

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-146584

(P2019-146584A)

(43) 公開日 令和1年9月5日(2019.9.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071 Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	4 C 0 8 7
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-88221 (P2019-88221)	(71) 出願人	507244910 プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ ・ハーバード・カレッジ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ ンブリッジ クインシー ストリート 1 7
(22) 出願日	令和1年5月8日 (2019.5.8)	(71) 出願人	596115687 ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 15, ボストン, シャタック・ストリート 55
(62) 分割の表示	特願2014-513695 (P2014-513695) の分割	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
原出願日	平成24年5月31日 (2012.5.31)		
(31) 優先権主張番号	61/492, 609		
(32) 優先日	平成23年6月2日 (2011.6.2)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/601, 745		
(32) 優先日	平成24年2月22日 (2012.2.22)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

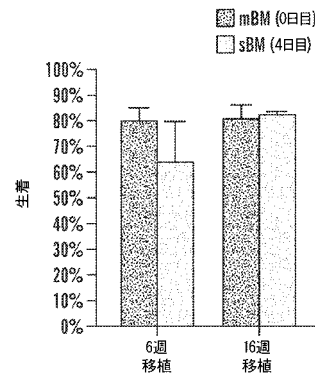
(54) 【発明の名称】 エキソビボ組織培養システムのための方法および使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】複数の細胞および組織器官様構造の構築を促進し、モデル化される組織および器官の重要な構造的構成および生理学的機能を呈し、かつ、エキソビボで生存し機能性を保つことが可能である実験用具および方法を提供する。

【解決手段】埋め込みデバイスを生きている動物の体内に埋め込み、かつ、細胞および組織を埋め込みデバイスに充満させて正常な微小環境構造および組織間の共有領域を確立することを可能にすることによって、埋め込みデバイス内に機能的器官構造の形成を誘導するために使用可能な方法およびデバイスを開示する。次いで、含有される細胞および組織を、外科手術により無傷で取り出し、かつ、別の動物に移植するか、または細胞生存に必要な培地および／または気体とともに流体チャネルのうちの1つ以上を通してそれを灌流することによってエキソビボで維持するかのいずれかを行うことができる方法およびデバイスを開示する。

【選択図】図20A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

組織をエキソビボで維持する方法であって、

埋め込みデバイスを対象に埋め込み、それによって、該埋め込みデバイスが、幹細胞、血管細胞、免疫細胞、分化細胞、および病変細胞のうちの少なくとも1つによって、コロニー形成されるステップと、

該埋め込みデバイスおよび該埋め込みデバイスに含有される該組織を、該対象から取り出すステップと、

該組織に灌流液を供給するステップと

を含む、方法。

10

【請求項 2】

灌流液を供給する前に、前記組織を前記埋め込みデバイスから取り出すステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

灌流液を供給する前に、前記組織をマイクロ流体システムに配置するステップをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記埋め込みデバイスが、少なくとも1つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも1つの開口ポートとを備える、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記埋め込みデバイスがマイクロ流体デバイスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記マイクロ流体デバイスをマイクロ流体システムに接続するステップをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記マイクロ流体デバイスが、少なくとも1つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも1つの開口ポートとを備える、請求項 5 または 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記マイクロ流体デバイスが、多孔質分離構成要素によって前記少なくとも1つの細胞成長チャンバから分離された少なくとも1つの流体チャネルを備える、請求項 5～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記マイクロ流体デバイスが、前記少なくとも1つの流体チャネルを前記マイクロ流体システムに接続しかつ灌流液を前記多孔質分離構成要素を通して前記少なくとも1つの細胞成長チャンバに供給する、少なくとも1つの吸入ポートと少なくとも1つの排出口とを備える、請求項 5～8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

少なくとも1つのポートが前記対象の筋肉組織に面するように、前記埋め込みデバイスが埋め込まれる、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記組織が骨髓組織である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

エキソビボで維持された前記骨髓組織を使用して、造血細胞または骨髓由来因子を生成する、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記造血細胞が、赤血球、白血球、血小板、造血幹細胞、リンパ球、好酸球、好中球、

50

単球、造血前駆細胞、間質細胞、およびこれらの細胞型のうちの2つ以上の混合物からなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記骨髓由来因子が、ペプチド、タンパク質、小分子、ヌクレオチド、脂質、炭水化物、サイトカイン、および成長因子からなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

前記造血細胞および／または前記骨髓由来因子が対象に投与される、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記対象が、欠陥のある免疫系、癌、自己免疫疾患、放射線毒性、および造血疾患からなる群から選択される状態を有する、請求項15に記載の方法。

10

【請求項17】

前記癌が、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、骨髓増殖性疾患、ランゲルハンス細胞組織球増加症、骨髓腫、および骨髓異形性症候群からなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記造血疾患が、サラセミア、第IX因子欠乏症、血友病、鎌状赤血球症、アミロイドーシス、無顆粒球症、貧血症、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症、汎血球減少症、グランツマン血小板無力症、尿毒症、血小板貯蔵プール欠乏症、フォンヴィルブラント病、および無フィブリノーゲン血症からなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

20

【請求項19】

前記対象が化学療法および／または放射線療法を受けたことがある、請求項15に記載の方法。

【請求項20】

前記造血細胞および／または前記骨髓由来因子が、インビトロで維持されている別の組織型に供給される、請求項12に記載の方法。

【請求項21】

エキソビボで維持された前記組織が、該組織への化合物の影響または該組織と化合物との相互作用を試験するために使用され、該化合物が、化学療法剤、放射線療法、分化、形成、機能、または再構築の修飾物質、ホルモン、核酸、ペプチド、タンパク質、抗体、小分子、薬物リード、酵素、細胞、ウイルス、細菌、寄生生物、ヌクレオチド、マーカー、色素、造影剤、酵素、ナノ粒子、および、遺伝子発現抑制分子からなる群から選択される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項22】

エキソビボで維持された前記組織が発達の任意の段階にある、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記埋め込みデバイスが非ヒト対象に埋め込まれる、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項24】

前記埋め込みデバイスが、ヒト造血細胞またはヒト化造血細胞を有する非ヒト対象に埋め込まれる、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記非ヒト対象が、癌から、または造血疾患を有するヒトから得られたヒト造血細胞を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記癌が、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、骨髓増殖性疾患、ランゲルハンス細胞組織球増加症、骨髓腫、および骨髓異形性症候群からなる群から選択される、請求項25に記載の方法。

50

【請求項 27】

前記造血疾患が、サラセミア、第 1 X 因子欠乏症、血友病、鎌状赤血球症、アミロイドーシス、無顆粒球症、貧血症、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症、汎血球減少症、グランツマン血小板無力症、尿毒症、血小板貯蔵プール欠乏症、フォンヴィルブラン病、および無フィブリノーゲン血症からなる群から選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

対象に埋め込むための組織または細胞を生成する方法であって、

埋め込みデバイスを第 1 の対象に埋め込み、それによって、該埋め込みデバイスが、組織または細胞によりコロニー形成されるステップと、

該埋め込みデバイスおよび該埋め込みデバイス内に含有される該組織を、該第 1 の対象から取り出すステップと、

該埋め込みデバイスまたは該埋め込みデバイス内に含有される少なくとも該組織または該細胞を第 2 の対象に移植し、それによって、該第 2 の対象に組織または細胞を供給するステップと

を含み、

それによって、埋め込まれた該組織または該細胞が、該第 2 の対象において細胞の成長および機能を示す、方法。

【請求項 29】

前記埋め込みデバイスが、少なくとも 1 つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも 1 つの開口ポートとを備える、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記埋め込みデバイスがマイクロ流体デバイスである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記マイクロ流体デバイスが、少なくとも 1 つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも 1 つの開口ポートとを備える、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記マイクロ流体デバイスが、多孔質分離構成要素によって前記少なくとも 1 つの細胞成長チャンバから分離された少なくとも 1 つの流体チャネルを備える、請求項 30 または 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記マイクロ流体デバイスが、前記少なくとも 1 つの流体チャネルを前記マイクロ流体システムに接続しかつ灌流液を前記多孔質分離構成要素を通して前記少なくとも 1 つの成長チャネルに供給する、少なくとも 1 つの吸入ポートと少なくとも 1 つの排出口とを備える、請求項 30 ～ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記少なくとも 1 つのポートが前記対象の筋肉組織に面するように、前記埋め込みデバイスが埋め込まれる、請求項 28 ～ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記組織または前記細胞が骨髄組織または造血細胞を含む、請求項 28 ～ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記移植を受ける前記第 2 の対象が、欠陥のある免疫系、癌、自己免疫疾患、および造血疾患からなる群から選択される状態であると診断されている、請求項 28 ～ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記癌が、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、骨髄増殖性疾患、ランゲルハンス細胞組織球増加症、骨髄腫、および骨髄異形性症候群からなる群から選択される、請求項 3

10

20

30

40

50

6に記載の方法。

【請求項38】

前記造血疾患が、サラセミア、第IX因子欠乏症、血友病、鎌状赤血球症、アミロイドーシス、無顆粒球症、貧血症、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症、汎血球減少症、グランツマン血小板無力症、尿毒症、血小板貯蔵プール欠乏症、フォンヴィルブランド病、および無フィブリノーゲン血症からなる群から選択される、請求項36に記載の方法。

【請求項39】

前記第2の対象が、化学療法および／または放射線療法を受けたことがある、請求項28～38のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項40】

前記埋め込みデバイスが、ヒト造血細胞またはヒト化造血細胞を有する非ヒトの第1の対象に埋め込まれる、請求項28～39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】

前記第1の対象および前記第2の対象が同じ個体であり、かつ、前記方法が、埋め込み部位から取り出して該対象へ移植するまでの間、骨髓組織および／もしくは造血細胞を含有する前記埋め込みデバイス、または、該埋め込みデバイスから取り出した後の該骨髓組織もしくは該造血細胞のいずれかを維持する追加のステップを含む、請求項28～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

埋め込み部位から取り出して前記第2の対象に移植するまでの間、骨髓組織および／もしくは造血細胞を含有する前記埋め込みデバイス、または、該埋め込みデバイスから取り出した後の該骨髓組織もしくは該造血細胞のいずれかを維持する追加のステップを含む、請求項28～40のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項43】

骨髓組織または造血細胞を含有する前記埋め込みデバイスのエキソビボでの維持が、骨髓組織および／もしくは造血細胞を含有する該埋め込みデバイス、または、該埋め込みデバイスから取り出した後の該骨髓組織および／もしくは該造血細胞のいずれかを凍結または冷蔵することを含む、請求項28～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

骨髓組織または造血細胞を含有する前記埋め込みデバイスのエキソビボでの維持が、該埋め込みデバイスをマイクロ流体システムに接続することと、灌流液を該埋め込みデバイスに供給することとを含む、請求項28～42のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項45】

前記埋め込みデバイス内に含有される前記組織または前記細胞が、前記第2の対象への埋め込み前に遺伝子改変される、請求項28～45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

請求項1に記載の方法に従ってエキソビボで維持された骨髓組織から得られた骨髓組織、造血細胞、または分化血球を含む、薬学的組成物。

40

【請求項47】

請求項28に記載の方法に従ってエキソビボで維持された骨髓組織から得られた骨髓組織および／または造血細胞を含む、薬学的組成物。

【請求項48】

前記骨髓組織および／または前記造血細胞が埋め込みデバイス内に含有される、請求項46～47のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項49】

造血細胞を生成または製造するための方法であって、埋め込みデバイスを対象に埋め込み、それによって、該埋め込みデバイスが、幹細胞、血管細胞、免疫細胞、または分化細胞によってコロニー形成されるステップと、

50

該埋め込みデバイスおよび該埋め込みデバイスに含有される組織を、該対象から取り出すステップと、

該組織に灌流液を供給するステップとを含み、

該埋め込みデバイスが、少なくとも1つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも1つの開口ポートとを備え、

該組織が骨髓組織であり、かつ

エキソビボで維持された該骨髓組織が、造血細胞を生成するために使用される、方法。

【請求項50】

前記造血細胞が、赤血球、白血球、血小板、造血幹細胞、リンパ球、好酸球、好中球、単球、造血前駆細胞、およびこれらの細胞型のうちの2つ以上の混合物からなる群から選択される、請求項49に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条(e)の下において、2011年6月2日に出願された米国特許仮出願第61/492,609号および2012年2月22日に出願された同第61/601,745号の利益を主張し、これらの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、配列表を包含し、この配列表は、E F S - W e bを介してA S C I I形式で提出されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2012年5月30日に作製された前記A S C I Iのコピーは、00280606. t x tという名称であり、サイズが7,292バイトである。

【0003】

技術分野

本明細書に記載の技術は、生体器官、組織、および細胞のエキソビボシステムのための方法および使用に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

組織工学およびインビトロ組織成長戦略の1つの制限は、組織および器官の天然構造を反復発生させるという課題であった。組織のうち最も単純なものですら、成長には、時間とともに変化する、成長因子、シグナル伝達分子、栄養素、細胞外マトリックス骨格、および機械力の複雑な混合の優れた均衡が達成されなければならず、そうでなければ、細胞は、組織および器官構造を正確に構成することに失敗することになる。あるいは、組織をエキソビボで研究するかまたは繁殖させるために、既存の組織または器官構造を対象から取り出すことは、組織の損傷をもたらす得、培養中または移植のための移送中に栄養素の適正な流れを組織に再確立することが困難であると証明されている。

【0005】

例えば、移植のため、または分化血球の代替物（例えば、赤血球、血小板、または白血球）を製造するための治療的骨髓材料源として有用な造血幹細胞は、インビトロ培養では扱いが困難である。複数の研究者が、造血幹細胞(HSC)をインビトロで培養および増殖させようと試みたが、培養HSCからの長期の生着および宿主造血再構成は、極めて非効率的であった(C s a s z a r, E. et al. Cell Stem Cell 10, 218-229 (2012) (非特許文献1)、Boitano, A. E. et al. Science 329, 1345-1348 (2010) (非特許文献2)、Cook

10

20

30

40

50

, M. M. et al. Tissue Eng. 18, 319-328 (2012) (非特許文献3))。多能性HSCは、それらが、一般的に、それらの幹細胞特性の維持に必要とされる多数の化学的、構造的、機械的、および空間的なシグナルを含有する複雑な骨髄ニッチから取り出されると、通常分化するためにインビトロで維持することが困難である(Takagi, M. J. Biosci. Bioeng. 99, 189-196 (2005) (非特許文献4)、Nichols, J. E. et al. Biomaterials 30, 1071-1079 (2009) (非特許文献5)、Maggio, N. D. et al. Biomaterials 32, 321-329 (2011) (非特許文献6))。

【0006】

10

したがって、複数の細胞および複数の組織器官様構造の構築を促進し、該構造が、モデル化される組織および器官の重要な構造的構成および生理学的機能を呈し、かつ、エキソビボで生存し機能性を保つことが可能である、実験用具および方法に対する必要性が存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Csaszar, E. et al. Cell Stem Cell 10, 218-229 (2012)

【非特許文献2】Boitano, A. E. et al. Science 329, 1345-1348 (2010)

20

【非特許文献3】Cook, M. M. et al. Tissue Eng. 18, 319-328 (2012)

【非特許文献4】Takagi, M. J. Biosci. Bioeng. 99, 189-196 (2005)

【非特許文献5】Nichols, J. E. et al. Biomaterials 30, 1071-1079 (2009)

【非特許文献6】Maggio, N. D. et al. Biomaterials 32, 321-329 (2011)

【発明の概要】

30

【0008】

概要

本明細書に記載の技術は、インビボにおいて埋め込みデバイスを生きている動物の体内に埋め込み、かつ、細胞および組織を埋め込みデバイスに充満させて正常な微小環境構造、組織間の共有領域、ならびに／または器官様構造および機能を確立することを可能にすることにより、埋め込みデバイス内に機能性細胞、組織、および器官構造の形成および／または発達を誘導するために使用可能な方法およびデバイスを対象とする。次いで、含有される細胞および組織を含む全てのデバイスを、外科手術により取り出すことができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスが埋め込まれている間またはその後に埋め込みデバイスにおいて形成および／または発達した細胞、組織、および／またはオルガノイド、ならびに任意でその埋め込みデバイスを、別の動物に移植することができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスが埋め込まれている間またはその後に埋め込みデバイスにおいて形成および／または発達した細胞、組織、および／またはオルガノイドは、埋め込みデバイス内で、または、埋め込みデバイスから取り出してマイクロ流体デバイスに配置した後に、細胞、組織、および／またはオルガノイドを、細胞生存に必要な培地および／または気体とともに灌流させることによって、インビトロで生存可能に維持することができる。複雑な器官模倣体を、例えば、マイクロ流体チャネルを介した連続的な灌流によって、インビトロで生存可能に維持することができ、いずれの既存のインビトロモデルシステムを使用しても不可能なレベルの複雑性を伴うそれらの通常の3D関連性において、高度に複雑な細胞および組織機能の研究に使用することができる。それはま

40

50

た、移植可能な治療用微小器官を生成するための製造戦略、または細胞もしくは細胞生成物を製造するための製造デバイスとして、使用することができる。

【0009】

本明細書に記載される技術の一態様に従って、少なくとも1つの細胞成長チャンバを有する埋め込みデバイスを、インビボで動物に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは、周辺組織空間に対して1つ以上の対応する細胞成長チャンバ開口部（例えば、ポート）を有するチャンバにおいて、所望の組織型の成長を誘導する化合物を含有する。例として、骨の成長を誘導するために、埋め込みデバイスは、骨誘導材料、すなわち、脱塩骨粉および／または骨形態形成タンパク質（BMP）を含み得る。創傷治癒の結果として、微小毛細血管および間葉系幹細胞を含有する結合組織は、埋め込みデバイスの細胞成長チャンバ内に成長し得、かつ、骨誘導材料の存在のため、血中造血前駆細胞を取り込んで完全に機能性の骨髄を形成する空間を有する骨を形成することができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは、皮下に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは、腎臓被膜下に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは、腹腔内に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは、筋肉内に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは、少なくとも1つの細胞成長チャンバ開口部（例えば、細胞の進入および／または存在を可能にするポート）が筋肉の表面に面した状態で、皮下に埋め込むことができる。

【0010】

いくつかの実施形態において、組織内成長プロセスが完了した時点で、手術部位を再び開き、新しく形成および／または発達した器官様組織複合体を、周辺組織の表面から切り離すことができる。いくつかの実施形態において、細胞、組織、および／またはオルガノイド、ならびに任意で埋め込みデバイスを、第2の動物に移植することができる。いくつかの実施形態において、細胞、組織、ならびに／または形成および／もしくは発達したオルガノイドを、埋め込みデバイスから取り出し、マイクロ流体デバイスに配置して、新たに形成および／もしくは発達した組織および構造を、その生存率およびインビトロでの機能を維持するのに必要な培地、酸素、栄養素、および支持因子とともに、灌流することができる。いくつかの実施形態において、細胞、組織、および／またはオルガノイド、ならびに埋め込みデバイスを取り出し、マイクロ流体デバイスおよび／またはシステムに接続して、新たに形成および／または発達した組織および構造を、その生存率およびインビトロでの機能を維持するのに必要な培地、酸素、栄養素、および支持因子とともに、灌流することができる。

【0011】

本明細書に記載される技術の一態様に従って、埋め込みデバイスは、マイクロ流体デバイスである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの細胞成長チャンバと、少なくとも1つの当接する流体流動チャンネルとを有するマイクロデバイスは、インビボで動物に埋め込むことができ、埋め込みデバイスは、周辺組織空間に対して1つ以上の対応する細胞成長チャンバ開口部（例えば、細胞のデバイスへの進入および／またはデバイスから退出を可能にするポート）を有するチャンネルに、所望の組織型の成長を誘導する化合物を含有する。細胞成長チャンバは、マイクロ流体デバイスの部分であり、ここで、細胞、組織、および／またはオルガノイドが、形成および／または発達することになる。流体流動チャンネルは、流体が、それを通してマイクロ流体チップに進入、通過、および／または退出する、マイクロ流体デバイスの部分である。いくつかの実施形態において、細胞成長チャンバは、1つ以上の流体流動チャンネルの一部分である（すなわち、流体流動チャンネルは細胞成長チャンバを備え得る）。いくつかの実施形態において、細胞成長チャンバは、1つ以上の流体流動チャンネルに接続されるが、流体流動チャンネルは、細胞成長チャンバを含まない。流体流動チャンネルは、その末端ポートを閉鎖するか、またはそこに固体ロッドまたはプラグ等の除去可能な固体材料を充填することによって、埋め込み中は閉鎖されてもよい。例として、骨の成長を誘導するために、埋め込みデバイスは、骨誘導材料、すなわ

ち、脱塩骨粉および／または骨形態形成タンパク質（BMP）を含み得る。創傷治癒の結果として、微小毛細血管および間葉系幹細胞を含有する結合組織は、埋め込みデバイスの細胞成長チャンバ内に成長し得、かつ、骨誘導材料の存在のため、血中の造血前駆細胞を補充して完全に機能性の骨髄を形成する空間を有する骨を形成および／または発達させることができる。いくつかの実施形態において、マイクロ流体デバイスは、皮下に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、マイクロ流体デバイスは、腎臓被膜下に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、マイクロ流体デバイスは、腹腔内に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、マイクロ流体デバイスは、筋肉内に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、マイクロ流体デバイスは、少なくとも1つの細胞成長チャンバ開口部が筋肉の表面に面した状態で、皮下に埋め込むことができる。

10

【0012】

いくつかの実施形態において、組織内成長プロセスが完了した時点で、手術部位を再度開くことが可能であり、流体流動チャンネルは、ロッドまたはプラグを除去することによって再び開放することができ、続いて、これを、細胞生存に必要な栄養素および気体を含有する培養培地が、流体流動チャンネルを通して送り出され、分離体構成要素（例えば、膜もしくはマイクロピラー）の孔を通過して、形成された組織を含有する細胞成長チャンバに入るように、流体レザーバーに接続することができる。マイクロ流体デバイス全体を、次に、周辺組織から切り離し、培地がマイクロ流体デバイスに流入している状態で、動物から取り出して、例えば、第2のチャンネルを通る連続的な流体流動により培養下に維持することができ、さらに、所望される場合、追加の流動を、それらの吸入および排出ポートに接続することによって第1のチャンネルにも同様に追加することができる。

20

【0013】

埋め込みデバイス内に含有される細胞、組織、および／または器官の構造は、正確な組織構造および構成を形成および／または展開し、したがって、細胞をインビトロで培養するための他の技術よりも、より正確にインビボ条件を模倣した複雑な三次元微小環境を作製することができる。

【0014】

いくつかの実施形態において、埋め込みデバイス内に含有された組織は、次いで、制御環境下として、インビトロでの無傷の組織機能についての研究に使用することができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイス内に含有される組織は、次に、毒性を含む、その組織との相互作用、または発達、機能、構造、成長、生存、および／もしくは分化の調節について、化合物をスクリーニングすることに使用することができる。

30

【0015】

いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスに含有される組織および／または細胞は、次いで、細胞または細胞由来因子の生成に使用することができる。いくつかの実施形態において、このように生成された細胞または細胞由来因子を、対象に投与してもよい。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスに含有される組織は、骨髄を含む。いくつかの実施形態において、造血細胞または骨髄由来因子を、対象に投与することができる。いくつかの実施形態において、対象は、癌、造血疾患、または欠陥のある免疫系を有し得る。いくつかの実施形態において、対象は、化学療法または放射線療法を受けたことがあってもよい。

40

【0016】

いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスを、ヒト細胞またはヒト化細胞を有する動物に埋め込み、それによって、ヒトのまたはヒト化された組織および／または細胞を埋め込みデバイスに供給することができる。いくつかの実施形態において、動物内のヒト細胞は、癌から、または埋め込みデバイス内での細胞型の成長に影響を及ぼす疾患を有するヒトから得ることができる。

【0017】

いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスを、ヒトのまたはヒト化された骨髄お

50

よび／または造血細胞を有する動物に埋め込み、それによって、ヒトのまたはヒト化された骨髄組織および／または造血細胞を埋め込みデバイスに供給することができる。いくつかの実施形態において、動物におけるヒト細胞は、健康なヒト対象の骨髄から、または造血細胞に影響を及ぼす癌もしくは他の疾患を有するヒトの骨髄から得ることができる。

【0018】

いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスに含有される組織および／もしくは細胞、または埋め込みデバイスから取り出された組織および／もしくは細胞は、第2の対象に移植することができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスに含有される骨髄組織および／もしくは造血細胞、または埋め込みデバイスから取り出された骨髄組織および／もしくは造血細胞は、第2の対象に移植することができる。いくつかの実施形態において、対象は、癌、造血疾患、放射線毒性、または欠陥のある免疫系を有し得る。いくつかの実施形態において、対象は、化学療法または放射線療法を受けたことがあってもよい。

【0019】

いくつかの実施形態において、組織および／もしくは細胞または複数の組織を含有する複数の埋め込みデバイスを、第2の対象に埋め込むことができる。非限定的な例として、埋め込みデバイス内のヒト骨髄を、マウスに埋め込んでもよく、ヒト癌細胞を、生検としてか、または第2の埋め込みデバイスに含有されるものとしてのいずれかで、同じマウスの第2の部位に埋め込んでもよい。このモデルを使用して、癌に対するヒト免疫応答を研究することができる。さらなる非限定的な例は、自己免疫疾患を研究するために、チップ内のおよび皮膚等の第2のヒト組織埋め込み片内のヒト骨髄を、対象の第2の部位に埋め込むことである。

【0020】

いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスが埋め込まれる第1の対象は、ヒト細胞またはヒト化細胞を有する非ヒト対象であり得る。いくつかの実施形態において、第1の対象および第2の対象は、同じ対象であってもよく、この方法は、組織および／または細胞を含有する埋め込みデバイスを、埋め込み部位から取り出して対象に移植して戻すまでの間、インビトロで維持する追加のステップを含む。いくつかの実施形態において、維持は、埋め込みデバイスの凍結、冷蔵、および／またはマイクロ流体システムへの接続、ならびに埋め込み部位からチップを取り出した後、対象に移植して戻すまで、埋め込みデバイスに灌流液を供給することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0021】

本特許および本出願書類は、カラーで作製された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を有する本特許または特許出願公報のコピーは、要求および必要費用の支払いに応じて、当局によって提供されるであろう。

【図1A】図1A～1Cは、本明細書に記載されるマイクロ流体デバイスの一実施形態（開放チャンネル形式）の図および写真を示す。

【図1B】図1A～1Cは、本明細書に記載されるマイクロ流体デバイスの一実施形態（開放チャンネル形式）の図および写真を示す。

【図1C】図1A～1Cは、本明細書に記載されるマイクロ流体デバイスの一実施形態（開放チャンネル形式）の図および写真を示す。

【図2】図2A～2Bは、本明細書に記載されるマイクロ流体デバイスの2つの実施形態を示す。図2Aは、単一チャンネル形式デバイスの光学上面図および垂直方向の断面図を示す。図2Bは、閉鎖チャンネル形式デバイスの光学上面図および垂直方向の断面図を示す。

【図3】図3A～3Dは、本明細書に記載される埋め込みデバイスの2つの実施形態を示す。図3Aは、遠近感のために10セント硬貨を隣に置いたウェル形式埋め込みデバイスを示す。図3Bは、インビボ培養後の、2つの開口部を有するウェル形式埋め込みデバイス、および1つの開口部を有するウェル形式埋め込みデバイスを示す。図3Cは、2つの開口部を有するウェル形式埋め込みデバイスの図を示す。図3Dは、1つの開口部を有す

るウェル形式埋め込みデバイスの図を示す。

【図 4】図 4 A～4 C は、マウスの皮下埋め込みデバイスの埋め込みを描写する写真を示す。図 4 A～4 B は、マウスの皮下部位において筋肉に縫合された P D M S を示す。図 4 C は、皮下埋め込みの 8 週間後の、P D M S ウェル中の埋め込み片の光学画像を示す。

【図 5】1 つの開口部または 2 つの開口部を有するウェル形式埋め込みデバイスの図および画像を示す。写真は、マウスの皮下でのインビボ成長の 4 週間後の埋め込みデバイスを示す。

【図 6】図 6 A～6 C は、埋め込み 8 週間後の 1 つの開口部を有するウェル形式埋め込みデバイスの内容物の H & E 染色を示す。図 6 A は、埋め込みデバイスの開口部が各画像の下側に来るように配向されている。スケールバーは示される通りである。

【図 7】図 7 A～7 D は、埋め込み 4 週間後（7 A～7 B）および 8 週間後（7 C～7 D）の 2 つの開口部を有するウェル形式埋め込みデバイスの内容物の H & E 染色を示す。スケールバーは示される通りである。

【図 8】造血幹細胞系統および各細胞型を識別するために使用可能なマーカーの図を示す。

【図 9 A】図 9 A～9 E は、造血幹細胞を検出するための F A C S 分析の結果を示す。9 A は、マウス骨髄（m B M）から得られたプロファイルを示し、9 B は、赤血球が溶解されているマウス末梢血（m P B）から得られたプロファイルを示し、9 C は、インビボ成長の 4 週間後の埋め込みデバイスから回収された組織について得られたプロファイル（s B M 4 週）を示し、9 D は、インビボ成長 8 週間後の埋め込みデバイスから回収された組織について得られたプロファイル（s B M 8 週）を示す。図 9 A～9 D の x 軸および y 軸に示されるマーカーを認識する抗体を使用した。図 9 E は、集団を 1 つのグラフと比較する。

【図 9 B】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 9 C】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 9 D】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 9 E】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 10 A】図 10 A～10 E は、造血前駆細胞を検出するための F A C S 分析の結果を示す。10 A は、マウス骨髄（m B M）から得られたプロファイルを示し、10 B は、赤血球が溶解されているマウス末梢血（m P B）から得られたプロファイルを示し、10 C は、インビボ成長の 4 週間後の埋め込みデバイスから回収された組織について得られたプロファイル（s B M 4 週）を示し、10 D は、インビボ成長 8 週間後の埋め込みデバイスから回収された組織から得られたプロファイル（s B M 8 週）を示す。図 10 A～10 D の x 軸および y 軸に示されるマーカーを認識する抗体を使用した。図 10 E は、集団を 1 つのグラフで比較する。

【図 10 B】図 10 A の説明を参照のこと。

【図 10 C】図 10 A の説明を参照のこと。

【図 10 D】図 10 A の説明を参照のこと。

【図 10 E】図 10 A の説明を参照のこと。

【図 11 A】図 11 A～11 E は、赤血球および白血球の比率を判定するための F A C S 分析の結果を示す。11 A は、マウス骨髄（m B M）から得られたプロファイルを示し、11 B は、マウス末梢血（m P B）から得られたプロファイルを示し、11 C は、インビボ成長の 4 週間後の埋め込みデバイスから回収された組織から得られたプロファイルを示し（s B M 4 週）、11 D は、インビボ成長 8 週間後の埋め込みデバイスから回収された組織から得られたプロファイル（s B M 8 週）を示す。図 11 A～11 D の x 軸および y 軸に示されるマーカーを認識する抗体を使用した。図 11 E は、集団を 1 つのグラフで比較する。

【図 11 B】図 11 A の説明を参照のこと。

【図 11 C】図 11 A の説明を参照のこと。

【図 11 D】図 11 A の説明を参照のこと。

10

20

30

40

50

【図 1 1 E】図 1 1 A の説明を参照のこと。

【図 1 2 A】図 1 2 A ～ 1 2 E は、白血球を検出するための F A C S 分析の結果を示す。1 2 A は、マウス骨髄 (m B M) から得られたプロファイルを示し、1 2 B は、マウス末梢血 (m P B) から得られたプロファイルを示し、1 2 C は、インビボ成長の 4 週間後の埋め込みデバイスから回収された組織から得られたプロファイル (s B M 4 週) を示し、1 2 D は、インビボ成長 8 週間後の埋め込みデバイスから回収された組織から得られたプロファイル (s B M 8 週) を示す。図 1 2 A ～ 1 2 D の x 軸および y 軸に示されるマーカーを認識する抗体を使用した。図 1 2 E は、集団を 1 つのグラフで比較する。

【図 1 2 B】図 1 2 A の説明を参照のこと。

【図 1 2 C】図 1 2 A の説明を参照のこと。

【図 1 2 D】図 1 2 A の説明を参照のこと。

【図 1 2 E】図 1 2 A の説明を参照のこと。

【図 1 3】多孔質膜によって分離することができる複数の層を有する埋め込みデバイスのさらなる実施形態の図を示す。

【図 1 4】図 1 4 A および 1 4 B は、生検形式のデバイスを示す。図 1 4 A は、マイクロ流体デバイスの図を示し、図 1 4 B は、細胞成長チャンバ内に生検試料が存在する状態でのマイクロ流体デバイスの光学画像である。

【図 1 5】インビボ埋め込み段階が完了した後、第 1 の対象から取り出され、マイクロ流体システムに接続されている埋め込みデバイスを示し、埋め込みデバイスの中心に骨髄組織が確認できる。

【図 1 6 A】図 1 6 A ～ 1 6 D は、インビボで骨形成を誘導する骨髄の操作を示す。図 1 6 A の上の画像は、骨誘導材料を充填した埋め込みデバイス、ならびに埋め込みの 4 週間後および 8 週間後の成長を示す。図 1 6 B は、大腿骨由来の天然のマウス骨髄および図 1 6 A の埋め込みデバイス由来の合成骨髄の高倍率顕微鏡写真を示す。図 1 6 C ～ 1 6 D は、マウス大腿骨 (m B M)、マウスに埋め込んだ 4 週間後の操作された骨髄 (e B M 4 週)、および 8 週間後の操作された骨髄 (e B M 8 週) に存在する造血幹および前駆集団 (図 1 6 C)、ならびに分化血球集団 (図 1 6 D) のグラフ表示を、マウス末梢血 (m P B) と比較して示す。

【図 1 6 B】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 6 C】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 6 D】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 7】合成骨髄のマイクロ流体培養および致死照射を受けたマウスへの移植を示す。右下のグラフは、エキソビボ培養 0 日目および 4 日目における培養された合成骨髄の細胞型の分布を示す。左下の図は、移植 6 週間後の移植された骨髄の末梢血集団への寄与を示す。

【図 1 8】埋め込みデバイスのさらなる実施形態を示す。

【図 1 9】図 1 9 A ～ 1 9 D は、埋め込み 4 週間後 (図 1 9 A) および 8 週間後 (図 1 9 B) の操作された骨髄、ならびにマウス脊椎骨 (図 1 9 C) のマイクロコンピュータ断層撮影 (マイクロ C T) 画像を示す。(図 1 9 D) 埋め込み 8 週間後の操作された骨髄の断面とマウス椎骨の断面の比較。マイクロ C T 画像は、骨鉱化の構造および範囲を示す。

【図 2 0 A】図 2 0 A ～ 2 0 E は、移植実験の結果を示す。図 2 0 A は、インビトロ培養 4 日後に、マウス大腿骨骨髄細胞または操作された骨髄細胞を移植した、致死照射を受けたマウスの生着の程度を示す。生着は、移植 6 週間後および 1 6 週間後に評価した。図 2 0 B は、生着した C D 4 5 + 集団内の分化血球の分布を示す。(図 2 0 C) 新たに単離したマウス大腿骨骨髄 (m B M) および操作された骨髄 (e B M) と比較した、4 日間の培養後の血球の生存率。操作された骨髄は、デバイスで 4 日間培養した (e B M、4 日)。マウス大腿骨から単離した骨髄細胞は、ディッシュにおいて間質細胞層上で 4 日間培養した (m B M、4 日)。(図 2 0 D ～ 2 0 E) 造血幹細胞および前駆細胞集団 (図 2 0 D) ならびに長期造血幹細胞集団 (L i n - C D 1 5 0 + C D 4 8 -) (図 2 0 E) のグラフ表示。

10

20

30

40

50

【図 20 B】図 20 A の説明を参照のこと。

【図 20 C】図 20 A の説明を参照のこと。

【図 20 D】図 20 A の説明を参照のこと。

【図 20 E】図 20 A の説明を参照のこと。

【図 21】図 21 A および 21 B は、ヒト臍帯血細胞培養の結果のグラフを示す。hCB 細胞を含有する操作された骨髓を、HSC を維持するために培養培地を灌流しながら、マイクロ流体デバイスで 4 日間 (eBM、4 日) または 7 日間 (eBM、7 日) 培養した。hCB 細胞はまた、ディッシュで 4 日間 (mBM、4 日) または 7 日間 (mBM、7 日) 培養した。(図 21 A) 新たに単離した hCB と比較した、4 日間の培養後の hCB の生存率。(図 21 B) 造血幹細胞集団 (Lin-CD34+CD38-CD90+) のグラフ表示。

10

【発明を実施するための形態】

【0022】

詳細な説明

定義

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用されるいくつかの用語および語句の意味を、以下に提供する。当該技術分野における用語の使用法と、本明細書で提供されるその定義との間に明らかな矛盾が存在する場合、本明細書で提供される定義が優先されるものとする。

【0023】

20

細胞生物学および分子生物学における一般的な用語の定義は、"The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 18th Edition, Merck Research Laboratories 出版, 2006 (ISBN 0-911910-18-2)、Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd. 出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9)、および Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)、The ELISA guidebook (Methods in molecular biology 149) by Crowther J. R. (2000)、Fundamentals of RIA and Other Ligand Assays by Jeffrey Travis, 1979, Scientific Newsletter s、Immunology by Werner Luttmann, Elsevier 出版, 2006 に見出すことができる。分子生物学における一般的な用語の定義はまた、Benjamin Lewin, Genes IX, Jones & Bartlett Publishing 出版, 2007 (ISBN-13: 9780763740634)、Kendrew et al. (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)、および Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds. に見出される。

30

40

【0024】

別段の定めがない限り、本明細書に記載される実験、アッセイ法、および方法は、例えば、参照によりそれらの全体が全て本明細書に組み込まれる、Methods in Enzymology, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis, J. N. Abelson, M. I. Simon, G. B. Fields (Editors), Academic Press, 1st edition (1

50

997) (ISBN-13: 978-0121821906)、米国特許第4,965,343号および同第5,849,954号、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (1982)、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (1989)、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986)、またはMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152, S. L. Berger and A. R. Kimmmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987)、Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et al., ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), and Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss、5th edition (2005)、Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998)に記載される標準的な手順を使用して行った。

【0025】

「減少する」、「低減した」、「低減」、「減少」、または「阻害」という用語は、全て、一般的に、統計学的に有意な量での減少を意味して、本明細書で使用される。しかしながら、誤解を避けるために、「低減した」、「低減」、または「減少」、または「阻害」とは、参照レベルと比較して、少なくとも10%の減少、例えば、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、もしくは100% (100%を含む) までの減少 (例えば、参照試料と比較して、存在しないレベルもしくは検出不可能なレベル)、または参照レベルと比較して、10~100%のいずれかの減少を意味する。疾患マーカーまたは症状との関連においては、このようなレベルの統計学的に有意な減少を意味する。減少は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%またはそれ以上であってもよく、好ましくは、このような障害を有さない個体にとって正常な範囲内として許容されるレベルまでの低下である。

【0026】

「増加した」、「増加」、または「強化」、または「活性化」という用語は、全て、一般的に、統計学的に有意な量での増加を意味して本明細書で使用され、誤解を避けるために、「増加した」、「増加」、または「強化」、または「活性化」という用語は、参照レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、もしくは100%まで (100%を含む) の増加、または参照レベルと比較して10~100%のいずれかの増加、あるいは、少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは

少なくとも約10倍の増加、または参照レベルと比較して2倍～10倍もしくはそれ以上のいずれかの増加を意味する。

【0027】

本明細書で使用される際、「対象」とは、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物とは、霊長類、齧歯類、家畜動物、狩猟動物等の脊椎動物である。霊長類には、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えば、アカゲザルが含まれる。齧歯類には、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ、およびハムスターが含まれる。家畜および狩猟動物には、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、飼いネコを例とするネコ種、イヌ、キツネ、オオカミを例とするイヌ種、ニワトリ、エミュー、ダチョウを例とする鳥類、マス、ナマズ、およびサケを例とする魚類が挙げられる。対象には、前述のもののあらゆるサブセット、例えば、上述のもの全てが含まれるが、ヒト、霊長類、または齧歯類等、1つ以上の群または種を除く。いくつかの実施形態において、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。「個体」、「患者」、および「対象」という用語は、本明細書で互換的に使用される。

10

【0028】

好ましくは、対象は哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、骨および／または骨髄の形成および成長の動物モデルを代表する対象として、有利に使用することができる。対象は、雄性または雌性であり得る。

【0029】

本明細書で使用される際、「造血疾患」、「造血状態」、または「造血障害」は、互換的に使用され、かつ、造血系統の任意の細胞型が、過剰生成するか、過小生成するか、または異常機能もしくは挙動を示す、状態を指す。

20

【0030】

本明細書で使用される際、「造血幹細胞」とは、自己再生能力、および分化して造血細胞系の成熟細胞型のうちの1つになる能力を有する細胞を指す。

【0031】

本明細書で使用される際、「造血前駆細胞」とは、分化して、造血細胞系の成熟細胞型のうちの少なくとも1つになる能力を有する細胞を指す。造血前駆細胞には、限定されないが、プレT細胞、プレB細胞、芽球コロニー形成細胞、巨核球赤血球系前駆細胞(MEP)、共通多分化能前駆細胞(CMP)、顆粒球／マクロファージ前駆細胞(GMP)、および顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子細胞が挙げられる。

30

【0032】

本明細書で使用される際、「造血細胞」には、造血系統のあらゆる成熟細胞、あらゆる造血前駆細胞、および／またはあらゆる造血幹細胞が含まれる。

【0033】

本明細書で使用される際、「維持する」とは、組織または細胞集団の生存率を継続することを指す。維持された組織は、代謝的に活性な細胞の集団を有することになる。これらの細胞の数は、少なくとも2週間の期間にわたっておおよそ安定であり得るか、または増加し得る。

40

【0034】

本明細書で使用される際、「埋め込みデバイス」または「チップ」という用語は、少なくとも細胞成長チャンバと1つのポートとをその中または上に備える、構造または基板を指す。埋め込みデバイスは、本明細書に記載のように、対象に埋め込まれ、細胞、組織、および／またはオルガノイドによってコロニー形成され得る。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスとは、マイクロ流体デバイス、マイクロ流体チップ、またはそれらの一部分を指し得る。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは、1つ以上の追加の構造に接続され、マイクロ流体デバイスまたはチップを作製してもよい。

【0035】

本明細書で使用される際、「マイクロ流体デバイス」および「マイクロ流体チップ」と

50

いう用語は、互換的に使用され、その中または上にマイクロ流体が含まれる、構造または基板を指す。いくつかの実施形態において、チップは、マイクロ流体デバイスに取り外し可能に接続することができる。

【0036】

本明細書で使用される際、「チャンネル」という用語は、基板の中または上に置かれている、あらゆる毛細管、チャンネル、管、または溝を指す。チャンネルは、微量の液体を通すために寸法決定されたチャンネルである、マイクロチャンネルであってもよい。

【0037】

本明細書で使用される際、「細胞成長チャンバ」という用語は、細胞、組織、および／またはオルガノイドが、特定の3D形態を呈するように、内部成長細胞、組織、および／またはオルガノイドの成長を制御するように成形され得る、埋め込みデバイス内の間隙を指す。いくつかの実施形態において、細胞、組織、および／またはオルガノイドは、細胞成長チャンバに配置される。いくつかの実施形態において、細胞、組織、および／またはオルガノイドは、細胞成長チャンバにコロニー形成するように誘導される。いくつかの実施形態において、細胞成長チャンバは、チャンネルであってもよい。

【0038】

本明細書で使用される際、「ポート」という用語は、流体および／または細胞がデバイスおよび／またはチップに進入ならびに／あるいはデバイスおよび／またはチップから退出するための手段を提供する、埋め込みデバイスまたはマイクロ流体チップの一部分を指す。ポートは、インビボ成長の際に、デバイスおよび／またはチップ内へ、および／またはそこから出る、流体および／または細胞の通過を可能にすることができる。ポートは、マイクロ流体デバイスの管、接続部、またはアダプターとの接続を受容および／または固定し、マイクロ流体デバイスに取り付けられると、流体および／または細胞の通過を可能にするように寸法決定および成形されたものであり得る。ポートは、流体のみもしくは細胞のみがデバイスの中に入る、および／もしくはそこから出ることのいずれかを可能にするように構成することができるか、または流体および／もしくは細胞がデバイスに進入する、および／もしくはそこから出ることのいずれかを可能にするように構成されてもよい。細胞が、デバイスおよび／またはチップの外側から細胞成長チャンバに進入および／または退出するための手段を提供するポートはまた、本明細書において、「細胞成長チャンバ開口部」と称される。

【0039】

本明細書で使用される際、「マイクロ流体システム」という用語は、マイクロリットル量および／またはナノリットル量の流体の操作が可能な機械を指す。

【0040】

「統計学的に有意な」または「有意に」という用語は、統計学的有意性を指し、一般的に、通常のマーカーの集中よりも低いかまたはさらに低い、2標準偏差(2SD)を意味する。この用語は、差があるという統計学的根拠を表す。これは、帰無仮説が実際に正しい場合に、帰無仮説を棄却する決定を行う確率として定義される。この決定は、しばしば、p値を使用して行われる。

【0041】

操作実施例、または別段に指定される場合以外では、本明細書で使用される成分の量または反応条件を表す全ての数値は、全ての場合において「約」という用語によって、修飾されるとして理解されるものとする。割合と関連して使用される場合の「約」という用語は、±1%を意味し得る。

【0042】

単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という用語は、文脈によりそうでないことが明確に示されない限り、複数形の指示対象を含む。同様に、「または」という単語は、文脈によりそうでない旨が明確に示されない限り、「および」を含むことを意図する。本明細書に記載のものに類似または同等の方法および材料が、本開示の実践または試験に使用可能であるが、好適な方法および材料を以下に記載する

。「例えば(e. g.)」という略語は、ラテン語のexempli gratiaから派生しており、本明細書において、非限定的な例を示して使用される。したがって、「例えば(e. g.)」という略語は、「例えば(for example)」という用語と同義である。

【0043】

特定された全ての特許および他の出版物は、例えば、本明細書に記載の技術に関連して使用され得る、このよう出版物に記載の方法を、説明および開示する目的で参照によって本明細書に明確に組み込まれる。これらの出版物は、単に、本出願の出願日前のそれらの開示のために提供される。この点に関して、本発明者らが、先行発明を理由として、またはいかなる他の理由によっても、このような開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきものは存在しない。これらの文書の日付に関する全ての記述、またはそれらの内容に関する表現は、出願者が入手可能な情報に基づくものであり、これらの文書の日付または内容の正確さに関して、いずれの権利も構成するものではない。

【0044】

埋め込み可能なデバイス

図1A～1Cは、本明細書に記載される埋め込みデバイスまたはチップの1つの実施形態を示す。図1A～1Cに示される実施形態は、開放チャンネル形式と称するものとする。図1Aは、遠近感のために10セント硬貨を隣に置いたPDMSチップ10を示すが、埋め込みデバイスは、埋め込みデバイスの用途に応じて、より大きくてもまたはより小さくてもよい。示されるように、チップは、八角形に形成することができるが、他の形状も使用可能である。本明細書に記載される技術のいくつかの実施形態において、チップ10の寸法および形状は、チップを特定のマイクロ流体システムで使用するができるように、選択することができる。いくつかの実施形態において、チップ10の寸法、形状、および構造は、チップを、製造業者または供給業者によって特定のマイクロ流体システム用に提供された他のチップの代替品として使用できるように、選択することができる。いくつかの実施形態において、チップ10は、1つ以上のマイクロ流体チャンネル20によって1つ以上の排出ポート14に接続された1つ以上の吸入ポート12を備え得る。ポート12、14は、特定のマイクロ流体システムの管および／またはコネクタを受容するために必要とされる、適切な寸法および形状で提供され得る。いくつかの実施形態において、吸入ポート12および排出ポート14を接続して、吸入ポート12に進入する流体が、排出ポートに到達する前に、流体チャンネル20のうちのいくつかまたは全てを通過することを可能にすることができる。いくつかの実施形態において、複数のポートを、流体チャンネルに接続してもよい。

【0045】

図1Bは、本明細書に記載される技術の1つの実施形態の上面図を示す。本明細書に記載される技術のいくつかの実施形態に従って、チップ10は、1つ以上の流体チャンネル24、26、および1つ以上の細胞成長チャンバ22を備え得る。本明細書に記載される技術の一実施形態に従って、各チャンネル22、24、26は、幅が少なくとも100μm、幅が少なくとも200μm、幅が少なくとも300μm、幅が少なくとも500μm、幅が少なくとも750μm、幅が少なくとも1000μm、または幅が少なくとも2000μmであり得る。本明細書に記載される技術の一実施形態に従って、2つの流体チャンネル24、26は、細胞成長チャンバ22によって分離することができる。細胞成長チャンバと流体チャンネルとの間の境界は、マイクロピラー16によって作製され得る。この実施形態において、マイクロピラー16間の隙間は、流体チャンネル24、26と細胞成長チャンバ22との間に所定量の流体交換を提供して、細胞成長を維持および促進するように調節することができる。マイクロピラーは、例えば、幅が少なくとも25μm、幅が少なくとも50μm、幅が少なくとも100μm、幅が少なくとも250μm、幅が少なくとも500μm、または幅が少なくとも1000μmであってもよい。マイクロピラー間の隙間は、例えば、幅が少なくとも25μm、幅が少なくとも50μm、幅が少なくとも100μm、幅

が少なくとも $250\text{ }\mu\text{m}$ 、幅が少なくとも $500\text{ }\mu\text{m}$ 、または幅が少なくとも $1000\text{ }\mu\text{m}$ であり得る。

【0046】

図1Cは、本明細書に記載される技術の実施形態によるマイクロ流体デバイス内の流体チャンネル24、26、および細胞成長チャンバ22の断面図を示す。本明細書に記載される技術のいくつかの実施形態に従って、細胞成長チャンバに当接する1つの流体チャンネルが存在してもよい。代替的な実施形態においては、細胞成長チャンバに当接する、2、3、4、5、6個、またはそれ以上の流体チャンネルが存在してもよい。流体チャンネルは、細胞成長チャンバ22に並行して延在し得、細胞成長チャンバ22の側面に沿って、ならびにその上および／または下に、位置付けられる。いくつかの実施形態において、異なる流体チャンネルが、細胞成長チャンバに沿って別の位置で細胞成長チャンバに当接してもよい。いくつかの実施形態において、細胞成長チャンバは、合計おおよそ 180 度で流体チャンネルに当接する。いくつかの実施形態において、細胞成長チャンバは、おおよそ 45 度、おおよそ 90 度、おおよそ 135 度、おおよそ 180 度、おおよそ 225 度、おおよそ 270 度、またはおおよそ 315 度で流体チャンネルに当接している。いくつかの実施形態において、流体チャンネルおよび／または細胞成長チャンバは、四角形の交差部を有する。他の実施形態において、流体チャンネルおよび／または細胞成長チャンバは、それぞれ、おおよそ円形の交差部、部分的に円形の交差部、卵形の交差部、長方形、五角形、六角形、七角形、八角形、九角形、または十角形の交差部を有し得る。いくつかの実施形態において、図1Cに示されるように、細胞成長チャンバ(6)の少なくとも1つの側面は、PDMチップ(1)のいずれの他の構成要素とも境を接しておらず、チップ周囲の環境に直接曝露することが可能である。

【0047】

いくつかの実施形態に従って、各チャンネル22、24、26は、高さが少なくとも $500\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $200\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $300\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $500\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $750\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $1000\text{ }\mu\text{m}$ 、または高さが少なくとも $2000\text{ }\mu\text{m}$ であり得る。細胞成長チャンバの深さは、高さが少なくとも $50\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $200\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $300\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $500\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $750\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $1000\text{ }\mu\text{m}$ 、または高さが少なくとも $2000\text{ }\mu\text{m}$ であり得る。厚さ、すなわち、チップまたはそれを有するマイクロ流体デバイスの高さ寸法は、その意図される使用および目的のための埋め込みデバイスに構造的統合性を提供するのに十分なものであり得る。いくつかの実施形態において、マイクロ流体デバイスは、高さが少なくとも $250\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも $500\text{ }\mu\text{m}$ 、高さが少なくとも 1 mm 、高さが少なくとも 2 mm 、高さが少なくとも 5 mm 、または高さが少なくとも 10 mm の厚さ範囲に及び得る。

【0048】

図1A～1Cに示される実施形態において、チップは、深さが $500\text{ }\mu\text{m}$ である。流体チャンネル24、26は、幅が $750\text{ }\mu\text{m}$ ～ 1 mm である。細胞成長チャンバ22は、長さ 3 mm 、幅 $500\text{ }\mu\text{m}$ 、および深さ $250\text{ }\mu\text{m}$ である。ポスト16は、 $100\text{ }\mu\text{m}\times 200\text{ }\mu\text{m}$ であり、ポスト間の隙間は $100\text{ }\mu\text{m}$ である。

【0049】

図2Aおよび2Bならびに図3A～3Dは、本明細書に記載される技術による埋め込みデバイスの他の実施形態を示す。図2Aは、単一閉鎖チャンネル形式のマイクロ流体デバイスの上面図および水平方向の断面図を示す。この実施形態において、チップ10は、4つのポート12、14を有し得、2つがチップの上面を貫通して位置付けられ、さらに2つがチップの底面を貫通して位置付けられている。これらのポートは、1つ以上のチャンネルに接続することができ(3/4)、これは、細胞成長チャンバおよび流体チャンネルの両方として機能する。

【0050】

図2Bは、代替的な実施形態に従って、閉鎖チャンネル形式のマイクロ流体デバイスの上

面図および水平方向の断面図を示す。この実施形態では、チップ10は、4つのポート12、14を備え得、2つがチップの上面に位置付けられ、さらに2つがチップの底面に位置付けられている。これらのポートは、2つの流体チャネル24、26に挟まれた細胞成長チャンバ22に接続する。この実施形態において、マイクロピラー16は、細胞成長チャンバ22と流体チャネル24、26とを分離するが、流体チャネルと成長チャンネルとの間の、流体、作用物質、および因子の移送を可能にするために、使用することができる。他の実施形態において、窓、穴、もしくはスロットを有する壁、膜、および他の透過性材料を含む、異なる分離要素を使用することができる。

【0051】

図2Aに示される実施形態において、チップ10は、幅8~10mm、長さ10~15mm、および高さ2mmである。ポート12、14は、直径2mmである。細胞成長チャンバ22は、長さ3~5mm、幅1mm、および深さ400μmである。図2Bに示される実施形態では、チップ10は、幅8mmおよび長さ12mmである。ポート12、14は、直径2mmである。細胞成長チャンバ22は、長さ3mmである。流体チャネル24、26は、幅750μm~1mmである。ポスト16は、150μm×200μmであり、ポスト間の隙間は、100μmである。

【0052】

図3A~3Dは、2つのウェル形式またはカートリッジの実施形態を示す。図3Aは、遠近感のために10セント硬貨の隣に置いたウェル形式チップの写真を示すが、埋め込みデバイスは、埋め込みデバイスの用途に応じて、より大きくてもより小さくてもよい。図3Bは、インビボ埋め込み段階後の2つのウェル形式チップを示す。埋め込みデバイスは、縫合による取り付けのための穴18を備え得る。図3Cは、1つが埋め込みデバイスの頂部に貫通し、もう1つが埋め込みデバイスの底部に貫通する、2つの開口部（またはポート）に接続された細胞成長チャンバ22を有するウェル形式チップの図を示す。この実施形態において、ポート12（この実施形態では、細胞成長チャンバの開口部として機能し得る）および細胞成長チャンバ22は、同一の広がりをも有し得、流体チャネル（示されない）および細胞成長チャンバ22は、例えば、流体チャネルが細胞成長チャンバ内にまたはそれを通して延在するところで、結合され得る。図3Dは、1つの開口部を有するウェル形式チップ10の実施形態を示す。この実施形態において、ポート12および細胞成長チャンバ開口部は、少なくとも部分的に、同一の広がりをも有し得る。示される実施形態において、細胞成長チャンバ22は、直径が4mmで、深さが1mm~2mmの範囲であり、チップ10は、深さが2mmであり、直径が8mmである。穴18は、例えば、直径が1mmであり得る。

【0053】

図3A~3Dに示される実施形態は、カートリッジに基づくシステムの一部であり得る。これらの実施形態において、チップまたはデバイス10は、例えば、図3B~3Dに示されるように丸形もしくは円形であってもよく、または図3Aに示されるように四角形もしくは長方形等の任意の他の多角形であってもよい。さらに、細胞成長チャンバまたはチャネル22は、例えば、図3A~3Dに示されるように円形であってもよく、または楕円形、四角形、長方形、もしくは他の多角形を含む、任意の他の形状であってもよい。この実施形態において、チップまたはデバイスは、隣接する細胞成長チャンバに流体が流れることを可能にする1つ以上の流体チャネルを有するマイクロ流体デバイスに挿入されるように適合される、カートリッジとして機能し得る。いくつかの実施形態において、複数のカートリッジ10を、単一のデバイスに挿入することができる。

【0054】

さらなる実施形態を、図13に示す。この実施形態では、チップ10は、PDMS多孔質膜34によって分離される、2つのPDMS層30、32からなる。上部層32は、培地の灌流を可能にするマイクロ流体チャネル24を有し、一方で下部層は、円筒形の細胞成長チャンバ22を有する。骨誘導材料が充填された埋め込みデバイスを、対象の皮下に埋め込み、次いで、インビボ成長後に外科手術により取り出すことができる。マイクロ流

体システムに接続する前に、底部流体チャネル26を、埋め込みデバイスの底部に結合させて、培養培地の灌流を行うことができる。示される実施形態において、チップ10は、長さが10～15mmおよび幅が8～10mmの範囲に及ぶ。ポート12、14は、それらがマイクロ流体システムに接続する場所の直径1mmである。底部層30は、直径3mmの細胞成長チャンバ22を有し、深さ500μmである。頂部層32は、幅および長さの両方が10～15mmであり、深さが1mmである。流体チャネル24は、深さ200μmおよび幅3mmである。ポート14、16は、幅が1mmであり、長さが1mm～7mmの範囲に及び得る。底部流体チャネル26を含有する態様は、上部層32と同一であってもよい。PDMS膜34は、深さ10μmである。

【0055】

さらなる実施形態を、図18に示す。この実施形態では、チップ10は、本明細書で上述された細胞成長チャンバ22を有するウェル形式チップを含む、中間PDMS層30を含む。骨誘導材料が充填された中間層30内の細胞成長チャンバ22を、対象の皮下に埋め込み、次いで、インビボ成長後に外科手術により取り出すことができる。取り出し後、中間層30の細胞成長チャンバ22の各開口部を、PDMS多孔質膜34で被覆してもよい。PDMS膜34を、次いで、上部PDMS層32および底部PDMS層36で被覆してもよい。上部層32は、培地の灌流を可能にするマイクロ流体チャネル24と、マイクロ流体システムに接続するポート12、14を備え得る。ポートのうちの少なくとも2つが、頂部マイクロ流体チャネル24に接続し、ポートのうちの少なくとも2つが、底部層36の底部マイクロ流体チャネル26に接続する。底部層36および上部層32が定位置にある状態で、チップ10全体を、マイクロ流体システムに接続することができる。示される実施形態において、チップ10は、長さ10～15mmおよび幅8～12mmの範囲に及び得る。ポート12、14は、それらがマイクロ流体システムと接続する場所の直径が、0.25～3mm、好ましくは1mmであり得、例えば、ポート12、14は、それらがマイクロ流体デバイスと接続する場所が、直径0.5～2mm、直径0.75～2mm、または直径0.8～1.5mmであり得る。中間層30は、深さ400～600μm、例えば、深さ450～550μmまたは深さ475～525μmであり得、直径2～6mmの細胞成長チャンバ22、例えば、直径2.5～5.5mmの細胞成長チャンバ、直径3～5mmの細胞成長チャンバ、または直径約4mmの細胞成長チャンバを有し得る。頂部層32は、幅および長さの両方が8～16mm、例えば、幅および長さの両方が9～15mm、または10～14mm、または11～13mmであり得、深さが3～7mm、例えば、深さが4～6mmまたは約5mmの範囲に及び得る。流体チャネル24は、深さが50～400μm、例えば、深さが100～300μmまたは150～250μmの範囲に及び得、幅が2～6mm、例えば、幅が3～5mm、または3.5～4.5mm、または約4mmの範囲に及び得る。ポート12、14は、直径が0.25～3mm、好ましくは1mmであり得、例えば、ポート12、14は、直径が0.5～2mm、直径が0.75～2mm、または直径が0.8～1.5mmであってもよい。底部流体チャネル26を含有する底部層36は、上部層32と同一の寸法を有し得る。PDMS膜34は、深さが2～20μm、例えば、深さが5～15μm、8～13μm、9～11μm、または約10μmであり得る。

【0056】

さらなる実施形態を、図14A～14Bに示す。この実施形態において、チップ10（深さ3mm、長さ50mm）は、5つのポート12、14、18を備え得る。ポート12、14は、2つの流体チャネル24、26に接続する。第5のポート18は、生検進入ポートであり、幅が500μm、長さが10mm、および深さが200～350μmの範囲に及ぶ細胞成長チャンバ22に接続する。この実施形態において、マイクロピラー16（50～150μm×100～200μmの寸法範囲に及び、マイクロピラー間の隙間が50～100μmである）は、細胞成長チャンバ22を流体チャネル24、26（1mm幅）から分離するが、流体チャネルと成長チャネルとの間の流体、作用物質、および因子の移送を可能にするために使用することができる。直径500μmの生検を、流出開口部へ

の陰圧を維持しながら、中間チャンネルに導入することができる。

【0057】

完全なシステムとして、本明細書に記載されるチップ10は、例えば、対象へ移植するための移送またはマイクロ流体システムへの移送のいずれかの際の長期培養のために、骨髓の構造および生存率を維持しながら、骨髓をインビトロで培養することを可能にする。

【0058】

本明細書に記載される埋め込みデバイスの細胞成長チャンバは、例えば、埋め込みデバイスのインビボ埋め込み時に、骨髓細胞または骨髓前駆細胞によってコロニー形成を行うことができる空間を提供する。細胞成長チャンバの開放した側面は、細胞成長チャンバへの細胞移動を可能にすることができる。埋め込みデバイスを対象から取り出す際、チップを、適合性マイクロ流体供給システムに配置または接続することができ、所望の流体の流動は、マイクロ流体供給システムを吸入および排出ポートに接続することによって、確立することができる（図13を参照されたい）。供給された流体は、流体チャンネルを通して流れ、マイクロピラーまたは他の分離構成要素が、細胞成長チャンバと流体チャンネルとの間で流体交換が生じることを可能にする。このようにして、栄養素、成長因子、ホルモン、試験化合物、小分子等が、細胞成長チャンバ内の細胞に、それらの生存率を維持するおよび／またはそれらのインビトロでの成長を支持するために供給され、試験および評価を行うことを可能にすることができる。さらに、細胞の生成物および／または廃棄物質は、細胞成長チャンバから取り出され、マイクロ流体システムに退出することができ、そこで、それらを廃棄および／または分析することができる。流体チャンネルはまた、試験化合物を細胞成長チャンバ内の骨髓細胞に送達する手段を提供する。細胞成長チャンバ内の骨髓細胞はまた、細胞を発生させることができ、これは、流体チャンネルに進入し、その後の分析のためにマイクロ流体デバイスによって収集することができる。種々の実施形態に従って、多孔質分離構成要素を使用して、流体、分子、および細胞が細胞成長チャンバまたは領域と流体チャンネルとの間に流れることを選択的に可能にするように選択された、細胞成長チャンバまたはチャンネルを流体チャンネルから分離することができる。例えば、いくつかの実施形態において、マイクロピラーおよびそれらの間の隙間は、細胞成長チャンバ内の細胞のうち少なくともいくつかは、定位置にとどまり、流体流動によってチップから除去されないように、選択され得る。選択されたピラーおよび隙間の寸法は、細胞成長チャンバ内の細胞に行われる流体および材料の交換の程度を判定に使用することができ、特定の用途に所望されるおよび／または必要とされる流体交換の程度を達成するために多様であり得る。いくつかの実施形態において、隙間は、例えば、1組の摺動ウインドウ（隙間）または調節可能な透過性を有する膜を使用して、調節可能に作製することができる。

【0059】

チップまたはデバイス10の本体は、設計および適用要件に応じて、可撓性材料または非可撓性材料から作製することができる。マイクロチャンネル設計は、例示であり、図に示される構成に制限されるものではないことに留意されたい。チップ10は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリウレタン、またはポリイミド等の生体適合性材料を含むがこれらに限定されない、可撓性生体適合性材料から作製することができる。チップ10はまた、ガラス、シリコン、ポリスルホン、硬質プラスチック等の非可撓性材料、ならびにこれらの材料の組み合わせから作製することもできる。チップ10はまた、ポリーラクチド-コ-グリコリド酸（PLGA）等の任意の好適な生体適合性および／または生分解性材料を使用して製造することもでき、いくつかの実施形態において、器官模倣デバイスを、インビボでの移植または埋め込みに使用することができる。

【0060】

本明細書に記載される技術のいくつかの実施形態に従って、細胞成長チャンバは、エッチング、3D印刷、またはマイクロマシニング等によって形成することができる、分離構成要素（例えば、複数のマイクロピラー）によって、流体チャンネルから分離することができる。あるいは、分離構成要素は、例えば、これもまたPDMSまたは多孔質ポリカーボネートフィルタから形成された、選択的透過性または半透過性の膜を備え得る。他の実施

形態において、膜は、他の材料または P D M S を含む材料の組み合わせから作製されてもよい。

【0061】

生体適合性ポリマーとは、生物学的機能に毒性または有害な影響を有さない材料を指す。生体適合性ポリマーには、天然または合成のポリマーが含まれる。生体適合性ポリマーの例には、コラーゲン、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリオルトエステル、およびポリ無水物等のポリ（ α エステル）、ならびにそれらのコポリマー、ポリグリコール酸、およびポリグラクチン、セルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ素化ポリエチレン、フェノール類、ポリ-4-メチルペンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリレート、ポリベンゾオキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリールエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、フッ化ポリビニリデン、再生セルロース、シリコン、尿素ホルムアルデヒド、ポリグラクチン、またはこれらの材料のコポリマーもしくは物理的混合物が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0062】

生体適合性材料はまた、例えば、金属基板上のセラミックコーティングであってもよい。しかしながら、いずれの種類のコーティング材料およびコーティングも、異なる種類の材料、金属、セラミック、ポリマー、ヒドロゲル、またはこれらの材料のうちのいずれかの組み合わせから作製することが可能である。生体適合性材料には、酸化物、ホスフェート、カーボネート、窒化物、または炭窒化物が含まれるが、これらに限定されない。酸化物の中では、次のものが好ましい：酸化タンタル、酸化アルミニウム、酸化イリジウム、酸化ジルコニウム、または酸化チタン。基板は、金属、セラミック、ポリマー、またはこれらのうちのいずれかの組み合わせ等の材料から作製される。ステンレス鋼、ニチノール、チタン、チタン合金、またはアルミニウム等の金属、およびジルコニア、アルミナ、またはリン酸カルシウム等のセラミックが、特に興味深い。

20

30

【0063】

生体適合性材料はまた、それが時間とともに分解され、生体組織によって置き換えられ得るという点で、生分解性でもある。このような生分解性材料には、ポリ（乳酸-グリコール酸）、ポリ乳酸、ポリグリコール酸（PGA）、コラーゲン、または他の ECM 分子、他の結合組織タンパク質、マグネシウム合金、ポリカプロラクトン、ヒアルロン酸（hyaluric acid）、接着タンパク質、生分解性ポリマー、バイオポリマー、バイオガラス、バイオセラミック等、合成の生体適合性および生分解性材料、硫酸カルシウム、例えば、リン酸-カルシウム-水和物、リン酸-カルシウム無水物、リン酸二カルシウム二水和物、リン酸二カルシウム無水物、リン酸四カルシウム、オルトリン酸カルシウムリン酸（calcium orthophosphate phosphate）、ピロリン酸カルシウム、 α -リン酸三カルシウム、 β -リン酸三カルシウム等のリン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト等のアパタイト、または、例えば、ポリ（ α -ヒドロキシエステル）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（エーテルエステル）、ポリ無水物、ポリ（ホスファゼン）、ポリ（プロピレンフマレート）、ポリ（エステルアミド）、ポリ（エチレンフマレート）、ポリ（アミノ酸）、多糖類、ポリペプチド、ポリ（ヒドロキシブチレート）、ポリ（ヒドロキシバレレート）、ポリウレタン、ポリ（リンゴ酸）、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリカプロラクトン、ポリ（グリコリド-コトリメチレンカーボネート）、ポリジオキサノン等のポリマー、またはそれらのコポリマー、ターポリマー、またはそれらのポリマーの混合物、あるいは生体適合性材料と生分解性材料の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。さらに、自己強化された生分解性ガラスおよ

40

50

び生体活性ガラス、ならびにポリグリコリド、ポリラクチド、および／またはグリコリド／ラクチドコポリマー等、部分的に結晶質の生体吸収性ポリマーから構成される、超高強度生体吸収性複合物を使用することもできる。

【0064】

生体適合性ポリマーは、例えば、溶媒キャストリング、圧縮成形、フィラメント延伸、メッシュ成形、浸出成形、織成、およびコーティング等の方法を使用して、成形することができる。溶媒キャストリングの場合、塩化メチレン等の適切な溶媒中の1つ以上のポリマーの溶液を、分枝パターンレリーフ構造として鋳造する。溶媒の蒸発後に、薄膜が得られる。圧縮成形では、ポリマーを、1平方インチ当たり最大30,000ポンドの圧力で、適切なパターンに押し付ける。フィラメント延伸は、溶融ポリマーから延伸することを伴い、メッシュ成形は、繊維をフェルト様材料に圧縮することによってメッシュを形成することを伴う。浸出成形では、2つの材料を含有する溶液を、RUGの最終形態に近似する形状に広げる。次に、溶媒を使用して、成分のうちの1つを溶解除去して、孔の形成をもたらす。(Mikosの米国特許第5,514,378号を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる)。核生成では、RUGの形状にある薄膜を、放射性核分裂生成物に曝露し、これが放射線により損傷した材料のトラックを作出する。次に、ポリカーボネートシートに、酸または塩基でエッチング処理を行い、放射線により損傷をした材料のトラックを、孔に変化させる。最後に、レーザーを使用して、多数の材料を通る個々の穴を成形および破壊して、均一な孔寸法を有するRUG構造を形成する。コーティングとは、例えば、液化コポリマー(ポリ-DL-ラクチドコグリコリド50:50 80mg/ml 塩化メチレン)等の材料をポリマー構造にコーティングまたは浸透させることにより、その機械的特性を改変することを指す。コーティングは、1つの層で行ってもよく、または所望の機械的特性が達成されるまで、複数の層で行ってもよい。これらの成形技術は、組み合わせて採用することができ、例えば、ポリマーマトリックスを、織成し、圧縮成形して、一緒に接着させてもよい。さらに、異なるプロセスによって成形された異なるポリマー材料を、一緒にして、複合体形状を形成することができる。この複合体形状は、層状構造であってもよい。例えば、ポリマーマトリックスを、1つ以上のポリマーマトリックスに結合させて、多層ポリマーマトリックス構造を形成することができる。結合は、液体ポリマーでの接着または縫合によって行うことができる。さらに、ポリマーマトリックスを、固体ブロックとして形成し、レーザーまたは他の標準的なマシニング技術によって、その所望される最終形態に成形してもよい。レーザー成形とは、レーザーを使用して材料を除去するプロセスを指す。

【0065】

いくつかの実施形態において、1つ以上の層を備えるチップ10を、1つ以上のアクリル板40の上またはそれらの間に載置することができる。アクリル板は、マイクロ流体管がチップ10のポート12、14にアクセスすることを可能にする1つ以上の穴を有し得る。あるいは、アクリル板は、チップ10の全表面には及ばない、中心開口部を有してもよい。アクリル板は、ネジ、ボルト、ピン、接着剤、または当該技術分野で既知の他の締結手段を使用して、接続することができる。非限定的な例として、図15に示される実施形態では、チップ10は、2つのアクリル板40の間に配置することができる。図15に示される各アクリル板40は、直径25mmおよび厚さ2mmであり得る。アクリル板40は、チップ10を、損傷および／または汚染から保護することができる。アクリル板40は、マイクロ流体システムに載置するための寸法および形状であり得る。

【0066】

方法

本明細書に記載される技術の種々の実施形態に従って、本明細書に記載のチップに、他の作用物質または製剤と混合した、コラーゲンゲル等のヒドロゲルを充填させて、細胞成長チャンバ内での細胞移動および／またはコロニー形成を誘導、誘引、および／または支持することができる。いくつかの実施形態において、細胞成長チャンバでコロニー形成を行う細胞は、幹細胞であり得る。いくつかの実施形態において、細胞成長チャンバでコロ

10

20

30

40

50

ニー形成を行う細胞は、前駆細胞であり得る。いくつかの実施形態において、細胞成長チャンバでコロニー形成を行う幹細胞および／または前駆細胞は、分化して、1つ以上の分化細胞型をもたらす得る。いくつかの実施形態において、細胞成長チャンバでコロニー形成を行う細胞は、組織構造または微小器官構造を形成し得る。細胞成長チャンバ内でコロニー形成を行うか、または幹細胞から発生し得る細胞型および／または組織型には、間葉系幹細胞、脂肪由来幹細胞、内皮幹細胞、造血幹細胞、骨細胞、骨髄細胞、肝細胞、血球、脂肪細胞、筋肉細胞、幹細胞、血管細胞、免疫細胞、分化細胞、病変細胞、結合組織、筋肉組織、神経組織、および／または上皮組織が挙げられるが、これらに限定されない。

【0067】

いくつかの実施形態において、ヒドロゲルは、骨成長を強化または刺激する組成物を含み得る。いくつかの実施形態において、これらの組成物は、脱塩骨粉、ならびに／または骨形態形成タンパク質2 (BMP-2) (配列番号: 01、NCBI ID NO: NP_001191.1) および／もしくはBMP-4 (配列番号: 02、NCBI ID NO: NP_001193、NP_570911、およびNP_570912) のタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態において、これらの組成物は、脱塩骨粉、ならびに／またはBMP-2および／もしくはBMP-4のタンパク質、ならびに任意で、他の骨誘導材料、すなわち、細胞成長のためのマトリックスの提供、埋め込みデバイスへの細胞移動の誘引、細胞成長の促進、骨細胞成長の促進、骨髄細胞成長の促進、骨細胞分化の促進、骨髄細胞分化の促進、骨組織成長の促進、および／または骨髄組織成長の促進に寄与する、小分子、ペプチド、またはタンパク質等の材料を含んでもよい。いくつかの実施形態において、ゲル混合物は、ポート、流体チャネル、および／または細胞成長チャンバに配置することができる。いくつかの実施形態において、骨誘導材料を細胞成長チャンバに配置してもよく、コラーゲンをポートに配置してもよい。いくつかの実施形態において、骨誘導材料を、細胞成長チャンバおよび流体チャネルに配置してもよく、コラーゲンをポートに配置してもよい。

【0068】

脱塩骨粉は、市販で入手することができる。あるいは、脱塩骨粉は、マウス大腿骨を摘出し、粉碎し、篩にかけ、直径250 μm 未満の粒子を得ることによって調製することができる。この粉末を、次いで、0.5N HClを使用して脱塩することができる。

【0069】

例示的なヒドロゲルのゲル混合物は、I型コラーゲンゲル (3 mg/mL)、脱塩骨粉 (0.1 mg/ μL)、BMP-2 (5 ng/ μL)、およびBMP-4 (5 ng/ μL) を使用して、調製することができる。BMP-2およびBMP-4は、Sigma Aldrichから市販入手可能である (St. Louis MO、それぞれ、カタログ番号B3555およびB2680)。

【0070】

他の実施形態において、チップで成長した組織は、例えば、骨髄、リンパ節、または脾臓を含む、造血または免疫系組織であり得、コラーゲンゲルは、例えば、リンパ節または脾臓組織の成長を強化または刺激する組成物を含み得る。いくつかの実施形態において、これらの組成物は、インターロイキン、ケモカイン、インターフェロン、腫瘍壊死因子、ヘマトポエチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を含み得る。

【0071】

他の実施形態において、チップで成長した組織は、例えば、結合組織、血管組織、または筋膜型構造であり得、コラーゲンゲルは、例えば、結合組織、血管組織、または筋膜型構造の成長を強化または刺激する組成物を含み得る。いくつかの実施形態において、これらの組成物は、VEGF (Cat # V7259、Sigma Aldrich, St. Louis, MO) およびPDGF (Cat # P8147、Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を含み得る。

【0072】

10

20

30

40

50

本明細書に記載される技術のいくつかの実施形態に従って、チップを、次いで、対象に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、チップは、皮下に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、チップは、腹腔内に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、チップは、筋肉内に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、チップは、皮下部位において、筋肉に縫合することができる。チップに、1つ以上の穴を提供して、縫合用針および／または糸が埋め込みデバイスを通すのを可能にすることができる。好ましい実施形態において、チップは、細胞成長チャンバの開放側面および／またはポートが、対象の下層筋肉組織に面するように、配置させることができる。

【0073】

いくつかの実施形態において、インビボ埋め込み段階は、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも4週間、少なくとも6週間、少なくとも8週間、少なくとも10週間、またはそれ以上継続し得る。埋め込み段階の継続期間は、細胞成長チャンバまたは領域における、所望される細胞の移動およびコロニー形成量の関数として、決定することができる。これは、対象および細胞成長チャンバまたは領域に供給されるコラーゲンゲルの組成物または他の混合物に依存し得る。

【0074】

いくつかの実施形態において、チップを皮下に埋め込むと、創傷治癒プロセスにより、埋め込みデバイスの細胞成長チャンバ内で成長する微小毛細血管、間葉系幹細胞、幹細胞、血管細胞、免疫細胞、分化細胞、および／または病変細胞を含む結合組織がもたらされ、骨誘導材料の存在のため、血中造血前駆細胞を取り込んで完全に機能性の骨髄を形成する空間を有する骨を形成し得ると考えられている。

【0075】

いくつかの実施形態において、チップ10を、対象に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、チップ10の中間層30を例とする、完全なマイクロ流体チップの一部をなす埋め込みデバイスを、対象に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、中間層30（例えば、カートリッジ）の構造を有するデバイスを例とする、完全なマイクロ流体チップの一部をなすわけではないが、後でさらなる構造体に結合されことなく完全なマイクロ流体チップを構成する埋め込みデバイスを、対象に埋め込むことができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは、対象に埋め込むことが可能であり、インビボ成長期間が終了した後、埋め込みデバイスを、埋め込みデバイスおよび／またはチップから細胞、組織、および／またはオルガノイドを取り出すことなく、マイクロ流体デバイスに結合させることができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは対象に埋め込むことが可能であり、インビボ成長期間が終了した後、細胞、組織、および／またはオルガノイドを、埋め込みデバイスから取り出して、マイクロ流体デバイスに配置することができ、それを、マイクロ流体システムに結合させてもよい。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは対象に埋め込むことが可能であり、インビボ成長期間が終了した後、埋め込みデバイスを、埋め込みデバイスから細胞、組織、および／またはオルガノイドを取り出すことなく、対象に移植することができる。いくつかの実施形態において、埋め込みデバイスは対象に埋め込むことが可能であり、インビボ成長期間が終了した後、細胞、組織、および／またはオルガノイドを、埋め込みデバイスから取り出して、対象に移植することができる。

【0076】

インビトロ／エキソビボ方法

本明細書に記載される技術のいくつかの実施形態は、インビボ埋め込み段階中に2つ以上の生理学および構造的に統合された組織から構成される機能性器官を形成すること、ならびに、本明細書に記載のインビトロおよび／またはエキソビボ段階の少なくとも一部の間、これらの構造的および機能的な関係性を維持することに関する。

【0077】

本明細書に記載される技術のいくつかの実施形態に従って、インビボ埋め込み段階の終

了時に、チップを、対象から取り出して、マイクロ流体システムに配置するか、またはそれに接続することができる。いくつかの実施形態において、マイクロ流体システムは、例えば、1つ以上の流体チャネルを使用して連続的な培地灌流を提供し、細胞および組織の生存率を向上および／または維持するために、使用することができる。いくつかの実施形態において、チップを、埋め込み部位から取り出し、次いで、灌流が開始されるマイクロ流体デバイスに接続することができる。他の実施形態において、チップは、埋め込み部位から取り出す前にマイクロ流体デバイスに接続することができ、埋め込み部位の組織からチップおよびその中に含有される組織を完全に引き離す前の任意の時点で、灌流が開始される。

【0078】

10

いくつかの実施形態において、チップは、チップをマイクロ流体システムに移送するために埋め込み部位から取り出した後に、栄養素が豊富な培地に配置することができる。

【0079】

いくつかの実施形態に従って、チップ内に存在する細胞を、連続的な灌流条件下で培養することができ、さらなる組織に分化および／またはそれを生成させることができる。代替的な実施形態において、細胞を、所望される広範な灌流プロファイルおよび条件を使用して培養し、培養された細胞の発達および維持を制御することができる。いくつかの実施形態に従って、チップ内に存在する細胞を、連続的な灌流条件下で培養することができ、それが、骨髓組織に分化し得る、および／またはさらなる骨髓組織を生成し得る。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する細胞の生存率は、埋め込みデバイスが第2の

20

【0080】

チップの移送のための栄養素が豊富な培地としても使用可能である、灌流に適した培地は、市販入手可能であり、チップ内で成長する特定の組織に適した培地は、当業者に周知である。培地に、例えば、所望の細胞のインビトロでの成長を強化する、追加の栄養素、抗生物質、成長因子、または他の化合物を補充してもよい。単なる例として、肝組織の成長に適した培地は、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS)、100 U/mL ペニシリン、および100 U/mL ストレプトマイシンを含有するダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) であり得、一方で骨髓の成長に適した培地は、非必須アミノ酸 (Gibco)、ピルビン酸ナトリウム (Sodium Pyruvate) (Gibco)、100 U/mL ペニシリン、および100 U/mL ストレプトマイシンを含有する MyeloCul M5300 培地 (Stem Cell Technologies) であり得る。

30

【0081】

いくつかの実施形態において、チップで成長した細胞および／または組織を、インビトロで用いて、治療または研究目的のための細胞または幹細胞を生成することができる。いくつかの実施形態において、チップで成長した細胞および／または組織を、インビボで用いて、治療または研究目的のための造血細胞または造血幹細胞を生成することができる。いくつかの実施形態において、造血細胞は、赤血球、白血球、血小板、造血幹細胞、リンパ球、好酸球、好中球、単球、造血前駆細胞、間質細胞、およびこれらの細胞型の2つ以上の混合からなる群から選択することができる。いくつかの実施形態において、細胞は、チップの流出液から収集することができる。いくつかの実施形態において、細胞は、細胞および／または組織を細胞成長チャンバ22から取り出すことによって、収集することができる。いくつかの実施形態において、細胞は、チップ内に存在する間に、治療または研究目的で用いることができる。

40

【0082】

いくつかの実施形態において、所望の細胞型の生成を強化する成長因子または化合物を、灌流液に添加することができる。非限定的な例として、エリスロポエチンは、赤血球の生成を刺激し、VEGFは、血管形成を刺激し、トロンプオエチンは、巨核球および血小板の生成を刺激する。

【0083】

50

本明細書に記載の方法によって生成された細胞は、さらなる操作なしに治療または研究目的で使うことができるか、またはそれらの最終使用の前に操作してもよい。非限定的な例として、細胞の操作は、細胞型に従って分類すること、培養液中で増殖すること、薬学的組成物の他の成分と混合すること、細胞を、細胞の状態、機能、もしくは機能性を改変させる化合物（すなわち、核酸、タンパク質、ペプチド、および／もしくは小分子）と接触させること、凍結させること、ならびに／または冷蔵することを含み得る。

【0084】

いくつかの実施形態において、組織および／または細胞を含有するチップの生成を目的とする方法およびデバイスはまた、細胞および／または組織、例えば、骨髓組織および／または造血細胞の、いくつかの化合物（例えば、化学療法もしくは放射線療法）に対する応答を調査するためにも使用可能である。いくつかの実施形態において、組織および／または細胞を含有するチップはまた、細胞、組織、および／または器官構造の分化、形成、生存、成長、機能、および／または再構築の制御に関与する機構を調査するためにも使用可能である。これらの実施形態において、細胞成長チャンバ内の細胞に、所定の時間間隔または送達プロファイル（所定の濃度、量、および時間間隔に応じて）で、いくつかの化合物を（例えば、血小板の生成を調節するトロンボポエチンまたは赤血球の生成を制御するエリスロポエチン等のホルモン）、流体チャネルを介して送達することが望ましい場合がある。流体チャネルを介して細胞成長チャンバ内の細胞に送達することができる化合物には、ホルモン、酵素、細胞、遺伝子発現抑制分子、いくつかの酵素の阻害剤、小分子、ペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、抗体、成長因子、ウイルス、細菌、寄生生物、マーカー、および／または色素が挙げられるが、これらに限定されない。

【0085】

いくつかの実施形態において、チップ内に存在する組織および／または細胞を使用して、毒性について化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する骨髓組織および／または造血細胞を使用して、骨髓に対する毒性について、化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する組織および／または細胞を使用して、組織またはその構成要素の成長、発達、および／または機能を増加させる能力について、化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する骨髓組織および／または造血細胞を使用して、骨髓またはその構成要素の成長、発達、生存、成長、および／または機能を増加させる能力について、化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する組織および／または細胞を使用して、組織またはその構成要素の成長、生存、発達、および／または機能を阻害する能力について、化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する骨髓組織および／または造血細胞を使用して、骨髓またはその構成要素の成長、生存、発達、および／または機能を阻害する能力について、化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する骨髓組織および／または造血細胞を使用して、骨髓由来のいくつかの細胞および／または非細胞生成物を移動させる能力について、化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する骨髓組織および／または造血細胞を使用して、骨髓由来のいくつかの細胞および／または非細胞生成物の移動を阻害する能力について、化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する組織および／または細胞を使用して、組織またはその構成要素のための造影剤としての適合性について、化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する骨髓組織および／または造血細胞を使用して、骨髓またはその構成要素のための造影剤としての適合性について、化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する組織および／または細胞を使用して、薬物またはリード化合物の薬物動態を特徴付けることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する骨髓組織および／または造血細胞を使用して、薬物またはリード化合物の薬物動態を特徴付けることができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する組織お

10

20

30

40

50

よび／または細胞を使用して、その組織型の微小環境、構造、機能、および／または発達を研究することができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する骨髓組織および／または造血細胞を使用して、骨髓の微小環境、構造、機能、および／または発達を研究することができる。

【0086】

いくつかの実施形態において、チップ内に存在する組織および／または細胞を使用して、さらなるインビトロシステムおよび／またはモデルで使用するための、細胞、および／または組織によって生成される非細胞因子もしくは化合物を生成することができる。いくつかの実施形態において、チップ内に存在する骨髓組織および／または造血細胞を使用して、さらなるインビトロシステムおよび／またはモデルで使用するための、血球、免疫細胞、他の骨髓由来細胞、および／または骨髓によって生成される非細胞因子もしくは化合物を生成することができる。非限定的な例として、骨髓由来因子は、ペプチド、タンパク質、小分子、ヌクレオチド、脂質、炭水化物、サイトカイン、および／または成長因子であり得る。非限定的な例として、化合物に対する肝組織の応答は、肝組織のインビトロモデルには存在しない免疫成分を含み得る。チップ内に存在する骨髓細胞および／または組織によって生成された免疫細胞は、肝機能および応答のより完全なモデルを構築するために、肝組織のインビトロモデルに送達することができる。いくつかの実施形態において、骨髓の生成物を、本明細書の他の箇所に記載されるように、チップから収集し、追加のインビトロシステムおよび／またはモデルに添加することができる。いくつかの実施形態において、骨髓を含有するチップを、追加のインビトロモデルおよび／またはシステムと同じマイクロ流体システムに位置付けることができる。灌流液は、骨髓および骨髓の生成物を含有する流出液を含有するチップを通過させることができ、追加のインビトロモデルおよび／またはシステムに送達することができる。骨髓を含有するチップは、追加のインビトロモデルおよび／またはシステムに対して、上流、下流、またはその両方であってもよい。骨髓を含有するチップの流出液の全てまたは一部を、追加のインビトロモデルおよび／またはシステムに送達することができる。

【0087】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法およびデバイスを使用して、発達の特定の段階での細胞および／または組織の研究またはそれらの生成を行うことができる。埋め込みの時間、組織誘導材料の同一性および濃度、チップの設計、ならびに灌流液の組成を変化させることによって、チップ上に存在する細胞および／または組織の発達の段階を、変化させることができる。いくつかの実施形態において、これを使用して、例えば、骨髓発達のプロセス、ある発達段階における骨髓構成物質の機能、発達の間の骨髓に対する化合物の分化効果、および／または骨髓の発達に対する化合物の効果を研究することができる。非限定的な例として、化合物は、化学療法剤、放射線療法、分化、形成、機能、もしくは再構築の修飾物質、ホルモン、核酸、ペプチド、タンパク質、抗体、小分子、薬物リード、酵素、細胞、ウイルス、細菌、寄生生物、ヌクレオチド、マーカー、色素、造影剤、酵素、ナノ粒子、および／または遺伝子発現抑制分子であり得る。

【0088】

いくつかの実施形態において、チップ内に存在する組織および／または細胞は、ヒトに埋め込まれたことのない、ヒト細胞および／または組織であり得る。これらの実施形態において、チップを、ヒト細胞および／またはヒト化細胞を有する動物に埋め込むことができる。非限定的な例として、マウスに放射線照射を行って、その内因性骨髓を排除し、次いで、ヒト骨髓および／またはヒト造血幹細胞のグラフトを与えることができる。上述の手順の前、最中、または後にかかわらず、チップが埋め込まれると、そこに、最終的にヒト骨髓細胞が増殖することになる。埋め込み部位から取り出され、マイクロ流体システム内に配置されると、チップ内に含まれる骨髓は、遺伝子的にヒトのものとなる。この方法で生成された骨髓は、本明細書に記載される実施形態のいずれかで使用することができる。

【0089】

いくつかの実施形態において、異種移植されるヒト細胞源は、癌腫瘍または癌性の組織および／または細胞である。いくつかの実施形態において、好適な種類の癌には、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、骨髄増殖性疾患、ランゲルハンス細胞組織球増加症、骨髄腫、および骨髄異形性症候群が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、異種移植されるヒト細胞は、疾患組織から得ることができる。いくつかの実施形態において、異種移植されるヒト細胞は、造血疾患を有するヒトから得ることができる。造血疾患には、サラセミア、第ⅠX因子欠乏症、血友病、鎌状赤血球症、アミロイドーシス、無顆粒球症、貧血症、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症、汎血球減少症、グランツマン血小板無力症、尿毒症、血小板貯蔵プール欠乏症、フォンヴィルブランド病、無フィブリノーゲン血症、および自己免疫疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0090】

いくつかの実施形態において、チップを第1の対象から取り出す際、チップ内に存在する細胞のうちのいくつかまたは全てを、チップから取り出してもよい。非限定的な例として、チップ内の骨髄ニッチにコロニー形成を行った骨髄細胞を、化学的および／または物理的手段により取り出すことができる。チップの細胞成長チャンバ内の細胞を、チップから取り出してもよく、および／または部分的もしくは完全に組織から脱細胞化するために、当該技術分野で既知の方法によって生存できないようにすることができる。非限定的な例には、(1) チップおよび／もしくは組織を洗浄剤で洗浄すること、または(2) チップを緩衝液で洗浄し、次いで、組織をパラホルムアルデヒドで固定することが挙げられる。いくつかの実施形態において、チップおよび／または組織を、4℃で48時間、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、次いで、チップおよび／または組織を、4℃で24時間、70%エタノールに浸漬し、PBS中で3回、毎回4℃で2時間洗浄してPFAを流すことによって、脱細胞化することができる。いくつかの実施形態において、チップの内部髄腔は、髄腔の端部に小さな切開を行い、培地を流すことによって、除去することができる。

20

【0091】

残りの脱細胞化された骨髄骨格を、エキソビポおよび／またはインビトロで使用することができ、別の源から供給された骨髄および／または血球を再び増殖させることができる。チップ内においてインビポで成長した組織および第2の細胞集団は、異なる種に由来するものであってもよく、例えば、チップを、マウスに埋め込んで、エキソビポで脱細胞化し、次いで、ヒト骨髄細胞を再増殖させることができる。

30

【0092】

インビポ方法

いくつかの実施形態において、組織および／もしくは細胞を含有するチップ、またはチップから取り出された組織および／もしくは細胞を、第1の対象から取り出した後に、第2の対象(例えば、ヒトもしくは動物)に埋め込み、インビポで使用することができる。いくつかの実施形態において、組織および／もしくは細胞を含有するチップ、またはチップから取り出された組織および／または細胞を、第2の対象の皮下に埋め込むことができる。チップからの任意の量の組織および／または細胞を、インビポで使用する事ができ、例えば、チップ内の組織および／または細胞の0.1%~100%を、インビポで使用してもよい。例えば、チップ内の組織もしくは細胞の少なくとも0.1%、チップ内の組織もしくは細胞の少なくとも1%、チップ内の組織もしくは細胞の少なくとも10%、チップ内の組織もしくは細胞の少なくとも50%、チップ内の組織もしくは細胞の少なくとも90%、またはチップ内の組織もしくは細胞の少なくとも95%もしくはそれ以上を、インビポで使用してもよい。組織および／または細胞は、例えば、組織および／または細胞の一部分の細胞分類(例えば、FACS)または物理的な分離によって、インビポで使用する前に、選択および／または分離することができる。

40

【0093】

いくつかの実施形態において、第1および第2の両方の対象が、動物であってもよい。

50

いくつかの実施形態において、第1および第2の両方の対象は、同じ種の非ヒト動物であってもよく、例えば、両方の対象が、マウスであってもよい。いくつかの実施形態において、第1および第2の両方の対象は、ヒトであり得る。いくつかの実施形態において、第1および第2の対象は、同じ対象であり得る。いくつかの実施形態において、第1および第2の対象は、異なる種のものであってもよく、例えば、第1の対象はマウスであってもよく、第2の対象がヒトであってもよい。

【0094】

いくつかの実施形態において、チップは、ヒト細胞および／またはヒト化細胞を有するマウスに埋め込むことができる。インビボ成長期間の後、組織および／もしくは細胞を含むチップ、またはチップから取り出された組織および／もしくは細胞を、チップで成長した細胞型の移植を必要とするヒトに移植することができる。いくつかの実施形態において、チップは、ヒトのおよび／またはヒトされた化骨髄または造血細胞を有するマウスに埋め込むことができる。インビボ成長期間の後、チップを、骨髄および／または造血細胞の移植を必要とするヒトに移植する。

【0095】

いくつかの実施形態において、レシピエント（例えば、第2の）対象は、癌、造血疾患、放射線毒性、または欠陥のある免疫系を有し得る。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、化学療法または放射線療法を受けたことがあってもよい。いくつかの実施形態において、レシピエントは、骨髄内に見られる血球型のうちの1つ以上が機能不全になる、血液疾患を有すると診断された対象である。いくつかの実施形態において、レシピエントは、治療を受け、それによって、それらの内因性骨髄が損傷、障害、または排除を受けた、ヒトである。このような治療には、例えば、化学療法、放射線療法が含まれ得る。いくつかの実施形態において、ヒトは、放射線源、または化学物質、汚染物質、もしくは感染に曝露され、それによって、それらの内因性骨髄が損傷、障害、または排除を受けたものであり得る。このような化学物質、汚染物質、または感染の例には、アルコール、ベンゼン、肝炎、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、パルボウイルスB19、およびHIVが挙げられる。

【0096】

さらなる実施形態において、組織および／または幹細胞は、ヒトが、その組織および／または細胞型を損傷、障害、または排除すると考えられる治療を受ける前に、ヒトから取り出されることができる。非限定的な例として、骨髄組織および／または造血幹細胞は、ヒトが、それらの骨髄を損傷、障害、または排除すると考えられる治療を受ける前に、ヒトから取り出されることができる。ヒトから取り出された骨髄組織および／または造血幹細胞を、免疫不全動物に埋め込むことができる。このようなマウスに埋め込まれたチップは、遺伝子的にヒトと同一な骨髄組織および／または造血細胞によってコロニー形成され、動物でのインビボ成長期間の後、チップをヒトに埋め込むか、またはチップに含有される細胞および／もしくは組織をヒトに埋め込み、それによって、遺伝子的にヒトと同一な骨髄組織および／または造血細胞の源を供給することができる。いくつかの実施形態において、チップまたはチップに含有される細胞および／もしくは組織は、マウスの埋め込み部位からそれらを取り出した後、ヒトにそれらを移植する前に、保管、保存、または維持することができる。いくつかの実施形態において、チップまたは細胞および／もしくは組織は、凍結によって保存することができる。いくつかの実施形態において、チップまたは細胞および／もしくは組織は、冷蔵によって保存することができる。いくつかの実施形態において、チップに含有される細胞は、本明細書の他の箇所に記載のように、埋め込み部位からチップを取り出し、それをマイクロ流体システムに接続することによって、維持することができる。灌流液を、マイクロ流体システムを介して供給することができ、チップに含有される細胞は、チップまたは骨髄組織および／もしくは造血細胞をヒトに移植することが所望されるまで、それらの生存率を維持する。

【0097】

いくつかの実施形態において、チップを対象に埋め込むことができる。インビボ成長期

間の後、チップを、マイクロ流体システムに接続することができ、チップに含有される組織および／または細胞を、本明細書に記載のように、流体の灌流によって維持することができる。チップを埋め込み部位から取り出した後、対象は、チップ上で成長した細胞および／または組織を損傷、障害、または排除する治療を受ける。このような治療が終了した後、組織および／もしくは細胞を含有するチップ、またはチップから取り出された組織および／もしくは細胞を、対象に埋め込み、それによって、遺伝子的に対象と同一な組織および／または細胞の源を供給することができる。非限定的な例として、骨成長がチップ内で誘導されたインビボ成長期間の後、本明細書に記載のように、チップを、マイクロ流体システムに接続し、チップ上に含有される骨髄組織および／または造血細胞を、流体の灌流によって維持することができる。チップを埋め込み部位から取り出した後、対象は、それらの内因性骨髄を損傷、障害、または排除する治療を受ける。このような治療が終了した後、骨髄組織および／もしくは造血細胞を含有するチップ、またはチップから取り出された骨髄組織および／もしくは造血細胞を、対象に埋め込み、それによって、遺伝的に対象と同一な骨髄組織および／または造血細胞の源を供給することができる。

10

【0098】

いくつかの実施形態において、チップまたはチップ内に含有される組織および／もしくは細胞は、第1の対象の埋め込み部位からそれらを取り出した後、第2の対象にそれらを戻すまで、および／または第1の対象の埋め込み部位からそれらを取り出した後、第1の対象にそれらを戻すまで、保管、保存、または維持することができる。いくつかの実施形態において、チップまたは細胞および／もしくは組織は、凍結によって保存することができる。いくつかの実施形態において、チップまたは細胞および／もしくは組織は、冷蔵によって保存することができる。いくつかの実施形態において、チップに含有される細胞は、本明細書の他の箇所に記載のように、埋め込み部位からチップを取り出し、それをマイクロ流体システムに接続することによって、維持することができる。灌流液を、マイクロ流体システムを介して供給して、チップに含有される細胞が、チップまたは骨髄組織および／もしくは造血細胞をヒトに移植することが所望されるまで、それらの生存率を維持することができる。いくつかの実施形態において、チップおよび／またはチップ内に含有される組織および／または細胞は、細胞および／または組織をエキソビボで維持、保管、または保存する複数の方法に供することができ、例えば、チップ内の組織を、マイクロ流体デバイスで培養し、次いで、凍結させ、その後、レシピエント対象に移植される前に解凍することができる。

20

30

【0099】

いくつかの実施形態において、チップならびに／またはチップ内に含有される組織および／もしくは細胞は、細胞および／または組織をエキソビボで維持、保管、および／または保存することなく、第1の対象から第2の対象へ、直接移植してもよい。

【0100】

いくつかの実施形態において、埋め込みデバイス内に含有される組織および／または細胞は、第2の対象への埋め込み前に、遺伝子改変される。いくつかの実施形態において、デバイスは、遺伝子改変された細胞によってコロニー形成され、例えば、第1の対象は、遺伝子改変された細胞を含む。いくつかの実施形態において、第1の対象は、トランスジェニック対象である。いくつかの実施形態において、組織および／または細胞は、埋め込みデバイスならびにその中に含有される組織および／または細胞が第1の対象から取り出された後に、遺伝子改変される。いくつかの実施形態において、組織および／または細胞は、組織および／または細胞が埋め込みデバイスから取り出された後に、遺伝子改変される。いくつかの実施形態において、組織および／または細胞は、組織および／または細胞がマイクロ流体デバイスまたはシステムにおいて維持または培養されている間に、遺伝子改変される。非限定的な例として、組織および／または細胞は、遺伝子発現を増加もしくは減少するか、または外因性遺伝子（例えば、マーカー遺伝子）を発現するように、遺伝子改変されてもよい。組織および／または細胞を遺伝子改変する方法は、当該技術分野で周知であり、ウイルスベクター、プラスミドベクター、相同的組み換え、安定した統合、

40

50

および一過性発現が含まれるが、これらに限定されない。

【0101】

薬学的組成物

対象への投与のために、細胞および／もしくは組織を含有するチップ、またはチップ内に含有される細胞および／もしくは組織、またはチップ内に含有される細胞および／もしくは組織の生成物を、薬学的に許容される組成物中に提供することができる。これらの薬学的に許容される組成物は、上述のように、1つ以上の薬学的に許容される担体（添加剤）および／または希釈剤と一緒に製剤化された、チップ、細胞、組織、および／または細胞もしくは組織の生成物を含む。以下に詳細に記載されるように、本明細書に記載される技術の薬学的組成物は、次のものに適合するものを含む、固体または液体の形態での投与のために特別に製剤化され得る：（１）経口投与、例えば、水薬（水溶性もしくは非水溶性の溶液もしくは懸濁液）、ロゼンジ、糖衣錠、カプセル、丸剤、錠剤（例えば、口腔、舌下、および全身での吸収を目的とするもの）、巨丸剤、粉末、顆粒、舌への投与のためのペースト、（２）非経口投与、例えば、例として滅菌溶液もしくは懸濁液、または持続放出製剤としての皮下、筋肉内、静脈内、または硬膜外への注射、（３）局所投与、例えば、皮膚に塗布されるクリーム、ローション、ゲル、軟膏、または制御放出パッチもしくはスプレー、（４）腔内または直腸内、例えば、ペッサリー、クリーム、坐剤、または泡状として、（５）舌下、（６）眼内、（７）経皮、（８）経粘膜、あるいは（９）経鼻。さらに、組成物は、患者に埋め込むことができるか、または薬物送達システムを使用して注射することができる。コーティングされた送達デバイスもまた、有用であり得る。例えば、Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24:199-236 (1984)、Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981)、米国特許第3,773,919号、米国特許第6,747,014号、および米国特許第353,270,960号を参照されたい。

10

20

【0102】

本明細書で使用される際、「薬学的に許容される」という用語は、健全な医療的判断の範囲内で、妥当な利益／危険性の比率に見合い、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を有することなく、ヒトおよび動物の組織と接触しての使用に好適な、化合物、材料、組成物、および／または投与形態を指す。

30

【0103】

本明細書で使用される際、「薬学的に許容される担体」という用語は、液体もしくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造補助剤（例えば、滑剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、もしくはステアリン酸亜鉛、またはステアリン酸）、または溶媒封入材料等、本主題の化合物を1つの器官または身体の一部から別の器官または身体の一部へ担持または移送することに関与する、薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクルを指す。各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、患者に有害でないという意味で、「許容される」必要がある。薬学的に許容される担体として機能し得る材料のいくつかの例には、次のものが含まれるが、これらに限定されない：（１）ラクトース、グルコース、およびスクロース等の糖類、（２）トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン等のデンプン、（３）カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶性セルロース、および酢酸セルロース等、セルロースおよびその誘導体、（４）粉末トラガカント、（５）モルト、（６）ゼラチン、（７）ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、およびタルク等の滑剤、（８）カカオバターおよび坐剤ワックス等の賦形剤、（９）ピーナツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油等の油、（１０）ポリエチレングリコール等のグリコール、（１１）グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール（PEG）等のポリオール、（１２）オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル等のエステル、（１３）寒天、（１４）水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム

40

50

ム等の緩衝剤、(15) アルギン酸、(16) 発熱物質不含水、(17) 等張食塩水、(18) リンガー溶液、(19) エチルアルコール、(20) pH緩衝溶液、(21) ポリエステル、ポリカーボネート、および／またはポリ無水物、(22) ポリペプチドおよびアミノ酸等の増量剤、(23) 血清アルブミン、HDL、およびLDL等の血清成分、(22) エタノール等のC₂-C₁₂アルコール、ならびに(23) 薬学的製剤に採用される他の非毒性の適合性物質。湿潤剤、結合剤、充填剤、滑剤、着色剤、崩壊剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、保存剤、水、塩類溶液、アルコール、酸化防止剤、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等もまた、製剤中に存在してもよい。「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」等の用語は、本明細書で互換的に使用される。

10

【0104】

多数の組織化された界面活性剤構造が研究されており、薬物の製剤化に使用されている。これらには、単分子層、ミセル、二分子層、および小胞体が含まれる。リポソーム等の小胞体は、薬物送達の観点から、それによって提供されるそれらの特異性および作用持続期間のため、強い関心を集めている。リポソームは、脂溶性材料から形成された膜と、水溶性の内部を有する、単層または多層の小胞体である。水溶性の部分が、送達される組成物を含む。リポソームは、カチオン性(Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985)、アニオン性(Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274)、または非イオン性(Hu et al., S. T. P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466)であり得る。リポソームは、いくつかの用途に有用な特定の特性を与えることができ、当該技術分野において説明されている、多数の異なるリン脂質、脂質、糖脂質、および／またはポリマーを含み得る(Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765; Papahadjopoulos et al. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64; Gabizon et al. PNAS, 1988, 85, 6949; Klibanov et al. FEBS Lett., 1990, 268, 235; Sunamoto et al. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778; Illum et al. FEBS Lett., 1984, 167, 79; Blume et al. Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91; 米国特許第4, 837, 028号、同第5, 543, 152号、同第4, 426, 330号、同第4, 534, 899号、同第5, 013, 556号、同第5, 356, 633号、同第5, 213, 804号、同第5, 225, 212号、同第5, 540, 935号、同第5, 556, 948号、同第5, 264, 221号、同第5, 665, 710号、欧州特許EP 0 445 131 B1、同EP 0 496 813 B1、欧州特許公報WO 88/04924、同WO 97/13499、同WO 90/04384、同WO 91/05545、同WO 94/20073、同WO 96/10391、同WO 96/40062、同WO 97/0478)。

20

30

40

【0105】

本明細書に記載される技術の組成物は、エマルジョンまたはマイクロエマルジョンとして調製および製剤化することができる。エマルジョンは、典型的に、1つの液体が通常0.1 μmを超える直径の液滴の形態で別の液体に分散された異質系であり、当該技術分野で説明されている。マイクロエマルジョンは、水、油、および両親媒性物質の系として定義することができ、単一の光学的に等方性で熱力学的に安定な溶液であり、界面活性剤および共界面活性剤を含み得る。これらの薬物送達手段はいずれも、当該技術分野で説明されている(例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V.

50

, Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY, Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199、Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Volume 1, p. 245、Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 2, p. 199, 245, & 335、Higuchi et al., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301、Leung and Shah, Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215、Schott, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271、Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390、Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205、Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143、Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92、米国特許第6, 191, 105号、同第7, 063, 860号、同第7, 070, 802号、同第7, 157, 099を参照されたい)。

【0106】

一実施形態において、リポソームまたはエマルジョン製剤は、界面活性剤を含む。界面活性剤は、エマルジョン（マイクロエマルジョンを含む）およびリポソーム等の製剤において、広範な応用が見出される。親水性基（「頭部基」としても知られる）の性質が、製剤に使用される異なる界面活性剤を分類するための最も有用な手段を提供する（Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285）。好適な界面活性剤には、脂肪酸および／またはそれらのエステルもしくは塩、胆汁酸および／またはそれらの塩が挙げられる。いくつかの実施形態において、界面活性剤は、アニオン性、カチオン性、または非イオン性であり得る。薬物製品、製剤、およびエマルジョンにおける界面活性剤の使用が検討されている（Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285）。

【0107】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、種々の浸透促進剤を採用して、細胞膜を越えて化合物の効果的な送達をもたらす。浸透促進剤は、5つの広範な分類、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、非キレート非界面活性剤のうちの1つに属するとして分類することができ、これらは全て他の場所に記載されている（例えば、Malmsten, M. Surfactants and Polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002、Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92、Takahashi et al., J. Pharm. Pharma

col., 1988, 40, 252、Touitou, E., et al. Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006、Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33、El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654、Brunton, Chapter 38 Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935、Swinyard, Chapter 39 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783、Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25、Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583、Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339、Katdare, A. et al., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006、Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51を参照されたい)。

10

20

【0108】

経口製剤およびそれらの調製は、米国特許第6,887,906号、米国特許出願公開第20030027780号、および米国特許第6,747,014号に記載され、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。非経口、実質内（脳内）、髄腔内、脳室内、または肝内投与のための組成物および製剤には、緩衝剤、希釈剤、ならびに浸透促進剤、担体化合物、および他の薬学的に許容される担体または賦形剤等であるがこれらに限定されない他の好適な添加剤もまた含有する滅菌水溶液が挙げられる。水性懸濁液は、さらに、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および／またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させる物質を含有してもよい。懸濁液はまた、安定剤を含有し得る。

30

【0109】

気道への送達のためのエアロゾルは、当該技術分野で既知である。例えば、Adjey, A. and Garren, J. Pharm. Res., 1:565-569 (1990)、Zanen, P. and Lamm, J.-W. J. Int. J. Pharm., 114:111-115 (1995)、Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990)、Anderson et al., Am. Rev. Respir. Dis., 140:1317-1324 (1989))、ならびにペプチドおよびタンパク質の全身送達にも同様に効力を有する (Patton and Platz, Advanced Drug Delivery Reviews, 8:179-196 (1992))、Timsina et al., Int. J. Pharm., 101:1-13 (1995)、およびTansey, I. P., Spray Technol. Market, 4:26-29 (1994)、French, D. L., Edwards, D. A. and Niven, R. W., Aerosol Sci., 27:769-783 (1996)、Visser, J., Powder Technology 58:1-10 (1989))、Rudt, S. and R. H. Muller, J. Controlled Release, 22:263-272 (1992)、Tabata, Y, and Y. Ikada, Biomed. Mater. Res., 22

40

50

: 837-858 (1988)、Wall, D. A., Drug Delivery, 2: 101-201 (1995)、Patton, J. and Platz, R., Adv. Drug Del. Rev., 8: 179-196 (1992)、Byron, P., Adv. Drug Del. Rev., 5: 107-132 (1990)、Patton, J. S., et al., Controlled Release, 28: 1579-85 (1994)、Damms, B. and Bains, W., Nature Biotechnology (1996)、Niven, R. W., et al., Pharm. Res., 12 (9): 1343-1349 (1995)、ならびに Kobayashi, S., et al., Pharm. Res., 13 (1): 80-83 (1996) を参照されたく、これらの全ての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0110】

本明細書に記載される技術の組成物は、薬学的組成物に従来の見られる他の補助剤を、それらの技術分野で確立されている使用量レベルで、追加として含有してもよい。したがって、例えば、組成物は、例えば、鎮痒薬、収斂薬、局所麻酔薬、もしくは抗炎症剤等の追加の適合性の薬学的に活性な材料を含み得るか、または色素、香味剤、保存剤、酸化防止剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤等、本明細書に記載される技術の組成物の種々の剤形を物理的に製剤化するのに有用な追加の材料を含有し得る。しかしながら、このような材料は、添加される場合、本明細書に記載される技術の組成物の成分の生物学的活性を不当に妨害するべきではない。製剤は、安定化することができ、所望される場合、例えば、製剤の化合物と有害に相互作用しない、滑剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に作用するための塩、緩衝剤、着色剤、香味剤、および／または芳香物質等と混合することができる。

20

【0111】

本開示の実施形態の説明は、包括的なものであることも、本開示を開示される正確な形態に限定することも意図するものではない。本開示の具体的な実施形態および実施例は、例示目的で本明細書に記載され、種々の同等の修正が、関連技術分野の当業者には理解されるように、本開示の範囲内で可能である。例えば、方法のステップまたは機能は、所定の順序で提示されるが、代替的な実施形態では、異なる順序で機能を実行してもよく、または機能は、実質的に同時に実行してもよい。本明細書で提供される開示の教示は、適宜、他の手順または方法に応用することができる。本明細書に記載される種々の実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。本開示の態様は、必要であれば、上述の参照および適用の組成物、機能、および概念を採用するように修正して、本開示のなおさらなる実施形態を提供することができる。これらおよび他の変更を、詳細な説明の範囲内で本開示に行うことができる。

30

【0112】

前述の実施形態のいずれの具体的な要素も、他の実施形態の要素と組み合わせるか、または置き換えることができる。さらに、本開示のある特定の実施形態と関連する利点が、これらの実施形態に関連して記載されているが、他の実施形態もまた、このような利点を示し得、全ての実施形態が、本開示の範囲内に含まれるために、必ずしもこのような利点を示すわけではない。

40

【0113】

特定された全ての特許および他の出版物は、例えば、本明細書に記載される技術に関連して使用され得る、このような出版物に記載される方法を説明および開示する目的で、参照により本明細書に明確に組み込まれる。これらの出版物は、単に、本出願の出願日前のそれらの開示の目的で提供される。この点に関して、本発明者らが、先行発明を理由として、またはいかなる他の理由によっても、このような開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきものは存在しない。これらの文書の日付に関する全ての記述または内容に関する表現は、出願者が入手可能な情報に基づくものであり、これらの文書の日付または内容の正確さに関していずれの権利も構成するものではない。

50

【0114】

本明細書に記載される技術を、以下の実施例によってさらに例示するが、これは制限とみなされるべきではない。

【0115】

本明細書に記載される技術のいくつかの実施形態は、以下の番号付けした段落のうちのいずれかとして定義することができる。

1. 組織をエキソビボで維持する方法であって、

埋め込みデバイスを対象に埋め込み、それによって、該埋め込みデバイスが、幹細胞、血管細胞、免疫細胞、分化細胞、および病変細胞のうちの少なくとも1つによって、コロニー形成されるステップと、

該埋め込みデバイスおよび該埋め込みデバイスに含有される該組織を、該対象から取り出すステップと、

該組織に灌流液を供給するステップとを含む、方法。

2. 灌流液を供給する前に、前記組織を前記埋め込みデバイスから取り出すステップをさらに含む、段落1に記載の方法。

3. 灌流液を供給する前に、前記組織をマイクロ流体システムに配置するステップをさらに含む、段落2に記載の方法。

4. 前記埋め込みデバイスが、少なくとも1つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも1つの開口ポートとを備える、段落1～3のいずれかに記載の方法。

5. 前記埋め込みデバイスがマイクロ流体デバイスである、段落1に記載の方法。

6. 前記マイクロ流体デバイスをマイクロ流体システムに接続するステップをさらに含む、段落5に記載の方法。

7. 前記マイクロ流体デバイスが、少なくとも1つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも1つの開口ポートとを備える、段落5または6に記載の方法。

8. 前記マイクロ流体デバイスが、多孔質分離構成要素によって前記少なくとも1つの細胞成長チャンバから分離された少なくとも1つの流体チャネルを備える、段落5～7のいずれかに記載の方法。

9. 前記マイクロ流体デバイスが、前記少なくとも1つの流体チャネルを前記マイクロ流体システムに接続しかつ灌流液を前記多孔質分離構成要素を通して前記少なくとも1つの細胞成長チャンバに供給する、少なくとも1つの吸入ポートと少なくとも1つの排出口とを備える、段落5～8のいずれかに記載の方法。

10. 少なくとも1つのポートが前記対象の筋肉組織に面するように、前記埋め込みデバイスが埋め込まれる、段落1～9のいずれかに記載の方法。

11. 前記組織が骨髄組織である、段落1～10のいずれかに記載の方法。

12. エキソビボで維持された前記骨髄組織を使用して、造血細胞または骨髄由来因子を生成する、段落1～12のいずれかに記載の方法。

13. 前記造血細胞が、赤血球、白血球、血小板、造血幹細胞、リンパ球、好酸球、好中球、単球、造血前駆細胞、間質細胞、およびこれらの細胞型のうちの2つ以上の混合物からなる群から選択される、段落12に記載の方法。

14. 前記骨髄由来因子が、ペプチド、タンパク質、小分子、ヌクレオチド、脂質、炭水化物、サイトカイン、および成長因子からなる群から選択される、段落12に記載の方法。

15. 前記造血細胞および／または前記骨髄由来因子が対象に投与される、段落12～14のいずれかに記載の方法。

16. 前記対象が、欠陥のある免疫系、癌、自己免疫疾患、放射線毒性、および造血疾患

10

20

30

40

50

からなる群から選択される状態を有する、段落 15 に記載の方法。

17. 前記癌が、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、骨髄増殖性疾患、ランゲルハンス細胞組織球増加症、骨髄腫、および骨髄異形性症候群からなる群から選択される、段落 16 に記載の方法。

18. 前記造血疾患が、サラセミア、第 IX 因子欠乏症、血友病、鎌状赤血球症、アミロイドーシス、無顆粒球症、貧血症、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症、汎血球減少症、グランツマン血小板無力症、尿毒症、血小板貯蔵プール欠乏症、フォンヴィルブラント病、および無フィブリノーゲン血症からなる群から選択される、段落 16 に記載の方法。

19. 前記対象が化学療法および／または放射線療法を受けたことがある、段落 15 に記載の方法。

20. 前記造血細胞および／または前記骨髄由来因子が、インビトロで維持されている別の組織型に供給される、段落 12 に記載の方法。

21. エキソビオで維持された前記組織が、該組織への化合物の影響または該組織と化合物との相互作用を試験するために使用され、該化合物が、化学療法剤、放射線療法、分化、形成、機能、または再構築の修飾物質、ホルモン、核酸、ペプチド、タンパク質、抗体、小分子、薬物リード、酵素、細胞、ウイルス、細菌、寄生生物、ヌクレオチド、マーカ、色素、造影剤、酵素、ナノ粒子、および、遺伝子発現抑制分子からなる群から選択される、段落 1～11 のいずれかに記載の方法。

22. エキソビオで維持された前記組織が発達の任意の段階にある、段落 1～11 のいずれかに記載の方法。

23. 前記埋め込みデバイスが非ヒト対象に埋め込まれる、段落 1～22 のいずれかに記載の方法。

24. 前記埋め込みデバイスが、ヒト造血細胞またはヒト化造血細胞を有する非ヒト対象に埋め込まれる、段落 1～22 のいずれかに記載の方法。

25. 前記非ヒト対象が、癌から、または造血疾患を有するヒトから得られたヒト造血細胞を有する、段落 24 に記載の方法。

26. 前記癌が、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、骨髄増殖性疾患、ランゲルハンス細胞組織球増加症、骨髄腫、および骨髄異形性症候群からなる群から選択される、段落 25 に記載の方法。

27. 前記造血疾患が、サラセミア、第 IX 因子欠乏症、血友病、鎌状赤血球症、アミロイドーシス、無顆粒球症、貧血症、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症、汎血球減少症、グランツマン血小板無力症、尿毒症、血小板貯蔵プール欠乏症、フォンヴィルブラント病、および無フィブリノーゲン血症からなる群から選択される、段落 25 に記載の方法。

28. 対象に埋め込むための組織または細胞を生成する方法であって、

埋め込みデバイスを第 1 の対象に埋め込み、それによって、該埋め込みデバイスが、組織または細胞によりコロニー形成されるステップと、

該埋め込みデバイスおよび該埋め込みデバイス内に含有される該組織を、該第 1 の対象から取り出すステップと、

該埋め込みデバイスまたは該埋め込みデバイス内に含有される少なくとも該組織または該細胞を第 2 の対象に移植し、それによって、該第 2 の対象に組織または細胞を供給するステップと

を含み、

それによって、埋め込まれた該組織または該細胞が、該第 2 の対象において細胞の成長および機能を示す、方法。

29. 前記埋め込みデバイスが、少なくとも 1 つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも 1 つの開口ポートとを備える、段落 28 に記載の方法。

30. 前記埋め込みデバイスがマイクロ流体デバイスである、段落 28 に記載の方法。

10

20

30

40

50

31. 前記マイクロ流体デバイスが、少なくとも1つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも1つの開口ポートとを備える、段落30に記載の方法。

32. 前記マイクロ流体デバイスが、多孔質分離構成要素によって前記少なくとも1つの細胞成長チャンバから分離された少なくとも1つの流体チャネルを備える、段落30または31に記載の方法。

33. 前記マイクロ流体デバイスが、前記少なくとも1つの流体チャネルを前記マイクロ流体システムに接続しかつ灌流液を前記多孔質分離構成要素を通して前記少なくとも1つの成長チャネルに供給する、少なくとも1つの吸入ポートと少なくとも1つの排出口とを備える、段落30～32のいずれかに記載の方法。

34. 前記少なくとも1つのポートが前記対象の筋肉組織に面するように、前記埋め込みデバイスが埋め込まれる、段落28～33のいずれかに記載の方法。

35. 前記組織または前記細胞が骨髓組織または造血細胞を含む、段落28～34のいずれかに記載の方法。

36. 前記移植を受ける前記第2の対象が、欠陥のある免疫系、癌、自己免疫疾患、および造血疾患からなる群から選択される状態であると診断されている、段落28～35のいずれかに記載の方法。

37. 前記癌が、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、骨髓増殖性疾患、ランゲルハンス細胞組織球増加症、骨髓腫、および骨髓異形性症候群からなる群から選択される、段落36に記載の方法。

38. 前記造血疾患が、サラセミア、第IX因子欠乏症、血友病、鎌状赤血球症、アミロイドーシス、無顆粒球症、貧血症、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症、汎血球減少症、グランツマン血小板無力症、尿毒症、血小板貯蔵プール欠乏症、フォンヴィルブラント病、および無フィブリノーゲン血症からなる群から選択される、段落36に記載の方法。

39. 前記第2の対象が、化学療法および／または放射線療法を受けたことがある、段落28～38のいずれかに記載の方法。

40. 前記埋め込みデバイスが、ヒト造血細胞またはヒト化造血細胞を有する非ヒトの第1の対象に埋め込まれる、段落28～39のいずれかに記載の方法。

41. 前記第1の対象および前記第2の対象が同じ個体であり、かつ、前記方法が、埋め込み部位から取り出して該対象へ移植するまでの間、骨髓組織および／もしくは造血細胞を含有する前記埋め込みデバイス、または、該埋め込みデバイスから取り出した後の該骨髓組織もしくは該造血細胞のいずれかを維持する追加のステップを含む、段落28～40のいずれかに記載の方法。

42. 埋め込み部位から取り出して前記第2の対象に移植するまでの間、骨髓組織および／もしくは造血細胞を含有する前記埋め込みデバイス、または、該埋め込みデバイスから取り出した後の該骨髓組織もしくは該造血細胞のいずれかを維持する追加のステップを含む、段落28～40のいずれかに記載の方法。

43. 骨髓組織または造血細胞を含有する前記埋め込みデバイスのエキソビボでの維持が、骨髓組織および／もしくは造血細胞を含有する該埋め込みデバイス、または、該埋め込みデバイスから取り出した後の該骨髓組織および／もしくは該造血細胞のいずれかを凍結または冷蔵することを含む、段落28～42のいずれかに記載の方法。

44. 骨髓組織または造血細胞を含有する前記埋め込みデバイスのエキソビボでの維持が、

該埋め込みデバイスをマイクロ流体システムに接続することと、

灌流液を該埋め込みデバイスに供給することと

を含む、段落28～42のいずれかに記載の方法。

45. 前記埋め込みデバイス内に含有される前記組織または前記細胞が、前記第2の対象への埋め込み前に遺伝子改変される、段落28～45のいずれかに記載の方法。

46. 段落1に記載の方法に従ってエキソビボで維持された骨髓組織から得られた骨髓組

10

20

30

40

50

織、造血細胞、または分化血球を含む、薬学的組成物。

47. 段落28に記載の方法に従ってエキソビボで維持された骨髓組織から得られた骨髓組織および／または造血細胞を含む、薬学的組成物。

48. 前記骨髓組織および／または前記造血細胞が埋め込みデバイス内に含有される、段落46～47のいずれかに記載の組成物。

49. 造血細胞を生成または製造するための方法であって、

埋め込みデバイスを対象に埋め込み、それによって、該埋め込みデバイスが、幹細胞、血管細胞、免疫細胞、または分化細胞によってコロニー形成されるステップと、

該埋め込みデバイスおよび該埋め込みデバイスに含有される組織を、該対象から取り出すステップと、

該組織に灌流液を供給するステップとを含み、

該埋め込みデバイスが、少なくとも1つの細胞成長チャンバと、該細胞成長チャンバに通路を設けて細胞コロニー形成のために該細胞成長チャンバに細胞が進入することを可能にする、少なくとも1つの開口ポートとを備え、

該組織が骨髓組織であり、かつ

エキソビボで維持された該骨髓組織が、造血細胞を生成するために使用される、方法。

50. 前記造血細胞が、赤血球、白血球、血小板、造血幹細胞、リンパ球、好酸球、好中球、単球、造血前駆細胞、およびこれらの細胞型のうちの2つ以上の混合物からなる群から選択される、段落49に記載の方法。

【実施例】

【0116】

実施例1：ウェル形式の埋め込みデバイス

埋め込みデバイスでの骨組織のインビボ培養を、まず、図3Cに示されるチップ、すなわち、2つの開口部を有するウェル形式の埋め込みデバイスを使用して、研究した。ウェルに、本明細書に記載される、I型コラーゲン、脱塩骨粉、BMP-2、およびBMP-4を含む、コラーゲングル混合物を充填した。埋め込みデバイスを、続いて、マウスの皮下に埋め込んだ（図4A～4B）。埋め込みデバイスを、埋め込み4週間後または8週間後に、対象から取り出し、チップの内容物を検査して、骨髓組織が埋め込みデバイス中に存在するかどうかを判定した。

【0117】

H&E染色を介した組織学的染色は、新しい骨と元の脱塩骨粉の組み合わせに包囲された、新たに生成された骨髓を示した（図7A～7D）。NB T／BCIPのすぐに使用可能な表（cat. #11-697-471-001、Roche applied science）を使用したアルカリ性ホスファターゼ活性についての染色は、チップ内で成長した組織が、マウス大腿骨の部分と比較した際、活性な骨形成領域を含有したことを示した（データは示されない）。アルカリ性ホスファターゼの存在下で、BCIP（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸、トリジン塩）を、脱リン酸化し、次いで、NB T（ニトロブルーテトラゾリウムクロリド）によって酸化させて、濃青色インディゴ沈殿色素を得た。

【0118】

赤血球細胞を、蛍光マーカーで染色することによって評価した（データは示されない）。Ter119染色によって検出される赤血球細胞は、4週間および8週間の両方のインビボで成長した組織に存在することがわかった。白血球の存在を、蛍光マーカーでの染色によって評価した（データは示されない）。CD45染色によって検出される白血球は、4週間および8週間の両方のインビボで成長した組織に存在することがわかった。

【0119】

実施例2：1つまたは2つの開口部を有するウェル形式の埋め込みデバイスの比較

2つの開口部を有するチップ内の骨髓は、造血微小環境に阻害作用を有することが既知の細胞型である脂肪細胞が多くを占めた。操作された骨髓の性質を高めるために、ポリマ

10

20

30

40

50

一鑄型を、筋肉表面に面した開口部を保持しながら、皮膚の脂肪組織に面したポリマーの中央空洞の端部を遮断することによって、脂肪細胞の浸潤を阻止するように、設計した（図3D）。1つの開口部または2つの開口部を有するウェル形式のチップの性能を比較した。チップに、本明細書に記載されるようにコラーゲン混合物を充填し、マウスの皮下に埋め込んだ。図5は、各チップ型の図、および4週間のインビボ成長後のチップの写真を示す。チップを、マウスの皮下に埋め込み、1つの開口部を有するチップは、開口部がマウスの筋肉に面するように配向した。H&E染色を介した組織学的染色により、8週間後、両方のチップ型に、新しい骨で包囲された新たに生成された骨髄が確認された（図6A～6Cおよび図7C～7D）。2つの開口部を有するチップに新たに形成された骨髄は、脂肪細胞が多くを占め、低い細胞充実性を示し（図7A～7D）、これは、脂肪細胞が造血を阻害するためであると見られる（Naverias O, et al. Nature 460, 259–263 (2009)）。1つの開口部を有するチップ内の骨髄の組織学的分析により、大腿骨の骨髄とほぼ同一な形態で、高度に細胞充実性の骨髄を包囲して、厚い壁のウェルが形成されたことが明らかとなった（図16B）。マイクロコンピュータ断層撮影（マイクロCT）分析は、操作された骨髄が、鈣化した皮質骨によって包囲され、成体マウスの椎骨に見られる天然の海綿骨に類似の構造特性で、海綿骨によって透過されていたことを示す（図19A～19D）。

10

【0120】

実施例3：埋め込みデバイスで成長した細胞のFACS分析

これらのチップで成長する細胞の固有性を、造血幹細胞およびそれらの分化した子孫細胞型を検出するように設計されたFACS分析によって、さらに調査した。骨髄の一部分の造血細胞構成を判定するために、操作された骨髄を、外科手術による除去の直後に分離し、系統混合物（Lineage cocktail）（Lin）、Sca-1、c-Kit、CD34、CD135、Ter119、CD45、Mac-1、Gr-1、CD19、およびCD3を対象とする抗体を用いて、フローサイトメトリーを使用して分析し、HSC（Lin-c-Kit+Sca-1+）、前駆細胞（Lin-c-Kit+、Lin-Sca-1+、Lin-CD34+、およびLin-CD135+）、赤血球（Ter119+）、白血球（CD45+、マクロファージ（CD45+Mac-1+）、顆粒球（CD45+Gr-1+）、B細胞（CD45+CD19+）、T細胞（CD45+CD3+）を特定した（図16C～16D）。図8は、造血幹細胞系統、および特定の細胞型を検出するために使用したマーカーを示す。細胞を、開口部が筋肉組織に面するようにマウスの皮下に埋め込まれた、1つの開口部を有するウェル形式チップにおいて成長させた。チップは、埋め込みの4週間後または8週間後に、マウスから摘出した。埋め込みデバイス内の組織を取り出し、小片に切断し、1mg/mLのコラゲナーゼを使用して、30分間消化させ、組織内の細胞を摘出した。細胞を、示されるように抗体で染色し、フローサイトメトリーを使用して分析した。100万個の細胞を、100μLの染色溶液で30分間染色した。溶液を洗い流し、分類用緩衝液と交換し、次いで、フローサイトメトリーを使用して、細胞を分析した。

20

30

【0121】

HSCパネルに対する染色溶液は、20μLのマウス造血系統eFluor 450 Cocktail、2μLの抗マウスCD34FITC、0.3μLの抗マウスLy-6A/E（Sca-1）APC、5μLの抗マウスCD135（Flt3）PE、0.65μLの抗マウスCD117（c-Kit）APC-eFluor780、および72μLの染色緩衝液であった。細胞系パネルに対する染色溶液は、2.5μLの抗マウスCD19eFluor450、0.5μLの抗マウスCD45FITC、0.65μLの抗マウスLy-6G（Gr-1）APC、0.65μLの抗マウスCD11b（Mac-1）PE、2.5μLの抗マウスTer119APC-eFluor780、5μLの抗マウスCD3PE-Cy5、および90μLの染色緩衝液であった。染色緩衝液は、PBS（-）中、3%FBSおよび0.05%アジ化ナトリウムであった。分類用緩衝液は、PBS（-）中、0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）および0.5%FBSであった。抗体

40

50

は、eBioscienceまたはBD Biosciencesから入手した。

【0122】

末梢血試料中のHSCの分析のために、それらの試料を、まず赤血球溶解に供した。3 mLの赤血球溶解緩衝液（R7757、Sigma）を、抹消血球のペレットに添加し、ピペティング操作を1回行った。室温で5分間のインキュベーションの後、20 mLのPBS（-）溶液を添加して、緩衝液を希釈した。緩衝液を、遠心分離によって除去した（7分間450g）。

【0123】

4週間のインビボ成長後（図9C、10C、11C、12C）または8週間のインビボ成長後（図9D、10D、11D、12D）にチップから回収した組織を、マウスの骨髓（図9A、10A、11A、12A）および末梢血（図9B、10B、11B、12B）の細胞プロファイルと比較した。FACS分析の結果を、図9A～9E、10A～10E、11A～11E、および12A～12Eに示す。

【0124】

埋め込みの4週間後または8週間後に摘出したデバイスは、造血幹細胞および前駆細胞を含む全ての造血細胞型、ならびに分化した赤血球および白血球両方の系統を含有する（図16C～16D）。造血幹細胞および前駆細胞の数は、4週間の操作された骨髓では、成体マウス大腿骨由来の骨髓に見られるものよりも減少したが、8週間で埋め込みデバイスから摘出された骨髓は、無傷な大腿骨内の骨髓から単離されたものとほぼ同一な、造血幹細胞、前駆細胞、および全ての系統から分化した血球の分布を示した。これらのデータは、操作された骨髓の造血コンパートメントが、天然の骨髓の完全な細胞構成要素を正確に反復することを示す。

【0125】

脱塩骨粉および骨形態形成タンパク質を含有するコラーゲンゲル混合物により、皮下部位において、宿主からの骨および骨髓両方の形成を漸加させることができた。4週間のインビボ成長後、骨髓形成が、埋め込みデバイスにおいて観察され、400万個の細胞を、チップから採取することができた。埋め込みデバイス内で形成された血球集団は、マウス骨髓と酷似していた。8週間で、チップは、骨髓でほぼ充填され、1000万個超の細胞を、チップから採取することができる。チップ内で形成された血球集団は、マウス骨髓と同一であった。これらの結果は、機能性の操作された骨髓が、インビボ成長後にマイクロ流体チップに存在することを示す。

【0126】

実施例4：単一チャンネル形式のチップ

単一チャンネル形式のチップ（図2Aに示される）の性能を評価した。単一の閉鎖型チャンネルに、本明細書の他の箇所に記載のように、コラーゲンゲル中の脱塩骨粉、BMP-2、およびBMP-4を充填した。ポートに、I型コラーゲンゲルを充填した。チップを、GFPを発現するトランスジェニックマウスの皮下に埋め込んだ。4週間のインビボ成長後、チップを取り出し、チャンネル内での細胞成長を試験した。チャンネルにはGFP発現細胞が増殖しており、骨誘導材料を除去した後、GFP発現細胞は、チャンネルに接着したままであった（データは示されない）。非常に多数のGFP発現細胞が、チャンネル内に見られ、赤血球細胞に対するTer119染色により、チャンネル内のそれらの存在が明らかとなった（データは示されない）。H&E染色による組織学的試験もまた、骨組織の成長を明らかにした（データは示されない）。

【0127】

実施例5：閉鎖チャンネル形式のチップ

閉鎖チャンネル形式のチップ（図2Bに示される）の性能もまた、試験した。細胞成長チャンバに、本明細書の他の箇所に記載のようにコラーゲンゲル中の脱塩骨粉、BMP-2、およびBMP-4を充填した。ポートに、I型コラーゲンゲルを充填した。チップをマウスの皮下に埋め込み、4週間インビボ成長を継続した。次いで、チップを取り出し、試験した。光学的に試験したとき、暗黒物質が細胞成長チャンバ内に優勢に存在していた。

チップを、Hoechst DNA染色で染色し、鮮明な蛍光染色は、細胞がポートおよび細胞成長チャンバ内に存在することを明らかにした（データは示されない）。

【0128】

実施例6：腫瘍生検

チェリー色（赤色）を形質導入したマウス肺癌細胞を、細胞が緑色蛍光を示すGFPマウスに皮下注射した。結果として得られたマウスで形成された腫瘍を摘出し、次いで、生検を、本明細書に記載されるマイクロ流体チップの細胞成長チャンバに導入した。培養培地を、 $1\mu\text{L}/\text{分}$ で連続的に灌流させた。使用した培地は、 $10\%(\text{v}/\text{v})$ ウシ胎児血清(FBS)、 $100\text{U}/\text{mL}$ ペニシリン、および $100\text{U}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含有する、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)であった。生検5日後に試験した際、鮮明な赤色蛍光（癌細胞）および緑色蛍光（マウス由来細胞）が観察され、癌細胞およびマウス由来細胞が、生存していることを示した（データは示されない）。さらに、癌細胞は、中間チャンネルから移出しており、癌細胞がマイクロ流体デバイス内で増殖し続けていることを示唆した。

10

【0129】

実施例7：肝臓生検

マウス肝臓を摘出し、次いで、肝臓生検を、本明細書に記載されるマイクロ流体チップの細胞成長チャンバ内に導入した。培養培地を、 $1\mu\text{L}/\text{分}$ で連続的に灌流させた。使用した培地は、 $10\%(\text{v}/\text{v})$ ウシ胎児血清(FBS)、 $100\text{U}/\text{mL}$ ペニシリン、および $100\text{U}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含有する、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)であった。肝臓生検の形状を、細胞成長チャンバ内で4日間維持した。カルセイン-AM（緑色、幹細胞染色）で染色した肝臓生検の染色、および摘出3日後のエチジウムホモ二量体（赤色、死細胞染色）は、ほとんどの細胞が、3日間のインビトロ成長後に生存していたことを示した（データは示されない）。

20

【0130】

実施例8：骨髄移植

骨誘導材料を、図16Aおよび図17に示されるように、チップを使用してマウスの背部の皮下に埋め込んだ。8週間の埋め込み後、骨および骨髄が材料に形成された。デバイスをマウスから取り出した後の外観検査により、組織内の赤血球の存在による赤色が、チップ内に存在することを明らかとなった。

30

【0131】

材料を、組織学的に特徴付けした（図16B）。図16の下の画像は、マウス大腿骨の断面図を示す。橙色は、骨組織の内部の骨髄を示す。上部および中間の画像は、それぞれ、4週間および8週間の埋め込み後の合成骨髄の断面図を示す。骨髄を含有する骨が観察される。合成骨髄は、マウス骨髄とほぼ同一である。示されるように、高倍率下では、細胞は、全く同じに見える。

【0132】

合成骨髄が、どの程度マウスの骨髄と類似するかを判定するために、細胞の分布を、抗体およびフローサイトメトリーを使用して分析した。図16Cおよび16Dは、分化した血球、造血幹細胞、および前駆細胞の分布を示す。4日間の培養後、デバイスから骨髄細胞を採取し、造血幹細胞および前駆細胞をインビトロで維持するために現在使用されている最も一般的な方法である、間質細胞支持層を有するDexter培養下に置いた、マウス大腿骨の天然の骨髄から単離された細胞と比較した。フローサイトメトリー分析は、操作された骨髄(eBM、D4)中の造血幹細胞および前駆細胞の分布は、新しいマウス大腿骨骨髄と類似したままであったが（図20D）、一方でDexter培養下の血球の組成物(mBM、D4)は、新しく摘出したマウスの大腿骨の骨髄とは全く異なったことを示した。4日間のDexter培養後、正常マウス骨髄に見られる数と比較して、長期HSC(Lin-CD150+CD48-染色細胞)の割合は減少し、造血前駆細胞(Lin-c-Kit+、Lin-Scal+、Lin-CD34+、およびLin-CD135+染色細胞)の割合は増加し、HSCが、これらの条件下において、分化してそれら

40

50

の多能性を損失することを示唆した。対照的に、マイクロ流体のチップ上の骨髓において4日間培養した後、操作された骨髓は、そのHSCならびに前駆細胞の正常な分布を維持した。これらの結果は、新しい骨髓の操作が成功したことを示す。

【0133】

合成骨髓を、マイクロ流体デバイスにおいて培養して、細胞をインビトロで生存したまま保持した。マウスから摘出された合成骨髓を、2つのチャンネル層からなるマイクロ流体デバイスに配置した。培養培地を、頂部および底部チャンネルを通して灌流させた。このシステムの画像を図17に示す。合成骨髓を、2つのチャンネルの間に配置し、培地を灌流させながら培養する。培養4日後、合成骨髓細胞を採取し、分析した。図17の右下のグラフは、造血幹細胞および前駆細胞の分布を示す。4日間の培養後の細胞の分布は、採取直後に分析されたものと類似である。

10

【0134】

これらのデータは、本明細書に記載される操作された骨髓系が、造血幹細胞および前駆細胞をインビトロで支持する能力のある機能性造血ニッチを維持できることを示唆するが、しかしながら、操作された骨髓が機能性を維持することを確認するためには、その機能性をインビボで示す必要がある。この問題に対処するために、4日間の培養後の操作された骨髓から単離した細胞、および安定な緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するマウスの大腿骨から新たに単離した天然の骨髓由来の細胞を、致死照射を受けた同種マウスに移植した。操作された骨髓における短期および長期のHSCの存在を、GFP標識した骨髓細胞が、それぞれ、移植6週間後および16週間後に末梢血の細胞成分を再構成する能力を判定することによって、評価した。マイクロ流体培養システムに置いて4日間後にデバイスから摘出した骨髓は、新たに摘出したマウス大腿骨骨髓と、類似の割合でマウスに生着することに成功した（図20A）。移植後、培養された骨髓細胞は、分化血球の全ての系統をインビボで生成することに成功した。移植6週間後および16週間後までに、レシピエント内の血球の65%および85%（それぞれ）が、移植した細胞からの子孫細胞となった。これらのデータは、本明細書に記載のようにインビボで操作された骨髓が、完全に機能性の骨髓であり、マイクロ流体チップ内で培養した操作された骨髓が、機能性HSCをインビトロで維持する能力があることを確認する。

20

【0135】

埋め込み4週間後、骨誘導材料が、デバイス内での骨の形成を誘導した。埋め込み8週間後、合成骨は、マウスの椎骨に類似の構造特性を有する、外側の皮質骨および内側の海綿骨からなる（図19A～19D）。

30

【0136】

マイクロ流体培養システムに置いて4日間後に、合成骨髓から単離された骨髓細胞を、致死照射を受けたマウスに移植した。合成骨髓細胞は、移植16週間後に、マウスへの生着が成功し、分化細胞の全ての系統を増殖させた（図20A～20B）。移植16週間後、合成骨髓細胞の生着率は、マウス大腿骨から採取したマウス骨髓細胞のものと同一であり、本明細書に記載のデバイスが、機能性の長期造血幹細胞をエキソビボで維持することができることを示す。

【0137】

実施例9：ヒト骨髓

血球の生成等、臨床適用のためのチップ上で骨髓を生成する技術（bone marrow-on-a-chip technology）の最終的な価値は、ヒト造血細胞を使用するためにそれを適応させる能力に依存することになる。この可能性を探求するために、マウス骨の椎間板（bone disk）を、本明細書に記載のように皮下に組み込み、外科手術により動物から除去した。内部髄腔チップを、その端部に小さな切開を行うことによって曝露させ、空洞は、パラホルムアルデヒドで固定してニッチ構造を維持した後、そこに培地を流して非接着マウス細胞を除去した。ヒト臍帯血細胞（huCBC）を、端部の同じ開口部を通して、操作された骨髓に注射し、続いてそれを、Matrigelを使用して密閉した。その髄腔内にhuCBCを含有する固定した操作された骨を、ヒ

40

50

トHSCを維持するように設計された培地中、マイクロ流体デバイスの流動下（ $1\mu\text{L}/\text{分}$ 、 $0.005\text{dyn}/\text{cm}^2$ ）において培養した。細胞を標準的な平面培養ディッシュに播種した場合、フローサイトメトリー分析により、hucBCの生存率および培養液中のヒトHSC（Lin-CD34+CD38-CD90+染色細胞）の数が、7日間にわたり劇的に減少したことが明らかとなった。対照的に、骨髓マイクロ流体チップで培養した場合、hucBCおよびヒトHSCの両方の生存率は、インビトロで7日間維持された（図21A～21B）。これらのデータは、操作されたマウス骨髓のニッチが、培養下でヒトHSCの生存率を維持するために必要な微小環境シグナルの全てを保持すること、ならびにマイクロ流体チップ培養技術が、実験的、治療的、および血球製造の用途ために、培養中によりこれらの細胞を維持および増殖させる手段を提供し得ることを示す。

10

【0138】

臨床的および科学的目的のために、複雑なヒト骨髓ニッチを再構成することができる、確かなインビトロシステムを開発する必要性が存在する。短期および長期HSCの生存率および自己再生機能、ならびに種々の血液細胞型に分化するそれらの能力を維持することができる、マイクロデバイスの開発は、多数の用途に対して大きな価値を有するであろう。動物モデルにおいて識別された造血毒性は、薬物開発プロセス中の早期候補薬物が失敗に終わる主な原因であるが、しかしながら、動物モデルは、必ずしもヒトにおける結果を予測するものではない。ヒトHSCおよびそれらの種々の系統を含有する骨髓チップは、臨床試験に入る前の薬物の造血、ならびにヒト骨髓への毒または放射線への曝露の効果を試験する、代替的な方法を提供し得る。それらはまた、単一の臨床骨髓穿刺液から単離された細胞を、将来的に同じ患者の多重移植に使用するために凍結および保存することができる、十分に多くの数にインビトロで増殖させることによって、現在の骨髓移植技術を強化する手段を提供することができる。

20

【0139】

血液ドナーの供給は、限られており、感染の危険性（例えば、HIV）によって複雑化しているため、高品質な治療用途のためのヒト血球（白血球、赤血球、血小板）源に対する必要性もまた存在する。ヒトHSCの生存率をインビトロで維持することができ、分化した血球型の持続的生成を可能にする骨髓チップにより、代替的な製造戦略を提供することができる。

【0140】

最後に、造血ニッチ生理学の理解は、生きている動物外で天然の骨髓環境を再現および／または模倣することに成功する関連インビトロモデルの使用が限られているため、依然として果たされていない。本明細書に記載される骨髓チップの微小技術は、機能性骨髓全体、および透過性海綿骨マトリックスを再構成する、チップ上で器官を生成するデバイスの作出をもたらし、同様に、HSCを培養し、種々の血液系統をインビトロで生成する手段を提供する。

30

【0141】

配列表

配列番号：1 BMP-2 アミノ酸配列、NCBI ID NO：NP_001191.1

40

```

1      mvagtrella lllpqvllgg aaglvpelgr rkfaaassgr pssqpsdevl sefelrlism
61     glkqrtps rdavpppym llyrrhsgqp gspapdhrle raasrantvr sfhheeslee
121    etsgktr rffnlssip teefitsael qvfreqmqda lgnssfhhr iniyeiikpa
181    tanskfpvtr lldtrlvnqn asrwesfdvt pavmrwtaqg hanhgvvvev ahleekqgvs
241    krhvrirsrl hqdehswsqi rpllvtfghd gkgphlhkre krqakhkqrk rikssckrhp
301    lyvdfsdvgw ndwivappgy hafychgecp fpladhlnt nhaivqtlvn svnskipkac
361    cvptelsais mlyldenekv vlknyqdmvv egcgcr

```

【0142】

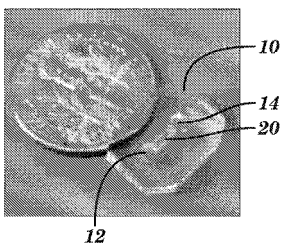
配列番号：2 BMP-4 アミノ酸配列、NCBI ID NO：NP_001193

50

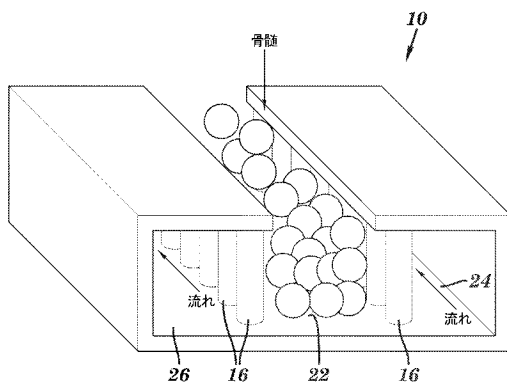
、 N P _ 5 7 0 9 1 1 、 お よ び N P _ 5 7 0 9 1 2

1 mipgnrmlmv vllcqvlgg ashaslipet gkkkvaieiqg haggrrsgqs hellrdfeat
 61 llqmfglrrr pqpsksavip dymrdlyrlq sgeeeeqih stgleyperp asrantvrsf
 121 hhechlenip gtsensafrf lfnlssipen evissaelrl freqvdqgpd wergfhrini
 181 yevmkppaev vpghlitrll dtrlvhhnvt rwetfdvspa vlrwtrekqp nyglaievth
 241 lhqtrthqgq hvrirsrlpq gsgnwaqlrp llvtfghdgr ghalttrrra krsphhsqr
 301 arkknknerr hslyvdfsdv gwndwivapp gyqafychgd cpfpladhln stnhaivqtl
 361 vnsvnssipk accvptelsa ismlyldeyd kvvlknyqem vvegcer

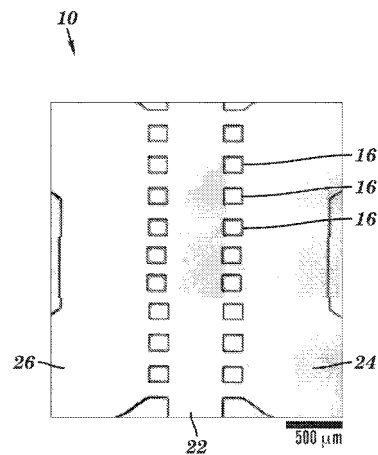
【図 1 A】



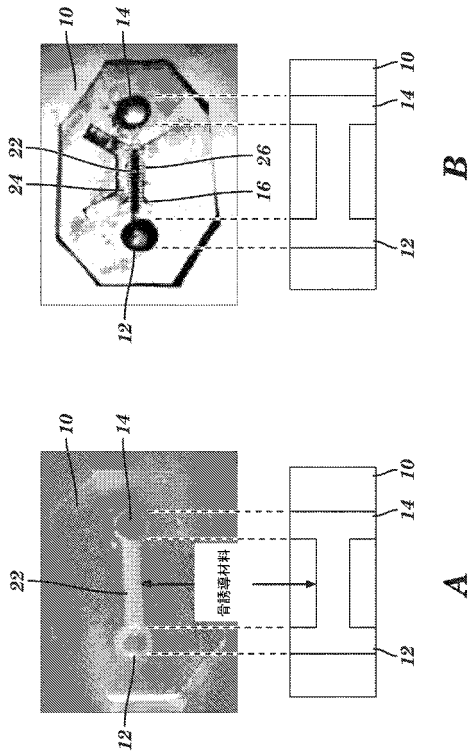
【図 1 B】



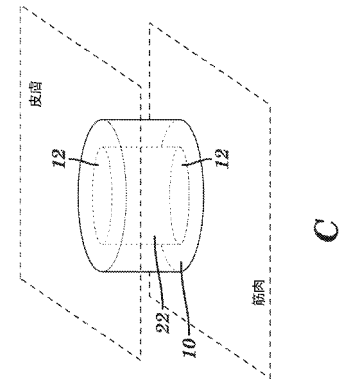
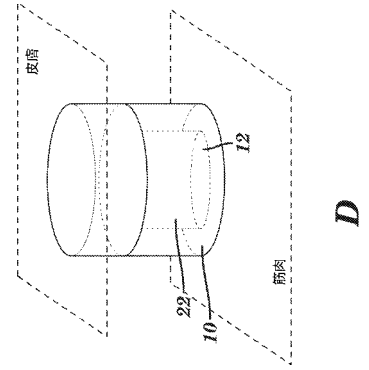
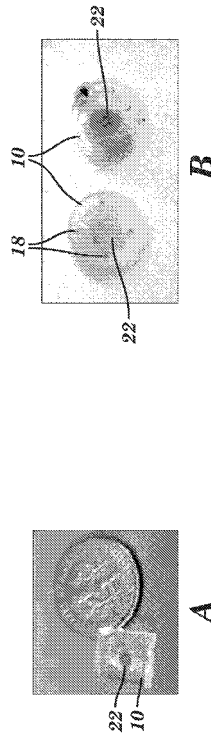
【図 1 C】



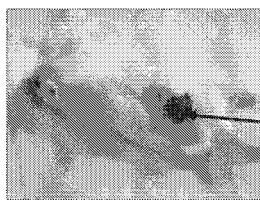
【図 2】



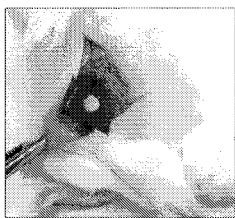
【図 3】



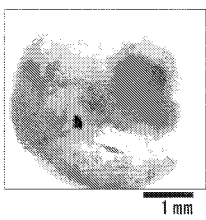
【図 4】



A



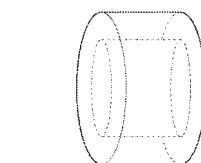
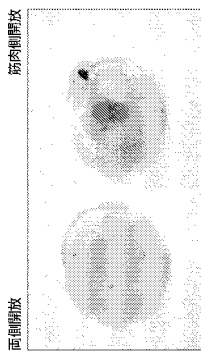
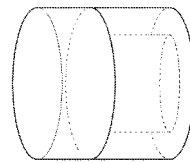
B



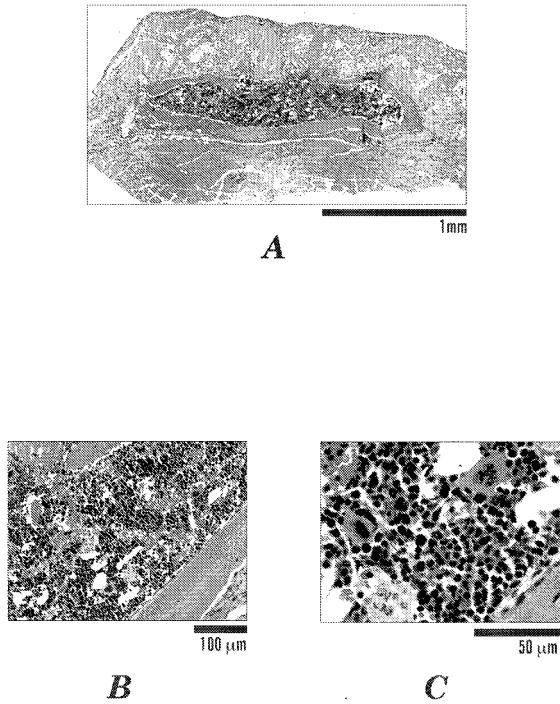
C

1 mm

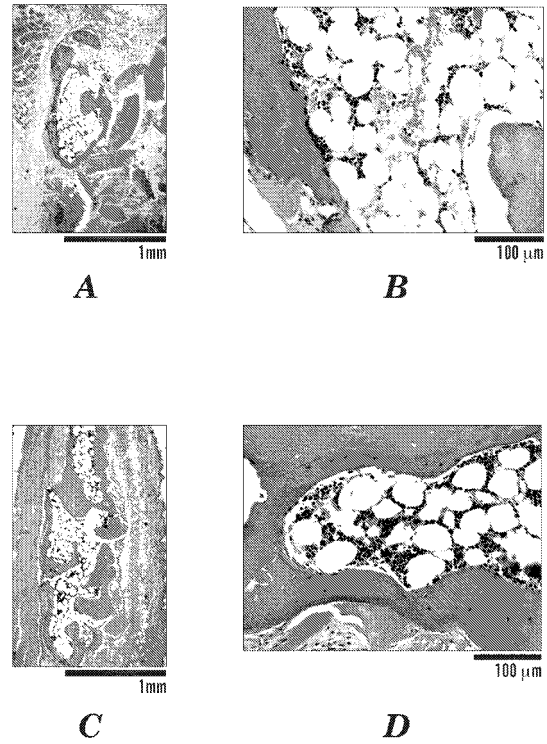
【図 5】



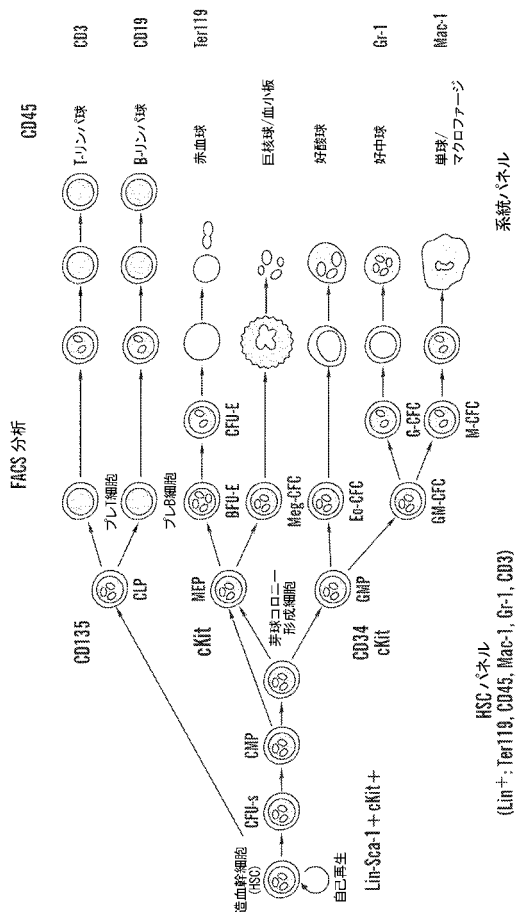
【図 6】



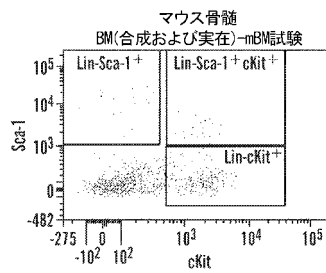
【図 7】



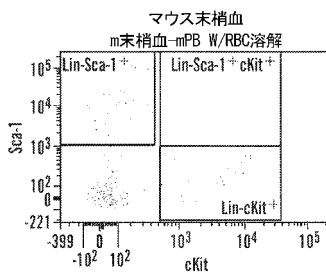
【図 8】



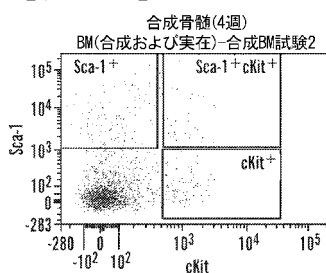
【図 9 A】



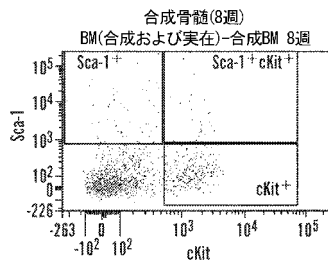
【図 9 B】



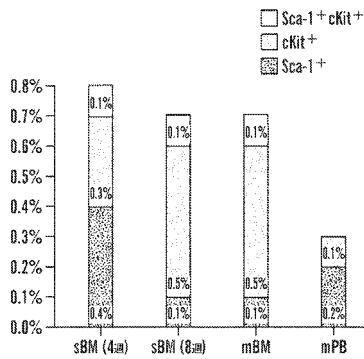
【図 9 C】



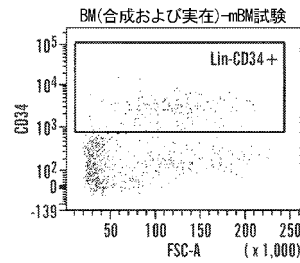
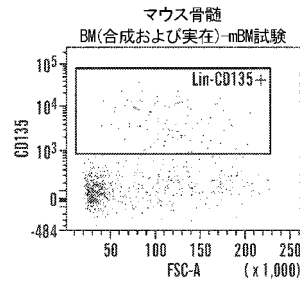
【図 9 D】



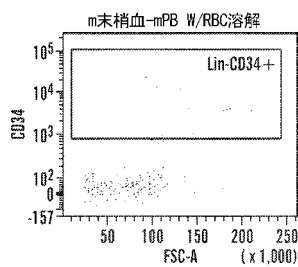
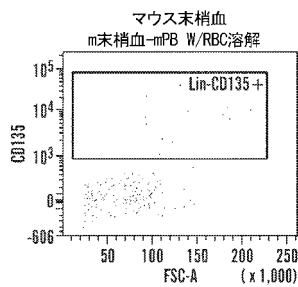
【図 9 E】



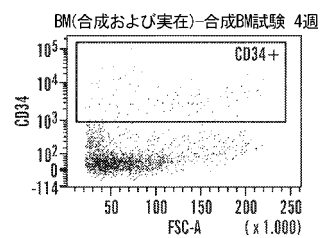
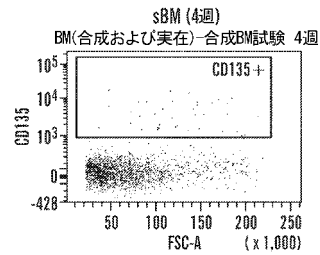
【図 10 A】



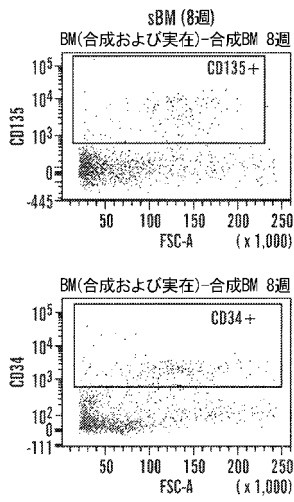
【図 10 B】



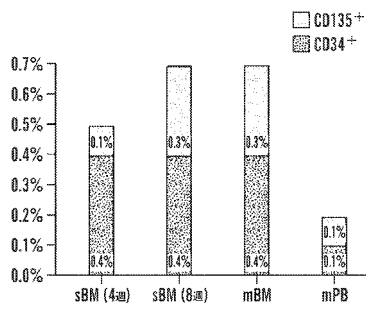
【図 10 C】



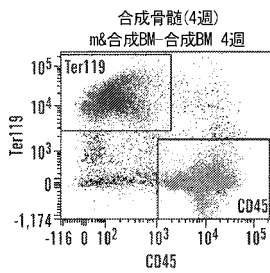
【図 10 D】



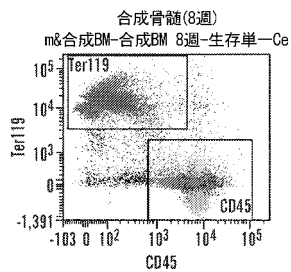
【図 10 E】



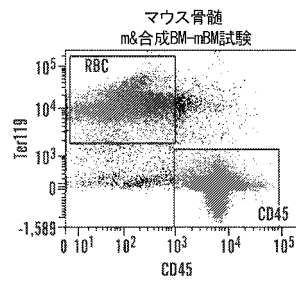
【図 11 C】



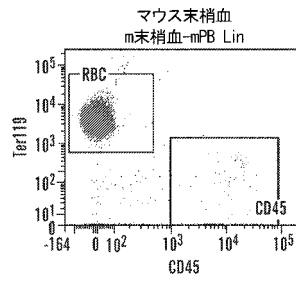
【図 11 D】



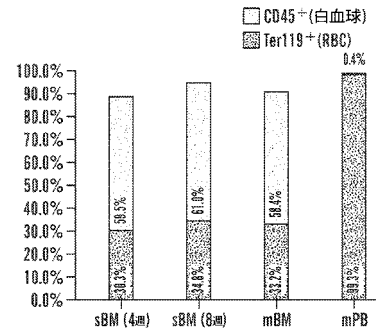
【図 11 A】



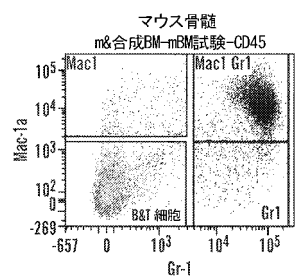
【図 11 B】



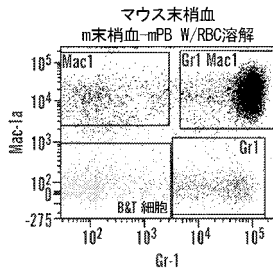
【図 11 E】



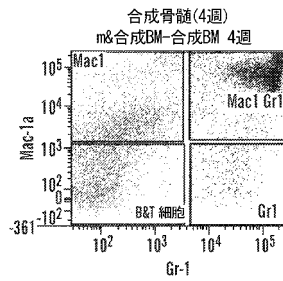
【図 12 A】



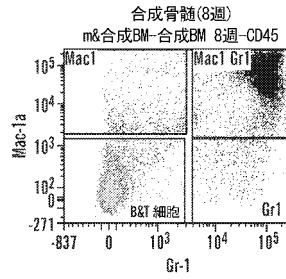
【図 1 2 B】



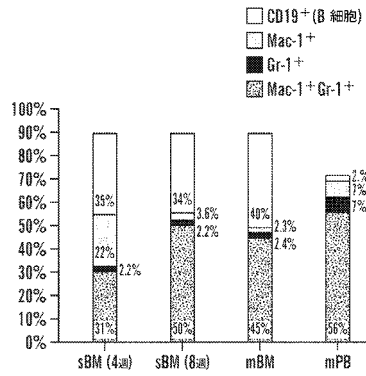
【図 1 2 C】



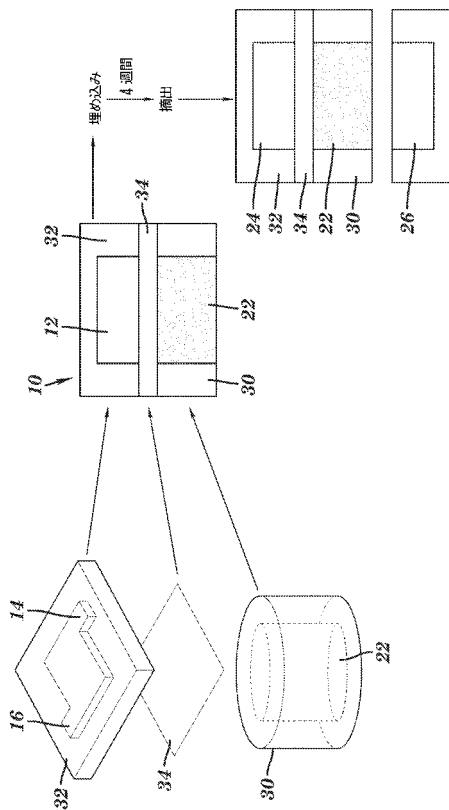
【図 1 2 D】



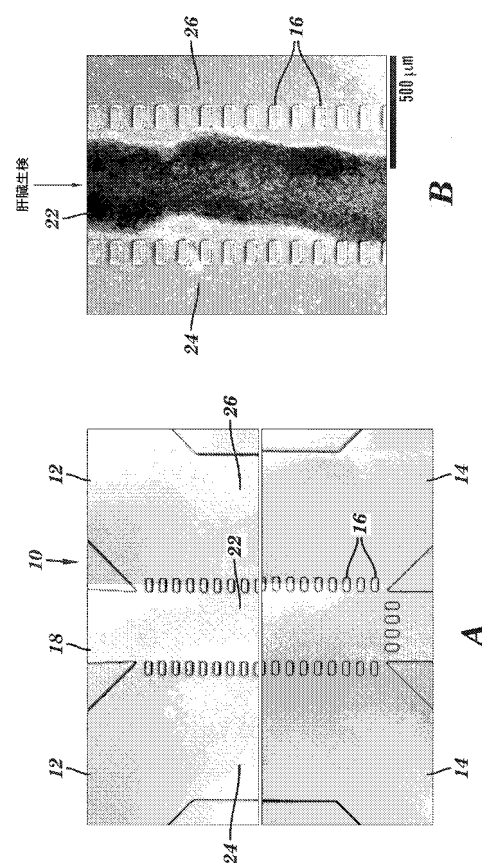
【図 1 2 E】



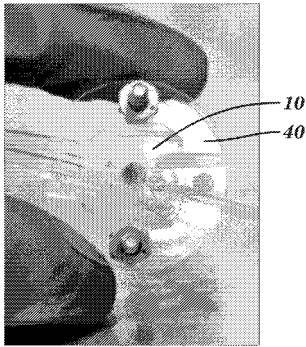
【図 1 3】



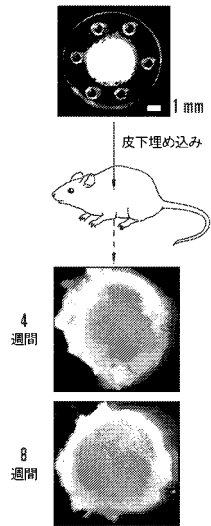
【図 1 4】



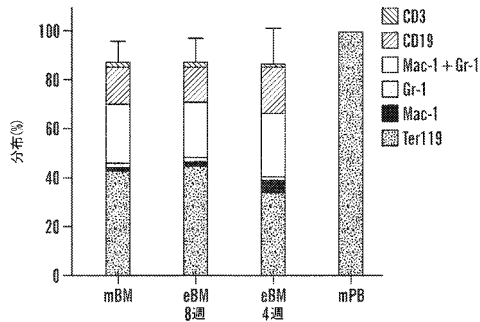
【図 15】



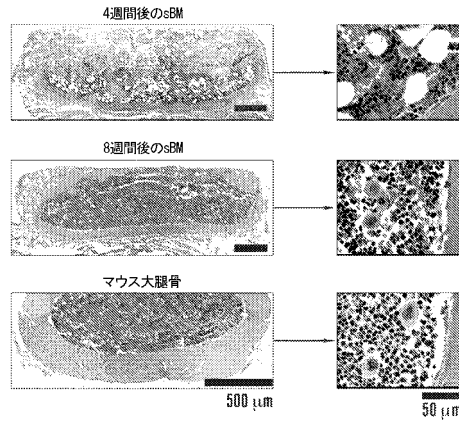
【図 16 A】



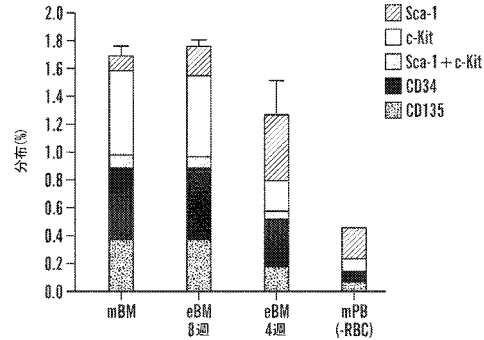
【図 16 D】



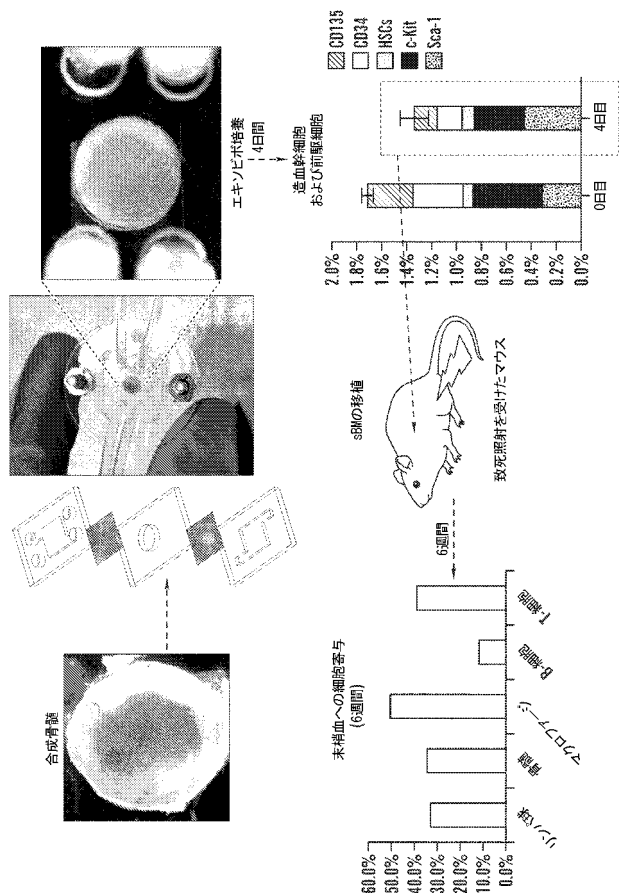
【図 16 B】



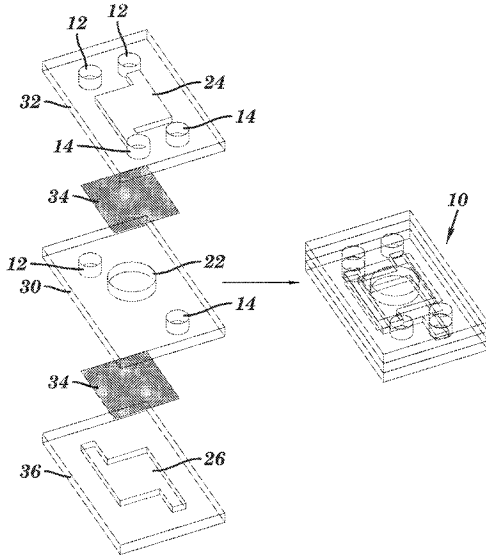
【図 16 C】



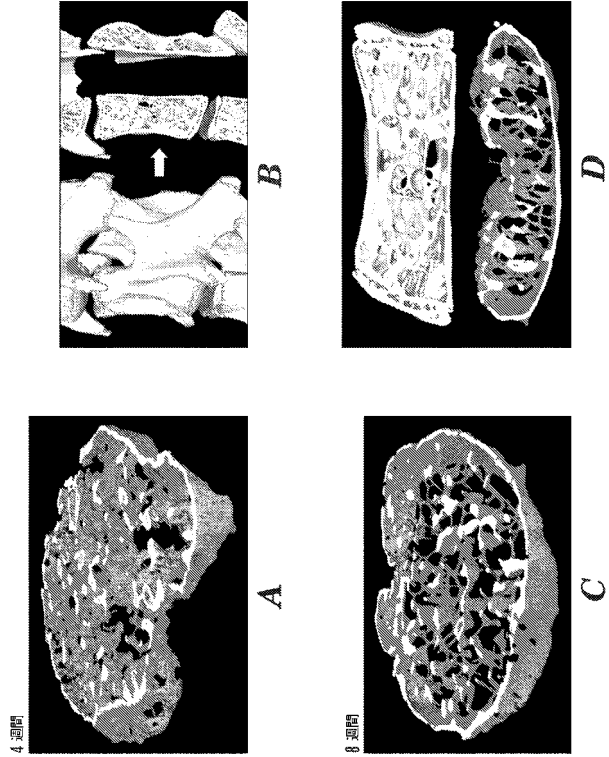
【図 17】



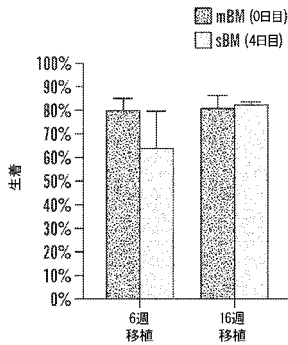
【図 18】



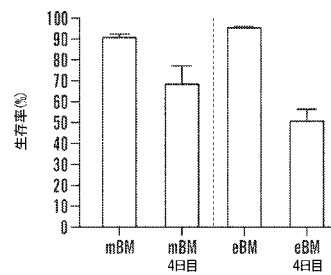
【図 19】



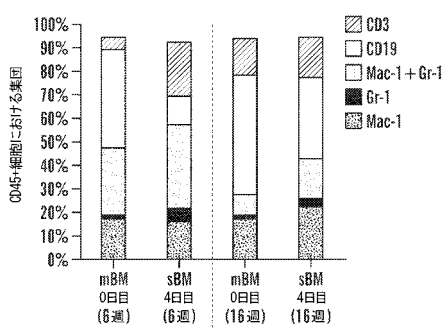
【図 20 A】



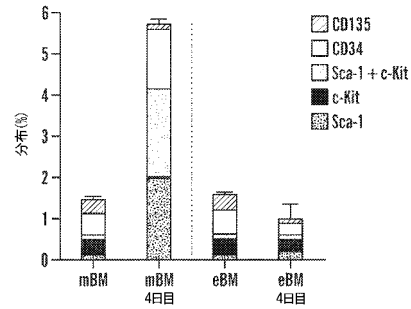
【図 20 C】



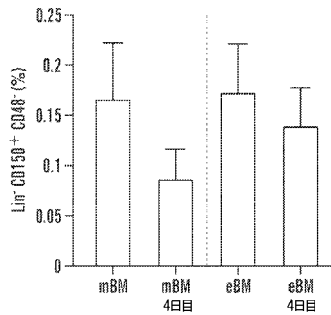
【図 20 B】



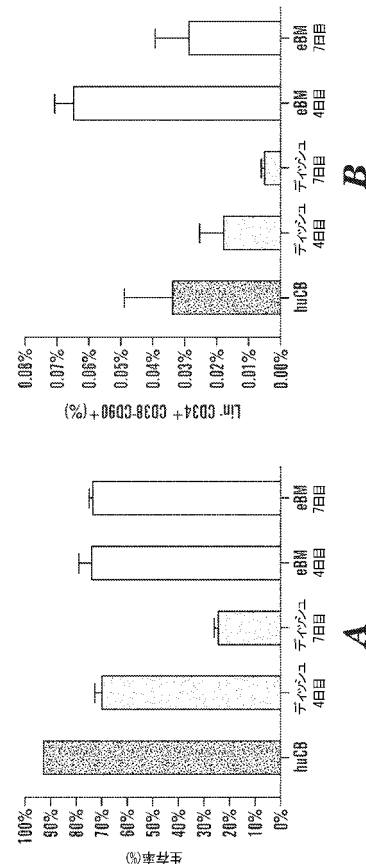
【図 20 D】



【図 20 E】



【図 21】



【配列表】

2019146584000001.app

【手続補正書】

【提出日】 令和1年6月5日 (2019.6.5)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織をエキソビポで維持する方法であって、

埋め込みデバイスを対象に埋め込み、それによって、該埋め込みデバイスが、幹細胞、血管細胞、免疫細胞、分化細胞、および病変細胞のうちの少なくとも1つによって、コロニー形成されるステップと、

該埋め込みデバイスおよび該埋め込みデバイスに含有される該組織を、該対象から取り出すステップと、

該組織に灌流液を供給するステップとを含む、方法。

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 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	

(74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 イングバー ドナルド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ポストン ウェスト カントン ストリート 1 6 2

(72)発明者 鳥澤 勇介
京都府京都市西京区川島桜園町 3 4

(72)発明者 ハミルトン ジェラルディン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ マクテナーン ストリート 2 0

(72)発明者 萬本 明子
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックライン ワシントン ストリート 6 3 6 # 2

(72)発明者 萬本 忠徳
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックライン ワシントン ストリート 6 3 6 # 2

(72)発明者 スピナ キャサリン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ポストン ウーチェスター ストリート 8 7 # 4

F ターム(参考) 4B065 AA90X BC25 CA44

4C084 AA17 NA14 ZA511 ZA512 ZA531 ZA532 ZA551 ZA552 ZA811 ZA812
ZB261 ZB262 ZB271 ZB272

4C087 AA01 AA02 AA03 BB34 BB44 CA04 CA05 NA14 ZA51 ZA53
ZA55 ZA81 ZB26 ZB27