

(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2018-521717

(P2018-521717A)

(43) 公表日 平成30年8月9日 (2018. 8. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/20 (2006.01)	A 6 1 L 27/20	4 C 0 7 6
A 6 1 L 27/50 (2006.01)	A 6 1 L 27/50	4 C 0 8 1
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L 27/38	4 C 0 8 4
A 6 1 L 27/44 (2006.01)	A 6 1 L 27/44	4 C 0 8 5
A 6 1 L 27/52 (2006.01)	A 6 1 L 27/52	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-559852 (P2017-559852)	(71) 出願人	596060697
(86) (22) 出願日	平成28年5月17日 (2016. 5. 17)		マサチューセッツ インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成30年1月12日 (2018. 1. 12)		オブ テクノロジー
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/032920		アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
(87) 国際公開番号	W02016/187225		39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア
(87) 国際公開日	平成28年11月24日 (2016. 11. 24)		ヴェニュー・77
(31) 優先権主張番号	62/162, 803	(71) 出願人	591044027
(32) 優先日	平成27年5月17日 (2015. 5. 17)		ザ チルドレンズ メディカル センター
(33) 優先権主張国	米国 (US)		コーポレーション
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
			2115 ボストン シャタックストリー
			ト 55
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 細胞および細胞凝集体を封入するための多層ヒドロゲルカプセル

(57) 【要約】

カプセル周辺での線維性過剰増殖が減少した埋め込み用生体医療デバイスを開示する。デバイスは、生体適合性材料を含み、特定の特徴を有し、これらの特徴は、デバイスに存在するこれらの特徴の1つまたは複数を欠く同じデバイスより埋め込み後の線維化反応の誘発を少なくすることができる。哺乳動物細胞を封入し、1 mm超の直径、および任意選択で細胞を含まないコアを有し、対象への埋め込み後の線維性過剰増殖を低減した、生体適合性ヒドロゲルカプセルを開示する。開示された封入された細胞の治療有効量を対象に投与することを含む、対象における疾患を処置する方法も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体医療デバイスの調製物であって、

該調製物の該デバイスの少なくとも 60% が、(i) 球様形状または回転楕円体様形状を有し、(ii) 少なくとも X mm であるが Y mm 以下の直径を有し、但し Y は X より大きく、X が 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9 または 2.0 であり、Y が 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 または 10.0 であり、

(a) 該調製物の該デバイスの 20% 以下が、球様形状または回転楕円体様形状以外を有し、

10

(b) 該調製物の該デバイスの少なくとも 50% が、1 個の生細胞もしくは複数の生細胞、または少なくとも 1000、2000 もしくは 5000 個の生細胞／デバイスを含み、

(c) 球様形状または回転楕円体様形状を有する該調製物の該デバイスの少なくとも 50% が、1 個の生細胞もしくは複数の生細胞、または少なくとも 1000、2000 もしくは 5000 個の生細胞を含み、

(d) 該調製物の該デバイスの 20% 以下が、エッジを有し、

(e) 該調製物の該デバイスの少なくとも 50% 中の該細胞が、該デバイス全体にわたって本質的に均一に分布し、

20

(f) 球様形状または回転楕円体様形状を有する該調製物の該デバイスの少なくとも 50% 中の該細胞が、該デバイス全体にわたって本質的に均一に分布し、

(g) 該調製物の該デバイスの少なくとも 50% 中の該細胞が、該デバイス全体にわたって本質的に均一に分布しておらず、

(h) 該調製物の該球様形状または回転楕円体様形状のデバイスの少なくとも 50% 中の該細胞が、該デバイス全体にわたって本質的に均一に分布していない、調製物。

【請求項 2】

前記生体医療デバイスは、生体適合性材料を含み、該生体適合性材料が、アルギナートまたはアルギナート誘導体である、請求項 1 に記載の調製物。

【請求項 3】

30

X = 1.2 および Y = 10.0 である、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の調製物。

【請求項 4】

X = 1.2 および Y = 8.0 である、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の調製物。

【請求項 5】

X = 1.3 および Y = 10.0 である、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の調製物。

【請求項 6】

X = 1.3 および Y = 8.0 である、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の調製物。

【請求項 7】

前記調製物の前記デバイスの少なくとも 60% が、球様形状または回転楕円体様形状を有する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の調製物。

40

【請求項 8】

前記調製物の前記デバイスの少なくとも 70% が、球様形状または回転楕円体様形状を有する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 9】

前記調製物の前記デバイスの少なくとも 80% が、球様形状または回転楕円体様形状を有する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 10】

前記調製物の前記デバイスの少なくとも 80% が、サブコンパートメント化されていない、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 11】

50

前記調製物の前記デバイスの少なくとも80%が、サブコンパートメント化されており、少なくとも1つのサブコンパートメントが、細胞を本質的に含まない、請求項1から10のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項12】

被験体を処置する方法であって、

(a) 該被験体に、治療効果を少なくともZ日間提供する、有効量の請求項1から11のいずれか一項に記載の調製物の最初の投与を施す工程、および

(b) 該被験体に、有効な量の該調製物の、その後の投与を施す工程を含み、

該最初の投与と該その後の投与とが少なくともZ-10、Z-5またはZ日離れており、中間の投与が提供されない、方法。 10

【請求項13】

Zが少なくとも14日である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

Zが少なくとも30日である、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

被験体を処置する方法であって、

被験体への有効な量の請求項1から11のいずれか一項に記載の調製物の前記最初の投与の少なくともZ日後に、有効な量の該調製物の、その後の投与を施す工程を含み、

該最初の投与と該その後の投与とが少なくともZ-10、Z-5またはZ日離れている、方法。 20

【請求項16】

Zが少なくとも14日である、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

Zが少なくとも30日である、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

細胞を封入したヒドロゲルカプセルであって、

該カプセルは、

内側の無細胞コア層、

哺乳動物分泌細胞、哺乳動物代謝細胞、哺乳動物構造細胞およびそれらの集合体からなる群から選択される移植される細胞を含有する、ヒドロゲル層、ならびに

外側の無細胞バリアまたは構造層の3層からなる、ヒドロゲルカプセル。 30

【請求項19】

平均直径が1mm超8mm未満である、請求項18に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項20】

前記コア層が、治療剤、予防剤または診断剤を含む、請求項18または19に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項21】

前記コア層が、抗炎症剤、フェノール系酸化防止剤および抗増殖薬からなる群から選択される治療剤を含む、請求項20に記載のヒドロゲルカプセル。 40

【請求項22】

前記コア層が、埋め込み部位で放出される治療剤を含む、請求項20または21に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項23】

細胞を封入したヒドロゲルカプセルであって、

該カプセルは、哺乳動物分泌細胞、哺乳動物代謝細胞、哺乳動物構造細胞およびそれらの集合体からなる群から選択される移植される細胞を含有する、ヒドロゲル層、ならびに外側の無細胞バリアまたは構造層 50

の2つまたはそれ超の層からなり、

該カプセルは、直径が少なくとも1 mmかつ8 mm未満であり、直径1 mm未満の同じカプセルより埋め込み後の線維化反応の誘発が少ない、ヒドロゲルカプセル。

【請求項24】

直径が少なくとも1.2 mmである、請求項23に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項25】

直径が少なくとも1.5 mmである、請求項23に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項26】

内側の無細胞コア層、

前記哺乳動物分泌細胞、哺乳動物代謝細胞、哺乳動物構造細胞およびそれらの集合体からなる群から選択される移植される細胞を含有する、ヒドロゲル層、ならびに

10

前記外側の無細胞バリアまたは構造層

の3層からなる、請求項24から25のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項27】

前記ヒドロゲルが、多糖、コラーゲン、アガロース、ポリホスファゼン、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、アクリル酸およびメタクリル酸のコポリマー、ポリ（アルキレンオキシド）、ポリ（ビニルアセテート）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ならびにそれらのコポリマーおよびブレンドからなる群から選択されるポリマーを含む、請求項18から26のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項28】

20

前記ヒドロゲルが、アルギナート、キトサン、ヒアルロナンおよびコンドロイチン硫酸からなる群から選択される多糖である、請求項18から27のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項29】

前記カプセルの表面が親水性である、請求項18から28のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項30】

前記細胞が、臍島細胞または未分化のもしくは部分的に分化したそれらの前駆体である、請求項18から29のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項31】

30

前記哺乳動物細胞が、同種異系または自家性である、請求項18から30のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項32】

前記哺乳動物細胞が臍島細胞である、請求項18から31のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項33】

細胞を封入したヒドロゲルカプセルの集団であって、該カプセルが、哺乳動物分泌細胞、哺乳動物代謝細胞、哺乳動物構造細胞およびそれらの集合体からなる群から選択される移植される細胞を含有し、カプセルの前記集団中の全てのカプセルは、直径が少なくとも1 mmかつ8 mm未満であり、前記ヒドロゲルカプセルは、直径1 mm未満の同じカプセルより埋め込み後の線維化反応の誘発が少ない、集団。

40

【請求項34】

前記集団中の前記カプセルが、直径が1 mm未満であるカプセルおよび直径が少なくとも8 mmであるカプセルから、直径が少なくとも1 mmかつ8 mm未満であるカプセルを分離することによって選択されたものである、請求項33に記載のヒドロゲルカプセルの集団。

【請求項35】

前記集団中の全ての前記カプセルは、直径が少なくとも1.2 mmである、請求項33または34に記載のヒドロゲルカプセルの集団。

【請求項36】

50

前記集団中の全ての前記カプセルは、直径が少なくとも 1.5 mm である、請求項 33 または 34 に記載のヒドロゲルカプセルの集団。

【請求項 37】

前記ヒドロゲルが、多糖、コラーゲン、アガロース、ポリホスファゼン、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、アクリル酸およびメタクリル酸のコポリマー、ポリ（アルキレンオキシド）、ポリ（ビニルアセテート）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ならびにそれらのコポリマーおよびブレンドからなる群から選択されるポリマーを含む、請求項 33 から 36 のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセルの集団。

【請求項 38】

前記ヒドロゲルが、アルギナート、キトサン、ヒアルロナンおよびコンドロイチン硫酸からなる群から選択される多糖である、請求項 33 から 37 のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセルの集団。

10

【請求項 39】

前記カプセルの表面が親水性である、請求項 33 から 38 のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセル。

【請求項 40】

前記細胞が、臍島細胞または未分化のもしくは部分的に分化したそれらの前駆体である、請求項 33 から 39 のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセルの集団。

【請求項 41】

前記哺乳動物細胞が、同種異系または自家性である、請求項 33 から 40 のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセルの集団。

20

【請求項 42】

前記哺乳動物細胞が臍島細胞である、請求項 33 から 43 のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセルの集団。

【請求項 43】

機能細胞を、それを必要とする個体に提供する方法であって、請求項 18 から 42 のいずれか一項に記載のヒドロゲルカプセルの有効量を前記個体に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 44】

細胞を封入したヒドロゲルカプセルを作製する方法であって、

30

該カプセルは、

内側の無細胞コア層

哺乳動物分泌細胞、哺乳動物代謝細胞、哺乳動物構造細胞およびそれらの集合体からなる群から選択される移植される細胞を含有する、ヒドロゲル層、ならびに

外側の無細胞バリアまたは構造層

の 3 層からなり、

該方法は、3つの別個の同心チューブからなるノズルを出口に有する電気スプレー装置を準備する工程、

1 種または複数種の抗炎症薬または撮像試薬を任意選択で含む、ヒドロゲル形成性材料を、該ノズルの最も内側のチューブ内へポンプ注入する工程、

40

ヒドロゲル形成性材料および封入される細胞を含有する第 2 の流れを、該ノズルの中間のチューブ内へポンプ注入する工程、

ヒドロゲル形成性材料を含有する第 3 の流れを、最も外側のチューブ内へポンプ注入し、3つの流れが該ノズルの該出口で合流し、ヒドロゲル溶液の粘度によって該 3つの流れの間の顕著な混じり合いが防止され、それによって、電界下で 3つの明瞭な同心層を有する液滴が形成される工程、ならびに

該液滴を、ヒドロゲルを架橋するための二価イオンを含有するゲル浴に落下させ、3層カプセルを形成させる工程

を含む、方法。

【請求項 45】

50

細胞を封入したヒドロゲルカプセルを作製する方法であって、

該カプセルは、

哺乳動物分泌細胞、哺乳動物代謝細胞、哺乳動物構造細胞およびそれらの集合体からなる群から選択される移植される細胞を含有する、ヒドロゲル層、ならびに

外側の無細胞バリアまたは構造層

の2つまたはそれ超の層からなり、

該カプセルは、直径が少なくとも1 mmかつ8 mm未満であり、直径1 mm未満の同じカプセルより埋め込み後の線維化反応の誘発が少なく、

第1のヒドロゲル流体（その中に懸濁された細胞を有する）および第2のヒドロゲル流体を、二流体同軸電気噴射に提供し、該2つの流体の比較的高い粘度およびそれらの間の短い相互作用時間によって、該流体が静電気力下で混じり合うことを防止する工程、

コアシェル構造を有するマイクロ液滴を形成する工程、ならびに

二価架橋イオンを含有するゲル化浴中で該マイクロ液滴を架橋して、ヒドロゲルカプセルを形成する工程

を含む、方法。

【請求項46】

生体適合性材料を含む埋め込み用生体医療デバイスであって、該デバイスは、直径が少なくとも1 mmかつ10 mm未満であり、該デバイスの表面孔は、0 nm超10 μm未満であり、該デバイスの表面は、中性または親水性であり、該デバイスは、回転楕円体様形状を有し、該デバイスの表面の曲率は、該表面の全ての点において、少なくとも0.2かつ2以下であり、該デバイスの表面は、平面、鋭角、溝または峰を有さず、該デバイスは、直径1 mm未満の同じデバイスより埋め込み後の線維化反応の誘発が少ない、デバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、2016年5月17日に出願した米国仮出願第62/162,803号の利益を主張する。2016年5月17日に出願した出願第62/162,803号は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

連邦支援研究開発に関する申立て

この発明は、米国国立衛生研究所により与えられた政府支援助成番号R01 DE016516によってなされた。政府は、本発明について一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、概して、治療剤を含有し細胞を封入した構造的デバイスを含めた生体医療デバイスの製作および使用の分野に関する。より詳細には、本発明の一部の態様は、哺乳動物細胞を封入した生体適合性ヒドロゲルおよび抗炎症薬を搭載したポリマー粒子を含む、埋め込みされる生体医療デバイスの生体適合性の改善を確実にするための改善された物理的パラメータに関する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

体内に移植される生体材料およびデバイスは、細胞移植、制御された薬物放出、生理学的状態の連続的感知およびモニタリング、電子的ペーシングならびに組織再生などの幅広い領域の臨床的応用に用いられている。これらの応用において、デバイスの寿命および忠実度は、デバイスが宿主免疫系による認識を避ける能力に高く依存する。持続性の炎症、線維形成（仕切り（walling-off））および周囲の組織への損傷を含めた異物反応を導く、宿主が編成する細胞プロセスのカスケードが、免疫認識によって引き起こされる。これ

らの不要な効果は、デバイスの機能に有害であり、患者の疼痛および不快感の重大な原因でもある。

【0005】

1980年、LimおよびSunは、膵臓膵島の封入のためのアルギナート／ポリリシン複合体でコーティングされたアルギナートマイクロカプセルを紹介した。それまで、組織工学および再生医療用の生細胞または細胞集合体の封入のためには、ヒドロゲルマイクロカプセルが広く調査されていた(Oriveら、Nat. Medicine、9巻：104頁(2003年)；Paulら、Regen. Med.、4巻：733頁(2009年)；Readら、Biotechnol.、19巻：29頁(2001年))。一般的に、カプセルは、細胞によって分泌される治療タンパク質を放出しながら、封入された細胞への酸素および栄養素の容易な拡散が可能となるように、かつ免疫系による攻撃から細胞が防御されるように設計される。これらは、I型糖尿病、がん、およびパーキンソン病などの神経変性障害を含めた一連の疾患に有望な治療剤として開発されてきた(Wilsonら、Adv. Drug. Deliv. Rev.、60巻：124頁(2008年)；Jokiら、Nat. Biotech.、19巻：35頁(2001年)；Kishimaら、Neurobiol. Dis.、16巻：428頁(2004年))。最も普及しているカプセル製剤の1つは、イオン架橋を通じて形成され得るアルギナートヒドロゲルをベースとしたものである。典型的なプロセスにおいて、まず、細胞が粘性のアルギナート溶液とブレンドされる。その後、細胞懸濁液は、空気剪断、音響振動または静電液滴形成などの種々の方法を使用して、マイクロ液滴へと加工される(Rabaneletら、Biotechnol. Prog.、25巻：946頁(2009年))。アルギナート液滴は、Ca²⁺またはBa²⁺などの二価イオンの溶液と接触するとゲル化する。

【0006】

しかしながら、細胞封入用のアルギナートマイクロカプセルにまつわる課題の1つは、カプセル内での細胞の相対的位置の制御に欠くということである。細胞は、カプセル表面上に捕捉され曝露されることがあり、これは不適切な免疫防御につながる(Wongら、Biomater. Artif. Cells Immobil. Biotechnol.、19巻：675頁(1991年))。不完全な被覆は、曝露された細胞の拒絶を引き起こすばかりでなく、曝露されたエリアを通過するマクロファージおよび線維芽細胞のカプセル中への侵入を可能にする場合もあるということが分かった(Chang、Nat. Rev. Drug Discovery、4巻：221頁(2005年))。アルギナートヒドロゲルマイクロカプセルは、I型糖尿病の処置のための膵臓膵島と共に用いたその有用性について広く調査されてきた(Calafiore、Expert Opin. Biol. Ther.、3巻：201頁(2003年))。げっ歯動物(Lim、Science、210巻：908頁(1980年)；Qiら、Artifi. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.、36巻：403頁(2008年))、イヌ(Soon-Shiongら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：5843頁(1993年))、および非ヒト霊長類(El, X. Ma, D. Zhou, I. Vacek, A. M. Sun.、J. Clin. Invest.、98巻：417頁(1996年))を含めたいくつかの動物モデルにおける多くの有望な結果が報告されている。Soon-Shiongら、Lancet、343巻：950頁(1994年)；Elliottら、Xenotransplantation、14巻：157頁(2007年)；Calafioreら、Diabetes Care、29巻：137頁(2006年)、Bastaら、Diabetes Care、34巻：2406頁(2011年)、およびTuchら、Diabetes Care、32巻：1887頁(2009年)によって、臨床試験も行われている。概して、これらの臨床試験は、インスリン分泌について報告しているが、長期の血糖制御の矯正についての報告はなく、これらの系を前進させるには、さらなる課題が残っている(Tamら、J. Biomed. Mater. Res. Part A、98A巻：40頁(2011年)；deVosら、Biomaterials、27巻：5603頁(2006年))。

【0007】

1つの課題は、カプセルの生体適合性である。移植時に、異物応答が、カプセル上での線維性細胞の過剰増殖を引き起こし、この過剰増殖は、酸素および栄養素の拡散を遮り、封入された膵島の壊死につながる。このため、研究グループは、線維化反応を低減するためのポリマーを開発してきた(Maら、Adv. Mater.、23巻：H189頁(2011年))

）。別の課題は、カプセル内での膵島の不完全な被覆である（deVosら、Transplantation、62巻：888頁（1996年）；deVosら、Transplantation、62巻：893頁（1996年））。カプセルの外側へ突出した膵島は、アルギナート溶液中での膵島数密度が増加する場合またはカプセルサイズが小さい場合に、より頻繁に観察されるが、これらの場合のいずれも、移植体積を最小化するためには望ましい（Leungら、Biochem. Eng. J., 48巻：337頁（2010年））。たとえ小さくとも膵島の断片が曝露していると、免疫エフェクター細胞は、膵島全体を破壊する場合があるという仮説が立てられてきた（Kingら、Graft、4巻：491頁（2001年）；Weberら、Ann. NY Acad. Sci., 875巻：233頁（1999年））。さらに、少数の膵島の曝露によって、増強された抗体特異的細胞免疫および移植の失敗につながる、事象のカスケードが始まる場合がある。

10

【0008】

二重封入法（Elliot、2007年；Wongら、Biomater. Artif. Cells Immobil. Biotechnol., 19巻：687頁（1991年））は、細胞を含有する非常に小さいカプセルをまず形成し、次いでいくつかの小さなカプセルを大きなカプセルそれぞれの中に入れるものであり、封入および異種移植片生存の改善のために使用されてきた。このアプローチは、2つのプロセス工程、ならびに細胞の生存能力および機能性に不可欠な物質輸送を必然的に限定する大きなサイズの最終カプセルを必要とする。Schneiderら（Biomaterials, 22巻（14号）：1961～1970頁（2001年））によって報告されているように、これらの問題のいくつかに対処するため、膵島含有アルギナートビーズが、ポリエチレンイミン、ポリアクリル酸またはカルボキシメチルセルロースとアルギナートとの交互の層でコーティングされた。膵島の薄いコンフォーマルコーティングは、拡散距離および総移植体積を低減する（Teramuraら、Adv. Drug Deliv. Rev., 62巻：827頁（2010年）；Wilsonら、J. Am. Chem. Soc., 131巻：18228頁（2009年））。しかしながら、この方法は、膵島に損傷を引き起こす複数の工程を伴うことが多く、コーティングが臨床での使用にとって十分に強固であるかどうか明らかではない（Califiore、2003年；Bastaら、Curr. Diab. Rep., 11巻：384頁（2011年））。Bastaら（Transpl. Immunol., 13巻：289頁（2004年））によるこれまでのデータは、コンフォーマルコーティングは、ヒドロゲルカプセルと比較して免疫防御能力を低減している可能性があるということを示唆している。

20

30

【0009】

要するに、長年にわたる様々な動物モデルにおける有望な研究にもかかわらず、封入されたヒト膵島はこれまで、臨床的な環境においてインパクトを与えてこなかった。生体適合性、低減された免疫防御、低酸素、カプセル周辺での線維性過剰増殖、封入プロセスの影響、および移植後の炎症などの多くの非免疫学的および免疫学的因子が、この有望な技術の応用の成功を阻んでいる（Vaithilingaら、Diabet Stud, 8巻（1号）：51～67頁（2011年））。近年使用されているアルギナートマイクロカプセルは、カプセルの外側に突出した膵島を有していることが多く、これは不適切な免疫防御につながる。カプセルのコア領域中に膵島を閉じ込めるための二流体同軸電気噴射法を用いた改善された封入が、Maら、Adv. Healthcare Materials, 2巻（5号）：667～672頁（2013年）によって報告されている。

40

【0010】

封入された細胞および他の生体材料ならびに医療デバイスの臨床的応用への大きな課題の1つは、それらが非特異的な宿主応答を誘発する可能性である（Williams、Biomaterials, 29巻（20号）：2941～53頁（2008年）；Parkら、Pharm Res, 13巻（12号）：1770～6頁（1996年）；Kvistら、Diabetes Technol, 8巻（4号）：463～75頁（2006年）；Wisniewskiら、J Anal Chem, 366巻（6号）：611～21頁（2000年）；Van der Giessenら、Circulation, 94巻（7号）：1690～7頁（1996年）；Granchiら、J Biomed Mater Res, 29巻（2号）：197～202頁（1995年）；Wardら、Obstet Gynecol, 86巻（5号）：84

50

8～50頁（1995年）；Remesら、Biomaterials、13巻（11号）：731～43頁（1992年）。この反応は、初期には好中球およびマクロファージなどの先天的免疫細胞、続いて、コラーゲンを堆積する線維芽細胞の補充を伴って、埋め込まれた対象物を囲む線維性カプセルを形成する（Williams、Biomaterials、29巻（20号）：2941～53頁（2008年）；Remesら、Biomaterials、13巻（11号）：731～43頁（1992年）；Andersonら、Semin Immunol、20巻（2号）：86～100頁（2008年）；Andersonら、Adv Drug Deliver Rev、28巻（1号）：5～24頁（1997年）；Abbasら、Pathologic Basis of Disease、第7版、Philadelphia：W.B Saunders（2009年）。線維性細胞層は、電気的伝達（Singarayarら、PACE、28巻（4号）：311～5頁（2005年））または化学的伝達を妨害し、分析物（Sharkawyら、J Biomed Mater Res、37巻（3号）：401～12頁（1997年）；Sharkawyら、J Biomed Mater Res、40巻（4号）：598～605頁（1998年）；Sharkawyら、J Biomed Mater Res、40巻（4号）：586～97頁（1998年））および栄養素の輸送を妨げる可能性があり、そうして、免疫隔離した膵臓膵島など多くの埋め込み可能な医療デバイスの最終的な失敗につながる（De Grootら、J Surg Res、121巻（1号）：141～50頁（2004年）；De Vosら、Diabetologia、40巻（3号）：262～70頁（1997年）；Van Schilfgaardeら、J Mol Med、77巻（1号）：199～205頁（1999年）。）。

【0011】

移植の際のカプセルに対する線維化反応は、膵島の移植に対する大きな課題を提起する。線維形成は、最終的に膵島の壊死および移植の失敗へとつながる。

【0012】

ヒト膵島細胞の移植のための改善された封入方法およびデバイスが、依然として実質的に必要とされている。

【0013】

本発明の目的は、カプセル周辺での線維性過剰増殖が低減された、細胞移植のための細胞封入系を提供することにある。

【0014】

本発明のさらなる目的は、カプセル周辺での線維性過剰増殖が低減された、細胞移植方法を提供することにある。

【0015】

本発明のさらなる目的は、封入された膵島細胞を使用して糖尿病を処置する、改善された方法を提供することにある。

【0016】

本発明のさらなる目的は、線維性隔離ならびに機能および長期間治療効率の妨げを防止する一般的なデバイス製作のための方法およびデバイスを提供することにある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Oriveら、Nat. Medicine、9巻：104頁（2003年）

【非特許文献2】Paulら、Regen. Med.、4巻：733頁（2009年）

【非特許文献3】Readら、Biotechnol.、19巻：29頁（2001年）

【非特許文献4】Wilsonら、Adv. Drug. Deliv. Rev.、60巻：124頁（2008年）

【非特許文献5】Jokiら、Nat. Biotech.、19巻：35頁（2001年）

【非特許文献6】Kishimaら、Neurobiol. Dis.、16巻：428頁（2004年）

【非特許文献7】Rabaneletら、Biotechnol. Prog.、25巻：946頁（2009年）

【非特許文献8】Wongら、Biomat. Artific. Cells Immobil. Biotechnol.、19巻：675頁（1991年）

【非特許文献9】Chang、Nat, Rev. Drug Discovery、4巻：221頁（2005年）

- 【非特許文献10】Calafiore、Expert Opin. Biol. Ther.、3巻：201頁（2003年）
- 【非特許文献11】Lim、Science、210巻：908頁（1980年）
- 【非特許文献12】Qiら、Artifi. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.、36巻：403頁（2008年）
- 【非特許文献13】Soon-Shiongら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：5843頁（1993年）
- 【非特許文献14】El, X. Ma、D. Zhou、I. Vacek、A. M. Sun.、J. Clin. Invest.、98巻：417頁（1996年）
- 【非特許文献15】Soon-Shiongら、Lancet、343巻：950頁（1994年） 10
- 【非特許文献16】Elliottら、Xenotransplantation、14巻：157頁（2007年）
- 【非特許文献17】Calafioreら、Diabetes Care、29巻：137頁（2006年）
- 【非特許文献18】Bastaら、Diabetes Care、34巻：2406頁（2011年）
- 【非特許文献19】Tuchら、Diabetes Care、32巻：1887頁（2009年）
- 【非特許文献20】Tamら、J. Biomed. Mater. Res. Part A、98A巻：40頁（2011年）
- 【非特許文献21】deVosら、Biomaterials、27巻：5603頁（2006年）
- 【非特許文献22】Maら、Adv. Mater.、23巻：H189頁（2011年）
- 【非特許文献23】deVosら、Transplantation、62巻：888頁（1996年）
- 【非特許文献24】deVosら、Transplantation、62巻：893頁（1996年） 20
- 【非特許文献25】Leungら、Biochem. Eng. J.、48巻：337頁（2010年）
- 【非特許文献26】Kingら、Graft、4巻：491頁（2001年）
- 【非特許文献27】Weberら、Ann. NY Acad. Sci.、875巻：233頁（1999年）
- 【非特許文献28】Wongら、Biomat. Artific. Cells Immobil. Biotechnol.、19巻：687頁（1991年）
- 【非特許文献29】Schneiderら、Biomaterials、22巻（14号）：1961～1970頁（2001年）
- 【非特許文献30】Teramuraら、Adv. Drug Deliv. Rev.、62巻：827号（2010年） 30
- 【非特許文献31】Wilsonら、J. Am. Chem. Soc.、131巻：18228頁（2009年）
- 【非特許文献32】Bastaら、Curr. Diab. Rep.、11巻：384頁（2011年）
- 【非特許文献33】Bastaら、Transpl. Immunol.、13巻：289頁（2004年）
- 【非特許文献34】Vaithilingaら、Diabet Stud、8巻（1号）：51～67頁（2011年）
- 【非特許文献35】Maら、Adv. Healthcare Materials、2巻（5号）：667～672頁（2013年）
- 【非特許文献36】Williams、Biomaterials、29巻（20号）：2941～53頁（2008年） 40
- 【非特許文献37】Parkら、Pharm Res、13巻（12号）：1770～6頁（1996年）
- 【非特許文献38】Kvistら、Diabetes Technol、8巻（4号）：463～75頁（2006年）
- 【非特許文献39】Wisniewskiら、J Anal Chem、366巻（6号）：611～21頁（2000年）
- 【非特許文献40】Van der Giessenら、Circulation、94巻（7号）：1690～7頁（1996年）
- 【非特許文献41】Granchiら、J Biomed Mater Res、29巻（2号）：197～202頁（1995年） 50

【非特許文献 4 2】Wardら、Obstet Gynecol、8 6 巻（5 号）：8 4 8～5 0 頁（1 9 9 5 年）

【非特許文献 4 3】Remesら、Biomaterials、1 3 巻（1 1 号）：7 3 1～4 3 頁（1 9 9 2 年）

【非特許文献 4 4】Andersonら、Semin Immunol、2 0 巻（2 号）：8 6～1 0 0 頁（2 0 0 8 年）

【非特許文献 4 5】Andersonら、Adv Drug Deliver Rev、2 8 巻（1 号）：5～2 4 頁（1 9 9 7 年）

【非特許文献 4 6】Abbasら、Pathologic Basis of Disease.第 7 版、Philadelphia：W.B Saunders（2 0 0 9 年）

10

【非特許文献 4 7】Singarayarら、PACE、2 8 巻（4 号）：3 1 1～5 頁（2 0 0 5 年）

【非特許文献 4 8】Sharkawyら、J Biomed Mater Res、3 7 巻（3 号）：4 0 1～1 2 頁（1 9 9 7 年）

【非特許文献 4 9】Sharkawyら、J Biomed Mater Res、4 0 巻（4 号）：5 9 8～6 0 5 頁（1 9 9 8 年）

【非特許文献 5 0】Sharkawyら、J Biomed Mater Res、4 0 巻（4 号）：5 8 6～9 7 頁（1 9 9 8 年）

【非特許文献 5 1】De Grootら、J Surg Res、1 2 1 巻（1 号）：1 4 1～5 0 頁（2 0 0 4 年）

【非特許文献 5 2】De Vosら、Diabetologia、4 0 巻（3 号）：2 6 2～7 0 頁（1 9 9 7 年）

20

【非特許文献 5 3】Van Schilfgaardeら、J Mol Med、7 7 巻（1 号）：1 9 9～2 0 5 頁（1 9 9 9 年）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 8】

ある特定の物理的特徴を有するように設計された生体医療デバイスは、宿主の拒絶ならびに生体材料および生体医療デバイスの線維性過剰増殖の低減を呈することを発見した。

【0 0 1 9】

生体医療デバイスの調製物、例えばヒドロゲルカプセルの調製物であって、調製物のデバイスの少なくとも 6 0、7 0、8 0、9 0、9 5 または 9 8 %が、(i) 球様形状または回転楕円体様形状を有し、(ii) 少なくとも X mmであるが Y mm以下の直径を有し、但し Yは Xより大きく、Xが 1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9 または 2. 0 であり、Yが 2. 0、2. 5、3. 0、3. 5、4. 0、4. 5、5. 0、5. 5、6. 0、6. 5、7. 0、7. 5、8. 0、8. 5、9. 0、9. 5 または 1 0. 0 である、調製物を開示する。

30

【0 0 2 0】

いくつかの形態において、調製物のデバイスの 2 0 %以下が、球様形状または回転楕円体様形状以外を有する。いくつかの形態において、調製物のデバイスの少なくとも 5 0、6 0、7 0、8 0 または 9 0 %が、1 個の生細胞もしくは複数の生細胞、または少なくとも 1 0 0 0、2 0 0 0 もしくは 5 0 0 0 個の生細胞／デバイスを含む。いくつかの形態において、球様形状または回転楕円体様形状を有する調製物のデバイスの少なくとも 5 0、6 0、7 0、8 0 または 9 0 %が、1 個の生細胞もしくは複数の生細胞、または少なくとも 1 0 0 0、2 0 0 0 もしくは 5 0 0 0 個の生細胞を含む。いくつかの形態において、調製物のデバイスの 1、2、3、4、5、1 0、1 5 または 2 0 %以下が、エッジを有する。いくつかの形態において、調製物のデバイスの少なくとも 5 0、6 0、7 0、8 0 または 9 0 %中の細胞が、デバイス全体にわたって本質的に均一に分布している。いくつかの形態において、球様形状または回転楕円体様形状を有する調製物のデバイスの少なくとも 5 0、6 0、7 0、8 0 または 9 0 %中の細胞が、デバイス全体にわたって本質的に均一に分布している。いくつかの形態において、調製物のデバイスの少なくとも 5 0、6 0、

40

50

70、80または90%中の細胞が、デバイス全体にわたって本質的に均一に分布していない。いくつかの形態において、調製物の球形状または回転楕円体形状のデバイスの少なくとも50、60、70、80または90%中の細胞が、デバイス全体にわたって本質的に均一に分布していない。これらの特色のあらゆる組合せが、生体医療デバイスの調製において使用され得る。

【0021】

いくつかの形態において、生体医療デバイスは、アルギナートまたはアルギナート誘導体などの生体適合性材料を含むことができる。いくつかの形態において、 $X = 1.2$ および $Y = 10.0$ である。いくつかの形態において、 $X = 1.2$ および $Y = 8.0$ である。いくつかの形態において、 $X = 1.3$ および $Y = 10.0$ である。いくつかの形態において、 $X = 1.3$ および $Y = 8.0$ である。

10

【0022】

いくつかの形態において、調製物のデバイスの少なくとも60%が、球形状または回転楕円体形状を有する。いくつかの形態において、調製物のデバイスの少なくとも70%が、球形状または回転楕円体形状を有する。いくつかの形態において、調製物のデバイスの少なくとも80%が、球形状または回転楕円体形状を有する。いくつかの形態において、調製物のデバイスの少なくとも80%が、サブコンパートメント化されていない。いくつかの形態において、調製物のデバイスの少なくとも80%が、例えば膜又は界面によって、サブコンパートメント化されており、少なくとも1つのサブコンパートメントが、細胞を本質的に含まない。

20

【0023】

また、被験体を処置する方法であって、(a) 被験体に、治療効果を少なくともZ日間提供する、有効量の (an effect of amount of) 本明細書に開示する調製物の最初の投与を施す工程、および (b) 被験体に、有効な量の (an effective of amount of) 調製物の、その後の投与を施す工程を含み、最初の投与とその後の投与とが少なくとも $Z - 10$ 、 $Z - 5$ またはZ日離れており、中間の投与が提供されない、方法を開示する。

【0024】

また、被験体を処置する方法であって、(a) 被験体への有効な量の本明細書に開示する調製物の最初の投与の少なくともZ日後に、有効な量の調製物の、その後の投与を施す工程を含み、最初の投与とその後の投与とが少なくとも $Z - 10$ 、 $Z - 5$ またはZ日離れている、方法を開示する。

30

【0025】

いくつかの形態において、Zは少なくとも14日である。いくつかの形態において、Zは少なくとも30日である。

【0026】

カプセル周辺での線維性過剰増殖が減じられた埋め込み用生体医療デバイスを開発した。デバイスは、生体適合性材料を含み、直径が少なくとも1mmかつ10mm未満であり、回転楕円体形状を有し、以下の追加の特徴の1つまたは複数を有する：デバイスの表面は、0nm超10 μ m未満である；デバイスの表面は、中性または親水性である；デバイスの表面の曲率は、表面の全ての点において、少なくとも0.2であり2以下である；およびデバイスの表面は、平面、鋭角、溝または峰を有さない。デバイスは、デバイス上に存在するこれらの特徴の1つまたは複数を欠く同じデバイスより、埋め込み後の線維化反応の誘発が少ない。一部の実施形態において、デバイスは、例えば、生物学的細胞もしくは組織、合成電気リード線またはセンサーを封入した、生体適合性の球様（回転楕円体）の外側シェルであり得る。

40

【0027】

生体医療デバイスは、ヒドロゲル、化学的に精製されたアルギナートおよび食品グレードのエンドトキシン含有アルギナートの両方、ガラスのような二酸化ケイ素系セラミックスなどの半導体材料、ならびにPCLおよびポリスチレンなどの分解性および非分解性ポリマーおよびプラスチックを含めた、様々な材料から作製することができる。特色の特定

50

の組合せは、デバイスの生体適合性という結果をもたらしたまたは生体適合性を改善する（特に、デバイスへの免疫反応およびデバイスのカプセル様の線維形成を低減したまたはなくすことによって）。

【0028】

生体医療デバイスは、例えば、長期埋め込み可能なセンサーおよびアクチュエーター、制御された薬物放出デバイス、プロステシスおよび組織再生生体材料、ならびに移植に関する技術を含めた、任意の生体医療用途に使用することができる。

【0029】

哺乳動物細胞を封入し、任意選択で抗炎症薬を含み、カプセル周辺での線維性過剰増殖が減少した、移植用生体適合性カプセルを開発した。カプセルは、その中に封入された哺乳動物細胞を有している。哺乳動物細胞は、カプセルのコア中には位置していない。好ましくは、カプセルは、2つまたは3つの層を含有する。無細胞コア、ヒドロゲル層および外側のバリア層を有する3層カプセルにおいて、細胞は中間層中に位置している。コアおよびシェルを含有する2層カプセルについては、細胞はシェル中に位置している。あるいはまた、細胞は、2層カプセルのコア中であってもよい。任意選択で、カプセルは、その中に封入された、抗炎症薬または放射線不透過性イメージング剤などの1種または複数種の治療剤、診断剤または予防剤も含有する。

【0030】

一般的に、コア-シェルカプセルは、2つまたはそれ超のまとまった層を有するカプセルおよびマイクロカプセルを形成するためのマイクロ流体または針システムを用いて膜層なしで製作される。例えば、2つの同時液体流を用いて、2層の液滴を形成してもよい。3層カプセルは、膜層なしで製作することができる。例えば、3つの同時流を用いて、硬化してカプセルおよびマイクロカプセルを形成する3層の液滴を形成してもよい。

【0031】

封入および移植に適した細胞は、一般的に、分泌もしくは代謝細胞（すなわち、それらは、治療因子を分泌するもしくは毒素を代謝する、もしくは両方）、または構造細胞（例えば、皮膚、筋肉、血管）、または代謝細胞（すなわち、それらは毒性物質を代謝する）である。一部の実施形態において、細胞は、自然にインスリンを分泌する膵島細胞など、自然分泌性であり、または、自然に解毒し分泌する肝細胞など、自然代謝性である。一部の実施形態において、細胞は、分泌タンパク質または代謝酵素などの組み換えタンパク質を発現するように生体工学によって作られたものである。細胞のタイプに応じて、細胞は、単一の細胞、細胞集合体、回転楕円体、または天然のもしくは生体工学によって作られた組織として組織され得る。

【0032】

カプセルは、好ましくはヒドロゲルカプセルである。一部の実施形態において、カプセルのコアは、非ヒドロゲルポリマーである。好ましくは、カプセルは1 mm超の直径を有し、より好ましくは、直径は1.5 mmまたはそれ超のサイズであるが8 mm未満である。より大きなカプセルは、ヒドロゲル中にわたる拡散によって細胞が適切な栄養素および気体交換を受けることができることを確実にするため、無細胞コアを必要とする。

【0033】

細胞を封入したヒドロゲルカプセルの集団を開発した。集団中のカプセルは、哺乳動物分泌細胞、哺乳動物代謝細胞、哺乳動物構造細胞およびそれらの集合体からなる群から選択される、移植される細胞を含有する。カプセルの集団中の全てのカプセルは、直径が少なくとも1 mmかつ8 mm未満である。集団中のカプセルは、直径1 mm未満の同じカプセルより、埋め込み後の線維化反応の誘発が少ない。集団中のカプセルは、直径が1 mm未満であるカプセルおよび直径が少なくとも8 mmであるカプセルから、直径が少なくとも1 mmかつ8 mm未満であるカプセルを分離することによって選択することができる。

【0034】

封入された膵島細胞を含有する人工膵臓などの人工臓器を、組成物から製作してもよい。これらの実施形態の一部において、細胞は、単一のヒドロゲル区画の中へ封入される。他

10

20

30

40

50

の実施形態において、組成物は、生体適合性構造中に分散または封入された複数の封入された細胞を含有する。

【0035】

疾患を処置する方法は概して、対象に、哺乳動物細胞および抗炎症薬を封入した生体適合性ヒドロゲルを投与することを伴う。一部の実施形態において、抗炎症薬は、制御放出ポリマー中に封入される。これらの実施形態の一部において、封入された細胞は、疾患を処置するための治療有効量の物質を、少なくとも30日間、好ましくは少なくとも60日間、より好ましくは少なくとも90日間、好ましくは分泌する。特に好ましい実施形態において、細胞は、対象において糖尿病を処置するための治療有効量のインスリンを、少なくとも30日間、好ましくは少なくとも60日間、より好ましくは少なくとも90日間分泌する膵島細胞である。

10

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、コアヒドロゲル中に細胞が封入されており、かつ外側の（包膜）ヒドロゲル中に薬物搭載粒子を含有する、3層カプセルの図である。コアと包膜ヒドロゲルとを分離する任意選択の膜材料が示されている。

【図2】図2は、三流体同軸電気スプレーにより3層カプセルを形成するためのノズルの図である。

【図3A-B】図3Aおよび3Bは、外側の架橋シェルを有するヒドロゲルマトリックス内に細胞を分散させる従来の細胞封入方法（図3A）、および、細胞を含有し、任意の細胞がカプセルの外壁に接触することを防ぐためにシェルによって囲まれており、カプセルが埋め込まれる宿主において、免疫細胞に曝露され得る、ヒドロゲルコアを形成するための二流体同軸電気噴射デバイスの模式図である。

20

【図4A】図4Aおよび4Bは、I型糖尿病の処置における対照、標準カプセルおよびコアシェルカプセルを比較したグラフである。図4Aは、封入された500ラット膵島当量を移植した後のSTZ誘発糖尿病マウスの血糖データを示す。エラーバーは、標準誤差を表す。図4Bは、正常血糖のマウスの数を時間の関数として示したものである。両方のタイプのカプセルについて、8回の反復を使用した。

【図4B】図4Aおよび4Bは、I型糖尿病の処置における対照、標準カプセルおよびコアシェルカプセルを比較したグラフである。図4Aは、封入された500ラット膵島当量を移植した後のSTZ誘発糖尿病マウスの血糖データを示す。エラーバーは、標準誤差を表す。図4Bは、正常血糖のマウスの数を時間の関数として示したものである。両方のタイプのカプセルについて、8回の反復を使用した。

30

【図5A-B】図5Aおよび5Bは、膵島細胞を含有する500 μ mヒドロゲルカプセル（図5A）およびラット膵島（500IE）を封入した1.5mmアルギナートカプセル（図5B）を埋め込まれたSTZ誘発C57BL/6糖尿病マウスにおける血糖レベルを比較したグラフである。

【図6】図6は、種々のサイズの空のカプセルにおける免疫応答（マクロファージまたは好中球から構成される細胞集団のパーセント）のグラフである。300 μ m、500 μ m、900 μ mおよび1500 μ mのカプセルについて評定した。

40

【図7】図7は、ウェスタンブロットによって決定した0.3mm、0.5mm、1mmおよび1.5mmのカプセルに関連する平滑筋アクチンおよび β -アクチンの正規化シグナル強度のグラフである。

【図8】図8は、カプセルの表面積（図8上部）またはカプセルの体積（図8下部）について正規化した、300 μ m、500 μ mおよび800 μ mのカプセルについての線維形成レベルのグラフである。

【図9A-B】図9A~9Dは、SLG20アルギナート（PRONOVA）、ポリスチレン、ガラス、ポリカプロラクトン（PCL）およびLF10/60アルギナート（FMC BioPolymer）から作製された500 μ mおよび1500 μ mのカプセルにおける線維形成マーカーの相対的発現のグラフである。線維形成は、CD68（マクロフ

50

フェージマーカー；図9A）、Ly6g（好中球マーカー；図9B）、CD11b（骨髄性細胞マーカー；図9C）、およびCol1a1（線維形成マーカー；図9D）を用いて測定した。

【図9C-D】図9A～9Dは、SLG20アルギナート（PRONOVA）、ポリスチレン、ガラス、ポリカプロラクトン（PCL）およびLF10/60アルギナート（FMC BioPolymer）から作製された500μmおよび1500μmのカプセルにおける線維形成マーカーの相対的発現のグラフである。線維形成は、CD68（マクロファージマーカー；図9A）、Ly6g（好中球マーカー；図9B）、CD11b（骨髄性細胞マーカー；図9C）、およびCol1a1（線維形成マーカー；図9D）を用いて測定した。

【図10A-B】図10Aおよび10Bは、種々の材料から作製された500μmおよび1500μmのカプセルにおける免疫応答（マクロファージ（図10A）または好中球（図10B）から構成される細胞集団のパーセント）のグラフである。カプセルは、SLG20アルギナート（PRONOVA）、ポリスチレン、ガラス、ポリカプロラクトン（PCL）およびLF10/60アルギナート（FMC BioPolymer）から作製された。

【図11】図11は、測定されたカプセル直径（μm）対カプセルサイズ（μm）の線グラフである。

【図12A-B】図12A、図12Bおよび図12Cは、それぞれアルファーマーSMA、Col1a1およびCol1a2に関する遺伝子発現対直径（mm）の線グラフである。図12Dは、球における細胞の過剰増殖内のアルファーマーSMA発現のウェスタンブロット解析の棒グラフである。

【図12C-D】図12A、図12Bおよび図12Cは、それぞれアルファーマーSMA、Col1a1およびCol1a2に関する遺伝子発現対直径（mm）の線グラフである。図12Dは、球における細胞の過剰増殖内のアルファーマーSMA発現のウェスタンブロット解析の棒グラフである。

【図13A-B】図13Aおよび図13Bは、応答する宿主マクロファージ（A）および好中球（B）についての特異的マーカーを使用したフロー（flow）解析から得た、それぞれマクロファージ細胞および好中球細胞の細胞集団の棒グラフである。中間のサイズ（0.5mm）および大きなサイズ（1.5～2mm）バージョンのSLG20アルギナート、LF10/60アルギナート（エンドトキシン含有）、ガラスおよびポリスチレンを、C57BL/6マウスの腹腔内に埋め込んでから14日後。モック（Mock）、手術およびPBSのみ注射；SLG、SLG20アルギナート；LF、LF10/60アルギナート（エンドトキシン含有）；PCL、ポリカプロラクトン；PS、ポリスチレン。

【図14A-B】図14A～図14Dは、種々の球に関する、それぞれCD68（マクロファージマーカー）、Ly6g/Gr1（好中球マーカー）、CD11b（骨髄性細胞マーカー）およびCol1a1（コラーゲンマーカー）のqPCRによって決定された相対的発現の棒グラフである。中間の（MED、0.4～0.6mm）球または大きなサイズの（LG、1.5～2.5mm）球を、C57BL/6マウスの腹腔内空間に埋め込んだ。次に、埋め込み14日後に全ての材料を回収し、異なる自然免疫および線維症マーカーのレベルを遺伝子発現によってアッセイした。CD68、マクロファージマーカー；Ly6g/Gr1、好中球マーカー；CD11b、骨髄性細胞マーカー；およびCol1a1、コラーゲンマーカー。材料：SLG20（化学的に精製されたアルギナート）、LF10/60（非精製、エンドトキシン含有アルギナート）、ポリマーのポリスチレン（PS）およびPCL（ポリカプロラクトン）、シリカベースのセラミックガラス、ならびにステンレス鋼（SS）。結果は、異物応答の低下におけるサイズ増加の効果が、ヒドロゲル、プラスチック、金属およびセラミックスを含む、ある範囲の材料にわたって拡大することを示す。プロットにおける注記、NT＝処置なし、およびMT＝モック処置（すなわち、PBS注射単独）。エラーバー、平均±SEM。処置当たりN＝5匹のマウス。qPCR統計解析：ボンフェローニ多重比較補正による一元配置ANOVA、*：p<0.05

10

20

30

40

50

、** : $p < 0.001$ および *** : $p < 0.0001$ 、MED 対 LG を比較。実験を 2 回繰り返した。

【図 14 C-D】図 14 A~図 14 D は、種々の球に関する、それぞれ CD68 (マクロファージマーカー)、Ly6g/Grl (好中球マーカー)、CD11b (骨髄性細胞マーカー) および Col1a1 (コラーゲンマーカー) の qPCR によって決定された相対的発現の棒グラフである。中間の (MED、0.4~0.6 mm) 球または大きなサイズの (LG、1.5~2.5 mm) 球を、C57BL/6 マウスの腹腔内空間に埋め込んだ。次に、埋め込み 14 日後に全ての材料を回収し、異なる自然免疫および線維症マーカーのレベルを遺伝子発現によってアッセイした。CD68、マクロファージマーカー；Ly6g/Grl、好中球マーカー；CD11b、骨髄性細胞マーカー；および Col1a1、コラーゲンマーカー。材料：SLG20 (化学的に精製されたアルギナート)、LF10/60 (非精製、エンドトキシン含有アルギナート)、ポリマーのポリスチレン (PS) および PCL (ポリカプロラクトン)、シリカベースのセラミックガラス、ならびにステンレス鋼 (SS)。結果は、異物応答の低下におけるサイズ増加の効果が、ヒドロゲル、プラスチック、金属およびセラミックスを含む、ある範囲の材料にわたって拡大することを示す。プロットにおける注記、NT=処置なし、および MT=モック処置 (すなわち、PBS 注射単独)。エラーバー、平均±SEM。処置あたり N=5 匹のマウス。qPCR 統計解析：ボンフェローニ多重比較補正による一元配置 ANOVA、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.001$ および *** : $p < 0.0001$ 、MED 対 LG を比較。実験を 2 回繰り返した。

【図 15】図 15 は、中間のサイズの球における相対的発現レベルに対し正規化されてプロットされた、中間の (0.5 mm) および大きなサイズの (0.5 mm) ガラスミクロスフェアにおける直接的な、線維症マーカーの α -SMA、コラーゲン 1a1 (Col1a1) およびコラーゲン 1a2 (Col1a2) の遺伝子発現の棒グラフである。Sprague-Dawley ラットの腹腔腔に埋め込まれ、2 週間後 (after two weeks) に回収された、ガラスミクロスフェア。エラーバー、平均±SEM。処置あたり N=3 匹のラット。qPCR 統計解析：ボンフェローニ多重比較補正による一元配置 ANOVA。** : $p < 0.001$ 、中間 (Med) 対 Large を比較。

【図 16 A-C】図 16 A および図 16 B は、ラット臍島 (500 IE) を封入する 0.5 mm および 1.5 mm アルギナートカプセルを移植された STZ 誘発 C57BL/6 糖尿病マウスにおける何日にもわたる (A) および何分間にもわたる血糖の線グラフである。大きな (1.5 mm) ヒドロゲルアルギナートカプセルにより長期にわたる正常血糖を示すが、標準 (0.5 mm) カプセルでは短期の成功しか示さない血糖曲線 (A)。標準 (0.5 mm) または大きな (1.5 mm) カプセルに封入されたラット臍島移植 7 日後の、健康なマウスおよび糖尿病マウスの in vivo グルコース負荷試験 (iv GTT) は、カプセル形状の関数として、BG 補正における有意な遅延を示さない (B)。全ての実験を少なくとも 2 または 3 回行った。図 16 C は、経時的に回復したマウスのパーセンテージを示す Kaplan-Meier プロットである。STZ-C57BL/6 マウスに、500 IE の初代ラット臍島を含有する 0.5 mm または 1.5 mm カプセルのいずれかを移植した。全ての実験を少なくとも 2 または 3 回行った。

【図 17 A-B】図 17 A および図 17 B は、インスリン分泌促進物質に応答した細胞内カルシウム流入を示す、経時的な Ca^{2+} 濃度のそれぞれ線グラフおよび棒グラフである。20 mM グルコースおよび 30 mM KCl (塩化カリウム) 刺激に応答した、単一のラット臍島の細胞内カルシウムの代表的トレース (A)。20 mM または 2 mM グルコースおよび 30 mM KCl に応答したカルシウム流入の平均 AUC [Ca^{2+}] %。左から右に：裸の (naked)、n=59；0.5 mm、n=49；1.5 mm、n=43。平均±SEM (B)。

【図 18 A-B】図 18 A~図 18 D は、インスリン分泌促進物質に応答した細胞内カルシウム流入を示す、経時的な Ca^{2+} 濃度の線グラフ (A、B) および棒グラフ (C、D) である。20 mM グルコースに応答した平均インスリン分泌動態 (A)。30 mM K

C l (塩化カリウム)に応答した平均インスリン分泌動態 (B)。20 mM グルコースに
 応答して分泌された平均AUC [インスリン/10 臍島] (C)。30 mM KCl に
 応答して分泌された平均AUC [インスリン/10 臍島]。(n = 3 匹の群、各群 50 臍島
 、平均 ± SD) (D)。

【図 18 C-D】図 18 A ~ 図 18 D は、インスリン分泌促進物質に
 応答した細胞内カルシウム流入を示す、経時的な Ca^{2+} 濃度の線グラフ (A、B) および棒グラフ (C、D)
) である。20 mM グルコースに
 応答した平均インスリン分泌動態 (A)。30 mM KCl (塩化カリウム)に
 応答した平均インスリン分泌動態 (B)。20 mM グルコースに
 応答して分泌された平均AUC [インスリン/10 臍島] (C)。30 mM KCl に
 応答して分泌された平均AUC [インスリン/10 臍島]。(n = 3 匹の群、各群 50 臍島
 、平均 ± SD) (D)。

10

【図 19 A-B】図 19 A および図 19 B は、STZ 誘発 C57BL/6 糖尿病マウスに
 おける、ラット臍島 (500 IE) を封入する 0.5 mm (A) および 1.5 mm (B)
 アルギナートカプセルの個々の BG 補正を示す、経時的な (数日間) 血糖の線グラフであ
 る。中間の 0.5 mm 直径カプセルによる短期の成功のみ (A)、対、大きな 1.5 mm
 直径ヒドロゲルアルギナートカプセルによる長期にわたる正常血糖 (B) を示す、個々の
 血糖曲線。n = 5 ~ 7 ; 2 回繰り返し。

【図 20 A-C】図 20 A ~ 図 20 C は、応答する宿主自然免疫骨髄性細胞 (A)、好中
 球細胞 (B) およびマクロファージ細胞 (C) についての特異的マーカーを使用した、直
 径 0.5 および 1.5 mm の SLG 20 アルギナートミクロスフェアに対する、埋め込ま
 れた球における経時的な細胞のフロー解析の棒グラフである。FACS 解析のため、処置
 当たり N = 5 匹のマウス。FACS 実験を 2 回行った。FACS サイズ比較を対応のない
 両側 t 検定によって行った。*、 $p < 0.05$; **、 $p < 0.001$; ***、 $p < 0.0001$ 。

20

【図 21 A-C】図 21 A ~ 図 21 F は、直径 0.5 (A ~ C) および 1.5 mm (D ~
 F) の SLG 20 アルギナートミクロスフェアに関する、2 を底とする対数目盛りで示す
 、埋め込み 1、4 および 7 日後に (それぞれ A & D、B & E および C & F) 沈着細胞 RN
 A 抽出物から解析された、マクロファージ表現型マーカーの発現に関する NanoStr
 ing に基づく解析である。エラーバー、平均 ± s. e. m. ; 生体イメージングのため
 、処置当たり N = 3 匹のマウス ; NanoString 解析のため、処置当たり N = 4。
 NanoString 解析を 1 回行った。

30

【図 21 D-F】図 21 A ~ 図 21 F は、直径 0.5 (A ~ C) および 1.5 mm (D ~
 F) の SLG 20 アルギナートミクロスフェアに関する、2 を底とする対数目盛りで示す
 、埋め込み 1、4 および 7 日後に (それぞれ A & D、B & E および C & F) 沈着細胞 RN
 A 抽出物から解析された、マクロファージ表現型マーカーの発現に関する NanoStr
 ing に基づく解析である。エラーバー、平均 ± s. e. m. ; 生体イメージングのため
 、処置当たり N = 3 匹のマウス ; NanoString 解析のため、処置当たり N = 4。
 NanoString 解析を 1 回行った。

【図 22】図 22 は、埋め込み 1、4、7、14 および 28 日後に、応答する宿主自然免
 疫骨髄性細胞 (a)、好中球細胞 (b) およびマクロファージ細胞 (c) についての特異
 的マーカーを使用した、直径 0.5 および 1.5 mm の SLG 20 アルギナートミクロス
 フェアに対する宿主応答のフロー解析の棒グラフである。エラーバー、平均 ± s. e. m.
 。FACS 解析のため、処置当たり N = 5 匹のマウス。FACS 実験を 2 回行った。F
 ACS サイズ比較を対応のない両側 t 検定によって行った。*、 $p < 0.05$; **、 p
 < 0.001 ; ***、 $p < 0.0001$ 。

40

【図 23】図 23 は、生体イメージングのためのマウスの調製を示す。埋め込まれた球の
 周りおよびその上におけるマクロファージ動員の in vivo 生体蛍光イメージングの
 ための、量子ドットを搭載したアルギナートヒドロゲル球による埋め込みのためのマウス
 の調製に関するプロセスの流れ図。

【図 24 A-C】図 24 A ~ 図 24 F は、腹腔内空間の細胞における、マクロファージ表

50

現型シフトのプロファイリングを示す。埋め込み1、4および7日後に抽出された（腹腔内洗浄された）、腹腔内空間における細胞からのマクロファージ表現型マーカーのRNA発現に関するNanoStringに基づく解析。発現は、モック手術（PBS注射された）マウスから収集された腹腔内細胞に対し正規化されており、2を底とする対数目盛りで示す。処置当たりN=4匹のマウス。解析の詳細については、補足的方法の記載を参照されたい。

【図24D-F】図24A～図24Fは、腹腔内空間の細胞における、マクロファージ表現型シフトのプロファイリングを示す。埋め込み1、4および7日後に抽出された（腹腔内洗浄された）、腹腔内空間における細胞からのマクロファージ表現型マーカーのRNA発現に関するNanoStringに基づく解析。発現は、モック手術（PBS注射された）マウスから収集された腹腔内細胞に対し正規化されており、2を底とする対数目盛りで示す。処置当たりN=4匹のマウス。解析の詳細については、補足的方法の記載を参照されたい。

10

【図25A-C】図25A～図25Fは、末梢網脂肪組織の細胞における、マクロファージ表現型シフトのプロファイリングを示す。埋め込み1、4および7日後に抽出された末梢脂肪組織における細胞からのマクロファージ表現型マーカーのRNA発現に関するNanoStringに基づく解析。発現は、モック手術（PBS注射された）マウスから収集された脂肪組織に対し正規化されており、2を底とする対数目盛りで示す。処置当たりN=4匹のマウス。

【図25D-F】図25A～図25Fは、末梢網脂肪組織の細胞における、マクロファージ表現型シフトのプロファイリングを示す。埋め込み1、4および7日後に抽出された末梢脂肪組織における細胞からのマクロファージ表現型マーカーのRNA発現に関するNanoStringに基づく解析。発現は、モック手術（PBS注射された）マウスから収集された脂肪組織に対し正規化されており、2を底とする対数目盛りで示す。処置当たりN=4匹のマウス。

20

【発明を実施するための形態】

【0037】

発明の詳細な説明

I. 定義

「ヒドロゲル」は、有機ポリマー（天然または合成）が、共有結合、イオン結合または水素結合を介して架橋し、水分子を捕捉してゲルを形成する3次元開放格子構造を作り出すときに形成される物質を指す。生体適合性ヒドロゲルは、生細胞に対して毒性がなく、かつ捕捉された細胞への、生存能力を維持するための酸素および栄養素の十分な拡散を可能にするゲルを形成するポリマーを指す。

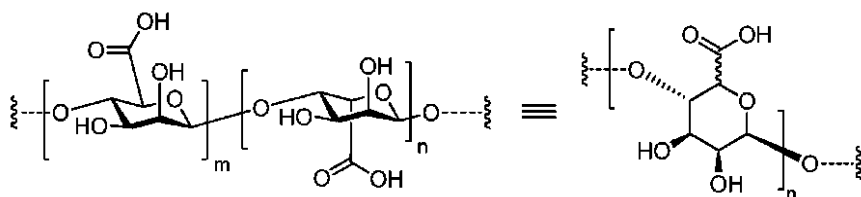
30

【0038】

「アルギナート」は、任意のM/G比のβ-D-マンヌロン酸（β-D-mannuronate）およびα-L-グルロン酸（α-L-guluronate）から形成された直鎖多糖ならびにそれらの塩および誘導体を指すのに使用される総称である。用語「アルギナート」は、本明細書で使用する場合、以下に示す構造を有する任意のポリマーおよびその塩を包含する。

【化1】

40



【0039】

「生体適合性」は、受容者に対し一般的に非毒性であり、対象に対しいかなる重大な有害効果も引き起こさない、材料およびその任意の代謝生成物または分解生成物を一般的に指す。

50

【0040】

「生分解性」は、生理的条件下で加水分解または酵素作用によって、対象により代謝、排出または排泄することが可能な小さい単位または化学種へと分解または腐食する材料を一般的に指す。分解時間は、ポリマーの組成および形態と相関関係にある。

【0041】

「薬物搭載粒子」は、そこへ溶解、分散、捕捉、封入または結合された薬物を有するポリマー粒子を指す。

【0042】

「ミクロ粒子」および「ナノ粒子」は、それぞれ、そこへ溶解、分散、捕捉、封入または結合された薬物を任意選択で含有する、ミクロスケールおよびナノスケールのサイズのポリマー粒子を指す。

10

【0043】

「抗炎症薬」は、組織における炎症を直接的にまたは間接的に低減する薬物を指す。この用語は、限定されるものではないが、免疫を抑制する薬物を含む。この用語は、リンパ球の増殖を阻害する薬物など、抗増殖免疫抑制薬を含む。

【0044】

「免疫抑制薬」は、対象内での異物への免疫応答を阻害するまたは防止する薬物を指す。免疫抑制薬は、T細胞の活性化を阻害すること、増殖を妨害すること、または炎症を抑制することによって、一般的に作用する。免疫抑制が起きている人は、免疫不全であると言われる。

20

【0045】

「哺乳動物細胞」は、同じまたは異なる対象への移植に適した哺乳動物対象に由来する任意の細胞を指す。細胞は、異種、自家性または同種異系であってよい。細胞は、哺乳動物対象から直接得られる1次細胞であり得る。細胞は、対象から得た細胞の培養および増大に由来する細胞であってもよい。例えば、細胞は、幹細胞であってよい。不死化細胞もまた、この定義に含まれる。一部の実施形態において、細胞は、組み換えタンパク質および／または核酸を発現するように遺伝子操作されたものである。

【0046】

「自家性」は、同一個体から取られて移植された生物学的物質を指す。

【0047】

「同種異系」は、同一種の異なる個体から取られて移植された生物学的物質を指す。

30

【0048】

「異種」は、異なる種から取られて移植された生物学的物質を指す。

【0049】

「膵島細胞」は、哺乳動物の膵臓に由来する内分泌細胞を指す。膵島細胞は、グルカゴンを分泌するアルファ細胞、インスリンおよびアミリンを分泌するベータ細胞、ソマトスタチンを分泌するデルタ細胞、膵臓ポリペプチドを分泌するPP細胞、またはグレリンを分泌するイブシロン細胞を含む。この用語は、これらの細胞の均一な集団および不均一な集団を含む。好ましい実施形態において、膵島細胞の集団は、少なくともベータ細胞を含有する。

40

【0050】

「移植」は、細胞、組織または臓器を、対象へ別の供給源から移植することを指す。この用語は、特定の様式の移植に限定されるものではない。封入された細胞は、注入または外科的な埋め込みなどの任意の適切な方法によって移植されてよい。

【0051】

「球様形状」は、球を概ね形成する表面を有する物体を指す。完全なまたは模範的な球形状以外に、球様形状は、波および起伏を有し得る。一般的に、球様形状は、準主軸が互いに10%以内である楕円体（その平均された表面について）である。球様形状の直径は、平均直径、例えば準主軸の平均である。

【0052】

50

「回転楕円体様形状」は、回転楕円体を概ね形成する表面を有する物体を指す。完全なまたは模範的な球、扁平回転楕円体または扁長回転楕円体形状以外に、回転楕円体様形状は、波および起伏を有し得る。一般的に、回転楕円体様形状は、準主軸が互いに100%以内である楕円体（その平均された表面について）である。回転楕円体様形状の直径は、平均直径、例えば準主軸の平均である。

【0053】

「平面」は、曲率が0の表面が5%超である連続エリアを指す。

【0054】

「鋭角」は、表面に対する正接が、表面の円周の2%またはそれ未満の距離にわたって10%超変化する表面上の場所を指す。表面内の端、角、溝および峰は、全て鋭角の形態である。

10

【0055】

II. 生体医療デバイスおよびカプセル

A. 線維形成が低減された生体医療デバイス

対象への埋め込みのための生体医療デバイスを開示する。デバイスは、生体適合性ポリマー、生分解性および非生分解性ポリマー、半導体材料、セラミックスならびにガラスなどの生体適合性材料から形成される。線維形成を低減または防止するため、デバイスは、一組の特徴のうちの一部または全部を含むべきである。

【0056】

(1) サイズ：デバイスは、最小直径1mm（好ましくは1.5mm）を有するべきである。直径は、8から10mmまで増加し得る。

20

【0057】

(2) 形状：デバイス全体は、球、球様、回転楕円体または回転楕円体様であるべきである。デバイスの表面上の任意の点における曲率は、0.2以上2以下であるべきである。デバイスの表面の曲率を計算する目的において、表面孔は無視される。

【0058】

(3) 疎水性：デバイスの表面は、中性またはより好水性（親水性）のいずれかであるべきであり、テフロン（登録商標）のように疎水性の化学的性質を有するべきではない。

【0059】

(4) 表面孔サイズ：デバイスの表面上の孔は、0nm超であるべきであるが、10μmを超えるべきではない。

30

【0060】

(5) 表面トポグラフィー：デバイスは、いかなる平面、鋭角、溝または峰も有するべきではない。

【0061】

これらの特徴は埋め込まれたデバイスの線維形成へ影響するということが発見された。はじめの2つの特徴と他の特徴のうち少なくとも1つとを有するデバイスは、低減された線維形成を呈することが分かった。これらの特徴のいずれか1つまたは組合せを有するデバイスを作製することができる。これらの特徴の全てを有するデバイスが好ましい。一般的に、開示されるデバイスは、これらの特徴のいずれか1つまたは複数を有する同じデバイスより、埋め込み後の線維化反応の誘発が少なくなる。一部の実施形態において、デバイスは、はじめの2つの特徴と他の特徴のうち少なくとも1つとを有する同じデバイスより、埋め込み後の線維化反応の誘発が少なくなる。一部の実施形態において、デバイスは、全ての特徴を有する同じデバイスより、埋め込み後の線維化反応の誘発が少なくなる。一部の実施形態において、生体医療デバイスは、本明細書に記載するカプセルまたはヒドロゲルカプセルである。本明細書におけるカプセルまたはヒドロゲルカプセルへの言及は、言及されるカプセルと同じ説明の生体医療デバイスへの言及も意図している。

40

【0062】

開示されるデバイスは、既存のデバイスおよび材料を超える利点および改良点を有する。例えば、円柱などの平らな表面（曲率ゼロ）を有する物体は、たとえ全体のサイズが大

50

きい（1 mmを超える）場合でも線維化するということが発見された。これとは対極的に、高い曲率（したがって、とても直径が小さい、すなわち1 mm未満である）を有する物体は、他の埋め込み材料および／または周辺組織と共に高充填密度が可能であり、このことは、免疫細胞の付着および線維性沈着を容易にする。特色の特定の組合せは、一緒になって、ヒドロゲル（化学的に精製されたアルギナートおよびエンドトキシン含有食品グレードアルギナートの両方）、半導体材料（ガラスのような二酸化ケイ素系セラミックスなど）、ならびに分解性および非分解性ポリマーおよびプラスチック（PCLおよびポリスチレンなど）を含めた多くの種別の材料の線維形成を低減または防止することが確立された。したがって、開示されるデバイスは、これらおよび多様な他の材料から作製することができる。

10

【0063】

特定した特徴を有するヒドロゲルアルギナートの球が産生され、ヒドロゲルアルギナートの球は、線維形成を防止し、かつ、疾患（1型糖尿病）の処置について、移植された様々な起源の哺乳動物細胞（すなわち、ラット、マウス、ブタ、ヒト）の長期生存能力および機能性を確実にすることが実証された。任意選択で、デバイスのシェルは、1種または複数種の治療剤（抗炎症剤など）または診断剤（酸素検知もしくは撮像化学物質など）も含有してもよい。

【0064】

生体医療デバイスは、例えば、長期埋め込み可能なセンサーおよびアクチュエーター、制御された薬物放出デバイス、プロステシスおよび組織再生生体材料、ならびに埋め込みおよび移植に関する技術を含めた、任意の生体医療用途に使用することができる。多くの生体医療デバイスおよび目的が公知であり、開示されるデバイスは、そのような目的に適合させることができる。

20

【0065】

一実施形態は、生体医療デバイスの調製物、例えばヒドロゲルカプセルの調製物であって、調製物のデバイスの少なくとも60、70、80、90、95または98%が、球形状または回転楕円体形状を有し、少なくともX mmであるがY mm以下の直径を有し、但しYはXより大きく、X=1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または2.0であり、Y=2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5または10.0であり、a) 調製物のデバイスの1、2、3、4、5、10、15または20%以下が、球形状または回転楕円体形状以外を有し、b) 調製物のデバイスの少なくとも50、60、70、80または90%が、1個の生細胞もしくは複数の生細胞、または少なくとも1000、2000もしくは5000個の生細胞／デバイスを含み、c) 調製物の球形状または回転楕円体形状のデバイスの少なくとも50、60、70、80または90%が、1個の生細胞もしくは複数の生細胞、または少なくとも1000、2000もしくは5000個の生細胞を含み、d) 調製物のデバイスの1、2、3、4、5、10、15または20%以下が、エッジを有し、

30

e) 調製物のデバイスの少なくとも50、60、70、80または90%中の細胞が、デバイス全体にわたって本質的に均一に分布し、f) 調製物の球形状または回転楕円体形状のデバイスの少なくとも50、60、70、80または90%中の細胞が、デバイス全体にわたって本質的に均一に分布し、g) 調製物のデバイスの少なくとも50、60、70、80または90%中の細胞が、デバイス全体にわたって本質的に均一に分布しておらず、h) 調製物の球形状または回転楕円体形状のデバイスの少なくとも50、60、70、80または90%中の細胞が、デバイス全体にわたって本質的に均一に分布していない、調製物を提供する。

40

【0066】

B. 線維形成が低減された、封入された細胞

哺乳動物細胞を対象へ移植するためのカプセルを開示する。カプセルは、移植される細胞を封入した、ヒドロゲル形成性の生体適合性ポリマーから形成される。カプセル様の過

50

剰増殖（線維形成）を阻害するため、細胞材料がカプセル表面上に位置することを、カプセルの構造によって防止する。加えて、細胞に適切な気体交換が起こること、およびそこに封入されている細胞によって栄養素が受け取られることが、カプセルの構造によって確実になる。任意選択で、カプセルは、制御放出のためにその中に封入された1種または複数種の抗炎症薬も含有する。

【0067】

C. 生体適合性ポリマー

開示される組成物は、移植される細胞を封入した、ヒドロゲル形成性の生体適合性ポリマーから形成される。適したヒドロゲルを形成するのに使用することができる材料の例には、アルギナートなどの多糖、コラーゲン、キトサン、硫酸セルロースナトリウム、ゼラチンおよびアガロース、水溶性ポリアクリレート、ポリホスファジン、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリ（アルキレンオキシド）、ポリ（ビニルアセテート）、ポリビニルピロリドン（PVP）ならびにそれぞれのコポリマーおよびブレンドが含まれる。例えば、米国特許第5,709,854号、同6,129,761号および同6,858,229号を参照されたい。

【0068】

一般的に、荷電側基またはその一価イオン塩を有するこれらのポリマーは、水、緩衝塩溶液またはアルコール水溶液などの水溶液中に、少なくとも部分的に可溶である。カチオンと反応することができる酸性側基を有するポリマーの例は、ポリ（ホスファゼン）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリ（ビニルアセテート）、およびスルホン化ポリスチレンなどのスルホン化ポリマーである。アクリル酸またはメタクリル酸とビニルエーテルモノマーまたはポリマーとの反応によって形成される酸性側基を有するコポリマーも使用することができる。酸性基の例は、カルボン酸基およびスルホン酸基である。

【0069】

アニオンと反応することができる塩基性側基を有するポリマーの例は、ポリ（ビニルアミン）、ポリ（ビニルピリジン）、ポリ（ビニルイミダゾール）、および一部のイミノ置換ポリホスファゼンである。ポリマーのアンモニウムまたは第四級塩も、主鎖の窒素またはペンダントイミノ基から形成することができる。塩基性側基の例は、アミノ基およびイミノ基である。

【0070】

ヒドロゲル形成性の生体適合性ポリマーは、好ましくは水溶性ゲル化剤である。好ましい実施形態において、水溶性ゲル化剤は、多糖ガム、より好ましくはポリアニオン性ポリマーである。

【0071】

細胞は、ヒドロゲル層（例えばコア）を提供するアルギナートなどのアニオン性ポリマーを使用して封入されることが好ましく、ここでは、ヒドロゲル層は、引き続いてポリカチオン性ポリマー（例えば、ポリリシンなどのアミノ酸ポリマー）で架橋されて、シェルを形成する。例えば、Goosenらに対する米国特許第4,806,355号、同4,689,293号および同4,673,566号；Limらに対する米国特許第4,409,331号、同4,407,957号、同4,391,909号および同4,352,883号；Rhaらに対する米国特許第4,749,620号および同4,744,933号；ならびにWangらに対する米国特許第5,427,935号を参照されたい。アルギナートなどのヒドロゲル形成性ポリマーを架橋するために使用してもよいアミノ酸ポリマーには、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリオルチニンならびにそれらのコポリマーおよびブレンドなどのカチオン性ポリ（アミノ酸）が含まれる。

【0072】

1. 多糖

細胞の封入に関し、いくつかの哺乳動物性および非哺乳動物性多糖について調査した。細胞の封入に適した例示的な多糖には、アルギナート、キトサン、ヒアルロナン（HA）およびコンドロイチン硫酸が含まれる。アルギナートおよびキトサンは、ある特定の溶液

条件下で架橋ヒドロゲルを形成するのに対し、HAおよびコンドロイチン硫酸は、ヒドロゲルを形成するための架橋性基を含有するように好ましくは修飾される。

【0073】

好ましい実施形態において、細胞を封入するヒドロゲル形成性の生体適合性ポリマーは、アルギナートである。アルギナートは、主として褐藻に由来し、乾燥重量にておよそ20%から40%で細胞外および細胞内に存在する、非分岐アニオン性多糖のファミリーである。1, 4-結合した α -1-グルロン酸(G)および β -d-マンヌロン酸(M)が、ホモポリマーブロック構造(GGGブロックおよびMMMブロック)またはヘテロポリマーブロック構造(MGMブロック)で配列する。褐藻の細胞壁は、主な構成成分として1-フコース四硫酸ブロックを有する分岐多糖硫酸エステルであるフコイダンも5%から20%含有する。市販のアルギナートは、海岸で洗われた藻類から抽出されることが多く、それらの特性は、収集および抽出プロセスに依存する。

10

【0074】

アルギナートは、二価カチオンの存在下で、イオン架橋を介してゲルを形成する。ヒドロゲルの特性は、アルギナート前駆体における変化を通じてある程度制御することができる(分子量、組成およびマクロマー濃度)が、アルギナートは分解せず、むしろ、二価カチオンが一価イオンによって置き換えられると溶解する。加えて、アルギナートは、細胞の相互作用を促進しない。

【0075】

特に好ましい組成物は、ポリリシンシェルを有するアルギナートのコア中に固定された細胞を含有するカプセルまたはマイクロカプセルである。好ましいカプセルまたはマイクロカプセルは、追加の外部アルギナート層(例えば包膜)を含有して、アルギナート/ポリリシン-アルギナート/アルギナート-細胞の多層カプセルまたはマイクロカプセルを形成してもよい。ポリリシンで架橋されたアルギナートヒドロゲルの説明については、Limらに対する米国特許第4,391,909号を参照されたい。ポリリシンに代えて架橋剤として使用するのに適した他のカチオン性ポリマーには、ポリ(β アミノアルコール)(PBA)が含まれる(Ma Mら、Adv. Mater., 23巻:H189-94(2011年))。

20

【0076】

キトサンは、天然の非哺乳動物性多糖であるキチンの部分脱アセチル化によって作製され、キチンは哺乳動物性多糖に近い類似性を呈し、このことが、キトサンを細胞封入にとって魅力的なものにしている。キトサンは、主にリゾチームによって、アセチル化残基の加水分解を通じて分解される。脱アセチル化度が高いと、分解時間が遅くなるが、疎水性が増すことにより細胞接着がより良好になる。希釈酸条件下($pH < 6$)では、キトサンはプラスに荷電し水溶性であるのに対し、生理学的なpHでは、キトサンは中性で疎水性であり、このことは、物理的に架橋した固体のヒドロゲルの形成につながる。ポリオール塩の添加によって、中性pHでの細胞の封入が可能となり、ここでは、ゲル化は温度依存性になる。

30

【0077】

キトサンは、修飾され得る多くのアミン基およびヒドロキシ基を有する。例えば、キトサンは、架橋性マクロマーを作り出すためにメタクリル酸をグラフトし、同時に生理学的なpHにおける水溶性を高めるために乳酸もグラフトすることによって、修飾されてきた。この架橋したキトサンヒドロゲルは、リゾチームおよび軟骨細胞の存在下で分解する。光重合性キトサンマクロマーは、光反応性アジド安息香酸基でキトサンを修飾することによって合成することができる。開始剤の不存在下でUVへ曝露すると、反応性ニトレン基が形成され、これは互いにまたはキトサン上の他のアミン基と反応して、アゾ架橋を形成する。

40

【0078】

ヒアルロナン(HA)は、体中の多くの組織中に存在するグリコサミノグリカンであり、胚発生、傷の治癒および血管新生において重要な役割を果たす。加えて、HAは、細胞

50

表面のレセプターを介して細胞と相互作用して、細胞内シグナル経路に影響する。これらの性質が一緒になって、HAを、組織工学の足場にとって魅力的なものにしている。HAは、細胞封入のために、メタクリレートおよびチオールなどの架橋性部分で修飾され得る。架橋HAゲルは、HAを様々な分子量のオリゴ糖断片に分けるヒアルロニダーゼによって依然として分解されやすいままである。細胞は、ゲル構造がマクロマー濃度およびマクロマー分子量によって制御された、光重合したHAヒドロゲル中に封入することができる。加えて、光重合したHAおよびデキストランヒドロゲルは、未分化ヒト胚性幹細胞の長期培養を維持する。HAヒドロゲルは、アクリル化HAをPEGテトラチオールと反応させること、またはチオール修飾HAをPEGジアクリレートと反応させることのいずれかのマイケル型付加反応メカニズムを通じて製作された。

10

【0079】

コンドロイチン硫酸は、皮膚、軟骨、腱および心臓弁を含めた多くの組織において見出される構造プロテオグリカンの多くのパーセンテージを占め、このことは、コンドロイチン硫酸を、一連の組織工学用途にとって魅力的なバイオポリマーにしている。光架橋コンドロイチン硫酸ヒドロゲルは、コンドロイチン硫酸をメタクリレート基で修飾することによって調製することができる。ヒドロゲルの特性は、メタクリレート置換度および重合前の溶液中のマクロマー濃度によって容易に制御された。さらに、マイナスに荷電したポリマーは、ゲルがその機械的特性を犠牲にすることなくより多くの水を吸収することを可能にする、増加した膨潤圧を生み出す。コンドロイチン硫酸とPEGまたはPVAなどの不活性ポリマーとのコポリマーヒドロゲルも使用してもよい。

20

【0080】

2. 合成ポリマー

ポリエチレングリコール (PEG) は、細胞封入のためのマクロマーを作り出すために最も広く使用されてきた合成ポリマーである。いくつかの研究では、様々な細胞を封入するために、ポリ (エチレングリコール) ジ (メタ) アクリレートが使用されてきた。生分解性PEGヒドロゲルは、架橋を可能にするため (メタ) アクリレート官能基で末端封鎖されたポリ (α -ヒドロキシエステル) -b-ポリ (エチレングリコール) -b-ポリ (α -ヒドロキシエステル) のトリブロックコポリマーから調製することができる。PLAおよびポリ (8-カプロラクトン) (PCL) は、細胞封入のための生分解性PEGマクロマーを作り出す際に、最も一般的に使用されてきたポリ (α -ヒドロキシエステル) である。分解プロファイルおよび速度は、分解性ブロックの長さおよび化学的性質を通じて制御される。エステル結合は、分解を加速する、血清中に存在するエステラーゼによって分解される場合もある。生分解性PEGヒドロゲルは、PEG-ビス [2-アクリロイルオキシプロパノエート] の前駆体から製作することもできる。直鎖PEGマクロマーの代替として、PEG 1分子当たり複数の反応性ビニル基を含有するポリ (グリセロール-コハク酸) -PEGのPEG系 dendrimer を使用することができる。これらの材料の魅力的な特色は、分岐度を制御する能力であり、これは、ヒドロゲルの全体的な構造特性およびその分解へ結果として影響する。分解は、dendrimer 主鎖中に存在するエステル結合を通じて起こる。

30

【0081】

ヒドロゲル形成性の生体適合性ポリマーは、ポリホスホエステルまたはポリホスフェートを含むことができ、ここで、ホスホエステル結合は、結果としてホスフェートを放出する加水分解を起こしやすい。例えば、ホスホエステルは、架橋性PEGマクロマーの主鎖ポリ (エチレングリコール) -ジ [エチルホスファチジル (エチレングリコール) メタクリレート] (PhosPEG-dMA) へ組み込まれて、生分解性ヒドロゲルを形成することができる。骨細胞によって合成されるECM構成成分であるアルカリホスファターゼを添加すると、分解が強まる。分解生成物であるリン酸は、媒体中でカルシウムイオンと反応して、ヒドロゲル内での自己石灰化を誘発する不溶性リン酸カルシウムを生成する。ポリホスホエステルであるポリ (6-アミノエチルプロピレンホスフェート) は、メタクリレートで修飾して、マルチビニルマクロマーを作り出すことができ、ここで、分

40

50

解速度は、ポリホスホエステルポリマーの誘導体化度によって制御された。

【0082】

ポリホスファゼンは、交互になった単結合および二重結合によって分けられた窒素およびリン (phosphorous) からなる主鎖を有するポリマーである。それぞれのリン原子は、2つの側鎖へ共有結合している。架橋に適したポリホスファゼンは、酸性であり二または三価カチオンと塩橋を形成することができる、大部分の側鎖基を有する。好ましい酸性側基の例は、カルボン酸基およびスルホン酸基である。加水分解に安定なポリホスファゼンは、 Ca^{2+} または Al^{3+} などの二価または三価カチオンによって架橋するカルボン酸側基を有するモノマーから形成される。加水分解によって分解するポリマーは、イミダゾール、アミノ酸エステルまたはグリセロール側基を有するモノマーを組み込むことによって合成することができる。生体侵食性ポリホスファゼン (polyphosphazene) は、多価カチオンと塩橋を形成することができる酸性側基、ならびに *in vivo* 条件下で加水分解する側基、例えば、イミダゾール基、アミノ酸エステル、グリセロールおよびグリコシルという、少なくとも2つの異なるタイプの側鎖を有する。側鎖の加水分解は、ポリマーの侵食という結果をもたらす。加水分解性側鎖の例は、基がアミノ結合を介してリン原子へ結合している、未置換または置換イミダゾール (imidazole)、およびアミノ酸エステルである (両方のR基がこの様式で結合したポリホスファゼンポリマーは、ポリアミノホスファゼンとして公知である)。ポリイミダゾールホスファゼンについては、ポリホスファゼン主鎖上の「R」基のいくつかは、環窒素原子を介して主鎖中のリンに結合したイミダゾール環である。

10

20

【0083】

D. 薬物とヒドロゲル形成性ポリマーとのコンジュゲート

一部の実施形態において、1種または複数種の抗炎症薬が、ヒドロゲル形成性ポリマーに共有結合する。これらの場合、抗炎症薬は、*in vivo* で切断されるように設計された結合部分を介してヒドロゲル形成性ポリマーに結合する。結合部分は、*in vivo* で抗炎症薬の持続放出をもたらすように、加水分解的、酵素的またはそれらの組合せで切断されるように設計され得る。結合部分の組成および抗炎症剤へのその結合点の両方は、結合部分の切断によって抗炎症剤または適したそのプロドラッグのいずれかが放出されるように選択される。結合部分の組成も、抗炎症剤の所望の放出速度の観点から選択することができる。

30

【0084】

結合部分は、1つまたは複数の有機官能基を一般的に含む。適した有機官能基の例には、第2級アミド ($-\text{CONH}-$)、第3級アミド ($-\text{CONR}-$)、第2級カルバメート ($-\text{OCONH}-$; $-\text{NHCOO}-$)、第3級カルバメート ($-\text{OCONR}-$; $-\text{NRCOO}-$)、尿素 ($-\text{NHCONH}-$; $-\text{NRCONH}-$; $-\text{NHCONR}-$; $-\text{NRCONR}-$)、カルビノール ($-\text{CHOH}-$; $-\text{CROH}-$)、ジスルフィド基、ヒドラゾン、ヒドラジド、エーテル ($-\text{O}-$) およびエステル ($-\text{COO}-$; $-\text{CH}_2\text{O}_2\text{C}-$; $\text{CHRO}_2\text{C}-$) が含まれ、式中、Rは、アルキル基、アリール基またはヘテロ環基である。一般的に、結合部分内の1つまたは複数の有機官能基の実体は、抗炎症剤の所望の放出速度の観点から選択することができる。加えて、1つまたは複数の有機官能基は、ヒドロゲル形成性ポリマーへの抗炎症剤の共有結合を容易にするように選択することができる。好ましい実施形態において、結合部分は、*in vivo* で単純な加水分解によって切断されて抗炎症剤を放出することができる、1つまたは複数のエステル結合を含有する。

40

【0085】

ある特定の実施形態において、結合部分は、上に記載した1つまたは複数の有機官能基を、スペーサー基と組み合わせて含む。スペーサー基は、オリゴマー鎖およびポリマー鎖を含めた、原子の任意の集まりから構成することができるが、スペーサー基中の原子の総数は、好ましくは3から200原子の間、より好ましくは3から150原子の間、より好ましくは3から100原子の間、最も好ましくは3から50原子の間である。適したスペーサー基の例には、アルキル基、ヘテロアルキル基、アルキルアリール基、オリゴおよび

50

ポリエチレングリコール鎖、ならびにオリゴおよびポリ（アミノ酸）鎖が含まれる。スペーサー基の変動は、*in vivo*での抗炎症剤の放出に対する追加的な制御をもたらす。結合部分がスペーサー基を含む実施形態において、1つまたは複数の有機官能基は、スペーサー基を抗炎症剤およびヒドロゲル形成性ポリマーの両方につなげるために一般的に使用される。

【0086】

ある特定の実施形態において、1種または複数種の抗炎症剤は、アルキル基、エステル基およびヒドラジド基を含有する結合部分を介して、ヒドロゲル形成性ポリマーへ共有結合する。例えば、抗炎症剤デキサメタゾンのアルギナートへのコンジュゲートは、アルキル基と、アルキル基を抗炎症剤へつなげるエステル基と、アルキル基をアルギナート上に位置するカルボン酸基へつなげるヒドラジド基とを含有する結合部分を介してなすことができる。この実施形態において、*in vivo*でのエステル基の加水分解は、長期間にわたって低用量でデキサメタゾンを放出する。

10

【0087】

抗炎症剤をヒドロゲル形成性ポリマーへ共有結合するのに有用な反応および方策は、当技術分野において公知である。例えば、March、「Advanced Organic Chemistry」、第5版、2001年、Wiley-Interscience Publication、ニューヨーク、およびHermanson、「Bioconjugate Techniques」、1996年、Elsevier Academic Press、米国を参照されたい。所与の抗炎症剤の共有結合の適切な方法は、所望の結合部分ならびに抗炎症剤およびヒドロゲル形成性ポリマー全体の構造の観点から選択することができ、なぜならば、それは、官能基の適合性、保護基の方策および不安定な結合の存在に関係するからである。

20

【0088】

E. 抗炎症薬および抗増殖薬

開示する組成物において使用するのに適した薬物について説明する。薬物は、開示する方法を使用して特定することができる。代表的な薬物には、グルココルチコイド、フェノール系酸化防止剤、抗増殖薬またはそれらの組合せが含まれる。本明細書において、別段断らない限り、これらをまとめて「抗炎症薬」という。

【0089】

非限定的な例には、ステロイド系抗炎症剤が含まれる。特に好ましいステロイド系抗炎症薬には、デキサメタゾン、5-FU、ダウノマイシンおよびマイトマイシンが含まれる。抗血管新生薬または抗増殖薬も有用である。例には、モノエステルおよびテトラヒドロクルクミンを含めたクルクミン、ならびにシロリムス（ラパマイシン）、シクロスポリン、タクロリムス、ドキシソルビシン、ミコフェノール酸およびパクリタキセルならびにそれらの誘導体などの薬物が含まれる。一部の実施形態において、抗炎症薬は、mTOR阻害剤（例えば、シロリムスおよびエベロリムス）である。新規な抗増殖薬は、42-O位の水素原子をアルコキシアルキル基で置き換えた高親油性の半合成シロリムスアナログであるバイオリムスA9である。リソフィリンは、抗炎症特性を有する合成小分子である。一部の実施形態において、抗炎症薬は、カルシニューリン阻害剤（例えば、シクロスポリン、ピメクロリムスおよびタクロリムス）である。

30

40

【0090】

一部の実施形態において、抗炎症薬は、合成または天然の抗炎症性タンパク質である。免疫抑制療法には、選択する免疫構成成分に特異的な抗体を加えることができる。一部の実施形態において、抗炎症薬は、抗T細胞抗体（例えば、抗胸腺細胞グロブリンもしくは抗リンパ球グロブリン）、抗IL-2R α レセプター抗体（例えば、バシリキシマブもしくはダクリズマブ）または抗CD20抗体（例えばリツキシマブ）である。

【0091】

好ましい実施形態において、1種または複数種の抗炎症薬は、組成物の線維形成を阻害するのに有効な量で哺乳動物対象に投与された後に、少なくとも30日間、好ましくは少なくとも60日間、より好ましくは少なくとも90日間にわたって、カプセルから放出さ

50

れる。一部の実施形態において、抗炎症薬は、少なくとも10日間、好ましくは少なくとも14日間、より好ましくは少なくとも30日間にわたって、全身的な免疫抑制なしで、対象中で空間的に局所化された炎症阻害をもたらす。一部の実施形態において、空間的に局所化された炎症は、対象における注入部位でカテプシン活性を測定することによって、検出される。他の実施形態において、空間的に局所化された炎症は、対象における注入部位で反応性酸素種（ROS）を測定することによって、検出される。一部の実施形態において、全身的な免疫抑制は、対象における対照部位、例えば、薬物なしのポリマー粒子またはヒドロゲルを注入した部位において、カテプシン活性またはROSがないということによって、検出される。開示する組成物中で使用する抗炎症薬の特定、選択および最適化の方法について、以下に説明する。

10

【0092】

放出速度および量は、ポリマー粒子の薬物搭載を加減することによって、ある程度選択することができる。本明細書に開示するように、高い薬物搭載は、顕著な初期バースト放出を引き起こし得る。これは、空間的に局所化された炎症阻害よりむしろ全身的な免疫抑制という結果にもなり得る。これとは対照的に、薬物搭載レベルが低すぎると、治療有効量の抗炎症薬が放出されない。

【0093】

最適な薬物搭載は、薬物、ポリマー、ヒドロゲル、細胞および埋め込み部位の選択を含めた多くの因子に必然的に依存する。一部の実施形態において、1種または複数種の抗炎症薬は、約0.01重量%から約15重量%、好ましくは約0.1重量%から約5重量%、より好ましくは約1重量%から約3重量%の濃度で、ポリマー粒子に搭載される。一部の実施形態において、1種または複数種の抗炎症薬は、0.01から10.0mg/mlヒドロゲル、好ましくは0.1から4.0mg/mlヒドロゲル、より好ましくは0.3から2.0mg/mlヒドロゲルの濃度で、ヒドロゲル中に封入される。しかしながら、任意の所与の薬物、ポリマー、ヒドロゲル、細胞および移植部位に最適な薬物搭載は、本明細書に記載されるものなどの常法によって特定され得る。

20

【0094】

F. 薬物送達のための生分解性ポリマー

抗炎症薬を含有する薬物搭載粒子は、薬物送達に適した生体適合性の生分解性ポリマーから好ましくは形成される。一般的に合成ポリマーが好ましいが、天然ポリマー、とりわけ、一部のポリヒドロキシアルカノエートなど、加水分解によって分解する天然のバイオポリマーの一部も使用することができ、同等のまたはより良好な特性を有することがある。

30

【0095】

代表的な合成ポリマーには、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）およびポリ（乳酸- α -グリコール酸）などのポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ（ラクチド）、ポリ（グリコリド）、ポリ（ラクチド- α -グリコリド）、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリエチレンおよびポリプロピレンなどのポリアルキレン、ポリ（エチレングリコール）などのポリアルキレングリコール、ポリ（エチレンオキサイド）などのポリアルキレンオキサイド、ポリ（エチレンテレフタレート）などのポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリ塩化ビニルなどのポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン、ポリシロキサン、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルアセテート）、ポリスチレン、ポリウレタン、ならびにこれらのコポリマー、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシエチルセルロース、セルローストリアセテートおよびセルロース硫酸ナトリウム塩などの誘導体化セルロース（本明細書において、まとめて「合成セルロース」という）、エステル、

40

50

ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）およびポリ（オクタデシルアクリレート）を含めた、アクリル酸、メタクリル酸のポリマーまたはそれらのコポリマーもしくは誘導体（本明細書において、まとめて「ポリアクリル酸」という）、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）およびポリ（ラクチド- ϵ -カプロラクトン）、それらのコポリマーおよびブレンドが含まれる。本明細書において使用する場合、「誘導体」には、置換、化学基の付加および当業者によって慣例的になされる他の修飾を有するポリマーが含まれる。

10

【0096】

好ましい生分解性ポリマーの例には、乳酸およびグリコール酸などのヒドロキシ酸のポリマーおよびPEGとのコポリマー、ポリ酸無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリウレタン、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド- ϵ -カプロラクトン）、それらのブレンドおよびコポリマーが含まれる。

【0097】

好ましい天然ポリマーの例には、アルブミン、コラーゲン、ゼラチンおよびプロラミン（例えばゼイン）などのタンパク質、ならびにアルギナートなどの多糖、セルロース誘導体およびポリヒドロキシアルカノエート（例えばポリヒドロキシブチレート）が含まれる。粒子およびマイクロ粒子の *in vivo* 安定性は、PEGと共重合したポリ（ラクチド- ϵ -グリコリド）などのポリマーを使用することによって、製造中に調整することができる。

20

【0098】

最も好ましい実施形態において、生分解性ポリマーとしてPLGAが使用される。PLGA粒子およびマイクロ粒子は、封入または結合される分子を数日から数週間の期間にわたって放出するように設計される。放出期間に影響する因子には、周囲の媒体のpH（pH 5およびそれ未満では、PLGAの酸触媒加水分解のため、放出速度が速い）、およびポリマー組成が含まれる。脂肪族ポリエステルは、疎水性が異なり、それが今度は分解速度に影響する。例えば、疎水性のポリ（乳酸）（PLA）、より親水性のポリ（グリコール酸）PGA、およびそれらのコポリマーであるポリ（ラクチド- ϵ -グリコリド）（PLGA）は、様々な放出速度を有する。これらのポリマーの分解速度は、また対応する薬物放出速度もしばしば、数日（PGA）から数ヶ月（PLA）まで変動することがあり、PLAとPGAとの比を変動させることによって容易に操作される。

30

【0099】

薬物搭載粒子の直径および多孔度は、送達される薬物ならびに所望の投与量および放出速度に基づいて最適化することができる。好ましい実施形態において、薬物搭載粒子は、マイクロ粒子またはナノ粒子である。より好ましい実施形態において、薬物搭載粒子は粒子である。粒子の平均直径は、必要とされる個々の薬物、投薬量および放出速度に基づいて、選択および最適化してもよい。好ましい実施形態において、薬物搭載ポリマー粒子は、約1 μm から約100 μm 、好ましくは約1 μm から約50 μm 、より好ましくは約1 μm から約10 μm の平均直径を有するマイクロ粒子である。他の実施形態において、薬物搭載ポリマー粒子は、少なくとも約50 nm、好ましくは少なくとも約100 nm、より好ましくは少なくとも約200 nmを含め、約10 nmから約999 nmの平均直径を有するナノ粒子である。より好ましい実施形態において、薬物搭載ポリマー粒子は、1 mm超、好ましくは1.5 mmまたはそれ超の平均直径を有する。一部の実施形態において、薬物搭載ポリマー粒子は、直径8 mmの大きさであり得る。

40

【0100】

G. カプセル

カプセルは、2または3層カプセルである。好ましくは、カプセルは、1 mm超、好ましくは1.5 mmまたはそれ超の平均直径を有する。一部の実施形態において、カプセル

50

は、直径 8 mm の大きさであり得る。例えば、カプセルは、1 mm から 8 mm、1 mm から 6 mm、1 mm から 5 mm、1 mm から 4 mm、1 mm から 3 mm、1 mm から 2 mm、1 mm から 1.5 mm、1.5 mm から 8 mm、1.5 mm から 6 mm、1.5 mm から 5 mm、1.5 mm から 4 mm、1.5 mm から 3 mm、または 1.5 mm から 2 mm のサイズ範囲であり得る。

【0101】

細胞の生存能力のために必要な分子がカプセルへ入る速度、ならびに治療用生成物および廃棄物がカプセル膜から出る速度は、マクロカプセルの透過性をモジュレートすることによって選択される。マクロカプセルの透過性は、免疫細胞、抗体およびサイトカインがカプセルまたはミクロカプセル中へ入ることを制限するためにも改変される。

10

【0102】

異なるタイプの細胞は異なる代謝要件を有するため、膜の透過性は、ヒドロゲル中に封入される細胞のタイプに基づいて最適化されるべきであるということが示された。カプセルまたはミクロカプセルの直径は、細胞カプセルに対する免疫応答およびカプセル膜を横断する物質輸送の両方に影響する重要な因子である。

【0103】

H. 細胞

開示する組成物に封入するために選択する細胞のタイプは、所望の治療効果に依存する。細胞は、患者から（自家細胞）であっても、同一種の別の提供者から（同種異系細胞）であっても、または別の種から（異種）であってもよい。異種細胞は、入手し易いが、拒絶の可能性、および患者へのウイルス伝染の可能性という危険によって、それらの臨床的応用が制限されている。抗炎症薬は、そのような細胞の存在によって誘発される免疫応答と戦う。自家細胞の場合、抗炎症薬は、異物であるヒドロゲル材料の存在によってまたは移植手術の外傷によって引き起こされる免疫応答を低減する。細胞は、患者もしくは提供者のバイオプシーまたは切除、細胞培養物または死体から得ることができる。

20

【0104】

一部の実施形態において、細胞は、タンパク質または核酸などの治療に効果的な物質を分泌する。一部の実施形態において、細胞は毒性物質を代謝する。一部の実施形態において、細胞は、皮膚、骨、軟骨、血管または筋肉などの構造組織を形成する。一部の実施形態において、細胞は、インスリンを自然に分泌する膵島細胞または自然に解毒する肝細胞など、天然のものである。一部の実施形態において、細胞は、異種のタンパク質もしくは核酸を発現するように、および／または内因性のタンパク質もしくは核酸を過剰発現するように、遺伝子操作される。

30

【0105】

封入のための細胞の例には、肝細胞、膵島細胞、副甲状腺細胞、腸を起源とする細胞、腎臓に由来する細胞、ならびに材料を主として合成および分泌または代謝するために作用する他の細胞を含む。好ましい細胞のタイプは、膵臓膵島細胞である。遺伝子操作された細胞もまた、開示される方法に従って封入するのに適している。一部の実施形態において、細胞は、例えば血友病の処置のために、血液凝固因子を分泌するように、または遺伝子欠損のある個人の処置のための成長ホルモンを分泌するように、操作される。あるいはまた、細胞は、がんまたは他の有害な物質を標的とする物質を生成するように操作されてもよい。一部の実施形態において、細胞は、天然のまたは生体工学的に操作された組織中に含有される。一部の実施形態において、細胞は、神経変性疾患の処置のために中枢神経系中へ移植するのに適している。

40

【0106】

カプセルおよびミクロカプセルなどの開示される組成物中に封入される細胞の量および密度は、細胞、ヒドロゲルおよび埋め込み部位の選択に応じて変動する。一部の実施形態において、単一種の細胞が、 0.1×10^6 から 4×10^6 細胞/ml、好ましくは 0.5×10^6 から 2×10^6 細胞/ml の濃度でヒドロゲル中に存在する。他の実施形態において、細胞は細胞集合体として存在する。例えば、膵島細胞集合体（または膵島全体）

50

は、150 μ m直径の各集合体について約1500～2000細胞を好ましくは含有し、これは、1膵島当量（IE）として定義される。したがって、一部の実施形態において、膵島細胞は、100～10000 IE/ml、好ましくは200～3,000 IE/ml、より好ましくは500～1500 IE/mlの濃度で存在する。

【0107】

1. 膵島細胞

好ましい実施形態において、開示する組成物は、インスリンを生成する膵島細胞を含有する。膵臓膵島細胞を単離する方法は、当技術分野において公知である。Fieldら、Transplantation、61巻：1554頁（1996年）；Linetskyら、Diabetes、46巻：1120頁（1997年）。新鮮な膵臓組織は、刻むこと、ほぐすこと（teasing）、粉碎、および／またはコラゲナーゼ消化によって、分割することができる。その後、膵島は、洗浄、ろ過、遠心分離または採集手順によって、コンタミネーションしている細胞および材料から単離され得る。膵島細胞を単離および精製する方法および装置は、Langleyに対する米国特許第5,447,863号、Scharpらに対する同5,322,790号、Langleyに対する同5,273,904号、およびScharpらに対する同4,868,121号に記載されている。単離された膵臓細胞は、当技術分野において公知の任意の適した膵島細胞培養方法を使用して、封入またはマイクロ封入前に、任意選択で培養してもよい。例えば、Brothersに対する米国特許第5,821,121号を参照されたい。単離された細胞は、抗原性の構成成分を排除する助けとなる条件下にて培地中で培養してもよい。

【0108】

2. 遺伝子操作細胞

一部の実施形態において、開示する組成物は、治療用タンパク質または核酸を生成するように遺伝子操作された細胞を含有する。これらの実施形態において、細胞は、幹細胞（例えば多能性）、前駆細胞（例えば、多分化能性もしくは寡能性）、または最終分化細胞（すなわち単能性）であり得る。細胞は、miRNAもしくはRNAiなどの治療用のポリヌクレオチドまたはタンパク質をコードするポリヌクレオチドをコードする核酸を含有するように操作され得る。核酸は、安定した発現のために細胞ゲノムDNA中へ組み入れることができ、または発現ベクター（例えばプラスミドDNA）中へ組み入れることができる。治療用のポリヌクレオチドまたはタンパク質は、処置される疾患および移植部位に基づいて選択することができる。一部の実施形態において、治療用のポリヌクレオチドまたはタンパク質は抗腫瘍剤である。他の実施形態において、治療用のポリヌクレオチドまたはタンパク質は、ホルモン、増殖因子、または酵素である。

【0109】

III. カプセルを作製する方法

A. 2および3層カプセルを作製する方法

3層カプセルは、三流体同軸電気スプレー法によって作製することができる。

【0110】

好ましくは、3層カプセルは、3つの別個の同心チューブからなるノズルを出口に有する電気スプレー装置中で形成される。ノズル（100）の例を図2に例証する。ヒドロゲル形成性材料を含有し、1種または複数種の抗炎症薬または撮像試薬を任意選択で含む第1の流れが、ノズルの最も内側のチューブ（110）中へポンプ注入される。ヒドロゲル形成性材料および膵島を含有する第2の流れが、ノズルの中間のチューブ（112）内へポンプ注入される。ヒドロゲル形成材料を含有する第3の流れが、最も外側のチューブ（114）へ送達される。

【0111】

3つの流れが、ノズルの出口で合流する。アルギナート溶液の比較的高い粘度によって、3つの流れの間のいかなる顕著な混じり合いも防止され、3つの明瞭な同心層を有する液滴が、電界下で形成される。カルシウムイオンまたはバリウムイオンなどの二価イオンを含有するゲル浴中へ液滴が落下した後、瞬時に架橋が起こり、3層カプセルが形成される。3層カプセルは、三流体同軸電気スプレーによって作製することができる。

0

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

【 0 1 1 6 】

【 0 1 1 7 】

【 0 1 1 8 】

様々なポリカチオンが、ポリマーヒドロゲルを半透過性表面膜へと複合体化させ、それによって安定化するために、使用され得る。使用することができる材料の例には、アミン

基またはイミン基などの塩基性反応基を有し、3,000から100,000の間の好ましい分子量を有するポリマー、例えばポリエチレンイミンおよびポリリシンが含まれる。これらは市販されている。ポリカチオンの1つはポリ(L-リシン)であり、合成ポリアミンの例は、ポチエチレンイミン、ポリ(ビニルアミン)およびポリ(アリルアミン)である。多糖であるキトサンなどの天然ポリカチオンもある。

【0119】

ポリマーヒドロゲル上の塩基性表面基との反応によって半透過性膜を形成するために使用することができるポリアニオンには、アクリル酸、メタクリル酸およびアクリル酸の他の誘導体のポリマーおよびコポリマー、スルホン化ポリスチレンなどのペンダントSO₃H基を有するポリマー、ならびにカルボン酸基を有するポリスチレンが含まれる。

10

【0120】

好ましい実施形態において、アルギナートカプセルは、懸濁した細胞を含有するアルギナート溶液から、封入機(Inotech封入機など)を使用して製作される。一部の実施形態において、アルギナートは、Ca²⁺、Ba²⁺またはSr²⁺などの多価カチオンとイオンの架橋する。特に好ましい実施形態において、アルギナートは、BaCl₂を使用して架橋される。一部の実施形態において、カプセルは、形成後にさらに精製される。好ましい実施形態において、カプセルは、例えば、HEPES溶液、Krebs溶液および/またはRPMI-1640培地で洗浄される。

【0121】

細胞は、提供者から直接、提供者からの細胞の細胞培養物から、または確立された細胞培養系から、得ることができる。好ましい実施形態において、細胞は、提供者から直接得て、洗浄され、ポリマー材料と組み合わせて直接埋め込まれる。細胞は、組織培養の分野における当業者に公知の技術を使用して培養される。

20

【0122】

細胞の付着および生存能力は、組織学および蛍光顕微鏡検査法などの標準的な技術を使用して評価することができる。埋め込まれた細胞の機能は、上記の技術と機能的アッセイとの組合せを使用して決定することができる。例えば、肝細胞の場合、in vivoの肝臓機能研究は、受容者の総胆管中へカニューレを配置することによって行うことができる。胆汁は、その後漸増して採取することができる。胆汁色素は、未誘導体化テトラピロールを探索する高圧液体クロマトグラフィーによって、またはP-グルクロニダーゼによる処置有りまたは無しのいずれかで、ジアゾ化されたアゾジピロールエチルアントラニレートとの反応によってアゾジピロールへ転換した後に薄層クロマトグラフィーによって、分析することができる。二抱合型ビルビリリンおよび一抱合型ビルビリリンは、抱合胆汁色素のアルカリメタノリシス後に薄層クロマトグラフィーによって決定することもできる。一般的に、機能する移植された肝細胞の数が増加すると、抱合ビルビリリンのレベルが増加する。アルブミン産生などの簡便な肝臓機能テストは、血液試料で行うこともできる。埋め込み後の細胞機能の程度を決定するために必要であれば、類似の臓器機能研究を、当業者に公知の技術を使用して実行することができる。例えば、膵臓の膵島細胞を、肝細胞を埋め込むために特に使用されるのと同じ様式で送達して、インスリンの適切な分泌によってグルコース調節を達成して、糖尿病を回復させてもよい。他の内分泌性組織も埋め込むことができる。

30

40

【0123】

細胞が埋め込まれる1つの部位または複数の部位は、個人の必要性に基づいて決定され、必要な細胞の数もまた同様である。臓器機能を有する細胞、例えば肝細胞または膵島細胞については、混合物を、腸間膜、皮下組織、後腹膜腔、腹膜前空間および筋肉内空間の中へ注入することができる。

【0124】

所望であれば、カプセルまたはマイクロカプセル中に含有される細胞の生理学的応答性を保持しながらまたは過度に損なわずにカプセルまたはマイクロカプセルの耐久性を増加するために、カプセルまたはマイクロカプセルは、硫酸ナトリウムなどの生理学的に許容される

50

塩または類似の剤で処理またはそれらと共にインキュベートしてもよい。「生理学的に許容される塩」は、カプセルまたはマイクロカプセル中に封入された細胞の生理学的応答性に対して過度に有害ではない塩を意味する。一般的に、そのような塩は、カプセルの中に含有される細胞の機能および／または生存能力を実質的に損なうことなく、カルシウムイオンに結合するアニオンを有してカプセルを十分に安定化する塩である。硫酸ナトリウムおよび硫酸カリウムなどの硫酸塩が好ましく、硫酸ナトリウムが最も好ましい。インキュベーション工程は、上記のようにカプセルの中に含有される細胞の機能および／または生存能力を実質的に損なうことなく、カプセルを安定化するのに有効な量の生理的塩類を含有する水溶液中で実施される。一般的に、塩は、約 0.1 または 1 ミリモル濃度から、約 20 または 100 ミリモル濃度まで、最も好ましくは約 2 から 10 ミリモル濃度の量で含まれる。インキュベーション工程の期間は重要ではなく、約 1 または 10 分から、約 1 もしくは 2 時間またはそれ超（例えば一晚）であってよい。インキュベーション工程が実施される温度も同様に重要ではなく、典型的には約 4℃ から約 37℃ までであり、室温（約 21℃）が好ましい。

10

【0125】

I V. 疾患または障害の処置

封入された細胞は、それを必要とする患者に、疾患または障害の処置のために投与する、例えば注入するまたは埋め込むことができる。一部の実施形態において、疾患または障害は、患者におけるホルモンまたはタンパク質分泌細胞の機能不全によって引き起こされ、またはそのような機能不全を伴う。これらの実施形態において、ホルモンまたはタンパク質分泌細胞が封入され、患者に投与される。例えば、封入された膵島細胞は、糖尿病を有する患者に投与され得る。別の実施形態において、細胞は、対象における組織を修復するために使用される。これらの実施形態において、細胞は、皮膚、骨、軟骨、筋肉または血管などの構造組織を形成する。これらの実施形態において、細胞は、好ましくは幹細胞または前駆細胞である。

20

【0126】

また、(a) 治療効果を少なくとも Z 日間提供するのに有効量の本明細書に開示する調製物の最初の投与を提供すること、および (b) 有効量の請求項 1 に記載の調製物の、その後の投与を施すことによって被験体を処置する方法であって、但し、最初の投与とその後の投与とが少なくとも Z-10、Z-5、Z 日離れており、中間の投与が提供されない、方法を開示する。いくつかの形態において、Z は、少なくとも 14、30、60 または 90 日である。

30

【0127】

また、有効量の本明細書に開示する調製物の最初の投与がなされた被験体に、有効量の請求項 1 に記載の調製物の、その後の投与を提供することによって、被験体を処置する方法であって、但し、その後の投与が、最初の投与の少なくとも Z-10、Z-5、Z 日後に行われる、方法を開示する。いくつかの形態において、Z は、少なくとも 14、30、60 または 90 日である。

【0128】

1. 糖尿病

半透過性膜中に膵島細胞を封入することに基づく糖尿病処置用バイオ人工膵臓の使用の可能性は、科学者らによって広く研究されている。マイクロ封入は、膵島細胞を免疫拒絶から防御し、動物細胞または遺伝子修飾されたインスリン産生細胞の使用を可能にする。

40

【0129】

エドモントンプロトコルは、死亡している提供者から抜き取ったヒト膵島の埋め込みを伴い、無自覚の低血糖に陥りやすい 1 型糖尿病患者の処置に向けた改良点を示した。しかしながら、この技術において直面している 2 つの大きなハードルは、提供者臓器の利用可能性が限られていること、および患者の体内における免疫応答を防止するための免疫抑制剤が必要であることである。

【0130】

50

いくつかの研究は、ポリマーカプセル内部での膵島細胞の固定を伴うバイオ人工膵臓の開発に向けて専念されてきた。この目的に向けた最初の試みは、1980年にLimらによって実証され、そこでは、異種移植膵島細胞が、アルギナートポリリシンマイクロカプセル内部に封入され、これは、数週間、有意な *in vivo* 結果をもたらした。

【0131】

膵島マイクロ封入に典型的に使用されるポリマーは、アルギナート、キトサン、ポリエチレングリコール (PEG)、アガロース、硫酸セルロースナトリウムおよび水不溶性ポリアクリレートである。

【0132】

2. がん

いくつかの形態のがんの処置に向けた細胞封入マイクロカプセルの使用は、大きな可能性を示してきた。研究者らによってなされてきた1つのアプローチは、遺伝子修飾されたサイトカイン分泌細胞を含有するマイクロカプセルの埋め込みを通じたものである。マウスに埋め込まれた、遺伝子修飾されたIL-2サイトカイン分泌非自家マウス筋芽細胞は、腫瘍の増殖を遅らせ、動物の生存率を増加させた。しかしながら、この処置の効率は、植え込まれたマイクロカプセルへの免疫応答のために小さかった。がん抑制への別のアプローチは、腫瘍の広がりにつながる増殖因子の放出を防止するための血管新生阻害剤の使用を通じたものである。硫酸セルロースポリマー中に封入された、遺伝子修飾されたチトクロームP450発現細胞が、固形腫瘍の処置のために有用である場合もある。

【0133】

3. 心臓疾患

虚血性心臓疾患後の患者における心臓組織再生を可能にするための細胞投与についての多くの方法が研究されてきたが、埋め込み後の拍動している心臓において保持される細胞数の効率は、今も非常に低い。この問題を克服するための有望なアプローチは、細胞マイクロ封入療法の使用を通じたものであり、これは、遊離の幹細胞の心臓中への注入と比較して高い細胞保持を可能にすることが示された。

【0134】

心臓再生用途向けの細胞ベースの封入技術の影響を改善するための別の方策は、新生血管形成を刺激し損傷を受けた虚血性心臓における灌流を回復する血管内皮増殖因子 (VEGF) などの血管新生因子を分泌することが可能な、遺伝子修飾された幹細胞の使用を通じたものである。

【0135】

4. 肝臓疾患

マイクロ封入された肝細胞は、バイオ人工肝臓補助デバイス (BLAD) において使用することができる。急性肝臓不全 (ALF) は、現代の集中治療において改善されてはいるものの今も相当な致死率をもたらす医学的な非常事態である。最も深刻な場合、緊急の同所性肝臓移植 (OLT) が、目下のところ唯一の生存の機会を提示する。しかしながら、提供者臓器の供給は限られており、臓器は、時間に間に合うように利用可能にならない場合がある。効果的な一時的な肝臓サポートシステムは、提供者肝臓が利用可能になるまで患者を維持することによって、この状況において生存の機会を改善する。さらに、ALFからの快癒に続く本来の肝臓の既知の再生能力は、十分な時間にわたって一時的な肝臓サポートを使用すると少なくとも一部の場合においてOLTの必要性がなくなりさえするという可能性を、上昇させる。

【0136】

一部の実施形態において、肝細胞は、修飾されたコラーゲンの内部コアならびにメチルメタクリレート (MMA)、メタクリレート (MAA) およびヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) のターポリマーの外側シェルを有するカプセルまたはマイクロカプセル中に封入される (Yin Cら、Biomaterials、24巻: 1771~1780頁 (2003年))。

【0137】

バイオ人工肝臓サポートシステムにおいて使用するために採用されてきたまたは現在調査中の細胞系には、ヒトまたは動物の肝臓から単離された初代肝細胞ならびに肝細胞癌、肝芽細胞腫および不死化肝細胞株などの様々に形質転換したヒト細胞が含まれる。

【0138】

以下の非限定的な実施例を参照することによって本発明はさらに理解される。

【0139】

実施例は、コア-シェルアルギナート系カプセルおよびマイクロカプセルの形成を実証するものであり、これらは、ヒドロゲルカプセル内に細胞を隔離し、体内の免疫細胞によって細胞が検出されることを防止することが可能であること（実施例1）、直径が1mm超のより大きなヒドロゲルカプセルは、より小さな直径を有する同じヒドロゲルカプセルより、引き起こす繊維化反応が少ないということ（実施例2）を実証している。

10

【実施例】

【0140】

（実施例1）コア-シェルアルギナート系マイクロカプセルの調製

材料および方法

コア-シェルノズルの設計およびコア-シェルカプセルの形成

【0141】

現在のアルギナート系細胞封入プロトコルと互換性のある二流体同軸電気噴射を使用した、コア-シェル構造を有するタイプのアルギナート系ヒドロゲルマイクロカプセルを開発した。コアおよびシェルの組成および厚さは、生体医療用途の多くのタイプのために、独立して設計および制御することができる。図3Aおよび3Bは、従来の細胞封入アプローチ（図3A）ならびにコア-シェルカプセルおよび細胞封入のための二流体同軸電気噴射（図3B）の模式図である。図3Bは、コア-シェルカプセルの製作および細胞または細胞集合体の封入のための二流体同軸電気噴射の概略を示している。この二流体構成は、コア-シェルヒドロゲルカプセルを作製し生細胞を封入するために使用された。

20

【0142】

シェル流体は、細胞を含まないアルギナート溶液からなるのに対し、コア流体は、臍島または他の治療用細胞を含有する。2つの流体の比較的高い粘度およびそれらの間の短い相互作用時間によって、それらの混じり合いが防止される。静電気力下において、コア-シェル構造を有するマイクロ液滴が形成され、ゲル化浴中でヒドロゲルカプセルに転換される。

30

【0143】

まず、コア-シェルヒドロゲルカプセルの形成を実証するため、蛍光標識されたアルギナートを使用してシェルを形成し、標識されていないアルギナートを使用してコアを形成した。コアおよびシェルの厚さは、単純にそれらそれぞれの流速を調和させることによって制御することができる。次に、細胞封入のため、カプセル当たりの所望の細胞質量に基づいて、コアのサイズを設計することができるのに対し、機械強度および物質輸送の要求に従って、シェルのサイズを調整することができる。コアおよびシェルの組成も調整可能である。これは、封入する細胞と直接接触する材料と、移植したときに宿主免疫系と隣接する材料との独立した最適化を可能にする。例えば、抗炎症薬または撮像コントラスト試薬（例えば、酸化鉄ナノ粒子）を、コア中の細胞に接触させることなく、シェル中に搭載することができる。アルギナートシェルの内側のコアとしてMatrigelなどの異なる材料を置くことも可能である。コア材料は、単独では機械的に強固なカプセルを形成することはできない場合があるが、それゆえ、封入された細胞にとって好ましい局所的環境を提供することができる。

40

【0144】

同軸ノズルの設計は、カプセルの均一なコア-シェル構造の安定した形成および臍島の完全な封入にとって重要であった。第一に、ノズルは同心でなければならず、何らかの偏心は、コア流体を囲むシェル流体の不均一流を引き起こし、コア-シェル構造を乱す場合がある。第二に、ノズルは、ノズルの内側のシェル流体流がコアチューブの周りに均一で

50

あるように設計されなければならない。第三に、コアチューブの内径は、豚島のサイズに適応しなければならない。同軸ノズルは、内径0.014インチおよび外径0.022インチのコアチューブ、ならびに内径0.04インチおよび外径0.0625インチのシェルチューブを有する。ノズル本体から突出するシェルチューブの長さは0.5インチであり、出口端において先細になっていた。コアチューブは、出口において、シェルチューブに対して100ミクロン内側に置かれていた。コアおよびシェル流体の流速は、別個のシリンジポンプによって、独立して調整された。電圧は6.2 kVであり、ノズル先端とゲル化溶液の表面との間の距離は1.8 cmであった。

【0145】

封入を最適化するため、所与の分子量のアルギナートの溶液濃度を最適化する必要がある。コアおよびシェル溶液の濃度の両方が低すぎると、コアおよびシェル溶液の間で顕著な混じり合いが生じ、不均一なコア-シェル構造につながる。PRONOVA S LG 20アルギナート(Mwおよそ75~220,000、FMC Biopolymer)について、最適な濃度範囲は、0.8% (w/v) から2% (w/v) であることが見出された。全てのアルギナート溶液は1.4% (w/v) であり、封入前のゲル化を避けるためMatrigel (BD Biosciences) は4℃の冷室内において4 mg/mLにて使用した。コアおよびシェル溶液の特性のほかに、操作パラメータの最適化も、理想的な封入を得るために重要であった。典型的な流速は、コア流については0.005 mL/分から0.1 mL/分、シェル流については0.1 mL/分から0.5 mL/分であった。

【0146】

ラット豚島の単離および精製：

豚島を収集するために、およそ300グラムの重さのCharles River LaboratoriesからのSprague-Dawleyラットを使用した。全てのラットは、1:20のキシラジン(10 mg/kg)とケタミン(150 mg/kg)の腹腔内注入によって麻酔し、各注入の総体積は、ラットの体重に応じて0.4~0.5 mLであった。単離手術を行った。簡単に説明すると、胆管にカニューレを挿入し、RPMI 1640培地中の0.15%リベラーゼ(研究用グレード、Roche)の溶液のin vivo注入によって豚臓を膨張させた。ラットは、下行大動脈を切ることによって屠殺し、膨張した豚臓臓器を取り出し、全ての手術が完了するまで氷上の50 mLコニカルチューブ中に保った。全てのチューブを37℃の水浴中に置いて30分間消化し、10%加熱不活性化ウシ胎児血清を含む冷M199培地を10~15 mL添加し軽く振とうすることによって、消化を停止した。消化された豚臓を、上述の同じM199培地で2回洗浄し、450 μmの篩を通してろ過し、その後、Histopaque 1077 (Sigma) / M199培地勾配中に懸濁し、1,700 RCFで4℃にて遠心分離した。勾配中で形成された豚島層の厚さに応じて、高純度の豚島のためにこの工程を繰り返した。最後に、豚島を勾配から採取し、一連の6つの重力沈降によってさらに単離し、ここで、それぞれの上澄みは4分の沈降の後に廃棄した。精製された豚島は、光学顕微鏡下でアリコートによって手で数え、その後、無菌の1Xリン酸塩緩衝食塩水中で3回洗浄した。その後、豚島を、10%加熱不活性化ウシ胎児血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地中で1回洗浄し、さらなる使用のためにこの培地中で一晩培養した。

【0147】

肝臓組織の均質化および封入

肝臓は、肝門脈系の血管および結合組織から肝臓を切り離すことによって、屠殺したラットから得た。それを0.9% NaCl溶液の中に入れ、シャーレ中で外科用鉗子およびハサミを使用して刻んだ。これらの切片を、0.9%食塩水で2回洗浄して血液を取り除き、その後、簡易のMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を使用して解離した。解離後、組織試料を100 μm細胞ストレーナー、続いて40 μm細胞ストレーナーを通してろ過した。このろ過をもう1回繰り返して、封入用肝臓組織

細胞を得た。単流体封入のため、解離した肝臓組織細胞 0.06 mL を、1.4% SLG 20 アルギナート溶液 4.5 mL に分散させた。二流体同軸封入のため、解離した肝臓細胞 0.06 mL を、1.4% SLG 20 アルギナート溶液 0.5 mL に分散させ、コア流体として使用した。別個の 1.4% アルギナート溶液 4 mL をシェルとして使用した。

【0148】

膵島の封入および移植

封入の直前に、培養した膵島を 1400 rpm で 1 分間遠心分離し、Ca を含有しない Krebs-Henseleit (KH) 緩衝液 (4.7 mM KCl、2.5 mM HEPES、1.2 mM KH_2PO_4 、1.2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、135 mM NaCl、pH およそ 7.4、浸透圧 およそ 290 mOsm) で洗浄した。洗浄後、膵島を再度遠心分離し、全ての上澄みを吸引した。その後、膵島沈渣を、所望の膵島数密度で、0.8% NaCl 溶液中に溶解した 1.4% SLG 20 アルギナート溶液中に再懸濁した。標準カプセルの場合、1000 膵島毎にアルギナート溶液 0.27 mL を使用した。コア-シェルカプセルには、1000 膵島毎に溶液 0.03 mL をコア流体として使用した。別の膵島なしの 1.4% アルギナート溶液 0.24 mL をシェル流体として使用した。シェルの流速は 0.2 mL/分であり、コアの流速は 0.025 mL/分であった。したがって、同じ数の膵島について、通常の封入およびコア-シェル封入の両方において使用したアルギナート溶液の総体積は同じであった。カプセルを BaCl₂ ゲル化溶液 (20 mM BaCl₂、250 mM D-マンニトール、25 mM HEPES、pH 約 7.4、浸透圧 およそ 290 mOsm) を使用して架橋した。架橋の直後に、封入した膵島を HEPES 緩衝液で 4 回、RPMI 培地 1640 で 2 回洗浄し、移植のため 37℃ にて一晩培養した。膵島は多様なサイズであり (50~400 μm)、封入プロセス中に膵島の不可避な損失があったため、封入された膵島の総数を再度数え、移植前に膵島当量 (IE、150 μm サイズに正規化) に変換した。

【0149】

免疫適格性の雄 C57BL/6 マウスを移植に利用した。インスリン依存性糖尿病マウスを作り出すため、健康な C57BL/6 マウスを、MIT への出荷前にストレプトゾシン (STZ) を用いて販売者 (Jackson Laboratory、バーハーバー、メイン州) が処置した。全てのマウスの血糖レベルを、移植前に再テストした。2 日続けて非絶食時血糖レベルが 300 mg/dL 超であったマウスのみが糖尿病とみなされ、移植を受けた。酸素中 3% イソフルオランを使用してマウスを麻酔し、手順全体を通じて同じ割合を維持した。手術前に、全てのマウスが、脱水症状を防止するための皮下の 0.9% 食塩水 0.3 mL と共に、手術前の鎮痛剤として 0.05 mg/kg 用量のブプレノルフィンを皮下に受けた。手術野へ移す前に、マウスの腹部の毛を剃り、ベタジンおよびイソプロピルアルコールで交互に擦って、無菌野を作り出した。腹部の正中線に沿って 0.5 mm 切開し、鈍的切開を用いて腹膜を曝露した。その後、腹膜を鉗子で掴み、白線に沿って 0.5~1 mm 切開した。その後、所定数の膵島当量を有する所望の体積のカプセルを無菌ピペット中へ採り、切開部を通して腹腔中へ移植した。その後、切開部を 5-0 先端テーパーポリジオキサノン (PDS II) 吸収性縫合糸を使用して閉じた。その後、創傷クリップおよび組織グルーを使用して、切開部にかけて皮膚を閉じた。

【0150】

全ての動物プロトコルは、MIT 動物飼育委員会によって承認され、全ての外科的手順および術後ケアは、MIT 比較医学部の獣医スタッフによって監督された。

【0151】

封入された膵島の共焦点画像化

膵臓膵島を Hoechst 染料 (2 μg/mL) で染色し、蛍光の標準カプセル、またはシェルが蛍光標識されたコア-シェルカプセルに封入した。チャンバーのあるカバーガラス (LabTek) 上にカプセルを置き沈降させた。その後、レーザー走査型共焦点顕微鏡 710 (LSM 710) を使用して、10 倍対物レンズ下で、封入された膵島を画像化した。試料の底部から頂部までの複数の共焦点スライスを画像化し、Z スタックを作成

した。LSMブラウザソフトウェアを使用して直交画像化および3D描画を行い、膵島含有カプセルを可視化した。

【0152】

血糖モニタリング

移植手術に続いて、血糖レベルを1週間に3回モニタリングした。ランセットを使用して尾静脈から血液の小滴を採取し、市販のグルコースメーター（Clarity One、Clarity Diagnostic Test Group、ボカラトン、フロリダ州）を使用してテストした。非絶食時血糖レベルが200mg/dL未満のマウスを正常血糖とみなした。実験群の全てのマウスが高血糖状態に戻るまでモニタリングを継続し、その時点でマウスは安楽死させた。

10

【0153】

結果

コアシェルカプセルを使用した良好な細胞封入が、均質化したラット肝臓組織細胞およびラット膵臓膵島の両方を使用して実証された。膵島を含有する標準カプセルおよびコアシェルカプセルの両方についての顕微鏡画像は、膵島当たり比較的少ない体積のアルギナート溶液（すなわち、1000膵島毎に溶液0.27mL）が使用されて、移植されるカプセルの総体積が最小化されたことを示す。これは、典型的に使用される体積のおよそ3分の1である（deVosら、Transplantation、1996年、62巻、888頁）。架橋のため、BaCl₂溶液（deVosら、Transplantation、1996年、62巻、888頁）を使用し、平均カプセルサイズは、両方とも500μm近辺であった。標準カプセルについては、膵島はカプセル内でランダムに位置し、外部へ突出した膵島が頻繁に観察された。これとは対照的に、コアシェルカプセル中の膵島は完全に封入されていた。カプセルのコアシェル構造は、シェルにおいて蛍光アルギナートを使用し、コアにおいて非蛍光アルギナートを使用することによって実証された。膵島が青色に染色される（すなわち核染色）蛍光画像は、一部の場合において、膵島はコアシェル界面に近いが、追加のシェル層のために、なお完全に封入されていることを示した。共焦点顕微鏡技術は完全な封入を確認するために使用されたということに留意することが重要である。従来の顕微鏡検査では、比較的密集した膵島塊がカプセルの底に落ちて対物レンズと一列になり得るときに、誤って理解されることがある。旧来のようにして形成されたアルギナートカプセルでは、従来の光学顕微鏡下で、膵島が完全に封入されたように見えた。しかしながら、共焦点顕微鏡法を使用したZシリーズおよび直交視野は、膵島がカプセルの外側へ部分的に曝露していることを明らかにした。これとは対照的に、コアシェルカプセルは、3方向全てから見たときに、膵島を完全に入れていた。量的には、共焦点顕微鏡法を使用した複数の膵島含有カプセルの試験に基づくと、標準カプセルは約30%で膵島が突出していたのに対し、コアシェルカプセルでは膵島の突出はなかった。コアシェル構造を有するヒドロゲルマイクロカプセルは、FITCで部分的に修飾されたアルギナートのシェルで形成されたのに対し、コアは標識されていないアルギナートまたはMatrigelである。シェルおよびコアの厚さは、それらのそれぞれの流速を調和させることによって制御される：（a）0.1mL/分および0.1mL/分；（b）0.15mL/分および0.05mL/分；（c）0.2mL/分および0.02mL/分。コアおよびシェルの組成も、独立して制御することができる。（d）シェルアルギナートは、抗炎症薬であるクルクミンの粒子を含有する。薬物粒子は、自己蛍光性である。シェルは蛍光アルギナートであり、コアは非蛍光Matrigelである。

20

30

40

【0154】

ストレプトゾシン（STZ）誘発糖尿病マウスモデル（Brodskyら、Diabetes、1969年、18巻、606頁）を使用して、同軸封入された膵島の機能性を評価し、標準カプセルと効能を比較した。比較は、標準カプセルおよびコアシェルカプセルに封入された膵島で実行した。コアシェルカプセルに封入された膵島の3D再構築共焦点蛍光画像では、膵島が青色に染色されているのに対し、シェルは緑色に標識されていることが示された。

50

【0155】

封入されたラットの膵島を糖尿病マウスの腹腔中へ移植し、それらの血糖を測定した。図4Aは、コアシェルカプセル（ダイヤモンド）および標準カプセル（丸）の両方についての移植後の日数の関数としてのマウスの血糖レベルを示している。両方のタイプのカプセルについて、アルギナート溶液0.27mLあたり1000の膵島密度を使用し、各マウスに500膵島当量（150 μ mサイズに正規化）を移植した。血糖が200mg/dL未満のマウスを正常血糖とみなす（Kimら、Lab Chip、2011年、11巻、246頁）。移植から数日後、全ての糖尿病マウスが、予測通り正常血糖となった。しかしながら、図4Bに実証されているように、2つのタイプのカプセルの間の差が、約2週間後に明らかになり始めた。標準カプセルを受けたマウスの平均血糖レベルは、15日で200mg/dL超に戻り、コアシェルカプセルを受けたマウスの平均血糖レベルは、50日まで200mg/dL未満を維持した。図4Bは、移植後の日数に対する正常血糖マウスのパーセントを示す。標準カプセルは、全てのマウスにおいて、糖尿病を20日まで制御することができなかったのに対し、コアシェルカプセルは、一部のマウスにおいて、移植後約80日まで制御することができ、コアシェルカプセルは、標準カプセルと比較して顕著に処置を改善したことが示された。

10

【0156】

要するに、コアシェル構造を有するヒドロゲルマイクロカプセルが作製され、改善された細胞封入および免疫防御のためのそれらの使用がなされた。膵島当たりの材料体積が低減したコアシェルカプセルを使用した、より良好な膵島封入が実証された。カプセルのコア領域中に細胞または細胞集合体を単純に閉じ込めることによって、単一の工程で、改善された免疫防御が達成された。コアシェル構造およびより良好な封入の両方が、共焦点顕微鏡法によって確認された。1型糖尿病マウスモデルを使用して、ラット膵島を封入したコアシェルカプセルが、現在使用されている標準カプセルより顕著に良好な処置を提供することが示された。

20

【0157】

膵島マイクロ封入は、1型糖尿病の処置のための有望なアプローチを提示し、数十年にわたり熱心な研究の主題となってきた（Bratlieら、Adv. Healthcare Mater., 2012年、1巻、267頁）。異なる研究グループからの結果は、たびたび相反していた。膵島の品質、および生体適合性などの材料特性は、処置の成果に影響を与える実に必要な因子である。封入の品質も、結果に影響し不一致を生じ得た。コアシェルカプセルは、標準カプセルを作製するために使用されてきたのと同じ封入プロトコルを使用する単一工程で作製することができ、膵島を傷付けることがない。シェルおよびコアの組成を制御する機会、より良好な免疫防御を提供することに加えて、マイクロ封入における追加の機会を提供する。その例には、コア中のアルギナートを、膵島の長期生存を増強し得る異なる材料で置き換えることが含まれる。加えて、幹細胞に由来するインスリン生成細胞（Calneら、Nature Reviews Endocrinology、2010年、6巻、173頁）または成人細胞（Zhouら、Nature、2008年、455巻、627頁）は、膵島に大きな選択肢を提供する。コアシェルカプセルは、改善された封入のみならず、シェル中に封入する材料およびコア中の細胞に直接接触する材料の設計における、より大きな自由度も可能にする。

30

40

【0158】

（実施例2）治療用細胞および細胞集合体の封入のための大きな2層ヒドロゲルカプセル（>1mm）の調製

材料および方法

封入方法は、（a）膵島を含有するアルギナート溶液の液滴の形成、および（b）液滴のヒドロゲルカプセルへの転換という2つの大まかな工程を含む。機械力または静電気力を使用して、液滴またはカプセルサイズを制御することができる。膵島は、カプセル内にランダムに分布し得る。物質輸送を容易にするため、膵島をカプセルのシェル領域中に導入することもできる。これは、二流体封入アプローチを使用することによって達成することができ、このアプローチでは、膵島を含有するアルギナート溶液の1つの流れがシェル

50

流体として働き、かつ細胞を含有しないアルギナート溶液の別個の流れがコアに流れる。抗炎症薬などの追加の構成成分もコアに組み込むことができる。

【0159】

膵島を封入するための2つのタイプの大きな ($D > 1\text{ mm}$) アルギナートヒドロゲルカプセルを調製した。1つ目では、膵島をカプセル内にランダムに分散させた。2つ目では、膵島をカプセルのシェル領域中に意図的に置いた。

【0160】

ラット膵島を封入した 1.5 mm カプセルを、STZ 誘発糖尿病マウスへ注入した。500 μm カプセルを対照として使用し、両方のカプセルサイズについて500 IEを使用した。

10

【0161】

結果

大きいサイズ ($D > 1\text{ mm}$) のカプセルは、従来の ($0 \sim 500\text{ }\mu\text{m}$) カプセルより、線維形成がはるかに少なく、はるかに長い回復をもたらした。500 μm カプセルは対照として使用し、500 IEが両方のサイズのカプセルに使用された。500 μm カプセル群の5匹のマウス全てが、43日までに失敗した (3つの連続した測定で血糖が 200 mg/dl 超) のに対し、大きなカプセルははるかに長く持続した。5匹のマウスのうちの1匹は43日で失敗し、1匹は75日で失敗し、別の1匹は146日で失敗し、残りの2匹は、実験を止めた196日で回復状態を維持した。500 μm カプセル群の5匹のマウス全てが、43日までに失敗した (すなわち、3つの連続した測定で血糖が 200 mg/dl 超) のに対し、大きなカプセルははるかに長く持続した。5匹のマウスのうちの1匹は43日で失敗し、1匹は75日で失敗し、別の1匹は146日で失敗し、残りの2匹は、実験を止めた196日で回復状態を維持した。

20

【0162】

再び500 IEを用いた別個の追跡研究において、500 μm カプセル群における8匹全てのマウスは35日までに失敗したのに対し、 1.5 mm カプセル群においては、6匹のうちの1匹が28日で失敗し、1匹は105日で失敗し、1匹は134日で失敗し、別の1匹は137日で失敗し、残りの2匹は、実験を止めた175日で回復状態に留まっていた。

【0163】

500 ミクロンカプセルについては図5A、 1.5 mm カプセルについては図5Bを参照されたい。

30

【0164】

回収したカプセルの分析によって、500 μm カプセルは、全て線維形成して塊になっていたが、 1.5 mm カプセルは、はるかに線維化が少なかったことが明らかになった。

【0165】

要するに、アルギナートヒドロゲルなどの材料を使用して膵島などの細胞または細胞集合体を封入することによって、直径 1 mm 超の大きなヒドロゲルカプセルを作製した。アルギナートヒドロゲルカプセル中に封入された膵島は、免疫抑制薬を使用することなく、1型糖尿病の処置のために移植することができた。1つの大きな課題は、最終的に膵島の壊死および移植の失敗につながる、移植時のカプセルに対する線維化反応である。現在使用されているカプセルの典型的な直径は、 1 mm 未満と比較的小さい。より大きなカプセルは、線維形成が少なく、したがって臨床的使用にとってより良好な疾患の転帰を有することが発見された。

40

【0166】

(実施例3) 大きい ($> 1\text{ mm}$) および小さい ($< 1\text{ mm}$) ヒドロゲルカプセルに対する線維化の影響の比較

開示した2または3層ヒドロゲルカプセルは、センサーまたは薬物放出制御用途に有用である。一部の実施形態において、カプセルは、異物応答に抵抗するように設計される。好ましいカプセルの大まかな特徴には、 1 mm 超のサイズおよび球形状、直線端のない滑

50

らかな表面、親水性材料から作製されること、およびカプセルは多孔性であってよく孔は $1\text{ }\mu\text{m}$ 未満のサイズが好ましいことが含まれる。 1 mm より大きいカプセルは、マクロファージ細胞の接着に効果的に抵抗する。例えば、マクロファージ被覆は、カプセルの総表面積の 30% 未満であり得る。この実施例は、 1 mm 超のカプセルへの低減した線維化の影響を示す。 1 mm 超のカプセルは、マクロファージおよび好中球の接着に効果的に抵抗し、マクロファージおよび好中球の動員を減少させる（図 6）。例えば、マクロファージおよび好中球のレベルは、カプセルと会合した線維化組織において FACS によってアッセイされ、より小さい $300\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルで観察されたレベルの 30% 未満まで低減した（図 6）。より大きなコアシェル（複層アルギナートカプセル）を、二重ノズル電気スプレー法（図 1 に例証されている）を使用して生産したところ、それらも、マクロファージ／好中球の動員および接着の同様の低減を示した。これは、移植後の多くの時点を通して（例えば、7、14 および 28 日、ならびに 1、6 ヶ月ならびに 1 年）、完全に健康なおよび STZ 誘発糖尿病 C57BL/6 マウスから取られたカプセルについて当てはまる。さらに、線維形成を、位相差／明視野画像上での細胞接着および線維性過剰増殖の目視検査によって、ならびに F-アクチン（細胞過剰増殖マーカー）およびアルファ平滑筋アクチン（線維形成マーカー）についての共焦点画像化およびウエスタンブロットによって測定した。qPCR を使用してコラーゲン（1A1）沈着の相対レベルも決定した。これらの実施例は、 1 mm 超のカプセルへの線維化の影響の低減を示す。

【0167】

種々のサイズの空のカプセル（封入された細胞がないカプセル）を SLG100 アルギナート（PRONOVA）を使用して生産した。カプセルを C57BL/6 マウスの腹腔内に移植し、回収、ならびに FACS 分析、qPCR、共焦点画像化および／またはウエスタンブロットによって決定する宿主拒絶応答（すなわち、免疫炎症および線維形成）の分析の前に、2 週間インキュベートした。位相差画像を使用して、処置群（すなわち、カプセルサイズ）当たり $n = 5$ の個体で、細胞の過剰増殖および線維形成の相対的レベルを評定した。 $300\text{ }\mu\text{m}$ および $500\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルは、 $1100\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルより、28 日後に有意に多く線維化していた。

【0168】

小さい（ $300\text{ }\mu\text{m}$ ）、中間（ $500\text{ }\mu\text{m}$ ）および大きい（ $1500\text{ }\mu\text{m}$ ）均一なサイズのカプセルを、電気スプレー技術を使用して生産し、C57BL/6 マウスの腹腔内でインキュベートし、分析のため 14 日後に回収した。線維形成のいくつかの尺度（FACS 分析、qPCR、共焦点画像化および／またはウエスタンブロット）を使用して、カプセルを試験した。 $300\text{ }\mu\text{m}$ および $500\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルは、明視野および共焦点画像化において、 $1500\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルより有意に多い線維形成を示した。

【0169】

種々のサイズのカプセルへの免疫応答を、マクロファージまたは好中球のいずれかにより構成される免疫細胞集団のパーセントを測定することによって評定した（図 6）。 $300\text{ }\mu\text{m}$ 、 $500\text{ }\mu\text{m}$ 、 $900\text{ }\mu\text{m}$ および $1500\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルを、FACS による分析のため試料を回収する前に、免疫適格性 C57BL/6 マウスの腹腔内で 14 日間インキュベートした。マクロファージのパーセントは、 $300\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルで高く、カプセルサイズが大きくなるにつれて着実に低減した。好中球のパーセントは、 $300\text{ }\mu\text{m}$ 、 $500\text{ }\mu\text{m}$ および $900\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルで高く、 $1500\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルでは対照レベル近くまで下がった。 0.3 mm 、 0.5 mm 、 1 mm および 1.5 mm のカプセルの回収されたカプセルからのタンパク質も、ウエスタンブロットによって分析した。平滑筋アクチン（SMA）および β -アクチンのウエスタンブロットによって、カプセルサイズが大きくなると線維形成が低減するという同じ傾向が確認された。種々のカプセルサイズに会合した平滑筋アクチンおよび β -アクチンの量を、ウエスタンブロットによって決定した。平滑筋アクチンについてのシグナルを、 β -アクチンについてのシグナルに対して正規化した。平滑筋アクチンのレベルは、 1.5 mm および 1 mm のカプセルで低かったが、 1.5 mm および 1.0 mm のカプセルでははるかに高かった（図 7）。

【0170】

線維形成の低減効果は、カプセルの表面積または体積を正規化したときも依然として明白である。300 μm 、500 μm および 800 μm のカプセルを C57BL/6 マウスの腹腔内で 14 日間インキュベートし、14 日後に回収し、位相差顕微鏡法を使用して画像化した。観察された線維形成量を、カプセルの表面積 (図 8 上) またはカプセルの体積 (図 8 下) について正規化した。両方の場合において、線維形成の尺度は、300 μm のカプセルで最も大きく、800 μm のカプセルで最も低かった。小さいカプセルに対する大きいカプセルの線維形成の低減は、小さいカプセル (300 μm) の体積の 9 倍大きいカプセル (1000 μm) をテストしたときでも明らかであった。

【0171】

大きいカプセルの線維形成の低減効果は、様々な材料にわたって依然として明白である。500 μm および 1500 μm のカプセルを、SLG20 アルギナート (PRONOVA)、ポリスチレン、ガラス、ポリカプロラクトン (PCL)、LF10/60 アルギナート (FMC BioPolymer) から作製し、また、大きな 2000 μm テフロン (登録商標) 球を作製した。カプセルを C57BL/6 マウス中で 14 日間インキュベートし、様々な技術 (すなわち、qPCR および FACS) によって分析した。線維形成は、CD68 (マクロファージマーカー)、Ly6g (好中球マーカー)、CD11b (骨髄性細胞マーカー) および Col1a1 (線維形成マーカー) を使用して測定し、qPCR によってアッセイした。1 組のみの例外があったが、マーカーは 1500 μm のカプセルの全てにおいて対照レベルまたはその近傍で発現し、500 μm のカプセルの全てにつ

【0172】

これらの異なる材料から作製された 500 μm および 1500 μm のカプセルへの免疫応答も、マクロファージおよび好中球から構成される細胞集団のパーセントを FACS によって測定することにより、細胞レベルで評定した (図 10)。SLG20 アルギナート (PRONOVA)、ポリスチレン、ガラス、ポリカプロラクトン (PCL) および LF10/60 アルギナート (FMC BioPolymer) からカプセルを作製した。カプセルを C57BL/6 マウス中で 14 日間インキュベートし、様々な技術 (すなわち、qPCR および FACS) によって分析した。各場合において、マクロファージのパーセントおよび好中球のパーセントは、1500 μm のカプセルより 500 μm のカプセルで有意に高かった (図 10)。

【0173】

(実施例 4) 生体適合性における球直径の効果

材料および方法

試薬

他に断りがなければ、全ての化学物質は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から、細胞培養試薬は Life Technologies (Grand Island, NY) から得た。抗体: Alexa Fluor 488 コンジュゲート抗マウス CD68 (カタログ番号 137012、クローン FA-11) および Alexa Fluor 647 コンジュゲート抗マウス Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) (カタログ番号 137012、クローン RB6-8C5) は、BioLegend Inc. (San Diego, CA) から購入した。Alexa Fluor 647 コンジュゲート抗マウス TGF β 1 (カタログ番号 bs-0103R-A647) は、Bioss 抗体から購入した。Cy3 コンジュゲート抗マウスアルファ平滑筋アクチン抗体は、Sigma Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。繊維状アクチン (Factin) 特異的 Alexa Fluor 488 コンジュゲートファロイジンおよ

びNewport Greenは、Life Technologies (Grand Island, NY) から購入した。中間のサイズ (500 μ m) および大きなサイズ (2 mm) のガラス球は、Sigma Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。中間のサイズ (500 μ m) および大きなサイズ (2.5 mm) のステンレス鋼球は、Thomas Scientific (Swedesboro, NJ) から購入した。中間のサイズ (400~500 μ m) および大きなサイズ (2 mm) のポリスチレン球は、Phosphorex (Hopkinton, MA) から購入した。研究で使用する球のサンプリングを、商業的販売者 (Charles River, Wilmington, MA) によるエンドトキシンテストのために提出したところ、結果は、球が、 <0.05 EU/ml のエンドトキシンレベルを含有したことを示した。

10

【0174】

アルギナートヒドロゲル球の製作

電圧発生器、垂直シリンジポンプおよび接地オートクレーブ可能ガラスコレクタ (grounded autoclavable glass collector) からなる特注のエレクトロジェッティング (electro-jetting) デバイスを使用して、アルギナートヒドロゲル球を作製した。電圧が、アルギナート溶液を含有するシリンジおよび針にカップルしている一方、ゲル化浴を接地して回路を完成した。0.9%食塩水 (pHほぼ7.4、浸透圧ほぼ290 mOsm) 中に溶解し、BaCl₂ ゲル化溶液 (20 mM BaCl₂、250 mM D-マンニトール、25 mM HEPES、pHほぼ7.4、浸透圧ほぼ290 mOsm) を使用して架橋した市販のアルギナート (PRONOVA S LG 20 (エンドトキシンレベルまたは LF10/60 NovaMatrix, Sandvika, Norway) の1.4% 溶液を使用して、球を生成した₁。

20

【0175】

異なる針ゲージ、電圧および流速を利用することにより、様々なサイズのアルギナートヒドロゲルミクロスフェアを生成した；30 Gの尖っていない針、電圧5 kVおよび200 μ l/分の流速を使用して0.3 mm球を生成し、25 Gの尖っていない針、電圧7 kVおよび200 μ l/分の流速により0.4 mm球を生成し、25 Gの尖っていない針、電圧5 kVおよび200 μ l/分の流速により0.5 mm球を生成し、25 Gの尖っていない針、電圧4 kVおよび180 μ l/分の流速により0.7 mm球を生成し、18 Gの尖っていない針、電圧7 kVおよび200 μ l/分の流速により0.9 mm球を生成し、18 Gの尖っていない針、電圧6 kVおよび200 μ l/分の流速により1 mm球を生成し、18 Gの尖っていない針、電圧5 kVおよび180 μ l/分の流速により1.5 mm球を生成し、18 Gの尖っていない針と電圧5 kVおよび150 μ l/分の流速により1.9 mm球を生成した。全てのミクロスフェアは、無菌ガラス容器内で250 mLのBaCl₂ ゲル化溶液において架橋した。架橋の直後に、球をHEPES緩衝液 (25 mM HEPES、1.2 mM MgCl₂ × 6H₂O、4.7 mM KCl、132 mM NaCl、pHほぼ7.4、ほぼ290 mOsm) で4回洗浄し、4℃で一晩貯蔵した。マウスの腹腔腔への埋め込みの直前に、球を0.9%食塩水でさらに2回洗浄した。製作されたヒドロゲルのサンプリングを、商業的販売者 (Charles River, Wilmington, MA) によるエンドトキシンテストのために提出したところ、結果は、LF10/60球が、31.6 EU/mLのエンドトキシンを含有した一方、S LG 20ヒドロゲルが、 <0.05 EU/mlのエンドトキシンレベルを含有したことを示した。

30

40

【0176】

ポリカプロラクトン (PCL) 球合成

溶媒蒸発によって、中間の (0.3~0.5 mm) および大きな (1.5~2.0 mm) 直径を有するポリカプロラクトン (PCL, Mn70, 000~90,000, Sigma) ミクロスフェアを調製した。6.5%濃度でジクロロメタン (Fisher) にPCLを溶解することにより、小さい直径のミクロスフェアを製作した。この溶液を、200 rpmのステンレス鋼4ブレードオーバーヘッドインペラを使用して攪拌した1%ポリ

50

ビニルアルコール（PVA、88mol%加水分解（hydrolyzed）、Polysciences Inc.）溶液に滴下して導入した。75分後に、この分散物を400mLのddH₂Oに添加し、溶媒が全て蒸発するまでさらに105分間攪拌した。次に、このミクロスフェアを篩にかけ、水で数回洗浄し、液体窒素中で即時凍結し、一晚凍結乾燥させた。9%ポリマー濃度、0.5%PVA溶液、および150rpmで攪拌する3ブレードオーバーヘッドインペラを使用して、大きなミクロスフェアを同様に調製した。

【0177】

埋め込み／移植手術

全ての動物プロトコルは、MIT実験動物委員会（Committee on Animal Care）によって承認され、全ての外科手技および術後ケアは、MIT比較医学部門（Division of Comparative Medicine）の獣医スタッフによって管理された。免疫適格性の（immune-competent）雄の非糖尿病またはSTZ誘発糖尿病C57BL/6マウス（Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME）または雄Sprague-Dawleyラット（Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME）を酸素中の3%イソフルランで麻酔し、その腹部の毛を剃り、ベタジン（betadine）およびイソプロパノールを使用して滅菌した。術前に、全てのマウスに、0.3mLの0.9%食塩水を皮下に与えて脱水を予防すると共に、手術前鎮痛薬として0.05mg/kg用量のブプレノルフィンも皮下に与えた。腹部の正中線に沿って0.5mm切開し、鈍的解剖を使用して腹膜層を露出させた。その後、腹膜壁を鉗子で掴み、白線に沿って0.5～1mm切開した。次に、所望の体積の球（臍島を含まない全ての材料並びにラット臍島を封入しているSLG20球）を無菌ピペットに装填し、切開部を通して腹膜腔に埋め込んだ。その後、切開部を5-0先端テーパポリジオキサノン（PDS II）吸収性縫合糸を使用して閉じた。その後、創傷クリップおよび組織グルーを使用して、切開部にわたって皮膚を閉じた。

【0178】

非ヒト霊長類（NHP）手技に関して、術前鎮痛薬としてブプレノルフィン（0.01～0.03mg/kg）を投与した。次に、ケタミン（10mg/kg）の筋肉内（IM）注射を使用してNHPを鎮静させ、必要であればさらなる鎮静のためにDCM vetスタッフによって指示される通りにミダゾラムを追加した。体温を維持するために手技の最中は循環温水ブランケットの上に動物を維持し、タオルで覆った。注射による本発明者らの生体材料の剪断を予防するために、18および12ゲージのカスタム製造された（Harvard Apparatus）無菌ステンレス鋼針とスリップチップシリンジを使用して、0.5または1.5mmの直径のSLG20球いずれかを、4匹の非ヒト霊長類（カニクイザル）の背側（背中）領域に注射した。針をNHPの背中に対して接線方向に挿入して、初回注射点からおよそ1～2cm離して滑り込ませ（貫通させ（tunneled））、それにより最終的材料応答の部位の注射部位から注射部位を分けるようにした。球（0.5および1.5mm直径）を、本発明者らの非ヒト霊長類のうち4匹の側腹部の合計4つのスポットに注射した：それぞれ0.5mmおよび1.5mm直径球の埋め込みのため、左側腹部に2つのスポットおよび右側腹部に2つのスポット。食塩水を注射し、3匹の追加の霊長類のそれぞれ背中の左および右側に最小1cm切開して、4mm直径のSLG20アルギナート円柱状ディスクを埋め込んだ。3-0ナイロンによる単一結節縫合またはVetBond（組織グルー）のいずれかにより、切開部を閉じた。

【0179】

細胞、組織および材料の回収

所望の時点において、埋め込みまたは移植（封入された臍島による）後に、図に指定される通り、CO₂投与と続く頸部脱臼によって、マウスを安楽死させた。ある特定の実例では、腹腔内洗浄を行って、自由に浮遊している腹腔内免疫細胞をすすぎ出して採取するために、5mLの氷冷PBSを先ず注射した。次に、鉗子およびハサミを使用して、腹部の皮膚および腹膜壁に沿って切開し、腹腔内洗浄液容量をピペットで吸い出して、新しい15mLファルコンチューブ（それぞれ、5mLのRPMI細胞培養培地で準備した）に

入れた。次に、洗浄ボトルの先端を腹腔に挿入した。次に、クレブス緩衝液を使用して、腹部から材料の球を全て洗い流し、採取のためにペトリ皿に入れた。全ての球が、洗い流されたまたは手で回収された（腹腔内組織に直接的に線維を形成する場合）ことを確実にした後に、これを下流の処理およびイメージングのために50 mL コニカルチューブに移した。腹腔内洗浄および球回収後に、残っている線維を形成した腹腔内組織も、下流のFACSおよび発現解析のために切除した。

【0180】

非ヒト霊長類皮下回収に関して、材料を埋め込んだ場合と同様に、NHPに術前鎮痛薬としてもう一度ブプレノルフィン（0.01~0.03 mg/kg）を与え、ケタミン（10 mg/kg）のIM注射を使用して鎮静させ、さらなる鎮静に必要であればDCM vetスタッフによって指示される通りにミダゾラムを用いた。体温を維持するために手技の最中は循環温水ブランケットの上に動物をもう一度維持し、タオルで覆った。次に、8 mm直径の生検パンチを使用して、埋め込み2週間後およびその後に4週間後に、皮膚全体および皮下空間をサンプリングした。生検パンチ後に、単純結節パターンの3-0 ナイロンおよびVet Bond（組織グルー）により、回収部位を閉じた。

【0181】

ELISpot マルチプレックスサイトカイン解析

プロテオームプロファイラマウスサイトカインアレイパネルAキット（カタログ番号ARY006、R&D Systems）を使用して、サイトカインアレイ解析を行った。この解析のため、ウェスタンブロッティングセクションにおいて、上述の通り、材料から直接的にタンパク質を抽出した。膜毎に、200 µlのタンパク質溶液を、100 µlの試料緩衝液（アレイ緩衝液4）および1.2 mlのブロッキング緩衝液（アレイ緩衝液6）と混合し、続いて15 µlの再構成されたマウスサイトカインアレイパネルA検出抗体カクテルを添加し、室温で1時間インキュベートした。アレイ膜をブロッキング緩衝液（アレイ緩衝液6）と共に2時間、ロッキングプラットフォームシェーカー上でインキュベートした。次に、ブロッキング緩衝液を吸引し、調製された試料/抗体混合物を膜に添加し、一晩4℃で、ロッキングプラットフォームシェーカー上でインキュベートした。膜を20 mlの1×洗浄緩衝液で10分間、ロッキングプラットフォームシェーカー上で3回洗浄し、脱イオン水で1回リンスし、続いてフルオロフォアコンジュゲートストレプトアビジン（1:5, 000希釈、カタログ番号926-32230、Li-Cor）により室温で30分間、ロッキングプラットフォームシェーカー上でプローブし、次に上述の通り、洗浄緩衝液でさらに3回、脱イオン水でもう一度洗浄した。800 nm波長におけるOdysey検出（Li-Cor、通し番号ODY-2329）を使用して、抗体-抗原複合体を可視化させた。Image Jソフトウェアを使用して、スポットの密度を解析した。

【0182】

統計解析

データは、平均±SEMとして表現し、時点あたりおよび処置群あたりN=5匹のマウスを用いた。ラット研究については、処置あたりN=3。これらの試料サイズは、以前の文献に基づき選択した。予期せぬ病気または罹患の場合を除いて、全ての動物を解析に含めた。動物コホートはランダムに選択した。治験責任医師は、盲検化せずに実験を行った。qPCRまたはFACSに関して、GraphPad Prism 5において実行される通り、他に指示がなければ、対応のない両側t検定またはボンフェローニ多重比較補正による一元配置ANOVAのいずれかにより、統計的有意性についてデータを解析した；*：p<0.05、**：p<0.001および***：p<0.0001。ハイスループットNanoStringに基づく遺伝子発現解析データを、マクロファージサブタイプおよび区画に基づきセットに分けた。NanoString陽性対照の幾何平均を使用してデータを正規化し、陰性対照の平均を使用してバックグラウンドレベルを確立した。ハウスキーピング遺伝子のTubb5、Hprt1、BactおよびCltcを使用して、試料間を正規化した。次に、データを対数変換した。サブタイプ、時間および区画群

毎に、遺伝子におけるサイズ遮断の効果の二元配置 A N O V A を行った。テューキーの H S D (Honest Significant Difference) 検定を使用して行ったペアワイズ比較から P 値を算出し、ボンフェローニ補正を使用して、全体的な誤り率を制御した。

【0183】

結果

生体適合性における球直径の効果を調査するために、本発明者らは、非常に狭いサイズ分布で、8種の異なるサイズ、0.3 mm、0.4 mm、0.5 mm、0.7 mm、0.9 mm、1 mm、1.5 および 1.9 mm の B a C 架橋 S L G 2 0 アルギナートヒドロゲル球を製作した(図 1 1)。次に、これらの球(350 μ l / マウス)を C 5 7 B L / 6 マウスの腹腔内空間に埋め込み、そこで 14 日間保持した。この期間の後に、安楽死させ 10 たマウスから球を収集し、細胞沈着および線維症に関して研究した(図 1 2 A ~ 図 1 2 D)。回収された球の暗視野位相差像は、そのサイズが増加するにつれて、球上への細胞沈着が著明に低下することを示す。球における細胞沈着は、D A P I (核マーカー)、F - アクチン(細胞の細胞骨格マーカー)および α - 平滑筋アクチン(α - S M A、筋線維芽細胞マーカー)を使用した Z スタック共焦点イメージングを使用して試験した。興味深いことに、より大きな球は、有意に低下した線維性沈着を有した。宿主免疫細胞マーカーの C D 6 8 (マクロファージ)、L y 6 G / L y 6 C - G R 1 (好中球)および T G F - β (炎症マーカー)に対する追加の免疫染色も、より大きな球における免疫細胞沈着低下を示した。追加の線維症マーカー、すなわち、コラーゲン 1 a 1 (C o l 1 a 1)、コラーゲン 1 a 2 (C o l 1 a 2) および α - S M A の q P C R 発現解析は、球サイズが増加するにつれて低下した細胞沈着をさらに示した(図 1 2 A ~ 図 1 2 C)。球における細胞の過剰増殖内の α - S M A 発現のウェスタンブロット解析は、球サイズが増加するにつれて有意な減少を示した(図 1 2 D)。

【0184】

サイズモジュレートされた線維化応答効果が、単純に表面積の関数ではないことを確実にするために、2種のサイズの 0.5 mm および 1.5 mm の球を埋め込み、総表面積において正規化した。換言すれば、100 μ l / マウスの中間のサイズの球および 300 μ l / マウスの大きなサイズの球を C 5 7 B L / 6 マウスの腹腔内空間に埋め込み、次いで 14 日後に回収した。回収された球の暗視野位相差像は、1.5 mm 球におけるごく限られた細胞沈着および 0.5 mm 球における有意な細胞沈着を明らかにした。これらの知見 30 は、この現象が、サイズ媒介性であり、埋め込まれた材料の総表面積に依存しないことを示す。

【0185】

線維症における埋め込みサイズの効果が、より大きなサイズの球における細胞沈着の動態における遅延に係るのかについて調査した。この仮説を研究するために、0.3 mm および 1.5 mm S L G 2 0 アルギナートヒドロゲル球を、有意により長い期間である 6 ヶ月間、C 5 7 B L / 6 マウスの腹腔内空間に埋め込んだ。6 ヶ月後に、埋め込まれたヒドロゲル球を回収し、細胞沈着に関して試験した。回収されたカプセルの暗視野位相差像は、1.5 mm 球が、細胞沈着を大部分は欠く一方で、0.3 mm 球が、沈着細胞で覆われており、一体に集塊していることを示す。 40

【0186】

このようなサイズモジュレートされる線維性沈着現象が、埋め込みにおいてより高レベルの線維化反応(fibrotic reaction)を生じることが公知の他の材料に拡張されるか否かについて評価した。この目的のために、S L G 2 0 アルギナート(無菌グレードアルギナート)、L F 1 0 / 6 0 アルギナート(医薬品グレードアルギナート)、ステンレス鋼、ガラス、ポリカプロラクトンおよびポリスチレンで構成された中間のサイズ(0.4 ~ 0.6 mm) およびより大きなサイズ(1.5 ~ 2.5 mm)の球を、C 5 7 B L / 6 マウスの腹腔内空間に埋め込んだ。ここで評価した材料球の表面の粗さは、相対的に滑らかな表面の材料(< 1 μ m 粗さ)のみを含んだ。埋め込み 14 日後に回収された材料の明視野像は、テストした全ての材料の中間サイズバージョンにおける有意な細胞沈着を明らか 50

にした。興味深いことに、サイズ増加におけるテストした全ての材料は、細胞の過剰増殖沈着の厚さの著明な低下をもたらした。回収した材料の免疫蛍光染色したZスタック共焦点像は、テストした全ての材料に及ぶマクロファージ（CD68）および筋線維芽細胞（アルファ-SMA）沈着の有意な減少を示す；有意には、大きなSLG20アルギナート、LF10/60（エンドトキシン含有アルギナート）、ガラスおよびステンレス鋼の球は、無視できる細胞沈着を有した。

【0187】

（実施例5）異なるサイズの球に対する自然免疫応答の評価

材料および方法

qPCR解析

製造業者の指示に従ってTRIzol（Invitrogen；Carlsbad、CA）を使用して、切除直後に液体窒素で手早く凍結（snapfrozen）した組織（末梢組織単独、球単独、および／または存在するのであれば接着細胞および線維性過剰増殖と共に、ならびにip洗浄液単独）から全RNAを単離した。加えて、完全な組織破壊を確実にできるようにするために、ポリトロンホモジナイザーによる強い機械的破壊も用いた。よって、全体を通して示された遺伝子発現サインは、回収された材料の上および／またはその周りに存在する細胞集団全体に比例的かつ代表的である。High Capacity cDNA Reverse Transcriptionキット（カタログ番号4368814；Applied Biosystems、Foster City、CA）を使用した逆転写の前に、試料毎に容量20μlに同じインプット1μg全RNAをロードすることにより、比較のために全ての試料を先ず正規化した。総容量16μl（SYBR GreenおよびPCRプライマーを含む）におけるcDNA（4.8μl；1：20希釈）を、次のプライマーを用いたqPCRによって増幅した。Primer Expressソフトウェア（Applied Biosystems、Carlsbad、CA、USA）を使用してプライマー（表2）を設計し、LaserGeneソフトウェア（DNASTar、Madison、WI、USA）を使用して評価して、マウスまたはラット（宿主）特異性のいずれかを確実にした。ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System（Applied Biosystems）において、試料を95℃で10分間インキュベートし、続いて40サイクルの95℃15秒間および60℃1分間を行った。製造業者によって記載される通りに比較C_T（DDC_T）方法を使用して、結果を解析した。比較C_T（ΔΔC_T）方法を使用して結果を解析し、各試料のβ-アクチンRNA含量に対する正規化後に、モック埋め込み対照細胞試料（末梢腹腔内脂肪組織または自由に浮遊している腹腔内洗浄細胞）のいずれかにおけるRNA発現と比較した相対的RNAレベルとして提示する。材料球単独に関して、0.3または0.5mmアルギナートSLG20球のいずれかと比べて全てを比較した。加えて、複数の回収時点にわたる適切な正規化および試料取扱いをさらに確実にするために、収集条件（すなわち、記載されている通り、ip洗浄液、接着細胞および線維症ありまたはなしの球、ならびに侵入による末梢組織）毎の全ての試料のRNAを並行して定量し、逆転写し、qPCRによって解析した。マウス特異的（宿主）またはラット（豚島）特異的フォワードおよびリバースプライマーセットを本研究に利用した（表2）。

【0188】

10

20

30

40

【表 2】

遺伝子	プライマー(5' から 3') : センス&アンチセンス
マウスコラーゲン 1a1 (<i>mCol1a1</i>)	フォワード: 5'-CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT-3' (配列番号 1)
	リバーズ: 5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3' (配列番号 2)
マウスコラーゲン 1a2 (<i>mCol1a2</i>)	フォワード: 5'-GCAGGTTACCTACTCTGTCCT-3' (配列番号 3)
	リバーズ: 5'-CTTGCCCCATTTCATTTGTCT-3' (配列番号 4)
マウスアルファ平 滑筋アクチン (<i>mActa2</i>)	フォワード: 5'-CGCTTCCGCTGCCCAGAGACT-3' (配列番号 5)
	リバーズ: 5'-TATAGGTGGTTTCGTGGATGCCCGCT-3' (配列番号 6)
マウス骨髄性細 胞マーカー CD11b (<i>mItgam</i>)	フォワード: 5'-CCAAGAGAATGCAAAAGGCTTT-3' (配列番号 7)
	リバーズ: 5'-GGGGGGCTGCAACAACACACA-3' (配列番号 8)
マウスマクロファ ージマーカー CD68 (<i>mCd68</i>)	フォワード: 5'-GCCCCAGTACAGTCTACCTGG-3' (配列番号 9)
	リバーズ: 5'-AGAGATGAATTCTGCGCCAT-3' (配列番号 10)
マウス好中球マ ーカー Gr1 (<i>mLy6g</i>)	フォワード: 5'-TGCCCCCTTCTCTGATGGATT-3' (配列番号 11)
	リバーズ: 5'-TGCTCTTGACTTTGCTTCTGTGA-3' (配列番号 12)
マウス β -アクチン (<i>mActB</i>)	フォワード: 5'-GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3' (配列番号 13)
	リバーズ: 5'-CGGAGCCGTTGTGCGACGACC-3' (配列番号 14)
ラットコラーゲン 1a1 (<i>rCol1a1</i>)	フォワード: 5'-CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT-3' (配列番号 15)
	リバーズ: 5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3' (配列番号 16)
ラットコラーゲン 1a2 (<i>rCol1a2</i>)	フォワード: 5'-CCTGGCTCTCGAGGTGAAC-3' (配列番号 17)
	リバーズ: 5'-CAATGCCCAGAGGACCAG-3' (配列番号 18)
ラットアルファ平 滑筋アクチン (<i>rActa2</i>)	フォワード: 5'-TGCCATGTATGTGGCTATTCA-3' (配列番号 19)
	リバーズ: 5'-ACCAGTTGTACGTCCAGAAGC-3' (配列番号 20)
ラット Pdx1 (<i>rPdx1</i>)	フォワード: 5'-CTCTCGTGCCATGTGAACC-3' (配列番号 21)
	リバーズ: 5'-TTCTCTAAATTGGTCCCAGGAA-3' (配列番号 22)
ラット β -アクチン (<i>rActB</i>)	フォワード: 5'-ACCTTCTTGACGCTCCTCCGTC-3' (配列番号 23)
	リバーズ: 5'-CGGAGCCGTTGTGCGACGACG-3' (配列番号 24)

表2. RNAレベルのqPCR解析に使用される、マウス(m)またはラット(r)特異的(宿主)フォワードおよびリバープライマーセット。遺伝子名も括弧内に示されている。

【0189】

結果

自然免疫細胞侵入に関して、埋め込みに対し末梢の網および精巣上体脂肪パッド組織を、フローサイトメトリー（図13Aおよび図13B）およびqPCR解析（図14A～図14D）の組合せを使用して評価した。これらの解析は、テストした全ての材料にわたって（SLG20アルギナート、LF10／60アルギナート、ステンレス鋼、ガラス、ポリカプロラクトンおよびポリスチレン）、増加する球サイズが、末梢組織における自然免疫細胞蓄積の有意な低下をもたらしたことを明らかにした。これらの知見は、マルチプレックス炎症性マウスサイトカインプロファイルによりさらに検証された。注目すべきことに、軟（アルギナートヒドロゲル、 $<100\text{ kPa}$; Papajovaら、Carbohydrate polymers 90巻（1号）：472～482頁（2012年））から硬（ステンレス鋼、 100 の台のGPa）まで変動する、ある範囲の機械的剛性特性を有するある範囲の材料の本発明者らによる評価は、剛性以外のサイズおよび形（shaper）が、生体適合性において決定

的な役割を果たすことを実証する。

【0190】

（実施例6）より大型の動物における研究

材料および方法

回収された材料球のイメージング

位相差イメージングのため、クレブス緩衝液を使用して、回収された材料を穏やかに洗浄し、Evos X1顕微鏡（Advanced Microscopy Group）を使用した位相差顕微鏡検査のために35mmペトリ皿に移した。回収された材料の明視野イメージングのため、クレブス緩衝液を使用して試料を穏やかに洗浄し、Leica実体顕微鏡を使用した明視野イメージングのために35mmペトリ皿に移した。

10

【0191】

共焦点免疫蛍光

免疫蛍光イメージングを使用して、球に付着した免疫集団を決定した。マウスから材料を回収し、4℃で4%パラホルムアルデヒドを使用して一晚固定した。次に、試料をクレブス緩衝液で2回洗浄し、0.1% Triton X100溶液を使用して30分間透過処理し、その後、1%ウシ血清アルブミン（BSA）溶液を使用して1時間ブロッキングした。次に、BSA中のDAPI（500nM）、特異的マーカープローブ（1:200希釈）からなる免疫染色カクテル溶液中で球を1時間インキュベートした。染色後に、球を0.1% Tween 20溶液で3回洗浄し、50%グリセロール溶液中に維持した。次に、ガラス底ディッシュに球を移し、5および10×対物レンズを備えたLSM 700ポイント走査型共焦点顕微鏡（Carl Zeiss Microscopy, Jena Germany）を使用して画像化した。Photoshop（Adobe Inc., Seattle, WA）を使用して、得られた像を提示のために直線的に調整した。

20

【0192】

結果

この観察されたサイズモジュレートされる線維化効果を、より大型のげっ歯動物モデルに置き換えることができるかについて試験した。これを試験するため、0.5mmおよび2.0mmガラス球を、Sprague-Dawleyラットの腹腔内空間に埋め込み、次いで14日後に材料を回収した。回収されたガラスミクロスフェアから得られた明視野およびZスタック共焦点像は、大きな球が、いかなる細胞沈着も欠く一方、より小さい球が、有意に一体に集塊し、厚い線維性カプセル内に包埋されたことを示す。線維症マーカーのコラーゲン1a1（Col1a1）、コラーゲン1a2（Col1a2）およびαSMAのqPCR発現解析は、球3サイズの増加が、球における直接的な線維症形成の有意な低下をもたらしたことを確かめた（図15）。これらの結果は、C57BL/6マウスにおける本発明者らのサイズ依存性線維化応答の観察が、他のより大型のげっ歯動物種にも置き換えられることを示唆する。

30

【0193】

（実施例7）非ヒト霊長類における研究

材料および方法

H&EおよびMassonのトリクローム染色のための組織学的処理

4℃で4%パラホルムアルデヒドを使用して、回収された材料を一晚固定した。固定後に、70%アルコールを使用して、アルギナート球または回収された組織試料を洗浄した。次に、材料を摂氏（calcium）4度に冷却されたHistogel（VWR、カタログ番号60872-486）と混合した。モールド硬化後に、標準組織学的方法に従って、パラフィン包埋、切片作製および染色のためにブロックを処理した。

40

【0194】

結果

これらの知見をより高等な種に、また、他の埋め込み部位に置き換えることができるかを評価するために、0.5mmおよび1.5mm球（N=4）ならびに円柱（4mm直径×1mm高さ；N=2）として調製されたSLG20アルギナートヒドロゲルを、非ヒト

50

霊長類（NHP）の背側領域の皮下に14または28日間埋め込んだ。埋め込み14および28日後の両方の回収時点において、1.5mm SLG20アルギナート球は、宿主組織に包埋されておらず、生検パンチでの切開における埋め込み部位から自由に分離された。回収された1.5mm過剰増殖。回収された大きな球のH&E染色された切片は、無視できる細胞沈着および線維症の欠如を確認した。逆に、14および28日目両方の回収時点で、埋め込まれた0.5mm球および円柱は、宿主組織に大量に包埋されていた。SLG20アルギナート1.5mm球、0.5mm球、円柱の埋め込み部位から得た切除された組織、および食塩水を注射された対照組織を、H&EおよびMassonのトリクローム染色の組合せを使用した組織学的解析により試験した。得られた像は、大きな球の包埋または線維症の欠如を確認する。しかし、埋め込まれた円柱および中間のサイズの球を包む、広範な包埋および線維症構築（最大100μm厚）が目に見える。

10

【0195】

皮下背側NHP観察を、NHPの腹腔内部位に置き換えることができることを確認するために、より小さい方のSLG20アルギナートヒドロゲルを、最小に侵襲的な腹腔鏡手術を使用して、非ヒト霊長類（処置当たりn=1）に別々に埋め込んだ。腹腔鏡カメラを使用して、埋め込み直後に、および埋め込み14日後に再度球の像およびビデオを記録した。得られたin situ像は、14日後に1.5mm球が半透明のままであり、宿主網／脂肪組織に包埋されていないことを明らかにする；逆に、0.5mm球は、網／脂肪組織に妨害される（impeded）。埋め込み14日後の食塩水によるIP洗浄は、SLG20 1.5mm球の回収を可能にした；しかし、IP宿主組織（網）内への強い接着および包埋のため、0.5mm球は、回収することができなかった。暗視野イメージングを使用して、回収された1.5mm球を試験したところ、無視できる細胞の過剰増殖で透明に見える。回収された1.5mm球のZスタック共焦点イメージングは、最小の細胞沈着、免疫マクロファージ、および線維症関連の活性化された筋線維芽細胞被覆の欠如を確認する。NHP網内の0.5mm球の包埋を検証するために、生検パンチを使用して、組織学的解析のためにこの組織の試料を切除したところ、その包埋および中間のサイズの球を包む有意な線維化組織構築が観察されたことを確認した。

20

【0196】

（実施例8）埋め込まれたデバイスによる研究

材料および方法

30

ラット臍島単離、精製および封入

臍島を収集するために、Jackson Laboratories（Bar Harbor, ME）からの、およそ300グラムの重さの雄Sprague-Dawleyラットを使用した。全てのラットは、1:20のキシラジン（10mg/kg）とケタミン（150mg/kg）の腹腔内注射によって麻酔し、各注射の総体積は、ラットの体重に応じて0.4ml~0.5mlであった。LacyおよびKostianovskyによって記載されている通りに単離手術を行った₂。簡潔に説明すると、胆管にカニューレを挿入し、RPMI 1640培地中の0.15%リベラーゼ（Liberase）（研究グレード、Roche）の溶液のin vivo注射によって臍臓を膨張させた。ラットは、下行大動脈を切ることによって屠殺し、膨張した臍臓臓器を取り出し、全ての手術が完了するまで、氷上の50mlコニカルチューブ内に保った。全てのチューブを37℃の水浴中に置いて30分間消化し、10%熱不活性化ウシ胎仔血清（HIFBS）を含有する冷M199培地を10~15ml添加し、軽く振とうすることによって、消化を停止した。消化された臍臓を、上述の同じM199培地で2回洗浄し、450μmの篩を通してろ過し、その後、Histopaque 1077（Sigma）/M199培地勾配中に懸濁し、1,700RCFで4℃にて遠心分離した。勾配内で形成された臍島層の厚さに応じて、高純度の臍島のためにこの工程を繰り返した。最後に、臍島を勾配から採取し、一連の6つの重力沈降によってさらに単離し、ここで、それぞれの上清は4分間の沈下の後に廃棄した。精製された臍島は、光学顕微鏡下で、一定分量ずつ手で数え、その後、無菌の1×リン酸緩衝食塩水において3回洗浄した。その後、臍島を、10%HIFBSおよび1%ペニシリン／ス

40

50

トレプトマイシンを含有するRPMI 1640培地中で1回洗浄し、さらなる使用のためにこの培地中で一晚培養した。

【0197】

封入の直前に、培養された膵島を1,400rpmで1分間遠心分離し、Caを含有しないKrebs-Henseleit (KH) 緩衝液(4.7mM KCl、25mM HEPES、1.2mM KH_2PO_4 、1.2mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、135mM NaCl、pHほぼ7.4、ほぼ290mOsm)で洗浄した。洗浄後に、膵島を再度遠心分離し、全ての上清を吸引した。次に、膵島沈渣を、0.9% NaCl溶液中に溶解した1.4% SLG20アルギナート溶液に、0.75mlアルギナート溶液当たり1,000個の膵島の膵島密度で再懸濁した。BaCl₂ゲル化溶液を使用して球を架橋し、空の球と同様の手技を使用してそのサイズを制御した(上述)。架橋の直後に、封入された膵島をHEPES緩衝液で4回、10% HIFBSを含有するRPMI培地1640で2回洗浄し、移植のために37℃で一晩培養した。膵島は、不定サイズ(50~400μm)を有し、封入プロセス中に膵島の不可避な損失があったため、封入された膵島の総数を再数え、移植前に、以前に発表された方法₃に基づき膵島当量(IE、150μmサイズに正規化)に換算した。

10

【0198】

血糖モニタリング

インスリン依存性糖尿病マウスを作り出すために、健康なC57BL/6マウスを、MITへの出荷前にストレプトゾトシン(STZ)を用いて販売者(Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME)が処理した。全てのマウスの血糖レベルを、移植前に再テストした。2日続けて非絶食時血糖レベルが300mg/dL超であったマウスのみが、糖尿病とみなされ、移植を受けた。

20

【0199】

膵島含有アルギナートカプセルの移植後に、血糖レベルを1週間に3回モニタリングした。ランセットを使用して尾静脈から血液の小液滴を採取し、市販のグルコメーター(glucometer)(Clarity One、Clarity Diagnostic Test Group、Boca Raton、FL)を使用してテストした。非絶食時血糖レベルが200mg/dL未満のマウスを正常血糖とみなした。全てのマウスが高血糖状態に戻るまでモニタリングを継続し、その時点でマウスを安楽死させ、球を回収した。

30

【0200】

ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロット解析のために、材料から直接的にタンパク質を抽出した。タンパク質解析のため、プロテアーゼ阻害剤(Haltプロテアーゼ阻害剤単回使用カクテル、カタログ番号78430、Thermo Scientific)を含有するPierce RIPA緩衝液(カタログ番号89901、Thermo Scientific)に氷上で材料を浸漬することにより、回収された材料を調製し、続いて超音波処理(30秒間オン、30秒間オフ、70%振幅で2回)によって溶解した。次に、試料を2時間4℃で一定の攪拌に付した。次に、ライセートを20分間12,000rpmで4℃にて遠心分離し、タンパク質含有上清を新たなチューブ内に採取し、氷上に維持した。脂肪組織由来の試料では、上清を移す前に、過剰な脂肪(上清上の上層)を先ず除去した。レーン毎に20μgタンパク質(BCAアッセイによって定量、Pierce BCAタンパク質アッセイキット、カタログ番号23225、Thermo Scientific)を95℃で5分間煮沸し、SDS-ポリアクリルアミドゲル(Any kD 15ウェルコーミニゲル、Biorad、カタログ番号456-9036)で電気泳動し、次いでニトロセルロース膜(Biorad、カタログ番号162-0213)にブロットした。抗α平滑筋アクチン抗体(1:400希釈、アルファ平滑筋アクチンに対するウサギポリクローナル;カタログ番号ab5694、AbCam)、抗PDX1抗体(1:1000希釈、膵臓&十二指腸ホメオボックス1に対するウサギポリクローナル;カタログ番号06-1379、EMD Millipore)およびローディング対照としての抗β-アクチ

40

50

ン抗体（1：4000希釈、マウスにおいて産生されたモノクローナル抗 β -アクチン抗体；カタログ番号A1978、Sigma Aldrich）と、続くロバ抗ウサギ（1：15,000希釈、カタログ番号926-32213、Li-Cor）およびヤギ抗マウス（1：15,000希釈、カタログ番号926-68070、Li-Cor）フルオロフォアコンジュゲート二次抗体により、プロットをプローブした。700および800 nm波長でOdyssey検出（Li-Cor、通し番号ODY-2329）を使用して、抗体-抗原複合体を可視化した。

【0201】

Newport GreenおよびLive/Dead臍島染色

LIVE/DEAD（登録商標）生存率/細胞傷害性キット（Life technologies、Carlsbad CA；カタログ番号L-3224）を製造業者の指示に従って使用して、封入後の臍島の生存率を評定した。DAPIと組み合わせた細胞浸透性色素であるNewport Green（商標）DCFジアセテート（Life technologies、Carlsbad CA；カタログ番号N-7991）を使用して、回収後に封入された臍島細胞を染色した。

【0202】

NanoString解析

モック埋め込み/モック処置された（MT）対照、または0.5もしくは1.5 mmアルギナート球保有マウス（ $n=4$ /群）のRNAを、記載されている通りに、埋め込み後の種々の時点で採取された組織試料から単離した。それぞれのRNAを定量し、適切な濃度（100 ng/ μ l）に希釈し、次いで本発明者らのカスタマイズされたマルチプレックス遺伝子マウスマイクロファージサブタイプ決定パネルによる発現解析のためにNanoString製造業者プロトコルに従って、各試料の500 ngを処理した。nCounter（NanoString Technologies Inc.、Seattle、WA）定量後にRNAレベル（絶対的コピー数）を得て、nSolver解析ソフトウェア（NanoString Technologies Inc.、Seattle、WA）を使用して群試料を解析した。

【0203】

結果

材料形状を調査して、これが、埋め込まれた生体医療デバイスの改善された/長期の機能を生じ得るかについて確かめた。この効果を研究するために、従来のサイズの0.5 mmアルギナートマイクロカプセル内に免疫単離（immunoisolated）/封入されたランゲルハンス（臍島）の臍島の生存を、1.5 mmカプセル内に保護された臍島と比較して評価した。以前に、移植された0.5 mmアルギナートマイクロカプセルの表面における細胞およびコラーゲン沈着による宿主認識および線維症が、STZ処置C57BL/6マウスにおける封入された臍島グラフト細胞死および糖尿病補正の失敗をもたらすことが示された。注目すべきことに、臍島封入の文脈において、ヒドロゲルカプセルの直径は、大部分で見落とされるパラメータであり、本発明者らの観察に基づき、これは、移植されたグラフトの有効性の改善において重要な役割を果たし得る。さらに、小さいカプセル（ $<350 \mu$ m）が、中間の（ $350 \sim 700 \mu$ m）およびより大きなカプセル（ $>700 \mu$ m；ref. 40）よりも、封入された臍島への栄養素および酸素の優れた拡散および輸送を可能にすることが伝統的に仮定されてきた。よって、本発明者らの知る限りでは、より大きな1.5 mm球状カプセルは、臍島細胞封入について以前に評価されていない。

【0204】

STZ誘発糖尿病C57BL/6マウスへのラット臍臓臍島の移植の異種間処置モデルを使用して、細胞生存におけるカプセルサイズの役割を調査した。ラット臍島（マウス当たり500 IE）を、1.5 mmまたは0.5 mm球として調製されたSLG20アルギナートヒドロゲルに別々に封入した。これらの研究のため、0.325 mlアルギナート溶液当たり500 IEの臍島密度調製を使用した。その理由として、この密度では、カプセルの外側における臍島の突出がほとんど観察されなかったことが挙げられる。Liv

e / d e a d 染色を使用して、封入後の膵島の生存率を確認した（図 1 6 A ～ 図 1 6 C）。より大きなサイズの 1. 5 mm カプセルの使用による潜在的拡散障壁を調査するために、移植前に、膵島を搭載した 1. 5 mm および 0. 5 mm カプセル内におけるグルコースおよびインスリン拡散の両方の動態を評価した。カプセル形状の関数として、グルコース（図 1 7 A および 図 1 7 B）またはインスリン（図 1 8 A ～ 図 1 8 D）の拡散動態における有意差は観察されなかった。移植後に、経時的に細胞グラフト機能を非侵襲的にモニタリングするための指標として血糖（B G）補正を使用し、1 週間に少なくとも 3 回測定を行った。0. 5 mm カプセル群における全てのマウス（ $n = 5$ ）が、平均して移植 30 日後までに失敗した（すなわち、3 回続けての測定で $2 \text{ mg } \text{m l}^{-1}$ を上回る B G）一方、1. 5 mm カプセル群（ $n = 5$ ）において、平均して、実験が停止される移植 175 日後まで（5 倍を超える増加）回復を維持した（図 1 9 A および 図 1 9 B）。実験の残りを通して 0. 5 mm 群による B G 調節における初期失敗後に（25 日目前後）、B G 正常化（図 1 6 A）および回復した割合（fraction cured）（図 1 6 C）の両方における差は、0. 5 mm および 1. 5 mm カプセル群の間で有意に異なった（ $p < 0. 0001$ ）。移植 7 日後に、グルコース負荷試験（G T T）を使用して、血糖補正の動態を評価したところ、カプセル形状の関数として有意な遅延は測定されなかった（図 1 6 B）。

10

【0205】

本研究の終了時に、移植 6 ヶ月後に、カプセルを回収し、線維症および生存可能な膵島の存在について解析した。暗視野イメージングは、0. 5 mm カプセルが、細胞沈着に覆われ集塊した一方、1. 5 mm カプセルが、大部分はきれいで、細胞沈着を欠くことを明らかにした。回収された 0. 5 mm および 1. 5 mm から取得した共焦点像は、1. 5 mm カプセル群のみにおける染色を示す。各群における回収されたカプセルから抽出されたタンパク質においてウエスタンブロットアッセイも行っており、P D X - 1（膵島生存能マーカー）および α - S M A（線維症マーカー）の相対的発現をモニタリングした。このアッセイのため、各マウスから回収されたカプセルのおよそ 50 % を消化し、総タンパク質抽出のために処理した。0. 5 mm カプセル群における 5 匹のマウスのうち 4 匹は、比較的縮小した P D X - 1 発現を有し、全 5 匹のマウスは、高レベルの α 平滑筋発現を示した；逆に、高レベルの P D X - 1 および最小の α - S M A が、1. 5 mm カプセル群における全 5 匹のマウスから回収されたカプセルにおいて検出された。回収されたカプセルから単離された R N A の q P C R 解析を使用して、P D X - 1 発現結果をさらに検証したところ、0. 5 mm カプセル群と比較して、1. 5 mm カプセルにおいておよそ 8 倍高いレベルのラット P D X - 1 が検出可能であった。組み合わせると、整えられた形状のヒドロゲルは、より長い持続時間線維症に抵抗することができたため、本発明者らの結果は、1. 5 mm カプセルにおけるグラフトが、従来のサイズの 0. 5 mm カプセルで調製されたものよりもおよそ 6 倍長く生存したことを示唆する。興味深いことに、カプセルにおける有意な線維症構築は、180 日後の回収時に観察されなかったが、この処置群におけるマウスは、およそ 140 日後に血糖制御を失った。これはおそらく、この処置モデルにおいて使用されるラット膵島の長期耐久性に関係する可能性がある、移植後のある程度の膵島生存能損失を示唆する。

20

30

【0206】

（実施例 9）埋め込み後の宿主媒介性自然免疫認識の動態プロファイリング解析

材料および方法

インスリン分泌動態

50 個のラット膵島を裸でまたは 0. 5 mm および 1. 5 mm アルギナートカプセルに封入して、カルシウム測定に使用される同じマイクロ流体デバイスに搭載することにより、膵島インスリン応答を評定した。自動フラクシオンコレクタ（G i l s o n、モデル 203 B、W I、U S A）により、灌流液（perifusate）試料を 1 分間毎に採取した（500 μL / 分）。げっ歯動物化学発光インスリン E L I S A（A l p c o、N H、U S A）を使用して、インスリン濃度を 1 分間おきに定量した。次の灌流（perifusion）プロトコルを使用した：1）K R B 2（0 ～ 20 分間）；2）20 mM グルコースまたは 30 mM

40

50

KC1 (20～55分間) ; 3) KRB2 (55～100分間)。一元配置ANOVA (有意として $p < 0.05$) を使用して群を統計的に比較するために、インスリン曲線 (裸の、0.5mmおよび1.5mmは $n = 3$) 毎の曲線下面積を計算した。

【0207】

FACS解析

製造業者のプロトコルに従ってgentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec、Auburn、CA) を使用して、新鮮に切除された組織の単一細胞懸濁液を調製した。受動的PEB解離緩衝液 (1×PBS、pH7.2、0.5% BSAおよび2mM EDTA) において単一細胞懸濁液を調製し、懸濁液を70μmフィルター (カタログ番号22363548、Fisher Scientific、Pittsburgh、PA) に通した。このプロセスは、表面に接着する大部分の細胞を除去した (>90%)。次に、全ての組織および材料試料に由来する、単一細胞集団を、5mlの1×RBC溶解緩衝液 (カタログ番号00-4333、eBioscience、San Diego、CA、USA) による赤血球溶解に5分間4℃で付した。20mlの無菌1×PBSの添加により反応を終結させた。残っている細胞を300～400gで4℃にて遠心分離し、抗体インキュベーションのために最小容量 (ほぼ50μl) のeBioscience染色緩衝液 (カタログ番号00-4222) に再懸濁した。次に、暗所で25分間4℃にて、細胞マーカーであるCD68 (試料当たり1μl (0.5μg) ; CD68-Alexa647、クローンFA-11、カタログ番号11-5931、BioLegend)、Ly-6G (Gr-1) (試料当たり1μl (0.5μg) ; Ly-6G-Alexa-647、クローンRB6-8C5、カタログ番号108418、BioLegend)、CD11b (試料当たり1μl (0.2μg) ; またはCD11b-Alexa-488、クローンM1/70、カタログ番号101217、BioLegend) に特異的な蛍光タグ付けされたモノクローナル抗体のうち2種により、全ての試料を共染色した。次に、2mlのeBioscienceフローサイトメトリー染色緩衝液 (カタログ番号00-4222、eBioscience) を添加し、試料を400～500gで5分間4℃にて遠心分離した。上清を吸引により除去し、この洗浄工程を染色緩衝液でさらに2回繰り返した。3回目の洗浄後に、各試料を500μlのフローサイトメトリー染色緩衝液に再懸濁し、BD FACSCalibur (カタログ番号342975)、BD Biosciences、San Jose、CA、USA) を使用した最終的なFACS解析のために40μmフィルター (カタログ番号22363547、Fisher Scientific) に通した。適切なバックグラウンドおよびレーザー強度設定のため、染色されていない単一の抗体およびIgG (Alexa-488またはAlexa-647のいずれかで標識、BioLegend) 対照も実行した。

【0208】

結果

埋め込みサイズの関数としての自然免疫応答についてより良く理解するために、0.5mmおよび1.5mm SLG20アルギナート球の埋め込み後に、28日間の期間にわたり (図20A～図20C)、C57BL/6マウスにおいて、宿主媒介性自然免疫認識の動態プロファイリング解析を行った。フローサイトメトリーを使用して、0.5mmおよび1.5mmサイズの球において直接的に、埋め込み1、4、7、14および28日後に、骨髄性細胞1 (図20A)、好中球 (図20B) およびマクロファージ (図20C) の蓄積を定量した。評価した全ての時点において、1.5mm球と比較して、0.5mm球における骨髄性細胞の蓄積の有意な増加が観察された (図20A)。マクロファージ細胞および好中球細胞の探索において、埋め込み4日後までに、0.5mm球における有意に増加した蓄積が観察され、これは、7日目までにプラトーであるようである (図20Cおよび図20C)。注目すべきことに、1.5mm球において、無視できる数の好中球細胞ならびに限られた数の骨髄性細胞およびマクロファージ細胞が全ての時点で観察された。

【0209】

(実施例 10) 埋め込まれた材料に対する異物反応の重要な駆動体

材料および方法

インスリン分泌動態

50 個のラット膵島を裸で、または 0.5 mm および 1.5 mm アルギナートカプセルに封入して、カルシウム測定に使用される同じマイクロ流体デバイスに搭載することにより、膵島インスリン応答を評価した。自動フラクションコレクタ (G i l s o n、モデル 203 B、W I、U S A) によって、灌流液試料を 1 分間毎に (500 μ L / 分) 採取した。げっ歯動物化学発光インスリン E L I S A (A l p c o、N H、U S A) を使用して、インスリン濃度を 1 分間おきに定量した。次の灌流プロトコルを使用した: 1) K R B 2 (0 ~ 20 分間); 2) 20 mM グルコースまたは 30 mM K C l (20 ~ 55 分間); 3) K R B 2 (55 ~ 100 分間)。一元配置 A N O V A (有意として $p < 0.05$) を使用して群を統計的に比較するために、インスリン曲線 (裸の、0.5 mm および 1.5 mm は $n = 3$) 毎の曲線下面積を計算した。

10

【0210】

膵島細胞内カルシウムのリアルタイム蛍光イメージング

封入された膵島のために修飾されたマイクロ流体デバイスにおいて、膵島細胞内カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ のリアルタイム蛍光イメージングを行った₄。簡潔にまとめると、50 個の S p r a g u e - D a w l e y ラット膵島を裸でまたはアルギナートカプセル (0.5 mm および 1.5 mm 直径) に封入して、2 mM グルコース (K R B 2) および 0.5 % B S A を補充したクレブス・リング緩衝液 (K R B) において 37 °C で 5 μ M F u r a - 2 / A M (カルシウム指標、M o l e c u l a r P r o b e s、C A、U S A) と共に 35 分間インキュベートした。次に、倒立落射蛍光顕微鏡 (L e i c a D M I 400 B、I L、U S A) に備え付けられたマイクロ流体デバイスに、膵島を搭載した。過剰な色素を K R B 2 で 35 分間、500 μ L / 分にて洗い流した。二重波長 F u r a - 2 / A M 色素を、340 および 380 nm でレシオメトリックに励起し、 $[Ca^{2+}]_i$ レベルの変化を F 340 / F 380 (基底 2 mM グルコースからの % 増加) として表現する。L a m b d a D G - 4 波長スイッチに備え付けられた励起フィルター (C h r o m a T e c h n o l o g y、V T、U S A) によって、励起波長を制御した。F u r a 2 / F I T C 多色性 (polychroic) ビームスプリッターおよびダブルバンド発光フィルター (C h r o m a T e c h n o l o g y、P a r t n u m b e r : 73.100 b s) を使用して、F u r a - 2 / A M の発光にフィルターをかけた。S i m p l e P C I ソフトウェア (H a m a m a t s u C o r p、I L、U S A) をイメージング取得および解析に使用した。高速高分解能電荷結合 (charge coupled) カメラ (C C D、R e t i g a - S R V、F a s t 1394、Q I m a g i n g) により、これらの像を収集した。

20

30

【0211】

次の灌流プロトコルにより、個々の膵島細胞内カルシウム応答を評価した: 1) K R B 2 (0 ~ 5 分間); 2) 20 mM グルコース (5 ~ 25 分間); 3) K R B 2 (25 ~ 45 分間); 4) 30 mM K C l (45 ~ 60 分間); 5) K R B 2 (60 ~ 70 分間)。一元配置 A N O V A (有意として $p < 0.05$) を使用して群を統計的に比較するために、期間毎の曲線下面積を個々の膵島毎に計算した。げっ歯動物単離物の 3 個の別々のバッチを評価に使用し、そこでは、同じバッチの膵島 (裸の膵島、 $n = 59$; 0.5 mm、 $n = 49$; 1.5 mm、 $n = 43$) から各条件をテストした。

40

【0212】

生体イメージングおよび M A F I A 枯渇

生体イメージングのため、0.5 mm および 1.5 mm サイズの S L G 20 ヒドロゲルに、Q d o t 605 (L i f e t e c h n o l o g i e s、G r a n d I s l a n d、N Y) を搭載し、上述の通り C 57 B L / 6 - T g (C s f l r - E G F P - N G F R / F K B P 1 A / T N F R S F 6) 2 B c k / J マウスへと外科的に埋め込んだ。埋め込み 1、4 または 7 日後に、マウスをイソフルラン麻酔下に置き、元の手術の部位に小さな切開を施し、ビーズを露出させた。マウスを倒立顕微鏡に置き、O l y m p u s F V

50

B-1000 MP多光子顕微鏡における25×のN.A. 1.05対物レンズを使用して、励起波長860nmで画像化した。像に応じて20～45分間の時系列において2分間隔で、200μm(10μm刻み)のZスタックを取得した。マウスを一定のイソフルラン麻酔下に維持し、イメージングセッションを通してモニタリングした。Velocity 3D画像解析ソフトウェア(Perkin Elmer、Waltham、MA)を使用して、得られた像を解析した。

【0213】

加えて、対照(非枯渇)または誘導されたマクロファージ枯渇MAFIAマウスにおける線維症またはその欠如を調査するために、0.5mm SLG20球を上述の通り移植した。標的化マクロファージ枯渇の場合、n=5匹のマウスの追加の群に、B/Bホモ二量体化合物(homodimerizer)(Clontech)を静脈内(尾静脈)注射した。本発明者らによる10mg/kgのホモ二量体化合物AP20187の静脈内注射のこれらのマウスにおける投与後に、有意なマクロファージ枯渇が達成された(ほぼ80～90%、平均群減少=84.36%、図22)。3日前に、続いてアルギナート球埋め込み3日後に開始して回収まで3日毎に1回の、MAFIAモデルにおける反復枯渇は、移植された非枯渇対照MAFIAマウスのIP空間に観察される腹膜レベルをはるかに下回ってマクロファージ数をロックダウンすることができた(ほぼ65.26%対ほぼ10.2%; 図22)。

【0214】

結果

マクロファージは、埋め込まれた材料に対する異物反応の重要な駆動体として意味づけられている₄₁。埋め込まれた材料に対する線維化応答に向けたその役割を探索するために、SLG20アルギナート球を、マクロファージ細胞枯渇の誘導を可能にするトランスジェニックマウスモデル、MAFIAのIP空間に移植した一連の実験を行った。このモデルにおいて、マクロファージFas誘導性アポトーシス導入遺伝子は、変異体ヒトFK506結合タンパク質1A、12kDa(ref. 42)の発現を駆動するための、マウスコロニー刺激因子1受容体プロモーター(CSF1R)を使用したマクロファージの誘導性/可逆性アポトーシスを可能にする。さらに、このモデルに含まれるEGFP導入遺伝子は、マクロファージ細胞のin situ蛍光モニタリングを可能にする。

【0215】

第一に、線維化応答の駆動におけるマクロファージの重要性を確認するために、0.5mm SLG20球を、マクロファージの枯渇を誘導するように処置したMAFIAマウスおよび同様に対照として、枯渇なしのMAFIAマウスのIP空間に14日間移植した。回収された球の暗視野顕微鏡像は、マクロファージが枯渇されたマウスに埋め込まれた球におけるごく限られた細胞沈着と、逆に、マクロファージを有するマウスから受け取った球における有意な細胞沈着を明らかにした(図22)。これらの結果は、マクロファージが実際に、本発明者らの移植材料に応答して観察される線維化応答の重要な駆動体であることを確認する。

【0216】

第二に、リアルタイムでマクロファージ挙動をモニタリングするために、蛍光標識された、0.5mmおよび1.5mmサイズの埋め込まれたアルギナート球におけるin vivo生体イメージングを行った。MAFIAマウスのIP空間における球状埋め込みを研究した(図23)。埋め込み1、4および7日後の、埋め込まれた中間のおよび大きなサイズの球から得たin vivo Zスタック生体内像は、マクロファージ細胞が、末梢脂肪パッド組織から溢出し、この1週間の期間にわたって0.5mm球に蓄積する一方、マクロファージが、1.5mm球付近にほとんど観察できないことを示す。埋め込み1、4および7日後の0.5mmおよび1.5mm球におけるマクロファージ蓄積のZスタックおよびタイムラプス生体内像は、1.5mm球を囲むマクロファージの活性および数の欠如、ならびに0.5mm球周囲の有意なマクロファージの活性および数の両方を確認する。1.5mm球が、ごく僅かなマクロファージ細胞に囲まれているため、大きな球周

囲のマクロファージは、活性化されるようになってはならず、さらなるマクロファージの動員および血管外遊出の低下をもたらすことが仮定された。

【0217】

マクロファージ細胞は、環境シグナルに対するその効率的な応答および関係する刺激に取り組むためのその表現型の変化を可能にする、顕著な柔軟性を有する。3つの状態：すなわち、古典的活性化（炎症誘発性、M_{古典的}）、代替的活性化（治癒促進性、M_{創傷}）および調節性活性化（M_{Reg}）にカテゴリー化することができる、広範囲のマクロファージ活性化が存在する。これらの表現型は、各活性化状態と相関する、特異的マーカーの遺伝子発現解析により特徴付けることができる。炎症誘発性マクロファージ表現型は、腫瘍壊死因子α（TNF-α）、インターロイキン1（IL1）およびインターフェロン調節因子5（IRF5；マクロファージの創傷治癒促進性表現型は、樹状細胞免疫受容体（Dc i r）、スタビリン（stabilin）1（S t a b 1）、ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド22（CCL22）、キチナーゼ様3（YM1）およびアルギナーゼ1（Arg）の発現における上方調節と相関する）の発現上昇と相関する。一方、調節性マクロファージ表現型は、インターロイキン10（IL10）、TNFスーパーファミリーメンバー14（L i g h t）およびスフィンゴシンキナーゼ1（S p h k 1）の発現上昇と相関すると特徴付けされた。マクロファージの変化する活性化／分化状態を解明するために、M_{古典的}、M_{創傷}およびM_{Reg}表現型を反映する一連のマーカーを使用して、ある範囲の埋め込まれた構築物を試験した。埋め込み1、4および7日後に、遺伝子発現解析を使用して、腹腔内空間、網脂肪パッド組織から単離されたおよび直接的に球における細胞の表現型マーカー発現を探索した。全体的に見て、有意に異なる遺伝子発現パターンが、1.5 mm球と比較して、0.5 mm球の埋め込み後のこれらの組織に関連する細胞に観察された。

【0218】

【表1】

表1. 埋め込み後のマクロファージマーカー、サイズおよび日数によって分類された、経時的なモック手術および埋め込まれたSLG20球の自然免疫応答の間の比較のための有意性のレベルを示すP値。Nanostringデータを対数変換し、時間、サイズ、遺伝子、区画およびマクロファージ型からなる線形モデルを構築した。テューキーの範囲検定を使用して、モック群および埋め込み群の間のペアワイズ比較を行った。有意性レベルα=0.05。処置当たりN=4匹のマウス。

区画	型	1日目		4日目		7日目	
		0.5 mm	1.5 mm	0.5 mm	1.5 mm	0.5 mm	1.5 mm
腹腔内空間	古典的	0.5832	1.0000	0.0168	1.0000	0.0017	0.8812
	調節性	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	創傷	0.0001	0.0097	<0.0001	0.0041	<0.0001	0.1455
脂肪	古典的	1.0000	1.0000	0.2175	0.2302	0.0326	0.5249
	調節性	1.0000	1.0000	0.8362	0.6927	1.0000	1.0000
	創傷	0.9603	1.0000	<0.0001	0.0075	0.0001	1.0000
球	古典的	0.0001	1.0000	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	調節性	1.0000	1.0000	0.0089	0.5295	<0.0001	1.0000
	創傷	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

【0219】

0.5 mmおよび1.5 mm球の両方の埋め込みは、腹腔内および末梢網脂肪区画における創傷治癒表現型に関連するマーカーの発現増加をもたらした（表1）。この表現型は

、マウスに埋め込まれた両方の球サイズに関して4日目に上昇し、1.5mm球に関して7日目までに減少した。これらのデータが、これらの区画におけるマクロファージ活性化と一致している、すなわち、埋め込まれた材料が1.5mm球からなる場合は低下することが考えられる。0.5mm球から直接的に得られる線維化組織は、全3種のマクロファージ表現型に関連するマーカーの増加する発現を示した。対照的に、古典的および創傷治癒表現型のみに関連するマクロファージマーカーの発現は、1.5mm球において富化された(表1**)。調節性マクロファージマーカーは、1.5mm球の埋め込み後に、テストしたいずれの時点においてもまたはいずれの区画においても有意に上方調節されなかった。しかし、このマクロファージ表現型に関連するマーカーの発現増加は、0.5mm球に関連する細胞において4および7日目に観察された。組み合わせた本発明者らの観察は、大きなサイズの球における調節性マクロファージ細胞蓄積の欠如が、トランケートされた線維化応答と相関することを示唆する。

10

【0220】

要約すると、データは、埋め込まれた材料の形状を調整することにより、その宿主認識および異物反応の伝播に影響を与えることができることを実証した。1.5mmの直径またはそれを超える球状材料が、そのより小さいサイズのまたは異なって形づくられた対応物よりも有意に生体適合性であることを証明した。この効果は、埋め込まれた総表面積に依存しないこと、また、テストした全ての材料で明らかであることが実証された。さらに、本発明者らの知見は、埋め込みサイズを単純に増加させることが、異物応答に抵抗するのに不十分であり、宿主線維症／拒絶に抵抗するには球状の形も不可欠であることを示唆する。有意には、1.5mmの直径のアルギナートミクロスフェアは、細胞沈着を少なくとも6ヶ月間避ける能力を実証した。ヒドロゲル、セラミックス、金属およびプラスチックを包含する広範囲の材料の球状寸法のモジュレートも、1.5mmまたはそれを超える直径の球が、異物性反応および線維症を有意に軽減したことを示した。これらの知見は、ある範囲の適用、トロールされた薬物放出(trolled drug release)、組織工学のための埋め込み可能なプロテーゼのためのin vivoで埋め込まれた生体医療デバイスの設計に重要な意義を有する。

20

【0221】

(実施例11) マクロファージ表現型シフトのプロファイリング

図24A～図24Fは、腹腔内空間の細胞におけるマクロファージ表現型シフトのプロファイリングを示す。埋め込み1、4および7日後に抽出された(腹腔内洗浄された)、腹腔内空間における細胞由来のマクロファージ表現型マーカーのRNA発現のNanoStringに基づく解析。発現は、モック手術(PBS注射)マウスから収集された腹腔内細胞に対し正規化され、2を底とする対数目盛りで示される。処置当たりN=4匹のマウス。解析の詳細については、補足方法の記載を参照されたい。

30

【0222】

図25A～図25Fは、末梢網脂肪組織の細胞におけるマクロファージ表現型シフトのプロファイリングを示す。埋め込み1、4および7日後に抽出された、末梢脂肪組織における細胞由来のマクロファージ表現型マーカーのRNA発現のNanoStringに基づく解析。発現は、モック手術(PBS注射)マウスから収集された脂肪組織に対し正規化され、2を底とする対数目盛りで示す。処置当たりN=4匹のマウス。

40

【0223】

0.5mmおよび1.5mmサイズの球の両方の埋め込みは、腹腔内および末梢網脂肪区画における創傷治癒表現型に関連するマーカーの発現増加をもたらした。この表現型は、マウスに埋め込まれた両方の球サイズに関して4日目に上昇し、1.5mmサイズの球に関して7日目までに減少した。本発明者らは、これらのデータが、これらの区画におけるマクロファージ活性化と一致している、すなわち、埋め込まれた材料が1.5mm球である場合は低下すると考える。0.5mmサイズから直接的に得られる線維化組織は、全3種のマクロファージ表現型に関連するマーカーの増加する発現を示した。対照的に、古典的および創傷治癒表現型のみに関連するマクロファージマーカーの発現は、1.5mm

50

球において富化された。調節性マクロファージマーカーは、1.5 mmサイズの球の埋め込み後に、テストしたいずれの時点においてもまたはいずれの区画においても有意に上方調節されなかった。しかし、このマクロファージ表現型に関連するマーカーの発現増加は、0.5 mm球に関連する細胞において4および7日目に観察された。組み合わせると、観察は、大きなサイズの球における調節性マクロファージ細胞蓄積の欠如が、トランケートされた線維症応答と相関することを示唆する。

【0224】

(実施例12) カプセル形状の関数としてのインスリンおよびグルコースの拡散

ベータ細胞において、グルコース誘導性インスリン分泌は、グルコース代謝、ミトコンドリアエネルギー産生、カリウム依存性ATPチャネル(K_{ATP} チャネル)、電位依存性カルシウムチャネル(VDC)、カルシウム流入およびインスリン分泌が関与する複雑なプロセスであり、二相性および振動性動態パターンを有する₅。本研究では、本発明者らは、インスリン分泌共役因子およびインスリン分泌における封入およびカプセルサイズの影響を特徴付けるために、マイクロ流体灌流デバイスを適用して、灌流液試料における細胞内カルシウム流入(細胞膜へのインスリン顆粒の融合およびエキソサイトーシスのための下流および直ぐ近位のトリガー)およびインスリン濃度を動的に測定した。図18A~図18Dに示す通り、グルコース誘導性細胞内カルシウムシグナルは、3群の間で同様であり、全3群で典型的な位相応答を有した。20 mMグルコースおよび30 mM KC1(塩化カリウム)負荷の両方に応答して、カルシウム流入の開始時から最大カルシウムピークまで、有意差は観察されなかった。その上、両方の刺激因子下におけるカルシウム濃度の曲線下面積(AUC)は、有意に異ならなかった(図18Cおよび図18D)。しかし、裸の臍島および0.5 mmカプセルと比較して、1.5 mmカプセルの最大カルシウムレベルに達する時間は、グルコースに応答して統計的に遅延した($p=0.03$)が、KC1刺激に応答して統計的に遅延しなかった。

【0225】

結果は、グルコース(180.2ダルトン)およびKC1(74.6ダルトン)等、小分子は、アルギナートカプセル中に非常に急速に拡散し、裸の臍島と同様の速度でカルシウム流入を効率的に誘導することを示唆する。これは、封入プロセスおよびアルギナート材料が、*in vitro*および*in vivo*機能に重要な、ミトコンドリアエネルギー産生およびイオンチャネル等のグルコース代謝、またはインスリン刺激因子分泌共役因子(insulin stimulator-secretion coupling factor)を激しく妨害しないことを示唆する。さらに、グルコース(180.2ダルトン)に応答して1.5 mmカプセルにおいて最大カルシウムレベルに達するのに遅延した時間が存在したが、KC1(74.6ダルトン)にはないため、カプセルにおける拡散効率は、分析物の分子量に依存し得る。

【0226】

次に、裸のおよび封入された臍島のインスリン分泌動態を調査した。図19Aに示す通り、裸の臍島は、グルコースに応答して典型的な二相性インスリン分泌パターンを示すが、両方の封入臍島群は、二相性パターンの損失を示し、インスリン分泌が、定義されたI相分泌なしに、グルコース刺激の期間にわたって徐々に増加することを示す。20 mMグルコースおよび30 mM KC1負荷の両方に応答して、インスリン分泌の開始時から最大ピークインスリン分泌まで、有意差は観察されなかった。しかし、20 mMグルコースおよび30 mM KC1から最大インスリン分泌に達する時間は、裸の臍島と比較して、0.5 mmおよび1.5 mm封入臍島では有意に遅延した($p=0.0002$ (20 mMグルコース)、 0.04 (30 mM KC1))。インスリン分泌動態曲線のさらなる解析は、刺激の最初の10分間で裸の臍島によって分泌される総インスリンが、グルコースおよびKC1(それぞれ $p=0.02$ および 0.04)の両方に応答した0.5 mmおよび1.5 mm封入臍島の両方よりも有意に高かったが、刺激におけるより後の時間区域では有意に異ならなかったことを示した。このデータは、より大きな分子量のインスリン(5,808 Da)が、裸の臍島と比較して両方の封入群にとって、アルギナートゲルを通して灌流液チャンバーに入るより長い拡散時間をもたらす決定因子であることをさらに示

唆する。

【0227】

刺激において（20～55分間）および刺激後の洗い流し期間において（55～100分間）全群によって分泌される総インスリンも、両方の刺激因子に応答して有意に異ならないことが判明した。これは、全体的大量のインスリン分泌が、封入またはカプセルサイズによって影響されないことを示唆する。より重要なことに、封入膵島は、裸の膵島と同様の基底インスリン分泌レベルに戻ったが、刺激後に長期にわたるインスリン分泌は、危険な低血糖を引き起こし得るため、これは、将来の臨床適用を考慮する場合、決定的な因子である。

【0228】

正常グルコース誘導性カルシウム流入と共に、本発明者らの結果は、より大きなMWのインスリンのカプセルから灌流液への増加する拡散時間のため、封入膵島のインスリン分泌プロファイルの変更が、アルギナートゲルの存在によって大部分は影響されるようであることを示す。これは、グルコースに応答した封入膵島のI相インスリン分泌の観察される損失を説明することができる。しかし、0.5mmおよび1.5mm封入膵島の間でインスリン分泌動態に有意差はなく、カプセルサイズが、インスリン分泌に効果がほとんどないことを示唆する。

【0229】

要約すると、小分子量分泌促進物質による膵島刺激動態は、封入またはカプセルサイズによって影響されない；しかし、初期インスリン分泌動態は、両方のカプセルサイズにおける封入膵島で同様に遅延される。にもかかわらず、両方のカプセルサイズの全体的大量のインスリン動態（overall bulk insulin kinetics）は、十分に保存されており、裸の膵島と同様である。

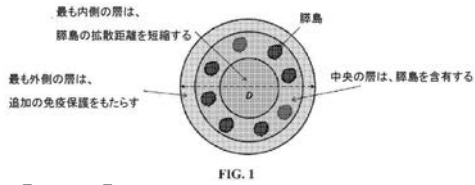
【0230】

本発明の改変および変形形態は、以下の請求項を参照することによってさらに理解される。本明細書において引用した全ての参考文献は、参照により明確に組み込まれる。

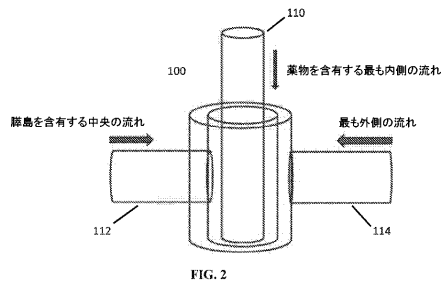
10

20

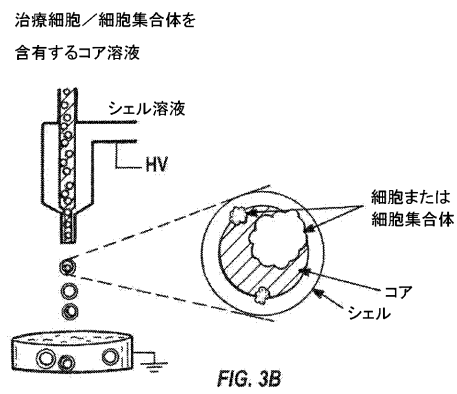
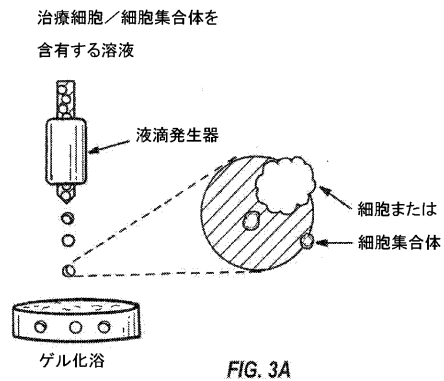
【図 1】



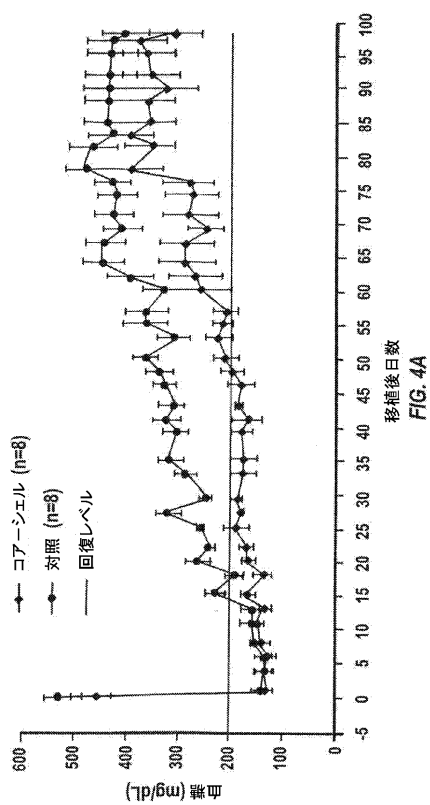
【図 2】



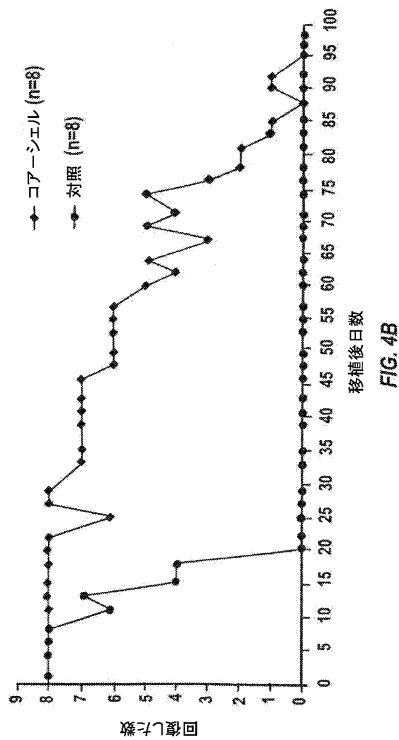
【図 3 A - B】



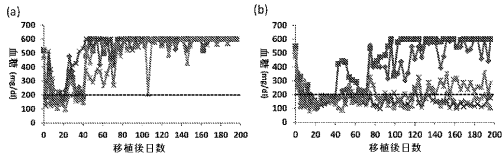
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 5 A - B】



FIGS. 5Aおよび5B

【図 6】

サイズ増加を有するアルギナート球に対する
免疫応答の有意な低下を示すFACS

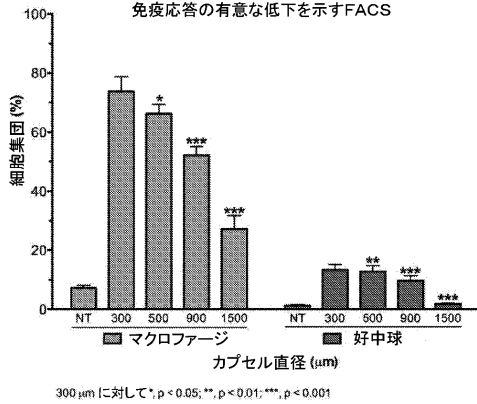


FIG. 6

【図 7】

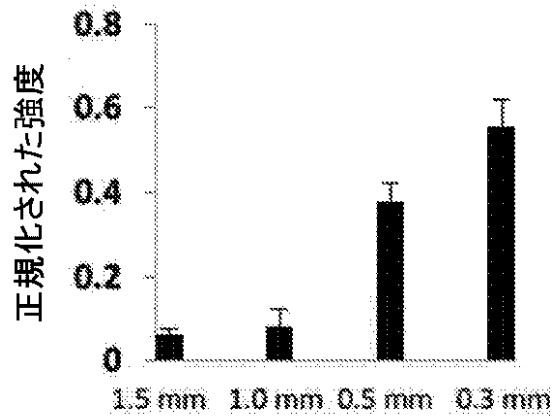


FIG. 7

【図 8】

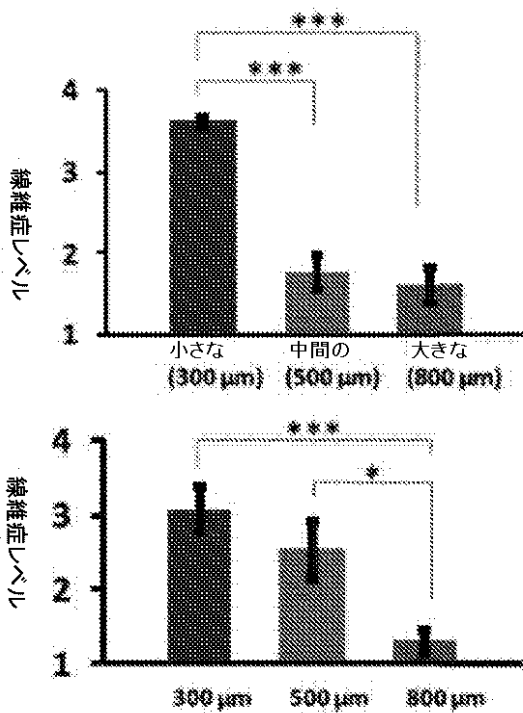


FIG. 8

【図 9 A - B】

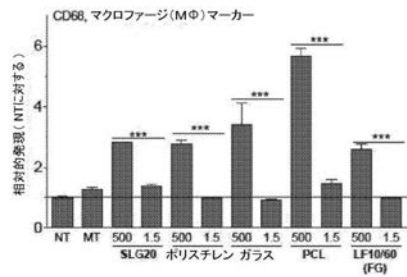


FIG. 9A

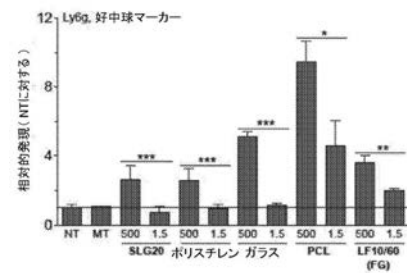


FIG. 9B

【図 9 C - D】

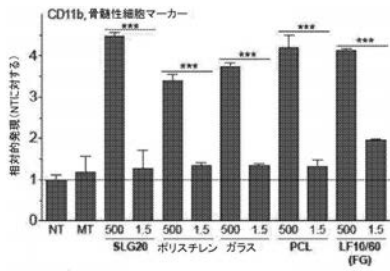


FIG. 9C

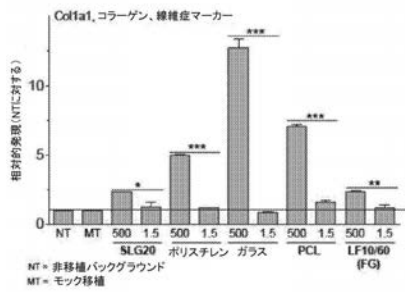


FIG. 9D

【図 10 A - B】

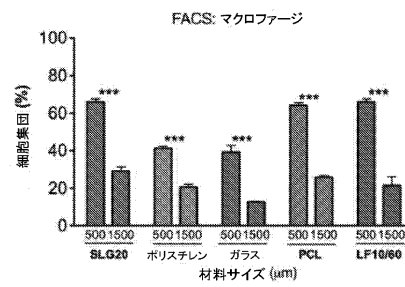


FIG. 10A

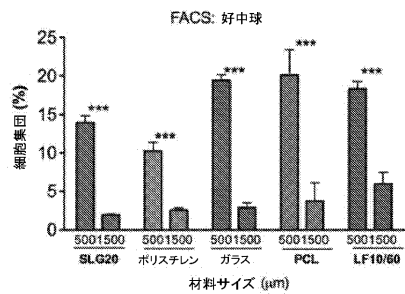


FIG. 10B

【図 11】

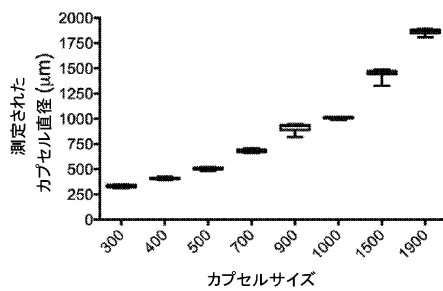


FIG. 11

【図 12 A - B】

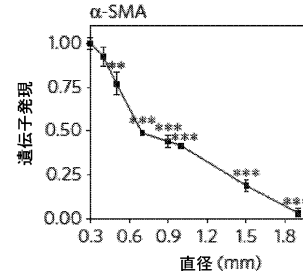


FIG. 12A

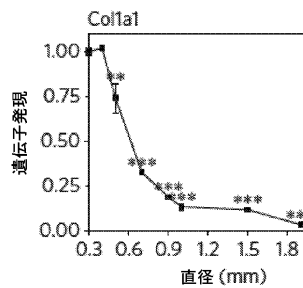


FIG. 12B

【図 1 3 A - B】



【図 1 4 C - D】



【図 15】

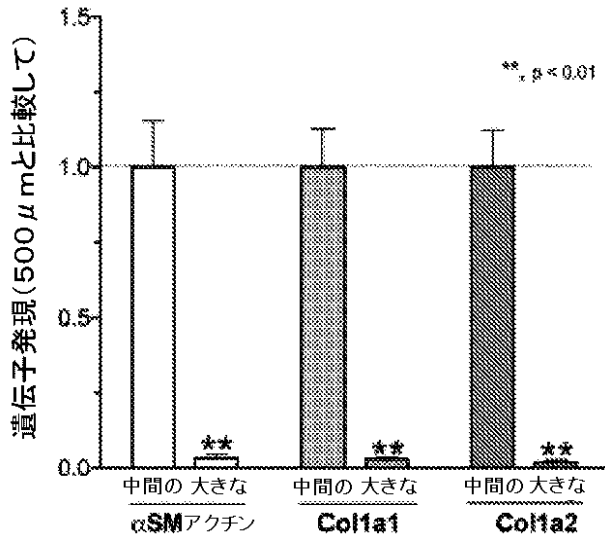


FIG. 15

【図 16 A - C】

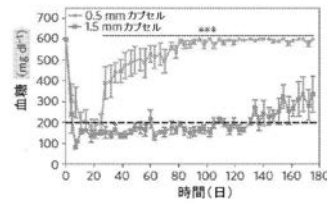


FIG. 16A

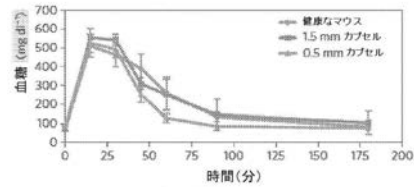


FIG. 16B

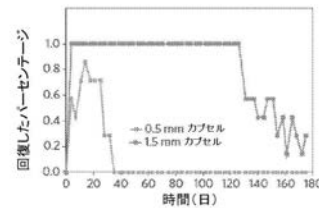


FIG. 16C

【図 17 A - B】

A

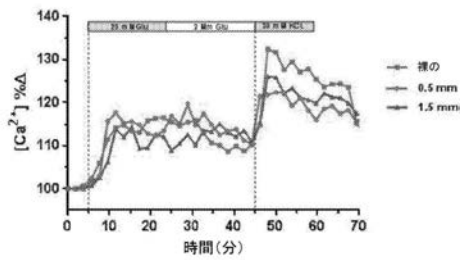


FIG. 17A

B

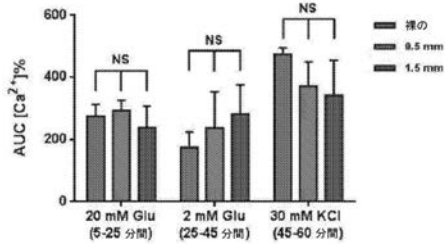


FIG. 17B

【図 18 A - B】

A

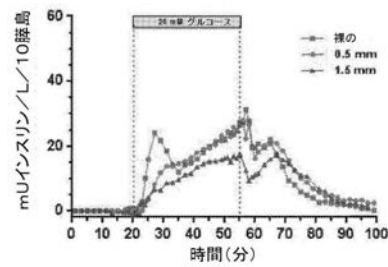


FIG. 18A

B

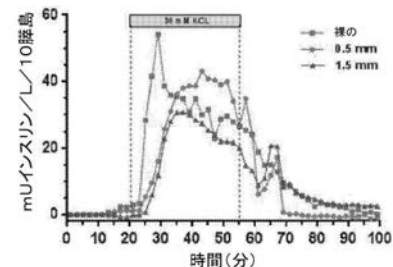
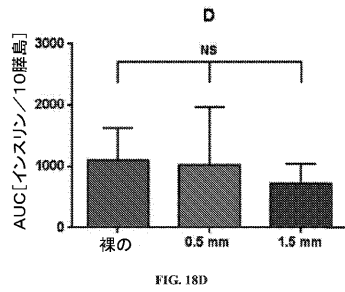
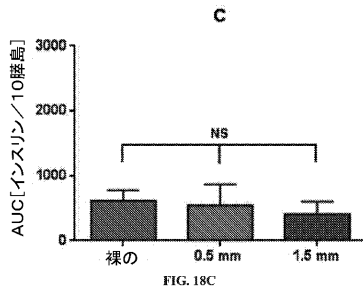
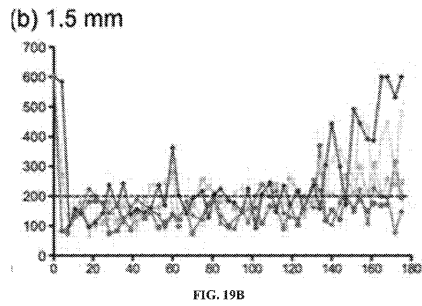
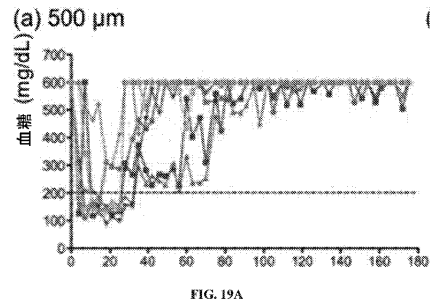


FIG. 18B

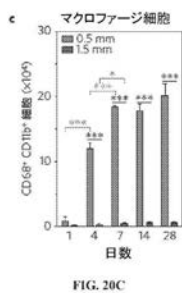
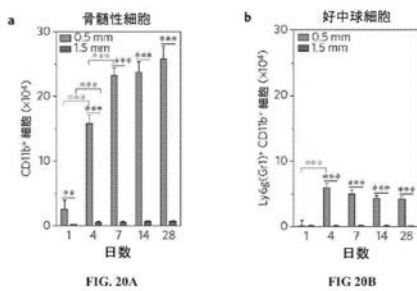
【図 18 C - D】



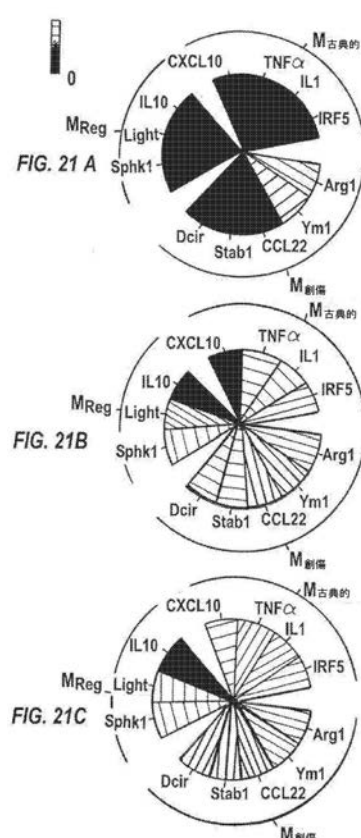
【図 19 A - B】



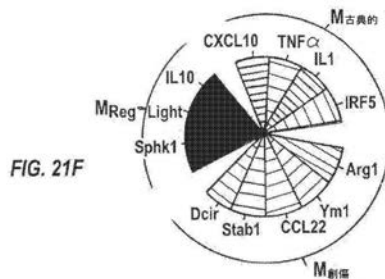
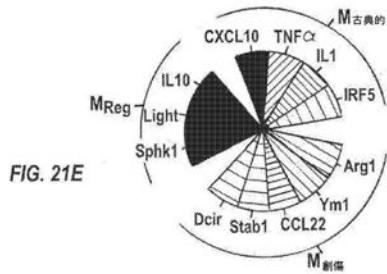
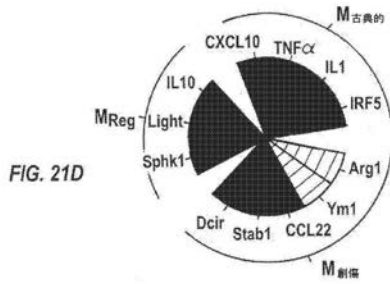
【図 20 A - C】



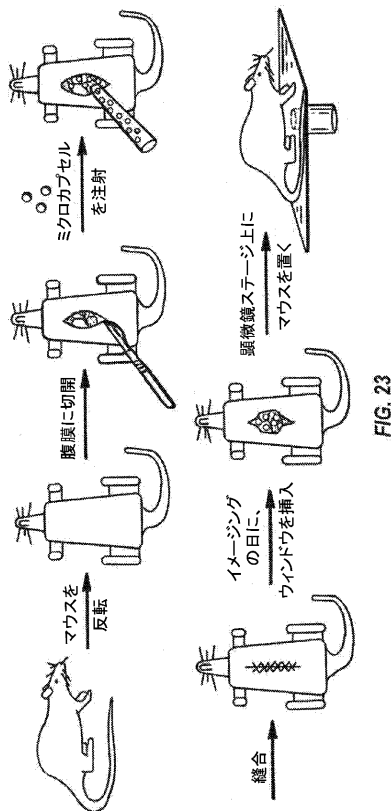
【図 21 A - C】



【図 2 1 D - F】

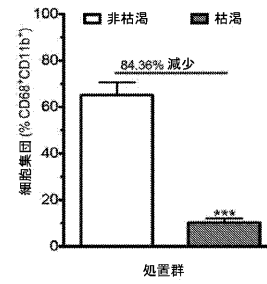


【図 2 3】

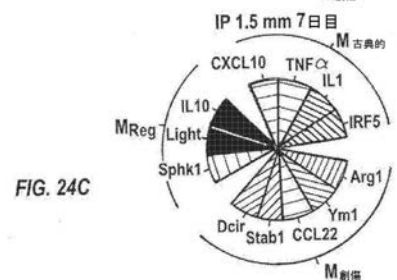
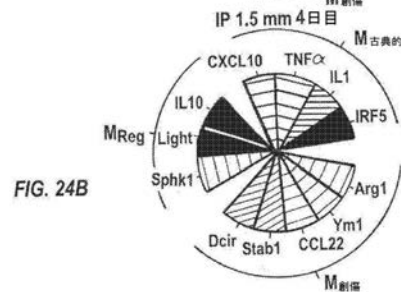
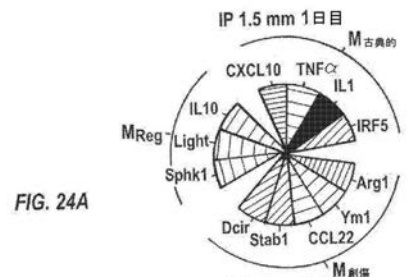


【図 2 2】

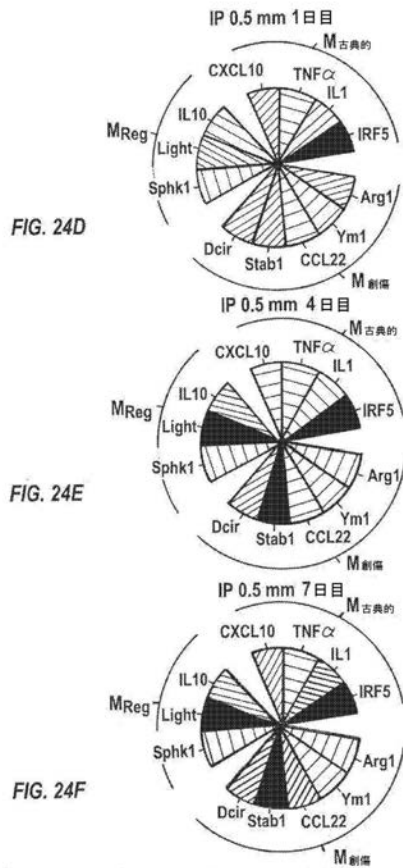
MAFIAマウスにおけるマクロファージ、埋め込み後
14日目、ビヒクルまたはホモ二量体物質誘導性枯渇後



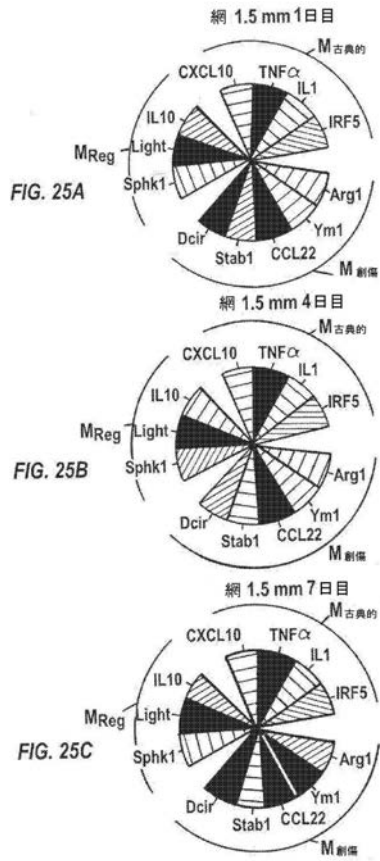
【図 2 4 A - C】



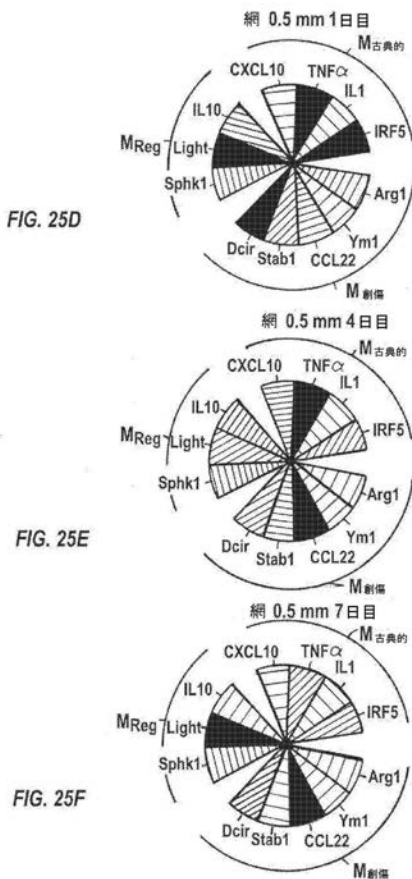
【図 24 D - F】



【図 25 A - C】



【図 25 D - F】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2016/032920
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, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of 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/US2016/032920**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-17, 46

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2016/032920

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-17, 46

A preparation of biomedical devices, wherein at least 60 % of the devices of the preparation (i) have a sphere-like shape or a spheroid-like shape and (ii) have a diameter of at least X mm, but no more than Y mm, provided that Y is greater than X, X is 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, or 2.0, and Y is 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, or 10.0, and

(a) no more than 20% of the devices of the preparation have other than a sphere-like shape or a spheroid-like shape;

(b) at least 50 % of the devices of the preparation comprise a live cell, or a plurality of live cells, or at least 1,000, 2,000 or 5,000 live cells/device;

(c) at least 50 % of the devices of the preparation having sphere-like shape or a spheroid-like shape comprise a live cell, or a plurality of live cells, or at least 1,000, 2,000 or 5,000 live cells;

(d) no more than 20% of the devices of the preparation have an edge;

(e) the cells in at least 50 % of the devices of the preparation are distributed essentially homogeneously throughout the device;

(f) the cells in at least 50 % of the devices of the preparation having sphere-like shape or a spheroid-like shape are distributed essentially homogeneously throughout the device;

(g) the cells in at least 50 % of the devices of the preparation are not distributed essentially homogeneously throughout the device; and

(h) the cells in at least 50 % of the sphere-like shape or spheroid-like shape devices of the preparation are not distributed essentially homogeneously throughout the device.

The first invention also covers the methods of treating a subject with a preparation of biomedical devices and a biomedical device for implantation.

2. claims: 18-45

Hydrogel capsules encapsulating cells, method of providing cells to an individual by administering hydrogel capsules, method of making the hydrogel capsules.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/032920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61L27/20 A61L27/38 A61L27/52 A61L27/54
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)

A61L

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, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
7 X	MINGLIN MA ET AL: "Core-shell hydrogel microcapsules for improved islets encapsulation", ADVANCED HEALTHCARE MATERIALS, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 2, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 667-672, XP002724800, ISSN: 2192-2640, DOI: 10.1002/ADHM.201200341 [retrieved on 2011-12-03] the whole document	1-17,46
5 A	WO 2014/153126 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 25 September 2014 (2014-09-25) claims 1-29	1-17,46

☐ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 August 2016

Date of mailing of the international search report

14 - 10 - 2016

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

Schneider, Aurore

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/032920

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014153126 A1	25-09-2014	AU 2014236296 A1	29-10-2015
		CA 2906174 A1	25-09-2014
		EP 2968115 A1	20-01-2016
		JP 2016519079 A	30-06-2016
		US 2014271843 A1	18-09-2014
		WO 2014153126 A1	25-09-2014

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 L	27/34	(2006.01)	A 6 1 L	27/34
A 6 1 L	27/28	(2006.01)	A 6 1 L	27/28
A 6 1 L	27/54	(2006.01)	A 6 1 L	27/54
A 6 1 L	27/24	(2006.01)	A 6 1 L	27/24
A 6 1 L	27/16	(2006.01)	A 6 1 L	27/16
A 6 1 L	27/18	(2006.01)	A 6 1 L	27/18
A 6 1 L	27/56	(2006.01)	A 6 1 L	27/56
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	35/39	(2015.01)	A 6 1 K	35/39
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/18
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	9/52	(2006.01)	A 6 1 K	49/00
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K	9/52
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	9/48
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/36
A 6 1 K	47/34	(2017.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 K	47/32	(2006.01)	A 6 1 K	47/34
			A 6 1 K	47/32

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T r i t o n

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 マ, ミンリン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 14850, イサカ, コンコルド プレイス 117

(72)発明者 アンダーソン, ダニエル ジー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01701, フレーミングハム, カーター ドライブ 78

(72)発明者 ランガー, ロバート エス.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02459, ニュートン, モントベール ロード 98

(72)発明者 バイセフ, オミド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 1105, アpartment 10イー

(72)発明者 ベガス, アルトゥーロ ホセ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, フランクリン ストリート
129, アpartment 328

(72)発明者 ドロフ, ジョシュア チャールズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02171, クインシー, ハンコック ストリート 2
, アpartment 208

(72)発明者 チェン, デライ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01801, ウォーバン, ホウソーン ストリート 3

(72)発明者 カストラップ, クリスチャン ジェイ.

カナダ国 ブイ6ケー 4ダブリュー4 ブリティッ シュコロンビア, バンクーバー, ウエ
スト 10ティーエイチ アベニュー 2137

F ターム(参考) 4C076 AA53 AA62 AA63 AA64 AA67 AA94 BB32 CC16 CC21 CC26
EE06 EE06H EE06K EE06M EE06P EE06Q EE09 EE09H EE09K EE09M
EE09P EE09Q EE11 EE11H EE11K EE11M EE11P EE11Q EE16 EE16H
EE16K EE16M EE16P EE16Q EE17 EE17H EE17K EE17M EE17P EE17Q
EE23 EE23H EE23K EE23M EE23P EE23Q EE30 EE30H EE30K EE30M
EE30P EE30Q EE36 EE36H EE36K EE36M EE36P EE36Q EE37 EE37H
EE37K EE37M EE37P EE37Q EE43 EE43H EE43K EE43M EE43P EE43Q
EE45 EE45H EE45K EE45M EE45P EE45Q EE48 EE48H EE48K EE48M
EE48P EE48Q FF31 FF35 FF36 FF67 GG16 GG21 GG23 GG31
4C081 AB11 BA03 BB01 BB06 CA051 CA052 CA061 CA062 CA081 CA082
CA151 CA152 CA171 CA172 CA181 CA182 CC01 CC04 CD011 CD012
CD041 CD042 CD071 CD072 CD081 CD082 CD091 CD092 CD121 CD122
CD34 CE02 DA11 DA12 DB02 DB03 DB07 DC03 DC04 EA02
EA05 EA06 EA13
4C084 AA19 MA28 MA37 MA38 MA67 NA06 NA12 ZA661 ZB112 ZB212
ZB221 ZC212 ZC351 ZC751
4C085 HH01 KA26 KB67 KB68 KB70 KB74 KB79 KB82 KB99 LL05
LL15
4C087 AA01 AA02 BB51 BB63 CA04 MA02 MA05 MA28 MA37 MA38
MA67 NA03 NA06 NA12 ZA66 ZB22 ZC35