

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7636801号
(P7636801)

(45)発行日 令和7年2月27日(2025.2.27)

(24)登録日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	9/06 (2006.01)	A 6 1 K	9/06
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/20 (2006.01)	A 6 1 K	47/20
請求項の数 28 (全47頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-571880(P2021-571880)	(73)特許権者	521527990
(86)(22)出願日	令和2年6月5日(2020.6.5)		リカルダ、インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2022-534787(P2022-534787 A)		L I K A R D A, I N C.
(43)公表日	令和4年8月3日(2022.8.3)		アメリカ合衆国ミズーリ州、カンザスシ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/036361		ティ、ヒックマン、ミルズ、ドライブ、
(87)国際公開番号	WO2020/247776		1 0 3 3 0、ビルディング、ツー、スイ
(87)国際公開日	令和2年12月10日(2020.12.10)	(74)代理人	100107342
審査請求日	令和5年5月17日(2023.5.17)		弁理士 横田 修孝
(31)優先権主張番号	62/858,578	(74)代理人	100155631
(32)優先日	令和1年6月7日(2019.6.7)		弁理士 榎 保孝
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100137497
			弁理士 大森 未知子
		(74)代理人	100207907
			弁理士 赤羽 桃子
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ハイドロゲル微粒子の調整可能な分解

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

移植部位に治療用の細胞および／または組織を局所的に送達し徐放するための球形または楕円形の非アルギン酸系ハイドロゲル微粒子であって、前記微粒子は共有結合によって架橋された非アルギン酸系ポリマー化合物の3次元マトリックスと、その中に封入された治療有効量の細胞および／または組織とを含み、前記細胞は少なくとも約50%の生存率を有し、前記微粒子は約30μm超のサイズを有し、前記微粒子はオイルエマルジョンなしに形成され、前記ポリマー化合物はポリエチレングリコールマレイミドであり、前記マトリックスは、ジチオスレイトール、ポリエチレングリコールジチオールおよびエチレングリコールビス−メルカプトアセテートからなる群から選択される、前記非アルギン酸系ポリマー化合物と架橋された架橋剤をさらに含む、非アルギン酸系ハイドロゲル微粒子。

【請求項2】

300μm超のサイズを有する、請求項1に記載の微粒子。

【請求項3】

前記マトリックスが、共有結合によって架橋された、ポリエチレングリコールマレイミド前駆体化合物とポリエチレングリコールジチオール前駆体化合物とから本質的になる、請求項1に記載の微粒子。

【請求項4】

微粒子の体積の50%まで前記細胞または組織を含む、請求項1に記載の微粒子。

【請求項5】

37℃のPBS中の保存安定性が6か月間未満である、請求項1に記載の微粒子。

【請求項6】

37℃のPBS中の保存安定性が6か月間超である、請求項1に記載の微粒子。

【請求項7】

生体内移植された場合に3か月間未満で分解する分解性微粒子である、請求項1に記載の微粒子。

【請求項8】

生体内移植された場合に少なくとも3か月間は分解しない耐久性微粒子である、請求項1に記載の微粒子。

【請求項9】

細胞培地成分をさらに含む、請求項1に記載の微粒子。

【請求項10】

前記細胞が非増殖性細胞または増殖性細胞である、請求項1に記載の微粒子。

【請求項11】

細胞に加えて、シグナル伝達分子、サイトカイン、ケモカイン、治療用タンパク質、ホルモン、ベシクル、抗体、ウイルス、エキソソームなどの分泌された細胞生産物をさらに含む、請求項1に記載の微粒子。

【請求項12】

前記細胞が遺伝子操作細胞またはトランスジェニック細胞である、請求項1に記載の微粒子。

【請求項13】

前記細胞が複数の凝集細胞からなる細胞塊である、請求項1に記載の微粒子。

【請求項14】

前記細胞塊が2種以上の異なる細胞を含む、請求項13に記載の微粒子。

【請求項15】

約50μm～約5mmのサイズを有する、請求項1に記載の微粒子。

【請求項16】

移植部位に治療用の細胞および／または組織および／または細胞生産物を局所的に送達し徐放するための組成物であって、生体適合性の送達媒体中に分散または懸濁された、請求項1～15のいずれか一項に記載の複数のハイドロゲル微粒子を含む、組成物。

【請求項17】

共有結合によって架橋された非アルギン酸系ポリマー化合物の3次元マトリックスを含み、約30μm超のサイズを有し、且つ細胞も組織も本質的に含まない、複数のハイドロゲル微粒子をさらに含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】

前記複数のハイドロゲル微粒子が、前記生体適合性送達媒体中に分散または懸濁された、分解性ハイドロゲル微粒子と耐久性ハイドロゲル微粒子との混合物を含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項19】

前記耐久性ハイドロゲル微粒子がインスリン産生性の細胞および／または組織を含み、前記分解性ハイドロゲル微粒子が幹細胞を含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記複数のハイドロゲル微粒子が、第一の細胞種および／または組織種を含む複数の第一ハイドロゲル微粒子と、前記第一の細胞種および／または組織種とは異なる第二の細胞種および／または組織種を含む複数の第二ハイドロゲル微粒子と、を含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項21】

前記第一の細胞種および／または組織種がインスリン産生性の細胞および／または組織を含み、前記第二の細胞種および／または組織種が幹細胞、またはグルカゴン産生性の細胞および／もしくは組織を含む、請求項20に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

前記複数のハイドロゲル微粒子が、第一のサイズを有する複数の第一ハイドロゲル微粒子と、前記第一のサイズとは異なる第二のサイズを有する複数の第二ハイドロゲル微粒子と、を含む、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記媒体が生体適合性の液状懸濁液またはゲルである、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記媒体が細胞培地の溶液またはゲルである、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

カテーテルを通じて注射可能または移植可能な、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

治療有効量の前記微粒子を含む、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

パテ、ペースト、またはゲルの形態である、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

液状懸濁液の形態である、請求項 1 6 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、ハイドロゲル微粒子の調整可能な分解と題された、2019年6月7日に出願された、米国仮特許出願第62／858,578号の優先権の利益を請求するものであり、当該仮特許出願はその全体が参照によって本明細書に援用されたものとする。

技術分野

【0 0 0 2】

本発明は、生物製剤をカプセル化するためのハイドロゲル系微粒子、並びに、各微粒子の分解プロファイルを増加または減少させるなどのために、ハイドロゲルマトリックスの物理的特徴および化学的特徴を調節するための方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

関連技術の説明

細胞のマイクロカプセル化は、急速に拡大している分野であり、糖尿病、がん、心疾患、および免疫不全などの疾患の治療、さらにはティッシュエンジニアリング研究や再生医療において広範な有用性を示す可能性を有している。従来のアルギン酸マイクロスフィアは生体適合性が乏しいという問題を未だ抱えており、より進歩したハイドロゲルを用いたマイクロカプセル化にはゲル化速度が遅いという課題がある。多種多様のハイドロゲル材料から製造可能な、細胞毒性のない非エマルジョンベースのハイドロゲル微粒子が求められている。

【発明の概要】

【0 0 0 4】

移植部位に治療用の細胞および／または組織（均一または不均一な細胞塊を含む）を局所的に送達し徐放するための非アルギン酸系ハイドロゲル微粒子が、本明細書に記載される。上記微粒子は、共有結合によって架橋された非アルギン酸系ポリマー化合物の3次元マトリックスと、その中に封入された治療有効量の細胞および／または組織とを含み、上記細胞は少なくとも50%の生存率を有し、上記微粒子は約30 μm超のサイズを有する。例示的なポリマー化合物は、分岐または非分岐のヒアルロン酸、分岐または非分岐の官能基付与ヒアルロン酸、分岐または非分岐の官能基付与ポリエチレングリコール、ヒアルロナン、フィブリン、キトサン、コラーゲン、ポリ乳酸、ポリ（L-乳酸）、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体、ポリカプロラクトン、ポリビニルアルコール、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される低速ゲル化ポリマー前駆体から選択される。上記マト

10

20

30

40

50

リックスは、ジチオスレイトール、分岐または非分岐の官能基付与ポリエチレングリコール、ジチオール類、エチレングリコールビス-メルカプトアセテート、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、上記非アルギン酸系ポリマー化合物と架橋された架橋剤をさらに含むことができる。例示的な官能基付与ポリエチレングリコールとしては、ポリエチレングリコールジチオール、ポリエチレングリコールジアクリレート、ポリエチレングリコールジビニルスルホン、ポリエチレングリコールジマレイミド、およびこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定はされない。上記マトリックスは、共有結合によって架橋されたポリマー骨格を1種類含む、均一なマトリックスとすることができる（異なるポリマー種の追加の架橋剤を含んでいても含んでいなくてもよい）。上記マトリックスはまた、高分子量（500 kDa以上、好ましくは100 kDa以上）ポリマー前駆体と低分子量（100 kDa未満、好ましくは50 kDa以下）ポリマー前駆体の組み合わせなどの、2種以上のポリマー前駆体の混合物、および／または2種以上の架橋剤の混合物を含む、不均一なマトリックスとすることもできる。

10

【0005】

そのような微粒子を複数含む組成物も、本明細書に記載される。そのような組成物は、細胞または組織を積載した微粒子と共に、複数の「空の」微粒子を分散させて含むこともできる。上記組成物は、異なる微粒子の混合物（例えば、分解性ハイドロゲル微粒子と耐久性ハイドロゲル微粒子との混合物）、並びに／または異なるサイズの微粒子の混合物（例えば、複数の大型微粒子と複数の小型微粒子）、並びに／または異なる種類の細胞および／もしくは組織をそれぞれ含有する微粒子の混合物（例えば、ある一連の微粒子内のインスリン産生細胞と別の一連の微粒子内の支持幹細胞）を含むことができる。2種の異なる組成物は、組み合わせることができ、あるいは、2種類の異なる粒子を混合して単一組成物とせずに同時投与することもできる。

20

【0006】

また、上記微粒子および／またはそのような微粒子を（単独で、または必要であれば他の種類の治療用化合物と組み合わせる）含有する組成物を投与することによって、移植部位に治療用の細胞および／または組織を局所的に送達し徐放するための種々の方法も、本明細書において企図される。通常、上記微粒子または組成物は治療部位またはその付近（隣接部位）に直接注射または移植される。

【0007】

また、ポリマー前駆体の質量分率または分子量、架橋剤の分子量、架橋剤とポリマー前駆体の比、架橋剤の加水分解、架橋キネティクス、架橋時間、例えば、紫外線暴露時間、およびこれらの組み合わせなどの、配合パラメータおよび／または加工パラメータにおける変化を含む、上記微粒子の各種パラメータを変化させることによって、上記微粒子の分解速度を調整するための種々の方法および技術も、本明細書に記載される。

30

【0008】

さらに、本明細書に記載の実施形態は、複数の空の微粒子を関節内に移植することによる、関節潤滑および／または関節内補充療法を目的とした、空の微粒子の使用も企図している。

【図面の簡単な説明】

40

【0009】

本特許または出願ファイルは、少なくとも1つのカラー図面を含んでいる。カラー図面を含む本特許または特許出願公開の写しは、請求に応じて、必要な手数料が支払われた場合に、米国特許商標庁により提供される。

【0010】

【図1】図1は、ハイドロゲル前駆体化合物同士の共有結合性架橋の例を図示している。
【図2】図2は、（A）液滴形成、（B）アルギン酸浴中のインキュベーション、（C）アルギン酸シェルの形成および肥厚化、並びに（D）ハイドロゲルコア架橋後のアルギン酸シェルの除去による、ハイドロゲル微粒子の生成、を含む、上記微粒子を形成するためのプロセスを図示している。

50

【図 3】図 3 は、(A) 微粒子を取り囲むアルギン酸シェル；および (B) アルギン酸シェル除去後のハイドロゲル微粒子、の各画像を示している。

【図 4】図 4 は、(A) 臍島を積載した球状の耐久性の PEG 系微粒子、(B) 臍島を積載した楕円体の PEG 系微粒子、(C) 幹細胞を積載した平らな縁を有する MeHA 系微粒子、および (D) 幹細胞を積載した楕円体の MeHA 系微粒子、の各画像を示している。

【図 5】図 5 は、細胞毒性試験の結果を示しており、(A) はイヌ臍島の生存率に対するカルシウム濃度および暴露時間の影響を、(B) は細胞生存率に対する光開始剤濃度および紫外線暴露時間の影響を示している。

【図 6】図 6 は、ThHA、MeHA、PEGDA、またはAHAから構成される100個の代表的な微粒子の直径をプロットしているグラフであり、それらの良好な単分散プロファイルが示されている。

10

【図 7】図 7 は、蛍光標識デキストランをPEGDAハイドロゲル微粒子、ThHAハイドロゲル微粒子、およびMeHAハイドロゲル微粒子に拡散させた場合の各画像を示している。

【図 8 A】図 8 A は、残留した微粒子ポリマーの質量に基づいた、各種粒子の経時的な分解のグラフである。

【図 8 B】図 8 B は、各種粒子における、Q 値（膨潤率）の経時的な変化のグラフである。

【図 8 C】図 8 C は、粒子質量の低下に基づいた、各種粒子の経時的な分解のグラフである。

【図 9】図 9 は、マウスにおける移植後の初期研究コホートにおいての、各群の日平均血糖値のグラフである。

20

【図 10】図 10 は、マウスの腹腔内 (I P space) からの微粒子の回収から得られた画像を示しており、(A) PEDGA、(B) MeHA、(C) PEDGA の場合、生存率は濃い赤色のジチゾン染色で示されており、(D) PEDGA の場合、生存率は深い赤色のジチゾンと緑色のカルセインによる共染色で示されている。

【図 11】図 11 は、PEGDA 微粒子を用いた移植後に、健常脂肪細胞に線維性組織が存在していないことを示す画像である。

【図 12】図 12 は、イヌにおける、毎日午前と午後に得られた測定値からの、平均非空腹時血糖のグラフである。

【図 13】図 13 は、(A) 耐久性 PEGDA 微粒子内でクラスター形成した HEK 293 細胞の画像、(B) 34 日後の上記 PEGDA 微粒子において、細胞の形態にも数にも (A) からの変化がほとんどないことの画像、(C) 分解性 MeHA 微粒子内の分散した HEK 293 細胞の画像、並びに、(D) 34 日後の上記 MeHA 微粒子内において、(C) から細胞が増殖していることの画像を示している。

30

【図 14】図 14 は、回収した使用済み培地を含むマイクロプレートウェルより得られた画像を示しており、(A) PEGDA 微粒子から拡散した HEK 293 細胞が非常に少ないこと、および、(B) MeHA 微粒子から拡散した生細胞の数が多いこと、が示されている。

【図 15】図 15 は、細胞放出蓄積に関する研究から得られた平均データをまとめたグラフである。

40

【図 16】図 16 は、(A) PEGDA 微粒子内にカプセル化された MSC の画像、(B) MeHA 微粒子内にカプセル化された MSC の画像、(C) PEGDA 微粒子内にカプセル化された臍島の画像、(D) MeHA 微粒子内にカプセル化された臍島の画像、および (E) AHA 微粒子内にカプセル化された MSC の画像を示している。

【図 17】図 17 は、ラットインスリノーマ細胞株が PEGDA 微粒子および AHA 微粒子にカプセル化された場合の、細胞生存率のグラフである。

【図 18】図 18 は、PEGDA または MeHA にカプセル化された臍島であって、インスリンを産生する機能的な臍島を示すためにジチゾン (dithiozone) で染色されたものの画像を示している。

【図 19】図 19 は、(A) PEDGA 微粒子が腹部網膜内およびその周囲に注入されて

50

いる画像、(B) 1 匹目のイヌにおいて微粒子が組織に粘着している画像、並びに (C) 2 匹目のイヌにおいて微粒子が組織に粘着している画像を示しており、当該粒子の「粘着性」が明らかとなった。

【図 20】図 20 は、(A) ラットの膝関節における、筋肉を通して見えている、青色に染色された PEGDA 微粒子の画像；(B) 膝関節包領域における、青色に染色された PEGDA 微粒子を示す、解剖された膝関節の画像；並びに、(C) 膝関節の最初に移植された場所に残留した、青色に染色された PEGDA 微粒子を示す、さらに解剖された膝関節の画像を示している。

【図 21】図 21 は、3 種類の微粒子群についての、体外移植組織のヘマトキシリン・エオシン染色の画像を示している。

【図 22】図 22 は、網膜における各微粒子に対する異物反応（の欠如）のグラフである。

【図 23】図 23 は、ハイドロゲル前駆体溶液中に使用されたコア（骨格）ポリマー種の質量分率の、Q 値に対する影響のグラフである。

【図 24】図 24 A は、架橋剤濃度の増加に伴い Q 値が低くなった配合を示すグラフである。図 24 B は、架橋剤濃度の増加に伴い Q 値が高くなった配合を示すグラフである。

【図 25】図 25 A は、pH の増加に伴い Q 値が高くなった配合を示すグラフである。図 25 B は、pH の増加に伴い Q 値が低くなった配合を示すグラフである。

【図 26】図 26 A は、架橋剤の分子量の増加に伴い Q 値が高くなった配合を示すグラフである。図 26 B は、架橋剤の分子量を増加させても Q 値に変化がなかった配合を示すグラフである。

【図 27】図 27 A は、反応性部位数／グラムが一定である場合の、コアポリマー種の分子量における変化の、Q 値に対する影響のグラフである。図 27 B は、反応性部位数／グラムが異なる場合の、コアポリマー種の分子量における変化の、Q 値に対する影響のグラフである。

【図 28】図 28 A は、各種微粒子配合物に対する UV 架橋時間の、粒子の Q 値（膨潤率）および直径に対する影響のグラフである。図 28 B は、UV 架橋時間の、MeHA 微粒子の Q 値に対する影響のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、広くは、治療用の細胞および組織を局所的に送達し徐放するためのハイドロゲル微粒子に関する。上記ハイドロゲル微粒子は、移植後の細胞を、生理条件下で初期に分解され洗い流されること（生分解）から保護し、数時間から数週間または数か月間の期間に亘って、細胞（並びに、細胞の治療的なタンパク質および分子）の局所領域または全身領域への放出キネティクスを調節する。分解するように設計されたハイドロゲル微粒子は、最終的には、通常の生理的プロセスによって、数日または数週間の期間に亘って、通常は 3 か月間未満のうちに、インビボ分解を受ける。これは、ハイドロゲル全体が、通常の生理的条件によって、この期間内に、移植領域に残っているハイドロゲルが実質的に存在しないほどの分解および洗い流しを受けたことを意味する（微量のゲルまたはポリマーが当該領域に残存している場合はあるが、通常、移植細胞に対するカプセル材として働くにはもはや十分ではないことを理解されたい）。いくつかの適応症では、特に関節に移植された場合、上記微粒子は運動や関節部位における衝撃による機械的分解も受けることも理解されよう。

【0012】

上記ハイドロゲル微粒子は、治療有効量の細胞がカプセル化されたハイドロゲルマトリックスを含む。上記細胞は真核細胞とすることも原核細胞とすることもできる。原核細胞の例としては細菌および古細菌が挙げられる。真核細胞としては動物細胞、植物細胞、および真菌が挙げられる。上記細胞は非増殖性細胞とすることも増殖性細胞とすることもできる。増殖性細胞は、移植前および／もしくは移植期間中に、または分解中のハイドロゲルから放出された後に、ハイドロゲル内にカプセル化された初期細胞数からさらに増殖（増加）することとなる。非増殖性細胞は、インビトロでの増殖能が限定されており、通常

10

20

30

40

50

、初期細胞数から増加することはない。しかし、ハイドロゲル微粒子内の条件は好適なものであるため、カプセル化された細胞における細胞死は最小限であり、非増殖性細胞をハイドロゲルでカプセル化した場合の初期細胞数が顕著に減少することもない。1または複数の実施形態において、微粒子内にカプセル化後の細胞の初期生存率は、前駆体溶液に含まれた開始細胞集団の生存率と比較した場合に、カプセル化後、少なくとも50%、好ましくは少なくとも約70%の生存率、より好ましくは少なくとも約80%の生存率、さらにより好ましくは少なくとも約90%の生存率、さらにより好ましくは少なくとも約95%の生存率で残存する。換言すれば、細胞集団の50%未満がカプセル化の際に失われ、細胞集団の、好ましくは30%未満、より好ましくは20%未満、さらにより好ましくは90%未満、さらにより好ましくは5%未満がカプセル化プロセスの際に失われる。これは、カプセル化プロセスが穏やかであるためと、保管中に細胞培地と栄養分が微粒子中に拡散できるためである。換言すれば、1または複数の実施形態において、上記微粒子は拡散障壁が少ない。

10

【0013】

1または複数の実施形態において、ハイドロゲル前駆体溶液中に含まれた細胞集団は、ハイドロゲル前駆体溶液1mL当たり、約 1×10^6 ～約 5×10^8 個の細胞を含むこととなり、好ましくは、ハイドロゲル前駆体溶液1mL当たり約 4×10^6 個の細胞～約 3×10^8 個の細胞を含むこととなり、いくつかの実施形態では、前駆体溶液1mL当たり約 5×10^6 ～約 1.5×10^8 個の細胞を含むこととなる。1または複数の実施形態において、上記ハイドロゲル前駆体溶液は、カプセル化されることとなる細胞、細胞塊、または組織を、ハイドロゲル前駆体溶液1mL当たり、およそ15体積%含むこととなる。

20

【0014】

増殖性細胞としては幹細胞および活性化T細胞が例示され、一方、非増殖性細胞としては膵島および分化型神経細胞が例示される。いずれの場合でも、細胞（およびその関連細胞生産物）はハイドロゲルから局所的な移植領域へとゆっくりと放出される。細胞と共に分泌され得る例示的な細胞生産物としては、シグナル伝達分子、治療用タンパク質、ベシクル、抗体、ウイルス、エキソソームなどが挙げられる。これらのタンパク質ベースの成分は、ネイティブ形態とすることができ、遺伝子改変型とすることもできる。同様に、上記生産物の細胞成分も、ネイティブまたは遺伝子改変型とすることができる。上記ハイドロゲル微粒子は、上記細胞が他の担体または非カプセル化細胞と比較してより長い期間、局所的移植領域に維持されることを可能にし、上記細胞および／またはそのシグナル伝達分子、タンパク質などの、当該領域への一時的な、しかし持続可能な、放出をもたらすことで、移植細胞の治療効果を改善する。細胞の積載は、使用される細胞のサイズおよび各微粒子のサイズに依存することが理解されよう。1または複数の実施形態では、上記微粒子の体積の50%までがカプセル化された細胞、細胞塊、および／または組織から構成され、好ましくは、細胞、クラスター、および／または組織の積載は、微粒子本体の体積の約10%～約20%の範囲である。通常、各1mm微粒子に、約50～約 1×10^5 個の細胞をカプセル化でき、好ましくは、各1mm微粒子に、約100～約 1×10^5 個がカプセル化される。

30

【0015】

1または複数の実施形態において、上記微粒子は、移植日から約3か月間（90日間）以下のうちに生体内で最終的に分解され、本明細書では「分解性」ハイドロゲル（大部分のハイドロゲルは最終的に結局は分解するものと理解される）と称される、より弱いハイドロゲルから形成される。本明細書で使用される場合、「分解性」ハイドロゲル微粒子は、「徐放性」でありながら、「即時分解性」すなわち「短期型」のハイドロゲルであり、PBS中では少なくとも24時間、生体内に移植された場合は最長3か月間、自立した微粒子本体を維持するものと定義される。また、このような分解性ハイドロゲル微粒子は、インビトロの保存条件（PBS、37℃）下では約6か月間以内に分解・劣化してしまう。換言すれば、ハイドロゲルマトリックスは、6か月間未満の「インビトロ保存安定性」を有しており、これは、37℃のPBS中で保存された場合、6か月間以内の保存中に加

40

50

水分解して自立体からばらばらになり始めることを意味する。1または複数の実施形態において、分解性ハイドロゲル微粒子は、150超のQ値を有することを特徴とし、好ましくは200超のQ値を有することを特徴とする。しかしながら、以下に示すように、架橋性に改変を加えると（例えば、易加水分解性架橋剤を使用）、Q値が低い（初期マトリックスが強固な）微粒子を得ることができるが、かなり急速に分解するため、やはり分解性ハイドロゲル微粒子と見なされる。

【0016】

これらの分解性微粒子は、耐久性ハイドロゲル微粒子に関する別の実施形態とは対照的である。そのような耐久性ハイドロゲル微粒子もまた徐放性であるが、少なくとも6か月間、37℃のPBS中の保存条件下で崩壊も分解もしないような、より長期の用途のものである。換言すれば、上記耐久性微粒子は、6か月超の「インビトロ保存安定性」を有する。1または複数の実施形態において、耐久性ハイドロゲル粒子は室温（27℃）のPBS中で1年間以上、長期常温保存可能なものである。好ましくは、そのような耐久性ハイドロゲル微粒子は、移植された場合に、通常の生理（ファゴサイトーシス、分解、吸着などを介した異物の通常のインビボクリアランスともいう）条件下で、少なくとも3か月間、より好ましくは少なくとも6か月間は崩壊しないものである。

【0017】

いずれの場合も、上記ハイドロゲル微粒子は、マイクロスフィア、マイクロビーズ、またはハイドロゲル微粒子として特徴付けることもできる。上記ハイドロゲル微粒子は、3次元ハイドロゲルマトリックスと、当該ハイドロゲルマトリックス中に懸濁、封入、またはカプセル化された細胞とを含む、個々の自立体の形態をとる。対象における移植用の徐放組成物も本明細書において記載される。上記徐放組成物は、薬剤的に許容できる送達媒体中に懸濁された複数の3次元ハイドロゲル微粒子を含んでなる。

【0018】

上記微粒子の形成に使用される好適なハイドロゲル前駆体化合物は、ハイドロゲル形成性のポリマー、オリゴマー、および／またはモノマーを包含し、そのようなものとして、架橋を通じて架橋結合した、すなわちネットワーク型の構造、すなわちマトリックス（すなわち、「ハイドロゲル」）を形成可能であり、液体と細胞は、得られたゲル化構造すなわちマトリックス体の間隙性空間または孔の内部に保持、懸濁、封入、且つ／またはカプセル化されてもよい。本発明で使用されるハイドロゲル前駆体化合物は、好ましくは、非アルギン酸系ハイドロゲル前駆体化合物である。すなわち、上記ハイドロゲル前駆体溶液は、好ましくは、アルギン酸系化合物、すなわち、アルギン酸エステル、アルギン酸、またはその塩もしくは誘導体をベースとした化合物を実質的に含まない。用語「実質的に含まない」とは、本明細書で使用される場合、付随的な不純物が生じている場合や、製造過程由来の残余／痕跡量が残っている場合はあったとしても、意図的に当該成分が当該組成物に添加されていないことを意味する。そのような実施形態では、上記ハイドロゲル前駆体溶液組成物は、係る成分を、100重量%と見なした溶液の総重量に対して、約0.05重量%未満、好ましくは約0.01重量%未満、より好ましくは約0重量%含む。

【0019】

上記ハイドロゲル微粒子は、ヒアルロン酸（HA）やポリエチレングリコールジアクリレート（PEGDA）、ポリエチレングリコールマレイミド（PEGMAL）、多分岐PEG、ヒアルロナン、フィブリン、キトサン、コラーゲン、ヘパリン、ポリ乳酸（PLA）、ポリ（L-乳酸）（PLLA）、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン（PVP）、メタクリル酸（MAA）、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル（HEMA）、ポリアクリルアミド（PAM）細胞外マトリックス、また、その官能基付与変種（例えば、アクリル化、メタクリル化、チオール化した変種など）やその多分岐型変種（例えば、4分岐PEG、8分岐PEG）などの、種々の低速ゲル化ポリマー前駆体から製造できるものであると都合がよい。しかし、いずれの架橋性ハイドロゲル前駆体化合物も本発明での使用に好適であり、好ましい化合物は、生体適合性の非アルギン酸系ホモポリマーま

10

20

30

40

50

たはコポリマー、特に非アルギン酸系のブロックコポリマーであり、さらに、他の種類の架橋性のモノマーおよび／またはオリゴマーも好ましい化合物である。通常、前駆体溶液中に含まれるポリマー前駆体の量は、50w/w%未満となる。この量は、ヒアルロン酸などの高分子量（500kDa以上、好ましくは100kDa以上）の多置換ポリマーの場合は約1w/w%～約50w/w%の範囲を取り、PEGDAやPEGMALなどのそれより小さな分子量のポリマー（100kDa未満、好ましくは50kDa以下）の場合は約5w/w%～約50w/w%の範囲を取る。

【0020】

上記微粒子の架橋特性は、前駆体化合物の分子量、並びに選択される架橋剤、架橋条件、および架橋工程を調節することで、調整可能である。例えば、いくつかの実施形態では、架橋時に分子が液滴／コアから周囲環境への浸出する能力を制限することで、ビーズ表面をより滑らかにしたり、ゲルをより強固にするために、「より堅固な」またはより速い架橋が望まれる場合がある。これは、前駆体種の分子量を増加させることでも（例えば約40kDa超）、且つ／または、架橋の化学特性や開始法を調整することによって架橋時間を減少させることでも、達成できる。しかし、二官能性前駆体種（すなわちPEGDA）の分子量を増加させると、通常、架橋密度が減少することにより、ゲルがより拡散したものとなる。さらに、易加水分解性の架橋剤を用いることで、移植部位への細胞の移植を促進するために初期Q値が低く最初は強固な微粒子を作製することができる。しかし、そのような架橋剤は、通常の生理的条件下では急速に分解されるため、その積載物を移植部位に急速に放出することとなる。架橋は、特定のハイドロゲル前駆体化合物に応じた種々の機序により実行できる。1または複数の実施形態において、上記コア／シェル微粒子は、好ましくは溶液中で、ハイドロゲルマトリックス架橋剤と組み合わせられる。この架橋剤がアルギン酸シェルを通過してコア／シェル微粒子へと浸出することで、ハイドロゲル前駆体化合物のゲル化（架橋）が起こり、3次元ハイドロゲルマトリックスが形成される。この架橋剤はハイドロゲル前駆体化合物に対応したものとなるが、得られる架橋マトリックス内にて達成される架橋速度と架橋レベルを制御するために変更することができる。通常、微粒子を形成する際に使用される架橋剤の量は、選択される架橋剤およびポリマー系に応じて、約0.5mM～約30mMの範囲を取り、好ましくは約1mM～約20mM、より好ましくは約2mM～約15mM、さらにより好ましくは約2.5mM～約10mM、さらにより好ましくは約2.5mM～約5mMの範囲を取る。

【0021】

好適な架橋剤としては、光開始型または熱開始型の架橋剤、化学架橋剤、例えばアクリレート類、メタクリレート類、アクリルアミド類、ビニルスルホン類、ジチオール類などが挙げられるが、これは、アルギン酸浴の一部として含まれることとなる。自己架橋ハイドロゲル前駆体を使用することもできる。これらの実施形態では、IRGACURE（登録商標）2959（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）またはリチウムフェニル-2,4,6-トリメチルベンゾイル-ホスフィン酸塩（LAP）などの光開始剤が触媒としてハイドロゲル前駆体溶液に含まれていてもよい。上記光開始剤はアルギン酸浴に含ませることもできる。化学的架橋系の場合、架橋剤は通常、アルギン酸浴中に供給される。UV開始架橋系の場合、架橋剤は、主要なポリマー（骨格）種と一緒に、アルギン酸浴中またはハイドロゲル前駆体溶液に含ませることができる。

【0022】

表1は、適切な架橋剤を用いてハイドロゲルを形成するのに使用できる、主軸となる化学作用が異なる、反応性基の例を示している。これらの反応の一部は紫外線によって開始され、その他は化学反応である。

10

20

30

40

50

【表 1】

表1: 反応性基および架橋の化学

反応性ポリマー(前駆体)	架橋剤	架橋機構
MeHA(メタクリル化HA)	PEGジアクリレート(PEGDA)	UV
	自己反応性	UV
AHA(アクリル化HA)	ジチオスレイトール(DTT)、PEGジチオール	化学的
	PEGDA	UV
	自己反応性	UV
ThHA(チオール化HA)	PEGDA、PEGジビニルスルホン、PEGジマレイミド	化学的
PHA(ペンテノエートHA)	DTT、PEGジチオール	UV
NorHA(ノルボルネンHA)	DTT、PEGジチオール	UV
PEGDA	自己反応性	UV
PEGジアクリルアミド	自己反応性	UV
4分岐または8分岐PEGMA L	DTT、PEGジチオール	化学的
	自己反応性	UV
4分岐または8分岐PEGビニルスルホン	DTT、PEGジチオール、エチレングリコールビスメーカプトアセテート(BMA)	化学的
	自己反応性	UV
4分岐または8分岐PEGアクリレート	DTT、PEGジチオール、BMA	化学的
	自己反応性	UV
コラーゲン-SH(チオール化コラーゲン)	PEGDA	化学的

【0023】

さらなる例示的な前駆体化合物として、非アルギン酸系多糖類、コラーゲン／ゼラチン、キトサン、アガロースなどが挙げられるが、これらに限定はされない。これらの前駆体化合物は、複数の分岐を有する分岐状ポリマーとすることができ、あるいは、単一主鎖の非分岐状／線状ポリマー鎖とすることもできる。さらに、これらのポリマーは、タンパク質、薬剤、または酵素をハイドロゲルに結合することによるさらなる機能化が可能であり、これにより、細胞の付着、機能、増殖、または生存率を調節することができる。特に好ましいハイドロゲル前駆体化合物はヒアルロン酸、またはヒアルロン酸／PEG混合物である。前駆体化合物は、ハイドロゲル製造時に前駆体化合物に添加された種々の化学成分で官能基付与されたものとすることもできる。これらの化学物質は、微粒子外への単純拡散のために、空隙にカプセル化されるものとは対照的に、ハイドロゲルマトリックスに結合される。例としては、架橋剤またはハイドロゲル骨格と反応するように官能基付与することができる細胞支持剤の添加が挙げられる。急速に分解する微粒子中で、これらの剤は、微粒子中にカプセル化された細胞および細胞生産物と一緒に、局所放出される。

【0024】

繰り返しであるが、好ましいハイドロゲルは低速ゲル化ハイドロゲルであり、これは、本明細書で使用される場合、ゲル前駆体液滴と架橋剤を含有する溶液との接触の際に通常の平滑さと通常の球状形態を有する構築物を形成するのに不十分なゲル化速度を有するハイドロゲルを意味する。低速ゲル化ハイドロゲルは、通常、架橋剤に暴露された際にゲル液滴を瞬時（またはほぼ瞬時、例えば、5～10秒以内程度）には形成しないものとされる。また、ハイドロゲルの企図される最終用途によっては、生体適合性ハイドロゲルも特に好ましい。本明細書で使用される場合、「生体適合性」とは、生体組織にもマトリックス

ス内にカプセル化された細胞にも有害でないこと、より具体的には、過剰な毒性、刺激性、アレルギー反応、免疫原性反応を起こさずに対象に投与でき、且つ、望ましくないいかなる生物学的効果をも引き起こさない、またはそれを含有している組成物の他の成分のいずれとも有害に相互作用しないという点で、生物学的またはその他の点で望ましくないものではないことを意味する。当業者には周知であるように、生体適合性ハイドロゲルは、対象におけるあらゆる有害副作用を最小限にするように選択される。ハイドロゲル前駆体と一緒に含ませてもよい追加の任意の成分としては、フィブロンネクチン、ラミニン、コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分などが挙げられ、その合成バージョンも包含される。

【0025】

通常、上記微粒子を作製するための方法は、参照によって本明細書に援用される、2015年6月3日に出版された米国特許第9,642,814号に詳述されたものである。この方法は、溶媒系中に分散または溶解した、ハイドロゲル前駆体化合物と、カプセル化されることとなる細胞と、二価陽イオン（例えば、カルシウム、バリウム、ストロンチウム、およびこれらの組み合わせ）と、を含む、ハイドロゲル前駆体溶液を準備することを含む。上記二価陽イオンは、上記ハイドロゲル前駆体化合物と共に溶媒系中に分散または溶解している。上記二価陽イオンは、100%と見なした溶液の総体積に対して、約0.025モル／リットル～約0.25モル／リットルのレベルで、溶液中に含ませるとよい。

【0026】

上記ハイドロゲル前駆体溶液は、任意のハイドロゲル架橋剤、触媒、添加剤、培地、栄養分、pH緩衝剤、密度改変剤、または粘度改変剤などを含ませることもできる。上記ハイドロゲル前駆体溶液がアルギン酸と組み合わせられることで、「内側から外側の」ゲル化過程を介して）当該ハイドロゲル前駆体溶液の周囲で当該アルギン酸のゲル化が開始されて、コア／シェル微粒子が得られる。各コア／シェル微粒子は、液状コアの周囲にアルギン酸シェルを含み、このアルギン酸シェルが上記ハイドロゲル前駆体溶液を含む。図2に示されているように、これは通常、（B）アルギン酸浴への（A）前駆体溶液の滴加を含み、例えば、前駆体溶液の液滴を生成／押出してアルギン酸浴に滴加または噴霧することによる滴加などが挙げられる。上記溶液中のアルギン酸の量は変化させることができるが、100%と見なした上記溶液の総体積に対して、約0.1重量／体積%～約2.0重量／体積%の範囲を取ることができる。通常、上記アルギン酸溶液の粘度は、上記ハイドロゲル前駆体溶液の粘度未満とするべきである。アルギン酸溶液の粘度は、アルギン酸濃度とアルギン酸ポリマーの平均分子量（すなわち、アルギン酸分子の長さまたはその鎖中のモノマー単位数）に依存し、同様の濃度では鎖が長いほど粘度は高くなる。1または複数の実施形態において、アルギン酸溶液の粘度は、室温（約20～25℃）において、約1～約20cPの範囲を取り、好ましくは約1～約4cPの範囲を取る。より具体的には、アルギン酸溶液の粘度に対するハイドロゲル前駆体溶液の粘度の割合は、室温で1より大きくするべきである。1 複数（one more）の実施形態において、ハイドロゲル前駆体溶液の粘度とアルギン酸溶液の粘度の比は、約1：1～約1000：1である。1または複数の実施形態において、上記ハイドロゲル前駆体の粘度の比は約20：1である。1または複数の実施形態において、ハイドロゲル前駆体溶液の粘度は約1～約500cPであり、室温で約40～約100cPが特に好ましい。アルギン酸浴のpHは約6.2～約7.8の範囲を取るべきであり、好ましくは約6.6～約7.4の範囲を取る。

【0027】

（B）および（C）に示すように、アルギン酸シェルが内側から形成し、陽イオンが前駆体溶液の液滴から浸出するにつれて、液滴の周囲に厚くなる。換言すれば、液滴中に陽イオンが存在することにより、浴中のアルギン酸が表面に凝集し、液滴周囲で架橋形成することとなる。次に、架橋および／または重合などによる、液状コア中のハイドロゲル前駆体化合物のゲル化が開始され、コア／シェル架橋微粒子が得られる。各コア／シェル架橋微粒子はアルギン酸シェルとゲル化コアとを含み、このゲル化コアは架橋した3次元ハイドロゲルマトリックスと封入された細胞とを含む。架橋は、準備された特定の前駆体溶液に応じて、化学的に導入することができ、熱によって導入することもでき、あるいは光

10

20

30

40

50

開始することもできる。例えば、ハイドロゲル架橋剤を、アルギン酸浴中に含ませ、アルギン酸シェルを通して拡散させることにより、コア中のハイドロゲル微粒子を架橋することができる。あるいは、コア／シェル微粒子を紫外線源に曝すことで、ハイドロゲル微粒子コア中で架橋を開始することもできる。紫外線暴露時間は約1分間～約10分間の範囲を取り、好ましくは約2分間～約8分間、さらにより好ましくは約2.5分間～約5分間の範囲を取る。UV暴露の波長は選択された光開始剤および／またはポリマー系に依存するが、通常は約100nm～約400nmの範囲を取り、好ましくは約315nm～約400nm、より好ましくは約365nmの範囲を取る。

【0028】

アルギン酸型微粒子のイオン結合とは異なり、本発明の微粒子は、図1に示されるような、ハイドロゲル前駆体化合物の共有結合性架橋を含む。PEGDAの例では、PEG骨格（黒線）の末端にジアクリル酸エステルの化学部位（chemistry）が示されており、反応部位が赤色の二重線で示されている。PEGDA分子は互いに架橋し合い、最終的なハイドロゲル配合物を生成する。対照的に、鎖上に分散して示される反応性基（赤色の二重線）を有するMeHA骨格（青線）は、PEGDAと共有結合で架橋される（図1）。従って、前駆体化合物が、最終産物において架橋反応を介した化学的な変化を受けることで、架橋されたハイドロゲルマトリックスが得られると理解されよう。例えば、1または複数の実施形態において、ハイドロゲルマトリックスは、チオエーテル架橋結合とエステル架橋結合とを含有する（例えば、チオール化HAの場合）、PEGポリマーとHAポリマーの架橋ネットワークから本質的になる（上記架橋ネットワークからなる場合すらある）。しかし、上記マトリックスが、ネットワーク中に残存した未反応の前駆体化合物および官能基などを微量に含んでいてもよいことは理解されよう。可能性のあるハイドロゲルマトリックスおよび架橋の他の例を表1に示す。この列举は例であるが、網羅的なものではない。表1に挙げられた化学作用において使用できる骨格分子の例としては、キトサン、アガロース、コンドロイチン硫酸、またはこれらの分子の組み合わせが挙げられる。骨格間で形成される結合は、チオエステル＋エステルによる化学結合、チオエステル＋エステルおよびβ炭素上のメチルによる化学結合、チオエーテルスルホンによる化学結合、またはチオエーテルスクシンイミドによる化学結合を包含する。しかし、他の化学結合が用いられてもよい。光（フリーラジカル）結合としては、エステル＋エーテルまたはアミド＋エーテルを挙げることができる。利用できる組み合わせは複雑化していくが、可能な組み合わせはほぼ無限であることが理解されよう。

【0029】

コアをゲル化させた後、アルギン酸シェルを除去することで（例えば、キレート化剤、および／または超音波処理などの機械的攪拌により）、（D）に示されるような、自立型ハイドロゲル微粒子またはマイクロビーズと、その中に封入された細胞とが得られる。換言すれば、アルギン酸シェルは最終産物の一部ではなく、上記微粒子の使用前に常に除去される。得られたハイドロゲル微粒子は、メッシュスクリーンや他の装置を用いて溶液から回収することができ、また、所望により、培地または適切な栄養分でリンスまたは懸濁してもよい。繰り返しになるが、得られた分解性ハイドロゲル微粒子は、好ましくはアルギン酸を実質的に含まない。

【0030】

この方法を用いることで、細胞、細胞塊、組織、その組み合わせ、およびその断片をハイドロゲル微粒子内に封入／カプセル化することができる。細胞は、天然由来の細胞すなわち新たに単離された初代細胞、培養された細胞すなわち増殖させた細胞、株化細胞系、分化型または未分化型の細胞、操作型または遺伝子改変型の細胞などとすることができる。細胞および組織の非限定例としては、臍島、臍島塊、肝細胞、幹細胞、並びに関連の細胞および組織、さらに、内分泌細胞、幹細胞塊、甲状腺塊、副腎塊、下垂体塊などのティッシュエンジニアリングまたは細胞ベース治療用の3次元細胞塊が挙げられる。組み合わせた細胞型および／または組織も微粒子内に使用できる（例えば、初代細胞型と幹細胞の組み合わせ）。上記微粒子は、ハイドロゲルマトリックス内に、細胞の維持と増殖を支持

する細胞培地成分を細胞型に依存して含むことができる。例示的な培地成分としては、血清、ニコチンアミド、抗生物質（ペニシリン、アンホテリシンB、ストレプトマイシン、硫酸ゲンタマイシン）、アミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミンなど）、pH緩衝剤（炭酸水素ナトリウム）、無機塩（ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、およびカルシウムイオンの供給源）、炭素源（グルコース、ガラクトース、フルクトース、マルトース、ピルビン酸ナトリウム）、タンパク質およびペプチド（アルブミン、トランスフェリン、フィブロンекチン、アクチビン、インスリン）、脂肪酸および脂質、ビタミン（A、D、E、K、B、ニコチンアミド）、ミネラルおよび微量元素（亜鉛、銅、セレン）、ホルモン、増殖因子などのうちの1または複数が挙げられる。完全培地、基本培地、および培地成分は市販のものであり、イーグル最小必須培地（EMEM）、ダルベッコ修飾イーグル培地（DMEM）、RPMI-1640、ハム栄養混合物、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）、CMRL-1066などが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0031】

得られるハイドロゲルマトリックスは、液体および気体に対して透過性であるが、定常状態では流動性を示さずその完全性を保持する、半硬質のネットワークであると特徴付けられる。ハイドロゲルは固体と見なすことができ、無限大に近づく粘度を有すると説明することもできる。ハイドロゲルマトリックスは3次元の自立体である。用語「自立体」とは、ハイドロゲルマトリックスが、いったん形成されると、外部の支持構造なしでその形状を保持し、且つ、それ自体の単なる内力や重量では変形をしにくいことを意味する。自立体は、ゼリー、パテ、またはペーストのように、柔軟性でも、持続変形性でも、流動性でもないが、マトリックス体が力を受けて一時的に降伏や変形し得るような弾力性がある。換言すれば、自立体は、わずかな圧縮および／または屈曲の後、反動や跳ね返りで元の形状に戻るものであり、ただし、上記ハイドロゲルマトリックスは、外圧や外力が十分にかかれば割れたり、切断されたり、剪断されたりする（その後は回復しない）と理解されたい。

【0032】

ハイドロゲル微粒子は、コア-シェル型カプセルのように別個のシェルを有するのではなく、ビーズ全体にわたって充填物を保持するマトリックス型カプセルである。上記のように、ハイドロゲル微粒子は自立体でもある。1または複数の実施形態において、得られる微粒子は実質的に球状の形態である。粒径は、選択された液滴生成装置の性能に応じてカスタマイズ性が高いと都合がよい。1または複数の実施形態において、得られるハイドロゲルマイクロスフィアまたはハイドロゲル微粒子の、断面の表面間の平均最大寸法（すなわち、球形または楕円形のマイクロスフィアの場合の、その直径）は、30 μm 超であり、300 μm となる場合もある。1または複数の実施形態において、得られるハイドロゲルマイクロスフィアまたはハイドロゲル微粒子の表面間平均最大寸法は、約5 mm未満である。好ましくは、得られるハイドロゲルマイクロスフィアまたはハイドロゲル微粒子の表面間平均最大寸法は、約2 mm未満であり、より好ましくは約30 μm ~ 約2 mm、さらにより好ましくは約50 μm ~ 約1.5 mm、より好ましくは約150 μm ~ 約1.5 mm、さらにより好ましくは約300 μm ~ 約1.4 mmの範囲を取る。場合によっては、サイズが約30 μm ~ 約750 μm または500 μm の範囲を取るより小型の微粒子を形成させることができる。言い易さのために、この断面寸法は単に上記微粒子の「サイズ」と称する。いずれにしても、本発明のハイドロゲル微粒子はナノサイズにはならず、ナノ粒子ともいかなる他の種類のナノ結晶性形状とも見なされることはない。

【0033】

上記ハイドロゲル微粒子は、急性または慢性の状態であって、それを緩和するために短期治療プロトコルが使用され得る状態に対する、局所的な治療的処置に特に適している。例えば、骨または軟骨の修復（例えば、関節）のための、並びに、移植された治療用の細胞、細胞塊、および／または組織の宿主免疫系からの全般的保護のための、細胞、細胞塊、および／または組織の局所送達（例えば、直接注射）が挙げられる。上記微粒子は、カ

プセル化された細胞、細胞塊、および／または組織を免疫系から短期間（例えば、数日、数週間、最長3か月）に亘って保護し、ハイドロゲルが崩壊して通常の生理プロセスにより洗い流されるまで治療効果を放出する。全身療法も企図される。1または複数の実施形態において、上記微粒子は、小分子治療薬を送達するためのものではなく、好ましくはそのような薬剤を含まず、ただし、係る薬剤が微粒子内に、細胞支持活性薬剤（例えば、免疫抑制剤などの、細胞や移植片を成功させるためのもの）として含まれているのであって、それ自体は活性薬剤あるいは治療剤としては含まれていない場合は除く。

【0034】

治療法においては、上記微粒子は、対象への投与に好適な送達媒体中に懸濁または分散される。例示的な送達媒体としては、微粒子を分布させた生体適合性の懸濁液、粘稠溶液、パテ、パスタ、またはゲルが挙げられ、好ましくは、栄養分と、投与されることとなる細胞、細胞塊、および／または組織の維持と成長を支持する成分とを含む。細胞培地は、例えば前述した細胞培地など、細胞や組織の種類に基づいてさらに添加することができ、好ましい媒体である。食塩水などの緩衝液も送達用の媒体として使用されてよい。上記方法は、通常、得られた微粒子組成物の治療有効量を患者に、例えば患者の炎症、傷害、関節炎、変性などの場所に、局所投与すること、を含む（または、からなる）。投与は通常、炎症、傷害、関節炎、変性などの部位またはその付近に、微粒子組成物を直接注射することを含む。徐放微粒子組成物は、治療有効期間の間、投与された細胞、細胞塊、および／または組織を局所領域に限定し、ゆっくりと放出された細胞、細胞塊、および／もしくは組織、並びに／またはその細胞成分もしくは細胞産物を当該局所領域に放出し、患者における状態の重症度を改善または低減するものであるため、都合がよい。本明細書で使用される場合、用語「治療的に有効な」とは、量および／または期間が、研究者や臨床医の探求対象である組織、系、動物、またはヒトの、生物学的または医学的反応を誘発し、特にいくつかの望ましい治療効果を誘発するものであることを指す。例えば、1または複数の実施形態において、治療有効量および治療有効期間は、炎症を低減し、炎症、傷害、関節炎、変性などの部位の治療を開始または促進するものである。状態が完全には根絶されておらず部分的な改善であっても、その量または期間が治療的に有効と見なされ得ることは、当業者には理解される。

【0035】

必要ならば、上記治療は追加の注射または点滴により反復されてもよい。特定の炎症、傷害、関節炎、変性、条件、または治療状態、また、医師や獣医、研究者の好みに応じて、治療プロトコルを変更することができることは、当業者には理解される。例えば、ニューロン修復は、脊髄損傷や変性疾患を修復するためのものなどがあるが、マイクロカプセル化した幹細胞を硬膜外腔、すなわち病変領域の硬膜外に注射することにより、治療可能であり得る。分解性ハイドロゲル微粒子は、幹細胞を環境と直接相互作用させるために、即時に当該領域に幹細胞を放出するように設計され、あるいは、より長く（例えば、約1〜3か月間）持続するように設計された分解性微粒子が、幹細胞をマイクロカプセル化し、正の増殖因子を当該領域に放出する一方、ゆっくりと分解されて、何も残らなくなるまで破壊と分解のために当該細胞を放出することができる。同様に、心発作後の心臓修復も、マイクロカプセル化され傷害領域に配置された細胞、細胞塊、および／または組織からの細胞または増殖因子の局所的放出によって、改善できる。別の例として、ホルモン療法による非機能性腺の治療が挙げられ、例えば、甲状腺の除去や切除により瘢痕組織が存在する場合の、マイクロカプセル化された甲状腺細胞、細胞塊、および／または組織を頸部または近傍／隣接部位に配置することによる、甲状腺機能の回復などである。耐久性ハイドロゲル微粒子のさらなる例として、神経内分泌障害に関与する神経伝達物質の局所送達、非治療性骨折付近に送達される骨促進因子の送達、うっ血性心不全を治療するための心房性ナトリウム利尿ペプチドなどの分子の全身放出、血友病の治療における凝固因子の放出、または、種々の生物学的に活性な物質を産生する操作された細胞もしくはトランスジェニック細胞のカプセル化が挙げられる。

【0036】

1 または複数の実施形態において、関節の滑沢剤治療の一部として、「空の」ハイドロゲル微粒子を投与することもできる。換言すれば、ハイドロゲルそれ自体の存在が、粒子それ自体の中に細胞もいかなる他の活性薬剤も必要とせず、患者に治療的な軽減を与える。
【0037】

本発明の組成物および微粒子の特定の利点は、移植時の、アルギン酸や他の種類の微粒子と比較した場合の、「粘着性」の改善である。すなわち、上記微粒子は、インビボの移植部位において組織に付着または粘着する傾向があり、下記の実施例において写真に示されている。これは、移植部位における細胞、細胞塊、および／または組織、並びにその細胞生産物の局所放出を維持することによって、治療の有効性をさらに強化する。さらに、上記微粒子は、移植部位における炎症反応、および／または、リンパ球やコラーゲン環形成といった異物反応を誘導しない。

10

【0038】

本発明の種々の実施形態のさらなる利点は、本明細書の開示内容と下記の実施例を検討することにより、当業者には明らかとなろう。本明細書に記載の種々の実施形態は、本明細書で特に記載がない限り、必ずしも相互に排他的ではないことが理解されよう。例えば、1つの実施形態で説明または描写された特徴は、他の実施形態に含まれている場合もあるが、必ずしも含まれているわけではない。すなわち、本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態の種々の組み合わせおよび／または統合を包含する。

【0039】

本明細書で使用される場合、「および／または」という表現は、2つ以上の項目からなる列挙で使用される場合、列挙された項目のいずれか1つを単独で採用できること、または、列挙された項目のうちの2つ以上の任意の組み合わせを採用できることを意味する。例えば、組成物が成分A、B、および／またはCを含有するまたは含有しないと記載されている場合、当該組成物は、A単独；B単独；C単独；AとBの組み合わせ；AとCの組み合わせ；BとCの組み合わせ；またはA、B、およびCの組み合わせを含有するまたは含有しない可能性がある。

20

【0040】

また、本明細書では、本発明の種々の実施形態に関連して特定のパラメータを定量化するために数値範囲を使用している。数値範囲が提供されている場合、そのような範囲は、範囲の低い方の値のみを記載しているクレーム限定、および範囲の高い方の値のみを記載しているクレーム限定に対して、文言上のサポートを提供するものと解釈されるべきであることを理解されたい。例えば、約10～約100の数値範囲が開示されている場合、「約10超」（上限なし）と記載しているクレームおよび「約100未満」（下限なし）と記載しているクレームに対して、文言上のサポートを提供する。

30

本発明は以下の通りである。

【1】 移植部位に治療用の細胞および／または組織を局所的に送達し徐放するための非アルギン酸系ハイドロゲル微粒子であって、前記微粒子は共有結合によって架橋された非アルギン酸系ポリマー化合物の3次元マトリックスと、その中にカプセル化された治療有効量の細胞および／または組織とを含み、前記細胞は少なくとも約50%の生存率を有し、前記微粒子は約30 μm 超のサイズを有する、非アルギン酸系ハイドロゲル微粒子。

40

【2】 300 μm 超のサイズを有する、上記【1】に記載の微粒子。

【3】 前記ポリマー化合物が、分岐または非分岐のヒアルロン酸、分岐または非分岐の官能基付与ヒアルロン酸、分岐または非分岐の官能基付与ポリエチレングリコール、ヒアルロナン、フィブリン、キトサン、コラーゲン、ポリ乳酸、ポリ(L-乳酸)、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体、ポリカプロラクトン、ポリビニルアルコール、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される低速ゲル化ポリマー前駆体から選択される、上記【1】に記載の微粒子。

【4】 前記マトリックスが、ジチオスレイトール、分岐または非分岐の官能基付与ポリエチレングリコール、ジチオール類、エチレングリコールビス-メルカプトアセテート、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、前記非アルギン酸系ポリマー化合物

50

と架橋された架橋剤をさらに含む、上記「1」に記載の微粒子。

〔5〕前記官能基付与ポリエチレングリコールが、ポリエチレングリコールジチオール、ポリエチレングリコールジアクリレート、ポリエチレングリコールジビニルスルホン、ポリエチレングリコールジマレイミド、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、上記「4」に記載の微粒子。

〔6〕前記マトリックスが、共有結合によって架橋された、官能基付与ヒアルロン酸前駆体化合物と官能基付与ポリエチレングリコール前駆体化合物とから本質的になるものである、上記「1」に記載の微粒子。

〔7〕前記マトリックスが、自己架橋した官能基付与ポリエチレングリコール前駆体化合物から本質的になるものである、上記「1」に記載の微粒子。

〔8〕前記マトリックスが、自己架橋した官能基付与ヒアルロン酸前駆体化合物から本質的になるものである、上記「1」に記載の微粒子。

〔9〕前記マトリックスが、共有結合によって架橋された第一および第二の官能基付与ポリエチレングリコール前駆体化合物から本質的になるものであり、前記第一および第二の官能基付与ポリエチレングリコール前駆体化合物は互いに異なるものである、上記「1」に記載の微粒子。

〔10〕前記マトリックスが、共有結合によって架橋された、メタクリル化ヒアルロン酸前駆体化合物とポリエチレングリコールジアクリレート前駆体化合物とから本質的になる、上記「1」に記載の微粒子。

〔11〕前記マトリックスが、共有結合によって架橋された、チオール化ヒアルロン酸前駆体化合物とポリエチレングリコールジアクリレート前駆体化合物とから本質的になる、上記「1」に記載の微粒子。

〔12〕前記マトリックスが、共有結合によって架橋された、ポリエチレングリコールマレイミド前駆体化合物とポリエチレングリコールジチオール前駆体化合物とから本質的になる、上記「1」に記載の微粒子。

〔13〕前記マトリックスが、共有結合によって架橋された、ポリエチレングリコールビニルスルホン前駆体化合物とジチオスレイトールまたはエチレングリコールビスーメルカプトアセテート前駆体化合物とから本質的になる、上記「1」に記載の微粒子。

〔14〕微粒子の体積の50%まで前記細胞または組織を含む、上記「1」に記載の微粒子。

〔15〕37℃のPBS中の保存安定性が6か月間未満である、上記「1」に記載の微粒子。

〔16〕37℃のPBS中の保存安定性が6か月間超である、上記「1」に記載の微粒子。

〔17〕生体内移植された場合に3か月間未満で分解する分解性微粒子である、上記「1」に記載の微粒子。

〔18〕生体内移植された場合に少なくとも3か月間は分解しない耐久性微粒子である、上記「1」に記載の微粒子。

〔19〕細胞培地成分をさらに含む、上記「1」に記載の微粒子。

〔20〕前記細胞が非増殖性細胞または増殖性細胞である、上記「1」に記載の微粒子。

〔21〕細胞に加えて、シグナル伝達分子、サイトカイン、ケモカイン、治療用タンパク質、ホルモン、ベシクル、抗体、ウイルス、エキソソームなどの分泌された細胞生産物をさらに含む、上記「1」に記載の微粒子。

〔22〕前記細胞が遺伝子操作細胞またはトランスジェニック細胞である、上記「1」に記載の微粒子。

〔23〕前記細胞が複数の凝集細胞からなる細胞塊である、上記「1」に記載の微粒子。

〔24〕前記細胞塊が2種以上の異なる細胞を含む、上記「23」に記載の微粒子。

〔25〕前記マトリックスが1種類の共有結合によって架橋されたポリマー骨格を含んで均一である、上記「1」に記載の微粒子。

〔26〕前記マトリックスが、高分子量ポリマー前駆体および低分子量ポリマー前駆体の組み合わせなどの、2種以上のポリマー前駆体の混合物、および／または2種以上の架橋

10

20

30

40

50

剤の混合物を含んで不均一である、上記「1」に記載の微粒子。

「27」約50 μm ～約5mmのサイズを有する、上記「1」に記載の微粒子。

「28」移植部位に治療用の細胞および／または組織および／または細胞生産物を局所的に送達し徐放するための組成物であって、生体適合性の送達媒体中に分散または懸濁された、上記「1」～「27」のいずれかに記載の複数のハイドロゲル微粒子を含む、組成物。

「29」共有結合によって架橋された非アルギン酸系ポリマー化合物の3次元マトリックスを含み、約30 μm 超のサイズを有し、且つ細胞も組織も本質的に含まない、複数のハイドロゲル微粒子をさらに含む、上記「28」に記載の組成物。

「30」前記複数のハイドロゲル微粒子が、前記生体適合性送達媒体中に分散または懸濁された、分解性ハイドロゲル微粒子と耐久性ハイドロゲル微粒子との混合物を含む、上記「28」に記載の組成物。

「31」前記耐久性ハイドロゲル微粒子がインスリン産生性の細胞および／または組織を含み、前記分解性ハイドロゲル微粒子が幹細胞を含む、上記「30」に記載の組成物。

「32」前記複数のハイドロゲル微粒子が、第一の細胞種および／または組織種を含む複数の第一ハイドロゲル微粒子と、前記第一の細胞種および／または組織種とは異なる第二の細胞種および／または組織種を含む複数の第二ハイドロゲル微粒子と、を含む、上記「28」に記載の組成物。

「33」前記第一の細胞種および／または組織種がインスリン産生性の細胞および／または組織を含み、前記第二の細胞種および／または組織種が幹細胞、またはグルカゴン産生性の細胞および／もしくは組織を含む、上記「32」に記載の組成物。

「34」前記複数のハイドロゲル微粒子が、第一のサイズを有する複数の第一ハイドロゲル微粒子と、前記第一のサイズとは異なる第二のサイズを有する複数の第二ハイドロゲル微粒子と、を含む、上記「28」に記載の組成物。

「35」前記媒体が生体適合性の液状懸濁液またはゲルである、上記「28」に記載の組成物。

「36」前記媒体が細胞培地の溶液またはゲルである、上記「28」に記載の組成物。

「37」カテーテルを通じて注射可能または移植可能な、上記「28」に記載の組成物。

「38」治療有効量の前記微粒子を含む、上記「28」に記載の組成物。

「39」パテ、ペースト、またはゲルの形態である、上記「28」に記載の組成物。

「40」液状懸濁液の形態である、上記「28」に記載の組成物。

「41」移植部位に治療用の細胞および／または組織を局所的に送達し徐放するための方法であって、上記「1」～「27」のいずれかに記載の複数の微粒子または上記「28」～「40」のいずれかに記載の組成物を対象における移植部位に投与することを含む、方法。

「42」前記投与が前記組成物を前記移植部位またはその付近に注射することを含む、上記「41」の方法。

「43」前記注射が関節内注射である、上記「41」に記載の方法。

「44」前記移植部位が前記対象の炎症領域、損傷領域、関節炎領域、変性領域などである、上記「41」に記載の方法。

「45」前記移植部位が関節である、上記「41」に記載の方法。

「46」前記移植部位が腺付近の領域であり、前記微粒子がホルモンなどの細胞生産物を前記腺付近に放出する、上記「41」に記載の方法。

「47」前記移植部位が、包内腔内、すなわち心嚢内または腎嚢内などの生理学的に格納された空間内である、上記「41」に記載の方法。

「48」前記移植部位が対象の網または腹膜である、上記「41」に記載の方法。

「49」前記移植部位が腫瘍部位またはその近接部位である、上記「41」に記載の方法。

「50」前記移植部位が腫瘍切除後部位またはその近接部位である、上記「41」に記載の方法。

「51」前記移植部位が敗血症部位である、上記「41」に記載の方法。

「52」前記微粒子が前記投与後の約3か月間以内に生分解する、上記「41」に記載の

10

20

30

40

50

方法。

〔53〕前記微粒子が前記投与後の少なくとも6か月間は生分解しない、上記〔41〕に記載の方法。

〔54〕前記移植部位が関節であり、前記微粒子が前記投与後の約3か月間以内に機械的に分解する、上記〔41〕に記載の方法。

〔55〕前記移植部位が関節であり、前記微粒子が前記投与後の少なくとも6か月間は機械的に分解しない、上記〔41〕に記載の方法。

〔56〕前記ハイドロゲル微粒子が移植部位の組織に付着することで、移植細胞を治療期間中に移植部位に維持する、上記〔41〕に記載の方法。

〔57〕細胞および／または組織および／または細胞生産物が微粒子の細孔を介して、且つ／または微粒子の生分解を介して、前記微粒子から移植部位の局所領域に徐放されることにより、対象における状態の重症度を緩和または低減する、上記〔41〕に記載の方法。

〔58〕前記微粒子が前記投与後の約5日間以内に生分解する、上記〔41〕に記載の方法。

〔59〕前記微粒子が前記投与後の約24時間以内に生分解する、上記〔41〕に記載の方法。

〔60〕前記微粒子が前記投与後の約1週間以内に生分解する、上記〔41〕に記載の方法。

〔61〕前記微粒子が前記投与後の約1か月間以内に生分解する、上記〔41〕に記載の方法。

〔62〕前記微粒子が前記投与後の約6か月間未満で生分解する、上記〔41〕に記載の方法。

〔63〕前記微粒子が前記投与後に生分解し、前記生分解はポリマー骨格の加水分解を含む、上記〔41〕に記載の方法。

〔64〕前記微粒子が前記投与後に生分解し、前記生分解は架橋剤の加水分解を含む、上記〔41〕に記載の方法。

〔65〕前記微粒子が前記投与後に生分解し、この分解速度は、ポリマー前駆体の分子量、架橋剤の分子量、架橋剤とポリマー前駆体の割合、架橋剤の加水分解、架橋キネティクス、紫外線暴露時間、およびこれらの組み合わせからなる群から選択されるパラメータを変化させることで調節可能である、上記〔41〕に記載の方法。

〔66〕関節において、疼痛を低減する、且つ／または関節内補充療法を提供するための方法であって、共有結合によって架橋された非アルギン酸系ポリマー化合物の3次元マトリックスを含み、約30 μm 超のサイズを有し、且つ細胞も組織も本質的に含まない、複数のハイドロゲル微粒子を関節内に導入することを含む、方法。

【実施例】

〔0041〕

下記の実施例は、本発明による方法を記載している。しかし、これらの実施例が例示として提供されており、いずれも本発明の範囲全体に対する限定と見なされるべきではないことは理解されたい。

〔0042〕

各実施例で使用されたHA配合物は、3か月に満たない期間で分解することが示されている。対照的に、PEGDA配合物はより耐久性が高い。分解性微粒子と耐久性微粒子を対比することで、このように製造された製品の特性が比較される。そのような比較としては、物理的および化学的な相違、インビトロおよびインビボにおける安定性、最終産物である微粒子内での細胞の形態、機能、および移動、並びに最終産物である微粒子がインビボにおいて組織に付着する、すなわち体内におけるその適用を限局化する能力が挙げられる。

〔0043〕

実施例1

耐久性ハイドロゲル微粒子最終産物と分解性ハイドロゲル微粒子最終産物における物理的

10

20

30

40

50

相違および化学的相違 序論

細胞カプセル化の概念は最初 Lim と Sun により 1980 年に広められ、この 2 人は、アルギン酸ハイドロゲル微粒子に埋め込んだ臍島によって、数週間だけではあるが、免疫抑制の必要もなく、ラットにおける糖尿病を回復に向かわせることができることを示した。この最初の成功に続いて、そのプロセスに対し理解を深め改善することを目的とした研究が行われた。この分野は長い時間をかけて大きな進歩を見せたが、アルギン酸マイクロスフィアには、長期の生体非適合性に関わる問題が未だ存在すると認知されている。そのような制限があるにもかかわらず、アルギン酸は、その独自の、ほぼ瞬間的な架橋キネティクスにより、手頃で注射可能な微粒子を簡単に製造できるという理由で、細胞カプセル化に最適な明確な材料として存続してきた。

10

【0044】

逆に、他のハイドロゲルは、架橋結合速度がより遅いため、典型的には、笠高い肉眼で見える大きさの構造としてしか作製できない。ポリエチレングリコール、アガロース、キトサン、またはヒアルロン酸などの代替ハイドロゲルを用いてマイクロスフィアを製造するためのプロトコルはいくつか開発されている。しかし、これらのアプローチはオイルエマルジョン技術をベースとするものであり、オイルエマルジョン技術は、非水溶媒に依存적であり、さらにプロセス制御が不十分であることから、細胞カプセル化および移植に通常適していない。

【0045】

20

細胞カプセル化の応用がその数と高度化において成長し続けていることから、高度バイオマテリアルを用いて簡便な注射用生体適合性微粒子を製造できることが有用であることには疑いがない。ここで、参照によって本明細書に援用される、2015年6月3日に出願された米国特許第9,642,814号に記載された、コア-シェルスフェリフィケーション (Core-Shell Spherification) (CSS) と称される、ハイドロゲル微粒子を製造するための新規方法を検討した。この方法は、戦略的には、アルギン酸と比較してゲル化速度がかなり遅いハイドロゲルでの使用を目的として設計されており、様々な化学的、物理的、および生理活性特性を有するハイドロゲル微粒子の製造が可能である。さらに、上記方法は、オイルエマルジョン技術を使用しない方法であり、アクセシビリティ、規模、および法令遵守をより良好に促すために、標準的な GMP 対応の装置および材料用に開発された。よく用いられている 2 種類のハイドロゲルとして、ヒアルロン酸 (HA) およびポリエチレングリコールジアクリレート (PEGDA) を使用した、CSS による微粒子製造を示す。

30

【0046】

方法

CSS 架橋法の細胞毒性

イヌ臍島を、100mM または 200mM の塩化カルシウム、10mM HEPES 緩衝液、および 20% PEGDA (分子量 3,400 Da) (ライサン・バイオ社 (Laysan Bio, Inc.)) を含有する溶液に 5 分間、10 分間、または 15 分間曝すことにより、CSS 法の一成分であるカルシウムの細胞毒性を試験した。また、ある群を、PEGDA を含まない 100mM 塩化カルシウムに曝すことで、カルシウム単独の効果も評価した。臍島を試験溶液中におよそ 5,000 IEQ/mL で懸濁し、上記カプセル化法に伴う高い細胞積載密度を模倣した。カルシウム暴露の後、臍島を CMRL 1066 臍島用補足培地で 2 回洗浄し、37°C、5% CO₂ で 3 時間インキュベートし、その後評価を行った。

40

【0047】

死細胞は、プロピジウムヨウ素染色と蛍光顕微鏡法を用いて同定した。蛍光顕微鏡像は、Cytation 5 イメージングマルチモードリーダー (バイオテック・インスツルメント社 (Biotek Instruments, Inc.))、531/647 nm ex/em) を用いて撮影した。Adobe Photoshop を用いて、総臍島ピクセルに

50

対する赤色（死細胞）ピクセルの割合を算出することにより、細胞死を定量化した。群毎に25個の個々の臍島を分析し、臍島以外の組織とはジチゾン染色により区別した。結果は平均生細胞割合として報告しており、対応した無治療対照群（すなわち、培地中の同一バッチ由来の臍島）の臍島生存率に対して正規化した。

【0048】

PEGDA微粒子とメタクリル化ヒアルロン酸（MeHA）微粒子の場合で、光架橋を利用した。よって、紫外線（UV）および光開始剤の毒性を検討する研究をまず行った。イヌ臍島を、0%（w/v）、0.025%（w/v）、または0.05%（w/v）のIRGACURE（登録商標）2959光開始剤を含有するダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）中に懸濁した。およそ50IEQを24ウェルプレートの各ウェルにロードし、長波長紫外（UV）線を3分間、5分間、または10分間照射した。プレートの照射は、製造データ（キュビトン・インターナショナル社）に従って、およそ40mW/cm²に相当する、6インチの距離で低出力モードのPortaRay 400 UVランプを用いて行った。暴露の後、臍島をCMRL1066臍島用補足培地で2回洗浄し、37℃、5%CO₂で3時間インキュベートし、その後評価を行った。細胞死はヨウ化プロピジウム染色により評価し、前述の通りに定量化した。

【0049】

MeHAハイドロゲル微粒子の製造

無毒なレベルの架橋剤を求めてから、微粒子製造を開始した。ハイドロゲル微粒子製造のためのCSS法の概略図を図2に示す。まず、MeHAの合成を、50:50の水:DMISO混合物中、トリエチルアミンおよびtert-ブチルアンモニウムブロミド（シグマ社（Sigma））の存在下、HA（分子量1MDa、ライフコア・バイオメディカル社（Lifecore Biomedical））を、50倍モル量の過剰メタクリル酸グリシジル（シグマ社）と5日間反応させることにより行った。次に、MeHAを脱イオン（DI）水に対して2日間透析してから凍結乾燥した。¹H NMR（Advance AV-III 500、ブルカー社（Bruker））を用いて、メタクリル酸プロトンのメチルプロトンに対する相対ピーク面積の比率を算出することによりメタクリル化の程度を求めたところ、54~72%であった。

【0050】

メタクリル化HA:PEGDAポリマー混合物（分子量3.4kDa、ライサン・バイオ社）を、2.5%:1%（w/w）で、100mM塩化カルシウム、15mM HEPES、および0.05%（w/v）IRGACURE（登録商標）2959、さらにOptiPrep（コスモバイオUSA社（CosmoBioUSA, Inc.））を含有するカスタム緩衝液中に調製した。この実施形態では、低濃度のPEGDAを架橋剤としてMeHA溶液に添加することで、ハイドロゲルの架橋密度を増加させた。上記溶液を0.22μmフィルターに通過させた。この前駆体溶液の粘度を、Cannon-Manning Semi-Micro目盛り付きガラス製毛细管粘度計を用いて室温で測定した。

【0051】

前駆体を、300mMマンニトール、0.1%Tween 20を含有させ、カスタムした15mM HEPES緩衝液を用いてpH7.6に調整し、攪拌した、0.15%（w/v）アルギン酸ナトリウム（Protanal LF 10/60、FMC社（FMC Corp.））浴中に、自動液滴生成装置を介して押し出した。MeHA前駆体の場合、液滴とアルギン酸浴との間のIRGACURE（登録商標）の平衡状態を維持し、浴中に滴加後の液滴からのIRGACURE（登録商標）の浸出（架橋結合を減少させる）を最低限にするために、0.05%（w/v）IRGACURE（登録商標）2959開始剤もアルギン酸浴に添加した。1.5mmの同軸空気ノズル内に空気ジェットノズルシステムと直径400μmの内部液体ノズルを備えたビュッヒ社製395-Proカプセル化装置（ビュッヒ社（Buchi Corporation）、ニューキャッスル、デラウェア州）を用いて、液滴生成を行った。液滴は圧縮窒素を用いて押出した。これらMeHA液滴は、ハイドロゲル前駆体溶液/液滴コアをカプセル化するアルギン酸シェルを各々有

する、コアシェル構築物を形成した。このハイドロゲル前駆体溶液／液滴コアに長波長紫外線を照射し、MeHAおよびPEGDAのフリーラジカル光架橋を開始させた。上記アルギン酸浴の中央への照射は、およそ40mW/cm² (PortaRay 400、ユビトロン・インターナショナル社)であった。照射は、コアシェル構築物内のハイドロゲルコアの架橋結合が完全に行われるように、前駆体溶液の押出中と押出後1分間、連続的に行った。次に、コアシェル構築物をDPBS中の25mMクエン酸緩衝液で穏やかに攪拌しながら5分間リンスし、アルギン酸シェルを溶解させた。得られた微粒子を、鋼鉄製メッシュスクリーンを用いて収集し、DPBS中に懸濁させた。50mMクエン酸での2回目のリンスを5分間行って、溶解を完了させてアルギン酸シェルを除去した。

【0052】

ThHAハイドロゲル微粒子の製造

チオール化HA (HySystem、バイオタイム社 (Biotime Inc)) を、1.2% (w/w) で、100mM塩化カルシウムと、溶液密度を調整するためのOptiPrep (コスモバイオUSA社) とを含有するカスタム緩衝液中に溶解させることで、ThHA前駆体を調製した。この前駆体溶液のpHを、カスタムした15mM HEPES緩衝液を用いておよそ7.0となるように調整することで、ThHAMクロマー同士のジスルフィド架橋を抑制した。溶液の粘度は上記のように測定した。コアシェル構築物は上記のように製造した。ただし、架橋結合は化学的架橋結合を介して達成された (対して、MeHAM微粒子はフリーラジカル光架橋)。PEGDA分子の末端アクリル酸基がマイケル付加反応を介してThHA上のチオール基と結合する。簡潔に記載すると、上記前駆体溶液が、アルギン酸浴との接触により、ThHA前駆体コアとアルギン酸シェルとを有するコアシェル構築物を生成した。アルギン酸浴は、架橋剤として働く0.4%PEGDA (分子量3.4kDa、ライサン・バイオ社) も含有させ、穏やかに5分間攪拌した。アルギン酸浴とハイドロゲル前駆体の両方に架橋剤 (例えば、PEGDA) を含有させることができるが、このプロトコルでは、アルギン酸浴のみに含まれることが好ましい。よりサイズの小さい3.4kDa PEGDA分子がアルギン酸シェルを通過してコア内に拡散することにより、架橋結合は進行した。その後、このアルギン酸浴をDPBSで半分に希釈し、溶液pHを7.4に低下させた。攪拌をさらに30分間継続し、コア内のHA前駆体を架橋結合させた。上記のように、コアシェル構築物を収集し、アルギン酸シェルを除去して、微粒子を得た。

【0053】

PEGDAハイドロゲル微粒子の製造

3.4kDaのPEGDAおよび20kDaのPEGDA (ライサン・バイオ社) を、それぞれ18% (w/w) および12% (w/w) で、100mM塩化カルシウム、10mM HEPES、および0.025% (w/v) IRGACURE (登録商標) 2959を含有する緩衝液中に溶解させることで、PEGDAHaidroゲル前駆体溶液を調製した。この溶液を0.22μm注射器を用いて濾過し、上記のように粘度を測定した。前駆体を、MeHAM微粒子の場合と同様の、ただし0.025% (w/v) IRGACURE (登録商標) 2959を含有する、攪拌アルギン酸浴中に押出した。MeHAM微粒子製造用およびPEGDA微粒子製造用の溶液は全て、超音波処理で脱気した水で調製し、光架橋阻害物質として知られる過剰酸素を排除した。コアシェル構築物に上記のように照射を行い、コアの架橋結合を達成させた。構築物にさらに上記のような処理を行い、アルギン酸シェルを溶解させて、ハイドロゲル微粒子を得た。

【0054】

AHAハイドロゲル微粒子の製造

まず、トリエチルアミンおよびN-ジメチルホルムアミド (シグマ社) の存在下、HA (分子量1MDaまたは200kDa、ライフコア・バイオメディカル社) を塩化アクリロイルおよびグリシドール (TCI) と5日間反応させることで、AHAを合成した。次に、AHAを脱イオン (DI) 水に対して5日間透析してから凍結乾燥した。1H NMR (Advance AV-III 500、ブルカー社 (Bruker)) を用いて、アシ

10

20

30

40

50

レートプロトン (acylate proton) のメチルプロトンに対する相対ピーク面積の比率を算出することによりアクリル化の程度を求めたところ、53～72%であった。次に、100mM塩化カルシウム、15mM HEPES緩衝液、および0.05% (w/v) IRGACURE (登録商標) 2959を含有するカスタム緩衝液中に、アクリル化HAを4%で溶解させることで、AHA前駆体溶液を調製した。この前駆体溶液を0.22 μ m注射器を用いて濾過し、上記のように粘度を測定した。前駆体を、MeHA微粒子の場合と同様の、攪拌アルギン酸浴中に押出した。コアシェル構築物に上記のように照射を行い、コアの架橋結合を達成させた。上記のようにクエン酸緩衝液を用いてアルギン酸シェルを除去し、AHAハイドロゲル微粒子を収集した。

【0055】

ハイドロゲル微粒子の物理的性質およびサイズ分布

100個の微粒子の個々の画像を、バイオテック社製Cytation 5マルチモードイメージングリーダーを用いて撮影した。微粒子のイメージングはマルチプルウェルプレート内のPBS中で行い、画像をAdobe Photoshopで解析することで、微粒子の種類毎に平均的微粒子直径とサイズ分布を求めた (N=100微粒子)。膨潤した水和状態質量の乾燥状態質量に対する比率である膨潤率「Q」を微粒子の種類毎に求めることで、ハイドロゲル微粒子のさらなる特徴付けを行った。平衡膨潤が達せられるように、微粒子を測定前に過剰な脱イオン水中に24時間浸漬し、溶解塩を除去した。微粒子から過剰な表面水分を除去した後、前秤量済み時計皿上で秤量した。その後、微粒子を60℃で一晩乾燥させ、再秤量して、乾燥状態質量を得た (N=3)。

【0056】

微粒子の拡散特性

ハイドロゲル微粒子を、以前に公開された手順に従って、10kDa、40kDa、70kDa、および500kDaの分子量を有する0.1mg/mL FITC標識デキストラン (インビトロジェン・モレキュラー・プローブス社 (Invitrogen Molecular Probes)) のDPBS溶液中で一晩インキュベートした。微粒子をDPBSでリンスし、レーザー走査型共焦点顕微鏡法によるイメージングを行って、上記プローブの流出をモニタリングした (オリンパス社製Fluoview 300)。顕微鏡像の撮影は、FITC-デキストランインキュベーション溶液から微粒子を除去してから3～30分後の各設定時点に行った。

【0057】

孔径の算出

FEI Quanta 600F ESEM装置で実行された環境制御走査型電子顕微鏡法 (ESEM) により、空のPEGDA微粒子およびMeHA微粒子を調べた。試料を、SEMチャンバ内の温度を6℃に設定された保冷台上の水に含浸させた。次いで、チャンバを1000Paに真空排気し、相対湿度は100%に維持した。画像は10,000倍の倍率で撮影した。標準となるSEM画像の収集も行った。そのような画像のために、試料は臨界点乾燥または凍結乾燥し、10nm白金で被覆し、高真空モードの同じESEM装置において5kVでイメージングを行った。SEM画像は1000倍の倍率で撮影した。

【0058】

結果

コアシェルスフェリフィケーションの手順

図2に要約されたCSS法によりハイドロゲル微粒子を製造した。この方法では、まず、低速硬化ハイドロゲル前駆体溶液 (官能基付与したPEGまたはHA) を、アルギン酸浴に当てた際に、アルギン酸シェル内に液滴として封入し、官能基付与PEGまたは官能基付与HAが硬化するまでの時間を得る。コア微粒子周囲に形成されたアルギン酸シェルは同心環リンク形態 (concentric ring-link morphology) を特徴とする (図3A)。その後、アルギン酸シェルは除去され、内側のコアハイドロゲルのみが残る (図3B)。図3Bは大部分が球状の微粒子を示している。しかし、最終産物として他の形状も許容される。図4は、許容される最終産物の特徴例をさらに示した

ものである。図4Aは、完全に球状の、イヌ臍島細胞を積載した、より遅い分解特性を有する、耐久性（持続性ともいう）がより高い、PEGDA系微粒子の例を示している。図4Bは、臍島を積載した、同様の、ただし引き伸ばされた形状、すなわち3次元楕円形の、耐久性PEGDA系微粒子を示している。図4Cは、左側の縁が平坦な、幹細胞を積載した、より速い分解特性を有する、高速分解性（短期型ともいう）の、MeHA系微粒子を示している。図4Dは、同じ種類であるが、3次元楕円形の微粒子を示している。これらの微粒子、および涙形や卵形など他の関連した形状のものは全て、CSS微粒子最終産物の機能的な例である。

【0059】

細胞毒性研究

微粒子製造の際、アルギン酸シェルを存在させたまま、シェルの除去後に3次元の自立した構造を維持するような架橋が、コアのゲル化に必要となる。CSSのプロセスを最適化するために、微粒子製造プロセスの架橋結合成分を、新たに播種した細胞（イヌ臍島）に対する細胞毒性効果について評価した。図5Aは、カルシウム濃度および暴露時間のイヌ臍島の生存率に対する影響を示している。試験された3つの条件は、100mMおよび200mMのカルシウム+PEGDA、または100mMのカルシウム単独であった。最短の暴露時間5分の測定の場合、いずれの群にも細胞毒性に有意差は確認されなかった。全ての群で、対応する無治療対照群（培地中の同一バッチ由来の臍島）と比較した生存率は97.5%を超えていた。しかし、5分時点の測定と比較して、その後の各時点では、200mMカルシウム群において有意な生存率の低下が見られた。200mMカルシウム群の生存率は、10分および15分の両方の時点で2つの100mM群よりも有意に低くなった。10分間を通じて100mM群のどちらにも違いは見られなかった。しかし、15分の時点で、PEGDAを含有する100mM群が、5分時点および10分時点との比較で、また、15分時点のPEGDAを含有しない100mM群との比較で、生存率の有意な減少を示した。興味深いことに、PEGDAを含有しない100mM群の中では、いずれの時点においても、生存率に有意な変化は確認されず、対照群と比較して15分時点で97.6%の生存率であった。

【0060】

光開始剤濃度および紫外線暴露時間の細胞生存率に対する影響を図5Bに示す。IRGACURE（登録商標）2959濃度を0%（w/v）、0.025%（w/v）、および0.05%（w/v）として、イヌ臍島に、約40mW/cm²の長波紫外線暴露による照射を3分間、5分間、および10分間行い、細胞毒性を評価した。興味深いことに、光開始剤（IRGACURE（登録商標）2959）を含有しない群が最も程度の高い細胞毒性を示した。0%群の生存率は、暴露時間3分と比較して、5分および10分において有意に低くなった。さらに、0%群は、両方のIRGACURE（登録商標）含有群と比較して、5分および10分において、生存率が有意に小さくなった。0.025%群と0.05%群との間の有意差は10分においてのみ見られ、生細胞率はそれぞれ94.5%、87.2%であった。

【0061】

ハイドロゲル微粒子の物理的性質およびサイズ分布

この新規のCSSプラットフォームの十分な試験を行うために、HAおよびPEGDAという2種類の異なる出発物質から微粒子を製造した。CSSプラットフォームを用いて化学架橋ハイドロゲルと光架橋ハイドロゲルを両方評価するため、HA製造をさらにチオール化HA（ThHA）とメタクリル化HA（MeHA）にそれぞれ分けた。表2は、架橋結合前後のハイドロゲル配合物の物理的性質、並びに平均微粒子直径および直径範囲を示している。

10

20

30

40

50

【表 2】

表2:微粒子製造の特徴および物理的性質

	ThHA微粒子	MeHA微粒子	PEGDA微粒子	AHA微粒子
ゲル前駆体中のポリマー質量分率	1. 2%	2. 5% MeHA 1% PEGDA 3. 4k	18% PEGDA 3. 4k 12% PEGDA 20k	4% AHA
前駆体粘度	90cSt	190cSt	60cSt	50cSt
架橋機序	化学的:チオール-アクリレートマイケル付加反応	光開始:フリーラジカル架橋	光開始:フリーラジカル架橋	光開始:フリーラジカル架橋
架橋時間	35分	60秒	60秒	5分
最終膨潤粒子中のポリマー質量分率	3. 6%	0. 95%	5. 8%	0. 39%
¹ 質量膨潤比「Q」	27. 7	105. 7	17. 3	256
粒径範囲(100粒子試料)	406~776 μm	1020~1370 μm	424~1146 μm	933~1332. 5
² 平均最終膨潤後直径(CV%)	637 μm (CV:11. 1%)	1156 μm (CV:6. 1%)	904 μm (CV:15. 7%)	1095

1. 膨潤比「Q」はゲルの水と平衡質量の乾燥質量に対する比である。

2. HAとPEGDAのビーズ直径には有意差があった($p < 0. 001$)。

【0062】

ゲル前駆体の前駆体質量分率は、PEGDAの場合で30%であり、一方、ThHAおよびMeHAは、それぞれ1.2%溶液および2.5%溶液から製造された。形の良い微粒子を形成するのに適した溶液粘度を達成するために、PEGDA前駆体は高い濃度を必要とした。ゲル配合物および対応する前駆体粘度を表2に示す。ThHAは唯一の化学架橋ハイドロゲルであり、光架橋ゲル(MeHAおよびPEGDA)と比べて架橋にはるかにより多くの時間(35分間)を必要とした。平均直径はMeHA微粒子が最も大きく、次にPEGDA微粒子が続く、その次に、他の2つの群よりも小さいThHA微粒子が続いた。PEGDA微粒子は最も低い平衡膨潤率「Q」を示し、ハイドロゲル全体がよりコンパクトであった。このことは、さらに図6に示されており、図には、ThHA、MeHA、PEGDA、またはAHAから構成される100個の代表的な微粒子の直径がプロットされており、各微粒子の、特にHA材料の場合で、良好な単分散が示されている。同じ液滴生成装置と架橋結合前パラメータを用いて製造されたのにもかかわらず、ThHA微粒子は、PEGDAやMeHAよりもサイズがかなり小さく、PEGDAと比べて直径範囲が狭かった。MeHA微粒子とAHA微粒子の平均直径が4つの群の中で最も大きかった。興味深いことに、臍島を含有するPEGDA粒子は、空のPEGDA微粒子と比べて、平均直径はわずかに大きいだけであったが、単分散度は改善していた(臍島を含有するPEGDAの場合938 μm [CV:8.4%]、空のPEGDA微粒子の場合904 μm [CV:15.7%])。

【0063】

微粒子の拡散特性

図7は、蛍光標識デキストランの、PEGDAハイドロゲル微粒子、ThHAハイドロゲル微粒子、およびMeHAハイドロゲル微粒子中への拡散を示している。微粒子を各種分子量の蛍光デキストラン中で一晩インキュベートし、リンスしてすぐに、共焦点顕微鏡法による試験を行い、拡散性の指標としてデキストラン浸透度と流出速度を評価した。この10kDaのプローブは全ての微粒子に浸透可能であった。しかし、PEGDA微粒子で、とりわけ当該構築物の中央付近で蛍光が弱くなり、これは、共に強い蛍光を示したHA微粒子と比べてプローブの浸透速度が低いことを示唆している。さらに、10kDaプローブの蛍光はHA群では急速に消失し、リンスの30分後には存在しないか、ほぼ存在しなかった。対照的に、PEGDA群では30分の時点でも局在性の蛍光が観察可能であり、これより、両方のHAゲルと比べて10kDaプローブに対する拡散障壁がより高いことが再度示唆された。

【0064】

P E G D A 微粒子の周縁部には40 k D a プローブ由来の低レベルの蛍光が検出されたが、中央部にはシグナルはほとんどまたは全く確認されず、このことは、当該プローブにしての拡散障壁を示している（図7）。より大きなデキストラン（70 k D a および500 k D a）の場合、P E G D A 微粒子中に蛍光シグナルはほとんどまたは全く示されておらず、これらのプローブのゲルマトリックス中への浸透は一晩のインキュベーション期間では無視できるものであることが示唆された。

【0065】

T h H A 微粒子とM e H A 微粒子は共に、評価した全てのプローブから強い蛍光を示したが、このことは、大型の分子に対してさえ最低限の拡散障壁しかないことを示唆している。さらに、M e H A における相対蛍光シグナルは、T h H A と比べて、リンス直後の全てのプローブの場合で著しく高く見え、このことは、プローブの濃度がより高く、すなわち拡散障壁がより低いことを示唆している。このことは、70 k D a プローブが最もよく例示できており、T h H A 微粒子中にはそれほど注入されていないが、M e H A 微粒子では飽和しているように見える。追加の研究は全て、拡散障壁がそれぞれ最大および最小であったハイドロゲル配合物、P E G D A およびM e H A に焦点を当てた。

【0066】

考察

細胞をカプセル化し送達するためのハイドロゲル微粒子を製造するための新規方法を開発し、その評価を行った。現在の細胞マイクロカプセル化法は、ゲル化速度が速いことから主にアルギン酸球をベースとしている。マイクロカプセル化に利用される他のハイドロゲルはあまり芳しくないオイルエマルジョン技術を必要とする。その代わりとして、C S S 法は種々様々なハイドロゲル材料に使用でき、標準的な市販のG M P 対応の装置に適合し、臍島に対する細胞毒性が最小限である。

【0067】

細胞毒性が低いことは、細胞カプセル化戦略において非常に重要な特徴である。そのため、C S S 法を可能とする重要な成分のいくつか、特にカルシウム含有量および紫外線暴露量について、臍島に対する細胞毒性効果の評価を行った。驚くことではないが、200 m M カルシウムは急速な細胞毒性を示した。しかし、臍島は、高濃度且つ粘稠性のP E G D A 溶液中であっても少なくとも10分間は100 m M カルシウムに耐容性を示すことが分かった。40 m W / c m ² 長波（約365 n m）紫外線への暴露の、イヌ臍島への細胞毒性は、10分までは最小限であった。予想外にも、光開始剤なしの群が紫外線暴露後に最も多い細胞死を示したが、これは他の類似の研究とは対照的である。しかし、これらの他の研究は4~10 m W / c m ² というずっとより低い紫外線強度を使用しており、本明細書で使用された光開始剤濃度も比較的に低いものであった。すなわち、本実験では、光開始剤が、おそらくは紫外線光子を選択的に吸収することで、保護効果を与えていた可能性がある。それでもやはり、I R G A C U R E（登録商標）2959含有群では濃度依存的な細胞毒性の増加が確認され、これは以前に公開された研究と一致する。

【0068】

微粒子はサイズに大きな違いがあり、M e H A ビーズはT h H A ビーズの2倍近い直径を有し、これは1微粒子当たりの総体積ではおよそ8倍の差異に相当するが、これにもかかわらず、同じ400 μ m ノズル系を用いて製造がなされている。群間のサイズの違いは、製造後体積の膨潤動態における違いの結果である可能性が最も高かった。ハイドロゲルの膨潤はいくつかの変数によって制御されるが、ポリマーの初期（すなわち架橋前）濃度と製造後ゲル内の架橋の密度に強く相関している。より具体的には、ゲルポリマーマトリックスに吸着した溶媒分子（例えば水）が外向きの圧力を及ぼし、ゲルを拡大（膨潤）させ、一方、ゲルマトリックス内の架橋は、外向きの拡張に抵抗する。例えば、初期ポリマー濃度が高く架橋密度が低いハイドロゲルは、製造後に体積を大きく拡張させるものと予想される。逆に、ポリマー濃度に対する架橋の比率が高いゲルは、製造後の拡張に抵抗する傾向がある。本研究では、T h H A 微粒子の最終的なサイズが小さくなったのは、おそ

らくは、初期ポリマー分率（１．２％）が低いことと、架橋密度が比較的高いことが組み合わせられた結果である。重要な注意点として、製造後の体積の膨潤は、膨潤率「Ｑ」（水和質量／乾燥質量）と混同されるべきではない。具体的には、Ｑは、体積膨潤が平衡に達した後の最終的なゲルの構造を述べており、通常、Ｑ値が低いほど、ゲルはより強固でコンパクトなものとなる。すなわち、ゲルが、顕著な体積膨潤を経験するも、Ｑ値は比較的低いままであるという可能性があり、これは、本研究におけるＰＥＧＤＡ微粒子の場合であると考えられる。対照的に、ＴｈＨＡ微粒子が経験した体積膨潤は（あったとしても）比較的小さいものであったが、Ｑ値はＰＥＧＤＡ微粒子と比べて高かった。さらに、ＭｅＨＡ微粒子は、初期ポリマー濃度が低くとも（３．５％）、著しく膨潤し、且つ高いＱ値を有し、相対架橋密度が非常に低いことが示された。

10

【００６９】

拡散性は微粒子群の間でかなり異なっていた。ＴｈＨＡ微粒子とＭｅＨＡ微粒子は、５００ｋＤａサイズまでのデキストランプローブに対してより大きな透過性を示し、ＭｅＨＡ微粒子は３つ全ての群の中で最も高い拡散率を有していると思われた。逆に、ＰＥＧＤＡ粒子は、４０ｋＤａ以上の分子量のデキストランの拡散を強く制限しているように思われた。多様な因子がゲルの拡散率に影響を及ぼし得るが、膨潤率「Ｑ」（ゲルの乾燥質量に対する平衡水和質量の比率）がハイドロゲルの透過性に強く相関する。ＰＥＧＤＡ微粒子、ＴｈＨＡ微粒子、およびＭｅＨＡ微粒子はそれぞれ、１７．３、２７．７、１０５．７のＱ値を有していた。すなわち、微粒子において観察されるデキストランプローブの拡散挙動は、対応するＱ値および測定された表面孔径と一致する。

20

【００７０】

実施例２

耐久性ハイドロゲル微粒子および急速分解性ハイドロゲル微粒子の最終産物の安定性

序論

耐久性ハイドロゲル微粒子と急速分解性ハイドロゲル微粒子とを対比する説明は、微粒子の物理的組成の安定性に依存するものである。３種類の配合物（ＰＥＧＤＡ、ＭｅＨＡ、およびＡＨＡ）の間に違いがあるかを確認するために、インビトロ安定性研究およびインビボ安定性研究の両方を実施した。ＣＳＳ法は様々な速度で分解するようにハイドロゲルを細密に調整することを可能とするが、以下では、数か月から数年長持ちし得る２種類の耐久性ハイドロゲルと、それと対比して、より急速に分解するハイドロゲルを例示する。

30

【００７１】

方法

インビトロ耐久性試験

ＭｅＨＡ、ＰＥＧＤＡ、およびＡＨＡの場合、１．０００グラムの水和微粒子を収集した後、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳで緩衝したリン酸緩衝生理食塩水と１％ゲンタマイシンとからなる分解用緩衝液中に加えた。この分解用溶液はｐＨ７．３±０．１０に維持した。溶解状態の微粒子を３７℃で１週間、３週間、および６週間保存した後、収集し、６０℃で一晩乾燥させて、分解後の乾燥質量を得た。この分解後乾燥質量を０日目の微粒子の乾燥質量と比較することで、質量減少率を求めた。さらに、各時点で膨潤率を測定し、ゲル強度を分解と一緒に評価した。

40

【００７２】

インビボ耐久性試験

イヌ膵島の単離

イヌ膵島は、地元の動物病院の安楽死させられたドナーから、臓器提供について所有者の同意を得て、地元で入手した膵臓から単離した。獲得と消化のプロトコルは以前に詳細に公開されたものである。臓器を摘出し洗浄した後、標準的な公開プロトコルを用いて、コラゲナーゼ消化、その後に密度勾配精製を行った。単離された膵島を、定量化を目的として、標準的な公開プロトコルに従ったジチゾン染色により、膵島当量、すなわち「ＩＥＱ」に変換した。イヌ膵島は、１０％ウシ胎児血清、２ｍＭグルタミン、１０ｍＭニコチンアミド、および１％抗生物質－抗真菌剤溶液を添加したＣＭＲＬ１０６６中、３７℃、

50

5 % C O₂ で培養した。

【 0 0 7 3 】

カプセル化膵島の異種移植

ストレプトゾトシン (S T Z、2 2 0 ~ 2 5 0 m g / k g) で処置することで糖尿病を誘導した免疫不全 N O D / S C I D マウス (N O D . C B 1 7 - P r k d c s c i d、ジャクソン研究所) を用いて、C S S によりカプセル化されたイヌ膵島の機能的能力を評価した。6 匹のマウスには P E G D A にカプセル化された膵島を投与し、2 匹のマウスには P E G M A L 内の膵島を投与し (下記の合成手順)、4 匹のマウスには M e H A にカプセル化された膵島を同用量投与した。2 匹のマウスに对照として等価用量の非カプセル化膵島を移植 (腹腔内) した。試験の 1 0 週目、M e H A にカプセル化された膵島を投与されたマウスが全て高血糖症となったため、非カプセル化膵島群と共に終了させた。後の組織学的研究の比較対象とするために、P E G D A 群からも 4 匹のマウスを 1 0 週目に終了させた。残りの 2 匹の P E G D A マウスはさらに 6 週間後に終了させた。この 2 匹の P E G M A L マウスのモニタリングは継続中である (移植から 1 6 週間超) 。

【 0 0 7 4 】

膵島カプセル化微粒子の耐久性 P E G D A 配合物および急速分解性 M e H A 配合物は、イヌ膵島細胞を前駆体に混合した以外は上記と同様に製造した。化学架橋型 (すなわち、非紫外線架橋型) の耐久性 P E G M A L 配合物は、上記の T h H A 微粒子と同様のスキームに従って準備した。簡潔に説明すると、2 5 % (w / w) 8 分岐 4 0 k D a P E G M A L (ジェンケム U S A 社 (J e n K e m U S A)) とイヌ膵島とから構成されるハイドロゲル前駆体を、0 . 2 5 % (m / v) の濃度の 1 k D a S H - P E G - S H 架橋剤 (バイオケム P E G (B i o c h e m P E G)) を含有する p H 6 . 6 のアルギン酸浴中に押し出し、5 分間攪拌した。5 分後、この架橋用アルギン酸浴を最終 p H が約 7 . 2 になるように H E P E S 緩衝膵島培地で半分に希釈し、さらに 3 0 分間攪拌して、ハイドロゲルコアを完全に架橋させた。その後、アルギン酸シェルを記載されたように除去した。

【 0 0 7 5 】

膵島含有微粒子は、1 8 G カテーテルを介してマウスの腹腔内 (I P) に投与した。膵島投与量は、およそ 4 0 0 0 膵島当量 / マウスが正常血糖をもたらすことを示した以前の漸増投与試験に基づくものであり、イヌ膵島がマウスに移植された以前の公開と一致している。血糖値は、全てのマウスに対し、移植後 1 4 日間は毎日測定を行い、その後は隔週で行った。

【 0 0 7 6 】

動物の 殺後 (1 0 週および 1 6 週)、膵島含有微粒子を腹腔内から回収し、培地に播いて評価を行った。膵島含有微粒子は、ジチゾン染色によりインスリンの存在を検出し、さらに、カルセイン染色 (生細胞) およびヨウ化プロピジウム染色 (アポトーシス / ネクローシス細胞) により体外移植組織の細胞生存率を評価した。染色された微粒子のカラー画像、明視野画像、および蛍光画像を、C y t a t i o n 5 イメージングマルチモードリーダー (バイオテック・インスツルメント社。) を用いて撮影した。

【 0 0 7 7 】

膵臓および微粒子が付着した腹膜由来の組織試料を採取し、1 0 % 中性緩衝ホルマリン中で一晩固定した後、P B S に移した。組織をパラフィンブロックに包埋し、染色用に適切に切片化した。ヘマトキシリン / エオシン (H & E) 染色では、切片を、C l e a r R i t e 3 溶液中に 3 回それぞれ 3 分間入れることで連続的な脱パラフィン処理を行い、続いて脱水工程と再水和工程を行った後、ヘマトキシリンおよびエオシンによる染色を行った。切片を水でリンスした後、B l u i n g R e a g e n t を加え、さらに水道水でリンスした。最後に、切片を 1 0 0 % 無水アルコールおよび C l e a r R i t e 3 に浸漬することで色安定性を向上させ、適宜カバーガラスを乗せた。スライドに対し検討を行い、バイオテック社製 C y t a t i o n 5 セルイメージングマルチモードリーダーで画像を撮影した。

【 0 0 7 8 】

カプセル化膵島の同種移植

最近糖尿病と診断された2匹の成体雄イヌに、耐久性PEGDAまたは急速分解性MeHAのいずれかでカプセル化されたイヌ膵島移植片を与えた(N=1匹/群)。イヌ膵島のカプセル化は前述のプロトコルに従った。それぞれのイヌには、およそ60mLの充填済み微粒子からなる移植片を、カテーテル直接注入を介して腹膜に送達させて投与した。これらのイヌは、移植後の最初の20日間毎日、体重および血糖をモニタリングした。

【0079】

結果

インビトロ分解

MeHA微粒子、PEGDA微粒子、およびAHA微粒子を、37℃のHEPES緩衝分解用溶液に入れ1週間、3週間、または6週間おいた後、乾燥させ、乾燥ポリマー質量を求めた。6週間の分解の後、MeHA微粒子は開始質量の24%しか残存していないが、一方、PEGDA微粒子とAHA微粒子はそれぞれ37%、53%残存していることが分かった(図8A)。PEGDAはかなりの量の質量を失ったが(図8C)、膨潤率に変化がない(図8B)ことから分かるように、その6週間の間ゲル強度は維持した。対照的に、MeHA微粒子およびAHA微粒子は膨潤率が激増しており、これは、微粒子が分解するにつれてゲル強度が著しく減少したことを示している。PEGDA微粒子とHA系微粒子との間のゲル強度における差異は、架橋密度とポリマーの化学的性質の両方に起因している可能性がある。PEGDA微粒子の場合、ポリマー鎖が、HA微粒子と比較してより高い架橋密度で、いくつかの共有結合により密接にまとめられる。加えて、PEGDAポリマー鎖は疎水性部分である領域をいくつか含んでいる。架橋密度と疎水性領域の両方により、微粒子中への水の拡散速度が、微粒子の表面上で生じる加水分解の速度よりも遅くなる。当然ながら、分解が表面上だけで起こる場合、内部のゲルネットワークはそのまま残り、ゲル強度は保存される。MeHA微粒子とAHA微粒子では、しかしながら、PEGDAと比較して、架橋密度はかなり低く、ポリマーの化学的性質もより親水性の構造を生じるものである。HA微粒子の架橋密度と親水性の低さは、共に、微粒子内への水の拡散速度が高くなることを促すものであり、バルク分解の機構をもたらす。バルク分解では、水がハイドロゲルネットワーク内に深く浸透し、ゲルネットワークの強度を損なう加水分解が生じる。このような分解が、AHA微粒子がなぜ6週間の分解後もPEGDAよりも高いポリマー質量を保持するかの説明になり得る。HA微粒子における経時的なゲル強度の減少は、加水分解が生じているが、その分解生成物がゲルネットワークの外にまだ拡散していないことを示している。この場合、ポリマーがゲルネットワーク内部に存在しても、ハイドロゲルの完全性にはもはや寄与していないので、残存するポリマー質量は分解の程度の正確な評価とはならないだろう。

【0080】

糖尿病マウスにおけるイヌ膵島搭載微粒子の機能

PEGDAまたはMeHAでカプセル化したイヌ膵島を糖尿病NOD/SCIDマウスに移植した。対照群には非カプセル化膵島を投与した。図9は、移植後の初期研究コホートにおいての、各群の日平均血糖値を示している。MeHA群、PEGMAL群、およびPEGDA群のマウスは全て、移植後2週目までには正常血糖になった。しかし、急速分解性MeHA微粒子を投与された動物は、外因性インスリン治療の再導入にもかかわらず、徐々に高血糖レベルへと戻っていった(移植のおよそ3週間後に始まって)。これらのマウスは10~11週目頃に安楽死させた。耐久性のPEGDAおよびPEGMALでカプセル化された膵島を投与されたマウスは、研究期間全体を通じて(PEGMALは進行中、16週間)正常血糖のままであり、外因性インスリンを用いずに優れた血糖コントロールがなされた。

【0081】

対照的に、非カプセル化膵島を投与されたマウスは全て、いずれの時点でも、持続的な正常血糖を達成できなかった。これらのマウスは、移植前は $386 \pm 23 \text{ mg/dL}$ の初期平均血糖を有しており、移植当日の血糖は $494 \pm 61 \text{ mg/dL}$ であった。他の2群

10

20

30

40

50

と同体積の膵島の移植後、血糖は一匹の動物において2日目に正常測定値を1つ示したのみであり、その他のマウスは19日目から30日目まで血糖値の変動を示したが、その後の残りの試験期間は、一貫した高血糖値へと戻った。

【0082】

剖検時、マウスの腹腔内から微粒子を回収した。結果を図10A～図10Dに示す。膵島を含有する耐久性PEGDA微粒子は10週目頃に容易に回収されたが、急速分解性MeHA微粒子は数が非常に少なく同定が困難であった。回収されたPEGDA微粒子の試料は、腹腔内の全体に不規則に分散しており、透明なまま、構造も損なわれていないことが分かった。回収されたPEGDA微粒子は、分解の徴候をほとんどまたは全く示しておらず（すなわち、平滑な縁、サイズに明確な変化がない、機械的に安定）、移植細胞が微粒子内にまだ含有されていた（図10A）。対照的に、急速分解性MeHA微粒子は形が歪で直径も小さく、これはハイドロゲル分解が顕著であることを示すものである。MeHA微粒子はインタクトな膵島を含有していないように見えた（図10B）。後の時点（16週目）でも、耐久性PEGDA微粒子は引き続き剖検時の回収が容易であった。PEGDA微粒子内の膵島を、ジチゾン、カルセイン、およびヨウ化プロピジウム（PI）で染色することで、生きた機能的膵島の有無を確認した。

【0083】

移植後16週目頃に回収されたPEGDA微粒子は、濃い赤色のジチゾン染色により同定される、健全な生きた膵島を含有していた（図10C）。同じ膵島を、一般的な生細胞指標である、緑色のカルセインで共染色した（図10D）。PI染色陽性（赤色；アポトーシス／ネクローシス細胞）がいくつか観察されたが、概して、回収された微粒子の表面に付着しているように見える膵島以外（すなわち、ジチゾン陰性）の組織に局在していた。逆に、膵島（ジチゾン陽性細胞）は、PI（死細胞）染色をほぼ完全に含んでいなかった（図10D）。

【0084】

耐久性PEGDA微粒子は、肝臓や腹壁などの組織への付着が見られたが、概して非付着性であり、腔内を自由に浮動していた。移植片部位の組織学的検査により、PEGDA微粒子の場所を特定した。組織学的検査用に加工する方法によりPEGDA微粒子の完全性は破壊されたが、付着部位に明白な線維性組織はなかった。図11は、2つの微粒子と交差している健全な脂肪細胞を示しており、それらの微粒子の場所は暗線で示されている。各微粒子位置の中央の青がかっている灰色の薄層は、加工後に残存したハイドロゲルである。対照的に、MeHA群から得られた組織学的検査用切片においてはゲル材料を同定できなかった。PEGDA群においては、概して、微粒子と網膜の界面に線維症は見られなかった。PEGDA処置マウスにおける血糖値の正常化が、ストレプトゾトシン処置後に膵臓内に残存する内在性膵島によるものではなく、移植片の移植によるものであることを確かめるため、膵臓の組織学的検査用切片を膵島の有無について検査した。マウス当たり6枚の膵臓切片において、膵島様構造は1つだけ同定された（結果は図示していない）。

【0085】

2匹の糖尿病のイヌに移植されたイヌ膵島を用いて同様の研究を完了させた。これらの動物は、移植前は共に糖尿病であり、定期的な外因性インスリンの投与は受けていなかった。一方のイヌには耐久性PEGDA微粒子にカプセル化されたイヌ膵島を投与し、他方には分解性MeHAハイドロゲルにカプセル化されたイヌ膵島を投与した。図12は、毎日午前と午後に得られた測定値からの、平均非空腹時血糖を示している。耐久性ハイドロゲル内の膵島を投与されたイヌは、正常範囲内のより低い血糖値へとゆっくりと戻っていき（実線）、実験期間中（8週間）その正常レベルを維持した。対照的に、急速分解性ハイドロゲルを投与された動物は、移植後20日以内に、完全な糖尿病状態へとゆっくりと戻っていった（点線）。

【0086】

考察

興味深いことに、両方のマウス群が微粒子の腹腔内注射後に正常血糖を達成したが、投

10

20

30

40

50

与量と移植部位が同じ非カプセル化膵島では正常血糖は達成されなかった。動物モデルには免疫不全マウスが用いられていたことから、この結果は、ハイドロゲルマトリックスが、特に腹腔内への注射による移植という状況において、より良好な細胞機能および生存を促す、物理的支持となる環境を提供することを示唆している。この結論は、MeHA微粒子の経時的な分解が、高血糖への復帰と同時に観察されたことから裏付けられる。さらに注目すべきは、PEGDA型膵島微粒子とPEGMA型膵島微粒子が、構造的により頑健であったことから、MeHA群で高血糖が再発する前の移植前後の時期に、MeHA移植に比べて、優れた血糖値コントロールをもたらしたことである。

【0087】

イヌでの試験は2匹の動物しか使用されていないが、この結果は、免疫不全のマウスと免疫力のあるイヌでの反応の違いを対比していることから重要である。インタクトなイヌの免疫系により、より脆弱なハイドロゲル(MeHA)はより急速に分解され、高血糖性の血糖値により速く戻る結果となった。この結果は、この特定の分解性ハイドロゲル微粒子配合物が、種に応じて、およそ数日から数週間の生体内持続期間があることを示している。しかし、耐久性ハイドロゲル微粒子は、少なくとも2か月間の生体内持続期間を示した。

【0088】

実施例3

耐久性微粒子最終産物と急速分解性微粒子最終産物のビーズ内増殖の比較

序論

細胞カプセル化材料の物理的性質および化学的性質の操作は、インビトロのティッシュエンジニアリング研究の強力なツールとなった。微小環境の機械的性質および化学的性質は種々の細胞型の振る舞いを変化させることが知られているが、中でも注目すべきは、幹細胞が細胞周囲の機械的特性による影響を受けることである。幹細胞のハイドロゲル内で増殖を継続する能力は、外傷による、または外科的処置に伴う軟部組織欠損の治療的処置において重要な特性となる。例えば、筋肉または皮膚の外傷には、増殖中の幹細胞を含むマイクロビーズの局所送達が有益である。幹細胞が増殖中であることは、微粒子内に存在しながら細胞数が増加し続けることから、微粒子の投与量が小さくなる。しかし、全てのハイドロゲルが細胞の微粒子内増殖を可能とするわけではない。ここでは、急速分解性ハイドロゲル微粒子が微粒子内での頑健な細胞増殖を可能にすることを示す。

【0089】

方法

ヒト胎児由来腎臓細胞(HEK293)を、高濃度のグルコースおよびウシ胎児血清を含有するDMEM培地中で培養し、37℃、5%CO₂の恒温器内で維持した。細胞が適切な密度に達したら、0.5%トリプシン-EDTAを2分間加えることで培養フラスコから剥離した。剥離後すぐに、細胞を増殖培地に移した。細胞のハイドロゲル内で増殖する能力を試験するため、上述のCSS製造法を用いて、急速分解性MeHAおよび耐久性PEGDAという2種類のハイドロゲルポリマーから微粒子を製造した。同量のポリマー前駆体(1mL)を、同じ数の増殖中ヒト胎児由来腎臓細胞(HEK293; 4×10⁶細胞)と混合し、前述の方法を用いて微粒子形成を行った。微粒子は培養条件下に3週間維持した。微粒子内での細胞の増殖を評価するため、バイオテック社製Cytation 5セルイメージングマルチモードリーダーを用いて、34日間に亘り画像を撮影した。

【0090】

結果

微粒子の配合時、細胞形態とその微粒子内分布はハイドロゲルに応じて独特となることが分かった。最初、耐久性PEGDA微粒子内では、HEK293細胞はクラスター化していた(図13A)。対照的に、分解性(MeHA)微粒子内では、同一密度で積載された同一細胞は単一細胞のままであった(図13C)。

【0091】

時間が経過しても、PEGDA微粒子内では、細胞の形態や数における変化はわずかで

あった（図 1 3 B）。対照的に、分解性 MeHA 微粒子内の細胞はハイドロゲル内部で増殖し、培養下で 3 4 日後に見られるような巨大なクラスターを微粒子内部で形成した（図 1 3 D）。これらのクラスターは、MeHA ビーズの表面から突出したりその表面に付着したりしてはいくには見え、ビーズマトリックス内にカプセル化されたままであった。しかし、耐久性 PEGDA 微粒子内部の同一細胞は、PEGDA ビーズの内部で急速に増殖することも、増殖性の細胞塊を形成することもしなかった。

【0092】

考察

これら最終産物形態において、各微粒子は、微粒子内部での細胞の増殖を、阻止するかまたは可能にする。本実施例で示されたデータにより示されているように、耐久性ハイドロゲルは細胞増殖を阻止したが、一方、より軟質の急速分解性 MeHA ハイドロゲルは胎児性細胞の顕著な増殖を可能にした。加えて、使用された配合物に応じて細胞の形態が変化した。このことは、増殖性細胞のカプセル化と非増殖性細胞のカプセル化を対比する際に重要である場合があり、CSS 技術を用いて調整可能である。

【0093】

実施例 4

耐久性微粒子最終産物と分解性微粒子最終産物における細胞遊走の比較

序論

いくつかの治療例では、細胞やその産物の微粒子外への移動が治療の重要な一面となる。例えば、内在性の幹細胞や前駆細胞は、正常な発生の過程で、さらには脳傷害や脳疾患などの病的状態下においても、脳に遊走することが示されている。ネイティブ幹細胞が実際に、傷害領域に、その修復の助けとなるために、遊走または「ホーン（hone）」すること示唆している研究もある。しかし、非損傷組織における幹細胞の数を現場測定することを対照とした場合、ほとんどの研究においてそのような主張を実証することができなかった。

【0094】

すなわち、細胞が任意の組織の修復の助けとなるためには、細胞は当該領域に長期間局在化する必要がある。カプセル化されていない幹細胞をある領域に配置することの治療実践には課題が多く、というのも、細胞は小さく、当該領域の外に急速に拡散してしまうか、免疫系に攻撃されてしまうためである。よって、特定領域への細胞の徐放を可能にする局在化アプローチは治療上大きな利益をもたらすであろう。本実施例では、分解性微粒子におけるこれらの特性を示す。

【0095】

方法

3 種類のハイドロゲルポリマー、MeHA、AHA、および PEGDA を、上記の CSS 製造法を用いて微粒子へと製造した。ヒト胎児由来腎臓細胞（HEK293）を、高濃度のグルコースおよびウシ胎児血清を含有する DMEM 培地中で培養し、37℃、5% CO₂ の恒温器内で維持した。ラット骨髄幹細胞（rBMSC）を、高グルコース DMEM、ウシ胎児血清、および GlutaGro 中で培養した。細胞が適切な密度に達したら、0.5% トリプシン-EDTA を 2 分間加えることで培養フラスコから剥離する。剥離後すぐに、細胞を増殖培地に移した。同量のポリマー前駆体（1 mL）を同数の HEK293 細胞または rBMSC（ 4×10^6 ）と混合し、その後ビーズ形成を行った。

【0096】

微粒子外への細胞遊走の量を評価するため、所定の時点で微粒子を培地から取り出し、スクリーンにかけて洗浄した。洗浄培地と微粒子周囲の培地を回収した。Cytation 5 イメージングマルチモードリーダー（バイオテック・インスツルメント社）および EV セルカウンターの両方を用いて細胞を計数した。

【0097】

結果

図 1 4 は、カプセル化の 4 日後の個々の細胞を含む、回収した使用済み培地と洗浄用培

10

20

30

40

50

地を含む、ウェルの典型的な画像を示している。PEGDAハイドロゲル内にカプセル化されたHEK293細胞の培地中では、細胞はほとんど計数されず、その多くが死滅していた（赤色）（図14A）。対照的に、図14Bにおいて多数の生細胞（緑色）がウェル内に残っていることから示されるように、分解性ハイドロゲルは多数の生細胞の放出を可能にした。しかし、これらの細胞数は、2週目の細胞放出蓄積値と比べて小さなものであった。

【0098】

図15は、細胞放出蓄積に関する研究から得られた平均データの要約である。培養の最初の6日間は、数千個の細胞のみがビーズから放出された。14日目までに、 2×10^7 個超の細胞が急速分解性MeHA微粒子によって放出されたが、一方、耐久性PEGDAビーズからは 2.2×10^5 個の細胞しか放出されなかった。累積として、21日目までに、MeHAビーズは 3.08×10^7 個の細胞を放出したが、PEGDAはその5%未満しか放出しなかった。

【0099】

考察

結果から、耐久性微粒子外へ遊走する増殖性細胞の数と分解性微粒子外へ遊走する増殖性細胞の数との比較において、明確な違いが示されている。最終微粒子産物は、細胞の微粒子外の周辺組織への遊走を可能にする。急速分解性配合物は、耐久性ハイドロゲルよりも速く且つ多数の遊走を可能にする。これらの結果は、微粒子の物理的分解が起こる前であっても、細胞の局所的傷害部位への遊走を可能とする点で、急速分解性ハイドロゲルの有用性を示すものである。

【0100】

実施例5

耐久性微粒子最終産物と急速分解性微粒子最終産物の生存率、形態、および機能の比較序論

耐久性ハイドロゲル配合物や急速分解性／短期型ハイドロゲル配合物には数多くの応用例がある。マイクロカプセル化間葉系幹細胞（MSC）が、マウス後肢傷害モデルにおいて、パラクリンを介した治癒を劇的に増強し、非カプセル化MSCと比較した場合に生存率および血管新生促進活性の増加を示すことが、文献で明らかにされている。カプセル化されると、細胞は必ず生存率を維持し、必ず治療的に機能している。カプセル化用のマトリックスの剛性を増加させると、MSCの分化が、より骨形成性の経路へと向かい、対して、より柔軟性の高い材料では軟骨形成経路へと向かうことが示されている。さらに、三次元コラーゲンハイドロゲル内で培養されたラット神経細胞は、二次元の同一材料上で増殖した細胞と比べて、より良好な生存率を示し、天然の神経回路網によりよく似た挙動を示した。

【0101】

方法

生存率および形態

急速分解性（MeHAおよびAHA）および耐久性（PEGDA）の2種類のハイドロゲルポリマーを、上記のCSS製造法を用いて微粒子へと製造した。同量のポリマー前駆体（1mL）を同数のマウスMSC（ 1.6×10^7 個）またはインスリノーマ細胞（ 3.0×10^7 個の細胞）と混合し、その後ビーズ形成を行った。ビーズは培養条件下に2週間維持した。微粒子内で培養した場合の細胞の生存率および機能は、どちらの配合物の場合でも高かった。カプセル化後、生存率の蛍光染色を用いて、微粒子内でのMSCおよびインスリノーマ細胞の生存率を測定した。カルセインはインタクトな膜を有する細胞にだけ侵入できることから、カルセインを生細胞の基準として培地に添加した。死細胞を同定するために、ヨウ化プロピジウムを培地に添加した。蛍光色素分子中で30～60分のインキュベーション後、Cyta tion 5イメージングマルチモードリーダー（バイオテック・インスツルメント社）で微粒子の画像を収集した。

【0102】

また、2種類の異なるハイドロゲルにカプセル化された非増殖性の体細胞源（イヌ膵島）を用いて同様の実験を行った。細胞（膵島または培養細胞）が前駆体へと混合された微粒子を上記のように製造した。イヌ膵島の場合、1.1倍濃度の前駆体をイヌ膵島スラリーと体積比10:1で混合し、その直後に液滴生成を行った。膵島微粒子の製造は、密閉された無菌のバイオリアクターシステムにおいて無菌的に行った。

【0103】

完成した微粒子は、ジチゾン染色によりインスリンの存在を検出し、さらに、カルセイン染色（生細胞）およびヨウ化プロピジウム染色（アポトーシス／ネクローシス細胞）により体外移植組織の細胞生存率を評価した。染色された微粒子のカラー画像、明視野画像、および蛍光画像を、Cytation 5 イメージングマルチモードリーダー（バイオテック・インスツルメント社）を用いて撮影した。

【0104】

結果

図16Aおよび図16Bに示されているように、MSCは、PEGDAまたはMeHAのいずれでカプセル化された場合も高い生存率を示した。同様の結果がAHAで見られた（図16E）。緑色の蛍光色素分子はカルセインで染色された生細胞を示している。赤色／黄色の細胞はヨウ化プロピジウムで染色された死細胞を示している。興味深いことに、細胞は、単一細胞として微粒子に積載されたが、耐久性PEGDAゲル内では急速にクラスター化したものの、分解性MeHAハイドロゲル内ではクラスター化は起こらず、主に単一細胞としてとどまった。製造プロセス中の細胞形態のモニタリングにより、製造後ではなく微粒子製造中に、細胞がクラスター化したことが示された。

【0105】

イヌ膵島を用いた研究では、細胞は両方のハイドロゲル微粒子内で高い生存率を有した（図16C:PEGDA、図16D:MeHA）。インスリン含量に関する細胞染色によって示されているように、細胞はどちらのハイドロゲル内でも機能性を持ち続けた。膵島は細胞のクラスターとして微粒子内に積載された。どちらの配合物においても、クラスター化頻度にもクラスターサイズにも、変化はないように思われた。

【0106】

ラットインスリノーマ細胞株を用いた場合も同様の結果が得られた。図17は、細胞の生存率が高いことを示しており、特に、AHA内にカプセル化された場合、カプセル化後1日以内は生存率が高い。その後の7日間に亘って、AHA内の細胞の生存率はおおよそ50%まで低下した。対照的に、PEGDA内のインスリノーマ細胞はより低い生存率からの開始であったが、試験を通じてその平均値付近を維持した。

【0107】

細胞内のインスリンを染色することで、島細胞の機能試験を行った。ジチゾン染色はインスリン産生の標準的な指標である。ジチゾン染色はインスリン陽性細胞を赤色／茶色がかった色調で染める。図18の画像は、カプセル化のおおよそ1週間後の、耐久性PEGDA微粒子および分解性MeHA微粒子の両方において膵島のインスリン染色が陽性となることを示しており、どちらの微粒子にカプセル化された後もインスリン産生を継続できることを示している。マウスMSCと異なり、これらの体細胞性島細胞の形態はどちらのハイドロゲル配合物内においてもほとんど変化しなかった。

【0108】

実施例6

耐久性微粒子最終産物と急速分解性微粒子最終産物の局所細胞投与の比較

序論

耐久性ハイドロゲル配合物や急速分解性ハイドロゲル配合物には数多くの応用例がある。マイクロカプセル化MSCが、マウス後肢傷害モデルにおいて、パラクリンを介した治療を劇的に増強し、非カプセル化MSCと比較した場合に生存率および血管新生促進活性の増加を示すことが、文献で明らかにされている。MSCのパラクリン型放出の使用に伴う問題の1つとして、カプセル化されていないMSCは傷害領域に滞留せずに、急速に体

10

20

30

40

50

内から取り除かれることが挙げられる。すなわち、粘着性ハイドロゲルを用いてカプセル化することで、細胞を移植領域にトラップし、そこで有益な化合物を分泌させることができる。微粒子が耐久性配合物であるか分解性配合物であるかで、周辺組織に付着し当該領域に残留する能力に違いが示されるかどうかを確認するための実験を行った。

【0109】

方法

組織への粘着性

イヌの網膜への移植術の際に、即時的な組織粘着について調べた。4匹のイヌにイヌ臍島を含有する微粒子を移植した。移植当日は、外科的処置の前、間、後に、液体注入用の橈側皮静脈カテーテルを含む、標準的な獣医学的手順を用いて、動物を麻酔した。外科医により微粒子が大網膜に注射された。腸組織、血管、リンパ節、リンパ管のいずれにも侵入しないように、またそれらを傷付けないように注意を払った。合計10,000臍島当量を1mLのハイドロゲル微粒子内に含有させた。臍島含有PEGDA微粒子の製造は前述のものである。写真を撮影した後、網膜を腹部にゆっくりと戻し、腹壁を閉じ、その後皮内縫合を行って皮膚を閉じた。

【0110】

別の例として、マイクロビーズをラット膝に注射することにより組織粘着を実証した。簡潔に説明すると、PBS中の300 μ mPEGDA微粒子100 μ Lを、25G針を通して、スプラグドローラット膝関節の関節包内へと押し出した。関節包内部に微粒子が存在することを確認するため、押出前に上記溶液およびビーズを青色に染色した。

【0111】

粘着された組織の組織学的検査

健常スプラグドローラットを用いて、急性の生体適合性と腹腔内の微粒子の場所（微粒子配合物につきN=2）について評価を行った。空の微粒子を前述の手順に従って網膜周囲に移植した。微粒子はDPBS中の懸濁液として注射器により送達した。およそ1mLの疎充填微粒子をラットの網膜の周囲および内部に蓄積させた。ラットは、微粒子移植後10日間、疼痛マーカーおよび活動レベルについてモニタリングとスコアリングを毎日行った。

【0112】

移植の14日後にラットを安楽死させ、腹腔内の微粒子位置の決定と、起こり得る組織異常の検査のための、移植部位の評価を行った。組織試料を採取し、中性緩衝ホルマリン中に保存し、パラフィン包埋し、7 μ m厚に切片化した。切片をH&E染色し、顕微鏡による評価を行った。

【0113】

結果

図19Aに示されるように、また、方法のセクションで説明したように、PEGDA微粒子を腹部網膜の内部および周囲に注入した。媒体中の微粒子を網膜の内部および周囲に注入した直後、網膜に用手操作を加えた場合も微粒子が組織に粘着していることを示す画像を収集した。図19Bおよび図19Cは、2匹の別々のイヌから得られた結果を示しており、共に微粒子の粘着性を示している。

【0114】

染色したPEGDA微粒子をラットの膝に注射した。関節に用手操作を加えた後、関節を解剖した。筋肉越しであっても、微粒子由来の青色は目で見ることができた（図20A）。さらに解剖した場合も、微粒子は可視であり、膝関節内にまだ存在することが分かった（図20Bおよび図20C）。

【0115】

耐久性PEGDA微粒子、分解性MeHA微粒子、分解性AHA微粒子（細胞なし）を、健常スプラグドローラットに移植し、CSS法を用いて製造された微粒子の安全性および生体適合性、さらに、場所および周辺組織への付着の評価を行った。剖検を2週間後と10週間後に行ったところ、急性炎症、過剰体液、組織異常の徴候は腹腔のどこにも

確認されず、ただし、網膜を胃壁に縫合した場所に組織癒着がいくらか確認された。微粒子配合物は共に、網膜においてインタクトな状態で見つかり、目視では半透明であり、非常に薄い膜のような層で取り囲まれているように見えた。少数の微粒子が肝臓の表面に付着して見られた。しかし、微粒子の大多数は網膜に付着しており、自由に浮動する微粒子は少数であった。

【0116】

上記3つの微粒子群について、体外移植組織のヘマトキシリン・エオシン染色を図21に示す。群の間に顕著な相違は見られなかった。微粒子は概ねインタクトな状態であったが、サイズが収縮しているように見え、組織学的検査用の組織処理の結果として潰れている／変形している場合もあった。微粒子は共通して、その外周部にしばしば2細胞厚または3細胞厚の薄い細胞層を有していることが分かり、空の微粒子を動物に注射したことから、全ての微粒子の内部には細胞が存在していなかった。ほとんどの単一微粒子は正常な網膜組織に取り囲まれており、各種配合物微粒子に応答した炎症反応が無いことが示された。

【0117】

網膜における微粒子の異物反応を定量化したものを図22に示す。細胞充実度が低いことと、コラーゲン含量が高いことにより特定される線維性領域の幅は、AHAにおいて最小となり、PEGDA微粒子の周囲で高値となった。それでも、PEGDA微粒子周囲の線維性の環の厚さは、アルギン酸などの他のハイドロゲル配合物の場合で報告された厚さに満たないものである。同様にリンパ球性領域も、AHA微粒子においてより小さい値となった。リンパ球性領域は、細胞性免疫細胞が微粒子周囲に遊走している領域と定義した。リンパ球性領域も、PEGDA微粒子の場合でより高い値となったが、それでも、最小限であると思なされた(図22)。

【0118】

考察

最終産物の固有の有益な特性として、耐久性ハイドロゲルマトリックスから構成されているか、分解性ハイドロゲルマトリックスから構成されているかにかかわらず、粘着性である点が挙げられる。この粘着性によって、上記最終産物が、周辺組織に急速に付着し、分解されるまで当該領域に保持されることが可能となる。豚島が腹腔腔内の周辺組織に付着したことに加えて、抗炎症サイトカインや治癒促進性サイトカインを放出するMSCなどの細胞を投与するために粘着性ハイドロゲルを使用することで、身体の他の領域への再分布を配慮せずに、関節などの炎症組織への注射により、細胞性因子を局所領域に長期送達することができた。

【0119】

実施例7

ハイドロゲル特性に影響を与えるパラメータの検討

本実施例では、各種パラメータについて、それらの相互の関係性や、得られるハイドロゲル微粒子の特性および特徴に対する影響をより深く理解するための検討を行った。以下でより詳細に考察されるように、各種微粒子特徴は、特定の所望の治療プロトコルおよび治療結果に対して、細かく適合・調整することができる。特に、これらのパラメータはそれぞれがハイドロゲル微粒子製造における動的因子であり、これは、その影響が配合物中に使用された他の成分の量もしくは比および／または他の加工パラメータに関連していることを意味する。さらに、ある特定のパラメータの変更は、必ずしも、得られるハイドロゲルに比例的な変化をもたらすわけではない。しかし、やはり、種々の微粒子配合物および加工パラメータを微妙に異ならせることで、カプセル化の対象となる細胞の種類、移植位置、および治療または予防の対象となる状態などの所望の結果に応じて、多くの様々な特徴をカスタマイズすることが可能である。

【0120】

これらの種々のパラメータの調査を行うため、微粒子の相対的分解速度の代わりとして膨潤率(Q)が使用される。

【0121】

A. コアポリマー種の質量分率

質量分率とは、ポリマー骨格に使用されたハイドロゲル前駆体溶液中の反応性ポリマー種の質量%組成を指す（例えば、10 gの前駆体溶液中の2.5 gのPEGMA Lの場合、質量分率は25%）。前駆体溶液中の反応性ポリマーの質量分率を調整すると、得られるQ値に一貫した影響が及ぼされる。質量分率が低いほど、Q値は高くなり、ゲルは柔らかくなる。このことを、500 Da PEGジチオールを有する各種多分岐PEGMA L種を架橋することによって示す。本実施例における架橋剤濃度は、アルギン酸浴中で0.25%の質量分率に一定に保持した。非反応性PEG種（PEG8000）を低質量分率群に含めることで、一定の溶液粘度を維持した。結果を図23に示す。

10

【0122】

B. アルギン酸浴中の架橋性化学種の濃度

アルギン酸浴中の架橋剤（例えば、PEGジチオール、DTT）の濃度は得られるハイドロゲル微粒子に影響を与える。しかし、浴中の架橋剤が少なすぎる場合や多すぎる場合があるため、架橋剤とハイドロゲルマトリックスの関係は単純ではない。架橋剤が不十分であると、不十分にしか架橋されていない脆いゲルが生じるが；架橋剤が多すぎても、ポリマー骨格上の反応部位を飽和させ、同様に架橋を妨げて脆いゲルを生じさせる。すなわち、このパラメータは、骨格に使用されるポリマー前駆体の量および種類とのバランスも取らなければならない。

20

【0123】

1. 架橋剤の濃度を増加させるとQ値は低くなる。

本実施例（コアポリマー＝4分岐10 kDa PEGMA L）では、架橋剤濃度（DTT）を増加させた場合、より低いQ値が得られた。これは、架橋剤濃度が、コアポリマーの飽和が起こるレベルに全く届いていなかったことを示している。結果を図24Aに示す。

【0124】

2. 架橋剤濃度を増加させるとQ値は高くなる。

本実施例（コアポリマー＝8分岐40 kDa PEG-ビニルスルホン）では、架橋剤（BMA、CAS 123-81-9）濃度を増加させた場合、最初はQ値が低くなったが、さらに増加させた場合、Q値が高くなり、これは実施例1で確認されたことと対照的であった。注目すべきことに、コア反応性基（ビニルスルホン）に対する架橋剤（チオール）の相対モル濃度は、前述の実施例とは異なるものであった。すなわち、実施例2の条件では、コアポリマー分子の飽和が生じ、架橋が不十分となった結果、ゲルネットワークが弱くなり、Qが高くなった可能性がある。結果を図24Bに示す。

30

【0125】

C. アルギン酸浴のpH

チオール-エン反応は環境のpHに強い影響を受ける。pH値を高くすると、チオール-エン反応キネティクスが劇的に増加する。すなわち、アルギン酸浴のpHを変更することで、ゲルの架橋ダイナミクスと得られるQ値に大きな影響を与えることができる。

【0126】

1. pHを増加させるとQ値は高くなる。

本実施例（コアポリマー＝8分岐40 kDa PEG-ビニルスルホン；架橋剤＝BMA）では、浴pHを増加させた場合、Q値が高くなった。結果を図25Aに示す。反応速度の増加により、反応が速くなり、最終的にコアポリマーの飽和が部分的なものとなったため、ゲルネットワークが弱くなり、Q値が高くなった可能性がある。

40

【0127】

2. pHを増加させるとQ値は低くなる。

本実施例（コアポリマー＝8分岐40 kDa PEGMA L；架橋剤＝500 Da PEGジチオール）では、pHを増加させた場合、Q値が低くなった。ポリマーと架橋剤は、飽和が起こらないようにバランスがとられる。すなわち、この場合、pHの増加により、反応キネティクスが速くなり、より効果的な架橋が起こった。結果を図25Bに示す。な

50

お、pHの増加に対するQ値の増加は、実施例1における非常に鋭い増加と比べて、実施例2ではかなり小さいものである。すなわち、Q値に対するpHの影響の方向と大きさは、共に、架橋剤とコアポリマー反応部位の相対量に大きく影響されると思われる。

【0128】

D. 架橋性化学種の分子量

架橋性化学種の分子量は、コアーシェル構築物中への拡散速度と、ゲルネットワーク内の架橋間の距離の両方に影響を与える。すなわち、架橋性化学種の分子量における差異が、プロセス中に使用された他のパラメータに依存して、得られるゲル微粒子の最終的なQ値に影響する可能性がある。

【0129】

1. 分子量を増加させるとQ値は高くなる。

本実施例（コアポリマー＝8分岐40kDa PEG-ビニルスルホン）では、154Da～500Daの架橋性化学種の分子量を増加させると、Q値が顕著に増加する。架橋剤化学種のモル濃度は、両方の調製物の場合で10mMとした。結果を図26Aに示す。

【0130】

2. 分子量を増加させてもQ値は変化しない。

本実施例（コアポリマー＝8分岐40kDa PEGMAL）では、架橋剤の分子量を増加させた場合でも、得られるゲルのQ値に明白な違いはなかった。架橋剤の分子量の変化の影響は、ポリマー反応部位に対する使用される架橋剤の相対量の調整を相殺するものである可能性がある。結果を図26Bに示す。

【0131】

E. コアポリマー化学種の分子量

ポリマーのグラム当たりの反応部位数が保存されている仮定すると、コアポリマー化学種の分子量は、架橋剤の分子量と比べてQ値への影響がかなり予想しやすいと思われる。例えば、8分岐40kDa PEGMALと4分岐20kDa PEGMALは、グラム当たり同じ数の反応部位（マレイミド）を有している。しかし、以下に示されるように、他の点では同じ環境下で作製された場合でも、40kDaの化学種の方が、はるかに強固なゲル（より低いQ値）が得られる。

【0132】

1. 反応部位数／グラムが一定である場合のコアポリマーの分子量の影響

本実施例では、3つの並列比較群を用いて、CSSにより作製されたゲル微粒子のQ値に対するコアポリマー分子量の影響を明らかにする。全ての調製物において、コア分子量が増加すると、質量分率や反応部位数／グラムが同じであっても、Q値は減少した。架橋剤の濃度が小さくなるほど（そして、サイズが増加するほど）、コア分子量の影響がより明白となっている点に留意されたい。結果を図27Aに示す。

【0133】

2. 反応部位数／グラムが等しくない場合のコアポリマーの分子量の影響

本実施例では、8分岐40kDaまたは4分岐10kDaのPEGMALコア種からなる微粒子を比較する。全ての場合で、コアポリマー溶液は10%の質量分率とした。4分岐10kDa化学種は、8分岐40kDaと比較したとき、2倍の反応部位数／グラムを有するが、8分岐40kDa微粒子は、生じ得る架橋密度がより小さいことにもかかわらず、4分岐10kDa微粒子と比べて、Q値が低かった（すなわち、ゲルがより強固であった）。結果を図27Bに示す。

【0134】

F. 紫外線架橋時間の影響

本実施例では、各種分子量のAHAマイクロスフィアおよびMeHAマイクロスフィアを、種々の紫外線暴露時間で製造した。簡潔に説明すると、1MDaもしくは200kDaのAHA、または1MDaのMeHAの2.5%溶液（それぞれ、1%の3.4kDa PEGDAを含む）を、上記のように攪拌アルギン酸浴に押出により滴加し、2.5分間、5分間、または7.5分間紫外線に暴露した。ポリマーの種類ごとに、得られる直径お

10

20

30

40

50

よびハイドロゲル膨潤率を定量化した。結果を図 2 8 A および図 2 8 B に示すが、これらの図では、マイクロスフィアの直径および膨潤率が紫外線暴露時間の関数として変化している。これらの結果から、紫外線暴露時間が増加するほど、直径も膨潤率も減少することは明らかである。注目すべきことに、1 M D a M e H A ハイドロゲルマイクロスフィアの膨潤率は、7.5 分間紫外線に暴露した後、5 分間と比べて、劇的に減少し、膨潤率はそれぞれ 5 0 9. 1、1 1 3. 4 となっている。この傾向はポリマーの種類毎および分子量毎に普遍であり、紫外線暴露時間の変化によるハイドロゲル耐久性の制御を実証している。

【0 1 3 5】

G. Q 値とは無関係に、架橋性化学種の加水分解性安定性によりハイドロゲル分解が制御される可能性。

1. より易加水分解性の架橋剤としての B M A。

ある特定の架橋剤を用いることで、微粒子の分解特性に影響を与えることができる。例えば、ジチオレート架橋剤分子である B M A は、チオール-エン型ハイドロゲルの加水分解性分解を促進する手段として活用できる可能性があった。

【0 1 3 6】

D T T または B M A で架橋された P E G - ビニルスルホンから構成される一連のハイドロゲル微粒子を作製し、5 0 m L ポリプロピレンチューブ内で、少なくとも 6 か月間、室温（約 2 7 °C）の D P B S 中で保存した。下記の表 3 は、各調製物の組成と対応する膨潤率を参照用に挙げている。6 か月間の保存の後、各微粒子に対し、分解の兆候についての定性的な再検査を行った。注目すべきことに、B M A で架橋された全ての微粒子は 6 か月までに完全に分解された。D T T で架橋されたものは 6 か月後も比較的变化はないように見えたが、正式な特性評価はこの時点では行われていない。さらに、完全に分解された B M A 架橋型微粒子のうちの 2 つは、この表に含まれている全微粒子の中で最も低い Q 値を先に示したが、より高い Q 値の D T T 架橋型微粒子と比較しても完全な分解を見せた。この結果は、B M A 架橋剤が、最初は非常に強固（低 Q）であるが、D T T や P E G ジチオールで架橋された同様の初期強度の他の微粒子よりもはるかに急速に分解する微粒子を生成するための有用な手段となり得ることを示唆している。

【表 3】

表3: DTTまたはBMAで架橋された微粒子の長期耐久性

架橋剤	コアポリマー構造	前駆体質量%	初期Q値	状態
DTT	8分岐、40kDa	25%	59. 6	6か月後も概ね変化なし
	8分岐、20kDa		113. 2	
			44. 3	
BMA	8分岐、40kDa	25%	35. 2	6か月以内に完全に分解
			34. 5	
		10%	80. 2	
			85. 3	
			85. 6	
			94. 7	
			102. 8	
			131. 8	
			91. 4	
	97. 2			
	8分岐、20kDa		78. 1	

【0 1 3 7】

下記の表 4 には、追加のジチオール種の一覧と、対応するチオール基 p K a が示されて

いる。チオール－エン反応の結果生じた結合の加水分解に対する不安定性は、反応性チオールの pK_a と相関している。すなわち、これらの化学種をチオール－エン反応スキームで化学架橋剤として使用することで、微粒子の加水分解に対する不安定性、ひいてはその分解速度を調節することができる。

【表 4】

表4: 加水分解に対する不安定性の程度が異なるジチオール架橋剤化学種の例

化学名	pKa
グリセリルジチオグリコレート	7.9～8.1
グリコールジメルカプトアセテート	7.9～8.1
PEG－ジエステル－ジチオール－1	7.9～8.1
(S)－2 アミノブタン1, 4ジチオール	8.5
ジチオスレイトール	9.2
グリコール ジ(3メルカプトプロピオネート)	9.4～9.5
2, 2'－チオジエタンチオール	9.4～9.5
PEG－ジエステル－ジチオール－2	9.4～9.5
2－メルカプトエチルエーテル	10.5～10.7
2, 2'－(エチレンジオキシ)ジエタンジオール	10.5～10.7
テトラエチレングリコールジチオール	10.5～10.7
ヘキサエチレングリコールジチオール	10.5～10.7
PEG－ジチオール	10.5～10.7

10

20

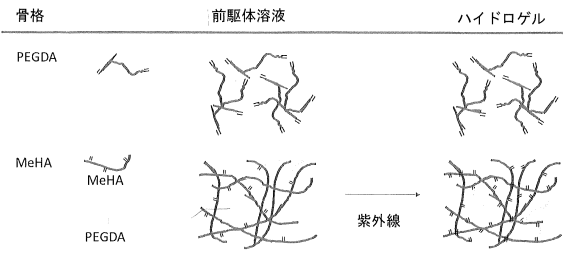
30

40

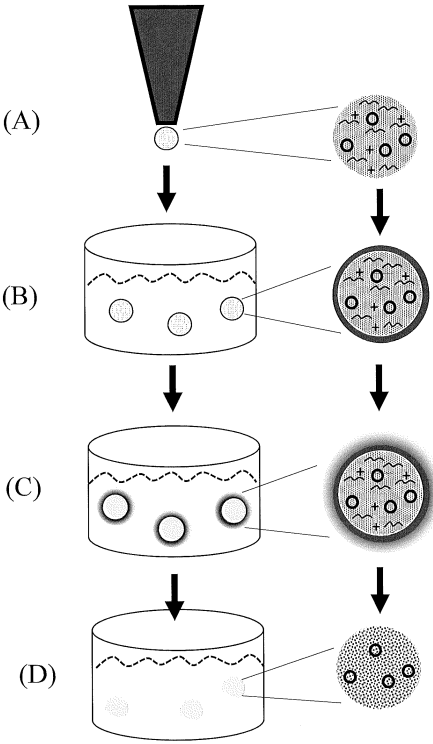
50

【図面】

【図 1】



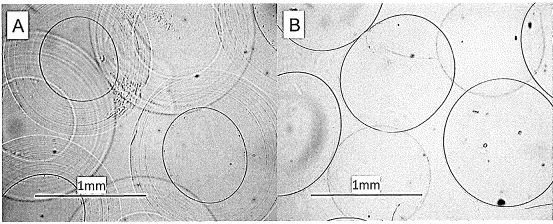
【図 2】



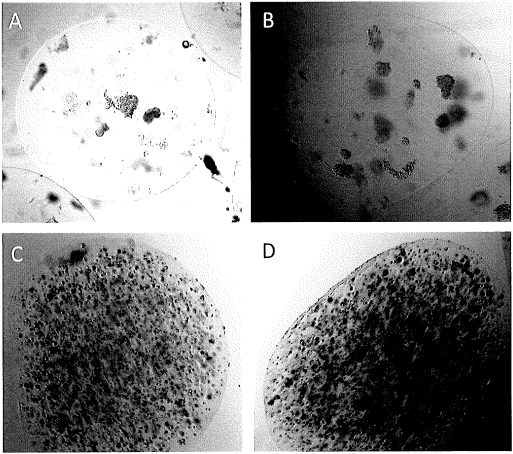
10

20

【図 3】



【図 4】

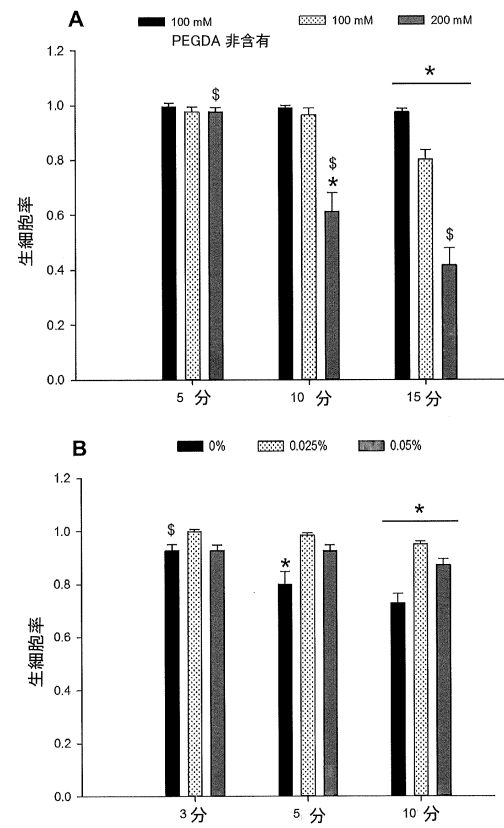


30

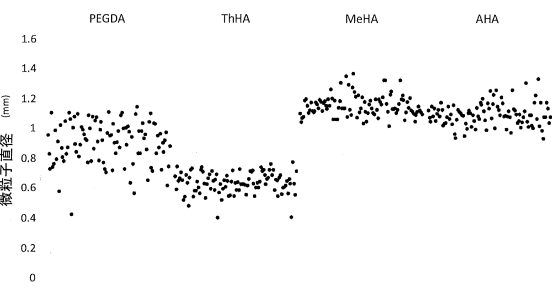
40

50

【図 5】



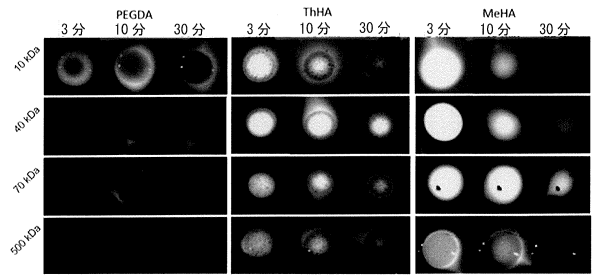
【図 6】



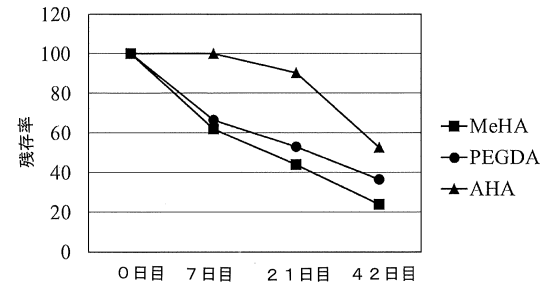
10

20

【図 7】



【図 8 A】

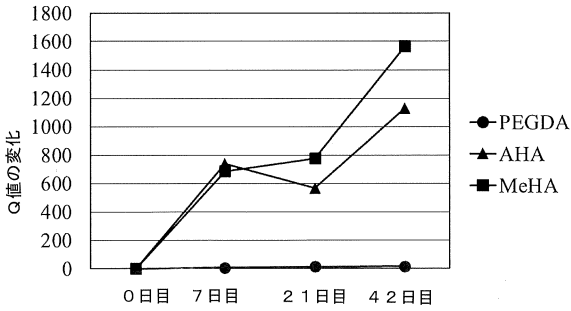


30

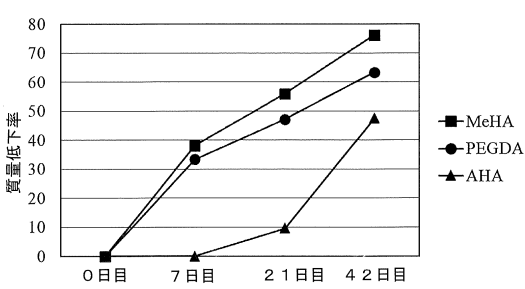
40

50

【図 8 B】

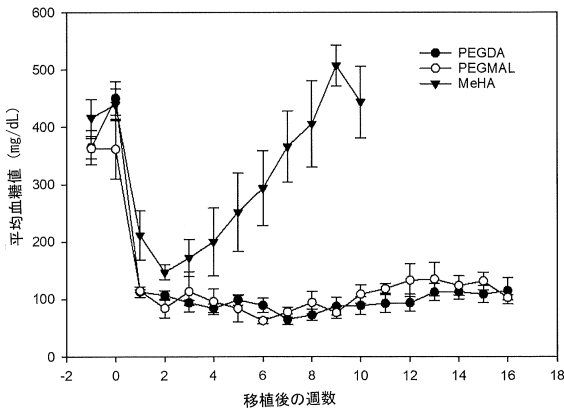


【図 8 C】

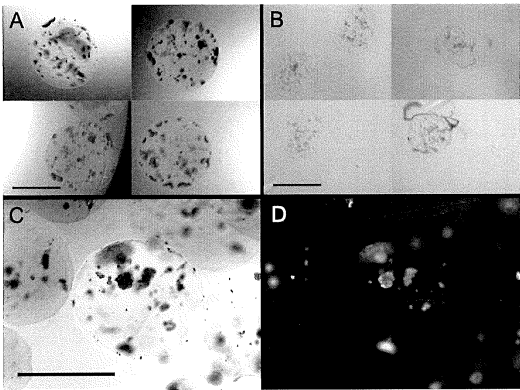


10

【図 9】

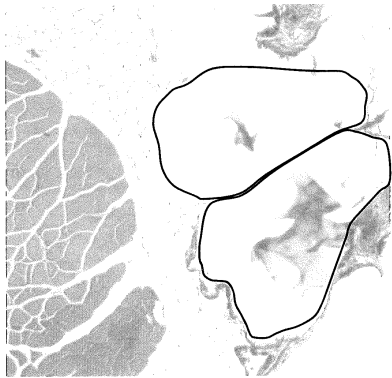


【図 10】

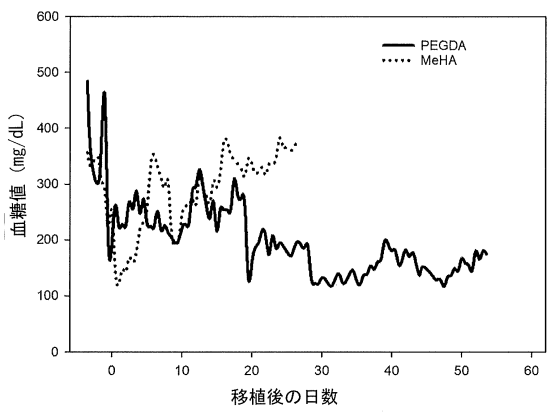


20

【図 11】



【図 12】

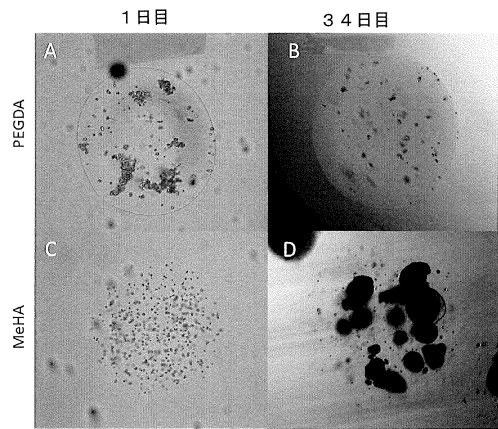


30

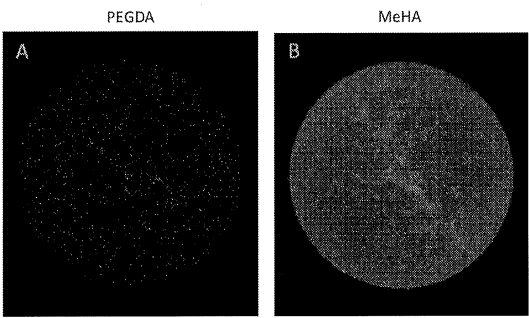
40

50

【図 1 3】

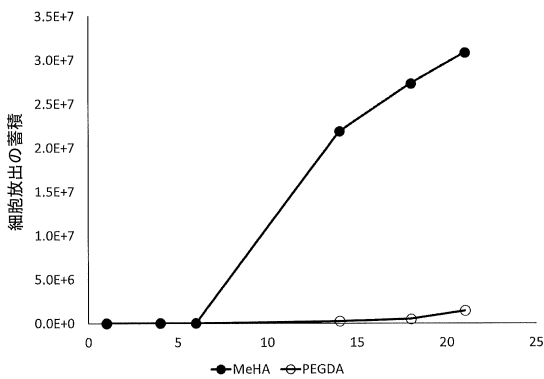


【図 1 4】

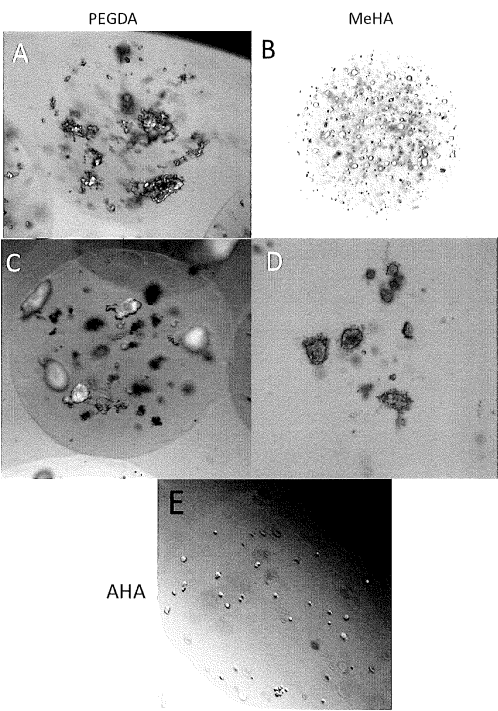


10

【図 1 5】



【図 1 6】



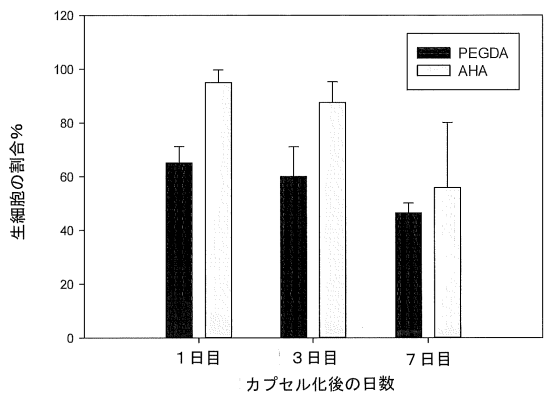
20

30

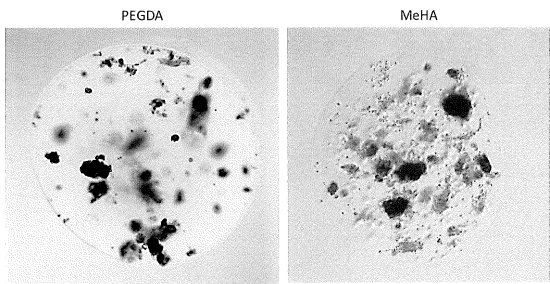
40

50

【図 17】

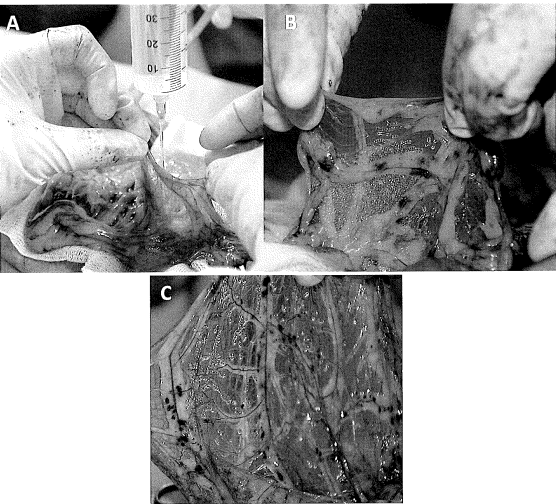


【図 18】

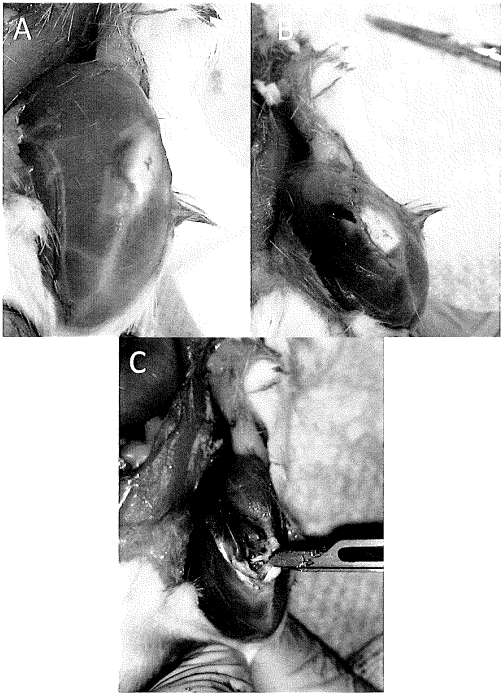


10

【図 19】



【図 20】



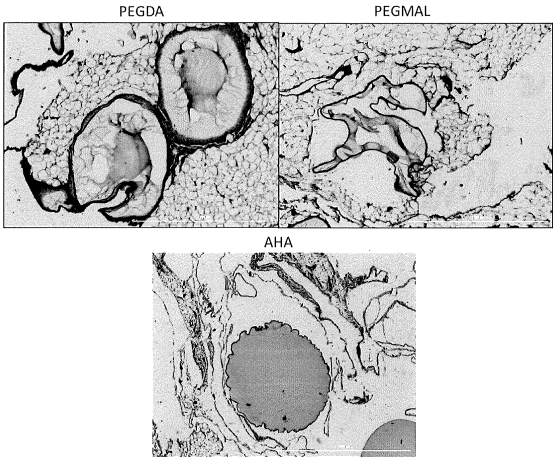
20

30

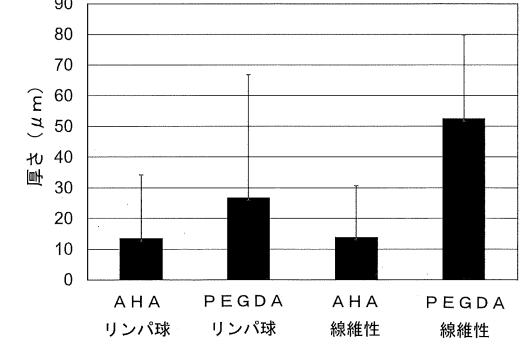
40

50

【図 2 1】

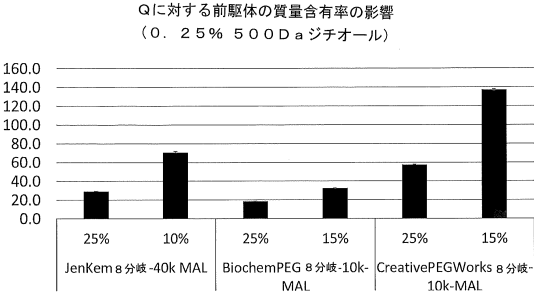


【図 2 2】

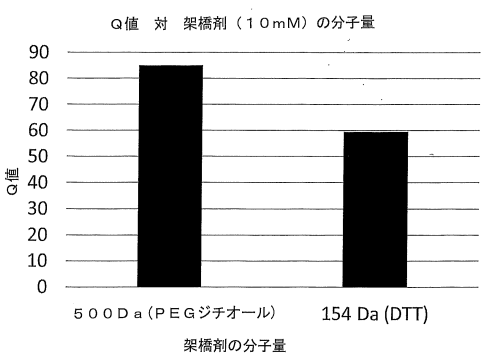


10

【図 2 3】

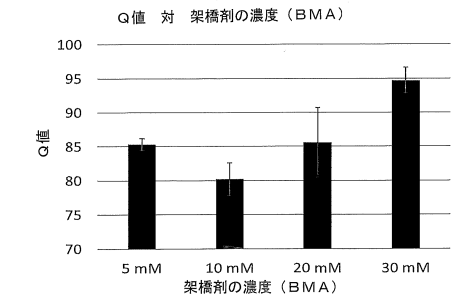


【図 2 4】



20

図 2 4 A



30

図 2 4 B

40

50

【図 25】

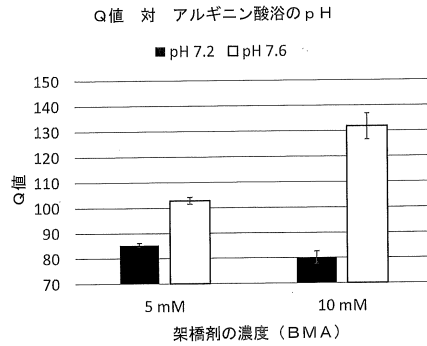


図 25 A

【図 26】

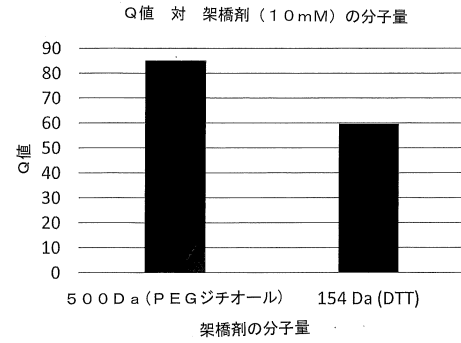


図 26 A

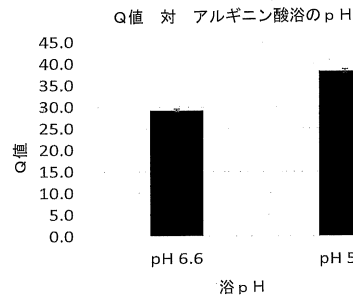


図 25 B

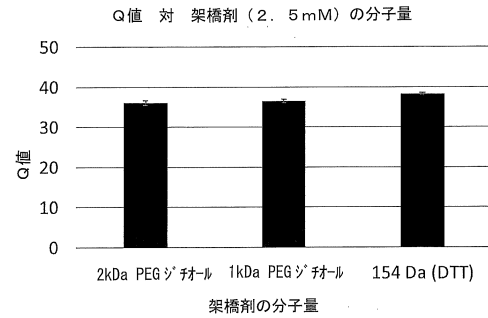


図 26 B

【図 27】

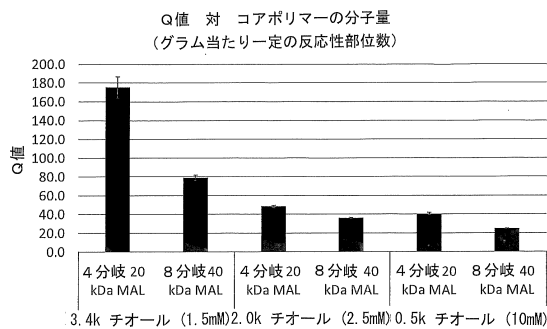


図 27 A

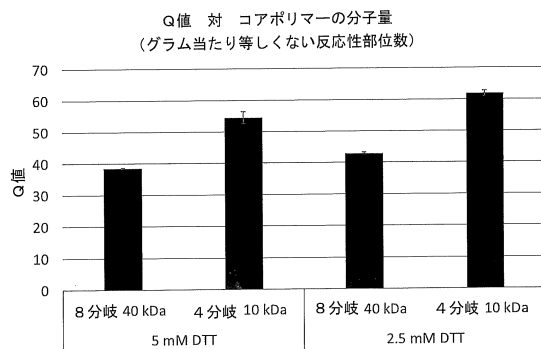


図 27 B

【図 28】

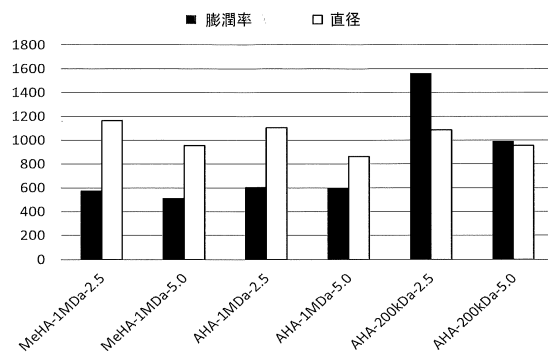


図 28 A

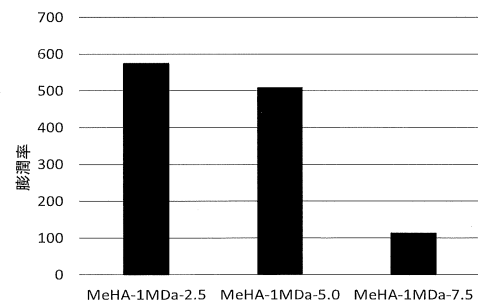


図 28 B

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K	38/19	
A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 K	38/22	
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 L	27/36	(2006.01)	A 6 1 L	27/36	1 0 0
A 6 1 L	27/52	(2006.01)	A 6 1 L	27/52	
A 6 1 L	27/58	(2006.01)	A 6 1 L	27/58	
A 6 1 L	27/18	(2006.01)	A 6 1 L	27/18	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/39	(2015.01)	A 6 1 K	35/39	
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K	35/28	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	

(74)代理人 100217294

弁理士 内山 尚和

(72)発明者 リンジー、オット

アメリカ合衆国ミズーリ州、カンザスシティ、ヒックマン、ミルズ、ドライブ、1 0 3 3 0、ビルディング、ツー、スイート、ビー

(72)発明者 スティーブン、ハリントン

アメリカ合衆国ミズーリ州、カンザスシティ、ヒックマン、ミルズ、ドライブ、1 0 3 3 0、ビルディング、ツー、スイート、ビー

(72)発明者 カールティック、ラマチャンドラン

アメリカ合衆国ミズーリ州、カンザスシティ、ヒックマン、ミルズ、ドライブ、1 0 3 3 0、ビルディング、ツー、スイート、ビー

(72)発明者 リサ、ステフノービッテル

アメリカ合衆国ミズーリ州、カンザスシティ、ヒックマン、ミルズ、ドライブ、1 0 3 3 0、ビルディング、ツー、スイート、ビー

(72)発明者 メーガン、イー・ハミルトン

アメリカ合衆国ミズーリ州、カンザスシティ、ヒックマン、ミルズ、ドライブ、1 0 3 3 0、ビルディング、ツー、スイート、ビー

審査官 榎本 佳予子

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 1 9 9 7 (U S , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 1 9 3 5 3 6 (U S , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 L 2 7 / 0 0 - 2 7 / 6 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)