

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7104425号

(P7104425)

(45)発行日 令和4年7月21日(2022.7.21)

(24)登録日 令和4年7月12日(2022.7.12)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 L	27/22	(2006.01)	A 6 1 L	27/22
A 6 1 L	27/10	(2006.01)	A 6 1 L	27/10
A 6 1 L	27/20	(2006.01)	A 6 1 L	27/20
A 6 1 L	27/12	(2006.01)	A 6 1 L	27/12
A 6 1 L	27/44	(2006.01)	A 6 1 L	27/44

請求項の数 37 (全44頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-536339(P2019-536339)
 (86)(22)出願日 平成29年9月20日(2017.9.20)
 (65)公表番号 特表2019-529022(P2019-529022 A)
 (43)公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)
 (86)国際出願番号 PCT/GB2017/052796
 (87)国際公開番号 WO2018/055361
 (87)国際公開日 平成30年3月29日(2018.3.29)
 審査請求日 令和2年9月1日(2020.9.1)
 (31)優先権主張番号 1615972.5
 (32)優先日 平成28年9月20日(2016.9.20)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 英国(GB)

(73)特許権者 519098040
 ラフト エンタープライジズ リミテッド
 イギリス国 エイチエー6 2アールエヌ
 ノースウッド ミドルセックス, マウン
 ト バーノン ホスピタル, レオポルド
 ミュラー ビルディング
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞外マトリックス材料

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

フィブリンまたはフィブリノゲン、および増量剤を含む架橋された足場であって、前記フィブリンまたはフィブリノゲンおよび前記増量剤が架橋されており、前記増量剤が前記フィブリンまたはフィブリノゲンに架橋されている、足場、ならびに

前記足場上に堆積しているセラミック

を含む、細胞外マトリックス材料。

【請求項2】

前記セラミックが、リン酸カルシウム鉱物相であるか、またはリン酸カルシウム鉱物相を含む、請求項1に記載の細胞外マトリックス材料。

【請求項3】

(a i) 前記増量剤が、アルギン酸塩、例えばアルギン酸ナトリウムまたは誘導体化アルギン酸塩、例えばプロピルグリコアルギン酸ナトリウムである、

(a i i) 前記増量剤が、グリコサミノグリカン (G A G ; 例えばコンドロイチン6-硫酸、コンドロイチン4-硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、キチン、キトサン、デキストラン硫酸またはヒアルロナン) である、あるいは

(a i i i) 前記増量剤が、ヒドロキシエチルデンプン、エチルセルロース、キサンタンガムおよびアガロースから選択される、請求項1または請求項2に記載の細胞外マトリックス材料。

【請求項4】

細胞外マトリックス材料を調製するための方法であって、セラミックを、フィブリンまたはフィブリノゲン、および増量剤を含む架橋された足場上に堆積させるステップを含み、ここで、前記フィブリンまたはフィブリノゲンおよび前記増量剤が架橋されており、前記増量剤が前記フィブリンまたはフィブリノゲンに架橋されている、方法。

【請求項 5】

前記セラミックが、リン酸カルシウム鉱物相である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記リン酸カルシウム鉱物相が、生物模倣堆積によって前記足場上に堆積させられる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、 Ca^{2+} および HPO_4^{2-} を含み、任意選択で i) Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 HCO_3^- 、 HPO_4^{2-} および SO_4^{2-} 、ii) Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 HCO_3^- および HPO_4^{2-} 、または iii) Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} をさらに含む流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、請求項 5 または請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、請求項 5 から 7 のいずれかに記載の方法であって、前記流体が、

(b i) 1~30 mM の Ca^{2+} 、好ましくは 1~20 mM の Ca^{2+} 、あるいは 1~5 mM の Ca^{2+} 、好ましくは 2~3 mM の Ca^{2+} 、最も好ましくは約 2.5 mM の Ca^{2+} 、あるいは 10~30 mM の Ca^{2+} 、

(b ii) 0.5~10 mM の HPO_4^{2-} 、あるいは 0.5~3 mM の HPO_4^{2-} 、好ましくは 0.5~2 mM の HPO_4^{2-} 、最も好ましくは約 1 mM の HPO_4^{2-} 、あるいは 5~10 mM の HPO_4^{2-} 、

(b iii) 100~800 mM の Na^+ 、あるいは 100~200 mM の Na^+ 、好ましくは 120~160 mM の Na^+ 、さらにより好ましくは 140~150 mM の Na^+ 、最も好ましくは約 142 mM の Na^+ 、あるいは 500~800 mM の Na^+ 、

(b iv) 1~50 mM の K^+ 、あるいは 1~10 mM の K^+ 、好ましくは 3~7 mM の K^+ 、最も好ましくは約 5 mM の K^+ 、あるいは 10~40 mM の K^+ 、

(b v) 0.5~20 mM の Mg^{2+} 、あるいは 0.5~3 mM の Mg^{2+} 、好ましくは 1~2 mM の Mg^{2+} 、最も好ましくは約 1.5 mM の Mg^{2+} 、あるいは 5~15 mM の Mg^{2+} 、

(b vi) 100~800 mM の Cl^- 、あるいは 100~200 mM の Cl^- 、好ましくは 120~160 mM の Cl^- 、より好ましくは 140~150 mM の Cl^- 、最も好ましくは約 148.8 mM の Cl^- 、あるいは 500~800 mM の Cl^- 、

(b vii) 1~100 mM の HCO_3^- 、あるいは 1~10 mM の HCO_3^- 、好ましくは 2~8 mM の HCO_3^- 、より好ましくは 4~5 mM の HCO_3^- 、最も好ましくは約 4.2 mM の HCO_3^- 、あるいは 10~100 mM の HCO_3^- 、ならびに

(b viii) 1~10 mM の SO_4^{2-}

からなる群から選択される少なくとも 1 つまたは複数を含む、方法。

【請求項 9】

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1~5 mM の Ca^{2+} 、0.5~3 mM の HPO_4^{2-} 、100~200 mM の Na^+ 、1~10 mM の K^+ 、0.5~3 mM の Mg^{2+} 、100~200 mM の Cl^- および 1~10 mM の HCO_3^- を含む流体もしくは 2~3 mM の Ca^{2+} 、0.5~2 mM の HPO_4^{2-} 、120~160 mM の Na^+ 、3~7 mM の K^+ 、1~2 mM の Mg^{2+} 、120~160 mM の Cl^- および 2~8 mM の HCO_3^- を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記足場が、少なくとも 12 時間、少なくとも 24 時間、少なくとも 2 日間、少なくとも 5 日間、少なくとも 6 日間、または少なくとも 9 日間、前記流体と接触させられるか、または前記流体に浸漬させられる、ならびに／あるいは
前記足場が、20 日間まで、好ましくは 10 日間まで、最も好ましくは 9 日間まで、前記流体と接触させられるか、または前記流体に浸漬させられる、請求項 7 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記足場が、

- (a) フィブリノゲンの水溶液を、凝固剤および増量剤と混合するステップと、
- (b) ステップ (a) で得られた混合物を、架橋剤と共にインキュベートするステップと、
- (c) 前記架橋剤を除去するために、ステップ (b) で得られた架橋された組成物を洗浄するステップと

を含む方法によって得られた、形成された、または入手可能である、請求項 5 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

- (a) フィブリノゲンの水溶液を、凝固剤および増量剤と混合するステップと、
- (b) ステップ (a) で得られた混合物を、架橋剤と共にインキュベートするステップと、
- (c) 前記架橋剤を除去するために、ステップ (b) で得られた架橋された組成物を洗浄するステップと

を含む方法によって、前記足場を形成することを含む、請求項 5 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

フィブリノゲンが、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%の1つを超える純度レベルで存在する、請求項 11 または請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

フィブリノゲンが、切断型のフィブリノゲン、例えばフィブリン A、フィブリン B、フィブリン C、フィブリン D、フィブリン X およびフィブリン Y として存在する、請求項 11 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

前記切断型のフィブリノゲンが、フィブリン E である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

フィブリノゲンが、リン酸緩衝食塩水 (PBS) または HEPES 緩衝食塩水で pH 4 ~ 10 の間に緩衝化された水溶液として存在する、請求項 11 から 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記凝固剤が、酵素または非酵素凝固剤を含む、請求項 11 から 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

前記凝固剤が、トロンビン、例えばヒトトロンビンである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

ステップ (a) が、発泡剤と混合することを含む、請求項 11 から 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

前記発泡剤が、非イオン性洗浄剤、温度感受性ゲル化界面活性剤、ポロキサマー、ポロキサミン、ジホスファチジルグリセロールタイプのリン脂質または不混和性相とフィブリノゲン水溶液相の混合物を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記発泡剤が、糖界面活性剤のクラスの 1 種または複数の界面活性剤からなるか、またはそれを含む、請求項 19 または請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

前記発泡剤が、糖アシル界面活性剤のクラスの 1 種または複数の界面活性剤からなるか、またはそれを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記発泡剤が、C₈～C₁₂のアシル鎖長を有する糖アシル界面活性剤のクラスの発泡剤である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記発泡剤が、少なくとも 2 種、好ましくは 3 種の糖界面活性剤を含むか、またはそれからなる、請求項 2 1 から 2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5】

前記発泡剤の糖アシル界面活性剤が、ピラノシド（特に、グルコピラノシド）、マルトシド、およびアシルスクロース界面活性剤のクラスから選択される、ならびに／あるいは前記糖アシル界面活性剤が、OGP、ODM、DGPおよびDdGP、TGP、HGP、DMP、デシルスクロース（nDS）、ドデシルスクロース（nDdS）、好ましくはOGM、DMPおよびDdGPからなる群から選択される、請求項 2 2 から 2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 6】

ステップ（b）で使用される前記架橋剤が、カルボジイミドカップリング剤、例えばN-（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイニド（ethylcarbodiiniide）（EDC）；N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、アジドカップリング剤；ジソシアネート架橋剤、例えばヘキサメチレンジイソシアネート；エポキシド架橋剤、例えばエピクロロヒドリン、グリシジルエーテルおよびグリシジルアミン；ならびにアルデヒド架橋剤、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサールから選択される、請求項 1 1 から 2 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 7】

前記架橋剤が、アルデヒド架橋剤、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサールを含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記アルデヒド架橋剤が、グルタルアルデヒドである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記方法が、

（c i）前記方法が、還元剤または毒性低減剤、例えば水素化ホウ素ナトリウムまたはリシンを添加するステップをさらに含むこと、

（c i i）前記混合ステップ（a）が、例えば曝気により混合して発泡させることによって達成されること、

（c i i i）ステップ（a）で得られた前記混合物が、前記インキュベーションステップ（b）の前にキャストされ、凍結され、任意選択で凍結乾燥されること、

（c i v）前記方法が、二価または多価金属イオン、例えばカルシウム、例えば塩化カルシウムを添加するステップをさらに含むこと、ならびに

（c v）混合ステップ（a）のための前記混合物が、タンパク質安定剤として糖をさらに含み、前記糖が、小さいポリオールまたは炭水化物、例えばグリセロール、ソルビトール、スクロースまたはトレハロースであること

からなる群から選択される少なくとも 1 つまたは複数の特徴を含む、請求項 1 1 から 2 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 0】

前記糖が、ステップ（a）の前記混合物中、フィブリノゲンに対して好ましくは 1 0～1 1 w t %の量、好ましくは 4～7 . 5 w t %の量のトレハロースである、請求項 2 9 の（c v）に記載の方法。

【請求項 3 1】

所定の形状を有する細胞外マトリックス材料を調製するための、請求項 1 1 から 3 0 のいずれかに記載の方法であって、前記方法が、

(d i) ステップ (a) の前記混合物が、前記インキュベーションステップ (b) の前に、所定の形状の型でキャストされ、凍結され、任意選択で凍結乾燥されること、
(d i i) 前記増量剤が、アルギン酸塩、例えばアルギン酸ナトリウムまたは誘導体化アルギン酸塩、例えばプロピルグリコアルギン酸ナトリウムであること、
(d i i i) 前記増量剤が、グリコサミノグリカン (G A G ; 例えばコンドロイチン 6-硫酸、コンドロイチン 4-硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、キチン、キトサン、デキストラン硫酸またはヒアルロナン) であること、ならびに
(d i v) 前記増量剤が、ヒドロキシエチルデンプン、エチルセルロース、キサンタンガムおよびアガロースから選択されること
からなる群から選択される少なくとも 1 つまたは複数の特徴を含む、方法。

10

【請求項 3 2】

請求項 4 から 3 1 のいずれかに記載の方法によって得られた、または入手可能である、細胞外マトリックス材料。

【請求項 3 3】

前記セラミックが、リン酸カルシウム鉱物相であるか、またはリン酸カルシウム鉱物相を含み、かつ

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記細胞外マトリックス材料の重量の少なくとも 1 0 %、好ましくは少なくとも 2 0 %、より好ましくは少なくとも 5 0 % である、あるいは

前記リン酸カルシウム鉱物相が、オルトリン酸カルシウム化合物、好ましくはヒドロキシアパタイトを含む、

20

請求項 1、3 または 3 2 のいずれかに記載の細胞外マトリックス材料。

【請求項 3 4】

医薬品の製造において使用するための、請求項 1 から 3 または 3 2 に記載の細胞外マトリックス材料の使用であって、前記医薬品が *in vitro*、*ex vivo* もしくは *in vivo* での骨再生のため、または骨欠損の処置のためのものである、使用。

【請求項 3 5】

請求項 1 から 3 または 3 2 のいずれか一項に記載の細胞外マトリックス材料を含む組成物であって、

前記組成物は、骨再生のための組成物であり、骨欠損、例えば創傷または骨折に適用されることを特徴とする、組成物であるか、あるいは

30

前記組成物は、*in vitro*、*ex vivo* もしくは *in vivo* での骨再生において使用するため、または骨欠損を処置するための組成物である、組成物。

【請求項 3 6】

前記リン酸カルシウム鉱物相が、オルトリン酸カルシウム化合物、好ましくはヒドロキシアパタイトを含む、

前記リン酸カルシウム鉱物相が、リン酸八カルシウムを含む、あるいは

前記リン酸カルシウム鉱物相が、非晶質および／または結晶性リン酸カルシウム鉱物相を含む、

請求項 5 から 3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 7】

40

前記セラミックが、リン酸カルシウム鉱物相であるか、またはリン酸カルシウム鉱物相を含み、かつ

前記リン酸カルシウム鉱物相が、リン酸八カルシウムを含む、ならびに／あるいは

前記リン酸カルシウム鉱物相が、非晶質および／または結晶性リン酸カルシウム鉱物相を含む、請求項 1、3 または 3 2 のいずれかに記載の細胞外マトリックス材料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞外マトリックス材料、およびこのような材料を作るための方法に関する。この材料は、骨再生を促進するために使用することができる。

50

【背景技術】

【0002】

外傷、感染、腫瘍または固有の遺伝的障害によって引き起こされた骨欠損の再生は、臨床的課題である。また骨欠損の再生は、外科手技、例えば脊椎固定術、または股関節および膝の再建手術に必要とされる。骨欠損を処置するための現在の外科手術法は、しばしば、自家または同種いずれかの骨の移植を伴う。自家骨移植片は、骨の修復および再生のための「至適基準」であるとみなされる。しかしこれらの方法は、自家骨移植片の場合には、骨供給の制限およびドナー部位の罹患 (donor site morbidity)、または同種骨移植の場合には疾患伝播および骨折および偽関節などの制限を受ける。これらの不利益は、有効な骨移植片代替品として作用し得る新しい生体材料の開発の推進力となっている (Garcia-Garetaら、2015年)。

10

【0003】

自然骨は、骨移植片代替品の開発のためのモデルとして働く。骨移植片代替品を開発するために使用される異なる材料は、1) 自然および合成生分解性ポリマー、2) リン酸カルシウム (CaP) 材料およびバイオガラスを含むセラミック、3) 金属、4) 炭素ベースの材料、例えばカーボンナノチューブおよびグラフェン、ならびに5) 2種またはそれよりも多い材料の組合せである複合材料である。

【0004】

骨に存在する生体鉱物は、高度に置換されているヒドロキシアパタイトである (WopenkaおよびPasteris 2005年; LeGeros 2008年)。生体鉱物から製作されたインプラントは、周辺骨組織と相互反応することができる (Garcia-Garetaら、2015年)。CaPを組み込む生体材料は、骨伝導性であってよく (このことは、その材料が、生体材料表面上の骨組織との直接結合を促進することを意味する)、骨誘導性であってよい (このことは、その材料が、局所幹細胞を誘導して骨細胞に分化することを意味する) (Garcia-Garetaら、2015年)。

20

【0005】

フィブリンは、骨、軟骨、皮膚、腱、靱帯、肝臓または心臓組織などの組織の再生に使用されている。しかし、このような用途では、フィブリンは、典型的にはゲルの形態である。例えば、骨再生の文脈では、フィブリン糊およびセメントの組合せを使用して、注射可能な材料を作製することができる (Cuiら、2010年; Dongら、2013年; Lopez-Herediaら、2013年; Xiuら、2014年)。またフィブリンは、複合骨移植片代替品を作製するために、合成ポリマー、例えばポリ (プロピレンフマレート) またはポリ-D L-ラクチド-co-ε-グルコリドと組み合わせられてきた (Mishraら、2016年; Ignjatovicら、2005年)。

30

【0006】

フィブリンは、優れた生体適合性を示す自然に存在する生分解性ポリマーであるが、フィブリンの血管新生促進特性および生理活性特性、機械特性、ならびに生分解特性は、非常に低く、したがってその使用が制限される (Ahmedら、2008年)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

40

【0007】

【文献】 Garcia-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. (2015) Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. Bone 81, 112-121

Wopenka B, Pasteris JD. (2005) A mineralogical perspective on the apatite in bone. Mater Sci Eng C25, 131-143

LeGeros RZ. (2008) Calcium phosphate-based osteoinductive materials. Chem Rev 108, 4742-4753

Cui G, Li J, Lei W, Bi L, Tang P, Liang Y, Tao S, Wang Y. (2010) The mechanical and biological properties of an injectable calcium phosph

50

hate cement-fibrin glue composite for bone regeneration. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 92(2), 377-85

Dong J, Cui G, Bi L, Li J, Lei W. (2013) The mechanical and biological studies of calcium phosphate cement-fibrin glue for bone reconstruction of rabbit femoral defects. Int J Nanomedicine 8, 1317-24

Lopez-Heredia MA, Pattipeilohy J, Hsu S, Grykien M, van der Weijden B, Leeuwenburgh SC, Salmon P, Wolke JG, Jansen JA. (2013) Bulk physicochemical, interconnectivity, and mechanical properties of calcium phosphate cements-fibrin glue composites for bone substitute application s. J Biomed Mater Res A 101(2), 478-90

Xiu J, Fan J, Li J, Cui G, Lei W. (2014) Different angiogenic abilities of self-setting calcium phosphate cement scaffolds consisting of different proportions of fibrin glue. Biomed Res Int 2014:785146

Mishra R, Roux BM, Posukonis M, Bodamer E, Brey EM, Fisher JP, Dean D. (2016) Effect of prevascularization on in vivo vascularization of poly(propylene fumarate)/fibrin scaffolds. Biomaterials 77, 255-66

Ignjatovic N, Ajdukovic Z, Uskokovic D. (2005) New biocomposite [biphasic calcium phosphate / poly-DL-lactide-co-glycolide/biostimulative agent] filler for reconstruction of bone tissue changed by osteoporosis. J Biomed Sci Mater Med 16(7), 621-6

Ahmed TAE, Dare EV, Hincke M. (2008) Fibrin: A versatile scaffold for tissue engineering applications. Tissue Eng Part B 14(2), 199-215

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

したがって、前述の欠点の少なくとも一部を克服する、改善された骨再生組成物を提供することが望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明によれば、フィブリンまたはフィブリノゲン、およびセラミックを含む細胞外マトリックス材料が提供される。

【0010】

本発明によれば、フィブリンまたはフィブリノゲン、増量剤、およびセラミックを含む細胞外マトリックス材料が提供される。

【0011】

フィブリンまたはフィブリノゲン、および任意選択で増量剤は、架橋され得る。架橋は、本明細書に記載される方法を使用して達成することができる。

【0012】

本発明によれば、フィブリンまたはフィブリノゲン、および増量剤を含む架橋された足場、ならびに足場上に堆積されているセラミックを含む細胞外マトリックス材料が提供される。

【0013】

本発明によれば、複合足場を含む細胞外マトリックス材料であって、複合足場が、フィブリンおよび／またはフィブリノゲン、ならびに増量剤を含み、架橋されているか、または架橋によって確立されたものであり、セラミックが、複合足場上に堆積されている、細胞外マトリックス材料が提供される。

【0014】

好ましくは、セラミックは、リン酸カルシウム鉱物相である。

【0015】

本発明によれば、フィブリンまたはフィブリノゲン、および増量剤を含む架橋された足場

10

20

30

40

50

、ならびに足場上に堆積されているリン酸カルシウム鉱物相を含む細胞外マトリックス材料が提供される。

【0016】

本発明によれば、細胞外マトリックス材料を調製する方法またはプロセスであって、セラミックを、フィブリンまたはフィブリノゲン、および増量剤を含む架橋された足場上に堆積するステップを含む、方法またはプロセスが提供される。

【0017】

本発明によれば、細胞外マトリックス材料を調製する方法またはプロセスであって、リン酸カルシウム鉱物相を足場に堆積するステップを含み、足場が、フィブリンまたはフィブリノゲン、および増量剤を含むか、またはそれから形成される、方法またはプロセスが提供される。

10

【0018】

好ましい一実施形態では、足場は、フィブリンを含む。

【0019】

一部の実施形態では、足場は、別個の層に配置された線維を含まない。

【0020】

本発明によれば、足場は、(a) フィブリノゲンの水溶液を、凝固剤および増量剤と混合すること、(b) ステップ(a) で得られた混合物を、架橋剤と共にインキュベートすること、(c) 架橋剤を除去するために、ステップ(b) で得られた架橋された組成物を洗浄することを含む方法によって得ることができ、または入手可能である。

20

【0021】

本発明の方法は、(a) フィブリノゲンの水溶液を、凝固剤および増量剤と混合するステップと、(b) ステップ(a) で得られた混合物を、架橋剤と共にインキュベートするステップと、(c) 架橋剤を除去するために、ステップ(b) で得られた架橋された組成物を洗浄するステップとを含むことができる。

【0022】

本発明の細胞外マトリックスを形成するために使用される組成物(例えば、本発明の方法のステップ(a) において使用するための組成物、例えばフィブリノゲンを含む組成物)において、凝固剤および増量剤(ならびに任意選択で発泡剤および/または安定化剤)、フィブリノゲンは、0.5~10重量%の量で存在し得る。フィブリノゲンは、pH 4~10の間に緩衝化された水溶液として存在し得る。フィブリノゲンは、pH 7~8の間(例えば7.4)に緩衝化され得る。フィブリノゲンは、リン酸緩衝食塩水(PBS)またはHEPES緩衝食塩水で緩衝化され得る。

30

【0023】

多孔質の架橋されたフィブリン足場は、全層皮膚創傷の処置のために開発されてきた。このような足場は、WO 2007/144644 A1およびWO 2013/164635 A1に記載されており、その具体例は、Smart Matrix(登録商標)である。Smart Matrix(登録商標)は、グルタルアルデヒド架橋によって安定化されている、フィブリンとアルギン酸塩の複合体である内因的に血管新生を促進する生体材料である。Smart Matrix(登録商標)を作るための基本的配合は、フィブリノゲンとトロンビンの酵素反応を伴い、アルギン酸塩が、足場を増量し、支えるために使用されている。

40

【0024】

驚くべきことに、本発明の出願人は、本発明の細胞外マトリックス材料は、堆積したセラミックを含まないこのような足場と比較して、分解速度が低下し得ることを見出した。このことは、in vivoでの新しい骨形成が4カ月間までかかり得ることが示唆されている骨再生分野において、特に有利である(HadjidakisおよびAndroulakis 2006年)。Smart Matrix(登録商標)は、ブタモデルの全層皮膚創傷への埋め込み後約5~6週間まで、組織学的切片において観測されている。

【0025】

50

さらに、セラミック、例えばリン酸カルシウム鉱物相を足場上に堆積するにもかかわらず、本発明の材料は、驚くべきことにその多孔性を維持して、細胞、例えば線維芽細胞（例えば皮膚線維芽細胞）および骨前駆細胞を生体材料に遊走させ、定植させることができる。この材料は、良好な生体適合性を有することができ、したがって細胞は、材料上で有効に成長し、増殖し、分化することができ、フィブリンまたはフィブリノゲンの血管新生促進特性および生理活性特性も維持され得る。したがって、本発明の材料は、フィブリンまたはフィブリノゲンによって提供される有益な特性の一部を維持することができると同時に、フィブリンおよびフィブリノゲンの有利でない特性、例えばその機械特性および生分解特性の一部を克服する。

【0026】

「リン酸カルシウム鉱物相」という用語は、カルシウムイオンを、オルトリン酸、メタリン酸またはピロリン酸、および場合により水素イオンまたは水酸化物イオンと一緒に含む鉱物相を包含する。例えば、リン酸カルシウム鉱物相は、リン酸一カルシウム、リン酸二カルシウムおよび／またはリン酸三カルシウムを含むことができる。一例では、リン酸カルシウム鉱物相は、アパタイト、例えばヒドロキシアパタイトを含む。セラミックは、リン酸八カルシウム（OCP）および／または非晶質リン酸カルシウム（ACP）を含むことができる。セラミックは、結晶性リン酸カルシウム鉱物相を含むことができる。

【0027】

セラミックは、本明細書に記載される通り、複数のまたは組合せの異なる鉱物相を含むことができる。

【0028】

リン酸カルシウム鉱物相は、他の1種または複数の元素、例えばマグネシウムを含むことができる。

【0029】

一部の実施形態では、リン酸カルシウム鉱物相は、ヒドロキシアパタイトを含まない。一部の実施形態では、リン酸カルシウム鉱物相は、リン酸三カルシウム、例えばβ-リン酸三カルシウムを含むことができない。

【0030】

リン酸カルシウム鉱物相は、生物模倣堆積を使用して足場に堆積され得る。例えば、足場は、流体もしくは溶液と接触させることができ、または流体もしくは溶液に浸漬させることができる。一実施形態では、流体は、疑似体液（SBF）溶液であってよい（Kokuboら、1990年）。流体または溶液は、カルシウムイオン（ Ca^{2+} ）およびリン酸イオン、例えばリン酸水素イオン（ HPO_4^{2-} ）を含むことができる。流体または溶液は、好ましくは、ナトリウムイオン（ Na^+ ）、カリウムイオン（ K^+ ）、マグネシウムイオン（ Mg^{2+} ）、塩化物イオン（ Cl^- ）、炭酸水素イオン（ HCO_3^- ）および／または硫酸イオン（ mM SO_4^{2-} ）をさらに含む。流体または溶液は、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、 HCO_3^- および SO_4^{2-} を含むことができる。流体または溶液は、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Cl^- および HCO_3^- を含むことができる。流体または溶液は、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 、 K^+ 、および Cl^- を含むことができる。

【0031】

流体は、1～30 mMの Ca^{2+} を含むことができる。流体は、1～20 mMの Ca^{2+} を含むことができる。一部の実施形態では、流体は、1～5 mMの Ca^{2+} 、例えば2～3 mMの Ca^{2+} 、例えば約2.5 mMの Ca^{2+} を含むことができる。あるいは、流体は、10～30 mMの Ca^{2+} 、例えば10～20 mMの Ca^{2+} 、例えば15～19 mMの Ca^{2+} を含むことができる。

【0032】

流体は、0.5～10 mMの HPO_4^{2-} を含むことができる。一部の実施形態では、流体は、0.5～3 mMの HPO_4^{2-} 、例えば0.5～2 mMの HPO_4^{2-} 、例えば約1 mMの HPO_4^{2-} を含むことができる。あるいは、流体は、5～10 mMの HPO_4

10

20

30

40

50

2-、例えば6~8mMの HPO_4^{2-} を含むことができる。

【0033】

流体は、100~800mMの Na^+ を含むことができる。一部の実施形態では、流体は、100~200mMの Na^+ 、例えば120~160mMの Na^+ または140~150mMの Na^+ 、例えば約142mMの Na^+ を含むことができる。あるいは、流体は、500~800mMの Na^+ 、例えば600~800mMの Na^+ を含むことができる。

【0034】

流体は、1~50mMの K^+ を含むことができる。一部の実施形態では、流体は、1~10mMの K^+ 、例えば3~7mMの K^+ 、例えば約5mMの K^+ を含むことができる。あるいは、流体は、10~40mMの K^+ を含むことができる。

【0035】

流体は、0.5~20mMの Mg^{2+} を含むことができる。一部の実施形態では、流体は、0.5~3mMの Mg^{2+} 、例えば1~2mMの Mg^{2+} 、例えば約1.5mMの Mg^{2+} を含むことができる。あるいは、流体は、5~15mMの Mg^{2+} 、例えば9~12mMの Mg^{2+} を含むことができる。

【0036】

流体は、100~800mMの Cl^- を含むことができる。一部の実施形態では、流体は、100~200mMの Cl^- 、例えば120~160mMの Cl^- を含むことができる。好ましくは、流体は、約140~150mMの Cl^- 、例えば約148.8mMの Cl^- を含む。あるいは、流体は、500~800mMの Cl^- 、例えば600~800mMの Cl^- を含むことができる。

【0037】

流体は、1~100mMの HCO_3^- を含むことができる。一部の実施形態では、流体は、1~10mMの HCO_3^- 、例えば2~8mMの HCO_3^- を含むことができる。好ましくは、流体は、4~5mMの HCO_3^- 、例えば約4.2mMの HCO_3^- を含む。あるいは、流体は、10~100mMの HCO_3^- 、例えば20~80mMの HCO_3^- を含むことができる。

【0038】

流体は、1~10mMの SO_4^{2-} を含むことができる。

【0039】

一例では、流体は、1~30mMの Ca^{2+} 、0.5~10mMの HPO_4^{2-} 、100~800mMの Na^+ 、1~50mMの K^+ 、0.5~20mMの Mg^{2+} 、100~800mMの Cl^- 、1~100mMの HCO_3^- 、および1~10mMの SO_4^{2-} を含むことができる。

【0040】

一例では、流体は、1~30mMの Ca^{2+} 、0.5~10mMの HPO_4^{2-} 、100~800mMの Na^+ 、1~50mMの K^+ 、0.5~20mMの Mg^{2+} 、100~800mMの Cl^- および1~100mMの HCO_3^- を含むことができる。

【0041】

一例では、流体は、1~30mMの Ca^{2+} 、0.5~10mMの HPO_4^{2-} 、100~800mMの Na^+ 、1~50mMの K^+ および100~800mMの Cl^- を含むことができる。

【0042】

一例では、流体は、1~5mMの Ca^{2+} および0.5~3mMの HPO_4^{2-} を含むことができ、任意選択で100~200mMの Na^+ 、1~10mMの K^+ 、0.5~3mMの Mg^{2+} 、100~200mMの Cl^- および1~10mMの HCO_3^- も含むことができる。

【0043】

別の例では、流体は、2~3mMの Ca^{2+} および0.5~2mMの HPO_4^{2-} を含むことができ、任意選択で120~160mMの Na^+ 、3~7mMの K^+ 、1~2mMの

10

20

30

40

50

Mg²⁺、120～160mMのCl⁻および2～8mMのHCO₃⁻も含むことができる。

【0044】

さらに別の例では、流体は、約2.5mMのCa²⁺および約1mMのHPO₄²⁻を含むことができ、任意選択で約142mMのNa⁺、約5mMのK⁺、約1.5mMのMg²⁺、約149mMのNa⁺および約4mMのHCO₃⁻も含むことができる。

【0045】

一例では、流体は、10～30mMのCa²⁺、5～10mMのHPO₄²⁻、500～800mMのNa⁺、10～40mMのK⁺、5～15mMのMg²⁺、500～800mMのCl⁻、10～100mMのHCO₃⁻および1～10mMのSO₄²⁻を含むことができる。

10

【0046】

一例では、流体は、10～30mMのCa²⁺、5～10mMのHPO₄²⁻、500～800mMのNa⁺、10～40mMのK⁺、5～15mMのMg²⁺、500～800mMのCl⁻および10～100mMのHCO₃⁻を含むことができる。

【0047】

一例では、流体は、10～30mMのCa²⁺、5～10mMのHPO₄²⁻、500～800mMのNa⁺、10～40mMのK⁺および500～800mMのCl⁻を含むことができる。

【0048】

足場は、流体に浸漬させるか、または流体と接触させることができる。好ましくは、足場は、流体に浸漬させられる。足場は、少なくとも12時間、少なくとも1日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間または少なくとも9日間、流体に浸漬させるか、または流体と接触させることができる。足場は、10日間まで、好ましくは9日間まで、流体に浸漬させるか、または流体と接触させることができる。例えば、足場は、1日～10日間、浸漬させることができる。あるいは、足場は、48時間（2日間）まで、流体に浸漬させるか、または流体と接触させることができる。例えば、足場は、12時間～48時間、流体に浸漬させることができる。

20

【0049】

流体への浸漬または流体との接触は、20℃および50℃、好ましくは30～40℃、より好ましくは約37℃で行うことができる。

30

【0050】

好ましくは、セラミック、例えばリン酸カルシウム鉱物相は、足場全体に堆積させられる。好ましくは、セラミックは、足場上または足場全体に実質的に均質または均一に堆積される。均質または均一な分布は、本明細書に記載される通り生物模倣法によって、例えば足場をSBF流体または溶液に浸漬させることによって助長され得る。

【0051】

リン酸カルシウム鉱物相、例えばヒドロキシアパタイトを合成する他の方法は、当業者に公知である。例えば、ヒドロキシアパタイトは、湿式化学堆積によって合成され得る。例えば、ヒドロキシアパタイトナノ結晶懸濁液は、以下の反応によって調製することができる。

40



【0052】

あるいは、ヒドロキシアパタイトは、ゾルゲル法または電解結晶化によって合成することができる。

【0053】

リン酸カルシウム鉱物相は、足場上に堆積している球状鉱物結晶および／またはプレート様の結晶の形態であってよい。これらは、球状またはプレート様の形態と呼ぶことができる。球状およびプレート様の形態の例は、図10に示されている。一部の例では、結晶は、0.025～1μm、好ましくは0.05～0.8μmのアベレージ（平均、最頻また

50

は中央) 最大線寸法を有することができる。

【0054】

セラミック、例えばリン酸カルシウム鉱物相は、本発明の細胞外マトリックス材料の重量の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%であり得る。好ましくは、セラミックは、細胞外マトリックスの重量の少なくとも40%である。より好ましくは、セラミックは、細胞外マトリックスの重量の少なくとも50%である。

【0055】

本発明の細胞外マトリックス材料は、好ましくは予め形成されるか、または予め製作され、したがって、マトリックス材料は、それが形成された後に対象に適用または投与される。

【0056】

本発明の細胞外マトリックス材料は、好ましくは無菌である。

【0057】

本発明の細胞外マトリックス材料は、使用前の保存のために、パッケージ、好ましくは無菌パッケージに含有され得る。

【0058】

本発明の細胞外マトリックス材料は、特定のレオロジー特性または粘弾特性を有することができる。例えば、材料は、20℃で、50~100kPa、例えば50~750kPa、例えば50~600kPaのせん断または貯蔵弾性率(G')を有することができる。 G' は、少なくとも50kPaであってよい。 G'' は、1000kPaまでであってよい。 G'' は、少なくとも200kPa、または少なくとも400kPaであってよい。

【0059】

本明細書におけるフィブリノゲンへの言及は、ヒトフィブリノゲンを含み得る。あるいは、フィブリノゲンは、ウシフィブリノゲンであってよい。フィブリノゲンは、血漿から精製されていてもよい。精製フィブリノゲンへの言及は、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%の1つを超える純度レベルのフィブリノゲンを含む。好ましくは、純度は、80%超、より好ましくは90%超である。フィブリノゲンは、組換えにより合成されていてもよい。

【0060】

天然のまたは自然に存在するフィブリノゲンに加えて、本明細書におけるフィブリノゲンへの言及は、フィブリノゲンの誘導体、例えばフィブリノゲンの断片またはフィブリノゲンの類似体も含み得る。フィブリノゲンの任意の断片または類似体は、天然のまたは自然に存在するフィブリノゲンの血管新生機能を保持するべきであることを理解されよう。フィブリノゲンの断片の例として、切断型のフィブリノゲン、例えばフィブリンA、フィブリンB、フィブリンC、フィブリンD、フィブリンXおよびフィブリンYが挙げられる。さらなる実施形態では、切断型のフィブリノゲンは、フィブリンEである。フィブリノゲンの類似体の例として、ペプチドの1つもしくは複数のアミノ酸残基が、他の自然に存在するもしくは合成のアミノ酸残基によって置換されており、かつ／または1つもしくは複数のアミノ酸残基が、ペプチドから欠失されており、かつ／または1つもしくは複数のアミノ酸残基が、ペプチドに付加されている、フィブリノゲンの修飾誘導体が挙げられる。フィブリノゲン類似体は、天然のまたは自然に存在するフィブリノゲン、例えばヒトフィブリノゲンの少なくとも70%、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列相同性を有することができる。フィブリノゲンへの言及は、電気処理された(electroprocessed)フィブリノゲンまたはその誘導体、例えば米国特許出願第2004/0229333号に記載されているものまでは拡大できないことを理解されよう。

【0061】

好ましい例では、本発明の細胞外マトリックスは、トロンビンによってフィブリノゲンが開裂した後に形成されたフィブリンを含む。トロンビンによるフィブリノゲンの開裂によって、フィブリンモノマーが形成され、そのフィブリンモノマーは、重合して線維を形成することができる。したがって、本発明において、例えば本発明の方法において使用する

10

20

30

40

50

ことができるフィブリノゲンの任意の誘導体は、好ましくは、トロンビンによって開裂されて、重合して線維を形成することができるフィブリンモノマー誘導体を形成する能力を保持している。したがって、本明細書におけるフィブリンへの言及は、フィブリンモノマーの誘導体、例えば重合してフィブリンを形成することができるフィブリンモノマーの類似体から形成されたフィブリンも含み得る。フィブリノゲンモノマー類似体は、天然のまたは自然に存在するフィブリンモノマー、例えばヒトフィブリンモノマーの少なくとも70%、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列相同性を有することができる。

【0062】

例えば、フィブリノゲンおよびフィブリンモノマーの類似体は、好ましくは、各末端における2つの球状小結節（Dドメイン）および中間における1つの球状小結節（Eドメイン）からなる球状構造を保持している。フィブリンモノマーの類似体は、好ましくは、フィブリンモノマーの γ および β 鎖に存在する空洞である γ および β ホールと、トロンビンによるフィブリノゲンからフィブリノペプチドAおよびBの切除によって曝露されるそれらの相補的結合ペプチド（ノブ）とのノブ-ホール相互反応を介して相互反応する能力を保持している。ノブは、中心のEドメインから伸びており、 γ および β ホールは、Dドメインに存在する。結果的に、1つのモノマーのEドメインは、隣接しているモノマーのDドメインと相互反応することができる。

【0063】

本発明の方法において使用される凝固剤は、酵素凝固剤または非酵素凝固剤を含むことができる。好ましい例では、酵素凝固剤は、トロンビン（IUBMB酵素命名法EC3.4.21.5）またはトロンビン模倣物である。細胞外マトリックスにおけるトロンビンまたはトロンビン模倣物の存在は、ゲル形態の安定な組成物の形成を助ける。

【0064】

一例では、酵素凝固剤は、トロンビン、例えばヒトトロンビンである。トロンビンは、トリプシン様の基質特異性を有するキモトリプシンファミリーのエンドペプチダーゼである。トロンビンは、フィブリノゲンのArg-Gly結合を選択的に開裂してフィブリノペプチドAおよびBを放出することによって、フィブリノゲンをフィブリンに変換する。

【0065】

またトロンビンは、フィブリノゲナーゼ、トロンバーゼ、トロンボフォート（thrombofort）、局所用トロンビン-C、トロポスタシン（tropostasin）、活性化血液凝固因子II、血液凝固因子Ha、因子Ha、Eトロンビン、 β -トロンビン、および γ -トロンビンと説明される。したがって、トロンビン模倣物への言及は、これらの特性を示す任意の構造的および機能的に関係する薬剤、類似体、およびそれらのあらゆる誘導体を含む。このようなトロンビン模倣物の例として、Batroxobin（同義語：デフィブラーゼ、レプチラーゼ；IUBMB命名法SOL.176）、Crotalase（Crotalus adamanteus 毒液に由来するもの；同義語：デフィブリンザイム（defibrinolytic）；IUBMB命名法SOL.177）、Bothrobin（Bothrops jararaca 毒液に由来するもの；IUBMB命名法SOL.179）、Atroxin（Bothrops atrox に由来するもの；IUBMB命名法U9G.05）、Ancrod（Agkistrodon contortrix 毒素に由来するもの；同義語Arvin、Protac、タンパク質Cアクチベーター；IUBMB命名法SOL.178）、およびGabonase（Bitis gabonica に由来するもの；IUBMB命名法SOL.430）が挙げられる。

【0066】

非酵素凝固剤には、プロタミンまたはヒアルロナンが含まれ得る。

【0067】

本発明の細胞外マトリックス材料の形成における増量剤の存在は、細胞外マトリックスの形成を開始するという利点をもたらすことができ、得られた混合物のミクロ構造を相乗的に調節することができる。

10

20

30

40

50

【0068】

増量剤の例として、アルギン酸塩；キサンタンガムおよびスクレログルカンを含めたバイオポリマー；カルボキシメチルセルロース；カラゲニン（例えばガラクトース硫酸）；ガラクトマンナン、すなわちローカストビーンガムおよびグアーガムの花（flower）；ヘタスターチ；特異的可溶性の不活性なマイクロビーズ；グリコサミノグリカン（GAG；例えばコンドロイチン6-硫酸、コンドロイチン4-硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸（heparan sulfate）、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、キチン、キトサン、デキストラン硫酸またはヒアルロナン）、ならびにローカストビーンガム精製エキス、例えばレシチンおよびペクチンが挙げられる。

【0069】

増量剤は、好ましくはアルギン酸塩または誘導体化アルギン酸塩である。例えば、増量剤は、アルギン酸ナトリウムまたはプロピルグリコアルギン酸（propylglycoalginic acid）ナトリウムであり得る。細胞外マトリックス組成物におけるアルギン酸塩の存在は、ゲル形態の安定な組成物の形成を助けるという利点をもたらす、カルシウムに依存しない共沈殿反応を誘導する。

【0070】

アルギン酸塩は、2つのヘキサロン酸残基： β -D-マンヌロン酸（またはM-残基）および α -L-グルロン酸（またはG-残基）の配列から構成されたポリウロニドである、アルギン酸の塩である。 α -L-グルロン酸は、 β -D-マンヌロン酸の酵素エピマー化から形成される。これらのモノマーは、連続G-残基（G-ブロック）、連続M-残基（M-ブロック）のホモポリマーブロック、交互MおよびG-残基（MG-ブロック）、または無作為組織化ブロックに見ることができる。各ブロックタイプの相対量は、共に、アルギン酸塩の起源と共に変わる。交互ブロックは、最も可撓性の鎖を形成し、より低いpHで、その他のブロックよりも可溶性が高い。G-ブロックは、二価のカチオン、例えば Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Cu^{2+} 等を添加すると、M-が豊富な鎖よりも強力なゲルを形成するので、より適している。これは、6つよりも多い残基の2つのG-ブロックが、二価のカチオンと安定な架橋接合点を形成して、三次元ゲル網目構造をもたらすことができるからである（Simpson-NEら、Biomaterials 25巻（2004年）2603～2610頁）。

【0071】

あるいは、増量剤は、グリコサミノグリカン（GAG；例えばコンドロイチン6-硫酸、コンドロイチン4-硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、キチン、キトサン、デキストラン硫酸またはヒアルロナン）であり得る。組成物内のGAGの存在は、フィブリノゲンの架橋中に共有結合によってフィブリノゲンに架橋され得るアミノ酸残基を有するという点で、安定性の増強という利点をもたらすことができる。

【0072】

増量剤は、ヒドロキシエチルデンプン、エチルセルロース、キサンタンガムおよびアガロースから選択することができる。

【0073】

本発明の細胞外マトリックス材料は、架橋された増量剤を含むことができる。架橋された増量剤は、フィブリンまたはフィブリノゲンに架橋され得る。

【0074】

足場を形成するための方法は、フィブリノゲンの水溶液を、発泡剤と混合するステップを含むことができる。したがって、この方法は、フィブリノゲンの水溶液を、凝固剤、増量剤および発泡剤（および任意選択で安定化剤）と混合するステップを含むことができる。

【0075】

発泡剤の例として、界面活性剤、ブロックコポリマー界面活性剤、例えばプルロニック界面活性剤、洗浄剤等が挙げられる。発泡剤の存在は、有効な発泡構造を作製すると同時に、例えば、界面活性剤の場合にはエタノールに溶解させることによって、またはマイクロビーズの場合にはカルシウムイオン濃度を低減してカルシウム依存性ビーズゲルを溶出する

10

20

30

40

50

ことによって、組成物から容易に除去できるという利益をもたらす。さらなる実施形態では、発泡剤は、界面活性剤、非イオン性洗浄剤、感熱性ゲル化界面活性剤、ポロキサマー（例えば、Pluronic（登録商標）、特にF68またはF127）またはポロキサミン（例えば、Tetronic（登録商標）1307）、ジホスファチジルグリセロールタイプのリン脂質、または不混和相（例えばイソペンタン）と水性フィブリノゲン溶液相の混合物を含む。好ましい一実施形態では、発泡剤は、好ましくは非イオン性界面活性剤、例えば、好ましくはPluronic F68およびF127から選択されるプルロニック界面活性剤を含む。特に好ましい一実施形態では、発泡剤は、Pluronic F68を含む。

【0076】

発泡剤は、糖界面活性剤のクラス、より好ましくは糖アシル界面活性剤のクラスの1種または複数の界面活性剤からなり得るか、またはそれを含み得る。発泡剤は、それが糖アシル界面活性剤のクラスの発泡剤である場合、C8～C12のアシル鎖長を有することができる。糖アシル界面活性剤は、ピラノシド（特に、グルコピラノシド）、マルトシド、およびアシルスクロース界面活性剤のクラスから選択することができる。糖アシル界面活性剤は、OGP、ODM、DGPおよびDdGP、TGP、HGP、DMP、デシルスクロース（nDS）、ドデシルスクロース（nDdS）からなる群から選択することができる。好ましくは、糖アシル界面活性剤は、DMP、DdGPおよび／またはODMを含むか、またはそれからなる。

【0077】

発泡剤は、少なくとも2種、または少なくとも3種の糖界面活性剤を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0078】

発泡剤は、複数種の糖界面活性剤および少なくとも1種のプルロニック界面活性剤を含むことができる。特に好ましい一実施形態では、発泡剤は、DMP、DdGP、ODMおよびPluronic F68を含む。

【0079】

足場を形成するための方法は、フィブリノゲンの水溶液を、安定化剤、例えばタンパク質安定化剤と混合するステップをさらに含むことができる。したがって、本発明の方法は、フィブリノゲンの水溶液を、凝固剤、増量剤、安定化剤、および任意選択で発泡剤と混合するステップを含むことができる。適切な安定化剤は、トレハロースである。他の適切な安定化剤には、小さい炭水化物、ポリオール、例えばグリセロール、ソルビトール、グルコースおよびスクロース、トレハロース、ならびにラフィノースが含まれ得る。好ましい安定化剤は、トレハロースである。好ましくは、トレハロースは、フィブリノゲン、凝固剤、増量剤（ならびに任意選択で発泡剤および／または安定化剤）を含む混合物中、フィブリノゲンに対して10～11wt%の量、好ましくは4～7.5wt%の量で存在する。

【0080】

あるいは、またはさらには、フィブリノゲンの水溶液を凝固剤および増量剤（ならびに任意選択で発泡剤および／または安定化剤）と混合する方法ステップは、キャストイング、相分離キャストイング、発泡、凍結乾燥、押出、織物化（textiling）、フェルト化（felted）、スプレーコーティングまたは急速製造ステップを含むことができる。一実施形態では、混合物は、インキュベーションステップの前に、キャストイングされ、凍結され、任意選択で凍結乾燥される。

【0081】

キャストイングステップは、典型的には、細胞外マトリックス組成物を調製する当業者に公知の手順を含むことを理解されよう。典型的には、キャストイングステップは、ステップ（a）で得られた混合物を、37℃で15分間インキュベーションすることを含む。あるいは、インキュベーションは、少なくとも30分間、または少なくとも1時間、行うことができる。例えば、インキュベーションは、37℃で1時間、行うことができる。

【0082】

凍結ステップは、典型的には、ステップ（a）で得られた、キャストイングされた混合物を、0℃未満（例えば−200℃〜−70℃）で数時間から一晩、保存することを含む。一実施形態では、ステップ（a）で得られた、キャストイングされた混合物は、−20℃で1時間凍結させられた後、−70℃で一晩凍結させられる。

【0083】

凍結乾燥ステップは、典型的には、凍結乾燥の当業者に公知の手順を含むことを理解されよう。例えば、ステップ（a）で得られた、キャストイングされ、凍結された混合物の凍結乾燥は、典型的には、一晩から数日間（例えば24時間）、適切な圧力（例えば10^{−2} mBar）および適切な温度（例えば−600℃）で凍結乾燥することを含む。

【0084】

本発明による細胞外マトリックスを調製するための方法は、フィブリノゲンの水溶液、凝固剤、増量剤（および任意選択で発泡剤および／または安定化剤）の混合物を、発泡させ、凝固させるステップを含むことができる。発泡は、曝気により混合することによって達成することができる。さらなる実施形態では、発泡は、曝気装置を使用して（例えば30秒間）達成される。発泡は、泡立てるか、またはブレンドすることによって達成することができる。

【0085】

本発明の細胞外マトリックス材料を形成するために、本発明の方法において使用される架橋剤は、当業者に一般に公知のいくつかの架橋剤または架橋技術のいずれか1つ、例えば化学的、放射的および熱脱水（dehydrothermal）法であってよい。

【0086】

本明細書における「架橋」への言及は、共有結合による架橋に関する。したがって、架橋は、フィブリンモノマーを、トロンビンを使用してフィブリノゲンからフィブリノペプチドAおよびBを開裂した後に会合させ、重合する方法は包含しない。好ましくは、架橋は、化学的架橋剤を使用して酵素によらず達成される。

【0087】

適切な化学的架橋剤の例として、カルボジイミドカップリング剤、例えばN-（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド（EDC）；N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、アジドカップリング剤；ジイソシアネート架橋剤、例えばヘキサメチレン（hexamethylene）ジイソシアネート；エポキシド架橋剤、例えばエピクロロヒドリン（epi-chlorhydrin）、グリシジルエーテルおよびグリシジルアミン；ならびにアルデヒド架橋剤、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサルが挙げられる。

【0088】

化学的架橋剤は、N-（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド（EDC）および／またはN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を含むことができる。

【0089】

化学的架橋剤は、アルデヒド架橋剤、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサルを含むことができる。アルデヒド架橋剤は、生体適合性が改善された細胞外マトリックス組成物を提供するという利点を有する。例えば、本発明者らは、アルデヒド架橋剤の存在によって、*in vitro*での伝播（例えばマトリックス上へのヒト内皮細胞または線維芽細胞の播種）が増強されることを本明細書で示している。さらなる実施形態では、アルデヒド架橋剤は、グルタルアルデヒドである。グルタルアルデヒドを架橋剤として使用することによって、他のアルデヒドよりも急速に最適な架橋密度をもたらすという驚くべき利点がもたらされ、相対的に高密度の架橋を達成することもできる。好ましい例では、化学的架橋剤は、グルタルアルデヒドである。

【0090】

架橋剤が、グルタルアルデヒドまたはN-（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド（EDC）および／またはN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を含む場合、本発明による方法は、毒性低減剤（例えばリシンまたは水素化ホウ素ナトリウム

10

20

30

40

50

)を添加するステップをさらに含むことができる。

【0091】

一例では、増量剤がアルギン酸塩を含む場合、本発明の方法は、アルギン酸塩をフィブリノゲンまたはフィブリンに架橋する追加の架橋ステップを含むことができる。さらなる例では、架橋剤は、過ヨウ素酸を含む。このような追加の架橋ステップは、得られた組成物の安定性を増強する可能性が高い。

【0092】

架橋剤を用いるインキュベーションは、典型的には、適切な温度（例えば20～50℃または室温）で1分間～24時間の間（例えば4時間）、実施することができる。

【0093】

架橋剤がアルデヒド架橋剤を含む場合、その方法は、還元剤を添加するステップをさらに含むことができる。還元剤は、インキュベーションの後、架橋剤を除去するための洗浄の前に添加することができる。

【0094】

還元剤の存在は、架橋プロセスを安定化すると考えられ、驚くべきことに、生物学的有効性が増強された細胞外マトリックス組成物をもたらす。さらに、還元剤の存在は、組成物から非還元架橋剤が浸出することによって引き起こされた細胞傷害効果を低減する可能性が高い。

【0095】

適切な還元剤の例として、水素化ホウ素ナトリウムまたは類似のカルボニル基反応性を有する薬剤が挙げられる。還元剤は、典型的には、0.1%w/w～10%w/w（例えば約1%w/w）の量で添加することができる。還元剤は、0.1%w/v～10%w/v（例えば約1%w/v）の量で添加することができる。

【0096】

本発明による方法は、二価または多価金属イオン、例えばカルシウム（例えば塩化カルシウム）を添加するステップを含むことができる。カルシウムの存在によって、以下の有益な特性の1つまたは複数をもたらされる。(i) トロンビンの活性化ステップ、(ii) 増量剤、例えばアルギン酸塩のゲル化ステップ、(iii) フィブリノゲン凝固反応の調節、(iv) タンパク分解に対する、架橋されたフィブリノゲン、フィブリンまたは誘導された断片の安定性。カルシウムの濃度は、アルギン酸塩をゲル化させ、かつ/またはトロンビンを活性化するのに十分に高いが、組成物から浸出する可能性が高く、細胞傷害効果を有する量を超えないように選択されることを理解されよう。一実施形態では、カルシウムは、1～50mMの間の最終濃度で添加される。さらなる実施形態では、カルシウムは、およそ50mMの最終濃度で添加される。

【0097】

本発明の方法の洗浄ステップは、数時間または数日間にわたって浸出するおそれがある、残留している化学的架橋剤（および存在する場合には還元剤）を除去する。洗浄ステップはまた、架橋後に得られた細胞外マトリックス組成物の生体適合性を増大する。

【0098】

ステップにおける洗浄は、適切な緩衝液、例えばPBS、または溶媒、例えば水、エタノール、メタノール、プロパノール、イソプロパノールもしくはその混合物中、適切な洗浄レジメ（regime）（例えば5×5分間の洗浄）を使用して達成することができる。洗浄ステップは、超音波処理を伴うことができる。超音波の形態の超音波処理（例えば5×30秒間のバースト）の存在は、架橋剤（および存在する場合には還元剤）の除去をさらに増強する。洗浄ステップは、エタノール/水の混合物（例えば95%v/vのエタノールおよび5%v/vの水）で5×5分間、洗浄することを含むことができる。

【0099】

本発明の細胞外マトリックス材料は、使用前に凍結され、任意選択で凍結乾燥され得る。

【0100】

本発明の細胞外マトリックス材料は、好ましくは、400μmまでの孔径分布を有する。

10

20

30

40

50

例えば、細胞外マトリックス材料は、大部分が20～270 μmの範囲のサイズの細孔を有することができる。

【0101】

本発明の細胞外マトリックス材料は、好ましくは、50%よりも高い、好ましくは60%よりも高い、より好ましくは75%よりも高い、例えば80%よりも高いバルク多孔性を有する。

【0102】

本発明のさらなる態様によれば、骨欠損、例えば創傷もしくは骨折の処置において使用するため、または骨再生を促進するための、本明細書で定義される細胞外マトリックス材料が提供される。

【0103】

本発明のさらなる態様によれば、骨欠損、例えば創傷もしくは骨折を処置するため、または骨再生を促進するための医薬品の製造において使用するための、本明細書で定義される細胞外マトリックス材料の使用が提供される。

【0104】

本発明のまたさらなる態様によれば、骨欠損、例えば創傷または骨折を処置する方法であって、本明細書で定義される細胞外マトリックス材料を骨欠損部位に適用するステップを含む、方法が提供される。

【0105】

本明細書で前述した細胞外マトリックス材料は、*in vivo*、*in vitro*または*ex vivo*での骨再生のために使用することができる。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

フィブリンまたはフィブリノゲン、および増量剤を含む架橋された足場、ならびに前記足場上に堆積しているセラミックを含む、細胞外マトリックス材料。

(項目2)

前記セラミックが、リン酸カルシウム鉱物相であるか、またはリン酸カルシウム鉱物相を含む、項目1に記載の細胞外マトリックス。

(項目3)

前記増量剤が、アルギン酸塩、例えばアルギン酸ナトリウムまたは誘導体化アルギン酸塩、例えばプロピルグリコアルギン酸ナトリウムである、項目1または項目2に記載の細胞外マトリックス材料。

(項目4)

前記増量剤が、グリコサミノグリカン（GAG；例えばコンドロイチン6-硫酸、コンドロイチン4-硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、キチン、キトサン、デキストラン硫酸またはヒアルロン酸）である、項目1または項目2に記載の細胞外マトリックス材料。

(項目5)

前記増量剤が、ヒドロキシエチルデンブレン、エチルセルロース、キサンタンガムおよびアガロースから選択される、項目1または項目2に記載の細胞外マトリックス材料。

(項目6)

細胞外マトリックス材料を調製するための方法であって、セラミックを、フィブリンまたはフィブリノゲン、および増量剤を含む架橋された足場上に堆積させるステップを含む、方法。

(項目7)

前記セラミックが、リン酸カルシウム鉱物相である、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、生物模倣堆積によって前記足場上に堆積させられる、項目6または項目7に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 9)

リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、 Ca^{2+} および HPO_4^{2-} を含み、任意選択で i) Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 HCO_3^- 、 HPO_4^{2-} および SO_4^{2-} 、ii) Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 HCO_3^- および HPO_4^{2-} 、または iii) Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} をさらに含む流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 6 から 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 10)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1~30mMの Ca^{2+} 、好ましくは1~20mMの Ca^{2+} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 9 のいずれかに記載の方法。

10

(項目 11)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、0.5~10mMの HPO_4^{2-} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 10 のいずれかに記載の方法。

(項目 12)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、100~800mMの Na^+ を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 11 のいずれかに記載の方法。

(項目 13)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1~50mMの K^+ を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 12 のいずれかに記載の方法。

20

(項目 14)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、0.5~20mMの Mg^{2+} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 13 のいずれかに記載の方法。

(項目 15)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、100~800mMの Cl^- を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 14 のいずれかに記載の方法。

30

(項目 16)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1~100mMの HCO_3^- を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 15 のいずれかに記載の方法。

(項目 17)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1~10mMの SO_4^{2-} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 16 のいずれかに記載の方法。

(項目 18)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1~5mMの Ca^{2+} 、好ましくは2~3mMの Ca^{2+} 、最も好ましくは約2.5mMの Ca^{2+} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 17 のいずれかに記載の方法。

40

(項目 19)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、0.5~3mMの HPO_4^{2-} 、好ましくは0.5~2mMの HPO_4^{2-} 、最も好ましくは約1mMの HPO_4^{2-} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目 7 から 18 のいずれかに記載の方法。

(項目 20)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、100~200mMの Na^+ 、好ましく

50

は120～160mMの Na^+ 、さらにより好ましくは140～150mMの Na^+ 、最も好ましくは約142mMの Na^+ を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から19のいずれかに記載の方法。

(項目21)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1～10mMの K^+ 、好ましくは3～7mMの K^+ 、最も好ましくは約5mMの K^+ を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から20のいずれかに記載の方法。

(項目22)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、0.5～3mMの Mg^{2+} 、好ましくは1～2mMの Mg^{2+} 、最も好ましくは約1.5mMの Mg^{2+} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から21のいずれかに記載の方法。

(項目23)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、100～200mMの Cl^- 、好ましくは120～160mMの Cl^- 、より好ましくは140～150mMの Cl^- 、最も好ましくは約148.8mMの Cl^- を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から22のいずれかに記載の方法。

(項目24)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1～10mMの HCO_3^- 、好ましくは2～8mMの HCO_3^- 、より好ましくは4～5mMの HCO_3^- 、最も好ましくは約4.2mMの HCO_3^- を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から23のいずれかに記載の方法。

(項目25)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1～5mMの Ca^{2+} 、0.5～3mMの HPO_4^{2-} 、100～200mMの Na^+ 、1～10mMの K^+ 、0.5～3mMの Mg^{2+} 、100～200mMの Cl^- および1～10mMの HCO_3^- を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目11から24のいずれかに記載の方法。

(項目26)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、2～3mMの Ca^{2+} 、0.5～2mMの HPO_4^{2-} 、120～160mMの Na^+ 、3～7mMの K^+ 、1～2mMの Mg^{2+} 、120～160mMの Cl^- および2～8mMの HCO_3^- を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目11から25のいずれかに記載の方法。

(項目27)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、10～30mMの Ca^{2+} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から17のいずれかに記載の方法。

(項目28)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、5～10mMの HPO_4^{2-} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から17または27のいずれかに記載の方法。

(項目29)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、500～800mMの Na^+ を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から17または27から28のいずれかに記載の方法。

(項目30)

10

20

30

40

50

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、10～40mMの K^+ を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から17または27から29のいずれかに記載の方法。

(項目31)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、5～15mMの Mg^{2+} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から17または27から30のいずれかに記載の方法。

(項目32)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、500～800mMの Cl^- を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から17または27から31のいずれかに記載の方法。

(項目33)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、10～100mMの HCO_3^- を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から17または27から32のいずれかに記載の方法。

(項目34)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、前記足場を、1～10mMの SO_4^{2-} を含む流体と接触させるか、または前記足場を前記流体に浸漬させることによって、前記足場上に堆積させられる、項目7から17または27から33のいずれかに記載の方法。

(項目35)

前記足場が、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも2日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、または少なくとも9日間、前記流体と接触させられるか、または前記流体に浸漬させられる、項目9から34のいずれかに記載の方法。

(項目36)

前記足場が、20日間まで、好ましくは10日間まで、最も好ましくは9日間まで、前記流体と接触させられるか、または前記流体に浸漬させられる、項目9から35のいずれかに記載の方法。

(項目37)

前記足場が、
(a) フィブリノゲンの水溶液を、凝固剤および増量剤と混合するステップと、
(b) ステップ(a)で得られた混合物を、架橋剤と共にインキュベートするステップと、
(c) 前記架橋剤を除去するために、ステップ(b)で得られた架橋された組成物を洗浄するステップと
を含む方法によって得られた、形成された、または入手可能である、項目7から36のいずれかに記載の方法。

(項目38)

(a) フィブリノゲンの水溶液を、凝固剤および増量剤と混合するステップと、
(b) ステップ(a)で得られた混合物を、架橋剤と共にインキュベートするステップと、
(c) 前記架橋剤を除去するために、ステップ(b)で得られた架橋された組成物を洗浄するステップと
を含む方法によって、前記足場を形成することを含む、項目7から36のいずれかに記載の方法。

(項目39)

フィブリノゲンが、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%の1つを超える純度レベルで存在する、項目37または項目38に記載の方法。

(項目40)

フィブリノゲンが、切断型のフィブリノゲン、例えばフィブリンA、フィブリンB、フィブリンC、フィブリンD、フィブリンXおよびフィブリンYとして存在する、項目37から39のいずれかに記載の方法。

(項目41)

10

20

30

40

50

前記切断型のフィブリノゲンが、フィブリンEである、項目40に記載の方法。

(項目42)

フィブリノゲンが、リン酸緩衝食塩水(PBS)またはHEPES緩衝食塩水でpH4～10の間に緩衝化された水溶液として存在する、項目37から41のいずれかに記載の方法。

(項目43)

前記凝固剤が、酵素または非酵素凝固剤を含む、項目37から42のいずれかに記載の方法。

(項目44)

前記凝固剤が、トロンビン、例えばヒトトロンビンである、項目43に記載の方法。

(項目45)

ステップ(a)が、発泡剤と混合することを含む、項目37から44のいずれかに記載の方法。

(項目46)

前記発泡剤が、非イオン性洗剤、温度感受性ゲル化界面活性剤(例えばプルロニック127)、ジホスファチジルグリセロールタイプのリン脂質または不混和性相とフィブリノゲン水溶液相の混合物を含み、好ましくは前記発泡剤が、プルロニック界面活性剤、例えばプルロニックF68および/またはプルロニックF127、より好ましくはプルロニックF68を含む、項目45に記載の方法。

(項目47)

前記発泡剤が、糖界面活性剤のクラスの1種または複数の界面活性剤からなるか、またはそれを含む、項目45または項目46に記載の方法。

(項目48)

前記発泡剤が、糖アシル界面活性剤のクラスの1種または複数の界面活性剤からなるか、またはそれを含む、項目47に記載の方法。

(項目49)

前記発泡剤が、C₈～C₁₂のアシル鎖長を有する糖アシル界面活性剤のクラスの発泡剤である、項目48に記載の方法。

(項目50)

前記発泡剤が、少なくとも2種、好ましくは3種の糖界面活性剤を含むか、またはそれからなる、項目47から49のいずれかに記載の方法。

(項目51)

前記発泡剤の糖アシル界面活性剤が、ピラノシド(特に、グルコピラノシド)、マルトシド、およびアシルスクロース界面活性剤のクラスから選択される、項目48から50のいずれかに記載の方法。

(項目52)

前記糖アシル界面活性剤が、OGP、ODM、DGPおよびDdGP、TGP、HGP、DMP、デシルスクロース(nDS)、ドデシルスクロース(nDdS)、好ましくはOGM、DMPおよびDdGPからなる群から選択される、項目48から51のいずれかに記載の方法。

(項目53)

ステップ(b)で使用される前記架橋剤が、カルボジイミドカップリング剤、例えばN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイニド(ethylcarbodiiniide)(EDC); N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、アジドカップリング剤; ジイソシアネート架橋剤、例えばヘキサメチレンジイソシアネート; エポキシド架橋剤、例えばエピクロロヒドリン、グリシジルエーテルおよびグリシジルアミン; ならびにアルデヒド架橋剤、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサールから選択される、項目37から52のいずれかに記載の方法。

(項目54)

前記架橋剤が、アルデヒド架橋剤、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよ

10

20

30

40

50

びグリオキサールを含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記アルデヒド架橋剤が、グルタルアルデヒドである、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

還元剤または毒性低減剤、例えば水素化ホウ素ナトリウムまたはリシンを添加するステップをさらに含む、項目 3 7 から 5 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 7)

前記混合ステップ (a) が、例えば曝気により混合して発泡させることによって達成される、項目 3 7 から 5 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 8)

ステップ (a) で得られた前記混合物が、前記インキュベーションステップ (b) の前にキャストイングされ、凍結され、任意選択で凍結乾燥される、項目 3 7 から 5 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 9)

二価または多価金属イオン、例えばカルシウム、例えば塩化カルシウムを添加するステップをさらに含む、項目 3 7 から 5 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 0)

混合ステップ (a) のための前記混合物が、タンパク質安定剤として糖をさらに含み、前記糖が、小さいポリオールまたは炭水化物、例えばグリセロール、ソルビトール、スクロースまたはトレハロースである、項目 3 7 から 5 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 1)

前記糖が、ステップ (a) の前記混合物中、フィブリノゲンに対して好ましくは 1 0 ~ 1 1 w t % の量、好ましくは 4 ~ 7 . 5 w t % の量のトレハロースである、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

(i) ステップ (a) の前記混合物が、前記インキュベーションステップ (c) の前に、所定の形状の型でキャストイングされ、凍結され、任意選択で凍結乾燥されるか、または (i i) ステップ (d) の生成物が、所定の形状の型で生成され、次に前記生成物が凍結され、任意選択で凍結乾燥されるかのいずれかである、所定の形状を有する細胞外マトリックス組成物を調製するための、項目 3 7 から 6 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 3)

前記増量剤が、アルギン酸塩、例えばアルギン酸ナトリウムまたは誘導体化アルギン酸塩、例えばプロピルグリコアルギン酸ナトリウムである、項目 3 7 から 6 2 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 4)

前記増量剤が、グリコサミノグリカン (G A G ; 例えばコンドロイチン 6 - 硫酸、コンドロイチン 4 - 硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、キチン、キトサン、デキストラン硫酸またはヒアルロン) である、項目 3 7 から 6 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 5)

前記増量剤が、ヒドロキシエチルデンプン、エチルセルロース、キサンタンガムおよびアガロースから選択される、項目 3 7 から 6 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 6)

項目 6 から 6 5 のいずれかに記載の方法によって得られた、または入手可能である、細胞外マトリックス材料。

(項目 6 7)

リン酸カルシウム鉱物相が、前記細胞外マトリックス材料の重量の少なくとも 1 0 %、好ましくは少なくとも 2 0 %、より好ましくは少なくとも 5 0 % である、項目 1 から 5 または 6 6 のいずれかに記載の細胞外マトリックス材料。

(項目 6 8)

10

20

30

40

50

in vitro、ex vivoもしくはin vivoでの骨再生のため、または骨欠損の処置のための医薬品の製造において使用するための、項目1から5または66に記載の細胞外マトリックス組成物の使用。

(項目69)

項目1から5または66に記載の細胞外マトリックス材料を、骨欠損、例えば創傷または骨折に適用するステップを含む、骨再生の方法。

(項目70)

in vitro、ex vivoもしくはin vivoでの骨再生において使用するため、または骨欠損を処置するための、項目1から5または66のいずれかに記載の細胞外マトリックス材料。

(項目71)

リン酸カルシウム鉱物相が、オルトリン酸カルシウム化合物、好ましくはヒドロキシアパタイトを含む、項目1から5または66のいずれかに記載の細胞外マトリックス材料。

(項目72)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、オルトリン酸カルシウム化合物、好ましくはヒドロキシアパタイトを含む、項目7から65のいずれかに記載の方法。

(項目73)

リン酸カルシウム鉱物相が、リン酸八カルシウムを含む、項目1から5または66のいずれかに記載の細胞外マトリックス材料。

(項目74)

リン酸カルシウム鉱物相が、非晶質および／または結晶性リン酸カルシウム鉱物相を含む、項目1から5、66または73のいずれかに記載の細胞外マトリックス材料。

(項目75)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、リン酸八カルシウムを含む、項目7から65のいずれかに記載の方法。

(項目76)

前記リン酸カルシウム鉱物相が、非晶質および／または結晶性リン酸カルシウム鉱物相を含む、項目7から65のいずれかに記載の方法。

【0106】

ここで、本発明の例を、添付の図を参照しながら例として記載する。

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1】図1は、150倍および40,000倍の拡大率におけるSmart Matrix（登録商標）の、相互接続した開口多孔性および線維性質、ならびにそのミクロ多孔性（左）およびナノ多孔性（右）を示すSEM写真を示しており、線維は、in vivoシナリオを模倣するナノサイズであり、細胞は、ナノサイズの細胞外マトリックスと接触している。

【0108】

【図2】図2は、模擬体液（SBF）に浸漬させた後の経時的な鉱物堆積を示す、40,000倍におけるリン酸カルシウム-Smart Matrix（登録商標）（CaP-SM）のSEM写真を示す。左上は、SBF中2日間、右上は、SBF中4日間、左下は、SBF中6日間、および右下は、SBF中9日間浸漬させたものである。

【0109】

【図3】図3は、SBFに浸漬させた後のミクロ多孔性の低減を示す、150倍におけるCaP-SMのSEM写真を示す。左上は、SBF中2日間、右上は、SBF中4日間、左下は、SBF中6日間、および右下は、SBF中9日間浸漬させたものである。

【0110】

【図4】図4は、SBFに6日間浸漬させた後のSmart Matrix（登録商標）（スペクトル1）およびCaP-SM（スペクトル2）のEDX分析を示しており、CaおよびPが、Mgも含有するCaP堆積物の主な元素であることを示している。

10

20

30

40

50

【0111】

【図5】図5は、この研究で使用したSmart Matrix（登録商標）足場のエオシン染色を示す（4倍の拡大率）（左）。エオシン対比染色によるVon Kossa染色（10倍の拡大率）（右）。

【0112】

【図6-1】図6は、SBFに浸漬させて2日目、6日目および9日目の、対照試料（Smart Matrix（登録商標））についてのVon Kossa染色結果を示す。左の写真は、20倍の拡大率であり、右の写真は、40倍の拡大率である。

【図6-2】図6は、SBFに浸漬させて2日目、6日目および9日目の、対照試料（Smart Matrix（登録商標））についてのVon Kossa染色結果を示す。左の写真は、20倍の拡大率であり、右の写真は、40倍の拡大率である。

10

【0113】

【図7】図7は、異なる期間にわたってSBFに浸漬させた、Smart Matrix（登録商標）（CaP-SM0）およびCaP-SMのin vitro分解を示す。上は、7日間（168時間）までの結果であり、下のクローズアップは、最初の6時間におけるCaP-SM足場の分解速度が、Smart Matrix（登録商標）と比較して激減することを示す結果である。結果は、アベレージ±標準偏差を示す。

【0114】

【図8】図8は、alamarBlue（登録商標）アッセイの結果を示している（* $p < 0.05$ ）。結果は、アベレージ±標準偏差を示す。

20

【0115】

【図9】図9は、10日間培養した後のヒト皮膚線維芽細胞を播種したCaP-SM足場の横断面のH&E染色を示す。左上は、Smart Matrix（登録商標）であり（20倍の拡大率）、右上は、SBFに2日間浸漬させた後のCaP-SMであり（40倍の拡大率）、左下は、SBFに6日間浸漬させた後のCaP-SMであり（40倍の拡大率）、右下は、SBFに9日間浸漬させた後のCaP-SMである（40倍の拡大率）。この図では白黒バージョンで目に見えないが、足場は、鮮やかなピンク色に染色されており、細胞は、紫色に染色されているように見える。

【0116】

【図10】図10は、CaP-SM1、CaP-SM2、SM1およびSM2のSEM写真を示す。

30

【0117】

【図11】図11は、CaP-SM1、CaP-SM2、SM1およびSM2の鉱物堆積物における主な元素のEDX元素分析を示す。

【0118】

【図12】図12は、CaP-SM、SM1およびSM2足場についてのFTIRの代表的スペクトルを示す。

【0119】

【図13】図13は、SM1、SM2、CaP-SM1およびCaP-SM2の足場のVon Kossa染色を示す。

40

【0120】

【図14】図14は、1%トリプシンを使用した、CaP-SM1およびCaP-SM2足場のin vitro生分解の写真を示す。

【0121】

【図15】図15は、MC3T3-E1骨前駆細胞で行った生存／死滅アッセイから、1日目および28日目に得られた結果を示す。+OMは、骨形成培地を示し、-OMは、標準培地を示す（骨形成補充物を含まない）。

【0122】

【図16】図16は、MC3T3-E1骨前駆細胞を用いて行った、Smart Matrix（登録商標）、CaP-SM1およびCaP-SM2を播種した足場についての、

50

骨形成培地中28日間の培養期間にわたるa l a m a r B l u e（登録商標）アッセイの結果を示す。結果は、アベレージ±標準偏差を示す。

【0123】

【図17】図17は、MC3T3-E1骨前駆細胞を用いて行った、標準（-OM）または骨形成（+OM）条件下のいずれかで28日間培養した後の、播種した足場のH&E染色を示す。この図では白黒バージョンで目に見えないが、細胞核は、周辺にピンク色の細胞質を伴って濃い紫色に見えており、足場は、ピンク色／濃いピンク色に染色されている。

【0124】

【図18】図18は、標準（-OM）または骨形成（+OM）条件下のいずれかで28日間培養した後の、MC3T3-E1を播種したSmart Matrix（登録商標）、CaP-SM1およびCaP-SM2足場のDAPI染色切片を示す。この図では白黒バージョンで目に見えないが、細胞核は、青色蛍光に見えている。スケールバーは500 μmである。

10

【0125】

【図19】図19は、MC3T3-E1骨前駆細胞を用いて行った、標準（-OM）または骨形成（+OM）条件下のいずれかで28日間培養した後の、播種した足場の代表的SEM画像を示す。

【0126】

【図20】図20は、標準（-OM）または骨形成（+OM）条件下のいずれかで28日間培養した後の、MC3T3を播種した足場におけるオステオポンチンの免疫染色を示す。この図では白黒バージョンで容易には目に見えないが、赤色蛍光は、オステオポンチンの存在を示し、青色蛍光は、細胞核を示す。

20

【0127】

【図21】図21は、標準（-OM）または骨形成（+OM）条件下のいずれかで28日間培養した後の、MC3T3を播種した足場におけるVon Kossa染色を示す。この図では白黒バージョンで容易には目に見えないが、黒色／暗褐色は、CaP堆積物を示し、ピンク色は、フィブリン線維を示す。

【0128】

【図22】図22は、（上）異なる足場および対照の代表的な巨視的画像、ならびに（下）足場および対照についての血管領域の百分率（平均±平均の標準誤差）を示す。3種の足場の間に、統計的有意性は見出されなかった。

30

【実施例】

【0129】

（実施例1）

材料および方法

・Smart Matrix（登録商標）の調製

Smart Matrixの製造方法は、3つの別個の段階で行われる。

1）予め加温した（37℃）試薬を激しく混合して（4000 rpm）、白色の発泡物を形成し、それを、型にキャストし、37℃で1時間インキュベートして凝固させる。

2）80%無水エタノール／20%MES緩衝液中、0.2% vol／volのグルタルアルデヒド（Sigma-Aldrich、UK）を用いて室温で4時間、化学的に架橋した後、d i H₂Oで1回洗浄し（10分）、d i H₂O中0.1% wt／volのNaBH₄（Sigma-Aldrich、UK）で1回洗浄し（一晚）、d i H₂O中0.1% wt／volのNaBH₄で5回洗浄し（10分）、d i H₂Oで5回洗浄して（10分）、残留している可能性がある任意のグルタルアルデヒドおよびその還元剤NaBH₄を排除する。

40

3）-40℃で36時間、足場を凍結乾燥させる（Virtis Genesis Freeze Dryer、Biopharma、UK）。

【0130】

第1の段階で混合した試薬は、以下のものである。

50

- ・MES緩衝液、 $\text{pH}=7.4$ 中、 $2\% \text{wt/vol}$ のアルギン酸塩 (Novamatrix、Norway) 3 ml
- ・ dH_2O 中 1 M CaCl_2 (Sigma-Aldrich、UK) $25 \mu\text{l}$
- ・MES/ NaCl 緩衝液、 $\text{pH}=7.4$ 中、 $2\% \text{wt/vol}$ の透析ヒトフィブリノゲン (RiaSTAP (登録商標)、CSL Behring Ltd.、UK) (Sharmaら、2015年) またはウシフィブリノゲン (Sigma-Aldrich、UK) 6 ml
- ・界面活性剤ミックス [dH_2O 中 $20\% \text{wt/vol}$ のPluronic F-68 (Sigma-Aldrich、UK)、 dH_2O 中 $20\% \text{wt/vol}$ のデシル- β -D-マルトピラノシド (Sigma-Aldrich、UK)、 dH_2O 中 $20\% \text{wt/vol}$ のドデシル- β -D-グルコピラノシド (Sigma-Aldrich、UK)、および dH_2O 中 $20\% \text{wt/vol}$ のオクチル- β -D-マルトピラノシド (Sigma-Aldrich、UK)] (WO2013164635A1) $750 \mu\text{l}$
- ・HEPES/ NaCl 緩衝液、 $\text{pH} 7.4$ 中、 10 I.U. / ml のヒトトロニン (TISSEEL (登録商標)、Baxter International Inc.、US) または透析ウシトロニン (Sigma-Aldrich、UK) 1.2 ml
- ・ dH_2O 中 $66\% \text{wt/vol}$ のトレハロース (Fisher Scientific、UK) 1.5 ml

【0131】

- ・模擬体液 (SBF) に浸漬させることによるリン酸カルシウム-Smart Matrix (登録商標) (CaP-SM) の調製

SBF溶液を、Kokuboら、1990年によって記載されているプロトコールに従って調製した。SBF溶液は、定義された濃度の関連するイオンを含有していた (表1)。

【表1】

イオン	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}
mM	142	5	1.5	2.5	148.8	4.2	1

表1: SBF溶液中の関連するイオンの濃度。

【0132】

SBF溶液を調製するために、以下の量および試薬を、 0.4 L の dH_2O に添加した。 0.152 g の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 0.176 g の NaHCO_3 、 0.114 g の $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 0.139 g の CaCl_2 、 0.112 g の KCl および 4.027 g の NaCl 。溶液を、10分間激しく攪拌した。 pH を、 $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ 50 mM / HCl 45 mM の緩衝液で7.25に調整した。最後に、体積を dH_2O で 0.5 L まで増大し、溶液を、10分間激しく攪拌した。

【0133】

$1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ のSmart Matrix (登録商標) 足場を、 37°C で9日間までSBFに浸漬させた。SBF溶液は、2~3日ごとに変更した。浸漬時間が経過した後、足場をSBF溶液から除去し、 dH_2O で洗浄し、 -80°C で凍結し、凍結乾燥させた。

【0134】

- ・走査電子顕微鏡 (SEM) およびエネルギー分散X線分光法 (EDX)
- SEMおよびEDX分析を、ロンドン大学クイーンメアリーのNanovision Centreで実施した。

【0135】

SBFに浸漬してから0、2、4、6および9日後の凍結乾燥させたCaP-SM試料に、金をスパッタリングコーティングした後、SEMおよびEDX分析で観測した。

【0136】

SEM顕微鏡写真を、150倍、500倍、2,000倍、10,000倍、20,000倍および40,000倍の拡大率で撮影し、 5 kV で得た。足場の形態、定性的な孔径、CaP結晶堆積物の形態およびサイズを、SEM画像から研究した。

【0137】

CaP-SM足場の元素分析およびCa/P比を、10kVで得られたEDXスペクトルから研究した。

・横断面のVon Kossa染色

【0138】

CaP-SM足場をパラフィンに包埋し、横断面を、ミクロトームを使用して厚さ4μmにカットした。

【0139】

Von Kossa染色の原理は、銀イオンが酸性条件下でリン酸と反応する沈殿反応である。次に、照明光の下で、リン酸銀から銀への光化学的分解が生じる。AgNO₃ 1.5gをdH₂O 100mlに添加することによって、1.5%硝酸銀溶液を調製した。同様に、Na₂S₂O₃ 2.5gをdH₂O 100mlに添加することによって、2.5%チオ硫酸ナトリウム溶液を調製した。

【0140】

スライドを、1.5%硝酸銀溶液でカバーし、明光に1時間曝露した後（ランプの下）、dH₂Oで洗浄した。次に、スライドを2.5%チオ硫酸ナトリウムで5分間カバーし、流水に浸した後、エオシン対比染料に5分間浸漬させた。スライドを70%IMSに浸し、次に90%IMSに浸し、100%IMSに1分間浸漬させた。最後に、キシレンに2分間浸漬させ、キシレンに2回浸し、乾燥させておき、光学顕微鏡下で観測するためにカバースリップを乗せた。CaP堆積物は、黒色／暗褐色に染色されており、Smart Matrix（登録商標）は、ピンク色／赤色に染色されていた。

【0141】

・in vitro生分解性（トリプシン消化）

1cm×1cmのCaP-SM足場（SBFへの浸漬時間当たりn=3）を、12ウェルプレートに入れた。足場ディスクを入れた各ウェルに、ベルセン溶液中0.25%トリプシン2.5mlを添加し、プレートを、5%CO₂を用いて37℃でインキュベートした。0、2、4、6、24、48、および168時間（7日）目に、各ウェルから得られた一定分量100μlを、エッペンドルフチューブに移し、-80℃で保存した。各ウェルに、ベルセン溶液中、新しい0.25%トリプシン100μlで補充した。

【0142】

総タンパク質比色アッセイを、一定分量100μlで実施した。0.1～1.5mg/mlのPBS中ウシ血清アルブミンの標準曲線を調製した。一定分量を解凍した後、一定分量から得られた50μlおよび標準を、キュベット中、Bradford Ultra（商標）溶液750μlと混合した。製造者の指示に従って、595nmにおける吸光度を、M550複光束UV／可視分光光度計（Spectronic Camspec Ltd.、UK）で空気に対して測定した。0時点について595nmにおける吸光度を、その他の試料から減算した。標準曲線をプロットし、それを使用して、完全に分解された場合には1×1cmの足場小片が溶液中4mg/mlのタンパク質を有するはずであることを考慮して、溶液中のマトリックスタンパク質の百分率を算出した。

【0143】

・alamarBlue（登録商標）アッセイによる細胞生存度

3人の異なるドナーから得られた正常なヒトの初代皮膚線維芽細胞を使用した。細胞を単離し、既に記載されている通り培養した（Sharmaら、2015年）。

【0144】

SEMによって、SBFに浸漬して2日後に、CaP堆積物が0.2μmまでのサイズになり、6日目および9日目には0.05～0.8μmの大きさの凝集体になることが示される通り、この研究では、SBF中CaP-SMを0、2、6および9日間使用した。さらに、SBFにおいて6日間経過した後よりも9日間経過した後、多くのCaPが観測される。したがってこの研究では、細胞生存度に対するCaP堆積物サイズおよびCaP濃度の効果が観測された。

【0145】

1 cm×1 cmのCaP-SM足場を、プラスチックカバースリップ（単層対照）と共に24ウェルプレートに移し、IMSで1回洗浄した後、PBSで4回洗浄した。細胞集団1つ当たり3つの足場を使用し、したがってn=9であった。

【0146】

足場1つ当たり0.5×10⁶個の細胞を、5回継代して播種し、5%CO₂を用いて37℃で3時間インキュベートした後、細胞を足場に接着させ、ウェルごとに培地2 mLを添加した。

【0147】

培養の1、2、4、7および10日目に、alarBlue（登録商標）アッセイを実施した。ウェルごとにalarBlue（登録商標）作用溶液（フェノールを含まないDMEMで原液を10倍希釈した）1 mLを添加し、試料を、5%CO₂を用いて37℃で4時間インキュベートした後、各ウェルの内容物をキュベットに移し、吸光度を、uv／vis分光光度計で570 nmにおいて測定した。

10

【0148】

結果を、一元ANOVAによってSigma Stat 3.5ソフトウェアを使用して統計的に分析した。p<0.05を有意な結果とみなした。

【0149】

・CaP-SMを介する細胞遊走

播種したCaP-SM足場を、10日間培養した後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン組織学的検査のために処理した。横断面を、ミクロトームを使用して厚さ4 μmにカットした。

20

【0150】

切片を、典型的なヘマトキシリンおよびエオシン染色で染色し、それによって、細胞は紫色／黒色に染色され、バックグラウンドは、鮮やかなピンク色に見える。

【0151】

染色された切片を乾燥させ、光学顕微鏡法で観測するためにカバースリップを乗せた。

【0152】

（実施例2）

結果

30

・SEMおよびEDX分析

図1のSEM画像は、Smart Matrix（登録商標）が、線維から構成された均一で均質な材料であることを示している。この材料は、ミクロ多孔性（30～350 μm）ならびにナノ多孔性（0.06～0.6 μm）を有している。細孔は、相互接続しているように見える。

【0153】

図2に示されているSEM画像は、経時的な鈣物堆積を示している。SBFに2日間浸漬させた後、0.2 μmまでのサイズの球状鈣物堆積物が観測される。SBFに4日間浸漬させた後、フィブリン／アルギン酸塩マトリックスの表面上に球状鈣物結晶が観測され、この結晶は、浸漬時間の延長に伴って成長する。SBFに6日間浸漬させた後、生体材料の表面全体に、球状鈣物結晶（0.05～0.8 μmの大きさの凝集体）が観測される。

40

【0154】

SBF溶液における浸漬時間の延長に伴って、結晶の大きさの増大が見られるが、図2の右下から分かる通り、SBFに9日間浸漬させた後、フィブリン線維がまだ目に見える。このことは、フィブリンの有益な血管新生促進特性および生理活性特性が、結晶の存在によって覆い隠されないはずであることを示唆している。

【0155】

図3の画像は、経時的なCaP堆積物の低拡大率の写真を示しており、これは、SBFにわずか2日間浸漬させた後に、多孔性の低減が顕著である通り、Smart Matrix（登録商標）に見出される元のミクロ多孔性が、SBFに浸漬させると低減することを

50

示唆している（図3、左上）。

【0156】

SBFに6日間浸漬させた後のCaP-SMのEDX分析（図4）は、CaおよびPが、9日目でも球状結晶の主な元素であることを示している。6日目までは、EDAXスペクトルにおいてCaおよびPは検出されない。Ca/P算出値は、 1.7 ± 0.6 であった（アベレージ±標準偏差；ヒドロキシアパタイトのCa/Pは、 1.67 である）。Mgも存在しており、SBFはMg²⁺を含有しており、Mg²⁺は、骨鉱物中に存在することが報告されている代替イオンの1つである（WopenkaおよびPasteris 2005年；LeGeros 2008年）。

【0157】

・横断面のVon Kossa染色

図5は、使用したSmart Matrix（登録商標）足場のエオシン染色（左）およびエオシンを用いた対比染色によるVon Kossaで染色された足場（右）を示す。図から分かる通り、Smart Matrix（登録商標）は、Von Kossa染色の後、より暗色に見える。SEM写真で既に観測された通り、足場の均質な開口細孔構造を見ることが出来る。

【0158】

図6は、模擬体液（SBF）に9日間まで浸漬させた後の、CaP-SM足場のVon Kossa染色結果を示す。試料を、エオシンで対比染色した。CaP堆積物は、黒色／暗褐色に染色されており、Smart Matrix（登録商標）は、ピンク色／赤色に染色されている。

【0159】

写真から観測される通り、足場線維は、SBFへの浸漬によって暗色に見える。黒色／褐色の染色は、SBFへの浸漬期間が長いほど、増大するように見える。足場構造全体にCaP堆積物が見出され、均質に染色されているように見えることが示されていることも興味深い。これらの結果は、足場をSBFに浸漬させる生物模倣手順によって、Smart Matrix（登録商標）全体にCaP堆積物の均質な堆積が達成され得ることを示唆している。

【0160】

・in vitro生分解性（トリプシン消化）

図7は、SBFへの浸漬時間が延長すると、足場のin vitro分解速度が低下することを示している。分解速度は、特に、Smart Matrix（登録商標）と比較して、最初の6時間で低下する。これらの結果は、CaP-SMが、ブタモデルの全層皮膚創傷への埋め込み後5～6週間まで、組織学的切片に観測されたSmart Matrix（登録商標）よりも、in vivoで分解するのにより長時間かかり得ることを示唆している。in vivoでの新しい骨形成は、4カ月間までかかり（HadjidakisおよびAndroulakis 2006年）、したがって、骨の修復にとって、CaP-SMの分解がより緩慢であることが有益であると予測されることを示唆している。

【0161】

・alamarBlue（登録商標）アッセイによる細胞生存度

図8に示されている結果は、細胞がCaP-SM足場上で成長し、増殖できることを示しており、このことは、生物模倣法によって堆積したCaPが、細胞にとって毒性ではないことを示唆している。

【0162】

単層対照と足場上の細胞の間に、4日目までに有意な差異があり（ $p < 0.05$ ）、7日目にはCaP-SM2および6だけにあり、次に10日目には有意な差異はない。このことは、播種効率が100%であるフラット対照と比較して、3D足場上への非効率的な細胞の播種に起因し得る。培養期間が進むと、3D足場の細胞は、フラット対照上よりも増殖する。最後に、Smart Matrix（登録商標）とCaP-SM足場の間に統計的有意差はなく、このことは、Smart Matrix（登録商標）の有益な細胞特性

10

20

30

40

50

が、CaP-SM足場に依然として存在することを示唆している。

【0163】

・CaP-SMを介する細胞遊走

図9の写真は、正常なヒトの初代皮膚線維芽細胞が、CaP-SM足場を介して遊走することができ、10日間培養した後、足場全体に定植したことを示している。

【0164】

(実施例3)

代替足場を形成するための材料および方法

代替足場を、前述した通り、Smart Matrix（登録商標）をSBF溶液に浸漬させることによって配合した。

【0165】

表2は、SBF溶液中に存在する関連するイオンの濃度を記載している。

【表2】

溶液	イオン	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	HPO ₄ ²⁻
SBF-1	mM	766.3	35.9	10.9	18.8	740.9	71.5	3.6	7.1
SBF-2	mM	686.1	31.2	9.3	15.6	728.6	26.1	-	6.2
SBF-3	mM	660	12.4	-	15.6	691.3	-	-	6.2

表2: SBF溶液中の関連するイオンの濃度。

【0166】

SBF-1溶液を調製するために、以下の量および試薬を、0.7LのdH₂Oに添加した。1.465gのCaCl₂、1.555gのMgCl₂・6H₂O、2.520gのNaHCO₃および1.150gのK₂HPO₄・3H₂O。この後、溶液のpHを、1MのHClを使用して6.0に調整した後、その溶液に0.360gのNa₂SO₄、1.125gのKCl、27.015gのNaClおよび2.130gのNa₂CO₃を添加した。最後に、溶液のpHを、1MのHClを使用して6.5に調整した。

【0167】

SBF-2溶液を調製するために、以下の量および試薬を、0.4LのdH₂Oに添加した。0.695gのCaCl₂、0.760gのMgCl₂・6H₂O、0.880gのNaHCO₃および0.570gのK₂HPO₄・3H₂O。この後、溶液のpHを、1MのHClを使用して6.0に調整した後、その溶液に0.560gのKClおよび20.135gのNaClを添加した。最後に、溶液のpHを、1MのNaOHを使用して6.5に調整した。

【0168】

SBF-3溶液を調製するために、以下の量および試薬を、0.4LのdH₂Oに添加した。20.135gのNaCl、0.695gのCaCl₂および0.570gのK₂HPO₄・3H₂O。この溶液のpHを、1MのHClを使用して6.0に調整した。

【0169】

すべての溶液を、使用前に0.22μmのPES膜で濾過した。

【0170】

1cm×1cmのSmart Matrix（登録商標）足場を、SBF-1またはSBF-2溶液のいずれかに、オービタルシェーカーにより160rpmで常に攪拌しながら、37℃で24時間浸漬させた。浸漬時間が経過した後、足場をSBF溶液から除去し、超音波水クリーナー中、dH₂Oで60秒間洗浄し、-80℃で凍結させ、凍結乾燥させた。

【0171】

凍結乾燥させた足場を、SBF-3に、オービタルシェーカーにより80rpmで常に攪拌しながら、37℃で48時間、さらに浸漬させることができる。浸漬時間が経過した後

10

20

30

40

50

、足場をSBF-3溶液から除去し、超音波水クリーナー中、dH₂Oで60秒間洗浄し、-80℃で凍結させ、凍結乾燥させた。

【0172】

凡例：

SM1：dH₂Oに24時間浸漬させたSmart Matrix（登録商標）足場（CaP-SM1の対照）。

SM2：dH₂Oに48時間浸漬させた、凍結乾燥させたSM1足場（CaP-SM2の対照）。

CaP-SM1：SBF-1に24時間浸漬させたSmart Matrix（登録商標）足場。CaP鉱物堆積物は、球状形態を示す。

CaP-SM2：SBF-3にさらに48時間浸漬させた、凍結乾燥させたSmart CaP1足場。CaP鉱物堆積物は、プレート様の形態を示す。

【0173】

（実施例4）

代替足場を試験するための方法および結果

a) 走査電子顕微鏡（SEM）およびエネルギー分散X線分光法（EDX）

【0174】

図10に示されている結果は、CaP-SM1のフィブリンマトリックス全体に均一に分布した、球状形態のCaP鉱物堆積物を示している。CaP-SM2には、プレート様の形態が観測される。SM1およびSM2は、Smart Matrix（登録商標）に見られる典型的な線維を示している。

【0175】

EDX元素分析（図11）は、CaP-SM1およびCaP-SM2の鉱物堆積物の主な元素がCaおよびPであることを示した。Ca/P算出値は、CaP-SM1およびCaP-SM2について、それぞれ 1.29 ± 0.28 および 1.02 ± 0.37 であった（アベレージ±標準偏差）。Mgも、CaP-SM1スペクトルに存在していた。

【0176】

b) フーリエ変換赤外分光法（FTIR）およびX線回折（XRD）

CaP堆積物における官能基の分析を、FTIRによって行った。足場を、減衰全反射アクセサリ（Golden Gate ATR、Specac、UK）と接触させて置くことによって、スペクトルを得た。スペクトルソフトウェアv5.0.1（Perkin-Elmer、UK）によって、各化学基のピーク強度を同定した（波数は、 $500 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ の間で固定し、分解は 4 cm^{-1} とした）。

【0177】

CaP堆積物の相の組成および結晶化度を、XRDによって、グラファイトフィルターを通したCu K α 放射線を用いてRIGAKU D/max 2500回折計を40kVおよび80mAで操作して使用して研究した。データを、 $2\theta = 5^\circ \sim 80^\circ$ からステップサイズ 0.03° で収集した。

【0178】

図12に示されているFTIRスペクトルは、対照（SM1およびSM2）とCaP-SM足場の間に差異が存在することを示している。CaP-SM試料では、PO₄バーストピークを、およそ 1050 cm^{-1} において見ることができ、その後およそ 850 cm^{-1} において小さいショルダーピークを見ることができるが、それらは、HPO₄基またはCO₃基またはその両方に起因し得る。特にCaP-SM2で目に見えるおよそ 600 cm^{-1} におけるピークは、PO₄基に起因し得る。CaP-SM1でおよそ 1450 cm^{-1} において見られる小さいピークは、CO₃基に起因し得る。さらに、スペクトルは、CaP-SM1と比較してCaP-SM2においてPO₄ピークの強度が大きくなることを示しており、このことは、CaP-SM1足場よりもCaP-SM2において、より多量のリン酸鉱物相が堆積したことを示唆している。FTIRの結果は、CaP堆積物中PO₄が存在し、特にCaP-SM1において、場合によりHPO₄およびCO₃基の両方

10

20

30

40

50

が存在することを示唆している。

【0179】

CaP-SM1足場におけるCaP堆積物が非常に非晶質であり、XRDが、非常に非晶質の鉱物相を検出しない通り、CaP-SM1のXRDスペクトルは、ピークを示さなかった。CaP-SM2では、XRDスペクトルによって、ヒドロキシアパタイト(HA)および／またはリン酸八カルシウム(OCp)に対応し得るピークが明らかになった。しかし、これらのピークはブロードであり、このことは、CaP-SM2中に存在するCaP鉱物相が、あまり結晶性でなかったことを示している。EDXによって算出されたCa/P比が、およそ1であることを考慮すると、CaP-SM2は、CaP相、例えばOCpと非晶質リン酸カルシウム(ACP)の組合せから構成され得る。OCpおよびACPについて、それぞれCa/P=1.33およびCa/P=0.67~1.5(Habrakenら、2016年)。

10

【0180】

c) 横断面のVon Kossa染色

図13は、エオシンを用いた対比染色によるVon Kossaで染色された足場を示している。図13では容易には目に見えないが、CaP鉱物堆積物は、黒色／暗褐色に染色されており、フィブリン線維は、ピンク色／赤色に染色されている。図13から観測される通り、CaP鉱物堆積物は、足場構造全体に見出され、このことは、足場全体にCaPが均質に堆積したことを示唆している。SM1およびSM2対照試料にはCaP鉱物堆積物は観測されなかった。

20

【0181】

d) レオロジー

レオロジーは、材料ならびに生体組織の粘弾特性(固体および流体の両方)を研究する工学部門である(Holtら、2008年;Saitohら、2010年)。Kinexusレオメータ(Malvern Instruments、UK)を振動モードで使用した。各足場から、2cm×2cmの試料を調製し、2つの直径20mmの並行プレートの間に置いた(プレート間の間隔=0.3mm)。試料を水和させ、統合温度調節器を使用して、試料ステージの温度を20℃に維持した。「振幅掃引」および「周波数掃引」を含めた測定の組合せを、各試料に対して行った。「振幅掃引」は、0.05から5%に線形増加する調節応力を適用することによって実施した。応力に対応する歪みを記録した。発振周波数は、1Hzに維持した。線形粘弾性領域(LVER)内の最大の歪みは、「振幅掃引」から選択された。せん断または貯蔵弾性率G'を、異なる試料について算出した。G'は、弾性に関するものであり、材料が、どのようにして弾性変形の形態で再使用することができるエネルギーを貯蔵するかの指標となる。したがって、G'は、材料の固体の特徴に関する。

30

【0182】

異なる足場のG'算出値(平均±標準誤差平均として)は、SM1では11.24±2.54kPa、SM2では11.04±2.33kPa、CaP-SM1では75.22±55.40kPa、CaP-SM2では561.33±109.79kPaであった。したがって、CaP鉱物相をフィブリンベースのマトリックスに添加すると、材料が強化される。プレート様の形態は、球状形態よりも足場を強力にする。

40

【0183】

e) in vitro生分解性(トリプシン消化)

足場(Smart Matrix(登録商標)、脱塩骨マトリックスまたはDBM、CaP-SM1およびCaP-SM2)を、5mm×5mmの正方形の小片にカットした後、pH7.2の1%トリプシンで37℃において48時間まで処理した。足場を、対照としてのPBS単独に浸漬させた。試料を、0時間、18時間、24時間および48時間目に、キャノンのカメラを使用して巨視的に画像化し、立体顕微鏡を使用して微視的に画像化した。

【0184】

図14の画像は、48時間後にSmart Matrix(登録商標)およびDBMの両

50

方が完全に分解するが、CaP-SM1およびCaP-SM2の小片はまだ目に見えていることを示している。CaP-SM1は、1%トリプシン中で48時間経過した後、CaP-SM2よりも分解の程度が大きかった。これらの結果は、CaP-SM足場が、Smart Matrix（登録商標）またはDBMよりもin vivoで分解するのに長時間かかり得ることを示唆している。

【0185】

f) 生存／死滅およびalamarBlue（登録商標）アッセイによる細胞生存度および増殖

足場（対照として使用したSmart Matrix（登録商標）、CaP-SM1およびCaP-SM2）を、5mm×5mmの正方形の小片にカットし、70%IMSで滅菌し、PBSで3回洗浄し、平底24ウェル超低接着プレートに入れた。足場に、培地20μl中、 1×10^5 個のMC3T3-E1サブクローンマウス前骨芽細胞（骨前駆細胞）を播種した。播種した後、プレートを、37℃において5%CO₂を用いて3時間インキュベートして、細胞を足場に接着させた。接着のためのインキュベーション時間が経過した後、骨形成補充物（50μg/mlのアスコルビン酸、10mMのβ-グリセロリン酸塩および100nMのデキサメタゾン）を含む（+OM）または含まない（-OM）、αMEM（1%抗生物質および10%ウシ胎仔血清を含むイーグル最小必須培地アルファ改変型）1mlを、ウェルごとに添加し、37℃において5%CO₂を用いて28日間にわたって培養した。

【0186】

播種した足場を、細胞の組込みおよび生存度について、生存／死滅細胞染色を使用して製造者の指針（Sigma）に従って評価した。ここで、生存細胞は、緑色蛍光を発し、死滅細胞は、赤色蛍光を発する。簡潔には、足場をPBSで洗浄した後、生存／死滅染色溶液で染色し、次に暗室中、37℃および5%CO₂で30分間、染色手順を実施した。生存細胞および死滅細胞を、蛍光画像化および共焦点顕微鏡によって可視化した。

【0187】

播種した足場を、新しい24ウェルプレートに移し、ウェルごとにalamarBlue（登録商標）作用溶液（10%FCSおよび1%抗生物質を補充した、フェノールを含まないダルベッコ改変イーグル培地で原液を10倍希釈した）1mlを添加し、試料を、37℃で5%CO₂を用いて3時間インキュベートした後、各ウェルの内容物をキュベットに移し、吸光度を、uv／vis分光光度計で570nmにおいて測定した。

【0188】

結果は、細胞が培養期間にわたって生存可能なままであり、増殖できることを示した。生存／死滅アッセイは、標準条件および骨形成条件下の両方で、あらゆる足場上に緑色蛍光性の細胞（生存可能）を示した（図15）。また画像は、細胞が、Smart Matrix（登録商標）と比較してCaP-SM足場において集団で成長することを示している。細胞は、最初、14日目にプラトーに達するまで、Smart Matrix（登録商標）対照およびCaP-SM1足場でより急速に増殖するよう見えたと、CaP-SM2では、細胞は、培養期間にわたって成長のプラトーに達しなかった（図16）。これらの結果は、CaP-SM1およびCaP-SM2が、Smart Matrix（登録商標）の有益な細胞特性を保っていることを示唆している。

【0189】

g) CaP-SMを介する細胞遊走

播種したCaP-SM足場を、28日間培養した後、実施例1と同様に4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン組織学的検査のために処理し、標準ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色した。

【0190】

図17の画像は、MC3T3-E1細胞が、CaP-SM足場を介して遊走することができ、28日培養した後、足場全体に定植したことを示している。Smart Matrixは、in vitroおよびin vivoの両方で細胞の流入および遊走を促進するこ

10

20

30

40

50

とが示されており（Garcia-Garetaら、2013年；Sharmaら、2016年）、これらの結果は、CaP-SM足場がこの特性を保持していることを示している。

【0191】

さらに、Smart Matrix（登録商標）、CaP-SM1およびCaP-SM2足場におけるMC3T3-E1細胞の分布を、標準（-OM）および骨形成（+OM）条件下で28日間培養した後、核のDAPI染色を使用して調査した。組織学的スライドを脱パラフィン処理し、再水和させ、蒸留水で洗浄した後、DAPIマウント培地を含むFluoroshield（商標）（F6057 Sigma）を、製造者の指示に従って適用した。簡潔には、バイアルを室温にし、マウント培地1～2滴を試料の上に直接適用し、室温でおよそ5分間静置した。次に、切片に、気泡が入らないように注意深くカバースリップを乗せ、端部をマニキュア液で封止した。次に、切片を、共焦点走査型レーザー顕微鏡を使用し、DAPIのために405nm波長のレーザーを使用して画像化した（励起372、発光456）。切片を、足場のXY面全体についてタイル走査し、次に、共焦点顕微鏡の5%オーバーラップ自動化機能を使用して重ね合わせた。

10

【0192】

図18の画像は、細胞が、足場全体に定植し、足場の深さにわたって均質に分布していることを示している。

【0193】

h) 細胞の取込み

標準条件または骨形成条件下のいずれかで28日間培養した後、播種した足場を、2.5%グルタルアルデヒドで固定した。1時間の1%四酸化オスミウム（Sigma-Aldrich）による固定の前後に、試料を0.1Mのカコジル酸ナトリウム緩衝液で洗浄した。この後、等級シリーズのIMS（20%～60%）およびエタノール（70%～100%）によって試料を脱水させた。試料を、100%エタノール中に残し、エタノールを一晩で蒸発させた。乾燥させた細胞化試料および無細胞試料をスタブにマウントし、炭素コーティングし（Agar Auto Sputter Coater、Agar Scientific）、SEM顕微鏡（FEI Inspect F、Oxford Instruments、Oxford、UK）で観察した。

20

【0194】

結果は、標準培養条件および骨形成培養条件の両方において、細胞がCaP-SM足場に取り込まれたことを示した（図19）。細胞は、相互接続した細胞の層を形成し、その一部の領域が、足場内に埋め込まれていることが分かる。すべての試料で、一部の細胞質突起が見られる。これらの結果は、CaP-SM足場の良好な細胞特性を実証している。

30

【0195】

i) 骨形成分化

足場（対照として使用したSmart Matrix（登録商標）、CaP-SM1およびCaP-SM2）を、既に説明した通り、5mm×5mmの正方形の小片にカットし、滅菌し、 1×10^5 個のMC3T3-E1を播種し、標準培地および骨形成培地の両方で培養した。

【0196】

非コラーゲン性マトリックスの堆積を、パラフィン包埋切片のオステオポンチン免疫染色によって評価した。簡潔には、抗原回復を、熱媒介性抗原回復によって、pH6のクエン酸ナトリウム緩衝液を使用して実施した。抗原が回復した後、切片を、5%ウシ血清アルブミンを使用して35℃で1時間ブロックし、一次抗オステオポンチン抗体（1:50、abcam ab8448）で4℃において一晩染色した。この後、切片を、alex fluor 546二次抗体を使用して室温で2時間染色した。次に、切片を洗浄し、DAPIをベースとするマウンティング培地でマウントし、カバースリップを乗せ、Leica DM IRE2共焦点顕微鏡を使用して可視化した。

40

【0197】

鉱物化を、既に説明した通りVon Kossa染色によって評価した。

50

【0198】

骨の細胞外マトリックス中に存在するタンパク質であるオステオポンチンの免疫染色は、MC3T3-E1が、CaP-SM1およびCaP-SM2足場において骨形成経路に分化したことを示した（図20、ここで赤色蛍光はオステオポンチンの存在を示しているが、これは、白黒バージョンの図では容易に観測することができない）。予想通り、骨形成条件下で培養した試料では、より多くの分化が観測された。Von Kossa染色は、Smart Matrix（登録商標）対照と比較して、播種したCaP-SM足場において鉱物が広範に堆積したことを示した（図21）。

【0199】

これらの結果は、CaP-SM足場中に存在するCaP鉱物堆積物が、骨形成経路への骨前駆細胞の分化を促進することを示している。

【0200】

j) 血管新生

足場の潜在的な血管新生促進可能性を、ex ovo絨毛性尿膜（CAM）アッセイを使用して評価した。足場（対照として使用したSmart Matrix（登録商標）、CaP-SM1およびCaP-SM2）を、5mm×5mmの正方形の小片にカットし、70%IMSで滅菌し、PBSで3回洗浄した。陰性および陽性対照を、足場と平行に実施した。濾紙に、PBS（陰性）または10ng/mlの血管内皮成長因子（VEGF）溶液（陽性）のいずれかを浸み込ませた。ニフトリの有精卵を、37.5℃、3%CO₂でインキュベートし、湿度を35%～45%の間に維持した。インキュベーション後3日目に、胚を、湿度75～80%およびインキュベーション温度37.5℃で、卵殻を含まない培養系に移した。卵殻なしの培養時間が経過して6日目に、足場を、成長しているCAM上に適用した。すべての足場の血管新生を、立体顕微鏡を使用して写真を撮影することによって巨視的に調査した。ImageJソフトウェアを使用して、巨視的写真を分析し、足場ごとの血管面積の百分率を算出した。

【0201】

CAMアッセイから得られた結果（図22）は、CaP-SM1およびCaP-SM2足場が、Smart Matrix（登録商標）足場と非常に類似した、潜在的な血管新生促進可能性を有していることを示した。Smart Matrix（登録商標）は、in vivoで血管新生を促進することが示されており、したがって結果は、CaP-SM1およびCaP-SM2足場が、CaP鉱物相を添加した後、この潜在的な血管新生促進可能性を保持するはずであることを示唆している。

【0202】

参考文献

- Ahmed TAE, Dare EV, Hincke M. (2008) Fibrin: A versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B* 14(2), 199-215.
- Cui G, Li J, Lei W, Bi L, Tang P, Liang Y, Tao S, Wang Y. (2010) The mechanical and biological properties of an injectable calcium phosphate cement-fibrin glue composite for bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 92(2), 377-85.
- Dong J, Cui G, Bi L, Li J, Lei W. (2013) The mechanical and biological studies of calcium phosphate cement-fibrin glue for bone reconstruction of rabbit femoral defects. *Int J Nanomedicine* 8, 1317-24.
- Garcia-Gareta E, Hua J, Knowles JC, Blunn GW. (2013) Comparison of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation between biomimetic and electrochemical coatings on different topographic surfaces. *J Mater Sci Mater Med* 24(1), 199-210.
- Garcia-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. (2015) Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* 81, 112-121.
- Garcia-Gareta E, Ravindran N, Sharma V, Samizadeh S, Dye JF. (2013)

10

20

30

40

50

A novel multiparameter of in vitro model of three-dimensional cell in gress into scaffolds for dermal reconstruction to predict in vivo outcome. *Biores Open Access* 2(6), 412-420.

Hadjidakis DJ, Androulakis II. (2006) Bone remodelling. *Ann NY Acad Sci* 1092, 385-396.

Ignjatovic N, Ajdukovic Z, Uskokovic D. (2005) New biocomposite [biphasic calcium phosphate / poly-DL-lactide-co-glycolide/biostimulative agent] filler for reconstruction of bone tissue changed by osteoporosis. *J Biomed Sci Mater Med* 16(7), 621-6.

Habraken W, Habibovic P, Epple M, Böhner M. (2016) Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Mater Today* 19(2):69-87.

Holt B, Tripathi A, Morgan J. (2008) Viscoelastic response of human skin to low magnitude physiologically relevant shear. *J Biomech* 41(12):2689-95.

Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. (1990) Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res* 24, 721-734.

LeGeros RZ. (2008) Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev* 108, 4742-4753.

Lopez-Heredia MA, Pattipeilohy J, Hsu S, Grykien M, van der Weijden B, Leeuwenburgh SC, Salmon P, Wolke JG, Jansen JA. (2013) Bulk physicochemical, interconnectivity, and mechanical properties of calcium phosphate cements-fibrin glue composites for bone substitute application s. *J Biomed Mater Res A* 101(2), 478-90.

Mishra R, Roux BM, Posukonis M, Bodamer E, Brey EM, Fisher JP, Dean D. (2016) Effect of prevascularization on in vivo vascularization of poly(propylene fumarate)/fibrin scaffolds. *Biomaterials* 77, 255-66.

Perez RA, Kim M, Kim TH, Kim JH, Ho Lee J, Park JH, Knowles JC, Kim HW. (2014) Utilizing core-shell fibrous collagen-alginate hydrogel cell delivery system for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 20, 103-114.

Qian G, Dong Y, Yang W, Wang M. (2012) Injectable calcium phosphate cement and fibrin sealant recombined human bone morphogenetic protein-2 composite in vertebroplasty: an animal study. *Bosn J Basic Med Sci* 12(4), 231-5.

Saitoh S, Sasaki K, Nezu T, Taira M. (2010) Viscoelastic behaviour of commercially available tissue conditioners under compression. *Dent Mater J* 29(4):461-468.

Sharma V, Patel N, Kohli N, Ravindran N, Hook L, Mason C, Garcia-Gareta E. (2016) Viscoelastic, physical, and bio-degradable properties of dermal scaffolds and related cell behaviour. *Biomed Mater* 11:055001.

Sharma V, Blackwood KA, Haddow D, Hook L, Mason C, Dye JF, Garcia-Gareta E. (2015) Method for estimating protein binding capacity of polymeric systems. *Biochimie Open* 1, 40-50.

V. Sharma, N. Patel, J.F. Dye, L. Hook, C. Mason, E. Garcia-Gareta, Albumin removal from human fibrinogen preparations for manufacturing human fibrin-based biomaterials, *Biochimie. Open.* 1 (2015) 6-10

Wopenka B, Pasteris JD. (2005) A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mater Sci Eng C* 25, 131-143.

Xiu J, Fan J, Li J, Cui G, Lei W. (2014) Different angiogenic abilities of self-setting calcium phosphate cement scaffolds consisting of different proportions of fibrin glue. Biomed Res Int 2014:785146.

【図面】

【図 1】

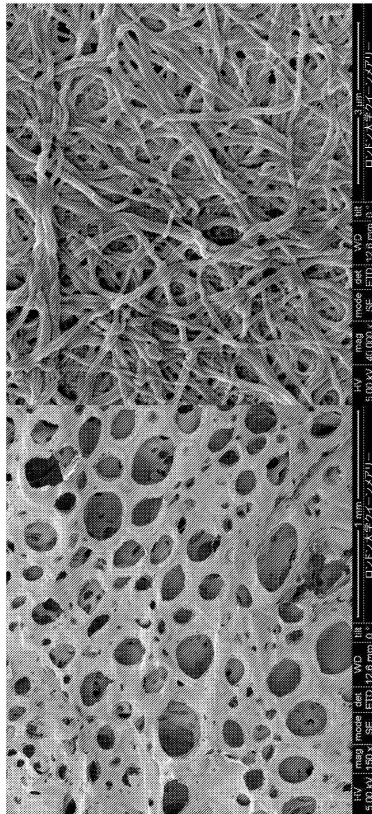


Figure 1

【図 2】

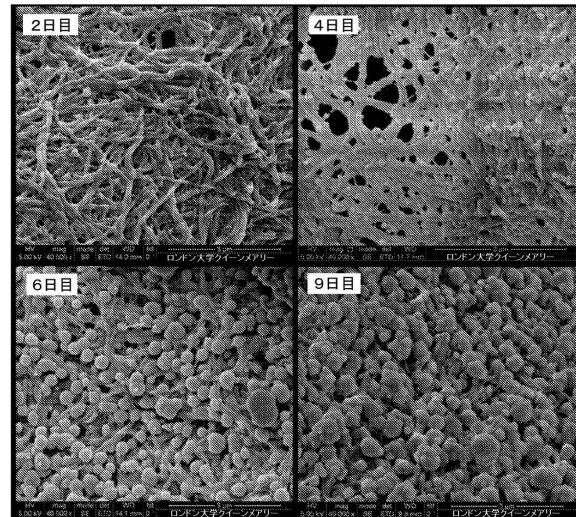


Figure 2

【図 3】

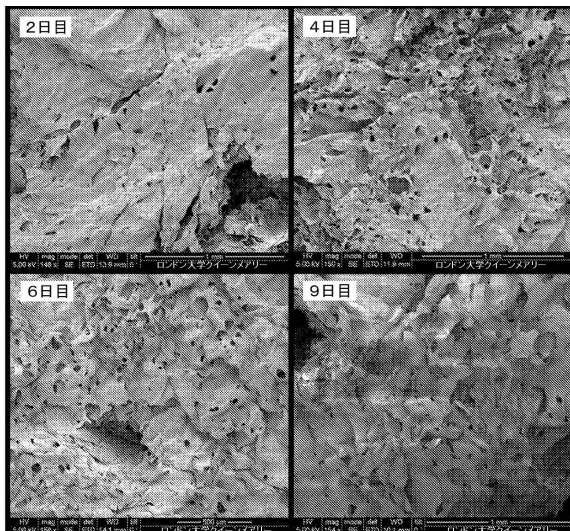


Figure 3

【図 4】

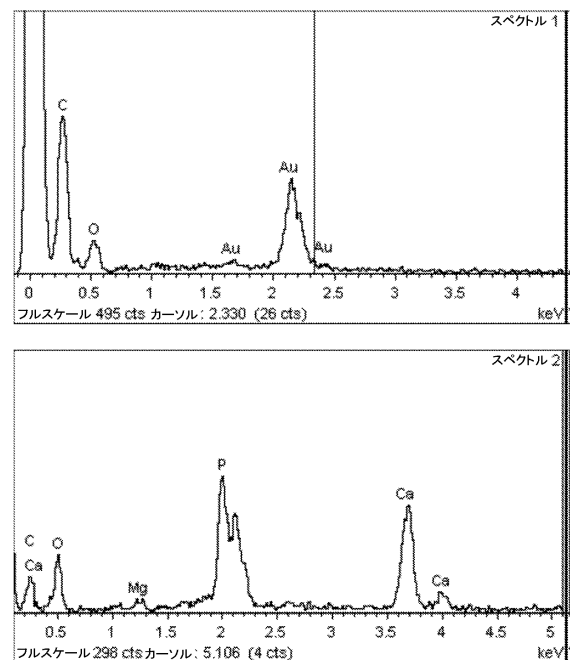


Figure 4

【図 5】

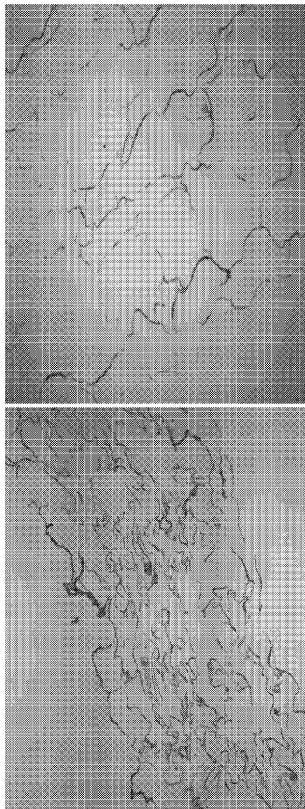


Figure 5

【図 6 - 1】

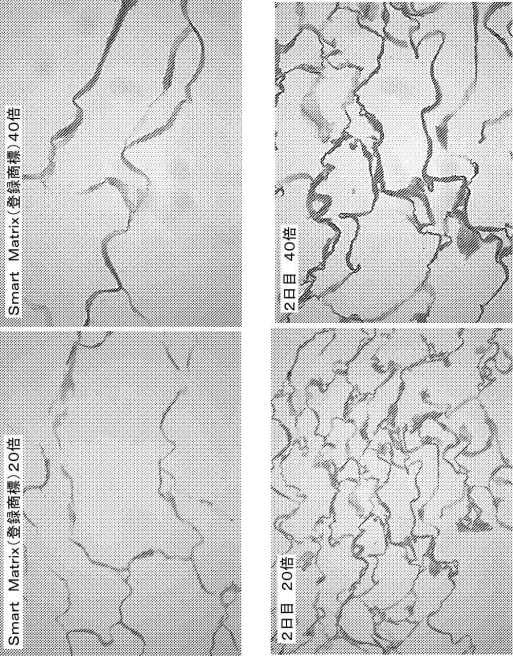
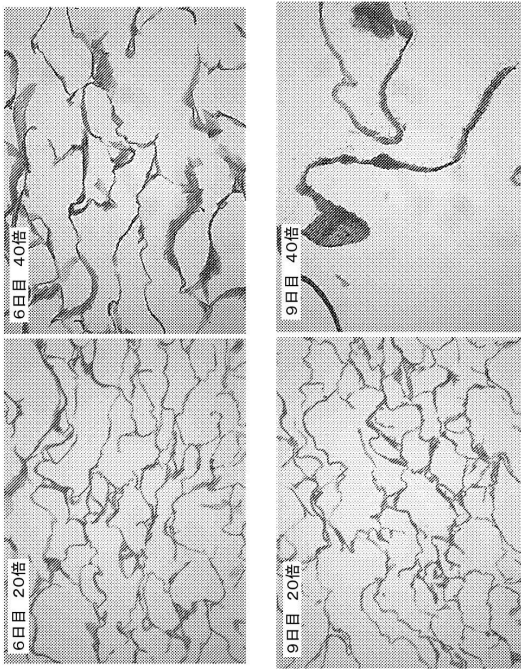


Figure 6

【図 6 - 2】



【図 7】

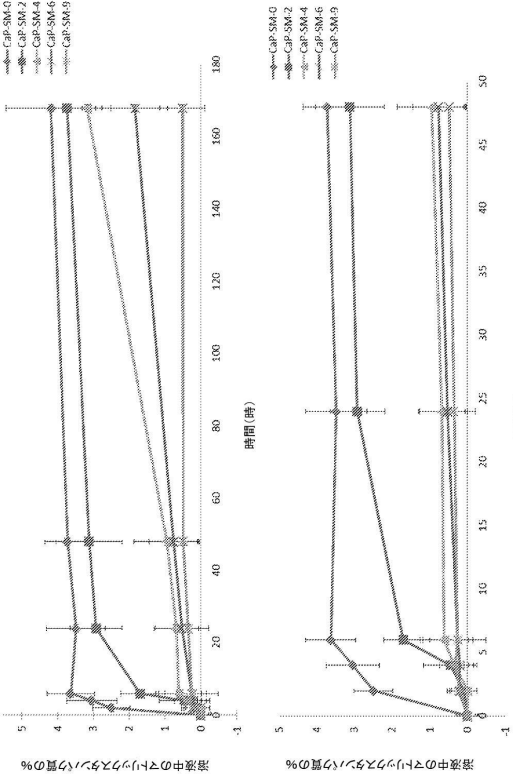
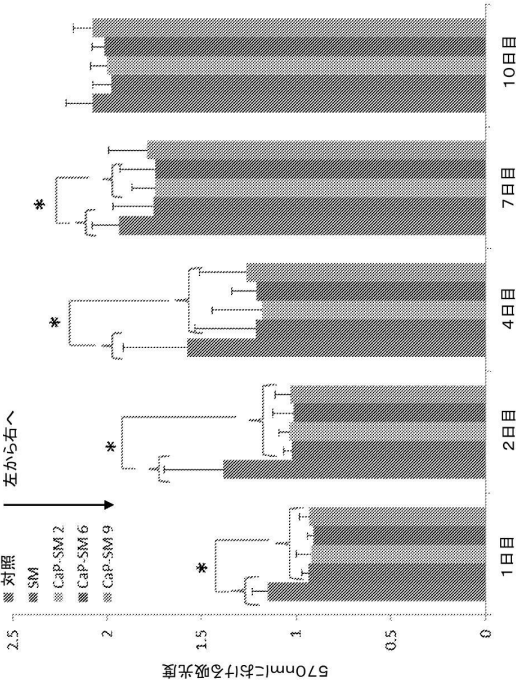


Figure 7

【図 8】



【図 10】

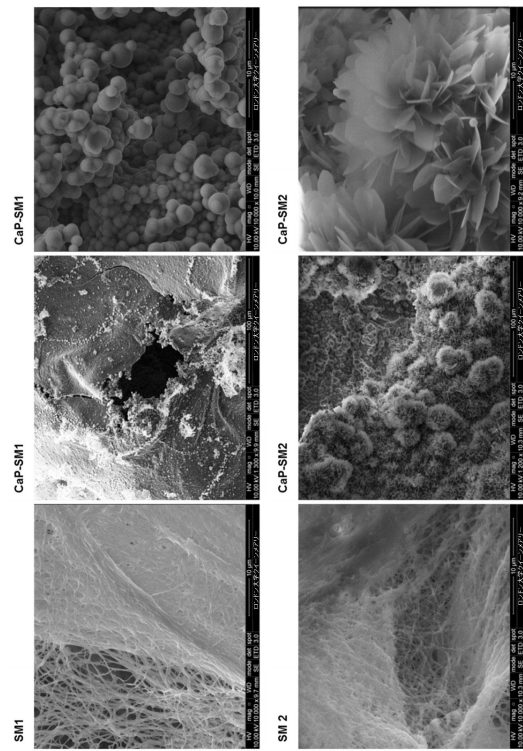


Figure 10

【図 9】

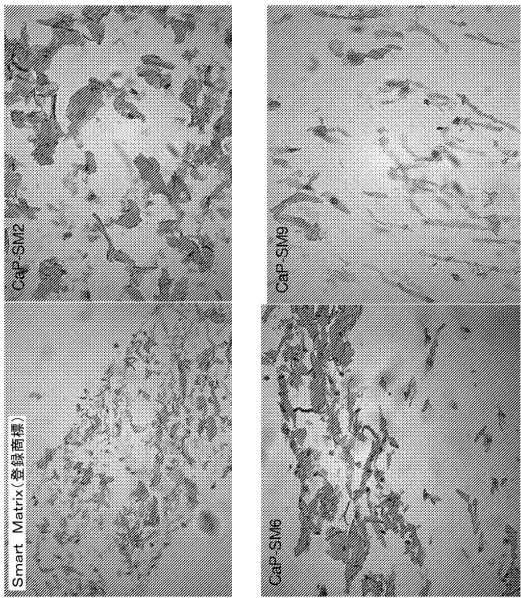


Figure 8

Figure 9

【図 11】

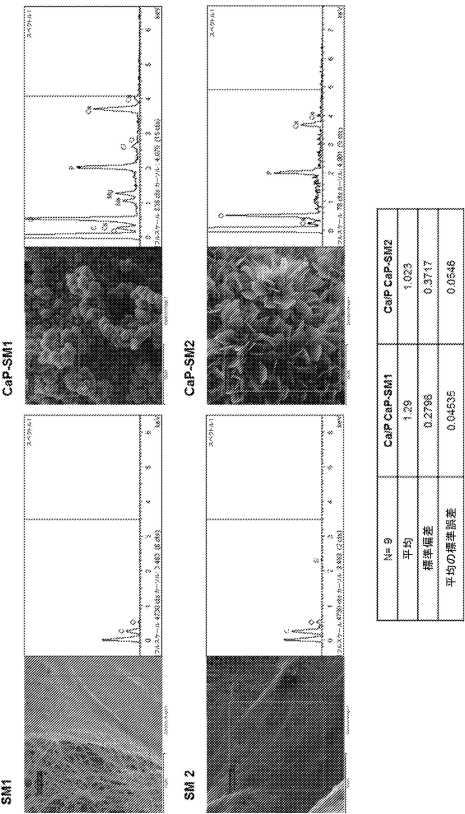


Figure 11

【図 1 2】

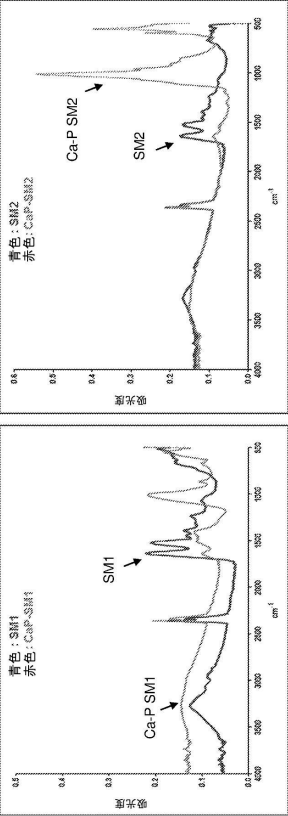


Figure 12

【図 1 3】

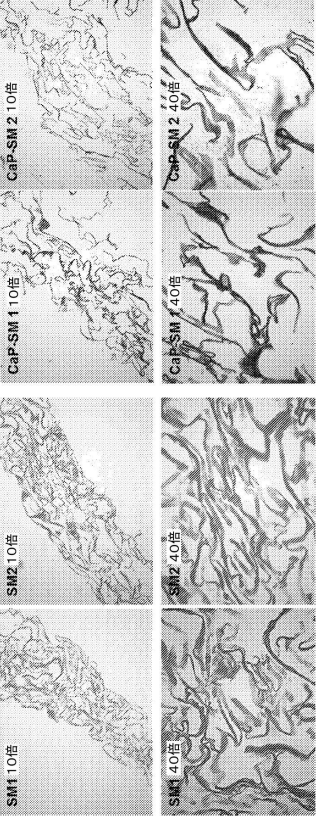


Figure 13

【図 1 4】

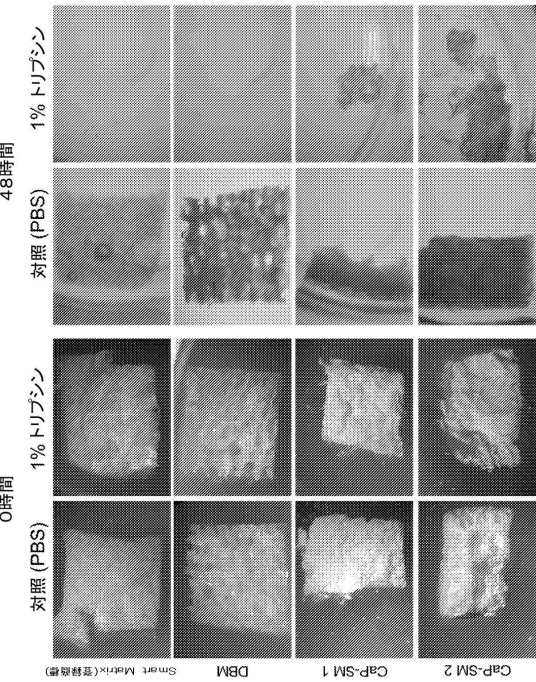


Figure 14

【図 1 5】

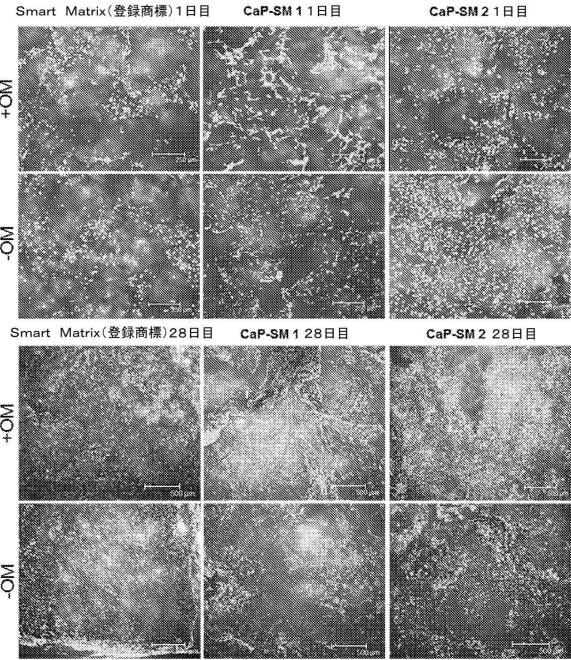


Figure 15

10

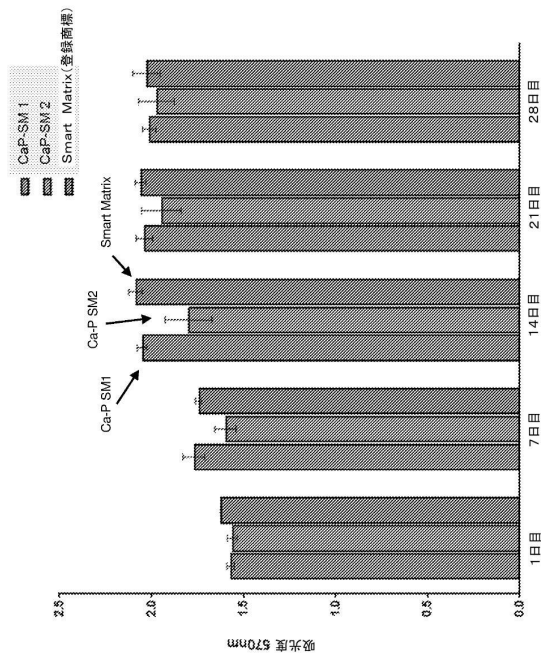
20

30

40

50

【図 16】



【図 17】

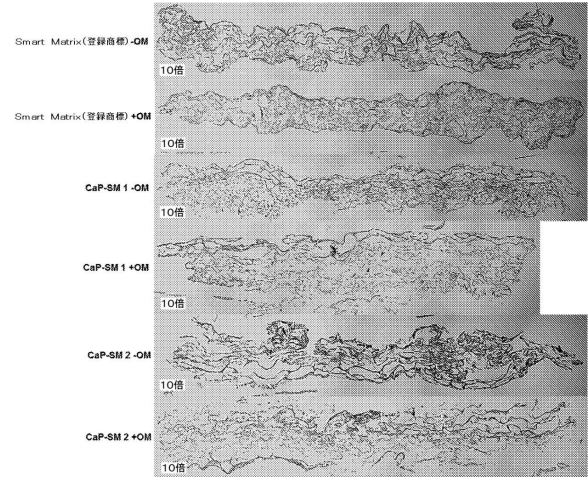


Figure 16

Figure 17

【図 18】

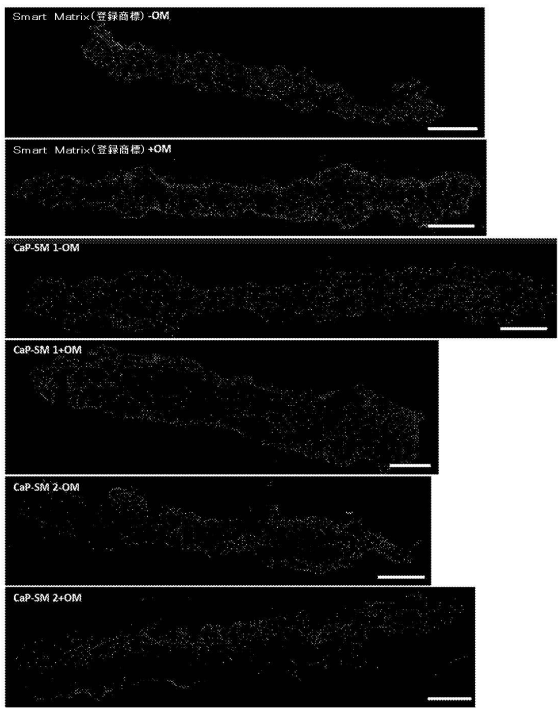


Figure 18

【図 19】

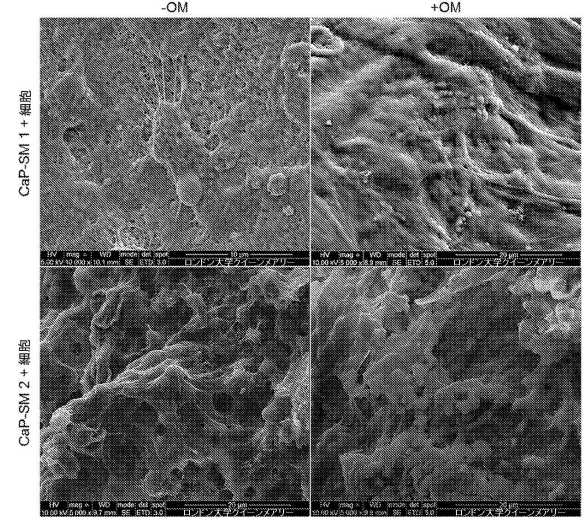


Figure 19

10

20

30

40

50

【図 20】

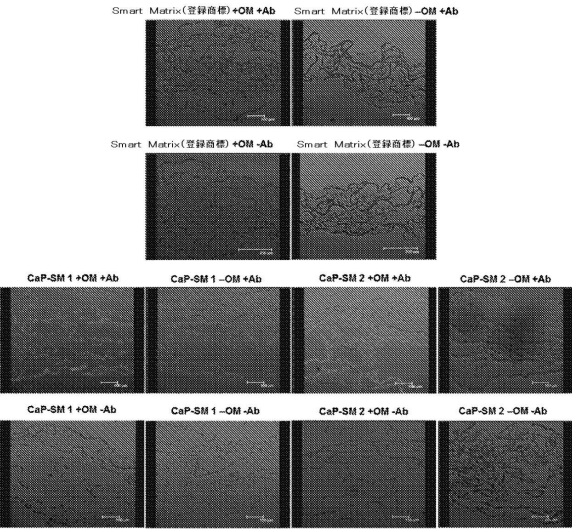


Figure 20

【図 21】

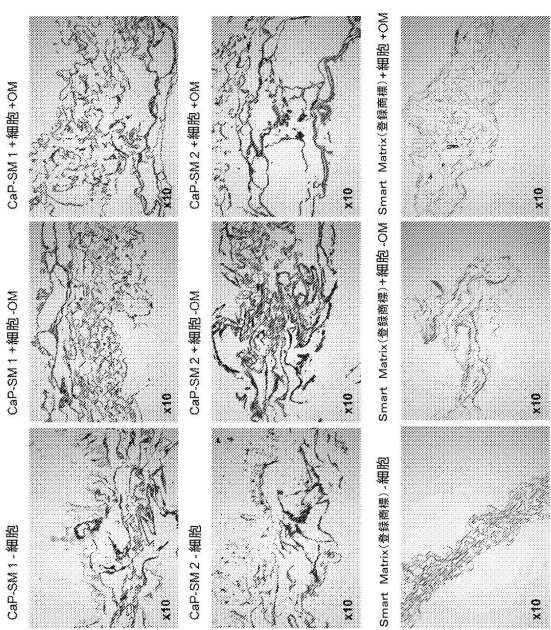


Figure 21

【図 22】

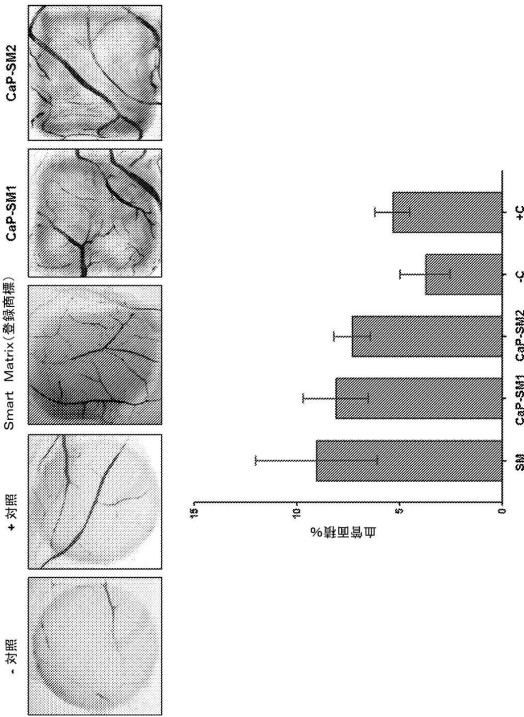


Figure 22

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 L 27/30 (2006.01)

A 6 1 L 27/30

A 6 1 L 27/32 (2006.01)

A 6 1 L 27/32

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ガルシアーガレタ, エレナ

イギリス国 エイチエー6 2アールエヌ ノースウッド ミドルセックス, マウント バーノン ホ
スピタル, レオポルド ミュラー ビルディング 気付

(72)発明者 コーリ, ヌパー

イギリス国 エイチエー6 2アールエヌ ノースウッド ミドルセックス, マウント バーノン ホ
スピタル, レオポルド ミュラー ビルディング 気付

審査官 参鍋 祐子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0219534 (US, A1)

特開平08-117323 (JP, A)

特開2004-008634 (JP, A)

特表2015-515872 (JP, A)

国際公開第2007/144644 (WO, A2)

特開平02-255515 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 L 27/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)