(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7316735号
(P7316735)

(45)発行日　令和5年7月28日(2023.7.28)

(24)登録日　令和5年7月20日(2023.7.20)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｌ　27/18　(2006.01)		Ａ６１Ｌ	27/18
Ａ６１Ｌ　27/24　(2006.01)		Ａ６１Ｌ	27/24
Ａ６１Ｌ　27/20　(2006.01)		Ａ６１Ｌ	27/20
Ａ６１Ｌ　27/16　(2006.01)		Ａ６１Ｌ	27/16
Ａ６１Ｌ　27/46　(2006.01)		Ａ６１Ｌ	27/46

ＦＩ

請求項の数　５　（全120頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-561769(P2020-561769)
(86)(22)出願日　令和1年5月2日(2019.5.2)
(65)公表番号　特表2021-526395(P2021-526395A)
(43)公表日　令和3年10月7日(2021.10.7)
(86)国際出願番号　PCT/IL2019/050492
(87)国際公開番号　WO2019/211854
(87)国際公開日　令和1年11月7日(2019.11.7)
審査請求日　令和4年4月4日(2022.4.4)
(31)優先権主張番号　62/666,267
(32)優先日　平成30年5月3日(2018.5.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　510146399
コルプラント リミテッド
イスラエル国 レホヴォト オッペンハイマー ストリート ４ イレブンス フロア
４ Ｏｐｐｅｎｈｅｉｍｅｒ Ｓｔｒｅｅｔ，１１ｔｈ Ｆｌｏｏｒ，Ｒｅｈｏｖｏｔ，Ｉｓｒａｅｌ
(74)代理人　110001379
弁理士法人大島特許事務所
(72)発明者　ジョゼヨフ、オデッド
イスラエル国ショーハム６０８０４１０・バレケット ストリート １０
(72)発明者　オー、ナダフ
イスラエル国マズケレット バティア７６８３５５・パルマッハ ストリート ２１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　皮膚充填剤およびその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

架橋ヒアルロン酸に架橋した植物由来のヒトコラーゲンを含む二重架橋皮膚充填剤を調製する方法であって、

（ａ）ヒアルロン酸を架橋する工程と、

（ｂ）前記架橋ヒアルロン酸の中和の工程と、

（ｃ）前記植物由来のヒトコラーゲンの中和の工程と、

（ｄ）中和された前記架橋ヒアルロン酸と、中和された前記植物由来のヒトコラーゲンとを混合する工程と、

（ｅ）低分子量ヒアルロン酸（ＭＷ　ＨＡ）の添加の工程と、

（ｆ）前記架橋ヒアルロン酸と前記植物由来のヒトコラーゲンの混合物を架橋する工程と、

（ｇ）二重架橋したヒアルロン酸－植物由来のヒトコラーゲン皮膚充填剤を透析する工程と、を含む、方法。

【請求項２】

請求項１に記載の方法であって、

前記植物由来のヒトコラーゲンは、１型組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）を含む、方法。

【請求項３】

請求項１または２に記載の方法であって、

前記ヒアルロン酸を架橋する工程（ａ）の前記架橋ヒアルロン酸を連結する架橋剤は、前記植物由来のヒトコラーゲンと前記架橋する工程（ｆ）の前記架橋ヒアルロン酸とを連結する架橋剤とは異なる、方法。
【請求項４】
請求項１～３のいずれか一項に記載の方法であって、
前記架橋ヒアルロン酸と前記植物由来のヒトコラーゲンとの比率は、６：１～１：６の範囲を含む、方法。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか一項に記載の方法であって、
前記ヒアルロン酸を架橋する架橋剤および前記植物由来のヒトコラーゲンを架橋する架橋剤は、それぞれ独立して、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル（ＢＤＤＥ）、１－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－３－エチルカルボジイミドメチオダイド（ＥＤＣ）、Ｎ，Ｎ'－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、Ｎ，Ｎ'－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）、ジビニルスルホン（ＤＶＳ）またはグルタルアルデヒドから選択される、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
植物由来のヒトコラーゲンと細胞増殖促進足場とを含む、光開始性の二重架橋皮膚充填剤、およびある場合には、軟組織増強のために皮膚充填剤を使用する方法が本明細書で開示される。
【背景技術】
【０００２】
コラーゲンは、脊椎動物や多くの他の多細胞生物の構造的完全性に関与する主要なタンパク質である。コラーゲンは、結合組織の主要な成分を構成し、哺乳類で最も豊富なタンパク質であり、体内に見られるタンパク質の約３０％を構成する。コラーゲンの消失または劣化は、老化または損傷の結果として発生する可能性がある（Ｏｌｓｅｎら、Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．２００３ Ｎｏｖ．２８；５５（１２）：１５４７－６７）。
【０００３】
老化の一般的な態様の１つは、筋、小じわ、またはしわの発生である。組織から抽出されたコラーゲンの使用を伴う治療は、筋、小じわ、またはしわを低減するか、または除去するために使用されてきた。同様の治療が、瘢痕を低減するために使用されてきた。
【０００４】
コラーゲンは、腱の成分でもある。腱障害は、通常はスポーツおよび身体活動に関連する一般的な障害であり、腱のコラーゲン線維の変性および配置の乱れに関連している。損傷した腱の治癒には、特定の細胞の組織化された活動と、損傷の近傍で関連する成長因子（ＧＦ）が長期間存在する必要がある。腱障害は、近年、筋骨格系の愁訴の主な相談理由である（Ｋａｕｘら（２０１１年１月）Ｊ．Ｓｐｏｒｔ．Ｓｃｉ．Ｍｅｄ．Ｊａｎｕａｒｙ：２３８－２５３）。腱障害は、腱の使い過ぎに起因する病理学的変化と、その結果としての再生反応との間の不均衡から生じる可能性がある、腱および靭帯の内部およびその周辺で発症する様々な痛みを伴う状態を指す（Ａｎｄｒｅｓら（２００８）Ｃｌｉｎ．Ｏｒｔｈｏｐ．Ｒｅｌａｔ．Ｒｅｓ．４６６：１５３９－１５５４）。腱障害は、コラーゲンの変性および配置の乱れに関連しており（Ｍａｆｆｕｌｌｉら（２００３）Ｃｌｉｎ．Ｓｐｏｒｔ．Ｍｅｄ．２２：６７５－６９２）、線維の微小な裂傷、血管分布の増加および軽度の炎症の存在と関係することもある（Ｋｈａｎら（１９９９）Ｓｐｏｒｔ．Ｍｅｄ．２７（６）：３９３－４０８）。臨床的には、腱のこわばり、活動に関連する痛み、機能の低下、時には局所的な腫れの発症を特徴とする（Ｋａｕｘ ２０１１；Ａｎｄｒｅｓ ２００８）。コラーゲン線維は、通常の密になった平行な束ねられた外観ではなく、不均一で不規則な圧着、緩み、うねりの増加が存在する（Ｍａｆｕｌｌｉ ２００３）。人々

は、高齢でも活動を続けるため、腱損傷の発生率は、今後数十年間で増加すると予想される。理学療法、薬理学的治療、およびそれらの組み合わせを含む、腱障害の多種多様な治療法が利用可能であるが、臨床結果は満足のいくものではなく、症状の再発は一般的である（Ｋａｕｘ ２０１１）。腱障害の治療のための自家多血小板血漿（ＰＲＰ）の注入は、過去数十年間で広く注目されていた（Ｄｅｌｏｎｇら（２０１６）Ｃｕｒｒ．Ｏｒｔｈｐａｅｄｉｃ Ｐｒａｃｔ．２２：５１４－５２３、Ｋａｕｘら（２０１２）Ｗｏｕｎｄ Ｒｅｐａｉｒ Ｒｅｇｅｎ．２０：７４８－７５６、Ｙｕａｎら（２０１３）Ｍｕｓｃｌｅｓ．Ｌｉｇａｍｅｎｔｓ Ｔｅｎｄｏｎｓ Ｊ．３（３）：１３９－４９、Ｄｉ Ｍａｔｔｅｏら（２０１５）Ｍｕｓｃｕｌｏｓｋｅｌｅｔ．Ｓｕｒｇ．９９（１）：１－９）。ＰＲＰは、高濃度の血小板を含む血液の血漿フラクションである。血小板は、損傷部位に注入されると、治癒過程を促進すると考えられている様々な種類の成長因子（ＧＦ）を放出する。ＰＲＰに関連するＧＦの中で、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、トランスフォーミングβ増殖因子（ＴＧＦ－β）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、血小板由来表皮増殖因子（ＰＤＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）および肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）が報告されている（Ｄｅｌｏｎｇ ２０１６、Ｙｕａｎ ２０１３、Ｈａｒｒｉｓｏｎら（２０１１）Ａｍ．Ｊ．Ｓｐｏｒｔｓ Ｍｅｄ．３９（４）：７２９－７３４）。多くのインビトロ研究およびインビボモデルは、ＰＲＰ治療がコラーゲン発現および細胞外マトリックス産生を向上させ、血管新生を刺激し、細胞移動、分化および増殖を増加させ、したがって腱損傷の治癒を補助することを示している（Ｙｕａｎ ２０１３、Ｋａｊｉｋａｗａら（２００８）Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．２１５（３）：８３７－８４５、Ｚｈａｎｇら（２０１０）Ａｍ．Ｊ．Ｓｐｏｒｔｓ Ｍｅｄ．３８（１２）：２４７７－２４８６）。しかしながら、ＰＲＰ治療の有効性に関する明確な臨床的証拠は、限られている（Ｄｅｌｏｎｇ ２０１６、Ｙｕａｎ ２０１３、Ｍｏｒａｅｓら（２０１４））。

【０００５】

コラーゲンは、ほとんどの組織の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の主要な成分および主要な構造的機械的決定因子として機能する［例えば、Ｋａｄｌｅｒ Ｋ．Ｂｉｒｔｈ Ｄｅｆｅｃｔｓ Ｒｅｓ Ｃ Ｅｍｂｒｙｏ Ｔｏｄａｙ．２００４；７２：１－１１、Ｋａｄｌｅｒ ＫＥ、Ｂａｌｄｏｃｋ Ｃ、Ｂｅｌｌａ Ｊ、Ｂｏｏｔ－Ｈａｎｄｆｏｒｄ ＲＰ．Ｊ Ｃｅｌｌ Ｓｃｉ．２００７；１２０：１９５５－１９５８、Ｋｒｅｇｅｒ ＳＴ．Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ．２０１０ ９３（８）：６９０－７０７を参照］。トロポコラーゲンは通常、結合して右巻きの三重らせんトロポコラーゲンを形成し、原線維を形成する、プロコラーゲンの３つの左巻きヘリックス（通常は２つの同一のヘリックスと第３の異なるヘリックス）からなる。

【０００６】

天然コラーゲンの形態と大部分の特性は、分子の９５％より多くを構成する三重ヘリックスドメインによって決定付けられる。このドメインは、３つのα鎖で構成されており、各々が約１，０００個のアミノ酸を含み、ロープ状の様式で包み込まれ、密な三重ヘリックス構造を形成する。この三重ヘリックスは、隣接するアミノ酸を連結するペプチド結合が分子内部に埋め込まれるように巻かれているため、コラーゲン分子は、ペプシンなどのプロテアーゼによる攻撃に耐性がある。

【０００７】

Ｉ型コラーゲンは、典型的な原線維コラーゲンであり、骨、腱、皮膚、大動脈および肺を含む大部分の組織において、主要なコラーゲン型である。Ｉ型コラーゲン線維は、優れた引張強度と限られた伸展性を提供する。Ｉ型コラーゲンの最も豊富な分子形態は、２つの異なるα鎖［α１（Ｉ）］$_2$およびα２（Ｉ）で構成されるヘテロトリマーである（Ｉｎｋｉｎｅｎ、Ｃｏｎｎｅｃｔｉｖｅ Ｔｉｓｓｕｅ Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｉｎ Ｗｏｕｎｄ Ｈｅａｌｉｎｇ ａｎ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｓｔｕｄｙ、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｄｉｓｓｅｒｔａｔｉｏｎ、２００３年９月、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｈｅｌｓｉｎｋｉ、Ｆａｃｕｌｔｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｂｉｏｓｃ

ｉｅｎｃｅｓ、Ｄｉｖｉｓｉｏｎ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）。

【０００８】

線維状コラーゲン分子の全てにおいて、３つのポリペプチド鎖が、繰り返しＧｌｙ－Ｘ－Ｙトリプレットから構築され、式中、ＸおよびＹは、任意のアミノ酸であってもよいが、多くの場合、イミノ酸のプロリンおよびヒドロキシプロリンである。コラーゲンは、特に、グリシン、プロリンおよびヒドロキシプロリンアミノ酸残基が豊富であり、コラーゲン鎖のタンパク質配列は、多くは、繰り返しアミノ酸配列を有する。プロコラーゲンは、プロリンおよびリジン残基にヒドロキシル基を付加することによって修飾される。これらのヒドロキシル化反応は、それぞれ、プロリル－４－ヒドロキシラーゼおよびリシル－ヒドロキシラーゼによって触媒作用を及ぼされる。次いで、リジン残基上のヒドロキシル基がグリコシル化され、その後、三重ヘリックスが形成する。

【０００９】

原線維を形成するコラーゲンの重要な特徴は、それらが球状のＮ末端およびＣ末端伸長プロペプチドを含む前駆体プロコラーゲンとして合成されることである。プロコラーゲンの生合成は、プロリンとリジンのヒドロキシル化、Ｎ結合型とＯ結合型のグリコシル化、鎖内と鎖間の両方のジスルフィド結合の形成など、いくつかの異なる翻訳後修飾を伴う複雑なプロセスである。これらの修飾を実行する酵素は、正しく整列され、熱的に安定した三重らせん分子の折り畳みと組織化を確実にするために、協調した態様で作用する。

【００１０】

三成分ポリペプチド鎖は、粗面小胞体（ＲＥＲ）内で組織化され、プロコラーゲンを形成する。ポリペプチド鎖が小胞体（ＥＲ）の膜を横切って同時翻訳的に移動するため、プロリンおよびリジン残基のプロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）依存性ヒドロキシル化が、Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙ繰り返し領域内で起こる。コラーゲンの最終的な三重らせん構造の安定性は、コラーゲン鎖のＰ４Ｈを介したヒドロキシル化に大きく依存する。リシルヒドロキシラーゼ（ＬＨ、ＥＣ １．１４．１１．４）、ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＥＣ ２．４．１．５０）、およびグルコシルトランスフェラーゼ（ＥＣ ２．４．１．６６）は、コラーゲンの翻訳後修飾に関与する酵素である。これらは、特定の位置のリシル残基を、ヒドロキシリシル、ガラクトシルヒドロキシリシル、およびグルコシルガラクトシルヒドロキシリシル残基に順次修飾する。これらの構造はコラーゲンに特有であり、それらの機能的活性に不可欠である（Ｗａｎｇら（２００２）Ｍａｔｒｉｘ Ｂｉｏｌｏｇｙ、２１（７）：５５９－５６６）。単一のヒト酵素であるリシルヒドロキシラーゼ３（ＬＨ３）は、ヒドロキシリシン結合した炭水化物形成での３つの連続する工程全てに触媒作用を及ぼすことができる（Ｗａｎｇら（２００２）Ｍａｔｒｉｘ Ｂｉｏｌｏｇｙ、２１（７）：５５９－５６６）。ポリペプチド鎖が小胞体の内腔に完全に移動すると、３つのプロα鎖がＣ－プロペプチドを介して結合してトリマー分子を形成し、Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙ繰り返し領域がそのＣ末端に核形成点を形成し、鎖の正しい整列を確実にする。次に、Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙ領域は、Ｃ方向からＮ方向に折り畳まれて、三重ヘリックスを形成する（Ｋｈｏｓｈｎｏｏｄｉら（２００６）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８１：３８１１７－３８１２１）。

【００１１】

体温での三重ヘリックスの安定性を確保するためにプロリン残基のヒドロキシル化が必要であるため、ポリペプチド鎖修飾と三重ヘリックス形成との間の時間的関係は重要である。一旦形成されると、三重ヘリックスは、もはやヒドロキシル化酵素の基質として機能しない。Ｃ－プロペプチド（およびより低い程度までＮ－プロペプチド）は、細胞を出る経路の間、プロコラーゲンを可溶性に維持する（Ｂｕｌｌｅｉｄら（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃｙ．Ｔｒａｎｓａｃｔ．、２８（４）：３５０－３５３）。細胞外マトリックスへのプロコラーゲン分子の分泌後、または分泌中に、プロペプチドは、プロコラーゲンのＮ－プロテイナーゼおよびＣ－プロテイナーゼによって除去され、それによって、コラーゲン分子から原線維への自発的な自己組織化を引き起こす（Ｈｕｌｍｅｓ、２００２、Ｊ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．Ｊａｎｕａｒｙ－Ｆｅｂｒｕａｒｙ；１３７（１－２

）：２－１０）。プロコラーゲンのＮ－プロテイナーゼおよびＣ－プロテイナーゼによるプロペプチドの除去によって、プロコラーゲンの溶解度が１００００分の１より大きく低下し、３７℃でコラーゲンから原線維への自己組織化を開始するために必要である。この組織化プロセスにとって重要なのは、Ｎ／Ｃプロテイナーゼで消化した後に残っているＮ末端およびＣ末端プロペプチドの非三重らせんレムナントである短いテロペプチドである。これらのペプチドは、その架橋可能なアルデヒドによって、原線維構造内のコラーゲン分子の正しい共有結合位置決めを確実にし、自己組織化の臨界濃度を下げるように作用する（Ｂｕｌｌｅｉｄら（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃｙ．Ｔｒａｎｓａｃｔ．、２８（４）：３５０－３５３）。

【００１２】

天然コラーゲンは、一般に、原線維の形態で並んで詰め込まれたテロペプチドを含有するコラーゲン分子として結合組織に存在する。各長手方向の道筋は、次の連続する横方向に隣接する長手方向の道筋に対してわずかに長手方向に互い違いになった空間を有し、端から端までの配置で整列された分子で構成される。このようにして、所与の長手方向の道筋中の連続した分子の向かい合う末端領域の間にギャップが作られ、これに対して横方向に隣接する平行な長手方向の道筋中の分子の互い違いになった側によって結合する。

【００１３】

天然動物コラーゲンの分散と可溶化は、コラーゲンの望ましい特性を与える基本的な堅い三重らせん構造に影響を与えることなく、分子間結合を破壊し、免疫原性の非らせんテロペプチドを除去する様々なタンパク質分解酵素を使用して達成することができる（例えば、精製された可溶性コラーゲンを調製するための一般的な方法について、米国特許第３，９３４，８５２号、同第３，１２１，０４９号、同第３，１３１，１３０号、同第３，３１４，８６１号、同第３，５３０，０３７号、同第３，９４９，０７３号、同第４，２３３，３６０号および同第４，４８８，９１１号を参照）。得られた可溶性アテロコラーゲンは、その後、低ｐＨおよび高イオン強度で繰り返し沈殿させ、続いて低ｐＨでの洗浄し、再可溶化することによって精製することができる。それにもかかわらず、可溶性調製物は、典型的には、タンパク質調製物の均一性を低下させる架橋コラーゲン鎖で汚染される。

【００１４】

コラーゲンは、その独特の特徴と人体機能における多様なプロファイルにより、組織修復に使用するために様々な生体適合性材料から選択され、構造的完全性を補助し、細胞浸潤を誘導し、組織再生を促進する。５つの主要なコラーゲン型の中で、Ｉ型コラーゲンは、人体で最も豊富なコラーゲンの形態である。

【００１５】

Ｉ型コラーゲンは、自己組織化して、生物活性接着部位を介して組織細胞を支えることが可能な線維状ヒドロゲルになることができる。コラーゲンにメタクリレート基を負荷すると、コラーゲンメタクリレート（ＣＭＡ）が生成し、分解に対して、より耐性になる（Ｇａｕｄｅｔら、Ｂｉｏｉｎｔｅｒｐｈａｓｅｓ（２０１２）７：２５－３３）。コラーゲンのチオール化は、凝集と粘膜付着を改善し、膨潤能力に影響を与える可能性がある（Ｄｕｇｇａｎら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｉｏｐｈａｒｍ．（２０１５年４月）９１：７５－８１）。

【００１６】

コラーゲンに固有の特性は、再生医療製品でのその使用に寄与する。コラーゲンは、薬剤（止血圧迫、スポンジ、治癒包帯）、医療（心臓弁、腱および靭帯、代用皮膚、充填剤などの補綴物）、歯科（歯肉移植／歯周病）、および美容（添加剤、しわ防止剤、香料物質用マイクロコンテナ）を含む、無数の用途に必要な特徴を有する生体材料を提供する。前述の市場の全てにおいて製造されたコラーゲンに基づく製品は、その製造のために大量のコラーゲン原料を必要とする。

【００１７】

死体または動物由来（ウシ、ブタ、またはウマ）などのヒトおよび動物由来のコラーゲ

ン、およびコラーゲンに基づく製品は、適用、注入、移植および経口摂取に使用されてきた。使用には、損傷した骨または軟骨構造の修復または部分的な交換のための所望の形状への事前成型、損傷した関節への注入、および皮膚充填剤としての注入が挙げられる。

【００１８】

動物由来のコラーゲン（ヒト由来のコラーゲンを含む）の使用は、非従来型の感染性物質による汚染のリスクの可能性があるため、問題がある。細菌やウイルスの汚染によって引き起こされるリスクは完全に制御することができるが、プリオンは封じ込めが難しく、かなりの健康上のリスクがある。タンパク質のような性質を持っていると思われるこれらの感染性物質は、変性動物脳症（羊震え病、牛海綿状脳症）およびヒト脳症（クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロスラー症候群、およびクールー病）の発症に関与する。他の病気（例えば、後天性免疫不全症候群［ＡＩＤＳ］、肝炎、狂犬病、いくつかの癌）もレシピエントに感染する可能性がある。脳症や他の疾患のいくつかの発症までに長い時間がかかるため、正式な管理を行うことは困難である。（一般的に、Ｃａｓｔｒｏｗら（１９８３）Ｊ．Ａｍ．Ａｃａｄ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．９（６）：８８９－９３、Ｓｉｅｇｌｅら（１９８４）Ａｒｃｈ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１２０（２）：１８３－１８７を参照。）

【００１９】

さらに、一部の患者では、ヒトまたは動物のコラーゲンによる治療が、アレルギーを含む細胞性または体液性の免疫反応を引き起こす。さらに、コラーゲンの質は、一般的に、供給源となる死体または生物の年齢と共に低下するか、または他の因子によって低下する可能性がある。これに加えて、抽出プロセスによって、その生物学的機能および機械的機能を損なう重大な構造的損傷が起こる（Ｓｔｅｉｎら（２００９）Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ １０（９）：２６４０－２６４５、Ｓｈｉｌｏら（２０１３）Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇ．Ｐａｒｔ Ａ １９（１３－１４）：１５１９－１５２６、Ｓｈｏｓｅｙｏｖら（２０１３）Ｔｉｓｓ．Ｅｎｇ．Ｐａｒｔ Ａ １９（１３－１４）：１５２７）。

【００２０】

コラーゲン鎖を発現する植物は、当該技術分野で知られている（例えば、ＷＯ２００５／０３５４４２、米国特許第６，６１７，４３１号、米国公開第２００２／００９８５７８号、米国公開第２００２／０１４２３９１号、Ｍｅｒｌｅら（２００２）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ５１５：１１４－１１８、Ｒｕｇｇｉｅｒｏら（２０００年3月3日）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４６９（１）：１３２－６を参照）。このような植物を使用して、コラーゲンだけではなくコラーゲン鎖を産生することができるが、このような鎖は正しくヒドロキシル化されておらず、そのため、その自己組織化は、植物内であろうとなかろうと、本質的に不安定なコラーゲンを生じる。例えば、植物は、ヒドロキシプロリンを含有するタンパク質を合成することができるが、植物細胞内のヒドロキシプロリンの合成に関与するプロリルヒドロキシラーゼは、哺乳動物Ｐ４Ｈと比較して、比較的緩い基質配列特異性を示し、したがって、Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙトリプレットの Ｙ位置にのみヒドロキシプロリンを含むコラーゲンを生成するには、コラーゲンとＰ４Ｈ遺伝子の植物共発現が必要である（Ｏｌｓｅｎら（２００３）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．、５５（１２）：１５４７－１５６７）。

【００２１】

フィシンおよび／またはパパインなどの植物由来のプロテアーゼを用いる動物由来の「不溶性コラーゲン」のプロセシングも当該技術分野で知られている（米国特許第４，５９７，７６２号、同第５，６７０，３６９号、同第５，３１６，９４２号、同第５，９９７，８９５号および同第５，８１４，３２８号）。

【００２２】

植物に自然に存在するヒドロキシル化機構に依存してヒトコラーゲンを生成する試みによって、プロリンヒドロキシル化に乏しいコラーゲンが得られた（Ｍｅｒｌｅら（２００２）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ５１５：１１４－１１８）。このようなコラーゲンは、３０℃未満の温度で融解するか、その三重らせん構造を失う。コラーゲンとプロリルヒドロ

キシラーゼの共発現によって、体温での適用に生物学的に関連する安定したヒドロキシル化コラーゲンが得られる（Ｍｅｒｌｅら（２００２）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ５１５：１１４－１１８）。

【００２３】

タバコで発現されたヒトコラーゲンのヒドロキシリシンは、ウシコラーゲンに見られるヒドロキシリシンの２％未満を形成する（残基の０．０４％／残基の１．８８％）。このことは、植物の内因性リシルヒドロキシラーゼが、コラーゲン中のリジンを十分にヒドロキシル化することができないことを示唆する。

【００２４】

最近の技術開発により、タバコ植物にヘテロトリマーＩ型コラーゲンをコードする５つのヒト遺伝子を導入することにより、天然のヒトＩ型コラーゲン（ｒｈコラーゲン）を精製するシステムが開発された（ＣＯＬＬＰＬＡＮＴ（商標）、イスラエル、ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ（登録商標）、セントルイス、ミズーリ州、米国でも入手可能）を精製するシステムが開発された［例えば、Ｓｔｅｉｎ Ｈ．（２００９）Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ １０：２６４０－５、Ｙａａｒｉら（２０１３）Ｔｉｓｓ．Ｅｎｇ．Ｐａｒｔ Ａ １９（１３／１４）：１５０２－１５０６、Ｗｉｌｌａｒｄら（２０１３）Ｔｉｓｓ．Ｅｎｇ．Ｐａｒｔ Ａ １９（１３／１４）：１５０７－１５１８、Ｓｈｉｌｏら（２０１３）Ｔｉｓｓ．Ｅｎｇ．Ｐａｒｔ Ａ １９（１３／１４）：１５１９－１５２６、Ｓｈｏｓｅｙｏｖら（２０１３）Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇ．Ｐａｒｔ Ａ １９：１５２７－１５３３、およびＳｈｏｓｅｙｏｖら（２０１４年１月／２月）Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ５：１、１－４を参照］。このタンパク質は、コラーゲンに固有の特性を利用する費用対効果の高い工業プロセスを通じて、均一になるまで精製される。それらは全てが、本明細書に完全に記載されているかのように参照により組み込まれる、ＷＯ２００６／０３５４４２、ＷＯ２００９／０５３９８５、ならびにそれらに由来する特許および特許出願も参照されたい。

【００２５】

部分的に変性して細胞結合ドメインが剥がれる可能性のある、組織から抽出されたコラーゲンと比較して、植物由来のヒトコラーゲンＩ型は、より一貫した構造と、より多くの細胞結合ドメインを有する（Ｓｈｏｓｅｙｏｖら（２０１４年１月／２月）Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ５：１、１－４、Ｍａｊｕｍｄａｒら（２０１５）Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．Ｐａｒｔ Ｂ：Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｍａｔｅｒ．１０４Ｂ：３００－３０７）。３Ｄ物体が、３Ｄバイオプリンティングによって、物体のコンピュータモデルを利用して層ごとの様式で製造されるプロセスである付加製造（ＡＭ）における用途では、ｒｈコラーゲンは、機能的な三次元（３Ｄ）マトリックスと足場を形成することができる。さらに、ｒｈコラーゲンは、一般的に、組織から抽出されたコラーゲンの免疫原性および疾患移動の問題がない。

【００２６】

少なくとも１つの種類のコラーゲンα鎖を発現し、内因性Ｐ４Ｈ活性を欠く細胞内コンパートメント内でのその蓄積を可能にすることによってコラーゲンを生成する方法（米国特許第８，４５５，７１７号）が、プロテアーゼを用いる処理によって、非動物細胞由来のヒトテロペプチドを含むコラーゲンからアテロコラーゲンを生成する方法（米国特許第８，７５９，４８７号）と同様に利用可能である。

【００２７】

Ｉ型コラーゲンとｒｈコラーゲンは、３Ｄバイオプリンティングの構築材料の主成分として使用するための候補物質であると考えられる。様々な種類の足場が、美容用途および他の再建用途に使用されてきた。

【００２８】

これに加え、軟組織増強、例えば、しわの低減のための皮膚充填剤の使用が増加してきている。皮膚充填剤を使用するための１つの可能な方法は、所望な領域への重合性皮膚充填剤材料の注入、その後、充填剤を所望な形態に輪郭形成するか、または成型することを

含む。様々な方法の１つによる材料の重合および架橋によって、注入された材料中のモノマーを変換して、ポリマーおよび鎖を形成することができ、これらは網目構造を形成し、所望な成型された形態を保持することができる。ポリマーを形成し、ポリマーを架橋するいくつかの方法が存在する。１つの方法は、モノマー溶液中で反応種を生成する光反応性試薬と光誘起反応を伴う。例えば、米国特許第９，７９５，７１１号、米国特許第８，９４５，６２４号、米国特許第６，３５２，７１０号および米国公開第２００９／０３２４７２２号、およびＥｌｉｓｓｅｅｆｆら（１９９９年3月）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９６：３１０４－３１０７を参照。

【００２９】

しかしながら、これらのアプローチの少なくともいくつかは、組織由来のコラーゲンまたは非コラーゲンポリマー（例えば、ポリ（ビニルアルコール）、ヒアルロン酸、またはポリエチレングリコール）に引き続き焦点を合わせている。さらに、組織から抽出されたコラーゲンの使用は、生理学的条件下で、２０℃を超える温度で自然なゲル形成を促進する温度およびイオン強度に対する感受性に起因して、制限されている［例えば、ＰｕｒｅＣｏｌ、Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＢｉｏＭａｔｒｉｘ，Ｉｎｃ．を参照］。組織から抽出されたコラーゲンの典型的な温度依存性のゲル形成は、正確な流動性を著しく損なわせる。適用するまでコラーゲンを低温に保つことは、この現象の可能な解決策であるが、深刻な技術的制限を内包する。別の解決策は、これらの条件下でゲル状にならないコラーゲンの変性形態であるゼラチンの使用である。しかしながら、ゼラチンは、天然コラーゲンの真の組織と細胞の相互作用を欠いているため、重要な生物学的機能が失われる。さらに、その粘度により、細いゲージの針を使用して真皮の下に注入することがより困難になり、また、それを広げてより小さな空洞内で成型することがより困難になる。

【００３０】

したがって、調整可能なレオロジー的および機械的特性を備える改善された注入可能な皮膚充填剤、ならびにその方法および使用が求められており、それを有することが非常に望ましく、有利であろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００３１】

一態様では、二重架橋皮膚充填剤であって、

（ａ）植物由来のヒトコラーゲンと、

（ｂ）架橋ヒアルロン酸と、を含み、

植物由来のヒトコラーゲンは、架橋ヒアルロン酸に架橋されている、二重架橋皮膚充填剤が本明細書で開示される。

【００３２】

関連する態様では、植物由来のヒトコラーゲンは、

（ａ）１型組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）、または

（ｂ）架橋ヒアルロン酸は、架橋ヒアルロン酸および非架橋ヒアルロン酸を含むか、または

（ｃ）それらの組み合わせを含む。

【００３３】

関連する態様では、架橋ヒアルロン酸を連結する架橋剤は、植物由来のヒトコラーゲンと架橋ヒアルロン酸とを連結する架橋剤とは異なるか、または架橋ヒアルロン酸と植物由来のヒトコラーゲンとの比率は、４：１～１：２の比率を含むか、またはそれらの組み合わせである。さらに関連する態様では、ヒアルロン酸を架橋する架橋剤および植物由来のヒトコラーゲンを架橋する架橋剤は、独立して、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル（ＢＢＤＥ）、１－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－３－エチルカルボジイミドメチオダイド（ＥＤＣ）、Ｎ，Ｎ'－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、Ｎ，Ｎ'－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）から選択される。

【００３４】

一態様では、架橋ヒアルロン酸に架橋した植物由来のヒトコラーゲンを含む二重架橋皮膚充填剤を調製する方法であって、
（ａ）ヒアルロン酸を架橋する工程と、
（ｂ）架橋ヒアルロン酸を中和する工程と、
（ｃ）植物由来のヒトコラーゲンを中和する工程と、
（ｄ）中和された架橋ヒアルロン酸と、中和された植物由来のヒトコラーゲンとを混合する工程と、
（ｅ）低分子量ヒアルロン酸（ＭＷ　ＨＡ）の添加の工程と、
（ｆ）架橋ヒアルロン酸と植物由来のヒトコラーゲンの混合物を架橋する工程と、
（ｇ）二重架橋した架橋ヒアルロン酸－植物由来のヒトコラーゲン皮膚充填剤を透析する工程と、を含む、方法が、本明細書で開示される。

【００３５】

関連する態様では、植物由来のヒトコラーゲンは、１型組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）を含むか、または工程（ａ）の架橋ヒアルロン酸を連結する架橋剤は、植物由来のヒトコラーゲンと工程（ｅ）の架橋ヒアルロン酸とを連結する架橋剤とは異なるか、またはそれらの組み合わせである。関連する態様では、架橋ヒアルロン酸と植物由来のヒトコラーゲンとの比率は、４：１～１：２の比率を含むか、またはヒアルロン酸を架橋する架橋剤および植物由来のヒトコラーゲンを架橋する架橋剤は、独立して、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル（ＢＢＤＥ）、１－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－３－エチルカルボジイミドメチオダイド（ＥＤＣ）、Ｎ，Ｎ'－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、Ｎ，Ｎ'－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）から選択されるか、またはそれらの組み合わせである。

【００３６】

それに加えて、一態様では、表皮の下の組織空間を充填する方法であって、
（ａ）組織空間に重合性溶液を導入する工程であって、重合性溶液は、
（ｉ）架橋可能な植物由来のヒトコラーゲン、
（ｉｉ）ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、酸化セルロース（ＯＣ）またはその修飾誘導体、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾誘導体、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾誘導体、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾誘導体、カルボキシメチルセルロースまたはその修飾誘導体、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾誘導体、またはこれらの組み合わせ、および
（ｉｉｉ）光開始剤を含む、該導入する工程と、
（ｂ）上述の空間の表面にある表皮の表面に光を当てて重合を誘導する工程と、を含む、方法が本明細書で開示される。

【００３７】

関連する態様では、重合性溶液の成分は、独立して、ほぼ同じ位置で、ほぼ同時に、組織空間に導入され、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンおよび光開始剤は、一緒に、かつ上述のヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、上述のポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、上述のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、酸化セルロース（ＯＣ）またはその上述の修飾誘導体、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその上述の修飾誘導体、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその上述の修飾誘導体、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその上述の修飾誘導体、カルボキシメチルセルロースまたはその上述の修飾誘導体、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその上述の修飾誘導体、または上述のこれらの組み合わせから独立して導入され、独立してほぼ同時に、組織空間に導入される。別の関連する態様では、本方法は、重合性溶液または重合性溶液の成分を、組織空間内の所望の構成内で成型または形を整える工程をさらに含み、この工程は、光を当てる工程と同時に起こるか、または光を当てる工程に続く。

【００３８】
別の関連する態様では、重合性溶液の成分は、混合物として一緒に組織空間に導入され、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンおよび光開始剤は、上述のヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、または上述のポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、または上述のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、または上述の酸化セルロース（ＯＣ）またはその上述の修飾誘導体、または上述のポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその上述の修飾誘導体、または上述のリン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその上述の修飾誘導体、または上述のカルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその上述の修飾誘導体、または上述のカルボキシメチルセルロースまたはその上述の修飾誘導体、または上述の結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその上述の修飾誘導体、またはこれらの組み合わせと一緒に導入される。
【００３９】
別の関連する態様では、重合性溶液の成分は、組織空間に互いに独立して導入され、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンおよび光開始剤は、一緒に、かつ上述のヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、または上述のポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、または上述のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、または上述の酸化セルロース（ＯＣ）またはその上述の修飾誘導体、または上述のポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその上述の修飾誘導体、または上述のリン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその上述の修飾誘導体、または上述のカルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその上述の修飾誘導体、または上述のカルボキシメチルセルロースまたはその上述の修飾誘導体、または上述の結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその上述の修飾誘導体、または上述のこれらの組み合わせから独立して導入される。
【００４０】
別の関連する態様では、組織空間に導入した後、本方法は、重合性溶液または重合性溶液の成分を、組織空間内の所望の構成内で成型または形を整える工程をさらに含み、この工程は、光を当てる工程と同時に起こるか、または光を当てる工程に続く。
【００４１】
別の関連する態様では、本方法は、非治療的であり、成型または形を整える工程は、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの組み合わせを低減する。
【００４２】
別の関連する態様では、
（ａ）架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンは、メタクリル化またはチオール化された１型ヒト組換えコラーゲン（ｒｈコラーゲン）であるか、または
（ｂ）ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロースまたは結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）の修飾誘導体は、メタクリル化またはチオール化された誘導体を含むか、または
（ｃ）ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロース、または結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）が、架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）、架橋ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、架橋ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、架橋酸化セルロース（ＯＣ）、架橋ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、架橋リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、架橋カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、架橋カルボキシメチルセルロース、または架橋結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）を含むか、または
（ｄ）（ａ）と（ｂ）、または（ａ）と（ｃ）の組み合わせである。
【００４３】

さらに関連する態様では、ＭＡ－ｒｈコラーゲンが選択される場合、また、ヒアルロン酸またはその誘導体、または架橋ヒアルロン酸が選択される場合、ＨＡとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。

【００４４】

一態様では、表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間に二重架橋皮膚充填剤を導入する工程を含み、二重架橋皮膚充填剤が、

（ａ）植物由来のヒトコラーゲンと、

（ｂ）架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾架橋誘導体、架橋ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾架橋誘導体、架橋ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾架橋誘導体、架橋酸化セルロース（ＯＣ）またはその修飾架橋誘導体、架橋ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾架橋誘導体、架橋リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾架橋誘導体、架橋カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾架橋誘導体、架橋カルボキシメチルセルロースまたはその修飾架橋誘導体、架橋結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾架橋誘導体、またはこれらの組み合わせと、を含み、

植物由来のヒトコラーゲンは、架橋した架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾架橋誘導体、架橋ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾架橋誘導体、架橋ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾架橋誘導体、架橋酸化セルロース（ＯＣ）またはその修飾架橋誘導体、架橋ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾架橋誘導体、架橋リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾架橋誘導体、架橋カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾架橋誘導体、架橋カルボキシメチルセルロースまたはその修飾架橋誘導体、架橋結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾架橋誘導体に架橋される、方法が本明細書で開示される。

【００４５】

関連する態様では、植物由来のヒトコラーゲンは、１型ヒト組換えコラーゲン（ｒｈコラーゲン）、またはＭＡまたはそのチオール化誘導体であるか、またはヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロースまたは結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）の修飾誘導体が、メタクリル化またはチオール化された誘導体を含むか、またはそれらの組み合わせである。

【００４６】

別の関連する態様では、架橋ＨＡが選択される場合、架橋ＨＡと植物由来のヒトコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。

【００４７】

関連する態様では、本方法は、非治療的であり、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの組み合わせを低減する。

【００４８】

一態様では、組織増強に使用するための重合性溶液または非重合性溶液であって、

（ａ）重合性溶液は、可視光の適用前に、可視光の適用と同時に、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンと、重合を誘導するための光開始剤とを含むか、または

（ｂ）非重合性溶液は、植物由来のヒトコラーゲンと、架橋ヒアルロン酸または架橋ＰＶＡ、または架橋ＰＧＥ、または架橋ＯＣを含む二重架橋皮膚充填剤を含み、植物由来のヒトコラーゲンが、架橋ヒアルロン酸または架橋ＰＶＡ、または架橋ＰＧＥ、または架橋ＯＣに架橋され、

上述の使用は、表皮の下の組織空間に上述の重合性溶液または非重合性溶液を注入する工程と、その後に、重合性溶液または非重合性溶液を所望の構成内で成型または形を整え、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕を低減する工程と、を含む。

【００４９】
関連する態様では、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンは、メタクリル化またはチオール化されているか、または重合性溶液は、さらに、ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体またはその光重合性修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体またはその光重合性修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体またはその光重合性修飾誘導体、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾誘導体またはその光重合性修飾誘導体、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾誘導体またはその光重合性修飾誘導体、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾誘導体またはその光重合性修飾誘導体、カルボキシメチルセルロースまたはその修飾誘導体またはその光重合性修飾誘導体、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾誘導体またはその光重合性修飾誘導体、またはこれらの組み合わせを含み、場合により、その誘導体は、メタクリル化またはチオール化された誘導体を含むか、またはそれらの組み合わせを含む。
【００５０】
別の関連する態様では、組織増強は、任意の医学的または歯科的状態（歯肉移植／歯周病）の結果として必要とされる。さらに関連する態様では、組織増強は、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの組み合わせを低減する。
【００５１】
一態様では、表皮の下の組織空間内に細胞増殖促進足場を誘導する方法であって、組織空間に溶液を導入する工程を含み、この溶液は、
（ａ）植物由来のヒトコラーゲンと、
（ｂ）少なくとも１つの成長因子またはその供給源と、を含み、
この方法は、コラーゲンを含む組織の治癒または置換を促進する、方法が本明細書で開示される。
【００５２】
関連する態様では、植物由来のコラーゲンは、１型組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）を含むか、または少なくとも１つの成長因子の供給源は、血漿または多血小板血漿を含むか、またはコラーゲンを含む組織が、皮膚を含むか、またはそれらの任意の組み合わせである。
【００５３】
別の態様では、本方法は、非治療的であり、細胞増殖促進足場が、組織空間内を充填し、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの組み合わせを低減する。
【００５４】
一態様では、細胞増殖促進足場を誘導する使用のための溶液であって、この溶液は、植物由来のヒトコラーゲンと、少なくとも１つの成長因子またはその供給源と、を含み、この使用は、表皮の下の組織空間にこの溶液を注入する工程を含み、この使用は、コラーゲンを含む皮膚組織の分解または損傷に起因する治癒または置換を促進するためのものである、使用のための溶液が本明細書で開示される。
【００５５】
関連する態様では、植物由来のコラーゲンは、１型組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）を含むか、または少なくとも１つの成長因子の供給源は、血漿または多血小板血漿を含むか、またはコラーゲンを含む組織が、皮膚を含むか、またはそれらの任意の組み合わせである。
【００５６】
別の関連する態様において、ｒｈコラーゲンは、そのメタクリレートまたはチオール誘導体を含む。
【００５７】
関連する態様では、この方法で使用される溶液は、さらに、ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、酸化セルロース（ＯＣ）またはその

修飾誘導体、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾誘導体、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾誘導体、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾誘導体、カルボキシメチルセルロースまたはその修飾誘導体、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾誘導体、またはこれらの組み合わせと、可視光の適用前に、可視光の適用と同時に、重合を誘導するための光開始剤、または架橋ヒアルロン酸または架橋ＰＶＡ、または架橋ＰＧＥ、または架橋ＯＣを含み、植物由来のヒトコラーゲンが、架橋ヒアルロン酸または架橋ＰＶＡ、または架橋ＰＧＥ、または架橋ＯＣに架橋される。

【００５８】

関連する態様では、本方法は、非治療的であり、細胞増殖促進足場が、組織空間内を充填し、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの組み合わせを低減する。

【００５９】

細胞増殖促進足場を誘導する使用のための溶液であって、この溶液は、植物由来のヒトコラーゲンと、少なくとも１つの成長因子またはその供給源と、を含み、この使用は、表皮の下の組織空間にこの溶液を注入する工程を含み、この使用は、コラーゲンを含む組織の分解または損傷に起因する治癒または置換を促進するためのものである、溶液が本明細書で開示される。

【００６０】

関連する態様では、少なくとも１つの成長因子の供給源は、血漿または多血小板血漿を含むか、または植物由来のコラーゲンは、１型組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）を含むか、またはコラーゲンを含む組織が、皮膚を含むか、またはそれらの組み合わせである。

【００６１】

別の関連する態様では、使用のための溶液は、さらに、ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、酸化セルロース（ＯＣ）またはその修飾誘導体、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾誘導体、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾誘導体、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾誘導体、カルボキシメチルセルロースまたはその修飾誘導体、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾誘導体、またはこれらの組み合わせと、可視光の適用前に、可視光の適用と同時に、重合を誘導するための光開始剤、または架橋ヒアルロン酸または架橋ＰＶＡ、または架橋ＰＧＥ、または架橋ＯＣを含み、植物由来のヒトコラーゲンが、架橋ヒアルロン酸または架橋ＰＶＡ、または架橋ＰＧＥ、または架橋ＯＣに架橋される。

【００６２】

一態様では、表皮の下の組織空間を充填する方法であって、（ａ）組織空間に重合性溶液を導入する工程であって、重合性溶液は、（ｉ）架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンおよび（ｉｉ）光開始剤を含む、該導入する工程と、上述の空間の表面にある表皮の表面に光を当てて重合を誘導する工程と、を含む、方法が本明細書で開示される。

【００６３】

関連する態様では、重合性溶液は、重合性溶液を、組織空間内の所望の構成内で成型または形を整える工程をさらに含み、この工程が、光を当てる工程と同時に起こるか、または光を当てる工程に続く。

【００６４】

別の関連する態様では、本方法は、非治療的であり、成型または形を整える工程が、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの組み合わせを低減する。

【００６５】

別の関連する態様では、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンは、メタクリル化またはチオール化された１型ヒト組換えコラーゲン（ｒｈコラーゲン）である。

【００６６】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の説明および図面から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００６７】

【図１Ａ】これまでに試験植物を形質転換するために使用されていた様々な発現カセットおよびベクターの構築を示す。研究の一部として合成された全てのコード配列は、タバコでの発現のために最適化された。本発明のいくつかの実施形態に係る植物発現ベクター内のＩ型コラーゲンαＩ鎖またはＩＩ型コラーゲンα２鎖のクローニングスキームを示す。

【図１Ｂ】これまでに試験植物を形質転換するために使用されていた様々な発現カセットおよびベクターの構築を示す。研究の一部として合成された全てのコード配列は、タバコでの発現のために最適化された。本発明のいくつかの実施形態に係る植物発現ベクター内の酵素プロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）のクローニングスキームを示す。

【図１Ｃ】これまでに試験植物を形質転換するために使用されていた様々な発現カセットおよびベクターの構築を示す。研究の一部として合成された全てのコード配列は、タバコでの発現のために最適化された。本発明のいくつかの実施形態に係る植物発現ベクター内のプロテイナーゼＣまたはプロテイナーゼＮのクローニングスキームを示す。

【図１Ｄ】これまでに試験植物を形質転換するために使用されていた様々な発現カセットおよびベクターの構築を示す。研究の一部として合成された全てのコード配列は、タバコでの発現のために最適化された。本発明のいくつかの実施形態に係る植物発現ベクター内のリシルヒドロキシラーゼ３（ＬＨ３）のクローニングスキームを示す。

【図２】これまでに使用されていた様々な共形質転換アプローチを示す。各発現カセットは、コード配列の短い名称で表される。コード配列は、表１に明記される。それぞれの共形質転換は、２つのｐＢＩＮＰＬＵＳバイナリベクターによって実行された。各長方形は、１つ、２つまたは３つの発現カセットを保有する単一のｐＢＩＮＰＬＵＳベクターを表す。プロモーターとターミネーターは、実施例１に明記される。

【図３】コラーゲンα１（３２４ｂｐフラグメント）またはコラーゲンα２（５３７ｂｐフラグメント）またはその両方について陽性であった植物を示す形質転換体の従来のマルチプレックスＰＣＲスクリーニングである。

【図４】同時形質転換２、３、４によって生成されたトランスジェニック植物の従来のウエスタンブロット分析である。全可溶性タンパク質を、タバコ共形質転換体２番、３番および４番から抽出し、抗コラーゲンＩ型抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＡＢ７４５）を用いて試験した。サイズマーカーは、Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ　Ｉｎｃ．製の番号ＳＭ０６７１であった。Ｗ．Ｔ．は、野生型タバコである。コラーゲンＩ型α１またはα２、または両方についてＰＣＲ陽性である植物において、陽性コラーゲンバンドを見ることができる。ヒト胎盤由来の５００ｎｇのコラーゲンＩ型の陽性対照バンド（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＣＣ０５０、ペプシン消化によってヒト胎盤から抽出された）は、トランスジェニック植物由来のサンプル中、全可溶性タンパク質の約０．３％（約１５０μｇ）に相当する。ヒトコラーゲンサンプルの約１４０ｋＤａの大きい方のバンドは、コラーゲンＩ型抗体の抗カルボキシ末端プロペプチド（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＭＡＢ１９１３）によって検出されるような、そのＣ－プロペプチドを有するプロコラーゲンである。ヒトコラーゲンサンプルの約１２０ｋＤａの小さい方のバンドは、プロペプチドを含まないコラーゲンである。それらの通常とは異なる組成に起因して、プロリンに富むタンパク質（コラーゲンを含む）は、ポリアクリルアミドゲル上を、予想より高い分子量を有するバンドとして一貫して移動する。したがって、分子量が約９５ｋＤａである、プロペプチドを含まないコラーゲン鎖は、約１２０ｋＤａのバンドとして移動する。

【図５】共形質転換８番（コラーゲン鎖に翻訳融合したアポプラストシグナルを保有する）によって生成するトランスジェニック植物の従来のウエスタンブロット分析である。トランスジェニックタバコの葉から全可溶性タンパク質を抽出し、抗コラーゲンＩ型抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＡＢ７４５）を用いて試験した。陽性コラーゲンα

２バンドは、植物８～１４１で見られる。ヒト胎盤由来のＩ型コラーゲン（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＣＣ０５０）を対照として使用した。
【図６Ａ】コラーゲン三重ヘリックス組織化と、熱処理およびトリプシンまたはペプシンの消化によって以前に認可を受けた熱安定性を示す。タバコ２－９（ｃｏｌ　α１のみを発現し、Ｐ４Ｈを発現しない）および３－５（ｃｏｌ　α１＋２とヒトＰ４Ｈαおよびβサブユニットの両方を発現する）からの全可溶性タンパク質を熱処理し（３８℃または４３℃で１５分間）、その後、トリプシン消化し（室温［ＲＴ］で２０分間）、ウエスタンブロット手順において、抗コラーゲンＩ型抗体を用いて試験した。陽性対照は、５００ｎｇのヒトコラーゲンＩ型＋ｗ．ｔ．タバコの全可溶性タンパク質のサンプルであった。
【図６Ｂ】コラーゲン三重ヘリックス組織化と、熱処理およびトリプシンまたはペプシンの消化によって以前に認可を受けた熱安定性を示す。全可溶性タンパク質は、トランスジェニックタバコ１３－６（コラーゲンＩ型α１およびα２鎖（矢印によって示される）、ヒトＰ４ＨαおよびβサブユニットならびにヒトＬＨ３を発現する）から抽出され、熱処理し（３３℃、３８℃または４２℃で２０分間）、三重ヘリックスの再組織化を防ぐために氷上ですぐに冷却し、室温（約２２℃）で３０分間、ペプシンでインキュベートし、その後、標準的なウエスタンブロット手順において、抗コラーゲンＩ型抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＡＢ７４５）を用いて試験した。陽性対照は、５０ｎｇのヒトコラーゲンＩ型（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＣＣ０５０、ペプシン消化によってヒト胎盤から抽出された）のサンプルを野生型（ｗ．ｔ．、ｗｔ）タバコから抽出された全可溶性タンパク質に添加したものであった。
【図７】野生型タバコについて行われた従来のノーザンブロット分析を示す。ブロットは、タバコＰ４Ｈ　ｃＤＮＡでプローブされた。
【図８】同時形質転換２、３、１３によって生成されたトランスジェニック植物の従来のウエスタンブロット分析である。全可溶性タンパク質を、タバコ共形質転換体から抽出し、抗ヒトＰ４Ｈαおよびβおよび抗コラーゲンＩ型抗体を用いて試験した。
【図９】通常の光レジメンで成長させた交雑液胞標的植物Ａ（２－３００＋２０－２７９）と、暗室で８日間成長させた１３－６５２液胞標的植物の従来のウエスタンブロット分析（レーン１）である。全ての植物は、外因性のｃｏｌ１、ｃｏｌ２、Ｐ４Ｈ－αおよびＰ４Ｈ－β、ならびにＬＨ３を発現する（ＰＣＲ検証済み）。
【図１０】トリプシンで消化した後のタバコ葉由来の精製コラーゲンを示す。コラーゲンは、材料および方法の章で詳述されたように、１００ｍＭのＴｒｉｓバッファ中で粉砕され、遠心分離され、タンパク質分解され、高塩濃度バッファ中で沈殿させた、タバコ植物トランスジェニック葉の系統番号１３－６から精製された。再懸濁後、コラーゲンを含有するペレットを洗浄し、透析し、濃縮して最終生成物にした。このゲルは、集めたコラーゲンサンプルのクマシー染色分析を示し、レーン１および２は、３００ｍｇ／Ｌのトリプシンを用いたプロコラーゲンの消化後に得られたコラーゲンである。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（０．５ｍｇ／ｍｌ）をロードし、コラーゲン１型α１およびα２鎖の陽性対照として実行した。
【図１１】様々な濃度のトリプシンで消化した後のタバコ葉由来の精製コラーゲンを示す。２０ｍｇ／Ｌのトリプシン（レーン１～７）または３０ｍｇ／Ｌのトリプシン（レーン８～１０）で消化した後、図１０のようにコラーゲンを抽出し、精製した。生成物を１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、クマシー系の染色液で分析した。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（０．５ｍｇ／ｍｌ）をロードし、コラーゲン１型α１およびα２鎖の陽性対照として実行した。
【図１２】トリプシンおよびペプシンで消化した後のタバコ葉由来の精製コラーゲンを示す。３０ｍｇ／Ｌのトリプシンおよび１μｇ／２００ｍｌのペプシンで消化した後、コラーゲンを図１０のように抽出し、精製した（レーン１～２）。生成物を１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、クマシー系の染色液で分析した。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（０．５ｍｇ／ｍｌ）をロードし、コラーゲン１型α１およびα２鎖の陽性対照として実行した。

【図１３】プロコラーゲンをスブチリシンまたはブロメラインで消化して得られたコラーゲン鎖を示す。コラーゲンは、１００ｍＭのＴｒｉｓバッファ中で粉砕され、遠心分離され、スブチリシン（１～２５ｍｇ／Ｌ）またはブロメライン（１～２５ｍｇ／Ｌ）のいずれかで３時間または６時間インキュベートしてタンパク質分解された、タバコ植物トランスジェニック葉の系統番号１３－３６１から精製された。サンプルを１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。コラーゲン鎖は、抗コラーゲンＩ型を使用して免疫検出された。均質化し、遠心分離した後に集めた未処理の上澄み液を、コラーゲンを含まない陰性対照として使用した（レーン３～４ｓｕｐ）。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（２．５μｇ）を、α１およびα２鎖の陽性対照として使用した（レーン１）。

【図１４】プロコラーゲンをパパインで消化して得られたコラーゲン鎖を示す。コラーゲンは、１００ｍＭのＴｒｉｓバッファ中で粉砕され、遠心分離され、パパイン（１～２５ｍｇ／Ｌ）で、３時間または６時間のインキュベート時間でタンパク質分解された、タバコ植物トランスジェニック葉の系統番号１３－３６１から精製された。サンプルを１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。コラーゲン鎖は、抗コラーゲンＩ型を使用して免疫検出された。均質化し、遠心分離し、酵素を用いずに１５℃で３時間（レーン３）または６時間（レーン２）でインキュベートした後に集めた未処理の上澄み液を、コラーゲンを含まない陰性対照として使用した。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（２．５μｇ）を、α１およびα２鎖の陽性対照として使用した（レーン１）。

【図１５】プロコラーゲンをフィシンまたはサビナーゼで消化して得られたコラーゲン鎖を示す。コラーゲンは、１００ｍＭのＴｒｉｓバッファ中で粉砕され、遠心分離され、フィシン（１～２５ｍｇ／Ｌ）またはサビナーゼ（１～２５ｍｇ／Ｌ）で、３時間または６時間のインキュベート時間でタンパク質分解された、タバコ植物トランスジェニック葉の系統番号１３－３６１から精製された。サンプルを１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。コラーゲン鎖は、抗コラーゲンＩ型を使用して免疫検出された。タンパク質分解の前に集めた未処理の上澄み液を、コラーゲンを含まない対照サンプルとして使用した（レーン３）。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（２．５μｇ）を、α１およびα２鎖の陽性対照として使用した（レーン１）。

【図１６】プロコラーゲンをプロタメックスまたはアルカラーゼで消化して得られたコラーゲン鎖を示す。コラーゲンは、１００ｍＭのＴｒｉｓバッファ中で粉砕され、遠心分離され、プロタメックス（１～２５ｍｇ／Ｌ）またはアルカラーゼ（１～２５ｍｇ／Ｌ）で、３時間または６時間のインキュベート時間でタンパク質分解された、タバコ植物トランスジェニック葉の系統番号１３－３６１から精製された。サンプルを１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。コラーゲン鎖は、抗コラーゲンＩ型を使用して免疫検出された。タンパク質分解の前に集めた未処理の上澄み液を、コラーゲンを含まない対照サンプルとして使用した（レーン１４）。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（２．５μｇ）を、α１およびα２鎖の陽性対照として使用した（レーン１）。

【図１７】プロコラーゲンをエスペラーゼまたはニュートラーゼで消化して得られたコラーゲン鎖を示す。コラーゲンは、１００ｍＭのＴｒｉｓバッファ中で粉砕され、遠心分離され、３時間または６時間のインキュベート時間の後にエスペラーゼ（１～２５ｍｇ／Ｌ）またはニュートラーゼ（１～２５ｍｇ／Ｌ）でタンパク質分解された、タバコ植物トランスジェニック葉の系統番号１３－３６１から精製された。サンプルを１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。コラーゲン鎖は、抗コラーゲンＩ型を使用して免疫検出された。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（２．５μｇ）を、α１およびα２鎖の陽性対照として使用した（レーン１）。

【図１８】プロコラーゲンをエスペラーゼ８．０Ｌまたはアルカラーゼで消化して得られたコラーゲン鎖を示す。コラーゲンは、１００ｍＭのＴｒｉｓバッファ中で粉砕され、遠心分離され、３時間または６時間のインキュベート時間の後にエスペラーゼ（１～２５ｍ

ｇ／Ｌ）またはニュートラーゼ（１～２５ｍｇ／Ｌ）でタンパク質分解された、タバコ植物トランスジェニック葉の系統番号１３－３６１から精製された。サンプルを１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。コラーゲン鎖は、抗コラーゲンＩ型を使用して免疫検出された。均質化し、遠心分離し、タンパク質酵素を用いずに１５℃で３時間（レーン３）または６時間（レーン２）でインキュベートした後に集めた未処理の上澄み液を、コラーゲンを含まない陰性対照として使用した。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（２．５μｇ）を、α１およびα２鎖の陽性対照として使用した（レーン１）。

【図１９】プロコラーゲンをフィシンで消化した後、様々な精製段階で得られたコラーゲン鎖を示す。コラーゲンは、１００ｍＭのＴｒｉｓバッファ中で粉砕され、遠心分離され、１５℃での３時間のインキュベート時間の後にフィシン（５ｍｇ／Ｌ）でタンパク質分解された、タバコ植物トランスジェニック葉の系統番号１３－３６１から精製された。サンプルを１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。コラーゲン鎖は、抗コラーゲンＩ型を使用して免疫検出された。粉砕し、遠心分離し、上澄み液をフィシンでインキュベートした後に集めたサンプルを、レーン５にロードした。レーン６～１４は、精製プロセスの様々な段階でのフィカイン処理されたコラーゲンのサンプルを示す。レーン６：フィシン後にインキュベートし、遠心分離したサンプル。レーン７：塩沈殿させ、０．５Ｍ酢酸に再懸濁した後。レーン８：遠心分離工程を追加した、レーン７と同じサンプル。レーン９：０．５Ｍ酢酸に再懸濁し、遠心分離した後のレーン８と同じサンプル。レーン１０：１０ｍＭのＨＣｌに再懸濁し、透析した後の成熟コラーゲン。レーン１１：濾過工程を追加した、レーン１０と同じサンプル。レーン１２：５倍濃縮工程を追加した、レーン１１と同じサンプル。レーン１３：２０倍濃縮工程を追加した、レーン１１と同じサンプル。レーン１４：５倍濃縮工程を追加した、レーン１３と同じサンプル。未処理のプロコラーゲンサンプル（レーン３～４）を、陰性対照として使用した。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（２．５μｇ）を、α１およびα２鎖の陽性対照として使用した（レーン１）。

【図２０】プロコラーゲンをフィシンで消化した後、様々な精製段階で得られたコラーゲン鎖を示す。コラーゲンは、１００ｍＭのＴｒｉｓバッファ中で粉砕され、遠心分離され、１５℃での３時間のインキュベート時間の後にフィシン（５ｍｇ／Ｌ）でタンパク質分解された、タバコ植物トランスジェニック葉の系統番号１３－３６１から精製された。サンプルを１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。コラーゲン鎖は、抗コラーゲンＩ型を使用して免疫検出された。粉砕し、遠心分離し、上澄み液をフィシンでインキュベートした後に集めたサンプルを、レーン５にロードした。レーン６～１４は、精製プロセスの様々な段階でのフィカイン処理されたコラーゲンのサンプルを示す。レーン６：フィシン後にインキュベートし、遠心分離したサンプル。レーン７：塩沈殿させ、０．５Ｍ酢酸に再懸濁した後。レーン８：遠心分離工程を追加した、レーン７と同じサンプル。レーン９：０．５Ｍ酢酸に再懸濁し、遠心分離した後のレーン８と同じサンプル。レーン１０：１０ｍＭのＨＣｌに再懸濁し、透析した後の成熟コラーゲン。レーン１１：濾過工程を追加した、レーン１０と同じサンプル。レーン１２：５倍濃縮工程を追加した、レーン１１と同じサンプル。レーン１３：２０倍濃縮工程を追加した、レーン１１と同じサンプル。レーン１４：５倍濃縮工程を追加した、レーン１３と同じサンプル。未処理のプロコラーゲンサンプル（レーン３～４）を、陰性対照として使用した。プロペプチドを含まないブタ由来コラーゲン（２．５μｇ）を、α１およびα２鎖の陽性対照として使用した（レーン１）。

【図２１】精製の様々な段階でのフィシン処理後サンプルのコラーゲン含有量を示す。コラーゲンを含有するサンプルを、材料および方法の章に記載されるリアクターサイズのＡＭＳ系精製手順のそれぞれの抽出段階および精製段階で集めた。サンプルを、プロペプチド除去のためにフィシンで処理し（５ｍｇ／Ｌ、１５℃、３時間）、１０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、クマシー系の染色液で分析した。

【図２２】食品グレードのフィシンによるプロコラーゲン開裂の最適化（フィシン濃度お

よび反応時間の最適化）を示す。ＡＭＳペレット化された、プロコラーゲンを発現するタバコ葉抽出物を抽出バッファに再懸濁し、次いで、食品グレードのフィシンの濃度を上げながら（５～１５ｍｇ／Ｌ）インキュベートした。次いで、反応混合物を１５℃で１～３時間インキュベートした。遠心分離によって開裂を終了し、タンパク質サンプルを８％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗コラーゲンＩ型抗体を用い、α－１およびα－２コラーゲン鎖をイムノブロッティングした。プロコラーゲンバンドは、白色の矢印によって示され、一方、赤色の矢印は、開裂したコラーゲンのバンドを示す。

【図２３Ａ】医薬品グレードのフィシンによるプロコラーゲン開裂の最適化（フィシン濃度および反応時間の最適化）を示す。ＡＭＳペレット化された、プロコラーゲンを発現するタバコ葉抽出物を抽出バッファに再懸濁し、次いで、医薬品グレードのフィシンの濃度を上げながら（２．５～１０ｍｇ／Ｌ）インキュベートした。次いで、反応混合物を１５℃で０．５～３時間インキュベートした。遠心分離によって開裂を終了し、タンパク質サンプルを８％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗コラーゲンＩ型抗体を用い、α－１およびα－２コラーゲン鎖をイムノブロッティングした。矢印は、プロコラーゲンバンドとコラーゲンバンドを示す。

【図２３Ｂ】医薬品グレードのフィシンによるプロコラーゲン開裂の最適化（フィシン濃度および反応時間の最適化）を示す。ＡＭＳペレット化された、プロコラーゲンを発現するタバコ葉抽出物を抽出バッファに再懸濁し、次いで、医薬品グレードのフィシンの濃度を上げながら（２．５～１０ｍｇ／Ｌ）インキュベートした。次いで、反応混合物を１５℃で０．５～３時間インキュベートした。遠心分離によって開裂を終了し、タンパク質サンプルを８％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗コラーゲンＩ型抗体を用い、α－１およびα－２コラーゲン鎖をイムノブロッティングした。矢印は、プロコラーゲンバンドとコラーゲンバンドを示す。

【図２３Ｃ】医薬品グレードのフィシンによるプロコラーゲン開裂の最適化（フィシン濃度および反応時間の最適化）を示す。ＡＭＳペレット化された、プロコラーゲンを発現するタバコ葉抽出物を抽出バッファに再懸濁し、次いで、医薬品グレードのフィシンの濃度を上げながら（２．５～１０ｍｇ／Ｌ）インキュベートした。次いで、反応混合物を１５℃で０．５～３時間インキュベートした。遠心分離によって開裂を終了し、タンパク質サンプルを８％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗コラーゲンＩ型抗体を用い、α－１およびα－２コラーゲン鎖をイムノブロッティングした。矢印は、プロコラーゲンバンドとコラーゲンバンドを示す。

【図２４Ａ】医薬品グレードのフィシンによるプロコラーゲン開裂の最適化（反応バッファのｐＨおよび塩濃度の最適化）を示す。ＡＭＳペレット化された、プロコラーゲンを発現するタバコ葉抽出物を、様々なｐＨ値（５．５～９．５）で、ＮａＣｌ濃度を上げながら（０．５～３Ｍ）、１０ｍｇ／Ｌの医薬品グレードのフィシンを含有する抽出バッファに再懸濁させた。次いで、反応混合物を１５℃で１時間インキュベートした。遠心分離によって開裂を終了し、得られたペレットおよび上澄み液の両方のタンパク質サンプルを８％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗コラーゲンＩ型抗体を用い、α－１およびα－２コラーゲン鎖をイムノブロッティングした。矢印は、コラーゲンバンドを示す。

【図２４Ｂ】医薬品グレードのフィシンによるプロコラーゲン開裂の最適化（反応バッファのｐＨおよび塩濃度の最適化）を示す。ＡＭＳペレット化された、プロコラーゲンを発現するタバコ葉抽出物を、様々なｐＨ値（５．５～９．５）で、ＮａＣｌ濃度を上げながら（０．５～３Ｍ）、１０ｍｇ／Ｌの医薬品グレードのフィシンを含有する抽出バッファに再懸濁させた。次いで、反応混合物を１５℃で１時間インキュベートした。遠心分離によって開裂を終了し、得られたペレットおよび上澄み液の両方のタンパク質サンプルを８％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗コラーゲンＩ型抗体を用い、α－１およびα－２コラーゲン鎖をイムノブロッティングした。矢印は、コラーゲンバンドを示す。

【図２５】医薬品グレードのフィシンによるプロコラーゲン開裂の最適化（反応バッファ中のＥＤＴＡおよびＬ－システインの濃度の最適化）を示す。ＡＭＳペレット化された、プロコラーゲンを発現するタバコ葉抽出物を、様々な濃度のＬ－システイン（１０～１００ｍＭ－－濃度の上側パネル）およびＥＤＴＡ（８～８０ｍＭ－－濃度の下側パネル）を含有する抽出バッファ（ｐＨ７．５）に再懸濁させた。次いで、サンプルを、１ｍｇ／Ｌの医薬品グレードのフィシンと共に１５℃で１時間インキュベートした。遠心分離によって開裂を終了し、タンパク質サンプルを８％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗コラーゲンＩ型を用い、α－１およびα－２コラーゲン鎖をイムノブロッティングした。

【図２６】ｐＨ７．５での組換えトリプシンによる効果的なプロコラーゲン消化を示す。ＡＭＳペレット化された、プロコラーゲンを発現するタバコ葉抽出物を、Ｌ－システインおよびＥＤＴＡを含有する抽出バッファ（ｐＨ７．５）に再懸濁させた。次いで、サンプルを、３０～１００ｍｇ／Ｌの組換えトリプシンと共に１５℃で１～３時間インキュベートした。遠心分離によって開裂を終了し、タンパク質サンプルを８％ＳＤＳ　ＰＡＧＥ上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗コラーゲンＩ型を用い、α－１およびα－２コラーゲン鎖をイムノブロッティングした。

【図２７】剪断速度の関数としての粘度（イータ［η］、ｃＰ）を示す。実線－リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中の２．７ｍｇ／ｍＬのウシコラーゲン、破線は、ＰＢＳ中の２．７９ｍｇ／ｍＬのｒｈコラーゲン。▼：４℃での測定、▲：３７℃での測定。

【図２８】ＦＢ中の３．４ｍｇ／ｍＬのウシコラーゲンの、剪断速度の関数としての粘度を示す。▼：４℃での測定、▲：３７℃での測定。

【図２９】ＰＢＳ中の１０ｍｇ／ｍＬのｒｈコラーゲン－ＭＡの、剪断速度の関数としての粘度を示す。▲：４℃での測定、▼：３７℃での測定。

【図３０】ＨＡ／ＨＡＭＡを添加した場合と添加しない場合のＤＭＥＭにおけるｒｈコラーゲン－ＭＡの粘度測定を示す。

【図３１】光架橋の前（上側のグラフ）および光架橋の後（下側のグラフ）の異なる濃度でのｒｈコラーゲン－ＭＡ製剤の貯蔵弾性率および損失弾性率、ならびにｔａｎ位相シフト角を示す。

【図３２】周波数スイープ試験で記録され、１Ｈｚでプロットされた、３７℃でのＧ'およびＧ"値を示す。

【図３３Ａ】ｒｈコラーゲンおよびｒｈコラーゲンメタクリレートのプロセシングについてのフローチャートを提供する。プロコラーゲンおよびコラーゲンの上流の単離およびプロセシングを示す（工程Ａ～Ｈ）。

【図３３Ｂ】ｒｈコラーゲンおよびｒｈコラーゲンメタクリレートのプロセシングについてのフローチャートを提供する。下流のプロセシングの２つの段階（それぞれ、工程Ｉ－Ｍおよび工程Ｎ～ＰおよびＺ）を示す。

【図３３Ｃ】ｒｈコラーゲンおよびｒｈコラーゲンメタクリレートのプロセシングについてのフローチャートを提供する。下流のプロセシングの２つの段階（それぞれ、工程Ｉ－Ｍおよび工程Ｎ～ＰおよびＺ）を示す。

【図３４】５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲンメタクリレート（ＣｏｌｌＭＡ）（実線の黒色曲線）および５ｍｇ／ｍｌのコラーゲンＭＡ＋ポリビニルアルコールメタクリレート（ＰＶＭＡ）（淡灰色の曲線）の粘度（イータ［η］、ｃＰ）を、ｃｏｌｌＭＡ：ＰＶＡＭＡ比率が５：１（実線の曲線）、２：１（破線の曲線）、１：２（点線の曲線）で示す。比較のために、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲンメタクリレートの粘度を報告する（黒色の曲線）。

【図３５】５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡ（実線の黒色曲線）および５ｍｇ／ｍｌのコラーゲンＭＡ＋ヒアルロン酸メタクリレート（ＨＡＭＡ）（灰色の曲線）の粘度を、ｃｏｌｌＭＡ：ＨＡＭＡ比率が５：１（実線の曲線）、２：１（破線の曲線）で示す。比較のために、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲンメタクリレートの粘度を報告する（実線の黒色の曲線）。これらの材料は、まだ架橋されていないが、注入後に架橋される。粘度は、材料の注

入性を表す。（ＨＡＭＡ－ＨＡメタクリレート；コラーゲンＭＡ（ＣｏｌＭＡ）－ｒｈコラーゲンメタクリレート。）
【図３６】５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡ（実線の黒色曲線）および５ｍｇ／ｍｌのコラーゲンＭＡ＋酸化セルロース（ＯＣ）（灰色の曲線）の粘度を、ｃｏｌｌＭＡ：ＯＣ比率が５：１（実線の曲線）、２：１（破線の曲線）、１：２（点線の曲線）で示す。比較のために、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲンメタクリレートの粘度を報告する（実線の黒色の曲線）。
【図３７】図３３～３５のデータの比較を提供する。５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡ（実線の黒色曲線）および５ｍｇ／ｍｌのコラーゲンＭＡ＋様々な添加剤（図に示されるような淡灰色から暗灰色の曲線）の粘度を、比率が５：１（実線の曲線）、２：１（破線の曲線）、１：２（点線の曲線）で示す。比較のために、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲンメタクリレートの粘度を報告する（実線の黒色の曲線）。
【図３８】ｃｏｌｌＭＡ：添加剤比率２：１でのｒｈコラーゲンメタクリレート（ＣｏｌＭＡ）＋添加剤の重合性足場を示す。ＣｏｌＭＡ単独を、ポリビニルアルコールメタクリレート（ＰＶＭＡ）、ヒアルロン酸メタクリレート（ＨＡＭＡ）、または酸化セルロース（ＯＣ）と組み合わせたＣｏｌＭＡと比較した。溶液を光開始剤２－ヒドロキシ－４'－（２－ヒドロキシエトキシ）－２－メチルプロピオフェノン（０．１％）と混合し、紫外（ｕｖ）光（３６５ｎｍ）を２０秒間照射した。
【図３９】生存率試験を示す。上側のグラフ：ｒｈコラーゲン－ＰＲＰマトリックスから放出されたＧＦ存在下で培養された場合（黒色）、活性化ＰＲＰから放出されたＧＦ存在下で培養された場合（灰色）、および飢餓条件下で培養された場合（白色）に、正常なヒト線維芽細胞（ｎＨＤＦ）の生存率（および増殖）の比較。このデータは、２人の異なるドナーから抽出されたＰＲＰで実行された２つの異なる線維芽細胞増殖アッセイの平均である。＊有意差（ｐ＜０．０００２）。下側の挿入図：ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスから放出されたＧＦ存在下で増殖した（Ａ）、活性化ＰＲＰから放出されたＧＦ存在下で増殖した（Ｂ）、および飢餓条件下で培養された（Ｃ）、ｎＨＤＦ細胞の顕微鏡画像。細胞を播種してから７日後に画像を撮影した。
【図４０】時間の関数としての足場の重量を示す（各点は、１時点あたり２匹のラット、ラットあたり３回の注入の６個の足場の平均である）。
【図４１Ａ】皮下ラットモデルを使用する研究（時間の関数としてのＰＤＧＦ含有量）を示す。＊ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスとＰＲＰ単独との間の有意差（ｐ＜０．０３８）、およびｒｈコラーゲンマトリックス単独とＰＲＰ単独との間の有意差（ｐ＜０．００４）。＊＊ｒｈコラーゲンマトリックス単独とＰＲＰ単独との間、ｒｈコラーゲンマトリックス単独とＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスとの間の有意差（ｐ＜０．０２１）。
【図４１Ｂ】皮下ラットモデルを使用する研究（皮下ラットモデルにおける時間の関数としてのＶＥＧＦ含有量）を示す。＊＊ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスとＰＲＰ単独との間、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスとｒｈコラーゲンマトリックス単独との間の有意差（ｐ＜０．００７）。
【図４２】ラットモデルにおいて４５（または３０）日間にわたる、注入されたマトリックス中の名目上のＰＤＧＦおよびＶＥＧＦの含有量の積分を示す。
【図４３Ａ】ＰＲＰまたはｒｈコラーゲン／ＰＲＰマトリックスで治療された腱障害（成熟線維症）のラットモデルにおける、アキレス腱の組織病理学的スコアリングを示す。
【図４３Ｂ】ＰＲＰまたはｒｈコラーゲン／ＰＲＰマトリックスで治療された腱障害（単核炎症細胞の存在）のラットモデルにおける、アキレス腱の組織病理学的スコアリングを示す。
【図４３Ｃ】ＰＲＰまたはｒｈコラーゲン／ＰＲＰマトリックスで治療された腱障害（未成熟肉芽組織の存在）のラットモデルにおける、アキレス腱の組織病理学的スコアリングを示す。
【図４４】３２ゲージ針および１ｍｌのシリンジ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ［

ＢＤ］、参照番号３０９６２８）からの架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）（黒色の曲線－□）、架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）＋モノマーコラーゲン（▽）、または架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）＋原線維化コラーゲン（△）の注入に必要な発現力（ニュートン、Ｎ）の比較を示す。架橋ＨＡ＋モノマーコラーゲンおよび架橋ＨＡ＋原線維化コラーゲンは、半相互貫入網目構造であり、コラーゲンはいずれにも架橋されていない。

【図４５】３２ゲージ針および１ｍｌのシリンジ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ［ＢＤ］、参照番号３０９６２８）からの架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）（黒色）、または架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）とコラーゲンの二重架橋網目構造（灰色）の注入に必要な発現力（ニュートン、Ｎ）の比較を示す。

【図４６】架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）（黒色）、架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）＋モノマーコラーゲン（▽）、または架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）＋原線維化コラーゲン（△）の粘度（イータ［η］、ｃＰ）の比較を示す。

【図４７】架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）（黒色）、または架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）とコラーゲンの二重架橋網目構造（灰色）の粘度（イータ［η］、ｃＰ）の比較を示す。

【図４８Ａ】メタクリル化コラーゲン（ｃｏｌｌＭＡ／ｒｈコラーゲンＭＡ）溶液の上部に置かれたマウスパッチの写真を示す。

【図４８Ｂ】皮膚を通して白色発光ダイオード（ＬＥＤ）トーチで照射した際の皮膚組織内で重合し、組み込まれたメタクリル化コラーゲン（ｃｏｌｌＭＡ／ｒｈコラーゲンＭＡ）の写真を示す。

【図４９】皮膚充填剤の成分の２つの例を示す。左側は、架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）とｒｈコラーゲンとを含む、半相互貫入皮膚充填剤の概略図である。右側は、架橋ヒアルロン酸とｒｈコラーゲンとを含む二重架橋皮膚充填剤の概略図であり、架橋ＨＡはさらにｒｈコラーゲンに架橋されている。淡灰色の棒状物は、ＨＡ架橋剤を示し、黒色の紐状物はＨＡを表し、ｒｈコラーゲンは、淡灰色の紐状物として表され、第２の架橋剤は、架橋ＨＡとｒｈコラーゲンとを架橋し、黒色の円として表される。

【図５０】コーン（１°）対プレートの構成（Ｃ３５／１）を使用するＨＡＡＫＥ－ＲＨＥＯ　ＳＴＲＥＳＳ　６００（商標）機器（ＴＨＥＲＭＯ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ（商標））を使用して測定された、様々な二重架橋製剤についての貯蔵弾性率および損失弾性率のレオロジー測定値を示すグラフを示す。周波数スイープ測定は、０．８％の一定の変形、０．０２～１００Ｈｚの範囲の周波数で実行された。市販の皮膚充填剤（実線および破線：実線の黒色－市販製品；実線の▽－製剤２；実線の□－製剤２Ａ；実線の上向きの五角形－製剤３；実線の下向きの五角形－製剤１Ａ；実線の○－製剤１；破線の△－市販製品Ｇ"；破線の▽－製剤２Ｇ"；破線の□－製剤２Ａ－Ｇ"；破線の○－製剤１Ｇ"；破線の下向きの五角形－製剤１Ａ　Ｇ"；破線の上向きの五角形－製剤３"）と比較した、代表的な二重架橋製剤（表７を参照）の貯蔵弾性率（実線）および損失弾性率（破線）。

【図５１】図５０に報告された製剤の貯蔵弾性率および損失弾性率のｆ＝１Ｈｚでの比較を示すグラフを示す。（白色の棒グラフＧ'［Ｐａ］；灰色の棒グラフＧ"［Ｐａ］。）

【図５２】製剤２、２Ａおよび３（表８）について使用される１ｍｌのＬＵＥＲ－ＬＯＫ（商標）シリンジ（ＢＥＣＴＯＮ－ＤＩＣＫＩＮＳＯＮ（商標））と３０Ｇの針を用いる、ＭＵＬＴＩＴＥＳＴ　１－ｉ　ＭＥＣＭＥＳＩＮ（商標）圧縮試験機を用いて測定された、選択された二重架橋製剤の注入性を示すグラフを示す。二重架橋製剤との比較のために、市販の皮膚充填剤が含まれる。代表的な二重架橋製剤のプランジャ変位（１２ｍｍ／分）の関数としての発現力を、市販の皮膚充填剤と比較した。（黒色の△－市販の皮膚充填剤；灰色の□－製剤３；灰色の上向きの五角形－製剤２；灰色の▽－製剤２Ａ。）

【図５３】高度に架橋したＨＡ（黒色の断続的な線の横向きの三角形）と比較した場合の、可視光で光硬化する前（破線）および後（実線）の高度に架橋したヒアルロン酸（ＨＡ）、ｒｈコラーゲンメタクリレート（ＭＡ）および／またはｒｈコラーゲンの様々な組み合わせ（表１０を参照）についての貯蔵弾性率および損失弾性率のレオロジー測定を示すグラフを示す。光硬化の前に、貯蔵弾性率および損失弾性率は、コーン（１°）対プレートの構成（Ｃ３５／１）を使用するＨＡＡＫＥ－ＲＨＥＯ　ＳＴＲＥＳＳ　６００（商標）

機器（ＴＨＥＲＭＯ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ（商標））を使用して測定された。周波数スイープ測定は、０．８％の一定の変形、０．０２～１００Ｈｚの範囲の周波数で実行された。光硬化（白色ＬＥＤ懐中電灯を用い、可視光を６分間照射）の後、貯蔵弾性率および損失弾性率は、鋸歯状プレートとプレートの構成（ＰＰ２０）を使用するＨＡＡＫＥ－ＲＨＥＯ　ＳＴＲＥＳＳ　６００（商標）機器（ＴＨＥＲＭＯ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ（商標））を使用して測定された。周波数スイープ測定は、３Ｐａの一定の剪断応力、０．０２～１００Ｈｚの範囲の周波数、０．３Ｎの一定の垂直負荷で実行された。（実線の△－製剤４－後；実線の▽－製剤５－後；実線の□－製剤６－後；破線の上向きの五角形－製剤４－前；破線の下向きの五角形－製剤５－前；破線の○－製剤６－前；破線－黒色の点線の横向きの三角形－高度に架橋したＨＡ。）

【図５４】Ｆ＝１Ｈｚの周波数で、表１０の製剤４、５および６の光硬化の前後、および非硬化性の高度に架橋したＨＡの貯蔵弾性率と損失弾性率の比較を示すグラフを示す。（白色の棒グラフG'［Ｐａ］；灰色の棒グラフG"［Ｐａ］。）

【図５５】全てのサンプルについて使用される１ｍｌのＬＵＥＲ－ＬＯＫ（商標）シリンジ（ＢＥＣＴＯＮ－ＤＩＣＫＩＮＳＯＮ（商標））と３０Ｇの針を用いる、ＭＵＬＴＩＴＥＳＴ　１－ｉ　ＭＥＣＭＥＳＩＮ（商標）圧縮試験機を用いて測定された、選択された二重架橋製剤の注入性を示すグラフを示す。代表的な二重架橋製剤のプランジャ変位（１２ｍｍ／分）の関数としての発現力を、高度に架橋したＨＡと比較した。（黒色の△－高度に架橋したＨＡ；灰色の▽－製剤４；灰色の□－製剤５；灰色の○－製剤６。）

【図５６】Ｓｐｒａｇｕｅ　ｄａｗｌｅｙラットの背中に製剤２、２Ａおよび対照（市販の皮膚充填剤）を皮下注入してから７日後の代表的な組織学画像を示す。いずれの場合も、矢印は、組織再生の開始を示す、製剤２および２Ａの炎症反応の上昇（重症ではない）を示している。

【図５７】図５６で分析された組織からの製剤２、２Ａおよび対照の７日目の組織学的スコアを示す。（黒色－対照；淡灰色－製剤２；暗灰色－製剤２Ａ。）

【図５８】７日目、１４日目、２０日目の光硬化性皮膚充填剤の光硬化性組織学的スコアリング結果を示す。（黒色－対照である高度に架橋したＨＡ；灰色－製剤４　高度に架橋したＨＡとｒｈＣｏｌＭＡ。）

【図５９】製剤４（灰色－高度に架橋したＨＡ＋ｒｈＣｏｌＭＡ）と対照（黒色－高度に架橋したＨＡ）を注入して７日後および１４日後の線維症スコアの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【００６８】

光開始性の皮膚充填剤および二重架橋皮膚充填剤、および細胞増殖促進足場、ならびに例えば、軟組織増強のためのこれらを使用する方法が本明細書で開示される。

【００６９】

コラーゲン産生植物を使用して、コラーゲンだけではなくコラーゲン鎖を産生することができるが、このような鎖は正しくヒドロキシル化されておらず、そのため、その自己組織化は、植物内であろうとなかろうと、本出願の植物由来のヒトコラーゲンとは対照的に、本質的に不安定なコラーゲンを生じる。

【００７０】

本発明の重合性溶液および二重架橋溶液、および使用方法を低減しつつ、実施するために、実施者は、コラーゲンの正しいヒドロキシル化を確実にし、それにより、ヒトＩ型コラーゲンの特徴（例えば、分子構造、温度安定性、細胞相互作用）を厳密に模倣するコラーゲンの植物内での産生を可能にする、植物発現アプローチを考案した。

【００７１】

一態様では、表皮の下の組織空間を充填する方法であって、

（ａ）組織空間に重合性溶液を導入する工程であって、重合性溶液は、

（ｉ）架橋可能な植物由来のヒトコラーゲン、および

（ｉｉ）光開始剤を含む、該導入する工程と、

（ｂ）上述の空間の表面にある表皮の表面に光を当てて重合を誘導する工程と、を含む

、方法が本明細書で開示される。

【００７２】

特定の実施形態では、本方法は、さらに、光を当てる工程の前に、または光を当てる工程と同時に、組織空間内の所望の構成内で重合性溶液を成型または形を整える工程を含む。別の特定の実施形態では、成型または形を整える工程は、筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減する。

【００７３】

さらに別の特定の実施形態では、ポリマー溶液は、さらに、ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、酸化セルロース（ＯＣ）またはその修飾誘導体、またはこれらの組み合わせを含む充填剤を含む。１つの特定の実施形態では、単離された植物由来のヒトコラーゲンは、場合により、例えば、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロース、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）、またはそれらの組み合わせなどを用いて製剤化される。

【００７４】

修飾誘導体としては、限定されないが、例えば、ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣの光重合性バージョンが挙げられる。修飾としては、限定されないが、メタクリル化またはチオール化が挙げられる。さらに別の特定の実施形態では、光源は、発光ダイオード（ＬＥＤ）、レーザ、キセノンランプなどから選択される。

【００７５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、それ自体にのみ架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、チオール化ｒｈコラーゲンに架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、任意のＭＡ／チオール化添加剤に架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、メタクリル化ＨＡに架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、チオール化ＨＡに架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、メタクリル化ＰＶＡに架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、チオール化ＰＶＡに架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、メタクリル化ＰＥＧに架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、チオール化ＰＥＧに架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、メタクリル化ＯＣに架橋する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤において、メタクリレートｒｈコラーゲンは、照射条件下で、チオール化ＯＣに架橋する。

【００７６】

当業者は、光硬化性製剤が、実際に硬化前には半ＩＰＮであり、硬化後にＩＰＮ（ｉｎｔｅｒｐｅｎｅｔｒａｔｅｄ　ｎｅｔｗｏｒｋ：相互貫入網目構造）になることを理解するであろう。ＩＰＮは、２つの絡み合った網目構造を包含してもよく、各１つがそれ自体に架橋し、他のものには架橋しない。

【００７７】

いくつかの実施形態では、架橋製剤は、非修飾ｒｈコラーゲンが照射下で架橋することができず、したがって、最終的な剛性を高めないため、ｒｈコラーゲンの最終的な合計量

を減らすことなく、（光を用いる）架橋後の剛性を調整するように非修飾ｒｈコラーゲンの比率を含む。メタクリル化ＨＡも、この最終的な製剤に加えられてもよい。

【００７８】

いくつかの実施形態では、ＨＡまたはＭＡ－ＨＡは、架橋剤、例えば、実施例２３に記載されるように、例えば、限定されないがＢＤＤＥを用い、それ自体に架橋されてもよい。いくつかの実施形態では、ＨＡまたはＭＡ－ＨＡを架橋する架橋剤は、ジビニルスルホン（ＤＶＳ）またはグルタルアルデヒドを含む。特定の実施形態では、ＢＤＤＥで架橋されたＨＡまたはＭＡ－ＨＡは、ｒｈコラーゲンまたはＭＡ－ｒｈコラーゲンにさらに架橋せず、いわゆる相互貫入網目構造を生成する（図４９の左側）。

【００７９】

さらに別の特定の実施形態では、植物由来のコラーゲンは、ｒｈコラーゲンを含む。別の特定の実施形態では、植物由来のコラーゲンは、遺伝子組み換え植物から得られる。別の特定の実施形態では、遺伝子組換え植物は、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラ、ニンジンおよび綿からなる群から選択される遺伝子組換え植物である。特に、遺伝子組み換え植物は、タバコ植物である。

【００８０】

さらに別の特定の実施形態では、遺伝子組換え植物は、ＣＯＬ１、ＣＯＬ２、Ｐ４Ｈ－α、Ｐ４Ｈ－βおよびＬＨ３からなる群から選択されるヒトデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）の少なくとも１つの遺伝子配列の発現可能な配列を含む。別の特定の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンは、配列番号３に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも修飾された１つのヒトコラーゲンα－１鎖と、配列番号６に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも１つの修飾ヒトコラーゲンα－２鎖と、を含み、遺伝子組換え植物は、さらに、外因性プロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）を発現する。別の特定の実施形態では、本方法は、リシルヒドロキシラーゼ（ＬＨ）、プロテアーゼＮおよびプロテアーゼＣからなる群から選択される外因性ポリペプチドを発現する工程をさらに含む。さらに別の特定の実施形態では、ヒトコラーゲンα－１鎖は、配列番号１に記載される配列によってコードされる。別の特定の実施形態では、ヒトコラーゲンα－２鎖は、配列番号４に記載される配列によってコードされる。

【００８１】

さらに別の実施形態では、外因性Ｐ４Ｈは、哺乳動物Ｐ４Ｈである。特に、外因性Ｐ４Ｈは、ヒトＰ４Ｈである。さらに別の実施形態では、本方法は、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－１を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と、をさらに含む。さらに別の実施形態では、本方法は、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－２を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と、をさらに含む。

【００８２】

さらに別の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンは、アテロコラーゲンである。別の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンは、配列番号１および配列番号４に由来するアミノ酸（ＡＡ）配列を有するアテロコラーゲンである。アテロコラーゲンは、配列番号１および配列番号４の産物である、プロコラーゲンの酵素消化（例えば、フィシンによる）に由来する。

【００８３】

さらに別の実施形態では、光開始剤は、可視光に応答して重合性溶液の重合を誘導する。特に、可視光は、３９０～８００ｎｍの波長を有する。特に、光開始剤は、エオシンＹ＋トリエタノールアミン、リボフラビンなどからなる群から選択される。

【００８４】

別の実施形態では、光開始剤は、紫外（ＵＶ）光に応答して重合性溶液の重合を誘導する。特に、光開始剤は、リチウム　フェニル－２，４，６－トリメチルベンゾイルホスフィネート（ＬＡＰ）または１－［４　２－ヒドロキシ－１－［４－（２－ヒドロキシエト

キシ）フェニル］－２－メチルプロパン－１－オン（ＩＲＧＡＣＵＲＥ（登録商標）２９５９）からなる群から選択される。

【００８５】

別の実施形態では、光開始剤は、赤外光に応答して重合性溶液の重合を誘導する。

【００８６】

さらに別の実施形態では、重合性溶液は、２７ゲージ～３３ゲージの範囲の中空針またはカニューレを介して組織空間に導入される。

【００８７】

さらに別の実施形態では、組織空間内の重合性溶液は、手動マッサージによって所望の構成内で成型または形を整えられる。別の実施形態では、組織空間内の重合性溶液は、成型または形を整える器具を使用して、所望の構成内で成型または形を整えられる。

【００８８】

さらに別の実施形態では、組織空間内の重合性溶液は、室温で本質的にゲル化不能である。別の実施形態では、組織空間内の重合性溶液は、３７℃で本質的にゲル化不能である。さらに別の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液は、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたは動物由来のコラーゲン、例えば、限定されないが、ウシまたはブタまたはウマのコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、室温での粘度が低い。別の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液は、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたは動物由来のコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、３７℃での粘度が低い。

【００８９】

全体を通して使用されるように、「動物由来のコラーゲン」という用語は、ウシまたはブタまたはウマのコラーゲンまたはラットテールコラーゲンを包含してもよく、これは、ヒト由来のコラーゲンとは対照的である。

【００９０】

さらに別の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液は、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたは動物由来のコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、室温において低い力で組織空間に導入される。さらに別の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液は、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたは動物由来のコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、３７℃において低い力で組織空間に導入される。

【００９１】

別の態様では、筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減するために表皮の下の組織空間に注入される重合性溶液の使用であって、重合性溶液は、メタクリル化またはチオール化された架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンと、可視光の適用前に、可視光の適用と同時に、重合を誘導するための光開始剤と、を含み、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕を低減するための所望の構成内で重合性溶液を成型または形を整える工程を含む、使用が本明細書で開示される。特定の実施形態では、重合性溶液は、さらに、ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、酸化セルロース（ＯＣ）またはその修飾誘導体、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾誘導体、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾誘導体、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾誘導体、カルボキシメチルセルロースまたはその修飾誘導体、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾誘導体、またはこれらの任意の組み合わせを含む充填剤を含む。

【００９２】

修飾誘導体としては、限定されないが、例えば、ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧ、ＯＣ、ＰＭＭＡ、ＴＣＰ、ＣａＨＡ、カルボキシメチルセルロースまたはＣＮＣの光重合性バージョンが挙げられる。修飾としては、限定されないが、メタクリル化またはチオール化が挙げられる。

【００９３】
別の態様では、表皮の下の組織空間を充填する方法であって、
（ａ）組織空間に重合性溶液を導入する工程を含み、重合性溶液が、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンを含む、方法が本明細書で開示される。
【００９４】
本技術は、部分的に、光源、例えば、可視光源を用いる光活性化で重合可能な、成形可能な組成物を形成する美容用および医療用のコラーゲン系重合性充填剤に関する。重合性充填剤は、光開始剤と共に、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンを含む。
【００９５】
目的の本技術は、典型的には侵襲的な外科的介入または全身麻酔を行うことなく、特注の輪郭を有する皮膚充填剤またはインプラントのｉｎ　ｓｉｔｕでの形成を可能にするという利点を有する。一般に、コラーゲン系重合性溶液は、表皮の下（すなわち、表皮の下）の組織空間内に導入され、重合は、皮膚表面に、すなわち、身体の外側または皮膚の外側から、または表皮に当てられる可視光に対する露光によって誘導される。
【００９６】
ｉｎ　ｓｉｔｕでの重合方法は、可視光源を用いる光活性化時に水不溶性の架橋した架橋網目構造を形成することが可能なポリマー成分を含む重合性溶液を使用する、美容用および医療用の矯正および／または増強手順を提供する。
【００９７】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示される皮膚充填剤または細胞増殖促進足場は、美容用途のためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される皮膚充填剤または細胞増殖促進足場は、医療用の矯正用途のためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される皮膚充填剤または細胞増殖促進足場は、増強手順、例えば、限定されないが、組織増強で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される二重架橋皮膚充填剤は、美容用途のためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される二重架橋皮膚充填剤は、医療用の矯正用途のためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される二重架橋皮膚充填剤は、医学的または歯科的状態（歯肉移植／歯周病）の結果として必要とされる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される二重架橋皮膚充填剤は、皮膚増強を必要とする医学的状態の結果として必要とされる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される二重架橋皮膚充填剤は、増強手順、例えば、限定されないが、組織増強で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される光硬化性皮膚充填剤は、美容用途のためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される光硬化性皮膚充填剤は、医療用の矯正用途のためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される光硬化性皮膚充填剤は、医学的または歯科的状態（歯肉移植／歯周病）の結果として必要とされる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される光硬化性皮膚充填剤は、皮膚増強を必要とする医学的状態の結果として必要とされる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される光硬化性皮膚充填剤は、増強手順、例えば、限定されないが、組織増強で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される細胞増殖促進足場は、美容用途のためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される細胞増殖促進足場は、医療用の矯正用途のためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される細胞増殖促進足場皮膚充填剤は、医学的または歯科的状態（歯肉移植／歯周病）の結果として必要とされる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される細胞増殖促進足場皮膚充填剤は、皮膚増強を必要とする医学的状態の結果として必要とされる。いくつかの実施形態において、医療用の矯正用途は、腱炎を治療することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される細胞増殖促進足場は、増強手順、例えば、限定されないが、組織増強で使用するためのものである。
【００９８】
いくつかの実施形態では、組織増強は、皮膚組織の組織増強である。
【００９９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される細胞増殖促進足場を含む皮膚充填剤の使用は、ヒトにおけるものである。いくつかの実施形態では、ヒトにおいて本明細書に開示される細胞増殖促進足場を含む皮膚充填剤の使用は、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの任意の組み合わせを減少する。いくつかの実施形態では、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの任意の組み合わせの低減は、美容目的のためのものである。いくつかの実施形態では、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの任意の組み合わせの低減は、美容目的のためのものである。いくつかの実施形態では、ヒトにおける本明細書に開示される細胞増殖促進足場を含む皮膚充填剤の使用は、組織、例えば、限定されないが、表皮または皮膚組織を増強する。いくつかの実施形態では、組織増強は、美容目的のためのものである。いくつかの実施形態では、組織増強は、医学的治療のためのものである。いくつかの実施形態では、組織増強は、増強手順の一部である。いくつかの実施形態では、組織増強は、皮膚増強手順の一部である。

【０１００】

いくつかの実施形態では、組織増強は、任意の医学的または歯科的状態（歯肉移植／歯周病）の結果として必要とされる。

【０１０１】

特定の実施形態では、本明細書に記載の使用のための皮膚充填剤は、相互貫入（ＩＰＮ）網目構造または半相互貫入（半ＩＰＮ）網目構造を含み、異なる構成成分は、それら自体に架橋され得るが、互いに対しては架橋されない。いくつかの実施形態では、ＩＰＮまたは半ＩＰＮ皮膚充填剤は、ｒｈコラーゲンと、充填剤、例えば、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、またはそれらの誘導体、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ＩＰＮまたは半ＩＰＮは、ｒｈコラーゲンと、架橋ＨＡと、を含む。いくつかの実施形態では、ＩＰＮまたは半ＩＰＮは、ｒｈコラーゲン誘導体、例えば、限定されないが、メタクリル化ｒｈコラーゲンまたはチオールｒｈコラーゲンおよび／または充填剤の誘導体、例えば、限定されないが、メタクリル化ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣ、またはチオール化ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣ、またはそれらの組み合わせを含む。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造または二重架橋網目構造は、充填剤、例えば、限定されないが、ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣと、ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造は、ＭＡ充填剤、例えば、限定されないが、ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣと、ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造は、充填剤、例えば、限定されないが、ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣと、ＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造は、ＭＡ－充填剤とＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造は、ＨＡとｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造は、ＭＡ－ＨＡとｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造は、ＨＡとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比

率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造は、ＭＡ－ＨＡとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造は、充填剤とｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造は、ＭＡ－ＨＡ、またはＭＡ－ＰＶＡ、またはＭＡ－ＰＥＧ、またはＭＡ－ＯＣと、ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造は、ＭＡ－ＨＡ、またはＭＡ－ＰＶＡ、またはＭＡ－ＰＥＧ、またはＭＡ－ＯＣと、ＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造は、ＭＡ－ＨＡ、またはＭＡ－ＰＶＡ、またはＭＡ－ＰＥＧ、またはＭＡ－ＯＣと、ＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、皮膚充填剤または二重架橋皮膚充填剤を含むＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造は、細胞増殖促進足場を含む。

【０１０６】

特定の実施形態では、本明細書に記載の使用のための皮膚充填剤は、光硬化性皮膚充填剤を含み、成分の少なくとも１つ、例えば、限定されないが、ｒｈコラーゲンは、メタクリレート－ｒｈコラーゲン誘導体またはチオール－ｒｈコラーゲン誘導体を含む。いくつかの実施形態では、硬化性皮膚充填剤は、ｒｈコラーゲンと、充填剤、例えば、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、またはそれらの誘導体、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、ＭＡ－ｒｈコラーゲンと、ＨＡまたはその誘導体と、を含む。いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、ｒｈコラーゲン誘導体、例えば、限定されないが、メタクリル化ｒｈコラーゲンまたはチオールｒｈコラーゲンおよび／または充填剤の誘導体、例えば、限定されないが、メタクリル化ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣ、またはチオール化ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣ、またはそれらの組み合わせを含む。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、充填剤、例えば、限定されないが、ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧもしくはＯＣ、またはそれらの誘導体と、ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、充填剤、例えば、限定されないが、ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧもしくはＯＣ、またはそれらの誘導体と、ＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、充填剤、例えば、限定されないが、ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧもしくはＯＣと、チオール－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、ＭＡ－充填剤とＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。

【０１０８】
いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、ＨＡとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１、１：３、１：４、１：５、または０：１を含む。いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、ＭＡ－ＨＡとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤は、ＭＡ－ＰＶＡ、ＭＡ－ＨＡ－またはＯＣとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１を含む。いくつかの実施形態では、光硬化性皮膚充填剤のＨＡ成分は、架橋ＨＡまたは架橋ＭＡ－ＨＡを含む。
【０１０９】
本出願全体を通して、皮膚充填剤の様々な実施形態およびその使用は、範囲形式で示され得る。範囲形式での記載は単に便宜上および簡潔にするためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限として解釈されるべきではないことが理解される必要がある。したがって、範囲の記載は、可能性のある全ての部分範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示していると考えられるべきである。例えば、１：１～６：１などの範囲の記述は、１．１：１、１．２：１、１．３：１から５．９：１、１：１．１～１：１．９などの部分範囲、およびその範囲およびその一部に含まれる個々の数字、例えば、１、２、３、４、５および６を具体的に開示していると考えるべきである。これは、範囲の広さにかかわりなく適用される。
【０１１０】
本明細書で数値範囲が示される際は常に、示された範囲内に任意の引用された数字（分数または整数）を含むことが意味される。第１に示された数字と第２に示された数字との「間の範囲」は、および第１に示された数字「から」第２に示された数字「までの範囲」の表現は、本明細書では互換的に使用され、第１の示された数字および第２に示された数字ならびにそれらの間の分数および整数の全てを含むことを意味する。
【０１１１】
例えば、本開示は、表皮の下の組織空間のために、単独で、または充填剤、例えば、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、またはそれらの組み合わせと一緒に、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンを含み、これらが架橋され、光開始剤存在下、可視光活性化時にｉｎ　ｓｉｔｕで水不溶性の架橋ポリマー調製物を形成する皮膚充填剤を提供し得る、皮膚充填剤を提供する。いくつかの実施形態では、コラーゲンは、メタクリル化またはチオール化されている。
【０１１２】
いくつかの実施形態では、皮膚充填剤は、本明細書に記載される使用を提供し、ＩＰＮまたは半ＩＰＮ網目構造を形成する。いくつかの実施形態では、皮膚充填剤は、本明細書に記載される使用を提供し、二重架橋網目構造を形成する。
【０１１３】
特定の実施形態では、本明細書に記載される使用のために提供される二重架橋皮膚充填剤は、架橋充填剤、例えば、架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）、架橋ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、架橋ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、架橋酸化セルロース（ＯＣ）、またはそれらの架橋誘導体、またはそれらの組み合わせに架橋されるｒｈコラーゲンを含む。特定の実施形態では、本明細書に記載される使用のために提供される二重架橋皮膚充填剤は、メタクリル化またはチオール化された架橋充填剤、例えば、ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣにさらに架橋されるｒｈコラーゲンを含む。
【０１１４】

特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋充填剤とｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、ＭＡ充填剤とｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋充填剤とＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、ＭＡ－充填剤とＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、チオール化充填剤とｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋充填剤とチオール化ｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、チオール化充填剤とチオール化ｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。

【０１１５】

特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋ＨＡまたは架橋ＭＡ－ＨＡは、ｒｈコラーゲンまたはメタクリル化ｒｈコラーゲンまたはチオールｒｈコラーゲンにさらに架橋され、二重架橋皮膚充填剤を生じる。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋ＨＡとｒｈコラーゲンまたはメタクリル化ｒｈコラーゲンまたはチオールｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋ＭＡ－ＨＡとｒｈコラーゲンまたはメタクリル化ｒｈコラーゲンまたはチオールｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋ＭＡ－ＨＡとｒｈコラーゲンまたはメタクリル化ｒｈコラーゲンまたはチオールｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。

【０１１６】

特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣ、または架橋ＭＡ－ＰＶＡ、ＭＡ－ＰＥＧ、またはＭＡ－ＯＣは、ｒｈコラーゲンまたはメタクリル化ｒｈコラーゲンにさらに架橋され、二重架橋皮膚充填剤を生じる。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣとｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋ＭＡ－ＰＶＡ、ＭＡ－ＰＥＧ、またはＭＡ－ＯＣとｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋ＰＶＡ、ＰＥＧまたはＯＣとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋ＭＡ－ＰＶＡ、ＭＡ－ＰＥＧ、またはＭＡ－ＯＣとＭＡｒｈコラーゲンまたはチオールｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。

【０１１７】

特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋チオール－ＰＶＡ、チオール

－ＰＥＧまたはチオール－ＯＣは、ｒｈコラーゲンまたはメタクリル化ｒｈコラーゲンにさらに架橋され、二重架橋皮膚充填剤を生じる。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋チオール－ＰＶＡ、チオール－ＰＥＧまたはチオール－ＯＣとｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。特定の実施形態では、二重架橋皮膚充填剤において、架橋チオール－ＰＶＡ、チオール－ＰＥＧまたはチオール－ＯＣとＭＡｒｈコラーゲンまたはチオールｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、ヒアルロン酸をコラーゲンに架橋することができる任意の水溶性カップリング剤を使用することができる。カップリング剤のいくつかの非限定的な例としては、Ｎ、Ｎ'－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、Ｎ、Ｎ'－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）、または１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）などのカルボジイミドが挙げられる。カルボジイミドカップリング剤は、結合の一部になることなく、エステル結合またはアミド結合の形成を促進する可能性がある。言い換えると、エステル結合またはアミド結合は、ヒアルロン酸またはコラーゲンの片方からのカルボキシレート基と、他方からのヒドロキシル基またはアミン基とからの原子を含んでもよい。しかしながら、架橋基の一部となる他のカップリング剤を使用してもよい。カップリング剤の濃度は変動してもよい。いくつかの実施形態では、カップリング剤は、約２ｍＭ～約１５０ｍＭ、約２ｍＭ～約５０ｍＭ、約２０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約５０ｍＭで存在してもよい。いくつかの実施形態では、カップリング剤は、約２０ｍＭ～約１００ｍＭ、約２ｍＭ～約５０ｍＭ、または約５０ｍＭの濃度で存在するＥＤＣである。いくつかの実施形態では、カップリング剤は、ｒｈコラーゲン中の遊離アミンの数の１０倍から１００倍に等しいＥＤＣの量で存在するＥＤＣである。いくつかの実施形態では、カップリング剤は、ｒｈコラーゲン中の遊離アミンの数の５０倍に等しいＥＤＣの量で存在するＥＤＣである。カルボジイミド濃度を約５０ｍＭまで増加させると、ヒドロゲルの剛性が高く、および／または膨潤が少ない架橋高分子マトリックスが得られる可能性がある。

【０１１９】

当業者は、二重架橋を含む皮膚充填剤であって、この充填剤が、それ自体に架橋され、次いで、ｒｈコラーゲンにも架橋される皮膚充填剤が、単一の反応において、単一の種類の架橋剤を用いてコラーゲンとＨＡを直接架橋することを含む皮膚充填剤とは異なることを理解するであろう。そのような皮膚充填剤の特性は、異なる。

【０１２０】

例として、本重合性溶液を使用して、皮膚表面のすぐ下の様々な管腔および空隙を遮断または充填することができる。したがって、本技術は、ヒト患者などの宿主における組織増強の方法であって、上述の目的の重合性溶液は、当該技術分野で知られている方法を使用、例えば、増強を必要とする組織部位の中または組織部位で重合性溶液を注入し、適用されると、その上にある体表面に可視光を当て、堆積した重合性溶液を重合する方法を使用して、目的の部位に導入される、方法を提供する。

【０１２１】

「増強」とは、欠陥、特に、組織の損失または欠如に起因する欠陥を、そのような組織をポリマーまたはネットワークまたは目的物で提供すること、増強すること、または置き換えることによる修復、予防または軽減を意味する。増強は、天然の構造または特徴の補強、すなわち、例えばその大きさを増加させるために既存の身体部分（例えば、唇、鼻、乳房、耳、器官の部分、あご、頬など）に付加する構築物を含むことも意味する。したがって、組織の増強としては、例えば、顔、首、手、足、指およびつま先の中または表面の筋、ひだ、しわ、瘢痕、小さな顔面の凹み、ひび割れた唇、表皮のしわなどの充填または低減、手および足、指およびつま先におけるものを含む、老化または疾患に起因する経度な奇形の矯正、発話を回復するための声帯または声門の増強、睡眠による筋および表情線

の皮膚充填、老化により失われた皮膚および皮下組織の置き換え、唇の増強、目の周囲のしわと眼窩溝の充填、乳房の増強、あごの増強、頬および／または鼻の増強、例えば過度な脂肪吸引または他の外相に起因する皮膚または皮下の軟組織中の凹みの充填、ニキビまたは外傷性の瘢痕およびしわの充填、ほうれい線、鼻眉間の筋および口腔下側の線筋の充填などを挙げることができる。

【０１２２】

目的の重合性溶液は、いくつかの実施形態では、使用温度で細い外科用針（例えば、少なくとも２７ゲージ、少なくとも３３ゲージのゲージを有する針、またはより細い針）などの送達手段によって容易に押し出すのに好適な粘度を有する重合性溶液を包含する。したがって、「注入可能」である溶液は、好適な送達デバイス、例えば、外科用針、他の外科用器具、または内視鏡もしくは経皮的椎間板切除術で使用される機器などの他の送達手段を通る流れを可能にする質感および粘度を有する溶液である。したがって、目的の重合性溶液は、当該技術分野で知られているように、好適なアプリケータ、例えば、カテーテル、カニューレ、針、シリンジ、管状装置などによって注入可能である。

【０１２３】

組織空間に注入されると、重合性溶液は、通常、重合の光開始が促進された後、組織空間内の所望の輪郭内で操作され、マッサージされ、成型され、または形を整えられてもよい。一実施形態では、操作、マッサージ、成型または形を整えることは、ゲル化プロセス中に行われる。重合性溶液、重合中の溶液、または部分的に重合された溶液は、例えば、外科用圧迫器などの成形手段、または平坦または曲がった表面、指、手のひら、ナックルなどを用いる他のツールまたは器具を用い、外部からの操作によって成形することができる。

【０１２４】

驚くべきことに、本方法の遺伝子組換えされた架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンは、より小さなゲージの針の使用および低減された注入力を可能にすることによって、また、より小さな組織空間を充填するその能力によって、改善されたコラーゲンを含有する皮膚充填剤および皮膚充填の改善された方法を提供する。

【０１２５】

注入の「発現力」（ニュートン、Ｎ）には、針またはカニューレからの注入に必要な力が含まれる。

【０１２６】

「絶対粘度」（「動的粘度」）は、力が加えられたときの流れに対する流体の抵抗である。絶対粘度は、力と速度の比率に比例する。ギリシャ文字のη（イータ）は、計算における絶対粘度を表す。多くの一般的な流体の粘度は０．５ｃＰ～１０００ｃＰであるため、通常はｃＰで測定される。

【０１２７】

「ゲル」は、高分子の分離のための媒体として使用される有機ポリマーの半硬質スラブまたは円柱形である。ゲルは、実質的に薄い架橋系であり、定常状態のときは流動性を示さない。ゲルは、主に、重量で液体であるが、液体のいくつかの特性、例えば、変形能を保持しつつ、液体内の三次元の架橋した網目構造に起因して部分的に固体として挙動する。ゲルにその構造（硬度）を与え、接着粘着（粘着性）に寄与するのは、流体内の架橋である。結果として、ゲルは、固体内の液体分子の分散、すなわち、固体媒体内に分散された液体粒子とみなすことができる。「ゲル化時間」は、重合性溶液がゲルを形成するのにかかる時間である。

【０１２８】

「ヒドロゲル」は、親水性であり、時に、水が分散媒体であるコロイドゲルとして見出されるポリマー鎖の網目構造である。ヒドロゲルは、吸収性が高く（例えば、９０％を超える水を含むことができる）ポリマー網目構造であり、その顕著な含水量に起因して、天然組織と非常によく似た柔軟性を有する。

【０１２９】

「ポリマー」は、一連の繰り返しサブユニットで構成される高分子である。基本的な繰り返しサブユニットは「モノマー」として知られている。ひとまとめにして、ポリマーは、その引張強度と弾性について知られている。

【０１３０】

「光開始剤」は、放射線（ＵＶまたは可視光）にさらされたときに反応種（フリーラジカル、陽イオン、または陰イオン）を生成する分子である。本発明の光開始剤は、重合性溶液の重合を誘導する。本方法で有用な光開始剤の例としては、限定されないが、リチウム　フェニル－２，４，６－トリメチルベンゾイルホスフィネート（ＬＡＰ）または１－［４　２－ヒドロキシ－１－［４－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニル］－２－メチルプロパン－１－オン（ＩＲＧＡＣＵＲＥ（登録商標）２９５９）、エオシンＹ＋トリエタノールアミンまたはリボフラビンが挙げられる。

【０１３１】

メタクリル酸は、メタクリル酸に由来するエステルまたは塩である。メタクリレートは、ポリマープラスチックの一般的なモノマーであり、アクリレートポリマーを形成する。コラーゲンへのメタクリレート基の付加によって、光硬化性のコラーゲンメタクリレート（ｒｈコラーゲン－ＭＡまたはＭＡ－ｒｈコラーゲン）が得られる。ヒアルロン酸（ＨＡ）へのメタクリレート基の付加によって、光硬化性のヒアルロン酸－メタクリレート（ＨＡＭＡまたはＭＡ－ＨＡ）が得られる。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の皮膚充填剤で使用されるｒｈコラーゲンは、非修飾ｒｈコラーゲンとＭＡ－ｒｈコラーゲンの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、非修飾ｒｈコラーゲンとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率は、約１：０、１：１、１：２、１：３、１：４、０：１、２：１、３：１または４：１である。いくつかの実施形態では、ＭＡ－ｒｈコラーゲンの最終濃度範囲は、約０～１２ｍｇ／ｍｌを含む。いくつかの実施形態では、非修飾ｒｈコラーゲンの最終濃度範囲は、約０～１２ｍｇ／ｍｌを含む。いくつかの実施形態では、ＭＡ－ｒｈコラーゲンの最終濃度範囲は、約０～１２ｍｇ／ｍｌを含み、非修飾ｒｈコラーゲンの最終濃度範囲は、約０～１２ｍｇ／ｍｌを含む。いくつかの実施形態では、ＭＡ－ｒｈコラーゲンの最終濃度範囲は、約０ｍｇ／ｍｌ～６ｍｇ／ｍｌを含む。いくつかの実施形態では、非修飾ｒｈコラーゲンの最終濃度範囲は、約０ｍｇ／ｍｌ～６ｍｇ／ｍｌを含む。いくつかの実施形態では、ＭＡ－ｒｈコラーゲンの最終濃度は、約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ｍｇ／ｍｌを含む。いくつかの実施形態では、非修飾ｒｈコラーゲンの最終濃度は、約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ｍｇ／ｍｌを含む。

【０１３３】

チオールは、炭素結合したスルフヒドリル（Ｒ－ＳＨ）基（式中、Ｒはアルキルまたは他の有機置換基を表す）を含む有機硫黄化合物である。コラーゲンのチオール化は、凝集特性および粘膜付着特性を改善する可能性があり、膨潤能力に影響を与える。

【０１３４】

光は、電磁放射線の一形態である。「可視光」は、３８０～８００ｎｍまたは少なくとも３９０～７００ｎｍの範囲の波長を有する光である。「紫外線」は、より短い波長を有し、「赤外線」は、より長い波長を有する。

【０１３５】

照射手段は、使用される光開始剤を活性化するのに好適な光源であってもよく、体外から光開始剤を活性化することができる。熱開始剤を使用することができ、したがって赤外線源を使用することができ、また、紫外線活性化開始剤を使用することができ、したがって好適な紫外線源を使用することができ、好ましい光源は、白色光源である。したがって、好適な光開始剤が使用され、その結果、開始剤および光源の最大吸光度が調整される。本明細書で上述されたように、そのような可視光源の１つは、発光ダイオード（ＬＥＤ）である。例えば、身体に、必要に応じて部位に、または皮膚表面の上から電磁放射線を当てることによって、ゲル化が、体内で、上述の部位で、皮膚表面の下などで発生する限り

、他の好適な光源を使用することができる。電磁放射線は、ゲル化を可能にする強度、時間および持続時間で当てられる。光源は、皮膚表面の上に、または皮膚表面に直接、典型的には成型または形を整えられる重合性溶液の位置の上に配置することができる。

【０１３６】

いくつかの実施形態のモノマー溶液は、製薬分野で知られているように、任意の様々な他の材料、例えば、不活性材料（例えば、防腐剤、充填剤、賦形剤または希釈剤）、薬理学的に活性な分子または薬剤（例えば、低分子または生物学的細胞など）を含んでもよい。したがって、好適な不活性な薬剤または生物学的に活性な薬剤をモノマー溶液に添加してもよい。後者の場合には、活性な薬剤は、目的の重合した構造または網目構造の部位またはその近傍で局所的に薬理作用を発揮し得るか、または形成された足場、マトリックスまたは網目構造から放出され、隣接する組織空間を通って移動してもよく、または局所的な効果を少なくするために循環系に入ってもよい。

【０１３７】

上で考察されたように、目的の重合性溶液の方法も、他の皮膚科、整形外科、美容および他の医学的治療と組み合わせて使用することができる。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、重合性溶液を既知の充填剤と混合して、成形可能であり、輪郭を形成することが可能であり、滞留時間が長いなどの組成物を提供する。充填剤の例としては、限定されないが、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、またはそれらの修飾誘導体、またはそれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、半液体相の重合性溶液は、同じく半液体相の既知の充填剤と同様に真皮に独立して注入され、それが一緒になって、成形可能であり、輪郭を形成することが可能であり、滞留時間が長いなどの組成物を提供する。独立して注入可能な充填剤の例としては、限定されないが、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、またはそれらの修飾誘導体、またはそれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、半液体相の重合性溶液は、混合物として真皮に注入され、それが一緒になって、成形可能であり、輪郭を形成することが可能であり、滞留時間が長いなどの組成物を提供する。ｒｈコラーゲンと混合して注入可能な充填剤の例としては、限定されないが、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、またはそれらの修飾誘導体、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【０１３９】

さらに別の態様では、表皮の下の組織空間内に細胞増殖促進足場を誘導する方法であって、組織空間に溶液を導入する工程を含み、この溶液は、（ａ）植物由来のヒトコラーゲンと、（ｂ）少なくとも１つの成長因子またはその供給源と、を含む、方法が本明細書で開示される。

【０１４０】

一実施形態では、少なくとも１つの成長因子の供給源は、血漿または多血小板血漿を含む。

【０１４１】

一実施形態では、細胞増殖促進足場は、コラーゲンを含む組織の分解または損傷に起因する治癒または置換を促進する。一実施形態では、コラーゲンを含む組織は、腱、靭帯、皮膚、角膜、軟骨、血管、腸、椎間板、筋肉、骨または歯からなる群から選択される。特定の実施形態では、細胞増殖促進足場は、腱炎の治癒を促進する。

【０１４２】

一実施形態では、植物由来のコラーゲンは、ｒｈコラーゲンを含む。一実施形態では、植物由来のコラーゲンは、遺伝子組み換え植物から得られる。様々な実施形態では、遺伝子組換え植物は、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラ、ニンジンおよび綿からなる群から選択される遺伝子組換え

植物である。一実施形態では、遺伝子組み換え植物は、タバコ植物である。
【０１４３】
一実施形態では、遺伝子組換え植物は、ＣＯＬ１、ＣＯＬ２、Ｐ４Ｈ－α、Ｐ４Ｈ－βおよびＬＨ３からなる群から選択されるヒトデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）の少なくとも１つの遺伝子配列の発現可能な配列を含む。
【０１４４】
特定の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンは、配列番号３に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも修飾された１つのヒトコラーゲンα－１鎖と、配列番号６に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも１つの修飾ヒトコラーゲンα－２鎖と、を含み、遺伝子組換え植物は、さらに、外因性プロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）を発現する。
【０１４５】
別の特定の実施形態では、本方法は、リシルヒドロキシラーゼ（ＬＨ）、プロテアーゼＮおよびプロテアーゼＣからなる群から選択される外因性ポリペプチドを発現する工程をさらに含む。
【０１４６】
１つの特定の実施形態では、ヒトコラーゲンα－１鎖は、配列番号１に記載される配列によってコードされる。別の特定の実施形態では、ヒトコラーゲンα－２鎖は、配列番号２に記載される配列によってコードされる。
【０１４７】
一実施形態では、外因性Ｐ４Ｈは、哺乳動物Ｐ４Ｈである。１つの特定の実施形態では、外因性Ｐ４Ｈは、ヒトＰ４Ｈである。
【０１４８】
一実施形態では、本方法は、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－１を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と、をさらに含む。一実施形態では、本方法は、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－２を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と、をさらに含む。
【０１４９】
１つの特定の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンは、アテロコラーゲンである。
【０１５０】
当業者は、「皮膚充填剤」という用語が、いくつかの実施形態では、植物由来のヒトコラーゲン、例えば、１型組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）またはその誘導体を含む溶液を包含することを理解するであろう。「皮膚充填剤」という用語はまた、いくつかの実施形態では、植物由来のヒトコラーゲン、例えば、１型組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）またはその誘導体と、充填剤またはその誘導体、または架橋充填剤またはその誘導体と、を含み、全て同じ意味および品質を有し、皮膚充填剤が、組織構造を増強するために使用されてもよく、または筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕、またはそれらの組み合わせを低減するために使用されてもよい、溶液を包含する。
【０１５１】
当業者は、本明細書に記載の皮膚充填剤が、例えば、以下に限定されないが、異なる製剤を含むことを理解するであろう。
●ｒｈコラーゲンまたはそのＭＡまたはチオール誘導体、
●ｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールと、充填剤またはその誘導体と、を含む、ＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造、
●ｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールと、ＨＡまたはＭＡ－ＨＡまたはチオール－ＨＡと、を含む、ＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造、
●ｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールと、ＰＶＡまたはＭＡ－ＰＶＡまたはチオール－ＰＶＡと、を含む、ＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造、

●ｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールと、ＰＥＧまたはＭＡ－ＰＥＧまたはチオール－ＰＥＧと、を含む、ＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造、
●ｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールと、ＯＣまたはＭＡ－ＯＣまたはチオール－ＯＣと、を含む、ＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造、
●ｒｈコラーゲンと、高濃度の血小板を含有する血液の自己多血小板血漿（ＰＲＰ）フラクションと、を含む、ＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造、または細胞増殖促進足場、
●ＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造、または細胞増殖促進足場であって、各々が、ｒｈコラーゲンと、高濃度の血小板を含有する血液の自己多血小板血漿（ＰＲＰ）フラクションと、を含み、血小板は、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、トランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、血小板由来表皮増殖因子（ＰＤＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）または肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、またはそれらの組み合わせを含む、様々な種類の成長因子（ＧＦ）を放出する、ＩＰＮまたは半ＩＰＮまたは二重架橋網目構造、または細胞増殖促進足場、
●架橋充填剤またはその誘導体に架橋されたｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールを含む、二重架橋皮膚充填剤、
●架橋ＨＡまたは架橋ＭＡ－ＨＡまたは架橋チオール－ＨＡに架橋されたｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールを含む、二重架橋皮膚充填剤、
●架橋ＰＶＡまたは架橋ＭＡ－ＰＶＡまたは架橋チオール－ＰＶＡに架橋されたｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールを含む、二重架橋皮膚充填剤、
●架橋ＰＥＧまたは架橋ＭＡ－ＰＥＧまたは架橋チオール－ＰＥＧに架橋されたｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールを含む、二重架橋皮膚充填剤、または
●架橋ＯＣまたは架橋ＭＡ－ＯＣまたは架橋チオール－ＯＣに架橋されたｒｈコラーゲンまたはｒｈコラーゲン－ＭＡまたはｒｈコラーゲン－チオールを含む、二重架橋皮膚充填剤。

【０１５２】

当業者は、いくつかの実施形態では、「細胞増殖促進足場」という用語は、コラーゲンと、血液の自己多血小板血漿（ＰＲＰ）フラクションまたはその成分と、を含む、皮膚充填剤を包含することを理解するであろう。いくつかの実施形態では、ＰＲＰは、「細胞」を含まないが、成長因子と、フィブリノーゲンおよびプロトロンビンなどの血漿成分とを含有する（細胞由来の）膜小胞を含む。いくつかの実施形態では、「細胞増殖促進足場」は、コラーゲンと、血液の自己多血小板血漿（ＰＲＰ）フラクションまたはその成分と、少なくとも１つのさらなる充填剤成分と、を含む皮膚充填剤を包含する。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、細胞増殖促進足場は、ＩＰＮ網目構造、半ＩＰＮ網目構造であってもよい皮膚充填剤、または高濃度の血小板を含有する血液の自己多血小板血漿（ＰＲＰ）フラクションをさらに含む二重架橋皮膚充填剤を含み、血液の自己ＰＲＰフラクションは、高濃度の血小板を含有し、血小板は、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、トランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、血小板由来表皮増殖因子（ＰＤＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）または肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、またはそれらの組み合わせを含む、様々な種類の成長因子（ＧＦ）を放出する。いくつかの実施形態では、細胞増殖促進足場は、ＩＰＮ網目構造、半ＩＰＮ網目構造を含む皮膚充填剤、または血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、トランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、血

小板由来表皮増殖因子（ＰＤＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）または肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、またはそれらの組み合わせを含む少なくとも１つの成長因子をさらに含む二重架橋皮膚充填剤を含む。いくつかの実施形態では、細胞増殖促進足場は、ＩＰＮ網目構造、半ＩＰＮ網目構造を含む皮膚充填剤、またはＰＲＰ成分の一部またはフラクションをさらに含む二重架橋皮膚充填剤を含む。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の皮膚充填剤は、重合性溶液を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の皮膚充填剤は、非重合性溶液を含む。いくつかの実施形態において、皮膚充填剤溶液の重合は、インビボで起こる。いくつかの実施形態では、重合可能な皮膚充填剤溶液の成分が一緒に注入され、次いで重合されて、硬化した皮膚充填剤を形成する。いくつかの実施形態では、重合可能な皮膚充填剤溶液の成分は、独立して注入され、次いで重合されて、硬化した皮膚充填剤を形成する。皮膚充填剤成分を独立して注射する独特のアプローチの一例は、いくつかの実施形態では、皮膚真皮に充填剤、例えば、限定されないが、ＨＡまたはその誘導体を注入する工程と、この皮膚真皮に、第１の注入のすぐ近くに、メタクリル化またはチオール－ｒｈコラーゲンを別個に注入する工程と、を含んでいてもよく、この成分は、半液体相であり、次いで、ｉｎ　ｓｉｔｕで架橋する工程を含んでもよい。このアプローチは、いくつかの実施形態では、光重合によって皮膚充填剤成分を一緒に硬化させる前に、より容易な注入およびｉｎ　ｓｉｔｕで形を整えることを可能にする。

【０１５５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される皮膚充填剤は、軟組織増強の方法で使用される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される皮膚充填剤は、細胞増殖を向上させる。いくつかの実施形態では、軟組織増強の方法で提供および使用される皮膚充填剤は、時間経過と共に分解する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される皮膚充填剤は、皮膚充填剤が表皮の下の組織空間を充填する軟組織増強の方法で使用される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される皮膚充填剤は、軟組織増強の方法で使用され、その使用は、筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減する。

【０１５６】

一実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液は、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたは動物由来のコラーゲンを含む類似の溶液と比較して、室温での粘度が低い。別の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液は、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたは動物由来のコラーゲンを含む類似の溶液と比較して、３７℃での粘度が低い。さらに別の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液は、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたは動物由来のコラーゲンを含む類似の溶液と比較して、室温で低い力で組織空間に導入される。さらに別の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液は、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたは動物由来のコラーゲンを含む類似の溶液と比較して、３７℃で低い力で組織空間に導入される。１つの特定の実施形態では、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液は、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたは動物由来のコラーゲンを含む類似の溶液と比較して、足場形成を増加させるか、または細胞増殖における増加を促進する。

【０１５７】

さらに別の態様では、細胞増殖促進足場を誘導するための表皮の下の組織空間に注入される溶液の使用であって、この溶液は、植物由来のヒトコラーゲンと、少なくとも１つの成長因子またはその供給源とを含み、コラーゲンを含む組織の分解または損傷に起因する治癒または置換を促進する、使用が本明細書で開示される。特定の実施形態では、少なくとも１つの成長因子の供給源は、血漿または多血小板血漿を含む。

【０１５８】

実施形態では、コラーゲンを含む組織は、腱、靭帯、皮膚、角膜、軟骨、血管、腸、椎間板、筋肉、骨または歯からなる群から選択される。別の実施形態では、細胞増殖促進足

場は、腱炎の治癒を促進する。実施形態では、コラーゲンを含む組織は、皮膚である。
【０１５９】
いくつかの実施形態では、少なくとも１種類のコラーゲンα鎖を発現し、内因性Ｐ４Ｈ活性を欠く細胞内コンパートメント中でそれを蓄積することが可能な遺伝子組換え植物が提供される。
【０１６０】
本明細書で使用される場合、「遺伝子組換え植物」という句は、外因性ポリヌクレオチド配列で安定的または一時的に形質転換される、任意の下等（例えば、コケ）植物または高等（例えば、維管束）植物、またはその組織または単離された細胞（例えば、細胞懸濁物の）を指す。植物の例としては、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラ、綿、ニンジン、およびコケなどの下等植物が挙げられる。
【０１６１】
本明細書で使用される場合、「コラーゲン鎖」という句は、コラーゲン線維、好ましくはＩ型線維のα１鎖またはα２鎖などのコラーゲンサブユニットを指す。本明細書で使用される場合、「コラーゲン」という句は、組み立てられたコラーゲントリマーを指し、Ｉ型コラーゲンの場合、２つのα１鎖と１つのα２鎖とを含む。コラーゲン線維は、末端のプロペプチドＣおよびＮを欠いたコラーゲンである。
【０１６２】
本明細書で使用される場合、「内因性Ｐ４Ｈ活性を欠く細胞内コンパートメント」という句は、植物Ｐ４Ｈまたは植物様Ｐ４Ｈ活性を有する酵素を含まない細胞の任意のコンパートメント化された領域を指す。このような細胞内コンパートメントの例としては、液胞、アポプラストおよび細胞質、ならびに葉緑体、ミトコンドリアなどの細胞小器官が挙げられる。
【０１６３】
任意の種類のコラーゲン鎖を、本発明の遺伝子組換え植物によって発現させることができる。例としては、原線維を形成するコラーゲン（Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＶおよびＸＩ型）、網目構造を形成するコラーゲン（ＩＶ、ＶＩＩＩおよびＸ型）、原線維表面と会合するコラーゲン（ＩＸ、ＸＩＩおよびＸＩＶ型）、膜貫通タンパク質として発生するコラーゲン（ＸＩＩＩおよびＸＶＩＩ型）、または１１ｎｍの周期的な球状フィラメントを形成するコラーゲン（ＶＩ型）が挙げられる。
【０１６４】
一実施形態では、発現されるコラーゲン鎖は、Ｉ型コラーゲンのα１および／または２鎖である。発現されるコラーゲンα鎖は、任意の哺乳動物に由来する任意のポリヌクレオチド配列によってコードされ得る。特定の実施形態では、コラーゲンα鎖をコードする配列は、ヒトであり、配列番号１および４によって示される。
【０１６５】
典型的には、植物で発現されるαコラーゲン鎖は、それらの末端プロペプチド（すなわち、プロペプチドＣおよびプロペプチドＮ）を含んでもよく、または含まなくてもよい。
【０１６６】
植物のタンパク質分解活性によるプロコラーゲンのプロセシングは、ヒトにおける通常のプロセシングとは異なり、開裂部位は不明であるが、そのプロペプチドＣは、植物のタンパク質分解活性によって除去される。Ｃプロペプチドの開裂は、トリマーの組織化の前にプロコラーゲンペプチドで起こる可能性がある（トリマーの組織化を開始するには、３個のＣ－プロペプチドの会合が不可欠である）。
【０１６７】
植物のタンパク質分解活性によるＮ－プロペプチドの開裂は、成熟した植物では起こるが、未発育の植物では起こらない。このような開裂により、Ｎテロペプチドから２個のアミノ酸が除去される（１７個のうち２個）。
【０１６８】

Ｃ－プロペプチド（およびこれより程度は低いがＮ－プロペプチド）は、動物細胞を通過する間、プロコラーゲンを可溶性に維持し（Ｂｕｌｌｅｉｄら、２０００）、植物細胞でも同様の効果があると予想される。細胞外マトリックスへのプロコラーゲン分子の分泌の後、または分泌中に、プロペプチドは、プロコラーゲンのＮ－プロテイナーゼおよびＣ－プロテイナーゼによって除去され、それによって、コラーゲン分子から原線維への自発的な自己組織化を引き起こす。プロコラーゲンのＮ－プロテイナーゼおよびＣ－プロテイナーゼによるプロペプチドの除去によって、プロコラーゲンの溶解度が１００００分の１より大きく低下し、コラーゲンから原線維への自己組織化を開始するために必要かつ十分である。この組織化プロセスにとって重要なのは、三重らせんドメイン末端にある、テロペプチドと呼ばれる短い非三重らせんペプチドであり、原線維構造内のコラーゲン分子の正しい位置決めを確実にし、自己組織化の臨界濃度が低下する。ペプシンは、コラーゲンの生成中にプロペプチドを開裂させることができる。しかしながら、ペプシンは、テロペプチドに損傷を与え、その結果、ペプシンによって抽出されたコラーゲンは、規則的な線維構造を形成することができない。

【０１６９】

ヒトＰ４Ｈのβサブユニットを形成するタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（ＰＤＩ）は、トリマー組織化の前にＣ－プロペプチドに結合し、それによって鎖組織化中に分子シャペロンとしても機能することが示された。

【０１７０】

異なる植物で発現されるヒトプロコラーゲンＩ型のＮ－プロテイナーゼおよびプロコラーゲンＣ－プロテイナーゼを使用すると、天然のヒトコラーゲンにより類似したコラーゲンが生成する可能性があり、規則的な線維構造を形成し得る。

【０１７１】

ＮまたはＣプロペプチドまたは両方が、発現したコラーゲン鎖に含まれる場合、本発明の遺伝子組換え植物も、それぞれのプロテアーゼ（すなわち、ＣまたはＮまたは両方）を発現することができる。そのようなプロテアーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号１８（プロテアーゼＣ）および２０（プロテアーゼＮ）によって例示される。そのようなプロテアーゼは、それらがコラーゲン鎖と同じ細胞内コンパートメントに蓄積されるように発現され得る。

【０１７２】

内因性Ｐ４Ｈ活性を欠く細胞内コンパートメント内で発現したコラーゲン鎖の蓄積は、いくつかのアプローチのいずれか１つを介してもたらされ得る。

【０１７３】

例えば、発現されたコラーゲン鎖は、発現されたタンパク質をアポプラストまたはオルガネラ（例えば葉緑体）などの細胞内コンパートメント内に標的化するためのシグナル配列を含み得る。好適なシグナル配列の例としては、葉緑体トランジットペプチド（Ｓｗｉｓｓ－ＰｒｏｔエントリーＰ０７６８９、アミノ酸１～５７に含まれる）およびミトコンドリアトランジットペプチド（Ｓｗｉｓｓ－ＰｒｏｔエントリーＰ４６６４３、アミノ酸１～２８に含まれる）が挙げられる。以下の実施例の章は、好適なシグナル配列のさらなる例、ならびに植物細胞におけるコラーゲン鎖の発現においてそのようなシグナル配列を使用するためのガイドラインを提供する。

【０１７４】

あるいは、コラーゲン鎖の配列は、植物内で発現されたときにコラーゲンの細胞局在化を変化させる方法で修飾することができる。

【０１７５】

本明細書で上述されたように、植物のＥＲには、コラーゲン鎖を正しくヒドロキシル化することができないＰ４Ｈが含まれる。コラーゲンα鎖には、発現したコラーゲンを翻訳後修飾される（正しくないヒドロキシル化を含む）ＥＲに誘導するＥＲ標的配列が本来含まれる。したがって、ＥＲ標的配列の除去は、いかなるヒドロキシル化を含む翻訳後修飾を欠く、コラーゲン鎖の細胞質蓄積を引き起こすであろう。

【０１７６】
以下の実施例の章の実施例１は、ＥＲ配列を欠くコラーゲン配列の生成を記載する。
【０１７７】
さらにこれに代えて、コラーゲン鎖は、葉緑体またはミトコンドリアなどのオルガネラを含むＤＮＡ内で発現され、蓄積され得る。葉緑体発現のさらなる説明は、本明細書で以下に提供される。
【０１７８】
本明細書で上述されたように、α鎖のヒドロキシル化は、安定したＩ型コラーゲンの組織化に必要である。本発明の遺伝子組換え植物によって発現されるα鎖は、内因性Ｐ４Ｈ活性を欠くコンパートメント内に蓄積するため、このような鎖は、植物、植物組織または細胞から単離され、インビトロでヒドロキシル化されてもよい。このようなヒドロキシル化は、Ｔｕｒｐｅｅｎｎｉｅｍｉ－ＨｕｊａｎｅｎおよびＭｙｌｌｙｌａ（Ｃｏｎｃｏｍｉｔａｎｔ ｈｙｄｒｏｘｙｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｌｉｎｅ ａｎｄ ｌｙｓｉｎｅ ｒｅｓｉｄｕｅｓ ｉｎ ｃｏｌｌａｇｅｎ ｕｓｉｎｇ ｐｕｒｉｆｉｅｄ ｅｎｚｙｍｅｓ ｉｎ ｖｉｔｒｏ．Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ．１９８４年7月１６日；８００（１）：５９－６５）によって記載される方法によって達成することができる。
【０１７９】
このようなインビトロでのヒドロキシル化は、正しくヒドロキシル化されたコラーゲン鎖を生じることができるが、達成するのは困難であり、費用がかさむ可能性がある。
【０１８０】
インビトロでのヒドロキシル化の制限を克服するために、本発明の遺伝子組換え植物は、好ましくは、コラーゲンα鎖を正しくヒドロキシル化する［すなわち、Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙトリプレットのプロリン（Ｙ）位置でのみヒドロキシル化する］ことが可能なＰ４Ｈも共発現する。Ｐ４Ｈは、αとβの２つのサブユニットで構成される酵素である。βサブユニットもシャペロン機能を保有するが、活性な酵素を形成するためには、両者が必要である。
【０１８１】
本発明の遺伝子組換え植物によって発現されるＰ４Ｈは、好ましくは、例えば、配列番号１２および１４によってコードされるヒトＰ４Ｈである。さらに、向上した基質特異性を示すＰ４Ｈ変異体、またはＰ４Ｈホモログも使用することができる。
【０１８２】
好適なＰ４Ｈホモログは、ＮＣＢＩ寄託ＮＰ＿１７９３６３によって特定されるＡｒａｂｉｄｏｐｓｉｓオキシドレダクターゼによって例示される。本願発明者らによって実施された、このタンパク質配列とヒトＰ４Ｈαサブユニットとのペアワイズアラインメントは、植物の任意の既知のＰ４Ｈホモログの機能性ドメイン間の最大の相同性を明らかにした。
【０１８３】
Ｐ４Ｈは、発現されたコラーゲン鎖と共に蓄積する必要があるため、そのコード配列は、好ましくは、それに応じて修飾される（シグナル配列の付加、ＥＲ標的化を妨ぎ得る欠失など）。
【０１８４】
哺乳動物細胞では、コラーゲンは、リシルヒドロキシラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、およびグルコシルトランスフェラーゼによっても修飾される。これらの酵素は、特定の位置のリシル残基を、ヒドロキシリシル、ガラクトシルヒドロキシリシル、およびグルコシルガラクトシルヒドロキシリシル残基に順次修飾する。単一のヒト酵素であるリシルヒドロキシラーゼ３（ＬＨ３）は、ヒドロキシリシン結合した炭水化物形成の３つの連続する工程全てに触媒作用を及ぼすことができる。
【０１８５】
したがって、本発明の遺伝子組換え植物は、好ましくは、哺乳動物ＬＨ３も発現する。ＬＨ３コード化配列、例えば配列番号２２によって示されるものは、そのような目的のた

めに使用することができる。

【０１８６】

上述のコラーゲン鎖および修飾酵素は、植物機能性プロモーターの転写制御下で配置されたα鎖および／または修飾酵素（例えば、Ｐ４ＨおよびＬＨ３）をコードするポリヌクレオチド配列を含む、安定に組み込まれたか、または一時的に発現された核酸構築物から発現されてもよい。そのような核酸構築物（本明細書では発現構築物とも呼ばれる）は、植物全体、定義された植物組織または定義された植物細胞、または植物の定義された発達段階での発現のために構成されてもよい。そのような構築物はまた、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性）と、エンハンサーエレメントと、細菌複製のための複製起点とを含んでもよい。

【０１８７】

２つの発現可能な挿入物（例えば、２種類のαプロコラーゲン鎖、またはα鎖およびＰ４Ｈ）を含む構築物は、好ましくは、各挿入物のための個々のプロモーターを含むか、あるいはそのような構築物は、単一のプロモーターからの両方の挿入配列を含む単一の転写キメラを発現してもよいことが理解されるであろう。そのような場合、キメラ転写物は、下流の挿入物がそこから翻訳され得るように、２つの挿入配列の間にＩＲＥＳ配列を含む。

【０１８８】

組織特異的、発生特異的、構成的または誘導性のいずれかであり得る多数の植物機能性発現プロモーターおよびエンハンサーを、本発明の構築物によって利用することができ、いくつかの例が本明細書で以下に提供される。

【０１８９】

「植物プロモーター」または「プロモーター」という句に続く本明細書および特許請求の範囲の章において、本明細書で使用される場合、植物細胞（ＤＮＡを含むオルガネラを含む）における遺伝子発現を指令することができるプロモーターを含む。このようなプロモーターは、植物、細菌、ウイルス、真菌または動物起源のものに由来してもよい。このようなプロモーターは、構成的（すなわち、複数の植物組織において高レベルの遺伝子発現を指令することができる）、組織特異的（すなわち、特定の植物組織または複数の組織において遺伝子発現を指令することができる）、誘導性（すなわち、刺激によって遺伝子発現を指令することができる）、またはキメラ（すなわち、少なくとも２つの異なるプロモーターの部分から形成された）であってもよい。

【０１９０】

したがって、使用される植物プロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、誘導性プロモーターまたはキメラプロモーターであってもよい。

【０１９１】

構成的植物プロモーターの例としては、限定されないが、ＣａＭＶ３５ＳおよびＣａＭＶ１９Ｓプロモーター、ＦＭＶ３４Ｓプロモーター、サトウキビ桿状バドナウイルスプロモーター、ＣｓＶＭＶプロモーター、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ＡＣＴ２／ＡＣＴ８アクチンプロモーター、ＡｒａｂｉｄｏｐｓｉｓユビキチンＵＢＱＩプロモーター、大麦葉チオニンＢＴＨ６プロモーターおよびイネアクチンプロモーターが挙げられる。

【０１９２】

組織特異的プロモーターの例としては、限定されないが、豆ファセオリン貯蔵タンパク質プロモーター、ＤＬＥＣプロモーター、ＰＨＳプロモーター、ゼイン貯蔵タンパク質プロモーター、大豆由来のコングルチンガンマプロモーター、ＡＴ２Ｓ１遺伝子プロモーター、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ由来のＡＣＴ１１アクチンプロモーター、Ｂｒａｓｓｉｃａｎａｐｕｓ由来のｎａｐＡプロモーターおよびジャガイモパタチン遺伝子プロモーターが挙げられる。

【０１９３】

誘導性プロモーターは、例えば、光、温度、化学物質、渇水、高塩分、浸透圧ショック、酸化剤条件を含むストレス条件などの特定の刺激によって、または病原性の場合に誘導されるプロモーターであり、限定されないが、豆ｒｂｃＳ遺伝子に由来する光誘導性プロ

モーター、アルファルファｒｂｃＳ遺伝子由来のプロモーター、渇水時に活性なプロモーターＤＲＥ、ＭＹＣおよびＭＹＢ、高塩分および浸透圧ショックのときに活性なプロモーターＩＮＴ、ＩＮＰＳ、ｐｒｘＥａ、Ｈａ ｈｓｐ１７．７Ｇ４およびＲＤ２１、ならびに病原性ストレスにおいて、プロモーターｈｓｒ２０３Ｊおよびｓｔｒ２４６Ｃである。

【０１９４】

好ましくは、本発明によって利用されるプロモーターは、構築物の挿入物の過剰発現が植物形質転換の後に行われるような強力な構成的プロモーターである。

【０１９５】

本発明で使用されるいずれの種類の構築物も、各種類の構築物において、同じまたは異なる選択マーカーを使用して同じ植物内で共形質転換することができることが理解されるであろう。あるいは、第１の種類の構築物を第１の植物に導入することができ、一方、第２の種類の構築物を第２の同系植物に導入することができ、その後、これらから得られるトランスジェニック植物を交配し、子孫を二重形質転換体について選択することができる。そのような子孫のさらなる自己交雑を使用して、両方の構築物についてホモ接合性の系統を生成することができる。

【０１９６】

単子葉植物と二子葉植物の両方に核酸構築物を導入する様々な方法がある（Ｐｏｔｒｙｋｕｓ，Ｉ．、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｌａｎｔ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．、Ｐｌａｎｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９１）４２：２０５－２２５、Ｓｈｉｍａｍｏｔｏら、Ｎａｔｕｒｅ（１９８９）３３８：２７４－２７６）。そのような方法は、核酸構築物またはその一部分の植物のゲノムへの安定した組み込み、または核酸構築物の一時的な発現のいずれかに依存し、この場合、これらの配列は植物の子孫に受け継がれない。

【０１９７】

これに加えて、核酸構築物が、葉緑体などのＤＮＡを含むオルガネラのＤＮＡに直接導入することができるいくつかの方法が存在する。

【０１９８】

植物ゲノム中の本発明の核酸構築物内に含まれるものなど、外因性配列の植物ゲノムへの安定したゲノム統合を達成するための２つの主要な方法が存在する。

（ｉ）Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍを介した遺伝子移入：Ｋｌｅｅら（１９８７）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．３８：４６７－４８６、Ｋｌｅｅ ａｎｄ Ｒｏｇｅｒｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ ａｎｄ Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｐｌａｎｔｓ、Ｖｏｌ．６、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｎｕｃｌｅａｒ Ｇｅｎｅｓ編集、Ｓｃｈｅｌｌ，Ｊ．およびＶａｓｉｌ，Ｌ．Ｋ．、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．（１９８９）ｐ．２－２５、Ｇａｔｅｎｂｙ、ｉｎ Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ編集、Ｋｕｎｇ，Ｓ．およびＡｒｎｔｚｅｎ，Ｃ．Ｊ．、Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｂｏｓｔｏｎ、Ｍａｓｓ．（１９８９）ｐ．９３－１１２。

（ｉｉ）直接的なＤＮＡ取り込み：Ｐａｓｚｋｏｗｓｋｉら、ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ ａｎｄ Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｐｌａｎｔｓ、Ｖｏｌ．６、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｎｕｃｌｅａｒ Ｇｅｎｅｓ編集、Ｓｃｈｅｌｌ，Ｊ．およびＶａｓｉｌ，Ｌ．Ｋ．、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．（１９８９）ｐ．５２－６８、プロトプラストへのＤＮＡの直接的な取り込みの方法を含む、Ｔｏｒｉｙａｍａ，Ｋ．ら（１９８８）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６：１０７２－１０７４。植物細胞の簡単な電気ショックによって誘導されるＤＮＡ取り込み、Ｚｈａｎｇら、Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ．（１９８８）７：３７９－３８４。Ｆｒｏｍｍら、Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）３１９：７９１－７９３。粒子衝突による植物細胞または組織へのＤＮＡの注入、Ｋｌｅｉｎら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９８８）６：５５９－５６３、ＭｃＣａｂｅら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９８８）６：９２３－９２６、Ｓａｎｆｏｒｄ、Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｐｌａｎｔ．（１９９０）７９：２０６－２０９。マイクロピペットシス

テムの使用によるもの、Ｎｅｕｈａｕｓら、Ｔｈｅｏｒ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．（１９８７）７５：３０－３６、Ｎｅｕｈａｕｓ ａｎｄ Ｓｐａｎｇｅｎｂｅｒｇ、Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｐｌａｎｔ．（１９９０）７９：２１３－２１７、または発芽花粉を用いるＤＮＡの直接的なインキュベーションによるもの、ＤｅＷｅｔら、ｉｎ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｏｖｕｌｅ Ｔｉｓｓｕｅ編集、Ｃｈａｐｍａｎ，Ｇ．Ｐ．およびＭａｎｔｅｌｌ，Ｓ．Ｈ．およびＤａｎｉｅｌｓ，Ｗ．Ｌｏｎｇｍａｎ、Ｌｏｎｄｏｎ、（１９８５）ｐ．１９７－２０９、およびＯｈｔａ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８６）８３：７１５－７１９。

【０１９９】

Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ系には、植物のゲノムＤＮＡに組み込まれる定義済みのＤＮＡセグメントを含むプラスミドベクターの使用が含まれる。植物組織への接種方法は、植物種およびＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ送達系に依存して異なる。広く使用されているアプローチは、植物全体の分化を開始するための優れた供給源を提供する任意の組織外植片で実行可能なリーフディスク手順である。Ｈｏｒｓｃｈら、ｉｎ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｍａｎｕａｌ Ａ５、Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｄｏｒｄｒｅｃｈｔ（１９８８）ｐ．１－９。補足的なアプローチでは、真空浸潤と組み合わせてＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ送達系を採用する。Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ系は、トランスジェニック双子葉植物の作成において特に実行可能である。

【０２００】

植物細胞に直接ＤＮＡを移行する様々な方法がある。エレクトロポレーションでは、プロトプラストは短時間、強い電界にさらされる。マイクロインジェクションでは、非常に小さなマイクロピペットを使用して、ＤＮＡを細胞に直接機械的に注入する。微粒子衝突では、ＤＮＡは、硫酸マグネシウム結晶、タングステン粒子または金粒子などの微小発射体に吸着され、微小発射体は、細胞または植物組織へと物理的に加速される。

【０２０１】

形質転換に続き、植物の繁殖が行われる。植物繁殖の最も一般的な方法は、種子によるものである。しかしながら、種子繁殖による再生には、メンデルの法則によって支配される遺伝的差異に従って種子が植物によって産生されるため、ヘテロ接合性のために作物の均一性が欠如するという欠点がある。基本的に、各種子は遺伝的に異なり、各々が独自の特定の形質をもって成長する。したがって、再生植物が親トランスジェニック植物と同一の形質および特徴を有するように、形質転換された植物を産生することが好ましい。したがって、形質転換された植物は、形質転換された植物の迅速で一貫した再生を提供するマイクロプロパゲーションによって再生されることが好ましい。

【０２０２】

本発明の核酸構築物に含まれる単離された核酸を一時的に発現するために利用可能な一時的な発現方法としては、限定されないが、上述のような、但し一時的な発現に望ましい条件下でのマイクロインジェクションおよび衝突、核酸構築物を含む封入されたか、または封入されていない組換えウイルスベクターを利用して、その中で確立された増殖組換えウイルスが非ウイルス核酸配列を発現するように植物組織または細胞を感染させる、ウイルスが介在する発現が挙げられる。

【０２０３】

植物宿主の形質転換に有用であることが示されているウイルスとしては、ＣａＭＶ、ＴＭＶおよびＢＶが挙げられる。植物ウイルスを使用する植物の形質転換は、米国特許第４，８５５，２３７号（ＢＧＶ）、ＥＰ－Ａ６７，５５３（ＴＭＶ）、日本公開出願第６３－１４６９３号（ＴＭＶ）、ＥＰＡ １９４，８０９（ＢＶ）、ＥＰＡ ２７８，６６７（ＢＶ）、およびＧｌｕｚｍａｎ，Ｙ．ら、Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ｐｐ．１７２－１８９（１９８８）に記載される。植物を含め、多くの宿主において外来ＤＮＡを発現する際に使用するた

めの偽ウイルス粒子は、ＷＯ８７／０６２６１に記載されている。
【０２０４】
植物における非ウイルス性外因性核酸配列の導入および発現のための植物ＲＮＡウイルスの構築は、上述の参考文献、ならびにＤａｗｓｏｎ，Ｗ．Ｏ．ら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ（１９８９）１７２：２８５－２９２、Ｔａｋａｍａｔｓｕら、ＥＭＢＯ Ｊ．（１９８７）６：３０７－３１１、Ｆｒｅｎｃｈら、Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８６）２３１：１２９４－１２９７、およびＴａｋａｍａｔｓｕら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ（１９９０）２６９：７３－７６によって示される。
【０２０５】
ウイルスがＤＮＡウイルスの場合、ウイルス自体に対して構築を行うことができる。あるいは、外来ＤＮＡを用いて所望のウイルスベクターを構築することを容易にするために、ウイルスを最初に細菌プラスミドにクローニングすることができる。その後、ウイルスをプラスミドから切除することができる。ウイルスがＤＮＡウイルスである場合、細菌の複製起点がウイルスＤＮＡに付着する場合があり、次いで、細菌によって複製される。このＤＮＡの転写と翻訳により、ウイルスＤＮＡをカプシドで包むコートタンパク質が生成される。ウイルスがＲＮＡウイルスである場合、ウイルスは、一般的に、ｃＤＮＡとしてクローニングされ、プラスミドに挿入される。次に、プラスミドを使用して全ての構築物を作成する。次に、プラスミドのウイルス配列を転写し、ウイルス遺伝子を翻訳して、ウイルスＲＮＡをカプシドで包むコートタンパク質を生成することにより、ＲＮＡウイルスを生成する。
【０２０６】
本発明の構築物に含まれるものなど、非ウイルス性外因性核酸配列の植物への導入および発現のための植物ＲＮＡウイルスの構築は、上述の参考文献および米国特許第５，３１６，９３１号に示されている。
【０２０７】
一実施形態では、天然コートタンパク質コード配列がウイルス核酸から削除され、植物宿主中での発現、組換え植物ウイルス核酸の封入を可能にし、組換え植物ウイルス核酸による宿主の全身感染を確実にする、非天然植物ウイルスコートタンパク質コード配列および非天然プロモーター、好ましくは、非天然コートタンパク質コード配列のサブゲノムプロモーターが挿入された、植物ウイルス核酸が提供される。あるいは、コートタンパク質遺伝子は、タンパク質が産生されるように、その中に非天然核酸配列を挿入することによって不活化され得る。組換え植物ウイルス核酸は、１つ以上のさらなる非天然サブゲノムプロモーターを含んでもよい。各非天然サブゲノムプロモーターは、植物宿主において隣接する遺伝子または核酸配列を転写または発現することができ、互いに、また、天然サブゲノムプロモーターと組換えることができない。非天然（外来）核酸配列は、天然植物ウイルスサブゲノムプロモーター、または複数の核酸配列が含まれる場合は天然および非天然の植物ウイルスサブゲノムプロモーターに隣接して挿入され得る。非天然核酸配列は、サブゲノムプロモーターの制御下で宿主植物において転写または発現されて、所望の産物を産生する。
【０２０８】
第２の実施形態では、組換え植物ウイルス核酸は、天然コートタンパク質コード配列が、非天然コートタンパク質コード配列の代わりに、非天然コートタンパク質サブゲノムプロモーターの１つに隣接して配置されることを除き、第１の実施形態と同様に提供される。
【０２０９】
第３の実施形態では、天然コートタンパク質遺伝子が、そのサブゲノムプロモーターに隣接しており、１つ以上の非天然サブゲノムプロモーターがウイルス核酸に挿入されている、組換え植物ウイルス核酸が提供される。挿入された非天然サブゲノムプロモーターは、植物宿主において隣接する遺伝子を転写または発現することができ、互いに、また、天然サブゲノムプロモーターと組換えることができない。非天然核酸配列は、非天然サブゲノム植物ウイルスプロモーターに隣接して挿入されてもよく、その結果、上述の配列は、

サブゲノムプロモーターの制御下で宿主植物において転写または発現され、所望の産物を産生する。

【０２１０】

第４の実施形態では、組換え植物ウイルス核酸は、天然コートタンパク質コード配列が、非天然コートタンパク質コード配列によって置き換えられていることを除き、第３の実施形態と同様に提供される。

【０２１１】

ウイルスベクターは、組換え植物ウイルス核酸によってコードされるコートタンパク質によってカプシドで包まれ、組換え植物ウイルスを産生する。組換え植物ウイルス核酸または組換え植物ウイルスは、適切な宿主植物に感染するために使用される。組換え植物ウイルス核酸は、宿主での複製、宿主での全身拡散、および宿主での外来遺伝子（単離された核酸）の転写または発現が可能であり、所望のタンパク質を産生する。

【０２１２】

葉緑体のゲノムに外因性核酸配列を導入するための技術が知られている。この技術には、次の手順が含まれる。まず、植物細胞を化学的に処理して、細胞あたりの葉緑体の数を約１つまで減らす。次に、外因性核酸は、少なくとも１つの外因性核酸分子を葉緑体に導入することを目的として、粒子衝突を介して細胞に導入される。外因性核酸は、葉緑体に固有の酵素によって容易に行われる相同組換えを介して葉緑体のゲノムに組み込むことができるように選択される。この目的のために、外因性核酸は、目的の遺伝子に加えて、葉緑体のゲノムに由来する少なくとも１つの核酸伸長部を含む。これに加えて、外因性核酸は、選択可能なマーカーを含み、これは、そのような選択に続く葉緑体ゲノムの全てまたは実質的に全ての複製物が外因性核酸を含むことを確認するための連続的な選択手順によって役立つ。この技術に関するさらなる詳細は、米国特許第４，９４５，０５０号および同第５，６９３，５０７号に見出され、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。したがって、ポリペプチドは、葉緑体のタンパク質発現系によって産生され、葉緑体の内膜に組み込まれるようにすることができる。

【０２１３】

上述の形質転換アプローチを使用して、任意の種の植物、またはこれらに由来する植物組織もしくは単離された植物細胞において、コラーゲン鎖および／または修飾酵素、ならびに組織化されたコラーゲン（プロペプチドを含むもの、または含まないもの）を産生することができる。

【０２１４】

好ましい植物は、本明細書に記載のコラーゲン鎖、コラーゲンおよび／またはプロセシング酵素を大量に蓄積することができる植物である。このような植物はまた、ストレス条件に対するそれらの耐性、および発現される成分または組織化されるコラーゲンを抽出することができる容易さに従って選択されてもよい。好ましい植物の例としては、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラおよび綿が挙げられる。

【０２１５】

コラーゲン繊維は、食品および美容業界で広く使用されている。したがって、植物によって発現されるコラーゲン繊維成分（α鎖）および修飾酵素は、コラーゲンの工業的合成において有用性を見出すが、植物における完全なコラーゲン産生は、その単純さおよび費用対効果のために好ましい。

【０２１６】

植物内でＩ型コラーゲンを生成するためにいくつかのアプローチを使用することができる。例えば、コラーゲンα１鎖は、コラーゲンα１およびＰ４Ｈ（および任意選択でＬＨ３）を発現する植物から単離され、コラーゲンα２およびＰ４Ｈ（および任意選択でＬＨ３およびプロテアーゼＣおよび／またはＮ）を発現する植物から単離されたコラーゲンα２鎖と混合されてもよい。コラーゲンα１鎖は、それ自体で自己組織化して三重ヘリックスになるため、コラーゲンα２鎖と混合し、再生する前に、このようなホモトリマーを変

性させる必要がある場合がある。
【０２１７】
好ましくは、コラーゲンα１およびＰ４Ｈ（および任意選択でＬＨ３およびプロテアーゼＣおよび／またはＮ）を発現する第１の植物は、コラーゲンα２を発現する第２の（そして好ましくは同系の）植物と交配することができるか、または両方のα鎖を発現する第１の植物は、Ｐ４Ｈおよび任意選択でＬＨ３およびプロテアーゼＣおよび／またはＮを発現する第２の植物と交配することができる。
【０２１８】
上述の植物育種アプローチは、２つの個別に形質転換された植物を利用するが、３つ以上の個別に形質転換された植物を利用し、各々が１つまたは２つの成分を発現するアプローチも利用可能であることに留意されたい。
【０２１９】
当業者は、様々な植物育種技術を十分に認識しているので、そのような技術のさらなる説明は本明細書では提供されない。
【０２２０】
植物育種アプローチが好ましいが、コラーゲンα１および２、Ｐ４ＨおよびＬＨ３（および任意選択でプロテアーゼＣおよび／またはＮ）を発現する単一の植物が、それぞれが１つ以上の発現可能な成分を細胞に導入するように設計されたいくつかの形質転換イベントを介して生成することができることに留意されたい。このような場合、各形質転換イベントの安定性は、特定の選択マーカーを使用して検証することができる。
【０２２１】
いずれにせよ、形質転換および植物育種のアプローチを使用して、任意の数の成分を発現する任意の植物を生成することができる。現在好ましいのは、コラーゲンα１および２鎖、Ｐ４Ｈ、ＬＨ３および少なくとも１つのプロテアーゼ（例えば、プロテアーゼＣおよび／またはＮ）を発現する植物である。以下の実施例の章でさらに説明するように、そのような植物は、４２℃までの温度で安定性を示すコラーゲンを蓄積する。
【０２２２】
育種または複数形質転換された植物から得られる子孫は、核酸またはタンパク質プローブ（例えば抗体）を使用することによって外因性ｍＲＮＡおよび／またはポリペプチドの存在を確認することによって、選択することができる。後者のアプローチは、発現されたポリペプチド成分の局在化を可能にし（例えば、分画された植物抽出物を精査することにより）、したがって、正しいプロセシングおよび組織化に対する可能性も検証するため、好ましい。好適なプローブの例は、次の実施例の章に記載される。
【０２２３】
コラーゲンを発現する子孫が同定されると、そのような植物は、コラーゲン鎖および修飾酵素の発現を最大化する条件下でさらに培養される。
【０２２４】
遊離プロリン蓄積は、本発明の遺伝子組換え植物によって発現されるコラーゲン鎖を含む異なるプロリンに富むタンパク質の過剰生産を促進し得るので、好ましい栽培条件は、栽培植物において遊離プロリン蓄積を増加させる条件である。
【０２２５】
遊離プロリンは、水分欠乏、塩化、低温、高温、病原体感染、重金属毒性、嫌気性菌、栄養素欠乏、大気汚染およびＵＶ照射などを含む、広範囲の環境ストレスに反応して、様々植物で蓄積する（ＨａｒｅおよびＣｒｅｓｓ、１９９７）。
【０２２６】
遊離プロリンはまた、ＡＢＡなどの化合物、または銅塩、パラクアット、サリチル酸などのストレス誘導化合物による植物または土壌の処理に反応して、蓄積する可能性がある。
【０２２７】
したがって、コラーゲンを発現する子孫は、異なるストレス条件下で成長させることができる（例えば、５０ｍＭ～２５０ｍＭまでの範囲の異なる濃度のＮａＣｌ）。コラーゲ

ン産生をさらに向上させるために、コラーゲン発現に対する様々なストレス条件の影響を調べ、植物の生存率、バイオマスおよびコラーゲンの蓄積に関して最適化される。

【０２２８】

植物組織／細胞は、好ましくは成熟時に収穫され、コラーゲン線維は、周知の先行技術の抽出アプローチを使用して単離され、そのようなアプローチの１つが以下に詳述される。

【０２２９】

トランスジェニック植物の葉を液体窒素下で粉末になるまで粉砕し、均質物を、０．２Ｍ　ＮａＣｌを含む０．５Ｍ酢酸中、４℃で６０時間かけて抽出する。不溶性物質を、遠心分離によって除去する。組換えコラーゲンを含む上澄み液を、０．４Ｍおよび０．７ＭのＮａＣｌで塩分画する。組換えヘテロトリマーコラーゲンを含む０．７Ｍ　ＮａＣｌ沈殿を０．１Ｍ酢酸に溶解し、これに対して透析し、－２０℃で保存する（Ｒｕｇｇｉｅｒｏら、２０００に従う）。

【０２３０】

一実施形態では、均質で可溶性の原線維を形成するアテロコラーゲンを生成するためにプロコラーゲンをプロセシングする方法が本明細書で開示される。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによるタンパク質分解結果の分析によって本明細書に示されるように、特定の植物由来のプロテアーゼ（例えば、パパイン）は、らせん領域内のタンパク質分解による開裂を行うことなく、可溶性プロコラーゲンからプロペプチド部分を開裂することができない（動物源に由来するテロコラーゲンからテロペプチドを除去することが可能であるとしても）が、一方、他のプロテアーゼ（例えば、エスペラーゼ、サビナーゼ）は、可溶性プロコラーゲンからプロペプチド領域を効果的に開裂せず、それによって、効果的な原線維形成を妨げる。綿密な実験を通じて、本願発明者らは、フィシンなどの特定の植物由来のプロテアーゼや、ニュートラーゼおよびスブチリシンなどの細菌由来のプロテアーゼのみを使用して、可溶性プロコラーゲンからプロペプチド部分（テロペプチドを含む）を正しく開裂して、非動物プロコラーゲンのらせん領域を消化することなく、可溶性アテロコラーゲンの均一な調製物を生成してもよいこと（図１３、１５、１７、１９および２０）を明らかにした。これに加えて、本願発明者らは、組換えトリプシンも正しい開裂が可能であることを示した（図２６）。本願発明者らはさらに、フィシンによる開裂により、得られたアテロコラーゲンがその原線維形成能を保持することを可能にすることを示した（以下の実施例の章の表５）。

【０２３２】

したがって、一態様によれば、アテロコラーゲンを生成する方法が提供される。この方法は、ヒト組換えテロペプチドを含むコラーゲンと、ニュートラーゼ、スブチリシン、組換えトリプシン、組換えペプシンおよびフィシンからなる群から選択されるプロテアーゼとを接触させる工程を含み、ヒト組換えテロペプチドを含むコラーゲンは、非動物細胞で発現し、それによってアテロコラーゲンを生成する。

【０２３３】

本明細書で使用される場合、「テロペプチドを含むコラーゲン」という句は、アテロコラーゲンに含まれるテロペプチドレムナントよりも長いテロペプチドを含む可溶性コラーゲン分子を指す。したがって、テロペプチドを含むコラーゲンは、全長プロペプチドを含むプロコラーゲンであってもよい。あるいは、テロペプチドを含むコラーゲンは、部分的に消化されたプロペプチドを含むプロコラーゲン分子であってもよい。さらにこれに代えて、テロペプチドを含むコラーゲンは、テロコラーゲンであってもよい。

【０２３４】

本明細書で使用される「プロコラーゲン」という用語は、Ｎ末端プロペプチド、Ｃ末端プロペプチドのいずれか、またはその両方を含むコラーゲン分子（例えば、ヒト）を指す。例示的なヒトプロコラーゲンアミノ酸配列は、配列番号３０、３１、３６および３７によって示される。

【０２３５】

本明細書で使用される「テロコラーゲン」という用語は、通常プロコラーゲンに含まれるＮ末端およびＣ末端プロペプチドの両方を欠いているが、依然としてテロペプチドを含むコラーゲン分子を指す。上の背景の章で述べたように、線維状コラーゲンのテロペプチドは、ネイティブＮ／Ｃプロテイナーゼで消化した後のＮ末端およびＣ末端プロペプチドのレムナントである。

【０２３６】

組換えヒトテロコラーゲンは、外因性ヒトプロコラーゲンとそれぞれのプロテアーゼ（すなわち、ＣまたはＮ、あるいはその両方）の両方を発現するように形質転換された細胞内で生成され得る。そのようなプロテアーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号３９（プロテアーゼＣ）および４０（プロテアーゼＮ）によって例示される。そのようなプロテアーゼは、本明細書で以下にさらに記載されるように、それらがコラーゲン鎖と同じ細胞内コンパートメントに蓄積されるように発現され得る。

【０２３７】

本明細書で使用される場合、「アテロコラーゲン」という用語は、典型的にはプロコラーゲンおよびそのテロペプチドの少なくとも一部に含まれるＮ末端およびＣ末端プロペプチドを両方とも欠いているが、可能な好適な条件下で原線維を形成することが可能であるような、そのテロペプチドの十分な部分を含む、コラーゲン分子を指す。

【０２３８】

本明細書に開示される方法に従って、任意の種類のアテロコラーゲンを生成することができる。例としては、原線維を形成するコラーゲン（Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＶおよびＸＩ型）、網目構造を形成するコラーゲン（ＩＶ、ＶＩＩＩおよびＸ型）、原線維表面と会合するコラーゲン（ＩＸ、ＸＩＩおよびＸＩＶ型）、膜貫通タンパク質として発生するコラーゲン（ＸＩＩＩおよびＸＶＩＩ型）、または１１ｎｍの周期的な球状フィラメントを形成するコラーゲン（ＶＩ型）が挙げられる。一実施形態によれば、アテロコラーゲンは、Ｉ型コラーゲンのα－１および／またはα－２鎖を含む。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、コラーゲン／アテロコラーゲンの遺伝子組換え形態、例えば、コラゲナーゼ耐性コラーゲンなどが本明細書で開示されることが理解されるであろう。

【０２４０】

組換えヒトプロコラーゲンまたはテロコラーゲンは、限定されないが、植物細胞および酵母や真菌などの他の真核細胞を含む任意の非動物細胞中で発現され得る。

【０２４１】

ヒトプロコラーゲンまたはテロコラーゲンが産生（すなわち発現）され得る植物は、その組織または単離された細胞、およびその抽出物（例えば、細胞懸濁物）を含め、下等（例えば、コケおよび藻類）または高等（例えば、維管束）植物種の植物であってもよい。好ましい植物は、本明細書で以下に記載される大量のコラーゲン鎖、コラーゲンおよび／またはプロセシング酵素を蓄積することが可能な植物である。このような植物はまた、ストレス条件に対するそれらの耐性、および発現される成分または組織化されるコラーゲンを抽出することができる容易さに従って選択されてもよい。ヒトプロコラーゲンが発現され得る植物の例としては、限定されないが、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラ、ニンジン、レタスおよび綿が挙げられる。

【０２４２】

組換えヒトプロコラーゲンの産生は、通常、ヒトプロコラーゲンをコードする外因性ポリヌクレオチド配列による安定的または一時的な形質転換によってもたらされる。

【０２４３】

ヒトプロコラーゲンをコードする例示的なポリヌクレオチド配列は、配列番号３２、３３、４１および４２によって示される。

【０２４４】

上述のように、ヒトテロコラーゲンの産生は、典型的には、ヒトプロコラーゲンをコー

ドする外因性ポリヌクレオチド配列および関連するプロテアーゼをコードする少なくとも１つの外因性ポリヌクレオチド配列による安定的または一時的な形質転換によってもたらされる。

【０２４５】

コラーゲンの三重らせん構造の安定性には、コラーゲン鎖内のヒドロキシプロリンの残基を形成するために、酵素プロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）によるプロリンのヒドロキシル化が必要である。植物は、ヒドロキシプロリンを含有するタンパク質を合成することができるが、植物細胞内のヒドロキシプロリンの合成に関与するプロリルヒドロキシラーゼは、哺乳動物Ｐ４Ｈと比較して、比較的緩い基質配列特異性を示す。したがって、Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙトリプレットの Ｙ位置にのみヒドロキシプロリンを含むコラーゲンを生成するには、コラーゲンとヒトまたは哺乳動物のＰ４Ｈ遺伝子の共発現が必要である。

【０２４６】

したがって、一実施形態によれば、プロコラーゲンまたはテロコラーゲンは、その正しくないヒドロキシル化を回避するために内因性Ｐ４Ｈ活性を欠く植物の細胞内コンパートメント内で発現される。本明細書で使用される場合、「内因性Ｐ４Ｈ活性を欠く細胞内コンパートメント」という句は、植物Ｐ４Ｈまたは植物様Ｐ４Ｈ活性を有する酵素を含まない細胞の任意のコンパートメント化された領域を指す。一実施形態によれば、細胞内コンパートメントは、液胞である。

【０２４７】

内因性Ｐ４Ｈ活性を欠く細胞内コンパートメント内で発現したプロコラーゲンの蓄積は、いくつかのアプローチのいずれか１つを介してもたらされ得る。

【０２４８】

例えば、発現されたコラーゲン／テロコラーゲンは、発現されたタンパク質をアポプラストまたはオルガネラ（例えば葉緑体）などの細胞内コンパートメント内に標的化するためのシグナル配列を含み得る。好適なシグナル配列の例としては、葉緑体トランジットペプチド（Ｓｗｉｓｓ－ＰｒｏｔエントリーＰ０７６８９、アミノ酸１～５７に含まれる）およびミトコンドリアトランジットペプチド（Ｓｗｉｓｓ－ＰｒｏｔエントリーＰ４６６４３、アミノ酸１～２８に含まれる）が挙げられる。

【０２４９】

あるいは、プロコラーゲンの配列は、植物内で発現されたときにプロコラーゲンの細胞局在化を変化させる方法で修飾することができる。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、ヒトプロコラーゲンおよびＰ４Ｈを両方とも共発現し、プロコラーゲンα鎖を正しくヒドロキシル化する［すなわち、Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙトリプレットのプロリン（Ｙ）位置でのみヒドロキシル化する］ことが可能な遺伝子組換え細胞が本明細書で開示される。Ｐ４Ｈは、Ｇｅｎｂａｎｋ番号Ｐ０７２３７およびＰ１３６７４に記載されているように、αとβの２つのサブユニットで構成される酵素である。両方のサブユニットが活性な酵素を形成するために必要であるが、βサブユニットはシャペロン機能も保有している。

【０２５１】

本発明の遺伝子組換え細胞によって発現されるＰ４Ｈは、好ましくは、例えば、配列番号３４および３５によってコードされるヒトＰ４Ｈである。さらに、向上した基質特異性を示すＰ４Ｈ変異体、またはＰ４Ｈホモログも使用することができる。好適なＰ４Ｈホモログは、ＮＣＢＩ寄託ＮＰ＿１７９３６３によって特定されるＡｒａｂｉｄｏｐｓｉｓオキシドレダクターゼによって例示される。

【０２５２】

Ｐ４Ｈが、発現されたプロコラーゲン鎖と共に蓄積することが不可欠であるため、そのコード配列は、好ましくは、それに応じて（例えば、シグナル配列の付加または欠失によって）修飾される。

【０２５３】

哺乳動物細胞では、コラーゲンは、リシルヒドロキシラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、およびグルコシルトランスフェラーゼによっても修飾される。これらの酵素は、特定の位置のリシル残基を、特定の位置でヒドロキシリシル、ガラクトシルヒドロキシリシル、およびグルコシルガラクトシルヒドロキシリシル残基に順次修飾する。Ｇｅｎｂａｎｋ番号Ｏ６０５６８に記載されている単一のヒト酵素であるリシルヒドロキシラーゼ３（ＬＨ３）は、ヒドロキシリシン結合した炭水化物形成に見られるように、３つの連続する修飾工程全てに触媒作用を及ぼすことができる。

【０２５４】

したがって、本明細書に開示される遺伝子組換え細胞はまた、哺乳動物ＬＨ３を発現してもよい。ＬＨ３コード化配列、例えば配列番号３８によって示されるものは、そのような目的のために使用することができる。

【０２５５】

上述のプロコラーゲンおよび修飾酵素は、機能性プロモーターの転写制御下で配置されたプロコラーゲンα鎖および／または修飾酵素（例えば、Ｐ４ＨおよびＬＨ３）をコードするポリヌクレオチド配列を含む、安定に組み込まれたか、または一時的に発現された核酸構築物から発現されてもよい。そのような核酸構築物（本明細書では発現構築物とも呼ばれる）は、生物全体（例えば、植物、定義された組織または定義された細胞）全体、および／または生物の定義された発達段階での発現のために構成されてもよい。そのような構築物はまた、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性）と、エンハンサーエレメントと、細菌複製のための複製起点とを含んでもよい。

【０２５６】

２つの発現可能な挿入物（例えば、２種類のαプロコラーゲン鎖、またはプロコラーゲンα鎖およびＰ４Ｈ）を含む構築物は、好ましくは、各挿入物のための個々のプロモーターを含むか、あるいはそのような構築物は、単一のプロモーターを用いて両方の挿入配列を含む単一の転写キメラを発現してもよいことが理解されるであろう。そのような場合、キメラ転写物は、下流の挿入物がそこから翻訳され得るように、２つの挿入配列の間に配列内リボソーム進入領域（ＩＲＥＳ）配列を含んでもよい。

【０２５７】

組織特異的、発生特異的、構成的または誘導性のいずれかであり得る多数の機能性発現プロモーターおよびエンハンサーを、本発明の構築物によって利用することができ、いくつかの例が本明細書で以下に提供される。

【０２５８】

採用された形質転換技術に関係なく、プロコラーゲンを発現する子孫が同定されると、そのような植物は、その発現を最大化する条件下でさらに培養される。形質転換された植物から得られる子孫は、核酸またはタンパク質プローブ（例えば抗体）を使用することによって外因性ｍＲＮＡおよび／またはポリペプチドの存在を確認することによって、選択することができる。後者のアプローチは、発現されたポリペプチド成分の局在化を可能にし（例えば、分画された植物抽出物を精査することにより）、したがって、外来タンパク質の正しいプロセシングおよび組織化に対する植物の可能性も検証する。

【０２５９】

そのような植物の栽培に続き、テロペプチドを含むコラーゲンが、通常、収穫される。植物組織／細胞は、好ましくは成熟時に収穫され、プロコラーゲン分子は、抽出アプローチを使用して単離される。好ましくは、収穫は、プロコラーゲンがプロテアーゼ酵素によって開裂され得る状態のままであるように行われる。一実施形態によれば、粗抽出物は、本発明のトランスジェニック植物から生成され、その後、プロテアーゼ酵素と接触する。植物粗抽出物を生成するための例示的な方法は、本明細書の以下の実施例の章に記載される。

【０２６０】

プロペプチドまたはテロペプチドを含むコラーゲンは、プロテアーゼとのインキュベーションの前に本発明の遺伝子操作された細胞から精製されてもよく、あるいはプロテアー

ゼとのインキュベーションの後に精製されてもよいことが理解されるであろう。さらにこれに代えて、プロペプチドまたはテロペプチドを含むコラーゲンは、プロテアーゼ処理の前に部分的に精製され、次いで、プロテアーゼ処理の後に完全に精製されてもよい。さらにこれに代えて、プロペプチドまたはテロペプチドを含むコラーゲンは、他の抽出／精製手順と同時にプロテアーゼで処理されてもよい。

【０２６１】

本発明のテロペプチドを含むコラーゲンを精製または半精製する例示的な方法には、硫酸アンモニウムなどによる塩析および／または限外濾過による低分子の除去が含まれるが、これらに限定されない。

【０２６２】

本明細書で上の背景に記載されているように、医療目的で動物源の材料を使用することにはリスクが伴う。このリスクは、植物中で発現するプロコラーゲンをアテロコラーゲンへとプロセシングする際に使用されるタンパク質分解酵素を選択するときにも関連する。トリプシンまたはペプシンなどの動物由来の供給源の酵素の適用は、それ自体が、最終調製物を疾患担体で汚染する可能性がある。したがって、全ての成分が動物由来のものではない生産システムを考案することが望まれる。

【０２６３】

特定のプロテアーゼのみが、組換えプロペプチドまたはテロペプチドを含むコラーゲンを正しく開裂することが可能であることが本明細書に開示されている。特定のプロテアーゼとしては、特定の植物由来のプロテアーゼ、例えば、フィシン（ＥＣ　３．４．２２．３）および特定の細菌由来のプロテアーゼ、例えば、スブチリシン（ＥＣ　３．４．２１．６２）、ニュートラーゼが挙げられる。いくつかの実施形態では、ｒｈトリプシンおよびｒｈペプシンなどの組換え酵素の使用が本明細書に開示される。このような酵素は、市販されており、例えば、イチジクラテックス由来のフィシン（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｆ４１２５およびＥｕｒｏｐｅ　Ｂｉｏｃｈｅｍ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ由来のスブチリシン（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｐ５４５９）、ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ由来のニュートラーゼ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、カタログ番号ＰＷ２０１０４１）およびＴｒｙｐＺｅａｎ．ＴＭ．、トウモロコシで発現する組換えヒトトリプシン（Ｓｉｇｍａカタログ番号Ｔ３４４９）である。

【０２６４】

プロコラーゲンまたはテロコラーゲンは、好ましくは、プロテアーゼがプロペプチドまたはテロペプチドを接触点から開裂することができるような条件下でプロテアーゼと接触する。通常、その条件は、選択した特定のプロテアーゼに従って決定される。したがって、例えば、プロコラーゲンは、プロテアーゼと共に、１～２５ｍｇ／ｍｌの濃度および約１０～２０℃の温度で最大１５時間インキュベートされてもよい。

【０２６５】

プロテアーゼ消化後、最終生成物が、ニュートラーゼ、スブチリシン、フィシンおよび組換えヒトトリプシンからなる群から選択されるプロテアーゼによって植物または植物細胞から生成したプロコラーゲンからプロセシングされ、当該技術分野で既知の方法（例えば、クマシー染色によるサイズ分析、ウエスタン分析など）を用いて分析されるアテロコラーゲンの精製された組成物を含むように、生成されたアテロコラーゲンは、以下の実施例の章に記載されるように、例えば、塩沈殿によってさらに精製されてもよい。

【０２６６】

精製後、酸性溶液（例えば、１０ｍＭ　ＨＣｌ）を添加することにより、アテロコラーゲンを再可溶化させてもよい。このような酸性溶液は、精製されたアテロコラーゲンの保存に有用である。

【０２６７】

本願発明者らは、フィシンによる消化後、アテロコラーゲンが、上述の酸性溶液の中和時に原線維を形成するその能力を維持していることを示した。一実施形態によれば、本発

明の方法に従って生成され、精製および再可溶化されたアテロコラーゲンの少なくとも７０％が、原線維を形成することが可能である。一実施形態によれば、本発明の方法に従って生成され、精製および再可溶化されたアテロコラーゲンの少なくとも８８％が、原線維を形成することが可能である。

【０２６８】

原線維を形成する能力は、生成されたアテロコラーゲンが、美容整形、火傷患者の治癒補助、骨の再建、および多種多様な歯科、整形外科および外科的目的を含むがこれらに限定されない医療目的に有用であることを示す。

【０２６９】

背景の章で述べたように、Ｉ型コラーゲンは、３Ｄバイオプリンティングの構築材料の主成分として使用するための完璧な候補物質であると考えられる。この天然ポリマーによって提供される重要な利点にもかかわらず、いくつかの要因が、３Ｄバイオプリンティングへのその使用を妨げている。この目的のための組織から抽出されたコラーゲンの使用は、生理学的条件下で、２０℃を超える温度で自然なゲル形成を促進する温度およびイオン強度に対する感受性に起因して、制限されている［例えば、ＰｕｒｅＣｏｌ、Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＢｉｏＭａｔｒｉｘ，Ｉｎｃ．を参照］。組織から抽出されたコラーゲンの典型的な温度依存性のゲル形成は、プリンティング中の正確な流動性を著しく損なわせる。適用するまで印刷媒体を低温に保つことは、この現象の可能な解決策であるが、深刻な技術的制限を内包する。別の解決策は、これらの条件下でゲル状にならないコラーゲンの変性形態であるゼラチンの使用である。しかしながら、ゼラチンは、天然コラーゲンの真の組織と細胞の相互作用を欠いているため、重要な生物学的機能が失われる。

【０２７０】

最近の技術開発により、タバコ植物にヘテロトリマーＩ型コラーゲンをコードする５つのヒト遺伝子（ＣＯＬＬＰＬＡＮＴ（商標）、イスラエル、現在ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ（登録商標）、セントルイス、ミズーリ州、米国でも入手可能）を導入することにより、天然のヒトＩ型コラーゲン（ｒｈコラーゲン）を精製するシステムが開発された。このタンパク質は、コラーゲンに固有の特性を利用する費用対効果の高い工業プロセスを通じて、均一になるまで精製される。それらは全て、本明細書に完全に記載されているかのように参照により組み込まれる、ＷＯ２００６／０３５４４２、ＷＯ２００９／０５３９８５、ならびにそれらに由来する特許および特許出願も参照されたい。

【０２７１】

したがって、一態様によれば、少なくとも１種類のコラーゲンα鎖を発現し、内因性Ｐ４Ｈ活性を欠く細胞内コンパートメント中でそれを蓄積することが可能な遺伝子組換え植物が本明細書で開示される。

【０２７２】

Ｉ型コラーゲンとｒｈコラーゲンは、３Ｄバイオプリンティングの構築材料の主成分として使用するための候補物質であると考えられる。様々な種類の足場が、美容用途および他の再建用途に使用されてきた。

【０２７３】

これに加え、軟組織増強、例えば、しわの低減のための皮膚充填剤の使用が増加してきている。皮膚充填剤を使用するための１つの可能な方法は、所望な領域への重合性皮膚充填剤材料の注入、その後、充填剤を所望な形態に輪郭形成するか、または成型する工程を含む。様々な方法の１つによる材料の重合および架橋によって、注入された材料中のモノマーを変換して、ポリマーおよび鎖を形成することができ、これらは網目構造を形成し、所望な成型された形態を保持することができる。ポリマーを形成し、ポリマーを架橋するためのいくつかの方法が存在する。１つの方法は、モノマー溶液中で反応種を生成する光反応性試薬と光誘起反応を伴う。

【０２７４】

しかしながら、これらのアプローチの少なくともいくつかは、組織由来のコラーゲンまたは非コラーゲンポリマー（例えば、ポリ（ビニルアルコール）またはヒアルロン酸）に

引き続き焦点を合わせている。さらに、組織から抽出されたコラーゲンの使用は、生理学的条件下で、２０℃を超える温度で自然なゲル形成を促進する温度およびイオン強度に対する感受性に起因して、制限されている［例えば、ＰｕｒｅＣｏｌ、ＡｄｖａｎｃｅｄＢｉｏＭａｔｒｉｘ，Ｉｎｃ．を参照］。組織から抽出されたコラーゲンの典型的な温度依存性のゲル形成は、正確な流動性を著しく損なわせる。適用するまでコラーゲンを低温に保つことは、この現象の可能な解決策であるが、深刻な技術的制限を内包する。別の解決策は、これらの条件下でゲル状にならないコラーゲンの変性形態であるゼラチンの使用である。しかしながら、ゼラチンは、天然コラーゲンの真の組織と細胞の相互作用を欠いているため、重要な生物学的機能が失われる。さらに、その粘度により、細いゲージの針を使用して真皮の下に注入することがより困難になり、また、それを広げてより小さな空洞内で成型することがより困難になる。

【０２７５】

本明細書に開示される皮膚充填剤の実施形態およびその使用としては、限定されないが、以下のものが挙げられる。

１．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、

ａ．組織空間に重合性溶液を導入する工程であって、重合性溶液は、

ｉ．架橋可能な植物由来のヒトコラーゲン、および

ｉｉ．光開始剤を含む、該導入する工程と、

ｂ．上述の空間の表面にある表皮の表面に光を当てて重合を誘導する工程と、を含む、方法。

２．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、

（ａ）重合性溶液を、組織空間内の所望の構成内で成型または形を整える工程をさらに含み、この工程が、光を当てる工程と同時に起こるか、または光を当てる工程に続く、方法。

３．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、成型または形を整える工程が、筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減する、方法。

４．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンが、メタクリル化またはチオール化される、方法。

５．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、ポリマー溶液が、さらに、ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、酸化セルロース（ＯＣ）またはその修飾誘導体、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾誘導体、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾誘導体、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾誘導体、カルボキシメチルセルロースまたはその修飾誘導体、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾誘導体、またはこれらの組み合わせを含む、方法。

６．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロースまたは結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）の修飾誘導体が、光重合性修飾誘導体を含む、方法。

７．ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロースまたは結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）の修飾誘導体が、メタクリル化またはチオール化された誘導体を含む、請求項５に記載の方法。

８．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のコラーゲンは、ｒｈコラーゲンを含む、方法。

９．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のコラーゲンは、遺伝子組換え植物から得られる、方法。

１０．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、遺伝子組換え植物は、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラ、ニンジンおよび綿からなる群から選択される遺伝子組換え植物である、方法。
１１．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、遺伝子組換え植物は、タバコ植物である、方法。
１２．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、遺伝子組換え植物は、ＣＯＬ１、ＣＯＬ２、Ｐ４Ｈ－α、Ｐ４Ｈ－βおよびＬＨ３からなる群から選択されるヒトデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）の少なくとも１つの遺伝子配列の発現可能な配列を含む、方法。
１３．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンは、配列番号３に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも修飾された１つのヒトコラーゲンα－１鎖と、配列番号６に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも１つの修飾ヒトコラーゲンα－２鎖と、を含み、遺伝子組換え植物は、さらに、外因性プロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）を発現する、方法。
１４．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、リシルヒドロキシラーゼ（ＬＨ）、プロテアーゼＮおよびプロテアーゼＣからなる群から選択される外因性ポリペプチドを発現する工程をさらに含む、方法。
１５．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、ヒトコラーゲンα－１鎖が、配列番号１に記載される配列によってコードされる、方法。
１６．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、ヒトコラーゲンα－２鎖が、配列番号２に記載される配列によってコードされる、方法。
１７．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、外因性Ｐ４Ｈが、哺乳動物Ｐ４Ｈである、方法。
１８．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、外因性Ｐ４Ｈが、ヒトＰ４Ｈである、方法。
１９．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－１を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と、をさらに含む、方法。
２０．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－２を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と、をさらに含む、方法。
２１．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンは、アテロコラーゲンである、方法。
２２．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、光源は、発光ダイオード（ＬＥＤ）、レーザまたはキセノンランプを含む、方法。
２３．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、光開始剤が、可視光に応答して重合性溶液の重合を誘導する、方法。
２４．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、可視光は、３９０～７００ｎｍの波長を有する、方法。
２５．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、光開始剤が、エオシンＹ＋トリエタノールアミンまたはリボフラビンからなる群から選択される、方法。
２６．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、光開始剤が、紫外（ＵＶ）光に応答して重合性溶液の重合を誘導する、方法。
２７．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、光開始剤が、リチウム　フェニル－２，４，６－トリメチルベンゾイルホスフィネート（ＬＡＰ）または１－［４　２－ヒドロキシ－１－［４－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニル］－２－メチルプロパン－１－オン（ＩＲＧＡＣＵＲＥ（登録商標）２９５９）からなる群から選択される、方法。
２８．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、光開始剤が、赤外光に応答して重合性溶液の重合を誘導する、方法。
２９．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、重合性溶液が、２７ゲージから３３ゲージの範囲の中空針またはカニューレを介して組織空間に導入される、方法。

３０．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間内の重合性溶液が、手動マッサージによって所望の構成内で成型または形を整えられる、方法。
３１．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間内の重合性溶液が、成型または形を整える器具を用い、所望の構成内で成型または形を整えられる、方法。
３２．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間内の重合性溶液が、室温で本質的にゲル化不能である、方法。
３３．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間内の重合性溶液が、３７℃で本質的にゲル化不能である、方法。
３４．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、室温での粘度が低い、方法。
３５．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、３７℃での粘度が低い、方法。
３６．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、室温で低い力で組織空間に導入される、方法。
３７．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、３７℃で低い力で組織空間に導入される、方法。
３８．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、組織増強が増加する、方法。
３９．筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減するために表皮の下の組織空間に注入される重合性溶液の使用であって、重合性溶液が、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンと、可視光の適用前に、可視光の適用と同時に、重合を誘導するための光開始剤と、を含み、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕を低減するための所望の構成内で重合性溶液を成型または形を整える工程を含む、使用。
４０．筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減するために表皮の下の組織空間に注入される重合性溶液の使用であって、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンが、メタクリル化またはチオール化される、使用。
４１．筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減するために表皮の下の組織空間に注入される重合性溶液の使用であって、ポリマー溶液が、さらに、ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾誘導体、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾誘導体、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾誘導体、カルボキシメチルセルロースまたはその修飾誘導体、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾誘導体、またはこれらの組み合わせを含む、使用。
４２．筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減するために表皮の下の組織空間に注入される重合性溶液の使用であって、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロースまたは結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）の修飾誘導体が、光重合性修飾誘導体を含む、使用。
４３．筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減するために表皮の下の組織空間に注入される重合性溶液の使用であって、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロースまたは結晶性ナノ

セルロース（ＣＮＣ）の修飾誘導体が、メタクリル化またはチオール化された誘導体を含む、使用。

４４．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間に重合性溶液を導入する工程を含み、重合性溶液が、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンを含む、方法。

４５．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、

（ａ）重合性溶液を、組織空間内の所望の構成内で成型または形を整える工程をさらに含む、方法。

４６．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、成型または形を整える工程が、筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減する、方法。

４７．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、重合性溶液が、さらに、ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、酸化セルロース（ＯＣ）またはその修飾誘導体、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェアまたはその修飾誘導体、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）またはその修飾誘導体、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）またはその修飾誘導体、カルボキシメチルセルロースまたはその修飾誘導体、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）またはその修飾誘導体、またはこれらの組み合わせを含む、方法。

４８．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のコラーゲンは、ｒｈコラーゲンを含む、方法。

４９．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のコラーゲンは、遺伝子組換え植物から得られる、方法。

５０．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、遺伝子組換え植物は、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラ、ニンジンおよび綿からなる群から選択される遺伝子組換え植物である、方法。

５１．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、遺伝子組換え植物は、タバコ植物である、方法。

５２．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、遺伝子組換え植物は、ＣＯＬ１、ＣＯＬ２、Ｐ４Ｈ－α、Ｐ４Ｈ－βおよびＬＨ３からなる群から選択されるヒトデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）の少なくとも１つの遺伝子配列の発現可能な配列を含む、方法。

５３．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンは、配列番号３に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも修飾された１つのヒトコラーゲンα－１鎖と、配列番号６に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも１つの修飾ヒトコラーゲンα－２鎖と、を含み、遺伝子組換え植物は、さらに、外因性プロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）を発現する、方法。

５４．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、リシルヒドロキシラーゼ（ＬＨ）、プロテアーゼＮおよびプロテアーゼＣからなる群から選択される外因性ポリペプチドを発現する工程をさらに含む、方法。

５５．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、ヒトコラーゲンα－１鎖が、配列番号１に記載される配列によってコードされる、方法。

５６．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、ヒトコラーゲンα－２鎖が、配列番号２に記載される配列によってコードされる、方法。

５７．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、外因性Ｐ４Ｈが、哺乳動物Ｐ４Ｈである、方法。

５８．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、外因性Ｐ４Ｈが、ヒトＰ４Ｈである、方法。

５９．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－１を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と、をさらに含む、方法。

６０．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－２を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と

、をさらに含む、方法。
６１．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンは、アテロコラーゲンである、方法。
６２．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、重合性溶液が、２７ゲージから３３ゲージの範囲の中空針またはカニューレを介して組織空間に導入される、方法。
６３．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間内の重合性溶液が、手動マッサージによって所望の構成内で成型または形を整えられる、方法。
６４．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間内の重合性溶液が、成型または形を整える器具を用い、所望の構成内で成型または形を整えられる、方法。
６５．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間内の重合性溶液が、室温で本質的にゲル化不能である、方法。
６６．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、組織空間内の重合性溶液が、３７℃で本質的にゲル化不能である、方法。
６７．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、室温での粘度が低い、方法。
６８．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、３７℃での粘度が低い、方法。
６９．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、室温で低い力で組織空間に導入される、方法。
７０．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、３７℃で低い力で組織空間に導入される、方法。
７１．表皮の下の組織空間を充填する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む重合性溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、組織増強が増加する、方法。
７２．筋、ひだ、小じわ、しわ、または瘢痕を低減するために表皮の下の組織空間に注入される重合性溶液の使用であって、重合性溶液が、架橋可能な植物由来のヒトコラーゲンを含み、筋、ひだ、小じわ、しわ、もしくは瘢痕を低減するための所望の構成内で重合性溶液を成型または形を整える工程を含む、使用。
７３．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、組織空間に溶液を導入する工程を含み、この溶液は、
（ａ）植物由来のヒトコラーゲンと、
（ｂ）少なくとも１つの成長因子またはその供給源と、を含む、方法。
７４．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、少なくとも１つの成長因子の供給源は、血漿または多血小板血漿を含む、方法。
７５．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、細胞増殖足場が、コラーゲンを含む組織の分解または損傷に起因する治癒または置換を促進する、方法。
７６．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、コラーゲンを含む組織が、腱、靭帯、皮膚、角膜、軟骨、血管、腸、椎間板、筋肉、骨または歯からなる群から選択される、方法。
７７．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、細胞増殖足場が、腱炎の治癒を促進する、方法。
７８．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物由来のコラーゲンは、ｒｈコラーゲンを含む、方法。
７９．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物由来のコラーゲンは、遺伝子組換え植物から得られる、方法。
８０．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、遺伝子組換え植

物は、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラ、ニンジンおよび綿からなる群から選択される遺伝子組換え植物である、方法。

８１．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、遺伝子組換え植物は、タバコ植物である、方法。

８２．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、遺伝子組換え植物は、ＣＯＬ１、ＣＯＬ２、Ｐ４Ｈ－α、Ｐ４Ｈ－βおよびＬＨ３からなる群から選択されるヒトデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）の少なくとも１つの遺伝子配列の発現可能な配列を含む、方法。

８３．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンは、配列番号３に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも修飾された１つのヒトコラーゲンα－１鎖と、配列番号６に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも１つの修飾ヒトコラーゲンα－２鎖と、を含み、遺伝子組換え植物は、さらに、外因性プロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）を発現する、方法。

８４．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、リシルヒドロキシラーゼ（ＬＨ）、プロテアーゼＮおよびプロテアーゼＣからなる群から選択される外因性ポリペプチドを発現する工程をさらに含む、方法。

８５．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、ヒトコラーゲンα－１鎖が、配列番号１に記載される配列によってコードされる、方法。

８６．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、ヒトコラーゲンα－２鎖が、配列番号２に記載される配列によってコードされる、方法。

８７．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、外因性Ｐ４Ｈが、哺乳動物Ｐ４Ｈである、方法。

８８．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、外因性Ｐ４Ｈが、ヒトＰ４Ｈである、方法。

８９．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－１を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と、をさらに含む、方法。

９０．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対してヒトコラーゲンα－２を標的化する工程と、それをフィシンで消化する工程と、をさらに含む、方法。

９１．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンは、アテロコラーゲンである、方法。

９２．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の溶液と比較して、室温での粘度が低い、方法。

９３．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の重合性溶液と比較して、３７℃での粘度が低い、方法。

９４．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の溶液と比較して、室温で低い力で組織空間に導入される、方法。

９５．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の溶液と比較して、３７℃で低い力で組織空間に導入される、方法。

９６．表皮の下の組織空間内に細胞増殖足場を誘導する方法であって、植物由来のヒトコラーゲンを含む溶液が、同じ濃度および製剤において、組織から抽出されたヒトまたはウシコラーゲンを含む類似の溶液と比較して、足場形成を増加させるか、または細胞増殖

における増加を促進する、方法。
９７．細胞増殖足場を誘導するための表皮の下の組織空間に注入される溶液の使用であって、この溶液は、植物由来のヒトコラーゲンと、少なくとも１つの成長因子またはその供給源とを含み、コラーゲンを含む組織の分解または損傷に起因する治癒または置換を促進する、溶液の使用。
９８．細胞増殖足場を誘導するための表皮の下の組織空間に注入される溶液の使用であって、少なくとも１つの成長因子の供給源は、血漿または多血小板血漿を含む、溶液の使用。
【０２７６】
定義
【０２７７】
本明細書で使用される単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈からそうでないことが明確に示されない限り、複数の言及を含む。例えば、「分子（ａ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）」という用語は、複数の分子も含む。
【０２７８】
本明細書で使用される場合、「約」という用語は、±１０％または±５％を指す。
【０２７９】
用語「ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ」、「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」、「ｉｎｃｌｕｄｅｓ」、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ」、「ｈａｖｉｎｇ」およびそれらの活用形は、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ（含む）が限定されない」ことを意味する。
【０２８０】
「からなる」という用語は、「含むおよび限定される」ことを意味する。
【０２８１】
「本質的にからなる」という用語は、追加の成分、工程および／または部品が特許請求された構成、方法、または構造の基本的なおよび新規の特性を実質的に変更しない場合のみ、構成、方法または構造が追加の成分、工程および／または部品を含んでもよいことを意味する。
【０２８２】
本明細書で使用する「方法」という用語は、化学、薬理学、生物学、生化学、医学の実務家により既知の、または、化学、薬理学、生物学、生化学、医学の実務家による既知の方法、手段、技術、および手順から容易に開発される方法、手段、技術、および手順を含むが、これらに限定されない、所定のタスクを達成するための方法、手段、技術、および手順を指す。
【０２８３】
本明細書で使用される場合、「遺伝子組換え植物」という句は、外因性ポリヌクレオチド配列で安定的または一時的に形質転換される、任意の下等（例えば、コケ）植物または高等（例えば、維管束）植物、またはその組織または単離された細胞（例えば、細胞懸濁物の）を包含する。植物の例としては、限定されないが、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラ、綿、ニンジン、およびコケなどの下等植物が挙げられる。
【０２８４】
本明細書で使用される場合、「コラーゲン鎖」という句は、コラーゲン線維、好ましくはＩ型線維のα１鎖またはα２鎖などのコラーゲンサブユニットを包含する。本明細書で使用される場合、「コラーゲン」という句は、組み立てられたコラーゲントリマーを指し、Ｉ型コラーゲンの場合、２つのα１鎖と１つのα２鎖とを含む。コラーゲン線維は、末端のプロペプチドＣおよびＮを欠いたコラーゲンである。
【０２８５】
本明細書で使用される場合、「テロペプチドを含むコラーゲン」という句は、アテロコラーゲンに含まれるテロペプチドレムナントよりも長いテロペプチドを含む可溶性コラーゲン分子を包含する。したがって、テロペプチドを含むコラーゲンは、全長プロペプチド

を含むプロコラーゲンであってもよい。あるいは、テロペプチドを含むコラーゲンは、部分的に消化されたプロペプチドを含むプロコラーゲン分子であってもよい。さらにこれに代えて、テロペプチドを含むコラーゲンは、テロコラーゲンであってもよい。

【０２８６】

本明細書で使用される「プロコラーゲン」という用語は、Ｎ末端プロペプチド、Ｃ末端プロペプチドのいずれか、またはその両方を含むコラーゲン分子（例えば、ヒト）を包含する。例示的なヒトプロコラーゲンアミノ酸配列は、配列番号１、２、７および８によって示される。

【０２８７】

本明細書で使用される「テロコラーゲン」という用語は、通常プロコラーゲンに含まれるＮ末端およびＣ末端プロペプチドの両方を欠いているが、依然としてテロペプチドを含むコラーゲン分子を包含する。線維状コラーゲンのテロペプチドは、ネイティブＮ／Ｃプロテイナーゼで消化した後のＮ末端およびＣ末端プロペプチドのレムナントである。組換えヒトテロコラーゲンは、外因性ヒトプロコラーゲンとそれぞれのプロテアーゼ（すなわち、ＣまたはＮ、あるいはその両方）の両方を発現するように形質転換された細胞内で生成され得る。そのようなプロテアーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号１０（プロテアーゼＣ）および１１（プロテアーゼＮ）によって例示される。そのようなプロテアーゼは、本明細書で以下にさらに記載されるように、それらがコラーゲン鎖と同じ細胞内コンパートメントに蓄積されるように発現され得る。

【０２８８】

本明細書で使用される場合、「アテロコラーゲン」という用語は、典型的にはプロコラーゲンおよびそのテロペプチドの少なくとも一部に含まれるＮ末端およびＣ末端プロペプチドを両方とも欠いているが、可能な好適な条件下で原線維を形成することが可能であるような、そのテロペプチドの十分な部分を含む、コラーゲン分子を包含する。本発明の方法によれば、任意の種類のアテロコラーゲンを生成することができる。例としては、原線維を形成するコラーゲン（Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＶおよびＸＩ型）、網目構造を形成するコラーゲン（ＩＶ、ＶＩＩＩおよびＸ型）、原線維表面と会合するコラーゲン（ＩＸ、ＸＩＩおよびＸＩＶ型）、膜貫通タンパク質として発生するコラーゲン（ＸＩＩＩおよびＸＶＩＩ型）、または１１ｎｍの周期的な球状フィラメントを形成するコラーゲン（ＶＩ型）が挙げられる。一実施形態によれば、アテロコラーゲンは、Ｉ型コラーゲンのα１および／またはα２鎖を含む。

【０２８９】

本明細書に開示される皮膚充填剤は、いくつかの実施形態では、コラーゲン／アテロコラーゲンの遺伝子組換え形態、例えば、コラゲナーゼ耐性コラーゲンなどを含んでもよいことが理解されるであろう。

【０２９０】

本明細書で使用される場合、「植物プロモーター」または「プロモーター」という句は、植物、真菌および酵母の細胞（ＤＮＡを含有するオルガネラを含む）における遺伝子発現を指令することができるプロモーターを含む。このようなプロモーターは、植物、細菌、ウイルス、真菌または動物起源のものに由来してもよい。このようなプロモーターは、構成的（すなわち、複数の組織において高レベルの遺伝子発現を指令することができる）、組織特異的（すなわち、特定の組織または複数の組織において遺伝子発現を指令することができる）、誘導性（すなわち、刺激によって遺伝子発現を指令することができる）、またはキメラ（すなわち、少なくとも２つの異なるプロモーターの部分から形成された）であってもよい。

【０２９１】

本明細書で使用される場合、「内因性Ｐ４Ｈ活性を欠く細胞内コンパートメント」という句は、植物Ｐ４Ｈまたは植物様Ｐ４Ｈ活性を有する酵素を含まない細胞の任意のコンパートメント化された領域を指す。このような細胞内コンパートメントの例としては、液胞、アポプラストおよび細胞質、ならびに葉緑体、ミトコンドリアなどの細胞小器官が挙げ

られる。

【０２９２】

本明細書全体を通して、「構築材料」という句は、「未硬化の構築材料」または「未硬化の構築材料製剤」という句を包含し、本明細書に記載されるように、層を順次形成するために使用される材料を包括的に説明するものである。この句は、最終物体を形成する未硬化材料、すなわち、１つ以上の未硬化モデリング材料製剤、および任意選択で、支持体を形成するために使用される未硬化材料、すなわち未硬化支持材料製剤を包含する。未硬化の構築材料は、１つ以上のモデリング製剤を含んでもよく、異なるモデリング製剤を硬化するときに物体の異なる部分が作られるように分配することができ、したがって、異なる硬化モデリング材料または硬化モデリング材料の異なる混合物で作られる。

【０２９３】

本明細書で使用される場合、「バイオプリンティング」は、本明細書に記載される自動または半自動のコンピュータ支援型の付加製造システム（例えば、バイオプリンタまたはバイオプリンティングシステム）と適合する方法論によって、生物学的成分を含む１つ以上のバイオインク製剤を利用しつつ、付加製造プロセスを実施することを意味する。

【０２９４】

本明細書全体を通して、バイオプリンティングの文脈において、「物体」という用語は、その少なくとも一部分に生物学的成分を含む付加製造の最終製品を説明する。この用語は、支持材料が未硬化の構築材料の一部として使用されている場合、支持材料を除去した後、本明細書に記載のバイオプリンティング法によって得られる製品を指す。いくつかの実施形態では、生物学的成分は、例えば、ＷＯ２００６／０３５４４２、ＷＯ２００９／０５３９８５、ならびにそれらに由来する特許および特許出願（これらは全て、本明細書に完全に記載されているかのように参照により組み込まれる）に記載されるような組換えヒトコラーゲンを含む。

【０２９５】

本明細書全体で使用される「物体」という用語は、物体全体またはその一部を指す。

【０２９６】

本明細書全体を通して、「硬化性材料」は、本明細書に記載の硬化条件にさらされると固化または硬化して、本明細書に定義される硬化モデリング材料を形成する化合物（モノマーまたはオリゴマーまたはポリマー化合物）である。硬化性材料は、典型的には重合性材料であり、好適なエネルギー源にさらされると重合および／または架橋を受ける。あるいは、硬化性材料は熱応答性材料であり、温度変化（例えば、加熱または冷却）にさらされると固化または硬化する。場合により、硬化性材料は、生物学的反応（例えば、酵素触媒反応）の際に硬化または固体した材料を形成するための反応を受ける生物学的材料である。

【０２９７】

「硬化条件」は、硬化エネルギー（例えば、温度、放射線）および／または硬化を促進する材料または試薬を包含する。

【０２９８】

本明細書に記載の実施形態のいずれかの一部において、硬化性材料は、本明細書に記載のように、放射線への曝露時に重合するか、または架橋を受ける光重合性材料であり、いくつかの実施形態では、硬化性材料は、本明細書に記載のように、ＵＶ－ｖｉｓ放射線への曝露時に重合するか、または架橋を受ける、ＵＶ硬化性または可視光硬化性の材料である。

【０２９９】

本明細書に記載の実施形態のいずれかの一部において、硬化性材料は、モノマー、オリゴマーまたは短鎖ポリマーであってもよく、各々が本明細書に記載されるように重合性である。

【０３００】

本明細書において、「硬化性」という用語は、「重合性」および「架橋性」という用語

を包含する。
【０３０１】
本明細書で使用される場合、「エアロポニックス」は、土壌または凝集媒体を使用せずに、空気または霧環境で植物を成長させるプロセスである（「ジオポニックス」として知られている）。
【０３０２】
本明細書で使用される場合、「ハイドロポニックス」は、水溶媒中の無機栄養溶液を使用して、土壌なしで植物を成長させるプロセス（「ジオポニックス」）である。
【０３０３】
本明細書で使用される場合、「内生菌」は、植物のすべてのエンドファイトを含む。
【０３０４】
本明細書で使用される場合、「滲出液」は、細孔または創傷を通して生物によって放出される流体である。「滲出」は、「滲出液」を放出するプロセスである。
【０３０５】
本明細書で使用される場合、「ハイドロポニックス」は、水溶媒中の無機栄養溶液を使用して、土壌なしで植物を成長させるプロセス（「ジオポニックス」）である。
【０３０６】
本明細書で使用される場合、「統合」または「統合ハイブリダイゼーション」は、ある種の遺伝子プールから別の種の遺伝子プールへの、種間雑種の１つとの反復戻し交配を介した遺伝子の移動（すなわち、「遺伝子流動」）である。その親種は、単純な交配とは異なり、親遺伝子の複雑な混合をもたらす。
【０３０７】
本明細書で使用される場合、「メタボローム」は、「生物学的サンプル」（細胞、オルガネラ、器官、組織、組織抽出物、生体液、または生物を含むが、これらに限定されない）内に見られる低分子化学物質の完全なセットである。メタボロームの低分子化学物質は、「内因性代謝物」または「外因性化学物質」であってもよい。「内因性代謝物」は、生物によって自然に生成し、アミノ酸、有機酸、核酸、脂肪酸、アミン、糖、ビタミン、補因子、色素および抗生物質を含むが、これらに限定されない。「外因性化学物質」は、生物によって自然に生成されるものではなく、薬物、環境汚染物質、食品添加剤、毒素、および他の生体異物を含むが、これらに限定されない。「内因性メタボローム」は、内因性代謝物で構成され、「外因性メタボローム」は「外因性化学物質」で構成される。「内因性メタボローム」は、特に植物、真菌、および原核生物に関して、「一次メタボローム」と「二次メタボローム」で構成される。「一次メタボローム」は、「一次代謝物」（すなわち、生物の正常な成長、発達、および生殖に直接関与する代謝物）で構成され、「二次メタボローム」は、「二次代謝物（すなわち、生物の正常な成長、発達、および生殖に直接関与しない代謝産物）」で構成される。二次代謝物は、重要な生態学的機能を有することが多い。
【０３０８】
本明細書で使用される場合、「代謝物」は通常、１５００Ｄａ未満の分子量を有する低分子である。「代謝物」としては、限定されないが、糖脂質、多糖類、短いペプチド、小さなオリゴヌクレオチド、有機酸、タキサン、アルカロイドおよびストリゴラクトンを挙げることができるが、非常に大きな高分子（例えば、タンパク質、ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、およびＤＮＡ）は、一般に代謝物ではなく、メタボロームの一部でもない。
【０３０９】
本明細書で使用される場合、「ＳＩＬＶＡデータベース」は、ＳＩＬＶＡリボソームＲＮＡデータベースである。
【０３１０】
あらゆる種類のさらなるプロセシングを受けたものを含む、生物から得られた全てのサンプルは、生物から得られたものとみなされる。
【０３１１】

ＤＮＡの単離、配列決定、増幅および／またはクローニングの方法は、当業者に知られている。ＤＮＡ増幅に最も一般的に使用される方法は、ＰＣＲである（ポリメラーゼ連鎖反応、例えば、ＰＣＲ Ｂａｓｉｃｓ：ｆｒｏｍ ｂａｃｋｇｒｏｕｎｄ ｔｏ Ｂｅｎｃｈ、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ、２０００、Ｅｃｋｅｒｔら、１９９１．ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ １：１７を参照）。さらなる好適な増幅方法としては、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、転写増幅および自立配列複製、および核酸に基づく配列増幅（ＮＡＳＢＡ）が挙げられる。同様に、ＲＮＡおよびタンパク質の単離、特性決定など、ならびにタンパク質発現のための方法は、当業者に知られている。

【０３１２】

以下の実施例は、本明細書に開示される、皮膚充填剤のいくつかの実施形態およびその使用をより完全に説明するために提示される。しかしながら、それらは、決して、本明細書に開示される皮膚充填剤、それらの使用の広い範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示される原理の多くの変形および改変を容易に考案することができる。

【実施例】

【０３１３】

実施例１．構築物および形質転換スキーム。

【０３１４】

この研究で使用される発現カセットおよびベクターの構築は、図１Ａ～１Ｄに示されている（米国特許第８，４５５，７１７号も参照のこと）。この研究におけるコード配列の全ては、タバコでの発現のために最適化され、所望のフランキング領域で化学的に合成された（配列番号１、４、７、１２、１４、１６、１８、２０、２２）。図１Ａ：液胞シグナルまたはアポプラストシグナル（配列番号７によってコードされる）のいずれかに融合しているか、またはシグナルが、Ｃｈｒｙｓａｎｔｈｅｍｕｍ ｒｂｃＳ１プロモーターおよび５'ＵＴＲ（配列番号１０）、Ｃｈｒｙｓａｎｔｈｅｍｕｍ ｒｂｃＳ１ ３'ＵＴＲおよびターミネーター（配列番号１１）で構成される発現カセット内でクローニングされていない、Ｃｏｌ１およびＣｏｌ２（配列番号１、４）をコードする合成遺伝子。完全な発現カセットは、ｐＢＩＮＰＬＵＳ植物形質転換ベクターの複数のクローニング部位内でクローニングされた（ｖａｎ Ｅｎｇｅｌｅｎら、１９９５、Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓ ４：２８８－２９０）。図１Ｂ：液胞シグナルまたはアポプラストシグナル（配列番号７によってコードされる）のいずれかに融合しているか、またはシグナルが、ベクターｐＪＤ３３０によって保有されるＣａＭＶ ３５Ｓプロモーターおよびｔｍｖオメガ配列およびＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍノパリンシンテターゼ（ＮＯＳ）ターミネーターで構成される発現カセット内でクローニングされていない、Ｐ４Ｈβ－ヒト、Ｐ４Ｈα－ヒトおよびＰ４Ｈ－植物（配列番号１２、１４および１６）をコードする合成遺伝子（Ｇａｌｉｌｉら、１９８７、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １５：３２５７－３２７３）。完全な発現カセットは、Ｃｏｌ１またはＣｏｌ２の発現カセットを保有するｐＢＩＮＰＬＵＳベクターの複数のクローニング部位内でクローニングされた。図１Ｃ：液胞シグナルまたはアポプラストシグナル（配列番号７によってコードされる）のいずれかに融合したプロテイナーゼＣおよびプロテイナーゼＮ（配列番号１８、２０）をコードする合成遺伝子が、Ｃｈｒｙｓａｎｔｈｅｍｕｍ ｒｂｃＳ１プロモーターおよび５'ＵＴＲ（配列番号１０）、Ｃｈｒｙｓａｎｔｈｅｍｕｍ ｒｂｃＳ１ ３'ＵＴＲおよびターミネーター（配列番号１１）で構成される発現カセット内でクローニングされた。完全な発現カセットは、ｐＢＩＮＰＬＵＳ植物形質転換ベクターの複数のクローニング部位内でクローニングされた。図１Ｄ：液胞シグナルまたはアポプラストシグナル（配列番号７によってコードされる）のいずれかに融合しているか、またはシグナルが、Ｃｏｌ１およびＰ４Ｈβの発現カセットを保有するｐＢＩＮＰＬＵＳベクターの複数のクローニング部位でクローニングされていない、隣接するイチゴベインバンディングウイルス（ＳＶＢＶ）プロモーター（ＮＣＢＩ寄託ＡＦ３３１６６６ ＲＥＧＩＯＮ：６２３．９５０バージョンＡＦ３３１６６６．１ ＧＩ：１３３４５７８８）を有し、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍオクトピン

シンターゼ（ＯＣＳ）ターミネーター（ＮＣＢＩ寄託Ｚ３７５１５　ＲＥＧＩＯＮ：１３４４．１５３８バージョンＺ３７５１５．１　ＧＩ：８８６８４３）によって停止する、ＬＨ３（配列番号２２）をコードする合成遺伝子。

【０３１５】

図１Ａ～１Ｄに記載の発現カセットを利用した宿主植物への共形質転換スキームを図２に示す。各発現カセット挿入物は、コード配列の短い名称で表される。コード配列および関連する配列番号を表１に記載する。各共形質転換は、２つのｐＢＩＮＰＬＵＳバイナリベクターによって実行される。各長方形は、１つ、２つまたは３つの発現カセットを保有する単一のｐＢＩＮＰＬＵＳベクターを表す。プロモーターとターミネーターは、図１Ａ～１Ｄに明記される。

【０３１６】

実施例２．植物コラーゲン発現。

【０３１７】

以下の表１に列挙されるタンパク質をコードする合成ポリヌクレオチド配列は、タバコ植物での発現のために設計され、最適化された。

【０３１８】

【表１】

発現タンパク質のリスト

名称：	SwissProt 寄託	アミノ酸	スプライシングアイソフォーム	欠損	名称	以下の配列番号に含まれる	以下の配列番号によってコードされる
コラーゲン α1（I）鎖 [前駆]	p02452	1442	一バージョン	ER シグナル	Col1	3	1
コラーゲン α2（I）鎖 [前駆]	p08123　p08123 中で行われた 2 箇所の変更：D549A および N249I	1342	一バージョン	ER シグナル	Col2	6	4
プロリル　4－ヒドロキシラーゼ β サブユニット	p07237	487	一バージョン	ER シグナル、KDEL	P4Hβ ヒト（Hunman）	13	12
プロリル　4－ヒドロキシラーゼ α－1 サブユニット	p13674	517	P13674-1	ER シグナル	P4Hα ヒト	15	14
プロリル　4－ヒドロキシラーゼ 植物	Swissprot にエントリーなし。NCBI 寄託：gi：15227885	252	一バージョン	ミトコンドリアシグナルは、aa1－39 であると予測される	P4H 植物	17	16
プロコラーゲン C－プロテイナーゼ	p13497	866	P13497-1 BMP1-3	ER シグナル、プロペプチド	プロテイナーゼ C	19	18
プロコラーゲン I N－プロテイナーゼリシルヒドロキシラーゼ 3	o95450	958	O95450-1 LpNPI	ER シグナル、プロペプチド	プロテイナーゼ N	21	20
	o60568	714	一バージョン	ER シグナル	LH3	23	22

【０３１９】

シグナルペプチド

【０３２０】
１．チオールプロテアーゼアリューレイン前駆体の大麦遺伝子の液胞シグナル配列（ＮＣＢＩ寄託Ｐ０５１６７　ＧＩ：１１３６０３）ＭＡＨＡＲＶＬＬＬＡＬＡＶＬＡＴＡＡＶＡＶＡＳＳＳＳＦＡＤＳＮＰＩＲＰＶＴＤＲＡＡＳＴＬＡ（配列番号２４）。
２．Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａのエンド－１，４－β－グルカナーゼのアポプラストシグナル（Ｃｅｌｌ、ＮＣＢＩ寄託ＣＡＡ６７１５６．１　ＧＩ：２４４００３３）；配列番号９、配列番号７によってコードされる。
【０３２１】
プラスミドの構築
【０３２２】
植物発現ベクターは、実施例１で教示されるように構築され、構築された各発現ベクターの組成は、制限分析および配列決定によって確認された。
【０３２３】
以下の発現カセットを含む発現ベクターを構築した。
【０３２４】
１．コラーゲンα１
２．コラーゲンα１＋ヒトＰ４Ｈβサブユニット
３．コラーゲンα１＋ヒトＰ４Ｈβサブユニット＋ヒトＬＨ３
４．コラーゲンα２
５．コラーゲンα２＋ヒトＰ４Ｈαサブユニットを有する
６．コラーゲンα２＋Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　Ｐ４Ｈを有する
７．Ｐ４Ｈβサブユニット＋ヒトＬＨ３
８．ヒトＰ４Ｈαサブユニット
【０３２５】
上述のコード配列の各々は、液胞トランジットペプチドまたはアポプラストトランジットペプチドに翻訳融合されるか、または任意のトランジットペプチド配列を欠いており、その場合、細胞質蓄積が予想される。
【０３２６】
植物の形質転換とＰＣＲスクリーニング
【０３２７】
タバコ植物（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ　ｔａｂａｃｕｍ、Ｓａｍｓｕｎ　ＮＮ）は、図２に教示される形質転換スキームに従って、上述の発現ベクターを用いて形質転換された。
【０３２８】
得られたトランスジェニック植物は、コラーゲンα１の３２４ｂｐフラグメントおよびコラーゲンα２の５３７ｂｐフラグメントを増幅可能なように設計された４個のプライマーを使用したマルチプレックスＰＣＲによってスクリーニングされた（表２）。図３は、１つのマルチプレックスＰＣＲスクリーンの結果を示す。
【０３２９】

【表２】

コラーゲンα1の324bpフラグメントおよびコラーゲンα2の537bpフラグメントを増幅するためのマルチプレックスPCR用プライマーのリスト

Col1順プライマー（24マー）：	5' ATCACCAGGAGAACAGGGACCATC 3'	配列番号25
Col1逆プライマー（29マー）：	5' TCCACTTCCAAATCTCTATCCCTAACAA C 3'	配列番号26
Col2順プライマー（23マー）：	5' AGGCATTAGAGGCGATAAGGGAG 3'	配列番号27
Col2逆プライマー（27マー）：	5' TCAATCCAATAATAGCCACTTGACCAC 3'	配列番号28

【０３３０】

実施例３．トランスジェニックタバコ植物におけるヒトコラーゲンの検出。

【０３３１】

５００ｍｇの葉を、０．５ｍｌの５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ＝７．５）中、「完全な」プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ＧｍｂＨ製の製品番号１８３６１４５、５０ｍｌバッファ中１個のタブレット）を用いて粉砕することによって、全可溶性タンパク質を、タバコ形質転換体２番、３番および４番から抽出した。粗抽出物を２５０μｌ　４Ｘと混合した。１０％のβ－メルカプトエタノールと８％のＳＤＳとを含むサンプル適用バッファ、サンプルを７分間煮沸し、１３０００ｒｐｍで８分間遠心分離した。２０Ｍｌの上澄み液を、１０％ポリアクリルアミドゲルにロードし、標準的なウエスタンブロット手順において、抗コラーゲンＩ型（変性）抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＡＢ７４５）を用いて試験した（図４）。Ｗ．Ｔ．は、野生型タバコである。コラーゲンＩ型α１またはα２、または両方についてＰＣＲ陽性である植物において、陽性コラーゲンバンドを見ることができる。ヒト胎盤由来の５００ｎｇのコラーゲンＩ型の陽性対照バンド（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＣＣ０５０）は、トランスジェニック植物由来のサンプル中、全可溶性タンパク質の約０．３％（約１５０μｇ）に相当する。

【０３３２】

コラーゲンが液胞に標的化された場合、全可溶性タンパク質の約１％までの予想される分子量でコラーゲンを発現する植物が検出された（図４）。アポプラストへの全長コラーゲンの細胞内標的化は首尾よく達成された（図５）。細胞質（すなわち、標的ペプチドがない）でコラーゲンを発現する植物は、コラーゲンを検出可能なレベルまで蓄積せず、このことは、植物におけるコラーゲンの細胞内標的化が、この成功にとって重要であることを示している。

【０３３３】

これに加えて、Ｎ－プロペプチドを欠くコラーゲンが本アプローチを用いて顕著なタンパク質分解を受けたことを示したＲｕｇｇｉｅｒｏら、２０００およびＭｅｒｌｅら、２００２の研究とは対照的に、Ｃ－プロペプチドおよびｎ－プロペプチドを有する全長コラーゲンタンパク質は、細胞内コンパートメントに高レベルで蓄積した。

【０３３４】

このデータはまた、各々が異なる種類のコラーゲン鎖を発現する２つの植物を交配することが、最適なレベルの各種類の鎖を発現する植物の選択を可能にし、その後の植物交配が、所望なコラーゲン産生植物を達成することを可能にするという点で有利であることを明確に示す。

【０３３５】

本発明の植物によって産生されるコラーゲンは、天然のプロペプチドを含み、したがって、タンパク質分解によって精製されたヒト対照よりも大きなタンパク質を形成すると予想される。ヒドロキシル化またはグリコシル化を行わないコラーゲンα１およびα２鎖の計算された分子量は、以下の通りである。プロペプチドを有するＣｏｌ１－－１３６ｋＤａ、プロペプチドを有しないＣｏｌ１－－９５ｋＤａ、プロペプチドを有するＣｏｌ２－－１２７ｋＤａ、プロペプチドを有しないｏｌ２－－９２ｋＤａ。

【０３３６】

図４で見ることができるように、形質転換体３－５および３－４９のＣｏｌ１バンドは、他の植物のＣｏｌ１バンドよりも大きいように見える。このバンドは、これらの植物中で共発現し、ヒトコラーゲン鎖と同じ細胞内コンパートメント（例えば、液胞）に対して標的化されたαおよびβサブユニットで構成されるヒトプロリン－４－ヒドロキシラーゼホロ酵素による、コラーゲン鎖中のプロリンヒドロキシル化を示す。

【０３３７】

実施例４．トランスジェニック植物におけるコラーゲン三重ヘリックス組織化および熱安定性

【０３３８】

トランスジェニック植物におけるコラーゲン三重ヘリックス組織化およびヘリックスの熱安定性を、トランスジェニック植物の全粗タンパク質抽出物の熱変成、次いで、トリプシンまたはペプシンの消化によって試験した（図６Ａ～６Ｂ）。

【０３３９】

第１の実験では、タバコ２－９（ｃｏｌ　α１のみを発現し、Ｐ４Ｈを発現しない）および３－５（ｃｏｌ　α１＋２およびヒトＰ４Ｈの両方を発現する）からの全可溶性タンパク質を、５００ｍｇの葉を、０．５ｍｌの５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ＝７．５）中で粉砕し、１３０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、上澄み液を集めることによって抽出した。上澄み液０μｌを熱処理（３３℃または４３℃で１５分）した後、直ちに氷上に置いた。５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ＝７．５）中の各サンプル６μｌの１ｍｇ／ｍｌのトリプシンに添加することによって、トリプシン消化を開始させた。サンプルを室温（約２２℃）で２０分間インキュベートした。１０％のβメルカプトエタノールと８％のＳＤＳとを含む２０μｌ　４Ｘサンプル適用バッファを添加することによって消化を停止させ、サンプルを７分間煮沸し、１３０００ｒｐｍで７分間遠心分離した。５０μｌの上澄み液を、１０％ポリアクリルアミドゲルにロードし、標準的なウエスタンブロット手順において、抗コラーゲンＩ型（変性）抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＡＢ７４５）を用いて試験した。陽性対照は、５００ｎｇのヒトコラーゲンＩ型（Ｃｈｅｍ

ｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＣＣ０５０、ペプシン消化によってヒト胎盤から抽出された）のサンプルをｗ．ｔ．タバコから抽出された５０μｌの全可溶性タンパク質に添加したものであった。

【０３４０】

図６Ａに示されるように、植物３番～５番および対照ヒトコラーゲン中で形成されたコラーゲン三重ヘリックスは、３３℃での変性に耐性があった。対照的に、２番～９番の植物によって形成されたコラーゲンは、３３℃で変性した。この熱安定性の違いは、コラーゲンα１およびコラーゲンα２とＰ４Ｈのβおよびαサブユニットの両方を発現する形質転換体３番～５番における三重ヘリックス組織化および翻訳後プロリンヒドロキシル化の成功を示す。

【０３４１】

２番～９番の形質転換体における２つのバンドは、ＳＤＳおよびメルカプトエタノールで７分間煮沸した後に安定なダイマーまたはトリマーを表している可能性がある。ヒトコラーゲン（上側パネル）および形質転換体３番～５番において、同様のバンドが見られる。考えられる説明は、リジンオキシダーゼによる２つのリジンの酸化的脱アミノ化の後に形成された、異なる三重ヘリックス（クロスリンク）内の２つのペプチド間の共有結合である。

【０３４２】

第２の実験では、トランスジェニックタバコ１３－６（コラーゲンＩ型α１およびα２鎖（矢印によって示される）、ヒトＰ４ＨαおよびβサブユニットならびにヒトＬＨ３を発現する）からの全可溶性タンパク質を、５００ｍｇの葉を、０．５ｍｌの１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ＝７．５）および３００ｍＭ　ＮａＣｌ中で粉砕し、１００００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、上澄み液を集めることによって抽出した。上澄み液５０μｌを熱処理（３３℃、３８℃または４２℃で２０分）した後、直ちに氷上に置いた。各サンプルに、１０ｍＭ酢酸中の４．５μｌの０．１Ｍ　ＨＣｌと４μｌの２．５ｍｇ／ｍｌのペプシンを加えることによって、ペプシン消化を開始した。サンプルを室温（約２２℃）で３０分間インキュベートした。５μｌの緩衝化されていない１Ｍ　Ｔｒｉｓを加えることにより消化を終了させた。各サンプルを、１０％のβ－メルカプトエタノールと８％のＳＤＳとを含む２２μｌ　４Ｘサンプル適用バッファと混合し、７分間煮沸し、１３０００ｒｐｍで７分間遠心分離した。４０μｌの上澄み液を、１０％ポリアクリルアミドゲルにロードし、標準的なウエスタンブロット手順において、抗コラーゲンＩ型抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＡＢ７４５）を用いて試験した。陽性対照は、約５０ｎｇのヒトコラーゲンＩ型（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＣＣ０５０、ペプシン消化によってヒト胎盤から抽出された）のサンプルをｗ．ｔ．タバコからの全可溶性タンパク質に添加したものであった。

【０３４３】

図６Ｂに示されているように、植物番号１３－６で形成されたコラーゲン三重ヘリックスは、４２℃での変性に耐性があった。プロペプチドの開裂は３３℃で最初に見られ、温度が３８℃までに上昇し、再び４２℃まで上昇すると、効率が徐々に向上する。開裂されたコラーゲン三重ヘリックスドメインは、ペプシンで処理されたヒトコラーゲンの移動と同様のゲル上の移動を示す。この実験で使用されたヒトコラーゲンは、ペプシンタンパク質分解によってヒト胎盤から抽出されたため、プロペプチドと一部のテロペプチドを欠いている。

【０３４４】

実施例５．植物Ｐ４Ｈ発現。

【０３４５】

天然植物Ｐ４Ｈの誘導

【０３４６】

タバコＰ４Ｈ　ｃＤＮＡをクローニングし、内因性Ｐ４Ｈ発現を誘導する条件と処理を決定するためのプローブとして使用した。ノーザンブロット分析（図７）は、Ｐ４Ｈが茎

頂で比較的高レベルで発現され、葉で低レベルで発現されることを明確に示す。Ｐ４Ｈレベルは、摩耗処理の４時間後に葉で有意に誘導された（下側のパネルで「負傷したもの」）。他のストレス条件を使用しても同様の結果が得られた（図には示していない）。

【０３４７】

トランスジェニックタバコ植物におけるヒトＰ４Ｈαおよびβサブユニットとコラーゲンα１およびα２鎖の検出。

【０３４８】

トランスジェニックタバコ植物におけるヒトＰ４ＨαおよびβサブユニットとコラーゲンＩ型α１およびα２鎖の検出は、抗ヒトＰ４Ｈαサブユニット抗体（ＩＣＮ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ　Ｉｎｃ．製の番号６３－１６３）、抗ヒトＰ４Ｈβサブユニット抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＮＭＡＢ２７０１）および抗コラーゲンＩ型抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．製の番号ＡＢ７４５）を使用して行った。これらの抗体でプローブされたウエスタンブロットの結果を図８に示す。

【０３４９】

Ｐ４Ｈα、Ｐ４Ｈβ、コラーゲン１型α１およびα２のバンドの発現は、植物１３－６で確認された（またヒトＬＨ３で形質転換されている）。液胞シグナルペプチドを含むＰ４Ｈαおよびβの計算された分子量は、それぞれ６５．５ｋＤａおよび５３．４ｋＤａである。ヒドロキシル化またはグリコシル化されていない、プロペプチドを含むコラーゲンα１およびα２鎖の計算された分子量は、それぞれ１３６ｋＤａおよび１２７ｋＤａである。

【０３５０】

実施例６．液胞を標的とするコラーゲンは、暗所で成長した植物で安定して発現する。

【０３５１】

コラーゲンを発現する植物：

【０３５２】

２０－２７９親タバコ植物系統は、Ｐ４Ｈβ＋ＬＨ３を発現する発現ベクターおよびＰ４Ｈαを発現する別の発現ベクターを用いる共形質転換によって生成された。各遺伝子の前には、植物の液胞チオールプロテアーゼであるアリューレインの液胞標的決定因子がある。

【０３５３】

２－３００親タバコ植物系統は、ｃｏｌ１を発現する発現ベクターおよびｃｏｌ２を発現する別の発現ベクターを用いる共形質転換によって生成された。各遺伝子の前には、植物の液胞チオールプロテアーゼであるアリューレインの液胞標的決定因子がある。

【０３５４】

１３－６５２植物は、Ｃｏｌ１、Ｐ４ＨβおよびＬＨ３をコードする発現ベクターおよびＣｏｌ２およびＰ４Ｈαをコードする第２の発現ベクターを用いるタバコ植物の共形質転換によって生成された。各遺伝子の前には、植物の液胞チオールプロテアーゼであるアリューレインの液胞標的決定因子があり、ベクターに含まれるカセット配列は、上の実施例１に記載される。

【０３５５】

明暗トライアル

【０３５６】

６個の１３－６／５２ホモ接合体植物の分析。葉番号４＋５／６からのサンプル、通常の条件（明条件下で１６時間、暗条件下で８時間）から３植物、暗状態でのみ成長させた３植物から、８日間にわたって同時に（１２：３０）毎日採取した。

【０３５７】

全タンパク質抽出およびウエスタンブロット分析。

【０３５８】

タバコの葉９０ｍｇを、ミキサーミルＭＭ３０１型（Ｒｅｔｓｃｈ）によって、抽出バッファ（１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ（ｐＨ＝７．５）、Ｒｏｃｈｅカタログ番号０４－

６９３－１１６－００１から入手可能なプロテアーゼ阻害剤カクテル）中、４℃で均質化した。３０分間の遠心分離（４℃で２０，０００Ｘｇ）後、上澄み液を回収した。タンパク質サンプルを８％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｌａｅｍｍｌｉ　１９７０）で分画し、ＢＩＯ－ＲＡＤ（商標）Ｐｒｏｔｅｉｎ　ＴＲＡＮＳ－ＢＬＯＴ（商標）装置を使用してニトロセルロース膜に転写した。膜を３％（ｇ／ｖ）スキムミルク（Ｄｉｆｃｏ）中、室温で３０分間ブロックし、次いで、いずれかの市販のウサギ抗ヒトコラーゲンＩ型ポリクローナル抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ）と室温で一晩反応させた。膜を水で３～５回すすぎ、次にＴＢＳで３０分間洗浄した。二次抗体［アルカリホスファターゼ（ＡＰ）（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ）に結合したヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体］と共に室温で２時間インキュベートした後、膜を水で３～５回すすぎ、次にＴＢＳで３０分間洗浄した。免疫検出は、ニトロテトラゾリウムブルークロリド（ＮＢＴ、Ｓｉｇｍａ）および５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリルホスフェート　ｐ－トルイジン塩（ＢＣＩＰ、Ｓｉｇｍａ）を用いて、室温で２時間～一晩行った。

【０３５９】

結果

【０３６０】

図９に示されるように、液胞標的コラーゲンについてトランスジェニックであるタバコ植物は、プロα－１およびプロα－２を発現する（レーン１）。暗条件で成長した液胞標的植物からのコラーゲンは、同様の安定性を示し（レーン２）、このことは、本発明の教示に従って生成されたコラーゲンの並外れた安定性を実証する。

【０３６１】

実施例７～１３．一般的な材料および方法

【０３６２】

コラーゲン抽出および酵素反応：ブレンダー内で、３００ｇのタバコ葉を、５ｇのＰＶＰＰおよび２ｇの活性炭を追加した冷却した抽出バッファ（３６０ｍｇのメタ重亜硫酸カリウム、５３０ｍｇのＬ－システインおよび１ｇのＥＤＴＡを含有する、６００ｍｌの１００ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５）中で混合した（米国特許第８，７５９，４８７号を参照）。温度を１５℃未満に保つように、１分間隔で５回、混合を行った。粗抽出物をガーゼパッドを通して濾過し、２５０００ｇ、５℃で３０分間、遠心分離した。上澄み液を集めた。$CaCl_2$を、最終濃度１０ｍＭになるまで添加した。上澄み液を、１０ｍｌのサンプルに分けた。以下の表３に記載されている条件に従って、所望の酵素を各１０ｍｌのサンプルに加えた。

【０３６３】

【表３】

プロコラーゲン消化反応条件

サンプル番号	プロテアーゼ：	プロテアーゼの濃度（mg／リットル）：	インキュベーション時間（時間）：	インキュベーション温度（摂氏）：
1	所望な酵素	1	3	15
2	所望な酵素	5	3	15
3	所望な酵素	25	3	15
4	所望な酵素	1	6	15
5	所望な酵素	5	6	15
6	所望な酵素	25	6	15
*	対照－プロテアーゼなし	0	3	15
*	対照－プロテアーゼなし	0	6	15

【０３６４】
酵素の説明：イチジクラテックス由来のフィシン（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｆ４１２５）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ由来のスブチリシン（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｐ５４５９－５ｇｒ）、パイナップルの茎由来のブロメライン（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｂ４８８２－１０ｇｒ）、Ｃａｒｉｃａ ｐａｐａｙａ由来のパパイン（Ｆｌｕｋａ、カタログ番号７６２２０－２５ｇｒ）、好アルカリ性細菌Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｅｎｔｕｓ由来のＳａｖｉｎａｓｅ ６．０ ｔ ｔｙｐｅ Ｗ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、カタログ番号ＰＸ９２５００５０１）、細菌Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ由来のＮｅｕｔｒａｓｅ １．５ ＭＧ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、カタログ番号ＰＷ２０１０４１）、プロタメックス、市販のＢａｃｉｌｌｕｓプロテイナーゼ複合体（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、カタログ番号ＰＷ２Ａ１０２１）、Ａｌｃａｌａｓｅ ３．０ Ｔ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓアルカリプロテイナーゼ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、カタログ番号ＰＪ９００００９０１）、Ｅｓｐｅｒａｓｅ ６．０ Ｔ、好アルカリ性細菌Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｅｎｔｕｓ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、カタログ番号ＰＥ９０１１０４０１）、Ａｌｃａｌａｓｅ ２．４ Ｌ ＦＧ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓアルカリプロテイナーゼ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、カタログ番号ＰＬＮ０５３３０）、Ｅｓｐｅｒａｓｅ ８．０ Ｌ、好アルカリ性細菌Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｅｎｔｕｓ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、カタログ番号ＰＥ０００７７）は、全てＮｏｖｏｚｙｍｅｓから寄贈された。動物の膵臓由来のトリプシンである膵臓トリプシン６．０ Ｓ無塩型（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、カタログ番号Ｐ２４５－Ｄ２０）。トウモロコシで発現した組換えトリプシンであるＴＲＹＰＺＥＡＮ（商標）は、Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（カタログ番号：Ｔ３４４９）から購入した。
【０３６５】
アテロコラーゲン濃度の決定：実施例９～１０に従って生成されたアテロコラーゲンの濃度を、以下の２つの方法によってアッセイした。
【０３６６】
ＳＩＲＣＯＬ（商標）アッセイ：ＳＩＲＣＯＬ（商標）コラーゲンアッセイキットは、

Ｂｉｏｃｏｌｏｒ　Ｌｔｄ．（カタログ番号８５０００）から購入した。このアッセイは、シリウスレッド色素とコラーゲン三重ヘリックスとの相互作用に基づく。分析は、供給業者の取扱説明書（第４版、２００２）年に従って行った。ウシコラーゲン標準を使用して、検量線を作成した（０～５０μｇコラーゲン）。１０～５０μｌのコラーゲンの１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液の３つのサンプルを、１．５ｍｌエッペンドルフチューブに入れ、その容積を０．５Ｍ酢酸で１００μｌにした。１ｍｌのＳＩＲＣＯＬ（商標）色素試薬を各チューブに加え、チューブを室温で３０分間振とうした。チューブを１２，０００ｒｐｍで１０分間、室温で遠心分離し、上澄み液を吸引し、チューブを吸収紙の上に逆さに置き、残りの上澄み液を除去した。綿棒を使用して、チューブの壁からアクセスドロップを除去した。１ｍｌのアルカリ試薬を各チューブに加え、よく混合し、室温で１０分間インキュベートした。分光光度計を使用して５４０ｎｍでの吸光度を測定し、ブランクサンプルとして１０ｍＭ　ＨＣｌを使用して、検量線に対してコラーゲンの濃度を計算した。

【０３６７】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥインスタントブルーアッセイ：サンプルをＳＡＢバッファー（還元条件）で５分間煮沸し、１２，０００ｒｐｍで５分間遠心分離した後、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ、８％アクリルアミドにロードした。ゲルは、Ｍｉｎｉ　Ｐｒｏｔｅａｎ　３ユニット（ＢｉｏＲａｄ番号１６５－３３０１、１６５－３３０２）で実施した。インスタントブルー試薬（Ｎｏｖｅｘｉｎ番号ＩＳＢ０１Ｌ）を、タンパク質がゲル上で青いバンドとして視覚化されるまで、ゲルに適用した。ゲルを水ですすぎ、乾燥させた。コラーゲンバンドの濃度は、同じゲルにロードされたヒト標準に対して、濃度測定によって計算した。

【０３６８】

クマシー分析：コラーゲンのサンプル（１０ｍＭ　ＨＣｌ中）を、１Ｍ　Ｔｒｉｓを使用して、ｐＨ７．５になるまで滴定した。１０％β－メルカプトエタノールと８％ＳＤＳを含むサンプル適用バッファを、３０μｌのｐＨ滴定したサンプルで４倍に希釈して添加した。サンプルを７分間煮沸した。３０μｌの上澄み液を１０％ポリアクリルアミドゲルにロードし、１００ボルトで２時間かけて分離した。ゲルを、クマシー系溶液に振とうしながら１時間かけて転写した。クマシー染料は、標準的な脱色溶液を使用して除去した。

【０３６９】

α－１およびα－２コラーゲン鎖のＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロット分析：サンプルを還元サンプル適用バッファ（２．５％β－メルカプトエタノールおよび２％ＳＤＳ）で７分間煮沸し、次いで、１３，０００ｒｐｍで１５分間遠心分離した。３０μｌの上澄み液を、１０％ポリアクリルアミドゲルで分離した。分離後、標準的なウエスタンブロットプロトコルを使用して、サンプルをニトロセルロース膜上にブロッティングした。転写後、α－１およびα－２コラーゲン鎖の免疫検出のために、膜を抗コラーゲンＩ型抗体（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．カタログ＃ＡＢ７４５）と共にインキュベートした。分子量マーカーはＦｅｒｍｅｎｔａｓ　Ｉｎｃ．（カタログ番号ＳＭ０６７１）から購入した。

【０３７０】

対照：Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ（番号２３４１３８）から購入したヒト皮膚コラーゲンＩ型の陽性対照を、ウエスタンブロット分析のマーカーとして使用した。粉砕した対照サンプルは、抽出バッファに再懸濁する直前のタバコの葉に由来するペレットを反映する。「Ｄ」対照サンプルは、抽出バッファに再懸濁した後の同じペレットを反映する。「Ｋ」対照サンプルには、１０ｍＭ　ＨＣｌ中のフィシン消化されたプロコラーゲンが含まれる。バックグラウンドのフィシン非依存性プロテアーゼ活性を監視するために、フィシンを含まない開裂サンプルを、常に、全てのフィシン消化試験と並行して調製した。

【０３７１】

トランスジェニック植物からのコラーゲンの精製：コラーゲンを含有する抽出物中のプロペプチドの消化は、３０ｍｇ／Ｌのトリプシンまたは５ｍｇ／Ｌ（５０μｌ／Ｌ）のスブチリシン（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｐ５４５９）または５ｍｇ／Ｌのフィシン（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｆ４１２５）の添加によって開始された。タンパク質分解を１５℃

で４時間行った。不溶性汚染物質の除去は、３０分間、２２，０００ｇ、１５℃で遠心分離することによって行われた。上澄み液を回収し、室温で２０分間絶えず撹拌しながら、結晶性ＮａＣｌを最終濃度３．１３Ｍになるまでゆっくりと加えることによりコラーゲンを沈殿させた。この溶液を撹拌せずに冷蔵室で一晩インキュベートした。コラーゲンの収集は、５℃で２時間、２５，０００ｇでの遠心分離によって行われた。

【０３７２】

上澄み液を４層のガーゼパッドに注意深く注いだ。マグネチックスターラーを使用して、ペレットを２００ｍｌの２５０ｍＭ酢酸および２Ｍ ＮａＣｌに５分間かけて再懸濁させた。懸濁物を、２５，０００ｇ、５℃で４０分間遠心分離した。微量の上澄み液をガラスバイアルから除去した。ペレットを２００ｍｌの０．５Ｍ酢酸に室温で１時間かけて再溶解させた。不溶性物質の除去は、１６，０００ｇ、３０分、１５℃での遠心分離によって行われた。上澄み液を１２層のガーゼパッドに注いだ。室温で２０分間絶えず撹拌しながら、ＮａＣｌを最終濃度３Ｍになるまでゆっくりと加えることによりコラーゲンを沈殿させた。この溶液を４℃で８時間から一晩インキュベートした。コラーゲンの収集は、５℃で２時間、２５，０００ｇでの遠心分離によって行われた。上澄み液を吸引した後、マグネチックスターラーを室温で１時間使用して、ペレットを２００ｍｌの０．５Ｍ酢酸に再溶解した。不溶性物質の除去は、１６，０００ｇ、３０分、１５℃での遠心分離によって行われた。上澄み液を１２層のガーゼパッドに注いだ。室温で２０分間絶えず撹拌しながら、ＮａＣｌを最終濃度３Ｍになるまでゆっくりと加えることによりコラーゲンを沈殿させた。この溶液を４℃で８時間インキュベートした。５℃で２時間、２，０００ｇでの遠心分離によってコラーゲンを集めた。上澄み液を吸引した。ピペッティングおよび室温で５分間ボルテックスすることによって、ペレットを４０ｍｌの１０ｍＭ ＨＣｌに再溶解させた。この溶液を透析バッグ（ＭＷＣＯ １４，０００Ｄａ）に移し、４Ｌの１０ｍＭＨＣｌに対し、４℃で４時間透析した。この透析を一晩繰り返した。

【０３７３】

コラーゲンの滅菌は、最初に０．４５μｍフィルターで溶液を濾過し、次に３０ｍｌシリンジを使用して０．２μＭフィルターで濾過することによって行われた。コラーゲンは、Ｖｉｖａｓｐｉｎ ＰＥＳ ２０ｍｌ濾過チューブ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ、番号ＶＳ２０４１、ＭＷＣＯ １００００）を使用した限外濾過によってさらに濃縮された。遠心分離は、容積が０．７５ｍｌに減少するまで、５０００ｇ、５℃で４５分間行われた。

【０３７４】

食品グレードのフィシンによるプロコラーゲン開裂の消化動態および条件の最適化：ペレット（実施例１０に記載したように集めた、２５％硫酸アンモニウム（ＡＭＳ）で飽和するまで）を、バッファ（バッファＡ：４．５ｍＭのメタ重亜硫酸カリウム、１２．５ｍＭのＬ－システイン、７．５ｍＭのＥＤＴＡを０．１Ｍのリン酸ナトリウムバッファに溶解し、１０Ｍ ＮａＯＨまたは６Ｎ ＨＣｌを用いてｐＨ７．５になるまで滴定した）で、ペレット４．３６ｇ：氷冷却したバッファ２００ｍＬの比率で再懸濁させた。次に、サンプルを１５℃で２０分間撹拌した。次に、１５ｍＬの試験管あたり１０ｍＬのアリコートを調製し、続いてフィシンの濃度を上げながら（５～１５ｍｇ／Ｌ）投与した（イチジクラテックス、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｅｕｒｏｐｅの食品グレードのフィシン）。サンプルを１５℃で１～３時間インキュベートし、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、次いで、プロコラーゲンより低い分子量で移動するコラーゲンの存在について、ウエスタンブロットによって分析した。

【０３７５】

様々なｐＨ値（５．５、７．５または８．５）のリン酸バッファＡ（２７．２ｇ：８００ｍＬバッファ）に再懸濁させたタバコの葉由来のペレットを、１５℃で、０～３ＭのＮａＣｌ存在下、１０ｍｇ／Ｌのフィシンで処理した。各反応混合物から１ｍＬのサンプルを遠心分離することにより反応を停止させた（１０分、１５０００ｇ、４℃）。ペレットを１ｍＬのバッファーＡ（ｐＨ７．５）に再懸濁し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、ウエスタンブロットの手段によって分析した。

【０３７６】
医薬品グレードのフィシンによるプロコラーゲン開裂の消化動態および条件の最適化：タバコの葉のペレットを、ＮａＣｌ濃度を挙げながら（０～３Ｍ）、これと共に様々なｐＨ値（７．５、８．５、９．５）の医薬品グレード（Ｂｉｏｃｈｅｍ－Ｅｕｒｏｐｅ Ｐｈａｒｍグレード）のフィシンを含有する抽出バッファ（１０ｍｇ／Ｌ）に５～４５分間かけて再懸濁させた。さらなる実験では、抽出バッファに対する添加剤としてのＥＤＴＡとＬ－システインの必要性、最適条件および濃度を研究した。サンプルを、０～１００ｍＭのＥＤＴＡと０～８０ｍＭのＬ－システインの存在下、消化混合物中で、１５℃、ｐＨ７．５、ＮａＣｌを用いずに１～３時間インキュベートした。
【０３７７】
原線維形成：原線維形成は、コラーゲン機能検査とみなされる。したがって、フィシンによって消化された精製コラーゲンが原線維を形成する能力は、得られた生成物の本質的な特性である。試験方法：コラーゲンを含有する溶液（複数個ずつのサンプル）のｐＨを、リン酸ナトリウム（ｐＨ１１．２）を用いてｐＨ６．７まで中和し、次いで、２７±２μＣで６時間インキュベートした。サンプルを遠心分離して、形成されたヒドロゲルを沈降させた。中和前および中和後（上澄み液）サンプルの両方のタンパク質濃度は、ローリー法によって決定された。ＰＵＲＥＣＯＬ（商標）（ＮＵＴＡＣＯＮから購入、カタログ番号５４０９）を陽性対照として使用し、ゼラチンを陰性対照として使用した。
【０３７８】
実施例７．トリプシンおよびペプシン存在下でのトランスジェニック植物からのコラーゲンの抽出および精製。
【０３７９】
ヒトの美容用途または医療用途での哺乳動物タンパク質の使用は、進化の近接性が相対性に近いため、ヒトの健康に危険を及ぼす可能性があるため、哺乳動物源からのコラーゲンの使用を避けるために、植物におけるヒトコラーゲンの生成が開始された。既知の疾患であるクロイツフェルト・ヤコブ病（ＣＪＤ）は、感染した哺乳動物プロテインがヒトによって消費されることによって引き起こされる疾患の一例である。
【０３８０】
当初、トランスジェニック植物からのコラーゲンの精製は、ウシ膵臓トリプシンと消化プロテアーゼペプシンを使用して行われ、これらはどちらも動物の消化器系のタンパク質の加水分解に触媒作用を及ぼす。以下の実施例は、コラーゲン精製プロセスでの使用に好適な非動物源由来のプロテアーゼの同定を示す。
【０３８１】
結果
【０３８２】
コラーゲン精製中のプロペプチド消化は、最初に、膵臓酵素トリプシンによって行われた。トリプシンは、３００ｍｇ／Ｌでコラーゲンプロペプチドを消化したが、コラーゲンの収量は、精製プロセス終了時に非常に低かった（図１０）。トリプシンの濃度を２０ｍｇ／Ｌまたは３０ｍｇ／Ｌまで下げると、収量は高くなったが、プロコラーゲン消化は部分的にしか起こらず、同一サンプル間で一貫性がなかった（図１１）。
【０３８３】
この問題を克服しようとする試みにおいて、様々なインキュベーション温度と時間を試した。しかしながら、その結果は、収量の変化にはつながらなかった（データは示していない）。精製プロセスの後でペプシン酵素を添加すると、部分的な消化の問題は解決し（図１２）、ブタ由来のコラーゲン対照サンプルと共に移動するα－１およびα－２コラーゲンが得られた。
【０３８４】
実施例８．コラーゲン抽出およびその酵素的に誘導された消化。
【０３８５】
しかしながら、トリプシン－ペプシン溶液は、２つの異なる酵素を必要とし、精製プロ

セスが長くなるため、最適なものではなかった。さらに、両方の酵素が、動物由来である。これらの課題を克服するために、非動物由来の異なるプロテアーゼ酵素のスクリーニングを行った。スクリーニングされた様々な酵素によって、様々な消化パターンが得られた。コラーゲンをサビナーゼ（図１５）およびエスペラーゼ（図１７）酵素と共にインキュベーションして得られたポリペプチドの消化は、ほとんど観察されないか、または全く観察されなかった。パパイン（図１４）、ブロメライン（図１３）、アルカラーゼ２．４Ｌおよびエスペラーゼ８．０Ｌ（図１８）を用いるインキュベーションによって、プロペプチドの過剰消化または過少消化が起こった。アルカラーゼおよびプロタメックス酵素（図１６）によって、所望な消化パターンおよびレベル（２５ｍｇ／Ｌ、６時間）を生じ、α１およびα２鎖は、ブタ由来のコラーゲンサンプルと同様に移動する。しかしながら、全ての分子が完全に消化されたわけではなく、さらに長いインキュベーション時間が必要になる場合がある。最適な結果は、フィシン（５ｍｇ／Ｌおよび２５ｍｇ／Ｌ）と共にプロコラーゲンをインキュベーションすると得られ（図１５）、ここで、α１およびα２鎖のバンドは、ブタ由来のコラーゲン対照サンプルと共に移動し、明らかな過剰消化はなかった。同様の結果が、スブチリシン５ｍｇ／Ｌで３時間（図１３）およびニュートラーゼ２５ｍｇ／Ｌで６時間（図１７）で示された。

【０３８６】

実施例９．スブチリシンまたはフィシンを用いる消化後のトランスジェニック植物からのコラーゲンの抽出および精製。

【０３８７】

トランスジェニック植物（１３－３６１または１３－６－５２）の葉４５０グラムからのコラーゲン精製を、フィシン（図１９）またはスブチリシン（図２０）を用いるプロコラーゲン消化後に行った。精製プロセスの様々な段階でのコラーゲンサンプルを、ウエスタン分析によって分析した。フィシンおよびスブチリシンによるプロペプチド消化によって、コラーゲン１およびコラーゲン２の望ましいプロセシング度が得られた。低分子量のバンドは、精製プロセス全体で、ウエスタンブロットで観察されたが、これらのバンドは、酵素を用いるインキュベーション前の植物抽出物（レーン３～４）と、さらにブタ由来のコラーゲン対照サンプル（陽性対照）（図１９）に現れた。

【０３８８】

実施例１０．フィシンを用いる消化後のトランスジェニック植物からのスケールアップしたコラーゲンの抽出および精製。

【０３８９】

１ｋｇのトランスジェニックタバコ葉を、４Ｌリアクター（ＥＳＣＯモデルＥＬ－３）中、あらかじめ冷却しておいた２Ｌの抽出バッファ（１００ｍＭのリン酸ナトリウムバッファｐＨ７．５、４．５ｍＭのメタ重亜硫酸カリウム、１２．２３ｍＭのＬ－システインおよび７．５ｍＭのＥＤＴＡ）を用いて２０分間粉砕した（５℃、５０％スクレーパ速度および１００％ホモジナイザーブレードｒｐｍ）。この抽出物に６．６８ｇの木炭と１６．６７ｇのＰＶＰＰを添加し、２０分間連続して撹拌した（５℃および５０％スクレーパ速度）。抽出物を遠心分離し（１１０００ｒｐｍ、５℃、０．５Ｈ）、上澄み液を１５％硫酸アンモニウムで飽和させた（１時間撹拌、５℃）。６８８０ｒｐｍ、５℃で３０分後、上澄み液を２５％硫酸アンモニウムになるように飽和させ、１時間撹拌した（５℃）。再遠心分離後、ペレット（６８８０ｒｐｍ、５℃、３０分）を、第１の遠心分離工程後に集めた体積の１５％で再懸濁した（抽出バッファ中）。プロペプチドの除去は、１５℃で５ｍｇ／Ｌのフィシン（Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｅｕｒｏｐｅ）を用いて３時間の消化によって実現された。サンプルを遠心分離し（１１，０００ｒｐｍ、１５℃、３０分）、３Ｍ　ＮａＣｌを使用して成熟コラーゲンを沈殿させた（ＮａＣｌを撹拌しながらゆっくりと添加し、４℃で一晩放置した）。沈殿（１３，０００ｒｐｍ、５℃、２時間）の後、上澄み液を捨て、ペレットを０．５Ｍ酢酸に再懸濁した。さらなる回の３Ｍ塩析（一晩）と遠心分離の後、ペレットを４０ｍｌの１０ｍＭ　ＨＣｌに再懸濁した。サンプルを透析バッグ（１２～１４ｋＤａ）に移し、４Ｌの１０ｍＭ　ＨＣｌに対し、４℃で４時間透析した。透

析を、新鮮な４Ｌの１０ｍＭ　ＨＣｌを用いて一晩繰り返した。透析された溶液を、０．４５ミクロのフィルター（前もって１０ｍＭ　ＨＣｌで洗浄した）を通して濾過し、次いで、０．２５ミクロンフィルターを通して濾過した。最後に、サンプルをＶｉｖａｓｐｉｎ（Ｖｉｖａｓｃｉｅｎｃｅ）濾過チューブ（１００ｋＤａ）で濃縮した。

【０３９０】

実施例１１．トランスジェニックタバコ植物において組換えヒトプロコラーゲンとして産生されたアテロコラーゲンの溶解度。

【０３９１】

実施例９～１０に従って生成されたアテロコラーゲンの濃度を、方法の章に記載しているように、以下の２つの方法によってアッセイした。フィシンで消化されたいくつかの典型的な調製物について得られた濃度の結果は、以下の表４に列挙されている。

【０３９２】

【表４】

インスタントブルーまたはSircol染色法で決定されたコラーゲン濃度

ロット番号	インスタントブルーによるコラーゲンのmg／ml	Sircol（商標）によるコラーゲンのmg／ml
UPEK1	15.7	9.3
UPEK2	5.8	4.78
PEK052	6.8	5.5
UPEK3	3.4	3.54
UPEK4	NA	3.3
UPEK6-1	5.9	4.7
UPEK6-2	4.3	3.7

【０３９３】

実施例１２．タバコの葉由来のプロコラーゲンのフィシン依存性タンパク質分解。

【０３９４】

食品グレードのフィシンによるプロコラーゲンの消化動態：最高のコラーゲン収量を可能にする適切なフィシン濃度とインキュベーション時間を較正するために、プロコラーゲンを発現するタバコ葉のペレットを、食品グレードのフィシンの濃度を上げながら（５～１５ｍｇ／Ｌ）、１５℃で１～３時間インキュベートした。次に、サンプルを、ウエスタンブロットで、α－１およびα－２コラーゲン鎖の免疫検出によって分析した。フィシン濃度の増加は、１時間のインキュベート時間後のコラーゲン鎖収率を改善した（図２２、レーン５対６）。しかしながら、反応時間を延長すると、フィシン濃度の増加は、コラーゲンの過剰消化を引き起こした（図２２、レーン１１対１２～１４およびレーン１７対１８～２０）。したがって、プロコラーゲンからコラーゲンへの消化に最適な条件は、１０ｍｇ／Ｌの食品グレードのフィシンを１５℃で１時間添加することと設定された。

【０３９５】

医薬品グレードのフィシンによるプロコラーゲンの消化動態：プロコラーゲンを発現するタバコ葉のペレットに対して同様の実験を行い、医薬品グレードのフィシンによるプロコラーゲンの消化に適した条件を決定した。ペレットを再懸濁し、医薬品グレードのフィシンの濃度を上げながら（２．５～１０ｍｇ／Ｌ）、１５℃で０．５～３時間インキュベ

ートした。消化効率を、ウエスタンブロットでのコラーゲン鎖の免疫検出によって決定した。図２３Ａ～２３Ｃに示されるように、フィシン濃度を増加させると、コラーゲン収量が増加し、プロコラーゲンレベルが減少した。製薬グレードのフィシンによるプロコラーゲンの最も効果的な消化は、１０ｍｇ／Ｌで、１時間の反応時間後にみられた。

【０３９６】

フィシン依存性プロコラーゲン開裂のためのｐＨ値と塩濃度の最適化：次に、消化バッファのｐＨと塩濃度の両方の寄与を評価した。同様のタバコの葉のＡＭＳ後のペレットを、０．５～３Ｍ　ＮａＣｌの範囲の塩含有量で、ｐＨ５．５、７．５、８．５または９．５になるように滴定した抽出バッファに再懸濁させた。次に、サンプルを１０ｍｇ／Ｌの医薬品グレードのフィシンと共に１５℃で１時間インキュベートした後、ウエスタンブロットで免疫分析を行った。酸性アッセイ条件（ｐＨ５．５）では不十分なコラーゲン収量を生じ（図２４Ａ、レーン２～６）、ｐＨ値の増加は、フィシン依存性コラーゲン含有量の相関的な上昇を示し、２Ｍ　ＮａＣｌ存在下、ピーク値はｐＨ８．５で観察された（図２４Ｂ、レーン１０）。これらの結果は、フィシンによって誘導されるプロコラーゲン消化のためにプールされた２つの１５ｋｇペレットで行われたスケールアップした抽出精製実験でさらに裏付けられた。イムノブロッティングで見られたコラーゲン鎖収量の増加は別として、２Ｍ　ＮａＣｌ存在下、ｐＨ８．５のバッファ中で消化されたサンプルは、バッファＡ（ｐＨ７．５、０ｍＭ　ＮａＣｌ）中で消化されたものと同様に効率的に原線維化した（以下の表５を参照、バッチＹＣ１およびＹＣ２）。したがって、ｐＨと塩濃度が両方とも高いと、フィシンによって誘導されるプロコラーゲン消化後のコラーゲン収量が改善された。

【０３９７】

消化反応混合物中のＥＤＴＡとＬ－システインの活力の測定：ＥＤＴＡとＬ－システインは、両方とも、コラーゲン精製プロセスの初期段階で抽出バッファ中に存在する添加剤である。本明細書において、効果的なフィシン依存性コラーゲン開裂に対して、これら２成分が必須であることが決定された。プロコラーゲンのＡＭＳ後のペレットを、ＥＤＴＡ（８～８０ｍＭ）およびＬ－システイン（１０～１００ｍＭ）の濃度を上げつつ含む抽出バッファに再懸濁させ、フィシン（１０ｍｇ／Ｌ）と共に１５℃で１時間、ｐＨ７．５でインキュベートした。１０ｍＭのＬ－システイン存在下、消化効率に顕著な向上効果が観察され（図２５、レーン７～１０）、フィシン依存性コラーゲン出力に対するＥＤＴＡの明らかな寄与はなかった（図２５、レーン７対８～１０）。

【０３９８】

フィシンによって誘導されるプロコラーゲン消化のための温度条件の最適化：プロコラーゲンを発現するタバコ葉のペレットを、フィシンと共に１５℃で１．５時間インキュベートし、次いで、３０℃浴にさらに１．５時間かけて移した。ウエスタンブロットおよび原線維形成アッセイでは、反応温度の上昇に関連するコラーゲン収量またはサンプル純度の改善は確認されなかった。

【０３９９】

フィシンによって誘導されるプロコラーゲンの開裂から抽出されたコラーゲンの原線維形成：フィシンによって誘導される消化後、原線維形成アッセイを行い、得られたコラーゲンが原線維を形成する能力、コラーゲンの機能を決定する究極の方法を決定した。以下の表５は、２つの変動プロトコルを用い、プロコラーゲンのフィシン開裂後に決定された原線維形成の結果をまとめている。両プロトコルＡおよびＢは、反応バッファｐＨおよび塩含有量が異なり、かなりの割合のコラーゲン原線維が得られた。したがって、本明細書で開発および最適化されたタンパク質分解反応パラメータは、高収率で機能性コラーゲンを生じる。

【０４００】

【表５】

様々な条件下での消化によって得られたコラーゲンによって観察された線維形成の割合

バッチ番号	消化条件：	%線維形成
C39	プロトコルA：10mg／L　フィシン、1時間、pH7．5	94.1
P100	プロトコルB：10mg／L　フィシン、pH8．5、2M　NaCl、1時間	87.2
P101	プロトコルA	73.1
YC1	プロトコルA	95.4
YC2	プロトコルB	98.4
YC3	プロトコルA	96
YC4	プロトコルA	93.1
YC5	プロトコルA	93.2
YC7-8	プロトコルB	94.2

【０４０１】
実施例１３．プロコラーゲン開裂におけるＴＲＹＰＺＥＡＮ（商標）プロテアーゼの有効性の決定。
【０４０２】
ＥＤＴＡ（７．５ｍＭ）およびＬ－システイン（１２．５ｍＭ）が豊富な抽出バッファ（ｐＨ７．５）に再懸濁したプロコラーゲンを発現するタバコ葉のペレットを、ＴＲＹＰＺＥＡＮ（商標）（３０～１００ｍｇ／Ｌ）と共に１５℃で１～３時間インキュベートした。１時間以内に、用量が６０および１００ｍｇ／ＬのＴＲＹＰＺＥＡＮ（商標）は、プロコラーゲンを効率的に開裂させ、２つの別個のαコラーゲン鎖を生成し、検出可能な過剰消化はなかった（図２６）。したがって、ｐＨ７．５でのＴＲＹＰＺＥＡＮ（商標）によるプロコラーゲン処理は、コラーゲン鎖α－１およびα－２への効果的な消化を引き起こす。
【０４０３】
考察
【０４０４】
上の実施例７～１３は、植物由来のコラーゲンの精製プロセスでの使用に好適な非哺乳動物プロテアーゼの同定を記載する。細菌および植物源からのプロテアーゼを調べたところ、コラーゲンプロペプチドの消化に好適な３つの酵素、すなわちニュートラーゼ、スブチリシン、ＴＲＹＰＺＥＡＮ（商標）およびフィシンが見出された。
【０４０５】
ニュートラーゼとスブチリシンは、両方とも細菌Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐによって分泌される。スブチリシンは、主に（９０％より多くが）洗剤および家庭用洗浄製品に使用される。スブチリシンの使用の約１０％は、タンパク質加水分解、皮革処理、繊維および美容業界などの工業用途向けである。高濃度でのコラーゲン精製プロセスにおけるスブチリシンの標準的な使用は、コラーゲンの過剰消化に起因した問題がある。ニュートラーゼは、主に飲料アルコール業界およびチーズの熟成に使用される。実施例７～１３において、

本明細書で上に記載されるように、ニュートラーゼは、高濃度でプロペプチドを消化する際にのみ有効であり、望ましい消化結果のために少なくとも６時間が必要であった。

【０４０６】

ここに記載されている実験条件下では、高酵素濃度または長時間のインキュベーション後にコラーゲンの過剰消化がなかったため、組換えトリプシンおよびフィシンが４つの中で最も好適であることがわかった。さらに、これらの酵素は、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析によって決定されるように、明らかにコラーゲンのらせん領域を消化しなかった。イチジク植物（Ｆｉｃｕｓ　ｃａｒｉｃａ）について抽出された天然酵素であるフィシンは、いくつかの供給元からの医薬品グレードを含むいくつかのグレードで低コストで市販されている。アルコールおよびビール産業、タンパク質の加水分解、食肉加工、ベーキング産業、ペット食品および健康食品の調製などの食品産業で使用される。また、コンタクトレンズの洗浄剤、癌治療、抗関節炎治療、消化補助剤の製薬業界だけでなく、美容業界および繊維業界にも応用されている。

【０４０７】

実施例１４．ｒｈコラーゲンの特性のさらなる分析。

【０４０８】

材料および方法

【０４０９】

材料

【０４１０】

トランスジェニックタバコ植物から発現され、単離されたヒト組換えコラーゲン（ｒｈコラーゲン）Ｉ型は、ＣｏｌｌＰｌａｎｔ　Ｌｔｄ（イスラエル）によって製造され、供給された。Ｉ型ウシコラーゲン（ＰｕｒｅＣｏｌ）は、米国のＡｄｖａｎｃｅｄ　Ｂｉｏｍａｔｒｉｘから購入した。無水メタクリル酸、メタクリル酸グリシジル、トリエチルアミン、臭化テトラブチルアンモニウム、２，４，６－トリニトロベンゼンスルホン酸（ＴＮＢＳ）、２－ヒドロキシ－４'－（２－ヒドロキシエトキシ）－２－メチルプロピオフェノン（Ｉｒｇａｃｕｒｅ　２９５９）、リン酸二水素ナトリウム無水物、ＨＣｌ　１Ｎ、３７％以上のＨＣｌ、重炭酸ナトリウムおよびＮａＯＨは、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｌｔｄ（イスラエル）から購入した。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、ｘ１０　ＰＢＳ、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、ＤＭＥＭ高グルコースおよびペニシリン／ストレプトマイシンは、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ　Ｌｔｄ（イスラエル）から購入した。リン酸水素二ナトリウム無水物は、Ｃａｎｔｏｎ（インド）から購入した。無水エタノールおよびアセトンは、Ｂｉｏ－Ｌａｂ　Ｌｔｄ（イスラエル）から購入した。ヒアルロン酸は、Ｌｉｆｅｃｏｒｅ，ＵＳＡによって購入された。

【０４１１】

バッファおよび光開始剤のストック溶液の調製

【０４１２】

原線維形成バッファ（ＦＢ）：リン酸水素二ナトリウムを再蒸留水（ＤＤＷ）に溶解し、最終濃度を１６２ｍＭにした。溶液を、１０Ｎ　ＮａＯＨを用いて、ｐＨ１１．２になるまで滴定した。

【０４１３】

培地調製：５０ｍｌのウシ胎児血清および５ｍｌのペニシリン／ストレプトマイシン（それぞれ１０，０００単位／ｍＬおよび１０ｍｇ／ｍＬ）を無菌条件下で５００ｍｌのＤＭＥＭ高グルコース培地に添加した。培地を穏やかに混合し、冷蔵庫に保管した。

【０４１４】

リン酸緩衝生理食塩水の調製：３９ｍｌの０．１Ｍリン酸二水素ナトリウム溶液を６１ｍｌの０．１Ｍリン酸水素二ナトリウム溶液と混合し、ＤＤＷで最終容積を２００ｍｌに調整した。必要に応じて、濃ＮａＯＨまたはＨＣｌを用いて、最終ｐＨを７に調整した。最終濃度が１５０ｍＭになるようにＮａＣｌを加えた。

【０４１５】

洗浄バッファ：ＨＣｌを原線維形成バッファに加えて、１６．２ｍＭのリン酸水素二ナトリウムおよび１０ｍＭ　ＨＣｌの最終濃度にした。１０Ｎ　ＮａＯＨを用いて、ｐＨを７．２～７．４に調整した。

【０４１６】

光開始剤１０％（ｖ／ｖ）ストック溶液：Ｉｒｇａｃｕｒｅ　２９５９を無水エタノール／ＰＢＳ　１：１溶液に溶解し、最終濃度を１００ｍｇ／ｍＬにした。

【０４１７】

ｒｈコラーゲンのメタクリル化。

【０４１８】

線維状ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドおよびモノマーｒｈコラーゲン－メタクリルアミドは、以下に記載するような水性媒体中、リジンおよびヒドロキシリジンコラーゲン残基と無水メタクリル酸との反応によって調製され、さらに使用するまで４℃で遮光して保存された。

【０４１９】

線維状ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド

【０４２０】

３～１０ｍｇ／ｍＬの線維状ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドは、洗浄バッファ、原線維形成バッファまたはＤＤＷのいずれかの中で、室温（ＲＴ）または１２℃で合成された。例えば、簡単に言うと、線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡは、ＤＤＷ中、以下のように合成された。１０ＭｍのＨＣｌ中のモノマーｒｈコラーゲン３～４ｍｇ／ｍＬ溶液（ＣＯＬＬＡＧＥ（商標））を原線維形成バッファと９：１（ｖ：ｖ）比率で混合し、室温で１時間撹拌し、原線維を受け取る。溶液を７５００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、上澄み液を捨てた。ペレットを等量の洗浄バッファに再懸濁し、同じ条件で遠心分離した。その後、堆積原線維をＤＤＷに再懸濁して１０ｍｇ／ｍＬにした。濃度は、固形分の百分率測定によって確認された。無水メタクリル酸（ＭＡ）を、窒素流下、室温で、コラーゲンリジンに対して１０～２０モルの比率で滴下し、反応溶液のｐＨを経時的に監視し、１０Ｎ　ＮａＯＨを用いてｐＨ７に調整した。２４時間の反応後、混合物を１０ｋＤａカットオフ透析チューブ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ、ＣＡ、ＵＳ）を使用し、洗浄バッファ（ｐＨ　７）に対して４℃で３日間透析し、透析液（この場合には洗浄バッファ）を少なくとも６回交換して反応副生成物を除去し、最終的に３～４日間凍結乾燥させた。

【０４２１】

モノマーｒｈコラーゲン－メタクリルアミド

【０４２２】

１５０ｍＭ　ＮａＣｌを添加した２００ｍＭのＭＯＰＳ、リン酸またはＴｒｉｓバッファを使用した。例えば、２００ｍＭ　ＭＯＰＳおよび１５０ｍＭ　ＮａＣｌを、３～４ｍｇ／ｍＬのＣＯＬＬＡＧＥ（商標）に加え、透明な溶液が得られるまで室温で撹拌した。その後、１０～２０倍過剰の無水メタクリル酸を、１２℃で、窒素流下で滴下し、ｐＨを１０Ｎ　ＮａＯＨを用いて経時的にｐＨ７に調整した。２４時間の反応後、混合物を１０ｋＤａカットオフ透析チューブを使用し、透析液を少なくとも６回交換しつつ、１０ｍＭ　ＨＣｌおよび２０ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ２）に対して４℃で３日間透析し、その後、３～４日間凍結乾燥させた。

【０４２３】

ヒアルロン酸（ＨＡ）のメタクリル化

【０４２４】

５００ｍｇのＨＡは、Ｌｅａｃｈら［Ｌｅａｃｈら、２００２、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、ｖｏｌ．８２、ｎｏ．５］に記載されるように官能基化した。簡単に言うと、１．８ｍｌのトリエチルアミン、１．８ｍｌのメタクリル酸グリシジルおよび１．８ｇの臭化テトラブチルアンモニウムをＤＤＷ中の５０ｍｌの１０ｍｇ／ｍＬのＨＡ溶液に別々に加え、完全に混合してから次の成分を加えた。反

応物を室温で一晩混合し、ＨＡＭＡを容積２０倍のアセトン中で沈殿させ、ＤＤＷに再溶解した。この沈殿プロセスを２回繰り返して、全ての反応残渣を除去した。材料は、最終的に凍結乾燥された。

【０４２５】

粘度測定のための溶液の調製

【０４２６】

ＰＢＳ中のＰｕｒｅＣｏｌおよびＣｏｌｌａｇｅ（商標）：１ｍｌのＰＢＳＸ１０を添加することにより、ｒｈコラーゲン（ＣＯＬＬＡＧＥ（商標））またはウシコラーゲン（ＰｕｒｅＣｏｌｌ）のいずれかの８ｍｌのモノマーコラーゲン溶液（１０ｍＭ　ＨＣｌ中３ｍｇ／ｍＬ）を中和した。次に、０．１Ｎ　ＮａＯＨで滴定することにより溶液をｐＨ７～７．５にした。最終的に、二重蒸留水を加えて、最終容積を１０ｍｌにした。測定を行う（３７℃または４℃のいずれか）前に、サンプルを３７℃で少なくとも９０分間インキュベートした。

【０４２７】

原線維形成バッファ中のＣＯＬＬＡＧＥ（商標）：１ｍｌの原線維形成バッファを添加することにより、９ｍｌのモノマーｒｈコラーゲン（ＣＯＬＬＡＧＥ（商標））溶液（１０ｍＭ　ＨＣｌ中３．７９ｍｇ／ｍＬ）を中和した。測定を行う（３７℃または４℃のいずれか）前に、サンプルを３７℃で少なくとも９０分間インキュベートした。

【０４２８】

ＰＢＳ中の線維状ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド：ＤＤＷ中で調製した凍結乾燥させた線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡを透析したものと、洗浄バッファ（１０倍過剰のＭＡを用いて上の記載に従い）をＰＢＳに溶解して、１０ｍｇ／ｍＬの濃度にした。測定を行う（３７℃または４℃のいずれか）前に、サンプルを３７℃で少なくとも９０分間インキュベートした。

【０４２９】

ＤＭＥＭ中のｒｈコラーゲン－メタクリルアミド：凍結乾燥させた線維状ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド（１５倍過剰のＭＡ、上の記載に従って洗浄バッファ中で調製され、透析された）をＤＭＥＭ培地に溶解し、最終濃度を２０および２６ｍｇ／ｍＬにした。

【０４３０】

ＤＭＥＭ中のｒｈコラーゲン－メタクリルアミド／ヒアルロン酸：ヒアルロン酸を、線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡの溶液に添加して、ＤＭＥＭ培地中の１０ｍｇ／ｍＬのＨＡおよび２０ｍｇ／ｍＬのｒｈコラーゲン－ＭＡの最終濃度を得た。

【０４３１】

ＤＭＥＭ中のｒｈコラーゲン－メタクリルアミド／ヒアルロン酸メタクリレート（ＨＡ－ＭＡ）：ヒアルロン酸メタクリレート（上を参照）を、線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡの溶液に添加して、ＤＭＥＭ培地中の１０ｍｇ／ｍＬのＨＡ－ＭＡおよび２０ｍｇ／ｍＬのｒｈコラーゲン－ＭＡの最終濃度を得た。

【０４３２】

損失弾性率および貯蔵弾性率測定のためのｒｈコラーゲン－ＭＡの光架橋

【０４３３】

ｒｈコラーゲン－ＭＡ架橋足場は、２つの個別の実験で調べることを目的として、２つの異なる調製物で形成された。第１の調製において、１０倍過剰のメタクリル酸試薬で合成された１～２重量％の線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡを、室温でＰＢＳ　０．１Ｍに溶解し、次いで、Ｉｒｇａｃｕｒｅ　２９５９　０．１％を添加し、最終容積１ｍＬの溶液を円板状の型に注入した。その後、水銀光源を使用して、平均強度６７０ｍＷ／ｃｍ２で、７秒間および１０秒間、１．５ｃｍの距離から硬化プロセスを実行し、最終的に架橋足場を得た。第２の調製は、１５倍および２０倍過剰のメタクリル酸試薬を用いて合成された繊維状ｒｈコラーゲン－ＭＡの２つの異なるバッチを含んでいた。１～２重量％をＰＢＳ　０．１Ｍに溶解し、Ｉｒｇａｃｕｒｅ　２９５９　０．１％を添加し、最終容積１．５ｍＬを得た。高度に架橋された足場を得るために、硬化プロセスを２ｃｍの距離から６０秒間

、平均強度４２０ｍＷ／ｃｍ^{2}で実施した。

【０４３４】

ＴＮＢＳアッセイ

【０４３５】

アッセイプロトコルは、Ｓａｓｈｉｄｈａｒら［Ｓａｓｈｉｄｈａｒ Ｒ．Ｂ．、Ｃａｐｏｏｒ，Ａ．Ｋ．、Ｒａｍａｎａ，Ｄ、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．１９９４、１６７、１２１－１２７］によって報告されたプロトコルと同様であり、Ｈａｂｅｅｂ［Ｈａｂｅｅｂ Ａ．Ｆ．Ｓ．Ａ、Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．１９６６、１４、３２８－３３６］に基づいていた。簡単に説明すると、新たに調製した０．４ｍＬの０．０１％（ｖ／ｖ）ＴＮＢＳを、重炭酸ナトリウム４％中の０．１～２ｍｇ／ｍＬの線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡ０．４ｍＬに添加した。４０℃で２時間反応させた後、０．２ｍＬの１Ｎ ＨＣｌおよび０．４ｍＬの１０％（ｖ／ｖ）ＳＤＳを添加した。吸光度を、１ｍＬポリスチレンキュベット中、分光光度計で３３５ｎｍで測定した。ｒｈコラーゲン－ＭＡ溶液の代わりに重炭酸ナトリウムバッファを添加したことを除き、同じ手順で対照（ブランク）を調製した。同じ条件で調製した１～２ｍｇ／ｍＬの線維状ｒｈコラーゲンの吸光度を、較正用に記録した。

【０４３６】

レオロジー特性決定

【０４３７】

粘度：粘度測定は、温度制御されたセルチャンバを備えるＨＡＡＫＥ ＲＨＥＯＳＴＲＥＳＳ６００（商標）レオメータ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｅｌｅｃｔｒｏｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）で、Ｃ６０／１° Ｔｉコーン－プレート設定を使用して行われた。粘度は、回転傾斜モードで、０．０００１～１０００ｓｅｃ－１の範囲の剪断速度、４℃、２５℃および３７℃で、１ｍＬサンプルについて測定された。

【０４３８】

足場の貯蔵弾性率および損失弾性率：ｒｈコラーゲンが架橋した円板のレオロジー挙動は、ＰＰ２０鋸歯状スピンドルと２０ｍｍ鋸歯状プレートの設定を使用した平行プレートシステムを用いて調べられた。架橋していないｒｈコラーゲン－ＭＡを特性決定するために、Ｃ６０／１° Ｔｉコーン－プレート要素を使用した。ｒｈコラーゲン－ＭＡのレオロジー挙動を評価するために、２セットの実験を個別に実施した。第１の実験では、１ｍＬのサンプルに、制御された応力モードで振動力を与え、周波数１Ｈｚ、３７℃で３００秒間、５Ｐａの剪断応力を加えつつ、貯蔵弾性率Ｇ'および損失弾性率Ｇ"の値を記録した。ギャップは、元のサンプルの高さの９０％に調整され、Ｇ'およびＧ"の値を、１５０～３００秒の範囲で平均化した。第２の実験では、１．５ｍＬの架橋した円板を、３７℃での周波数スイープ振動状態で試験し、Ｇ'は、１Ｐａの剪断応力、０．０１～１００Ｈｚの周波数範囲で記録した。測定を開始するために、スピンドルを下げてヒドロゲル表面に接触させ、次に機器の軸力が０．４Ｎに等しくなるまでさらに下げた。全ての測定の前に、温度平衡に達するように、サンプルを湿度蓋で覆われたプレート上に１分間保持した。

【０４３９】

結果

【０４４０】

ＴＮＢＳアッセイ

【０４４１】

ｒｈコラーゲンの修飾の程度は、ＴＮＢＳ比色分析を使用して定量化された。このアッセイは、リジンおよびヒドロキシルリジンに由来する遊離の未反応のε－アミノ基のモル含有量、およびその後に官能基化の程度を定量化する。表６に示すように、線維状ｒｈコラーゲンの１０倍、１５倍および２０倍の異なるバッチの官能基化の程度を、ＴＮＢＳアッセイによって決定した。

【０４４２】

【表６】

ＴＮＢＳアッセイによって決定された、様々な調製物からの線維状ｒｈコラーゲンの官能基化の程度。

線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡバッチ	メタクリル化の程度［％］
１０倍	９８．１
１５倍	９５．５
２０倍	９２．９

【０４４３】

この結果は、線維状ｒｈコラーゲンの高い修飾能を示しており、モル比１０でメタクリル酸試薬を加えることが、線維状コラーゲンの最大官能基化を得るために好ましい可能性があることを示唆する。

【０４４４】

レオロジー

【０４４５】

１．粘度

【０４４６】

ｒｈコラーゲン／ウシコラーゲンの粘度の温度依存性

【０４４７】

図２７は、Ｔ＝４℃（青色、それぞれ、破線および実線）およびＴ＝３７℃（赤色、それぞれ、破線および実線）で、剪断速度の関数として表された、ＰＢＳ中のｒｈコラーゲン（ＣＯＬＬＡＧＥ（商標））およびウシコラーゲン（ＰｕｒｅＣｏｌ）の粘度を示す。ウシコラーゲン（実線）は、ゼロせん断速度粘度（η０）の明確な温度依存性を示す。すなわち、低い剪断速度値での粘度の平坦状態、３７℃（赤色）では、４℃（青色）値より１桁以上高いη０値を有する。これとは対照的に、ｒｈコラーゲン（破線）は、４℃および３７℃でのη０値間に有意な差を示さない。ＦＢで中和されたｒｈコラーゲン（方法を参照）は、非常に類似した挙動を示し（図２８）、すなわち、４℃および３７℃での粘度は、ほぼ同一である。図２９は、４℃（青色の線）と３７℃（赤色の線）での線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡの粘度を示す。プロファイルは同一ではないが、ゼロ剪断速度の値は、両温度で約１０００ｃＰである。

【０４４８】

ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドの粘度

【０４４９】

図３０は、２５℃でＤＭＥＭに溶解したｒｈコラーゲン－ＭＡの粘度を示す。図２７および２８に見られるｒｈコラーゲンの典型的なずり減粘挙動は、ＨＡ／ＨＡ－ＭＡの添加の有無にかかわらず、ｒｈコラーゲン－ＭＡでも維持される。ｒｈコラーゲンの濃度を２０２６ｍｇ／ｍＬから２６ｍｇ／ｍＬまで上げると（それぞれ緑色および赤色の線）、１０ｍｇ／ｍＬのＨＡまたはＨＡＭＡを後で添加して最終的なポリマー濃度を３０ｍｇ／ｍＬにすることによって、ゼロせん断粘度が増加する。

【０４５０】

当業者は、ｒｈコラーゲン－ＭＡが架橋されておらず、架橋を達成するために、光開始剤および光を加える必要があることを認識するであろう。

【０４５１】

２．足場の損失弾性率および貯蔵弾性率

【０４５２】

第１の実験で実施された３７℃での経時的な１ｍＬ円板のレオロジー分析を図３１に示す。上側のグラフは、ＵＶ硬化前の損失弾性率と貯蔵弾性率およびｔａｎ（デルタ）を報告し、下側のグラフは、ＵＶ硬化後（光開始剤の添加時）の値を報告する。このデータは

、ｒｈコラーゲン－ＭＡの貯蔵弾性率が、光開始剤の存在下で照射すると、２倍に増加することを示す。さらに、この結果は、ｒｈコラーゲン－ＭＡ濃度を変更することによって足場の特性を制御する能力を示す。G'値とG"値の差が大きく、架橋円板のｔａｎ（デルタ）値がゼロに近いことは、それらの弾性様挙動を示す。（G'－貯蔵弾性率；G"－損失弾性率；G'、「貯蔵／弾性率」は、変形中にゲルによって蓄えられ、後で元の形状に戻るために使用されるＧ＊のエネルギー分率を表す。G'は、ゲルの弾性挙動、または剪断変形後にゲルがどの程度その形状を回復することができるかを測定する。例えば、加硫ゴムは、応力がかかると瞬時に変形し、応力が取り除かれると完全に形状が回復するため、純粋な弾性材料である（すなわち、Ｇ＊～G'）（～は近似値を表す）。G''、「損失／粘性係数」は、内部摩擦による剪断変形で失われたＧ＊のエネルギー分率を表す。ＨＡ充填剤は純粋に粘性ではないため、G"は、粘度に直接関係しない。その代わり、この用語は、剪断応力が除去された後、ゲルがその形状を完全に回復できないことを反映している。）

【０４５３】

第２の実験では、図３２に示すように、６０秒間照射された１．５ｍＬ円板は、より高いG'値を示す。このデータは、G'が、ｒｈコラーゲン－ＭＡ濃度およびメタクリル化の程度と共に増加することを示しており、足場の特性を制御する能力を示す。

【０４５４】

実施例１５．タバコ植物からｒｈコラーゲンを得て、プロセシングするための手順。

【０４５５】

上述のように遺伝子組換えされたタバコ植物を成長させ、葉を収穫し、最初の上流の抽出および精製のために調製する（図３３Ａ～３３Ｃ）。図３３Ａに示されるように、葉は、機械的細断にかけられ（工程Ａ）、パルプがスラリーから除去され、一方、プロコラーゲンを含有する部分は保持され、酵素消化にかけられ、プロコラーゲンをコラーゲンに変換する（工程Ｂ～Ｃ）。パルプが再び廃棄され、コラーゲンを含有する部分は、スラリーから保持される（工程Ｃ）。酸性化工程の後、サンプルは、最初の洗浄工程のために最初の遠心分離を受け、その後ペレットが廃棄される（工程Ｄ～Ｆ）。ＡＭＳ沈殿と２回目の遠心分離の後、タンパク質が沈殿し（Ｈペレット）、上澄み液が廃棄される（工程Ｇ～Ｈ）。Ｈペレットは、－２０℃で冷凍保存が可能である。

【０４５６】

図３３Ｂに示されるように、Ｈペレットは、再懸濁されてタンパク質懸濁物を生成し、続いて、３回目の遠心分離が行われ、その後ペレットは廃棄される（工程Ｉ～Ｊ）。デプスフィルターを使用して懸濁物を洗浄し、ＮａＣｌで塩析してコラーゲンを沈殿させる（工程Ｋ～Ｌ）。４回目の遠心分離でコラーゲンペレットが得られ、上澄み液が廃棄される（工程Ｍ）。

【０４５７】

図３３Ｃに示されるように、コラーゲンペレットは、ＨＣｌに再懸濁されて、可溶化されたコラーゲンを生成する（工程Ｎ）。０．２～０．８ミクロンの濾過後、限外濾過（ＵＦ）（濃縮および透析濾過）により、バルク濃縮コラーゲンが生成される（工程Ｏ～Ｐ）。０．２ミクロンの濾過と充填の後、精製されたコラーゲンは最終容器に保存される（工程Ｚ）。

【０４５８】

実施例１６．添加剤を用いたｒｈコラーゲンメタクリレートの粘度と重合

【０４５９】

コラーゲンＭＡ：添加剤の比率５：１、２：１および１：２で、異なる添加剤（ポリビニルアルコールメタクリレート（ＰＶＡＭＡ）（図３４および３７）、ヒアルロン酸メタクリレート（ＨＡＭＡ）（図３５および３７）、および酸化セルロース（ＯＣ）（図３６および３７））を豊富に含む５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲンメタクリレートの粘度が、図３１～３７に示される。比較のために、各図において、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲンメタクリレートの粘度を報告する（黒色の曲線）。全てのサンプルは、０．１Ｍリン酸バッファ（ｐＨ７．４）＋１１．３ｍＭ　ＮａＣｌ（生理学的浸透圧）で調製され、測定はＴ

＝２２℃で行われた。データを比較し、これを図３７にまとめる。
【０４６０】
異なる添加剤を豊富に含むｒｈコラーゲンメタクリレートの重合は、ｃｏｌｌＭＡ：添加剤２：１の比率で、５ｍｇ／ｍｌのコラーゲンＭＡ＋異なる添加剤の典型的な足場に関しても示される（図３８）。ＣｏｌＭＡ単独を、ポリビニルアルコールメタクリレート（ＰＶＭＡ）、ヒアルロン酸メタクリレート（ＨＡＭＡ）、または酸化セルロース（ＯＣ）と組み合わせたＣｏｌＭＡと比較した。溶液を光開始剤２－ヒドロキシ－４'－（２－ヒドロキシエトキシ）－２－メチルプロピオフェノン（０．１％）と混合し、紫外（ｕｖ）光（３６５ｎｍ）を２０秒間照射した。
【０４６１】
実施例１７．注入可能なｒｈコラーゲン／多血小板血漿足場。
【０４６２】
注入可能なｒｈコラーゲン／多血小板血漿（ＰＲＰ）足場は、腱障害のための足場および治癒器具として調査された。成長因子（ＧＦ）の供給源、例えば、多血小板血漿（ＰＲＰ）と組み合わせた、分解の遅いｒｈコラーゲンマトリックスを、損傷した腱の治癒を促進するために必要な補助を提供しようとするために、損傷した腱の近傍に注入した。この治療では、植物由来の組換えヒトＩ型コラーゲン（ｒｈコラーゲン）とＰＲＰを混合したマトリックスを使用した。これは、損傷部位での成長因子の持続的な放出を補助し、治癒を促進する。ｒｈコラーゲン－ＰＲＰマトリックスの効果を、コラゲナーゼによって誘導されるアキレス腱の腱障害ラットモデルにおける線維芽細胞の増殖、血餅分解、ＧＦの放出、および腱治癒を補助する際に、インビトロおよびインビボでＰＲＰと比較した。ｒｈコラーゲン－ＰＲＰは、インビトロおよびインビボで、ＰＲＰ単独と比較して、優れた性能を示した。これらの結果は、腱障害の適応症の臨床試験において、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスの使用に関して有望なものである。
【０４６３】
材料および方法
【０４６４】
ｒｈコラーゲンマトリックス
【０４６５】
１０ｍＭ ＨＣｌ中のｒｈコラーゲンのモノマー溶液（ＣｏｌｌＰｌａｎｔ、ネスジオナ、イスラエル）を、リン酸溶液中でのｐＨ中和によって原線維化し、１８ｍＭの１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、イスラエル）で架橋した。次に、架橋したコラーゲンを、再蒸留水中で繰り返し遠心分離することにより洗浄し、塩化カルシウム（ＣａＣｌ２）（Ｍｅｒｃｋ、イスラエル）を添加して、最終濃度が２０ｍＭになるように計算した。ｒｈコラーゲンスラリーを充填したシリンジを凍結乾燥し、最終的にエチレンオキシドで滅菌した。
【０４６６】
多血小板血漿（ＰＲＰ）の調製
【０４６７】
顆粒球を含まないＰＲＰは、Ｔｒｏｐｏｃｅｌｌ ＰＲＰキット（ＥＳＴＡＲ、イスラエル）を用いて、製造元の指示に従って調製した。インビトロ細胞増殖アッセイのために、健康なヒト志願者からヒト血液を採取した（ヘルシンキ許可番号２０１２０６８）。インビボ動物実験のために、Ｈｓｄ：Ｓｐｒａｇｕｅ ＤａｗｌｅｙＳＤラット（Ｈａｒｌａｎ）から血液を採取した。
【０４６８】
ｒｈコラーゲンマトリックス／ＰＲＰおよび対照の調製
【０４６９】
ｒｈコラーゲンマトリックス／ＰＲＰ：凍結乾燥した架橋ｒｈコラーゲンを含むシリンジを、ＰＲＰまたは生理食塩水で水和して、最終濃度２０ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲンを得た。

【０４７０】
トロンビン活性化ＰＲＰ（対照）：ヒトＰＲＰを精製トロンビン（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、イスラエル）と混合して、１００ＩＵ／ｍｌの最終濃度を得た。
【０４７１】
ＣａＣｌ２活性化ＰＲＰ（対照）：ラットＰＲＰをＣａＣｌ２（Ｍｅｒｃｋ、イスラエル）と混合して、最終濃度２０Ｍｍを得た。
【０４７２】
インビトロ細胞増殖アッセイ
【０４７３】
この試験では、正常なヒト皮膚線維芽細胞（ｎＨＤＦ）の生存率と増殖に対するＧＦの影響を評価した。細胞の生存率と増殖は、ＰＲＰと組み合わせた架橋ｒｈコラーゲンマトリックスで構成されるマトリックスまたはトロンビン活性化ＰＲＰで構成される血餅のいずれかからのＧＦの拡散時に比較した。ＰＲＰまたはトロンビン活性化ＰＲＰ（各２００μｌ）と組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスを、２４ウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、イスラエル）の上に配置したトランスウェル（Ｔｈｉｎｃｅｒｔｓ（商標）２４ウェル８．０μｍ、Ｇｒｅｉｎｅｒ　ｂｉｏ－ｏｎｅ、イスラエル）に注入し、血餅形成を可能にするために３７℃で２０分間インキュベートした。正常なヒト皮膚線維芽細胞（ｎＨＤＦ）（０．５ｍｌあたり５，０００細胞）を、血清欠乏培地（ダルベッコ改変イーグル培地、ＤＭＥＭ、１％ウシ胎児血清、ＦＢＳ、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、イスラエルを含む）の各ウェルの底部に播種した。マトリックス（ＰＲＰまたはトロンビン活性化ＰＲＰのいずれかと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックス）を含むトランスウェルを、播種したウェルの上に置き、さらに０．２ｍｌの培地をサンプルの上部に加えた。０．５ｍｌのＤＭＥＭ中のｎＨＤＦ、１％ＦＢＳを対照として播種した。細胞増殖キットＷＳＴ－１（Ｒｏｃｈｅ、イスラエル）を製造元の指示に従って使用して、播種から７日後および１０日後にサンプルを３回試験した。
【０４７４】
インビボ試験
【０４７５】
動物
【０４７６】
２３０ｇ±２０％の体重のＨｓｄ：ＳｐｒａｇｕｅＤａｗｌｅｙＳＤラットを動物実験用に選択した。動物には固有の動物識別耳番号が与えられ、特定のグループに無作為に割り当てられた。動物は、専用の熱、換気、空調（ＨＶＡＣ）のある動物施設の個別換気（ＩＶＣ）ケージに収容された。温度と湿度は、継続的に監視された。動物には、市販のげっ歯類用飼料（Ｈａｒｌａｎ　Ｔｅｋｌａｄ　ＴＲＭ　Ｒａ／Ｍｏｕｓｅ　Ｄｉｅｔ）を自由に与え、オートクレーブ処理した水を自由に摂取させた。施設は外光にさらされておらず、１２時間の明状態と１２時間の暗状態の自動交互サイクルで維持される。全ての動物は実験動物の治療とケアのガイドラインに従って治療され、全てのプロトコルは、地元のＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅによって承認された。研究期間全体を通して、いずれの動物にも異常は検出されなかった。グループの平均体重値と増加に、統計的に有意な差は見られなかった。全ての増加は、終了時に通常予想される値の範囲内であった。
【０４７７】
インビボでの血餅分解および成長因子放出
【０４７８】
皮下（ＳＣ）ラットモデル（Ｓｃｉｅｎｃｅ　ｉｎ　Ａｃｔｉｏｎ　Ｌｔｄ．、ネスジオナ、イスラエル）において、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックス、ｒｈコラーゲンマトリックスのみ、または$CaCl_2$活性化ＰＲＰの分解時間と経時変化に伴うＧＦ含有量を比較した。
【０４７９】

３４匹の雌のＳｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラット（Ｈａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ネスジオナ、イスラエル）の背中の注射部位を剃り、印を付けた。各ラットは、背側平面上に、ラットの背中の前部に２つの部位および後部に２つの部位の４つの離れた場所に０．５ｍｌの同じ製剤を注入された。動物は、治療から１、７、１４、２１、３０、および４５日後の時点で安楽死させた（グループあたり１０匹または１２匹、１時点あたり２匹）。各時点で、注入部位を露出させ、肉眼で評価した。注入部位の皮膚を、はさみを使用して筋肉から穏やかに分離し、その部位を０．２５ｍｌのＤＭＥＭ、１％ＦＢＳ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、イスラエル）で洗浄し、血餅を抽出して秤量した。抽出した血餅を６ウェルプレートまたは１２ウェルプレートに移しながら、洗浄培地をエッペンドルフチューブ（１．５～２ｍｌ）に移した。秤量したら、血餅をそれぞれの洗浄培地と組み合わせ、はさみで切断し、乳棒で細かく刻み、血餅から周囲の培地へのＧＦの放出を促進した。次に、エッペンドルフチューブを少なくとも５分間遠心分離して、血餅のペレットと培地を分離した。上澄み液を集め、アッセイするまで－８０℃で保存した。動物に注入することなく、上と同じ手順に従って、それぞれの製剤を約０．５ｍｌ含む対照（Ｔ０）をインビトロで形成した。研究終了時に、保存された上澄み液中のＰＤＧＦおよびＶＥＧＦの含有量をＥＬＩＳＡ（Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡ　Ｍｏｕｓｅ／ｒａｔ　ＰＤＧＦ　ａｎｄ　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡ　Ｒａｔ　ＶＥＧＦ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、イスラエル）によって評価した。

【０４８０】

ラットに誘導されたインビボでの腱障害。

【０４８１】

ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスおよびＰＲＰのみの治癒特性を、３６匹の雄のＳｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラット（グループあたり１８匹のラット、時点あたり６匹の動物）のコラゲナーゼ誘導性腱障害モデルで比較した。実験は、Ｈａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｓｒａｅｌ　Ｌｔｄ．（ネスジオナ、イスラエル）で行われた。

【０４８２】

総踵骨腱上のラットの右後肢の近位部分に皮膚切開を行った。適切な倍率で、腱の中央枝を特定して分離し、０．５ｍｌのインスリンシリンジを使用して、総踵骨腱嚢の下に０．３ｍｇのコラゲナーゼ（１０ｍｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）を注入することにより、腱障害を誘導した。最終的に、４／０　Ｖｉｃｒｙｌを使用して、皮下縫合を中断して皮膚を閉じた。腱障害誘導の１週間後、眼の角膜／強膜ナイフを使用して、腱嚢に刺し傷を作成した。次に、カニューレを使用して、腱嚢の下にトンネル部を作成し、５０μｌのＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンまたはＰＲＰのみを、事前に作成しておいた管に注入した。処置から３、７、および１４日後に、動物を安楽死させた。処置された腱は、組織病理学的評価のために切除され、保存された。

【０４８３】

組織学

【０４８４】

組織をパラフィンに包埋し、４～５ミクロンの厚さのサンプルに連続的に切断した。スライドを、組織病理学的検査のためにヘマトキシリン＆エオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色し、病理医によって盲検評価した。

【０４８５】

結果

【０４８６】

インビトロ細胞増殖アッセイ

【０４８７】

この研究では、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンで構成されるマトリックスとトロンビン活性化ＰＲＰで構成される血餅の近傍に播種された細胞の生存率と増殖を比較した。未処理のウェルに播種した細胞を対照として使用した。マトリックス（ＰＲＰと組み合

わせたｒｈコラーゲンまたはトロンビン活性化ＰＲＰのいずれかで構成される）を、細胞層と直接接触することなくマトリックスからウェルへのＧＦの拡散を可能にするために、播種したウェルの上部のトランスウェルに配置した。７日目および１０日目の生細胞の数は、２つの異なる献血者からＰＲＰが抽出された２つの異なる実験（実験のための３回の繰り返し）の平均として報告される（図３９の上側）。図３９に示されるように、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスから放出されたＧＦの存在下での細胞生存率（７日目および１０日目）は、トロンビン活性化ＰＲＰの血餅または対照よりも有意に高い。さらに、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスの存在下では、細胞数は、７日目～１０日目まで増加したが、トロンビン活性化ＰＲＰの存在下および対照グループでは、細胞数は減少し、細胞の生存率と増殖が両方とも、ｒｈコラーゲンマトリックスの存在下でかなり優れている。データは顕微鏡分析によって確認された（図３９の下側）。ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスの存在下で培養された細胞（図３９の下側、パネルＡ）は、細長い形状を示し、播種後７日ですでに完全なコンフルエンスに達した。一方、トロンビン活性化ＰＲＰの存在下で培養された細胞はほとんど生存しておらず、これは、この実験設定では、トロンビンの毒性効果を示している可能性がある。（図３９の下側、パネルＢ。）培地のみの存在下で培養された細胞は、非常に限られた生存率を示した（図３９の下側、パネルＣ）。

【０４８８】

インビボでのマトリックス分解プロファイルおよび成長因子放出。

【０４８９】

マトリックス分解プロファイル

【０４９０】

注入された製剤の分解プロファイルは、ラットへの皮下注入後の異なる時点でマトリックスを秤量することによって決定された。

【０４９１】

活性化ＰＲＰを注入すると、材料は１日目にすでに消失し（図４０）、このことは、最初の２４時間の間のフィブリン血餅の完全な分解を示唆する。他方、ｒｈコラーゲンマトリックス単独またはＰＲＰと組み合わせたものは、初日の急激な重量減少から始まり、その後比較的遅い分解速度となり、３０～４５日後に完全に排除される（最終重量＜初期重量の０．５％）２相分解プロファイル（図４０）を有していた。

【０４９２】

成長因子含有量

【０４９３】

時間の関数としての注入部位のＧＦ含有量は、ＰＤＧＦおよびＶＥＧＦについてのＥＬＩＳＡによって評価された（図４１Ａ～４１Ｂ）。時間０でのＰＤＧＦ含有量は、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスおよび活性化ＰＲＰ処理において類似しており（図４１Ａ）、このことは、０日目のＰＤＧＦ含有量が、ＰＲＰによってもたらされたＧＦに富む血小板の唯一の寄与であることを示唆している。しかしながら、ＰＲＰのみを注入すると、注入部位でのＰＤＧＦ含有量は、注射の１日後にすでに検出限界より低く、急速な血餅分解と一致して、研究全体を通して検出不可能のままであった（図４０）。ＰＲＰがｒｈコラーゲンマトリックスに組み込まれたときの異なる写真が示される（図４１Ａ）。ＰＤＧＦ含有量は、足場の分解に伴い、１日目から１４日目まで徐々に増加し、４５日目に完全に消失するまで再び減少した（図４０）。興味深いことに、ｒｈコラーゲンマトリックスのみのグループのＰＤＧＦ含有量は、７日目から増加し、ＰＲＰと組み合わせたマトリックスのグループによって示されるパターンに従った。０日目のＶＥＧＦ含有量は、全ての製剤について検出限界よりも低く、活性化ＰＲＰグループにおいて、ベースラインレベルに留まった（図４１Ａ～４１Ｂおよび４２）。ＰＲＰと組み合わされたｒｈコラーゲンマトリックスのＶＥＧＦプロファイルは、７日目あたりのＶＥＧＦ含有量の急激な増加、続いて１４日目までの急激な減少、および３０日目までの平坦状態を示し、ＶＥＧＦは、足場分解を伴って４５日目で最終的に減少する（図４１Ｂ）。

【０４９４】
ＰＤＧＦ分析では１日目～１４日目まで、ＶＥＧＦ分析では０日目～７日目までに見られるＧＦの増加は、ｒｈコラーゲン足場がＧＦの蓄積を可能にする能力を証明しており、おそらく足場内で移動し、増殖する細胞を反映している。各製剤の研究全体にわたるＰＤＧＦおよびＶＥＧＦの名目上の含有量の積分を図４２にまとめる。活性化ＰＲＰ単独と比較して、ｒｈコラーゲンマトリックスのみまたはＰＲＰと組み合わせたものの注入の場合、注入部位でのＧＦの含有量がはるかに高いことは明らかである。
【０４９５】
ラットに誘導されたインビボでの腱障害
【０４９６】
ＰＲＰ単独と比較したＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスの治癒特性を、腱障害のラットモデルで評価し、異なる時点での組織病理学的分析によって評価した。腱の治癒および炎症は、成熟線維症のレベル、単核炎症細胞の存在、および未成熟肉芽組織の存在をスコアリングすることによって定量化された（表７に記載されているスコア０～５）。
【０４９７】
【表７】

組織病理学的スコアリング

スコア	説明
0	変化なし
1	切片化された組織の面積の１０％までが病変に関与している
2	切片化された組織の面積の２５％までが病変に関与している
3	切片化された組織の面積の５０％までが病変に関与している
4	切片化された組織の面積の７５％までが病変に関与している
5	切片化された組織の面積の７５％より多くが病変に関与している

【０４９８】
各治療に関連する組織病理学的スコアの累積値は、図４３Ａ～４３Ｃに示される。ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスで治療されたグループは、特に３日目と１４日目に、ＰＲＰ治療グループと比較してわずかに成熟した線維症を示した。これは一貫しており、１４日目にＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスで治療したグループによって示される低レベルの未成熟肉芽と相関関係がある（図４３Ｃ）。さらに、図

４３Ｂにおいて、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスで治療されたグループは、全ての時点で、特に３日目および１４日目に単核炎症細胞の存在が少ないことによって示されるように、炎症の減少を示す。全体として、このデータは、損傷した腱を、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスで治療すると、標準的なＰＲＰ注入治療と比較した場合に、炎症性単核細胞の大幅な減少を伴う高レベルの成熟線維症および低レベルの未成熟肉芽組織によって示されるように、より速い治癒を促進することを示す。

【０４９９】

考察

【０５００】

腱および靭帯の損傷を含む軟組織への損傷は、非常に一般的であり、重大な臨床的負担を引き起こす。いくつかの治療が利用可能であるが、それらの臨床的利益は、依然として限られている。このことは、治癒を改善し、回復時間を短縮することを目的とした新しい選択肢の探索を促すものであった。ヒト組換えＩ型コラーゲンで構成される注入可能なマトリックスが開発され、このマトリックスは、ＰＲＰと混合されると、コラーゲン－フィブリン－ＰＲＰコンポジットを形成し、このコンポジットは、ゆっくりと分解し、細胞の移動と増殖をコラーゲン足場に引き付け、損傷部位でのＧＦの持続的な放出を可能にし、そのため、治癒過程をよりよく補助する。インビトロ実験（図３９）は、トロンビン活性化ＰＲＰと比較して、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスの周囲において、かなり優れたｎＨＤＦ生存率および増殖を示した。この結果は、コラーゲンマトリックスから放出された持続的な成長因子が細胞増殖を促進し、向上させることを示した。Ｉ型ｒｈコラーゲンは、ＰＲＰと組み合わせると、細胞層と直接接触していない場合であっても、細胞増殖を促進し、向上させる補助環境を提供する。ラットへの皮下注入は、ＰＲＰ注入時にｉｎ　ｓｉｔｕで形成されたフィブリン血餅を含むＧＦが、すでに２４時間以内に分解し、その結果、注入部位のＧＦ含有量がＥＬＩＳＡ検出限界よりも低いことを初めて示した（図４１Ａ～４１Ｂ）。血小板がｒｈコラーゲンマトリックスと複合体を形成すると、ＧＦは４５日間にわたって放出され、これは、足場の分解と一致する時間である（図４０および４１Ａ～４１Ｂ）。ＧＦ含有量のプロファイルは、標準的な放出プロファイルによって予想されるように、単調ではないことに注目するのは興味深い。ＰＲＰ処理を行ったｒｈコラーゲンマトリックスのＰＤＧＦプロファイル（図４１Ａ～４１Ｂ）は、ＰＲＰ単独の場合と非常によく似た、初日の最初の急激な減少を示したが、その後、２１日目まで徐々に増加し、最後に足場の分解に伴い、減少して検出不可能なレベルに達する。興味深いことに、ｒｈコラーゲンだけでも、最初の数週間でＰＤＧＦ含有量が徐々に増加し、足場が完全に分解する方向に減少するという同様のパターンを示した。したがって、ＰＲＰを有するｒｈコラーゲンの足場は、捕捉されたＰＲＰによって提供される利点（早期のＧＦ放出）と、細胞の動員および増殖を高度に促進し、向上させるｒｈコラーゲン足場自体によって提供される利点を組み合わせたものである。ＶＥＧＦ含有量プロファイルに関しては、ＰＲＰ注入時にＶＥＧＦレベルは研究全体を通して非常に低いままであったが、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスの注入は、最初の１週間以内にＶＥＧＦレベルの増加をもたらし、最終的に足場の分解に伴って減少した。興味深いことに、ＰＤＧＦとは対照的に、ｒｈコラーゲンマトリックスのみで治療したグループのＶＥＧＦレベルは、ＰＲＰのみのグループよりも依然として高かったが、特に７日目に、ＰＲＰを含むｒｈコラーゲンマトリックスとは異なるプロファイルを示した。この観察結果は、コラーゲン足場と組み合わされるときのＧＦレベルへのＰＲＰの寄与を強調するものである。ｒｈコラーゲンとＰＲＰの治癒特性は、最終的に、総踵骨腱（アキレス腱）の腱障害のラットモデルで、ＰＲＰと比較された。組織学的評価により、以前の実験で予想されたように、細胞の動員および増殖を促進する足場の能力と一致する、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスの成熟線維性組織を構築するさらに速い能力が確認された。さらに、この組織学的分析はまた、損傷部位が、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスで治療されると、炎症は、ＰＲＰ単独での標準的な治療と比較して実質的に減少することを示す。

【０５０１】
この研究は、架橋したヒト組換えＩ型コラーゲンから構成される注入可能な足場のインビトロおよびインビボでの生物学的効果を示す。ＰＲＰなどのＧＦの自家供給源と組み合わせると、形成された足場は、炎症反応を制御し、新しい健康な組織のより迅速な形成を促進することにより、軟組織損傷の治癒を加速する。この結果は、治癒特性の向上が、ＧＦの放出を延長するｒｈコラーゲンと自家ＰＲＰの独自の組み合わせにあることを示唆する。このデータは、腱障害の臨床試験において、ＰＲＰと組み合わせたｒｈコラーゲンマトリックスの使用を裏付けるものである。
【０５０２】
実施例１８．皮膚充填剤としての植物由来のヒト組換えコラーゲンの使用。
【０５０３】
組織由来のヒトおよびウシコラーゲンと比較して、免疫原性を低下させ、組織再生を促進し、レオロジー特性が改善された、より均一で潜在的に長持ちする皮膚充填剤を提供するために、ヒトトランスジェニックコラーゲン（ｒｈコラーゲン）が、植物（例えば、遺伝子操作されたタバコ植物）から生成し、単離され、次いで、皮膚充填剤として使用される。典型的には、遺伝子組換え植物は、ＣＯＬ１、ＣＯＬ２、Ｐ４Ｈ－α、Ｐ４Ｈ－βおよびＬＨ３からなる群から選択されるヒトデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）の少なくとも１つの遺伝子配列の発現可能な配列を含む。典型的には、植物由来のヒトコラーゲンは、配列番号３に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも修飾された１つのヒトコラーゲンα－１鎖と、配列番号６に示され、遺伝子組換え植物中で発現される少なくとも１つの修飾ヒトコラーゲンα－２鎖と、を含み、遺伝子組換え植物は、さらに、外因性プロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）（例えば、ヒトまたは他の哺乳動物のＰ４Ｈ）を発現する。場合により、遺伝子組換え植物は、さらに、リシルヒドロキシラーゼ（ＬＨ）、プロテアーゼＮおよびプロテアーゼＣからなる群から選択される外因性ポリペプチドを発現する。例えば、ヒトコラーゲンα－１鎖は、配列番号１に記載される配列によってコードされ、および／またはヒトコラーゲンα－２鎖は、配列番号２に記載される配列によってコードされる。場合により、ヒトコラーゲンα－１鎖および／またはα－２鎖は、植物または遺伝子組換え植物の液胞に対して標的化され、フィシンで消化され、ヒトアテロコラーゲンが得られる。
【０５０４】
場合により、ｒｈコラーゲンは、皮膚充填剤について当該技術分野で知られているものを含む、他の物質で修飾されるか、または一緒に配合される。修飾の例としては、限定されないが、メタクリル化および／またはチオール化が挙げられる。他の物質の例としては、限定されないが、ヒアルロン酸（ＨＡ）またはその修飾誘導体、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）またはその修飾誘導体、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはその修飾誘導体、酸化セルロース（ＯＣ）またはその修飾誘導体、またはこれらのいずれかの組み合わせが挙げられる。他の物質の例としては、限定されないが、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロース、結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）、またはそれらの組み合わせが挙げられる。ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧ、またはＯＣの修飾誘導体には、限定されないが、光重合性誘導体が含まれる。ＨＡ、ＰＶＡ、ＰＥＧ、またはＯＣの修飾としては、限定されないが、メタクリル化および／またはチオール化が挙げられる。他の物質の例には、光開始剤（例えば、可視光線、紫外線（ＵＶ）、または赤外線に敏感）などの重合剤または開始剤が含まれるが、これらに限定されない。可視光光開始剤の例としては、限定されないが、エオシンＹ＋トリエタノールアミンまたはリボフラビンが挙げられる。紫外線光開始剤の例としては、限定されないが、リチウム　フェニル－２，４，６－トリメチルベンゾイルホスフィネート（ＬＡＰ）または１－［４　２－ヒドロキシ－１－［４－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニル］－２－メチルプロパン－１－オン（ＩＲＧＡＣＵＲＥ（登録商標）２９

５９）が挙げられる。
【０５０５】
組織から抽出されたコラーゲンの固有の特性は、室温でのゲル化である。生理学的バッファ中の比較的低濃度（例えば、５～１５ｍｇ／ｍｌ）では、組織から抽出されたコラーゲンは、低温（約４℃）から室温に変わるときに、ゲルを形成する。
【０５０６】
これとは対照的に、ｒｈコラーゲンは、粘度が比較的低く（同じ濃度と配合で）、比較的小さな発現力を使用して狭いゲージの針またはカニューレ（２７ゲージ～３３ゲージ）からの注入が可能であり、より小さな空間への浸透が向上し、注入後の調整（形を整える）の際の柔軟性が向上する。
【０５０７】
ｒｈコラーゲンを、細いゲージの針を有するシリンジまたはカニューレ（２７ゲージ～３３ゲージ）に入れ、真皮の下の空洞または空間に注入する。次に、注入されたｒｈコラーゲンを、所望な位置に成型するか、形を整えるか、または他の方法で操作する（例えば、手動マッサージによって、または成型または形を整える器具、例えば、外科用圧迫器を用いる）。重合は、このプロセス前、プロセス中、またはプロセス後に、注入された製剤の上にある真皮の表面または上に配置された光源（例えば、発光ダイオード（ＬＥＤ）、レーザ、またはキセノンランプ）への曝露によって開始されてもよい。
【０５０８】
実施例１９．光開始剤および添加剤を配合した、修飾された植物由来のヒト組換えコラーゲンの使用
【０５０９】
ｒｈコラーゲンは、実施例１８に記載されるように、メタクリル化によって修飾される。修飾ｒｈコラーゲンは、光開始剤（例えば、エオシンＹ＋トリエタノールアミンまたはリボフラビン）を用いる重合性溶液製剤として調製される。ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）マイクロスフェア、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、カルシウムヒドロキシルアパタイト（ＣａＨＡ）、カルボキシメチルセルロースまたは結晶性ナノセルロース（ＣＮＣ）、またはそれらのいくつかの組み合わせが含まれる。
【０５１０】
製剤を、細いゲージの針を有するシリンジまたはカニューレ（２７ゲージ～３３ゲージ）に入れ、真皮の下の空洞または空間に注入する。次いで、実施例１８に記載されるように、注入された製剤を、手動で、または適切な外科用器具を用いて、光源（例えば、可視光源）への曝露中または曝露後に、所望な位置に成型するか、形を整えるか、または他の方法で操作する。
【０５１１】
実施例２０．光開始剤および修飾添加剤を配合した、修飾された植物由来のヒト組換えコラーゲンの使用。
【０５１２】
ｒｈコラーゲンは、実施例１９と同様に、メタクリル化またはチオール化によって修飾される。修飾ｒｈコラーゲンは、実施例１８に記載されるように、光開始剤（例えば、エオシンＹ＋トリエタノールアミンまたはリボフラビン）を用いる重合性溶液製剤として調製される。ヒアルロン酸（ＨＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、酸化セルロース（ＯＣ）、またはそれらのいくつかの組み合わせの修飾誘導体が含まれ、メタクリル化またはチオール化によって修飾される。
【０５１３】
製剤を、細いゲージの針を有するシリンジまたはカニューレ（２７ゲージ～３３ゲージ）に入れ、真皮の下の空洞または空間に注入する。次いで、実施例１８に記載されるように、注入された製剤を、手動で、または適切な外科用器具を用いて、光源（例えば、可視

光源）への曝露中または曝露後に、所望な位置に成型するか、形を整えるか、または他の方法で操作する。

【０５１４】

実施例２１．コラーゲンを用いた架橋ヒアルロン酸の注入性および粘度の比較。

【０５１５】

図４４に示すように、架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）の注入に必要な発現力（ニュートン、Ｎ）（黒色に□の曲線）を、モノマーコラーゲン（▽の曲線）または原線維化コラーゲン（△の曲線）と架橋したヒアルロン酸（ＨＡ）の注入に必要な発現力と比較した。（架橋ＨＡ　２０ｍｌ／ｍｌ；架橋ＨＡ　２０ｍｇ／ｍｌ、モノマーｒｈＣｏｌ　７．５ｍｇ／ｍｌ；架橋ＨＡ　２０ｍｇ／ｍｌ、原線維化コラーゲン１０ｍｇ／ｍｌ）

【０５１６】

図４５に示すように、架橋ＨＡの注入に必要な発現力（ニュートン、Ｎ）を、二重架橋ＨＡ－コラーゲンの製剤の注入に必要な力（灰色の曲線）と比較した。２つの曲線は、大部分が類似していた。

【０５１７】

図４６に示すように、架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）の粘度（黒色に□の曲線）を、モノマーコラーゲン（▽の曲線）または原線維化コラーゲン（△の曲線）と架橋したヒアルロン酸（ＨＡ）の粘度と比較した。原線維化コラーゲンと架橋したＨＡの粘度は、モノマーコラーゲンと架橋したＨＡの粘度より低かったが、以前として架橋ＨＡ単独の粘度より高かった。濃度は、図４４と同じであった。

【０５１８】

図４７に示すように、架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）の粘度を、二重架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）－コラーゲンの製剤の粘度（灰色の曲線）と比較した。二重架橋ＨＡコラーゲンの粘度は、架橋ＨＡ単独の粘度よりも大きかった。

【０５１９】

架橋ＨＡ皮膚充填剤に対する、ｒｈコラーゲンの付加は、モノマー性または原線維化したもの、架橋しているか架橋していないかによらず、発現力が顕著に増加せず、このことは、医師にとって同様の性能を可能としているが、一方で、材料の粘度は顕著に増加し、注入時に皮膚をより良く持ち上げることが可能となる。

【０５２０】

実施例２２．組換えヒトコラーゲンメタクリレート（ｒｈコラーゲンＭＡ）の経皮重合。

【０５２１】

図４８Ａ～４８Ｂに示されるように、マウス皮膚パッチの下に注入された、光開始剤としてエオシンＹ／ＴＥＡを含む組換えヒトコラーゲンメタクリレート（ｒｈコラーゲンＭＡ）の溶液（図４８Ａ）を、白色ＬＥＤトーチからのＬＥＤ白色光を皮膚に６分間照射することによって経皮重合させた。ｒｈコラーゲンＭＡは重合し、皮膚組織に組み込まれた（図４８Ｂ）。

【０５２２】

ｒｈコラーゲンＭＡは、光開始剤としてエオシンＹ／ＴＥＡの存在下で、小さなＬＥＤトーチで６分間照射すると、皮膚の下で重合する。

【０５２３】

実施例２３．二重架橋皮膚充填剤の製剤化：２工程合成

【０５２４】

目的：審美的目的または臨床的目的のいずれかで皮膚表面の外観を改善するために使用するための注入可能な皮膚充填剤を開発すること。皮膚充填剤は、Ｉ型組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）またはその修飾形態、メタクリル化ｒｈコラーゲン（ＭＡ－ｒｈＣｏｌ）、および架橋ヒアルロン酸（ＨＡ）で構成される。

【０５２５】

架橋ＨＡがさらにｒｈコラーゲンに架橋される二重架橋製品（図４９）は、ヒアルロン酸が構造的支持と空隙充填を提供し、ｒｈコラーゲンが細胞増殖を促進して組織再生を促

進する足場となるように設計される。足場は最終的に分解し、新しく形成された組織が残る。別の目的は、Ｉ型ｒｈコラーゲンによって促進される組織再生を伴う、架橋ＨＡによって提供されるリフティング効果（組織増強）を調べ、二重架橋皮膚充填剤を分析することである。

【０５２６】

方法

【０５２７】

二重架橋

【０５２８】

－ＨＡ架橋－

【０５２９】

高分子量ヒアルロン酸（７００ＫＤａ～３ＭＤａの範囲、好ましくは１．５ＭＤａ）をアルカリ性条件下（ｐＨ１２～１３、例えば０．３Ｎ　Ｎａ（ＯＨ））、５０～２００ｍｇ／ｍｌ（好ましくは１００ｍｇ／ｍｌ）の濃度で溶解した。架橋剤１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル（ＢＤＤＥ）を、ＨＡを溶解する前に、ＨＡ二糖の量の１～５０％の範囲（好ましくは６、８、１０％）の比率で、溶媒に添加した。この製剤のいくつかの実施形態では、ＨＡは、メタクリル化ＨＡ（ＭＡ－ＨＡ）を含む。

【０５３０】

ＨＡ架橋を、室温で２４時間行った。

【０５３１】

低ＭＷ　ＨＡの追加と中和

【０５３２】

総ＨＡ量の１～３０％（好ましくは５～１０％）の範囲の低分子量ＨＡ（５０ＫＤａ～１０００ＫＤａ、好ましくは３００～７００ＫＤａ）を、１０～１００ｍｇ／ｍｌの範囲（好ましくは３０ｍｇ／ｍｌ）の濃度で水に溶解した。この製剤のいくつかの実施形態では、ＨＡは、メタクリル化ＨＡ（ＭＡ－ＨＡ）を含む。

【０５３３】

非架橋ＨＡを架橋ＨＡと混合する前に、ＨＣｌを非架橋ＨＡに、架橋ＨＡのｐＨを中和するのに必要な量で添加する。リン酸緩衝液（ＰＢ）とＮａＣｌを、０．１Ｍ　ＰＢと０．２Ｍ　ＮａＣｌの最終濃度になるように添加する。

【０５３４】

ｒｈコラーゲンの中和

【０５３５】

ｒｈコラーゲンをＨＡと混合する前に、ｒｈコラーゲンをＰＢ＋０．２ＭＮａＣｌで０．１Ｍにする。

【０５３６】

ＨＡ＋ｒｈコラーゲンの混合

【０５３７】

ＨＡ（架橋＋非架橋ＨＡ）は、（６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６）の範囲のＨＡ：ｒｈコラーゲンの比率でｒｈコラーゲンと混合され、２～８℃に維持される。ＨＡの最終濃度は、約５～５０ｍｇ／ｍｌである。ｒｈコラーゲンまたはＭＡ－ｒｈコラーゲンの最終濃度は、約１～５０ｍｇ／ｍｌである。

【０５３８】

第２の架橋

【０５３９】

ＨＡとｒｈコラーゲンを十分に混合したら、１－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－３－エチルカルボジイミドメチオダイド（ＥＤＣ）を用いて、２回目の架橋を行った。ｒｈコラーゲン中の遊離アミンの量の１０～１００倍（好ましくは５０倍）に等しい量のＥＤＣを溶解し（０．１Ｍ　ＰＢ＋０．２Ｍ　ＮａＣｌに）、架橋ＨＡ－ｒｈコラーゲンに

加え、混合した。第２の架橋は、暗状態で、２～８℃で２～３時間行う。

【０５４０】

透析

【０５４１】

次に、二重架橋材料を、ＰＢＳと１ｍＭ　ＨＣｌ、または低リン酸緩衝液のいずれかに対して透析した（低リン酸緩衝液の調製：（ａ）ストック溶液：１０Ｎ　Ｎａ（ＯＨ）でｐＨ１１．２にした１６２ｍＭのリン酸水素二ナトリウム、（ｂ）ストック溶液を０．１ｍＭ　ＨＣＬで１：１０００に希釈する）。

【０５４２】

レオロジーおよび機械的評価

【０５４３】

貯蔵弾性率および損失弾性率は、例えば、コーン（１°）対プレートの構成（Ｃ３５／１）を使用するＨＡＡＫＥ－ＲＨＥＯ　ＳＴＲＥＳＳ　６００（商標）機器（ＴＨＥＲＭＯ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ（商標））を使用して測定された。周波数スイープ測定は、一定範囲の周波数（例えば、０．０２～１００Ｈｚ）で一定の変形（例えば、０．８％）で実行された。場合により、一方または両方の成分の様々な比率または架橋比率を試験した。最終製品の貯蔵弾性率および損失弾性率を制御するために、第１および第２の架橋を調整することができる。

【０５４４】

注入性の測定は、例えば、発現力を観察するためにプランジャ変位（ｍｍ）の関数としてＭＵＬＴＩＴＥＳＴ　１－／ｉ　ＭＥＣＭＥＳＩＮ（商標）機を使用して行われた。

【０５４５】

注入性

【０５４６】

注入性の測定は、上述のようにＭＵＬＴＩＴＥＳＴ　１－／ｉ　ＭＥＣＭＥＳＩＮ（商標）機を使用して行われた。製剤２、２Ａおよび３には、１ｍｌのＬＵＥＲ－ＬＯＫ（商標）シリンジ（ＢＥＣＴＯＮ－ＤＩＣＫＩＮＳＯＮ（商標））と３０Ｇの針を使用した（表８）。代表的な二重架橋製剤２、２Ａおよび３のプランジャ変位の関数としての発現力（表８）を、同じく３０Ｇ針を使用して、市販の皮膚充填剤と比較した。

【０５４７】

動物実験

【０５４８】

２００μｌの製剤２または２Ａ、または対照を、Ｓｐｒａｇｕｅ　ｄａｗｌｅｙラットの背中に皮下注入した。組織学は、１週間後に行われた。

【０５４９】

結果

【０５５０】

当業者は、ここでの２工程の二重架橋が２種類の架橋剤を使用することを理解するであろう。第１の工程は、架橋剤としてＨＡおよびＢＤＤＥを含む。第２の工程では、コラーゲンと非架橋ＨＡが追加され、ＥＤＣを使用して架橋が実現される。皮膚充填剤調製の他の全ての方法と比較して、架橋化学および作用の順序の違いは、機械的特性、組織相互作用および分解速度を含む異なる特性を有する皮膚充填剤組成物をもたらすはずであると予想される。

【０５５１】

ＨＡ：ｒｈコラーゲンの製剤は、上の方法を使用して作成され、代表的な製剤は表８に示される。

【０５５２】

【表８】

組成物の処方。

製剤	HA 架橋比率	HA：rh コラーゲンの比率	注釈
1	10%	2：1	透析されたもの対リン酸バッファー生理食塩水
1A	10%	2：1	透析されたもの対 1mM HCl および中和されたもの
2	6%	2：1	透析されたもの対リン酸バッファー生理食塩水
2A	6%	2：1	透析されたもの対 1mM HCl および中和されたもの
3	8%	2：1	透析されたもの対リン酸バッファー生理食塩水

【０５５３】

レオロジーおよび機械的評価

【０５５４】

図５０に示されるように、代表的な二重架橋製剤（表８）の貯蔵弾性率（実線）および損失弾性率（破線）は、市販の皮膚充填剤と同等であった。ｆ＝１Ｈｚでのこれらの製剤とこの市販の充填剤の貯蔵弾性率および損失弾性率の比較を図５１に示す。

【０５５５】

最終製品の貯蔵弾性率および損失弾性率を制御するために、第１および第２の架橋を調整することができる。図５２に示されるように、３０Ｇ針を通して二重架橋製剤を注入するのに必要な発現力は、市販の皮膚充填剤を注入するのに必要な発現力より有意に低かった。

【０５５６】

組織学および動物実験

【０５５７】

上述のように動物実験を行った。製剤２および２Ａ（表８および９を参照）を、皮下注入後の市販の皮膚充填剤製品と比較した。炎症は、重症でない限り、再生プロセスの最初の工程である。

【０５５８】

皮下注入から７日後の平均組織学的スコアを、表９で市販の皮膚充填剤と比較する。

【０５５９】

【表９】

７日目の組織学的スコア。

	炎症スコア	%リンパ球	%マクロファージ	%好中球	壊死スコア	線維症スコア
製剤 2	2	50	40	10	0	2
製剤 2A	2．25	42．5	42．5	15	0	2
市販の材料／対照	1．333333	36．66667	53．33333	10	0	1．333

【０５６０】

表９に示されるように、二重架橋製剤は、市販の皮膚充填剤よりも高い線維症スコアお

よび高い炎症レベルを有し、このことは、組織再生のより高度なプロセスを示す。

【０５６１】

図５６は、製剤２、２Ａまたは対照の皮下注入から７日後の代表的な組織画像を示す。矢印は、組織再生の開始を示す、製剤２および２Ａの炎症反応の上昇（ただし重症ではない）を示している。「ブレブ」は、注入された材料によって形成された水疱を示す。

【０５６２】

図５６に示されるサンプルの組織学的スコアは、図５７に棒グラフとして示され、二重架橋製剤２および２Ａについて、炎症スコアおよび線維症スコアが高いことは、対照と比較して改善された組織再生を示したことを示す。

【０５６３】

まとめ／結論

【０５６４】

２７～３２Ｇ針によって簡単に注入され、幅広い剛性Ｇ'－Ｇ"を有する二重架橋製剤が開発されてきた。注入から１週間後の組織学的結果は、組織再生プロセスの開始が強化されていることを示す。

【０５６５】

実施例２４．光硬化性皮膚充填剤

【０５６６】

目的：光硬化性皮膚充填剤の特性を分析すること。光硬化性配合物は、硬化前は半ＩＰＮであり、硬化後はＩＰＮ（相互貫入網目構造）になる。２つの絡み合った網目構造を意味しており、各１つがそれ自体に架橋し、他のものには架橋しない。

【０５６７】

方法

【０５６８】

ｒｈコラーゲンとメタクリル化ｒｈコラーゲンの混合物を、実施例２３のように架橋した、既に架橋されたＨＡに、最終濃度が１～１０ｍｇ／ｍｌになるように加え、メタクリル化ｒｈコラーゲンと非メタクリル化ｒｈコラーゲンとの比率は、１：０、１：１、１：２、１：３、１：４、０：１、２：１、３：１または４：１である。ＭＡ－ｒｈコラーゲンの最終濃度範囲は、０～１２ｍｇ／ｍｌであり、非修飾ｒｈコラーゲンの最終濃度範囲は、０～１２ｍｇ／ｍｌである。架橋ＨＡとＭＡ－ｒｈコラーゲンとの比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６または０：１である。ＨＡの最終濃度は、１２～２５ｍｇ／ｍｌであり、ｒｈコラーゲン（ＭＡ＋非修飾）の最終濃度は、１～２４ｍｇ／ｍｌである。

【０５６９】

可視光光開始剤を混合物に加えた（例えば、エオシンＹ、トリエタノールアミンおよびＮ－ビニルピロリドンの組成物）。

【０５７０】

レオロジー試験

【０５７１】

代表的な製剤４、５、および６、および対照の１．６ｍｌサンプル（以下の表１０を参照）を、直径２ｃｍ、高さが０．５ｍｍの円筒形の型および円筒に注ぎ、白色ＬＥＤ懐中電灯を用いて、一定量の可視光を６分間照射することによって、硬化させた。

【０５７２】

表１０に示すように、上述の方法を使用して、高度に架橋されたヒアルロン酸（ＨＡ）の製剤を、ｒｈコラーゲンおよび／またはｒＨコラーゲンメタクリレートの組み合わせと、３つの異なる代表的な比率で、一定量の可視光光開始剤と共に混合した。高度にＢＤＤＥで架橋されたＨＡ（ただし、同様に任意の他の架橋剤であってもよく、または架橋ＨＡのみから作られる標準的な市販の充填剤であってもよい）を、ｒｈＣｏｌおよびｒｈＣｏｌＭＡと異なる比率で混合した。その結果、硬化後に、ＨＡが架橋し、絡み合ったｒｈＣｏｌＭＡが架橋する。これは、ＨＡがそれ自体に架橋され、コラーゲンがＨＡ網目構造内

でそれ自体に架橋される相互貫入網目構造を形成する。

【０５７３】

【表１０】

光硬化の前後に試験された製剤。

	架橋ＨＡ	ｒｈコラーゲンＭＡ	ｒｈコラーゲン
対照（架橋ＨＡ）	２３ｍｇ／ｍｌ	－	－
製剤４	１９ｍｇ／ｍｌ	２．５	－
製剤５	１９ｍｇ／ｍｌ	１．２５	１．２５
製剤６	１９ｍｇ／ｍｌ	０．６４	１．８３

【０５７４】

貯蔵弾性率および損失弾性率を、以下に説明するように、照射の前後に測定した。

【０５７５】

ａ．硬化前

【０５７６】

貯蔵弾性率および損失弾性率はコーン（１°）対プレートの構成（Ｃ３５／１）を使用するＨＡＡＫＥ－ＲＨＥＯ　ＳＴＲＥＳＳ　６００（商標）機器（ＴＨＥＲＭＯ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ（商標））を使用して測定された。周波数スイープ測定は、０．０２～１００Ｈｚの範囲の周波数で、０．８％の一定の変形で実行された。

【０５７７】

ｂ．硬化後

【０５７８】

光硬化した円筒形の貯蔵弾性率および損失弾性率は、鋸歯状プレートとプレートの構成（ＰＰ２０）を使用するＨＡＡＫＥ－ＲＨＥＯ　ＳＴＲＥＳＳ　６００（商標）機器（ＴＨＥＲＭＯ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ（商標））を使用して測定された。周波数スイープ測定は、０．０２～１００Ｈｚの範囲の周波数、０．３Ｎの一定の通常の負荷で、３Ｐａの一定の剪断応力で実行された。

【０５７９】

注入性

【０５８０】

注入性の測定は、製剤４、５および６について、また、対照としての高度に架橋したＨＡについて、上述のようにＭＵＬＴＩＴＥＳＴ　１－／ｉ　ＭＥＣＭＥＳＩＮ（商標）機を使用して行われた。全てのサンプルについて、１ｍｌのＬＵＥＲ－ＬＯＫ（商標）シリンジ（ＢＥＣＴＯＮ－ＤＩＣＫＩＮＳＯＮ（商標））と３０Ｇの針を使用した（表１０）。代表的な製剤４、５および６（表１０）のプランジャ変位（１２ｍｍ／分）の関数としての発現力を、高度に架橋したＨＡと比較した。

【０５８１】

動物実験

【０５８２】

上述のように動物実験を行った。製剤４（表１０および１１を参照）を、ラットの背中に皮下注入した後の高度に架橋したＨＡと比較した。

【０５８３】

結果

【０５８４】

レオロジーおよび機械的評価

【０５８５】

図５３は、製剤４、５および６の光硬化の前後の貯蔵弾性率と、高度に架橋したＨＡとの比較を示す（表１０を参照）。ｆ＝１Ｈｚの周波数で、光硬化の前後の両方でのこれら

の製剤と、高度に架橋したＨＡ（硬化性ではない）の貯蔵弾性率と損失弾性率の比較を図５４に示す。矢印は「傾向」を表す。ｒｈＣｏｌＭＡの量が増えると、剛性が増す。

【０５８６】

注入性

【０５８７】

図５５に示すように、３０Ｇ針を介した製剤４、５および６の注入に必要な発現力は、架橋ＨＡのみの場合に必要な発現力よりも小さく、医師にとって使いやすく、患者の微細な線および繊細な領域への注射が容易になる。しかしながら、ｉｎ　ｓｉｔｕでの光硬化（注入後）の後、材料の剛性は、架橋ＨＡ単独よりも著しく高くなるように調整することができる（図５３および５４を参照）。

【０５８８】

組織学および動物実験

【０５８９】

皮下注射から７日目の製剤４の平均組織学的スコアを、表１１の高度に架橋されたＨＡと比較した。

【０５９０】

【表１１】

７日目の組織学的スコア。

	炎症スコア	%リンパ球	%マクロファージ	%好中球	壊死スコア	線維症スコア
製剤４	1．5	42．5	50	7．5	0	1．5
市販の材料／対照	1．333333	36．66667	53．33333	10	0	1．333

【０５９１】

表１１に示されるように、製剤４は、高度に架橋したＨＡよりも高い線維症スコアおよび高い炎症レベルを有し、このことは、組織再生のより高度なプロセスを示している。

【０５９２】

図５８および図５９は、式４が、対照の皮膚充填剤よりも高い炎症スコアおよび線維症スコアを有することを示し、このことは、式４の皮膚充填剤による組織再生プロセスの開始の改善を示している。

【０５９３】

結論／まとめ

【０５９４】

光硬化性充填剤は、注入前の剛性が比較的低く、２７～３２Ｇ針からの注入が容易であるが、光硬化後の剛性が大幅に向上（調整可能）するように開発された。ｒｈＣｏｌとｒｈＣｏｌＭＡとの最終的な比率を制御することにより、剛性を調整することができる。この技術により、医師は、充填剤を光硬化照射で固定する前に、充填剤を希望の形状に形を整えることができる。注入された材料は、周囲の組織に強く付着する。予備的なインビボでの結果は、再生プロセスの開始を示す。

【０５９５】

実施例２５．インビボ動物実験：皮膚充填剤成分の独立した注入

【０５９６】

目的：ＨＡまたはそのメタクリル化誘導体、およびメタクリル化ｒｈコラーゲンを半液相で皮下に別々に注入し、注射後、皮膚を通して白色光を照射することにより、それらをｉｎ　ｓｉｔｕで架橋する（架橋は、ｒｈＣｏｌＭＡに対するｒｈＣｏｌＭＡである）こと。このアプローチにより、光重合によって固定する直前に、注入を容易にし、材料の形状をｉｎ　ｓｉｔｕで形を整えることが容易になる。皮下ラットモデルを使用して、細胞増殖、組織増強、および経時的なマトリックス分解の特徴を評価する。

【０５９７】

方法：このモデルでは、評価用のサンプル製剤成分（ＨＡまたはそのメタクリル化誘導体、およびメタクリレート化ｒｈコラーゲンと光開始剤）を、雄のＳｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットの背中に皮下注入し、注入部位を最大２０日間監視する。注射はほぼ同時に（直ちに次々に）、同じ位置で行われる。成分溶液は、架橋の前または同時または後に、ｉｎ　ｓｉｔｕでマッサージすることができる。皮下ラットモデルは、生体適合性、リフティング効果および持続性を推定するための最も単純なモデルであるため、選択される。さらに、Ｈｉｌｌｅｌらは、この特定のモデルの検証研究を公開した（Ｄｅｒｍａｔｏｌ　Ｓｕｒｇ　２０１２；３８：４７１－４７８）。

【０５９８】

動物は、各治療の前にケタミン／キシラジンで鎮静化される。動物の背中を剃り、剃った皮膚に、注入部位の印を付ける。各ラットに、２７．５～３２Ｇ針を使用して、背側平面上の離れた位置に、０．２ｍｌの製剤を、ラットあたり全部で６回注入する。

【０５９９】

製剤は、注入部位を白色光ＬＥＤトーチで２分間経皮照射することにより、注入後に架橋される。

【０６００】

研究期間全体を通して、全ての動物の罹患率と死亡率を１日に２回観察する。３日ごと（注射から０、１、４、７、１１、１４、１８、２１日後の時点）に、各ブレブの高さ、幅、長さをノギスで測定し、各ブレブの楕円体の体積［（４／３）（π）（１／２高さ）（１／２長さ）（１／２幅）］を計算する。

【０６０１】

動物を、例えば、限定されないが、治療から７、１４、２１日後の時点で安楽死させる。

【０６０２】

各安楽死の時点で、注入部位を露出さえ、肉眼で評価し、組織学的評価のためにブレブを集める。注入部位（ブレブを含む）は、その上にある皮膚と共に切除され、４％ホルマリンで固定され、パラフィンに包埋される。

【０６０３】

組織学

【０６０４】

スライドの調製

【０６０５】

パラフィンブロックは、約３～５ミクロンの厚さに切断され、スライドガラス上に置かれ、ヘマトキシリン＆エオシン（Ｈ＆Ｅ）およびマッソントリクロームで染色され、自動化された機械で覆われる。全てのスライドの組織学的評価は、光学顕微鏡（Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＢＸ６０、シリアル番号７Ｄ０４０３２）を使用して実行される。

【０６０６】

画像は、倍率４倍で撮影される。画像の取得は、病理学的変化と代表的な動物に対してのみ行われる。

【０６０７】

結果

【０６０８】

実施例２４で得られた結果と同様の結果が期待され、光硬化性皮膚充填剤の成分の別個の独立した注入は、例えば、製剤混合物と比較して成分の粘度が低下するため、注入の容易さを増加させ得る。

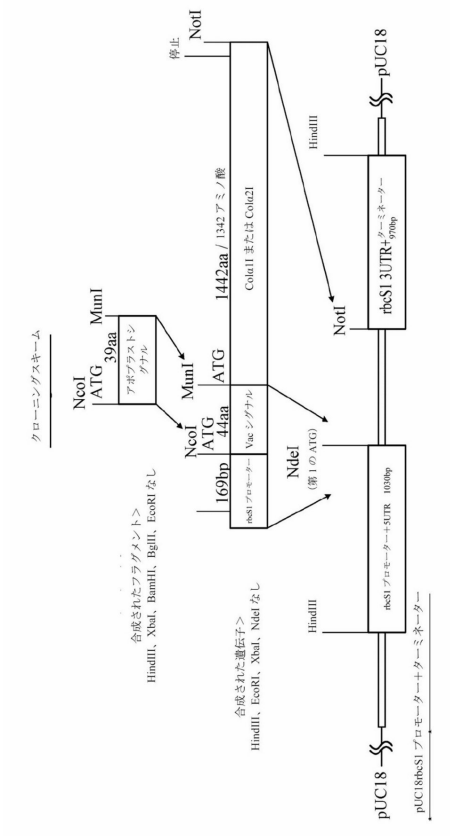
【０６０９】

細胞増殖促進足場を含む皮膚充填剤およびその使用を、その特定の実施形態と併せて説明してきたが、多くの代替、修正、および変形が当業者に明らかであることは明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の趣旨および広い範囲内にあるそのような代替、修正、および変形の全てを包含することが意図される。本明細書で言及される全ての出版物、特許、および特許出願、ならびにＧｅｎＢａｎｋ寄託番号は、各個々の出版物、特許、

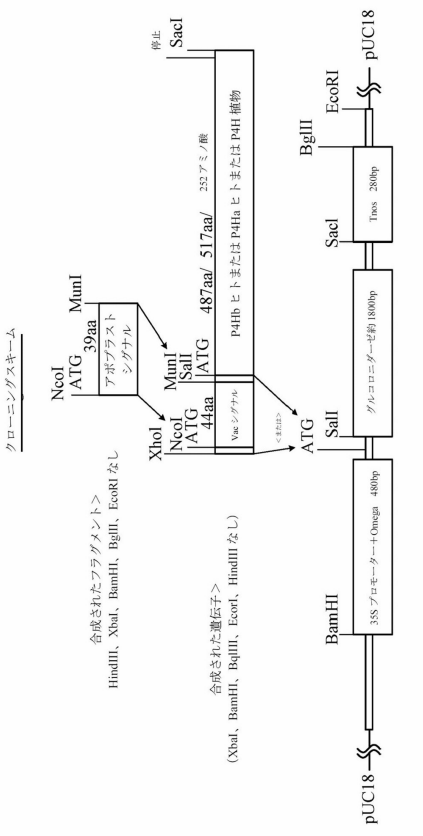
または特許出願、またはＧｅｎＢａｎｋ寄託番号が参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個別に示されるのと同程度に、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。さらに、本出願におけるいかなる参考文献の引用または識別も、そのような参考文献が先行技術として利用可能であるという承認として解釈されるべきではない。

【図面】

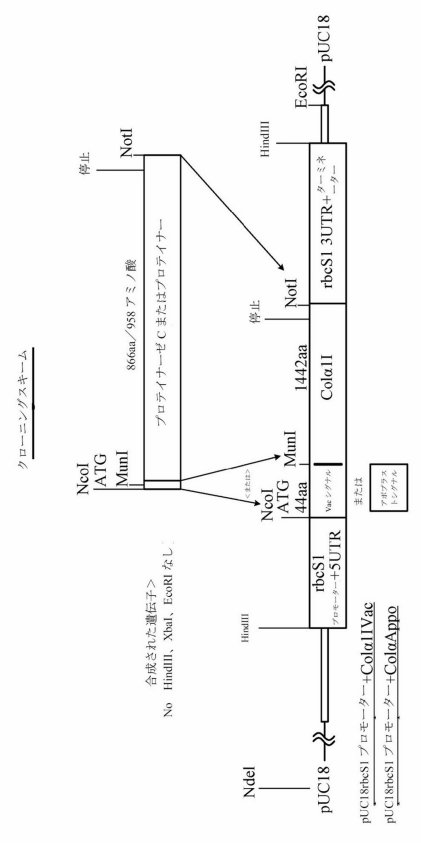
【図１Ａ】



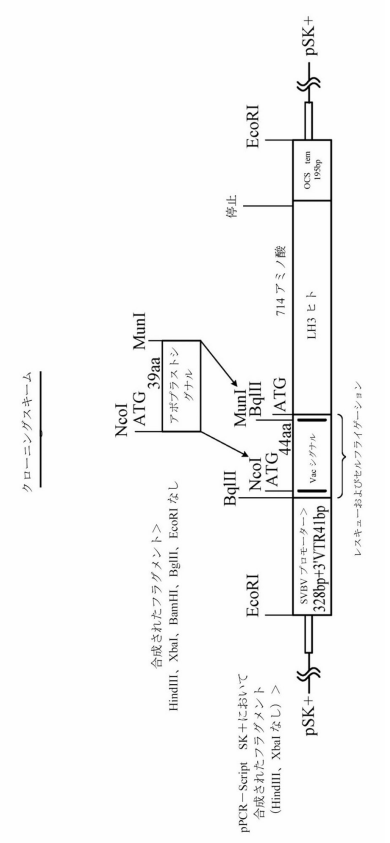
【図１Ｂ】



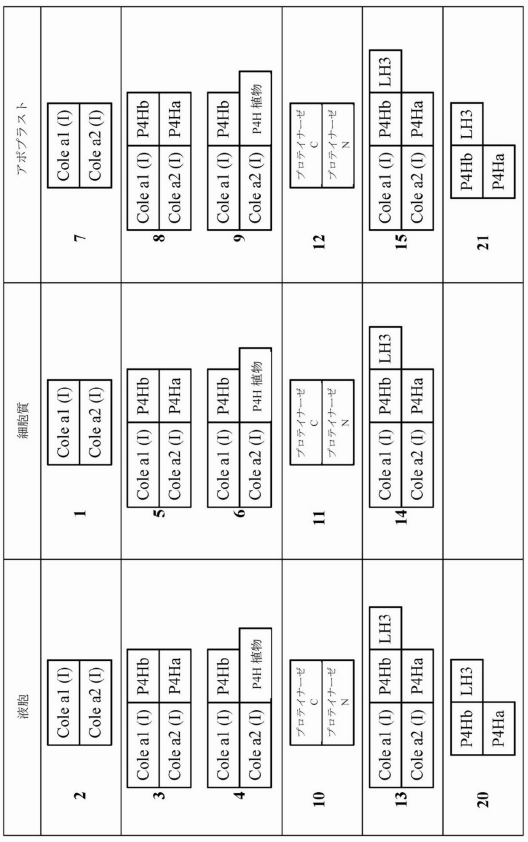
【図１Ｃ】


クローニングスキーム
NcoI
ATG
MunI
866aa／958 アミノ酸
プロテイナーゼ C またはプロテイナー
停止
NotI
合成された遺伝子>
No HindIII、XbaI、EcoRI なし
NcoI
ATG
44aa
MunI
1442aa
ColαII
停止
NotI
rbcS1 3UTR+ターミネーター
HindIII
EcoRI
pUC18
HindIII
rbcS1
プロモーター+5'UTR
Vae シグナル
または
NdeI
pUC18
pUC18rbcS1 プロモーター+ColαIIVac
pUC18rbcS1 プロモーター+ColαAppo

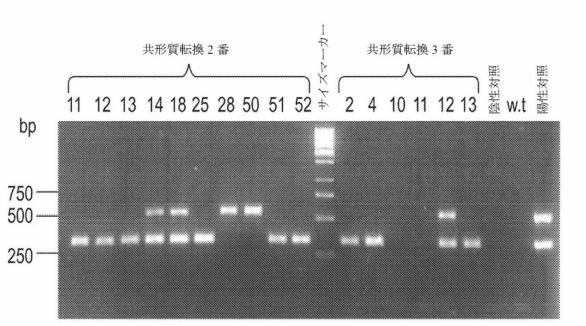
【図１Ｄ】


クローニングスキーム
pSK+
EcoRI
停止
NcoI
ATG
39aa
MunI
アポプラストシグナル
714 アミノ酸
LH3 ヒト
OCS term 198bp
BglII
MunI
NcoI
ATG
44aa
BglII
ATG
Vae シグナル
合成されたフラグメント>
HindIII、XbaI、BamHI、BglII、EcoRI なし
EcoRI
SVBV プロモーター>
328bp+3'VTR41bp
レスキューおよびセルフライゲーション
pPCR−Script SK+において
合成されたフラグメント
(HindIII、XbaI なし) >
pSK+

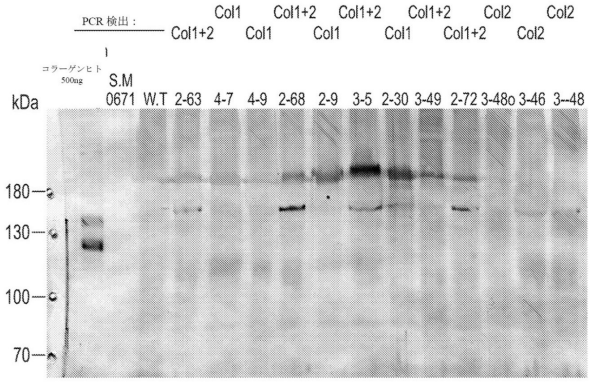
【図２】


液胞
細胞質
アポプラスト
2 Cole a1 (I) Cole a2 (I)
1 Cole a1 (I) Cole a2 (I)
7 Cole a1 (I) Cole a2 (I)
3 Cole a1 (I) Cole a2 (I) P4Hb P4Ha
5 Cole a1 (I) Cole a2 (I) P4Hb P4Ha
8 Cole a1 (I) Cole a2 (I) P4Hb P4Ha
4 Cole a1 (I) Cole a2 (I) P4Hb P4H 補物
6 Cole a1 (I) Cole a2 (I) P4Hb P4H 補物
9 Cole a1 (I) Cole a2 (I) P4Hb P4H 補物
10 プロテイナーゼ C プロテイナーゼ N
11 プロテイナーゼ C プロテイナーゼ N
12 プロテイナーゼ C プロテイナーゼ N
13 Cole a1 (I) Cole a2 (I) P4Hb P4Ha LH3
14 Cole a1 (I) Cole a2 (I) P4Hb P4Ha LH3
15 Cole a1 (I) Cole a2 (I) P4Hb P4Ha LH3
20 P4Hb P4Ha LH3
21 P4Hb P4Ha LH3

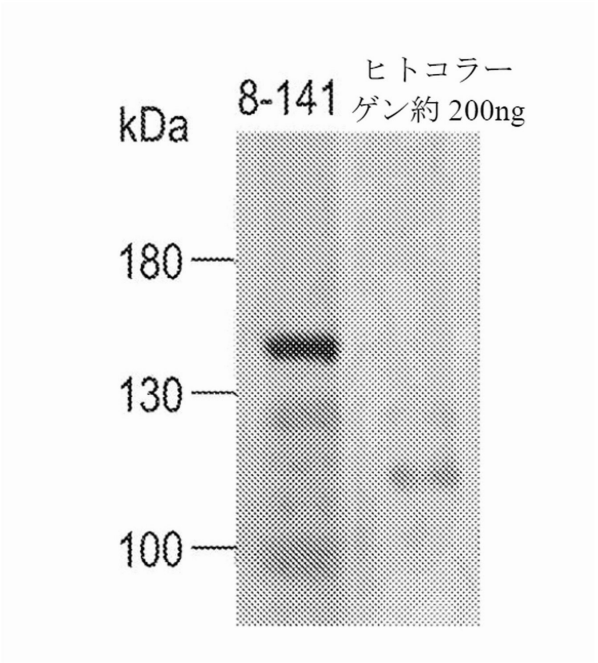
【図３】


共形質転換 2 番
共形質転換 3 番
11 12 13 14 18 25 28 50 51 52
サイズマーカー
2 4 10 11 12 13
陰性対照
w.t
陽性対照
bp
750
500
250

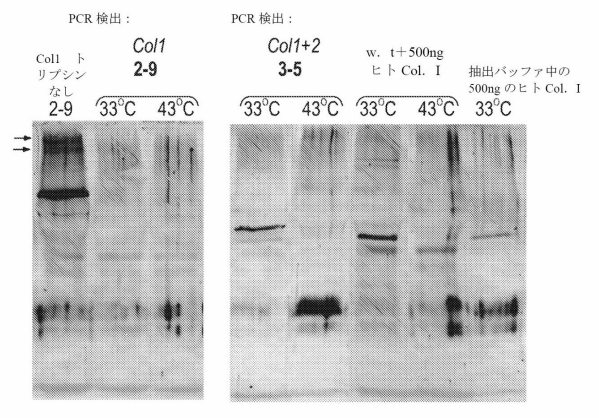
【図４】


PCR 検出：
Col1+2
Col1
Col1+2
Col1
Col1+2
Col1
Col1+2
Col1+2
Col2
Col2
Col2
コラーゲンヒト 500ng
S.M
0671
W.T
2-63
4-7
4-9
2-68
2-9
3-5
2-30
3-49
2-72
3-48o
3-46
3--48
kDa
180
130
100
70

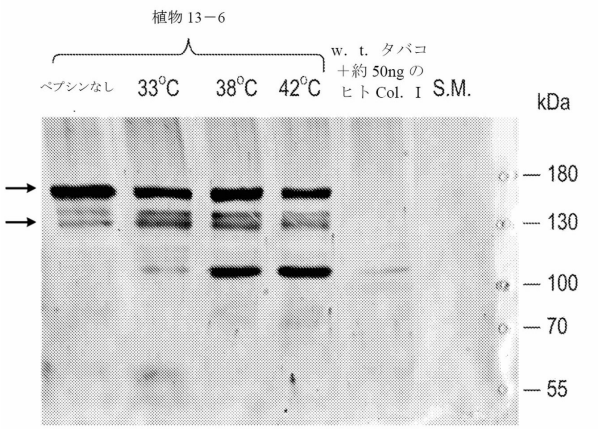
【図５】


8-141
ヒトコラーゲン約 200ng
kDa
180
130
100

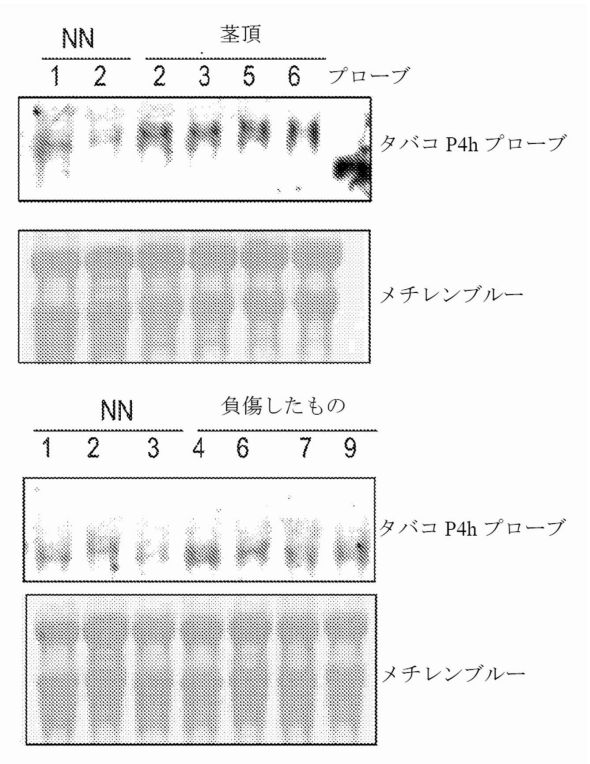
【図６Ａ】


PCR 検出：
PCR 検出：
Col1 トリプシンなし
Col1
2-9
Col1+2
3-5
w. t＋500ng ヒト Col. I
抽出バッファ中の 500ng のヒト Col. I
2-9
33°C
43°C
33°C
43°C
33°C
43°C
33°C

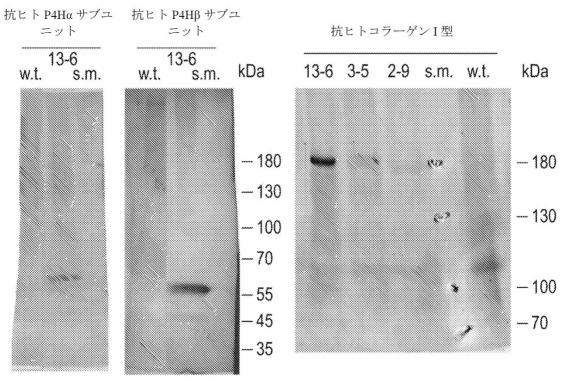
【図６Ｂ】


植物 13－6
ペプシンなし
33°C
38°C
42°C
w. t. タバコ＋約 50ng のヒト Col. I
S.M.
kDa
180
130
100
70
55

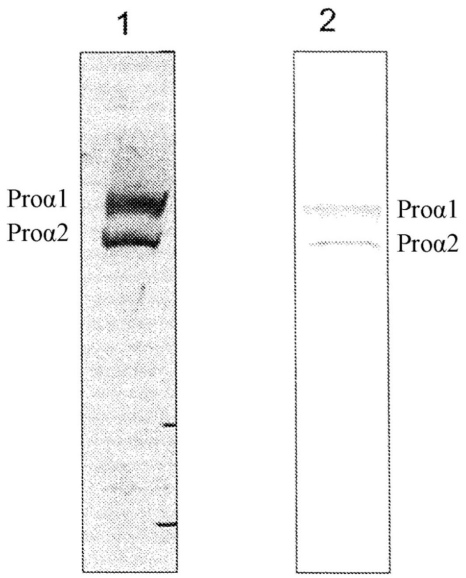
【図７】


NN
茎頂
1 2 2 3 5 6 プローブ
タバコ P4h プローブ
メチレンブルー
NN
負傷したもの
1 2 3 4 6 7 9
タバコ P4h プローブ
メチレンブルー

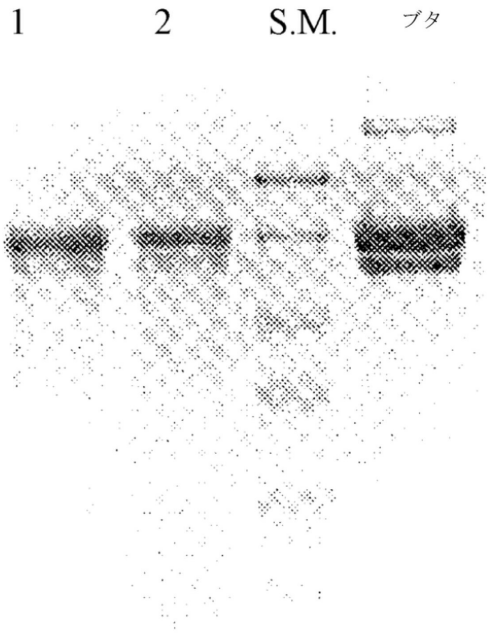
【図８】


抗ヒト P4Hα サブユニット
抗ヒト P4Hβ サブユニット
抗ヒトコラーゲンⅠ型
13-6
w.t. s.m.
kDa
180
130
100
70
55
45
35
13-6 3-5 2-9 s.m. w.t.

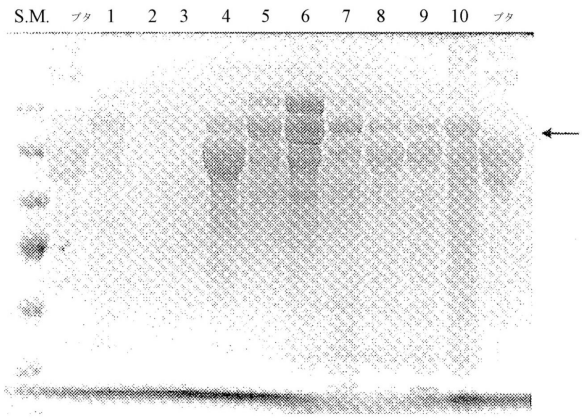
【図９】


1
2
Proα1
Proα2
Proα1
Proα2

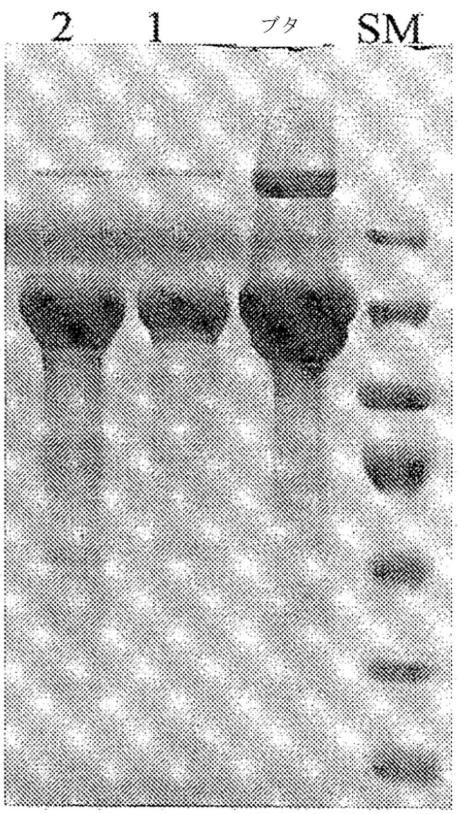
【図１０】


1
2
S.M.
ブタ

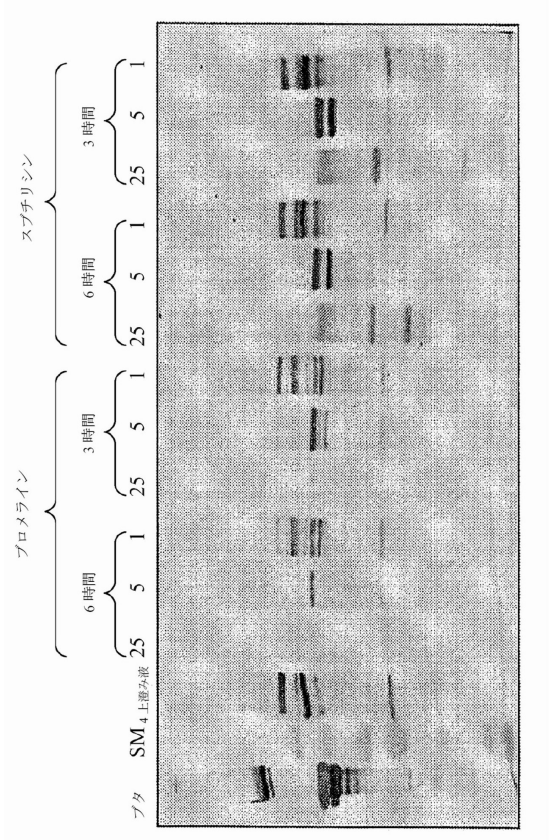
【図１１】



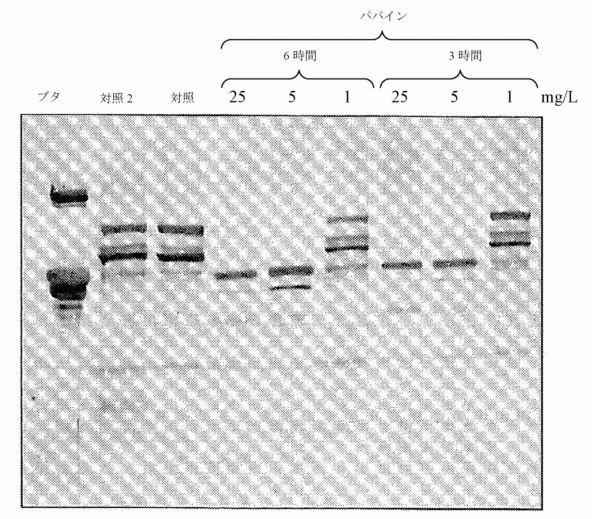
【図１２】



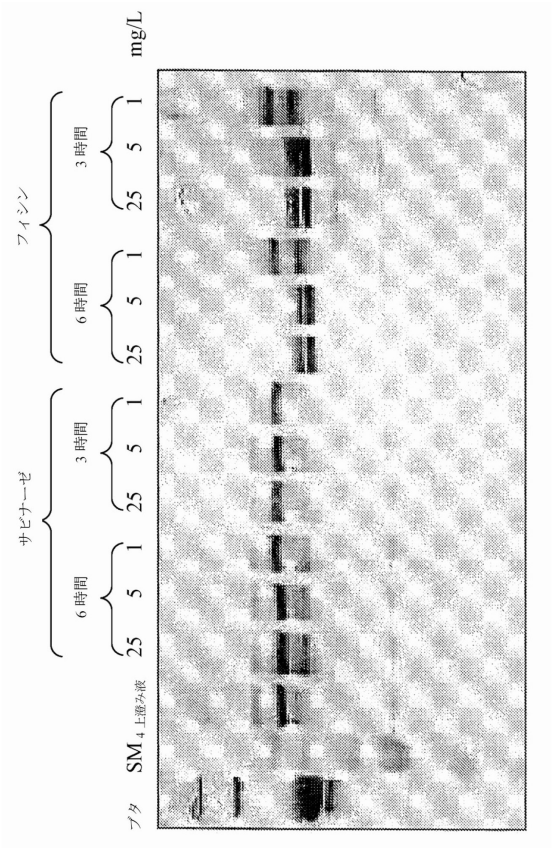
【図１３】



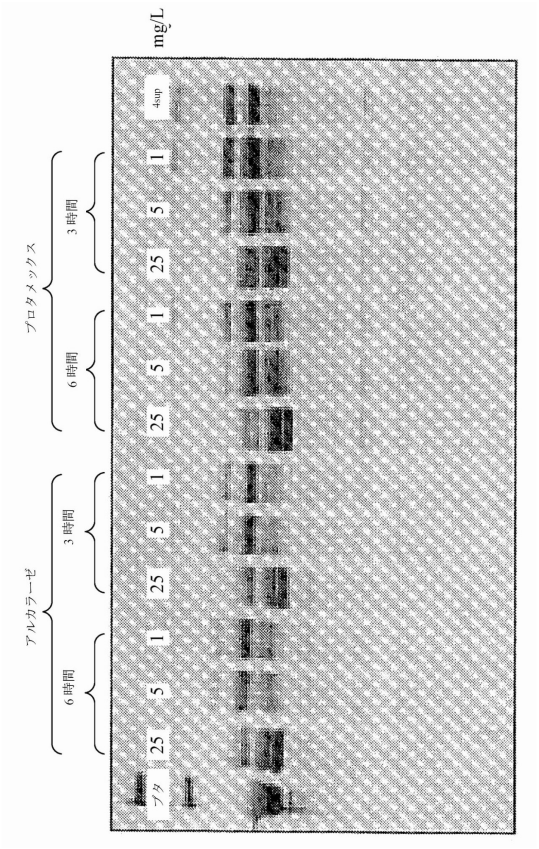
【図１４】



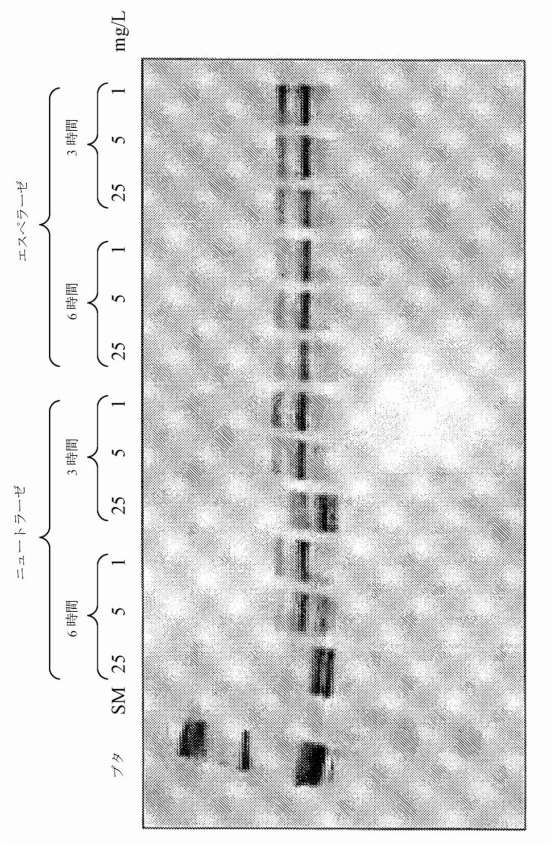
【図１５】



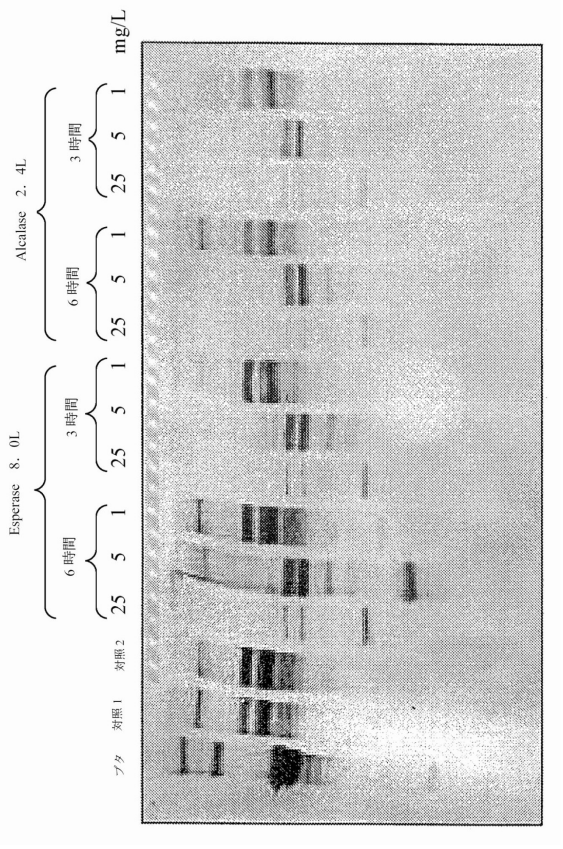
【図１６】



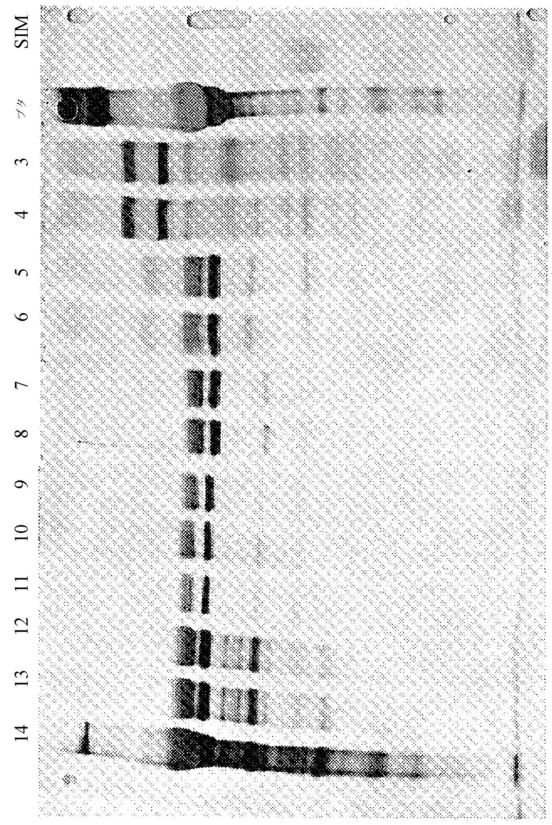
【図１７】



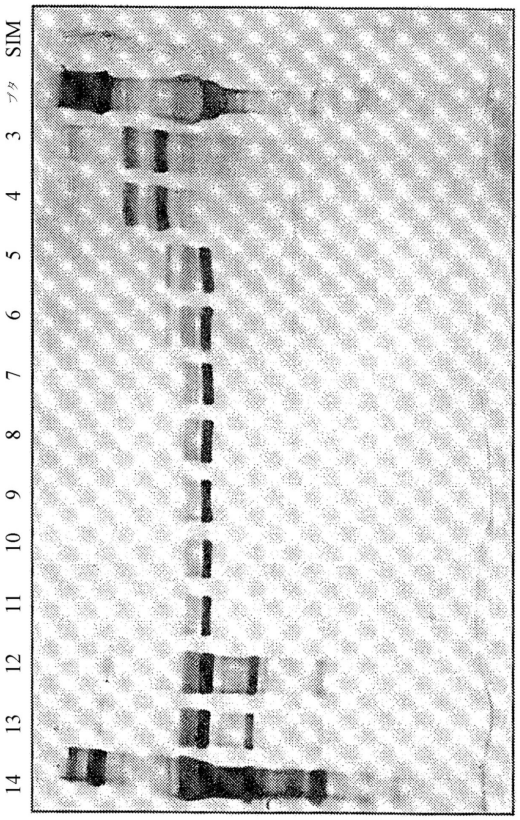
【図１８】



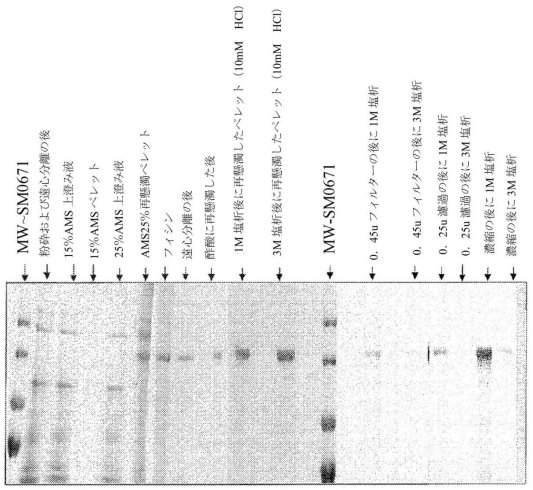
【図１９】



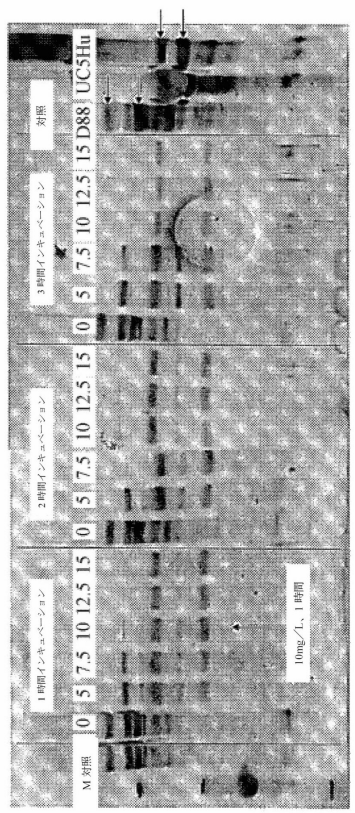
【図２０】



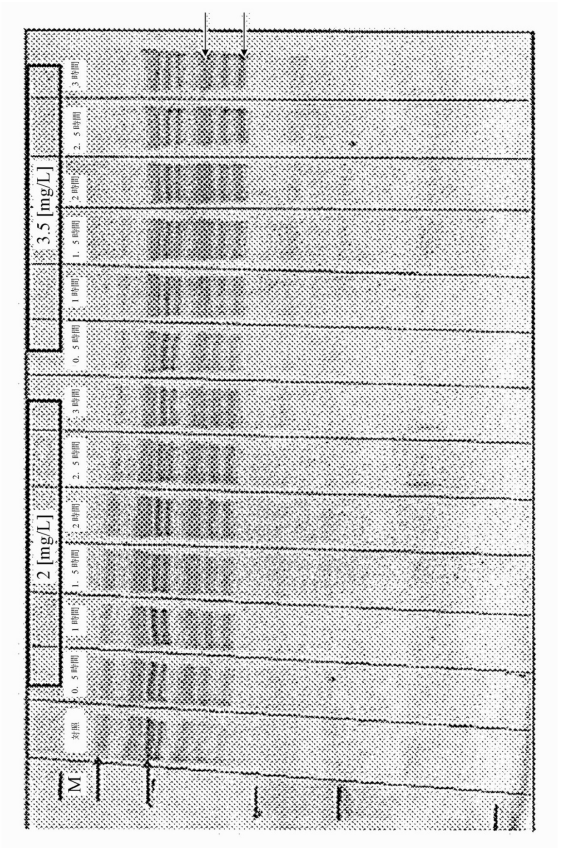
【図２１】



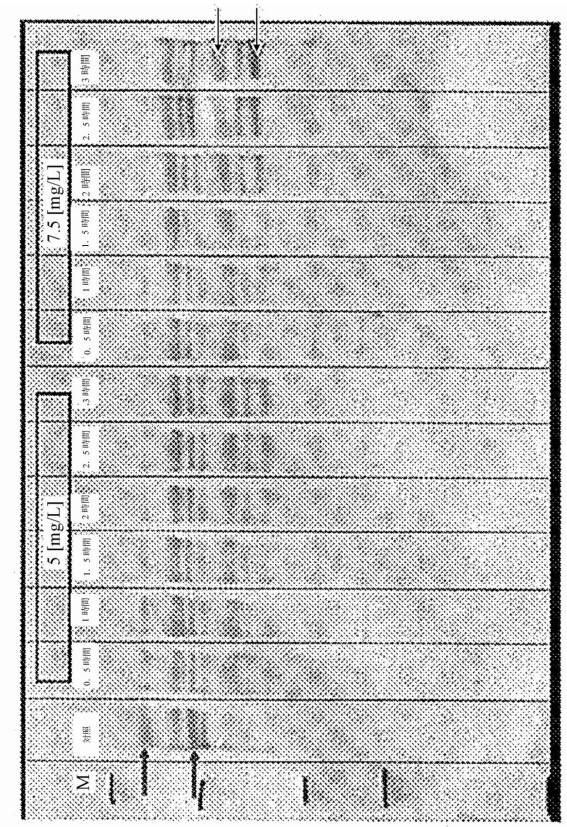
【図２２】



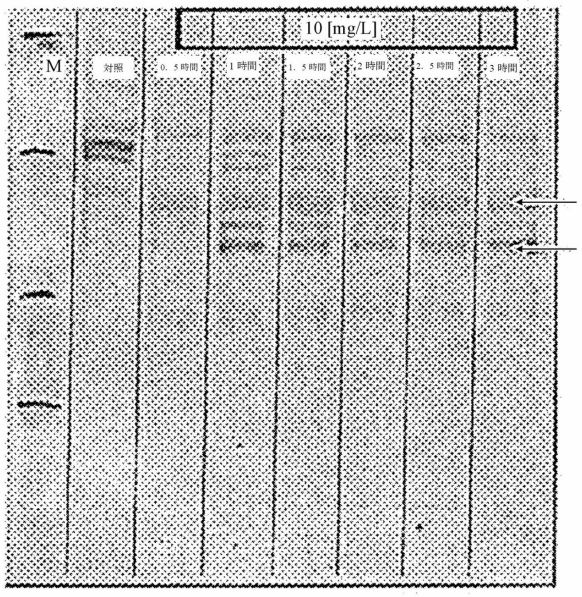
【図２３Ａ】



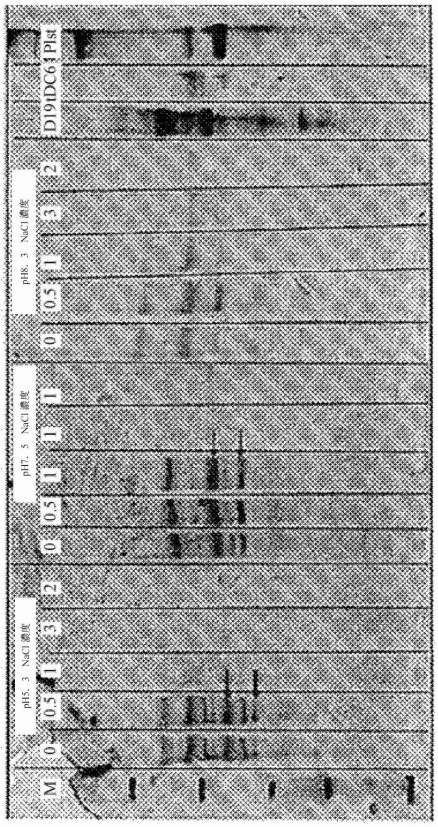
【図２３Ｂ】



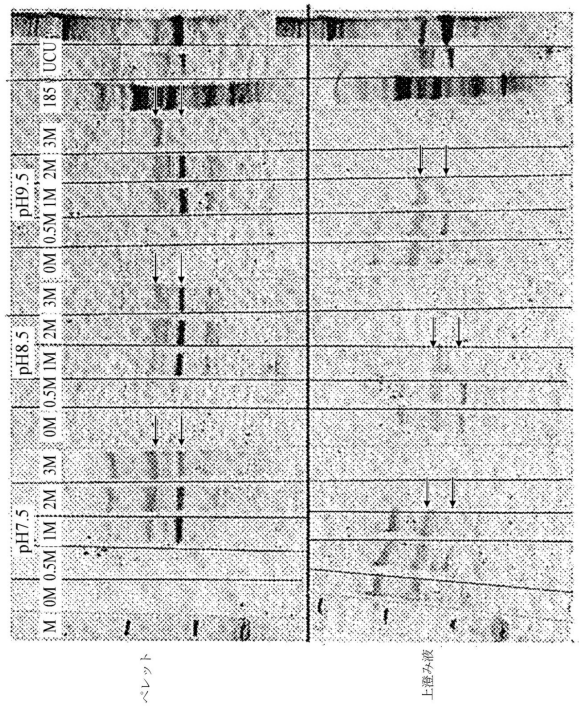
【図２３Ｃ】



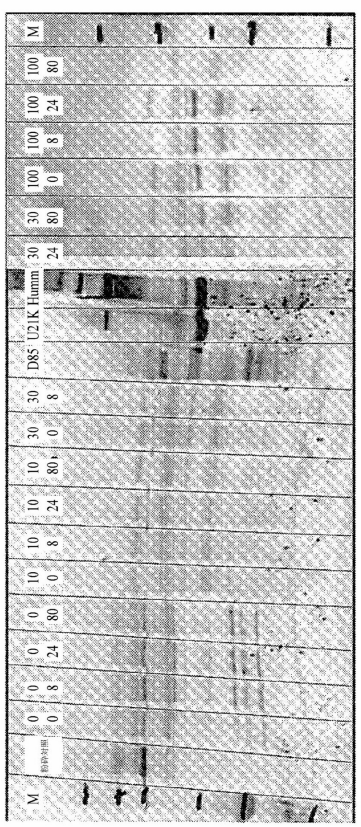
【図２４Ａ】



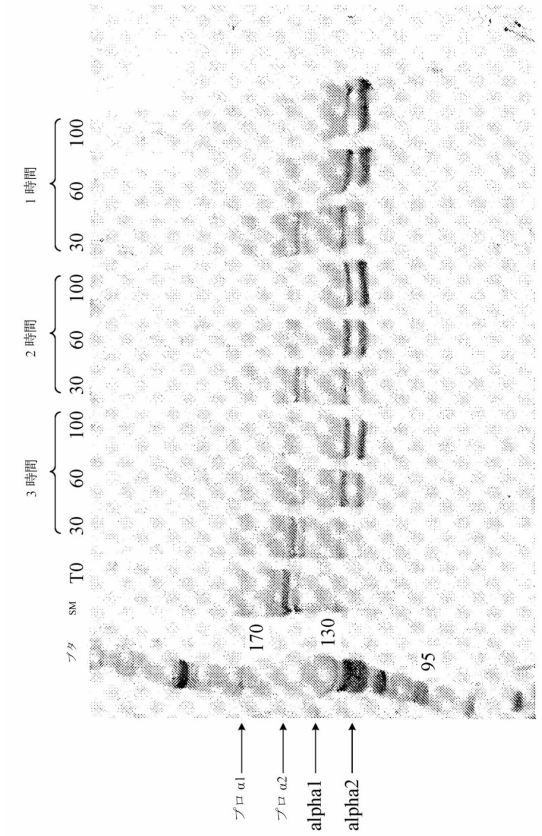
【図２４Ｂ】



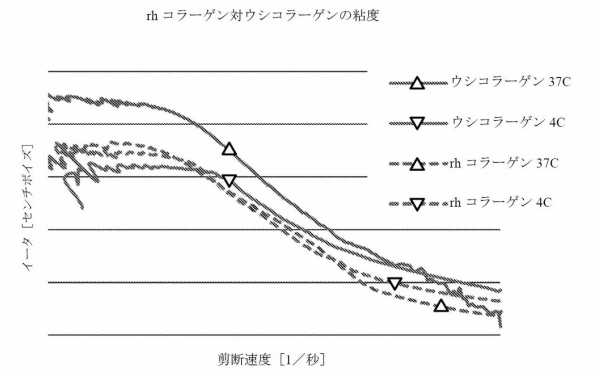
【図２５】



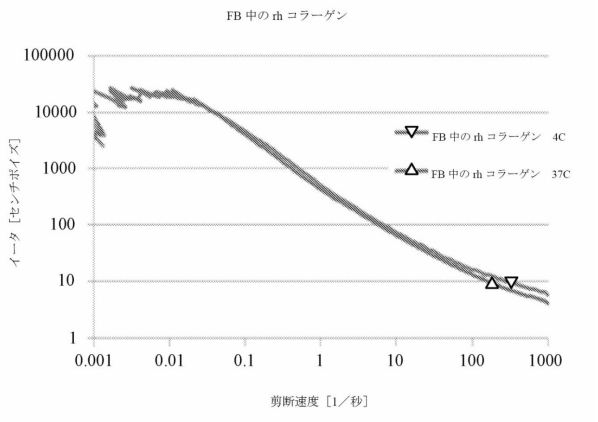
【図２６】



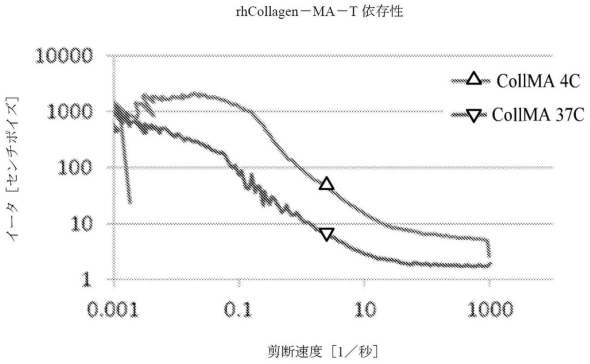
【図２７】



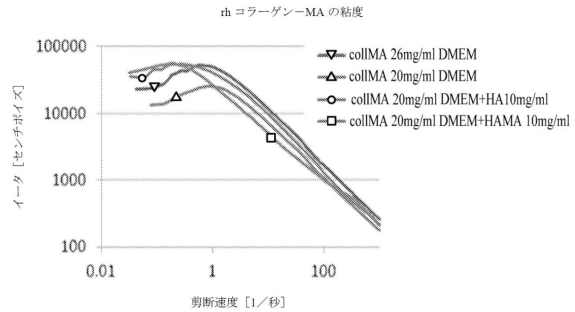
【図２８】



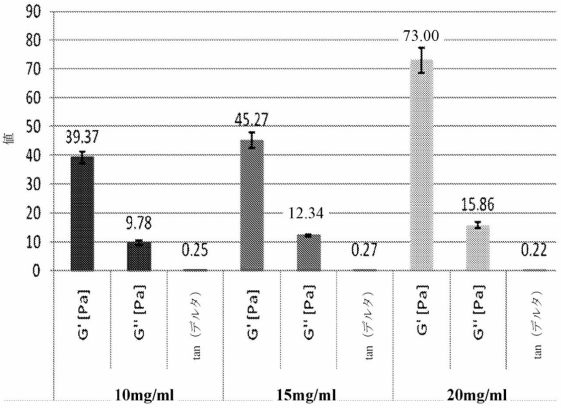
【図２９】

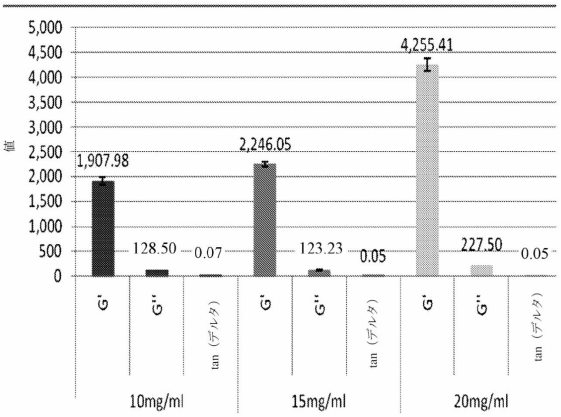


【図３０】

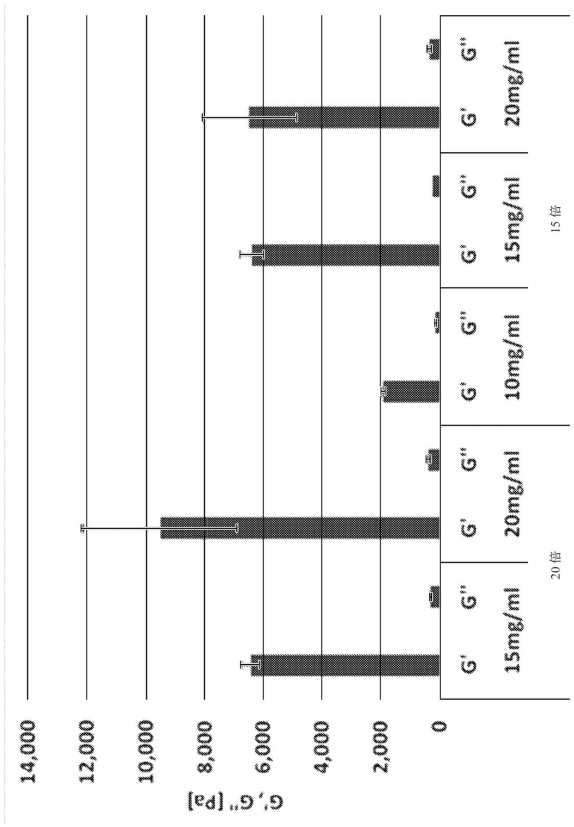


【図３１】

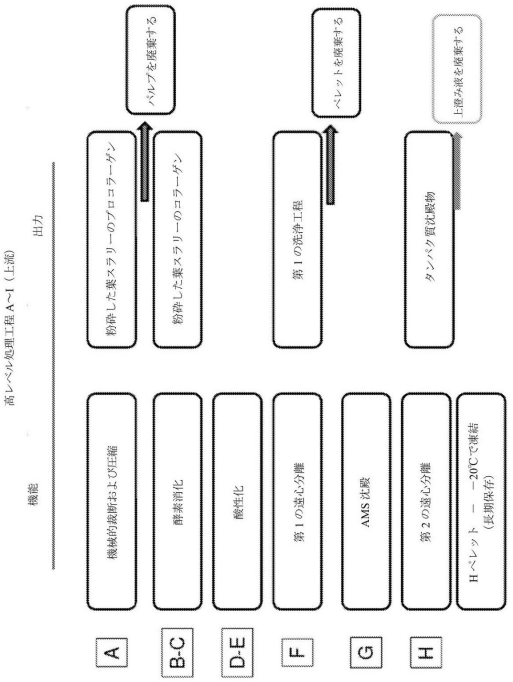




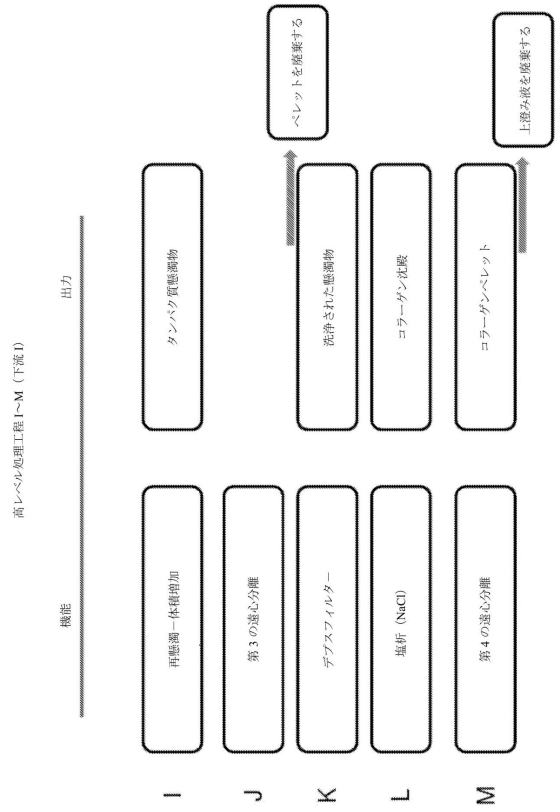
【図３２】



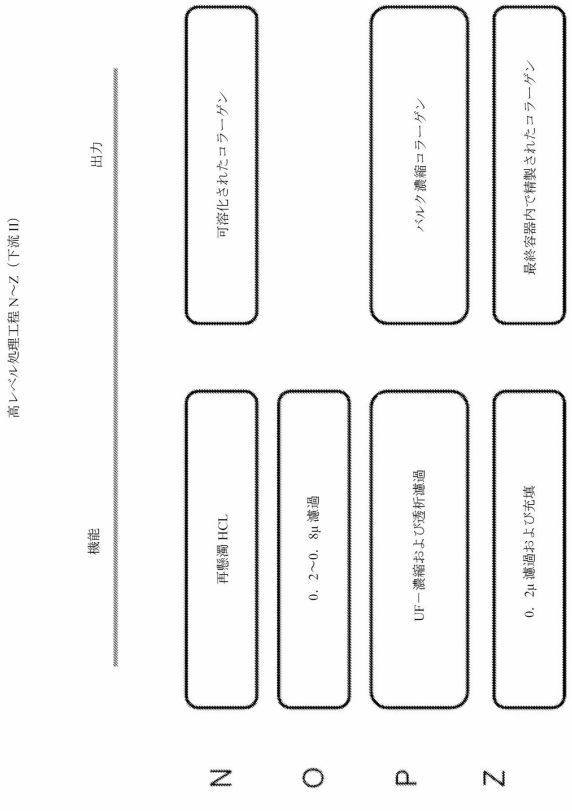
【図３３Ａ】



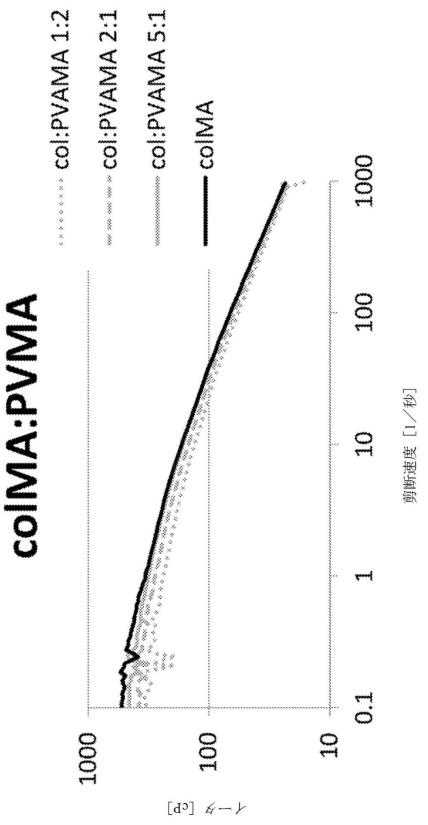
【図３３Ｂ】



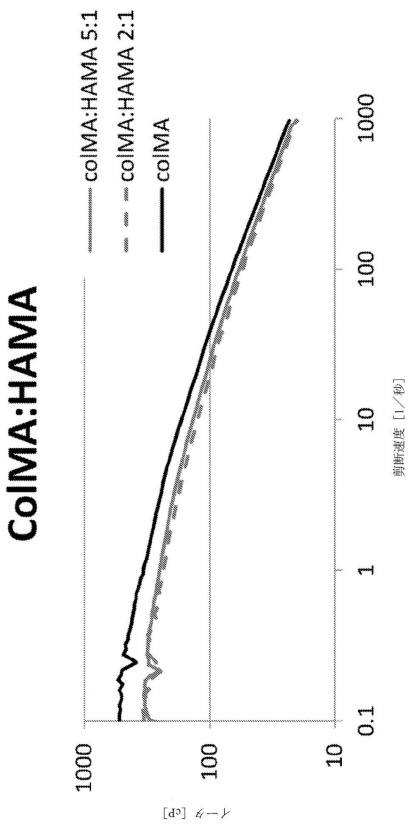
【図３３Ｃ】



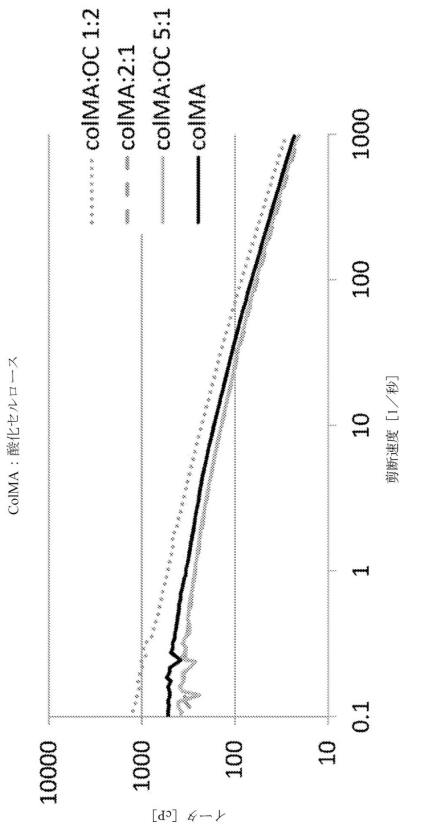
【図３４】



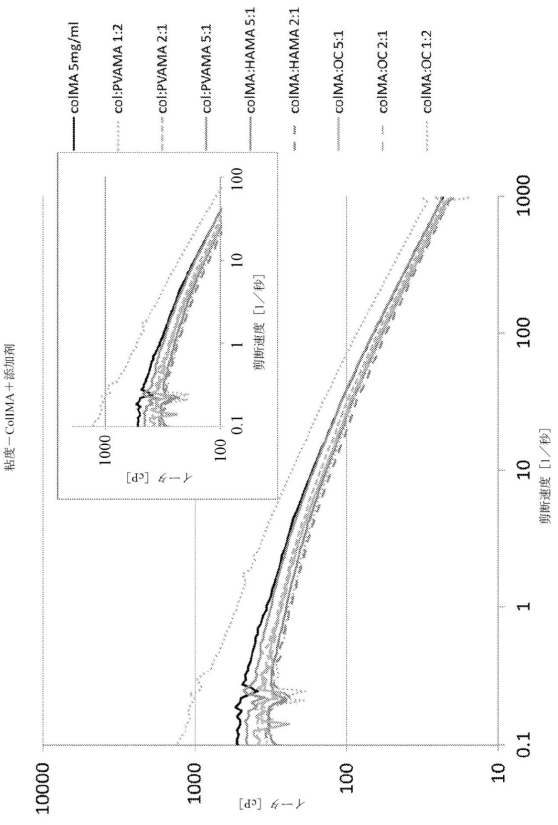
【図３５】



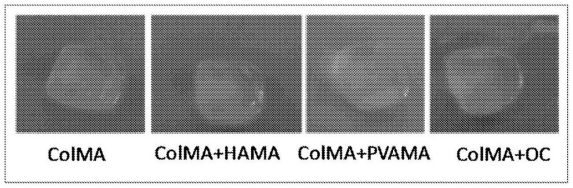
【図３６】



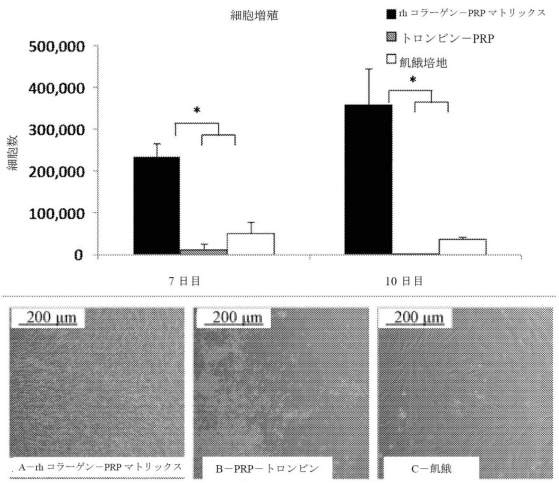
【図３７】



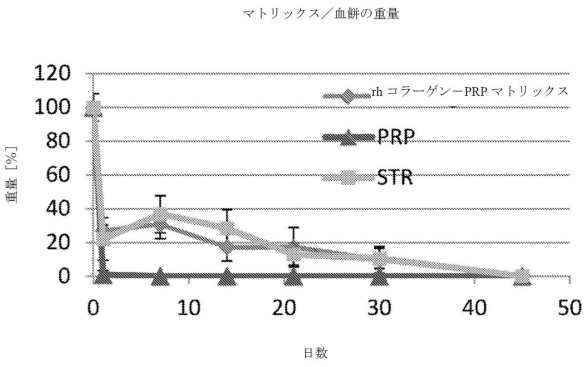
【図３８】



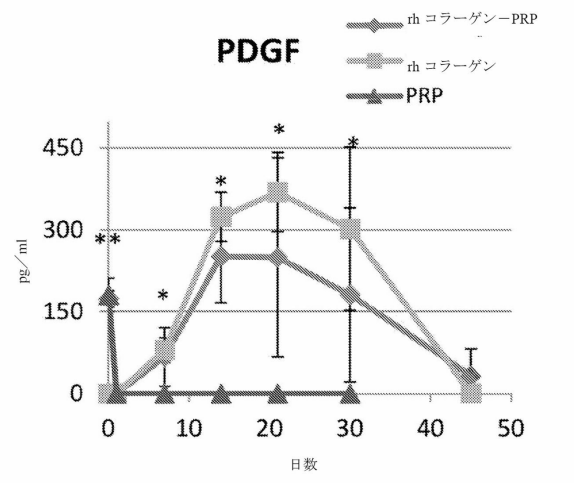
【図３９】



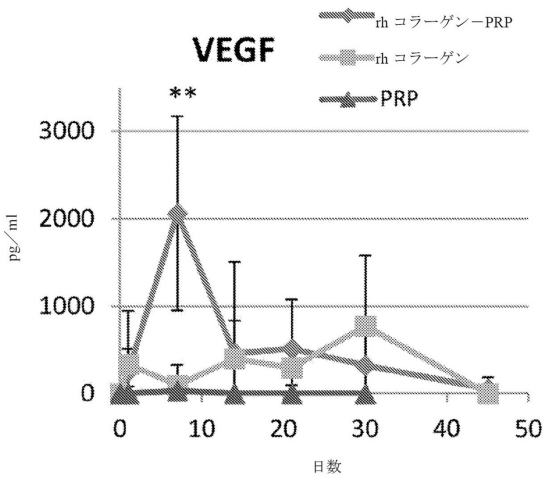
【図４０】



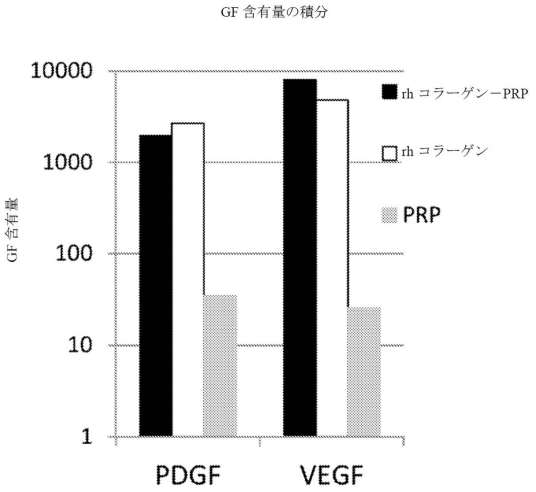
【図４１Ａ】



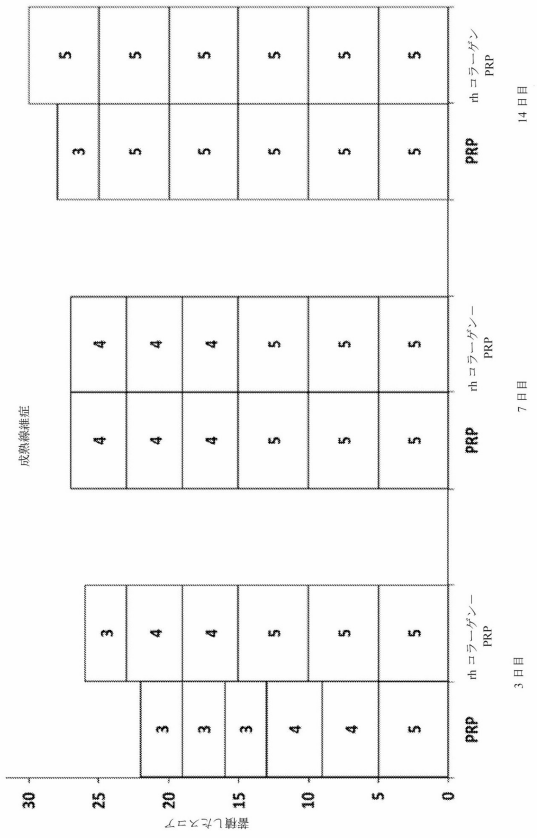
【図４１Ｂ】



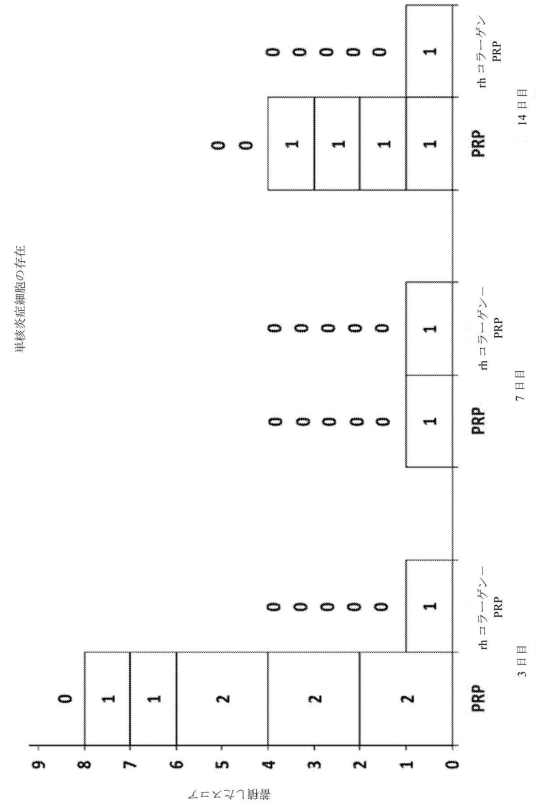
【図４２】



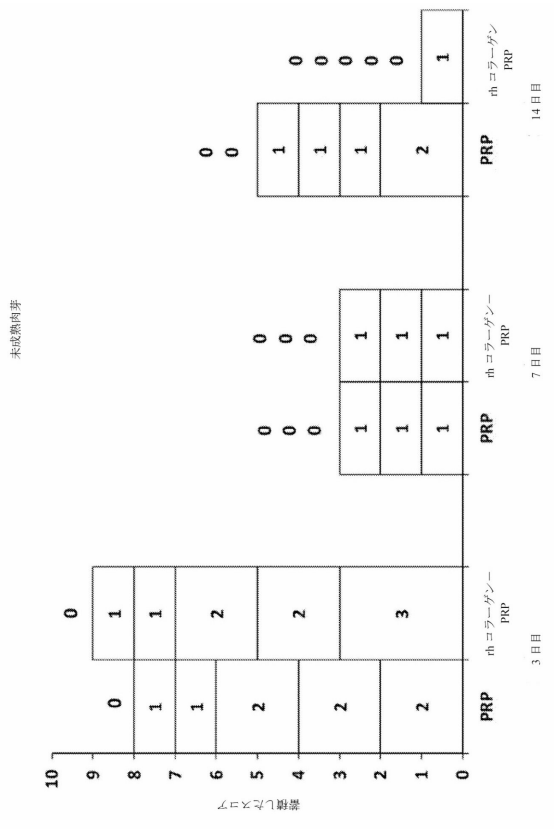
【図４３Ａ】



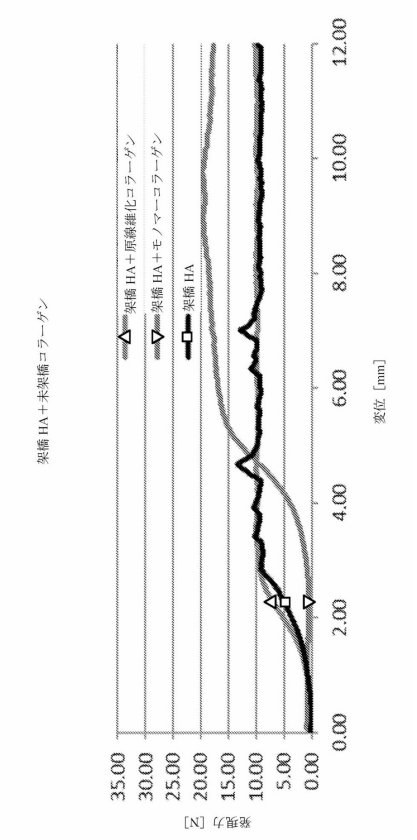
【図４３Ｂ】



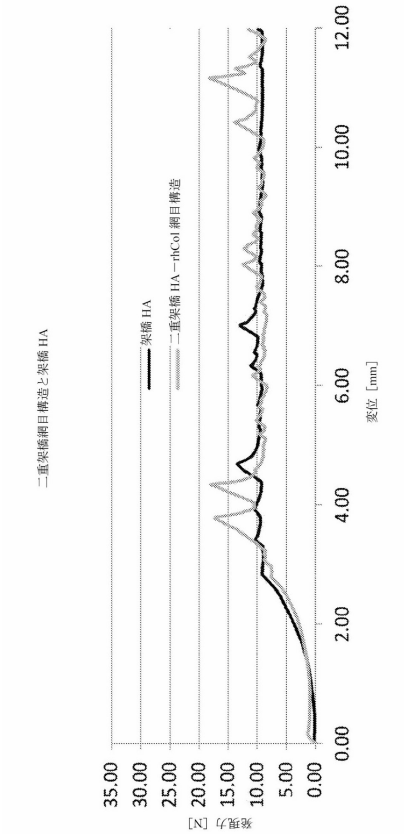
【図４３Ｃ】



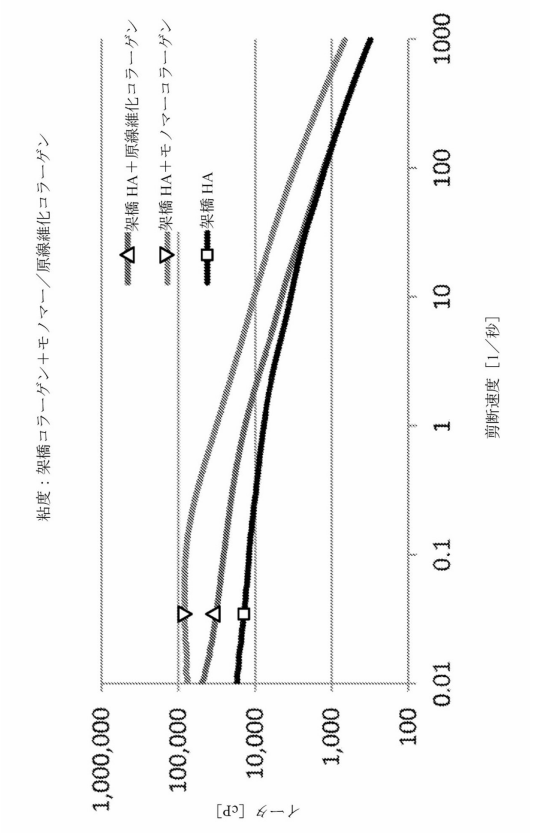
【図４４】



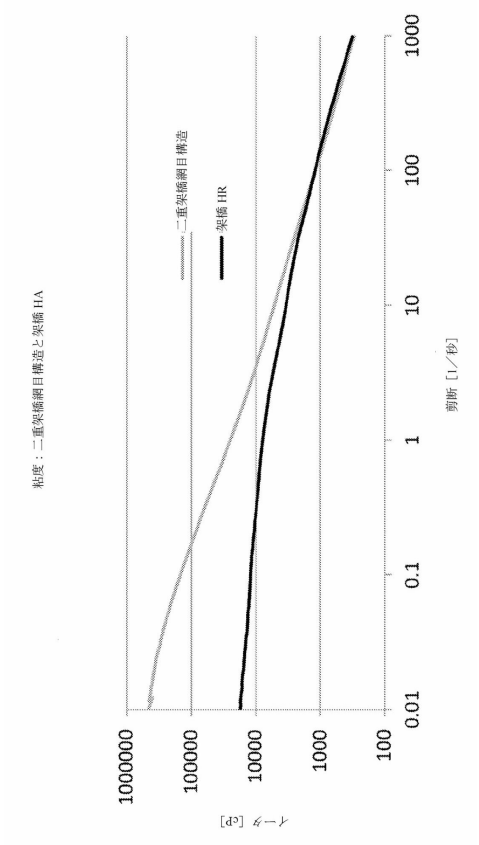
【図４５】



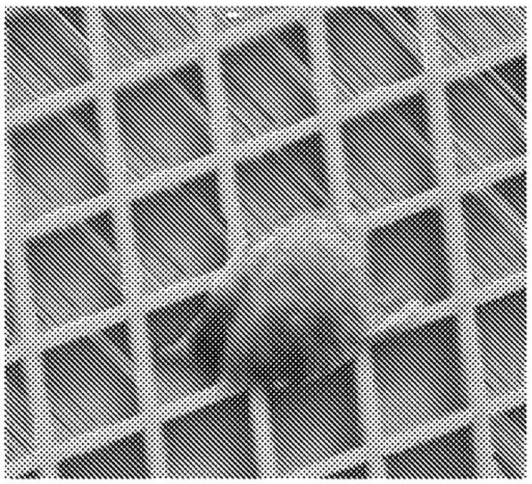
【図４６】



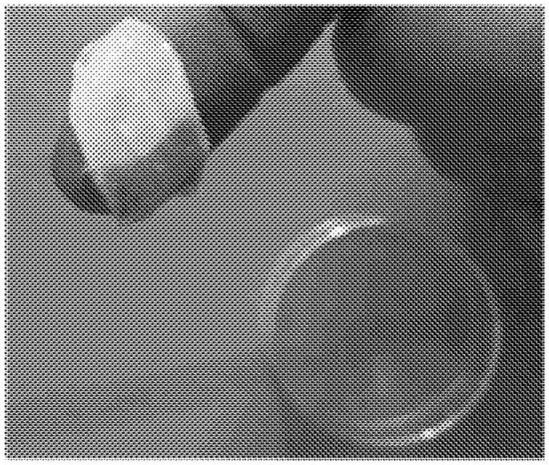
【図４７】



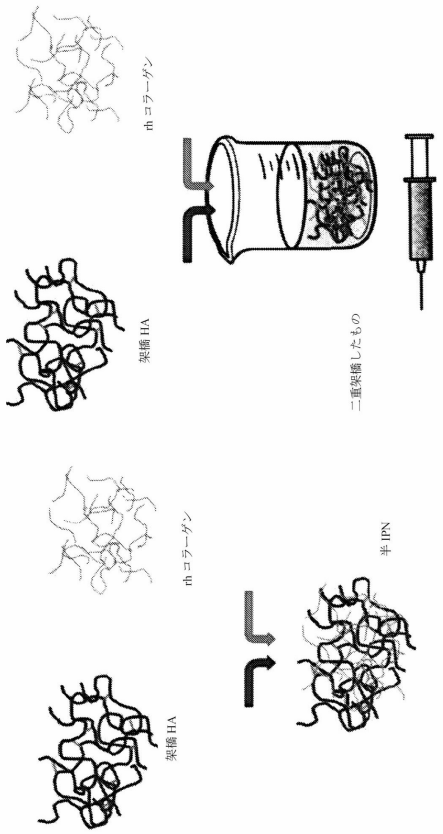
【図４８Ａ】



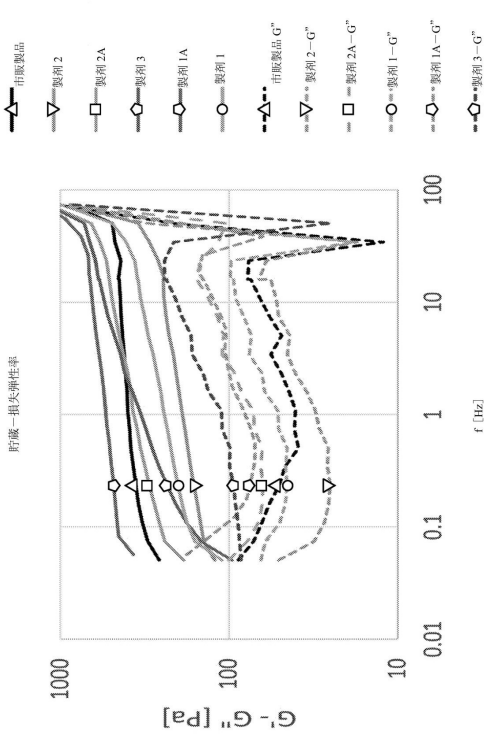
【図４８Ｂ】



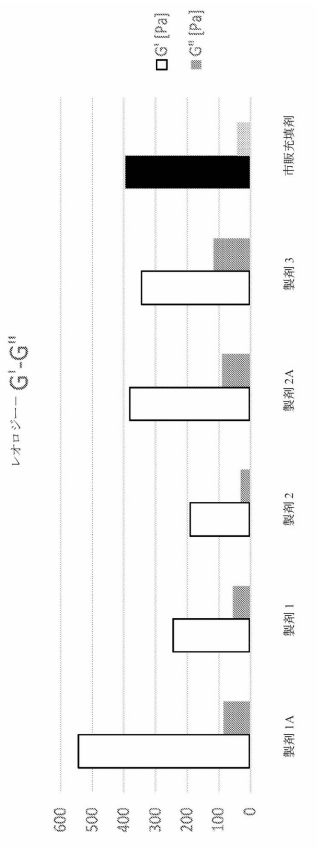
【図４９】



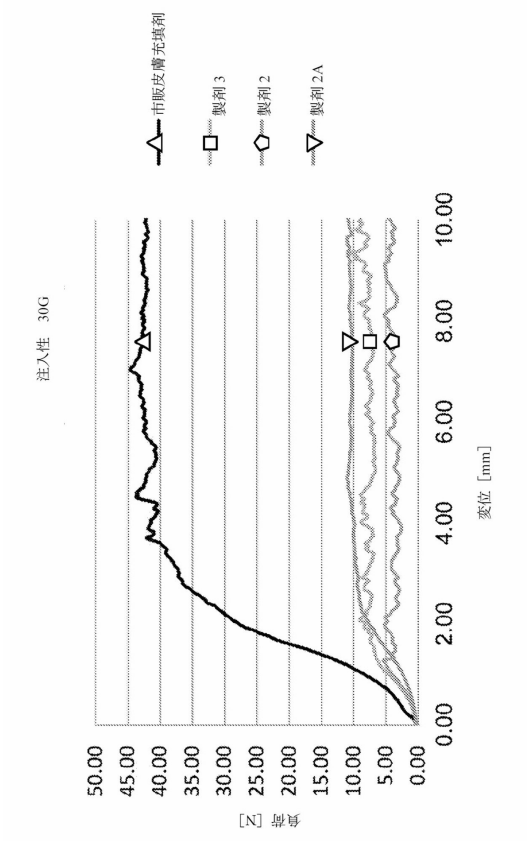
【図５０】



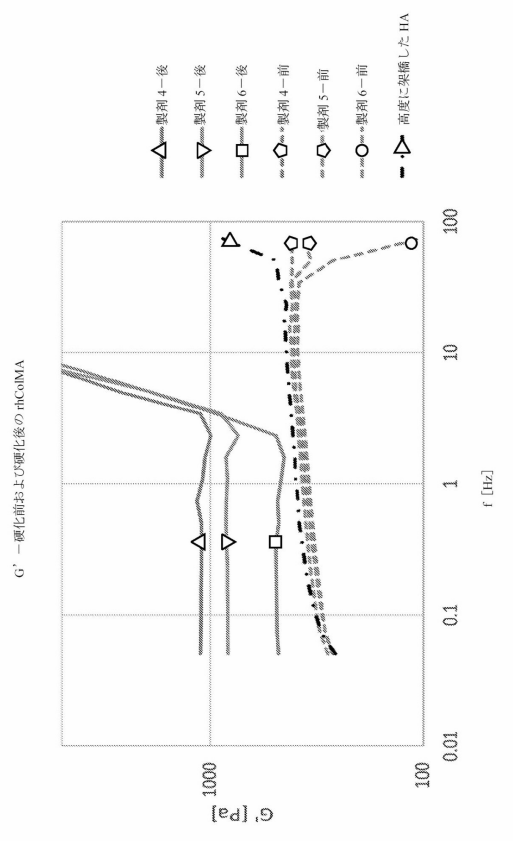
【図５１】



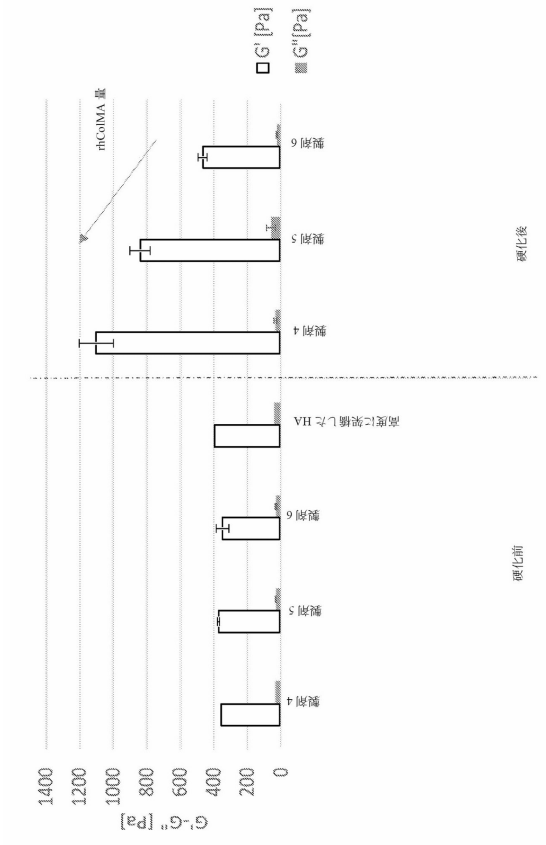
【図５２】



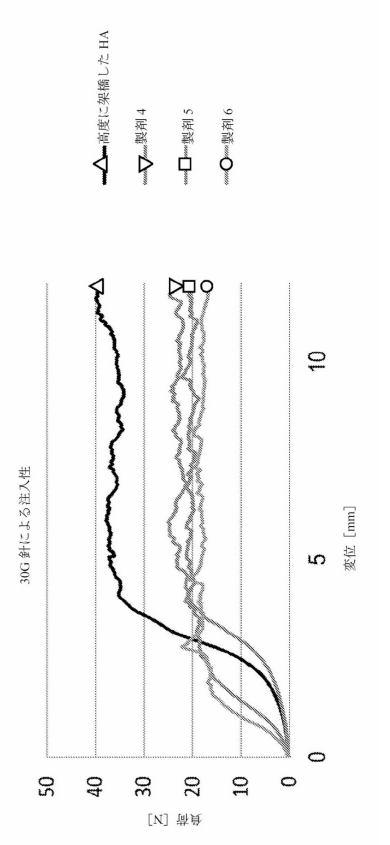
【図５３】



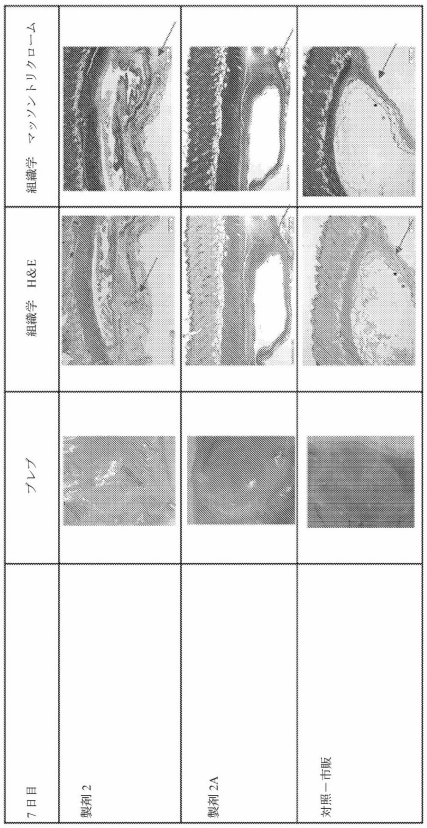
【図５４】



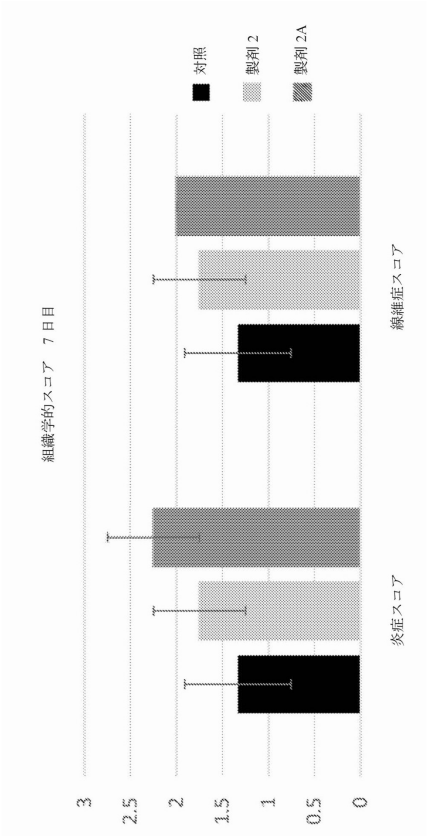
【図５５】



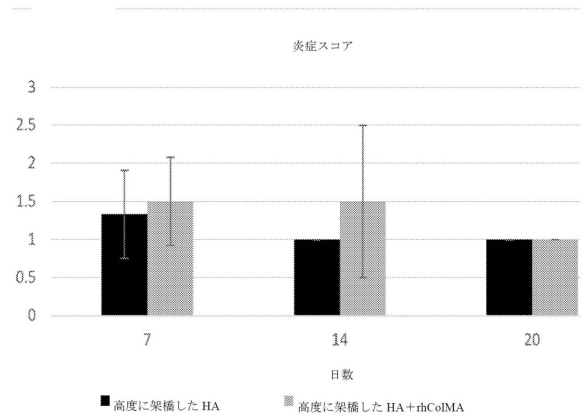
【図５６】



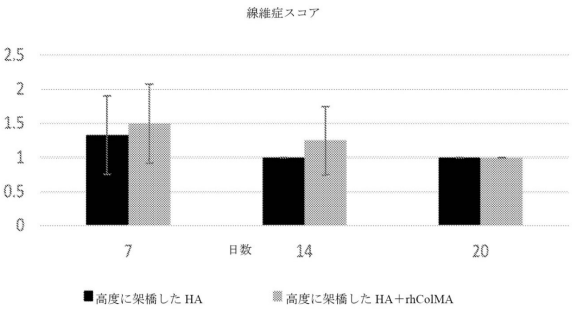
【図５７】



【図５８】



【図５９】



【配列表】

0007316735000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
A61L	*27/60*	*(2006.01)*	A61L	27/60	
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	15/12	ZNA
C07K	*14/78*	*(2006.01)*	C07K	14/78	

(72)発明者 セロー マクヌウズ、ジャスミン
イスラエル国テルアビブ６４５８４０７・ラクヘル ストリート ７
(72)発明者 ザルカ、レヴィタル
イスラエル国マズケレット バティア７６８４４０８・ハーシュコビッツ ストリート ８／３

審査官 内藤 康彰

(56)参考文献 特表２００９－５０７１０３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１５－５２９２６８（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００９／００９３７５５（ＵＳ，Ａ１）
特表２００８－５１４２２５（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５０７５７３（ＪＰ，Ａ）
SHOSEYOV, O. et al，Human collagen produced in plants，Bioengineered，2014年，Vol,5:1，pp.49-52
Tissue Engineering: Part A，2013年，Vol.19, No.13 and 14，pp.1507-1518

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｌ １５／００－３３／１８