

(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2017-525438
(P2017-525438A)

(43) 公表日 平成29年9月7日(2017.9.7)

(51) Int.Cl.
A61L 27/60 (2006.01)

F I
A61L 27/60

テーマコード (参考)
4C081

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2017-504138 (P2017-504138)
(86) (22) 出願日 平成26年7月29日 (2014.7.29)
(85) 翻訳文提出日 平成29年3月27日 (2017.3.27)
(86) 国際出願番号 PCT/EP2014/066258
(87) 国際公開番号 W02016/015754
(87) 国際公開日 平成28年2月4日 (2016.2.4)

(71) 出願人 508290633
ユニヴァーシテト チューリッヒ
スイス ツェーハー 8006 チューリッ
ヒ レミシュトラーセ 71 プロレクト
ラート エムエンヴェー
(74) 代理人 100106002
弁理士 正林 真之
(74) 代理人 100120891
弁理士 林 一好
(72) 発明者 レイヒマン エルンスト
スイス国 シーエイチー 6043 アドリ
ゲンスヴィル マイアースマツシュトラ
ッセ 52

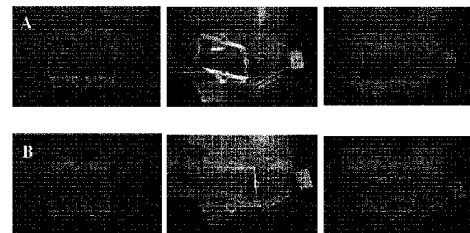
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織移植片

(57) 【要約】

本発明は、組織移植片を製造する方法であって、少なくとも以下の工程：ゲルを提供する工程と、少なくとも第1の種類の細胞および/または第2の種類の細胞を前記ゲルに播種する工程と、前記第1の種類の細胞および/または前記第2の種類の細胞によって前記ゲルに少なくとも1つの第1の生体構造が形成するまで、前記ゲル中に前記第1の種類の細胞および/または前記第2の種類の細胞を培養する工程とを含む、方法に関する。

【選択図】 図7



Assembly of flask

FIG. 7

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

組織移植片を製造する方法であって、少なくとも以下の工程：

ゲルを提供する工程と、

少なくとも第 1 の種類の細胞および / または第 2 の種類の細胞を前記ゲルに播種する工程と、

前記第 1 の種類の細胞および / または前記第 2 の種類の細胞によって前記ゲル中および / または上に少なくとも 1 つの第 1 の生体構造が形成するまで、前記ゲル中および / または上に前記第 1 の種類の細胞および / または前記第 2 の種類の細胞を培養する工程とを含む、方法。

10

【請求項 2】

前記第 1 の種類の細胞および / または前記第 2 の種類の細胞によって前記少なくとも 1 つの第 1 の生体構造が前記ゲル中に形成された後、第 3 の種類の細胞が前記ゲル上に播種される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 3 の種類の細胞を播種した後、前記ゲル上に少なくとも 1 つの第 2 の生体構造が形成するまで前記ゲルを培養する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の生体構造は、脈管構造、好ましくは、毛細血管および / またはリンパ毛細管の脈管網である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

第 2 の生体構造は表皮構造である、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 の種類の細胞および / または第 2 の種類の細胞および / または第 3 の種類の細胞は、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 の種類の細胞および / または第 2 の種類の細胞および / または第 3 の種類の細胞は、自己細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 の種類の細胞および / または第 2 の種類の細胞は、内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞、間葉細胞、造血細胞、免疫系の細胞、脂肪組織由来の細胞、壁細胞、幹細胞、前駆細胞、遺伝子改変細胞からなる群から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記第 3 の種類の細胞は、ケラチノサイト、メラノサイト、メルケル細胞、免疫系の細胞、脂肪組織由来細胞、表皮に由来しない上皮細胞、幹細胞、前駆細胞、遺伝子改変細胞、好ましくはケラチノサイトからなる群から選択される、請求項 2 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 の種類の細胞は内皮細胞であり、前記第 2 の種類の細胞は線維芽細胞であり、前記内皮細胞および前記線維芽細胞は前記第 1 の生体構造の形成のために前記ゲル中で一緒に共培養される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

内皮細胞および線維芽細胞は、少なくとも 3 : 7、好ましくは少なくとも 2 : 3、より好ましくは約 1 : 1 の線維芽細胞対内皮細胞の比で前記ゲル中に播種され、共培養される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1 の種類の細胞は、h B E C および / もしくは h L E C、またはそれらの混合物、好ましくは H D M E C からなる群から選択される内皮細胞であるか、あるいは前記第 1 の種類の細胞は S V F 細胞である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 13】

第1の種類の細胞および/または第2の種類の細胞を前記ゲルに播種した後、前記ゲルは好ましくは圧縮によって圧密化される、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記ゲルは圧縮装置での圧縮によって圧密化される、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記ゲルの圧密化は、前記少なくとも1つの第1の生体構造の形成の前または後に実施される、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記ゲルの圧密化後、第3の種類の細胞が前記ゲルに播種される、請求項2および請求項13～15のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記ゲルは、ヒドロゲル、好ましくはフィブリンヒドロゲルまたはコラーゲンヒドロゲル、好ましくはI型コラーゲンヒドロゲルである、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

圧縮されていない状態の前記ゲルは第1の厚さを有し、前記ゲルが圧縮状態において前記第1の厚さより、3～20倍少ない、好ましくは約10倍少ない第2の厚さに到達するまで前記圧密化が実施され、好ましくは圧縮状態における前記ゲルの厚さは約0.7～1mmである、請求項14～17のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 19】

ゲルを含む組織移植片であって、前記ゲルは、前記ゲル中および/または上で少なくとも第1の種類の細胞および/または第2の種類の細胞から形成される少なくとも1つの第1の生体構造を含む、組織移植片。

【請求項 20】

前記組織移植片は、前記ゲル中および/または上、好ましくは前記ゲル上で少なくとも第3の種類の細胞から形成される少なくとも1つの第2の生体構造をさらに含む、請求項19に記載の組織移植片。

【請求項 21】

前記第1の種類の細胞および/または第2の種類の細胞および/または第3の種類の細胞はヒト由来であり、より好ましくは自己移植ヒト由来である、請求項19または20に記載の組織移植片。

30

【請求項 22】

前記第1の生体構造および/または第2の生体構造は、器官構造または組織構造、好ましくは腺状上皮構造、胎盤上皮構造または羊膜上皮構造を含む上皮構造；脈管構造、好ましくは血管および/またはリンパ管構造；神経構造；骨構造、毛髪構造、爪構造、歯構造、間葉構造、筋肉構造、脂肪構造を含む結合組織構造からなる群から選択される、請求項19～21のいずれか一項に記載の組織移植片。

【請求項 23】

前記第1の生体構造および/または第2の生体構造は、神経堤、トロホプラスト由来の細胞、生殖細胞、幹細胞、前駆細胞、遺伝子改変細胞を含む、内胚葉由来の細胞、中胚葉由来の細胞、外胚葉由来の細胞からなる群から選択される細胞を含む、請求項19～22のいずれか一項に記載の組織移植片。

40

【請求項 24】

前記移植片は、好ましくは少なくとも3：7、より好ましくは少なくとも2：3、最も好ましくは約1：1の線維芽細胞対内皮細胞の比で、前記ゲル中に自己移植ヒト内皮細胞および自己移植ヒト線維芽細胞を含む、請求項19～23のいずれか一項に記載の組織移植片。

【請求項 25】

前記第1の生体構造は、脈管生体構造、好ましくは毛細血管およびリンパ毛細管の脈管

50

網である、請求項 19 ~ 24 のいずれか一項に記載の組織移植片。

【請求項 26】

前記第 2 の生体構造は、表皮生体構造である、請求項 20 ~ 25 のいずれか一項に記載の組織移植片。

【請求項 27】

前記第 1 の生体構造は前記ゲル中の脈管生体構造であり、前記第 2 の生体構造は前記ゲル上の表皮生体構造である、請求項 20 ~ 25 のいずれか一項に記載の組織移植片。

【請求項 28】

前記リンパ毛細管は、生理学的サイズ、好ましくは 17 ~ 60 μm の途切れのない管腔を有する、請求項 25 ~ 27 のいずれか一項に記載の組織移植片。

10

【請求項 29】

管腔形成リンパ毛細管、好ましくは固着線維を有するリンパ毛細管、好ましくはフィブリン固着線維を含む、請求項 25 ~ 27 のいずれか一項に記載の組織移植片。

【請求項 30】

前記ゲルはフィブリンまたはコラーゲンヒドロゲル、好ましくは I 型コラーゲンヒドロゲルである、請求項 19 ~ 29 のいずれか一項に記載の組織移植片。

【請求項 31】

前記ゲルは、圧密化された、好ましくは圧縮されたヒドロゲルである、請求項 19 ~ 30 のいずれか一項に記載の組織移植片。

【請求項 32】

前記移植片は表皮 - 真皮皮膚移植片であり、好ましくは前記第 1 の生体構造に含まれる細胞は HDMEC または SVF 細胞であり、前記第 2 の生体構造に含まれる細胞は、ケラチノサイト、好ましくはヒト表皮ケラチノサイトである、請求項 20 ~ 30 のいずれか一項に記載の組織移植片。

20

【請求項 33】

前記移植片は、0.2 ~ 3 mm、好ましくは 0.7 ~ 1 mm の厚さを有する、請求項 19 ~ 32 のいずれか一項に記載の組織移植片。

【請求項 34】

請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法によって製造される組織移植片。

【請求項 35】

損傷組織の治療における、または試験のための、請求項 19 ~ 34 のいずれか一項に記載の組織移植片の使用であって、前記組織移植片は、好ましくは表皮 - 真皮皮膚移植片であり、前記損傷組織は好ましくは皮膚組織、特に熱傷によって損傷した皮膚組織である、使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療的処置に使用するため、および / またはヒトもしくは他の哺乳動物組織をインビトロで試験するための、少なくとも 1 つの生体構造を含む手段、および該手段を製造する方法に関する。例えば、該手段は、熱傷、損傷、または疾患した皮膚についての皮膚創傷に使用されてもよく、正常な損傷していない皮膚としての構造および機能を提供する。

40

【背景技術】

【0002】

ヒトの皮膚は 3 つの主な層：表皮（最外）、真皮（中間）および皮下（最深）から構成される。例えば火傷の出来事の後には深い傷（全層皮膚創傷）が生じた場合、表皮および全真皮（一部の場、皮下も）が損傷し、外科的介入が必要とされる。小さな全層皮膚損傷は全層皮膚自己移植によって最適に処置される：表皮および全真皮は身体の健全な部分から採取され、創傷に移植される。対照的に、大きな全層皮膚欠陥は分層皮膚自己移植（表皮ならびに非常におよび不完全な薄い真皮層のみからなる）によって処置され、臨床的に

50

未解決の問題を表したままになる。実際に、そのような創傷は、治癒が悪くなり、大きな外観を損なった正常に機能しない瘢痕が発生する。分層皮膚自己移植と対照的に、全層皮膚自己移植が深い創傷を最適に治癒する理由は多数存在する。それらの理由のうちの1つは、全層皮膚自己移植における脈管構造の存在および分層皮膚自己移植における脈管構造の不在であることが分かっている。脈管生体構造（血管およびリンパ管）は、酸素および栄養素を絶えず提供すること、ならびに免疫細胞輸送により、ヒトの身体における器官に不可欠であり、それらは完全な機能および生存に寄与している。同様のことが、移植器官、皮膚などの薄く平らな器官にも当てはまる。全層皮膚移植片における毛細管は創傷床の毛細管とつながる必要があるだけであるが、分層皮膚移植片の場合、毛細管は組織に分散するように移植片の内部に伸びる必要がある。

10

【0003】

最近、研究および臨床的証拠により、リンパ管が、本質的に免疫細胞、残屑、および過剰な流体を創傷領域から排出することによって、皮膚移植片生存に必要であり得ることも示唆されている。大きな全層皮膚欠陥の処置のために多量の全層皮膚移植片を提供する方法を考慮すると、脈管生体構造を含む皮膚の再生医療が役に立つ。（他の種類の足場、例えばコラーゲンスポンジに対して）足場材料としてのヒドロゲルの主な利点の1つは、3D細胞基質としてのその性質である。それは生体適合性および生体模倣性が高く、免疫原性が低く（種を超えて保存される）、線維ネットワーク内で間隙に容易に播種できる細胞によって再生される。しかしながら、ヒドロゲルの不十分な機械的性質が、再生医療用途についての足場としてそれらの臨床的用途における主要な限定要因である。

20

【0004】

機械的安定性は、特にヒドロゲルに基づく組織操作によって作製された産生物が皮膚移植片のように大きく薄い物理的寸法によって特徴付けられる場合、それらの産生物の臨床用途に不可欠である（皮膚移植片についての臨床的に関連するサイズは2mm未満の厚さで最低50cm²である）。

【0005】

機械的安定性は、培養の間および後、ならびに外科的応用および/または試験の間および後にヒドロゲルの操作および処理を可能にすることを必要とする。ゲルの機械的安定性は圧密化によって増加され得る。特許文献1は、医療用途のための線維ネットワークを形成するためのコラーゲンゲルマトリクスの圧縮を開示している。特許文献2は、組織移植のための足場細胞マトリクスの調製におけるゲルの塑性圧密化の使用を開示している。

30

【0006】

非特許文献1は、ヒドロゲルベースの大きな7×7cmのヒト表皮-真皮皮膚移植片の操作についての改変された塑性圧縮法について報告している。これらの圧縮された操作された産生物は、細胞培養段階の間および後、ならびにブタでの移植段階の間、最適な機械的安定性を示した（非特許文献2、非特許文献3）。驚いたことに、ヒドロゲル中および上に播種した細胞の生物学的性質は圧縮プロセスによって変化しなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

40

【特許文献1】欧州特許第0187104号

【特許文献2】欧州特許第1773416号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Braziulisら、2012 (Modified Plastic Compression of Collagen Hydrogels Provides an Ideal Matrix for Clinically Applicable Skin Substitutes, Tissue Engineering: Part C; Vol. 18, No. 6, 2012)

【非特許文献2】Braziulisら、2011 Skingineering I:

50

engineering porcine dermo-epidermal skin analogues for autologous transplantation in a large animal model、Pediatr.Surg.Int.(2011)27:241-257

【非特許文献3】Schiestlら、2011(Skingeengineering II:transplantation of large-scale laboratory-grown skin analogues in a new pig model、Pediatr.Surg.Int.(2011)27:249-254)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

本発明の目的は概して、ヒトにおける臨床用途および/または試験のための、好ましくは生体適合性があり、生分解性のヒドロゲルマトリクス中および/または上に細胞および少なくとも1つの生体構造を含む、改良され、機械的に安定な組織移植手段を製造することである。より具体的には、臨床用途および試験のための、好ましくは生体構造を用いた自己移植の表皮真皮皮膚移植片を開発することを目的とする。

【0010】

これまで、血管生体構造を含む、予め脈管が新生した表皮-真皮皮膚代用物が研究目的のために生成されている。皮膚欠陥を処置するための意図した臨床用途のための、予め脈管が新生した表皮-真皮皮膚移植片についての生物学に関して利用可能なデータは存在しない。

20

【0011】

さらにこれまで、ヒトリンパ毛細管の操作について限られたデータが利用可能であり、機能的なヒトリンパ毛細管を含む、予め脈管が新生した表皮-真皮皮膚代用物の生物学についての利用可能なデータは存在しない。ヒトの真皮において、リンパ管は組織液恒常性および免疫細胞輸送において重要な役割を果たす。真皮リンパ毛細管は、広い管腔、固着線維を示し、基底膜がないか、または不完全であり、壁細胞被覆を欠いている。これらの特徴により、過剰な組織液を吸収し、除去することによってリンパ毛細管が間隙液圧に応答できる。創傷後、リンパ管内皮も破裂し、それによりリンパ管の排出能力が損なわれる。結果として、組織液の蓄積が生じる。持続性の局所間質液、ならびに局所残屑および炎症細胞の遅延した除去は創傷治癒を妨げる。対照的に、リンパ管形成の誘導および免疫細胞動員は皮膚再生を加速させることが示された。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の第1の実施形態は、少なくとも以下の工程：

ゲルを提供する工程と、

少なくとも第1の種類の細胞および/または第2の種類の細胞をゲルに播種する工程と

、
第1の種類の細胞および/または第2の種類の細胞によって前記ゲル中に少なくとも1つの第1の生体構造が形成するまで、前記ゲル中に第1の種類の細胞および/または第2の種類の細胞を培養する工程と
を含む、組織移植片を製造する方法に関する。

40

【0013】

つまり、1種以上の細胞種類がゲルに播種され、少なくとも1つの種類の生体構造の形成まで細胞は前記ゲル中および/または上で培養される。本発明の方法に使用されるゲルは、コラーゲンヒドロゲル、好ましくはI型コラーゲンまたはフィブリンヒドロゲルなどの任意の3D生体マトリクスであってもよい。

【0014】

生物学において、構造は、階層的に原子および分子から細胞、組織、器官、生物、集団および生態系レベルまでの有機体の全てのレベルで存在する。本出願の目的のために、「

50

生体構造」という用語は、いくつかの種類の有機体および/または複雑性および/または機能性を有する、ヒトまたは他の哺乳動物の身体/胚/胎児に存在する1つより多い細胞から構成される任意の構造/組織/器官と理解されるべきである。したがって、細胞の単なるランダムクラスターはこの定義に該当しない。

【0015】

本出願において提示される結果は、ゲル中および/または上にそれぞれヒト脈管および表皮生体構造を形成するためのデータを示す。しかしながら、本発明によるシステムは、ヒトまたは他の哺乳動物の身体/胚/胎児に存在する任意の種類が生体構造、例えば上皮(腺、胎盤および羊膜を含む)、脈管(血管およびリンパ管)、神経、結合組織(骨を含む)、毛髪、爪および歯、間葉、筋肉、脂肪および全てのヒトまたは他の哺乳動物の器官および組織を操作するために使用されてもよい。

10

【0016】

生体構造(の1種または複数の種類)の形成は、全ての種類/タイプのヒトまたは他の哺乳動物細胞およびそれらの混合物(神経堤、トロホプラスト由来の細胞、生殖細胞、幹細胞、前駆細胞、遺伝子改変細胞などを含む、内胚葉由来の細胞、中胚葉由来の細胞、外胚葉由来の細胞を含み得る)を播種し、培養することによって誘導され得、ここで播種される細胞は生体構造形成能を有する。ゲルに播種するために使用される細胞または細胞種類の組み合わせの選択は操作される組織の種類に依存する。

【0017】

好ましい実施形態において、第1の生体構造はゲル中で形成される。また、1種より多い種類の生体構造が(ゲル中または上で)形成されることができる。

20

【0018】

さらに好ましい実施形態において、第1の生体構造/第1の種類が生体構造は、脈管構造、好ましくは毛細血管および/またはリンパ毛細管、好ましくはその両方の脈管網である。

【0019】

少なくとも第1の生体構造(または1種より多い種類の生体構造)を誘導するために、ヒドロゲル内に播種される第1の種類および/または第2の種類(および/またはさらなる種類)の細胞は、身体/胚/胎児、好ましくはヒトまたは他の哺乳動物の身体に存在する細胞種類のいずれかであってもよい。好ましくは、第1の種類および/または第2の種類(および/またはさらなる種類)の細胞は、内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞、間葉細胞、造血細胞、免疫系の細胞、脂肪組織由来細胞、壁細胞、幹細胞、前駆細胞、遺伝子改変細胞からなる群から選択される。また、さらなる種類(2種より多い)の細胞が使用されてもよく、様々な種類の混合物、すなわち2種より多い種類が、ゲル中および/または上での少なくとも1つ、可能な場合、1つより多い生体構造(1種または複数の種類)の誘導/生成に必要であってもよい。

30

【0020】

脈管生体構造の誘導に関して、好ましくは、内皮細胞と線維芽細胞の混合物が使用される。つまり、特に好ましい実施形態によれば、第1の種類は内皮細胞であり、第2の種類は線維芽細胞である。次いで内皮細胞および線維芽細胞は第1の生体構造の形成のためにゲル中で一緒に共培養される。好ましくは、内皮細胞および線維芽細胞は、少なくとも3:7、好ましくは少なくとも2:3、より好ましくは約1:1の線維芽細胞対内皮細胞の比でゲル中に播種され、共培養される。

40

【0021】

内皮細胞は、好ましくは、ヒト血管内細胞(hBEC)および/またはヒトリンパ内皮細胞(hLEC)、好ましくは、ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HDMC)またはSVF由来である。HDMCはhLECおよびhBECの両方の混合物からなるので、両方の種類の機能的毛細管(血管およびリンパ管)がフィブリンまたはコラーゲンヒドロゲル中でインビトロでこれらの細胞から形成される。別の可能な細胞源はSVFであり、それは患者の特有の割合の血管内皮細胞、線維芽細胞および壁細胞の混合物であり、フィブリン

50

またはコラーゲンヒドロゲル中でインビトロで機能的毛細血管の形成を導く。

【0022】

全ての種類の生体構造の形成は本発明によるヒドロゲル系で誘導され得る。生体構造の形成はヒドロゲル上および/または中で細胞の播種および培養によって誘導され得る。細胞および生体構造の全てまたは一部は自己移植であってもよく、それらの起源は培養手段の受容者(移植片で処置される患者)であることを意味する。自己移植細胞は、置き換える組織移植片で処置される身体として同じヒトまたは他の哺乳動物の身体から単離される。自己移植は、有益には、組織適合性および拒絶に関する懸念を取り除く。

【0023】

さらなる好ましい実施形態によれば、少なくとも1つの第1の生体構造が、第1の種類
10
の細胞および/または第2の種類
の細胞によってゲル中で(少なくとも部分的または完全に)形成された後、第3の種類(またはさらなる種類)の細胞がゲル上に播種される。第3の種類
の細胞を播種した後、ゲル中および/または上、好ましくはゲル上で少なくとも1つの第2の生体構造が形成するまで、ゲルは、好ましくは、適切な培地中で培養される。しかしながら、移植はまた、第2の生体構造が部分的または完全に形成される前でもよい。第2の生体構造は第1の生体構造と同じ種類であってもよいが、好ましくは、(第1の種類
の細胞および/または第2の種類
の細胞によって形成される生体構造の種類と)異なる種類の生体構造である。好ましくは、第3の種類
の細胞によって/から形成される第2の生体構造は表皮構造である。

【0024】

好ましくは、ゲルは、特定の細胞種類の細胞成長のために適切な細胞培養培地を含有する
20
フラスコ内でそれぞれの細胞と共培養される。少なくとも第2の生体構造を誘導するために、ヒドロゲル上に播種される第3の種類
の細胞は、通常、身体、好ましくはヒトまたは他の哺乳動物の身体に存在する細胞種類のいずれかであってもよい。第3の種類(またはさらなる種類)の細胞は、第1の生体構造を形成するために播種される細胞と同じおよび/または異なる種類であってもよい。好ましくは、表皮生体構造を誘導するために、ケラチノサイトが使用される。しかしながら、他の可能な細胞は、例えばメラノサイト、メルケル細胞、免疫系の細胞、脂肪組織由来細胞、表皮に由来しない上皮細胞、幹細胞、前駆細胞、遺伝子改変細胞などである。

【0025】

好ましくは、第1の種類および/または第2の種類および/または第3の(またはさらなる)種類
30
の細胞は、哺乳動物細胞、最も好ましくはヒト細胞である。ゲルに播種するために使用される細胞が自己移植細胞である場合、特に有益である。

【0026】

特に好ましい実施形態による上述の方法は、毛細血管および/またはリンパ毛細管、好ましくはその両方によって予め脈管が新生されたヒト表皮-真皮皮膚代用物のインビトロ
40
での生物学およびインビボでの移植に関する。hLEC(ヒト包皮から単離した)およびHDMEC(ヒト包皮から単離した)に存在するhLEC画分の両方の純粋な集団を、フィブリンまたはI型コラーゲンヒドロゲル中で21日以内にインビトロで管腔形成真正リンパ毛細管内で成長させた。操作した微小脈管のリンパ管の性質は、それらが固着線維を提示し、全ての主要なリンパ管マーカーを発現し、リンパ管新生および抗リンパ管新生刺激の両方によって調節され得ることを示すことによって確認した。リンパ管の機能性は、生物学によって操作したリンパ微小管が、インビトロで間質腔から流体を吸収し、インビボで流体排出を誘発したことを実証することによって確認した。インビボでの移植研究は、操作したリンパ微小管がそれらの管腔およびそれらの典型的な特徴、例えば完全な基底膜の不在および壁細胞被覆の欠如を維持したことを明らかにした。生物学によって操作したヒトリンパ管は、移植後14日ほどの早さで受容者のリンパ管と吻合することが見出された。免疫不全ラットへ移植すると、予め脈管を新生した真皮は表皮の成長を支援し、将来、これらの予め脈管を新生した表皮-真皮代用物を臨床応用へ置き換えることが可能であり得ることを示す。

10

20

30

40

50

【0027】

さらに、毛細血管がヒト脂肪組織（SVF）の脈管の間質画分を使用することによってヒドロゲル中で操作され得る。SVF細胞は脈管形成の可能性が高いことが示されている。SVF細胞をヒト表皮-真皮皮膚移植片における機能的毛管網内で成長させた。移植後、移植片を採取し、迅速な移植片かん流により再構築すると、移植した移植片の生存および機能性が支持された。これまで、脂肪組織由来の内皮細胞（間質脈管画分、SVF）を使用することによって予め脈管を新生した表皮-真皮皮膚移植片の生物学についての利用可能なデータは存在していない。他の組織から単離した内皮細胞に対するSVF細胞の利点は以下の通りである：第1に、単一のSVF生検は理想的な割合で自己移植間質、脈管新生および壁細胞をつくる。第2に、SVF細胞は、全ての年代の群にわたって、さらに高齢の患者または熱傷を有する患者においてさえ脈管新生の可能性が高いことを示す。第3に、SVFの細胞は完全に自動化された手順で多量に単離され得るので、それらはインビトロでの増加を必要とせず、例えば直接的な術中使用のために新たに使用され得る。

10

【0028】

本発明による移植片は、皮膚、角膜、軟骨、内皮、弁などのヒトの身体における任意の組織、または腺、毛髪、神経、筋肉などの他の構造を操作するために使用されてもよく、それらは、例えば薬物スクリーニングのための試験手段として使用されてもよい。

【0029】

本発明の第1の態様による上述の予め脈管を新生した移植片は、試験およびスクリーニングなどの研究目的、ならびに例えばマウスおよびラットなどの小動物モデルへの移植に適している。本発明の方法によれば、完全に機能的な管腔形成ヒト毛細管、血管およびリンパ管の両方がインビトロでヒドロゲル中で操作され得る。しかしながら、例えば、ブタおよびウサギなどの大型動物での試験のために、またはより重要なことには、ヒトのより大きく、より薄く、より機械的に安定な構築物における臨床試験のために必要とされる。

20

【0030】

したがって、本発明の第2のより進化した態様によれば、上述の実施形態に従って組織移植片を製造するための方法が提供され、その方法においてさらに、第1および/または第2の種類（またはさらなる種類）の細胞をゲルに播種した後、ゲルは好ましくは圧縮によって圧密化される。

【0031】

細胞を播種したコラーゲンゲルは組織等価インプラントについての優れた生体模倣開始点であることが示されている（例えば欧州特許第1773416（B1）号）が、その機械的脆弱性が欠点である。ゲル圧密化の工程を加えることによって、機械的強度に関するその不十分さを補うことなくゲル（例えばコラーゲン製）の最適な特徴を使用することができる。それによって、非常に薄い移植片、すなわち組織/器官の生理学的厚さの移植片が、機械的強度を犠牲にせずに生成され得る。圧密化/圧縮による、特定の厚さを有するゲルの機械的強度の増加だけでなく、圧密化/圧縮による非常に薄いゲルの機械的安定性もまた、非常に厚い厚さを有するゲルの機械的安定性よりさらに高くなる。

30

【0032】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、ゲルは、塑性圧密化、好ましくは圧縮装置での圧縮、好ましくは機械的圧縮力をゲルに加えることによって圧密化される。それによって、足場マトリクスの密度および機械的強度が増加する。

40

【0033】

本出願の意味において「塑性圧密化」は、体積を減少させるようにゲルを変形させ、それによりゲルは、圧密化の原因を取り除いた後でさえ、実質的にその新たな体積を維持することを意味する。ゲルの体積は、好ましくは、少なくとも40%、好ましくは最大90%減少する。

【0034】

この説明に関して圧密化は、迅速な細胞とは関係のないプロセスであり、ゲルを物理的処理、例えば外力または圧力に供し、ゲルから間隙液を排出する。したがって、塑性圧縮

50

はゲル内で培養される細胞の作用から独立している。圧密化の量および程度はゲルの厚さの所望の減少に応じて変化させてもよい。ゲルの圧密化は、少なくとも1つの第1の生体構造の形成前または後に実施され得る。表皮 - 真皮皮膚移植片の好ましい実施形態に関して、圧密化は予め脈管が新生したゲルに適用される。つまり、この好ましい実施形態によれば、ゲルの圧縮は脈管生体構造を既に含有しているゲルで実施される。驚くべきことに、生体構造の発生、すなわちこの場合、脈管網の発生はヒドロゲルの塑性圧密化 / 圧縮による影響を受けない。好ましくは、ゲルの圧密化後に第3の種類（またはさらなる種類）の細胞がゲルに播種される。例えば、表皮 - 真皮皮膚移植片の好ましい実施形態に関して、ゲル表面上の表皮構造は別のやり方では圧縮により損傷される。

【0035】

圧縮されていない状態のゲルは第1の厚さを有し、ゲルが圧縮状態において、第1の厚さより3 ~ 20倍小さい第2の厚さ、好ましくは約10倍小さい第2の厚さに到達するまで圧密化が実施される。表皮 - 真皮皮膚移植片に関して、例えば、圧縮状態におけるゲルの好ましい厚さは約0.7 ~ 1mmであり、これは皮膚の生理学的厚さに相当する。

【0036】

ゲルは、特定の細胞種類の細胞成長に適した培地を含有するフラスコ内でそれぞれの細胞と共培養され得る。好ましくは、ゲルは圧縮のためにフラスコから除去され、圧縮後、さらなる培養のためにフラスコに戻される。

【0037】

本発明はさらに、ゲルを含む組織移植片に関し、そのゲルは、ゲル中および / または上、好ましくはゲル中で少なくとも第1の種類および / または第2の種類の細胞から（インビトロで）形成された少なくとも1つの第1の生体構造を含む。好ましくは、組織移植片は、ゲル中および / または上、好ましくはゲル上で少なくとも第3の種類の細胞から形成された少なくとも1つの第2の生体構造をさらに含む。好ましくは、第1および / または第2および / または第3の種類（またはさらなる種類）の細胞はヒト由来、より好ましくは自己移植ヒト由来である。

【0038】

好ましくは、移植片は上述の実施形態の1つによる方法によって生成された。

【0039】

第1および / または第2の生体構造は、器官構造または組織構造、好ましくは、腺状上皮構造、胎盤上皮構造または羊膜上皮構造を含む上皮構造；脈管構造、好ましくは血管および / またはリンパ管構造；神経構造；骨構造、毛髪構造、爪構造、歯構造、間葉構造、筋肉構造、脂肪構造を含む結合組織構造からなる群から選択される。第1および / または第2の生体構造は、好ましくは、神経堤、トロホプラスト由来の細胞、生殖細胞、幹細胞、前駆細胞、遺伝子改変細胞を含む、内胚葉由来の細胞、中胚葉由来の細胞、外胚葉由来の細胞からなる群から選択される細胞を含む。

【0040】

例示的な好ましい実施形態によれば、移植片は、好ましくは、少なくとも3 : 7、より好ましくは少なくとも2 : 3、最も好ましくは約1 : 1の線維芽細胞対内皮細胞の比で、ゲル中の自己移植ヒト内皮細胞および自己移植ヒト線維芽細胞を含む。

【0041】

第1の生体構造は、好ましくは脈管生体構造、好ましくは毛細血管および / またはリンパ毛細管の脈管網である。第2の生体構造は、好ましくは表皮生体構造である。有益には、第1の生体構造はゲル中で形成される脈管生体構造であり、第2の生体構造はゲル上で形成される表皮生体構造である。

【0042】

第1の生体構造がゲル中の毛細血管およびリンパ毛細管の脈管網である場合、好ましくは、そのゲル中のリンパ毛細管は、生理学的サイズ、好ましくは17 ~ 60 μm の途切れない管腔を有する。これらの管腔形成リンパ毛細管は、好ましくは固着線維、好ましくはフィブリン固着線維を有する。

10

20

30

40

50

【0043】

移植片の足場を形成するゲルは、好ましくは、フィブリンまたはコラーゲンヒドロゲル、好ましくはI型コラーゲンヒドロゲルである。好ましくは、ゲルは圧密化され、好ましくは圧縮されたヒドロゲルである。好ましくは、ゲルは欧州特許第13174441号に開示されている装置において圧縮される。

【0044】

最も好ましくは、組織移植片は表皮-真皮皮膚移植片であり、好ましくは第1の生体構造に含まれる細胞はHDMECまたはSVF細胞であり、第2の生体構造に含まれる細胞はケラチノサイト、好ましくは表皮ケラチノサイトである。特に表皮-真皮皮膚移植片の場合、移植片は、好ましくは0.2~3mm、好ましくは0.7~1mmの厚さを有する。

10

【0045】

ヒドロゲル足場に基づいた自己移植の生物学によって操作された予め脈管を新生した表皮-真皮皮膚移植片はインビボで再生する能力を示した。実際に移植後、予め形成した毛細管は、受容者の脈管構造に機能的に結合し、表皮および真皮再生が大いに支援された(Marinoら 2014、Bioengineering dermo-epidermal skin grafts with blood and lymphatic capillaries、Sci Transl Med. 2014 Jan 29; 6(221):221ra14およびKlarら 2014、Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with adipose-derived cells、Biomaterials. 2014 Jun; 35(19):5065-78)。

20

【0046】

本発明による方法は特に、損傷または疾患内因性組織(組織移植片)を修復または置き換えるための、組織等価インプラント、または個体への移植のための手段の生成に有用である。このような欠陥組織の例としては、皮膚、神経、腱、軟骨、骨、泌尿生殖器、肝臓、心肺組織、腎臓、眼組織、血管、腸および腺が挙げられる。組織移植片が表皮-真皮皮膚移植片である場合、損傷した組織は、好ましくは皮膚組織である。脈管が新生していない皮膚移植片と比べて、脈管が新生したヒドロゲルの表皮-真皮皮膚移植片はインビボでより迅速で良好に再生することが示されるので、それらは例えば熱傷および他の皮膚欠陥の処置において臨床的に適用可能であり得る。

30

【0047】

本発明を利用して、ヒトの血管およびリンパ管の両方が1つの組織または器官移植片において操作され得る。インビトロで生成した毛細管網は皮膚構成要素の血流を顕著に支援するので、酸素および栄養素への迅速で効果的なアクセスを提供し、このことは、皮膚移植の迅速な取り込み、増殖および分化を確実にする(Bottcher-Haberzethら、Tissue engineering of skin、Burns 36、450-460(2010))。予め形成されたリンパ毛細管網を表皮-真皮皮膚移植片内に生物学により操作することは、リンパ排水を改善し、組織液恒常性の確立を加速させることによって血清腫形成を回避するのに役立つはずである。

40

【0048】

本発明のさらなる実施形態は従属請求項に定められる。

【0049】

本発明の好ましい実施形態は図面を参照して以下に記載され、それらは本発明の現在の好ましい実施形態を例示する目的のためであり、それらを限定する目的のためではない。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】大きいヒドロゲルの調製を示し、A)は全体的なヒドロゲル培養および操作を示し、B)は薄い圧縮されていないヒドロゲルの操作および稠度を示し、C)は厚い圧縮されていないヒドロゲルの操作および稠度を示し、D)は薄い圧縮されたヒドロゲルの操作

50

および稠度を示す。

【図2】概略的な棒グラフにおける機械的安定性およびヒドロゲル厚さの相関関係を示す。

【図3】脈管構造を含むヒドロゲルの生成プロセスの概略的な図を示す。最初に、脈管構造を含む大きな圧縮したヒドロゲルの生成についての工程の順序を示し(A)、大きな脈管が新生した表皮-真皮移植片を示し(B)、続いて免疫蛍光研究(C、Dの上側パネル、D')および組織切片(Dの下側パネル)におけるこのような方法の結果を示す。

【図4】圧縮されていない予め脈管が新生した組織移植片について、a)毛細管領域に対する、b)分岐点の数/mm²に対する、c)平均毛細管直径(μm)に対する、内皮細胞(HDMEC)対皮膚繊維芽細胞の比を示す。

【図5】圧縮されていないヒドロゲルに対する圧縮したヒドロゲルにおける変化のない脈管の特徴を示す。a)脈管領域を示し、b)分岐点の量を示し、c)脈管長さを示す。

【図6】工程の順序に対して2つのバリエーションの脈管生体構造を含む圧縮したヒドロゲルの生成プロセスの概略図を示す。

【図7】圧縮した予め脈管が新生した組織移植片の生成の写真の記録を示す。フラスコ組み立ておよびヒドロゲル調製の写真の記録を示す。

【図8】圧縮した予め脈管が新生した組織移植片の生成の写真の記録を示す。圧縮装置の組み立ての写真の記録を示す。

【図9】圧縮した予め脈管が新生した組織移植片の生成の写真の記録を示す。圧縮工程の写真の記録を示す。

【図10】圧縮した予め脈管が新生した組織移植片の生成の写真の記録を示す。ゲル移動工程の写真の記録を示す。

【発明を実施するための形態】

【0051】

本発明は、従来技術と対照的に、患者の皮膚細胞を含まない皮膚移植片に関する。本発明はまた、エキソピポ(インピトロ)で「予め脈管が新生し」、次いで創傷上に移植されるリンパ毛細管および/または毛細血管の両方にも関する。表皮-真皮皮膚移植片は、ヒト包皮由来のHDMECまたはヒト脂肪組織由来のSVFを採取し、それらを三次元ヒドロゲルに埋め込むことによって作製される。HDMECおよびヒト線維芽細胞またはSVF細胞およびケラチノサイトを含む、操作した皮膚移植片をインピポに移動させ、ヌードラット(機能的免疫系を有さない動物)の創傷した背部に移植した。2週間後にヒト皮膚移植片が予期した皮膚層を形成し、毛細管が既存のラットの毛細管と機能的に結合した。これらの操作された表皮-真皮ヒドロゲルは、次世代の皮膚移植片を表す可能性があり、血管および/またはリンパ管生体構造を備え、移植する準備ができています。

【実施例】

【0052】

実施例1:

毛細血管およびリンパ毛細管を含む、圧縮されていない予め脈管が新生した表皮-真皮皮膚移植片の生成

脈管(血管およびリンパ管)網を含むヒト表皮-真皮皮膚移植片のラットへの移植をモニターした。最初に、皮膚移植片を、フィブリンヒドロゲル中で、CD31陽性(CD31+)HDMEC、ヒトCD90陽性(CD90+)線維芽細胞、およびヒトケラチン5陽性(K5+)ケラチノサイトを使用してインピトロで作製した。

【0053】

移植片の皮膚区画を構成する両方の細胞種類を、表皮区画である、ケラチノサイトのいくつかの層の下に配置した(共焦点顕微鏡により可視化し、確認した)。次いでこれらの皮膚移植片を、ラットケラチノサイトの競合的、側部内側成長/過剰成長を回避するためにFusenigチャンパを使用して免疫不全nu/nuラットの創傷した背部に移植した。移植の2週間後、ヒト皮膚代用物をラットの下部組織から外科的に除去し、皮膚構造および新脈管形成について分析した。脈管形成した新たな真皮(neodermis)は

10

20

30

40

50

上を覆う表皮の成層を支援した。2週間後の免疫蛍光分析により、新たな真皮においてヒトの微小血管および微小リンパ管の両方の存在が明らかになった。生物学により操作したProx1-陽性/CD31-陽性(Prox1+/CD31+)微小リンパ管のほとんどはインビボでそれらの管腔を維持した。Lyve-1およびポドプラニンを発現するヒト微小管を検出し、ヒトのリンパ毛細管が、移植の2週間後、インタクトなままであることが示される。CD31のみを発現した微小血管も検出した。注目すべきことに、2つの異なる種類の微小管は吻合しなかったことが見出された。毛細管のさらなる分析により、ヒトの微小リンパ管がフィブリン+固着線維を提示したことが明らかになり、このことは、毛細管が間質圧変化に反応し、インビボで組織液蓄積を消失できることを強く示唆している。さらに、生物学により操作したヒトのリンパ毛細管は壁細胞被覆を欠いていた。リンパ排液実験を実施して、生物学により操作したリンパ毛細管がインビボで機能するかどうかを調べた。少量(25 μ l)のエバンスブルーを、移植の15日後に移植片に注入した。注入の30分後に移植片を分析すると、約5倍多いエバンスブルーが、ヒトのリンパ毛細管および毛細血管を含むヒドロゲルと比較して、ヒトの線維芽細胞のみを含むヒドロゲル中に保持され、このことは、予め脈管が新生した移植片におけるリンパ排液機能を示す。このデータにより、移植したヒトのリンパ管が、受容者のリンパ管によって認識され、それらと吻合すること、および新たに発生したリンパ管網がインビボで体液を効果的に排出したことが示唆される。

10

【0054】

実施例1についての材料および方法：

20

ヒト細胞(ケラチノサイト、線維芽細胞および内皮細胞)を、Marinoら、2014、Bioengineering Dermo-Epidermal Skin Grafts with Blood and Lymphatic Capillaries、Sci. Transl. Med. 6、221ra14(2014)に記載されるように単離した。この研究において、最初に、hLECを3Dヒドロゲル内でヒト皮膚線維芽細胞と共培養して、管腔を形成する真正のリンパ毛細管内で発生するLECの能力を調べた。しかしながら、次にLECよりむしろHDMECを使用して、予め脈管が新生した表皮-真皮皮膚代用物を操作した。HDMECは皮膚血管とLECの混合物であるので、それらを選択した。したがって、それらの細胞は両方の種類の毛細管を生じる可能性を有する。

30

【0055】

HDMECおよび皮膚線維芽細胞の単離および培養：

HDMEC(ヒト皮膚微小管内皮細胞)およびヒト皮膚線維芽細胞を、慣用の包皮切除後、University Children's Hospital of Zurichから得た包皮(n=8)から同時に単離した。Montanoら、Formation of human capillaries in vitro: The engineering of prevascularized matrices. Tissue Eng. Part A 16、269-282(2010)に記載されるように包皮を処理した。単離したHDMECおよび線維芽細胞を、内皮細胞成長培地-2(内皮細胞補足物を有するEBM-2MV; Lonza)入りの0.1%のゼラチンで被覆した皿(Sigma-Aldrich)で共培養した。毎日、機械的に擦ることによって線維芽細胞を除去した。CD90(Dianova)およびCD31(DakoCytomation)についてのFACS分析を使用して、線維芽細胞およびHDMEC(それらの比は全ての実験において1:1であった)の数を算出した。細胞は全ての実験において継代1で使用した。

40

【0056】

ヒドロゲルにおける毛細管の生成：

フィブリンまたはコラーゲンヒドロゲルを、3mm孔を有する膜(BD Falcon)を有する6ウェル培養挿入物からなるTranswellシステムを用いて生成した。簡潔に述べると、フィブリンヒドロゲルについて、ウシ血漿由来のフィブリノゲン(Si

50

gma - Aldrich) を NaCl 中で 10 mg/ml の最終濃度に再構成し、次いで 11 ml のトロンピン (Sigma - Aldrich、100 U/ml) を加えた。コラーゲンヒドロゲルについて、膜をラットの尾の I 型コラーゲンヒドロゲル (3.2 ~ 3.4 mg/ml、BD Biosciences) で被覆した。Montano ら、2010 に記載されるようにコラーゲンマトリクスを調製した。1 ml のヒドロゲル溶液に、100,000 個のヒト皮膚細胞 (HDMEC / 線維芽細胞、1:1) (最初、調査目的のためのみ、40,000 個のヒト皮膚線維芽細胞と組み合わせて 60,000 個の hLEC (Marino ら、2014 に従って単離した)) を加え、6 ウェルプレートについて挿入物内に移した。室温にて凝固させた後、調製物を 37 °C にて 35 分間、5% の CO₂ を含有する加湿インキュベーター内でインキュベートして、重合を確実にした。インキュベーション期間の終わりに、培養培地を上側および下側チャンバ [内皮細胞成長培地 - 2 (内皮細胞補足物を含む EBM - 2 MV; Lonza)] に加え、ヒドロゲルを最大 3 週間インキュベートした。培地は 2 日毎に変化させた。

10

【0057】

リンパ管形成における線維芽細胞の役割についての試験：

Marino ら、2014 に記載されるように、上記のようにフィブリンヒドロゲルを生成し、インビトロで 3 週間培養した。0 個の線維芽細胞 / 100,000 個の LEC を有するヒドロゲルを、培養培地、培養培地および VEGF - A (40 ng/ml、Chemicon)、培養培地および VEGF - C (100 ng/ml、R&D Systems)、または線維芽細胞馴化培養培地のいずれかで培養した。10,000 個の線維芽細胞 / 90,000 個の LEC または 40,000 個の線維芽細胞 / 60,000 個の LEC を有するヒドロゲルを培養培地中で成長させた。Transwell アッセイのために、100,000 個の線維芽細胞を Transwell の下側に播種し、一方、100,000 個の LEC を有するヒドロゲルを上部で培養した。少しの数の線維芽細胞の移動を、ヒドロゲル内の多孔質膜を介して挿入物の下側から観察した。培養培地は毎日変化させた。

20

【0058】

毛細管形成は線維芽細胞の不在下では起こらなかった。同様に、線維芽細胞馴化培地、血管内皮細胞成長因子 - A (VEGF - A) または VEGF - C の添加も、Transwell システムの下側での線維芽細胞の存在のいずれも、hLEC において毛細管形成を誘導しなかった。したがって、ヒト皮膚線維芽細胞と LEC との間の物理的接触は、ヒドロゲルにおける真正の分岐リンパ毛細管の発生に必要であった。組織構造により、操作した毛細管が、ホールマウント (whole-mount) 標本で測定して生理学的サイズ (17 ~ 60 μm) の途切れのない管腔を発生したことが明らかになった。リンパ毛細管の性質を、ホールマウントヒドロゲル調製物で実施した二重免疫蛍光染色によって確認した。生物学によって操作したリンパ毛細管は CD31 およびリンパ管特異的核転写因子 Prox1 を発現した。毛細管のほとんどは核の生理学的サイズ (直径 10 μm) を示した。2 つの他のリンパ管マーカーである Lyve - 1 およびポドプラニン は、生物学により操作されたヒト毛細管のリンパ管の性質を実証した。

30

【0059】

図 4 に示した試験の結果において、毛細管領域 (図 4 a)、分岐点の数 / mm² (図 4 b) および平均毛細管直径 (図 4 c) を観察し、様々な割合の内皮細胞 (HDMEC) 対線維芽細胞に関して定量した。3 つのパラメーター a) - c) の全てに関して、1:1 の割合の内皮細胞対線維芽細胞の播種は、圧縮されていないゲル中の毛細管形成に関して最適な割合であることが示されたのに対して、2:3 および 3:7 の割合もまた、プラスの結果を示した。

40

【0060】

予め脈管が新生した皮膚移植片の調製：

2 週間の培養後、100 万個のヒトケラチノサイト (Brazilius ら、2012 に記載されるように単離した) を、予め脈管が新生したフィブリンヒドロゲルの上部に播

50

種した。その1週間後、移植またはホールマウント免疫染色を実施した。

【0061】

生物学により操作した皮膚移植片の免疫不全 *nu/nu* ラットへの移植：

免疫不全のメスの *nu/nu* ラット (Elevage Janvier) ($n = 12$) を5%イソフルレン (Baxter) の吸入によって麻酔し、マスクを介する2.5%イソフルレンの吸入によって昏睡状態を維持した。手術の前に、鎮痛のためにブプレノルフィン (0.5 mg/kg) (Temgesic) および眼の保護のためにレチノールクリーム (ビタミンA「Blache」; Bausch & Lomb) を適用した。側部からの創傷閉鎖およびラット組織によるヒト移植の過剰成長を防ぐために、特別なポリプロピレンリング (改変したFusenigチャンバ)、2.6 cm直径を本発明者らの実験室で設計した。リングを、非吸収性ポリエステル縫合糸 (Ethibond; Ethicon) を用いてラットの背部に作り出した皮膚欠陥の全層に縫合した。直径約2.6 cm および3~8 mmの厚さの培養した予め脈管が新生した表皮-真皮円形皮膚移植片をポリプロピレンリングに入れ、シリコンホイル (Silon-SES; Bio Med Sciences) およびポリウレタンスポンジ (Ligasano; Ligamed) で被覆した。手術の15日後にラットを屠殺した。屠殺時に、包帯および縫合を取り除き、複数の移植生検 ($n = 12$) を異なる分析のために採取した。

10

【0062】

実施例2：

SVF細胞によって生成された毛細血管を含む圧縮されていない予め脈管が新生した表皮-真皮皮膚移植片の生成

20

血管網を含むヒト表皮-真皮皮膚移植片のラットへの移植をモニターした。最初に、フィブリンヒドロゲル中でSVF細胞およびケラチノサイトを使用して皮膚移植片をインビトロで作製した。

【0063】

SVF細胞を、表皮区画であるケラチノサイトのいくつかの層の下に配置した (共焦点顕微鏡によって可視化し、確認した)。次いでこれらの皮膚移植片を、ラットケラチノサイトの競合的、側部内側成長/過剰成長を回避するためにFusenigチャンバを使用して免疫不全 *nu/nu* ラットの創傷した背部に移植した。移植の2週間後、ヒト皮膚代用物をラットの下部組織から外科的に除去し、皮膚構造および新脈管形成について分析した。脈管形成した新たな真皮は上を覆う表皮の成層を支援した。2週間後の免疫蛍光分析により、新たな真皮におけるヒトの血管の存在が明らかになった。生物学により操作した微小管はインビボでそれらの管腔を維持し、移植後4日ほどの早さで受容者の脈管系と吻合し、移植片をかん流した。この迅速なかん流は皮膚の生存および機能性を誘発した。

30

【0064】

実施例2についての材料および方法：

ヒト細胞 (ケラチノサイトおよびSVF細胞) を、Klar⁵, 2014, Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with adipose-derived cells, Biomaterials, 2014 Jun; 35 (19): 5065-78 に記載されるように単離した。この研究において、SVF細胞を使用して、予め脈管が新生した表皮-真皮皮膚代用物を操作した。

40

【0065】

細胞単離および培養：

ヒトの皮下脂肪組織試料を、健常なヒトドナー (18~68歳) の女性または男性の主に腹部の身体部分由来の脂肪吸引物 (lipoaspirate) または脂肪切除物から得た。それらの全ては外科的脂肪吸引または切除術を受けていた。脂肪吸引物または切除した脂肪試料を小さな部分に切り刻み、37 °Cにて60分間、振盪しながら0.075% (W/V) のI型コラゲナーゼ (355 U/mg, Worthington, Lakewood, NJ, USA) で消化した。200 gにて10分間の遠心分離後、油および水

50

層を捨てた。得られたペレットをリン酸緩衝液 (PBS、Gibco、Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) 中で洗浄し、100mmおよび40mmのストレーナーに通した。赤血球を2分間、0.15M/lの塩化アンモニウム、1.0mM/lの炭酸水素カリウム (両方、Merck、Darmstadt、ドイツ)、および0.1mM/lのNa-EDTA (Fluka Analytical、Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、スイス) を含有する緩衝液を用いてインキュベーションにより溶解した。遠心分離およびPBS中での洗浄後、SVF細胞ペレットを、10%ウシ胎仔血清 (FBS) を補足したa-改変イーグル培地 (a-MEM、Gibco)、1%hepes、1%ピルビン酸ナトリウムおよび1%ペニシリンストレプトマイシングルタミン (100x) 溶液 (全てGibco製) からなる完全培地 (CM) 中で再懸濁し、クリスタルバイオレット (Sigma) で染色し、Neubauerチャンパを使用することによって計数した。1.6-0.9x10⁵個の有核細胞を1mlの脂肪吸引生検から、および1-0.55x10⁵個の有核細胞を1gの切除生検から慣用的に単離した。単層増加のために、SVF細胞を組織培養プレート上で2x10³個の細胞/cm²の密度で播種し、さらに5ng/mlのFGF-2 (R&D Systems) を補足したCM中で培養し、コンフルエントな場合、3x10³個の細胞/cm²の密度で継代した。ドナーが一致した単層が増加した脂肪由来細胞は、新たに単離したSVF細胞の集団と区別するために、以下で脂肪間質細胞 (ASC) と称する。インビトロで、および移植後、操作したヒト皮膚代用物の質および自己複製能を評価するために、Pontiggiaら、Markersに記載されるようにヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) およびケラチノサイト (KC) を包皮 (2~18歳の男性) から単離し、増加させた (J. Invest. Dermatol. 2009; 129: 480-90)。

【0066】

予め脈管が新生したヒドロゲルの調製:

10mg/mlの最終濃度にて0.9%のNaCl中で再構成したウシ血漿由来のフィブリノゲン (Sigma-Aldrich) を使用してフィブリンヒドロゲルを調製した。比較可能な細胞を獲得するために、ヒドロゲル内に3x10⁵個のSVF細胞、7.5x10⁴個のASCまたは7.5x10⁴個のHDF/3mlゲルを播種した。SVF細胞の濃度を、移植前に機能的および均質な皮膚毛細管網を生成することに関して最適化した。対応する予め脈管が新生した移植片は、移植の3~4日後に効果的なかん流が開始した。細胞の播種密度を、SVFにおけるよりASCにおいて約4倍高い、間葉細胞の数に応じて正規化した。本発明者らは、皮膚を再構成するために1mlのヒドロゲル当たり1x10⁵個のSVF細胞を播種した。細胞を遠心分離し、100mlのEGM-2MV培地 (Lonza、Basel、スイス) 中に再懸濁し、3mlのフィブリノゲン溶液と混合した。ゲルを、3.0mmの孔サイズの膜 (BD Falcon、ドイツ) を有する6ウェル細胞培養挿入物に入れた。33mlのトロンピン (Sigma-Aldrich、100U/ml) を添加することによって重合を開始し、ゲルを室温にて10分間、続いて37にて1時間、5%CO₂を含有する加湿インキュベーター中で維持した。コラーゲンヒドロゲルを調製するために、ラットI型コラーゲン (BD Bioscience、Franklin Lakes、NJ、USA) を、0.15MのNaOHを含有する0.2mlの中和緩衝液と混合した。重合期間の後、EGM-2MVをフィブリン/コラーゲンヒドロゲルの上側および下側チャンパに加え、それらを1または3週間インキュベートし、脈管網形成について分析した。移植のための表皮-真皮皮膚代用物 (DESS) を調製するために、細胞をEGM-2MV培地におけるフィブリン/コラーゲンヒドロゲル中で2週間培養し、続いてケラチノサイト (7.5x10⁴/ゲル) により被覆し、さらに1週間培養し、免疫不全ラットに移植した。間質細胞 (ECを有するまたは有さない) が皮膚区画を形成したのに対して、ケラチノサイトはDESSの表皮区画において優勢な細胞種類を構成した。vascDESSの皮膚区画はインビトロで予め脈管が新生したので、それは既にヒトの操作した毛細管の成熟網を含んだ。

【0067】

組織操作した皮膚代用物の移植：

外科手術プロトコルは、地域の動物実験委員会 (Committee for Experimental Animal Research) (認可番号76/2011) によって承認された。8~10週齢の免疫不全のメスのnu/nuラット (Harlan Laboratories, The Netherlands) を準備し、(Pontiggiaら、2009に記載されるように) 麻酔した；SVF (1回の条件当たりn=6；18匹のラット) およびASC (1回の条件当たりn=6；18匹のラット) についての3つの独立したドナー、およびHDF (1回の条件当たりn=4；12匹のラット) についての4つの独立したドナー (合計48匹のラット) (Schneiderら、Matriderm versus Integra: a comparative experimental study. Burns 2009；35:51-7)。DESSを、ラットの背部に外科的に作り出した皮膚欠陥の全層に移植した。移植を保護し、周囲のラットの皮膚からの創傷閉鎖を防ぐために、特注の鋼リング (直径2.6cm) を、ラットの背部に作り出した皮膚欠陥の全層内に、非吸収性ポリエステル縫合糸 (Ethibond、Ethicon、USA) を使用して縫合した。次いで移植を、シリコーンホイール (Silon-SES、BMS、USA)、ポリウレタンスポンジ (Ligasano、Ligamed、オーストリア)、粘着適合包帯 (Sincohaft、Theo Frey AG、スイス)、および創傷包帯としてテープで被覆した。これらの手段によって、包帯を巻いた部位を完全に保護し、ラットは移植を引っ掻くことができなかった。包帯の交換および写真の記録を1週間に1回実施した。4、7および14日後、移植した皮膚類似物を切除し、凍結およびパラフィン切片、ならびに電子顕微鏡検査のために処理した。

10

20

30

40

50

【0068】

実施例3：

圧縮した予め脈管が新生した表皮-真皮皮膚移植片の生成

実施例3についての材料および方法：

ヒト細胞 (ケラチノサイト、線維芽細胞および内皮細胞) を上記のように単離した。組織移植片を、図7~10を参照して以下に記載されるように7×8cmサイズのヒドロゲルから調製した。機械的安定性を得るために、改変した塑性圧縮を、欧州特許第13174441号による圧縮装置を用いて実施した。

【0069】

ヒドロゲルの調製 (図7に示す)：

図7に示すように、挿入フレーム (A) および挿入物 (B) を115cm²の組織培養フラスコに入れる。100万個の線維芽細胞/内皮細胞 (1:1の比) を4mlの内皮細胞培地 (「細胞」) 中で再懸濁する。18±1mlのコラーゲンヒドロゲルを管に注ぐ (「ヒドロゲル」)。850μlの濾過した酢酸を「ヒドロゲル」 (「混合物」) に加える。「混合物」を、管を穏やかに回転させることによって混合する。

- 7.5±0.2mlの再構成緩衝液の細胞への添加 (「細胞+RB」) (再構成緩衝液は、Aqua ad injectabilia、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、HEPES緩衝液を含み；オリジナルの配合について、Costeaら：Crucial Effects of Fibroblasts and Keratinocyte Growth Factor on Morphogenesis of Reconstituted Human Oral Epithelium. J Invest Dermatol 121:1479-1486、2003を参照のこと)。

- 「細胞+RB」を、管を穏やかに反転させることによって混合する。

- 「細胞+RB」を「混合物」： (「最終ヒドロゲル」) に移す。

- 「最終ヒドロゲル」を、管を穏やかに反転させることによって混合する。

- 「最終ヒドロゲル」を、フラスコ内の挿入物 (B) に注ぐ。

【0070】

ゲル化：

フラスコを室温（18～26℃）にて10±2分間インキュベートし、続いて37±1℃にて30±1分間インキュベートした。

【0071】

圧縮装置の組み立て（図8に示す）：

機械的安定性を得るために、改変された塑性圧縮を、図8に示すように欧州特許第13174441号による圧縮装置を用いて実施した。

- ベーストレイ（C）をベースフレーム（D）に置く。
- 多孔プレート（E）をベーストレイに置く。
- スペース（F）をベーストレイに置く。
- ピストンプレート（G）を上部プレートに置く。

10

【0072】

圧縮（図9に示す）：

- フラスコの挿入物を圧縮装置（H）に移す。
- ピストンプレート（I）を有する上部プレートを圧縮装置に加える。
- 3つの圧縮重り（J）を圧縮装置に連続して加える：
5分間150g、次いで5分間150g+200g、次いで5分間150g+200g+500g。

【0073】

ゲル移動（図10に示す）：

- 15±1分の圧縮時間後、圧縮達成を視覚的に調べる。
- 圧縮重りを圧縮装置から除去する。
- ピストンプレートを上部プレート（クリック機構）から開ける。
- 上部プレートを、ピストンプレートが挿入物に残った状態で圧縮装置から除去する。
- ピストンプレートを、一方の側で最初に注意深く持ち上げ、次いで他方の側でヒドロゲル（K）をかき乱さないことによって膜挿入物から除去する。

20

【0074】

ゲル培養：

- ゲルを有する挿入物をフラスコの挿入フレームに移す。
- 90mlの内皮細胞培地をフラスコ基部（バリア内）に加える。ヒドロゲルは培地中に完全に浸さなければならない。
- 10mlの内皮細胞培地をゲル（挿入物内）に加える。ヒドロゲルは培地中に完全に浸さなければならない。
- フラスコを21日間インキュベーター内に保存して脈管生体構造を形成させる。

30

【0075】

ケラチノサイト播種：

- 800万個のケラチノサイトを調製し、10±2mlのケラチノサイト培地中で再懸濁する。
- ゲルの上部の培地を吸引する。
- ゲルの下部の培地を吸引する。
- 90±5mlの内皮細胞培地をフラスコの基部（バリア内）に加える。ゲルは培地中に完全に浸さなければならない。
- 10±2mlのケラチノサイト培地をゲル（挿入物内）に加える。ゲルは培地中に完全に浸さなければならない。
- フラスコを2～4日間インキュベーター内に保存してケラチノサイトを付着させ、増殖させる。

40

【0076】

次いで最後の増殖工程を以下のように行う。

インビポでの移植または表皮生体構造形成のための気液相：

ケラチノサイトをケラチノサイト培地中で4日間培養する。次いで、ケラチノサイト層

50

を気/液界面に持ち上げ、さらに3週間培養する(気液層化プロトコル: Pontiggia Lら、Journal of Investigative Dermatology (2009) 129、480-490; doi: 10.1038/jid.2008.254; 2008年8月21日にオンラインで公開による)。

【0077】

分析:

微小リンパ管の形態および機能性を、免疫蛍光および組織構造によりインビトロおよびインビボの両方で特徴付け、分析した。組織学的およびホールマウント分析をMarinora 2014に記載されるように実施した。

【0078】

図1は、異なる種類のヒドロゲル間での操作の相違を示す。A) 大きなヒドロゲル(7x8cm、1型コラーゲン)を細胞と組み合わせて調製し、さらなる処理のためにそれらの除去を可能にするフラスコ内で培養した。B) これまで、例えばヒトの皮膚(0.7~1mm)の厚さに到達するように薄いヒドロゲルを作製する必要がある場合、その不十分な機械的安定性が大きな問題であった。C) 約10mmの厚さの厚いヒドロゲルは高い機械的安定性を示したが、それらは組織操作目的の大部分について適さなかった。D) 塑性圧密化/圧縮により、薄く、大きく、機械的に安定なヒドロゲルベースの組織産物の生物学による操作を可能にする。

【0079】

図2は、圧縮したヒドロゲル対圧縮していないヒドロゲルについての機械的安定性とヒドロゲル厚さとの間の関係を示す。圧縮していないヒドロゲル(黒色の柱)において、機械的安定性は、ヒドロゲルの厚さの増加に伴って増加する。約0.5mmの同じ厚さの圧縮したヒドロゲルにおいて、機械的安定性は約80倍高い。ヒトの皮膚は約0.7~1mmの厚さを有し、そのためこの範囲のヒドロゲルが特に興味深い。図2のグラフによれば、0.5~3mmの厚さの圧縮したヒドロゲルは、同じ厚さの圧縮していないヒドロゲルよりはるかに高い機械的安定性を示し、さらに10mmの厚さの圧縮していないヒドロゲルの機械的安定性より高い。

【0080】

図3は、圧縮したヒドロゲルが脈管および表皮生体構造と共に作製され得ることを示す。上部に、脈管構造および脈管が新生した表皮-真皮皮膚移植片を含むヒドロゲルの生成プロセスを示す。Aで印した第1の矢印は、4つの工程が脈管構造を含む大きな圧縮したヒドロゲルの作製に必要であることを示す(混合、注入、圧縮、培養)。Bで印した第2の矢印は、圧縮したヒドロゲルに基づいた大きな脈管が新生した表皮-真皮皮膚移植片の操作について、6つ全ての示した工程が必要であることを示す(混合、注入、圧縮、培養、播種、培養)。Cで標識した2つの写真において、脈管構造を、播種の21日後、内皮細胞マーカー(CD31)および核リンパ管マーカー(Prox1)についてホールマウント免疫蛍光によって可視化する。上部の第1の写真において、多くの脈管構造が可視化される。これにより、HDMECが脈管構造に組織化することが確認される。下部の第2の写真において、リンパ管のみが可視化される。これにより、ヒトの包皮から単離したHDMECが、Prox1陽性リンパ管およびProx1陰性血管内皮細胞の両方を含むことが確認される。Dで標識した写真において、第1の上部の写真は、CD31およびケラチノサイトマーカー(サイトケラチン(Citokeratin)5)についてのホールマウント免疫蛍光を示し、ケラチノサイトの層(矢印)の下の皮膚移植片における脈管構造(矢印の先端)を可視化する。第2の下部の写真は、管腔を有する内皮細胞層および毛細管を可視化している組織切片を示す。ヒドロゲルが気-液条件下でさらに培養される場合、表皮生体構造の形成が起こる: D'で標識した写真において、免疫蛍光分析は基底膜沈着(矢印)を有する層状表皮を示す。この表皮は脈管生体構造を含むヒドロゲルで成長する(矢印の先端)。

【0081】

図5は、圧縮したヒドロゲル(白色のバー)対圧縮していないヒドロゲル(黒色のバー

10

20

30

40

50

）における変化のないままである脈管の特徴を示す。脈管形成は圧縮したヒドロゲルおよび圧縮していないヒドロゲルの両方で起こった。定量分析により、脈管領域および分岐点の数が、圧縮したヒドロゲルと比べて圧縮していないヒドロゲルにおいて多くなったことが示された。しかしながら、統計的分析により、有意でない差が示された（ $p < 0.05$ ）。脈管の長さは変化のないままである。驚くべきことに、このことにより、脈管網の発生は、ヒドロゲルの塑性圧密化/圧縮によって影響を受けなかったことが示された。

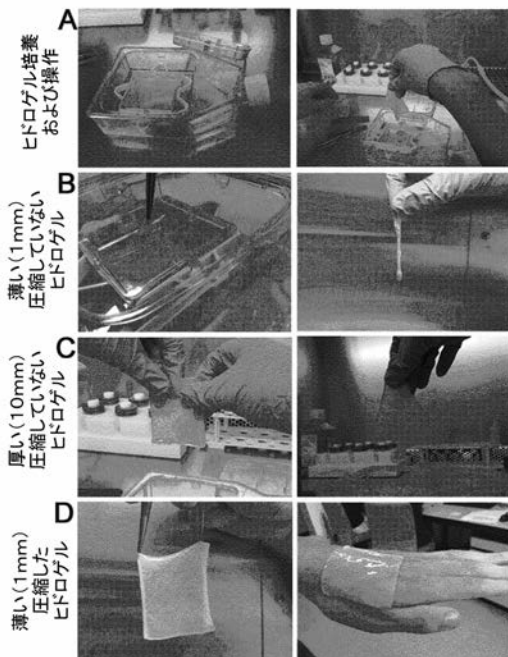
【0082】

図6において、上側の行は図3の生成順序を示す。しかしながら、Ca-細胞の圧縮および培養の工程を反転させることも可能である（第1の種類および/または第2の種類の細胞を第1の生体構造の形成のために播種した）。他の組織は、圧縮したヒドロゲルにおいて他の生体構造を生成する他の細胞を使用して操作できる。圧縮は構造形成の前または後に実施され得る。圧縮工程を含むことによって生成される組織移植片は、皮膚、角膜、軟骨、膜、内皮細胞、粘膜などの全ての種類の薄い組織に有用である。

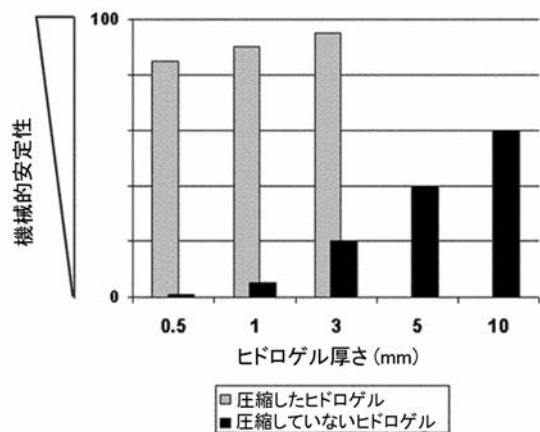
【0083】

本発明の方法は、毛細血管（HDMECまたはSVF細胞によって生成され得る）以外に、三次元ヒドロゲルを使用して機能的リンパ毛細管が生成され得ることを示す。正常なリンパ管と同様に、これらの毛細管分岐は管腔を形成し、免疫不全状態の齧歯動物への移植後、インビトロおよびインビボで流体を吸収する。リンパ毛細管の形成はリンパ管新生および抗リンパ管新生刺激の両方によって調節され得、インビトロ試験についてのこの系の潜在的有用性を実証する。血管およびリンパ管内皮細胞は脈管発生の間、決して混ざらず、記載されている状況下で毛細血管もリンパ毛細管も吻合しない。操作した移植片の移植後、ヒトのリンパ毛細管はヌードラットのリンパ管網と吻合し、体液排出をサポートした。このデータは、生理的、構造的および機能的特性を有するこれらの皮膚移植片/代用物が、重度の皮膚欠陥に悩んでいる患者に1日で適用され得ることを示唆している。

【図1】



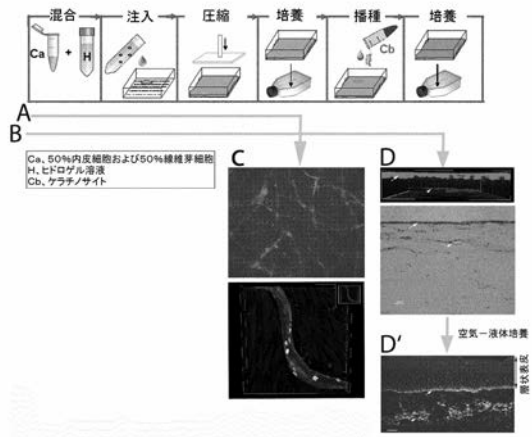
【図2】



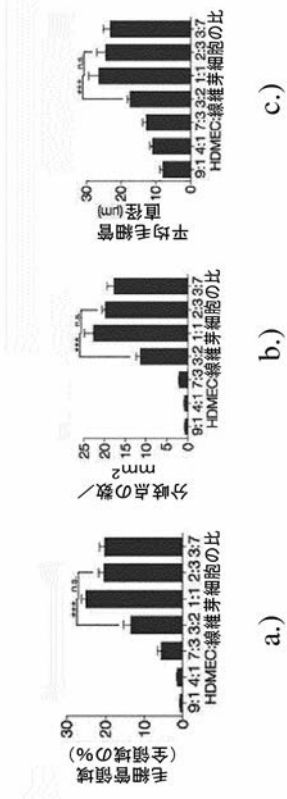
10

20

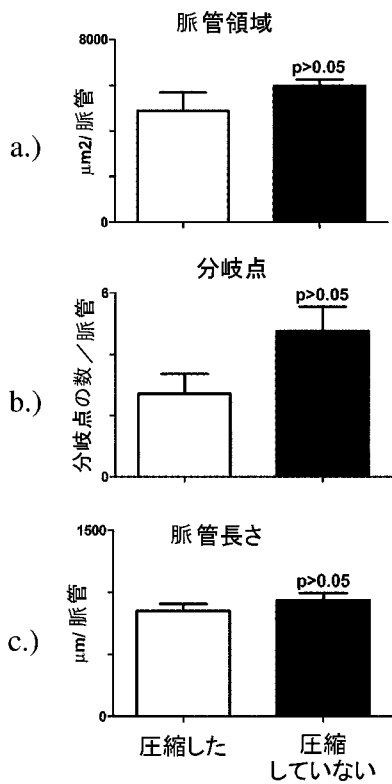
【 図 3 】



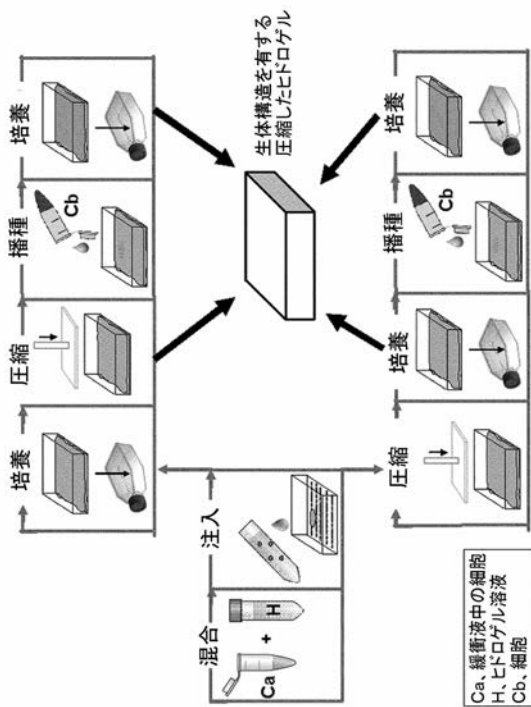
【 図 4 】



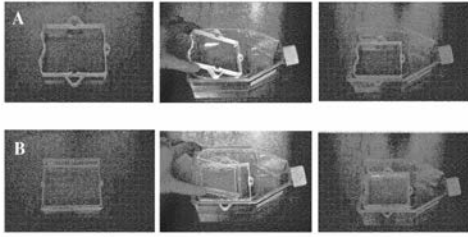
【 図 5 】



【 図 6 】

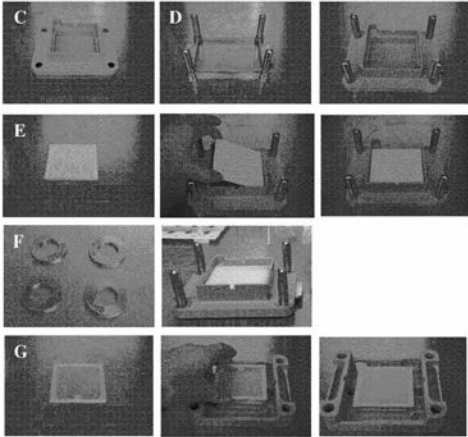


【 図 7 】



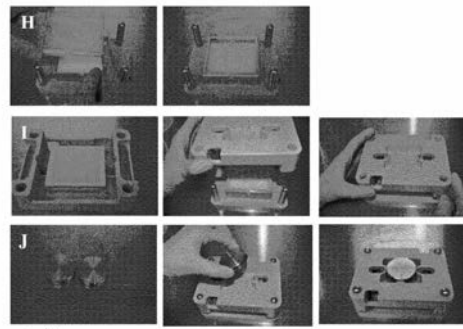
フラスコの組み立て

【 図 8 】



圧縮装置の組み立て

【 図 9 】



圧縮

【 図 10 】



ゲル移動

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2014/066258 |
|---|

| | | |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| INV. | A61L27/22 | A61L27/24 |
| | A61L27/60 | A61L27/38 |
| | | A61L27/50 |
| | | A61L27/52 |
| 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, COMPENDEX, EMBASE, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | KLAR AGNIESZKA S ET AL: "Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with adipose-derived cells", BIOMATERIALS, vol. 35, no. 19, 27 March 2014 (2014-03-27), pages 5065-5078, XP028847267, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.02.049 page 5065, right-hand column, line 8 - page 5066, column 6, line 11 page 5066, left-hand column, line 60 - right-hand column, line 2 page 5066, right-hand column, line 41 - page 5067, left-hand column, line 10 ----- -/-- | 1-9,12, 17, 19-30, 32,34,35 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of Box C. | <input checked="" type="checkbox"/> 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 | | "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 |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | | "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 |
| "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) | | "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 |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | "&" document member of the same patent family |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 24 March 2015 | | 01/04/2015 |
| 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 Zalfen, Alina |

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/066258

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|---|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>ERIK BRAZIULIS ET AL: "Modified Plastic Compression of Collagen Hydrogels Provides an Ideal Matrix for Clinically Applicable Skin Substitutes", TISSUE ENGINEERING PART C: METHODS, vol. 18, no. 6, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 464-474, XP055178560, ISSN: 1937-3384, DOI: 10.1089/ten.tec.2011.0561 page 464, right-hand column, lines 19-29 page 465, left-hand column, line 30 - right-hand column, line 16 page 467, left-hand column, lines 10-11 -----</p> | <p>1-3,5-9, 13-23, 26,30-35</p> |
| X | <p>WO 00/62833 A1 (UNIV NEW YORK STATE RES FOUND [US]) 26 October 2000 (2000-10-26) page 5, lines 13-17 page 18, line 25 - page 19, line 6 example V -----</p> | <p>1,4,6,8, 10-12, 17,19, 21-23, 25, 28-30, 34,35</p> |
| X | <p>WO 2011/154687 A1 (UCL BUSINESS PLC; DANIELS JULIE THERESA [GB]; LEVIS HANNAH JANE [GB];) 15 December 2011 (2011-12-15) page 3, lines 5-14 page 4, line 30 - page 5, line 1 page 8, lines 8-12 page 10, lines 31-34 -----</p> | <p>1-3,6,8, 9,13-22, 30,31, 34,35</p> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/066258

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 0062833 | A1 | 26-10-2000 | AU 4351000 A |
| | | | WO 0062833 A1 |
| | | | 02-11-2000 |
| | | | 26-10-2000 |
| WO 2011154687 | A1 | 15-12-2011 | NONE |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, 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, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

特許法第30条第2項適用申請有り 発行日：平成26年1月29日 公開物：Science Translational Medicine, 2014, vol 6, Issue 221 221ra14, pp 1-12 公開者：マリーノ ダニエラ ルギンブル ヨヒム スコラ サイモネッタ メウリ マーティン レイヒマン エルンスト 発行日：平成26年3月27日 公開物：Biomaterials, 35, 2014, pp. 5065-5078 公開者：クラア アグニエツカ シルヴィア グーヴェン サイネン ビダーマン トーマス ルギンブル ヨヒム ボッチャー ハバルジス ソフィ メウリ-サイメン クラウディア メウリ マーティン マーティン イヴァン シアベリヒ アーノウド レイヒマン エルンスト

(72)発明者 マリーノ ダニエラ

スイス国 シーエイチ - 8048 チューリッヒ マロジャヴェグ 4

(72)発明者 クラア アグニエツカ シルヴィア

スイス国 シーエイチ - 8305 ディートリコン プロマッカーシュトラッセ 4

Fターム(参考) 4C081 AA01 AA12 AB19 BA12 BA13 CD11 CD12 CD34 DA12 EA03