

(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2018-521084

(P2018-521084A)

(43) 公表日 平成30年8月2日 (2018. 8. 2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/711 (2006. 01)	A 6 1 K 31/711	4 C 0 8 1
A 6 1 K 31/713 (2006. 01)	A 6 1 K 31/713	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/00 (2006. 01)	A 6 1 K 9/00	
A 6 1 K 47/42 (2017. 01)	A 6 1 K 47/42	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-503255 (P2018-503255)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月22日 (2016. 7. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月9日 (2018. 3. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/043762
 (87) 国際公開番号 W02017/019568
 (87) 国際公開日 平成29年2月2日 (2017. 2. 2)
 (31) 優先権主張番号 62/196, 634
 (32) 優先日 平成27年7月24日 (2015. 7. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511033243
 フィブラリン コーポレーション
 F I B R A L I G N C O R P .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 587, ユニオンシティー, アルバラドー
 ナイルズロード 32930, スイート
 350
 (74) 代理人 110001302
 特許業務法人北青山インターナショナル
 (72) 発明者 パウクシュト, マイケル, ヴイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 404, フォスターシティー, ピアリーレ
 ーン 820

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸ベースの治療法の標的送達組成物

(57) 【要約】

遺伝子活性化フィブリル組成物、及び少なくとも1つの対象のポリペプチドをコードすることができる当該組成物の設計、作製、製造、及び／又は形成の方法、工程、装置を本明細書で説明する。対象の少なくとも1つのポリペプチドのレベルを増大させることにより、遺伝子活性化フィブリル組成物を対象者に投与することにより、当該対象者における疾病、疾患、及び／又は症状を治療する方法も開示する。

【選択図】 図5

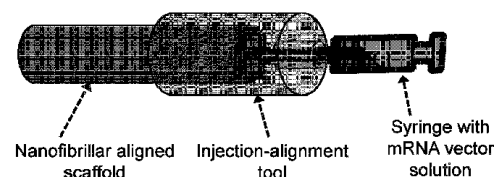


Figure 5.

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 種類の細胞の付着及び配置を可能とする少なくとも 1 つの配向したフィブリル材を具える組成物であって、前記フィブリル材は、前記フィブリル材に付着した細胞の遺伝子発現を調節する核酸ベースの分子を具えることを特徴とする組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記核酸ベースの分子は、前記フィブリル材に付着した細胞の遺伝子導入を可能とする核酸ベクターであることを特徴とする組成物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記フィブリル材は、液晶材料を形成する自己組織化ポリペプチド、フィブリルポリペプチド、フィブリルコラーゲン、フィブリン、フィブロネクチン、ラミニン、シルク、ポリ-L-乳酸、ポリグリコール酸、エラスティン様ポリペプチド、ポリ(炭酸プロピレン)、キトサン、それらの誘導体、又はそれらの組み合わせの群から選択されることを特徴とする組成物。

10

【請求項 4】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記フィブリル材は、調節可能な分解速度を伴う生体適合性及び生分解性材料であることを特徴とする組成物。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記組成物は医療装置を更に具えることを特徴とする組成物。

20

【請求項 6】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記核酸は、pDNA、mRNA、miRNA、mmRNA、siRNA、RNAi、ssRNA、pDNA、dsRNA、アンチセンス、触媒RNA、及びそれらの誘導体の群から選択されることを特徴とする組成物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の組成物であって、核酸は、ポリマーナノ構造のカチオン性領域、又は、前記核酸と静電複合体を形成するカチオン性脂質及び／又はカチオン性ポリマーにより少なくとも部分的にカプセル化されることを特徴とする組成物。

【請求項 8】

請求項 2 に記載の組成物であって、化学的遺伝子導入法は静電相互作用に依存して、核酸を結合し、リン酸カルシウム、ポリカチオン、リボソーム、並びにカチオン性脂質、ポリマー、デンドリマー、ナノ粒子、ポリエチレンイミン、及びポリリジン等の化合物を用いる細胞膜を標的にすることを特徴とする組成物。

30

【請求項 9】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記核酸又は核酸ベースの化合物は、肝細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神経細胞、心細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、膵β細胞、下垂体細胞、滑膜ライニング細胞、卵巣細胞、精巣細胞、繊維芽細胞、B細胞、T細胞、網状赤血球、白血球、顆粒球、及び腫瘍細胞からなる群から選択される細胞の遺伝子発現を調節することを特徴とする組成物。

40

【請求項 10】

請求項 1 に記載の組成物であって、核酸ベースの分子は、アライメントシステムを用いて、注入により前記フィブリル材に担持されることを特徴とする組成物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記フィブリル材は、ポリ(エチレングリコール)、炭水化物、糖タンパク質、グリコサミノグリカン、単糖、多糖、又はそれらの組み合わせを更に具えることを特徴とする組成物。

【請求項 12】

請求項 2 に記載の組成物であって、前記配向したフィブリル材に付着した前記細胞への遺伝子導入は、組織培養用プラスチックに付着した同一の細胞への遺伝子導入よりも少な

50

くとも60%多いことを特徴とする組成物。

【請求項13】

糸状のフィブリルスキャフォールドを形成する組成物であって、前記フィブリルは、前記フィブリルが少なくとも1種類の細胞の付着及び配置を可能とするように、糸の方向に配向され、前記スキャフォールドは、前記フィブリルに付着した前記細胞の遺伝子発現を調節する核酸ベースの分子を具えることを特徴とする組成物。

【請求項14】

請求項13に記載の組成物であって、前記糸状のスキャフォールドは、少なくとも80%が互いにつながった細孔を伴う多孔性を有し、前記スキャフォールドに沿ったキャピラリーフローを可能とし、前記スキャフォールドは少なくとも50ミクロンの直径、及び前記糸の方向に少なくとも20MPaの機械的強度を有することを特徴とする組成物。

【請求項15】

請求項13に記載の組成物であって、前記スキャフォールドは、4週間から1年にわたる、架橋のレベルに応じた調節可能な分解を伴う生体適合性及び生分解性インプラントであることを特徴とする組成物。

【請求項16】

請求項13に記載の組成物であって、前記スキャフォールドは、EDC/sNHSにより架橋された、配向した糸状のコラーゲンスキャフォールドであることを特徴とする組成物。

【請求項17】

棒状のフィブリルマイクロキャリアを形成する組成物であって、前記フィブリルは、前記フィブリルが少なくとも1種類の細胞の付着及び配置を可能とするように、棒の方向に配向され、前記マイクロキャリアは、前記フィブリルに付着した前記細胞の遺伝子発現を調節する核酸ベースの分子を具えることを特徴とする組成物。

【請求項18】

請求項17に記載の組成物であって、前記棒状のマイクロキャリアは、少なくとも80%が互いにつながった細孔を伴う多孔性を有し、前記マイクロキャリアに沿ったキャピラリーフローを可能とし、前記マイクロキャリアは少なくとも10ミクロンの直径、及び前記棒の方向に少なくとも20MPaの機械的強度を有することを特徴とする組成物。

【請求項19】

請求項17に記載の組成物であって、前記マイクロキャリアは、4週間から1年にわたる、架橋のレベルに応じた調節可能な分解を伴う生体適合性及び生分解性インプラントであって、マイクロキャリアの水性の懸濁液が、注入可能な生体適合性及び生分解性スキャフォールドを形成することを特徴とする組成物。

【請求項20】

請求項19に記載の組成物であって、前記マイクロキャリアは、EDC/sNHSにより架橋された、配向した棒状のコラーゲンスキャフォールドであることを特徴とする組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〔関連出願〕

本願は、2015年7月24日に出願され、「核酸ベースの治療法の標的送達の組成物」と題された、米国仮特許出願第62/196,634号の利益及び優先権を主張し、その全体の開示が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、遺伝子活性化フィブリル組成物、及び単一のシステム内で遺伝子治療と組織工学との組み合わせを用いて臨床症状を治療する方法に関する。遺伝子活性化フィブリル組成物、及び少なくとも1つの対象のポリペプチドをコードすることができる当該組成物の設計、作製、製造、及び／又は形成の方法、工程、装置を本明細書で説明する。本発明

10

20

30

40

50

はまた、少なくとも1つの対象のポリペプチドのレベルを増大させることにより、遺伝子活性化フィブリル組成物を対象者に投与することにより、当該対象者における疾病、疾患、及び／又は症状を治療する方法も提供する。

【背景技術】

【0003】

遺伝子物質の特定部位への送達、組織の成長及び維持のためにシグナル及び合図を細胞に空間的及び経時的に導入するため、ナノメートルスケールで制御された組織を有するスキャフォールドへの核酸ベクター（例えば、HGF-mRNA-及びHGF-pDNA）の組み込みは、細胞と細胞外環境との相互作用を強める可能性が大きい。従って、治療用ベクターは、組織構成物の組み込み、及び周辺の組織でその成長及び同化を強化することができる。また、ベクターの送達に用いられるナノフィブリルマトリックス、特にコラーゲンマトリックスは、標的キャリア及びベクター錯化剤だけでなく、組織工学に適用して構造的スキャフォールドとしても機能することができる。単一のシステム内での遺伝子治療と組織工学とのこの組み合わせは、再生医療に関する新たなより包括的なアプローチを可能とする。遺伝子活性化マトリックスを用いる局所的遺伝子送達システムは、これらの2つの戦略を統合し、治療用遺伝子の発現を伴う*in vivo*の局所的バイオリアクターの役割を果たして、構造テンプレートを提供して、細胞外マトリックスの細胞接着、増殖、及び合成に関する病変的な欠陥を補う。

【0004】

核酸ベースの治療法を開発するのに、ほぼ20年間、大きな試みが行われてきた。しかし、この核酸ベースの治療法の臨床応用は、低効率、オフターゲット効果、毒性、及び非効率的な送達により妨げされてきた。これらの制限は、ここで提案される標的型送達システム、及び修飾mRNA（mmRNA）ベクターの高い導入効率に劣っていた。提案される組成物の導入効率を上げる更なる要因は、ベクターの細胞内への侵入を促進する送達マトリックスの能力であろう。従って、配向したフィブリル基質は、固体の状態で遺伝子導入することができる。

【0005】

核酸は、一般的に細胞膜を透過しないように負電荷を帯びた分子である[Akhtar, et al., Adv. Drug Delivery Rev. 2007, 59, (2-3), 164-182]。ネイキッド核酸とアニオン性細胞膜表面との間の静電反発力は、エンドサイトーシスを防ぎ得る[Akhtar, et al., Adv. Drug Delivery Rev. 2007, 59, (2-3), 164-182]。従って、選択性送達システムは、核酸の効率的輸送、及び標的細胞内でのそれらの放出に必要である。最もよく用いられる遺伝子送達システムは、生物学的（ウィルス性）及び非生物学的（非ウィルス性）システムに分類することができる。

【0006】

生物学的キャリア及びウィルスは、核酸導入において効率性を有し、それを提供するが、製造が困難で、毒性である[Thomas, et al., Nat. Rev. Genet. 2003, 4, (5), 346-358]。これらの制限は、核酸送達に対する非生物学的システム開発の優先度が高いままであることを意味する。非ウィルス性送達システムは、静電的相互作用により負電荷を帯びた核酸と相互作用する、ペプチド、脂質（リポソーム）、デンドリマー、及び正電荷を帯びた直鎖又は分岐状ポリマー[Duncan, et al., Adv. Polym. Sci. 2006, 192, (Polymer Therapeutics I), 1-8]を含む[El-Aneed, J. Controlled Release, 2004, 94, (1), 1-14]。非生物学的送達システムの中で、デンドリマーは、明確に定められた構造、サイズ、安定性、及び生体適合性を有するという利点がある[Duncan, et al., Adv. Drug Delivery Rev. 2005, 57 (15), 2215-2237]。しかし、多段階の合成、その合成の各段階で時間や労力を要する精製、そして結果的にデンドリマー作製の高コスト化が、その適用を制限している。先行技術の医療用ポリマー合成方法は、段階成

長縮重合プロトコルに依存し、そのプロトコルは、高い多分散性、自由機能性、トポロジー、及び組成を有する不明確なポリマーをもたらし得、核酸送達にふさわしくない。

【0007】

従って、容易に製造され、そして、様々な臨床症状を治療するのに、核酸を標的生物学的位置に効率的に送達するのに用いることができる核酸送達システムが必要である。可能な解決法は、コラーゲンフィブリルのキャリア／スキャフォールドを用いた固体状態での遺伝子導入であり、そこでは正電荷を帯びたコラーゲンフィブリルが、スキャフォールドの表面に組み込まれた負電荷を帯びた核酸を補う。

【発明の概要】

【0008】

本発明の実施例は、遺伝子活性化フィブリル組成物、及び単一のシステム内で遺伝子治療と組織工学との組み合わせを用いて臨床症状を治療する方法を提供する。遺伝子活性化フィブリル組成物、及び少なくとも1つの対象のポリペプチドをコードすることができる当該組成物の設計、作製、製造、及び／又は形成の方法、工程、装置を本明細書で説明する。

【0009】

本発明の実施例はまた、少なくとも1つの対象のポリペプチドのレベルを増大させることにより、遺伝子活性化フィブリル組成物を対象者に投与することにより、当該対象者における疾病、疾患、及び／又は症状を治療する方法も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を形成する添付図面は、本発明を図示し、更に、明細書の記載と共に本発明の原理を説明し、当業者が本発明を実施及び使用できるようにする。本発明の実施例は、以下の添付図面を参照して、一例としてのみ説明される。

【0011】

【図1】図1は、配向したコラーゲンフィブリルの複数の超薄膜層間にカプセル化されたHGFプラスミドを示す図である。

【0012】

【図2】図2は、核酸が層間に局在化する多層構成物を形成するステップを示す図である。

【0013】

【図3】図3は、核酸が層間に局在化する多層構成物を形成する代替ステップを示す図である。

【0014】

【図4】図4A及び4Bは、それぞれHGFベクターを担持したスキャフォールドの設計及び適用の概略図である。

【0015】

【図5】図5は、アラインメントシステムを用いてスキャフォールドにベクターを搭載する方法の概略図である。

【0016】

【図6】図6A～6Eは、糸状のコラーゲンスキャフォールド（「BioBridge」ともいう）及び特性を示す写真である。

【0017】

【図7】図7Aは糸状のコラーゲンスキャフォールドの断面画像であって、図7Bは2つのレベルのスキャフォールド架橋に対する結果を示すグラフである。

【0018】

【図8】図8A～8Cは、糸状コラーゲンスキャフォールドの様々なキャピラリティの特性を示す。

【0019】

【図9】図9A及び9Bは、異なる架橋値でのBioBridgeのキャピラリティを示

10

20

30

40

50

す。

【0020】

【図10】図10は、湿潤状態のBioBridgeスキファールドの力 - 変位曲線を示すグラフである。

【0021】

【図11】図11A及び11Bは、コラゲナーゼによるBioBridgeの分解を示すグラフである。

【0022】

【図12】図12A及び12Bは、異なるレベルのEDC架橋での糸状のコラーゲンスキファールドからのpDNAの放出、及び凍結乾燥した非架橋の糸状のコラーゲンスキファールドからのpDNAの放出を示すグラフである。

10

【0023】

【図13】図13A及び13Bは、様々な実施例に関する導入効率を示す。

【0024】

【図14】図14は、細胞遊走アッセイの作製のステップを示す概略図である。

【0025】

【図15】図15は、リンパ節切除及び放射線治療を含む癌手術後の乳癌関連リンパ浮腫の予防の実施例に係る、BioBridge又は他のスキファールドの使用を示す概略図である。

【0026】

20

【図16】図16A及び16Bは、配向したコラーゲンスキファールドの表面及び培養組織用プラスチックに、HGF-mRNAが導入されたヒトの繊維芽細胞の写真である。

【0027】

【図17】図17A及び17Bは、マイクロキャリアの断面、及び注入可能なマイクロキャリアを有するシリンジを示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

近年、薬理学的及び再生使用のmRNAをベースとした技術の適用が検討されている。mRNAをベースとした治療の既存及び提案の方法には、ガン免疫療法、律速又は欠陥内因性タンパク質が補足又は置換される転写置換療法、再生医療、及びゲノム編集が含まれている。再生医療におけるmRNAの有用な方法の範囲において、mRNAをベースとした技術を用いて、体細胞（例えば、繊維芽細胞）の胚様細胞（iPSCs）への良好なリプログラミングが実証されている。更に、mRNA、修飾されたmRNA（mmRNA）のより安定的で、翻訳可能で、免疫原性が低いアナログが開発され、治療用タンパク質を送達する際に、mmRNAの重要な臨床的可能性を示す機能タンパク質に翻訳される能力を発揮した。遺伝子導入及び発現に関して、DNAに対するmRNAの有利な点は、導入効率が高いこと、核局在化又は転写の必要がないこと、送達される配列のゲノムの組み込みの可能性が格段に小さいことである。

30

【0029】

スキファールドを介した遺伝子送達は、遺伝子導入に対して重要な有利な点をもたらす。それは、移植部位の周辺細胞により主に取り込まれる治療用遺伝子の局所的送達、及び、持続した遺伝子導入を可能とするような、スキファールド材の分解速度により制御される放出速度によるスキファールドからの段階的なベクター放出を含む。スキファールドの別の有利な点は、ベクター保護における役割であり、それは、マトリックスに組み込まれるときにin vivoで除去又は分解されにくくなるためである。スキファールドはまた、in situでの細胞のリクルートメントの生物活性剤、及び再生のプラットフォームとしても機能することができ、組織形成を開始できるテンプレート構造をもたらす。移植可能なポリマースキファールドは、スキファールド及びそのごく周りを含む3次元（3D）空間を画定し、細胞を移動させスキファールドに付着させて、ベクターをその空間内の細胞に送達する。送達部位の、スキファールドが放出されたベク

40

50

ターが導入された細胞は、局所的に作用して全身的に分布されるタンパク質生成物を分泌する。これに関連して、含浸ベクターを有するスキャフォールドは、必要であれば部位から除去できるため、標的型送達は少なくとも部分的に可逆的である。スキャフォールドは多層構造物として構成できるため、複数のベクターを所望の順番で送達することもできる。更に、スキャフォールドは、例えば、活性化T細胞又は特定の癌細胞等、1種類の細胞のみがスキャフォールドに結合できるよう、特定の細胞のリガンドを表面のみに有してもよい。従って、選択された種類の細胞のみを導入の対象としてもよい。

【0030】

生来の状態に似せることがスキャフォールドの設計における主な原理であり、スキャフォールドで用いられる天然素材は、分解の間、*in vivo*の毒性が低く、移植について免疫反応が低く、適切な（細胞特異性の）細胞接着をもたらす。ECMの不可欠な要素であり、身体における主要な構造タンパク質であるコラーゲンは、組織工学で最も幅広く用いられる天然素材であり、創傷被覆、縫合、止血剤、代用皮膚、骨代用材、及び血管再生に用いられる。テロペプチドはコラーゲンの主要な抗原領域であるため、コラーゲンは、テロペプチド領域が除去された免疫原性が低いものを用いることが好ましい。この種のコラーゲン（アテロコラーゲン）をこの適用で用いることができる。コラーゲンベースの材料は、数時間から数か月の期間でプラスミドDNAの放出を行った。例えば、筋肉内に投与されるコラーゲンミニペレットに組み込まれるDNAにより誘発される全身作用は、直接的なDNA注入よりもかなり長かった。非ウィルス性又はウィルス性DNAのコラーゲンベースの送達は、骨、軟骨組織、神経再生のモデル、つまり創傷治癒及び筋肉修復に採用されている。これらすべての適用も、ここで対象とする。

【0031】

3D空間全体のベクターの分布、及び3次元構造での導入は、2D導入と比べて、遺伝子発現レベルを増大及び長くし得る。更に、ナノファイバ基材の異方性は、これらの基材では細長い細胞形態と相関しており、レンチウィルス導入により、リプログラミングの効率を上げる[Downing, et al., Nature Materials 2, 1154-1162 (2013)]。従って、フィブリルに沿った細胞の配置を誘導する、異方性3D構造を有するコラーゲンナノフィブリルスキャフォールドは、遺伝子送達にとって良好な候補である。多くの刊行物において、ナノフィブリルコラーゲンスキャフォールドが、内皮細胞形態及び*in vitro*での増殖をサポートし、*in vivo*での細胞生存を高めることが実証されている。ナノフィブリルスキャフォールドは、天然ECMが成長因子を保存及び放出するのと同様、pDNA、mRNA、及び他の生理活性分子の「貯蔵所(depot)」として機能することができる。更に、スキャフォールドは、例えば、血管再生の仮のマトリックスを提供する。更に、近年のデータは、ナノファイバスキャフォールドが繊維症関連の遺伝子の発現を現象させることを実証した。1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC)によりコラーゲン zero-length 架橋するという確立したストラテジーを、スキャフォールド製造で用いる。EDCアプローチは、スキャフォールドに添加材を加えず、スキャフォールドの物理的強度を変えず、EDC架橋度を変えることにより、スキャフォールドの酵素分解を制御する手段を提供する。

【0032】

定義 ここでは、我々は、交換可能な「フィブリル」及び「繊維」を用いる。我々は、「核酸」という語が「核酸アナログ」を含むと仮定する。装置の例は、軟組織修復装置、人工弁、ペースメーカー、パルス発生器、除細動器、動静脈シャント、及びステントを含む。例えば、スクリュー、アンカー、プレート、ステーブル、タック、ジョイント、及び同様の装置等を含む医療装置の他の例が整形外科で用いられる。これらの植え込み型医療装置は、例えば、メタル、プラスチック、及び様々なポリマー材料を含む幅広い材料から作られる。他の矯正装置は、軟組織インプラント、臀部、肩、肘、及び膝の置換及び手術、又は頭蓋顎顔面再構築用のインプラント、及びインプラントコーティング等のインプラン

10

20

30

40

50

トを含み、関節鏡検査及び腹腔鏡検査の処置で用いられる装置も含む。医療装置の他の例は、眼内レンズ及び緑内障シャントを含む、インプラント等の視覚装置を含む。更に他の装置は、胃腸内埋め込み装置を含む。本発明の様々な実施形態の更なる詳細な説明を、以下の非限定的実施例で行う。

【0033】

実施例 1 架橋用の 2 つの EDC / s NHS の濃度 (1.0 x : 1 mg / ml EDC 及び 1.1 mg / ml s NHS、及び 0.2 x : 0.2 mg / ml EDC 及び 0.2 mg / ml s NHS) を、配向したナノフィブリルコラーゲンスキャフォールドの架橋に用いることができる。1.0 x 及び 0.2 x の架橋スキャフォールドは同様の引っ張り強さを示すが、実質的には異なる分解速度を示す。架橋スキャフォールドは、生体適合性に関して (例えば、BioBridge コラーゲンマトリックス、510 K デバイス K151083)、後肢虚血モデルで動脈形成を促すことに関して (Nakayama KH, Hong G, Lee JC, Patel J, Edwards B, Zaitseva TS, Paukshto MV, Dai H, Cooke JP, WOO YJ, Huang NF. Aligned-Braided Nanofibrillar Scaffold with Endothelial Cells Enhances Arteriogenesis. ACS Nano. 9 (7): 6900-8. 2015)、良好に試験が行われた。ヒト EC は、パターン化されていないスキャフォールドよりも、配向したスキャフォールドからの増殖が多いことを示した。インテグリン $\alpha 1$ の抑制により効果が阻害されたため、インテグリン $\alpha 1$ は、配向したナノフィブリルスキャフォールドで細胞増殖が増強したことに部分的に関与する。in vivo での新たな血管形成の改善において、EC 播種の配向したナノフィブリルスキャフォールドの効力を試験するため、EC 播種の配向したナノフィブリルスキャフォールド、EC 播種のパターン化されていないスキャフォールド、生理食塩水中の EC、配向したナノフィブリルスキャフォールドのみ、のいずれかでマウスの虚血肢を治療する、或いは治療なしとした。14 日後、レーザドップラー血液分光法は、生理食塩水中の EC での治療又は治療なしと比べて、スキャフォールドのみで治療、及び EC 播種の配向したナノフィブリルスキャフォールドでの治療では血液還流の回復が大幅に向上したことを実証した。人工多能性幹細胞 (iPSC-ECs) 由来のヒト EC で播種されたスキャフォールドで虚血肢を治療した実験では、全身注入の単層カーボンナノチューブ蛍光を採用し、28 日後に近赤外線 I I (NIR-II, 1000 ~ 1700 nm) 撮像を用いて小動脈を視覚化及び数値化した。NIR-II 撮像は、iPSC-EC 播種の配向したスキャフォールド群が、生理食塩水又は細胞群よりも微小血管密度がかなり高かったことを実証した。これらのデータは、細胞のみ又はスキャフォールドのみと比べて、配向したナノフィブリルスキャフォールドで送達された EC からなる「デュアル」治療が、血液還流や動脈形成を高め、治療用細胞の送達ストラテジーの設計に重要な影響を与えることを示唆する。従って、ナノフィブリルの配向したスキャフォールドでの虚血肢の治療は、血液還流を高めることを実証し、mmRNA-HGF の使用は、この効果を更に高めることとなる。

【0034】

実施例 2 血管新生に関する症状の治療及び／又は予防における、HGF プラスミド DNA の導入効率を高める方法を提案する。HGF プラスミドは、配向したコラーゲンフィブリルの複数の超薄膜層間にカプセル化されることとなる。図 1 を参照。各層の厚さ及び分解を、それぞれ積層 (層の厚さ) 及び架橋により制御することができる。50 mg / ml の濃縮ブタアテロコラーゲンタイプ I の溶液から精密なスロット色素コーターで製造される、配向したコラーゲン層の典型的な厚さは、100 nm から 2 ミクロンの範囲で制御できる。プラスミド (HGF mRNA) の懸濁液又は溶液は、Sono-Tek 社の精密噴射システムにより、コラーゲン層に均等に噴射されることとなる。複数の層の真空アタッチメントは、自発的なコラーゲン対コラーゲンの架橋をもたらし、それによりプラスミドをカプセル化する。コラーゲン層の厚さ (ナノメータからミクロンの範囲)、及びその積層前の架橋が、コラーゲン分解の速度、よってプラスミド又は RNA の放出を制御す

ることとなる。核酸が複数の層間で局所化された多層構造物を形成する他の方法は、図 2 及び図 3 で示す。

【0035】

フィブリル材、例えばコラーゲンは、UV 感受性マルチアーム PEG と低濃度で混合でき、蒸発により濃縮されて、液晶状態に到達する。我々は、以下のことを発見した。

1. 一般的に PEG、特にマルチアーム PEG は、液晶状態に影響を及ぼさない。従って、全ての異なるパターン、特に、皮膚様パターン (skin-like)、配向的パターン (aligned)、配向的で織り込まれたパターン (aligned-braided) (米国特許 8,492,332 B2、8,227,574 B2、及び 8,513,382 B2 を参照) は、フィブリルコラーゲンを含む液晶材料から作ることができる。

2. 材料堆積及びパターン形成の後、UV (例えば、マルチアーム PEG の反応基次第で、250 nm) により、膜を乾燥状態で架橋することができる。

【0036】

コラーゲン/PEG をポリエチレンテレフタレート (PET) 基材に堆積する場合、この層は PET 基材に架橋されることとなる。

【0037】

UV 架橋結合の間に UV マスクを用いる場合、架橋結合されていない水溶性コラーゲンを、(pH が 2~6 の範囲の) 水のすすぎにより除去することができる。

【0038】

パターン化した多層スタックを形成するため、堆積及び架橋の工程を繰り返すことができる。異なる核酸設計物を、架橋前に、層の間に堆積することができる。

【0039】

コラーゲン/PEG を、例えばガラス基材などの UV により架橋されない基材に塗布することができる。それから、各層を、架橋後に剥離することができる。或いは、多層スタックを形成するために、コラーゲン/PEG 層を架橋前に剥離することができる。図 2 及び図 3 を参照。ここで Q-ガラスは、250 nm の UV 照射を透過する石英ガラスプレートである。「Col. + 0.4 PEG」は、0.4 重量%の PEG と混合される分子コラーゲンを意味する。「基材上の 0.25 EDC」は、堆積した膜が基材 (例えば、PET 基材) に付着する間の特定の EDC 架橋を意味する。EDC 架橋の後、コラーゲンを基材から剥離することができる (EDC は、コラーゲンと PET との間の架橋をもたらさない)。「M-PEG」は、UV により乾燥状態で架橋することができるマルチアーム PEG を意味する。

【0040】

酸性 pH の分子アテロコラーゲンの液晶状態を変えない更なる材料は、EDC/NHS である。コラーゲン/EDC/NHS を堆積して nanoweave 構造を形成した後、pH を (例えば、アンモニア蒸気に) 変えることにより、膜を架橋することができる。

【0041】

配向したナノフィブリルコラーゲンスキャフォールドは、細胞の伸長及び移動を誘導して、移植後にスキャフォールドを定着させることとなる。このようにして、我々は、本来の生理環境に似せることができる。更に、我々は、適切な核酸を細胞に送達して、所望の成果、例えば再生を促進する。これが、コラーゲン架橋により見出された長期にわたる (4~6 週間から数か月) 局所持続細胞発現の方法である。

【0042】

実施例 3 HGF ベクターを担持したスキャフォールドの設計の図 4 A 及び適用の図 4 B の概要。配向したコラーゲンの存在下で、繊維芽細胞、虚血領域にある又は引き付けられる局所的内皮細胞及び内皮前駆細胞は、スキャフォールドに付着し、HGF を産生し、毛細血管の形成を促すことができる。

【0043】

ベクターをスキャフォールドに担持する方法は、図 5 に概略的に示されるアライメントシステムを用いる。糸状の多孔スキャフォールドを透明な管に挿入し、そこでクランプに

10

20

30

40

50

より保持する。第2の小さい透明の管と最初の管とが並べられ、シリンジを第2の管に挿入する。このようにして、ベクターの溶液を、多孔性及び毛管現象を用いてスキャフォールドに正確に送達することができる。色素をベクター溶液（例えば、メチレンブルー）に添加すると、担持方法が簡単になる。凍結乾燥は、核酸がスキャフォールド表面に付着するのをより安定させる。単糖又は多糖をベクター溶液に添加すると、低温（ -2°C 以下）及び高真空（ 50 mPa 以下）の凍結乾燥の間、核酸を保護する。提案した方法は、無菌状態及び手術室の環境の両方での使用に適している。

【0044】

実施例 4 我々は、米国特許第8,492,332 B2号、第8,227,574 B2号、及び第8,513,382 B2号に開示された方法に係る、フィブリルコラーゲンからなるBioBridgeスキャフォールドを製造した。

10

【0045】

BioBridgeの特徴。本実施例で用いられる糸状のコラーゲンスキャフォールド（BioBridge）の基本的特徴を図6に示す。BioBridgeは、折り畳まれた超薄のコラーゲンリボンから形成され、リボンを形成する全ての薄いコラーゲンフィブリルが、スキャフォールドの方向に沿って配向されるようにする。

【0046】

BioBridgeスキャフォールドの多孔性。BioBridgeスキャフォールドの断面画像を、高解像度の反射顕微鏡により撮影した。典型的な画像を図7Aに示す。黒画素と断面の総面積との比をとることによる多孔率の値の標準ビットマップフィルタによって、画像を解析した。スキャフォールドの架橋の2つのレベル、 $1.0\times$ 及び $0.2\times$ について、結果を図7Bに示す。平均多孔性は、標準偏差を低く抑えて約85%である。

20

【0047】

BioBridgeスキャフォールドのキャピラリティ。スキャフォールドのキャピラリティは、水平位置で二重スコッチテープに付着したBioBridgeの13mm長の断片について測定した。図8A及び8Bを参照。約0.1mLの緑色の食品着色料の色素を各BioBridge端部に担持させるのに、シリンジ及び25Gの針を用いた。2分及び4分の時点を採用し、色素がそれぞれの断片に対してどれくらい遠く移動するか分析した。緑色の色素の管内伝搬を、乾燥コラーゲンの最初の白色をベースラインとする緑色の流れで測定した。BioBridgeの断片の全距離に対する色素の伝搬距離の割合を、それぞれの実験について図9に示す。結果、標準偏差を低く抑えたBioBridgeの高いキャピラリティが示された。 $0.2\times$ 架橋のBioBridgeは、 $1.0\times$ 架橋のBioBridgeより若干高いキャピラリティを示し、それは多孔性測定と一致する。BioBridgeの13mmの断片を通した常圧での色素伝搬は約4分かかる。

30

【0048】

BioBridgeデバイスは、薬物担持に適した高多孔性（約85%）を有する。孔は互いにつながり、デバイスに沿ったキャピラリーフローを可能とする。BioBridgeの多孔構造（図6）は、HGFプラスミド（HGF-pDNA）をスキャフォールドに担持させるのに用いることができるキャピラリーの特性を具える。

【0049】

pDNA担持を最適にするために、我々は、直径100nm及び $1\mu\text{m}$ の蛍光性スフェアをモデルとして用いた。実際のプラスミドサイズは、2つの直径の間のどこかである。蛍光性ナノスフェア、及びミクロスフェアの溶液を 0.1 mg/ml の濃度で準備し、スフェアをキャピラリーフローによりスキャフォールドに担持させた。担持時間は、両方のタイプの粒子で同一であった。蛍光顕微鏡Leitz DM IRBにより粒子の存在が観測された（図8C）。

40

【0050】

BioBridgeの機械的特性。BioBridgeスキャフォールドは、縦に崩れて糸状の構造を形成する、1ミクロン（ $1\times 10^{-6}\text{ m}$ ）の厚さの膜から作られる。全てのBioBridgeスキャフォールドの断面積は、 $2.54\times 10^{-8}\text{ m}^2$ に等しい。

50

以下の式に従って、応力を計算する。

応力 (MPa) = $10^{-6} \times$ 力 (N) / 面積 (m^2)

BioBridgeの機械測定を、目盛引張試験機により湿潤状態で行った。典型的な応力-変位曲線を図10に示す。従って、典型的な引っ張り強度は100 g Fより大きいいため、最大応力は30 MPa以上である。

【0051】

BioBridgeの酵素分解。ニンヒドリン反応性を用いて水溶性タンパク質を測定することにより、コラゲナーゼにおけるコラーゲンスキャフォールドの分解を分析した [Starcher B. A ninhydrin-based assay to quantify the total protein content of tissue samples. Anal Biochem 292: pp. 125-129. (2001)]。各サンプルに対して、1 cmのスキャフォールドのセグメントを微量遠心機の管に配置した。サンプルを、100又は50 U/mL バクテリアコラゲナーゼ (*Clostridium histolyticum*, Calbiochem) を含む、0.1 M Tris-base、0.25 M CaCl₂ (pH 7.4) の200 μ Lに、37°Cで培養した。培養後、サンプルを15,000 RCFで10分間遠心分離し、上澄みを熱湯で、2%のニンヒドリン試薬 (Sigma) と10分間反応させた。それから、光学濃度 (OD) を、分光光度計 (SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) において570 nmで測定し、得られた光学濃度からバックグラウンド (コラゲナーゼのみの制御) の値を差し引くことにより、相対ODを測定した。最終的なデータは、材料のmg当たりの相対ODとして示される。

【0052】

BioBridge 1.0xは、移植後の3カ月で分解されることが仕様で示されている腸線縫合糸 (図11A) よりも迅速にコラゲナーゼにより分解されたことを、我々のデータは示した。BioBridgeの分解は、架橋に用いられるEDC濃度の機能であり (図11B)、BioBridge 0.2xは、1.0xよりも迅速にコラゲナーゼにより分解されたことを、我々のデータは実証した。

【0053】

pDNAを添加したスキャフォールドの作製。毛管力によりスキャフォールドに担持されるDNAの量を図るため、我々はまず、上記の0.2x 多孔性のスキャフォールドを用いて、スキャフォールドをpCMV6-AC-GFPプラスミドの溶液に培養することによりプラスミドを取り込んだ。スキャフォールドのサンプル (5 mm長) を、(反応において、1~0.025 μ g/ μ l 濃度、4~40 μ gの総DNA量で) プラスミド溶液の40 μ lのアリコートに1時間室温で培養し、それからpDNA溶液を除去し、架橋溶液 (pH 6.0のPBSで、EDC 1 mg/ml、及びsNHS 1.1 mg/ml) の500 μ lと30分間交換した。pDNAスキャフォールドを、PBSで30分間、4回すすいだ。

【0054】

反応においてpDNAの量を4~40 μ gに増加したが、スキャフォールドに留まるDNAの量は大きく増加しなかった。反応に導入されるDNA量の5%を構成する4 μ gのDNAで培養した後、相当量のDNA (208 ngまで) がスキャフォールドに留まっていることを、我々のパイロットデータは示した。反応混合液中のDNA量の増加に伴い、留まったDNA量は増加したが、スキャフォールド中に留まったDNAの量は比例して増加することはなかった。反応に添加した40 μ gのDNAのうち、295 ng (0.7%) が留まっていた。我々のスキャフォールドは、 mm^3 のスキャフォールド量あたり566 ngまで留まることができ、これは、同様のアプローチに対して文献に報告されたデータに基づいた、 mm^3 のスキャフォールド量に正規化した場合にコラーゲンスキャフォールドにより留まったpDNAの量 (70 ng) よりも多い。従って、我々は、反応で4 μ gの総pDNA量を用いて進めた。

【0055】

我々は、(1) 反応で EDC/sNHS の減少した濃度と、(2) EDC 架橋の代わりに、pDNA を担持したスキャフォールドの凍結乾燥とを用いたため、スキャフォールドの pDNA 残留及び放出能については、担持後の工程の修飾で更に検討する。全てのスキャフォールドサンプル (5mm 長) を、(0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 濃度の) プラスミド溶液の 40 μl アリコート中に 1 時間室温で培養し、それから DNA 溶液を除去した。架橋溶液の 500 μl (pH 6.0 の PBS で、EDC 1 mg/ml 及び sNHS 1.1 mg/ml (1.0x)、又は EDC 0.2 mg/ml 及び sNHS 0.22 mg/ml (0.2x)) と 30 分間交換した。pDNA-スキャフォールドを、PBS で 30 分間、4 回すすいだ。代替的に、pDNA 担持後、スキャフォールドのサンプルを冷凍し、凍結乾燥した (Lyo)。

10

【0056】

スキャフォールドへの pDNA 導入の評価。スキャフォールドに保持された DNA 量を評価するため、上記のように作製された pDNA スキャフォールドを、50 μl のアリコートプロテナーセ K 溶液 (Roche) において、18 時間 54 $^{\circ}\text{C}$ で消化処理を行った。消化サンプル中の DNA の中身はアリコートで、製造業者の指示に従って、PicoGreen 試薬 (Quant-iT (商標) PicoGreen (登録商標) dsDNA Assay Kit, Life Technologies, NY) を用いた。蛍光プレートリーダー Analyst HD&AT (LJL Biosystems Inc.) により、蛍光強度を測定した。EDC 濃度の減少により、スキャフォールドに留まる pDNA の量は実質的には変わらなかったものの、凍結乾燥により pDNA の保持量が増加した (図 12A) ことを我々は発見した。

20

【0057】

pDNA 放出の分析。スキャフォールドからの pDNA の放出を評価するため、pDNA スキャフォールドを 40 μl の TE バッファアリコートで培養し、アリコートを特定の間隔ごとに回収し、新鮮なアリコートと交換した。回収したサンプルにおける DNA の中身を、上述の PicoGreen 試薬を用いて評価した。図 12B に示すように、pDNA スキャフォールドは、11 日間、少量の DNA を TE バッファに安定的に放出する。11 日間の培養を通して放出された DNA の総量は、「EDC 1.0」スキャフォールドに取り込まれた pDNA (61 ng) のうち 5.9 ng 又は 9.7%、又は「EDC 0.2」スキャフォールドに取り込まれた pDNA (70 ng) のうち 5.8 ng 又は 8.3%、及び「Lyo」スキャフォールドに取り込まれた pDNA (112 ng) のうち 11.5 ng 又は 10.3% だった。これらのデータをもとに、導入実験用にスキャフォールドを担持するのに凍結乾燥を採用できることを、我々は結論づけた。

30

【0058】

プラスミド導入効率の最適性。pDNA を担持する混合液の最適な組成を判断するため、我々はまず、pCMV6-AC-GFP プラスミドに対する最適な導入剤を特定した。我々は、(1) プラスミド製造業者の標準プロトコルに従った、TurboFectin 8.0 (OriGene)、及び (2) プラスミド製造業者により推奨された代替の導入剤 (Viromer) を用いた。最初に試験した 2 つのバージョンの Viromer (Red 及び Yellow) のうち、Viromer Red がより高い導入効率となり、製造業者 (Lipocalyx) による標準的及び直接的錯体生成の導入プロトコルの両方を用いる更なる最適化にそれを用いた。ヒト包皮の繊維芽細胞は、96 ウェル組織培養用プレート上に 10% の FBS が添加された DMEM で成長し、60~80% のコンフルエントに達した。プラスミド DNA を、抗生物質なしで無血清の培養液に希釈し、静かに混合し、導入剤と合わせ、15~45 分間室温で培養し、細胞培養液に添加した。細胞を、24~48 時間後に開始する過剰発現の効果に対する試験の前に、5% の CO_2 培養器に 37 $^{\circ}\text{C}$ で維持した。蛍光顕微鏡 (Leica DMIRB) により、GFP 遺伝発現を定期的に監視した。最適化工程を何度か繰り返しても、TurboFectin を用いた導入は、低画分の GFP 発現細胞をもたらすのみであった。Viromer Red の標準プロトコルでの導入は、GFP 発現細胞がより多く、直接的錯体形成プロトコルでの導

40

50

入は、GFP発現細胞が最も多かった。

【0059】

GFP mRNA mRNAは効率的な導入をもたらすため、最終生産物でpDNAベクターの効率的な代替物であろうと我々は考え、研究において、導入にGFP mRNA (RNAcore, Houston Methodist Research Institute, TX)を使用する可能性を検討し、pDNAとの比較で導入効率の評価を進めた。

【0060】

pDNA及びmRNA導入効率の評価。(1) pDNA導入：我々は、最適化実験で最も高い導入効率を示した(上述の)導入試薬Viromer Redでの直接的錯体形成プロトコルを用いて、pCMV6-AC-GFPを伴う導入の研究を継続した。ヒト包皮の繊維芽細胞は、96ウェル組織培養用プレート上に10%のFBS添加されたDMEMで成長し、60~80%のコンフルエントに達した。プラスミドDNAを、抗生物質なしで無血清の媒体に薄め、静かに混合し、導入剤と合わせ、15~45分間室温で培養した。(2) mRNA導入：我々は、製造業者より推奨された導入試薬、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Cat #13778-075)、及びViromed Red (pDNA導入で説明したものと同様、直接的錯体形成プロトコルに従う)を用いた。

【0061】

リポフェクタミン導入プロトコル。我々は、製造業者により提案されたプロトコルの基本的ステップに従い、6ウェルプレートフォーマットから96ウェルフォーマットに調節した。リポフェクタミン(1.6又は2.4 µl)をOMEM(12又は17.6 µl)で希釈し、mRNA(50 ng/µlの1.3又は2 µl)に添加し、OMEM(12又は18.4 µl)で希釈した。リポフェクタミン/mRNAの混合液を、室温で15分間培養し(この時点で、成長培地をOMEMと交換した)、それから液滴をそれぞれウェルに、ウェル毎に3.4又は5 µl、を添加し、ウェル毎に8.3又は12.5 ngのmRNAが導入された。4時間の培養後、OMEMを除去し、DMEM/10%のFBSと交換した。

【0062】

Viromer Redの直接的錯体形成プロトコル 使用するmRNA溶液(50 µl)を、15 ng/µlで作製した。ストックViromer溶液(0.3 µl)を管に配置し、mRNA溶液を、Viromerが入った管に直接添加し、静かに混合し、室温で15分培養した。この時点で、成長培地を新たにした。導入混合液は、それぞれのウェルに、ウェル毎に6.7 µlの液滴が添加された細胞に使用され、ウェル毎に100 ngのmRNAが導入された。更なる最適化は、5 ng/µlの使用液を用いる、又は15 ng/µlの使用液で調整した導入混合液の2 µlを添加することにより、反応中のmRNA量を低減させることを含む。細胞を5%のCO₂培養器に37℃で維持し、蛍光顕微鏡(Leica DMIRB)により定期的にGFP遺伝子発現を監視した。

【0063】

導入効率の評価。導入後の24時間で、GFP発現を、生きた培養菌の蛍光顕微鏡法により評価した。代表画像を撮った後で、細胞を2%のパラホルムアルデヒドで固定し、細胞核の定量化のため、Hoechst(1:10000)で着色した。各ウェルに対して、3~4の整合画像をGFP及び核に対して撮った。Amscopeソフトウェアを用いて画像毎の核の数を計算し、画像上に重ねられたグリッドを用いてGFP陽性細胞の数を手動で数えた。(GFP陽性細胞の数/核の数) x 100として、導入効率を計算した。蛍光プレートリーダーでGFP蛍光強度を測定することにより、GFP発現のレベルを更に評価した。

【0064】

mRNAとpDNAとの導入効率の比較は、用いられた条件に対して、mRNAが繊維芽細胞を導入する上でより効率的だったことを示した(図13A)。更に、我々は、mR

10

20

30

40

50

NA導入の条件範囲を拡大し（図13B）、用いられた全てのバリエーションに対して、Viromer Red導入剤がリポフェクタミンよりも高い導入効率をもたらしたことを実証した。我々の最初のプロトコルは製造業者の推奨に基づいているため、ウェルに導入したmRNAの量は、Viromerとリポフェクタミンプロトコルとで異なることに注意されたい。

【0065】

3D細胞遊走アッセイ 細胞遊走アッセイを開発し、細胞遊走に対する成長因子放出の効果を試験した。このアッセイの概略図を図14に示す。

【0066】

適用 細胞分化を含む局所細胞反応を調節する、標的型遺伝子送達のパターン化した遺伝子活性化スキャフォールドによる、リンパ浮腫、緑内障、ケロイド及び他の傷跡、角膜矯正、歯の疾患の治療の手段とするのに上記方法を用いることができる。不通のリンパ管を形成してリンパ系を再接続できる、BioBridge又はその他のスキャフォールドの使用を図15に示す。ガン細胞の成長を防ぐ遺伝子材料、例えば、siRNAを添加してもよい。この方法は、リンパ浮腫の形成を予防でき、癌手術中又はそのすぐ後に用いることができる。

【0067】

実施例5 HGF mRNAとともに導入され、a-hHGF（赤）及びHoechst（青）で着色されたヒト繊維芽細胞を図16に示す。Aでは、組織培養用プラスチックに細胞を播種し、Bでは、配向したコラーゲンスキャフォールド（プラスチック上に配向したクリンプのコーティング）に細胞を播種した。TERT mRNAを担持したスキャフォールドのヒトT細胞のin vitroでの導入は、潜在的な増殖能を高め、ひいては、T細胞治療の全体的な有効性を大いに高めることができる。

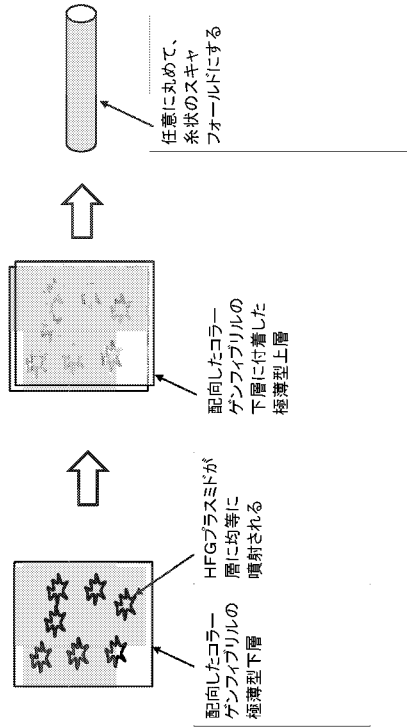
【0068】

実施例6 細胞/mRNA送達に対するマイクロキャリアプラットフォーム。50〜300ミクロンの直径を有する注入可能なnanoweave微粒子を、単一のBioBridgeスキャフォールドからの切り取りにより作ることができる。例えば、そのような微粒子を、実施例4で述べた配向した糸状のコラーゲンスキャフォールドから作ることができる。この場合、微粒子は、大きい表面積、マルチルーメンの多孔性、及び調整された分解を伴う、配向したコラーゲン構造（図17を参照）を有することとなる。キャピラリティを用いる、又はBioBridge形成の前に最初のコラーゲン溶液に導入される核酸により、これらの微粒子を活性化することができる。そのようなマイクロキャリアは、少なくとも容積式のシリンジにより注入可能であり、核酸（例えば、mRNA又はpDNA）の持続的送達を可能とする。特に、癌細胞が拡大及び増殖することを回避するような有益な因子をコードする核酸ベクターを放出することで、これらのマイクロキャリアをリンパ節及び標的型癌細胞に注入することができる。

【0069】

特定の構成を参照して実施例を説明した。特定の実施例及び例の上記の説明は、図示及び説明の目的のみに示されたものであり、本発明は幾つかの先行の実施例により図示されているものの、それらによって限定されるものとして構成されるべきではない。

【図 1】



【図 2】

Figure 1.

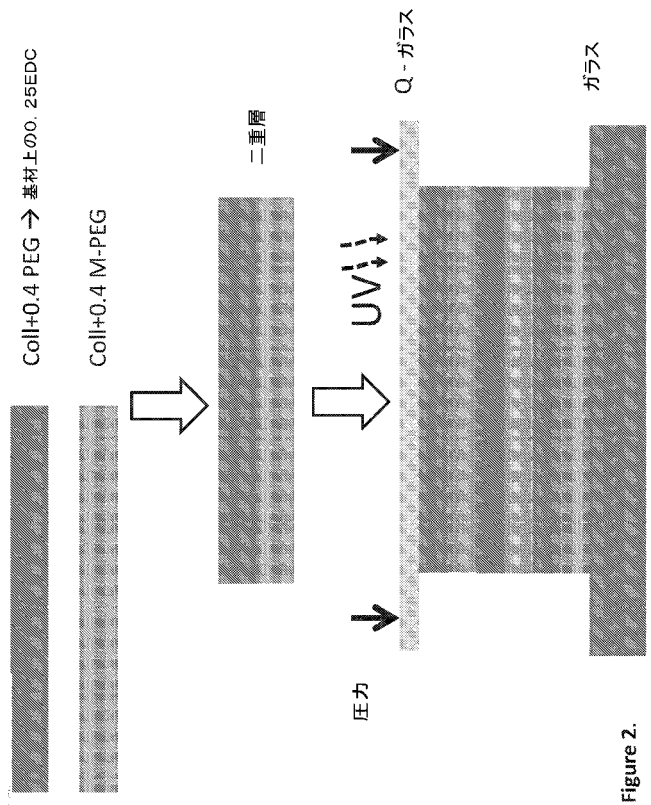


Figure 2.

【図 3】

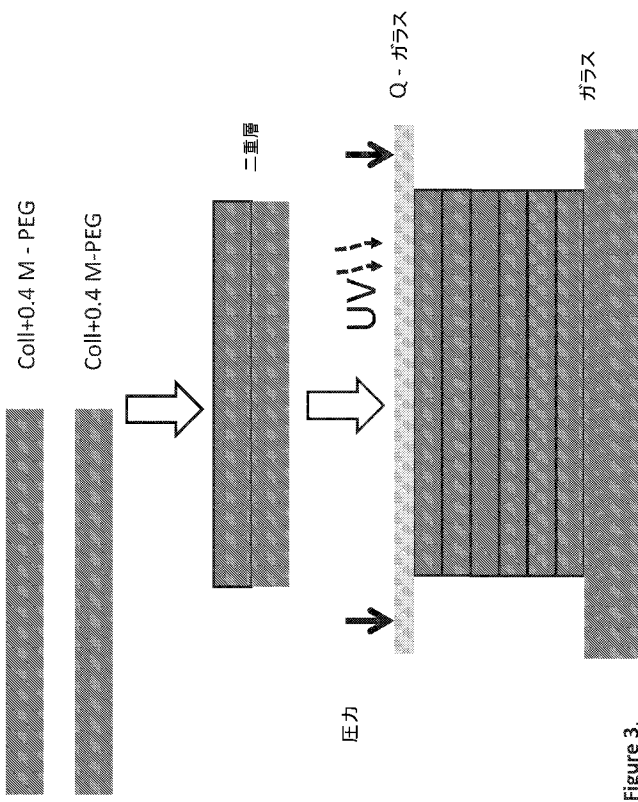


Figure 3.

【図 4】

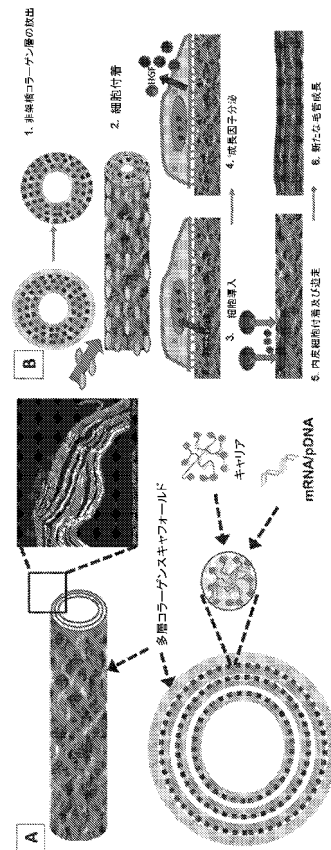


Figure 4.

【図 5】

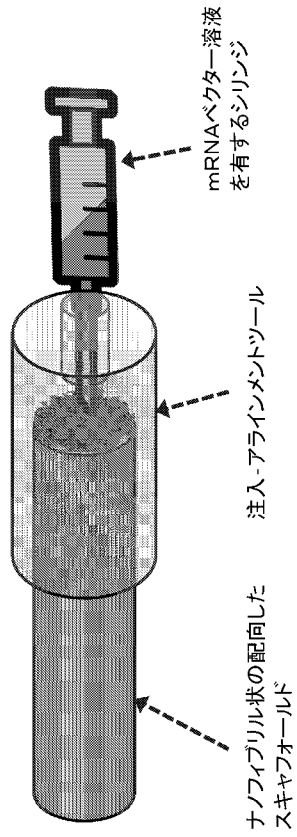


Figure 5.

【図 7】

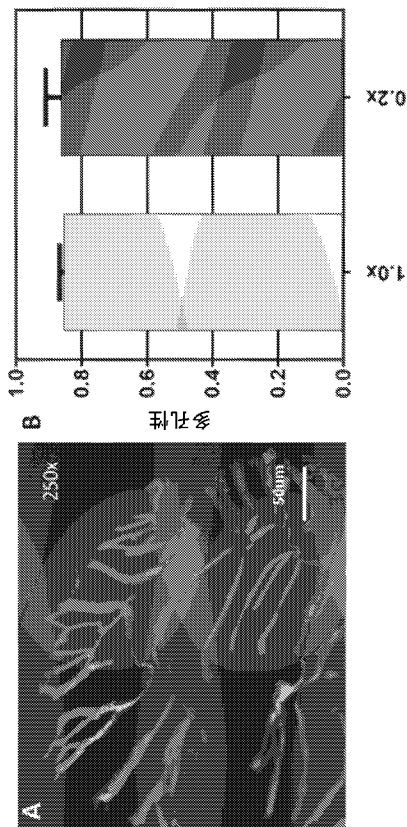


Figure 7.

250x拡大下のBioBridgeデバイスの断面(A)、及びBitmap FilterによるBioBridgeの多孔性(B)

【図 6】

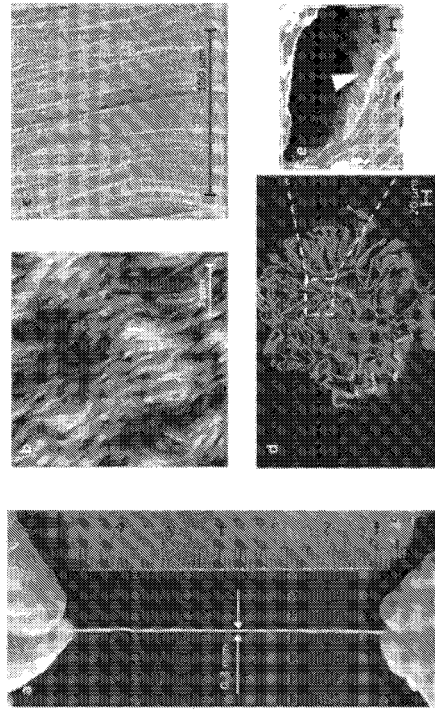


Figure 6.

糸状のナノファイブリル状のコラーゲンスキャフォールド。

(a) スキャフォールドの巨視的な写真。

(b) 配向したコラーゲンファイブリルにより形成された極薄の折りたためられたコラーゲンリボンの原子間力顕微鏡画像

(c) 配向したナノコラーゲンファイブリルの典型的パターンを有する、糸状のコラーゲンスキャフォールド (折りたためられたリボン) の表面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像

(d) 糸状のスキャフォールドの3次元断面のSEM画像

(e) 配向したコラーゲンのファイブリルを示す (矢印)、糸状のスキャフォールドのルーメンのSEMの細部の拡大部

【図 8】

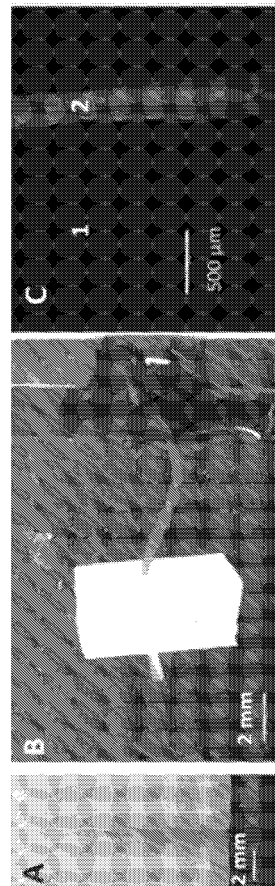


Figure 8.

BioBridgeのキャビリティー。BioBridgeに緑色の着色溶液が充填する。:

(A) 水平状態で膜に付着したスキャフォールド;

(B) 表面の3mmの断面がポリウレタン発泡材のブロックで隔離された、高いスキャフォールド

(C) 担持されていない (自家蛍光) コラーゲンスキャフォールド (1)、及び蛍光性粒子を担持したコラーゲンスキャフォールド (2)

【図9】

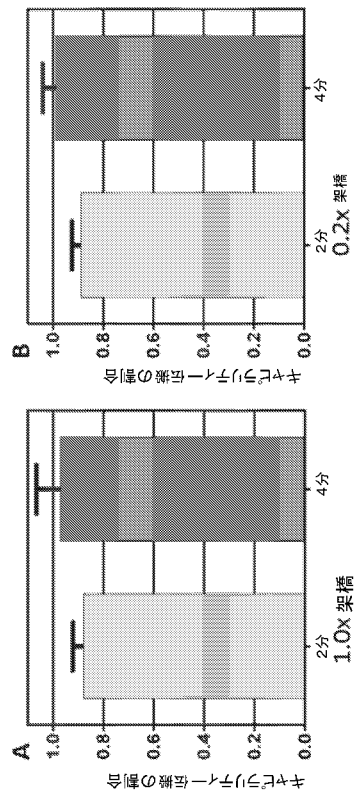


Figure 9.

BioBridge 1.0x(A)及び0.2x(B)の架橋装置のキャピラリー(各グループに対してn=20)

【図10】

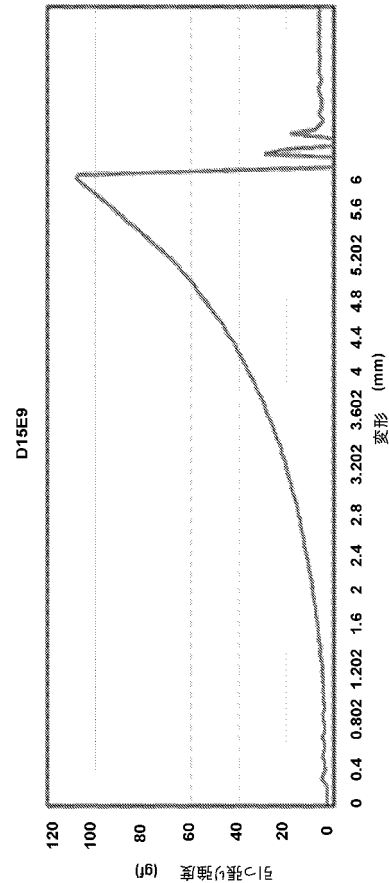


Figure 10. 湿潤状態のBioBridgeスキャフォールドの典型的な力-変位曲線

【図11】

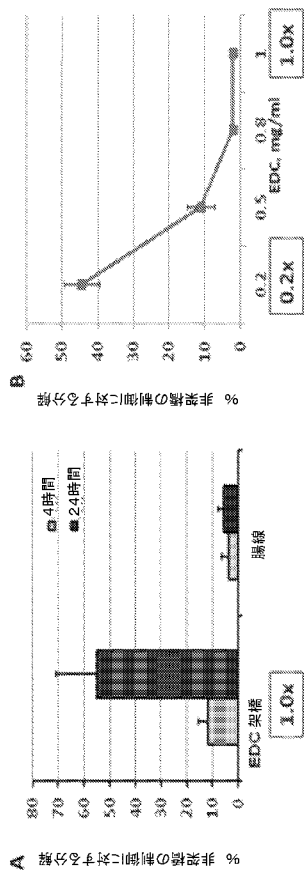


Figure 11.

コラゲナーゼによるBioBridgeの分解。

(A) 100U/mlのコラゲナーゼ溶液で腸線縫合糸(5.0)と比較したBioBridgeサンプルの分解

(B) 架橋で用いられるEDCの濃度とサンプルの分解との関係。

1.0x及び0.2xは、それぞれEDCと1及び0.2mg/mlで架橋されるサンプルである。

【図12】

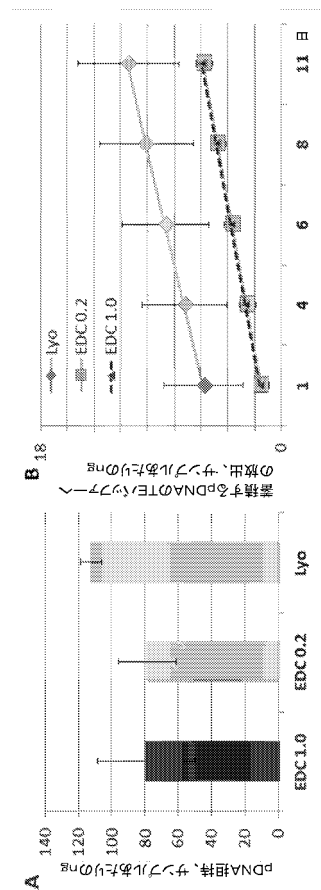


Figure 12.

プロテイナーゼKによるpDNAを担持したスキャフォールドの消化及びpicoGreenによる放出されたDNAの測定(A)、及びpDNA-スキャフォールドからTEバッファーへのpDNAの放出(B)後を基にした、スキャフォールドへのpDNA担持の評価。データは、M±SD(n=2)として示される。pDNAを担持した後、スキャフォールドを1.0又は0.2mg/ml(EDC1.0及びEDC0.2のグループ)のEDCと架橋、又は凍結乾燥(Lyo)した。

【図 13】

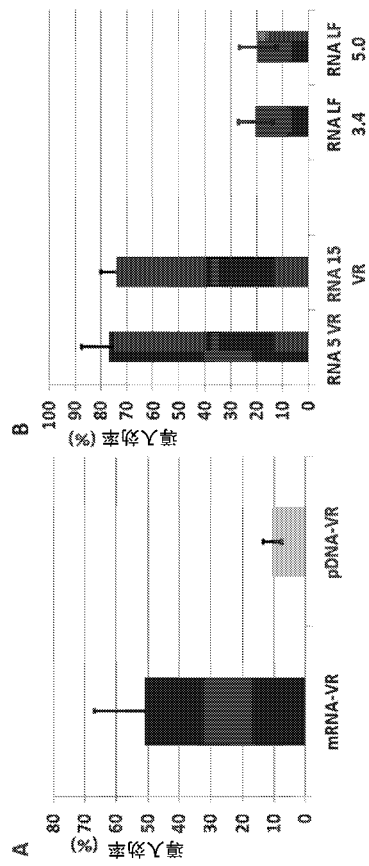
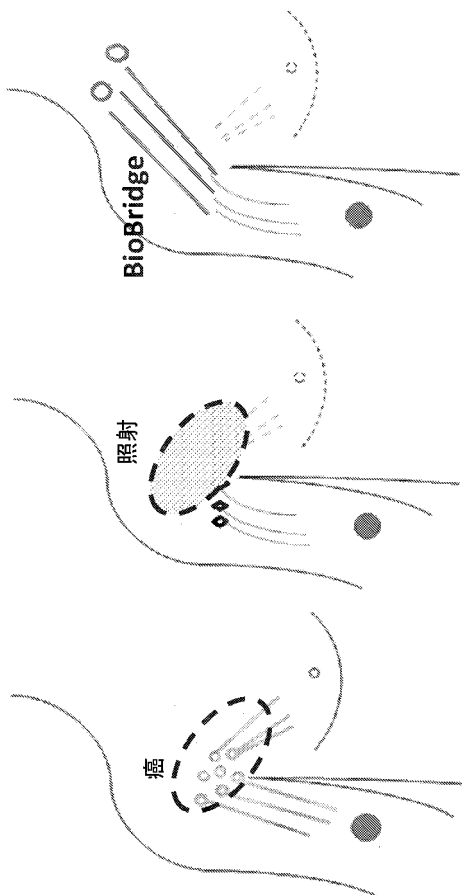


Figure 13.
 (A) Viromer Red (VR) 導入剤での mRNA 及び pDNA、及び
 (B) Viromer Red (VR) 又は リポフェクタミン (LF) で複合体化した mRNA の導入効率の評価。
 RNA 5 VR: 5 ng/μl RNA 濃度、6.7 μl/ウェルで添加;
 RNA 15 VR: 15 ng/μl RNA 濃度、6.7 μl/ウェルで添加;
 RNA LF 3.4 及び RNA LF 5.0: RNA-LF 溶液を、それぞれ 3.4 及び 5.0 μl 添加。
 データは、 $M \pm SD (n \geq 2)$ として示される。

【図 15】



1. 癌の手術リンパ節切除
 2. 照射
 3. siRNA あり、又はなしで BioBridge 移植

Figure 15.

【図 14】

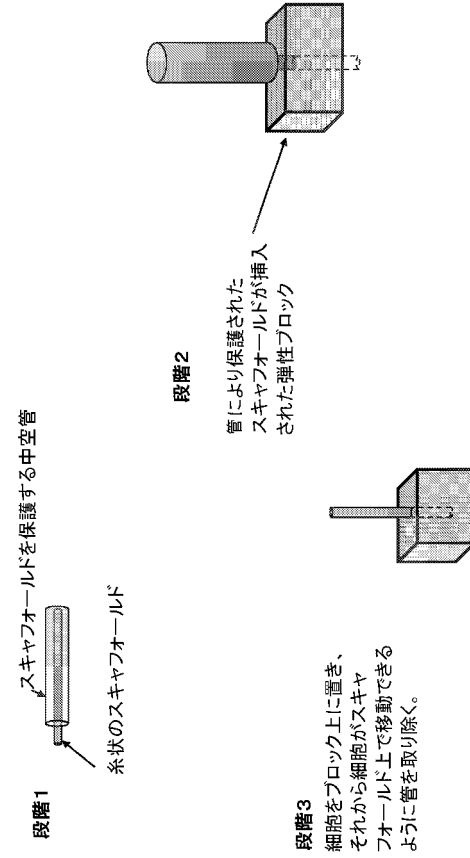


Figure 14.

【図 16】

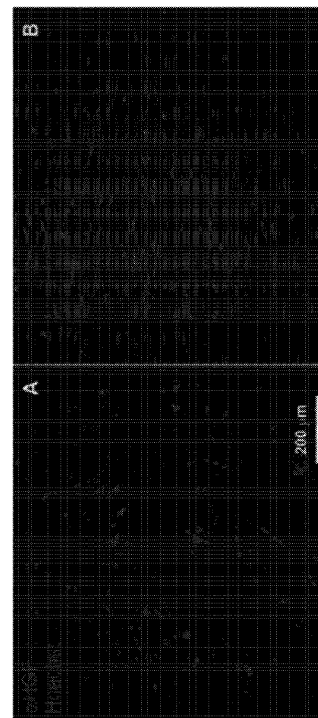
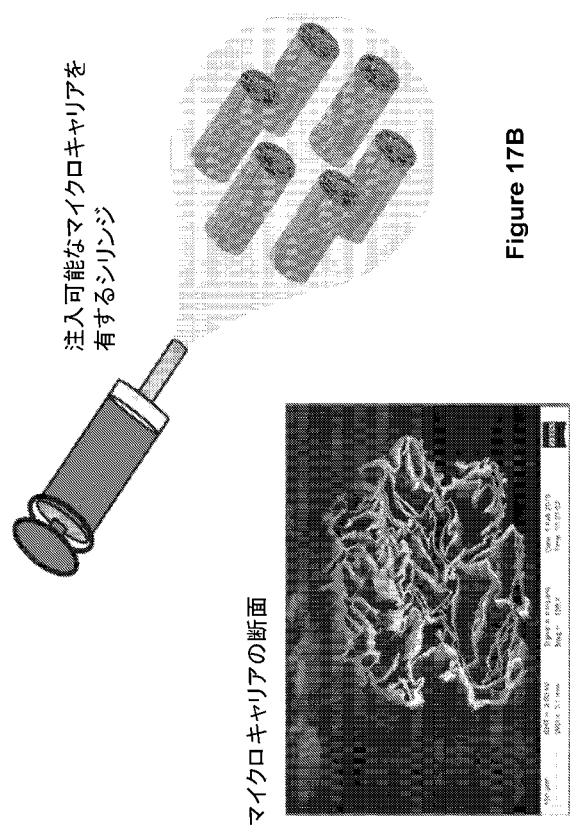


Figure 16.

【图 17】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/43762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12M 3/04; A61L 27/24, 27/22, 27/20, 27/18 (2016.01) CPC - C12M 3/04, 25/14, 33/04; A61L 27/24, 27/22, 27/20, 27/18, 2430/40 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) Classifications: C12M 3/04; A61L 27/24, 27/22, 27/20, 27/18 (2016.01) CPC Classifications: C12M 3/04, 25/14, 33/04; A61L 27/24, 27/22, 27/20, 27/18, 2430/40 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) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; EBSCO; Pubmed; Search terms used: fibril, Cell attachment, Gene expression, Nucleic acid, fibril*, collagen, cell*, bind, attach*, nucleot*, DNA, RNA, gene express*, cross linked by EDC/NHS, load fibril syringe, load fibril electrospraying, nanofibrillar scaffold injection alignment		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	(BAKER, BM et al.) New Directions in Nanofibrous Scaffolds for Soft Tissue Engineering and Regeneration. Expert Review of Medical Devices. September 2009, Vol. 6, No. 5; pages 515-532; abstract; pages 4, 7, 8, 10, and 13; Figures 2, 5E; DOI: 10.1586/erd.09.39	1-9 ----- 1, 2, 11-20
X	(NIE, H et al.) Fabrication and Characterization of PLGA/HAp Composite Scaffolds for Delivery of BMP-2 Plasmid DNA. Journal of Controlled Release 1 April 2007; volume 120, Nos. 1-2; pages 111-121; abstract; page 119, 5th paragraph; Fig. 1, 5, 7; DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.03.018	1, 2, 12 ----- 7-8
Y	WO 2013/103423 A2 (FIBRALIGN CORPORATION, et al.) 11 July 2013; paragraph [0091]	11
Y	(NAKAYAMA, KH et al.) Aligned-Braided Nanofibrillar Scaffold with Endothelial Cells Enhances Arteriogenesis. ACS Nano. 17 Jun 2015, Vol. 9, No. 7; pages 6900-6908; abstract; DOI: 10.1021/acsnano.5b00545	13-16
Y	US 8,227,574 B2 (PAUKSHTO, MV et al.) 24 July 2012; Figures 2A-C, 5, 6, 10	17-20
Y	(XU, C et al.) Porous Collagen Scaffold Reinforced with Surface Activated PLLA Nanoparticles. The Scientific World Journal 2012, Vol. 2012; page 7, 1st paragraph; DOI: 10.1100/2012/695137	15, 19-20
Y	(G-BIOSCIENCES) EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylamino) propyl carbodiimide, hydrochloride. Datasheet [online]. 24 June 2015 [Retrieved on 4 October 2016]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.gbiosciences.com/PDF/Protocol/EDC.pdf>; page 3, 1st and 2nd paragraphs; page 5, 2nd paragraph	16, 20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 October 2016 (04.10.2016)		Date of mailing of the international search report 28 OCT 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/43762

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	(HUANG, NF et al.) The Modulation of Endothelial Cell Morphology, Function, and Survival Using Anisotropic Nanofibrillar Collagen Scaffolds. Biomaterials. May 2013, Vol. 34, No. 16; pages 4038-4047; page 6, 3rd paragraph; DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.02.036	14, 18
A	(MONTERO, RB et al.) bFGF-containing Electrospun Gelatin Scaffolds with Controlled Nano-architectural Features for Directed Angiogenesis. Acta Biomaterialia. May 2012, Vol. 8, No. 5; pages 1778-1791; abstract; DOI: 10.1016/j.actbio.2011.12.008	10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/32	(2006.01)	A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 47/36	(2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 9/48	(2006.01)	A 6 1 K 9/48	
A 6 1 K 47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 L 31/04	(2006.01)	A 6 1 L 31/04	1 2 0
A 6 1 L 31/06	(2006.01)	A 6 1 L 31/04	1 1 0
A 6 1 L 31/14	(2006.01)	A 6 1 L 31/06	
A 6 1 L 31/16	(2006.01)	A 6 1 L 31/14	5 0 0
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 L 31/16	
		A 6 1 L 31/14	4 0 0
		A 6 1 P 43/00	1 0 5
		A 6 1 P 43/00	1 1 1

(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, 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, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ザイツェワ, タチアナ エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 1 2 7, サンノゼ, モーリードライブ 3 6 1 5

Fターム(参考) 4C076 AA53 AA99 BB32 CC26 DD26 DD66 DD67 EE02 EE13 EE23

EE24 EE25 EE26 EE30 EE37 EE41 EE43

4C081 AC03 BA16 BB06 CA021 CA171 CA181 CA231 CD091 CD121 CD171

CE02 CF012

4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA37 MA67 NA10 ZB21 ZC41