(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-522357
(P2020-522357A)
(43)公表日　令和2年7月30日(2020.7.30)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61L 27/24	(2006.01)	A61L	27/24	4C081
B33Y 70/00	(2020.01)	B33Y	70/00	4C084
B33Y 10/00	(2015.01)	B33Y	10/00	4H045
B33Y 80/00	(2015.01)	B33Y	80/00	
A61P 17/00	(2006.01)	A61P	17/00	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 60 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-567638 (P2019-567638)
(86)(22)出願日　平成30年6月8日 (2018.6.8)
(85)翻訳文提出日　令和2年2月3日 (2020.2.3)
(86)国際出願番号　PCT/IL2018/050627
(87)国際公開番号　WO2018/225076
(87)国際公開日　平成30年12月13日 (2018.12.13)
(31)優先権主張番号　62/517,179
(32)優先日　平成29年6月9日 (2017.6.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　510146399
コルプラント　リミテッド
イスラエル国　レホヴォト　オッペンハイマー　ストリート　４　イレブンス　フロア
４　Ｏｐｐｅｎｈｅｉｍｅｒ　Ｓｔｒｅｅｔ，　１１ｔｈ　Ｆｌｏｏｒ，　Ｒｅｈｏｖｏｔ，　Ｉｓｒａｅｌ
(74)代理人　110002952
特許業務法人鷲田国際特許事務所
(72)発明者　ショセヨフ　オデッド
イスラエル国　ショハム　バレケット　ストリート　１０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換えコラーゲン含有配合物を使用した積層造形

(57)【要約】
３Ｄ物体の積層造形（例えば、３Ｄバイオプリンティング）用のモデリング材料配合物の調製に使用可能な、硬化性組換えヒトコラーゲンを含む組成物とそれを含むキットを提供する。少なくともその一部にコラーゲン系材料を有する３Ｄ物体の積層造形において、このようなモデリング材料配合物を利用する方法も提供する。配合物は１０℃を超える温度（例えば、室温又は３７℃）で所望の粘度を示し、システム又はその一部を冷却せずに積層造形を実施することが可能となる。
【選択図】　図３

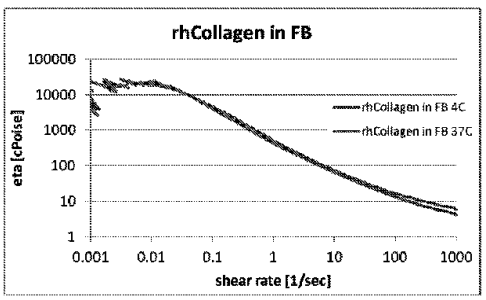


FIG. 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも一部がコラーゲン系材料であることを特徴とする３次元物体を積層造形するプロセスであって、少なくとも１種のモデリング材料配合物を分注し、物体の形状に対応する構成パターンで複数の層を連続的に形成することを含むプロセスにおいて、
前記複数の層の少なくとも一部に関しては、前記分注は、少なくとも１種の硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンを含むモデリング材料配合物の分注であり、
これによって３次元物体を製造する、プロセス。
【請求項２】
前記複数の層の前記一部を、前記少なくとも１種の硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンを固化させるのに適した硬化条件に曝露することを更に含む、請求項１に記載のプロセス。
【請求項３】
前記少なくとも１種の硬化性基は光硬化性基である、請求項１又は２に記載のプロセス。
【請求項４】
前記複数の層の前記一部を照射に曝露することを更に含む、請求項３に記載のプロセス。
【請求項５】
前記組換えヒトコラーゲンは組換えヒトＩ型コラーゲンである、請求項１～４のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項６】
前記組換えヒトコラーゲンは植物由来組換えコラーゲンである、請求項１～５のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項７】
前記組換えヒトコラーゲンを含む前記モデリング材料配合物は、水性担体を更に含む、請求項１～６のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項８】
前記モデリング材料配合物はｐＨが約６～約８の範囲である、請求項７に記載のプロセス。
【請求項９】
前記モデリング材料配合物中の、前記硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンの濃度は０．５ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ又は０．５ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬの範囲である、請求項７又は８に記載のプロセス。
【請求項１０】
前記複数の層の少なくとも一部に関しては、前記分注は更に、前記硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲン以外の少なくとも１種の硬化性材料を含むモデリング材料配合物の分注である、請求項１～９のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１１】
前記分注は、前記硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンと前記少なくとも１種の硬化性材料とを含むモデリング材料配合物の分注である、請求項１０に記載のプロセス。
【請求項１２】
前記硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンと前記少なくとも１種の硬化性材料との重量比は、１０：１～１：２、又は１０：１～１：１、又は５：１～２：１の範囲である、請求項１１に記載のプロセス。
【請求項１３】
前記複数の層の少なくとも一部において、前記分注は、配合物及び／又は前記配合で構成された物物体の部分の機械的及び／又はレオロジー的及び／又は物理的特性を変更する試薬を含むモデリング材料配合物の更なる分注である、請求項１～１２のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項１４】
前記複数の層の少なくとも一部において、前記分注は、前記ヒト組換えコラーゲン以外の生物学的材料を含むモデリング材料配合物の更なる分注である、請求項１～１３のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１５】
前記ヒト組換えコラーゲンを含む前記モデリング材料配合物は、前記生物学的材料を更に含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１６】
前記モデリング材料配合物は、ゼロせん断歪み速度、３７℃の条件下で、粘度が２，０００センチポアズ以下又は１，５００センチポアズ以下であり、硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンの濃度は少なくとも３ｍｇ／ｍＬである、請求項１～１５のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１７】
前記モデリング材料配合物は、せん断歪み速度が５　１／秒で室温の条件下で、粘度が２，０００センチポアズ以下又は１，５００センチポアズ以下であり、硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンの濃度が少なくとも３ｍｇ／ｍＬである、請求項１～１６のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１８】
前記モデリング材料配合物は、固化した際に貯蔵弾性率（Ｇ’）が少なくとも１，０００Ｐａである、請求項１～１７のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１９】
前記モデリング材料は、固化した際にその貯蔵弾性率（Ｇ’）が少なくとも１０倍に上昇する、請求項１～１８のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２０】
分注を行う温度は少なくとも１０℃、又は少なくとも２０℃、又は３７℃である、請求項１～１８のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２１】
請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法によって得られる３次元生物学的物体。
【請求項２２】
その少なくとも一部の中又は上に前記コラーゲン系材料以外の生物学的材料を更に含む、請求項２１に記載の物体。
【請求項２３】
損傷した組織の修復に使用する、請求項２１又は２２に記載の３次元生物学的物体。
【請求項２４】
人工の組織又は器官として使用する、請求項２１又は２２に記載の３次元生物学的物体。
【請求項２５】
少なくとも１種の硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンを含む組成物であって、少なくとも一部にコラーゲン系材料を含む３次元物体の積層造形に使用可能なモデリング材料配合物の調製用である、組成物。
【請求項２６】
少なくとも１種の硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンの水溶液を含む、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２７】
請求項２５又は２６に記載の組成物がパッケージされたキットであって、少なくとも一部にコラーゲン系材料を含む３次元物体の積層造形に使用可能なモデリング材料配合物の調製用に特定されたキット。
【請求項２８】
前記モデリング材料配合物は水性担体を更に含み、前記キットは、前記水性担体又は前記水性担体を含む配合物を調製するための説明書を更に含む、請求項２７に記載のキット

。
【請求項２９】
少なくとも一部にコラーゲン系材料を含む３次元物体の積層造形用の配合物であって、少なくとも１種の硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンと水性担体とを含み、せん断歪み速度が５ｌ／秒で室温の条件下で、粘度が２，０００センチポアズ以下又は１，５００センチポアズ以下である配合物において、硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンの濃度は、少なくとも３ｍｇ／ｍＬである配合物。
【請求項３０】
前記少なくとも１種の硬化性基は光硬化性基である、請求項２９に記載の配合物。
【請求項３１】
前記組換えヒトコラーゲンは組換えヒトＩ型コラーゲンである、請求項２９又は３０に記載の配合物。
【請求項３２】
前記組換えヒトコラーゲンは植物由来の組換えコラーゲンである、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の配合物。
【請求項３３】
水性担体を更に含む、請求項２９～３２のいずれか一項に記載の配合物。
【請求項３４】
ｐＨが約６～約８の範囲である、請求項３３に記載の配合物。
【請求項３５】
モデリング材料配合物中の前記組換えヒトコラーゲンの濃度は０．５ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ又は０．５ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬの範囲である、請求項３３又は３４に記載の配合物。
【請求項３６】
前記硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲン以外の少なくとも１種の硬化性材料を更に含む、請求項２９～３５のいずれか一項に記載の配合物。
【請求項３７】
前記硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンと前記少なくとも１種の硬化性材料の重量比は１０：１～１：２、又は１０：１～１：１、又は５：１～２：１の範囲である、請求項３６に記載の配合物。
【請求項３８】
配合物及び／又は前記配合で構成された物物体の部分の機械的及び／又はレオロジー的及び／又は物理的特性を変更する試薬を更に含む、請求項２９～３７のいずれか一項に記載の配合物。
【請求項３９】
前記ヒト組換えコラーゲン以外の生物学的材料を更に含む、請求項２９～３３のいずれか一項に記載の配合物。
【請求項４０】
ゼロせん断歪み速度、３７℃の条件下で、粘度が２，０００センチポアズ以下又は１，５００センチポアズ以下であり、硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンの濃度が少なくとも３ｍｇ／ｍＬである、請求項２９～３９のいずれか一項に記載の配合物。
【請求項４１】
せん断歪み速度が５　ｌ／秒で室温の条件下で、粘度が２，０００センチポアズ以下又は１，５００センチポアズ以下であり、硬化性基を有する前記組換えヒトコラーゲンの濃度が少なくとも３ｍｇ／ｍＬである、請求項２９～４０のいずれか一項に記載の配合物。
【請求項４２】
固化した際に貯蔵弾性率（Ｇ’）が少なくとも１，０００Ｐａである、請求項２９～４１のいずれか一項に記載の配合物。
【請求項４３】
固化した際にその貯蔵弾性率（Ｇ’）が少なくとも１０倍に上昇する、請求項２９～４

２のいずれか一項に記載の配合物。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、２０１７年６月９日出願の米国仮特許出願第６２／５１７，１７９号の優先権を主張するものであり、その内容全体を本明細書の一部を構成するものとしてここに援用する。
【０００２】
本発明は、その幾つかの実施形態において、積層造形に関し、より詳細には、コラーゲン系構築材料を使用する３次元（３Ｄ）物体の３Ｄバイオプリンティングに関するが、これに限定されない。
【背景技術】
【０００３】
コラーゲンは、結合組織の主成分であり、哺乳動物で最も豊富なタンパク質であり、体内に存在するタンパク質の約３０％を占めている。コラーゲンは、殆どの組織細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の主成分及び主要な構造的－機械的決定因子として機能する［例えば、Kadler K. Birth Defects Res C Embryo Today. 2004; 72:1-11; Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. J Cell Sci. 2007; 120:1955-1958.; Kreger ST. Biopolymers. 2010 93(8): 690-707を参照］。
【０００４】
コラーゲンは、その独特な特徴と人体機能における多様なプロファイル故に、組織を修復して構造的完全性を支持し、細胞浸潤を誘導し、組織再生を促進するために、様々な生体適合性材料の中から選択されることが多い。５種の主要なコラーゲン型の内、Ｉ型コラーゲンは人体で最も豊富な形態である。コラーゲンは、その独特な特性によって再生医療製品に好んで使われている。
【０００５】
積層造形（ＡＭ）は一般に、物体のコンピュータモデルを使用して３次元（３Ｄ）物体を製造するプロセスである。ＡＭシステムの基本操作は、３次元コンピュータモデルを薄い断面にスライスし、結果を２次元位置データに変換し、３次元構造を層状に製造する制御装置にデータを供給することから成る。
【０００６】
様々なＡＭ技術が存在し、その中にはステレオリソグラフィー、デジタル光処理（ＤＬＰ）、及び３次元（３Ｄ）印刷（３Ｄインクジェット印刷等）がある。このような技術は一般に、１種以上の構築材料（通常、光重合性（光硬化性）材料が含まれる）を１層ずつ堆積させ、それを硬化（例えば、固化）させて行う。
【０００７】
例えば、ステレオリソグラフィーは、液状の紫外線（ＵＶ）硬化性構築材料とＵＶレーザーを使用する積層造形プロセスである。このようなプロセスでは、構築材料を分注した各層において、分注液体構築材料の表面に対して、部品パターンの断面をレーザー光線がトレースする。ＵＶレーザー光への曝露によって、構築材料にトレースされたパターンが硬化して固まり、下の層に結合する。構築した後、形成した部品を化学浴に浸漬して余分な構築材料を除去した後、ＵＶオーブンで硬化させる。
【０００８】
例えば、３次元印刷プロセスでは、１組のノズルを有する分注ヘッドから構築材料を分注して支持構造に層を堆積させる。次に、構築材料に応じ、適切な装置を使用して層を硬化又は固化させることができる。

【０００９】
構築材料はモデリング材料配合物と支持材料配合物とを含んでもよく、これらは固化時にそれぞれ、物体と構築中の物体を支持する一時的支持構造物とを形成する。
【００１０】
モデリング材料配合物を堆積させて所望の物体を製造する。また、モデリング材料要素の有無に関わらず、支持材料配合物を使用して構築中の物体の特定領域に支持構造を設け、その後に設けられる物体層が確実且つ適切に垂直配置されるようにする。これは、例えば、物体に張り出した部分や形状（例えば、曲線形状、負の角度、隙間等）が含まれる場合に行う。
【００１１】
モデリング材料と支持材料はいずれも、分注する作業温度では液体であり、その後、通常は硬化エネルギー（例えば、ＵＶ硬化）等の固化又は硬化条件に曝露すると固化し、必要な層形状を形成することが好ましい。印刷完了後、（存在する場合には）支持構造を除去し、製造した３Ｄ物体の最終形状を明らかにする。分注した材料を固化（硬化）するには、通常、重合（例えば、光重合）及び／又は架橋（例えば、光架橋）を行う。
【００１２】
積層造形の最初の生物学的応用は、３次元犠牲樹脂型の形成であり、生物学的材料から３Ｄ足場が作製された。
【００１３】
３Ｄバイオプリンティングとは、機能部品を精密に位置決めし、その配置を厳密に制御しながら、生物学的材料を必要に応じて化学物質及び／又は細胞と組み合わせて使用して、これらを層毎に印刷して３Ｄ構造を形成する積層造形方法である。
【００１４】
３次元（３Ｄ）バイオプリンティングは、移植に適した複雑な足場、組織及び器官の必要性に取り組むため、多くの医療用途、特に再生医療で勢いを増している。
【００１５】
一般に３Ｄ印刷には、印刷媒体（分注した構築材料）の機械的特性が、印刷後の硬化（固化）材料と大きく異なる点が内在している。
【００１６】
印刷後の硬化（例えば、重合）を厳密に制御できるようにするため、構築材料には通常、分注時に（例えば、鎖伸長及び／又は架橋によって）重合する重合性（例えば、光重合性）の部分又は基が含まれており、これによって、幾何学的形状が保たれ、最終製品に必要な物性が得られる。
【００１７】
３Ｄインクジェット印刷、押出印刷、レーザーによる印刷及び投影ステレオリソグラフィー等、３Ｄバイオプリンティング用に様々な技術が開発されている［例えば、Murphy SV, Atala A, Nature Biotechnology. 2014 32(8).; Miller JS, Burdick J. ACS Biomater. Sci. Eng. 2016, 2, 1658-1661を参照］。各技術では分注した構築材料（本明細書では印刷媒体とも称される）に対して様々な要件があり、これらは、特定の塗布機構と、印刷後の足場の３Ｄ構造を維持するのに必要な硬化／ゲル化プロセスに由来する。
【００１８】
全ての技術に関して、印刷の精度と効率を決定する最も重要なパラメータは、分注した構築材料の静的及び動的物性、例えば、粘度、ずり減粘及びチキソトロピー特性である。構築材料の静的及び動的特性は印刷技術にとって重要なだけでなく、細胞を含む印刷、即ち、印刷中に分注する構築材料内の細胞等を考慮する場合にも重要である。この場合、印刷（分注）中に構築材料に印加されるせん断力は、細胞の生存に大きな影響を及ぼす。従って、広範囲の条件、即ち、濃度、温度、イオン強度及びｐＨに亘って印刷媒体の特定の特性を良好に制御することが望ましい。
【００１９】
Ｉ型コラーゲンは、３Ｄバイオプリンティングにおいて構築材料の主成分として使用す

るのに最適な候補と考えられている。

【００２０】

コラーゲンメタクリレートを迅速に自己集合するＩ型コラーゲンとして使用し、組織工学用の架橋ヒドロゲルを形成することができる［例えば、Isaacson et al., Experimental Eye Research 173, 188-193 (2018)を参照］。コラーゲンメタクリレートは、間葉系幹細胞［Kathryn E. Drzewiecki et al., A thermoreversible, photocrosslinkable collagen bio-ink for free-form fabrication of scaffolds for regenerative medicine, TECHNOLOGY (2017)］、線維芽細胞、脂肪由来幹細胞、上皮細胞及び更に多くの細胞と共に使用されている。コラーゲンメタクリレートは、コラーゲン濃度や硬化条件（例えば、照射強度や照射期間）を変えることによって、様々な剛性の足場を形成するのに有用である。

【００２１】

組織から抽出されたコラーゲンメタクリレートは、３Ｄバイオプリンティング（押出、インクジェット及びフォトリソグラフィー）での有用性が広く特徴付けられている［Drzewiecki, K. E. et al. Langmuir 30, 11204-11211 (2014); Gaudet, I. D. & Shreiber, D. I. Biointerphases 7, 25 (2012)］。

【００２２】

この天然ポリマーが持つ大きな利点にも関わらず、多くの要因によって３Ｄバイオプリンティングへの使用が妨げられている。この目的での組織抽出コラーゲンの使用は、温度とイオン強度に対する感度に起因して制限され、生理的条件下では２０℃より高い温度で自発的にゲルを形成する［例えば、PureCol, Advanced BioMatrix, Inc.を参照］。組織抽出コラーゲンの典型的な温度依存によるゲル形成によって、印刷中の正確な流動性が大きく妨げられる。この現象の可能な解決策として、印刷媒体を塗布するまで低温に保つことが挙げられるが、これは重大な技術的限界を意味する。別の解決策は、このような条件下でゲル状にならない、コラーゲンの変性形態であるゼラチンの使用である。しかし、ゼラチンには天然コラーゲンの示す、組織や細胞との真の相互作用が欠けているため、重要な生物学的機能が失われる。

【００２３】

本譲受人は、ヘテロ三量体Ｉ型コラーゲンをコードする５種のヒト遺伝子をタバコ植物に組み込むことによって、ナイーブなヒトＩ型コラーゲン（ｒｈコラーゲン）の精製を可能にする技術を開発した［例えば、Stein H. (2009) Biomacromolecules; 10:2640-5を参照］。このタンパク質は、コラーゲンに独特の特性を利用した費用対効果の高い工業プロセスによって均一に精製される。ＷＯ２００６／０３５４４２号、ＷＯ２００９／０５３９８５号、ＷＯ２０１１／０６４７７３号、ＷＯ２０１３／０９３９２１号、ＷＯ２０１４／１４７６２２号、及びこれらに由来する特許と特許出願も参照されたい（これらの全ての内容全体を本明細書の一部を構成するものとしてここに援用する）。更なる背景技術としては米国特許出願第１５／８６７，７８３号が挙げられる。

【発明の概要】

【００２４】

本発明の幾つかの実施形態の一様相によれば、少なくとも一部にコラーゲン系材料を含む３次元物体の積層造形に使用するか又は使用可能な配合物であって、少なくとも１種の硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンを含む配合物が提供される。

【００２５】

本発明の実施形態の幾つかによれば、少なくとも１種の硬化性基は光硬化性基である。

【００２６】

本発明の実施形態の幾つかによれば、組換えヒトコラーゲンは組換えヒトＩ型コラーゲンである。

【００２７】

本発明の実施形態の幾つかによれば、組換えヒトコラーゲンは植物由来の組換えコラーゲンである。

【００２８】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物は水性担体を更に含む。
【００２９】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物はｐＨが約６～約８の範囲である。
【００３０】
本発明の実施形態の幾つかによれば、水性担体はリン酸緩衝液を含む。
【００３１】
本発明の実施形態の幾つかによれば、水性担体は酸を含む。
【００３２】
本発明の実施形態の幾つかによれば、水性担体は培地を含む。
【００３３】
本発明の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物中の組換えヒトコラーゲンの濃度は０．５ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ又は０．５ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬの範囲である。
【００３４】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物は、硬化性基を有する組換えヒトコラーゲン以外の少なくとも１種の硬化性材料を更に含む。
【００３５】
本発明の実施形態の幾つかによれば、硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンと少なくとも１種の硬化性材料の重量比は１０：１～１：２、又は１０：１～１：１、又は５：１～２：１の範囲である。
【００３６】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物は、配合物及び／又は前記配合で構成された物物体の部分の機械的及び／又はレオロジー的及び／又は物理的特性を変更する試薬を更に含む。
【００３７】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物はヒト組換えコラーゲン以外の生物学的材料を更に含む。
【００３８】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物はずり減粘配合物である。
【００３９】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物は熱減粘配合物である。
【００４０】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物は、せん断歪み速度がゼロで３７℃の条件下で、粘度が２，０００センチポアズ以下又は１，５００センチポアズ以下であり、硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンの濃度は少なくとも３ｍｇ／ｍＬである。
【００４１】
本発明の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、せん断歪み速度が５ｌ／秒で室温の条件下で、粘度が２，０００センチポアズ以下又は１，５００センチポアズ以下であり、硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンの濃度は少なくとも３ｍｇ／ｍＬである。
【００４２】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物は、固化した際に貯蔵弾性率（Ｇ’）が少なくとも１，０００Ｐａである。
【００４３】
本発明の実施形態の幾つかによれば、配合物は、固化した際にその貯蔵弾性率（Ｇ’）が少なくとも１０倍に上昇する。
【００４４】
本発明の幾つかの実施形態の一様相によれば、少なくとも一部がコラーゲン系材料であることを特徴とする３次元物体を積層造形するプロセス又は方法であって、少なくとも１

種のモデリング材料配合物を分注し、物体の形状に対応する構成パターンで複数の層を連続的に形成することを含むプロセスにおいて、複数の層の少なくとも一部に関しては、分注は、本明細書にて各実施形態及びその任意の組み合わせに記載の少なくとも１種の硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンを含むモデリング材料配合物の分注であり、これによって３次元物体を製造するプロセスが提供される。

【００４５】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、プロセスは、複数の層の一部を、少なくとも１種の硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンを固化させるのに適した硬化条件に曝露することを更に含む。

【００４６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、少なくとも１種の硬化性基は光硬化性基である。

【００４７】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、プロセスは、複数の層の一部を照射に曝露することを更に含む。

【００４８】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、組換えヒトコラーゲンは組換えヒトＩ型コラーゲンである。

【００４９】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、複数の層の少なくとも一部に関しては、分注は更に、硬化性基を有する組換えヒトコラーゲン以外の少なくとも１種の硬化性材料を含むモデリング材料配合物の分注である。

【００５０】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、分注は、硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンと少なくとも１種の硬化性材料とを含むモデリング材料配合物の分注である。

【００５１】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンと少なくとも１種の硬化性材料との重量比は１０：１～１：２、又は１０：１～１：１、又は５：１～２：１の範囲である。

【００５２】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、少なくとも１種の硬化性材料は、少なくとも１種の硬化性基を有するヒアルロン酸を含む。

【００５３】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、配合物及び／又は当該配合で構成された物物体の部分の機械的及び／又はレオロジー的及び／又は物理的特性を変更する試薬を含むモデリング材料配合物の更なる分注である。

【００５４】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、分注は、配合物及び／又は配合で構成された物物体の部分の機械的及び／又はレオロジー的及び／又は物理的特性を変更する試薬を含むモデリング材料配合物の更なる分注である。

【００５５】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、試薬はチキソトロピー剤である。

【００５６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、試薬はゲル形成剤である。

【００５７】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物はヒト組換えコラーゲン以外の生物学的材料を更に含む。

【００５８】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、複数の層の少なくとも一部において、分注は、ヒト組換えコラーゲン以外の生物学的材料を含むモデリング材料配合物の更なる分

注である。
【００５９】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、ヒト組換えコラーゲンを含むモデリング材料配合物は生物学的材料を更に含む。
【００６０】
本発明の実施形態の幾つかによれば、分注を行う温度は少なくとも１０℃、又は少なくとも２０℃、又は３７℃である。
【００６１】
本発明の幾つかの実施形態の一様相によれば、本明細書に記載の各実施形態及びその任意の組み合わせのＡＭのプロセスによって得られる３次元生物学的物体が提供される。
【００６２】
本発明の実施形態の幾つかによれば、物体はその少なくとも一部の中又は上にコラーゲン系材料以外の生物学的材料を更に含む。
【００６３】
本発明の実施形態の幾つかによれば、物体は損傷した組織の修復に使用するか又は使用可能である。
【００６４】
本発明の実施形態の幾つかによれば、物体は人工の組織又は器官であるか、又は人工の器官又は組織の構築用である、または構築に使用可能である。
【００６５】
本発明の幾つかの実施形態の一様相によれば、本願の各実施形態及びそれらの任意の組み合わせに記載の、少なくとも１種の硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンを含む組成物が提供される。
【００６６】
本発明の実施形態の幾つかによれば、組成物は、少なくとも一部にコラーゲン系材料を含む３次元物体の積層造形に使用可能なモデリング材料配合物の調製用である、または調製に使用可能である。
【００６７】
本発明の実施形態の幾つかによれば、組成物は、少なくとも１種の硬化性基を有する組換えヒトコラーゲンの水溶液を更に含む。
【００６８】
本発明の幾つかの実施形態の一様相によれば、本明細書に記載の組成物がパッケージされたキットであって、少なくとも一部にコラーゲン系材料を含む３次元物体の積層造形に使用可能なモデリング材料配合物の調製用に特定されたキットが提供される。
【００６９】
本発明の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は水性担体を更に含み、キットは水性担体又は水性担体を含む配合物を調製するための説明書を更に含む。
【００７０】
特に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術用語及び／又は科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が通常理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様の又は等価な方法及び材料を、本発明の実施形態の実践又は試験に使用することができるが、例示的な方法及び／又は材料を以下に記載する。矛盾する場合、定義を含む本特許明細書が優先する。また、材料、方法及び実施例は単なる例示であり、必ずしも限定を意図するものではない。
【００７１】
本発明の実施形態の方法及び／又はシステムを実施する際には、選択タスクを手動、自動又はそれらの組み合わせで実行又は完了することができる。更に、本発明の方法及び／又はシステムの実施形態の実際の機器や装置によれば、ハードウェア、ソフトウェア又はファームウェア、又はオペレーティングシステムを使用するそれらの組み合わせによって幾つかの選択タスクを実施することができる。

【００７２】
例えば、本発明の実施形態に係る選択タスクを実行するためのハードウェアは、チップ又は回路として実装することができる。ソフトウェアの場合、本発明の実施形態に係る選択タスクは、任意の適切なオペレーティングシステムを使用してコンピュータで実行される複数のソフトウェア命令として実装することができる。本発明の例示的実施形態では、本明細書に記載の方法及び／又はシステムの例示的実施形態に係る１種以上のタスクは、複数の命令を実行するコンピューティングプラットフォーム等のデータプロセッサによって実行される。必要に応じて、データプロセッサには、命令及び／又はデータを格納する揮発性メモリ、及び／又は命令及び／又はデータを格納する不揮発性記憶装置、例えば、磁気ハードディスク及び／又はリムーバブルメディアが含まれる。必要に応じて、ネットワーク接続も設けられる。ディスプレイ及び／又はユーザー入力装置（例えば、キーボードやマウス）も必要に応じて設けられる。
【００７３】
本発明の幾つかの実施形態について、その例示のみを目的として、添付の図面を参照しながら本明細書に記載する。以下、特に図面を詳細に参照して示す細部は、例示を目的とし、本発明の実施形態の詳細な説明を目的とすることを強調する。これに関して、図面と共に説明を見ることで、本発明の実施形態をどのように実行し得るか当業者には明らかとなる。
【図面の簡単な説明】
【００７４】
【図１】図１は、５００ＭＨｚ分光計を使用して定量分析で記録したｒｈコラーゲン（上）とｒｈコラーゲンメタクリレート（下）の^{1}Ｈ核磁気共鳴（ＮＭＲ）スペクトルである。ｒｈコラーゲンメタクリレートに導入されたメタクリレートのメチル官能基とアクリルプロトンのシグナルをそれぞれ（ｂ）と（ｃ）で示し、ｒｈコラーゲンのリジンメチレンシグナルを（ａ）で示す。
【図２】図２は、４℃（青）と３７℃（赤）で測定した、２．７ｍｇ／ｍＬのウシコラーゲンのＤＰＢＳ溶液（実線）と２．７９ｍｇ／ｍＬのｒｈコラーゲンのＤＰＢＳ溶液（破線）のせん断速度の関数としての粘度を示す比較プロットである。
【図３】図３は、４℃（青）と３７℃（赤）で測定した、３．４ｍｇ／ｍＬのｒｈコラーゲンのＦＢ溶液のせん断速度の関数としての粘度を示す比較プロットであり、両方の温度で同一のずり減粘挙動を示す。
【図４】図４は、４℃（青）と３７℃（赤）で測定した、１０ｍｇ／ｍＬのｒｈコラーゲン－ＭＡのＤＰＢＳ溶液のせん断速度の関数としての粘度を示す比較プロットであり、両方の温度でのずり減粘挙動を示す。
【図５】図５は、せん断速度を５［ｌ／秒］として回転温度ステップＣＲモードを用いたレオメータで測定した、１０ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡの２０ｍＭ酢酸溶液（青）とウシコラーゲンメタクリレートインク（ウシＩ型コラーゲンメタクリレート）の同等溶液（赤）の温度上昇の関数としての粘度を示す比較プロットである。
【図６】図６Ａ～Ｂは、光硬化前（図６Ａ）と光硬化後（図６Ｂ）の様々な濃度でのｒｈコラーゲン－ＭＡ配合物の貯蔵弾性率及び損失弾性率とｔａｎ位相シフト角（ｔａｎデルタ）を示す棒グラフである。
【図７】図７は、３７℃にて周波数掃引試験で記録され、１Ｈｚでプロットされた、線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡの様々な配合物から調製された硬化物体のＧ’値とＧ”値を示す棒グラフである。
【図８】図８は、歪み７％及び角周波数５ｒａｄ／秒の振動を用いたレオメータで記録された、１５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡの１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液から調製された硬化物体について経時的に測定したＧ’値と複素粘度値を示すプロットである。
【図９】図９は、ｒｈコラーゲン－ＭＡ、ｒｈコラーゲン－ＭＡ＋ヒアルロン酸（ＨＡ）、又はｒｈコラーゲン－ＭＡとヒアルロン酸－ＭＡ（ＨＡＭＡ）のＤＭＥＭ溶液のせん断速度の関数としての粘度を示す比較プロットである。

【図１０】図１０は、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ溶液（ｃｏｌ、黒色曲線）及び５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡとポリビニルアルコールメタクリレートの溶液（ＰＶＡＭＡ、緑色曲線）（ｒｈコラーゲン－ＭＡ：ＰＶＡＭＡ重量比は５：１（緑色実線曲線）、２：１（緑色破線曲線）又は１：２（緑色点線曲線））のせん断速度の関数としての粘度を示す比較プロットである。全ての溶液は０．１Ｍ　ＰＢ＋１１．３ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．４）にて調製。

【図１１】図１１は、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ溶液（ｃｏｌ、黒色曲線）及び５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡとＨＡＭＡの溶液（青色曲線）（ｒｈコラーゲン－ＭＡ：ＨＡＭＡ重量比は５：１（青色実線曲線）又は２：１（青色破線曲線））のせん断速度の関数としての粘度を示す比較プロットである。全ての溶液は０．１Ｍ　ＰＢ＋１１．３ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．４）にて調製。

【図１２】図１２は、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ溶液（ｃｏｌ、黒色曲線）及び５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡとTiO_2の溶液（赤色曲線）（ｒｈコラーゲン－ＭＡ：TiO_2重量比は５：１（赤色実線曲線）、２：１（赤色破線曲線）又は１：２（赤色点線曲線））のせん断速度の関数としての粘度を示す比較プロットである。全ての溶液は０．１Ｍ　ＰＢ＋１１．３ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．４）にて調製。

【図１３】図１３は、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ溶液（ｃｏｌ、黒色曲線）及び５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡと酸化セルロースの溶液（橙色曲線）（ｒｈコラーゲン－ＭＡ：酸化セルロース重量比は５：１（橙色実線曲線）、２：１（橙色破線曲線）又は１：２（橙色点線曲線））のせん断速度の関数としての粘度を示す比較プロットである。全ての溶液は０．１Ｍ　ＰＢ＋１１．３ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．４）にて調製。

【図１４】図１４は、ｒｈコラーゲン－ＭＡと様々な添加剤を、ｒｈコラーゲン－ＭＡ：添加剤の重量比２：１で含む配合物から得た硬化物体（足場）の写真である。

【図１５】図１５は、室温にて回転ＣＲモードを用いたレオメータで記録した、硬化前の１０ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡの、リン酸緩衝液０．１Ｍ／ＮａＣｌ０．０１６Ｍ溶液（青）と１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液（赤）のせん断速度の関数としての粘度を示すプロットであり、ＰＢＳ溶液のより顕著なずり減粘挙動を示す。

【図１６】図１６は、３７℃にて振動ＣＲモードを用いたレオメータで記録した、１０ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡの、リン酸緩衝液０．１Ｍ／ＮａＣｌ０．０１６Ｍ溶液と１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液を硬化させて得た物体のＧ’値を示す棒グラフである。

【図１７】図１７は、ｒｈコラーゲン－ＭＡ溶液から調製された足場であって、マウス皮膚パッチ（エクスビボ）に組み込まれ、皮膚を介した白色ＬＥＤトーチ照射後にえられたものの写真である。皮膚パッチは、その外側を照射し、ｒｈコラーゲン－ＭＡ溶液は皮膚下の型に分注した。

【図１８】図１８は、ｒｈコラーゲン－ＭＡとリン酸カルシウム粒子を含む溶液で形成された足場に播種した、正常ヒト皮膚線維芽細胞の増殖を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【００７５】

本発明は、その幾つかの実施形態がは積層造形、より詳細には、コラーゲン系構築材料を使用する３次元（３Ｄ）物体の３Ｄバイオプリンティングに関するが、これに限定されない。

【００７６】

本発明の少なくとも１つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、必ずしもその用途が以下の説明及び／又は図面及び／又は実施例で例示される構造の詳細や構成要素の配置及び／又は方法に限定されるものではないことを理解すべきである。本発明は他の実施形態が可能であり、様々な手段で実施又は実行することが可能である。

【００７７】

本発明の少なくとも１つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、必ずしもその用途が以下の説明又は実施例で例示される詳細に限定されるものではないことを理解すべきである。本発明は他の実施形態が可能であり、様々な手段で実施又は実行することが可能

である。
【００７８】
本発明者らは、驚くべきことに、組換えヒトコラーゲン（ｒｈコラーゲン）が組織抽出コラーゲンに比べて温度やイオン強度の条件に対して遥かに耐性があることを見出した。本発明者らは、ｒｈコラーゲンの水溶液が２０℃を超える温度、更には３７℃でもゲルを形成せず、その粘度が様々な条件、例えば、酸性条件、又は５０ｍＭを超える塩濃度にも殆ど影響を受けないことを見出した。
【００７９】
図２と図３は、異なる温度でｒｈコラーゲン溶液のせん断速度を上昇させた場合に、粘度プロファイルは同様であることを示す。図２は、組織抽出コラーゲンの水溶液の場合には、異なる温度で観察される粘度プロファイルが異なること、特に低せん断速度での組織抽出コラーゲン溶液の粘度が実質的により高いことを更に示す。
【００８０】
本発明者らは、上述のｒｈコラーゲンの特性が、積層造形プロセス（例えば、３Ｄバイオプリンティング）において有利に利用できることを見出した。上述の特性によって、積層造形システムを冷却する必要性を回避し、モデリング材料配合物の流動性をより適切に制御しながら、生物学的添加剤に適合する条件（例えば、生理的温度やイオン強度、低せん断力の印加）での実施が可能となった。
【００８１】
本発明を実施に移しながら、本発明者らは、ｒｈコラーゲンのアミノ酸残基（例えば、リジン残基）の置換基として硬化性基（例えば、（メタ）アクリル基）を生成させることに成功し、図１と表１に示すように、リジン残基の８０％超が、その側鎖にアミン基ではなくメタクリルアミド基を有するように修飾されることを示した。
【００８２】
本明細書に記載の（メタ）アクリル基等の１種以上（好ましくは複数）の硬化性基を有するｒｈコラーゲンを、本明細書全体を通して「硬化性ｒｈコラーゲン」又は単に「硬化性コラーゲン」とも交換可能に称する。
【００８３】
硬化性ｒｈコラーゲンの水溶液は、図４に示すように、低せん断速度では同様の比較的低い粘度を示し、同様のずり減粘挙動を示すことが分かった。更に、図５に示すように、硬化性ｒｈコラーゲン溶液は、積層造形プロセスで使用可能な作業温度の温度範囲内では、熱減粘挙動を示し、硬化性組織抽出コラーゲン溶液が示す熱増粘挙動及び高粘度とは対照的に、この温度範囲で適切な粘度を示すことが分かった。
【００８４】
図６Ａ～Ｂ、図７及び図８に示すように、硬化性ｒｈコラーゲン溶液は、良好な硬化性と硬化安定性を示し、所望の機械的特性を有する硬化材料をもたらすことが更に分かった。
【００８５】
図１０～１６に示すように、硬化性ｒｈコラーゲンの有利な特性は、様々な添加剤の存在下でも、異なる溶液（水性担体）で使用した場合にも、維持されることが分かった。
【００８６】
硬化性ｒｈコラーゲンは、図１７に示すように経皮適用のインビトロモデルでうまく機能し、図１８に示すように、生体適合性があることが分かった。
【００８７】
従って、本発明の実施形態は、硬化性組換えヒトコラーゲンを含む組成物、硬化性組換えヒトコラーゲンを含む配合物、及びコラーゲン系材料を特徴とする３次元（３Ｄ）物体を製造するためにその配合物を利用する積層造形プロセスに関する。
【００８８】
積層造形：
本発明の幾つかの実施形態の一様相によれば、３次元物体の積層造形（ＡＭ）のプロセ

ス（方法）が提供される。この様相の実施形態によれば、この方法は、物体の形状に対応する構成パターンで複数の層を連続的に形成して、物体を形成する。この様相の実施形態によれば、各層の形成は、少なくとも１種の未硬化構築材料を分注し、分注した構築材料を硬化条件に曝露して固化（硬化）材料を形成することによって行う。

【００８９】

本明細書全体を通して、「構築材料」という語句は、「未硬化構築材料」又は「未硬化構築材料配合物」という語句を包含し、本明細書に記載のように、層を連続的に形成することで分注される材料の総称である。この語句は、最終物体を形成する未硬化材料、即ち、１種以上の未硬化モデリング材料配合物を包含し、場合によっては、支持体の形成に使用される未硬化材料、即ち、未硬化支持材料配合物も包含する。構築材料には、好ましくはプロセス中に如何なる変化も受けない（又は受けようとしない）非硬化性材料、例えば、（本明細書に記載の硬化性コラーゲン以外の）生物学的材料又は成分及び／又は本明細書に記載の他の試薬又は添加剤も包含される。

【００９０】

本明細書に記載のように層を連続的に形成するために分注する構築材料を、本明細書では「印刷媒体」又は「バイオプリンティング媒体」とも交換可能に称す。

【００９１】

未硬化構築材料は、１種以上のモデリング材料配合物を含むことができ、異なるモデリング配合物の固化（例えば、硬化）時に物体の異なる部分が形成されるように未硬化構築材料を分注することができる。従って、物体の異なる部分が、異なる固化（例えば、硬化）モデリング材料、又は固化（例えば、硬化）モデリング材料の異なる混合物で形成される。

【００９２】

本実施形態の方法では、物体の形状に対応する構成パターンで複数の層を形成することによって、３次元物体を層状に製造する。

【００９３】

各層の形成は、２次元表面をスキャンしてそれをパターン化する積層造形装置によって行う。スキャン中に、各標的位置又は標的位置の群に関して、装置は２次元の層又は表面の複数の標的位置に向かい、プリセットアルゴリズムに従って、その標的位置又は標的位置の群が構築材料で占有されているかどうか、また、どの種類の構築材料をそこへ送達させるかを決定する。この決定は表面のコンピュータ画像に従って行われる。

【００９４】

ＡＭを３次元インクジェット印刷によって行う場合、本明細書で定義した未硬化構築材料を、１組のノズルを有する分注ヘッドから分注し、構築材料を支持構造上に層状に堆積させる。従って、ＡＭ装置は占有対象の標的位置に構築材料を分注し、他の標的位置を空けたままにする。装置は通常、複数の分注ヘッドを有しており、各分注ヘッドは、異なる構築材料（例えば、異なるモデリング材料配合物（各々は異なる生物学的成分、又は異なる硬化性材料、又は異なる濃度の硬化性材料を含む）及び／又は異なる支持材料配合物）を分注するように構成されている。従って、異なる標的位置は、異なる構築材料（例えば、本明細書で定義したモデリング配合物及び／又は支持配合物）で占有させることができる。

【００９５】

最終３次元物体は、固化モデリング材料、又は固化モデリング材料の組み合わせ、又は固化モデリング材料と支持材料の組み合わせ、又は（例えば、硬化後の）それらの修飾物で形成されている。このような操作は全て、積層造形（固体自由成形としても知られている）の当業者には周知である。

【００９６】

本発明の幾つかの例示的な実施形態では、２種以上の異なるモデリング材料配合物を含む構築材料を分注（各モデリング材料配合物をＡＭ装置の異なる分注ヘッドから分注）して物体を製造する。複数のモデリング材料配合物は、必要に応じて、好ましくは、分注へ

ッドの同一パス中に層状に堆積させる。層内のモデリング材料配合物及び／又は配合物の組み合わせは、物体の所望の特性に従って選択する。

【００９７】

本発明の幾つかの実施形態に係る例示的なプロセスは、物体の形状に対応する３Ｄ印刷データを受信することによって開始する。データは、例えば、コンピュータ物体データに基づく製造指示に関するデジタルデータを送信するホストコンピュータから受信することができ、そのデータの形式は、例えば、標準テッセレーション言語（ＳＴＬ）又はステレオリソグラフィー輪郭（ＳＬＣ）フォーマット、仮想現実モデリング言語（ＶＲＭＬ）、積層造形ファイル（ＡＭＦ）フォーマット、図面交換フォーマット（ＤＸＦ）、ポリゴンファイルフォーマット（ＰＬＹ）、医用におけるデジタル画像と通信（ＤＩＣＯＭ）又はコンピュータ支援設計（ＣＡＤ）に適した他の任意のフォーマットとすることができる。

【００９８】

印刷データに従って、１個以上の分注（例えば、印刷）ヘッドを使用し、受取媒体上に本明細書に記載のように構築材料を層状に分注することによって、プロセスが継続する。

【００９９】

用いる積層造形方法と選択した構成に応じて、液滴又は連続流の形態で分注を行うことができる。

【０１００】

受取媒体は、印刷システムのトレイ、又は生体適合性材料で形成又は被覆された支持体又は媒体（例えば、バイオプリンティングで一般に使用される支持媒体又は物品）、又は事前に堆積された層とすることができる。

【０１０１】

幾つかの実施形態では、受取媒体は、造形物を埋め込むための型として、犠牲ヒドロゲル又は他の生体適合性材料を含み、その後、化学的、機械的又は物理的（例えば、加熱又は冷却）手段によってそれは除去される。このような犠牲ヒドロゲルは、例えば、プルロニック材料又はゼラチンで形成することができる。

【０１０２】

一旦未硬化構築材料が３Ｄデータに従って受取媒体上に分注されると、必要に応じて好ましくは、次に分注された配合物を固化させる。幾つかの実施形態では、プロセスの次の工程で堆積した層を硬化条件に曝露する。好ましくは、硬化条件の各層への適用は、この層の堆積後且つ前の層の堆積前に行う。

【０１０３】

本明細書で使用する「硬化」という用語は、配合物が固化するプロセスを表す。配合物の固化は通常、配合物の粘度の上昇及び／又は配合物の貯蔵弾性率（Ｇ’）の上昇を伴う。幾つかの実施形態では、液体として分注される配合物は、固化すると固体又は半固体（例えば、ゲル）になる。半固体（例えば、柔らかいゲル）として分注される配合物は、固化すると固体になるか、より硬い又はより強い半固体（例えば、強いゲル）になる。

【０１０４】

本明細書で使用する「硬化」という用語は、例えば、モノマー材料及び／又はオリゴマー材料の重合及び／又はポリマー鎖の架橋（硬化前に存在するポリマーの架橋又はモノマー又はオリゴマーの重合で形成されるポリマー材料の架橋）を包含する。従って、硬化反応の生成物は通常、ポリマー材料及び／又は架橋材料である。本明細書で使用するこの用語は、部分硬化、例えば、配合物の少なくとも２０％又は少なくとも３０％又は少なくとも４０％又は少なくとも５０％又は少なくとも６０％又は少なくとも７０％の硬化も包含すると共に、配合物の１００％の硬化も包含する。

【０１０５】

本明細書における「硬化に影響を及ぼす条件」又は「硬化を誘発するための条件」という語句は、本明細書では「硬化条件」又は「硬化誘発条件」とも交換可能に称せられ、硬化性材料を含む配合物に適用された際に、本明細書で定義した硬化を誘発する条件を表す。このような条件としては、例えば、以下に記載のような硬化性材料への硬化エネルギー

の印加、及び／又は硬化性材料と化学反応性成分（例えば、触媒、共触媒及び活性化剤）との接触を挙げることができる。

【０１０６】

硬化を誘発する条件に硬化エネルギーの印加が含まれる場合、「硬化条件に曝露する」という語句とその文法的転用は、分注した層を硬化エネルギーに曝露することを意味し、曝露は、通常、分注した層に硬化エネルギーを印加して行う。

【０１０７】

「硬化エネルギー」は通常、放射線の印加又は熱の印加を包含する。

【０１０８】

放射線は、硬化する材料に応じて、電磁放射線（例えば、紫外線又は可視光線）、又は電子ビーム放射線、又は超音波放射線又はマイクロ波放射線とすることができる。放射線の印加（又は照射）は適切な放射線源によって行う。例えば、本明細書に記載のように、紫外線源又は可視光源又は赤外線源又はキセノン光源又は水銀光源又はランプ光源又はＬＥＤ光源を使用することができる。

【０１０９】

放射線に曝露すると硬化する硬化性材料又は系は、本明細書では「光重合性」又は「光活性化可能」又は「光硬化性」と交換可能に称される。

【０１１０】

硬化エネルギーが熱を含む場合、硬化は本明細書及び当技術分野では「熱硬化」とも称され、熱エネルギーの印加を包含する。本明細書に記載のように、例えば、層が分注される受取媒体又は受取媒体を収容するチャンバを加熱することによって熱エネルギーの印加を行うことができる。幾つかの実施形態では、抵抗加熱器を使用して加熱を行う。

【０１１１】

幾つかの実施形態では、分注した層に熱誘導放射線を照射して加熱を行う。このような照射は、例えば、堆積層上に放射線を放出するように作動するＩＲランプ又はキセノンランプによって行うことができる。

【０１１２】

幾つかの実施形態では、セラミックランプ、例えば、約３μｍから約４μｍ（例えば、約３．５μｍ）の赤外線放射をもたらすセラミックランプによる赤外線放射によって加熱を行う。

【０１１３】

熱に曝露すると硬化する硬化性材料又は系は、本明細書では「熱硬化性」又は「熱活性化可能」又は「熱重合性」と称される。

【０１１４】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、分注した配合物を固化することは、本明細書で各実施形態のいずれかに記載の硬化条件、例えば、照射（照明）に対して分注した配合物を曝露することを含む。

【０１１５】

幾つかの実施形態では、硬化条件への曝露は、短時間、例えば、３分未満、３００秒未満、例えば、１０秒～２４０秒、又は１０秒～１２０秒、又は１０秒～６０秒の期間（その間の中間値や部分範囲を含む）に亘って行う。

【０１１６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、本方法は、支持材料配合物が構築材料に含まれる場合、支持材料配合物の除去の前又は後に硬化モデリング材料配合物を後処理条件に曝露することを更に含む。後処理条件は通常、硬化モデリング材料を更に固化させることを目的としている。幾つかの実施形態では、部分的に硬化した配合物を後処理によって固化させて、完全に硬化した配合物を得る。

【０１１７】

幾つかの実施形態では、本明細書で各実施形態のいずれかに記載のように、熱又は放射線への曝露によって後処理を行う。

【０１１８】
幾つかの実施形態では、異なる分注ヘッドから異なる調合物を分注して物体を製造することが企図される。このような実施形態では、特に、所定数の配合物からある配合物を選択し、選択した配合物とその特性の所望の組み合わせを定めるための基準（ability）を提供する。
【０１１９】
本実施形態によれば、層において各配合物を堆積する空間位置を決める際には、異なる配合物が異なる３次元空間位置を占有するように行うか、又は２種以上の異なる配合物が実質的に同じ３次元位置又は隣接する３次元位置を占有して、堆積後に層内で配合物の空間的組み合わせが可能となるように行う。
【０１２０】
従って、本実施形態は、広範囲の材料の組み合わせを堆積すること、および複数のモデリング材料配合物の異なる組み合わせから成る物体の製造が可能である。当該物体においては、物体の各部分を特徴付けるのに望ましい特性に従って、複数のモデリング材料配合物を物体の異なる部分に位置させることができる。
【０１２１】
積層造形で利用されるシステムには、受取媒体と１個以上の分注ヘッドが含まれていてもよい。受取媒体は、例えば、印刷ヘッドから分注された材料を運ぶ水平面を有し得る製造トレイとすることができる。幾つかの実施形態では、受取媒体は、本明細書に記載のように、生体適合性材料で形成又は被覆されている。
【０１２２】
分注ヘッドは、例えば、分注ヘッドの長手方向軸に沿って１列以上のアレイに配置された複数の分注ノズルを有する印刷ヘッドとすることができる。分注ヘッドは、その長手方向軸が割出方向と実質的に平行になるように設置することができる。
【０１２３】
積層造形システムは、ＡＭプロセス、例えば、所定のスキャン計画（例えば、標準テッセレーション言語（ＳＴＬ）フォーマットに変換され、制御装置にプログラムされたＣＡＤ構成）に従った分注ヘッドの動作を制御するマイクロプロセッサ等の制御装置を更に含むことができる。分注ヘッドは複数の噴射ノズルを含むことができる。噴射ノズルによって材料が受取媒体上に分注され、３Ｄ物体の断面を表す層が形成される。
【０１２４】
分注ヘッドに加えて、分注した構築材料を硬化させるための硬化エネルギー源を設けることができる。硬化エネルギーは通常、放射線であり、例えば、紫外線又は熱放射線である。或いは、電磁放射線又は熱放射線以外の硬化条件を提供する手段、例えば、分注した構築材料を冷却する手段又は硬化を促進する試薬と構築材料を接触させる手段を設けることができる。
【０１２５】
更に、ＡＭシステムは、堆積と少なくとも部分的な固化を行った後、次の層を堆積する前に、各層の高さを平準化及び／又は規定するための平準化装置を含むことができる。
【０１２６】
本実施形態によれば、本明細書に記載の積層造形方法は、生物学的物体をバイオプリンティングするためのものである。
【０１２７】
本明細書で使用する「バイオプリンティング」とは、本明細書に記載の自動化又は半自動化のコンピュータ支援積層造形システム（例えば、バイオプリンタ又はバイオプリンティングシステム）と適合する方法によって、本明細書に記載の生物学的成分を含む１種以上のバイオインク配合物を利用しながら積層造形プロセスを実行することを意味する。
【０１２８】
本明細書全体を通して、「モデリング材料配合物」という語句（本明細書では「モデリング配合物」又は「モデリング材料組成物」又は「モデリング組成物」、又は単に「配合

物」又は「組成物」とも交換可能に称される）は、本明細書に記載のように、最終物体を形成するために分注される未硬化構築材料（印刷媒体）の一部又は全てを表す。モデリング配合物は未硬化のモデリング配合物であり、硬化条件に曝露すると、物体又はその一部を形成する。

【０１２９】

バイオプリンティングという観点から、未硬化構築材料は、１種以上の生物学的成分又は材料（例えば、本明細書に記載の硬化性ｒｈコラーゲン）を含む少なくとも１種のモデリング配合物を含み、本明細書及び当技術分野では「バイオインク」又は「バイオインク配合物」とも称される。

【０１３０】

幾つかの実施形態では、バイオプリンティングは、好ましくは本明細書に記載の３次元印刷データに従った構成パターンでの未硬化構築材料の複数の層の連続形成を含む。形成された層の少なくとも１個、好ましくは大部分又は全ては（固化又は硬化前に）本明細書に記載の１種以上の生物学的成分（例えば、本明細書に記載の硬化性ｒｈコラーゲン）を含む。必要に応じて、形成された層の少なくとも１個は（固化又は硬化前に）１種以上の非生物学的硬化性材料、及び／又は非硬化性生物学的又は非生物学的成分、好ましくは、印刷媒体及び／又はバイオインク中の生物学的成分（例えば、コラーゲン）の生物学的及び／又は構造的特徴に干渉しない（例えば、悪影響を及ぼさない）生体適合性材料を含む。

【０１３１】

幾つかの実施形態では、バイオインク又は印刷媒体中の成分、例えば、非硬化性及び硬化性材料、及び／又は硬化を行うために適用される硬化条件は、バイオインク又は印刷媒体中の生物学的成分の構造的及び／又は機能的特性に大きく影響を及ぼさないように選択する。

【０１３２】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、構築材料（例えば、印刷媒体）はモデリング材料配合物（バイオインク）と必要に応じて支持材料配合物を含み、これらは全て、生物学的成分の生物学的及び／又は構造的特徴に干渉しない材料又はその材料の組み合わせを含むように選択する。

【０１３３】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、バイオプリンティング方法は、バイオインク中の生物学的成分の構造的及び／又は機能的特性に大きく影響を及ぼさない条件下で層を形成するように構成する。

【０１３４】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載のバイオプリンティングプロセス／方法を行うためのバイオプリンティングシステムは、バイオインク中の生物学的成分の構造的及び／又は機能的特性に大きく影響を及ぼさない条件下で層を形成できるように構成する。

【０１３５】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、積層造形（例えば、バイオプリンティング）プロセス及びシステムは、プロセスパラメータ（例えば、温度、せん断力、せん断歪み速度）が生物学的成分の機能的及び／又は構造的特徴に干渉しない（実質的に影響を及ぼさない）ように構成する。

【０１３６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、積層造形プロセス（バイオプリンティング）は、少なくとも１０℃又は少なくとも２０℃の温度、例えば、約１０～約４０℃の範囲の温度、好ましくは約１０℃～３７℃、又は約２０℃～３７℃、又は約２０℃～約３０℃、又は約２０℃～約２８℃、又は約２０℃～約２５℃（その間の中間値や部分範囲を含む）、又は室温、又は３７℃で行う。

【０１３７】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、上述の温度／温度範囲は、構築材料（例えば

、少なくとも本明細書に記載の生物学的成分を含むモデリング材料配合物）を分注する温度である。即ち、ＡＭシステム内の分注ヘッドの温度及び／又は分注ヘッド内を通過する前にモデリング材料配合物が保持される温度である。

【０１３８】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、ＡＭプロセスは、ＡＭシステム（例えば、分注ヘッド及び／又はモデリング材料配合物）を室温未満の温度、例えば、２０℃未満又は１０℃未満の温度、又は５℃未満（例えば、４℃）まで冷却せずに行う。

【０１３９】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、ＡＭシステムには、システム又はその一部（例えば、分注ヘッド及び／又はモデリング材料配合物）を室温未満の温度、例えば、２０℃未満又は１０℃未満の温度、又は５℃未満（例えば、４℃）まで冷却する手段がない。

【０１４０】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、生物学的成分（例えば、細胞）の構造的及び／又は機能的特性に悪影響を及ぼさないせん断力を印加しながら、積層造形プロセス（バイオプリンティング）を行う。せん断力の印加は、構築材料（例えば、少なくとも本明細書に記載の生物学的成分を含むモデリング材料配合物）を分注ヘッドに通すことによって行うことができ、構築材料をせん断力に付すとも見なされるべきである。

【０１４１】

本明細書で説明し、以下の実施例の項で示すように、本発明の実施形態によって、バイオインクに含まれる生物学的成分の機能的及び／又は構造的特徴に影響を及ぼさない条件下（例えば、低せん断力及び室温又は生理学的温度）でＡＭバイオプリンティングプロセスを行いながら、必要な流動性（流動性を付与する粘度、例えば、１０，０００センチポアズ未満又は５，０００センチポアズ未満、又は２，０００センチポアズ未満）を維持し、更に分注した構築材料の硬化性を維持することができる。本発明の実施形態によって、既知の方法のいずれかを用いたバイオプリンティングの操作をうまく行うことができ、且つそのような各方法に必要なプロセスパラメータに制限されることはない。

【０１４２】

以下、本発明の実施形態において使用可能なＡＭバイオプリンティング方法の例について説明する。

【０１４３】

バイオプリンティング方法及び対応するシステムは、積層造形を行うための当技術分野で既知の方法とシステムのいずれかとすることができ、そのようなシステムと方法の例は上述されている。適切な方法とシステムは、解像度、堆積速度、拡張性、バイオインク適合性及び使い易さ等の印刷機能を考慮して選択することができる。

【０１４４】

例えば、適切なバイオプリンティングシステムは通常、分注システム（温度制御モジュールを備えるか又は常温）、ステージ（受取媒体）、及びＣＡＤ－ＣＡＭソフトウェアで指示されるｘ軸、ｙ軸及びｚ軸に沿った動作を含む。形成された層の硬化を促進するように硬化エネルギー（例えば、光線又は熱放射線を印加）又は硬化条件を堆積領域（受取媒体）に適用する硬化源（例えば、光源又は熱源）及び／又は加湿器もシステムに含めることができる。複数の分注ヘッドを使用して数種の材料の連続分注を容易にするプリンタが存在する。

【０１４５】

一般に、バイオプリンティングは、積層造形に関する既知の技術を用いて行うことができる。以下に幾つかの例示的な積層造形技術を列挙するが、他の如何なる技術も企図される。

【０１４６】

３Ｄインクジェット印刷：

３Ｄインクジェット印刷は、非生物学的用途と生物学的（バイオプリンティング）用途の両方に使用される一般的な３Ｄプリンタである。インクジェットプリンタは、熱又は音

響の力を利用して、最終構造の一部を支持又は形成することができる基材上に液滴を噴射する。この技術では、制御された量の液体が所定の場所に送られ、（１）インク滴の位置と（２）インク量（これは、微細構造印刷の場合、又は少量の生体反応性の試薬又は薬物を添加する際に有益となる）とが精密に制御された高解像度印刷が得られる。インクジェットプリンタは、例えば、複数種の生物学的成分及び／又は生物活性剤を含む数種のインクで使用できる。更に、印刷は高速であり、培養プレートに応用できる。

【０１４７】

３Ｄインクジェット印刷システムを利用するバイオプリンティング方法は、本明細書に記載の１種以上のバイオインクモデリング材料配合物を使用し、３Ｄ印刷データに従って、１個以上のインクジェット印刷ヘッドを使用して受取媒体上に配合物の液滴を層状に分注して行うことができる。

【０１４８】

押出印刷：

この技術では、液滴ではなく材料の連続ビーズを使用する。このような材料のビーズを２Ｄで堆積し、ステージ（受取媒体）又は押出ヘッドがｚ軸に沿って移動し、堆積した層が次の層の基礎として機能する。３Ｄバイオプリンティング用途向けの生物学的材料押出の最も一般的な方法は、空気圧式又は機械式分注システムである。

【０１４９】

ステレオリソグラフィー（ＳＬＡ）及びデジタル光処理（ＤＬＰ）：

ＳＬＡ及びＤＬＰは、光源を使用した選択的硬化によって、浴中の未硬化構築材料を層毎に固化材料に変えながら、未硬化材料を固化材料から後で分離／洗浄する積層造形技術である。ＳＬＡは、バイオプリンティングを含む様々な産業でモデル、試作品、パターン及び生産部品の形成に広く用いられている。

【０１５０】

レーザーによる印刷：

３Ｄバイオプリンティングのために適応させた形態のレーザーによる印刷技術は、金属を転写するために開発されレーザー誘起前方転写（ＬＩＦＴ）の原理に基づいており、現在では生物学的材料への応用に成功している。この装置は、レーザー光線、集束系、エネルギー吸収／変換層、生体物質層（例えば、細胞及び／又はヒドロゲル）及び受取基板から成る。レーザーによるプリンタは、レーザー光線を吸収層に照射することで作動し、これによってエネルギーが機械的力に変換され、この力によって生体層から基板上に小さな液滴が押し出される。次に、光源を利用して基板上の材料を硬化させる。

【０１５１】

レーザーによる印刷は一連の粘度に適合し、細胞生存率や細胞機能に影響を及ぼすことなく哺乳動物細胞を印刷することができる。細胞の堆積は、最大10^8個／ｍｌの密度とし、１滴当たり細胞１個のマイクロスケール解像度で行うことができる。

【０１５２】

エレクトロスピニング：

エレクトロスピニングは、電気力を用いてポリマー溶液又はポリマー溶融物の帯電した糸を引く繊維製造技術である。

【０１５３】

組換えヒトコラーゲン：

本明細書で使用する「コラーゲン」という用語は、三重らせん構造を有し、繰り返しＧｌｙ－Ｘ－Ｙトリプレットを含むポリペプチドを意味し、ＸとＹは任意のアミノ酸とすることができるが、イミノ酸（プロリンとヒドロキシプロリン）であることが多い。一実施形態によれば、コラーゲンはＩ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、Ｖ型、ＸＩ型、又はそれらに由来する生物学的に活性な断片である。

【０１５４】

本発明のコラーゲンは、相同体（例えば、デフォルトパラメータを使用した全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアによって決定された

、表Ａに記載のコラーゲン配列と少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも８７％、少なくとも８９％、少なくとも９１％、少なくとも９３％、少なくとも９５％以上、約１００％相同であるポリペプチド）も意味する。相同体は、その欠失、挿入又は置換変異体（アミノ酸置換を含む）及びその生物学的に活性なポリペプチド断片を意味することもある。

【０１５５】

特定の実施形態によれば、コラーゲンはヒトコラーゲンである。

【０１５６】

他の実施形態では、コラーゲンはヒトコラーゲンの天然由来のアミノ酸配列を含む。

【０１５７】

以下の表ＡにコラーゲンＮＣＢＩ配列番号の例を示す。

【０１５８】

【表１】

表Ａ

例示的なプロコラーゲンのＮＣＢＩ配列番号	配列番号
Ｐ０２４５２	１
Ｐ０８１２３	２

【０１５９】

配列番号１の注釈は次の通りである。

アミノ酸１～２２：シグナルペプチド

アミノ酸２３～１６１：Ｎ末端ペプチド

アミノ酸１６２～１２１８：コラーゲンα－１（Ｉ）鎖

アミノ酸１２１９～１４６４：Ｃ末端ペプチド

【０１６０】

配列番号２の注釈は次の通りである。

アミノ酸１～２２：シグナルペプチド

アミノ酸２３～７９：Ｎ末端ペプチド

アミノ酸８０～１１１９：コラーゲンα－２（Ｉ）鎖

アミノ酸１１２０～１３６６：Ｃ末端ペプチド

【０１６１】

一実施形態によれば、本発明のコラーゲンはテロペプチドを十分に含んでおり、適切な条件下で原線維を形成することができるようになっている。

【０１６２】

従って、例えば、コラーゲンはアテロコラーゲン、テロコラーゲン又はプロコラーゲンとすることができる。

【０１６３】

本明細書で使用する「アテロコラーゲン」という用語は、プロコラーゲン及びそのテロペプチドの少なくとも一部に通常含まれるＮ末端及びＣ末端プロペプチドの両方を欠いているが、適切な条件下で原線維を形成することができるようにテロペプチドを十分に含むコラーゲン分子を意味する。

【０１６４】

本明細書で使用する「プロコラーゲン」という用語は、Ｎ末端プロペプチドとＣ末端プロペプチドのいずれか一方、又はその両方を含むコラーゲン分子（例えば、ヒト）を意味する。例示的なヒトプロコラーゲンアミノ酸配列を配列番号３、４、５及び６に示す。

【０１６５】

本明細書で使用する「テロコラーゲン」という用語は、プロコラーゲンに通常含まれる

Ｎ末端及びＣ末端プロペプチドの両方を欠いているが、テロペプチドを含むコラーゲン分子を意味する。線維性コラーゲンのテロペプチドは、天然のＮ／Ｃプロテイナーゼによる消化後のＮ末端及びＣ末端プロペプチドのレムナントである。

【０１６６】

他の実施形態によれば、コラーゲンはそのテロペプチドを欠いており、原線維形成を経ることができない。

【０１６７】

他の実施形態によれば、コラーゲンは上述のコラーゲン型の混合物である。

【０１６８】

特定の実施形態によれば、コラーゲンを組換えＤＮＡ技術によって遺伝子操作されたもの（例えば、ヒトコラーゲン）である。

【０１６９】

動物からコラーゲンを単離する方法は当技術分野で知られている。天然（native）の動物コラーゲンの分散と可溶化は、コラーゲンの望ましい特性を付与する基本的な堅い三重らせん構造に影響を及ぼさずに分子間結合を破壊し、免疫原性非らせんテロペプチドを除去する様々なタンパク質分解酵素（例えば、ブタ粘膜ペプシン、ブロメライン、キモパパイン、キモトリプシン、コラゲナーゼ、フィシン、パパイン、ペプチダーゼ、プロテイナーゼＡ、プロテイナーゼＫ、トリプシン、微生物プロテアーゼ、及び類似の酵素又はこのような酵素の組み合わせ）を使用して行うことができる（精製可溶性コラーゲンの一般的な調製方法については、米国特許第３，９３４，８５２号、第３，１２１，０４９号、第３，１３１，１３０号、第３，３１４，８６１号、第３，５３０，０３７号、第３，９４９，０７３号、第４，２３３，３６０号及び第４，４８８，９１１号を参照）。次に、得られた可溶性コラーゲンを低ｐＨと高イオン強度で繰り返し沈殿させた後、低ｐＨで洗浄と再可溶化を行って精製することができる。

【０１７０】

コラーゲン鎖及びプロコラーゲンを発現する植物は当技術分野で知られている（例えば、ＷＯ０６０３５４４２Ａ３号、Merle et al., FEBS Lett. 2002 Mar 27;515(1-3):114-8. PMID: 11943205、及びRuggiero et al., 2000, FEBS Lett. 2000 Mar 3;469(1):132-6. PMID: 10708770、及び米国特許出願公開第２００２／０９８５７８号及び第２００２／０１４２３９１号、及び米国特許第６，６１７，４３１号を参照）。これらの文献の各々を本明細書の一部を構成するものとしてここに援用する。

【０１７１】

本発明は、コラーゲン／アテロコラーゲンの遺伝子改変体、例えば、コラゲナーゼ抵抗性コラーゲン等［Wu et al., Proc Natl. Acad Sci, Vol. 87, p.5888-5892, 1990］も企図することが理解されよう。

【０１７２】

組換えプロコラーゲン又はテロコラーゲン（例えば、ヒト）は、任意の非動物細胞（例えば、植物細胞及び酵母や真菌等の他の真核細胞が挙げられるが、これらに限定されない）で発現できる。

【０１７３】

プロコラーゲン又はテロコラーゲンを産生し得る（即ち、発現し得る）植物は、低級（例えば、苔及び藻類）又は高級（維管束）植物種（例えば、組織又は単離細胞及びその抽出物（例えば、細胞懸濁液））とすることができる。好ましい植物は、大量のコラーゲン鎖、コラーゲン及び／又は本明細書で以下に記載のプロセシング酵素を蓄積することができる植物である。このような植物は、ストレス状態に対する抵抗性や発現成分又は集合コラーゲンを抽出できる容易さに従って選択することもできる。ヒトプロコラーゲンが発現し得る植物の例としては、タバコ、トウモロコシ、アルファルファ、米、ジャガイモ、大豆、トマト、小麦、大麦、キャノーラ、ニンジン、レタス及び綿が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７４】

組換えプロコラーゲンの産生は通常、ヒトプロコラーゲンをコードする外因性ポリヌクレオチド配列による安定な又は一過性の形質転換によって行う。

【０１７５】

ヒトプロコラーゲンをコードする例示的なポリヌクレオチド配列を配列番号７、８、９及び１０に示す。

【０１７６】

ヒトテロコラーゲンの産生は通常、ヒトプロコラーゲンをコードする外因性ポリヌクレオチド配列と関連プロテアーゼをコードする少なくとも１種の外因性ポリヌクレオチド配列による安定な又は一過性の形質転換によって行う。或いは、組換えプロコラーゲンの単離後にプロテアーゼを添加することができる。

【０１７７】

コラーゲンの三重らせん構造の安定性には、酵素プロリル－４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４Ｈ）によってプロリンをヒドロキシル化してコラーゲン鎖内にヒドロキシプロリンの残基を形成することが必要である。植物はヒドロキシプロリン含有タンパク質を合成できるが、植物細胞内のヒドロキシプロリンの合成に関与するプロリルヒドロキシラーゼは、哺乳動物Ｐ４Ｈと比較して比較的緩やかな基質配列特異性を示す。従って、Ｇｌｙ－Ｘ－ＹトリプレットのＹ位置にのみヒドロキシプロリンを含むコラーゲンの産生には、コラーゲンとヒト又は哺乳動物Ｐ４Ｈ遺伝子の同時発現が必要である［Olsen et al, Adv Drug Deliv Rev. 2003 Nov 28;55(12):1547-67］。

【０１７８】

従って、一実施形態によれば、プロコラーゲン又はテロコラーゲンは内因性Ｐ４Ｈ活性を持たない植物の細胞内区画で発現する。

【０１７９】

本明細書で使用する「内因性Ｐ４Ｈ活性を持たない細胞内区画」という語句は、植物Ｐ４Ｈ又は植物様Ｐ４Ｈ活性を有する酵素を含まない細胞の任意の区画化された領域を意味する。一実施形態によれば、細胞内区画は液胞、アポプラスト又は葉緑体である。特定の実施形態によれば、細胞内区画は液胞である。他の実施形態によれば、細胞内区画はアポプラストである。

【０１８０】

内因性Ｐ４Ｈ活性を持たない細胞内区画における発現プロコラーゲンの蓄積は、数種のアプローチの内のいずれか１種によって行うことができる。

【０１８１】

例えば、発現プロコラーゲン／テロコラーゲンは、発現タンパク質をアポプラストやオルガネラ（例えば、葉緑体）等の細胞内区画に標的化するためのシグナル配列を含むことができる。

【０１８２】

適切なシグナル配列の例としては、葉緑体輸送ペプチド（スイスプロットエントリーＰ０７６８９、アミノ酸１～５７に含まれる）及びミトコンドリア輸送ペプチド（スイスプロットエントリーＰ４６６４３、アミノ酸１～２８に含まれる）が挙げられる。液胞への標的化は、コラーゲンをコードするポリヌクレオチド配列を液胞標的化配列に融合させて、例えば、チオールプロテアーゼアリューレイン前駆体の液胞標的化配列（ＮＣＢＩ受託番号Ｐ０５１６７　ＧＩ：１１３６０３）：ＭＡＨＡＲＶＬＬＬＡＬＡＶＬＡＴＡＡＶＡＶＡＳＳＳＳＦＡＤＳＮＰＩＲＰＶＴＤＲＡＡＳＴＬＡ（配列番号１４）を使用して行うことができる。通常、コラーゲンをコードするポリヌクレオチド配列はＥＲ標的化配列も含む。一実施形態では、ＥＲ標的化配列はコラーゲン配列に固有のものである。他の実施形態では、天然のＥＲ標的化配列を除去し、非天然のＥＲ標的化配列を添加する。非天然のＥＲ標的化配列は液胞標的化配列に含まれていてもよい。ＥＲを横断して液胞に移動するには、コラーゲン配列はＥＲ保持配列を含むべきでないことが理解されよう。

【０１８３】

或いは、プロコラーゲンの配列は、植物で発現した際にプロコラーゲンの細胞局在を変

化させる方法で改変することができる。

【０１８４】

本発明は、ヒトプロコラーゲンとＰ４Ｈの両方を同時発現する遺伝子改変細胞を企図する。一実施形態では、Ｐ４Ｈはプロコラーゲンα鎖を正確にヒドロキシル化する［即ち、Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙトリプレットのプロリン（Ｙ）位置のみをヒドロキシル化する］ことができる。Ｐ４Ｈは、Ｇｅｎｂａｎｋ番号Ｐ０７２３７及びＰ１３６７４に記載のαとβの２種のサブユニットで構成される酵素である。両方のサブユニットは活性酵素を形成するのに必要であるが、βサブユニットはシャペロン機能も有する。

【０１８５】

本発明の遺伝子改変細胞によって発現されるＰ４Ｈは、ヒトＰ４Ｈであることが好ましい。ヒトＰ４Ｈをコードする例示的なポリヌクレオチド配列は、配列番号１１及び１２である。更に、高い基質特異性を示すＰ４Ｈ変異体、又はＰ４Ｈ相同体も使用することができる。適切なＰ４Ｈ相同体の例としては、ＮＣＢＩ受託番号：ＮＰ＿１７９３６３で特定されるアラビドプシス酸化還元酵素が挙げられる。

【０１８６】

Ｐ４Ｈは発現プロコラーゲン鎖と共蓄積することが不可欠であるため、そのコード配列を適切に（例えば、シグナル配列の付加又は欠失によって）改変することが好ましい。従って、本発明は、液胞標的化配列に融合されるＰ４Ｈポリヌクレオチド配列の使用を企図する。液胞を標的化するため、内因性ＥＲ保持配列が存在する場合には、発現の前にそれを除去する必要があることが理解されよう。

【０１８７】

哺乳動物細胞では、コラーゲンはリシルヒドロキシラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ及びグルコシルトランスフェラーゼによっても改変される。これらの酵素は、特定の位置のリシル残基を、特定の位置のヒドロキシリシル残基、ガラクトシルヒドロキシリシル残基及びグルコシルガラクトシルヒドロキシリシル残基に連続的に改変する。Ｇｅｎｂａｎｋ番号Ｏ６０５６８に記載の単一のヒト酵素であるリシルヒドロキシラーゼ３（ＬＨ３）は、ヒドロキシリジン結合炭水化物の形成で見られる３つの連続改変段階全てを触媒することができる。

【０１８８】

従って、本発明の遺伝子改変細胞は、哺乳動物ＬＨ３（必要に応じて液胞標的化配列に融合）を発現することもできる。液胞を標的化するため、内因性ＥＲ保持配列を発現の前に除去することが理解されよう。

【０１８９】

配列番号１３で示されるようなＬＨ３コード配列をこのような目的に使用することができる。

【０１９０】

上述のプロコラーゲン及び改変用酵素は、プロコラーゲンα鎖をコードするポリヌクレオチド配列及び／又は機能性プロモーターの転写制御下に位置する改変用酵素（例えば、Ｐ４Ｈ及びＬＨ３）を含む安定的に組み込まれた又は一時的に発現された核酸構築物から発現することができる。このような核酸構築物（本明細書では発現構築物とも称される）は、生物全体（例えば、植物、規定組織又は規定細胞）及び／又は生物の規定の発生段階での発現用に構成することができる。このような構築物は、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性）、エンハンサー要素及び細菌複製用の複製起点を含むこともできる。

【０１９１】

単子葉植物と双子葉植物の両方に核酸構築物を導入するための様々な方法が存在する（Potrykus, I., Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol. (1991) 42:205-225; Shimamoto et al., Nature (1989) 338:274-276）。このような方法は、核酸構築物又はその一部の植物ゲノムへの安定した組み込み、又は核酸構築物の一過性発現に依存するが、この場合、このような配列は植物の子孫には遺伝されない。

【０１９２】

更に、葉緑体等のＤＮＡ含有オルガネラのＤＮＡに核酸構築物を直接導入することができる数種の方法が存在する。

【０１９３】

本発明の核酸構築物内に含まれるような外因性配列を植物ゲノムへ安定してゲノム組み込みさせる２種の原理方法が存在する。

【０１９４】

（ｉ）アグロバクテリウム媒介の遺伝子導入：Klee et al. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38:467-486; Klee and Rogers in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., and Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, in Plant Biotechnology, eds. Kung, S. and Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

（ｉｉ）ＤＮＡの直接取り込み：Paszkowski et al., in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J., and Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 52-68; プロトプラストへのＤＮＡの直接取り込み方法を含む、Toriyama, K. et al. (1988) Bio/Technology 6:1072-1074. 植物細胞の短時間の電気ショックにより誘導されるＤＮＡの取り込み：Zhang et al. Plant Cell Rep. (1988) 7:379-384. Fromm et al. Nature (1986) 319:791-793. 粒子衝撃による植物細胞又は植物組織へのＤＮＡ注入、Klein et al. Bio/Technology (1988) 6:559-563; McCabe et al. Bio/Technology (1988) 6:923-926; Sanford, Physiol. Plant. (1990) 79:206-209; マイクロピペットシステムの使用による方法：Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet. (1987) 75:30-36; Neuhaus and Spangenberg, Physiol. Plant. (1990) 79:213-217; 又は発芽中の花粉とのＤＮＡの直接インキュベーションによる方法、DeWet et al. in Experimental Manipulation of Ovule Tissue, eds. Chapman, G. P. and Mantell, S. H. and Daniels, W. Longman, London, (1985) p. 197-209; and Ohta, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:715-719.

【０１９５】

植物細胞への直接ＤＮＡ導入には様々な方法が存在する。エレクトロポレーションでは、プロトプラストを強い電場に短時間曝露する。マイクロインジェクションでは、非常に小さなマイクロピペットを使用して、ＤＮＡを細胞に直接機械的に注入する。微粒子衝撃では、硫酸マグネシウム結晶、タングステン粒子又は金粒子等の微粒子発射物にＤＮＡを吸着させ、微粒子発射物を細胞又は植物組織へ物理的に加速させる。

【０１９６】

用いられる形質転換技術に関係なく、一旦コラーゲン発現子孫が特定されると、そのような植物をその発現を最大化する条件下で更に栽培する。核酸又はタンパク質プローブ（例えば、抗体）を使用して外因性ｍＲＮＡ及び／又はポリペプチドの存在を確認することによって、形質転換植物から生じる子孫を選択することができる。後者のアプローチによって、（例えば、分画された植物抽出物を精査して）発現ポリペプチド成分を局在化することができるため、外来タンパク質の正確な処理や構築に対する植物の可能性も検証される。

【０１９７】

そのような植物を栽培した後、テロペプチド含有コラーゲンを通常回収する。植物組織／細胞を好ましくは成熟時に回収し、抽出アプローチによってプロコラーゲン分子を単離する。プロコラーゲンがプロテアーゼ酵素で切断できる状態に留まるように回収を行うことが好ましい。一実施形態によれば、本発明の遺伝子導入植物から粗抽出物を生成させた後、プロテアーゼ酵素と接触させる。

【０１９８】

上述のように、プロペプチド含有又はテロペプチド含有コラーゲンをプロテアーゼとインキュベートしてアテロコラーゲン又はコラーゲンを生成させた後に可溶化することができる。プロペプチド含有又はテロペプチド含有コラーゲンをプロテアーゼとインキュベー

トする前に遺伝子改変細胞から精製してもよく、プロテアーゼとインキュベートした後に精製してもよいことが理解されよう。或いは、プロペプチド含有又はテロペプチド含有コラーゲンをプロテアーゼ処理の前に部分的に精製し、プロテアーゼ処理後に完全に精製することができる。或いは、プロペプチド含有又はテロペプチド含有コラーゲンをプロテアーゼで処理するのと同時に他の抽出／精製手順を行うことができる。

【０１９９】

本発明のテロペプチド含有コラーゲンを精製又は半精製する方法の例としては、硫酸アンモニウム等による塩析及び／又は限外濾過による小分子の除去が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２００】

一実施形態によれば、組換えプロペプチド又はテロペプチド含有コラーゲンを切断するのに使用するプロテアーゼは動物に由来しない。例示的なプロテアーゼとしては、特定の植物由来のプロテアーゼ、例えば、フィシン（ＥＣ３．４．２２．３）及び特定の細菌由来のプロテアーゼ、例えば、スブチリシン（ＥＣ３．４．２１．６２）やニュートラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。本発明者らはｒｈトリプシンやｒｈペプシン等の組換え酵素の使用も企図する。このような酵素の幾つかは市販されており、例えば、イチジクの木のラテックス由来のフィシン（Ｓｉｇｍａ社、カタログ番号Ｆ４１２５及びＥｕｒｏｐｅ　Ｂｉｏｃｈｅｍ社）、バチルス・リケニフォルミス由来のスブチリシン（Ｓｉｇｍａ社、カタログ番号Ｐ５４５９）、バチルス・アミロリケファシエンス由来のニュートラーゼ（Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ社、カタログ番号ＰＷ２０１０４１）及びＴｒｙｐＺｅａｎ（商標）、即ち、トウモロコシで発現の組換えヒトトリプシン（Ｓｉｇｍａ社、カタログ番号Ｔ３４４９）が挙げられる。

【０２０１】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、組換えヒトコラーゲンは組換えヒトＩ型コラーゲンである。

【０２０２】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、組換えヒトコラーゲンは植物由来の組換えヒトコラーゲンであり、幾つかの実施形態では、植物はタバコである。

【０２０３】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、組換えヒトコラーゲンは、デフォルトパラメータを使用した全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアによって決定された配列番号１５に記載の配列と少なくとも９０％相同、少なくとも９１％相同、９２％相同、少なくとも９３％相同、少なくとも９４％相同、少なくとも９５％相同、少なくとも９６％相同、少なくとも９７％相同、少なくとも９８％相同、少なくとも９９％相同又は１００％相同であるアミノ酸配列を有する２個のα１ユニットと、配列番号６に記載の配列と少なくとも９０％相同、少なくとも９１％相同、９２％相同、少なくとも９３％相同、少なくとも９４％相同、少なくとも９５％相同、少なくとも９６％相同、少なくとも９７％相同、少なくとも９８％相同、少なくとも９９％相同又は１００％相同であるアミノ酸配列を有する１個のα２ユニットを含む組換えヒトＩ型コラーゲンである。特定の実施形態によれば、Ｉ型コラーゲンは、デフォルトパラメータを使用した全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアによって決定された配列番号１５に記載の配列から成る２個のα１ユニットと、配列番号６に記載の配列から成る１個のα２ユニットから成る。

【０２０４】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、α１ユニットは、配列番号１６に記載の核酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９

８％、少なくとも約９９％、例えば、１００％同一であるポリヌクレオチド配列によってコードされる。α２ユニットは、配列番号１０に記載の核酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、例えば、１００％同一であるポリヌクレオチド配列によってコードされる。

【０２０５】

同一性（例えば、パーセント相同性）は、任意の相同性比較ソフトウェア、例えば、デフォルトパラメータ等を使用する全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＮソフトウェアを使用して決定することができる。

【０２０６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、本明細書で各実施形態のいずれかに記載のヒト組換えコラーゲン（ｒｈコラーゲン）は単量体ｒｈコラーゲンである。

【０２０７】

「単量体」とは、水溶液に可溶であり、線維性凝集物を形成しない、本明細書に記載のｒｈコラーゲンを意味する。

【０２０８】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、本明細書で各実施形態のいずれかに記載のヒト組換えコラーゲン（ｒｈコラーゲン）は線維性ｒｈコラーゲンである。

【０２０９】

「線維性」とは、水溶液中で線維性凝集物の形態をとる、本明細書に記載のｒｈコラーゲンを意味する。通常、線維性ｒｈコラーゲンは、単量体ｒｈコラーゲンを原線維形成緩衝液（通常は塩基性ｐＨを特徴とする）に曝露して形成するが、必ずしもそうでなくてもよい。線維性ｒｈコラーゲンを形成するための例示的な手順を以下の実施例の項に記載する。

【０２１０】

硬化性コラーゲン：

本発明の幾つかの実施形態の一様相によれば、硬化性コラーゲンを含む組成物が提供される。幾つかの実施形態によれば、組成物は、本明細書に記載の３Ｄ物体の積層造形（例えば、バイオプリンティング）で使用可能である。幾つかの実施形態によれば、組成物は、積層造形プロセス（例えば、バイオプリンティング）用のモデリング材料配合物の調製に使用可能である、または調製用である。

【０２１１】

「硬化性」とは、本明細書では、適切な硬化条件に曝露すると本明細書で定義したように硬化又は固化することが可能な材料を意味する。

【０２１２】

硬化性材料は通常、重合及び／又は架橋を経て固化又は硬化する。

【０２１３】

硬化性材料は通常、重合性材料であり、適切な硬化条件又は適切な硬化エネルギー（適切なエネルギー源）に曝露すると重合及び／又は架橋する。或いは、硬化性材料は熱応答性材料であり、温度変化（例えば、加熱又は冷却）に曝露すると硬化又は固化する。場合によっては、硬化性材料は、硬化して固化材料を形成することができる小粒子（例えば、ナノ粒子又はナノクレイ）で形成されている。更に場合によっては、硬化性材料は、生物学的反応（例えば、酵素触媒反応）によって固化材料又は固体材料を形成する反応を経る生物学的材料である。

【０２１４】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、硬化性材料は光重合性材料であって、本明細書に記載のように放射線への曝露時に重合及び／又は架橋する。幾つかの実施形態では、

硬化性材料は紫外線硬化性材料であって、本明細書に記載のように紫外線－可視光線への曝露時に重合又は架橋する。

【０２１５】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、硬化性材料を硬化条件（例えば、放射線、試薬）に曝露すると、鎖伸長、絡み合い及び架橋のいずれか又はその組み合わせによって重合する。架橋は化学的及び／又は物理的となり得る。

【０２１６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、硬化性材料は単官能硬化性材料又は多官能硬化性材料とすることができる。

【０２１７】

本明細書では、単官能硬化性材料は１個の硬化性基、即ち、硬化条件（例えば、放射線、カルシウムイオンの存在）に曝露すると重合、絡み合い及び／又は架橋することが可能な官能基を含む。

【０２１８】

多官能硬化性材料は、２個以上、例えば、２個、３個、４個又はそれ以上の硬化性基を含む。多官能硬化性材料は、例えば、それぞれ２個、３個又は４個の硬化性基を含む二官能、三官能又は四官能硬化性材料とすることができる。

【０２１９】

「硬化性コラーゲン」とは、本明細書に定義の１個以上の硬化性基を有する、本明細書で各実施形態に記載のコラーゲン（ヒト組換えコラーゲン）を意味する。本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、硬化性コラーゲンは、本明細書に定義の複数の硬化性基を含む多官能硬化性材料である。

【０２２０】

本明細書では「硬化性コラーゲン」、「硬化性ｒｈコラーゲン」及び「１個以上の（又は少なくとも１個の）硬化性基を有するｒｈコラーゲン」という用語は交換可能に使用される。

【０２２１】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、硬化性コラーゲンは、本明細書で各実施形態に記載のアミノ酸配列を含み、コラーゲンを形成するアミノ酸残基の少なくとも一部で、好ましくはアミノ酸残基の側鎖の官能基への硬化性基を含む化合物の共有結合によって生成する１個以上（好ましくは複数）の硬化性基を有する。上記の代わりに、又は上記に加え、例えば、硬化性基を含む化合物をアミン又はカルボン酸へ共有結合させることによって、コラーゲンを形成する１個以上のユニットのそれぞれＮ末端及び／又はＣ末端に硬化性基を生成させることができる。

【０２２２】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、本明細書に記載の硬化性コラーゲンの硬化性基の少なくとも一部は架橋性基であり、硬化条件に曝露すると架橋する。

【０２２３】

幾つかの実施形態では、硬化性基はフリーラジカル機構によって重合及び／又は架橋することができる。

【０２２４】

このような硬化性基の例としては、アクリル基、例えば、アクリル酸基、メタクリル酸基、アクリルアミド基及びメタクリルアミド基が挙げられる。他のフリーラジカル硬化性基としては、チオール、ビニルエーテル、及び反応性二重結合を特徴とする他の基を挙げることができる。

【０２２５】

幾つかの実施形態では、硬化性基は、カチオン重合や（カチオン又はアニオン）開環重合等の他の機構によって重合及び／又は架橋することができる。このような硬化性基の例としては、エポキシ含有基、カプロラクタム、カプロラクトン、オキセタン及びビニルエーテルが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２６】
他の硬化性基としては、例えば、官能性カルボン酸とアミン基（各々は他方と反応して架橋する硬化性基である）との間のアミド結合の形成、触媒の存在下及び／又は紫外線への曝露時の重縮合によるイソシアネート基とヒドロキシル基との間のウレタンの形成、及び２個のチオール間のジスルフィド結合の形成が挙げられる。
【０２２７】
他の如何なる硬化性基も企図される。
【０２２８】
硬化性コラーゲンの硬化性基の生成は、本明細書に記載のように、硬化性基を含むか又はその硬化性基を発生可能な材料とコラーゲンに存在する化学適合性官能基とを直接化学反応させる手段によって行うか、又は当技術分野で周知の化学を用いたスペーサー又はリンカーの手段によって行うことができる。例えば、硬化性基と官能基を含む材料をコラーゲンの適合性官能基（例えば、アミノ酸側鎖の官能基）と反応させて、硬化性基がアミノ酸側鎖の置換基となるようにすることができる。
【０２２９】
幾つかの実施形態では、適合性官能基は先ず、コラーゲンの化学基の化学修飾によってコラーゲン内に生成し、反応時に硬化性基を含むか又は生成する材料と反応する。
【０２３０】
硬化性コラーゲンが１個を超える硬化性基を含む場合には、硬化性基は同一であっても異なっていてもよい。
【０２３１】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、本実施形態の硬化性コラーゲン内の硬化性基の少なくとも一部又は全ては、本明細書に記載の照射への曝露時に重合及び／又は架橋することができる光重合性基（例えば、紫外線硬化性基）である。
【０２３２】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、硬化性基は光硬化性基又は光重合性基（例えば、アクリレート又はメタクリレート）である。
【０２３３】
上記の代わりに、又は上記に加え、硬化性基はチオール含有基であり、硬化時にジスルフィド架橋が得られる。
【０２３４】
上記の代わりに、又は上記に加え、硬化性基又は硬化性部分は（ＥＤＣ等のカップリング剤を使用した）結合又は糖化等の化学反応によって硬化する。
【０２３５】
幾つかの実施形態によれば、硬化性基は、硬化時にペプチド結合を形成するアミン及びカルボキシル基を含む。
【０２３６】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、本実施形態の硬化性コラーゲン内の硬化性基の少なくとも一部又は全部は、本明細書で定義したアクリル基である。
【０２３７】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、メタクリルアミド等のアクリル基は、アクリレート又はメタクリレート（例えば、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル又はメタクリルエステル、アクリル又はメタクリル無水物）を（例えば、リジン残基の）アミン官能基と反応させて生成させることができる。
【０２３８】
本発明の実施形態の幾つかによれば、本明細書に記載の硬化性コラーゲン内の硬化性基の数によって硬化の程度（例えば、架橋の程度）を決めることができ、その数を操作して所望の硬化度（例えば、架橋度）を得ることができる。
【０２３９】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、硬化性コラーゲンは、本明細書に記載の

リジン残基との反応によって生成する複数のアクリルアミド又はメタクリルアミド硬化性基を有する。

【０２４０】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、硬化性コラーゲンは、コラーゲン内のリジン残基のアミン基を置換する複数のアクリルアミド又はメタクリルアミド硬化性基を有する。

【０２４１】

幾つかの実施形態では、コラーゲン内のリジン残基の少なくとも５０％、又は少なくとも６０％、又は少なくとも７０％がメタクリルアミド又はアクリルアミド基で置換されている。幾つかの実施形態では、硬化性コラーゲンは、そのリジン残基の７０％～１００％、又は８０％～１００％、又は９０％～１００％（その間の中間値や部分範囲を含む）がメタクリルアミド又はアクリルアミド基で置換されていることを特徴とする。

【０２４２】

本発明の幾つかの実施形態の一様相によれば、本明細書に記載の硬化性ｒｈコラーゲンを調製するプロセスが提供される。このプロセスは、幾つかの実施形態では、本明細書に記載の実施形態に従って、硬化性基を含む材料又は硬化性基を生成する材料をｒｈコラーゲンと反応させて行う。

【０２４３】

ｒｈコラーゲン内の硬化性基の数は、ｒｈコラーゲンと反応して硬化性基を生成させる材料の量を操作して制御することができる。

【０２４４】

幾つかの実施形態では、材料を使用する際には、その材料と反応する各官能基に対してモル過剰で、例えば、ｒｈコラーゲン内の化学適合性官能基（例えば、このような官能基を特徴とするアミノ酸残基）又はｒｈコラーゲンに対して２：１、５：１、１０：１、１５：１、２０：１、３０：１、５０：１、又は例えば、１．１：１～５０：１（その間の中間値や部分範囲を含む）のモル比で使用する。

【０２４５】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、硬化性コラーゲンは、本明細書で各実施形態のいずれか及びそれらの任意の組み合わせに記載の組換えヒトＩ型コラーゲンである。

【０２４６】

モデリング材料配合物：

本明細書に記載の本実施形態によれば、ＡＭ（バイオプリンティングプロセス）中に形成される層の少なくとも１個においては、分注されたモデリング材料配合物は本明細書に記載の生物学的成分又は材料を含み、本明細書に記載のバイオインクと見なされる。

【０２４７】

本実施形態によれば、構築材料は、本明細書で各実施形態のいずれかに記載のように、硬化性組換えヒトコラーゲンを含む少なくとも１種のモデリング材料配合物を含む。このようなモデリング材料配合物は、本明細書ではｒｈコラーゲン含有配合物とも称される。

【０２４８】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、ｒｈコラーゲン含有配合物は担体を更に含み、これらの実施形態の幾つかでは、担体は水性担体である。

【０２４９】

水性担体は水、ｐＨが約４～約１０、又は約６～約８、又は約７～約７．４の範囲であることを特徴とする緩衝液、塩基性水溶液又は酸性水溶液とすることができる。

【０２５０】

水性担体は塩や他の水溶性材料を様々な濃度で含むことができる。幾つかの実施形態では、担体中の塩の濃度は、約０．１ｍＭ～約０．２Ｍ、又は約０．１ｍＭ～約０．１Ｍ、又は約０．１ｍＭ～約１００ｍＭ、又は約０．１ｍＭ～約５０ｍＭ、又は約０．１ｍＭ～約２０ｍＭの範囲（その間の中間値や部分範囲を含む）である。

【０２５１】
幾つかの実施形態では、水性担体は塩を生理学的に許容し得る濃度で含んでおり、配合物が生理学的モル浸透圧濃度付近のモル浸透圧濃度を特徴とするようなっている。
【０２５２】
幾つかの実施形態では、水性担体はリン酸塩、例えば、一塩基性リン酸ナトリウム（NaH_2PO_4）及び／又は二塩基性リン酸ナトリウム（リン酸水素ナトリウム、Na_2HPO_4）を含む。幾つかの実施形態では、リン酸塩の総濃度は約０．１Ｍである。
【０２５３】
幾つかの実施形態では、水性担体はＮａＣｌ又は他の生理学的に許容し得る塩を含む。
【０２５４】
幾つかの実施形態では、水性担体はリン酸緩衝液を含み、幾つかの実施形態では、水性担体は、一塩基性リン酸ナトリウム及び／又は二塩基性リン酸ナトリウムとＮａＣｌを含むリン酸緩衝食塩水を含む。
【０２５５】
リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）は、市販のＰＢＳ（例えば、ＤＰＢＳ）又は望ましいｐＨ及び／又はモル浸透圧濃度を特徴とする特注緩衝液とすることができる。
【０２５６】
例示的な実施形態では、水性担体は、本明細書に記載のリン酸ナトリウム塩を約０．１Ｍの濃度で含み、ＮａＣｌを約０ｍＭ～約２００ｍＭの濃度（その間の中間値や部分範囲を含む）で含むリン酸緩衝液を含む。
【０２５７】
他の如何なる緩衝液も本実施形態の状況で使用可能である。
【０２５８】
本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、水性担体は酸を含む。
【０２５９】
幾つかの実施形態では、酸の濃度は１００ｍＭ未満であり、例えば、０．１ｍＭ～５０ｍＭ、又は０．１ｍＭ～３０ｍＭ、又は０．１ｍＭ～４０ｍＭ、又は０．１ｍＭ～３０ｍＭ、又は１～３０ｍＭ、又は１０～３０Ｍｍ（その間の中間値や部分範囲を含む）とすることができる。
【０２６０】
酸は無機酸（例えば、ＨＣｌ）又は有機酸（好ましくは上述の濃度で水溶性である（例えば、酢酸））とすることができる。
【０２６１】
本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、水性担体は培地を含む。培地は市販の培地又は特注の培地とすることができる。培地は、少なくとも細胞生存を可能にする任意の液体培地とすることができる。このような培地は、例えば、塩、糖、アミノ酸及び鉱物を適切な濃度で様々な添加剤と共に含むことができ、当業者は特定の細胞型に適した培地を決定することができる。このような培地の非限定的な例としては、リン酸緩衝食塩水、ＤＭＥＭ、ＭＥＭ、ＲＰＭＩ１６４０、マッコイ５Ａ培地、培地１９９及びＩＭＤＭ（例えば、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ社（イスラエル国、ベス・ハエメック）、Ｇｉｂｃｏ－Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（米国、ニューヨーク州、グランドアイランド）から入手可能）が挙げられる。
【０２６２】
培地には、様々な抗生物質（例えば、ペニシリンやストレプトマイシン）、増殖因子又はホルモン、特定のアミノ酸（例えば、Ｌ－グルタミン）、サイトカイン等を添加することができる。
【０２６３】
本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、モデリング材料配合物中の硬化性組換えヒトコラーゲンの濃度は０．５ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ、又は０．５ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬ、又は１ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ、又は１ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ、又

は１ｍｇ／ｍＬ～４０ｍｇ／ｍＬ、又は１ｍｇ／ｍＬ～３０ｍｇ／ｍＬ、又は２ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬ、又は５ｍｇ／ｍＬ～１５ｍｇ／ｍＬの範囲（その間の中間値や部分範囲を含む）である。

【０２６４】

モデリング材料配合物中の硬化性ｒｈコラーゲンの濃度は、配合物及び分注時に得られる固化配合物のレオロジー特性に影響を及ぼすことがあり、用いるＡＭ方法及び条件や最終物体又はその一部の所望の特性に応じて操作することができる。

【０２６５】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、ずり減粘挙動を特徴とし、ずり減粘配合物である。

【０２６６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、熱減粘挙動と熱減粘配合物を特徴とする。

【０２６７】

「ずり減粘」という用語は、（せん断歪み下での）せん断力印加時の粘度低下（流動性上昇）に反映される流体材料の特性を表す。本実施形態の幾つかでは、ずり減粘材料は、せん断歪みを約１％から５０％超に上げると、そのずり弾性率が大幅に（例えば、少なくとも１００％）低下するようになる。従って、ずり減粘材料はせん断力依存の粘度プロファイルを示す。

【０２６８】

「熱減粘」という用語は、熱エネルギー印加（温度上昇）時の粘度低下（流動性上昇）に反映される流体材料の特性を表す。本実施形態の幾つかでは、熱減粘材料は５℃の温度上昇時に少なくとも１０％の粘度低下を特徴とする。従って、熱減粘材料は温度依存の粘度プロファイルを示す。

【０２６９】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、ｒｈコラーゲン含有配合物は本明細書に定義のように、ずり減粘配合物と熱減粘配合物の両方である。

【０２７０】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、せん断速度ゼロ、３７℃にて、以下の実施例の項に記載のレオメータを使用して求めた粘度が２，０００センチポアズ以下又は１，５００センチポアズ以下であることを特徴する。

【０２７１】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、せん断速度５１／秒、室温にて、以下の実施例の項に記載のレオメータを使用して求めた粘度が２，０００センチポアズ以下又は１，５００センチポアズ以下であることを特徴とする。

【０２７２】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、硬化性コラーゲンの濃度が少なくとも３ｍｇ／ｍＬ、又は少なくとも５ｍｇ／ｍＬ、例えば、１０ｍｇ／ｍＬの場合に粘度が上述の値であることを特徴とする。

【０２７３】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、３７℃での粘度プロファイルが４℃での粘度プロファイルと同様であることを特徴とする。

【０２７４】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、硬化性ｒｈコラーゲン濃度が同じ場合、せん断速度１～１０［１／秒］で測定した３７℃での粘度が４℃での粘度に比べて少なくとも１０％、又は少なくとも２０％低いことを特徴とする。

【０２７５】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、固化した際に貯蔵弾性率（Ｇ’）が少なくとも１，０００Ｐａであることを特徴とする。

【０２７６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、固化した際に（例えば、本明細書で各実施形態のいずれかに記載の硬化条件に曝露した際に）、その貯蔵弾性率（Ｇ’）が少なくとも１０倍に上昇することを特徴とする。

【０２７７】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物は、固化すると、水性担体内のｒｈコラーゲンの架橋によってヒドロゲル材料を形成する。

【０２７８】

本明細書及び当技術分野では、「ヒドロゲル」という用語は、水を少なくとも２０％、通常は少なくとも５０％、又は少なくとも８０％、最大で約９９．９９％（質量％）含む３次元繊維ネットワークを表す。ヒドロゲルは、殆どが水であるが、液体分散媒内でポリマー鎖（例えば、コラーゲン鎖）によって形成された３次元架橋固体状ネットワークに起因して、固体又は半固体のような挙動を示す材料と見なすことができる。ポリマー鎖は、化学結合（共有結合、水素結合、及びイオン結合／錯体結合／金属結合、通常は共有結合）によって相互連結（架橋）している。

【０２７９】

本明細書全体を通して、ポリマー鎖又はポリマー材料が記載される場合には、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド及び核酸等のポリマー生物学的材料（例えば、高分子）を包含する。

【０２８０】

ヒドロゲルは、柔らかくて脆くて弱いものから硬くて弾力性があり丈夫なものに至る物理的な形態をとり得る。柔らかいヒドロゲルは、弾性及び粘弾性パラメータを含むレオロジーパラメータによって特徴付けられる一方、硬いヒドロゲルは、引張強度パラメータ、弾性率、貯蔵弾性率及び損失弾性率（これらの用語は当技術分野で知られている）によって適切に特徴付けられる。

【０２８１】

ヒドロゲルの柔らかさ／硬さは、特にポリマー鎖の化学組成、「架橋度」（鎖間の相互結合リンクの数）、水性媒体の含有量と組成、及び温度によって支配される。

【０２８２】

本発明の幾つかの実施形態によれば、ヒドロゲルは、主な架橋ネットワークに化学的に結合していない高分子ポリマー要素及び／又は繊維要素を含むこともあるが、むしろ機械的な絡み合い及び／又は浸漬を生じる。このような高分子繊維要素は、（例えば、メッシュ構造のように）織ることができるか又は不織布にすることができ、幾つかの実施形態では、ヒドロゲルの繊維ネットワークの強化材料として機能することができる。このような高分子の非限定的な例としては、ポリカプロラクトン、ゼラチン、ゼラチンメタクリレート、アルギネート、アルギネートメタクリレート、キトサン、キトサンメタクリレート、グリコールキトサン、グリコールキトサンメタクリレート、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ＨＡメタクリレート、及び他の非架橋天然又は合成ポリマー鎖等が挙げられる。上記の代わりに、又は上記に加え、このような高分子は、例えば、架橋剤として作用するか、又はヒドロゲルの３次元ネットワークの一部を形成することによって、ヒドロゲルの主な架橋ネットワークに化学的に結合する。

【０２８３】

幾つかの実施形態では、ヒドロゲルは多孔質であり、幾つかの実施形態では、ヒドロゲル中の細孔の少なくとも一部はナノ細孔であり、平均体積がナノスケール範囲である。

【０２８４】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、ｒｈコラーゲン含有モデリング材料配合物は１種以上の更なる材料、例えば、１種以上の更なる硬化性材料、１種以上の非硬化性材料及び／又は１種以上の生物学的成分又は材料を更に含む。

【０２８５】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、印刷媒体（構築材料）は１種以上の更なる材料、例えば、１種以上の更なる硬化性材料、１種以上の非硬化性材料及び／又は１種

以上の生物学的成分を含む。

【０２８６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、更なる材料はｒｈコラーゲン含有配合物又は１種以上の他のモデリング材料配合物に含まれる。

【０２８７】

ｒｈコラーゲン配合物又は１種以上の他のモデリング材料配合物に含めることができる更なる硬化性材料は、本明細書に定義の任意の硬化性材料とすることができ、生体適合性材料であることが好ましい。

【０２８８】

幾つかの実施形態では、更なる硬化性材料は、本明細書に定義のヒドロゲルであるか又はそれを含み、架橋及び／又は共重合反応が生じる硬化条件に曝露すると、通常は更なる架橋及び／又は共重合によって固化モデリング材料を形成することができる。このような硬化性材料は、本明細書ではヒドロゲル硬化性材料とも称される。

【０２８９】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、硬化性材料は、本明細書に定義のヒドロゲル形成材料であるか又はそれを含み、架橋、重合及び／又は共重合、及び／又は絡み合い反応が生じる硬化条件に曝露すると、通常は架橋、絡み合い、重合及び／又は共重合によって固化モデリング材料としてのヒドロゲルを形成することができる。このような硬化性材料は、本明細書ではヒドロゲル形成硬化性材料又はゲル形成材料とも称される。

【０２９０】

本発明の実施形態によれば、ヒドロゲルは生物起源であってもよく、合成的に調製してもよい。

【０２９１】

本発明の幾つかの実施形態によれば、ヒドロゲルは生体適合性であり、生物学的部分がヒドロゲルに含浸又は蓄積すると生物学的部分の活性が維持される、即ち、生物学的部分の活性の変化が生理学的媒体中の生物学的部分の活性と比較して３０％以下、又は２０％以下、又は１０％以下となる。

【０２９２】

本実施形態に係るヒドロゲルを形成するのに使用可能なポリマー又はコポリマーの例としては、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン及び上述のいずれかのコポリマーが挙げられる。他の例としては、架橋基によって官能化されたか、又は適合性のある架橋剤と組み合わせて使用可能なポリエーテル、ポリウレタン、及びポリ（エチレングリコール）が挙げられる。

【０２９３】

幾つかの具体的で非限定的な例としては、ポリ（２－ビニルピリジン）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（Ｎ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミド）、ポリ（Ｎ－（Ｎ－プロピル）アクリルアミド）、ポリ（メタクリル酸）、ポリ（２－ヒドロキシアクリルアミド）、ポリ（エチレングリコール）アクリレート、ポリ（エチレングリコール）メタクリレート、及びヒアルロン酸、デキストラン、アルギネート、アガロース等の多糖類、及び上述の任意のコポリマーが挙げられる。

【０２９４】

このようなポリマー鎖を形成するヒドロゲル前駆体（ヒドロゲル形成材料）（それらの任意の組み合わせを含む）が企図される。

【０２９５】

ヒドロゲルは通常、二官能性、三官能性又は多官能性のモノマー、オリゴマー又はポリマーで形成されるか又はその存在下で形成され、これらをまとめて、２個、３個又はそれ以上の重合性基を有するヒドロゲル前駆体又はヒドロゲル形成剤又はヒドロゲル形成材料と称する。１個を超える重合性基の存在によって、このような前駆体が架橋可能になり、３次元ネットワークの形成が可能となる。

【０２９６】
架橋性モノマーの例としては、２個又は３個の重合性官能基（これらの内の１個は架橋性官能基と見なすことができる）を有するジアクリレート及びトリアクリレートモノマーのファミリーが挙げられるが、これらに限定されない。ジアクリレートモノマーの例としては、メチレンジアクリレート、及びポリ（エチレングリコール）$_n$ジメタクリレート（ｎＥＧＤＭＡ）のファミリーが挙げられるが、これらに限定されない。トリアクリレートモノマーの例としては、トリメチロールプロパントリアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、トリス（２－ヒドロキシエチル）イソシアヌレートトリアクリレート、イソシアヌル酸トリス（２－アクリロイルオキシエチル）エステル、エトキシル化トリメチロールプロパントリアクリレート、ペンタエリスリチルトリアクリレート及びグリセロールトリアクリレート、ホスフィニリジントリス（オキシエチレン）トリアクリレートが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９７】
本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、硬化性材料は、モノマーであろうとオリゴマーであろうと単官能硬化性材料又は多官能硬化性材料とすることができる。

【０２９８】
本実施形態に係るヒドロゲルを形成するのに使用可能なポリマー又はコポリマーの例としては、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン及び上述のいずれかのコポリマーが挙げられる。他の例としては、架橋基によって官能化されたか、又は適合性のある架橋剤と組み合わせて使用可能なポリエーテル、ポリウレタン、及びポリ（エチレングリコール）が挙げられる。

【０２９９】
幾つかの具体的で非限定的な例としては、ポリ（２－ビニルピリジン）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（Ｎ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミド）、ポリ（Ｎ－（Ｎ－プロピル）アクリルアミド）、ポリ（メタサイクリック酸）、ポリ（２－ヒドロキシアクリルアミド）、ポリ（エチレングリコール）アクリレート、ポリ（エチレングリコール）メタクリレート、及びデキストラン、アルギネート、アガロース等の多糖類、及び上述の任意のコポリマーが挙げられる。

【０３００】
このようなポリマー鎖を形成するヒドロゲル前駆体（ヒドロゲル形成材料）（それらの任意の組み合わせを含む）が企図される。

【０３０１】
バイオプリンティングの分野で使用可能な硬化性材料は、主に動物又はヒト組織から単離できる天然由来の材料、例えば、マトリゲル、アルギネート、ペクチン、キサンタンガム、ゼラチン、キトサン、フィブリン、セルロース及びヒアルロン酸に基づくか、或いは組換えによって生成されたか又は合成的に調製された材料、例えば、ポリエチレングリコール；ＰＥＧ、ゼラチンメタクリレート；ＧｅｌＭＡ、ポリ（プロピレンオキシド）；ＰＰＯ、ポリ（エチレンオキシド）；ＰＥＯ；ＰＥＧ、ポリエチレングリコールジアクリレート、ポリグルタミン酸、ゼラチンメタクリレート；ＧｅｌＭＡ、ＰＬＧＡ／ＰＬＬＡ、ポリ（ジメチルシロキサン）；ナノセルロース；プルロニックＦ１２７、短いジペプチド（ＦＦ）、Ｆｍｏｃ－ＦＦ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ＦＲＧＤ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ＲＧＤＦ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－２－Ｎａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ＦＧ－ＯＨ等のＦｍｏｃ－ペプチド系ヒドロゲル、及びポリカプロラクトン（ＰＣＬ）、ポリ乳酸（ＰＬＡ）又はポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）等の熱可塑性ポリマーに基づく。

【０３０２】
本実施形態の状況で使用可能な硬化性材料の例としては、マトリゲル、ゼラチンメタクリレート（ＧｅｌＭＡ）、ナノセルロース（セルロースナノ結晶（ＣＮＣ）、セルロースナノフィブリル（ＣＮＦ）、及び微生物セルロースとも称される細菌バクテリアセルロース（ＢＣ）等の紫外線硬化可能なナノスケール構造材料）、プルロニック（登録商標）材

料、例えば、低温では流動性があり、臨界ミセル濃度（ＣＭＣ）を超える高温ではゲルを形成するプルロニックＦ１２７及び紫外線硬化可能なプルロニックＦ１２７－ジアクリレート（ＤＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アクリル化ヒアルロン酸（ＡＨＡ）、メタクリル化ヒアルロン酸（ＭＡＨＡ）、ポリ（エチレングリコール）ジアクリレート（ＰＥＧＤＡ）、アルギネート、キサンタンガム、ペクチン、グルタルアルデヒド、ゲニピン又はトリポリリン酸ナトリウム（ＴＰＰ）等の化学剤で架橋できるキトサンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３０３】

例示的な硬化性材料を以下の実施例の項に記載する。

【０３０４】

本明細書に記載の１種以上のモデリング材料配合物に含めることができる生物学的成分又は材料としては、例えば、培養細胞等の細胞成分や、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子等の他の細胞成分が挙げられると共に、他の生物学的成分、例えば、タンパク質や、細胞接着、細胞伸展、細胞増殖、細胞分化及び／又は細胞遊走を高めるように作用する剤、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ＤＮＡ、ＲＮＡ、脂質及び／又はプロテオグリカンが挙げられる。

【０３０５】

細胞は不均一な細胞集団を含んでいてもよく、或いは細胞は均一な細胞集団を含んでいてもよい。このような細胞は、例えば、幹細胞（胚性幹細胞、骨髄幹細胞、臍帯血細胞、間葉系幹細胞、成人組織幹細胞等）、前駆細胞、又は軟骨細胞、骨芽細胞、結合組織細胞（例えば、線維細胞、線維芽細胞及び脂肪細胞）、内皮細胞及び上皮細胞等の分化細胞とすることができる。細胞は未処理であってもよく、遺伝子改変されていてもよい。

【０３０６】

本発明のこの様相の一実施形態によれば、細胞は哺乳動物起源である。

【０３０７】

更に、細胞は分娩後由来細胞（米国特許出願第１０／８８７，０１２号及び第１０／８８７，４４６号に記載）等の自家起源又は非自家起源であってもよい。通常、細胞は所望の用途に応じて選択する。

【０３０８】

使用可能な適切なタンパク質としては、細胞外マトリックスタンパク質［例えば、フィブリノゲン、コラーゲン、フィブロネクチン、ビメンチン、微小管関連タンパク質１Ｄ、神経突起伸長因子（ＮＯＦ）、細菌セルロース（ＢＣ）、ラミニン及びゼラチン］、細胞接着タンパク質［例えば、インテグリン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、ラミニン、細胞間接着分子（ＩＣＡＭ）１、Ｎ－ＣＡＭ、カドヘリン、テネイシン、ギセリン、ＲＧＤペプチド及び神経損傷誘発タンパク質２（ニンジュリン２）］、増殖因子［上皮増殖因子、形質転換増殖因子－α、線維芽細胞増殖因子－酸性、骨形成タンパク質、線維芽細胞増殖因子－塩基性、エリスロポエチン、トロンボポエチン、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子－Ｉ、インスリン様増殖因子－ＩＩ、インターフェロン－β、血小板由来増殖因子、血管内皮増殖因子及びアンジオペプチン］、サイトカイン［例えば、Ｍ－ＣＳＦ、ＩＬ－１β、ＩＬ－８、β－トロンボグロブリン、ＥＭＡＰ－ＩＩ、Ｇ－ＣＳＦ及びＩＬ－１０］、プロテアーゼ［ペプシン、低特異性キモトリプシン、高特異性キモトリプシン、トリプシン、カルボキシペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、プロリン－エンドペプチダーゼ、黄色ブドウ球菌Ｖ８プロテアーゼ、プロテイナーゼＫ（ＰＫ）、アスパラギン酸プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、ＡＤＡＭＴＳ１７、トリプターゼ－γ及びマトリプターゼ－２］及びプロテアーゼ基質が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３０９】

更に、ヒドロキシアパタイト等のリン酸カルシウム材料を、例えば、粒子の形態（ナノＨＡやナノＴＣＰが挙げられるが、これらに限定されない）で使用することができる。粒子径は目詰まりを回避するために分注ヘッドに適合する必要がある。

【０３１０】
本明細書に記載の１種以上のモデリング配合物に含めることができる、本明細書に記載の生物学的材料以外の非硬化性材料は、配合物又は固化配合物及びそれによって形成された物体の一部に特定の特性を付与する材料とすることができる。このような特性は、物理的特性（例えば、透明性や不透明性等の光学的特性、色、スペクトル特性、耐熱性、電気的特性等）、又は粘度、弾性、貯蔵弾性率、損失弾性率、剛性、硬度等の機械的又はレオロジー的特性とすることができる。上記の代わりに、又は上記に加え、非硬化性材料は生物学的機能をもたらすもの、例えば、治療的に活性な薬剤とすることができる。
【０３１１】
非硬化性材料の例としては、チキソトロピー剤、補強材、強化剤、充填剤、着色剤、顔料等が挙げられる。
【０３１２】
非硬化性材料の一例としては、二酸化チタンが挙げられる。
【０３１３】
非硬化性材料の一例としては、酸化セルロースが挙げられる。
【０３１４】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物の１種以上はヒアルロン酸を含む。
【０３１５】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物の１種以上は、本明細書に定義の硬化性基を有するヒアルロン酸を含む。
【０３１６】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物の１種以上は、１種以上の生物学的成分又は材料（例えば、細胞、増殖因子、ペプチド、ヘパラン硫酸及びフィブロネクチンが挙げられるが、これらに限定されない）を含む。
【０３１７】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、モデリング材料配合物の１種以上は、本明細書に記載の配合物及び／又は物体の機械的特性を変更する１種以上の試薬（例えば、アルギネート、ヒアルロン酸、フィブリノゲン、エラスチン、ペプチド及びチキソトロピー剤（例えば、結晶ナノセルロース（ＣＮＣ））、酸化セルロース、二酸化チタン、粘土鉱物及びカーボンナノチューブが挙げられるが、これらに限定されない）を含む。
【０３１８】
本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、ｒｈコラーゲン含有配合物は、本明細書で各実施形態のいずれかに記載の１種以上の更なる硬化性材料を更に含む。
【０３１９】
これらの実施形態の幾つかでは、硬化性組換えヒトコラーゲンと更なる硬化性材料の重量比は、１０：１～１：２、又は１０：１～１：１、又は５：１～２：１の範囲（その間の中間値や部分範囲を含む）である。
【０３２０】
本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、ｒｈコラーゲン含有配合物は本明細書に定義のチキソトロピー剤を更に含む。
【０３２１】
本明細書全体を通して、「チキソトロピー」という用語は、時間依存のずり減粘に反映される流体化合物又は流体材料の特性、即ち、その粘度がせん断力の印加時間と相関して低下し、せん断力の印加を停止すると元の値に戻るという特性を表す。本実施形態の幾つかでは、チキソトロピー材料又はチキソトロピー剤は、５０％歪み下でずり弾性率が大幅に（例えば、少なくとも１００％）低下するようになる。
【０３２２】
本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、ｒｈコラーゲン含有配合物はゲル形成剤、例えば、本明細書に記載のヒドロゲル形成剤を更に含む。

【０３２３】
本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、ｒｈコラーゲン含有配合物は本明細書に記載の生物学的成分又は材料を更に含む。
【０３２４】
本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、ｒｈコラーゲン含有配合物は、本明細書の実施形態のいずれかに記載の、１種以上の硬化性又は非硬化性材料を更に含む。
【０３２５】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、組換えヒトコラーゲンは、以下の実施例の項で示すように単量体コラーゲン及び線維性コラーゲンから選択される。
【０３２６】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、硬化性基とコラーゲンのモル比は、本質的に本明細書の実施例の項で示す通りである。
【０３２７】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、配合物は本明細書に記載のヒアルロン酸を更に含む。
【０３２８】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、配合物は重合性基を特徴とするヒアルロン酸を更に含む。
【０３２９】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、配合物は１種以上の生物学的成分（例えば、細胞、増殖因子、ペプチド、ヘパラン硫酸及びフィブロネクチンから選択される成分が挙げられるが、これに限定されない）を更に含む。
【０３３０】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、配合物は、配合物及び／又は物体の機械的特性を変更する１種以上の試薬（例えば、アルギネート、ヒアルロン酸、フィブリノゲン、エラスチン、ペプチド及びチキソトロピー剤（例えば、結晶ナノセルロース（ＣＮＣ））が挙げられるが、これらに限定されない）を更に含む。
【０３３１】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、配合物は中性ｐＨ（例えば、約６～約８）を特徴とする。
【０３３２】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、配合物は、本質的に本明細書に記載の粘度パラメータを特徴とする。
【０３３３】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、配合物は、４℃及び１０℃を超える温度、又は２０℃を超える温度（例えば、３７℃）で粘度がほぼ同じであることを特徴とする。
【０３３４】
２種以上のモデリング材料配合物を使用する実施形態では、２種以上の配合物は本明細書に記載のｒｈコラーゲン含有配合物であり、そこに含まれる更なる材料の存在、種類及び／又は濃度が互いに異なる。例えば、ある配合物は硬化性ｒｈコラーゲンを含むことができ、他の配合物は硬化性ｒｈコラーゲンと本明細書に記載の生物学的材料を含むことができる。例えば、ある配合物は硬化性ｒｈコラーゲンを含むことができ、他の配合物は硬化性ｒｈコラーゲンと本明細書に記載の更なる硬化性材料を含むことができる。例えば、ある配合物は硬化性ｒｈコラーゲンと更なる硬化性材料を含むことができ、他の配合物は硬化性ｒｈコラーゲンと本明細書に記載の別の更なる硬化性材料を含むことができる。例えば、ある配合物は硬化性ｒｈコラーゲンと更なる硬化性材料を含むことができ、他の配合物は硬化性ｒｈコラーゲンと本明細書に記載の非硬化性材料を含むことができる。他の如何なる組み合わせも企図される。
【０３３５】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、構築材料中の全ての硬化性材料が同じ硬化条件下で硬化する。幾つかの実施形態では、全ての硬化性材料は光硬化性である。

【０３３６】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、硬化性材料を含むモデリング材料配合物は、硬化条件に曝露すると硬化性材料の硬化又は固化を促進する試薬を更に含む。

【０３３７】

試薬の濃度は、硬化性材料の濃度及び所望の硬化度（例えば、所望の架橋度）に応じて決定することができる。

【０３３８】

硬化性材料が光硬化性材料である場合、剤は光開始剤である。光開始剤は硬化機構（例えば、フリーラジカル、カチオン等）に応じて選択する。

【０３３９】

フリーラジカル光開始剤は、紫外線や可視光線等の放射線に曝露するとフリーラジカルを生成し、それによって重合反応を開始する任意の化合物とすることができる。適切な光開始剤の非限定的な例としては、ベンゾフェノン、メチルベンゾフェノン、ミヒラーのケトン及びキサントン等のベンゾフェノン類（芳香族ケトン）、２，４，６－トリメチルベンゾリジフェニルホスフィンオキシド（ＴＭＰＯ）、２，４，６－トリメチルベンゾイルエトキシフェニルホスフィンオキシド（ＴＥＰＯ）及びビスアシルホスフィンオキシド（ＢＡＰＯ）等のアシルホスフィンオキシド型光開始剤、ベンゾイン、ベンゾインメチルエーテル及びベンゾインイソプロピルエーテル等のベンゾイン類及びベンゾインアルキルエーテルが挙げられる。光開始剤の例としては、α－アミノケトン及びビスアシルホスフィンオキシド（ＢＡＰＯ）が挙げられる。

【０３４０】

光開始剤の例としては、Ｉｒｇａｃｕｒｅ（登録商標）ファミリー、リボフラビン、ローズベンガル等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３４１】

フリーラジカル光開始剤は単独で使用してもよく、共開始剤と組み合わせて使用してもよい。共開始剤は、光硬化性フリーラジカル系で活性なラジカルを生成するのに第２の分子を必要とする開始剤と共に使用する。ベンゾフェノンは、フリーラジカルを生成するのにアミン等の第２の分子を必要とする光開始剤の例である。放射線を吸収した後、ベンゾフェノンは水素引き抜きによって三級アミンと反応し、アクリレートの重合を開始するα－アミノラジカルを生成する。共開始剤の種類の非限定的な例としては、トリエチルアミン、メチルジエタノールアミン及びトリエタノールアミン等のアルカノールアミンが挙げられる。

【０３４２】

適切なカチオン性光開始剤としては、例えば、重合を開始するのに十分な紫外線及び／又は可視光線への曝露時に非プロトン酸又はブレンステッド酸を形成する化合物が挙げられる。使用する光開始剤は、単一の化合物、２種以上の活性化合物の混合物、又は２種以上の異なる化合物の組み合わせ、即ち、共開始剤とすることができる。適切なカチオン性光開始剤の非限定的な例としては、アリールジアゾニウム塩、ジアリールヨードニウム塩、トリアリールスルホニウム塩、トリアリールセレノニウム塩等が挙げられる。カチオン性光開始剤の一例はトリアリールスルホニウムヘキサフルオロアンチモネート塩の混合物である。

【０３４３】

適切なカチオン性光開始剤の非限定的な例としては、Ｐ－（オクチルオキシフェニル）フェニルヨードニウムヘキサフルオロアンチモネートＵＶＡＣＵＲＥ１６００（Ｃｙｔｅｃ　Ｃｏｍｐａｎｙ（米国）から入手可能）、Ｉｒｇａｃｕｒｅ２５０又はＩｒｇａｃｕｒｅ２７０として知られるヨードニウム（４－メチルフェニル）（４－（２－メチルプロピル）フェニル）－ヘキサフルオロホスフェート（Ｃｉｂａ　Ｓｐｅｃｉａｌｔｙ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ社（スイス）から入手可能）、ＵＶＩ６９７６及び６９９２として知られ

る混合アリールスルホニウムヘキサフルオロアンチモネート塩（Ｌａｍｂｓｏｎ　Ｆｉｎｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ社（英国）から入手可能）、ＰＣ２５０６として知られているジアリールヨードニウムヘキサフルオロアンチモネート（Ｐｏｌｙｓｅｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ（米国）から入手可能）、Ｒｈｏｄｏｒｓｉｌ（登録商標）Ｐｈｏｔｏｉｎｉｔｉａｔｏｒ２０７４として知られている（トリルクミル）ヨードニウムテトラキス（ペンタフルオロフェニル）ボレート（Ｂｌｕｅｓｔａｒ　Ｓｉｌｉｃｏｎｅｓ社（米国）から入手可能）、Ｔｅｇｏ　ＰＣ１４６６として知られるヨードニウムビス（４－ドデシルフェニル）－（ＯＣ－６－１１）－ヘキサフルオロアンチモネート（Ｅｖｏｎｉｋ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ　ＡＧ（ドイツ）から入手可能）が挙げられる。

【０３４４】

物体：

本明細書全体を通して、バイオプリンティングの観点から、「物体」という用語は、少なくともその一部に生物学的成分を含む積層造形の最終生成物を表す。この用語は、本明細書に記載のバイオプリンティング方法において、未硬化構築材料の一部として支持材料を使用する場合には、支持材料を除去した後に得られる生成物を意味する。

【０３４５】

本明細書全体で使用される「物体」という用語は、物体全体又はその一部を意味する。

【０３４６】

本実施形態の状況では、物体はその少なくとも一部にコラーゲン系材料を含む。

【０３４７】

「コラーゲン系材料」とは、コラーゲンを含む材料、好ましくは、本明細書で各実施形態のいずれか及びその任意の組み合わせに記載の組換えヒトコラーゲンを含む材料を意味する。

【０３４８】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、コラーゲン系材料は足場、例えば、本明細書に記載の組換えヒトコラーゲンを含む３次元線維性ネットワークで形成されたヒドロゲル足場を含む。

【０３４９】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、コラーゲン系材料は、複数の単量体及び／又は線維性コラーゲンユニットが互いに連結して３次元ネットワークを形成している重合及び／又は架橋組換えヒトコラーゲンを含む。

【０３５０】

３次元ネットワーク又は足場は、所望の必要性に応じて、例えば、フィルム、スポンジ、多孔質構造、ヒドロゲル、及び他の任意の形態とすることができる。

【０３５１】

本明細書に記載の実施形態の幾つかでは、物体は組織又は器官の形態であり、少なくともその一部に本明細書に記載のコラーゲン系材料を含む。このような物体は、本明細書に記載の硬化性コラーゲンに加えて、本明細書に記載の更なる硬化性材料及び生物学的材料を使用して、所望の器官又は組織の各３Ｄ印刷データに従って組み立てることができる。

【０３５２】

幾つかの実施形態では、物体は移植可能な物体である。幾つかの実施形態では、物体は人工皮膚である。幾つかの実施形態では、物体は人工組織（例えば、結合組織、又は心臓組織や膵臓組織等の筋組織）である。結合組織の例としては、軟骨（弾性軟骨、硝子軟骨、及び線維軟骨等）、脂肪組織、網状結合組織、胚性結合組織（間葉系結合組織及び粘液結合組織等）、腱、靭帯及び骨が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３５３】

幾つかの実施形態では、物体は人工器官又は人工組織の構築に使用可能であるか又は構築用である。

【０３５４】

物体は、本明細書で各実施形態のいずれかに記載の更なる硬化性材料の１種以上、本明

細書で各実施形態のいずれかに記載の生物学的成分又は材料、及び／又は本明細書で各実施形態のいずれかに記載の非硬化性材料で形成された固化材料を更に含むことができる。

【０３５５】

幾つかの実施形態では、物体は、研究又は治療用途、例えば、損傷組織の修復（例えば、損傷組織への培養細胞の播種時）又は創傷治癒に使用可能なコラーゲン足場又はフィルムの形態である。

【０３５６】

足場をそれを必要とする対象に施して、結合組織等の組織、心臓組織や膵臓組織等の筋組織を再生することができる。

【０３５７】

フィルムを使用して生物医学装置、例えば、血液透析用のコラーゲン膜等を構築することができる。

【０３５８】

幾つかの実施形態によれば、フィルム又は足場を細胞培養で使用することができる。

【０３５９】

本明細書で使用する「細胞培養」又は「培養」という語句は、人工、例えば、インビトロ環境での細胞の維持を意味する。しかし、「細胞培養」という用語は一般用語であり、個々の原核生物（例えば、細菌）又は真核生物（例えば、動物、植物及び真菌）の細胞の培養のみならず、組織、器官、器官系又は生物全体の培養をも含むように使用可能であることを理解されたい。

【０３６０】

幾つかの実施形態では、フィルム又は足場を創傷治癒プロセスで使用することができる。

【０３６１】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載のコラーゲンフィルムを使用して、腱損傷後の癒着を防止したり、上眼瞼挙筋の眼科手術を延ばしたり、切断神経を修復したりする。更に、本明細書に記載のコラーゲンフィルムを火傷包帯や骨欠損の治癒に使用することができる。

【０３６２】

本実施形態の目的は無数の他の用途を含み、例えば、間質性膀胱炎、強皮症、関節リウマチ美容整形等の疾患の治療用途、火傷患者の治癒補助としての用途、創傷治癒剤としての用途、皮膚充填剤としての用途、脊椎固定手順用の用途、尿道膨張用の用途、硬膜形成手順での用途、骨再構築用の用途、及び様々な歯科、整形外科及び手術目的の用途が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３６３】

キット：

本発明の幾つかの実施形態の一様相によれば、本明細書で各実施形態のいずれかに記載の硬化性ｒｈコラーゲンを含むキットが提供される。

【０３６４】

幾つかの実施形態によれば、キットは、本明細書において実施形態のいずれかに記載の硬化性ｒｈコラーゲンを含む組成物を含む。

【０３６５】

幾つかの実施形態によれば、組成物は凍結乾燥形態の硬化性ｒｈコラーゲンを含む。

【０３６６】

幾つかの実施形態によれば、組成物は硬化性ｒｈコラーゲンと水溶液又は水性担体を含む。

【０３６７】

本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、キットは、本明細書で各実施形態のいずれかに記載の物体の積層造形（例えば、バイオプリンティング）用のモデリング材料配合物として使用するのに特定されるか、又は使用可能である。

【０３６８】
本明細書に記載の実施形態の幾つかによれば、キットは、本明細書において実施形態のいずれかに記載のように、水性担体を更に含む。幾つかの実施形態では、組成物と水性担体をキット内で個別にパッケージする。
【０３６９】
或いは、キットは、組成物を水性担体と混合して本明細書に記載のモデリング材料配合物を調製するための説明書を含む。
【０３７０】
本願から成熟する特許の存続期間中に、多くの関連する硬化性生体適合性材料、バイオプリンティング媒体、及び／又はバイオプリンティング技術が開発されることが予想される。硬化性生体適合性材料、バイオプリンティング媒体、及び／又はバイオプリンティング技術に関する実施形態の範囲は、このような新技術を全て先験的に包含することを意図する。
【０３７１】
本明細書で使用する「約」という用語は、±１０％又は±５％を意味する。
【０３７２】
「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含んでいる（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含んでいる（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」という用語及びその活用形は「含んでいるが、それに限定されない」ことを意味する。
【０３７３】
「～から成る」という用語は「含んでおり、それに限定される」ことを意味する。
【０３７４】
「～から本質的に成る」という用語は、組成物、方法又は構造が追加の成分、段階及び／又は部分を含み得ることを意味するが、これは、追加の成分、段階及び／又は部分が、請求項に記載の組成物、方法又は構造の基本的且つ新規な特性を実質的に変更しない場合に限られる。
【０３７５】
本明細書で使用する、単数形を表す「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、文脈が明らかに他を示さない限り、複数も対象とする。例えば、「化合物（ａ　ｃｏｍｐｏｕｎｄ）」又は「少なくとも１種の化合物」という用語の場合には、複数の化合物が含まれ、それらの混合物も含み得る。
【０３７６】
本願全体を通して、本発明の様々な実施形態は範囲形式にて示すことができる。範囲形式での記載は、単に利便性や簡潔さのためであり、本発明の範囲の柔軟性を欠く制限ではないことを理解されたい。従って、範囲の記載は可能な部分範囲の全て、及びその範囲内の個々の数値を具体的に開示していると考えるべきである。例えば、１～６のような範囲の記載は、１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６等の部分範囲だけでなく、その範囲内の個々の数値、例えば、１、２、３、４、５及び６も具体的に開示していると考えるべきである。これは範囲の大きさに関わらず適用される。
【０３７７】
本明細書において数値範囲を示す場合、それは示される範囲内の任意の引用数（分数又は整数）を含むことを意図する。第１の指示数と第２の指示数「との間の範囲」という表現と、第１の指示数「から」第２の指示数「までの範囲」という表現は、本明細書で交換可能に使用され、第１の指示数及び第２の指示数と、それらの間の分数及び整数の全てを含むことを意図する。
【０３７８】
本明細書で使用する「方法」という用語は、所定の課題を達成するための様式、手段、技術及び手順を意味し、化学、薬理学、生物学、生化学及び医療の各分野の従事者に既知のもの、又は既知の様式、手段、技術及び手順から従事者が容易に開発できるものが含ま

れるが、これらに限定されない。

【０３７９】

本明細書で使用する「治療する」という用語は、病態の進行の抑止、実質的な阻害、遅延又は逆転、病態の臨床的又は審美的症状の実質的な寛解、或いは病態の臨床的又は審美的症状の出現の実質的な予防を包含する。

【０３８０】

明確さのために別々の実施形態に関連して記載された本発明の複数の特徴は、単一の実施形態において、これらの特徴を組み合わせても提供できることを理解されたい。逆に、簡潔さのために単一の実施形態に関連して記載された本発明の複数の特徴は、別々に提供してもよく、又は任意の適切な部分的な組み合わせにおいて提供してもよく、本発明の他に記載された実施形態において適切に提供してもよい。様々な実施形態に関連して記載される複数の特徴は、その要素なしで実施形態が不作用ではない限り、その実施形態の本質的な特徴であると見なしてはならない。

【０３８１】

上述のように本明細書に記載され、後述の特許請求の範囲で請求される本発明の様々な実施形態及び様相は、以下の実施例によって実験的に支持される。

【実施例】

【０３８２】

ここで、以下の実施例を参照するが、これらの実施例は、上述の記載と共に本発明の幾つかの実施形態を非限定的に説明するものである。

【０３８３】

材料：

トランスジェニックタバコ植物から発現及び単離されたヒト組換えコラーゲン（ｒｈコラーゲン）Ｉ型は、ＣｏｌｌＰｌａｎｔ　Ｌｔｄ（イスラエル）によって生産且つ供給された。

【０３８４】

Ｉ型ウシコラーゲン（ＰｕｒｅＣｏｌ（登録商標））とウシ系メタクリル化コラーゲンはＡｄｖａｎｃｅｄ　Ｂｉｏｍａｔｒｉｘ社（米国）から購入した。

【０３８５】

無水メタクリル酸、メタクリル酸グリシジル、トリエチルアミン、臭化テトラブチルアンモニウム、２，４，６－トリニトロベンゼンスルホン酸（ＴＮＢＳ）、２－ヒドロキシ－４’－（２－ヒドロキシエトキシ）－２－メチルプロピオフェノン（Ｉｒｇａｃｕｒｅ２９５９）、一塩基性リン酸ナトリウム無水物、ＨＣｌ　１Ｎ、ＨＣｌ≧３７％、重炭酸ナトリウム、二酸化チタン（TiO_2）、Ｈｅｐｅｓ緩衝液、エオシンＹ、Ｎ－ビニルピロリドン及びＮａＯＨは、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｌｔｄ（イスラエル）から購入した。

【０３８６】

ダルベッコリン酸緩衝食塩水（ＤＰＢＳ）、×１０ＤＰＢＳ、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、ＤＭＥＭ高グルコース及びペニシリン／ストレプトミシンは、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ　Ｌｔｄ（イスラエル）から購入した。

【０３８７】

二塩基性リン酸ナトリウム無水物はＣａｎｔｏｎ社（インド）から購入した。

【０３８８】

無水エタノールとアセトンはＢｉｏ－Ｌａｂ　Ｌｔｄ（イスラエル）から購入した。

【０３８９】

ヒアルロン酸はＬｉｆｅｃｏｒｅ社（米国）で購入した。

【０３９０】

酢酸はＪＴ　Ｂａｋｅｒ社又はＡｄｖａｎｃｅｄ　Ｂｉｏｍｅｔｒｉｘ社から購入した。

【０３９１】

酸化セルロースはＳｙｎｔｈｅｓｉａ社から受け取った。

【０３９２】

ＰＶＡＭＡ（ポリビニルアルコールメタクリレート）はＳｈｏｓｅｙｏｖ教授から提供された。

【０３９３】

ＴＥＡ（トリエタノールアミン）はＪ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ社から購入した。

【０３９４】

ナノヒドロキシアパタイト（ナノＨＡ）とナノリン酸三カルシウム（ナノＴＣＰ）はＦｌｕｉｄｉｎｏｖａ社から購入した。

【０３９５】

緩衝原液の調製：

原線維形成緩衝液（ＦＢ）：二塩基性リン酸ナトリウムを再蒸留水（ＤＤＷ）に溶解して最終濃度を１６２ｍＭとした。溶液を１０Ｎ　ＮａＯＨでｐＨ１１．２に調整した。

【０３９６】

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

【０３９７】

リン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（０．０１６Ｍ）の調製（３００ｍＯｓ／Ｌ）：１Ｍリン酸緩衝液を次のように調製した。３１．６ｍＬの１Ｍ二塩基性リン酸ナトリウムを６８．４ｍＬの１Ｍ一塩基性リン酸ナトリウムと混合した。得られた１Ｍリン酸緩衝液にＤＤＷ（９：１、ｖｏｌ／ｖｏｌ）を添加して０．１Ｍに希釈した。ＮａＣｌを添加して最終濃度を１５．８ｍＭとし、生理学的モル浸透圧濃度（３００ｍＯｓ／Ｌ）を得た。

【０３９８】

リン酸緩衝液（０．１Ｍ；ｐＨ７．４）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）（生理学的モル浸透圧濃度）の調製：１Ｍリン酸緩衝液は次のように調製した。７７．４ｍＬの１Ｍ二塩基性リン酸ナトリウムを２２．６ｍＬの１Ｍ一塩基性リン酸ナトリウムと混合した。得られた１Ｍリン酸緩衝液にＤＤＷ（９：１、ｖｏｌ／ｖｏｌ）を添加して０．１Ｍに希釈した。ＮａＣｌを添加して最終濃度を１１．３ｍＭとし、生理学的モル浸透圧濃度（３００ｍＯｓ／Ｌ）を得た。

【０３９９】

洗浄緩衝液：ＨＣｌを原線維形成緩衝液に添加して、二塩基性リン酸ナトリウムの最終濃度を１６．２ｍＭ、ＨＣｌの最終濃度を１０ｍＭとした。１０Ｎ　ＮａＯＨでｐＨを７．２～７．４に調整した。

【０４００】

機器データ：

^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトルはＢｒｕｋｅｒ　ＡｖａｎｃｅＩＩ分光計（１Ｈ共振周波数：５００ＭＨｚ、使用溶媒：D_2O）によって２５℃で記録した。分析は、ＳＮ比を平均するための６４回のスキャンと８．６秒のリサイクル遅延を用いた定量ＮＭＲで行った。得られた値はｐｐｍ（標準化学シフト）δで表す。

【０４０１】

粘度とＧ’／Ｇ”の測定は、Ｃ６０／１°Ｔｉ又はＣ３５／１°Ｔｉコーンプレートのセットアップを用い、温度制御セルチャンバを備えたＨＡＡＫＥ　ＲｈｅｏＳｔｒｅｓｓ６００レオメータ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）で行った。架橋（固化）ディスクの分析は、ＰＰ２０鋸歯状スピンドルと２０ｍｍ鋸歯状プレートのセットアップを用いて行った。

【０４０２】

紫外線チャンバを備えたＴＡディスカバリーハイブリッド温度制御レオメータによってin situ架橋実験を行った。

【０４０３】
他の測定は以下に説明するように行った。
【０４０４】
［実施例１］
ｒｈコラーゲンのメタクリル化
線維性ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドと単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドの調製は、コラーゲンのリジン及びヒドロキシリジン残基を無水メタクリル酸と後述の水性媒体中で反応させて行い、次に使用するまで光保護して４℃で保存した。
【０４０５】
線維性ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド：
本明細書に記載の１×洗浄緩衝液、本明細書に記載の原線維形成緩衝液又はＤＤＷ中、室温（Ｒ．Ｔ．）又は１２℃で３～１０ｍｇ／ｍＬの線維性ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド（ｒｈコラーゲン－ＭＡ）を合成した。
【０４０６】
例示的な手順では、線維性ｒｈコラーゲン－ＭＡをＤＤＷ中で次のように合成した。３～４ｍｇ／ｍＬの単量体ｒｈコラーゲンの１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液（Ｃｏｌｌａｇｅ（商標））を原線維形成緩衝液と９：１のｖ／ｖ比で混合し、室温で１時間攪拌して原線維を得た。この溶液を７５００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離した後、上清を廃棄した。残ったペレットを同量の洗浄緩衝液に再懸濁させ、同じ条件で遠心分離した。その後、沈殿した原線維をＤＤＷに再懸濁させて１０ｍｇ／ｍＬの溶液を得た。％固体測定値で濃度を確認した。窒素流下、室温でコラーゲンリジンに対して１０～２０モル比（１０～２０倍）で無水メタクリル酸を滴下し、反応溶液のｐＨを経時的にモニターし、１０Ｎ　ＮａＯＨでｐＨ７に調整した。２４時間の反応後、１００ｋＤａカットオフ透析チューブ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ、米国カリフォルニア州）を使用し、４℃で３日間、混合物を洗浄緩衝液（ｐＨ＝７）に対して透析し、透析液（この場合は洗浄緩衝液）を少なくとも６回交換して反応副産物を除去した後、３～４日間凍結乾燥させた。
【０４０７】
ｒｈコラーゲンの修飾の程度は、ＴＮＢＳ（２，４，６－トリニトロベンゼンスルホン酸）比色アッセイによって定量化した。このアッセイでは、リジンとヒドロキシルリジンに由来する遊離未反応のε－アミノ基のモル含有量とそれに応じた官能化の程度を定量化する。
【０４０８】
このアッセイは、前述のプロトコル［Sashidhar et al., Journal of Immunological Methods.1994, 167, 121-127］に従い、Ｈａｂｅｅｂ［Habeeb A.F.S.A, Analytical Biochemistry. 1966, 14, 328-336］に基づいて行った。即ち、新しく調製した０．４ｍＬの０．０１％（ｖ／ｖ）ＴＮＢＳを０．４ｍＬの０．１～２ｍｇ／ｍＬ線維性ｒｈコラーゲン－ＭＡ４％重炭酸ナトリウム溶液に添加した。４０℃で２時間反応させた後、０．２ｍＬの１Ｎ　ＨＣｌと０．４ｍＬの１０％（ｖ／ｖ）ＳＤＳを添加した。吸光度の測定は分光光度計にて１ｍＬポリスチレンキュベット中３３５ｎｍで行った。ｒｈコラーゲン－ＭＡ溶液の代わりに重炭酸ナトリウム緩衝液を添加したこと以外は同じ手順で対照（ブランク）を調製した。同じ条件で調製した１～２ｍｇ／ｍＬの天然線維性ｒｈコラーゲンの吸収を較正用に記録した。
【０４０９】
以下の表１には、線維性ｒｈコラーゲンを１０倍、１５倍又は２０倍モル比の無水メタクリル酸と反応させて得たバッチの官能化度について得たデータ（ＴＮＢＳアッセイで測定）を示す。
【０４１０】

【表２】

表１

ＭＡ：線維性ｒｈコラーゲンモル比	メタクリル化度［％］
１０：１	９８．１
１５：１	９５．５
２０：１	９２．９

【０４１１】

これらの結果から、全てのＭＡ濃度で線維性ｒｈコラーゲンの修飾度が高いことが分かり、線維性ｒｈコラーゲンの官能化を最大にするには１０：１のモル比でメタクリル試薬を添加するのが好ましいことが示唆される。

【０４１２】

単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド：

単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドの合成は、２００ｍＭのＭＯＰＳ、リン酸又はＴｒｉｓ緩衝液を使用し、１５０ｍＭのＮａＣｌを添加して行った。

【０４１３】

例示的な手順では、２００ｍＭのＭＯＰＳと１５０ｍＭのＮａＣｌを３～４ｍｇ／ｍＬのｃｏｌｌａｇｅ（商標）（単量体ｒｈコラーゲンの１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液）に添加し、この溶液を透明な溶液が得られるまで室温で撹拌した。その後、１～２０倍モル比の過剰の無水メタクリル酸を窒素流下、１２℃で滴下し、１０Ｎ　ＮａＯＨで経時的にｐＨ７に調整した。２４時間の反応後、混合物を最初に１００ｋＤａカットオフ透析中空繊維カートリッジ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して１０ｍＭ　ＨＣｌ／２０ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ＝２）に対して透析し、透析液を少なくとも５回交換し、その後１０ｍＭ　ＨＣｌに対して透析した。次に、材料を凍結乾燥させた。

【０４１４】

非修飾単量体ｒｈコラーゲンの構造的特性とｒｈコラーゲンのコラーゲンリジンアミンのメタクリル化（本明細書ではＣｏｌｌ－ＭＡとも称される）の程度を^{1}Ｈ－ＮＭＲ分光法（５００ＭＨｚ）によって解析した。１０倍モル過剰の無水メタクリル酸で合成したＣｏｌｌ－ＭＡの代表的なスペクトルを図１に示す。導入したメタクリレートのメチル官能基とアクリルプロトンのシグナルをそれぞれ（ｂ）と（ｃ）に示し、非修飾ｒｈコラーゲンのリジンメチレンシグナルを（ａ）に示す。

【０４１５】

非修飾ｒｈコラーゲンのスペクトルは、文献［R. Ravichandran et.al; J. Mater. Chem. B, 2016, 4, 318-326］で報告されているコラーゲンスペクトルと高度に一致していた。

【０４１６】

メタクリル化の程度は、定量分析技術を用いて得たスペクトルから計算することができる。δ＝３ｐｐｍのシグナル（ａ）はコラーゲンのリジンメチレン基に起因し、メタクリル化後に大幅に減少した。非修飾ｒｈコラーゲンと比較して、Ｃｏｌｌ－ＭＡのスペクトルでは１．９ｐｐｍ（ｂ）と５．４～５．７ｐｐｍ（ｃ）に新しいシグナル（それぞれ導入したメタクリル基のメチル官能基とアクリルプロトンに帰属する）が観察され、これによってコラーゲンへのメタクリレートの結合が成功したことが確認される。

【０４１７】

［実施例２］

ｒｈ－コラーゲンとｒｈ－コラーゲン－ＭＡの粘度測定

粘度測定用の溶液の調製：

ＤＰＢＳ中のＰｕｒｅＣｏｌ（登録商標）とＣｏｌｌａｇｅ（商標）：８ｍＬの単量体コラーゲン溶液（３ｍｇ／ｍＬの１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液）とｒｈコラーゲン（Ｃｏｌｌａ

ｇｅ（商標））又はウシコラーゲン（ＰｕｒｅＣｏｌ（登録商標））を１ｍＬのＤＰＢＳ×１０を添加して中和した。次に、溶液を０．１Ｎ　ＮａＯＨでｐＨ７～７．５に調整した。その後、再蒸留水（ＤＤＷ）を添加して最終体積を１０ｍＬとした。試料を３７℃で少なくとも９０分間インキュベートした後、（３７℃又は４℃で）測定を行った。

【０４１８】

原線維形成緩衝液中のＣｏｌｌａｇｅ（商標）：９ｍＬの単量体ｒｈコラーゲン（Ｃｏｌｌａｇｅ（商標））溶液（３．７９ｍｇ／ｍＬの１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液）を１ｍＬの原線維形成緩衝液を添加して中和した。試料を３７℃で少なくとも９０分間インキュベートした後、（３７℃又は４℃で）測定を行った。

【０４１９】

ＤＰＢＳ中の線維性ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド：ＤＤＷにて調製し、洗浄緩衝液（上述の実施例１に記載、モル比１０：１のＭＡ：ｒｈコラーゲンを使用）に対して透析した凍結乾燥線維性ｒｈコラーゲン－ＭＡをＤＰＢＳに溶解し、１０ｍｇ／ｍＬの濃度とした。試料を３７℃で少なくとも９０分間インキュベートした後、（３７℃又は４℃で）測定を行った。

【０４２０】

酢酸中の単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド：１０ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－メタクリルアミドの２０ｍＭ酢酸溶液の調製は、適切量の媒体を凍結乾燥材料に添加し、完全に溶解するまで室温で混合して行った。

【０４２１】

酢酸中のウシコラーゲン－メタクリレート：１０ｍｇ／ｍｌのウシコラーゲン－メタクリレートの２０ｍＭ酢酸溶液の調製は、適切量の媒体（Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＢｉｏＭａｔｒｉｘ社）を凍結乾燥材料に添加し、完全に溶解するまで室温で混合して行った。

【０４２２】

ｒｈコラーゲン／ウシコラーゲン粘度の温度依存性：

図２は、せん断速度の関数として表されるＤＰＢＳ中のｒｈコラーゲン（Ｃｏｌｌａｇｅ（商標））とウシコラーゲン（ＰｕｒｅＣｏｌ）の粘度を示す比較プロットであり、Ｔ＝４℃（青、それぞれ破線と実線）及びＴ＝３７℃（赤、それぞれ破線と実線）でのプロットである。ウシコラーゲン（実線）は、せん断速度ゼロ粘度（η_0）の明確な温度依存性（即ち、低せん断速度値での粘度プラトー）を示しており、３７℃（赤）でのη_0値が４℃（青）での値に比べて１桁以上高い。これに対して、ｒｈコラーゲン（破線）では４℃と３７℃でのη_0値に有意差が示されていない。

【０４２３】

図３は、上述のように調製した、ＦＢで中和されたｒｈコラーゲンの粘度を示す比較プロットであり、非常に類似した挙動を示す（即ち、４℃と３７℃での粘度は、全てのせん断速度でほぼ同一である）。

【０４２４】

ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドの粘度：

図４は、４℃（青線）及び３７℃（赤線）でのＤＰＢＳ中の線維状ｒｈコラーゲン－ＭＡの粘度を示す比較プロットであり、プロファイルは類似している（両方ともずり減粘である）が同一ではないことを示しており、ゼロせん断速度値は両方の温度で約１０００ｃＰである。

【０４２５】

図５は、ウシ系メタクリル化硬化性コラーゲンについて示された温度上昇に伴う粘度の上昇と比較した、熱安定性と、より重要な、高い作業温度（例えば、噴射温度）の範囲内での粘度の低下を示す比較プロットである。粘度測定は、温度ステップを上げて、１０ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡの２０ｍＭ酢酸溶液（青）とウシ系硬化性コラーゲンの酢酸溶液（赤）について行い、速度５［ｌ／秒］の回転温度ステップＣＲモードを用いたレオメータにて記録した。酢酸溶液は上述のように調製した。

【０４２６】

［実施例３］
固化ｒｈコラーゲン－ＭＡの特徴付け
損失弾性率と貯蔵弾性率を測定するためのｒｈコラーゲン－ＭＡの光架橋：
ｒｈコラーゲン－ＭＡ架橋足場は、２種の個別実験で調べることを目的として、２種の異なる調合でそれぞれ形成した。
【０４２７】
光開始剤１０％（ｖ／ｖ）原液を次のように調製した。Ｉｒｇａｃｕｒｅ２９５９を無水エタノール／ＤＤＷの１：１溶液に溶解し、最終濃度を１００ｍｇ／ｍＬとした。
【０４２８】
第１の調合の場合、１０倍モル過剰のメタクリル試薬を用いて合成した１～２重量％の線維性ｒｈコラーゲン－ＭＡを室温で０．１ＭのＤＰＢＳに溶解した後、０．１％Ｉｒｇａｃｕｒｅ２９５９を最終量１ｍＬの溶液複製物に添加し、これをディスク状の型に注入した。その後、水銀光源を使用し、６７０ｍＷ／ｃｍ^{2}の平均強度で１．５ｃｍの距離から７秒間及び１０秒間硬化プロセスを行い、架橋足場を得た。
【０４２９】
第２の調合には、１５倍及び２０倍モル過剰のメタクリル試薬を用いて合成した２種の異なるバッチの線維性ｒｈコラーゲン－ＭＡが含まれていた。１～２重量％を０．１ＭのＤＰＢＳに溶解し、０．１％Ｉｒｇａｃｕｒｅ２９５９を添加して最終体積を１．５ｍＬとした。高度架橋の足場を得るため、水銀光源を使用し、４２０ｍＷ／ｃｍ^{2}の平均強度で２ｃｍの距離から６０秒間硬化プロセスを行った。
【０４３０】
足場の貯蔵弾性率と損失弾性率の測定：
ｒｈコラーゲン架橋ディスクのレオロジー挙動を、ＰＰ２０鋸歯状スピンドルと２０ｍｍ鋸歯状プレートのセットアップを用いた平行プレートシステムによって調べた。Ｃ６０／１°Ｔｉコーンプレート要素を使用して、非架橋ｒｈコラーゲン－ＭＡの特徴付けを行った。
【０４３１】
ｒｈコラーゲン－ＭＡのレオロジー挙動を評価するため、２セットの実験を個別に行った。
【０４３２】
第１のセットでは、３７℃での経時的な振動解析を行ったが、それを図６のＡ及びＢに示す。１ｍＬの試料に制御応力モードで振動力を印加しながら、周波数を１Ｈｚとし、３７℃で３００秒間に亘って５Ｐａのせん断応力を印加した。図６Ａは、紫外線硬化前の損失弾性率／貯蔵弾性率（Ｇ’／Ｇ”）とｔａｎ（デルタ）値を示し、図６Ｂは光硬化曝露後（光開始剤を添加した架橋による硬化後）のこれらの値を示す。ギャップを元の試料の高さの９０％に調整して硬化試料（１ｍｌディスク）を試験した。Ｇ’とＧ”の値は全ての測定で１５０～３００秒の範囲で平均化された。
【０４３３】
この結果から、光開始剤の存在下での照射（照射による硬化）によってｒｈコラーゲン－ＭＡの貯蔵弾性率が２倍上昇することが分かる。更に、この結果から、ｒｈコラーゲン－ＭＡの濃度と照射時間（照射；硬化条件への曝露）を変えることによって足場特性を制御できることが分かる。架橋ディスクのＧ’値とＧ”値の大きな差、及びゼロに近いｔａｎ（デルタ）値は弾性に似た挙動を示す。
【０４３４】
第２のセットでは、１．５ｍＬの硬化（架橋）ディスクを３７℃の周波数掃引下で振動を印加して特徴付けを行った。Ｇ’は０．０１～１００Ｈｚの周波数範囲にて１Ｐａのせん断応力下で記録した。測定を開始するため、スピンドルを下げてヒドロゲル表面に接触させた後、機器の軸方向の力が０．４Ｎと等しくなるまで更に下げた。
【０４３５】
全ての測定を行う前に、湿度蓋で覆われたプレート上に試料を1分間保持して温度平衡

に到達させた。

【０４３６】

結果を図７に示すが、この結果から、６０秒間の照射を行った１．５ｍＬディスクでは、Ｇ’値がより高いことが分かる。ｒｈコラーゲン－ＭＡ濃度の上昇及びメタクリル化の程度の上昇と共にＧ’値が上昇するが、これは足場特性を制御できることを示す。

【０４３７】

ｒｈコラーゲン－ＭＡのｉｎ　ｓｉｔｕ架橋：

適切量の媒体を凍結乾燥材料に添加して１５ｍｇ／ｍｌの単量体ｒｈコラーゲン－ＭＡの１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液を調製し、完全に溶解した後、０．１％のＩｒｇａｃｕｒｅ光開始剤を各複製物に添加した。

【０４３８】

歪み７％及び角周波数５ｒａｄ／秒を用い、２５℃で経時的に振動力を印加してｒｈコラーゲン－ＭＡのｉｎ　ｓｉｔｕ架橋を試験した。８０μｌの溶液を２０ｍｍの平行プレートジオメトリーに置き、Ｇ’と複合粘度特性を先ず測定した後に上述の架橋を行った。その後、外部紫外線３６５ｎｍ光源を導入し、プレート上で架橋反応中に試料の特性を経時的に記録した。

【０４３９】

結果を図８に示す。図８に示すように、試験した特性が短時間で直ちに急激に上昇することが観察され、３０秒経たずにプラトーに達し、配合物の良好な硬化性が示された。６０秒間硬化した後、光源をオフにし、硬化後も経時的に値を測定し続けたが、同様の値を示し、安定性が示された。

【０４４０】

［実施例４］

様々な培地及び／又は様々な添加剤を用いたｒｈコラーゲン－ＭＡ配合物の特徴付け

ＤＭＥＭ配合物の調製：

ＤＭＥＭ中のｒｈコラーゲン－メタクリルアミド：凍結乾燥した線維性ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド（上述の実施例１に記載のように調製、モル比１５：１のＭＡ：ｒｈコラーゲンを使用）をＤＭＥＭ培地に溶解し、最終濃度を２０ｍｇ／ｍＬ及び２６ｍｇ／ｍＬとした。

【０４４１】

ＤＭＥＭ中のｒｈコラーゲン－メタクリルアミド／ヒアルロン酸：ヒアルロン酸を線維性ｒｈコラーゲン－ＭＡの溶液に添加して、ＤＭＥＭ培地でのＨＡの最終濃度を１０ｍｇ／ｍＬとし、ｒｈコラーゲン－ＭＡの最終濃度を２０ｍｇ／ｍＬとした。

【０４４２】

ヒアルロン酸メタクリレート（ＨＡＭＡ）の調製：

５００ｍｇのＨＡをＬｅａｃｈらが記載のように［Leach et.al. 2002, Biotechnology and Bioengineering, vol. 82, no. 5］機能化した。即ち、１．８ｍＬのトリエチルアミン、１．８ｍＬのメタクリル酸グリシジル、及び１．８ｇの臭化テトラブチルアンモニウムを１０ｍｇ／ｍＬのＨＡのＤＤＷ溶液５０ｍＬに別々に添加しながら反応混合物を完全に混合した後、各成分を添加した。得られた反応混合物を室温で一晩撹拌した後、２０倍量のアセトンを添加してＨＡＭＡを沈殿させた後、ＤＤＷに再溶解した。この沈殿プロセスを２回繰り返し、考えられる全ての副産物を除去した後、得られた反応生成物を凍結乾燥させた。

【０４４３】

ＤＭＥＭ中のｒｈコラーゲン－メタクリルアミド／ヒアルロン酸メタクリレート（ＨＡＭＡ）：上述のように調製したヒアルロン酸メタクリレートを線維性ｒｈコラーゲン－ＭＡの溶液に添加して、ＤＭＥＭ培地でのＨＡ－ＭＡの最終濃度を１０ｍｇ／ｍＬとし、ｒｈコラーゲン－ＭＡの最終濃度を２０ｍｇ／ｍＬとした。

【０４４４】

ＤＭＥＭ配合物の粘度：

２５℃でのＤＭＥＭ中のｒｈコラーゲン－ＭＡ単独の粘度と、ヒアルロン酸（ＨＡ）又はＨＡ－ＭＡ（実施例１に記載のように調製）の存在下での粘度を試験し、得られたデータを図９に示す。

【０４４５】

図９に示すように、図２及び図３に示すｒｈコラーゲンの典型的なずり減粘挙動は、ＨＡ／ＨＡ－ＭＡの添加の有無に関わらずｒｈコラーゲン－ＭＡでも維持される。ｒｈコラーゲンの濃度を２０ｍｇ／ｍＬから２６ｍｇ／ｍＬ（それぞれ緑線と赤線）に上昇させると、ゼロせん断粘度が上昇した。同様のことが１０ｍｇ／ｍＬのＨＡ又はＨＡＭＡの添加（この場合、最終ポリマー濃度は３０ｍｇ／ｍＬとなる）の場合にも見られる。

【０４４６】

０．１Ｍのリン酸緩衝液０．１Ｍ（ｐＨ７．４）／ＮａＣｌ　１１．３ｍＭ溶液を用いた、配合物の調製：

以下の原液を調製した。即ち、７．５ｍｇ／ｍｌの単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド（１０倍）のリン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）溶液、３０ｍｇ／ｍｌのＰＶＡＭＡのリン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）溶液、３０ｍｇ／ｍｌのTiO_2のリン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）溶液、３０ｍｇ／ｍｌの酸化セルロースのリン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）溶液を調製した。ＨＡＭＡをＡｄｖａｎｃｅｄ　ＢｉｏＭａｔｒｉｘ社から購入し、１０ｍＭ　ＨＣｌに溶解して１０ｍｇ／ｍｌとした。０．５ｍｌの１Ｍリン酸緩衝液＋１１３ｍＭ　ＮａＣｌを添加して４．５ｍｌのＨＡＭＡ溶液を最終的に中和した。

【０４４７】

単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドの、リン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）溶液の調製：単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドの原液を０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）＋１１．３ｍＭ　ＮａＣｌで５ｍｇ／ｍｌに希釈した。

【０４４８】

ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドとＨＡＭＡの、リン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）溶液の調製：コラーゲンＭＡ（単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド）とＨＡＭＡの溶液（コラーゲンＭＡ：ＨＡＭＡの重量比は５：１及び２：１）の調製は、上述のコラーゲンＭＡとＨＡＭＡの原液の適切量をリン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）と混合して行い、最終濃度をそれぞれ５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡと１ｍｇ／ｍｌのＨＡＭＡ（５：１の比）及び５ｍｇ／ｍｌのｃｏｌｌＭＡと２．５ｍｇ／ｍｌのＨＡＭＡ（２：１の比）とした。

【０４４９】

ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドとＰＶＡＭＡの、リン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）溶液の調製：コラーゲンＭＡ（単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド）とＰＶＡＭＡ（コラーゲンＭＡ：ＰＶＡＭＡの重量比は５：１、２：１及び１：２）の調製は、上述のコラーゲンＭＡとＰＶＡＭＡの原液の適切量をリン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）と混合して行い、最終濃度を５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡと１ｍｇ／ｍｌのＰＶＡＭＡ（５：１の比）、５ｍｇ／ｍｌのｃｏｌｌＭＡと２．５ｍｇ／ｍｌのＰＶＡＭＡ（２：１の比）、及び５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡと１０ｍｇ／ｍｌのＰＶＡＭＡ（１：２の比）とした。

【０４５０】

ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドと二酸化チタン（TiO_2）の、リン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）溶液の調製：コラーゲンＭＡ（単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド）と二酸化チタン（TiO_2）（コラーゲンＭＡ：二酸化チタン（TiO_2）の重量比は５：１、２：１及び１：２）の調製は、上述のコラーゲンＭＡと二酸化チタン（TiO_2）の原液の適切量をリン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）と混合して行い、最終濃度を５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡと１ｍｇ／ｍｌの二酸化チタン（TiO_2）（５：１の比）、５ｍｇ／ｍｌのｃｏｌｌＭＡと２．５ｍｇ／ｍｌの二酸化チタン（TiO_2）（２：１の比）、及び５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡと１

０ｍｇ／ｍｌの二酸化チタン（TiO_2）（１：２の比）とした。

【０４５１】

ｒｈコラーゲン－メタクリルアミドと酸化セルロースの、リン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）溶液の調製：コラーゲンＭＡ（単量体ｒｈコラーゲン－メタクリルアミド）と酸化セルロース（コラーゲンＭＡ：酸化セルロースの重量比は５：１、２：１及び１：２）の調製は、上述のコラーゲンＭＡと酸化セルロースの原液の適切量をリン酸緩衝液（０．１Ｍ）／生理食塩水（１１．３ｍＭ）と混合して行い、最終濃度を５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡと１ｍｇ／ｍｌの酸化セルロース（５：１の比）、５ｍｇ／ｍｌのｃｏｌｌＭＡと２．５ｍｇ／ｍｌの酸化セルロース（２：１の比）、及び５ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌＭＡと１０ｍｇ／ｍｌの酸化セルロース（１：２の比）とした。

【０４５２】

０．１Ｍのリン酸緩衝液０．１Ｍ（ｐＨ７．４）／ＮａＣｌ　１１．３ｍＭを用いた配合物の粘度：

上述のように調製した、０．１Ｍのリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）／１１．３ｍＭ　ＮａＣｌ（生理学的モル浸透圧濃度）中に５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲンメタクリルアミド（ｒｈコラーゲン－ＭＡ；ｃｏｌ）を含み、様々な添加剤（ポリビニルアルコールメタクリレート（ＰＶＡＭＡ）、ヒアルロン酸メタクリレート（ＨＡＭＡ）、二酸化チタン（TiO_2）及び酸化セルロース（ＯＣ））が豊富な配合物（コラーゲンＭＡ：添加剤比は５：１、２：１及び１：２）の粘度を試験した。測定は、コーンオンプレート構成（スピンドルＣ３５／１　Ｔｉ　Ｔｈｅｒｍｏ　ＨＡＡＫＥ　Ｒｈｅｏ　Ｓｔｒｅｓｓ６００機器）を使用してＴ＝２２℃で行った。得られたデータを図１０～図１３に示す。

【０４５３】

図１０は、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ（ｃｏｌ、黒色曲線）及び５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ＋ポリビニルアルコールメタクリレート（ＰＶＡＭＡ、緑色曲線）（ｒｈコラーゲン－ＭＡ：ＰＶＡＭＡ重量比は５：１（緑色実線曲線）、２：１（緑色破線曲線）、１：２（緑色点線曲線））の粘度を示す比較プロットである。

【０４５４】

図１１は、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ（ｃｏｌ、黒色曲線）及び５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ＋ＨＡＭＡ（青色曲線）（ｒｈコラーゲン－ＭＡ：ＨＡＭＡ重量比は５：１（青色実線曲線）及び２：１（青色破線曲線））の粘度を示す比較プロットである。

【０４５５】

図１２は、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ（ｃｏｌ、黒色曲線）及び５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ＋TiO_2（赤色曲線）（ｒｈコラーゲン－ＭＡ：ＨＡＭＡ重量比は５：１（赤色実線曲線）、２：１（赤色破線曲線）、１：２（赤色点線曲線））の粘度を示す比較プロットである。

【０４５６】

図１３は、５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ（ｃｏｌ、黒色曲線）及び５ｍｇ／ｍｌのｒｈコラーゲン－ＭＡ＋酸化セルロース（橙色曲線）（ｒｈコラーゲン－ＭＡ：ＨＡＭＡ重量比は５：１（橙色実線曲線）、２：１（橙色破線曲線）、１：２（橙色点線曲線））の粘度を示す比較プロットである。

【０４５７】

０．１Ｍのリン酸緩衝液０．１Ｍ（ｐＨ７．４）／ＮａＣｌ　１１．３ｍＭを用いた、硬化ｒｈコラーゲン－ＭＡ配合物：

ｒｈコラーゲン－ＭＡを単独で含むか、又は様々な添加剤と共に含む（コラーゲン：添加剤の重量比は２：１）、上述の配合物を光開始剤２－ヒドロキシ－４’－（２－ヒドロキシエトキシ）－２－メチルプロピオフェノンと混合した（０．１％）。１３０μＬの配合物をシリコン金型（８ｍｍ×８ｍｍ×８ｍｍ）に導入し、１．５ｃｍの距離で紫外光（３６５ｎｍ）を２０秒間照射した。

【０４５８】

得られた成形物体の画像を図１４に示す。

【０４５９】

リン酸緩衝液及びＨＣｌを用いたｒｈコラーゲン－ＭＡ配合物の粘度と、それから形成した硬化物体のＧ’測定：

１０ｍｇ／ｍｌの単量体ｒｈコラーゲン－ＭＡ（１０倍）の、リン酸緩衝液０．１Ｍ／ＮａＣｌ　１５．８ｍＭ（約１６ｍＭ）溶液又は１０ｍＭ　ＨＣｌ溶液は、適切量の媒体を凍結乾燥材料に添加して調製した。完全に溶解した後、配合物の粘度を試験した後に硬化させた。

【０４６０】

高い周波数でのこれらの製剤の粘度を、回転ＣＲモード使用のレオメータによって室温で記録し、得られたデータを図１５に示す。図１５に示すように、０．１Ｍリン酸緩衝液／０．０１６Ｍ　ＮａＣｌ（計３００ｍＯｓ／Ｌ）配合物の粘度（青線）は、１０ｍＭ　ＨＣｌ（赤線）及び２０ｍＭ酢酸（データは示さず）よりも高い。このリン酸緩衝液媒体のずり減粘挙動は、他の全ての試験媒体と比べてより顕著である。

【０４６１】

これらの配合物を紫外線ＬＥＤ源によって３６５ｎｍで硬化させた。０．１％光開始剤を含む１．６ｍｌの溶液をディスク状の型に注入し、１００ｍＷ／ｃｍ^{2}によって９０秒間硬化させ、硬化物体の高周波数でのＧ’値を、振動ＣＲモード使用のレオメータによって３７℃で測定した。

【０４６２】

得られたデータを図１６に示す。これによって、リン酸緩衝液系配合物で形成された硬化物体の貯蔵弾性率が高いことが分かる。

【０４６３】

［実施例５］

２０ｍｇ／ｍｌの単量体ｒｈコラーゲン－ＭＡ（１０倍モル過剰のＭＡを使用して調製）のＨｅｐｅｓ緩衝食塩水溶液を、Ｎ－ビニルピロリジノン及び光開始剤としてのエオシンＹ／ＴＥＡ（トリエタノールアミン）と混合した。１２０マイクロリットルをシリコン金型（８ｍｍ×８ｍｍ×３ｍｍ）に分注し、マウス皮膚パッチ（Ｓｃｉｅｎｃｅ　ｉｎ　Ａｃｔｉｏｎ　Ｌｔｄ．）で被覆した。皮膚パッチの外側を白色ＬＥＤトーチからの白色光で６分間照射することによって、配合物を経皮的に重合させた。

【０４６４】

図１７は、カメラを使用して撮影した照射後の皮膚パッチの写真であり、ｒｈコラーゲン－ＭＡが重合して皮膚組織に組み込まれたことが分かる。

【０４６５】

［実施例６］

単量体ｒｈコラーゲン－ＭＡ単独の場合と、ｒｈコラーゲン－ＭＡ（単量体）をリン酸カルシウム粒子と組み合わせた場合について、正常ヒト皮膚線維芽細胞（Ｐｒｏｍｏｃｅｌｌ）を使用した細胞増殖アッセイで評価した。

【０４６６】

（１）ｒｈコラーゲン－ＭＡのみ（９ｍｇ／ｍｌ）、（２）ｒｈコラーゲン－ＭＡ（９ｍｇ／ｍｌ）とナノヒドロキシアパタイト（ｎａｎｏＨＡ）（７ｍｇ／ｍｌ）、及び（３）ｒｈコラーゲン－ＭＡ（９ｍｇ／ｍｌ）とナノリン酸三カルシウム（ｎａｎｏＴＣＰ）（７ｍｇ／ｍｌ）を含むＤＤＷに溶解した凍結乾燥ｒｈコラーゲン－ＭＡから物体（足場）を調製した。各溶液を紫外線硬化させ、凍結乾燥し、酸化エチレン（ＥＴＯ）で滅菌した。正常なヒト皮膚線維芽細胞を足場に播種し、１日目、３日目及び７日目に比色アッセイ（ＷＳＴ－１）によって細胞増殖を測定した。図１８は得られたデータを示すが、全ての試験配合物で良好な細胞増殖が示されている。

【０４６７】

本発明をその具体的な実施形態との関連で説明したが、多くの代替、修正及び変更が当業者には明らかであろう。従って、このような代替、修正及び変更は全て、添付の特許請

求の範囲の趣旨と広い範囲内に含まれることを意図するものである。

【０４６８】

本明細書で言及した全ての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物、特許及び特許出願の各々が具体的且つ個別に本明細書の一部を構成するものとして援用される場合と同程度に、それらの全体が本明細書の一部を構成するものとして援用される。更に、本願における如何なる参考文献の引用又は特定も、このような参考文献が本発明の先行技術として利用可能なことを容認するものとして解釈されるべきではない。各項の見出しが使用される範囲において、必ずしも限定として解釈されるべきではない。

【配列表フリーテキスト】

【０４６９】

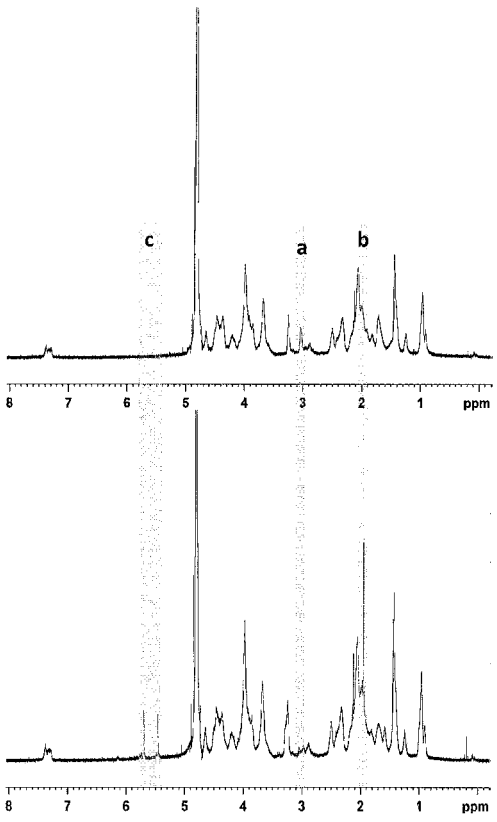
配列番号１１：　ヒトプロリル４－ヒドロキシラーゼβサブユニットおよびそのその隣接領域に融合した、オオムギ遺伝子のチオールプロテアーゼ遺伝子aleurain前駆体の維管束シグナル配列のコード領域を含む、合成配列

配列番号１２：　ヒトプロリル４－ヒドロキシラーゼβサブユニットおよびそのその隣接領域に融合した、オオムギ遺伝子のチオールプロテアーゼ遺伝子aleurain前駆体の維管束シグナル配列のコード領域を含む、合成配列

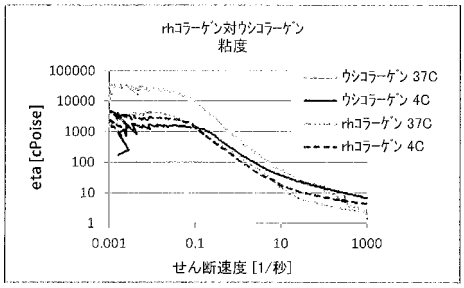
配列番号１３：　ヒトリシルヒドロキシラーゼ３およびそのその隣接領域に融合した、オオムギ遺伝子のチオールプロテアーゼ遺伝子aleurain前駆体の維管束シグナル配列のコード領域を含む、合成配列

配列番号１４：　チオールプロテアーゼ遺伝子aleurain前駆体の液胞標的配列（ＮＣＢＩアクセッション番号Ｐ０５１６７　ＧＩ：１１３６０３）

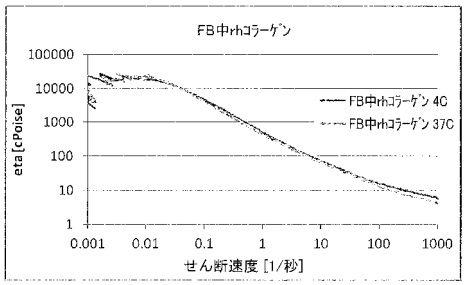
【図１】



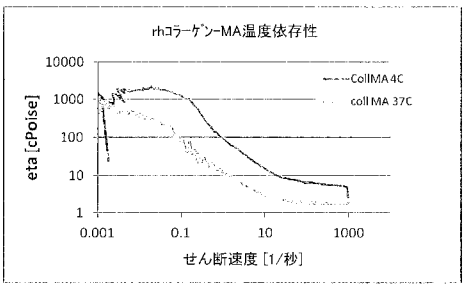
【図２】



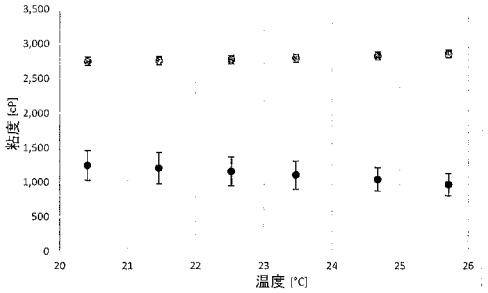
【図３】



【図４】



【図５】



【図６】

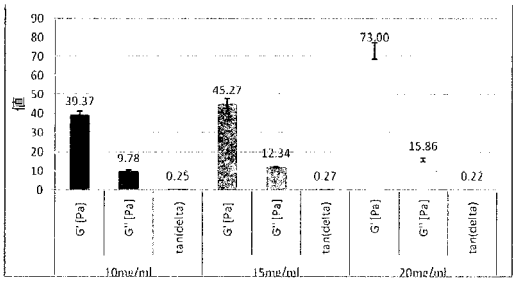


図 6A

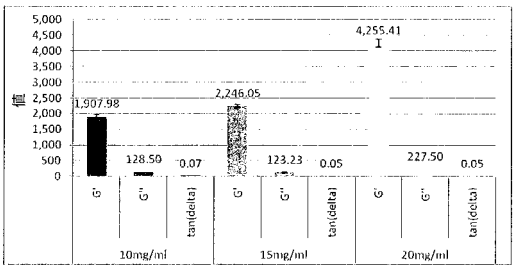
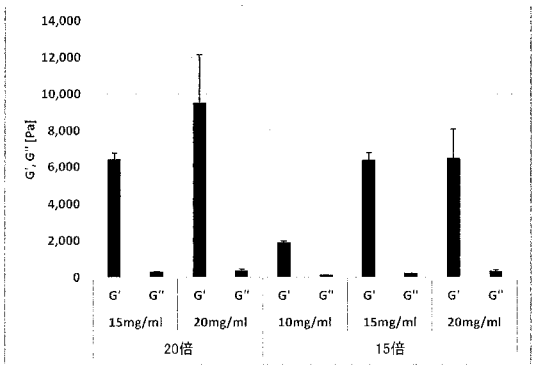
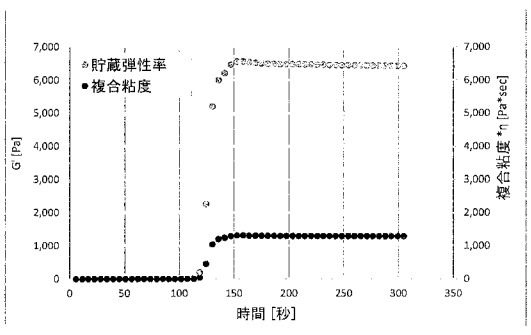


図 6B

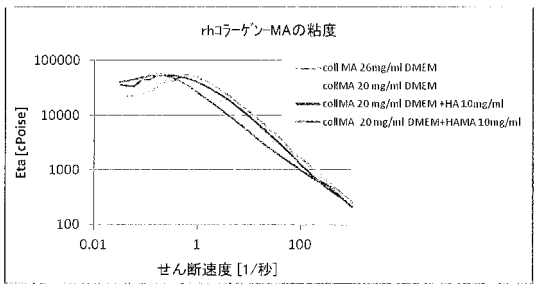
【図７】



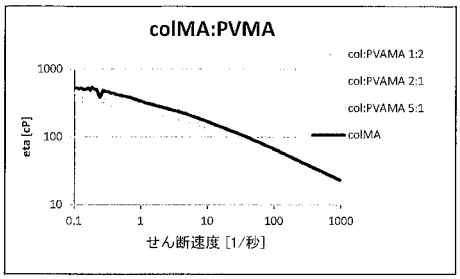
【図８】



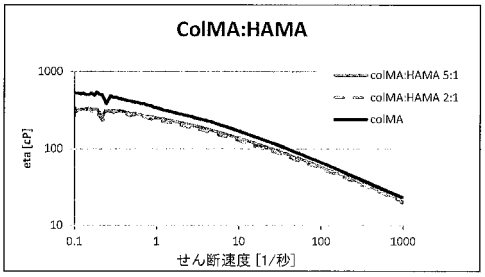
【図９】



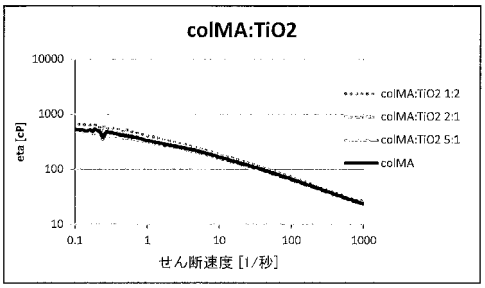
【図１０】



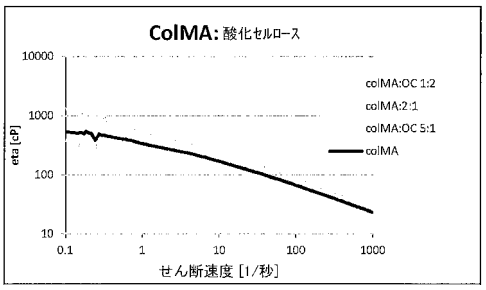
【図１１】



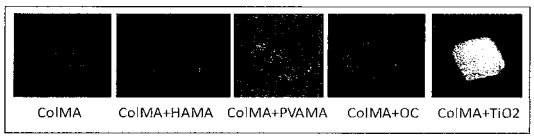
【図１２】



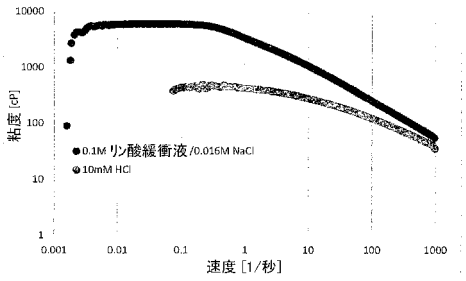
【図１３】



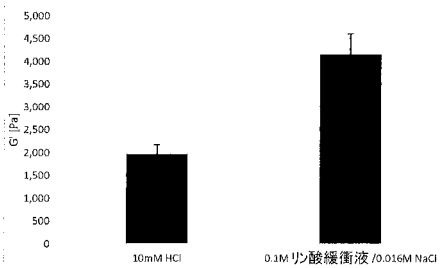
【図１４】



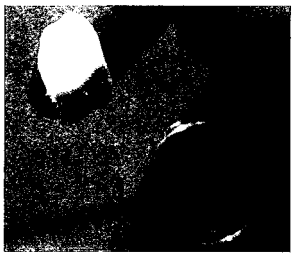
【図１５】



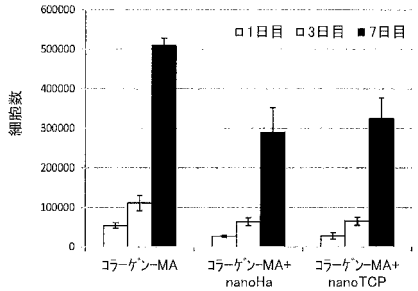
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【配列表】
2020522357000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2018/050627

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC (2018.01) A61L 27/24, B33Y 70/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC (2018.01) A61L, B33Y

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Databases consulted: Esp@cenet, Google Patents, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, Google Scholar, DWPI, Derwent Innovation
Search terms used: "Collagen methacryl* ";"Methacrylated collagen"; "additive manufacturing"; 3D printing; CPC=A61L27/24 AND/OR B33Y70; author:shoseyov

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Drzewiecki, K. E., Parmar, A. S., Gaudet, I. D., Branch, J. R., Pike, D. H., Nanda, V., & Shreiber, D. I. (2014). Methacrylation induces rapid, temperature-dependent, reversible self-assembly of type-I collagen. Langmuir, 30(37), 11204-11211. https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la502418s 28 Aug 2014 (2014/08/28) The whole document especially page 11205, left hand column, third paragraph.	1-9,13,21-35,38
Y	Ravichandran, R., Islam, M. M., Alarcon, E. I., Samanta, A., Wang, S., Lundstr?m, P., ... & Phopase, J. (2015). Functionalised type-I collagen as a hydrogel building block for bio-orthogonal tissue engineering applications. Journal of Materials Chemistry B, 4(2), 318-326. https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/tb/2016/c5tb02035b 23 Nov 2015 (2015/11/23) The whole document; Supplemental material paragraph 2.11, Page 8; Figure 8; supplemental information, paragraph 2.5	1-4,7-30,33-43
Y	WO 2015032985 A1 UAB Ferentis 12 Mar 2015 (2015/03/12) The whole document, especially example 4, page 18	10-12,14,15,36,37,39

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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	Date of mailing of the international search report
27 Aug 2018	29 Aug 2018
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Facsimile No. 972-2-5651616	Authorized officer PACE Umberto Telephone No. 972-2-5651625

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2018/050627

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Gaudet, I. D., & Shreiber, D. I. (2012). Characterization of methacrylated type-I collagen as a dynamic, photoactive hydrogel. Biointerphases, 7(1), 25. https://avs.scitation.org/doi/abs/10.1007/s13758-012-0025-y 10 Mar 2012 (2012/03/10) The whole document, especially the abstract, Chapter 2.1 and Fig. 4.	14-20,39-43
Y	WO 2014147622 A1 Collplant, LTD 25 Sep 2014 (2014/09/25) The whole document	1-43

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2018/050627

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
WO 2015032985 A1	12 Mar 2015	WO 2015032985 A1	12 Mar 2015
		EP 3043835 A1	20 Jul 2016
		US 2016193384 A1	07 Jul 2016
		US 10039859 B2	07 Aug 2018
WO 2014147622 A1	25 Sep 2014	WO 2014147622 A1	25 Sep 2014
		CA 2907680 A1	25 Sep 2014
		CN 105263511 A	20 Jan 2016
		EP 2976097 A1	27 Jan 2016
		IL 241703 D0	30 Nov 2015
		US 2016120955 A1	05 May 2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
A61K	***41/00***	***(2020.01)***	Ａ６１Ｋ	41/00		
A61L	***27/44***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｌ	27/44		
A61L	***27/50***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｌ	27/50		
C07K	*14/78*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/78	ＺＮＡ	
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		

(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,JO,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

(72)発明者　オー　ナダフ
イスラエル国　マズケレット　バティア　パルマッハ　ストリート　２１
(72)発明者　セロー　マクヌウズ　ジャスミン
イスラエル国　テルーアビブ　ラクヘル　ストリート　７
(72)発明者　ザルカ　レヴィタル
イスラエル国　マズケレット　バティア　ハーシュコビッツ　ストリート　８／３

Ｆターム(参考) 4C081 AB11 AB19 BB03 BC01 CB031 CC04 CD081 CD082 CD121 DA01
DA02 DC12 EA02 EA03 EA05 EA13
4C084 AA11 NA20 ZA891 ZA892 ZB211 ZB212
4H045 AA30 BA10 CA40 EA34 FA74