

(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2016-508129

(P2016-508129A)

(43) 公表日 平成28年3月17日 (2016.3.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18 Z N A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-548590 (P2015-548590)	(71) 出願人	515168709
(86) (22) 出願日	平成25年12月19日 (2013.12.19)		セリャド エス. アー.
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月11日 (2015.8.11)		ベルギー王国 ビー-1 4 3 5 モン-サ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/077476		ン-ギベール, リュ エドゥアール プラ
(87) 国際公開番号	W02014/096248		ン 1 2, アクシス ビジネス パーク
(87) 国際公開日	平成26年6月26日 (2014.6.26)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	1223058.7		弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成24年12月20日 (2012.12.20)	(74) 代理人	100105991
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 田中 玲子
		(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子
		(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健
		(74) 代理人	100149076
			弁理士 梅田 慎介
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 バイオマーカー方法および組成物

(57) 【要約】

MADS ボックス転写増強因子2、ポリペプチドCとしても知られるMEF2C（筋細胞特異的増強因子2C）に選択的に結合する抗体が提供される。MEF2Cは、幹細胞から分化されて方向付けられた細胞において発現される数種のバイオマーカーの1つである。MEF2Cは、タンパク質のMEF2ファミリーにおける転写因子であり、心臓形態形成、筋形成および血管の発達において役割を果たす。該抗体を産生するハイブリドーマならびに診断および治療目的で該抗体を使用するための使用方法およびキットも提供される。

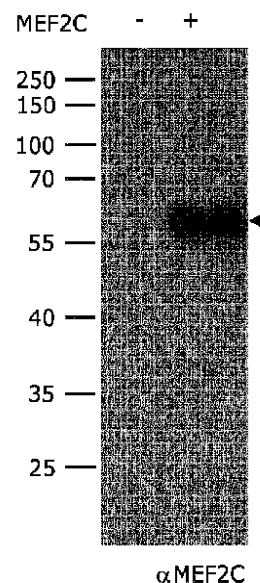


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する、単離された抗体またはその断片。

【請求項 2】

M E F 2 C が、ヒト M E F 2 C である、請求項 1 に記載の単離された抗体またはその断片。

【請求項 3】

エピトープが、配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 2 に記載の単離された抗体またはその断片。

【請求項 4】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその断片。

【請求項 5】

抗体が、抗抗イディオタイプ抗体である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその断片。

【請求項 6】

モノクローナル抗体が、マウスモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体およびラットモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその断片。

【請求項 7】

抗体が、単一ドメイン抗体である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその断片。

【請求項 8】

断片が、s c F v 断片、s c F v₂断片、F v 断片、F a b 断片、F a b ' 断片または F (a b ')₂断片である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその断片。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の抗体を産生する、ベルギー微生物保存機関 (B C C M) に受託番号 L M B P 9 9 4 9 C B で寄託された、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項 10】

ベルギー微生物保存機関 (B C C M) に受託番号 L M B P 9 9 4 9 C B で寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生される、モノクローナル抗体またはその断片。

【請求項 11】

配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列からなる M E F 2 C エピトープに特異的に結合するための、B C C M に受託番号 L M B P 9 9 4 9 C B で寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体またはその断片と競合することができる、モノクローナル抗体またはその断片。

【請求項 12】

重鎖が配列番号 13 ～ 15 の少なくとも 1 以上から選択される相補性決定領域 (C D R) を含んでなり、かつ、軽鎖が配列番号 16 ～ 18 の少なくとも 1 以上から選択される C D R を含んでなる、請求項 11 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 8 および 10 ～ 12 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその断片をコードする、単離された核酸。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 8 および 10 ～ 12 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその断片の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (C D R) をコードする、単離された核酸。

【請求項 15】

プロモーターに作動可能に連結された、請求項 13 または 14 に記載の単離された核酸

10

20

30

40

50

。

【請求項 16】

請求項 13～15 に記載の核酸を含んでなる、単離された発現ベクター。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の発現ベクターで形質転換された、単離された宿主細胞。

【請求項 18】

請求項 1～8、11 および 12 のいずれか一項に記載の単離された抗体の製造における、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープの使用。

【請求項 19】

ペプチドディスプレイライブラリーのスクリーニングを目的とする、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープの使用。

【請求項 20】

ペプチドディスプレイライブラリーが、ヒトコンビナトリアル抗体ライブラリー（H u C A L（商標））である、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

請求項 1～8 および 10～12 のいずれか一項に記載の抗体と担体とを含んでなる、組成物。

【請求項 22】

心血管系統へ方向付けられた細胞を検出する方法であって、

細胞を含んでなる生体試料と、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を検出すること

を含んでなり、免疫複合体の存在が、心血管系統へ方向付けられた細胞の存在を示す、方法。

【請求項 23】

細胞内の免疫複合体の局在を可視化する工程をさらに含んでなる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

可視化工程が、光学顕微鏡法、U V 顕微鏡法および共焦点顕微鏡法からなる群から選択される技術を用いて行われる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

細胞の心血管系統への方向付けを定量化する方法であって、

細胞を含んでなる生体試料と、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を定量化すること

を含んでなり、免疫複合体の存在が、細胞の心血管系統への方向付けの定量化を示す、方法。

【請求項 26】

生体試料が、ヒトから得られる、請求項 22～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

生体試料を、抗体またはその断片と特異的に結合する第二の抗体と接触させることをさらに含んでなる、請求項 22～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

第二の抗体が、検出剤に結合される、請求項 27 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

検出剤が、酵素、蛍光標識、発光標識、放射性標識または発色標識から選択される群の1つ以上を含んでなる、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

神経系統へ方向付けられた細胞を検出する方法であって、

細胞を含んでなる生体試料と、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を検出すること

を含んでなり、免疫複合体の存在が、神経系統へ方向付けられた細胞の存在を示す、方法。

10

【請求項 31】

細胞内の免疫複合体の局在を可視化する工程をさらに含んでなる、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

可視化工程が、光学顕微鏡法、UV 顕微鏡法および共焦点顕微鏡法からなる群から選択される技術を用いて行われる、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

細胞の神経系統への方向付けを定量化する方法であって、

細胞を含んでなる生体試料と、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を定量化すること

を含んでなり、免疫複合体の存在が、細胞の神経系統への方向付けの量を示す、方法。

20

【請求項 34】

神経系統へ方向付けられた細胞を検出するための、請求項 30～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

心血管系統へ方向付けられた細胞を同定するためのキットであって、

(i) 配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片；または

(i i) 配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列からなる M E F 2 C エピトープに特異的に結合するための、B C C M に受託番号 L M B P 9 9 4 9 C B で寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体またはその断片と競合することができる、モノクローナル抗体またはその断片の少なくとも 1 つ；および

該キットを使用するための指示書

を含んでなる、キット。

30

40

【請求項 36】

神経系統へ方向付けられた細胞を同定するためのキットであって、

(i) 配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片；または

(i i) 配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列からなる M E F 2 C エピトープに特異的に結合するための、B C C M に受託番号 L M B P 9 9 4 9 C B で寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体またはその断片と競合することができる、モノクローナル抗体またはその断片の少なくとも 1 つ；および

該キットを使用するための指示書

50

を含んでなる、キット。

【請求項 37】

心臓障害を有する個人を処置する方法であって、
個人から細胞および／または幹細胞を得ること；
該細胞および／または幹細胞を心血管系統に分化させること；
配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片を用いて、該細胞および／または幹細胞が心血管系統へ方向付けられた細胞になったか否かを検出すること；
心血管系統へ方向付けられた細胞を単離すること；および
心血管系統へ方向付けられた細胞をそれを必要とする個人に投与すること
を含んでなる、方法。

10

【請求項 38】

神経変性障害を有する個人を処置する方法であって、
個人から細胞および／または幹細胞を得ること；
該細胞および／または幹細胞を神経系統に分化させること；
配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片を用いて、該細胞および／または幹細胞が神経系統へ方向付けられた細胞になったか否かを検出すること；
神経系統へ方向付けられた細胞を単離すること；および
神経系統へ方向付けられた細胞をそれを必要とする個人に投与すること
を含んでなる、方法。

20

【請求項 39】

心疾患を処置する方法に使用するための、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片。

【請求項 40】

心疾患を処置する方法に使用するための、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列からなる M E F 2 C エピトープに特異的に結合するための、B C C M に受託番号 L M B P 9 9 4 9 C B で寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体またはその断片と競合することができる、モノクローナル抗体またはその断片。

30

【請求項 41】

重鎖が配列番号 13～15 の少なくとも 1 以上から選択される相補性決定領域（C D R）を含んでなり、かつ、軽鎖が配列番号 16～18 の少なくとも 1 以上から選択される C D R を含んでなる、請求項 40 に記載のモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオマーカーを同定するための、詳細には、分化のバイオマーカーを同定するための、とりわけ、幹細胞の分化により得られる心血管または神経系統へ方向付けられた細胞を追跡するための方法および組成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

心血管疾患は、世界中で死亡の主要原因となっており、高い修復能を有する組織とは対照的に、心臓組織は、非修復性の損傷を受けやすい。したがって、心疾患障害に対処するため、細胞ベースの心血管再生医療が求められている。未熟な状態で送達された成体幹細胞は、心疾患障害を有する患者において限られた効果しか示さず、よって、心臓の再生を助けるために、未熟ヒト幹細胞を患者に注入する前に心臓系統に導く療法が開発中である。

。

【0003】

50

心血管系統へ方向付けられた細胞 (Cardiovascular lineage committed cells) は、未熟な幹細胞が心臓系統へ方向付けられた細胞に分化されたことを同定するのに用いることができる数種のバイオマーカーを発現する。そのようなバイオマーカーの1つが、心臓の形態形成、筋形成および血管発生において重要な役割を果たすMEF2ファミリーの転写因子であるMEF2C (筋細胞特異的増強因子2C; Myocyte-specific enhancer factor 2C) である。MEF2Cは、神経発生および脳の発達においても重要な因子であることが知られている。

【0004】

MEF2Cを検出するための抗体は市販されているが欠点がある。例えば、ウサギにMEF2Cの全長タンパク質または主要タンパク質部分を免疫することで得られたウサギポリクローナル抗体が知られている。しかしながら、これらのポリクローナル抗体は、全長タンパク質またはタンパク質の部分を免疫に用いることから、MEF2CのみならずMEF2ファミリーの他のメンバーに対しても選択的であり得、よって選択性が低い。さらに、ポリクローナル抗体は、バッチ間変動を受ける、すなわち、選択性または特異性の一定のレベルの保証がないため、バイオマーカーを正確に検出することに適していないといえる。

【0005】

マウスにMEF2Cの全長タンパク質またはタンパク質部分を免疫することで作成されたマウスモノクローナル抗体も市販されている。しかしながら、これらのモノクローナル抗体も、全長タンパク質またはタンパク質の部分を免疫に用いることから、MEF2CのみならずMEF2ファミリーの他のメンバーに対しても選択的であり得、よって選択性が低い。

【0006】

したがって、MEF2Cを発現する系統へ方向付けられた細胞の正確な検出を可能にする、感度および特異性が高い検出方法および組成物、詳細には、特異性および感度が高い抗体が大いに求められている。

【発明の概要】

【0007】

第一の面において、本発明は、配列番号3および配列番号4の少なくとも1つから選択されるアミノ酸配列を含んでなるMEF2Cエピトープに選択的に結合する単離された抗体またはその断片にある。単離された抗体またはその断片は、適切には、ヒトMEF2Cである。本発明の態様によれば、抗体またはその断片は配列番号2のアミノ酸配列を含んでなる。本発明の態様によれば、抗体はモノクローナル抗体である。場合により、抗体は抗抗イディオタイプ抗体である。

【0008】

本発明のさらなる態様によれば、モノクローナル抗体は、マウスモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体およびラットモノクローナル抗体からなる群から選択されてよい。場合により、単離された抗体またはその断片は単一ドメイン抗体である。

【0009】

本発明の別の態様において、断片は、scFv断片、scFv₂断片、Fv断片、Fab断片、Fab'断片またはF(ab')₂断片から選択されてよい。

【0010】

本発明の第二の面によれば、本明細書に記載の抗体を産生する、ベルギー微生物保存機関 (Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms, BCCM) に受託番号LMBP9949CBで寄託されたハイブリドーマ細胞株が提供される。本発明の1つの態様によれば、上述の寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体またはその断片が提供される。

【0011】

本発明の第三の面によれば、MEF2Cエピトープに特異的に結合するための、BCC

10

20

30

40

50

Mに受託番号LMBP9949CBで寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体またはその断片と競合することができるモノクローナル抗体またはその断片が提供される。適切には、エピトープは配列番号3および配列番号4の少なくとも1つから選択されるアミノ酸配列からなる。本発明の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号13～15の少なくとも1以上から選択される相補性決定領域(CDR)を含んでなる重鎖と、配列番号16～18の少なくとも1以上から選択されるCDRを含んでなる軽鎖とを含んでなる。

【0012】

本発明の第四の面によれば、本明細書に記載されるような単離された抗体またはその断片をコードする核酸配列が提供される。適切には、核酸配列はcDNA配列を含んでなる。

10

【0013】

本発明の第五の面によれば、本明細書に記載されるような単離された抗体またはその断片の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)をコードする核酸配列が提供される。

【0014】

本発明の第六の面によれば、プロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載されるような核酸が提供される。第七の面によれば、本発明の上述の核酸のいずれかを含んでなる単離された発現ベクターが提供される。本発明の第八の面によれば、本明細書に記載される発現ベクターで形質転換された単離された宿主細胞が提供される。

【0015】

本発明の第九の面によれば、抗体の製造における、配列番号3および配列番号4の少なくとも1つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる(あるいは、から実質的になる)MEF2Cエピトープの使用が提供される。本発明の第十の面によれば、ペプチドディスプレイライブラリーのスクリーニングを目的とする、配列番号3および配列番号4の少なくとも1つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる(あるいは、から実質的になる)MEF2Cエピトープの使用が提供される。本発明の特定の態様において、ペプチドディスプレイライブラリーはヒトコンビナトリアル抗体ライブラリー(HuCAL(商標))である。

20

【0016】

本発明の第十一の面によれば、本明細書に記載されるような任意の面による抗体またはその断片と担体とを含んでなる組成物が提供される。担体は、適切には、溶媒、緩衝液または保存溶液を含んでもよい。

30

【0017】

本発明の第十二の面によれば、心血管系統へ方向付けられた細胞を検出する方法であって、

細胞を含んでなる生体試料と、配列番号3および配列番号4の少なくとも1つから選択されるアミノ酸配列を含んでなるMEF2Cエピトープに選択的に結合する抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を検出すること

40

を含んでなり、免疫複合体の存在が心血管系統へ方向付けられた細胞の存在を示す方法が提供される。

【0018】

本発明の特定の態様において、開示された任意のおよびすべての方法は、細胞内の免疫複合体の局在を可視化する工程をさらに含んでよい。場合により、可視化工程は、光学顕微鏡法、UV顕微鏡法および共焦点顕微鏡法からなる群から選択される技術を用いて行われる。

【0019】

本発明の第十三の面によれば、細胞の心血管系統への方向付けを定量化する方法であって、

50

細胞を含んでなる生体試料と、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を定量化すること

を含んでなり、免疫複合体の存在が、細胞の心血管系統への方向付けの定量化を示す方法が提供される。

【0020】

適切には、生体試料はヒトから得ることができる。

【0021】

本発明の特定の態様において、該方法は、生体試料を、前記抗体またはその断片と特異的に結合する第二の抗体と接触させることをさらに含んでなる。場合により、第二の抗体は検出剤に結合される。典型的には、検出剤は、酵素、蛍光標識、発光標識、放射性標識または発色標識から選択される群の 1 つ以上を含んでなる。

【0022】

本発明の第十四の面によれば、神経系統へ方向付けられた細胞を検出する方法であって、

細胞を含んでなる生体試料と、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を検出すること

を含んでなり、免疫複合体の存在が、神経系統へ方向付けられた細胞の存在を示す方法が提供される。

【0023】

本発明の第十五の面によれば、細胞の神経系統への方向付けを定量化する方法であって、

細胞を含んでなる生体試料と、配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を定量化すること

を含んでなり、免疫複合体の存在が、細胞の神経系統への方向付けの量を示す方法が提供される。

【0024】

本発明の態様において、該方法は、神経系統へ方向付けられた細胞を検出するための方法である。

【0025】

本発明の第十六および第十七の面によれば、それぞれ、心血管または神経系統へ方向付けられた細胞を同定するためのキットであって、

配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる M E F 2 C エピトープに選択的に結合する抗体またはその断片；または

配列番号 3 および配列番号 4 の少なくとも 1 つから選択されるアミノ酸配列からなる M E F 2 C エピトープに特異的に結合するための、B C C M に受託番号 L M B P 9 9 4 9 C B で寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体またはその断片と競合することができる、モノクローナル抗体またはその断片の少なくとも 1 つ；および

該キットを使用するための指示書

を含んでなるキットが提供される。

【0026】

本発明の第十八の面によれば、心臓障害を有する個人を処置する方法であって、
個人から細胞および／または幹細胞を得ること；

該細胞および／または幹細胞を心血管系統に分化させること；

配列番号3および配列番号4の少なくとも1つから選択されるアミノ酸配列を含んでなるMEF2Cエпитープに選択的に結合する抗体またはその断片を用いて、該細胞および／または幹細胞が心血管系統へ方向付けられた細胞になったか否かを検出すること；

心血管系統へ方向付けられた細胞を単離すること；および

心血管系統へ方向付けられた細胞をそれを必要とする個人に投与すること
を含んでなる方法が提供される。

【0027】

10

本発明の第十九の面によれば、神経変性障害を有する個人を処置する方法であって、
個人から細胞および／または幹細胞を得ること；

該細胞および／または幹細胞を神経系統に分化させること；

配列番号3および配列番号4の少なくとも1つから選択されるアミノ酸配列を含んでなるMEF2Cエピトープに選択的に結合する抗体またはその断片を用いて、該細胞および／または幹細胞が神経系統へ方向付けられた細胞になったか否かを検出すること；

神経系統へ方向付けられた細胞を単離すること；および

神経系統へ方向付けられた細胞をそれを必要とする個人に投与すること
を含んでなる方法が提供される。

【0028】

20

本発明の第二十の面によれば、心疾患を処置する方法に使用するための、配列番号3および配列番号4の少なくとも1つから選択されるアミノ酸配列を含んでなるMEF2Cエピトープに選択的に結合する抗体またはその断片が提供される。

【0029】

本発明の第二十一の面によれば、心疾患を処置する方法に使用するための、配列番号3および配列番号4の少なくとも1つから選択されるアミノ酸配列からなるMEF2Cエピトープに特異的に結合するための、BCCMに受託番号LMBP9949CBで寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体またはその断片と競合することができるモノクローナル抗体またはその断片が提供される。適切には、モノクローナル抗体は、配列番号13～15の少なくとも1以上から選択される相補性決定領域(CDR)を含んでなる重鎖と、配列番号16～18の少なくとも1以上から選択されるCDRを含んでなる軽鎖とを含んでよい。

30

【0030】

これらの方法は、細胞療法における使用のために、心血管系統へ方向付けられた細胞の検出および単離を促進するための抗体の使用を含んでもよい。

【0031】

適切な場合には上記の本発明の態様および面のいずれかを組み合わせても用いることにも向けられる。

【図面の簡単な説明】

【0032】

40

【図1】図1は、空のベクター(－)およびMEF2Cコーディングベクター(＋)をトランスフェクトした細胞についてのウェスタンブロット法を用いる免疫検出の結果を示す。本発明の抗MEF2Cモノクローナル抗体(αMEF2C)は、MEF2Cトランスフェクト細胞(＋)における60kDa付近の特異的なバンド(これはMEF2Cに対応する)を認識する。

【図2】図2の左のパネルは、トランスフェクトHeLa細胞におけるMEF2C免疫染色の結果を示す。図2の右のパネルは、非トランスフェクト(＋)およびMEF2Cトランスフェクト(×)HeLa細胞におけるMEF2CおよびFlag染色の分布を示す。グラフの右上象限における黄色のバツ印(×)は二重陽性核、すなわちMEF2CおよびFlagの双方について染色強度を示す細胞を表す。

50

【図3】図3は、骨髓間葉系幹細胞（左の写真）の、同じ骨髓起源由来の心血管系統へ方向付けられた細胞（右の写真）と比較した免疫蛍光を示す。

【図4】図4は、骨髓間葉系幹細胞の核および心血管系統へ方向付けられた細胞の核の平均核強度を表す。

【図5】図5は、蛍光強度の間隔の単位が7.5である細胞集団比率に対する核蛍光強度のヒストグラムである。骨髓間葉系細胞は灰色の前列のバーにより表され、心臓系統へ方向付けられた細胞は赤の後列のバーにより表される。

【図6】図6は、本発明によるハイブリドーマにより産生される抗MEF2C抗体のコンセンサス配列を示す。

【図7】図7は、アラニンスキャニングエピトープマッピング研究において抗MEF2C結合についてのMEF2Cエピトープ内の残基の相対的重要性を示す、450nmで測定された吸光度のヒストグラムを示す。野生型ペプチドの異なる単一点変異および抗MEF2C mAb（濃い灰色のバー）または抗GST mAb（薄い灰色のバー）。野生型ペプチドは抗MEF2C mAb媒介検出に対する陽性対照として、GSTペプチドは抗GST mAb媒介検出に対する陽性対象として使用した。

【図8】図8は、アラニンスキャニングエピトープマッピング研究における抗MEF2Cモノクローナル抗体の結合の相対的定量化を測定するヒストグラムを示す。

【発明の具体的説明】

【0033】

断りのない限り、本発明の実施には、当業者の能力の範囲内の化学、分子生物学、微生物学、組換えDNAテクノロジー、化学的方法、医薬処方および送達ならびに患者の処置についての従来技術を採用する。このような技術は文献、例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridisation: Principles and Practice*, Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; および D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press においても説明されている。これらの一般的記載はそれぞれ参照することで本明細書に組み込まれる。

【0034】

本発明を説明する前に、本発明の理解を助けるであろういくつかの定義を提供する。

【0035】

本明細書において用いられる「含んでなる」との用語は、記載された要素のいずれかを必ず含むが、他の要素も含んでよいことを意味する。「から本質的になる」とは、記載された任意の要素を必ず含むが、挙げられた要素の基本かつ新規の特徴に実質的に影響を与える要素は排除され、その他の要素は含んでもよいことを意味する。「からなる」とは、挙げられた要素以外のすべての要素が排除されることを意味する。これらの用語でそれぞれ定義される態様は本発明の範囲内である。

【0036】

本明細書で用いられる用語「アミノ酸」は、天然型のL- α -アミノ酸または残基を含む。天然型のアミノ酸に対して一般的に用いられる1文字または3文字の略号を本明細書で使用する：A=Ala；C=Cys；D=Asp；E=Glu；F=Phe；G=Gly；H=His；I=Ile；K=Lys；L=Leu；M=Met；N=Asn；P=Pro；Q=Gln；R=Arg；S=Ser；T=Thr；V=Val；W=Trp；およびY=Tyr（Lehninger, A. L., (1975) Biochemistry, 2d ed., pp. 71-92, Worth Publishers, New York）。一般の用語「アミノ酸」は、D-アミノ酸、レトロ？インベルソアミノ酸のみならず、アミノ酸類似体等の化学的に改変されたアミノ酸、ノルロイシン等のタンパク質には通常組み込まれない天然型のアミノ酸および β -アミノ酸等のアミノ酸の特徴として当技術分野において知られている特性を有する化学的に合成された化合物をさらに含む。例えば、フェニルアラニンまたはプロリンの類似体または模倣体であって、天然のPheまたはProが許すのと同様のペプチド化合物の立体構造の制限を許すものがアミノ酸の定義に含まれる。このような類似体または模倣体は、本明細書では各アミノ酸の「機能的同等物」と呼ばれる。アミノ酸の他の例としては、参照することで本明細書に組み込まれるRoberts and Vellaccio, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Gross and Meierhofer, eds., Vol. 5, p. 341, Academic Press, Inc., N. Y. 1983に挙げられる。

10

20

【0037】

用語「増幅」は、サンプル中の核酸分子のコピー数を増加させる技術の使用、例えば、本発明の抗体またはその断片をコードする核酸の増幅を意味する。増幅の例としては、対象から採集した生体サンプルとオリゴヌクレオチドプライマーペアとを、サンプル中の核酸鋳型へのプライマーのハイブリダイゼーションを許す条件下で接触させるポリメラーゼ連鎖反応である。プライマーは適切な条件下で伸長し、鋳型から解離し、その後再アニールし、伸長し、解離し、核酸のコピー数を増幅する。増幅産物は電気泳動、制限エンドヌクレアーゼ切断パターン、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションもしくはライゲーションおよび／または標準的技術を使用する核酸配列決定により特徴付けてもよい。

【0038】

用語「抗体」は、抗原またはその断片のエピトープを特異的に認識し、これに結合する軽鎖または重鎖の免疫グロブリン可変領域を少なくとも含んでなるポリペプチドリガンドを意味する。抗体は、可変重鎖（ V_H ）領域および可変軽鎖（ V_L ）領域と名付けられた可変領域をそれぞれ有する重鎖および軽鎖から構成される。 V_H 領域および V_L 領域は共に抗体により認識される抗原の結合に関与している。これは完全な免疫グロブリンならびにFab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fv断片、単鎖Fvタンパク質（「scFv」）、scFv₂断片およびジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）等の当技術分野においてよく知られるそれらのバリエーションおよび部分を含む。scFvタンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域と免疫グロブリンの重鎖可変領域とがリンカーにより結合される融合タンパク質であるが、dsFvでは、両鎖の会合を安定化するために両鎖にジスルフィド結合を導入するための変異導入がなされている。この用語はまた、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲート抗体（二重特異性抗体等）、抗抗イディオタイプ抗体ならびにナノボディを含む単一ドメイン抗体、または一次、二次、三次または四次構造に基づいて遺伝子的にないしin silicoで操作された構築物も含む。Pierce Catalogue and Handbook, 1994-1995（Pierce Chemical Co., Rockford, IL）；Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。典型的には、天然起源の免疫グロブリンは、ジスルフィド結合により相互接続された重（H）鎖および軽（L）鎖を有する。ラムダ（ λ ）およびカッパ（ κ ）の2種の軽鎖が存在する。抗体分子の機能活性を決定

30

40

50

する5つの主要重鎖クラス（またはアイソタイプ）：IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEが存在する。各重鎖および軽鎖は定常領域および可変領域（これらの領域は「ドメイン」としても知られる）を含有する。組み合わせると重鎖および軽鎖可変領域は抗原に特異的に結合する。軽鎖および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる3つの超可変領域で遮られる「フレームワーク」領域を含有する。種々の軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は相対的に種内で保存されている。構成軽鎖および重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、3次元空間においてCDRを位置付け、整列させるのに役立つ。CDRは第一に抗原のエピトープへの結合に関与している。各鎖のCDRは、典型的にはN末端から順に番号が付けられ、CDR1、CDR2およびCDR3と呼ばれ、また、典型的には特定のCDRが位置する鎖により同定される。目的の抗原に結合する抗体は特異的なV_H領域およびV_L領域配列、それゆえ特異的なCDR配列を有する。異なる特異性を有する抗体（異なる抗原についての異なる結合部位による）は異なるCDRを有する。CDRは抗体によって異なるが、CDR内の限られた数のアミノ酸位置のみが抗原結合に直接関与する。CDR内のこれらの位置は特異性決定残基（SDR）と呼ばれる。用語「抗体」は、特異的な結合について無傷抗体と競合する少なくとも1つの所望のエピトープに対する特異性を有する抗体の任意の部分（例えば、エピトープに特異的に結合するために十分なCDR配列を有し、かつ、十分なフレームワーク配列を有する断片）も含む。例として、抗原結合断片は、断片が由来する抗体と結合するエピトープへの結合について競合することができる。

10

【0039】

20

所定のエピトープに対する抗体の特異性は競合アッセイにより決定することができる（例えば、Stahli C, Miggiano V, Stocker J, Staehelin T, Haring P, Takacs B (1983) Methods Enzymol; 92: 242-53を参照）。

【0040】

用語「モノクローナル抗体」はハイブリドーマ細胞の単一クローンまたは単一抗体の軽鎖および重鎖遺伝子がトランスフェクトされた細胞もしくはその後代により産生される抗体を意味する。モノクローナル抗体は当業者に知られた方法、例えば、骨髄腫細胞と免疫脾臓細胞との融合からハイブリッド抗体形成細胞（ハイブリドーマ細胞）を作製することにより産生される。

30

【0041】

用語「キメラ抗体」は、ある種（例えばヒト）由来のフレームワーク残基と別の種由来のCDRまたはSDR（一般的に抗原結合を付与する）を有する抗体を意味する。最も典型的には、キメラ抗体は、ヒトおよびマウス抗体ドメイン、一般的には、ヒト定常領域および／またはフレームワーク領域ならびにマウス可変領域、マウスCDRおよび／またはマウスSDRを含む。

【0042】

用語「ヒト化抗体」は、ヒトフレームワーク領域および非ヒト由来の1または複数のCDRまたはSDR（例えば、マウス、ラットまたは合成）免疫グロブリンを含む免疫グロブリンを意味する。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と名付けられる。

40

【0043】

ヒト抗体は、内在性の免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたマウス等のトランスジェニック動物にヒト免疫グロブリン座位を導入することにより作製することができる。免疫負荷にあたり、ヒト抗体産生は宿主において観察され、遺伝子再配列、構築および抗体レパートリーを含むあらゆる点でヒトにおいて見られるものとよく似ている。

【0044】

「単一ドメイン抗体」は、単一の単量体の抗原結合（例えば、可変）ドメインを含んだ抗体断片を意味する。ナノボディと呼ばれることがある単一ドメイン抗体は、ラクダ

50

科 V_HH 抗体断片等の非ヒト起源の単ドメイン重鎖抗体を含んでもよい。そのような抗体断片は典型的には従来の抗体よりもサイズが小さいか Fab 断片と同等である。

【0045】

用語「抗原」は免疫応答を引き起こす分子を意味する。抗原は全長ポリペプチドまたはタンパク質の形態であってよい。あるいは、抗原は、ペプチド断片に対して産生された抗体が全長ポリペプチドへの結合も可能にする特異的なエピトープを有するペプチド断片の形態とすることができる。

【0046】

本明細書で用いられる用語「分化」は、より特殊化されていない細胞がより特殊化された細胞になるプロセスを意味する。

【0047】

用語「発現ベクター」は、直鎖または環状のいずれかの DNA 分子であって、適当なサイズの別の DNA 配列断片を組み込むことができるものを意味するのに使用される。そのような DNA 断片は、DNA 配列断片によりコードされる遺伝子の転写のための追加のセグメントを含むことができる。追加のセグメントは、限定されるものではないが、プロモーター、転写ターミネーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位、非翻訳領域、ポリアデニル化シグナル、選択性マーカー、複製起源等を含むことができる。発現ベクターはしばしばプラスミド、コスミド、ウイルスベクターおよび酵母人工染色体に由来し；ベクターはしばしばいくつかの起源からの DNA 配列を含有する組換え分子である。

【0048】

用語「宿主細胞」は、ベクターが増殖することができ、その DNA が発現される（例えば、開示された抗体またはその断片をコードするベクター）細胞を意味する。細胞は原核生物であっても真核生物であってもよい。この用語は対象宿主細胞の任意の後代も含む。複製の間に変異が起こることがあるため、すべての後代は親細胞と同一ではないことがあることは理解される。しかしながら、「宿主細胞」という用語を使用するときはそのような後代が含まれる。宿主細胞は本発明の抗体、その機能的断片またはそのヒト化形態をコードするベクターを増殖することができる。

【0049】

ポリヌクレオチド配列に適用する場合の用語「単離」は、配列が起源の天然生物から取り出され、ゆえに外来性または望まないコードまたは制御配列がないことを意味する。単離された配列は、組換え DNA プロセスや遺伝子操作されたタンパク質合成系内で使用するのに適している。このような単離された配列は、cDNA およびゲノムクローンを含む。単離された配列は、タンパク質をコードする配列のみに限定されてもよく、プロモーターおよび転写ターミネーター等の 5' および 3' 調節配列を含むこともできる。

【0050】

ポリペプチド配列に適用する場合の用語「単離」は、起源のその天然生物から取り出されたポリペプチドである。単離されたポリペプチドは、起源生物のプロテオーム由来の他のポリペプチドが実質的にないことが好ましい。単離されたポリペプチドは、少なくとも 95% 純粋、より好ましくは 99% を超えて純粋な形態であることが最も好ましい。本文脈において、用語「単離」は、天然型であるか、変性型であるか、二量体／多量体であるか、グリコシル化されているか、結晶化されているか、あるいは誘導体化形態であるかを問わず代替的な物理的形態の同一のタンパク質を含むことを意図する。

【0051】

用語「標識」は、抗体またはタンパク質等の他の分子の検出を促進するためにこの分子に直接的または間接的にコンジュゲートされる検出可能な化合物または組成物を意味する。標識の特定かつ非限定的な例としては、蛍光タグ、酵素結合、蛍光タグおよび放射性アイソトープが挙げられる。

【0052】

DNA 配列に適用する場合の用語「作動可能に連結された」は、例えば発現ベクターにおいて、複数の配列がそれらの意図する目的を達成するために協同的に機能する（例えば

10

20

30

40

50

、プロモーター配列は、連結されたコード配列を通して終結配列まで進行する転写の開始を可能にする）ように配置されることを示す。

【0053】

「ポリヌクレオチド」は、各ヌクレオチドの3'および5'末端がホスホジエステル結合により結び付いた複数のヌクレオチドの一本鎖または二本鎖の共有結合配列である。ポリヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチド塩基またはリボヌクレオチド塩基で構成されてよい。ポリヌクレオチドはDNAおよびRNAを含み、イン・ビトロで合成的に作られてもよく天然源から単離されてもよい。ポリヌクレオチドのサイズは典型的には、二本鎖ポリヌクレオチドについては塩基対 (bp) の数で、一本鎖ポリヌクレオチドの場合はヌクレオチド (nt) の数で表される。1000bpまたはntはキロベース (kb) に等しい。40付近未満のヌクレオチドの長さのポリヌクレオチドは典型的には「オリゴヌクレオチド」と呼ばれる。

【0054】

「ポリペプチド」は、天然に生産されたものであるか合成手段によりイン・ビトロで生産されたものであるかを問わず、ペプチド結合により結び付いたアミノ酸残基のポリマーである。12付近未満のアミノ酸残基の長さのポリペプチドは典型的には「ペプチド」と呼ばれる。本明細書で用いられる用語「ポリペプチド」は、天然起源のポリペプチド、前駆体型または前駆タンパク質の産物を意味する。ポリペプチドはまた、これに限定されないが、グリコシル化、タンパク質切断、脂質化、シグナルペプチド切断、プロペプチド切断、リン酸化等を含み得る成熟化または翻訳後修飾プロセスを受ける。「タンパク質」は1または複数のポリペプチド鎖を含んでなる高分子である。

【0055】

本明細書で用いられる用語「プロモーター」は、RNAポリメラーゼが結合し、転写を開始するDNA上の部位を意味する。プロモーターは、常にではないが、通常、遺伝子の5'非コード領域に位置する。

【0056】

本明細書で用いられる用語「特異的な結合」は、抗体またはその断片と抗原またはエпитープとの選択的相互作用を意味する。相互作用が選択的であるためには、抗体は特定の抗原以外のマーカーとは実質的には結合しないか、あるいは実質的に結合することができないようにされうる。

【0057】

本明細書で用いられる用語「細胞」は、任意の手段で分化、再分化および脱分化させるのに用いることができるヒトまたは動物体の任意の細胞、例えば、iPS細胞（人工多能性幹細胞）を意味する。

【0058】

本明細書で用いられる用語「幹細胞」は、未分化状態ではあるが有糸分裂により自己複製する能力により特徴づけられ、かつ、細胞分化により種々の分化細胞種を生じさせる能力を有する未分化細胞を意味する。哺乳類において、幹細胞には大きく2つの種類がある：胚盤胞の内細胞塊から単離された胚性幹細胞；および種々の組織に見出される成体幹細胞。成体幹細胞は疾患または傷害により損傷した組織を交換する修復系の役割を果たす。それらは皮膚、血液および腸組織等の再生器官の正常な代謝回転も維持する。胚性幹細胞はあらゆる特殊化された胚組織に分化し得る。

【0059】

幹細胞の心血管系統へ方向付けられた細胞への分化

未熟な状態で送達された成体幹細胞は、心疾患障害を有する患者において限られた効果しか示さず、よって、心臓の再生を助けるために、未熟ヒト幹細胞を患者に注入する前に心臓系統に導く療法が開発中である。特に関心が高まっているのが、採取についての入手可能性、培養における増殖傾向および生物学的プロファイルの好ましきから、成体間葉系幹細胞である。

【0060】

幹細胞は、分裂して（有糸分裂を介して）多様な特殊化された細胞種に分化する能力を有し、かつ、自己複製してさらに幹細胞を生産することができるあらゆる多細胞生物に見られる生体細胞である。心臓発生は幹細胞が心臓細胞に発達し、心筋を形成するプロセスである。心血管前駆（precursor）細胞は、心臓形成細胞または心血管前駆（progenitor）細胞としても知られ、心臓系統へ方向付けられたが、まだ完全に心筋細胞または心臓内皮細胞または平滑筋細胞に分化していない細胞である。心臓形成細胞は、例えば完全に分化された心筋細胞よりも再生医療に用いられる可能性が高いことから、これらの細胞を検出および単離できることが望ましい。

【0061】

心臓の発達は、シグナル伝達経路と筋肉の成長、収縮性および配列についての遺伝子とを結び付ける進化的に保存された転写因子（遺伝子Nkx2.5、GATA4、GATA6、MEF2C、Tbx5、Mesp1、FOG1、FOG2、およびFlk1によりコードされる転写因子を含む）のネットワークによって制御される。

【0062】

心臓形成細胞は、特有の表現型を有し、検出可能なサルコメアタンパク質の不在を伴う初期心臓転写因子Nkx2.5および後期心臓転写因子MEF2Cの核移行により特徴付けられる。サルコメアタンパク質の発現が検出できないレベルであることが心臓形成細胞の特有の特徴であり、該特徴により幹細胞に由来する他の心筋様細胞と区別される。Nkx2.5およびMEF2Cポリペプチドの核移行は決定的な心臓系統への方向付けに必要である。

【0063】

心臓形成細胞は、例えば、成体幹細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS）、骨髄分離成体多系統誘導細胞（MAMI）、常在心臓幹細胞またはこれらの組み合わせを含む幹細胞に由来することができる。適切には、幹細胞は、例えば、骨髄、脂肪組織、臍帯血、羊水、月経液、血液を含む任意の適切な組織源から採取された間葉系幹細胞である。適切には、心臓組織の発生へ方向付けられた細胞は、典型的には、ヒト、ネコ、イヌ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ハムスターおよび他の哺乳類からなる群から選択される哺乳類細胞である。

【0064】

幹細胞は、成長因子、サイトカイン、ホルモンおよびこれの組み合わせのカクテルと接触させることにより心臓系統に導いてよい。このような物質としては、BMP-1、BMP-2、BMP-5、BMP-6等の骨形成タンパク質（BMP）；上皮増殖因子（EGF）；エリスロポエチン（EPO）；FGF-1、FGF-4、FGF-5、FGF-12、FGF-13、FGF-15、FGF-20等の線維芽細胞増殖因子（FGF）；顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）；増殖分化因子-9（GDF-9）；肝細胞増殖因子（HGF）；IGF-2等のインスリン様成長因子（IGF）；ミオスタチン（GDF-8）；NT-3、NT-4、NT-1および神経成長因子（NGF）等のニューロトロフィン；PDGF-β、PDGF-AA、PDGF-BB等の血小板由来増殖因子（PDGF）；トロンボポエチン（TPO）；トランスフォーミング増殖因子α（TGF-α）；TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3等のトランスフォーミング増殖因子β（TGF-β）；VEGF-A、VEGF-C等の血管内皮増殖因子（VEGF）；TNF-α；白血病抑制因子（LIF）；インターロイキン6（IL-6）；レチノイン酸；ストロマ細胞由来因子-1（SCDF-1）；脳由来神経栄養因子（BDNF）；ペリオスチン；アンジオテンシンII；Flt3リガンド；グリア細胞由来神経栄養因子；ヘパリン；インスリン様成長因子結合タンパク質-3；インスリン様成長因子結合タンパク質-5；インターロイキン-3；インターロイキン-8；ミッドカイン；プロゲステロン；プトレシン；幹細胞因子；Wnt1；Wnt3a；Wntδa；カスパーゼ-4；ケモカインリガンド1；ケモカインリガンド2；ケモカインリガンド5；ケモカインリガンド7；ケモカインリガンド11；ケモカインリガンド20；ハプトグロビン；レクチン；コレステロール-25-ヒドロキシラ

ーゼ；シンタキシン－8；シンタキシン－11；セルロプラスミン；補体第一成分；補体第三成分；インテグリン α 6；リソソーム酸リパーゼ1； β －2ミクログロブリン；ユビキチン；マクロファージ遊走阻止因子；コフィリン；シクロフィリンA；FKBP12；NDPK；プロフィリン1；シスタチンC；カルサイクリン；スタニオカルシン－1；PGE－2；mpCCL2；IDO；iNOS；HLA－G5；M－CSF；アンジオポエチン；PIGF；MCP－1；細胞外マトリックス分子；CCL2（MCP－1）；CCL3（MIP－1 α ）；CCL4（MIP－1 β ）；CCL5（ランテス）；CCL7（MCP－3）；CCL20（MIP－3 α ）；CCL26（エオタキシン－3）；CX3CL1（フラクタルカイン）；CXCL5（ENA－78）；CXCL11（i－TAC）；CXCL1（GRO α ）；CXCL2（GRO β ）；CXCL8（IL－8）；CCL10（IP－10）；およびこれらの組み合わせからなる群から選択することができる。

10

【0065】

種々の異なる心臓発生性カクテルを用いることができる。例えば、TGF β －1、BMP4、 α －トロニン、カルジオトロフィンおよびIL－6からなる群から選択される化合物ならびにカルジオゲノールCおよびレチノイン酸からなる群から選択される化合物を含んでなる心臓発生性物質のカクテルを用いることができる。別のカクテルは、TGF β －1、BMP4、 α －トロニン、カルジオトロフィンおよびカルジオゲノールCを含んでなることができる。さらに別のカクテルは、FGF－2、IGF－1、アクチビン－A、TNF－ α 、FGF－4、LIF、VEGF－Aおよびこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの化合物を含んでなることができる。カクテルはまた、FGF－2、IGF－1およびアクチビン－Aを含んでなることができる。他の好ましいカクテルは、アクチビン－A、FGF－2、IL－6、IGF－1およびレチノイン酸を含んでなる。他のカクテルは、TNF－ α 、FGF－4、LIFおよびVEGF－Aからなる群から選択される少なくとも1つの化合物を欠いてもよい。

20

【0066】

特に好ましい心臓発生性カクテルおよびこれらカクテルの組成は、参照することにより組み込まれる国際公開第2010/133686号および国際公開第2009/151907号に開示されており、心臓形成細胞集団を誘導するために、TGF β －1、BMP4、FGF2、IGF－1、アクチビン－A、カルジオトロフィン、 α －トロニンおよびカルジオゲノールCを含む。これらの心臓発生性カクテルと接触させた骨髄間葉系幹細胞は心臓系統への分化を示し、心臓組織再生を助けるためにヒトに移植することができる。本発明の組成物および方法と用いるために幹細胞から心血管系統へ方向付けられた細胞を誘導するための任意の適切な方法を用いることができるが、ヒト骨髄間葉系幹細胞から心血管系統へ方向付けられた細胞を誘導するために上記のようなカクテルを本発明において用いることができる。

30

【0067】

MEF2C

MADSボックス転写増強因子2、ポリペプチドCとしても知られるMEF2C（筋細胞特異的増強因子2C）は、幹細胞から分化されて方向付けられた細胞において発現される数種のバイオマーカーの1つである。

40

【0068】

MEF2Cは、タンパク質のMEF2ファミリーの転写因子であり、心臓形態形成、筋形成および血管の発達において役割を果たす。転写因子は特異的なDNA配列に結合し、DNAのmRNAへの転写を制御するタンパク質である。転写因子は単独であるいは複合体として他のタンパク質と共にこの機能を果たし、DNAからRNAへの転写を行う酵素であるRNAポリメラーゼの特異的な遺伝子への動員を促進または阻害することができる。脊椎動物は4種のMEF2遺伝子を有し、ヒトの各種はMEF2A、MEF2B、MEF2CおよびMEF2Dと示される。胚形成時および成体期を通していずれも互いに区別可能だが重なり合ったパターンで発現する。

50

【 0 0 6 9 】

哺乳類MEF2遺伝子は、およそ50%の全アミノ酸同一性ならびに高度に保存されたN末端MADSボックスドメインおよびMef2DNA結合ドメインにわたって約95%の類似性を共有するが、C末端トランス活性化ドメインでは配列が異なる。

【 0 0 7 0 】

成熟MEF2Cタンパク質は細胞核において認められ、その発現レベルは産後発育の初期段階で最も高い。MEF2Cは、未分化細胞においてクラスIIヒストンデアセチラーゼと複合体を形成するが、筋分化が始まると、ヒストンデアセチラーゼが細胞質に放出され、MEF2Cは活性化のために他のタンパク質と相互作用する。

【 0 0 7 1 】

コードされたヒトMEF2Cタンパク質は473アミノ酸の長さであり、3つのアイソフォームが同定されている。

配列番号1はヒトMEF2Cのアイソフォーム1のアミノ酸配列に関する：

【 化 1 】

10	20	30	40	50	60
MGRKKIQITR	IMDERNRQVT	FTKRKFGLMK	KAYELSVLCD	CEIALIIFNS	TNKLQFYAST
70	80	90	100	110	120
DMDKVLLKYT	EYNEPHESRT	NSDIVETLRK	KGLNGCDSPD	PDADDSVGHS	PESEDKYRKI
130	140	150	160	170	180
NEDIDLMISR	QRLCAVPPPN	FEMPVSIPVS	SHNSLVYNSP	VSSLGNPNLL	PLAHPSLQRN
190	200	210	220	230	240
SMSPGVTHRP	PSAGNTGGLM	GGDLTSGAGT	SAGNGYGNPR	NSPGLLVSPG	NLNKNMQAKS
250	260	270	280	290	300
PPPMNLGMNN	RKPDRLVLIP	PGSKNTMPSV	SEDVDLLLQ	RINNSQSAQS	LATPVVSVAT
310	320	330	340	350	360
PTLPGQGMGG	YPSAISTTYG	TEYSLSSADL	SSLSGFNTAS	ALHLGSVTGW	QQQHLHNMP
370	380	390	400	410	420
SALSQLGACT	STHLSQSSNL	SLPSTQSLNI	KSEPVSPPRD	RTTTPSRYPQ	HTRHEAGRSP
430	440	450	460	470	
VDSLSSCSSS	YDGSREDHR	NEFHSPIGLT	RSPDERESP	SVKRMRLSEG	WAT

【 0 0 7 2 】

473 アミノ酸のうち、およそ20～50のアミノ酸がMEF2Cに特有である。この特有のアミノ酸の範囲から、本発明のモノクローナル抗体の作成に用いるためにヒトMEF2C由来の13アミノ酸配列が選択された。この特定のペプチド配列（エピトープ）は、二次構造の欠如および内部システインの不在および他のMEF2ファミリータンパク質との配列類似性の低さから選択され、これにより、本発明のモノクローナル抗体の選択性がMEF2Cに対してのみであることを確実にする。有利には、この13アミノ酸配列は、齧歯類および非齧歯類を含む哺乳類間で高度に保存されているから、本発明のモノクローナル抗体はヒトMEF2Cに加えて他の哺乳類MEF2Cにも結合することが期待できる。

【0073】

ヒトMEF2Cの13アミノ酸配列（配列番号2）は以下の通りである：

G N P N L L P L A H P S L

【0074】

幹細胞の他のMEF2C発現細胞種への分化

MEF2Cは心臓形成以外の系統に予定されている幹細胞の分化のマーカーとしても知られている。血管の発達における細胞および組織はMEF2Cを発現することが知られており、その因子は、神経幹細胞発達、神経発生、特には脳の発達において重要な役割を果たすことが知られている（Li et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA. July 8; 105 (27): 9397-9402）。例として、ヒトにおけるMEF2Cのハプロ不全は、常同運動、発作および/または脳奇形を伴う深刻な精神遅滞の原因とみられている（Le Meur et al. (2010) J. Med. Genet. January 47 (1): 22-29）。MEF2Cの誤調節はまた、複雑な頭蓋顔面欠損やいわゆるワールデンブルヒ症候群を特徴とする難聴を引き起こし得る発達経路に関係があるとされている（Agarwal et al. (2011) Development, 138 (12): 2555-2565）。よって、MEF2Cの発現や局在のより優れたモニタリングを可能にする方法、キットおよび組成物は、心臓形成の枠を離れ、あるいはこれに加え、診断、研究およびバイオモニタリングにおいて重要な役割を果たすことができる。

【0075】

抗体の作成

本明細書において、MEF2C、特には、ヒトMEF2Cの特異的エピトープに結合することができる、単離された抗体またはその断片、特には単離されたモノクローナル抗体またはその断片が開示される。

【0076】

本発明のモノクローナルは、従来のモノクローナル抗体作成技術を用いて生産することができる。

【0077】

本発明のモノクローナル抗体を作成する方法の1つとして、マウスに配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるヒトMEF2C抗原を免疫する。マウスにおいて抗原に対する免疫応答が開始した後、すなわち、抗原に対する抗体を発現するリンパ球が生産された後、免疫されたマウスから脾臓細胞を取り出し、すでに自身の抗体を産生しない特殊化された骨髓細胞株と融合させる。得られた融合細胞はハイブリドーマとして知られ、適切な選択培地において無限に増殖しながら所望の抗体を産生することができ、このように所望の抗体は量的制約なく入手可能である。

【0078】

モノクローナル抗体を作成するための他の公知の方法、例えばウサギB細胞を用いてウサギハイブリドーマを形成する等、を用いてもよい。

【0079】

本発明のモノクローナル抗体は、本出願人により2012年12月20日にBCCM/LMBPに寄託され、受託番号LMBP9949CBに対応する連絡番号BCCM/LM

10

20

30

40

50

BP/12-16 (BCCM/LMBP, Plasmidcollectie Vakgroep Moleculaire Biologie, Universiteit Gent, Technologiemark 927, B-9052 Gent-Zwijnaarde, Belgium) を有するもののようなハイブリドーマ細胞株により産生させることができる。前述の寄託ハイブリドーマにより産生された本発明の抗MEF2Cモノクローナル抗体は、図6に示され、また、配列番号5～配列番号12で列記されるような重鎖および軽鎖の核酸およびアミノ酸配列を有するIgG抗体を産生する。したがって、本発明は、例えば、本明細書に記載される重鎖可変領域のアミノ酸配列（例えば、配列番号6）と少なくとも80%、85%、90%、95%またはこれを超えるアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域ポリペプチドと、本明細書に記載される軽鎖ポリペプチドの10アミノ酸配列（例えば、配列番号8）と少なくとも80%、85%、90%、95%またはこれを超えるアミノ酸配列同一性を有する可変軽鎖ポリペプチドとを含んでなる抗体またはその抗原結合断片を提供する。本発明の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号13～15の少なくとも1以上から選択される相補性決定領域(CDR)を含んでなる重鎖および配列番号16～18の少なくとも1以上から選択されるCDRを含んでなる軽鎖のみを含んでもよい。

【0080】

本発明のモノクローナル抗体は、予想外かつ格別に高い特異性および感度でヒトMEF2Cと結合することができ、ひいては心血管系統へ方向付けられた細胞を容易に検出することができる。モノクローナル抗体は典型的にはポリクローナル抗体よりも高い選択性を有する一方で感度が低い傾向にあるが、本発明のモノクローナル抗体は、高い選択性と高い特異性の双方を有することでこの傾向に抗う。MEF2Cの検出を可能にするために典型的には0.21mg/ml～0.73mg/mlストックのおよそ1:150の希釈を必要とするウサギポリクローナル抗体と比較して、本発明のモノクローナル抗体は3mg/mlストックのおよそ1:3000の希釈でMEF2Cを検出することができ、よってウサギポリクローナル抗体のおよそ1.5～5倍の感度および能力を示す。20

【0081】

本発明のモノクローナル抗体は、少なくともナノモル範囲、すなわち少なくとも 10^{-7} Mで平衡解離定数(K_d)を示すことが明らかとなった。 K_d は、どれだけ速くその抗原から解離するかという抗体解離速度(K_{off})の、どれだけ速くその抗原に結合するかという抗体会合速度(K_{on})に対する割合を表す。30

【0082】

モノクローナル抗体を作成するためのマウスへの免疫に用いられた抗原、すなわち配列番号2のアミノ酸配列を含んでなる抗原は、他のMEF2ファミリータンパク質とは非常に低い類似性しか示さないことから、モノクローナル抗体のMEF2Cタンパク質に対する高い選択性を確実にする。配列番号2のアミノ酸配列はまた、齧歯類および非齧歯類を含む哺乳類に渡って高く保存されている。したがって、本発明のモノクローナル抗体が主としてヒトMEF2Cに結合する能力について試験されたとしても、他の哺乳類のMEF2Cとも同様に高い特異性および感度で結合することが期待される。本発明の抗体は、心血管系統への方向付けを高いレベルで示す成体または胚性幹細胞に由来する細胞の同定において特に有利である。40

【0083】

配列番号2に記載されるエピトープのマッピングは、7つの最初のアミノ酸のうちの6つ、すなわち配列GNPNLxLが本発明の1つの態様による抗MEF2Cモノクローナル抗体の結合に必要であることを示した。第一の7つのアミノ酸のいずれかのアラニン変異が、抗MEF2Cの90%以上の相対的な結合低下をもたらすことが認められた。したがって、本発明の1つの態様では、抗MEF2Cモノクローナル抗体に標的にされるエピトープは以下のアミノ酸配列で定義され：

GNPNLxL [配列番号3]

ここで、大文字および小文字は、それぞれ一文字アミノ酸コードに従って、抗MEF2

10

20

30

40

50

Cモノクローナル抗体によるエピトープ認識に決定的かつ重要なアミノ酸を、xは当該目的に非特異的なアミノ酸残基を示す。

【0084】

7番目のアミノ酸残基、すなわちペプチドの12位のセリンは、その変異が抗MEF2Cモノクローナル抗体の相対的な結合を50%以上低下させたことから、何らかの重要性を有することも見出した。したがって、本発明のさらなる態様では、抗MEF2Cモノクローナル抗体に標的にされるエピトープは以下のアミノ酸配列で定義される：

G N P N L x P x x x x s [配列番号4]

【0085】

本明細書に記載されるエピトープ決定基に結合することができる抗体断片、例えば、Fv断片、Fab断片またはF(ab')₂断片は、当技術分野における従来の方法、例えば、抗体のタンパク質加水分解により、または断片をコードするDNAの宿主細胞における発現により調製することができる。断片を作成するための抗体の切断には、断片が全抗体により認識される抗原に結合する限り、他の化学的技術、酵素的技術または遺伝学的技術を使用してもよい。

【0086】

本発明の抗体または抗体断片の保存的バリエーション、すなわち抗体または抗体断片の1つ以上のアミノ酸の機能的に類似のアミノ酸への置換により作成されるものは、従来技術を用いて生産することができる。保存的バリエーションは、典型的には、親抗体または親抗体断片と同等の効率で、あるいは場合によりさらに高い効率で標的抗原と結合するであろう。

【0087】

治療、診断または検出部分等のエフェクター分子は、当技術分野において任意の公知の方法を用いて本発明の抗体または抗体断片に連結することができる。

【0088】

本発明の抗体または抗体断片のアミノ酸配列をコードする核酸も開示される。本発明のハイブリドーマ細胞株により産生される抗体をコードする核酸は、当業者であれば本明細書に開示されるアミノ酸配列を用いて、当技術分野において公知の適切な方法、例えば、直接化学合成法、適当な配列のクローニングおよび／または増幅法により容易に生産することができる。さらに、機能的に同等の核酸を含有するが同一の抗体配列または抗体断片配列をコードする種々のクローンは当業者であれば容易に構築することができる。

【0089】

抗体作成の従来方法に加え、ペプチドと高い結合親和性を有する抗体をコードするクローンを同定および単離するために、MEF2Cエピトープ（配列番号2～配列番号4によりコードされるようなもの）を1以上のペプチド（すなわち抗体）ディスプレイライブラリーをスクリーニングするために用いてよい。使用することができる適切なペプチドディスプレイライブラリー発現系としては、限定されるものではないが、mRNAディスプレイ（Roberts & Szostak (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 12297-12302）；リボソームディスプレイ（Mattheakis et al., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9022-9026）；およびCISディスプレイ（Odegrip et al., (2004), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 2806-2810）等のイン・ビトロペプチド作成ライブラリーが挙げられる。あるいは、適切な高親和性結合抗体を同定するために、ヒトコンビナトリアル抗体ライブラリーを含むファージディスプレイ系（例えば、HuCAL（商標）、MorphoSys AG、ドイツ）がスクリーニングされてもよい。

【0090】

本発明のモノクローナル抗体は、配列番号2～配列番号4によりコードされるエピトープに対する結合特異性をさらに最適化するために、イン・ビトロ親和性成熟に供してもよい。このプロセスにおいて、ペプチドディスプレイライブラリー内に含まれる抗原に対してスクリーニングされる際に、より高い結合特異性を有するバリエーションを作成するために

、抗体におけるSDRの配列をランダムまたは特異的変異導入に供してよい（例えば、De Pascalis et al., Clin Cancer Res. (2003) 15; 9 (15): 5521-31 参照。）。イン・ビトロ親和性成熟により得られたモノクローナル抗体は、エピトープ結合についてハイブリドーマにより産生される抗体と競合することができ、このようなものも本発明の範囲内に含まれる。

【0091】

本発明の抗体または抗体断片をコードする核酸は、従来技術に従って組換え宿主細胞において発現させることができる (Sambrook J. et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)。適切な宿主細胞は、培養により増殖させることができ、かつ、細菌、真菌細胞、昆虫細胞および高等真核生物起源の細胞、好ましくは哺乳類細胞を含む外因性DNAの形質転換を受けやすいものである。

【0092】

宿主細胞における発現を可能にするために、本発明の抗体または抗体断片をコードする核酸は、適当なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、開始コドンおよび停止コドン等を含む発現制御配列と作動可能に連結し、発現ベクターに挿入することができる。適切な発現ベクターは、宿主細胞における核酸配列の挿入または組み込みが可能となるように操作することができるプラスミドおよびウイルスまたは他の媒体を含む。

【0093】

外来DNA（適切には発現ベクターに含まれる）が宿主細胞において継続的に維持されることを可能にする安定な移行方法は、原核生物であれ真核生物であれ当技術分野において公知である。

【0094】

一度発現されると、本発明の抗体ポリペプチドまたはその断片は、例えば、クロマトグラフィー、析出および免疫学的分離を含む当技術分野において標準的な手順を用いて単離および精製することができる。

【0095】

組換え方法に加え、本発明の抗体およびその断片は、標準的なペプチド合成技術を用いて全体または部分を構築してもよい。

【0096】

心血管系統へ方向付けられた細胞の検出および心血管系統への方向付けの定量化

本明細書には、心血管系統へ方向付けられた細胞を検出および／または単離および／または定量化するための方法が開示される。

【0097】

該方法は、生体試料と本発明の抗体またはその断片とを、抗体またはその断片と標的抗原-MEF2Cとが免疫複合体を形成するような条件下で接触させることを含む。その後、免疫複合体の存在（あるいは不在）を検出し、これを目的の細胞を単離するために用いることができるし、定量化のために用いることもできる。免疫複合体の存在は、心血管系統へ方向付けられた細胞の存在を示し、定量化は心血管系統への方向付けを測定することができる。

【0098】

生体試料は心臓系統へ方向付けられた細胞を含む可能性があるいずれの試料であってもよい。例えば、生体試料は、成体幹細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPS)、骨髓分離成体多系統誘導細胞 (M1AMI)、常在心臓幹細胞またはこれらの組み合わせの試料を含んでよく、心臓系統へ方向付けられた細胞への細胞の分化を引き起こす物質の心臓発生性カクテルに供したものであってもそうでなくてもよい。適切には、幹細胞は、例えば、骨髓、脂肪組織、臍帯血、羊水、月経液および血液を含む適切な組織源から採取されてよい。適切には、心臓組織への発生へ方向付けられた細胞は哺乳類細胞であり、典型的には、ヒト、ネコ、イヌ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ハムスターおよび他の哺乳類

からなる群から選択されるが、好ましくは、ヒトである。

【0099】

該方法は、典型的には対象から得られた生体試料についてイン・ビトロで実施される。生体試料の細胞は、典型的には本発明の抗体が配列番号2の標的MEF2Cエピトープに接近できるように、抗体による検出および／または定量化の前に溶解／破壊される。本発明の抗体またはその断片はその後破壊された生体試料に添加され、MEF2C抗原が存在する場合は抗体と抗原との間で免疫複合体が形成される。

【0100】

本発明による方法および抗体は、心臓系統へ方向付けられた（心臓形成）細胞を含んでなる細胞調製物を含んでなる生成物の品質管理を確実にするのに特に適している。いくつかの品質管理出荷試験は、通常、そのような細胞調製物の製造バッチに対し、

- 同一性
- 予期せぬ細胞種混入レベル
- 均質性

などについて行われる。

【0101】

純度および均質性双方の基準を超えた細胞調製物のバッチにおいて、心臓形成細胞は、本発明による特異的な抗MEF2Cモノクローナル抗体（mAb）を用いた免疫蛍光法により適切に検出されるMEF2Cの特徴的な核移行を示す。

【0102】

本発明の抗体は、従来型の直接的な検出および／または定量化方法に従って、免疫複合体の検出および／または定量化を可能にする検出剤で標識されるか、またはこれに結合されてもよい。しかしながら、典型的には、免疫複合体を含む生体試料は、本発明の（第一の／最初の）抗体またはその断片に特異的に結合する第二の（二次）抗体（ここで、第二の抗体は検出可能なおよび／または定量化可能な剤またはプローブで標識される）と接触させるであろう。第二の抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、適切には、例えば、哺乳類、ヒト、ヤギ、ウサギ、齧歯類、またはキメラ起源であってもよい。検出可能なおよび／または定量化可能な剤の種類は、心血管系統へ方向付けられた細胞の検出および／または定量化に用いられる検出法またはイムノアッセイに依存するであろう。分化された細胞の検出および／または定量化に適切なイムノアッセイとしては、例えば、免疫蛍光法、免疫組織化学、免疫沈降、ウェスタンブロット法および酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）が挙げられる。これらの測定法は当業者によく知られており、例えば、Sambrook J. et al, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYを参照することができる。

【0103】

第二の抗体、あるいは実際には第一の抗体に結合させる適切な検出可能なおよび／または定量化可能な剤またはプローブは、例えば、とりわけ、ビオチン；アルカリフォスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ等のリポーター酵素；蛍光標識；発光標識；放射性標識；および発色標識が挙げられる。

【0104】

例えば、酵素イムノアッセイは、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、アミラーゼ、ビオチン-アビジン複合体等をプローブ／検出剤として用いて行ってよい。蛍光イムノアッセイは、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート、ジクロロトリアジンイソチオシアネート、アレクサまたはアレクサフルオロ等の蛍光物質またはフルオロフォアならびにGFPおよびフィコエリトリンを含む蛍光タンパク質をプローブ／検出剤として用いて行ってよい。ラジオイムノアッセイに有用なラジオアイソトープの例としては、ト

10

20

30

40

50

リチウム、ヨード (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I および ^{121}I)、リン (^{32}P)、硫黄 (^{35}S) および金属 (例えば、 ^{68}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ge 、 ^{54}Mn 、 ^{99}Mo 、 ^{99}Tc 、 ^{133}Xe 等) が挙げられる。発光イムノアッセイは、適切には、例えば、ルシフェラーゼ系、ルミノール-過酸化水素-ペルオキシダーゼ系、ジオキセタン化合物系を用いて行ってもよい。

【0105】

心臓形成との関係において、本発明の抗体とMEF2C抗原との間の免疫複合体の検出結果が陽性であることおよび／または該免疫複合体が定量されることは、心血管系統へ方向付けられた細胞の存在を示す。神経発生等の別の状況において類推すると、本発明の抗体とMEF2C抗原との間の免疫複合体の検出結果が陽性であることおよび／または該免疫複合体が定量されることは、神経細胞等の他の特定の細胞種の存在を示す。

10

【0106】

よって、心血管系統へ方向付けられた細胞を検出および／または定量化する方法は、生体試料における幹細胞を含む細胞を、1つ以上の成長因子、サイトカイン、ホルモンおよび／またはこれらの組み合わせを含んでなる組成物を用いて心臓細胞系統に分化させること、

生体試料と、本発明の抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と分化された幹細胞上の標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を検出および／または定量化すること

(ここで、免疫複合体の存在は、心血管系統へ方向付けられた細胞を示す、および／または、心血管系統への方向付けを定量化する。)

20

を含んでよい。

【0107】

同様に、神経系統へ方向付けられた細胞を検出および／または定量化する方法は、

生体試料における幹細胞を含む細胞を、1つ以上の成長因子、サイトカイン、ホルモンおよび／またはこれらの組み合わせを含んでなる組成物を用いて神経細胞系統に分化させること、

生体試料と、本発明の抗体またはその断片とを、該抗体またはその断片と分化された幹細胞上の標的抗原とが免疫複合体を形成するような条件下で接触させること；および

免疫複合体の存在を検出および／または定量化すること

(ここで、免疫複合体の存在は、神経系統へ方向付けられた細胞を示す、および／または、神経系統への方向付けを定量化する。)

30

を含んでよい。

【0108】

本発明の特定の態様において、神経細胞(neural cell)系統は、ニューロン細胞(neuronal cell)系統であり、場合により、ドーパミン作動性ニューロン細胞である。

【0109】

適切には、標的抗原は、配列番号2～配列番号4のいずれか1つのヒトMEF2Cエピトープである。

【0110】

組成物および治療方法

本明細書には、心血管系統へ方向付けられた細胞、神経系統へ方向付けられた細胞およびニューロン細胞の検出および／または定量化に用いるための、本発明の抗体またはその断片を含んでなる組成物が開示される。組成物は、選択される特定の投与方法に応じて適当な液体または固体担体とともに処方することができる。典型的には、組成物は、液体担体とともに調製され、MEF2Cバイオマーカーを発現する幹細胞を含む分化された細胞、すなわち、心血管系統へ方向付けられた細胞を適切に検出および／または定量化するためにイン・ビトロで使用されるであろう。そのように適切な組成物の1つは、本発明の抗体とPBS／グリセロール担体とを含んでよい。

【0111】

50

本明細書において、心臓障害または心疾患を有する個人を処置する方法も開示される。本明細書で使用される「処置する」または「処置」は、本明細書に記載される疾患または障害と関連する症状の発症の緩和または遅延を意味する。これらの用語はまた、現存の制御できないまたは望まれない症状の改善やさらなる症状の予防を含む。よって、これらの用語は、ある疾患または症状を罹患しているまたはそのような疾患または症状を発症する可能性がある個人に有益な効果が与えられることを表す。個人が、病気の兆候または症状の少なくともいくつかの緩和または軽減を経験する、特に、限定されるわけではないが、予測される生存の延長がある場合に応答が達成される。期待される無進行生存期間は、再発の数、病期および他の因子を含む予後因子により数か月から数年で測定することができる。

10

【0112】

細胞ベースの修復アプローチは、虚血性心疾患の管理においてますます検討されている。特に、心臓の再生を助けるために、未熟ヒト幹細胞を患者に注入する前に心臓系統に導く療法が開発中である。心臓発生性カクテルが誘導する骨髄由来ヒト間葉系幹細胞の細胞分化は、不全マウス虚血心への移植後の安全で持続的な機能や構造の利益を確実にすることが示されている (Behfar et al., Guided Cardiopoiesis Enhances Therapeutic Benefit of Bone Marrow Human Mesenchymal Stem Cells in Chronic Myocardial Infarction, Journal of the American College of Cardiology, Vol. 56, No. 9, 2010)。

20

【0113】

心臓障害を有する個人の処置方法は、個人から幹細胞を含む細胞を得ること；該幹細胞を心血管系統に分化させること；本発明の単離された抗体またはその断片を用いて、幹細胞が心血管系統へ方向付けられた細胞になったか否かを検出および／または定量化すること；心血管系統へ方向付けられた細胞を単離すること；および心血管系統へ方向付けられた細胞をそれを必要とする個人に投与することを含んでなる。

【0114】

さらに、神経変性障害を有する個人を処置する方法であって、個人から幹細胞を含む細胞を得ること；該幹細胞を神経またはニューロン系統に分化させること；本発明の単離された抗体またはその断片を用いて、該幹細胞が神経またはニューロン系統へ方向付けられた細胞になったか否かを検出および／または定量化すること；方向付けられた細胞を単離すること；および神経またはニューロン系統へ方向付けられた細胞をそれを必要とする個人に投与することを含んでなる方法が開示される。神経変性疾患は、限定されるわけではないが、ニューロンの進行性消失や機能不全を引き起こす疾患を含んでよい。神経変性疾患の例としては、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 等が挙げられる。

30

【0115】

キット

本明細書にはまた、心血管系統、神経またはニューロンへ方向付けられた細胞の、典型的にはイン・ビトロでの、検出および／または定量化に用いるための、本発明の抗体またはその断片を含有するキットが開示される。よって、本発明の抗体およびキットは、MEF2C発現または局在が指標因子となる心臓形成または他の系統への細胞の方向付けのレベルを測定する方法に適切に用いられる。

40

【0116】

該キットは、適切に分化した幹細胞の検出および／または定量化において本発明の抗体またはその断片を使用する手段を開示する説明資料を含んでよい。説明資料は、例えば、書かれたものであっても電子的形態であってもよい。

【0117】

該キットは、また、検出および／または定量化の方法に用いるのに適切な緩衝液、担体

50

および／または試薬を含んでもよい。さらに、該キットはまた検出および／または定量化の方法が正常に機能していることを証明するための対照サンプル／反応を含んでもよい。

【0118】

さらに、該キットは、イムノアッセイを行うのに必要とされる追加の成分を含んでもよい。追加の成分は、使用するイムノアッセイの種類により様々であろう。例えば、本発明の抗体またはその断片は、酵素、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性化合物、薬剤または電磁ビーズを含む他の化合物と直接的または間接的にコンジュゲートされていてもよい。イムノアッセイは、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、免疫沈降アッセイ、免疫組織化学アッセイ、ウェスタンブロット法および免疫蛍光法を含んでよい。ウェスタンブロット法の場合は、例えば、該キットは、本発明の抗体またはその断片のMEF2Cバイオマーカーへの結合を検出するために化学発光剤が結合された第二抗体をさらに含むことができる。免疫蛍光法の場合は、例えば、該キットは、本発明の抗体またはその断片のMEF2Cバイオマーカーへの結合を検出および／または定量化するために蛍光剤が結合された第二抗体をさらに含むことができる。

【実施例】

【0119】

実施例1：ウェスタンブロット法によるMEF2Cの検出

空のベクター（－）またはMEF2Cコーディングベクター（＋）をトランスフェクトした細胞の細胞抽出物（2 μg／レーン）をSDS-PAGE（10％ アクリルアミド／ビスアクリルアミド）で20 mA／ゲルで分離した。タンパク質を60 Vで90分間ニトロセルロース膜（Hybond C Extra nitrocellulose、アマシャム、#RPN203E）に転写した。

【0120】

電気泳動の後、膜をブロッキング緩衝液〔TBS、0.1％ Tween、5％ Blotting Grade Blocker（バイオ・ラッド、#170-6404）〕で室温にて30分間飽和した。この後、ブロッキング緩衝液で1：500に希釈した本発明の一次抗体、すなわちハイブリドーマ細胞株BCCM/LMBP/DBT1/12-16由来のモノクローナル抗体とともに緩やかな攪拌の下、4℃で一晩インキュベートした。

【0121】

TBS-T 0.1％で洗浄した後、膜を西洋ワサビペルオキシダーゼレポーター酵素が連結され、かつ、ブロッキング緩衝液で希釈（1：2000）された適当な二次抗体とともに緩やかな攪拌の下、室温でインキュベートした。

【0122】

TBS-T 0.1％で洗浄した後、化学発光（パーキンエルマー、Plus ECL、#NEL103001EA）とHyperfilm ECL（アマシャム、#28906837）により検出を行った。

【0123】

図1は、ウェスタンブロット法を用いたこの免疫検出の結果を示す。小矢印により示されるように、本発明の抗MEF2Cモノクローナル抗体（αMEF2C）はMEF2Cトランスフェクト細胞（＋）における60 kDa付近の特異的なバンド（これはMEF2Cに対応する）を認識する。

【0124】

実施例2：免疫蛍光法によるMEF2Cの検出

免疫蛍光アッセイにおいて本発明のモノクローナル抗MEF2C抗体の標的認識についての特異性をFlagタグ全長MEF2Cタンパク質でトランスフェクトされたHeLa細胞で評価した。

【0125】

簡潔には、HeLa細胞を6ウェルプレートにおいて1.5 μgの市販のプラスミド（オリジーン、MEF2C（NM_002397）ヒトcDNA ORFクローンとキアゲ

10

20

30

40

50

ン、PolyFect transfection reagent)で一過性にトランスフェクトした。24時間後、細胞を採取し、50,000細胞/ウェルの濃度でバイオコートスライドに播種した。

【0126】

一晚培養後、細胞を3%PFA PBS溶液において固定し、1%Triton PBS溶液において透過させた。

【0127】

細胞を不希釈Superblockを用いて室温にて30分間ブロックし、ブロッキング工程の後、1:250のウサギ抗Flag(シグマ、マウスF1804産生モノクローナル抗FLAG(商標)M2抗体-1mg/ml)と本発明の一次抗体、すなわちハイブリドーマ細胞株BCCM/LMBP/DBT1/12-16由来のモノクローナル抗体、1:3000に希釈した3mg/mlストックとともに4℃で一晩ブロッキング緩衝液においてインキュベートした。

【0128】

0.1%Tween20 PBSにおいて洗浄した後、細胞を1:500希釈の二次抗体(アレクサフルオロ488コンジュゲートヤギ抗マウス抗体およびアレクサフルオロ568コンジュゲートヤギ抗ウサギIgG)とともに室温で1時間加湿箱においてインキュベートした。

【0129】

0.1% Tween20 PBSにおいて洗浄した後、スライドをDAPI含有封入剤で封入し、2~8℃で暗所において最短4時間保存した。

【0130】

写真の取得は封入後48時間以内にソフトウェアNIS-Element BR 3.0を用いて行った。

【0131】

図2の左のパネルは、トランスフェクトHeLa細胞におけるMEF2C免疫染色の結果を示す。一番下の写真に示されるように、本発明の抗MEF2Cモノクローナル抗体はMEF2Cを検出することができ、中央の写真に示されるように、Flagエピトープについて陽性であるすべての核においてMEF2Cに対応するシグナルが観察された。

【0132】

図2の右のパネルは、非トランスフェクト(+)およびMEF2Cトランスフェクト(×)HeLa細胞におけるMEF2CおよびFlag染色の分布を示す。カットオフ値は陰性細胞集団染色に基づいてMEF2CおよびFlag染色についてそれぞれ10および20の値で設定した。グラフの右上象限における黄色のバツ印(×)は二重陽性核、すなわちMEF2CおよびFlagの双方について染色強度を示し、かつ、非トランスフェクト細胞の染色を超える細胞を表す。これらの細胞はFlagタグMEF2Cを発現したことから成功裏にトランスフェクトされた細胞であると考えられる。

【0133】

本発明のモノクローナル抗体は、予想外かつ格別に高い特異性および感度でヒトMEF2Cと結合することができ、心血管系統へ方向付けられた細胞の検出のための優れた候補となる。MEF2Cの検出を可能にするために典型的には0.21mg/ml~0.73mg/mlストックのおよそ1:150の希釈を必要とするウサギポリクローナル抗体と比較して、本発明のモノクローナル抗体は3mg/mlストックのおよそ1:3000の希釈でMEF2Cを検出することができ、よってウサギポリクローナル抗体のおよそ1.5~5倍の感度および能力を示す。

【0134】

実施例3：骨髄間葉系幹細胞の心血管系統へ方向付けられた細胞への分化

Lonzap培地において培養される骨髄間葉系幹細胞を実施例2に記載される染色条件を用いて免疫蛍光により分析し、同じ骨髄起源由来の心血管系統へ方向付けられた細胞と比較した。

10

20

30

40

50

【0135】

図3は、骨髄間葉系幹細胞（左の写真）の、同じ骨髄起源由来の心血管系統へ方向付けられた細胞（右の写真）と比較した免疫蛍光を示し、心臓形成細胞の核の大部分が未熟な間葉系幹細胞と比較してMEF2Cバイオマーカー発現の増加を示すことを明らかに示した。

【0136】

図4は、骨髄間葉系幹細胞の核および心血管系統へ方向付けられた細胞の核の平均核強度を表す。

【0137】

図5は、蛍光強度の間隔の単位が7.5である細胞集団比率に対する核蛍光強度のヒストグラムである。骨髄間葉系細胞は灰色の前列のバーにより表され、心臓系統へ方向付けられた細胞は赤の後列のバーにより表される。

【0138】

図4および図5のいずれも心臓形成細胞の核の大部分が未熟な間葉系幹細胞と比較してMEF2Cバイオマーカー発現の増加を示すことを明らかにした。

【0139】

このMEF2Cタンパク質発現についての全体的な集団シフトは、心血管系統への方向付けをもたらすプロセスが、心臓発生分化の広く認識されるこのマーカーの発現の増加を効果的にもたらすことを示す。

【0140】

実施例4：抗MEF2Cモノクローナル抗体の配列決定

全RNAは受託番号LMBP9949CB（BCCM/LMBP、ゲント、ベルギー）で寄託された凍結ハイブリドーマ細胞から抽出し、このRNAからcDNAを合成した。次にRT-PCRを行い、抗体の可変領域（重鎖および軽鎖）および定常領域を増幅し、これらを別々に標準クローニングベクターにクローニングし、配列決定した。

【0141】

材料と方法全RNA抽出：

全RNAはTRIzol（商標）（TRIzol（商標）Plus RNA Purification System、インビトロジェン、カタログ番号：15596-026）の技術マニュアルに従ってハイブリドーマ細胞から単離した。全RNAはアガロースゲル電気泳動により分析した。

【0142】

RT-PCR：

全RNAはSuperScript™ III First-Strand Synthesis System（SuperScript™ III First-Strand Synthesis System、インビトロジェン、カタログ番号：18080-051）の技術マニュアルに従って、アイソタイプ特異的なアンチセンスプライマーまたはユニバーサルプライマーを用いてcDNAに逆転写した。V_H、V_L、C_HおよびC_Lの抗体断片はジェンスクリプト社のRACEの標準操作手順に従って増幅した。

【0143】

抗体遺伝子のクローニング：

増幅された抗体断片はそれぞれ標準分子クローニング手順を用いて標準クローニングベクターにクローニングした。

【0144】

スクリーニングおよび配列決定：

正しいサイズの挿入を有するクローンを同定するためにコロニーPCRスクリーニングを行った。各抗体断片について、正しいサイズの挿入を有する5つ以上の単一コロニーを配列決定した。正しいV_H、V_L、C_Lを有する5つの単一コロニーとC_Hの挿入サイズを有する14のコロニーを配列決定した。特有の1種のV_H、V_LおよびC_LDNA配列と3種

10

20

30

40

50

の C_HDNA 配列を見出した。各断片の異なるクローンはほぼ同一であることが認められた。図 6 に示されるコンセンサス配列はハイブリドーマにより産生される抗 MEF 2 C 抗体の配列（配列番号 5～8 に示される）と考えられる。

【0145】

実施例 5：抗 MEF 2 C モノクローナル抗体の産生に用いられた MEF 2 C エピトープのエピトープマッピング

本研究は先に産生された抗 MEF 2 C mAb のエピトープを同定することを目的とする。実験は技術的要件の国際的に認められた基準に沿って設計された。本計画はアラニンスクヤニングペプチドライブラリーの合成および ELISA によるエピトープの検出を含む。

10

【0146】

本発明の標的抗体のエピトープを同定するために用いられるペプチドライブラリーの設計のための根拠として配列番号 2 のペプチドを使用した。ペプチドライブラリーは Gen Script（商標）により合成した。ペプチドは最終濃度 10 mg/ml となるよ DM SO に溶解し、-20℃で保存した。

【0147】

追加の試薬および溶液：

ヤギ抗マウス IgG (H+L)、2.3 mg/ml、サーモ、カタログ番号：31160

ウサギ抗ヤギ IgG (H+L) [HRP]、0.8 mg/ml、サーモ、カタログ番号：31402

20

PBS: NaCl 137 mmol/L、

KCl 2.7 mmol/L、

Na₂HPO₄ 4.3 mmol/L、

KH₂PO₄ 1.4 mmol/L、pH 7.4

PBS-T: 1X PBS 中、0.05% Tween 20

コーティング緩衝液: 0.05M NaHCO₃、pH 9.6

MPBS: 1X PBS 中、5% スキムミルク

TMB

1M HCl

30

【0148】

ELISA は抗体の抗原への結合を評価するために行った。96 ウェルマイクロタイタープレートをコーティング緩衝液 100 μl 中の抗原ペプチド 10 μg/ml を用いて 4℃で 16 時間コートし、続いて 5% MPBS を用いて 37℃で 2 時間ブロックした。プレートを PBS-T で洗浄し、異なる 3 つの濃度 (5 μg/ml、1 μg/ml および 0.1 μg/ml) の 100 μl 標的/対照抗体を用いて 37℃で 2 時間インキュベートした。ELISA プレートをその後 PBS-T で洗浄し、100 μl ヤギ抗マウス IgG (H+L) (0.1 μg/ml) を用いて 1 時間インキュベートした。ELISA プレートをその後 PBS-T で洗浄し、100 μl ウサギ抗ヤギ IgG (H+L) [HRP] (0.1 μg/ml) を用いて 1 時間インキュベートした。PBS-T でのプレートの洗浄後、100 μl の TMB 基質で 10 分間、色を発生させた。100 μl の 1M HCl の添加により反応を止め、各ウェルの吸光度を分光計を用いて 450 nm で測定した。

40

【0149】

試験抗体のエピトープをマッピングするために ELISA を行った。96 ウェルマイクロタイタープレートをペプチドを 4℃で 16 時間コートした。その後プレートを 5% MPBS を用いて 37℃で 2 時間ブロックした。PBS-T での洗浄後、100 μl の標的/対照抗体 (0.5 μg/ml) を添加し、37℃で 2 時間インキュベートした。プレートを PBS-T で洗浄し、100 μl の 0.1 μg/ml ヤギ抗マウス IgG (H+L) を用いて 37℃で 1 時間インキュベートした。プレートを PBS-T で洗浄し、ウサギ抗ヤギ IgG (H+L) [HRP] を用いて 37℃で 1 時間インキュベートした。PBS-T

50

でのプレートの洗浄後、100 μ l の TMB 基質で 10 分間、色を発生させた。100 μ l の 1 M HCl の添加により反応を止め、吸光度を分光計を用いて 450 nm で測定した。陽性 ELISA シグナルは試験抗体がペプチドに結合していることを示す。非コートウェルはブランク対照として設定し、検出抗体のみでインキュベートしたペプチドライブラリーを陰性対照として設定した。

【0150】

13 の変異体ペプチドに番号順に番号をつけ、それらの標的／対照抗体との結合活性を間接 ELISA により決定した。ペプチド、標的抗体およびウサギ抗ヤギ IgG [HRP] の間の非特異的結合を決定した。ペプチド、ヤギ抗マウス IgG およびウサギ抗ヤギ IgG [HRP] の間の非特異的結合も同様に決定した。図 7 に示される結果から分かるように、2 位～5 位のペプチドでの変異は、抗原ペプチドと抗体との相互作用を完全に消失させており、抗体のエピトープは NP LL のペプチド配列の範囲であることを示す。1 位および 7 位のペプチドでの変異も結合に影響を与えており、アミノ酸残基 G1 ” および P7 はペプチド抗原と抗体との結合を促進させ得ることを示唆している。

【0151】

アラニンスキャニングに加えて、結合の相対的定量化を行った。上記の手順に従って直接 ELISA において各変異ペプチドを分析し、野生型ペプチドで行った検量線と比較した。その後、相対的結合定量化を先に記載した通り行った。結合の相対的定量化の結果を図 8 に要約する。図 8 に示されるように、NP NL 配列のアミノ酸のいずれかの変異が 99 % を超える劇的な結合の減少を引き起こした。さらに、先に示したように、第 1 および第 7 の残基の変異も 90 % を超える消失で結合に影響を与えた（グリシン（G）およびプロリン（P）のアラニンによるアミノ酸置換についてそれぞれ、92.9 % および 96.4 % の消失）。ペプチド配列の終わりから 3 番目のアミノ酸（S）の変異は、抗 MEF 2 C モノクローナル抗体とペプチドとの間の結合の減少が劇的ではないものの、残存する相対的結合の 41.3 % と一致を示した。よって、図 7 および図 8 で得られたデータを組み合わせると、抗 MEF 2 C mAb のエピトープ標的は以下のアミノ酸配列であり：

G N P N L x P x x x x s [配列番号 4]

ここで、大文字および小文字はそれぞれ抗 MEF 2 C mAb によるエピトープ認識に決定的かつ重要なアミノ酸を、x は当該目的に重要ではないことを示す。

【0152】

実施例 6：抗 MEF 2 C モノクローナル抗体の親和性測定

抗体のペプチドの対する親和性は B I A c o r e T 2 0 0 を用いることにより測定した。抗体を S e r i e s S センサーチップ CM5 に共有結合させた後、異なる濃度（0.078、0.781、1.563、3.125 および 6.250 μ M）のペプチドを順次、抗体およびブランクのフローセルに流速 30 μ l / 分で注入した。会合および解離フェーズを 30 および 150 秒間それぞれ監視した。6.250 μ M の濃度を有するペプチドを繰り返しとして設定した。抗体表面を 10 mM グリシン-HCl、pH 2.0、30 秒注入 1 回で再生した。

【0153】

約 10000 RU の抗体をセンサーチップに一級アミン基を介して固定化した。結合データは、B I A c o r e T 2 0 0 評価ソフトウェアを用いて、処理し、ブランク注入からの応答で二重参照し、1：1 相互作用モデルに当てはめた。反応速度データを表 1 に示す。

【0154】

【表 1】

Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K _d (M)
2.34 x 10 ⁴	3.67 x 10 ⁻³	1.57 x 10 ⁻⁷

【0155】

会合定数 (K_a) は K_d の逆数を計算することができ、 $6.37 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と等しかった。

【0156】

モノクローナル抗体について得られたナノモル K_d 値が標的エピトープに対し良好な特異性を示すことを示す。

10

【0157】

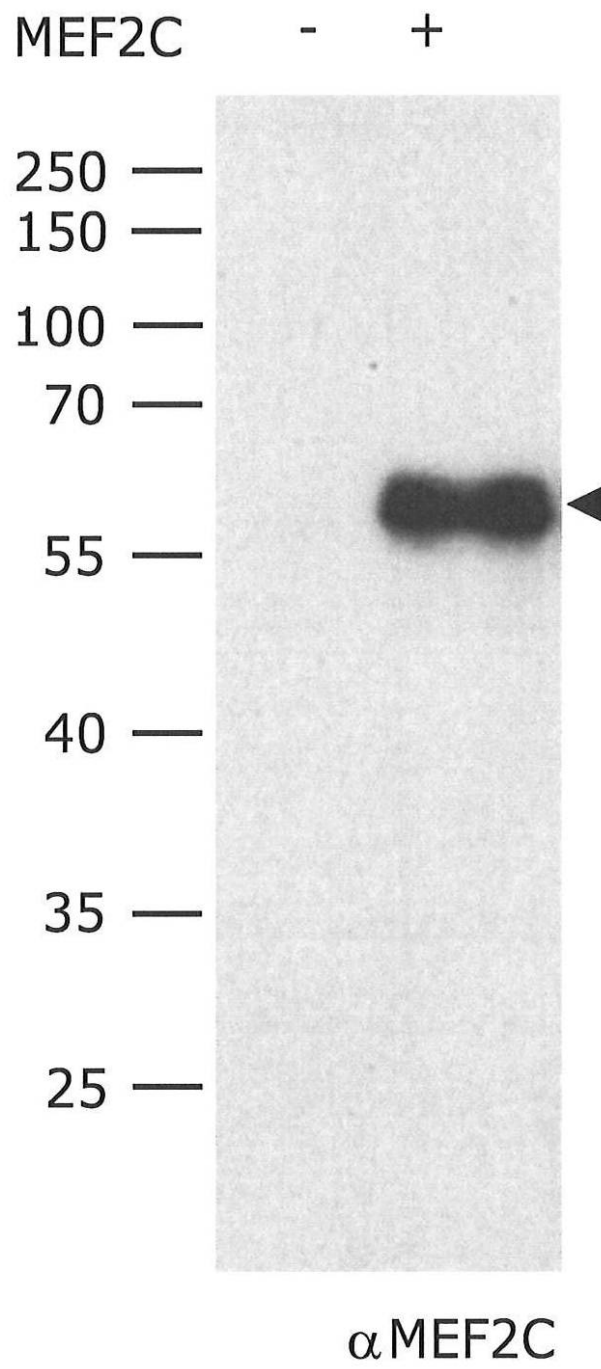
M E F 2 C の免疫蛍光検出に使用した場合に観察された有効性と併せてエピトープマッピングおよび親和性測定に関して得られた結果は、本発明の抗体が M E F 2 C 発現および細胞局在の感度の高い検出および測定を可能にするという重要な利点を示すこと明確に示す。本発明の例示的抗体はまた、配列番号 3 および配列番号 4 の配列に基づいて最適化されたエピトープを用いるさらなる抗 M E F 2 C 抗体および関連する結合ペプチドの開発の基礎としての役割も果たす。

【0158】

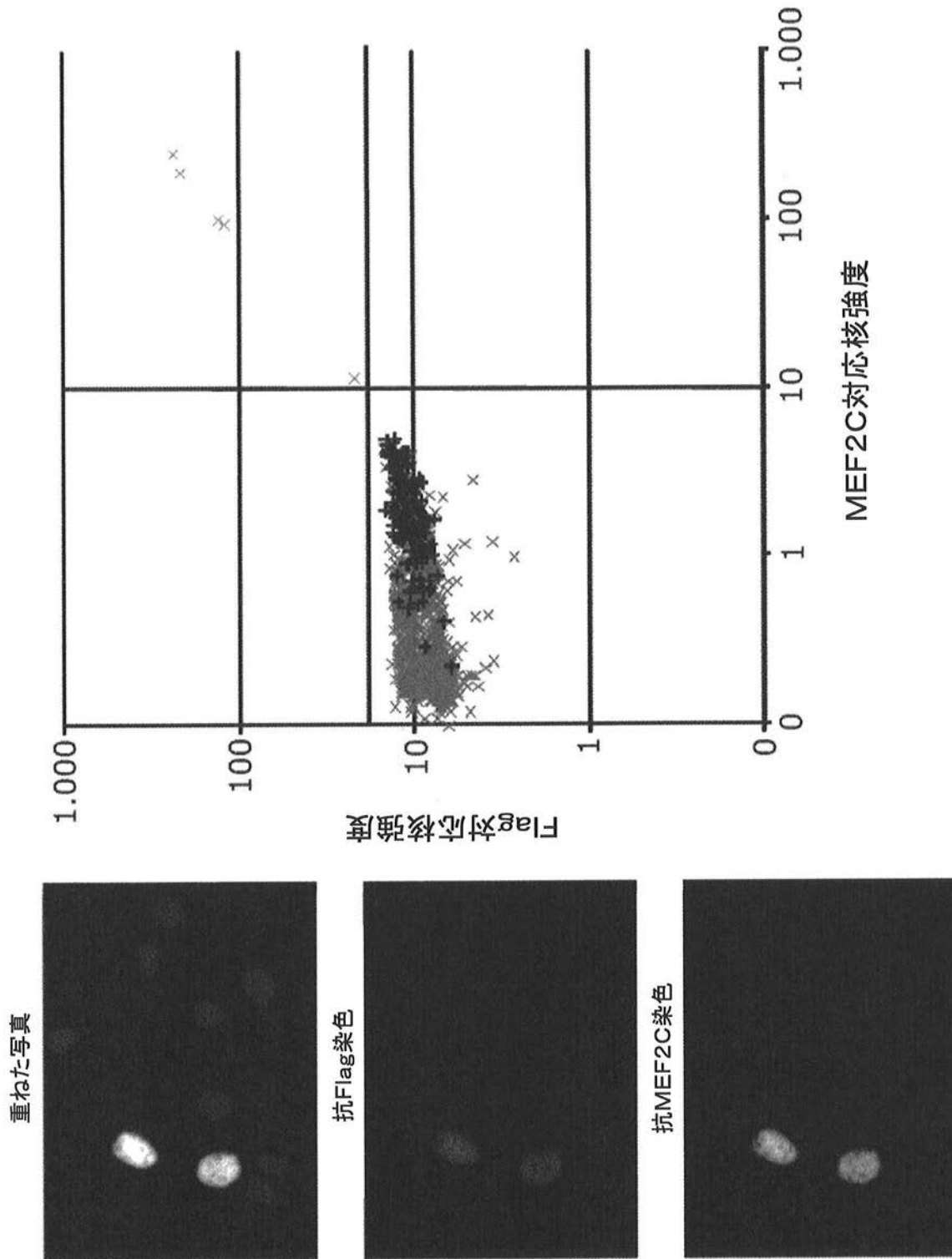
本発明の特定の態様が本明細書に詳細に開示されているが、これは例として、かつ単に説明する目的でなされたものである。前述の態様は添付された特許請求の範囲を限定することを意図したものではない。特許請求の範囲によって定められるような本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明に種々の置換、変更および改変を行い得ることは発明者により企図される。

20

【図 1】

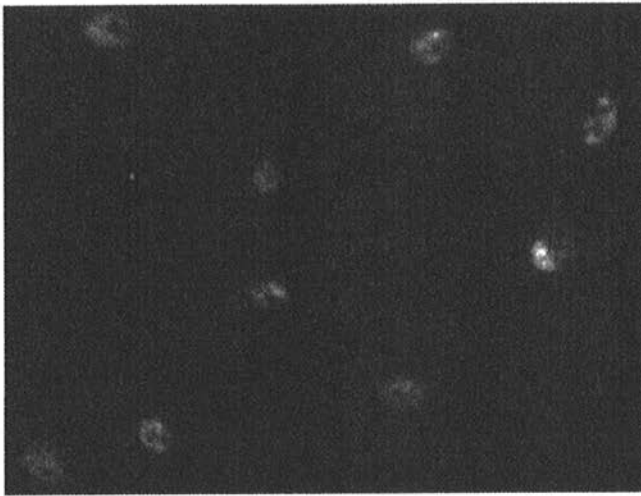


【図 2】

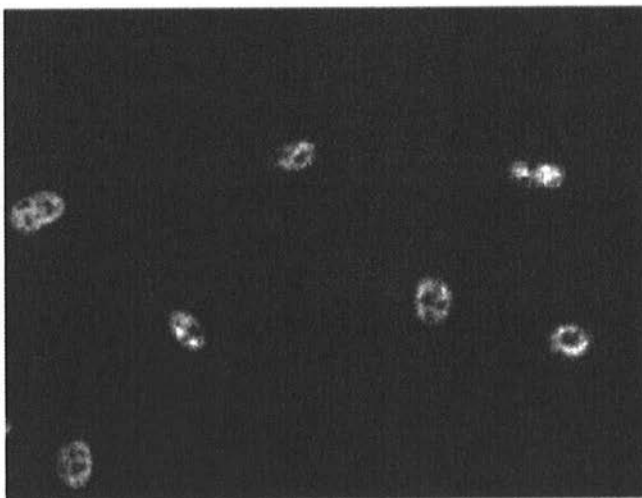


【図 3】

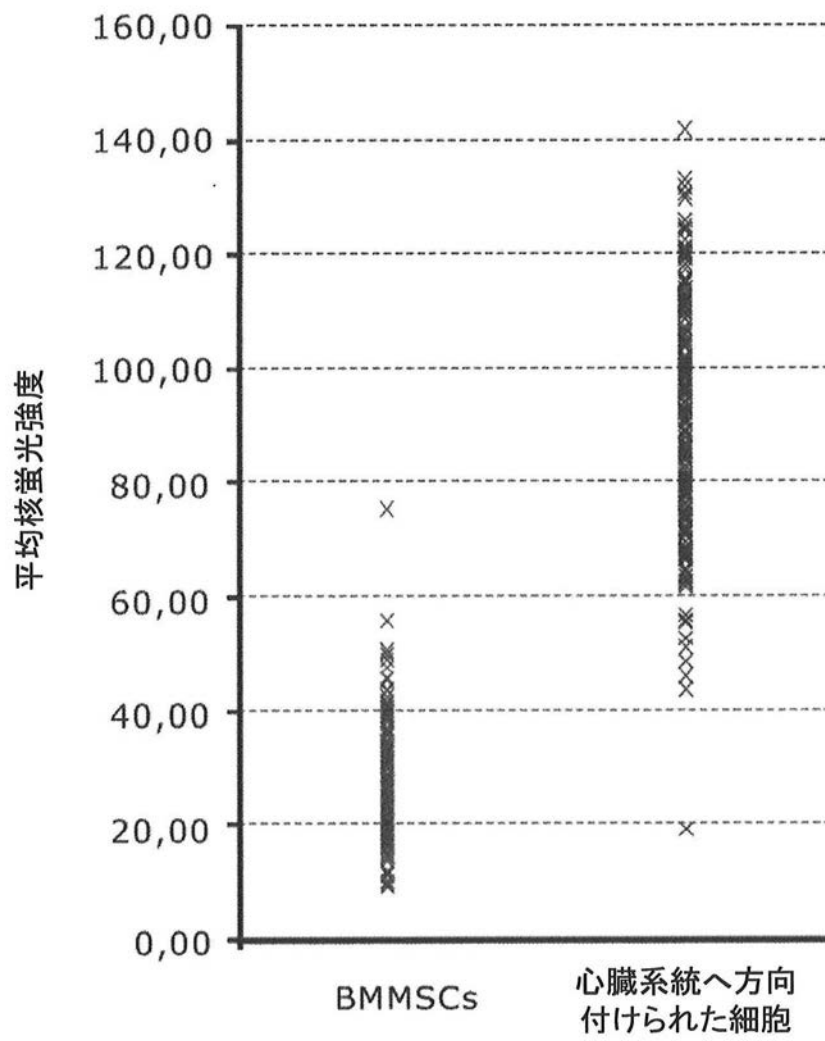
BMMSCs



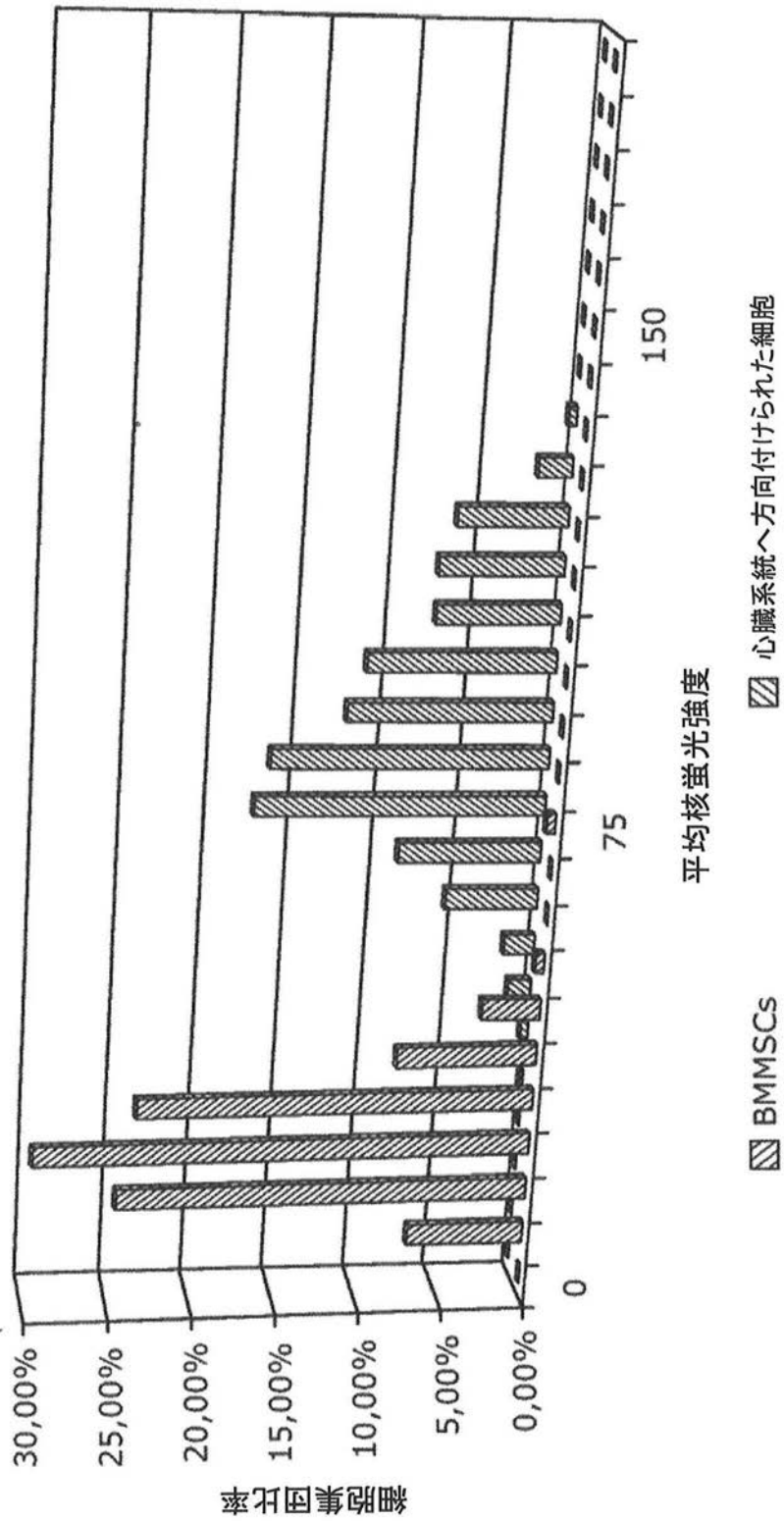
心臓系統へ方向付けられた細胞



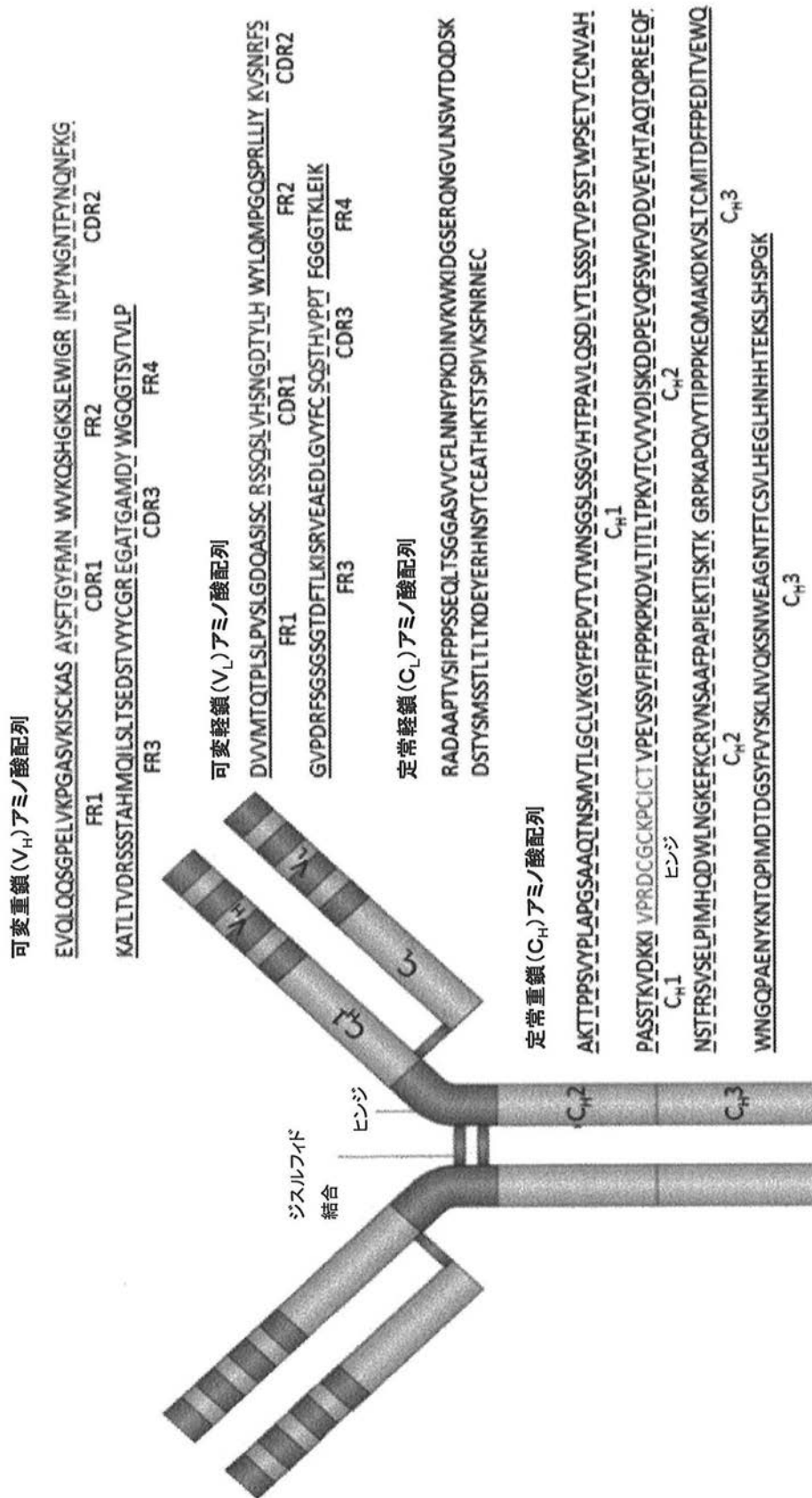
【図 4】



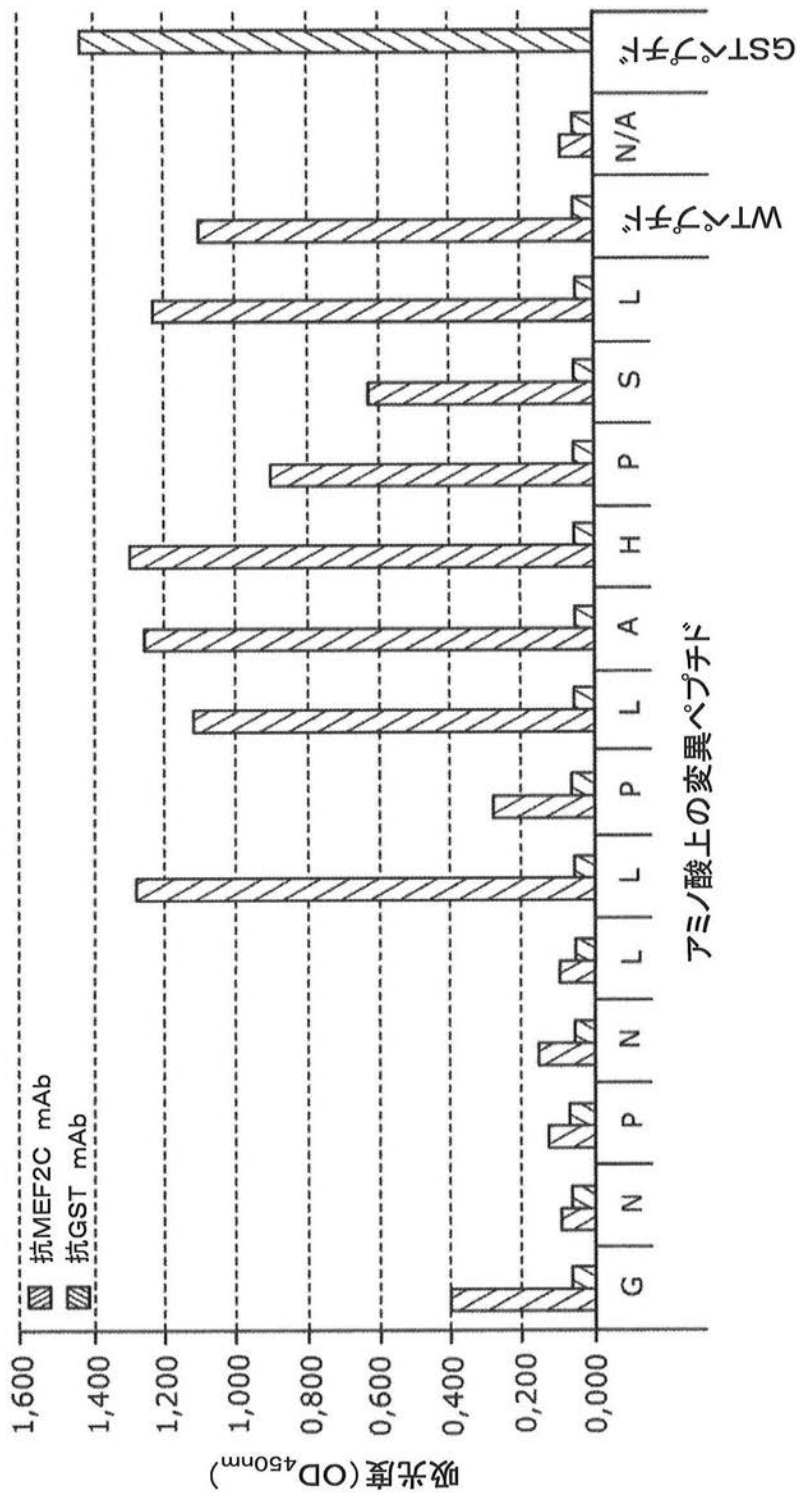
【図 5】



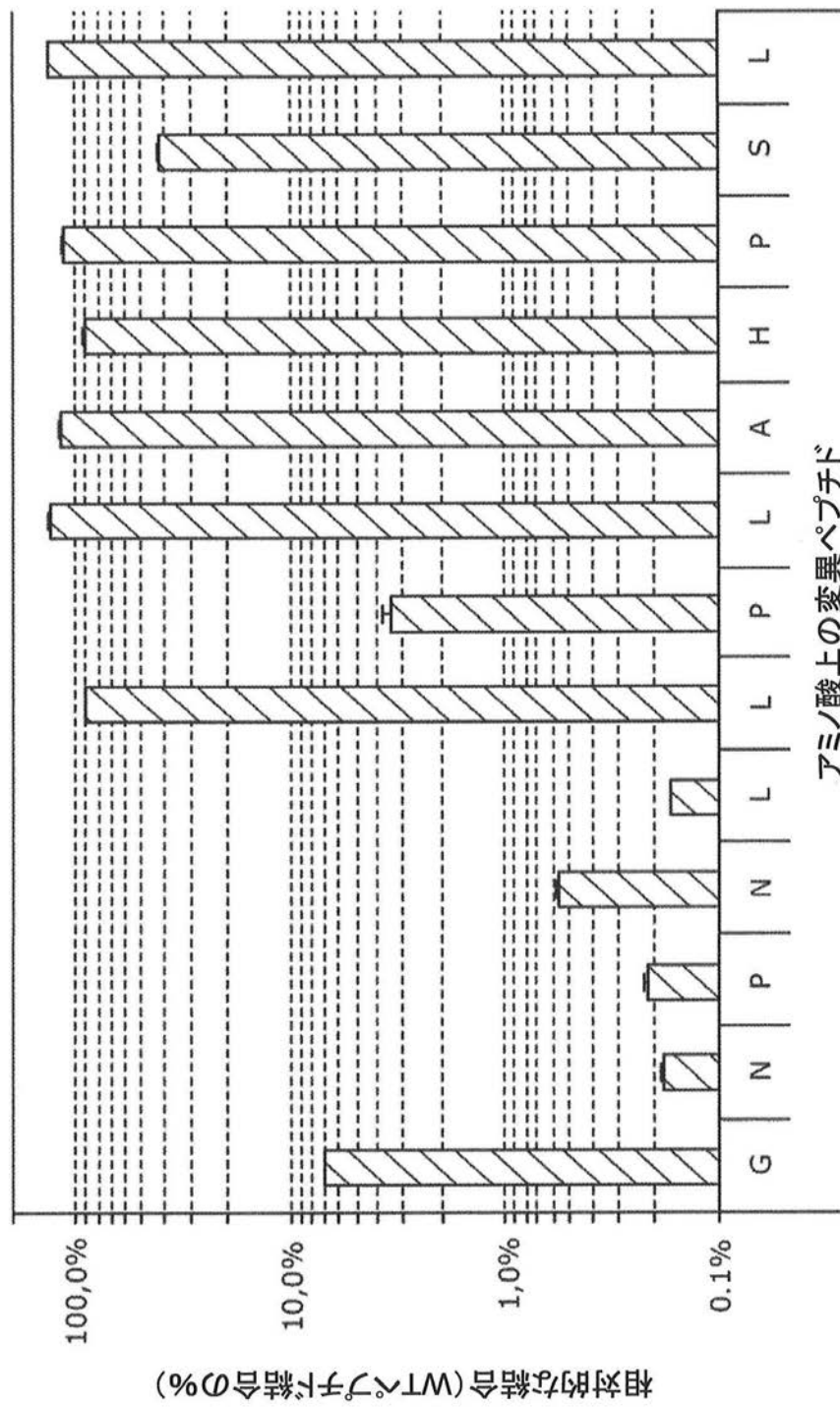
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

2016508129000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2013/077476

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)



on paper



in electronic form

b. (time)



in the international application as filed



together with the international application in electronic form



subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/077476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/18
ADD.

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)

C07K

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous: "Anti-MEF2C Product Data Sheet", Atlas Antibodies ¹ December 2012 (2012-12-01), XP002724290, Retrieved from the Internet: URL:https://atlasantibodies.com/print_data sheet/02721 [retrieved on 2014-05-13] the whole document ----- -/--	1-41



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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 application or patent 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 May 2014

Date of mailing of the international search report

16/06/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bayer, Annette

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/077476

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous: "Anti-MEF2C Product Data Sheet", Atlas Antibodies 1 December 2012 (2012-12-01), XP002724291, Retrieved from the Internet: URL:https://atlasantibodies.com/print_data sheet/02638 [retrieved on 2014-05-13] the whole document	1-41
X	----- A. VORONOVA ET AL: "Gli2 and MEF2C activate each other's expression and function synergistically during cardiomyogenesis in vitro", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 40, no. 8, 22 December 2011 (2011-12-22), pages 3329-3347, XP055117779, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr1232 page 3332, left-hand column, paragraph 2 -& Anonymous: "MEF-2C (E-17): sc-13266", SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. XP002724292, Retrieved from the Internet: URL:http://datasheets.scbt.com/sc-13266.pdf f [retrieved on 2014-05-13] -----	1-41
X	----- LEIFER D ET AL: "MEF2C, A MADS/MEF2-FAMILY TRANSCRIPTION FACTOR EXPRESSED IN A LAMINAR DISTRIBUTION IN CEREBRAL CORTEX", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 90, 1 February 1993 (1993-02-01), pages 1546-1550, XP002905113, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.90.4.1546 page 1546, right-hand column, paragraph 3 page 1547, right-hand column, paragraph 3; figure 2 -----	1-20, 22-41

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 N 5/20 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 5/20	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
	C 1 2 N 1/21	
	C 1 2 N 5/10	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100173185

弁理士 森田 裕

(74)代理人 100133042

弁理士 佃 誠玄

(72)発明者 マウエン, セバスチャン

ベルギー王国 ビー-1 4 3 5 モン-サン-ギベール, リュ エドゥアール ブラン 1 2, ア
クシス ビジネス パーク

(72)発明者 デ ワエル, ペーター

ベルギー王国 ビー-1 4 3 5 モン-サン-ギベール, リュ エドゥアール ブラン 1 2, ア
クシス ビジネス パーク

(72)発明者 ゴードン-ベレス フォード, ローランド

ベルギー王国 ビー-1 3 1 0 ラ ウルプ, アヴニュ アントワネット エルラン 1 1

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA29 AA40 BA13 BA14 BB20 BB24 CB01 CB17 DA20

DA36 FA16 FA29 FB01 FB02 FB03 FB05 FB06 FB08 FB12

FB13 FB15 GB02 GC10 GC15

4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 CA05

4B063 QA01 QQ08 QR48 QR51 QR66 QS33 QS36 QX02

4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AB01 AB02 AC14 BA02

4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB11 CC02 DD62

4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 CA01 NA14 ZA36

4H045 AA11 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	生物标志物方法和组合物		
公开(公告)号	JP2016508129A	公开(公告)日	2016-03-17
申请号	JP2015548590	申请日	2013-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	Seryadoesua		
申请(专利权)人(译)	Seryado上课啊.		
[标]发明人	マウエンセバスチャン デワエルペーター ゴードンベレスフォードローランド		
发明人	マウエン,セバスチャン デワエル,ペーター ゴードン-ベレス フォード,ローランド		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/02 C12N15/09 C12Q1/04 C12Q1/06 A61K35/545 A61P9/00 A61P25/00 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/48 G01N33/577 C12N5/20 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10		
CPC分类号	A61P25/00 C07K16/18 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/92 G01N33/6878		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N15/00.C C12N15/00.A C12Q1/04 C12Q1/06 A61K35/545 A61P9/00 A61P25/00 A61K39/395.N A61K39/395.D G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N33/577.B C12N5/20 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA29 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GB02 2G045/GC10 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA05 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR66 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/DD62 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB65 4C087/CA01 4C087/NA14 4C087/ZA36 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	田中 玲子 松任谷 裕子 北野 健 森田 裕		
优先权	2012023058 2012-12-20 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了与MADS盒转录增强子2选择性结合的抗体，MEF2C (也称为多肽C，肌细胞特异性增强子2C)。MEF2C是在已与干细胞分化并定向的细胞中表达的几种生物标记之一。MEF2C是蛋白质MEF2家族中的转录因子，在心脏形态发生，肌发生和血管发育中起作用。还提供了产生抗体的杂交瘤及其使用方法和将该抗体用于诊断和治疗目的的试剂盒。

(21) 出願番号	特願2015-548590 (P2015-548590)	(71) 出願人	515168709
(86) (22) 出願日	平成25年12月19日 (2013.12.19)		セリャド エス. アー.
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月11日 (2015.8.11)		ベルギー王国 ビー-1435 モンサ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/077476		ン-ギベール, リュ エドゥアール ブラ
(87) 国際公開番号	WO2014/096248		ン 12, アクシス ビジネス パーク
(87) 国際公開日	平成26年6月26日 (2014.6.26)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	1223058.7		弁理士 大野 聖二
(32) 優先日	平成24年12月20日 (2012.12.20)	(74) 代理人	100105891
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 田中 玲子
		(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子
		(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健
		(74) 代理人	100149076
			弁理士 梅田 慎介
最終頁に続く			