(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2018-537125
(P2018-537125A)
(43)公表日　平成30年12月20日(2018.12.20)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 5/071	(2010.01)	C12N	5/071	4B065
A61K 35/39	(2015.01)	A61K	35/39	4C076
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	4C084
A61K 9/48	(2006.01)	A61K	9/48	4C087
A61K 47/38	(2006.01)	A61K	47/38	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 33 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-543451 (P2018-543451)
(86)(22)出願日　平成28年11月10日 (2016.11.10)
(85)翻訳文提出日　平成30年7月6日 (2018.7.6)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/077193
(87)国際公開番号　WO2017/081112
(87)国際公開日　平成29年5月18日 (2017.5.18)
(31)優先権主張番号　15193861.0
(32)優先日　平成27年11月10日 (2015.11.10)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　518160816
エコール　ナショナル　ヴェテリネア
フランス国　４４３０７　ナント　セデックス　３　シト　デ　ラ　シャントレリ　ビーピー　４０７０６
(71)出願人　510184715
シュ、ナント
ＣＨＵ　ＮＡＮＴＥＳ
フランス国ナント、アレ、ド、リル、グロリエット、５
(71)出願人　505028222
ユニベルシテ　ドゥ　ナント
フランス国，エフ－４４０３５　ナンテセデ　１，ベ．ペ．１３５２２，ケ　ドゥ　トウルビル，１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】１型糖尿病治療用Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞

(57)【要約】
本発明は１型糖尿病治療のためのシラン化ヒドロキシプロピルメチルセルロース（Ｓｉ－ＨＰＭＣ）にカプセル化したインスリン産生細胞の使用に関する。また、方法及びキットは１型糖尿病患者及び１型前糖尿病患者において正常血糖値を回復及び／又は維持するために提供される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
１型糖尿病治療における使用のため、特に１型糖尿病患者又は１型前糖尿病患者における正常血糖値を回復及び／又は維持するためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項２】
Ｓｉ－ＨＰＭＣが以下の簡易式：
（ＨＰＭＣ）－Ｏ－CH_2－ＣＨ（ＯＨ）－CH_2－Ｏ－（CH_3）$_3$－Ｓｉ（O^-Na^+）$_3$　（Ｉ）
を有する、請求項１に記載の前記使用のためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項３】
前記インスリン産生細胞が単離された同種膵島又は単離された異種膵島である、請求項１又は２に記載の前記使用のためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項４】
前記インスリン産生細胞が膵β細胞、膵β様細胞、及びその任意の組合わせからなる群から選択される単離細胞である、請求項１又は２に記載の前記使用のためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項５】
膵β様細胞が胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、多能性間葉系間質細胞、導管細胞、肝細胞又はα細胞の分化により得られる、請求項４に記載の前記使用のためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項６】
前記インスリン産生細胞がＳｉ－ＨＰＭＣマイクロビーズ、Ｓｉ－ＨＰＭＣマイクロスフェア又はＳｉ－ＨＰＭＣマイクロカプセルにマイクロカプセル化される、請求項１～５のいずれか一項に記載の前記使用のためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項７】
前記インスリン産生細胞がＳｉ－ＨＰＭＣヒドロゲルにマクロカプセル化される、請求項１～５のいずれか一項に記載の前記使用のためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項８】
前記インスリン産生細胞が少なくとも１つの治療化合物とＳｉ－ＨＰＭＣにカプセル化される、請求項１～７のいずれか一項に記載の前記使用のためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項９】
前記１型糖尿病患者がブリットル型糖尿病を患う、請求項１～８のいずれか一項に記載の前記使用のためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項１０】
前記１型糖尿病治療が、前記Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の皮下注射、前記Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の筋肉内注射、前記Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の腹膜腔、腸間膜、網又は腎被膜への埋込、のうちの１つを含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の前記使用のためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞。
【請求項１１】
１型糖尿病治療における使用のため、特に１型糖尿病患者又は１型前糖尿病患者における正常血糖値を回復及び／又は維持するためのキットであって、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞を含むキット。
【請求項１２】
１型糖尿病治療における使用のため、特に１型糖尿病患者又は１型前糖尿病患者におけ

る正常血糖値を回復及び／又は維持するためのキットであって、
・　Ｓｉ－ＨＰＭＣ；
・　インスリン産生細胞；及び
・　前記インスリン産生細胞をＳｉ－ＨＰＭＣにカプセル化するための使用説明書、
を含む、キット。
【請求項１３】
Ｓｉ－ＨＰＭＣが以下の簡易式：
（ＨＰＭＣ）－Ｏ－CH_2－ＣＨ（ＯＨ）－CH_2－Ｏ－（CH_3）$_3$－Ｓｉ（O^-Na^+）$_3$　（Ｉ）
を有する、請求項１２に記載の前記使用のためのキット。
【請求項１４】
前記インスリン産生細胞が同種膵島、異種膵島、同種膵β細胞、異種膵β細胞、膵β様細胞、およびそれらの任意の組合わせからなる群から選択される単離細胞であり、前記膵β様細胞が胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、多能性間葉系間質細胞、導管細胞、肝細胞又はα細胞の分化により得られる、請求項１２又は１３に記載の前記使用のためのキット。
【請求項１５】
１型糖尿病治療を行うための使用説明書をさらに含む、請求項１２～１４のいずれか一項に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は２０１６年１１月１０日に出願された欧州特許出願第ＥＰ１５　１９３　８６１．０号に対する優先権を主張するものであり、この出願はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
１型糖尿病（１型真性糖尿病としても知られる）は一般的に小児に発症する原因不明の深刻な慢性疾患である。膵臓のインスリン産生（ベータ）β細胞の自己免疫破壊により特徴付けられる。続いて起こるインスリンの欠乏は血中及び尿中グルコースの増加を引き起こす。地球規模で、世界中の１５００万から３０００万人が１型糖尿病に罹患している（世界保健機関）。小児期発症糖尿病の発生率は多くの国で増加しており（非特許文献１；非特許文献２）、毎年この疾患を発症する小児は８０，０００人と推定される。インスリン療法は１型糖尿病患者の生存に必須であり、無期限に継続しなければならず、毎日の複数回注射を含む。インスリン療法に加えて、食事の管理が重要である。未治療又は管理不十分な糖尿病は心臓疾患、卒中、腎不全、足部潰瘍、眼球損傷、及び昏睡を含む重篤な長期合併症など、多くの合併症を引き起こすことがある。一部の１型糖尿病患者（血中グルコース値の深刻な不安定さを有し、生活の混乱を招き、繰り返す及び／又は長期の入院をもたらすことが多いブリットル型１型糖尿病の患者など）において、合併症は過剰治療による低血糖に起因する場合がある。
【０００３】
インスリン注射に代わる治療法の一つはインスリンポンプの皮下埋め込みである。リアルタイム持続血糖測定器と組み合わせたインスリンポンプ療法はセンサ付きポンプ（ＳＡＰ）療法として知られ、毎日の複数回注射又は標準的な継続的インスリン皮下注入と比較して、代謝調節を改善し、１型糖尿病の成人における低血糖率を低減することを示している（非特許文献３；非特許文献４；非特許文献５；非特許文献６）。大規模な糖尿病センターでの頻繁な使用にも関わらず、持続血糖測定器児科の患者には通常使用されない（非特許文献７；非特許文献８）。この理由の一つは、構造基盤、及び患者やその家族にこの技術の効果的な使用を教える資格のある人材の欠如である（非特許文献９；非特許文献１０）。患者やその家族に対する１型糖尿病の負担を軽減するため、いわゆる「人工膵臓」

の開発に向けて確実な進展がある。結局は、この人工膵臓はインスリン注入ポンプ（又はパッチ式インスリンポンプ）と持続血糖センサを組み合わせた完全自動化閉ループインスリン送達システムでよく（例えばメドトロニック、アボット、デクスコムなどにより開発されたシステム）、持続インスリン注入を作動するための有効な数学アルゴリズムを用いている。

【０００４】

外因性インスリンに代わる別の手段は膵島の同種間移植である。エドモントンプロトコールは患者の正常血糖値を回復するための膵島移植の実行可能性及び成功を証明している（非特許文献１１）。しかし、この手順は欠失したβ細胞蓄積を補給することを試みており、質の良いヒトの臓器の不足、患者一人につき複数のドナーの必要性、一貫性のない膵島の生産力、免疫抑制療法の必要性、及び結果として生じる有害な副作用により限定される。免疫抑制を伴わないカプセル化ブタ又は同種膵島の低侵襲皮下移植は今日では、慎重な治療法であると思われる（非特許文献１２；非特許文献１３；非特許文献１４；非特許文献１５；非特許文献１６；非特許文献１７；非特許文献１８；非特許文献１９；非特許文献２０；非特許文献２１）。カプセル化において、細胞は生体適合性マトリックスに完全に包まれる。その主要な役割は、細胞外マトリックスに加えて、免疫細胞及び細胞毒性分子に対するバリアを作ることであるため、さらに酸素、微量及び主要栄養素、並びにホルモンを活性拡散させながら拒絶を回避する。しかし、最後の障害のいくつかはこの細胞療法における最適で恒久的な有効性を妨げ続ける。特に、膵島カプセル化用の標準的なポリマーであるアルギン酸塩は、精製及び滅菌が困難である、免疫原性であり得る、不安定で可逆的であり、解離することがあり、侵襲性の埋込を必要とするヒドロゲルを形成する、といういくつかの欠点を有する。侵襲性の埋込は外科作用を含み、通常の外科的合併症に加えて、炎症反応及び拒絶リスクを増加させる。

【０００５】

従って、当技術分野では、容易、安全及び成功する１型糖尿病療法として、膵島移植を確立する見込みを実現することができる新しい手段の必要性が依然として存在している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｐａｔｔｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｒｅｓ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ．，２０１４，１０３：１６１－１７５
【非特許文献２】Ｔａｍａｙｏ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｒｅｓ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ．，２０１４，１０３：２０６－２１７
【非特許文献３】Ｄｅｉｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ，２００６，２９：２７３０－２７３２
【非特許文献４】Ｏ’Ｃｏｎｎｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ，２００９，５２：１２５０－１２５７
【非特許文献５】Ｒａｃｃａｈ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ，２００９，３２：２２４５－２２５０
【非特許文献６】Ｂａｔｔｅｌｉｎｏ ｅｔ ａｌ，Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ，２０１２，５５：３１５５－３１６２）
【非特許文献７】Ｋｌｏｎｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．，２０１１，９６：２９６８－２９７９
【非特許文献８】Ｐｈｉｌｌｉｐ ｅｔ ａｌ．，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｄｉａｂｅｔｅｓ，２０１２，１３：２１５－２２８
【非特許文献９】Ｔｕｍｍｉｎｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｔｉｅｎｔ Ｐｒｅｆｅｒ Ａｄｈｅｒｅｎｃｅ，２０１５，９：１２６３－１２７０
【非特許文献１０】Ｊｏｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｄｉａｂ．Ｒｅｐ．，２０１５，１５：８１
【非特許文献１１】Ｓｈａｐｉｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．，２０

００，３４３：２３０－２３８
【非特許文献１２】Ｄｕｆｒａｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２００６，８１：１３４５－１３５３
【非特許文献１３】Ｅｌｌｉｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２００７，１４：１５７－１６１
【非特許文献１４】Ｚｉｍｍｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｄｉａｂ．Ｒｅｐ．，２００７，７：３１４－３２０
【非特許文献１５】Ｄｕｆｒａｎｅ ｅｔ ａｌ，Ｗｏｒｌｄ Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．，２０１２，１８：６８８５－６８９３
【非特許文献１６】Ｓａｋａｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｗｏｒｌｄ Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．，２０１２，３：１９－２６
【非特許文献１７】Ｏ’Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．，２０１１，３２：８２７－８４４
【非特許文献１８】Ｒａｍｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｒｅｖ．，２０１３，９：２９４－３１１
【非特許文献１９】Ｓｈａｒｐ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．，２０１４，６７－６８：３５－７３
【非特許文献２０】Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ Ｓｕｒｇ．，２０１４，１：７
【非特許文献２１】Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｚｈｅｊｉａｎｇ Ｕｎｉｖ．Ｓｃｉ．Ｂ，２０１５，１６：３２９－３４３

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明者はシラン化ヒドロキシプロピルメチルセルロース（Ｓｉ－ＨＰＭＣ）が、新生仔ブタ膵島及びマウスβ細胞など、インスリン産生細胞のカプセル化に便利なポリマーであることを見出している。実際に、Ｓｉ－ＨＰＭＣは、生体適合性で、滅菌が容易であり、その自己網状化が共有結合性の安定した結合を形成する、という複数の利点を示す。さらに、生理的ｐＨ及び温度で自己架橋（又は自己網状化）し、これは自己架橋前にＳｉ－ＨＰＭＣを皮下注射することによりカプセル化膵島の非侵襲性投与を可能にする。本発明者はカプセル化マウス偽膵島が免疫不全ＮＯＤマウス（高用量のストレプトゾトシン）及び免疫応答性Ｃ５７Ｂｌ／６マウス（低用量のストレプトゾトシン）におけるストレプトゾトシン誘発糖尿病を調節することができることを示している。Ｓｉ－ＨＰＭＣヒドロゲルはマウス偽膵島及びブタ膵島がそれぞれｉｎ ｖｉｔｒｏで２５０日及び７０日以上生存し、インスリンを分泌し続けることが見出された。また、本発明者はＳｉ－ＨＰＭＣヒドロゲルがｉｎ ｖｉｔｒｏでヒトマクロファージ及びＮＯＤ脾細胞によるＩＬ－６のブタ膵島誘発分泌を防止することができることを観察した。これらの結果は１型糖尿病の現実的で見込みのある細胞療法に道を開いている。
【０００８】
従って、本発明は１型糖尿病治療における使用のため、特に１型糖尿病患者又は１型前糖尿病患者における正常血糖値を回復及び／又は維持するためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞を提供する。例えば、１型糖尿病患者はブリットル型糖尿病を患う場合がある。
【０００９】
特定の実施形態において、本発明の実施に用いられるＳｉ－ＨＰＭＣは以下の簡易式：
（ＨＰＭＣ）－Ｏ－CH_2－ＣＨ（ＯＨ）－CH_2－Ｏ－（CH_3）$_3$－Ｓｉ（O^-Na^+）$_3$　（Ｉ）
を有する。
【００１０】
特定の実施形態において、本発明の実施に用いられるインスリン産生細胞は単離された同種膵島又は単離された異種膵島である。

【００１１】
特定の実施形態において、本発明の実施に用いられるインスリン産生細胞は、膵β細胞、膵β様細胞、及びその任意の組合せからなる群から選択される単離細胞である。膵β細胞は胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、多能性間葉系間質細胞、導管細胞、肝細胞、又はα細胞の分化により得ることができる。
【００１２】
本発明の特定の実施形態において、インスリン産生細胞はＳｉ－ＨＰＭＣマイクロビーズ、Ｓｉ－ＨＰＭＣマイクロカプセル又はＳｉ－ＨＰＭＣマイクロスフェアにマイクロカプセル化される。
【００１３】
他の実施形態において、インスリン産生細胞はＳｉ－ＨＰＭＣヒドロゲルにマクロカプセル化される。
【００１４】
本発明の特定の実施形態において、インスリン産生細胞は少なくとも一つの治療化合物とＳｉ－ＨＰＭＣにカプセル化される。
【００１５】
特定の実施形態において、１型糖尿病治療は、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の皮下注射、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の筋肉内注射、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の腹膜腔、腸間膜、網（ｏｍｅｎｔｕｍ）又は腎被膜への埋込のうちの一つを含む。
【００１６】
特定の実施形態において、１型糖尿病治療は患者へのインスリン療法の適用をさらに含む。
【００１７】
別の態様において、本発明は１型糖尿病治療における使用のため、特に１型糖尿病患者又は１型前糖尿病患者における正常血糖値を回復及び／又は維持するためのキットであって、本明細書に記載するＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞を含むキットを提供する。
【００１８】
また、本発明は１型糖尿病治療における使用のため、特に１型糖尿病患者又は１型前糖尿病患者における正常血糖値を回復及び／又は維持するためのキットであって、Ｓｉ－ＨＰＭＣ；インスリン産生細胞；及び本明細書に記載するインスリン産生細胞をＳｉ－ＨＰＭＣにカプセル化する使用説明書を含むキットを提供する。
【００１９】
関連態様において、本発明は１型糖尿病治療方法、特に１型糖尿病患者又は１型前糖尿病患者における正常血糖値を回復及び／又は維持する方法であって、本明細書に記載するＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の治療有効量を該患者に投与する工程を含む方法を提供する。
【００２０】
本発明のこれらの及び他の目的、利点及び特徴は以下の好ましい実施形態の詳細な説明を理解する当業者に明らかとなるであろう。
【００２１】
定義
本明細書を通して、以下の段落で定義されるいくつかの用語が用いられる。
【００２２】
本明細書では、「生体材料」という語は生体液又は生体組織と接触すること（対象者への埋込又は移植によるなど）が意図される材料を指す。生体材料は生理環境との最小限の反応を誘導することが望ましい。生体材料が生理環境に置かれた後、炎症反応が最小限で、アナフィラキシー反応の兆候が無く、生体材料表面の細胞増殖が最小限であれば、「生体適合性」であるとみなされる。宿主ほ乳類への埋込／移植において、ヒドロゲルなど生

体適合性材料はヒドロゲルの機能に不利に作用するのに十分な宿主応答を引き起こさない。このような宿主応答としては、ヒドロゲルに接触する又はヒドロゲル周囲の繊維性構造の形成、ヒドロゲルの免疫学的拒絶、あるいはヒドロゲルから取り囲む宿主組織及び／又は体液への毒性又は発熱性化合物の放出が挙げられる。

【００２３】

本明細書では、「ヒドロゲル」という語は架橋親水性ポリマーの三次元網状組織を指す。この網状組織は実質的に水から構成されるゲル状、好ましくはこれに限定されないが、９０％より多い水のゲル状である。架橋ヒドロゲルはかなりの印加せん断応力が無ければ流動せず、又は変形しないため、固体であるとみなすこともできる。

【００２４】

本明細書では、「カプセル化」という語はその技術分野で理解される意味を有し、物質的バリア（すなわち、構造の透過性を低減又は制御するバリア）により示される三次元構造（例えば、カプセル、ヒドロゲルなど）内に一つ又は複数の細胞を包含、固定及び／又は捕捉することを指す。本発明の実施において、カプセル化はマイクロカプセル化又はマクロカプセル化により実施されてよい。当技術分野で公知のように、マイクロカプセル化法においては、より小さい細胞集団はそれ自体の球形ポリマーカプセル（例えば直径約０．３ｍｍ～約２ｍｍ）又はポリマー層に個別に捕捉される。マクロカプセル化法においては、細胞は２枚又はそれ以上の選択的透過性平膜間、又は半透過性中空糸内腔内、さらに又はヒドロゲル内に封入される。マクロカプセル化は大量の細胞の捕捉を伴い、細胞を容易に埋め込み、除去する。反対に、マイクロカプセル化細胞は移植後に回収できない。当業者は細胞マイクロカプセル化及び細胞マクロカプセル化が何を意味するか認識している（Ｕｌｕｄａｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，２０００、４２：２９－６４）。特に、細胞マイクロカプセル化デバイスとしては、これに限定されないが、直径約０．３ｍｍ～約２ｍｍの球状カプセル（従来、マイクロカプセルともいう）、マイクロビーズ、及び細胞集団表面を膜で取り囲んだコンフォーマルコーティングが挙げられることを当業者は認識している。当業者はマイクロカプセルと比べて、マクロカプセルははるかに大きいデバイスであり、通常は平面又は円筒形状、及びより小さい表面積対体積比を有することを認識している。従って、マクロカプセル化デバイスとしてはこれに限定されないが、平膜（スペーサ要素の両側に取り付けられて内部区画又はカプセル化チャンバを作製する２枚の平面膜からなる）及び中空繊維膜（細胞が内腔に注入され、次に末端が密封されるあらかじめ形成された中空繊維膜を利用する）が挙げられることを当業者は認識している。

【００２５】

本明細書では、「細胞」という語は組織に保持される細胞、細胞塊（膵島又はその一部など）、及び個別に単離された細胞を含むがこれらに限定されない様々な形状を指す。

【００２６】

細胞を指すために本明細書で用いられる場合の「単離された」という語は、自然に会合した、又は最初に得られた、もしくは調製された時に会合した少なくとも一部の成分から、その起源又は操作により分離される細胞を意味する。

【００２７】

本明細書では、「対象」という語は１型糖尿病を発症し得るが、この疾患に罹患するかはわからないヒト又は他の哺乳動物（例えば、霊長類、イヌ、ネコ、ヤギ、ウマ、ブタ、ネズミ、ラット、ウサギなど）を指す。非ヒトの対象はトランスジェニック、又はそうでなければ遺伝子組み換え動物でよい。本発明の多くの実施形態において、対象はヒトである。このような実施形態において、対象は「個体」又は「患者」と呼ばれることが多い。「対象」「個体」及び「患者」という語は特定の年齢を示さないため、新生児、小児、ティーンエイジャ、及び成人を包含する。「患者」という語はより具体的には疾患（例えば、１型糖尿病）を患う個体を指す。

【００２８】

「治療」という語は、（１）疾患又は状態（ここでは１型糖尿病）の発症を遅らせるか

、又は予防すること；（２）疾患又は状態の症状の進行、重症化又は悪化を遅らせるか、又は止めること；（３）疾患又は状態の症状の改善をもたらすこと；あるいは（４）疾患又は状態を治すこと、を目的とした方法又はプロセスを特徴づけるために本明細書で用いられる。治療効果のため、疾患又は状態の発症後に治療を適用してよい。あるいは、予防又は防止効果のため、疾患又は状態の発症前に治療を適用してよい。この場合、「防止」という語が用いられる。

【００２９】

本明細書では、「治療有効量」という語は、細胞、組織、系又は対象における所望の生物的又は医薬の応答など、治療薬又はその組成物のその意図される目的を満たすのに十分な任意の量を指す。例えば、本発明の特定の実施形態において、この目的は１型糖尿病患者における正常血糖値を回復及び／又は維持することでよい。

【００３０】

「正常血糖値」及び「正常血糖」という語は本明細書で交換可能に用いられる。その技術分野で理解される意味を有し、正常（すなわち、健康な）血中グルコース濃度を有する状態を指す。「低血糖」という語は正常よりも低い血中グルコース状態を指し、「高血糖」という語は正常より高い血中グルコース状態を指す。

【００３１】

数字に関連して本明細書で用いられる「およそ」及び「約」という語は、特に明記しない限り、又は内容から特に明白でない限り、一般的に数字の両方向に１０％の範囲（その数字より大きいか又は小さい）に入る数字を含む（該数字が可能性のある値の１００％を超える場合を除く）。

【図面の簡単な説明】

【００３２】

【図１】単離後７日間ペトリ皿で培養された非カプセル化新生仔ブタ膵島の動態。（Ａ）培養１日目のＩＥＱにより３日目、５日目及び７日目のＩＥＱの百分率として計算した膵島当量数（平均ＩＥＱ（膵島当量）±ＳＥＭ）。（Ｂ）培養の１、３、５又は７日後の基礎培地（黒）、２０ｍＭグルコース（灰色）、又は２０ｍＭグリコース＋１０ｍＭテオフィリン（白）で２時間培養した幼若ブタ膵島のインスリン特異産生（平均ｑインスリン±ＳＥＭ）（ｎ＝８）。＊ｐ＜０．０５。

【図２】単離後６週間のヒドロゲルにカプセル化された新生仔ブタ膵島の動態。（Ａ）生存性染色（生膵島はカルセイン（緑）及び死膵島はエチジウムホモダイマー（赤））。（Ｂ）Ｓｉ－ＨＰＭＣ（黒、ｎ＝６）又はアルギン酸塩（灰、ｎ＝３）にカプセル化した新生仔ブタ膵島の基礎インスリン特異産生（平均ｑインスリン±ＳＥＭ）。＊ｐ＜０．０５。Ｓｉ－ＨＰＭＣは少なくとも４２日間、すなわち６週間（最大試験期間：７２日間）の培養において新生仔ブタ膵島の生存力及び機能を持続した。

【図３】９ヶ月間マイクロプレートで培養されたＳｉ－ＨＰＭＣにカプセル化された偽膵島Ｍｉｎ６の動態。（Ａ）培養１、３又は６ヶ月後の生存性染色（生膵島はカルセイン（緑）及び死膵島はエチジウムホモダイマー（赤））。（Ｂ）基礎インスリン特異産生（平均ｑインスリン±ＳＥＭ）（ｎ＝３）。Ｎｓ：有意差無し。

【図４】刺激に応じたインスリン産生。（Ａ）基礎培地、又は２０ｍＭグルコース＋１０ｍＭテオフィリン（Ｇ＋Ｔ）で培養されたＳｉ－ＨＰＭＣ（黒丸）又はアルギン酸塩（黒四角）にカプセル化された２日間培養の新生仔ブタ膵島のインスリン特異産生（ｑインスリン）。（Ｂ）Ｓｉ－ＨＰＭＣ（黒、ｎ＝６）又はアルギン酸塩（灰、ｎ＝３）にカプセル化された新生仔ブタ膵島の１時間Ｇ＋Ｔ刺激を含む３時間のインスリン産生の曲線下面積（平均ＡＵＣ±ＳＥＭ）。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．００５、ｎｓ：有意差無し。

【図５】ＳｉＨＰＭＣにカプセル化された偽膵島ＭＩＮ６の刺激に応じたインスリン産生。（Ａ）培養１ヶ月（黒丸）、３ヶ月（黒四角）及び９ヶ月（黒三角）後、基礎培地、又は２０ｍＭグルコース＋１０ｍＭテオフィリン（Ｇ＋Ｔ）におけるインスリン特異産生（ｑインスリン）。（Ｂ）１時間のＧ＋Ｔ刺激を含む３時間のインスリン産生の曲線下面積（平均ＡＵＣ±ＳＥＭ）（ｎ＝３）。Ｎｓ：有意差無し。

【図６】ストレプトゾトシン誘発糖尿病（Ａ）ＮＯＤ　ＮＳＧ免疫不全マウス（ＳＴＺ高用量、ｎ＝４）及び（Ｂ）免疫応答性Ｃ５７Ｂｌ／６マウス（ＳＴＺ低用量、ｎ＝４）に移植されたＳｉ－ＨＰＭＣヒドロゲルでのＭＩＮ６偽膵島（５００ＩＥＱ）の皮下マクロカプセル化。矢印は該当マウスのグラフト外植の時間を示す。
【図７】（Ａ）単独（黒、ｎ＝４）で、Ｓｉ－ＨＰＭＣ（薄灰、ｎ＝４）又はアルギン酸塩（濃灰、ｎ＝２）と３６時間培養、及び（Ｂ）ＬＰＳ（１０ｎｇ／ｍＬ）と６時間培養（ｎ＝４）したマウス全脾臓細胞又はヒトマクロファージの培地培養におけるＩＬ－６分泌（平均ＩＬ－６量±ＳＥＭ）。
【図８】３６時間、単独で培養（黒）、あるいは非カプセル化新生仔ブタ膵島（白）、Ｓｉ－ＨＰＭＣ（薄灰）又はアルギン酸塩（濃灰）にカプセル化した新生仔ブタ膵島と共培養した（Ａ）マウス全脾臓細胞（ｎ＝３）又は（Ｂ）ヒトマクロファージ（ｎ＝２）の培地培養におけるＩＬ－６分泌（平均ＩＬ－６量±ＳＥＭ）。＊ｐ＜０．０５、ｎｓ：有意差無し。
【図９】４８時間単独で培養（Ｃｔ－、黒）、あるいは非カプセル化幼若ブタ膵島（白）又はＳｉ－ＨＰＭＣにカプセル化した幼若ブタ膵島（灰）とトランズウェル共培養したマウス全脾臓細胞の培地培養におけるＩＬ－６分泌（平均ＩＬ－６百分率／Ｃｔ－±ＳＥＭ）（ｎ＝２）。
【発明を実施するための形態】
【００３３】
上記のように、Ｓｉ－ＨＰＭＣはインスリン産生細胞のカプセル化に有利なポリマーとして本明細書で記載され、本発明は１型糖尿病の管理における、特に１型糖尿病患者における正常血糖値を回復及び／又は維持するためのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の使用に関する。
【００３４】
Ｉ－インスリン産生細胞カプセル化のためのＳｉ－ＨＰＭＣ
Ａ．シラン化ヒドロキシプロピルメチルセルロース（Ｓｉ－ＨＰＭＣ）
本発明では、「Ｓｉ－ＨＰＭＣ」という語はシラン化（すなわち、シリル化（ｓｉｌｙｌａｔｅ））ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、より具体的にはＧｕｉｃｈｅｕｘ教授及びＷｅｉｓｓ教授のチーム（Ｌａｂｏｒａｔｏｉｒｅ　ｄ’Ｉｎｇｅｎｉｅｒｉｅ　Ｏｓｔｅｏ－Ａｒｔｉｃｕｌａｉｒｅ　ｅｔ　Ｄｅｎｔａｉｒｅ、ＬＩＯＡＤ、フランス、ナント）により開発されたシラン化ＨＰＭＣを指す。
【００３５】
このポリマー（Ｓｉ－ＨＰＭＣ）はすでに生体適合性材料としてのいくつかの応用が見出されている。実際に、軟骨細胞（Ｖｉｎａｔｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００５，２６：６６４３－６６５１）；骨形成原細胞（Ｔｒｏｊａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００５，２６：５５０９－５５１７）；及びヒト脂肪由来間葉系幹細胞（Ｍｅｒｃｅｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ，２０１１，２０：１５７５－１５８８；Ｐｏｒｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，２０１３，８（４）：ｅ６２３６８）の三次元培養に用いられている。ヒト鼻腔軟骨細胞を基礎とする軟骨工学の適当な骨格（Ｖｉｎａｔｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ　Ｒｅｓ．Ａ，２００７，８０：６６－７４）及び関節軟骨欠陥における自己鼻腔軟骨細胞移動に適当な注射ヒドロゲル（Ｖｉｎａｔｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，２００９，１０２：１２５９－１２６７）であることが見出された。異所性骨形成のための未分化骨髄間質細胞を充填したリン酸カルシウムと組み合わせた複合材料として用いられている（Ｔｒｏｊａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００６，２７：３２５６－３２６４）。また、Ｓｉ－ＨＰＭＣは骨及び軟骨組織工学のため、グリコサミノグリカン様海産エキソ多糖類と組み合わされた（Ｒｅｄｅｒｓｔｏｒｆｆ　ｅｔ　ａｌ，Ａｃｔａ　Ｂｉｏｍａｔｅｒ．，２０１１，７（５）：２１１９－２１３０）。間葉系幹細胞を播種したＳｉ－ＨＰＭＣヒドロゲルの心筋内送達は心筋梗塞後、心機能を保護し、心室リモデリングを弱めることを

示した（Ｍａｔｈｉｅｕ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，２０１２，７（１２）：ｅ５１９９１）。

【００３６】

Ｇｕｉｃｈｅｕｘ教授及びＷｅｉｓｓ教授のチームにより開発され、本発明の実施で用いられるＳｉ－ＨＰＭＣは、シラン基がグラフトされたヒドロキシプロピルメチルセルロースからなる注射可能な自己硬化（又は自己固化）ポリマーである。シラン基はｐＨが低下するとＨＰＭＣ鎖間に共有結合を形成する（下記参照）。Ｓｉ－ＨＰＭＣは、例えば国際公開第２００５／０４４３２６号、米国特許出願番号第ＵＳ２００７／０２１２８９、米国特許出願第２０１０／０８０８３６号、及び米国特許出願第ＵＳ２０１４／０１６７７５号）に記載されている。そのレオロジー及びゲル化性質が研究されている（Ｆａｔｉｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００８，２９（５）：５３３－５４３；Ｆａｔｉｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌａ，２００９，５（９）：３４２３－３４３２，Ｍａｔｈｉｅｕ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，２０１２，７（１２）：ｅ５１９９１）。

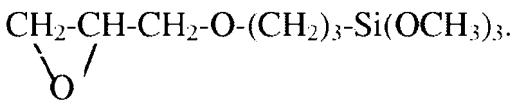
【００３７】

より具体的には、本発明の実施に用いられるＳｉ－ＨＰＭＣは、簡易式：（ＨＰＭＣ）－Ｏ－Ｘ－Ｓｉ（ＯＺ）$_3$のポリマーからなり、式Ｘ－Ｓｉ（ＯＺ）$_3$の化合物とＨＰＭＣの反応により得ることができる。式中、Ｘはエポキシ機能を含むハロゲン原子または炭化水素基、特にＣ$_2$－Ｃ$_{20}$炭化水素基を示し、Ｚは水素原子、アルカリ金属及びアルキル基、特にＣ$_1$－Ｃ$_5$アルキル基からなる群から選択される。

【００３８】

特定の好ましい実施形態において、式Ｘ－Ｓｉ（ＯＺ）$_3$の化合物は（３－グリシドキシプロピル）トリメトキシシランであり、以下の式：

【化１】



を有する。

塩基性媒体において、３－グリシドキシプロピルトリメトキシシランはエポキシドの開環によりＨＰＭＣにグラフトされ、メトキシシラン基は加水分解されて、簡易式（Ｉ）：

（ＨＰＭＣ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ$_2$－Ｏ－（ＣＨ$_3$）$_3$－Ｓｉ（Ｏ$^-$Ｎａ$^+$）$_3$　（Ｉ）

のＳｉ－ＨＰＭＣを作製する。

【００３９】

本発明の実施において、Ｓｉ－ＨＰＭＣは任意の適当な方法を用いて調製することができる。しかし、特定の好ましい実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣは簡易式（Ｉ）を有し、前に記載されたように調製される（Ｆａｔｉｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｅｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００８，２９：５３３－５４３；Ｖｉｎａｔｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００５，２６：６６４３－６６５１）。簡潔に述べると、開始ＨＰＭＣはメトセル（登録商標）ＥＡ４プレミアム（ダウ・ケミカル製、Ｍ$_w$＝２９０，０００ｇ／ｍｏｌ、メトキシ含有量は２９％、ヒドロキシプロピル含有量は９．７％、平均置換度（ＤＳ）１．９及び平均モル置換度（ＭＳ）０．２３に相当する）である。ＨＰＭＣへのシラングラフトは、ＨＰＭＣのヒドロキシ機能及びシランのエポキシド基間のウィリアムソン反応を含む。Ｖｉｎａｔｉｅｒら（Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００５，２６：６６４３－６６５１）により記載されたように、Ｓｉ－ＨＰＭＣは異種媒体中で１４．２４％の３－グリシドキシプロピルトリメトキシシランをＨＰＭＣ（メトセル（登録商標）ＥＡ４プレミアム）にグラフトすることにより合成される。

【００４０】

本発明による治療に用いられる前に、Ｓｉ－ＨＰＭＣは粉末状で保管することができる

。あるいは、Ｓｉ－ＨＰＭＣはおよそ１２．４より大きいか等しいｐＨの水溶液中で安定しており、アルカリ性の水酸化ナトリウム溶液（ｐＨ≧１２．４）で保管することができる。

【００４１】

Ｂ．インスリン産生細胞

本明細書では、「インスリン産生細胞」という語はインスリンを産生することができる任意の細胞を指す。

【００４２】

特定の実施形態において、本発明の実施で用いられるべきインスリン産生細胞は単離された膵島細胞である。ヒト膵臓の体積のおよそ１％は、外分泌性の膵臓中に散在するランゲルハンス島（又は「膵島」）からできている。各膵島はインスリン産生β細胞、並びにグルカゴン含有α細胞、ソマトスタチン分泌デルタ細胞、及び膵臓ポリペプチド含有細胞（ＰＰ細胞）を含む。膵島細胞の大部分はインスリン産生β細胞である。特異的表面抗原の発現は、ある細胞が膵β細胞であるかどうかを決定するために用いられる。例えば、膵β細胞はグルコース輸送体であるＧｌｕｔ－１及び／又はＧｌｕｔ－２を発現する。あるいは、特異的転写因子の発現は、ある細胞が膵β細胞であるかどうかを決定するために用いられる。例えば、β細胞は転写因子であるＰｄｘ１、Ｎｋｘ６．１、ＭａｆＡ及びＰａｘＡを高く発現する。最後に、電子顕微鏡観察は非定型β細胞微細構造を確認するために用いることができる。

【００４３】

本発明の実施に使用するための膵島細胞は同種膵島細胞又は異種膵島細胞でよい。本明細書では、「同種」及び「異種」という語は当技術分野で理解される意味を有する。細胞に関して用いられる場合、「同種」という語は送達される対象からではなく、治療される患者と同じ種のドナーから得られる細胞を指す。細胞に関して用いられる場合、「異種」という語は細胞が送達される患者の種とは異なる種のドナーから得られた細胞を指す。

【００４４】

当技術分野で公知のように、ヒト膵島の代替物としてブタから得られる膵島が浮上しており、これは優れた利用可能性と、糖尿病患者におけるブタインスリンの長年の使用を含むヒト膵島との生理的類似点と、ドナーソースを遺伝子的に修飾する能力と、のためである。非ヒト霊長類における糖尿病の好転を実現する際に、多くの研究がブタ膵島の使用を証明することに成功している（Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｗｉｎｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅａｂｅｔｅｓ，２０１２，６１：３０４６－３０５５により考察された）。今日まで、結果は主として成功していないが、ヒトにおけるブタ膵島注入はいくつかのグループにより報告されている（Ｇｒｏｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ，１９９４，３４４：１４０２－１４０４；Ｅｌｌｉｏｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２００７，１４：１５７－１６１；Ｖａｌｄｅｓ－Ｃｏｎｚａｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｎｏｌ．２０１０，１６２：５３７－５４２；Ｅｌｌｉｏｔ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｏｒｇａｎ　Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ，２０１１，１６：１９５－２００；Ｅｌｌｉｏｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２０１３，２０：４９）。移植片生着を改善する様々な技術、例えばマイクロカプセル化（Ｄｕｆｒａｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２０１０，９０：１０５４－１０６２）及びセルトリ細胞との共培養（Ｉｓａａｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｐｒｏｃ．，２００５，３７：４８７－４８８）が試験されている。様々な遺伝子組み換えを行ったブタは膵島移植片の免疫介在性拒絶に抵抗するように作製され（Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｗｉｎｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅａｂｅｔｅｓ，２０１２，６１：３０４６－３０５５；Ｐｈｅｌｐｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２００３，２９９：４１１－４１４；Ｙａｒｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２００７，１４：４２８；Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｗｉｎｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．，２００９，９：２７１６－２７２６；Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ，２０１１，１１：２５９３－２６０２）、いくつかの

免疫抑制レジメンが膵島移植片拒絶を低減するために調査されている（Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｗｉｎｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．，２００９，９：２７１６－２７２６；Ｈｅｒｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄ．，２００６，１２：３０１－３０３；Ｃａｒｄｏｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄ．，２００６，１２：３０４－３０６；Ｃａｒｄｏｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．，２００７，７：２２６０－２２６８；Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ，２０１１，１１：９４７－９５７）。従って、膵島異種移植の分野における研究は、日常の臨床診療となるかもしれないことを証明している。

【００４５】

本発明の実施における使用のための膵島は、任意の適当な方法を用いて単離することができる。生膵島細胞を単離する方法は当技術分野で公知である（例えば、Ｆｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，１９９６，６１：１５５４；Ｌｉｎｅｔｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅａｂｅｔｅｓ，１９９７，４６：１１２０を参照のこと）。例えば、ブタ膵島又は膵島細胞は、当技術分野で公知の方法により、成体ブタ膵臓、新生仔ブタ膵臓又はブタ胎児膵臓から採取することができる（例えば、Ｓｗａｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍａｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２０１１，６２：７３９－７４９；Ｃａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ，２００８，５１：１２０－１２９；Ｃａｎｔｏｒｏｖｉｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２００２，９：２５－３５；Ｇｒｏｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，１９９９，７７：１５３－１５４；Ｋｏｒｂｕｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１９９６，９７：２１１９－２１２９を参照のこと）。例えば、ヒト膵島は当技術分野で公知の方法により、ヒト死体膵臓から単離することができる（例えば、Ｓｈａｐｉｒｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．，２０００，３４３：２３０－２３８；Ｌａｂｌａｎｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｃａｒｅ，２０１５，３８：１７１４－１７２２を参照のこと）。

【００４６】

新鮮膵臓組織は、刻む、ほぐす、粉砕及び／又は酵素消化（例えば、コラゲナーゼ消化）により分割することができる。その後、膵島は洗浄、ろ過、遠心分離及び／又は処置を選ぶことにより汚染細胞及び材料から単離される。膵島細胞を単離、精製する方法及び装置は米国特許第５，４４７，８６３号、５，３２２，７９０号、５，２７３，９０４号及び４，８６８，１２１号に記載されている。単離された膵臓細胞は当技術分野で公知のように、膵島細胞を培養する任意の適当な方法を用いて、カプセル化前に任意に培養してよい（例えば、米国特許第５，８２１，１２１号を参照のこと）。単離細胞は抗原性成分の除去を促進する条件下、培地で培養してよい。

【００４７】

カプセル化前に単離した膵島を培養してよい。この膵島は公知の細胞培養技術により少なくとも３時間、又はより好ましくは例えば１８～２４時間など１２～３６時間、抗酸化物質（例えば、グルタチオン又はグルタチオン類縁体、グルタチオンモノエステル、並びにＮ－アセチルシステイン及び／又はスーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、ビタミンＥ、トロロックス、リポ酸、ラザロイド、ブチルヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ビタミンＫなど）、抗サイトカイン（例えば、ジメチルチオ尿素、シチオロン、プラバスタチンナトリウム、Ｌ－Ｎ^{G}－モノメチルアルギニン、ラクトフェリン、４－メチルプレドニゾロンなど）、抗エンドトキシン（例えば、Ｌ－Ｎ^{G}－モノメチルアルギニン、ラクトフェリン、Ｎ－アセチルシステイン、バミフィリン（テオフィリン）などのアデノシン受容体アンタゴニスト、及びエキノマイシンなどの抗リポ多糖化合物など）、並びに抗生物質（例えば、ペニシリン、テトラサイクリン、セファロスポリン、マクロライド、βラクタム及びアミノグリコシド；このような適当な抗生物質の例としてはストレプトマイシン及びアンフォテリシンＢが挙げられる）など、グルコース刺激インスリン分泌を向上する薬剤を含有する培養培地で培養してよい。

【００４８】

単離した膵β細胞の生存力及び機能性はカプセル化前に評価してよい。例えば、ブタ膵島細胞を、静置インキュベーション試験により膵島機能について評価することができる（例えば、Ｃａｎｔａｒｏｖｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２００２，９：２３－３５を参照のこと）。

【００４９】

本明細書では、「インスリン産生細胞」という語はまた、インスリンを分泌する膵前駆細胞又はその前駆体から分化した細胞を指す。インスリン産生細胞としては、膵β細胞及び膵β様細胞（すなわち、インスリン陽性内分泌細胞）が挙げられ、合成し（すなわち、インスリン遺伝子を転写し、プロインスリンｍＲＮＡを翻訳し、プロインスリンｍＲＮＡをインスリンタンパクに修飾する）、発現し（すなわち、インスリン遺伝子によりもたらされる表現型形質を表す）、あるいは構造的又は誘導的にインスリンを分泌する（すなわち、インスリンを細胞外空間に放出する）。「膵β様細胞」は膵前駆細胞又はその前駆体から分化により作製される細胞として定義される。内因性機能膵β細胞によるインスリン発現量の少なくとも１５％、あるいは少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約１００％又は１００％超、例えば内因性膵β細胞により分泌されるインスリン量の少なくとも約１．５倍、あるいは少なくとも約２倍、少なくとも約２．５倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍又は約５倍超の量を発現する。あるいは内因性膵β細胞の少なくとも一つ、又は少なくとも二つの特性を示し、例えばグルコース応答性インスリン分泌、並びに例えばｃペプチド、Ｐｄｘ１、Ｇｌｕｔ－１及び／又はＧｌｕｔ－２などのβ細胞マーカの発現が挙げられるが、これらに限定されない。

【００５０】

従って、特定の実施形態において、本発明の実施で用いられるべきインスリン産生細胞は、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞又は多能性間葉系間質細胞由来の膵β細胞又は膵β様細胞である。

【００５１】

胚性幹細胞（ＥＳＣ）は現在容易に利用でき、非常に増殖させることができ、β細胞に分化させることができる（Ｍｆｏｐｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，２０１０，５９：２０９４－２１０１）ため、他の潜在的なソースに対するいくつかの利点がある。多くの研究はＥＣＳからのＰｄｘ１＋又は内分泌細胞の誘導を証明しており、いくつかのグループはインスリン又はＣペプチド分泌細胞を発生させている（Ｓｏｒｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，２０００，４９：１５７－１６２；Ｍａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００９，３０：１７０６－１７１４；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．，２００９，１９：４２９－４３８）。

【００５２】

人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）は膵島移植における使用に関して研究されている幹細胞の別の重要なソースである。治療に有用な可能性がある自家細胞を生じる独特の性質を有する（Ｔａｋａｈａｓｈｉ，Ｃｅｌｌ．２００７，１３１：８６１－８７２）。ｉＰＳＣのβ細胞分化の可能性は、部分グルコース反応性Ｃペプチド放出の証明によりｉｎ ｖｉｔｒｏで示されている（Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．，２００９，１９：４２９－４３８；Ｔａｔｅｉｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．，２００８，２８３：３１６０１－３１６０７；Ｍａｅｈｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，２００９，１０６：１５７６８－１５７７３）。さらに、最近の研究は、糖尿病マウスモデルにおけるｉｎ ｖｉｔｒｏでの分化及び移植後、高血糖を好転するマウス（Ａｌｉｐｉｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，２０１０，１０７：１３４２６－１３４３１）及びアカゲザル（Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ，２０１１，５４：２３２５－２３３６）ｉＰＳＣの可能性を強調している。糖尿病の好転はヒト多能性幹細胞にｉｎ ｖｉｔｒｏで由来するインスリン産生細胞を用いて、マウスでも観察された（Ｒｅｚａｎｉａ ｅｔ

ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２０１４，３２：１１２１－１１３３）。

【００５３】

多能性間葉系間質細胞（ＭＳＣ）は多くの組織ソースから容易に単離され、ｉｎ ｖｉｔｒｏで非常に増殖させることができ、凍結保存に耐性があり、多くの異なる系統に分化する可能性を有する。糖尿病の好転はＳＴＺ糖尿病ラットへの移植後、免疫抑制無く、インスリン$^{+}$細胞に分化されるヒトＭＳＣを用いて報告されている（Ｃｈａｏ ｅｔ ａｌ．，ＰｌｏＳ Ｏｎｅ，２００８，３：ｅ１４５１）。臍帯血、脂肪組織、及び骨髄など異なるＭＳＣソースがインスリン産生細胞を生じるために用いられている（Ｃｈａｏ ｅｔ ａｌ．，ＰｌｏＳ Ｏｎｅ，２００８，３：ｅ１４５１；Ｋａｊｉｙａｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．，２０１０，５４：６９９－７０５；Ｘｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ，２００９，７７：４８３－４９１；Ａｌｌａｈｖｅｒｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｊ．，２０１５，１７：２３１－２４２）。

【００５４】

上記すべての細胞型に加えて、導管細胞などの膵上皮細胞（Ｓｅａｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２００４，２２：１１１５－１１２４；Ｂｏｎｎｅｒ－Ｗｅｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，２０００，９７：７９９９－８００４；Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，２００３，５２：２００７－２０１５，Ｈａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ，２００６，１２：３１０－３１６）、肝細胞（Ｆｅｒｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．，２０００，６：５６８－５７２；Ｓａｐｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，２００５，１０２：７９６４－７９６９；Ｋａｎｅｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，２００５，５４：１００９－１０２２）、及びさらにα細胞（Ｃｏｌｌｏｍｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２００９，１３８：４４９－４６２；Ｔｈｏｒｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１０，４６４：１１４９－１１５４；Ｇｉａｎａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｍｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ．，２０１１，３３：２３－２７）は、適切な条件下で膵β細胞に分化することができることが証明されている（Ｌｙｓｙ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．，２０１２，１：１５０－１５９）。

【００５５】

Ｃ．Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の調製

Ｓｉ－ＨＰＭＣへのインスリン産生細胞のカプセル化は、（Ｕｌｕｄａｇ ｅｔ ａｌ．，Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，２０００，４２：２９－６４により考察された）当技術分野で公知の任意の適当なマクロカプセル化又はマイクロカプセル化技術を用いて行うことができる。カプセル化は移植されたカプセル化細胞を宿主の免疫拒絶から保護するため、物質的バリアでインスリン産生細胞又はインスリン産生細胞群を取り囲むことを目的とする。患者に導入されたときに細胞を生存させ、正確に機能させさえすれば、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の調製方法は限定因子ではない。

【００５６】

Ｓｉ－ＨＰＭＣを用いるカプセル化は、ｐＨの機能として、Ｓｉ－ＨＰＭＣのゲル性を利用する。

【００５７】

上記のように、Ｓｉ－ＨＰＭＣはｐＨが低下するとＨＰＭＣ鎖間に共有結合を形成するシラン基をグラフトしたヒドロキシプロピルメチルセルロースからなる自己固化（又は自己硬化）ポリマーである（下記参照）。Ｓｉ－ＨＰＭＣは１２．４より大きいか又は等しいｐＨの水溶液中で安定であるが、この溶液の酸性化は漸次粘度を増し、ヒドロゲルを形成させる。ゲル化ｐＨは所望の架橋率に応じて７～１２である。この物理現象は（ｉ）シラノラート基（－Ｓｉ（Ｏ$^{-}$Ｎａ$^{+}$）$_{3}$）のシラノール基（－Ｓｉ（ＯＨ）$_{3}$）への変化と、その後の（ｉｉ）一つのＳｉ－ＨＰＭＣ分子上の第１シラノール基の異なるＳｉ－Ｈ

ＰＭＣ分子上の第２シラノール基との縮合、及び／又は一つのＳｉ－ＨＰＭＣ分子上のシラノール基の異なるＳｉ－ＨＰＭＣ分子上のＨＰＭＣ鎖のヒドロキシ基との縮合による三次元網状構造の形成と、によるＳｉ－ＨＰＭＣの架橋を伴う。条件（特にｐＨ及び温度）をＳｉ－ＨＰＭＣの架橋率を制御するように選択することができる（Ｂｏｕｒｇｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｃｏｌｌｏｉｄ Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ Ｓｃｉ．２００２，９９：２１５－２２８）。

【００５８】

一般に、Ｓｉ－ＨＰＭＣへのインスリン産生細胞のミクロ及びマクロカプセル化は、細胞が粘性液体状のＳｉ－ＨＰＭＣ溶液に取り込まれる工程を含む。このようなＳｉ－ＨＰＭＣ粘性液体は前に記載された通りに得ることができる（Ｆａｔｉｍｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００８，２９：５５３－５４３；Ｖｉｎａｔｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２００５，２６：６６５４－６６５１）。簡潔に述べると、Ｓｉ－ＨＰＭＣ粉末（３％ｗ／ｖ）を室温で４８時間常に撹拌しながら０．２ＭのＮａＯＨ（３％）に可溶化することができる。その後、この溶液を例えば蒸気（１２１℃、２０分）により滅菌することができる。最後に、網状ヒドロゲルを形成させるため、この溶液を０．５体積の０．２６ＭのＨＥＰＥＳバッファと混合する。最終生成物は細胞を取り込むｐＨ７．４の粘性液体である。当業者に認識されるように、この方法の変形体を容易に設計することができる。

【００５９】

例えば、Ｓｉ－ＨＰＭＣ粘性液体を前に記載されたように、又は以下の実施例に記載されるように得ることができる。簡潔に述べると、Ｓｉ－ＨＰＭＣを０．２ＭのＮａＯＨ水溶液（３０．９ｍｇ／ｍＬ、ｐＨ＞１２．５）に溶解した後、分子量カットオフ６～８ｋＤａの透析２回を０．０９ＭのＮａＯＨ$_{水溶液}$で行い、Ｓｉ－ＨＰＭＣ粉末から任意の非グラフト３－グリシドキシプロピルトリメトキシシランを除去する。その後、一つのルアーロックシリンジに含まれる１体積のＳｉ－ＨＰＭＣ塩基性溶液を別のルアーロックシリンジの０．５体積の酸性バッファ溶液と、両方のシリンジを相互に接続することにより混合して、ヒドロゲル前駆体溶液が得られる。ｐＨ３．２の酸性バッファ溶液を６．２ｇの４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ≧９９．５％）、１．８ｇのＮａＣｌ（≧９９％）、及び６０ｍＬの０．１ＭのＨＣｌ水溶液（３７ｗｔ％ＨＣｌ）を混合することにより調製することができる。容量は最終ｐＨ７．４に達するように脱イオン水で１００ｍＬに調節する。その後、この混合物はゲル点に達するまで３０～４０分間注射可能である。本明細書に記載のように、同じプロセスを用いて、膵島又は細胞膵島の懸濁液を（ｉ）架橋前に第３ルアーロックシリンジで添加し、Ｓｉ－ＨＰＭＣの最終粘性溶液と連結させるか、あるいは（ｉｉ）架橋前にＳｉ－ＨＰＭＣの最終粘性溶液に導入してよい。

【００６０】

特定の実施形態において、インスリン産生細胞はＳｉ－ＨＰＭＣにマイクロカプセル化される。マイクロカプセル化は球状液滴／ビーズ又は多層システムを介して宿主系から単一のインスリン産生細胞（例えば、膵島）又は細胞群を免疫単離させる。このカプセル化形状は作製し易さ、機械的安定性、大きい表面積対体積比、及び最適な拡散性のため、過去３０年に渡って最も熱心に研究されている。初期の研究におけるマイクロスフェアの大きさは６００～８００μｍであったが、最近の製造技術では３５０～５００μｍのマイクロスフェアを作製することができる。しかし、マイクロスフェア、マイクロカプセル又はマイクロビーズは３５０μｍより小さく、８００μｍより大きくてよい。

【００６１】

インスリン産生細胞のＳｉ－ＨＰＭＣへのマイクロカプセル化は一般的に、インスリン産生細胞のＳｉ－ＨＰＭＣ粘性溶液（プレゲル状）内への取り込みと；細胞の小さい液滴への分散によるマイクロカプセルの作製と；適切なｐＨの生物バッファを用いたＳｉ－ＨＰＭＣの架橋（又は自己網状化）による液滴の安定化と、の三工程を含む。適当な生物バッファの例としては、リン酸バッファ（ＰＢＳ、リン酸緩衝生理食塩水）、ＨＥＰＥＳ及

びＴＲＩＳバッファが挙げられる。当業者に公知の任意の生物培地、例えばＤＭＥＭ培地又はアルファＭＥＭ培地（アルファ最小必須媒体）を用いても良い。その後、インスリン産生細胞を含有するＳｉ－ＨＰＭＣマイクロカプセルを３７℃、５％CO_2のインキュベータで定期的に培養培地を交換する培養条件下、短くて数時間、長くて数日、（生理的ｐＨ（７．４）及び温度（３７℃）で）保管してよい。

【００６２】

ゲル化可能な媒体（すなわちＳｉ－ＨＰＭＣ）に懸濁した細胞は、これらに限定されないが、乳化（例えば、米国特許第４，３５２，８８３号）、針からの押出（例えば、米国特許第４，４０７，９５７号；Ｎｉｇａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，１９８８，２：２７１－２７６）、スプレー針の使用（Ｐｌｕｎｋｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，１９９０，６２：５１０－５１７）、又は針及びパルス電気静電圧の使用（例えば、米国特許第４，７８９，５５０号及び５，６５６，４６８号）を含む当技術分野で公知の任意の適当な方法を用いて液滴に形成することができる。

【００６３】

特定の実施形態において、インスリン産生細胞はＳｉ－ＨＰＭＣにマクロカプセル化される。マイクロカプセル化とは対照的に、マクロカプセル化は肉眼で扱うことができるより大きいデバイス又はヒドロゲルに、より大量のインスリン産生細胞を包含する。マクロカプセル化膵島は有害事象（感染など）が起これば回収し易く、機能が経時的に低下すれば交換し易い。

【００６４】

特定の実施形態において、インスリン産生細胞を含有するヒドロゲルはｉｎ ｖｉｔｒｏ（ｅｘ ｖｉｖｏ）で調製された後、それ自体が患者体内に導入される。インスリン産生細胞のＳｉ－ＨＰＭＣヒドロゲルへのカプセル化は、インスリン産生細胞をＳｉ－ＨＰＭＣの粘性溶液（プレゲル状）と混合し、又は粘性溶液に取り込み；Ｓｉ－ＨＰＭＣの架橋を引き起こす（上記のような）生物バッファを用いてｐＨの低下を誘導することにより実施することができ、これによりインスリン産生細胞が捕捉されたヒドロゲルを形成する。

【００６５】

他の実施形態において、インスリン産生細胞を含有する最終ヒドロゲルはｉｎ ｖｉｖｏ（すなわち、患者体内で）作製される。より具体的には、インスリン産生細胞がｉｎ ｖｉｔｒｏ（ｅｘ ｖｉｖｏ）でＳｉ－ＨＰＭＣ粘性溶液（プレゲル状）と混合され、又は粘性溶液に取り込まれ、この粘性溶液が患者に注射され、生理的ｐＨでＳｉ－ＨＰＭＣが自己網状化し、これによりインスリン産生細胞を含有するヒドロゲルを形成する。

【００６６】

Ｄ．付加的治療化合物

特定の実施形態において、インスリン産生細胞はＳｉ－ＨＰＭＣカプセル又はヒドロゲルにおける唯一の「治療活性」成分である。

【００６７】

他の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は少なくとも一つの治療化合物をさらに含む。

【００６８】

治療化合物はインスリン感受性増強薬、糖吸収阻害薬、ビグアニド、インスリン分泌促進薬、インスリン製剤、グルカゴン受容体アンタゴニスト、インスリン受容体キナーゼ刺激薬、トリペプチジルペプチダーゼＩＩ阻害薬、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ阻害薬、タンパク質チロシンホスファターゼ－ＩＢ阻害薬、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害薬、グルコース－６－ホスファターゼ阻害薬、フルクトースビスホスファターゼ阻害薬、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ阻害薬、肝糖新生阻害薬、Ｄ－カイロイノシトール、グリコーゲン合成酵素キナーゼ－３阻害薬、グルカゴン様ペプチド－１、グルカゴン様ペプチド－１類縁体、グルカゴン様ペプチド－１アゴニスト、アミリン、アミリン類縁体、アミリンア

ゴニスト、アルドース還元酵素阻害薬、終末糖化産物生成阻害薬、タンパク質キナーゼＣ阻害薬、γ－アミノ酪酸受容体アンタゴニスト、ナトリウムチャネルアンタゴニスト、転写因子ＮＦ－κＢ阻害薬、脂質過酸化酵素阻害薬、Ｎ－アセチル化－α－リンクト－アシッド－ジペプチダーゼ阻害薬、インスリン様成長因子－Ｉ、血小板由来成長因子、血小板由来成長因子類縁体、上皮成長因子、神経成長因子、カルニチン誘導体、ウリジン、５－ヒドロキシ－１－メチルヒダントイン、ＥＧＢ－７６１、ビモクロモル、スロデキシド、Ｙ－１２８、ヒドロキシメチルグルタリルコエンザイムＡ還元酵素阻害薬、フィブリン酸誘導体、β３－アドレナリン受容体アゴニスト、アシルコエンザイムＡコレステロールアシル基転移酵素阻害薬、プロブコール、甲状腺ホルモン受容体アゴニスト、コレステロール吸収阻害薬、リパーゼ阻害薬、ミクロソームトリグリセリドトランスファープロテイン阻害薬、リポキシゲナーゼ阻害薬、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ阻害薬、スクアレン合成酵素阻害薬、低比重リポ蛋白受容体増強薬、ニコチン酸誘導体、胆汁酸封鎖剤、ナトリウム共役胆汁酸トランスポーター阻害薬、コレステロールエステル転送タンパク阻害薬、食欲抑制薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、中性エンドペプチダーゼ阻害薬、アンジオテンシンＩＩ受容体アンタゴニスト、エンドセリン変換酵素阻害薬、エンドセリン受容体アンタゴニスト、利尿薬、カルシウムアンタゴニスト、血管拡張性降圧薬、交換神経遮断薬、中枢性降圧薬、α２－アドレナリン受容体アゴニスト、抗血小板薬、尿酸生成阻害薬、尿排泄薬、尿アルカリ化薬、酸素担体、又はその任意の組み合わせでよい。

【００６９】

ＩＩ－Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の使用

Ａ．指標

Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は１型糖尿病と診断された患者を治療するために用いることができる。患者は好ましくはヒトであり、子供、ティーンエイジャ、又は成人でよい。

【００７０】

１型糖尿病は１型糖尿病を診断するために臨床的に用いられるいずれかの方法を用いて診断することができる。世界保健機関は真性糖尿病について空腹時血糖値７．０ｍｍｏｌ／ｌ（１２６ｍｇ／ｄｌ）超（全血６．１ｍｍｏｌ／ｌ又は１１０ｍｇ／ｄｌ）、あるいは２時間血糖値１１．１ｍｍｏｌ／Ｌ以上（２００ｍｇ／ｄＬ以上）の診断値を定義している。他の真性糖尿病を示唆する又は示す値としては、動脈圧上昇１４０／９０ｍｍＨｇ以上；血漿トリグリセリド上昇（１．７ｍｍｏｌ／Ｌ；１５０ｍｇ／ｄＬ）及び／又は低ＨＤＬコレステロール（男性０．９ｍｍｏｌ／Ｌ、３５ｍｇ／ｄｌ未満；女性１．０ｍｍｏｌ／Ｌ、３９ｍｇ／ｄＬ未満）；中心性肥満（男性：ヒップとウエストの比率０．９０超；女性：ヒップとウエストの比率０．８５超）、及び／又は３０ｋｇ／ｍ^{2}を超える肥満度指数；尿中アルブミン排泄率２０μｇ／分以上である微量アルブミン尿、又はアルブミンクレアチニン比３０ｍｇ／ｇ以上が挙げられる。

【００７１】

特定の実施形態において、患者はブリットル型１型真性糖尿病と診断されている。「ブリットル型１型真性糖尿病」「ブリットル型１型糖尿病」及び「不安定型１型糖尿病」という語は本明細書で交換可能に用いられる。１型糖尿病を制御するのが特に難しい疾患を指す。ほぼすべての糖尿病患者は非糖尿病患者よりも大きく、予測しにくい血中グルコース値の変動を経験する。これらの変動が過度になり、患者の生活の乱れ及び／又は長期入院を引き起こすと、そのヒトは不安定型又はブリットル型糖尿病を有するとして分類される。

【００７２】

あるいは、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は、１型前糖尿病（すなわち、１型糖尿病発症前）と診断された患者を治療するために、特にブドウ糖負荷試験が無調節の開始を示すときに、用いて良い。

【００７３】

Ｂ．Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の投与

本発明による治療方法は１型糖尿病患者にＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞を投与することを含む。「投与する」「導入する」及び「移植する」という語は本明細書で交換可能に用いられる。カプセル化細胞を所望部位に位置させ、埋め込んだカプセル化細胞の少なくとも一部が生存する方法又は経路による、対象へのＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の配置を指す。患者の投与後の生存期間は短ければ数時間（例えば、１２時間、２４時間）から数日（例えば、２日、３日、５日、１０日、２０日、３０日又は３０日超）から、長ければ数ヶ月（例えば、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月、７ヶ月、８ヶ月、９ヶ月、１０ヶ月、１１ヶ月、１２ヶ月）あるいは数年（例えば、２年、３年、４年、５年、又は５年超）であることができる。

【００７４】

Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は患者の身体の任意の適切な部位に導入してよい。理想的には、移植及び血管再生間の虚血期間をできる限り短くするため、移植部位では組織の素早い血管新生を行うべきである。潜在的な膵島移植部位として見なされている血管外部位としては、これらに限定されないが、膵臓（Ｓｔａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ｐａｎｃｒｅａｓ，２００７，８：６２８－６３６）、胃粘膜下組織（Ｃａｉａｚｚｏ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ Ｐｒｏｃ，２００７，３９：２６２０－２６２３）、横紋筋（Ｓｖｅｎｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ，２０１１，２０：７８３－７８８）、腹膜（Ｆｒｉｔｓｃｈｙ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，１９９１，５２：７７７－７８３）、網（Ａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，１９９３，５６：５２４－５２９）、骨髄（Ｃａｎｔａｒｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２００９，１１４：４５６６－４５７４）、腎臓被膜（Ｃａｒｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２０００，６９：７６１－７６６）、リンパ節（Ｋｏｍｏｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２０１２，３０：９７６－９８３）、脾臓（Ｋａｕｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，１９９０，５０：３８５－３９１）、並びに前眼房、精巣及び胸腺）などいくつかの免疫特権部位（Ｃａｎｔａｒｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｄｉａｂ．Ｒｅｐ．，２０１１，１１：３６４－３７４）が挙げられる。

【００７５】

本発明の特定の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は１型糖尿病患者に皮下注射により投与される。糖尿病マウス及び非ヒト霊長類における正常血糖は、皮下組織へのカプセル化膵島の移植により証明されている（Ｄｕｆｒａｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２０１０，９０：１０５４－１０６２；Ｋａｗａｋａｍｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｎｃｒｅａｓ，２００１，２３：３７５－３８１；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２００２，７３：１２２－１２９；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２００３，７６：２９－２９６）。１型糖尿病患者に皮下移植されたカプセル化膵島の臨床試験が報告されている（Ｓｈａｒｐ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，１９９４，４３：１１６７－１１７０；及びＳｅｒｎｏｖａのセルパウチを用いた臨床膵島移植プログラム）。

【００７６】

本発明の特定の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は１型糖尿病患者に筋肉内投与される。筋肉内移植は膵島自家移植においてすでに臨床段階に達している（Ｃｈｒｉｓｔｏｆｆｅｒｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，２０１０，５９：２５６９－２５７８）。

【００７７】

本発明の特定の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は１型糖尿病患者の腹膜腔に埋め込まれる。「腹膜腔」という語は、腹壁から腹腔中の臓器を分離する２つの膜である壁側腹膜及び臓側腹膜間の空間を指す。１型糖尿病患者に皮下移植されたカプセル化膵島の臨床試験が報告されている（Ｓｏｏｎ－Ｓｈｉｏｎｇ ｅｔ

ａｌ．，Ｔｈｅ Ｌａｎｃｅｔ，１９９４，３４３：９５０－９５１；Ｓｃｈａｒｐ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，１９９４，４３：１１６７－１１７０；Ｃａｌａｆｉｏｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ，２００６，２９：１３７－１３８；Ｔｕｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ，２００９，３２：１８８７－１８８９；並びにＡｍｃｙｔｅ，Ｉｎｃ．、Ｎｏｖｏｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．（ＶｉａＣｙｔｅ，Ｉｎｃ．）及びＬｉｖｉｎｇ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ＬＣＴ）により現在実施される臨床試験）。

【００７８】

本発明の特定の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は１型糖尿病患者の腸間膜に埋め込まれる。本明細書では、「腸間膜」という語は腹腔後壁から腸管につながる膜質組織のひだを指す。糖尿病マウスにおける正常血糖は腸間膜へのカプセル化膵島の移植により証明されている（Ｖｅｒｎｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ，２０１２，２１（１０）：１０．３７２７／０９６３６８９１２Ｘ６３６７８６；Ｒｏｇｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．，２０１０，１７７：８５４－８６４）。

【００７９】

本発明の特定の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は１型糖尿病患者の網、例えば上腸間膜動脈分岐に隣接する網、又は大網内に埋め込まれる。本明細書では、「網」という語は腹部臓器を取り囲む腹膜の層を指す。糖尿病マウスの正常血糖は網へのカプセル化膵島の移植により証明されている（Ｋｏｂａｙａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ，２００６，１５：３５９－３６５）。

【００８０】

本発明の特定の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は１型糖尿病患者の腎臓被膜下に埋め込まれる。「腎臓被膜」及び「腎被膜」という語は本明細書で交換可能に用いられ、腎臓を取り囲み、腎周囲脂肪組織の厚い層で覆われた丈夫な線維層を指す。糖尿病マウスの正常血糖は腎被膜へのカプセル化膵島の移植により証明されている（Ｄｕｆｒａｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，２００６，８１：１３４５－１３５３）。

【００８１】

特定の好ましい実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は皮下又は筋肉内に埋め込まれる。筋肉及び皮下組織はいくつかの利点を示し、腹腔内臓器など他の部位と比較して扱い易い。そのため、カプセル化細胞は必要又は所望であれば容易に移植及び除去することができる。

【００８２】

患者の身体の部位により、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の投与は注射、局所注入、カテーテル、外科的移植などを含むが、これらに限定されない様々な方法のいずれかを用いて行われる。

【００８３】

一般的に、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は治療有効量、すなわち１型糖尿病患者における正常血糖値を回復及び／又は維持するという意図された目的を満たすのに十分な量で投与される。国際膵移植登録機構は、正常血糖値を達成するため、レシピエント体重１キログラムあたり少なくとも６，０００膵島当量の移植を推奨している。２０００年には、エドモントンプロトコールは移植手順にいくつかの変更を行い、レシピエントの体重１キログラムあたり１１，０００膵島当量の平均膵島塊の移植を推奨した。しかし、移植されるべきＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の量は、グルコース刺激に反応してｉｎ ｖｉｖｏでインスリンを生じるカプセル化細胞の能力に依存することは当業者に明らかである。従って、投与されるべきＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の正確な量は、年齢、性別、体重、及び患者が患う血中グルコース値変動の重症度に応じて対象ごとに変わるだけでなく、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞の有効性、併用療法（例えば、外因性インスリン療法）の使用（又は未使用）、及び他

の臨床的因子によっても変わる。これらの因子は治療過程で主治医により容易に決定される。

【００８４】

本発明による治療効果は１型糖尿病の診断のために当技術分野で公知のアッセイ及び試験のいずれか、特に血中グルコース濃度を評価することにより監視することができる。

【００８５】

Ｃ．治療の併用

特定の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は、血糖を調節するために１型糖尿病患者に投与される唯一の治療薬である。他の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞はインスリン療法と併用される。この併用は、より軽いインスリン療法の適用、並びに（高及び／又は低）血糖のより優れた調節を行うことができる。

【００８６】

特定の実施形態において、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞は免疫抑制治療と併用適用される。しかし、他の実施形態において、移植を受けた１型糖尿病患者は免疫抑制治療を併用適用されない。

【００８７】

ＩＩＩ－キット

他の態様において、本発明は本発明による治療方法を実施するために有用な材料を含むキットを提供する。本発明の治療方法を実施するための材料及び試薬はキットに一緒にまとめられてよい。特定の実施形態において、発明に関するキットは、Ｓｉ－ＨＰＭＣ（例えば粉末状、又はｐＨ＞１２．４の水溶液状）及びインスリン産生細胞、並びにインスリン産生細胞をＳｉ－ＨＰＭＣにカプセル化する使用説明書、及び１型糖尿病患者又は１型前糖尿病患者にカプセル化細胞を投与する使用説明書を含む。他の実施形態において、発明に関するキットは、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化インスリン産生細胞及び１型糖尿病患者又は１型前糖尿病患者への投与のための使用説明書を含む。

【００８８】

その手順に応じて、このキットは洗浄バッファ及び／又は試薬、溶解バッファ及び／又は試薬、ゲルバッファ及び／又は試薬などの１つ又は複数をさらに含んでよい。手順における異なる工程を実施するためのこれらのバッファ及び試薬を使用するプロトコールが、このキットに含まれていてよい。

【００８９】

これらの試薬は固体状（例えば、凍結乾燥状）又は液体状で供給されてよい。本発明のキットは任意に個々のバッファ及び／又は試薬用の異なる容器（例えば、バイアル、アンプル、試験管、フラスコ又は瓶）を含んでよい。各成分は一般的にそのそれぞれの容器に分注されるのが適当であり、又は濃縮状で提供される。他の開示された方法の特定の工程を実施するのに適当な容器が提供されてもよい。このキットの個々の容器は市販用に厳重な密閉状態で維持されることが好ましい。

【００９０】

本発明に記載のキットは本発明の方法によるキットを使用するための使用説明書をさらに含んでよい。本発明の方法によるキットを使用するための使用説明書はマクロカプセル化を実施するための使用説明書、マイクロカプセル化を実施するための使用説明書、１型糖尿病患者に投与／注射／移植するための使用説明書などを含んでよい。

【００９１】

特定の実施形態において、本発明によるキットは患者にカプセル化細胞を投与するためのデバイス（例えば、シリンジ及びニードルシステム）を含んでよい。

【００９２】

医薬又はバイオ製品の製造、使用又は販売を規制する行政機関により規定された形式の通知又は添付文書が容器に任意に含まれていてよく、この通知はヒトへの投与のための製造、使用又は販売の機関による承認を示す。

【００９３】
識別子、例えばバーコード、無線周波数、ＩＤタグなどが、キット中又は上に存在してよい。例えば、品質管理、在庫管理、ワークステーション間の動作追跡などの目的でキットを独自に識別するために、この識別子を用いることができる。
【００９４】
本発明を以下の図及び実施例によりさらに説明する。しかし、これらの実施例及び図は本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。
【実施例】
【００９５】
下記実施例は本発明をなし、実施する一部の好ましい形態を説明する。しかし、実施例は説明のためだけのものであり、本発明の範囲を限定しないことを理解すべきである。さらに、実施例の記述が過去形で表されていなければ、本明細書の残りのように、この文章は実験が実際に実施された、又はデータが実際に得られたと示すことを意図しない。
【００９６】
材料及び方法
倫理
動物の世話及び実験はすべて、関連するフランスのガイドライン（２００１年５月２９日のＤｅｃｒｅｔ２００１～４６４及び２０１３年２月１日のＤｅｃｒｅｔ２０１３～１１８）に準拠して行った。特定病原体の無い環境のＯＮＩＲＩＳ齧歯類設備（承諾番号：４４　２６６）で滅菌水道水及び食餌を用いてマウスを飼育した。すべての実験動物は動物実験の倫理に関して、Ｐａｙｓ　ｄｅ　ｌａ　Ｌｏｉｒｅ　Ｒｅｇｉｏｎａｌ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅにより承認された（承認番号：０１０７４．０１／０２）。苦しみを最小限に抑えるように努力した。
【００９７】
細胞
新生仔ブタ膵島（ＮＰＩ）。ユカタン新生仔ブタをＩＮＲＡ（フランス、サン＝ジル）から購入した。１～１４日齢の雌性又は雄性ユカタン新生仔ブタ（体重１～２ｋｇ）から膵臓を得た。仔ブタをイソフルランを用いて麻酔し、全採血後開腹した。仔ブタの鎮痛はブトルファノール及びミダゾラムの前投薬、並びに術前モルヒネクロロハイドラート投与を含んでいた。その後、膵臓を周辺組織から注意深く切断し、１０ｍＭのＨｅｐｅｓ、１００Ｕ／ｍｌのペニシリン及び０．１ｍｇ／ｍｌストレプトマイシンを添加した冷却ＨＢＳＳ（ＨＢＳＳバッファ）に入れた。新生仔ブタ膵島の単離及び培養をＫｏｒｂｕｔｔらにより記載された通りに実施した（Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１９９６，９７：２１１９－２１２９）。簡潔に述べると、はさみを用いて膵臓を１～２ｍｍ^{3}の小片に切断し、洗浄後、２．５ｍｇ／ｍｌコラゲナーゼ（シグマアルドリッチ）で消化し、３７℃の水浴振とう機で１４～１６分間穏やかに撹拌した。消化物を１０ｍＭのＨｅｐｅｓ、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、０．１ｍｇ／ｍｌストレプトマイシン及び０．５％ＢＳＡを添加したＨＢＳＳで４回洗浄したナイロン篩い（５００μｍ）を通してろ過した後、１０ｍＭグルコース（シグマアルドリッチ）、５０ｍＭのＩＢＭＸ（シグマアルドリッチ）、５ｇ／ＬのＢＳＡ（シグマアルドリッチ）、２ｍＭのＬ－グルタミン（Ｄｕｔｓｈｅｒ）、１０ｍＭのニコチンアミド（シグマアルドリッチ）、１００ＩＵ／ｍｌのペニシリン及び１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｄｕｔｓｈｅｒ）を添加したハムＦ１０（Ｄｕｔｓｃｈｅｒ）を含有する無細胞培養処理されたペトリ皿（Ｄｕｔｓｃｈｅｒ）に置いた。単離後一日目及びその後一日おきに培地を交換しながら、培養皿を加湿空気（５％CO_2、９５％空気）中３７℃で維持した。ヒドロゲルにカプセル化されると（下記参照）、１０ｍＭグルコース、５０ｍＭのＩＢＭＸ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１０ｍＭのニコチンアミド、１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシン及び１０％ブタ血清を添加したハムＦ１０でＮＰＩを培養した。
【００９８】
ＭＩＮ６偽膵島（ＰＩ）。ＭＩＮ６マウスインスリン細胞は親切にも宮崎純一教授（日

本、大阪大学医学部）により提供された。低継体（５～１０）ＭＩＮ６細胞を選択してＰＩを形成した。２５ｍＭのグルコースを含有し、１０％熱不活化ウシ血清（インビトロジェン、米国、カールスバッド）、１％ペニシリン／ストレプトマイシン／ネオマイシン混合物（ＰＡＡ）及び５０μＭメルカプトフェノール（シグマアルドリッチ）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ、Ｄｕｔｓｈｅｒ）でＭＩＮ６細胞を培養した。５０ｍＬチャンバＲＣＣＳバイオリアクタ（シンセコン、米国、ヒューストン）において、４日間及び３日間、３７℃、加湿空気（５％CO_2、９５％空気）中で、未処置ペトリ皿に10^6細胞／ｍＬを播種することでＭＩＮ６　ＰＩを調製した。

【００９９】

膵島当量計算法。膵島当量を決定して、その体積に対する膵島数を標準化した。国際膵膵島移植学会の第二会議（Ｒｉｃｏｒｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｄｉａｂｅｔｏｌ．Ｌａｔ．，１９９０，２７：１８５－１９５）で設定された判断基準によれば、１ＩＥＱは直径１５０μｍの膵島に等しい。各計数について、５０μＬの三サンプルを用いた。

【０１００】

Ｓｉ－ＨＰＭＣ及びアルギン酸塩ヒドロゲルへのＮＰＩ及びＰＩのマクロカプセル化

マクロカプセルにおける膵島濃度は２５００膵島当量（ＩＥＱ）／ｍＬを対象とした。３％（ｗ／ｖ）シラン化ヒドロキシプロピルメチルセルロース（Ｓｉ－ＨＰＭＣ）はＬＩＯＡＤ（Ｌａｂｏｒａｔｏｉｒｅ　ｄ’Ｉｎｇｅｎｉｅｒｉｅ　Ｏｓｔｅｏ－Ａｒｔｉｃｕｌａｉｒｅ　ｅｔ　Ｄｅｎｔａｉｒｅ－ＵＭＲ＿Ｓ７９１、フランス、ナント）により提供された。Ｓｉ－ＨＰＭＣ及び酸バッファをルアーロックにより結合した２つのシリンジを用い、２：１（ｖ：ｖ）比で、それぞれ最終２％（ｗ／ｖ）ヒドロゲルとなるように混合した（Ｂｏｕｒｇｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｄｖ．Ｃｏｌｌｏｉｄ　Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ　Ｓｃｉ．，２００２，９９：２１５－２２８）。ゲル化（プレゲル）の１０分後、膵島（２０μＬ体積）を先の細い０～２００μＬ円錐体を用いて２００μＬのヒドロゲル内に滴下した。その後、２３ゲージ針を通した押出しにより、膵島をヒドロゲル内に埋め込んだ。２００μＬのゲル及び膵島混合体を４８ウェルＴＣＰＳプレートに配置し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＳｉ－ＨＰＭＣ膵島マクロカプセルを得た。３７℃で６０分のインキュベーション後、成長培地を加えた。

【０１０１】

Ｎｏｖａｍａｔｒｉｘ（ノルウェー、Ｓａｎｄｖｉｋａ）の臨床グレードの低粘度、高グルクロン酸塩のアルギン酸ナトリウム（ＰＲＯＮＯＶＡ　ＵＰ　ＬＶＧ）を用いて、アルギン酸塩マクロカプセルを作製した。アルギン酸ナトリウムを２．２％（ｗ／ｖ）で０．９％ＮａＣｌ（ｗ／ｖ；シグマアルドリッチ）に、一晩４℃で優しく撹拌することにより可溶化した後、０．２μＭのろ過（ミリポア、ドイツ、ダルムシュタット）を用いて滅菌した。ＮＰＩ及びＰＩを０．９％ＮａＣｌで３回洗浄し、アルギン酸カルシウム２．２％溶液に１：８（ｖ：ｖ）で懸濁した。シリンジドライバを用い、２３ゲージ針を通して、１００ｍＭの$CaCl_2$（シグマアルドリッチ）ゲル化浴に１０分間押し出すことによりマクロスフェアを得た。その後、マクロスフェアを０．９％ＮａＣｌの１０分浴２回及び培養培地で連続的に洗浄した。得られたマクロスフェアの平均は直径２ｍｍであった。２００μＬのゲル及び膵島混合体を４８ウェルプレートに滴下した後、カプセルを取り囲み、覆う１００ｍＭの$CaCl_2$溶液と２０分インキュベーションし、マクロカプセルを得た。ゲル化後、$CaCl_2$を除去し、マクロカプセルを０．９％ＮａＣｌ（２０分浴２回）及び培地で連続的に洗浄した。

【０１０２】

カプセル化ＮＰＩ又はＰＩを加湿空気（５％CO_2、９５％空気）中３７℃で維持し、培養培地を２～３日ごとに交換した。

【０１０３】

ＮＰＩ及びＰＩのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの生存力

カプセル化又は非カプセル化ＮＰＩ及びＰＩの生存力をメーカー推奨（ライフテクノロジーズ、米国、カールスバッド）のＬＩＶＥ／ＤＥＡＤキット（カルセインＡＭ及び臭化

エチジウム（ＥｔｈＤ－１））を用いて評価した。試験前、非カプセル化細胞をＤ－ＰＢＳ（シグマアルドリッチ）で１回洗浄し、カプセル化細胞をＤ－ＰＢＳで３回１５分洗浄した。ＥｔｈＤ－１及びカルセインＡＭプローブを３０～６０分間、それぞれ４μＭ及び２μＭの濃度でインキュベートした。

【０１０４】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＮＰＩ及びＰＩ機能

グルコース刺激インスリン分泌（ＧＳＩＲ）。急性のグルコース±テオフィリン（インスリン分泌増強剤）に反応してインスリンを放出する非カプセル化又はカプセル化膵島の能力をそれぞれ静的又は静的／動的方法により評価した。２．８ｍＭのグルコース（ＰＡＡ）、２ｍＭのＬ－グルタミン及び５ｇ／ＬのＢＳＡ（シグマアルドリッチ）を添加したＲＰＭＩ（ＰＡＡ）から基礎培地（Ｂ）を構成した。グルコース刺激培地（Ｇ）及びグルコースプラステオフィリン培地（Ｇ＋Ｔ）はそれぞれ２０ｍＭグルコース及び２０ｍＭグルコース±１０ｍＭテオフィリン（シグマアルドリッチ）を添加した基礎培地であった。Ｋｏｒｂｕｔｔら（Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１９９６，９７：２１１９－２１２９）に記載されたように、非カプセル化膵島の静的ＧＳＩＲを２時間、Ｂ、Ｇ又はＧ＋Ｔ培地で５０膵島当量（ＩＥＱ）（あらかじめ基礎培地で洗浄した）をインキュベートすることにより評価した。その後、組織及び培地を遠心分離により分離し、それぞれのインスリン含有量について分析した。静的／動的方法を用いて、カプセル化膵島（５００ＩＥＱ／２００μｌのヒドロゲル）のＧＳＩＲを評価した。まず、カプセル化膵島を基礎培地で３０分間の５連続インキュベーションにより洗浄した。その後、インスリンの基礎及び刺激産生は、カプセル化膵島を３０分間、４００μＬの基礎培地（２回）、グルコースプラステオフィリン（２回）及び基礎培地（３回）で連続的にインキュベートすることにより評価した。

【０１０５】

培養下のカプセル化膵島の基礎インスリン分泌。各週、培養培地の上清を最後の培地交換の２４時間後、カプセル化膵島から採取して、培養下のカプセル化膵島によるインスリン基礎産生について分析した。

【０１０６】

インスリンアッセイ及び結果計算。インスリンをＥＬＩＳＡ（Ｍｅｒｃｏｄｉａ、スウェーデン、ウプサラ）により分析した。インスリン（ｉｎｓ）の特異産生率（ｑ）を以下の等式を用いて計算した。ＸはＩＥＱの数であり、ｔは産生時間である：

【数１】

$$q_{ins} = \left(\frac{1}{X}\right)\left(\frac{dIns}{dt}\right) \quad (\text{pg/1000 IEQ/h で表される})$$

【０１０７】

ヒドロゲルの免疫生体適合性及び免疫保護

マウス脾細胞及びヒトマクロファージとの膵島インキュベーション。非カプセル化又はカプセル化膵島をヒトマクロファージ又はマウス脾細胞と共培養した。ヒト単球はＣＩＣ（Ｃｅｎｔｒｅ　ｄ’Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ　Ｃｌｉｎｉｑｕｅ、フランス、ナント）から購入した。ヒトマクロファージは１０％ＦＣＳ（ｖ／ｖ）、２ｍＭのグルタミン、１００ＩＵ／ｍＬのペニシリン、１００ｍｇ／ｍＬのストレプトマイシン及び10^4Ｕ／ｍＬのｒｈＭ－ＣＳＦ（組み換えマクロファージコロニー刺激因子、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、英国、アビンドン）を添加したＲＰＭＩ１６４０において、ペトリ皿で６日間培養した（10^6細胞／cm^2）単球のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの分化により得られた。マクロファージをアクターゼ（シグマアルドリッチ）により採取し、５００μＬの完全培地において、４８ウェルプレートに各ウェルあたり4×10^4細胞で培養した。ＮＯＤ／ＳｈｉＬＴＪマウスから、脾臓を穏やかに機械的破砕し、７０μｍ篩いを通した後、赤血球の溶

解により脾細胞を単離した。サイトカイン分泌アッセイのため、１０％ＦＣＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン及び１００ＩＵ／ｍＬのペニシリン、１００ｍｇ／ｍＬのストレプトマイシンを添加した５００又は１０００μＬのＲＰＭＩ１６４０培地において、脾細胞をそれぞれ４８ウェルプレートに各ウェルあたり２ｘ１０^{5}細胞、又は２４ウェルプレートに各ウェルあたり４ｘ１０^{5}細胞で培養した。

【０１０８】

サイトカイン分泌。全培地を４０±２時間後に集め、－２０℃の温度で保管した。ＣＢＡ試験（ベクトン・ディッキンソン、米国、フランクリンレイクス）又はＥＬＩＳＡ試験（バイオテクネ、米国、ミネアポリス）をＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＩＬ－１２又はＩＬ－１０定量化のために実施した（ＦＡＣＳ　Ａｒｉａ、ＢＤ　Ｂｉｏｓｉｅｎｃｅｓ）。

【０１０９】

カプセル化ＭＩＮ６偽膵島（ＰＩ）のストレプトゾトシン誘発糖尿病免疫不全ＮＳＧ及び免疫応答性Ｃ５７Ｂｌ／６マウスへの移植

６～１２週齢の雌性マウスを用いた。ＮＯＤｓｃｉｄガンマ免疫不全（ＮＳＧ）マウスをチャールズリバーラボラトリーズ（フランス、リヨン）から購入した。絶食マウスを移植５日前に１５０ｍｇ／体重ｋｇの高用量ストレプトゾトシン（シグマアルドリッチ；クエン酸バッファに新たに溶解した）の単回腹腔内注射により糖尿病にした。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスをＪａｎｖｉｅｒ　Ｌａｂｓ（フランス、ル・ジュネスト＝サン＝ティスル）から得た。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスを移植４０日前に５０ｍｇ／体重ｋｇの低用量ストレプトゾトシン（シグマアルドリッチ；クエン酸バッファに新たに溶解した）の腹腔内注射５回（１日１回）により糖尿病にした。血糖をグルコトレンド／アキュチェック（ロシュ・ダイアグノスティックス、ドイツ、マンハイム）を用いて監視した。血液サンプルを尾静脈から得た。２回連続した監視について血糖が１３．５ｍｍｏｌ／Ｌよりも高いとき、糖尿病と診断された。注射当日、レシピエント動物はイソフルランを用いて麻酔した。上記のように、５００ＩＥＱを２００μＬのＳｉ－ＨＰＭＣヒドロゲルにカプセル化した。プレゲル化の１０分後、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化膵島を麻酔マウスの右脇腹に皮下注射した。その後、ＳｉＨＰＭＣのマクロカプセルを一部のマウスから除去した。そのため、マウスをイソフルランを用いて麻酔し、鎮痛をブプレノルフィンで実施した。

【０１１０】

統計分析。データを独立観測の平均±ＳＥＭとして表す。統計分析をＰｒｉｓｍ（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．）及び図の凡例に示す統計的検定を用いて実施した。

【０１１１】

結果

非カプセル化はｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養された新生仔ブタ膵島の生存力の急速な減少により特徴付けられる一方（図１（Ａ）を参照のこと）、Ｓｉ－ＨＰＭＣカプセル化は４２日を超えて新生仔ブタ膵島を生存させる（図２（Ａ）参照のこと、最大試験日数：７２日）。同様の結果が９ヶ月までのｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養におけるマウス偽膵島（Ｍｉｎ６）でも観察された（図３（Ａ）参照のこと）。

【０１１２】

カプセル化膵島のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの機能性について言えば：新生仔ブタ膵島によりｉｎ　ｖｉｔｒｏで分泌されるインスリンの基礎量は、アルギン酸塩（臨床グレードＧＭＰ　Ｎｏｖａｍａｔｒｉｘ）にカプセル化された時よりもＳｉ－ＨＰＭＣにカプセル化された場合がより高いことが見出された（図２（Ｂ）参照のこと、ｐ＜０．０５）。新生仔ブタ膵島のｉｎ　ｖｉｔｒｏでのインスリン分泌はグルコースにより刺激されなかった（図１（Ｂ）参照のこと）。新生仔ブタ膵島が機能的に未成熟であることがわかっているため、この結果は予想された。しかし、予期した通り（Ｋｏｒｂｕｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１９９６，９７：２１１９－２１２９）、新生仔ブタ膵島のｉｎ　ｖｉｔｒｏでのインスリン分泌は相乗剤であるテオフィリンと併用したグルコー

スにより刺激されることが観察された（図１（Ｂ）を参照のこと、ｐ＜０．０５）。刺激剤（グルコース＋テオフィリン）及びアルギン酸塩のようなヒドロゲルを通過したインスリン自体の拡散の遅れはインスリン分泌刺激試験をより困難にする。このカプセル化に固有の技術的問題を解決するため、本発明者は免疫分泌の「動的」試験を開発した（図４（Ａ））。グルコース及びテオフィリンを用いた刺激後に分泌されるインスリンの量が培養初期にＳｉ－ＨＰＭＣを用いるよりもアルギン酸塩を用いる方が高い（ｐ＜０．０５）ことが見出されたなら、その反転は後に実際になる（図４（Ｂ）を参照のこと）。マウス偽膵島の場合、基礎インスリン分泌（はるかに高い量）がＳｉ－ＨＰＭＣを用いたカプセル化後のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの培養全体で維持されることが見出された（図３（Ｂ）参照のこと、最大試験期間：９ヶ月）。同様のことが刺激されたインスリン分泌にも当てはまる（図５参照のこと）。

【０１１３】

生理的ｐＨ及び温度で自己網状化（自己架橋）するＳｉ－ＨＰＭＣの能力は、簡素なシリンジ及びニードルシステム（２３Ｇｘ１）を用い、重合化前の皮下注射を可能にする。このような投与経路を用いて、本発明者はＳｉ－ＨＰＭＣにカプセル化されたマウス偽膵島が免疫不全ＮＯＤマウス（図６（Ａ）を参照のこと）及び免疫応答性Ｃ５７Ｂｌ／６マウス（図６（Ｂ）を参照のこと）におけるストレプトゾトシン（ＳＴＺ）誘発糖尿病を治療することができると示している。ＳＴＺの高用量注射は膵臓の全インスリン産生細胞を化学的に破壊することが見出された。反対に、ＳＴＺの低用量注射を繰り返すと、膵臓のインスリン産生細胞の部分的及び限定的化学破壊を引き起こし、インスリン細胞による自己抗原の放出によって自己免疫糖尿病を招く（Ｗｅｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，１９９１，４０：１１５７－１１６２；Ｒｏｓｓｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９７７，７４：２４８５－２４８９）。偽膵島を含有するヒドロゲルの外科的除去は血糖の急増を招き、糖尿病調整は実際には他の因子（膵臓のインスリン産生細胞の新生又は皮下ヒドロゲルから出た偽膵島又はＭＩＮ６細胞の作用など）によるよりもむしろマクロカプセル化膵島によると示している。

【０１１４】

バイオ人工膵臓としてのＳｉ－ＨＰＭＣの生体免疫適合性を試験するため、本発明者はマクロファージ及び樹状細胞により分泌される炎症性サイトカインであるＩＬ－６の分泌を評価している。自身がヒトマクロファージ及びマウス脾細胞によるＩＬ－６分泌を誘導するアルギン酸塩とは対照的に、Ｓｉ－ＨＰＭＣはＩＬ－６分泌を誘導する効果を有さないことが見出された（図７（Ａ）を参照のこと）。試験される細胞の機能性を評価する陽性対照としてＬＰＳを用いた（図７（Ｂ）を参照のこと）。

【０１１５】

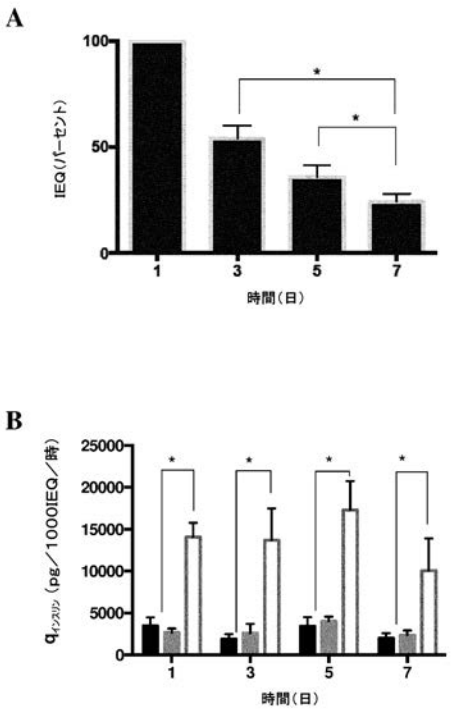
Ｓｉ－ＨＰＭＣは膵島が免疫系細胞により認識されることを防ぎ、従ってカプセル化膵島に効率的な免疫保護を与えることが見出された。実際に、図８に示すように、Ｓｉ－ＨＰＭＣはブタ膵島との接触により誘導されるヒトマクロファージ及びマウス脾細胞によるＩＬ－６のｉｎ　ｖｉｔｒｏ分泌を妨げる。反対に、アルギン酸塩自体はＩＬ－６分泌を誘導する能力を有している（上記参照）。さらに、Ｓｉ－ＨＰＭＣはカプセル化膵島による可溶性因子の放出により誘導される免疫細胞によるＩＬ－６分泌を限定する（トランスウェルでの共培養試験、図９を参照のこと）。

【０１１６】

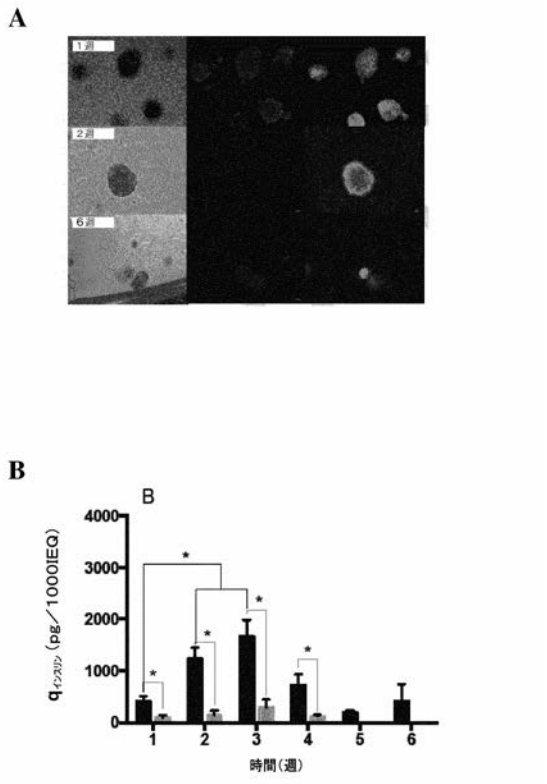
インスリン産生細胞のＳｉ－ＨＰＭＣカプセル化の長期耐久性及び有効性はまだ実証されていない。上記報告されたすべての実験は終濃度が２％（ｗ／ｖ）のＳｉ－ＨＰＭＣを含有する標準処方を用いて実施し、ヒドロゲル）を調製している。当業者に認識されるように、Ｓｉ－ＨＰＭＣの終濃度は修正及び最適化して、拡散、生存力、安定性及び耐久性間の最良の妥協点を見出すことができる。より低い濃度のＳｉ－ＨＰＭＣ（例えば、約１．５％、約１％又は約０．５％）及びより高い濃度のＳｉ－ＨＰＭＣ（例えば、約２．５％、約３％、約４％又は約５％をヒドロゲルの密度を調節するため、従ってインスリン及びグルコースをさらに拡散させ、生存力を維持しながらその耐久性を調節するために用い

ることができる。

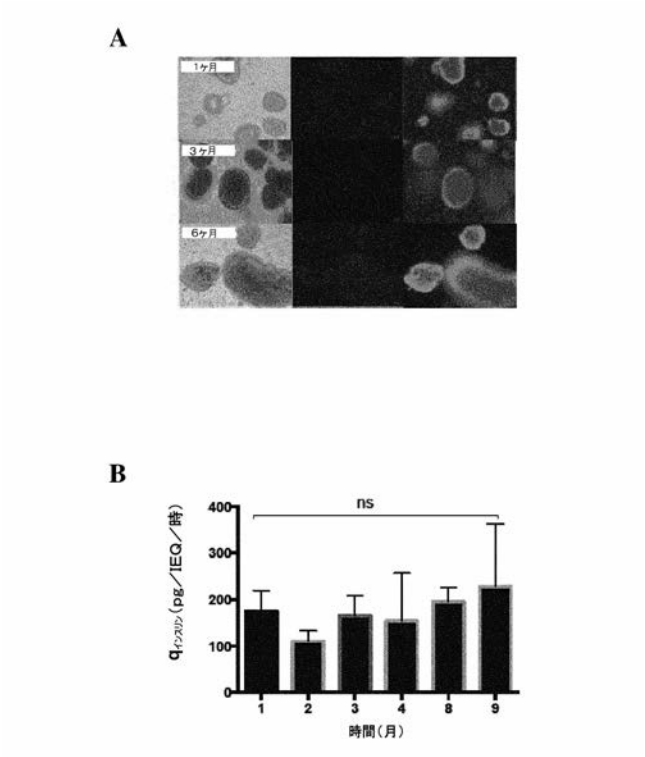
【図１】



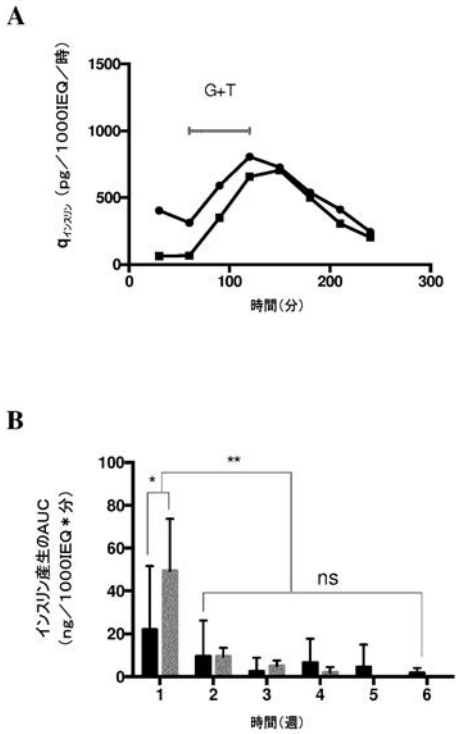
【図２】



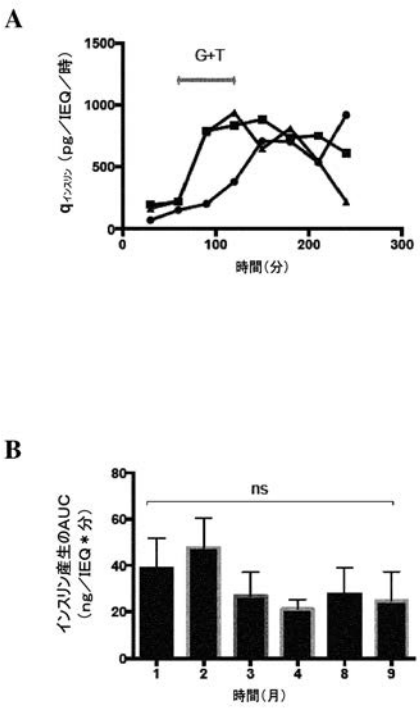
【図３】


A
1ヶ月
3ヶ月
6ヶ月
B
ns
400
300
200
100
0
1
2
3
4
8
9
時間(月)

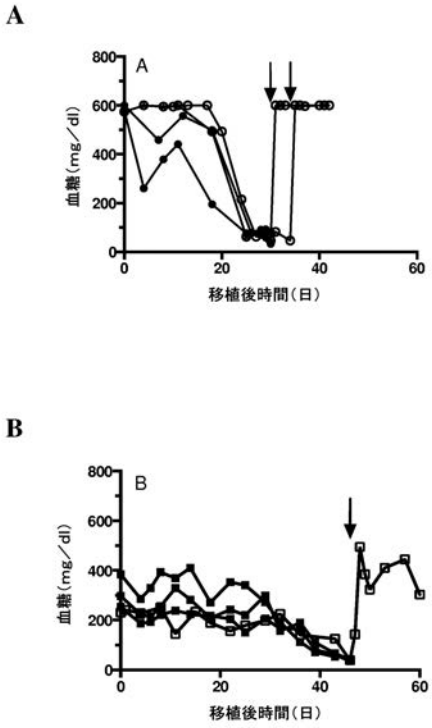
【図４】


A
G+T
1500
1000
500
0
0
100
200
300
時間(分)
B
*
**
ns
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
時間(週)

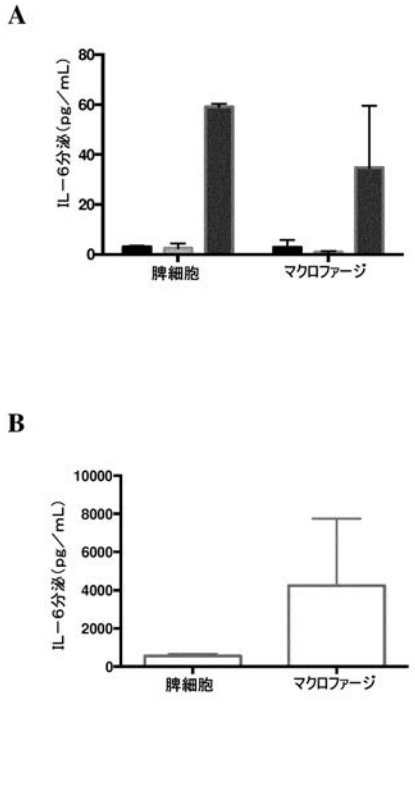
【図５】


A
G+T
1500
1000
500
0
0
100
200
300
時間(分)
B
ns
80
60
40
20
0
1
2
3
4
8
9
時間(月)

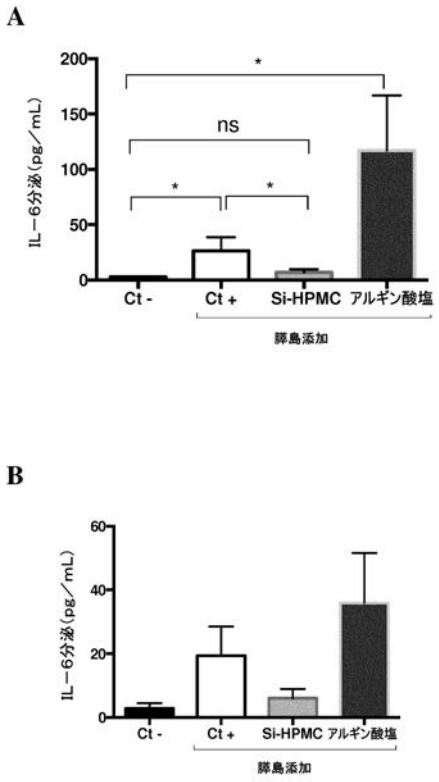
【図６】


A
A
800
600
400
200
0
0
20
40
60
移植後時間(日)
B
B
800
600
400
200
0
0
20
40
60
移植後時間(日)

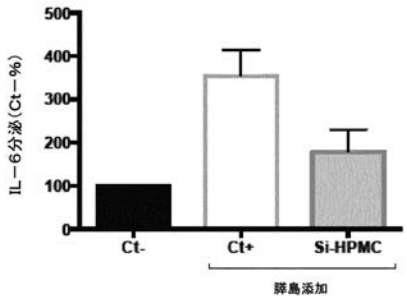
【図７】


A
IL－6分泌（pg／mL）
80
60
40
20
0
脾細胞
マクロファージ
B
IL－6分泌（pg／mL）
10000
8000
6000
4000
2000
0
脾細胞
マクロファージ

【図８】


A
IL－6分泌（pg／mL）
200
150
100
50
0
*
ns
*
*
Ct -
Ct +
Si-HPMC
アルギン酸塩
膵島添加
B
IL－6分泌（pg／mL）
60
40
20
0
Ct -
Ct +
Si-HPMC
アルギン酸塩
膵島添加

【図９】


IL－6分泌（Ct－%）
500
400
300
200
100
0
Ct-
Ct+
Si-HPMC
膵島添加

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/077193

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61L27/38 A61P3/10 A61K35/39 A61K47/38 A61K9/16 A61K9/00
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61L C12N A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RISBUD M V ET AL: "ISLET IMMUNOISOLATION: EXPERIENCE WITH BIOPOLYMERS", JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE. POLYMER EDITION, VSP, UTRECHT, NL, vol. 12, no. 11, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1243-1252, XP008009610, ISSN: 0920-5063, DOI: 10.1163/156856201753395770 page 1245, paragraph 1 - paragraph 2; figures 2, 3 page 1246, last paragraph - page 1247, paragraph 1 page 1250, paragraph 2 ----- -/--	1-15

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 February 2017	13/02/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Markopoulos, Eytyxia

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/077193

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VINATIER C ET AL: "A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 26, no. 33, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 6643-6651, XP027767631, ISSN: 0142-9612 [retrieved on 2005-11-01] abstract * p. 6644, col. 2, 2.2 Synthesis of Si-HPMC hydrogel * 3 p. 6650, col. 1, 3 *; figures 2-4	1-15
Y	EVA MATHIEU ET AL: "Intramyocardial Delivery of Mesenchymal Stem Cell-Seeded Hydrogel Preserves Cardiac Function and Attenuates Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction", PLOS ONE, vol. 7, no. 12, 20 December 2012 (2012-12-20), page e51991, XP055252201, DOI: 10.1371/journal.pone.0051991 abstract * p. 2, col. 1, 1, last sentence - 2 * * p. 9, col. 2, Synthesis of Si-HPMC hydrogel * * p. 9, col. 2, Cell viability in 3D cultures *; figures 1, 2, 4, 5	1-15
Y	WO 2005/044326 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; UNIV NANTES [FR]; WEISS PIERRE [FR]; GUI) 19 May 2005 (2005-05-19) abstract; claims 1-10	1-15
A	VIJAYAGANAPATHY VAITHILINGAM ET AL: "Islet Transplantation and Encapsulation: An Update on Recent Developments", THE REVIEW OF DIABETIC STUDIES, vol. 8, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01) , pages 51-67, XP055252459, DE ISSN: 1613-6071, DOI: 10.1900/RDS.2011.8.51 abstract * p. 55, col. 2, Microcapsules - p. 58, col. 2, 1 *	1-15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/077193

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005044326 A1	19-05-2005	AT 361108 T	15-05-2007
		AU 2004287234 A1	19-05-2005
		CA 2543917 A1	19-05-2005
		CN 1897989 A	17-01-2007
		DE 602004006299 T2	10-04-2008
		DK 1689461 T3	10-09-2007
		EP 1529543 A1	11-05-2005
		EP 1689461 A1	16-08-2006
		ES 2286709 T3	01-12-2007
		JP 4351258 B2	28-10-2009
		JP 2007510410 A	26-04-2007
		US 2007212389 A1	13-09-2007
		US 2010297764 A1	25-11-2010
		WO 2005044326 A1	19-05-2005

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P 3/10		***(2006.01)***	A61P	3/10		
A61P 43/00		***(2006.01)***	A61P	43/00	１１１	
A61K	*35/545*	*(2015.01)*	A61P	43/00	１２１	
A61K	*35/407*	*(2015.01)*	A61K	35/545		
A61K	*35/35*	*(2015.01)*	A61K	35/407		
			A61K	35/35		

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

(71)出願人 507042442
インサーム （インスティテュート ナショナル デ ラ サンテ エ デ ラ ルシェルシェ メディカル）
フランス国 パリ セデックス １３ リュ デ トルビアック １０１
(74)代理人 100120891
弁理士 林 一好
(74)代理人 100165157
弁理士 芝 哲央
(74)代理人 100205659
弁理士 齋藤 拓也
(74)代理人 100126000
弁理士 岩池 満
(74)代理人 100185269
弁理士 小菅 一弘
(74)代理人 100202577
弁理士 林 浩
(72)発明者 バシュ ジャン－マリー
フランス国 ４４４７０ カルクフー アヴェニュ クリオ ９
(72)発明者 モッサー マチルド
フランス国 ４４０００ ナント リュ スブマン ３
(72)発明者 サラマ アポリン
フランス国 ４４１００ ナント シュマン ポワッソン ４ アパルトマン ３
(72)発明者 ムーレ アン
フランス国 ６５２７０ サン プレ ド ビゴール アヴェニュ サンシュ ド ガスコーニュ １
(72)発明者 レヴェク グザヴィエ
フランス国 ４４１００ ナント ビス リュ デ ラ ペレテリ １７
(72)発明者 ヴェイス ピエーレ
フランス国 ４４２００ ナント プロムナード ヨーロッパ ６
(72)発明者 ギーシュー ジェローム
フランス国 ４４９８０ サント リュス シュル ロワール リュ ド イル ドオディック １６

(72)発明者　ボワイエ　セシル
フランス国　４４２００　ナント　ルート　ド　サン　セバスチャン　１
(72)発明者　リオシェ　ダヴィド
フランス国　４４１００　ナント　リュ　デ　ラ　ヴェルリ　７

Ｆターム(参考) 4B065 AA93X BD06 CA44
4C076 AA11 AA29 AA53 AA61 BB11 BB15 BB16 BB32 CC21 EE32
EE32H FF16 FF21 FF43 FF61 FF63
4C084 AA19 MA17 MA37 MA38 MA44 MA66 MA67 NA05 NA14 ZC351
ZC352 ZC751 ZC752
4C087 AA01 AA02 BB51 BB52 BB63 CA04 MA02 MA17 MA37 MA38
MA44 MA66 MA67 NA05 NA14 ZC35 ZC75