

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年10月5日(05.10.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/170342 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/78 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)
A61L 27/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/012284
- (22) 国際出願日: 2017年3月27日(27.03.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-065396 2016年3月29日(29.03.2016) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社(FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目26番30号 Tokyo (JP). テルモ株式会社(TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷二丁目44番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 中村 健太郎(NAKAMURA Kentaro); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 佐野進弥(SANO Shinya); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 車 陽介(KURUMA Yosuke); 〒

2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 鮫島正(SAMEJIMA Tadashi); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

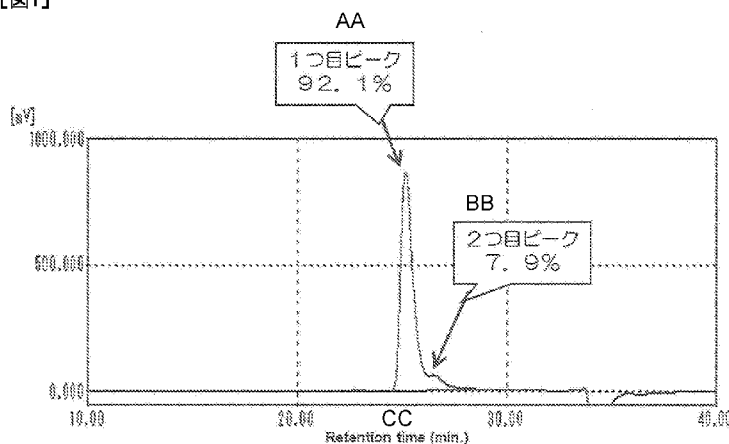
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[続葉有]

(54) Title: CELL SHEET EMBEDDING AGENT, CELL SHEET EMBEDDING COMPOSITION AND KIT

(54) 発明の名称: 細胞シート包埋剤、細胞シート含有組成物およびキット

[図1]



AA First peak 92.1%
BB Second peak 7.9%
CC Retention time (min)

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a cell sheet embedding agent which enables stable transfer of a cell sheet during low-temperature transfer and which enables easy recovery of the cell sheet from the cell sheet embedding agent after the transfer; and also to provide a cell sheet-containing composition and a kit. A cell sheet embedding agent is provided which contains polypeptides, shown in expression 1 below, of which it holds that, in a molecular weight distribution measurement, the area of the greatest molecular weight peak is greater than or equal to 80% of the total area of all the molecular weight peaks. Expression 1: A-[(Gly-X-Y)_n]_m-B In the expression, X and Y each independently represents an amino acid, m is an integer 2-10, n is an integer 3-100, and A and B represent any amino acid or amino acid sequence.

(57) 要約: 本発明の課題は、低温での輸送時に安定して細胞シートを輸送することができ、輸送後、簡便に細胞シート包埋剤から細胞シートを回収することができる細胞シート包埋剤、並びに細胞シート含有組成物およびキット

を提供することである。本発明によれば、下記式1で示され、かつ分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上であるポリペプチドを含む、細胞シート包埋剤が提供される。式1: A-[(Gly-X-Y)_n]_m-B 式中、XおよびYはそれぞれ独立にアミノ酸を示し、mは2~10の整数であり、nは3~100の整数であり、AおよびBは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。



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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

細胞シート包埋剤、細胞シート含有組成物およびキット

技術分野

[0001] 本発明は、分子量分布が所定の条件を満たすポリペプチドを含む細胞シート包埋剤に関する。本発明はさらに、上記細胞シート包埋剤を含む細胞シート含有組成物およびキットに関する。

背景技術

[0002] 近年、多くの再生医療および細胞移植治療が実施されている。特に、細胞を細胞シートとして、細胞のみをシート状にして移植する治療が多く検討されている。個々の細胞を懸濁液として投与することに比べて、細胞シートは構造物として維持されることから、体内での生着が良く有効性が向上するとされている。特許文献1には、臨床への適用に障害となる製造工程由来不純物成分を含まない細胞培養液を用いた製造方法を提供することを目的として、実質的に増殖することなく細胞シートを形成し得る密度の細胞を、有効量の成長因子を含まない細胞培養液中で培養することを含む、細胞シートの製造方法が記載されている。

[0003] 一方、シート状でない個々の細胞については、細胞の支持体となる足場材料と細胞を組み合わせることで移植することが検討されている。細胞の支持体となる足場材料としては、遺伝子組換えゼラチンが知られている。特許文献2には、細胞付着を伴う幾つかの用途、例えば、細胞培養作業、および足場依存性細胞の細胞培養を伴う用途、ならびに多様な医療用途にも特に有用な、遺伝子組換えゼラチンが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2010-81829号公報

特許文献2：国際公開WO2008/103041号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 細胞シートは非常にもろく、輸送時に壊れやすいという問題があり、病院施設等に輸送する際の問題になる。また、病院施設等では、細胞シートの輸送後に、簡便に細胞シートを移植できることが望ましい。細胞シートの移植においては上記の問題を解決することが望まれている。本発明は、低温での輸送時に安定して細胞シートを輸送することができ、輸送後、簡便に細胞シート包埋剤から細胞シートを回収することができる細胞シート包埋剤を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記細胞シート包埋剤を含む細胞シート含有組成物、および上記細胞シート包埋剤を含むキットを提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、特定の配列を有するポリペプチドであって、分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上であるポリペプチドを含む細胞シート包埋剤によれば、低温での輸送時に安定して細胞シートを輸送することができ、さらに輸送後の細胞シート移植時に、室温において簡便に細胞シート包埋剤から細胞シートを回収することができることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。本発明によれば以下の発明が提供される。

[0007] [1] 下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチドを含む、細胞シート包埋剤。



式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X：ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の

分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

[2] ポリペプチドがリコンビナントゼラチンである、[1]に記載の細胞シート包埋剤。

[3] ポリペプチドが、下記式2で示されるポリペプチドである、[1]または[2]に記載の細胞シート包埋剤。

式2: $\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Pro}-[(\text{Gly}-\text{X}-\text{Y})_{63}]_3-\text{Gly}$

式中、63個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、63個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63個の $\text{Gly}-\text{X}-\text{Y}$ はそれぞれ同一でも異なってもよい。

[4] ポリペプチドが、(1)配列番号1に記載のアミノ酸配列、または(2)配列番号1に記載のアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有し、生体親和性を有するアミノ酸配列を有する、[1]～[3]のいずれかに記載の細胞シート包埋剤。

[5] ポリペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、[1]～[4]のいずれかに記載の細胞シート包埋剤。

[6] 細胞シートと、[1]～[5]のいずれかに記載の細胞シート包埋剤とを含み、上記細胞シートが上記細胞シート包埋剤により包埋されている、細胞シート含有組成物。

[7] 細胞シートと、[1]～[5]のいずれかに記載の細胞シート包埋剤とを含む、キット。

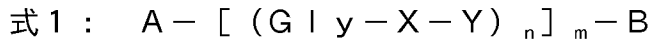
[0008] [8] 細胞シートの包埋において使用するための、下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチド。

式1: $\text{A}-[(\text{Gly}-\text{X}-\text{Y})_n]_m-\text{B}$

式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X：ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

[9] 細胞シート包埋剤の製造のための、下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチドの使用。



式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X：ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

[10] 細胞シートを、下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチドで包埋することを含む、細胞シートの包埋方法。



式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X：ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

発明の効果

[0009] 本発明の細胞シート包埋剤、細胞シート含有組成物およびキットによれば、低温での輸送時に安定して細胞シートを輸送することができ、輸送後、簡単に細胞シート包埋剤から細胞シートを回収することができる

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、リコンビナントゼラチンの分子量分布を示す。

[図2]図2は、天然動物ゼラチンの分子量分布を示す。

[図3]図3は、C B E 3 包埋細胞シートとC B E 3 を含まない細胞シートの振とう前および振とう後の形状を示す。

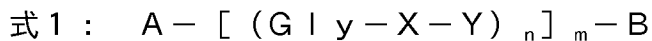
[図4]図4は、振とう前および振とう後のC B E 3 包埋細胞シートの染色の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

<細胞シート包埋剤>

本発明の細胞シート包埋剤は、下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチドを含む、細胞シート包埋剤である。



式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X：ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

[0012] 本明細書で言う細胞シート包埋剤とは、細胞シートを包埋処理することができる物質である。包埋処理とは、細胞シートの表面の一部又は全部に、細胞シート包埋剤を浸漬等により接触させ、次いで細胞シートの表面の一部又は全部を細胞シート包埋剤で被覆する処理である。

[0013] [ポリペプチド]

上記式1で示されるポリペプチドは、溶液の状態で（低温度ではない条件）細胞シートを包埋し、温度を低下させることにより、ゲル化し、輸送に適した状態となる。なお、細胞の保存の観点でも、輸送の際には低温とする必要がある。また、本発明においては、ポリペプチドが、条件X（ゲル浸透ク

ロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である）を満たすことにより、低温（4℃）でのゲル化と室温（25℃）での溶解とがシャープになり、細胞シート移植時に、室温において簡便に、細胞シート包埋剤から細胞シートを回収することが可能になる。

[0014] 上記の通り、本発明において、ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積は、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上であるが、より好ましくは85%以上であり、特に好ましくは90%以上である。

[0015] ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（Waters社製AQUITY UPLCシステムEmpower2）を使用し、緩衝液には100mmol/Lリン酸バッファー（pH6.8）を用いて測定することができる。

[0016] 上記式1において、 m は2～10の整数であるが、好ましくは3～5の整数を示す。

上記式1において、 n は3～100の整数であり、好ましくは15～70の整数であり、より好ましくは50～65の整数である。

[0017] 本発明で用いる式1で示されるポリペプチドは、分子量分布が上記条件Xを満たす限り、リコンビナントポリペプチド、化学合成ポリペプチド、または天然ポリペプチドの何れでもよい。

[0018] 化学合成ポリペプチドとは、人工的に合成したポリペプチドを意味する。ポリペプチドの合成は、固相合成でも液相合成でもよいが、好ましくは固相合成である。ポリペプチドの固相合成は当業者に公知であり、例えば、アミノ基の保護としてFmoc基（Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl基）を使用するFmoc基合成法、並びにアミノ基の保護としてBoc基（tert-Butyl Oxy Carbonyl基）を使用するBoc基合成法などが挙げられる。

[0019] ポリペプチドは好ましくは、リコンビナントポリペプチドである。本明細書においては、式1で示されるリコンビナントポリペプチドのことを、リコ

ンビナントゼラチンと称する。リコンビナントゼラチンについては本明細書中において後記する。

[0020] 本発明で用いるポリペプチドの親水性値「 $1 / \text{IOB}$ 」値は、0から1.0が好ましい。より好ましくは、0から0.6であり、さらに好ましくは0から0.4である。IOBとは、藤田穆により提案された有機化合物の極性/非極性を表す有機概念図に基づく、親疎水性の指標であり、その詳細は、例えば、“Pharmaceutical Bulletin”, vol.2, 2, pp.163-173 (1954)、「化学の領域」vol.11, 10, pp.719-725 (1957)、「フレグランスジャーナル」, vol.50, pp.79-82 (1981)等で説明されている。簡潔に言えば、全ての有機化合物の根源をメタン (CH_4) とし、他の化合物はすべてメタンの誘導体とみなして、その炭素数、置換基、変態部、環等にそれぞれ一定の数値を設定し、そのスコアを加算して有機性値 (OV)、無機性値 (IV) を求め、この値を、有機性値をX軸、無機性値をY軸にとった図上にプロットしていくものである。有機概念図におけるIOBとは、有機概念図における有機性値 (OV) に対する無機性値 (IV) の比、すなわち「無機性値 (IV) / 有機性値 (OV)」をいう。有機概念図の詳細については、「新版有機概念図ー基礎と応用ー」(甲田善生等著、三共出版、2008)を参照されたい。本明細書中では、IOBの逆数をとった「 $1 / \text{IOB}$ 」値で親疎水性を表している。「 $1 / \text{IOB}$ 」値が小さい(0に近づく)程、親水性であることを表す表記である。

[0021] 本発明で用いるポリペプチドの「 $1 / \text{IOB}$ 」値を上記範囲とすることにより、親水性が高く、かつ吸水性が高くなる。

[0022] 本発明で用いるポリペプチドは、Grand average of hydropathicity (GRAVY) 値で表される親疎水性指標が、0.3以下、マイナス9.0以上であることが好ましく、0.0以下、マイナス7.0以上であることがさらに好ましい。Grand average of hydropathicity (GRAVY) 値は、『Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bair och A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server

;(In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607』および『Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A.; ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis.; Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003).』の方法により得ることができる。

本発明で用いるポリペプチドのGRAVY値を上記範囲とすることにより、親水性が高く、かつ、吸水性が高くなる。

[0023] [リコンビナントゼラチン]

本発明で用いるポリペプチドは、好ましくはリコンビナントゼラチンである。

リコンビナントゼラチンとしては、例えばEP1014176、米国特許6992172号、国際公開WO2004/85473、国際公開WO2008/103041等に記載のものをを用いることができるが、これらに限定されるものではない。本発明で用いるリコンビナントゼラチンとして好ましいものは、以下の態様のリコンビナントゼラチンである。

[0024] リコンビナントゼラチンは、天然のゼラチン本来の性能から、生体親和性に優れ、且つ天然由来ではないことで牛海綿状脳症（BSE）などの懸念がなく、非感染性に優れている。

[0025] リコンビナントゼラチンの分子量は、特に限定されないが、好ましくは2000以上100000以下（2kDa（キロダルトン）以上100kDa以下）であり、より好ましくは2500以上95000以下（2.5kDa以上95kDa以下）であり、さらに好ましくは5000以上90000以下（5kDa以上90kDa以下）であり、最も好ましくは10000以上90000以下（10kDa以上90kDa以下）である。

[0026] リコンビナントゼラチンは、コラーゲンに特徴的なGly-X-Yで示される配列の繰り返しを有することが好ましい。ここで、複数のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。Gly-X-Yにおいて、Glyはグリシンを表し、XおよびYは、任意のアミノ酸（好ましくは、グリ

シン以外の任意のアミノ酸)を表す。コラーゲンに特徴的なG I y - X - Yで示される配列とは、ゼラチン・コラーゲンのアミノ酸組成および配列における、他のタンパク質と比較して非常に特異的な部分構造である。この部分においてはグリシンが全体の約3分の1を占め、アミノ酸配列では3個に1個の繰り返しとなっている。グリシンは最も簡単なアミノ酸であり、分子鎖の配置への束縛も少なく、ゲル化に際してのヘリックス構造の再生に大きく寄与している。XおよびYで表されるアミノ酸はイミノ酸(プロリン、オキシプロリン)が多く含まれ、全体の10%~45%を占めることが好ましい。好ましくは、リコンビナントゼラチンの配列の80%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上のアミノ酸が、G I y - X - Yの繰り返し構造である。

[0027] 一般的なゼラチンは、極性アミノ酸のうち電荷を持つものと無電荷のものが1:1で存在する。ここで、極性アミノ酸とは具体的にシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシンおよびアルギニンを指し、このうち極性無電荷アミノ酸とはシステイン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニンおよびチロシンを指す。本発明で用いるリコンビナントゼラチンにおいては、構成する全アミノ酸のうち、極性アミノ酸の割合が10~40%であり、好ましくは20~30%である。且つ上記極性アミノ酸中の無電荷アミノ酸の割合が好ましくは5%以上20%未満であり、より好ましくは5%以上10%未満である。さらに、セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシンおよびシステインのうちいずれか1アミノ酸、好ましくは2以上のアミノ酸を配列上に含まないことが好ましい。

[0028] 一般にポリペプチドにおいて、細胞接着シグナルとして働く最小アミノ酸配列が知られている(例えば、株式会社永井出版発行「病態生理」Vol. 9、No. 7(1990年)527頁)。本発明で用いるリコンビナントゼラチンは、これらの細胞接着シグナルを一分子中に2以上有するものでもよい。具体的な配列としては、接着する細胞の種類が多いという点で、アミノ

酸一文字表記で表される、R G D配列、L D V配列、R E D V配列、Y I G S R配列、P D S G R配列、R Y V V L P R配列、L G T I P G配列、R N I A E I I K D I配列、I K V A V配列、L R E配列、D G E A配列、およびH A V配列の配列が好ましい。さらに好ましくはR G D配列、Y I G S R配列、P D S G R配列、L G T I P G配列、I K V A V配列およびH A V配列、特に好ましくはR G D配列である。R G D配列のうち、好ましくはE R G D配列である。

[0029] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンにおけるR G D配列の配置としては、R G D間のアミノ酸数が0～100の間、好ましくは25～60の間で均一でないことが好ましい。

この最小アミノ酸配列の含有量は、タンパク質1分子中3～50個が好ましく、さらに好ましくは4～30個、特に好ましくは5～20個である。最も好ましくは12個である。

[0030] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンにおいて、アミノ酸総数に対するR G Dモチーフの割合は少なくとも0.4%であることが好ましい。リコンビナントゼラチンが350以上のアミノ酸を含む場合、350のアミノ酸の各ストレッチが少なくとも1つのR G Dモチーフを含むことが好ましい。アミノ酸総数に対するR G Dモチーフの割合は、より好ましくは少なくとも0.6%であり、さらに好ましくは少なくとも0.8%であり、さらに一層好ましくは少なくとも1.0%であり、特に好ましくは少なくとも1.2%であり、最も好ましくは少なくとも1.5%である。リコンビナントペプチド内のR G Dモチーフの数は、250のアミノ酸あたり、好ましくは少なくとも4、より好ましくは6、さらに好ましくは8、特に好ましくは12以上16以下である。R G Dモチーフの0.4%という割合は、250のアミノ酸あたり、少なくとも1つのR G D配列に対応する。R G Dモチーフの数は整数であるので、0.4%の特徴を満たすには、251のアミノ酸からなるゼラチンは、少なくとも2つのR G D配列を含まなければならない。好ましくは、本発明のリコンビナントゼラチンは、250のアミノ酸あたり、少なく

とも2つのRGD配列を含み、より好ましくは250のアミノ酸あたり、少なくとも3つのRGD配列を含み、さらに好ましくは250のアミノ酸あたり、少なくとも4つのRGD配列を含む。本発明のリコンビナントゼラチンのさらなる態様としては、少なくとも4つのRGDモチーフ、好ましくは6つ、より好ましくは8つ、さらに好ましくは12以上16以下のRGDモチーフを含む。

[0031] リコンビナントゼラチンは部分的に加水分解されていてもよい。

[0032] より好ましくは、本発明で用いるポリペプチドは、下記式2で示される。

式2: $\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Pro}-[(\text{Gly}-\text{X}-\text{Y})_{63}]_3-\text{Gly}$

式中、63個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、63個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63個の $\text{Gly}-\text{X}-\text{Y}$ はそれぞれ同一でも異なってもよい。

[0033] 繰り返し単位には天然に存在するコラーゲンの配列単位を複数結合することが好ましい。ここで言う天然に存在するコラーゲンとは天然に存在するものであればいずれでも構わないが、好ましくはI型、II型、III型、IV型、またはV型コラーゲンである。より好ましくは、I型、II型、またはIII型コラーゲンである。別の形態によると、上記コラーゲンの由来は好ましくは、ヒト、ウシ、ブタ、マウスまたはラットであり、より好ましくはヒトである。

[0034] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンの等電点は、好ましくは5～10であり、より好ましくは6～10であり、さらに好ましくは7～9.5である。リコンビナントゼラチンの等電点の測定は、等電点電気泳動法(Maxey, C. R. (1976; Phitogr. Gelatin 2, Editor Cox, P. J. Academic, London, Engl. 参照)に記載されたように、1質量%ゼラチン溶液をカチオンおよびアニオン交換樹脂の混晶カラムに通したあとのpHを測定することで実施することができる。

[0035] 好ましくは、リコンビナントゼラチンは脱アミン化されていない。

好ましくは、リコンビナントゼラチンはテロペプチドを有さない。

好ましくは、リコンビナントゼラチンは、アミノ酸配列をコードする核酸により調製された実質的に純粋なポリペプチドである。

[0036] リコンビナントゼラチンは、特に好ましくは、

(1) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；または

(2) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と 80%以上（好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、特に好ましくは 98%以上）の配列同一性を有し、生体親和性を有するアミノ酸配列：
を有する。

なお、生体親和性とは、生体に接触した際に、長期的かつ慢性的な炎症反応などのような顕著な有害反応を惹起しないことを意味する。

リコンビナントゼラチンは、最も好ましくは、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する。

[0037] 本発明における配列同一性は、以下の式で計算される値を指す。

$$\% \text{配列同一性} = [(\text{同一残基数}) / (\text{アラインメント長})] \times 100$$

2つのアミノ酸配列における配列同一性は当業者に公知の任意の方法で決定することができ、BLAST ((Basic Local Alignment Search Tool)) プログラム (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) 等を使用して決定することができる。

[0038] リコンビナントゼラチンは、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ生体親和性を有するアミノ酸配列を有するものでもよい。

[0039] 「1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」における「1 若しくは数個」とは、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個、特に好ましくは 1～3 個を意味する。

[0040] リコンビナントゼラチンは、当業者に公知の遺伝子組み換え技術によって製造することができ、例えば EP 1 0 1 4 1 7 6 A 2 号公報、米国特許第 6 9 9 2 1 7 2 号公報、国際公開 WO 2 0 0 4 / 8 5 4 7 3 号、国際公開 WO

2008/103041号等に記載の方法に準じて製造することができる。具体的には、所定のリコンビナントゼラチンのアミノ酸配列をコードする遺伝子を取得し、これを発現ベクターに組み込んで、組み換え発現ベクターを作製し、これを適当な宿主に導入して形質転換体を作製する。得られた形質転換体を適当な培地で培養することにより、リコンビナントゼラチンが産生されるので、培養物から産生されたりリコンビナントゼラチンを回収することにより、本発明で用いるリコンビナントゼラチンを調製することができる。

[0041] [細胞シート包埋剤の形態]

本発明の細胞シート包埋剤の形態は特に限定されず、式1で示され、かつ分子量分布が条件Xを満たすポリペプチドを含む限り、任意の形態とすることができる。例えば、溶液（水溶液など）、懸濁液、粉末、またはゲルなどの何れでもよい。粉末、またはゲル等の場合には使用時に、水などの溶媒に溶解して使用することができる。

[0042] 本発明の細胞シート包埋剤における上記ポリペプチドの含有量は特に限定されないが、一般的には0.1質量%から100質量%であり、好ましくは0.5質量%から100質量%である。

本発明の細胞シート包埋剤を適用する細胞シートについては、本明細書中後記する。

[0043] <細胞シート含有組成物>

本発明はさらに、細胞シートと、本発明の細胞シート包埋剤とを含み、上記細胞シートが上記細胞シート包埋剤により包埋されている、細胞シート含有組成物に関する。

[細胞シート]

本発明における細胞シートとは、細胞を主成分とするシートを意味する。細胞シートは、細胞が互いに連結してシート状になったものであり、シート形状である限り、その構成は特に限定されず、単層細胞シート、二層以上の細胞で形成されたシート、または三次元培養された細胞で形成されたシートの何れでもよい。

[0044] 細胞同士は、直接および／または介在物質を介して、互いに連結していてもよい。介在物質としては、細胞同士を少なくとも機械的に連結し得る物質であれば特に限定されないが、例えば、細胞外マトリックスなどが挙げられる。介在物質は、好ましくは細胞由来のもの、特に、細胞シートを構成する細胞に由来するものである。細胞は少なくとも機械的に連結されるが、さらに機能的、例えば、化学的、電氣的に連結されてもよい。

[0045] 本発明における細胞シートには、細胞シートを形成し得る任意の細胞が含まれる。細胞の例としては、特に限定されず、心筋細胞、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞）、線維芽細胞、滑膜細胞、上皮細胞、および内皮細胞などが含まれる。上記の中でも好ましくは、心筋細胞、および骨格筋芽細胞である。細胞としては、細胞シートによる治療が可能な任意の生物に由来する細胞を使用することができる。生物は、特に限定されず、例えば、ヒト、非ヒト霊長類（サルなど）、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ラット、マウスおよびハムスターなどが挙げられる。また、用いる細胞は１種類のみであってもよいが、２種類以上の細胞を用いることもできる。

[0046] 細胞シートは、公知の細胞シートの製造方法またはそれに準ずる方法で製造することができる。例えば、細胞を培養皿で培養し、細胞がシート状になったら、シートを培養皿から回収すればよい。上記の通り、細胞シートの製造方法は特に限定されないが、一例としては、特開２０１０－８１８２９号公報に記載の方法により細胞シートを製造することができる。

[0047] 細胞シートは、典型的には、細胞を培養液に播種する工程、および細胞を培養して細胞シートを形成させる工程により製造される。

[0048] 細胞の培養は、本技術分野で通常なされている条件で行うことができる。例えば、典型的な培養条件としては、３７℃、５％ＣＯ₂での培養が挙げられる。

[0049] [細胞シート含有組成物の製造]

上記した細胞シートを本発明の細胞シート包埋剤により包埋することによって、細胞シート含有組成物を製造することができる。包埋の方法は特に限

定されないが、細胞シートを含む容器に、本発明の包埋剤（好ましくは溶液）を添加して、低温（例えば、 $2 \sim 12^{\circ}\text{C}$ ）で冷却することによって、溶液をゲル化させることができる。上記により、細胞シートが細胞シート包埋剤により包埋されている細胞シート含有組成物を製造することができる。

[0050] <キット>

本発明によればさらに、上記した細胞シートと、本発明の細胞シート包埋剤とを含む、キットが提供される。細胞シートおよび細胞シート包埋剤の詳細、好ましい態様は本明細書中上記した通りである。キットにはさらに、包埋処理を行うための容器、および取扱説明書などが含まれていてもよい。

[0051] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0052] (1) リコンビナントゼラチン

リコンビナントゼラチンとして以下のCBE3を用意した（国際公開WO 2008/103041号公報に記載）。

CBE3：

分子量：51.6 kD

構造：GAP [(GXY)₆₃]₃G

アミノ酸数：571個

RGD配列：12個

イミノ酸含量：33%

ほぼ100%のアミノ酸がGXYの繰り返し構造である。CBE3のアミノ酸配列には、セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシンおよびシステインは含まれていない。CBE3はERGD配列を有している。

等電点：9.34

GRAVY値：-0.682

1/I0B値：0.323

アミノ酸配列（配列表の配列番号1）（国際公開WO 2008/10304

1号公報の配列番号3と同じ。但し末尾のXは「P」に修正)

GAP(GAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGAPGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPP)3G

[0053] (2) リコンビナントゼラチンの分子量分布の測定

上記(1)に記載のリコンビナントゼラチンCBE3(実施例1)について、ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)を用いて分子量分布の測定を実施した。分子量分布の測定はHPLC(Waters社製AQUITY UPLCシステムEmpower2)を使用し、緩衝液には100mmol/Lリン酸バッファー(pH6.8)を用いた。これらを用いてリコンビナントゼラチンの分子量分布の相対性を測定した。

[0054] その結果を図1に示す。CBE3の分子量ピークは2つ存在していた。それら2つのピークについて面積比から全ピーク中の占有率を計算したところ、1つ目のピークが92.1%、2つ目のピークが7.9%となっていた。このことから、CBE3は占有率の高いピークとして、92%占有する分子量ピークを有することが分かった。

[0055] (3) 天然動物ゼラチンの分子量分布の測定

比較として、天然動物ゼラチン(比較例1)について、上記(2)と同様にGPCを用いて分子量分布の測定を実施した。結果を図2に示す。天然動物ゼラチンの分子量ピークが2つ存在していた。それら2つのピークについて面積比から全ピーク中の占有率を計算したところ、1つ目のピークが47.6%、2つ目のピークが52.4%となっていた。このことから、天然動物ゼラチンは占有率の高いピークとして、52%の分子量ピークを有することが分かった。

[0056] (4) 包埋剤性能試験(ゲル化速度)

細胞シートを輸送する際の包埋剤として使うためには、低温でのゲル化速度が速く、逆に可逆反応である常温下では素早く液体に戻る性能が重要となる。そこで1質量%濃度で、低温でのゲル化速度、常温での液体へ戻る速さ

を試験した。

- [0057] その結果、実施例1のCBE3では4℃に移すことで速やかにゲル化し、液の流動性が素早く低下し、完全にゲル化させた試料を25℃の室温環境下へ移すと、早期に液体へと戻る現象が観察された。

具体的には、CBE3では4℃に移すことで40分後からゲル化が始まり50分後にはほぼ安定なゲルになった。また、そのゲルは強度があり、手で押してもつぶれることのないゲルであった。そのゲルを25℃の室温に戻すと、40分で完全な液体に戻った。

- [0058] 一方で、比較例1の天然動物ゼラチンは、4℃に移すことでゲル化は起こるものの、その速度がCBE3の時よりも緩やかであり遅かった。また、完全にゲル化させた試料を25℃の室温環境下へ移して、再度液体へ戻る速さを試験した結果、実施例1のCBE3に比べて比較例1の天然動物ゼラチンは液体に戻るのが遅かった。

具体的には、天然動物ゼラチンでは、4℃に移すことで60分後からゲル化が始まるが、90分後でもゆるいゲル状にしかならなかった。その後も強度のあるゲルには移行せず、手で押すと簡単に潰れる程度のゆるいゲル状でとどまった。ゲル状のものを25℃の室温に戻した場合、天然動物ゼラチンでは完全な液体に戻るまでに、70分要した。

- [0059] (5) CBE3包埋細胞シートの作製

ヒト骨格筋芽細胞 6.0×10^7 個を20% (v/v) ヒト血清を含むDMEM/F12培地 10mLに懸濁し、10cm dish温度応答性培養皿 (UpCell (登録商標) : 株式会社セルシード) に播種した。37℃、5%CO₂下で一晩培養して細胞シート化し、室温で剥離させた。室温にて1質量% CBE3を含むHBSS+ (Thermo Fisher Scientific社製) 10mLを温度応答性培養皿に添加し、2~8℃で1時間冷却してゲル化させ、CBE3包埋細胞シートを作製した。HBSSは、Hanks' Balanced Salt solutionの略称である。

[0060] (6) 振動評価

(6-1)

上記(5)で作製したCBE3包埋細胞シートを卓上シェイカー(NR-3, タイテック社製)に載せ、回転数100rpm(回転毎分: rotation per minute)に設定し2~8℃で2日間振とうさせた。対照として、10cmdish温度応答性培養皿で調製した細胞シートにCBE3を含まないHBSS+を添加して、同様に振とうさせた。振とう後、CBE3包埋細胞シートを室温に静置し、ゲルを融解して細胞シートを回収した。振とう前および振とう後の形状を図3に示す。

[0061] CBE3を含まないHBSS+を添加した場合、振とう後の細胞シートが壊れたのに対し、1質量%CBE3を含むHBSS+を用いて細胞シートを包埋した場合、振とう後でも細胞シートが壊れなかった。

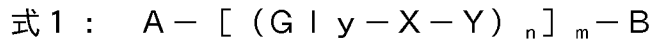
[0062] (6-2)

シート化直後の細胞シートおよび1質量%CBE3を含むHBSS+を添加して、振とうさせた後に回収した細胞シートを10質量%中性緩衝ホルマリンで一晩固定し、パラフィン包埋した。包埋サンプルは薄切して脱パラフィン後、カラッチのヘマトキシリンとエオジンで染色した。結果を図4に示す。

[0063] 1質量%CBE3を含むHBSS+を添加して、細胞シートを包埋した場合、振とう後の細胞シートは、内部の細胞が作製時同様に生存しており、十分にその性能を発揮できる細胞シートであることが確認された。

請求の範囲

【請求項1】 下記式1で示され、かつ分子量分布が下記条件Xを満たすポリペプチドを含む、細胞シート包埋剤。

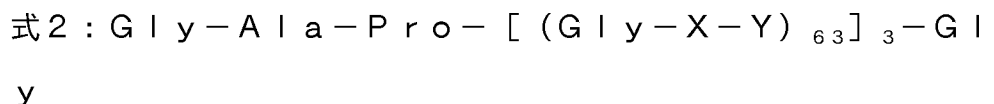


式中、n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、mは2～10の整数であり、nは3～100の整数であり、Aは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を示す。

条件X：ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布測定における最大の分子量ピークの面積が、全ての分子量ピークの合計面積の80%以上である。

【請求項2】 ポリペプチドがリコンビナントゼラチンである、請求項1に記載の細胞シート包埋剤。

【請求項3】 ポリペプチドが、下記式2で示されるポリペプチドである、請求項1または2に記載の細胞シート包埋剤。



式中、63個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、63個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。

【請求項4】 ポリペプチドが、(1)配列番号1に記載のアミノ酸配列、または(2)配列番号1に記載のアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有し、生体親和性を有するアミノ酸配列を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞シート包埋剤。

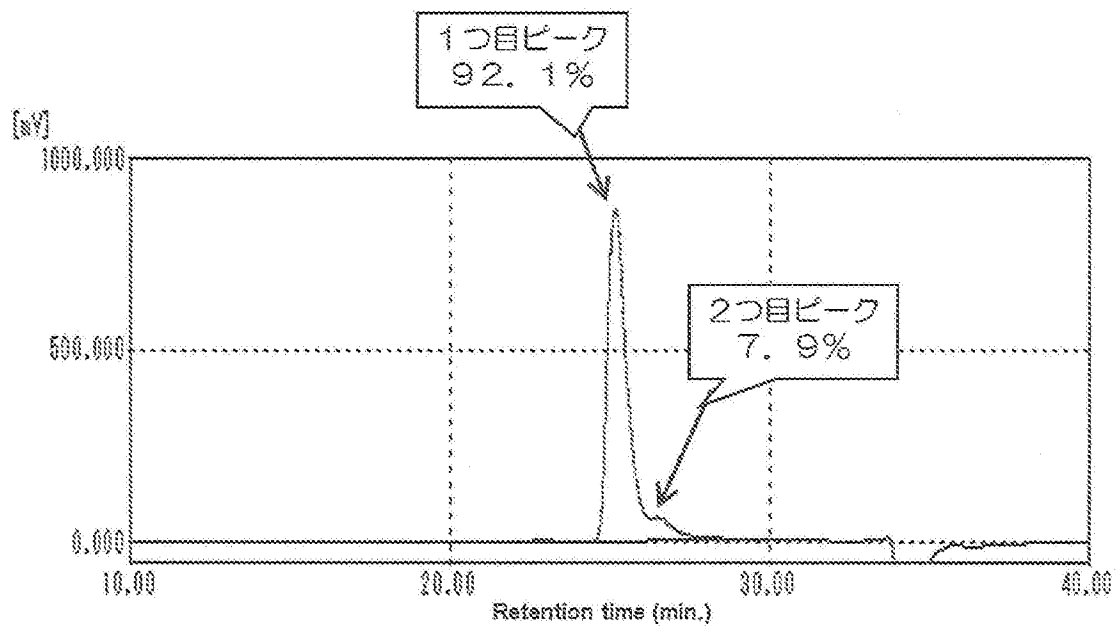
【請求項5】 ポリペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、請求項1～4のいずれか一項に記載の細胞シート包埋剤。

【請求項6】 細胞シートと、請求項1～5のいずれか一項に記載の細胞シート包埋剤とを含み、前記細胞シートが前記細胞シート包埋剤により包埋され

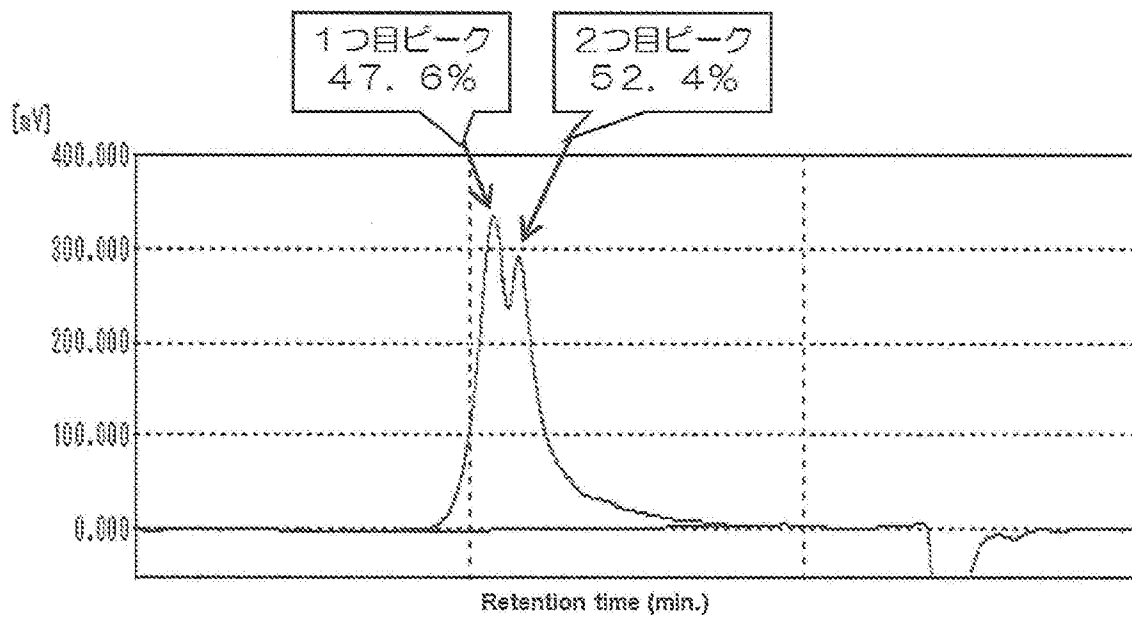
ている、細胞シート含有組成物。

[請求項7] 細胞シートと、請求項1～5のいずれか一項に記載の細胞シート包埋剤とを含む、キット。

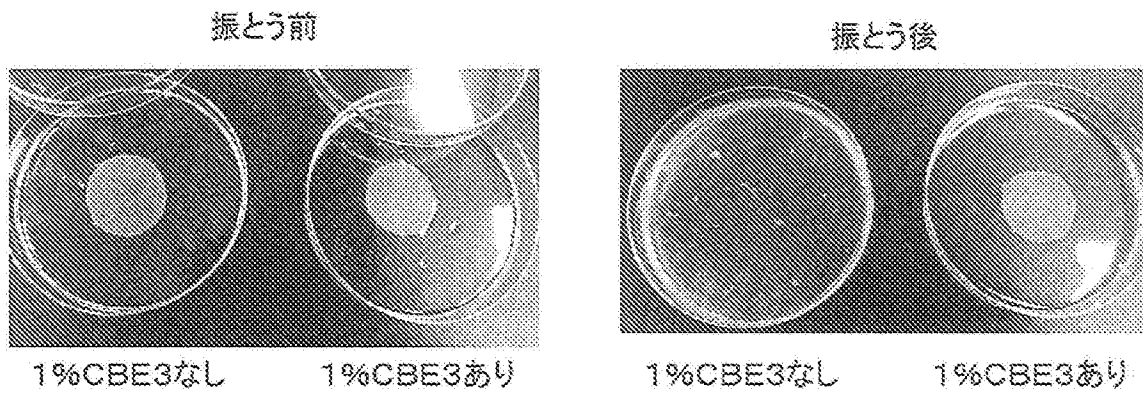
[図1]



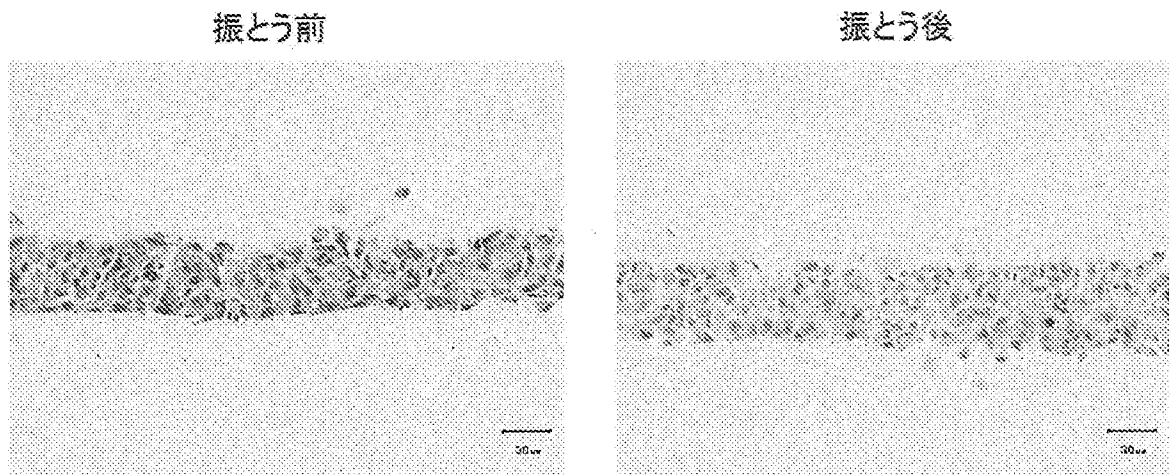
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/012284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/78(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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)

C07K14/78, A61L27/00, C12M1/00, C12N5/07, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2011-172925 A (Terumo Corp.), 08 September 2011 (08.09.2011), claims; example 1 (Family: none)	1, 6-7 1-7
Y	JP 8-23968 A (Gunze Ltd.), 30 January 1996 (30.01.1996), claims; paragraph [0007]; examples (Family: none)	1-7
Y	Yoshimi OYABU et al., "Gel-ka Ondo ga Kojo shita Gelatin ni yoru Saibo Seat no Hogo", Regenerative Medicine, 01 February 2016 (01.02. 2016), vol.15, Suppl 2016, page 307, P-01-078, entire text	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"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
25 April 2017 (25.04.17)

Date of mailing of the international search report
09 May 2017 (09.05.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/012284

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-519251 A (Fujifilm Manufacturing Europe B.V.), 03 June 2010 (03.06.2010), claims; paragraphs [0008], [0012], [0029], [0030]; examples & WO 2008/103041 A1 claims; page 2, lines 5 to 21; page 3, lines 1 to 3; page 7, line 29 to page 8, line 15; examples & US 2010/0119574 A1 & EP 1961411 A1	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K14/78(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K14/78, A61L27/00, C12M1/00, C12N5/07, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2011-172925 A (テルモ株式会社) 2011.09.08, 特許請求の範囲, 実施例1 (ファミリーなし)	1, 6-7 1-7
Y	JP 8-23968 A (ゲンゼ株式会社) 1996.01.30, 特許請求の範囲, [0007]段落, 実施例 (ファミリーなし)	1-7
Y	大藪 淑美 他, ゲル化温度が向上したゼラチンによる細胞シート の保護, 再生医療, 2016.02.01, VOL.15 Suppl 2016, p.307, P-01-078 全文	1-7

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.04.2017

国際調査報告の発送日

09.05.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉門 沙央里

4 B

5081

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2010-519251 A (フジフィルム・マニュファクチャリング・ヨーロッパ・ベスローテン・フエンノートシャップ) 2010.06.03, 特許請求の範囲, [0008], [0012], [0029], [0030]段落, 実施例 & WO 2008/103041 A1, 特許請求の範囲, 第2頁第5-21行, 第3頁 第1-3行, 第7頁第29行-第8頁第15行, 実施例 & US 2010/0119574 A1 & EP 1961411 A1	1-7