

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4114952号  
(P4114952)

(45) 発行日 平成20年7月9日(2008.7.9)

(24) 登録日 平成20年4月25日(2008.4.25)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 38/27 (2006.01)	A 6 1 K 37/36
A 6 1 K 38/04 (2006.01)	A 6 1 K 37/43
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42

請求項の数 8 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-537463
(86) (22) 出願日	平成9年4月11日(1997.4.11)
(65) 公表番号	特表2001-519767(P2001-519767A)
(43) 公表日	平成13年10月23日(2001.10.23)
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/007301
(87) 国際公開番号	W01997/038729
(87) 国際公開日	平成9年10月23日(1997.10.23)
審査請求日	平成16年4月8日(2004.4.8)
(31) 優先権主張番号	08/631, 334
(32) 優先日	平成8年4月12日(1996.4.12)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティー オブ ミシガン アメリカ合衆国 48109-1280 ミシガン州, アナーバー, サウス ステ ート ストリート 3003 ルーム 20 71, ウォルヴァリン タワー
(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	弁理士 石井 貞次
(74) 代理人	弁理士 間山 世津子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 損傷治癒のための in vivo 遺伝子導入法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

損傷部位において血管形成を促進するポリペプチドをコードする1種類以上のDNA分子を含有する生物適合性マトリックスを含んでなる、血管形成の調節に使用する組成物であって、該マトリックスが、骨組として機能し、細胞の内殖および修復細胞によるDNA分子の取り込みを促進する、前記組成物。

【請求項 2】

血管形成を阻害するポリペプチドをコードする1種類以上のDNA分子を含有する生物適合性マトリックスを含んでなる、血管形成の調節に使用する組成物であって、該マトリックスが、細胞の浸潤を促進する骨組として機能する、前記組成物。

【請求項 3】

少なくとも1種類のDNA分子が、線維芽細胞増殖因子(FGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、または血小板由来増殖因子(PDGF)をコードする、請求項1記載の組成物。

【請求項 4】

少なくとも1種類のDNA分子が、増殖因子またはサイトカインをコードする、請求項1記載の組成物。

【請求項 5】

マトリックスが、コラーゲン性、金属、ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミネート、バイオセラミック材料、金属材料、精製したタンパク質または細胞外マトリックス組成物である、請求項1または2記載の組成物。

## 【請求項 6】

少なくとも 1 種類の DNA 分子が、抗血管形成因子をコードする、請求項 2 記載の組成物。

## 【請求項 7】

少なくとも 1 種類の DNA 分子が、トロンボスポンジン、TGF- またはアンギオスタチンをコードする、請求項 2 記載の組成物。

## 【請求項 8】

細胞が血管内皮細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 1. 序論

本発明は、関心のある治療用タンパク質をコードする DNA の提示、および哺乳動物の修復細胞 (repair cell) への直接導入のための新規な in vivo 方法に関する。該方法は、関心のある DNA を含有するマトリックス (本明細書では「遺伝子活性化マトリックス」という) を真新しい損傷部位に移植することを含む。修復細胞は、通常は損傷の周囲の生存組織で発生し、増殖し、遺伝子活性化マトリックスへと移動し、そこで該 DNA と出会い、それを取り込み、発現する。したがって、トランスフェクトされた修復細胞は、損傷を治癒させる試薬 (DNA がコードする RNA、タンパク質など) を生産する、in situ バイオリクター (損傷部位内に局在する) として作用する。

本発明は、さらに、関心のある DNA を導入するために本発明を実施する際に用いることのできる医薬組成物に関する。かかる組成物は、関心のある DNA とともに適当でないかなるマトリックスも含む。

## 2. 発明の背景

## 2.1. 損傷治癒

現在利用できる損傷治癒療法は、治療用タンパク質の投与を含む。かかる治療用タンパク質としては、通常の治癒過程に關与する、全身性ホルモン、サイトカイン、増殖因子その他の、細胞の増殖および分化を調節するタンパク質のような調節因子が挙げられる。かかる損傷治癒能があると報告される増殖因子、サイトカインおよびホルモンとしては、例えば、タンパク質のトランスフォーミング増殖因子 スーパーファミリー (TGF-) [Cox, D.A., 1995, Cell Biology International, 19:357-371]、酸性繊維芽細胞増殖因子 (FGF) [Slavin, J., 1995, Cell Biology International, 19:431-444]、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、および副甲状腺ホルモン (PTH) のようなカルシウム調節剤が挙げられる。

治療用タンパク質、すなわちサイトカインの損傷治癒療法における使用には、非常に多くの問題が伴う。第一に、治療用タンパク質の精製および/または組換え生産は、経費と時間がかかる工程であることが多い。しかしながら、最善の努力にもかかわらず、精製されたタンパク質製剤は、不安定であることが多く、貯蔵および使用が面倒となり、タンパク質の不安定性は宿主に有害である予想外の炎症性反応に (タンパク質の分解産物に) つながることがある。

第二に、治療用タンパク質、すなわちサイトカインの全身送達は、損傷していない組織での望ましくない重篤な副作用を伴うことがある。身体 of 細胞や組織への不十分な送達のため、充分量のタンパク質が適切な標的組織に到達するのを確保するためには、高用量のタンパク質の投与が必要とされる。また、該タンパク質は、タンパク質分解性の分解により体内での半減期が短いため、繰り返して投与しなければならず、これにより該治療用タンパク質に対する免疫反応を生じ得る。高用量の治療用タンパク質の循環は、投与されたタンパク質の多面発現作用のために有毒であることが多く、重篤な副作用を生じ得る。

第三に、組換えタンパク質の外からの送達は不十分である。標的部位での治療用タンパク質の固定化によって、高レベルのタンパク質の投与を限定しようとする試みがなされている。しかし、この治療方針では、反復投与のためのタンパク質の再投与が複雑となる。

第四に、膜受容体、転写因子および細胞内結合タンパク質のような様々なタンパク質に関しては、生物学的活性は、細胞内での正確な発現および局在に依存する。多くのタンパク

10

20

30

40

50

質に関しては、細胞における正確な局在は、タンパク質が細胞内部で翻訳後に修飾される際に生じる。したがって、かかるタンパク質は、細胞内部に取り込まれ、適正に発現されるように、外から投与することができない。

これらの問題が実証するとおり、損傷治癒のための最新の組換えタンパク質療法は、外来タンパク質を送達する合理的な方法を提示していないがため、無意味である。これらのタンパク質、すなわちサイトカインは、通常、生理学的な量でそれらの作用部位で生産され、細胞表面のシグナリング受容体へと効率的に送達される。

## 2.2. 遺伝子療法

遺伝子療法は、本来、機能的に活性な治療用遺伝子を標的細胞内に送達するために、遺伝し得る欠損を修正する特異的遺伝子置換療法として考えられた。体細胞遺伝子療法に向けての当初の試みは、*ex vivo*遺伝子療法と呼ばれる、組織に遺伝子を導入する間接手段に依拠しており、例えば、標的細胞を身体から取り出し、組換え遺伝子を担持するベクターをトランスフェクトまたは感染させ、再び体内に移植する（「自己細胞導入」）。DNAを*in vitro*で細胞に導入するには、リン酸カルシウム - DNA沈降、DEAE - デキストラントランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソームを介したDNA導入、または組換えウイルスベクターによる形質導入をはじめ、様々なトランスフェクションの手法が現在利用できる。かかる*ex vivo*治療のプロトコルは、DNAを異なる様々な細胞型に導入するためのものが提唱されており、上皮細胞 [ 米国特許第4,868,116号明細書 ; MorganおよびMulliganの国際公開第W087/00201号公報 ; Morganら, 1987, Science 237:1476-1479 ; MorganおよびMulliganの米国特許第4,980,286号明細書 ]、内皮細胞 [ 国際公開第W089/05345号公報 ]、肝細胞 [ 国際公開第W089/07136号公報 ; Wolffら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3344-3348 ; Ledleyら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:5335-5339 ; WilsonおよびMulliganの国際公開第W089/07136号公報 ; Wilsonら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:8437-8441 ]、繊維芽細胞 [ Palmerら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1055-1059 ; Ansonら, 1987, Mol. Biol. Med. 4:11-20 ; Rosenbergら, 1988, Science 242:1575-1578 ; NaughtonおよびNaughtonの米国特許第4,963,489号明細書 ]、リンパ球 [ Andersonらの米国特許第5,399,346号明細書 ; Blaese, R.M.ら, 1995, Science 270:475-480 ] および造血幹細胞 [ Lim, B.ら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8892-8896 ; Andersonらの米国特許第5,399,346 ] が挙げられる。

直接的な*in vivo*遺伝子導入は、最近、リポソーム [ Ledleyら, 1987, J. Pediatrics 110:1 ] またはウイルス外皮受容体タンパク質を含有するプロテオリポソーム [ Nicolauら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1068 ] にトラップしたDNA、またはポリリシン - 糖タンパク質担体複合体に結合したDNAの製剤で試みられている。加えて、「遺伝子ガン」が、細胞内への遺伝子の送達に用いられている [ オーストラリア国特許第9068389号明細書 ]。裸のDNA、またはリポソームと結合したDNAを、細胞内へのDNAの導入のための間質空間への注射用の液体担体溶液として配合することができると考えられている [ Felgnerの国際公開第W090/11092号公報 ]。

おそらく、現在考案されている遺伝子療法に伴う最大の問題の一つは、*ex vivo*であると*in vivo*であるとに拘らず、DNAを標的細胞集団に効率的に導入できないこと、および*in vivo*での遺伝子産物の高レベル発現を達成できないことである。ウイルスベクターは、最も効率的なシステムであると考えられ、組換えによる複製欠如ウイルスベクターが、*ex vivo*と*in vivo*との双方で細胞に形質導入（すなわち感染）させるのに用いられている。かかるベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連、ならびにヘルペスウイルスベクターが挙げられる。遺伝子導入では非常に効率的であるが、ウイルスベクターの使用に伴う主な短所としては、多くのウイルスベクターは、分裂しない細胞に感染させられないこと；挿入突然変異誘発に付随する問題；ウイルスに対する炎症反応、およびヘルパーウイルス産生の可能性、ならびに/あるいは他のヒト患者への有害ウイルスの伝搬が挙げられる。

ほとんどの細胞型が、外来DNAを取り込み、発現する効率の低いことに加え、多くの標的細胞集団は体内において少数しか存在しないので、特異的な標的細胞型へのDNAの提

10

20

30

40

50

示の効率が、はるかに低下することが見出されている。今のところ、DNAを標的細胞集団にターゲティングする効率を高めるためのプロトコルまたは方法は、現在全く存在しない。

### 3. 発明の概要

本発明は、損傷治癒に關与する哺乳動物の修復細胞へとDNAを特異的にターゲティングし、かつ導入して、損傷部位で治療用産物を発現するための、新規な方法に關する。本発明の方法は、遺伝子活性化マトリックスを身体の真新しい損傷部位に投与することを含む。これによれば、修復細胞を損傷部位に局在させ、ここでそれらはトランスフェクトされ、結果的に、損傷治癒を増進するようなDNAにコードされる試薬（RNA、タンパク質など）を生産する。

10

本発明は、部分的には、損傷治癒の過程で活性となる修復細胞が、増殖して損傷の区域へと周囲の組織から移動し、遺伝子活性化マトリックスを浸透させるとの知見に基づく。該マトリックスは、細胞の内殖を促進し、次いで、DNAの付近への修復細胞の局所的蓄積によって遺伝子導入を促進する、骨組として作用することができる。マトリックス中では、修復細胞は、DNAを取り込み、翻訳産物、すなわちタンパク質、または転写産物、すなわちアンチセンスおよびリボザイムとして発現する際に、驚異的に効率的である。そうして、トランスフェクトされた修復細胞は、遺伝子産物の生産をin vivoで増幅する局所的バイオリクターとして働く。

本方法には、いかなる数のDNA配列を用いることもできるが、好適なDNA配列は、(a) 組織の修復を促進するか；または(b) 疾病過程を破壊する（それによって、正常な組織治癒を生じさせる）ことができる、翻訳産物（すなわちタンパク質）または転写産物（すなわちアンチセンスもしくはリボザイム）をコードするDNA配列である。

20

本発明は、治療用タンパク質を投与することを含む、損傷治癒に現在用いられる操作の欠点を克服する。第一に、安定的かつ無害であるDNAを、高用量でin vivoに安全に投与することができる。第二に、反復的投与を、可能ではあるが、必要としない。該DNAを取り込み、かつ発現する細胞は、損傷部位での遺伝子産物の供給を与える。第三に、本発明は、投与の一時的な必要性を解決するようにして実施することもできる。例えば、該DNAは、標的細胞のゲノムに組み込まれるベクター中で提示されることができる。この場合、すべての娘細胞が、導入されたDNAを含有かつ発現し、それによって治療剤の持続的供給源として作用することになる。対照的に、組み込まれないシステムを利用し得るが、ここでは、DNAはゲノムに組み込まれず、遺伝子が娘細胞に受け渡されない。このような場合には、損傷治癒過程が完了し、遺伝子産物がそれ以後は必要とされないときには、遺伝子産物は発現されないことになる。

30

本発明は、実施例を通じて実証されるが、それらは、遺伝子を、損傷した様々な軟および硬組織でin vivoで再現的に導入かつ発現できることを示す。具体的には、本発明の方法は、現在利用できる遺伝子療法のプロトコルに伴う問題点を克服することが示される。本発明の方法は、適当な数の修復細胞への遺伝子の導入を与えて、機能的効果を、すなわち、施行者によるそれ以上のいかなるターゲティングまたは細胞特定をも必要とすることなく、達成する。遺伝子療法のin vivo方法は、何らかの形態のターゲティングを必要とするが、これらは機能しないことが非常に多い。本発明の方法では、ターゲティングは問題とならない。比喩的には、DNAは、「罌」の中の「餌」によく似た働きをする：DNAは、増殖した気付かない修復細胞に出会い、該細胞は増殖し、次いで遺伝子活性化マトリックス中に移動する。次いで、これらの細胞は、驚異的にも、DNAを取り込み、治療剤としてそれを発現することができる。

40

本発明の一つの実施態様では、本発明の方法は、軟および硬組織の修復と組織の再生とを刺激する目的で、哺乳動物の修復細胞へのDNAの導入によるドラッグデリバリーシステムとして使用することができる。修復細胞は、治療しようとする損傷の区域に通常到達する細胞であることになる。したがって、本治療用組成物を適用すべき適当な標的細胞の入手に伴う困難は皆無である。必要とされるのは、損傷部位での遺伝子活性化マトリックスの移植だけである。この生物学的環境の性質は、適切な修復細胞が、施行者によるそれ以

50

上のいかなるターゲティングまたは細胞特定をも必要とせず、「餌」であるDNAを能動的に取り込み、かつ発現するというものである。

もう一つの実施態様では、本発明の方法は、生物学のおよび合成によるマトリックスを用いて、骨格の再生を刺激するために哺乳動物の修復細胞にDNAを導入するのに使用することができる。さらにもう一つの実施態様では、本発明の方法は、生物学のおよび合成によるマトリックスの両方を用いて、靭帯および腱の修復を刺激するために哺乳動物の修復細胞にDNAを導入するのに使用することができる。さらに、本発明の方法は、生物学のおよび合成によるマトリックスの両方を用いて、骨格筋の修復、および/または血管の修復を刺激するために哺乳動物の修復細胞にDNAを導入するのに使用することができる。本発明の実施の際に用いるDNAとしては、組織の修復を促進するか、または疾病過程を破壊することができる、翻訳産物(すなわちタンパク質)または転写産物(すなわちアンチセンスもしくはリボザイム)をコードするいかなるDNAをも挙げることができる。例えば、該DNAは、増殖因子、サイトカイン、ホルモンなどのような、治療に有用なタンパク質をコードする遺伝子を含んでもよい。さらに、該DNAは、損傷治癒を阻害するか、または炎症を誘導するタンパク質をコードするmRNAの翻訳を阻害し得る、アンチセンスまたはリボザイム分子をコードしてもよい。

関心のある治療用産物をコードするDNAは、遺伝子活性化マトリックスを形成するためのマトリックスに結び付けるか、または浸漬する。調製したら、遺伝子活性化マトリックスは、哺乳動物内の損傷の部位に配置する。

本発明は、実施例を通じて実証されるが、そこでは、修復および再生を行ないつつある組織への効率的なin vivo導入および発現を実証する。

### 3.1. 定義

本明細書に用いられる場合には、下記の用語は、以下に示した意味を有することになる。遺伝子活性化マトリックス(GAM)は、本明細書では、関心のある治療剤をコードするDNAを含有する、いかなるマトリックス材料としても定義される。例えば、遺伝子活性化マトリックスは、損傷治癒を増進するために、哺乳動物の宿主の体内の損傷部位に配置される。

修復細胞は、本明細書では、組織の傷害に応答して移動および増殖するよう刺激される、いかなる細胞としても定義される。修復細胞は、損傷治癒応答の成分である。かかる細胞としては、繊維芽細胞、毛細血管内皮細胞、毛細血管周細胞、単核炎症細胞、分節化炎症細胞、および肉芽組織細胞が挙げられる。

損傷部位は、外傷性組織傷害からか、またはこれに代えて、外科的操作によって誘発もしくは招来された組織損傷から生じる、宿主中のいかなる場所としても定義される。

### 4. 図面の説明

図1A. 繊維性偽関節の大腿骨切除モデル。5mmの骨切除を、成体の退役した雄種畜スプレーグ・ドーリー(Sprague-Dawley)系ラットの大腿骨に外科的に創出した。ここに示した間隙は、全対照群を表し、哺乳動物の宿主には、骨切除のみ(n=3)、骨切除+コラーゲンスポンジ(n=10)、または骨切除+対照(マーカー遺伝子)プラスミドDNAを含有するスポンジ(n=23)のいずれかを与えた。手術直後の対照ラット大腿骨を示す単純X線フィルム。間隙は、平板と4本のピンよりなる外部固定装置によって安定化した。皮膚の切開は、金属クリップで閉鎖した。

図1B. 手術後9週間の対照ラット大腿骨切除を示す単純X線フィルム。丸くなった手術縁(矢印)は、反応性骨形成によるもので、偽関節骨折の標準的X線像と一致する。

図1C. 増殖する修復繊維芽細胞と、浮腫性細胞外マトリックスに包埋された毛細血管とを示す、手術後3週間の間隙組織の組織学切片。リンパ球およびマクロファージよりなる病巣性炎症浸潤物も存在する。

図1D. 濃密な繊維性組織を示す、9週間の対照間隙の組織学切片。1cm=20μm(CおよびD)。

図2. マウスBMP-4をコードするpGAM1構築物の模式図。CMVプロモーター、BMP-4コード配列、HAエピトープ、およびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルの

10

20

30

40

50

位置を示す。

図3A．修復繊維芽細胞によるBMP-4の発現。プラスミドにコードされたBMP-4の発現は、pGAM1プラスミドDNAを含有する遺伝子活性化マトリックスの移植後4週間に抗HA抗体、および免疫過酸化法を用いた、ブアン固定し、脱灰し、パラフィン包埋した組織切片で検出された。矢印は、繊維芽細胞の細胞質の陽性(赤褐色)の染色の例(上左の顕微鏡写真)を指す。これらの細胞は、紡錘形の形態、筋束の増殖、およびI型コラーゲンに対する免疫染色(示さず)に基づいて、繊維芽細胞として特定した。ウサギ免疫前血清とともに、または第1抗体なしでインキュベーションした一連の切片は、陰性であった。陰性の結果は、抗HA-11抗体とともにインキュベーションした、擬似手術した対照(コラーゲンスポンジのみ)でも得られた(上右の顕微鏡写真)。HA-11抗体とともにインキュベーションした対照切片では、マクロファージ、破骨細胞および骨芽細胞の偽陽性の染色が、一貫して観察された。pGAM1導入3週間後に新たに形成された骨の島が、下左の顕微鏡写真に示されている。新たな骨は、肉芽組織の形成に付随した。新形成された骨の高倍率の像が、下右の顕微鏡写真に示されている。矢印は、新たな骨の梁の表面の予定骨芽細胞を指す。間隙の組織は、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて(上の顕微鏡写真)か、またはゴモリの三色法(コラーゲンに富む組織は緑色に出現する、下の顕微鏡写真)で染色した。1cm=20mm(上の顕微鏡写真)。

図3B．動物(手術23後週間)の単純フィルムでのX線撮影図。単純フィルムX線撮影図(左)では、矢印は、骨切除のおおよその位置を示すが、それは、X線で濃く写る組織で満たされている。外部固定装置は取り外されていることに注意されたい。多彩な様式によって示されるとおり、骨の再形成が生じている。矢印の頭は、間隙に隣接する骨の欠損を指す(ピン取付けの結果)。2個所の遠位のピンの部位は、この時点で完全に治癒した(図示せず)。全戴写真(右)は、示した(犠牲に供した後の)動物の間隙のゴモリ染色した組織切片を提示している。矢印は間隙を指し、それは、今では、十分に形成された表層骨を表面に有する。骨髄空間(または間隙の空間)の環状の欠損は、最も内側の固定装置のピンの取付けの結果である。顕微鏡写真の底部での組織の崩壊は、標本取扱いの人為的産物である。

図4A．ヒトPTH1-34をコードするpGAM2構築物の模式図。PTH1-34の発現を行なわせる、上流の長い末端反復配列の位置(矢印)、PTH1-34コード配列、neo発現を行なわせるSV40のプロモーター(矢印)、neoコード配列、pBR配列、および下流の長い末端反復配列を示す。

図4B．PTH1-34遺伝子の導入および発現は、in vivoでの骨新形成を行なわせる。pGAM2プラスミドDNAを含有する遺伝子活性化マトリックスを与えた動物での、移植後9週間の5mmの骨切除の間隙の新たな骨架橋を示す単純フィルムX線撮影図。矢印は、間隙の、X線で濃く写る組織を指す。ここに示した結果は、1匹の追加の動物での実験を表している。

図5．2プラスミドのGAMによるin vivoでの骨新形成(上端)。pGAM1+pGAM2のプラスミドDNAを含有する遺伝子活性化マトリックスを与えた動物での、移植4週間後の5mmの骨切除の間隙の新たな骨架橋を示す単純フィルムX線撮影図。矢印は、間隙の、X線で濃く写る組織(骨であることを組織学的に確認)を指す(下辺)。外部固定装置の取り外し(5週間早期;手術後全体で17週間)の後の間隙の単純X線撮影図が写真の上端に示されている。矢印は、間隙の位置を示し、それは、近位の手術した辺縁に近い低鉱物化した組織の一片を除いて、X線で濃く写る組織で満たされている。多彩な様式によって示されるとおり、大規模な再形成応答が生じている。ここに示した結果は、1匹の追加の動物での実験を表している。

図6．in vivoでの骨修復/再生細胞へのアデノウイルスを介した遺伝子導入。UltraFiber(商標)移植片を、AdCMVlacZウイルス溶液( $10^{10} \sim 10^{11}$ プラーク形成単位またはPFU/ml)に6分間浸漬し、次いで、骨切除の部位に移植した。3週間欠損を治癒させ、その間、損傷治癒応答の進行を、毎週のX線撮影での検査によって追跡した。3週までに、欠損の40%が仮骨組織で満たされたと推計された。哺乳動物の宿主を犠牲に供し、プ

10

20

30

40

50

アン固定で組織を固定し、次いで、標準的ギ酸溶液を用いて、7日間脱灰した。手術の3週間後に骨切除部位に形成された新たな骨(仮骨)の横断切片から、光学顕微鏡写真を撮影した。上端左のパネル: UltraFiberアデノウイルス移植片からの仮骨組織の、陽性(赤色)の *α*-gal 細胞質染色に注意されたい。この結果は、感染を媒介し、またこうしてウイルス形質導入を媒介する細胞表面受容体は、(少なくとも1集団の)仮骨細胞によって骨折治癒過程の際に発現されることを示す。上端左のパネル: *α*-gal 抗体のビヒクル + 非特異的ウサギ IgG 抗体のカクテルで染色した一連の切片の負の対照。底部のパネル: UltraFiberおよびAdRSVntlacZで満たした骨切除部位での軟骨細胞の陽性(赤色)の *α*-gal 核染色に注意されたい。この結果は、抗 *α*-gal 抗体の精妙な特異性を実証し、骨切除の間隙でのマーカー遺伝子産物の発現を決定的に実証する。

10

図7. 修復繊維芽細胞へのpGAM2プラスミド遺伝子の導入は、ラット骨切除モデルにおける新たな骨の成長を招く。pGAM1 + pGAM2のプラスミドDNAを含有する遺伝子活性化マトリックスを与えた動物での、移植6週間後の5mmの間隙の新たな骨架橋を示す単純フィルムX線撮影図。矢印は、間隙の、X線で濃く写る組織(骨であることを組織学的に確認)を指す。

### 5. 発明の詳細な説明

本発明は、治療剤を発現する目的での哺乳動物の修復細胞へのDNAの提示および導入のためのin vivo方法に関する。本発明の方法は、遺伝子活性化マトリックスを真新しい損傷部位に移植または配置することを含む。

損傷治癒は、通常、事象の調和した画一的な序列であって、(a)組織の崩壊、および正常な組織構造の喪失; (b)細胞壊死および出血; 止血(血餅形成); (c)分節化された単核炎症細胞の浸潤とともに、血管の充血および組織浮腫; (d)単核球(マクロファージ)による血餅ならびに損傷細胞および組織の溶解、(e)肉芽組織の形成(繊維増殖および脈管形成)を包含する。細胞性事象のこの序列は、非常に多数の哺乳動物種に発生するすべての組織および器官からの損傷で観察されている[Gaillet et al., 1994, Curr. Opin. Cell. Biol. 6:717-725]。したがって、上記の細胞性序列は、すべての哺乳動物組織の修復の普遍的態様である。

20

本発明は、損傷治癒過程に関与する修復細胞は、自然に増殖し、組織傷害の部位に移動し、遺伝子活性化マトリックスに浸潤するという知見に基づく。驚くべきことに、これらの修復細胞は、通常は、in vitroまたはin vivoのいずれでも、効率的にトランスフェクトするのが困難であるが、損傷治癒過程によって増殖するよう活性化されたときは、DNAを取り込み、かつ発現するのが極めて効率的である。

30

この特徴を利用して、本発明の方法は、治療剤をコードする1種類またはそれ以上のDNA分子を、増殖する修復細胞に効率的に導入するよう設計されている。該方法は、翻訳産物(すなわちタンパク質)または転写産物(すなわちアンチセンスもしくはリボザイム)をコードするDNAを含有する遺伝子活性化マトリックスの、哺乳動物の宿主内の損傷部位への投与を含む。損傷は、外傷性組織傷害からか、またはこれに代えて、外科的操作によって誘発もしくは招来された組織損傷から生じてもよい。

増殖する修復細胞は、遺伝子活性化マトリックス中に移動し、これと接触すると、関心のあるDNAを取り込み、かつ発現し、それによって治療剤、タンパク質またはRNAの量を増幅する。そのため、トランスフェクトされた修復細胞は、局所的な修復環境に影響を及ぼす治療剤を生産する、局所的バイオリクターとして働く。例えば、トランスフェクトされた修復細胞が生産する増殖因子またはサイトカインは、同種の細胞表面受容体を発現する標的エフェクター細胞に結合し、かつこれを刺激して、それによって損傷治癒過程に通常付随する生理的事象のカスケードを刺激かつ増幅すると思われる。

40

これに代えて、修復細胞は、損傷治癒過程の拮抗薬の活性を阻害するタンパク質をコードするDNAを取り込み、かつ発現してもよい。該DNAは、損傷治癒を阻害するか、または過剰な繊維症を生起する、炎症性タンパク質その他の因子をコードするmRNAの翻訳を阻害するのに用い得るアンチセンスもしくはリボザイムRNA分子をコードしていてもよい。

50

本発明の遺伝子活性化マトリックスは、様々な手法を用いて患者に導入することができる。例えば、損傷治癒や再生を刺激するときには、該マトリックスは、損傷部位、すなわち折れた骨、損傷した結合組織などに直接導入される。皮膚の修復に用いるには、該マトリックスを局所的に投与することになる。器官再生に用いるには、該マトリックスを、器官に作られた損傷に外科的に入れることになる。

本発明の方法は、損傷部位内への修復細胞の自然な移動および増殖、ならびに損傷部位に局在する遺伝子活性化マトリックスへの浸潤、およびその後のDNAの取り込みに基づくことから、該マトリックスは、体内の損傷治癒過程が誘導された部位に導入しなければならないことが理解される。

本発明の特に重要な一つの特徴は、修復過程を操作して、瘢痕組織の形成、および/または組織再生のいずれを招いてもよいことである。例えば、損傷部位での治療用タンパク質の過剰発現は、瘢痕組織が形成することなく、損傷した組織の再生を招き得る。多くの場合に、例えば骨修復のような場合に、瘢痕組織は、正常な力学的機能を支援するのに最適に設計されていないため、かかる骨修復が望ましい。これに代えて、縫合系の周囲では、本質的に弱い組織をまとめて固定するために、瘢痕組織を形成するのが望ましいことがある。したがって、本発明の方法は、発現される治療用タンパク質のタイプおよびレベルに応じて、瘢痕組織の形成を伴うか、または伴わないかのいずれで損傷治癒を刺激するのに用いてもよい。

損傷治癒過程の刺激を通じての、マトリックスから哺乳動物修復細胞へのプラスミドDNAの直接導入は、数多くの利点を与える。第一に、DNA構築物を生産かつ精製するのが容易であることは、従来のタンパク質製造法のコストに比してまさるとも劣らない。第二に、マトリックスは、細胞の内殖および増殖を自動的に促進する構造的骨組として作用することができる。したがって、それらは、遺伝子導入のための修復細胞のターゲティングを容易にする。第三に、遺伝子直接導入は、複雑な生合成過程を通常たどる分子、または細胞膜に適正に位置しなければならない受容体に対するドラッグデリバリーの好都合な方法となり得る。これらの種類の分子は、仮に外部から細胞に送達された場合には、働くことができないと思われる。

本発明は、損傷治癒に用いるための、DNAを含有するマトリックスを含んでなる医薬組成物にも関する。本発明の組成物は、一般的には、関心のある治療用タンパク質をコードするDNAを含有する、生物適合性であるか、または骨適合性であるマトリックス材料で構成される。

本発明は、損傷治癒の用途のための現在の組換えタンパク質療法に特異的に付随する欠点を克服する。第一に、遺伝子直接導入は、トランスフェクトされた細胞が、(a)生理学的量の治療用タンパク質を組織および状況特異的な方式で修飾されるようにすることと、(b)適切な状況下で、このタンパク質を適切な細胞表面シグナリング受容体へと送達することを可能にする従来の方法である。上記の理由のため、外部からのかかる分子の送達は、投与および送達上の重大な問題を伴うことが予想される。第二に、遺伝子活性化マトリックス技術によれば、反復的投与は、可能ではあるが、必要とせず：DNAの細胞への取り込みは、十分に確立された徐放送達の技術によって精密に制御することができるか、またはこれに代えて、トランスフェクトされるDNAの組み込みは、長期間の組換えタンパク質発現を伴うことができる。

本発明の方法は、異なる多くの細胞、組織および器官が関与する損傷に普遍的に適用することができる；肉芽組織の修復細胞 [Gaillet et al., 1994, Curr. Opin. Cell. Biol. 6:717-725] は、本発明の方法が用いられる「標的とされる」。本発明は、本明細書では、3種類の動物モデル(イヌ、ラットおよびウサギ)、ならびに5種類の組織(骨、腱、靭帯、血管および骨格筋)で、3種類のマーカー遺伝子(β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼおよびアルカリ性ホスファターゼ)、3種類のプロモーター系(CMV、RSV、LTRおよびSV40)、2種類のマトリックス(生物学的、および合成による)を用いて実証される。すべての場合に、遺伝子活性化マトリックス内に移動する修復細胞は、良好にトランスフェクトされた。特に、骨芽細胞の分化および増殖のシグナル形質導入スイッ

10

20

30

40

50

チとして作用する B M P - 4 [Wozney, 1992, Mol. Reprod. Dev. 32:160-167 ; Reddi, 1994, Curr. Opin. Genet. Deve. 4:737-744]、または骨始原細胞を補充する P T H 1 - 3 4 [Orloff, et al., 1992, Endocrinology 131:1603-1611 ; Dempster et al., 1995 Endocrin Rev. 4:247-250] をコードするプラスミド構築物の、修復繊維芽細胞への遺伝子導入後には、機能的な成果（骨成長）が実証された。

#### 5.1. 遺伝子活性化マトリックス

本発明によれば、関心のある治療剤、例えば、翻訳産物、すなわちタンパク質、または転写産物、すなわちアンチセンスもしくはリボザイムをコードする D N A を含有するいかなる生物適合性マトリックス材料も、配合かつ使用することができる。

本発明の遺伝子活性化マトリックスは、いかなる生物適合性材料からも誘導し得る。かかる材料としては、細胞の付着や増殖を支援する骨組、粉末またはゲルへと配合される生分解性もしくは非生分解性材料を含み得るが、これらに限定されない。マトリックスは、合成重合体、あるいはコラーゲン、その他の細胞外マトリックスタンパク質、または他の構造的巨大分子のような、天然に産するタンパク質から誘導し得る。

マトリックスに組み込む D N A は、構想される治療用途に応じて、様々な治療用タンパク質のうちのいずれをコードしてもよい。かかるタンパク質としては、増殖因子、サイトカイン、ホルモン、または細胞の増殖、分化もしくは生理学的機能を調節できるその他いかなるタンパク質を含んでもよい。該 D N A は、損傷の修復を阻害し、および/または炎症を誘発するタンパク質の翻訳を阻害するアンチセンスもしくはリボザイム分子をコードしてもよい。

導入する D N A は、標的細胞のゲノムに組み込む必要はなく；実際、遺伝子活性化マトリックスにおける非組み込み D N A の使用が、本発明の好適な実施態様である。このようにして、損傷治療過程が完了し、遺伝子産物がそれ以後は必要とされなくなったときは、該遺伝子産物は、発現されないことになる。

生物適合性マトリックスおよび D N A を含有する治療用キットは、本発明のもう一つの態様である。ある場合には、該キットは、事前に形成した遺伝子活性化マトリックスを含有し、それによって、医師が、体内に該マトリックスを直接投与することができる。これに代えて、該キットは、遺伝子活性化マトリックスの形成に必要な成分を含有してもよい。かかる場合には、医師は、該成分を組み合わせて、遺伝子活性化マトリックスを形成し、次いで体内に置くことによって、治療に用い得る。本発明の一つの実施態様では、マトリックスを用いて、縫合糸材料または移植片のような手術装置を被覆してもよい。本発明のさらにもう一つの実施態様では、遺伝子活性化マトリックスは、即座に使用できるスポンジ、管、バンドエード、凍結乾燥した成分、ゲル、パッチ、または粉末、およびテルファ ( telfa ) パッドを含んでもよい。

#### 5.1.1. マトリックス材料

本発明の一つの態様では、関心のある治療剤をコードする D N A をマトリックス中で会合させるか、または浸漬して、遺伝子活性化マトリックスを形成する、組成物を調製する。マトリックス組成物は、( i ) 修復細胞の内殖を促進し ( ターゲッティング ) ； ( ii ) D N A を収容する ( 送達 ) ように機能する。遺伝子活性化マトリックスを調製したら、将来の使用のために貯蔵するか、または直ちに損傷部位に配置する。

本発明の組成物、装置および方法に用い得るマトリックスの型は、実質的に無制限であり、生物学的なマトリックスと合成によるそれとの双方を含んでよい。マトリックスは、哺乳動物の宿主に投与したときに、不都合な、アレルギー性の、または他の不適当な反応を生じない形態をなすという点で、「生物適合性」であることに一般的に付随するすべての特徴を有すると思われる。かかるマトリックスは、天然のか、または合成によるかのいずれの材料から形成してもよい。マトリックスは、体内に恒久的な構造を残すことが望ましい場合には、非生分解性であってよく；あるいは、治療用タンパク質の発現が、短い持続時間にのみ必要とされるにすぎない場合は、生分解性であってよい。マトリックスは、スポンジ、移植片、管、テルファパッド、バンドエード、包帯、パッド、凍結乾燥した成分、ゲル、パッチ、粉末またはナノ粒子の形態をとってよい。加えて、マトリックスは、長

10

20

30

40

50

い期間にわたるDNAの徐放性を与えるように設計してもよい。

マトリックス材料の選択は、治療しようとする損傷の特定の状況および部位によって異なる。引用により本発明に組み込まれる、米国特許第5,270,300号明細書に記載されたようなマトリックスを用いてもよい。物理的および化学的特性、例えば、生物適合性、生分解性、強さ、剛性、界面特性、および美容上の外見でさえ、当業者には周知のとおり、マトリックスを選ぶ際に考慮することができる。適切なマトリックスは、DNA分子を送達するとともに、哺乳動物の修復細胞がその中を移動し得るin situの骨組としても作用することになる。

マトリックスを長期間維持しようとする場合、非生分解性マトリックス、例えば、焼結ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミネート、その他のバイオセラミック材料および金属材料、特にチタンを用いてもよい。適当なセラミック送達系は、引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,596,574号明細書に記載のそれである。該バイオセラミックは、カルシウム-アルミネート-ホスフェートのように、組成を変更してよく；特定の物理的および化学的特性、例えば細孔径、粒度、粒子の形状、および生分解性を変えるように加工してもよい。重合体マトリックスを用いてもよく、それぞれ、引用により本明細書に組み込まれる、それぞれ米国特許第4,521,909号および4,563,489号明細書に記載のような、アクリル系エステル重合体および乳酸重合体を含む。有用な重合体の特定の例は、オルトエステル、無水物、プロピレン-co-フマレート(propylene-cofumarates)、または1種類またはそれ以上の-ヒドロキシカルボン酸単量体、例えば-ヒドロキシ酢酸(-hydroxy auric acid)(グリコール酸)および/または-ヒドロキシプロピオン酸(乳酸)の重合体である。

本発明の特に重要な態様は、移植片自体、および移植片の機能的部分、例えば外科用ねじ、ピンその他をはじめとする、整形外科用の移植片や境界面、および人工関節と結合してのその使用である。好適な実施態様では、移植片またはその一部の金属の単数もしくは複数の表面、例えばチタン表面を、核酸に対して親和性を有する材料、最も好ましくはヒドロキシアパタイトで被覆し、次いで、被覆された金属を、導入したいと望む遺伝子または核酸でさらに被覆することが考えられる。吸収性材料、例えばヒドロキシアパタイトの利用できる化学基は、当業者には公知のとおり、核酸に対するその親和性を制御するように、容易に操作し得る。

好適な実施態様では、生分解性マトリックスが、最も有用である可能性がある。生分解性マトリックスは、一般的には、体内に再吸収されることができるものとして定義される。本発明の組成物、装置および方法と結合して用いるのに可能な、生分解性マトリックスとしては、例えば、生分解性で、化学的に定義された、硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリ無水物、精製タンパク質のマトリックス、および半精製細胞外マトリックス組成物が挙げられる。

使用可能なその他の生物適合性の生分解性重合体は、当技術分野において周知であり、限定のためでなく例示のために示すと、ポリグリコリド、ポリラクチドおよびポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体(「PLGA」)のようなポリエステル[Langer & Folkman, 1976, Nature 263:797-800]；ポリカプロラクトン(「PCL」)のようなポリエーテル；ポリ無水物；n-ブチルシアノアクリレートおよびイソプロピルシアノアクリレートのようなポリアルキルシアノアクリレート；ポリアクリルアミド；ポリ(オルトエステル)；ポリホスファゼン；ポリペプチド；ポリウレタン；ならびにかかる重合体の混合物を含む。核酸の徐放または制御放出に適した、現在公知であるか、または後日開発されることになる実質的にいかなる重合体も、本発明に用い得ることを理解すべきである。

好適な実施態様では、生物適合性の生分解性重合体は、グリコール酸と乳酸との共重合体(「PLGA」)であって、約100/0~約25/75の範囲の乳酸/グリコール酸単位の比率を有する。該重合体の平均分子量(「MW」)は、標準的な分子量の商業的に入手できるポリスチレンを用いたゲル透過クロマトグラフィーによって決定した限りで、典型的には約6,000~700,000、好ましくは約30,000~120,000の範囲であり、0.5~10.5の範囲の固有粘度を有する。

10

20

30

40

50

本発明によるマトリックスからの核酸の、持続的な維持または制御された放出の期間の長さは、主として、重合体のMW、および乳酸/グリコール酸の組成比に依存する。一般に、乳酸/グリコール酸の比が大きいほど、例えば75/25のときには、核酸の制御または維持された放出の期間が長くなるのに対し、乳酸/グリコール酸の比が低いほど、核酸の放出が急速となる。好ましくは、乳酸/グリコール酸の比は、50/50である。

徐放または制御放出の期間の長さは、重合体のMWにも依存する。一般に、より高いMWの重合体は、徐放または制御放出の、より長い期間を与える。例えば、約3ヶ月間の制御放出または徐放を与えるマトリックスを調製する場合、乳酸/グリコール酸の組成比が100/0であるときは、重合体の好ましい平均MWは、約7,000~25,000であり；90/10のときは、約6,000~30,000であり；80/20のときは、約12,000~30,000である。

使用可能なもう一つのタイプの生物材料は、小腸粘膜下組織(SIS)である。SISの移植片材料は、成体ブタの空腸の分節から調製し得る。組織サンプルの単離は、Badybak et al., 1989, J. Surg. Res. 47:74-80に記載された手法のようなルーチン組織培養手法を用いて実施し得る。SIS材料は、腸間膜組織の除去、分節の反転、その後の力学的剥離手法による粘膜および表面粘膜の除去によって調製し得る。分節をその本来の配向に復帰させた後、漿膜および筋層をリンスし、将来の使用のために貯蔵する。

適当な材料のもう一つの特定の例は、繊維性コラーゲンであって、組織からの抽出および部分的精製の後に凍結乾燥し、次いで滅菌することができる。マトリックスは、様々な商業的供給源、例えばSigma and Collagen Corporationから得られるような、腱、または皮膚のコラーゲンからも調製し得る。コラーゲンマトリックスは、それぞれ、引用により本明細書に組み込まれる米国特許第4,394,370号および4,975,527号明細書に記載のとおり調製してもよい。

さらに、Yannas & Burkeの米国特許第4,505,266号明細書に記載のような、コラーゲンおよびグリコサミノグリカン(GAG)で製造した格子を、本発明の実施に用いることができる。コラーゲン/GAGマトリックスは、その中に修復細胞が移動し得る、支持体または「骨組」構造として効果的に働きうる。コラーゲンマトリックス、例えばBellの米国特許第4,485,097号明細書に開示されたものも、マトリックス材料として用いてよい。

様々なコラーゲン性材料が、鉱物化したコラーゲンの形態でもあり得る。例えば、Norian Corp. (1025 Terra Bella Ave., Mountain View, CA, 94043) から得られる、UltraFiberと呼ばれる繊維性コラーゲン移植片材料が、マトリックスの形成に用い得る。引用により本明細書に組み込まれる米国特許第5,231,169号明細書は、分散したコラーゲン微小繊維の存在下、in situでの穏やかな攪拌下でのリン酸カルシウムの鉱物の形成による、鉱物化コラーゲンの調製を記載している。かかる製剤は、核酸セグメントを骨組織部位に送達する状況で用い得る。鉱物化コラーゲンは、例えば骨折修復用の遺伝子活性化マトリックスの治療用キットの一部として、使用することができる。

コラーゲンの少なくとも20の異なる形態が特定されており、これらのコラーゲンのそれぞれを本発明の実施に使用することができる。例えば、可動結合関節または成長板から単離されるような、硝子軟骨からコラーゲンを精製してもよい。硝子軟骨から精製されたII型コラーゲンは、商業的に入手可能であり、例えばSigma Chemical Company, St. Louisから購入することができる。ラットの尾の腱由来のI型コラーゲンは、例えばCollagen Corporationから購入することができる。細菌性酵母、哺乳動物および昆虫の細胞をはじめとするコラーゲン発現組換え宿主細胞から得られるとおり、いかなる形態の組換えコラーゲンをも使用することができる。コラーゲンをマトリックス材料として用いるときは、コラーゲン分子の末端に位置し、炎症性応答を誘発することが知られている「テロペプチド」と呼ばれるものを除去するのが好都合であり得る。

本発明に用いられるコラーゲンは、所望ならば、追加の無機質、例えばリン酸カルシウムの形態での、カルシウムのようなものを補充してもよい。未変性および組換えの双方の形式のコラーゲンに、この方式での追加の無機質を、混合、吸収、さもなければ会合させることによって補充することができる。

10

20

30

40

50

### 5.1.2. DNA

本発明の方法および組成物では、様々な異なる種類のDNA分子を用いることができる。DNA分子としては、ゲノム、cDNA、一本鎖DNA、二本鎖DNA、三本鎖DNA、オリゴヌクレオチドおよびZ-DNAが挙げられる。

前記DNA分子としては、細胞外、細胞表面および細胞内のRNAやタンパク質を含む、損傷治癒を促進する様々な因子をコードし得る。細胞外タンパク質の例としては、増殖因子、サイトカイン治療用タンパク質、ホルモン、およびホルモンのペプチド断片、サイトカインの阻害剤、ペプチドの増殖および分化因子、インターロイキン、ケモカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子、ならびに血管形成誘導因子が挙げられる。かかるタンパク質の例としては、5種類のTGF- $\beta$  イソ型および骨形態形成タンパク質(BMP)をはじめとするTGF- $\beta$  分子のスーパーファミリー、潜在性TGF- $\beta$  結合タンパク質、すなわちLTBP;ケラチン生成細胞増殖因子(KGF);肝細胞増殖因子(HGF);血小板由来増殖因子(PDGF);インスリン様成長因子(IGF);塩基性繊維芽細胞増殖因子(FGF-1、FGF-2等);血管内皮増殖因子(VEGF);VIII因子およびIX因子;エリスロポエチン(EPO);組織プラスミノゲン活性化因子(TPA);アクチビンおよびインヒピンが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の実施の際に用い得るホルモンとしては、成長ホルモン(GH)および副甲状腺ホルモン(PTH)を含む。細胞外タンパク質の例としては、コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチンのような細胞外マトリックスタンパク質も含む。細胞表面タンパク質の例としては、細胞接着分子(例えば、インテグリン、セレクチン、N-CAMやL1のようなIgファミリーメンバー、およびカドヘリン)のファミリー;I型およびII型TGF- $\beta$  受容体やFGF受容体のようなサイトカインシグナリング受容体;ならびに-グリカンおよびシンデカンのような非シグナリング補受容体を含む。細胞内RNAおよびタンパク質の例としては、シグナル導入キナーゼ、タリンおよびピンクリンのような細胞骨格タンパク質、潜在性TGF- $\beta$  結合タンパク質のファミリーのようなサイトカイン結合タンパク質、ならびに転写因子および促進因子のような核トランス作用性タンパク質を含む。

前記DNA分子は、病理学的過程を遮断し、それによって自然の損傷治癒過程を妨害せずに発生させる、タンパク質をコードしてもよい。遮断因子の例としては、RNAの機能を破壊するリボザイム、および、例えば、組織の保全を破壊する酵素の組織阻害剤、例えば関節炎に付随するメタロプロテイナーゼをコードするDNAを含む。

当業者には一般的に公知の様々な分子生物学的手法を用いて、関心のあるタンパク質をコードするDNAセグメントを得ることができる。例えば、既知のヌクレオチド配列に基づく配列を有するプライマーまたはプローブを用いて、cDNAまたはゲノムのライブラリーをスクリーニングすることができる。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて、関心のあるタンパク質をコードするDNAフラグメントを生成してもよい。あるいはまた、商業的供給源からDNAフラグメントを得てもよい。

文献に記載のものとは異なる配列を有する遺伝子も、変更または改変された遺伝子が、何らかの直接的または間接的な方式で損傷治癒を刺激するよう機能するタンパク質を依然としてコードする限り、本発明に含まれる。これらの配列としては、点突然変異によって生じたもの、遺伝暗号の縮重、または天然に産する対立遺伝子変異種、および遺伝子工学、すなわち人間の手によって導入されたそれ以上の改変によるものを含む。

コードされたタンパク質またはポリペプチドの機能的特性を変更するよう設計された、ヌクレオチド配列の変化を導入する手法は、当技術分野で周知である。そのような改変としては、アミノ酸配列の変化を招く、塩基の欠失、挿入または置換を含む。変化によって、コードされたタンパク質の活性を増大させ、その生物学的安定性または半減期を増大させ、そのグリコシル化の様式を変え、温度感受性を与え、またはタンパク質の発現様式その他を変更させることができる。ヌクレオチド配列に対するかかる改変はすべて、本発明に含まれる。

関心のある翻訳または転写産物をコードするDNAは、遺伝子活性化マトリックスを調製するためのDNAの大規模な複製を行う、様々なベクター系へ組み込ませることが可能で

10

20

30

40

50

ある。これらのベクターは、損傷部位で *in vivo* にて修復細胞に取り込まれ DNA 配列の転写および / または翻訳を支配するのに必要なエレメントを含有するように設計することができる。

用い得るベクターとしては、組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA またはコスミド DNA に由来するものを含むが、それらに限定されない。例えば、pBR322、pUC19/18、pUC118、119、および M13mp 系統のベクターのようなプラスミドベクターを用い得る。バクテリオファージとしては、gt10、gt11、gt18-23、ZAP/R および EMBL 系統のバクテリオファージベクターを含み得る。利用し得るコスミドベクターとしては、pJB8、pCV103、pCV107、pCV108、pTM、pMCS、pNNL、pHSG274、COS202、COS203、pWE15、pWE16、およびカロミド 9 系統のベクターを含み得るが、これらに限定されない。RNA の *in vitro* 転写を可能にするベクター、例えば SP6 ベクターも、マトリックスに組み込み得る大量の RNA を生産するのに用い得る。あるいは、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはウシ乳頭腫ウイルスのようなウイルスから誘導されるものを含むが、それらに限定されない組換えウイルスベクターを遺伝子工学的に作製してもよい。組み込みベクターを用いてよいが、損傷治癒のためには、多くの世代にわたって遺伝子産物を娘細胞に伝達することのない非組み込み系が好適である。このようにして、遺伝子産物は、損傷治癒の過程で発現され、遺伝子が子孫の世代で希釈されてしまうにつれて、発現される遺伝子産物の量は、減少する。

適切な転写 / 翻訳制御シグナルと機能的に関連するタンパク質コード配列を含有する発現ベクターを構成するために、当業者に周知の方法を用いることができる。これらの方法としては、*in vitro* 組換え DNA 技術、および合成技術を含む。例えば、Sambrook, et al., 1992, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. および Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, N.Y. に記載の技術を参照されたい。

関心のあるタンパク質をコードする遺伝子は、異なる様々なプロモーター / エンハンサーエレメントと機能的に関連し得る。これらのベクターの発現エレメントは、それらの強さおよび特異性が異なる。利用する宿主 / ベクター系に応じて、多数の適当な転写および翻訳エレメントのうちいずれか一つを用いることができる。プロモーターは、関心のある遺伝子と天然に関連するプロモーターの形態をなし得る。これに代えて、DNA は、組換えまたは異種プロモーター、すなわち該遺伝子と通常は関連しないプロモーターの制御下に置き得る。例えば、組織特異的プロモーター / エンハンサーエレメントを、特定の細胞型に導入した DNA の発現を調節するのに用い得る。記載されており、使用できるとと思われる、組織特異性を示す転写制御領域の例としては、膵腺房細胞内で活性であるエラストラーゼ I 遺伝子制御領域 [Swift et al., 1984, Cell 38:639-646 ; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 ; MacDonald, 1987, Hepatology 7:42 S-51S] ; 膵細胞内で活性であるインスリン遺伝子制御領域 [Hanahan, 1985, Nature 315:115-122] ; リンパ系細胞内で活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域 [Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658 ; Adams et al., 1985, Nature 318:533-538 ; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444] ; 肝臓内で活性であるアルブミン遺伝子制御領域 [Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276] ; 肝臓内で活性である - フェトプロテイン遺伝子制御領域 [Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648 ; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58] ; 肝臓内で活性である - 1 - 抗トリプシン遺伝子制御領域 [Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171] ; 骨髄系細胞内で活性である - グロビン遺伝子制御領域 [Magram et al., 1985, Nature 315:338-340 ; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94] ; 脳内の希突起神経膠細胞内で活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 [Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712] ; 骨格筋内で活性であるミオシン軽鎖 - 2 遺伝子制御領域 [Shani, 1985, Nature 314:283-286] ; および視床下部内で活性である性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域 [Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378] を含むが、それらに限定されない。哺乳動物細胞内で増殖するウイルスのゲノムから単離されたプロモーター (例えば

10

20

30

40

50

、RSV、ワクシニアウイルス7.5K、SV40、HSV、アデノウイルスMLP、MMTV LTRおよびCMVのプロモーター)はもとより、組換えDNAまたは合成技術によって作製されたプロモーターも用い得る。

ある場合には、該プロモーターエレメントは、構成的または誘発可能プロモーターであってよく、関心のある遺伝子の高レベルまたは調節された発現を支配するのに適切な条件下で用いることができる。構成的プロモーターの制御下での遺伝子の発現は、遺伝子発現を誘発するための特異的な基質の存在を必要とせず、細胞増殖のすべての条件下で生じることになる。対照的に、誘発可能プロモーターが制御する遺伝子の発現は、誘導作用因の存否に応答する。

挿入されたタンパク質コード配列の十分な翻訳には、特異的な開始シグナルも必要とされる。これらのシグナルとしては、ATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。開始コドンおよび隣接配列を含むコード配列全体を適切な発現ベクターに挿入する場合は、追加の翻訳制御シグナルは全く必要とされないことがある。しかし、コード配列の一部のみを挿入するにすぎない場合は、ATG開始コドンをはじめとする、外来の翻訳制御シグナルを与えなければならない。さらに、開始コドンは、挿入断片全体の翻訳を確保するために、タンパク質コード配列の読み枠を有する相に存在しなければならない。これらの外来の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の双方の、様々な起源のものであることができる。発現の効率および制御は、転写減衰配列、エンハンサーエレメント等々の含有によって増進し得る。

関心のある治療用タンパク質をコードするDNA配列に加えて、本発明の範囲は、哺乳動物の修復細胞に導入し得るリボザイムまたはアンチセンスDNAの使用も含む。かかるリボザイムおよびアンチセンス分子は、疾病過程または損傷治癒過程を阻害する遺伝子のタンパク質をコードするRNAの翻訳を阻害し、それによって組織修復が生じるのを可能にするために用い得る。

アンチセンスRNA分子の発現は、標的mRNAに結合し、タンパク質翻訳を妨げることによって、mRNAの翻訳を直接遮断するように作用することになる。RNAの特異的切断を触媒できる酵素性のRNA分子であるリボザイムの発現も、タンパク質翻訳を遮断するために用い得る。リボザイム作用の機序は、相補的な標的RNAとのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後のヌクレオチド内部分解による切断とを含む。本発明の範囲内には、RNA配列のヌクレオチド内部分解による切断を特異的かつ効率的に触媒する、遺伝子工学的に作製されたハンマーヘッドモチーフのリボザイム分子がある。RNA分子は、該RNA分子をコードするDNA配列の転写によって、生成し得る。

1種類またはそれ以上のプロモーターの制御下で単一の遺伝的構築物に組合されるか、または同一もしくは異なる形式の別個の構築物として調製される複数の遺伝子を用い得ることも、本発明の範囲内にある。したがって、異なる遺伝子または遺伝的構築物のほとんど無限の組合せを用い得る。一定の遺伝子の組合せを、細胞の刺激および再生に対する相乗効果を達成するように設定し得るか、あるいはそれらの使用は該達成を招くことがあり、いかなる、およびすべてのかかる組合せも、本発明の範囲内に属するものとする。実際、学術文献中には、多くの相乗効果が記載されており、そのため、当業者であればあり得る相乗的な遺伝子の組合せ、または遺伝子-タンパク質の組合せでさえも、容易に特定することができるであろう。

### 5.1.3. 遺伝子活性化マトリックスの調製

好適実施態様では、マトリックスまたは移植片材料を組換えDNA原液中に浸漬することによって、該材料を関心のある治療用産物をコードするDNAと接触させる。マトリックスへのDNAの組込みに要するDNAの量、および接触時間の長さは、用いるマトリックスの種類に依存すると思われ、当業者であれば過度の実験なしに容易に決定することができる。これに代えて、合成重合体、例えばポリ乳酸-ポリグリコール酸のブロック共重合体[引用により本明細書に組込まれるLanger & Folkman, 1976, Nature, 263:797-800を参照されたい]のマトリックス中に、DNAを封入してもよい。やはり、これらのパラメ

10

20

30

40

50

ータは、当業者であれば過度の実験なしに容易に決定することができる。例えば、マトリックスに適用されるDNA構築物の量は、様々な生物学および医学的要因を考慮して決定することになる。特定の遺伝子、マトリックス、損傷部位、哺乳動物宿主の年齢、性別および食餌、ならびに様々な因子およびホルモンの血清レベルのような損傷治癒に影響し得るその他のいかなる臨床的要因も考慮されるものと思われる。

本発明の追加の実施態様では、生物学的マトリックスと合成マトリックスの双方とDNAとの組成物を、ともに凍結乾燥して、乾燥した医薬用粉剤を形成し得る。遺伝子活性化マトリックスは、体内への移植の前に再水和し得るか、あるいは、体内に入れたときに、自然に再水和されるようになり得る。

ある場合には、移植片、縫合糸、損傷包帯等々のような医療用具を、当技術に周知のとおり 10  
の慣用の被覆手法を用いて、本発明の核酸組成物で被覆し得る。かかる方法は、核酸組成物への該用具の浸漬、核酸組成物での該用具の刷毛塗り、および/または本発明のエロゾル核酸組成物での該用具への吹き付けを含むが、これは例示のためであって限定のためではない。そうして、該用具は、場合により減圧下で、室温にて、または乾燥オーブンを使用して乾燥する。縫合糸を被覆するのに好適な方法は、実施例に記載する。

プラスミドDNAを含有する重合体マトリックスで被覆した縫合糸について、出願人らは、全部で約0.01~10mgのプラスミドDNA、好ましくは約1~5mgのプラスミドDNAを含有する被覆組成物を、約5~100回、好ましくは約5~50回、最も好ましくは約15~30回塗布することにより、70cmの長さの縫合糸に塗布することが、治療上効果的かつ均一なコーティングを生じることを発見した。 20

特に好適な実施例では、本発明は、被覆した縫合糸、特に損傷治癒をin vivoで刺激する治療用タンパク質をコードする核酸を含有する重合体マトリックスで被覆した縫合糸を提供する。

本発明の方法および組成物に従って被覆し得る縫合糸は、天然または合成の起源のいかなる縫合糸も含む。代表的な縫合糸材料としては、例示のためであって限定のためでなく、絹；綿；麻；ポリエチレンやポリプロピレンのようなポリオレフィン；ポリエチレンテレフタレートのようなポリエステル；ヒドロキシカルボン酸エステルの単独重合体および共重合体；コラーゲン（プレーンまたはクロム処理の）；腸線（プレーンまたはクロム処理の）；ならびにシアノアクリレートのような縫合糸代替品を含む。縫合糸は、紐または縫り糸のような好都合ないかなる形態をとってもよく、当技術に一般的に用いられる限りの 30  
広い範囲の寸法を有し得る。

被覆した縫合糸、特に損傷治癒を刺激する治療用タンパク質をコードする核酸を含有する重合体マトリックスで被覆した縫合糸の利点は、ヒトおよび動物における外科的用途の実質的にあらゆる分野を網羅する。

#### 5.2. 遺伝子活性化マトリックスの使用

本発明は、ヒト用医薬品の中でも幅広く多種多様な創傷治癒の局面に適用できる。これらには、限定されるものではないが、骨修復、腱修復、靭帯修復、血管修復、骨格筋修復、および皮膚修復が含まれる。例えば、該遺伝子活性化マトリックス技術を用いて、トランスフェクトされた修復細胞により産生されたサイトカイン成長因子が細胞表面のシグナリング受容体に結合し、それにより通常創傷治癒の過程に伴う生理学的結果のカスケードを刺激、増幅し、創傷中の他の細胞に影響を及ぼすであろう。その結果として組織修復および再生の増大が起こる。 40

また、本発明の方法は、臨床学的目標が疾病の過程の阻止であり、それによって本来の組織治癒を行わせる場合、もしくはその目標が遺伝学的に欠陥のある蛋白質機能を代替することである場合に有用である。

創傷は、外傷性損傷により生ずるか、もしくはそうでなければ外科的手術の処置により誘発されるか、またはその結果として起こったかの何れかである組織損傷により生ずる可能性がある。本発明の遺伝子活性化マトリックスは、種々の手法を用いて患者に移植することができる。例えば、マトリックスは、治療学的移植片もしくは被覆装置（例えば、縫合、ステント、被覆移植片等）の何れかとして、医師の手によって創傷部位に直接移植する 50

ことができる。マトリックスは、幾分離れた病組織を治療するために、外科的により正常組織部位に配置するごとくに、局所的に投与することができる。

創傷治癒の過程は、出血、血塊形成、血塊の溶解と同時に起こる損傷組織の除去、および初期の修復物質としての肉芽組織の沈着を含む一連の統合された事象である。該肉芽組織は、線維芽細胞と毛細血管の混合物である。創傷治癒過程には、内皮細胞、幹細胞、マクロファージおよび線維芽細胞を始めとする多様な細胞母集団が関与する。創傷修復に関与する調節因子は、全身性ホルモン、サイトカイン、成長因子、細胞外マトリックス蛋白質およびその他の成長および分化を調節する蛋白質を含むことが知られている。

本発明のDNA転移法およびマトリックス組成物は、種々の異なるタイプの組織における組織修復および再生を刺激するための薬物送達法として広範囲の適用を有するであろう。これらには、限定されるものではないが、骨修復、皮膚修復、結合組織修復、器官再生、もしくは血管新生および/または脈管新生の調節が含まれる。また、遺伝子活性化マトリックスを用いて、例えば加齢もしくは糖尿病の影響に起因する治癒能力を損なった患者を治療してもよい。また該マトリックスは、例えば高齢者、慢性皮膚創傷の患者のごとき既存の療法に応答しない者における、本質的な理由のために治癒の緩慢な創傷の治療に用いられてもよい。

本発明の重要な特徴の一つは、創傷部位における癒痕組織の形成が遺伝子活性化マトリックスの選択的使用により調節できることであろう。癒痕組織の形成は、発現した治療学的蛋白質のレベルを制御することにより調節できよう。火傷もしくは結合組織の損傷の治療のごとき例においては、癒痕組織の形成の阻害することが特に望ましい。

本発明の方法は、宿主への注目するDNAを含有するマトリックスの移植 (grafting or transplantation) を包含する。該マトリックスの移植のための手順には、マトリックスの宿主への外科的手術による移植、もしくは注射が含まれてよい。該マトリックスが注射される例においては、該マトリックスをシリンジ中に吸い込み、患者の創傷部位に注射する。創傷部位には、複数回の注射が行われてよい。別法として、該マトリックスを創傷部位に外科的に移植してもよい。本発明の目的、すなわち創傷の修復および再生の刺激を達成するために必要とされるマトリックスの量は、部位、宿主の年齢、および体重に依存して変化する。

いつ遺伝子活性化マトリックスが宿主に移植されたとしても、また注射もしくは外科的手術の何れの方法により移植されたとしても、局所的な組織損傷が創傷治癒過程を誘発するために十分であるということが、本発明の重要な特徴である。これは、標的とされる哺乳類修復細胞の、遺伝子活性化マトリックスの部位への移動および増殖の誘発のために必要な先行条件である。

特定の具体例を下記の節で説明する。

### 5.3. 骨の再生

骨は、骨折に続き再生する本質的な能力を有している。複雑であるが規則正しい一連の骨折修復には、鬱血、血塊溶解、肉芽組織の生長不良、仮骨の形成、および最適化された構造への仮骨の改変が含まれる (A.W. Hem., 1930, J. Bone Joint Surg. 12, 827-844)。この過程に関与する細胞には、血小板、炎症性細胞、線維芽細胞、内皮細胞、周皮細胞、骨芽細胞、および骨原性先祖が含まれる。最近、数種のペプチド生長因子および分化因子が骨の形成および修復と関連している細胞の事象を制御するらしいことが確認されている (Eeiebacher, A.ら, 1995, Cell 80, 371-378)。例えば、骨形態形成蛋白質 (BMPs) は、骨原細胞の運命を制御する可溶性細胞外因子であり、BMP遺伝子は通常、培養された胎児骨芽細胞によって (Harris, S.E.ら, 1994, J. Bone Min. Res. 9, 389-394) およびマウス胚の骨格形成中の骨芽細胞によって (Lyons, K.M.ら, 1989, Genes Dev. 3, 1657-1668; Lyons, K.M.ら, 1990, Development 190, 833-844; Jones, M.C.ら, 1991, Development 111, 531-542) 発現され、組換えBMP蛋白質は軟骨および骨先祖細胞分化を開始させ (Yamaguchi, A.ら, 1991, J. Cell Biol. 113, 681-687; Ahrens, M.ら, 1993, J. Bone Min. Res. 12, 871-880; Gitelman, S.E.ら, 1994, J. Cell Biol. 126, 1595-1609; Rosen, V.ら, 1994, J. Cell Biol. 127, 1755-1766)、組換えBMPの送達は軟骨内の骨形成

10

20

30

40

50

に類似する一連の骨形成を誘発し (Wozney, J.M., 1992, Mol. Reprod. Dev. 32, 160-167; Reddi, A.H., 1994, Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 737-744)、さらにBMP-4遺伝子発現は骨折修復の過程の初期には調節されない (Nakase, T.ら, 1994, J. Bone Min. Res. 9, 651-659)。骨原性蛋白質-1、BMPに関連する分子ファミリーのメンバー (Ozkaynak, E.ら, 1990, EMBO J. 9, 2085-2093) は、in vitroおよびin vivoにおいて類似の効果が可能である (Sampath, T.K.ら, 1992, J. Biol. Chem. 267, 20352-20362; Cook, S.D.ら, (1994) J. Bone Joint Surg. 76-A, 827-838)。TGF- $\beta$  はまた、in vivoにおいて軟骨および骨形成を促進することが示されている (Centrella, M.ら, 1994, Endocrine Rev. 15, 27-38; Sumner, D.R.ら, 1995, J. Bone Joint Surg, 77A, 1135-1147)。最後に、副甲状腺ホルモン (PTH) は、血漿および細胞外液のCa<sup>2+</sup>濃度を上昇させる84個のアミノ酸のホルモンである。骨格組織中において、生物学的活性のための構造上の必要条件を有するPTH断片 (aa 1-34) の間欠投与は、真の同化作用効果をもたらす: 多数のin vivoおよびin vitro研究は、(ラットを含む) 動物へのPTH1-34の投与の結果、破骨細胞への阻害効果および骨原細胞への促進効果を組み合わせることによって分離した高品質の骨の形成が起こっているという強力な証拠を提供する (Dempster, D.W.ら, 1993, Endocrine Rev. 14, 690-709)。該PTH1-34ペプチドは、in vitroにおいて骨芽細胞を分化する際に機能的細胞表面PTH受容体の発現をアップレギュレートするBMP-4と相互依存的に相互作用することが知られている (Ahrens, M.ら, 1993, J. Bone Min. Res. 12, 871-880)。

組換え蛋白質として、BMPおよびTGF- $\beta$  1のごときペプチド生長および分化因子は、骨折修復のための有望な治療代替物を示す (Wozney, J.M., 1992, Mol.Reprod. Dev. 32, 160-167; Reddi, A.H., 1994, Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 737-744; Centrella, M.ら, 1994, Endocrine Rev. 15, 27-38; Sumner, D.R.ら, 1995 J. Bone Joint Surg. 77-A, 1135-1147)。しかしながら、動物において重要な新しい骨の形成を促進するためには、比較的多い投与量 (マイクログラム量) が必要であり、将来のヒトの治療が高価となり、かつ毒性の危険が増大するかも知れないという懸念が生じてくる。

本発明の具体例では、ヒトにおける複雑で治癒していない骨折のモデルであるラットの5mmの骨の部位に、遺伝子活性化マトリックスを外科的に移植する。本発明者らは、骨切り術の間隙の修復細胞への遺伝子導入が容易に達成され得るということを見出した。

骨の修復および再生の過程における欠陥は、臨床の整形外科的实施における重要な合併症、例えば、骨折に続く線維質の非結合、移植境界面の不全および大きな同種移植片の不全と関連している。多くの複雑骨折は現在では自家移植片を用いて処置されているが、この方法は効果的でなく合併症を伴う。

もちろん、骨の修復を促進するために計画された新規な方法は何れも、骨折を処置する際の価値ある手段であろう。折れた骨のかなりの部分は、自然のメカニズムによって創傷の修復を果たさせる鑄造法によっていまだ処置されている。近年では、改良された装置を含めて、骨折の処置が進歩してきてはいるけれども、創傷修復メカニズムを促進、または補足するための新規な方法の開発が、当該技術分野における重要な進歩を表している。

本発明を用いて、骨折の修復を促進するための骨生長遺伝子を導入することができる。この技術の他の重要な態様には、骨粗鬆症様の疾病におけるごとき「虚弱骨」を有する患者を治療するための、未知の理由、例えば、繊維質の非結合のための起こり得る不良な治癒を改善するための、移植の完成および人工ジョイントの機能を促進するための、アキレス腱のごとき他の骨格組織の治癒を促進するための、および大きな欠損を修復するためのアジュバントとしての遺伝子導入の使用が含まれる。

骨組織は修復および再生の能力を有することが知られており、これらの過程の細胞的および分子的な基礎についてはある理解が存在する。新しい骨の形成の開始には、修復細胞の投入、クローン伸張、および分化が含まれる。ひとたび開始されれば、骨の形成は種々のポリペプチド生長因子によって促進される。次いで、新しく形成された骨は、一連の局所的小および全身的な生長および分化因子によって維持される。

数種の骨の形態形成蛋白質遺伝子は現在クローン化されており (Wozneyら, 1988; Rosenら, 1989, Connect. Tissue Res., 20:313:319; Alper, 1994に要約)、この研究はDN

10

20

30

40

50

A配列の相同性に基づく形質転換生長因子- (TGF-)スーパーファミリーのメンバーとしてのBMPを確立している。異なるBMP遺伝子のクローン化は、個々のBMP遺伝子および蛋白質をBMP-1ないし少なくともBMP-8と表すことにつながった。BMP2-8は一般に骨形成性があると考えられているが、一方、BMP-1はさらに一般化されたモルフォゲンである可能性がある；Shimellら, 1991, Cell, 67:469-481)。BMP-3は骨形成原とも呼ばれており (Luytenら, 1989, J. Biol. Chem., 264:13377-13380)、さらにBMP-7はOP-1とも呼ばれている (Ozkaynakら, 1990, EMBO J., 9:2085-2093)。TGFおよびBMPはそれぞれ、細胞表面受容体のファミリーとの複雑で組織特異的な相互作用を介して細胞に作用する (RobertsおよびSporn, 1989, M.B. SpornおよびA.B. Roberts編、Springer-Verlag, Heidelberg, 95 (Part1)；Aralkarら, 1991)。

10

また形質転換生長因子 (TGF) は、細胞増殖、遺伝子発現、およびマトリックス蛋白質合成に影響を及ぼすことによって組織の治癒を調節する際に中心的な役割を持つことが示されている (RobertsおよびSporn, 1989, M.B. SpornおよびA.B. Roberts編、Springer-Verlag, Heidelberg, 95 (Part1))。例えば、TGF-1およびTGF-2は、軟骨形成および骨形成の双方を開始させることができる (Joyceら, 1990, J. Cell Biol., 110:195-2007；Izumiら, 1992, J. Bone Min. Res., 7: 115-111；Jingushiら, 1992, J. Orthop. Res., 8:364-371)。

TGFおよびBMPの以外の他の生長因子/ホルモンを本発明の実施に用いて、骨折に続く新しい骨の形成に影響を与えることができる。例えば、複数回の高投与量で (1.0mg/50ml) ラットの骨折部位に注入した骨芽細胞生長因子 (Jingushiら, 1990) によって、骨折間隙中の軟骨組織に著しい増加が見られたが、より低投与量では効果はなかった。

20

また、副甲状腺ホルモン (PTH) のごときカルシウム調節ホルモンも、本発明の1つの態様に用いることができる。PTHは、その主な機能が血漿および細胞外液中のCa<sup>++</sup>濃度を上昇させることである、84個のアミノ酸のカルシウム調節ホルモンである。また、自然のままのPTHは30年以上前に器官培養において骨の再吸収を促進することがわかり、さらに該ホルモンは破骨細胞の数および活性を増大させることが知られている。天然のホルモンを用いた、また合成ペプチドを用いた研究は、分子 (aa-1-34) のアミノ末端が生物学的活性に対する構造上の必要条件を含んでいることを実証している (Tregearら, 1973；Hermann-Erleeら, 1976, Endocrine Research Communications, 3:21-35；Rioud, 1993, Clin. Sci., 85:223-228)。

30

本発明の具体例では、遺伝子活性化マトリックスを骨折部位に外科的に移植する。かかる外科的手法には、GAM調製物の骨折部位への直接注入、複雑骨折の外科的修復、または関節鏡による手術が含まれてよい。該遺伝子活性化マトリックスが折れた骨を修復するために用いられる場合には、哺乳類の修復細胞は自然に移動して骨の損傷部位で増殖する。

本発明者らは、驚くべきことに、骨切り術の間隙内で再生している組織中の修復細胞への遺伝子導入が容易に達成され得ることを見出した。現在では、遺伝子導入を達成するための好ましい方法には、一般に、骨の生長の促進を所望する部位に置かれる前に、短時間DNA溶液に浸した繊維コラーゲン移植材料を用いること、またはPLGAのブロック共重合体のごとき合成マトリックス中に封入されたプラスミドDNAの調製物を用いることが含まれる。本明細書中に表されている研究が示すごとく、該移植材料は骨の再生/修復に明らかに関与している骨切り術間隙の細胞による外生プラスミド構築体の標的化された取り込みを促進する。機能的マーカー遺伝子産物のin vivoでの発現によって証明されるごとく、導入遺伝子は細胞の取り込みに続き、組換えポリペプチドの発現を指示する。

40

骨栄養遺伝子の導入の結果、組換え骨栄養分子の細胞内発現が起こり、その発現が新しい骨の形成の促進に直接関連していることを実証するさらなる研究が、本明細書中に示されている。特に、BMP-4をコードする遺伝子導入ベクターおよびヒトPTM1-34の断片をコードする遺伝子導入ベクターは、単独で、また組み合わせさせて新しい骨の形成を促進すると考えられる。比較的多数の候補遺伝子を検討した後に、ヒト副甲状腺ホルモン、hPTH1-34の断片をコードする遺伝子導入ベクターは、Sprague-Dewleyラットにおいて新しい骨の形成を促進すると考えられ、このことは、ヒトペプチドがラットの骨芽細胞表面のPTH/PTHrP

50

受容体と効率よく結合できることを示唆するものである。

#### 5.4. 軟組織

また、本発明を用いて靭帯、腱、軟骨および皮膚のごとき軟組織の成長または再生を促進してもよい。外傷による骨格結合組織の損傷は、種々の成長因子をコードする遺伝子を含むマトリックスを用いて治療してもよい。通常、結合組織は細胞および特徴的な組織構造で組織された細胞外マトリックスから成り立つ。組織の創傷はこの構造を破壊し、創傷治癒反応を刺激する。瘢痕組織は結合組織の正常な機械的機能を妨害するので、損傷組織が瘢痕組織を形成することなく再生することが重要である場合に、本発明の方法は結合組織の成長および再生の刺激に特によく適合する。

種々の成長因子を用いて軟組織の修復を促進することができる。これらには、限定されるものではないが、細胞外マトリックス蛋白質に関してコードする遺伝子の発現を促進する TGF- スーパーファミリーのメンバー（例えば TGF- 自身）、および EFG および PDGF のごとき他のサイトカイン類が含まれる。用い得る他の遺伝子の例としては、(a) ペプチド増殖および分化因子類、インターロイキン類、ケモカイン類、インターフェロン類、コロニー刺激因子類のごときサイトカイン類；(b) FGF および VEGF のごとき血管新生因子類；(c) コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチンのごとき細胞外マトリックス蛋白質；(d) 細胞接着分子ファミリー（例えば、インテグリン、セレクチン、N-CAM および L1 のごとき Ig ファミリーメンバー、および カドヘリン）；(e) I 型および II 型 TGF- 受容体および FGF 受容体のごとき細胞表面サイトカインシグナリング受容体；(f) グリカンおよびシンデカンのごとき非シグナリングコレセプター；(g) シグナル変換キナーゼファミリー；(h) タリンおよびピンクリンのごとき細胞骨格蛋白質；(i) 潜在 TGF- 結合蛋白質ファミリーのごときサイトカイン結合蛋白質；および (j) 転写因子のごとき核トランス (trans) 作用蛋白質が挙げられる。

ひとたび形成されれば、かかるマトリックスを、次いで、哺乳類宿主内の傷ついた結合組織の領域に置けばよい。該遺伝子活性化マトリックスは傷ついた結合組織の領域に直接注入してもよい。そうでなければ、関節鏡による手術のごとき外科的手法を用いて、傷ついた結合組織の領域へ該マトリックスを送達してもよい。

#### 5.5. 器官再生

また、本発明を用いて器官組織の修復および再生を促進してもよい。外傷または外科手術による器官の損傷は、本発明の方法を用いて治療できる。肝臓の場合、肝臓は過剰なアルコール摂取によって、もしくは肝炎ウイルスファミリーのごとき種々のタイプの感染性病原体の感染によって損傷を受ける可能性がある。同様に腎臓は、通常、腎臓病に起因する損傷の結果として機能不全を起こすと考えられる。食道、胃または十二指腸の粘膜には、胃液中の酸およびペプシンによって引き起こされた潰瘍が含まれる可能性がある。該潰瘍もまた、細菌ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) を伴う胃粘膜細胞の住み着きより生じる可能性がある。これら器官および疾病は例示としてのみ提供され、実際に本発明を用いて疾病を治療したり、またはその体内の何れの器官においても器官の再生を促進することができる。

細胞の増殖および分化を刺激し、かつ/または組織の形態形成を調節するサイトカイン類をコードする DNA を含むマトリックスは、適切な器官部位に移植してよい。かかる因子としては、限定されるものではないが、形質転換成長因子ファミリーの蛋白質、血小板誘導成長因子 (PDGF)、インスリン様成長因子 (IGF) および骨芽細胞成長因子 (FGF) が挙げられる。いくつかの例では、所与の器官、すなわち、肝細胞、腎細胞または心臓細胞などに対して特異的な細胞種の増殖を促進する成長因子類および/またはサイトカイン類を発現させることが有用であると考えられる。例えば、肝細胞成長因子を発現させて、肝臓における創傷治癒過程を促進すればよい。ヘリコバクター感染に起因する潰瘍の治療のためには、該遺伝子活性化マトリックスは抗微生物蛋白質をコードする DNA を含めばよい。

本発明の遺伝子活性化マトリックスは、治療される器官に外科的に移植することができる。別法として、ラプロスコピー (laproscopic) 外科手術手法を利用して遺伝子活性化マ

10

20

30

40

50

トリックスを体内に導入してもよい。その治療が損傷組織の応答下にある場合、本来の創傷治癒過程が修復細胞の移植マトリックスへの移動および増殖を刺激するであろう。また、該遺伝子活性化マトリックス損傷を受けていない器官へ導入された場合、例えば、マトリックスが移植され創傷治癒に無関係の治療上の蛋白質を発現した場合、その創傷治癒過程は損傷組織の誘導によって刺激することができる。

#### 5.6. 血管形成の調節

本発明はまた、血管の形成や延伸又は脈管形成や血管形成をそれぞれ調節するために使用することもできる。これらの生理学的過程は共に創傷治癒や器官再生で重要な役割を果たしている。

まず、創傷部位に、コラーゲン、マトリックス及び血管の混合物である肉芽組織が沈着し、そして組織修復中に創傷に強度を与える。新しい血管の形成には血管内皮細胞の増殖、移動及び浸潤が関与し、そして多様なポリペプチド増殖因子によって調節されることが知られている。内皮細胞増殖促進活性を有する幾つかのポリペプチドが同定されており、これらには酸性及び塩基性繊維芽細胞増殖因子(FGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)及び胎盤由来増殖因子(PDGF)が含まれる。

血管の形成や延伸を刺激するために、このような増殖因子をコードするDNAをマトリックス内に組み込み、そしてこれらのマトリックスを宿主に移植することができる。場合によっては、組織を損傷させて創傷治癒過程を誘発する必要があるかもしれない。

例えば、固形腫瘍の増殖に関連のある血管形成(増殖が血管形成に依拠している)においては、血管形成の増殖を阻止することが望ましいことがある。腫瘍の血管形成は血管形成の負のインヒビター、例えばトロンボスポンジン又はアンギオスタチンをコードしているDNAを導入(transfer)して阻止することができる。本発明の特定の実施態様では、例えばトロンボスポンジン又はアンギオスタチンをコードしているDNAをマトリックス内に組み込み、続いてこのマトリックスを患者の腫瘍部位に移植することができる。

#### 5.7. 皮膚の修復

本発明はまた、皮膚組織の増殖や修復を刺激するために使用することもできる。皮膚領域の損傷に係わる創傷、特に大火傷の場合には、感染を防止し、体液損失を減少させそして癒痕形成可能領域を減少させるために皮膚は非常に急速に増殖することが重要である。火傷、穿刺創、切り傷及び/又は擦過傷から生じる皮膚損傷は、本発明の遺伝子活性化マトリックスを使用して治療することができる。乾癬、アトピー性皮膚炎のような皮膚疾患、又は真菌、細菌及びウイルス性感染若しくはメラノーマのような皮膚癌の治療から生じる皮膚損傷も本発明の方法を使用して治療することができる。

中心基底幹細胞、ケラチノサイト、メラノサイト、ランゲルハンス細胞及びメルケル細胞を含む皮膚細胞の増殖や分化を刺激するサイトカインをコードしているDNAを含有するマトリックスを使用して皮膚損傷及び疾患を治療することができる。遺伝子活性化マトリックスは2つの機能、即ち感染や脱水から創傷を保護しそして修復細胞に取り込まれるDNAを供給する機能を果たす。本発明の遺伝子活性化マトリックスには、皮膚パッチ、死体皮膚、バンドエイド、ガーゼパッド、米国特許4,505,266若しくは米国特許4,485,097に開示されているようなコラーゲン格子、局所クリーム又はゲルを含めることができる。上記マトリックスを創傷部位に適用する前に、損傷皮膚又は失活組織を除去することができる。マトリックス内に組み込まれるDNAは、ケラチノサイト増殖因子(KGF)又は上皮増殖因子(EGF)を含む多種多様な増殖因子をコードしていることができる。治癒過程の一部としての上皮細胞移動や増殖の強力な誘発因子であることが示されているIL-1をコードしているDNAを本発明のマトリックス内に組み込むこともできる。

#### 6. 実施例：骨遺伝子導入に使用される移植材料

インビポにおける骨修復及び/又は再生部位に遺伝子を導入するために種々の移植材料を使用することができる。これらの材料は、骨再増殖部位に導入させるDNA又は遺伝子を含有する溶液中に浸漬される。或いは、好ましい製造方法としてDNAをマトリックス内に組み込むことができる。

適当な材料の1つの特別の例は繊維性コラーゲンであり、そしてこれは、組織から抽出し

10

20

30

40

50

て部分的に精製した後に凍結乾燥しそしてその後滅菌することができる。もう1つの特に好ましいコラーゲンはII型コラーゲンであり、最も特に好ましいコラーゲンは組換えII型コラーゲン又は鉱化II型コラーゲンのいずれかである。骨切断部位に配置する前に、移植材料は無菌条件下でDNA（又はウイルス）溶液に浸漬する。浸漬は適当且つ好都合な期間、例えば、6分から一夜までの期間であることができる。DNA（例えば、プラスミド）溶液は無菌の水溶液、例えば滅菌水又は許容可能な緩衝液であることができ、その濃度は一般的には約0.5~1.0mg/mlである。現在好ましいプラスミドはpGL2（Promege）、pSV40-gal、pAd.CMVlacZ及びpcDNA3のようなものである。

## 7. 実施例：トランスジーン発現後のインビボタンパク質検出

### 7.1. -ガラクトシダーゼトランスジーン

細菌性 -ガラクトシダーゼは免疫組織化学的に検出することができる。骨切断組織標本をブアン固定液中で固定し、鉱物質を除去し、そしてその後縦軸平面に沿って半分に分けた。各標本の半分は、その後の細菌性 -ガラクトシダーゼタンパク質の免疫組織化学的同定用にパラフィンに包埋した。

免疫組織化学用に、横断面切片（2~3mm厚さ）をポリ-L-リジンで被覆した顕微鏡スライドに移しそしてアセトン中0で少なくとも20分間固定した。切片はPBS中で再水化した。内因性ペルオキシダーゼ活性は、0.1%の過酸化水素（95%メタノール中）中室温で10分間組織切片を浸漬して停止させ、そして停止させた切片はPBS中で3回洗浄した。場合によっては、切片化した頭蓋冠を4%EDTA、5%ポリビニルピロリドン及び7%スクロース、pH7.4中4で24時間浸漬して鉱物質を除去した。鉱物質除去切片は抗体に適用する前に3回洗浄した。一次抗体はハイブリードーマ上清液の形態で希釈しないで使用した。精製した抗体は5mg/mlの濃度で組織切片に適用した。一次抗体はビオチン化ウサギ抗マウスIgG及びペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン（Zymed Histostain-S Pkit）で検出した。ペルオキシダーゼ染色後、切片をヘマトキシリンで対比染色した。

細菌性 -galは、市販で入手できるキット（例えば、Promege）を製造者の指示に従って使用して基質使用アッセイによっても検出した。

### 7.2. ルシフェラーゼトランスジーン

ルシフェラーゼは市販で入手できるキット（例えば、Promege）を製造者の指示に従って使用して基質使用アッセイで検出した。

### 7.3. PTHトランスジーン

組換えPTH、例えばhPTH1-34ペプチドは骨切断間隙組織のホモジネート中で、例えば、市販で入手できる2つのラジオイムノアッセイキットを製造者のプロトコール（Nichols Institute Diagnostics、カリフォルニア州サンジュアンカピストラノ）に従って使用してアッセイした。

1つのキットは無傷PTH-副甲状腺ホルモン100Tキット（Intact PTH-Parathyroid Hormone 100T Kit）である。このラジオイムノアッセイは無傷ホルモンのカルボキシ末端に対する抗体を使用しており、そしてこれは間隙骨切断組織中のホルモンの内因値を測定するために使用する。このアッセイを使用してラット骨切断モデルの基線値PTH発現を確立することができる。

2番目のキットは、ラットPTHを測定するための2部位免疫放射線測定キットである。このキットは無傷ラットホルモンのアミノ末端（PTH1-34）に特異的な親和性精製抗体を使用しており、そしてその結果内因性PTH産生並びに組換えタンパク質を測定する。以前の研究でこれらの抗体はヒトPTHと交差反応しそしてインビボで組換え分子を認識できることが示されている。

キット番号1（カルボキシ末端に対する抗体）で得られた値をキット番号2（アミノ末端に対する抗体）で得られた値から差し引いて、正確且つ感度の高い測定値を得た。かくして、組換えペプチドの値を新しい骨の形成度と相互に関連させた。

### 7.4. BMPトランスジーン

BMPタンパク質、例えばネズミBMP-4トランスジーンペプチド産物は、HAエピトー

10

20

30

40

50

プ (Majmudar等、1991年、J. Bone and Min. Res. 6:869~881) を認識する特異的な抗体、例えばベーリンガー-マンハイム (Boehringer-Mannheim) から入手できるモノクローナル抗体を使用して免疫組織化学的に検出した。BMPタンパク質自体に対する抗体を使用することもできる。このような抗体は種々のイムノアッセイ方法と一緒に米国特許4,857,456に記載されており、そしてこれは参照して本明細書に組み入れる。

骨切断組織標本はブアン固定液中で固定し、鉍物質を除去し、そしてその後縦軸平面に沿って半分に分けた。各標本の半分は、その後の組換えネズミBMP-4分子の免疫組織化学的同定用にパラフィンに包埋した。

#### 8. 実施例：骨向性遺伝子の導入はインビボにおける骨再生/修復を刺激する

遺伝子導入を使用して、組換えhPTH1-34をインビボで構造的に発現するトランスフェクションされた細胞を創製し得たかどうか、そしてこのトランスジーンが骨形成を刺激し得るかどうかを研究するために、次の実験を設計した。新しい骨の形成速度は次のようにして分析した。剖検で、骨切断部位を組織形態測定分析用に注意深く解剖した。仮骨組織のA-P及びM-L寸法はカリパスを使用して測定する。次いで、標本はブアン固定液に浸漬して固定し、エタノールで洗浄し、そして緩衝化したギ酸中で鉍物質を除去した。試料調製及び切片化中のメタクリレートの寸法安定性が優れているため、脱石灰した材料のプラスチック包埋を使用した。

組織ブロックは、アルコール濃度を高めて脱水しそして包埋した。5mm厚さの切片は、ライチャートポリコット (Reichert Polycot) ミクロトームを使用して冠状面で切断した。切片は試料採取の偏りを抑制するために骨髄腔の幅全体の中ほどから調製した。光学顕微鏡用の切片は、骨、類骨、軟骨及び繊維組織を識別するために修正ゴールドナー (Goldner) のトリクローム染色を使用して染色した。切片は、オイキット (Eukitt) のマウンティングメディウム (Calibrated Instruments、ニューヨーク州アードスレイ) を使用してカバーを素早く移動させた。組織形態測定分析は、ニコンオブチホトリサーチ (Nikon Optiphot Research) 顕微鏡を使用して明視野下で実施した。標準点カウント立体学技術は10mm×10mmの接眼レンズ網状格子を使用した。

総仮骨面積は治癒反応の全体的な強さの指標として125倍の倍率で測定した。骨、軟骨及び繊維組織の面積フラクションは、仮骨形成に対する各組織の相対的寄与を調べるために250倍の倍率で測定した。骨切断間隙の寸法は基線 (時間0) を反映しているため、その後の時間間隔での骨面積の測定を使用して骨充満 (bone infill) 速度を示した。統計的有意性は変動分析を使用して評価し、その後の群間の比較はタキイ (Tukey) のスチューゲント範囲試験を使用して行った。

上記した5mmのラット骨切断モデルで、PTHトランスジーン発現は生存動物の骨再生/修復を刺激し得ることが見い出された。これは、hPTH1-34が連続的に投与されたときとは対照的に断続的に投与されたときに一層強力な同化作用物質であることが知られており、そしてここで使用される遺伝子導入方法で得られるのは連続型の送達であるため、特に重要な所見である。

#### 9. 実施例：インビボで再生中の骨への直接的な遺伝子導入

哺乳類発現プラスミドDNAを含有する遺伝子活性化マトリックスを、成熟雄大腿骨内に創製された大きな分節間隙に移植した。ベータ-ガラクトシダーゼ又はルシフェラーゼプラスミドを含有する遺伝子活性化マトリックスの移植は、上記間隙内に増殖中の修復細胞によるDNA取り込み及び機能酵素発現をもたらした。更に、骨形態形成タンパク質-4プラスミドか又は副甲状腺ホルモンのフラグメント (アミノ酸1~34) をコードするプラスミドのどちらかを含有する遺伝子活性化マトリックスを移植すると、上記間隙に充満している新しい骨の生物学的応答をもたらした。最後に、インビトロで相乗的に作用することが示されている骨形態形成タンパク質-4及び副甲状腺ホルモンフラグメントをコードする2つのプラスミド遺伝子で活性化したマトリックスを移植すると、どちらかの因子単独より急速に新しい骨が形成された。これらの研究は、骨中の修復細胞をインビボで遺伝的に操作できることを初めて示している。本発明の遺伝子活性化マトリックスは修復繊維芽細胞の生物学及び創傷治癒応答を試験する有用なツールとして使用できるが、広範な治

10

20

30

40

50

療的有用性も有している。

## 9.1. 材料及び方法

### 9.1.1. 哺乳類宿主モデル

5 mmの骨切断物を作るために、直径1.2mmの4つのピンを正常な成熟スプラッグ-ドリーラットの大腿骨幹内に全身麻酔下でそして常に洗浄し乍らねじ入れた。外科用型版で平行なピン配置を誘導し、そしてこれはフルオログラフィーで確認した（ピンは固定器具位置の端から3.5mmそして2.5mm離して設置した）。次いで、外部固定器具の位置（30×10×5mm）をピン上に確保した。外部固定器具プレートはCNCミル上にアルミニウム合金で組み立てて高い寛容性を確保した。ロックワッシャーを連結させて予め組み立てた締め具と糸を通したピンはステンレス鋼製であった。固定器具の部品は全て、外科手術前に酸化エチレンガスで滅菌した。5 mmの分節欠損は、ホールマイクロ（Hall Micro）100振動のこぎり（Zimmer Inc.、インディアナ州ワルソー）を用いて骨幹中央に創製した。コラーゲンスポンジは、凝血塊で取り囲まれるまで骨切断間隙内に位置させそして維持した；予備的研究で、この手段によってスポンジは骨切断部位で固定されることが示された。皮膚切開部はステーブルで閉じた。上記固定器具で必要な安定性が提供されたので、哺乳類宿主の移動は数週間制限されなかった。

10

### 9.1.2. 免疫組織化学

光学顕微鏡用に組織を調製し、そして免疫組織化学は記載された（Wong等、1992年、J. Biol. Chem. 267:5592~5598）ようにして実施した。組織学切片は市販で入手できる抗-gal抗体（1：200希釈、5 Prime 3 Prime）及び市販で入手できる抗-HA.11ポ

20

### 9.1.3. ルシフェラーゼ及び-gal酵素アッセイ

ルシフェラーゼ及び-gal活性はルシフェラーゼアッセイ系（Promega）及び-galクトシダーゼ酵素アッセイ系（Promega）を製造者が提供したプロトコールに従って使用して測定した。

### 9.1.4. pGAM1発現プラスミド

pGAM1を組み立てるために、mRNAは、キット試薬及びプロトコール（Poly AT TractmRNA単離系I、Promega）を使用して13.5日のp.c.CD-1マウス胎仔から調製した。mRNAのアリコートを使用し、市販の試薬（逆転写酵素系、Promega）を使用してcDNAを産生させた。全長のマウスBMP-4 cDNAコード化配列は次の条件：94℃、4分、1サイクル；94℃、1分、65℃、1分、72℃、1分、30サイクル；72℃、8分、1サイクルを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で産生させた。PCRプライマーの配列は既知のマウスBMP-4配列（GenBank）：上流プライマー-5'CCATGATTCCTGGTAACCGAATGCTG3'；下流プライマー-5'CTCAGCGGCATCCGCACCCCTC3'に基づいていた。予想された大きさ（1.3Kb）の単一PCR産物をアガロースゲル電気泳動で精製し、そしてTAクローニングベクター（Invitrogen）内にクローン化した。BMP-4挿入物の5'末端は、HAエピトープをコードする27ヌクレオチド配列を添加してさらに修飾し（PCR）、そしてBMP-4挿入物をpcDNA3発現ベクター（Invitrogen）内にクローン化した。プラスミドDNAを調製しそして配列を決定して（両ストランド）、BMP-4挿入物の配向及び完全性を確かめた。

30

40

pGAM1プラスミドはインビトロ転写及び翻訳キット（TNT T7が結合した網状赤血球溶解物系、Promega）を製造者が提供したプロトコールに従って使用して発現させた。タンパク質放射性標識、免疫沈降、試料調製及びSDS-PAGE、オートラジオグラフィ、一時的なトランスフェクション及びウエスタン分析は記載されたようにして実施した（Yin等、1995年、J. Biol. Chem. 270: 10147~10160）。

### 9.1.5. pGAM2発現プラスミド

アミノ酸プレプロール-34をコードしているヒト副甲状腺ホルモンcDNAフラグメントはPCRで産生させた。PCRプライマーの配列は既知のヒトPTH配列（GenBank）：上流プライマー-5'GCGGATCCGCGATGATACCTGC AAAAGAC

50

A T G 3' ; 下流プライマー - 5' G C G G A T C C G C G T C A A A A A T T G T G C A C A T C C 3' に基づいていた。このプライマー対は P C R フラグメントの両末端に B a m H I 部位を創製した。このフラグメントを B a m H I で消化しそして P L J レトロウイルスベクター ( Wilson 等、1992年、Endocrinol.130: 2947 ~ 2954 ) の B a m H I クローニング部位に結合させた。

コード化配向に挿入物を有するクローン ( p G A M 2 ) を最終的に単離しそして D N A 配列分析で特徴を決定した。

レトロウイルスストックを産生させるために、C R I P パッケージング細胞系 ( Wilson, J. M. 等、1992年、Endocrinology130: 2947 ~ 2954 ) を、リン酸カルシウム方法を使用して 10 μg の組換えベクター D N A でトランスフェクションした。一夜インキュベーションした後、レトロウイルス粒子を含有する培養培地 ( 10% ウシ胎児血清、ペニシリン ( 100 単位 / ml ) 及びストレプトマイシン ( 100mg / ml ) ( 試薬は全て Gibco- B R L L i f e Technologies, Inc. から ) を補充した Dulbecco の修正イーグル培地 ) を回収し、そして培養した Rat- 1 細胞に適用した。成功裏に形質導入された Rat- 1 細胞の独立のクローンは、標準的な感染及び選択方法で取得した。簡単に述べると、培養した Rat- 1 細胞は集密になるまで増殖させ、1 : 10 に分割し、そして G 418 ( 1mg / ml, Gibco- B R L L i f e Technologies, Inc. ) 内で選択した。或る場合には、抗生物質耐性コロニーを単一培養物中にプールした。他の場合には耐性細胞の単一コロニーを維持した。同様な方法を使用して、細菌性 b - gal 酵素をコードしている B A G T レトロウイルスで形質導入された R a t - 1 細胞のクローンを産生させた。

細胞培養培地中の h P T H 1 - 34 濃度は、市販のラジオイムノアッセイキット ( I N S - P T H, Nichols ) を使用しそして製造者のプロトコールに従って評価した。p G A M 2 によってコードされるペプチドの生物学的活性は記載された ( McCauley 等、1994年、Mol. Cell. Endocrinol.101: 331 ~ 336 ) ようにして評価した。

#### 9. 1. 6. 遺伝子で活性化したコラーゲンスポンジの調製

各骨切断間隙用に、凍結乾燥ウシ気管コラーゲン ( 10mg, S i g m a ) を、0.5 ~ 1.0mg のプラスミド D N A の滅菌溶液に完全に浸し、そして移植前に 4 時間で 1 ~ 16 時間インキュベートした。

#### 9. 1. 7. ラジオグラフィー

携帯 X 線ユニット ( G E、モデル 100 ) を使用して哺乳類宿主を覚醒させ乍ら、週に 1 回簡易フィルムラジオグラフ ( 後部 - 前部図 ) を得た。暴露は 57kv 及び 15ma で 1 / 10 秒であった。

### 9. 2. 結果

#### 9. 2. 1. 骨切断モデル

我々のモデル系では成熟ラット大腿骨の 5 mm の骨幹中央骨切断術を使用した。骨切断間隙は 4 個のピンの外部固定器具で安定化させた。ラットの骨切断修復は外科手術後 9 週間までに完結するが、修復の様態は間隙の大きさに依存する : 2 mm の間隙は骨癒合で治癒するが、5 mm の間隙は繊維性の非癒合で治癒する ( Rouleau, J. P. 等、Trans. Ortho. Res. Soc. 20: ) 。対照哺乳類宿主を外科手術後 13 週間までの間維持すると、5 mm の間隙が典型的には繊維性の非癒合によって治癒するという観察が確認された。週に 1 回の簡易フィルムラジオグラフィーと組織学 ( 図 1 A ~ D ) によって、5 mm の骨切断単独 ( n = 3 ) 、5 mm の骨切断とコラーゲンスポンジ ( n = 10 ) 又は 5 mm の骨切断とマーカー遺伝子露出プラスミド D N A を含有するコラーゲンスポンジ ( n = 23 ) のいずれかを受けた哺乳類宿主では骨が形成しなかったことが示された。36 の対照間隙は全て繊維組織の沈着によって治癒した。対照大腿骨は巣状骨膜の新骨形成 ( ピン配置の合併症 ) を示した。間隙組織における巣状の一時的な炎症性応答 ( リンパ球及びマクロファージ ) も外科手術後に観察された。

#### 9. 2. 2. マーカー遺伝子試験

予備的な実現可能な試験で、lac Z 及び - gal 発現プラスミド D N A はインピボで首尾良く導入された。この目的は遺伝子活性化マトリックス調製プロトコール及び手術後の時間

経過を標準化することであった。ルシフェラーゼをコードしているGAMを1匹のラットの骨切断間隙に入れ、そして-galをコードしている遺伝子活性化マトリックスを別の動物の間隙に入れた。3週間後、周囲の骨、軟骨及び骨格筋を注意して切除した後に、間隙ホモジネート(肉芽組織を構成する)を調製した。各ホモジネートのアリコートは、基質使用アッセイで酵素発現について評価した。予想された酵素活性が各ホモジネート試料で検出された。条件を変えた(例えば、DNA投与量、タンパク質発現をアッセイする時間)他の実験で陽性の結果が得られた。

### 9.2.3. BMP-4 遺伝子導入

間隙細胞はマトリックスからプラスミドDNAを取り込んだ後に機能酵素を発現することが証明されたので、我々は遺伝子導入を使用して骨再生を調節できるかどうかを求めた。我々はBMP-4、即ち、通常は骨折修復中に前駆細胞によって発現される骨形成誘発因子の過剰発現を選択した。全長マウスBMP-4 cDNAをPCRで産生させ、そしてpcDNA3(Invitrogen)真核生物発現ベクター内にサブクローン化した(図2)。組換えタンパク質を特異的に検出するために、赤血球凝集素(HA)エピトープを添加してBMP-4コード化配列の3'末端を修飾した。組換えBMP-4は、インビトロ転写及び翻訳プロトコルを使用してこの構築物(pGAMI)から発現させた。免疫沈降試験によって、抗-HAポリクローナル抗体がHAエピトープを認識し得ることが確立された。組換えBMP-4の生合成は、pGAMIプラスミドDNAと共に培養した293T細胞の一時的なトランスフェクション後に評価した。免疫沈降で示されるように、BMP-4分子はホモ二量体に組み立てられ、分泌され、そして予想されたように処理された。総合すると、これらの結果によってHA-エピトープが抗-HAポリクローナル抗体で認識されることが確立された。

pGAMIDNAを含有するコラーゲンスポンジを9匹の成熟ラットの間隙内に入れ、4~24週間維持した。外科手術の4週間後に屠殺した1匹の哺乳類宿主で、抗-HA抗体を使用する免疫組織化学試験によって上記間隙内での修復繊維芽細胞によるpGAMI発現が証明された。我々が13匹の対照哺乳類宿主から得られる間隙組織の調査で疑似陽性染色を観察しなかったことを所与のものとするれば、上記のことは有意であった。外科手術の両境界から生じる新しい骨の顕微鏡的巣状物が4週間標本でも観察された。自己誘発による骨形成に関する古典的な記載(Urist, 1965年、Science150: 893~899)と一致して、これらの巣状物は大きい立方形の骨芽細胞が表面についた骨板からなっており、そして多形性の紡錘形繊維芽細胞と毛細血管から構成された細胞結合組織で支持されていた。外科手術5~12週間後に屠殺した7匹の哺乳類宿主では、たとえトランスジーンでコードされるBMP-4が免疫組織化学で検出されなかったとしても、ラジオグラフによる新骨量は着実に増加した(図3A)。骨切断間隙を横切って外科手術境界から伸びる新しい骨として定義される架橋形成は典型的には9週間までに観察された。9番目の哺乳類宿主は外科手術後24週間の間合併症なしに生存した。外部固定器具を除去できるほど十分な新骨が18週間までに形成され、そして哺乳類宿主は更に6週間の間良好に動き回った(図3A)。屠殺時に、間隙は新しい骨で満たされており、間隙の遠位境界近くの放射線透過性組織の薄片を除いて活発に再形成された。哺乳類宿主が固定されないで首尾良く動き回っていたことを所与のものとする、この片は部分的に鉱物質化されていると考えられた。この仮説と一致して、生物力学的試験(Frankenburg等、1994年、Trans. Ortho. Res. Soc. 19:513)によって、治癒した間隙は同じ哺乳類宿主から得られる手術しなかった大腿骨と本質的に同一の機械的強度を有している(6.3%の差異、最大トルク試験)ことが示された。対側性(手術していない)大腿骨のラジオグラフの外観は9つの全ての場合で変化しておらず、遺伝子導入及びBMP-4過剰発現の効果が骨切断間隙に限定されることを示していた。

### 9.2.4. プラスミドカクテル(BMP-4 + PTH1-34)の導入及び発現

骨再生は通常、調節された配列内で作用する多数の因子によって支配されるので、幾つかの同化作用因子の発現によって単一因子単独より強力に骨形成が刺激されるのではないかと我々は考えた。この仮説を評価するために、我々はBMP-4と副甲状腺ホルモン(P

10

20

30

40

50

PTH) のペプチドフラグメントをコードしている 2-プラスミド G A M を送達することを選択した。PTH は血漿及び細胞外流体の  $Ca^{+2}$  濃度を上昇させる 84 アミノ酸のホルモンである。骨格組織では、生物学的活性の構造的要件を有している PTH フラグメント (アミノ酸 1 ~ 34) の断続的投与によって真の同化作用効果がもたらされる: 多数のインビボ及びインビトロ試験は、哺乳類宿主 (ラットを含む) において PTH1-34 を投与すると、破骨細胞に対する阻止効果と骨形成細胞に対する刺激効果の組合せによって高品質の非結合骨形成が生じるという強力な証拠を提供している (Dempster 等、1993年、Endocrin . Rev . 14:690 ~ 709)。PTH1-34 ペプチドは BMP - 4 と相乗的に相互作用することが知られており、そして BMP - 4 は分化中の骨芽細胞における機能細胞表面の PTH レセプターの発現を上方に調節する (Ahrens 等、1993年、J . Bone Min . Res . 12:871 ~ 880)。

10

ヒト PTH1-34 をコードする c D N A フラグメントは P C R で産生させた。その生物学的活性を確立するために、このフラグメントを P L J レトロウイルスベクター内にサブクローン化して (Wilson 等、1992年、Endocrin、130:2947 ~ 2954)、p G A M 2 発現 プラスミドを産生させた (図 4 A)。複製欠如組換えレトロウイルスのストックを調製し、そして培養中の Rat - I 細胞に適用した。形質導入された Rat - I 細胞の独立のクローンが得られ、そしてレトロウイルス D N A の安定した組込み及び発現がサザン及びノーザン分析で証明された。ラジオイムノアッセイを使用して、個々のクローンのならし培地中でヒト PTH1 - 34 の濃度を確立した。R O S 17 / 2.8 細胞は、G タンパク質結合レセプタースーパーファミリーに属する PTH 細胞表面レセプターを有している (Dempster 等、1993年、Endocrin . Rev . 14:690 ~ 709)。安定的に形質導入された細胞系 (ラジオイムノアッセイで > 2 pg / ml を分泌する) から得られるならし培地のアリコートと共に R O S 17 / 2.8 細胞をインキュベーションすると、対照に対して C A M P 応答が 2.7 倍上昇し、これは分泌された PTH1-34 ペプチドが生物学的に活性であることを確立する 1 つの結果であった。

20

次いで、p G A M 2 プラスミド D N A を単独で含有している G A M で刺激され、B M P - 4 と PTH1-34 発現 プラスミド D N A を一緒に含有している骨 G A M を更に 3 匹の哺乳類宿主の骨切断間隙に移植した。3 匹の哺乳類宿主の全てで 4 週間までに架橋形成が観察され (1 匹の哺乳類宿主はこの時点で組織学用に屠殺した)、そして残りの哺乳類宿主では移植後 12 週間までに外部固定器具を除去できるほど十分な新骨が形成していた (図 5)。両哺乳類宿主は、それぞれ移植 15 及び 26 週間後の公表時に良好に動き回っている。簡易フィルムラジオグラフィに基づいて、遺伝子導入及び過剰発現の効果は再度、骨切断間隙に限定されるように思われた。

30

コラーゲンスポンジを使用する試験に続いて、プラスミド D N A は、ポリ乳酸 - ポリグリコール酸粒子のブロックコポリマーの調製物内にカプセル化させた後に持続形態で細胞に送達され得ることも知られている。これらの結果は、ポリ乳酸 - ポリグリコール酸粒子から放出されるプラスミド D N A で培養細胞をトランスフェクションさせ得ることを示している。これらの結果はまた、インビボ修復繊維芽細胞 (ラット骨切断モデル) がポリ乳酸 - ポリグリコール酸粒子のブロックコポリマーから放出されるプラスミド D N A を取り込みそして発現することも示していた。図 7 は、インビボ修復繊維芽細胞 (ラット骨切断モデル) がポリ乳酸 - ポリグリコール酸粒子からの放出後に p G A M 2 プラスミド D N A を取り込みそして発現することを示している。図 7 に示されるように、プラスミドでコードされる PTH1-34 の発現は骨切断間隙における顕著な新骨形成と関係がある。総合すると、これらの試験は、遺伝子活性化マトリックス技術の成功がコラーゲン性マトリックスに依存していないことを示している。それ故、この技術は十分に広範囲であるので、生物学的及び合成マトリックスの両方と組み合わせることができる。

40

#### 10 . 実施例 : 再生しつつある腱および再生しつつある十字靭帯への in vivo における遺伝子の導入

アキレス腱および靭帯 (肩および膝) の修復では、損傷組織の機械的な能力を高めるために、癒痕形成を刺激することが臨床上必要である。アキレス腱に部分的な欠損を作り、新

50

規な生体素材である小腸粘膜下組織またはSISを、腱移植片/分子送達剤として用いるモデル系が開発された。本実施例では、SIS移植片を用いて、マーカー遺伝子構築物を、再生しつつある腱組織内に送達し発現させる能力について説明する。

#### 10.1. 材料および方法

アキレス腱に部分的な欠損を作り、SIS標品を腱移植片/分子送達系として用いた。プラスミド(pSVoga1、プロメガ(Promega))のストック液を、標準的なプロトコール(Sambrook等、1989、Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press)に従って調製した。SIS移植片材料は、成体ブタの空腸の一分節から調製した(Badylak等、1989、J. Surg. Res. 47:74-80)。採取に当たっては、腸間膜組織を除去し、その分節を逆転し、粘膜および表層の粘膜下組織を機械的な搔爬術により除去した。分節を元の向きに戻した後、漿膜および筋肉層をすすぎ、希釈した過酢酸による処理にて滅菌し、使用するまで4週に保存した。

雑種犬(オールスタディーズ(all studies))を麻酔し、挿管し、加温パッドに真横に横臥させ、吸入麻酔を維持した。筋腱接合部から足底の筋膜までの外側切開を用いてアキレス腱を露出させた。2倍の厚さのSISシートで腱の中央部をおおい包み、両端を縫合し、1.5cmの腱の分節を、移植片素材の横向きの開口部から除去し、移植片および手術部位を縫合した。後肢は6週間固定され、その後6週間は自由に使われた。移植片組織は以下に示す時点で採取し、プアン液中に固定し、パラフィンに包埋した。組織切片(8μm)を切り、免疫組織化学に用いた。

#### 10.2. 結果

最初の研究では、SIS素材のみ(SIS単独移植片)を移植し、雑種犬において手術後6ヵ月間については、部分的な欠損の作製に続いてアキレス腱の再生が促進された。このリモデリングプロセスは、肉芽組織の速やかな形成および、最終的な移植片の分解を含んでいた。瘢痕組織は形成されず、免疫媒介性拒絶の証拠は観察されなかった。

第二の研究では、SISはプラスミドDNA溶液に浸し(SIS+プラスミド移植片)、続いてアキレス腱移植片(n=犬2匹)、または十字靭帯移植片(n=犬2匹)として正常な雑種犬に移植した。-ガラクトシダーゼ(-gal)活性を作動させるためのシミアンウイルス40の調節配列を用いたpSVoga1プラスミドが、4/4の宿主哺乳動物において、特異抗体を用いた免疫組織化学により検出可能であった。ネガティブコントロールとしては、これらの宿主哺乳動物の手術していないアキレス腱または十字靭帯では、-gal活性は検出されなかった。従ってSISは腱および靭帯の両者において、新生腱細胞によるプラスミドDNAの取り込みとそれに続く発現を促進したと考えられる。第三の研究は、-gal導入遺伝子の発現の時間経過を測定するために計画された。SIS+プラスミド移植片を、3、6、9、および12週(各時点でn=犬2匹)にわたって移植し、導入遺伝子の発現を免疫組織化学により分析した。プアン固定し、パラフィン包埋した組織の横断切片(8μm)を切り出し、プローブオンプラス(Probeon Pluse)スライド(フィッシャー(Fisher))上にマウントした。免疫組織化学は、ヒストステイン-S P(Histostain-SP)キット(ザイムド(Zymed))を用いたプロトコールに従って行なった。要約すれば、スライドをよくキャラクタライズされた抗-ガラクトシダーゼ抗体(12:00希釈、5'->3')とインキュベートし、PBSで洗浄し、ビオチン

化した第二の抗体とインキュベートし、洗浄し、酵素結合体プラス基質-色素原混合物で染色し、さらにヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色した。細菌の-gal活性が、SIS+プラスミド移植片を受けた腱(8/8宿主哺乳動物)から検出された。厳密に定量的ではないが、導入遺伝子の発現は、9ないし12週にピークが見られた。細菌の-gal遺伝子の発現は、SIS単独移植片を受けた35の宿主哺乳類では検出されなかった。

#### 11. 実施例：再生しつつある骨へのin vivoにおけるアデノウイルス遺伝子の導入

再生しつつある組織内へin vivoで遺伝子導入を行なうためのもう一つの方法は、アデノウイルスを媒介とする導入事象の利用である。ラットの切骨モデルにおいて、骨修復細胞へのマーカー遺伝子構築物の、アデノウイルスによる好結果の遺伝子導入を行なった。

### 11.1. 材料および方法

アデノウイルスベクター pAd. CMVlacZ は、許容細胞内では複製することができる複製欠損アデノウイルスベクターの一例である (Stratford-Perricaudet 等、1992、J. Clin. Invest. 90:626-630)。この特殊なベクターでは、レポーター遺伝子から下流にクローン化された SV40 ポリアデニル化配列と共に lacZ の転写を駆動させるために、サイトメガロウイルス (CMV) の初期のエンハンサー/プロモーターが用いられている (Davidson 等、1993、Nature Genetics 3:219-223)。

pAd.RSV4 は、pAdCMVlacZ と基本的には同じ主鎖を有するが、CMV プロモーターおよび単一の BglII クローニングサイトが、カセット様の様式で、RSV プロモーター、マルチブルクローニングサイト、およびポリ (A<sup>+</sup>) 部位から成る BglII フラグメントに置き換えられている。このベクターのより大きな柔軟性は、hPTH 1-34 cDNA フラグメントのような骨向性遺伝子の、さらに進んだ研究に用いるためのサブクローニングに有用であると考えられている。

ウルトラファイバー™ (Ultra Fiber™) 移植片を AdCMVlacZ ウイルス (10<sup>10</sup> - 10<sup>11</sup> プラーク形成単位または PFU/ml) の溶液中に 6 分間浸し、次に切骨部位に移植した。この欠損を 3 週間に渡って治癒させ、その間の損傷治癒反応の進行を、週一回の放射線検査によって追跡した。三週間までには、欠損の 40% が仮骨組織で満たされていた。この宿主哺乳動物を犠牲にし、組織をブアン固定液にて固定し、標準的なギ酸溶液を用いて 7 日間の鉍物質除去をおこなった。

### 11.2. 結果

得られた結果は、切骨間隙の軟骨細胞様の細胞におけるマーカー遺伝子産物の発現を決定的に証明するものであった (第 6 図)。核を標的とするシグナルは、前骨芽細胞にも見られた。

### 12. 実施例：骨格筋への遺伝子導入

アキレス腱および靭帯 (肩および膝) 以外の柔組織の修復では、損傷組織の機械的な能力を高めるために、癒痕形成を刺激することが臨床上必要である。成体ラットの骨格筋を切開し、PLGA 粒子およびプラスミド DNA を持続的に放出する標品でコートした縫合糸標品を、骨格筋/遺伝子送達デバイスとして用いるモデル系を開発した。本発明のコート組成物ならびに方法の可能性を証明するために、縫合糸をマーカー DNA (ヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼをコードしている) でコートし、ラットの骨格筋組織の縫合に用いた。この実験は、コートした縫合糸で修復した組織において、DNA の好結果の導入および発現を証明した。

### 12.1. 材料および方法

#### 12.1.1. DNA-PLGA コーティング組成物の調製

PLGA/クロロフォルム溶液 (3% (W/V) 50/50 ポリ乳酸ポリグリコール酸 PLGA コポリマー、平均分子量 90,000、インヘレント粘度 1.07) に、ヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼをコードしているマーカー DNA を含んでいる 0.2 mL の溶液 (1 mg DNA、0.5 mM トリス-EDTA、0.5 mM EDTA、pH 7.3) を加えた。この溶液を 2 分間の渦巻き攪拌により乳状化し、マイクロチッププローブ型の超音波処理器を 55 ワットの出力で用いて、約 0 において 30 秒間超音波処理した。この工程は非常に乳状の様相の乳濁液を産生した。

#### 12.1.2. 縫合糸のコーティング

テフロンコートした箔片 (ノートンパフォーマンスプラスチック社 (Norton Performance Plastic Corp.)、オハイオ州、アクロン) に 22 ゲージの針を用いて穴をあけた。この穴に DNA-PLGA 乳濁液を一滴 (約 60 μL) 上置した。この穴を通して 70 cm の長さの 3-0 クロム縫合糸 (エシコン (Ethicon)) を引っ張り、縫合糸をコートした。縫合糸は、穴を通過する際、コーティング組成物の薄い (厚さ約 30 μm) 均一な被覆物でコートされていった。縫合糸を約 3 分間空気乾燥し、このコーティングの工程を、各コートを実行しながら 15 回繰り返した。コートされた縫合糸を電子顕微鏡 (150 倍) で調べ、DNA-PLGA の均一な被覆物でコートされていることを確認した。さ

らに、このコーティングは、縫合糸を何度も組織に通した後でもそのまま残っていた。

### 12.1.3 コートした縫合糸を用いた骨格筋の修復

上記のように調製した縫合糸で、外科的に十分な結果を以って二匹の正常な成体ラットの骨格筋組織を縫合した。縫合糸は良好な束縛性を示した。一週間後、筋肉プラス縫合糸を切開し、液体窒素中で急速冷凍し、粉碎して粉末にした。この粉末を200 $\mu$ Lの溶解緩衝液中にインキュベートし、三回の凍結-解凍サイクルに処して透明にした。この透明な液体を65 $^{\circ}$ Cでインキュベートした後、標準的な方法を用いてアルカリ性ホスファターゼ活性を分析した。

### 12.2. 結果

結果は、コートした縫合糸で縫合し一週間後に回復したラットの骨格筋が、アルカリ性ホスファターゼ活性を示し、マーカーであるアルカリ性ホスファターゼ遺伝子が筋肉組織において発現されていることを示した。対照の回復体は、有意なアルカリ性ホスファターゼ活性を示さなかった。これらのデータは、縫合糸を効果的にコートし、増殖している修復細胞に*in vivo*で遺伝子を送達するために、乳化液を用いることができることを証明する。

10

### 13. 実施例：血管への遺伝子導入

例えば、血管形成術に続く血管修復の間に起きるかもしれないような、過剰の繊維症（再狭窄）を防止することが、临床上必要である。このことは、例えばリシルオキシダーゼインヒビターをコードしている遺伝子の送達によって、あるいはある種のTGF- $\beta$ 類をコードしている遺伝子の導入によって遂行されうる。さらに、例えば組織の低酸素症および細胞死を防止するために新しい血管の形成を刺激することが目的である、というような血管機能不全疾患では、脈管形成を制御することが临床上必要である。ウサギの大血管の修復細胞に、PLGA粒子およびプラスミドDNAを持続して放出する標品を導入するモデル系を開発した。これらのウサギの血管は、临床上のヒトのアテローム動脈硬化症によく似た泡沫細胞の病変を含んでいるため修復細胞が存在する。本実施例は、マーカー遺伝子構築物を大血管の修復細胞に送達し、発現させる能力を証明する。

20

### 13.1. 材料および方法

本研究には、体重3.1ないし3.5kgの雌雄のニュージーランドシロウサギを用いた。筋肉内投与したケタミン(35mg/kg)およびキシラジン(5mg/kg)によりウサギを麻酔し、周辺静脈からのケタミン(8mg/kg)の静脈内投与により維持麻酔を行なった。下行大動脈分岐と鼠径部靭帯との間の両腸骨動脈の約2cmの分節を分離し、近位の方を縛り、この動脈分節のすべての小さい分枝を結紮した。耳の周辺静脈へのヘパリン(100mg)投与により、局所的な血栓を防止した。腸骨動脈切開術により、バルーン血管形成術用カテーテル(2.0mmバルーン)を腸骨動脈分節に導入し、バルーンを8気圧で1分間膨張させた。

30

バルーンの膨張の後、血管形成術用カテーテルを除去し、20mgのヘパリンを動脈内に注入して、遠位の血栓症を防止した。腸骨動脈の両端を1.0の絹糸で縛り、各々の腸骨動脈に、5mg/mlのDNA-ナノ粒子懸濁液を0.5気圧で3分間注入した。創傷を縫合した。バルーン血管形成術およびナノ粒子の送達の2週後にウサギを犠牲にした。下腹部を縦に切開し、両腸骨動脈を単離した。腸骨動脈の2cmの分節を両側で切除した。ウサギの頸動脈を対照標本として採取した。アルカリ性ホスファターゼ分析用に、組織を液体窒素中に保存した。

40

### 13.2. 結果

ホスファターゼ発現の分析結果は、ナノ粒子プラスDNA調合物が、バルーンカテーテルで傷害を与えた成体ウサギの腸骨動脈において、修復細胞に核酸を送達することができることを示した。ナノ粒子プラスDNA調合物に暴露した後の腸骨動脈は、左右共にホスファターゼ活性が陽性であった。対照の大動脈にはホスファターゼ活性が検出されなかった。これらの陽性の結果は、大血管の修復細胞を遺伝子活性化マトリックスに暴露すると、核酸分子を取り込み、発現することができることを示している。

例示した態様は本発明の一つの局面を説明することを意図したものであって、本発明の範

50

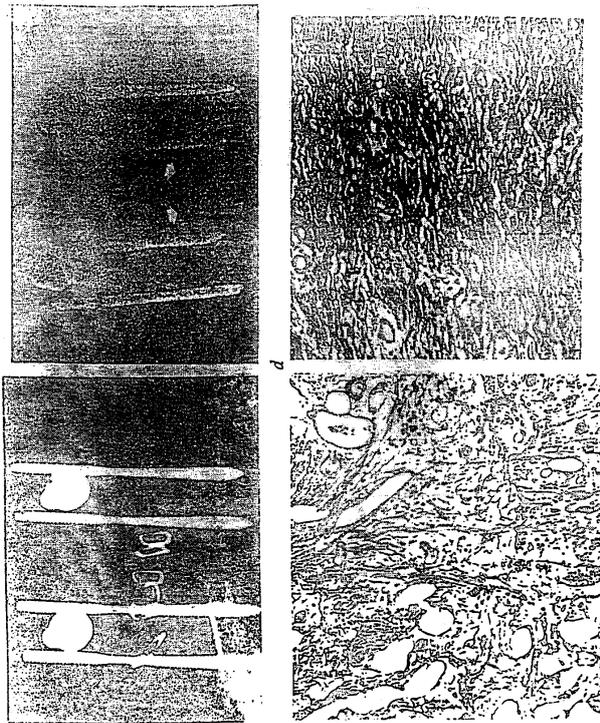
囲はこれらに制限されず、機能的に同等であるいかなるクローン、DNAまたはアミノ酸配列も本発明の範囲内にある。実際、これらに加えて本発明の種々の変更も先の記述および添付の図面から当業者には明らかであろう。

かかる変更は、添付された請求の範囲内に入るものである。

また、ヌクレオチドに与えた塩基対の大きさはすべて概算であり、説明のために使用されていることを理解されたい。

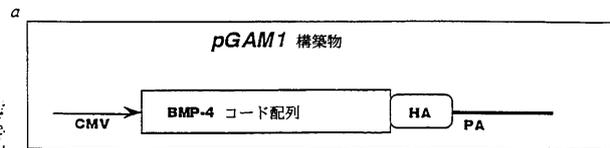
【図1A-D】

FIGURE 1A-D



【図2】

FIGURE 2



【図 3 A】

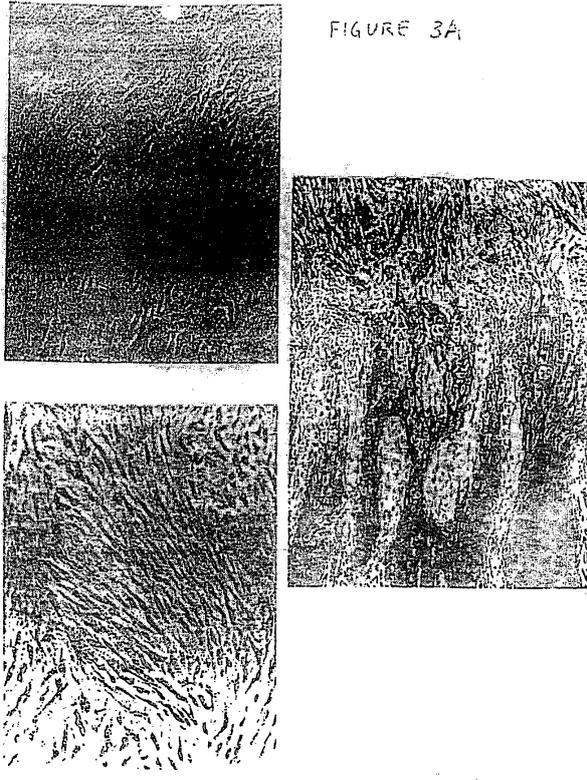


FIGURE 3A

【図 3 B】

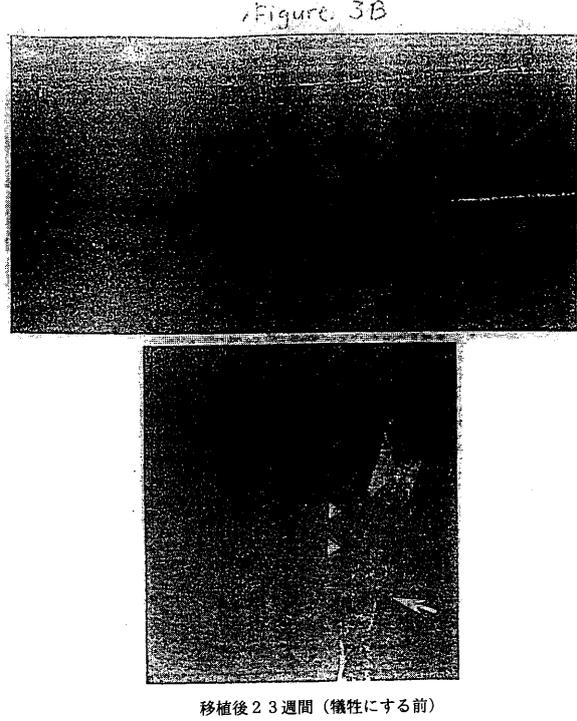
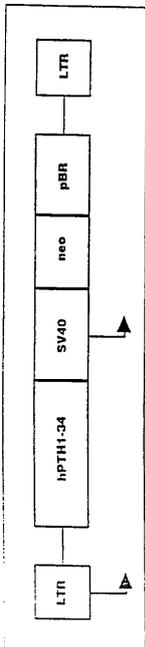


Figure 3B

移植後23週間（犠牲にする前）

【図 4 A - B】

FIGURE 4 A-B



b

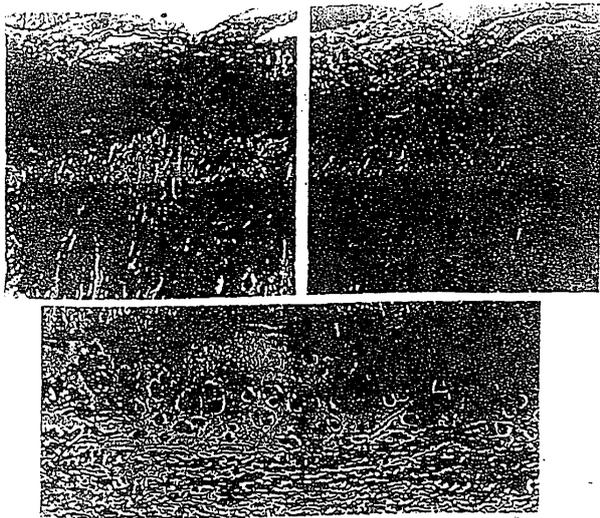
【図 5】

FIGURE 5



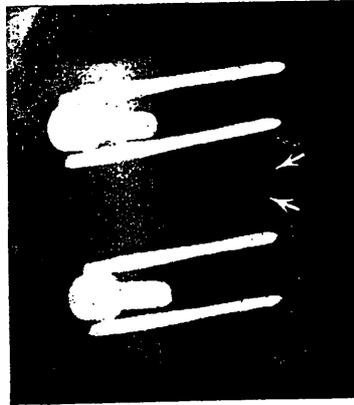
【図6】

FIGURE 6



【図7】

FIGURE 7



6 週間

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 L 27/00 (2006.01) A 6 1 L 27/00 Z  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 1

(72)発明者 ゴールドSTEIN, スティーブン, エー.  
 アメリカ合衆国 4 8 1 0 5 ミシガン州, アナーバー, グリーン ロード 6 0 8

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 国際公開第95/022611(WO, A1)  
 特表平09-509825(JP, A)  
 特表平05-505169(JP, A)  
 特表平04-502027(JP, A)  
 特表平03-500655(JP, A)  
 国際公開第93/021969(WO, A1)  
 国際公開第94/001139(WO, A1)  
 欧州特許出願公開第00248531(EP, A1)  
 Fujisato T. et al., Biomaterials (Jan 1996), Vol.17, p.155-162  
 FUJISATO, T. et al, New cartilage formation in vivo using chondrocytes seeded on poly(L-lactide), Macromolecular Symposia, 1996, Vol.103(Polymers and Medicine), p.73-83

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 48/00  
 A61K 38/04  
 A61K 38/27  
 A61K 47/02  
 A61K 47/42  
 A61L 27/00  
 A61P 43/00  
 BIOSIS(STN)  
 Cplus(STN)  
 MEDLINE(STN)