

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-512232

(P2014-512232A)

(43) 公表日 平成26年5月22日(2014.5.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 V	4 C 0 8 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2014-506621 (P2014-506621)	(71) 出願人	513263547
(86) (22) 出願日	平成24年4月23日 (2012. 4. 23)		サイトグラフ ティッシュ エンジニアリ
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月16日 (2013. 12. 16)		ング インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/034692		CYTOGRAFT TISSUE EN
(87) 国際公開番号	W02012/145756		GINEERING, INC.
(87) 国際公開日	平成24年10月26日 (2012. 10. 26)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(31) 優先権主張番号	61/478, 033		949 ノバート ハミルトン ランディ
(32) 優先日	平成23年4月21日 (2011. 4. 21)		ング 3 スーツ 220
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100147485
			弁理士 杉村 憲司
		(74) 代理人	100174001
			弁理士 結城 仁美
		(74) 代理人	100181272
			弁理士 神 絃一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞合成粒子

(57) 【要約】

本技術は、細胞合成生物学的粒子、細胞合成粒子を生成するためのプロセス、ならびにこうした細胞合成粒子を組織および臓器に構築するためのプロセスを提供する。粒子は天然細胞外マトリックスを生成する生細胞により培養においてインビトロで合成される。多数の粒子は顕著なボイド空間を有する組織に構築することができる。粒子または組織は追加の細胞タイプの基質として作用することができる。粒子または組織はインビトロでさらに培養し、有利な細胞もしくは細胞外マトリックス増殖、組織または他の所望の特性を達成することができる。粒子または組織は失活または脱細胞化することができる。粒子または組織はヒトに注射または移植し、分泌、機械的、または審美的機能を修復、向上、または形成することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1 つまたは複数の組織工学によって作製された粒子を含む組成物であり、該粒子が 1 つまたは複数の生物学的細胞および該細胞により合成される 1 つの細胞外マトリックスを含む、組成物。

【請求項 2】

前記生物学的細胞が 2 つ以上の細胞タイプを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記細胞が実質的に失活されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記細胞が遺伝子操作されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記粒子が約 50 μm ~ 約 5 mm の直径を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

外因性成分をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記外因性成分が：ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、プロテグリカン、抗体、多糖、DNA もしくは RNA、トランスフェクション剤、抗生物質、医薬剤、金属粒子、不溶性鉱物結晶もしくは粒子、ポリマー粒子、放射線薬剤、薬物送達システム、無線周波数識別チップまたは他の磁気もしくは電子装置から選択される、天然または合成成分であることを特徴とする、請求項 6 に記載の組成物。

20

【請求項 8】

組織工学によって作製された粒子組成物の製造方法であり、該方法は：

(a) 培養容器において細胞集団を播種するステップと；

(b) 該培養容器の内面と接触した組織シートの形成を可能にする条件下で該細胞を培養するステップであり、該シートが細胞および該細胞により合成される細胞外マトリックスからなる、ステップと；

(c) 該シートを複数の片に切断し、これにより粒子組成物を形成するステップとを含む、方法。

30

【請求項 9】

前記細胞が：線維芽細胞、間質細胞、筋線維芽細胞、筋細胞もしくはその前駆細胞、平滑筋細胞もしくはその前駆細胞、大食細胞、骨芽細胞もしくはその前駆細胞、間葉幹細胞、骨髄由来幹細胞、脂肪由来幹細胞、皮膚由来幹細胞（付属物を含む）、胚性幹（ES）細胞、人工多能性幹（iPS）細胞またはそれらの組み合わせから選択される、1 つ又は複数のタイプの細胞を含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞集団が遺伝子操作されていることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記複数の片を前記基質から分離するステップをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記組織シートを前記切断前に前記基質から取り外すステップをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記片のそれぞれの面積が約 0.01 mm^2 ~ 約 400 mm^2 であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記組織シートまたは前記生体適合性粒子組成物を実質的に失活させるステップをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

50

【請求項 15】

(i) 前記接着細胞を外因性成分の存在下で培養するステップ；または

(ii) 外因性成分を前記組織シートもしくは前記形成された粒子組成物に結合するステップ

をさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 16】

前記組織シートまたは前記粒子組成物を架橋剤で処理するステップをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 17】

前記組織シートを切断前に乾燥させるステップをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 18】

組織工学によって作製された構築物の製造方法であって、該方法は：

(a) 1 つ又は複数のタイプの細胞合成の粒子組成物を容器に入れるステップと；

(b) 該粒子の融合を可能にする条件下で該粒子を培養し、これにより組織を形成するステップと；

(c) 該組織を構築物に成形するステップと

を含む、方法。

【請求項 19】

前記構築物を部分的に失活させるステップをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

20

1 つ又は複数の細胞を前記組織中または上に播種するステップをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記細胞合成の粒子が請求項 8 に記載の方法により製造されたことを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

注射に適した形態である請求項 1 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

30

(優先権の主張)

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) に基づき、その内容の全開示を本明細書に参照により組み入れる、2011 年 4 月 21 日出願の米国仮特許出願第 61 / 478, 033 号の優先権を主張する。

【0002】

本技術は組織工学の分野に関する。より具体的には、その技術は、培養において細胞から生成される天然細胞外マトリックスを含む粒子、それらの調製方法およびそれらのその後の使用の分野に関する。

【背景技術】**【0003】**

40

多細胞生物は組織、すなわち同様の形態および機能を有する細胞の群からなる。異なる組織は互いに組み合わせられ、ともに機能して臓器を形成する。いくつかの組織は細胞のみから構成されるように見えるが、ほとんどの組織は第 2 の重要な成分—細胞外マトリックス (ECM) を有する。ECM は細胞により合成される各種タンパク質で構成され、細胞の物理的な外周を形成する。ECM は機械的構造の提供、ならびに適当な細胞挙動のための接着部位、増殖因子およびサイトカインの貯蔵場所の提供にも重要な役割を果たし、進行中の研究の対象である他の役割を果たす。ECM の多くのタンパク質のうち、コラーゲンが一般的にはもっとも豊富であり、その機械的役割についてよく知られている。今日に至るまで約 20 タイプのコラーゲンが開示されている。エラスチンもいくつかの組織において重要な機械的役割を果たす周知のタンパク質である。ECM は、さまざまな機能を

50

有し、容易に人工的に再生することができない複雑な微小環境を形成する、多くの他のタンパク質も含有する。(それらのタンパク質としては:フィブロネクチン、ラミニン、ピトロネクチン、デコリン、フィビュリン、フィブリリン、ミクロフィブリル関連糖タンパク質(MFAP)、エミリン、オステオポンチン、テネイシン、エンタクチン/ニドゲン、トロンボスポンジン、酸性でシステインに富んだ分泌タンパク質(SPARC)、マトリリン、パーシカン、ヒアルロナン、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、パイグリカン、パールカン、シンデカン、ルミカン、グリピカン、および多くのその他が挙げられる。)適切に構成されたECMが正常な細胞表現型および機能を維持するのに重要であることはここで十分に認められる。

【0004】

組織欠損は多数の医学的状態に起因し得るが、例えば、先天性奇形、外傷性損傷、感染症、および腫瘍切除が挙げられる。数百年間、外科医は生体における損傷組織を修復するという問題に取り組んできた。組織および臓器の移植は多くの病的状態を治療することができる。しかしながら、限られた数の臓器ドナー、および限られた体の再生能力は、多くの患者を未治療のままにし、しばしば多くの苦痛および死ももたらしてきた。

【0005】

欠損または損傷組織の修復の成功は部分的には、適当な細胞再生を可能にし、修復プロセス中の感染症および炎症の可能性を最小化する状態の提供に依存する。多くの組織および臓器は自発的に再生することができず、または現行の外科的および薬理学的技術を用いて修復することができないので、組織再生を促進し、またはインビトロで生成される新規組織を提供する治療方法の継続的必要性がある。

【0006】

組織工学は細胞生物学および工学の分野の収束から出現した。組織工学は、人体外で、例えばインビトロで組織を生成する技術および方法を含む。従来より組織工学は、複雑な医療装置を製造する材料科学の技術と併せて細胞生物学の原理を用い、組織修復に関する問題を解決しようと試みてきた。一般的には、組織操作とは自己組織化による細胞成分からの組織片の構築を指す。

【0007】

それにもかかわらず、人工材料は体により異物と認識されることが多く、慢性炎症および瘢痕化により特徴づけられる、「異物反応」として知られる免疫反応を引き起こす(例えば、Anderson, J. M., et al., Semin. Immunol. 20(2), 86(2008)参照)。この反応は多くの場合、人工移植片の瘢痕組織中への部分または完全被包をもたらし、これは体の循環系から移植片を実際に分離する。これは移植片の多くの機械的機能を妨げないが(例えば、整形外科および歯科移植片と同様)、移植片内に存在する細胞の生存に悪影響を及ぼす(例えば、肝臓、腎臓、脾臓の置換の問題)。このタイプの問題は、厚く、酸素の運搬および代謝老廃物の排出に効果的な血液供給を必要とする多数の細胞を含有する移植片にとってとくに問題である。さらに、合成材料は、体の免疫細胞にとって近づくのが困難な微小環境に病原性微生物を保持し得るので、感染症にかかりやすい。これらの理由のため、より最近のアプローチは、完全に生物学的な材料の使用が組織機能の修復、置換、維持および向上を目的とした治療方法の開発においてより大きな成功を可能にするだろうという予想に注目した。しかしながら、純粋に生物学的な材料の開発にはその独自の障害がある。

【0008】

完全に生物学的な組織操作構築物を生成する1つのアプローチは、動物またはヒト供給源から抽出されるタンパク質(例えば、コラーゲン、エラスチン、およびフィブリン)を用いるものだった。生物工学的アプローチにより得られる組換えタンパク質を用いることもできる。物理化学的方法により、これらのタンパク質は異なる形状(フィルム、スポンジ、ファイバー、チューブ、等)に構築することができる。特定の細胞を次にタンパク質構造に添加し、特定の組織の生理学的組織または機能を模倣することができる。このアプローチの重要な限界の1つは、タンパク質は多くの場合、組織操作構築物へのそれらの構

10

20

30

40

50

築前に多少精製されたタンパク質を得るために必要な抽出プロセスにより変性または化学的に修飾されるということである。組織にインビトロで再構成される場合、これらの修飾タンパク質はもとのタンパク質の微小構造を欠き、または細胞外マトリックス（ECM）の微小組織を再形成するのに必要な1つ以上の関連タンパク質を欠く。ほとんどの例では、インタクトなタンパク質でも、生細胞の介在なしに、自然において見られる複雑な組織に自発的に再構築することはできないだろう。抽出されたタンパク質の異常な微小構造は次に、宿主の非特異的免疫系により「損傷」組織と認識される。これはこのタイプの移植片の急速分解、機能および機械的強度の損失をもたらす（例えば、Patino, M. G., et al., J. Oral Implantol. 28(5), 220, (2002) 参照）。タンパク質が動物由来であり、ヒトに用いられる場合、それらはまた特異的免疫系による認識を誘発し、そうして拒絶をもたらす得る。構築物の機械的強度を向上する、またはタンパク質を酵素分解に対してより耐性にするのに化学処理を用いることができるが、このタイプの処理はタンパク質をさらに変性し、天然タンパク質の使用がそもものこの回避を目的とする、異物反応炎症プロセスを誘発し得る。（例えば、Cheung, D. T., et al., Connect. Tissue Res., 25(1), 27(1990) 参照）。

【0009】

アスコルビン酸化合物の存在下での長期培養中、線維芽細胞のような接着細胞は多量のECMタンパク質を培養皿の内面上に付着させることができることが見出された。結果として、生細胞および該細胞により生成されるECMタンパク質で構成される生体組織は、長期培養後に培養皿から平面形状の片で分離することができる。これらの生体細胞合成組織片（本明細書では「シート」と称される）は、いずれかの人工または他の外因性足場の必要なしに高い機械的強度を有する生体および完全に生物学的な構築物の生成を可能にする、シート系組織操作（「SBTE」）と称される方法の基礎を形成した。

【0010】

SBTEをうまく用い、ヒトの皮膚、および血管が生成され、後者は現在臨床試験が実施されている（例えば、そのすべてを本明細書に参照により組み入れる、Michel, et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim., 35(6), 318(1999); L'Heureux, et al., FASEB. J., 12(1), 47(1998); L'Heureux, et al., Nat. Med., 12(3), 361(2006); L'Heureux, et al., N. Engl. J. Med., (2007) 357(14), 1451; 米国特許第7,112,218号および第7,504,258号参照）。いくつかのSBTE法は、シート層を重ねた、または巻いた後、それらが培養中に互いに接着および強く融合するまで待ち、より厚い組織を生成するステップを含む。シート層は、異なる層の融合を達成するため、成熟期と称される長時間、密接並置して維持しなければならない。

【0011】

より最近では、本明細書ではスレッド系組織操作（「TBTE」）と称される技術において、細胞合成スレッドがシートから、または直接生成された。スレッドは、織物産業からの製織または他の技術を用いることにより、ファイバーに形成し、血管のようなさまざまな構造に生成することができる（本明細書に参照により組み入れる、米国特許出願公開第2010-0189712号）。得られる完全に生物学的な血管は、スレッドが生成された後数日で構築することができ、これにより他の技術に関連する長い成熟期を回避する；それらは優れた機械的特性を示す。

【0012】

SBTEおよびTBTEの両方は完全に天然、未修飾、機械的に非常に強い組織を生成するが、得られる構築物は非常に密度が高く、これはガス、栄養物および老廃物の適当な交換をもたらす血管のネットワークにより灌流する必要がある厚い組織の生成には有益ではない。よって、自然において見られるものと同様の組織の微小構造および微小組織を含有し、肝臓、腎臓、脾臓、脳および脂肪組織のような灌流可能な厚い組織を構築するため

の多孔性構造を提供する天然材料を開発する必要性がある。また、シート系およびスレッド系構造の両方は、幅広い範囲の組成勾配を有する複雑な三次元構造を形成する限られた能力を有する。最後に、SBTEおよびTBTEは注射可能な製品の製造に修正可能ではない。

【0013】

他の組織系材料は注射可能な形態で提供されてきたが、多数の欠点を有する。例えば、Fascian（商標）は、美容用途を有する、死体組織から生成される皮膚充填剤である。（Shore, Ophthalm. Plastic and Reconst. Surg., 16(1), Jan. 2000参照）。この物質は多数のECMおよび比較的少ない細胞を有する組織を用い、従って組織工学の原理を用いて構築されていない。さらに、Fascianは生細胞を用いず、従って通常は凍結乾燥形態、または粉碎もしくは細断された粒子で提供される。Fascian（商標）は、必ずしも純粋ではないので、組織操作材料とも異なり、従ってその利点を欠く；その供給源は、血管、神経、および免疫系のような、すべての種類の破碎細胞を含有することができることを意味する。この均質性の欠如は、とくに拒絶が問題となり得る多くの高感度用途には適していないことを意味する。

10

【0014】

本明細書における背景の記載は、技術の状況を説明するために含まれる。これは、参照される文献のいずれかが本明細書に添付される特許請求の範囲のいずれかの優先日時点で出版されていた、既知であった、または一般的な常識の一部であったと解釈されるものではない。

20

【0015】

本明細書の記載および特許請求の範囲を通して、「comprise（～を含む）」の語ならびに「comprising」および「comprises」のようなその変形は、他の添加物、成分、整数またはステップを除外することを意図しない。

【発明の概要】

【0016】

本開示は細胞合成粒子の形成および使用について記載する。とくに、本開示は1つ以上の組織操作粒子を含む組成物を含み、該粒子は1つ以上の生物学的細胞および該細胞により合成される細胞外マトリックスを含む。

30

【0017】

本開示は、組織操作粒子組成物を生成する方法であって、該方法が：（a）培養容器において細胞集団を播種するステップ；（b）該培養容器の内面と接触した組織シートの形成を可能にする条件下で該細胞を培養するステップにおいて、該シートが細胞および該細胞により合成される細胞外マトリックスからなる、ステップ；ならびに（c）該シートを複数の片に切断し、これにより粒子組成物を形成するステップを含む、方法をさらに含む。

【0018】

本開示は、組織操作構築物を生成する方法であって、該方法が：（a）1つ以上のタイプの細胞合成粒子組成物を容器に入れるステップ；（b）該粒子の融合を可能にする条件下で該粒子を培養し、これにより組織を形成するステップ；および（c）該組織を構築物に成形するステップを含む、方法をさらに含む。

40

【0019】

本技術は、細胞合成生物学的粒子、細胞合成粒子を生成するプロセス、ならびに細胞合成粒子を組織および臓器に構築するプロセスを含む。この技術は粒子系組織操作（本明細書では、「PBTE」）の基礎を形成する。粒子はまず培養における生細胞および該細胞が生成する細胞外マトリックスから基質上にインビトロで生成される。粒子は1つ以上の細胞タイプで構成し、さまざまなサイズまたは形状を有することができる。1つ以上のタイプの粒子を用い、そうでなければ形成することができなかったより複雑な構築物を形成することができる。粒子は細胞および細胞合成ECMから構築され、さまざまな方法で用いることができる、一般的には寸法2mm未満～数ミクロン以上の小さな組織片である。

50

1つの方法は、体の局所領域において組織を形成、修復、または増殖するための注射可能な方法である。注射後、周囲細胞は注射された組織へ遊走し、これを再構築し、体に一体化させるのを助ける。

【0020】

粒子または粒子を含む組織は、医療産業において有益であると証明され、シート生成中に気候条件を変える、組織上の応力および歪みを変える、または培養環境の化学組成を調節することにより達成することができる、機械的および生物学的特性を有する。細胞合成粒子は従って、細胞合成シートおよびスレッドに対して相補的な技術を提供する；それらは組織操作構築物を生成するための異なる形態のビルディングブロックを提供し、同様にクロス、ビーズ、およびローブを織物製造に用いることができる。

10

【0021】

本明細書に記載されるプロセスは、未修飾天然ECMからなる生物学的粒子をもたらす。これは移植後に顕著な免疫反応を引き起こさない製品をもたらす。粒子または組織は、部分的にまたは実質的に、失活または脱細胞化することができる。粒子または組織は生体材料、化学物質、医薬剤、または生物製剤のような他の成分と組み合わせ、新規製品を製造することができる。

【0022】

本開示は、本明細書に記載される細胞合成粒子のインビボ用途および使用を提供する。

【0023】

本明細書における技術は審美的、および外科的用途を有する。例えば、本明細書に記載される細胞合成粒子は、外観不良、しわ、等を修正するため皮膚充填剤として注射することができる。この場合、細胞合成粒子は現行形態の美容外科の代替を示し、またそれらの形態に対して相補的である。例えば、細胞合成粒子はプラスチック、セラミック、または死体組織から生成される他の皮膚充填剤と併せて用いることができる。

20

【0024】

本開示は、細胞合成粒子を形成するのに適した方法で組織を培養するための装置、および細胞合成組織シートのような組織シートから粒子を切断するための装置をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0025】

図面は、本発明の詳細な説明、実施例、および添付の特許請求の範囲と併せて見る場合、本明細書における技術の態様を例示する典型的な開示を提供する。

30

【図1】AおよびBは、本明細書にさらに記載されるような典型的な粒子の顕微鏡写真を示す。スケールバーは各図に示される。各例において、粒子は、まず組織シートから切断された組織フラグメントを、例えばピンセットで束ねることにより、機械的に条件づけられた。図1Aは、さまざまなサイズ、直径約75 μm 、150 μm 、250 μm および350 μm の乾燥粒子の明視野顕微鏡写真である。図1Bは、水和後の、図1Aにおける同じ小さいほうから3つの粒子の位相コントラスト顕微鏡写真である。およそのサイズはここで165 μm 、260 μm および600 μm であり、粒子の体積は水和後に顕著に増加したことを示す。粒子は乾燥して保存することができるが、通常「湿潤」、または水和形態で用いられる。水和は、例えば粒子を水性媒体中に浸漬することにより、比較的容易に行うことができる。一般的な粒子は、水和した場合、その乾燥重量の約50%の水を保持する。

40

【図2】図1Aおよび1Bのものより角度がある形状の粒子を生成するように切断された水和粒子の位相コントラスト顕微鏡写真を示す。これらの粒子はより丸形の粒子を生成するには機械的に条件づけられなかった。図2の粒子は、図1Aおよび1Bの粒子を生成するのに用いられるシートより厚い180ミクロン厚の組織シートから生成された。

【図3】粒子が生または死細胞を含むかに応じて形成後どのように再構築するかを示すグラフを提供する。再構築は、ここで生細胞の活性による二次元表面積の変化（1日目までに約50%減少）により測定される、組織収縮により証拠づけられる（各時間点の左側の（暗）棒）。細胞が粒子を形成する前に殺傷される場合、粒子の突出表面積は約1.4 m

50

m^2 で一定のままである（各時間点の右側の（明）棒）。

【図 4】本明細書にさらに記載されるように粒子系組織操作により形成された組織のロッド形状フラグメントを示す。粒子はヒト線維芽細胞合成シートから生成され、さらにヒト内皮細胞を播種され、多孔性底部を有するチューブ状金型において構築された。組織は、金型から外す前に、遠心分離バイオリアクターにおいて 5 日間培養し、媒体を組織に灌流させた。組織のロッドは約 5 mm 厚であり、その成熟におけるこの早期段階でもピンセットで取り扱うことができる。

【図 5】遠心分離灌流下の培養において 5 日後、粒子系組織操作により得られた組織の組織学的断面を示す。ヘマトキシリンおよびエオシン染色（パネル A）は融合粒子およびさまざまなサイズのチャンネルの複雑なネットワークを示す。生体線維芽細胞は組織全体に分布される。マッソン三色染色（パネル B）は組織の高いコラーゲン含有量を強調する。

【図 6】粒子系組織操作により形成された失活（A）および生体（B）粒子への内皮細胞の播種を示す。両染色は二次細胞タイプ、ここでは内皮細胞が線維芽細胞合成粒子を覆う範囲を強調する。パネル A は、予め失活させた粒子の表面に播種され、5 日間培養された内皮細胞の免疫標識を示す。用いられる抗体は、内皮細胞に特異的な分子であり、細胞 - 細胞界面に存在する VE - カドヘリンに対する。また、細胞核はヘキスト 33342 を用いて染色される。パネル B は、生体粒子の表面に播種され、5 日間培養された内皮細胞の免疫標識を示す。用いられる抗体は、内皮細胞に特異的な分子であり、細胞の細胞質に存在するフォンウィルブランド因子に対する。B では、粒子が生体線維芽細胞を含有したので、可視チャンネルにより証拠づけられるように 5 日間の培養により組織が形成した。対照的に、パネル A における失活粒子は凝集性組織を形成せず、取り扱った際に崩壊した。

【図 7】A および B は、全体図（7A）、および切断部分の拡大図（7B）において、組織シートから細胞合成粒子を形成するための典型的な切断装置を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本明細書では、損傷または欠損臓器または組織の修復のため細胞合成生物学的粒子、ならびに粒子、およびその組成物の生成および使用に関する装置、材料および方法について開示する。細胞合成粒子は組織操作の技術を用いて形成することができる。細胞合成粒子は研究目的のためインビトロモデルとして用いることもできる。細胞合成粒子は、細胞培養足場として、組織または臓器代替物として用いられる複雑な三次元構築物に構築することができる；それらは増量剤として一例えば注射可能な組成物の一部として、薬剤送達システムとして、または創傷治療デバイスとして用いることができる。

【0027】

細胞合成粒子の形成

本明細書に記載される技術の 1 つの実施形態では、細胞合成粒子は組織シートから切断される。組織シートは好適には本明細書において他の場所に記載または参照される他の方法から構築されるものであり、生細胞および該細胞により生成される細胞外マトリックスを含む。それは人工または他の外因性足場の必要性なしに高い機械的強度を有する。適切な組織シートは 50 ~ 300 μm 厚、一般的には約 50 ~ 100 μm 厚であり得る。こうしたシートを形成するための典型的な方法および装置は、そのすべてを本明細書に参照により組み入れる、Michel, et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim., 35 (6), 318 (1999); L'Heureux, et al., FASEB J., 12 (1), 47 (1998); L'Heureux, et al., Nat. Med., 12 (3), 361 (2006); L'Heureux, N., et al., N. Engl. J. Med., 357 (14) (2007), 1451; 米国特許第 7, 112, 218 号および第 7, 504, 258 号に記載されるような、シート系組織操作の方法である。

【0028】

組織シートは、細胞増殖を支持する無菌基質上に線維芽細胞を約 1×10^6 細胞 / cm^2 以下、好適には約 100 細胞 / cm^2 ~ 1×10^5 細胞 / cm^2 、より好適には約 $1 \times$

10^3 細胞 / cm^2 ~ 5×10^4 細胞 / cm^2 、もっとも好適には約 1×10^4 細胞 / cm^2 の密度で播種することにより生成することができる。細胞は好適には、細胞増殖および ECM 生成を支持する無菌培地上で増殖させる。こうした培地の一例は、4 mM の L-グルタミンもしくは同等物、20% のウシ胎児血清（好適には免疫グロブリン枯渇）および $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ のアスコルビン酸ナトリウム、または他のコラーゲン合成促進剤を添加した、ダルベッコ修飾イーグル培地（DMEM）（L-グルタミンを含まない、高グルコース製剤）およびハム F-12 培地のベース 3:1 混合物である。他の添加剤を用い、コラーゲンまたは他の ECM 成分（例えば、エラスチン）の生成を促進することができる。あるいは、無血清培地を用いることができる；この培地は化学的に定義することができる。増殖培地は 2 ~ 5 日毎に完全にまたは部分的に新鮮な培地で置き換えられる。細胞は約 10% の CO_2 、約 20% の O_2 を含有し、約 37 °C の温度の環境中に維持される。シートは低 O_2 濃度または CO_2 を必要としない培地でも増殖させることができる。細胞増殖および ECM 生成を支持する他の細胞適合性試薬および培養条件は、哺乳類細胞培養の当業者であれば確認することができる。シートの一般的な培養期間は約 24 週間以下、好適には約 1 ~ 16 週間、より好適には約 4 ~ 12 週間、もっとも好適には約 8 週間である。

10

20

30

40

50

【0029】

細胞合成粒子は、組織操作シートをすべての種類の形状、一般的には長方形を有する非常に小さい片に切断することにより形成することができる。これらの長方形は、幅広い粒子凝集組成物を形成するため、あの範囲内の異なるサイズ（例えば、 $0.1 \times 0.1 \text{ mm}$ ~ $20 \times 20 \text{ mm}$ の寸法に対応する、面積 0.01 mm^2 ~ 400 mm^2 ）で形成することができる。この実施形態では、粒子はシートの厚さに対応する 1 つの寸法を有する。長方形に加えて、他の形状（四角形、円形、楕円形、三角形、等）をシートから切断し、さらにより複雑な構築物を生成し、製造しやすさを向上する、または治療用途および効果を向上することができる。パターンの切断は、同じシートから異なる形状およびサイズを生成することができる。1 つの実施形態では、シートは互いに同じ形状およびサイズの粒子に切断される。別の実施形態では、異なる形状および / またはサイズの粒子が同じシートから切断される。粒子の幅または直径を記載する場合、粒子は 1 つの断面において円形である、または断面において均一であることも示さないことが理解されるべきである。幅または直径は従ってその粒子の平均寸法、または粒子の周囲上の 2 つの点の間の最長距離の測定値を指す。

【0030】

シートの切断は、刃、切断型、切断砥石、打抜型または針のような 1 つ以上の機械的装置により達成することができる。シートの粒子への破断は、光（レーザーを含む）、音、熱または他の形態のエネルギーを用いて行うこともできる。切断は液体または微粒子の噴射によって行うこともできる。より優れた正確さを達成するため、切断はマスク、ガイドを用いることができ、またはコンピュータ制御もしくは補助することができる。切断プロセスは部分的にまたは完全に自動化することができる。

【0031】

別の実施形態では、組織シートからの粒子の切断は、それぞれのシートから粒子を打ち出す、1 つまたは複数の中空針を用いて達成することができる。一般的には、こうした方法大きな力を針に印加する必要がある。ここでの針は、 $50 \text{ ミクロン} \times 50 \text{ ミクロン}$ のサイズの粒子を形成することができるが、 $10 \sim 100 \text{ ミクロン} \times 10 \sim 100 \text{ ミクロン}$ の範囲内のような他のサイズも可能である。通常、例えば空気の噴射または一吹きを針に送ることにより、針における開口から粒子を押し出すことも必要である。

【0032】

別の実施形態では、粒子は、図 7A に示されるように、カスタム設計の細断機 1 を用いて組織シートから形成することができる。こうした細断機の正確な外観は図 7A および 7B において純粹に例示的な形態で示される。細断機 1 の中心部分 3 は組織シート（図示せず）を含有する。シートは上プレート 7 と下プレート 5 との間にしっかり保持することができる。シートの張力は 1 つ以上のねじ 9 により調節することができる。切断ユニット 1

5 は複数のロッド 1 1 を含む。図示される実施形態におけるロッドは、2 つの平行な列に配置され、2 列のロッドの位置は互いに対してオフセットである。各ロッドは、刃として作用し、組織シートに切断作用を適用するように構成された、カットアウト 1 3 (図 7 B において拡大図で示される) を含有する。図示される実施形態では、切断ユニットは矢印の方向に進み、シート上を移動し、各列のロッドがシートの先端を横切ると多数の粒子を形成する。ロッドは、シートの端部に接する際垂直に (シートの平面に垂直に) さらに移動することにより、切断を促進することができる。流体流またはブラシを用い、シートの下に配置された容器 (図示せず) に落ちるように、粒子を刃具から除去することができる。本明細書における他の記載と一致して、異なるサイズの粒子を得るため、ある範囲のサイズのロッドを用いることができる。

10

【 0 0 3 3 】

切断はシート形成のいずれかの段階で行うことができ、その上で増殖させた基質からのシートの分離前、その間または後に行ってもよい。シートが基質にまだ付着したまま切断される場合、細胞合成粒子の分離は機械的に、酵素的に、化学的に、熱力学的変化 (例えば温度もしくは圧力変化の適用) により、または当技術分野において知られる他の方法を用いて達成することができる。シートは、粒子の形成前に脱水または失活させることができる。1 つの実施形態では、切断パターンはその後の粒子の分離を可能にする切り取り線をもたらしすることができる。切断パターンは、粒子を他の粒子に、またはシートの残りの部分に結合する組織の非常に小さなセグメントをもたらしすることができる。これは粒子の列または群および粒子の縁を有するシートを形成する 1 つの方法である。

20

【 0 0 3 4 】

粒子は、組織の集合が非常に小さい不連続培養表面上で増殖され、粒子を直接生成する場合、シートからの切断なしに生成することもできる。不連続表面は、培養基質の領域を選択的に処理し、そうでなければ非許容性の基質上への細胞接着を促進することにより、またはあるいは、定義領域を処理し、一般的に許容性の基質上への細胞接着を阻害することにより形成することができる。両アプローチは組み合わせて用いることができる。これらの表面は多数の形状を有することができ、同じ培地を共有することができ、薄い領域により結合し、その後の段階での粒子の分離、または崩壊を可能にすることができる。粒子は、本明細書において他の場所に記載される方法を用いて基質から分離することができる。

30

【 0 0 3 5 】

本明細書に記載されるような細胞合成粒子は、科学文献 (例えば、K e l m , J . M . , e t a l . , J . B i o t e c h n o l . , 1 7 (2 0 1 0) ; および N a p o l i t a n o , A . P . , e t a l . , T i s s u e E n g . , 1 3 (8) , 2 0 8 7 (2 0 0 7)) に以前記載された細胞凝集体とは顕著に異なる。多くの場合「自己組織化」と称され、これらの細胞凝集体は、基質に接着するのを妨げられた、単一の細胞懸濁液、または小集団から形成される。これらの凝集体は主に細胞からなり、顕著な量の E C M を含有しない。この違いは、その後の凝集体からの組織の構築および考えられる治療用途にとって重要な結果を有する。E C M の存在は細胞挙動および生存に好影響を及ぼし、機械的構造を提供する。また、懸濁液中に形成された細胞凝集体は、過度に高い非生理学的細胞密度を有し得、これは一般的には培養中または移植の際に細胞死をもたらし得る。E C M の欠如および過度な細胞密度は、移植の際に、こうした凝集体から生成される構築物の顕著な再構築を必要とする。さらに、過剰な量の死細胞および細胞破片は過剰な炎症を引き起こし得る。結果として、細胞凝集体からなる移植片の形態は、時間とともにマイナスであり得る方法で変化し得る。

40

【 0 0 3 6 】

対照的に、本明細書に記載される細胞合成粒子は、それらの複雑な天然 E C M のため、およびそれらの細胞密度が正常組織のものより一般的であるため、製造された組織および臓器が移植後それらの構造をより良好に維持することを可能にすることができる。

【 0 0 3 7 】

50

シートおよび初期粒子

粒子は自家または非自家（同種）ヒト細胞から、動物（異種）細胞から、遺伝子修飾細胞（ヒトもしくは動物）またはそのいずれかの組み合わせから生成することができる。粒子は完全にヒト細胞から、さらに自家形成し、免疫反応を回避することができる。

【0038】

線維芽細胞は粒子生成にとって好適な細胞タイプであるが、粒子は、これらに限定されないが：さまざまないわゆる間質細胞、筋線維芽細胞、筋細胞もしくはその前駆細胞、平滑筋細胞もしくはその前駆細胞、大食細胞、骨芽細胞もしくはその前駆細胞、間葉系幹細胞、骨髄由来幹細胞、脂肪由来幹細胞、皮膚由来幹細胞（付属物を含む）、胚性幹（ES）細胞、人工多能性幹（iPS）細胞またはそのいずれかの組み合わせのような、その他のECM生成細胞タイプを用いて生成することができる。これらの細胞はシート生成中に同時にまたは連続的に播種することができる。特定の細胞は免疫原性に関して重要な利点を有し得るが、本明細書に記載されるような粒子系組織操作の方法および用途は特定の細胞タイプに限定されない。いくつかの実施形態では、細胞は線維芽細胞ではなく、細胞培地は線維芽細胞を含まない。

10

【0039】

また、非ECM生成細胞はECM生成細胞と合体させ、他の生物学的機能を行う、製造を促進する、または移植の際に治療的役割を果たすことができる。これらの細胞は、組織、例えばシートの生成の始め、またはその間に添加することができる。あるいは、非ECM生成細胞は、シート生成プロセスの終わり（粒子形成前）に、シートの表面および/または底面上に播種することができる。この方法で用いることができる非ECM生成細胞タイプとしては、これらに限定されないが、神経細胞もしくはその前駆細胞、神経膠細胞もしくはその前駆細胞、島細胞もしくはその前駆細胞、肝細胞もしくはその前駆細胞、内皮細胞もしくはその前駆細胞、中皮細胞もしくはその前駆細胞、角化細胞、またはネフロンからの細胞が挙げられる。

20

【0040】

シートを生成するのに用いられる基質は、これらに限定されないが、耐久性（例えば非生物分解性）合成ポリマー（例えば、ePTFE）、再吸収性または生物分解性合成ポリマー（例えば、ポリグリコール酸）、生物学的材料（例えば、コラーゲン、エラスチン、タンパク質、ペプチド）のような、生体適合性材料の膜または薄層であり得る。1つの実施形態では、基質はシートとともに切断し、粒子の一部となり、これにより複合体粒子を生成することができる。こうした複合体生成物は、生物学的材料を基質から分離するステップを回避することにより、粒子を製造するより簡単な方法を提供する。いくつかの状況では、基質自体が、患者に注射された、または本明細書にさらに記載されるように成型された後、細胞合成粒子の治療に有益であり得る。基質は体積単位当たりの製品のコストを低減する充填剤でもあり得る。

30

【0041】

シート増殖中、外因性成分は培地に添加され、シートに埋め込まれ、またはそうでなければ合体され、最終的にはそのシートから生成される粒子の一部となることができる。これらの成分としては、これらに限定されないが、天然もしくは合成ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、プロテオグリカン、抗体、多糖、DNAもしくはRNA、トランスフェクション剤、抗生物質、医薬剤、金属粒子、不溶性鉱物結晶もしくは粒子、ポリマー粒子、放射性薬剤、薬物送達システム、無線周波数識別（RFID）チップまたは他の磁気もしくは電子装置が挙げられる。識別目的のほか、これらの添加物は、さらなる操作、保存、診断的、外科的用途または治療を促進または向上する役割を果たすことができる。

40

【0042】

粒子の生成後の処理

細胞合成粒子は、被験者に導入される場合、生体であり、所望の生物学的効果または有益な治療をもたらすことができる。しかしながら、細胞合成粒子を生成するのに用いられるシート、または粒子自体は、失活または脱細胞化することもできる（両プロセスは本明

50

細書において他の場所に「失活」の語により表される)。失活は完全または部分的であり得る。それは、これらに限定されないが、乾燥、加熱、冷却、冷凍、酸、アルカリ、酵素、塩、毒素もしくは溶媒のような、化学物質の添加、またはこれらに限定されないが、超音波、放射線、機械的力および浸透圧を含む、さまざまな形態のエネルギーの印加を含む、当技術分野において知られる方法のいずれか、または組み合わせにより達成することができる。失活プロセスは二次効果を有することができ、機械的強度の増加、免疫原性もしくは血栓形成性の低減、製造の促進、または移植成功の可能性の向上のような、潜在的な目的のために行うことができる。これは、例えば、同種または異種移植における有害免疫反応のリスクを低減することにより、粒子の治癒効果を向上させることができる。これは、粒子の加工、保存および輸送を簡単にすることもできる。脱細胞化もより複雑な粒子系生成物の構築にとって必要または実践的であり得る。

10

【0043】

培養基質からの分離後、細胞合成粒子は移植もしくは組織構築に直接用いることができ、またはそれらは培養において生きたまま維持し、組織収縮もしくは他の生物学的変化が起こることを可能にすることができる。粒子は、攪拌、圧縮、または圧延に関連するもののような力により生成される応力下に機械的に条件づけることができる。図4は、細胞が死んでいるか生きているかに応じて、粒子表面積が培養において時間とともにどのように変化するかを示す。

【0044】

1つの実施形態では、粒子は、攪拌バイオリアクターにおいて懸濁液中に維持される。粒子上の流体せん断応力の誘発は、細胞生存性を維持し、これにより有用および有益な生成物を生成するのにとくに重要であり得る。これは液体培地の攪拌の動作が O_2 の細胞中への移動を加速するためであり得ることが理解される。液体でせん断された細胞がその発現プロファイルを変化させることも周知である。その動作は、細胞がコラーゲンまたは他のタンパク質を生成または分解するのを誘発することもできる。生体(非失活)細胞合成粒子は、バイオリアクターまたは当技術分野において知られるその他保存システムに保存し、粒子の生存性を維持しながら、機械的応力および歪みを印加する(機械的条件づけ)、または他の環境条件(例えば適当な O_2 濃度および温度)を構築することができる。細胞合成粒子は、当技術分野において知られる方法を用いて極低温保存および冷凍形態で保存し、生存性を維持することもできる。すべての細胞の完全な生存性を達成するのはほぼ不可能である;いくつかの細胞は常に死滅することが理解される。

20

30

【0045】

粒子は、例えば粒子を表面上で圧延することにより機械的に加工し、それらをより球形または卵形粒子に成形することもできる。これは1つ以上の乾燥または再水和ステップと併せて行うことができる。これは粒子調製にとりわけ良好な注射可能特性を提供することができる。

【0046】

加えてまたはあるいは、細胞合成粒子またはシートは、完全もしくは部分失活を達成する、免疫原性効果を低減する、生物分解を遅延する、機械的特性を変更する、または単純に化学的もしくは生物学的化合物を粒子もしくはシートに直接付着するのに用いることができる、アルデヒドを含む、さまざまな強度を有する強力な架橋剤で処理することができる。

40

【0047】

粒子は、本明細書において他の場所に記載されるように、前述のような条件下で失活および/または架橋することもできる。生体粒子は本明細書に記載される生成ステップのいずれかで失活させることができる。失活プロセス中または後、生体粒子は、流体せん断応力を含む、圧縮、磁気、等尺、等張、変調または他のタイプまたは型の力により、いずれかまたは多数の方向で機械的に条件づけることができる。失活粒子は、水溶液、アルコール、または架橋剤の溶液のようなさまざまな液体中に保存することができ、乾燥または冷凍することができる。

50

【 0 0 4 8 】

細胞合成粒子、生体もしくは失活粒子、または粒子を形成するのに用いられるシートの生成中のいずれかの時間に、生成物はさまざまな作用剤でコーティングし、治癒、機械的特性もしくは治療効果を向上する、生成物を標識する、またはさらなる製造を促進することができる。これらの作用剤としては、これらに限定されないが、外因性タンパク質もしくはペプチド、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、天然デオキシリボ核酸（「DNA」）、組換えDNA、天然リボ核酸（「RNA」）、組換えRNA、ウィルス剤、トランスフェクション剤、増殖因子、抗増殖剤、抗体、抗生物質もしくは消毒薬またはこれらの化合物のいずれかのフラグメントもしくは組み合わせが挙げられる。

【 0 0 4 9 】

粒子の製造プロセス前、後またはその間のいずれかの時間に、生体もしくは失活粒子、または細胞合成粒子を形成するのに用いられるシートには、新規、または追加の細胞を播種することができる。追加の細胞は、粒子生成に用いられたものと同じもしくは異なるタイプ、または細胞集団の組み合わせであり得る。これらの追加の細胞は自家もしくは非自家ヒト（同種）細胞、動物細胞、遺伝子修飾細胞（ヒトもしくは動物）またはそのいずれかの組み合わせであり得る。追加の細胞はECM生成、または非ECM生成細胞であり得る。追加の細胞を用い、治癒、機械的特性もしくは治療効果を向上する、生成物を識別する、またはさらなる製造を促進することができる。追加の細胞を用いた結果、実際に、以前記載された方法のいずれか、またはすべてにおいて変えることができる複合体粒子を形成する。

【 0 0 5 0 】

特殊化した新規細胞の粒子への添加は、標的組織および臓器を修復または置換する手段であり得る。例えば、新規腎臓組織を生成するため、一次腎細胞集団を注射前に粒子の表面上に播種することができる。腎細胞が粒子に付着し、実質的に増殖した後、これは適当なバイオリアクターにおいて達成することができるが、細胞播種粒子を適当な場所に注射し、新規組織を形成することができる。あるいは、特殊化した細胞は粒子の切断前にシートに添加することができる、または単純に粒子と共注射することができる。線維芽細胞の存在が結果にマイナスの効果を有する場合、失活粒子を代わりに用いることができる。

【 0 0 5 1 】

追加の細胞を添加する別の例では、心筋細胞、筋細胞またはそれらの前駆細胞および、場合によっては内皮細胞を粒子に添加し、不全心臓の壁に注射することができる。不全心臓の細胞系治療はいくらかの可能性を示したが、厄介な問題は、心臓の壁に注射された細胞の非常に低い定着および生存率である。粒子に付着した細胞の注射は、単純な機械的障害のため、定着を向上することができ、細胞が天然ECMに付着し、懸濁液中に存在しないため、生存を向上することができる。

【 0 0 5 2 】

本明細書に記載される細胞合成粒子の主な用途は、注射可能な組成物の一部としてのものである。こうした組成物は修復が必要な部位に直接注射することができる。注射に用いられる針のゲージは粒子の平均サイズに応じて異なる。本明細書における粒子を含有する組成物は従って、例えば美容外科における皮膚充填剤としての用途を有する。こうした組成物は、少なくとも周囲組織中に真に一体化する可能性を提供するので、当技術分野において用いられる非生体および無機材料（例えば、プラスチックおよびセラミック）とは異なる。本明細書において他の場所に記載されるように、本技術の組織操作粒子は、例えば単一の細胞株/ドナーから生成することができるので、より良好な品質管理を提供するという点で、美容用途を有する、死体組織から生成される皮膚充填剤、Fascianとも異なる。

【 0 0 5 3 】

細胞合成粒子の複雑な構造体への構築

多孔性構造および複雑な形態を有する凝集性および完全に生物学的な生体組織は、生体細胞合成粒子から生成することができる。これらの組織は、組織内の顕著なボイド空間の

10

20

30

40

50

ため、S B T E または T B T E で形成された組織ほど機械的には強くない。強度は組織融合に大いに依存し、ポイドがあるため、粒子の一部のみが接触している。S B T E により生成されたシートは固有の強度を有し、T B T E により生成されたスレッドは融合なしに強度を生み出す配置を有する。

【 0 0 5 4 】

しかしながら、本明細書に記載されるアプローチにより形成された粒子は、組織シートおよびスレッドに対して他の重要な利点を有する。もっとも顕著には、P B T E は、チャンネルの複雑なネットワークの発達を可能にする、大きなポイド空間を有する組織を生成する。これらのチャンネルを用い、血管、リンパ管、分泌管、気道または他の同様の構造体を形成することができる。その目的のため、特殊化した細胞をポイド空間に播種することができる。これらの構造体は、肝臓、腎臓、脳、脾臓、肺、脂肪組織、骨、軟骨またはその他のようなさまざまな臓器および組織を模倣することができる。これらの構築物におけるポイド空間は、所望の構造または治療効果を達成するため、外因性 E C M (他の場所で供給され、例えばフィブリン、またはエラスチンを含む E C M) のような他の材料で充填することもできる。また、P B T E は、達成することができる形態、多孔性および細胞含有量の幅広い範囲および微細な分布のため、複雑な形態の生成を促進することができる。例えば、さまざまなサイズおよびさまざまな形状の粒子を構築することにより、幅広い範囲の多孔性組織を形成することができる。組み合わせられ、これらの特徴は、P B T E が血管新生した大きな臓器の生成にとって顕著な利点を提供することを意味する。利用可能なさまざまな構築技術の利点を活かし、大きな臓器は、体の血管構造に接続することができる細孔またはチャンネルのネットワークとともに構築することができる。

10

20

【 0 0 5 5 】

細胞合成粒子を用い、さまざまな二次元 (すなわち、平面)、好適には三次元構築物を生成することができる。本発明のもっとも簡単な実施形態では、バイオリアクター中の培地における、懸濁液中の生体粒子は、容器の底に沈殿させ、細胞生存にとって好ましい環境条件中に維持される。数時間から数日まで、数週間まで、および数か月までにも及ぶ成熟期後、粒子は細胞活性 (例えば、細胞 - 細胞接着、細胞 - E C M 接着および E C M 合成) の結果として融合する。成熟時間は一般的には展開剤により制御され、特定の細胞タイプでの経験および特定の用途にとっての目標 (組織硬度のようなパラメータにより定義される) に基づき決定される。

30

【 0 0 5 6 】

粒子融合を誘発する方法は、さまざまな物理的方法 (遠心分離、圧縮、濃縮、例えば、粒子中に磁性体を含めた後、磁場を印加して粒子に力を及ぼすことによる、粒子の磁気環荷、静電力、等) を含むことができる。1つの実施形態では、粒子は1つの開放端および紙で封止した他端を有する無菌チューブ中に入れる。粒子を充填したチューブは培地を充填したバイオリアクターに入れ、同心円状に回転させ、粒子塊によって遠心力および培地流動の両方を誘発する。粒子融合を誘発する薬理学的方法を用いることもできる: 1つの方法は、細胞活性を促進する添加物を培地中に導入することによる。生物学的または化学的接着剤のような接着剤を用いることもできる。ペプチド、タンパク質、抗体、等を用いるリガンド - レセプターの組み合わせのような分子接着剤を用いることができる。外因性供給源からの酵素活性を用いることもできる。別の実施形態では、粒子はヒドロゲルまたは多数の粒子を含む凝集性組織を形成する他の化合物中に埋め込まれる。別の実施形態では、粒子は生体適合性膜または封入体を形成する他のデバイス中に封入される。別の実施形態では、失活粒子が用いられ、粒子間結合を形成するのに化学的架橋剤が用いられる。

40

【 0 0 5 7 】

構築物は粒子の連続構築により生成し、同じまたは異なる特性を有する層を形成することができる。構築物は、同じまたは異なる細胞タイプの生体および失活粒子の両方を組み合わせることにより生成することができる (いずれかの粒子組成を用いることができる)。異なるサイズの粒子を用いることができる。沈殿表面の形態を変え、構築物形態を制御

50

することができる。粒子は金型または鋳型において構築することができる。特定のタイミングおよび特別に調整した粒子サイズの分布を用いることにより、幅広い範囲の複雑な構造体を生成することができる。

【0058】

組織構築物における追加のボイド空間は、粒子構築中に外因性物体を完全にまたは部分的に埋め込み、次に粒子が融合された後この物体を除去することにより形成することができる。あるいは、外因性物体は構築物中に残し、粒子融合、機械的特性、治癒もしくは治療効果を向上すること、生成物を標識すること、またはさらなる製造を促進することができる。物体は、天然または合成、および本質的に耐久性または再吸収性であり得る材料で生成することができる。物体は、本明細書においてそこから粒子が切断される組織シートに場合によっては埋め込まれる、またはそうでなければ含まれると記載される外因性成分のいずれかであり得る。また、物体は、構築された粒子系構築物がシートの厚さよりかなり大きくあり得るので、シートに埋め込まれたものより物理的に大きくあり得る。追加の物体としては、チューブまたはカニユーレならびにさまざまなタイプのコネクタ、ハンドル、ワイヤー、ループ、磁石および組織操作、移植またはさらなる製造を促進する接続、縫合または固着装置を挙げることができる。これらの物体としては、心臓血管ステントまたは血管グラフトのような装置を挙げることができる。

10

【0059】

これらの構築物には、個別の粒子について以前記載されたものと同じ処理および手順を、同じ理由で行うことができる。例えば、構築物は、生きたまま維持し、さらなる細胞活性および再構築を可能にすることができる。それらはさまざまな液体中に保存、乾燥または冷凍することができる。生体構築物は、当技術分野において知られる方法を用いて冷凍し、一部の生存性を維持することができる。構築物は、本明細書において他の場所に記載されるように、部分的にまたは完全に失活させる、機械的力に曝露する、さまざまな作用剤で架橋またはコーティングすることができる。

20

【0060】

構築物生成後、またはその間のいずれかの時間に、新規細胞を構築物に添加することができる。細胞は粒子生成に用いられたものと同じもしくは異なるタイプ、または細胞集団の組み合わせであり得る。これらの細胞は自家もしくは非自家ヒト細胞（同種）、動物細胞、遺伝子修飾細胞（ヒトもしくは動物）またはそのいずれかの組み合わせであり得る。これらの細胞はECM生成または非ECM生成細胞であり得る。これらの追加の細胞を用い、粒子融合、機械的特性、治癒もしくは治療効果を向上する、生成物を標識する、またはさらなる製造を促進することができる。構築物におけるチャンネルには、適当な特殊化した細胞を播種し、置き換える組織または臓器を模倣することができる。

30

【0061】

より複雑な構築物は、本明細書に記載されるような細胞合成粒子を細胞合成シート（例えば、米国特許第7,112,218号および第7,504,258号参照）および細胞合成スレッド（米国特許出願公開第2010-0189712号）と組み合わせることにより生成することができ、そのすべての全開示を本明細書に参照により組み入れる。

【0062】

本明細書に記載されるような粒子は、臓器修復、およびほぼすべての体組織の置換のための支持構造体を提供するのに用いることができ、これらに限定されないが、肝臓、腎臓、脳、脾臓、肺、脂肪組織、骨、および軟骨の修復または置換を含む用途に用いることができる。また、粒子は形成および再建手術に再生、充填または増量剤として用いることができる。1つの実施形態では、粒子はシリンジ状装置で注射することができる。

40

【0063】

組織構築物は、細胞合成粒子をインビトロで培養することにより構築することができる。例えば、粒子は、例えば1つ以上のタイプの細胞合成粒子を容器に入れることにより、金型中に沈殿させ、他の媒体と組み合わせることができる。他の細胞を導入し、粒子が互いに融合し、組織を形成するのを助けることができる。成型組織は次に、例えばさまざま

50

な成形手段を用いることにより、所望の構築物に成形することができる。

【0064】

本明細書に記載されるような粒子は、ある範囲のサイズで生成することができる。例えば、粒子が細胞のシートから切断される場合、粒子は100ミクロン～2cmの範囲の幅を有することができる。粒子幅の他の範囲としては、10～150ミクロン、1mm～10cm、0.5cm～5cm、および1～2cmが挙げられる。また他の範囲としては：10～25ミクロン；25～50ミクロン；50～75ミクロン；75～100ミクロン；100～150ミクロン；150～200ミクロン；200～250ミクロン；250～300ミクロン；300～500ミクロン；500～750ミクロン；750～1000ミクロン；1000～1250ミクロン；1250～1500ミクロン；1500～2000ミクロン；2000～2500ミクロン；および2500～5000ミクロンが挙げられる。前述のリストの範囲の異なる各範囲から選択される下端点およびより上端点からなる他の範囲を用い、粒子幅の有用な範囲を記載することもできることが理解されるべきである。正確な数（例えば、250ミクロン）として表される範囲はあるいはいくらかの不正確さを有するもの（例えば、「約250ミクロン」）として表し、これにより正確に記載された範囲からやや外れた値を含むことができることがさらに理解されるべきである。一般的には、「約」の使用は+/-5%の不正確さを表すことができる。他の典型的な幅は、0.4、0.6、および0.8cmである。好適な粒子サイズは0.1～1mmの範囲内に該当する。サイズは全体の平均として表すことができる。従って、例えば、シートから切断された粒子の全体は特定の範囲、例えば、長さおよび幅0.3～0.5mm内のサイズを有することができる、すなわち、全体の平均は0.3～0.5mmである。本明細書において他の場所に記載されるように、粒子の厚さはそこから切断されるシートの厚さに由来し、一般的には0.05～0.3mmであり得る。長さ寸法による粒子サイズの表示は、例えば対応する体積を記載することによる、サイズを定量化する他の方法を排除しない。

10

20

【実施例】

【0065】

実施例1：注射可能な細胞合成粒子

細胞合成組織シート（本明細書において他の場所に記載される方法により生成）を24週間の培養期間後に切断し、粒子を生成する。この用途には、面積約1mm²の粒子が好適であり、これは直径約250μmの回転楕円体の体積に近いが、注射可能な粒子をもたらすいずれの粒子サイズも用いることができる。シートは培養基質から機械的に分離され、まな板に移される。多刃工具を用い、シートを1つの方向に、その後垂直方向に切断し、個別の粒子を形成する。粒子は細胞適合性液体中に懸濁させ、細胞合成粒子を形成する。粒子はすぐに注射する、より球形に収縮させる、またはそうでなければ数分～何か月もの範囲であり得る時間で再構築することができる。これは、粒子再構築および生存を促進し、治療効果を向上する、攪拌または培地のような、特定の培養条件を提供するバイオリアクターにおいて達成することができる。

30

【0066】

移植前、粒子は、数分～数日間、特定の緩衝剤ですすぎ、移植の成功に悪影響を及ぼし得る、ウシ血清のような培地の望ましくない成分を除去することができる。それらは、移植片の治癒を促進する、製剤の体積を増加する、または他の所望の効果を有する作用剤でインキュベート、もしくは単にこれと共に注射することもできる。例えば、作用剤は注射の部位で血管新生を促進し、粒子生存ならびに新生組織形成および安定を向上することができる。別の実施形態では、作用剤は、注射された粒子が骨の修復治療として意図される場合、石灰化が有利である。別の実施形態では、粒子はフィブリン接着剤、または他の足場ゲルと注射され、注射後より凝集性の塊を形成する。

40

【0067】

実施例2：組織修復のための多孔性足場

この実施形態では、生体粒子を生成し（1mm²断面積）、バイオリアクターにおいて

50

、攪拌条件下（40RPM）37 および10%のCO₂の培地中に3日間維持する。粒子は次に多孔性底部を有する金型に注ぐ。例えば、金型は100μmの細孔サイズを有するポリエステルのメッシュにより閉じられた1つの末端を有するシリコンシリンダー（1cm内径）であり得る。粒子をチューブに注いだ後、他の末端は、1mm内径の中央開口を有する挿入物で閉じることができる。金型はその後回転シャフト上に、メッシュがシャフトの反対側に向き、挿入物がシャフト側に向くように取り付けられる（シャフトは垂直であるが、チューブは水平に配向される）。シャフトはその縦軸のまわりを回転するので、チューブはシャフトに対して放射状に配向される。得られる遠心力は組織をメッシュに接して維持し、組織内の培地交換を確実にする。3週間後、粒子は組織に融合し、金型から取り出すことができる。この組織は患者に移植し、欠損を埋めることができる。組織におけるポイド空間はグラフトの血管新生および全体的な形態の維持に有利である。

10

【0068】

代替アプローチでは、組織は失活させ、患者自身の細胞で完全に再配置される。このアプローチは、失活グラフトは生体組織よりかなり容易に保存および輸送することができるので、製造の観点から顕著な利点を有する。また、失活組織は、シートが自家細胞でいくつかの免疫反応を回避することにより生成された場合、治癒の向上をもたらすことができる。失活自家組織でも、線維芽細胞が組織の血管新生または他の有益な再構築を阻害する場合、より良好な結果をもたらすことができる。より良好な治癒は、例えば、構築物のポイド空間の内腔表面に結合したヘパリンコーティングを追加することにより達成することもできる。このヘパリンには、マトリックスの血管新生を加速する血管内皮増殖因子をさらに装填することができる。

20

【0069】

1つの美容用途は、輪郭変形を削る、または腫瘍欠損を置き換えることである。除去された癌性組織の体積を患者自身の血管再生組織で復元する臨床的に変換可能な方法の開発には、多数の再建、美容、および矯正の可能性がある。

【0070】

実施例3：特殊化した細胞を含有する多孔性足場

本明細書において他の場所に記載されるように、生体または失活細胞合成粒子を用い、多孔性足場を形成することができる。足場には移植前に細胞集団を播種することができる。この播種足場は、細胞集団に基づき、いずれかの臓器の正常な機能を模倣または補足する能力を有する。この細胞模倣性を用い、生化学的役割、例えばインスリンの生成、または構造的役割を行うことができる。1つの実施形態では、内皮細胞またはその前駆細胞を播種し、内皮細胞がレシピエントの周辺細胞から遊走する自発的再構築によるものより迅速に血管の機能的ネットワークを形成することができる。機能的血管構造を有することにより、移植片はそのもとの形状を維持し、美容および再建外科のためのより良好な製品を提供する可能性が高い。組織の形成中、1つ以上のチューブ状構造は組織に部分的に一体化させることができ、自由端はレシピエントの血管に結合されたままであり、他端は組織に埋め込まれ、組織におけるチャンネルに接続され、よって組織の灌流を可能にする。この灌流はインビトロで行い、組織形成を向上し、移植に備えることもできる。

30

【0071】

また、特殊化した細胞は内皮細胞とともに用い、さらなる機能を追加することができる。例えば、脂肪細胞またはその前駆細胞が播種される場合、粒子構築物は外科医に、乳房再建のための所定の体積の患者に特異的な脂肪組織の供給源を提供することができる。膵臓細胞が播種される場合、この構築物はグルコースチャレンジに対してインスリンを生成することができる。一次腎細胞が播種される場合、この構築物は機能的血液濾過ユニットに再構築することができる。肝細胞が播種される場合、この構築物は不全肝臓に移植し、解毒機能を向上することができる。

40

【0072】

実施例4：研究モデル

粒子は、インビボ腫瘍微小環境の態様を再現する複雑な細胞培養モデルの構築に用い、

50

腫瘍発症、進行、および治療の変遷を多重スケールで研究することができる。粒子は複雑な細胞培養モデルの構築に用い、血管ネットワーク発達を灌流下で研究することができる。

【0073】

実施例5：PBTE、TBTEおよびSBTEの組み合わせ

細胞合成シート、スレッドおよび粒子はそれぞれ、組織および臓器設計に関して明確な異なる利点を有する。この実施形態では、封入体はシートを巻くことにより形成することができる。この封入体は、縫合材料としてスレッドを用いてシートの縁を縫い合わせるにより、完全にまたは部分的に封止することができる。封入体は次に特殊化した細胞（例えば、肝細胞）を播種した粒子で充填することができる。封入体は、米国特許第7, 112, 218号に記載されるように、シートから形成されたチューブに接続し、灌流系を形成することができる。この組織のポイド空間には内皮細胞を播種することができる。適当なインビトロ培養期間後、この構築物は、チューブを患者の循環系に接続することにより、患者に移植することができる。いくつかのチューブは肝管、胆管、または直接十二指腸に接続することができる。こうした構築物は完全に生物学的な肝臓様構造体を提供することができる。シートおよびスレッドは生体適合性材料により置き換えることができる。当業者であれば、用いられる特殊化した細胞、構築物の形態および移植場所を変えることにより、多数の臓器を形成することができることを理解することができる。このアプローチを用い、内壁を内皮細胞および気道上皮で覆い、チューブのいくつかを気管支に接続することにより、肺を形成することもできる。

10

20

【0074】

本明細書に記載される方法および装置は一般的にはヒトに用いられる組織粒子を形成するのに適用されるが、本方法および装置は、獣医学および農学用途の、例えばペットおよび家畜のための組織粒子を形成するのに採用することもできることが理解されるべきである。一般的には、本明細書における方法および装置は哺乳類に適用されるが、こうした方法は鳥類、爬虫類、両生類、および魚のような水生生物に用いられる組織を形成することもできる。

【0075】

前述の記載は本技術のさまざまな態様を例示することを意図する。本明細書において提示される実施例は添付の特許請求の範囲を限定することを意図しない。本発明はここで十分に説明され、添付の特許請求の範囲またはその精神を逸脱することなく多くの変更および修正を行うことができることは当業者にとって明らかである。

30

【0076】

本明細書において引用されるすべての参考文献は、そのそれぞれの全開示をすべての目的のため本明細書に参照により組み入れる。

【図 1 A】

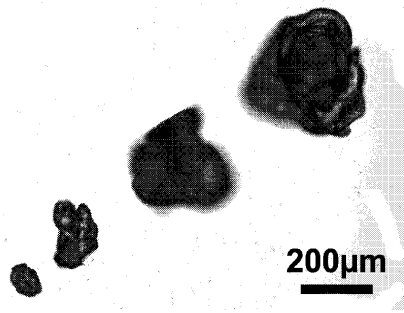


FIG. 1A

【図 1 B】

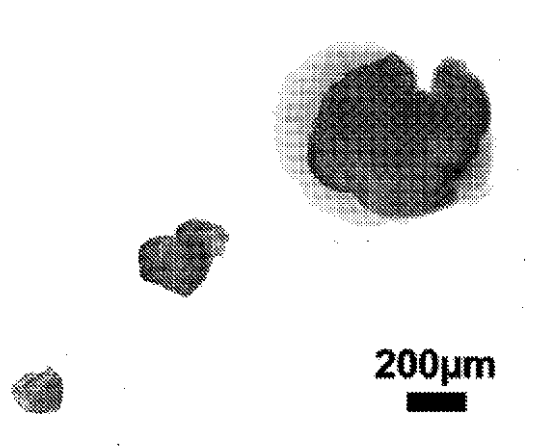


FIG. 1B

【図 2】

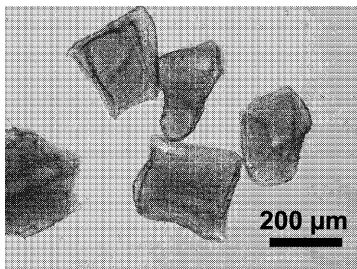


FIG. 2

【図 4】

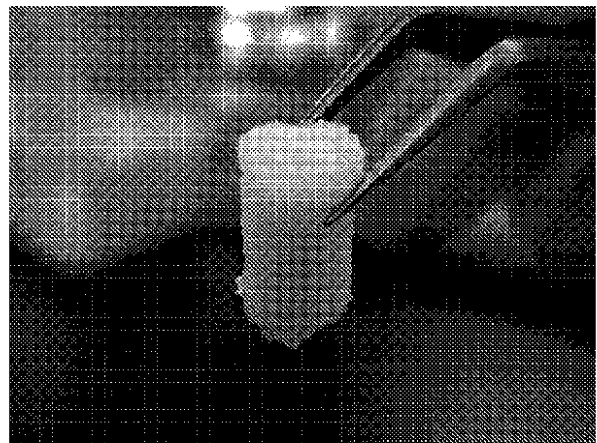
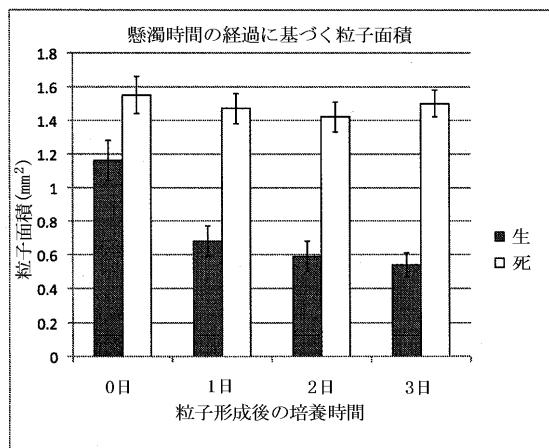


FIG. 4

【図 3】



【 図 5 】

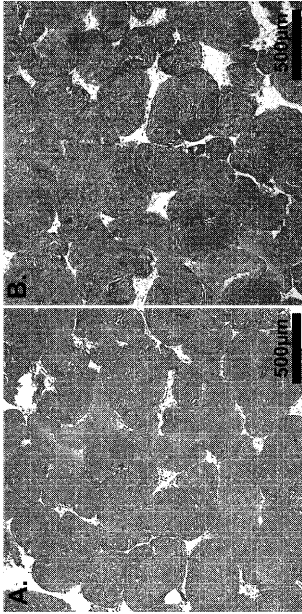


FIG. 5

【 図 6 】

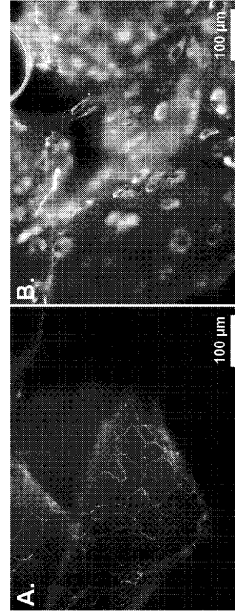


FIG. 6

【 図 7 A 】

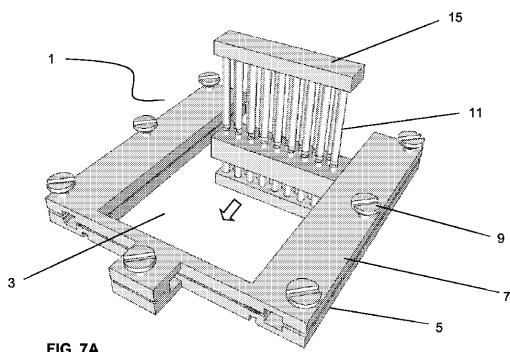


FIG. 7A

【 図 7 B 】

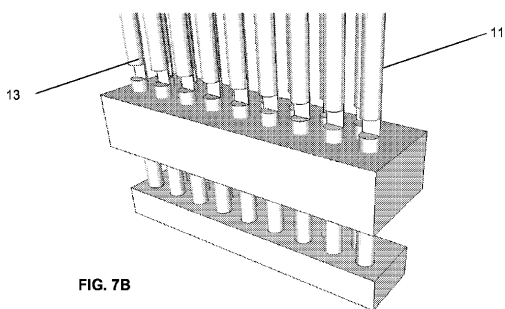


FIG. 7B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/34692																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/00; C12N 5/02 (2012.01) USPC - 435/325 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12N 5/00; C12N 5/02 (2012.01) USPC - 435/325 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - C12N 5/00; C12N 5/02 (2012.01), USPC - 435/325; keyword search, as below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO PubWest (databases: PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Google Scholar -- Search Terms: cells, particles, devitalized, dried, dry, lyophilized, non-viable, extracellular matrix, ECM, recombinant, heterologous, engineered, exogenous, produce, form, inject, syringe, intravenous, subcutaneous																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X --- Y</td> <td>US 2009/0142836 A1 (WANG et al.) 4 June 2009 (04.06.2009) para [0020]; [0052]; [0053]; [0055]; [0004]; [0064]; [0079]; [0062]</td> <td>1-7 ----- 22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2011/0064701 A1 (YOUNG et al.) 17 March 2011 (17.03.2011) abstract, para [0049]; [0091]; [0304]; [0450]; [0313]</td> <td>22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2009/0196901 A1 (GULIAK et al.) 6 August 2009 (06.08.2009) whole doc.</td> <td>1-7, 22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010/0112031 A1 (KATZ) 6 May 2010 (06.05.2010) whole doc.</td> <td>1-7, 22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010/0189712 A1 (L'Heureux et al.) 29 July 2010 (29.07.2010) whole doc.</td> <td>1-7, 22</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X --- Y	US 2009/0142836 A1 (WANG et al.) 4 June 2009 (04.06.2009) para [0020]; [0052]; [0053]; [0055]; [0004]; [0064]; [0079]; [0062]	1-7 ----- 22	Y	US 2011/0064701 A1 (YOUNG et al.) 17 March 2011 (17.03.2011) abstract, para [0049]; [0091]; [0304]; [0450]; [0313]	22	A	US 2009/0196901 A1 (GULIAK et al.) 6 August 2009 (06.08.2009) whole doc.	1-7, 22	A	US 2010/0112031 A1 (KATZ) 6 May 2010 (06.05.2010) whole doc.	1-7, 22	A	US 2010/0189712 A1 (L'Heureux et al.) 29 July 2010 (29.07.2010) whole doc.	1-7, 22
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X --- Y	US 2009/0142836 A1 (WANG et al.) 4 June 2009 (04.06.2009) para [0020]; [0052]; [0053]; [0055]; [0004]; [0064]; [0079]; [0062]	1-7 ----- 22																		
Y	US 2011/0064701 A1 (YOUNG et al.) 17 March 2011 (17.03.2011) abstract, para [0049]; [0091]; [0304]; [0450]; [0313]	22																		
A	US 2009/0196901 A1 (GULIAK et al.) 6 August 2009 (06.08.2009) whole doc.	1-7, 22																		
A	US 2010/0112031 A1 (KATZ) 6 May 2010 (06.05.2010) whole doc.	1-7, 22																		
A	US 2010/0189712 A1 (L'Heureux et al.) 29 July 2010 (29.07.2010) whole doc.	1-7, 22																		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 11 September 2012 (11.09.2012)		Date of mailing of the international search report 21 SEP 2012																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/34692

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 21
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-7, 22

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/34692

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Group I: Claims 1-7, and 22, directed to a composition comprising one or more tissue engineered particles, the particles comprising one or more biological cells and an extracellular matrix synthesized by the cells.

Group II: claims 8-17, directed to a method of making a tissue engineered particle composition, the method comprising:

- (a) seeding a population of cells in a culture vessel;
- (b) culturing the cells under conditions that allow the formation of a tissue sheet in contact with an inner surface of the culture vessel, wherein the sheet is comprised of cells and extracellular matrix synthesized by the cells; and
- (c) cutting the sheet into a plurality of pieces thereby forming a particle composition.

Group III: claims 18-20, directed to a method of making a tissue-engineered construct, the method comprising:

- (a) placing one or more types of cell-synthesized particle compositions in a container;
- (b) culturing the particles under conditions that allow the fusion of the particles, thereby forming a tissue; and
- (c) shaping the tissue into a construct.

The inventions listed as Groups I - III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of the claims of Groups I-III are disclosed in the Group descriptions, above. Group III includes elements, including the fusion of particles to form a tissue, and shaping the tissue-engineered construct, which are not found in the claims of Group II.

The only common technical element shared by all of the above groups is that they are related to tissue engineered particles, the particles comprising one or more biological cells and an extracellular matrix synthesized by the cells. Groups II and III share the further common technical elements of being related to a method of making a tissue engineered particle composition, the method comprising: (a) seeding a population of cells in a container; (b) culturing the cells under conditions that allow the formation of a tissue sheet; and (c) shaping or cutting the construct. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2010/0189712 A1 to L'Heureux et al., which teaches "a tissue engineered biocompatible thread composition comprising one or more biological cells and an extracellular matrix synthesized by the cells" (para [0011]), as well as "a process for making a tissue engineered biocompatible thread composition, the process comprising: (a) seeding a population of cells in a culture vessel; and (b) culturing the cells under conditions that allow the formation of a tissue sheet comprised of cells and extracellular matrix synthesized by the cells in contact with the surface of the culture vessel; and (c) cutting the sheet into one or more strips thereby forming a biocompatible thread composition" (para [0012]). (Note: although L'Heureux does not specifically recite the term "particles", the instant application indicates wherein "Particles can be comprised of one or more cell types and have various sizes or shapes" (instant application; para [0019]), and wherein "The processes described herein result in a biological particle that is comprised of unmodified natural ECM" (instant application; para [0021]). Since, as above, L'Heureux teaches both elements, the claimed particles are inherently disclosed by L'Heureux.

Therefore, the inventions of Groups I-III lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 ニコラス ルルー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 9 0 1 サン ラファエル エッジウッド ウェイ 2
0

(72)発明者 トッド エヌ マカリスト

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 9 6 0 サン アンセルモ サン アンセルモ アベニ
ュー 1 0 0 9

Fターム(参考) 4C081 AB11 CD34 CE01 CE02 DA11 EA01