(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7445273号
(P7445273)

(45)発行日　令和6年3月7日(2024.3.7)

(24)登録日　令和6年2月28日(2024.2.28)

(51)国際特許分類

A61L 31/06 (2006.01)		A61L	31/06
A61F 2/00 (2006.01)		A61F	2/00
A61L 27/16 (2006.01)		A61L	27/16
A61L 27/18 (2006.01)		A61L	27/18
A61L 27/20 (2006.01)		A61L	27/20

FI

請求項の数　25　（全74頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-528199(P2018-528199)
(86)(22)出願日　平成28年8月17日(2016.8.17)
(65)公表番号　特表2018-529489(P2018-529489A)
(43)公表日　平成30年10月11日(2018.10.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/047282
(87)国際公開番号　WO2017/031167
(87)国際公開日　平成29年2月23日(2017.2.23)
審査請求日　令和1年8月15日(2019.8.15)
審判番号　不服2022-2436(P2022-2436/J1)
審判請求日　令和4年2月18日(2022.2.18)
(31)優先権主張番号　62/206,011
(32)優先日　平成27年8月17日(2015.8.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　518056003
ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ
アメリカ合衆国、メリーランド州 ２１２１８、ボルチモア、ノース・チャールズ・ストリート ３４００
(74)代理人　100189131
弁理士　佐伯 拓郎
(74)代理人　100182486
弁理士　中村 正展
(74)代理人　100147289
弁理士　佐伯 裕子
(72)発明者　マーティン ラッセル
アメリカ合衆国 メリーランド州，ボルチモア，クレスモント アベニュー ２９１１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　組織修復のための繊維－ヒドロゲル複合材料の手術用メッシュ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヒドロゲル材料に共有結合している約１００ｎｍ～約８０００ｎｍの平均直径を有する高分子繊維を含む、層状足場構造複合体を含む手術用足場構造体デバイスであって、

ａ）前記高分子繊維は前記ヒドロゲル材料中に分散しており；

ｂ）前記足場構造複合体は反応した架橋部位を含み；

ｃ）前記足場構造複合体の表面の上または内部に存在する複数の空孔を含み、前記空孔は１ｃｍ^{2}当たり少なくとも５０個の空孔の濃度で存在し、前記空孔の少なくとも８０％が少なくとも約５ミクロンの平均孔径を有し；

ｄ）前記デバイスが、皮膚、筋膜、胸膜、硬膜、心膜、腱傍組織、骨膜、神経周膜、血管壁、及びリンパ管壁から選択される器官または組織の中への埋め込みに適した形状で構成され；および

ｅ）前記デバイスが、第３の寸法よりも独立に少なくとも約５倍長さが大きい第１の寸法及び第２の寸法を有するシートとして構成され；

前記ヒドロゲル材料が、反応性基を有するヒアルロン酸を含み、

前記高分子繊維が、表面に官能性基を有するポリカプロラクトンを含み、前記反応した架橋部位が、前記ヒアルロン酸が有する前記反応性基と、前記ポリカプロラクトンが有する前記官能性基とが反応した架橋部位である、

手術用足場構造体デバイス。

【請求項２】

前記層状足場構造複合体が等方的に強化されている、請求項１に記載のデバイス。
【請求項３】
前記高分子繊維が官能基を含み、高分子繊維上の前記官能基の表面密度が繊維の１０ｎｍｏｌ／ｍｇから繊維の１６０ｎｍｏｌ／ｍｇである、請求項１に記載のデバイス。
【請求項４】
前記反応した架橋部位が反応したマレイミド基を含む、請求項１に記載のデバイス。
【請求項５】
第３の寸法よりも独立に少なくとも５倍長さが大きい第１の寸法及び第２の寸法を有するシートとして構成される、請求項１に記載のデバイス。
【請求項６】
前記第３の寸法が１ｃｍ未満である、請求項５に記載のデバイス。
【請求項７】
前記第３の寸法が５ｍｍ未満である、請求項５に記載のデバイス。
【請求項８】
前記第３の寸法が１ｍｍ未満である、請求項５に記載のデバイス。
【請求項９】
前記第１の寸法及び前記第２の寸法が、独立して１ｃｍよりも大きい、請求項５に記載のデバイス。
【請求項１０】
前記第１の寸法及び前記第２の寸法が、独立して１ｃｍよりも大きい、請求項６に記載のデバイス。
【請求項１１】
これを必要とするヒト被験体の皮下に埋め込み可能に構成される、請求項１に記載のデバイス。
【請求項１２】
被験体に投与された場合に皮膚、筋膜、胸膜、硬膜、心膜、腱傍組織、骨膜、神経周膜、血管壁、リンパ管壁を含む１つ以上の組織の補強及び／または再生をもたらすため、または被験体に投与された場合に乳房インプラントまたは組織拡張器などの医療用インプラントの補強または被覆をもたらすために有効な量で請求項１に記載の前記デバイスを含む、外科的処置を行う被験体の中での使用のための医療用デバイス。
【請求項１３】
手術用デバイスであって、
ｉ）ヒドロゲル材料に共有結合している１００ｎｍ～８０００ｎｍの平均直径を有する高分子繊維を含む層状足場構造複合体であって；
前記高分子繊維は前記ヒドロゲル材料中に分散しており；
前記足場構造複合体は反応した架橋部位を含み；
前記足場構造複合体の表面の上または内部に存在する複数の空孔を含み、前記空孔は１ｃｍ^{2}当たり少なくとも５０個の空孔の濃度で存在し、前記空孔の少なくとも８０％が少なくとも約５ミクロンの平均孔径を有し；
前記ヒドロゲル材料が、反応性基を有するヒアルロン酸を含み、
前記高分子繊維が、表面に官能性基を有するポリカプロラクトンを含み、前記反応した架橋部位が、前記ヒアルロン酸が有する前記反応性基と、前記ポリカプロラクトンが有する前記官能性基とが反応した架橋部位である、
複合体；及び、
ｉｉ）手術用メッシュ材料であって；前記手術用メッシュ材料は層状足場構造複合体に動作可能に結合しており、前記手術用メッシュ材料が前記足場構造複合体の全てまたは大部分の上に配置される、手術用メッシュ材料；
を含む手術用デバイス。
【請求項１４】
前記高分子繊維が、さらに、ポリ（乳酸－ｃｏ－グルコール酸）、ポリ（乳酸）、及び

／またはポリカプロラクトン、またはこれらの組み合わせを含む合成高分子材料；あるいは絹、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸及びキトサン、またはこれらの組み合わせからなる群から選択される生体高分子材料を含む、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項１５】
前記ヒドロゲル材料が、さらに、ポリ（エチレングリコール）、コラーゲン、デキストラン、エラスチン、アルギン酸塩、ヒアルロン酸、ポリ（ビニルアルコール）、またはこれらの組み合わせであるヒドロゲル材料を含む、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項１６】
前記手術用メッシュ材料が、ポリカプロラクトン、ポリプロピレン、ポリグリコール酸、ポリテトラフルオロエチレン（ｅＰＴＦＥ）、ポリグラチン、ポリグレカプロン、セルロース、またはこれらの組み合わせの群より選択される繊維を含む、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項１７】
前記反応した架橋部位が反応したマレイミド基を含む、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項１８】
これを必要とするヒト被験体の皮下に埋め込み可能に構成される、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項１９】
第１の層状足場構造複合体と第２の層状足場構造複合体を含み、前記手術用メッシュ材料が前記第１の層状足場構造複合体と前記第２の層状足場構造複合体との間に配置される、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項２０】
第１の層状足場構造複合体と第２の層状足場構造複合体を含み、前記手術用メッシュ材料が前記第１の層状足場構造複合体と前記第２の層状足場構造複合体との間に挟まれる、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項２１】
ヒト細胞または細胞抽出物を更に含む、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項２２】
前記ヒドロゲル材料が、機能性網状構造の中の複合体の中に存在する、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項２３】
前記層状足場構造複合体が前記手術用メッシュ材料と共有結合により結合している、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項２４】
細胞、小分子、核酸、及びポリペプチドから選択される治療薬を更に含む、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【請求項２５】
前記高分子繊維がシート状に配置される、請求項１３に記載の手術用デバイス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、米国特許法第１１９条（ｅ）の定めにより、２０１５年８月１７日に出願された「Ｃｏｍｐｏｓｉｔｅ　Ｍａｔｅｒｉａｌ　ｆｏｒ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｒｅｓｔｏｒａｔｉｏｎ」というタイトルの米国仮特許出願第６２／２０６，０１１に基づく優先権を主張する国際特許出願である。本出願は、２０１５年８月１７日に出願された「Ｃｏｍｐｏｓｉｔｅ　Ｍａｔｅｒｉａｌ　ｆｏｒ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｒｅｓｔｏｒａｔｉｏｎ」というタイトルの国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ１５／４５４９４にも関連する。これらの関連出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】
本開示は、軟部組織の再生を促進しつつ軟部組織の欠損を修復する複合材料及び方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
外傷、腫瘍切除、または先天性奇形により生じる軟部組織の欠損は、従来の手段によっては治療することは困難である。組織の再配置または組織移植などの現行の治療方法は供与部位の欠損を生じさせる。人工インプラントなどの他の治療は、線維化または被膜化を生じさせる。組織の内殖を促進させるための既存の戦略も、軟部組織の欠損を治療するためには不十分である。現在の無細胞性マトリックスは、理想的な再建に必要とされる軟らかくて三次元の組織ではなく、扁平で線維質の組織のシートを生じさせる。最後に、脂肪移植は軟部組織の欠損を修復することができるものの、その幅広い用途は、変動する移植片生着率及び限定的な修復体積によって妨げられる。軟部組織再建のための理想的なアプローチは、生体内で脂肪組織または筋膜などの軟部組織の再生を働きかけた後に組織を移植して再生を促すことであろう。しかし、脂肪組織または筋膜の再増殖は、細胞が新しい組織に付着、遊走、増殖、分化、及び組織化するための適切なマトリックスを必要とする。ほとんどの天然の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）は修復部位で失われている。そのため、失われた組織体積を直ちに修復するだけでなく、微小環境を再調整し、被移植体の細胞の浸潤をサポートし、軟部組織の再生を促進する合成マトリックスの再形成が、脂肪または筋膜組織を主体とする再建を使用して軟部組織の欠損を修復する場合の必要不可欠な課題となっている。
【０００４】
ヒドロゲルは、軟部組織の再建のための材料として複数の利点を有している。しかしながら、十分な機械的特性を得るためには、より高い架橋密度が通常必要とされる。しかし、これらの条件下では、被移植体の組織細胞（例えば脂肪細胞前駆細胞及び内皮性前駆細胞）は足場構造体の中への浸透及び成長ができない。分解性ヒドロゲルの場合、被移植体組織の内殖が遅過ぎるため、あるいは少なくとも繊維性材料の吸収よりも遅いペースのため、瘢痕化または線維性組織の形成が典型的である。
【０００５】
近年、様々な細胞活動をサポートするＥＣＭ模倣体として機能する機能性ナノファイバーが開発された。ポリカプロラクトン（ＰＣＬ）またはポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）（ＰＬＧＡ）などのＦＤＡ準拠の合成生分解性ポリ－α－エステルは、電界紡糸として知られる方法によってナノファイバーを生成するために使用することができる。これらのポリマーから作製された生分解性の縫合糸及びインプラントは、これらの非常に優れた生体適合性についての実績のため、臨床的に広く使用されてきた。幹細胞工学用途のための様々な直径及びトポグラフィーの様々なナノファイバーが開発されてきた。しかし、これらのナノファイバーはマクロ構造を与えず、そのため３Ｄ足場構造体として使用することが困難である。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
このような従来の方法及びシステムに関連する様々な問題に鑑みて、当該技術分野では軟部組織の欠損を治療するための改良された解決策が依然として必要とされている。本開示は、当該技術分野で着目されている様々な問題を克服するこの要求のための解決策を提供する。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明は、少なくとも一部には、改良された特性（例えば以下で詳しく説明するような、軟部組織の再建のための改良された品質）を有する高分子繊維成分を有する足場構造複合体の特定に基づく。

【０００８】
特定の態様においては、本発明は、相互貫入構造を有する手術用メッシュシート周りに形成され、その結果一体化された網状組織を形成するナノファイバー－ヒドロゲル複合材料からなる、層状シート足場構造体を提供する。
【０００９】
別の態様においては、本発明は、界面結合が繊維とヒドロゲル網状構造との間に導入され、その結果一体化された網状構造を形成する一方で、表面が官能化された電界紡糸繊維のシートとヒドロゲルとから作製されるナノファイバー－ヒドロゲル複合材料からなる、層状シート足場構造体を提供する。
【００１０】
追加的な態様においては、本発明は、界面結合が手術用メッシュ表面とヒドロゲル網状構造との間に導入され、その結果一体化された網状構造を形成する一方で、手術用メッシュシートとヒドロゲル複合材料とからなる、層状シート足場構造体を提供する。
【００１１】
ある態様においては、本発明は、ヒドロゲル材料に共有結合した約１００ｎｍ～約８００ｎｍの平均直径を有する高分子繊維を含む足場構造複合体であって、繊維対ヒドロゲル材料の比率が成分質量基準で約１：１０～約１０：１であるか、濃度基準で約１～５０ｍｇ／ｍＬである、足場構造複合体を提供する。
【００１２】
ある実施形態においては、高分子繊維には、生体適合性の生分解性ポリエステルが含まれる。任意選択的には、高分子繊維にはポリカプロラクトンが含まれる。
【００１３】
別の実施形態においては、ヒドロゲル材料は機能性網状構造中の複合体中に存在する。
【００１４】
追加的な実施形態においては、繊維対無水ヒドロゲル材料の比率は約１：１０～約１０：１である。
【００１５】
別の実施形態においては、高分子繊維には不織高分子繊維が含まれる。
【００１６】
特定の実施形態においては、高分子繊維には電界紡糸されたポリカプロラクトン繊維が含まれる。任意選択的には、高分子繊維には、ポリ乳酸－グリコール酸共重合体、ポリ（乳酸）、及び／またはポリカプロラクトン、またはこれらの組み合わせを含む合成高分子材料が含まれる。
【００１７】
ある実施形態においては、複合体は、実質的に生体適合性であるように配合される。任意選択的には、高分子繊維には、絹、コラーゲン、キトサン、及び／またはこれらの組み合わせを含む生体高分子材料が含まれる。
【００１８】
ある実施形態においては、ヒドロゲル材料はヒアルロン酸を含む。任意選択的には、ヒドロゲル材料は、ポリ（エチレングリコール）、コラーゲン、デキストラン、エラスチン、アルギン酸塩、フィブリン、アルギン酸塩、ヒアルロン酸、ポリ（ビニルアルコール）、これらの誘導体、またはこれらの組み合わせを含むヒドロゲル材料を含む。
【００１９】
特定の実施形態においては、ヒドロゲル材料には処理された組織細胞外マトリックスが含まれる。
【００２０】
ある実施形態においては、処理された組織細胞外マトリックスは脂肪組織由来である。
【００２１】
別の実施形態においては、足場構造複合体は不織ポリカプロラクトン繊維を含む。
【００２２】

ある実施形態においては、ヒドロゲル材料は、ポリカプロラクトン繊維の外表面の少なくとも一部を実質的に被覆するヒアルロン酸を含む。

【００２３】

特定の実施形態においては、ヒドロゲル材料は高分子繊維の外表面に結合する。

【００２４】

別の実施形態においては、足場構造複合体は、高分子繊維とヒドロゲル材料との間に結合を導入するのに有効な量で存在する架橋部位を更に含む。

【００２５】

特定の実施形態においては、足場構造複合体は、足場構造複合体の表面上または中に存在する複数の空孔を含み、空孔は、表面１ｃｍ^{2}当たり少なくとも約５０個の空孔の濃度で存在し、少なくとも８０％の空孔が少なくとも約５ミクロンである表面上での平均孔径を有する。

【００２６】

追加的な実施形態においては、足場構造複合体は、ポリカプロラクトン繊維とヒアルロン酸との間に架橋を導入するのに有効な量で存在する架橋部位を更に含む。

【００２７】

任意選択的には、足場構造複合体は、ヒト被験中に存在する標的組織の中に埋め込まれた場合に組織の成長及び細胞の浸潤を促す。

【００２８】

特定の実施形態においては、足場構造複合体は、ヒトの組織の中に埋め込まれた場合に実質的に生分解性である。

【００２９】

ある実施形態においては、足場構造複合体は、ヒトの組織の中に埋め込まれた場合に実質的に非生分解性である。

【００３０】

別の実施形態においては、足場構造複合体は、細胞、小分子、核酸、及びポリペプチドから選択される治療薬を更に含む。

【００３１】

本発明の別の態様は、本発明の足場構造複合体を含む埋め込み可能な生体材料を提供する。

【００３２】

特定の実施形態においては、埋め込み可能な材料は実質的に無細胞である及び／または実質的にポリペプチドを含まない。

【００３３】

ある実施形態においては、埋め込み可能な材料は注入による投与のために配合される。

【００３４】

別の実施形態においては、埋め込み可能な材料は皮下投与のために配合される。

【００３５】

本発明の追加的な態様は、本発明の埋め込み可能な材料を含むキットを提供する。

【００３６】

本発明の更なる態様は、被験体に投与した場合に組織の形状を保持するのに有効な量で本発明の足場構造複合体及び／または埋め込み可能な材料を含む、外科的処置が行われる被験体中の組織の形状を保持するための医療デバイスを提供する。

【００３７】

本発明の別の態様は、複数の空孔を生成するように配向した高分子繊維を含む無細胞の三次元足場構造体を得る工程であって高分子繊維の少なくとも一部が他のポリカプロラクトン繊維と架橋する工程；高分子繊維の上にヒドロゲル材料を含む組成物を配置して複合体を形成する工程；及び複合体を反応または安定化させて安定化されたインプラントを形成し、それによりインプラントを作製する工程；を含む、組織または軟骨の修復のためのインプラントの作製方法を提供する。

【００３８】
任意選択的には、組織には軟部組織が含まれる。
【００３９】
本発明の更なる態様は、複数の空孔を生成するように配向した高分子繊維を含む無細胞の三次元足場構造体を得る工程；高分子繊維の上にヒドロゲル材料を含む組成物を配置して複合体を形成する工程；及び複合体を反応または安定化させて安定化されたインプラントを形成する工程であって高分子繊維の少なくとも一部がヒドロゲル材料に架橋する工程；を含む、組織または軟骨の修復のためのインプラントの作製方法を提供する。
【００４０】
特定の実施形態においては、三次元足場構造体は反応性ポリカプロラクトン繊維を含む。
【００４１】
本発明の更なる態様は、複数の空孔を生成するように配向した高分子繊維を含む無細胞の三次元足場構造体を得る工程；高分子繊維の上にヒドロゲル材料を含む組成物を配置して複合体を形成する工程；及び複合体を反応または安定化させて安定化されたインプラントを形成する工程であって高分子繊維の少なくとも一部がヒドロゲル材料に架橋する工程；を含む、組織または軟骨の修復のためのインプラントの作製方法を提供する。
【００４２】
本発明の追加的な態様は、外傷または外科的処置により生じる組織の欠損を消失させるための方法であって、方法が組織を膨張させることを含み、組織を膨張させることが組織の中に有効量の本発明の足場構造複合体を埋め込むことよってこれを膨張させることを含む、方法を提供する。
【００４３】
本発明の別の態様は、老化に関連した病気、疾患、または状態に起因する組織の欠損を低減するまたは元に戻すための方法であって、方法が組織を含む組織を膨張させることを含み、組織を膨張させることが組織の中に有効量の本発明の足場構造複合体を埋め込むことよってこれを膨張させることを含む、方法を提供する。
【００４４】
任意選択的には、組織の欠損には、胸膜組織、筋肉組織、皮膚、またはこれらの組み合わせが含まれる。
【００４５】
少なくとも１つの態様においては、本発明は、ゲルと、ゲルの中に配置された少なくとも１つのナノ構造体とを含む複合材料を提供する。ゲルは、ヒドロゲルであっても任意の他の適切なゲルであってもよい。ナノ構造体は、ナノファイバーであっても任意の他の適切なナノ構造体であってもよい。ナノ構造体はゲルに共有結合していてもよい。ナノ構造体は、ポリカプロラクトン（ＰＣＬ）、または任意の他の適切な材料で形成されていてもよい。
【００４６】
少なくとも別の態様においては、本発明は、軟部組織の欠損に複合材料を適用することを含む軟部組織の欠損の治療方法であって、複合材料がゲルと、ゲルの中に配置された少なくとも１つのナノ構造体とを含む、方法を提供する。
【００４７】
また別の態様においては、本発明は、軟部組織の欠損の治療に使用するための複合材料の製造方法であって、ゲルとゲルの中に配置されたナノファイバーを得ることを含む、方法を提供する。
【００４８】
別の態様においては、ｉ）ヒドロゲル材料に動作可能に結合している約１００ｎｍ～約８０００ｎｍの平均繊維直径を有する高分子繊維シート（任意選択的には不織及び／または電界紡糸された高分子繊維シート）を含む層状足場構造複合体；並びに、ｉｉ）手術用メッシュ材料；を含む、手術用デバイスが提供される。
【００４９】

複数の実施形態が本発明の異なる態様の下に記載されているものの、適切な場合には、あるいは具体的に請求項から除外されていない場合には、本明細書に記載のいずれか１つの実施形態を任意の他の１つ以上の実施形態と組み合わせ得ることが意図されている。

【００５０】

これら及び他の実施形態は開示されており、あるいは以降の「発明を実施するための形態」から自明であり、また「発明を実施するための形態」に含まれる。

【００５１】

以降の詳細な説明は例として示されているが、記載されている具体的な実施形態のみに本発明を限定することは意図されておらず、添付の図面と組み合わせることで最もよく理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【００５２】

【図１Ａ】ゲルの中に配置されたナノ構造体、及び特にはゲル中の官能基へのナノ構造体の共有結合を示す、本開示による複合材料のある実施形態の構造を示す。

【図１Ｂ】完全に膨潤した図１に示されている複合材料の光学顕微鏡画像を示す。

【図１Ｃ】水和した図１に示されている複合材料の肉眼での外観画像を示す。

【図１Ｄ】脱水した図１に示されている複合材料の走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）画像を示し、ＥＣＭとの微細構造の類似性を明らかにしている。

【図２Ａ】ＨＡヒドロゲル単独に対してプロットされた図１の複合材料のある実施形態の応力－歪み曲線を示し、同じ架橋密度のヒドロゲルと比較して改善された弾性率を明らかにしている。

【図２Ｂ】図２Ａの複合材料の実施形態が通常のヒドロゲルと比較して同程度の機械的完全性の堅牢性を保持していることを示す疲労試験を示す。

【図３Ａ】ナノファイバー－ＨＡヒドロゲル複合材料の中で４日間培養したＡＳＣの蛍光及び位相差画像（図３Ｂ）とのオーバーレイ（図３Ａ）を示す。

【図３Ｂ】ナノファイバー－ＨＡヒドロゲル複合材料の中で４日間培養したＡＳＣの蛍光及び位相差画像（図３Ｂ）とのオーバーレイ（図３Ａ）を示す。

【図３Ｃ】通常のＨＡヒドロゲルの中で４日間培養したＡＳＣの蛍光及び位相差画像（図３Ｄ）とのオーバーレイ（図３Ｃ）を示す。

【図３Ｄ】通常のＨＡヒドロゲルの中で４日間培養したＡＳＣの蛍光及び位相差画像（図３Ｄ）とのオーバーレイ（図３Ｃ）を示す。

【図４Ａ】整列した６５０ｎｍのナノファイバーに沿ってスフェロイドから遊走しているＡＳＣを対比する蛍光画像及び位相差画像（図４Ｂ）とのオーバーレイ（図４Ａ）を示す。

【図４Ｂ】整列した６５０ｎｍのナノファイバーに沿ってスフェロイドから遊走しているＡＳＣを対比する蛍光画像及び位相差画像（図４Ｂ）とのオーバーレイ（図４Ａ）を示す。

【図５Ａ】ラット鼠径部脂肪体の下の生体内原位置でのナノファイバー－ヒドロゲル複合材料の外観を示す写真である。

【図５Ｂ】埋め込み後２週間の時点で採取した複合材料周辺の組織からの切片のＨ＆Ｅ染色画像を示す。

【図５Ｃ】細胞の浸潤を示す、４週間時点の複合材料－組織界面から採取した組織切片のＨ＆Ｅ染色画像を示す。

【図６Ａ】ポリカプロラクトン（ＰＣＬ)繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料についての合成スキームを示す。

【図６Ｂ】ＰＣＬ繊維とＨＡ鎖網状構造との間の界面結合を有する複合体構造の概略図を示す。

【図６Ｃ】作製したばかりの同じ寸法（スケールバー＝５ｍｍ）の円柱状繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料（左）とＨＡヒドロゲル（右）の全体的な外観を表す光学画像を示す。

【図６Ｄ】凍結乾燥及び再水和後の同じ組のサンプルの光学画像を示す。

【図６Ｅ】ＨＡヒドロゲルの断面のＳＥＭ画像を示す（スケールバー＝４０μｍ）。

【図６Ｆ】ＰＣＬ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の断面のＳＥＭ画像を示す（スケールバ

ー＝１００μｍ）。
【図６Ｇ】脱細胞化した天然脂肪組織の断面のＳＥＭ画像を示す（スケールバー＝１０μｍ）。
【図７Ａ】ＨＡヒドロゲルの圧縮弾性率の強化に対する繊維直径及び界面結合の影響を示す。ＨＡヒドロゲル及び複合材料は、４．５ｍｇ／ｍｌのＨＡを基にして作製した。応力の値は５０％の歪みで測定した。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。
【図７Ｂ】ＰＥＧヒドロゲルの圧縮弾性率の強化に対する繊維直径及び界面結合の影響を示す。ＰＥＧヒドロゲル及び複合材料は、３０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＳＨ及び２０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡを基にして作製し、繊維－ＰＥＧヒドロゲル複合材料を合成するために１．０μｍのＰＣＬ繊維を使用した。応力の値は５０％の歪みで測定した。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。
【図８Ａ】ＨＡヒドロゲルのせん断貯蔵弾性率の強化に対する界面結合密度及び繊維の直径の影響を示す。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。
【図８Ｂ】ＰＥＧヒドロゲルのせん断貯蔵弾性率の強化に対する界面結合密度及び繊維の直径の影響を示す。せん断貯蔵弾性率の値は１Ｈｚの周波数で測定した。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。
【図８Ｃ】ＨＡヒドロゲルのせん断貯蔵弾性率の強化に対する界面結合密度及び繊維の直径の影響を示す。せん断貯蔵弾性率の値は１Ｈｚの周波数で測定した。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。
【図８Ｄ】ＨＡヒドロゲルのせん断貯蔵弾性率の強化に対する界面結合密度及び繊維の直径の影響を示す。せん断貯蔵弾性率の値は１Ｈｚの周波数で測定した。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。
【図９Ａ】ＨＡヒドロゲルのせん断貯蔵弾性率に対する繊維添加量の影響を示す。ＨＡヒドロゲル及び複合材料は１０ｍｇ／ｍｌのＨＡを使用して合成した。せん断貯蔵弾性率は１Ｈｚの周波数で測定した。青矢印は、ＳＨ基対（ＤＡ＋ＭＡＬ）基のモル比が１対２である両方の複合材料についての条件を示す。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。
【図９Ｂ】ＨＡヒドロゲルのせん断貯蔵弾性率に対する繊維添加量の影響を示す。ＨＡヒドロゲル及び複合材料は４．５ｍｇ／ｍｌのＨＡを使用して合成した。せん断貯蔵弾性率は１Ｈｚの周波数で測定した。青矢印は、ＳＨ基対（ＤＡ＋ＭＡＬ）基のモル比が１対２である両方の複合材料についての条件を示す。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。
【図１０Ａ】異なる周波数での繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の機械的強度を示す。ＨＡヒドロゲル及び複合材料のせん断貯蔵弾性率は、異なる周波数のせん断荷重に対して測定される。
【図１０Ｂ】異なる再水和での繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の機械的強度を示す。再水和前後の複合材料の圧縮応力の比較（歪み＝４０％）。
【図１０Ｃ】異なる周期的負荷での繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の機械的強度を示す。ＨＡヒドロゲル及び対応する複合材料の圧縮応力は周期的負荷に対して測定される（歪み＝２５％）。
【図１１Ａ】ＨＡヒドロゲルの中で２７日目のヒト脂肪由来の幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。約１．９ｋＰａの同様の圧縮弾性率を示すために、ＨＡヒドロゲル対照及び２つの複合材料が選択された。ｈＡＳＣのＦ－アクチン及び核は、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤色）及びＤＡＰＩ（青色）で染色した。ナノファイバーは、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白色）で標識した。スケールバー＝１００μｍ。
【図１１Ｂ】ナノファイバー－ＨＡヒドロゲル複合材料の中で２７日目のヒト脂肪由来の幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。約１．９ｋＰａの同様の圧縮弾性率を示すようにＨＡヒドロゲル対照及び２つの複合材料を選択した。ｈＡＳＣのＦ－アクチン及び核は、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤色）及びＤＡＰＩ（青色）で染色した。ナノファイバーは、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白

色）で標識した。スケールバー＝１００μｍ。
【図１１Ｃ】ＲＧＤ－ナノファイバー－ＨＡヒドロゲル複合材料の中で２７日目のヒト脂肪由来の幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。約１．９ｋＰａの同様の圧縮弾性率を示すようにＨＡヒドロゲル対照及び２つの複合材料を選択した。ｈＡＳＣのＦ－アクチン及び核は、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤色）及びＤＡＰＩ（青色）で染色した。ナノファイバーは、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白色）で標識した。スケールバー＝１００μｍ。
【図１１Ｄ】ＲＧＤ－ナノファイバー－ＨＡヒドロゲル複合材料の中で２７日目のヒト脂肪由来の幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。約１．９ｋＰａの同様の圧縮弾性率を示すようにＨＡヒドロゲル対照及び２つの複合材料を選択した。（ｄ）及び（ｅ）中の黄色い矢印は、繊維または繊維クラスターに付着している細胞を示す。ｈＡＳＣのＦ－アクチン及び核は、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤色）及びＤＡＰＩ（青色）で染色した。ナノファイバーは、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白色）で標識した。スケールバー＝２０μｍ。
【図１１Ｅ】ナノファイバー－ＨＡヒドロゲル複合材料の中で２７日目のヒト脂肪由来の幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。約１．９ｋＰａの同様の圧縮弾性率を示すようにＨＡヒドロゲル対照及び２つの複合材料を選択した。（ｄ）及び（ｅ）中の黄色い矢印は、繊維または繊維クラスターに付着している細胞を示す。ｈＡＳＣのＦ－アクチン及び核は、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤色）及びＤＡＰＩ（青色）で染色した。ナノファイバーは、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白色）で標識した。スケールバー＝２０μｍ。
【図１１Ｆ】ヒト脂肪由来の幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。ＰＣＬ繊維とＨＡ鎖網状構造との間の界面結合を有する複合構造中のｈＡＳＣスフェロイドの概略図が示されている。
【図１２Ａ】３０日間埋め込まれた繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料及びＨＡヒドロゲルによって媒介された組織の再生を示す。鼠径部脂肪体下への埋め込み前（はめ込み図）及び後の複合材料の巨視的画像が示されている（スケールバー＝２ｍｍ）。白い星は埋め込まれたマトリックスを示す。
【図１２Ｂ】３０日間埋め込まれた繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料及びＨＡヒドロゲルによって媒介された組織の再生を示す。鼠径部脂肪体下への埋め込み前（はめ込み図）及び後のＨＡヒドロゲルの巨視的画像が示されている（スケールバー＝２ｍｍ）。白い星は埋め込まれたマトリックスを示す。
【図１２Ｃ】３０日間埋め込まれた繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料及びＨＡヒドロゲルによって媒介された組織の再生を示す。（ｉ）天然脂肪組織、（ｉｉ）疑似手術後の治癒した組織、（ｉｉｉ，ｖ）繊維－ＨＡヒドロゲルが埋め込まれた組織、並びに（ｉｖ，ｖｉ）１４日目及び３０日目のＨＡヒドロゲルが埋め込まれた組織の、Ｈ＆Ｅ及びマッソントリクロームで染色された画像が示されている。画像の中で、Ｈ＝ＨＡヒドロゲル、Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料、Ｂ＝褐色脂肪組織、黄色矢印＝血管である。スケールバー＝２００μｍ。
【図１２Ｄ】３０日間埋め込まれた繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料及びＨＡヒドロゲルによって媒介された組織の再生を示す。（ｉ）天然脂肪組織、（ｉｉ）疑似手術後の治癒した組織、（ｉｉｉ，ｖ）繊維－ＨＡヒドロゲルが埋め込まれた組織、及び（ｉｖ，ｖｉ）１４日目及び３０日目のＨＡヒドロゲルが埋め込まれた組織の、Ｈ＆Ｅ及びマッソントリクロームで染色された画像が示されている。マッソントリクローム染色による青色の染色は、検査した組織中の全コラーゲンを示す。画像の中で、Ｈ＝ＨＡヒドロゲル、Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料、Ｂ＝褐色脂肪組織、黄色矢印＝血管である。スケールバー＝２００μｍ。
【図１３Ａ】ＰＡＡ－グラフト法によってＭＡＬで表面修飾された繊維を作製する模式図を示す。
【図１３Ｂ】３及び１０％（ｖ／ｖ）のアクリル酸でＰＡＡをグラフトした後の繊維上の

カルボキシル基の平均密度を示す（＊ｐ＜０．０５，ｎ＝６）。
【図１４】４．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ－ＳＨを用いて作製したＳＨ対ＤＡが様々なモル比のＨＡヒドロゲルのせん断貯蔵弾性率を示す。
【図１５Ａ】様々な量の繊維から作製された繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料のせん断貯蔵弾性率を示す。繊維の平均直径は６８６ｎｍであり、繊維上のＭＡＬ表面密度は１００ｎｍｏｌ／ｍｇであり、複合材料は４．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ－ＳＨと５ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡを用いて作製した。青矢印はＳＨ基対（ＤＡ＋ＭＡＬ)基の１：２のモル比を示す。＊ｐ＜０．０５（ｎ＝３）。
【図１５Ｂ】様々な繊維の添加量での繊維－ＰＥＧヒドロゲル複合材料のせん断貯蔵弾性率を示す。＊ｐ＜０．０５（ｎ＝３）。
【図１６】断面のＳＥＭ画像に基づいて評価したＨＡヒドロゲル及びナノファイバー－ＨＡヒドロゲル複合材料の平均孔径を示す（＊ｐ＜０．０５）。
【図１７Ａ】１４日目の繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料を通る細胞の浸潤及び組織の内殖を示す。切片化した組織は全コラーゲン（青色）のためにＨ＆Ｅによって染色した。ラベル：Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料、黄色矢印＝血管。スケールバー＝５０μｍ。
【図１７Ｂ】１４日目の繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料を通る細胞の浸潤及び組織の内殖を示す。切片化した組織は全コラーゲン（青色）のためにマッソントリクロームによって染色した。ラベル：Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料、黄色矢印＝血管。スケールバー＝５０μｍ。
【図１７Ｃ】３０日目の繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料を通る細胞の浸潤及び組織の内殖を示す。切片化された組織は全コラーゲン（青色）のためにＨ＆Ｅによって染色した。ラベル：Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料、黄色矢印＝血管。スケールバー＝５０μｍ。
【図１７Ｄ】３０日目の繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料を通る細胞の浸潤及び組織の内殖を示す。切片化された組織は全コラーゲン（青色）のためにマッソントリクロームによって染色した。ラベル：Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料、黄色矢印＝血管。スケールバー＝５０μｍ。
【図１８】脱細胞化した脂肪組織の断面（上のパネル）及び繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料（下のパネル）の断面のＳＥＭ画像を示す。
【図１９Ａ】４日目のＨＡヒドロゲル中でのｈＡＳＣの遊走能（Ｇ’＝２４．８５μ　２．９２Ｐａ）を示す。ＨＡヒドロゲルは、２．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ－ＳＨ及び５．０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡを用いて製造した。スケールバー＝１００μｍ。
【図１９Ｂ】４日目の１．０μｍ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料中でのｈＡＳＣの遊走能（Ｇ’＝３２．２９μ　２．１６Ｐａ）を示す。複合材料は、２．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ、５．０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡ、及び１０ｍｇ／ｍｌの繊維を用いて製造した。スケールバー＝１００μｍ。
【図１９Ｃ】４日目の２８６ｎｍ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料中でのｈＡＳＣの遊走能（Ｇ’３９．５６μ　１．２６Ｐａ）を示す。複合材料は、２．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ、５．０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡ、及び１０ｍｇ／ｍｌの繊維を用いて製造した。スケールバー＝１００μｍ。
【図２０Ａ】注入可能な配合を示す。繊維－ヒドロゲル複合材料は注入可能な用途のために配合することができる。
【図２０Ｂ】注入可能な複合材料が注入後すぐに安定であることを示す。
【図２０Ｃ】注入可能な複合材料が形状及び体積を保ちつつ水に非分散性のままであることを示す。
【図２０Ｄ】３０日目の注入可能な繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料を通る細胞の浸潤及び組織の内殖を示し、広範な細胞のリモデリングと脂肪細胞の形成が示されている。切片化した組織はＨ＆Ｅによって染色した。ラベル：ｃ＝繊維－ＨＡ－ヒドロゲル複合材料。
【図２１】繊維質手術用メッシュとナノファイバー－ヒドロゲル複合材料とからなる複合材料である手術用足場構造体デバイスの構造及び作製スキームを示す。右下の挿入図は、凍結乾燥されてから再水和して元の水和状態に戻った複合材料メッシュの光学画像を示す。

【図２２】複合材料ナノファイバー－ヒドロゲルシート足場構造体の構造及び作製スキームを示す。表面が官能化されたナノファイバーシートが追加的なマイクロファイバーメッシュなしで使用される。ランダムなまたは配向したナノファイバーのシートは、ＰＣＴ／ＵＳ１５／４５４９４に記載のものと同じ方法を凍結粉砕工程なしで使用して官能化される。無傷のシートはその後複合材料シート足場構造体を形成するために使用される。
【図２３】凍結乾燥形態（左）及び再水和形態（右）の複合材料ナノファイバーシートの光学画像を示す。
【図２４】複合材料マイクロファイバー－ヒドロゲルシート足場構造体の構造及び作製スキームを示す。表面が官能化されたマイクロファイバーシートが追加的なナノファイバーメッシュなしで表面が使用される。編まれた、または織布の、または不織布の、マイクロファイバーメッシュシートは、ＰＣＴ／ＵＳ１５／４５４９４に記載のものと同じ方法を使用して官能化される。マイクロファイバーシートはその後、複合材料シート足場構造体を形成するために使用される。
【図２５】再水和形態の複合材料マイクロファイバーシートの光学画像を示す。この足場構造体の構成は、ナノファイバー成分なしで作製した。繊維なしのＨＡヒドロゲルはマイクロファイバーメッシュの周りに注型した。
【図２６Ａ】ラット生体内モデル中の腹壁に沿った手術用メッシュの設置を示す。図面は外科的処置を示す。
【図２６Ｂ】ラット生体内モデル中の腹壁に沿った手術用メッシュの設置を示す。げっ歯動物中へのメッシュの埋め込み画像が具体的に示されている。
【図２７Ａ】生体内への埋め込み後４日目の疑似手術対照（上段）、未被覆のポリプロピレンメッシュ（中段）、及び複合材料メッシュ（下段）の組織学的な評価を示す。代表的なヘマトキシン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した連続した組織断面を、５倍の倍率（左列）及び２０倍の倍率（中央及び右の列）で画像化した。対照及びメッシュだけの群と比較した場合に複合体メッシュの群で増加した細胞の浸潤が観察された。
【図２７Ｂ】生体内への埋め込み後４日目の疑似手術対照（上段）、未被覆のポリプロピレンメッシュ（中段）、及び複合材料メッシュ（下段）の組織学的な評価を示す。代表的なマッソントリクロームで染色した連続した組織断面を、５倍の倍率（左列）及び２０倍の倍率（中央及び右の列）で画像化した。対照及びメッシュだけの群と比較した場合に複合体メッシュの群で増加した細胞の浸潤が観察された。
【発明を実施するための形態】
【００５３】
本発明は、軟部組織の再建のための方法で使用するための、ヒドロゲルとナノ構造体とを含む複合材料に関する。本発明は、ヒドロゲル及びその中に配置されたナノ構造体を含む組成物を使用する、軟部組織の損傷を修復または再建するための方法にも関する。本発明は、別の態様においては、軟部組織の再建における使用のための組成物の製造方法であって、組成物がヒドロゲル及びその中に配置されたナノ構造体を含む方法にも関する。
【００５４】
本明細書で提供される複合材料シート足場構造体の１つの利点は、異物反応を減らす、炎症を減らす、及び組織－材料界面を改善する、これらの足場構造体の性質であり、最終的には手術用メッシュと被験体の周囲の組織との一体化が改善される。本明細書に記載の足場構造体は、以下に記載のような、及びその他の当該技術分野で公知のもしくは認識されているような、様々な用途で使用することができる。
【００５５】
本発明の複合材料シート足場構造体の少なくとも３つの明確な構成が、本明細書で提供される。手術用メッシュと、ヒドロゲルと、ナノファイバーとを含む１つ目の構成では、構成は、周囲の組織からの細胞の浸潤を促すための足場構造体の能力を最大にし、インプラントと組織の一体化を改善するように設計され、親特許出願であるＰＣＴ／ＵＳ１５／４５４９４に規定のナノファイバー－ヒドロゲル複合材料の完全な利点が実現される。代替の構成においては、これは手術用メッシュ及びヒドロゲルのみを含むより単純な構成（

ナノファイバーなし）である。この代替の構成であってもマイクロファイバー手術用メッシュの良好な機械的特性が保たれる。最後の構成は、ヒドロゲルに連結したナノファイバーの層状マトリックスであるが、別個の手術用メッシュが存在しない。この構成はメッシュ－ナノファイバー－ヒドロゲル組成物の大きな引張強度を有さないものの、これはより簡単に製造され、またナノファイバー及びヒドロゲル成分の吸収性のため、永久的な手術用メッシュと比較してより少ない瘢痕形成しか生じさせないであろう。そのため、この構成は、大きい引張強度は必要とされないが最小限の瘢痕形成が必要とされる硬膜または胸膜の修復などの状況において理想的であろう。重要なことには、一体化した網状構造は全ての例示構成の共通の特徴である。

【００５６】

以降で当業者が本発明を実施するために役立つ本発明の詳細な説明が示される。当業者は、本発明の趣旨または範囲から逸脱することなしに本明細書に記載の実施形態を修正及び変更することができる。特段の規定がない限り、本明細書で使用されている全ての技術的及び科学的な用語は、本発明が属する技術分野の当業者が普通に理解するのと同じ意味を有する。本明細書において本発明の説明で使用される専門用語は、単に具体的な実施形態を説明するためのものであり本発明の限定を意図していない。本明細書中で述べられている全ての刊行物、特許出願、特許、図面、及び他の参照文献は、それらの全体が参照により明確に組み込まれる。

【００５７】

本明細書に記載のものと同様のあるいは均等の任意の方法及び材料を本発明の実施または試験において使用することもできるものの、好ましい方法及び材料は以降で説明される。本明細書で述べられている全ての刊行物は開示のために参照により本明細書に組み込まれ、刊行物が引用されている方法及び／または材料と組み合わせて述べられる。

る。

【００５８】

別段の規定がない限り、本明細書で使用されている全ての技術的及び科学的な用語は、本発明が属する技術分野の当業者が普通に理解する同じ意味を有する。参照によってその開示全体が本明細書に組み込まれる次の参照文献は、本明細書で使用される多くの用語の一般的な定義を当業者に提供する（本明細書に別段の規定がない限り）：Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ （２ｎｄ ｅｄ．１９９４）；Ｔｈｅ Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｗａｌｋｅｒ ｅｄ．，１９８８）；Ｔｈｅ Ｇｌｏｓｓａｒｙ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，５ｔｈ Ｅｄ．，Ｒ．Ｒｉｅｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ（１９９１）；及びＨａｌｅ＆Ｍａｒｈａｍ，ｔｈｅ Ｈａｒｐｅｒ Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９１）。通常、本明細書に記載のまたは固有の及び同様の分子生物学的手法の手順は、当該技術分野で使用されている一般的な手法である。そのような標準的な手法は、例えばＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，（２０００，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）；及びＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，（１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ－Ｙｏｒｋ）などの参照マニュアルの中で見ることができる。

【００５９】

別段の規定がない限り、次の用語は下で付与された意味を有し得る。しかし、当業者に知られているまたは理解される他の手段も可能であり、本発明の範囲内にあると理解されるべきである。本明細書中で述べられている全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参照文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先される。更に、材料、方法、及び実施例は、例示にすぎず、限定することは意図されていない。

【００６０】
定義
本明細書において、「足場構造複合体」には、高分子繊維とヒドロゲル材料の２つの成分の任意の共有結合性の会合が含まれる。足場構造複合体は、「機能性網状構造」の中に高分子繊維及びヒドロゲル材料を含み、これは、成分間の相互作用が化学的、生物化学的、生物物理的、物理的、または生理学的な利益を生じさせることを意味する。更に、機能性網状構造は、細胞、生体物質（例えばポリペプチド、核酸、脂質、及び炭水化物）、治療用化合物、合成分子等などの追加的な成分を含んでいてもよい。特定の実施形態においては、足場構造複合体は、ヒト被験体中に存在する標的組織の中に埋め込まれた場合に組織の成長及び細胞の浸潤を促す。
【００６１】
本明細書において、用語「ヒドロゲル」は「ゲル」の種類であり、共有結合によるまたは非共有結合による架橋によって互いに結合している高分子（例えば親水性ポリマー、疎水性ポリマー、これらのブレンド物）の三次元網状構造からなることで弾性ゲルを形成している、多量の水（例えば非水分子の単位当たり５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または９９％超）を吸収することができる、水膨潤性高分子マトリックスのことをいう。高分子マトリックスは、任意の適切な合成高分子材料または天然由来の高分子材料で形成されていてもよい。本明細書において、用語「ゲル」とは、液体媒体の体積全体に広がり、表面張力の作用でこれを網にかける固体の三次元網状構造のことをいう。この内部網状構造は、物理的結合（物理ゲル）または化学的結合（化学ゲル）からだけでなく、広がっている流体内部で完全なまま保たれる結晶または他の接合からも生じ得る。水（ヒドロゲル）、油、及び空気（エアロゲル）などの事実上全ての流体をエクステンダーとして使用することができる。重さと体積のいずれを基準としても、ゲルは組成がほぼ流体であり、そのためそれらの構成成分の液体と似た密度を示す。ヒドロゲルは、液体媒体として水を使用するタイプのゲルである。
【００６２】
「疎水性」及び「親水性」のポリマーの定義は、１００％の相対湿度でポリマーによって吸収される水蒸気の量に基づく。この分類によれば、疎水性ポリマーは１００％の相対湿度（「ｒｈ」）で最大でわずか１％の水しか吸収しない一方で、中程度の親水性ポリマーは１～１０％の水を吸収し、親水性ポリマーは１０％超の水を吸収することができ、吸湿性ポリマーは２０％超の水を吸収する。「水膨潤性」ポリマーは、水性媒体に浸漬されると、その自身の重量の少なくとも５０％超の量の水を吸収するものである。
【００６３】
本明細書において、用語「架橋した」とは、共有結合と非共有結合のいずれにより生じたものかに関わらず、分子内及び／または分子間の架橋を含む組成物のことをいい、これは直接的であっても架橋剤を含んでいてもよい。「非共有」結合には水素結合と静電（イオン）結合の両方が含まれる。
【００６４】
用語「ポリマー」には、直鎖及び分岐のポリマー構造が含まれ、架橋ポリマーだけでなく、コポリマー（架橋していてもしていなくてもよい）も包含され、そのためブロックコポリマー、交互コポリマー、ランダムコポリマー等も含まれる。「オリゴマー」と本明細書で呼ばれるこれらの化合物は、約１０００Ｄａ未満、好ましくは約８００Ｄａ未満の分子量を有するポリマーである。ポリマー及びオリゴマーは、天然由来であっても合成原料から得たものであってもよい。
【００６５】
特定の実施形態においては、手術用メッシュが用いられる。いくつかの実施形態においては、「手術用メッシュ」とは、手術時に器官及び他の組織のための永久的なまたは一時的な支持体として使用されるゆるく編まれたシートのことをいう。手術用メッシュは、無機及び／または生体材料から形成することができ、また様々な手術で使用することができる。

【００６６】
軟部組織の再建
腫瘍摘出、外傷、老化、または先天性奇形を原因とする壊滅的な軟部組織の欠損は、毎年何百万人もの人に影響を与えている。皮膚、脂肪、及び筋肉などの組織の欠損は、従来の手段によっては治療が困難な、主要機能の及び審美的な障害を生じさせる。例えば、米国では毎年３００，０００件を超える乳房部分切除術が行われており、これによって胸部の軟部組織の欠損に起因する外観を損なう胸部の傷跡が生じる。軟部組織の修復のための既存の選択肢は大きな欠点を有している。自家組織移植組織片は、これは長時間の外科的処置における体の別の部分からの軟部組織の移動を必要とし、供与部位の欠損を残すＬｏ Ｔｅｍｐｉｏ ２０１０．Ｐｌａｓｔｉｃ ａｎｄ Ｒｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｖｅ Ｓｕｒｇｅｒｙ，１２６（２），３９３－４０１；Ｐａｔｅｌ ２０１２．Ａｎｎａｌｓ ｏｆ Ｐｌａｓｔｉｃ Ｓｕｒｇｅｒｙ，６９（２），１３９－１４４｝。人工インプラントは、線維化及び被膜化を生じさせる異物反応を起こしやすい｛Ｃａｌｏｂｒａｃｅ ２０１４ Ｐｌａｓｔｉｃ ａｎｄ Ｒｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｖｅ Ｓｕｒｇｅｒｙ，１３４（１ Ｓｕｐｐｌ），６Ｓ－１１；Ｔｓｏｉ ２０１４．Ｐｌａｓｔｉｃ ａｎｄ Ｒｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｖｅ Ｓｕｒｇｅｒｙ，１３３（２），２３４－２４９｝。脂肪吸引時に採取した含脂肪細胞を配置することを含む脂肪移植は少量に限定され、また不十分な移植片生着率が妨げとなっている｛Ｋａｋａｇｉａ ２０１４ Ｓｕｒｇｉｃａｌ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ，２１（３），３２７－３３６；Ｌａｒｇｏ ２０１４ Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｌａｓｔｉｃ Ｓｕｒｇｅｒｙ，６７（４），４３７－４４８｝。最後に、注入可能なヒドロゲル軟部組織充填剤が使用される場合があるが、これらは小さい欠損にのみ適切であり、これらがもたらす体積の修復は一時的である｛Ｙｏｕｎｇ ２０１１．Ａｃｔａ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ，７（３），１０４０－１０４９；Ｖａｒｍａ ２０１４ Ａｃｔａ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ，１０（１２），４９９６－５００４｝。再建部位での脂肪組織などの軟部組織の再生のためのテンプレートとしてのヒドロゲル足場構造体の使用に焦点を当てるために、新世代の組織工学の解決策が提案された。
【００６７】
軟部組織再建のための現在の組織工学的手法
脂肪由来幹細胞（ＡＳＣ）は、軟部組織の欠損を取り囲む創傷床として認められた１種の間葉系幹細胞（ＭＳＣ）である｛Ｓａｌｉｂｉａｎ ２０１３ Ａｒｃｈｉｖｅｓ ｏｆ ｐｌａｓｔｉｃ ｓｕｒｇｅｒｙ ４０．６：６６６－６７５｝。これらは適切なマトリックス微小環境で支持された場合に脂肪などの軟部組織へと分化することができる。他のＭＳＣは、筋膜、硬膜、及び胸膜などの軟部組織の再建のための適切な微小環境に遊走することができる。そのため、機能性材料で修復部位を充填する戦略は、内因性のＭＳＣを使用した新しい組織の再生を可能にする可能性を有している。ヒドロゲルは、軟部組織と似たその三次元（３Ｄ)特性及び弾力性から、組織の欠損の再生のための足場構造体マトリックスとして広く研究されてきた。周囲の組織からの物理的な応力に対してその体積及び形状を維持しながらも、天然の脂肪組織と似た弾性率（～２ｋＰａ）を有するヒドロゲル足場構造体を生み出すために、様々な手法が使用されてきた｛Ａｌｋｈｏｕｌｉ ２０１３ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ，３０５（１２），Ｅ１４２７－３５；Ｓｏｍｍｅｒ ２０１３ Ａｃｔａ ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ ９．１１（２０１３）：９０３６－９０４８｝。これはより大きい架橋密度とより小さい平均孔径を必要とし｛Ｒｙｕ ２０１１ Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ １２．７（２０１１）：２６５３－２６５９；Ｋｈｅｔａｎ ２０１３ Ｎａｔｕｒｅ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ，１２（５），４５８－４６５；Ｌｉ ２０１４ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｔｒａｕｍａ，３１（１６），１４３１－１４３８｝、より少ない細胞の浸潤と不十分な再生をもたらす。細胞浸潤を促進するヒドロゲル足場構造体の能力は、軟部組織の修復成功の鍵である。血管浸潤の不足は、大きい体積の脂肪移植及び他の組織工学的な試みの失敗の原因である。現在入手できる材料はいずれも、軟部組織を再生するための早期の血管新生及びＡＳＣ分化を促進し

つつ軟部組織の欠損部で失われた体積を充填することができない。
【００６８】
ヒドロゲルマトリックス
過去数年にわたり、Ｌｉ及びＷｅｎは、幹細胞移植のために最適化された孔径と弾性率（１０～１００Ｐａ）を有するラミニン由来ループペプチド
（ＣＣＲＲＩＫＶＡＶＷＬＣ，１０μＭ）
と複合体化したヒアルロン酸（ＨＡ）ヒドロゲルを開発した。彼らは、このヒドロゲルがロバストな神経幹細胞（ＮＳＣ）の遊走及び分化細胞からの神経突起の発芽を助けることを示した｛Ｌｉ ２０１４ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｔｒａｕｍａ，３１（１６），１４３１－１４３８｝。外傷性の脳損傷についてのラットの制御式皮質損傷（ＣＣＩ）モデルでは、このヒドロゲルをＣＣＩ損傷後３日目に注入した場合、埋め込み後４週間から６カ月後に損傷部位（＞１０ｍｍ）を充填する多量の血管系網目構造の形成が促進された。この改善された血管新生は、組織により分泌される増殖因子、特には血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）を保持し、発現させるこのヒドロゲルの能力に起因する。文献の報告は、３～１０個の二単糖単位の小さいＨＡ分解断片が、内皮性細胞の分裂、遊走、細管形成、及び血管新生の有力な調節因子であることも明らかにした｛Ｓｌｅｖｉｎ ２００２ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２７７（４３），４１０４６－４１０５９｝。最近の研究では、ＣＣＩ損傷後の脳の損傷部位におけるヒト胎児組織由来のＮＨＣスフェロイドを生じさせるためのこのＨＡヒドロゲルの有効性が試験された。このＨＡヒドロゲルは、移植後の足場構造体マトリック内部で頑丈な血管を生じさせた。再生された血管は損傷の中に成長し、埋め込まれたマトリックスを貫通し、神経前駆体の生存及び成長を助けた。これらの研究は脂肪組織再生についてではないものの、これらの結果は、この最適化されたＨＡヒドロゲル組成物の、被移植体の血管の内殖の促進における特有の能力を裏付けた。より重要なことには、ヒドロゲルマトリックスは、ヒドロゲルマトリックスの内部へのロバストな細胞の遊走を可能にするのに十分に多孔質である。しかし、ヒドロゲルの機械的特性が埋め込み部位の完全性を維持するのに十分なほどには高くはないことから（周囲の脂肪組織は１０倍以上高い弾性率を有する）、軟部組織再建のためにこのＨＡヒドロゲルを直接使用することは実現不可能である。その弾性率を改善するために架橋密度を上げると、細胞の浸潤及び遊走に不十分な浸透性になる。バルクのヒドロゲルの平均孔径を大きく減らすことなしに機械的特性を向上させるための、新しい戦略が必要とされている。脂肪組織由来の及び／またはこれから誘導可能な細胞外マトリックスなどの、処理された組織細胞外マトリックスを含む及び／またはこれから分離されたヒドロゲル材料が提供される。
【００６９】
足場構造複合体。
【００７０】
本明細書においては、例えば注入または埋め込みなどによって複合体が投与されるヒト被験体の組織の中に組み込まれる、医療デバイスの使用に好適な足場構造複合体が提供される。足場構造複合体は、通常は約１００ｎｍ～約８０００ｎｍ、または約１５０ｎｍ～約５，０００ｎｍ、または約１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、１，５００、２，０００、２，５００、３，０００、３，５００、４，０００、４，５００、５，０００、５，５００、６，０００、６，５００、７，０００、７，５００、もしくは８，０００などの、約１０ｎｍ～約１０，０００ｎｍの平均直径を有する高分子繊維を含む。本明細書において、高分子繊維対ヒドロゲル材料の比率は、当該技術分野で公知の任意の手段により決定することができる。例えば、高分子繊維対ヒドロゲル材料の比率は、成分の質量基準で約１：１００～約１００：１、約１：５０～約５０：１など、または約１：１０～約１０：１、約１：５～約５：１など、約１：３～約３：１などである。高分子繊維対ヒドロゲル材料の比率は、例えばヒドロゲル材料の体積当たりの高分子繊維の所定の重量などの濃度基準としても示される。例えば、濃度は約１～５０ｍｇ／ｍＬである。ヒドロゲル材

料は通常、ポリマー繊維の外表面（または組成及び形状に応じた外表面）に結合するなどポリマー繊維上に配置される。足場構造複合体は、通常は均質な固体材料ではない。代わりに、足場構造複合体は、足場構造複合体の表面上または内部に存在する複数の空孔を含む。空孔の存在、大きさ、分布、頻度、及び他のパラメータは、足場構造複合体の形成時に調節することができる。孔径は、１、２、３、４　５、１０、１５、２０、３０、４０、５０、６０　７０、８０、９０、または１００ミクロンなどの約１ミクロン未満から最大１００ミクロンであってもよく、またその大きさは、例えば５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または９５％超などの少なくとも４０％の空孔が望みの大きさにまたは望みの大きさの範囲内にあるように、狭く調節され得る。

【００７１】

本発明の足場構造複合体は、ヒト被験体の組織の中への組み込みに適しており、そのためこれらは通常「生体適合性」である。すなわち、それらの中で及び／またはそれによって病態生理学的反応を生じることなしに、生体システム（ヒト被験体中でみられるものなど）と相互作用できる。いくつかの実施形態においては、足場構造複合体は、組織の中に永続的に保持されるように提供される。あるいは、足場構造複合体はヒト被験体の中で一時的に保持され、実質的に生分解性であるものとして提供される。好ましくは、高分子繊維は生体適合性生分解性ポリエステルを含む。好ましい実施形態においては、高分子繊維はポリカプロラクトンを含む。

【００７２】

本明細書で規定されているように、高分子繊維とヒドロゲルとを含む複合体の相互作用の１つの好ましい形態は、高分子繊維とヒドロゲル材料との間に結合を生じさせるのに有効な量で、例えばポリカプロラクトン繊維とヒアルロン酸との間の架橋を生じさせるのに有効な量で、通常存在する架橋部位を含む。

【００７３】

軟部組織修復のための足場構造体の設計

複合材料の概念は、材料強化のメカニズムとして広く使用されてきた。例えば、ヒドロゲルの中にヒドロキシアパタイト粒子を添加すると、その剛性を増加させることができ｛Ｗｕ　２００８　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｐｈｙｓｉｃｓ　１０７．２（２００８）：３６４－３６９｝、細長い粒子に関しては複合材料の引張弾性率が一層増加する｛Ｙｕｓｏｎｇ　２００７　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，４２（１３），５１２９－５１３４｝。電界紡糸されたナノファイバーメッシュは、天然のＥＣＭとのその形態的な類似性のため、組織工学の基材として広く使用されてきた。特に興味深いことは、脂肪組織の脱細胞化ＥＣＭが本質的に高度に繊維質かつ多孔質なことである。（図６Ｇ）｛Ｙｏｕｎｇ　２０１１．　Ａｃｔａ　Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ，７（３），１０４０－１０４９｝。複数の最近の研究は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリアクリルアミド、またはアルギン酸ヒドロゲルに、断片化したポリ（乳酸）（ＰＬＡ）またはキトサン繊維を導入することによって繊維質成分を再現することを試みていた｛Ｃｏｂｕｒｎ　２０１１　Ｓｍａｒｔ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，７（３），２１３；＃３７；Ｚｈｏｕ　２０１１　Ｃｏｌｌｏｉｄｓ　ａｎｄ　Ｓｕｒｆａｃｅｓ　Ｂ：Ｂｉｏｉｎｔｅｒｆａｃｅｓ，　８４（１），１５５－１６２；Ｓｈｉｎ　２０１５　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ｝。断片化された繊維は、ヒドロゲル前駆体溶液と混合され、ゲル化工程時にヒドロゲルの中に組み込まれて３Ｄ構造体を形成する。これらの繊維が埋め込まれたヒドロゲルは、対応するヒドロゲルに対して改善された機械的特性を示した。しかし、生体内での被移植体細胞への浸潤の試験については報告されていなかった。更に、これらのヒドロゲルは非分解性であり、また脂肪接着及び分化のための接着性リガンドを必要とする。

【００７４】

ナノファイバー－ヒドロゲル複合材料の設計

ヒドロゲル相中の高い空隙率を維持しつつも繊維強化効果を達成するために、他の足場構造体と比較して優れた特性を与える電界紡糸繊維－ヒドロゲル複合材料が提供される。

以前に報告された{Ｃｏｂｕｒｎ ２０１１ Ｓｍａｒｔ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，７（３），２１３}ナノファイバーとヒドロゲルマトリックスとをブレンドすることに勝る、繊維表面とヒドロゲル架橋網状構造との間の界面結合が本発明では導入される（図６）。そのような複合材料設計は固体繊維成分由来のより強い機械的強化を可能にするのみならず、ヒドロゲル相のバルク機械的特性及び平均孔径／空隙率の独立した微調整も可能にし、これにより最適な細胞の浸潤特性と構造的完全性の両方が実現する。これは更に、繊維がＡＳＣ及び内皮前駆体のための好ましい細胞接着基材として利用でき、そのため細胞の遊走及びＡＳＣの分化を助けるガイドとして機能することも期待される。

【００７５】

革新

特定の態様においては、鍵となる革新はナノファイバー表面とヒドロゲル網状構造との間に界面結合を有するように設計されたナノファイバー－ヒドロゲル複合材料である（図６Ａ）。この人工の複合材料は、ヒドロゲル相中の平均孔径を有意に減らすことなしに、ヒドロゲルの機械的特性を劇的に改善させる可能性を有している。界面結合の導入は、２つの成分の単なる物理的なブレンドと比較して、優れた機械的な強化作用を示すことができる。この研究は、ブレンド物と対比した、電界紡糸ポリカプロラクトン（ＰＣＬ）繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料で達成可能な機械的特性（圧縮弾性率及びせん断弾性率）の範囲を精密に示す。２つ目の革新は、そのようなナノファイバー－ヒドロゲル複合材料が軟部組織の欠損を修復することの実演である。予備的な特性評価では、複合材料が構造的特徴を脂肪組織と共有することが示された（図６）{Ｃｈｒｉｓｔｍａｎ，２０１２ ＵＳ ２０１２０２６４１９０ Ａ１；Ｙｏｕｎｇ ２０１１．Ａｃｔａ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ，７（３），１０４０－１０４９}。この複合材料が軟部組織の再生に重要な構造的完全性及び機械的特性を示すという仮設が立てられた。この研究は、ヒドロゲルと比較した複合材料の汎用性及び有効性も示した。

【００７６】

特定の態様においては、鍵となる革新は、筋膜、硬膜、または胸膜を失うことによってもたらされるものなどの層状軟部組織の欠損を再建するために適切な、平坦なシートとしてのナノファイバー－ヒドロゲル複合材料の構成である（図２３）。

【００７７】

特定の態様においては、鍵となる革新は、手術用メッシュと一体化されたヒドロゲルまたはナノファイバー－ヒドロゲル複合材料の組成である。得られる複合材料は、手術用メッシュの強い引張強度の利益を享受しながらも、ヒドロゲルの低い炎症プロファイル及び優れた組織の内殖を保つ。

【００７８】

特定の態様においては、鍵となる革新は、優先的な細胞の遊走を促進し得る直線的に配向したナノファイバーを有するナノファイバー－ヒドロゲル複合材料の構成である（図４）。この組成は、筋膜及び硬膜などの組織において明らかなように単一の軸に沿った組織の再生を導くために理想的である。

【００７９】

この研究課題の成功裏の完結は、軟部組織構造の欠損の復元のための、特には層状種のより大きい欠損のための、既製品溶液を生みだすことであり、強くて柔軟性のある材料のシートを得て、血管の網状構造を構築し、組織修復部位の完全性を維持し、細胞の遊走及び組織化を促進し、被移植体の細胞を回復させることは、全て持続的な組織の復元に極めて重要である。組織適合性に関するこれらの予備データと共に、この複合材料の設計に使用した材料成分（すなわちＨＡヒドロゲル及び生分解性ポリエステル繊維）のための広範囲の臨床的な実績から、優れた組織適合性及び臨床応用のための容易な規制承認の経路が示唆された。

【００８０】

特徴

いくつかの実施形態においては、本発明は、ヒドロゲル成分中でのナノファイバーとポリマー網状構造との間の界面結合を提供する。これは、「真」の複合材料の形成のために重要である。そのような繊維とヒドロゲルのブレンドでは同じ程度の機械的な強化を得られないことが示された。ナノファイバー－ヒドロゲルブレンド物の使用についての以前の報告も存在する。つまり、重要なことには、界面結合が、この新しい研究を従来技術と差別化する。更に、界面結合は、この原稿で示されるような共有結合と、水素結合及び静電荷相互作用などの２次結合を含み得る。

【００８１】

いくつかの実施形態においては、本発明は、硬膜、胸膜、及び筋膜などの層状組織の再建に好適な構成の中でヒドロゲルに結合するナノファイバーの層状シートを提供する。任意選択的には、ナノファイバーは配向して好ましい方向に沿った細胞の内殖を促す。

【００８２】

別の実施形態においては、本発明は、強い外科用メッシュを組み込むことによって強化された層状ヒドロゲルまたは層状ナノファイバー－ヒドロゲル複合材料を提供する。得られる材料は、ヒドロゲルによって与えられる改善された炎症プロファイル及び優れた組織適合性及び内殖を保持しつつも、腹壁の修復などの用途で有利な場合がある外科用メッシュの引張強度の利益を享受することができる。

【００８３】

これは、等方的な強化を示す、すなわち複合材料が任意の形状の体積の欠陥を置換するために必要とされる通りに全ての方向でより強いことを示す、この分野における初めての研究でもある。ナノファイバーマットまたは少数の配向したフィラメントを有する設計は、本質的に異方性である。この設計は、等方性材料と異方性材料の両方を形成することができる。

【００８４】

本明細書で示される研究は、少なくとも特定の態様については、複合材料の形成のために使用される成分を、細胞の遊走及び被移植体組織の内殖のための十分な孔径と空隙率を有するヒドロゲル網状構造と、５０ｎｍ～１０μｍの範囲の直径の高分子繊維を緩く含むナノファイバーとに規定している。

【００８５】

ゲル／ヒドロゲル成分

本発明のヒドロゲル複合材料は、任意の種類の好適なヒドロゲル成分を含んでいてもよい。本発明は、当該技術分野で公知の任意の適切なヒドロゲル成分を含む任意の好適なゲル成分を含む、ナノ構造体／ゲル複合材料を意図している。ゲル及び／またはヒドロゲルは、任意の適切な合成材料または天然由来の材料で形成することができる。

【００８６】

例えば、ゲル及び／またはヒドロゲルのポリマー成分は、セルロースエステル、例えばセルロースアセテート、セルロースアセテートプロピオネート（ＣＡＰ）、セルロースアセテートブチレート（ＣＡＢ）、セルロースプロピオネート（ＣＰ）、セルロースブチレート（ＣＢ）、セルロースプロピオネートブチレート（ＣＰＢ）、セルロースジアセテート（ＣＤＡ）、セルローストリアセテート（ＣＴＡ）等を含んでいてもよい。これらのセルロースエステルは、米国特許第１，６９８，０４９、１，６８３，３４７、１，８８０，８０８、１，８８０，５６０、１，９８４，１４７、２，１２９，０５２、及び３，６１７，２０１に記載されており、当該技術分野で公知の手法を使用して調整してもよく、あるいは商業的に入手してもよい。本明細書で好適な市販のセルロースとしては、全てＥａｓｔｍａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｋｉｎｇｓｐｏｒｔ，Ｔｅｎｎから入手可能なＣＡ３２０、ＣＡ３９８、ＣＡＢ３８１、ＣＡＢ５５１、ＣＡＢ５５３、ＣＡＰ４８２、ＣＡＰ５０４が挙げられる。そのようなセルロースエステルは、典型的には約１０，０００～約７５，０００の数平均分子量を有する。

【００８７】

セルロースエステルは、並びにセルロース及びセルロースエステルモノマー単位の混合

物を含み；例えば、市販のセルロースアセテートブチレートは、セルロースアセテートモノマー単位だけでなく、セルロースブチレートモノマー単位及びエステル化されていないセルロース単位も含む。

【００８８】

本発明のゲル／ヒドロゲルは、アクリレートポリマーなどの他の水膨潤性ポリマーから構成されていてもよく、これは通常アクリル酸、メタクリル酸、メチルアクリレート、エチルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、及び／または他のビニルモノマーから形成される。好適なアクリレートポリマーは、上に示したようなＲｏｈｍＰｈａｒｍａ（Ｇｅｒｍａｎｙ）から商品名「Ｅｕｄｒａｇｉｔ」として入手可能なコポリマーである。Ｅｕｄｒａｇｉｔシリーズ Ｅ、Ｌ、Ｓ、ＲＬ、ＲＳ、及びＮＥコポリマーは、有機溶媒に溶解されたものとして、水性分散液で、または乾燥粉末として入手可能である。好ましいアクリレートポリマーは、Ｅｕｄｒａｇｉｔ Ｌ及びＥｕｄｒａｇｉｔ Ｓシリーズのポリマーなどのメタクリル酸とメチルメタクリレートとのコポリマーである。特に好ましいそのようなポリマーは、Ｅｕｄｒａｇｉｔ Ｌ－３０Ｄ－５５及びＥｕｄｒａｇｉｔ Ｌ－１００－５５（後者のコポリマーは水で戻すことが可能なＥｕｄｒａｇｉｔ Ｌ－３０Ｄ－５５の噴霧乾燥形態である）である。Ｅｕｄｒａｇｉｔ Ｌ－３０Ｄ－５５及びＥｕｄｒａｇｉｔ Ｌ－１００－５５コポリマーの分子量は約１３５，０００Ｄａであり、フリーのカルボキシル基対エステル基の比率は約１：１である。コポリマーは、通常は５．５未満のｐＨの水性流体に不溶である。別の特に好適なメタクリル酸－メチルメタクリレートコポリマーはＥｕｄｒａｇｉｔ Ｓ－１００であり、これはフリーのカルボキシル基対エステル基の比率が約１：２である点でＥｕｄｒａｇｉｔ Ｌ－３０Ｄ－５５とは異なる。Ｅｕｄｒａｇｉｔ Ｓ－１００は５．５未満のｐＨで不溶であるが、Ｅｕｄｒａｇｉｔ Ｌ－３０Ｄ－５５とは異なり５．５～７．０の範囲のｐＨを有する水性流体に溶解しにくい。このコポリマーは、ｐＨ７．０以上で可溶である。Ｅｕｄｒａｇｉｔ Ｌ－１００も使用することができ、これが６．０未満のｐＨで不溶であることに関する限り、Ｌ－３０Ｄ－５５とＥｕｄｒａｇｉｔ Ｓ－１００の間のｐＨに依存した溶解性プロファイルを有する。Ｅｕｄｒａｇｉｔ Ｌ－３０Ｄ－５５、Ｌ－１００－５５、Ｌ－１００、及びＳ－１００を、同様のｐＨに依存した溶解性の特徴を有する他の許容可能なポリマーで置き換えられることは当業者に認識されるであろう。

【００８９】

本明細書に記載のゲル／ヒドロゲル組成物のいずれも、活性薬剤を含むように改良されてもよく、それにより身体の表面（例えば組織修復部位）に活性薬剤が伝達される関係において適用された場合に、活性薬剤送達システムとして機能する。本発明のこのヒドロゲル組成物の中に「装填」された活性薬剤の放出は、典型的には膨潤によって制御される拡散メカニズムによる水の吸収と薬剤の脱離の両方を含む。例えば、経皮薬物送達システム、創傷ドレッシング、局所医薬製剤、移植薬物送達システム、経口投与形態等において、活性薬剤を含むヒドロゲル組成物を用いることができる。

【００９０】

本発明のヒドロゲル組成物の中に組み込むことができ、全身に送達することができる（例えば経皮、経口、または薬剤の全身投与に適切な他の投与形態）好適な活性薬剤としては、これらに限定するものではないが、蘇生薬；鎮痛剤；麻酔薬；抗関節炎薬；抗喘息薬などの呼吸器作用薬；抗腫瘍薬などの抗がん剤；抗コリン作用薬；抗てんかん薬；抗うつ薬；抗糖尿病薬；止瀉薬；駆虫薬；抗ヒスタミン薬；抗高脂血症薬；抗高血圧症薬；抗生剤及び抗ウイルス薬などの抗感染症薬；抗炎症剤；抗片頭痛製剤；抗嘔吐薬；抗パーキンソン病薬；かゆみ止め；抗精神病薬；解熱剤；抗痙攣薬；抗結核剤；抗潰瘍薬；抗ウイルス薬；抗不安薬；食欲抑制剤；注意欠陥障害（ＡＤＤ）及び注意欠陥多動性障害（ＡＤＨＤ）薬；カルシウムチャンネル遮断薬、抗狭心症薬、中枢神経系（ＣＮＳ）作用薬、ベータ遮断薬、及び抗不整脈薬などの心臓血管薬；中枢神経系興奮薬；鬱血除去薬などの感冒薬；利尿薬；遺伝物質；薬草剤；ホルモン薬；催眠剤；血糖降下剤；免疫抑制剤；ロイコトリエン阻害剤；有糸分裂阻害因子；筋弛緩剤；麻薬拮抗薬；ニコチン；ビタミン、必須

アミノ酸、及び脂肪酸などの栄養剤；抗緑内障薬などの点眼薬；副交感神経遮断薬；ペプチド薬；精神刺激薬；鎮静薬；黄体ホルモン、エストロゲン、副腎皮質ホルモン、アンドロゲン、及び同化剤などのステロイド；禁煙補助薬；交感神経様作用薬；鎮静薬；並びに一般冠状動脈、抹消、及び脳などの血管拡張薬が挙げられる。本発明の接着性組成物との併用で有用な具体的な活性薬剤は、限定するものではないが、アナバシン、カプサイシン、硝酸イソソルビド、アミノスチグミン、ニトログリセリン、ベラパミル、プロプラノロール、シラボリン、フォリドン、クロニジン、シチシン、フェナゼパム、ニフェジピン、フルアシジン、及びサルブタモールが挙げられる。

【００９１】

局所用薬物の投与及び／または薬用クッション（例えば、薬用フットパッド）のためには、適切な活性薬剤としては、例えば以下のものが挙げられる。

【００９２】

静菌剤及び殺菌剤：好適な静菌剤及び殺菌剤としては、例えば、ヨウ素、ポビドンヨード複合体（すなわち、「ポビジン」とも呼ばれるＰＶＰとヨウ素の複合体であり、Ｐｕｒｄｕｅ Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋから商品名Ｂｅｔａｄｉｎｅとして入手可能である）、ヨウ化物塩、クロラミン、クロロヘキシジン、及び次亜塩素酸ナトリウム；スルファジアジン、アセチルタンニン酸プロテイン銀、硝酸銀、酢酸銀、乳酸銀、硫酸銀、及び塩化銀などの銀及び銀含有化合物；安息香酸トリ－ｎ－ブチルスズなどの有機スズ化合物；亜鉛及び亜鉛塩；過酸化水素及び過マンガンカリウムなどの酸化剤；ホウ酸フェニル水銀またはメルブロミンなどのアリール水銀化合物；チメロサールなどのアルキル水銀化合物；チモール、ｏ－フェニルフェノール、２－ベンジル－４－クロロフェノール、ヘキサクロロフェン、及びヘキシルレゾルシノールなどのフェノール；並びに、８－ヒドロキシキノリン、クロルキナルドール、クリオキノール、エタクリジン、ヘキセチジン、クロルヘキシジン、及びアンバゾンなどの有機窒素化合物、が挙げられる。

【００９３】

抗生剤：好適な抗生剤としては、これらに限定するものではないが、リンコマイシン系の抗生剤（最初にｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｌｉｎｃｏｌｎｅｎｓｉｓから回収された抗生剤の分類のことをいう）、テトラサイクリン系の抗生剤（最初にｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ａｕｒｅｏｆａｃｉｅｎｓから回収された抗生剤の分類のことをいう）、及び硫黄系抗生剤、すなわちスルホンアミドが挙げられる。リンコマイシン系の例示的な抗生剤としては、リンコマイシン、クリンダマイシン、例えば米国特許第３，４７５，４０７、３，５０９，１２７、３，５４４，５５１及び３，５１３，１５５に記載の関連化合物、並びにこれらの薬理学的許容可能な塩及びエステルが挙げられる。テトラサイクリン系の例示的な抗生剤としては、テトラサイクリン自体、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、デメクロサイクリン、ロリテトラサイクリン、メタサイクリン、及びドキシサイクリン、並びにこれらの薬理学的許容可能な塩及びエステル、特には塩酸塩などの酸付加塩が挙げられる。例示的な硫黄系抗生剤としては、これらに限定するものではないが、スルホンアミド スルファセタミド、スルファベンズアミド、スルファジアジン、スルファドキシン、スルファメラジン、スルファメタジン、スルファメチゾール、スルファメトキサゾール、並びにこれらの薬理学的に許容可能な塩及びエステル（例えばスルファセタミドナトリウム）が挙げられる。

【００９４】

鎮痛剤：好適な鎮痛剤は局所麻酔薬であり、限定するものではないが、アセトアミドオイゲノール、酢酸アルファドロン、アルファキサロン、アムカイン、アモラノン、アミロカイン、ベノキシネート、ベトキシカイン、ビフェナミン、ブピバカイン、ブレタミン、ブタカイン、ブタベン、ブタニリカイン、ブタリタール、ブトキシカイン、カルチカイン、２－クロロプロカイン、シンコカイン、コカエチレン、コカイン、シクロメチカイン、ジブカイン、ジメチソキン、ジメトカイン、ジペラドン、ジクロニン、エクゴニジン、エクゴニン、アミノ安息香酸エチル、塩化エチル、エチドカイン、エトキサドロール、．β．－オイカイン、オイプロシン、フェナルコミン、フォモカイン、ヘキソバルビタール、

ヘキシルカイン、ヒドロキシジオン、ヒドロキシプロカイン、ヒドロキシテトラカイン、ｐ－アミノ安息香酸イソブチル、ケンタミン、メシル酸ロイシノカイン、レボキサドロール、リドカイン、メピバカイン、メプリルカイン、メタブトキシカイン、メトヘキシタール、塩化メチル、ミダゾラム、ミルテカイン、ネパイン、オクタカイン、オルトカイン、オキセサゼイン、パレトキシカイン、フェナカイン、フェンシクリジン、フェノール、ピペロカイン、ピリドカイン、ポリドカノール、プラモキシン、プリロカイン、プロカイン、プロパニジド、プロパノカイン、プロパラカイン、プロピポカイン、プロポフォール、プロポキシカイン、プソイドコカイン、ピロカイン、リソカイン、サリチルアルコール、テトラカイン、チアルバルビタール、チミラール、チオブタバルビタール、チオペンタール、トリカイン、トリメカイン、ゾラミン、及びこれらの組み合わせが挙げられる。テトラカイン、リドカイン、及びプリロカインは本明細書において言及されている鎮痛剤である。

【００９５】

薬剤送達システムとして本発明のヒドロゲル組成物を使用して送達され得る他の局所薬としては：ウンデシレン酸、トルナフテート、ミコナゾール、グリセオフルビン、ケトコナゾール、シクロピロックス、クロトリマゾール、及びクロロキシレノールなどの抗真菌剤；サリチル酸、乳酸、及び尿素などの角質溶解薬；カンタリジンなどの発疱剤；有機過酸化物（例えば過酸化ベンゾイル）、レチノイド（例えばレチノイン酸、アダパレン、及びタザロテン）、スルホンアミド（例えばスルファセタミドナトリウム）、レゾルシノール、コルチコステロイド（例えばトリアムシノロン）、α－ヒドロキシ酸（例えば乳酸及びグリコール酸）、α－ケト酸（例えばグリオキシル酸）、並びに座瘡の処置のために具体的に指示される抗菌剤（アゼライン酸、クリンダマイシン、エリスロマイシン、メクロサイクリン、ミノサイクリン、ナジフロキサシン、セファレキシン、ドキシサイクリン、及びオフロキサシン等）などの抗座瘡剤；ヒドロキノン、コウジ酸、グリコール酸、及び他のα－ヒドロキシ酸、アルトカルピン、及び特定の有機過酸化物などの美白剤及び漂白剤；サリチル酸、イミキモド、ジニトロクロロベンゼン、スクアリン酸ジブチル、ポドフィリン、ポドフィロトキシン、カンタリジン、トリクロロ酢酸、ブレオマイシン、シドホビル、アデホビル、及びこれらの類似物質などのいぼを治療するための薬剤；並びに、コルチコステロイド及び非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）（ＮＳＡＩＤとしては、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、ナプロキセン、フェノプロフェン、ベノキサプロフェン、インドプロフェン、ピルプロフェン、カルプロフェン、オキサプロジン、プラノプロフェン、スプロフェン、アルミノプロフェン、ブチブフェン、フェンブフェン、及びチアプロフェン酸が挙げられる）などの抗炎症剤、が挙げられる。

【００９６】

創傷ドレッシングのためには、好適な活性薬剤は創傷の処置に有用なものであり、これらに限定するものではないが、静菌性化合物及び殺菌性化合物、抗生剤、鎮痛剤、血管拡張薬、組織治癒促進剤、アミノ酸、タンパク質、タンパク質分解酵素、サイトカイン、並びにポリペプチド増殖因子が挙げられる。

【００９７】

いくつかの活性薬剤の局所投与及び経皮投与のため、及び創傷ドレッシングにおいて、皮膚内にまたは皮膚を通過する薬剤の浸透速度を向上させるために、ヒドロゲル組成物に浸透促進剤を組み込むことが必要であるまたは望ましい場合がある。好適な促進剤としては、例えば：ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）及びデシルメチルスルホキシドなどのスルホキシド；ジエチレングリコールモノエチルエーテル（Ｔｒａｎｓｃｕｔｏｌとして販売）及びジエチレングリコールモノメチルエーテルなどのエーテル；ラウリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、塩化ベンザルコニウム、Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ（２３１、１８２、１８４）、Ｔｗｅｅｎ（２０、４０、６０、８０）、及びレシチン（米国特許第４，７８３，４５０）などの界面活性剤；１－置換アザシクロヘプタン－２－オン、特には１－ｎ－ドデシルシクラザ－シクロヘプタン－２－オン（Ｎｅｌｓｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ＆Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｃｏ．，Ｉｒｖｉ

ｎｅ，Ｃａｌｉｆ．から商品名Ａｚｏｎｅとして入手可能；米国特許第３，９８９，８１６、４，３１６，８９３、４，４０５，６１６、及び４，５５７，９３４を参照）；エタノール、プロパノール、オクタノール、デカノール、ベンジルアルコール等などのアルコール；ラウリン酸、オレイン酸、及び吉草酸などの脂肪酸；ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、プロピオン酸メチル、及びオレイン酸エチルなどの脂肪酸エステル；プロピレングリコール、エチレングリコール、グリセロール、ブタンジオール、ポリエチレングリコール、及びポリエチレングリコールモノラウレート（ＰＥＧＭＬ；例えば、米国特許第４，５６８，３４３を参照）などのポリオール及びそのエステル；尿素、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、２－ピロリドン、１－メチル－２－ピロリドン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、及びトリエタノールアミンなどのアミド及び他の含窒素化合物；テルペン；アルカノン；並びに有機酸、特に、サリチル酸及びサリチレート、クエン酸、及びコハク酸が挙げられる。２種類以上の促進剤の混合物も使用してもよい。

【００９８】

特定の別の実施形態においては、ゲル（例えば、ヒドロゲル成分）とナノ構造体とを含む本発明の複合材料組成物は、任意選択的な追加的な添加剤成分も含んでいてもよい。そのような成分は当該技術分野で公知であり、例えば充填剤、保存料、ｐＨ調節剤、軟化剤、増粘剤、顔料、染料、屈折性粒子、安定化剤、強化剤、粘着防止剤、医薬用薬剤（例えば、抗生剤、血管形成促進剤、抗真菌剤、免疫抑制剤、抗体など）、及び浸透促進剤を挙げることができる。これらの添加剤及びその量は、ヒドロゲル組成物の望ましい化学的特性及び物理的特性を有意に妨げないように選択される。

【００９９】

吸収性充鎮剤は、接着性物質が皮膚または他の身体表面上に存在する場合の水和の程度を制御するために有利に組み込まれる場合がある。そのような充填剤としては、微結晶セルロース、タルク、ラクトース、カオリン、マンニトール、コロイド状シリカ、アルミナ、酸化亜鉛、酸化チタン、ケイ酸マグネシウム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、疎水性デンプン、硫酸カルシウム、ステアリン酸カルシウム、リン酸カルシウム、リン酸カルシウム二水和物、紙織物、不織紙、及び綿材料が挙げられる。他の好適な充填剤は、不活性すなわち実質的に非吸収性であり、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリウレタンポリエーテルアミドコポリマー、ポリエステル及びポリエステルコポリマー、ナイロン、並びにレーヨンが挙げられる。

【０１００】

組成物は、１種以上の保存料も含有していてもよい。保存料としては、例えばｐ－クロロ－ｍ－クレゾール、フェニルエチルアルコール、フェノキシエチルアルコール、クロロブタノール、４－ヒドロキシ安息香酸メチルエステル、４－ヒドロキシ安息香酸プロピルエステル、塩化ベンザルコニウム、セチルピリジニウムクロリド、クロロヘキシジンジアセテートまたはグルコネート、エタノール、及びプロピレングリコールが挙げられる。

【０１０１】

組成物は、ｐＨ調節化合物も含有していてもよい。ｐＨ調節剤として有用な化合物としては、これらに限定するものではないが、グリセロール緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、リン酸緩衝液が挙げられ、あるいは、ヒドロゲル組成物のｐＨがそれぞれの身体表面に確実に適合するようにクエン酸－リン酸緩衝液が含められてもよい。

【０１０２】

組成物は、適切な軟化剤も含有していてもよい。好適な軟化剤としては、クエン酸トリエチルまたはアセチルクエン酸トリエチルなどのクエン酸エステル、酒石酸ジブチルなどの酒石酸エステル、グリセロールジアセテート及びグリセロールトリアセテートなどのグリセロールエステル；フタル酸ジブチル及びフタル酸ジエチルなどのフタル酸エステル；及び／または親水性界面活性剤、好ましくは、親水性の非イオン界面活性剤（例えば糖の脂肪酸部分エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪族アルコールエーテル、及びポリエチレングリコールソルビタン－脂肪酸エステルな

ど）が挙げられる。

【０１０３】

組成物は、増粘剤も含有していてもよい。本明細書における好ましい増粘剤は、天然由来の化合物またはその誘導体であり、例えば：コラーゲン；ガラクトマンナン；デンプン；デンプン誘導体及び加水分解物；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、及びヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体；コロイド状ケイ酸；並びに、ラクトース、サッカロース、フルクトース、及びグルコースなどの糖が挙げられる。ポリビニルアルコール、ビニルピロリドン－酢酸ビニル－コポリマー、ポリエチレングリコール、及びポリプロピレングリコールなどの合成増粘剤も使用することができる。

【０１０４】

特定の実施形態においては、ヒドロゲルとナノ構造体とを含む本発明のヒドロゲル複合材料は、血管新生を促進させる成分を更に含む。臨床的に関連する軟部組織の再生を達成するための本発明以前の課題は、再生された組織が好ましくは再び血管を新生する必要があるということである。したがって、軟部組織の再生を促進する任意の材料は、好ましくは血管新生も促進させる必要がある。これを達成するための方法の１つは、血管新生と組織形成を促す増殖因子を強化及び保持するための増殖因子結合部位として機能し得るヘパリン含有ヒドロゲル成分の使用によるものである。

【０１０５】

ヒアルロン酸（ＨＡ）はヒドロゲル材料であることから、様々な他の実施形態においては、本発明の複合材料は、ヒアルロン酸（ＨＡ）を主体としたものであってもよい。ＨＡは、ヒドロゲル成分を形成する繰り返し二糖単位を有する非硫酸化型の直鎖多糖である。ＨＡは、ヒト組織中の細胞外マトリックスの非免疫原性の天然成分でもあり、美容処置及び再建処置において皮膚用充填剤として広く使用されている。

【０１０６】

ＨＡの分解は、天然のヒアルロニダーゼによって促進され、この発現は、組織の損傷及び炎症の領域で増加する。重要なことには、研究により、３～１０個の二糖単位の小さいＨＡの分解断片が内皮細胞の増殖、遊走、細管形成、及び血管新生の有力な調節因子であることが示された。ＨＡのこれらの生物学的機能は、Ｒａｓ及びＰＫＣを含む経路においてＣＤ４４によって媒介されると考えられている。抗ＣＤ４４抗体を用いたＣＤ４４／ＨＡ相互作用の遮断により、生体外でヒト微小血管の内皮細胞の増殖及び遊走が減少した。ＨＡヒドロゲルは、細胞送達のための有望なマトリックスとして様々な細胞及び組織の損傷モデルにおいて研究されてきた。これらのヒドロゲルは、細胞を保護及び支持する足場構造体として機能することがき、また瘢痕形成も減らすことができる。そのため、ＨＡは、細胞浸潤及び血管新生の促進による組織再生の向上において重要な役割を有していると考えられる。

【０１０７】

第１に、材料は、３次元の完全性及び天然脂肪組織と似た粘稠度を有する。これにより、これは失われている軟部組織体積の既製品による回復に適したものとなる。第２に、材料は好ましくは、脂肪細胞及び内皮前駆細胞の遊走のための基材としての機能し得る複数の柔軟なナノファイバーと共に堆積され得る。第３に、材料は、これらの前駆細胞が足場構造体の周囲に線維被膜を形成せずに足場構造体内に速やかに浸潤して一体化することを可能にするのに十分な空隙率を有する。第４に、ＨＡヒドロゲル成分は、圧縮性及び体積膨張を与える一方で、重要な血管新生のきっかけも与える。第５に、ナノファイバーとヒドロゲル成分は生分解性であり、そのため再生される軟部組織と置き換えられることが可能である。第６に、全ての成分材料は、多くのＦＤＡ承認デバイスにおいて高い安全性の実績を有しており、臨床応用に対する規制のハードルを下げる潜在性を有している。

【０１０８】

本発明のゲル／ヒドロゲル／ナノ構造体複合材料は、上皮成長因子（ＥＤＦ）、ＰＤＧＦ、及び神経成長因子（ＮＧＦ）などの多数の増殖因子等の組織修復剤も含んでいてもよ

い。例えば、組成物はＥＧＦを含んでいてもよい。上皮成長因子（ＥＧＦ）は、実験用マウスの皮膚創傷が、マウスが傷をなめることを許容した場合の方が速やかに治癒するようであるという観察の後に発見された。これは、単に唾液中の少量の防腐剤（リゾチームなど）のためではなかった。特定の増殖因子（現在ＥＧＦとして知られている）が原因であることが示された。ＥＧＦはウロガストロンと同一であり、血管新生特性を有する。トランスフォーミング増殖因子－α（ＴＧＦ－．α．）は非常に類似しており、これは同じ受容体に結合し、上皮細胞の再生（上皮化）の刺激においていっそう効果的である。

【０１０９】

そのため、ＥＧＦ／ＴＧＦを含む本発明のヒドロゲルは、創傷治癒の加速及び火傷、ケロイドの瘢跡形成の低減（特に火傷について）、皮膚生着用ドレッシング、並びに慢性下肢潰瘍の処置において有利に使用することができる。

【０１１０】

本発明において有用な組織修復剤としては、上皮成長因子（ＥＤＦ）、ＰＤＧＦ、及び神経成長因子（ＮＧＦ）などの多数の成長因子が挙げられる。一般的に、成長促進ホルモンは１～４種の組織に影響を及ぼす。そのようなタンパク質から開発される製品の多くは１種類または別の種類の創傷修復を目的としたものであるが、他の適応症も存在する。最も重要な組織成長因子のいくつかを以下で詳しく述べる。

【０１１１】

本発明のゲル／ナノ構造体組成物は、本発明の組織修復方法及び他の用途に有用であり得る１種類以上の増殖因子も含んでいてもよい。

【０１１２】

例えば、本発明は、本発明の組成物にＰＤＧＦを含めることを想定している。血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）は、ほぼ全ての間葉由来細胞、すなわち、血液、筋肉、骨、軟骨、及び結合組織の細胞についての有糸分裂促進因子である。これは、ＡＡもしくはＢＢホモ二量体として、またはＡＢヘテロ二量体として存在する二量体型の糖タンパク質である。多くの増殖因子と同様、ＰＤＧＦは、より大きな因子のファミリーのメンバーであると現在考えられている。ＰＤＧＦに加えて、このファミリーには、ホモ二量体因子である血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）及び胎盤増殖因子（ＰＩＧＦ）、ＶＥＧＦ／ＰＩＧＦヘテロ二量体、及び結合組織増殖因子（ＣＴＧＦ）、ヒト血管内皮細胞及び線維芽細胞によって分泌されるＰＤＧＦ様因子が含まれる。ＮＧＦ、ＴＧＦ－．β．、及び糖タンパク質ホルモン（ヒト絨毛性ゴナドトロピンホルモン（ｈＣＧ）など）と共に、ＰＤＧＦは現在、システインノット増殖因子スーパーファミリーのメンバーとして分類されている。全てのこれらの因子は、本発明のヒドロゲルと共に使用することができる。

【０１１３】

ＰＤＧＦは血小板によって産生され、血液凝固の過程で放出される。これは、これらの細胞由来の増殖因子の１つにすぎない。ＰＤＧＦは、線維芽細胞及び白血球を損傷部位に引き付けるだけでなく、置換結合組織（主に線維芽細胞及び平滑筋細胞）の成長を刺激する。これは、様々な細胞（コラーゲンを産生するものなど）における細胞分裂を刺激し、そのため血管新生を促す。これは、有糸分裂誘発、血管収縮、走化性、酵素活性、及びカルシウム動員も刺激する。

【０１１４】

血小板由来増殖因子は、本発明の組成物を用いた特定の処置の際に骨及び軟部組織の再生を回復させるため、並びに慢性及び急性創傷の治癒過程を加速するために使用することができる。したがって、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、有利には、血小板由来増殖因子カクテルを含むものであってもよい。

【０１１５】

本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、例えばＰＤＧＦ遺伝子の局所送達のための遺伝子療法で使用されてもよい。ＰＤＧＦをコードするプラスミドＤＮＡは、ヒドロゲルマトリックス及び肉芽組織線維芽細胞（これは創傷周囲の生存可能な組織において発生し、マトリックスの中に増殖及び遊走する）の中に組み込まれ、プラスミド遺伝子の伝播及

び発現の標的としての機能を果たす。

【０１１６】

本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、血管新生を促進させるためのＶＥＧＦも含んでいてもよい。血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ－血管透過性因子としても知られている）は、もう１つの血管増殖因子であり、多機能性の血管新生サイトカインである。これは、内皮細胞の増殖を微小血管レベルで刺激してこれの遊走及び遺伝子の発現の変更を生じさせることによって、間接的及び直接的の両方で血管新生（血管成長）に寄与する。ＶＥＧＦはまた、これらの内皮細胞の透過性を亢進して血漿タンパク質を血管間隙外に放出させ、これにより領域内を変化させることで血管新生にも寄与する。

【０１１７】

本発明の組成物は、ＦＧＦも含んでいてもよい。線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）は、実際にはヘパリン結合増殖因子ファミリーに属する少なくとも１９　１４　１８ｋＤのペプチドのファミリーであり、培養した線維芽細胞及び血管内皮細胞に対して分裂促進性である。これらは生体内で血管新生性でもあり、この血管新生性はＴＮＦによって強化される。ＦＧＦはＥＧＦと同じような方法で使用することができる。ｂＦＧＦ（ＦＧＦ－２としても知られる）は、ヒト巨核球形成の制御に関与しており、ＦＧＦは内皮細胞形成の刺激及び結合組織修復の補助に有効であることが示されている。

【０１１８】

ヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、創傷治癒及び上皮細胞の破壊を伴う他の障害における使用のためのケラチノサイト成長因子（ＫＧＦ）（ＦＧＦ－７としても知られる）も含んでいてもよい。

【０１１９】

トランスフォーミング増殖因子（ＴＧＦ）は、様々な細胞株を形質転換させる能力を有し、例えば、培養状態で限定的な世代数よりも多く増殖する能力、単層ではなく多層に増殖する能力、及び異常な核型を獲得する能力を付与することができる。ＴＧＦファミリーには少なくとも５つのメンバーが存在し、最も広く研究されている２つはＴＧＦ－αとＴＧＦ－βである。前者は、線維芽細胞及び内皮細胞に対して分裂促進性であり、血管新生性であり、骨吸収を促進させる。組成物はＴＧＦも含んでいてもよい。ＴＧＦ－βは、細胞制御の一般的な媒介因子、細胞増殖の強力な阻害因子であり、また多くの細胞型の増殖を阻害する。ＴＧＦ－βは、他のペプチド増殖因子の分裂促進効果を拮抗させることができ、また、多くの腫瘍細胞株の増殖も阻害することができる。ＴＧＦ－βは血管新生効果も有しており、線維芽細胞におけるコラーゲン形成を促進させる。本発明のヒドロゲルの適応症としては、糖尿病患者の神経栄養性足部潰瘍などの慢性皮膚潰瘍が挙げられる。他の分野としては、創傷治療、骨の修復、及び免疫抑制性疾患が挙げられる。

【０１２０】

本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、例えば適切な細胞を担持するために使用されてもよい。有効性を最大限にするために、これらは創傷または他の適切な領域に適用する直前にゲルの中に組み込まれてもよい。好適な細胞としては、自己由来の線維芽細胞及びケラチノサイト（これらは主に真皮及び表皮の形成を担う）が挙げられる。それぞれが１つの細胞型を含む別々のゲルを連続的にまたは一緒に適用してもよく、あるいは１種類のゲルが両方の細胞型を含んでいてもよいが、これは通常あまり好ましくない。

【０１２１】

本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、有用には例えばコラーゲンを含むものあってもよい。コラーゲンはこの形態では有用な構造的な機能を果たしにくいものの、これは主としてタンパク質分解活性が望ましくないほど高い場合の犠牲タンパク質としての機能を果たし、それにより例えば健常組織の浸軟の防止に役立つ。

【０１２２】

ヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、特定の酵素も含んでいてもよい。酵素は、急性と慢性の両方の創傷の創面切除において使用される。創面切除は、創傷からの生存不能な組織及び異物の除去であり、創傷修復過程において自然に生じる事象である。炎症相の間に、

好中球及びマクロファージが、「使用済」血小板、細胞デブリ、及び無血管損傷組織を消化して創傷領域から除去する。しかしながら、多量の損傷組織が蓄積されると、この自然な過程は圧倒されて不十分になる。その場合、壊死組織の蓄積が創傷に対する多量の食細胞の需要を生じさせて創傷治癒を遅らせる。結果として、壊死組織の創面切除が局所療法の具体的な課題であり、最適な創傷管理の重要な要素である。

【０１２３】

酵素は、例えば選択的な創面切除法を得るために、局所適用のための本発明のヒドロゲル中に組み込まれてもよい。好適な酵素は、オキアミ、カニ、パパイア、ウシ抽出物、及び細菌などの様々な供給源由来であってもよい。市販の好適な酵素としては、コラーゲナーゼ、パパイン／尿素、及びフィブリノリジンとデオキシリボヌクレアーゼの組み合せが挙げられる。

【０１２４】

本発明における使用のための酵素は、通常、２つの様式：かさぶた成分（例えば、フィブリン、細菌、白血球、細胞デブリ、漿液性浸出液、ＤＮＡ）の直接消化による；または無血管組織を下部の創傷床に固定するコラーゲン「アンカー」の溶解による；のうちの１つで作用する。

【０１２５】

望まれる場合には、一般的には抗菌効果及び臭気抑制を与えるために、本発明のヒドロゲルはデーキン溶液を含んでいてもよい。創面切除用薬剤としては、デーキン溶液は、その細胞毒性の性質のため選択肢ではない。デーキン溶液はタンパク質を変性させ、創傷からより除去し易くする。かさぶたを剥がれ易くすることも、他の方法による創面切除を促進する。目的が創面切除である場合、デーキン溶液を含有するヒドロゲルは１日２回交換することができる。創傷周囲の皮膚の保護は、一般的に、例えば、軟膏、液状皮膚保護フィルムドレッシング、または固形板状皮膚保護剤を付与する必要がある。

【０１２６】

本発明のゲルは、シリンジもしくはベローズパックなどの任意の適切な方法によって（単回用量送達系）、または加圧送達系もしくは「缶に入った袋（ｂａｇ　ｉｎ　ｔｈｅ　ｃａｎ）」型のシステム（ＷＯ９８／３２６７５で公開されたものなど）による送達などの複数回用量システムによって送達されてもよい。ベローズパックの例は、公開ＵＫ意匠登録番号２０８２６６５に示されている。

【０１２７】

そのため、本発明は、創傷の治療のための本発明によるゲルを含む単回用量送達系にも拡張される。本発明は、本発明によるゲルを含む加圧送達系、及び、圧力をこれから解放するとスプレーを形成することができるエアロゾル容器内で加圧された本発明のヒドロゲルにも拡張される。このような送達手段を使用することによって、患者が横になっているときの患者の背部などの、他の方法では直接適用することによって到達させることが困難な患者の領域にゲルを送達することができる。

【０１２８】

特定の実施形態においては、生体用電極及び他の電気療法の状況における使用のために、すなわち、電極または他の導電性の部材を身体の表面に付着させるために、本発明のヒドロゲル組成物に導電性を付与することが有利な場合がある。例えば、ヒドロゲル組成物は、経皮的抹消神経刺激電極、電気外科的対極板、またはＥＫＧ電極を患者の皮膚または粘膜組織に付着させるために使用されてもよい。これらの用途は、導電性種を含むようにするためのヒドロゲル組成物の改質を伴う。好適な導電性種は、イオン伝導性の電解質、特には、皮膚または他の身体表面への適用のために使用される導電性接着剤の製造に通常使用されるものであり、イオン化可能な無機塩、有機化合物、または両方の組み合わせが挙げられる。イオン伝導性の電解質の例としては、これらに限定されるものではないが、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、酢酸モノエタノールアミン、酢酸ジエタノールアミン、乳酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、硫酸カルシウム、塩化リチウム、過

塩素酸リチウム、クエン酸ナトリウム、及び塩化カリウム、並びに、第二鉄塩と第一鉄塩（硫酸塩とグルコン酸塩など）の混合物などの酸化還元対が挙げられる。好ましい塩は塩化カリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、及び酢酸マグネシウムであり、ＥＫＧ用途のためには塩化カリウムが最も好ましい。事実上、任意の量の電解質が本発明の接着性組成物中に存在していてもよいが、任意の電解質は、ヒドロゲル組成物の約０．１～約１５重量％の範囲の濃度で存在することが好ましい。生体電極を製造するためのＮｉｅｌｓｅｎらの米国特許第５，８４６，５５８に記載の手順を本発明のヒドロゲル組成物での使用のために適合させることができ、この特許の開示は製造の詳細に関して参照により組み込まれる。当業者に認識されるであろうように、他の適切な製造手順も使用することができる。

【０１２９】

架橋

特定の用途のためには、特に大きい凝集強さが望まれる場合には、本発明のゲル／ヒドロゲルのポリマーを共有結合により架橋させてもよい。本開示は、架橋がゲル／ヒドロゲル成分のポリマー間にあることが望ましい場合があるが、架橋は、本発明の複合材料のゲル／ヒドロゲルのポリマーとナノ構造体成分との間にあることも望ましい場合があることが見込まれる。本発明は、ポリマー同士を互いに架橋させるため、及びゲル／ヒドロゲルのポリマーを本発明のナノ構造体成分と架橋させるための任意の適切な手段を想定している。ゲル／ヒドロゲルポリマーは、他のポリマーまたはナノ構造体に、分子内もしくは分子間のいずれかにまたは共有結合によって共有結合的に架橋されてもよい。前者の場合、ポリマーが他方とまたはナノ構造体と連結する共有結合は存在しないが、後者の場合は、ポリマーが他方とまたはナノ構造体と結合する共有結合性の架橋が存在する。架橋は、熱、照射、または化学硬化（架橋）剤を使用するなどの任意の適切な手段を使用して形成されてもよい。架橋度は、圧縮下でのコールドフローをなくすか少なくとも最小限にするのに十分である必要がある。架橋は、架橋プロセスで利用される第３の分子である「架橋剤」の使用も含んでいてもよい。

【０１３０】

熱架橋のためには、フリーラジカル重合開始剤が使用され、これは、ビニル重合に従来使用されている任意の公知のフリーラジカル生成開始剤であってもよい。好ましい開始剤は有機過酸化物及びアゾ化合物であり、通常重合性材料の約０．０１重量％～１５重量％、好ましくは０．０５重量％～１０重量％、より好ましくは約０．１重量％～約５％、最も好ましくは約０．５重量％～約４重量％の量で使用される。好適な有機過酸化物としては、ｔ－ブチルペルオキシド及び２，２ビス（ｔ－ブチルペルオキシ）プロパンなどのジアルキルペルオキシド、ベンゾイルペルオキシド及びアセチルペルオキシドなどのジアシルペルオキシド、ｔ－ブチルペルベンゾエート及びｔ－ブチルペル－２－エチルヘキサノエートなどのペルエステル、ジセチルペルオキシジカーボネート及びジシクロヘキシルペルオキシジカーボネートなどのペルジカーボネート、シクロヘキサノンペルオキシド及びメチルエチルケトンペルオキシドなどのケトンペルオキシド、並びにクメンヒドロペルオキシド及びｔｅｒｔ－ブチルヒドロペルオキシドなどのヒドロペルオキシドが挙げられる。好適なアゾ化合物としては、アゾビス（イソブチロニトリル）及びアゾビス（２，４－ジメチルバレロニトリル）が挙げられる。熱架橋のための温度は実際の成分に依存し、当業者によって容易に推測され得るが、典型的には約８０Ｃ～約２００Ｃの範囲である。

【０１３１】

架橋は、照射を用いて、典型的には光開始剤の存在下で行うこともできる。照射は、紫外線、α線、β線、γ線、電子ビーム、及びｘ線であってもよいが、紫外線が好ましい。有用な光増感剤は「水素引き抜き」型の三重項増感剤であり、ベンゾフェノン及び置換ベンゾフェノン、並びにアセトフェノン（ベンジルジメチルケタール、４－アクリルオキシベンゾフェノン（ＡＢＰ）、１－ヒドロキシ－シクロヘキシルフェニルケトン、２，２－ジエトキシアセトフェノン、及び２，２－ジメトキシ－２－フェニルアセト－フェノンなど）、２－メチル－２－ヒドロキシプロピオフェノンなどの置換α－ケトール、ベンゾイ

ンメチルエーテル及びベンゾインイソプロピルエーテルなどのベンゾインエーテル、アニソインメチルエーテルなどの置換ベンゾインエーテル、２－ナフタレンスルホニルクロリドなどの芳香族スルホニルクロリド、１－フェニル－１，２－プロパンジオン－２－（Ｏ－エトキシ－カルボニル）－オキシムなどの光活性オキシム、アルキル－及びハロゲン－置換チオキサントンなどのチオキサントン（２－イソプロピルチオキサントン、２－クロロチオキサントン、２，４ジメチルチオキサノン、２，４ジクロロチオキサノン、及び２，４－ジエチルチオキサノン）、並びにアシルホスフィンオキシドが挙げられる。２００～８００ｎｍ、好ましくは２００～５００ｎｍの波長を有する照射が本明細書における使用に好ましく、ほとんどの場合、架橋の誘導には低強度の紫外光で十分である。しかし、水素引き抜き型の光増感剤を用いる場合、十分な架橋を達成するためにはより高い強度のＵＶ露光が必要な場合がある。そのような露光は、ＰＰＧ、Ｆｕｓｉｏｎ、Ｘｅｎｏｎなどから入手可能なものなどの水銀灯処理装置によって得ることができる。架橋は、ガンマ線または電子ビームを照射することによっても生じさせることができる。適切な照射パラメータ、すなわち、有効な架橋のために使用される照射の種類及び照射量は、当業者に自明であろう。

【０１３２】

好適な化学硬化剤（化学架橋「促進剤」ともいう）としては、これらに限定されるものではないが、２，２－ジメルカプトジエチルエーテル、ジペンタエリスリトールヘキサ（３－メルカプトプロピオネート）、エチレンビス（３－メルカプトアセテート）、ペンタエリスリトールテトラ（３－メルカプトプロピオネート）、ペンタエリスリトールテトラチオグリコレート、ポリエチレングリコールジメルカプトアセテート、ポリエチレングリコールジ（３－メルカプトプロピオネート）、トリメチロールエタントリ（３－メルカプトプロピオネート）、トリメチロールエタントリチオグリコレート、トリメチロールプロパントリ（３－メルカプトプロピオネート）、トリメチロールプロパントリチオグリコレート、ジチオエタン、ジ－またはトリチオプロパン、及び１，６－ヘキサンジチーオルなどのポリメルカプタンが挙げられる。架橋促進剤は、その共有結合性の架橋を促進させるために未架橋の親水性ポリマーに、または２つの成分間の架橋を付与するために未架橋の親水性ポリマーと補足的なオリゴマーとのブレンド物に、添加される。

【０１３３】

ポリマー及び／またはナノ構造体は、補足的なオリゴマーとの混合前に架橋されてもよい。そのような場合、ポリマーへのモノマー型前駆体を多官能性コモノマーと混合して共重合させることによって架橋形態のポリマーを合成することが好ましい場合がある。モノマー型前駆体及び対応する高分子生成物の例は以下の通りである：ポリ（Ｎ－ビニルアミド）生成物のためのＮ－ビニルアミド前駆体；ポリ（Ｎ－アルキルアクリルアミド）生成物のためのＮ－アルキルアクリルアミド；ポリアクリル酸生成物のためのアクリル酸；ポリメタクリル酸生成物のためのメタクリル酸；ポリ（アクリロニトリル）生成物のためのアクリロニトリル；及びポリ（ビニルピロリドン）（ＰＶＰ）生成物のためのＮ－ビニルピロリドン（ＮＶＰ）。重合は、バルク、懸濁、溶液または乳化状態で行うことができる。溶液重合が好ましく、酢酸エチル及び低級アルカノールなど（例えばエタノール、イソプロピルアルコールなど）の極性有機溶媒が特に好ましい。親水性ビニルポリマーの合成のためには、合成は、典型的には、上述のフリーラジカル開始剤の存在下でのフリーラジカル重合法によって行われる。多官能性コモノマーとしては、例えば、ビスアクリルアミド、ブタンジオール及びヘキサンジオールなどのジオールのアクリル酸エステルまたはメタクリル酸エステル（１，６－ヘキサンジオールジアクリレートが好ましい）、ペンタエリスリトールテトラアクリレート及び１，２－エチレングリコールジアクリレートなどの他のアクリレート、並びに１，１２－ドデカンジオールジアクリレートが挙げられる。他の有用な多官能性の架橋性モノマーとしては、例えばポリ（エチレンオキシド）ジアクリレートまたはポリ（エチレンオキシド）ジメタクリレートなどのオリゴマー型及びポリマー型の多機能性（メタ）アクリレート；置換及び無置換のジビニルベンゼンなどのポリビニル系架橋剤；及びＥＢＥＣＲＹＬ２７０及びＥＢＥＣＲＹＬ２３０（それぞれ重量平均

分子量１５００及び重量平均分子量５０００のアクリレート化ウレタン、共にＳｍｙｒｎａ，Ｇａ．のＵＣＢから入手可能）などの二官能性ウレタンアクリレート；並びにこれらの組み合わせが挙げられる。化学架橋剤を使用する場合、使用量は、好ましくは親水性ポリマーに対する架橋剤の重量比が約１：１００～１：５の範囲となるような量である。より高い架橋密度を得るために、必要に応じて、化学架橋が照射による硬化と併用される。

【０１３４】

ナノ構造体

本発明のナノ構造体成分は、繊維、フィラメント、メッシュ断片、分岐したフィラメントもしくは網状構造、シート、または成形された粒子などの任意の適切な形態であってもよい。ナノ構造体は、本発明のナノ構造体とヒドロゲルのポリマーとの間の共有結合性架橋または非共有結合性架橋を促す任意の適切な化学官能基も含んでいてもよい。方法、手法、及び材料は、ナノ構造体の製造及び官能基化の技術分野で周知である。

【０１３５】

特定の実施形態においては、本発明のナノ構造体を作製するために微細加工法が使用される。様々な実施形態において、本開示のデバイスは、任意の適切な微細加工技術を用いて組み立て及び／または製造することができる。そのような方法及び技術は当該技術分野で広く知られている。

【０１３６】

本明細書に開示のナノ構造体の作製で使用することができる微細加工法としては、リソグラフィー；レーザー、プラズマエッチング、フォトリソグラフィー、または化学エッチング（湿式化学的、乾式、及びフォトレジスト除去など）などのエッチング技術；または３Ｄプリンティング（３ＤＰ）、光造形法（ＳＬＡ）、選択的レーザー焼結（ＳＬＳ）、衝撃粒子造形法（ＢＰＭ）、及び熱溶解積層法（ＦＤＭ）などの固体自由造形法によるもの；マイクロマシニングによるもの；シリコン熱酸化；電気めっき及び無電界めっき；ホウ素、リン、ヒ素、及びアンチモンの拡散などの拡散法；イオン注入；
；蒸発（フィラメント、電子ビーム、フラッシュ、並びにシャドウイング及びステップカバレッジ）、スパッタリング、化学蒸着（ＣＶＤ）、エピタキシー（気相、液相、及び分子線）、電気めっき、スクリーン印刷、積層などの膜堆積；またはその組合せが挙げられる。Ｊａｅｇｅｒ，Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｍｉｃｒｏｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ（Ａｄｄｉｓｏｎ－Ｗｅｓｌｅｙ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｒｅａｄｉｎｇ Ｍａｓｓ．１９８８）；Ｒｕｎｙａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｍｉｃｏｎｄｕｃｔｏｒ Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ Ｃｉｒｃｕｉｔ Ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ａｄｄｉｓｏｎ－Ｗｅｓｌｅｙ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｒｅａｄｉｎｇ Ｍａｓｓ．１９９０）；Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ ＩＥＥＥ Ｍｉｃｒｏ Ｅｌｅｃｔｒｏ Ｍｅｃｈａｎｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ １９８７－１９９８；Ｒａｉ－Ｃｈｏｕｄｈｕｒｙ，ｅｄ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｌｉｔｈｏｇｒａｐｈｙ，Ｍｉｃｒｏｍａｃｈｉｎｉｎｇ&Ｍｉｃｒｏｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ（ＳＰＩＥ Ｏｐｔｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｅｌｌｉｎｇｈａｍ，Ｗａｓｈ．１９９７）を参照のこと。モールドとして使用される材料の選択によって、どのように表面が構成されて分岐構造が形成されるかが決定される。

【０１３７】

例えば、フォトリソグラフィー法及び半導体産業由来の方法を利用する微小電気機械システム（ＭＥＭＳ）の製造のための最新技術を使用してもよい。比較的最近開発された方法としては、「ソフトリソグラフィー」（Ｗｈｉｔｅｓｉｄｅｓ ｅｔ ａｌ，Ａｎｇｅｗ ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ ｅｄ，３７；５５０－５７５，（１９９８））及びマイクロ流体テクトニクス（ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｔｅｃｔｏｎｉｃｓ）（米国特許第６，４８８，８７２，Ｂｅｅｂｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ；４０４：５８８－５９（２０００））が挙げられる。ポリマーマイクロデバイス製造の概説及び他の考察としては、Ｍａｄｏｕ，Ｍ．Ｊ．Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌｓ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ｏｆ Ｍｉｎｉａｔｕｒｉｚａｔｉｏｎ；２ｎｄ ｅｄ．；ＣＲＣ Ｐｒ

ｅｓｓ：Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，１９９７；Ｂｅｃｋｅｒ，Ｈ．，ａｎｄ Ｌｏｃａｓｃｉｏ，Ｌ．Ｅ．“Ｐｏｌｙｍｅｒ ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｄｅｖｉｃｅｓ．”Ｔａｌａｎｔａ，５６（２）：２６７－２８７，２００２；Ｑｕａｋｅ，Ｓ．Ｒ．，ａｎｄ Ｓｃｈｅｒｅｒ，Ａ．“Ｆｒｏｍ ｍｉｃｒｏ－ｔｏ ｎａｎｏｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ｓｏｆｔ ｍａｔｅｒｉａｌｓ．”Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９０（５４９６）：１５３６－１５４０，２０００；及びＷｈｉｔｅｓｉｄｅｓ，Ｇ．Ｍ．，ａｎｄ Ｓｔｒｏｏｃｋ，Ａ．Ｄ．“Ｆｌｅｘｉｂｌｅ ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ．”Ｐｈｙｓｉｃｓ Ｔｏｄａｙ，５４（６）：４２－４８，２００１が挙げられ、これらそれぞれは参照により本明細書に組み込まれる。

【０１３８】

本発明のナノ構造体は、静電紡糸（電界紡糸とも呼ばれる）によっても製造することができる。繊維を形成することができる液体及び／または溶液の電界紡糸の手法は周知であり、例えば米国特許第４，０４３，３３１及び５，５２２，８７９号などの多数の特許の中で報告されている。電界紡糸法は一般的に、液体から繊維を生じさせるために液体を電界に導入することを含む。これらの繊維は一般的に、回収のための誘引性の電位の導体へと引っ張られる。液体から繊維への変換の際に、繊維は固化及び／または乾燥する。この固化及び／または乾燥は、液体の冷却によって（すなわち、液体が室温で通常固体である場合）；例えば脱水（物理的に生じる固化）などの溶媒の蒸発によって；または硬化機構（化学的に生じる固化）によって、生じさせることができる。

【０１３９】

静電紡糸法は、典型的には、例えば米国特許第４，０４３，３３１に開示されているように、マットまたは他の不織材料を形成するための繊維の使用に関するものであった。直径５０ｎｍ～５マイクロメートルの範囲のナノファイバーを、不織ナノファイバーメッシュまたは整列したナノファイバーのメッシュへと電界紡糸することができる。小さい繊維径のため、電界紡糸された繊維製品は本質的に非常に大きい表面積及び小さい孔径を有している。これらの特性のため、電界紡糸された繊維製品は、メンブレン、組織足場構造体、及び他の生体用途などの多数の用途のための有望な候補となっている。

【０１４０】

静電紡糸された繊維は、非常に細い直径で製造することができる。電界紡糸繊維の直径、稠度、及び均一性に影響を及ぼすパラメータとしては、繊維を形成する組み合わせの中の高分子材料と架橋剤の濃度（添加量）、印加電圧、及びニードルとコレクター間の距離が挙げられる。本発明のある実施形態によれば、ナノファイバーは約１ｎｍ～約１００．ｍｕ．ｍの範囲の直径を有する。別の実施形態においては、ナノファイバーは約１ｎｍ～約１０００ｎｍの範囲の直径を有する。更に、ナノファイバーは、少なくとも約１０～約少なくとも１００の範囲のアスペクト比を有していてもよい。繊維の非常に小さい直径から、繊維が単位質量当たりの大きい表面積を有していることが認識されるであろう。この大きい表面積対質量比によって、繊維を形成する溶液または液体を、液体または溶媒和された繊維形成材料から固体のナノファイバーへと短時間で変換させることができる。

【０１４１】

本発明のナノファイバー／ナノ構造体を形成するために使用される高分子材料は、架橋剤と適合性のある任意の繊維形成材料から選択することができる。意図される用途に応じて、繊維を形成する高分子材料は、親水性、疎水性、または両親媒性であってもよい。更に、繊維を形成する高分子材料は、熱応答性高分子材料であってもよい。

【０１４２】

合成または天然の生分解性または非生分解性のポリマーが本発明のナノファイバー／ナノ構造体を形成してもよい。「合成ポリマー」とは、人工的に合成された、天然に存在しないモノマー単位を含むポリマーのことをいう。例えば、合成ポリマーは、アクリレート単位またはアクリルアミド単位などの非天然のモノマー単位を含んでいてもよい。合成ポリマーは典型的には、付加重合、重縮合、またはフリーラジカル重合などの従来の重合反応によって形成される。合成ポリマーには、非天然のモノマー単位（例えば合成のペプチ

ド、ヌクレオチド、及び糖誘導体）と組み合わされた天然のポリマー単位（天然のペプチド、ヌクレオチド、及び糖のモノマー単位など）を有するものも含めることができる。これらのタイプの合成ポリマーは、固相合成などの標準的な合成手法または組み換え（許容される場合）によって製造することができる。

【０１４３】

「天然ポリマー」とは、自然に、組み換えにより、または合成によって作製された、高分子主鎖が天然に存在するモノマー単位からなるポリマーのことをいう。いくつかの場合においては、天然ポリマーの化学的及び／または物理的な特性を変化させるために、天然ポリマーに対して修飾、加工、誘導体化、またはその他の処理が行われてもよい。これらの場合、「天然ポリマー」という用語は、天然ポリマーに対する変更を反映するように修飾される（例えば「誘導体化天然ポリマー」または「脱グリコシル化天然ポリマー」）。

【０１４４】

ナノファイバー材料は、例えば、ポリオレフィン、ポリアセタール、ポリアミド、ポリエステル、セルロースのエーテル及びエステル、ポリアルキレンスルフィド、ポリアリーレンオキシド、ポリスルホン、変性ポリスルホンポリマー、及びこれらの混合物などの、付加重合ポリマー材料と重縮合体材料の両方を含み得る。これらの一般分類に含まれる例示的な材料としては、ポリエチレン、ポリ（．ε．－カプロラクトン）、ポリ（ラクテート）、ポリ（グリコレート）、ポリプロピレン、ポリ（塩化ビニル）、ポリメチルメタクリレート（及び他のアクリル樹脂）、ポリスチレン、並びにこれらのコポリマー（ＡＢＡ型ブロックコポリマーを含む）、ポリ（フッ化ビニリデン）、ポリ（塩化ビニリデン）、様々な加水分解度（８７％～９９．５％）の架橋形態及び非架橋形態のポリビニルアルコールが挙げられる。典型的な付加重合ポリマーは、ガラス状になる傾向がある（室温より高いＴｇ）。これは、ポリ塩化ビニル及びポリメチルメタクリレート、ポリスチレンポリマー組成物、またはポリフッ化ビニリデン及びポリビニルアルコール材料についてのアロイもしくは低結晶化度の場合である。

【０１４５】

本発明のいくつかの実施形態においては、ナノファイバー／ナノ構造体材料はポリアミド重縮合体である。より具体的な実施形態においては、ポリアミド重縮合体はナイロンポリマーである。用語「ナイロン」は、全ての長鎖合成ポリアミドの総称である。別のナイロンは、少量の水の存在下でのεカプロラクタムの重縮合によって製造することができる。この反応により、直鎖ポリアミドであるナイロン－６が形成される（ε－アミノカプロン酸としても知られる環状ラクタムから製造される）。更に、ナイロンコポリマーも想定される。コポリマーは、反応混合物中で様々なジアミン化合物と、様々な二酸化合物と、様々な環状ラクタム構造を組み合わせ、次いでポリアミド構造中でランダムに位置したモノマー材料を有するナイロンを形成することによって製造することができる。例えば、ナイロン６，６－６，１０材料は、ヘキサメチレンジアミンと、二酸のＣ６及びＣ１０のブレンド物とから製造されるナイロンである。ナイロン６－６，６－６，１０は、εアミノカプロン酸と、ヘキサメチレンジアミンと、Ｃ６及びＣ１０の二酸材料のブレンド物との共重合によって製造されるナイロンである。

【０１４６】

ブロックコポリマーもナノファイバー材料として使用することができる。ナノファイバーの作製のための組成物の調製においては、溶媒系は、どちらのブロックも溶媒に可溶性であるように選択することができる。１つの例は、塩化メチレン溶媒中のＡＢＡ（スチレン－ＥＰ－スチレン）ポリマーまたはＡＢ（スチレン－ＥＰ）ポリマーである。そのようなブロックコポリマーの例は、スチレン／ブタジエン及びスチレン／水素化ブタジエン（エチレンプロピレン）などのＫｒａｔｏｎ型のＡＢ及びＡＢＡブロックポリマー、Ｐｅｂａｘ型のε－カプロラクタム／エチレンオキシド、並びにＳｙｍｐａｔｅｘ型のポリエステル／エチレンオキシド、及びエチレンオキシドとイソシアネートとのポリウレタンである。

【０１４７】

ポリフッ化ビニリデン、シンジオタクチックポリスチレン、フッ化ビニリデンとヘキサフルオロプロピレンとのコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリ酢酸ビニルなどの付加重合ポリマー、ポリ（アクリロニトリル）及びそのアクリル酸及びメタクリレートとのコポリマー、ポリスチレン、ポリ（塩化ビニル）及びその様々なコポリマー、ポリ（メタクリル酸メチル）及びその様々なコポリマーなどの非晶質付加重合ポリマーは、低圧及び低温で可溶性であるため、比較的容易に溶液紡糸することができる。ポリエチレン及びポリプロピレンのような高結晶性のポリマーは、溶液紡糸する場合には、一般的に高温高圧の溶媒が必要とされる。

【０１４８】

ポリマー混合物、アロイ形態、または架橋により化学的に結合した構造の状態の、２種以上の高分子材料を含有する高分子組成物からもナノファイバーを形成することができる。２種の関連するポリマー材料をブレンドすると有益な特性を有するナノファイバーを得ることができる。例えば、高分子量ポリ塩化ビニルを低分子量ポリ塩化ビニルとブレンドすることができる。同様に、高分子量ナイロン材料を低分子量ナイロン材料とブレンドすることができる。更に、異なる種類の一般的な高分子種をブレンドしてもよい。例えば、高分子量スチレン材料を、低分子量の耐衝撃性ポリスチレンとブレンドすることができる。ナイロン－６材料は、ナイロン－６；６，６；６，１０コポリマーなどのナイロンコポリマーとブレンドすることができる。更に、８７％加水分解されたポリビニルアルコールなどの低加水分解度のポリビニルアルコールを、９８～９９．９％及びそれ以上の加水分解度を有する完全にまたは高度に加水分解されたポリビニルアルコールとブレンドすることができる。混合物の状態の全てのこれらの材料は、適切な架橋機構を用いて架橋することができる。ナイロンは、アミド結合中の窒素原子と反応性である架橋剤を用いて架橋することができる。ポリビニルアルコール材料は、モノアルデヒド（ホルムアルデヒドなど）、尿素、メラミン－ホルムアルデヒド樹脂及びその類似体、ホウ酸及び他の無機化合物、ジアルデヒド、二酸、ウレタン、エポキシ、並びに他の公知の架橋剤などのヒドロキシル反応性材料を使用して架橋することができる。架橋剤は反応してポリマー鎖間に共有結合を形成し、分子量、耐薬品性、全体的な強度、及び機械的な分解に対する耐性を大幅に改善する。

【０１４９】

生分解性ポリマーも、本発明のナノ構造体の作製において使用することができる。生分解性材料として研究されてきた合成ポリマーの分類の例としては、ポリエステル、ポリアミド、ポリウレタン、ポリオルトエステル、ポリカプロラクトン（ＰＣＬ）、ポリイミノカーボネート、脂肪族カーボネート、ポリホスファゼン、ポリ無水物、及びこれらのコポリマーが挙げられる。例えば埋め込み可能な医療用デバイスと関連して使用することができる生分解性材料の具体的な例としては、ポリ乳酸、ポリグルコール酸、ポリジオキサノン、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）、ポリ（グリコリド－ｃｏ－ポリジオキサノン）、ポリ無水物、ポリ（グリコリド－ｃｏ－トリメチレンカーボネート）、及びポリ（グリコリド－ｃｏ－カプロラクトン）が挙げられる。これらのポリマーと他の生分解性ポリマーとのブレンド物も使用することができる。

【０１５０】

いくつかの実施形態においては、ナノファイバーは非生分解性ポリマーである。非生分解性とは、一般的に、非酵素的に、加水分解により、または酵素により分解されることができないポリマーのことをいう。例えば、非生分解性ポリマーは、プロテアーゼによって生じ得る分解に対して耐性を有する。非生分解性ポリマーには、天然と合成いずれのポリマーも含まれ得る。

【０１５１】

ナノファイバーを形成する組成物の中に架橋剤を含めることにより、ナノファイバーが様々な支持体表面と適合することが可能になる。架橋剤は、単独で使用されても、あるいは望ましい表面特性を付与する他の材料との組合せで使用してもよい。

【０１５２】

好適な架橋剤としては、照射、電気エネルギー、または熱エネルギーなどのエネルギー源に曝された場合に他の材料と共有結合を形成することができる少なくとも２つの潜在的に反応性である活性化可能な基を有する、モノマー系（小分子材料）材料と高分子系材料のいずれも挙げられる。通常、潜在的に反応性である活性化可能な基は、特定の印加された外部エネルギーまたは刺激に応答して、隣接する化学構造への得られる共有結合を有する活性種を生じさせる化学成分である。潜在的な反応性基は、貯蔵条件下ではその共有結合を保持しているが、外部エネルギー源によって活性化されると他の分子との共有結合を形成する基である。いくつかの実施形態においては、潜在的な反応性基は、フリーラジカルなどの活性種を形成する。これらのフリーラジカルとしては、ニトレン、カルビン（ｃａｒｂｉｎｅ）、または外的に印加された電気エネルギー、電気化学的エネルギー、もしくは熱エネルギーを吸収したケトンの励起状態を挙げることができる。公知のまたは市販の潜在的な反応性基の様々な例は、米国特許第４，９７３，４９３；５，２５８，０４１；５，５６３，０５６；５，６３７，４６０；または６，２７８，０１８の中で報告されている。

【０１５３】

例えば、Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｐｒｏｄｕｉｔｓ Ｃｈｉｍｉｑｕｅｓ Ａｕｘｉｌｉａｉｒｅｓ ｅｔ ｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｅｓ，（Ｌｏｎｇｊｕｍｅａｕ，Ｆｒａｎｃｅ），Ｓｈｉｎ－Ｎａｋａｍａｒａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｍｉｄｏｒｉ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｃｏ．，Ｌｔｄ．、またはＰａｎｃｈｉｍ Ｓ．Ａ．（Ｆｒａｎｃｅ）のいずれかから入手可能な、トリクロロメチルトリアジンを主成分とする市販の多官能性光架橋剤を使用することができる。８種の化合物には、２，４，６－トリス（トリクロロメチル）－１，３，５トリアジン、２－（メチル）－４，６－ビス（トリクロロメチル）－１，３，５－トリアジン、２－（４－メトキシナフチル）－４，６－ビス（トリクロロメチル）－１，３，５－トリアジン、２－（４－エトキシナフチル）－４，６－ビス（トリクロロメチル）－１，３，５－トリアジン、４－（４－カルボキシルフェニル）－２，６－ビス（トリクロロメチル）－１，３，５－トリアジン、２－（４－メトキシフェニル）－４，６－ビス（トリクロロメチル）－１，３，５－トリアジン、２－（１－エテン－２－２’－フリル）－４，６－ビス（トリクロロメチル）－１，３，５－トリアジン、及び２－（４－メトキシスチリル）－４，６－ビス（トリクロロメチル）－１，３，５－トリアジンが含まれる。

【０１５４】

使用方法及び例示的な実施形態

本発明のゲル／ヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、数々の組織修復の状況、並びにカテーテル及び他の手術用デバイス及びインプラント上にコーティングを設けるなどの他の用途において有利に使用することができる。本発明のゲル／ヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、抗生剤、増殖因子、及び免疫抑制剤などの本明細書に記載の活性薬剤を送達するためにも使用することができる。

【０１５５】

特定の実施形態においては、本発明は、複合材料を軟部組織の欠損に適用することを含む軟部組織の欠損の治療方法であって、複合材料がゲルとゲルの中に配置されたナノ構造体とを含む方法を提供する。

【０１５６】

本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物の有利な特性には：１）容易な特性評価及び品質管理を与える能力；２）既存の組織マトリックスと一体化する能力；３）新たに形成されたマトリックスに直接組み込む能力；４）細胞及び生体活性な因子を直接的に含む能力；５）生体適合性を維持する能力；６）生体内吸収を制御する能力；７）ナノ構造体の大きな構造的剛性による複雑な解剖学的形状へと成形し易い能力；並びに８）関節軟骨などの天然組織の機械的特性を示す能力；が含まれることが認識されるであろう。

【０１５７】

ある用途においては、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材料組成物は、軟骨組織を

修復するために使用することができる。軟骨修復のための現行の生物学に基づく外科的処置としては、自己由来軟骨細胞の移植、ドリリング、摩耗軟骨形成術、マイクロフラクチャー、及びモザイク関節形成術が挙げられる。全てのこれらの処置は病巣の関節軟骨の損傷部のみを治療し、重度の変形性関節症及び関節リウマチでみられるような軟骨が露出した関節表面は治療しない。また、これらは、軟骨欠損部を充填するために患者から採取された軟骨組織プラグまたは拡張軟骨細胞のいずれかを使用する。これらの組織または軟骨細胞は、既存の軟骨マトリックスと一体化され、正常な軟骨の生物機械的特性を有する、新たに合成されるヒアリン軟骨などの完全に新たな材料を合成することによって欠損を充填することが期待されている。しかし、このような処置は全て、真のヒアリン軟骨ではなく修復性組織（線維軟骨）の形成を促し、また関節に変形性関節症を生じやすくすると考えられている線維軟骨に対する機械的な損傷を伴う。更に、修復材料としての内在性軟骨の利用可能性はかなり限定的であり、その採取は患者自身のリスク及び病的な状態を与える。上の考察から明らかなように、本明細書に開示の得られるヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、軟骨変性性疾患に罹患している患者における有望な新しい治療法のための実用的な材料を提示する。

【０１５８】

本明細書に記載のように、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、任意の数の合成組織の埋め込みまたは増加、並びに他の臨床用途に適した幅広い特性を有するように作製することができる。既述のように、本発明の材料は、損傷または疾患のいずれかの結果生じた軟骨欠損を修復するために使用することができる。そのように修復され得る損傷による欠損は、スポーツ関連または事故関連のものであってもよく、また軟骨表面層のみを含むものであっても、または下にある軟骨下骨を含むものであってもよい。本明細書に記載の組成物を用いて修復され得る疾患による欠損としては、変形性関節症及び関節リウマチに起因するものが挙げられる。傷害によるものと疾患によるもののいずれかに関わらず、そのような欠損は、成熟軟骨と成長板軟骨のいずれにおけるものであってもよい。人工成長板軟骨用のヒドロゲルのための配合物は、成長時の生体材料の制御された生体内吸収を可能にするために無置換の足場構造体材料を組み込むことが必要な場合がある。

【０１５９】

本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物が有用な場合がある別の分野は、頭頸部の軟骨性組織及び軟部組織の修復、再建、または増大である。軟部組織の増大及び頭頸部の再建のための生体材料の利用可能性は、依然として形成外科手術及び再建手術の分野の根本的な課題である。適切な生体適合性及び寿命を有する材料の開発に対して相当量の研究及び投資が行われてきた。この研究の結果は有望なものではなかった。免疫応答性動物に入れた場合、現在提案されている材料の構造的完全性は、骨格が吸収されるため損なわれることが示されている。更に、従来の合成材料は優れた寿命を示すものの、これらは特定の避けられない潜在的な危険を有している。例えば、シリコンは安全性及び長期的な免疫関連の影響の懸念を伴う。合成ポリマーであるＰＴＦＥ（ゴアテックス）及びシラスティックは、組織反応性は低いものの、組織との一体化を生じず、異物感染及び突出の長期的なリスクを示し得る。本出願に記載の材料は、頭頸部の軟部組織欠損の増強または修復のための合成の軟部組織足場構造体材料の作製に有用である。特に、非炎症性であり、非免疫原性であり、適切な程度の粘弾性（本明細書の記載を参照のこと）を有するように作製することができるヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、効果的な埋め込み可能な足場構造体材料として使用できるであろう。

【０１６０】

更に、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、多くの場合外傷または先天性異常の副次的な軟骨欠損または骨欠損を修復するための頭頸部の再建処置において使用される軟骨用インプラントを作製するための、例えば新規な生体適合性かつ生体に関する規格に準拠した材料として使用することができる。耳に固有の用途としては耳形成術及び耳介再建が挙げられ、これらは多くの場合、外傷、新生物（すなわち扁平上皮癌、基底細胞癌、及びメラノーマ）、及び小耳症などの先天性の欠損による軟骨の欠損を修復するために行わ

れる。鼻に特有の用途としては鼻及び鼻中隔の美容目的の処置及び再建処置が挙げられる。鼻のハンプ部の増大、先端、シールド、及びスプレッダーグラフトが美容目的の鼻形成術によく使用される。外傷、新生物、自己免疫疾患（ウェゲナー多発血管炎性肉芽腫症など）または先天性の欠損後の鼻の再建には、修復のための軟骨が必要とされる。中隔穿孔は管理が困難であり、多くの場合、治療が失敗する。自己由来のまたはドナーの軟骨は多くの場合利用できないことから、軟骨移植片は、これらの用途に理想的であろう。喉に固有の用途としては喉頭気管再建が挙げられ、これは小児においては通常肋軟骨の採取を必要とし、この採取は不健康な状態を必ず伴う。耳介軟骨及び中隔軟骨は多くの場合、この用途には不十分である。本明細書の開示のヒドロゲルから作製される合成軟骨材料は、試薬濃度、置換、及び架橋率などのヒドロゲルの合成パラメータの微調整に基づいて上述の用途それぞれに適するように合成することができる。喉頭気管再建は、通常、声門下または気管狭窄による気道狭窄に対して行われる。病因は外傷性（すなわち、挿管による外傷または気管切開術）であっても特発性であってもよい。他の可能性としては、数多くの頭顔用途に加えて顎及び頬の増大、並びに下眼瞼の眼瞼外反の修復における使用が挙げられる。これらの用途は、関節軟骨の厳格な機械的特性を有する軟骨が必要でない場合もあることに留意すべきである。細胞集団または生体活性な薬剤を組み込むことが望ましい場合もある。

【０１６１】

本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、感染及びかさぶたの形成を生じさせる鼻腔内に流体が慢性的に溜まることを予防するために、通常は過度に積極的な外科的切除の後、鼻腔の修復及び狭小化のためにも使用することができる。別の有望な用途は、例えば心臓血管手術などの外科的処置の際の挿管による喉頭気管損傷の結果としての小児及び成人両方の喉頭気管再建におけるものである。本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、がんによる頸部切除後の頸動脈を保護するための環状軟骨代用材を提供するために使用することもできる－本発明の組成物は、頸動脈と皮膚との間に、皮膚バリアの喪失に対する頸動脈の保護バリアとして配置することができる。切除された神経の神経細胞再増殖中の保護コーティングとして－多くの場合線維組織は神経細胞の再増殖よりも速く形成し、その最終的な形成が妨げられる。本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物の予め成形されたチューブ内に神経末端を配置すると、再増殖部位からの線維性組織の形成をなくすことができるであろう。

【０１６２】

本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、任意の内部器官または外部器官の軟部組織の欠損の修復のためにも使用することができる。例えば、本発明の材料は、数多くの頭蓋顔面の用途に加えて、顎及び頬の増大並びに下眼瞼の眼瞼外反修復における使用のために使用することができる。頭頸部以外の部位での美容目的及び再建目的については、例えば豊胸のための乳房インプラントとしての使用、例えば、乳房または首のリンパ節除去（すなわちがんによる）後にできた空隙を充填し、リンパ管を封止して切除部位内への制御不能な体液の排出（これは、感染及び他の合併症を生じさせ得る）を減少させるための創傷用シーラントとしての使用である。

【０１６３】

上の使用に加えて、本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、人工形態の軟骨の合成について上述したものと同様の戦略及び方法論を使用して、骨、腱、靭帯、半月板、及び椎間板などの（ただしこれらに限定されない）合成の整形外科用組織を製造するための他の組織工学用途において使用することができる。ヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、人工形態の軟骨の合成について上述したものと同様の戦略及び方法論を使用して、声帯、硝子体、心臓弁、肝臓、膵臓、及び腎臓などの（ただしこれらに限定されない）合成の非整形外科用組織を製造するためにも使用することができる。

【０１６４】

本明細書に開示のヒドロゲル／ナノ構造体組成物が使用され得る別の分野は、腹部または胃腸の器官の瘢痕組織または狭窄の形成を処置または予防することが必要とされる胃腸

用途である。既に様々な臨床段階及びＦＤＡ承認段階の数多くの製品が存在しており、これらは一般的に「ヒドロゲル」と呼ばれており、瘢痕形成及び／または狭窄形成の処置及び予防において有用であるように設計または意図されている。本発明の材料は、ヒドロゲル材料に支持、形状、及び強度を付与することができるナノ構造体を本開示のものが含み得るという点で、他の公知のヒドロゲルよりも優れている。本明細書に開示のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、胃腸管の狭窄または瘢痕の処置のためなどの、既に公知のヒドロゲルが使用されるか使用が意図されるものと同様の用途において使用することができる。処理には、予測される狭窄部位での瘢痕形成を予防するためのヒドロゲル材料の注入、または治療後の既存狭窄部位での狭窄の再発を予防するために狭窄胃腸管を拡張するためのヒドロゲル材料の注入が含まれる。

【０１６５】

本発明の材料は、食道狭窄の処置のためにも使用することができる。食道狭窄は、胃食道逆流疾患（ＧＥＲＤ）の一般的な合併症である。ＧＥＲＤは、酸、胆汁、及び他の有害な胃内容物が食道に逆流して食道の内層細胞を傷付けることによって生じる。ＧＥＲＤ患者の約７～２３％に食道狭窄または食道の線維性瘢痕が起こる。食道瘢痕は、バレット食道を処置するために使用されるアブレーション治療によっても生じ得る。そのようなアブレーション治療の主な合併症は、アブレーションによる傷害が食道壁に深く広がりすぎて、食道の瘢痕または狭窄が生じることである。食道狭窄によって正常な嚥下が妨げられ、患者の不健康な状態の大きな原因となる。本明細書に記載の材料は、ＧＥＲＤ、バレット食道、及び食道アブレーション治療に起因する食道狭窄を処置または予防するために使用することができる。

【０１６６】

本発明の複合材料は、クローン病の治療のためにも使用することができる。クローン病は、腸管腔を閉塞するか狭める狭窄または瘢痕を生じさせ、正常な腸の機能を妨げる。本発明の材料は、そのような狭窄を処置または予防するために有用な場合がある。

【０１６７】

複合材料は、原発性硬化性胆管炎（ＰＳＣ）を治療するための方法においても使用することができる。ＰＳＣは、肝臓の胆管の希少疾患である。胆管は、肝臓内で分岐網状構造を形成しており、２つの主要な分岐を通って肝臓を出る。２つの主要な分岐は、胆汁を肝臓及び胆嚢から十二指腸内に排出する共通の胆管へと結合する。胆管は直径が非常に狭く、通常、最も大きな遠位部分で最大でもわずか２ｍｍであるが、これらは毎日肝臓から十二指腸内に何リットルもの胆汁を正常に排液しなければならない。これらの管になんらかの閉塞が生じると、黄疸として知られる重篤な状態になる場合があり、これによって多くの毒素及び特にはヘモグロビン分解生成物が体内に蓄積される。ＰＳＣは、肝臓内の胆管の、及び肝臓を小腸と連結する上述の肝外胆管における、瘢痕または構造を形成する疾患である。ＰＳＣの胆管狭窄は、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物を用いて処置または予防することができる。

【０１６８】

本発明の複合材料は、慢性膵炎を治療するためにも使用することができる。慢性膵炎は、膵管の瘢痕または狭窄の合併症を併発し得る膵臓の慢性の炎症性疾患である。これらの狭窄によって膵液（これは、通常は管または排液路のシステムを通って膵臓から小腸内に出て行かなければならない）の排出が遮られる。膵液には、多くの消化酵素、並びに正常な消化及び栄養分の吸収に重要な他の要素が含まれている。慢性膵炎による膵管の閉塞または狭窄により、膵臓が自己消化されて、生命を脅かす腹部感染及びまたは膿瘍が形成される重度の合併症が生じ得る。慢性膵炎の膵臓狭窄は、本発明のヒドロゲルを用いて処置または予防することができる。

【０１６９】

本明細書に記載の組成物は、胆石により生じる胆管及び膵管の狭窄の処置のためにも使用することができる。胆石は非常に一般的な疾患であり、その主な合併症は胆管及び膵管の狭窄の形成である。これはヒドロゲルを用いて処置または予防することができる。虚血

性腸疾患の治療のため。血液の供給が損なわれた場合、腸に瘢痕または狭窄が形成され易い。血流障害は虚血と呼ばれ、これは、心臓血管疾患、アテローム性動脈硬化、高血圧、血液量減少症、腎疾患もしくは肝疾患により生じる低アルブミン血症、血管炎、薬物により生じる疾患、及び多くの他のものなどの多くの病状によって引き起こされる場合がある。これらの病因の全ての末期の結果は、腸を閉塞させてその正常な機能を妨げる腸狭窄を生じさせ得る。本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材料は、虚血性腸狭窄を処置または予防するために使用することができる。

【０１７０】

本発明の組成物は、放射線により生じる腸狭窄の処置にも使用され得る。がんの放射線療法は数多くの不健康な状態と関連しており、中でも重要なのは腸狭窄の形成である。本発明のヒドロゲル複合材料は、放射線により生じる腸狭窄を処置または予防するために使用することができる。

【０１７１】

合成組織の作製または天然組織の修復に加えて、本明細書に開示のヒドロゲル／ナノ構造体複合材料は、手術器具、またはセラミック製もしくは金属製のプロテーゼなどの、生体内埋め込みのために手術またはその他で使用される非生物学的構造体またはデバイスをコーティングするためにも使用することができる。そのようなコーティングは、非生物学的なデバイス材料と生体組織との間にバリアを付与するであろう。非生物学的デバイスに対するバリアとしてのヒドロゲルの役割としては、これらに限定するものではないが：１）高分子及び／または細胞（これらはデバイス表面上のタンパク質付着物または血栓症を生じさせ得る）の非生物学的デバイスの表面上への吸収の防止；２）無毒性、非炎症性、非免疫原性、生体適合性の表面を、付与しない場合に生体適合性ではない材料で作製されたデバイスに付与すること；３）グルコースセンサーに対するグルコースの拡散、圧力センサーのための機械的な力の伝達、または血管グラフトもしくはステントの内皮化などの、デバイス機能との適合性、；４）ＭＥＭＳに基づいた人工ネフロン中の既存の大きさのバリアに対する電荷バリアの付与などのデバイス機能の強化；５）水性の生理学的に適合性のある環境内に捕捉された生存細胞集団の非生物学的デバイス内への組み込み；並びに、６）デバイスの血管新生、上皮化、または内皮化を促すように設計された、薬物または生体活性因子（増殖因子、抗ウイルス剤、抗生剤、または接着分子など）の組み込み、が挙げられる。

【０１７２】

前述のことに基づき、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材料は、糖尿病の管理のための埋め込み可能なグルコースセンサーなどの様々な埋め込み可能なデバイスに非アレルギー性コーティングを付与するために使用されてもよい。また、ヒドロゲル／ナノ構造体複合材料は：ＭＥＭＳに基づいた人工ネフロンの開発のための電荷バリア；有足細胞などの埋め込まれた腎細胞をＭＥＭＳに基づいた人工ネフロンの設計の中に組み込むことができる、水性の生理学的に適合性がある環境；並びに、薬物送達、機械的感知、及びバイオ検出システムとしてなどの（ただしこれらに限定されない）様々な目的のために設計された埋め込み可能なＭＥＭＳデバイスのためのコーティング；を付与するために使用することができる。

【０１７３】

本開示のヒドロゲル／ナノ構造体複合材料、特にはヒアルロナンを主成分とするヒドロゲルは、シリコンを主体とするデバイスに、例えばシリコン表面へのチラミンの１級アミンの第１の共有結合を介して共有結合的に連結することで、ヒドロキシフェニルで被覆された表面化学構造を付与することもできる。これは、遊離アミンで修飾されたＤＮＡをシリコン表面に結合させるために使用されるものと同じ化学構造を使用してもよい。次いで、ＨＡを主成分とするヒドロゲルが、ヒドロキシフェニルで被覆された表面に、上述の好ましい架橋方式で使用されるものと同じペルオキシダーゼによって促進される化学によって共有結合的に連結される。

【０１７４】

ヒドロゲル／ナノ構造体複合材料は、カテーテル、ステント、及び血管グラフトなどの非生物学的な心臓血管デバイスのコーティングにも使用することができる。これらには、その生体不適合性のために従来は使用されていなかったものの現在使用されているデバイスよりも優れた設計特性を有している材料から製造されるデバイスも含まれるであろう。ヒドロゲルの、及びその結果としての埋め込まれたデバイスの内皮化または上皮化を促すための、生体活性因子をヒドロゲルに組み込むこともできるであろう。

【０１７５】

本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材料についての具体的な例及び使用を本明細書で説明してきたが、このような具体的な使用は限定を意味しない。本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材料は、公知のヒドロゲルについて一般的に使用されている任意の用途のために使用することができ、特には、身体の任意の場所の軟部組織の修復及び／または再生に有用である。

【０１７６】

ここで図面を参照するが、これらの中で、同様の参照番号は、主題の開示の同様の構造的特徴または態様を識別する。説明及び例示のため、限定するものではないが、本開示による生分解性複合材料のある実施形態の説明図を図１Ａに示し、通常は参照符号１００と表示する。本明細書に記載の系及び方法は、軟部組織の欠損の治癒を強化するために使用することができる。

【０１７７】

概略的に図１Ａ～１Ｄを参照すると、生分解性複合材料１００は、ゲル１０３とナノファイバー１０１の両方の利点を兼ね備えている、ナノファイバー１０１で強化されたゲル１０３を含み得る。ゲル１０３は、限定するものではないが、ヒドロゲルなどの任意の適切な材料を含み得る。ナノファイバー１０１は、例えばポリカプロラクトン（ＰＣＬ）または任意の他の適切な材料などの任意の適切なナノ材料から作製されたものであってもよく、また任意の適切な形状及び／またはサイズであってもよい。複合材料１００は、十分な機械的特性（例えば完全性及び組織の支持を維持するため）を維持しつつも高い空隙率（例えば細胞の付着及び遊走を媒介するため）を有する。

【０１７８】

少なくとも一部の実施形態においては、ナノファイバー１０１は、１つ以上のポリマー鎖を形成しているヒドロゲル１０３に共有結合により結合されている。ヒドロゲル１０３のナノファイバー１０１への共有結合により、単独で使用された成分材料または単純なブレンド物としてのものよりも優れた、組み合わされた一組の理想的な特性を有する材料を得ることができる。

【０１７９】

図２Ａは、同じ架橋密度のヒドロゲルと比べて改善された弾性率を示す、ＨＡヒドロゲル単独に対してプロットされた、図１の複合材料のある実施形態の応力－歪み曲線を示している。示されているように、試験した複合材料１００（４．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ，１０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧ－ＤＡ，６．７５ｍｇ／ｍｌのＰＣＬ繊維）の弾性率は７５０Ｐａであり、同じ密度のヒドロゲル単独は３２０Ｐａであった。図２Ｂは、図１に示されている複合材料が通常のヒドロゲルと比較して同程度のロバスト性の機械的完全性の堅牢性を保持していることを示す疲労試験を示す。

【０１８０】

図３Ａ～３Ｂを参照すると、複合材料１００は、脂肪組織由来幹細胞（ＡＳＣ）の遊走をサポートすることが示された。脂肪吸引の吸引物由来のＧＦＰで標識したＡＳＣを培養してスフェロイドにし、次いで、複合材料またはヒドロゲルの中に播種した。

【０１８１】

図３Ａ及び３Ｂは、ナノファイバー－ＨＡヒドロゲル複合材料の中で４日間培養したＡＳＣの蛍光及び位相差画像（図３Ｂ）とのオーバーレイ（図３Ａ）を示す。細胞は外方に遊走し、長い突起及び軌跡が延在している。対照的に、図３Ｃ及び３Ｄに示されているＨＡヒドロゲル単独の中で培養されたＡＳＣは有意な細胞遊走を示さなかった。

【０１８２】
図４Ａ及び４Ｂは、整列した６５０ｎｍのナノファイバー１０１に沿ってスフェロイドから遊走しているＡＳＣを対比する蛍光画像及び位相差画像（図４Ｂ）とのオーバーレイ（図４Ａ）を示し、ナノファイバー１０１の存在に対する強い遊走応答を示している。
【実施例】
【０１８３】
実施例１：複合材料手術用足場構造体デバイスの作製
ナノファイバーは、ＰＣＬ（ポリカプロラクトン，Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈの８０ｋ）の電解紡糸によって製造した。ナノファイバーをランダムなメッシュへと紡糸した。紡糸パラメータは、９０％／１％ｗ／ｗのＤＣＭ－ＤＭＦ中の１０重量％ＰＣＬ溶液とし、ターゲット金属プレートから１５ｃｍの２７ゲージブラントニードルを０．６ｍｌ／時の流速で通した。ニードル電圧を＋１０ｋＶにし、ターゲットプレートを－３ｋＶの電圧で負バイアスにした。各ナノファイバーシートの１ラウンドあたり１ｍＬの溶液を紡糸した。
【０１８４】
その後、繊維を多工程プロセスによって官能基化した。簡潔にいうと、繊維をプラズマ処理して繊維表面上に反応性基を有するようにし、これに、ＵＶ光によって開始することによりアクリル酸を結合させた。次いで、アクリレート基をＥＤＣ及びジアジミン（ｄｉａｚｉｍｉｎｅ）と反応させて１級アミンを形成した。その後、これらのアミンをＳＭＣＣと反応させるとマレイミド基に結合させることができ、これはヒドロゲル中のチオール基と容易に反応できるであろう。
【０１８５】
複合材料手術用メッシュは、５．４ｍｇ／ｍＬのチオレート化ヒアルロン酸（２２０ＫＤａ、２５％のチオレート化度）及び５．４ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ジアクリレート（ＰＥＧ－ＤＡ）の、１０ｍｇ／ｍＬの官能化された分散されているナノファイバーとの複合材料ゲル配合物を使用して作製した。使用したポリプロピレン手術用メッシュは、Ｅｔｈｉｃｏｎ　Ｐｒｏｌｅｎｅ　Ｓｏｆｔ（製品コードＳＰＭＨ）であった。使用の前にメッシュを連続したエタノール溶液で洗浄してからバイオセーフティキャビネット内で乾燥させた。１×２ｃｍの長方形のメッシュを、２．５×４．５ｃｍのテフロン（登録商標）製モールドの底に、モールド当たり２枚配置した。
【０１８６】
５００μＬの分量の複合材料を、各モールド（両方のメッシュのために）の中にピペットで入れ、次いで１枚のプラスチックをメッシュの上に置き、複合材料が広がるように押し付けた。メッシュは、３７℃のインキュベーターの中で一晩ゲル化させた。ゲル化したメッシュを最終製品として取り出して凍結乾燥した（図２１参照）。メッシュはその後、使用の前に再水和できた。
【０１８７】
特定の実施形態においては、官能基化した繊維メッシュを６０ｍｇ以下の断片にカットした。６０ｍｇサンプルをエタノール中に浸漬し、次いで液体窒素を部分的に充填しておいたセラミック乳鉢に添加する。繊維サンプルは非常に剛直になる。剛直性が維持されるのに十分な冷却状態にサンプルを保ちながら、はさみで繊維シートを約５ｍｍ×５ｍｍ断片にカットする。全シートをカットした後、乳鉢を液体窒素で部分的に満たしながら、繊維を乳鉢と乳棒で約２０分間摩砕する。次いで、繊維スラリーをエタノールの中に注ぎ入れる。繊維のもつれ防止を補助するために、約１ｍｇの界面活性剤をスラリーに添加する。懸濁液を３００Ｇで分間遠心分離し、上清みを廃棄する。繊維を一晩乾燥させる。その後、正確な濃度の繊維を懸濁できるように、繊維を２つ目の遠沈管に計り入れる。次いで、繊維をエタノール中に浸漬させて滅菌し、遠心分離し、上清みを廃棄し、バイオセーフティキャビネット内で一晩乾燥させる。次いで、繊維を脱イオン水の中に望みの濃度まで（通常１５ｍｇ／ｍＬ）再懸濁させる。
【０１８８】

ヒドロゲル複合材料を形成するために、１ｍＬの繊維－懸濁液を用いて１バイアルのＨＡ－ＳＨを再水和させ、１５ｍｇ／ｍＬの繊維と１０ｍｇ／ｍＬのヒアルロン酸の溶液を得る。９００μＬのこの溶液に、１００μＬの１０％ＰＥＧ－ＤＡストック溶液を添加して、１３．６ｍｇ／ｍＬの繊維、９ｍｇ／ｍＬのＨＡ－ＳＨ、及び１０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡの最終濃度を得る。これは最初の生体内実施例の配合物であるが、成分濃度を変えることにより他の配合物も作製した。

【０１８９】

得られた複合材料は、繊維なしのヒドロゲルが透明であるのに対して、乳白色の色であった（図１Ｃ）。複合材料ゲルは、その形状を維持しており、良好な取扱い性を有していた一方で、ヒドロゲル単独の群は裂け易かった。ヒドロゲル中の繊維は分散しており、長さが数十～数百ミクロンの範囲であった（図１Ｂ）。破砕及び凍結乾燥したサンプルの複合材料の断面のＳＥＭ画像は、繊維とヒドロゲル成分間の密接な結び付き、及び分散されている繊維の高い密度を示している（図１Ｄ）。

【０１９０】

材料及び方法

チオレート化ヒアルロン酸（ＨＡ）は、ＥＳＩ　ＢＩＯ（Ａｌａｍｅｄａ，ＣＡ）から購入した。ポリ（エチレングリコール）ジアクリレートはＬａｙｓａｎ　Ｂｉｏ，Ｉｎｃ（Ａｒａｂ，ＡＬ）から購入した。ポリ（ε－カプロラクトン）、エチルアミノ－マレイミド、アクリル酸、トルイジンブルーＯ、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド（ＮＨＳ）、システイン、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、酢酸、及びＴｒｉｔｏｎ^{TM}Ｘ－１００は、Ｓｉｇｍａから入手した。ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、ペニシリン／ストレプトマイシン、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８　Ｐｈａｌｌｏｉｄｉｎ、及び４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）は、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入した。エチル（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）は、ＡｎａＳｐｅｃ，Ｉｎｃ．（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ）から入手した。他の全ての化学薬品及び試薬は分析グレードであった。

【０１９１】

レオロジー実験のためのＰＣＬナノファイバーの電解紡糸：

２つの異なる直径のＰＣＬ繊維を製造するために、１１．０及び８．５％（ｗ／ｖ）のＰＣＬ溶液を、ジクロロメタンとジメチルホルムアミド（９：１，ｖ／ｖ）の混合物、及びクロロホルムとメタノール（３：１，ｖ／ｖ）の混合物、の中でそれぞれ調製した。それぞれの均一なＰＣＬ溶液を、２７Ｇの金属製ニードルでシリンジに装填した。次いで、以下のパラメータ；１．０ｍｌ／ｈの供給速度、金属製ニードルに対する１５ｋＶの印加正電圧、及び１２ｃｍのニードル端とアースとの間の距離、で電界紡糸を行った。繊維の形態は、電界放出型走査型電子顕微鏡（ＦＥＳＥＭ，ＪＥＯＬ　６７００Ｆ）を用いて観察し、繊維の直径はＦＥＳＥＭ画像で、ＩｍａｇｅＪソフトウェア（ＵＳ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）を用いて測定した。

【０１９２】

生体内複合材料のための電界紡糸

紡糸条件：ジクロロメタンとジメチルホルムアミド（９：１，ｗ／ｗ）の溶媒混合物中の１６％ｗ／ｖのＰＣＬ（９５％の４５．０００ＭｎのＰＣＬ，５％の８０，０００ＭｎのＰＣＬ，共にＳｉｇｍａより）。繊維は、５．２５ｍｌ／ｈの速度で、接地されたホイール（１０００ｒｐｍで紡糸）面から１０ｃｍ離した先が丸い２７ゲージのニードルを通して紡糸した。印加電圧は１５ｋＶであり、電界紡糸ポンプは、８５ｍｍの移動距離を前後に一定軌道で１４０回、２ｍｍ／秒で動かした（約４時間）。その後、繊維シートを官能化のために直径１４ｃｍの別々のシートにカットした。

【０１９３】

ＭＡＬで表面を官能化した繊維の作製

ＭＡＬで繊維の表面を官能化するために、若干修正を加えた文献［Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ Ｆｏｃｕｓ ２０１１，１，７２５－７３３］に従ってポリ（アクリル酸）（ＰＡＡ）をグラフトすることにより、繊維表面にカルボキシル基を誘導した。簡潔にいうと、繊維を２８０ｍｍＨｇの下、酸素雰囲気で室温で１０分間プラズマ処理し、繊維表面上にフリーラジカルを生じさせた。次いで、７０ｍｇの繊維が入っている１０ｍｌの３または１０％（ｖ／ｖ）のアクリル酸溶液（０．５ｍＭのＮａＩＯ３中）を、繊維表面でのＰＡＡの光重合のために、ＵＶ（３６ｍＷ／ｃｍ^2，ＤＹＭＡＸ Ｌｉｇｈｔ Ｃｕｒｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ ５０００ Ｆｌｏｏｄ，Ｔｏｒｒｉｎｇｔｏｎ，ＣＴ）に９０秒間露光した（ＰＡＡ－繊維）。ＰＡＡ－繊維を室温で２０分間インキュベーションした後、ＰＡＡ－繊維を２０ｍｌの脱イオン水で３回洗浄して未反応アクリル酸を除去した。ＰＡＡ－繊維を完全に空気乾燥させた後、ＰＡＡ－繊維上のカルボキシル基の密度を、トルイジンブルーＯ（ＴＢＯ）アッセイにより、ＴＢＯが１：１のモル比で繊維上のカルボキシル基と相互作用すると仮定して決定した［Ｊ Ｂｉｏｍｅｄ Ｍａｔｅｒ Ｒｅｓ ２００３，６７，１０９３－１１０４］。簡潔にいうと、ＰＡＡ－繊維（１×１ｃｍ^2）を、２０μｌの５０％（ｖ／ｖ）エタノール中に浸漬させた後に０．５ｍＭのＴＢＯ溶液（０．１ｍＭのＮａＯＨ（ｐＨ１０）中）１ｍｌの中に完全に浸漬させ、穏やかに振とうしながら室温で５時間反応させた。これらを０．１ｍＭのＮａＯＨ（ｐＨ１０）で洗浄した後、ＰＡＡ－繊維の表面上に吸着したＴＢＯを、１ｍｌの５０％（ｖ／ｖ）酢酸を用いて、室温で１時間激しく振とうしながら脱離させた。その後、上清みの光学密度を、マイクロプレートリーダー（ＢｉｏＴｅｃｋ Ｓｙｎｅｒｇｙ２，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）を用いて６３３ｎｍで測定した。５０％（ｖ／ｖ）酢酸中のＴＢＯを標準として使用した。

【０１９４】

ＰＡＡ－繊維を、１分間の粉砕と３分間の液体窒素中での冷却を１０サイクル、のパラメータを用いた低温ミル（Ｆｒｅｅｚｅｒ／Ｍｉｌｌ ６７７０，ＳＰＥＸ ＳａｍｐｌｅＰｒｅｐ，Ｍｅｔｕｃｈｅｎ，ＮＪ）を使用して繊維断片を作製した。ＰＡＡ－繊維断片を５０ｍｌのコニカルチューブに採取した後、ＰＡＡ－繊維断片をイソプロピルアルコール（ｉｓｏｐｒｏｐｙｌａｃｏｈｏｌ）と蒸留水の１０ｍｌの混合物（１：１，ｖ／ｖ）中に完全に分散させ、繊維表面上をアミノエチル－ＭＡＬで修飾した。簡潔にいうと、ＰＡＡ－繊維をＮＨＳとＥＤＣに添加して繊維上のＰＡＡのカルボキシル基を活性化させた。カルボキシル基対ＮＨＳ及びＥＤＣのモル比は、それぞれ１対４及び４であった。活性化は、穏やかに振とうしながら室温で行った。１時間後、カルボキシル基が活性化された繊維に、カルボキシル基対アミノエチル－ＭＡＬのモル比が１対２でアミノエチル－ＭＡＬを添加した。次いで、穏やかに振とうしながら室温で反応を１２時間行った。蒸留水で３回洗浄した後、ＭＡＬを有する表面が官能化された繊維を凍結乾燥させた。ここで、繊維上のＭＡＬの密度は、繊維表面上の全てのカルボキシル基がＭＡＬによって完全に置換されるとの仮定に基づいた。

【０１９５】

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の作製

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料を作製するために、チオレート化ＨＡ及びＰＥＧＤＡをＰＢＳ（ｐＨ７．４）に、それぞれ１２．５ｍｇ／ｍＬ及び１００ｍｇ／ｍＬの望みの濃度まで完全に溶解させた。２５ｍｇ／ｍＬの望みの濃度を有するＭＡＬ－繊維をＰＢＳ（ｐＨ７．４）中に完全に分散させた。次いで、ナノファイバー、ＨＡ、ＰＥＧ－ＤＡ、及びＰＢＳの懸濁液を連続的に添加して配合物の望みの最終濃度に到達させた。この複合材料前駆体溶液を均一に混合した後、レオロジー試験のために、１００μＬの複合材料前駆体溶液をモールド（直径＝８ｍｍ）の中に注ぎ入れ、ゲル化のために３７℃で２時間インキュベートした。圧縮試験のために、２００μＬの前駆体溶液を円柱状のテフロン（登録商標）製モールド（直径＝６．３５ｍｍ，ｈ＝６．３５ｍｍ）に添加し、上の通りにインキュベートする。繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料及びＨＡヒドロゲルの断面の形態をＦＥＳＥＭを用いて観察するために、複合材料及びＨＡヒドロゲルを連続的にエタノール洗浄（５０％、７０％、８０％、９０％、１００％、及び１００％エタノールでそれぞれ１０

分間）によって脱水させた後、臨界点乾燥（Ｓａｍｄｒｉ－７９５，Ｔｏｕｓｉｍｉｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｌｅ，ＭＤ）または化学的乾燥（ＨＤＭＳ）のいずれかを行った。サンプルを液体窒素中で凍結破断させて内部の空孔構造を露出させた。構造体を１０ｎｍの層の白金でスパッタコーティングし（Ｈｕｍｍｅｒ　６．２　Ｓｐｕｔｔｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍ，Ａｎａｔｅｃｈ　ＵＤＡ，Ｈａｙｗａｒｄ，ＣＡ）、次いで電界放射ＳＥＭ（ＪＥＯＬ６７００Ｆ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）で撮像した。

【０１９６】

生体内動物試験用の複合材料の作製のため、チオレート化ＨＡをＰＢＳ中で１２．５ｍｇ／ｍＬに再構成した。ＰＥＧ－ＤＡをＰＢＳ中に１００ｍｇ／ｍＬまで溶解させた。ＭＡＬ－繊維を滅菌ＰＢＳ中に２５ｍｇ／ｍＬまで再懸濁させた。繊維を最初にＨＡ溶液と混ぜて１０分間反応させた後、ＰＥＧ－ＤＡと混ぜて望みの最終濃度を得た。その後、生体内サンプル用に直径１１．１２５ｍｍ高さ３ｍｍの円柱状のモールドに３００μＬの条件で、懸濁液を直ちに円柱状のテフロン（登録商標）製モールド（ＭｃＭａｓｔｅｒ－Ｃａｒｒ，Ｒｏｂｂｉｎｓｖｉｌｌｅ，ＮＪ）内にピペットで入れた。次いでゲルを３７℃のインキュベーターの中に入れて一晩ゲル化させた。

【０１９７】

ＨＡのチオール基と繊維上のＭＡＬとの間の界面結合の効果を確認する目的で、クエンチされた繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料を作製するためにシステインを用いて繊維上のＭＡＬをクエンチした。簡潔には、１ｍｇの繊維を１ｍｌのシステイン溶液（ＰＢＳ（ｐＨ８．０）中）の中に分散させ、次いで、ＭＡＬ対システインのモル比を１対２にした。室温で１２時間穏やかに振とうしながらＭＡＬをクエンチした後、ＭＡＬがクエンチされた繊維を１ｍｌの蒸留水で５回洗浄し、未反応のシステインを除去して凍結乾燥した。

【０１９８】

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の機械的特性：

圧縮試験。圧縮試験のために、直径６．３５ｍｍ高さ６．３５ｍｍの円柱状のモールドの中に２００μＬで、ヒドロゲル前駆体懸濁液を円柱状のテフロン（登録商標）製モールド（ＭｃＭａｓｔｅｒ－Ｃａｒｒ，Ｒｏｂｂｉｎｓｖｉｌｌｅ，ＮＪ）の中にピペットで入れた。次いでゲルを３７℃のインキュベーターの中に入れて一晩ゲル化させた。ゲルをモールドから取り出してすぐに、Ｅｎｄｕｒａ　ＴＥＣメカニカル試験機ＥＬＦ　３２００Ｓｅｒｉｅｓ，ＢＯＳＥ　ＥｌｅｃｔｒｏＦｏｒｃｅ，Ｅｄｅｎ　Ｐｒａｉｒｉｅ，ＭＮ）を用いて、２つの平行なプレート間の一軸圧縮により試験した。サンプルを５０％歪みまで圧縮し、弾性率を、応力－歪み曲線の１０％歪みから２０％歪みまでの直線部分の傾きから求めた。サンプルを３回ずつ試験し、平均圧縮弾性率を決定するために１グループ当たり３つのサンプルを試験した。再水和させた繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の圧縮弾性率を測定するために、複合材料を凍結乾燥させ、１ｍｌのＰＢＳ（ｐＨ７．４）を用いて３７℃で２４時間再水和させた。疲労試験のためには、圧縮したサンプルを０．１Ｈｚで０％から２５％までの歪みのサイクルを繰り返した。

【０１９９】

レオロジー試験。様々な繊維－ＨＡ複合材料のせん断貯蔵弾性率（Ｇ’）を、平行プレート（φ＝８ｍｍ）を有する振動型レオメーター（ＡＲＥＳ－Ｇ２　Ｒｈｅｏｍｅｔｅｒ，ＴＡ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｎｅｗ　Ｃａｓｔｌｅ，ＤＥ）を用いて測定した。１０％の一定の歪みでの１Ｈｚから１０ＨｚまでのＧ’の変動をモニタリングするために、振動周波数掃引を使用した。

【０２００】

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料中でのｈＡＳＣの遊走：

ヒト脂肪由来幹細胞（ｈＡＳＣ）を、１０％のＦＢＳ、１％のペニシリン／ストレプトマイシン、及び１ｎｇ／ｍｌのｂＦＧＦを含む高グルコースＤＭＥＭ中で培養した。培養培地を最適な増殖のために１週間に３回交換した。ｈＡＳＣスフェロイドを作製するために、５０μｌのｈＡＳＣ溶液（５．６×10^5細胞／ｍｌ）を注型マイクロ成形されたアガロースゲル（ＭｉｃｒｏＴｉｓｓｕｅｓ（登録商標）３Ｄ　Ｐｅｔｒｉ　Ｄｉｓｈ（登録

商標）マイクロ成形スフェロイド，９６穴）に注ぎ入れてｈＡＳＣスフェロイドを作製し、穏やかに振とうしながら３７℃で２４時間インキュベートした。

【０２０１】

ＨＡ及びＰＥＧＤＡを、ＨＡについては４．５及び２．５ｍｇ／ｍｌ、ＰＥＧＤＡについては５．０ｍｇ／ｍｌの最終濃度で、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中に完全に溶解させた。２０μｌの５０％（ｖ／ｖ）エタノールで事前に湿らせた繊維をＰＥＧＤＡ中に１０．０ｍｇ／ｍｌの最終濃度で完全に分散させ、次いで繊維とＰＥＧＤＡとの混合物中にＨＡを添加した。３０μｌの複合材料前駆体溶液を９６ウェルの組織培養プレートの各ウェルに注ぎ入れ、ｈＡＳＣスフェロイドが組織培養プレートの表面上に達することを回避するために３７℃で１時間インキュベートして架橋させた。その後、５０μｌの複合材料前駆体溶液を３～５個のｈＡＳＣスフェロイドと共に各ウェルに注入した。３７℃で１時間架橋させた後、２００μｌの新鮮培地を各ウェル内に添加し、２日毎に培地を交換した。複合材料内部のｈＡＳＣスフェロイドからの遊走細胞を観察するために、ｈＡＳＣのＦ－アクチンと核を、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｏｕｒ（登録商標）５６８　Ｐｈａｌｌｏｉｄｉｎ及びＤＡＰＩで染色した。簡潔にいうと、４日間の培養後、ｈＡＳＣスフェロイドを有する複合材料を、室温で一晩、１００μｌの４％（ｖ／ｖ）パラホルムアミドで固定した。次いで、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、複合材料を、非特異的な染色を抑止するために１００μｌの１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ（ＰＢＳ中）と共に４℃で一晩インキュベートし、ＰＢＳで３回洗浄した。引き続き、複合材料を１００μｌの０．１％（ｖ／ｖ）Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００（ＰＢＳ中）と共に室温で１時間インキュベートした。ＰＢＳで３回洗浄した後、１６０ｎＭのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８　Ｐｈａｌｌｏｉｄｉｎ１００μｌを各複合材料に添加し、室温で４時間インキュベートした。次いで、上清みを除去した後、複合材料を１００μｌの０．５μｇ／ｍｌのＤＡＰＩと共に室温で１時間インキュベートした。ＰＢＳで３回洗浄した後、遊走ｈＡＳＣを、共焦点レーザー走査型顕微鏡（ＣＬＳＭ，Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ７８０，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８　Ｐｈａｌｌｏｉｄｉｎについては励起５６１ｎｍ及び発光５７０～６００ｎｍで、ＤＡＰＩについては励起４０５ｎｍ及び発光３８５～４２０ｎｍで観察した。

【０２０２】

繊維－ヒドロゲル複合材料の生体内での性能：

チオレート化ＨＡを、ＰＢＳ中で１２．５ｍｇ／ｍＬに再構成した。ＰＥＧ－ＤＡをＰＢＳ中に１００ｍｇ／ｍＬまで溶解させた。ＭＡＬ－繊維を滅菌ＰＢＳ中で２５ｍｇ／ｍＬまで再懸濁させた。繊維を最初にＨＡ溶液と合わせて１０分間反応させた後、ＰＥＧ－ＤＡと合わせて望みの最終濃度を得た。その後、直径１１．１２５ｍｍ及び高さ３ｍｍの円柱状のモールドに３００μＬの条件で、懸濁液を直ちに円柱状のテフロン（登録商標）製モールド（ＭｃＭａｓｔｅｒ－Ｃａｒｒ，Ｒｏｂｂｉｎｓｖｉｌｌｅ，ＮＪ）内にピペットで入れた。次いでゲルを３７℃のインキュベーターの中に入れて一晩ゲル化させた。脂肪組織の２ｋＰａの剛性と一致するように２つの配合物を選択した。ＨＡ－単独の配合物は１０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡ及び９ｍｇ／ｍＬのＨＡ－ＳＨであり、ＨＡ－繊維複合材料配合物は５ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡ、５ｍｇ／ｍＬのＨＡ－ＳＨ、及び１２．５ｍｇ／ｍＬの分散ナノファイバーであった。

【０２０３】

複合材料ナノ材料足場構造体の生体適合性を試験するために、これらをＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの鼠径部脂肪体下に埋め込み、様々な長さの時間観察した。揮発性麻酔薬投与下で、鼠径部のしわのすぐ近くの両側に１ｃｍの切開を行った。皮下組織を鈍的に切開した後、鼠径部脂肪体を露出させた。電気焼灼を用いて細部まで止血しながら、及び注意深く栄養血管を保存しながら、これを持ち上げた。足場構造体を動物の右側の脂肪体の下に埋め込んだ。左側には埋め込まず、疑似手術対照として機能させた。両側を標準的な重ね合わせ方式で閉鎖した。動物を７、１４、３０及び９０日間観察した。採取の時点で動物を致死させ、足場構造体を有する鼠径部脂肪体と有しない鼠径部脂肪体を露出

させ、４％ＰＦＡの中で固定した。標本を埋め込み、標準的なヘマトキシリン及びエオシンでの染色のために切片化した。

統計的分析

全ての結果は、平均値及び標準偏差で表されている。１対の群の間の統計学的有意差は、ＳｉｇｍａＰｌｏｔ １２．０ソフトウェア（ＳＰＳＳ）を用いたＯｎｅ Ｗａｙ ＡＮＯＶＡを行うことによって決定した；ｐ＜０．０５の値を統計学的に有意とみなした。

【０２０４】

本明細書で開示した複合材料１００の実施形態の任意の他の適切な作製方法も本明細書において想定されている。

【０２０５】

実施例２：ナノファイバー－ヒドロゲル複合材料の圧縮試験

圧縮試験のために、繊維－ヒドロゲルサンプルを、８．５mmの直径及び約４mmの高さの円筒体として形成し、モールド内で３７℃で一晩硬化させた。Ｂｏｓｅ ＥｎｄｕｒａＴＥＣ ＥＬＦ ３２００（Ｅｄｅｎ Ｐｒａｉｒｉｅ，ＭＮ）を用いた圧縮試験によって弾性率を決定した。サンプルに対して２つの平行プレート間で一方向圧縮を行い、５０％の歪みまで圧縮した。弾性率は、最初の直線領域の傾きを測定することにより決定した。繊維あり及びなしの同じヒドロゲル配合物を用いて、２つのサンプル群を試験した。ヒドロゲルのみのサンプルは、４．５ｍｇ／ｍＬのチオレート化ヒアルロン酸（Ｇｙｌｃｏｓａｎ Ｇｌｙｃｏｓｉｌ）及び１０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡ（ポリエチル－グリコールジアクリレート，分子量３３５０）を用いて形成した。繊維－ヒドロゲル複合材料群は、同じヒドロゲル濃度を有していたが、チオレート化ヒアルロン酸と容易に反応することができるマレイミド基で表面が官能化されている６．７５ｍｇ／ｍＬのＰＣＬナノファイバーを追加的に有する。

【０２０６】

代表的な応力－歪みトレースは、図２Ａ中で見ることができる。ヒドロゲルのみの群は３２０Ｐａの弾性率を有していた一方で、繊維－ヒドロゲル複合材料はより高い７５０Ｐａの弾性率を有していた。繊維－ヒドロゲル複合材料の増加した剛性は、全ての歪み値で応力の値がより高いことで確認することができる。官能化されたナノファイバーの存在は材料の強度及び剛性を大きく増加させた。そのため、複合材料の構造全体は標的組織に適合した剛性を有することができる一方で、ヒドロゲル成分は、ナノファイバーの恩恵がない場合に同じ剛性を達成するために必要であろう密度よりも低い架橋密度を有することができる。これによって、所定のインプラントの剛性についてのより良好な細胞応答が得られるはずである。

【０２０７】

その後、サンプル群を、０．１Ｈｚで２５％の歪みまで繰り返し圧縮（２０サイクル）することによって試験した。代表的なトレースは図２Ｂ中で見ることができる。これは、ヒドロゲルと複合材料が繰り返しの圧縮に耐え得ること、及び複合材料が繊維なしの群よりも持続的に剛性であることを示す。

【０２０８】

実施例３：細胞－材料相互作用。

【０２０９】

複合材料ヒドロゲルに対する細胞応答について試験するために、脂肪由来幹細胞（ＡＳＣ）の遊走可能性を、繊維あり及びなしのヒドロゲルの様々な配合物で試験した。

【０２１０】

ＡＳＣを、ＧＦＰを発現するようにトランスフェクションし、次いで、この細胞を、Ｍｉｃｒｏｔｉｓｓｕｅｓモールドによって製造されたアルギネートモールド内に一晩播種することにより、スフェロイドクラスターへと形成した。スフェロイドはこれから遊走している細胞を容易に測定することができる独立した点源であることから、細胞運動がよりよく評価されるように、細胞はスフェロイドとして播種した。スフェロイドをヒドロゲル中に混合した後、９６ウェルプレート内にピペットで入れてから硬化させた。次いで、細

胞をその後数日間にわたって撮像することでその遊走を観察した。それぞれの孔径の増大のため、細胞はヒアルロン酸及びＰＥＧ－ＤＡの濃度が下がるにつれて、次第に更に遊走することができた。同じヒドロゲル密度（４．５ｍｇ／ｍＬのヒアルロン酸及び２．５ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡ）では、細胞は、分散ナノファイバーを有するサンプル（１２ｍｇ／ｍＬ，図３Ａ及び３Ｂ）において、なしのサンプル（図３Ｃ及び３Ｄに図示）よりも良好に遊走することができた。これは、官能基化ナノファイバーの存在が、ナノファイバーの機械的特性を改善しただけではなく、細胞遊走の改善を補助し得ることも示している。

【０２１１】

ＡＳＣがナノファイバーの存在に強く影響を受けたことを明確に実証するために、ＡＳＣスフェロイドを、ヒドロゲルなしの整列したナノファイバーのシート上で培養した。９６時間後、細胞（図３Ｃ及び３Ｄ中で緑色）は、整列したナノファイバーの同じ軸に沿って、スフェロイドから明らかに遊走した（図３Ｄに図示）。

【０２１２】

実施例４：ナノファイバー－ヒドロゲル複合材料の組織適合性。

【０２１３】

複合材料ナノ材料足場構造体の生体適合性を試験するために、これらをＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの鼠径部脂肪体下に埋め込み、様々な長さの時間観察した。揮発性麻酔薬投与下で、鼠径部のしわのすぐ近くの両側に１ｃｍの切開を行った。

【０２１４】

図５Ａは、ラット鼠径部脂肪体の下の生体内原位置でのナノファイバー－ヒドロゲル複合材料の外観を示す写真である。図５Ｂは、埋め込み後２週間目に採取した複合材料周囲の組織からの切片のＨ＆Ｅ染色画像を示す。エオシン好性の濃いピンクに染色された間葉細胞の葉状部は、ナノ材料（薄いピンクに染色）中への遊走が示されている。

【０２１５】

図５Ｃは、４週間目に複合材料－組織界面から採取した組織切片の細胞浸潤を示すＨ＆Ｅ染色画像を示している。埋め込み部位の周囲の間葉組織はエオシンで濃いピンクに染色されている。ナノ材料は薄いピンクに見える。ピンク色の間葉細胞の浸潤は、界面だけでなく、はっきりとした丸い液胞の推定脂肪細胞も確認することができる。

【０２１６】

皮下組織を鈍的に切開した後、鼠径部脂肪体を露出させた。電気焼灼を用いて細部まで止血しながら、及び注意深く栄養血管を保存しながら、これを持ち上げた。足場構造体を動物の右側の脂肪体の下に埋め込んだ。左側には埋め込まず、疑似手術対照として機能させた。両側を標準的な重ね合わせ方式で閉鎖した。動物を２、４、及び６週間観察した。採取の時点で動物を致死させ、足場構造体を有する鼠径部脂肪体と有しない鼠径部脂肪体を露出させ、４％ＰＦＡの中で固定した。標本を埋め込み、標準的なヘマトキシリンとエオシンでの染色のために切片化した。早い時点（２週間）で創面床からの間葉細胞が材料に浸潤していることが見出され、材料が自然な細胞内殖を可能にするのに十分な空隙率を有することが示唆された（図５Ｂにおける濃いピンクの染色）。

【０２１７】

重要なことには、細胞の内殖は、外因性の増殖因子の不存在下であっても達成された。単に該材料を囲んでいるのではなく材料に浸潤している細胞の存在により、この複合ナノ材料は、現在使用されている他の人工材料と区別される。後者の材料は線維被膜によって囲まれるため、軟部組織の再建のためにはあまり望ましくない。後の時点（４週間）では、発生期の脂肪細胞分化を表している可能性がある液胞領域がみられ（図５Ｃ中の濃いピンクの染色及びはっきりとした丸）、細胞の内殖は更に明確である。

【０２１８】

実施例５：繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の設計

繊維は、天然の細胞外マトリックス中でよく見ることができる線維質の構造物を形成し、細胞の遊走を補助し、ヒドロゲルの初期の低い機械的特性を強化し得るであろう。ヒドロゲルと繊維との間に界面結合を導入することによって（図６Ａ，図６Ｂ）、複合材料は

、細胞遊走の大きな妨げとなり得る平均孔径及び空隙率の低下なしに強化される（図６）。ヒドロゲルと繊維表面と間の界面結合の密度を制御することによって機械的特性が微調整され得ることも見込まれた。ここでは、表面が官能化された繊維は、チオレート化ヒアルロン酸（ＨＡ－ＳＨ）との界面結合を導入するためにマレイミド（ＭＡＬ）を用いて作製した（図６）。電界紡糸したポリ（ε－カプロラクトン）（ＰＣＬ）繊維の表面をO_2プラズマで処理して表面上にフリーラジカルを誘導した後、ポリ（アクリル酸）（ＰＡＡ）をグラフトした。カルボキシル基をカップリング試薬であるＮＨＳ及びＥＤＣによって活性化させ、次いでＮ－（２－アミノエチル）マレイミドを、活性化されたカルボキシル基と反応させた（図１３）。引き続き、ＭＡＬで官能化した繊維を、ＨＡ－ＳＨ及びＰＥＧＤＡで構成されたヒドロゲル前駆体溶液に導入し、繊維－ヒドロゲル複合材料を作製した。ＨＡのチオール基は、繊維上のＭＡＬ基とＰＥＧリンカーのＤＡ基の両方と反応させることによってゲルを形成するために使用した。興味深いことには、繊維－ヒドロゲル複合材料の断面は、同様の架橋密度を有するＨＡヒドロゲルの断面と比較して高い空隙率を有する線維性の３Ｄ構造を示した（図６）。得られた複合材料は、複合材料の幅と高さの両方全体にナノファイバーの一様な分布を示し、等方的な強化を可能にした。また、再水和した繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料は、凍結乾燥後に９９．３４％の体積回復を示した一方で、ＨＡヒドロゲルは７０．１７％の体積回復を示した（図６Ｄ）。

【０２１９】

実施例６：繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の圧縮弾性率

まず、反応性基がモル基準で等しい場合に複合材料がその最大の剛性（せん断下）を有することを確認した。ＨＡ上のチオール基は、ナノファイバー上のＭＡＬ基またはＰＥＧ－ＤＡ上のアクリレート基のいずれかと反応することができる。そのため、ＳＨ対（ＤＡ＋ＭＡＬ）のモル比が約１対１である場合、ゲルは最適なせん断貯蔵弾性率を示した。したがって、その後の全ての試験でこの比率を維持した。ゲルに対して一軸圧縮試験を行ってＨＡヒドロゲル及び繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料の弾性率を評価した（図７）。官能化されたナノファイバーの補強効果は、５０％までの歪み時の圧縮応力で確認することができる（図７Ａ）。圧縮応力は、１．０μｍの繊維群ではヒドロゲルのみ群よりも３．１倍大きく、機械的な補強効果が示された。２８６ｎｍの繊維群は更により顕著な補強効果を示し、圧縮応力は５０％歪みで４．２倍大きかった。興味深いことに、２８６ｎｍの繊維の剛性化効果は、ゲル化前にマレイミド基をクエンチした場合、ヒドロゲルと比べてわずか１．３倍までに大きく減少し、繊維とヒドロゲルとの界面結合が官能化繊維の強化効果に極めて重要であることが確認された。更に、複合材料を形成する前に２８６ｎｍの繊維を官能化しなかった場合、補強効果は消失し、ヒドロゲル単独よりもかろうじて剛性である複合材料が得られた。高濃度のＨＡとＰＥＧ－ＤＡを用いて複合材料を配合することによって、より剛性を有するゲルを配合した場合に同じ補強効果を確認することができる（図７）。より多くのマレイミド基をナノファイバー表面に徐々に添加するとより剛性の材料が徐々に得られ、界面結合の重要性がより明らかになることから、界面結合は、複合材料ゲルの剛性化において用量応答も示す。複合材料に対して、脱水及び再水和の前後での機械的特性の変化についても試験した。２つの異なるマレイミド密度の官能化されたナノファイバーあり及びなしのゲルについて、圧縮下で機械的に試験した。次いでゲルを凍結乾燥させ、次いで完全に再水和させ、再度圧縮について試験した。全てのサンプルは再水和後その剛性を維持し、これは複合材料が凍結乾燥品として臨床使用に適したものであり得ることを示す。ＨＡ－単独のゲルは、一見その剛性を維持していたが、繊維含有群とは異なり、脱水－再水和過程の際に、ゲル自体が著しく圧縮された。複合材料のゲルを疲労効果について試験するために、周期的な負荷もかけた。代表的なトレースは図１０に示されている。２５％歪みまでの反復負荷で、複合材料のゲルは経時的にその剛性を維持し、一貫してヒドロゲル単独よりも剛性を有していた。

【０２２０】

実施例７：繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料のせん断貯蔵弾性率

高い圧縮弾性率に加えて、繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料はＨＡヒドロゲル単独よりも

大幅に高いせん断貯蔵弾性率を示した（図８Ａ）。２８６ｎｍの繊維を有する複合材料のせん断貯蔵弾性率は、６８６ｎｍの繊維を有する複合材料のものよりも大きかった（図８Ｃ）。複合材料のせん断貯蔵弾性率が、圧縮試験下での弾性率と同様に、２８６ｎｍの繊維上のマレイミドの表面密度を増加させることによって大きくなることも確認された（図８Ｄ）。表面上に６２ｎｍｏｌ／ｍｇのＭＡＬを有する繊維を導入することによって、複合材料は、ＨＡヒドロゲル単独のものと比べて１．３倍のせん断貯蔵弾性率の増加を示した。更に、繊維上に１４７ｎｍｏｌ／ｍｇのＭＡＬを有する複合材料のせん断貯蔵弾性率は、６２ｎｍｏｌ／ｍｇのＭＡＬ基の弾性率と比べて１．８倍高くなり、繊維上のＭＡＬ表面密度の２．４倍の増加に対応する明確な用量応答が示された。ゲル化の前に繊維上のＭＡＬ基がクエンチされた場合、せん断貯蔵弾性率は、圧縮試験でみられたものと同様に、クエンチされていない繊維と比べて相応に低下した。更に、周波数を１０Ｈｚに上げた場合に複合材料のせん断貯蔵弾性率は維持された一方で、ＨＡヒドロゲル単独とクエンチされた繊維を有する複合材料のいずれも、１０Ｈｚでは１Ｈｚよりもせん断貯蔵弾性率の低下を示した。複合材料のせん断貯蔵弾性率は、繊維の表面積（直径）に関わらず繊維上のＭＡＬ表面密度の増加に伴って大きくなり、剛性に対する繊維直径の先に観察された効果がマレイミド密度の関数であった可能性があることが示唆された（図８Ｄ）。ＭＡＬ表面密度とせん断貯蔵弾性率との相関からＲ２＝０．９３の線形回帰を得た。更に、複合材料のせん断貯蔵弾性率はヒドロゲル成分に対する官能化繊維の重量比の増大に伴って大きくなったため、複合材料は繊維添加量に対して用量応答を示した（図９）。

【０２２１】

実施例８：生体外での繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料中の細胞遊走

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料が、（ｉ）同じ機械的特性を有する場合に細胞遊走のための空間を与える、より大きな孔径を有する複合材料のより大きな空隙率、及び（ｉｉ）本質的に細胞遊走を導くことが可能な複合材料内のＥＣＭ模倣線維質構造、のため、ＨＡヒドロゲルと比較して細胞遊走を強化するという仮説をたてた。そのため、この仮説を実証するために、モデル細胞としてヒト脂肪由来幹細胞（ｈＡＳＣ）のスフェロイドを播種し、ＨＡヒドロゲル及び複合材料内部の組織塊を模倣し、その後ｈＡＳＣスフェロイドを２７日間培養した（図１１）。ＡＳＣは、これが脂肪組織に存在することから、そして血管新生と脂肪細胞形成の両方において重要であることから選択した。複合材料はＨＡヒドロゲルと同様のヤング率の１．９ｋＰａを有するが、複合材料の孔径はＨＡヒドロゲルのものより２．０８倍大きい（図１６）。そのため、より大きな細孔は細胞の遊走に適応できることからｈＡＳＣが複合材料内部で３次元的に遊走することがはっきりと観察された（図１１Ｂ～１１Ｅ）一方で、ｈＡＳＣはＨＡヒドロゲル中での細胞遊走全くなしにそのスフェロイド形状を維持していた（図１１Ａ）。特に、細胞の遊走は、複合材料の繊維を細胞接着ペプチドＲＧＤで改質した場合に一層増強された（図１１Ｃ）。しかし、生体内の状況では、局所環境からの複合材料中への因子の拡散が、追加的な接着のきっかけを与えてこの差を小さくするはずである。いくつかの場合においては、一部の繊維が、ＰＣＬ繊維間の疎水性相互作用のためにゲル化中にわずかに集合体を形成し、細胞集団が複合材料内部の繊維集合体に優先的に接着することが観察された（図１１Ｄ及び１１Ｅ）。更に、同じＨＡ及びＰＥＧ－ＤＡ濃度では（図１９）、複合材料は無繊維群と比べて強化された細胞遊走を示し、ナノファイバー自体が空隙率に関係なく本質的に細胞遊走を導く助けとなり得ることが示された。

【０２２２】

実施例９：組織応答及び被移植体の組織浸潤

これらの複合材料インプラントの治療上の可能性を調べるために、複合材料インプラントを、ラット脂肪体モデルにおいて生体内で試験した。インプラントの群の配合物は、複合材料のゲル及び標的脂肪組織と同じ２ｋＰａの初期剛性が得られるように配合した。そのため、ＨＡ－ゲル単独インプラントの配合物は、繊維－複合材料群の剛性と一致させるために、チオレート化ＨＡとＰＥＧ－ＤＡの両方を、より高い濃度で有していた。この高濃度にも関わらず、ＨＡ－単独のインプラントは、試験全体の間その形状及び体積を維持

することができなかった。４週間後の肉眼での観察では、ＨＡ－単独のインプラントは伸びており、体積が有意に小さかった。その肉眼での外観及び組織学的な浸潤の欠如を考慮すると、ＨＡ－単独の系は、細胞浸潤を促して所定の形状を維持することができるように最適化することができない。しかしながら、繊維－ゲル複合材料インプラントは、生体内で９０日後、肉眼観察下でその元々の形状をよく維持していた。しかし注目すべきことには、組織学的な観察では、複合材料は完全に浸潤されていてインプラントと天然組織との境界を決定することが困難になっていた。

【０２２３】

マイクロ手術法を使用して鼠径部脂肪体が露出され持ち上げられて、事前に成形された複合材料がその下部に入れられた、Ｌｅｗｉｓラットの軟部組織欠損モデルが開発された。この明確に定義されたモデルは、Ａｉｍ３の仮説のすべての要素及びＲ２１試験に適した規模に対処するために理想的である。これは、そのような複合材料が大きな欠損を回復させる能力を直接的には実証しないものの、原理を証明し、複合材料設計の全ての必須な機能を確認し、より臨床的に関連するモデルにおける大きな欠損の回復を試験するための大型動物モデルの基礎を築くものである。

【０２２４】

予備試験では、同様の弾性率のＰＣＬナノファイバー－ＨＡヒドロゲル複合材料及びＨＡヒドロゲルを、８～１２週齢の雄のＬｅｗｉｓラットの鼠径部脂肪体の下に埋め込んだ（時点当たりｎ＝３）。ＨＡヒドロゲル群と複合材料群の両方とも、移植後１４日目及び３０日目に良好な組織適合性を示した（図１２，ＰＯＤ１４，ＰＯＤ３０において同様の観察結果、ＰＯＤ＝術後日数）。ＰＯＤ３０での組織検査では、疑似手術群と比べて高いレベルの炎症応答は示されなかった。Ｈ＆Ｅ及びマッソントリクローム染色により、隔壁形成及び天然の脂肪による複合材料を通る細胞浸潤、周囲部での毛細管形成、並びに分泌腺及び天然脂肪の含脂肪細胞部分の再生が示された（図１２）。他方で、ＨＡヒドロゲル対照には細胞浸潤はなく、薄い線維質の組織シート及び異物反応が形成された。このＨＡヒドロゲルは、十分な機械的特性を確保するために２ｋＰａで作製した。この結果は、細胞浸潤のために足場構造体の空隙率が重要であることを浮き彫りにしている。

【０２２５】

早い時点（２週間）では、創傷床から間葉細胞が材料に浸潤していることが見出され、これは材料が自然な細胞内殖を可能にするのに十分な空隙率を有することを示唆している（図１２における濃いピンクの染色）。重要なことには、細胞内殖は、外因性増殖因子の非存在下であっても達成された。単に囲んでいるのではなく材料に浸潤している細胞の存在により、この複合ナノ材料は、現在使用されている他の人工材料と区別される。後者の材料は線維被膜によって囲まれるため、軟部組織の再建のためにはあまり望ましくない。後の時点（４週間）では、発生期の脂肪細胞分化を表している可能性がある液胞領域がみられ、細胞の内殖は更に明確である。

【０２２６】

実施例１０：ヘパリン含有配合物

ヒアルロン酸に結合させたヘパリンを有する複合材料配合物も調製した。この配合物を、上の事前成形した足場構造体と同じに生体内で試験した。組織を７日目、１４日目、３０日目、及び９０日目に採取した（ｎ＝３）。ｂＦＧＦ、ＰＤＧＦ、及びＶＥＧＦなどの多くの関連する増殖因子は、ヘパリン結合ドメインを有する。結合したヘパリンは２つの目的を果たし得る；第１に、これは、注入部位に存在する内在性増殖因子の多くに結合し、局所的なリザーバー及び組織の再生の誘因刺激として機能することができる。第２に、ヘパリン化された複合材料は、再生をより良好に促進するための増殖因子を足場構造体に事前に装填するために使用することができる。ヘパリン化された足場構造体は、７日目及び１４日目では、ヘパリン化されていない複合材料足場構造体と比べて増強された血管新生を示したが、３０日目と９０日目では同様の結果であった。

【０２２７】

実施例１１：注入可能な配合物

ヒドロゲル－ナノファイバー複合材料を、注入可能な変形形態にも配合した。生体内で使用した予め成形された複合材料で使用したものと同じ２００μＬの組成物（５ｍｇ／ｍＬのチオレート化ＨＡ，５ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡ，１２．５ｍｇ／ｍＬの繊維）を混合し、シリンジ内で８～１０分間、一部硬化させた。この時点では、複合材料は、外科用ニードルから注入可能な粘性で流動性のある液体である（図２０）。注入の後は、複合材料は、逆さにした場合にその形状を維持し、水に浸漬した場合には非分散性であり、形状を維持し、また非／低膨潤性である。注入可能な複合材料の生体適合性について試験するために、懸濁液をその後ラットの鼠径部脂肪体内に２１ゲージのニードルから注入する。次いで、組織を７日目、１４日目、３０日目、及び９０日目に採取し（ｎ＝３）、先の実施例と同じように解析した。複合材料は、３０日目において広範な細胞リモデリングを示した一方で体積を維持し、線維被膜は生じなかった。早い段階の脂肪細胞の複合材料内部での発生をはっきりと確認することができる。

【０２２８】

実施例１２：既存の手術用メッシュの既存の織布ポリプロピレン成分を完全に除去するためのナノファイバーシートの使用

特定の上の実施例においては、ナノファイバー複合材料の技術は、既存の手術用メッシュ材料の増強及び改善のために使用された。代わりに、前述の方法の際に作製されたナノファイバーシートは、既存の手術用メッシュの既存の織布ポリプロピレン成分を完全に除去するために使用することもできるであろう。織布ポリプロピレンフィラメントの代わりに、不織ナノファイバーメッシュがいくつかの用途における手術用メッシュのためのシート構造及び一体性を付与することができるであろうと考えられた。これらは配向したナノファイバーのシートまたはランダムな繊維シートから構成できるであろう。

【０２２９】

例として、１０ｍｇ／ｍＬの官能化された分散されているナノファイバーを有する５．４ｍｇ／ｍＬのチオレート化ヒアルロン酸（２２０ＫＤａ，チオレート化度２５％）及び５．４ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ジアクリレート（ＰＥＧ－ＤＡ）を用いた複合材料ゲル配合物を使用して、複合材料ナノファイバー手術用メッシュを作製した。複合材料ゲルは、電界紡糸されたＰＣＬナノファイバーの不織メッシュ（ポリプロピレンフィラメントの代替）を含浸する相互貫入ヒドロゲル網状構造として形成した。ナノファーバーメッシュは、ナノファイバー表面上にマレイミド基を含ませるように予め官能化して、繊維を周囲のヒドロゲルと直接結合できるようにし、繊維－ヒドロゲル界面での剥離に対する耐性を有する強い配合物にできるようにした。１×２ｃｍの長方形のナノファイバーメッシュを、２．５×４．５ｃｍのテフロン（登録商標）製モールドの底に、モールド当たり２枚配置した。５００μＬの分量の複合材料を、各モールド（両方のメッシュのために）の中にピペットで入れ、次いで１枚のプラスチックをメッシュの上に置き、複合材料が広がるように押し付けた。メッシュは、３７℃のインキュベーターの中で一晩ゲル化させた。その後、ゲル化したメッシュを最終製品として凍結乾燥した。メッシュはその後、使用の前に再水和できた。

【０２３０】

この複合材料配合物は、ポリプロピレンメッシュと組み合わせて使用でき、あるいは代わりにナノファイバーメッシュを個別に使用することができた。シートは上の実施例のものよりも剛性が小さいものの、創傷ドレッシングまたは硬膜の修復などの他の用途に適切な取り扱い性及び強度特性を有していた（図２２参照）。

【０２３１】

実施例１３：ポリ（アクリル酸）鎖でグラフトする織布ポリピレンまたは不織マイクロファイバーメッシュの直接表面プラズマ処理

代替の構成においては、織布ポリピレンまたは不織マイクロファイバーメッシュは、ＰＣＴ／ＵＳ１５／４５４９４に記載の方法を使用して、直接的に表面プラズマ処理及びポリ（アクリル酸）鎖によるグラフト化を行うことができる。マイクロファイバーシートは、上の実施例１２中で使用されているナノファイバーメッシュを置き換えるために使用す

ることができる。そのようなマイクロファイバーシートは、図２４中に示されているような、一体化された架橋網目構造を形成するために使用することができる。

【０２３２】

例えば、適切な量の官能化マイクロファイバーシート（Ｅｔｈｉｃｏｎ　Ｐｒｏｌｅｎｅ　Ｓｏｆｔ，製品コードＳＰＭＨ）を有する５．４ｍｇ／ｍＬのチオレート化ヒアルロン酸（２２０ｋＤａ，チオレート化度２５％）及び５．４ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ジアクリレート（ＰＥＧ－ＤＡ）を用いた複合材料ゲル配合物を使用して、複合材料手術用マイクロファイバーメッシュを作製した。マイクロファイバーメッシュは、繊維表面上にマレイミド基を含ませるように予め官能化して、繊維を周囲のヒドロゲルと直接結合できるようにした。複合材料ゲルは、マイクロファイバー上の官能基と共に形成及び架橋した。１×４ｃｍの長方形のＰｒｏｌｅｎｅ　Ｓｏｆｔ繊維メッシュを、２．５×４．５ｃｍのテフロン（登録商標）製モールドの底に、モールド当たり２枚配置した。５００μＬの分量のチオレート化ＨＡ及びＰＥＧ－ＤＡ混合物（上述の通り）を、各モールドの中にピペットで入れ、直ちに混合した。メッシュは、３７℃のインキュベーターの中で一晩ゲル化させた。その後、ゲル化したメッシュを最終製品として凍結乾燥した。メッシュはその後、使用の前に再水和できた（図２５参照）。

【０２３３】

実施例１４：複合材料手術用メッシュの生体内での生体適合性及び組織との一体化

６～８週齢のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットをランダムにグループ化した。長さ３ｃｍの腹部正中切開の印を付け、腹壁筋肉組織のレベルに至るまで皮膚の切開を行った。表面切開を約２ｃｍ両側まで続けた。１×２ｃｍの手術用メッシュ（ポリプロピレン、ポリプロピレンと複合材料ゲル、またはナノファイバーと複合材料ゲル）を、ラットの右腹部全体の皮下の面に埋め込んだ。メッシュを所定の位置で４－０Ｖｉｃｒｙｌ縫合糸を使用してｏｎ－ｌａｙ方式で縫合した。皮膚を結節４－０Ｖｉｃｒｙｌ縫合で閉じた。同じラットの左腹部には疑似手術を行った。３匹のラットそれぞれに、未修飾のＰｒｏｌｅｎｅ手術用メッシュと、ナノファイバー－ヒドロゲル網状構造を有する複合材料手術用メッシュを埋め込んだ。３日目及び１４日目にラットを安楽死させ、組織サンプルを、腹壁及び埋め込んだメッシュの一括切除によって外植した。図２６～２８はそのような手術による配置の設計及び結果を示している。

【０２３４】

実施例１５：実施例５～１４の考察

ヒドロゲルは、細胞遊走を促すその３Ｄ水和環境及び高い空隙率のため、組織欠損の再生のための充填材料として広く研究されてきた。しかし、ヒドロゲルは体液並びに内部応力及び外部応力によって容易に分解されて、崩壊する場合があることから、ヒドロゲルの比較的弱い機械的特性が組織再生の期間全体にわたってその体積を維持するのには不十分なため、ヒドロゲルは体積の大きい欠損のための置換物としては不十分であることが示されている。ヒドロゲルの機械的特性を改善するための当該技術分野における主な戦略は、（ｉ）ヒドロゲル前駆体の濃度を上げること、（ｉｉ）ヒドロゲル内部の架橋網目構造の密度を上げること、及び（ｉｉｉ）ヒドロキシアパタイト粒子を埋め込むことまたは繊維シートを積層することなどによって強化材料を導入すること、であった［Ｍａｔｅｒ　Ｃｈｅｍ　Ｐｈｙｓｉｃｓ，２００８，１０７，３６４－３６９，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ　２００６，２７，５０５－５１８，Ａｃｔａ　Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ　２０１０，６，１９９２－２００２］。残念なことには、これらの非常に強化させる戦略は、得られるヒドロゲルの平均孔径及び空隙率を本質的に低下させ、細胞をこれらのヒドロゲルの中に遊走可能にすることの妨げとなった。そのため、速やかな細胞浸潤を可能にする以上の大きい空隙率を依然として保持する新しい機構による、ヒドロゲルの強化が求められていた。複合材料は、ヒドロゲル相の大部分を空隙率などが損なわれないままにしつつもヒドロゲル複合材料全体の強度を上げることができる、官能化ナノファイバーを導入することによって設計された。得られた繊維－ヒドロゲル複合材料は、鍵となる２つの成分のため、これまでの軟部組織複合材料を改善する。第１に、等方的に強度を上げるため、ナノファ

イバーを大きい添加量でヒドロゲル中に均一に分散させる必要があった。組織工学分野においては、一般的に、繊維の平坦なシートまたはマットとしての電界紡糸されたナノファイバーが使用されていた。そのため、これらは典型的には、マットをヒドロゲル前駆体溶液で含浸することによって複合材料へと加工される。

【０２３５】

これは、ヒドロゲル全体へのナノファイバーの分散を大きく制限し、複合材料の形状を２Ｄシートまたはチューブに制限する。これらの形状は、神経の修復または創傷ドレッシングなどの特定の用途には有用であるが、体積の大きい欠損の修復には不十分な選択肢である。繊維シートを凍結粉砕することによって、平均繊維長を、水溶液中で懸濁状態で保持できるのに十分な短い長さまで小さくすることができた。そのため、その後、サンプルはヒドロゲル前駆体溶液の中に容易にピペットで入れられ、それによりゲル化前のヒドロゲル体積全体へのナノファイバー断片の均一な分散液を形成した。その後、溶液は、ほとんどの電界紡糸されたナノファイバーメッシュの限定された平面的な形状とは異なり、注入用配合物として直接使用するか、あらゆる任意の形状の足場構造体ゲルを形成するためにモールドに添加することができる。ヒドロゲル中に分散されている繊維の複合材料構造は、細胞外マトリックスの線維性構造も再現しており（図６Ｇ）、複合材料中での細胞遊走を補助し得る接着部位を与える。

【０２３６】

第２に、ナノファイバーをヒドロゲル中に単に分散させるだけでは、強い複合材料を形成するためには不十分である。これらのデータは、ナノファイバー自体を単に組み込むだけでは複合材料の弾性率の改善は非常にわずかしか得られず、改善は界面結合が導入された場合にのみ生じることを示した。ヒドロゲルと繊維成分との間に強い連結を形成しないと、負荷をより剛性のある材料に伝えずに水及びヒドロゲル成分が繊維成分をすり抜ける可能性があるため、界面結合は必須である。更に、そのような異なる材料間の界面は、複合材料中で剥離及び破壊を生じさせる場合がある。加えて、繊維が優先的に互いに凝集して懸濁液から分離する凝塊を形成するため、ＰＣＬの初期の疎水性は、これが水溶液中に分散することを困難にする。プラズマ処理及びこれに引き続いてのカルボン酸基とアミン基での官能化は、繊維の親水性を増加させ、分散を可能にする。この機械的特性の劇的な増加は、繊維表面上のマレイミド基とヒアルロン酸分子上のチオール基との間に界面結合が生じる場合にのみ生じた。この共有結合強度の結合は、圧縮または引っ張り時に負荷をより効率的に繊維に移行させ、より剛性でより強い材料にする。更に、複合材料は、マレイミド密度の増加とともに弾性率が大きくなる強い傾向を示し、強度を上げる機構だけでなく、補強の微調整可能な特性におけるその重要性が強調される。

【０２３７】

本研究において、繊維－ヒドロゲル複合材料の機械的特性を、繊維の総表面積、繊維表面上の官能性マレイミド基の密度、及びヒドロゲルへの繊維の添加量などの様々な因子によって微調整できることが確認された。第１に、より小さい直径の繊維を有する複合材料は、より大きな直径の繊維を有する複合材料よりも大きい圧縮弾性率及びせん断貯蔵弾性率を示した（図７Ａ及び図８Ｃ）。同様に、文献において、グルタルアルデヒドを用いてプラズマ活性化された単独の超高分子量ポリエチレン（ＵＨＭＷＰＥ）繊維（約２５μｍ）は、６０束のＵＨＭＷＰＥ繊維と比べてポリ（ビニルアルコール）ヒドロゲル中で約２．３６倍の界面せん断強度の増加を示した［Ａｃｔａ　Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ　２０１４，１０，３５８１－３５８９］。そのため、繊維の直径を小さくし、その結果繊維の比表面積を増加させることは、複合材料の機械的特性の改善に有効である可能性がある。しかし、各繊維群は、わずかしか異ならない繊維上のＭＡＬ表面密度を有しており（約１０～１５ｎｍｏｌ／ｍｇ）、そのため、繊維単独の表面積の効果は断定的には決定できない。したがって、第２に、同じ直径の繊維を有するが様々な繊維上のＭＡＬ表面密度を有する複合材料を作製した（図８）。複合材料の圧縮弾性率及びせん断貯蔵弾性率は、繊維上のＭＡＬ表面密度の増加と共に大きくなった。ＰＡＡ工程（繊維上のカルボキシル基）により修飾を行ったが追加的なＭＡＬ結合工程を行わなかった繊維を使用することにより

、界面結合なしの複合材料はわずかな圧縮弾性率の向上しか示さない（図７）ことが確認された。界面結合の重要性は、ゲル化の前に繊維上のＭＡＬ基をシステインでクエンチすることによって更に確認された。システインはマレイミド基と結合し、繊維とヒドロゲルとの間の界面結合を妨げる。繊維を界面結合群と同じ別の方法で加工したことから、これによって界面結合の効果のみを取り出すことができる。興味深いことに、ＭＡＬでクエンチされた繊維を有する複合材料の機械的特性は劇的に低下し（図７Ａ及び図８Ｂ）、ＭＡＬでクエンチされた繊維群は、ＨＡの濃度を１０ｍｇ／ｍｌにした場合、ＨＡヒドロゲル単独よりも低い圧縮弾性率を示した（図７）。以前の試験でみられたように、ＭＡＬでクエンチされた繊維が、繊維とヒドロゲルの界面で容易に剥離することによって複合材料全体が弱くなった可能性がある［Ａｃｔａ　Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ　２０１４，１０，３５８１－３５８９］。また、官能基なしの繊維は、１種類の成分で構成されているかまたはゲル化中に異物が全くない純粋なヒドロゲルと比較して、ゲル化を抑止する異物として作用する場合がある［ＪＭＣ　Ｂ　２０１５，ＤＯＩ：１０．１０３９／Ｃ３ＴＢ２１８３０Ａ，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｐａｒｔ　Ａ　２０１０，９５（２），５６４－５７３］。更に、様々なＭＡＬ表面密度を有する複合材料によって、せん断貯蔵弾性率と界面結合の密度との間の有意な相関が確認された（図８Ｃ）。これらの試験は、ヒドロゲルの機械的特性が界面結合によって強化され、微調整され得るという強力な証拠を与える。第３に、複合材料のせん断貯蔵弾性率は、ヒドロゲルに対する繊維の重量比の増加に伴って強化された（図９）。これにより、重量比は、繊維－ヒドロゲル複合材料の機械的特性を微調整するために使用することができるもう１つの変数であることが確認された。しかし、ここでは、繊維添加量の増加に伴って、せん断貯蔵弾性率の増加が横ばいになり始め、０．６より上の重量比ではわずかに減少さえしたことが確認された。この飽和作用の１つの可能性は、どの程度のＭＡＬを有する過剰の繊維が大部分のＨＡのチオール基と反応してゲル化のためのＰＥＧＤＡの反応が妨げられたかによって、複合材料の界面結合の密度が減少することである場合がある。ＨＡヒドロゲルの最も高いせん断貯蔵弾性率がＨＡ－ＳＨとＰＥＧＤＡの各官能基が等モル量で得られたこと、及びＨＡ－ＳＨまたはＤＡのいずれかが過剰量でせん断貯蔵弾性率が低下することを考慮すると（図１４Ａ）、繊維上の過剰のＭＡＬは、繊維の量が増えると複合材料内部のＳＨ－ＤＡ間の結合を妨害する可能性がある。

【０２３８】

一般的に、埋め込まれた生体材料は、組織欠損の再生時に、様々な内部応力及び外部応力に耐える必要がある。応力は激しくも連続的でもないが、そのような応力を再現するために、反復条件または高周波数（１０Ｈｚ）下で応力抵抗性試験を行った（図１０及び図８）。ＨＡヒドロゲルと繊維－ＨＡヒドロゲル複合材料は共に、繰り返しの圧縮歪みの間、損傷及び機械的強度の低下を全く生じることなしに耐えた。注目すべきことには、界面結合を有する複合材料は１０Ｈｚの周波数でそのせん断貯蔵弾性率を保持していた一方で、ＨＡヒドロゲル、及び界面結合なしの複合材料のせん断貯蔵弾性率は、１０Ｈｚでは低下した。この傾向は、分散繊維との界面結合が複合材料の機械的特性の強化に極めて重要であることを示唆している。更に、繊維－ＨＡ複合材料は、凍結乾燥及びその後の再水和を経た後に、その寸法及びヤング率を維持していたが、ＨＡ－単独のゲルは同じプロセス下で実質的に収縮した（図６Ｃ及び図１０）。複合材料の凍結乾燥形態が得られることによって市販品の滅菌及び保存がより容易になり得ることから、この脱水及び再水和の後の形状、体積、及び剛性の維持は、本技術の臨床応用のために重要な特徴である。

【０２３９】

軟部組織の再建に関し、理想的な埋め込まれた足場構造体は欠損空隙を直ちに充填し得るが、身体自身の細胞が足場構造体の中へと増殖するための基材としても機能し、増殖して適切な組織表現型へと分化し、最終的に正常で健常な組織が人工足場構造体と置き換わり得る。そのため、関連する細胞がヒドロゲル中または複合材料足場構造体内で遊走し得ることは非常に重要である。関連する細胞型についての足場構造体内で遊走する潜在能力を調べるために、ｈＡＳＣスフェロイドをＨＡヒドロゲル及び繊維－ＨＡヒドロゲル複合

材料の内部に播種し、その細胞遊走を評価した。ＨＡヒドロゲル単独の内部では、ＨＡヒドロゲルが柔らかすぎて細胞遊走のための牽引力を提供できなかったため、ｈＡＳＣは遊走できなかった（図１１Ａ）［Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２０１５，４２，１３４－１４３］。興味深いことには、複合材料のせん断貯蔵弾性率はＨＡヒドロゲルと同様であったものの、ｈＡＳＣは、複合材料内部でスフェロイドから離れて有意に遊走することができた（図１１）。１つの仮説は、複合材料内部の繊維が、脂肪組織の天然ＥＣＭのフィブリル成分と同様に、細胞遊走をガイドする接着部位を付与し得ることである。整列した繊維及びランダム繊維が、様々な細胞型における細胞の接着、増殖、分化、及び遊走のための極めて重要な因子となり得ることが以前に示された［Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２００５，２６，２５３７－２５４７／２００６，２７，６０４３－６０５１／２００９，３０，５５６－５６４／２０１０，３１，９０３１－９０３９，Ａｃｔａ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ ２０１３，９，７７２７－７７３６］。特に、細胞骨格は下にある繊維に沿って整列して続いているため、細胞は繊維をガイドマトリックスとして認識することが観察された［Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２００６，３０，６０４３－６０５１／２００９，３０，５５６－５６４］。しかし、１０００ｎｍと２８６ｎｍのいずれのナノファイバーを有する複合材料内でもこれらは確実に遊走したため、複合材料内部の繊維の直径は遊走細胞に影響しなかった（図１９）。

【０２４０】

ベンチトップ試験及び生体外細胞培養でみられた空隙率及び細胞遊走の影響は、複合材料の生体内試験の際の顕著な差に変換された。脂肪を模倣する２ｋＰａの剛性に配合した繊維なしのヒドロゲルは、セルの浸潤のためには低すぎる空隙率を有していた。細胞応答は、ヒドロゲルを囲むコラーゲンの厚い層の壁を築くことであり、異物反応に典型的な浸潤またはリモデリングはなかった。しかしながら、ナノファイバー－ヒドロゲル複合材料は、細胞内殖、血管新生、及び細胞リモデリングを異物反応なしで促進するのに十分な空隙率を有していた。これは、身体の大きい体積の欠損部が、最終的には身体の自身の組織になるもので永続的に充填されるという見込みを与える。この結果は、被移植体の組織とのより密着した界面を形成できる注入用配合物で一層顕著であり、確実な脂肪形成の徴候を示した。

【０２４１】

結論：

ヒドロゲルの中に官能化されたナノファイバーを分散させることによって、この２つの成分の強度を兼ね備えた複合材料構造体が形成される。ナノファイバーとヒドロゲル成分との間の界面結合は、組織及び細胞の内殖を促進する高い空隙率と孔径を維持しつつ強い複合材料を作製するのに極めて重要である。得られる複合材料の特性は、繊維の直径、繊維添加レベル、マレイミド密度レベル、及びヒドロゲル成分の添加量レベルを変更することによって容易に微調整することができる。これは目標とする全体の剛性でのより低い架橋及びより高い空隙率を可能にし、細胞浸潤及びその後の組織リモデリングを増加させることができる。繊維自体も、天然のＥＣＭ中でみられるものと同様の接着部位を与えることによって細胞の遊走を直接的に改善し得る。得られる複合材料インプラントは、天然脂肪組織の剛性と一致するが細胞浸潤及びリモデリングのための透過性は保持するように微調整することができる。この新規な複合材料は、あらゆる任意の形状の大きい体積の欠損部が直ちに充填されるのに十分な強さである。そのため、この複合材料インプラントは、身体自身の細胞が複合材料内に浸潤し、血管を形成し、脂肪細胞のような細胞へと分化するための許容される足場構造体として機能する。足場構造体は、組織のリモデリングの際に、最初の欠損空隙が正常な健常組織で完全に置き換わるまでゆっくり分解するであろう。この複合材料構造体は、再建手術及び美容手術の将来性のための大きな可能性を有している。

【０２４２】

実施例１６．医療デバイスの製造及び使用

合成メッシュ及び生物学的メッシュは、一般外科、再建外科、脳神経外科、泌尿器科、

婦人科外科、整形外科、及び美容外科における広い応用可能性を有している。これらのメッシュは、全身の組織を補強または置換するために使用される。これらのメッシュの主な限界は、合併症の中でも特に異物反応、血清腫の形成、及び感染症を生じさせる、身体との不十分な一体化である。既存の合成メッシュと比較して大きく改善された身体の組織との一体化を有するナノファイバー－ヒドロゲル複合材料が提供される。この材料は、組織の強化及び置換用のメッシュとして機能するために、平坦なシートとして製造及び利用される。これは、従来のメッシュの生体適合性及び一体化の潜在性を改善するための補助材としても有用である。

【０２４３】

本発明の足場構造複合体は、手術用メッシュ材料と結合して手術用デバイスの中に組み込まれる。例えば、手術用メッシュは、ｉ）ヒドロゲル材料と動作可能に結合している約１００ｎｍ～約８０００ｎｍの平均直径の高分子繊維を含有する「層状」の足場構造複合体；及びｉｉ）手術用メッシュ材料；を含む。本明細書においては、「層状」足場構造複合体は、通常、平面状で柔軟性があり、手術用メッシュと結合することができる十分な表面を有する。例示的な手術用メッシュとしては、ポリグラチン９１０、ポリプロピレン、ポリグリコール酸、ポリテトラフルオロエチレン（ｅＰＴＦＥ）、吸収性ポリグラチンを有するポリプロピレン、ポリグレカプロン２５を有するポリプロピレン、セルロースを有するポリプロピレン、ｅＰＴＦＥを有するマクロ多孔性ポリプロピレンが挙げられる。そのような医療用デバイスは、これらを容易にヒト被験体の中の組織欠損部位（例えば外科的処置の部位）またはその近位に埋め込む（すなわち挿入）ことができるような大きさ及び形状である。足場構造複合体は、手術用メッシュと共有結合的にまたは非共有結合的に結合する。

【０２４４】

本発明は、一つの実施形態では、以下の（１）～（５６）に関する。

（１）　ヒドロゲル材料に動作可能に結合している層状足場構造複合体を含む、手術用足場構造体デバイスであって、前記足場構造複合体が約１００ｎｍ～約８０００ｎｍの平均直径を有する高分子繊維を含む、手術用足場構造体デバイス。

（２）　前記デバイスが、皮膚、筋膜、胸膜、硬膜、心膜、腱傍組織、骨膜、神経周膜、血管壁、及びリンパ管壁から選択される器官または組織の中への埋め込みに適した形状で構成される、（１）に記載のデバイス。

（３）　第３の寸法よりも独立に少なくとも約５倍長さが大きい第１の寸法及び第２の寸法を有するシートとして構成される、（１）に記載のデバイス。

（４）　前記第３の寸法が約１ｃｍ未満である、（３）に記載のデバイス。

（５）　前記第３の寸法が約９ｍｍ、８ｍｍ、７ｍｍ、６ｍｍ、５ｍｍ、４ｍｍ、３ｍｍ、２ｍｍ、１ｍｍ、または０．５ｍｍ未満である、（３）に記載のデバイス。

（６）　前記第１の寸法及び前記第２の寸法が、独立して約１ｃｍよりも大きい、（３）に記載のデバイス。

（７）　これを必要とするヒト被験体の中に埋め込み可能に構成される、（１）に記載のデバイス。

（８）　皮下に埋め込み可能に構成される、（１）に記載のデバイス。

（９）　複数の直線的に配列した高分子繊維を含む、（１）に記載のデバイス。

（１０）　その上での直線的な細胞遊走を与えるように配置された複数の高分子繊維を含む、（１）に記載のデバイス。

（１１）　前記ヒドロゲル材料が前記高分子繊維と共有結合により結合している、（１）に記載のデバイス。

（１２）　前記高分子繊維を前記ヒドロゲル材料へ動作可能に結合させるリンカー部位を更に含む、（１）に記載のデバイス。

（１３）　ｉ）ヒドロゲル材料に動作可能に結合している約１００ｎｍ～約８０００ｎｍの平均直径を有する高分子繊維を含む層状足場構造複合体；及び、ｉｉ）手術用メッシュ材料；を含む、手術用デバイス。

（１４）　前記高分子繊維が不織布である、（１３）に記載のデバイス。
（１５）　前記高分子繊維が電界紡糸される、（１３）または（１４）に記載のデバイス。
（１６）　前記高分子繊維がシート状に配置される、（１３）～（１５）のいずれか１項に記載のデバイス。
（１７）　無機手術用メッシュ材料を含む、（１３）に記載のデバイス。
（１８）　有機手術用メッシュ材料を含む、（１３）に記載のデバイス。
（１９）　前記ヒドロゲル材料が、脂肪、筋肉、膀胱、腸、腱、または軟骨から選択される哺乳類組織から誘導されたまたは誘導可能な生体材料を含む、（１３）に記載のデバイス。
（２０）　前記足場構造複合体が前記手術用メッシュ材料の全てまたは大部分の上に配置される、（１３）に記載のデバイス。
（２１）　第１の層状足場構造複合体と第２の層状足場構造複合体を含み、前記手術用メッシュ材料が前記第１の層状足場構造複合体と前記第２の層状足場構造複合体との間に配置される、（１３）に記載のデバイス。
（２２）　第１の層状足場構造複合体と第２の層状足場構造複合体を含み、前記手術用メッシュ材料が前記第１の層状足場構造複合体と前記第２の層状足場構造複合体との間に挟まれる、（１３）に記載のデバイス。
（２３）　ヒト細胞または細胞抽出物を更に含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（２４）　ヒト幹細胞または前駆幹細胞を更に含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（２５）　前記高分子繊維が生体適合性かつ生分解性のポリエステルを含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（２６）　前記高分子繊維がポリカプロラクトンを含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（２７）　前記ヒドロゲル材料が、機能性網状構造の中の複合体の中に存在する、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（２８）　前記高分子繊維が不織高分子繊維を含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（２９）　互いに実質的に平行に配向している複数の不織高分子繊維を含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（３０）　前記高分子繊維が電界紡糸されたポリカプロラクトン繊維を含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（３１）　前記高分子繊維が、ポリ（乳酸－ｃｏ－グルコール酸）、ポリ（乳酸）、及び／またはポリカプロラクトン、またはこれらの組み合わせを含む合成高分子材料を含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（３２）　実質的に生体適合性を有するように配合される、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（３３）　前記高分子繊維が、絹、コラーゲン、及びキトサン、またはこれらの組み合わせからなる群から選択される生体高分子材料を含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（３４）　前記ヒドロゲル材料がヒアルロン酸を含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（３５）　前記ヒドロゲル材料が、ポリ（エチレングリコール）、コラーゲン、デキストラン、エラスチン、アルギン酸塩、フィブリン、アルギン酸塩、ヒアルロン酸、ポリ（ビニルアルコール）、これらの誘導体、またはこれらの組み合わせであるヒドロゲル材料を含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（３６）　前記ヒドロゲル材料が処理された組織細胞外マトリックスを含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（３７）　前記処理された組織細胞外マトリックスが脂肪組織から誘導される、（３６）

に記載のデバイス。
（３８） 不織ポリカプロラクトン繊維を含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（３９） 前記ヒドロゲル材料が、前記ポリカプロラクトン繊維の外表面の少なくとも一部を実質的に被覆するヒアルロン酸を含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（４０） 前記ヒドロゲル材料が、前記高分子繊維の前記外表面に結合する、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（４１） 高分子繊維とヒドロゲル材料との間に結合を導入するのに有効な量で存在する架橋部位を更に含む、（４０）に記載のデバイス。
（４２） 前記デバイスの表面の上または内部に存在する複数の空孔を更に含み、前記空孔は１ｃｍ^{2}の前記表面当たり少なくとも約５０個の空孔の濃度で存在し、前記空孔の少なくとも８０％が前記表面上で少なくとも約５ミクロンの平均孔径を有する、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（４３） ポリカプロラクトン繊維とヒアルロン酸との間に架橋を生じさせるのに有効な量で存在する架橋部位を更に含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（４４） 前記デバイスが、ヒト被験体の中に存在する標的組織の中に埋め込まれた場合に組織の成長及び細胞の浸潤を促進する、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（４５） 前記デバイスが、ヒト組織の中に埋め込まれた場合に実質的に生分解性である、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（４６） 前記デバイスが、ヒト組織の中に埋め込まれた場合に実質的に非生分解性である、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（４７） 細胞、小分子、核酸、及びポリペプチドから選択される治療薬を更に含む、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（４８） （１）または（１３）に記載の前記デバイスを含む、埋め込み可能な生体材料。
（４９） 実質的に無細胞である及び／または実質的にポリペプチドを含まない、（４８）に記載の埋め込み可能な材料。
（５０） 注入によって投与するために配合される、（４８）に記載の埋め込み可能な材料。
（５１） 皮下投与するために配合される、（４８）に記載の埋め込み可能な材料。
（５２） 皮膚創傷への適用のために配合される、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（５３） 皮下創傷への適用のために配合される、（１）または（１３）に記載のデバイス。
（５４） （４８）～（５１）のいずれか１項に記載の埋め込み可能な材料を含むキット。
（５５） 被験体に投与された場合に皮膚、筋膜、胸膜、硬膜、心膜、腱傍組織、骨膜、神経周膜、血管壁、リンパ管壁を含む１つ以上の組織の補強及び／または再生をもたらすために有効な量で（１）に記載の前記デバイスまたは（４８）に記載の前記埋め込み可能な材料を含む、外科的処置を行う被験体の中での使用のための医療用デバイス。
（５６） 被験体に投与された場合に乳房インプラントまたは組織拡張器などの医療用インプラントの補強または被覆をもたらすために有効な量で（１）に記載の前記デバイスまたは（４８）に記載の前記埋め込み可能な材料を含む、外科的処置を行う被験体の中での使用のための医療用デバイス。

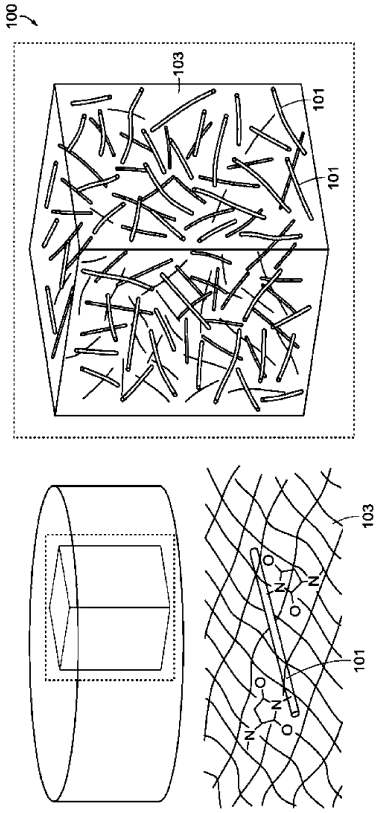
均等物

本明細書に記載の詳細な実施例及び実施形態は、説明の目的のために例示しているにすぎず、本発明を限定するものとして決してみなすべきでないことが理解される。これらを踏まえて様々な修正または変更が当業者に示唆されるであろう。それらは本出願の趣旨及び範囲に含まれ、添付の請求項の範囲内であるとみなされる。例えば、成分の相対的な量は、望みの効果を最適化するために変更することができ、追加的な成分を添加してもよく、及び／または記載した成分のうちの１ 種以上を同様の成分と置き換えてもよい。本発明の系、方法、及びプロセスに関連する追加的な有利な特徴及び機能は、添付の請求項から明らかになるであろう。更に、当業者であれば、本明細書に記載の発明の具体的な実施形

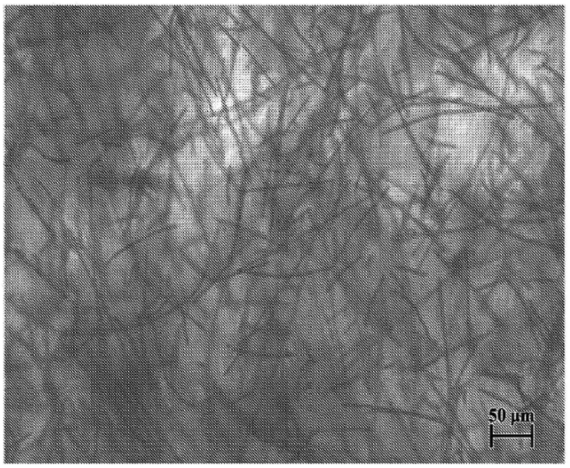
態の多くの均等物を認識し、あるいは単なる慣用的な実験だけで確認することができるであろう。そのような均等物は以下の請求項に包含されることが意図されている。

【図面】

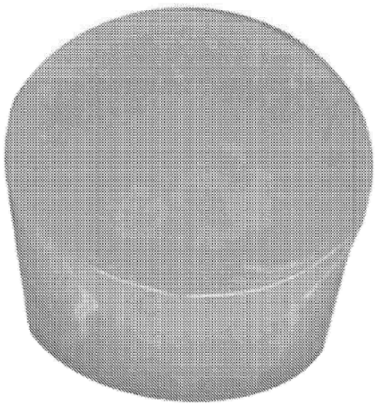
【図１Ａ】



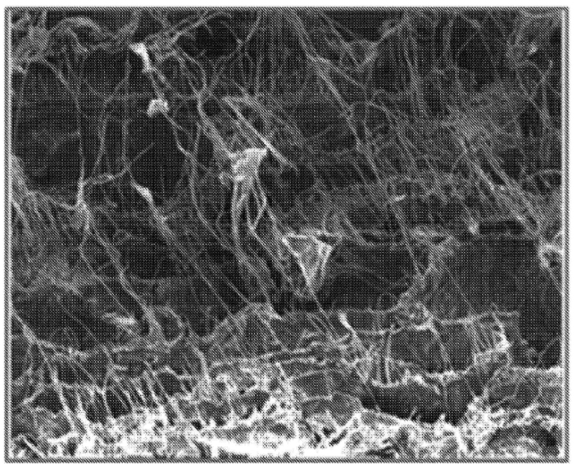
【図１Ｂ】



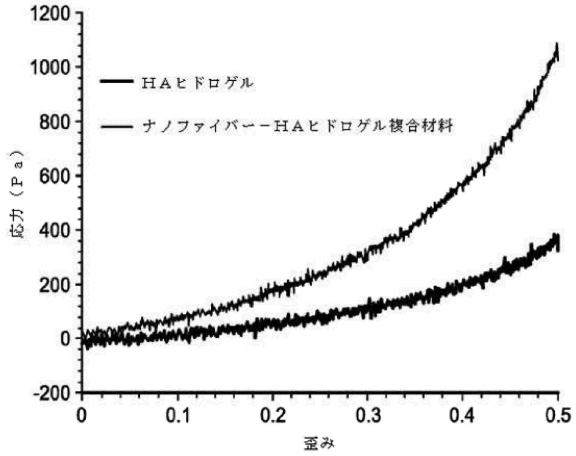
【図１Ｃ】



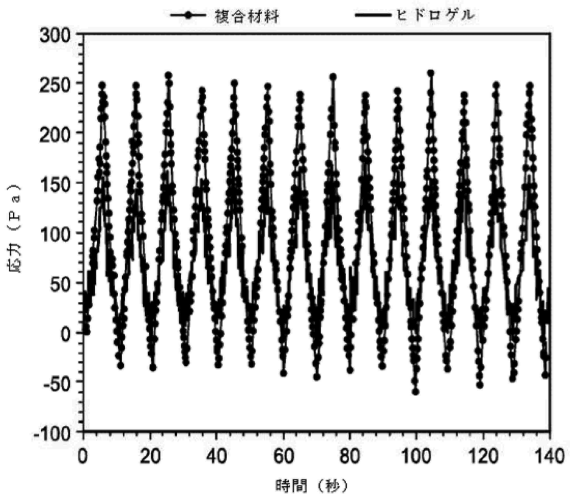
【図１Ｄ】



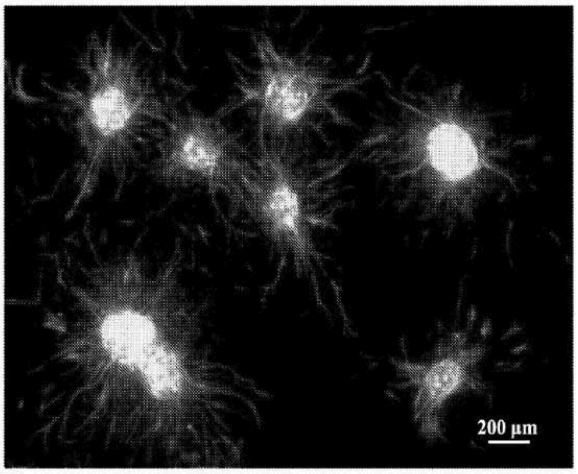
【図２Ａ】



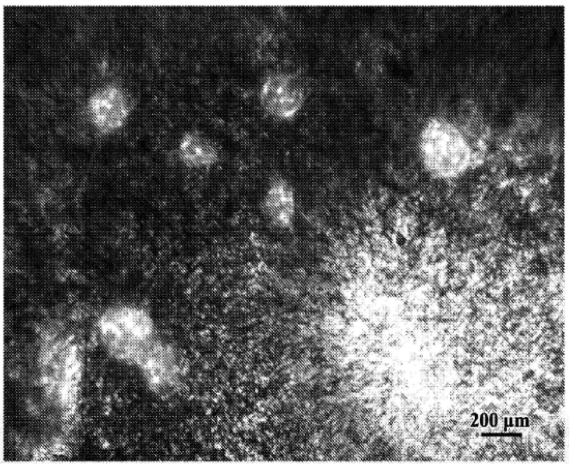
【図２Ｂ】



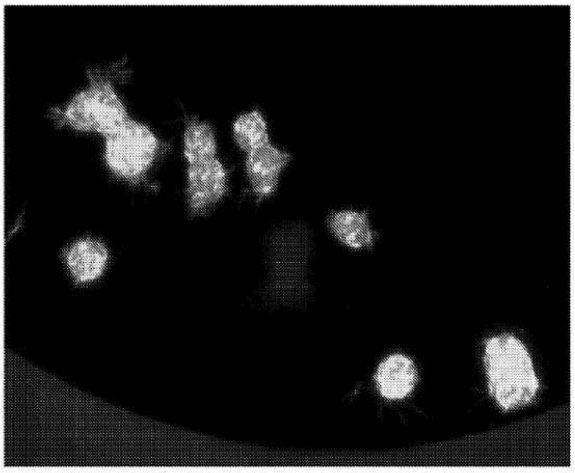
【図３Ａ】



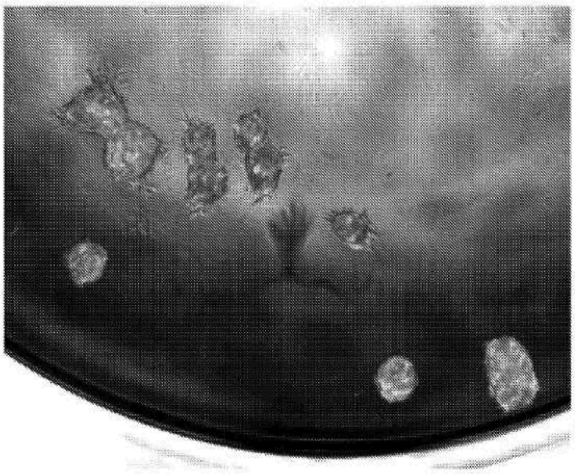
【図３Ｂ】



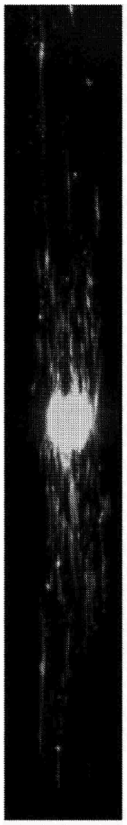
【図３Ｃ】



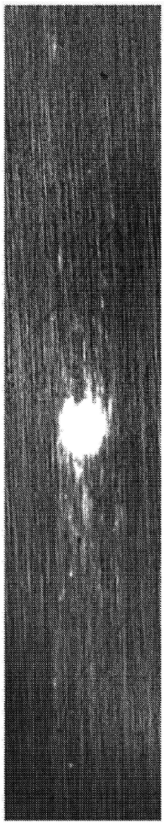
【図３Ｄ】



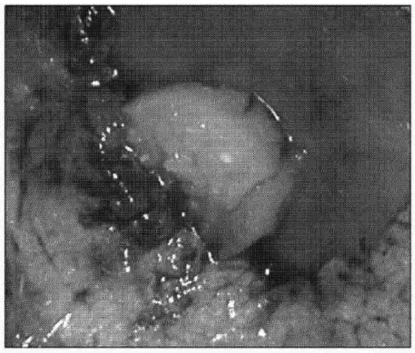
【図４Ａ】



【図４Ｂ】



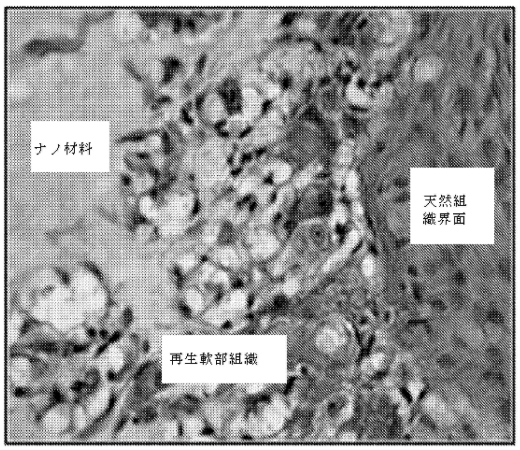
【図５Ａ】



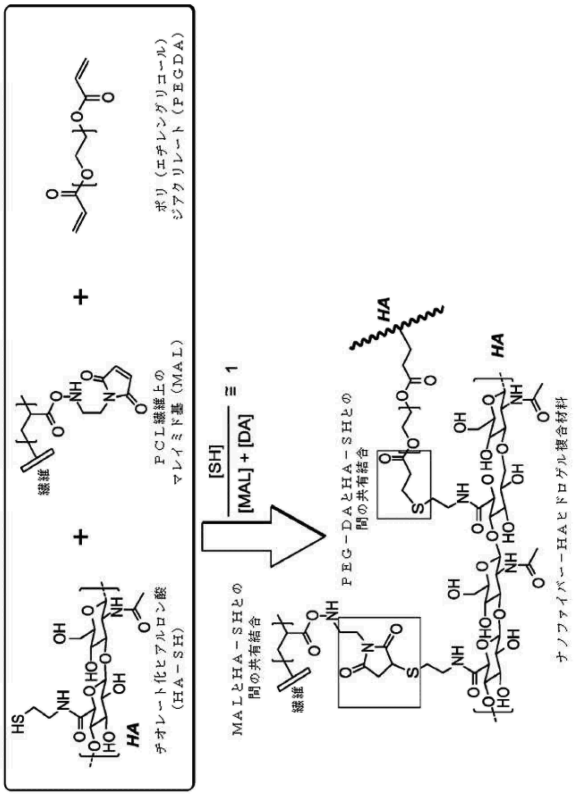
【図５Ｂ】



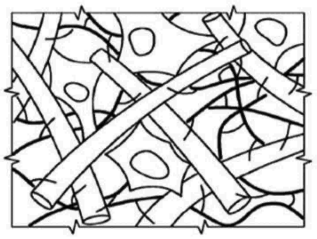
【図５Ｃ】



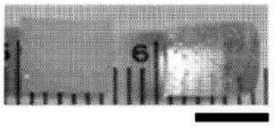
【図６Ａ】



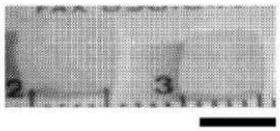
【図６Ｂ】



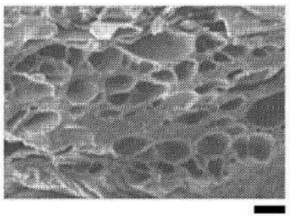
【図６Ｃ】



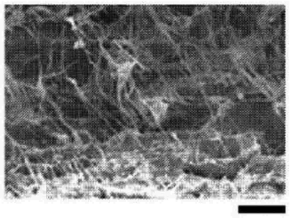
【図６Ｄ】



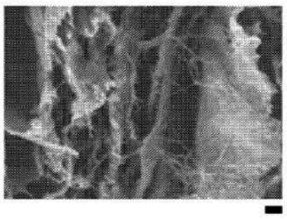
【図６Ｅ】



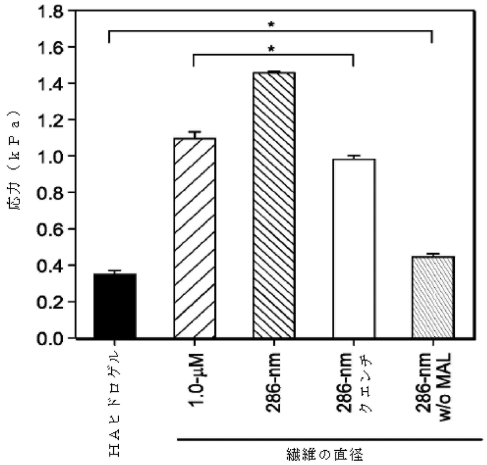
【図６Ｆ】



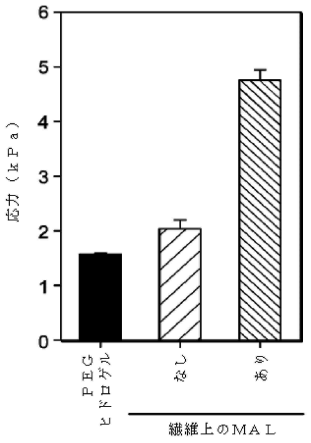
【図６Ｇ】



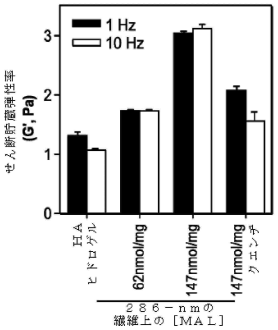
【図７Ａ】



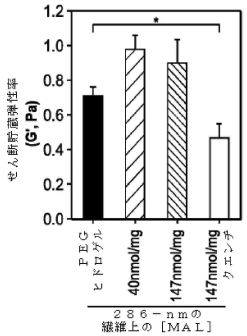
【図７Ｂ】



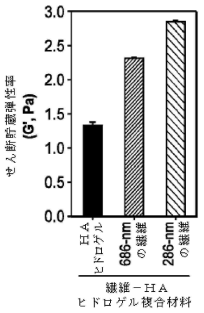
【図８Ａ】



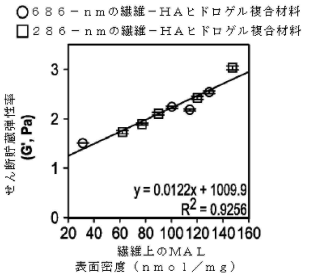
【図８Ｂ】



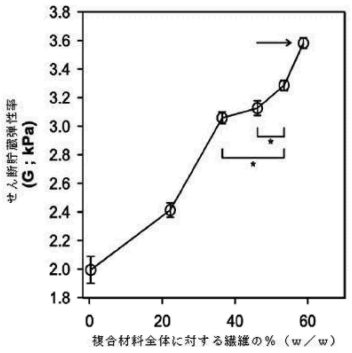
【図８Ｃ】



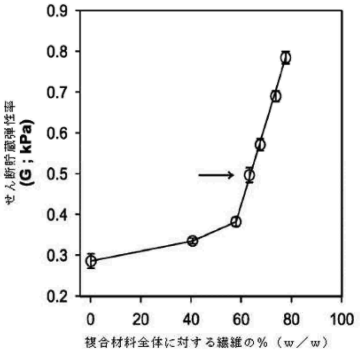
【図８Ｄ】



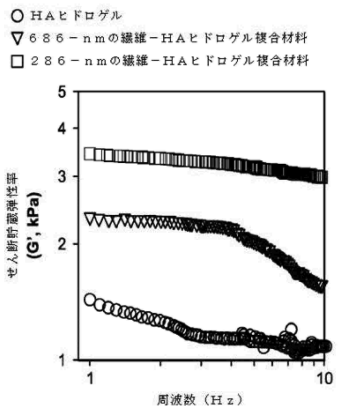
【図９Ａ】



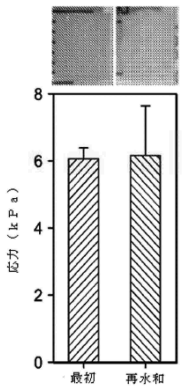
【図９Ｂ】



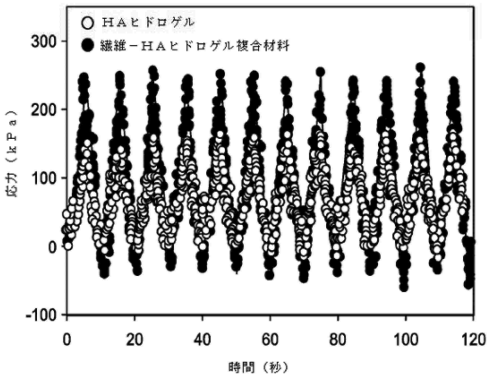
【図１０Ａ】



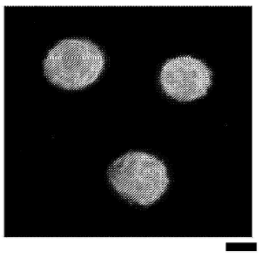
【図１０Ｂ】



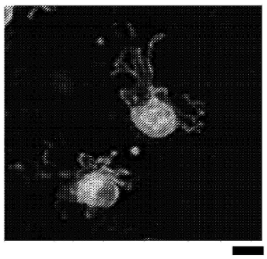
【図１０Ｃ】



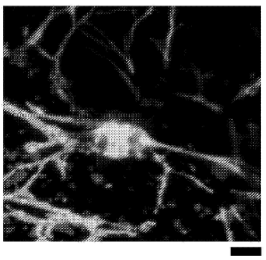
【図１１Ａ】



【図１１Ｂ】



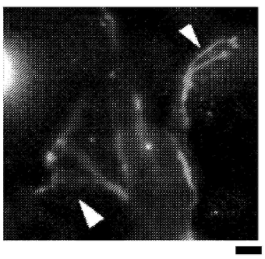
【図１１Ｃ】



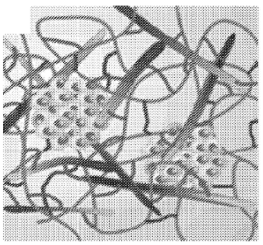
【図１１Ｄ】



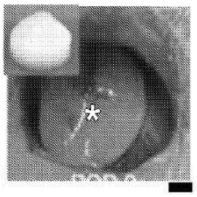
【図１１Ｅ】



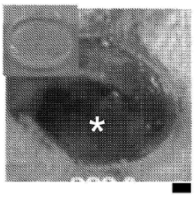
【図１１Ｆ】



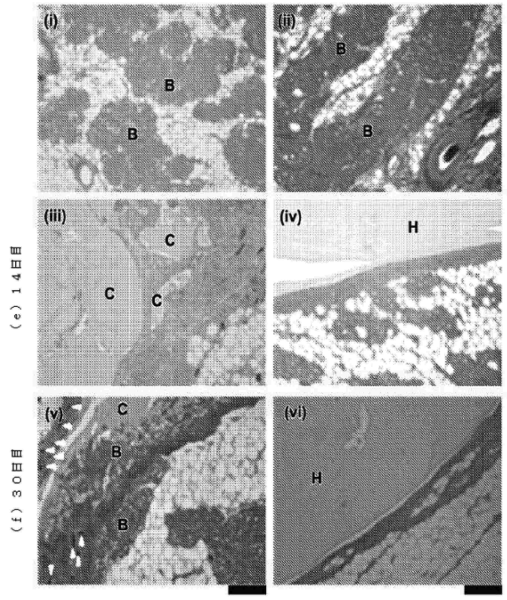
【図１２Ａ】



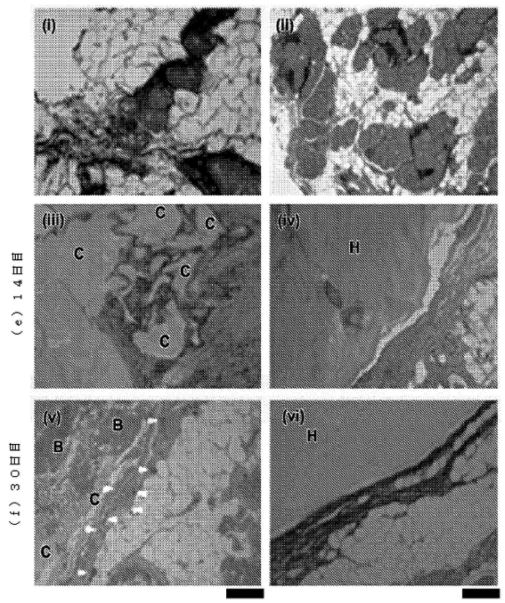
【図１２Ｂ】



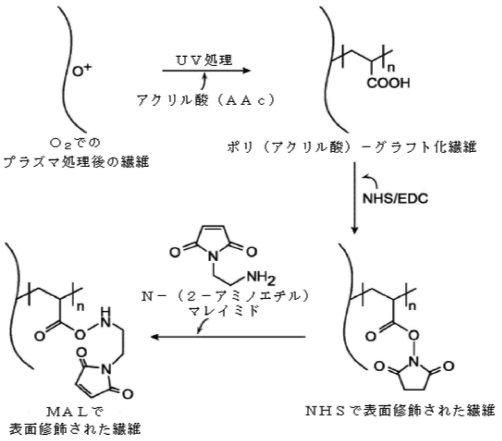
【図１２Ｃ】



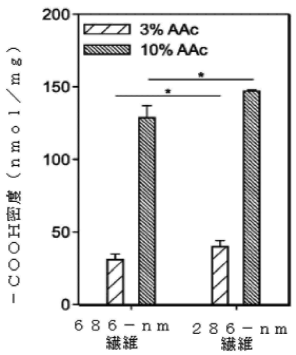
【図１２Ｄ】



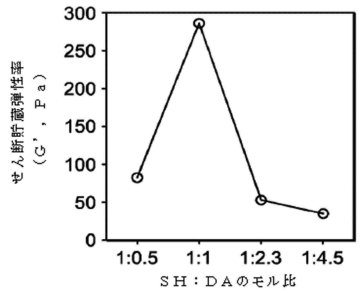
【図１３Ａ】



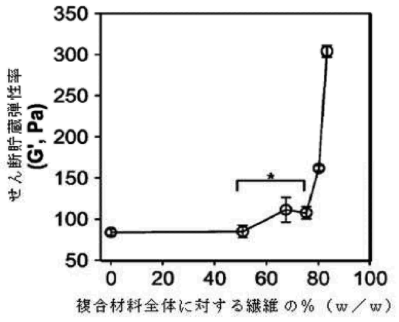
【図１３Ｂ】



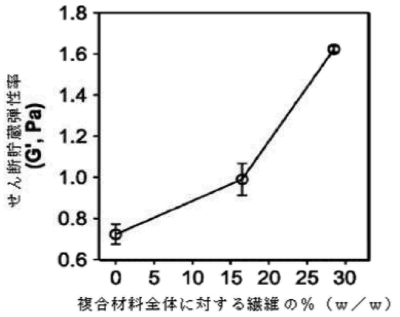
【図１４】



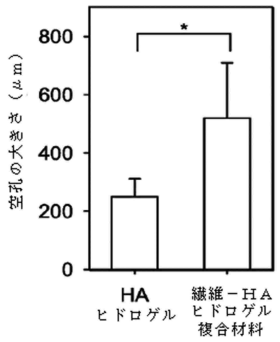
【図１５Ａ】



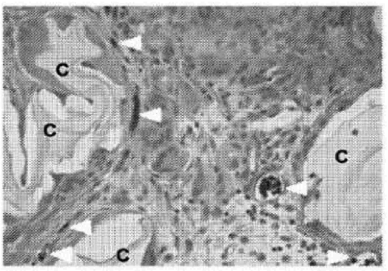
【図１５Ｂ】



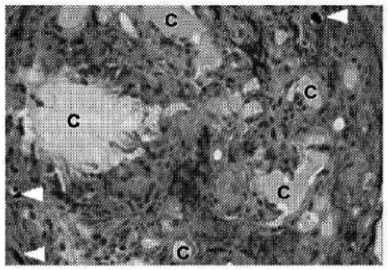
【図１６】



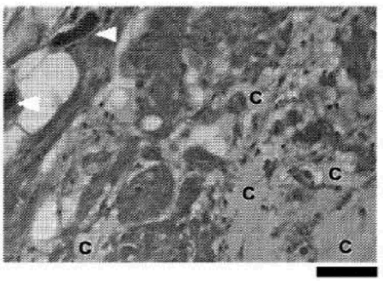
【図１７Ａ】



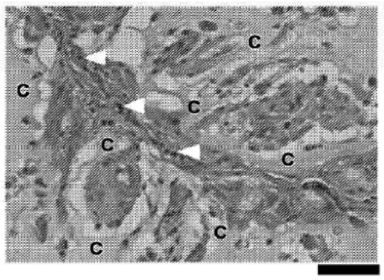
【図１７Ｂ】



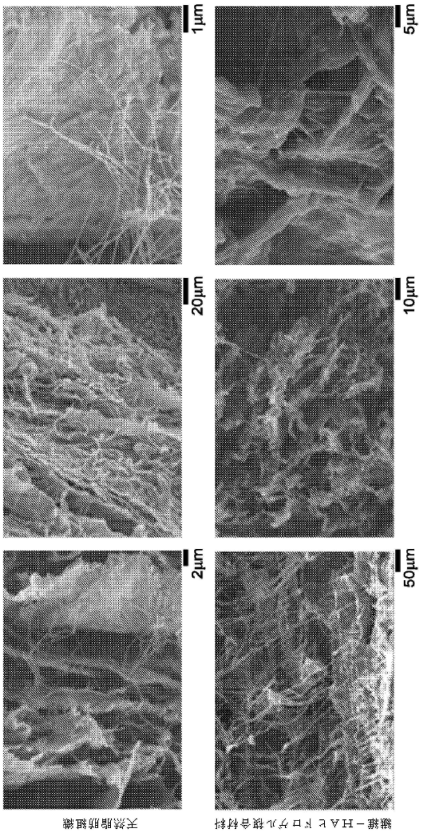
【図１７Ｃ】



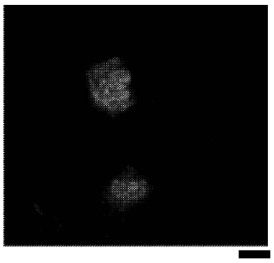
【図１７Ｄ】



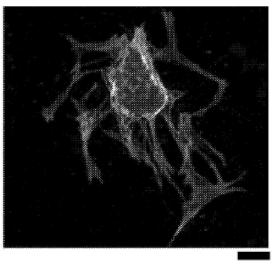
【図１８】



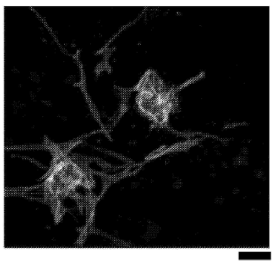
【図１９Ａ】



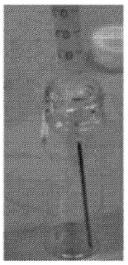
【図１９Ｂ】



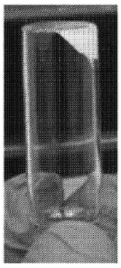
【図１９Ｃ】



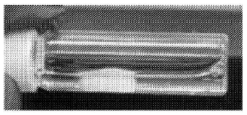
【図２０Ａ】



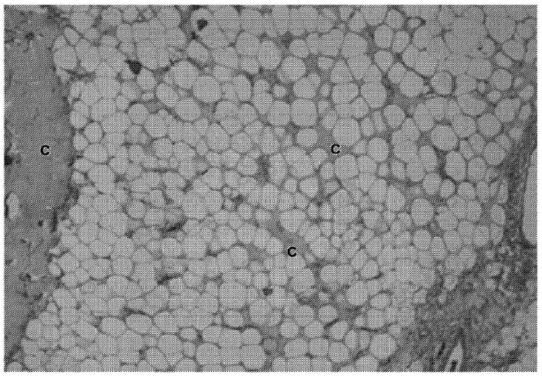
【図２０Ｂ】



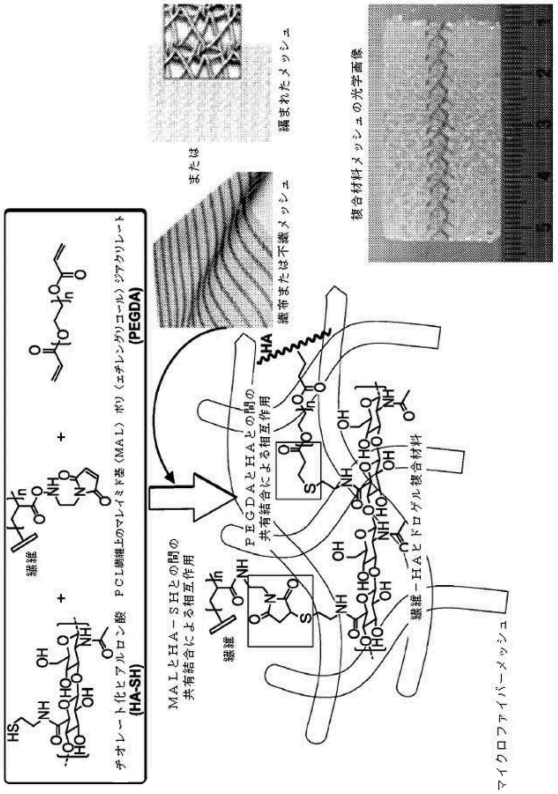
【図２０Ｃ】



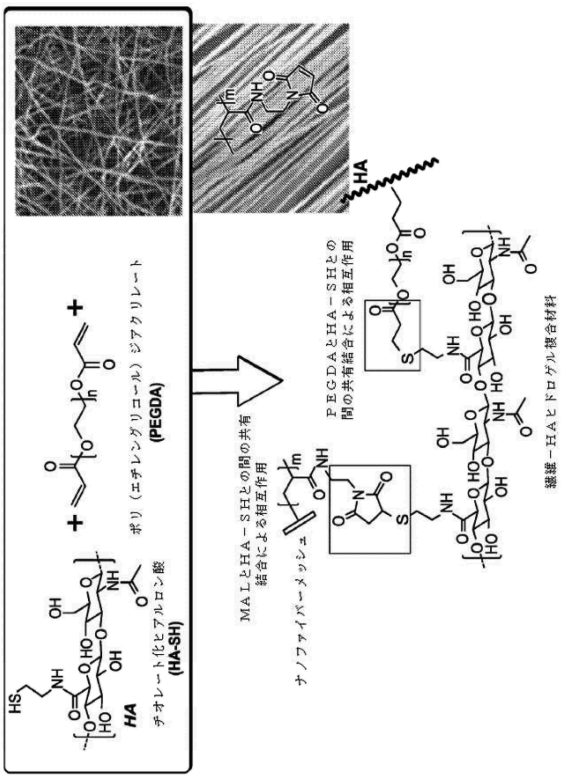
【図２０Ｄ】



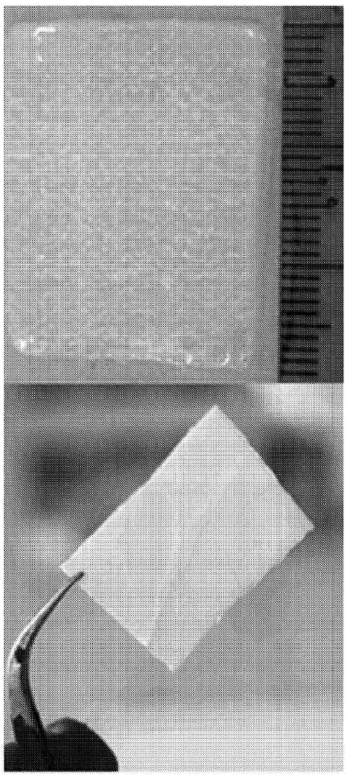
【図２１】



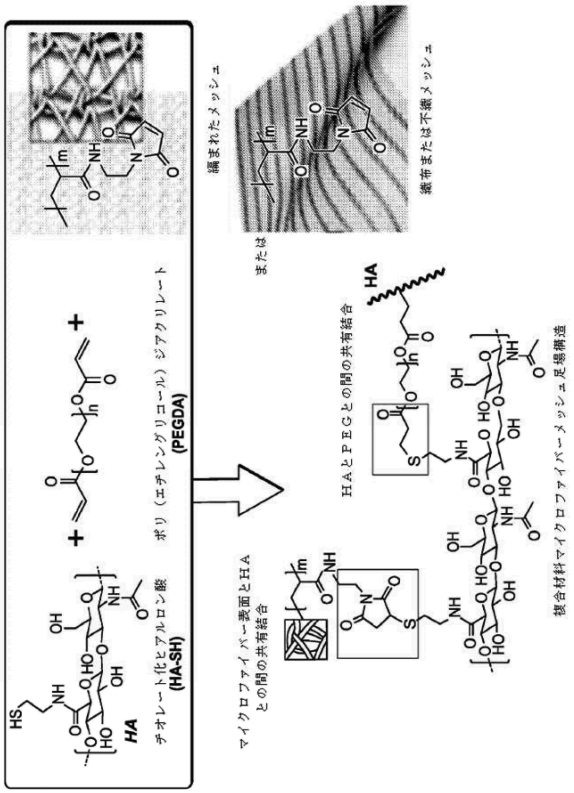
【図２２】



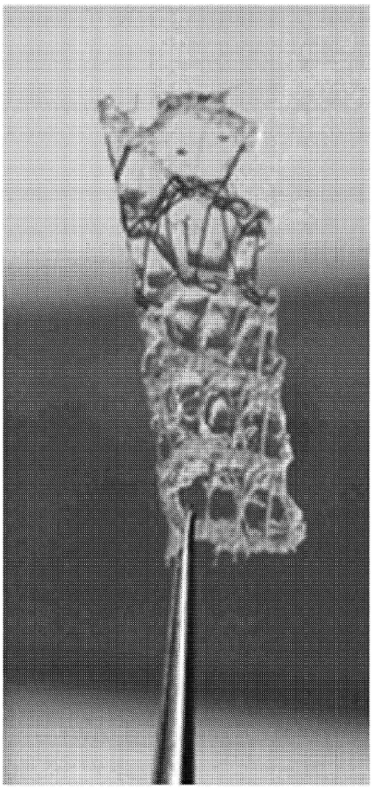
【図２３】



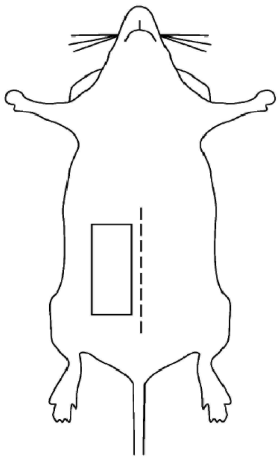
【図２４】



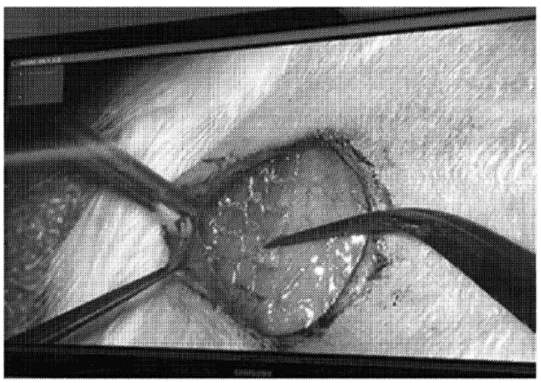
【図２５】



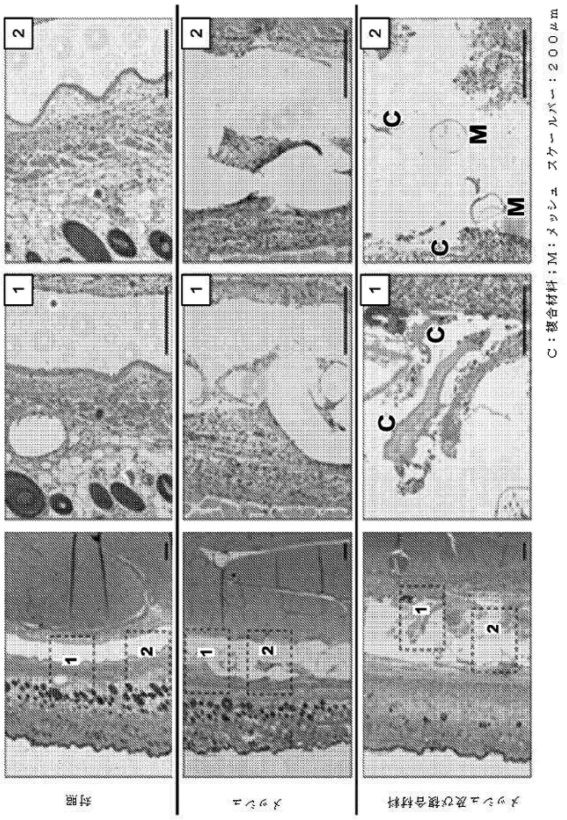
【図２６Ａ】



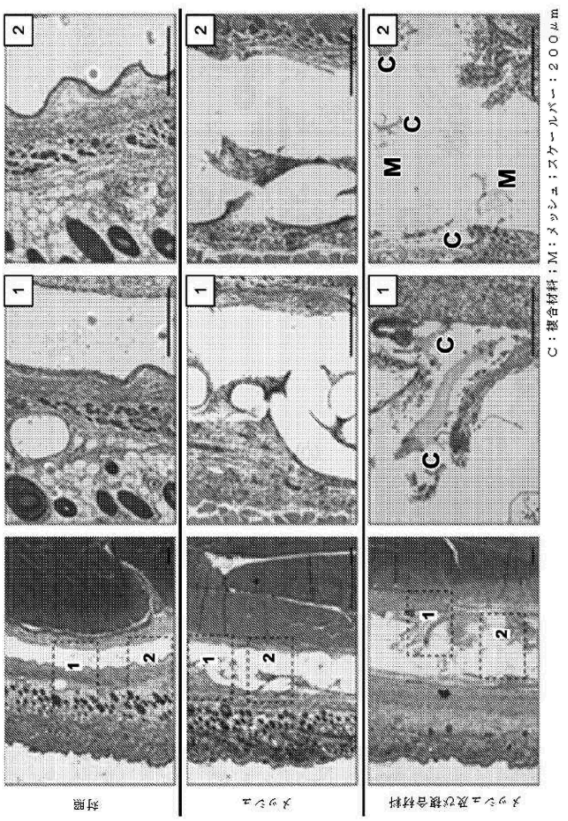
【図２６Ｂ】



【図２７Ａ】


C：複合材料；M：メッシュ　スケールバー：２００μｍ
タッシュ及び複合材料
タッシュ
対照
C
M
1
2

【図２７Ｂ】


C：複合材料；M：メッシュ；スケールバー：２００μｍ
タッシュ及び複合材料
タッシュ
対照
C
M
1
2

フロントページの続き

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｌ	*27/22*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*27/24*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*27/36*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*27/38*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*27/40*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*27/52*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*27/54*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*27/58*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*31/04*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*31/12*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*31/14*	*(2006.01)*
Ａ６１Ｌ	*31/16*	*(2006.01)*

ＦＩ

Ａ６１Ｌ	27/22	
Ａ６１Ｌ	27/24	
Ａ６１Ｌ	27/36	１００
Ａ６１Ｌ	27/36	３００
Ａ６１Ｌ	27/38	１００
Ａ６１Ｌ	27/40	
Ａ６１Ｌ	27/52	
Ａ６１Ｌ	27/54	
Ａ６１Ｌ	27/58	
Ａ６１Ｌ	31/04	１１０
Ａ６１Ｌ	31/04	１２０
Ａ６１Ｌ	31/12	
Ａ６１Ｌ	31/14	３００
Ａ６１Ｌ	31/14	５００
Ａ６１Ｌ	31/16	

(72)発明者　レディー サシャンク
アメリカ合衆国 メリーランド州，ボルチモア，ノース チャールズ ストリート １２０９，ユニット ４１６
(72)発明者　サックス ジャスティン
アメリカ合衆国 メリーランド州，ボルチモア，ノース チャールズ ストリート １００，テクノロジー ベンチャーズ，クラーク １０６
(72)発明者　リー シァオウェイ
アメリカ合衆国 メリーランド州，タウソン，キャンバーレー サークル ７０５，シー６
(72)発明者　チョー ブライアン オネウィー
アメリカ合衆国 メリーランド州，ボルチモア，ダンコーク ロード ６２
(72)発明者　マオ ハイ－チュアン
アメリカ合衆国 メリーランド州，ボルチモア，ノース チャールズ ストリート ６１２９

合議体
審判長　原田 隆興
審判官　前田 佳与子
審判官　小川 亮

(56)参考文献　米国特許出願公開第２０１２／００４０４６１（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１３／０２３０６０１（ＵＳ，Ａ１）

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61L31/00-31/18
A61L27/00-27/60