

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6401178号
(P6401178)

(45) 発行日 平成30年10月3日(2018.10.3)

(24) 登録日 平成30年9月14日(2018.9.14)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 L 27/22	(2006.01)	A 6 1 L 27/22	
A 6 1 L 27/36	(2006.01)	A 6 1 L 27/36	3 0 0
A 6 1 L 27/60	(2006.01)	A 6 1 L 27/36	3 1 0
A 6 1 L 27/54	(2006.01)	A 6 1 L 27/36	3 1 1
A 6 1 L 27/52	(2006.01)	A 6 1 L 27/36	3 1 2

請求項の数 20 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-545603 (P2015-545603)	(73) 特許権者	515156304
(86) (22) 出願日	平成25年12月10日(2013.12.10)		エラストジェン・プロプライエタリー・リミテッド
(65) 公表番号	特表2016-501084 (P2016-501084A)		Elastagen Pty Ltd
(43) 公表日	平成28年1月18日(2016.1.18)		オーストラリア2015ニュー・サウス・ウェールズ州イブリー、コーンウォリス・ストリート4番、ナショナル・イノベーション・センター
(86) 国際出願番号	PCT/AU2013/001435	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02014/089610		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成26年6月19日(2014.6.19)	(74) 代理人	100084146
審査請求日	平成28年11月10日(2016.11.10)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	2012905409	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成24年12月10日(2012.12.10)		弁理士 冨田 憲史
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 計測可能な三次元弾性構造物の製造

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- トロポエラスチンモノマーの溶液を提供するステップと、
 - 前記溶液を表面に適用するステップと、
 - 前記トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、材料が水溶液と接触する時にトロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成することを可能にするために、架橋剤なしで8.5未満のpHにて約60 ~ 約200の温度まで前記表面上で前記溶液を加熱して、それによって弾性材料を形成するステップと
 を含む、弾性材料の形成方法。

【請求項2】

前記トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、材料が：
 - 生理的条件下に曝露される；
 - 約6.5 ~ 8.0のpHを有する水溶液と接触する；
 - 約30 ~ 約45の温度を有する水溶液と接触する；および/または
 - 約75mM ~ 約300mMの塩濃度を有する水溶液と接触する、
 時にトロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成することを可能にするために十分な温度まで前記溶液を加熱する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記溶液の加熱のために前記表面が加熱される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

10

20

前記弾性材料が、前記加熱ステップの完了時に、前記材料の約0% (w/w) より多く、約50% (w/w) までの溶媒含有量を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記溶液が、

- トロポエラスチンモノマーの溶液を提供するステップと、
- 前記溶液中のトロポエラスチンモノマーの濃度を増加させるステップと
を含むプロセスによって形成される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記トロポエラスチンモノマーの濃度が、前記溶液から溶媒を蒸発させることによって増加する、請求項5に記載の方法。 10

【請求項7】

前記溶液が前記表面に適用される時に、前記溶媒を前記溶液から蒸発させる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、材料が水溶液と接触する時にトロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成することを可能にする温度まで前記表面上で前記溶液が加熱されると、前記溶媒が蒸発し、前記トロポエラスチンモノマーの濃縮が可能となる、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記トロポエラスチンモノマーの濃度が、トロポエラスチンモノマーを溶媒から分離することによって増加する、請求項5に記載の方法。 20

【請求項10】

前記トロポエラスチンモノマーが、前記トロポエラスチンモノマーの電気紡糸によって前記溶媒から分離される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記溶液が前記表面に適用される時に、前記溶液が約1～40% (w/v) のトロポエラスチンモノマーの濃度を有する、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記溶液がコアセルベートされたトロポエラスチンモノマーを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項13】

前記モノマーが、トロポエラスチンの親水性および疎水性ドメインを含有する、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記モノマーが、少なくとも50の連続的なアミノ酸に渡って、ヒトトロポエラスチンのアミノ酸配列との少なくとも90%の配列同一性を有する配列を有する、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記モノマーが、ヒトトロポエラスチンイソ型の配列を有する組み換え型トロポエラスチンモノマーである、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項16】

前記溶液が、前記表面上へ前記溶液を噴霧することによって前記表面に適用される、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記表面が、前記プロセスによって形成された前記弾性材料が、予め定義された形状に成形されることを可能にする、ダイ、型またはキャストの形態で提供される、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記溶液が水溶液である、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。 50

【請求項 19】

- 請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法によって弾性材料を形成するステップと、
- 前記弾性材料を水溶液と接触させるステップとを含む、弾性ヒドロゲルの形成方法。

【請求項 20】

トロポエラスチンモノマーの加熱がアルカリ pH ではない pH で実行される、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、トロポエラスチンからの弾性材料の製造、そして特に、好ましい三次元形状への材料の形成、そして特に、排他的にはないが、組織の治療および修復のために使用することが可能な材料に関する。

【背景技術】

【0002】

本明細書のいずれの従来技術の参照も、その従来技術が、オーストラリアまたは他のいずれかの管轄権で共通の一般知識の一部を形成すること、あるいはその従来技術が、当業者によって関連すると確認され、理解され、かつ考察されることが適度に予想可能であることの承認、またはいずれかの形態の示唆ではなく、またそのように解釈されるべきではない。

20

【0003】

ヒト組織修復のために使用可能な三次元構造物の需要が著しく増加している。天然生体適合物質（エラスチンなど）をベースとする構造物は、弾性、自己組織化、長期的安定性および生物学的活性を含むそれらの注目に値する特性のために、様々な再生医学用途の最有力候補として現れた。

【0004】

トロポエラスチンは、エラスチンおよび弾性繊維の形成のための基材材料である。エラスチンは、トロポエラスチンが架橋される時に、トロポエラスチンから形成される。

【0005】

30

トロポエラスチンはほとんどの水溶液中で可溶性であり、かつ実際に、生理的塩および pH において可溶性である。トロポエラスチンは、水溶液を加熱することによって、水溶液から沈殿を誘導することができる。このプロセスは、1つのトロポエラスチンモノマーの疎水性領域と別のモノマーの同様の領域との接触によって、トロポエラスチンモノマーが互いと会合する、コアセルベーションとして知られている。モノマーのこのような会合は可逆性であり、そしてコアセルベートしたトロポエラスチン中のトロポエラスチンモノマーは、例えば、pH、塩または温度変更によって解離し得、コアセルベートのトロポエラスチンモノマーの溶液中への溶解およびコアセルベートの消失を導き得る。これが意味するものは、トロポエラスチンのコアセルベートが生理的条件下で安定性のある好ましい三次元弾性構造を形成するために十分に強硬ではないということである。

40

【0006】

トロポエラスチンモノマーの架橋は、コアセルベートされた形態であっても、他の形態であっても、トロポエラスチンモノマーの共有結合を導き、これは表面的にはトロポエラスチンモノマーの会合を表すが、それは、pH、塩または温度調整によって分離されることができない。一般に、エラスチンおよび弾性繊維で観察されるような、架橋されたトロポエラスチンモノマーは、天然供給源からのエラスチンの精製のための従来技術プロセスで記載されるように、モノマーが加水分解されない限り、互いから分離することは不可能である。

【0007】

エラスチンまたは弾性繊維の場合のように、架橋されたトロポエラスチンにおいて観察

50

されるトロポエラスチンモノマーの一般に不可逆性の会合が生じる場合、トロポエラスチンの架橋は、好ましい三次元弾性構造の形成を可能にする溶液として提案される。この技術の例は、非特許文献1、特許文献1および特許文献2に開示されており、それによって、電気紡糸材料は、好ましい安定性のある構造に架橋される。いくつかの架橋技術は加熱ステップを必要としており、それによって、トロポエラスチン含有組成物は、好ましい弾性構造の形成において加熱される。一般に加熱ステップは、溶媒をエバポレーションするため、そして/または架橋反応に必要とされる温度条件を提供するために必要とされる。

【0008】

架橋が関与するプロセスに関する1つの問題は、架橋剤が、架橋剤または残留する未反応架橋剤の化学性に対する、あるいは架橋された材料の弾性作用に対する、組織のいずれの耐性の関係で、生物学的適合性ではないということである。別の問題は、架橋後、材料は、次いで好ましい強硬な形状に適合することができない種類の構造に急速に凝固するため、架橋された材料から好ましい構造を形成することが困難であるということである。したがって、噴霧成形技術などによって構造を形成する際に、そのようなプロセスを使用することができる範囲に関して制限がある。

【0009】

最終的に、トロポエラスチンモノマーから安定性のある好ましい三次元構造を形成するために必要とされることは、好ましい構造および形状の損失を導き得る、互いからの解離を防ぐような様式で、モノマーを互いに架橋することである。安定性のある弾性三次元構造物を形成する別のアプローチは、1つのトロポエラスチンモノマーを別のものと架橋するための架橋剤として表面的に作用する他の分子を使用することである。この例としては、一般に特許文献2で検討されるような合成ポリマーが含まれる。別のアプローチは、特許文献3、特許文献4および特許文献5のように、非水溶性基材を可溶性弾性モノマーの溶液で噴霧またはコーティングすることである。この後者のアプローチにおいて、特許文献5の場合のようなナノ繊維ウェブ、または特許文献4の場合のような管などの不溶性基材は、表面的にトロポエラスチンモノマーを互いに架橋し、それらは水性条件で分離しない。これらのアプローチに関する問題は、必然的に、好ましい三次元形状を提供するものは、分子成分ではなくて、不溶性基材であるということであり、これは、構造の全体的な弾性プロフィールに影響を及ぼし、かつ三次元構造を構築する能力を制限する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第2008/033847号パンフレット

【特許文献2】国際公開第2009/099570号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2012/080706号パンフレット

【特許文献4】国際公開第2011/127478号パンフレット

【特許文献5】国際公開第2007/029913号パンフレット

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Miyamoto, K. et al. Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker. Int J Biol Macromolecules 45, 33-41 (2009).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

弾性三次元構造の形成のための新規アプローチが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、上記の限定、必要性または問題の1つまたはそれ以上を解決するか、または少なくとも改善を提供することを模索し、そして一実施形態において、

- トロポエラスチンモノマーの溶液を提供するステップと、
 - 溶液を表面に適用するステップと、
 - トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、材料が水溶液と接触する時にトロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成することを可能にするために十分な温度まで表面上で溶液を加熱して、それによって弾性材料を形成するステップと
- を含む、弾性材料の形成方法を提供する。

【0014】

別の実施形態において、

- トロポエラスチンモノマーの溶液を提供するステップと、
- 溶液を表面に適用するステップと、
- それより高い温度ではトロポエラスチンモノマーが互いに結合して、水溶液中で解離しない材料を形成する最小値と、それより高い温度では非弾性材料が形成される最大値とによって定義される範囲内の温度まで表面上で溶液を加熱して、それによって弾性材料を形成するステップと

を含む、弾性材料の形成方法を提供する。

【0015】

別の実施形態において、上記方法によって形成される弾性材料が提供される。

【0016】

別の実施形態において、

- 上記方法に従って弾性材料を形成するステップと、
 - 弾性材料を水溶液と接触させるステップと
- を含む、弾性ヒドロゲルの形成方法が提供される。

【0017】

別の実施形態において、上記方法によって形成される弾性ヒドロゲルが提供される。

【0018】

別の実施形態において、上記弾性材料またはヒドロゲルを含む構造物、インプラントまたはデバイスが提供される。

【0019】

別の実施形態において、生物学的組織の修復および/または回復のため、ならびにアクセ用途における弾性材料の使用のための上記弾性材料、ヒドロゲル、デバイス、インプラントまたは構造物の方法および使用が提供される。

【0020】

ここで、本発明は、添付の実施例および図面を参照して、より完全に説明される。しかしながら、以下の記載は例示のみを目的としており、上記の本発明の概略を限定するものとして解釈されるべきではないことは理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】 A . 160 まで加熱後、B . P B S 中湿潤後の熱処理された水をベースとするトロポエラスチン溶液。

【図2】 A . 160 まで加熱後、B . P B S 中湿潤後の熱処理されたH F Pをベースとするトロポエラスチン溶液。

【図3】 A . 160 までの加熱前、B . 160 まで加熱後、C . P B S 中側面図、D . P B S 中湿潤後の熱処理された70%エタノールをベースとするトロポエラスチン溶液。

【図4】 A . 160 まで加熱後、B . P B S 中湿潤後の、管をコーティングするために使用された、熱処理されたH F Pをベースとするトロポエラスチン溶液。

【図5】 A . 160 まで加熱後、B . P B S 中湿潤後の、熱処理された電気紡糸トロポエラスチンの走査電子顕微鏡検査像。

10

20

30

40

50

【図6】熱処理された電気紡糸トロポエラスチン上に培養された線維芽細胞の走査電子顕微鏡検査像。

【図7】熱処理された電気紡糸トロポエラスチンの持続性を示す、VVG染色皮膚生検の像。

【図8】A) 37 で16時間乾燥後、B) 160 で4時間さらに加熱後の、熱処理された水をベースとするトロポエラスチン溶液から製造された膜。

【図9】熱処理された水性トロポエラスチン溶液から製造された微細パターン膜。溝パターンは、深さ500nmおよび幅3.5 μ mである。

【図10】0~105%および105~19%の伸びにおける弾性率の計算。

【発明を実施するための形態】

10

【0022】

ここで、本発明のある種の実施形態を詳細に参照する。本発明は実施形態とともに説明されるが、その意図は、本発明をそれらの実施形態に限定することではないことは理解されるべきである。逆に、本発明は、請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に含まれ得る、全ての代替、変形および同等物を包含することが意図される。

【0023】

当業者は、本発明の実施において使用することができる、本発明に記載されるものと同様または同等の多くの方法および材料を認識するであろう。本発明は、記載される方法および材料に決して限定されない。

【0024】

20

本明細書に開示および定義される本発明は、本明細書もしくは図面に記載されるか、またはそれらから明白である2種以上の全ての別の組み合わせに延長されることは理解されるであろう。これらの異なる組み合わせの全ては、本発明の様々な別の態様を構成する。

【0025】

本明細書で参照される特許および刊行物の全ては、全体として参照によって組み込まれる。

【0026】

本発明は、初めて、トロポエラスチンを加熱するステップを通しての単純なプロセスによって、強度および弾性などの望ましい特性を有する生体親和性材料を合成することができることを実証する。したがって、本発明は、生物学的適合性の三次元弾性材料を製造するための、信頼性が高く、計測可能であり、かつ安価な経路を提供する。本発明は、高スループット製造が可能であり、そして治療および試験管内アッセイ用途で有用である広範囲の用途の生体適合物質（例えば、シート、管および繊維）を製造するためのタンパク質を使用する。本発明のプロセスによって製造される材料は、天然エラスチンの特質である弾性および強度の特性を有するが、架橋剤を使用して形成される構造物で一般に見られるか、またはそれに関連する化学汚染物質および毒性副産物がない。

30

【0027】

本発明の材料の有利な特性は、本明細書を通して検討され、そして特に、トロポエラスチンの溶液の加熱によって単純な様式で本発明の材料を製造することができること、ならびに形成された材料が、生体適合性、強度、弾性、細胞結合および細胞外基質相互作用の必要とされる特性を有し、このことが、再生医学用途において、ならびに試験管内アッセイの構造においての使用を可能にさせることを示す実施例において示される。

40

【0028】

上記のとおり、生体適合物質をベースとする骨格は、それらの生体適合性および機械的特性のため、再生医学用途において使用されてきた。しかしながら、三次元生体適合物質をベースとする構造物を合成する従来技術の方法は能率が悪く、低速で制限的であり、そして別の従来の再生医学技術は、低速で高価な方法の使用を圧倒的に必要とし（構造物を製造するために何週間もかかる可能性がある）、一般に数百ミクロンの厚さに拡散抑制され、そして規制対応を要求する毒性成分または副産物の問題によって一様に負担がある。

【0029】

50

したがって、一実施形態において、
 - トロポエラスチンモノマーの水溶液を提供するステップと、
 - 溶液を表面に適用するステップと、
 - トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、材料が水溶液と接触する時にトロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成することを可能にするために十分な温度まで表面上で溶液を加熱して、それによって弾性材料を形成するステップとを含む、弾性材料の形成方法が提供される。

【0030】

本発明の重要な知見は、加熱ステップによって、凝集体が水溶液と接触する時にモノマーが実質的に分離しないような親和性によって、トロポエラスチンモノマーの会合が可能となるということである。加熱は、生理的条件下で個々のモノマーへと分離しない範囲までコアセルベートとは異なり、かつグルタルアルデヒドなどの毒性の架橋剤によるモノマーの架橋を必要としない、あるいはそれ自体を固相に維持するため、またはそれが形成された形状の永続性を保持するために塩基性pHを有する溶媒を使用しないという意味で弾性繊維または他の材料とは異なる弾性凝集体、マスまたは材料を形成する。利点は、プロセスが、毒性を懸念せずに、組織用途で使うことができる永続的な構造または形状に多かれ少なかれ永久に生体適合性モノマーを組立てるということである。

10

【0031】

典型的に、溶液は、材料が生理的条件下、特にヒトの生理的条件下に暴露される時にトロポエラスチンモノマーに解離しない弾性材料を形成するために、トロポエラスチンモノマーが互いに結合することが可能となるように十分な温度まで加熱される。特に、凝集体は、温度およびpHの生理的条件下で分離しない。好都合にも、凝集体は、以下の条件：

20

- ・ 温度（約30～約45）、
- ・ 塩（約75mM～約300mMの濃度）、
- ・ pH（約6.5～約8.0）

では分離しない。

【0032】

したがって、この材料は、生理的条件下のみならず、それが他のより要求が多い条件に暴露され得る試験管内アッセイなどの他の用途での使用のためにも適切である。特に、この材料は、いずれかのトロポエラスチンモノマーの架橋を実行することを必要とせず、そしてペプチドの組立てを結合する骨格を使用することを必要とせずに達成される。

30

【0033】

本発明のプロセスによって形成される材料は、多くの利点を有する。第1に、トロポエラスチンモノマーは互いに結合したまま残り、凝集体から形成された弾性材料の三次元形状は水性環境で保持される。第2に、再生医学用途において有用なトロポエラスチンを製造する出発材料の特性（例えば、弾性、強度、弾性および生体適合性）は、最終生成物で保持される。第3に、凝集体は、ヒドロゲルを形成するための水溶液で水に溶解し得るが、その際、凝集体は分離せず、それによって、弾性材料の三次元構造を維持する。

【0034】

一実施形態において、トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、約6.5～約8.0のpHを有する水溶液と材料が接触した時に、トロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成するために十分な温度まで、溶液を加熱する。本明細書で使用される場合、例えば、「1～5まで」などの長さの範囲の限界を定義する用語は、1～5のいずれの整数、すなわち、1、2、3、4および5を意味する。言い換えると、明白に記載された2つの整数によって定義されるいずれの範囲も、上記限界を定義するいずれの整数も、そして上記範囲に含まれるいずれの整数も含み、かつ開示するように意味される。例えば、溶液は、約6.6、約6.7、約6.8、約6.9、約7.0、約7.1、約7.2、約7.3、約7.4、約7.5、約7.6、約7.7、約7.8、約7.9または約8.0のpHを有してもよい。

40

【0035】

50

一実施形態において、トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、約30～約45の温度を有する水溶液と材料が接触した時に、トロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成するために十分な温度まで、溶液を加熱する。例えば、温度は、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44 または約45 でもよい。

【0036】

一実施形態において、トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、約75 mM～約300 mMの塩濃度を有する水溶液と材料が接触した時に、トロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成するために十分な温度まで、溶液を加熱する。例えば、塩濃度は、約75 mM、約80 mM、約85 mM、約90 mM、約95 mM、約100 mM、約110 mM、約120 mM、約130 mM、約140 mM、約150 mM、約160 mM、約170 mM、約180 mM、約190 mM、約200 mM、約210 mM、約220 mM、約230 mM、約240 mM、約250 mM、約260 mM、約270 mM、約280 mM、約290 mMまたは約300 mMでもよい。

【0037】

一実施形態において、トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、生理的条件（例えば、約7.2～約7.5のpH、約36～約37の温度および約150 mMの塩濃度）に材料が曝露された時に、トロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成するために十分な温度まで、溶液を加熱する。

【0038】

このプロセスによると、本発明の弾性材料を形成するために、溶液は加熱される。上記のとおり、加熱ステップの目的は、会合したトロポエラスチンモノマーを含有する材料を形成すること、より具体的には、トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、弾性材料が水溶液と接触した時に、トロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成することである。加熱ステップは、濃縮物中のトロポエラスチンモノマーが互いに結合して、トロポエラスチンモノマーを含む凝集体または材料を形成するために十分な温度で実行される。典型的に、加熱ステップは、約100以上、例えば、100～160の温度で実行される。例えば、加熱ステップの温度は、110以上、120以上、130以上、140以上、150以上、160以上、170以上または180以上でもよい。好ましくは、温度は、約120～約180、約130～約170、または約140～約160である。最も好ましくは、温度は約160である。

【0039】

別の実施形態において、

- トロポエラスチンモノマーの溶液を提供するステップと、
- 溶液を表面に適用するステップと、
- それより高い温度ではトロポエラスチンモノマーが互いに結合して、水溶液中で解離しない材料を形成する最小値と、それより高い温度では非弾性材料が形成される最大値とによって定義される範囲内の温度まで表面上で溶液を加熱するステップとを含む、弾性材料の形成方法が提供される。

【0040】

本実施形態によると、最小値未満では、本発明の弾性材料は形成されない。すなわち、形成されたものは、特に生理的条件の水溶液中で解離性である。したがって、最小値未満では、コアセルベートに類似するものが形成され得る。最大値未満では、材料は、本明細書に検討される弾性特性を保持する。最大値より上では、材料は弾性の特性を失い得る。

【0041】

溶液の加熱が実行されるべき時間の適切な長さには、約10分以上、約20分以上、約30分以上、約40分以上、約50分以上、約1時間以上、約2時間以上、約3時間以上、約4時間以上または約5時間以上が含まれる。しかしながら、当業者は、溶液が加熱されるべき温度、ならびに溶液が加熱されるべき時間は、

- ・ 利用される加熱方法の種類（例えば、乾燥加熱、急速加熱など）、

- ・溶液中のトロポエラスチンモノマーの濃度、
- ・溶液の体積、
- ・トロポエラスチンモノマーの組成、
- ・凝集体または弾性材料中の所望の会合の程度、
- ・加熱間の相対湿度

などの様々な要因次第であることを理解するであろう。

【 0 0 4 2 】

ある種の実施形態において、8～16時間の加熱は、より結晶質であり、なおかつ弾性特性を保持する物質を提供するために使用されてもよい。

【 0 0 4 3 】

一般に、加熱間の湿度は、約20～約80%、好ましくは約35、45、55、65または75%の相対湿度であつてもよい。

【 0 0 4 4 】

本明細書に記載されるように、加熱ステップによって、色変化を発現させる弾性材料の形成がもたらされてもよい。したがって、ある種の実施形態において、材料が色変化を発現させたかどうかを決定することによって、弾性材料の形成に関しての、または加熱ステップの完了を調査するための試験がされてもよい。色変化は、一般に、エラスチンの通常の半透明の外観から黄色または茶色っぽい色への変化である。材料が全体的に色変化を発現させる必要はない。一般に、色変化は、水和によって弾性材料において低下し得る。

【 0 0 4 5 】

当業者は、異なる加熱方法を利用することによって、異なる内部構造を有する凝集体を得ることができることも認識するであろう。例えば、急速加熱は、非常に限定的な時間量のみ、濃縮物を激しい熱源に曝露することを伴う。したがって、加熱は、モノマーが会合して、凝集体を形成するために十分であるが、凝集体に捕捉された全ての溶媒が凝集体から蒸発するには速く、それによって空胞型構造を有する凝集体が形成される時間量で生じるであろう。さらに捕捉された溶媒を蒸発させ、それによって、空胞を拡張して、多孔性凝集体の形成がもたらされるように、凝集体を再び加熱することができる。当業者は、溶媒が凝集体に内部的に存在し得ないが、凝集体の外面に存在し得ることも認識するであろう（凝集体中に存在する溶媒に加えて、またはその代わりに）。

【 0 0 4 6 】

本プロセスの1つの特に重要な利点は、ある種の実施形態において、本プロセスによって形成された材料は、表面的に気体不浸透性でもよいことであり、これは、加熱ステップによって保持されるタンパク質分子の密接な配列から得られる。これによって、ガラス吹き技術で生じるものと非常に似たように、材料を特定の形状へと吹き込むことが可能となる。

【 0 0 4 7 】

いずれの加熱方法が使用されるかに関係なく、当業者は、溶液の加熱によって形成される凝集体は、したがって、様々な程度で水を含んでもよいことを理解するであろう。例えば、凝集体は、有意な量の水を含んでもよく（例えば、約60% w/wより多くの水）、これによって、本質的にヒドロゲルとなる。あるいは、水は凝集体中に約10% w/wのみの量で存在してもよい。含水量は弾性に影響するため、凝集体（したがって、材料）の弾性は、凝集体の含水量を変化させることによって変更させることができ、これは次に、加熱前の濃縮物に存在する水の量、ならびに加熱時間、方法および温度などの様々な要因を変化させることによって変更させることができる。

【 0 0 4 8 】

一実施形態において、弾性材料は、加熱ステップの完了時の材料の約0%より多くから約50% (w/w) までの溶媒含有量を有する。例えば、弾性材料は、約0.5% (w/w)、約1% (w/w)、約2% (w/w)、約3% (w/w)、約4% (w/w)、約10% (w/w) 約5% (w/w)、約15% (w/w)、約20% (w/w)、約25% (w/w)、約30% (w/w)、約35% (w/w)、約40% (w/w)、約45

10

20

30

40

50

% (w/w) または約 50% (w/w) の溶媒含有量を有してもよい。一実施形態において、溶媒は水である。

【0049】

溶液は、溶液を直接加熱することによって、またはその上に溶液が配置される表面を加熱することによって加熱されてもよい。後者の実施形態において、溶液がそれに適用される前に表面が加熱されてもよく、またはそれは溶液の適用時点では室温状態にあってもよくて、次いで、関連する温度まで加熱されてもよい。したがって、一実施形態において、表面は溶液の加熱のために加熱される。

【0050】

また上記で検討されたように、本発明のプロセスの主要な利点は、このプロセスは、ポリマー形成に有効な架橋剤などの薬剤の使用を必要としないため、生体親和性材料を形成することができるということである。したがって、一実施形態において、本発明のプロセスは、架橋剤の使用を排除する。

10

【0051】

別の実施形態において、本プロセスは、トロポエラスチンをベースとするポリマーの形成を促進するための塩または他のコアセルベーション剤の使用を排除してもよい。

【0052】

別の実施形態において、本プロセスは、トロポエラスチンモノマーの不可逆性凝集をもたらす pH 変性剤の使用を排除してもよい。特に、一実施形態において、加熱ステップは、アルカリ pH ではない pH で実行され、例えば、pH は一般に 8.5 または 8.0 未満であってよい。

20

【0053】

上記のように、本発明の材料は、(例えば、成形された型の中の) 表面でトロポエラスチンの溶液を加熱することによって形成される。作用のいずれかの理論または様式に拘束されることを望まないが、本発明者は、トロポエラスチンの濃縮した溶液中で、トロポエラスチンモノマーが密接に充填されていると考える。このような密接充填は、溶液の加熱時にモノマー間の結合を促進し、それによって、水性環境に置かれた時に、別々のトロポエラスチンモノマーに解離しない弾性材料が製造される。

【0054】

トロポエラスチンモノマーの溶媒を形成する溶液は、水溶液または非水溶液であってよい。

30

【0055】

本明細書で使用される場合、「水溶液」という用語は、含水溶液を指す。水溶液は、緩衝剤および薬学的に容認できる賦形剤などの他の成分を含んでもよく、そしてメタノール、エタノールおよびヘキサフルオロプロパノール、ならびにその組み合わせなどの他の有機水混和性溶媒を含んでもよい。水溶液が他の溶媒を含む場合、当業者は、水が主要溶媒成分であり、そしてその他の溶媒が少数の部分の溶媒成分を構成することを理解するであろう。水溶液の使用は、トロポエラスチン濃縮物、したがって、材料が、非生体適合性または毒性であるか、あるいは体の中で分解して、毒性または望ましくない副産物を形成し得る、いずれの成分も含有しない組成物から形成されることを意味するため、特に有利である。したがって、好ましくは、水溶液は、毒性または非生物学的適合性であり、かつ/あるいは材料を使用中に(例えば、体内で、またはアッセイにおいて) 毒性または非生物学的適合性の種を形成する、いずれの成分(溶媒、緩衝剤など)も含有しない。

40

【0056】

本明細書で使用される場合、「非水溶液」という用語は、水を含有しないか、または少数の溶媒成分として水を含有する溶液を指す。非水溶媒の例は、例えば、本明細書の実施例で例証されるように HFP を含む。非水溶液を形成するために非水溶媒を使用する 1 つの利点は、一般に、溶媒が水より低い沸点を有し得るということである。これによって、熱の実質的な追加をせずに、本プロセスの間、溶媒を必要に応じて蒸発させることが可能となる。

50

【 0 0 5 7 】

－実施形態において、溶液は、以下：

- トロポエラスチンモノマーの溶液を提供するステップと、
 - 溶液中のトロポエラスチンモノマーの濃度を増加させるステップと
- を含むプロセスによって形成される。

【 0 0 5 8 】

最終生成物は、「濃縮物」と呼ばれてもよい。濃縮物は、当業者が適切であることを知っているいずれかの方法によって得られてもよい。濃縮物中、トロポエラスチンモノマーは互いに密接に接触して、加熱時にモノマーは凝集体またはマスを形成し、そしてそれが形成される表面の形状にこれを適合させることができ、かつこれは、凝集体が水性環境に配置された時に、解離、または加熱の間に形成される架橋の有意な破壊を経験しないと

10

【 0 0 5 9 】

濃縮物は、例えば、溶液を加熱すること、または溶液上に空気もしくは窒素を吹きつけることによって、溶液から溶媒を蒸発させることによって得られてもよい。したがって、実施形態において、トロポエラスチンモノマーの濃度は、溶液から溶媒を蒸発させることによって増加する。

【 0 0 6 0 】

溶媒は、溶液が表面に適用される時に溶液から蒸発してもよい。溶液が、トロポエラスチンモノマーが互いに結合して、材料が水溶液と接触した時にトロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成する温度まで表面上で加熱されると、溶媒が蒸発して、トロポエラスチンモノマーの濃縮が可能となり得る。

20

【 0 0 6 1 】

実施形態において、トロポエラスチンモノマーの濃度は、トロポエラスチンモノマーを溶媒から分離することによって増加する。トロポエラスチンモノマーは、トロポエラスチンモノマーの電気紡糸によって溶媒から分離されてもよい。「電気紡糸」は、電位傾度に渡って、荷電溶液または溶融物を穴に流すことによって、繊維が溶液または溶融物から形成されるプロセスである。実施形態において、溶液は、溶液が表面に適用される時に、約 1 % ~ 約 4 0 % (w / v) のトロポエラスチンモノマーの濃度を有する。例えば、溶液中のトロポエラスチンモノマーの濃度は、約 2 %、約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 1 0 %、約 1 2 %、約 1 4 %、約 1 6 %、約 1 8 %、約 2 0 %、約 2 2 %、約 2 4 %、約 2 6 %、約 2 8 %、約 3 0 %、約 3 2 %、約 3 4 %、約 3 6 %、約 3 8 % または約 4 0 % (w / v) であってよい。

30

【 0 0 6 2 】

「電子紡糸材料」は、電気紡糸プロセスの結果として、構造または構造の群（例えば、繊維、ウェブまたは液滴）を形成する、いずれかの分子または物質である。一般に、この材料は、天然、合成、またはそれらの組み合わせでもよいが、本発明において、トロポエラスチンが使用されることが好ましい。

【 0 0 6 3 】

マトリックス材料は、電気紡糸を使用して、織物テンプレート上に被着されてよい。このプラットフォーム技術は、ナノおよびマイクロ繊維構造から構成される骨格を製造するために、再生医学において広く使われている (L i ら (2 0 0 6) および L i ら (2 0 0 5)) 。

40

【 0 0 6 4 】

電気紡糸プロセスには、ポリマーまたはモノマー含有流体（例えば、ポリマーまたはモノマー溶液、ポリマーまたはモノマー懸濁液、あるいはポリマーまたはモノマー溶融物）を、針またはピペットチップなどの小型オリフィスおよび定量ポンプを備えた貯蔵器に配置するステップが含まれる。高圧供給源の 1 つの電極は、流体またはオリフィスと電氣的に接触するように配置され、一方、他の電極は、標的（典型的にコレクタースクリーンまたは回転マンドレル）と電氣的に接触するように配置される。電気紡糸の間、流体は、溶

50

液またはオリフィスへの高電圧（例えば、約3～約15kV）の印加によって荷電され、次いで、安定したフローが提供されるように定量ポンプで強制的に小型オリフィスを通して。オリフィスにおいて流体は、表面張力のために通常、半球状の形状を有するが、高電圧の印加によって、オリフィスにおける半球状の流体は延長して、テイラー（Taylor）円錐形として既知の円錐形状を形成する。流体および/またはオリフィスに印加される十分高い電圧によって、荷電された流体の反発する静電力は表面張力を克服して、そして荷電された流体の噴出物は、テイラー円錐形の先端から放出され、そして典型的に - 2 ~ - 10 kV の間で偏向する標的の方へ加速される。印加された偏向（例えば、1 ~ 10 kV）を有するフォーカスリングは、荷電された流体の噴出物の弾道を導くために任意に使用されてもよい。荷電された流体の噴出物が、偏向した標的の方へ移動すると、それは複雑なむち振りおよび屈曲した運動を受ける。流体がモノマーまたはポリマー溶液または懸濁液の状態である場合、溶媒は飛行中に典型的に蒸発し、偏向した標的上にポリマーまたはモノマー繊維を残す。流体がポリマーまたはモノマー熔融物である場合、熔融モノマー/ポリマーは飛行中に冷却し、凝固して、そして偏向した標の上でモノマー/ポリマー繊維として収集される。ポリマー/モノマー繊維が偏向した標の上で蓄積すると、多孔性メッシュが、偏向した標の上で形成される。

【0065】

電気紡糸マトリックスの特性は、電気紡糸条件を偏向することによって調整されてもよい。例えば、テンプレートがオリフィスに相対的に近い場合、繊維のいくつかの領域が「ビーズ様」外観を有するように、得られる電気紡糸メッシュは不規則に厚い繊維を含有する傾向がある。しかしながら、テンプレートがオリフィスから離れてさらに移動される場合、メッシュの繊維の厚さはより均一となる傾向がある。さらに、テンプレートはオリフィスと相対して移動されてもよい。ある種の実施形態において、メッシュの繊維が互いに実質的に平行であるように、テンプレートは規則的で周期的な様式で前後に移動される。この場合、得られるメッシュは、繊維に対して垂直方向と比較して、繊維に対して平行方向の歪みに、より高い抵抗を有し得る。他の実施形態において、偏向した標的は、二次元または三次元パターンでオリフィスに対して移動されて、同様の、または異なるストランド配向、厚さなどを有する1種またはそれ以上のパターン層を含んでなるメッシュを作製する。他の実施形態において、テンプレートはオリフィスに対して無作為に移動され、そのため、メッシュの平面の歪みへの抵抗は等方性である。電気紡糸マトリックスの特性は、電気紡糸システムに印加される電圧の大きさを変更することによって変化されてもよい。非限定的な例において、電気紡糸装置は、20kVまで偏向したオリフィスを含む。別の非限定的な例において、電気紡糸装置は、-7kVまで偏向したテンプレートを含む。なお別の非限定的な例において、電気紡糸装置は、3kVまで偏向したフォーカスリングを含む。

【0066】

一実施形態において、溶液中のトロポエラスチンの濃度は、溶液が表面に適用される時点で約10～約350mg/mLである。例えば、トロポエラスチンの濃度は、約15mg/mL、約20mg/mL、約25mg/mL、約30mg/mL、約35mg/mL、40mg/mL、約45mg/mL、約50mg/mL、約55mg/mL、約60mg/mL、約65mg/mL、約70mg/mL、約75mg/mL、約80mg/mL、約85mg/mL、約90mg/mL、約95mg/mL、約100mg/mL、約110mg/mL、約120mg/mL、約130mg/mL、約140mg/mL、約150mg/mL、約160mg/mL、約170mg/mL、約180mg/mL、約190mg/mL、約200mg/mL、約210mg/mL、約220mg/mL、約230mg/mL、約240mg/mL、約250mg/mL、約260mg/mL、約270mg/mL、約280mg/mL、約290mg/mL、約300mg/mL、約310mg/mL、約320mg/mLまたは約340mg/mLである。

【0067】

一実施形態において、溶液中のトロポエラスチンの濃度は、トロポエラスチンが添加さ

10

20

30

40

50

れる溶媒の種類および溶媒の温度次第であり得る。

【0068】

表面に適用されるトロポエラスチンの溶液または濃縮物は、粘度の範囲を有してもよい。それは、コアセルベートなどの沈殿した非クロスリンクトロポエラスチンを含んでもよい。

【0069】

ある種の実施形態において、表面に適用される溶液は、コアセルベートされたトロポエラスチンモノマーを含んでもよい。

【0070】

一実施形態において、

- トロポエラスチンモノマーの溶液を提供するステップと、
- 溶液中のトロポエラスチンモノマーの濃度を増加させ、トロポエラスチンの濃縮物を形成するステップと、
- 濃縮物を表面に適用するステップと、
- 濃縮物中のトロポエラスチンが互いに結合して、材料が水溶液と接触する時にトロポエラスチンモノマーへと解離しない弾性材料を形成するために十分な温度まで濃縮物を表面上で加熱して、それによって弾性材料を形成するステップと

を含む、弾性材料の形成方法が提供される。一実施形態において、濃縮物は、それより高い温度ではトロポエラスチンモノマーが互いに結合して、水溶液中で解離しない材料を形成する温度である最小値と、それより高い温度では非弾性材料が形成される温度である最大値とによって定義される範囲内の温度まで加熱され、それによって弾性材料を形成する。この方法は、濃縮物の約1~20%(w/w)の水、好ましくは約15%(w/w)の水の水損失を可能にするように表面上で濃縮物を加熱するステップが関与してもよい。

【0071】

トロポエラスチンは、エラスチン(ELN)ゲノム配列(または遺伝子)によってコード化されるモノマータンパク質である。トロポエラスチンモノマーは、約60~70kDaの径である。約36の小ドメインがトロポエラスチンにあり、そしてそれぞれ、約2kDaの重量である。エクソン内では、交互に、グリシン、バリン、プロリン、イソロイシンおよびロイシンなどの非極性アミノ酸が豊富な疎水性ドメイン(このドメインは、しばしば、GVGVP、GGVPおよびGVGVAPなどの3~6個のペプチドの繰り返しで生じる)と、リジンおよびアラニンが豊富な親水性ドメインとがある。親水性ドメインは、しばしば、AAAKAAKAAなどの2個または3個のアラニン残基によって分離されたリジンの区間からなる。追加的に、トロポエラスチンは、その2個のみのシステイン残基を含有する親水性カルボキシ末端配列を末端とする。トロポエラスチンはアセンブリの間に裂開を受けず、また微小繊維の形成は、コアセルベーションと呼ばれる自己会合プロセスによって達成される。

【0072】

トロポエラスチンは、疎水性ドメイン間の相互作用のため、生理的溫度において凝集する。このプロセスは可逆性で、熱力学的に制御される。コアセルベートは、リジルオキシダーゼによる架橋によって安定する。コアセルベートは次いで不溶性になり、そしてプロセスは不可逆性である。それは、次いで、縮合し、デスモシンまたはイソデスモシンのいずれかにおいて2個の残基または4個の残基の架橋構造を形成する。

【0073】

ある種の実施形態において、本発明で使用されるトロポエラスチンモノマーは、親水性および疎水性ドメインを含む。親水性ドメインは、(例えば、水への結合によって)弾性機能に寄付する。またそれらは、細胞への、そして細胞外基質への結合を含む、より広範囲にわたる様々な生物学的機能に寄付する。疎水性ドメインは、弾性(すなわち、本発明の材料の特徴)を提供することに関して重要であると考えられている。

【0074】

トロポエラスチンモノマーに存在してもよいアミノ酸配列のいくつかの例は、以下のとお

10

20

30

40

50

りである。

【化1】

GGVPGAIPGGVPGGVFYFYP

GVGLPGVYP

GVPLGYF

PYTTGKLPYGYGP

GGVAGAAGKAGYP

TYGVGAGGFP

KPLKP

ADAAAAYKAAKA

GAGVKPGKV

GAGVKPGKV

TGAGVKPKA

QIKAPKL

VAPGVG

VPGVG

AAAAAAKAAAK

AAAAAAAAAKAAKYGAAAGLV

EAAKAAKAAKYGAR

EAQAAAAKAAKYGVGT

AAAAKAAKAAQFGLV

GGVAAAASAAKVAAKAQLRAAAGLGAGI

GALAAKAAKYGAAV

AAAAAAKAAAKAA

AAAANKAAKYGAA

CLGKACGRKRK

10

20

30

【0075】

本発明に用いられるトロポエラスチンは、ある種の実施形態において、上記の配列のいずれか1つを含むか、またはそれからなる。

【0076】

一実施形態において、本発明に用いられるトロポエラスチンは、以下に示される配列を含むか、それからなる。

【化2】

VXPGVG

(式中、Xは、いずれかのアミノ酸残基か、または残基がない)

【化3】

ZXPGZG

50

(式中、Zは、いずれかの脂肪族残基である)

【化4】



(式中、(I/L/V)は、イソロイシン、ロイシンまたはバリンである)

【0077】

一実施形態において、トロポエラスチンモノマーは、トロポエラスチンの親水性および疎水性ドメインを含有する。

【0078】

他の適切なトロポエラスチン配列は当該技術において既知であり、CAA33627(ヒト(ホモ・サピエンス)(Homo sapiens))、P15502(ヒト(ホモ・サピエンス)(Homo sapiens))、AAA42271(ドブネズミ(ラッツス・ノーウィジアス)(Rattus norvegicus))、AAA42272(ドブネズミ(ラッツス・ノーウィジアス)(Rattus norvegicus))、AAA42268(ドブネズミ(ラッツス・ノーウィジアス)(Rattus norvegicus))、AAA42269(ドブネズミ(ラッツス・ノーウィジアス)(Rattus norvegicus))、AAA80155(ハツカネズミ(ムス・ムスクルス)(Mus musculus))、AAA49082(セキショクヤケイ(ガルス・ガルス)(Gallus gallus))、P04985(ウシ(ボス・タウルス)(Bos taurus))、ABF82224(セブラフィッシュ(ダニオ・レリオ)(Danio rerio))、ABF82222(アフリカツメガエル(ゼノプス・トロピカリス)(Xenopus tropicalis))およびP11547(ヒツジ(オピス・アリエス)(Ovis aries))が含まれる。好ましい実施形態において、本発明に用いられるトロポエラスチンモノマーは、ヒトトロポエラスチンから誘導される。一実施形態において、それらはGenBankエントリーAAC98394のアミノ酸残基27-724に相当する配列を有する。本明細書に明示されたように、本発明は、トロポエラスチンの変異体、例えば、種変異体または多型変異体を含む。

【0079】

本発明に用いられるトロポエラスチンモノマーは、組み換え型供給源から得られてもよい。それらは天然供給源から抽出することができ、または合成されることも可能である(例えば、固相合成技術によって)。トロポエラスチンモノマーは、商業的にも入手可能である。

【0080】

トロポエラスチンには多くのイソ型が存在し、したがって、トロポエラスチンポリペプチドを構成するアミノ酸の厳密な数は変動する。「ポリペプチド」または「ポリペプチド鎖」という用語は、通常アミド結合によって架橋した、アミノ酸のポリマーを指す。アミノ酸の機能的に活性なポリマーは、「タンパク質」と一般に呼ばれる。本発明は、トロポエラスチンの変異型、例えば、種変異型または多型変異型を含む。本発明は、同一活性(すなわち、生体適合性および弾性)を示すトロポエラスチンの全ての機能的に活性な変異型を包括するように意図される。これには、トロポエラスチンの分離および全型、翻訳後に変性された型、ならびにグリコシル化または非グリコシル化誘導体も含まれる。そのような機能的に活性なフラグメントおよび変異型は、例えば、保存的アミノ酸置換を有するものを含む。

【0081】

一実施形態において、モノマーは、ヒトトロポエラスチンイソ型の配列を有する組み換え型トロポエラスチンモノマーである。

【0082】

「機能的に活性」という用語は、トロポエラスチンのフラグメントまたは変異型に関して、以下にさらに検討されるような弾性材料を形成することが可能なフラグメントまたは

10

20

30

40

50

変異型（例えば、類似物、誘導体または変異体）を意味する。そのような変異型には、天然由来変異型および非天然由来変異型が含まれる。1種またはそれ以上のアミノ酸の添加、除去、置換および誘導体化は、変性によってフラグメントまたは変異型の機能的活性の損失をもたらさない限り、考察される。機能的に活性なフラグメントは、例えば、エキソペプチダーゼを使用して、またはより短い長さのアミノ酸配列を合成することによって、アミノ酸配列を短縮し、次いで、以下の実施例で例示される方法などによって弾性材料形成能力を試験することによって、容易に決定することができる。

【0083】

非天然変異型が生じる場合、フラグメントは、ペプチド模倣 (peptidomimetic) と呼ばれていてもよく、そしてこれも本発明の範囲内である。例えば、合成アミノ酸およびそれらの類似物は、天然アミノ酸の1種またはそれ以上と置換されてもよく、以下にさらに記載されるような構造物形成活性を提供する。

10

【0084】

「ペプチド模倣」は、本発明に用いられるトロポエラスチンと実質的に同一の構造および/または機能的特徴を有する合成化合物である。ペプチド模倣は、一般に、天然では合成されない少なくとも1種の残基を含有する。ペプチド模倣化合物の非天然成分は、以下の1つまたはそれ以上のものに従ってよい：a)天然アミド結合(「ペプチド結合」)架橋以外の残基連鎖群、b)天然由来アミノ酸残基の代わりに非天然残基、またはc)二次構造的な模倣を誘導する、すなわち、二次構造を誘導するか、または安定させるための残基、例えば、ベータターン、ガンマターン、ポリプロリントーン、ベータシート、アルファヘリックス構造など。

20

【0085】

ペプチド模倣は、科学文献および特許文献 (Gilmanら、al-Obeidiら (1998)、Hrubyら (1997) および Ostergaard & Holm (1997)) に記載される様々な手順および方法を使用して合成することができる。

【0086】

好ましくは、機能的に活性なフラグメントは、約100のアミノ酸の長さである。一般に、本発明に使用されるより短いフラグメントは、約10のアミノ酸の長さである。したがって、フラグメントは、約10~約100のアミノ酸の長さであってもよい。より短いフラグメントは有利であり、例えば、固相合成による長いフラグメントの調製は達成が困難である可能性があるため、フラグメントが合成技術によって製造されるように試みられている。フラグメントは、非常に純粋な生成物が得られることが望ましい場合、試験管内で一般に合成される。より長いフラグメントの利点は、その弾性特性と同様に、フラグメントの疎水性/親水性性質をより容易に調整することができることである。好ましくは、機能的に活性なフラグメントまたは変異型は、上記などのペプチドに対して、少なくとも約60%の同一性、より好ましくは少なくとも約65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%または85%の同一性、さらにより好ましくは90%の同一性、なおさらにより好ましくは、少なく約95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する。機能的に活性なフラグメントまたは変異型は、トロポエラスチンからのアミノ酸の隣接する配列に相当してもよいが、または同一性を有してもよいが、機能的に活性なフラグメントは、トロポエラスチンの三次元構造で空間的に集合したアミノ酸の配列に相当するか、同一性を有することも考えられる。

30

40

【0087】

そのような機能的に活性なフラグメントおよび変異型には、例えば、保存的アミノ酸置換を有するものが含まれる。当業者は、比較される配列の完全な長さにおいて最大の配列を達成するために必要とされる、いずれのアルゴリズム(以下に記載する非限定的な実施例)も含む、配列を測定するための適切なパラメーターを決定することができる。アミノ酸配列が配列される時、所与のアミノ酸配列Bに対する所与のアミノ酸配列Aのパーセントアミノ酸配列同一性(これは、代わりに、所与のアミノ酸配列Bに対する特定のパーセ

50

ントアミノ酸配列同一性を有するか、または含む所与のアミノ酸配列 A として言い表すことができる)は、以下のとおりに算出することができる: パーセントアミノ酸配列同一性 = $(X/Y) \times 100$ (式中、X は、A および B の配列プログラム、またはアルゴリズム配列による同一の一致として記録されるアミノ酸残基の数であり、そして Y は、B 中のアミノ酸残基の全体の数である)。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さと同じでない場合、B に対する A のパーセントアミノ酸配列同一性は、A に対する B のパーセントアミノ酸配列同一性と等しくならない。

【0088】

パーセント同一性を算出する際に、完全一致は考慮される。2つの配列間のパーセント同一性の測定は、数学的アルゴリズムを使用して実行することができる。2つの配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの非限定的な例は、Karlin および Altschul (1993) におけるような、変更された Karlin および Altschul のアルゴリズム (1990) である。そのようなアルゴリズムは、Altschul らの (1990) BLASTN および BLASTX プログラムに組み込まれる。比較目的のためのギャップがある配列を得るために、Altschul ら (1997) に記載されるように、Gapped BLAST (BLAST 2.0 において) を利用することができる。あるいは、PSI-Blast を使用して、分子間の距離関係を検出する繰り返しの検索を実行することができる。上記 Altschul ら (1997) を参照のこと。1つの好ましい実施形態において、BLAST、Gapped BLAST および PSI-Blast プログラムを利用して、それぞれのプログラム (例えば、BLASTX および BLASTN) のデフォルトパラメーターが使用される。配列は、検査によって手動で実行されてもよい。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の非限定的な例は、ClustalW アルゴリズム (Higgins ら (1994)) である。ClustalW は配列を比較して、アミノ酸または DNA 配列の全体を配列し、したがって、全アミノ酸配列の配列保護に関するデータを提供することができる。ClustalW アルゴリズムは、Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) の ALIGNX モジュールなどのいくつかの商業的に入手可能な DNA / アミノ酸分析ソフトウェアパッケージで使用される。ClustalW によるアミノ酸配列の配列後、パーセントアミノ酸同一性を評価することができる。ClustalW 配列の分析のために有用なソフトウェアプログラムの非限定的な例は、GENEDOC (商標) または Jalview である (<http://www.jalview.org/>)。GENEDOC (商標) は、複数のタンパク質間のアミノ酸 (または DNA) 類似性および同一性の評価を可能にする。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の非限定的な例は、Myers および Miller のアルゴリズム (CABIOS 1988; 4: 11-17) である。そのようなアルゴリズムは、GCG Wisconsin Genetics Software Package, Version 10 (Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USA から入手可能) の一部である、ALIGN プログラム (2.0 版) に組み込まれる。1つの好ましい実施形態において、アミノ酸配列を比較するために ALIGN プログラムを利用して、PAM 120 重量残基表、12 のギャップ長さペナルティおよび 4 のギャップペナルティは、パーセント同一性を評価する時に使用される。

【0089】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、同一種類の別のアミノ酸によるアミノ酸の置換を指し、種類は以下の通りである。

非極性: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp

非荷電極性: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln

酸性: Asp, Glu

塩基性: Lys, Arg, His

【0090】

10

20

30

40

50

他の保存的アミノ酸置換は、以下の通りに製造されてもよい。

芳香族：Phe、Tyr、His

プロトン供与体：Asn、Gln、Lys、Arg、His、Trp

プロトン受容体：Glu、Asp、Thr、Ser、Tyr、Asn、Gln

【0091】

一実施形態において、モノマーは、少なくとも50の連続的なアミノ酸に渡って、ヒトトロポエラスチンのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を有する。

【0092】

一実施形態において、モノマーは、VPGVGからなる連続的なアミノ酸配列に渡って、ヒトトロポエラスチンの配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を有する。

【0093】

1種のトロポエラスチンモノマーが本発明で使用されてもよく、または異なるトロポエラスチンモノマーの組み合わせが使用されてもよい。例えば、トロポエラスチンモノマーの組み合わせは、1、2、3、4、5、6、7、9、10またはそれより多くの異なる種類のトロポエラスチンモノマーを含むことができる。別の実施形態において、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10またはそれより多くの異なるトロポエラスチンモノマーを使用することができる。別の実施形態において、1またはそれ以上、2またはそれ以上、3またはそれ以上、4またはそれ以上、5またはそれ以上、6またはそれ以上、7またはそれ以上、8またはそれ以上、9またはそれ以上、あるいは10またはそれ以上の異なる種類のトロポエラスチンモノマーを使用することができる。

【0094】

加えて、他の実施形態において、トロポエラスチンモノマーは、ヒトおよび/またはヒト以外（例えば、霊長類、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコまたは齧歯類）のトロポエラスチンモノマーのいずれの数または組み合わせでもある。

【0095】

さらに、組み合わせに存在するそれぞれのトロポエラスチンモノマーの比率および/または同一性を変化させることによって、所望の弾性、引張強さおよび成形性を有する、トロポエラスチンをベースとするヒドロゲルを発生させることができること、したがって、トロポエラスチンの様々な多型をポリマー骨格に組み込むことによって、トロポエラスチンポリマーの強度、弾性、架橋性、ならびに他の物理的および生化学的挙動を、変更し、そしておそらく制御することができることが認識されるであろう。

【0096】

加えて、組み合わせに存在するそれぞれのトロポエラスチンモノマーの比率および/または同一性は、修復されるか、置換されるか、または再生する組織に存在するトロポエラスチンモノマーに一致させるように変更することができる。

【0097】

一実施形態において、溶液は表面上へ溶液を噴霧することによって表面に適用される。

【0098】

「表面」という用語は、本明細書で使用される場合、相補的形狀のトロポエラスチンをベースとするポリマー構造物を製造するために使用することができる、いずれかの対象またはデバイスを指す。例えば、表面は、その上に平坦な膜として凝集体が形成するような平坦な表面でもよく、または型であってもよい。型とは、へこんだ部分を含む対象またはデバイスであることが一般に理解される。この部分をトロポエラスチンモノマーの溶液で充填して、濃縮物が加熱される時、それは型内部で硬化して、その形状を取り入れる。型は、当業者によって望まれるいずれの形状であってもよい。例えば、型は、それから形成される構造物が、修復および/または置換される特定の生物学的組織（例えば、軟骨、維管束組織または骨）の形状であるように成形されているか、あるいはアッセイ用途に使用

10

20

30

40

50

することができるパターン（以下でさらに検討されるようなチャネル、溝など）を含んでもよい。したがって、一実施形態において、表面は、本プロセスによって形成される弾性材料が、あらかじめ定義された形状に成形されることを可能にするダイ、型またはキャストの形状で提供される。

【0099】

一実施形態において、弾性材料は、トロポエラスチンモノマーの溶液が上記プロセスによって適用され得る「表面」を形成してもよい。例えば、第1の適用は、非タンパク性表面における弾性材料の形成をもたらす。第2の適用は、非タンパク性表面で形成された弾性材料に行われてよく、第1の適用から誘導される弾性材料上での弾性材料の形成をもたらす。このプロセスは、構造の構築を可能にするように、例えば、トロポエラスチンモノマーの溶液の滴下による適用によって、複数回繰り返すことができる。

10

【0100】

また本発明は、
- トロポエラスチンモノマーの溶液を提供するステップと、
- 溶液を表面に適用するステップと、
- 濃縮物中のトロポエラスチンモノマーが互いに結合して、トロポエラスチンモノマーの凝集体を形成するために十分な温度まで溶液を表面上で加熱するステップと
を含むプロセスによって形成される弾性材料に関する。

【0101】

また本発明は、トロポエラスチンモノマーの、加熱によって促進された会合によって形成される弾性材料を含む構造物に関する。

20

【0102】

弾性材料は、被験者の天然組織（の少なくとも一部）を、修復、成長または置換するために使用することのできる三次元ポリマー構造であってもよい（例えば、獣医学的または医学（ヒト）用途）。加えて、弾性材料は、三次元構造物に組み込まれてもよく、またはその一部分を形成してもよい。例えば、凝集体は、層として、軟骨修復のために使用される構造物に組み込まれてもよく、またはステントに組み込まれてもよい。

【0103】

加熱ステップ前の溶液中のトロポエラスチンモノマー間の接触の程度が、材料の特性に影響を及ぼすこともできることを当業者は理解するであろう。例えば、加熱前、溶液が、（濃縮物に存在するトロポエラスチンの量に関して）より濃縮されると、より多くのトロポエラスチンモノマーが、凝集体を形成するために相互作用し、そして得られた材料はより弾性が少なくなる。したがって、特定の実施形態において、溶液中のトロポエラスチンモノマーの濃度は、重合度と直接相関し得る。他の要因も材料の特性に寄与し得、これには、例えば、上記で検討されるように、使用されるトロポエラスチンモノマーの種類、加熱ステップが実行される温度、加熱が実行される時間が含まれる。

30

【0104】

上記のとおり、本明細書に記載される材料は多孔性であってもよく、すなわち、材料は空隙を有してもよく、すなわち、材料の部分的体積は、オープンスペース、例えば、細孔または他の開口部から構成されてもよい。したがって、空隙率は、材料の空隙空間を測定し、そして0～100%（または0～1）のパーセントでの全体積における空隙の体積分率である（例えば、Coulsonら（1978）を参照のこと）。マトリックス空隙率の測定は、当業者に周知であり、例えば、水銀ポロシメトリーおよび気体吸着（例えば、窒素吸着）などの標準技術を使用して実行される。一般に、材料の空隙率は、0.5～0.99、約0.75～約0.99、または約0.8～約0.95の範囲であることができる。好ましくは、材料の空隙率は、少なくとも0.75、より好ましくは少なくとも0.8、最も好ましくは少なくとも0.9である。

40

【0105】

多孔性材料は、いずれの細孔径も有することができる。本明細書で使用される場合、「細孔径」という用語は、直径または細孔の横断面の有効直径を指す。「細孔径」という用

50

語は、複数の細孔の測定をベースとする、平均直径、または細孔の横断面の平均有効直径も指す。円形ではない横断面の有効直径は、非円形横断面と同一断面積を有する円形横断面の直径に等しい。細孔には、水または空気などの流体を充填することができる。いくつかの実施形態において、材料の細孔は、約50nm~約1000 μ m、約250nm~約500 μ m、約500nm~約250 μ m、約1 μ m~約200 μ m、約10 μ m~約150 μ m、約15 μ m~約125 μ m、約20 μ m~約100 μ m、または約40 μ m~約65 μ mの範囲の細孔径分布を有することができる。いくつかの実施形態において、材料は、約12 μ m、約25 μ m、約45 μ m、約50 μ mまたは約65 μ mの細孔径を有することができる。いくつかの実施形態において、材料は、 $11.7 \pm 3.3 \mu\text{m}$ 、 $23.4 \pm 5.8 \mu\text{m}$ または $51 \pm 9 \mu\text{m}$ の細孔径を有することができる。

10

【0106】

細孔が、示された「径」の周辺の径の分布を示すことができることを当業者は理解するであろう。特記されない限り、「径」という用語は、本明細書で使用される場合、細孔の径分布のモードを指し、すなわち、径分布において最も頻繁に生じる値を指す。

【0107】

細孔は、実質的に円形の横断面または開口部であることができる。「実質的に円形」が意味することは、細孔横断面の最長垂直軸対最短垂直軸の長さの比率が約1.5以下であることである。実質的に円形には、一連の対称性が必要とされない。いくつかの実施形態において、細孔横断面の最長軸および最短軸の長さの比率は、約1.5以下、約1.45以下、約1.4以下、約1.35以下、約1.30以下、約1.25以下、約1.20以下、約1.15以下、約1.1以下である。

20

【0108】

有利には、本発明の材料は弾性である。「弾性」材料は、それに適用された力（例えば、圧縮または伸張）が排除された後、特定の形状または形態に戻る材料である。これは、弾性的に圧縮可能な、および伸長可能な、機械的耐久性、または柔軟性の比較的低ヒステリシスの材料とも記載される。この材料は、伸縮性、伸張性、弾性、はね返りが可能と記載されてもよい。例えば、材料は、約20~約400%の伸張性を有することができる。

【0109】

いくつかの実施形態において、材料は、約1kPa~約 10^3 kPaの範囲の弾性率を有することができる。本明細書で使用される場合、「弾性率」という用語は、力がそれに適用された時に弾性変形する（すなわち、非永久的）対象または物質の傾向を指す。一般に、対象の弾性率は、弾性変形領域におけるその応力-歪み曲線の勾配として定義される。指示を含めて、応力および歪みを測定する方法を明示することによって、多くの種類の弾性率を定義することが可能となる。ヤング率（E）は、引張弾性率、または対向した力が軸に沿って適用される時に軸に沿って対象が変形する傾向を説明する。これは、引張応力対引張歪みの比率として定義される。これは、しばしば、単に弾性率として言及される。本プロセスによって形成される弾性材料が、弾力的に圧縮に応じることにも認識される。いくつかの実施形態において、材料は、約1kPa~約1000kPaの範囲の弾性率を有することができる。いくつかの実施形態において、材料は、約10kPa、約100kPaまたは約200kPaの弾性率を有することができる。

30

40

【0110】

本発明による所与の材料のより高いヤング率は、以下：

- より長い時間、例えば、8~16時間の加熱、
- トロポエラスチンの可溶化および加熱より前の絹の添加、
- リンカーの添加

のいずれか1つによって達成することができる。

【0111】

これらの調整によって、10マガパスカルまでのヤング率を有する材料がもたらされる。

【0112】

本発明の材料は、ヒドロゲルを形成するために、水に添加されてもよい。したがって、

50

本発明は、

- トロポエラスチンモノマーの溶液を提供するステップと、
 - 溶液を表面に適用するステップと、
 - 濃縮物中のトロポエラスチンモノマーが互いに結合して、トロポエラスチンモノマーの凝集体を形成するために十分な温度まで溶液を表面上で加熱して、それによって弾性材料を形成するステップと
- を含むプロセスによって形成される弾性材料を含む、ヒドロゲルにも関する。

【0113】

ヒドロゲルは一般に、ポリマー鎖（親水性である）の網状構造として理解され、その中では水が分散媒である。ヒドロゲルは高度に吸収性であり、それらは99.9%以上の水を含有することができ、そしてそれらの有意な含水量のために、天然組織に非常に同様の可撓性を有する。

10

【0114】

したがって、本発明の弾性材料または凝集体を含むヒドロゲルは、実質的な量の水を典型的に含有する。しかしながら、ヒドロゲルを形成するために凝集体が添加されるか、または浸漬される水量は、ヒドロゲルにおいて望ましい弾性の程度などの要因次第である。すなわち、凝集体に添加される水量は、弾性を与えるためにのみ十分な量であってもよい。あるいは、結果として生じるヒドロゲルを高度に弾性にさせるために、有意な水量が添加されてもよい。当業者は、使用される水量が凝集体自体の弾性次第であることも理解するであろう（すなわち、凝集体がすでに非常に弾性である場合、凝集体が弾性でない場合よりも少量の水が添加される必要がある）。

20

【0115】

当業者は、本発明の材料の追加的な成分（例えば、細胞、薬学的活性成分など）、ならびに本発明の材料の形態（例えば、再生医学構造物、およびアッセイとして）に関する本明細書の説明は、本発明の弾性材料を含んでなる構造物およびヒドロゲルにも適用されることを理解するであろう。

【0116】

本明細書に記載される材料は、再生医学用途に使用することができる。いくつかの実施形態において、再生医学は、組織および/または器官機能を置換、修復および/または再生させること、あるいは移植のための人工組織および/または器官を作製することを目的とする。一般に、再生医学で使用される骨格は、天然細胞外基質（ECM）を模倣して、細胞接着、移動および増殖用の担体を提供する。理想的には、それらは区別された機能、新規組織生成およびその三次元組織を可能にする。骨格の所望の特徴には、機械的強度および分解性などの物理的パラメーターが含まれるが、生物学的特性には、生物学的に関連する微環境を提供する生体適合性および能力が含まれる。生物分解可能な材料は、組織が成長した後、得られた構造が、生物学的成分から完全に、またはほとんど完全に製造されるため、いくつかの用途（例えば、組織再生）において有利である。

30

【0117】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される材料は、維管束組織、心臓組織、膀胱、皮膚、肺、靭帯、腱、内分泌腺、肝臓、腎臓組織、リンパ節、すい臓、骨、軟骨および他の組織の成長および/または置換を含む多くの再生医学用途のために使用することができる。いくつかの実施形態において、材料は、信号を細胞に供給するために、細胞増殖および機能のための担体構造として作用するために、そして空間充填物を提供するために使用することができる。

40

【0118】

弾性材料の代表的な所望の形状には、限定されないが、シート、管および他のいずれかの三次元形状が含まれる。シートの形状に形成される弾性材料は、真皮組織、歯根被覆のための膜、膜組織のための修復、置換および/または再生治療を提供するためのインプラント、構造物およびグラフトなどの調製において使用することができる。管の形状で形成される弾性材料は、動脈、静脈、尿管、尿道、神経、長骨などのための修復、置換および

50

／または再生治療を提供するためのインプラント、構造物およびグラフトの調製において使用することができる。他のいずれかの三次元の物体の形状で形成される弾性材料は、臓器移植、骨の修復、歯のインプラント、または筋肉、腱、靭帯および軟骨グラフトのための修復、置換および／または再生治療を提供するためのインプラント、構造物およびグラフトの調製において使用することができる。

【0119】

一実施形態において、弾性材料は、プレキャストパッチとしてのその使用を可能にする形状に形成されてもよく、それは次いで、縫合またはそれ以外の方法で表面上へ接着されてもよい。例には、心臓パッチ、真皮パッチまたは角膜のために適切なパッチが含まれる。

10

【0120】

シートの形状に形成されたか、キャストされたか、または成形された生体適合性弾性材料は、平坦なシートであることができるか、あるいは修復、置換または再生される負傷、損害、病組織または器官の輪郭に密接に一致するように湾曲を有するシートであることができる。シートは、限定されないが、正方形、長方形、台形、三角形、円、楕円などを含むいずれの幾何学的な形状であってもよい。

【0121】

シートの典型的な面積には、約 1 mm^2 ～約 1 m^2 、約 1 mm^2 ～約 50 cm^2 、約 1 mm^2 ～約 25 cm^2 、約 1 mm^2 ～約 10 cm^2 、約 1 mm^2 ～約 1 cm^2 、約 1 cm^2 ～約 1 m^2 、約 1 cm^2 ～約 500 cm^2 、 1 cm^2 ～約 250 cm^2 、 1 cm^2 ～約 200 cm^2 、 1 cm^2 ～約 150 cm^2 、～約 100 cm^2 、約 1 cm^2 ～約 50 cm^2 、約 1 cm^2 ～約 25 cm^2 、約 1 cm^2 ～約 10 cm^2 、約 1 cm^2 ～約 5 cm^2 、約 1 cm^2 ～約 2.5 cm^2 、約 10 mm^2 ～約 10 cm^2 、約 0.1 cm^2 ～約 10 cm^2 、約 0.1 cm^2 ～約 1 cm^2 、またはそのいずれかの介在範囲の面積が含まれる。例えば、典型的なシートの 1 cm^2 ～ 100 cm^2 の面積の範囲には、約 1 cm^2 、約 5 cm^2 、約 10 cm^2 、約 20 cm^2 、約 30 cm^2 、約 40 cm^2 、約 50 cm^2 、約 60 cm^2 、約 70 cm^2 、約 80 cm^2 、約 90 cm^2 および約 100 cm^2 が含まれる。

20

【0122】

シートの形状で形成、キャストまたは成形される弾性材料の厚さの典型的な程度には、約 0.1 mm ～約 10 mm 、約 0.25 mm ～約 7.5 mm 、約 0.5 mm ～約 5 mm 、約 0.75 mm ～約 2.5 mm 、約 1 mm ～約 2 mm またはそのいずれかの介在範囲が含まれる。

30

【0123】

別の実施形態において、厚さは、約 0.1 mm 、約 0.25 mm 、約 0.5 mm 、約 0.75 mm 、約 1 mm 、約 2 mm 、約 3 mm 、約 4 mm 、約 5 mm 、約 7.5 mm 、or 約 10 mm またはそれ以上であることができる。

【0124】

管の形状で形成、キャストまたは成形される弾性材料は、骨格の径が、負傷、損害または病組織もしくは器官を修復、置換および／または再生させるために適切であるように、いずれかの所望の長さ、直径および厚さを有することができる。管の典型的な長さには、約 0.5 cm 、約 1 cm 、約 2.5 cm 、約 5 cm 、約 10 cm 、約 25 cm 、約 50 cm 、約 100 cm 、約 150 cm 、約 200 cm 、約 250 cm 、約 300 cm 、約 350 cm 、約 400 cm 、約 450 cm 、約 500 cm またはそれ以上が含まれる。管の典型的な直径には、直径約 0 mm （例えば固体繊維）、 0.5 mm 、約 1 mm 、約 1.5 mm 、約 2 mm 、約 2.5 mm 、約 3 mm 、約 3.5 mm 、約 4 mm 、約 4.5 mm 、約 5 mm 、約 5.5 mm 、約 6 mm 、約 6.5 mm 、約 7 mm 、約 7.5 mm 、約 8 mm 、約 8.5 mm 、約 9 mm 、約 9.5 mm 、約 10 mm 、約 11 mm 、約 12 mm またはそれ以上が含まれる。好ましい実施形態において、本発明の管は、約 1 mm ～約 10 mm の直径を有する。

40

50

【0125】

他の三次元の物体の形状で形成、キャストまたは成形される弾性材料は、骨格の径が、負傷、損害または病組織もしくは器官を修復、置換および/または再生させるために適切であるように、いずれかの所望の体積および形状を有することができる。

【0126】

三次元形状骨格の典型的な体積は、約 100 mm^3 ~ 約 5 m^3 、約 100 mm^3 ~ 約 1000 cm^3 、約 1 cm^3 ~ 約 1000 cm^3 、約 1 cm^3 ~ 約 100 cm^3 、約 1 cm^3 ~ 約 10 cm^3 、約 10 cm^3 ~ 約 1000 m^3 、約 10 cm^3 ~ 約 100 cm^3 、約 500 cm^3 ~ 約 1000 cm^3 、約 100 mm^3 ~ 約 5 cm^3 、約 100 mm^3 ~ 約 2.5 cm^3 、約 1 cm^3 ~ 約 5 cm^3 、約 1 cm^3 ~ 約 2.5 cm^3 、約 750 cm^3 ~ 約 1250 cm^3 、約 850 cm^3 ~ 約 1150 cm^3 、約 950 cm^3 ~ 約 1050 cm^3 、約 900 cm^3 ~ 約 1000 cm^3 、またはそのいずれかの介在範囲である。例えば、典型的な三次元形状の 1 cm^3 ~ 10 cm^3 の体積の範囲には、約 1 cm^3 、約 2 cm^3 、約 3 cm^3 、約 4 cm^3 、約 5 cm^3 、約 6 cm^3 、約 7 cm^3 、約 8 cm^3 、約 9 cm^3 および約 10 cm^3 のおおよその体積が含まれる。一実施形態において、骨格は、約 1 ~ 約 100 マイクロリットルまでの体積を有してもよい。

【0127】

いくつかの実施形態において、弾性材料は膜の形状である。膜の厚さは、ナノメートルからミリメートルの範囲であることができる。例えば、膜厚は、約 1 nm ~ 約 1000 m の範囲であることができる。いくつかの実施形態において、膜厚は、約 1 nm ~ 1000 nm 、約 $1\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $1000\text{ }\mu\text{m}$ 、約 1 mm ~ 約 1000 mm であることができる。いくつかの実施形態において、膜厚は、約 500 nm ~ 約 $750\text{ }\mu\text{m}$ 、約 750 nm ~ 約 $500\text{ }\mu\text{m}$ 、約 1000 nm ~ 約 $250\text{ }\mu\text{m}$ 、約 $10\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $100\text{ }\mu\text{m}$ 、約 $25\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $75\text{ }\mu\text{m}$ であることができる。いくつかの実施形態において、膜厚は約 10 nm ~ 約 1 m の範囲である。いくつかの実施形態において、膜厚は約 $50\text{ }\mu\text{m}$ であることができる。

【0128】

いくつかの実施形態において、弾性材料は発泡体である。発泡体は、例えば、凍結乾燥、および水が溶媒であるか、あるいは窒素または他の気体がそれぞれ発泡剤である気体発泡を含む、当該分野で既知の方法から製造することができる。

【0129】

いくつかの実施形態において、材料は、正確に定義された放出プロフィールが可能な複合供給デバイスを構成するために使用することができる。これは、薬物送達デバイス（すなわち、ナノ粒子または微粒子）と本明細書に記載される材料とを組み合わせ、そしてこれらを使用して、より多くの複合薬物送達システムを構成することによって達成することができる。一例であるが、本明細書に記載される材料は、追加的に、送達される治療剤を含むことができる（例えば、小分子、核酸、タンパク質、脂質および/または炭水化物薬剤）。そのような材料は、組織再生を目標とする部位に薬剤を供給するために有用でありえる。例えば、新しい骨を再生させる目的のために被験者に投与される骨誘導性細胞を含んでなる材料は、追加的に、それらの放出時に、新しい骨の成長をさらに刺激することができる、1種またはそれ以上の骨形成タンパク質（BMP）を含むことができる。

【0130】

本明細書に記載される弾性材料は、複合材料を形成するために、別の材料、例えば生体適合物質と組み合わせることができる。「生体適合物質」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に生物学的適合性の天然に存在する材料を指す。典型的な生体適合物質には、限定されないが、生物高分子、スポンジ、絹、脱細胞化組織およびゼラチンが含まれる。「生物高分子」という用語は、本明細書で使用される場合、天然由来のポリマー、あるいは生体系に適合性があるか、または天然由来のポリマーを模倣する合成ポリマーのいずれかを指す。典型的な生物高分子には、限定されないが、オリゴ糖類、多糖類、例えば、グリコサミノグリカン、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、核酸、ポリケチド、ペプトイド、ヒドロゲル、ポリ（グリコール）、例えば、ポリ（エチレングリコー

10

20

30

40

50

ル)、コラーゲン、絹およびポリアクテートが含まれる。

【0131】

一実施形態において、弾性材料を、塩、またはポリビニルポリビニルピロリドンと組み合わせてもよい。

【0132】

本発明の弾性材料は、標的組織の修復および/または再生を促進するため、そして/または生物学的に活性化化合物の目標とする供給を達成する方法を提供するため、薬学的に容認できる賦形剤および生物学的に活性化薬剤(例えば、薬剤、ビタミンおよびミネラル)などの他の成分を含んでもよい。そのような成分は、加熱の前にトロポエラスチン溶液に添加されてもよく(それが形成されたまま、それらが弾性材料に組み込まれるように)、またはそれが形成された後に、弾性材料に配置されてもよい。加えて、成分は、弾性材料からヒドロゲルを形成するために使用される水溶液に存在してもよい。当業者は、添加される成分が、弾性材料を形成するために必要とされる条件で安定ではない場合、弾性材料が形成された後に、成分が添加されるべきであることを理解するであろう。

10

【0133】

疾患の診断、治療または予防において利益があることが当業者に既知のいずれの生物学的に活性化薬剤も、本発明の文脈において治療剤として考察される。治療剤には、ホルモン、成長因子、酵素、DNA、プラスミドDNA、RNA、siRNA、ウイルス、タンパク質、脂質、炎症誘発性分子、抗体、抗生物質、抗炎症剤、アンチセンスヌクレオチド、および形質転換核酸、またはそれらの組み合わせが含まれる。治療剤のいずれも、そのような組み合わせが生物学的に適合性である範囲で組み合わせることができる。

20

【0134】

適切な成長因子およびサイトカインには、限定されないが、幹細胞因子(SCF)、顆粒白血球-コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒白血球-マクロファージ刺激因子(GM-CSF)、間質細胞由来因子-1、造血幹細胞因子、VEGF、TGF、プレートレット由来成長因子(PDGF)、アンジオポエチン(Ang)、上皮成長因子(EGF)、bFGF、HNF、NGF、骨形成タンパク質(BMP)、線維芽細胞成長因子(FGF)、肝細胞成長因子、インシュリン様成長因子(IGF-1)、インターロイキン(IL)-3、IL-1、IL-1、IL-6、IL-7、IL-8、IL-11およびIL-13、コロニー刺激因子、トロポポエチン、エритроポイエチン、fit3-リガンドおよび腫瘍壊死因子(TNF)が含まれる。他の例は、Dijkeら(1989)、Mulderら(1998)、Zieglerら(1997)に記載される。適切なホルモンには、限定されないが、アンチミュラーリアンホルモン(またはミュラー管抑制因子またはホルモン)、アジポネクチン、副腎皮質刺激ホルモン(またはコルチコロピン)、アンジオテンシノーゲンおよびアンジオテンシン、抗利尿ホルモン(またはバソプレッシン、アルギニンバソプレッシン)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(またはアトリオペプチン)、カルシトニン、コレシストキニン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、エритроポイエチン、卵胞刺激ホルモン、ガストリン、グレリン、グルカゴン、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤乳汁分泌ホルモン、成長ホルモン、インシュリン様成長因子1、インシュリン様成長因子(またはソマトメジン)、レプチン、黄体形成ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモンMSH、オレキシン、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、プロラクチン、リラキシン、セクレチン、ソマトスタチン、トロポポエチン、甲状腺刺激ホルモン(またはチロトロピン)、および甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンが含まれる。

30

40

【0135】

典型的な薬学的に活性化化合物(例えば、治療剤)には、限定されないが、Harrisonら、Physicians Desk Reference、Pharmacological Basis of Therapeutics(1990)、United States Pharmacopeia、現行版のGoodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Ther

50

apeutics、および現行版のThe Merck Indexに見られるものが含まれる。

【0136】

別の実施形態において、弾性材料（またはそれから形成されるヒドロゲル）には、多能性または多分化能性幹細胞の集団（以下にさらに検討される）およびホルモン、成長因子、サイトカイン、モルフォゲン（例えば、レチノイン酸など）、細胞外基質材料（例えば、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンなど）、または弾性材料またはヒドロゲルが患者に移植されたら、特定の発達経路に沿って細胞集団の分化を促進する他の材料（例えば、DNA、ウイルス、他の細胞型など）が含まれる。あるいは、または加えて、弾性材料またはヒドロゲルとともに細胞を培養する間に細胞を試験管内で分化してもよい。

10

【0137】

生理活性剤は、リンカーを通して弾性材料に共有結合することができる。リンカーは、用途次第で、切断可能リンカーまたは非切断可能リンカーであることが可能である。本明細書で使用される場合、「切断可能リンカー」は、様々な条件で裂開が可能であるリンカーを指す。裂開のために適切な条件には、限定されないが、pH、UV照射、酵素活性、温度、加水分解、除去および置換反応、酸化還元反応および結合の熱力学特性が含まれる。多くの場合、結合またはカップリング相互作用の意図された性質、あるいは所望の生物学的効果は、リンカー基の選択を決定する。

【0138】

薬学的に容認できる賦形剤には、所望の特定の剤形に適切であるような、いずれの、および全ての溶媒、分散媒、希釈剤または他の液体媒体、分散または懸濁助剤、表面活性剤、アイソトニック剤増粘または乳化剤、防腐剤、固体結合剤、潤滑剤などを含む。Gennaro (2006) は、医薬品組成物を調製する際に使用される様々な賦形剤およびその調製に関する既知の技術を開示する。いずれかの望ましくない生物学的効果を生じるか、またはヒドロゲルの他のいずれかの成分と有害な様式で相互作用することによってなど、いずれかの従来賦形剤が物質またはその誘導体と不適合である場合を除き、その使用は、本発明の範囲内であると考察される。

20

【0139】

医薬品組成物の製造において使用される薬学的に容認できる賦形剤には、限定されないが、不活性希釈剤、分散および/または粒状化剤、表面活性剤および/または乳化剤、崩壊剤、結合剤、防腐剤、緩衝剤、潤滑剤および/または油が含まれる。そのような賦形剤は、任意にトロポエラスチン含有溶液に含まれてもよい。着色剤、コーティング剤、甘味料、調味料および芳香剤などの賦形剤は、配合する人の判断によって、溶液に存在することができる。調製物の一般的に考慮すべき点および/または医薬品の製造は、例えば、Gennaro (2006) に見られ得る。

30

【0140】

材料に存在するトロポエラスチンおよび生物学的に活性な薬剤の量は、必ず、特定の薬剤および治療される状態次第である。当業者は、状態を治療するために使用する適切な薬剤および量を認識するであろう。

【0141】

本発明の材料の治療上有効な量は、疾病、疾患および/または状態の診断の前に、それと同時に、および/またはその後生体に供給してもよい。いくつかの実施形態において、本発明の材料の治療上有効な量は、疾病、疾患および/または状態の発症の前に、それと同時に、および/またはその後患者および/または生体に供給される。

40

【0142】

「治療上有効な量」という用語は、本明細書で使用される場合、疾病、疾患および/または状態の1種またはそれ以上である兆しまたは特徴を治療する、軽減する、改善する、緩和する、発症を遅らせる、進行を抑制する、重症度を低下させる、および/または発生率を低下させるために十分な本発明の材料の量を指す。

【0143】

50

上記のとおり、本発明の材料を、再生医学用途のために使用することができる。いくつかの実施形態において、再生医学は、組織および/または器官機能を置換、修復および/または再生させるか、あるいは移植用の人工組織および器官を作製することを目的とする。一般には、再生医学で使用される骨格（例えば、ヒドロゲル骨格）は、天然ECMを模倣し、そして細胞接着、移動および増殖のための担体を提供する。理想的には、それらは、分化機能、新規組織生成およびその三次元組織を可能にする。弾性骨格の所望の特徴には、機械的強度および分解性などの物理的パラメーターが含まれ、一方、生物学的特性には、生体適合性、および生物学的に関連する微環境を提供する能力が含まれる。生物分解可能な材料は、組織が成長した後、得られた構造が生物学的成分から、完全に、またはほとんど完全に製造されるため、有利である。

10

【0144】

いくつかの実施形態において、薬物送達のために利用される材料は、向上した残留時間、持続する薬物送達および/または目標とした薬物送達を得られる様式で変更することができる。透過性（例えば、持続性放出用途）、環境応答性（例えば、パルス放出用途）、表面官能性（例えば、ステルス放出のためのPEGコーティング）、生物分解性（例えば、生体再吸収性用途）、および表面生体認識部位（例えば、目標とされた放出および生体接着用途）などの材料特性は、制御された薬物送達用途のために変更および/または最適化することができる。例えば、トロポエラスチン鎖長、トロポエラスチン組成および/またはトロポエラスチン濃度を制御することによって、材料の密度を制御することが可能である。密度の制御は、とりわけ、得られた材料の持続性放出特性に対する制御を提供する。

20

【0145】

いくつかの実施形態において、生物学的分析物に感応する薬物送達システムを作製するために、酵素を材料内でカプセル化することができる。

【0146】

本明細書に記載される弾性材料は、1種またはそれ以上の添加剤を追加的に含むことができる。添加剤は、分解性（生物分解可能な）ポリマー、マンニトール、デンプン糖、イノシトール、ソルビトール、グルコース、ラクトース、蔗糖、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、アミノ酸、塩化マグネシウム、クエン酸、酢酸、ヒドロキシシルブタン二酸、リン酸、グルクロン酸、グルコン酸、ポリ-ソルビトール、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸アルミニウム、ステアリン酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、デンプン、微粒子、ナノ粒子、アプロチニン、因子XIIIまたはそれらの混合物であることができる。理論に拘束されることを望まないが、材料中の1種またはそれ以上の添加剤は、材料の分解の速度を変更（例えば、低下または増加）させることができる。

30

【0147】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される材料を、試験管内の組織培養用途のために利用することができる。特定の実施形態において、記載される材料を利用して、薬剤の発見および生物学的研究のために有用なアッセイを開発することができる（例えば、高スループット薬剤スクリーニングのための明確な材料のアセンブリアレイ）。例えば、機能細胞（例えば、肝細胞）の存在下でフィーダー細胞（例えば、内皮細胞または線維芽細胞）の存在を使用して、機能細胞型の維持を増加させることができる。したがって、機能的器官の本来の構造を模倣する三次元構造を発生させることが可能であり、これは、薬剤発見および/または診断アッセイのためにその後使用することができる。

40

【0148】

当業者は、弾性材料に組み込まれる細胞が弾性材料を形成するために必要とされる条件で安定ではない場合、弾性材料が形成された後に細胞が添加されるべきであることを理解するであろう。例えば、細胞は、弾性材料からヒドロゲルを形成するために使用される水溶液に存在してもよい。

50

【0149】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される材料は、（例えば、肝細胞がカプセル化された材料を利用して）試験物質の毒性を試験することができる毒性アッセイに利用することができる。

【0150】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される材料を使用して、マイクロ流体チャネルなどの様々な構造をコーティングすることができる。この方法では、マイクロチャネルの壁は、ポリスチレン、ガラスおよびPDMSなどのより一般的に用いられる材料からの代わりに構造物アセンブリから製造することができる。構造物アセンブリから製造されるマイクロ流体チャネルは、例えば、マイクロ流体チャネルの壁が細胞を誘引し、結合

10

【0151】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される材料は、診断用途のために使用することができる。一例として、1種またはそれ以上の特定の微生物の存在を試験するアッセイにおいて使用することができる組織様材料および/または材料アセンブリを生じるために、細胞を積載した（cell-laden）材料を使用することができる。例えば、微生物（例えば、バクテリア、ウイルス、菌類など）が特定の組織に特異的に結合することが知られている場合、試料中の微生物の存在を試験する組織様材料を製造することができる。

【0152】

本明細書に記載される材料は、パターン化されてもよい（例えば、マイクロパターン化された弾性材料）。マイクロパターン化された弾性材料は、例えば、トロポエラスチン溶液を、例えば、その少なくとも一表面上で、弾性材料の少なくとも一表面上に配置され、かつそれに必要不可欠である予め定められたマイクロパターンの三次元ネガ構造を含む型の表面と接触させるステップと、型のマイクロパターン化された表面と接触させながら、溶液を加熱し、それによって、マイクロパターン化された弾性材料を提供するステップとを含む方法を使用して調製することができる。このように調製される弾性材料は、材料の少なくとも一表面で予め定められ、かつ設計された、細胞整列、組織修復、成長または再生を促進するために有効であるか、あるいはタンパク質または治療剤の供給を提供するために有効であるマイクロパターンを含む。マイクロパターンの形状は、適切なパターンまたは径の型を使用して制御することができる。さらに、マイクロパターンは、電界放射走査電子および原子力顕微鏡などの既知の技術によって、表面モルフォロジーに関する特徴を決定することができる。

20

30

【0153】

いくつかの実施形態において、マイクロパターンは、溝またはチャネルの形態である。溝の径（幅）は、約500nm～約500 μ mの範囲であることができる。いくつかの実施形態において、溝の径は、約1 μ m～約250 μ m、約10 μ m～約100 μ m、または約20 μ m～約75 μ mの範囲であることができる。いくつかの実施形態において、溝の径は、約50 μ mまたは約20 μ mである。

【0154】

溝の間隔も、所望の使用のために最適化することができる。例えば、溝の間隔は、約500nm～約500 μ mの範囲であることができる。いくつかの実施形態において、溝の間隔は、約1 μ m～約250 μ m、約10 μ m～約100 μ m、または約20 μ m～約75 μ mの範囲であることができる。いくつかの実施形態において、溝の間隔は、約50 μ mまたは約20 μ mである。

40

【0155】

溝の厚さは、約250nm～約500 μ mの範囲であることができる。いくつかの実施形態において、溝の厚さは、約500nm～約250 μ m、または約750nm～約1000nmの範囲であることができる。

【0156】

50

上記のとおり、本明細書に記載される弾性材料は、再生医学および組織修復において使用することができる。本明細書で使用される場合、「修復」という用語は、健全化、再生、治癒、パッチングまたは機能を回復させる同様のものためのいずれの補修、強化、調整、治療、構成も指す。したがって、「修復」という用語は、健全化、再生、治癒、パッチングまたは機能を回復させる同様のものための補修、強化、調整、治療、構成も意味する。

【0157】

本発明の弾性材料から形成されるヒドロゲルも同様に再生医学および組織修復において使用することができることを当業者は理解するであろう。したがって、本発明の弾性材料がこれらの文脈に記載される場合、弾性材料自体に加えて、またはその代わりに、材料から形成される適切なヒドロゲルを利用することができることは理解されるであろう。ヒドロゲルは、単に弾性材料と生理的条件との接触によって、周囲環境から弾性材料が吸水することによって、弾性材料から形成することができる。

10

【0158】

「治療」、「予防」または「改善」とは、発症を遅らせるか、または予防すること、疾病もしくは疾患に関連した状態の進行、悪化、または重症度の進行を後退させること、軽減させること、改善させること、抑制させること、減速させること、または停止させることを意味する。

【0159】

本発明の弾性材料は、治療のために有効ないずれかの投与量およびいずれかの投与ルートを使用して投与されてもよい。必要とされる正確な量は、種、年齢および被験者の一般的な状態、感染症の重症度、特定のヒドロゲル、その投与方法、その活性モードなど次第で、被験者によって異なるであろう。

20

【0160】

別の実施形態において、本明細書に記載される弾性材料は、限定されないが、頭蓋顔面、歯牙、歯周療法学用途を含む整骨治療学用途のために、再生医療で使用される。一実施形態において、弾性材料（または弾性材料から形成されるヒドロゲル）を含む構造物またはデバイスは、口部および頭蓋顔面組織の再構成および再生のために提供される。

【0161】

特定の実施形態において、弾性材料（または弾性材料から形成されるヒドロゲル）は、1種またはそれ以上のトロポエラスチンモノマーおよびヒトコラーゲンを含む。得られた材料およびヒドロゲルは、所望の表面トポグラフィ、間隙率、強度および弾性のために設計される。いくつかの実施形態において、弾性材料またはヒドロゲルは、トロポエラスチン以外のタンパク質またはポリペプチドを含有しない。

30

【0162】

一実施形態において、弾性材料はシートの形態でキャストされ、そして様々な臨床用途、例えば、誘導組織再生（GTR）または根面被覆において再生膜として使用することができる。一実施形態において、弾性材料はシートとしてキャストされ、そして歯周靭帯細胞（PDL）で接種され、根面被覆のために適切である移植片またはグラフトを形成する。移植片が形成されたならば、外科医は、当業者に既知の方法を使用して根面被覆において移植片を差し込む。

40

【0163】

別の実施形態において、弾性材料は、骨充填材料としての使用のために三次元形状でキャストされる。実質的に、予熱された溶液が形成可能な形態であるため、いずれの形状も達成することができる。型または所望の領域に配置されたら、溶液を加熱によって「硬化」することができる。加えて、材料は、誘導骨再生（GBR）に関して歯周医療において独特の臨床用途を支持することができる、そして骨充填剤および膜が骨グラフトを含有する必要を排除することができる。

【0164】

特定の実施形態において、弾性材料（または材料から形成されるヒドロゲル）、あるいは

50

は弾性材料または材料から形成されるヒドロゲルを含んでなる移植片は、所望の形状に成形され、そして1種またはそれ以上の細胞集団を含む。

【0165】

一般に、本発明に従って使用される細胞は、いずれの種類 of 細胞でもある。本発明の弾性材料（または弾性材料から形成されるヒドロゲル）に組み込まれる時に、細胞は生存可能でなければならない。いくつかの実施形態において、適切な細胞には、限定されないが、哺乳類細胞（例えば、ヒト細胞、霊長類細胞、哺乳類細胞、齧歯類細胞など）、鳥類細胞、魚類細胞、昆虫類細胞、植物細胞、菌類細胞、細菌類細胞および混成細胞が含まれる。いくつかの実施形態において、典型的な細胞は、幹細胞、全能細胞、多能性細胞およびES細胞を含む。いくつかの実施形態において、典型的な細胞は、限定されないが、い

10

【0166】

典型的な哺乳類細胞には、限定されないが、ヒト臍静脈内皮細胞（HUV EC）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒーラー細胞、メイディン-ダービー腎臓（MDCK）細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK細胞）、NS0細胞、Mcf-7細胞

20

【0167】

特定の実施形態において、1種またはそれ以上の細胞集団は、組織または骨再生を促進するために、骨髄幹細胞、間充織幹細胞または前骨芽細胞を含む。追加的に、材料/ヒドロゲル/移植片の骨形成可能性を単独の療法として、あるいは現在利用可能な商業的な骨充填剤生成物または主な自家骨収穫と組み合わせて使用することができる。いずれの種類

30

【0168】

いくつかの実施形態において、細胞が弾性材料（またはそれから形成されるヒドロゲル）に含まれる条件は、細胞生存可能性を最大にするために変更される。いくつかの実施形態において、周囲環境の条件（例えば、pH、イオン強度、養分有効性、温度、酸素有効性、浸透性など）は、細胞生存可能性を最大にするために調節および/または変更される必要があり得る。

【0169】

細胞生存可能性は、細胞生存可能性の多くの指標の1つを監視することによって測定することができる。いくつかの実施形態において、細胞生存可能性の指標には、限定されないが、細胞内エステラーゼ活性、原形質膜完全性、代謝活性、遺伝子発現およびタンパク質発現が含まれる。一例として、細胞が蛍光性エステラーゼ基質（例えば、カルセインAM）に曝露された時、生存細胞は、エステラーゼ基質を緑色蛍光生成物へと加水分解する細胞内エステラーゼ活性の結果として、緑色の蛍光を発する。他の例としては、細胞が蛍光性核酸ステイン（例えば、エチジウムホモ二量体-1）に曝露された時、死滅細胞は、それらの原形質膜が悪化して、したがって、高親和性核酸ステインに透過性であるため、赤色蛍光を発する。

40

【0170】

一般には、材料（またはそれから形成されるヒドロゲル）の細胞のパーセントは、本発

50

明による弾性材料および/またはヒドロゲルの形成を可能にするパーセントである。いくつかの実施形態において、適切である細胞のパーセントは、約0.1% w/w ~ 約80% w/w、約1.0% w/w ~ 約50% w/w、約1.0% w/w ~ 約40% w/w、約1.0% w/w ~ 約30% w/w、約1.0% w/w ~ 約20% w/w、約1.0% w/w ~ 約10% w/w、約5.0% w/w ~ 約20% w/w、または約5.0% w/w ~ 約10% w/wの範囲である。いくつかの実施形態において、本発明による弾性材料を形成するために適切である溶液中の細胞のパーセントは、約5% w/wである。いくつかの実施形態において、本発明によるヒドロゲルを形成するために適切である水溶液中の細胞の濃度は、約 1×10^5 細胞/mL ~ 1×10^8 細胞/mLまたは約 1×10^6 細胞/mL ~ 1×10^7 細胞/mLの範囲である。いくつかの実施形態において、それから形成される単一弾性材料またはヒドロゲルは、同一の細胞および/または細胞集団を含む。いくつかの実施形態において、それから形成される単一弾性材料またはヒドロゲルは、同一ではない細胞および/または細胞集団を含む。いくつかの実施形態において、それから形成される単一弾性材料またはヒドロゲルは、少なくとも2種の異なる種類の細胞を含んでもよい。いくつかの実施形態において、それから形成される単一弾性材料またはヒドロゲルは、3、4、5、10またはより多くの種類の細胞を含んでもよい。

10

【0171】

1種またはそれ以上の細胞型または細胞系の増殖を支持することが可能である複合培地および/または無血清培養基を含む様々な細胞培養基のいずれも、細胞を増殖および/または維持するために使用されてもよい。典型的に、細胞培養基は、緩衝剤、塩、エネルギー源、アミノ酸（例えば、天然アミノ酸、非天然アミノ酸など）、ビタミンおよび/または微量元素を含有する。細胞培養基は、任意に、限定されないが、炭素源（例えば、天然糖、非天然糖など）、共同因子、脂質、糖、ヌクレオシド、動物誘導成分、加水分解物、ホルモン、成長因子、界面活性剤、指示薬、ミネラル、特定の酵素の活性剤、特定の酵素の活性剤抑制剤、酵素、有機物および/または小分子代謝物質を含む様々な他の成分を含有してもよい。本発明による使用のために適切な細胞培養培地は、様々な供給源、例えばATCC (Manassas, Va.) から商業的に入手可能である。特定の実施形態において、細胞増殖のために以下の培地の1種またはそれ以上が使用される：RPMI-1640培地、ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、イーグル最小必須培地 (Minimum Essential Medium Eagle)、F-12K培地、イスコブ変法ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)。

20

30

【0172】

上記のとおり、本発明の1つの有意な利点は、それ自身がユニークな特性を有する、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の個々のトロポエラスチンイソ型を組み合わせることによって生じる、ユニークな特性、例えば、引張強さ、弾性および可撓性/剛性を有する材料（および相当するヒドロゲル）の開発である。そのようなユニークな材料（および相当するヒドロゲル）を、それらのユニークな特性が最も有利である体内の位置での使用に合うように調整することができる。例えば、最も強い繊維は、筋肉修復に使用することができ、最も弾性の繊維は、膀胱および他の弾力的な器官（例えば、血管および心臓組織）を構成するために使用することができ、そして最も固い繊維は、軟骨修復において使用することができる。

40

【0173】

また本発明は、生物学的組織の修復および/または回復方法であって、それを必要とする被験者への本発明の弾性材料の治療上有効な量の投与を含んでなる方法に関する。

【0174】

また本発明は、生物学的組織の修復および/または回復のための、本発明の弾性材料の治療上有効な量の使用にも関する。

【0175】

一実施形態において、本発明は、生物学的組織の修復および/または回復方法における

50

使用時に、本発明の弾性材料を提供する。

【0176】

また本発明は、生物学的組織の修復および/または回復のための、本発明の弾性材料の治療上有効な量の使用にも関する。また本発明は、生物学的組織の修復および/または回復のための薬剤の製造のためのこの材料の使用を含む。

【0177】

上記のとおり、これらの実施形態において、弾性材料の代替として、本発明の弾性材料から形成されるヒドロゲルを使用することができるが、ただし、これは次いで、ヒドロゲルを形成するために適切に処理される(例えば、水への曝露によって)ことを条件とすることは認識されるであろう。

10

【0178】

また本発明は、生物学的組織の修復および/または回復方法であって、

- 組織損傷を有する被験者を識別するステップと、
- 本発明の弾性材料の治療上有効な量を被験者に投与するステップ、または
- 本発明の弾性材料から形成されるヒドロゲルの治療上有効な量を被験者に投与するステップ、または
- ヒドロゲルの治療上有効な量を形成するための本発明の弾性材料の量を被験者に投与し、続いて、本発明の弾性材料を処理して、ヒドロゲルを形成するステップと

を含んでなる方法に関する。

20

【0179】

また本発明は、

- 本発明の弾性材料の治療上有効な量、
- 本発明の弾性材料から形成されるヒドロゲルの治療上有効な量、あるいは
- ヒドロゲルの治療上有効な量を形成して、続いて、弾性材料を処理してヒドロゲルを形成するための本発明の弾性材料の量

を、それを必要とする被験者に投与するステップを含んでなる、生物学的組織の修復および/または修復を促進する方法に関する。

【0180】

本発明の弾性材料、およびそれから形成されるヒドロゲルは、典型的に、投与の容易さおよび投与量の均一性のために剤形単位で調製される。しかしながら、本発明の材料および/またはヒドロゲルの1日の使用量は、正常な医療用の見解の範囲内で主治医によって決定されることは理解されるであろう。

30

【0181】

いずれの特定の被験者または生体のための具体的な治療上有効な投与量レベルは、治療される疾患および疾患の重症度; 利用される特定の活性成分の活性; 利用される特定のポリマーおよび/または細胞; 被験者の年齢、体重、健康状態、性別および食習慣; 利用される特定の活性成分の投与の時間、投与のルート、および排出速度; 治療の時間; 利用される特定の活性成分と組み合わせ、または一致して使用される薬剤; ならびに医術において周知の同様の要因を含む様々な要因次第であろう。

【0182】

本発明の材料(およびそれから形成されるヒドロゲル)は、いずれのルートによっても投与されてよい。いくつかの実施形態において、本発明の材料は、影響を受けた部位への直接投与を含む、様々なルートによって投与される。例えば、材料(および/またはそれから形成されるヒドロゲル)は、組織再生が必要である部位付近で局所的に投与されてもよい。

40

【0183】

特定の実施形態において、本発明(および/またはそれから形成されるヒドロゲル)の弾性材料は、所望の治療効果を得るために、送達される含まれる細胞および/または治療剤が、被験者の体重に対して1日あたり約0.001mg/kg~約100mg/kg、約0.01mg/kg~約50mg/kg、約0.1mg/kg~約40mg/kg、約

50

0.5 mg/kg ~ 約30 mg/kg、約0.01 mg/kg ~ 約10 mg/kg、約0.1 mg/kg ~ 約10 mg/kg または約1 mg/kg ~ 約25 mg/kg の範囲の濃度で放出されるように、1日に1回またはそれ以上の回数で投与されてもよい。所望の投与量は、例えば、1日に3回、1日に2回、1日に1回、2日ごと、3日ごと、1週ごと、2週ごと、3週ごと、または4週ごとに送達されてもよい。特定の実施形態において、所望の投与量は、複数の投与（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 またはそれ以上の投与）を使用して送達されてもよい。

【0184】

いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の弾性材料（および/またはそれから形成されるヒドロゲル）を含んでなる「治療カクテル」を包含する。いくつかの実施形態において、材料は単細胞型、および任意に治療剤を含む。いくつかの実施形態において、材料は、複数の異なる細胞型、および任意に治療剤を含む。

10

【0185】

本発明による細胞を積載した弾性材料（およびそれから形成されるヒドロゲル）を併用療法において利用することができることは認識されるであろう。併用療法で利用される治療（治療学または手順）の特定の組み合わせは、所望の治療学および/または手順の適合性、ならびに達成される所望の治療効果を考慮する。利用される治療が、同一目的のために所望の効果を達成し得ること（例えば、組織成長を促進するために使用される特定の細胞型を含んでなるヒドロゲルは、同一組織の成長を刺激するために使用される別の治療薬剤と同時に投与されてもよい）、またはそれらが、異なる効果（例えば、炎症、感染症などのいずれかの悪影響の制御）を達成し得ることは認識されるであろう。

20

【0186】

本発明は、本発明の材料の1種またはそれ以上を含んでなる様々なキットを提供する。例えば、本発明は、弾性材料および使用に関する指示を含んでなるキットを提供する。キットは、複数の異なる弾性材料を含んでもよい。キットは、任意に、トロポエラスチンモノマー、トロポエラスチンモノマーの濃縮溶液、会合したトロポエラスチンモノマー、生物学的に活性化化合物などを含んでもよい。キットは、いずれかの組み合わせで、多数のいずれかの追加的な成分または試薬を含んでもよい。様々な組み合わせの全てを明らかにしないが、各組み合わせは本発明の範囲に含まれる。本発明に従って提供されるいくつかの典型的なキットは、以下の段落で記載される。

30

【0187】

本発明の特定の実施形態によると、キットは、例えば、(i) トロポエラスチンモノマーの溶液、(ii) 型、および(iii) 弾性材料を加熱し、そして溶液から形成するための指示を含んでもよい。

【0188】

またキットは、例えば、(i) トロポエラスチンモノマーの濃縮物、(ii) 型、および(iii) 濃縮物から弾性材料を形成するための指示を含んでもよい。

【0189】

キットは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針およびシリンジを含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

40

【0190】

キットは、典型的に本発明の材料の使用のための指示を含む。指示は、例えば、プロトコルを含んでよく、かつ/または弾性材料の製造、それを必要とする被験者への材料の投与、材料組み立ての製造などの条件を説明してもよい。キットは、一般に、個々の成分および試薬のいくつかまたは全てが別々に収納され得るように、1種またはそれ以上の容器または容器を含む。キットは、販売のために比較的近接して拘束して個々の容器を封入するための手段、例えば、その中に指示、スタイロフォームなどの包装材料などが封入されてもよいプラスチックボックスを含んでもよい。

【0191】

キットまたは「製造物品」は、容器と、容器上または容器に関連したラベルまたはパッ

50

ケージ挿入物を含んでもよい。適切な容器には、例えば、ボトル、ガラス瓶、プリスターパックなどが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成されてもよい。ラベルまたはパッケージ挿入物は、構造物または組成物が選択の状態を治療するために使用されることを示す。一実施形態において、ラベルまたはパッケージ挿入物は、使用のために指示を含み、治療組成物を使用して組織修復および再生をすることができることを示す。

【実施例】

【0192】

実施例1 - トロポエラスチンのための溶媒としての水の使用

100 mgのトロポエラスチンを4 で333 μ lの水中に溶解した。ガラススライド上へトロポエラスチン溶液の液滴を配置するために、1 mlの31ゲージシリンジを使用した。1分間160 で配置した。トロポエラスチンのさらなる液滴を添加し、さらなる液滴を添加する前に1分間そのままにした。約10回繰り返した。160 で4時間そのままにした。材料は、ガラス質で暗褐色となった(A)。PBS中に配置し、ゆっくり湿潤させたが、溶解せず、完全に弾性になった(B)。

10

【0193】

実施例2 - トロポエラスチンのための溶媒としてのHFPの使用

100 mgのトロポエラスチンを一晩、室温で500 μ lの1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ2-プロパノール(HFP)中に溶解した。70 に設定された加熱ブロックの上部でガラススライド上へトロポエラスチン溶液の液滴を配置するために、1 mlの31ゲージシリンジを使用した。4時間160 で配置した。材料はオープン中で発砲するように見え、ガラス質で茶色となった(A)。PBS中に配置し、ゆっくり湿潤させ、軟質で弾性となり、材料内に捕捉された気泡を有するようになった(B)。

20

【0194】

実施例3 - トロポエラスチンのための溶媒としての70% EtOHの使用

100 mgのトロポエラスチン650 μ lのEtOH(154 mg/mL)中に溶解した。85 に設定された加熱ブロックの上部に配置されたガラススライド上へトロポエラスチン溶液の液滴を配置するために、1 mlの31ゲージシリンジを使用した。各液滴間で約1分間待つことによって、液滴の3D構造を構築することができた。4時間160 で配置した。材料はオープン中で発砲するように見え、ガラス質で暗褐色となった。

30

【0195】

実施例4 - 無生対象のコーティング

HFP中20% w/vのトロポエラスチンを使用して、溶液に繰り返し浸漬することにより、Tygon管の断片をコーティングした。コーティングされた管を4時間160 で配置した。トロポエラスチン溶液は、硬質でガラス様となり、そし管から除去することができなかった。PBSで湿潤した。材料は軟質で弾性となり、管から剥離することができ、溶解しなかった。

【0196】

実施例5 - 電気紡糸

HFP中20% (w/v)のトロポエラスチンを、1 mL/時間、シリンジチップからコレクターへ約17 cm、20 kV(+)/接地、0.1 ml溶液、コレクターに整列配置されたワイヤーが2 cm間隔で長さ4 cmで電気紡糸した。24時間160 で配置した。PBSで湿潤し、溶解せず、ゲル様となり、形状は維持された。SEMによって検査した。

40

【0197】

実施例6 - 熱処理電気紡糸トロポエラスチンにおける試験管内での真皮ヒト線維芽細胞増殖。

HFP中20% (w/v)のトロポエラスチンを上記のとおり電気紡糸した。ヒト新生児真皮線維芽細胞(NHF8909、5 x 10⁵細胞/ウェル)を、熱処理された電気紡糸整列配置された繊維上へ接種し、それを、6個のウェルプレート内のプラスチックカバ

50

ースリップに固定した。5%CO₂中、37℃でのDMEM+10%FB+Pen/Strep中で48時間培養した後、試料をSEM分析用に調製した。試料を、0.1Mカコジル酸ナトリウム/0.1Mのクローズ中2%グルタルアルデヒドで固定し、1%オスミウムでその後固定し、付けられたエタノールおよびコーティングされた金の濃度を増加させる際に脱水した。熱処理電気紡糸トロポエラスチンは、細胞接着、拡散および増殖を支持した。

【0198】

実施例7 - マウスにおける熱処理電気紡糸トロポエラスチンの皮下挿入。

HFP中20%のトロポエラスチンを使用して、非整列配置電気紡糸トロポエラスチン構造物を調製した。試料を、17cmの距離、1mL/時間の速度で、円形コレクター上へ20kVで紡糸した(非整列配置)。22時間160℃で配置した。

10

【0199】

各マウスに、1つの熱処理された非整列配置電気紡糸トロポエラスチン構造物、および1つのIntegra対照を移植した。1週、3週および6週の各時点の2匹のマウスであった。皮下挿入は、各マウスの背面に作成され、皮下に小袋を作製するために切開された2カ所の10mmの切開によって実行した。電気紡糸骨格またはIntegra骨格(Integra Life Sciences Corporation)は、外側のシリコーン層を用いず、各小袋に挿入された。創傷を6-0の絹縫合で次いで閉鎖し、そしてIV3000創傷包帯(Smith & Nephew)を使用して、5日間被覆した。無痛覚のため、カルプロフェン(5mg/kg)を麻酔時、次いで、手術翌日に投与した。手術後、各マウスを最初の2日間個々のケージに入れ、次いで、その後、水および食糧の自由な摂取のためにケージにつき2匹のマウスを入れた。皮膚生検は、皮下挿入の1、3および6週後に組織学的分析のために収集した。外植された骨格および周囲の皮膚を、Verhoeff-Van Gieson(VVG)で染色し、移植片の弾性性質を実証した。

20

【0200】

熱処理電気紡糸トロポエラスチンは、皮下挿入後、最低6週間はマウスで持続した。

【0201】

実施例8 - 熱処理された水をベースとするトロポエラスチン膜

100mgのトロポエラスチンを4℃で1mlの水中に溶解した。8-ウェルガラスチャンバースライドのウェル中へ溶液をピペットで移した。溶液を濃縮し、16時間37℃に配置することによって乾燥した。試料を4時間160℃でさらに加熱した。37℃での加熱後、骨格は半透明で薄茶色である。160℃での加熱に続いて、試料はなお半透明であるが、より暗色である。

30

【0202】

実施例9 - マイクロパターン化された、熱処理された水をベースとするトロポエラスチン膜

70mgのトロポエラスチンを4℃で1mlの水中に溶解した。幅3.5μmおよび深さ500nmの棟を含有するPDMS(ポリジメチルシロキサン)の型上に溶液をピペットで添加した。16時間37℃で配置することによって、溶液を濃縮し、乾燥させた。試料を4時間160℃までさらに加熱した。像は、20倍および40倍の対物レンズを有する光学顕微鏡を使用して得られた。

40

【0203】

参考文献

al-Obeidi, F. et al. Peptide and peptidomimetic libraries: molecular diversity and drug design. *Mol Biotechnol* 9(3), 205-223 (1998).

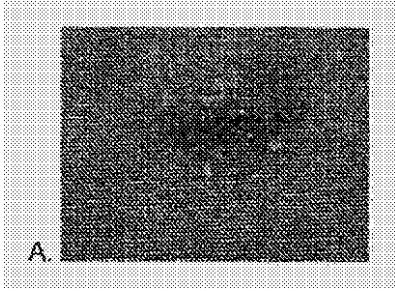
Altschul, S.F. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3), 403-410 (1

50

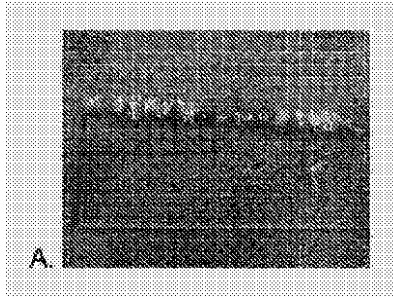
- 990).
- Altschul, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17), 3389-3402 (1997).
- Anderson, et al. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 22, 863-866 (2004).
- Anderson, et al. Biomaterial microarrays: rapid, microscale screening of polymer-cell interaction. *Biomaterials* 26, 4892-4897 (2005). 10
- Coulson J.M. et al., *Chemical Engineering*, 1978, volume 2, 3rd Edition, Pergamon Press, 126.
- Dijke et al. Growth factors for wound healing. *Bio/Technology* 7, 793-798 (1989).
- Falsey, et al. Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjugate Chemistry* 12, 346-353 (2001). 20
- Gennaro, A.R., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st ed. (2006), Lippincott Williams & Wilkins.
- Gilman et al. (eds) *Organic Syntheses Collective Volumes*, John Wiley & Sons, Inc., NY.
- Harrison, T.R. et al. (eds) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13th Edition, McGraw-Hill N.Y., NY. 30
- Higgins, D.G. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22), 4673-4680 (1994).
- Hruby, V.J. et al. Synthesis of oligopeptide and peptidomimetic libraries. *Curr Opin Chem Biol* 1(1), 114-119 (1997). 40
- Karlin, S. & Altschul, S.F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(6), 2264-2268 (1990).
- Karlin, S. & Altschul, S.F. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(12), 5873-5877 (1993).
- Miyamoto, K. et al. Creation of cross-linked 50

- d electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker. *Int J Biol Macromolecules* 45, 33-41 (2009).
- Li, M. et al. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* 26(30), 5999-6008 (2005).
- Li, M. et al. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 27(13), 2705-2715 (2006). 10
- Liu, et al. Nanostructured materials designed for cell binding and transduction. *Biomacromolecules* 2(2), 362-368 (2001).
- Mulder GD, Haberer PA, Jeter KF (eds). *Clinicians' Pocket Guide to Chronic Wound Repair*. 4th ed. Springhouse, PA: Springhouse Corporation; 1998:85.
- Orner, et al. Arrays for the combinatorial exploration of cell adhesion. *Journal of the American Chemical Society* 126, 10808-10809 (2004). 20
- Ostergaard, S. & Holm, A. Peptomers: a versatile approach for the preparation of diverse combinatorial peptidomimetic bead libraries. *Mol Divers* 3(1), 17-27 (1997).
- Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Edition, Goodman and Gilman, 1990.
- Physicians Desk Reference*, 50th Edition, 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co. 30
- Tauriari, G. et al. Polymer microarrays for cellular adhesion. *Chem Comm* 2118-2120 (2006).
- United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XII NF XVII*, 1990.
- Ziegler T.R., Pierce, G.F., and Herndon, D.N., 1997, *International Symposium on Growth Factors and Wound Healing: Basic Science & Potential Clinical Applications* (Boston, 1995, Serono Symposia USA), Publisher: Springer Verlag. 40

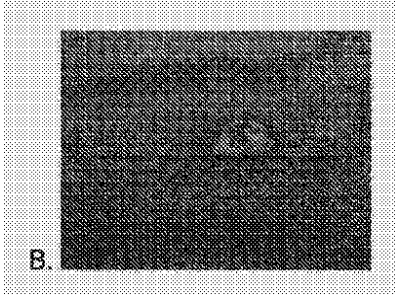
【図 1 A】



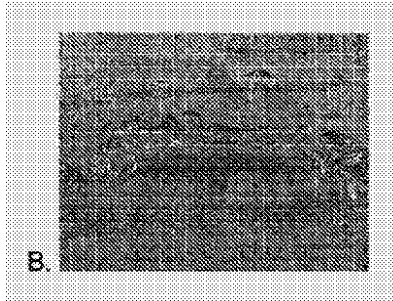
【図 2 A】



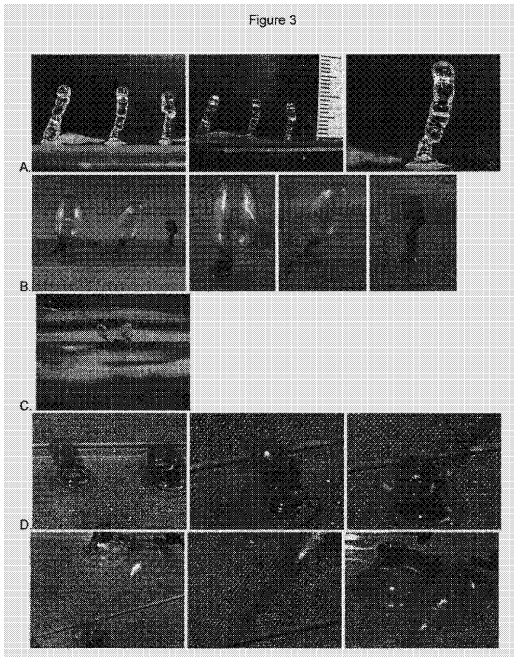
【図 1 B】



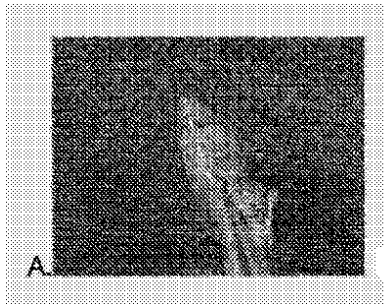
【図 2 B】



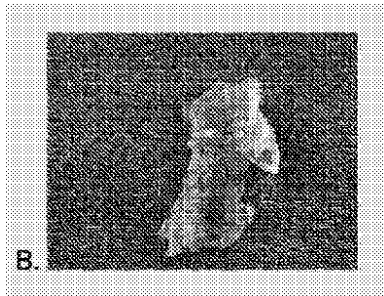
【図 3】



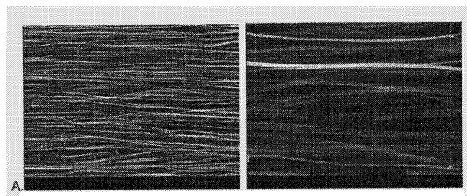
【図 4 A】



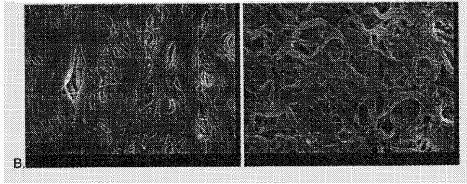
【図 4 B】



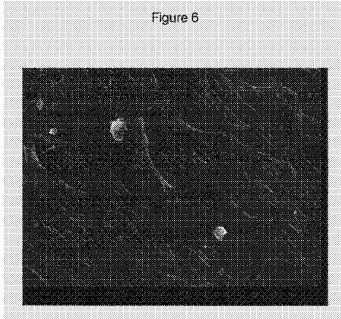
【図 5 A】



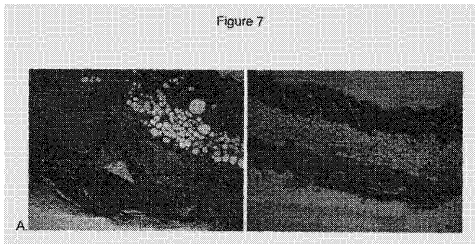
【 図 5 B 】



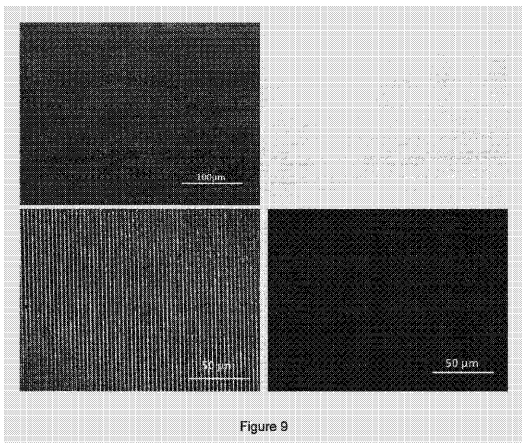
【 図 6 】



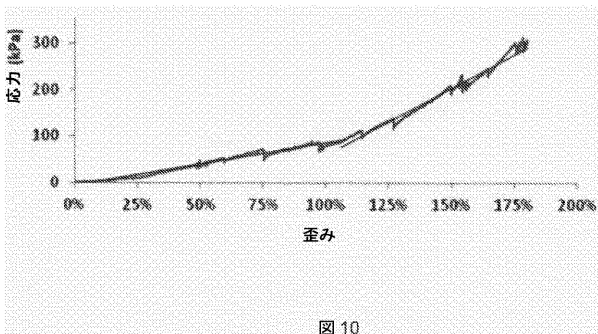
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 10 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 L 27/36 3 2 0
A 6 1 L 27/60
A 6 1 L 27/54
A 6 1 L 27/52

(72)発明者 アンソニー・スティーブン・ワイズ
オーストラリア2006ニュー・サウス・ウェールズ州ザ・ユニバーシティ・オブ・シドニー、エ
スアイティ・ビルディング(ジェイ12)、レベル5、ザ・ユニバーシティ・オブ・シドニー内

(72)発明者 スザンヌ・マリー・ミチュー
オーストラリア2006ニュー・サウス・ウェールズ州ザ・ユニバーシティ・オブ・シドニー、エ
スアイティ・ビルディング(ジェイ12)、レベル5、ザ・ユニバーシティ・オブ・シドニー内

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 国際公開第2008/058323(WO, A1)
特開2008-291258(JP, A)
国際公開第2008/037028(WO, A1)
特表2009-512508(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 L 2 7 / 0 0 - 2 7 / 6 0