(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-527422
(P2017-527422A)
(43)公表日　平成29年9月21日(2017.9.21)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61L 27/26	***(2006.01)***	A61L	27/26	4C081
A61L 27/18	***(2006.01)***	A61L	27/18	
A61L 27/52	***(2006.01)***	A61L	27/52	
A61L 27/22	***(2006.01)***	A61L	27/22	
A61L 27/24	***(2006.01)***	A61L	27/24	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 62 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-528772 (P2017-528772)
(86)(22)出願日　平成27年8月17日 (2015.8.17)
(85)翻訳文提出日　平成29年4月12日 (2017.4.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/045494
(87)国際公開番号　WO2016/025945
(87)国際公開日　平成28年2月18日 (2016.2.18)
(31)優先権主張番号　62/038,030
(32)優先日　平成26年8月15日 (2014.8.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　398076227
ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティー
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　100158872
弁理士　牛山　直子
(74)代理人　100147289
弁理士　佐伯　裕子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組織修復のための複合材料

(57)【要約】
複合材料は、ゲルと、該ゲル中に配置された少なくとも１つのナノ構造体とを含むものであり得る。軟組織欠損を治癒させるための方法は、複合材料を軟組織欠損に適用することを含むものであり得、該複合材料が、ゲルと、該ゲル中に配置されたナノ構造体とを含むものである。軟組織欠損の治癒における使用のための複合材料の製造方法は、ゲルを準備すること、およびナノ繊維を該ゲル中に配置することを含むものであり得る。
【選択図】図１Ａ

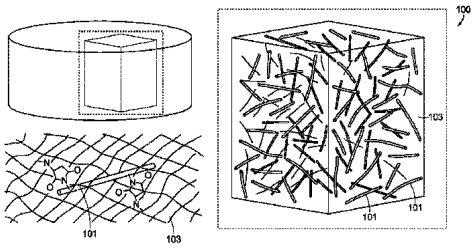


FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒドロゲル材料に共有結合された約１００ｎｍ～約８０００ｎｍの平均直径を有する高分子繊維を含むものである構造骨格複合体であって、該ヒドロゲル材料に対する該繊維の比が成分の質量ベースで約１：１０～約１０：１、または濃度ベースで約１～５０ｍｇ／ｍＬである構造骨格複合体。
【請求項２】
高分子繊維が生体適合性生分解性ポリエステルを含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項３】
高分子繊維がポリカプロラクトンを含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項４】
ヒドロゲル材料が機能性網目の前記複合体中に存在している、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項５】
無水ヒドロゲル材料に対する繊維の比が約１：１０～約１０：１である、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項６】
高分子繊維が不織高分子繊維を含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項７】
高分子繊維がポリカプロラクトンエレクトロスピニング繊維を含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項８】
高分子繊維が、ポリ（乳酸グリコール酸共重合体）、ポリ乳酸および／またはポリカプロラクトン、またはその組合せを含む合成高分子材料を含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項９】
実質的に生体適合性となるように配合された、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項１０】
高分子繊維が、シルク、コラーゲンおよびキトサン、またはその組合せからなる群より選択される生物学的高分子材料を含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項１１】
ヒドロゲル材料がヒアルロン酸を含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項１２】
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、アルギネート、フィブリン、アルギネート、ヒアルロン酸、ポリ（ビニルアルコール）、もしくはその誘導体、またはその組合せを含むものであるヒドロゲル材料を含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項１３】
ヒドロゲル材料が加工組織細胞外マトリックスを含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項１４】
加工組織細胞外マトリックスが脂肪組織から誘導可能なものである、請求項１３に記載の構造骨格複合体。
【請求項１５】
不織ポリカプロラクトン繊維を含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項１６】
ヒドロゲル材料が、前記ポリカプロラクトン繊維の外側表面の少なくとも一部分を実質的に覆っているヒアルロン酸を含むものである、請求項１に記載の構造骨格複合体。

【請求項１７】
ヒドロゲル材料が前記ポリマー繊維の外側表面に結合している、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項１８】
さらに、ポリマー繊維とヒドロゲル材料との間に結合が導入されるのに有効な量で存在している架橋性部分を含む、請求項１７に記載の構造骨格複合体。
【請求項１９】
表面上または表面内に存在している複数の細孔を含み、該細孔が該表面１ｃｍ^{2}あたり少なくとも約５０個の細孔の濃度で存在しており、該表面上の該細孔の少なくとも８０％が、少なくとも約５ミクロンである平均細孔直径を有する、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項２０】
さらに、ポリカプロラクトン繊維とヒアルロン酸との間に架橋が誘導されるのに有効な量存在している架橋性部分を含む、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項２１】
ヒト被験体に存在している標的組織に埋入された場合、組織成長および細胞浸潤を促進させる、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項２２】
ヒト組織内に埋入された場合、実質的に生分解性である、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項２３】
ヒト組織内に埋入された場合、実質的に非生分解性である、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項２４】
さらに、細胞、小分子、核酸およびポリペプチドから選択される治療用薬剤を含む、請求項１に記載の構造骨格複合体。
【請求項２５】
請求項１に記載の構造骨格複合体を含むものである埋入可能バイオマテリアル。
【請求項２６】
実質的に無細胞および／または実質的にポリペプチド無含有である、請求項２５に記載の埋入可能マテリアル。
【請求項２７】
注入による投与のために配合される、請求項２５に記載の埋入可能マテリアル。
【請求項２８】
皮下投与のために配合される、請求項２５に記載の埋入可能マテリアル。
【請求項２９】
請求項２５～２８のいずれか１つに記載の埋入可能マテリアルを備えたキット。
【請求項３０】
被験体に投与された場合、組織の形状の保持がもたらされるのに有効な量の請求項１に記載の構造骨格複合体または請求項２５に記載の埋入可能マテリアルを備えている、外科処置を受けている被験体において組織の形状を保持するための医療用デバイス。
【請求項３１】
複数の細孔がもたらされるように配向された高分子繊維を含むものである無細胞３次元構造骨格を準備する工程、ここで、該高分子繊維の少なくとも一部分は他のポリカプロラクトン繊維に架橋されている；ヒドロゲル材料を含む組成物を該高分子繊維上に配置して複合体を形成する工程；および該複合体を反応させるか、または安定化させて安定化された埋入物を形成し、それにより該埋入物を調製する工程を含む、組織または軟骨の修復のための埋入物の調製方法。
【請求項３２】
組織が軟組織を含む、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】
複数の細孔がもたらされるように配向された高分子繊維を含むものである無細胞３次元構造骨格を準備する工程；ヒドロゲル材料を含む組成物を該高分子繊維上に配置して複合体を形成する工程；および該複合体を反応させるか、または安定化させて安定化された埋入物を形成する工程、ここで、該高分子繊維の少なくとも一部分は該ヒドロゲル材料に架橋されている、を含む、組織または軟骨の修復のための埋入物の調製方法。
【請求項３４】
前記高分子繊維がポリカプロラクトンを含むものである、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記ヒドロゲル材料がヒアルロン酸を含むものである、請求項３３に記載の方法。
【請求項３６】
前記３次元構造骨格が反応性ポリカプロラクトン繊維を含むものである、請求項３３に記載の方法。
【請求項３７】
複数の細孔がもたらされるように配向された高分子繊維を含むものである無細胞３次元構造骨格を準備する工程；ヒドロゲル材料を含む組成物を該高分子繊維上に配置して複合体を形成する工程；および該複合体を反応させるか、または安定化させて安定化された埋入物を形成する工程、ここで、該高分子繊維の少なくとも一部分は該ヒドロゲル材料に架橋されている、を含む、組織または軟骨の修復のための埋入物の調製方法。
【請求項３８】
外傷または外科的介入に起因する組織欠損の解消方法であって、該組織を含む組織を膨張させることを含み、該組織を膨張させることが、有効量の請求項１に記載の構造骨格複合体を該組織に埋入し、それによりこれを膨張させることを含む方法。
【請求項３９】
加齢関連の疾患、障害または病状に起因する組織欠損を低減または逆転させるための方法であって、該組織を含む組織を膨張させることを含み、該組織を膨張させることが、有効量の請求項１に記載の構造骨格複合体を該組織に埋入し、それによりこれを膨張させることを含む方法。
【請求項４０】
組織欠損が胸膜組織、筋肉組織、皮膚、またはその組合せを含むものである、請求項３８または３９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１４年８月１５日に出願された発明の名称が「組織修復のための複合材料」である米国特許仮出願第６２／０３８，０３０号に対する３５Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１１９（ｅ）に基づく優先権の恩典を主張する国際特許出願である。この仮出願は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
技術分野
本開示は、失われた軟組織容積を回復させるとともに軟組織再生を促進させる複合材料および方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
外傷、腫瘍学的切除または先天性奇形に起因する軟組織欠損は、慣用的な手段によって処置することが困難である。現行の治療法、例えば組織再編成または組織移植はドナー部位の欠損を引き起こす。他の治療法、例えば補綴物の埋入は線維形成および被包化をもたらす。また、組織の内殖を促進させるための既存のストラテジーは軟組織欠損の処置には不充分である。現在使用されている無細胞マトリックスは、理想的な再構築に必要とされ

る軟質の３次元の組織ではなく、線維質の平坦なシート状の組織をもたらす。最後に、脂肪移植は軟組織欠損を回復させ得るが、その広範な利用は、移植片のばらばらな生着率および限定的な回復容積によって妨げられている。軟組織の再構築に対する理想的なアプローチにより、インビボでの脂肪組織などの軟組織の再生、その後の再生を促進させるための該組織の埋入が促され得よう。しかしながら、脂肪組織の再生には、細胞が新しい組織に付着する、遊走する、増殖する、分化、および組織化するための適切なマトリックスが必要とされる。修復部位では天然の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）の大部分がない。したがって、失われた組織容積をすぐに回復させるだけでなく、微小環境を修正し、宿主細胞浸潤を支持し、軟組織の再生も促す合成マトリックスの再創製は、脂肪組織ベースの再構築を用いて軟組織欠損を修復する場合の必須の課題となる。

【０００４】

ヒドロゲルは、軟組織の再構築のためのフィラー材として、いくつかの利点をもたらす。しかしながら、充分な機械的特性を得るためには、通常、高架橋密度が必要とされる。しかしながら、このような条件下では、宿主組織の細胞（例えば、脂肪細胞の前駆細胞および内皮前駆細胞）は、構造骨格内に浸透して成長することができない。分解性ヒドロゲルの場合、瘢痕形成性で線維性の組織の形成が典型的である。それは、宿主組織の内殖が起こるのが遅すぎるため、または少なくとも、該線維物質の吸収より遅いペースで起こるためである。

【０００５】

最近、種々の細胞の活動を支持するためのＥＣＭ模倣物としての機能を果たす官能基化ナノ繊維が開発されている。ＦＤＡに従う合成の生分解性ポリ－α－エステル、例えば、ポリカプロラクトン（ＰＣＬ）またはポリ（ラクチド－コ－グリコリド）（ＰＬＧＡ）は、エレクトロスピニングとして知られる方法によってナノ繊維を作製するために使用され得る。このようなポリマーから調製された生分解性の縫合糸および埋入物は、生体適合性に関するその優れた追跡記録のため臨床的に広く使用されている。幹細胞工学用途のためのさまざまな直径およびトポグラフィーの種々のナノ繊維が開発されている。しかしながら、このようなナノ繊維は巨視的構造をもたらすものではなく、３Ｄ構造骨格として使用することが困難になっている。

【０００６】

かかる慣用的な方法および系に伴う種々の問題を考慮すると、当該技術分野において、軟組織欠損の治癒に対する改善された解決策の必要性が依然として存在している。本開示により、当該技術分野において認識されている種々の問題が解決されるこの必要性に対する解決策を提供する。

【発明の概要】

【０００７】

本発明は、少なくとも一部において、改善された特性（例えば、以下にさらに詳述するような、軟組織の再構築のための改善された品質）を有する高分子繊維成分を有する構造骨格複合体の同定に基づいている。

【０００８】

一態様において、本発明により、ヒドロゲル材料に共有結合された約１００ｎｍ～約８０００ｎｍの平均直径を有する高分子繊維を含むものである構造骨格複合体であって、該ヒドロゲル材料に対する該繊維の比が成分の質量ベースで約１：１０～約１０：１、または濃度ベースで約１～５０ｍｇ／ｍＬである構造骨格複合体を提供する。

【０００９】

一実施形態では、高分子繊維が生体適合性生分解性ポリエステルを含むものである。任意選択で、高分子繊維はポリカプロラクトンを含むものである。

【００１０】

別の実施形態では、該ヒドロゲル材料が機能性網目の該複合体中に存在している。

【００１１】

さらなる一実施形態では、無水ヒドロゲル材料に対する該繊維の比が約１：１０～約１

０：１である。
【００１２】
別の実施形態では、高分子繊維が不織高分子繊維を含むものである。
【００１３】
一部の特定の実施形態では、高分子繊維がポリカプロラクトンエレクトロスピニング繊維を含むものである。任意選択で、高分子繊維は、ポリ（乳酸グリコール酸共重合体）、ポリ乳酸および／またはポリカプロラクトン、またはその組合せを含む合成高分子材料を含むものである。
【００１４】
一実施形態では、該複合体は実質的に生体適合性となるように配合されている。任意選択で、高分子繊維は、シルク、コラーゲン、キトサンおよび／またはその組合せを含む生物学的高分子材料を含むものである。
【００１５】
一実施形態では、該ヒドロゲル材料はヒアルロン酸を含むものである。任意選択で、該ヒドロゲル材料は、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、アルギネート（ａｎ　ａｌｇｉｎａｔｅ）、フィブリン、アルギネート（ａ　ａｌｇｉｎａｔｅ）、ヒアルロン酸、ポリ（ビニルアルコール）、もしくはその誘導体、またはその組合せを含むヒドロゲル材料を含むものである。
【００１６】
一部の特定の実施形態では、該ヒドロゲル材料は加工組織細胞外マトリックスを含むものである。
【００１７】
一実施形態では、加工組織細胞外マトリックスが脂肪組織から誘導可能なものである。
【００１８】
別の実施形態では、該構造骨格複合体が不織ポリカプロラクトン繊維を含むものである。
【００１９】
一実施形態では、該ヒドロゲル材料は、該ポリカプロラクトン繊維の外側表面の少なくとも一部分を実質的に覆っているヒアルロン酸を含むものである。
【００２０】
一部の特定の実施形態では、該ヒドロゲル材料が該ポリマー繊維の外側表面に結合している。
【００２１】
別の実施形態では、該構造骨格複合体は、さらに、該ポリマー繊維と該ヒドロゲル材料との間に結合が導入されるのに有効な量で存在している架橋性部分を含むものである。
【００２２】
一部の特定の実施形態では、該構造骨格複合体が、表面上または表面内に存在している複数の細孔を含み、該細孔が該表面１ｃｍ^{2}あたり少なくとも約５０個の細孔の濃度で存在しており、該表面上の該細孔の少なくとも８０％が少なくとも約５ミクロンである平均細孔直径を有する。
【００２３】
さらなる実施形態では、該構造骨格複合体は、さらに、該ポリカプロラクトン繊維とヒアルロン酸との間に架橋が誘導されるのに有効な量存在している架橋性部分を含むものである。
【００２４】
任意選択で、該構造骨格複合体は、ヒト被験体に存在している標的組織に埋入された場合、組織成長および細胞浸潤を促進させるものである。
【００２５】
一部の特定の実施形態では、該構造骨格複合体は、ヒト組織内に埋入された場合、実質的に生分解性である。

【００２６】
一実施形態では、該構造骨格複合体は、ヒト組織内に埋入された場合、実質的に非生分解性である。
【００２７】
別の実施形態では、該構造骨格複合体は、さらに、細胞、小分子、核酸およびポリペプチドから選択される治療用薬剤を含むものである。
【００２８】
本発明の別の態様により、本発明の構造骨格複合体を含むものである埋入可能バイオマテリアルを提供する。
【００２９】
一部の特定の実施形態では、該埋入可能マテリアルは実質的に無細胞および／または実質的にポリペプチド無含有である。
【００３０】
一実施形態では、該埋入可能マテリアルは注入による投与のために配合される。
【００３１】
別の実施形態では、該埋入可能マテリアルは皮下投与のために配合される。
【００３２】
本発明のさらなる一態様により、本発明の埋入可能マテリアルを含むキットを提供する。
【００３３】
本発明のさらなる一態様により、被験体に投与された場合、組織の形状の保持がもたらされるのに有効な量の本発明の構造骨格複合体および／または埋入可能マテリアルを含むものである、外科処置を受けている被験体において組織の形状を保持するための医療用デバイスを提供する。
【００３４】
本発明の別の態様により、複数の細孔がもたらされるように配向された高分子繊維を含むものである無細胞３次元構造骨格を準備する工程（ここで、該高分子繊維の少なくとも一部分は他のポリカプロラクトン繊維に架橋されている）；ヒドロゲル材料を含む組成物を該高分子繊維上に配置して複合体を形成する工程；および該複合体を反応させるか、または安定化させて安定化された埋入物を形成し、それにより該埋入物を調製する工程を含む、組織または軟骨の修復のための埋入物の調製方法を提供する。
【００３５】
任意選択で、該組織は軟組織を含む。
【００３６】
本発明のさらなる一態様により、複数の細孔がもたらされるように配向された高分子繊維を含むものである無細胞３次元構造骨格を準備する工程；ヒドロゲル材料を含む組成物を該高分子繊維上に配置して複合体を形成する工程；および該複合体を反応させるか、または安定化させて安定化された埋入物を形成する工程（ここで、該高分子繊維の少なくとも一部分は該ヒドロゲル材料に架橋されている）を含む、組織または軟骨の修復のための埋入物の調製方法を提供する。
【００３７】
一部の特定の実施形態では、該３次元構造骨格が反応性ポリカプロラクトン繊維を含むものである。
【００３８】
本発明のさらなる一態様により、複数の細孔がもたらされるように配向された高分子繊維を含むものである無細胞３次元構造骨格を準備する工程；ヒドロゲル材料を含む組成物を該高分子繊維上に配置して複合体を形成する工程；および該複合体を反応させるか、または安定化させて安定化された埋入物を形成する工程（ここで、該高分子繊維の少なくとも一部分は該ヒドロゲル材料に架橋されている）を含む、組織または軟骨の修復のための埋入物の調製方法を提供する。

【００３９】
本発明のさらなる一態様により、外傷または外科的介入に起因する組織欠損の解消方法であって、該組織を膨張させることを含み、該組織を膨張させることが、有効量の本発明の構造骨格複合体を該組織に埋入し、それによりこれを膨張させることを含む方法を提供する。
【００４０】
本発明の別の態様により、加齢関連の疾患、障害または病状に起因する組織欠損を低減または逆転させるための方法であって、該組織を含む組織を膨張させることを含み、該組織を膨張させることが、有効量の本発明の構造骨格複合体を該組織に埋入し、それによりこれを膨張させることを含む方法を提供する。
【００４１】
任意選択で、組織欠損は胸膜組織、筋肉組織、皮膚、またはその組合せを含む。
【００４２】
少なくとも一態様において、本発明により、ゲルと、該ゲル中に配置された少なくとも１つのナノ構造体とを含むものである複合材料を提供する。ゲルはヒドロゲルまたは任意の他の適切なゲルであり得る。ナノ構造体はナノ繊維または任意の他の適切なナノ構造体であり得る。ナノ構造体は該ゲルに共有結合され得る。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作製されたものであり得る。
【００４３】
少なくとも別の態様において、本発明により、複合材料を軟組織欠損に適用することを含み、該複合材料が、ゲルと、該ゲル中に配置されたナノ構造体とを含むものである、軟組織欠損を治癒させるための方法を提供する。
【００４４】
さらに別の態様において、本発明により、ゲルを準備すること、およびナノ繊維を該ゲル中に配置することを含む（ｗ　ｉｎｃｌｕｄｅ）、軟組織欠損の治癒における使用のための複合材料の製造方法を提供する。
【００４５】
適用可能な場合、または具体的に放棄されていない場合、本明細書に記載の任意の１つの実施形態は任意の他の１つ以上の実施形態と、該実施形態が本発明の異なる態様において記載されている場合であっても、組み合わせることができることが想定される。
【００４６】
これらおよび他の実施形態は開示されているか、または以下の詳細説明から自明であり、以下の詳細説明に包含されている。
【図面の簡単な説明】
【００４７】
一例として示し、本発明を記載の具体的な実施形態だけに限定することを意図するものではない以下の詳細説明は、添付の図面と併せると最良に理解され得よう。
【００４８】
【図１Ａ】図１Ａは、ゲル内に配置されたナノ構造体、特に、ナノ構造体とゲルの官能基との共有結合を示す、本開示による複合材の一実施形態の構造を示す（ｉｓ　ｉｌｌｕｓｔｒａｔｅｓ）。
【００４９】
【図１Ｂ】図１Ｂは、完全に膨潤した図１に示す複合材の光学顕微鏡画像を示す。
【００５０】
【図１Ｃ】図１Ｃは、水和させた図１に示す複合材の巨視的外観の画像である。
【００５１】
【図１Ｄ】図１Ｄは、ＥＣＭとの超微細構造上の類似性を示す、脱水させた図１に示す複合材の走査型電子顕微鏡検査（ＳＥＭ）画像を示す。
【００５２】
【図２Ａ】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した、図１の複合材の一実施形態の応力－歪み曲線を示す。

【００５３】

【図２Ｂ】図２Ｂは、図２Ａの複合材の実施形態が通常のヒドロゲルと比べて同様のロバスト性の機械的完全性を保持していることを示す疲労試験を示す。

【００５４】

【図３－１】図３Ａおよび図３Ｂは、ナノ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材内で４日間培養したＡＳＣの蛍光オーバーレイ（図３Ａ）および位相差画像（図３Ｂ）を示す。

【００５５】

【図３－２】図３Ｃおよび図３Ｄは、通常のＨＡヒドロゲル内で４日間培養したＡＳＣの蛍光オーバーレイ（図３Ｃ）および位相差画像（図３Ｄ）を示す。

【００５６】

【図４】図４Ａおよび図４Ｂは、スフェロイドから、整列した６５０ｎｍナノ繊維に沿って遊走しているＡＳＣを造影した蛍光画像およびオーバーレイ（図４Ａ）および位相差画像（図４Ｂ）を示す。

【００５７】

【図５Ａ】図５Ａは、ラット鼠径部脂肪体下のインサイチュでのナノ繊維－ヒドロゲル複合材の外観を示す写真である。

【００５８】

【図５Ｂ】図５Ｂは、埋入後２週間目に収集した複合材の周囲の組織の切片のＨ＆Ｅ染色画像を示す。

【００５９】

【図５Ｃ】図５Ｃは、４週間目に複合材－組織界面から採取した組織切片の細胞浸潤を示すＨ＆Ｅ染色画像を示す。

【００６０】

【図６－１】図６Ａは、ポリカプロラクトン（ＰＣＬ）繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の合成スキームを示す。

【００６１】

【図６－２】図６Ｂは、ＰＣＬ繊維とＨＡ鎖網目間に界面結合を有する複合材構造の模式図を示す。

【００６２】

図６Ｃは、同じ寸法を有する調製したばかりの円柱状繊維－ＨＡヒドロゲル複合材（左）とＨＡヒドロゲル（右）の全体的外観を示す光学画像を示す（スケールバー＝５ｍｍ）。

【００６３】

図６Ｄは、凍結乾燥および再水和後の同じ一組のサンプルの光学画像を示す。

【００６４】

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

【００６５】

図６Ｆは、ＰＣＬ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の断面のＳＥＭ画像を示す（スケールバー＝１００μｍ）。

【００６６】

図６Ｇは、脱細胞処理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）。

【００６７】

【図７】図７Ａは、ＨＡヒドロゲルの強化性圧縮弾性率に対する繊維直径および界面結合の効果を示す。ＨＡヒドロゲルおよび複合材は４．５ｍｇ／ｍｌのＨＡを元にして調製した。応力の値は５０％歪みで測定した。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。

【００６８】

図７Ｂは、ＰＥＧヒドロゲルの強化性圧縮弾性率に対する繊維直径および界面結合の効

果を示す。ＰＥＧヒドロゲルおよび複合材は３０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＳＨと２０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡを元にして調製し、繊維－ＰＥＧヒドロゲル複合材の合成には１．０μｍのＰＣＬ繊維を使用した。応力の値は５０％歪みで測定した。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。

【００６９】

【図８】図８Ａは、ＨＡヒドロゲルの強化性剪断貯蔵弾性率に対する界面結合の密度および繊維直径の効果を示す。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。

【００７０】

図８Ｂは、ＰＥＧヒドロゲルの強化性剪断貯蔵弾性率に対する界面結合の密度および繊維直径の効果を示す。剪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）。

【００７１】

図８Ｃは、ＨＡヒドロゲルの強化性剪断貯蔵弾性率に対する界面結合の密度および繊維直径の効果を示す。剪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）。

【００７２】

図８Ｄは、ＨＡヒドロゲルの強化性剪断貯蔵弾性率に対する界面結合の密度および繊維直径の効果を示す。剪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）。

【００７３】

【図９】図９Ａは、ＨＡヒドロゲルの剪断貯蔵弾性率に対する繊維負荷量の効果を示す。ＨＡヒドロゲルおよび複合材は１０ｍｇ／ｍｌのＨＡを用いて合成した。剪断貯蔵弾性率は１Ｈｚの周波数で測定する。青色矢印は、ＳＨ基対（ＤＡ＋ＭＡＬ）基のモル比が１対２である両方の複合材の条件を示す。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。

【００７４】

図９Ｂは、ＨＡヒドロゲルの剪断貯蔵弾性率に対する繊維負荷量の効果を示す。ＨＡヒドロゲルおよび複合材は４．５ｍｇ／ｍｌのＨＡを用いて合成した。剪断貯蔵弾性率は１Ｈｚの周波数で測定する。青色矢印は、（ＤＡ＋ＭＡＬ）基に対するＳＨ基のモル比が１対２である両方の複合材の条件を示す。＊ｐ＜０．０５（スチューデントのｔ検定）。

【００７５】

【図１０】図１０Ａは、異なる周波数での繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の機械的強度を示す。ＨＡヒドロゲルおよび複合材の剪断貯蔵弾性率は異なる周波数の剪断負荷に対して測定する。

【００７６】

図１０Ｂは、異なる再水和での繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の機械的強度を示す。再水和前および再水和後の複合材の圧縮応力の比較（歪み＝４０％）。

【００７７】

図１０Ｃは、異なる負荷サイクルでの繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の機械的強度を示す。ＨＡヒドロゲルおよび対応する複合材の圧縮応力を負荷サイクルに対して測定する（歪み＝２５％）。

【００７８】

【図１１】図１１Ａは、ＨＡヒドロゲル内における２７日目のヒト脂肪由来幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。１．９ｋＰａ前後の同様の圧縮弾性率を示すＨＡヒドロゲル対照とこの２種類の複合材を選択した。ｈＡＳＣのＦ－アクチンと核を、それぞれＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤）とＤＡＰＩ（青）で染色した。ナノ繊維をＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白）で標示した。スケールバー＝１００μｍ。

【００７９】

図１１Ｂは、ナノ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材内における２７日目のヒト脂肪由来幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。１．９ｋＰａ前後の同様の圧縮弾性率を示すＨＡヒドロ

ゲル対照とこの２種類の複合材を選択した。ｈＡＳＣのＦ－アクチンと核を、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤）とＤＡＰＩ（青）で染色した。ナノ繊維をＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白）で標示した。スケールバー＝１００μｍ。

【００８０】

図１１Ｃは、ＲＧＤ－ナノ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材内における２７日目のヒト脂肪由来幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。１．９ｋＰａ前後の同様の圧縮弾性率を示すＨＡヒドロゲル対照とこの２種類の複合材を選択した。ｈＡＳＣのＦ－アクチンと核を、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤）とＤＡＰＩ（青）で染色した。ナノ繊維をＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白）で標示した。スケールバー＝１００μｍ。

【００８１】

図１１Ｄは、ＲＧＤ－ナノ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材内における２７日目のヒト脂肪由来幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。１．９ｋＰａ前後の同様の圧縮弾性率を示すＨＡヒドロゲル対照とこの２種類の複合材を選択した。（ｄ）と（ｅ）における黄色の矢印は、繊維または繊維集合体に接着している細胞を示す。ｈＡＳＣのＦ－アクチンと核を、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤）とＤＡＰＩ（青）で染色した。ナノ繊維をＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白）で標示した。スケールバー＝２０μｍ。

【００８２】

図１１Ｅは、ナノ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材内における２７日目のヒト脂肪由来幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。１．９ｋＰａ前後の同様の圧縮弾性率を示すＨＡヒドロゲル対照とこの２種類の複合材を選択した。（ｄ）と（ｅ）における黄色の矢印は、繊維または繊維集合体に接着している細胞を示す。ｈＡＳＣのＦ－アクチンと核を、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８ファロイジン（赤）とＤＡＰＩ（青）で染色した。ナノ繊維をＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（白）で標示した。スケールバー＝２０μｍ。

【００８３】

図１１Ｆは、ヒト脂肪由来幹細胞（ｈＡＳＣ）の遊走能を示す。ＰＣＬ繊維とＨＡ鎖網目間に界面結合を有する複合材構造内におけるｈＡＳＣスフェロイドの模式図を示す。

【００８４】

【図１２－１】図１２Ａは、埋入した繊維－ＨＡヒドロゲル複合材およびＨＡヒドロゲルによって媒介された３０日目の組織再生を示す。鼠径部脂肪体下に埋入前（インセット）および埋入後の複合材の巨視的画像（スケールバー＝２ｍｍ）を示す。白色星印は、埋入したマトリックスを示す。

【００８５】

図１２Ｂは、埋入した繊維－ＨＡヒドロゲル複合材およびＨＡヒドロゲルによって媒介された３０日目の組織再生を示す。鼠径部脂肪体下に埋入前（インセット）および埋入後のＨＡヒドロゲルの巨視的画像（スケールバー＝２ｍｍ）を示す。白色星印は、埋入したマトリックスを示す。

【００８６】

図１２Ｃは、埋入した繊維－ＨＡヒドロゲル複合材およびＨＡヒドロゲルによって媒介された３０日目の組織再生を示す。（ｉ）天然脂肪組織、（ｉｉ）疑似手術後に治癒した組織、（ｉｉｉ，ｖ）繊維－ＨＡヒドロゲル埋入組織、および（ｉｖ，ｖｉ）ＨＡヒドロゲル埋入組織の１４日目および３０日目のＨ＆Ｅ染色画像およびマッソントリクローム染色画像を示す。画像において、Ｈ＝ＨＡヒドロゲル，Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材，Ｂ＝褐色脂肪組織，黄色の矢印＝血管。スケールバー＝２００μｍ。

【００８７】

【図１２－２】図１２Ｄは、埋入した繊維－ＨＡヒドロゲル複合材およびＨＡヒドロゲルによって媒介された３０日目の組織再生を示す。（ｉ）天然脂肪組織、（ｉｉ）疑似手術

後に治癒した組織、（ｉｉｉ，ｖ）繊維－ＨＡヒドロゲル埋入組織、および（ｉｖ，ｖｉ）ＨＡヒドロゲル埋入組織の１４日目および３０日目のＨ＆Ｅ染色画像およびマッソントリクローム染色画像を示す。マッソントリクローム染色による青色染色は、検査した組織内のすべてのコラーゲンを示す。画像において、Ｈ＝ＨＡヒドロゲル，Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材，Ｂ＝褐色脂肪組織，黄色の矢印＝血管。スケールバー＝２００μｍ。

【００８８】

【図１３】図１３Ａは、ＭＡＬを有する表面改質繊維のＰＡＡグラフト法による調製の模式的説明図を示す。

【００８９】

図１３Ｂは、３および１０％（ｖ／ｖ）のアクリル酸を用いたＰＡＡグラフト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）。

【００９０】

【図１４】図１４は、４．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ－ＳＨを用いて調製した、ＤＡに対するＳＨのモル比が種々のＨＡヒドロゲルの剪断貯蔵弾性率を示す。

【００９１】

【図１５】図１５Ａは、種々の量の繊維で調製した繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の剪断貯蔵弾性率を示す。繊維の平均直径は６８６ｎｍである。繊維上のＭＡＬ表面密度は１００ｎｍｏｌ／ｍｇであり、複合材は、４．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ－ＳＨおよび５ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡを用いて調製した。青色矢印は、ＳＨ基対（ＤＡ＋ＭＡＬ）基のモル比が１対２であることを示す。＊ｐ＜０．０５（ｎ＝３）。

【００９２】

図１５Ｂは、種々の量の負荷繊維を有する繊維－ＰＥＧヒドロゲル複合材の剪断貯蔵弾性率を示す。＊ｐ＜０．０５（ｎ＝３）。

【００９３】

【図１６】図１６は、断面のＳＥＭ画像に基づいて推定したＨＡヒドロゲルおよびナノ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の平均孔径を示す（＊ｐ＜０．０５）。

【００９４】

【図１７】図１７Ａは、繊維－ＨＡヒドロゲル複合材中への１４日目の細胞浸潤および組織内殖を示す。切片化組織をＨ＆Ｅにより、すべてのコラーゲン（青）について染色した。標示：Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材，黄色の矢印＝血管。スケールバー＝５０μｍ。

【００９５】

図１７Ｂは、繊維－ＨＡヒドロゲル複合材中への１４日目の細胞浸潤および組織内殖を示す。切片化組織をマッソントリクロームにより、すべてのコラーゲン（青）について染色した。標示：Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材，黄色の矢印＝血管。スケールバー＝５０μｍ。

【００９６】

図１７Ｃは、繊維－ＨＡヒドロゲル複合材中への３０日目の細胞浸潤および組織内殖を示す。切片化組織をＨ＆Ｅにより、すべてのコラーゲン（青）について染色した。標示：Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材，黄色の矢印＝血管。スケールバー＝５０μｍ。

【００９７】

図１７Ｄは、繊維－ＨＡヒドロゲル複合材中への３０日目の細胞浸潤および組織内殖を示す。切片化組織をマッソントリクロームにより、すべてのコラーゲン（青）について染色した。標示：Ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材，黄色の矢印＝血管。スケールバー＝５０μｍ。

【００９８】

【図１８】図１８は、脱細胞処理した脂肪組織（上側パネル）および繊維－ＨＡヒドロゲル複合材（下側パネル）の断面のＳＥＭ画像を示す。

【００９９】

【図１９】図１９Ａは、ＨＡヒドロゲル（Ｇ’＝２４．８５μ　２．９２Ｐａ）内におけ

る４日目のｈＡＳＣの遊走能を示す。ＨＡヒドロゲルは、２．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ－ＳＨおよび５．０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡを用いて製作した。スケールバー＝１００μｍ。

【０１００】

図１９Ｂは、１．０μｍ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材（Ｇ’＝３２．２９μ　２．１６Ｐａ）内における４日目のｈＡＳＣの遊走能を示す。複合材は、２．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ、５．０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡおよび１０ｍｇ／ｍｌの繊維を用いて製作した。スケールバー＝１００μｍ。

【０１０１】

図１９Ｃは、２８６ｎｍ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材（Ｇ’　３９．５６μ　１．２６Ｐａ）内における４日目のｈＡＳＣの遊走能を示す。複合材は、２．５ｍｇ／ｍｌのＨＡ、５．０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧＤＡおよび１０ｍｇ／ｍｌの繊維を用いて製作した。スケールバー＝１００μｍ。

【０１０２】

【図２０】図２０Ａは注入用配合物を示す。繊維－ヒドロゲル複合材は注入用の用途のために配合することができる。

【０１０３】

図２０Ｂは、注入用複合材が注入直後、安定であることを示す。

【０１０４】

図２０Ｃは、注入用複合材が水中に非分散性のままであり、形状と容積が保持されることを示す。

【０１０５】

図２０Ｄは、広範な細胞リモデリングおよび脂肪細胞形成を示す、注入用繊維－ＨＡヒドロゲル複合材中への３０日目の細胞浸潤および組織内殖を示す。切片化組織をＨ＆Ｅによって染色した。標示：ｃ＝繊維－ＨＡヒドロゲル複合材。

【発明を実施するための形態】

【０１０６】

本発明は、軟組織の再構築のための方法における使用のためのヒドロゲルとナノ構造体とを含むものである複合材料に関する。また、本発明は、軟組織の傷害を、ヒドロゲルと該ヒドロゲル中に配置されたナノ構造体とを含む組成物を用いて修復または再構築するための方法に関する。また、他の態様における本発明は、軟組織の再構築における使用のための組成物であって、ヒドロゲルと該ヒドロゲル中に配置されたナノ構造体とを含むものである組成物の製作方法に関する。

【０１０７】

以下は、当業者が本発明を実施するのを補助するために示した本発明の詳細説明である。当業者により、本明細書に記載の実施形態において本発明の趣旨または範囲を逸脱することなく修正および変形がなされ得る。特に定義していない限り、本明細書で用いる科学技術用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本発明の説明において本明細書で用いている専門用語は、具体的な実施形態の説明のためのものにすぎず、本発明を限定することを意図するものではない。本明細書で言及した刊行物、特許出願、特許、図および他の参考文献はすべて、引用によりその全体が明示的に組み込まれる。

【０１０８】

本明細書に記載のものと同様または同等の任意の方法および材料もまた、本発明の実施または試験において使用され得るが、好ましい方法および材料を次に説明する。本明細書で言及した刊行物はすべて、該刊行物の引用に関連する方法および／または材料を開示および記載するために、引用により本明細書に組み込まれる。

【０１０９】

特に定義していない限り、本明細書で用いる科学技術用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。以下の参考文献（その全開示内容は引用により本明細書に組み込まれる）は、当業者に、本発明で用いている

用語（本明細書において特に定義していない限り）の多くの一般的な定義を示すものである：Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（第２版 １９９４）；Ｔｈｅ Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｗａｌｋｅｒ編，１９８８）；Ｔｈｅ Ｇｌｏｓｓａｒｙ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，第５版，Ｒ．Ｒｉｅｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（編），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ（１９９１）；およびＨａｌｅ ＆ Ｍａｒｈａｍ，ｔｈｅ Ｈａｒｐｅｒ Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９１）。一般的に、本明細書に記載の、または本明細書に内在する分子生物学的方法の手順などは、当該技術分野で使用されている一般的な方法である。かかる標準的な手法は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，（２０００，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第３版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）；およびＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，（１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ－Ｙｏｒｋ）などの参照マニュアルにおいて知得され得る。

【０１１０】

以下の用語は、特に指定のない限り、以下の該用語に帰属する意味を有するものであり得る。しかしながら、当業者に知られているか、または理解されている他の意味もまた考えられ得、本発明の範囲に含まれることを理解されたい。本明細書で言及した刊行物、特許出願、特許および他の参考文献はすべて、引用によりその全体が組み込まれる。矛盾する場合は、本明細書（定義を含む）に支配される。また、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定を意図するものではない。

【０１１１】

定義

本明細書で用いる場合、「構造骨格複合体」は、２つの成分：高分子繊維とヒドロゲル材料の任意の共有結合体を包含している。構造骨格複合体は、高分子繊維とヒドロゲル材料を、成分間の相互作用によって化学的、生化学的、生物物理学的、物理学的または生理学的有益性がもたらされることを意味する「機能性網目」の状態で含有している。また、機能性網目に、さらなる成分、例えば、細胞、生物学的物質（例えば、ポリペプチド、核酸、脂質、炭水化物）、治療用化合物、合成分子などを含めてもよい。一部の特定の実施形態では、該構造骨格複合体は、ヒト被験体に存在している標的組織に埋入された場合、組織成長および細胞浸潤を促進させるものである。

【０１１２】

本明細書で用いる場合、用語「ヒドロゲル」は、「ゲル」の一類型であり、共有結合性架橋または非共有結合性架橋によって一体に保持された巨大分子（例えば、親水性ポリマー、疎水性ポリマー、そのブレンド）の３次元網目からなり、相当な量の水分（例えば、非水分子１単位あたり５０％、６０％ ７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または９９％より多く）を吸収して弾性ゲルを形成し得る水膨潤性の高分子マトリックスをいう。任意の適切な合成または天然のポリマー材料の高分子マトリックスが形成され得る。本明細書で用いる場合、用語「ゲル」は、液状媒体の容積にまたがり、表面張力効果によって捕えられた（ｅｎｓｎａｒｅ）固形の３次元網目をいう。この内部網目構造は、物理的結合（物理的ゲル）により生じるものであってもよく、化学結合（化学的ゲル）により生じるものであってもよいとともに、クリスタリットまたはエクステンダー液中でインタクトなままである他の接合部であってもよい。事実上、任意の流体、例えば、水（ヒドロゲル）、油および空気（エーロゲル）がエクステンダーとして使用され得る。重量および容積の両方で、ゲルは組成の大部分が流体であり、したがって、その構成液状物のものと同様の密度を示す。ヒドロゲルは、水が液状媒体として使用されるゲルの一類型である。

【０１１３】

「疎水性」ポリマーおよび「親水性」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１％までしか水を吸収しないものであるが、適度に親水性のポリマーは１～１０％の水を吸収するものであり、親水性ポリマーは１０％より多くの水を吸収し得るものであり、吸湿性ポリマーは２０％より多くの水を吸収するものである。「水膨潤性」ポリマーは、水性媒体中に浸漬させると自重の少なくとも５０％より多くの量の水を吸収するものである。

【０１１４】

用語「架橋されている」とは、本明細書において、組成物が、共有結合によってもたらされるものであれ非共有結合によってもたらされるものであれ、分子内および／または分子間架橋を含んでいることをいい、該架橋は直接的であってもよく、橋かけ剤を含むものであってもよい。「非共有」結合には水素結合と静電（イオン）結合の両方が包含される。

【０１１５】

用語「ポリマー」には線状および分岐型のポリマー構造が包含され、また、架橋ポリマーならびにコポリマー（これは架橋型であっても、そうでなくてもよい）、したがって例えば、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などが包含される。本明細書において「オリゴマー」という化合物は、約１０００Ｄａより小さい、好ましくは約８００Ｄａより小さい分子量を有するポリマーである。ポリマーおよびオリゴマーは、天然に存在するものであってもよく、合成供給源から得られるものであってもよい。

【０１１６】

軟組織の再構築

腫瘍根絶、外傷、加齢または先天性奇形による破滅的な軟組織喪失により、毎年、何百万人もの人が苦しめられている。組織、例えば皮膚、脂肪および筋肉の喪失は、大きな機能的および美容的障害をもたらし、これは、慣用的な手段で処置することが困難である。一例として、米国では毎年、３００，０００例を超える部分乳房切除術が行われており、乳房の軟組織の喪失により乳房の醜い傷跡となる。軟組織回復のための既存の選択肢は大きな欠点を有する。自家組織皮弁は、長時間外科処置での身体の別の部分からの軟組織の移動を必要とし、これはドナー部位を欠陥状態にする{ＬｏＴｅｍｐｉｏ ２０１０．Ｐｌａｓｔｉｃ ａｎｄ Ｒｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｖｅ Ｓｕｒｇｅｒｙ，１２６（２），３９３－４０１；Ｐａｔｅｌ ２０１２．Ａｎｎａｌｓ ｏｆ Ｐｌａｓｔｉｃ Ｓｕｒｇｅｒｙ，６９（２），１３９－１４４}。補綴埋入物は、異物に応答して線維形成および被包化をもたらしがちである{Ｃａｌｏｂｒａｃｅ ２０１４ Ｐｌａｓｔｉｃ ａｎｄ Ｒｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｖｅ Ｓｕｒｇｅｒｙ，１３４（１ Ｓｕｐｐｌ），６Ｓ－１１；Ｔｓｏｉ ２０１４．Ｐｌａｓｔｉｃ ａｎｄ Ｒｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｖｅ Ｓｕｒｇｅｒｙ，１３３（２），２３４－２４９}。脂肪吸引で収集した脂肪細胞の配置を伴う脂肪移植は、小容積に限定され、移植片の不充分な生着率によって妨げられている{Ｋａｋａｇｉａ ２０１４ Ｓｕｒｇｉｃａｌ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ，２１（３），３２７－３３６；Ｌａｒｇｏ ２０１４ Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｌａｓｔｉｃ Ｓｕｒｇｅｒｙ，６７（４），４３７－４４８}。最後に、注入用ヒドロゲル軟組織フィラーを使用することができるが、このようなものは小さい欠損部だけに適しており、もたらされる容積の回復は一時的である{Ｙｏｕｎｇ ２０１１．Ａｃｔａ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ，７（３），１０４０－１０４９；Ｖａｒｍａ ２０１４ Ａｃｔａ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ，１０（１２），４９９６－５００４}。再構築部位の軟組織（脂肪組織など）を再生させるためのテンプレートとしてヒドロゲル構造骨格を使用することに着目した新しい世代の組織工学的解決策が提案されている。

【０１１７】

軟組織の再構築に対する現行の組織工学的アプローチ

脂肪由来幹細胞（ＡＳＣ）は、軟組織欠損部周囲の創面環境において確認されている{Ｓａｌｉｂｉａｎ ２０１３ Ａｒｃｈｉｖｅｓ ｏｆ ｐｌａｓｔｉｃ ｓｕｒｇｅｒ

ｙ　４０．６：６６６－６７５｝。この細胞は、適切なマトリックス微小環境により支持された場合、脂肪などの軟組織に分化し得る。したがって、修復部位を機能性材料で充填するストラテジーは、内在性ＡＳＣを用いて新しい組織を再生できる可能性を有する。ヒドロゲルは、軟組織のものと同様のその３次元（３Ｄ）の性質と弾性特性のため、組織欠損の再生のための構造骨格マトリックスとして広く研究されている。天然脂肪組織のものと同様の弾性率（約２ｋＰａ）を有する｛Ａｌｋｈｏｕｌｉ　２０１３　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ，３０５（１２），Ｅ１４２７－３５；Ｓｏｍｍｅｒ　２０１３　Ａｃｔａ　ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ　９．１１（２０１３）：９０３６－９０４８｝とともに、周囲組織による物理的応力に対してその容積および形状が維持されるヒドロゲル構造骨格を作製するために種々の方法が使用されている。これには高い架橋密度と小さな平均孔径が必要とされる｛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｝が、低細胞浸潤および再生不良となる。ヒドロゲル構造骨格が細胞浸潤を促進させる能力は成功裡の軟組織回復の鍵である。血管浸潤がないことは、大容量の脂肪の移植および他の組織工学的試行の不成功の一因である。軟組織欠損の失われた容積を充填することができるとともに早期血管新生およびＡＳＣ分化を促進させて軟組織を再生させる現在利用可能な材料はない。

【０１１８】

ヒドロゲルマトリックス

過去、数年間で、ＬｉおよびＷｅｎにより、ラミニン由来ループペプチド（ＣＣＲＲＩＫＶＡＶＷＬＣ，１０μＭ）とコンジュゲートさせた、幹細胞移植のための最適化された孔径および弾性率（１０～１００Ｐａ）を有するヒアルロン酸（ＨＡ）ヒドロゲルが開発されている。彼らにより、このヒドロゲルが、ロバストな神経幹細胞（ＮＳＣ）の遊走および分化細胞からの神経突起の出現を支持することが示されている｛Ｌｉ　２０１４　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｎｅｕｒｏｔｒａｕｍａ，３１（１６），１４３１－１４３８｝。外傷性脳傷害のラット制御式皮質傷害（ＣＣＩ）モデルにおいて、このヒドロゲルは、ＣＣＩ傷害後３日目に注入した場合、有意な脈管構造網目形成を促進させ、埋入後、４週間～６ヵ月間で病変部位（＞１０ｍｍ）が充填された。この改善された新脈管形成は、このヒドロゲルが、組織が分泌する増殖因子、特に血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）を保持および提示する能力によるものであった。また、文献の報告により、３～１０個の二糖単位の小さいＨＡ分解断片は、内皮細胞の増殖、遊走、細管形成および新脈管形成の強力な調節因子であることが明らかになった｛Ｓｌｅｖｉｎ　２００２　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２７７（４３），４１０４６－４１０５９｝。最近の研究で、ＣＣＩ傷害後の脳病変部位にヒト胎児組織由来ＮＳＣスフェロイドを生成させるためのこの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、構造骨格マトリックス内部にロバストな血管形成をもたらした。再生血管は病変内に成長し、埋入したマトリックス中に浸透して神経前駆細胞の生着と成長を支持した。このような研究が脂肪組織再生のためのものでなくても、このような結果により、宿主の血管内殖の促進におけるこの最適化されたＨＡヒドロゲル組成物の特殊な能力が確認された。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内部でのロバストな細胞遊走が可能であるのに充分に多孔質である。しかしながら、このＨＡヒドロゲルをそのまま軟組織の再構築のために使用することは実現可能でない。それは、その機械的特性が、埋入部位の完全性が維持されるのに充分に高くない（周囲の脂肪組織は１０倍超高い弾性率を有する）ためである。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および遊走のための透過性が不充分になる。バルクヒドロゲルの平均孔径を有意に低減させることなく機械的特性を高めるための新しいストラテジーが必要とされている。加工組織細胞外マトリックス、例えば、脂肪組織に由来する、および／または脂肪組織から誘

導可能な細胞外マトリックスを含む、および／または該細胞外マトリックスから単離したヒドロゲル材料を提供する。

【０１１９】

構造骨格複合体。

本明細書において、ヒト被験体の組織内に組み込まれる医療用デバイス用途に適した構造骨格複合体を提供し、該複合体はヒト被験体に、例えば注入または埋入によって投与される。構造骨格複合体は、一般的には約１０ｎｍ～約１０，０００ｎｍ、例えば約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の平均直径を有する高分子繊維を含有している。本明細書に示しているように、ヒドロゲル材料に対する高分子繊維の比は、当該技術分野で知られた任意の手段によって（ｍｙ）求めることができる。例えば、ヒドロゲル材料に対する高分子繊維の比は、成分の質量ベースで約１：１００～約１００：１、例えば約１：５０～約５０：１、または１：１０～約１０：１、例えば１：５～約５：１、例えば約１：３～約３：１である。また、ヒドロゲル材料に対する高分子繊維の比は濃度ベースで、例えば、単位容量のヒドロゲル材料あたりの高分子繊維の所与の重量でも示される。例えば、該濃度は約１～５０ｍｇ／ｍＬである。ヒドロゲル材料は一般的にポリマー繊維上に、例えば、ポリマー繊維の外側表面（または組成および形状に応じて１つの外側表面）に結合しているように配置される。構造骨格複合体は、一般的には一様な固形物質ではない。そうではなく、構造骨格複合体は、該構造骨格複合体の表面上または表面内に存在している複数の細孔を含むものである。細孔の存在、サイズ、分布、頻度および他のパラメータは構造骨格複合体の創製中に調整することができる。孔径は約１ミクロン未満から１００ミクロンまで、例えば、１、２、３、４　５、１０、１５、２０、３０、４０、５０、６０　７０、８０、９０または１００ミクロンであり得、そのサイズは、例えば、細孔の少なくとも４０％、例えば５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または９５％より多くが所望のサイズであるか、または所望のサイズ範囲内であるように狭く個別調整され得る。

【０１２０】

本発明の構造骨格複合体はヒト被験体の組織内への組込みに適しており、したがって、一般的には「生体適合性」（生物学的系（例えば、ヒト被験体においてみられるもの）と、該系内に、および／または該系による病態生理学的応答が誘導されることなく相互作用し得ることを意味する）である。一部の実施形態では、該構造骨格複合体を、組織内に永続的に保持させるために提供する。あるいはまた、該構造骨格複合体をヒト被験体内に一時的に保持し、実質的に生分解性のものとして提供する。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有するものである。好ましい一実施形態では、高分子繊維はポリカプロラクトンを含有するものである。

【０１２１】

本明細書に示しているように、ポリマー繊維とヒドロゲルを含むものである該複合体の相互作用の好ましい一形態は、一般的に、該ポリマー繊維と該ヒドロゲル材料との間に結合が導入されるのに有効な量、例えば、該ポリカプロラクトン繊維とヒアルロン酸との間に架橋が誘導されるのに有効な量で存在している架橋性部分を含む。

【０１２２】

軟組織回復のための構造骨格の設計

複合材のコンセプトは、材料強化機構として広く使用されている。例えば、ヒドロキシアパタイト粒子をヒドロゲルに添加すると剛性を高めることができ｛Ｗｕ　２００８　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｐｈｙｓｉｃｓ　１０７．２（２００８）：３６４－３６９｝、細長い粒子では複合材の引張弾性率はさらにいっそう高くなる｛Ｙｕｓｏｎｇ　２００７　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｓｃｉｅｎｃ

ｅ，４２（１３），５１２９－５１３４｝。エレクトロスピニングナノ繊維メッシュは、そのトポグラフィー上での天然ＥＣＭとの類似性のため、組織工学的基材として広く使用されている。特に重要なことに、脂肪組織の脱細胞処理ＥＣＭは高度に線維性で多孔質の性質である（図６Ｇ）｛Ｙｏｕｎｇ　２０１１．Ａｃｔａ　Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ，７（３），１０４０－１０４９｝。いくつかの最近の研究で、断片化したポリ（ラクチド）（ＰＬＡ）またはキトサンの繊維を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ネートヒドロゲルに導入することにより、この線維性成分を再現することが試みられている｛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｝。断片化繊維は、ヒドロゲル前駆物質溶液と混合すると、ゲル化プロセス中にヒドロゲルに組み込まれ、３Ｄ構造物が創製される。このような繊維包埋ヒドロゲルは、対応するヒドロゲルと比べて改善された機械的特性が示されている。しかしながら、インビボでの宿主細胞浸潤の試験は報告されていない。また、このようなヒドロゲルは非分解性であり、脂肪細胞の接着および分化のための接着性リガンドが必要とされる。

【０１２３】

ナノ繊維－ヒドロゲル複合材の設計

ヒドロゲル相内に高い多孔度を維持したまま繊維強化効果を得るため、他の構造骨格と比べて卓越した特性をもたらすエレクトロスピニング繊維－ヒドロゲル複合材を提供する。既報のようにナノ繊維とヒドロゲルマトリックスをブレンドすること｛Ｃｏｂｕｒｎ　２０１１　Ｓｍａｒｔ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，７（３），２１３｝に加えて、本発明では、繊維表面とヒドロゲルの架橋網目との間に界面結合を導入する（図６）。かかる複合材設計は、固形の繊維成分によるより強固な機械的強化が可能になるだけでなく、ヒドロゲル相のバルクの機械的特性および平均孔径／多孔度を独立して微調整することも可能になり、最適な細胞浸潤特性と構造的完全性の両方が可能になる。繊維はＡＳＣおよび内皮前駆細胞のための好ましい細胞接着基材として使用され得、したがって、細胞遊走およびＡＳＣ分化を支持するためのガイドとしての機能を果たすことがさらに想定される。

【０１２４】

技術革新

一部の特定の態様において、技術革新の鍵は、ナノ繊維表面とヒドロゲルの網目との間に界面結合を有するナノ繊維－ヒドロゲル複合材設計である（図６Ａ）。この工学的複合材は、ヒドロゲル相の平均孔径を有意に低減させることなくヒドロゲルの機械的特性が劇的に改善される可能性を有する。界面結合の導入により、２つの成分を単に物理的にブレンドするのと比べて卓越した機械的強度効果がもたらされ得る。本研究は、ブレンドとは対照的にエレクトロスピニングポリカプロラクトン（ＰＣＬ）繊維－ＨＡヒドロゲル複合材で達成され得る範囲の機械的特性（圧縮弾性率および剪断弾性率）を計画するものである。第２の技術革新は、かかるナノ繊維－ヒドロゲル複合材が軟組織欠損を回復させることの実証である。事前の特性評価では、該複合材が脂肪組織と構造的特徴を共有していることが示された（図６）｛Ｃｈｒｉｓｔｍａｎ，２０１２　米国特許出願公開第２０１２０２６４１９０号；Ｙｏｕｎｇ　２０１１．Ａｃｔａ　Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ，７（３），１０４０－１０４９｝。この複合材により軟組織再生に重要な構造的完全性と機械的特性がもたらされるという仮説をたてた。また、本研究により、ヒドロゲルと比べて該複合材の多用途性および効率が実証された。

【０１２５】

本プロジェクトの成功裡の完成により、欠けている軟組織容積の回復のための、特に、血管網目の確立、組織修復部位の完全性の維持、細胞の遊走と組織化の促進、および宿主細胞の動員がすべて持続的な組織の回復に極めて重要な大きな欠損のためのオフザシェルフ（ｏｆｆ－ｔｈｅ－ｓｈｅｌｆ）の解決策がもたらされる。この複合材設計に使用され

る材料成分、すなわち、ＨＡヒドロゲルおよび生分解性ポリエステル繊維に関する広範な臨床的追跡記録により、組織適合性に関するこの事前のデータと合わせて、卓越した組織適合性および臨床応用のための規制当局の許可へのまっすぐな道が示唆された。

【０１２６】

特長：

一部の実施形態では、本発明により、ヒドロゲル成分中においてナノ繊維とポリマー網目との間に界面結合を提供する。これは「真の」複合材の形成に重要である。かかる繊維とヒドロゲルをブレンドすることでは同じ度合の機械的増強は得られないことが実証された。また、ナノ繊維－ヒドロゲルブレンドの使用に関する先の報告も存在する。換言すると、重要なことには、この界面結合によって新規な本研究が従来技術と識別される。さらに、界面結合には、本文書に示したような共有結合、ならびに二次結合、例えば、水素結合および静電荷相互作用が包含され得る。

【０１２７】

また、これは、等方性強化を示す、すなわち該複合材が、任意の幾何構造の欠損容積に置き換わるのに必要な全方向においてより強固になることを示す当該技術分野における最初の研究である。ナノ繊維マットまたは少数の整列したフィラメントを有する設計は本来、異方性である。本設計は、等方性材料および異方性材料の両方を構成することができるものである。

【０１２８】

本明細書に提示した本研究において、少なくとも一部の特定の態様では、複合材の形成に使用する成分を、細胞遊走および宿主組織の内殖に充分な孔径および多孔度を有するヒドロゲル網目と、５０ｎｍ～１０μｍの範囲の直径を有するポリマー繊維を疎密に含むナノ繊維とに規定している。

【０１２９】

ゲル／ヒドロゲル成分

本発明のヒドロゲル複合材は、任意の型の適切なヒドロゲル成分を含むものであり得る。本発明では、任意の適切なゲル成分、例えば、当該技術分野で知られた任意の適切なヒドロゲル成分を含むものであるナノ構造体／ゲル複合材を想定している。任意の適切な合成または天然の材料のゲルおよび／またはヒドロゲルが形成され得る。

【０１３０】

例えば、ゲルおよび／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）などを含むものであり得る。このようなセルロースエステルは、米国特許第１，６９８，０４９号、同第１，６８３，３４７号、同第１，８８０，８０８号、同第１，８８０，５６０号、同第１，９８４，１４７号、同第２，１２９，０５２号、および同第３，６１７，２０１号に記載されており、当該技術分野で知られた手法を用いて調製され得るか、または市販品で得られ得る。本明細書において好適な市販のセルロースエステルとしては、ＣＡ　３２０、ＣＡ　３９８、ＣＡＢ　３８１、ＣＡＢ　５５１、ＣＡＢ　５５３、ＣＡＰ　４８２、ＣＡＰ　５０４（すべて、Ｅａｓｔｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｋｉｎｇｓｐｏｒｔ，Ｔｅｎｎ．）から入手可能）が挙げられる。かかる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ものである。

【０１３１】

セルロースエステルは、セルロースモノマー単位とセルロースエステルモノマー単位の混合物を含むものである（ａｎｄ　ｃｏｍｐｒｉｓｅ）；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ならびにセルロースブチレートモノマー単位および非エステル化セルロース単位を含むものである。

【０１３２】

また、本発明のゲル／ヒドロゲルは、他の水膨潤性のポリマー、例えばアクリレートポリマーで構成されたものであってもよく、アクリレートポリマーは一般的に、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸メチル、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、メタクリル酸エチルおよび／または他のビニルモノマーから形成されるものである。好適なアクリレートポリマーは、上記のＲｏｈｍ　Ｐｈａｒｍａ（Ｇｅｒｍａｎｙ）の商標名「Ｅｕｄｒａｇｉｔ」で入手可能なコポリマーである。ＥｕｄｒａｇｉｔシリーズＥ、Ｌ、Ｓ、ＲＬ、ＲＳおよびＮＥコポリマーは、有機溶媒中に可溶化されたものとして、水性分散体の状態で、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、メタクリル酸とメタクリル酸メチルのコポリマー、例えば、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　ＬおよびＥｕｄｒａｇｉｔ　Ｓシリーズのポリマーである。特に好ましいかかるコポリマーはＥｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－３０Ｄ－５５とＥｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－１００－５５である（後者のコポリマーは、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－３０Ｄ－５５の噴霧乾燥形態であり、水で再構成することができる）。Ｅｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－３０Ｄ－５５およびＥｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－１００－５５コポリマーの分子量はおよそ１３５，０００Ｄａであり、エステル基に対する遊離カルボキシル基の比はおよそ１：１である。このコポリマーは一般的に、５．５より下のｐＨを有する水性液に不溶性である。別の特に適切なメタクリル酸－メタクリル酸メチルコポリマーはＥｕｄｒａｇｉｔ　Ｓ－１００であり、これは、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－３０Ｄ－５５とは、エステル基に対する遊離カルボキシル基の比がおよそ１：２であるという点で異なる。Ｅｕｄｒａｇｉｔ　Ｓ－１００は５．５より下のｐＨで不溶性であるが、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－３０Ｄ－５５とは異なり、５．５～７．０の範囲のｐＨを有する水性液中に難溶性である。このコポリマーはｐＨ７．０以上で可溶性である。また、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－１００も使用され得、これは、６．０より下のｐＨで不溶性である限りにおいてＥｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－３０Ｄ－５５とＥｕｄｒａｇｉｔ　Ｓ－１００の間のｐＨ依存性の溶解性プロフィールを有する。当業者には、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　Ｌ－３０Ｄ－５５、Ｌ－１００－５５、Ｌ－１００およびＳ－１００は、同様のｐＨ依存性の溶解性特徴を有する他の許容され得るポリマーで置き換えられ得ることが認識されよう。

【０１３３】

本明細書に記載の任意のゲル／ヒドロゲル組成物は、活性薬剤が含有され、それにより、身体表面（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した場合に活性薬剤送達系としての機能を果たすように改質してもよい。本発明の本発明のヒドロゲル組成物に「負荷」された活性薬剤の放出は典型的には、膨潤制御型拡散機構による水分の吸収と該薬剤の脱離の両方を伴う。活性薬剤含有ヒドロゲル組成物は、一例として、経皮薬物送達系、創傷ドレッシング材、経表面医薬配合物、埋入型薬物送達系、経口投薬形態などに使用され得る。

【０１３４】

本発明のヒドロゲル組成物に組み込まれ、全身（例えば、経皮、経口または薬物の全身投与に適した他の投薬形態で）送達され得る好適な活性薬剤としては、限定されないが：興奮剤；鎮痛剤；麻酔剤；抗関節炎剤；呼吸器用の薬物、例えば、抗喘息剤；抗がん剤、例えば、抗新生物薬；抗コリン作用薬；抗痙攣薬；抗鬱薬；抗糖尿病剤；下痢止め薬；駆虫薬；抗ヒスタミン薬；抗高脂血症剤；抗高血圧剤；抗感染剤、例えば、抗生物質および抗ウイルス剤；抗炎症性剤；抗片頭痛調製物；制吐剤；抗パーキンソニズム薬；止痒薬；抗精神病薬；解熱薬；鎮痙薬；抗結核剤；抗潰瘍剤；抗ウイルス剤；抗不安薬；食欲抑制薬；注意欠陥障害（ＡＤＤ）および注意欠陥多動障害（ＡＤＨＤ）薬；心血管用調製物、例えば、カルシウムチャネル遮断薬、抗狭心症剤、中枢神経系（ＣＮＳ）用の薬剤、β－遮断薬および抗不整脈剤；中枢神経系刺激薬；咳および風邪用の調製物、例えば、鬱血除去薬；利尿薬；遺伝物質；薬草療法薬；ホルモン溶解薬；催眠薬；低血糖剤；免疫抑制剤；ロイコトリエン阻害薬；分裂阻害薬；筋弛緩薬；麻薬拮抗薬；ニコチン；栄養剤、例えば、ビタミン類、必須のアミノ酸および脂肪酸；眼科系薬物、例えば、抗緑内障剤；副交感神経遮断薬；ペプチド薬物；精神刺激薬；鎮静薬；ステロイド薬、例えば、プロゲストゲン、エストロゲン、コルチコステロイド、アンドロゲンおよび同化剤；禁煙剤；交感神

経興奮薬；精神安定薬；ならびに血管拡張薬（例えば、冠状全般、末梢および脳のための）が挙げられる。本発明の接着性組成物とともに有用な具体的な活性薬剤としては、限定されないが、アナバシン、カプサイシン、硝酸（ｄｉｎｉｔｒａｔｅ）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（ｆｏｒｉｄｏｎｅ）、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（ｆｌｕａｃｉｚｉｎ）およびサルブタモールが挙げられる。

【０１３５】

経表面薬物投与および／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、一例として、以下のものが挙げられる。

【０１３６】

静菌剤および殺菌剤：好適な静菌剤および殺菌剤としては、一例として：ハロゲン化合物、例えば、ヨウ素、ポビドンヨード（ｉｏｄｏｐｏｖｉｄｏｎｅ）複合体（すなわち、ＰＶＰとヨウ素の複合体（「ポビジン（ｐｏｖｉｄｉｎｅ）」とも称され、Ｐｕｒｄｕｅ Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋの商標名Ｂｅｔａｄｉｎｅで入手可能である））、ヨウ化物塩、クロラミン、クロロヘキシジン、および次亜鉛素酸ナトリウム；銀および銀含有化合物、例えば、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、硫酸銀および塩化銀；有機スズ化合物、例えば、安息香酸トリ－ｎ－ブチルスズ；亜鉛および亜鉛塩；酸化剤、例えば、過酸化水素および過マンガンカリウム；アリール水銀化合物、例えば、ホウ酸フェニル水銀またはメルブロミン；アルキル水銀化合物、例えば、チメロサール（ｔｈｉｏｍｅｒｓａｌ）；フェノール、例えば、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およびヘキシルレゾルシノール；ならびに有機窒素化合物、例えば、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（ｃｈｌｏｒｈｅｘｅｄｉｎｅ）およびアンバゾン（ａｍｂａｚｏｎｅ）が挙げられる。

【０１３７】

抗生剤：好適な抗生剤としては、限定されないが、リンコマイシン系の抗生物質（最初にｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｌｉｎｃｏｌｎｅｎｓｉｓから収集された抗生剤の一類型をいう）、テトラサイクリン系の抗生物質（最初にｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ａｕｒｅｏｆａｃｉｅｎｓから収集された抗生剤の一類型をいう）、およびイオウベースの抗生物質、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物質としては、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号、同第３，５０９，１２７号、同第３，５４４，５５１号および同第３，５１３，１５５号に記載の関連化合物、ならびにその薬理学的に許容され得る塩およ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物質としては、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、メタサイクリンおよびドキシサイクリンならびにその薬学的に許容され得る塩およびエステル、特に酸付加塩（塩酸塩など）が挙げられる。例示的なイオウベースの抗生物質としては、限定されないが、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、ならびにその薬理学的に許容され得る塩およびエステル、例えば、スルファセタミドナトリウムが挙げられる。

【０１３８】

鎮痛剤：好適な鎮痛剤は、局所麻酔薬、例えば限定されないが、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（ａｍｕ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（ｂｕｒｅｔｈａｍｉｎｅ）、ブタカイン、ブタベン（ｂｕｔａｂｅｎ）、ブタニリカイン、ブタリタール（ｂｕｔｈａｌｉｔａｌ）、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（ｄｉｐｅｒａｄｏｎ）、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（ｅｔｏｘａｄｒｏｌ）、β－オイカイン、オイプロシン（ｅｕｐｒｏｃｉｎ）、フェナルコミン、フォモカイン（ｆｏｍｏｃａｉｎｅ）、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（ｋｅｎｔａｍｉｎｅ）、メシル酸ロイシノカイン、レボキサドロール（ｌｅｖｏｘａｄｒｏｌ）、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（ｔｈｉｍｙｌａｌ）、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、およびその組合せである。テトラカイン、リドカインおよびプリロカインは本明細書において言及している鎮痛剤である。

【０１３９】

本発明のヒドロゲル組成物を薬物送達系として用いて送達され得る他の経表面薬剤としては、以下のもの：抗真菌剤、例えば、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、クロトリマゾールおよびクロロキシレノール；角質溶解剤、例えば、サリチル酸、乳酸および尿素；起壊死性薬（ｖｅｓｓｉｃａｎｔ）、例えば、カンタリジン；抗座瘡剤、例えば、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、およびタザロテン）、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、乳酸およびグリコール酸）、α－ケト酸（例えば、グリオキシル酸）、ならびに具体的に座瘡の処置に指示される抗菌剤、例えば、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、およびオフロキサシン；美白剤および漂白剤、例えば、ヒドロキノン、コウジ酸、グリコール酸および他のα－ヒドロキシ酸、アルトカルピン、および一部の特定の有機過酸化物；疣を処置するための薬剤、例えば、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、およびそのアナログ；ならびに抗炎症剤、例えば、コルチコステロイドおよび非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）（ここで、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、およびチアプロフェン酸が挙げられる）が挙げられる。

【０１４０】

創傷ドレッシング材のためには、好適な活性薬剤は創傷の処置に有用なものであり、限定されないが、静菌性化合物および殺菌性化合物、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、タンパク質分解性酵素、サイトカインならびにポリペプチド増殖因子が挙げられる。

【０１４１】

一部の活性薬剤の経表面投与および経皮投与のため、および創傷ドレッシング材において、皮膚内または皮膚経由での該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向上剤を組み込むことが必要または望ましい場合があり得る。好適な向上剤としては、例えば、以下のもの：スルホキシド、例えば、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）およびデシルメチルスルホキシド；エーテル、例えば、ジエチレングリコールモノエチルエーテル（Ｔｒａｎｓｃｕｔｏｌとして市販品として入手可能）およびジエチレングリコールモノメチルエーテル；界面活性剤、例えば、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、ポロキサマー（２３１、１８２、１８４）、Ｔｗｅｅｎ（２０、４０、６０、８０）およびレシチン（米国特許第４，７８３，４５０号）；１－置換アザシクロヘプタン－２－オン、特に、１－ｎ－ドデシルシクラザ－シクロヘプタン－２－オン（Ｎｅｌｓｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ＆ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｃｏ．，Ｉｒｖｉｎｅ，Ｃａｌｉｆ．の商標Ａｚｏｎｅで入手可能；米国特許第３，９８９，８１６号、同第４，３１６，８９３号、同第４，４０５，６１６号および同第４，５５７，９３４号参照）；アルコール、例えば、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など；脂肪酸、例えば、ラウリン酸、オレイン酸および吉草酸；脂肪酸エステル、例えば、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、およびオレイン酸エチル；ポリオールおよびそのエステル、例えば、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、およ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号参照）；アミドおよび他の含窒素化合物、例えば、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およびトリエタノールアミン；テルペン；アルカノン；ならびに有機酸、特に、サリチル酸およびサリチレート、クエン酸およびコハク酸が挙げられる。また、２種類以上の向上剤の混合物を使用してもよい。

【０１４２】

他の一部の特定の実施形態において、ゲル（例えば、ヒドロゲル成分）およびナノ構造体を含むものである本発明の複合材組成物はまた、任意選択のさらなる添加剤成分も含むものであってもよい。かかる成分は当該技術分野で知られており、例えば、フィラー、保存料、ｐＨ調節剤、柔軟剤、増粘剤、顔料、色素、屈折性粒子、安定剤、強化剤、粘着防止剤、医薬用薬剤（例えば、抗生物質、新脈管形成促進薬、抗真菌剤、免疫抑制剤、抗体など）、および浸透向上剤が挙げられ得る。このような添加剤およびその量は、ヒドロゲル組成物の所望の化学的および物理的特性に有意に支障を来さないような様式で選択される。

【０１４３】

吸収剤フィラーは、該接着体が皮膚または他の身体表面上に存在する場合の水和の度合を制御するために好都合に組み込まれ得る。かかるフィラーとしては、微晶質セルロース、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、網目紙および不織紙ならびに木綿材料が挙げられ得る。他の適切なフィラーは、不活性な、すなわち実質的に非吸着性であり、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、ポリエステルおよびポリエステルコポリマー、ナイロンならびにレーヨンが挙げられる。

【０１４４】

また、該組成物に１種類以上の保存料を含めてもよい。保存料としては、一例として、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、およびプロピレングリコールが挙げられる。

【０１４５】

また、該組成物にｐＨ調節化合物を含めてもよい。ｐＨ調節剤として有用な化合物としては、限定されないが、グリセロールバッファー、クエン酸バッファー、ホウ酸バッファー、リン酸バッファーが挙げられるか、あるいは、また、ヒドロゲル組成物のｐＨが個体の身体表面のものと同等であることが確実になるようにクエン酸－リン酸バッファーを含めてもよい。

【０１４６】
また、該組成物に適切な柔軟剤を含めてもよい。好適な柔軟剤としては、クエン酸エステル、例えば、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、酒石酸エステル、例えば、酒石酸ジブチル、グリセロールエステル、例えば、グリセロールジアセテートおよびグリセロールトリアセテート；フタル酸エステル、例えば、フタル酸ジブチルおよびフタル酸ジエチル；および／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、糖類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、およ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。

【０１４７】
また、該組成物に増粘剤を含めてもよい。本明細書における好ましい増粘剤は、天然に存在する化合物またはその誘導体であり、一例として：コラーゲン；ガラクトマンナン；デンプン；デンプン誘導体および加水分解物；セルロース誘導体、例えば、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、およびヒドロキシプロピルメチルセルロース；コロイド状ケイ酸；ならびに糖類、例えば、ラクトース、サッカロース、フルクトースおよびグルコースが挙げられる。また、合成増粘剤、例えば、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およびポリプロピレングリコールも使用され得る。

【０１４８】
一部の特定の実施形態では、ヒドロゲルとナノ構造体を含むものである本発明のヒドロゲル複合材はさらに、新脈管形成を促進させる成分を含むものである。臨床的に重要な軟組織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血管形成すべきということである。したがって、軟組織再生を促進させる任意の材料は好ましくはまた、新脈管形成を促すものもあるのがよい。これを達成するための方法の１つは、新脈管形成および組織形成を促進させる増殖因子を富化および保持するための増殖因子結合部位としての機能を果た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。

【０１４９】
種々の他の実施形態において、本発明の複合材料は、ヒドロゲル材料として（ａｓ　ｔｈｅｙ）ヒアルロン酸（ＨＡ）をベースにしたものであり得る。ＨＡは、ヒドロゲル成分を構成する二糖反復単位を有する非硫酸系の線状多糖である。また、ＨＡは、ヒト組織の細胞外マトリックスの非免疫原性天然成分であり、美容処置および再建処置において皮膚用フィラーとして広く使用されている。

【０１５０】
ＨＡの分解は天然のヒアルロニダーゼによって助長され、ヒアルロニダーゼの発現は組織損傷領域および炎症領域で高くなっている。重要なことに、研究により、３～１０個の二糖単位のＨＡの分解小断片が内皮細胞の増殖、遊走、細管形成および新脈管形成の強力な調節因子であることが示されている。ＨＡのこのような生物学的機能は、ＲａｓおよびＰＫＣを伴う経路において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相互作用のブロックにより、インビトロでヒト微小血管の内皮細胞の増殖および遊走が低減された。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さまざまな細胞傷害モデルおよび組織傷害モデルにおいて研究されている。このようなヒドロゲルは、細胞のための保護的および支持性構造骨格としての機能を果たし得、また、瘢痕形成性を低減させ得る。したがって、ＨＡは、細胞浸潤を促進させること、および新脈管形成を促進させることによって組織再生の向上に極めて重要な役割を有すると考えられる。

【０１５１】
第１に、該材料は、３次元の完全性および天然脂肪組織のものと同様の粘稠度を有する。これにより、欠けている軟組織容積のオフザシェルフの回復に適したものとなる。第２に、該材料は好ましくは、脂肪細胞および内皮前駆細胞の遊走のための基材としての機能を果たし得る複数の柔軟性ナノ繊維とともに堆積され得る。第３に、該材料は、このよう

な前駆細胞が、構造骨格の周囲に線維性被膜を形成するのではなく構造骨格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充分な多孔度を有する。第４に、ＨＡヒドロゲル成分は、圧縮性および容積膨張をもたらすとともに、重要な血管形成のきっかけももたらす。第５に、ナノ繊維およびヒドロゲル成分は生分解性であり、再生される軟組織と置き換えられることが可能になる。第６に、すべての成分材料は、数多くのＦＤＡ承認デバイスにおいて高い安全性の追跡記録を有し、臨床応用に対する規制当局のハードルが下がる可能性がある。

【０１５２】

また、本発明のゲル／ヒドロゲル／ナノ構造体複合材に、組織修復剤、例えば、いくつかの成長因子、例えば、上皮成長因子（ＥＤＦ）、ＰＤＧＦおよび神経成長因子（ＮＧＦ）を含めてもよい。例えば、該組成物はＥＧＦを含むものであり得る。上皮成長因子（ＥＧＦ）は、実験用マウスの皮膚の創傷が、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しているようであるという観察の後に見出された。これは、単純に、唾液中の一部の殺菌性因子（リゾチームなど）のためだけではなかった。特定の成長因子（現在は、ＥＧＦとして知られている）が一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、血管形成特性を有する。トランスホーミング増殖因子－α（ＴＧＦ－α）は非常に同様しており、同じ受容体に結合し、上皮細胞の再生（上皮化）の刺激においてさらにより有効である。

【０１５３】

したがって、ＥＧＦ／ＴＧＦを含むものである本発明のヒドロゲルは、創傷治癒の加速および火傷、ケロイドの傷跡形成の低減（特に火傷に対して）、皮膚生着用ドレッシング材、ならびに慢性下肢潰瘍の処置において好都合に使用され得る。

【０１５４】

本発明において有用な組織修復剤としては、いくつかの成長因子、例えば、上皮成長因子（ＥＤＦ）、ＰＤＧＦおよび神経成長因子（ＮＧＦ）が挙げられる。一般的に、成長促進ホルモンは１種類から４種類の組織に影響を及ぼす。かかるタンパク質から開発された製剤品の多くは１種類またはもう１種類の創傷修復を目的としたものであるが、他の適応症もある。最も重要な組織成長因子のいくつかを以下にさらに記載する。

【０１５５】

また、本発明のゲル／ナノ構造体組成物に、本発明の組織修復方法および他の用途に有用であり得る１種類以上の増殖因子を含めてもよい。

【０１５６】

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、ほぼすべても間葉由来細胞、すなわち、血液、筋肉、骨、軟骨および結合組織の細胞のマイトジェンである。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、現在、大ファミリーの因子の一構成員であると考えられている。ＰＤＧＦに加えて、このファミリーには、ヒト血管内皮細胞および線維芽細胞によって分泌されるＰＤＧＦ様因子であるホモ二量体型因子の血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）および胎盤増殖因子（ＰＩＧＦ）、ＶＥＧＦ／ＰＩＧＦヘテロ二量体、および結合組織成長因子（ＣＴＧＦ）が含まれる。ＮＧＦ、ＴＧＦ－βおよ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）とともに、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一構成員として分類される。このような因子はすべて、本発明のヒドロゲルと一緒に使用され得る。

【０１５７】

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、この細胞に由来する増殖因子の１つにすぎない。ＰＤＧＦは、線維芽細胞および白血球を傷害部位に誘引するとともに、置換結合組織（主に、線維芽細胞および平滑筋細胞）の成長を刺激する。これは、種々の細胞（例えば、コラーゲンを生成するもの）の細胞分裂を刺激し、そのため新脈管形成を促す。また、これは、有糸分裂誘発、血管収縮、走化性、酵素活性

およびカルシウム動員も刺激する。

【０１５８】

血小板由来増殖因子は、本発明の組成物を用いた一部の特定の処置の際に骨および軟組織再生を回復させるため、ならびに慢性および急性創傷の治癒過程を加速するために使用され得る。したがって、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は好都合には、血小板由来増殖因子カクテルを含むものであり得る。

【０１５９】

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に使用され得る。ＰＤＧＦをコードしているプラスミドＤＮＡをヒドロゲルマトリックス中に組み込むと、肉芽組織線維芽細胞（これは、創傷周囲のバイアブル組織において発生し、プラスミド遺伝子の導入および発現の標的としての機能を果たす）がマトリックス中で増殖および遊走する。

【０１６０】

また、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物に、新脈管形成を促進させるためのＶＥＧＦを含めてもよい。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、別の血管増殖因子であり、多機能性の血管形成性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該細胞が遊走すること、および一般的な発現の改変を引き起こすことによって間接的および直接的の両方で新脈管形成（血管成長）に寄与する。また、ＶＥＧＦは、この（ｔｈｅｓｅｓ）内皮細胞の透過性を亢進させ、該細胞が血漿タンパク質を血管腔外部に放出することを引き起こし、これにより該領域内に変化を引き起こして新脈管形成に寄与する。

【０１６１】

また、本発明の組成物にＦＧＦを含めてもよい。線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）は、実は、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および血管内皮細胞に対して分裂促進性である。また、これは、インビボで血管形成性であり、この血管形成性はＴＮＦによって増強される。ＦＧＦはＥＧＦと同様の様式で使用され得る。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およ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。

【０１６２】

また、ヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、創傷治癒およ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）を含むものであってもよい。

【０１６３】

トランスホーミング増殖因子（ＴＧＦ）は、種々の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多く増殖する能力、単層ではなく多層層での増殖、および異常な核型の獲得を付与し得るものである。ＴＧＦファミリーには少なくとも５つの構成員が存在し、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、線維芽細胞および内皮細胞に対して分裂促進性であり、血管形成性であり、骨吸収を促進させる。また、該組成物にＴＧＦを含めてもよい。ＴＧＦ－βは、細胞制御の一般的な媒介因子、細胞成長の強力な阻害因子であり、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に対して拮抗作用をもたらし得、また、多くの腫瘍細胞株の増殖も阻害し得る。また、ＴＧＦ－βは血管形成効果も有し、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、慢性皮膚潰瘍、例えば、糖尿病患者の神経栄養性足部潰瘍が挙げられる。他の分野としては、創傷治癒、骨修復および免疫抑制性疾患が挙げられる。

【０１６４】

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得る。有効性を最大限にするため、細胞は該ゲル中に創傷または他の適切な領域に適用する直前に組み込まれ得る。好適な細胞としては、自己由来の線維芽細胞およびケラチ

ノサイト（これらは主に真皮および表皮の形成を担う）が挙げられる。各々が一方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、１種類のゲルに両方の細胞型を含めてもよいが、これは一般的にはあまり好ましくない。

【０１６５】

本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は有益にはコラーゲンを含むものであり得る。コラーゲンは、この形態では、有用な構造的機能を果たす可能性は低いが、例えば、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的タンパク質としての機能を果たし、それにより健常組織の柔軟化の抑制を補助する。

【０１６６】

また、ヒドロゲル／ナノ構造体組成物に一部の特定の酵素を含めてもよい。酵素は、急性および慢性どちらの創傷のデブリードマンにも使用される。デブリードマンは、創傷からのバイアブルでない組織および異物の除去であり、創傷修復過程において天然に起こる事象である。炎症相の間、好中球およびマクロファージが「使用済」血小板、細胞デブリおよ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、相当な量の損傷組織が蓄積されると、この自然過程は破滅的になって不充分になる。その結果、壊死組織の蓄積が創傷に対して相当な食細胞の需要を生み出し、創傷治癒を遅らせる。そのため、壊死組織のデブリードマンは経表面療法の具体的な目的の１つであり、最適な創傷マネージメントの重要な要素である。

【０１６７】

例えば、酵素は、経表面適用のための本発明のヒドロゲル中に、選択的なデブリードマン法をもたらすために組み込まれ得る。好適な酵素は、種々の供給源、例えば、オキアミ、甲殻類、パパイア、牛乳および細菌に由来するものであり得る。適切な市販の酵素としては、コラーゲナーゼ、パパイン／尿素、およびフィブリノリジンとデオキシリボヌクレアーゼの組合せが挙げられる。

【０１６８】

本発明における使用のための酵素は一般的に、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；または無血管組織を下部の創面環境に固定するコラーゲン「アンカー」の溶解のうちの１つによって作用する。

【０１６９】

所望により、一般的には抗菌効果および臭いのコントロールをもたらすために、本発明のヒドロゲルにデーキン液を含めてもよい。デブリードマン用薬剤として、デーキン液は、その細胞毒性の特性のため非選択的である。デーキン液はタンパク質を変性させ、創傷からより除去され易くする。また、かさぶたを剥がれ易くすることも、他の方法によるデブリードマンを助長する。目的がデブリードマンである場合、デーキン液を含めたヒドロゲルを１日２回交換するのがよい。創傷周囲の皮膚の保護は一般的に、例えば、軟膏、液状皮膚保護剤のフィルムドレッシング材、または固形皮膚保護剤のオブラートを用いて施すのがよい。

【０１７０】

本発明のゲルは、任意の適切な方法によって、例えば、シリンジもしくは蛇腹パック（ｂｅｌｌｏｗｓ　ｐａｃｋ）（単回用量送達系）または反復用量システム、例えば、加圧送達系もしくは「バッグインザカン（ｂａｇ　ｉｎ　ｔｈｅ　ｃａｎ）」型システム（例えば、ＷＯ９８／３２６７５で公開されたもの）による送達によって送達され得る。蛇腹パックの一例は、公開ＵＫ意匠登録番号２０８２６６５に示されている。

【０１７１】

そのため、本発明は、本発明によるゲルを含む創傷の処置のための単回用量送達系にもまた拡張される。また、本発明は、本発明によるゲルを含むものである加圧送達系、および圧力を解放するとスプレー剤を形成し得るエーロゾル容器内で加圧した本発明によるヒドロゲルにも拡張される。かかる送達手段の使用により、該ゲルを患者において、他の方法では直接適用によって到達することが困難な領域、例えば、患者が横になっているとき

の患者の背部に送達すること可能になる。

【０１７２】

一部の特定の実施形態では、本発明のヒドロゲル組成物を、生物医学的電極および他の電気療法の状況における使用のために、すなわち、電極または他の電気伝導性の部材を身体表面に付着させるために電気伝導性にすることが好都合な場合があり得る。例えば、該ヒドロゲル組成物は、経皮的神経刺激電極、電気外科的戻り電極または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得る。このような用途は、導電性の種を含有するようにするための該ヒドロゲル組成物の改質を伴う。好適な導電性の種は、イオン伝導性の電解質、特に、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、イオン化性の無機塩、有機化合物または両者の組合せが挙げられる。イオン伝導性の電解質の例としては、限定されないが、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、モノエタノールアミン酢酸塩、ジエタノールアミン酢酸塩、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および塩化カリウム、ならびに酸化還元対、例えば、第二鉄塩と第一鉄塩（例えば、硫酸塩とグルコン酸塩）の混合物が挙げられる。好ましい塩は塩化カリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウムおよび酢酸マグネシウムであり、塩化カリウムがＥＫＧ用途に最も好ましい。事実上、任意の量の電解質を本発明の接着性組成物中に存在させ得るが、電解質（存在させる場合）は該ヒドロゲル組成物の約０．１～約１５ｗｔ．％の範囲の濃度で存在させることが好ましい。生物医学的電極を製作するためのＮｉｅｌｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．に対する米国特許第５，８４６，５５８号に記載の手順が本発明のヒドロゲル組成物での使用のために適合され得、製造の詳細に関する該特許の開示内容は引用により組み込まれる。他の適切な製作手順も同様に使用され得、当業者には認識されよう。

【０１７３】

架橋

一部の特定の用途では、特に、高い粘着凝集強度が所望される場合、本発明のゲル／ヒドロゲルのポリマーを共有結合性架橋させるのがよい。本開示では、架橋がゲル／ヒドロゲル成分のポリマー間に所望され得ることを想定しているが、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間にも所望されることを想定している。本発明では、ポリマー同士を互いに架橋させるための任意の適切な手段、および本発明のゲル／ヒドロゲルのポリマーを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／ヒドロゲルのポリマーは他のポリマーまたはナノ構造体に、分子内結合もしくは分子間結合または共有結合のいずれかによって共有結合性架橋され得る。前者の場合、ポリマー同士を互いに、またはポリマーとナノ構造体を連結する共有結合はないが、後者の場合は、ポリマー同士を互いに、またはポリマーとナノ構造体を結合する共有結合性架橋が存在する。架橋は任意の適切な手段を用いて、例えば、熱、放射線または化学的硬化（架橋）剤を用いて形成され得る。架橋度は、圧縮下でのコールドフローが解消されるか、または少なくとも最小限となるのに充分であるのがよい。また、架橋は、架橋プロセスに使用される「橋かけ剤」である第３の分子の使用も包含している。

【０１７４】

熱架橋では、フリーラジカル重合開始剤が使用され、これは、ビニル重合に慣用的に使用される任意の既知のフリーラジカル生成性開始剤であり得る。好ましい開始剤は有機過酸化物およびアゾ化合物であり、一般的に、該重合性材料の約０．０１ｗｔ．％～１５ｗｔ．％、好ましくは０．０５ｗｔ．％～１０ｗｔ．％、より好ましくは約０．１ｗｔ．％～約５％、最も好ましくは約０．５ｗｔ．％～約４ｗｔ．％の量で使用される。好適な有機過酸化物としては、過酸化ジアルキル、例えば、過酸化ｔ－ブチルおよび２，２ビス（ｔ－ブチルペルオキシ）プロパン、過酸化ジアシル、例えば、過酸化ベンゾイルおよび過酸化アセチル、パーエステル、例えば、過安息香酸ｔ－ブチルおよびパー－２－エチルヘキサン酸ｔ－ブチル、ペルジカーボネート、例えば、ペルオキシ二炭酸ジセチルおよびペ

ルオキシ二炭酸ジシクロヘキシル、ケトンペルオキシド、例えば、シクロヘキサノンペルオキシドおよびメチルエチルケトンペルオキシド、ならびにヒドロペルオキシド、例えば、クメンヒドロペルオキシドおよびｔｅｒｔ－ブチル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）およびアゾビス（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。

【０１７５】

また、架橋は、放射線を用いて、典型的には光開始剤の存在下で行われ得る。放射線は、紫外線、α放射線、β放射線、γ放射線、電子ビームおよびｘ線であり得るが、紫外線が好ましい。有用な光増感剤は「水素抽出」型の三重項増感剤であり、ベンゾフェノンおよび置換ベンゾフェノンならびにアセトフェノン、例えば、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および２，２－ジメトキシ－２－フェニルアセト－フェノン、置換α－ケトール、例えば、２－メチル－２－ヒドロキシプロピオフェノン、ベンゾインエーテル、例えば、ベンゾインメチルエーテルおよびベンゾインイソプロピルエーテル、置換ベンゾインエーテル、例えば、アニソインメチルエーテル、芳香族スルホニルクロリド、例えば、２－ナフタレンスルホニルクロリド、光活性オキシム、例えば、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、チオキサントン、例えば、アルキル－およびハロゲン置換チオキサントン（ｔｈｉｏｘａｎｔｈｏｎｓｅ）、例えば、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（ｔｈｉｏｘａｎｏｎｅ）、２，４ジクロロチオキサノン、および２，４－ジエチルチオキサノン、なら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の波長を有する放射線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充分である。しかしながら、水素抽出型の光増感剤を伴う場合、充分な架橋を行うためには高強度のＵＶ曝露が必要な場合があり得る。かかる曝露は、水銀ランププロセッサー、例えば、ＰＰＧ、Ｆｕｓｉｏｎ、Ｘｅｎｏｎなどから入手可能なものによってもたらされ得る。また、架橋は、γ放射線または電子ビームを照射することによっても誘導され得る。適切な照射パラメータ、すなわち、架橋を行うために使用される放射線の型および線量は当業者に自明であろう。

【０１７６】

好適な化学的硬化剤（化学的架橋「促進剤」とも称される）としては、限定されないが、ポリマーカプタン、例えば、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および１，６－ヘキサンジチーオルが挙げられる。架橋促進剤は、未架橋の親水性ポリマーに、その共有結合性架橋を促進させるために添加されるか、または未架橋の親水性ポリマーと相補的オリゴマーのブレンドに、この２つの成分間の架橋をもたらすために添加される。

【０１７７】

また、該ポリマーおよび／またはナノ構造体を相補的オリゴマーとの混合前に架橋させてもよい。かかる場合、該ポリマー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り、該ポリマーを架橋形態に合成することが好ましい場合があり得る。モノマー型前駆体および対応する高分子生成物の例は以下のとおり：ポリ（Ｎ－ビニルアミド）生成物ではＮ－ビニルアミド前駆体；ポリ（Ｎ－アルキルアクリルアミド）生成物ではＮ－アルキルアクリルアミド；ポリアクリル酸生成物ではアクリル酸；ポリメタ

クリル酸生成物ではメタクリル酸；ポリ（アクリロニトリル）生成物ではアクリロニトリル；およびポリ（ビニルピロリドン）（ＰＶＰ）生成物ではＮ－ビニルピロリドン（ＮＶＰ）である。重合は、バルク、懸濁、溶液または乳化状で行われ得る。溶液重合が好ましく、極性有機溶媒、例えば、酢酸エチルおよび低級アルカノール（例えば、エタノール、イソプロピルアルコールなど）が特に好ましい。親水性ビニルポリマーの調製のためには、合成は典型的には、上記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、ジオール、例えば、ブタンジオールおよびヘキサン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）、他のアクリレート、例えば、ペンタエリスリトールテトラアクリレート、および１，２－エチレングリコールジアクリレート、および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架橋性モノマーとしては、オリゴマー型およびポリマー型の多機能性（メタ）アクリレート、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；ポリビニル系架橋剤、例えば、置換および非置換のジビニルベンゼン；ならびに二官能性ウレタンアクリレート、例えば、ＥＢＥＣＲＹＬ　２７０およびＥＢＥＣＲＹＬ　２３０（それぞれ、重量平均分子量１５００および重量平均分子量５０００のアクリレート含有ウレタン、－どちらもＳｍｙｒｎａ，Ｇａ．のＵＣＢから入手可能）、ならびにその組合せが挙げられる。化学的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。高架橋密度を得るため、所望により、化学的架橋を放射線硬化と併用する。

【０１７８】

ナノ構造

本発明のナノ構造体成分は任意の適切な形態、例えば、繊維、フィラメント、メッシュ切片、分岐型フィラメントもしくは網目、シート、または成形粒子であり得る。また、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間の共有結合性架橋または非共有結合性架橋を助長する任意の適切な化学官能基を含むものであってもよい。方法、手法および材料は、ナノ構造体の作製および官能基化の技術分野でよく知られている。

【０１７９】

一部の特定の実施形態では、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。種々の実施形態において、本開示のデバイスは、任意の適切な微細加工手法を用いてアセンブルおよび／または製造され得る。かかる方法および手法は当該技術分野で広く知られている。

【０１８０】

本明細書に開示のナノ構造体の作製に使用され得る微細加工法としては、リソグラフィー；エッチング手法、例えば、レーザー、プラズマエッチング、フォトリソグラフィー、もしくは化学的エッチング、例えば、湿式化学的、乾式、およびフォトレジスト除去；もしくは固体自由形状手法によるもの、例えば、スリーディー（ｔｈｒｅｅ－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ）プリンティング（３ＤＰ）、ステレオリソグラフィー（ＳＬＡ）、選択的レーザー焼結（ＳＬＳ）、弾道粒子（ｂａｌｌｉｓｔｉｃ　ｐａｒｔｉｃｌｅ）製造（ＢＰＭ）および熱溶解積層法（ＦＤＭ）；マイクロマシニングによるもの；シリコン熱酸化；電気メッキおよび無電界メッキ；拡散法、例えば、ホウ素、リン、ヒ素およびアンチモン拡散；イオン注入；膜堆積、例えば、蒸着（ｅｖａｐｏｒａｔｉｏｎ）（フィラメント、電子ビーム、フラッシュ、ならびにシャドウおよびステップカバレージ）、スパッタリング、化学気相蒸着（ｄｅｐｏｓｉｔｉｏｎ）（ＣＶＤ）、エピタキシー（気相、液相および分子線）、電気メッキ、スクリーン印刷、ラミネーションまたはその組合せによるものが挙げられる。Ｊａｅｇｅｒ，Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｔｏ　Ｍｉｃｒｏｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ　Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ（Ａｄｄｉｓｏｎ－Ｗｅｓｌｅｙ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｒｅａｄｉｎｇ　Ｍａｓｓ．１９８８）；Ｒｕｎｙａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｍｉｃｏｎｄｕｃｔｏｒ　Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　Ｃｉｒｃｕｉｔ　Ｐｒｏｃｅｓ

sing Technology（Addison－Wesley Publishing Co.，Reading Mass．１９９０）；Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference １９８７－１９９８；Rai－Choudhury編，Handbook of Microlithography，Micromachining & Microfabrication（SPIE Optical Engineering Press，Bellingham，Wash．１９９７）を参照のこと。成形型として使用される材料の選択によって、分岐構造が形成されるためにどのように表面を構成されるかが決定される。

【０１８１】

例えば、当該技術分野の水準の製作法である微小電気機械システム（ＭＥＭＳ）（フォトリソグラフィー法および半導体業界から誘導した方法を使用する）を使用してもよい。ごく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編，３７；５５０－５７５，（１９９８））およびマイクロ流路テクトニクス（microfluidic tectonics）（米国特許第６，４８８，８７２号，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作の概説および他の論考としては、Madou，M．J．Fundamentals of Microfabrication：The Science of Miniaturization；第２版；ＣＲＣ Press：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；およびWhitesides，G．M．，and Stroock，A．D．「Flexible methods for microfluidics．」Physics Today，５４（６）：４２－４８，２００１が挙げられ、これらの各々は引用により本明細書に組み込まれる。

【０１８２】

また、本発明のナノ構造体は、静電紡糸（エレクトロスピニングとも称される）によっても製作され得る。繊維が形成され得る液状物および／または溶液のエレクトロスピニング手法はよく知られており、いくつかの特許、例えば、米国特許第４，０４３，３３１号および同第５，５２２，８７９号などに報告されている。エレクトロスピニング法は一般的に、液状物を電界に導入し、それにより該液状物から繊維が作製されるようにすることを伴うものである。このような繊維は、一般的に、誘引的電位の導体へと延伸されて収集される。液状物から繊維に転換中に、繊維は硬化および／または乾燥する。この硬化および／または乾燥は、該液状物を冷却すること（すなわち、該液状物が通常、室温で固形である場合）；溶媒の蒸発、例えば、脱水（物理学的誘導性硬化）；または硬化機構（化学的誘導性硬化）によって引き起こされ得る。

【０１８３】

静電紡糸法は典型的には、例えば米国特許第４，０４３，３３１号に開示されているように、マットまたは他の不織材を創製するための繊維の使用に関するものであった。直径が５０ｎｍ～５マイクロメートルの範囲のナノ繊維が不織ナノ繊維メッシュまたは整列ナノ繊維メッシュにエレクトロスピニングされ得る。その小さい繊維直径のため、エレクトロスピニング紡織物は内在的に非常に高い表面積および小孔径を有する。このような特性により、エレクトロスピニングファブリックは、いくつかの用途、例えば：メンブレン、組織用構造骨格、および他の生物医学的用途の有望な候補となっている。

【０１８４】

静電紡糸繊維は、非常に細い直径を有するものが作製され得る。エレクトロスピニング

繊維の直径、粘稠度および一様性に影響を及ぼすパラメータとしては、繊維形成性配合物中の高分子材料と橋かけ剤の濃度（負荷量）、印加電圧、およびニードルとコレクター間の間隔が挙げられる。本発明の一実施形態によれば、ナノ繊維は、約１ｎｍ～約１００μｍの範囲の直径を有するものである。他の実施形態では、ナノ繊維は、約１ｎｍ～約１０００ｎｍの範囲の直径を有するものである。さらに、ナノ繊維は、少なくとも約１０～ほぼ少なくとも１００の範囲のアスペクト比を有するものであってもよい。繊維の非常に小さい直径のため、この繊維は、単位質量あたり高い表面積を有するものであることは認識されよう。この高い表面積対質量比により、繊維形成性の溶液または液状物が、液状または溶媒和された繊維形成性材料から固形のナノ繊維にほんの一瞬で変換されることが可能になる。

【０１８５】

本発明のナノ繊維／ナノ構造体を形成するための使用される高分子材料は、架橋剤と適合性である任意の繊維形成性材料から選択され得る。意図される用途に応じて、繊維形成性高分子材料は親水性、疎水性または両親媒性であり得る。さらに、繊維形成性高分子材料は熱応答性高分子材料であってもよい。

【０１８６】

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繊維／ナノ構造体を構成し得る。「合成ポリマー」は、合成的に調製され、天然に存在しないモノマー単位を含むものであるポリマーをいう。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むものであり得る。合成ポリマーは典型的には、従来の重合反応、例えば、付加重合、縮合重合またはフリーラジカル重合によって形成される。また、合成ポリマーは、天然のモノマー単位、例えば、天然のペプチド、ヌクレオチドおよび糖のモノマー単位を非天然のモノマー単位（例えば、合成のペプチド、ヌクレオチドおよび糖誘導体）との組合せで有するものを含むものであってもよい。このような型の合成ポリマーは標準的な合成手法によって、例えば、固相合成、または許容される場合は組換え手法によって作製され得る。

【０１８７】

「天然ポリマー」は、天然、組換え手法または合成のいずれかで調製され、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をいう。一部の場合では、天然ポリマーは、該天然ポリマーの化学的および／または物理的特性を変更するために修飾、加工、誘導体化またはその他の方法で処理され得る。このような場合、用語「天然ポリマー」は、天然ポリマーに対する変更を反映するために修飾される（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」）。

【０１８８】

ナノ繊維材料は、例えば、付加重合体材料と縮合重合体材料の両方、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およびエステル、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、修飾ポリスルホンポリマーならびにその混合物を含むものであり得る。このような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（および他のアクリル樹脂）、ポリスチレン、ならびにそのコポリマー（例えば、ＡＢＡ型ブロックコポリマー）、ポリ（フッ化ビニリデン）、ポリ（塩化ビニリデン）、種々の加水分解度（８７％～９９．５％）のポリビニルアルコール（架橋形態および非架橋形態）が挙げられる。例示的な付加重合体はガラス状となる傾向がある（室温より高いＴｇ）。これは、ポリ塩化ビニルおよ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、またはアロイもしくは低結晶化度のポリフッ化ビニリデンおよびポリビニルアルコール材料の場合である。

【０１８９】

本発明の一部の実施形態では、ナノ繊維／ナノ構造体材料はポリアミド縮合重合体である。より具体的な実施形態では、ポリアミド縮合重合体はナイロンポリマーである。用語

「ナイロン」は、すべ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作製されたものであり得る。この反応により、線状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作製される）。さらに、ナイロンコポリマーもまた想定される。コポリマーは、種々のジアミン化合物、種々の二酸化合物および種々の環状ラクタム構造を合わせて反応混合物にし、次いで、ポリアミド構造中にモノマー材料がランダムに位置するナイロンを形成することにより作製され得る。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および二酸のＣ６とＣ１０のブレンド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、ヘキサメチレンジアミンおよび二酸のＣ６とＣ１０のブレンドの材料の共重合によって製造されるナイロンである。

【０１９０】

また、ブロックコポリマーもナノ繊維材料として使用され得る。ナノ繊維の調製のための組成物の調製において、溶媒系は、どちらのブロックも該溶媒に可溶性であるように選択され得る。一例は、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。かかるブロックコポリマーの例は、クレイトン型のＡＢおよびＡＢＡブロックポリマー、例えば、スチレン／ブタジエンおよびスチレン／水素化ブタジエン（エチレンプロピレン）、ペバックス型のε－カプロラクタム／エチレンオキシドならびにシンパテックス型のポリエステル／エチレンオキシドおよびエチレンオキシドとイソシアネートのポリウレタンである。

【０１９１】

付加重合体、例えば、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のコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリ酢酸ビニル、非晶質付加重合体、例えば、ポリ（アクリロニトリル）ならびにそのアクリル酸およ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）およびその種々のコポリマー、ポリ（メタクリル酸メチル）およびその種々のコポリマーは、低圧および低温で可溶性であるため、比較的容易に湿式（ｓｏｌｕｔｉｏｎ）紡糸され得る。ポリエチレンおよびポリプロピレンのような高度に結晶性のポリマーは一般的に、湿式紡糸する場合、高温高圧溶媒が必要とされる。

【０１９２】

また、ナノ繊維はポリマー混合物、アロイ形式または架橋型の化学結合構造体の状態の２種類以上の高分子材料を含むものである高分子組成物からも形成され得る。２種類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繊維が得られ得る。例えば、高分子量ポリ塩化ビニルが低分子量ポリ塩化ビニルとブレンドされ得る。同様に、高分子量ナイロン材料が低分子量ナイロン材料とブレンドされ得る。さらに、異なる種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が低分子量の耐衝撃性ポリスチレンとブレンドされ得る。ナイロン－６材料は、ナイロンコポリマー、例えば、ナイロン－６；６，６；６，１０コポリマーとブレンドされ得る。さらに、低加水分解度を有するポリビニルアルコール、例えば８７％加水分解ポリビニルアルコールが、９８～９９．９％およびそれ以上の加水分解度を有する完全または超加水分解ポリビニルアルコールとブレンドされ得る。混合物の状態のこのような材料はすべて、適切な架橋機構を用いて架橋され得る。ナイロンは、アミド結合の窒素原子と反応性である架橋剤を用いて架橋され得る。ポリビニルアルコール材料は、ヒドロキシ反応性材料、例えば、モノアルデヒド、例えば、ホルムアルデヒド、尿素、メラミン－ホルムアルデヒド樹脂およびその類似体、ホウ酸および他の無機化合物、ジアルデヒド、二酸、ウレタン、エポキシド、ならびに他の既知の架橋剤を用いて架橋され得る。架橋試薬は反応してポリマー鎖間に共有結合を形成し、分子量、薬品抵抗性、全体的な強度および機械的分解に対する抵抗性を実質的に改善するものである。

【０１９３】

生分解性ポリマーも、本発明のナノ構造体の調製に使用され得る。生分解性材料として

研究されている類型の合成ポリマーの例としては、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、およびそのコポリマーが挙げられる。例えば、埋入可能な医療用デバイスと関連して使用され得る生分解性材料の具体例としては、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリジオキサノン、ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）、ポリ（グリコリド－コ－ポリジオキサノン）、ポリ無水物、ポリ（グリコリド－コ－トリメチレンカーボネート）、およびポリ（グリコリド－コ－カプロラクトン）が挙げられる。また、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も使用され得る。

【０１９４】

一部の実施形態では、ナノ繊維は非生分解性ポリマーである。非生分解性とは、ポリマーが一般的に、非酵素的、加水分解的または酵素的に分解され得ないものであることをいう。例えば、非生分解性ポリマーは、プロテアーゼによって引き起こされ得る分解に対して抵抗性のものである。非生分解性ポリマーには、天然または合成いずれのポリマーも包含され得る。

【０１９５】

ナノ繊維を形成する組成物中に架橋剤を含めることにより、ナノ繊維が広範な支持表面と適合性となることが可能になる。架橋剤は単独で使用してもよく、所望の表面特性をもたらす他の材料との組合せで使用してもよい。

【０１９６】

好適な架橋剤としては、モノマー型（小分子材料）、またはエネルギー源、例えば、放射線、電気エネルギーもしくは熱エネルギーに供された場合に他の材料と共有結合を形成し得る少なくとも２つの潜在反応性活性化性基を有する高分子材料のいずれかのものが挙げられる。一般に、潜在反応性活性化性基は、適用した特定の外部エネルギーまたは刺激に応答して活性種を生成させ、その結果、隣接する化学構造体との共有結合をもたらす化学的存在体である。潜在反応性基は、保存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共有結合を形成する基である。一部の実施形態では、潜在反応性基は、活性種、例えばフリーラジカルを形成するものである。このようなフリーラジカルとしては、ニトレン、カービンまたは外的に負荷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て励起状態のケトンが挙げられ得る。既知または市販の潜在反応性基の種々の例が米国特許第４，９７３，４９３号；同第５，２５８，０４１号；同第５，５６３，０５６号；同第５，６３７，４６０号；または同第６，２７８，０１８号に報告されている。

【０１９７】

例えば、トリクロロメチルトリアジンをベースにした市販の多機能性光クロスリンカー（Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｐｒｏｄｕｉｔｓ Ｃｈｉｍｉｑｕｅｓ Ａｕｘｉｌｉａｉｒｅｓ ｅｔ ｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｅｓ（Ｌｏｎｇｊｕｍｅａｕ，Ｆｒａｎｃｅ）、新中村化学工業、緑化学（Ｍｉｄｏｒｉ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｃｏ．，Ｌｔｄ．）またはＰａｎｃｈｉｍ Ｓ．Ａ．（Ｆｒａｎｃｅ）のいずれかから入手可能）が使用され得る。８種類の化合物として、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－トリアジンおよび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－トリアジンが挙げられる。

【０１９８】

使用方法およ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、数多くの組織修復の状況、ならびに他の用途、例えば、カテーテルおよび他の外科用デバイスおよび埋入物上にコーティングを施す際において好都合に使用され得る。また、本発明のゲル／ヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、本明細書に記載の活性薬剤、例えば、抗生物質、増殖因子および免疫抑制剤を送達するためにも使用され得る。

【０１９９】

一部の特定の実施形態では、本発明により、複合材料を軟組織欠損に適用することを含み、該複合材料が、ゲルと、該ゲル中に配置されたナノ構造体とを含むものである、軟組織欠損を治癒させるための方法を提供する。

【０２００】

本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物の好都合な特性としては：１）容易な特性評価および品質管理をもたらす；２）存在している組織マトリックスと一体化する；３）新たに形成されたマトリックスに直接組み込まれる；４）細胞および生物活性因子を直接内包する；５）生体適合性を維持する；６）生体内吸収をコントロールする；７）ナノ構造体の大きな構造的硬直性のため、複雑な解剖学的形状に容易に成型される；ならびに８）天然組織（例えば、関節軟骨）の機械的特性を示す能力が挙げられることは認識されよう。

【０２０１】

用途の一例において、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材組成物は、軟骨組織を修復するために使用され得る。軟骨修復のための現行の生物学的ベースの外科処置としては、自己由来の軟骨細胞の移植、ドリリング、削摩（ａｂｒａｓｉｏｎ）軟骨形成術、マイクロフラクチャー、およびモザイクプラスティ（ａｒｔｈｒｏｐｌａｓｔｙ）が挙げられる。これらの処置ではすべて、病巣の関節軟骨の損傷部のみが処置され、例えば、重度の変形性関節症および関節リウマチでみられる関節表面に露出した軟骨は処置されない。また、これらの処置では、軟骨欠損部を充填するために患者から収集された軟骨組織プラグまたは拡大培養軟骨細胞のいずれかが使用される。このような組織または軟骨細胞は、存在している軟骨マトリックスと一体化され、正常な軟骨の生体機械的特性を有する完全にデノボ材料、例えば、新たに合成されるヒアリン軟骨が合成されることにより、欠損部が充填されることが予測される。しかしながら、かかる処置はすべて、真のヒアリン軟骨ではなく修復性組織（線維軟骨）の形成を促進させ、さらに、関節に変形性関節症の素因を与えることが考えられる線維軟骨に対する機械的損傷を伴う。さらに、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に対してリスクおよび罹病性を提示する。前述の論考から明らかなように、得られる本明細書に開示のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、軟骨変性性疾患に苦しんでいる患者における将来有望な新しい治療法のための実用的な材料を提示する。

【０２０２】

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移植または増大ならびに他の臨床用途に適した広くさまざまな特性を有するように調製され得る。既に記載のように、本発明の材料は、傷害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され得る。そのように修復され得る傷害による欠損は、スポーツ関連または事故関連のものであり得、軟骨表面層のみを伴うものであり得るか、または下部の軟骨下骨を含むものであり得る。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、変形性関節症および関節リウマチに起因するものが挙げられる。傷害によるものであれ疾患によるものであれ、かかる欠損は、成熟軟骨または成長板軟骨のいずれかにおけるものであり得る。合成成長板軟骨のためのヒドロゲル用配合物には、成長中のバイオマテリアルの制御された生体内吸収を可能にするために非置換構造骨格材料を含めることが必要とされ得る。

【０２０３】

本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物が有用であり得る別の分野は、頭頸部

の軟骨性組織ならびに軟組織の修復、再構築または増大である。軟組織増大および頭頸部再構築のためのバイオマテリアルの利用可能性は、依然として、形成外科手術および再建手術の分野の根本的な課題である。適切な生物学的適合性および寿命を有する材料の開発に対して相当な研究および投資が行われている。この研究の結果は、将来有望ではなかった。免疫適格動物に入れた場合、現在提案されている材料の構造的完全性は、骨組みが吸収されるため、損なわれることが示されている。さらに、慣用的な合成材料は優れた寿命をもたらすが、一定の不可避の落とし穴を提示する。例えば、シリコンは、安全性および長期的な免疫関連の影響の問題を含んでいる。合成ポリマーＰＴＦＥ（ゴアテックス）およびシラスティックは、もたらされる組織反応性は低いが組織との一体化がもたらされず、長期的な異物感染および突出のリスクを表し得る。本出願に記載の材料は、頭頸部の軟組織欠損の増大または修復のための合成軟組織構造骨格材料を調製するために有用である。特に、非炎症性であり、非免疫原性であり、適切な度合の粘弾性（本明細書の記載参照）を有するように調製され得るヒドロゲル／ナノ構造体組成物が有効な埋入可能構造骨格材料として使用され得よう。

【０２０４】

また、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、例えば軟骨用埋入物を調製するための、多くの場合、外傷または先天性異常に副次的な軟骨性欠損または骨性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新規な生体適合性でバイオコンプライアント（ｂｉｏｃｏｍｐｌｉａｎｔ）な材料として使用され得る。耳に対する具体的な用途としては耳形成術および耳介再構築が挙げられ、これらは、多くの場合、外傷、新生物（すなわち、扁平上皮癌、基底細胞癌および黒色腫）ならびに先天性の欠損、例えば小耳症による軟骨性欠損を修復するために行われる。鼻に対する具体的な用途としては、鼻および鼻中隔の美容整形処置および再建処置が挙げられる。ハンプ部（ｄｏｒｓａｌ　ｈｕｍｐ）増大、鼻尖、シールドおよびスプレッダー移植片が多くの場合で美容整形的鼻形成術に使用される。外傷、新生物、自己免疫疾患（例えば、ウェゲナー多発血管炎性肉芽腫症）または先天性の欠損後の鼻の再構築には、修復のための軟骨が必要とされる。マネージメントのための中隔穿孔は困難であり、多くの場合、処置は不成功である。軟骨移植片は、このような用途に理想的となり得よう。それは、多くの場合、自己由来またはドナーの軟骨が入手できないためである。喉に対する具体的な用途としては、喉頭気管再構築が挙げられ、これは、小児において通常、肋軟骨の収集を必要とし、この収集は罹病性を伴わずにはなされない。耳介軟骨および中隔軟骨は多くの場合、この用途には不充分である。本明細書の開示のヒドロゲルから調製される合成軟骨性材料は、ヒドロゲル合成のパラメータ、例えば、試薬濃度、置換および架橋速度の微調整に基づいて、前述の各用途に適合するように合成され得る。喉頭気管再構築は通常、声門下または気管の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、もしくは気管切開術）または特発性であり得る。他の可能性としては、数多くの頭蓋および顔面用途に加えて顎および頬増大および下眼瞼の眼瞼外反修復における使用が挙げられる。このような用途は、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り得ることに注意されたい。また、細胞集団または生物活性剤を含めることも望ましい場合があり得る。

【０２０５】

また、本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、通常、過度に積極的な外科的切除後、感染および痂皮形成をもたらす鼻道内の液の慢性貯留を予防するための鼻腔の修復および狭小化のために使用され得る。別の将来有望な用途は、例えば、外科処置（例えば、心血管手術）中の挿管による喉頭気管傷害の結果としての小児および成人両方の喉頭気管再構築におけるものである。また、本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、首のがん切除後の頸動脈を保護するための輪状リング置換体を提供するために使用され得る－本発明の組成物は、頸動脈と皮膚の間に、皮膚バリアの喪失からの頸動脈の保護バリアとして配置され得る。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、線維性組織は、神経細胞の再増殖よりも速く形成され、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備成型チューブ内に神経

末端を配置すると、再増殖部位での線維性組織の形成が排除される可能性がある。

【０２０６】

また、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組織欠損の修復のためにも使用され得る。例えば、本発明の材料は、数多くの頭蓋および顔面用途に加えて顎および頬増大および下眼瞼の眼瞼外反修復における使用のために使用され得る。頭頸部以外の部位の美容整形目的および再建目的では、例えば、豊胸のための乳房用埋入物としての使用、例えば、乳房または首のリンパ節除去（すなわち、がんのため）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排液（これは、感染および他の合併症をもたらし得る）を和らげるための創傷用シーラントとしての使用。

【０２０７】

上記の使用に加えて、本明細書に記載のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、他の組織工学的用途において、人工形態の軟骨の合成について上記のものと同様のストラテジーおよび方法論を用いて、合成の整形外科用組織、例えば限定されないが、骨、腱、靭帯、半月板および椎間板を作製するために使用され得る。また、該ヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、人工形態の軟骨の合成について上記のものと同様のストラテジーおよび方法論を用いて、合成の非整形外科用組織、例えば限定されないが、声帯、ガラス体、心臓の弁、肝臓、膵臓および腎臓を作製するためにも使用され得る。

【０２０８】

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傷跡の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である場合の胃腸における用途である。既に種々の臨床段階およびＦＤＡ承認段階であるいくつかの製剤品が存在しており、これらは一般的に「ヒドロゲル」と称され、瘢痕形成および／または狭窄形成の処置および予防において有用であるように設計または意図されたものである。本発明の材料は、他の既知のヒドロゲルよりも、本明細書に開示のものは、ヒドロゲル材料に対して支持、形状および強度をもたらし得るナノ構造体を含むものであり得るという点で卓越している。本明細書に開示のヒドロゲル／ナノ構造体組成物は、既に既知のヒドロゲルが使用されるものまたは使用が意図されるものと同様の用途、例えば、以下：胃腸管の狭窄または瘢痕形成の処置のために使用され得る。該処置は、予想される狭窄部位での瘢痕形成を予防するための該ヒドロゲル材料の注入、または狭窄ＧＩ管を拡張するための治療後の存在する狭窄部位での狭窄の再発を予防するための該ヒドロゲル材料の注入を伴うものである。

【０２０９】

また、本発明の材料は、食道狭窄の処置ためにも使用され得る。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、胆汁およ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つけることによって引き起こされる。ＧＥＲＤ患者のおよそ７～２３％に食道狭窄または食道の線維性瘢痕形成が起こる。また、食道瘢痕形成は、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引き起こされ得る。かかる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、食道の傷跡または狭窄がもたらされることである。食道狭窄により正常な嚥下が妨げられ、患者の罹病性の大きな原因となる。本明細書に記載の材料は、ＧＥＲＤ、バレット食道およ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され得る。

【０２１０】

また、本発明の複合材料はクローン病の処置にも使用され得る。クローン病は、腸管腔を閉塞させるか、または狭くする狭窄または傷跡を引き起こし、正常な腸の機能を妨げる。本発明の材料は、かかる狭窄を処置または予防するために有用であり得る。

【０２１１】

また、該複合材料は、原発性硬化性胆管炎（ＰＳＣ）を処置するための方法においても使用され得る。ＰＳＣは、肝臓の胆管の稀な疾患である。胆管は、肝臓内で分岐網目を形

成しており、肝臓から２つの大きな分岐路を通って出て行き、この２つの大きな分岐路は、肝臓および胆嚢から十二指腸内に胆汁を排液する共通の胆管で合流する。胆管は直径が非常に狭く、通常、最も大きな遠位部分で２ｍｍまでしかないが、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。このような管が詰まった場合は、黄疸として知られる重篤な病状がもらされることになり得、これにより、多くの毒素および特にヘモグロビン分解産物が体内に蓄積される。ＰＳＣは、肝臓内の胆管および肝臓と小腸を連結する上記の肝外胆管における瘢痕形成性または構造形成性（ｓｔｒｕｃｔｕｒｉｎｇ）の疾患である。ＰＳＣの胆管狭窄は、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体組成物により処置または予防され得る。

【０２１２】

また、本発明の複合材料は、慢性膵炎を処置するためにも使用され得る。慢性膵炎は、膵管の傷跡または狭窄による合併症が起こり得る膵臓の慢性の炎症性疾患である。このような狭窄により、膵液（これは、通常、膵臓から管系または排液路を通って小腸内に出て行かなければならない）の排液が遮られる。膵液には、多くの消化酵素および正常な消化と栄養分の吸収に重要な他の元素が含まれている。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およびまたは膿瘍が形成される重度の合併症がもたらされることになり得る。慢性膵炎の膵臓狭窄は、本発明のヒドロゲルにより処置または予防され得る。

【０２１３】

また、本発明に記載の組成物は、胆石誘導性の胆管および膵管の狭窄の処置にも使用され得る。胆石は、非常に一般的な障害であり、その主な合併症は胆管および膵管の狭窄の形成であり、これは該ヒドロゲルによって処置または予防され得る。虚血性腸疾患のため。腸は、血液供給が障害された場合、傷跡または狭窄が形成され易い。血流障害は虚血と称され、多くの病態、例えば、心血管疾患、アテローム性動脈硬化、高血圧、血液量減少症、腎疾患または肝疾患誘導性低アルブミン血症、血管炎、薬物誘導性疾患、および多くの他のものによって引き起こされ得る。このような病因のすべての末期の結果は、腸を閉塞させてその正常な機能を妨げる腸狭窄をもたらし得る。本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材は、虚血性腸狭窄を処置または予防するために使用され得る。

【０２１４】

また、本発明の組成物は、放射線誘導性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罹病性と関連しており、中でも重要なのは腸狭窄形成である。本発明のヒドロゲル複合材は、放射線誘導性腸狭窄を処置または予防するために使用され得る。

【０２１５】

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／ナノ構造体複合材はまた、手術もしくはその他の方法でインビボ埋入のために使用される非生物学的構造物もしくはデバイス（例えば、外科用器具）またはセラミック製もしくは金属製のプロテーゼにコーティングを施すためにも使用され得る。かかるコーティングにより、非生物学的デバイス材料と生体組織間にバリアがもたらされ得よう。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、限定されないが：１）非生物学的デバイスの表面上の、デバイス表面上のタンパク質汚れもしくは血栓症をもたらし得る巨大分子および／または細胞の吸収の抑制；２）無毒性、非炎症性、非免疫原性、生物学的に適合性の表面を、別の様式では生物学的に適合性でない材料で作製されたデバイスに付与すること；３）デバイス機能との適合性、例えば、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力の伝達、または血管移植片もしくはステントの内皮化；４）デバイス機能の増強、例えば、ＭＥＭＳベースの人工ネフロンに存在するサイズバリアに対する電荷バリアをもたらすこと；５）水性の生理学的に適合性の環境内に捕捉されたバイアブル細胞集団の非生物学的デバイス内への組込み；ならびに６）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物活性因子、例えば増殖因子、抗ウイルス剤、抗生物質または接着分子のデバイスへの含有が挙げられる。

【０２１６】

前述のことに基づき、本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材は、さまざまな埋入可能デバイス、例えば、糖尿病のマネージメントのための埋入可能グルコースセンサーに非アレルギー性コーティングを施すために使用され得る。また、該ヒドロゲル／ナノ構造体複合材は：ＭＥＭＳベースの人工ネフロンの開発のための電荷バリア；内蔵型腎臓細胞、例えば有足細胞がＭＥＭＳベースの人工ネフロン設計内に組み込まれ得る水性の生理学的に適合性の環境；ならびにさまざまな目的、例えば限定されないが薬物送達、機械的感知のため、およびバイオ検出システムとして設計された埋入可能ＭＥＭＳデバイスのためのコーティングをもたらすために使用され得る。

【０２１７】

また、本開示のヒドロゲル／ナノ構造体複合材、特にヒアルロナンベースのヒドロゲルをシリコンベースのデバイスに、例えば、まず、シリコン表面へのチラミンの第１級アミンの共有結合によりヒドロキシフェニルコート表面ケミストリーを得ることによって共有結合させてもよい。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ケミストリーを使用するものであり得る。次いで、ＨＡベースのヒドロゲルをヒドロキシフェニルコート表面に、上記の好ましい架橋様式で使用されるものと同じペルオキシダーゼ駆動性ケミストリーによって共有結合させる。

【０２１８】

また、該ヒドロゲル／ナノ構造体複合材は、非生物学的心血管デバイス、例えば、カテーテル、ステントおよび血管移植片のコーティングにも使用され得る。このようなものには、生物学的不適合性のため慣用的には使用されない材質で作製されているが現在使用されているデバイスよりも卓越した設計特徴を有するデバイスも包含され得よう。該ヒドロゲル内に、該ヒドロゲルの、したがって埋入したデバイスの内皮化または上皮化を促進させるための生物活性因子を組み込んでもよい。

【０２１９】

本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材の具体的な例および使用を本明細書において説明したが、かかる具体的な使用は限定を意図するものではない。本発明のヒドロゲル／ナノ構造体複合材は、既知のヒドロゲルに一般的に使用される任意の用途に使用され得、特に、身体の任意の箇所の軟組織の修復および／または再生に有用である。

【０２２０】

次に、図面に言及する。図面において、同様の参照番号は、主題の開示の同様の構造的特色または態様を特定するものである。説明および例示の目的のため、限定されないが、本開示による生分解性複合材の一実施形態の説明図を図１Ａに示し、一般的に、参照文字１００と表示している。本明細書に記載の系および方法は、軟組織欠損の治癒を増強させるために使用され得る。

【０２２１】

一般的に図１Ａ～１Ｄを参照されたい。生分解性複合材１００は、ナノ繊維１０１で強化されたゲル１０３を含むものであり得、これは、ゲル１０３とナノ繊維１０１の両方の利点を兼ね備えている。ゲル１０３は、任意の適切な材料、例えば限定されないがヒドロゲルを含むものであり得る。ナノ繊維１０１は、任意の適切なナノ材料、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で作製されたものであり得、任意の適切な形状および／またはサイズのものであり得る。複合材１００は、高い多孔度を含むものである（例えば、細胞の接着および遊走を媒介するため）とともに、充分な機械的特性維持している（例えば、完全性および組織の支持を維持するため）。

【０２２２】

少なくとも一部の実施形態では、ナノ繊維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に共有結合されている。ヒドロゲル１０３とナノ繊維１０１との共有結合により、単独で使用された構成成分材料または単純なブレンドとしての構成成分材料よりも卓越した一群の理想的な特性を兼ね備えて有する材料がもたらされ得る。

【０２２３】

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した、図１の複合材の一実施形態の応力－歪み曲線を示す。図示のように、試験複合材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に示す複合材が通常のヒドロゲルと比べて同様のロバスト性の機械的完全性を保持していることを示す疲労試験を示す。

【０２２４】

図３Ａ～３Ｂを参照されたい。複合材１００は、脂肪組織由来幹細胞（ＡＳＣ）の遊走を支持することが示された。脂肪吸引の吸引物由来のＧＦＰ標識ＡＳＣを培養してスフェロイドにし、次いで、複合材またはヒドロゲル内に播種した。

【０２２５】

図３Ａおよび３Ｂは、ナノ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材内で４日間培養したＡＳＣの蛍光およびオーバーレイ（図３Ａ）（位相差画像（図３Ｂ）との）を示す。細胞は外方に遊走し、長い突起および軌跡が延在している。対照的に、図３Ｃおよび３Ｄに示すＨＡヒドロゲル単独内で培養したＡＳＣは有意な細胞遊走を示さなかった。

【０２２６】

図４Ａおよび４Ｂは、ナノ繊維１０１の存在に対する強い遊走応答を示す、スフェロイドから、整列した６５０ｎｍナノ繊維１０１に沿って遊走しているＡＳＣを造影した蛍光画像およびオーバーレイ（図４Ａ）（位相差画像（図４Ｂ）との）を示す。

【０２２７】

実施例１：ナノ繊維－ヒドロゲル複合材の調製。

ナノ繊維を、ＰＣＬ（ポリカプロラクトン，Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈの８０ｋ）のエレクトロスピニングによって作製した。ナノ繊維を紡糸してランダムメッシュにした。紡糸パラメータは９０％／１％ｗ／ｗのＤＣＭ－ＤＭＦ中ＰＣＬの１０％ｗｔ溶液とし、ターゲットメタルプレートから１５ｃｍの２７ゲージブラントニードルに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。１ラウンドあたり１ｍＬの溶液を紡糸した。

【０２２８】

次いで、繊維を多工程プロセスによって官能基化させる。簡単には、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重合開始によってアクリル酸を結合させる。次いで、このアクリレート基をＥＤＣおよびジアジミン（ｄｉａｚｉｍｉｎｅ）と反応させて第１級アミンを形成する。次いで、このアミンをＳＭＣＣと反応させるとマレイミド基が結合され得、この基がヒドロゲルのチオール基と容易に反応し得る。

【０２２９】

官能基化繊維メッシュを６０ｍｇ以下の切片にカットした。６０ｍｇサンプルをエタノール中に浸漬させ、次いで、一部に液体窒素を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。サンプルを硬直性が維持されるのに充分な冷却状態に維持しながら、はさみで繊維シートを約５ｍｍ×５ｍｍ切片にカットする。全シートをカットしたら、乳鉢を一部に液体窒素が充填された状態に維持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に注入する。繊維もつれの抑制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。次いで、繊維を第２の遠心管に、厳密な濃度の繊維が懸濁され得るように計り入れる。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、バイオハザード対策用キャビネット内で一晩乾燥させる。次いで、繊維を脱イオン水中に所望の濃度まで（通常、１５ｍｇ／ｍＬ）再懸濁させる。

【０２３０】

ヒドロゲル複合材を形成するため、１ｍＬの繊維－懸濁液を用いてバイアル１本のＧｌｙｃｏｓｉｌヒアルロン酸を再水和させ、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、１３．６ｍｇ／ｍＬの繊維、９ｍｇ／ｍＬのヒアルロン酸および１０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡの終濃度にする。これは最初のインビボ実施例の配合物であるが、構成成分の濃度を変えることにより他の配合物も作製している。

【０２３１】

得られた複合材は、繊維なしのヒドロゲルが透明であるのに対して、色が乳白色であった（図１Ｃ）。複合材のゲルは、その形状を維持しており、良好な取扱い性を有していたが、ヒドロゲル単独群は裂け易かった。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）。凍結乾燥させたサンプル複合材を割った断面のＳＥＭ画像は、繊維とヒドロゲル成分間の密接な結合ならびに高い分散繊維密度を示す（図１Ｄ）。

【０２３２】

材料および方法

材料

チオール基含有ヒアルロン酸（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。以下のもの；ポリ（ｅ－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－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）、システイン、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、酢酸およびＴｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００はＳｉｇｍａから入手した。ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、ペニシリン／ストレプトマイシン、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８　Ｐｈａｌｌｏｉｄｉｎおよび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。他の化学薬品および試薬はすべて、分析等級であった。

【０２３３】

方法

レオロジー実験のためのＰＣＬナノ繊維のエレクトロスピニング：

２つの異なる直径のＰＣＬ繊維を製作するため、１１．０および８．５％（ｗ／ｖ）のＰＣＬ溶液を、それぞれ、ジクロロメタンとジメチルホルムアミド（９：１，ｖ／ｖ）の混合物中、およびクロロホルムとメタノール（３：１，ｖ／ｖ）の混合物中で調製した。均一な各ＰＣＬ溶液を２７Ｇの金属製ニードルでシリンジに負荷した。次いで、エレクトロスピニングを、以下のパラメータ；１．０ｍｌ／時の供給速度、金属製ニードルに対して１５ｋＶの印加正電圧、およびニードル端とアース間の間隔は１２ｃｍで行った。繊維の形態構造は電界放射走査型電子顕微鏡（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。

【０２３４】

インビボ複合材のエレクトロスピニング：

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１６％ｗ／ｖのＰＣＬ（９５％の４５．０００ＭｎのＰＣＬ，５％の８０，０００ＭｎのＰＣＬ，ともにＳｉｇｍａ製）。繊維を５．２５ｍｌ／時の速度で、アース付きホイール（１０００ｒｐｍで紡糸）面から１０ｃｍ離した２７ゲージのブラントニードルから紡糸した。印加電圧は１５ｋＶとし、エレクトロスピニングポンプを、８５ｍｍの移動距離を前後に一定軌道で１４０回、２ｍｍ／秒で通過させた（約４時間）。次いで、官能基化のため、繊維シートを１４ｃｍ直径の個々のシートにカットした。

【０２３５】

ＭＡＬを有する表面官能基化繊維の調製：

繊維上にＭＡＬを有するように表面官能基化するため、文献［Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ　Ｆ

ｏｃｕｓ ２０１１，１，７２５－７３３］（少し修正を加えた）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。簡単には、繊維を２８０ｍｍＨｇ下、酸素雰囲気で室温にて１０分間プラズマ処理し、繊維表面上にフリーラジカルを誘導した。次いで、７０ｍｇの繊維を含む１０ｍｌの３または１０％（ｖ／ｖ）のアクリル酸溶液（０．５ｍＭ ＮａＩＯ３中）を、繊維表面上へのＰＡＡの光重合（ＰＡＡ－繊維）のためにＵＶ（３６ｍＷ／ｃｍ^2，ＤＹＭＡＸ Ｌｉｇｈｔ Ｃｕｒｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ ５０００ Ｆｌｏｏｄ，Ｔｏｒｒｉｎｇｔｏｎ，ＣＴ）に９０秒間曝露した。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、未反応アクリル酸を除去した。ＰＡＡ－繊維を完全に風乾させた後、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が繊維上のカルボキシル基と１：１のモル比で相互作用すると仮定して測定した［Ｊ Ｂｉｏｍｅｄ Ｍａｔｅｒ Ｒｅｓ ２００３，６７，１０９３－１１０４］。簡単には、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１ｍｌの０．５ｍＭ ＴＢＯ溶液（０．１ｍＭのＮａＯＨ（ｐＨ１０）中）中に完全に浸漬させ、穏やかに振盪しながら室温で５時間反応させた。０．１ｍＭ 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、激しく振盪しながら室温で１時間脱離させた。次いで、上清みの光学密度を６３３ｎｍで、マイクロプレートリーダー（ＢｉｏＴｅｃｋ Ｓｙｎｅｒｇｙ２，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）を用いて測定した。ＴＢＯ含有５０％（ｖ／ｖ）酢酸を標準として使用した。

【０２３６】

ＰＡＡ－繊維を、低温ミル（Ｆｒｅｅｚｅｒ／Ｍｉｌｌ ６７７０，ＳＰＥＸ ＳａｍｐｌｅＰｒｅｐ，Ｍｅｔｕｃｈｅｎ，ＮＪ）を以下のパラメータ；１分間のミリングおよび３分間の液体窒素中での冷却を１０サイクルで用いて摩砕し、繊維断片を調製した。ＰＡＡ－繊維断片を５０ｍｌ容円錐管内に収集した後、ＰＡＡ－繊維断片をイソプロピルアルコール（ａｃｏｈｏｌ）と蒸留水（１：１，ｖ／ｖ）の１０ｍｌの混合物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。簡単には、ＰＡＡ－繊維をＮＨＳとＥＤＣに添加し、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およびＥＤＣのモル比は、それぞれ１対４および４とした。活性化は、穏やかに振盪しながら室温で行った。１時間後、アミノエチル－ＭＡＬをカルボキシル基活性化繊維に、カルボキシル基対アミノエチル－ＭＡＬのモル比を１対２で添加した。次いで、反応を、穏やかに振盪しながら室温で１２時間行った。蒸留水で３回洗浄した後、ＭＡＬを有する表面官能基化繊維を凍結乾燥させた。ここで、繊維上のＭＡＬの密度は、繊維表面上のすべてのカルボキシル基がＭＡＬによって完全に置換されることを前提とした。

【０２３７】

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の調製：

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材を調製するため、チオール基含有ＨＡおよびＰＥＧＤＡをＰＢＳ（ｐＨ７．４）に、それぞれ１２．５ｍｇ／ｍＬおよび１００ｍｇ／ｍＬの所望の濃度まで完全に溶解させた。２５ｍｇ／ｍＬの所望の濃度を有するＭＡＬ－繊維をＰＢＳ（ｐＨ７．４）中に完全に分散させた。次いで、ナノ繊維、ＨＡ、ＰＥＧ－ＤＡおよびＰＢＳの懸濁液を連続的に添加し、配合物の所望の終濃度にする。この複合材前駆物質溶液を均一に混合した後、レオロジー試験のため、１００μＬの複合材前駆物質溶液を成形型（φ＝８ｍｍ）に注入し、３７℃で２時間インキュベートしてゲル化させた。圧縮試験のため、２００μＬの前駆物質溶液を円柱状のテフロン製成形型（φ＝６．３５ｍｍ，ｈ＝６．３５ｍｍ）に添加し、上記とおりにインキュベートする。繊維－ＨＡヒドロゲル複合材およびＨＡヒドロゲルの断面の形態構造をＦＥＳＥＭを用いて観察するため、複合材およびＨＡヒドロゲルを連続エタノール洗浄（５０％、７０％、８０％、９０％、１００％および１００％エタノールで各々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細孔構造

を露出させた。構造を１０ｎｍの白金層でスパッタ被覆し（Ｈｕｍｍｅｒ　６．２　Ｓｐｕｔｔｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍ，Ａｎａｔｅｃｈ　ＵＤＡ，Ｈａｙｗａｒｄ，ＣＡ）、次いで電界放射ＳＥＭ（ＪＥＯＬ　６７００Ｆ，日本，東京）でイメージングした。

【０２３８】

インビボ動物試験用の複合材の調製のため、チオール基含有ＨＡをＰＢＳ中で１２．５ｍｇ／ｍＬまで再構成した。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。繊維をまずＨＡ溶液と合わせて１０分間反応させた後、ＰＥＧ－ＤＡと合わせて所望の終濃度を得た。次いで、この懸濁液を即座に円柱状のテフロン製成形型（ＭｃＭａｓｔｅｒ－Ｃａｒｒ，Ｒｏｂｂｉｎｓｖｉｌｌｅ，ＮＪ）内にピペッティングし、３００μＬを、インビボサンプル用に１１．１２５ｍｍの直径および３ｍｍの高さの円柱状成形型にピペッティングした。次いで、ゲルを３７℃のインキュベータ内に入れ、一晩ゲル化させた。

【０２３９】

ＨＡのチオール基と繊維上のＭＡＬ間の界面結合の効果を確認するため、繊維上のＭＡＬを、システインを用いてクエンチし、クエンチ型繊維－ＨＡヒドロゲル複合材を調製した。簡単には、１ｍｇの繊維を１ｍｌのシステイン溶液（ＰＢＳ（ｐＨ８．０）中）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。穏やかに振盪しながら室温で１２時間、ＭＡＬをクエンチした後、ＭＡＬクエンチ型繊維を１ｍｌの蒸留水で５回洗浄し、未反応システインを除去して凍結乾燥させた。

【０２４０】

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の機械的特性：

圧縮試験。ヒドロゲル前駆物質懸濁液を円柱状のテフロン製成形型（ＭｃＭａｓｔｅｒ－Ｃａｒｒ，Ｒｏｂｂｉｎｓｖｉｌｌｅ，ＮＪ）内にピペッティングし、２００μＬを圧縮試験用に６．３５ｍｍの直径および６．３５ｍｍの高さの円柱状成形型内にピペッティングした。次いで、ゲルを３７℃のインキュベータ内に入れ、一晩ゲル化させた。このゲルを成形型から取り出し、すぐに、２つの平行なプレート間の一軸（ｕｎｃｏｎｆｉｎｅｄ　ｕｎｉａｘｉａｌ）圧縮により、Ｅｎｄｕｒａ　ＴＥＣメカニカル試験装置ＥＬＦ３２００　Ｓｅｒｉｅｓ，ＢＯＳＥ　ＥｌｅｃｔｒｏＦｏｒｃｅ，Ｅｄｅｎ　Ｐｒａｉｒｉｅ，ＭＮ）を用いて試験した。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％歪みまでの線形部分の傾きから求めた。サンプルを３回ずつ試験し、１群あたり３つのサンプルを試験して平均圧縮弾性率を測定した。再水和させた繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の圧縮弾性率を測定するため、複合材を凍結乾燥させ、１ｍｌのＰＢＳ（ｐＨ７．４）で３７℃にて２４時間、再水和させた。疲労試験では、圧縮サンプルを０．１Ｈｚで０％歪みから２５％歪みまでのサイクルを繰り返した。

【０２４１】

レオロジー試験。種々の繊維－ＨＡ複合材の剪断貯蔵弾性率（Ｇ’）を、パラレルプレート（φ＝８ｍｍ）を有する振動型レオメータ（ＡＲＥＳ－Ｇ２　Ｒｈｅｏｍｅｔｅｒ，ＴＡ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｎｅｗ　Ｃａｓｔｌｅ，ＤＥ）を用いて測定した。振動数スイープを使用し、１Ｈｚから１０ＨｚまでのＧ’の変動を１０％の定歪みでモニタリングした。

【０２４２】

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材中での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および１ｎｇ／ｍｌのｂＦＧＦを含有している高グルコースＤＭＥＭ中で培養した。培養培地を最適な増殖のため週に３回交換した。ｈＡＳＣスフェロイドを調製するため、５０μｌのｈＡＳＣ溶液（５．６×10^5細胞／ｍｌ）をキャスティングマイクロ成形アガロースゲル（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）に注入してｈＡＳＣスフェロイドを調製し、穏やかに振盪しながら３７℃で２４時間インキュベートした。

【０２４３】

ＨＡおよびＰＥＧＤＡをＰＢＳ（ｐＨ７．４）中に、ＨＡは４．５および２．５ｍｇ／ｍｌ、ならびにＰＥＧＤＡは５．０ｍｇ／ｍｌの終濃度で完全に溶解させた。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の終濃度で完全に分散させ、次いでＨＡを、繊維とＰＥＧＤＡの混合物中に添加した。３０μｌの複合材前駆物質溶液を９６ウェル組織培養プレートの各ウェルに注入し、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。次いで、５０μｌの複合材前駆物質溶液を３～５個のｈＡＳＣスフェロイドととも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、２～３日毎に培地を交換した。複合材内部のｈＡＳＣスフェロイドからの遊走細胞を観察するため、ｈＡＳＣのＦ－アクチンと核を、それぞれＡｌｅｘａ　Ｆｌｏｕｒ（登録商標）５６８　ＰｈａｌｌｏｉｄｉｎおよびＤＡＰＩで染色した。簡単には、４日間の培養後、ｈＡＳＣスフェロイドを有する複合材を１００μｌの４％（ｖ／ｖ）パラホルムアミドで室温にて一晩固定した。次いで、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で３回洗浄後、複合材を１００μｌの１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ（ＰＢＳ中）とともに４℃で一晩インキュベートして非特異的染色を抑止し、ＰＢＳで３回洗浄した。続いて、複合材を１００μｌの０．１％（ｖ／ｖ）Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００（ＰＢＳ中）とともに室温で１時間インキュベートした。ＰＢＳで３回洗浄した後、１００μｌの１６０ｎＭ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８　Ｐｈａｌｌｏｉｄｉｎを各複合材に添加し、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、複合材を１００μｌの０．５μｇ／ｍｌのＤＡＰＩとともに室温で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および発光５７０～６００ｎｍで、およびＤＡＰＩについては励起４０５ｎｍおよび発光３８５～４２０ｎｍで観察した。

【０２４４】

繊維－ヒドロゲル複合材のインビボでの性能：

チオール基含有ＨＡをＰＢＳ中で１２．５ｍｇ／ｍＬまで再構成した。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。繊維をまずＨＡ溶液と合わせて１０分間反応させた後、ＰＥＧ－ＤＡと合わせて所望の終濃度を得た。次いで、この懸濁液を即座に円柱状のテフロン製成形型（ＭｃＭａｓｔｅｒ－Ｃａｒｒ，Ｒｏｂｂｉｎｓｖｉｌｌｅ，ＮＪ）内にピペッティングし、３００μＬを、１１．１２５ｍｍの直径および３ｍｍの高さの円柱状成形型にピペッティングした。次いで、ゲルを３７℃のインキュベータ内に入れ、一晩ゲル化させた。脂肪組織の２ｋＰａの剛性にマッチするような２つの配合物を選択した。ＨＡ－単独配合物は１０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡおよび９ｍｇ／ｍＬのＨＡ－ＳＨであり、ＨＡ－繊維複合材配合物は５ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡ、５ｍｇ／ｍＬのＨＡ－ＳＨおよび１２．５ｍｇ／ｍＬの分散ナノ繊維であった。

【０２４５】

複合材ナノ材料構造骨格の生体適合性を試験するため、これをＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの鼠径部脂肪体下に埋入し、さまざまな時間長で観察した。揮発性麻酔薬投与下で、１ｃｍの切開を鼠径ひだのすぐ近位の両側に行った。皮下組織の鈍的切開後、鼠径部脂肪体を露出させた。これを、電気焼灼術を用いて細部まで止血しながら、注意深く栄養血管を保存しながら持ち上げた。構造骨格を動物の右側の脂肪体下に埋入した。左側には埋入物を入れず、疑似手術対照として供した。両側を標準的重層様式で閉鎖した。動物を７、１４、３０および９０日間観察した。収集時点では、動物を致死させ、構造骨格を有する鼠径部脂肪体および有しない鼠径部脂肪体を露出させ、４％ＰＦＡ中で固定した。被検物を埋め込み、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。

【０２４６】

統計解析

結果はすべて、平均値と標準偏差で表示している。１対の群間の統計学的有意差は、ＳｉｇｍａＰｌｏｔ　１２．０ソフトウェア（ＳＰＳＳ）を用いた一元配置ＡＮＯＶＡを実施することによって判定した；ｐ＜０．０５の値を統計学的に有意とみなした。

【０２４７】

本明細書に開示した複合材１００の実施形態の任意の他の適切な作製方法が本明細書において想定される。

【０２４８】

実施例２：ナノ繊維－ヒドロゲル複合材の圧縮試験。

圧縮試験のため、繊維－ヒドロゲルサンプルを、８．５ｍｍの直径および約４ｍｍの高さの円筒体として形成し、成形型内で３７℃にて一晩硬化させた。ＢｏｓｅＥｎｄｕｒａＴＥＣ　ＥＬＦ　３２００（Ｅｄｅｎ　Ｐｒａｉｒｉｅ，ＭＮ）を用いた圧縮試験によって弾性率を求めた。サンプルに対して２つのパラレルプレート間で一軸圧縮を行い、５０％歪みまで圧縮した。弾性率は、最初の線形領域の傾きを測定することにより求めた。同じヒドロゲル配合物を有し、繊維ありおよびなしの２つのサンプル群を試験した。ヒドロゲルのみサンプルは、４．５ｍｇ／ｍＬのチオール基含有ヒアルロン酸（Ｇｙｌｃｏｓａｎ　Ｇｌｙｃｏｓｉｌ）および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－ヒドロゲル複合材群は、同じヒドロゲル濃度を有するが、さらに、６．７５ｍｇ／ｍＬのＰＣＬナノ繊維（チオール基含有ヒアルロン酸と容易に反応し得るマレイミド基で官能基化された表面を有する）を有するものにした。

【０２４９】

代表的な応力－歪み図は図２Ａにおいて確認され得る。ヒドロゲルのみ群は３２０Ｐａの弾性率を有していたが、繊維－ヒドロゲル複合材は、より高い７５０Ｐａの弾性率を有していた。繊維－ヒドロゲル複合材の高い剛性は、どの歪み値でも応力値が高いことで確認され得る。官能基化ナノ繊維の存在により材料の強度と剛性が大きく増大した。したがって、複合材構造全体は、標的組織にマッチした剛性を有するものであり得るが、ヒドロゲル成分は、ナノ繊維の有益性なしで同じ剛性を得るために必要であり得る密度よりも低い架橋密度を有するものであり得る。これにより、所与の埋入物の剛性で、より良好な細胞応答がもたらされるはずである。

【０２５０】

次いで、サンプル群を、０．１Ｈｚで２５％歪みまでの反復圧縮（２０サイクル）によって試験した。代表的な図は図２Ｂにおいて確認され得る。これは、ヒドロゲルと複合材が反復圧縮に耐え得るものであること、および複合材は持続的に無繊維群よりも剛性であることを示す。

【０２５１】

実施例３：細胞－材料間の相互作用.

複合材ヒドロゲルに対する細胞応答について試験するため、脂肪由来幹細胞（ＡＳＣ）の遊走可能能を、繊維ありおよびなしのヒドロゲルのさまざまな配合物で試験した。

【０２５２】

ＡＳＣを、ＧＦＰを発現するようにトランスフェクトし、次いで、この細胞を、Ｍｉｃｒｏｔｉｓｓｕｅｓ成形によって作製したアルギネート成形型内に一晩播種することによりスフェロイド集合体に形成した。細胞は、細胞運動がよりよく評価されるようにスフェロイドとして播種した。これは、スフェロイドが、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だからである。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ティングし、硬化させた。次いで、細胞を次の数日間にわたってイメージングし、その遊走を観察した。細胞は、ヒアルロン酸およびＰＥＧ－ＤＡの濃度が下がるにつれて、それぞれのその孔径の増大のため、進行的にさらに遊走することができた。同じヒドロゲル密度（４．５ｍｇ／ｍＬのヒアルロン酸および２．５ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ＤＡ）では、細胞は、分散ナノ繊維を有するサンプル（１２ｍｇ／ｍＬ，図３Ａおよび３Ｂ）において、なしのサンプル（図３Ｃおよび３Ｄに示す）よりも良好に遊走

することができた。これは、官能基化ナノ繊維の存在が、ナノ繊維の機械的特性を改善しただけでなく、細胞遊走の改善を補助し得ることを示す。

【０２５３】

ＡＳＣがナノ繊維の存在に強く影響を受けたことを明白に実証するため、ＡＳＣスフェロイドを、ヒドロゲルなしの整列したナノ繊維のシート上で培養した。９６時間後、細胞（図３Ｃおよび３Ｄにおいて緑色）は、スフェロイドから整列したナノ繊維の同じ軸に沿って明白に遊走した（図３Ｄに示す）。

【０２５４】

実施例４：ナノ繊維－ヒドロゲル複合材の組織適合性。

複合材ナノ材料構造骨格の生体適合性を試験するため、これをＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの鼠径部脂肪体下に埋入し、さまざまな時間長で観察した。揮発性麻酔薬投与下で、１ｃｍの切開を鼠径ひだのすぐ近位の両側に行った。

【０２５５】

図５Ａは、ラット鼠径部脂肪体下のインサイチュでのナノ繊維－ヒドロゲル複合材の外観を示す写真である。図５Ｂは、埋入後２週間目に収集した複合材の周囲の組織の切片の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）中に遊走しているようにを示されている。

【０２５６】

図５Ｃは、４週間目に複合材－組織界面から採取した組織切片の細胞浸潤を示すＨ＆Ｅ染色画像を示す。埋入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。浸潤しているピンク色の間葉細胞が界面に、ならびに推定脂肪細胞が明白な丸い小腔で確認され得る。

【０２５７】

皮下組織の鈍的切開後、鼠径部脂肪体を露出させた。これを、電気焼灼術を用いて細部まで止血しながら、注意深く栄養血管を保存しながら持ち上げた。構造骨格を動物の右側の脂肪体下に埋入した。左側には埋入物を入れず、疑似手術対照として供した。両側を標準的重層様式で閉鎖した。動物を２、４および６週間観察した。収集時点では、動物を致死させ、構造骨格を有する鼠径部脂肪体および有しない鼠径部脂肪体を露出させ、４％ＰＦＡ中で固定した。被検物を埋め込み、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。早い時間点（２週間）では、創面環境からの間葉細胞が該材料に浸潤していることがわかり、該材料は天然の細胞内殖を可能にするのに充分な多孔度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）。

【０２５８】

重要なことに、細胞内殖は、外来性増殖因子の非存在下であっても行われた。単に該材料を囲んでいるのではなく該材料に浸潤している細胞の存在により、この複合材ナノ材料は、現在使用されている他のアロプラスト材料と区別される。後者の材料は線維性被膜によって囲まれ、したがって、軟組織の再構築にはあまり望ましくない。後の時点（４週間）では、細胞内殖はさらにより明らかであり、生成途中の脂肪細胞分化を表すものであり得る小胞領域がみられる（図５Ｃにおける濃いピンクの染色および明白な円）。

【０２５９】

実施例５：繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の設計

該繊維は、天然の細胞外マトリックスに多くの場合でみられ得る線維性構造物を形成し、細胞遊走を補助し、ヒドロゲルの初期の低い機械的特性を強化し得るものである。ヒドロゲルと繊維間に界面結合を導入することにより（図６Ａ，図６Ｂ）、該複合材は、平均孔径および多孔度の低下（これは細胞遊走を有意に障害し得る）なく強度が上がる（図６）。また、機械的特性は、ヒドロゲルと繊維表面間の界面結合の密度を制御することにより微調整され得ることが予測された。ここでは、表面官能基化繊維を、チオール基含有ヒアルロン酸（ＨＡ－ＳＨ）との界面結合を導入するためにマレイミド（ＭＡＬ）を用いて調製した（図６）。エレクトロスピニングしたポリ（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、この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ＮＨＳと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）。続いて、ＭＡＬ－官能基化繊維を、ＨＡ－ＳＨとＰＥＧＤＡで構成されたヒドロゲル前駆物質溶液に導入し、繊維－ヒドロゲル複合材を製作した。ＨＡのチオール基は、繊維上のＭＡＬ基および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、繊維－ヒドロゲル複合材の断面は、同様の架橋密度を有するＨＡヒドロゲルの断面と比べて高い多孔度を有する線維性の３Ｄ構造を示した（図６）。得られた複合材は、複合材の幅と高さの両方で全体にナノ繊維の一様な分布を示し、等方性強化が可能であった。また、再水和繊維－ＨＡヒドロゲル複合材は、凍結乾燥後に９９．３４％の容積回復を示したが、ＨＡヒドロゲルで示された容積回復は７０．１７％であった（図６Ｄ）。

【０２６０】

実施例６：繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の圧縮弾性率

まず、複合材が、反応性基がモルベースで等しい場合に最大剛性（剪断下）を有することを確認した。ＨＡ上のチオール基は、ナノ繊維上のＭＡＬ基またはＰＥＧ－ＤＡ上のアクリレート基のいずれかと反応し得る。そのため、ＳＨ対（ＤＡ＋ＭＡＬ）のモル比がおよそ１対１である場合、ゲルは最適な剪断貯蔵弾性率を示した。したがって、その後のすべての試験で、この比を維持した。ゲルに対して一軸圧縮試験を行い、ＨＡヒドロゲルおよび繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の弾性率を評価した（図７）。官能基化ナノ繊維の強化効果は、５０％までの歪み時の圧縮応力で確認され得る（図７Ａ）。圧縮応力は、１．０μｍ繊維群ではヒドロゲルのみ群よりも３．１倍大きく、機械的強化効果が示された。２８６ｎｍ繊維群は、さらにより顕著な強化効果を示し、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倍までに大きく低減され、繊維とヒドロゲルとの界面結合が官能基化繊維の強化効果に極めて重要であることが確認される。さらに、複合材を形成する前に２８６ｎｍ繊維を官能基化しなかった場合、強化効果は消失し、ヒドロゲル単独よりもかろうじて剛性である複合材がもたらされた。複合材に高濃度のＨＡとＰＥＧ－ＤＡを配合することによって、より剛性のゲルを配合した場合に同じ強化効果がみられ得る（図７）。また、この界面結合は複合材ゲルの剛性化において用量応答を示す。これは、進行的により多くのマレイミド基をナノ繊維表面に添加すると進行的により剛性の材料がもたらされ、界面結合の重要性がより明示的になるためである。また、複合材を、脱水およ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基化ナノ繊維を有するゲルおよび有しないゲルについて、圧縮下でメカニカル試験を行った。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。サンプルはすべて、再水和後、その剛性を維持しており、該複合材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－再水和過程で、ゲル自体が有意に圧密化された。また、複合材のゲルを疲労効果について試験するための負荷サイクルに供し、代表的な図を図１０に示す。２５％歪みまでの反復負荷下で、複合材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であった。

【０２６１】

実施例７：繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の剪断貯蔵弾性率

高い圧縮弾性率に加えて、繊維－ＨＡヒドロゲル複合材はＨＡヒドロゲル単独よりも有意に高い剪断貯蔵弾性率を示した（図８Ａ）。２８６ｎｍ繊維を有する複合材の剪断貯蔵弾性率は、６８６ｎｍ繊維を有する複合材のものよりも高かった（図８Ｃ）。また、複合材の剪断貯蔵弾性率は、圧縮試験下の弾性率と同様、２８６ｎｍ繊維上のマレイミドの表面密度を上げることにより高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り、複合材は、ＨＡヒドロゲル単独のものと比べて１．３倍の剪断貯蔵弾性率の増大を示した。さらに、繊維上に１４７ｎｍｏｌ／ｍｇのＭＡＬを有する複合材の剪断貯蔵弾性率は、６２ｎｍｏｌ／ｍｇのＭＡＬ群の弾

性率と比べて１．８倍高くなり、対応する繊維上のＭＡＬ表面密度の２．４倍の増大に対して明白な用量応答が示された。ゲル化の前に繊維上のＭＡＬ基をクエンチした場合、剪断貯蔵弾性率は、圧縮試験でみられたものと同様、非クエンチ繊維のものと比べて相応に低下した。さらに、周波数を１０Ｈｚに上げた場合、複合材の剪断貯蔵弾性率は維持されたが、ＨＡヒドロゲル単独およびクエンチ繊維を有する複合材はどちらも、１０Ｈｚでは１Ｈｚよりも剪断貯蔵弾性率の減少が示された。複合材の剪断貯蔵弾性率は、繊維の表面積（直径）に関係なく繊維上のＭＡＬ表面密度の上昇に伴って大きくなり、先に観察された剛性に対する繊維直径の効果がマレイミド密度の関数であるかもしれないことが示された（図８Ｄ）。ＭＡＬ表面密度と剪断貯蔵弾性率の相関から線形回帰を得た（Ｒ２＝０．９３）。さらに、複合材の剪断貯蔵弾性率がヒドロゲル成分に対する官能基化繊維の重量比の増大に伴って大きくなったため、複合材は繊維負荷量に対して用量応答を示した（図９）。

【０２６２】

実施例８：インビトロでの繊維－ＨＡヒドロゲル複合材中の細胞遊走

繊維－ＨＡヒドロゲル複合材は、（ｉ）大孔径を有する複合材の高い多孔度により、同じ機械的特性を有する場合に細胞遊走のための空間性がもたらされる、および（ｉｉ）複合材内のＥＣＭ模倣線維性構造物により、固有に細胞遊走をガイドすることが可能であるため、ＨＡヒドロゲルと比べて細胞遊走を増強させるという仮説をたてた。したがって、本仮説を実証するため、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ヒドロゲルおよび複合材内部の模倣組織塊、次いで、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ため、および新脈管形成と脂肪細胞形成の両方における重要性のため選択した。複合材はＨＡヒドロゲルと同様のヤング率１．９ｋＰａを有するが、複合材の孔径はＨＡヒドロゲルのものより２．０８倍大きい（図１６）。したがって、ｈＡＳＣが複合材内部を３次元的に遊走することが明白に観察され（図１１Ｂ～１１Ｅ）、これは、より大きな細孔が細胞の遊走に適応され得たとともに、ｈＡＳＣが、ＨＡヒドロゲル中でなんら細胞遊走なしでもそのスフェロイド形状を維持していたためであった（図１１Ａ）。特に、細胞遊走は、複合材の繊維を細胞接着ペプチドＲＧＤで改質した場合に一段と増強された（図１１Ｃ）。しかしながら、インビボの状況では、局所環境からの複合材中への因子の拡散によってさらなる接着のきっかけがもたらされ、この差は小さくなるはずである。一部の場合では、一部の繊維が、ＰＣＬ繊維間の疎水性相互作用のため、ゲル化中にわずかに集合体を形成し、細胞集団が、複合材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および１１Ｅ）。さらに、同じＨＡおよびＰＥＧ－ＤＡ濃度では（図１９）、複合材は無繊維群と比べて増強された細胞遊走を示し、ナノ繊維自体が、多孔度に関係なく固有に細胞遊走のガイドを補助し得ることが示された。

【０２６３】

実施例９：組織応答および宿主組織浸潤

このような複合材埋入物の治療的潜在能を調べるため、複合材埋入物を、ラット脂肪体モデルにおいてインビボで試験した。埋入物群の配合物は、複合材のゲルおよ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。したがって、ＨＡ－ゲル単独埋入物の配合物は、繊維－複合材群の剛性とマッチさせるため、チオール基含有ＨＡおよびＰＥＧ－ＤＡの両方を、より高い濃度で有するものであった。この高濃度にもかかわらず、ＨＡ－単独埋入物は試験過程において、その形状および容積を維持することができなかった。４週間後の肉眼観察下で、ＨＡ－単独埋入物は伸びており、容積が有意に小さくなっていた。その肉眼での外観および組織学的浸潤欠如を考慮すると、ＨＡ－単独の系は、細胞浸潤を促し、所定の形状を維持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－ゲル複合材埋入物は、インビボで９０日後、肉眼観察下で、その元の形状を充分に維持していた。しかしながら、注目すべきことに、組織学的観察では、複合材は、埋入物と天然組織の境界を調べることが困難になるほど全体に浸潤されていた。

【０２６４】

マイクロサージャリー手法を用いて鼠径部脂肪体を露出させ、持ち上げて、事前に成形した複合材をその下部に入れたＬｅｗｉｓラットの軟組織欠損モデルが開発されている。このはっきり定義されたモデルは、Ａｉｍ　３の仮説のすべての要素および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、かかる複合材が大きな欠損を回復させる能力を直接的に実証するものではないが、概念実証を確立し、複合材設計の必須のあらゆる官能部が確認され、より臨床的に重要なモデルにおいて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。

【０２６５】

パイロット試験において、同様の弾性率のＰＣＬナノ繊維－ＨＡヒドロゲル複合材および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下に埋入した（ｎ＝３／時間点）。ＨＡヒドロゲル群および複合材群はどちらも、移植後、１４日目および３０日目に良好な組織適合性を示した（図１２，ＰＯＤ　１４，ＰＯＤ　３０において同様の観察結果．ＰＯＤ＝術後日数）。ＰＯＤ　３０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およびマッソントリクローム染色により、天然の脂肪による隔壁形成および複合材中への細胞浸潤、周囲部における毛細管形成、および天然脂肪の腺細胞部分ならびに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、薄い線維質組織シートの形成および異物応答がみられた。このＨＡヒドロゲルは、充分な機械的特性を確保するために２ｋＰａを有するように調製した。この結果により、細胞浸潤のための構造骨格の多孔度の重要性が強調される。

【０２６６】

早い時間点（２週間）では、創面環境からの間葉細胞が該材料に浸潤していることがわかり、該材料は天然の細胞内殖を可能にするのに充分な多孔度を有することが示唆された（図１２における濃いピンクの染色）。重要なことに、細胞内殖は、外来性増殖因子の非存在下であっても行われた。単に該材料を囲んでいるのではなく該材料に浸潤している細胞の存在により、この複合材ナノ材料は、現在使用されている他のアロプラスト材料と区別される。後者の材料は線維性被膜によって囲まれ、したがって、軟組織の再構築にはあまり望ましくない。後の時点（４週間）では、細胞内殖はさらにより明らかであり、生成途中の脂肪細胞分化を表すものであり得る小胞領域がみられる。

【０２６７】

実施例１０：ヘパリン含有配合物

また、ヒアルロン酸にコンジュゲートさせたヘパリンを有する複合材配合物も調製した。この配合物を、上記のプリフォーム構造骨格と同一にインビボで試験した。組織を７日目、１４日目、３０日目および９０日目に収集した（ｎ＝３）。多くの重要な増殖因子、例えば、ｂＦＧＦ、ＰＤＧＦおよびＶＥＧＦはヘパリン結合ドメインを有する。コンジュゲート型ヘパリンは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、再生している組織の局所レザーバおよび誘引のきっかけとしての機能を果たし得る。第２に、ヘパリン含有複合材は、再生をより良好に増強するための増殖因子を有する構造骨格を事前に負荷するために使用され得る。ヘパリン含有構造骨格は、７日目と１４日目では、ヘパリン無含有複合材構造骨格と比べて増強された新脈管形成を示したが、３０日目と９０日目では同様の結果であった。

【０２６８】

実施例１１：注入用配合物

また、ヒドロゲル－ナノ繊維複合材を注入用変形型にも配合した。インビボで使用したプリフォーム複合材で使用した２００μＬの同じ組成物（５ｍｇ／ｍＬのチオール基含有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、部分硬化させた。この時点では、複合材は、外科用ニードルから注入できる粘性で流動性の液状物である（図２０）。注入したら、複合材は、逆さにしたとき、その形状を維持し、水中に浸漬させたとき、非分散性、形状維持性および非／低膨潤性である。注入用複合材の生体適合性について試験するため、次いで、懸濁液をラットの鼠径

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日目および９０日目に収集し（ｎ＝３）、先の実施例と同一に解析した。複合材は、３０日目において広範な細胞リモデリングを示したとともに用量を維持しており、線維質被包化は引き起こされていなかった。複合材料中で発生している初期段階の脂肪細胞が明白に確認され得る。

【０２６９】

実施例１２：実施例５～１１の考察

ヒドロゲルは、細胞遊走を助長させるその３Ｄ水和環境および高い多孔度のため、組織欠損の再生のためのフィラー材として広く研究されている。しかしながら、ヒドロゲルは、容積の大きい欠損の置換は不充分であることが示されている。これは、ヒドロゲルが体液ならびに内部応力および外部応力によって容易に分解され、崩壊し得るため、組織再生の全期間中において、ヒドロゲルの比較的弱い機械的特性が、その容積を維持するのに不充分であるためである。ヒドロゲルの機械的特性を改善するため、当該技術分野における主なストラテジーは（ｉ）ヒドロゲル前駆物質の濃度を上げる、（ｉｉ）ヒドロゲル内部の架橋網目の密度を上げる、および（ｉｉｉ）例えば、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ラミネートすること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］。残念ながら、このような非常に高強度化ストラテジーは内因的に、得られるヒドロゲルの平均孔径および多孔度を低下させ、細胞がこのようなヒドロゲル中に遊走し得ることを妨げるものであった。したがって、依然として高い多孔度は保持され得るが速やかな細胞浸潤を可能にする新しい機構によってヒドロゲルの強度を上げることが模索された。ヒドロゲル相の大部分がインタクトなまま、多孔度を含み、ヒドロゲル複合材全体の強度を上げることができる官能基化ナノ繊維を導入することにより、複合材料を設計した。得られた繊維－ヒドロゲル複合材は、鍵となる２つの成分のため、これまでの軟組織複合材を改善するものである。第１に、等方的に強度を上げるため、ナノ繊維を高い負荷レベルでヒドロゲル中に一様に分散させる必要があった。組織工学分野では、一般的に、エレクトロスピニングナノ繊維が繊維の平坦なシートまたはマットとして使用されていた。そのため、これは典型的には、このマットにヒドロゲル前駆物質溶液を含浸させることによって複合材に作製される。

【０２７０】

これは、ヒドロゲル全体へのナノ繊維の分散を大きく制約し、複合材の幾何構造を２Ｄシートまたはチューブに制限する。このような幾何構造は、特定の用途、例えば、神経修復または創傷ドレッシング材には有用であるが、容積の大きい欠損の修復には不充分な選択肢である。繊維シートを低温ミリングすることにより、平均繊維長さを、水溶液中で懸濁状態で保持することが可能であるのに充分に短い長さまで縮小することが可能になった。したがって、次いで、サンプルはヒドロゲル前駆物質溶液中に容易にピペッティングされ、ゲル化前のヒドロゲル容積全体へのナノ繊維断片の一様な分散体が創製された。次いで、溶液は、ほとんどのエレクトロスピニングナノ繊維メッシュの制限された平面的な幾何構造とは異なり、注入用配合物として直接使用され得るか、または任意の自由裁量の幾何構造の構造骨格ゲルを作製するために成形型に添加され得る。また、ヒドロゲル中の分散繊維の複合材構造は、細胞外マトリックスの線維性構造物を再現しており（図６Ｇ）、複合材中での細胞遊走を補助し得る接着部位をもたらす。

【０２７１】

第２に、単にナノ繊維をヒドロゲル中に分散させるだけでは、強力な複合材を形成するには不充分である。本データにより、ナノ繊維自体を含めるだけでは、複合材の弾性率の改善は非常にわずかしか得られず、改善は界面結合を導入した場合にのみ起こることが示された。界面結合は、ヒドロゲルと繊維成分間の強力な結合の形成なしでは、水およびヒドロゲル成分が、負荷量をより剛性の材料に移行せずには繊維成分の前方を横切ることができないであろうから必要である。さらに、かかる異なる材料間の界面は、複合材におい

て剥離および破断をもたらし得る。さらに、ＰＣＬの初期の疎水性により、繊維が優先的に一体に凝集し、懸濁液から分離する凝塊を形成するため、水溶液中に分散させることが困難になる。プラズマ処理およびカルボン酸基とアミン基でのその後の官能基化により、繊維の親水性が大きく増大し、分散が可能になる。この機械的特性の劇的な増大は、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間に界面結合が存在する場合にのみ起こった。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量をより効率的に繊維に移行させ、より剛性でより強力な材料をもたらす。さらに、複合材は、マレイミド密度の増大とともに弾性率が大きくなる強い傾向を示し、強度を上げる機構ならびに強化の微調整性における重要性が強調される。

【０２７２】

本研究において、繊維－ヒドロゲル複合材の機械的特性を、種々の因子、例えば、繊維の全表面積、繊維表面上の官能性マレイミド基の密度、およびヒドロゲル中に負荷される繊維の量によって微調整することが可能であることが確認された。第１に、小さい直径の繊維を有する複合材は、大きな直径の繊維を有する複合材のものよりも高い圧縮弾性率および剪断貯蔵弾性率を示した（図７Ａおよび図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せた単独の超高分子量ポリエチレン（ＵＨＭＷＰＥ）繊維（約２５μｍ）は、ポリ（ビニルアルコール）ヒドロゲルにおいて６０束のＵＨＭＷＰＥ繊維と比べておよそ２．３６倍の界面剪断強度の増大を示した［Ａｃｔａ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ ２０１４，１０，３５８１－３５８９］。したがって、繊維直径を縮小し、したがって繊維の比表面積を増大させることは、複合材の機械的特性の改善に有効であり得ることが考えられ得る。しかしながら、各繊維群が有した繊維上のＭＡＬ表面密度の差はわずかであり（およそ１０～１５ｎｍｏｌ／ｍｇ）、そのため、繊維単独の表面積の効果は決定的には判定され得ない。したがって、第２に、同じ直径の繊維を有するが繊維上のＭＡＬ表面密度が種々である複合材を製作した（図８）。複合材の圧縮弾性率および剪断貯蔵弾性率は、繊維上のＭＡＬ表面密度の増大とともに大きくなった。界面結合なしの複合材は、ＰＡＡ工程（繊維上にカルボキシル基）を行ったがさらなるＭＡＬコンジュゲーション工程なしによって改質した繊維を使用することにより、わずかな圧縮弾性率の増強しか示されない（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さらに確認された。システインはマレイミド基とコンジュゲートし、繊維とヒドロゲル間の界面結合を妨げる。これにより、本発明者らは、繊維を界面結合群と同一に別の方法で加工したため、まさに、界面結合の効果を取り上げることになる。興味深いことに、ＭＡＬクエンチ型繊維を有する複合材の機械的特性は劇的に低下し（図７Ａおよび図８Ｂ）、ＭＡＬクエンチ型繊維群は、ＨＡの濃度を１０ｍｇ／ｍｌにした場合、ＨＡヒドロゲル単独のものより低い圧縮弾性率示した（図７）。先の試験でみられる場合のように、ＭＡＬクエンチ型繊維によって、繊維とヒドロゲルの界面で容易に剥離が起こることにより複合材全体が弱くなったということが考えられ得る［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べてゲル化を抑止する異物として作用し得る［ＪＭＣ Ｂ ２０１５，ＤＯＩ：１０．１０３９／Ｃ３ＴＢ２１８３０Ａ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｔ Ａ ２０１０，９５（２），５６４－５７３］。さらに、種々のＭＡＬ表面密度を有する複合材により、剪断貯蔵弾性率と界面結合の密度間の有意な相関が確認された（図８Ｃ）。この試験は、ヒドロゲルの機械的特性が界面結合によって強化され、微調整されるという強力な証拠を示す。第３に、複合材の剪断貯蔵弾性率は、ヒドロゲルに対する繊維の重量比の増大に伴って大きくなった（図９）。それにより、重量比は、繊維－ヒドロゲル複合材の機械的特性を微調整するために使用され得る別の可変量であることが確認された。しかしながら、ここでは、繊維負荷量の増大とともに、剪断貯蔵弾性率の増大が平坦になり始め、０．６よる上の重量比ではわずかに減少すらすることが確認された。この飽和効果の可能性の１つは、複合材の界面結合の密度が、どの程度、ＭＡＬを有する過剰

の繊維が大量画分のＨＡのチオール基と反応し、ゲル化のためのＰＥＧＤＡの反応が妨げられたかによって低減されたことであり得る。ＨＡヒドロゲルの最も高い剪断貯蔵弾性率がＨＡ－ＳＨとＰＥＧＤＡの各官能基が等モル量で得られたこと、ならびにＨＡ－ＳＨまたはＤＡのいずれかが過剰量で剪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内部のＳＨ－ＤＡ間結合を破壊するのかもしれない。

【０２７３】

一般的に、埋入されたバイオマテリアルは、組織欠損の再生中、数多くの内部応力および外部応力に耐えるものでなければならない。応力は重度でなく連続的ではないが、かかる応力を模倣するため、反復条件下および高周波数（１０Ｈｚ）下で応力抵抗性試験を行った（図１０および図８）。ＨＡヒドロゲルおよび繊維－ＨＡヒドロゲル複合材はどちらも、反復圧縮歪み中、なんら損傷または機械的強度の低下なく、耐えた。注目すべきことに、界面結合を有する複合材は、１０Ｈｚの周波数で、その剪断貯蔵弾性率を保持していたが、ＨＡヒドロゲルおよび界面結合なしの複合材の剪断貯蔵弾性率は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の機械的特性の強化に極めて重要であることを示す。また、繊維－ＨＡ複合材は、凍結乾燥およびその後の再水和に供された後、その寸法およびヤング率を維持していたが、ＨＡ－単独ゲルは同じプロセス下で実質的に収縮した（図６Ｃおよび図１０）。脱水および再水和後のこの形状、容量および剛性の維持は、複合材の凍結乾燥形態が得られることにより市販品の滅菌および保存がより容易になり得るため、本技術の臨床応用に重要な特長である。

【０２７４】

軟組織の再構築のための、理想的な埋入型構造骨格は、欠損空隙をすぐに充填し得るが、また、身体の自身の細胞が増殖して構造骨格になるための基材としての機能も果たし、増殖して適正な組織表現型に分化し、最終的に正常な健常組織を有する人工構造骨格に置き換わり得るものであり得る。したがって、適切な細胞がヒドロゲル中または複合材構造骨格中内で遊走できるであろうことは決定的に重要である。適切な細胞型が構造骨格内で遊走する潜在能を調べるため、ｈＡＳＣスフェロイドをＨＡヒドロゲルおよび繊維－ＨＡヒドロゲル複合材の内部に播種し、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、複合材の剪断貯蔵弾性率はＨＡヒドロゲルのものと同様であったが、ｈＡＳＣは、複合材内部で、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）。仮説の１つは、複合材内部の繊維が、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もたらしているのかもしれないということである。以前に、整列した繊維およびランダム繊維は、種々の細胞型における細胞の接着、増殖、分化および遊走のための極めて重要な因子となり得ることが示された［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、細胞は、その細胞骨格が下部の線維に沿って整列し、続いているため、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］。しかしながら、１０００ｎｍまたは２８６ｎｍのいずれのナノ繊維を有する複合材内でもロバストに遊走したため、複合材内部の繊維の直径は遊走細胞に影響しなかった（図１９）。

【０２７５】

ベンチトップ試験およびインビトロ培養細胞でみられた多孔度および細胞遊走の効果は、複合材のインビボ試験中での顕著な差に変わった。脂肪を模倣するように配合した２ｋＰａの剛性の繊維なしのヒドロゲルが有する多孔度は、細胞浸潤には低すぎた。細胞応答は、ヒドロゲルを厚いコラーゲン層で囲まれるというものであり、異物応答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、ナノ繊維－ヒドロゲル複合材は、細胞

内殖、血管新生および細胞リモデリングが助長されるのに充分な多孔度を有しており、異物応答はなかった。これにより、身体における容積の大きい欠損部が、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がもたらされる。この結果は、宿主組織とのより堅固な界面を形成し得る注入用配合物でさらにより顕著であり、ロバストな脂肪形成の徴候を示した。

【０２７６】

結論：

ヒドロゲル中の官能基化ナノ繊維の分散により、この２つの成分の強度を兼ね備えた複合材構造が形成される。ナノ繊維とヒドロゲル成分間の界面結合は、組織および細胞の内殖を助長する高い多孔度と孔径を維持したまま強力な複合材を作製するのに極めて重要である。得られる複合材の特性は、繊維直径、繊維負荷量レベル、マレイミド密度レベルおよびヒドロゲル成分の負荷量レベルを変更することにより容易に微調整され得る。これにより、目標の全体的剛性で低架橋および高い多孔度にし、細胞浸潤およびその後の組織リモデリングを高めることが可能になる。また、繊維自体も、天然のＥＣＭにみられるものと同様の接着部位をもたらすことにより細胞遊走を直接改善し得る。得られる複合材埋入物は、天然脂肪組織の剛性とマッチしているが細胞浸潤およ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され得る。この新規な複合材は、任意の自由裁量の形状の容積の大きい欠損部がすぐに充填されるのに充分に強力である。そのため、この複合材埋入物は、身体の自身の細胞が複合材内に浸潤し、血管を形成し、脂肪細胞のような細胞に分化することに対して許容性の構造骨格としての機能を果たす。構造骨格は、組織リモデリング中、初期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。この複合材構造は、再建手術および美容手術の将来性のための大きな将来性を有する。

【０２７７】

均等物

本明細書に記載の詳細な実施例および実施形態は、一例として例示の目的で示したものにすぎず、なんら本発明を限定するものとみなされるものでないことは理解されよう。これに鑑みて種々の修正または変更が当業者に示唆され、本出願の趣旨および範囲に含まれ、添付の特許請求の範囲に含まれているとみなす。例えば、成分の相対量は、所望の効果が最適化されるように変更してもよく、さらなる成分を添加してもよく、および／または記載の成分の１つ以上を同様の成分で置き換えてもよい。本発明の系、方法およびプロセス工程に関連するさらなる好都合な特長および官能部は、添付の特許請求の範囲から明らかであろう。さらに、当業者には、常套的な範囲内の実験手法を用いて、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が認識されるか、または確認することができよう。かかる均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されていることを意図する。

【図１Ａ】

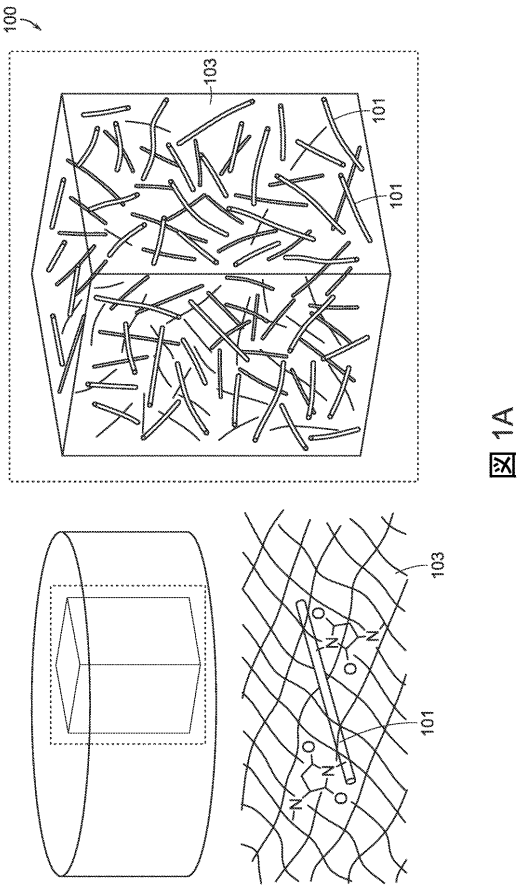


図1A

【図１Ｂ】

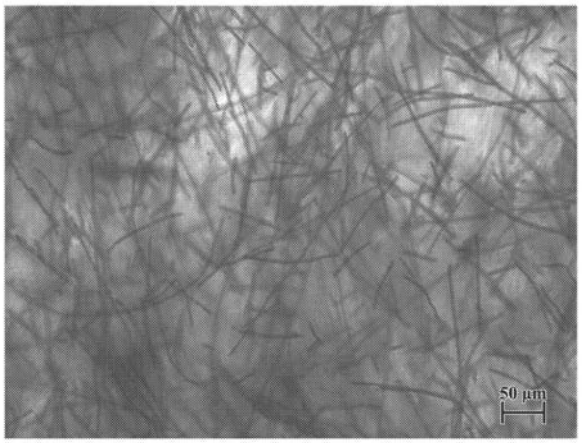


図1B

【図１Ｃ】

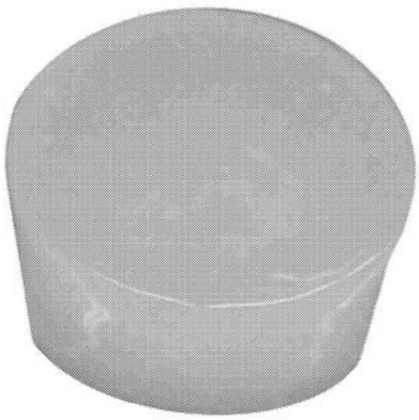


図1C

【図１Ｄ】

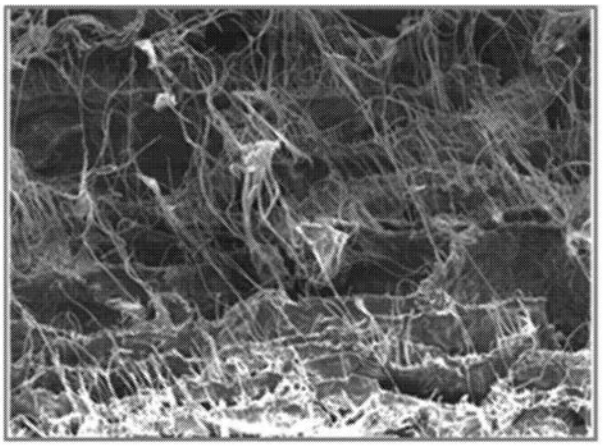


図1D

【図２Ａ】

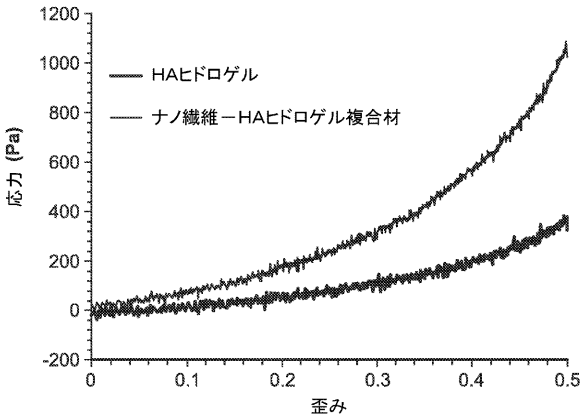


図2A

【図２Ｂ】

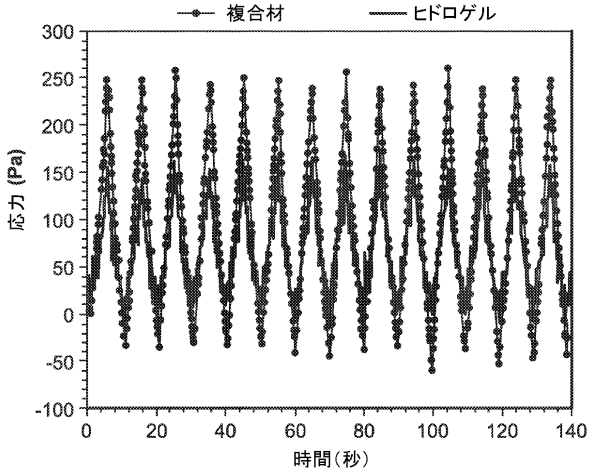


図2B

【図３－１】

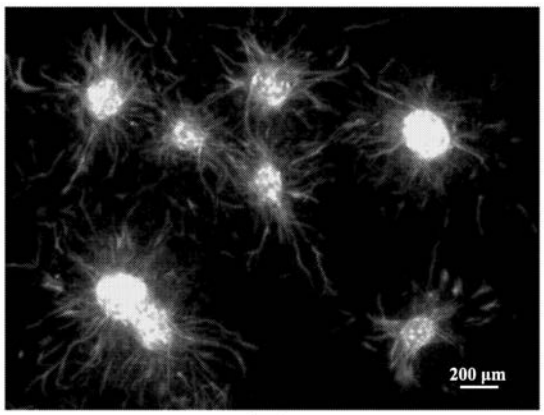


図3A

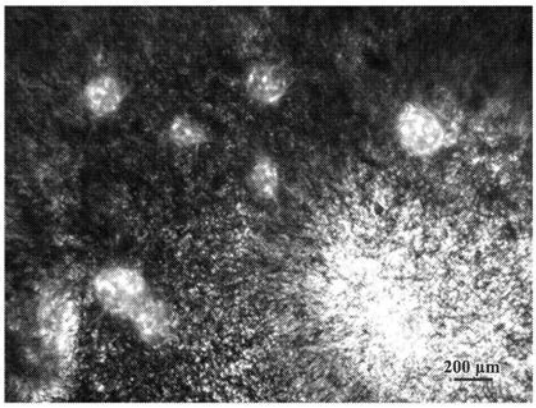


図3B

【図３－２】

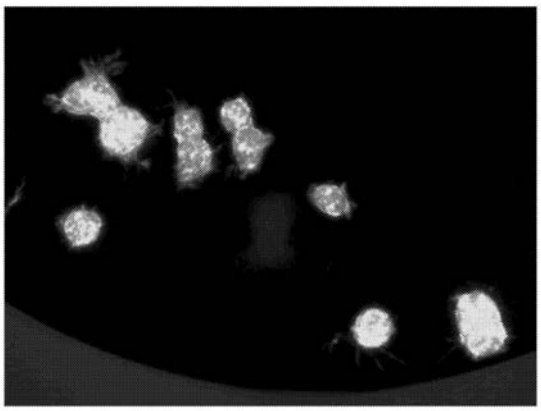


図3C

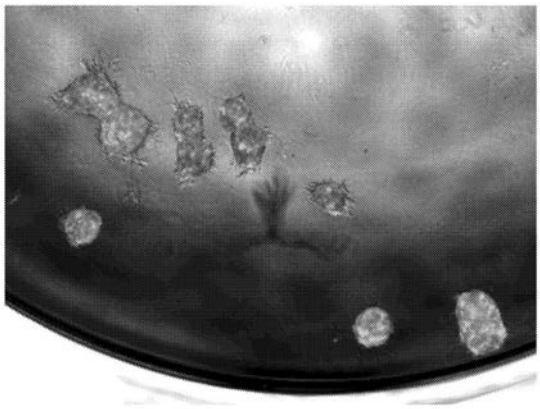


図3D

【図４】

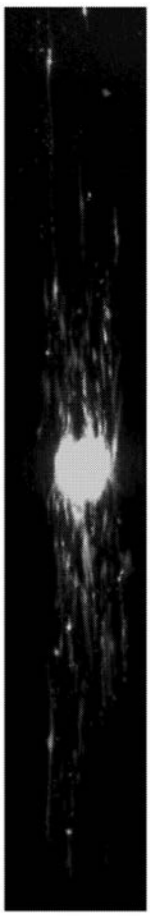


図 4A

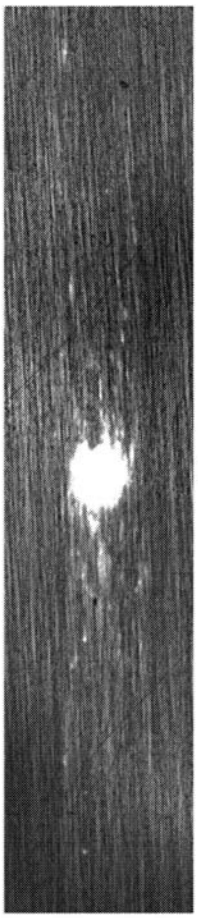


図 4B

【図５Ａ】

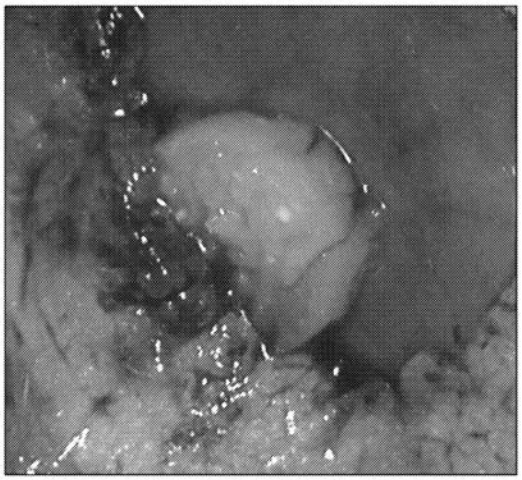


図 5A

【図５Ｂ】



図 5B

【図５Ｃ】

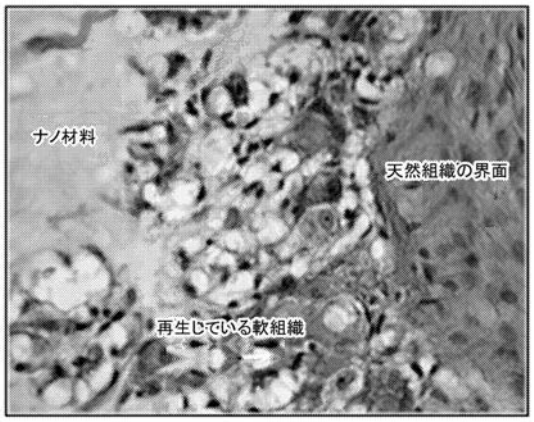


図5C

【図６－１】

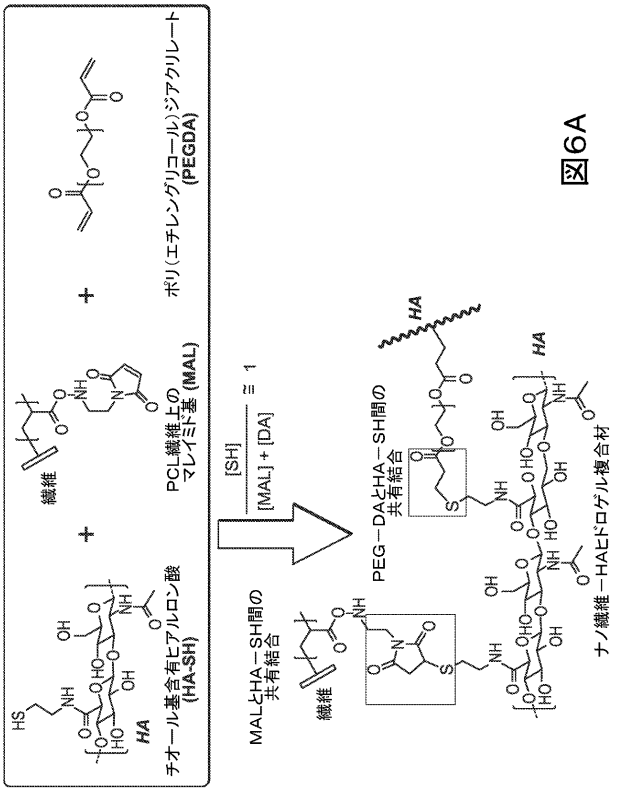
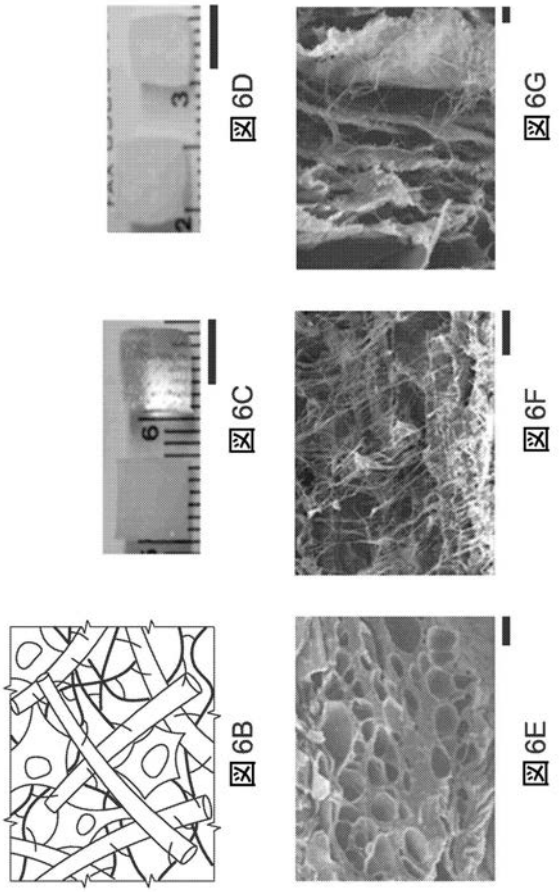
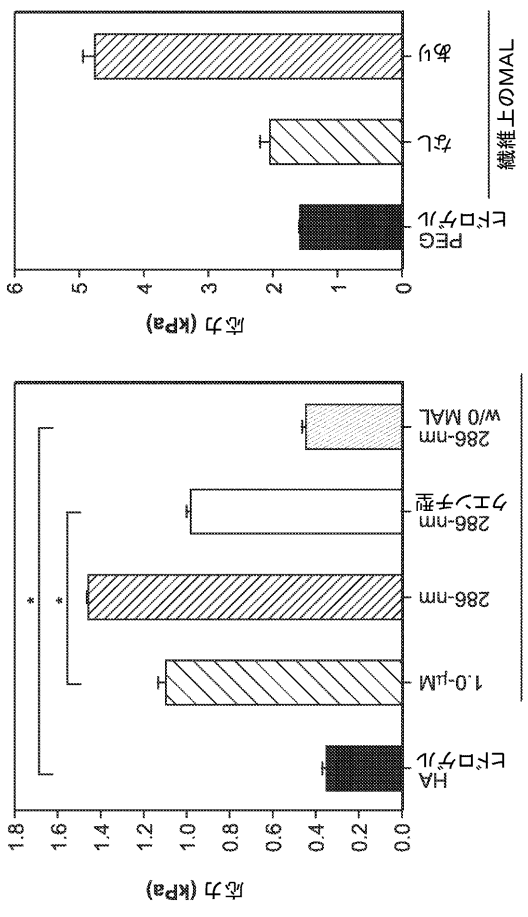


図6A

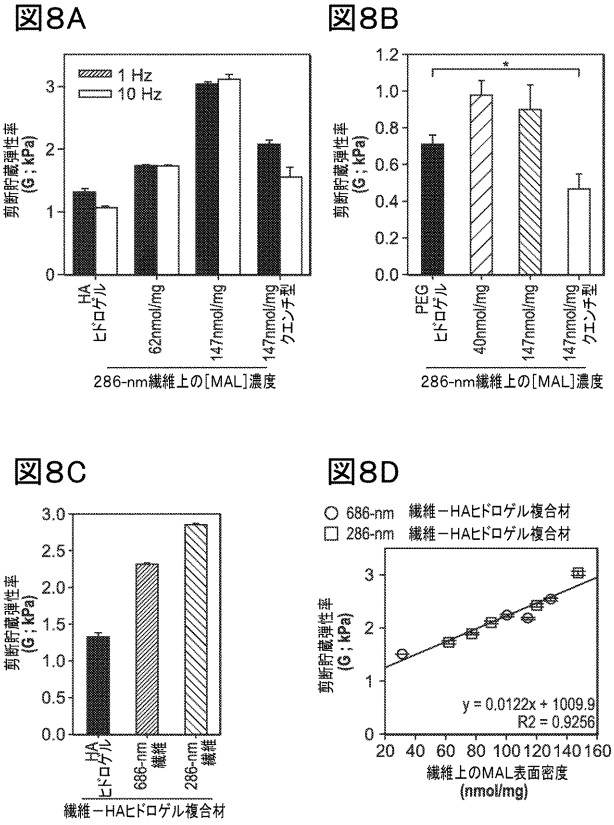
【図６－２】



【図７】



【図８】



【図９】

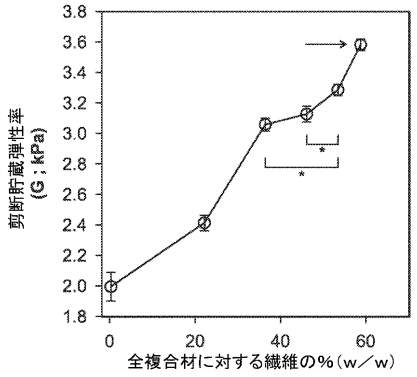


図9A

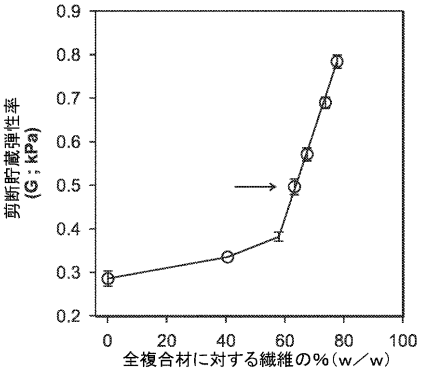


図9B

【図１０】

図10A

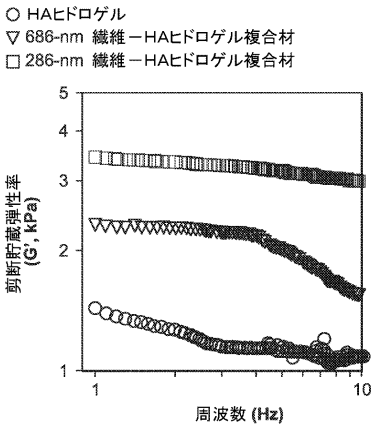


図10B

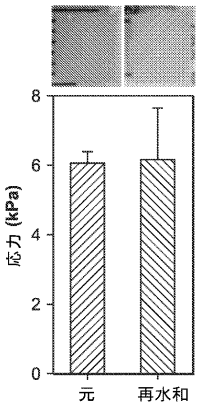
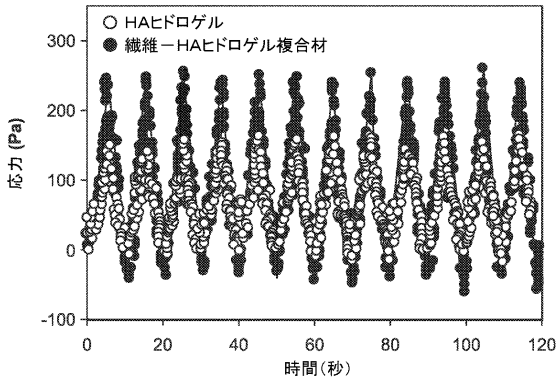
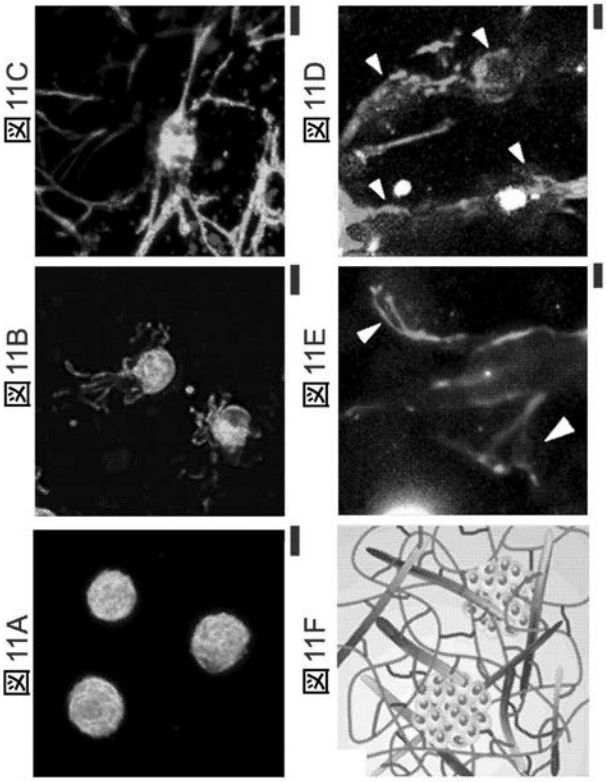


図10C



【図１１】



【図１２－１】

図12A

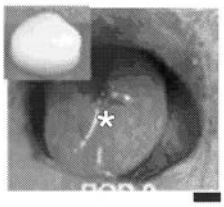


図12B

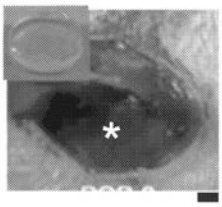
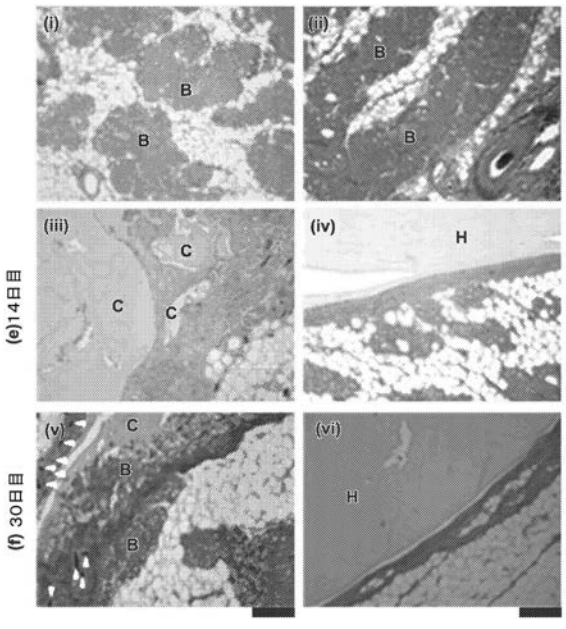
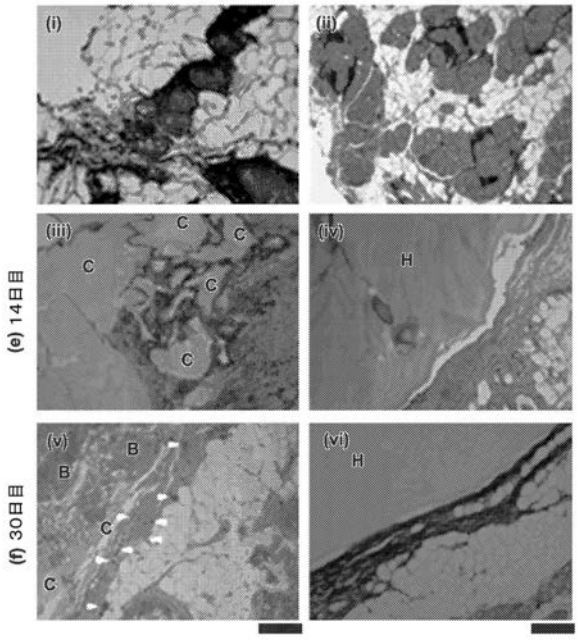


図12C



【図１２－２】

図12D



【図１３】

図13B

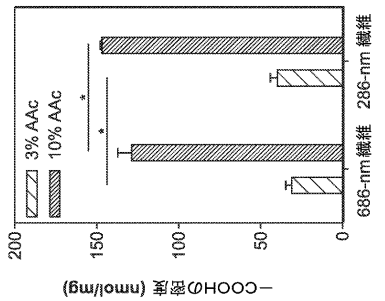
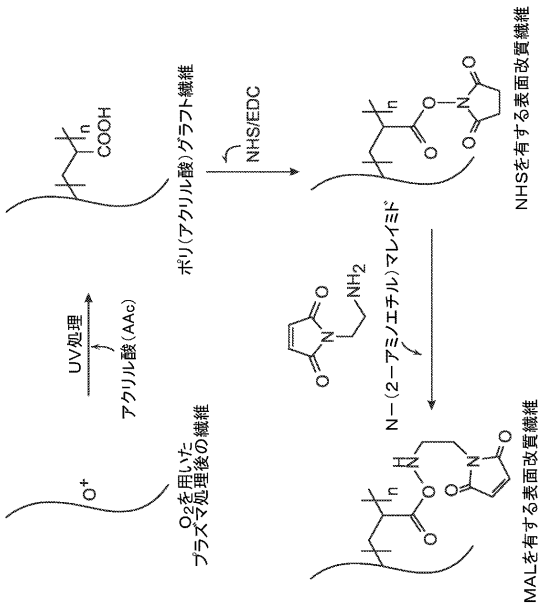
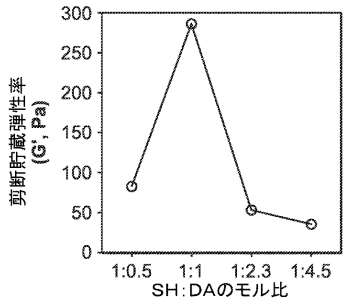


図13A



【図１４】

図14



【図１５】

図15A

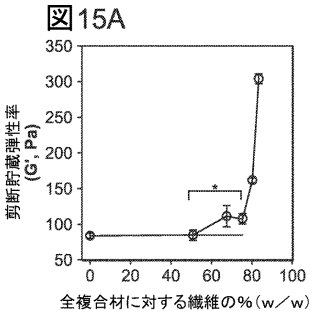
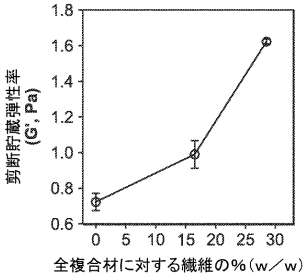
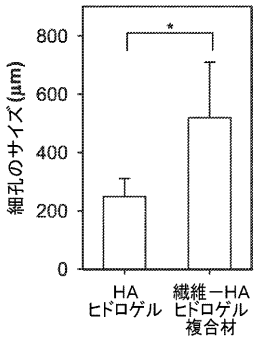


図15B

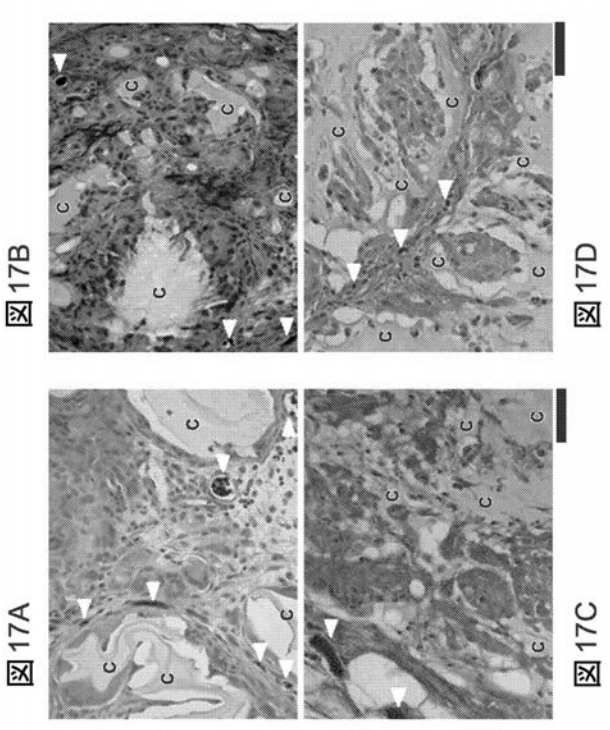


【図１６】

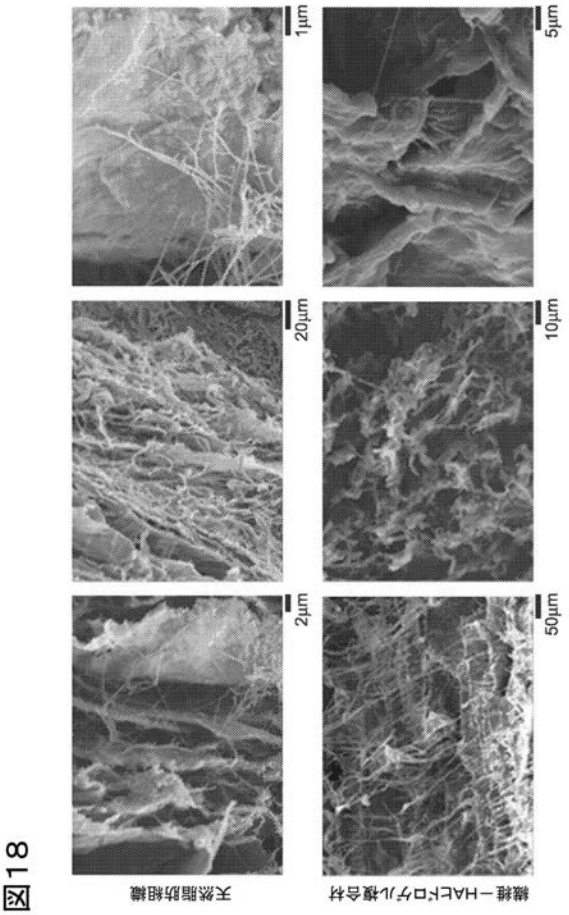
図16



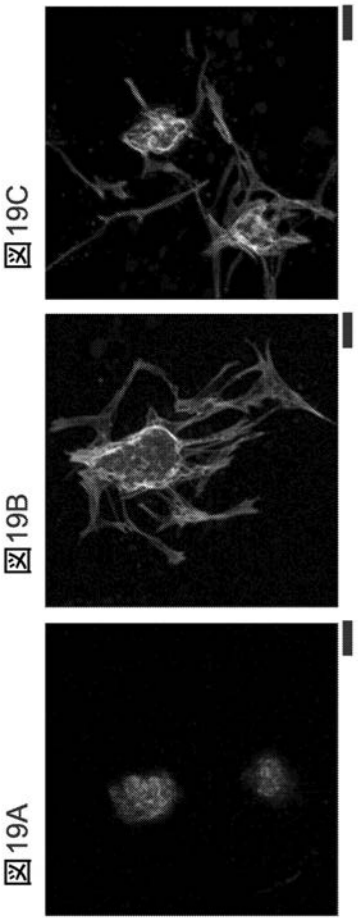
【図１７】



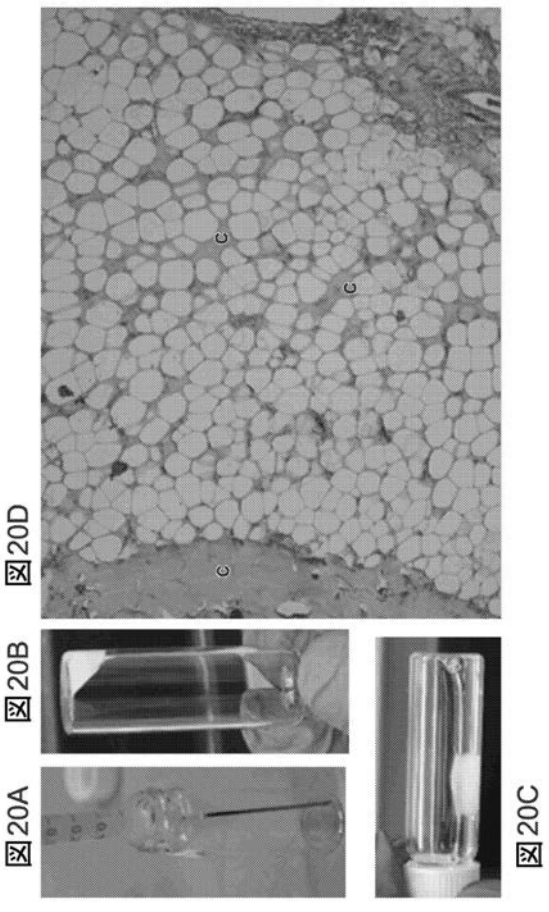
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/045494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61L 27/26 (2015.01)
CPC - A61L 27/26 (2015.09)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61F 2/02; A61L 27/26, 27/52 (2015.01)
CPC - A61F 2/02; A61L 27/26, 27/48, 27/52, 2400/06, 2400/12, 2430/00; D01D 5/0007 (2015.09)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 623/23.72; IPC(8) - A61F 2/02; A61L 27/26, 27/52; CPC - A61F 2/02; A61L 27/26, 27/48, 27/52, 2400/06, 2400/12, 2430/00; D01D 5/0007 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Orbit, Google Patents, Google Scholar.
Search terms used: *caprolactone*, fiber, nanofiber, microfiber, hyaluronic, hydrogel, heprasil, scaffold, tissue, covalent, chemical bond, diameter

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0040461 A1 (BEACHLEY et al) 16 February 2012 (16.02.2012) entire document	1-13, 15-18, 20-22, 24-26, 28, 31, 33-37
Y		14, 19, 23, 27, 29, 30, 32, 38-40
Y	WO 2013/071107 A1 (TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE et al) 16 May 2013 (16.05.2013) entire document	14, 19, 27, 29, 30, 32, 38-40
Y	US 2004/0197367 A1 (REZANIA et al) 07 October 2004 (07.10.2004) entire document	23
A	EKAPUTRA et al. The three-dimensional vascularization of growth factor-releasing hybrid scaffold of poly(epsilon-caprolactone)/collagen fibers and hyaluronic acid hydrogel. Biomaterials 32(32): 8108-8117, 2011. [Retrieved on 28 September 2015]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211007939>. see abstract	1-40
A	WO 2013/172788 A1 (TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION LTD et al) 21 November 2013 (21.11.2013) entire document	1-40

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 September 2015	06 NOV 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｌ 27/20	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/20	
Ａ６１Ｌ 27/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/16	
Ａ６１Ｌ 27/44	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/44	
Ａ６１Ｌ 27/56	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/56	
Ａ６１Ｌ 27/54	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/54	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ゴアテックス
２．テフロン

(72)発明者 ジアン, シュエソン
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, クラーク １０６, テクノロジー ベンチャーズ
(72)発明者 レディ, サシャンク
アメリカ合衆国 メリーランド州 ２１２０１ 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 ブランダチャー, ジェラルド
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, クラーク １０６, テクノロジー ベンチャーズ
(72)発明者 マオ, ハイクアン
アメリカ合衆国 メリーランド州 ２１２１２－１２２８ ボルチモア, ノース チャールズ ストリート ６１２９
(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 ２１２１８ ボルチモア, ノース チャールズ ストリート ３４００, クラーク １０６, テクノロジー ベンチャーズ
(72)発明者 リ, ショウイ
アメリカ合衆国 バージニア州 ２３２２８ ヘンリコ, ノースボーン コート ７７１１エイ
(72)発明者 フェン, ケビン
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, クラーク １０６, テクノロジー ベンチャーズ
(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 ２１２１１ ボルチモア, クレスモント アベニュー ２９１１

Ｆターム(参考) 4C081 AB05 AB11 AB18 AB19 BA16 BB06 CA051 CA151 CA161 CA181
CD031 CD041 CD081 CD091 CD111 CD121 DA16 DB03 EA02