

(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2004-508305

(P2004-508305A)

(43) 公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I               | テーマコード (参考)     |
|----------------------------|-------------------|-----------------|
| <b>C07K 14/75</b>          | C07K 14/75        | 4B063           |
| <b>A61K 7/00</b>           | A61K 7/00         | 4B065           |
| <b>A61K 38/36</b>          | A61K 47/42        | 4C076           |
| <b>A61K 47/42</b>          | A61L 27/00        | 4C081           |
| <b>A61L 27/00</b>          | A61P 7/04         | 4C083           |
|                            | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 | (全 87 頁) 最終頁に続く |

|               |                              |          |   |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2002-523955 (P2002-523955) | (71) 出願人 | 502074459   |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年9月4日 (2001.9.4)         |          | ヴァージニア コモンウェルス ユニバー<br>シティ インテレクチュアル プロパティ<br>ー ファンデーション              |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成15年3月3日 (2003.3.3)         |          | アメリカ合衆国 ヴァージニア 2329<br>8 リッチモンド イースト マーシャル<br>ストリート 1101 ルーム 201<br>5 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2001/027409            | (74) 代理人 | 100089244   |
| (87) 国際公開番号   | W02002/018441                |          | 弁理士 遠山 勉  |
| (87) 国際公開日    | 平成14年3月7日 (2002.3.7)         | (74) 代理人 | 100090516   |
| (31) 優先権主張番号  | 09/654, 517                  |          | 弁理士 松倉 秀実   |
| (32) 優先日      | 平成12年9月1日 (2000.9.1)         | (74) 代理人 | 100100549   |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 川口 嘉之   |
| (31) 優先権主張番号  | 60/241, 008                  |          |   |
| (32) 優先日      | 平成12年10月18日 (2000.10.18)     |          |   |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気処理されたフィブリンをベースとするマトリックスおよび組織

## (57) 【要約】

本発明は細胞外マトリックスとしての電気処理されたフィブリンの形成および使用、ならびに細胞と合わせた改変された組織形成での利用を目的としている。改変された組織はレシピエント内に移植され得る特異的臓器または組織の合成製造を包含し得る。電気処理されたフィブリンはまた、電気処理されたフィブリンの適用または移植部位への分子を運搬する目的で、その他分子と組み合わせてもよい。フィブリンまたはフィブリン/細胞懸濁液は基体上に電着されて、組織および臓器を形成する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

電気処理されたフィブリン。

## 【請求項 2】

マトリックス内にある請求項 1 記載の電気処理されたフィブリン。

## 【請求項 3】

さらに細胞を含む、請求項 2 記載の電気処理されたフィブリンマトリックス。

## 【請求項 4】

さらに成長因子、分化誘導体、酸化防止剤、ビタミン、ホルモン、核酸、薬物、ペプチド、核酸、皮膚軟化剤、湿潤剤、コンディショナーまたは化粧品を含む、請求項 2 記載の電気処理されたフィブリンマトリックス。

10

## 【請求項 5】

請求項 2 記載の電気処理されたフィブリンマトリックスおよび細胞を含む改変された組織。

## 【請求項 6】

細胞が幹細胞または分化した細胞である、請求項 5 記載の改変された組織。

## 【請求項 7】

止血、または物質運搬を目的とする、前記請求項のいずれか一項に記載の電気処理されたフィブリンまたはフィブリンマトリックスの創傷ドレッシングとしての改変された組織内での使用。

20

## 【請求項 8】

物質に対する前記細胞の生物学的反応を評価することを目的とする、請求項 3 記載の電気処理されたフィブリンマトリックスの使用。

## 【請求項 9】

フィブリンまたはフィブリンを形成できる分子を含む 1 またはそれ以上の帯電溶液を接地標的基体上に、前記基体上へフィブリンを電着するのに有効な条件で電着させることを含む、請求項 1 記載の電気処理されたフィブリンの製造方法。

## 【請求項 10】

フィブリンまたはフィブリンを形成できる分子を含む 1 またはそれ以上の帯電溶液を接地標的基体上に、前記基体上へフィブリンを電着して電気処理されたフィブリン含有細胞外マトリックスを形成するのに有効な条件で電着させること；を含む、請求項 2 記載の電気処理されたフィブリンマトリックスの製造方法。

30

## 【請求項 11】

電気処理されたフィブリンまたはフィブリンを形成できる分子、および細胞を含む 1 またはそれ以上の帯電溶液を接地標的基体上に、該基体上への前記電気処理されたフィブリンおよび前記細胞の電着に有効な条件で電着することを含む、請求項 5 記載の改変された組織の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## [発明の分野]

40

本発明は、電気処理されたフィブリンを製造および使用する新規の方法に関する。発明は様々な機能に関する細胞外マトリックスとしての電気処理されたフィブリンの使用を包含する。さらに発明は、電気処理されたフィブリンと細胞とを一つに組み合わせ改変された組織を形成することを包含する。この改変された組織は特定臓器または「臓器様」組織の合成製造も包含し得る。

## 【0002】

## [発明の背景]

フィブリンは天然の凝固剤である。それゆえにフィブリンおよびフィブリン誘導体は止血用途に一般的に使用されている。類似の用途および各種強化添加物と組み合わせた使用が知られており、十分立証されている。

50

## 【0003】

別の分野では、損失または損傷した臓器機能を持つ患者の組織または臓器の移植が、いくつかの重大な問題によって妨げられている。第一は、移植組織または移植臓器の供給源が一般には生存中の親族ドナーまたは死体ドナーであることである。これら供給源は共にその数が限られており、レシピエントが病原性ウイルスに曝されるリスクを有している。第二は、移植組織または臓器の供給源が（生存一卵性双子ドナーの場合を除き）レシピエントと遺伝的に異なっているため、臓器拒絶および移植片対宿主疾患が問題になることである。これら問題は共に免疫抑制により治療できるが、それが重大な副作用を引き起こし、患者の感染リスクを大きく増加させることがある。

## 【0004】

さらに別の分野では、新たに登場した遺伝子移入に関連した技術は、インビボで実施された場合危険な場合がある。言い換えれば、インビボ遺伝子移入はレシピエントを各種ウイルス合併症の危険に曝す可能性がある。さらに既知の遺伝子治療には限界があり、例えば第V I I I 因子（抗血友病因子）の遺伝子のような大型遺伝子を受け取るのに十分な大きさを持つウイルスコートを遺伝子工学的に作製することに関し限界がある。

## 【0005】

別の研究分野では、癌患者に関する化学療法の科学は、少なくとも一定レベルに関しては、患者癌細胞との闘いについて各種治療に推定された効果に基づいている。インビボまたはインビトロでの化学療法に対する患者癌細胞の反応を特定する効果的な方法は存在しない。

## 【0006】

止血、ドラッグデリバリー、その他物質の運搬、皮膚修復、創傷治療、組織工学およびその他各種用途に使用できる能力を備えたフィブリンの新規製造法が必要とされている。

## 【0007】

## [ 発明の概要 ]

本発明は、電気処理されたフィブリンおよび電気処理されたフィブリンマトリックス、電気処理されたフィブリンおよびフィブリンマトリックスの製造方法、および電気処理されたフィブリンおよびフィブリンマトリックスの広範な用途での使用方法を提供することにより上記限界を克服する。

## 【0008】

本発明の電気処理されたフィブリンにはいくつかの利用法がある。用途の一つでは、電気処理されたフィブリンは細胞外マトリックスとして用いられる。電気処理されたフィブリンは他の天然または非天然繊維と、ならびに細胞とも組み合わせられ得る。組織および臓器移植の分野では、細胞とフィブリンを含むがこれに限定されない電気処理されたフィブリンの使用は、潜在的感染および拒絶の問題を克服できる。遺伝子移入の分野では細胞操作をインビトロで行うことができるが、この場合には培養され、電気処理されたフィブリンを含む細胞外マトリックス内に挿入される細胞をより簡便に操作し、試験することができるだろう。創傷治療の分野では、電気処理されたフィブリンのシートは、例えば非自己性の電気処理されたフィブリンを傷害部位または慢性潰瘍に用いて血友病患者の出血を抑制するように、出血抑制に利用できる。細胞と共に移植された電気処理されたフィブリン細胞外マトリックスは薬物またはその他試験物質に対する細胞の反応性を試験するのに使用できるだろう。化学療法の分野では、患者の腫瘍細胞と共に移植された電気処理されたフィブリン細胞外マトリックスは、代替化学療法による治療に対するこれら細胞の感受性をインビトロで同定するのに使用できるだろう。上記各代替法はより安全且つより予測的な医療をもたらすことができるだろう。

## 【0009】

本発明は電気処理されたフィブリンマトリックスを含む、細胞増殖を促進する細胞外マトリックスを提供する。フィブリンは電気紡糸（electrospun：電界紡糸）フィブリン繊維または電気エアロゾル（electroaerosol）フィブリン滴に形成できる。電気処理されたフィブリンはまた、フィブリンを形成できる分子を用いて作るこ

10

20

30

40

50

ともできる。フィブリノーゲンおよびトロンピンはこの種の2分子であり、そして本発明の電気処理技術を用いこれら分子またはその他分子から電気処理されたフィブリンを作ることができるだろう。フィブリノーゲンはまた電気紡糸または電気エアロゾル技術を用い加工してから酵素的方法により電気処理されたフィブリンに変換することもできる。

**【0010】**

本発明はまた電気処理されたフィブリンおよび細胞を含む電気改変された組織も提供する。いずれの細胞も使用できる。細胞はフィブリンと共に、あるいは別々に細胞を電気処理することを含む多くの技術を使って電気処理されたフィブリンに適用され得る。細胞は幹細胞、コミットした細胞 (committed stem cell)、または分化した細胞である。細胞分化誘導因子も利用できるが、これらにはペプチド成長因子、薬物またはセンスもしくはアンチセンス方向の完全もしくは部分遺伝子配列が含まれるが、もとよりこれらに限定されるものではない。改変された組織は所定の形状を有し、そして所望形状を形成するのに電気処理されたフィブリンおよび細胞が用いられる。

10

**【0011】**

本発明は電気処理された技術を用いたフィブリン含有細胞外マトリックスの製造方法を包含する。これら技術は、電気紡糸、電気スプレー、電気エアロゾル、電気スプッターまたは基体または標的に電着を達成するその他任意の技術を含むが、もとよりこれらに限定されるものではない。方法は、接地基体上にフィブリンを付着させて細胞外マトリックスを形成するのに有効な条件の下に、フィブリンを含む帯電溶液を接地標的基体上に流すことを含む。溶液およびアースの極性は交換可能である。帯電溶液はさらにフィブリンを形成する能力を持つ分子を含んでもよい。好ましい実施形態では、帯電溶液は電気処理されたフィブリンを作るのに使用されるフィブリノーゲンおよびトロンピンを含み得る。あるいは帯電溶液は血漿およびトロンピンを含む。基体上に流されたフィブリンまたはフィブリン形成分子は電気紡糸繊維または電気エアロゾル滴を含み得る。ポリエチレングリコール (PEG) のようなキャリアー分子を用いて電気処理を促進してもよい。例えばシステムのある成分に好ましい溶媒が水系の場合 (例えば薬物化合物)、フィブリノーゲンまたはフィブリンは高分子量 PEG 存在下に水中に懸濁され得る。PEG は水から容易に紡ぎ出され、キャリアーとして機能して、特定のパターンまたはランダムなパターンにフィブリノーゲンまたはフィブリン分子を特定部位に電着する。キャリアーはまた純粋な有機溶媒からフィブリノーゲン/フィブリンを加工するのに用いられ得る。

20

30

**【0012】**

本発明はまた所定形状を持ったフィブリン含有細胞外マトリックスの製造方法も提供する。方法は、所定形状の作製に適したモールドを前もって選択すること、およびこのモールドに電気処理技術を使ってフィブリンまたはフィブリン形成分子を充填することを含む。または方法は所定の形状を作るのに適したモールドであって、接地標的基体を含むモールドを事前に選択することを含み得る。次にフィブリンまたはフィブリンを形成できる分子を含む1またはそれ以上の帯電溶液を、基体上にフィブリンを付着させ所定の形状を持つ細胞外マトリックスを形成させるのに有効な条件の下に接地標的基体上に流す。基体上に流されたフィブリンは電気紡糸繊維または電気エアロゾル滴を含み得る。

**【0013】**

電気処理され改変された組織を製造する本方法では、基体上にフィブリンおよび細胞を電着するのに有効な条件の下、フィブリンまたはフィブリン形成可能な分子の帯電溶液および細胞を接地標的基体上に電着する。基体上に流されたフィブリンおよび細胞は電気紡糸繊維または電気エアロゾル滴を含み得る。いずれの細胞を使用してもよい。この細胞としては以下のものが挙げられるが、もとよりこれらに限定されるものではない：以下を含むがこれに限定されない幹細胞および/またはコミットした細胞：以下を含むがこれに限定されない骨芽細胞、筋原細胞、神経芽細胞、繊維芽細胞、膠芽細胞；生殖細胞、肝細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、結合組織細胞、上皮細胞、内皮細胞、ホルモン分泌細胞、免疫系細胞および神経細胞。電気処理を使い、細胞を体内の特定部位に運搬することができる。いくつかの応用では、ある臓器に運ばれると多くのタイプの幹細胞はその臓器

40

50

特異的パターンに分化するよう誘導できることから、電気処理技術を使って特定部位に運ばれる幹細胞のタイプを事前選択する必要がない場合がある。例えば肝臓に運ばれた幹細胞は、肝臓の生物化学的環境内に幹細胞を置くだけで肝臓細胞に誘導される。電気紡糸は、マトリックスが特定臓器部位に合わせ調整できることから、このタイプの応用に有効である。電気紡糸マトリックスはまた、素早く安定または分解するよう「プログラム」され得る。

**【0014】**

本発明は電気処理されたフィブリン含有細胞外マトリックスの製造方法を提供する。方法は電氣的に接地された基体を含み、さらにフィブリン溶液またはフィブリンを形成できる分子の溶液を含む1または複数のタンクを備える。実施形態の一つでは、タンクは単一の開口部と実質的に接続しており、それによりタンクから溶液が出ることでタンクからの溶液を混合することができる。溶液は帯電しており、溶液の混合体は基体上に流され細胞外マトリックスを形成する。別の実施形態では、複数のタンクが第一および第二タンクを含む。第一タンクはフィブリノーゲンを含む溶液を有し、第二タンクはトロンピンを含む溶液を有する。フィブリノーゲンもまた、キャリアー分子、例えばPEGもしくはコラーゲン有りまたは無しに電気紡糸され、フィブリンに加工された後、電気処理される。これら物質もまた、トロンピンおよびフィブリノーゲンをフィブリンに加工するその他生化学作用物質を含む標的または溶媒槽上に電気紡糸することができる。このタイプの応用では、標的にフィブリノーゲンを付着した後のいずれかの時点でそれを電気処理し、そしてフィブリンに変換する。

10

20

**【0015】**

本発明はフィブリノーゲンおよびトロンピンの電気処理の工程の産物を包含する。この処理は、フィブリノーゲンおよびトロンピンを電気紡糸しフィブリンを製造することを含み、それはフィブリノーゲンおよびトロンピン滴を電気スプレーすることを含み、それはフィブリノーゲンおよびトロンピンを電気スパッターすることを含み、またはそれはフィブリノーゲンおよびトロンピンの電気エアロゾル付着を含むだろう。使用する方法を問わず、フィブリンは基体または標的に電着される。架橋剤を電気処理されたフィブリンと共に使用してもよい。例えば第XIII因子による共有結合の導入は、構造強度を増し、その後のマトリックスの溶解を遅らせる。

**【0016】**

電気処理されたフィブリンのマトリックスを製造する方法の一つは、基体および2つの溶液タンクを提供することを含み、この場合溶液の一つはフィブリノーゲンを含み、もう一つの溶液はトロンピンまたはその他の物質を含み、各タンクはタンクから溶液を出すことができる開口部を有している。実施形態の一つでは、各開口部は共通流路と連絡しており、2種類の溶液を一つに合わせ、共通流路への開口部から押し出すことができる。次に基体または溶液の一方を帯電し、もう一方を接地する。次にフィブリノーゲンおよびトロンピンを共通開口部から基体上に流し、マトリックスを形成させる。フィブリノーゲンおよびトロンピンを流す段階により電気処理されたフィブリン繊維のマトリックスを形成することができる。この段階により、あるいは電気処理されたフィブリン滴のマトリックスを形成することができる。

30

40

**【0017】**

別の構成では、フィブリノーゲンおよびトロンピンを含む溶液の入った別個のタンクは共通流路に連絡しないが、それぞれのタンクから溶液の流れを可能にする開口部を個別に有している。2種類の溶液を同時に併せて流すことで標的に、または標的に達する前の外気の中でフィブリンを形成させることができる。

**【0018】**

さらに別の構成では、フィブリノーゲン溶液を含むタンクを使用してトロンピン溶液を含む標的またはトロンピンを含む表層上にフィブリノーゲンを電気スパッター、電気スプレーまたは電気紡糸し、標的に直接フィブリンを形成させることができる。キャリアー分子を随意使用し、標的または表層にフィブリノーゲンを受動的に運搬してもよい。あるい

50

は、トロンピン溶液を用い、フィブリノーゲンを含む標的にトロンピンを電気スパッター、電気スプレーまたは電気紡糸してフィブリンを形成させてもよい。凝固反応はカルシウムイオン存在下に合理的な速度で進行することから、カルシウムを含まないフィブリノーゲンとトロンピン、またはカルシウムを含まない血漿とトロンピンをカルシウムを含む標的に電気加工することができる。あるいはカルシウムを含まないフィブリン形成分子の流れを、任意のフィブリン形成分子のカルシウムを含む流と一緒に電着させることができる。

**【0019】**

別のフィブリンマトリックス製造方法は、基体、標的、および一方がフィブリノーゲンを含み、もう一方がトロンピンを含む少なくとも2種類の分離したタンク溶液を提供し、この場合各タンクは下記いずれかの開口部を有する； a) タンクを出た溶液が、各開口部と連絡する共通流路を通る別の溶液と接触してから、共通流路の端部に配置された開口部から混合溶液となって電気押し出しされることが可能な開口部、または b) 各タンクの開口部と連絡する一つの口から直接電気押し出しできる開口部。次に標的または溶液の一方を帯電し、もう一方を接地する。基体を開口部と標的の間に配置する。次にフィブリノーゲン/トロンピン混合体またはフィブリノーゲンおよびトロンピン別々の溶液をタンクから開口部を通して基体上に流し、マトリックスを形成させる。これらフィブリノーゲンおよびトロンピン溶液を流す段階は、フィブリン繊維のマトリックス、またはフィブリン滴のマトリックスを形成する。さらに基体は前もって選択した形状を画定していてもよい。フィブリンマトリックスは架橋剤存在下に形成しても、または流した後に架橋剤で処理してもよい。

10

20

**【0020】**

本発明の電気処理されたフィブリンはその他細胞外マトリックスタンパク質、薬物および他の物質のスcaffolds (scaffolds) 用ビークルまたはキャリアーとして利用できる。電気処理されたフィブリンを他のポリマーまたは天然もしくは非天然繊維と組み合わせ、そしてポリマーを電気処理されたフィブリン内に架橋した場合には、フィブリンは天然または人工的手段によって後で溶解され、所定位置に架橋scaffoldsが残される。

**【0021】**

本発明の電気処理されたフィブリンはドラッグデリバリーまたはその他物質、例えば酸化防止剤、ビタミン、化粧品、核酸、ベクター、創傷治療製品およびホルモンのような物質の運搬のためのビークルとして使用できる。この電気処理されたフィブリンは「生体分解性」貯蔵システムとして使用でき、薬物のような物質を特定部位に高濃度に貯蔵することができる。薬物放出は電気処理されたフィブリンの構造、またはそれが溶解する速度を変えることで目的に合わせ調整できる。いずれの薬物その他の物質も電気処理されたフィブリンと組み合わせることができる。

30

**【0022】**

電気処理されたフィブリンは特に皮膚および表皮への応用、例えば治療または化粧品応用に有用である。例えば電気処理されたフィブリンは血管内皮形成促進を目的とする血管移植体に有用である。例えば傷、擦過傷、または潰瘍といった創傷の治療および修復は、発明の好ましい応用である。このような応用では抗生物質、抗菌剤、抗炎症剤または当業者既知の治療を促進する物質を使用することができる。その他分類の薬物または物質としては、抗生物質、化学療法剤、抗カビ剤、鎮痛剤、ホルモン、皮膚軟化剤、湿潤剤、酸化防止剤、ビタミン、注射薬、およびコンディショナーが挙げられるが、これらに限定されるものではない。好ましい薬物または物質としては、エストロゲン、アンドロゲン、コルチゾン、シクロスポリン、ペプチド、VEGF (血管内皮成長因子)、NGF (神経成長因子)、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、FGFb、FGFaおよびBGF (骨成長因子) を含む成長因子が挙げられるが、これらに限定されるものではない。局所抗生物質としては、ペニシリン、ゲンタマイシン、テトラサイクリンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。抗真菌剤も使用され得る。

40

50

## 【0023】

本発明の電気処理されたフィブリン、電気処理されたフィブリンマトリックスおよび/または電気処理されたフィブリンと細胞は、経口投与、肛門投与、局所適用、エアロゾル適用、吸入、腹腔内投与、体腔内投与、臓器内腔および実質内投与、所望部位への直接噴霧を含む任意の手段により所望部位に適用できるが、もとよりこれら手段に限定されるものではない。噴霧には所望部位への電気スプレーが包含され得る。適用部位は上皮のような外面、または胃潰瘍のような内側、手術域等である。本発明の電気処理されたフィブリンはクリーム、ゲル、溶液、懸濁液、リポソーム、粒子、または治療薬および化粧品物質の調合ならびに送達に関し当業者既知であるその他手段の形状で適用される。超微細粒子の大きさを持つ電気処理されたフィブリンは、治療薬の吸入送達に使用できる。

10

## 【0024】

本発明は電気処理されたフィブリンマトリックス内に含まれた細胞に対する有効分子をインビトロで試験する方法を包含している。任意の細胞をフィブリンマトリックス内に配置し、任意の所望の物質をフィブリンマトリックス内の細胞に投与する。そして任意の所望の生物学的反応を評価する。あるいは、この方法はフィブリンと癌細胞が基体上に付着するのに効果的な条件の下に、フィブリンおよび癌細胞を含む帯電溶液を接地された標的基体上に流すことにより電気改変された組織を製造することを包含し得る。本発明はインビトロでの癌治療法の有効性を試験する方法を包含する。方法は、フィブリンと癌細胞を含む電気改変された組織を製造することを包含する。電気改変された組織の複数のサンプルについて、複数の癌治療法が行われる。方法はさらに癌治療法の相対的有効性を評価することも包含する。この場合も癌細胞は癌治療を必要としている患者より得られるだろう。

20

## 【0025】

従って本発明は上記限界および欠点を、電気処理されたフィブリンを製造し、使用することで克服することを目的としている。

## 【0026】

本発明の別の目的は、電気処理されたフィブリンマトリックスを提供することである。電気処理によって、とりわけ生物医学応用を含む様々な分野での使用に合ったフィブリンマトリックスを形成できる。電気処理されたフィブリンは、3次元の、空間充填ネットワークを形成し、形成中に流体力学を利用することで配列を整えることができる。形成後もフィブリンマトリックスは機械的牽引、磁力またはその他手段によりその配列を調整できる。

30

## 【0027】

本発明の別の目的は、電気処理されたフィブリンおよび電気処理されたフィブリンマトリックスの製造方法を提供することである。

## 【0028】

本発明の目的の一つは、電気処理工程にフィブリンまたはフィブリンを形成できる任意の溶液を使用することである。

## 【0029】

本発明の別の目的は、電気処理工程にトロンピン、および/またはフィブリノーゲンをフィブリンに加工できるその他作用物質と組み合わせたフィブリノーゲンを使用することである。本発明の電気処理方法を通じて、とりわけ生物医療応用を含む複数の領域での使用に合わせてフィブリンマトリックスを形成できる。

40

## 【0030】

本発明の別の目的は、本法を利用し電気処理されたフィブリンまたは電気処理されたフィブリンマトリックスを含む組織を改変することである。これら組織は細胞、薬物またはその他物質を含む。

## 【0031】

本発明のさらに別の目的は、薬物のような物質を、電気処理されたフィブリン、電気処理されたフィブリンマトリックスおよび電気処理されたフィブリンマトリックスを含む改変された組織のような物質を用いて送達する新規の方法を提供することである。

50

## 【0032】

本発明のさらに別の目的は、創傷ドレッシング、神経ガイドとして、または別の移植可能組織として利用できる電気処理されたフィブリンマトリックスを含む改変された組織を提供することである。

## 【0033】

本発明の利点は、自己フィブリンが使用でき、それにより電気処理されたフィブリンマトリックスまたは電気処理されたフィブリンマトリックスを含む改変された組織の免疫拒絶の機会を最小限にすることである。

## 【0034】

本発明のこれらおよびその他目的、特徴および利点は、開示の実施形態に関する以下の詳細な説明および添付の図面を概観することで明らかになるだろう。 10

## 【0035】

好ましい実施形態の詳細な説明

用語「電気処理」および「電着」は広義に用いられ、フィブリン滴を電気紡糸、電気スプレー（電気エアロゾル）、電気スパッターする方法、電気紡糸および電気エアロゾルの組み合わせ、それらの別の組み合わせ、およびフィブリン、フィブリンを形成できる分子、フィブリノーゲン、トロンビンまたはそれらの組み合わせが電界を横切り、標的に向かって流され、噴霧され、スパッターされまたは滴下されるその他方法を包含する。同様に、溶液は1またはそれ以上の接地タンクから帯電基体に向かって、または帯電タンクから接地標的に向かって流される。「電気紡糸」とは、フィブリン繊維が溶液から形成されるか、または帯電溶液を流し溶解するか、または開口部を通し溶解する工程を意味する。「電気エアロゾル」とは、溶液から滴が形成されるか、または帯電ポリマー溶液を流して溶解するか、または開口部を通し溶解する工程を意味する。従って用語「電気処理」は、ここに記載の具体例に限定されるものではない。 20

## 【0036】

本発明の目的に於いては、用語フィブリン細胞外マトリックスとはその上またはその中に細胞が付着し、増殖し、そして成長することのできる任意の3次元構造を指す。フィブリン細胞外マトリックスに関するその他一般的用語としては、筋肉または神経を取り囲むことができるスカフォールド、プラットフォームおよび筋膜鞘が挙げられる。

## 【0037】

本明細書を通し、用語「溶液」は電気処理法のタンク内にある液体を表すのに用いられる。好ましい実施形態では、溶液中のフィブリンは標的に電着される。本発明では、フィブリン形成に適した溶液はトロンビン溶液およびフィブリノーゲン溶液を含む。フィブリノーゲンはトロンビンによりフィブリンモノマーに変換され、それが静電的相互作用により集合しフィブリンとなる。このフィブリンは共有結合で架橋されてはいない。電気紡糸、電気スプレーまたはいずれか形の電着によりフィブリンを形成できるいずれの溶液も本発明の範囲内と理解される。例えばフィブリン、フィブリン類似体、その前駆体または活性断片、フィブリノーゲン類似体、その前駆体または活性断片、およびトロンビン類似体、その前駆体または活性化断片、ならびにフィブリン形成可能なその他分子が本発明に利用できる。血漿は、フィブリン形成のためのフィブリノーゲンのよい供給源であり、この 40  
応用のために電気処理され得る。実施形態の一つでは、自己に投与するためにフィブリンマトリックスが患者の血液を用いて調製される。複数の酵素がフィブリノーゲンを凝固するが、この能力を持ついずれの酵素も本発明の範囲内と考えられる。これらにはレブチラーゼ、バトロキソピンおよびその他各種蛇毒酵素が挙げられるが、もとよりこれらに限定されない。さらにフィブリノーゲンは大量の硫酸プロタミンを付加することで「フィブリン様」マトリックスを形成する。この工程はパラコアグレーションと呼ばれている。

## 【0038】

本明細書では、用語「溶液」はまたフィブリン、フィブリンを形成できる分子、細胞、薬物のような物質、その他分子または電着物を含む懸濁液も指す。「溶液」は有機的または生物学的に適合した形状であり得る。この広義の定義は、多くの電気処理の変形に使用さ 50



れ得る多数の溶媒またはその他液体ならびにPEG等のキャリアー分子を考慮する上で適当である。非架橋型のフィブリンモノマーは尿素、一塩化酢酸またはヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)のような溶媒から電着または電気スパンされる。

#### 【0039】

用語「フィブリン」は本明細書を通し、その最も広い定義で使用される。それには断片、類似体、保存的アミノ酸置換および非天然型アミノ酸による置換が含まれるが、これらに限定されるものではない。フィブリンには天然型ならびに合成的に製造されたかもしくは遺伝子工学的に製造されたタイプといった複数のタイプのフィブリンが存在する。将来別のタイプのフィブリンが見いだされ、または合成されるか、あるいは各種フィブリン分子の特定のサブセットが固有の作用を持つ形で単離され、そしてここに記載のものと同様の産物の製造に使用されるかもしれない。これらタイプおよびサブセットは全てここでは用語「フィブリン」の使用の中に包含される。同様に実施例のいくつかにより実証される如く、フィブリンまたはフィブリンマトリックスの特定の最終使用に関して特に望まれる特性を得るために、フィブリノーゲンおよび/またはトロンプインを電気処理中に別のポリマーまたはその他分子と混合することがある。

10

#### 【0040】

##### フィブリン形成電気処理法

本発明ではフィブリンまたはフィブリンを形成できる任意の分子を用い、電気処理されたフィブリンを形成できる。フィブリノーゲンおよびトロンプインはフィブリン製造に関する2種類の好ましい分子である。フィブリノーゲンをトロンプインと共に、または別々に電気処理して電気処理されたフィブリンまたは電気処理されたフィブリンマトリックスを形成することができる。これは、トロンプインがフィブリノーゲンからフィブリンへの加工を促進しない条件の下に実行される。これはいくつかの方法で達成される。例えばフィブリノーゲンおよびトロンプインを、トロンプインを機能させない溶媒から電気処理することができる。あるいはフィブリノーゲンまたはトロンプインをキャリアー物質内に包み込むことができる。本明細書においてフィブリノーゲンは1種類の供給源液より標的に電気処理(それ自体のみで、またはキャリアーと共に)することができる。トロンプインは別の供給源より電気エアロゾル法で付着させることができる。トロンプインはカプセル化し、微細な粒子の霧として噴霧することができる。またはトロンプインおよびフィブリノーゲンはPEGまたはコラーゲンのようなキャリアーと混合することができる。

20

30

#### 【0041】

予備成形ゲルのようなフィブリンを電気処理することができる。フィブリンゲルは、例えばその後方に圧力ヘッドがあるシリンジを使って加圧され、フィブリンゲルは電界内に押し出される。

#### 【0042】

キャリアーは、反応物が活性化されるまでそれらを所定位置に保持するのに働く。生成物は全て乾燥状態に保存されることが好ましい。物質を湿潤環境、例えば切傷、潰瘍または湿潤創傷内に置くと、トロンプインが放出され、フィブリノーゲンをフィブリンに加工し凝固塊の形成が起こる。上記の如くキャリアーはフィブリンを形成できる分子と共に使用されると理解される。例えばフィブリノーゲンはPEG、コラーゲンまたはフィラメントを形成するその他既知キャリアーと混合することができる。これにより毛髪状のフィラメントが作られるが、この毛髪状フィラメントがフィブリンである。このタイプの利用では、フィブリンは周囲のマトリックスキャリアーを架橋してゲルを形成する。この手法は、常態でゲルでない分子をゲル化するために用いられ得る。例えばIV型コラーゲン、または何らかのその他コラーゲンはフィラメントを形成しない場合、フィブリノーゲン、コラーゲンおよびPEGを電気スプレーして電気処理されたフィブリン含有マトリックスを形成することができる。フィブリン形成が始まった後にフィブリン/コラーゲンゲルが作られる。

40

#### 【0043】

あるいはフィブリノーゲン/フィブリンはシートを形成する別の分子(例えばPEG、P

50

L A、P G A : P L A、コラーゲン、フィブロンectin)と共にスパッターできる。このシートは創傷の上全体に置くことができる。創傷が開いている場合、フィブリノーゲンはフィブリンに変換され、凝固塊を形成する。トロンピンがシート内に存在する場合、凝固塊は水の付加およびトロンピンの放出により得ることができる。このようなシートはとりわけ外科手術および創傷治療に応用できる。フィブリノーゲンおよびトロンピン以外のその他フィブリン形成分子も使用され得ると理解すべきである。

【0044】

所望の結果を得ることができるよう成された複数の装置の変形および改良に加え、溶液もまた異なる結果を得るために変更できる。例えばフィブリノーゲンまたはトロンピンが溶解された、または懸濁された溶媒または液体は変更できる。

10

【0045】

フィブリノーゲンまたはトロンピンは所望の結果を得るために、他の分子、モノマーまたはポリマーと混合することができる。例えばポリマーを加えて溶液の粘度を変更することができる。さらに別の変形では、複数のタンクを使用する場合、これらタンク内の成分を別々または併せてノズルから電気スプレーし、各種タンク内の成分を同時に相互反応させながら溶液を電界内に流し込むことができる。また複数のタンクを使用する場合、異なるタンク内の異なる成分を処理期間中、時間的に段階導入してもよい。例えばフィブリノーゲンは、分子の炭水化物プロフィールを変化させることで直接変化させられる。またその他物質はフィブリノーゲンおよび/またはトロンピンを電気処理する前、最中または後にフィブリンに付着され得る。さらに温度および工程のその他物理特性を変更して、異なる結果を得ることができる。

20

【0046】

最後に電気処理法より生ずるフィブリンマトリックスを変更、調整するのに使用できる多くのタイプの工程後処理が存在する。例えばフィブリンマトリックスは、化学物質およびUV光ベース架橋剤を含む架橋剤で処理することができる。またフィブリンマトリックスは各種温度で処理することができる。マトリックスに特定の最終特性を望む者は、さらに別の化学的変更も構想され得る。フィブリンは、例えばフィブリノーゲンとトロンピンとを適当な濃度で一つに混合するような様々な方法で形成される。この様にフィブリンを含む細胞外マトリックスを構築することは、フィブリノーゲンおよびトロンピンといったフィブリンを形成できる分子と一緒にして電気処理法にかけられる多様な方法を包含している。

30

【0047】

最も基本的な意味に於いて、フィブリンを電気処理するための電気処理装置は流動機構と標的基体を含む。流動機構は、工程中に流される1またはそれ以上の溶液を保持するための1または複数のタンクを含む。1または複数のタンクはタンクから溶液を流すことができる少なくとも1個の開口部またはノズルを持つ。所与の電気処理装置は1本または複数本のノズルを持つ場合がある。複数のノズルがある場合は、それらは同一または異なる溶液を含む1または複数のタンクに取り付けられ得る。同様に同一または異なる溶液を含む複数のタンクに単一のノズルが接続されることもある。またノズルの大きさは、ノズルを通しタンクの外に流れ出る溶液量の増加または減少に合わせ変えることもできる。タンクに接続して使用されるポンプを利用し、1または複数のノズルを通りタンクから流れる溶液流を制御することもできる。ポンプは電気処理中に様々な点で流量を増やし、または減らすようにプログラムされる。

40

【0048】

標的基体はまた電気処理されたフィブリン製造に使用される分子の電気処理に於ける変動特性として利用することもできる。具体的には、標的は電気処理されたフィブリンの製造に使用される分子に関する実際の基体であるか、または電気処理されたフィブリンそのものが付着する基体である。あるいは、基体は標的とノズルの間に配置することができる。例えばペトリ皿をノズルと標的間に配置することができ、そしてマトリックスを皿の中に形成し、皿の底にスカフォールドを形成することで細胞増殖を3次元で研究することがで

50

きる。その他変動要素としては、ノズルおよび標的間の非付着性表面がある。開口部から流れ出した溶液を特定の方向に向けるために、標的を前もって選択されたパターンに特異的に帯電（接地）することもできる。電界はプログラムにより制御され、希望の構造配置を持つ電気処理されたフィブリンマトリックスを作る。標的および1または複数本のノズルは互いに可動式に改変されたことができ、それにより形成されるフィブリンマトリックスの構造配置を追加制御することができる。全工程は、特定の、前もって選択され電気処理されたフィブリンおよび、必要であればその他分子、モノマーまたはポリマーのマトリックスを得るための特定パラメータでプログラムされたマイクロプロセッサにより制御することができる。

**【0049】**

また以下特定例に記載される如く、タンクからの溶液の流れを可能にするノズルまたは開口部は帯電されて示されており、そして標的は接地されて示されている。電気処理分野の当業者は、ノズルおよび溶液を接地し、そして標的を帯電できることを認識するだろう。いずれの場合も、それにより電界が形成され、そしてフィブリン流またはフィブリン形成を補助するトロンピンおよびフィブリノーゲン流に電界が影響する。

10

**【0050】**

本発明によれば、電気紡糸フィブリン繊維の細胞外マトリックスは以下記載の様に作ることができる。フィブリンを形成できるいずれの分子も利用できるが、フィブリノーゲンまたはトロンピンを電気紡糸してフィブリン繊維を作製することが好ましい。様々な有効条件を用いてフィブリン繊維マトリックスを電気紡糸することができる。以下は好ましい方法の説明であるが、他のプロトコルを用い同一の結果を得ることもできる。フィブリン繊維を電気紡糸している図3および図4を参照すると、マイクロピペット10にはフィブリノーゲンまたはトロンピン溶液が充填され、例えばRCCSパイオリアクターの中心シリンドラ内に置かれた金属製接地スクリーンのような接地標的11の上に懸垂されている。微細ワイヤー12が溶液内に配置され、各ピペットチップ13内にある溶液に高電圧をかけている。溶液および装置配置毎に定められた特定電圧により、各ピペットチップ内にある懸濁溶液は接地標的に向け流される。このフィブリノーゲンおよびトロンピンの流れ14は連続するフィラメントを形成し、このフィラメントは接地標的に到達すると集まり、乾燥して3次元の極めて薄い、相互に接続したフィブリン繊維のマトリックスを形成する。

20

30

**【0051】**

この工程では最低の電流が用いられており、従って作業中フィブリノーゲンおよびトロンピン溶液内の温度が上昇することは予想されないことから、この流動工程はフィブリノーゲンおよびトロンピンを変性しない。

**【0052】**

電気紡糸工程同様、電気エアロゾル工程を用い高密度の、マット状の(mattelike)フィブリン滴マトリックスを作ることができる。電気エアロゾル工程は電気紡糸工程の変形であり、電気エアロゾル工程では作業中に低濃度のフィブリノーゲンおよびトロンピンを使用する。スプレーノズルの帯電先端部ではポリマースプレー(繊維)を生成するのではなく、フィブリノーゲンおよび/またはトロンピンの小滴が形成される。次にこれら滴は帯電先端部から接地基体に移され、融合ポリマー滴から成る、一般には直径10ミクロン未満程度のスポンジ状のマトリックスを形成する。

40

**【0053】**

先述の電気紡糸工程同様、電気エアロゾル工程も様々な有効条件を利用し実施できる。例えば図3および図4に示すように、電気紡糸工程で使用した同一装置を電気エアロゾル工程に利用する。電気紡糸との違いとしては、マイクロピペットタンク内の溶液に加えられたフィブリノーゲンおよびトロンピンの濃度、および/または滴流を作り出すのに用いられた電圧が挙げられる。

**【0054】**

当業者は、フィブリノーゲンおよびトロンピン溶液の濃度変更は、ピペット先端部での滴

50

の形成および流れを得るための必要な特定電圧の変更も必要とすることを認識している。

【0055】

各種分子を単独または組み合わせて使用して、電気紡糸および/または電気エアロゾルフィブリンマトリックスを作ることができる。フィブリンを形成するいずれの好ましい分子も利用することができる。好ましい実施形態では、フィブリノーゲンおよびトロンピンを用い、細胞外フィブリンマトリックスが形成される。フィブリン、フィブリノーゲンおよびトロンピンは販売会社より入手するか、または当分野で既知の方法に従い調製することができる。

【0056】

ポリマーのような各種分子、細胞またはその他物質を電気紡糸または電気エアロゾル溶液内に追加できる。実施形態の一つでは、特定産物(複数可)に関する所望コード情報を含む裸のDNAまたはベクターを、組織工学スカフォールド内に取り込ませることを目的としてフィブリノーゲンまたはトロンピン溶液内に混入できる。接種細胞によるスカフォールドの消費/再構築により、細胞はベクターを自身のDNA内に取り込み、所望の効果を生じ得る。DNAは細胞内への取り込みを促進するのに効果的ないずれの形状でもよい。例えばそれは裸の状態(例えば米国特許第5,580,859号、第5,910,488号)であっても、または複合もしくはカプセル化(例えば米国特許第5,908,777号;第5,787,567号)されたものでよい。DNA添加同様にして、抗生物質、化学療法剤、抗真菌剤、鎮痛剤、ホルモン、皮膚軟化剤、湿潤剤、抗カビ剤、酸化防止剤、ビタミン、コンディショナー、拒絶薬、その他薬物、VEGF(血管内皮成長因子)、NGF(神経成長因子)、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PGFb、PGFaおよびBGF(骨成長因子)を含むペプチド成長因子、モノカイン、免疫抑制剤、血管形成因子または本書他所にて論じるその他の因子を電気紡糸または電気エアロゾルマトリックス内に加え、組織再生を補助し、あるいはその他希望の生物学的結果を得ることができる。

【0057】

電気紡糸または電気エアロゾル工程は、これら方法で作られた電気処理されたフィブリンの任意の所定の応用に合わせて操作でき、特定条件に合致させることができる。実施形態の一つでは、マイクロピペットは接地基体に関しx、yおよびz面に動くフレーム上に取り付けることができる。マイクロピペットは接地基体、例えば管状マンドレル(mandrel)の周辺に取り付けてもよい。このように、マイクロピペットから流れ出たフィブリノーゲンまたはトロンピンを特定の目標に向かわせるか、またはパターン化することができる。マイクロピペットは手で動かすこともできるが、好ましくはマイクロピペットが取り付けられたフレームはマイクロプロセッサとモーターによって制御され、これにより特定マトリックスを作製する者は流動コラーゲンのパターンを事前に決定することができる。このようなマイクロプロセッサおよびモーターは当業者にとって既知である。例えばフィブリン繊維または滴は特定の方向に配置でき、それらを層状に重ねることができ、あるいはそれらをプログラムして完全に無作為で、方向性を持たないようにすることもできる。

【0058】

電気紡糸工程では、フィブリノーゲンおよびトロンピン流(単数または複数)を枝分かれさせてフィブリン繊維を形成することができる。分枝の程度は、電圧、接地構造、マイクロピペット先端部から基体までの距離、マイクロピペット先端部の直径、フィブリノーゲン濃度、およびトロンピン濃度を含む多くの要素により変わるが、もとより要素はこれらに限定されない。フィブリノーゲン、トロンピン、フィブリンおよび各種組み合わせを、物質をエアロゾルにする装置から電界内に噴射することで、システムの電界に送り込むこともできる。この工程は、電圧(例えば約0~30,000ボルトの範囲)、マイクロピペット先端部から基体までの距離(例えば0~40cm)、およびマイクロピペット先端部の直径(約0~2mm)を含む多くの要素により変わるが、もとより要素はこれらに限定されない。これら変数のいくつかは電子紡糸微小繊維織物分野の当業者にとって周知で

10

20

30

40

50

ある。

【0059】

接地標的の構造は、所望マトリックスの生産に合わせて変更できる。好ましい実施形態では、回転壁バイオリクターが用いられる。接地基体は、電気紡糸または電気エアロゾル工程の内部シリンダー内側に適合するシリンダーである。接地構造を変えること、例えば平面または直線若しくは複数の点で接地するようにすることで、フィブリンの流れの方向を変え、特定の応用に合わせ変更することができる。例えば一連の平行線を有する接地標的を用いて、電気紡糸フィブリンを特定の方向に向けることができる。接地標的はシリンダー状マンドレルでもよく、これにより管状マトリックスが形成される。最も好ましくは、接地は、その中にプログラムされた特定の接地構造を指令するマイクロプロセッサにより制御できる可変式表面である。あるいは、例えば接地はコラーゲンを流す固定式マイクロピペット先端部に対しx、yおよびz面内に動くフレーム上に取り付けられる。図4の接地標的11は、その長軸に沿って振動できることが示されている。

10

【0060】

フィブリンがその上に流され、噴霧され、またはスパッターされる基体は接地標的自体であっても、またはマイクロピペットチップ先端部と接地標的の間に配置されてもよい。基体はインビボでのその後の使用に合わせた特定の形状、例えば神経ガイド、皮膚パッチ、筋膜鞘、または血管移植体といった形状に成形することができる。フィブリンマトリックスは成形して、欠損部または充填部位に合わせることができる。例えば腫瘍が除去された部位、あるいは皮膚の損傷部位（傷、生検部位、穴やその他欠損）であり、失った若しくは粉砕された骨片を再構築または交換する。電気処理は高い柔軟性を持っており、実質的に必要とされる如何なる形状にも構築体を作り上げることができる。フィブリンは柔軟性に富んでおり、実質如何なる形にも形成できる。

20

【0061】

電気処理、特に電気紡糸および電気エアロゾル法のその他変形としては以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない：

- 1．異なる溶液（例えばフィブリノーゲンおよびトロンビン）を用い2種類またはそれ以上の異なるファイバー若しくは滴を同時に産生するもの（マトリックス繊維または滴列）。この場合、単一成分溶液は別々のタンクの中に維持できる。
- 2．同一タンク（複数可）内にある混合溶液（例えばフィブリン、フィブリンと細胞、フィブリノーゲンと細胞、トロンビンと細胞、フィブリノーゲンと成長因子、フィブリノーゲンまたはトロンビンと薬物）を用いて、複数の物質より成る繊維または滴（繊維組成体「ブレンド」）を産生するもの。非生物学的ではあるが生物適合物質、例えばPVA、ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、PEO等は、フィブリン、フィブリノーゲンまたはトロンビンのような生物分子と混合できる。その他生物物質、例えばコラーゲンまたはコラーゲンの配合体を加えることができる。
- 3．異なる溶液または同一溶液にも適用される複数の電位を使用するもの。
- 4．2またはそれ以上の種類の構造接地標的を備えるもの（すなわち小型および大型メッシュスクリーン）。
- 5．接地標的の正面にモールドまたはマンドレル、あるいはその他非接地標的を配置するもの。
- 6．標的の上にテフロンのような作用物質を適用し、標的からの電気処理された物質の除去を容易にしたもの（すなわち電気処理された物質が標的に張り付かないように物質をより滑りやすくする）。

30

40

【0062】

これら変形は全て別々または組み合わせて実施でき、極めて多様な電気紡糸および電気エアロゾル電気処理されたフィブリン細胞外マトリックスを産生することができる。

【0063】

さらに電気紡糸フィブリンおよび電気エアロゾルフィブリンの両方を含むマトリックスを形成できる。換言すれば、繊維と滴の組み合わせは模倣対象となる特定構造に応じて、あ

50

る応用には有益であり得る。繊維と滴のこの組み合わせは、同一のマイクロピペットと溶液を帯電条件を変化させて使用する；接地基体からの距離を変えて使用する；タンク内のポリマー濃度を変えて使用する；一部が繊維を流すためのものであり、残りが滴を流すためのものである複数のマイクロピペットを使用する；または当業者が想像できる任意のその他の方法の変更により得ることができる。繊維および滴は層状に重ねるか、または一つに混合して同一の層にすることができる。構築体は、各交互の層が後に異なる速度で分解、崩壊、加水分解するように設計された多層構造に作り上げることができる。例えば構築体の内層は電気紡糸フィブリノーゲン/フィブリンから作られ得る。次のこの層はコーゲンで覆われ、それからPLAの層、PGAの層またはその他所望の層で覆われる。

#### 【0064】

電気紡糸または電気エアロゾルマトリックスの安定性、剛性およびその他属性は、それらの化学的変更の程度に応じて制御することができる。電気紡糸または電気エアロゾルマトリックスは未変化状態で用いても、あるいは特定応用時の必要条件に合わせ変更してもよい。マトリックスの変更は、電気紡糸または電気エアロゾル工程の間に行われるか、またはそれが付着した後に行うことができる。カルボジイミドEDC(1-エチル-3(3ジメチルアミノプロピル)、塩酸カルボジイミド、NHS(n-ヒドロキシスクシンイミド)といった架橋剤またはUV光を使うことができるが、例えばアルデヒド(例えばグルタルアルデヒド)感光物質は特定波長の光、4酸化オスmiumおよびその他架橋固定化剤に曝されると架橋する。

#### 【0065】

電気紡糸フィブリンに関する条件の実施形態の一つが以下に示されている。フィブリノーゲンとトロンピンを組み合わせることによる電気紡糸フィブリンでは、おおよその適当範囲は次の通りである：電圧0~30,000ボルト、pH7.0~7.4、カルシウム3~10mM、温度20~40、イオン強度0.12から0.20M、トロンピン0.1~1.0単位/ml、およびフィブリノーゲン5~25mg/ml。電気紡糸フィブリンモノマーでは、pHは5から始まり7.4まで増加するが、イオン強度は0.3Mより高いところから始まり0.1Mまで減少する。その他条件は、このパラグラフでは開始時と同様である。各種特性を持つフィブリンマトリックスは、pHをシフトさせること、イオン強度を変えること、カルシウム濃度を変化させること、または追加のポリマー基質もしくはカチオン物質を添加することで作ることができる。

#### 【0066】

電気処理されたフィブリンマトリックスの形成

電気処理されたフィブリンは、特異形状モールドの内側に電着することができる(図5)。例えば交換が望まれる特定のタイプの臓器または組織は特異的な形状を持っており、例えば皮膚パッチは生検部位、または悪性黒色腫発見後の広範囲除去に後続した大規模な頭皮(scalp)除去領域に適した形状を持つ。次にこの形状を模すようデザインされたモールドの内側にその形が再生されて作られる。モールド内にフィブリンを電着させることでこのモールドを充填させることができる。このようにして、フィブリンマトリックスは正確にモールド形状を模す。特異形状を持つ細胞外フィブリンマトリックスを作ること、新規の臓器を作り上げる上で極めて重要であり得る。マトリックスの形状がフィブリンマトリックス内に播種された細胞を特定の様式に分化するよう誘導することができる。成長因子またはその他物質は本明細書の他所に論じるように取り込まれる。その結果、より効果的で、より本物に近い臓器または組織が作られる。中空または中実臓器を作ることができる。電気スプレー中に細胞と物質とを混合するとマトリックス内に細胞を形成することができ、それによって細胞がゲル内に侵入する必要がなくなる。

#### 【0067】

フィブリンの細胞外マトリックスはまた、電気紡糸および電気エアロゾルといった電気処理技術により作ることもできる。この目的で論じる場合、電気紡糸および電気エアロゾルは相互交換可能に使用される用語である。フィブリンを電気紡糸するためには、少なくとも2種類の異なるタンクが一個の開口部で一つに接続される。タンクの一つはフィブリノ

10

20

30

40

50

ーゲンを含み、もう一方のタンクはトロンピンを含む。これら成分を含む溶液は、それらが開口部から電気紡糸工程内に流し込まれる直前に一つに混合される。このようにして電気紡糸工程ではフィブリンはまさしく微細繊維を形成するか、または微小滴が形成される。

【0068】

フィブリノーゲンはまた、トロンピンの湿潤雰囲気内に電気スプレーされ、電界内にフィラメントを形成することもできる。フィブリノーゲンはまた、トロンピンを持つ標的に電気スプレーされてもよい。あるいはトロンピンをフィブリノーゲンを持つ標的に電気スプレーしても良い。

【0069】

フィブリンを取り込んだ細胞外マトリックスは、フィブリンと1つまたはそれ以上のその他物質および成分とを組み合わせマトリックスを作ることによって作製できる。例えばコラーゲンおよび/またはフィブロネクチン、および/またはその他マトリックス物質、ならびにその中に取り込まれたフィブリンを有する細胞外マトリックスを作ることができる。このことは特定タイプの合成組織または合成臓器によっては有用であり得る。フィブリンとその他マトリックス成分とを混合することに加え、フィブリンを他のマトリックス構築工程に結びつけて利用することもできる。換言すれば、押し出し成形されたチューブはその上に外層電気紡糸を持つことができ、この場合異なる層が相互に補い合って、特定のタイプの細胞増殖を促進するのに適当なマトリックスを提供する。例としては主にコラーゲンチューブを含む血管移植体が挙げられる。チューブの外側には、フィブリンと細胞の電気紡糸層が加えられ、特定レシピエントへの移植体の受け入れ性を高め得る。第二の例は繊維芽細胞を一層に増殖させ、この第一層を電気処理されたコラーゲンで覆い、次にフィブリンマトリックス内に表皮細胞からなる第二層を増殖させることで形成されたインビトロ皮膚標本である。この「サンドイッチ」技術は各種組織の作製に使用できる。

【0070】

細胞外マトリックスの各種特性は、ニーズと、そのマトリックス中に浮遊し、増殖させられる細胞の仕様に合わせ調整できる。例えば細胞外マトリックスを作製する方法に従って、多孔性を変えることができる。例えば繊維(滴)の大きさおよび密度により特定のマトリックスの電気紡糸を変えることができる。マトリックス内で増殖すべき細胞が大量の栄養流および廃物排除を必要とする場合には、緩いマトリックスを作ることができる。他方、作製すべき組織が高密度環境を必要とする場合には、稠密な(dense)マトリックスをそれに合わせ設計することができる。多孔性は塩またはその他抽出性作用物質を混合することで操作できる。塩を除去することでマトリックス内に規定の大きさの穴が残るだろう。

【0071】

電気処理されたフィブリンの利用

電気処理法により作製されたフィブリンには多くの種々の用途がある。この多様性は、工程そのものが持つ可変性が可能にしている。一般的には、使用する装置および溶液は変更可能であり、そして各種の工程後処理が存在する。工程後処理の一つは、ネットワーク分解を遅らせ、より高い耐久性物質を提供するために抗繊維素溶解剤を添加することである。別の工程後処理は、電気処理されたフィブリンを成形または整列させるために、電気処理されたフィブリンに力を加える牽引アラインメントであり得る。これは神経ガイドまたはその他目的物の製造に有用である。フィブリンまたはフィブリノーゲンは、架橋蛋白質分野の当業者に既知である架橋剤、例えばカルボジイミド、アルデヒド、または紫外線エネルギー(感光剤を使用している場合)を使って架橋され得る。

【0072】

細胞外マトリックスとしての電気処理されたフィブリンの使用には多くの利点がある。凝固剤として、フィブリンが体内の治癒に関係している。フィブリンはフィブリン構造内に浮遊している細胞への、または細胞からの栄養物および老廃物の流れを可能にする多孔性の媒体である。またフィブリンの存在は近接領域の血管系の成長を促進し、そして多くそ

10

20

30

40

50

の他の形では天然の治癒促進物質である。

【0073】

フィブリンは容易に入手できる物質である。フィブリンは血漿中に存在する。細胞外マトリックスをレシピエント内に移植される組織または臓器の作製に使用する場合には、マトリックスを作るフィブリン(フィブリノーゲン)供給源としてレシピエント自身の血漿を使用することができる。このようにして、マトリックスはレシピエント自身のフィブリンから作られるため、他のヒトドナーより得た物質からのウイルス暴露に関する潜在的な合併症を解消できる。他の供給源より集められたフィブリンの使用は、複数の精製段階、および低温殺菌のような工程、またはウイルス粒子およびその他感染作用物質を除くその他工程によって、有意に安全なものにできる。

10

【0074】

フィブリンはレシピエントの体部により自然に吸収されることため、優れた細胞外マトリックスである。換言すれば、フィブリンがその治癒/再構築の目的を果たしている間および後に、体部はフィブリンを自然に分解する。これは自然の治癒メカニズムの一部である。そこには残留異物は存在せず、移植細胞を構成する細胞、組織または臓器のみが残る。電気処理されたフィブリンは、異なる分解速度を得るために他の原繊維物質と混合してもよい。天然フィブリンは迅速に分解し、そしてコラーゲンの分解はこれより遅く、PGAおよびPLAはさらに遅く分解する。フィブリンまたは他の物質を様々な程度に架橋することは、物質を様々な程度に安定化するだろう。半減期を若干延ばす場合には、電気処理されたフィブリンはわずかに架橋され、あるいはより長期間使用する場合にはより強く架橋され得る。

20

【0075】

電気処理法により産生されるフィブリンには多くの用途がある。この工程およびその産物の利用に関する別分野としては、生物医療への応用が挙げられる。本明細書では、これら使用分野の潜在的応用の非限定例について論じる。

【0076】

生物医療応用

電気処理技術により産生されたフィブリンに関しては、少なくとも2つの大きな生物医療応用がある。一般的には、電気処理されたフィブリンマトリックスは細胞外マトリックスの形成および薬物を含む物質の運搬に使用される。

30

【0077】

電気処理されたフィブリンは以下を含む複数の生物医療領域で使用されるが、もとよりこれらに限定されるものではない：局所創傷治療、時間的(temporary)皮膚パッチ、皮膚移植体、硬膜パッチ、床ずれ、糖尿病潰瘍を含む潰瘍、切傷、擦過傷、代替筋膜、開放部位または手術野への電気スプレーといった外科応用、出血を止めるための止血剤(シート、ペースト、粉末、フィルムおよびその他形状)、生物学的縫合材、マイクロ臓器製造用マトリックス、神経交換時に神経幹細胞と組み合わせ使用する神経修復用神経ガイド、体内への細胞導入または再導入のためのスカフォールド。電気処理されたフィブリンは水と接触して反応するか、または水と接触した後に一定時間(フィブリノーゲンを処理するのに使用されるキャリアー分子により決定される)後に反応する乾燥形状で作製される。本発明の電気処理されたフィブリンの止血特性は、血友病患者に特に有益であろう。

40

【0078】

架橋型の電気処理されたフィブリンの生物医療応用としては以下のもの、すなわち血管弁、血管移植体、腱/筋肉修復、腱または靭帯、血管スカフォールドまたはサポート、創傷治療、軟骨、ヘルニアパッチ、神経修復、骨、縫合材料、および生物工学プラットフォームが挙げられる。

【0079】

電気処理されたフィブリンマトリックスを用いた生物工学

発明の更なる応用は、固体支持体として電気処理されたフィブリンマトリックスを使用す

50



る組織製造用プラットフォームとしての応用である。プラットフォーム製造は、フィブリン、または他の分子と組み合わせられたフィブリンの電気処理されたマトリックス、微小繊維または物質配合体より構成される。プラットフォーム全体の三次元構造の形状は、生物工学の対象となる組織の最終デザインとタイプにより決定される。

#### 【0080】

複数のデザイン変更 (permutations) が可能である。例えばフィブリン含有組織の固体三次元「プラグ」を作製するには、マンドレル上またはモールド内に製造プラットフォームを、おそらくは電気スプレーにより電着する。マンドレルは円筒形、平たい卵形、長方形の封筒型 (郵便封筒のような)、またはその他所望の形状である。フィブリン含有生物工学プラットフォームは所望形状を持つマンドレル上に電着され、硬化される。電着マトリックスはマンドレルから取り外される。円筒状の生物工学プラットフォームまたはその中に密封領域が望まれるその他形状の構築体では、生物工学プラットフォームの一端を密封するのに縫合糸、接着剤、ステープルまたはヒートシール、あるいはその他方法が用いられる。これにより、一端が閉じられ他端が開いた中空プラットフォームが得られる。次に電着フィブリン含有プラットフォームは細胞またはその他物質で満たされるか、または細胞もしくはその他物質は構築体外面上に置かれる。例えば電気処理操作より得たフィブリン混合体、または細胞のようなその他物質、あるいは薬物または成長因子のような分子がプラットフォーム内に置かれる。構築体を物質で充填するのに使用された封筒の自由開放端は縫合、接着またはヒートシールされ、密封された生物工学プラットフォームが作り出される。次に構築体全体が細胞培養用バイオリクターまたは更なる発生を目的として原位置に直接置かれる。変更を加えれば、中空体ではない固体フォーマットより構成された生物工学フィブリン含有プラットフォームも電気処理することができる。

10

20

#### 【0081】

毛細管ネットワークを予備形成するために、播種の最中にフィブリン含有生物工学プラットフォームのコアまたは外面に内皮細胞を加えてもよい。

#### 【0082】

細胞は、フィブリンマトリックス形成時に細胞をフィブリンマトリックス内に捕捉または取り囲むために、電気処理工程に加えられてもよい。この作業は、電気処理される物質、例えばフィブリンノーゲンおよびトロンビンを一種類または複数の有機溶媒 (例えば高または低 pH を持つ溶媒、あるいは高または低塩含有量の溶媒内) に置かなければならない場合には、別ノズルまたは別の供給源から細胞を加えることで達成される。細胞はまた別の手段で加えることもでき、例えば細胞を電気紡糸流中に滴下し、形成された繊維で捕捉してもよい。

30

#### 【0083】

細胞の極性は、電気処理中または後でマンドレル上のフィブリン繊維の方向を管理することで制御できる。整列した (aligned) 繊維の場合、この作業はおそらくは電気紡糸を用いて、回転している標的マンドレル上に電着することで達成できる。フィブリン繊維は回転方向にマンドレル周囲に巻き取られるだろう。静止した非回転電気紡糸マンドレル上に電気紡糸すると、より無作為な繊維マトリックスが生じるだろう。フィブリンは紡糸後に牽引またはその他形状の機械膨張により機械的に方向付けできる。電気処理されたフィブリンマトリックスが方向性を持つことは、細胞増殖を促進する上で有益であろう。

40

#### 【0084】

極性は、まず、回転しているマンドレル上に方向性をもったマトリックスを電着することで制御してもよい。次にマトリックスをマンドレルから切り取り、90度 (またはその他の回転角度) 回転してからマンドレルに戻す。次に第一層の上に第二物質層を電気紡糸する。この方法は回転長軸に沿って整列されたフィブリン繊維の内層を作り出す。あるいはこの方法で作製されたフィブリン層の周囲を他の物質層で囲んでもよい。これら物質はPGA、PLA、PGA:PLAコポリマーのような生体適合物質を含む。

#### 【0085】

細胞極性は、バイオリクター内に設置された牽引装置内に生物工学プラットフォームを配

50

置することで制御できる。時間をかけて構築体を横切る応力を徐々に加えることで、プラットフォーム内の細胞は加えられた応力と平行に広がるだろう。

【0086】

細胞は電気処理されたフィブリンと共に、同一タンクまたは別のタンクから電着してもよい。電気処理されたフィブリン生物学プラットフォームは、幹細胞のような細胞を操作するための分化プラットフォームとして使用できる。電気処理されたフィブリンマトリックスの多孔性および化学組成は、製造前、製造中および製造後に制御できる。これにより、幹細胞の分化プロセスを制御するのに重要と信じられている、望ましい微小環境を作り出すことができる。

【0087】

電導性物質は電気処理されたフィブリンマトリックス内または上に電着してもよい。このようにしてフィブリン含有構築体を電気刺激して、神経の内側への成長、幹細胞の分化または改変された筋肉の収縮を促進し、あるいはフィブリンが骨再生キャリアーとして使用されている整形外科応用での骨形成を促進することができる。電気処理により作られたフィブリンマトリックス内への電導性物質の取り込みは、製造後にフィブリンマトリックスの特性をさらに変更する手段として使用することもできる。例えば、存在するフィブリンマトリックスにわたり電界を印加することは、マトリックスの形状、多孔性または密度を変えるのに使用され得る。フィブリンマトリックスの安定性（分解耐性）は、フィブリンにわたって電界を印加することで変更されるだろう。磁性物質を、マトリックスを動かすことができるようにマトリックス内に置くことができる。例えば磁場を使うことで、比較的  
非侵襲的手段によりマトリックスの位置決めを行い、そして腹膜内のマトリックスの運動を方向付けできる。このような物質としては、カーボンブラックまたはグラファイト、カーボンナノチューブ、磁性流体および電導性ポリマーの各種分散体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また電導性ポリマー繊維はフィブリン電気処理中に電気紡糸することで製造できる。さらに電導性ポリマーは、例えば重合開始剤および酸化剤（例えば  $FeCl_3$ ）で処理した後でのモノマー（例えばピロール）の取り込みにより、原位置でフィブリン内に調製することができる。最後に電気処理後にフィブリン被覆コンダクターを例えばポリピロールまたはポリアニリンの電気化学合成アノードとして使用することで、電導性ポリマーをフィブリン内に成長させることができる。フィブリノーゲンをピロールまたはアニリン水溶液に加えることで、アノードに捕捉用フィブリノーゲンと一緒  
に電導性ポリマーを作ることができ、そして捕捉フィブリノーゲンはその後トロンピンで処理することができる。

【0088】

フィブリンを含有する改変された組織は各種手段により血管化できる。血管形成因子マツトが電気処理されたフィブリン内に供給される。電気処理されたフィブリンを含有する改変された組織は、網組織内に配置されることで血管を形成し得る。

【0089】

フィブリンを含有する改変された組織をバイオリクター内に入れて臓器を改変し、または細胞の遺伝子プロファイルを変えることができる。例えば細胞は患者から得て、患者のフィブリンを患者血漿より電気処理することができ、この電気処理されたフィブリンマトリックスを用いて患者より単離した細胞を支持することができる。これら細胞をトランスフェクションし、培養し、特性分析（characterized）し、患者内に移植することができる。この方法を用いると、患者自身の物質だけが使用されることから、拒絶の可能性を最小限にすることができる。トランスフェクションは希望する応用に応じて、一時的または永久的な様式で発現され得る。

【0090】

本発明では、初期には細胞は通常技術で培養される。適当な細胞密度に達した後、細胞は電気処理される前にフィブリン溶液内に懸濁される。あるいは、細胞をフィブリノーゲンまたはトロンピン溶液内に懸濁してから、この懸濁液を電気処理する。細胞がフィブリノーゲンに懸濁されている場合には、この懸濁液は電気処理、例えば噴霧または紡糸され、

10

20

30

40

50

そしてこれとは別にトロンピン溶液がフィブリノーゲンスプレー内に噴霧されるか、またはフィブリノーゲン内に懸濁された細胞で被覆された標的に噴霧される。したがってフィブリンは混合スプレー内または標的に形成される。次にその中に細胞が埋め込まれた形の三次元フィブリン構造体が細胞培養装置に戻され、増殖が続けられる。以下の実施例で示すように、細胞はフィブリンネットワークに付着すると迅速に集合する。マトリックス内に懸濁する細胞のタイプによっては、細胞を、細胞のタイプに対応する正常組織または臓器と同一の生物学的外観での増殖を促進できる。

#### 【0091】

この電気処理されたフィブリン含有組織はいくつかの利点を提供する。それは組織を非常に高密度に増殖するのに使用できる固体支持体を提供する。これはフィブリンマトリックスを機械的または化学的に圧壊するだけで達成できる。これは問題の細胞の「増殖」段階および「使用/実用」段階が各種細胞密度を必要とする場合に有利である。例えば栄養および気体輸送 (transport) の観点から、より希釈した場合に、より効率的に増殖細胞を得ることができる。増殖段階がなされている場合、マトリックスを圧壊することで細胞を濃縮でき、移植体またはその他試験に適した濃縮細胞「プラグ」を容易に提供できる。この電気処理されたフィブリン含有マトリックスは構築体の局所微小環境を管理し、確立する。マトリックスの物質特性を制御することで、構築体の浮遊性やマトリックスの多孔性および安定性を制御できる (すなわちそれを非常に安定なもの、または比較的短時間に分解するものにデザインできる)。それはバイオリクター環境での使用に固有であり、かつ適応しやすい (amenable) 細胞培養または組織生物学向けプラットフォームを提供する。それはまた大型ではあるが手で操作できる、細胞培養および多様なタイプ組織の生物学に適したプラットフォームも提供する。また電気処理されたフィブリン含有マトリックスはペプチド成長因子、薬物または遺伝子配列、センスおよびアンチセンス方向の部分遺伝子配列に関する固相運搬装置を提供する。

10

20

#### 【0092】

本発明は、三次元の細胞増殖および組織/臓器合成を可能にする技術を記載する。転移の病理プロセスを模倣することで、細胞は電気処理された三次元フィブリンマトリックス内に配置されて、増殖および正常細胞間相互作用をサポートする。細胞はこれらフィブリン構造内で迅速に増殖し、正常組織および臓器内に見られる形状を呈するだろう。

#### 【0093】

電気処理されたフィブリンマトリックス内の細胞カプセル化

試験で使用される多くの電気処理の応用では、生物学用の電気処理されたフィブリンマトリックスの製造には有機溶媒を使用してフィブリン形成可能分子を持ち込まなければならない。しかしフィブリンの電気処理工程中に、フィブリンマトリックス内に細胞を取り込むことが望まれる応用も多い。例えば生物学軟骨または骨作製時には、電気処理されたフィブリンマトリックス製造時にその内にこれら組織の残存細胞を捕捉することが望ましい。生物学用マトリックスの製造に最も効果的である多くの溶媒を使用した場合、これは不可能である。フィブリノーゲン溶液内、またはフィブリンマトリックス (例えば部分的または完全に重合させたフィブリンマトリックス) 内に細胞を浮遊させれば、細胞をフィブリン製造中に電気処理されたフィブリンマトリックス内に運び込むことができるだろう。

30

40

#### 【0094】

マトリックスは各種因子および蛋白質で処理し、または播種してマトリックスのレシピエント環境内への分解/吸収を制御することもできる。このことは、例えばマトリックス内に播種された細胞の増殖が遅い場合、細胞の再生および増殖を可能にするのに十分な時間マトリックスの完全性を維持するのに有益である。一方、細胞が迅速に増殖し成長できる場合には、短命型のマトリックスが望ましいだろう。アプロチニン添加物、アミノカプロン酸または同様の繊維素分解阻害剤の濃度を変えること、またはマトリックス内の化学的または紫外線架橋の強さを変えることは、この変動の正確な制御に利用できるだろう。マトリックスには移植した際の血管の成長を促進するための血管形成因子、神経成長を促す

50

神経成長因子、骨形成を促進する骨成長因子、および細胞分裂を促進するPDGFアイソマーを含む各種成長因子を接種することも可能であるが、もとよりこれら因子に限定されるものではない。フィブリン含有マトリックスに、治癒を促進する、免疫拒絶を最小限に留める因子を接種してもよい。フィブリン含有マトリックスに、炎症とそれに続く治癒を誘導するかまたは繊維カプセル(PGA)形成を促進する作用物質を接種してもよい。添加可能なその他作用物質としては以下のものが挙げられるが、もとよりこれらに限定されるものではない：コルチゾンのような炎症抑制剤、他の抗炎症剤、ホルモン、シクロスポリンおよびその他抗拒絶剤、ならびにセンスおよびアンチセンス両方向の完全および部分長遺伝子配列。例えばマトリックス内のセンス方向のVEGFは、創傷に対する局所適用に使用される。この遺伝子配列は傷害部位近傍の細胞に運ばれ、これら細胞に一過的または永久的にトランスフェクションする。プロテアーゼを対象としたアンチセンス配列も利用できるだろう。この応用では、アンチセンス配列は完全長でも部分長でもよく、または複数の混合体でもよい。これらアンチセンス配列が運搬されると、一過的な様式にて標的分子の発現を抑制する。

10

## 【0095】

細胞は、電気処理されたフィブリンマトリックスが製造されている最中にその中に配置してもよい。細胞はフィブリン、またはフィブリノーゲンもしくはトロンビンのようなフィブリンを形成可能な分子の同一溶液から、電気処理されたフィブリンと共に沈着される。別の実施形態では、細胞は第二供給源から電気処理中にフィブリンマトリックスに運搬される。実施形態の一つでは、細胞はフィブリン電気処理中にマンドレル上に滴下される。

20

## 【0096】

細胞は、電気処理されたフィブリンマトリックスへの細胞運搬システムとして、エアロゾル内に浮遊させてもよい。細胞はフィブリンマトリックス形成中にこの様式で運搬される。心臓繊維芽細胞をリン酸干涉生理食塩水(PBS)に約1ミリリットル当たり百万個の細胞濃度で懸濁した。この細胞懸濁液をパッシュェ(Paasche)エアブラシのタンク内に入れた。このタイプの装置を使った細胞運搬の効率を試験するために、本発明者らはまずこの細胞懸濁液を100mm培養皿に噴霧した。生き残ったいくつかの細胞は皿に付着し、基体上に広がった。

## 【0097】

第二試験では、培養皿をエアブラシからさらに遠くに置き、実験を繰り返した。細胞は皿の上に観察された。それらは衝撃により平坦になったように見え、その一部が基体表面に広がっていた。皿に培地を加えてから細胞をインキュベーター内に入れた。1時間の培養後、細胞を再度調べたところ多くの細胞がさらに基体上に広がっているのが見いだされた。これらの結果は単純なエアブラシ装置が、細胞をエアロゾル滴にして必要に応じて対象表面または部位に細胞を運搬するのに使用できることを示している。細胞生存率はこの技術を技術中に生ずる切断力に耐性な細胞に制限すること、細胞を衝撃から守る添加物に加え細胞懸濁液を開発すること、またはより多くの層流を生ずるようにエアロゾル発生装置を改良することで改善される。さらに、細胞エアロゾルを、フィブリンフィラメントへ送ることは、フィブリンフィラメントが、マンドレルと電気処理されたフィブリンを形成可能な分子供給源との間の空隙で重合を進める場合には、細胞のクッションにもなるだろう。以下の説明と結びつける意図はないが、細胞は電気紡糸または電気処理で作られ、マンドレル上に引っ張られたフィラメントストーム(storm)内に捕捉されると考えられる。このやり方は、細胞を固体表面に直接噴霧することに比べ細胞への傷害が小さいものとされる。

30

40

## 【0098】

細胞をフィブリンマトリックスに運搬する別の方法としては、細胞の電気エアロゾル運搬がある。細胞は8kVで静電スプレーすることで標準的なポリスチレン製培養皿上に付着でき、静電的細胞スプレーが有効な方法であることを示唆している。本発明者らはまた心臓繊維芽細胞のPBS液を最大20kV電位差で電気エアロゾル化した。

## 【0099】

50

シュワン細胞（ラット）を1日後に通常の方法でP S ペトリ皿で平板培養した。またシュワン細胞を1日後に、皿後方に金属アースプレートが付いたP S ペトリ皿の上に10kVで電気スプレーした。両サンプルは1週間後ほぼ周密状態まで増殖した。この方法はいくつかの著しい利点をもたらす。第一に運搬段階（すなわちエアロゾル発生時）に生ずる剪断力の細胞に対する傷害性がきわめて小さくなると思われる。第二は、エアロゾルの方向を高い忠実度で制御できることである。本質的に細胞エアロゾルは対象表面上に「塗布」することができる。これにより細胞を特定の部位に向けることができる。電気エアロゾル運搬では、細胞は適当な媒体（例えば培地、生理食塩水等）中に懸濁させられ、電圧がかけられ、そして接地標的に向けて送られる。この工程は電気処理、特に電気紡糸で使用される工程にきわめてよく似ている。これにより、それらが作られ接地標的に送られる時に、滴内に細胞を捕捉した微小霧が作られる。

10

#### 【0100】

細胞はエアロゾルおよび電気エアロゾル技術を用いて、電気処理技術により形成されたマトリックス、例えばフィブリンマトリックス上に運搬され、おそらくは電気紡糸により電着を受ける。細胞の電気エアロゾルは、フィブリンマトリックスの電気紡糸と平行して（すなわちフィブリンを電気紡糸する部位に沿って）、または別の場所から運搬されるだろう。細胞はフィブリン電気紡糸工程中の空隙内に作られたフィラメントストームに運ばれるか、または標的に送られる。細胞および電気処理されたフィブリンマトリックスはまた別の様式で標的に運ばれてもよく、すなわちマトリックスを電着し、細胞をエアロゾルにして運搬してもよい。これにより構築体を別個の層に分離することができる。細胞を回収するのに用いられる標的マンドレル上に水を送る蒸気源を設けることができる。これは細胞を処理中の脱水から守ることとなり、生存率が改善するだろう。

20

#### 【0101】

エアロゾル法を使用する場合、細胞はいずれの時点またはいずれの方向からも電気処理されたフィブリンマトリックスに加えられるだろう。最後の考察は、細胞、または薬物、凝固因子、抗炎症剤、成長因子、抗菌剤またはDNAのようなその他物質のエアロゾルを直接原位置部位に送達することである。例えば電気処理されたフィブリンマトリックス、おそらくは電気紡糸フィブリンマトリックスは、皮膚創傷部位上に、細胞存在下、または非存在下に直接作られるだろう。次に追加の細胞または物質がエアロゾルとして創傷部位の上または中に適用されるだろう。他の手術部位についても、電気エアロゾル、電気紡糸、電気スプッター、電気スプレーまたはそれら方法の組み合わせといった各種電着技術を用いた物質運搬が利用できるだろう。

30

#### 【0102】

多くの潜在的用途を持つ細胞運搬に関するさらに別の実施形態は、細胞または薬物を、エアロゾルを作る前にキャリアー内に捕捉することである。例えば細胞または薬物、あるいはその他物質をアルギン酸塩のような物質内に封入する。封入された細胞は処理中の剪断力または傷害から物理的に保護される。この形で電気処理されたフィブリンマトリックスに運ばれた細胞は、スプレーまたは静電的に播種された場合により高い生存率を有することが期待される。このタイプの方法は電気処理に用いられたフィブリン繊維と相互作用しない薬物またはペプチドのような捕捉物質の放出プロファイルを指定するのにも使用できる。例えばペニシリンのような薬物はフィブリンの電気紡糸マトリックスに結合または相互作用しない。しかしこの薬物はPGAペレット、PLAペレット内に捕捉することができ、または電気エアロゾル化してフィブリンの電気紡糸マトリックス内にペレットを作ることにもできる。ペニシリンを含むこのペレットまたは電気エアロゾル化滴は溶解を始め、捕捉した物質を送出する。放出プロファイルは、工程に使用する物質の成分により調整できる。細胞の運搬に加え、断片化した細胞の破砕体または細胞断片を、未処理細胞存在下または非存在下に電気処理されたフィブリンマトリックスに運搬してもよい。細胞断片はいくつかの組織で治癒を促進することが知られている。したがって、いくつかの応用では、電気処理中にフィブリン形成溶液内から直接、または別の供給源から間接的に電気処理されたフィブリンマトリックス内に細胞破砕体を取り込むことが望ましい。

40

50

## 【0103】

上記考察は電気処理された細胞外フィブリンマトリックスの構築に関し特異的なものに限られている。組織または臓器（または臓器様組織）を構築するには、細胞をマトリックスに加える必要がある。好ましくは、細胞はフィブリノーゲンおよびトロロンピン混合体を一緒にする前、またはそれと同時に加えられる。このようにして細胞は3次元マトリックス全体に懸濁（suspend：浮遊）される。典型的には細胞はフィブリノーゲン（血漿または精製フィブリノーゲンでもよい）を含む混合体中に含まれる。フィブリノーゲンおよびトロロンピンが、モールド内への挿入直前、または電気紡糸工程における流し込み段階直前に一緒にされると、懸濁液中に細胞が良好に分布し、細胞外マトリックスを得ることができる。細胞はまた形成中のマトリックス内に噴霧または滴下してマトリックスを形成してもよく、それによってマトリックスが供給源溶液と標的の間の空隙を横切る際に細胞が捕捉される。

10

## 【0104】

組織または臓器の作製には多くのタイプの細胞が利用できる。幹細胞、コミットした細胞、および/または分化した細胞が利用できる。また作られる組織または臓器のタイプによっては、特定のタイプのコミットした幹細胞が利用できる。例えば筋原細胞は各種筋肉構造の構築に使用でき、神経芽細胞は神経の構築に使用でき、骨芽細胞は骨形成のために選択できる。その他タイプのコミットした幹細胞および未決定の（uncommitted）胚性幹細胞、骨髄幹細胞および臍帯幹細胞を含む幹細胞を使って、肝臓、腎臓等の臓器または臓器様組織を作ることができる。同様に繊維芽細胞のような分化した細胞をフィブリンマトリックス内に用いて、これら細胞を特定の部位、例えば肝臓内に配置するための運搬装置となるパッチ、例えばヘルニアパッチ、皮膚向け内皮細胞、骨向け骨芽細胞、および死体ドナー膵臓島細胞のような分化した細胞（フィブリンを固相に用いる）を作ることができる。前述のように、フィブリン含有細胞外マトリックスの形状は、細胞を希望する方向の特定のタイプに成長させ増殖させる信号を細胞に送るのに役立つ。その他因子および分化誘導体をマトリックスに加えて、特定タイプの細胞の増殖を促進することができるだろう。さらに、細胞外マトリックス内に取り込まれるタイプの細胞の様々な混合体もあるだろう。これらは、例えば得られた「臓器」または「臓器様」組織の血管化を促進するのに利用できる。

20

## 【0105】

特定の疾患状態では、臓器は機能不全状態に成っている。その典型例は肝硬変である。肝硬変では正常肝細胞は瘢痕組織の繊維帯に捕捉されている。本明細書に記載の技術を用い、疾患肝臓を生検し、生存肝細胞を獲得し、本新規電気処理されたフィブリン含有細胞外マトリックス内にて増殖させ、通常の肝移植までの一時的橋渡しまたはそれに代わるものとして患者に細胞を再移植することができる。

30

## 【0106】

単分化能細胞株を三次元マトリックス内に混入する方法は、複合臓器を模した構造体の製造に利用できる。グルカゴン分泌細胞、インシュリン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、および/または膵臓ポリペプチド分泌細胞またはその組み合わせを別々の培養器内で培養し、次に電気処理によりそれらをフィブリンマトリックス内に一つに混合することで、人工膵臓島が作られる。次にこれら三次元構造体を、移植可能な糖尿病長期治療装置として皮膚下、腹腔内、肝臓内、または他所望の部位内に配置する。

40

## 【0107】

その他非限定的応用としては、ホルモン産生細胞が挙げられる。このカテゴリーには多くの応用がある、すなわち、例えばとりわけ成長ホルモン分泌、黄体形成ホルモン、濾胞刺激ホルモン、プロラクチンおよび甲状腺刺激ホルモンの合成および分泌に影響する下垂体前葉細胞の移植がある。ライディッヒ細胞や濾胞細胞といった生殖腺細胞が、テストステロンまたはエストロゲンレベルの補充に使用できる。特別にデザインされた組み合わせは、閉経後および前の女性のホルモン補充療法、あるいは内因性テストステロン分泌減少後の男性のホルモン補充療法に有益である。ドーパミン産生ニューロンは、黒質内の欠損ま

50

たは損傷ドーパミン細胞の補充を目的として、フィブリンマトリックス内に使用され、移植される。患者自身の幹細胞またはその他幹細胞を、若干損傷を受けた細胞、例えば膵臓島細胞または肝細胞と混合し、電気処理されたフィブリンマトリックス内に入れ、その後、幹細胞を所望のタイプの細胞に分化させてから回収することもできる。これはインビトロまたはインビボで実行できる。次に、新たに形成された分化した細胞が患者体内に導入される。

**【0108】**

電気処理されたフィブリンを用いた物質運搬

さらに、応用によっては、薬物、酸化防止剤、ビタミン、化粧品、核酸、ベクター、創傷治療製品およびホルモンを含む物質を比較的局所環境に、電気処理されたフィブリンを用いて運搬し閉じこめられるが、もとよりこれら物質に限定されるわけではない。その他物質および薬物を以下に非限定的に掲載する、すなわち抗生物質、抗菌剤、抗炎症剤または治癒を促進する物質、抗生物質、抗カビ剤、化学療法剤、抗真菌剤、鎮痛剤、ホルモン、皮膚軟化剤、湿潤剤、酸化防止剤、ビタミン、拒絶薬およびコンディショナー。いくつかの好ましい薬物または物質としては、エストロゲン、アンドロゲン、コルチゾン、シクロスポリン、VEGF（血管内皮成長因子）、NGF（神経成長因子）、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、FGFb、FGFaおよびBGF（骨成長因子）を含むペプチド成長因子が挙げられるが、これらに限定されるものではない。望ましい物質または薬物は電気処理されたフィブリンと組み合わせられると理解すべきである。以下のパラグラフでは、薬物および物質は相互交換的に使用される。

10

20

**【0109】**

例えば圧迫性潰瘍（例えば床ずれ）については、単独または複数の薬物が電気処理されたフィブリンマトリックスにより局所に運搬されるだろう。事実上、電気処理されたフィブリンマトリックスはそれ自体が分解し自然に溶解することから、除去を必要とせず薬物を送達する生物学的適合包帯として機能する。体全体を対象とした、より一般的な薬物送達では、電気処理されたフィブリンマトリックスは体腔内に挿入されるか、または皮下ドメイン内に置かれるだろう。いずれの場合も、薬物の放出は局所的または全身性、持続性またはより一過性に調整できる。

**【0110】**

電気処理されたフィブリンマトリックスは様々な形で薬物（または他の応用では制御的方法で放出しなければならない薬剤）を送達するのに用いられる。この工程で物質の処理に用いられるノズルまたは溶媒タンクの数に制限はない。

30

**【0111】**

薬物分子は、電気処理用のフィブリンを調製するのに使用される溶媒キャリアー内に混合される。このシステムでは、生物学的に適合した合成ポリマー（例えばPLAまたはPGA、ポリマー配合体、またはその他ポリマー）、天然ポリマー（例えばフィブリノーゲン、トロンピン、フィブリン、またはフィブリンを形成可能なその他ポリマー、あるいは天然材料からなる合成ポリマー）を各種薬物と混合し、直接電気処理する。得られた電気処理されたフィブリン含有マトリックスは特定部位に局所適用でき、薬物はマトリックスから周辺環境内に分解していくフィブリンに相関して放出される。取り込まれた薬物に関連した電気処理されたフィブリンの状態は規定され、システムの化学により制御でき、フィブリン形成溶媒（複数可）と薬物の溶解性によって変わる。これらパラメータを操作して薬物の放出（または周囲環境へのその他要素の放出）を制御することができる。電気処理されたフィブリン含有マトリックスは、電気スプレーまたは電気スプレーと電気紡糸の組み合わせ、またはその他順番を変更した組み合わせにより作製することもできる。この方法は薬物送達について別の制御レベルを提供する。

40

**【0112】**

別の実施形態では、薬物は電気処理されたフィブリンに使用される物質と共に、懸濁した凝集体の集合として目的に合わせ作製される。このタイプの溶液の電気処理は、薬物粒子を電気処理されたフィブリンマトリックス内に物理的に取り込む。電気処理されたフィブ

50

リンマトリックスからの薬物分子の放出は、フィブリン分解と薬物粒子の周囲環境への溶解とに相関する。同一薬物を、懸濁液ではなく溶液として電気処理工程に使用すると、異なる放出パターンと、さらに別の工程制御レベルを得ることが期待される。他の例では、薬物粒子は電気処理されたフィブリンマトリックス内に捕捉される。放出は凝集、溶解およびフィブリンマトリックスの分解の複雑な相互作用により規定される。

#### 【0113】

別の例では、薬物分子を電気処理されたフィブリンまたはフィブリノーゲンに共有結合または化学結合することが望まれる。理論ではこのような分子はポリマーキャリアー(c a r r i e r)が加水分解または酵素分解された時にのみ放出される。この方法は生体医療工学またはその他外科応用に特に魅力的である。血管形成ペプチドや神経成長因子といった薬物は、改変された組織を支持するのに用いられる電気処理されたフィブリンマトリックスのポリマー主鎖に結合される。この場合も、フィブリンマトリックスが溶解する際にペプチドは局所ドメイン中に勾配を形成しながら制御された様式で放出されるだろう。ペプチド勾配の形成は多くの生物学的プロセス、例えば血管新生にとって重要な調節成分である。外科応用では、抗血管ペプチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは電気処理されたフィブリンマトリックス内に取り込まれ、次にそれを使って通常処置が及ばない腫瘍の周囲を包む。抗血管物質の放出は腫瘍の増殖を抑制するだろう。別の使用では、センスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド(遺伝物質ではあるが完全長の遺伝子ではない)が、ある期間細胞機能を促進または阻害するのに使用される。例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドを電気処理されたフィブリンマトリックスに使用して、創傷内の有害な酵素の発現を抑制できる。標的の一つは、慢性創傷で過剰発現されるMMPと呼ばれる一群の酵素である。

10

20

#### 【0114】

薬物はまた粒子、エアロゾルまたはおそらくは蒸気としても調製されるだろう。電気処理されたフィブリンマトリックスはこれら物質により紡がれ、フィブリンマトリックス内に運搬されるべき薬物を受動的に捕捉する。この工程はフィブリンマトリックス内への粒子または分子の物理的封じ込めに依存している。細胞または錠剤といった大型の対象物は、この方法を用いマトリックス内に捕捉できる。この後半の概念は、電気処理されたフィブリンマトリックス製造時に、ストリームまたはフィブリン形成溶液の上または中に物質を滴下するだけで達成できるだろう。

30

#### 【0115】

電気処理されたフィブリンマトリックスからの薬物放出の制御は、電気処理時に磁性物質または電導性物質をフィブリンマトリックス内に引き込むか、取り込ませることでさらに制御される。電気紡糸マトリックスに機械応力を加えると、物質の結晶性を変化させその分解を早めることができる。安定性の同様の变化は、磁気感受性または電気感受性である物質を電気処理時にマトリックス内に取り込ませることで達成できるだろう。次に電気処理されたフィブリンマトリックスにわたって磁場または電界を印加して、マトリックス内の運動または立体構造変化を促し、これによって続いて電気処理されたフィブリンマトリックスからの物質の放出を促進する。上記は電気処理されたフィブリンマトリックスの配置を直接変化することにより立体構造を薬物放出により好ましいな形にすることで達成される。

40

#### 【0116】

皮下またはその他の場所に置かれた磁気感受性または電気感受性物質は、長期間の薬物運搬に使用されるだろう。例えば磁気特性または電気特性、およびインスリンを持つ電気処理されたフィブリンマトリックスを作製し、皮下の目立たない場所に置くことができるだろう。電気処理されたフィブリンマトリックス全体にわたって磁場または電界に通すことで、薬物の放出を誘導することができる。これは、長期間にわたり電気処理されたフィブリンマトリックスから制御された形式で薬物を送達するのに利用できる。

#### 【0117】

この課題の別の変形は、移植可能であり、刺激を受けるとカプセル化物質に力を及ぼすこ

50



とができる電磁特性を持つ電気処理されたフィブリンマトリックスを作製することである。例えばこのような装置は、永久型にすることができるか、または経時的に溶解するために心臓が十分回復した後での装置の回収を目的とした手術を必要としない一時的な左心室補助装置として使用できるだろう。

【0118】

電気処理されたフィブリンを含む電気改変された組織の処置

電気処理されたフィブリンおよび細胞を含む電気改変された組織が組立てられたら、組織をレシピエント内に挿入できる。あるいは構造体を培養体の中に置き、細胞増殖を高めることができる。各種栄養および増殖因子を培養体に加え（またはレシピエントに投与し）、特定のタイプの改変された組織の増殖を促進することができる。一例では、改変された筋肉組織標本と特に結びついて、フィブリンおよび細胞を含む電気改変された組織を機械的または受動的に引っ張り（strain）、あるいは電氣的に前処理して、細胞の整列を促してより機能的な筋肉移植体を形成することができる。皮膚パッチでは、応力を加えることで、頭皮（scalp）のような、擦過傷といった強い引っ張り力に曝される部位への使用に適した皮膚の方向付けが容易になる。この文脈での受動的引張は、細胞がマトリックスと接触し、マトリックスを再編成した時に細胞自体により変形が誘導される工程を指す。これは典型的には、電気改変されたフィブリンマトリックスの端部を固定することで誘導される。細胞がマトリックスと接触してマトリックスを変化させる際、マトリックスの固定端が所定位置に留まるために、固定端が等張負荷に対向し「引っ張る」際に細胞を引っ張ることになる。この引張が細胞を整列させるだけでなく、増殖と発生に関するシグナルを細胞に伝える。構築体を外側から引っ張ることもでき、すなわち構築体を準備してから引っ張り、機械的に整列させることもできる。伸張（stretch）は一般には時間をかけて徐々に行われる。フィブリンもまた伸張し、構築体に細胞を加える前委マトリックス内に整列させることができる（すなわちマトリックスを形成し、マトリックスを伸張し、次に細胞を加える）。

10

20

【0119】

電気処理された細胞 - フィブリンマトリックスは、各種遺伝子治療を試験する上でも有用である。換言すれば、細胞/フィブリンを使ってインビトロで作業することにより、前もって選択しておいたDNAを懸濁液内（細胞、フィブリン、血漿等のいずれか）に挿入することで異なるタイプの遺伝子治療および操作を行うことができる。技法をインビボで施行しようとした場合に比べ、インビトロではより広範囲の治療技法が利用できる。エレクトロポレーションといった非ウイルス性の技法は、フィブリンマトリックス内に挿入する前の培養細胞処理に使用できるだろう。それら培養細胞はまた、電気改変された組織をレシピエントに挿入する前にフィブリンマトリックス内で処理することもできる。インビトロでの遺伝子移入はレシピエントのウイルス産物への暴露を回避し、生殖細胞系にウイルスが取り込まれる可能性を回避する。これは第VII因子（抗血友病因子）の遺伝子のような大型の遺伝子を受け取るのに十分な大きさを持つウイルスコートを発見し、または改変するといった問題を回避する。しかしインビボの遺伝子治療は、フィブリンを本発明の電気処理技術で作製する時にDNAをフィブリン内に取り込むことによって、インビボでフィブリンがゆっくり分解する際に一部のDNAがインビボでフィブリンと接触した細胞に取り込まれることで達成される。このことは特に小型の遺伝子配列、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合に当てはまる。処理中または処理後にマトリックスに追加作用物質を加えることで、遺伝子トランスフェクション速度およびトランスフェクション効率を操作することができる。例えばマトリックスへのファイブロネクチン添加は細胞のピノサイトーシス活性（pinocytotic activity）を増加し、周辺マトリックスからの遺伝子配列を含む物質の取り込みを増やす。あるいは、遺伝子トランスフェクションに一般的に使用される作用物質、例えばリポフェクション剤をマトリックスに加えてもよい。

30

40

【0120】

改変された組織/臓器は患者の腫瘍細胞のインビトロ培養を可能にし、各種化学療法およ

50

び放射線治療に対する感受性をインビトロで特定することを可能にする。この方法は本質的に診断ツールとしてマトリックスを使用する。この方法では、代替可能な化学療法および放射線治療法を分析して特定の患者に最適な治療法を予測する。例えば、フィブリンおよびガン細胞、好ましくは患者自身のガン細胞を含む改変された組織を作ることができる。この組織の複数のサンプルを次に複数の異なる癌治療法にかける。異なる治療法の結果を次に直接相互に比較して、その効能を評価することができる。

#### 【0121】

改変されたフィブリン移植体およびバイオリアクター

改変されたフィブリン移植体は以下の成分を1またはそれ以上含むが、以下は非限定リストである。それらは骨格筋、心筋、神経ガイド、事故または病気の間に関与した脳の損傷 / 除去領域を満たすものとしての脳構造体、軟骨スcaffolding、美容修復用シート、皮膚（皮膚等価物にすべく細胞が加えられたシート）、血管移植体およびその成分、局所適用シート（皮膚を被覆するが細胞は含まない - パッチのようなもの）、薬物ならびに物質運搬体。

10

#### 【0122】

切断力の小さい、高い栄養物灌流環境を提供するよう設計された装置である市販バイオリアクターにはいくつかの種類がある。最近までは多くの入手可能なバイオリアクターは細胞を浮遊液の状態に保ち、栄養と酸素をインペラーまたはその他攪拌手段を使って散布により供給した。RCCSバイオリアクター (Synthecore) は回転壁型バイオリアクターである。それは小型の内側シリンダーと、より大型の外側シリンダー内側に取り付けられた電気紡糸工程用の基体から構成されている。電気紡糸または電気エアロゾルフィブリン含有マトリックスは内側シリンダーの上で作製することができるが、接種のための場所としてはフィブリンマトリックス用にバイオリアクター内の別の場所を使用してもよい。内側シリンダーと外側シリンダーの間隙が細胞の培養容器空間として機能する。培地は外部疎水膜を通して酸素供給される。Synthecore RCCSバイオリアクターの低い切断環境は、活発な攪拌または散布により起こる損傷、または栄養の「洗い流し」なしに、細胞間および細胞 - 細胞外マトリックス (ECM) 間の相互作用を促進する。典型的には、RCCS装置は細胞を浮遊液状態に保つことが求められるので回転速度8から60RPMまで、そして容器の中央シャフトに沿って固定化された培養体については8RPM未満（好ましくは2~3RPM）で運転される。Synthecoreバイオリアクターは標準的な組織培養インキュベーターの中で使用することができる。この場合の回転速度およびその他パラメータの値は、作製される具体的な組織に応じて変わるだろう。

20

30

#### 【0123】

電気処理されたフィブリン、特に架橋型の電気処理されたフィブリンは人工器官の形成に有用である。電気処理されたフィブリンの一応用例は、媒体および小径の人工血管の形成にある。例としてはバイパスまたは移植用冠状血管、大腿動脈、膝窩動脈、上腕動脈、頸骨動脈、橈骨動脈またはそれらに対応する静脈が含まれるが、これらに限定されるものではない。電気処理されたフィブリンは人工血管、例えばコラーゲンチューブの内側に内皮細胞を組み合わせた時、およびコラーゲンチューブの外側に繊維芽細胞を組み合わせた時に特に有用である。先細および/または枝分かれした血管を含むより複雑な形状も作られる。必要なものはその周囲に大型の繊維を巻き取る、または電気紡糸/電気エアロゾルポリマーの方向付けを行うための異なる形状を持ったマンドレルだけである。

40

#### 【0124】

電気処理されたフィブリンおよび巻き取られたポリマー繊維の組み合わせは、細胞に最適な増殖条件を提供できる。ポリマーは基本構造マトリックスを形成し、電気処理されたフィブリンマトリックスは細胞の運搬に用いられる。これにより細胞の構造マトリックスへの付着が促進される。さらにポリマー内の応力がマトリックス内のフィブリン繊維を方向付けし、細胞に追加の空間的な手がかりを提供する。

#### 【0125】

50

別の製造方法では、円筒状の構築物が好ましい標的、例えば円筒形のマンドレルの上に電気紡糸される。その他の形状も可能であり、その形状は移植体を内部に設置しようとしている部位の形状によって決まる。このマトリックスは電気処理されたフィブリノーゲン/フィブリン（例えば血管新生、細胞統合および周辺組織からの侵入を促進する）、コラーゲン（細胞侵入の促進および機械的安全性（*integrity*）の付与）および例えばPGA、PLAおよびPGA-PLA配合体、PEO、PVAまたはその他配合体といったその他成分から構成され得る。この構築体の各種成分の相対比は特定の応用に合わせ調整することができる（例えば皮膚移植体の血管化を促進するためにフィブリンを多くしてコラーゲンを少なくする）。円筒形の筋肉を作る場合は、構築体を筋肉細胞または幹細胞、あるいはその他のタイプの細胞で満たし、電気紡糸構築体の遠位端を縫合するか、密閉する。細胞は各種マトリックス物質と混合して、構築体内でのそれら分布を促進することができる。例えば細胞は構築体挿入前に電気処理されたフィブリンまたはコラーゲンと混合され得る。この方法の目的は、構築体に追加の機械的支持を提供すること、および構築体内の細胞に三次元マトリックスを提供して増殖を促進することである。このことは同時に構築体内の細胞の均一な分布を維持するのにも役立つ。この方法を用いて構築体内の細胞が整列するのを促進することができる。この「充填」物質は、充填物質を押し出した時整列が起きる場合には、円筒構築体内に直接押し出してもよい。血管新生を加速するために、内皮細胞を構築体内に挿入される別の細胞（あるいは別のタイプの細胞）と混合することができる。この目的を達成する別の方法は、内皮細胞を円筒鞘の形成を補助するのに役立つ電気処理されたフィブリンマトリックス内に直接電気紡糸することである。構築体を含む電気紡糸マトリックス内の繊維の並びは、互いに関して標的と供給源溶液相互の相対運動を管理することで制御できる。腱繊維芽細胞のような別のタイプの細胞を構築体外面内または外面上に電気紡糸して、構築体を形成する外側結合組織鞘の形成を促進することもできる。本明細書記載の別の設計原理は、例えばペプチド成長因子、抗生物質および/または抗拒絶薬を電気紡糸マトリックスと結びつけて用いることである。構築体全体は通常の培養法であるバイオリアクター内で培養でき、あるいはインピボに直接置くことができる。他の細胞タイプの使用により、他の組織タイプを製造できる。

10

20

#### 【0126】

電気処理されたフィブリンを含む改変された組織の血管新生は手術後数日で原位置で生じる。さらに上記の如くそれは血管形成および成長促進因子で刺激され、ペプチド、タンパク質または遺伝子治療として投与される。電気処理されたフィブリンを含む改変された構築体の血管新生はまた、作製時に内皮細胞を構築体内に混入することで高めることができる。血管供給（*vascular supply*）を有する電気処理されたフィブリンを含む改変された組織を供給する別の方法は、網内に組織を一時的に移植する方法である。網は血管供給にきわめて富んでおり、この血管供給は、改変された組織を支える、生きているインキュベーターとして利用することができる。改変された組織はバイオリアクターから取り出され、網に包まれ、網内の周辺組織からの栄養および酸素の拡散により支持される。あるいは、またはこの方法に加えて、改変された組織は網の内因性血管供給に直接接続される。血管は部分的に孔が開けられるか、または切られるか、あるいは網の切断面をそのままにする。電気処理されたフィブリンを含む改変された組織で血管の周囲を包む。改変された組織は孔の開いた血管から漏れる栄養により、または血管が無傷のままのこされている場合には単純な栄養の拡散によって支持される。方法にかかわらず改変された組織は網とその豊富な供給血管にくるまれる。

30

40

#### 【0127】

電気処理されたフィブリンを含む組織は内因性の血管系と共に改変してもよい。この血管系は人工血管、または移植体レシピエントのドナー部位から切り出した血管から構成され得る。次に電気処理されたフィブリンを含む改変された組織を血管周囲に組み立てる。改変された組織を組み立てている間または後で、その組織で血管を包むことで、改変された組織はレシピエントの血管系に結合できる血管を持つ。この例では、網内の血管が切られ、改変された組織の欠陥が網血管の2カ所の自由端に接続する。血液は網血管から改変さ

50

れた組織の血管系に流れ込み、組織を通り、網血管に戻る。組織を網内に包み、それを網血管系に接続することで、改変された組織は網からの、および製造中に組織内に取り込まれた血管からの栄養の拡散によって支えられる。好ましいな期間を経た後、組織は網から取り出され、レシピエントの正しい部位に配置される。この方法を利用することで電気処理されたフィブリンを含む改変された組織は、バイオリアクターから取り出された後最初の数日間は豊かな栄養環境に支えられる。網の環境はまた移植組織内の新血管形成を促進する。この網インキュベーター法は電気処理中にフィブリンに血管形成因子を組み合わせるような、別の方法と組み合わせることができる。いくつかの選択肢がある。第一の選択肢では、移植体を血管芽細胞および/または内皮細胞を一緒に接種して、血管要素の形成を加速してから改変された組織を原位置に置くことができる。第二の選択肢では、浸透圧ポンプを使って血管形成ペプチドを改変された組織内に導入することができる。浸透圧ポンプを使うことでペプチド、または上記のように、血管形成ペプチドまたは成長因子を生物学的に効果的かつ経済効果的に対象部位に直接運搬することができる。ウサギの虚血状態の後ろ脚に V E G F を与えたところ、毛細血管床の成長を加速し、血管の分枝を増やし、虚血状態のコントロールに比べ筋肉性能が改善した。別の方法は、原位置で移植する直前に電気処理されたフィブリンを含む完全に分化した組織構築体に追加の内皮細胞および/または血管芽細胞を「接種する」方法である。電気処理されたフィブリンマトリックスへの血管形成作用物質を取り込ませる方法も利用できる。マトリックスは徐々に分解/崩壊してこれら因子を放出し、血管の成長を加速させる。神経成長因子をマトリックス上に電気紡糸して、マトリックスおよび組織への神経の成長を促進させることができる。

10

20

#### 【0128】

幹細胞または移植体構築に使用されるその他細胞は被検体、または組織再構築を必要としているその他適合ドナーから単離できる。これは、細胞が再構築を必要としている被検体（自己組織）に由来するため、免疫反応を誘導しない細胞を使用する利点を与える。比較的小規模の生検を行うことで、移植体の構築に十分な数の細胞を得ることができる。これにより細胞提供部位として作用する内因性組織に対する機能的損失および損傷は最小限にとどめられる。

#### 【0129】

本発明を以下実施例によりさらに例示するが、これら実施例はいかなる形でも本発明の範囲を制限するものではない。むしろ手段には様々なその他実施形態、変形およびその等価物があり、それらは本明細書の説明を読んだ後では、本発明の精神から逸脱することなく当業者に思い浮かぶものであることを明瞭に理解しなければならない。

30

#### 【0130】

##### 【実施例1】

##### 細胞培養

複数のタイプの細胞を、フィブリンおよび血漿を用いた実験に使用した：

a) 切断型 S C I P 転写因子を持つトランスジェニックマウス由来シュワン細胞。これら細胞はインビボでは未熟で過剰のミエリン化を示した。この細胞系は、特別な因子なしに容易に大量培養できることから選ばれた。

b) 座骨神経由来初代ラットシュワン細胞。これら細胞は以下の実験条件では分裂しない。これら試験細胞は細胞系を由来ではなかった。

40

#### 【0131】

いずれの場合も、細胞は 10% ウシ血清および 1% ストレプトマイシン - ペニシリンが増補されたダルベッコの改良型無ピルビン酸イーグル培地 (G i b c o B R L、G r a n d I s l a n d, N Y) の入った 10.5 cm<sup>2</sup> のプラスチック製培養フラスコ内に維持された。培養体は 37、7% C O<sub>2</sub> および 100% 相対湿度 (R H) のインキュベーター内に置かれた。

#### 【0132】

タイプ (a) の細胞を周密状態 (c o n f l u e n c e) まで培養してから集めた。タイプ (b) の細胞は必要に応じて集めた。タイプ (c) の細胞は半周密培養で増殖してから

50

、数回パッセージ ( passage : 継代 ) した。使用するために細胞を取り出すには、成長培地を取り除き ( drained )、細胞が皿の底から剥がれるまで培養体を 1 mL トリプシン - EDTA ( Gibco BRL ) で処理した。次に 4 mL の新鮮培地でトリプシンを中和し、フラスコ内容物を遠心チューブに移した。細胞を 130 g、5 分間の遠心分離で濃縮した。上清を取り除き、細胞を新鮮培地内にタイプ ( a ) および ( c ) の細胞の場合は約  $10^6$  細胞 / mL、そしてタイプ ( b ) の細胞の場合は  $2 \sim 5 \times 10^5$  細胞 / mL の密度に再懸濁した。これら細胞懸濁液を以下実験のいくつかに用いた。

【 0 1 3 3 】

【 実施例 2 】

トロンビン、フィブリノーゲンおよび血漿保存溶液の調製

トロンビンは Baxter 社より凍結乾燥粉末として得て、10 mM の塩化カルシウム脱イオン水液に 50 単位 / mL の濃度に溶解した。あるいは凍結乾燥トロンビン ( Sigma、American Diagnostic、等 ) を 0.15 M NaCl に溶解し、凝固塊形成時にカルシウムを加えてもよい。血液は無菌的、非外傷的に正常ボランティアより静脈穿刺して得た。血液は 3.8% クエン酸ナトリウムを含む青キャップ真空採血管 ( blue top vacutainer tubes ) に集めた。カルシウムのクエン酸への結合がサンプルの凝固を阻止した。貧血小板血漿は 10,000 g、5 分間の遠心分離で調製した。細胞の上 1 cm の深さの血漿を残すように紡糸 ( spun ) チューブの上部から血漿を捨て、細胞汚染を最小限にとどめた。クエン酸塩加貧血小板血漿を無菌条件下に 0.45 ミクロンフィルターを通して濾過し、微細粒子成分を除いた。未使用部分

【 0 1 3 4 】

【 実施例 3 】

電気処理されたフィブリンおよび細胞の方向付け

細胞は、細胞のニーズを満たすためにその環境に適合することが知られている。筋細胞およびシュワン細胞は共に、高度に方向性を持った構造体になるようにフィブリン鎖を自己再編成する。電気処理されたフィブリンマトリックス内の細胞は、機械力を加えて方向を整えることができる。

【 0 1 3 5 】

電気処理されたフィブリンマトリックスおよび細胞 ( 繊維芽細胞 ) を含む、皮膚として使用される電気処理された組織に以下の方法で力を加えた。Dupont 社製のポリイミドポリマー撚糸である滅菌した Normex 系 11 の短片を電気処理された組織の各端部に取り付けた ( 図 1 )。次に Normex 系 11 の各端部に 5 mm 厚のポリスチレンホルダー 13 を嵌め合わせた一組のナイロンネジ 12 を取り付けた。ネジ 12 とホルダー 13 との間には、ネジがセットされた後いかなる動きも阻止するのに十分な摩擦が存在する。フィブリンが電気処理された組織内でピンと張り、加えられた引っ張りで整列が見られるまでナイロンネジ 12 を僅かに回して Normex 系 11 に張力を加える。実験の残りの装置に他のどんな調節も行わない。コントロール操作は、同様の電気処理された組織を用いて、この組織に外部から引っ張り力を加えないことで行った。力が加えられた組織は繊維芽細胞の整列を示し、力が加えられなかった組織に比べより大きな引っ張り強度を示した。

【 0 1 3 6 】

【 実施例 4 】

電気エアロゾルフィブリンおよび細胞

通常血漿で希釈した細胞懸濁液 20 およびトロンビン保存溶液 21 ( それぞれ ~ 1 mL ) を別々の 3 mL プラスチック製注射器 22 に充填した ( 図 2 )。注射器 22 を別々の注射器ポンプに差し込み、サイズ 13 のタイゴン ( Tygon ) チューブ 24 を介して混合 T 字管 23 に接続した。混合 T 字管の出口は 27 ゲージの針 25 で終わっていた。この針

10

20

30

40

50

を Spellman CZE 1000R 高電圧電源 26 の一方の極に接続した。もう一方の極にはプラスチック製培養皿の後方に取り付けられたステンレス鋼フォイル 27 が接続された。混合 T 字管 23 は培養皿から約 10 cm のところに配置された。各ポンプを 1.15 mL / 分の供給速度に設定し、-10 kV の電位を加えてフィブリン / 細胞を針 25 先端部から培養皿に伝わり落としした (drop)。

【0137】

【実施例 5】

電気処理されたフィブリンマトリックス内の細胞に対する物質の生物学活性の評価  
54 歳の男性が悪性黒色腫と診断された。黒色腫細胞を生検で取り出し、培養した。培養黒色腫細胞を帯電シリンジ内に充填した。別の実験では、培養黒色腫細胞をエアロゾル装置に充填した。電気処理されたフィブリンマトリックスを形成し、メラノーマ細胞を、形成中のフィブリンマトリックス内に電着するか、またはエアロゾル法を使って形成中のフィブリンマトリックスに加えた。これらサンプルを 50 作製した。

【0138】

電気処理されたフィブリンマトリックス内の黒色腫細胞の異なるサンプルに、黒色腫に効くと言われる 1 つまたはそれ以上の化学療法剤の用量域を作用させた。化学療法剤に曝した後、選択時間間隔で分裂指数を計算した。トリパンプルー排除も同時に調べた。結果は、いずれの薬剤も黒色腫細胞の分裂を抑制し、細胞生存率に影響を及ぼすことを示した。

【0139】

【実施例 6】

電気処理されたフィブリンマトリックス内の人口膵臓島  
培養インスリン分泌細胞の混合体を電気処理されたフィブリンマトリックス内に接種し、電気処理されたフィブリン含有組織を形成する。インスリン分泌細胞を含む電気処理されたフィブリンマトリックスを、インスリンを必要とする糖尿病レシピエント内に移植する。この電気処理されたフィブリン含有組織は任意選択的にさらに血管を含む。マトリックスは腹膜後空間に移植され、血管が肝門脈循環に吻合される。インスリンはインスリン含有細胞から放出され、循環系に送られる。

【0140】

インスリン分泌細胞を含む電気処理されたフィブリンマトリックスは、膵臓島のホルモン補充を模倣するために、任意選択的にグルカゴン、ソマトスタチン、膵臓ポリペプチド、またはそれらの組み合わせを合成し、分泌する細胞を補充される。

【0141】

【実施例 7】

電気処理されたフィブリンマトリックス内の電気処理されたシュワン細胞  
本実験は、まずペリスタリックポンプを使用し、その後に 2 台の注射器注入ポンプを使って実施した。実験はまた 2 ~ 3 mg / mL のフィブリノーゲンまたはヒト血漿を用いて懸濁された細胞を使って行われた。

【0142】

以下に注入ポンプを使って実施した場合を記載するが、これはペリスタリックポンプを使用し実施したものと同様である。細胞 (ワインスタインシュワン) を 0.4  $\mu$ m フィルター濾過した血漿 (フィブリノーゲンをすでに含有している) または 2 ~ 4 mg / mL のフィブリノーゲンが増加された標準のイーグル培地中に  $10^5$  ないし  $10^7$  の間の濃度で接種した。細胞懸濁液 1 mL 当たり 10,000 kIU のアプロチニン 10  $\mu$ L を添加し、凝固塊の分解を遅らせた。この懸濁液を 3 mL のプラスチック製注射器に充填した。2 本目の 3 mL 注射器を、十分量の塩化カルシウムが補給された 50 ~ 200 IU / mL の間のトロンビン濾過溶液で満たし、最終混合液がゲルになるようにした。これら混合液を層流フード下で処理し、無菌状態を保った。

【0143】

各注射器を別々の注射器注入ポンプに設置した。二重ポンプを使うことで、フィブリノーゲンに対するトロンビンの濃度を変化させることが可能となり、そのため、凝固速度に影響

響が及ぼされた。注射器の出口は、短い長さのサイズ13のタイゴンチュービング ( tubing ) を介して混合T字管に接続されている。この出口は電気紡糸設定段階 ( setup ) で一方の電極として機能する金属製の注射針 ( 各種ゲージを使用した、18~27 ) から構成された。標的は混合T字管の出口から約10cm離れて設置された標準的なプラスチック製培養皿から構成された。この皿の背面にはアルミニウムホイルがテープで取り付けられており、これが対電極を提供している。電着を実行するには、ポンプを始動し ( 0.25ml / 分未満 ~ 数ml / 分の流速を使用 )、印加する電圧を電着が進行する電圧まで ( 4 - 6 kV ) ゆっくりと増加した。実験は10分以内で終了させ、チュービング / 注射器内の細胞の沈降を最小限にした。電着後、10µL / mLのアプロチニンが増加した培地で皿をトッピングする前に、37℃インキュベーター内で約1時間ゲルを硬化させた。結果を分析した結果、電気処理されたフィブリンマトリックス内に健康と思われるシュワン細胞が示された。

10

【0144】

【実施例8】

電気処理されたフィブリンマトリックス内の薬物送達

各種濃度の神経成長因子をフィブリノーゲン溶液に添加し、ウエル当たり約10,000個の神経芽細胞を含む96ウエル型培養皿に電気スプレートロンピン溶液と平行して電気スプレーした。これらのウエルは細胞、および神経成長因子を含む電気処理されたフィブリンマトリックスも含むようになった。フィブリンはゆっくり溶解し、神経芽細胞は神経成長因子に反応して用量依存的に増殖した。

20

【0145】

別の実験では、神経成長因子を含む電気処理されたフィブリンマトリックスを同様の方法で調製し、損傷 ( fall ) で傷を負った動物の下部頸髄の外傷部分に挿入する。同様の外傷を負った別の動物には神経成長因子を含まない電気処理されたフィブリンマトリックスを与えた。動物の回復速度を求めた。神経成長因子を含む電気処理されたフィブリンマトリックスを与えられている動物は、前足の運動機能のより早い回復を示す。

【0146】

上記引用の全ての特許、公開物および要約はその全体が参照により本明細書に援用されている。上記は本発明の好ましい実施形態にのみ関係するものであること、および以下の特許請求の範囲に定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく多くの変更または改変が本発明において可能であることを理解すべきである。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】

電気処理されたフィブリンに引張を施す装置の概略図である。

【図2】

電気紡糸装置の概略図である。

【図3】

電気処理装置および回転壁型バイオリアクターを含む、電気処理装置の概略図である。

【図4】

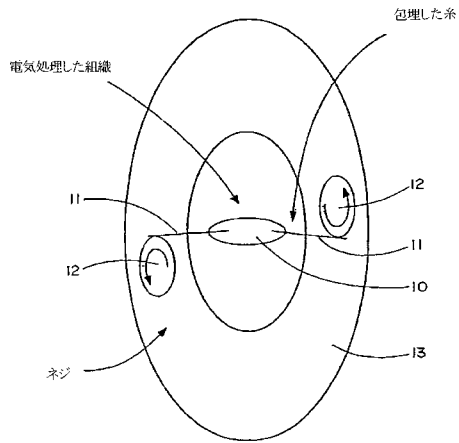
電気処理装置および回転壁型バイオリアクターを含む、電気処理装置の概略図である。

40

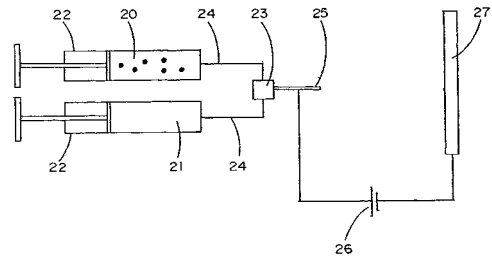
【図5】

電気処理装置、および成型された標的に向けられた電気処理された物質を表す概略図である。

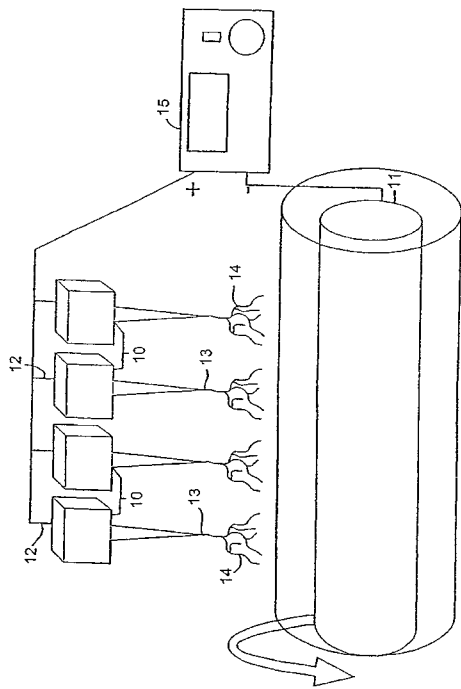
【図 1】



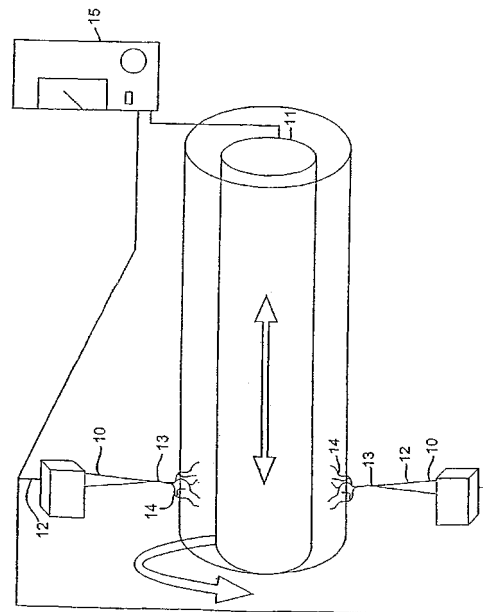
【図 2】



【図 3】

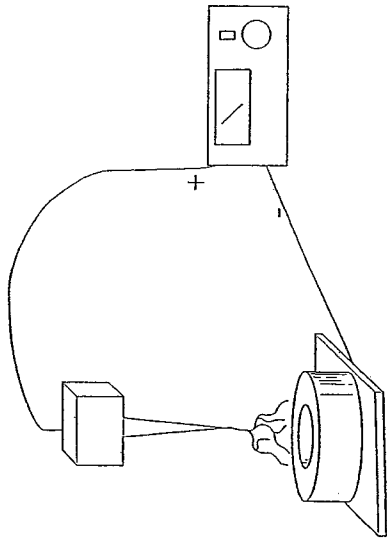


【図 4】





【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/18441 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/75,  
C12N 5/00, C12Q 1/02, A61L 15/32, A61K 47/42, C12N  
5/06

L. [US/US]; 7437 Brook Way Court, Mechanicsville,  
VA 23111 (US). WNEK, Gary, E. [US/US]; 12508  
Rocky River Drive, Midlothian, VA 23113-7141 (US).  
SIMPSON, David, G. [US/US]; 10265 Cloverlea Court,  
Mechanicsville, VA 23116 (US). LAM, Philippe [FR/US];  
3000 Treetops Circle, Apartment 208, San Bruno, CA  
94066 (US). CARR, Marcus, E., Jr. [US/US]; 2540  
Swanhurst Drive, Midlothian, VA 23113 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/27409

(22) International Filing Date:  
4 September 2001 (04.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
09/654,517 1 September 2000 (01.09.2000) US  
60/241,008 18 October 2000 (18.10.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): VIR-  
GINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY INTEL-  
LECTUAL PROPERTY FOUNDATION [US/US];  
1101 East Marshall Street, Room 2015, Richmond, VA  
23298 (US).

(74) Agents: MCDONALD, John, K. et al.; Suite 2800, 1100  
Peachtree Street, Atlanta, GA 30309 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.

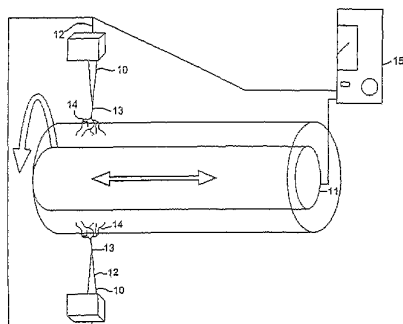
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European

[Continued on next page]



WO 02/18441 A2

(54) Title: ELECTROPROCESSED FIBRIN-BASED MATRICES AND TISSUES



(57) Abstract: The invention is directed to formation and use of electroprocessed fibrin as an extracellular matrix and, together with cells, its use in forming engineered tissue. The engineered tissue can include the synthetic manufacture of specific organs or tissues which may be implanted into a recipient. The electroprocessed fibrin may also be combined with other molecules in order to deliver the molecules to the site of application or implantation of the electroprocessed fibrin. The fibrin or fibrin/cell suspension is electrodeposited onto a substrate to form the tissues and organs.

---

**WO 02/18441 A2** 

patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

**Published:**

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 02/18441

PCT/US01/27409

## ELECTROPROCESSED FIBRIN-BASED MATRICES AND TISSUES

## 5 FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to novel methods of making and using electroprocessed fibrin. The invention comprises the use of electroprocessed fibrin as an extracellular matrix for numerous functions. Further, the invention includes combining electroprocessed fibrin and cells together to form engineered tissue. The engineered tissue can include the synthetic manufacture of specific organs or "organ-like" tissue.

## 10 BACKGROUND OF THE INVENTION

Fibrin is a natural clotting agent. Therefore, fibrin and fibrin derivatives have commonly been used in hemostatic applications. Its use in analogous applications and in connection with various reinforcing additives have been known and well-documented.

In another field, tissue and organ replacement in patients with failing or damaged organ function is hampered by several significant problems. First, the source of replacement tissue or a replacement organ is typically a living related or cadaveric donor. Both of these sources are limited in number and carry the risk of exposing a recipient to pathologic viruses.

20 Second, since the source of the replacement tissue or organ (with the exception of a living identical twin donor) is genetically distinct from the recipient, the problems of organ rejection and graft versus host disease are significant. Both of these problems can be treated with immunosuppression, but this can cause significant side effects and dramatically increase the risk of infection in a patient.

25 In yet another field, the emerging techniques with respect to gene transfer can be dangerous when performed *in vivo*. In other words, *in vivo* gene transfer can expose a recipient to various viral complications. Further, there are limitations to known gene therapies, for instance, with respect to engineering viral coats large enough to accept large genes such as the gene for Factor VIII (anti-hemophilic factor).

30 In a different field of study, the science of chemotherapy for cancer patients is, at least at some level, based on estimates of effectiveness of various treatments in combating a patient's cancer cells. There is no efficient way to identify the response of a patient's cancer cells to chemotherapy *in vivo* or *in vitro*.

WO 02/18441

PCT/US01/27409

2

What is needed is a new method of making a fibrin that provides the capability to use it in hemostasis, drug delivery, delivery of other substances, skin repair, wound treatment, tissue engineering, and various other applications.

5 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention to overcome the foregoing limitations by providing electroprocessed fibrin and an electroprocessed fibrin matrix, methods for making electroprocessed fibrin and fibrin matrix, and methods of using electroprocessed fibrin and fibrin matrix in a wide variety of applications.

10 The electroprocessed fibrin of the present invention has several uses. In one application, electroprocessed fibrin may be used as an extracellular matrix. Electroprocessed fibrin may be combined with other natural and non-natural fibers, and also with cells. In the fields of tissue and organ replacement, the use of electroprocessed fibrin, including but not limited to, cells and fibrin, can overcome problems of potential infection and rejection. In the field of gene transfer, the manipulation of cells can occur *in vitro*, where cells that are  
15 cultured to be inserted into an extracellular matrix comprised of electroprocessed fibrin could be more easily manipulated and tested. In the field of wound care, a sheet of electroprocessed fibrin can be used to suppress hemorrhage, for example, using non-autologous electroprocessed fibrin to suppress bleeding in a hemophilic, at an injury site or a chronic ulcer. The electroprocessed fibrin extracellular matrix implanted with cells may be used to test cell responsiveness to drugs or other test substances. In the context of chemotherapy, the electroprocessed fibrin extracellular matrix implanted with a patient's tumor cells could be used to identify *in vitro* the susceptibility of those cells to alternative chemotherapy treatments. Each of the foregoing alternatives can result in safer and more  
25 predictable medical practices.

The present invention provides an extracellular matrix for promoting cell growth comprising the electroprocessed fibrin matrix. The fibrin can be formed of electrospun fibrin fibers or electroaerosol fibrin droplets. Electroprocessed fibrin may also be made through the use of molecules capable of forming fibrin. Fibrinogen and thrombin are two such  
30 molecules, and electroprocessing techniques of the present invention may be used to make electroprocessed fibrin from these or other molecules. Fibrinogen may also be processed by electrospinning or electroaerosol techniques and subsequently converted to electroprocessed fibrin by enzymatic methods.

The present invention also provides an electroengineered tissue comprising  
35 electroprocessed fibrin and cells. Any cells may be used. The cells may be applied to the

WO 02/18441

PCT/US01/27409

3

electroprocessed fibrin through many techniques, including electroprocessing the cells together with fibrin or separately. The cells may be stem cells, committed stem cells, or differentiated cells. Cellular differentiation inducers may also be employed, including but not limited to peptide growth factors, drugs, or full or partial gene sequences in the sense or antisense direction. The engineered tissue may have a predetermined shape, and the electroprocessed fibrin and cells are used to form the desired shape.

The present invention includes a method of manufacturing a fibrin-containing extracellular matrix using electroprocessing techniques. These techniques include, but are not limited to, electrospinning, electrospray, electroaerosol, electrosputter, or any other technique achieving electrodeposition onto a substrate or target. The method includes streaming an electrically-charged solution comprising fibrin onto a grounded target substrate under conditions effective to deposit the fibrin on said substrate to form an extracellular matrix. The polarity of the solution and ground may be interchanged. The electrically charged solutions may further comprise any molecules with the capability to make fibrin. In a preferred embodiment, electrically charged solutions may comprise fibrinogen and thrombin, used to make electroprocessed fibrin. Alternatively, the electrically charged solution may comprise plasma and thrombin. The fibrin, or fibrin-forming molecules, streamed on to the substrate may comprise either electrospun fibers or electroaerosol droplets. Carrier molecules, such as polyethylene glycol (PEG), may be used to facilitate electroprocessing. For example, if the preferred solvent for a given component of the system is aqueous (for example a drug compound), the fibrinogen or fibrin may be suspended in water in the presence of high molecular weight PEG. PEG spins readily from water and acts as a carrier to electrodeposit the fibrinogen or the fibrin molecules in a specific site with a specific pattern or random pattern. Carriers may also be used to process fibrinogen/fibrin from pure organic solvents.

The present invention also provides a method for manufacturing a fibrin-containing extracellular matrix having a predetermined shape. The method includes pre-selecting a mold adapted to make the predetermined shape and filling the mold with fibrin or fibrin forming molecules using electroprocessing techniques. Alternatively, the method may comprise pre-selecting a mold adapted to make the predetermined shape wherein the mold comprises a grounded target substrate. Then, one or more electrically charged solutions comprising fibrin, or molecules capable of forming fibrin, are streamed onto the grounded target substrate under conditions effective to deposit the fibrin on the substrate to form the extracellular matrix having the predetermined shape. The fibrin streamed onto the substrate may comprise electrospun fibers or electroaerosol droplets.

In the present method of manufacturing an electroprocessed engineered tissue, electrically charged solutions of the fibrin, or molecules capable of forming fibrin, and cells are electrodeposited onto a grounded target substrate under conditions effective to deposit the fibrin and cells onto the substrate. The fibrin and cells streamed onto the substrate may  
5 comprise electrospun fibers or electroaerosol droplets. Any cell may be used. The cells include, but are not limited to the following: stem cells and/or committed stem cells, including but not limited to the following: osteoblasts, myoblasts, neuroblasts, fibroblasts, glioblasts; germ cells, hepatocytes, chondrocytes, smooth muscle cells, cardiac muscle cells, connective tissue cells, epithelial cells, endothelial cells, hormone-secreting cells, cells of the  
10 immune system, and neurons. Electroprocessing may be used to deliver cells to a specific site within the body. In some applications it may not be necessary to pre-select the type of stem cell that is to be delivered to a specific site using electroprocessing techniques, because many types of stem cells can be induced to differentiate in an organ specific pattern once delivered to a given organ. For example, a stem cell delivered to the liver may be induced to  
15 become a liver cell simply by placing the stem cell within the biochemical environment of the liver. Electrospinning is effective at this type of application because the matrix can be tailored to a specific organ site. Also the electrospun matrix can be "programmed" to be stable or to degrade rapidly.

The present invention provides a method for manufacturing an electroprocessed,  
20 fibrin-containing extracellular matrix. The method includes an electrically grounded substrate and further provides one or a plurality of reservoirs containing fibrin solutions or solutions of molecules capable of forming fibrin. In one embodiment, the reservoirs are connected substantially at a single orifice that allows the mixture of solutions from the reservoirs upon exit from the reservoirs. The solutions are electrically charged and the  
25 mixture of solutions is streamed onto the substrate to form an extracellular matrix. In an alternative embodiment, the plurality of reservoirs comprises first and second reservoirs. The first reservoir has a solution comprising fibrinogen and the second reservoir has a solution comprising thrombin. Fibrinogen may also be electrospun, with or without a carrier molecule, for example, PEG or collagen, and processed into fibrin subsequent to  
30 electroprocessing. It is also possible to electrospin these materials onto a target or solvent bath containing thrombin and other biochemical agents that process fibrinogen to fibrin. In this type of application fibrinogen is electroprocessed and converted to fibrin at some time after its deposition on the target.

The present invention includes the product of the process of electroprocessing  
35 fibrinogen and thrombin. This processing may comprise electrospinning fibrinogen and

WO 02/18441

PCT/US01/27409

5

thrombin to make fibrin, it may comprise electro spraying fibrinogen and thrombin droplets, it may comprise electro sputtering fibrinogen and thrombin, or it may comprise electro aerosol deposition of fibrinogen and thrombin. Regardless of the method employed, fibrin is electrodeposited onto a substrate or target. Cross-linking agents may also be employed together with the electroprocessed fibrin. For example, the introduction of covalent bonds by Factor XIIIa increases structural rigidity and delays subsequent matrix dissolution.

One method for making a matrix of electroprocessed fibrin includes providing a substrate and two reservoirs of solutions, one solution comprising fibrinogen and the other solution comprising thrombin or other substances, wherein the reservoirs each have an orifice that allows the solution to leave the reservoir. In one embodiment, each orifice communicates with a common channel to allow the two solutions to be combined and ejected through an orifice to the common channel. Then, either the substrate or the solutions are electrically charged and the other is grounded. The fibrinogen and the thrombin are then streamed from the common orifice onto the substrate to form a matrix. The step of streaming fibrinogen and thrombin may form a matrix of electroprocessed fibrin fibers. This step may, alternatively, form a matrix of electroprocessed fibrin droplets.

In another arrangement, separate reservoirs containing solutions comprising fibrinogen and thrombin do not communicate through a common channel but have individual orifices that permit streaming of the solution from each reservoir. The simultaneous co-streaming of the two solutions permits fibrin to form on the target, or in the atmosphere prior to reaching the target.

In yet another arrangement, a reservoir containing a solution of fibrinogen may be used to electro sputter, electro spray or electro spin fibrinogen onto a target containing a thrombin solution or a surface layer containing thrombin in order form fibrin directly on the target. Carrier molecules may optionally be employed to passively carry fibrinogen to the target or surface layer. Alternatively, a solution of thrombin may be used to electro sputter, electro spray or electro spin thrombin onto a target containing fibrinogen to form fibrin. Since the clotting reaction proceeds with reasonable speed in the presence of calcium ion, a calcium-free fibrinogen plus thrombin, or calcium-free plasma plus thrombin can be electroprocessed onto a target containing calcium. Alternatively, a calcium-free stream of any fibrin-forming molecule can be electrodeposited together with a calcium-containing stream of any fibrin-forming molecule.

A further method for making a matrix of fibrin provides a substrate, a target, and at least two separate reservoir solutions, one including fibrinogen and the other including thrombin, wherein the each reservoir has an orifice that either: a) allows the solution to leave



the reservoir and contact the other solution through a common channel in communication with each orifice prior to electrojection of the mixed solutions from an orifice located at an end of the common channel, or b) permits electrojection directly from an opening in communication with the orifice from each reservoir. Then, either the target or the solution is electrically charged and the other is grounded. The substrate is disposed between the orifice and the target. The fibrinogen/ thrombin mixture or the separate solutions of fibrinogen and thrombin are then streamed from the reservoir and through the orifice onto the substrate to form a matrix. The step of streaming these fibrinogen and thrombin solutions forms a matrix of fibrin fibers or alternatively, a matrix of fibrin droplets. Further, the substrate may define a preselected shape. The fibrin matrix can be formed in the presence of cross-linking agents or may be treated with cross-linking agents after streaming.

The electroprocessed fibrin of the present invention may be employed as a vehicle or carrier for scaffolds of other extracellular matrix proteins, drugs and other substances. If electroprocessed fibrin were combined with other polymers or natural or non-natural fibers, and the polymers were cross-linked in the electroprocessed fibrin, the fibrin would later dissolve through natural or artificial means, leaving the cross-linked scaffold in place.

The electroprocessed fibrin of the present invention may be employed as a vehicle for drug delivery or delivery of other substances, for example, anti-oxidants, vitamins, cosmetics, nucleic acids, vectors, wound care products, and hormones. This electroprocessed fibrin can be used as a "bio-degradable" depot system, placing high concentrations of a substance such as a drug at a specific location. Drug release can be tailored by altering the structure of the electroprocessed fibrin or the rate at which it dissolves. Any drug or other substance may be combined with the electroprocessed fibrin.

The electroprocessed fibrin is particularly useful in application to the dermis and epidermis, for example in therapeutic or in cosmetic applications. For example, the electroprocessed fibrin is useful in vascular grafts for promoting endothelialization. Healing and wound repair, for example with cuts, abrasions or ulcers represents a preferred application of the invention. Such applications may employ antibiotics, antibacterials, anti-inflammatory or substances that promote healing, as known to one of ordinary skill in the art. Other classes of drugs or substances include, but are not limited to, antibiotics, chemotherapy agents, antifungals, analgesics, hormones, emollients, humectants, anti-oxidants, vitamins, rejection drugs, and conditioners. Some preferred drugs or substances include, but are not limited to, estrogen, androgen, cortisone, cyclosporin, peptide growth factors including VEGF (vascular endothelial growth factor), NGFs (nerve growth factors), PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, FGFb, FGFa, and BGF (bone growth factors). Topical

WO 02/18441

PCT/US01/27409

7

antibiotics include, but are not limited to, penicillin, gentimycin, tetracycline. Antimycotics may also be employed.

The electroprocessed fibrin, electroprocessed fibrin matrix and/or electroprocessed fibrin and cells of the present invention may be applied to a desired site through any means, including but not limited to oral administration, anal administration, topical application, aerosol application, inhalation, intraperitoneal administration, administration into a body cavity, administration into the lumen or parenchyma of an organ, or spraying directly on a desired site. Spraying may include electro spraying on a desired site. Sites of application may be external, such as on the epidermis, or internal, for example a gastric ulcer, a surgical field or elsewhere. The electroprocessed fibrin of the present invention may be applied in the form of creams, gels, solutions, suspensions, liposomes, particles, or other means known to one of skill in the art of formulation and delivery of therapeutic and cosmetic substances. Ultrafine particle sizes of electroprocessed fibrin may be used for inhalation delivery of therapeutics.

The present invention includes a method for testing the effectiveness molecules on cells contained in an electroprocessed fibrin matrix *in vitro*. Any cell may be placed in the fibrin matrix and any desired substance may be administered to the cell in the fibrin matrix. Any desired biological response may be evaluated. This method may alternatively include manufacturing electroengineered tissue by streaming an electrically charged solution comprising fibrin and cancer cells on to a grounded target substrate under conditions effective to deposit the fibrin and cancer cells onto the substrate. The present invention includes a method for testing the effectiveness of cancer therapy treatments *in vitro*. The method includes manufacturing electroengineered tissue comprising fibrin and cancer cells. A plurality of samples of the electroengineered tissue are subjected to a plurality of cancer therapy treatments. The method further includes evaluating the relative effectiveness of the cancer therapy treatments. Also, the cancer cells may be obtained from a patient who is in need of cancer therapy treatments.

Accordingly, it is an object of the present invention to overcome the foregoing limitations and drawbacks by making and using electroprocessed fibrin.

Yet another object of the present invention is to provide an electroprocessed fibrin matrix. By electroprocessing, a fibrin matrix can be formed for use in numerous fields including biomedical applications, among others. Electroprocessed fibrin forms a three-dimensional, space filling network, and can be aligned during formation by flow dynamics. Once formed, the fibrin matrix can be aligned by mechanical traction, magnetic force or other means.

Another object of the present invention is to provide methods for making

WO 02/18441

PCT/US01/27409

8

electroprocessed fibrin and an electroprocessed fibrin matrix.

It is an object of the present invention to use fibrin or any solution capable of forming fibrin in the process of electroprocessing.

It is another object of the present invention to use fibrinogen in combination with thrombin, and/or other agents capable of processing fibrinogen to fibrin, in the process of electroprocessing. Through the electroprocessing method of the present invention, a fibrin matrix can be formed for use in multiple fields including biomedical applications, among others.

It is another object of the present invention to use the present methods to engineer tissues containing electroprocessed fibrin or an electroprocessed fibrin matrix. These tissues may include cells, drugs or other substances.

Still another object of the present invention is to provide a new method of delivery of substances, such as drugs, using electroprocessed fibrin, electroprocessed fibrin matrix and engineered tissue containing electroprocessed fibrin matrix.

Yet another object of the present invention is to provide engineered tissue containing electroprocessed fibrin matrix which can be used as a wound dressing, a nerve guide or as another implantable tissue.

An advantage of the present invention is that autologous fibrin may be employed, thereby minimizing chances for immune rejection of the electroprocessed fibrin matrix or the engineered tissue containing electroprocessed fibrin matrix.

These and other objects, features and advantages of the present invention will become apparent after a review of the following detailed description of the disclosed embodiments and the appended drawings.

#### 25 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a schematic of an apparatus for applying strain to electroprocessed fibrin.

Figure 2 is a schematic of an electrospinning apparatus.

Figures 3 and 4 are schematic drawings of an electroprocessing device including the electroprocessing equipment and a rotating wall bioreactor.

Figure 5 is a schematic drawing of an electroprocessing device and electroprocessed material directed to a shaped target.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The terms "electroprocessing" and "electrodeposition" shall be used broadly to cover the methods of electrospinning, electro spraying (electro aerosoling), electrosputtering of fibrin

droplets, combinations of electrospinning and electroaerosoling, other combinations thereof, and any other method wherein fibrin, molecules capable of forming fibrin, fibrinogen, thrombin or combinations thereof, are streamed, sprayed, sputtered or dripped across an electric field and toward a target. Similarly, the solution may be streamed from one or more grounded reservoirs in the direction of a charged substrate or from charged reservoirs toward a grounded target. "Electrospinning" means a process in which fibrin fibers are formed from a solution or melt by streaming an electrically charged solution or melt through an orifice. "Electroaerosoling" means a process in which droplets are formed from a solution or melt by streaming an electrically charged polymer solution or melt through an orifice. The term "electroprocessing", therefore, is not limited to the specific examples set forth herein.

For the purposes of the present invention, the term fibrin extracellular matrix refers to any three-dimensional structure onto which or in which cells can attach, multiply and grow. Other common terminology for fibrin extracellular matrices include scaffold, platform and a fascial sheath that could surround a muscle or nerve.

Throughout this application, the term "solution" is used to describe the liquid in the reservoir of the electroprocessing method. In a preferred embodiment, fibrin in a solution is electrodeposited on a target. In the present invention, preferred solutions for formation of fibrin comprise a solution of thrombin and a solution of fibrinogen. Fibrinogen is converted to fibrin monomer by thrombin, which aggregates into fibrin due to electrostatic interactions. This fibrin is not covalently cross-linked. It is to be understood that any solutions capable of forming fibrin following electrospinning, electro spraying or any form of electrodepositing are included within the scope of the present invention. For example, fibrin, fibrin analogs, precursors or active fragments thereof, fibrinogen analogs, precursors or active fragments thereof, and thrombin analogs, precursors or active fragments thereof and other molecules that are capable of forming fibrin may be employed in the present invention. Plasma is a good source of fibrinogen for fibrin formation, and plasma may be electroprocessed for this application. In one embodiment, a patient's blood may be used to prepare fibrin matrix for autologous application. Several enzymes will clot fibrinogen, and any enzyme with this capability is considered within the scope of the present invention. These include but are not limited to, reptilase, batroxobin, and a variety of other snake venom enzymes. In addition, fibrinogen will form a "fibrin-like" matrix by adding large amounts of protamine sulfate. This process has been termed paracoagulation.

In this application, the term "solution" also refers to suspensions containing the fibrin, molecules capable of forming fibrin, cells, substances such as drugs, other molecules or anything to be electrodeposited. "Solutions" may be in organic or biologically compatible

forms. This broad definition is appropriate in view of the large number of solvents or other liquids and carrier molecules, such as PEG, that may be used in the many variations of electroprocessing. Non cross-linked fibrin monomer may be electrodeposited or electrospun from solvents such as urea, monochloroacetic acid, or hexafluoroisopropanol (HFIP).

5 The term "fibrin" is used throughout the present application in its broadest definition. It includes, but is not limited to, fragments, analogs, conservative amino acid substitutions, and substitutions with non-naturally occurring amino acids. There are multiple types of fibrin that are naturally-occurring as well as types that are being synthetically manufactured or produced by genetic engineering. Other types may be found or synthesized in the future, or  
10 specific subsets of various fibrin molecules may be isolated with unique effects and may be used to make products like those described herein. All of these types and subsets are encompassed in the use of the term "fibrin" herein. Also, as evidenced by some of the examples, the fibrinogen and/or the thrombin may be mixed with other polymers or other molecules during electroprocessing to obtain specifically desirable properties for given end  
15 use of the fibrin or fibrin matrix.

*Electroprocessing Methods of Forming Fibrin*

Fibrin, or any molecule capable of forming fibrin, can be used in the present invention to form electroprocessed fibrin. Fibrinogen and thrombin are two preferred molecules for  
20 making fibrin. Fibrinogen can be electroprocessed in conjunction with or separately from thrombin to form electroprocessed fibrin or an electroprocessed fibrin matrix. This is conducted under conditions that do not allow thrombin to promote the processing of fibrinogen to fibrin. This may be accomplished several ways. For example, the fibrinogen and thrombin can be electroprocessed from a solvent that does not allow thrombin to  
25 function. Alternatively, the fibrinogen or thrombin can be packaged in a carrier material. In this application the fibrinogen can be electroprocessed onto the target from one solution source (by itself or with a carrier). The thrombin can be deposited in an electroaerosol manner from a separate source. The thrombin can be encapsulated and sprayed as a fine mist of particles. Alternatively, thrombin and fibrinogen can be mixed with a carrier, such as PEG  
30 or collagen.

Fibrin as a preformed gel can be electroprocessed. A fibrin gel may be subjected to pressure, for example using a syringe with a pressure head behind it to extrude the fibrin gel into the electrical field.

35 The carrier acts to hold the reactants in place until they are initiated. The entire product is preferably stored under dry conditions. When the material is placed in a moist

WO 02/18441

PCT/US01/27409

11

environment, for example a cut, ulcer, or weeping wound, the thrombin is released, processes fibrinogen to fibrin and clot formation occurs. As stated above, it is to be understood that carriers may be used in conjunction with the molecules capable of forming fibrin. For example, fibrinogen can be mixed with PEG, collagen or other known carriers that form filaments. This produces hairy filaments with the hair being fibrin. The fibrin in this type of use cross links the surrounding matrix carrier into a gel. This approach may be used for gelling molecules that do not normally gel. For example, if type IV collagen, or some other collagen, would not form filaments, the fibrinogen, collagen and PEG could be electro sprayed to form an electroprocessed fibrin-containing matrix. Once fibrin formation begins, a fibrin/collagen gel would be produced.

Alternatively, the fibrinogen/fibrin can be sputtered with another molecule that forms a sheet (for example, PGA PLA PGA:PLA, collagen, fibronectin). This sheet could be placed over a wound. If the wound opens the fibrinogen is converted to fibrin and a clot forms. If thrombin is present in the sheet, a clot may be obtained with the addition of water and the release of the thrombin. Such sheets have applications in surgery and wound care, among other uses. It is to be understood that other fibrin forming molecules besides fibrinogen and thrombin may be employed.

In addition to the multiple equipment variations and modifications that can be made to obtain desired results, similarly the solution can be varied to obtain different results. For instance, the solvent or liquid in which the fibrinogen or thrombin is dissolved or suspended may be varied.

The fibrinogen or thrombin can be mixed with other molecules, monomers or polymers to obtain desired results. For instance, polymers can be added to modify the viscosity of the solution. In still a further variation, when multiple reservoirs are used, the ingredients in those reservoirs may be electro sprayed separately or joined at the nozzle so that the ingredients in the various reservoirs may react with each other simultaneously with the streaming of the solution into the electric field. Also, when multiple reservoirs are used, the different ingredients in different reservoirs may be phased in temporally during the processing period. The fibrinogen may be directly altered, for example, by altering the carbohydrate profile of the molecule. Also, other materials may be attached to the fibrin before, during or after electroprocessing of the fibrinogen and or thrombin. Further, the temperature and other physical properties of the process can be modified to obtain different results.

Finally, there are many types of post-process treatments that may be used to modify and adjust the fibrin matrix resulting from the electroprocessing procedure. For instance, the

fibrin matrix may be treated with a cross-linking agent, including chemical and UV-light based cross-linking agents. Also, the fibrin matrix may be treated with variations in temperature. Still further chemical variations may be envisioned by those desiring specific end properties of a matrix. Fibrin is formed in different ways, for example by mixing  
5 together fibrinogen and thrombin in appropriate concentrations. Building an extracellular matrix comprised of fibrin, therefore, involves different ways of bringing the molecules capable of forming fibrin, such as fibrinogen and thrombin, together through electroprocessing methods. This fibrin may also be manipulated after it is formed with the electroprocessing methods.

10 In the most fundamental sense, the electroprocessing apparatus for electroprocessing fibrin includes a streaming mechanism and a target substrate. The streaming mechanism includes a reservoir or reservoirs to hold the one or more solutions that are to be streamed in the process. The reservoir or reservoirs have at least one orifice or nozzle to allow the streaming of the solution from the reservoirs. There may be a single nozzle or multiple  
15 nozzles in a given electroprocessing apparatus. If there are multiple nozzles, they may be attached to one or more reservoirs containing the same or different solutions. Similarly, there may be a single nozzle that is connected to multiple reservoirs containing the same or different solutions. Also, the size of the nozzle may be varied to provide for increased or decreased flow of the solution out of the reservoir through the nozzle. A pump used in  
20 connection with the reservoir may be used to control the flow of solution streaming from the reservoir through the nozzle or nozzles. The pump may be programmed to increase or decrease the flow at different points during electroprocessing.

The target substrate may also be used as a variable feature in the electroprocessing of molecules used to make electroprocessed fibrin. Specifically, the target may be the actual  
25 substrate for the molecules used to make electroprocessed fibrin, or electroprocessed fibrin itself is deposited. Alternatively, a substrate may be disposed between the target and the nozzle. For instance, a petri dish can be disposed between a nozzle and a target, and a matrix can be formed in the dish to study cell growth in three dimensions by forming a scaffold in the bottom of the dish. Other variations include non-stick surfaces between the nozzle and  
30 target. The target may also be specifically charged (grounded) along a preselected pattern so that the solution streamed from the orifice is directed into specific directions. The electric field may be controlled by a program to create an electroprocessed fibrin matrix having a desired geometry. The target and the nozzle or nozzles may be engineered to be movable with respect to each other thereby allowing additional control over the geometry of the fibrin  
35 matrix to be formed. The entire process may be controlled by a microprocessor that is

WO 02/18441

PCT/US01/27409

13

programmed with the specific parameters to obtain a specific, preselected and electroprocessed matrix of fibrin and, if desired, other molecules, monomers or polymers.

Also, as noted in the specific examples that follow, the nozzle or orifice that allows streaming of solution from the reservoir is shown to be charged and the target is shown to be grounded. Those of skill in the electroprocessing arts will recognize that the nozzle and solution may be grounded and the target may be electrically charged. In any event, it is the creation of the electrical field and the effect of the electrical field on the streamed fibrin, or the streamed thrombin and fibrinogen that help create the fibrin.

An extracellular matrix of electrospun fibrin fibers, in accordance with the present invention, can be produced as described below. While any molecules capable of forming fibrin may be used, it is preferable to electrospin fibrinogen or thrombin to make fibrin fibers. Various effective conditions can be used to electrospin a fibrin fiber matrix. While the following is a description of a preferred method, other protocols can be followed to achieve the same result. Referring to Figures 3 and 4, in electrospinning fibrin fibers, micropipettes are filled with a solution of fibrinogen or thrombin and suspended above a grounded target 11, for instance, a metal ground screen placed inside the central cylinder of the RCCS bioreactor. A fine wire 12 is placed in the solution to charge the solution in each pipette tip 13 to a high voltage. At a specific voltage determined for each solution and apparatus arrangement, the solution suspended in each pipette tip is directed towards the grounded target. This stream 14 of fibrinogen and thrombin forms a continuous filament that, upon reaching the grounded target, collects and dries to form a three-dimensional, ultra thin, interconnected matrix of fibrin fibers.

Minimal electrical current is involved in this process, and, therefore, the streaming process does not denature the fibrinogen and thrombin, because there is no expected temperature increase in the fibrinogen and thrombin solutions during the procedure.

Like the electrospinning process, an electroaerosoling process can be used to produce a dense, matte-like matrix of fibrin droplets. The electroaerosoling process is a modification of the electrospinning process in that the electroaerosol process utilizes a lower concentration of the fibrinogen and thrombin during the procedure. Instead of producing a polymeric splay (fibers) at the charge tip of the splay nozzle, small droplets of fibrinogen and/or thrombin are formed. These droplets then travel from the charged tip to the grounded substrate to form a sponge like matrix composed of fused polymeric droplets, generally in the order of less than 10 microns in diameter.

As with the electrospinning process described earlier, the electroaerosol process can be carried out using various effective conditions. The same apparatus that is used in the



electrospinning process, for instance as shown in Figures 3 and 4, is utilized in the electroaerosol process. The differences from electrospinning include the concentration of the fibrinogen or thrombin placed in solution in the micropipette reservoir and/or the voltage used to create the stream of droplets.

5 One of ordinary skill in the art recognizes that changes in the concentration of fibrinogen or thrombin solutions requires modification of the specific voltages to obtain the formation and streaming of droplets from the tip of a pipette.

Various molecules can be used alone, or in combination, to produce the electrospun and/or electroaerosol fibrin matrices. Any suitable molecules that will form fibrin may be  
10 used. In preferred embodiments, fibrinogen and thrombin are employed to form the extracellular fibrin matrix. Fibrin, fibrinogen and thrombin are available from commercial sources, or they can be prepared according to methods known in the art.

Numerous molecules, cells or other materials, such as polymers, can be supplemented into the electrospinning or electroaerosoling solution. In one embodiment, naked DNA or vectors containing desired coding information for a specific product(s) can be mixed into the  
15 fibrinogen or thrombin solutions for incorporation into the tissue-engineered scaffold. Upon consumption/reorganization of the scaffolding by the seeded cells, they may incorporate the vector into their DNA and produce a desired effect. The DNA can be in any form which is effective to enhance its uptake into cells. For example, it can be naked (e.g., U.S. Patent Nos.  
20 5,580,859; 5,910,488) or complexed or encapsulated (e.g., U.S. Patent Nos. 5,908,777; 5,787,567). Similar to adding DNA, antibiotics, chemotherapy agents, antifungals, analgesics, hormones, emollients, humectants, antimicrobics, anti-oxidants, vitamins, conditioners, rejection drugs, other drugs, peptide growth factors including VEGF (vascular endothelial growth factor), NGFs (nerve growth factors), PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB,  
25 FGFb, FGFa, and BGF (bone growth factors), monokines, immunosuppressants, angiogenic factors or other factors as discussed elsewhere herein, may be added into the electrospun or electroaerosol matrix to aid in tissue regeneration or to achieve other desired biological results.

The electrospinning or electroaerosoling process can be manipulated to meet the  
30 specific requirements for any given application of the electroprocessed fibrin made with these methods. In one embodiment, the micropipettes can be mounted on a frame that moves in the x, y and z planes with respect to the grounded substrate. The micropipettes may be mounted around a grounded substrate, for instance a tubular mandrel. In this way, the fibrinogen or thrombin streamed from the micropipette can be specifically aimed or patterned. Although  
35 the micropipettes can be moved manually, preferably, the frame onto which the micropipettes

are mounted is controlled by a microprocessor and a motor that allows the pattern of streaming collagen to be predetermined by a person making a specific matrix. Such microprocessors and motors are known to one of ordinary skill in the art. For instance, fibrin fibers or droplets can be oriented in a specific direction, they can be layered, or they  
5 can be programmed to be completely random and not oriented.

In the electrospinning process, the fibrinogen and thrombin stream or streams can branch out to form fibrin fibers. The degree of branching can be varied by many factors including, but not limited to, voltage, ground geometry, distance from micropipette tip to the substrate, diameter of micropipette tip, fibrinogen concentration, and thrombin concentration.  
10 Fibrinogen, thrombin, fibrin and various combinations can also be delivered to the electric field of the system by injecting the materials into the field from a device that will cause them to aerosol. This process may be varied by many factors including, but not limited to, voltage (for example ranging from about 0 to 30,000 volts), distance from micropipette tip to the substrate (for example from 0-40 cm), and the diameter of micropipette tip (approximately 0-  
15 2 mm). Several of these variables are well-known to those of skill in the art of electrospinning microfiber textile fabrics.

The geometry of the grounded target can be modified to produce a desired matrix. In a preferred embodiment, a rotating wall bioreactor is used. The grounded target is a cylinder that fits inside the inner cylinder in the electrospinning or electroaerosoling process. By  
20 varying the ground geometry, for instance having a planar or linear or multiple points ground, the direction of the streaming fibrin can be varied and customized to a particular application. For instance, a grounded target comprising a series of parallel lines can be used to orient electrospun fibrin in a specific direction. The grounded target may be a cylindrical mandrel whereby a tubular matrix is formed. Most preferably, the ground is a variable surface that  
25 can be controlled by a microprocessor that dictates a specific ground geometry that is programmed into it. Alternatively, for instance, the ground may be mounted on a frame that moves in the x, y, and z planes with respect to a stationary micropipette tip streaming collagen. The grounded target 11 in Figure 4 is shown as being able to oscillate along its longitudinal axis.

The substrate onto which the fibrin is streamed, sprayed or sputtered can be the grounded target itself or it can be placed between the micropipette tip and the grounded target. The substrate can be specifically shaped, for instance in the shape of a nerve guide, skin patch, fascial sheath, or a vascular graft for subsequent use in vivo. The fibrin matrix  
30 can be shaped to fit a defect or site to be filled. For example a site where a tumor has been removed, or an injury site in the skin (a cut, a biopsy site, a hole or other defect) or to  
35

reconstruct or replace a missing or shattered piece of bone. Electroprocessing allows great flexibility and makes it possible to customize the construct to virtually any shape needed. Fibrin is so flexible that it can be formed to virtually any shape.

Other variations of electroprocessing, particularly electrospinning and electroaerosoling include, but are not limited to the following:

1. Using different solutions (e.g., fibrinogen and thrombin) to produce two or more different fibers or droplets simultaneously (matrix fiber or droplet array). In this case, the single component solutions can be maintained in separate reservoirs.
2. Using mixed solutions (for example, fibrin, fibrin and cells, fibrinogen and cells, thrombin and cells, fibrinogen and growth factors, fibrinogen or thrombin and drugs) in the same reservoir(s) to produce fibers or droplets composed of multiple substances (fiber composition "blends"). Nonbiological but biologically compatible material can be mixed with a biological molecule such as fibrin, fibrinogen or thrombin, for example PVA, poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), PEO, etc. Other biological materials can be added, for example collagen or blends of collagen.
3. Utilizing multiple potentials applied for the different solutions or even the same solutions.
4. Providing two or more different geometric grounded targets (i.e. small and large mesh screens).
5. Placing the mold or mandrel or other ungrounded target in front of the grounded target.
6. Applying agents such as Teflon onto the target to facilitate the removal of electroprocessed materials from the target (i.e. make the material more slippery so that the electroprocessed materials do not stick to the target).

All these variations can be done separately or in combination to produce a wide variety of electrospun and electroaerosol electroprocessed fibrin extracellular matrices.

Additionally, a matrix can be formed that includes both electrospun fibrin and electroaerosol fibrin. In other words, a combination of fibers and droplets may be beneficial for some applications depending on the particular structure to be mimicked. This combination of fibers and droplets can be obtained by using the same micropipette and solution in varying the electrical charge; varying the distance from the grounded substrate; varying the polymer concentration in the reservoir; using multiple micropipettes, some from streaming fibers and others for streaming droplets; or any other variations to the method that could be envisioned by those of skill in this art. The fibers and droplets could be layered or mixed together in same layers. The construct can be fabricated in laminate layers so that

each alternate layer is designed to undergo degradation, breakdown, hydrolysis after different rates. For example, the inner layer of a construct might be fabricated from electrospun fibrinogen/fibrin. This layer is then coated with collagen, then a layer of PLA, a layer of PGA or any other desired layer.

5 The stability, rigidity, and other attributes of the electrospun or electroaerosol matrix can be regulated by the degree to which it is chemically modified. The electrospun or electroaerosol matrix may be used in its unmodified state, or it may be modified in accordance with the requirements of a specific application. Modifications to the matrix can be made during the electrospinning or electroaerosoling process or after it is deposited.

10 Cross-linking agents such as carbodiimide EDC (1-ethyl-3(3 dimethyl aminopropyl)), carbodiimide hydrochloride, NHS (n-hydroxysuccinimide), or UV light can be used, e.g., aldehydes (e.g. glutaraldehyde) photosensitive materials that cross link upon exposure to specific wavelengths of light, osmium tetroxide and other cross-linking fixatives.

One embodiment for appropriate conditions for electrospinning fibrin is presented

15 below. For electrospinning fibrin by combining fibrinogen and thrombin, the appropriate approximate ranges are: voltage 0-30,000 volts; pH 7.0 to 7.4; calcium 3 to 10 mM; temperature 20 to 40°C; ionic strength 0.12 to 0.20 M; thrombin 0.1 to 1.0 units per ml; and fibrinogen 5 to 25 mg/ml. For electrospinning fibrin monomer, the pH would start at 5 and increase to 7.4 while the ionic strength would start above 0.3 M and decrease to 0.1 M. The

20 other conditions are similar as stated within this paragraph. Fibrin matrices of varying properties can be engineered by shifting the pH, changing the ionic strength, altering the calcium concentration or adding additional polymeric substrates or cationic materials.

#### *Forming an Electroprocessed Fibrin Matrix*

25 Electroprocessed fibrin can be electrodeposited inside a specifically shaped mold (Figure 5). For instance, a particular type of organ or tissue that is desired to be replaced has a specific shape, such as a skin patch to fit a biopsy site or a large scalp area following a wide area removed after discovering a malignant melanoma. That shape is then reproduced and created inside a mold designed to mimic that shape. This mold could be filled by

30 electrodepositing the fibrin into the mold. In this way, the fibrin matrix exactly mimics the mold shape. Creating an extracellular fibrin matrix that has a specific shape can be very important in creating a new organ. The shape of the matrix can induce cells seeded into the fibrin matrix to differentiate in a specific manner. Growth factors or other substances may be incorporated as discussed elsewhere herein. This can result in a more effective, more natural-

35 like organ or tissue being created. Hollow and solid organs can be made. Mixing cells with

the material during electrospaying forms cells within the matrix so that they do not have to migrate into the gel.

5 An extracellular matrix of fibrin may also be created through electroprocessing techniques such as electrospinning and electroaerosoling. For this purposes of this discussion, electrospinning and electroaerosoling are terms that are used interchangeably. In order to electrospin fibrin, at least two different reservoirs are connected together at an orifice. One of the reservoirs contains fibrinogen, another contains thrombin. The solutions containing these components are mixed together immediately before they are streamed from an orifice in the electrospinning process. In this way, fibrin forms literally as the microfibrils or microdroplets are formed in the electrospinning process.

10 Fibrinogen may also be electrospayed into a moist atmosphere of thrombin to form filaments within the electric field. Fibrinogen may also be electrospayed onto a target that has thrombin. Alternatively thrombin may also be electrospayed onto a target that has fibrinogen.

15 An extracellular matrix incorporating fibrin can be made by combining fibrin with one or more other materials and components to create a matrix. For instance, an extracellular matrix that has both collagen and or fibronectin and or other matrix materials and fibrin incorporated into it could be created. This could be useful depending on the specific type of tissue or organ being synthesized. In addition to mixing fibrin with other matrix ingredients, fibrin can be used in connection with other matrix building processes. In other words, an extruded tube could have an outside layer electrospun onto it wherein the different layers complement each other and provide an appropriate matrix to promote a specific type of cell growth. An example includes a vascular graft comprised primarily of a collagen tube. Outside the tube, an electrospun layer of both fibrin and cells could be added to promote the acceptability of the graft in a particular recipient. A second example is an *in vitro* skin preparation formed by growing fibroblasts in one layer, covering the first layer with electroprocessed collagen, and then growing a second layer composed of epidermal cells in the fibrin matrix. This "sandwiching" technique could be used to make a variety of tissues.

20 The various properties of the extracellular matrix can be adjusted in accordance with the needs and specifications of the cells to be suspended and grown within it. The porosity, for instance, can be varied in accordance with the method of making the extracellular matrix. Electrospinning a particular matrix, for instance, can be varied by fiber (droplet) size and density. If the cells to be grown in the matrix require a great deal of nutrient flow and waste expulsion, then a loose matrix could be created. On the other hand, if the tissue to be made requires a very dense environment, then a dense matrix could be designed. Porosity may be

WO 02/18441

PCT/US01/27409

19

manipulated by mixing salts or other extractable agents. Removing the salt will leave holes of defined sizes in the matrix.

*Uses for Electroprocessed Fibrin*

5 There are many different applications for fibrin produced through electroprocessing methods. This versatility is enabled by the variability of the process itself. Generally speaking, there is variability with the equipment and solutions used, and various post-process treatments. One post treatment is the addition of antifibrinolytic agents to delay network dissolution and provide a more durable material. Another post-process treatment is traction  
10 alignment to apply force to the electroprocessed fibrin in order to shape or align it. This could be useful for the production of nerve guides and other objects. Fibrin or fibrinogen may be cross-linked with cross-linking agents known to one of ordinary skill in the art of cross-linking proteins, for example, with carbodiimides, aldehydes, or ultraviolet energy (if photo-sensitive agents are employed).

15 The use of electroprocessed fibrin as an extracellular matrix has many advantages. As a clotting agent, fibrin is associated with healing in the body. It is a porous medium that allows nutrients and waste to flow to and from cells suspended within a fibrin structure. The presence of fibrin also promotes the growth of vasculature in adjacent regions, and in many other ways is a natural healing promoter.

20 Fibrin is a readily available material. It is present in plasma. To the extent that the extracellular matrix is being used to fabricate a tissue or organ to be transplanted into a recipient, the recipient's own plasma can be used as a source of fibrin (fibrinogen) to create the matrix. In this way, the matrix is made from a recipient's own fibrin, thereby overcoming potential complications with respect to viral exposure from materials obtained from other  
25 human donors. Use of fibrin collected from other sources can be made significantly safer by multiple purification steps, and by processes such as pasteurization or other processes to remove viral particles and other infectious agents.

Fibrin is an excellent extracellular matrix because it is eventually absorbed by the body of the recipient. In other words, during and after fibrin serves its healing/rebuilding  
30 purpose, the body will naturally degrade it. This is part of the natural healing mechanism. There would be no lingering foreign matter, only the cells constituting the replacement cells, tissues or organs. Electroprocessed fibrin may be mixed with other fibrillar materials to obtain different rates of degradation. Native fibrin degrades rapidly, collagen more slowly, PGA and PLA more slowly yet. Cross-linking the fibrin and other materials to various  
35 degrees will stabilize the materials to different extents. Electroprocessed fibrin may be

WO 02/18441

PCT/US01/27409

20

slightly cross-linked for small increase in half life, or highly cross-linked to provide extended duration of use.

There are numerous applications for fibrin produced through electroprocessing methods. The different fields of use of this process and the product thereof include 5 biomedical applications. Non-limiting examples of potential applications in these fields of use will be discussed herein.

#### *Biomedical Applications*

10 There are at least two major biomedical applications for fibrin produced through electroprocessing techniques. In general terms, electroprocessed fibrin matrix may be used in the formation of an extracellular matrix and in delivery of substances, including drugs.

Electroprocessed fibrin may be used in several biomedical areas, including but not limited to the following: topical wound care; temporary skin patch; skin grafts; dural patches; bed sores; ulcers, including diabetic ulcers; cuts; abrasions; fascial replacements; surgical 15 applications for example, application such as electrospray onto a open site or surgical field; hemostatic agent to stop bleeding (sheets, paste, powders, films, and other forms); biological suture material; matrix for micro-organ production; nerve guide for nerve repair as a nerve replacement when combined with neurogenic stem cells; as a scaffold for introducing or reintroducing cells into the body. Electroprocessed fibrin may be made in a dry form ready 20 to react upon contact with water, or timed to react after contact with water after some interval (determined by the carrier molecules used to process the fibrinogen). Hemophiliacs would especially benefit from the hemostatic properties of the electroprocessed fibrin of the present invention.

25 Biomedical applications of cross-linked electroprocessed fibrin include the following: vascular valves; vascular grafts; tendon/muscle repair; tendon or ligament; vascular scaffold or support; wound care; cartilage; hernia patch; nerve repair; bone; suture material; and as a bioengineering platform.

#### *Bioengineering Using Electroprocessed Fibrin Matrix*

30 An additional application of the invention is as a platform for the fabrication of tissue using an electroprocessed fibrin matrix as a solid support. The fabrication platform is composed of an electroprocessed matrix of fibrin, or fibrin combined with other molecules, microfibers or blends of materials. The overall three-dimensional geometric shape of the platform is determined by the ultimate design and type of tissue to be bioengineered.

Several permutations of the design are possible. For example, to fabricate a solid three-dimensional "plug" of fibrin-containing tissue, a fabrication platform is electrodeposited on a mandrel or into a mold, perhaps through electrospraying. The mandrel may be cylindrical in shape, a flattened oval shape, a rectangular envelope shape (like a mailing envelope), or any other desired shape. The fibrin-containing bioengineering platform is electrodeposited on a mandrel with the desired shape and allowed to cure. The electrodeposited matrix is removed from the mandrel. For a cylindrical-shaped bioengineering platform or any other shape of construct in which an enclosed area is desired, a suture, glue, staple or heat seal or some other method may be used to seal one end of the bioengineering platform. This results in a hollow platform that is closed on one end and open on the other. The electrodeposited fibrin-containing platform can now be filled with cells or other materials, or cells or other materials may be placed on the outer surface of the construct. For example, a mixture of fibrin from the electroprocessing procedure, or other materials such as cells, or molecules such as drugs or growth factors may be placed within the platform. The free and open end of the envelope that was used to fill the construct with material can be sutured, glued or heat sealed shut to produce an enclosed bioengineering platform. The entire construct is then placed into a bioreactor for cell culture or directly placed *in situ* for further development. With modifications, a bioengineering fibrin-containing platform composed of a solid, rather than a hollow, format can be electroprocessed.

Endothelial cells may be added to the core or outside surface of the fibrin-containing bioengineering platform during seeding to pre-form a capillary network.

Cells may be added during the electroprocessing process to trap or surround cells within the fibrin matrix as it forms. This may be accomplished by adding cells from a separate nozzle(s) or other sources if the materials to be electroprocessed, for example fibrinogen and thrombin, must be placed in an organic solvent or solvents (for example a solvent with high or low pH or a solvent with high or low salt content). Cells may also be added by other means, for example cells may be dribbled into an electrospinning stream and trapped by the forming fibers.

Cell polarity can be regulated by controlling the orientation of the fibrin fibers on the mandrel during or after electroprocessing. For aligned fibers, this can be accomplished by electrodepositing, perhaps using electrospinning, onto a target mandrel that is spinning. The fibrin fibers will be wrapped around the mandrel in the direction of rotation. Electrospinning onto a static, non-spinning mandrel will produce a more random fibrillar matrix. Fibrin can be mechanically aligned after spinning by stretching or some other form of mechanical



distension. Orientation of the electroprocessed fibrin matrix may be beneficial in facilitating cell proliferation.

Polarity may also be controlled by first electroprocessing an aligned matrix onto a spinning mandrel. The matrix is then cut from the mandrel, rotated 90 degrees (or any other degree of rotation) and placed back onto a mandrel. A second layer of material is then electrospun onto the first layer. This method will produce an inner layer of fibrin fibers that are aligned along the long axis of rotation. Alternatively, fibrin layers created with this method may be surrounded by layers of other materials. These materials may include biocompatible materials such as PGA, PLA, PGA:PLA co-polymers.

10 Cell polarity can be regulated by placing the bioengineering platform within a stretching device installed in the bioreactor. By gradually applying strain across the construct over time the cells within the platform will spread in parallel with the applied force.

15 Cells may also be electrodeposited with the electroprocessed fibrin, either from the same reservoir or from different reservoirs. The electroprocessed fibrin bioengineering platform may be used as a differentiation platform for the manipulation of cells such as stem cells. The porosity and chemical composition of the electroprocessed fibrin matrix can be controlled prior, during, and after fabrication. This permits creation of a desired microenvironment that is believed to be critical for controlling the differentiation process in stem cells.

20 Conductive materials may be electrodeposited into or onto the electroprocessed fibrin matrix. In this way the fibrin-containing construct can be electrically stimulated to promote neural ingrowth, stem cell differentiation, or contraction of engineered muscle, or to promote the formation of bone in orthopedic applications where fibrin is used as a carrier to reconstruct bone. Incorporating conductive materials into an fibrin matrix produced through  
25 electroprocessing also could be used as means to further alter the properties of a fibrin matrix following fabrication. For example, applying an electrical field across an existing fibrin matrix might be used to alter the shape, porosity or density of the matrix. The stability of the fibrin matrix (resistance to breakdown) might be altered by applying an electric field across the fibrin. Magnetic materials can be placed in the matrix to allow the matrix to be moved.  
30 For example, a magnetic field can be used to position a matrix by relatively non-invasive means, to direct the movement of the matrix within the peritoneum. Such materials include but are not limited to carbon black or graphite, carbon nanotubes, ferrofluids, and various dispersions of electrically conducting polymers. Also, conducting polymer fibers can be produced by electrospinning during fibrin electroprocessing. In addition, conducting  
35 polymers can be prepared in-situ in the fibrin by, for example, incorporation of a monomer

(e.g., pyrrole) followed treatment with polymerization initiator and oxidant (e.g., FeCl<sub>3</sub>). Finally, conducting polymers can be grown in fibrin after electroprocessing by using a fibrin-coated conductor as the anode for electrochemical synthesis of, for example, polypyrrole or polyaniline. Fibrinogen can be added to an aqueous solution of pyrrole or aniline to create a  
5 · conducting polymer at the anode with entrapped fibrinogen which can then be treated with thrombin.

The fibrin-containing engineered tissue can be vascularized through different means. Angiogenic factors may be seeded into the electroprocessed fibrin. Electroprocessed fibrin-containing engineered tissue may be vascularized by placing it within the omentum.

10 The fibrin-containing engineered tissue can be placed in a bioreactor to engineer an organ or alter the gene profile of cells. For example, cells may be obtained from a patient, the patient's fibrin could be electroprocessed from the patient's plasma, and this electroprocessed fibrin matrix can be used to support cells isolated from the patient. These cells could be transfected, cultured, characterized and implanted into the patient. Using this approach, only  
15 the patient's own materials are used, thereby minimizing chances of rejection. Transfections may be expressed in a temporary or permanent manner depending on the desired application.

In the present invention, cells are initially cultured by routine techniques. Once an appropriate cell density has been achieved, the cells are suspended in a solution of fibrin prior to electroprocessing. Alternatively, cells are suspended in fibrinogen or thrombin solutions  
20 prior to electroprocessing the suspension. If cells are suspended in fibrinogen, this suspension may be electroprocessed, for example sprayed or spun, and a thrombin solution may separately be sprayed into the fibrinogen spray or sprayed on the target covered by the cells suspended in fibrinogen. Fibrin, therefore, is formed in the mixed sprays or on the target. This three-dimensional fibrin structure with the cells implanted in it is then returned  
25 to a cell culture apparatus for continued growth. As is demonstrated in the following examples, the cells attach to the fibrin network and rapidly concentrate themselves. Depending on the type of cells suspended in the matrix, the cells can be promoted to grow in the same biological appearance as the normal tissue or organ corresponding to the cell type.

This electroprocessed fibrin-containing tissue provides several advantages. It  
30 provides a solid support that can be used to grow tissue at very high density. This can be achieved by simply collapsing a fibrin matrix either mechanically or chemically. This has advantages if the "growth" phase and "use/service" phase of the cells in question require different cell densities. For instance, growing cells can be made more efficient when more dilute, in term of nutrient and gas transport. When the growth phase is done, the cells can be  
35 concentrated by collapsing the matrix thus providing with a concentrated cell "plug" ready

for implant or other testing. This electroprocessed fibrin-containing matrix controls and establishes a local microenvironment with the construct. By controlling material properties of the matrix, one can control the buoyant nature of the construct, the porosity and the stability of the matrix (i.e. it can be designed to be very stable or to degrade over a relatively short period of time). It provides a platform for cell culture or tissue bioengineering that is unique and amenable for use in a bioreactor environment. It also provides a platform for cell culture and bioengineering of many different types of tissues that are large and can be manipulated manually. Also, the electroprocessed fibrin-containing matrix provides a solid phase delivery device for peptide growth factors, drugs and gene sequences, partial gene sequences in the sense and anti-sense directions.

The present invention describes a technique that allows three-dimensional cell growth and tissue/organ synthesis. By mimicking the pathologic process of metastasis, cells are placed in an electroprocessed three-dimensional fibrin matrix to support growth and normal cell to cell interactions. Cells may grow at a rapid rate in these fibrin structures, and may assume the shapes seen in normal tissue and organs.

*Cell Encapsulation in the Electroprocessed Fibrin Matrix*

In many of the electroprocessing applications used in testing, organic solvents must be used to carry molecules capable of forming fibrin for the fabrication of an electroprocessed fibrin matrix for bioengineering. However, there are many applications in which it would be desirable to incorporate cells within the fibrin matrix during the fibrin electroprocessing process. For example, during the fabrication of bioengineered cartilage or bone, it would be desirable to entrap the resident cells of these tissues within the electroprocessed fibrin matrix as it is fabricated. This is not possible with many of the solvents that are most effective for producing the matrix for bioengineering. By suspending cells in a fibrinogen solution or within a fibrin matrix (for example a partially or fully polymerized matrix of fibrin) they may be delivered to an electroprocessed fibrin matrix during the fabrication of the fibrin.

The matrix can also be treated or seeded with various factors and proteins to control the degradation/absorption of the matrix into a recipient environment. For instance, if the cells seeded within the matrix are slow-growing, then it is beneficial to maintain the matrix integrity for enough time to allow the cells to regenerate and grow. On the other hand, if the cells are able to quickly reproduce and grow, then a short lived matrix could be desirable. Varying the concentration of aprotinin additives, aminocaproic acid, or similar fibrinolytic inhibitors or varying the degree of chemical or ultraviolet cross-linking in the matrix could be

used to precisely control this variable. The matrix could also be seeded with varying growth factors, including but not limited to, angiogenesis factors, to promote a growth of blood vessels upon implantation, nerve growth factors to promote nerve growth, bone growth factors to promote bone formation, and PDGF isomers to promote cell division. The fibrin-containing matrix may be seeded with factors to promote healing, to minimize immunorejection. The fibrin-containing matrix may be seeded with agents that can induce inflammation and subsequent healing or promote the formation of a fibrotic capsule (PGA). Other agents that may be added include but are not limited to the following: suppressors of inflammation like cortisone; other anti-inflammatory drugs; hormones; cyclosporin and other anti-rejection agents; and full and partial length gene sequences both in the sense and antisense directions. For example, VEGF in the sense direction in a matrix that is used as a topical application to a wound. The gene sequence is delivered to cells in the immediate vicinity of the injury, transfects those cells transiently or permanently. Antisense sequences directed against proteases may be employed. In this application the antisense sequences may be full length or partial length, or mixtures of several. When delivered, these antisense sequences suppress the expression of the target molecule in a transient fashion.

Cells may be placed within the electroprocessed fibrin matrix as it is undergoing fabrication. Cells may be co-deposited with electroprocessed fibrin from the same solution of fibrin or molecules capable of forming fibrin, such as fibrinogen or thrombin. In another embodiment, a secondary source of cells can be delivered to the fibrin matrix during electroprocessing. In one embodiment, cells may be dribbled onto the mandrel during electroprocessing of fibrin.

Cells may be suspended within an aerosol as a delivery system for the cells to the electroprocessed fibrin matrix. The cells may be delivered in this manner while the fibrin matrix is being formed. Cardiac fibroblasts were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at a concentration of approximately one million cells per milliliter. The suspension of cells was placed within a reservoir of a Paasche air brush. To test the efficacy of using this type of device to deliver cells we initially sprayed the cell suspension onto a 100 mm culture dish. Some of the cells survived, attached to the dish and spread out over the substratum.

In the second trial the culture dish was located further away from the air brush and the experiment was repeated. Cells were observed on the dish. They appeared to be flattened by the impact and were partially spread out over the surface of the substratum. Culture media was added to the dish and the cells were placed into an incubator. After one hour of culture, the cells were re-inspected and many were found to have spread out further over the substratum. These results demonstrate that a simple airbrush device can be used to place cells

into an aerosol droplet and deliver them on demand to a surface or site of interest. Cell viability may be improved by restricting this technique to cells that are resistant to the shear forces produced in the technique, developing a cell suspension with additives that cushions the cells or refining the aerosolizing device to produce a more laminar flow. In addition  
5 directing the cell aerosol into fibrin filaments as they are undergoing polymerization in the air gap between the mandrel and source(s) of molecules capable of forming electroprocessed fibrin would cushion the cells. While not wanting to be bound by the following statement, it is believed that the cells will be trapped in the filament storm produced by electrospinning or electroprocessing and pulled onto the mandrel. This should be less traumatic to the cells than  
10 directly spraying the cells onto a solid surface.

An alternative method to deliver cells to the fibrin matrix involves electroaerosol delivery of the cells. Cells can be deposited by electrostatic spraying at 8kV directly onto standard polystyrene culture dishes, suggesting that electrostatic cell spraying is a viable approach. We have also electroaerosoled cardiac fibroblasts in PBS up to a 20 Kv potential  
15 difference.

Schwann cells (rat) were plated on a PS petri dish by conventional methods after one day. Schwann cells were also electrosprayed onto a PS petri dish with a metal ground plate behind the dish at 10kV after one day. Both samples grew to almost confluence after one week. This provides some distinct advantages. First, the shear forces produced during the  
20 delivery phase (i.e. the production of the aerosol) appear to be much less traumatic to the cells. Second, the direction of the aerosol can be controlled with a high degree of fidelity. In essence the cell aerosol can be "painted" onto the surface of interest. This allows the cell to be targeted to specific sites. In electroaerosol delivery, cells are suspended in an appropriate media (e.g. culture media, physiological salts etc) and charged to a voltage, and directed  
25 towards a grounded target. This process is very similar to that used in electroprocessing, particularly electrospinning. The produces a fine mist of cells trapped within the droplets as they are produced and directed at the grounded target.

Cells may be delivered using aerosol and electroaerosol techniques onto an matrix forming by electroprocessing techniques, for example a fibrin matrix that is undergoing electrodeposition, perhaps via electrospinning. The electroaerosol of cells might be delivered  
30 in parallel (i.e. along side the electrospinning fibrin) with the electrospun fibrin matrix or from a separate site. The cells may be delivered to the filament storm produced within the air gap in the fibrin electrospinning process or directed at the target. The cells and electroprocessed fibrin matrix also may be delivered in an alternative fashion to the target,  
35 i.e. electrodeposit the matrix, aerosol the cells, electrodeposit the matrix, aerosol the cells.

This would allow for the discreet layering of the construct in separate layers. A vapor source could be provided that directs water onto the mandrel of target used to collect the cells. This would improve viability by keeping the cells from dehydrating during processing.

Cells might be added to the electroprocessed fibrin matrix at any time or from any orientation in any aerosol strategy. A final consideration is that an aerosol of cells or other materials, such as drugs, coagulation factors, anti-inflammatories, growth factors, antibacterials, or DNA, might be delivered directly to an *in situ* site. For example, an electroprocessed fibrin matrix, perhaps an electrospun fibrin matrix might be produced directly onto a skin wound, with or without cells. Then additional cells or materials might be aerosolized onto or into the wound site. Other surgical sites may also be amenable the delivery of materials using various electrodeposition techniques such as electroaerosol, electrospinning, electrosputtering, electro spraying or a combination of these methods.

Yet another embodiment for cell delivery that has many potential applications is to trap cells or drugs within a carrier prior to producing an aerosol. For example, cells or drugs or other materials might be encapsulated within a material like alginate. The encapsulated cells would be physically protected from shear and trauma during processing. Cells delivered in this form to the electroprocessed fibrin matrix would be expected to have higher viability when sprayed or electrostatically seeded. This type of strategy can also be used to specify release profiles of entrapped materials, like drugs or peptides that may not interact with the fibrin fibers used in electroprocessing. For example, a drug like penicillin might not bind or interact with an electrospun matrix of fibrin. However, the drug could be entrapped in PGA pellets, PLA pellets or even electroaerosoled to produce pellets into the electrospun matrix of fibrin. The pellets or electroaerosoled droplets containing the penicillin would begin to dissolve to deliver the entrapped material. The release profile can be tailored by the composition of the material used in the process. In addition to delivery of cells, fragmented cell debris or cell fragments may alternatively be delivered to the electroprocessed fibrin matrix, in the presence or absence of intact cells. Cell fragments are known to promote healing in some tissues. Thus, in some applications it may be desirable to incorporate cellular debris into the electroprocessed fibrin matrix, either directly within the fibrin forming solutions during electroprocessing, or indirectly from a separate source.

The foregoing discussion has been limited to specifics with respect to building an electroprocessed extracellular fibrin matrix. In order to build tissue or organs (or organ-like tissue), it is necessary to add cells to the matrix. Preferably, the cells are added either before or at the same time as the fibrinogen and thrombin mixtures are brought together. In this way, the cells are suspended throughout the three-dimensional matrix. Typically, the cells

are included in the mixture that contains the fibrinogen (whether it is plasma or purified fibrinogen). When the fibrinogen and thrombin are brought together immediately prior to insertion into a mold, or immediately prior to the streaming step in the electrospinning process, the result is a good distribution of cells in suspension in the resulting extracellular matrix. Cells may also be sprayed or dribbled into the forming matrix and thereby trapped as the matrix crosses the air gap between the source solutions and target.

Many types of cells can be used to create tissue or organs. Stem cells, committed stem cells, and/or differentiated cells may be used. Also, depending on the type of tissue or organ being made, specific types of committed stem cells can be used. For instance, myoblast cells can be used to build various muscle structures, neuroblasts can be employed to build nerves, osteoblasts are chosen to build bone. Other types of committed stem cells, and stem cells including uncommitted, and embryonic stem cells, bone marrow stem cells and umbilical cord stem cells can be used to make organs or organ-like tissue such as livers, kidneys, etc. Also differentiated cells, like fibroblasts can be used in fibrin matrix to make a patch, for example a hernia patch, endothelial cells for skin, osteoblasts for bone, and differentiated cells like cadaver donor pancreatic islet cells (using the fibrin as a solid phase) for a delivery device to place these cells in a specific site, for example the liver. As noted earlier, the shape of the fibrin-containing extracellular matrix may help send signals to the cells to grow and reproduce in a specific type of desired way. Other factors and differentiation inducers may be added to the matrix to promote specific types of cell growth. Further, there may be different mixtures of cell types that are incorporated into the extracellular matrix. This could be used to enhance, for instance, the vascularization of the resulting "organ" or "organ-like" tissue.

In certain disease states, organs are scarred to the point of being dysfunctional. A classic example is cirrhosis. In cirrhosis, normal hepatocytes are trapped in fibrous bands of scar tissue. With the techniques described herein, the diseased liver could be biopsied, viable liver cells obtained, grown in this new electroprocessed fibrin-containing extracellular matrix, and re-implanted in the patient as a bridge to or replacement for routine liver transplantations.

Mixing of committed cell lines in a three dimensional matrix can be used to produce structures that mimic complex organs. By growing glucagon secreting cells, insulin secreting cells, somatostatin secreting cells, and/or pancreatic polypeptide secreting cells, or combinations thereof, in separate cultures, and then mixing them together in a fibrin matrix through electroprocessing, an artificial pancreatic islet is created. These structures could then be placed under the skin, retroperitoneally, intrahepatically or in other desirable locations, as implantable, long-term treatments for diabetes.

Other non-limiting applications include hormone-producing cells. Numerous applications fall within this category; for example, replacement of anterior pituitary cells to affect synthesis and secretion of growth hormone secretion, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin and thyroid stimulating hormone, among others. Gonadal cells, such as Leydig cells and follicular cells may be employed to supplement testosterone or estrogen levels. Specially designed combinations may be useful in hormone replacement therapy in post and perimenopausal women, or in men following decline in endogenous testosterone secretion. Dopamine-producing neurons may be used and implanted in a fibrin matrix to supplement defective or damaged dopamine cells in the substantia nigra. A patient's own stem cells or other stem cells may be mixed with slightly damaged cells, for example pancreatic islet cells, or hepatocytes, and placed in an electroprocessed fibrin matrix and later harvested control the differentiation of the stem cells into a desired cell type. This could be done *in vitro* or *in vivo*. The newly formed differentiated cells may then be introduced into the patient.

15

*Substance Delivery Using Electroprocessed Fibrin*

In addition, depending upon the application, substances including but not limited to drugs, anti-oxidants, vitamins, cosmetics, nucleic acids, vectors, wound care products, and hormones might be delivered and confined to a relatively local environment using electroprocessed fibrin. Other substances and drugs include the following non-limiting list: antibiotics, antibacterials, anti-inflammatories or substances that promote healing, antibiotics, antimycotics, chemotherapy agents, antifungals, analgesics, hormones, emollients, humectants, anti-oxidants, vitamins, rejection drugs, and conditioners. Some preferred drugs or substances include, but are not limited to, estrogen, androgen, cortisone, cyclosporin, peptide growth factors including VEGF (vascular endothelial growth factor), NGFs (nerve growth factors), PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, FGFb, FGFa, and BGF (bone growth factors). It is to be understood that any desired substance or drug may be combined with the electroprocessed fibrin. In the following paragraphs, drug and substance may be used interchangeably.

20

For example, for a pressure ulcer (e.g. bedsore) a drug or drugs might be delivered to a topical site by an electroprocessed fibrin matrix. In effect, the electroprocessed fibrin matrix would function as a biologically compatible bandage that delivered drugs without need to remove it because it would breakdown and dissolve naturally. For more general drug delivery throughout a system, the electroprocessed fibrin matrix might be inserted into a body cavity or placed in a sub-dermal domain. In all cases the release of the drug could be tailored

25

30

35



to be local or systemic, sustained or more transient.

An electroprocessed fibrin matrix may be used to deliver drugs (or again other agents that must be released in a controlled manner in other applications) in a variety of different ways. There is no limitation to the number of nozzles or solvent reservoirs that might be used in the processing of materials in this process.

Drug molecules may be mixed in the solvent carriers used to prepare fibrin for electroprocessing. In this system biologically compatible synthetic polymers (e.g. PLA or PGA, polymer blends or other polymers), naturally occurring polymers (e.g. fibrinogen, thrombin, fibrin or other molecules capable of forming fibrin, or synthetic polymers of natural materials) might be mixed with various drugs and directly electroprocessed. The resulting electroprocessed fibrin-containing matrix could be topically applied to a specific site, drugs would be released from the matrix as a function of the fibrin undergoing breakdown in the surrounding environment. The state of the electroprocessed fibrin in relation to the incorporated drugs is dictated and could be controlled by the chemistry of the system and varies by the fibrin forming solvent(s), and the drug solubility. These parameters can be manipulated to control the release of the drugs (or other elements into the surrounding environment). The electroprocessed fibrin-containing matrix can also be fabricated by electrospray or a mixture of electrospray and electrospinning, or any other permutation. This approach provides another level of control for the delivery of a drug.

In another embodiment, the drug is purposefully fabricated as a collection of aggregates in suspension with the substrates used for electroprocessing fibrin. Electroprocessing this type of solution incorporates the drug particles physically within the electroprocessed fibrin matrix. Release of the drug molecules from the electroprocessed fibrin matrix is a function of fibrin breakdown and the dissolution of the drug particles into the surrounding environment. Using the same drug in solution, rather than suspension, during the electroprocessing process can be expected to exhibit a different pattern of release and yet another level of control for the process. In other examples, particles of the drug might be trapped within the electroprocessed fibrin matrix. Release would be dictated by a complex interplay of aggregation, dissolution and fibrin matrix breakdown.

In other examples it might be desirable to covalently or chemically bond a drug molecule to the electroprocessed fibrin or fibrinogen. In theory, such molecules might only be released as the polymer carrier underwent hydrolytic or enzymatic breakdown. This application is particularly attractive for biomedical engineering or other surgical applications. Drugs such as angiogenic peptides and neural growth factors might be coupled to the polymer backbone of an electroprocessed fibrin matrix used to support an engineered tissue. Again as

the fibrin matrix underwent dissolution, the peptides would be released in a controlled manner in a localized domain in a gradient. The formation of peptide gradients is a critical regulatory component of many biological processes, for example in neovasculogenesis. In surgical applications, anti-vascular peptides or anti-sense oligonucleotides might be incorporated into an electroprocessed fibrin matrix that is then wrapped around a tumor that is inaccessible to conventional treatments. Release of the anti-vascular substances would suppress tumor growth. In another use, sense and antisense oligonucleotides (genetic material but not full length genes) are used to promote or inhibit cell function for a period of time. For example, an antisense oligonucleotide could be used in an electroprocessed fibrin matrix to suppress the expression of a deleterious enzyme in a wound. One target is the enzyme class called MMPs that are over expressed in chronic wounds.

Drugs might also be prepared as particles, an aerosol or perhaps a vapor. An electroprocessed fibrin matrix might be spun through these materials to passively trap the drugs to be delivered within the fibrin matrix. The process depends on the physical entrapment of particles or molecules within the fibrin matrix. Large objects, like cells or tablets, could be trapped in the matrix using this approach. This later conception of the idea could be accomplished simply by dropping materials onto or through a stream or fibrin forming solutions as an electroprocessed fibrin matrix is fabricated.

Control of drug release from the electroprocessed fibrin matrix may be further regulated by strain or by incorporating magnetic materials or electrically conductive materials into the fibrin matrix as it is electroprocessed. Applying mechanical forces to an electrospun matrix can hasten its breakdown by altering the crystallinity of the material. Similar changes in stability might be achieved by incorporating materials that are magnetically sensitive or electrically sensitive into a matrix as it is electroprocessed. A magnetic or electric field might then be subsequently applied across the electroprocessed fibrin matrix to stimulate movement or conformational changes in the matrix that subsequently stimulate the release of material from the electroprocessed fibrin matrix. This could be accomplished by directly altering the arrangement of the electroprocessed fibrin matrix to make it adopt a conformation more favorable for drug release.

Magnetic or electrically sensitive materials placed in a sub-dermal location or other location might be used to deliver drugs over a long interval of time. For example, an electroprocessed fibrin matrix that had magnetic or electrical properties and insulin might be fabricated and placed subdermally in an inconspicuous site. By passing a magnetic field or an electrical field across the electroprocessed fibrin matrix, drug release could be induced. This could be used to deliver drugs in a controlled fashion over a long period of time from the

electroprocessed fibrin matrix.

Another variation of this theme is to fabricate an electroprocessed fibrin matrix with electromagnetic properties that could be implanted and stimulated to exert force on the encapsulated material. For example, such a device could be used as a temporary left ventricular assist device that could be made to be permanent, or one that could be designed to dissolve over time, eliminating the need for surgery to recover the device once the heart had recovered sufficiently.

*Treatment of the Electroengineered Tissue Containing Electroprocessed Fibrin*

Once the electroengineered tissue containing electroprocessed fibrin and cells is assembled, the tissue can be inserted into a recipient. Alternatively, the structure can be placed into a culture to enhance the cell growth. Different types of nutrients and growth factors can be added to a culture (or administered to a recipient) in order to promote a specific type of growth of the engineered tissue. In one example, specifically in connection with the preparation of an engineered muscle tissue, the electroengineered tissue containing fibrin and cells can be mechanically or passively strained or electrically preconditioned in order to stimulate the alignment of cells to form a more functional muscle implant. In a skin patch, application of stress may facilitate orientation of the skin for use in an area such as the scalp, exposed to significant stretching force. Passive strain in this context refers to a process in which strain is induced by the cells themselves as they contract and reorganized a matrix. This is typically induced by fixing the ends of the electroengineered fibrin matrix. As the cells contract and alter the matrix the fixed ends of the matrix remain in place and thereby strain the cells as they "pull" against the isometric load. The strain not only aligns the cells, it sends signals to them with respect to growth and development. The construct can also be strained externally, i.e. the construct can be prepared and then stretched to cause mechanical alignment. Stretch is typically applied in gradual fashion over time. The fibrin can also be stretched to cause alignment in the matrix before the cells are added to the construct (i.e. form the matrix, stretch the matrix and then add the cells).

The electroengineered cell-fibrin matrix is also useful for testing various gene therapies. In other words, by working with the cells/fibrin *in vitro*, different types of gene therapy and manipulation can be achieved by inserting preselected DNA in the suspension (either the cells, fibrin, plasma, etc.). There is a wider range of therapeutic techniques available *in vitro* than when techniques are attempted to be administered *in vivo*. Nonviral techniques such as electroporation may be used to treat the cultured cells prior to insertion into the fibrin matrix. They may also be treated within the fibrin matrix before the

WO 02/18441

PCT/US01/27409

33

electroengineered tissue is inserted into a recipient. *In vitro* gene transfer avoids the exposure of a recipient to viral products and avoids the potential for germ cell line viral incorporation. It avoids the problem of finding or engineering viral coats large enough to accept large genes such as the one for Factor VIII (anti-hemophilic factor). However, *in vivo* gene therapy may be accomplished by incorporating DNA into the fibrin as it is created through the electroprocessing techniques of the present invention, whereby some DNA will be incorporated into the *in vivo* cells in contact with the fibrin as the fibrin slowly degrades *in vivo*. This is especially true of small gene sequences, such as antisense oligonucleotides. Adding additional agents to the matrix during or after processing can be used to manipulate gene transfection rates and the efficiency of transfection. For example, adding fibronectin to the matrix will increase the pinocytotic activity of the cells and increase the uptake of materials, including gene sequences, from the surrounding matrix. Alternatively, agents conventionally used in gene transfection may be added to the matrix, such as lipofection agents.

The engineered tissue/organ allows permits the *in vitro* culturing of a patient's tumor cells to identify *in vitro* susceptibility to various types of chemotherapy and radiation therapy. This application is essentially using the matrix as a diagnostic tool. In this way, alternative chemotherapy and radiation therapy treatments may be analyzed to calculate the very best treatment for a specific patient. For instance, an engineered tissue may be manufactured that includes fibrin and cancer cells, preferably a patient's own cancer cells. Multiple samples of this tissue can then be subjected to multiple different cancer therapies. The results from different treatments can then be directly compared to each another for assessment of efficacy.

#### *Engineered Fibrin Implant and a Bioreactor*

An engineered fibrin implant can comprise one or more of the following components, although this is a non-limiting list. They are skeletal muscle, cardiac muscle, nerve guides, brain constructs as a filler for damaged/removed areas of the brain that are lost during accident or disease, cartilage scaffoldings, sheets for cosmetic repairs, skin (sheets with cells added to make a skin equivalent), vascular grafts and components thereof, sheets for topical applications (skin covering but no additional cells-just a patch), drug and substance delivery.

There are several kinds of commercially available bioreactors, devices designed to provide a low-shear, high nutrient perfusion environment. Until recently, most of the available bioreactors maintained cells in suspension and delivered nutrients and oxygen by sparging, through the use of impellers, or other means of stirring. The RCCS bioreactor (Synthecon) is a rotating wall bioreactor. It consists of a small inner cylinder, the substrate

for the electrospinning process, positioned inside a larger outer cylinder. Although the electrospun or electroaerosol fibrin-containing matrix can be fabricated on the inner cylinder, other locations within the bioreactor also may be used for placement of the fibrin matrix for seeding. The gap between the inner and outer cylinders serves as the culture vessel space for 5 cells. Culture medium is oxygenated via an external hydrophobic membrane. The low shear environment of the Synthecon RCCS bioreactor promotes cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions without the damage or "washing away" of nutrients that occurs with active stirring or sparging. Typically, the RCCS device is operated at rotation rates of 8 up to 60 RPM, as required to maintain cells in suspension, and at less than 8 RPM (preferably 10 2-3 RPM) for cultures immobilized along the center shaft of the vessel. The Synthecon bioreactor can be used in a standard tissue culture incubator. These values for spin rates and other parameters may be varied depending on the specific tissue created.

Electroprocessed fibrin, particularly cross-linked electroprocessed fibrin is useful in formation of prostheses. One application of the electroprocessed fibrin is in the formation of 15 medium and small diameter vascular prostheses. Some examples include, but are not limited to coronary vessels for bypass or graft, femoral artery, popliteal artery, brachial artery, tibial artery, radial artery or corresponding veins. The electroprocessed fibrin is useful especially when combined with endothelial cells on the inside of the vascular prosthesis, for example a collagen tube, and also when combined with fibroblasts on the outside of the collagen tube. 20 More complicated shapes including tapered and/or branched vessels may also be constructed. All that is necessary is a different-shaped mandrel to wind the large fibers around or to orient the electrospun/electroaerosol polymer.

Combination of electroprocessed fibrin and wound polymer fibers can provide optimal growth conditions for cells. The polymer forms a basic structural matrix and the 25 electroprocessed fibrin matrix is used to deliver the cells. This facilitates cell attachment onto the structural matrix. Furthermore the stress in the polymer can also orient fibrin fibers in the matrix providing further spatial cues for the cells.

In an alternative fabrication strategy, a cylindrical construct is electrospun onto a suitable target, for example a cylindrical mandrel. Other shapes are also possible and the 30 shape is determined by the shape of the site that the implant is designed to be placed within. This matrix may be composed of electroprocessed fibrinogen/fibrin (for example to promote neovascularization, cellular integration and infiltration from the surrounding tissue), collagen (to promote cell infiltration and lend mechanical integrity), and other components, for example PGA, PLA, and PGA-PLA blends, PEO, PVA or other blends. The relative ratio of 35 the different components of this construct can be tailored to specific applications (e.g. more

fibrin less collagen for enhanced vascularization in a skin graft). To fabricate a cylindrical muscle the construct is filled with muscle or stem cells or other cell type and the distal ends of the electrospun constructs are sutured or sealed shut prior. The cells can be mixed with various matrix materials to enhance their distribution within the construct. For example the cells may be mixed with electroprocessed fibrin or collagen prior to insertion into the construct. The objective of this strategy is to provide additional mechanical support to the construct and provide the cells with a three dimensional matrix within the construct to promote growth. This also helps to maintain the cells in an even distribution within the construct. This method can be used to enhance the alignment of the cells within the construct. This "filling" material may be extruded directly into the cylindrical construct, as the filling is extruded, alignment occurs. Mixing endothelial cells with the other cells inserted into the construct (or other cell types) can be done to accelerate neovascularization. Another method to accomplish this objective is to electrospin endothelial cells directly into the electroprocessed fibrin matrix that aids in formation of the cylindrical sheath. The alignment of the fibers within the electrospun matrix that comprises the construct can be controlled by controlling the relative movement of the target and source solution with respect to one another. Other cell types, such as tendon fibroblasts, could be electrospun into or onto the outer surface of the construct to enhance the formation of the outer connective tissue sheath that forms the construct. Other design principles described in this document can be used in conjunction, for example the addition of peptide growth factors, antibiotics, and/or anti-rejection drugs, to the electrospun matrix. The entire construct can be cultured in a bioreactor, conventional culture or placed directly *in vivo*. The use of other cell types can be used to fabricate other tissue types.

Vascularization of the engineered tissue containing electroprocessed fibrin will occur *in situ* several days after surgery. It can be stimulated further, as mentioned above, by angiogenic and growth-promoting factors, either administered as peptides, proteins or as gene therapy. Neovascularization of an engineered construct containing electroprocessed fibrin can also be enhanced by mixing endothelial cells into the construct during fabrication. Another alternative for supplying engineered tissue containing electroprocessed fibrin with a vascular supply is to temporarily transplant the tissue into the omentum. The omentum has an extensive and rich vascular supply that could be used like a living incubator for the support of engineered tissue. The engineered tissue is removed from a bioreactor, wrapped in the omentum and supported by the diffusion of nutrients and oxygen from the surrounding tissue in the omentum. Alternatively, or in addition to this approach, engineered tissue is connected directly to the endogenous vascular supply of the omentum. A blood vessel might

be partially perforated or cut or left dissected free of the omentum. The engineered tissue containing electroprocessed fibrin is wrapped around the vessel. The engineered tissue is supported by nutrients leaking from the perforated vessel or by the simple diffusion of nutrients if the vessel is left intact. Regardless of strategy, the engineered tissue is surrounded by the omentum and its rich vascular supply.

Tissue containing electroprocessed fibrin may be engineered with an endogenous vascular system. This vascular system may be composed of artificial vessels or blood vessels excised from a donor site on the transplant recipient. The engineered tissue containing electroprocessed fibrin is then assembled around the vessel. By enveloping such a vessel with the tissue during or after assembly of the engineered tissue, the engineered tissue has a vessel that can be attached to the vascular system of the recipient. In this example, a vessel in the omentum is cut, and the vessel of the engineered tissue is connected to the two free ends of the omental vessel. Blood passes from the omental vessel into the vascular system of the engineered tissue, through the tissue and drains back into the omentum vessel. By wrapping the tissue in the omentum and connecting it to an omental blood vessel, the engineered tissue is supported by the diffusion of nutrients from the omentum and the vessel incorporated into the tissue during its fabrication. After a suitable period of time the tissue is removed from the omentum and placed in the correct site in the recipient. By using this strategy the engineered tissue containing electroprocessed fibrin is supported in a nutrient rich environment during the first several days following removal from the bioreactor. The environment of the omentum also promotes the formation of new blood vessels in implanted tissue. This omental incubator strategy can be combined with the other strategies such as combining angiogenic factors in the fibrin during electroprocessing. Several options are available. First, the implants can be seeded with angioblasts and/or endothelial cells to accelerate the formation of vascular elements once the engineered tissue is placed *in situ*. Second, angiogenic peptides can be introduced into the engineered tissue via an osmotic pump. The use of an osmotic pump permits delivery of peptides or, as noted, angiogenic peptides or growth factors directly to the site of interest in a biologically efficient and cost-effective manner. VEGF delivered to ischemic hind limbs of rabbits accelerated capillary bed growth, increased vascular branching and improved muscular performance with respect to ischemic controls. An alternative approach is to "seed" fully differentiated tissue constructs containing electroprocessed fibrin with additional endothelial cells and or angioblasts shortly before they are implanted in situ. Incorporating angiogenic agents into the electroprocessed fibrin matrix can also be used. The gradual degradation/breakdown of the matrix will release these factors and accelerate the ingrowth of blood vessels. Nerve growth factors can be electrospun into

the matrix to promote growth of neurons into the matrix and tissue.

The stem cells or other cells used to construct the implant can be isolated from the subject, or other compatible donor requiring tissue reconstruction. This provides the advantage of using cells that will not induce an immune response, because they originated with the subject (autologous tissue) requiring the reconstruction. Relatively small biopsies can be used to obtain a sufficient number of cells to construct the implant. This minimizes functional deficits and damage to endogenous tissues that serve as the donor site for the cells.

The present invention is further illustrated by the following examples, which are not to be construed in any way as imposing limitations upon the scope thereof. On the contrary, it is to be clearly understood that resort may be had to various other embodiments, modifications, and equivalents thereof, which, after reading the description herein, may suggest themselves to those skilled in the art without departing from the spirit of the present invention.

#### 15 Example 1

##### Cell Culture

Several types of cells are used in experiments with the fibrin and plasma :

a) Schwann cells from transgenic mice with truncated SCIP transcription factor. These cells have shown premature and excessive myelination *in vivo*. This line of cells was selected, because they can be easily cultured in large quantities without any special factor.

b) Primary rat Schwann cells from sciatic nerve. These cells do not divide under the following experimental conditions. Those test cells were not from a cell line.

In all cases the cells were maintained in 10.5 cm<sup>2</sup> plastic culture flasks with Dulbecco's modified pyruvate-free Eagle medium augmented with 10% bovine serum and 1% streptomycin-penicillin (Gibco BRL, Grand Island, NY). The cultures were placed in an incubator at 37°C, 7% CO<sub>2</sub> and 100% relative humidity (RH).

Cells type (a) were cultured to confluence then harvested. Cells type (b) were harvested as needed. Cells type (c) were grown in subconfluent cultures for several passages. In order to remove the cells for use, the growth media was drained and the culture was treated with 1 mL trypsin-EDTA (Gibco BRL) until the cells detached from the bottom of the dish. The trypsin was then neutralized with 4 mL of fresh media and the content of the flask transferred to a centrifuge tube. The cells were concentrated by centrifugation at 130 g for 5 minutes. The supernatant was removed and the cells resuspended in fresh media to densities of about 10<sup>6</sup> cells/mL for cell type (a) and (c) and 2-5x10<sup>5</sup> cells/mL for cell type (b). These cell suspensions were used in some of the following examples.



## Example 2

*Preparation of Thrombin, Fibrinogen and Plasma Stock Solutions*

Thrombin was obtained from Baxter as a lyophilized powder and dissolved in 10 mM calcium chloride in deionized water to a concentration of 50 units/mL. Alternatively, lyophilized thrombin (Sigma, American Diagnostic, etc.) can be dissolved in 0.15 M NaCl and calcium can be added at the time of clot formation. Blood was obtained by aseptic, nontraumatic venipuncture of a normal volunteer. The blood was collected into blue top vacutainer tubes containing 3.8% sodium citrate. The citrate binding of calcium prevented coagulation of the sample. Platelet poor plasma was prepared by centrifugation at 10,000 g for five minutes. Plasma was decanted from the top of the spun tube leaving the last centimeter depth of plasma on top of the cells to minimize cellular contamination. The citrated platelet poor plasma was filtered through a 0.45 micron filter under sterile conditions to remove fine particulate. Unused portions were stored up to three weeks at 4°C.

Fibrinogen was obtained from Sigma as a lyophilized powder and used immediately after dissolution in sterile 10 mM Tris buffer at pH 7.4 and 0.138 M NaCl to a concentration of 3 mg/mL (roughly the concentration in plasma).

20

## Example 3

*Orientation of Electroprocessed Fibrin and Cells*

Cells are known to adapt to their environment to suit their needs. Both muscle cells and Schwann cells self-reorganize fibrin strands into a highly oriented structures. Cells in an electroprocessed fibrin matrix may be oriented through application of mechanical force.

An electroprocessed tissue comprising electroprocessed fibrin matrix and cells (fibroblasts) to be used as skin is subjected to force in the following manner. A short piece of sterile Normex string 11, a stranded polyimide polymer string from Dupont, is attached to each end of the electroprocessed tissue (Figure 1). Each end of the Normex string 11 is then attached to a set of nylon screws 12 mating with a 5 mm thick polyethylene holder 13. There is sufficient friction between the screws 12 and the holder 13 to prevent any motion once the screws are set. The Normex strings 11 are tensioned by slightly turning the nylon screws 12 until the fibrin strains in the electroprocessed tissue show alignment under the applied strain. No other adjustments are made to the apparatus for the remainder of the experiment. A control is also performed using similar electroprocessed tissue which is not subjected to externally

WO 02/18441

PCT/US01/27409

39

applied strain. The tissue subjected to force demonstrate alignment of fibroblasts and greater tensile strength than the tissue not subjected to force.

#### Example 4

##### 5 *Electroaerosol Fibrin and Cells:*

A diluted cell suspension 20 in plain plasma and the stock thrombin solution 21 (~1 mL of each) were loaded into separate 3 mL plastic syringes 22 (Figure 2). The syringes 22 were inserted in separate syringe pumps and connected to a mixing tee 23 via a size 13 Tygon tube 24. A 27 gauge needle 25 terminated the outlet of the mixing tee. The needle was 10 connected to one pole of a Spellman CZE 1000R high voltage power supply 26. The other pole was connected to a stainless steel foil 27 attached to the back of a plastic culture dish. The mixing tee 23 was placed at about 10 cm from the culture dish. Each of the pumps was set to deliver 1.15 mL/min and a potential of -10 kV was applied, causing fibrin/cell drops to travel from the tip of the needle 25 to the culture dish.

15

#### Example 5

##### *Assessment of Biological Activity of a Substance on Cells in an Electroprocessed Fibrin Matrix*

A 54 year old man is diagnosed with malignant melanoma. Melanoma cells are removed from the biopsy and cultured. The cultured melanoma cells are loaded into a charged syringe. In a separate experiment, cultured melanoma cells are loaded into an aerosol device. Electroprocessed fibrin matrices are formed and the melanoma cells are electrodeposited into the forming fibrin matrix or applied to the forming fibrin matrix through an aerosol method. Fifty of these samples are produced.

25 Different samples of the melanoma cells in the electroprocessed fibrin matrix are subjected to a dose range of one or more putative chemotherapeutic agents for melanoma. A mitotic index is calculated at selected time intervals following exposure to the chemotherapeutic agents. Trypan blue exclusion is also evaluated. The results indicate which agent suppresses mitosis of melanoma cells and affects cell viability.

30

#### Example 6

##### *Artificial Pancreatic Islet in Electroprocessed Fibrin Matrix*

A mixture of cultured insulin secreting cells is seeded into an electroprocessed fibrin matrix to form an electroprocessed fibrin-containing tissue. The electroprocessed fibrin 35 matrix containing the insulin secreting cells is implanted into a diabetic recipient in need of

insulin. This electroprocessed fibrin-containing tissue optionally further contains a vessel. The matrix is implanted into the retroperitoneal space and the vessel is anastomosed into the hepatic portal circulation. Insulin is released from the insulin-containing cell and is transmitted to the circulation.

5 The electroprocessed fibrin matrix containing the insulin secreting cells is optionally supplemented with cells that synthesize and secrete glucagon, somatostatin, pancreatic polypeptide, or combinations thereof, in order to mimic the hormonal complement of the pancreatic islet.

10 Example 7

*Electroprocessed Schwann cells in an Electroprocessed Fibrin Matrix*

This experiment has been performed first using a peristaltic pump and later using two syringe infusion pumps. Experiments were also performed with cells suspended in either 2-3 mg/mL fibrinogen or using human plasma.

15 The following describes what was done with the infusion pumps which is similar to what was done with the peristaltic pump. The cells (Weinstein Schwann) were seeded at a concentration between  $10^5$  to  $10^7$  into 0.4  $\mu$ m filtered plasma (already containing fibrinogen) or standard Eagle media augmented with 2-4 mg/mL fibrinogen. 10  $\mu$ L of 10,000 kIU aprotinin was added to each mL of cell suspension to retard clot degradation. This suspension was loaded into a 3 mL plastic syringe. A second 3 mL syringe was filled with a filtered solution of thrombin between 50-200 IU/mL complemented with sufficient calcium chloride so that the final mixture would gel. These mixtures were processed under the laminar flow hood to maintain aseptic conditions.

25 The syringes were each mounted onto separate syringe infusion pumps. Using dual pumps permitted variation of the concentration of thrombin to fibrinogen and thus affected the clotting rate. The outlet of the syringes were connected, via short lengths of size 13 Tygon tubing, to a mixing tee. The outlet consisted of a metal syringe needle (various gauges were used, 18-27) which served as one of the electrodes in the electrospinning setup. The target consisted of a standard plastic culture dish placed at about 10 cm away from the outlet of the mixing tee. Aluminum foil was affixed to the back of the dish with tape to provide a counter electrode. To perform electrodeposition, the pumps were started (using flow rates of less than 0.25 mL/min to several mL/min) and the applied voltage was slowly increased to the point where electrodeposition proceeded (4-6 kV). The experiment was completed in less than 10 min to minimize settling of the cells inside the tubing/syringe. Following the electrodeposition, the gel was allowed to cure in the 37°C incubator for about one hour prior

35

WO 02/18441

PCT/US01/27409

41

to topping the dish with culture media augmented with 10 uL/mL of aprotinin. The results were analyzed and demonstrated healthy appearing Schwann cells embedded in the electroprocessed fibrin matrix.

5

## Example 8

*Delivery of Drugs in an Electroprocessed Fibrin Matrix.*

Different concentrations of nerve growth factor are added to fibrinogen solutions and electrospayed in parallel with an electrospayed thrombin solution into wells of a 96 well culture dish containing about 10,000 neuroblasts per well. These wells now contain cells and also a electroprocessed fibrin matrix containing nerve growth factor. The fibrin slowly dissolves and the neuroblasts proliferate in response to the nerve growth factor in a dose dependent manner.

In another experiment, electroprocessed fibrin matrix containing nerve growth factor is prepared in a similar manner and is inserted into a traumatized segment of the lower cervical spinal cord of an animal injured in a fall. Another animal with a similar injury receives electroprocessed fibrin matrix without nerve growth factor. The recovery rates of the animals are evaluated. The animal receiving the electroprocessed fibrin matrix containing nerve growth factor exhibits a faster recovery of motor function of the forelimbs.

All patents, publications and abstracts cited above are incorporated herein by reference in their entirety. It should be understood that the foregoing relates only to preferred embodiments of the present invention and that numerous modifications or alterations may be made therein without departing from the spirit and the scope of the present invention as defined in the following claims.

WO 02/18441

PCT/US01/27409

42

## CLAIMS

1. Electroprocessed fibrin.
- 5 2. The electroprocessed fibrin of Claim 1 in a matrix.
3. The electroprocessed fibrin matrix of Claim 2, further comprising cells.
4. The electroprocessed fibrin matrix of Claim 2, further comprising growth factors,  
10 differentiation inducers, anti-oxidants, vitamins, hormones, nucleic acids, drugs, peptides,  
nucleic acids, emollients, humectants, conditioners or cosmetics.
5. An engineered tissue comprising the electroprocessed fibrin matrix of Claim 2 and  
15 cells.
6. The engineered tissue of Claim 5, wherein the cells are stem cells or differentiated  
cells
7. Use of the electroprocessed fibrin or fibrin matrix of any of the preceding claims in  
20 an engineered tissue, as a wound dressing, for hemostasis, or for delivery of substances.
8. Use of the electroprocessed fibrin matrix of Claim 3 for evaluating biological  
responses of the cells to a substance.
- 25 9. A method of manufacturing the electroprocessed fibrin of Claim 1 comprising:  
electrodepositing one or more electrically-charged solutions comprising fibrin or  
molecules capable of forming fibrin onto a grounded target substrate under conditions  
effective to electrodeposit fibrin on said substrate.
- 30 10. A method of manufacturing the electroprocessed, fibrin matrix of Claim 2  
comprising:  
electrodepositing one or more electrically-charged solutions comprising fibrin or  
molecules capable of forming fibrin onto a grounded target substrate under conditions  
effective to electrodeposit fibrin on said substrate to form the electroprocessed fibrin-  
35 containing extracellular matrix.

WO 02/18441

PCT/US01/27409

43

11. A method of manufacturing an engineered tissue of Claim 5, comprising:  
electrodepositing one or more electrically-charged solutions comprising  
electroprocessed fibrin or molecules capable of forming fibrin, and cells, onto a grounded  
5 target substrate under conditions effective to deposit the electroprocessed fibrin and the cells  
onto the substrate.

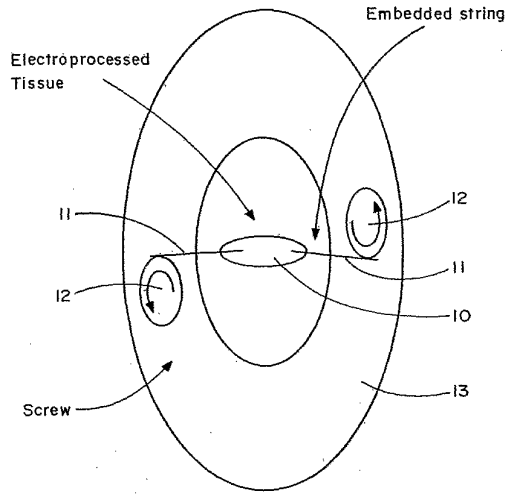


Figure 1

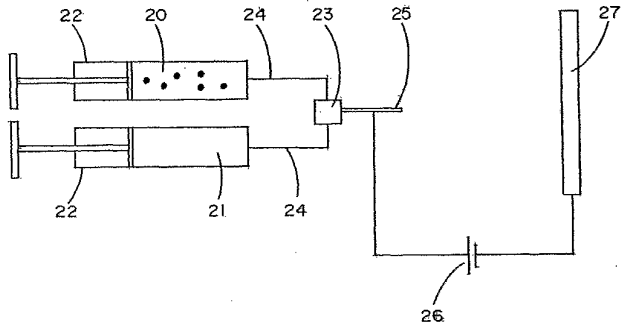


Figure 2



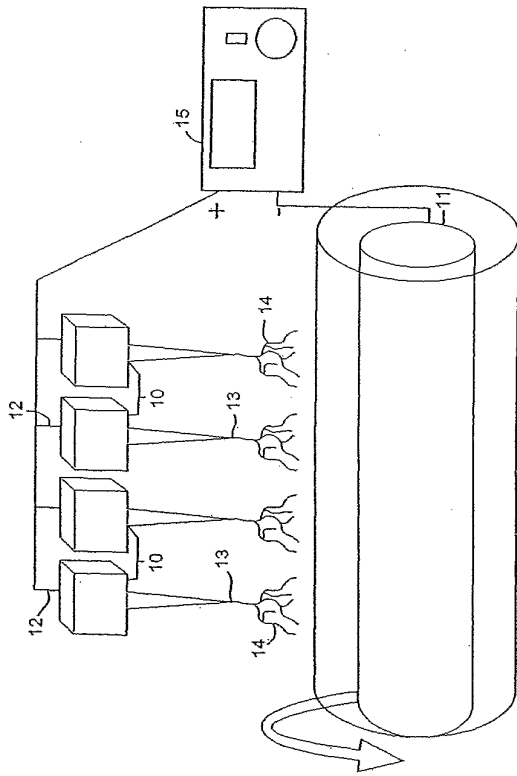


Figure 3

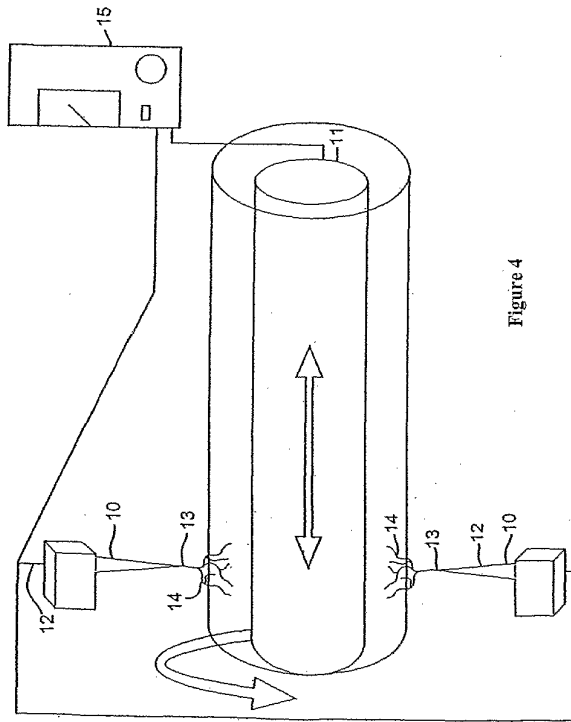


Figure 4

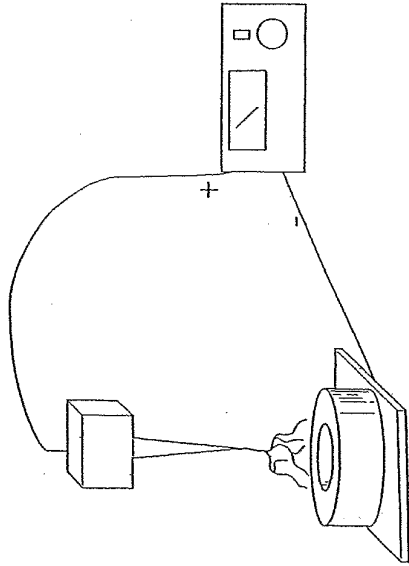


Figure 5

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/18441 A3(51) International Patent Classification: B29C 41/00,  
C07K 14/75, A61L 15/32, C12N 5/00, C12Q 1/02, A61K  
47/42, C12N 5/0694066 (US), CARR, Marcus, E., Jr. [US/US]; 2540  
Swanhurst Drive, Midlothian, VA 23113 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/27409

(74) Agents: MCDONALD, John, K. et al.; Suite 2800, 1100  
Peachtree Street, Atlanta, GA 30309 (US).(22) International Filing Date:  
4 September 2001 (04.09.2001)(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
09/654,517 1 September 2000 (01.09.2000) US  
60/241,008 18 October 2000 (18.10.2000) US(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).(71) Applicant (for all designated States except US): VIR-  
GINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY INTEL-  
LECTUAL PROPERTY FOUNDATION [US/US];  
1101 East Marshall Street, Room 2015, Richmond, VA  
23298 (US).Published:  
— with international search report

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BOWLIN, Gary,  
L. [US/US]; 7437 Brook Way Court, Mechanicsville,  
VA 23111 (US), WNEK, Gary, E. [US/US]; 12508  
Rocky River Drive, Midlothian, VA 23113-7141 (US),  
SIMPSON, David, G. [US/US]; 10265 Cloverlea Court,  
Mechanicsville, VA 23116 (US), LAM, Philippe [FR/US];  
3000 Treetops Circle, Apartment 208, San Bruno, CA(88) Date of publication of the international search report:  
30 May 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/18441 A3

(54) Title: ELECTROPROCESSED FIBRIN-BASED MATRICES AND TISSUES

(57) Abstract: The invention is directed to formation and use of electroprocessed fibrin as an extracellular matrix and, together with cells, its use in forming engineered tissue. The engineered tissue can include the synthetic manufacture of specific organs or tissues which may be implanted into a recipient. The electroprocessed fibrin may also be combined with other molecules in order to deliver the molecules to the site of application or implantation of the electroprocessed fibrin. The fibrin or fibrin/cell suspension is electrodeposited onto a substrate to form the tissues and organs.

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT   |  | International Application No.<br>PCT/US 01/27409 |
|---|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 B29C41/00 C07K14/75 A61L15/32 C12N5/00 C12Q1/02<br>A61K47/42 C12N5/06   |  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 B29C A61L C07K B05B D01D C12N   |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the texts searched  |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>WPI Data, PAJ, EPO-internal   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |  |
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                            |
| X   | WO 98 03267 A (ELECTROSOLS LTD ;COFFEE RONALD ALAN (GB))<br>29 January 1998 (1998-01-29)<br>claims 1-5,16,20,25,26,36; figures 11-14 | 1-11   |
| A   | WO 98 56894 A (UNIV MINNESOTA)<br>17 December 1998 (1998-12-17)<br>the whole document  | 1-11   |
| E   | GB 2 360 789 A (MASON CHRISTOPHER)<br>3 October 2001 (2001-10-03)<br>claims; examples 3-5  | 1-11   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.  |  |  |
| * Special categories of cited documents :<br>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>*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<br>*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<br>*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.<br>*A* 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 February 2002  | 06/03/2002   |  |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5816 Patentkan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   | Authorized officer<br>Mathey, X  |  |

Form PCT/ISA/C10 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/27409

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |            |
|--|------------------|-------------------------|------------------|------------|
| WO 9803267                             | A                | 29-01-1998              | AU 3628497 A     | 10-02-1998 |
|  |                  |                         | EP 0912251 A1    | 06-05-1999 |
|  |                  |                         | WO 9803267 A1    | 29-01-1998 |
|  |                  |                         | JP 2000516130 T  | 05-12-2000 |
| WO 9856894                             | A                | 17-12-1998              | AU 8059998 A     | 30-12-1998 |
|  |                  |                         | EP 0988370 A1    | 29-03-2000 |
|  |                  |                         | US 6093557 A     | 25-07-2000 |
|  |                  |                         | WO 9856894 A1    | 17-12-1998 |
| GB 2360789                             | A                | 03-10-2001              | NONE             |            |

## フロントページの続き

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I           | テーマコード(参考) |
|----------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 7/04               | A 6 1 P 17/02 | 4 C 0 8 4  |
| A 6 1 P 17/02              | C 0 7 K 1/00  | 4 H 0 4 5  |
| C 0 7 K 1/00               | C 1 2 Q 1/02  |            |
| C 1 2 N 5/06               | C 1 2 N 5/00  | E          |
| C 1 2 Q 1/02               | A 6 1 K 37/46 |            |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

## テフロン

(74) 代理人 100098268

弁理士 永田 豊

(72) 発明者 ボウリン, ゲリー エル.

アメリカ合衆国 ヴァージニア 2 3 1 1 1 メカニクスビル メレディス ファームズ ドライブ 7 0 1 6

(72) 発明者 ネック, ゲリー イー.

アメリカ合衆国 ヴァージニア 2 3 1 1 3 - 7 1 4 1 ミドロシアン ロッキー リバー ドライブ 1 2 5 0 8

(72) 発明者 シンプソン デイビッド ジー.

アメリカ合衆国 ヴァージニア 2 3 1 1 6 メカニクスビル クローバーリー コート 1 0 2 6 5

(72) 発明者 ラム, フィリップ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 6 サン ブルノ アpartment 2 0 8 トリートパス サークル 3 0 0 0

(72) 発明者 カー, マーカス イー., ジュニア

アメリカ合衆国 ヴァージニア 2 3 1 1 3 ミドロシアン スワンハースト ドライブ 2 5 4 0

F ターム(参考) 4B063 QA18 QA20 QQ08 QQ20 QR48 QR77 QS11 QS40 QX01

4B065 AA93X BD39 BD50 CA44 CA46

4C076 CC03 EE41

4C081 BA11 BA12 BA13 CD34 EA11

4C083 AD411 AD47 CC01

4C084 AA02 AA06 BA44 DC10 MA56 MA63 ZA89

4H045 AA10 AA20 AA30 CA42 DA65 EA34 EA60 FA65 FA70