクト（１）Ｎｏ．１０３　ＧＬＰ－１（７－３７）、（２）Ｎｏ．３１７　ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－１１　ＡＡ伸張、および（３）Ｎｏ．２１７　ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＧＬＰ－１（７－３７）で一過性トランスフェクトした。ＨＥＫ２９３細胞は、ジーンコンストラクトのための効果的な宿主である（実施例４も参照のこと）。

【図５】図５は、コンストラクトＮｏ．２１７　ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＧＬＰ－１（７－３７）によって生成されるＧＬＰ－１ペプチドＣＭ１を分泌する、恒常的トランスフェクトしたｈＴＥＲＴ－ＭＳＣ細胞クローン７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５を用い、かつコントロールとして合成ＧＬＰ－１（７－３７）を用いて行った血漿動的安定性（インビトロ）を表す図である。結果は、独立した３回の実験から得られた。活性型ＧＬＰ－

１を、ＧＬＰ－１（ａｃｔｉｖｅ）ＥＬＩＳＡ（Ｌｉｎｃｏ社製）を用いて測定した。
【図６】図６は、以下に示すペプチドのウエスタンブロット解析を示す図である。以下の値が得られた：ＧＬＰ－１（７－３７）に対応するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１　（ＩＤ１ｓｙｎ）、３１ａａ、３．３ｋＤ；ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２に対応するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８（ＩＤ８　ｓｙｎ、ＣＭ３）、４６ａａ、５．１ｋＤ；ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＲＲ－ＧＬＰ２に対応するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．７（ＩＤ７ｒｅｃ、ＣＭ２）、８３ａａ、９．４ｋＤ；ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＲＲ－ＧＬＰ１（７－３７）に対応するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．６（ＩＤ６ｓｙｎ、ＣＭ１）、７９ａａ、８，７ｋＤ（実施例５も参照のこと）。
【図７】図７は、バイオアッセイの株細胞１１１ＣＨＯ３４９／１８においてｃＡＭＰの増加を媒介するＧＬＰ－１レセプターの量反応曲線を示した図である。コンストラクトＮｏ．２１７　ＧＬＰ－１（７－３７）－ＩＰ２－ＧＬＰ－１（７－３７）によって生成されたＣＭ１を分泌する７９ＴＭ２１７／１８Ｋ５細胞を、順次希釈されたならし培地において刺激を行った。ｈＭＳＣ－ＴＥＲＴの親の株細胞において、検出可能なｃＡＭＰ反応は見られなかった。グラフは、独立した５回の実験から作成した。ｃＡＭＰバイオアッセイにおいて最大半量（ＥＤ５０）が生成されるペプチド量は、３５３ｐＭであることが決定された（実施例６も参照のこと）。
【図８】図８は、一過性および恒常的な遺伝子発現に用いたベクターの例を示す。ベクターは、目的とする遺伝子（ＧＯＩ）のための１つのユニットと、自殺遺伝子ＨＳＶチミジンキナーゼと抵抗遺伝子ブラスチシジンとが融合した１つのユニットとの、２つの分離した転写ユニットからなる。第１の転写ユニットに対してヒトユビキチンＢプロモーターを用い、第２の転写ユニットに対してヒトフェリチンプロモーターを用いた（実施例９も参照のこと）。
【図９】図９は、本明細書にて規定したような（球状の）マイクロカプセルにおいて、予め不死化した後に用いられる細胞の特性を示す図である。図９Ａから理解できるように、不死化細胞はなお、その非不死化カウンターパート（左、右）として、脂肪細胞、骨細胞および軟骨細胞に分化し得る。不死化細胞は、線維芽細胞の形態を有し、大きさに関してより均一である。また、本明細書において用いた初代細胞に特有の、例えばＣＤ４４およびＣＤ１６６エピトープマーカーを用いたフローサイトメトリーによって示される不死化ＭＳＣ細胞としての粒度に関しても、より均一である。不死化細胞は、その非不死化カウンターパートとして、同一のＣＤマーカーを発現する（図９Ｂを参照のこと）。
【図１０】図１０は、Ｃ末端伸張ＧＬＰ－１アナログＣＭ１の抗アポトーシス有効性を示す図である。ＲＩＮ－５Ｆ細胞においてタンパク質生合成の阻害剤であるシクロヘキシミド（ＣＨＸ）の付加によって、終濃度１０μｇ／ｍｌおよび１００μｇ／ｍｌのそれぞれにおいて、アポトーシスは引き起こされる。二量体ＧＬＰ－１融合タンパク質ＣＭ１を生成する組み換え大腸菌が、異なる濃度で存在した結果、２４時間インキュベートした後に測定された細胞の生存力が顕著に上昇する（ｐ＜０．０１）。
【図１１】図１１は、ＡＭＩおよびＭＩの処置に用いられ、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する（球状の）マイクロカプセルを用いた本発明の概念の概略図である。例えば、間葉系の幹細胞、間葉系の間質細胞または同種細胞のような細胞を、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する、選択的透過性のアルギン酸塩基質形状の（球状の）薄いマイクロカプセル内に封入する。アルギン酸塩基質は、細胞がコードし、分泌するＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１融合タンパク質と同様に、封入された細胞に供給する酸素および栄養素透過する。一方、本明細書において示すように、この壁は、細胞および免疫系の構成要素は透過できない。図１１の左図は、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する（球状の）マイクロカプセルを用いた本発明の概念の概略図である。コアのビーズ（クリーム色）を含む細胞は、純粋なアルギン酸塩の層（灰色）によって囲まれている。図１１の右図は、インビトロでＧＬＰ－１をコードし、分泌する（球状の）マイクロカプセルである。
【図１２】図１２は、心臓の病理展開図である。図において、冠動脈には、（Ａ）アルギン酸塩のビーズ、または（Ｂ）本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）によ

って塞栓が形成されている（黒破線）。（Ａ）において、白で縁取られた断片が心臓表面の目に見える梗塞部分を表している一方で、非常にわずかな梗塞部分が（Ｂ）において見られる。

【図１３】図１３は、本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）により塞栓が形成された心臓表面のＬＶ梗塞部分の比率（％）を、アルギン酸塩のコントロールとの比較で示す図である。

【図１４】図１４は、本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）を用いたグループの回復を証明する、梗塞前、梗塞直後および梗塞４週間後の駆出率の比率（％）を示す図である。

【図１５】図１５は、動脈内細胞ビーズ供給（左から右）に一致し得る、管理梗塞後の梗塞区域（ＩＺ）領域、境界区域（ＢＺ）領域、および辺境のブタ心臓のＬＡＤ中央（左冠動脈前下行枝（ＬＡＤ））の組織部分を示す図である。

【図１６】図１６は、動脈内細胞ビーズ供給（左、全体、右：梗塞領域および遠隔領域を別々に）４週間後の梗塞組織および遠隔組織におけるＧＬＰ－１レセプターのウエスタンブロット解析を示す図である。実験により、荒地のブタのモデルにおいて、ＧＬＰ－１の使用について確固たる理論的根拠を確認した。梗塞４日後の心臓サンプルの、ウエスタンブロット法を用いた分析によって、ブタ心臓内の細胞が、ＧＬＰ－１レセプターを有すると判断した。図１６は、レセプターが確かに存在したことを示し（負荷コントロールとしてＧＡＰＤＨを使用）、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）、またはコントロールのアルギン酸塩の間だけでなく、梗塞区域または遠隔区域の間にも、顕著な差はなかったことを示している。

【図１７】図１７は、フォンウィルブラント因子（ｖｏｎ　Ｗｉｌｌｉｂｒａｎｄ　Ｆａｃｔｏｒ）の免疫化学を使用した組織部分を示す図である。この図は、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）の、心臓の血管形成における効果を示している。心臓の梗塞境界から遠隔領域までの部分を、フォンウィルブラント因子抗体染色プロトコールにより、この目的のために染色した。

【図１８】図１８は、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）を動脈内に供給した４週間後の血管形成効果の結果を示す図であり、図１７のフォンウィルブラント因子抗体染色プロトコールにより染色した（Ａ）全体、および（Ｂ）領域近傍を示す。血管密度の分析は、ＧＬＰ－１細胞ビーズを供給した心臓もまた、全体（図１８（Ａ））および領域近傍（図１８（Ｂ））のコントロールと比較して、顕著により多くの血管を含むことを示した。この傾向は、ＬＶ領域（ＬＶの頂点：３９．２５±７．５対６．８±２．２、Ｐ＝０．００２、およびＬＶの中間点：３４．５±３．８対１４．６±６．２、Ｐ＝０．０４）内に見られた。血管の大きさに関しては、コントロールグループとＧＬＰ－１細胞ビーズグループとの両方において、直径４～１０μｍの血管が最も多かった。

【図１９】図１９は、ビーズ供給の４週間後の組織部分を炎症性細胞浸潤のために染色し、ブタ心筋における炎症性細胞浸潤を証明する組織部分を示す図である。結果を図２０に示す。

【図２０】図２０は、ブタ心筋における炎症性細胞浸潤を証明する図１９の組織部分の結果をしめす図である。炎症性細胞浸潤のために染色したビーズ供給の４週間後の組織部分には、コントロールに対して、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）に、統計的により多い量の炎症細胞が見られた（図２０（Ａ）＆（Ｂ））。このことは、ｈＭＳＣ細胞によって生成されることが知られている単球走化性因子のような因子を放出するパラクリン効果が、これらの重要な細胞（単球および好中球）を梗塞領域に補給することの原因となることを提案する。

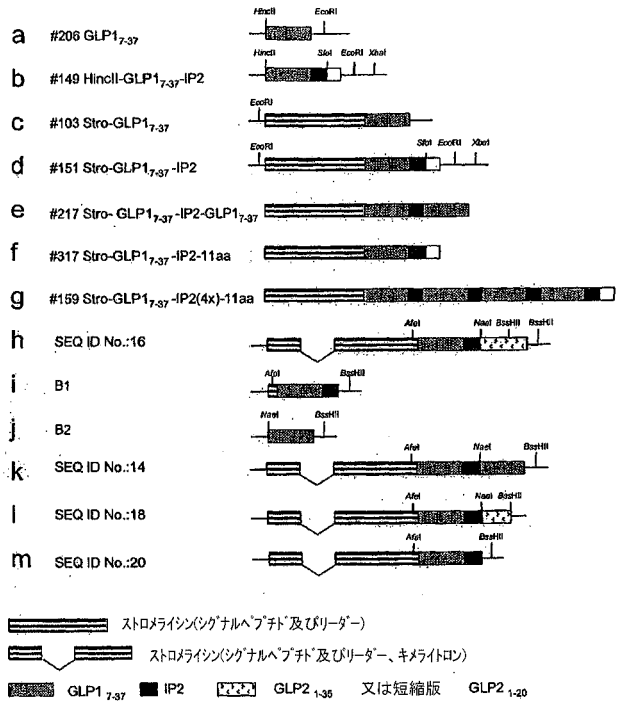
【図２１】図２１は、動脈内ビーズ供給４週間後のブタ心筋のＴＵＮＥＬ染色を示す図である。結果を図２２に示す。

【図２２】図２２は、図２１による動脈内ビーズ供給４時間後のブタ心筋のＴＵＮＥＬ染色の結果を示す図である。動脈内ビーズ供給４週間後の組織部分のＴＵＮＥＬ染色による

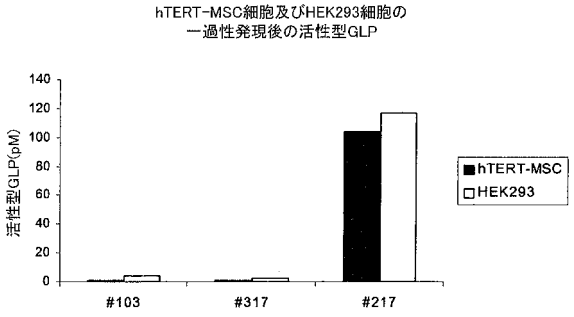
アポトーシスの評価によって、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）マイクロカプセル（細胞ビーズ）においては、コントロールと比較して統計的にアポトーシス細胞がより少ない（ＴＵＮＥＬ＋）ことが示された（図２２（Ａ）＆（Ｂ））。

【図２３】図２３は、本発明の（球状の）マイクロカプセルの内径および全直径を示した、ＧＬＰ－１をコードし、分泌する本発明の（球状の）１６０μｍ細胞ビーズの、明視野像（Ａ）および活性染色（Ｂ）の顕微写真の例を示す図である。

【図１】



【図２】



【図３】

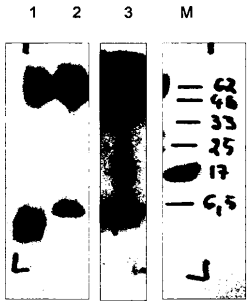
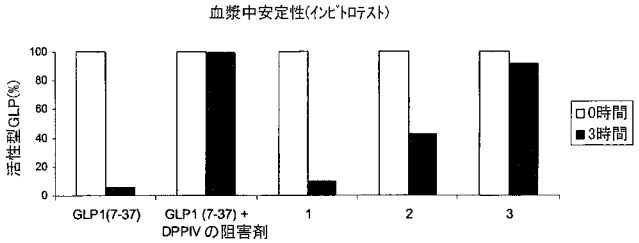
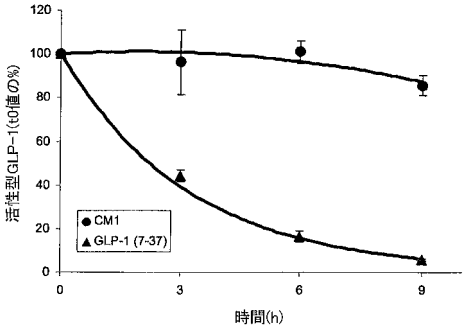


Figure 3

【図４】



【図５】



【図６】

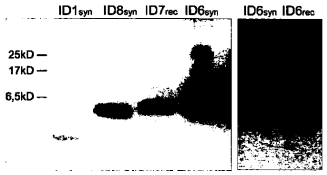


Figure 6

【図７】

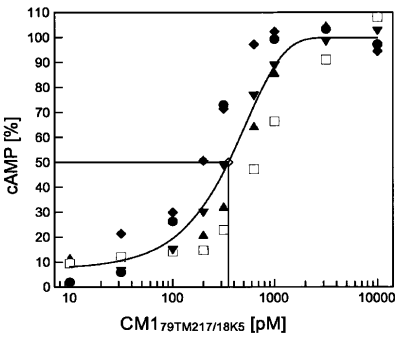
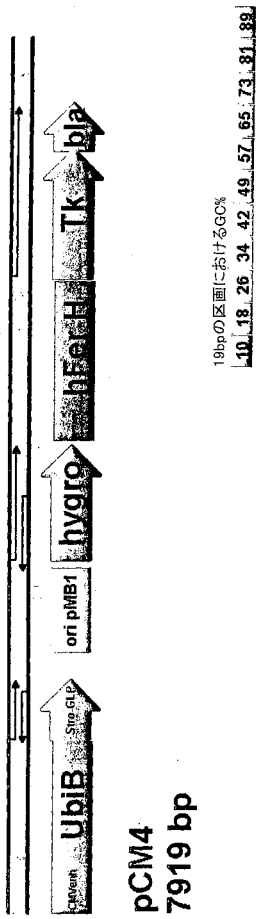
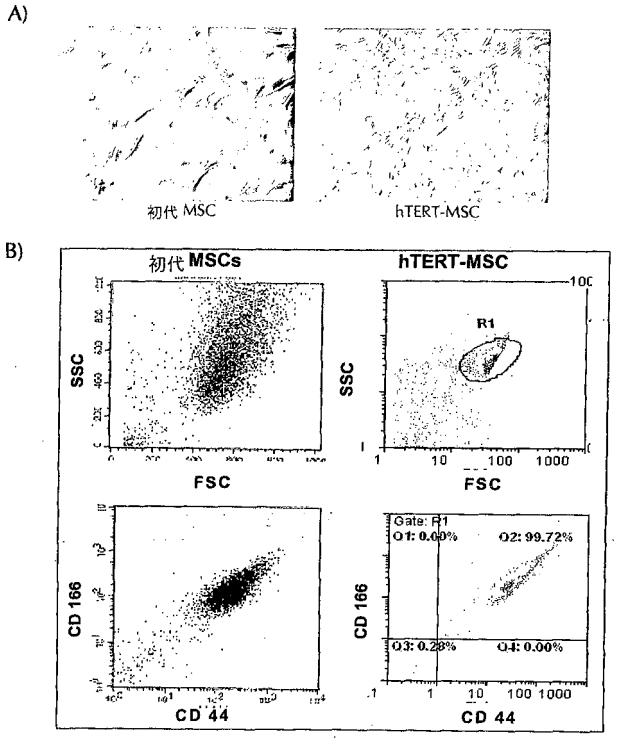


Figure 7

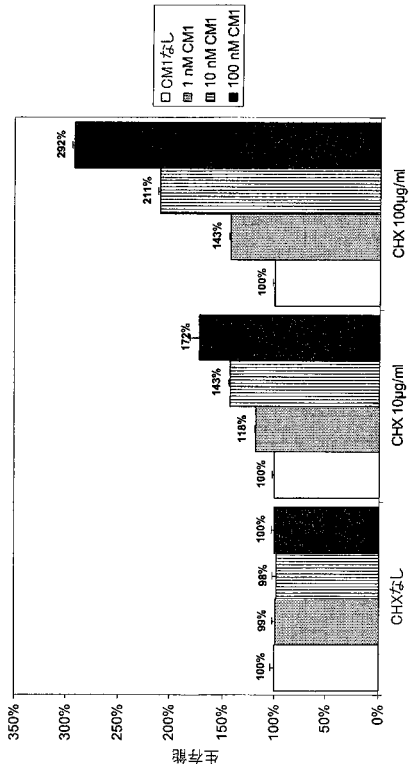
【図８】


CMVenh
UbiB
Sno GLP
ori pMB1
hygro
hEF-1α
Tk
bla
pCM4
7919 bp
19bpの区画におけるGC%
10 18 26 34 42 49 57 65 73 81 89

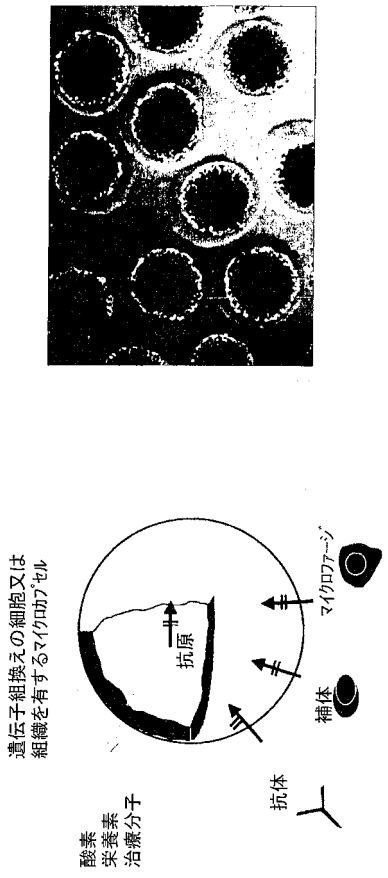
【図９】


A)
初代 MSC
hTERT-MSC
B)
初代 MSCs
hTERT-MSC
SSC
FSC
R1
CD 166
CD 44
Gate: R1
O1: 0.00%
O2: 99.72%
O3: 0.28%
O4: 0.00%

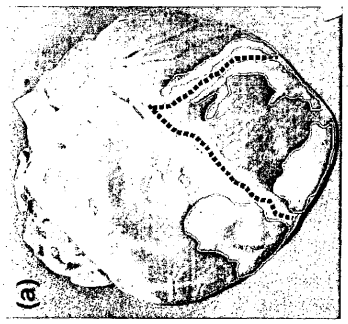
【図１０】


CM1なし
1 nM CM1
10 nM CM1
100 nM CM1
CHXなし
CHX 10μg/ml
CHX 100μg/ml
292%
211%
143%
100%
172%
143%
118%
100%
100%
98%
99%
100%
生存率
350%
300%
250%
200%
150%
100%
50%
0%

【図１１】


遺伝子組換えの細胞又は
組織を有するマイクロカプセル
酸素
栄養素
治療分子
抗体
抗原
補体
マイクロファージ

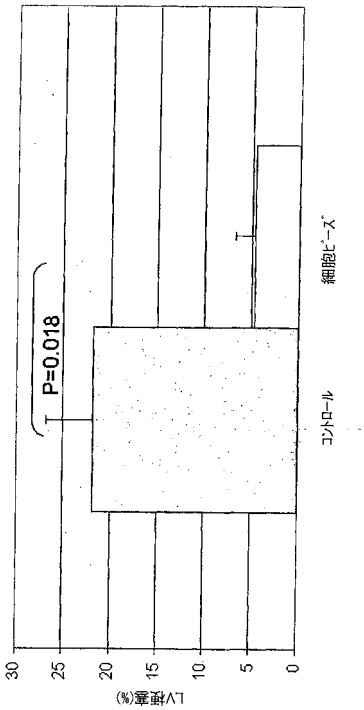
【図１２（ａ）】



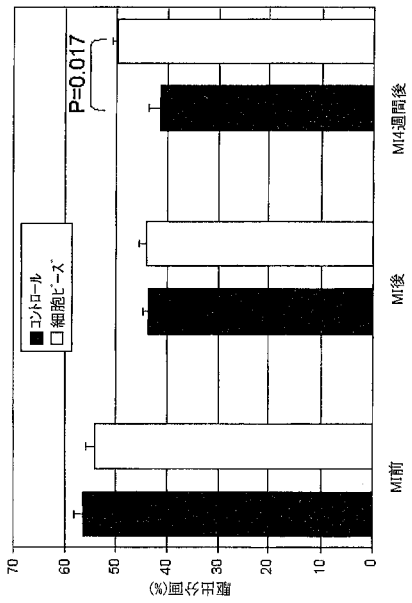
【図１２（ｂ）】



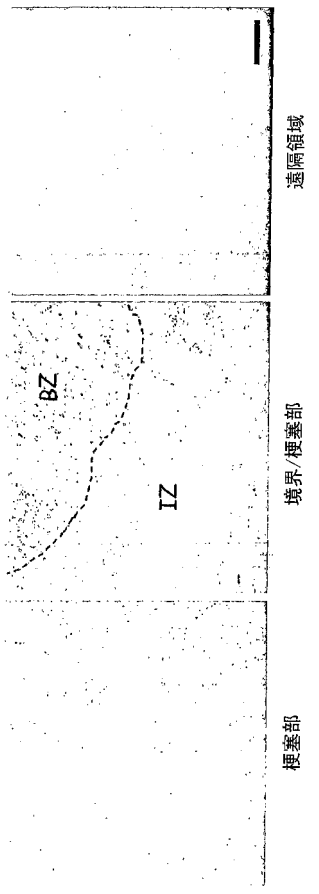
【図１３】



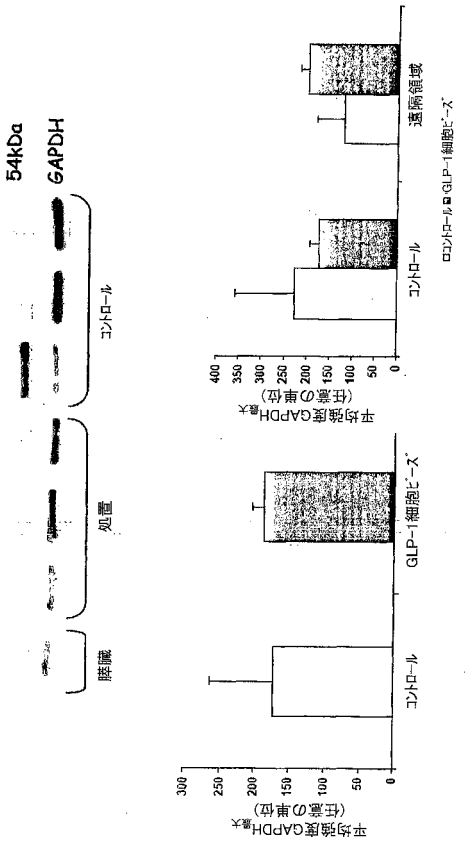
【図１４】



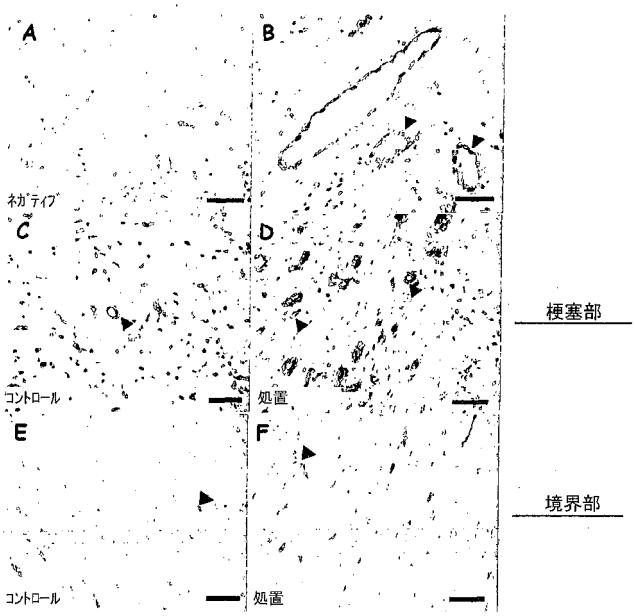
【図１５】



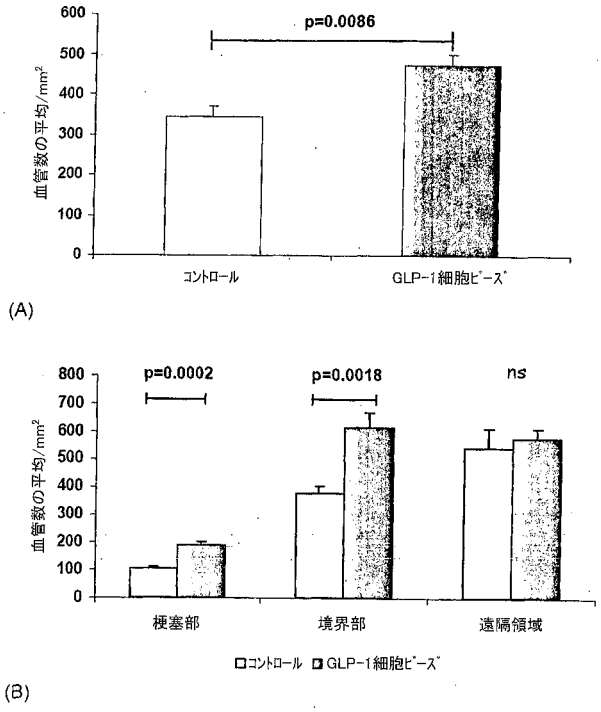
【図１６】



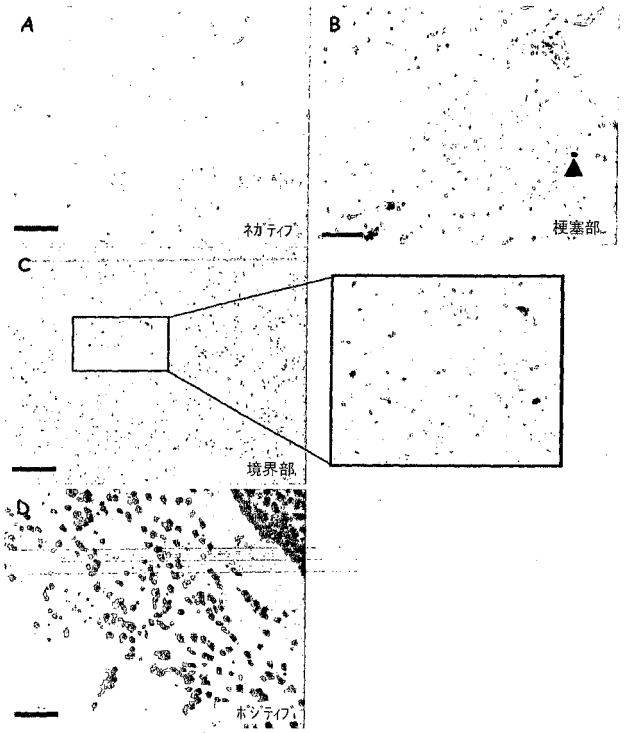
【図１７】



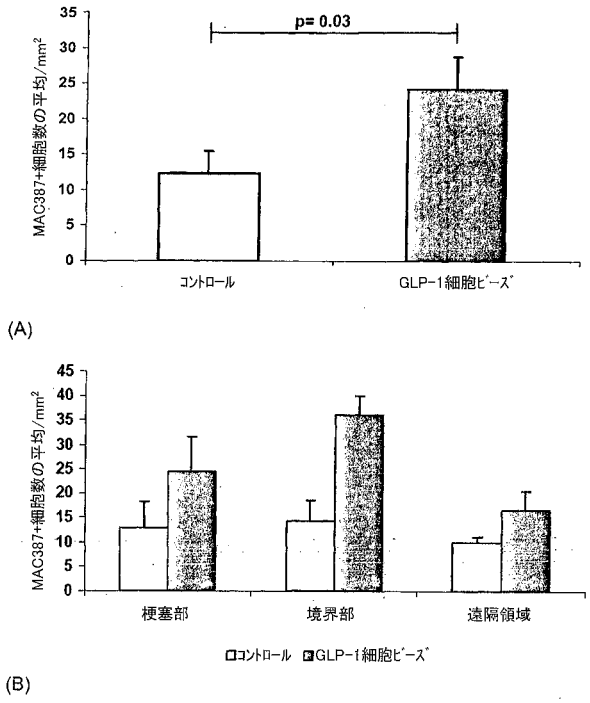
【図１８】



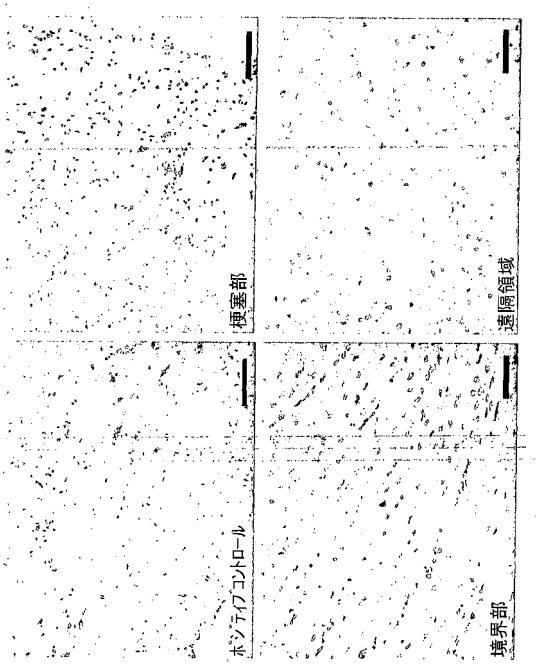
【図１９】



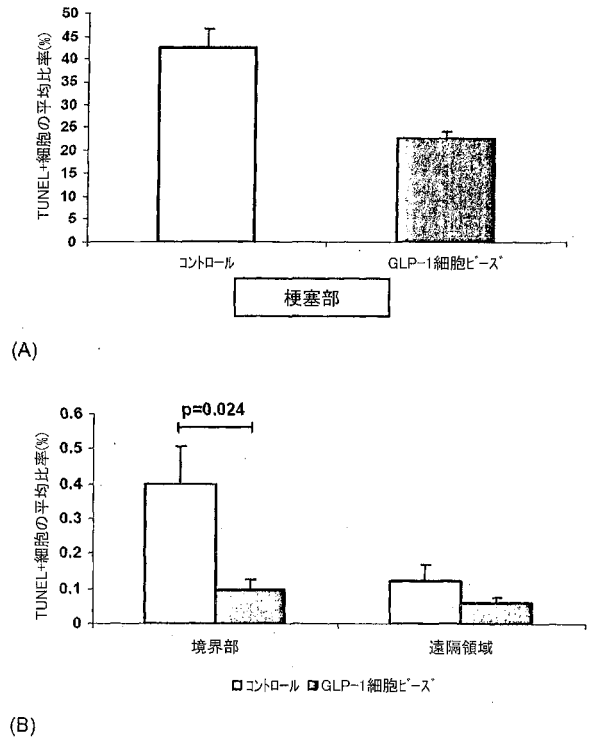
【図２０】



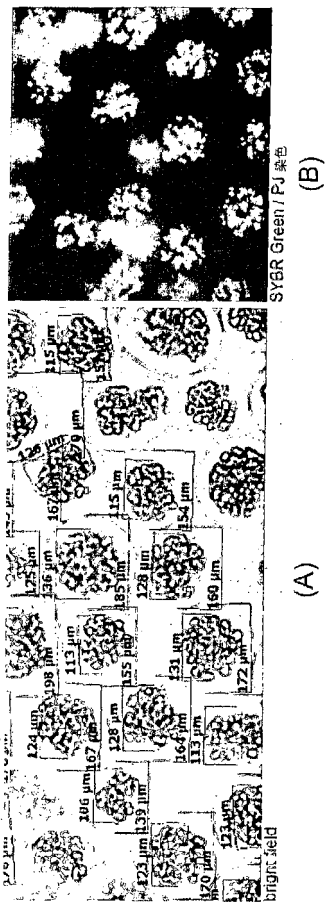
【図２１】



【図２２】



【図２３】



【配列表】
2012502072000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/50 C12N5/00 A61P9/00

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)
A61K C12N A61P

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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/66135 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 13 September 2001 (2001-09-13) page 8, line 12 - line 23 page 41, line 35 - page 42, line 5	1
Y	EP 1 854 455 A (BIOCOMPATIBLES UK LTD [GB]) 14 November 2007 (2007-11-14) [0001],[0004]-[0006],[0018]-[0020],[0024]	1-18
Y	WO 99/53064 A (MODEX THERAPEUTIQUES S A [CH]; THORENS BERNARD [CH]) 21 October 1999 (1999-10-21) page 1, line 13 - line 17 page 7, line 6 - line 22 page 22, line 24 - line 25	1-18

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 December 2009	30/12/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schönwasser, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006620

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/002136 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 9 January 2003 (2003-01-09) page 11, line 27 - page 12, line 4	1-18
Y	NIKOLAIDIS L A ET AL: "Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion" CIRCULATION, LIPPINCOT WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, US, vol. 109, no. 8, 2 March 2004 (2004-03-02), pages 962-965, XP002407971 ISSN: 1524-4539 cited in the application abstract column 1, paragraph 3	1-18
Y	SUSHEEL G. ET AL.: "A degradation product of GLP-1 confers protection against acute myocardial ischemia reperfusion injury in diabetes mellitus" JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 51, no. 10, 11 March 2008 (2008-03-11), page A378, XP002519012 abstract	1-18
A	MC KNIGHT C A ET AL: "Synthesis of Chitosan-alginate microcapsules membranes" JOURNAL OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS, LANCASTER, PA, US, vol. 3, no. 3, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 334-355, XP002112137 the whole document	1-18
A	ZIMMERMANN H ET AL: "Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation" JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 16, no. 6, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 491-501, XP019212187 ISSN: 1573-4838	1-18

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006620

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HEILE ANNA ET AL: "GLP-1 secreting encapsulated human mesenchymal stem cells for neuroprotection" CEREBROSPINAL FLUID RESEARCH, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 4, no. Suppl 1, 20 December 2007 (2007-12-20), page S47, XP021038474 ISSN: 1743-8454	1-18
T	HEILE ANNA M B ET AL: "Cerebral transplantation of encapsulated mesenchymal stem cells improves cellular pathology after experimental traumatic brain injury" NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 463, no. 3, October 2009 (2009-10), pages 176-181, XP002560356 ISSN: 0304-3940	1-18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/006620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0166135 A	13-09-2001	AT 309818 T	15-12-2005
		AU 3725401 A	17-09-2001
		DE 60114996 D1	22-12-2005
		DE 60114996 T2	10-08-2006
		EP 1263458 A1	11-12-2002
		ES 2253353 T3	01-06-2006
		JP 2003525908 T	02-09-2003
EP 1854455 A	14-11-2007	AT 444741 T	15-10-2009
		AU 2007247511 A1	15-11-2007
		CA 2649902 A1	15-11-2007
		CN 101489539 A	22-07-2009
		EP 2015736 A2	21-01-2009
		WO 2007128443 A2	15-11-2007
		JP 2009536166 T	08-10-2009
WO 9953064 A	21-10-1999	AU 3047299 A	01-11-1999
WO 03002136 A	09-01-2003	AT 382057 T	15-01-2008
		AU 2002316811 A1	03-03-2003
		DE 60224284 T2	18-12-2008
		DK 1412384 T3	28-04-2008
		EP 1412384 A2	28-04-2004
		ES 2298378 T3	16-05-2008
		JP 2004535442 T	25-11-2004
		PT 1412384 E	28-03-2008
		US 2003119734 A1	26-06-2003
		US 2009111752 A1	30-04-2009
		US 2008167226 A1	10-07-2008

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ	*14/605*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/605	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｎ	*5/077*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	２０２Ｇ	
Ｃ１２Ｎ	*5/0775*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	２０２Ｈ	

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

(72)発明者 ルーイス，アンドリュー，レナード
イギリス国，ジーユー９ ９エーエー サリー，ファーンハム，モントン レーン，ステイブル コテージ
(72)発明者 ストラットフォード，ピーター，ウィリアム
イギリス国，ジーユー２７ ３エルエー サリー，ヘイスルミア，ファーンダン レーン，ウイールライツ
(72)発明者 テーネス，エリック
ドイツ連邦共和国，６３６５４ ビューディンゲン，ブルグガッセ １２

Ｆターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC12 AC14 BD06 CA24 CA44
4C076 AA61 AA63 BB11 CC11 EE36H FF36 GG21
4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA19 BA23 DC50 NA03 ZA362
4C087 AA01 AA02 BB65 CA04 MA66 NA03 ZA36
4H045 AA10 AA30 BA19 BA41 CA40 DA30 EA30