

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5144876号
(P5144876)

(45) 発行日 平成25年2月13日 (2013. 2. 13)

(24) 登録日 平成24年11月30日 (2012. 11. 30)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 38/22 (2006. 01)	A 6 1 K 37/24	
A 6 1 L 27/00 (2006. 01)	A 6 1 L 27/00	Z
A 6 1 P 1/16 (2006. 01)	A 6 1 P 1/16	

請求項の数 10 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2004-514806 (P2004-514806)	(73) 特許権者	509128568
(86) (22) 出願日	平成15年6月20日 (2003. 6. 20)		バーダー、アウグスティヌス
(65) 公表番号	特表2005-533800 (P2005-533800A)		ドイツ、O 4 6 6 8 パーテンシュタイン
(43) 公表日	平成17年11月10日 (2005. 11. 10)		オーター クリッガー、クランケンハウ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/006509		スシュトラーセ 7
(87) 国際公開番号	W02004/001023	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成15年12月31日 (2003. 12. 31)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成18年5月29日 (2006. 5. 29)	(74) 代理人	100062409
審判番号	不服2010-11119 (P2010-11119/J1)		弁理士 安村 高明
審判請求日	平成22年5月24日 (2010. 5. 24)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	10227611.0		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成14年6月20日 (2002. 6. 20)	(72) 発明者	バーダー、アウグスティヌス
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ国 3 1 2 7 5 イメンゼン、ヒ
(31) 優先権主張番号	10234204.0		ンター デン ランゲン ハーフエン 1
(32) 優先日	平成14年7月26日 (2002. 7. 26)		6
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増殖因子を用いて、および生物学的マトリクスあるいは支持構造を用いて細胞を増殖および分化する方法およびデバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における肝臓再生を促進するための薬剤を製造するための、E P Oの使用であって、肝臓の切除あるいは部分的切除に使用されることを特徴とし、E P Oの全身的あるいは局部的投与に使用されることを特徴とし、構造的増殖を先導し、終了し、あるいは構造化するための局所的支持構造の使用であることを特徴とする、使用。

【請求項 2】

肝臓柔組織の再生に使用されることを特徴とする、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

処置されない肝臓と比べて有意な構造的増殖を示すことを特徴とする、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 4】

前記患者は慢性または急性の肝障害を有する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

前記慢性肝障害は、肝炎、肝硬変および線維症からなる群より選択される、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

被験体における肝臓再生を促進するための、E P Oを含む組成物であって、肝臓の切除あるいは部分的切除に使用されることを特徴とし、E P Oの全身的あるいは局部的投与に

10

20

使用されることを特徴とし、構造的増殖を先導し、終了し、あるいは構造化するための局所的支持構造の使用であることを特徴とする、組成物。

【請求項 7】

肝臓柔組織の再生に使用されることを特徴とする、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

処置されない肝臓と比べて有意な構造的増殖を示すことを特徴とする、請求項 6 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記患者は慢性または急性の肝障害を有する、請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記慢性肝障害は、肝炎、肝硬変および線維症からなる群より選択される、請求項 9 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、初代分化細胞の培養のために分離された形状においての少なくとも 1 つの増殖因子の使用方法、および、局部的に特定のおよび/または管理された、成体細胞の増殖、ならびに/または骨、組織および/もしくは内分泌臓器の再生のために、分離された形状においての少なくとも 1 つの増殖因子の使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

個体発生、すなわち個別生物体の発生において、細胞数に数値的に関連する基本的な構造プロセスを開始可能な増殖因子の発現が存在する。成長生物体においては、もはやこれら増殖因子は発現しないため、再生による構造的修復能力は、増大して失われる。骨髄および造血器官の因子は、特定の個体発生プロセス中に、いずれ他の器官の成長プロセスに適時に結合される。

【0003】

例えば、上皮細胞増殖因子 (EGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) あるいは肝細胞増殖因子 (HGF) のように既知の増殖因子の 1 つの不都合点は、特にインビトロにおける初代細胞の使用において、増殖プロセスは制限される点、およびインビボにおける使用は、例えば癌遺伝子の活性化のような副作用の可能性のため、問題を含む点にある。

【0004】

今日まで、例えば、下垂体あるいは視床下部からの組織抽出は、肝細胞の増殖を起こすために特に適切であると考えられてきた (例えば、US 6,008,047 参照)。そのような、動物抽出物、場合によって、ヒト抽出物は、既に細胞培養に加えられている。しかしながら、動物あるいはヒト組織の抽出物は、例えば BSE ウイルス、豚ウイルスあるいは羊ウイルスのような伝染性ウイルスのために、実験室での使用あるいは治療使用においては問題がある。そのような抽出物の使用には、実際に関連する因子に関する、およびそれらの潜在的な使用および作用に関する知識が欠如している。さらに重要な不都合点は、使用されるソースに規定されかつかなり依存することが困難な異質の抽出物によって、一部の環境において、臨床的使用において好ましくない副作用あるいは特性を引き起こす因子の培養への導入が存在することにある。そのため、その因子およびコントロールされたその投与量の正確な知識は、ともに、特にヒト組織工学の領域において細胞の増殖および分化を適切な方法によって可能にするために、および三次元 (3-D) 再生の構造プロセスを導入するために重要な要素である。

【0005】

3D 増殖およびその開始はいまだ解明されていないが、そのような構造的課題は、特にヒト組織工学において優先事項である。そのような凝集体培養の従来のアプローチは高密度を達成したが、それらは、例えば肝細胞である初代組織から予備増幅した細胞あるいは

10

20

30

40

50

初代組織から分離された細胞によって形成されねばならない。規定された所定の構造への誘導的増殖プロセスは、今日、可能ではない。

【 0 0 0 6 】

しかしながら、今日、例えば肝細胞のような細胞は、さらなる大きな凝集体（超凝集体）の形成を避けるために、増殖期の後においてもゲル状に定着している。これらのゲルは、二次元的に拡がって高細胞密度を有し、そのため細胞増殖を停止する。層を成すそのような 2 - D 封入は、サンドイッチモデルあるいはゲルエンタラップメントとして、Baderらによる、Artif. Organs、19、368 ~ 374 ページ（1995）に、既に記載されている。ゲル状の凝集体の定着は、分化の維持において改善となるが、さらなる増殖とはならない。

10

【 0 0 0 7 】

インビトロおよびインビボにおける組織再生の意味において、わずかな前駆細胞から 3 - D 構造および近接プロセスのための誘導的行動への急激な増殖は、今日、可能ではない。しかしながら、細胞の誘導的行動は、特に治療的あるいはバイオ工学的プロセスにとって相当な革新を意味する。そのような増殖行動は、3 - D 支持マトリクスにアシストされて、コロニー化あるいは構造的再構築の意味において増殖を許すのみならず、実際、誘導的細胞核から導かれたデノボ形成を許し得る。そのようなプロセスは個体発生において起こり、先在する原基に成長する。

【 0 0 0 8 】

増殖因子は、例えば、白血病抑制因子（LIF）、（CNTF）、（GDNF）、あるいは神経成長因子（NGF）のような胎児起源のニューロン先駆体の場合において特に、脱分化されたニューロンの増殖期を可能にする。しかしながら、分化の後、これら因子はもはや活動できない。

20

【 0 0 0 9 】

ヒト組織工学において、胎児細胞よりいっそう既に分化された、患者特定の成体細胞システムが使用されるという、さらなる問題が存在する。さらに、培養状態はインサイチュおよびインビトロにおいて利用されるが、従来の使用は考慮されていない。それに対し、望ましくないため、例えば、柔組織肝細胞の拡張の際に肝臓で発生するような、内皮細胞、マクロファージおよび線維芽細胞の同時培養を避ける試みが行われる。しかしながら、分化された培養における、これらいわゆる非柔組織細胞の存在は、分化に実質的に寄与

30

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

そのため、実質的に、細胞システムの生理学的状態を維持し得、かつ実質的に構造増殖を可能にする、インビトロにおける増殖方法、および/またはインビボにおける再生方法の提供が望まれる。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明において、トロポポエチン（TPO）、および/またはエリスロポエチン（EPO）、および/または成長ホルモン（GH）、特にヒト成長ホルモン（HGH）、および/またはソマトスタチン、および/または白血病抑制因子（LIF）、および/または毛様体向神経性因子（CNTF）、の増殖因子の使用が、細胞の増殖および分化を開始および終了し、ならびに構造的に誘導することが、見出された。

40

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 2 】

これは、細胞の増殖のみならず、構造的プロセスの導入、特に局所的な特定の細胞増殖をもたらす、また、管理された分化が、誘導的作用によってインプラント上のその位置（インサイチュ）において、例えばいわゆるホーミングプロセスを介してもたらされる。これは、成長ホルモンがこれら構造プロセスを導入および終了できることを、意味する。

50

【 0 0 1 3 】

本発明は、さらに、インビトロにおいて細胞を増殖および分化する方法に関連し、ここにおいて、細胞の増殖プロセスは、TPO、および/またはEPO、および/またはGH、特にHGH、および/またはソマトスタチン、および/またはLIF、および/またはCNTF、の増殖因子を用いることによって開始あるいは終了され、かつ構造的に導かれる。

【 0 0 1 4 】

TPOは、例えばc-Mplリガンド、mplリガンド、メガポイエチンあるいは巨核芽細胞増殖として知られ、また今日、例えば成体肝細胞、あるいは血小板およびその前駆体を除く他の初代細胞の培養に使用されていない。TPOは、本質的に、巨核芽細胞および血小板の成長および増殖に必要であり、またそのため、血小板の形成に必要である。TPOは、に肝臓内に構成的に生成され、また腎臓内に332アミノ酸長タンパク質として構成的に生成される。

10

【 0 0 1 5 】

本発明に従って使用され得る追加的な増殖因子は、悪性化増殖因子 (TGF)、プロスタグランジン、顆粒球マクロファージ刺激因子 (GM-CSF)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH)、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH)、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)、ドーパミン、抗利尿ホルモン (ADH)、オキシトシン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン、ベータセルトロピン、ルトロピン、および/またはバソプレシンである。

【 0 0 1 6 】

培養への上記増殖因子の供給の停止あるいは削減の他に、ソマトスタチンおよび/またはTGF および/またはプロスタグランジンが、本発明の増殖プロセスの終了のために適する。

20

【 0 0 1 7 】

溶剤中の増殖因子の個別の濃度は、通常、ほぼ1 ng/ml ~ ほぼ100 ng/mlであり、好ましくは、ほぼ10 ng/ml ~ ほぼ50 ng/mlであり、特に、ほぼ10 ng/ml ~ ほぼ20 ng/mlである。しかしながら、局所的なコーティングの場合、増殖因子の濃度は、その倍であり得る。

【 0 0 1 8 】

例えば、内分泌臓器の再生の場合、特に、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH)、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)、ソマトスタチン、ドーパミン、抗利尿ホルモン (ADH) および/またはオキシトシン、の増殖因子の相互作用は、支持マトリクスを用いて、内分泌物の分化および/またはインサイチュの増殖を誘導する。

30

【 0 0 1 9 】

プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン、ベータセルトロピン、ルトロピン、および/またはバソプレシンを構造的プロセスに追加的に使用することも可能である。

【 0 0 2 0 】

さらなる実施形態において、1つ以上の神経再生因子、好ましくは神経成長因子 (NGF)、および/または1つ以上の脈管再生因子、好ましくは血管内皮増殖因子 (VEGF) および/または血小板由来増殖因子 (PDGF) が、追加的に使用することが可能である。

40

【 0 0 2 1 】

内皮細胞の存在において、細胞の内皮化およびその結果最適な血液適合性が達成される。

【 0 0 2 2 】

増殖因子は通常、商業的に購入可能であり、また当業者には既知のように、遺伝子操作により準備され可能である。それらは自然発生的増殖因子のみならず、実質的に同一生物学的活動を有する誘導体あるいは改変体を含む。

【 0 0 2 3 】

50

例えば、TPOは、Cell System GmbH、St Katharinenから購入可能である。ヒトTPOの使用は、ヒト成体肝細胞を培養するために好適である。さらに、TPOおよびその改変体の準備および特性化は、例えばEP 1 201 246、WO 95 / 2 1 9 1 9、WO 95 / 2 1 9 2 0、およびWO 95 / 2 6 7 4 6に記載されている。

適切なTPO改変体は、WO 95 / 2 1 9 1 9に記載されたTPO誘導体であり、あるいはWO 95 / 2 1 9 2 0に記載された改変体あるいは種相同器官であり、あるいはWO 95 / 2 6 7 4 6およびEP 1 201 246に記載されたPEG化TPOであり、それらに限定されることはない。PEG化TPOは、本発明においては、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、あるいはポリオキシアルキレンのような有機ポリマーに結合されるTPO誘導体を意味する。さらに、TPO改変体は、100%より小さい配列同一性を有し、それにもかかわらず、好ましくはEP 1 201 246に記載されたようなTPOの機能を有する。TPO誘導体は、通常、少なくとも70%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも75%、とりわけ少なくとも80%、特に、TPO機能を有する部分を含むヒトTPOと比較して少なくとも85%の配列同一性を有する。本発明の目的のための特に好ましいTPO機能は、TPOあるいはその改変体によるこれら細胞の血小板生成形態における、巨核芽細胞または巨核芽細胞前駆体の増殖分化および/または成熟分裂のスピードアップである。

【0024】

EP Oはまた、TPOの初期形態を示し、その改変体が例えばEP 0 148 605、EP 0 205 564、EP 0 209 539、EP 0 267 678あるいはEP 0 411 678に記載される。

【0025】

上記において詳細に記された誘導体および改変体の例は、他の増殖因子に類似的に適合する。

【0026】

したがって、本発明によれば、増殖因子という用語は、天然に存在する形態に限定されず、天然に存在しない形態、および改変体あるいは誘導体をも含む。本発明によれば、増殖因子という用語は、増殖促進剤のみならず、例えばソマトスタチン、TGF および/またはプロスタグランジンのような増殖阻害剤をも含む。そのような増殖阻害剤は、同時あるいは連続的であって非常に局部に集中した使用によって、例えばまた、ヒドロゲルあるいは徐放性材料によって、特に、例えば腫瘍細胞のように変異した細胞の増殖を抑制し、あるいは阻害するために適する。

【0027】

本発明の増殖プロセスは、特別な細胞のために適切な培養において実施される。ここで、適切なデバイスを用いて、必要に応じて増殖プロセスの間に形成した細胞凝集体に細分化され、そして必要に応じて膜化され、そして必要に応じて凍結され得る。

【0028】

適切なデバイスの例は、例えば500 μmのサイズのカットメッシュ構造を有するグリッドであり、そのカットメッシュ構造は、例えば肝細胞の新しい補助的な凝集体を繰り返し生成され得る作用を有する。これは有利にも完全な閉鎖システムにおいて起こり得る。特に、非接触であり、自動的あるいは手動によって制御されたポンプシステムを使用することが可能である。このポンプシステムは、例えばピストンポンプを含み、あるいは磁氣的にまたはタービンの圧縮空気によって生成された管理された流れを形成する。内皮細胞の存在において、灌流された生物反応炉内の剪断応力によって、凝集体の表面上での内皮細胞の自発的な合流が可能となる。これはさらなる使用のために有利となり得る。

【0029】

莢膜化のための適切な材料は当業者には既知であり、その中で、例えば構造化された形状あるいは空間は集積され、かつインサイチュ増殖構造あるいは拡張を可能にする。他に

10

20

30

40

50

おいては、莢膜は除かれ、例えば、内皮細胞の存在のもとに、内皮化およびそれによる最適な血液相互性が得られる。

【0030】

さらなる実施形態において、細胞の増殖プロセスは、好ましくは生物学的マトリクスによって、局所的に開始および終了され、かつ構造的に導かれる。

【0031】

生物学的マトリクスは、この場合、成長ホルモンのうちの1つによって、あるいは混合物としてまたは連続的に該成長ホルモンによる組み合わせによって処理される。これは、成体細胞システムを用いた場合にさえ、3-D再生、および/または組織修復の人工的な案内、あるいは組織培養を可能にする。

10

【0032】

生物学的マトリクスは、通常、インプラントであり、例えばステント、パッチ、あるいはカテーテル、移植体、例えば皮膚移植体、および/または支持材料、例えば細胞増殖のための支持材料、例えばいわゆる徐放性、例えばヒドロゲル、例えばファブリンに基づいた、および/または例えばポリラクチドあるいはポリヒドロアルカノレート、および/またはアルギナートのようなポリマー、骨代替材、例えばリン酸三カルシウム、同種異系の、自家組織のあるいは異種の、脱細胞化されたあるいは脱細胞化されていない組織、例えば心臓弁、静脈弁、動脈弁、皮膚、管、大動脈、腱、側副(comea)、軟骨、骨、気管(tracea)、神経、半月板(miniscus)、椎間板、肝臓、腸管上皮、尿管、尿道、あるいは膀胱(例えば、EP 0 989 867あるいはEP 1 172 120参照)、マトリクス、例えばラミニン、コラーゲンIV、および/またはマトリゲルマトリクス、好ましくは、例えばコラーゲンI、3T3および/またはMRC-5フィーダー層のようなフィーダー層、またはコラーゲンファブリック、である。

20

【0033】

さらなる好ましい実施形態においては、生物学的マトリクスは、細胞、好ましくは組織特異性細胞、前駆細胞、骨髄細胞、末梢血、脂肪組織、および/または線維組織を用いて、例えば骨髄からの成体前駆細胞を用いて、当業者に既知の方法によってプレコロニー化される。この方法によって、インビボにおける創傷治癒の予期がインビトロにおいて達成可能になり、それによりインビボにおける移植の後に、復帰時間が短縮される。

【0034】

30

本発明によって使用される細胞は特に成体細胞であり、すなわち、好ましくは、もはや胚あるいは胎性の表現型を有さない最初に分化された細胞であり、特に好ましくはヒト成体細胞である。その例は、成体前駆細胞および/または組織特異性細胞、好ましくは骨芽細胞、線維芽細胞、肝細胞、および/または平滑筋細胞である。

【0035】

しかしながら、例えばソマトスタチン、TGF および/またはプロスタグランジンのような増殖阻害剤のかなり集中した同時あるいは連続的な投与によって、例えば腫瘍細胞のような変異細胞の増殖を抑制し、あるいは阻害することができる。この場合、上記した、少なくとも1つの増殖阻害剤を含み、あるいはそれとともに補足され、かつ局部的あるいは変異細胞の近くに提供される、ヒドロゲルあるいは徐放性材料を使用することができ

40

【0036】

そのため本発明の方法は、局部的に特定のおよび/または管理された、成体細胞の増殖、構造成長および次の分化のために特に適切であり、ならびに/または骨、組織および/もしくは内分泌臓器の再生のために、例えば、心臓弁、静脈弁、動脈弁、皮膚、管、大動脈、腱、側副、軟骨、骨、気管、神経、半月板、椎間板、肝臓、腸管上皮、尿管、尿道、あるいは膀胱の再生のために、特に適切である。

【0037】

本発明の方法は、インビボにおける増殖因子による局部的な投与のために使用され得る。その際、増殖因子は、単独、あるいは混合物としての併用、あるいは連続的に、あるい

50

は生物学的マトリクスあるいは支持構造との組み合わせによって使用される。例えば、肝臓再生、心筋再生のような組織再生のために、あるいは皮膚の創傷治癒の分野、例えば糖尿病性潰瘍あるいは歯肉のために使用される。ヒドロゲル、例えばフィブリンおよび/またはポリラクチドあるいはポリヒドロキシアルカノエートのようなポリマー、および/またはカテーテルを備えたポートを介しての、例えば肝臓再生のための肝臓の切除表面への、あるいは投与される局所的あるいは全身的な例えば急性肝疾患へのアルギナートへの、例えばTPOの適用が可能である。そのため、増殖因子は、肝臓再生をアシストするために、肝臓切除あるいは肝臓組織の除去の前後および最中に、投与され得る。軟骨再生を促進するための増殖因子の使用において、増殖因子は直接、膝関節に注入される。そのため、増殖因子は、新軟骨構造の形成に滑膜液を介して直接作用する。

10

【0038】

さらにまた、本発明は、TPO、および/またはEPO、および/またはGH、および/またはソマトスタチン、および/またはLIF、および/またはCNTFの増殖因子の使用であって、骨、軟骨組織、および/または内分泌臓器、例えば柔組織器官および/または非柔組織器官の再生処置、特に心筋、心臓弁、静脈弁、動脈弁、皮膚、管、大動脈、腱、側副、軟骨、骨、気管、神経、半月板、椎間板、肝臓、腸管上皮、尿管、尿道、あるいは膀胱の再生処置用の薬剤、および生殖疾患の再生処置用の薬剤、および/または創傷治癒処理のアシスト用の薬剤、特にクローン病、潰瘍性大腸炎、および/または皮膚領域における好ましくは糖尿病性潰瘍または歯肉治癒処理のアシスト用の薬剤、および/または肝疾患の治療のための、特に肝硬変、肝炎、急性あるいは慢性肝疾患の治療用の薬剤、および/またはスポーツ損傷後の、筋肉疾患後の、骨損傷後の、軟組織損傷後の筋肉領域における創傷治癒用の薬剤、および/または創傷治癒および組織再生の改善用の、例えば手術後の急性および慢性疾患および/または虚血性心筋疾患改善用の薬剤、新血管形成および再生の刺激用の薬剤、および/または損傷および外傷後の虚血および/または例えば、続く虚血を伴う一部の環境における心筋梗塞あるいは血栓症を伴う組織損傷の後の組織の再生用の薬剤、を製造するための、増殖因子の使用に関連する。この場合のEPO投与量は、血管形成、および続くあるいは付随する組織再生を可能にする。

20

【0039】

特定の実施形態において、悪性化増殖因子 (TGFB)、プロスタグランジン、顆粒球マクロファージ刺激因子 (GM-CSF)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH)、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH)、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)、ドーパミン、抗利尿ホルモン (ADH)、オキシトシン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン、ベータセルトロピン、ルトロピン、および/またはバソプレシンが、増殖因子として追加的な使用される、使用がある。1つ以上の神経再生因子、好ましくは神経成長因子 (NGF)、および/または1つ以上の脈管再生因子、好ましくは血管内皮増殖因子 (VEGF) および/または血小板由来増殖因子 (PDGF) が、さらに追加して使用される。

30

【0040】

本発明に示されたさらなる実施形態は、本使用発明にも類似的に適用される。

【0041】

本発明のさらなる手段は、TPO、EPO、GH、特にHGH、ソマトスタチン、LIF、および/またはCNTFのうちの少なくとも1つの増殖因子を含む、生物学的マトリクスあるいは支持構造である。これらは、3-D増殖および/または分化あるいは増殖停止のための増殖期内あるいは増殖期後の再生のための、誘導基質として使用される。例えば、少なくとも1つの増殖因子が、上記されたように、いわゆる徐放性材料との組み合わせメントに適用され得る。

40

【0042】

さらに本発明は、トロンボポエチン (TPO)、および/またはエリスロポエチン (EPO)、および/または成長ホルモン (GH)、特にヒト成長ホルモン (HGH)、および/またはソマトスタチン、および/または白血病抑制因子 (LIF)、および/または毛

50

様体向神経性因子 (CNTF)、のうちの少なくとも1つの増殖因子を含む、生物学的マトリクスあるいは支持構造に関連する。生物学的マトリクスあるいは支持構造は、追加的に、TGF、プロスタグランジン、GM-CSF、GHRH、TRH、GnRH、CRH、ドーパミン、ADH、オキシトシン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン、ベータセルトロピン、ルトロピン、および/またはバソプレシンのうちの少なくとも1つの増殖因子、および、必要に応じて、追加的に、1つ以上の神経再生因子、好ましくは神経成長因子 (NGF)、および/または1つ以上の脈管再生因子、好ましくは血管内皮増殖因子 (VEGF) および/または血小板由来増殖因子 (PDGF) を含む。

【0043】

本発明の生物学的マトリクスあるいは支持構造は、成長細胞のための、例えば、インプラント、移植体、および/または支持材料である。生物学的マトリクスあるいは支持構造は、ステント、パッチ、カテーテル、皮膚、ヒドロゲル、骨代替材、同種異系の、自家組織のあるいは異種の、脱細胞化されたあるいは脱細胞化されていない組織、合成組織、フィバー層、またはファブリックである。例えば、ファブリックは、コラーゲン、ラミニン、および/または、例えばプラスチックあるいは生物学的マトリクスのような合成あるいは他のタイプの基礎構造を伴うあるいは伴わない、フィブロネクチンから生成される。その例示的な実施形態は上記されている。

【0044】

生物学的マトリクスあるいは支持構造は、上記詳細したように、好ましくは既に、細胞によって、組織特異性細胞、前駆細胞、骨髄細胞、末梢血、脂肪組織、および/または線維組織によってプレコロニー化されているか、あるいは既に、インビトロにおいてのコロニー化のために、あるいはインビトロにおける誘導的再形成のために準備されている。

【0045】

生物学的マトリクスあるいは支持構造は、増殖因子の少なくとも1つを含む生分解性の(バイオ)ポリマー層によって被覆されている。フィブリン、血漿、コラーゲンおよび/またはポリラクチドが、例えば(バイオ)ポリマー層として適切である。

【0046】

本発明はまた、本発明の生物学的マトリクスあるいは支持構造の製造方法に関し、ここで、随意的に活性化された生物学的マトリクスあるいは支持構造は、TPO、EPO、GH、特にHGH、ソマトスタチン、LIF、および/またはCNTFのうちの少なくとも1つの増殖因子によって被覆されている。発明の生物学的マトリクスあるいは支持構造は、随意的に、追加的に、TGF、プロスタグランジン、GM-CSF、GHRH、TRH、GnRH、CRH、ドーパミン、ADH、オキシトシン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン、ベータセルトロピン、ルトロピン、および/またはバソプレシンのうちの少なくとも1つの増殖因子によって、および必要に応じて、追加的に、1つ以上の神経再生因子、好ましくはNGF、および/または1つ以上の脈管再生因子、好ましくはVEGF および/またはPDGFによって被覆され得る。

【0047】

生物学的マトリクスあるいは支持構造の活性化は、例えば、プラズマイオン化あるいはレーザ活性化によって活性化され得る。

【0048】

本発明の他の手段は、増殖因子を含む生分解性の(バイオ)ポリマー層による被覆である。この目的の適切な例は、フィブリン、血漿、血液、コラーゲンおよび/またはポリラクチドである。

【0049】

本発明の方法において、生物学的マトリクスあるいは支持構造は、インビトロにおいて細胞によって、好ましくは組織特異性細胞、前駆細胞、骨髄細胞、末梢血、脂肪組織、および/または線維組織によってプレコロニー化され得る。

【0050】

上記された本発明の好ましい実施形態および実施例は、本発明の製造プロセスに類似的

10

20

30

40

50

に適用される。

【 0 0 5 1 】

本発明はさらに、本発明の方法を実施するデバイスにも適用され、ここで、灌流バイオリアクタは、特に閉鎖系であることが好ましい。

【 0 0 5 2 】

以下の実施例は、制限されることなく、本発明を詳細に説明することを意図する。

【実施例】

【 0 0 5 3 】

(1 . 骨の再生)

単相のリン酸三カルシウムを、例えば、 $15\text{ }\mu\text{m}$ より大きな微小孔性を有する顆粒として調製し、患者の要件に対応する3-D欠損の型の形状にする。このことは、通常、焼結プロセスにおいて起こる。その材料を、その表面の活性化が生じるように、実質的にプラズマイオン化によって処理し、その構築を、トロンボポエチン、エリスロポエチン、および/または成長ホルモン(GH)を含む溶液中に配置し、このようにして、規定された様式において少量がコーティングされる。あるいは、予め表面を活性化することも、これらの増殖因子を含む生分解性(生体)ポリマー層でのコーティングもなしで、溶液中でのインキュベーションを行い得る。このことは、例えば、フィブリン、血漿、コラーゲンおよび/またはポリラクチドを使用する場合において可能である。

【 0 0 5 4 】

次いで、この構築物を、欠損に直ぐ導入するか、または組織特異性細胞、前駆細胞、または骨髄細胞とともにインビトロでプレコロニー化する。このことにより、インビボ創傷治癒プロセスがインビトロで先に行われ、よってインビボでの移植の後(例えば、7日後)に再生時間の短縮が生じ得る。神経再生因子(NGF)または血管再生因子(VEGF、PDGF)との組み合わせが可能である。構造形成因子と環境的概念とを組み合わせることは、この関係において重要である。

【 0 0 5 5 】

インビボおよびインビトロでは、造血性かつ幹細胞が豊富な骨髄と支持マトリクスの吸収速度の増大と正常な骨による置換とが調和している。部位特異的組み込みは、漸増能力および誘導特徴が原因で起こる。

【 0 0 5 6 】

これは、外側側面でインビトロで骨膜とともにコロニー形成することによりさらに促進され得る。

【 0 0 5 7 】

(2 . 心臓弁再生および泌尿器科学用構築物の生成)

生物学的マトリクス(無細胞化ありまたはなしの同種異系または自己の心臓弁、コラーゲンの化学的組成およびそれらの空間的配置に関して心臓血管標的組織の生理学的微小環境をまねる、プラスチックで作製された合成支持構造体)は、増殖因子としてのトロンボポエチンおよびエリスロポエチンで予めコーティングされる。

【 0 0 5 8 】

次いで、その材料は、プラズマイオン化によって(例えば、過酸化水素 H_2O_2 を使用して)処理され、同時に滅菌が行われる。その結果、表面の活性化が起こり、その構築物は、トロンボポエチン、エリスロポエチン、および/または成長ホルモン(GH)を含む溶液中に配置され、従って、少量が規定の様式においてコーティングされる。あるいは、予め表面を活性化することも、増殖因子を含む生分解性(生体)ポリマー層でコーティングすることもなく、溶液中でインキュベートすることも可能である。フィブリン、血漿、血液、コラーゲンまたはポリラクチドは、この場合に使用され得る。

【 0 0 5 9 】

この構築物は、次いで、この構築物を、必要な部位(パッチとして心臓弁位置、または血管の置換)に直ぐ導入するか、または組織特異性細胞、前駆細胞、または骨髄細胞とともにインビトロでプレコロニー化する。このことにより、インビボ創傷治癒プロセスがイ

10

20

30

40

50

ンビトロで先に行われ、よってインビボでの移植の後（例えば、7日後）に再生時間の短縮が生じ得る。神経再生因子（NGF）または血管再生因子（VEGF、PDGF）との組み合わせが可能であるが、必ずしも必要であるわけではない。

【0060】

インビボおよびインビトロでは、造血性かつ幹細胞が豊富な骨髓と支持マトリクスの吸収速度の増大と、線維芽細胞および平滑筋細胞の分化速度の増大と、正常な心血管組織による置換とが調和している。部位特異的組み込みは、漸増能力および誘導特徴が原因で起こる。

【0061】

これは、外側側面でインビトロで内皮細胞とともにコロニー形成することによりさらに促進され得る。

【0062】

泌尿器科学用構築物は、対応する様式で生成され得る。

【0063】

（3．非実質細胞との同時培養における成体幹細胞の増殖）

生検または部分的切除物に由来する混合肝細胞集団を、培養上清に添加することによって、10～50 ng/mlの濃度のTPOおよび/またはEPOおよび/または成長ホルモン（例えば、HGH）で処理する。播種細胞密度は、10,000細胞/cmである。コンフルエントになった後に、細胞を、0.005% コラゲナーゼおよび0.01%トリプシンで処理し、2 g/l アルブミンまたは自己血清（10～20%）を5時間添加した。次いで、細胞から、上清を吸引し、2 g/l アルブミンを含有する培養培地中で3回洗浄し（Williams E（Williamsら（1971）Exptl. Cell Res., 69, 106）、次いで、コラーゲンコーティングしたペトリ皿に沈められる。

【0064】

細胞の分化は、細胞外マトリクスを重層することによって達成され得る。あるいは、細胞は、攪拌することによって沈んで、一緒に凝集しないようにされ得る。

【0065】

増殖プロセスの間に凝集が大きくなり過ぎることを避けるために、細胞を、新たな付随する凝集物が繰り返し生成され得るように、適切なデバイス中、サイズが500 μmのカットメッシュ構造体を有するグリッドに通過させ得る。このことは、完全な閉鎖計において生じ得る。理想的には、接触なしのポンプ輸送系（磁性により生成される指向性の流れ以外の蠕動式システムによっても、チュービングの空気圧縮、または自動もしくは手動のピストンポンプによっても押し出すことはない）が、使用される。

【0066】

次いで、細胞をカプセル化および凍結し得る。与えられた形状および空間は、カプセル構造に組み込まれ得、このことにより、インサイチュでの増殖構造および拡大が可能になる。

【0067】

あるいは、そのカプセルは、この系において内皮細胞の存在およびこれらの細胞の標的化された添加とともに、かつその存在を介して与えられ得、内皮化、従って、最適な血液適合性（hemocompatibility）が達成され得る。

【0068】

灌流バイオリアクタ中での剪断応力は、凝集物の表面上での内皮細胞の自発的なコンフルエンスを生じる。標的サイズが達成されると、それらは、例えば、培養のために既に理想的に使用されているバッグ中で凍結され得る。

【0069】

（4．軟組織（筋肉斑、神経、腱）

腹壁欠損を再構築するために、例えば、蒸気のように、対応してプラスチックもしくは生物学的マトリクス、または空間的に規定された構造（神経、腱のための管）のような、

10

20

30

40

50

合成または別のタイプの基本的構造体ありまたはなしのコラーゲンのタイル (t i l e) または繊維 (例えば、ラミニン、フィブロネクチン) を生成することは可能である。これらのコラーゲンタイルまたは構造体は、形作られ、TPO、EPOおよび/または成長ホルモン (GH) でコーティングされ、標的組織 (例えば、腱細胞 (t e n o c y t e) 、ニューロン) の細胞とともに移植されるか、またはこの細胞とともにプレコロニー形成される。

【 0 0 7 0 】

生物学的マトリクス (無細胞化ありまたはなしの同種異系または自己の心臓弁、コラーゲンの化学的組成およびそれらの空間的配置に関して標的組織の生理学的微小環境をまねる、プラスチックで作製された合成支持構造体) は、増殖因子としてのトロンボポエチンおよびエリスロポエチンで予めコーティングされる。

10

【 0 0 7 1 】

次いで、その前または後に、その材料は、プラズマイオン化によって (例えば、過酸化水素 H_2O_2 を使用して) 処理され、同時に滅菌が行われる。その結果、表面の活性化が起こり、その構築物は、トロンボポエチン、エリスロポエチン、および/または成長ホルモンを含む溶液中に配置され、従って、少量が規定の様式においてコーティングされる。あるいは、予め表面を活性化することも、増殖因子を含む生分解性 (生体) ポリマー層でコーティングすることなく、溶液中でインキュベートすることも可能である。フィブリン、血漿、血液、コラーゲンまたはポリラクチドは、この場合に使用され得る。

【 0 0 7 2 】

20

この構築物は、次いで、この構築物を、必要な部位 (パッチとして腹腔壁、心筋、骨格筋) に直ぐ導入するか、または組織特異性細胞、前駆細胞、もしくは骨髄細胞とともにインビトロでプレコロニー化する。このことにより、インビボでの創傷治癒プロセスがインビトロで先に行われ、よってインビボでの移植の後 (例えば、7日後) に再生時間の短縮が生じ得る。神経再生因子 (NGF) または血管再生因子 (VEGF、PDGF) との組み合わせが可能であるが、必ずしも必要であるわけではない。

【 0 0 7 3 】

インビボおよびインビトロでは、造血性かつ幹細胞が豊富な骨髄と、線維芽細胞および平滑筋細胞の分化速度の増大と、支持マトリクスの吸収速度の増大と、正常な心血管組織による置換とが調和している。部位特異的組み込みは、漸増能力および誘導特徴が原因で起こる。

30

【 0 0 7 4 】

これは、外側側面でインビトロでケラチノサイト (腹筋)、シュワン細胞および/または繊維性組織とともにコロニー形成することによりさらに促進され得る。

【 0 0 7 5 】

(5 . インビボでの組織再生)

a) 肝臓

肝臓を部分的に切除した後に、EPOを、患者に対して、全身に投与するか、そして/またはポリマーを切除表面に塗布することによって局所的に投与する。そのポリマーは、例えば、フィブリン (例えば、フィブリン接着剤に由来する) のような生体ポリマー、ポリマー化血漿、ポリマー化血液または生体接着剤 (例えば、筋接着剤) であり得る。しかし、そのポリマーは、合成もしくは生物学的ゲルまたはヒドロゲルであり得る。EPOはまた、出血を停止するように働くファブリック (f a b r i c s) (例えば、コラーゲン生地、タンポン、織物および編み物) に導入され得る。EPOの作用を通じて、2週間以内に肝臓の本来の体積に回復する。このことは、肝細胞の増殖だけでなく、調整された増殖にもまた関連し、そこで血管、胆管および嚢様構造 (c a p s u l a r s t r u c t u r e) が成長して、それらの本来の大きさに戻る。

40

【 0 0 7 6 】

30匹の動物において、コントロール動物 (EPO投薬なし) と比較して、肝臓再生が実質的に生じたことが示された。EPOはまた、慢性肝障害 (例えば、肝硬変、線維症、

50

肝炎)における肝臓再生のために使用され得る。このようにして、初めて、肝臓実質に関連して治療的効果を達成することが可能である。

【0077】

b) 炎症性腸障害

クローン病の患者において、腸上皮の領域における創傷治癒は、損なわれている。下層にある組織構造はまた、炎症反応に関与し得る。これらの患者において、EPOの全身のおよび/または局所的投薬は、再生を通じて、腸上皮の回復をもたらす。局所的な投薬は、腸領域中の遅延放出性カプセルによって、またはゲル含有坐剤もしくは溶液の局所的滴注を与えることによって、生じ得る。

【0078】

限局性の血管領域における吸収は、ペグ(PEG)化合物を与えることによって最適化され得、その結果、全身的な効果、よって創傷治癒プロセスの開始は、炎症領域における限局的投薬を介して起こり得る。

【0079】

貧血の存在は、クローン病の患者についてのポジティブな予後因子と見なすべきである。過去に、貧血は、独立した付随する障害であるか、または吸収の問題に起因する衰弱に起因すると推測されていた。本発明者らの結果により、創傷治癒の低下は、内因性EPOの欠乏に関連することが示されている。従って、EPOを外部から投与することによって、クローン病を非常に選択的に処置することが可能である。さらに、潰瘍性大腸炎の分野においてもまた、用途が見出される。

【0080】

c) 皮膚領域における創傷治癒の低下

糖尿病性潰瘍の患者は、栄養障害を有し、通常は、足の領域の創傷閉鎖が困難である。構造的組織再生の能力が、根本にある障害に起因して制限される。これらの場合、創傷治癒は、EPOの全身投薬および/または局所的投薬を通じて誘導される。挫滅組織切除の間に下部層が粗面を呈した後、EPOを投与することは有利であることが判明している。EPOと塩化カルシウムによって誘導されたポリマー化とを組み合わせると、血餅にEPOが組み込まれ、局所的な遅延放出調製物が生じる。あるいは、EPOはまた、フィブリン接着剤とともに、またはEPOを含浸させた生地またはタンポン(例えば、コラーゲン生地)とともに投与され得る。

【0081】

EPOは、例えば、スポーツ傷害後の筋肉領域、筋肉障害、骨傷害、軟組織傷害において、他の創傷治癒要件全てについて、そして一般に、創傷治癒および組織再生のために(例えば、手術、急性障害および慢性障害の後に)類似の様式で与えられ得る。

10

20

30

フロントページの続き

合議体

審判長 内藤 伸一

審判官 大久保 元浩

審判官 中村 浩

(56)参考文献 特表平6 - 510292 (JP, A)

特開平10 - 67678 (JP, A)

日本消化器外科学会雑誌, 2000年7月1日, Vol. 33, No. 7, p. 1255

肝臓, 1986年6月, Vol. 27, No. 6, p. 714 - 719

Regulatory Peptides, 1995年7月21日, Vol. 58, No. 1 /
2, p. 55 - 62

Biomedical Research, 2002年2月, Vol. 23, No. 1, p. 1
7 - 21

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K38/00-38/27

A61P1/00-1/16

MEDLINE(STN)

BIOSIS(STN)

EMBASE(STN)

CA(STN)

REGISTRY(STN)

JSTPlus(JDream2)

JST7580(JDream2)

JMEDPlus(JDream2)