

(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2017-513473

(P2017-513473A)

(43) 公表日 平成29年6月1日(2017.6.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02 ZNA	4B063
C12N 5/00 (2006.01)	C12N 5/00	4B065
C07K 7/00 (2006.01)	C07K 7/00	4H045
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	
C12N 5/0735 (2010.01)	C12N 5/0735	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-561787 (P2016-561787)	(71) 出願人	594106405 ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ ファウンデーション
(86) (22) 出願日	平成27年4月10日 (2015.4.10)		
(85) 翻訳文提出日	平成28年11月21日 (2016.11.21)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/025473		WISCONSIN ALUMNI RE SEARCH FOUNDATION
(87) 国際公開番号	W02015/157732		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537 26, マディソン, ウォルナット ス トリート 614
(87) 国際公開日	平成27年10月15日 (2015.10.15)		
(31) 優先権主張番号	61/978,032	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成26年4月10日 (2014.4.10)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細管形成を促進するためのヒドロゲル組成物

(57) 【要約】

ヒドロゲル組成物およびヒドロゲル組成物の使用方法を開示する。ヒドロゲル組成物が、細胞接着、拡散、増殖、移動および分化に影響を及ぼすための基質成分を迅速にスクリーニングする能力を提供することが有利である。特に適切な実施態様において、本発明のヒドロゲル組成物は、内皮細胞の細管形成を促進するために用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細管形成促進剤および抗細管形成剤のスクリーニング方法であって、
 ヒドロゲル組成物(ここで、ヒドロゲル組成物は、ノルボルネンで官能化されたポリエチレングリコール、架橋ペプチド、細胞接着ペプチドおよび可溶性因子結合剤を含む)を製造すること；

細管形成を促進または減少させると思われる作用剤を提供すること；

細胞を、ヒドロゲル組成物および作用剤に接触させること；および

細胞を分析すること；を含む方法。

【請求項 2】

該剤がヒドロゲル組成物にカップリングする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該剤が細胞培養培地内に含まれ、細胞培養培地がヒドロゲル組成物に接触する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

細胞接着ペプチドが、CRGDS(配列番号：2)、アセチル化GICYGRGDSPG(配列番号：31)、環状RGD[Fd]C(配列番号：33)、CRGD-(G)₁₃-PHSRN(配列番号：29)、CPHSRN-(SG)₅-RGD(配列番号：30)、RKRLQVQLSIRT(配列番号：37)、IKVAV(配列番号：38)、YIGSR(配列番号：39)、KRTGQYKL(配列番号：40)、TYRSRKY(配列番号：41)、KRTGQYKLGSKTGPQK(配列番号：42)、QAKHKQRKRLKSSC(配列番号：43)、およびSPKHHSQRARKKKNKNC(配列番号：44)から選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

架橋ペプチドが、KCGGPQGIWGQGCK(配列番号：27)およびKCGGPQGIAGQGCK(配列番号：28)から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

可溶性因子結合剤が、配列番号：22-26から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞が、胚性幹細胞、胚性幹細胞由来の神経細胞、胚性幹細胞由来の神経前駆細胞、胚性幹細胞由来の星状膠細胞、胚性幹細胞由来の小膠細胞、胚性幹細胞由来の内皮細胞、胚性幹細胞由来の網膜色素上皮細胞、誘導多能性幹細胞、誘導多能性幹細胞由来の神経前駆細胞、誘導多能性幹細胞由来の星状膠細胞、誘導多能性幹細胞由来の小膠細胞、誘導多能性幹細胞由来の内皮細胞、誘導多能性幹細胞由来の網膜色素上皮細胞、間葉系幹細胞、臍帯静脈内皮細胞、NIH 3T3線維芽細胞、皮膚線維芽細胞、線維肉腫細胞、弁間質細胞、心筋細胞、誘導多能性幹細胞由来の心筋細胞、内皮前駆細胞、循環脈管形成細胞、神経細胞、周皮細胞、癌細胞、肝細胞、膵臓細胞、膵島細胞およびその組合せから選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

細管形成を促進する方法であって、

ヒドロゲル組成物(ここで、ヒドロゲル組成物は、ノルボルネンで官能化されたポリエチレングリコール、架橋ペプチド、細胞接着ペプチドおよび可溶性因子結合剤を含む)を製造すること；

ヒドロゲル組成物に接触している培養培地を提供すること；

ヒドロゲル組成物に接触している培養培地に、細胞を接触させること；および

細胞を分析すること；を含む方法。

【請求項 9】

細胞接着ペプチドが、CRGDS(配列番号：2)、アセチル化GICYGRGDSPG(配列番号：31)、環状RGD[Fd]C(配列番号：33)、CRGD-(G)₁₃-PHSRN(配列番号：29)、CPHSRN-(SG)₅-RGD(配列番号：30)、RKRLQVQLSIRT(配列番号：37)、IKVAV(配列番号：38)、YIGSR(配列番号：39)、KRTGQYKL(配列番号：40)、TYRSRKY(配列番号：41)、KRTGQYKLGSKTGPQK(配列番号：42)

10

20

30

40

50

)、QAKHKQRKRLKSSC(配列番号：43)、およびSPKHHSQRARKKKKNKNC(配列番号：44)から選ばれる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

架橋ペプチドが、KCGGPQGIWGQGCK(配列番号：27)およびKCGGPQGIAGQGCK(配列番号：28)から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

可溶性因子結合剤が、配列番号：22-26から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項12】

細胞が、胚性幹細胞、胚性幹細胞由来の神経細胞、胚性幹細胞由来の神経前駆細胞、胚性幹細胞由来の星状膠細胞、胚性幹細胞由来の小膠細胞、胚性幹細胞由来の内皮細胞、胚性幹細胞由来の網膜色素上皮細胞、誘導多能性幹細胞、誘導多能性幹細胞由来の神経前駆細胞、誘導多能性幹細胞由来の星状膠細胞、誘導多能性幹細胞由来の小膠細胞、誘導多能性幹細胞由来の内皮細胞、誘導多能性幹細胞由来の網膜色素上皮細胞、間葉系幹細胞、臍帯静脈内皮細胞、NIH 3T3線維芽細胞、皮膚線維芽細胞、線維肉腫細胞、弁間質細胞、心筋細胞、誘導多能性幹細胞由来の心筋細胞、内皮前駆細胞、循環脈管形成細胞、神経細胞、周皮細胞、癌細胞、肝細胞、膵臓細胞、膵島細胞およびその組合せから選ばれる、請求項8に記載の方法。

10

【請求項13】

細管形成が、内皮細胞細管ネットワーク形成を含む、請求項8に記載の方法。

20

【請求項14】

ノルボルネンで官能化されたポリエチレングリコール、架橋ペプチド、細胞接着ペプチドおよび可溶性因子結合剤を含むヒドロゲル組成物。

【請求項15】

ノルボルネンで官能化されたポリエチレングリコールが、ノルボルネンで官能化された8-アーム、20 kDaのポリエチレングリコールを含む、請求項14に記載のヒドロゲル組成物。

【請求項16】

細胞接着ペプチドが、CRGDS(配列番号：2)、アセチル化GICYGRGDSPG(配列番号：31)、環状RGD[Fd]C(配列番号：33)、CRGD-(G)₁₃-PHSRN(配列番号：29)、CPHSRN-(SG)₅-RGD(配列番号：30)、アセチル化GICYGRGDSPG(配列番号：31)、CRDGS(配列番号：32)、環状RGD[Fd]C(配列番号：33)、RKRLQVQLSIRT(配列番号：37)、IKVAV(配列番号：38)、YIGSR(配列番号：39)、KRTGQYKL(配列番号：40)、TYRSRKY(配列番号：41)、KRTGQYKLGSKTGPQK(配列番号：42)、QAKHKQRKRLKSSC(配列番号：43)、およびSPKHHSQRARKKKKNKNC(配列番号：44)から選ばれる、請求項14に記載のヒドロゲル組成物。

30

【請求項17】

可溶性因子結合剤が、配列番号：22-26から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項14に記載のヒドロゲル組成物。

【請求項18】

約0.1 kPa～約300 kPaの範囲の弾性率を有する、請求項14に記載のヒドロゲル組成物。

40

【請求項19】

ポリエチレングリコールの濃度が、約36 mg/mL～約70 mg/mLである、請求項14に記載のヒドロゲル組成物。

【請求項20】

約30%～約70%の架橋を含む、請求項14に記載のヒドロゲル組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表を提出するための支持的記載

50

配列表の紙コピーおよびサイズが11,539バイト(MICROSOFT WINDOWS(登録商標)EXPLORER内で測定)である「P140314W001_ST25.txt」と称するファイルを含む配列表のコンピュータに読み込み可能な形式は、本明細書において提供され、参照することによって本明細書に援用される。配列表は、配列番号：1-47からなる。

関連出願の相互参照

本出願は、2014年4月10日出願の米国仮出願第61/978,032号に対する優先権を主張する。上記出願の開示の全体を参照することにより本出願に含める。

連邦政府資金による研究開発の記載

本発明は、本発明は、米国政府の支援を受け、国立衛生研究所によって与えられた契約番号HL093282のもとで行われた。米国政府は本発明に関して権利を有する。

10

【背景技術】

【0002】

本開示は、一般に、生体材料組成物の製造方法および生体材料組成物の使用方法に関する。さらに詳しくは、本開示は、ヒドロゲル組成物、特に、ヒドロゲルアレイ、ヒドロゲル組成物を用いて細胞基質相互作用をスクリーニングする方法、およびヒドロゲル組成物を用いて細管形成を促進する方法に関する。

【0003】

大部分の組織のタイプの発達は、成熟した組織特異的な細胞型への制御された前駆細胞の分化をもたらす複数の信号の複雑な相互作用を含む。たとえば、間葉系幹細胞(MSC)は、さまざまな増殖因子に曝露されることによって、骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞、神経細胞および内皮細胞にインビトロで分化することができる。増殖因子への曝露は、細胞が培養される培地および基質によって制御されうる。実質的進歩は、規定培地の開発において行なわれているが、近年、細胞生長における基質および細胞-基質接着の役割が研究されている。

20

【0004】

規定培地を決定するための研究に基づいて、基質が、細胞増殖および組織発生にとって重要であることが明らかにされている。たとえば、ヒト胚性幹細胞による基質への接着が、細胞が未分化のままであるか、または分化するかどうかという変化性に寄与していることが実証されている。したがって、細胞培養を成功させるための細胞培養培地を同定することのみならず、規定基質を同定することも重要である。

30

【0005】

アレイ形式において明確に定義された表面をスクリーニングすることは、細胞接着、細胞拡散、増殖、移動および分化を促進する特異的分子、ならびに細胞挙動を調節する分子の迅速な同定を可能にする。アレイに置かれた細胞へのリガンドを提供するアレイ形式の自己組織化単分子膜(SAM)(すなわち、SAMアレイ)などの生体材料アレイが構築されている。SAMは、分子の一方の端が、基質に対して特異的かつ可逆的親和性を示し、他方の端が官能基を有する両親媒性分子の組織された層である。SAMアレイを形成するために分極されるので、親水性「ヘッド基」は、基質上で集合し、疎水性テール基は、基質から離れて集合する。最密充填分子の領域は、核を形成し、基質が単一の単分子膜で覆われるまで増殖する。

40

【0006】

SAMアレイを構築するためのアルカンチオールの使用は、再現性SAMアレイおよび表面の形成を可能にする。SAMアレイを用いて、細胞接着、拡散、増殖、移動および分化を促進する特異的リガンドまたはエピトープを同定することができる。さらに、SAMアレイは、アレイの規定領域においてリガンドが細胞に提供されるようにパターンニングされてもよい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

SAMアレイなどの生体材料アレイは、細胞挙動における固定化リガンドの効果を研究す

50

るための優れたモデル基質を提供し、より少ない労働集約型の過程を用いてSAMアレイプラットフォームを製造することが、SAMアレイの用途をより広範囲にするために必要である。したがって、培養物中での細胞の生存および増殖をサポートし、細胞接着、細胞拡散、増殖、移動、分化を促進し、細胞挙動を調節する特異的分子の迅速な同定を可能にする表面を同定するためのパターンニングされた生体材料アレイを製造するための別の方法に対する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示の簡単な記載

本開示は、一般に、生体材料組成物および生体材料組成物の使用方法に関する。さらに詳しくは、本開示は、ヒドロゲル組成物、特に、ヒドロゲルアレイ、ヒドロゲル組成物を用いて細胞基質相互作用をスクリーニングする方法、およびヒドロゲル組成物を用いて細管形成を促進する方法に関する。

10

【0009】

本開示にしたがって、培養物中での細胞の生存および増殖をサポートし、細胞接着、細胞拡散、増殖、移動、分化を促進し、細胞挙動を調節する特異的分子の迅速な同定を可能にするヒドロゲル組成物の製造方法が見い出されている。本開示のヒドロゲル組成物は、二次元(2D)および三次元(3D)細胞培養のために用いることもできる。本開示のヒドロゲル組成物は、さらに、たとえば、可溶性因子結合剤を用いる細胞表面への生体分子の富化などの、生体分子の二次元および三次元富化のために用いることもできる。本開示のヒドロゲル組成物は、細胞および可溶性因子放出微粒子を封入することによる可溶性因子源として用いることもでき、血管新生を促進し、細管形成を促進し、形態形成過程を促進し、および薬物毒性などをスクリーニングするために用いることができる。さらに、本開示のヒドロゲル組成物は、たとえば、リガンド-標的相互作用、抗体-抗原相互作用、タンパク質-タンパク質相互作用、増殖因子-結合リガンド相互作用、受容体-リガンド相互作用などの分子-分子相互作用を分析するために用いることもできる。分子-分子相互作用を分析するための本開示のヒドロゲル組成物の使用は、結合の特異性、結合の親和性などを決定することを可能にする。

20

【0010】

1つの態様において、本開示は、細管形成促進剤(pro-tubulogenic agent)および抗細管形成剤(anti-tubulogenic agent)のスクリーニング方法に関する。方法は、ヒドロゲル組成物(ここで、ヒドロゲル組成物は、ノルボルネンで官能化されたポリエチレングリコール、架橋ペプチド、細胞接着ペプチドおよび可溶性因子結合剤を包含する)を製造すること；細管形成を促進または減少させるとされる作用剤を提供すること；細胞を、ヒドロゲル組成物および作用剤に接触させること；および細胞を分析すること；を含む。

30

【0011】

もう1つの態様において、本開示は、細管形成を促進する方法に関する。方法は、ヒドロゲル組成物(ここで、ヒドロゲル組成物は、ノルボルネンで官能化されたポリエチレングリコール、架橋ペプチド、細胞接着ペプチドおよび可溶性因子結合剤を包含する)を製造すること；ヒドロゲル組成物に接触している培養培地を提供すること；ヒドロゲル組成物に接触している培養培地に、細胞を接触させること；および細胞を分析すること；を含む。

40

【0012】

さらに別の態様において、本開示は、ノルボルネンで官能化されたポリエチレングリコール、架橋ペプチド、細胞接着ペプチドおよび可溶性因子結合剤を含むヒドロゲル組成物に関する。

【0013】

後述の詳細な記載を考慮することにより、本開示はより十分に理解され、かつ上記以外の特徴、態様および利点が明らかとなるであろう。このような詳細な記載は、以下の図面に言及する。

50

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A - B】を製造するためのステップ本開示のヒドロゲルアレイを製造するためのステップの模式図である。

【図2A】本開示のヒドロゲルアレイの製造方法で用いられる金属コーティングされた基質の模式図である。

【図2B】図2Aに示す金属コーティングされた基質をパターニングするためのステップ中の金属コーティングされた基質の端面図である。

【図3】本開示の方法を用いて製造された64個の個々のヒドロゲルスポットを有するヒドロゲルアレイの写真である。

【図4】原子間力顕微鏡法によって決定されたヒドロゲルアレイの表面粗さを描くグラフである。

【図5】異なる形状の個々のヒドロゲルスポットを示す高倍率の上面画像である。

【図6】異なる高さを有する個々のヒドロゲルスポットを示す側面画像である。

【図7】実施例2で検討される、蛍光タグ付きペプチドの密度を増加させること、およびカプセル化された蛍光マイクロスフェアの密度を増加させることによる、個々のヒドロゲルスポットのパターニングを示すヒドロゲルアレイである。

【図8】本開示の方法を用いるヒドロゲル前駆体溶液中のPEG-NB(w/w%)の総濃度を変化させることによる、ヒドロゲルアレイの個々のヒドロゲルスポットの圧縮率の制御を描くグラフである。

【図9】本開示の方法を用いて、ヒドロゲルアレイを製造し、さらに、マイクロウェルアドオン(add-on)とともにヒドロゲルアレイを組み立てるためのステップを描く模式図である。

【図10A - C】実施例2で検討される、4重量%(図10A)、6重量%(図10B)および8重量%(図10C)のポリエチレングリコールを用い、線形RGDペプチドを提供して製造された、ヒドロゲルアレイ上で培養されたhMSCの写真である。スケール・バー = 100 μm 。

【図11A - C】実施例2で検討される、4重量%(図11A)、6重量%(図11B)および8重量%(図11C)のポリエチレングリコールを用い、ペプチドアイデンティティを変化させて製造された、ヒドロゲルアレイ上で培養されたhMSCの写真である。スケール・バー = 100 μm 。

【図12A】実施例3で検討される、細管形成をサポートしなかった、ヒドロゲルスポットに封入された内皮細胞を図示する。

【図12B】実施例3で検討される、細管形成を受けた、ヒドロゲルスポットに封入された内皮細胞を図示する。

【図12C】実施例3で検討したように、細胞を播種されたヒドロゲルアレイならびに細管形成をサポートしなかったヒドロゲルスポットの拡大および細管形成をサポートしたヒドロゲルスポットの拡大を示す模式図である。

【図13A - C】本開示のPEGヒドロゲルに包含される分子を示す。図13Aは、(i)各アームが、ノルボルネン分子で機能化された8-アームPEG分子；および(ii)マルチプル8-アームPEG分子を順序付けられたポリマーネットワークに橋架けするジチオール化PEG架橋分子；から構成されるヒドロゲルを図示する。ジチオール化PEG分子は、細胞分解性ではない内部架橋分子として働く；(iii)生物活性ヒドロゲルにおいて、PEG分子は、CRGDS(配列番号：2)接着ペプチドまたはCRDGS(配列番号：32)スクランブルペプチドで飾られて、ヒドロゲルへの細胞接着を調節する；(iv)ジチオール化MMP不安定架橋ペプチドは、細胞駆動ヒドロゲル分解を可能にする。図13Bは、「バックグラウンド」ヒドロゲルが、細胞接着分子を欠いており、細胞駆動分解に付されないことを図示する。図13Cは、「ヒドロゲルスポット」が、共有的に結合された接着分子を介して細胞挙動を調節し、MMPを介して生物分解性であることを図示する。

【図14A - E】ヒドロゲルアレイ製作の模式的表現を図示する：A)さまざまな比率のCRGDS(配列番号：2)接着ペプチド(白丸)およびスクランブルCRDGS(配列番号：32)非機能性ペプチド(灰色の丸)を含む別々のヒドロゲルスポット溶液をPDMSステンシルのウェルにピ

10

20

30

40

50

ペットで移す。総ペンダントペプチド濃度をすべての溶液において2 mMに固定する；B)UV光を用いて、ヒドロゲルスポットをステンシル内で架橋させる；C)架橋した1-mm厚の「バックグラウンド」ヒドロゲルスラブを架橋生物活性ヒドロゲルスポットの上に置く(バックグラウンドヒドロゲル溶液の薄層をスラブに加えて、硬化したスポットをバックグラウンドにしっかりと固定する)；D)UV光による処理後、ヒドロゲルスポットをバックグラウンドにしっかりと固定する；およびE)完成したヒドロゲルアレイをステンシルから除去する。アレイの模式図および側面画像において、ボックスは、隆起したスポットを強調する。

【図15A-D】実施例4の機械的特性の特徴決定およびヒドロゲルアレイへのペンダントペプチド組み込みを図示する。図15Aは、低、中および高ヒドロゲル弾性率条件で用いた、分解性(左)およびバックグラウンド(右)ヒドロゲルの平衡膨潤比を図示する。図15Bは、低、中および高ヒドロゲル弾性率条件で用いた、分解性(左)およびバックグラウンド(右)ヒドロゲルの複素せん断弾性率を図示する。誤差バーは標準偏差を示す。図15Cは、NMRで測定されるとおり、CRGDS(配列番号：2)接着ペプチドおよびCRDGS(配列番号：32)スクランブルペプチドの共有カップリングによるノルボルネンアルケンプロトンの減少を図示する。図15Dは、アレクサフルオロ(Alexa Fluor)(登録商標)488で標識されたCRGDS(配列番号：2)接着ペプチドのN末端アミンを図示する。左欄から右欄への緑色蛍光強度を定量した(黒線：PEGポリマーおよび架橋剤；円形：CRGDS)。

【図16A-C】ヒドロゲルアレイスポットの内部に封入されたHUVEC(human umbilical vein endothelial cell:ヒト臍帯静脈内皮細胞)の生存能力を図示する。図16Aは、封入の48時間後の生細胞および死細胞核を計数することによって決定された細胞の生存能力を図示する。図16Bは、他の弾性率条件下での等しいCRGDS(配列番号：2)接着ペプチド濃度すべてに対して比較した、VEGFR2が10 μ M SU5416の補足によって阻害された場合に測定された細胞の生存能力を図示する；* : $p < 0.05$ 、&、 $p < 0.05$ 。図16Cは、増殖培地コントロールと比較した、増殖培地中でのHUVECの生存能力に対して正規化されたSU5416処置HUVECの生存能力を図示する；* : $p < 0.05$ ；** : $p < 0.01$ ；*** : $p < 0.001$ 。

【図17A-D】ヒドロゲルアレイスポットの内部に封入されたHUVECの増殖を示す、セルトラッカーグリーンで緑色に染色された細胞、アレクサフルオロ(登録商標)594で赤色に染色されたS期の細胞の核、およびヘキスト核染料で青色に染色された核の黑白重ね合わせ画像を図示する。図17Aは、封入の24時間後のClick-it Edu染色によって決定された細胞増殖を図示する。図17Bは、他の弾性率条件下での等しいCRGDS(配列番号：2)接着ペプチド濃度すべてに対して比較した、VEGFR2が10 μ M SU5416の補足によって阻害された場合に測定された細胞増殖を図示する；* : $p < 0.05$ 、&、 $p < 0.05$ 。図17Cは、増殖培地コントロールと比較した、増殖培地中での増殖に対して正規化されたSU5416処置中の細胞増殖を図示する；* : $p < 0.05$ ；** : $p < 0.01$ ；*** : $p < 0.001$ 。図17Dは、多細胞構造内に局在化された増殖する細胞(矢印)を図示する。

【図18A-D】ヒドロゲルアレイスポットの内部に封入されたHUVECの細管形成を図示する。図18Aは、落射蛍光Zスタック画像からスポット全体の細管の長さを手動で測定することによって決定された細管の長さの合計を図示する。封入後24時間の時点で、セルトラッカーグリーンおよびヘキスト核染料を用いて細胞を染色した。図18Bは、他の弾性率条件下での等しいCRGDS(配列番号：2)接着ペプチド濃度すべてに対して比較した、VEGFR2が10 μ M SU5416の補足によって阻害された場合の細管形成を図示する；* : $p < 0.05$ 、&、 $p < 0.05$ 。図18Cは、増殖培地コントロールと比較した、増殖培地中での細管形成に対して正規化されたSU5416処置中の細管形成を図示する；* : $p < 0.05$ ；** : $p < 0.01$ ；*** : $p < 0.001$ 。図18Dは、低い弾性率における低い細管形成およびSU5416処置による増加した細管形成の共焦点顕微鏡画像を示す、セルトラッカーグリーンで緑色に染色された細胞、2 μ M RGDS 接着ペプチドスポット、およびヘキスト核染料で青色に染色された核の黑白重ね合わせ画像を図示する。下の図：VEGFR2阻害された条件下で見られるキャピラリー様構造の拡大例。スケール・バー：100 μ m。

【図19A-D】標準モデルシステムにおけるVEGFR2阻害の効果を図示する。図19Aは、

組織培養ポリスチレン(TCPS)上でのSU5416補足有りおよび無しでのHUVEC増殖を図示する；* : $p < 0.05$ 。図19Bは、増殖因子抑制MATRIGEL(登録商標)におけるSU5416補足有りおよび無しでのHUVEC細管形成を図示する。図19Cおよび19Dは、0.4 μL MATRIGEL(登録商標)スポットにおけるHUVEC CLS形成を図示する。対の画像それぞれにおいて、右側写真の細管は、強調されたものである。EGM2およびSU5416処置条件の間；* : $p < 0.05$ 。

【図20A - B】実施例4で分析される、拘束されたヒドロゲルへの細胞封入の効果を図示する。図20Aは、RGDを含まず、非分解性であった第二の安定化ヒドロゲルを用いて48ウェルプレートの底部に固定されているヒドロゲル中のHUVEC細管形成を図示する。図20Bは、24ウェルプレートの中の10 μM SU5416を含む増殖培地中を自由に浮遊していた同様のヒドロゲル中のHUVEC細管形成を図示する。

10

【図21】実施例5で形成される、チオール-エン光重合を介して形成されたポリエチレングリコールヒドロゲルアレイを図示する。

【図22A - E】実施例5で分析される、2Dおよび3Dヒドロゲルアレイ培養物中の内皮細胞を図示する。

【図23A - E】実施例5で分析される、マトリックス特性、架橋密度、培養培地およびサポート細胞の存在が変更される場合の、得られたネットワーク形成範囲、接着、架橋密度および脈管構造の安定性を図示する。

【図24A - B】実施例6で分析される、ヒドロゲルがCRGDS(配列番号：2)接着ペプチドを提供する場合、PEGヒドロゲル表面が、播種後0~12時間または12~24時間、HUVECによる細管ネットワーク形成をサポートすることを説明するヒートマップを図示する。

20

【図25A - C】実施例6における、PEGヒドロゲル表面上に細管ネットワークを形成するHUVECの写真ならびに細管ネットワークを形成できないHUVECの例を図示する。

【図26A - B】実施例7で分析される、表面がCRGDS(配列番号：2)接着ペプチドではなくて環状RGDを提供する場合、PEGヒドロゲル表面が、播種後24時間、HUVECによる細管ネットワーク形成をサポートすることを説明するヒートマップを図示する。

【図27A - C】実施例8で分析される、ヒドロゲル表面上に細管ネットワークを形成するHUVECの写真を図示する。特に、図27Aおよび27Bは、環状RGD接着ペプチドならびに機能性およびスクランブルVEGF結合ペプチドを提供するヒドロゲル表面上に細管ネットワークを形成するHUVECの写真を図示する。図27Cは、播種後24時間および48時間の時点での、環状RGD接着ペプチドのみを提供するヒドロゲル表面上に細管ネットワークを形成するHUVEC

30

の写真を図示する。

【図28A - B】実施例9で分析される、PEGヒドロゲル表面が、封入後24時間、HUVECによる3D細管形成をサポートすることを説明するヒートマップを図示する。

【図29A - B】実施例9で分析される、封入後24時間の時点でPEGヒドロゲルにおいて3D細管構造を形成するHUVECの写真ならびに細管ネットワークを形成できないHUVECの例を図示する。

【図30A - B】実施例10で分析される、封入後24および48時間の時点でPEGヒドロゲルにおいて3D細管ネットワークを形成し、72時間後に不安定になるHUVECの写真を図示する。

【図31A - B】実施例11で分析される、さまざまな濃度のVEGFで処理した後の、封入後第8および9日の時点でPEGヒドロゲルにおいて3D細管ネットワークを維持するiPS-ECの一連の写真ならびにネットワークを維持できないHUVECの例を図示する。

40

【図32】実施例12で分析される、封入後第1、2、3および5日の時点でPEGヒドロゲルにおいて3D細管ネットワークを形成するiPS-ECの一連の写真を図示する。

【図33A - D】実施例12で分析される、細管ネットワーク安定性を強化するために、存在する細管形成促進ヒドロゲルに補強ヒドロゲルを添加することの効果および補強ヒドロゲルを組み入れる過程を説明する。

【図34A - B】実施例13で分析される、IPSC-ECの中心に集められた源からの毛細管出芽における架橋密度およびCRGDS(配列番号：2)接着ペプチド濃度を変化させることの結果を説明する。

50

【図35A-B】実施例14で分析される、硬化ヒドロゲル中でのペプチド提示におけるヒドロゲル前駆体溶液中の接着ペプチド濃度を变化させることの効果を説明する。

【図36A-C】実施例15で分析される、ペンダントペプチドをPEG分子にカップリングさせることの有効性を測定するためのNMRを用いる方法を説明する。

【図37A-D】実施例16で分析される、ヒドロゲル前駆体溶液中のPEG濃度を变化させることの効果、およびPEGヒドロゲルせん断弾性率における架橋パーセントの効果を説明する。

【図38A-B】実施例17で分析される、環状RGD接着ペプチドを含むPEGヒドロゲルが、播種後24および48時間、HUVECによる細管形成をサポートすることを説明するヒートマップを図示する。

10

【図39A-B】実施例17で分析される、CRGDS(配列番号:2)接着ペプチドを含むPEGヒドロゲルが、播種後24および48時間、HUVECによる細管形成をサポートすることを説明するヒートマップを図示する。

【図40A-B】実施例17で分析される、環状RGD接着ペプチドを含むPEGヒドロゲルが、播種後24および48時間、iPSC誘導ECによる細管形成をサポートすることを説明するヒートマップを図示する。

【図41A-B】実施例17で分析される、CRGDS(配列番号:2)接着ペプチドを含むPEGヒドロゲルが、播種後24および48時間、iPSC誘導ECによる細管形成をサポートすることを説明するヒートマップを図示する。

【発明を実施するための形態】

20

【0015】

本開示は、さまざまな修正および代替形態が可能であるが、その特定の実施態様は、図面において例示を目的として示されるものであり、本明細書で詳細に説明される。しかしながら、特定の実施態様の記載は、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の真の趣旨および範囲に入るすべての変更、等価物および代替物をカバーする本開示を限定することを意図するものではないことを理解すべきである。

【0016】

本開示の詳細な記載

他に特記しない限り、本明細書で用いるすべての技術および科学用語は、本開示が属する当業者によって通常理解されている意味と同じ意味を有する。本命最初に記載の方法および材料と類似または等価な任意の方法および材料を、本開示の実施または試験において用いることができるが、好ましい方法および材料は、以下に記載される。

30

【0017】

本開示にしたがって、分子-分子相互作用をスクリーニングし、細管形成を促進するための生体材料組成物の製造方法が見い出されている。さらに詳しくは、本開示は、ヒドロゲル組成物に関する。1つの態様において、ヒドロゲル組成物は、個別に制御されたヒドロゲルスロット弾性率、ヒドロゲルスロットポリマー密度、ヒドロゲルスロットリガンドアイデンティティおよびヒドロゲルスロットリガンド密度を有するヒドロゲルアレイとして製造されうる。本開示は、ヒドロゲルアレイの製造方法に関する。もう1つの態様において、ヒドロゲル組成物を、細胞培養プレートの表面上で使用するためなどのコーティングとして製造することができる。さらにもう1つの態様において、ヒドロゲル組成物を、懸濁培養におけるマイクロキャリアとして製造することができる。本開示のヒドロゲル組成物は、生体分子で機能化することができ、細胞培養に適合し、生体適合性がある。本開示のヒドロゲル組成物を、細胞機能を変更する(たとえば、増強する、抑制する、および変化させる)ために用いることもできる。ヒドロゲルによって囲まれて、ヒドロゲルが存在しない(欠けている)領域を形成する領域を包含するようにヒドロゲル組成物を製造することもできる。

40

【0018】

当業者に公知のように、ヒドロゲル組成物は、ポリマー材料および水が平衡状態にある親水性のポリマー鎖のネットワークである。ヒドロゲル組成物は、非重合の出発物質を用

50

いて形成される。ポリマー材料は、たとえば、天然ポリマー材料、合成ポリマー材料およびその組合せでありうる。

【0019】

有利なことに、本開示のヒドロゲル組成物の製造方法は、合成中にアミノ酸配列にシステインを含むことにより、重合中にヒドロゲルネットワークにペプチドを直接組み込むことを可能にし、合成後修飾の必要性を排除することを可能にする。この方法では、ペプチドを、両端にシステインを含むことによって架橋剤として用いるか、またはペンダント基として組み込むことができ、ポリマー主鎖に予めカップリングさせ、さまざまな組合せで混合するか、または簡単にするために重合中に組み込むことができる。

【0020】

ヒドロゲル組成物およびヒドロゲル組成物の製造方法

本開示は、ヒドロゲル組成物の製造方法および得られる組成物の使用に関する。ヒドロゲルアレイを製造するために用いられる場合、製造方法は、一般に、基質にヒドロゲル前駆体溶液を接触させること(ここで、基質は疎水性領域と親水性領域を含む)；ヒドロゲル前駆体溶液が基質と表面修飾基質との間に位置するように、表面修飾基質をヒドロゲル前駆体溶液上に置くこと；ヒドロゲル前駆体溶液を重合させること；および基質から表面修飾基質を分離して、ヒドロゲルアレイを得ること；を含む(図1A-1B参照)。このように、ポリマーヒドロゲル前駆体溶液を基質と表面修飾基質との間で重合させ、得られるヒドロゲルを表面修飾基質がヒドロゲルアレイを含むように表面修飾基質とともに移す。1つの実施態様において、以下に詳述するように、ヒドロゲルを含まないバックグラウンドによって囲まれるヒドロゲルスポットのアレイを含むように、ヒドロゲルアレイをパターンニングすることができる。もう1つの実施態様において、以下に詳述するように、ヒドロゲルバックグラウンド内にヒドロゲルを含まないスポット(またはプール)のアレイが形成されるように、ヒドロゲルアレイをパターンニングすることができる。

【0021】

ヒドロゲルスポットを有するヒドロゲルアレイにおいては、各ヒドロゲルスポットの表面形状を定義してアレイの各ヒドロゲルスポットの含量を限定するため、ならびに、近隣のスポットとの関連におけるアレイ内の各ヒドロゲルスポットの空間パターンを定義するための、差動湿潤(differential wettability)が得られるように、得られるヒドロゲルアレイをパターンニングすることができる。これは、一般的マルチウェルプレートのサイズおよび寸法(たとえば、96ウェルプレート、384ウェルプレートなど)に適合する、さまざまなサイズおよび寸法の一般的なマイクロアレイアドオンとともに用いるためのヒドロゲルアレイを製造するために特に有用である。これは、強化スループット細胞培養、培地交換などのためのマルチチャンネルピペットでの使用にも有用である。アレイの個々のヒドロゲルスポットは、所望の形状を有することができる(たとえば、図5を参照)。たとえば、形状は、円形(circular)、円形(round)、楕円形、四つ葉、長方形、三角形、星形、菱形、その組合せなどでありうる。ヒドロゲルスポットのパターンは、列、渦巻き、円、正方形、長方形、その組合せなどに作られてもよい。個々のヒドロゲルスポットの形状は、パターンニングされる基質のパターンニング中のエッチングのために用いられるステンシルのパターンを変えることによって変えることができる。

【0022】

ヒドロゲルを含まないスポットを有するヒドロゲルアレイにおいては、個々のヒドロゲルを含まないスポットは、所望の形状を有することができる(たとえば、図5を参照)。たとえば、形状は、円形(circular)、円形(round)、楕円形、四つ葉、長方形、三角形、星形、菱形、その組合せなどでありうる。ヒドロゲルを含まないスポットのパターンは、列、渦巻き、円、正方形、長方形、その組合せなどに作られてもよい。個々のヒドロゲルを含まないスポットの形状は、パターンニングされる基質のパターンニング中のエッチングのために用いられるステンシルのパターンを変えることによって変えることができる。

【0023】

ヒドロゲルアレイのサイズの上限は、パターンニングされた基質の寸法および/または表

10

20

30

40

50

面修飾基質の寸法に応じて変化する。得られるヒドロゲルアレイをパターンニングして、所望のサイズを有する個々のヒドロゲルスポットおよびヒドロゲルを含まないスポットを得ることもできる。個々のヒドロゲルスポットおよびヒドロゲルを含まないスポットのサイズおよび形状は、パターンニングされる基質のパターンニング中のエッチングのために用いられるステンシルのパターンを変えることによって変えることができる。ヒドロゲルアレイの適当な個々のヒドロゲルスポットサイズは、単一の細胞を適応させるのに十分小さくありうるが、たとえば、多くの細胞を適応させるのに十分大きくもありうる。このように、ヒドロゲルアレイの個々のヒドロゲルスポットサイズは、任意の所望の直径でありうる。ヒドロゲルアレイの特に適当な個々のヒドロゲルスポットサイズは、約10 μmおよびそれ以上でありうる。

10

【0024】

2014年7月24日出願の米国特許出願第14/339,938号(参照することによって本明細書に援用される)などに記載の自己組織化単分子膜(SAM)によって形成される疎水性領域および親水性領域を作成することによって、パターンニングされた基質を製造することができる。自己組織化単分子膜を形成するための適当な基質は、当業者に公知であり、たとえば、Love et al., Chem. Rev. 2005, 105:1103-1169(参照することによって本明細書に援用される)に記載のような、金属コーティングされた基質、シリコン基質、ダイヤモンド基質、ポリジメチルシロキサン(PDMS)基質などでありうる。たとえば、基質を過フッ素化アルカンチオール溶液に浸漬して、過フッ素化アルカンチオール自己組織化単分子膜(フッ素SAM)が形成されようようにすることにより、基質上に差動湿潤を伴う領域を形成することによって、パターンニングされた基質を製造することができる。親水性領域を形成するために、フッ素SAM金属コーティングされた基質領域をプラズマエッチングから保護するために、フッ素SAM金属コーティングされた基質上にステンシルを置くことができる。次いで、フッ素SAM基質の露出領域を、酸素プラズマ処理によってエッチングして、基質中にエッチングされたフッ素SAMを形成することができる。次いで、基質を水酸基末端アルカンチオール溶液に浸漬して、基質のエッチングされた領域中に、親水性アルカンチオールSAM(EG3SAM)を形成する。得られるパターンニングされた基質は、疎水性SAMおよび親水性SAMに基づく差動湿潤を有する。

20

【0025】

方法は、さらに、パターンニングされた基質と表面修飾基質との間にスペーサーを置くことを包含する。方法の実行中にパターンニングされた基質上に置かれたスペーサーは、ヒドロゲルアレイを形成するヒドロゲルの高さ(または厚さ)を定義するように機能する。より高い(すなわち、より厚い)ヒドロゲルアレイを製造する場合に、スペーサーは特に望ましい。このように、ヒドロゲルアレイは、任意の所望の高さを有することができる(たとえば、図6を参照)。しかしながら、ヒドロゲルアレイの適当な高さは、約20マイクロメートル(μm)~約1ミリメートルであり、ヒドロゲルアレイは、必要に応じて、より高くされうる。スペーサーは、ヒドロゲルの形成中の、パターンニングされた基質および表面修飾基質の表面間の直接接触を予防するようにも機能する。本発明方法に用いるスペーサーは、当業者に公知の任意の適当な材料でありうる。特に適当なスペーサーは、たとえば、ポリジメチルシロキサン(PDMS)である。ヒドロゲルアレイの高さは、たとえば、ヒドロゲルの頂点から基質に到るまで焦点を合わせるための顕微鏡を用い、基質からヒドロゲルの頂点に至るまで焦点を合わせるための顕微鏡を用い、そして、原子間力顕微鏡法によって決定されるヒドロゲルアレイの表面粗さを測定することによって決定されうる(たとえば、図4を参照)。

30

40

【0026】

製造方法はさらに、パターンニングされた基質に、ヒドロゲル前駆体溶液を接触させることを包含する。さらに詳しくは、パターンニングされた基質の親水性領域に、ヒドロゲル前駆体溶液を接触させる。パターンニングされた基質の疎水性領域は、隣接する親水性領域のバリアーとして働き、各親水性領域の単離を可能にする。ヒドロゲル前駆体溶液は、たとえば、ポリマーと多官能性ポリマー架橋剤の組合せでありうる。

50

【0027】

ヒドロゲルコーティング組成物として用いられる場合、製造方法は、一般に、コーティングされるべき基質(たとえば、細胞培養プレートの表面)に、ヒドロゲル前駆体溶液を接触させることを包含する。

【0028】

ヒドロゲル前駆体溶液のための適当なポリマーは、当業者には公知であり、たとえば、ポリ(エチレングリコール)、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、マトリゲル(MATRIGEL(登録商標))、ジチオールポリマー(たとえば、アクリルアミド)、クリックベースの複合ヒドロゲル(Polizzotti et al. Biomacromolecules 2008、9:1084-1087(参照することによって本明細書に援用される)で論じられたもの)、ポリ(エチレングリコール) - ジアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ビニルスルホンなどが挙げられる。特に適当なポリマーは、たとえば、ポリ(エチレングリコール)でありうる。特に適当なポリマーは、たとえば、機能性ポリマーでありうる。ポリマーの機能化は、たとえば、¹H核磁気共鳴分光学、質量分析、エルマン試薬、紫外可視分光法、赤外分光法およびその他の当業者に既知の方法で確認されうる。

10

【0029】

特に適当な機能性ポリマーは、たとえば、ノルボルネンで官能化されている末端ヒドロキシル(-OH)基を有する8-アームポリ(エチレングリコール)(JenKem Technology USA、テキサス州、アレンから市販されている)でありうる。Fairbanks et al.(Adv. Mater. 2009、21:5005-5010)に記載のように、8-アームポリ(エチレングリコール)は、ノルボルネンで官能化されうる。

20

【0030】

他の特に適当なポリマーは、クリックケミストリーを用いて機能化されてもよいポリ(エチレングリコール)である。「クリック」ケミストリーは、化学的に生体分子を結合させるための非常に多彩な方法であり、アルキンとアジド官能基間の[3+2]型の付加環化を述べるために用いられる。アジドとアルキンは、生体分子および水性環境に対して非常に不活性であり、フイスゲン1,3-双極性付加環化を用いて、酸化または還元することが非常に困難である安定なトリアゾールを得ることを可能にする。銅(I)触媒および銅を含まないひずみアルキン変異体反応は両者とも、穏やかで、非常に効率的である。これらの反応は、少量の水溶液中で行うこともでき、酸素および水に対して非感受性であり、ペプチド上の官能基に対して強固である。クリックケミストリーは、たとえば、オリゴヌクレオチドおよびタンパク質などの生体サンプル中の抱合反応における選択性を可能にする。クリックケミストリーに特に適した試薬は、Laysan Bio Inc.(アラバマ州、アラブ)から市販されている。

30

【0031】

一般に、ヒドロゲル前駆体溶液は、約36 mg/mL ~ 約70 mg/mLのポリマーの濃度を含有する。

【0032】

ヒドロゲル前駆体溶液中にて用いるための適当な多官能性ポリマー架橋剤は、当業者には公知である。特に、多官能性架橋剤は、たとえば、二官能性ポリマー架橋剤および多官能性ポリマー架橋剤($n \geq 2$)であり、末端は、ヒドロゲル前駆体溶液のポリマーとの共有結合を形成しうる官能基でありうる。特に、適当な二官能性ポリマー架橋剤および多官能性ポリマー架橋剤は、たとえば、ポリエチレングリコールジチオール(PEG-DT)、プロテアーゼ分解性架橋剤およびチオール末端マルチアームポリ(エチレングリコール)(たとえば、チオール末端4-アームPEG)でありうる。適当なプロテアーゼ分解性架橋剤は、たとえば、Nagase and Fields (Biopolymers 1996、40:399-416; 参照することによって本明細書に援用される)に記載のマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)分解性架橋剤でありうる。さらに詳しくは、ヒドロゲル前駆体溶液中にて用いるための適当なMMP分解性架橋ペプチドとして、KCGGPQGIWGQGCK(配列番号: 27)およびKCGGPQGIAGQGCK(配列番号: 28)が挙げられる。

40

50

【0033】

ヒドロゲル前駆体溶液は、さらに、開始剤を含むことができる。当業者には公知であるように、ヒドロゲル重合は、開始剤の不在下でも起こりうる。しかしながら、開始剤は、重合を誘発し、および/または、重合速度を低下させる。適当な開始剤は、当業者に公知であり、たとえば、化学開始剤および光開始剤でありうる。特に適当な光開始剤は、たとえば、IRGACURE 2959 光開始剤(Ciba/BASF、ドイツ、ルートウィヒスハーフェンから市販されている)であり得、ヒドロゲルを形成するためのエオシンY重合は、温度変化によっても行われうる。

【0034】

もう1つの態様において、ヒドロゲル前駆体溶液は、細胞接着ペプチドを含みうる。本明細書で用いる「細胞接着ペプチド」は、細胞が受容体-リガンド相互作用を介して結合する接着タンパク質から得られるアミノ酸配列を意味する。溶液中の細胞接着ペプチドおよびその濃度を変化させることは、得られるヒドロゲル組成物への細胞接着の安定性を制御する能力を可能にする。適当な細胞接着ペプチドとして、たとえば、RGD、RGDS(配列番号：1)、CRGDS(配列番号：2)、CRGDSP(配列番号：3)、PHSRN(配列番号：4)、GWGGRGDSP(配列番号：5)、SIDQVEPYSSSTAQ(配列番号：6)、GRNIAEIIKDI(配列番号：7)、DITYVRLKF(配列番号：8)、DITVTLNRL(配列番号：9)、GRYVVLPR(配列番号：10)、GNRWHSIYITRFG(配列番号：11)、GASIKVAVSADR(配列番号：12)、GTTVKYIFR(配列番号：13)、GSIKIRGTYS(配列番号：14)、GSINNR(配列番号：15)、SDPGYIGSR(配列番号：16)、YIGSR(配列番号：17)、GTPGPQGIAGQGVV(配列番号：18)、GTPGPQGIAGQRVV(配列番号：19)、MNYYSNS(配列番号：20)、KKQFRHRNRKG(配列番号：21)、CRGDGGGGGGGGGGGGPHSRN(配列番号：29)、CPHSRNSGSGSGSGSRGD(配列番号：30)、アセチル化GCVGRGDSPG(配列番号：31)、CRDGS(配列番号：32)、環状RGD[Fd]C(配列番号：33)、RKRLQVQLSIRT(配列番号：37)、IKVAV(配列番号：38)、YIGSR(配列番号：39)、KRTGQYKL(配列番号：40)、TYRSRKY(配列番号：41)、KRTGQYKLGSKTGPKQ(配列番号：42)、QAKHKQRKRLKSSC(配列番号：43)、SPKHHSQRARKKKNKNC(配列番号：44)、XBBXB(ここで、B = 塩基性残基であり、X = 疎水性親水性残基である)(配列番号：45)、XBBXXB(ここで、B = 塩基性残基であり、X = 疎水性親水性残基である)(配列番号：46)、およびRGDSP(配列番号：47)が挙げられる。

【0035】

ヒドロゲル前駆体溶液中の細胞接着ペプチドの濃度は、用いられる特定の細胞接着ペプチドならびにヒドロゲル前駆体溶液中のその他の成分に応じて変わる。しかしながら、典型的には、ヒドロゲル前駆体溶液は、約0.25 mM ~ 約2 mMの細胞接着ペプチドなどの約0.125 mM ~ 約4 mMの細胞接着ペプチドを含む。1つの適当な実施態様において、細胞接着ペプチドは、CRGDS(配列番号：2)であり、ヒドロゲル前駆体溶液は、約0.25 mM ~ 約4 mMのCRGDS(配列番号：2)を含む。もう1つの適当な実施態様において、細胞接着ペプチドは、環状RGDであり、ヒドロゲル前駆体溶液は、約0.125 mM ~ 約2 mMの環状RGD、特に、環状RGD[Fd]C(配列番号：33)を含む。

【0036】

もう1つの態様において、ヒドロゲル前駆体溶液は、可溶性因子結合剤を含みうる。1つの態様においては、細胞培養培地に含まれる可溶性因子を結合するためのペプチドが、ヒドロゲル前駆体溶液に含まれる。ヒドロゲル組成物中の可溶性因子結合剤の密度(濃度)は、ヒドロゲル前駆体溶液中の可溶性因子結合剤の濃度を変えることによって制御されうる。特に適当な可溶性因子結合剤の例を下記第1表において提供する。

【0037】

第1表：ヒドロゲル組成物のための可溶性因子結合剤ペプチド配列

10

20

30

40

【表1】

名前/源	配列	配列番号：
血管内皮増殖因子結合ペプチド	GGGKLTWQELYQLKYKGI	22
血管内皮増殖因子結合ペプチド(VR-BP)	KLTWQELYQLKYKGI	23
骨形成タンパク質-2(BMP-2)受容体結合ペプチド	KIPKASSVPTTEL	24
骨形成タンパク質受容体結合ペプチド	KIPKASSVPTELSAISTLYL	25
ヘパリンプロテオグリカン結合ペプチド(HPG-BP)	KRTGQYKL	26
MMP分解性ペプチド架橋剤	KCGGPQGIWGQGCK	27
MMP分解性ペプチド架橋剤2	KCGGPQGIAGQGCK	28
VEGF結合ペプチド	CE[Fd][Ad][Yd][Ld]IDFNWEYPASK	35
スクランブルVEGF結合ペプチド	CD[Ad]PYN[Fd]EFAWE[Yd]VIS[Ld]K	36

10

20

30

40

50

【0038】

ヒドロゲル前駆体溶液中の可溶性因子結合剤の濃度は、用いられる特定の可溶性因子結合剤ならびにヒドロゲル前駆体溶液中のその他の成分に応じて変わる。しかしながら、典型的には、ヒドロゲル前駆体溶液は、約0.03 mM～約0.3 mMの可溶性因子結合剤などの約0 mM～約0.3 mMの可溶性因子結合剤を含む。

【0039】

もう一つの態様において、ヒドロゲルアレイは、可変弾性率を有するヒドロゲルスロットを含むように製造されうる。ヒドロゲルアレイは、広範な弾性率(本明細書において、基質弾性率として表される)を有することができる。異なる弾性率を有するヒドロゲルスロットを有するヒドロゲルアレイは、ヒドロゲル前駆体溶液中のポリマーの濃度を変化させること、および/または、多官能性ポリマー(たとえば、チオール-ポリエチレングリコール-チオール(SH-PEG-SH))：ポリマー比の理論混合比を変化させることによって製造されうる(たとえば、図8参照)。適当な比は、約1:1～約4:1(モル比)でありうる。たとえば、PEG-NBポリマーおよびジチオール架橋剤を用いるヒドロゲルのヒドロゲル弾性率は、たとえば、PEG-NB重量%を一定に固定することによりPEG-NB：ジチオール架橋剤の比を変更し、次いで、たとえば、約25%～100%架橋などのPEG-NBアームの一部のみを架橋する比で架橋剤を加えることによって制御されうる。

【0040】

もう一つの態様において、ヒドロゲル前駆体溶液は、さらに、細胞を包含する。適当な細胞は、当業者に公知であり、たとえば、胚性幹細胞、胚性幹細胞由来の神経細胞、胚性幹細胞由来の神経前駆細胞、胚性幹細胞由来の星状膠細胞、胚性幹細胞由来の小膠細胞、胚性幹細胞由来の内皮細胞、胚性幹細胞由来の網膜色素上皮細胞、誘導多能性幹細胞、誘導多能性幹細胞由来の神経前駆細胞、誘導多能性幹細胞由来の星状膠細胞、誘導多能性幹細胞由来の小膠細胞、誘導多能性幹細胞由来の内皮細胞、誘導多能性幹細胞由来の網膜色素上皮細胞、間葉系幹細胞、臍帯静脈内皮細胞、NIH3T3線維芽細胞、皮膚線維芽細胞、線

維肉腫細胞、弁間質細胞、心筋細胞、誘導多能性幹細胞由来の心筋細胞、内皮前駆細胞、循環脈管形成細胞、神経細胞、周皮細胞、癌細胞、肝細胞、膵臓細胞、膵島細胞、およびその組合せなどが挙げられる。

【0041】

もう1つの態様において、ヒドロゲル前駆体溶液は、マイクロスフェア担体(すなわち、マイクロ担体)を含みうる。マイクロスフェア担体は、たとえば、細胞、生体分子、染料および当業者に公知のその他の分子などの分子を含みうる。マイクロスフェアは、溶解または分解してマイクロスフェアの内容物を放出する分解性マイクロスフェアでありうる。

【0042】

調製後、基質(たとえば、パターンニングされた表面修飾基質、細胞培養プレートの表面など)に、ヒドロゲル前駆体溶液を接触させる。

10

【0043】

パターンニングされた表面修飾基質上で用いられる場合、表面修飾基質は、たとえば、雲母、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび金属酸化物表面でありうる。表面修飾基質は、たとえば、シラン単層を有するガラスカバースリップなどの表面を官能化することによって製造されうる。特に適当な表面修飾基質は、たとえば、ガラススライドでありうる。基質を官能化するための特に適当な方法は、たとえば、シラン処理でありうる。基質は、酸素プラズマ処理中に表面の両側を活性化することによって表面修飾されうる。酸素プラズマ処理は、基質の表面上の活性化ヒドロキシル基の数を増加させうる。当業者には公知のように、シラン単層は、たとえば、トルエンなどの無水有機溶媒に溶解されるアルコキシシランで製造されうる。他の適当なアルコキシシランは、たとえば、アミノシラン、グリシドキシシランおよびメルカプトシランでありうる。特に適当なアミノシランは、たとえば、(3-アミノプロピル)-トリエトキシシラン、(3-アミノプロピル)-ジエトキシ-メチルシラン、(3-アミノプロピル)ジメチルエトキシシランおよび(3-アミノプロピル)-トリメトキシシランでありうる。特に適当なグリシドキシシランは、たとえば、(3-グリシドキシプロピル)ジメチル-エトキシシランでありうる。特に適当なメルカプトシランは、たとえば、(3-メルカプトプロピル)-トリメトキシシランおよび(3-メルカプトプロピル)-メチル-ジメトキシシランでありうる。他の適当なシランは、市販されている(Sigma Aldrich、ミズーリ州、セントルイス)。表面修飾シラン基質の製造は、本明細書に記載のとおり、クリックケミストリーに参加しうる末端官能基を有する任意のシランを用いて行なわれうる。たとえば、メルカプトシランは、PEG-ノルボルネンのノルボルネンと反応しうる末端チオールを含む。他の適当な官能性表面修飾シラン基質は、たとえば、アクリレートおよびメタクリレートでありうる。基質の表面修飾に続いて、表面修飾基質上に、非接着自己組織化単分子膜が形成される。

20

30

【0044】

ヒドロゲル前駆体溶液に基質を接触させた後、方法は、重合ヒドロゲルが基質に接着する(すなわち、結合する)ようにヒドロゲル前駆体溶液を重合することを含む。

【0045】

ヒドロゲル前駆体溶液に基質を接触させた後、方法は、重合ヒドロゲルが基質に接着する(すなわち、結合する)ようにヒドロゲル前駆体溶液を重合することを含む。

40

【0046】

1つの実施態様において、方法は、実質的にヒドロゲルを含まないか、または完全に含まない(「ヒドロゲルを含まない」)バックグラウンドによって囲まれるヒドロゲルの「スポット」または「島」(本明細書において、「ヒドロゲルスポット」と称する)を有するアレイを形成するために用いられうる。この実施態様において、ヒドロゲルを含まないバックグラウンドは、パターンニングされた基質の疎水性領域に対応し、ヒドロゲルスポットは、パターンニングされた基質の親水性領域に対応する。図1に関して、本実施態様では、円形は、ヒドロゲルを含まない領域によって囲まれるヒドロゲルスポットを表す。

【0047】

もう1つの実施態様において、方法は、ヒドロゲルのバックグラウンド(本明細書におい

50

て、「ヒドロゲルバックグラウンド」と称する)によって囲まれたヒドロゲルを含まないプールを有するアレイを形成するために用いられうる。図1に関して、本実施態様では、円形は、ヒドロゲルを含まないバックグラウンドによって囲まれるヒドロゲルを含まないプールを表す。

【0048】

もう1つの態様において、本開示は、可変弾性率、可変せん断弾性率、可変リガンドアイデンティティ、可変リガンド密度およびその組合せを有するヒドロゲルスロットを含むパターンニングされたヒドロゲルアレイに関する。可変弾性率、可変せん断弾性率、可変リガンドアイデンティティ、可変リガンド密度およびその組合せを有するヒドロゲルスロットを含むパターンニングされたヒドロゲルアレイは、上述の本発明方法にしたがって製造されうる。

10

【0049】

適当なりガンドは、当業者に公知であり、たとえば、任意のシステインを含む、および/または、チオールで官能化された生体分子でありうる。リガンドのチオール官能化は、市販のキット(たとえば、トラウト試薬(2-イミノチオラン・HCl)、Thermo Fischer Scientific、イリノイ州、ロックフォード)を用いて行われうる。適当なりガンドは、たとえば、タンパク質、ペプチド、核酸、多糖類、脂質、生体機能模倣材料およびその他の分子、ならびにその組合せでありうる。特に適当なタンパク質は、たとえば、接着タンパク質でありうる。特に適当な接着タンパク質は、たとえば、フィブロネクチン、カドヘリンおよびその組合せでありうる。特に適当なペプチドは、たとえば、上述の細胞接着ペプチドおよび/または可溶性因子結合剤でありうる。

20

【0050】

本開示のヒドロゲル組成物が、細胞と結合または相互作用して、細胞接着、拡散、移動、増殖、分化および細胞構造(たとえば、細管など)の形成に影響を及ぼすと思われる細胞接着ペプチドおよび可溶性因子結合剤の組合せを含むのが適当である。この態様は、たとえば、細胞接着、拡散、移動、増殖、分化および細胞構造の形成などの細胞における効果について可溶性因子結合剤を特にスクリーニングするためにヒドロゲル組成物を用いることを可能にする。さらに、未知の機能をもつ可溶性因子結合剤は、細胞接着、拡散、移動、増殖、分化および細胞構造の形成における変化についてスクリーニングするために細胞接着ペプチドと組み合わせて固定されうる。

30

【0051】

ヒドロゲル組成物は、さらに、可変弾性率を含んでもよい。ヒドロゲル組成物は、広範な剛性(本明細書において基質弾性率と称する)を有しうる。たとえば、異なる弾性率を有するヒドロゲルは、ヒドロゲル前駆体溶液中のポリマーの濃度を変化させること、および/または、多官能性ポリマー(たとえば、チオール-ポリエチレングリコール-チオール(SH-PEG-SH))：ポリマー比の理論混合比を変化させることによって製造されうる(たとえば、図8参照)。適当な比は、約1:1~約4:1(モル比)でありうる。

【0052】

もう1つの態様において、パターンニングされたヒドロゲルアレイは、さらに、それによってパターンニングされたヒドロゲルアレイが、任意のサイズのアドオンを適合させるための寸法で製造される、マイクロアレイアドオンとともに組み立てられうる。適当なマイクロアレイアドオンは、市販されている(Grace Bio Labs、オレゴン州、ベンド)。マイクロアレイアドオンは、可溶性因子のプレゼンテーションが制御されうるように、ヒドロゲルアレイの個々のヒドロゲルスロットおよびヒドロゲルを含まないプールを単離することを可能にする。マイクロアレイアドオンは、各ヒドロゲルスロットおよびヒドロゲルを含まないプールが、可溶性因子プレゼンテーションで独立して調べられうるように、ヒドロゲルアレイの個々のヒドロゲルスロットおよびヒドロゲルを含まないプールとの数と同じ数の開口を含みうる。あるいは、マイクロアレイアドオンは、1つ以上の個々のヒドロゲルスロットおよび1つ以上の個々のヒドロゲルを含まないプールを適合させうる、より大きい開口を有しうる。たとえば、は、単一のヒドロゲルスロットまたは単一のヒドロゲルを

40

50

含まないプールを適合させるのに十分に大きい開口を有しうる。

【0053】

ヒドロゲル組成物の使用方法

さらにもう1つの態様において、本開示は、分子-分子相互作用をスクリーニングする方法に関する。方法は、ヒドロゲル組成物を製造すること(ここで、ヒドロゲル組成物は、少なくとも1つの可溶性因子結合剤を含む)；少なくとも1つの可溶性因子結合剤と相互作用することが知られているか、または相互作用すると思われる分子に、ヒドロゲル組成物を接触させること；およびヒドロゲル組成物を分析すること；を含む。

【0054】

ヒドロゲル組成物は、本明細書に記載のように製造されうる。

10

【0055】

ヒドロゲル組成物は、当業者に公知の方法を用いて分析されうる。たとえば、ヒドロゲル組成物は、蛍光、顕微鏡法などを用いて分析されうる。

【0056】

1つの態様において、本開示は、可変密度(弾性率)、可変リガンド固有性(identities)、可変リガンド密度およびその組合せを有するヒドロゲルスロットを含むように本明細書にしたがって製造されたヒドロゲルアレイを用いて、細胞-表面相互作用をスクリーニングする方法に関する。本開示のヒドロゲルアレイを用いてスクリーニングされるべきリガンドは、細胞と結合または相互作用することが知られているか、または思われるリガンドでありうる。方法は、さらに、個々のヒドロゲルスロットが可溶性因子で調べられうるように、本明細書に記載のパターニングされたヒドロゲルアレイをマイクロアレイアドオンとともに組み立てることを含む。

20

【0057】

方法は、さらに、パターニングされたヒドロゲルアレイに、細胞を接触させることを含む。本明細書で用いる「細胞を接触させる」は、細胞およびヒドロゲルアレイを分析するために、パターニングされたヒドロゲルアレイ上に細胞を播種することを意味する。当業者には公知のように、細胞懸濁液を基質に移し、細胞が基質に接着するのに十分な時間を付与するのが一般的である。

【0058】

もう1つの実施態様において、細胞は、ポリマー、架橋剤、細胞接着ペプチドおよび細胞を含むヒドロゲル前駆体溶液を用いて、パターニングされたヒドロゲルアレイのヒドロゲルに組み込まれうる。

30

【0059】

次いで、細胞は、たとえば、約1時間~約30日間などの所望の期間培養される。所望の期間の後、細胞は、たとえば、免疫蛍光顕微鏡法、位相差顕微鏡法、光学顕微鏡法、電子顕微鏡法およびその組合せなどの顕微鏡法によって分析されうる。細胞は、細胞接着、細胞拡散、細胞形態、細胞増殖、細胞移動、細胞分化、タンパク質発現およびその組合せについて分析されうる。

【0060】

適当な細胞は、当業者に公知の任意の細胞でありうる。特に適当な細胞は、たとえば、胚性幹細胞、胚性幹細胞由来の神経細胞、胚性幹細胞由来の神経前駆細胞、胚性幹細胞由来の星状膠細胞、胚性幹細胞由来の小膠細胞、胚性幹細胞由来の内皮細胞、胚性幹細胞由来の網膜色素上皮細胞、誘導多能性幹細胞、誘導多能性幹細胞由来の神経前駆細胞、誘導多能性幹細胞由来の星状膠細胞、誘導多能性幹細胞由来の小膠細胞、誘導多能性幹細胞由来の内皮細胞、誘導多能性幹細胞由来の網膜色素上皮細胞、間葉系幹細胞、臍帯静脈内皮細胞、NIH 3T3線維芽細胞、皮膚線維芽細胞、線維肉腫細胞、弁間質細胞、心筋細胞、誘導多能性幹細胞由来の心筋細胞、内皮前駆細胞、循環脈管形成細胞、神経細胞、周皮細胞、癌細胞、肝細胞、膵臓細胞、膵島細胞およびその組合せでありうる。

40

【0061】

方法は、さらに、パターニングされたヒドロゲルアレイのヒドロゲルスロット上の細胞

50

が培養される培養培地に可溶性分子を含めることによって、可溶性分子に細胞を接触させることを含んでもよい。特に適当な可溶性分子は、増殖因子およびプロテオグリカンでありうる。適当な増殖因子は、たとえば、形質転換増殖因子 スーパーファミリーからのタンパク質、増殖因子の線維芽細胞増殖因子ファミリー、増殖因子の血小板由来増殖因子ファミリーおよびその組合せでありうる。特に適当な増殖因子は、たとえば、血管内皮増殖因子、骨形態形成タンパク質、線維芽細胞増殖因子、インスリン様増殖因子およびその組合せでありうる。適当なプロテオグリカンは、たとえば、ヘパリン、ヘパリン硫酸、および/またはコンドロイチングリコサミノグリカン側鎖を有するプロテオグリカンでありうる。

【0062】

1つの特に適当な実施態様において、本開示は、ヒドロゲル組成物を用いる細管形成促進剤および/または抗細管形成剤に関する。本明細書で用いる「細管形成」は、接着、拡散、出芽、移動、細胞結合形成、細管ネットワーク形成および維持(たとえば、内皮細胞細管ネットワーク形成)、脈管形成および/または血管新生する細胞の能力、およびその組合せを意味する。一般に、方法は、以下を含む:本開示のヒドロゲル組成物を製造すること;細管形成を促進または減少させるとされる作用剤を提供すること;ヒドロゲル組成物および作用剤に細胞を接触させること;および細胞を分析すること。ヒドロゲル組成物は、一般に、本明細書に記載のノルボルネンで官能化されたポリエチレングリコール、架橋ペプチド、細胞接着ペプチドおよび可溶性因子結合剤を含む。本明細書で用いる「細管形成を減少させる」は、細管形成を最小化、低減化または排除することをも意味する。

【0063】

もう1つの適当な実施態様において、本開示は、細管形成を促進する方法に関する。一般に、方法は、以下を含む:本開示のヒドロゲル組成物および可溶性因子を含むヒドロゲル組成物を製造すること;ヒドロゲル組成物に接触した培養培地を提供すること;ヒドロゲル組成物に培養培地中の細胞を接触させること;および細胞を分析すること。細胞を培養するのに用いるための培養培地は、当業者に公知の任意の適当な培養培地を含む。たとえば、培養培地は、特定の細胞型のための標準増殖培地を含んでもよい(たとえば、HUVEC用のMedium 199およびEGM-2 BULLETKIT(商標)(Lonza、スイス、バーゼル)、iPSC-ECsおよびhESC-EC用のVASCULIFE(登録商標)およびVEGF LifeFactors (Lifeline Cell Technology、メリーランド州、フレデリック))。1つの特定の実施態様において、方法は、内皮細胞細管ネットワーク形成を促進することを含む。

【0064】

本開示の方法およびヒドロゲル組成物は、ヒドロゲルスロット上のリガンドの密度に対する非常に優れた制御、ならびにヒドロゲルスロット上のリガンドのアイデンティティに対する非常に優れた制御を可能にする。ヒドロゲルの剛性も制御することができる。この制御は、細胞培養のための基質の特定のパラメーターのスクリーニングを可能にし、基質および培養環境に対する細胞応答の結果を変更し、影響を及ぼしうる。本開示のパターニングされたヒドロゲルアレイは、リガンドの組合せをスクリーニングすることも可能にする。このように、本開示のパターニングされたヒドロゲルアレイは、基質および培養環境に対する細胞応答の結果を変更し、影響を及ぼしうる基質の特定のパラメーターを同定するための単一表面上のハイスループットな多変数生物学的スクリーニングを行なうツールを提供する。

【0065】

本開示は、以下の非限定的実施例を考慮することにより、より完全に理解されるであろう。

【0066】

実施例

材料および方法

PEG-ノルボルネン合成

末端ヒドロキシル基(-OH)を有し、分子量20 kDaである8-アームポリ(エチレングリコー

10

20

30

40

50

ル) (PEG) を JenKem Technology USA (テキサス州、アレン) から購入した。無水ピリジン、4-(ジメチルアミノ)ピリジン (DMAP)、5-ノルボルネン-2-カルボン酸、ジエチルエーテル、および 0.03 % v/v テトラメチルシラン (TMS) を含む重水素化クロロホルム (CDCl_3 、99.8%) を Sigma Aldrich (ミズーリ州、セントルイス) から購入した。N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、無水ジクロロメタン (DCM) を ACROS Organics (ベルギー、ヘール) から購入した。3.5K 分子量カットオフのスネークスキン (SNAKESKIN) 透析チューブを Thermo Fisher Scientific (マサチューセッツ州、ウォルサム) から購入した。

【 0 0 6 7 】

8-アーム PEG-OH をで ノルボルネン 官能化して、生物活性リガンドの光重合および固定のためにチオール-エン化学を利用した (Fairbanks et al. *Adv. Mater.* 2009、21:5005-5010 ; Impellitteri et al. *Biomaterials* 2012、33:3475-84 ; Belair and Murphy *Acta Biomater.* 2013 ; および Gould et al. *Acta Biomater* 2012、8:3201-3209 に記載)。官能化反応の PEG-ノルボルネン (PEG-NB) 生成物を、中型のフリット付きブフナー漏斗を通してろ過し、反応中に形成された塩を除去した。ろ液を 900 mL 冷ジエチルエーテルおよび 100 mL ヘキサンで沈殿させた。固体を定性ろ紙で集め、一夜風乾した。残留ノルボルネン酸を除去するために、水で戻したスネークスキン透析チューブを用い、4 にて 72 時間、4L の dH_2O に対して透析することによって PEG-NB 生成物を精製し、次いで、凍結乾燥した。

【 0 0 6 8 】

^1H 核磁気共鳴分光法で、>90% のノルボルネン官能化が確認された。TMS 内部標準を含む CDCl_3 中、6 mg/mL にてサンプルを調製した。マディソン国立磁気共鳴施設によって提供される分光分析サービスを用いて、Bruker Instruments Avance III 500i で、400 MHz および 27 にて、自由誘導減衰 (FID) スペクトルを得た。

【 0 0 6 9 】

ヒドロゲルアレイ形成

これらの実験に用いたヒドロゲルアレイは、シラン化ガラス基質に固定されたヒドロゲルスロットから構成された。ヒドロゲルスロットは、金の、異なる湿潤性をもつことにより、エラストマーステンシルによってパターンが定義される領域を有するようにパターンニングされた表面を用いて形成された。ヒドロゲルアレイの製造方法を、以下にさらに記載する。

【 0 0 7 0 】

ガラスシラン化

ガラスカバースリップおよび塩酸 (HCl) 溶液を Thermo Fisher Scientific (マサチューセッツ州、ウォルサム) から購入した。トルエン、メタノール、エタノール、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン (3-MPTS) およびジチオスレイトール (DTT) を Sigma Aldrich (ミズーリ州、セントルイス) から購入した。低圧プラズマシステムを Diener Electronic (ドイツ、エプハウゼン) から購入した。

【 0 0 7 1 】

3-MPTS でガラスカバースリップをシラン化して、PEG-NB とのチオール-エン反応に酸化することができ、次いで、PEG-NB ヒドロゲルの共有固定化を可能にするチオール基を提供する基質を作成した (Seo et al. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012、98:1-6)。既述されたように、液相シラン化を行なった (Seo et al. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012、98:1-6 ; Halliwell et al. *Anal Chem* 2001、73:2476-2483 ; and Cras et al. *Biosens Bioelectron* 1999、14:683-688)。1:1 のメタノール : HCl 中で 45 分間、カバースリップを超音波処理して、大量汚染物質を除去した。シラン化の直前に、それぞれの側に 5 分間、40 sccm および 50 W にて酸素プラズマ処理することによって、カバースリップを反応させて、表面上の活性化ヒドロキシル基の数を増加させた。2.5% v/v 3-MPTS を含むコプリンジャー内に活性化されたカバースリップを 4 時間置いた。トルエン、1:1 のエタノール/トルエン、およびエタノールで濯ぐことによって、カバースリップの表面から過剰のシランを除去し、 N_2 ガスで乾燥した。シラン化カバースリップを気密室に置き、 N_2 ガスでパージし、次いで、100 にて 1 時間養生して、表面に結合したシランを架橋させ、それらの加

水分解に対する感受性を低下させた。使用まで、 N_2 ガスでパージされ、光から保護されたチャンパー内でシラン化ガラススリップを保管した。使用前に、37 °Cにて30分間、PBS中の10 mM DTTでシラン化ガラススリップを処理して、表面上に形成されたジスルフィドを減少させ、表面で利用可能な遊離チオールを増加させた(Vistas et al. Appl Surf Sci 2013、286:314-318)。

【0072】

エラストマーステンシルの製作

シリコンウェハーをWRS Materials(カリフォルニア州、サンノゼ)から購入した。SU-8 100フォトレジストをMicroChem(マサチューセッツ州、ニュートン)から購入した。Sylgard 184シリコンエラストマーキットをDow Corning Corporation(ミシガン州、ミッドランド)から購入した。

10

【0073】

既述されたように、ソフトリソグラフィーを用いて、ポリジメチルシロキサン(PDMS)エラストマーステンシルを製造した(Jo et al. J Microelectromechanical Syst 2000、9:76-81)。アドビイラストレーターを用いてステンシルのためのレイアウトおよび形状を描き、ImageSetter(ウィスコンシン州、マディソン)によって提供される高解像度の市販のレーザープリントサービスを用いて透明フィルム上に印刷した。従来のソフトリソグラフィー技術と組み合わせた光マスクとして透明フィルムを用いて、シリコンウェハー上にスピンコートしたSU-8ネガ型UVフォトレジストをもつマスターモールドを製造した。PDMSステンシルを製造するために、Sylgardエラストマーキットからの硬化剤およびPDMSプレポリマー溶液を、1:10 重量比で完全に混合し、マスターモールド上に広げ、80 °Cにて6時間硬化させた。硬化後、マスターモールドからステンシルをはがし、エタノールで簡単に洗浄し、 N_2 ガスで乾燥した。

20

【0074】

疎水性 / 親水性 パターニング

金コートテストスライド(25 mm x 75 mm x 1 mmのガラス上の50 nmのチタン金属薄膜上に1,000 nmの金)をEvaporated Metal Films(ニューヨーク州、イサカ)から購入した。過フッ素化アルカンチオール($HS-(CH_2)_{11}-O-(CH_2)_2-(CF_2)_5-CF_3$)をProChimia Surfaces(ポーランド、ソポト)から購入した。既述されたように、ヒドロキシル末端アルカンチオール($HS-C_{11}-(O-CH_2-CH_2)_3-OH$)を合成した(Prime and Whitesides J. Am. Chem. Soc. 1993、115:10714-10721)。

30

【0075】

金コートスライドを、アルカンチオレートの疎水性および親水性自己組織化単分子膜(SAM)でパターニングして、差動湿潤を有する領域を形成した。差動湿潤パターニングは、2つの目的を同時に果たした：1)ヒドロゲルスポットの形状を定義した；および2)アレイ内の各ヒドロゲルスポットの含量を限定した。金コートスライドをエタノールに浸漬し、~2分間超音波処理し、エタノールで濯ぎ、 N_2 ガスで乾燥して、汚染物質および酸化金属層を除去した。金コートスライドを、過フッ素化アルカンチオレートの1 mMエタノール溶液に2時間浸漬して、フッ素化アルカンチオレートSAM(フッ素SAM)を形成させた。フッ素SAM形成後、フッ素SAM金コートスライドをエタノールで洗浄し、 N_2 ガスで乾燥した。基質上の親水性領域を定義するために、PDMSステンシルをフッ素SAM金コートスライド上に置いて、プラズマエッチングからスライドの領域を選択的に保護した。PDMSステンシルのパターンによって、フッ素SAM金コートスライド上の露出領域の空間的および形状的パターニングが決定され、次いで、アレイが含むヒドロゲルスポットの形状および空間的パターニングが決定された。1分間、40 sccmおよび50 Wでの酸素プラズマ処理によって、フッ素SAM金コートスライドの露出領域をエッチングした。エッチングされた金コートスライドを、エタノールで洗浄し、 N_2 ガスで乾燥し、金コートスライドの選択的にエッチングされた領域に、親水性アルカンチオレートSAM(EG_3 SAM)が形成されるように、ヒドロキシル末端アルカンチオールの0.1 mMエタノール溶液に2時間浸漬した。エタノールで得られる金コートスライドを洗浄し、ヒドロゲル形成前に N_2 ガスで乾燥した。

40

50

【0076】

接触角測定によって、金コートスライド上の疎水性および親水性SAM形成を確認した(図2B参照)。接触角ゴニオメーター(DataPhysics Contact Angle System OCA、カリフォルニア州、サンノゼ)を用い、室温にて静的接触角を測定した。表面上に蒸留水の液滴(3 μ L)を置き、3つの異なるサンプル上の異なる5つの部位において、各サンプルについて静的接触角を測定した。

【0077】

ヒドロゲルスポット重合および固定化

上述のように、PEG-NBを官能化した。二官能性PEGジチオール(PEG-DT)架橋剤(3.4 kDa)をLaysan Bio(アラバマ州、アラバ)から購入した。IRGACURE 2959光開始剤をCiba/BASF(ドイツ、ルートヴィヒスハーフェン)から購入した。システイン末端ペプチドをGenScript USA(ニュージャージー州、ピスカタウェイ、NJ)から購入した。オムニキュアシリーズ1000 UVスポット硬化ランプ(波長365 nm)、ライトガイドおよびコリメートアダプタをLumen Dynamics Group(カナダ、オンタリオ)から購入した。上記と同じ手順を用い、所望のヒドロゲルスポット高さに対応する厚さ寸法をもつPDMSスペーサーを製造した。

【0078】

PEG-NB、PEG-DT、ペプチドおよび光開始剤を組み合わせることによってヒドロゲル前駆体溶液を製造し、ヒドロゲルスポット形成の直前に、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で所望の濃度に希釈した。各ヒドロゲルアレイを形成するために、バターニングされた金コートスライドをエタノールで濯ぎ、 N_2 ガスで乾燥し、PDMSスペーサーをスライドの疎水性領域に置き、ヒドロゲル前駆体溶液を親水性領域に配置した。DTT処理シラン化ガラスカバースリップを用いて、カバースリップとスライドの間にヒドロゲル前駆体溶液を挟んだ。ガラスカバースリップを貫通する光を用いる90 mW/cm^2 にて2秒間のUV開始光架橋によってヒドロゲル前駆体溶液を重合させた。得られる重合ヒドロゲルスポットをカバースリップ上に共有的に結合させ、固定した。シラン化手順が、ヒドロゲル前駆体溶液重合に用いるチオール-エン反応に参加する能力があるチオール末端シランで官能化されるガラスカバースリップを製造し、ヒドロゲルネットワークを表面結合シランに効率的に架橋することを想起されたい。カバースリップから金コートスライドを分離し、ガラス固定化ヒドロゲルスポットが、金コートスライドから容易に切り離されるのを可能にした。「ヒドロゲルアレイ」と総称される、得られるガラス固定化ヒドロゲルスポットを、70%エタノール中で1時間滅菌し、PBSで洗浄して、残留未反応成分を除去した。

【0079】

それに組み込まれたペプチドのアイデンティティおよび濃度によって、アレイ中の各ヒドロゲルスポットの生物活性を決定した。この検討に用いたペプチドは、CRGDS(配列番号:2)、CRGD-(G)₁₃-PHSRN(配列番号:29)、CRGD-(SG)₅-PHSRN(配列番号:30)、アセチル化CRGDSP(配列番号:31)、環状(RGD[Fd]C)(配列番号:33)、および非生物活性スクランブルペプチド CRDGS(配列番号:32)であった。各ヒドロゲルスポットの生物活性を調節するために、ヒドロゲル前駆体溶液に異なるペプチドを加え、UV開始架橋を行った後、得られる重合ヒドロゲルネットワークは、それぞれ、異なる固定化ペプチドを現した。すべてのアレイに対して、ヒドロゲルネットワークに合計4 mMのペプチドを組み込んだ。ペプチドアイデンティティおよび濃度の制御を介してヒドロゲルスポットの生物活性を同時に変化させるために、選択された生物活性ペプチドの所望の濃度を決定し、CRDGS(配列番号:32)ペプチドを補足して、ヒドロゲル前駆体溶液中の総ペプチド濃度4 mMを維持した。

【0080】

架橋ヒドロゲルネットワーク中のPEGの総濃度によって、ヒドロゲルアレイ中の各ヒドロゲルスポットの弾性率を決定した。ヒドロゲル前駆体溶液中のPEG-NBの濃度の増加により、ネットワーク重合に、より多量のPEG架橋がもたらされ、圧縮弾性率が増加した(図8参照)。

【実施例1】

【0081】

本実施例では、ガラス基質上に固定されたヒドロゲルアレイを調製した。

パターニングされたアルカンチオレート自己組織化単分子膜(SAM)で、金基質を修飾して、周囲の疎水性領域によって分離される単離された親水性領域を提供した(図1A-1Bに示す)。図2A(図1Aにも)に示すように、金コートスライド上の疎水性および親水性SAM形成を、接触角測定によって確認した。図2Bは、疎水性パターニング前のステップにおける金基質 100 ; フッ素SAMを有する基質 110 ; エッチング後の基質 120 ; および親水性パターニング後の基質 130 ; のパターニング中の端面図を提供する。

【0082】

重合反応に必要なすべての成分を含むヒドロゲル前駆体溶液を、パターニングされた基質の親水性SAM領域上に沈着させた(図1B参照)。親水性領域は、各領域上に沈着した溶液の含量を限定するように、および得られる重合ヒドロゲルの形状を定義するように機能した。パターニングされたスライドの疎水性領域上に、エラストマースペースャー(所望のヒドロゲルアレイ高さに相当する厚さ寸法をもつ)を置いた。重合反応に参加する能力がある末端官能基をもつSAMを有するようにシラン化によって修飾されたガラス基質を用いて、ヒドロゲル前駆体溶液を挟んだ。UV重合中に、ヒドロゲル前駆体溶液の成分は、架橋ネットワークを形成し、ガラス基質上の末端官能基との共有結合を形成した。重合ヒドロゲルを、パターニングされた金基質からきれいに除去して、ガラス基質上に固定されたヒドロゲルアレイを製造した(図3参照)。

【実施例2】

【0083】

本実施例では、ヒドロゲルアレイを用いて、初期の幹細胞接着における基質特性の効果を決定した。

上述のように(図1A-1B参照)、金基質上のパターニングされた疎水性/親水性自己組織化単分子膜を用いて、アレイにおける各ヒドロゲルスポットの形状を定義し、含量を限定するように、ポリ(エチレングリコール)(PEG)ヒドロゲルアレイを形成した。UV開始チオール-エン架橋は、同時にヒドロゲルを重合させ、ヒドロゲルスポットをガラス上に固定して、ヒドロゲルアレイをもたらしした。図9に示すように、ヒドロゲルアレイを、64ウェルマイクロアレイアドオン(オランダ州、ペンドのGrace Bio-Labsから市販)に適合する寸法で製造することができた。

【0084】

フィブロネクチン由来ペプチド、蛍光マイクロスフェアおよびジチオール架橋剤を含むヒドロゲル溶液をSAMに沈着させ、シラン化ガラススライドで挟んだ。図7に示すように、ヒドロゲルアレイの個々のヒドロゲルスポットを、さまざまな量の蛍光タグ付きペプチドならびにさまざまな量の蛍光マイクロスフェアを含むように製造することができた。また、架橋前に、さまざまなPEGまたは架橋剤濃度をもつヒドロゲル溶液を製造して、剛性、ペプチドアイデンティティまたはペプチド濃度を变化させた(図8)。得られるアレイ(図3参照)は、直径2.4 mm、高さ150 μmの柱(post)を含んだ。ヒト間葉幹細胞(hMSC)を、さまざまなPEG濃度(4重量%、6重量% and 8重量%)をもつ柱上で培養して剛性を变化させ、初期細胞接着および拡散における変化をモニターした。ヒト胚性幹細胞(hESC)を、さまざまなペプチドアイデンティティ(ブランク、RDGS、RGDS(配列番号:1)、RGD-PHSRN(配列番号:34)、RGDSP(配列番号:47)および環状RGD)をもつ柱上で培養し、初期細胞接着および拡散における変化をモニターした。

【0085】

図10A-10Cに示すように、hMSCの2D培養は、公開された見解(Engler et al.細胞126:677(2006)を参照)と一致した、弾性率の変化に回答した細胞拡散依存性を実証した。化学的に規定され、アルブミンを含まない培地でのhMSCの2D培養は、細胞接着が、ペプチド提示スポットに非常に特異的であることを実証した。hESC細胞接着と拡散との両方が、固定化ペプチドへのインテグリン受容体の結合親和性に依存性であった(図11参照)。アレイは、ヒドロゲルスポット形状、ヒドロゲルスポット高さ(パターニングされたヒドロゲルスポット形状を変更すること、またはスペースャーを付加することによる)、ヒドロゲルスポッ

10

20

30

40

50

ト剛性およびヒドロゲルスロットペプチド濃度における変更を可能にし、2Dおよび3D細胞培養に対して適合可能であった。

【0086】

これらの結果は、本明細書に記載のヒドロゲルアレイの製造方法が、剛性、固定化リガンドアイデンティティおよびリガンド濃度、ならびに可溶性増殖因子提示を制御する能力を提供することを実証する。本開示のヒドロゲルアレイは、細胞接着および生存をサポートすることができ、複雑な細胞-環境相互作用をスクリーニングすることを可能にする。

【実施例3】

【0087】

本実施例では、パターンニングされたヒドロゲルアレイを用いて、インビトロでの内皮細胞細管ネットワーク形成(すなわち、「細管形成」)を研究した。

詳しくは、パターンニングされたヒドロゲルアレイは、ノルボルネンで官能化された8-アーム、20 kDaのポリ(エチレングリコール)から構成された。パターンニングされたヒドロゲルアレイは、30-60 mg/mLの、MMP分解架橋ペプチド(KCGGPQGIWGQGCK(配列番号:27)またはKCGGPQGIAGQGCK(配列番号:28))で30-70%架橋しているPEG、および0.25-2 mMの細胞接着性ペプチド(CRGDS(配列番号:2))を含有するヒドロゲルスロットを含んだ。パターンニングされたヒドロゲルアレイスポットに、各細胞型用の標準増殖培地(HUVEC用のMedium 199およびEGM-2 BULLETKIT(商標)(Lonza、スイス、パーゼル)、iPSC-ECおよびhESC-EC用のVASCULIFE(登録商標)およびVEGF LifeFactors (Lifeline Cell Technology、メリーランド州、フレデリック))を含有する培養培地中のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト人工多能性幹細胞由来の内皮細胞(iPSC-EC)およびヒト胚性幹細胞由来の内皮細胞(hESC-EC)を播種した。

【0088】

36 mg/mL未満のPEG、30%未満のMMP分解性架橋ペプチドおよび0.25 mM未満の細胞接着ペプチドを有するヒドロゲルスロットは、細管を形成しなかった(図12A)。30-60 mg/mLの、MMP分解架橋ペプチドで30-70%架橋しているPEG、および0.25-2 mMの細胞接着性ペプチドを含有するヒドロゲルスロットは、EC細管形成を支援した(図12B)。ネットワークは、最初、HUVECでは4時間、iPSC-ECでは24時間にて観察され、ネットワークは、HUVECでは最大4時間、iPSC-ECでは最大21日間、およびhESC-ECでは最大16日間安定であった。さらに、細管ネットワークの持続性は、血管内皮増殖因子(VEGF)に対する生化学的隔離ペプチドをヒドロゲルアレイに組み込むことによるか、または支持細胞(たとえば、iPS由来のFib-2間葉系間質細胞、ヒト脳由来の周皮細胞、ヒト間葉系幹細胞)とともに3D共培養することによって強化された。

【0089】

HUVEC(2Dヒドロゲル上および3Dヒドロゲル中)およびiPSC-EC(3D中)のネットワーク形成を促進するヒドロゲルアレイは、MMP分解性ペプチドおよび2mMの細胞接着ペプチド(CRGDS(配列番号:2))による50%架橋を含み、hESC-EC(3D中)のネットワーク形成は、2mMの細胞接着ペプチド(CRGDS(配列番号:2))による45-50%架橋を含む条件において促進された。図12Cは、本実施例で記載する細管形成を調査するためのヒドロゲルアレイの略図を示す。

【実施例4】

【0090】

本実施例では、PEGヒドロゲルのアレイを用いて、モデル細胞型としてカプセル封入されたヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用い、血管新生促進性細胞挙動における接着リガンド密度、弾性率およびVEGFR2シグナル伝達の組合せ効果をスクリーニングした。

【0091】

細胞接着、ヒドロゲル弾性率およびVEGFR2媒介性シグナル伝達が、HUVECの生存能力、増殖および細管形成を調節することが仮定された。さらに、VEGFR2インヒビターが、周囲のECM状況に応じて別々に、生存能力、増殖および細管形成を調節すると考えられた。したがって、PEGヒドロゲルにおけるインヒビターの効果を、インビトロで血管形成薬をスクリーニングするための標準的プラットフォームであるMATRIGEL(登録商標)における効果に

10

20

30

40

50

対して比較した。

【0092】

材料および方法

細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をLonza(メリーランド州、ウォーカーズビル)から購入し、EGM-2 Bulletkit(Lonza)を補足したMedium 199(M199)(Mediatech Inc.、バージニア州、マナッサス)中で培養した。培地補足剤は、2%ウシ血清アルブミン ならびにヒドロコルチゾン、hFGF-B、VEGF、R3-IGF-1、アスコルビン酸、ヘパリン、FBS、hEGFおよびGA-1000を含有した。単純化のために、EGM-2を補足したM199を「増殖培地」と称する。増殖培地を、1日おきに交換し、細胞を4-5日ごとに継代した。0.05% トリプシン溶液(HyClone、Lagan、IIT)を用いて細胞継代を行ない、剥離した細胞を、10%宇宙の子牛血清(HyClone)を補足したM199中に回収した。すべての培地に100 U/mLペニシリン/100 μg/mLストレプトマイシン(HyClone)を補足した。5% CO₂、37 °Cの加湿したインキュベーター内で細胞を維持し、すべての実験において7~16の集団倍加を用いた。

10

【0093】

ノルボルネンによるポリ(エチレングリコール)(PEG)官能化

PEG-ノルボルネン(PEGNB)を以下のとおり合成した。無水ジクロロメタン(Fisher Scientific、マサチューセッツ州、ウォルサム)に、固体8-アームPEG-OH(分子量20 kDa、トリペンタエリスリトールコア、Jenkem USA、テキサス州、アレン)、ジメチルアミノピリジンおよびピリジン(Sigma Aldrich、ミズーリ州、セントルイス)を溶解した。別の反応容器にて、無水ジクロロメタンに、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(Thermo Scientific、マサチューセッツ州、ウォルサム)およびノルボルネンカルボン酸(Sigma Aldrich)を溶解した。PEG溶液とノルボルネン溶液を合わせ、無水条件下で反応混合物を一夜攪拌することによってカルボキシル基を介して、PEG-OHに、ノルボルネンカルボン酸を共有的に結合させた。ガラスフリット付き漏斗を用いて反応混合物から尿素を除去し、冷ジエチルエーテル(Fisher)中でろ液を沈殿させた。沈殿したPEGNBを集め、プフナー漏斗で一夜乾燥した。不純物を除去するために、クロロホルム(Sigma Aldrich)に、PEGNBを溶解し、ジエチルエーテル中で沈殿させ、プフナー漏斗で二回目の乾燥をした。過剰のノルボルネンカルボン酸を除去するために、PEGNBを脱イオン水に溶解し、脱イオン水中で1週間透析し、孔径0.4 μmのシリンジフィルターでろ過した。水性PEGNB溶液を、液体窒素を用いて凍結させ、凍結乾燥した。プロトン核磁気共鳴分光法(NMR)を用いて、ノルボルネン基によるPEGの官能化(図13A)を定量して、6.8-7.2 PPMに位置する結合アルケン基を検出した。これらの実験において、PEG-OHアームへのノルボルネンカップリングの官能化効率は、すべてのPEGNBについて、88%を超えた。

20

30

【0094】

PEGNBへの接着ペプチドのプレカップリング

凍結乾燥PEGNBを、10 mM リン酸緩衝生理食塩水(1 x PBS)に、10 mMの濃度(80 mMノルボルネン基)の濃度で溶解し、0.05% w/vのIRGACURE 2959光開始剤(I2959)(Ciba Specialty Chemicals、ニューヨーク州、タリタウン)ならびに2 x モル過剰のアミド化Cys-Arg-Gly-Asp-Ser(CRGDS)接着ペプチド(配列番号:2)またはアミド化Cys-Arg-Asp-Gly-Ser(CRDGS)(配列番号:32)スクランブル非官能性ペプチド(Genscript、ニュージャージー州、ピスカタウェイ)のいずれかと合わせた。混合物を365 nm UV光下、線量率4.5 mW/cm²で3分間反応させて、チオレン反応を介して、チオール-エン反応を介して、ペプチドをノルボルネン基(図13A)に共有的に結合させた。装飾されたPEGNBから緩衝塩および未反応ペプチドを除去するために、反応混合物を脱イオン水で2日間透析した。透析された溶液を液体窒素で凍結させ、凍結乾燥した。プロトンNMRを用いて、ペプチドへのPEGNBのカップリング効率を定量して、ペプチドのノルボルネン基への共有結合によって引き起こされた6.8-7.2 PPMに位置する結合アルケンプロトンの消失を検出した。単純化のために、予めカップリングさせたPEGNB分子をPEGNB-CRGDS(配列番号:2)およびPEGNB-CRDGS(配列番号:32)と称する。

40

50

【 0 0 9 5 】

PEGヒドロゲルの形成

2つの別のヒドロゲルからヒドロゲルアレイ構築物を形成した：3.4 kDa PEG-ジチオール(PEG-DT)(図13A)架橋分子(Laysan Bio、アラバマ州、アラブ)を用いて架橋される不活性ヒドロゲル「バックグラウンド」(図13B)、および接着ペプチドで装飾され、MMP分解性 KCGGPQGIWGQGCKペプチド(配列番号：27)(図13A)(Genscript)を用いて架橋される「ヒドロゲルスロット」(図13C)。すべてのヒドロゲル溶液は、無血清M199中で作成され、PEGNB、0.05% w/v I2959およびPEGNBに対して2xモル過剰の架橋分子から構成されて、50%架橋密度(図13)を達成した。ヒドロゲルへの細胞接着を変化させるために、予めカップリングさせたPEGNB-CRGDS(配列番号：2)およびPEGNB-CRDGS(配列番号：32)分子を溶液に加えて、すべての溶液に包含される合計2 mMのペンダントペプチドによる所望の接着ペプチド濃度を達成した。バックグラウンドヒドロゲルの弾性率を変化させるために、PEGNBとPEG-DTを合わせた重量%を4、6または8% w/vに変化させた。ヒドロゲルスロットの弾性率を変化させるために、PEGNB、分解性架橋分子および接着ペプチドを合わせた重量%を4.2、5および7% w/vに変化させた。

10

【 0 0 9 6 】

PEGヒドロゲルの機械的特性

バックグラウンドヒドロゲルサンプルおよびヒドロゲルスロットのバルクサンプルにおいて質量平衡膨潤比およびせん断弾性率を測定した。質量平衡膨潤比(Q)を測定するために、20 μ L液滴のヒドロゲル溶液を平らなテフロン表面上に分注し、365 nm UV光下、線量率90 mW/cm²で2秒間架橋させた。無血清M199中で24時間サンプルを膨潤させ、膨潤重量(W_S)を秤量した。その後、サンプルを脱イオン水で一夜洗浄して、ヒドロゲルからM199成分を除去し、-80 $^{\circ}$ Cにて2時間凍結させ、凍結乾燥した。乾燥したポリマーの乾燥重量(W_D)を測定し、下記方程式により質量平衡膨潤比を計算した：

20

$$\text{質量平衡膨潤比 } Q = :W_S / W_D$$

【 0 0 9 7 】

ヒドロゲルのせん断弾性率を測定するために、660 μ Lの上記溶液を、直径2.1 cmのテフロンウェルに分注した。得られるヒドロゲルを1 x PBSで24時間膨潤させた後、条件当り3反復で、穴あけ器を用いて直径8 mmのテストサンプルを回収した。を用いてサンプルをテストした。Ares-LS2レオメータ(TA Instruments、デラウェア州ニューキャッスル)を用いてサンプルをテストした。20グラム重量をサンプルに適用し、10 Hz固定周波数で、0.1~20%ひずみにて、ひずみスイープ試験を行った。各サンプルの複合せん断弾性率は、10 Hz、1-10%ひずみにおける測定値の平均であった。

30

【 0 0 9 8 】

ヒドロゲルアレイステンシル

従来のフォトリソグラフィ技術を用いて、ヒドロゲルアレイステンシルを製作し、2つの別のエラストマーパーツから形成した：マイクロウェルの厚さ200 μ mのシートおよび厚さ1 mmのベース。簡単に述べると、シリコンウェハー(University Wafer、マサチューセッツ州、ボストン)上への200 μ m層のSU-8 100(Microchem、マサチューセッツ州、ニュートン)のスピンコーティングによってシリコンマスターモールドを製作した。配置された1 mm径柱のフォトレジストを、フォトマスク(ImageSetter、ウィスコンシン州、マディソン)を用いて決定した。Sylgard PDMS溶液と架橋溶液(Dow Corning、Midland、MI)を、体積比10:1にて組み合わせることによって、ポリ(ジメチルシロキサン(PDMS)を製造した。溶液を真空下で45分間脱気し、シリコンマスターモールドに注ぎ入れ、ホットプレート上で85 $^{\circ}$ Cにて4時間架橋させ、シートの全厚さを貫通するマイクロウェルの厚さ200 μ mのシートを形成した。ヒドロゲルアレイステンシルのベースを形成するために、ガラススライドの間にPDMS溶液を注ぎ入れて、厚さ1 mmのシートを形成し、ホットプレート上で85 $^{\circ}$ Cにて4時間硬化させた。両方のステンシル構成要素を、ソックスレー抽出器によってヘキサン(Fisher)で洗浄し、真空下で残留溶媒を除去した。完成PDMSステンシルを、厚さ200 μ mのシートを厚さ1 mmのベースの上に置くことによって形成した。

40

50

【 0 0 9 9 】

PEGヒドロゲルアレイの形成

PDMSステンシルウェルに、0.4 μ l液滴としてヒドロゲルスロット溶液を加えた(図14)。乾燥前にヒドロゲルスロットを固化させるために、5滴ずつパターンニングした後に、365 nm UV光下、線量率90 mW/cm²で2秒間、液滴を架橋させた。フォトマスクを用いて、すでに硬化したスロットへの多重UV曝露を防止した。

【 0 1 0 0 】

いったんすべてのスロットがUV光下で架橋されたら、365 nm UV光下、線量率90 mW/cm²で2秒間、230 μ lバックグラウンドヒドロゲル溶液を硬化させることによって、平らな厚さ1 mmのPDMSシートと1" x 1" ガラススライドの間に、厚さ1 mmのバックグラウンドヒドロゲルスラブを形成した。PDMSシートのみを除去した後、さらなる30 μ lバックグラウンドヒドロゲル溶液をヒドロゲルスラブの上に分注して、架橋により、スロットをバックグラウンドスラブに固定した。依然としてガラススライドに結合したままのバックグラウンドスラブを、硬化ヒドロゲルスロットの上に置き、アレイ全体を、365 nm UV光下、線量率90 mW/cm²でさらに2秒間硬化させた。PDMSステンシルからヒドロゲルアレイを除去し、6ウェル細胞培養プレート上の培地に浸漬した。磁石を用いることによって、完成アレイをウェルの底に固定して、ガラススライドを適切な位置で支えた。

【 0 1 0 1 】

ヒドロゲルアレイスロットへのペプチド組み込み

ヒドロゲルアレイスロットへの制御可能なペプチド組み込みを検証するために、上記手順を用いて濃度0、0.01、0.1、1、2 mMのCRGDS(配列番号：2)がアレイにパターンニングされるようなPEGNB、PEGNBに対して2xモル過剰の3.4 kDa PEGジチオールおよびPEGNB-CRGDS(配列番号：2)からなる12% w/v 総ポリマーのヒドロゲル溶液。バックグラウンドヒドロゲルは、スロットと組成的に同一であったが、CRGDS(配列番号：2)を欠いた。ペプチドのN末端をフルオレセインで標識することによって、CRGDS(配列番号：2)濃度を検証した。簡単に述べると、PBS中のフルオレセイン複合スルホジクロロフェノールエステル(Invitrogen、ニューヨーク州、グランドアイランド)の3 μ M溶液でアレイを処理し、一夜インキュベートし、次いで、新しいPBS中で24時間濯いだ。Nikon TI Eclipse顕微鏡を用いて、蛍光標識されたスロットを写真撮影し、ImageJソフトウェアを用いて蛍光強度を定量した。

【 0 1 0 2 】

3Dヒドロゲルアレイ中のHUVECの生存能力、細管形成および増殖

ヒドロゲルアレイ製作において、ヒドロゲルスロットは、 2×10^7 細胞/mLの密度にてHUVECを包含した。PEGNB-CRGDS(配列番号：2)を添加して、CRGDS接着ペプチド(配列番号：2)の濃度を、0、0.25、0.5、1.0および2.0 mMに調節し、PEGNB-CRDGS(配列番号：2)を添加して、すべてのヒドロゲルスロット中の総ペプチド濃度を2 mMに維持した。総ポリマー重量%は、ヒドロゲルスロット中、4.2、5および7% w/vに変化させたが、バックグラウンド中、4、6および8% w/vに変化させ、低重量%ヒドロゲルスロットは低重量%バックグラウンドに対応し、高重量%ヒドロゲルスロットは高重量%バックグラウンドに対応した。生存能力実験において、封入された細胞のアレイを、増殖培地単独中で、または公知のVEGFR2シグナル伝達インヒビターである10 μ M SU5416(Sigma Aldrich)を含む増殖培地で、48時間培養した。封入の24時間後に培地を交換した。48時間培養した後、アレイを無血清M199で洗浄し、M199中、5 μ Mのセルトラッカーグリーン(Invitrogen)で45分間染色した。15分間染色した後、染色溶液にヘキスト核染料(Invitrogen)を補足して、最終濃度10 μ g/mLを達成した。染色後、アレイを無血清M199で洗浄し、2 μ Mのエチジウムホモダイマー(Invitrogen)を含む増殖培地中で30分間インキュベートした。次いで、アレイを1X PBSで洗浄し、10%中緩衝ホルマリン(Fisher)中で30分間固定した。アレイを1X PBS中に一夜浸漬し、48時間の固定中に、Nikon TE300蛍光顕微鏡を用いて写真撮影した。生細胞核の数を、柱内の核の総数で割ることによって生存能力を定量した。

【 0 1 0 3 】

増殖および細管形成実験において、封入された細胞のアレイを、増殖培地単独中で、または10 μM SU5416を含む増殖培地中で、24時間のみ培養した。その後、細胞を、増殖マーカーとしての20 μM 5-エチニル-2'-デオキシウリジン(EdU)(Invitrogen)、および適切な場合には10 μM SU5416とともに増殖培地中で5時間インキュベートした。その後、アレイを、生存能力アッセイと同様にセルトラッカーグリーンで染色したが、ヘキスト核染料またはエチジウムホモダイマーは用いなかった。アレイを1X PBSで洗浄し、10%緩衝ホルマリン中で30分間固定し、Click-iT EdU 594増殖キット(Invitrogen)を用いて染色した。染色手順を、製造者の使用説明書とは僅かに変更し、アレクサフルオロ(登録商標)594を推奨濃度の半分に希釈した。アレイを1X PBSに一夜浸漬し、Nikon TE300蛍光顕微鏡を用いて写真撮影した。EdU-ポジティブ細胞の数を計数し、柱内の核の総数で割ることによって、増殖を定量した。セルトラッカーグリーンで標識された各柱における全体的な毛細管様構造(CLS)長さを手作業で測定することによって、細管形成を定量した。共焦点顕微鏡画像を得るために、Prolong Gold退色防止溶液(Invitrogen)中に、ヒドロゲルアレイ置き、Nikon A1R-Si共焦点顕微鏡で写真撮影した。

10

【0104】

VEGFR2阻害によるHUVEC増殖

HUVECを、 5.0×10^4 細胞/cm²の密度で組織培養ポリスチレン(TCPS)24-ウェルプレートに置いた。細胞を、増殖培地単独中で、または10 μM SU5416を含む増殖培地中で、24時間増殖させた。その後、培地を、10 μM SU5416および20 μM EdUを含むか、または含まない新鮮な増殖培地と交換したClick-iT EdU 594増殖キット(Invitrogen)。5時間のインキュベーション後、細胞を、10%緩衝ホルマリン中で30分間固定し、Click-iT EdU 488増殖キット(Invitrogen)を用いて染色した。染色手順を、製造者の使用説明書とは僅かに変更し、アレクサフルオロ(登録商標)488を推奨濃度の半分に希釈した。細胞を、Nikon TE300蛍光顕微鏡を用いて写真撮影し、EdUに対する核染色ポジティブを計数し、核の総数に対して正規化することによって、増殖を定量した。

20

【0105】

マトリゲル(登録商標)中のHUVEC細管形成

HUVECを、 2×10^7 細胞/mLの密度で増殖因子低減(growth factor-reduced)マトリゲル(登録商標)(BD Biosciences、カリフォルニア州、サンノゼ)中に懸濁させた。厚さ200 μm のマイクロウェルのPDMSシートをガラススライドの上に置き、マトリゲル(登録商標)-細胞懸濁液を、0.4 μl の液滴としてマイクロウェルに分注した。マトリゲル(登録商標)「スポット」のアレイを、37 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間インキュベートし、増殖培地単独中、または10 μM SU5416を含む増殖培地中に浸漬した。48時間の培養後、アレイを、PEGヒドロゲル中での生存能力アッセイと同様にセルトラッカーグリーンで染色したが、ヘキスト核染料またはエチジウムホモダイマーは用いなかった。アレイを、1X PBSで洗浄し、10%緩衝ホルマリン中で30分間固定した。封入の48時間後に、Nikon TI Eclipse顕微鏡を用いて、各スポットの緑色蛍光および位相差zスタック画像を撮影した。個々のスポット内の総CLS長さを手作業で定量した。

30

【0106】

拘束されたヒドロゲル中のHUVEC細管形成

10 μl 容のヒドロゲル中のHUVEC細管形成を定性的に評価して、CLS形成におけるヒドロゲル閉じ込めの効果を決定した。ここで、ヒドロゲルは、4.2% w/vの総ポリマー、PEGNBに対して2Xモル過剰の細胞分解性化合物共ペプチドおよびPEGNB-CRGDS(配列番号:2)を含み、2 mMのCRGDS(配列番号:2)の濃度を確立した。これらのヒドロゲルにおいて用いたHUVECを、トリプシン処理前に、1 μM のセルトラッカーグリーンで処理した。簡単に述べると、細胞を無血清M199で洗浄し、M199中、セルトラッカーグリーンで45分間染色した。染色後、細胞を無血清M199で洗浄し、増殖培地中で30分間インキュベートした。トリプシン処理後、 2×10^7 細胞/mLの密度で細胞をPEGヒドロゲル溶液に懸濁させた。

40

【0107】

拘束されたヒドロゲル中の細管形成を観察するために、細胞含有ヒドロゲル溶液を10

50

μl の液滴として48ウェルTCPSプレート上に分注した。液滴を、365 nm UV光下、線量率90 mW/cm^2 で2秒間架橋させた。実験期間中を通して液滴が確実に固定されたままであるように、固化したヒドロゲルの周囲に90 μl の8% w/vバックグラウンドヒドロゲル溶液を加え、365 nm UV光下、線量率90 mW/cm^2 で2秒間架橋させた。封入された細胞を、10 μM SU5416を含む増殖培地中で24時間インキュベートした。封入の24時間後に、Nikon TI Eclipse顕微鏡を用いて、各サンプルの緑色蛍光および位相差zスタック画像を撮影した。

【0108】

拘束されたヒドロゲル中の細管形成を観察するために、細胞含有ヒドロゲル溶液を10 μl の液滴として平面PDMSシート上に分注し、365 nm UV光下、線量率90 mW/cm^2 で2秒間架橋させた。得られるヒドロゲルを、10 μM SU5416を含む増殖培地を入れた24ウェルTCPSプレートに移した。24時間のインキュベーション後、24ウェル培養インサート(Becton Dickinson、ニュージャージー州、フランクリンレイクス)を用いてゲルを固定して、写真撮影時にゲルを静止させた。

10

【0109】

統計分析

等分散を仮定する、両側スチューデントT検定を用いて、統計的差異を計算した。統計的有意さを $p < 0.05$ として示した。

【0110】

結果

ヒドロゲル平衡膨潤比および複合せん断弾性率

分解性ヒドロゲルスロットおよび不活バックグラウンドヒドロゲルの性膨潤特性および弾性率を、製剤に含まれるポリマーの重量%を調節することによって制御した。4.2、5および7% w/vのポリマーを含有するヒドロゲルスロット製剤の質量平衡膨潤比は、それぞれ、 42.1 ± 2.1 、 28.7 ± 2.9 および 21.6 ± 0.4 であった。4、6および8% w/vのポリマーを含有するバックグラウンドヒドロゲルの平衡膨潤比は、それぞれ、 34.9 ± 0.9 、 23.9 ± 0.9 および 21.3 ± 1.1 であった(図15A)。培養中にスロットを係留するための、より安定な基質を提供するために、バックグラウンドヒドロゲルは、ヒドロゲルスロットと類似しているが、わずかに低い膨潤比を持つように設計された。4.2、5および7% w/vのポリマーを含有するヒドロゲルスロット製剤の弾性率は、それぞれ、 260 ± 140 Pa、 980 ± 210 Paおよび 3220 ± 610 Paであった。したがって、データの表示を明確にするために、実験期間中、4.2、5および7% w/vのヒドロゲルを「低」、「中」および「高」弾性率ヒドロゲルと称する。4、6 and 8% w/vのポリマーを含有するバックグラウンドヒドロゲルの弾性率は、それぞれ、 1040 ± 100 Pa、 3100 ± 220 Paおよび 4160 ± 350 Paであった(図15B)。実施例用に選ばれた弾性率の範囲(~ 260 - 3220 Pa)は、機械的特性ならびに血管新生の程度において異なる組織の2つの例である、声帯ヒダ基底膜などの軟組織、ならびに正常乳房組織およびガン性乳房組織などの広範囲の組織に及ぶ。

20

30

【0111】

ヒドロゲルアレイ製作およびペプチド組み込み

本実施例におけるヒドロゲル構築物は、制御された濃度のCRGDS(配列番号:2)を含有する配置されたPEGヒドロゲルスロットからなった。CRGDS(配列番号:2)またはCRDGS(配列番号:32)によるPEGNBの官能化効率を、NMRを用いて確認した。接着ペプチドCRGDS(配列番号:2)およびCRDGS(配列番号:32)を、2Xモル過剰にてPEGNBに反応させて、細胞接着ペプチドで、平均してPEGNB分子の8アームの2つを装飾した。PEGNBに対して2xモル過剰のCRGDS(配列番号:2)の存在は、PEG分子上に存在するアルケンプロトンの 24.8 ± 4.1 %の減少をもたらし、PEGNBに対して2xモル過剰のCRDGS(配列番号:32)の存在は、アルケンプロトンの 25.7 ± 4.9 %の減少をもたらした(図15C)。これは、予想どおり、所定のPEGNB分子上の8つの利用可能なノルボルネン基のうちのおよそ2つが、接着ペプチドに結合したことを示す。

40

【0112】

ヒドロゲルアレイへのペプチド装飾PEGマクロマーの組み込みもまた、スルホジクロロ

50

フェノールエステル結合を介する蛍光染色を用いて視覚化した。アレイからの蛍光シグナルは、配置されたヒドロゲルスポットに加えたペプチドの量に直接比例した。さらに、スポット間ではバックグラウンド蛍光のみが検出され、ペプチドがスポットのみに存在することが示された(図15D)。これらの結果は、PEGヒドロゲルを用いて、チオール含有リガンド、この場合、細胞接着ペプチドCRGDS(配列番号：2)の組み込みにおいて、合成制御を提供することができることを実証した。

【0113】

PEGヒドロゲルアレイにおける三次元細胞生存能力

次いで、封入されたHUVECの生存能力を定量して、細胞が、封入およびアレイパターンニング過程を持ちこたえることを検証し、細胞生存を維持することにおける接着リガンド密度および剛性の効果を評価した。細胞生存能力は、一般に、CRGDS(配列番号：2)を増加させると増加し、高弾性率条件は、生存能力を抑制した。すべての条件において、HUVECは、総封入細胞の40%以上の生存能力レベルを提示し、最低の生存能力レベルは、0 mMのCRGDS(配列番号：2)を含有するスポットにおいて観察された。CRGDS(配列番号：2)濃度の増加は、すべての弾性率条件において生存能力を増加させ、最大の生存能力は、0.5および1.0 mMのCRGDS(配列番号：2)において観察された。これらのCRGDS(配列番号：2)濃度において、低弾性率ヒドロゲルは、高弾性率条件での等価なCRGDS(配列番号：2)濃度と比較して、最高の生存能力レベルを促進した。しかしながら、CRGDS(配列番号：2)濃度が1.0から2.0 mMに増加した場合、低および中弾性率ヒドロゲル中での生存能力は減少した。この減少は、0 mMのCRGDS(配列番号：2)濃度で観察されたレベルより下へは生存能力を低下させず、2.0 mMのCRGDS(配列番号：2)濃度が、有害ではないが、非接着条件と比較して、HUVECの生存能力にとって準最適であることが示された。高弾性率条件では、1.0 mMのCRGDS(配列番号：2)と比較した場合、2.0 mMではHUVECの生存能力において有意な減少はなく、高濃度のCRGDS(配列番号：2)の存在下で生存能力を維持することにおける剛性の役割が示唆された(図16A)。

【0114】

PEGヒドロゲルアレイにおける三次元細胞増殖

S期の封入されたHUVECの核を標識し、定量することによって、増殖における細胞接着および剛性の効果を決定した。すべての弾性率条件において、ヒドロゲルへのCRGDS(配列番号：2)の添加は、CRGDS(配列番号：2)を欠いているスポットを大きく越えて細胞増殖を増加させた(図17A)。増殖は、CRGDS(配列番号：2)の増加に関しては単調な傾向に従わず、高弾性率ヒドロゲルは、低および中弾性率条件と比較して、増殖を抑制する傾向にあった。特に、低および中弾性率条件における増殖は、増加するCRGDS(配列番号：2)に対して二相性の応答を示した。増殖は、低弾性率条件において、0.25および2.0 mMのCRGDS(配列番号：2)と比較して、0.5 mMのCRGDS(配列番号：2)の方がより低く、中弾性率条件において、2.0 mMのCRGDS(配列番号：2)と比較して、0.5および1.0 mMのCRGDS(配列番号：2)の方がより低かった。高弾性率条件において、全体的な増殖率は、低および中弾性率条件における増殖率よりも有意に低く、CRGDS(配列番号：2)を含む条件間で有意な差異は存在しなかった。増殖におけるECM効果に加えて、大部分の増殖細胞が、多細胞構造と共局在したことが定性的に注目される(図17D)。

【0115】

PEGヒドロゲルアレイにおける三次元細管形成

細胞接着およびヒドロゲル剛性は、ヒドロゲルスポットにおける総毛細管様構造(CLS)長さに有意に影響を及ぼし、CRGDS(配列番号：2)濃度および弾性率の最適レベルは、試験した条件の範囲におけるCLS形成を最大化した。すべての弾性率条件において、CLS形成は、CRGDS(配列番号：2)の不在下では稀であった。低弾性率条件において、CLS形成は、1.0 mMの濃度までCRGDS(配列番号：2)の増加とともに増加し、2.0 mMのCRGDS(配列番号：2)において減少した。この傾向は、中弾性率条件においては観察されず、形成は、2.0 mMのCRGDS(配列番号：2)まで上昇したままであった(図18A)。高弾性率条件において、CLS形成は、CRGDS(配列番号：2)を欠いている条件と比較して、0.25、0.5および1.0 mMのCRGDS(

配列番号：2)にて有意に増加したが、この上昇は、2.0 mMのCRGDS(配列番号：2)においてはもはや有意ではなかった。0.5 mMのCRGDS(配列番号：2)でのCLS形成は、高弾性率条件において、低弾性率条件と比較して有意に低く、1.0および2.0 mMのCRGDS(配列番号：2)でのCLS形成は、高弾性率条件において、中弾性率条件と比較して有意に低く、剛性の高さが、これらのヒドロゲルにおけるCLS形成を妨げた。総合すれば、これらの結果は、細管形成が、CRGDS(配列番号：2)の増加とともに増加するが、最も有意な増加は、過度に柔軟または剛性でない最適中弾性率条件において観察されることを示唆する。

【0116】

VEGFR2阻害に伴うHUVEC生存能力、増殖および細管形成

SU5416は、VEGFR2リン酸化に対するインヒビターであり、増殖培地にSU5416を添加することによってVEGFシグナル伝達を阻害することが、従来の細胞培養系においてHUVEC増殖および細管形成を低下させることが確認された。特に、HUVECを組織培養ポリスチレン(TCPS)表面上に播種し、増殖についてアッセイした場合、VEGFR2阻害は、増殖培地コントロールと比較して、増殖において20%の減少をもたらした(図19A)。HUVECを増殖因子低減マトリゲル(登録商標)中に封入し、CLS形成についてアッセイした場合、VEGFR2阻害は、増殖培地のみでインキュベートされたHUVECと比較して、総細管長さにおいて50%の減少をもたらした(図19Bおよび19C)。

【0117】

合成環境におけるVEGFR2シグナル伝達、制御された接着リガンド密度および剛性の組合せによる役割を調査するために、HUVECをSU5416で処理したヒドロゲルアレイスポットに封入し、生存能力、増殖および細管形成についてアッセイした。VEGFR2阻害は、CRGDS細胞接着ペプチド(配列番号：2)を含まない条件において、細胞生存能力を有意に低下させた(図16B)。すべての弾性率条件において、生存能力は、0.5 mMのCRGDS(配列番号：2)にて頭打ちであり、VEGFR2が阻害された場合の細胞生存能力を維持することにおけるCRGDS(配列番号：2)の役割の限界を示す。

これは、HUVEC生存能力との関連において、VEGFR2とインテグリン媒介性細胞接着との間の相乗的相互作用も示唆する。しかしながら、正常なVEGFR2は、通常、阻害されたVEGFR2と比較して生存能力レベルを増加させたが、正常なVEGFR2条件と阻害された条件との間の差異は、CRGDS(配列番号：2)濃度が増加すると減少した。すべての弾性率条件において、VEGFR2阻害による生存能力の低下は、2 mMのCRGDS(配列番号：2)を含むスポットにおいては有意ではなく、増加したCRGDS(配列番号：2)の存在下での生存能力を調節することにおけるVEGFR2の役割が弱いことを示す。さらに、生存能力におけるVEGFR2阻害の効果は、CRGDS(配列番号：2)濃度が0.5 mM以上である場合、高弾性率条件において有意ではなく(図16C)、VEGFR2の役割が、低弾性率ヒドロゲルと比較して、高弾性率において実質的ではなかったことを示す。

【0118】

ヒドロゲル条件の大部分において、VEGFR2阻害によってHUVEC増殖が減少した。低および中弾性率条件において、CRGDS(配列番号：2)を含有するすべてのスポットは、0 mMのCRGDS(配列番号：2)条件より上昇した細胞増殖レベルを有したが、増殖レベルは、高弾性率条件において、CRGDS(配列番号：2)による増加はなかった(図17B)。低弾性率条件において、VEGFR2阻害は、0、0.25および1 mMのCRGDS(配列番号：2)条件にて増殖レベルの有意な減少を引き起こした。興味深いことに、低弾性率において、2 mMのCRGDS(配列番号：2)条件における増殖レベルは、VEGFR2阻害により有意に増加した。中弾性率条件において、VEGFR2阻害は、0.5および2 mMのCRGDS(配列番号：2)条件において、有意な増殖減少を引き起こし、増殖における増加は観察されなかった。高弾性率条件において、VEGFR2阻害による増殖の有意な減少は、0 mMのCRGDS(配列番号：2)条件以外のすべてのCRGDS(配列番号：2)濃度において観察された。CRGDS(配列番号：2)の不在下では増殖の有意な増加はないが、増殖レベルは、他の弾性率条件においてCRGDS(配列番号：2)により観察された増殖レベルよりも低かった(図17C)。まとめると、合成的ヒドロゲル条件の周囲の状況は、細胞増殖によって測定されるように、VEGFR2阻害に対するHUVEC応答を劇的に変える。

【0119】

SU5416によるVEGFR2の阻害もまた、試験したすべてのせん断弾性率条件において、細管形成におけるCRGDS(配列番号：2)依存性の傾向を有意に変更した。低せん断弾性率条件において、CLS長さは、CRGDS(配列番号：2)濃度により単調に増加し、2.0 mMのCRGDSにて劇的に増加した(図18B-D)。中弾性率条件において、CRGDS(配列番号：2)を含むスポットにおけるCLS長さは、CRGDS(配列番号：2)の不在下において観察された長さよりも有意に大きかった。しかしながら、中弾性率では、VEGFR2阻害により、CRGDS(配列番号：2)濃度では、CLS長さはもはや変化しなかった(図18B)。高弾性率条件において、CRGDS(配列番号：2)を含むすべてのスポットにおけるCLS長さは、CRGDS(配列番号：2)の不在下で観察される長さよりも有意に長かった。ここでも、CRGDS(配列番号：2)濃度を変化させても、CLS長さは変化せず、すべてのCRGDS(配列番号：2)濃度におけるCLS長さは、中弾性率条件におけるCLS長さよりも低かった。CLS傾向におけるこれらの変化にもかかわらず、増殖培地コントロールと比較した場合、ほとんどのヒドロゲル条件において、VEGFR2阻害は、CLS長さに対する有意な変化を引き起こさなかった(図18C)。3つのヒドロゲル条件のみが、VEGFR2阻害による有意な効果を示した：低弾性率、2 mMのCRGDS(配列番号：2)スポットにおけるCLS長さの増加；中弾性率、0 mMのCRGDS(配列番号：2)スポットにおけるCLS長さの減少；および高弾性率、1 mMのCRGDS(配列番号：2)スポットにおけるCLS長さの減少。これらのデータは、マトリゲル(登録商標)におけるVEGFR2阻害とは全く対照的であり、CLS長さの明らかな減少をもたらした。まとめると、データは、ヒドロゲル条件の周囲の状況は、HUVEC生存能力、増殖および細管形成によって測定されるように、VEGFR2阻害に対するHUVEC応答を劇的に変えたことを実証する。

10

20

【0120】

拘束および非拘束ヒドロゲルにおける細管形成

多くの先行研究と比較した場合に、本実施例にて提供されるヒドロゲルアレイの1つの特徴は、ヒドロゲルが物理的に拘束される度合いである。たとえば、標準的プラスチックウェルプレートまたはエラスロマーデバイスにて形成されたヒドロゲルは、典型的に、高度に拘束されるが、本開示のアレイプラットフォームにおけるヒドロゲルスポットは、バックグラウンドヒドロゲルと共同して膨潤する。堅い基質に拘束されたヒドロゲル中のCLS形成と、非拘束ヒドロゲルとの比較をさらに理解するために、48ウェルプレートに拘束されるか、または基質から離脱したヒドロゲルにおけるCLS形成空間分布を定性的に観察し、培地中で自由に膨潤させた。拘束されたヒドロゲルは、膨潤中に物理的な「座屈」の影響を受けやすく、ヒドロゲルの真中に、焦点外領域をもたらした(図20A)。座屈は、座屈したヒドロゲル領域の端の周りを形成する構造の大部分において、CLS形成中に不均質を引き起こした。対照的に、非拘束ヒドロゲルにおけるCLS形成は、本実施例のヒドロゲルアレイスポットにおける観察と同様に、ヒドロゲルの体積全体に均質に起こった(図20B)。これらの観察は、拘束されたヒドロゲルにおける細胞封入が、3D新血管新生実験の結果に有意に影響を及ぼす、膨潤における潜在的な変数を導入しうることを示唆する。

30

【実施例5】

【0121】

本実施例では、PEG-ヒドロゲルアレイを分析し、変化させて、ヒト内皮細胞を用いて血管ネットワーク形成を促進し、最適化した。チオール-エン光重合を用いてポリ(エチレングリコール)(PEG)ヒドロゲルアレイを形成して、チオール含有ペプチドを、上述のようにノルボルネン基で官能化されたマルチアームPEG分子に結合させた。3D細胞培養のために、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)分解性架橋でヒドロゲルアレイを形成して、たんぱく質分解性リモデリングおよびペンダントRGD含有ペプチドが接着を促進するのを可能にした(アレイに用いたペプチドについては図21を参照)。

40

【0122】

RGD濃度を変化させたPEGヒドロゲルに封入されたヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)または誘導多能性幹細胞由来内皮細胞(iPSC-EC)についてのネットワーク形成および出芽を分析して、接着およびMMP架橋密度を調整し、機械的特性を変化させた。HUVECおよびiPSC-EC

50

を、異なる細胞密度：(1)ネットワーク組み立てをモニターするための $5-40 \times 10^6$ 細胞/mL；または(2)高密度クラスターを形成し、次いで、第二のヒドロゲル層で囲んで出芽を調査するための 40×10^6 細胞/mL；でPEGヒドロゲルに封入した。

【0123】

図22に示すように、PEGヒドロゲルアレイ中に分散細胞懸濁液として封入される場合、細胞は組織されたネットワークに組み立てられ、高密度クラスターが無細胞PEGマトリックスに囲まれる場合、出芽に一致した管様構造が観察された。ネットワークは、少なくとも第16日まで存在した。ネットワーク形成の程度は、接着および架橋密度(剛性)に依存し、得られる血管構造の安定性は、マトリックス特性(たとえば、細胞接着ペプチド濃度(ヒドロゲルアレイ安定性/接着)、架橋密度(ヒドロゲルアレイ剛性)、培養培地(たとえば、ネットワークへの周皮細胞の組み込み)およびサポートする細胞の存在(図23A-23C参照)などに依存した。

【実施例6】

【0124】

本実施例では、制御された剛性およびCRGDS(配列番号：2)を有するPEG-ヒドロゲルアレイ製剤を形成し、細胞播種後24時間以内の細管形成をサポートする能力について分析した。

【0125】

リン酸緩衝生理食塩水中、45または62 mg/mLの、0~2 mMのCRGDS(配列番号：2)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、3 mMの総ペンダントペプチド濃度を維持するための追加CRDGS(配列番号：32)スクランブル接着ペプチド、PEGに対して2xモル過剰濃度のKCGPQG1WGQCK(配列番号：27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤を組み合わせることで、ヒドロゲル溶液を作成した。溶液を、UV光(90 mW/cm²、365 nm、3秒)下、重合させてヒドロゲルにした。HUVECを、 8.5×10^4 細胞/cm²の密度でヒドロゲルアレイ上に播種し、EGM2増殖サプリメントを補足したM199中でインキュベートし、播種の1時間後および1時間毎に24時間まで写真撮影した。

【0126】

1~12時間および12~24時間の、非接着、単層形成およびネットワーク形成として、細管形成を採点し、すべての試行は、ヒドロゲル剛性当たり3回の別の実験にわたって蓄積された。図24Aおよび24Bに示すように、4つの条件は、細管ネットワークを一貫して生成した：45 mg/mL、0.25 mMのCRGDS(配列番号：2)、12時間より前；62 mg/mL、0.25 CRGDS(配列番号：2)、12時間より後；45 mg/mL、1 mMのCRGDS(配列番号：2)、12時間より後；および45 mg/mL、2 mMのCRGDS(配列番号：2)、12時間より後。さらに、図25A-25Cは、本実施例で形成された細管ネットワークを図示する。

【実施例7】

【0127】

本実施例では、制御された剛性および環状RGDを有するPEG-ヒドロゲルアレイ製剤を形成し、細胞播種後48時間にわたって細管形成をサポートする能力について分析した。

【0128】

リン酸緩衝生理食塩水中、40、50または70 mg/mLの、0~1 mMの環状RGD[Fd]C(配列番号：33)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、1 mMの総ペンダントペプチド濃度を維持するための追加CRDGS(配列番号：32)スクランブル接着ペプチド、0.3 mMのCE[Fd][Ad][Yd][Ld]IDFNWEYPASK(配列番号：35)VEGF結合ペプチドまたはスクランブルバージョンCD[Ad]PYN[Fd]EFAWE[Yd]VIS[Ld]K(配列番号：36)のいずれか、PEGに対して1.2または2xモル過剰濃度のKCGPQG1WGQCGK(配列番号：27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤を組み合わせることで、ヒドロゲルアレイ溶液を作成した。溶液を、UV光(90 mW/cm²、365 nm、3秒)下、重合させてヒドロゲルにした。HUVECを、 8.5×10^4 細胞/cm²の密度でヒドロゲルアレイ上に播種し、EGM2増殖サプリメントを補足したM199中でインキュベートし、播種の24時間後に写真撮影した。非接着、単一細胞/コロニー接着、単層形成およびネットワーク形成として、細管形成を採点した。結果を図26Aお

10

20

30

40

50

よび26Bに示す。特に、図26Bに示すように、0または0.3 mMのいずれかのVBPを含む、0.25 mMの環状RGDを含む製剤Bは、細管を一貫して生成した。

【実施例 8】

【0129】

本実施例では、制御された剛性および環状RGDを有するPEG-ヒドロゲルアレイ製剤を形成し、細胞播種後の48時間にわたって細管形成をサポートする能力について分析した。

【0130】

リン酸緩衝生理食塩水中、40 mg/mLの、0.25 mMの環状RGD[Fd]C(配列番号：33)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、0~0.3 mMのCE[Fd][Ad][Yd][Ld]IDFNWEYPASK(配列番号：35)VEGF結合ペプチドまたはスクランブルバージョンCD[Ad]PYN[Fd]EFAWE[Yd]VIS[Ld]K(配列番号：36)のいずれか、PEGに対して2xモル過剰濃度のKCGGPQGIWGQCGK(配列番号：27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤を組み合わせることによって、ヒドロゲルアレイ溶液を作成した。溶液を、UV光(4.5 mW/cm²、365 nm、2分)下、重合させてヒドロゲルにした。HUVECを、1.2 x 10⁵細胞/cm²の密度でヒドロゲルアレイ上に播種し、EGM2増殖サプリメントを補足したM199中でインキュベートした。ここで、EGM2中のVEGF濃度は、5 ng/mLで定義された。播種の24時間および48時間後に写真撮影した。結果を図27A-27Cに示す。

10

【実施例 9】

【0131】

本実施例では、制御された剛性およびCRGDS(配列番号：2)を有するPEG-ヒドロゲルアレイ製剤を形成し、細胞播種後24時間~48時間、封入されたHUVECによる細管形成をサポートする能力について分析した。

20

【0132】

リン酸緩衝生理食塩水中、36、42または60 mg/mLの、0~2 mMのCRGDS(配列番号：2)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、2 mMの総接着ペプチド濃度を維持するための追加CRDGS(配列番号：32)スクランブル接着ペプチド、PEGに対して2xモル過剰濃度のKCGPQGIWGQCK(配列番号：27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤を組み合わせることによって、ヒドロゲル溶液を作成した。溶液を、UV光(90 mW/cm²、365 nm、2秒)下、重合させてヒドロゲルにした。HUVECを、2.0 x 10⁷細胞/cm²の密度でヒドロゲルに封入し、EGM2増殖サプリメントを補足したM199中でインキュベートした。細胞を、セルトラッカーグリーンCMFDAで染色し、播種の24時間後に写真撮影し、スポット中の総細管長さについて採点した。結果を図18、28および29に示す。特に、図28Aおよび28Bに示すように、SU5416 VEGFインヒビターの存在下、1または2 mMのCRDGS(配列番号：2)を含む中弾性率ゲル、または2 mMのCRGDS(配列番号：2)を含む低弾性率ゲルは、細管を一貫して生成した。

30

【実施例 10】

【0133】

実施例 9と同様に、本実施例では、制御された剛性およびCRGDS(配列番号：2)を有するPEG-ヒドロゲルアレイ製剤を形成し、細胞播種後24、48および72時間まで、封入されたHUVECによる細管形成をサポートする能力について分析した。

40

【0134】

リン酸緩衝生理食塩水中、40 mg/mLの、2 mMのCRGDS(配列番号：2)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、0.3 mMの総結合ペプチド濃度を維持するための0または0.07 mMのCE[Fd][Ad][Yd][Ld]IDFNWEYPASK(配列番号：35)VEGF結合ペプチド、さらなるCD[Ad]PYN[Fd]EFAWE[Yd]VIS[Ld]K(配列番号：36)スクランブルVEGF結合ペプチド、PEGに対して2xモル過剰濃度のKCGPQGIWGQCK(配列番号：27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤を組み合わせることによって、ヒドロゲル溶液を作成した。溶液を、HUVECとともに、UV光(90 mW/cm²、365 nm、3秒)下、重合させてヒドロゲルにした。HUVECを、2.0 x 10⁷細胞/cm²の密度でヒドロゲルに封入し、10 ng/mLで定義されたVEGF濃度を有するEGM2増殖サプリメントを補足したM199中でインキュベートした。細胞を、セル

50

トラッカーグリーンCMFDAで染色し、播種の5、24、48および72時間後に写真撮影し、スポット中の総細管長さについて採点した。図30Aおよび30Bに示すように、細管ネットワークは、培養中72時間まで安定であった。

【実施例 1 1】

【0 1 3 5】

本実施例では、制御された剛性およびCRGDS(配列番号:2)を有するPEG-ヒドロゲルアレイ製剤を形成し、細胞播種後48時間を越えて、封入されたiPSC由来内皮細胞による細管形成をサポートする能力について分析した。

【0 1 3 6】

リン酸緩衝生理食塩水中、40 mg/mLの、2 mMのCRGDS(配列番号:2)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、PEGに対して2xモル過剰濃度のKCGPQGIWGQCK(配列番号:27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤を組み合わせることによって、ヒドロゲル溶液を作成した。溶液を、PDMSマイクロチャネル内で、iPSC由来内皮細胞とともに、UV光(90 mW/cm²、365 nm、3秒)下、重合させてヒドロゲルにした。iPSC由来内皮細胞を、1.0および8.5 x 10⁷細胞/cm²の密度でヒドロゲルに封入し、VASCULIFE基礎培地、Cellular Dynamics International(CDI)(ウィスコンシン州、マディソン)からの内皮増殖サプリメントおよび200-1000 ng/mL VEGF中でインキュベートした。細胞を、細胞封入から8および9日後に写真撮影した。図31Aおよび31Bに示すように、製剤中に封入されたiPSC由来内皮細胞は、少なくとも9日間まで亜安定な細管ネットワークを生成した。

10

20

【実施例 1 2】

【0 1 3 7】

実施例 1 1と同様に、本実施例では、制御された剛性およびCRGDS(配列番号:2)を有するPEG-ヒドロゲルアレイ製剤を形成し、細胞播種後48時間を越えて、封入されたiPSC由来内皮細胞による細管形成をサポートする能力について分析した。

【0 1 3 8】

リン酸緩衝生理食塩水中、40 mg/mLの、2 mMのCRGDS(配列番号:2)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、PEGに対して2xモル過剰濃度のKCGPQGIWGQCK(配列番号:27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤を組み合わせることによって、ヒドロゲル溶液を作成した。溶液およびiPSC由来内皮細胞を、UV光(5-10 mW/cm²、365 nm、2分)下、重合させてヒドロゲルにした。iPSC由来内皮細胞を、5.0 x 10⁶細胞/cm²の密度でヒドロゲルに封入し、VASCULIFE基礎培地およびCDIからの内皮増殖サプリメント中でインキュベートした。細胞を、細胞封入から1、2、3および5日後に写真撮影した。図32Aおよび32Bに示すように、製剤中に封入されたiPSC由来内皮細胞は、少なくとも5日間まで亜安定な細管ネットワークを生成した。

30

【0 1 3 9】

さらに、封入の24時間後、リン酸緩衝生理食塩水中、40 mg/mLの、接着ペプチドなしの20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、PEGに対して2.4xモル過剰濃度のKCGPQGIWGQCK(配列番号:27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤からなる第二のヒドロゲル溶液を最初のヒドロゲルアレイの周囲に分注した。補強ヒドロゲルを、UV光(5-10 mW/cm²、365 nm、2分)下で硬化させた。細胞を、VASCULIFE基礎培地およびCDIからの内皮増殖サプリメント中でインキュベートし、ヒドロゲル強化の14日後に写真撮影した。結果を図33A-33Dに示す。

40

【実施例 1 3】

【0 1 4 0】

本実施例では、制御された剛性およびCRGDS(配列番号:2)を有するPEG-ヒドロゲルアレイ製剤を形成し、細胞播種後48時間を越えて、内皮細胞源からの細管血管新生出芽をサポートする能力について分析した。

【0 1 4 1】

iPSC由来内皮細胞を、4.0 x 10⁷細胞/mLの密度で、リン酸緩衝生理食塩水中の、40 mg/

50

mLの、2~4mMのCRGDS(配列番号:2)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、PEGに対して1.8~2.2xモル過剰濃度のKCGPQGIWGQCK(配列番号:27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤からなる0.5 μ Lのヒドロゲルスフェアに封入した。UV光(175 mW/cm²、365 nm、1.2秒)下、ピペットチップの末端でスフェアを硬化させた。スフェアを、VASCULIFE基礎培地およびCDIからの内皮増殖サプリメント中、一夜インキュベートした後、最初のスフェアの周囲に、10 μ Lの第二の等しいヒドロゲル製剤を供給した。UV光(4.5 mW/cm²、365 nm、30秒)下、第二のヒドロゲルアレイを硬化させ、細胞を、VASCULIFE基礎培地およびCDIからの内皮増殖サプリメント中、さらに3日間インキュベートした。図34Aおよび34Bに示すように、CRGDS(配列番号:2)を含むヒドロゲルアレイ製剤は、局在化された細胞源からの内皮毛細管出芽をサポートした。

10

【実施例14】**【0142】**

本実施例では、2セットのヒドロゲルアレイを形成し、その中にペプチドを組み込む能力について分析した。

【0143】

リン酸緩衝生理食塩水中、80 mg/mLの、0~4 mMのCRGDS(配列番号:2)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、8-アームPEGに対して1:1モル比の3.4 kDaのジチオール化PEG架橋剤および0.05% IRGACURE 2959光開始剤を用いて、第一のヒドロゲルアレイを製造した。リン酸緩衝生理食塩水中、90 mg/mLの、0~2 mMのCRGDS(配列番号:2)接着ペプチドを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、8-アームPEGに対して2xモル過剰濃度の3.4 kDaのジチオール化PEG架橋剤および0.05% IRGACURE 2959光開始剤を用いて、第二のヒドロゲルアレイを製造した。スルホジクロロフェノールエステル媒介性反応は、ペンダントペプチドのN末端をフルオレセインで標識し、落射蛍光顕微鏡下でスポットを写真撮影した。図35Aおよび35Bに示すように、蛍光強度は、初期ペプチド濃度に比例して増加し、ヒドロゲルアレイへの制御されたペプチド組み込みを示す。

20

【実施例15】**【0144】**

本実施例では、ノルボルネン官能化20 kDaの8-アーム分子を、CRGDS(配列番号:2)ペプチドに反応させて、チオール-エン反応を介してPEGにペプチドを結合させる効率を評価した。

30

【0145】

リン酸緩衝生理食塩水中、PEGを、0、1または2xモル過剰のCRGDS(配列番号:2)および0.05% IRGACURE 2959光開始剤と組み合わせた。溶液を、UV光(4.5 mW/cm²、365 nm、3分)で反応させ、脱イオン水で透析した。生成物を凍結乾燥し、NMR分析のためにCDCl₃に溶解した。図36A-36Cに示すように、PEGへのペンダントペプチドの結合効率は、未反応PEGNBと比較した5.8-6.2 ppm領域におけるピーク減少を計算することによって観察されうる。さらにシグナル減少は、モル過剰ペプチドに比例して増加した。

【実施例16】**【0146】**

本実施例では、さまざまな濃度のPEGおよび/またはさまざまな濃度の架橋分子を用いてヒドロゲルアレイを形成し、せん断弾性率について分析した。

40

【0147】

リン酸緩衝生理食塩水中、20~100 mg/mLの、0.27 mMのVEGF結合ペプチドまたはスクランブル等価物を有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、PEGに対して1-4xモル過剰濃度の3.4 kDaのジチオール化PEG架橋分子またはKCGPQGIWGQCGK(配列番号:27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤を組み合わせることによって、ヒドロゲル溶液を作成した。溶液を、UV光(365 nm)下、重合させてヒドロゲルにした。リン酸緩衝生理食塩水中での24時間の膨潤後、サンプルを直径8 mmのディスクに切断し、平行板レオメータ下、せん断弾性率について試験した。図37A-37Dに示すように、せん断弾性率は、PEG濃度および架橋密度とともに増加した。

50

【実施例 17】

【0148】

本実施例では、PEG-ヒドロゲル表面を分析して、CRGDS(配列番号：2)または環状RGD接着ペプチドのいずれかをヒドロゲルが提供し、0-10 ng/mLのVEGFが内皮増殖培地に添加される場合の、該表面が、播種の24時間および48時間後におけるHUVECおよびIPSC由来内皮細胞による細管ネットワーク形成をサポートする能力を決定した。

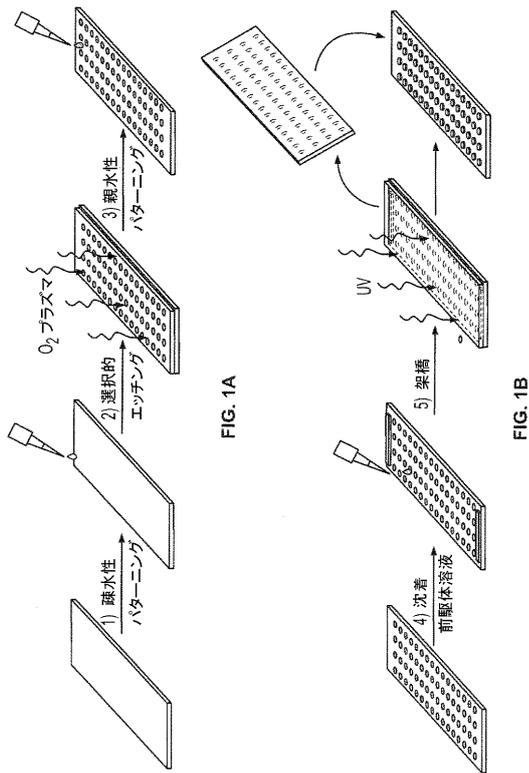
【0149】

リン酸緩衝生理食塩水中、40、50または70 mg/mLの、0~1 mMの環状RGD[Fd]C(配列番号：33)接着ペプチドまたは0~4 mMのCRGDS(配列番号：2)接着ペプチドのいずれかを有する20 kDaの8-アームノルボルネン官能化PEG、1または4 mMのそれぞれの総接着ペプチド濃度を維持するためのさらなるCRDGS(配列番号：32)スクランブル接着ペプチド、PEGに対して2xモル過剰濃度のKCGGPQGIWGQCGK(配列番号：27)架橋ペプチドおよび0.05% IRGACURE 2959光開始剤を組み合わせることによって、ヒドロゲル前駆体溶液を製造した。溶液を、UV光(4.5 mW/cm²、365 nm、4分)下、重合させてヒドロゲルにした。HUVECまたはIPSC誘導ECのいずれかを8.5 x 10⁴細胞/cm²の密度でヒドロゲルアレイ上に播種し、EGM2増殖サプリメント(HUVECS)を補足したMedia 199またはCDIからの内皮増殖サプリメント(IPSC由来EC)を補足したVASCULIFE基礎培地のいずれか中でインキュベートした。特定の条件下で、培地に5または10 ng/mLのVEGFを補足した。播種の24および48時間後に写真撮影し、非接着、低細胞接着、単層形成およびネットワーク形成として採点した。結果を図38-41に示す。

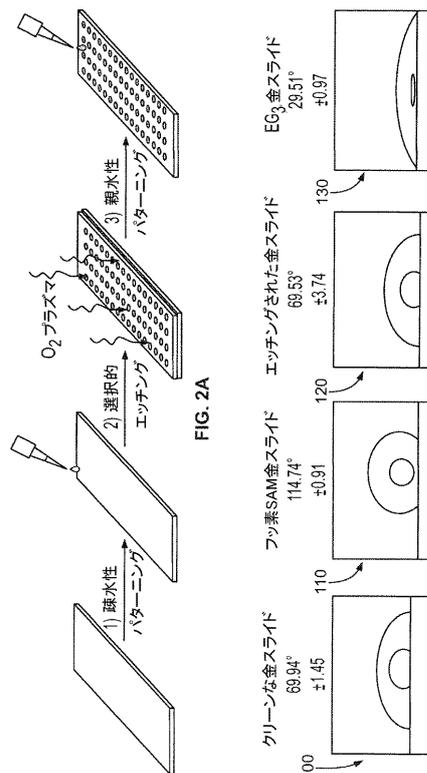
10

20

【図 1 A - 1 B】



【図 2 A - 2 B】



【 図 3 】

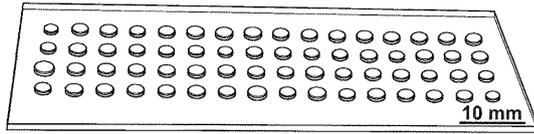


FIG. 3

【 図 4 】

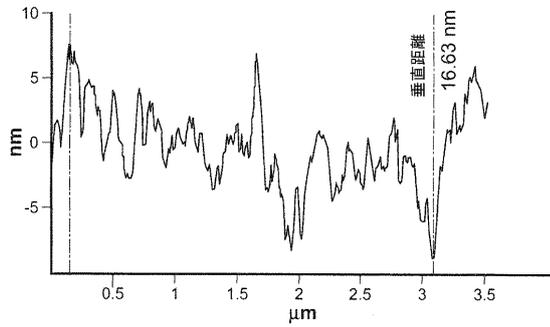


FIG. 4

【 図 5 】

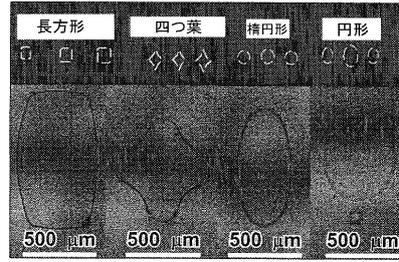


FIG. 5

【 図 6 】



FIG. 6

【 図 7 】

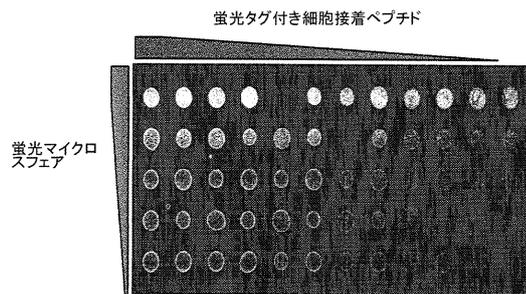


FIG. 7

【 図 8 】

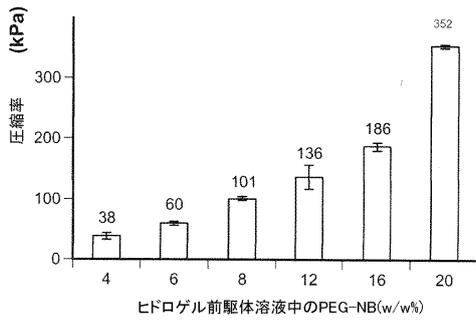


FIG. 8

【 図 9 】

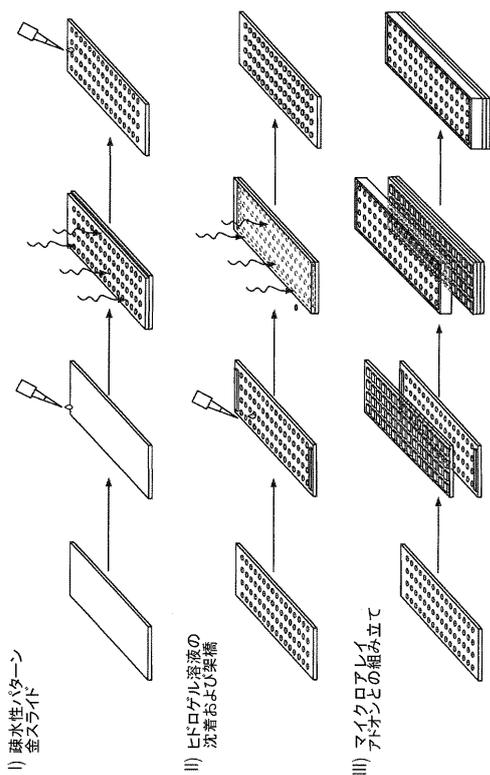


FIG. 9

【 10 A - 10 C 】

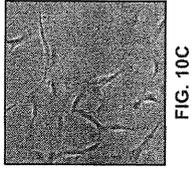


FIG. 10C

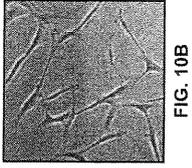


FIG. 10B

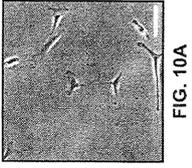


FIG. 10A

【 11 A - 11 C 】

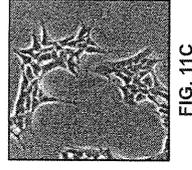


FIG. 11C

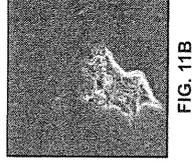


FIG. 11B

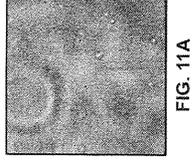


FIG. 11A

【 12 A - 12 B 】

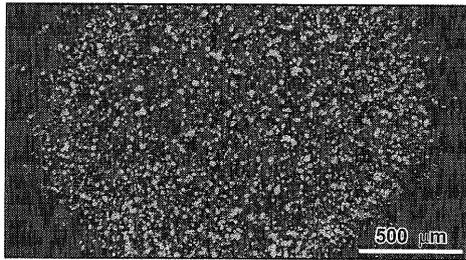


FIG. 12A

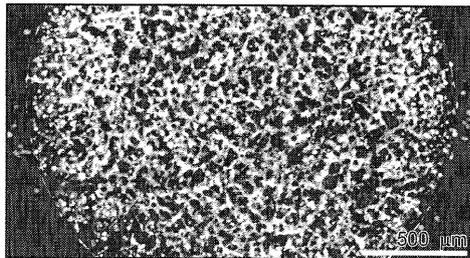


FIG. 12B

【 12 C 】

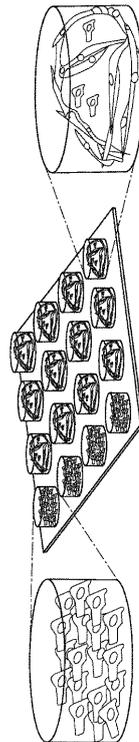


FIG. 12C

【 図 1 3 A 】

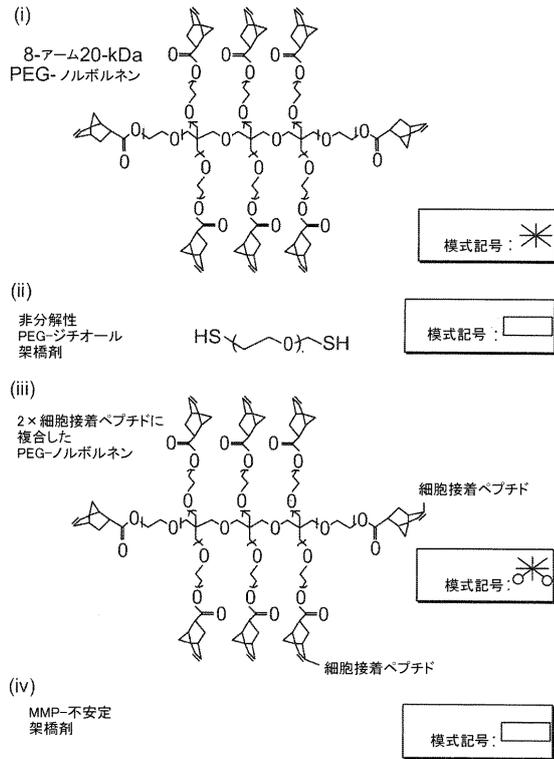


FIG. 13A

【 図 1 3 B - 1 3 C 】

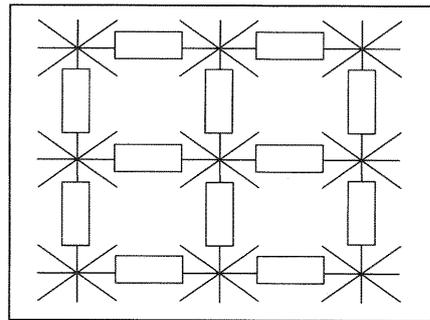


FIG. 13B

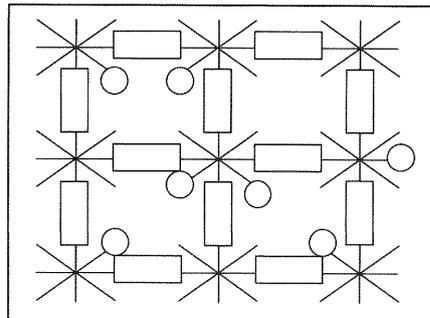
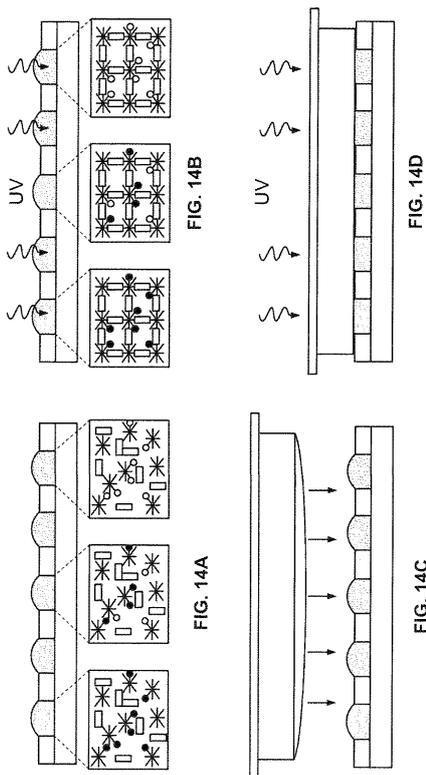


FIG. 13C

【 図 1 4 A - 1 4 D 】



【 図 1 4 E 】

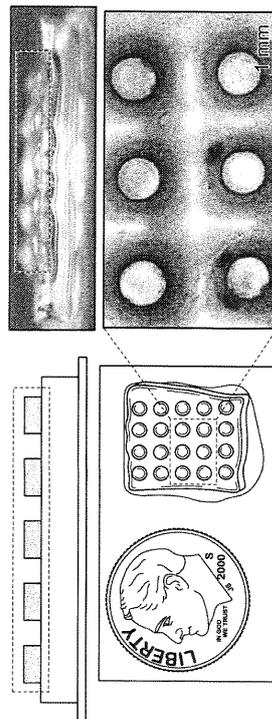


FIG. 14E

【 図 1 5 A - 1 5 B 】

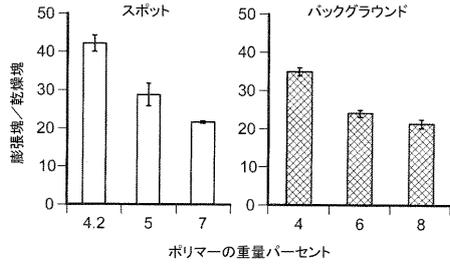


FIG. 15A

【 図 1 5 C - 1 5 D 】

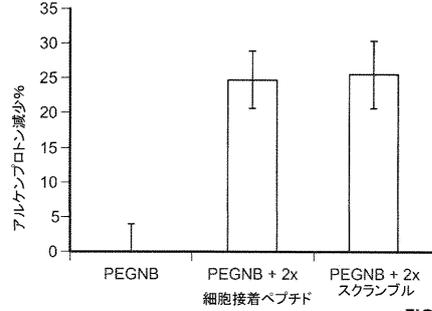


FIG. 15C

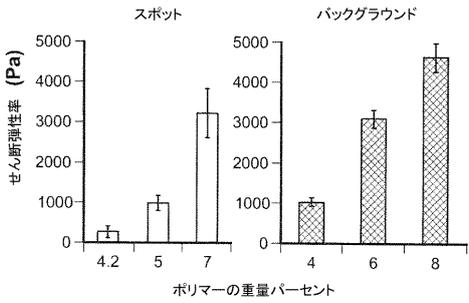


FIG. 15B

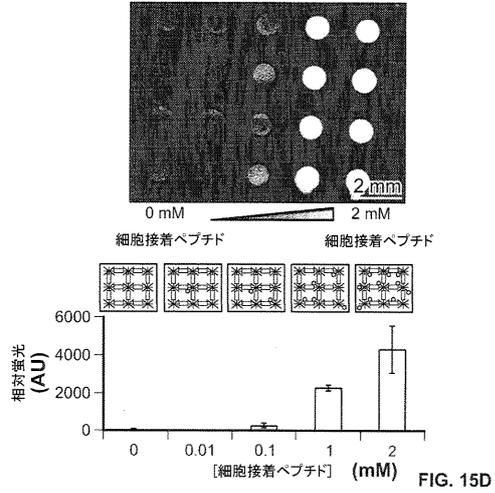


FIG. 15D

【 図 1 6 A - 1 6 B 】

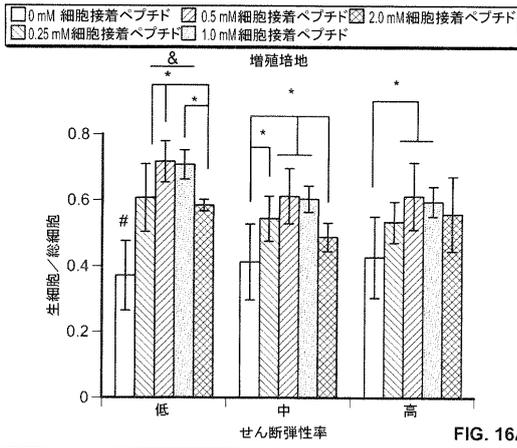


FIG. 16A

【 図 1 6 C 】

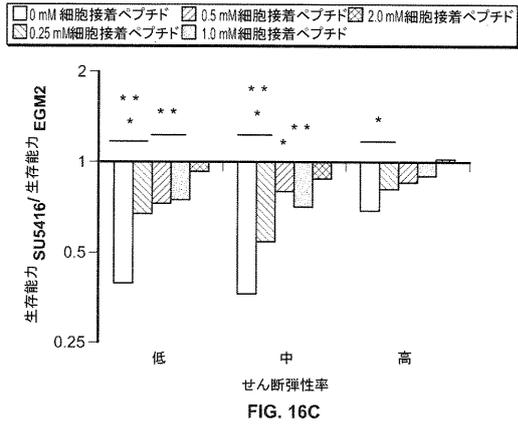


FIG. 16C

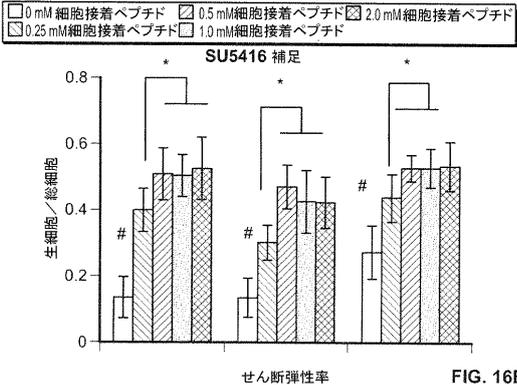
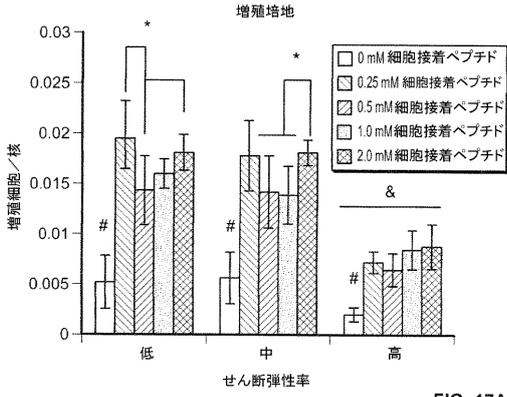
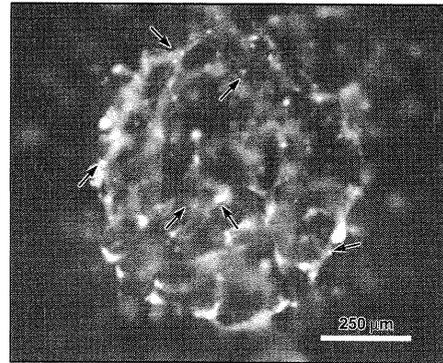
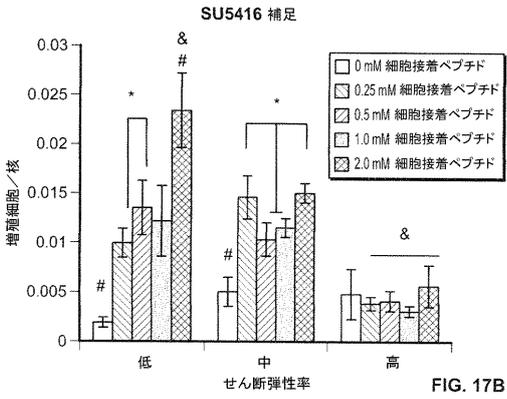
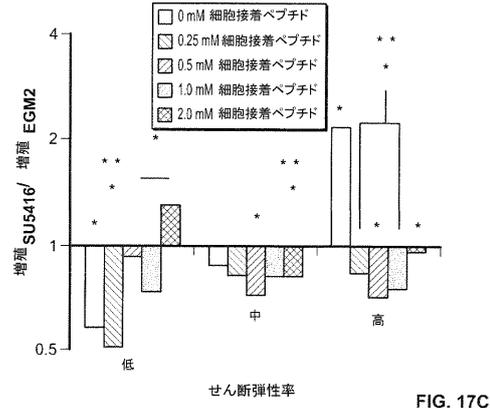


FIG. 16B

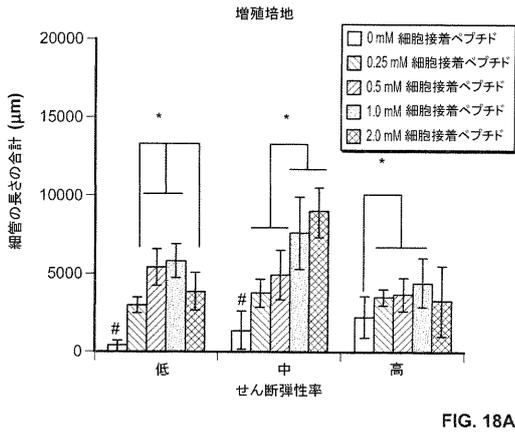
【図 17 A - 17 B】



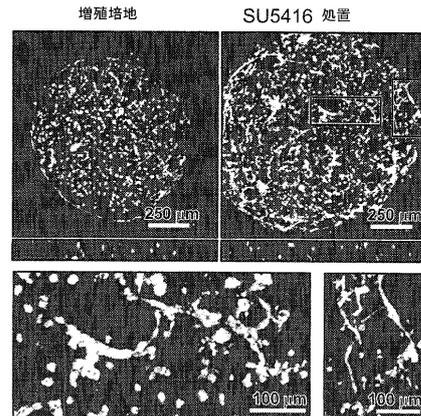
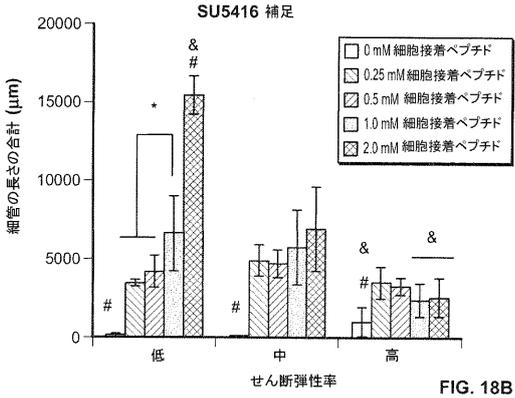
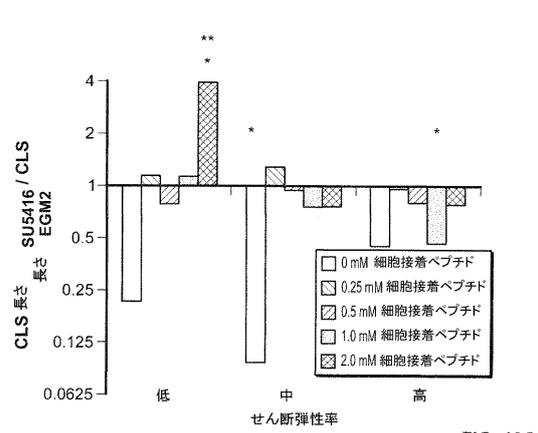
【図 17 C - 17 D】



【図 18 A - 18 B】



【図 18 C - 18 D】



【 図 19 A - 19 B 】

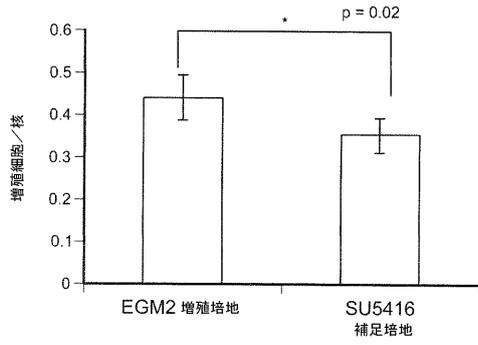


FIG. 19A

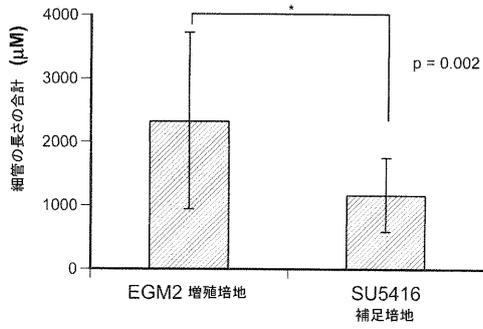


FIG. 19B

【 図 19 C - 19 D 】

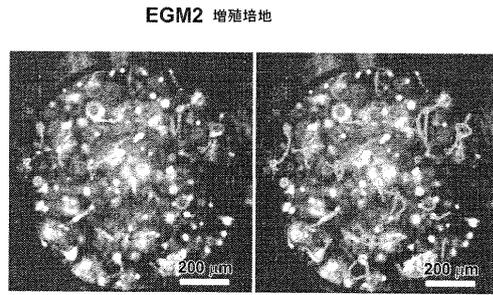


FIG. 19C

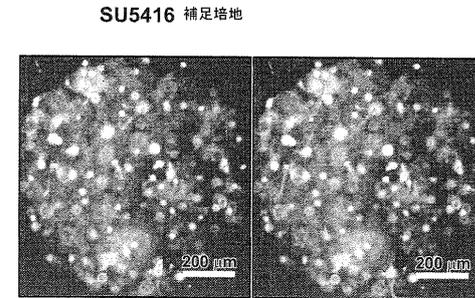


FIG. 19D

【 図 20 A - 20 B 】

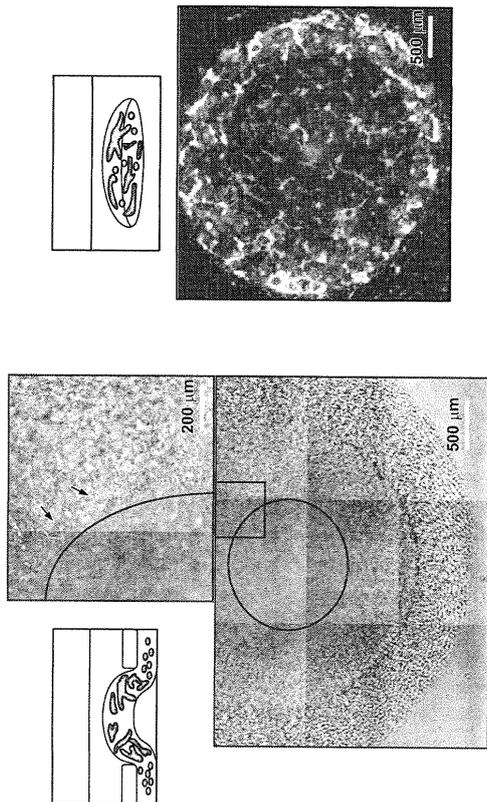


FIG. 20B

FIG. 20A

【 図 21 】

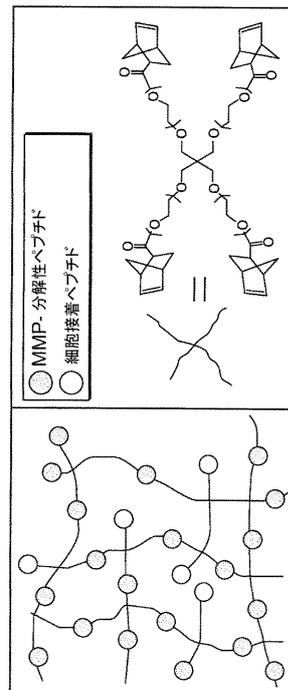


FIG. 21

【 図 2 2 A - 2 2 E 】

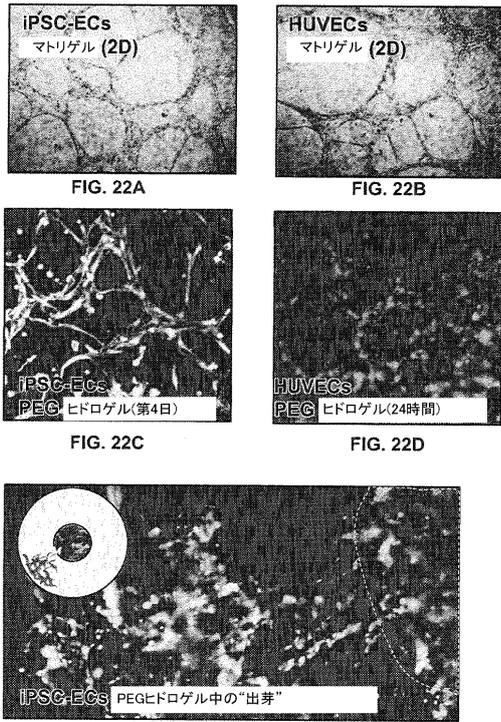
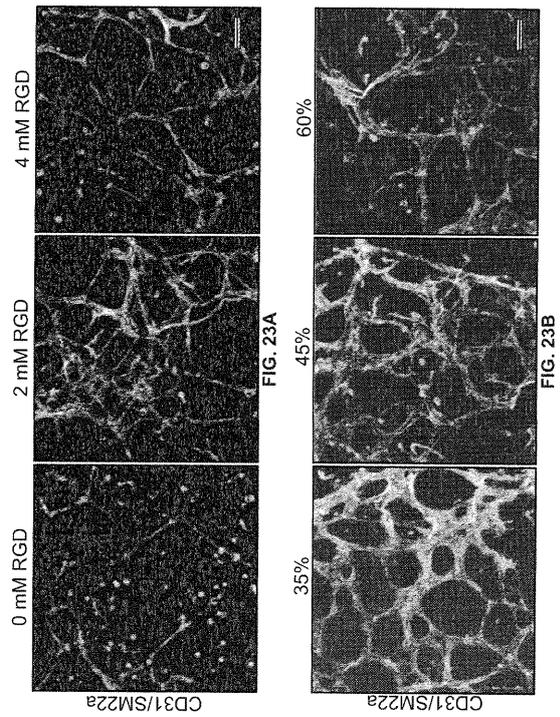


FIG. 22E

【 図 2 3 A - 2 3 B 】



【 図 2 3 C - 2 3 D 】

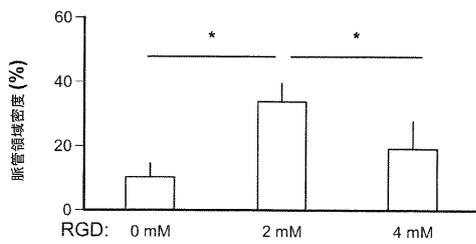


FIG. 23C

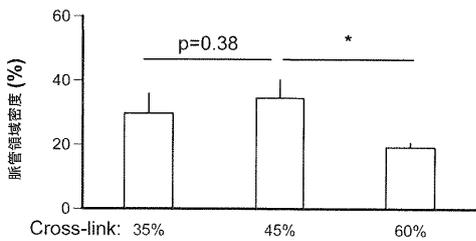


FIG. 23D

【 図 2 3 E 】

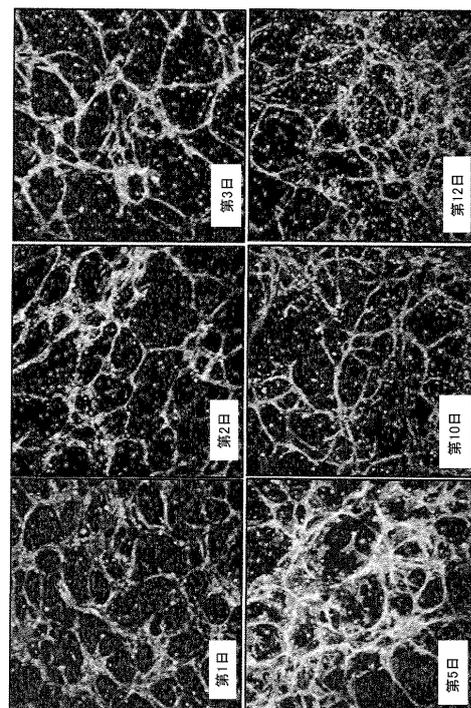


FIG. 23E

【図 24A - 24B】

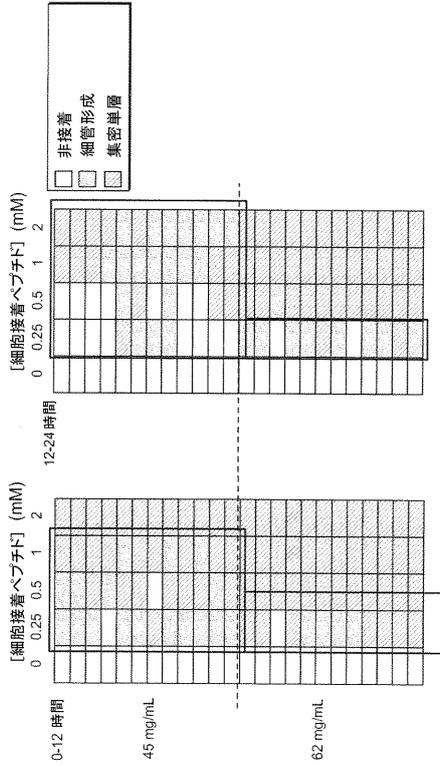


FIG. 24A

FIG. 24B

【図 25A】

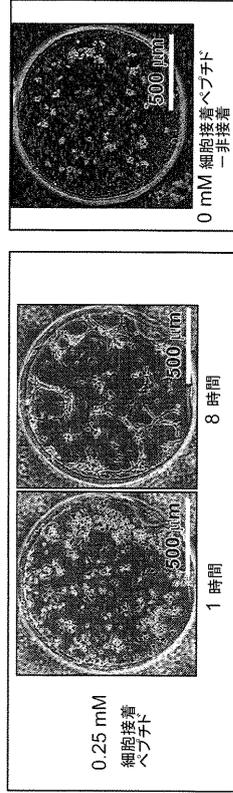


FIG. 25A

【図 25B】

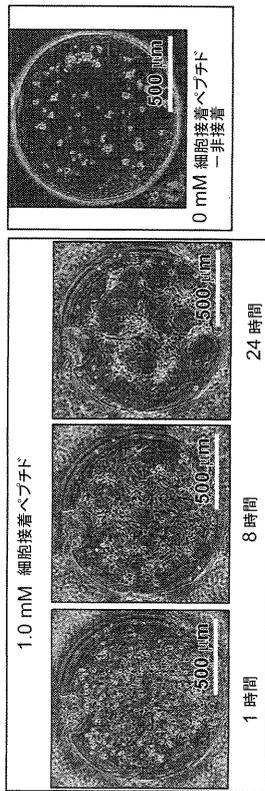


FIG. 25B

【図 25C】

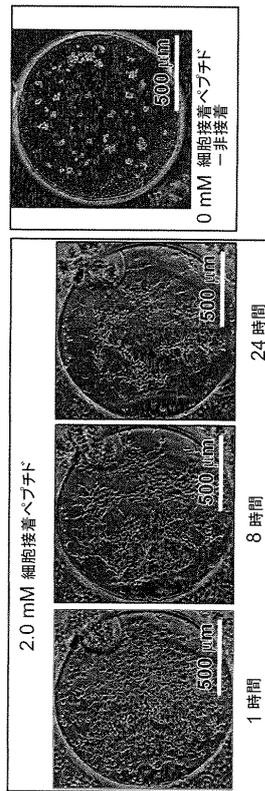
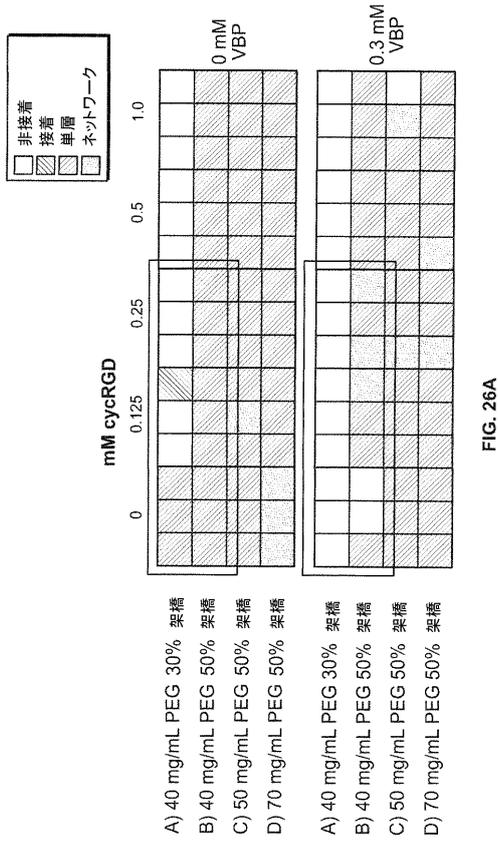
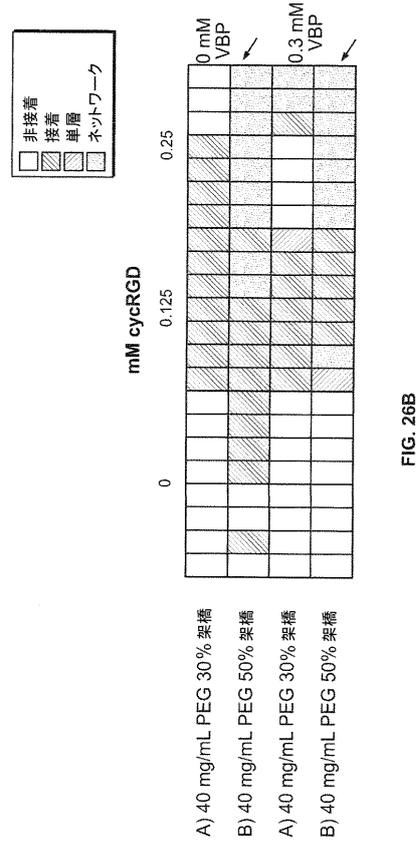


FIG. 25C

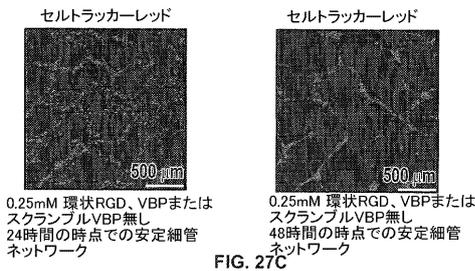
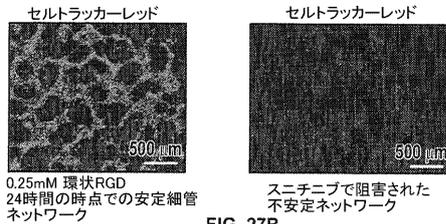
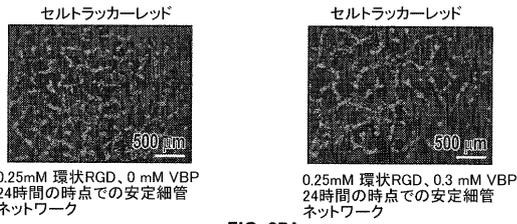
【図 26A】



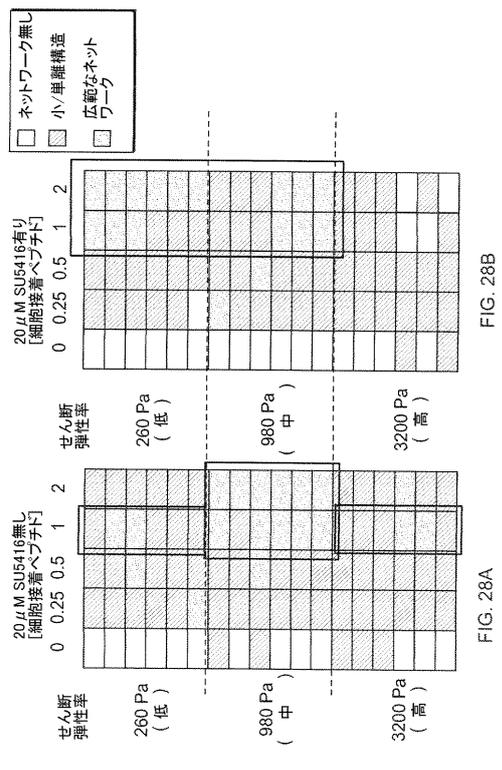
【図 26B】



【図 27A - 27C】



【図 28A - 28B】



【 図 29 A - 29 B 】

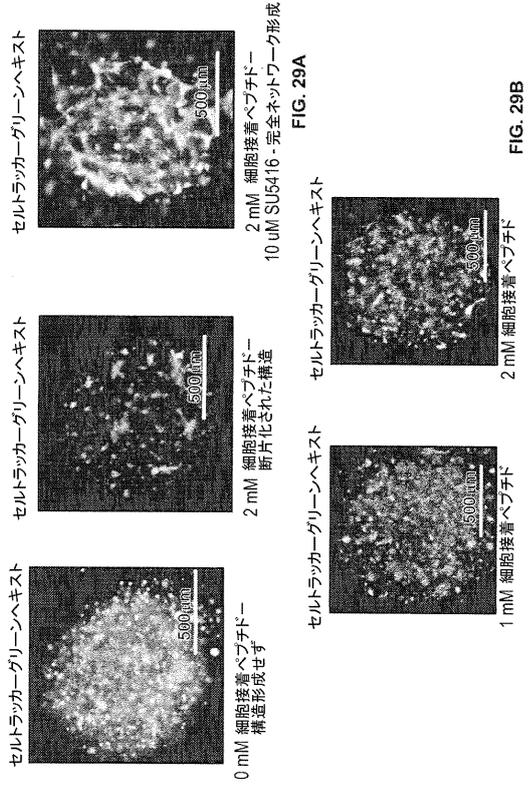


FIG. 29A

FIG. 29B

【 図 30 A 】

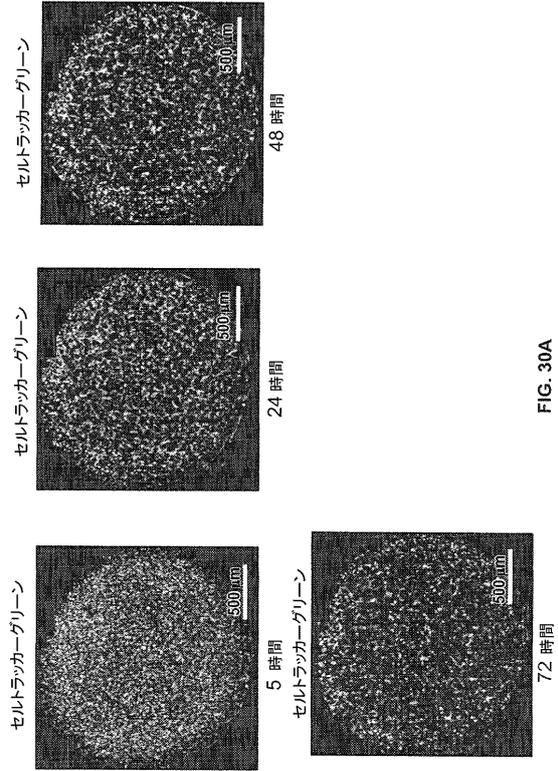


FIG. 30A

【 図 30 B 】

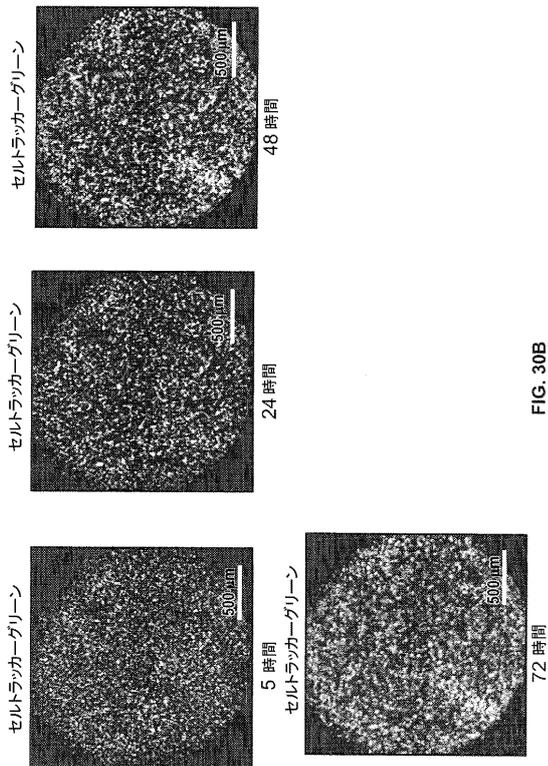


FIG. 30B

【 図 31 A - 31 B 】

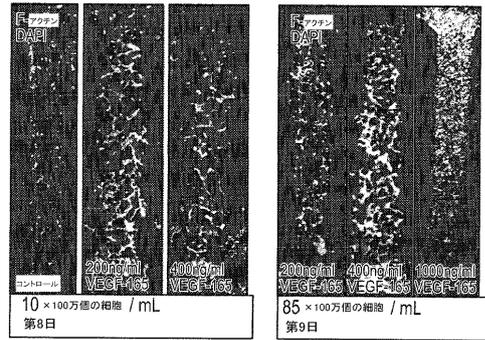


FIG. 31A

FIG. 31B

【 図 32 】

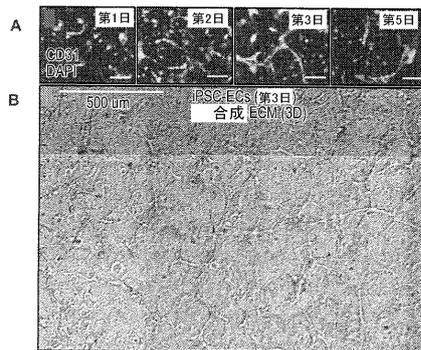


FIG. 32

【 図 3 3 A - 3 3 C 】

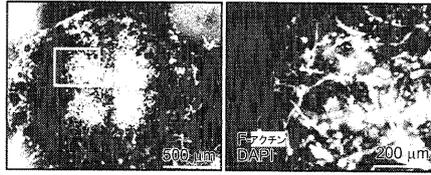


FIG. 33A

FIG. 33B

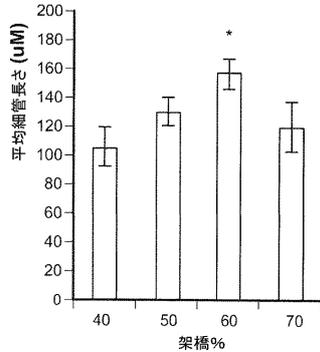


FIG. 33C

【 図 3 3 D 】

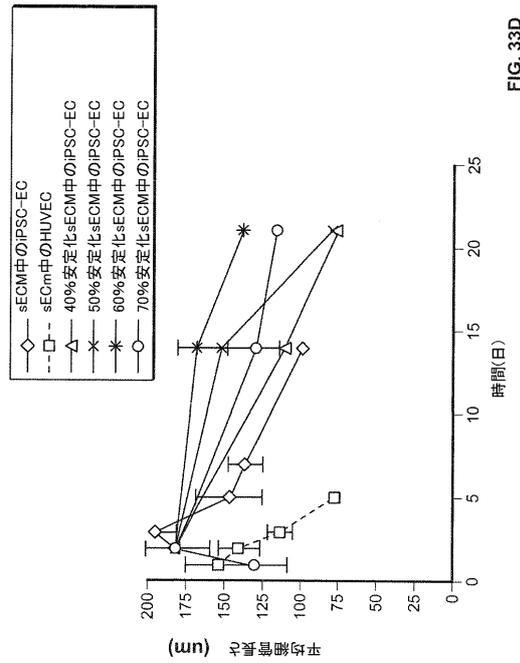


FIG. 33D

【 図 3 4 A - 3 4 B 】

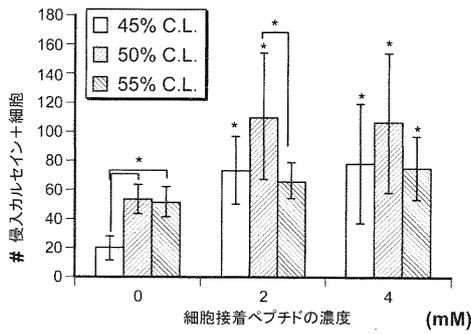


FIG. 34A

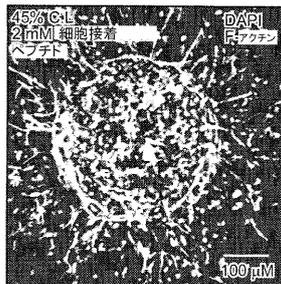


FIG. 34B

【 図 3 5 A - 3 5 B 】

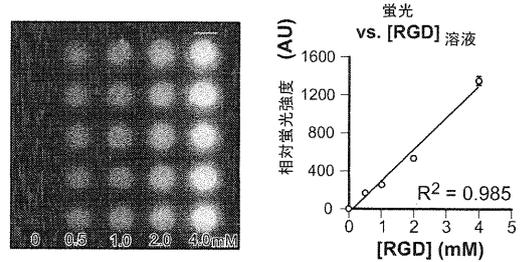


FIG. 35A

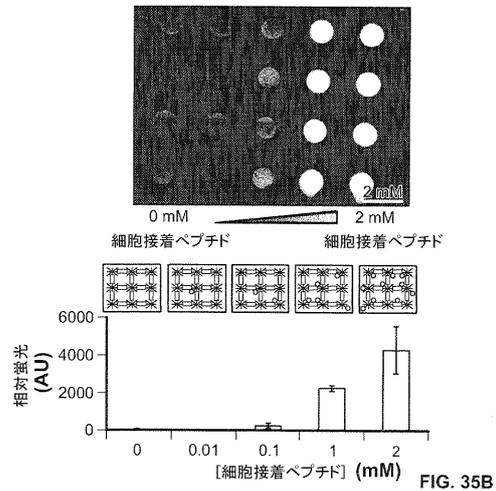
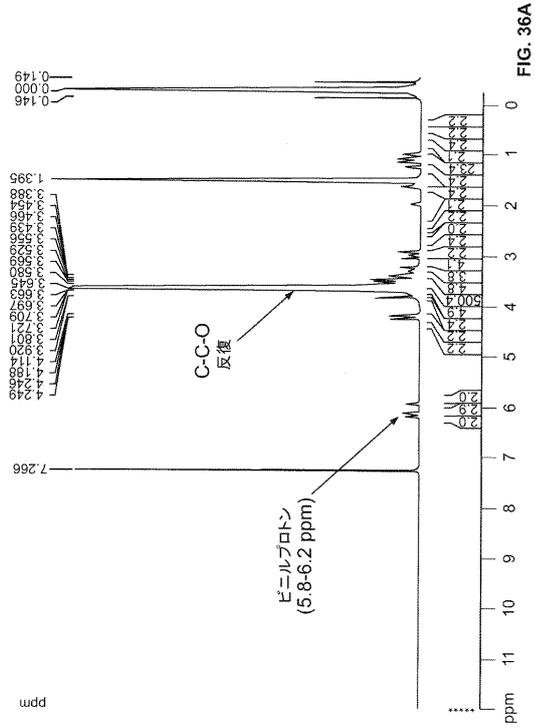


FIG. 35B

【 図 3 6 A 】



【 図 3 6 B - 3 6 C 】

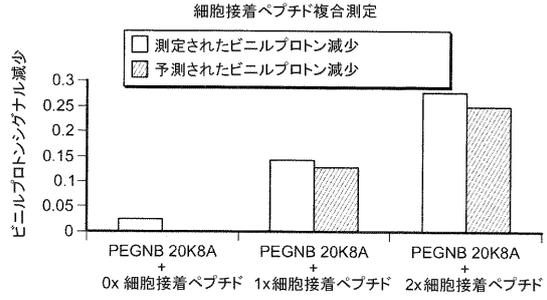


FIG. 36B

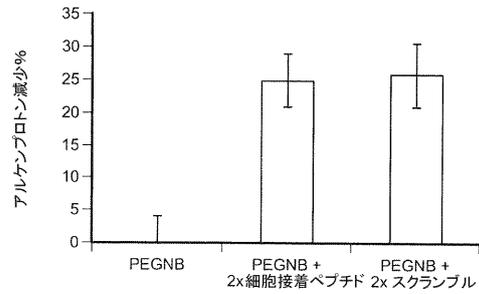
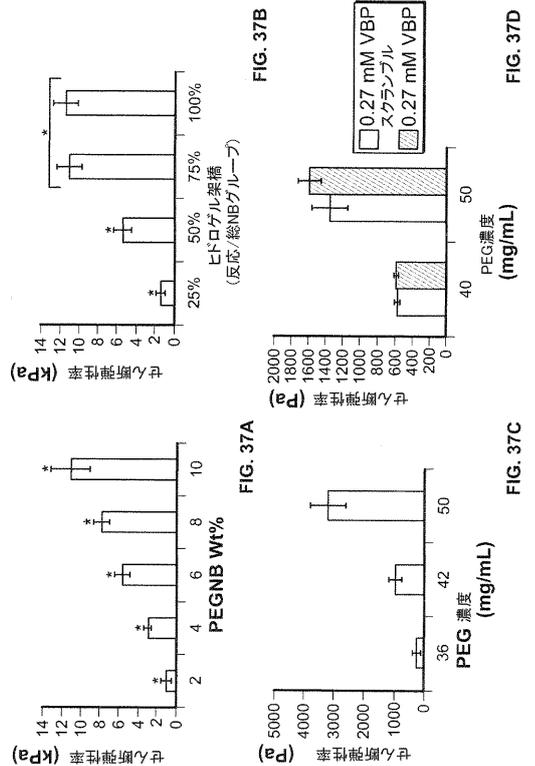


FIG. 36C

【 図 3 7 A - 3 7 D 】



【 図 3 8 A - 3 8 B 】

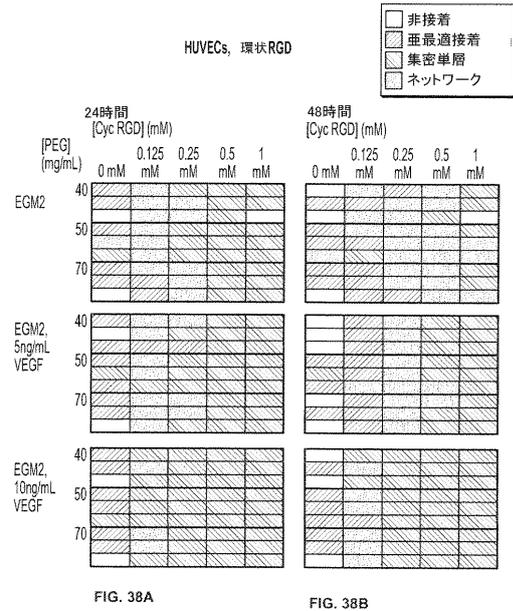
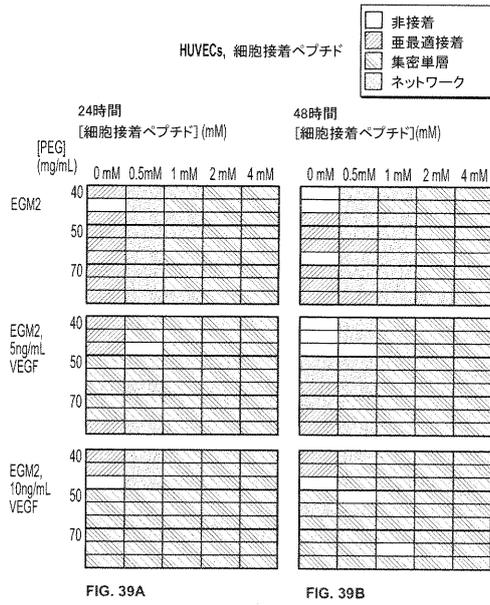


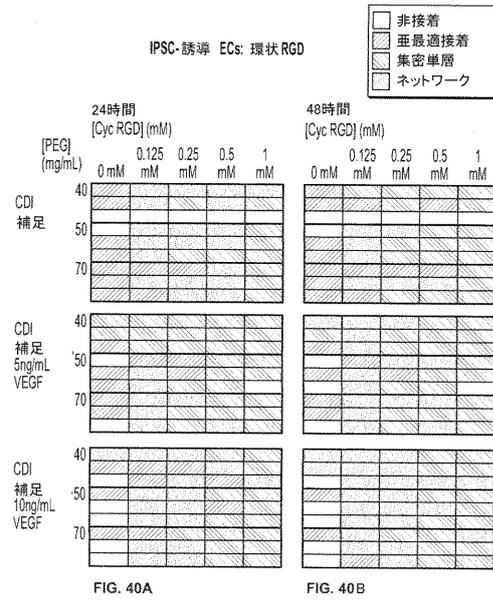
FIG. 38A

FIG. 38B

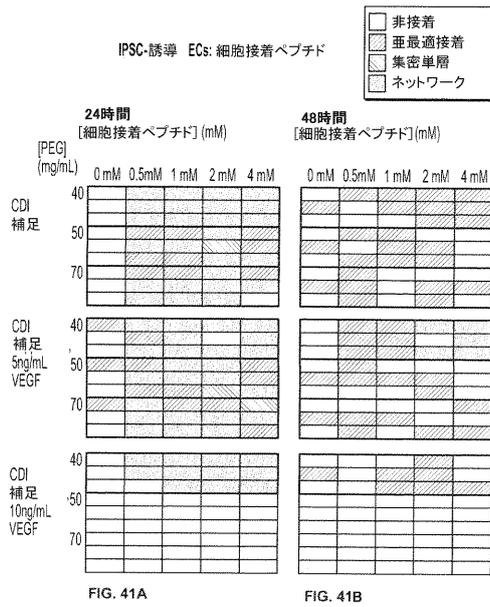
【 図 3 9 A - 3 9 B 】



【 図 4 0 A - 4 0 B 】



【 図 4 1 A - 4 1 B 】



【配列表】

2017513473000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年11月21日(2016.11.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2017513473000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/025473
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/02(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, C12N 5/02(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i		
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) C12Q 1/02; C12N 5/00; C12N 5/02; B05D 1/36; A61K 38/18; C40B 30/04; G01N 33/50; C12N 5/071		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: hydrogel, tubulogenesis, PEG-NB, crosslinking peptide, cell adhesion peptide, soluble factor binder		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KYBURZ et al., "Three-dimensional hMSC motility within peptide-functionalized PEG-based hydrogels of varying adhesivity and crosslinking density" Acta Biomaterialia, Vol.9, No.5, pp.6381-6392 (2013) See abstract; and pages 6382-6384.	1-20
Y	LESLIE-BARBICK et al., "The promotion of microvasculature formation in poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels by an immobilized VEGF-mimetic peptide" Biomaterials, Vol.32, No.25, pp.5782-5789 (2011) See abstract; and page 5783.	1-20
A	US 2012-0225814 A1 (HANJAYA-PUTRA et al.) 06 September 2012 See the whole document.	1-20
A	US 2013-0260464 A1 (VANNIER et al.) 03 October 2013 See the whole document.	1-20
A	US 2013-0296177 A1 (KOEPESEL et al.) 07 November 2013 See the whole document.	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 17 July 2015 (17.07.2015)		Date of mailing of the international search report 17 July 2015 (17.07.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2015/025473

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012-0225814 A1	06/09/2012	CA 2780490 A1	19/05/2011
		EP 2504432 A2	03/10/2012
		EP 2504432 A4	02/07/2014
		IL 219728 D0	31/07/2012
		US 8900868 B2	02/12/2014
		WO 2011-060095 A2	19/05/2011
		WO 2011-060095 A3	24/11/2011
US 2013-0260464 A1	03/10/2013	AU 2011-268951 A1	10/01/2013
		AU 2011-268951 B2	07/08/2014
		CA 2802557 A1	29/12/2011
		EP 2585586 A1	01/05/2013
		JP 2013-529464 A	22/07/2013
		WO 2011-161172 A1	29/12/2011
US 2013-0296177 A1	07/11/2013	US 2014-0113835 A1	24/04/2014
		US 8642516 B2	04/02/2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/025473**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0793 (2010.01)	C 1 2 N 5/0793	
C 1 2 N 5/0797 (2010.01)	C 1 2 N 5/0797	
C 1 2 N 5/09 (2010.01)	C 1 2 N 5/09	
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077	

(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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

- (74) 代理人 100156144
弁理士 落合 康
- (72) 発明者 ウィリアム・エル・マーフィー
アメリカ合衆国 5 3 5 9 7 ウィスコンシン州ワウナキー、ブルーバード・トレイル 1 1 1 8 番
- (72) 発明者 ゴク・ニ・レ
アメリカ合衆国 3 0 0 9 3 ジョージア州ノークロス、ローズミア・コート 4 6 0 1 番
- (72) 発明者 マイケル・ピー・シュワルツ
アメリカ合衆国 5 3 7 1 8 ウィスコンシン州マディソン、キングス・ミル・サークル 1 8 番、ナンバー 3 1 1
- (72) 発明者 エリック・ファイ・ダン・グエン
アメリカ合衆国 5 3 7 2 6 ウィスコンシン州マディソン、ユニバーシティ・アベニュー 2 1 2 1 番、アパートメント 1 9
- (72) 発明者 ステファン・ゾーン
アメリカ合衆国 5 3 7 2 6 ウィスコンシン州マディソン、ケンドール・アベニュー 2 3 1 4 番
- (72) 発明者 ハミシャ・アルダラニ
アメリカ合衆国 5 3 7 0 5 ウィスコンシン州マディソン、シェボイガン・アベニュー 4 7 1 5 番、アパートメント 2 1 6
- (72) 発明者 マシュー・ザノテッリ
アメリカ合衆国 5 3 1 5 0 ウィスコンシン州マスケゴ、マーティン・ドライブ・サウス 6 8 ・ウエスト 1 7 0 3 1
- (72) 発明者 マシュー・ブライアン・パーラート
アメリカ合衆国 5 3 7 2 6 ウィスコンシン州マディソン、チェンバレン・アベニュー 4 0 1 番、アパートメント 1
- (72) 発明者 デイビッド・グレゴリー・ベルエア
アメリカ合衆国 5 3 7 1 5 ウィスコンシン州マディソン、ピラス・アベニュー 1 0 0 2 番、アパートメント 2
- (72) 発明者 ウィリアム・ティ・デイリー
アメリカ合衆国 5 3 7 0 5 ウィスコンシン州マディソン、ウエスト・ゴーハム・ストリート 4 2 0 番、アパートメント 3 0 8

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QR48 QR77 QR80

4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 BA30 BB06 BB19 BC46 CA44

4H045 AA10 AA30 BA15 BA16 BA17 CA40 EA20 EA60 FA20