

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6633628号  
(P6633628)

(45) 発行日 令和2年1月22日(2020.1.22)

(24) 登録日 令和1年12月20日(2019.12.20)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 L 27/52	(2006.01)
A 6 1 L 27/20	(2006.01)
A 6 1 L 27/22	(2006.01)
A 6 1 L 27/44	(2006.01)
A 6 1 L 27/38	(2006.01)
	A 6 1 L 27/52
	A 6 1 L 27/20
	A 6 1 L 27/22
	A 6 1 L 27/44
	A 6 1 L 27/38

請求項の数 15 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2017-522556 (P2017-522556)
(86) (22) 出願日	平成27年10月23日(2015.10.23)
(65) 公表番号	特表2017-531533 (P2017-531533A)
(43) 公表日	平成29年10月26日(2017.10.26)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/074610
(87) 国際公開番号	W02016/062862
(87) 国際公開日	平成28年4月28日(2016.4.28)
審査請求日	平成30年7月2日(2018.7.2)
(31) 優先権主張番号	14382417.5
(32) 優先日	平成26年10月24日(2014.10.24)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)

(73) 特許権者	517141546 イストセル ソシエダッド リミターダ H I S T O C E L L, S. L. スペイン国 4 8 1 6 0 ビスカヤ デリ オ、バルケ テクノロヒコ デ ビスカヤ 8 0 0 セグンド
(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
(74) 代理人	100103447 弁理士 井波 実
(74) 代理人	100111730 弁理士 伊藤 武泰
(74) 代理人	100180873 弁理士 田村 廉政

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】口腔粘膜を再生するためのバイオマテリアル足場材料

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

バイオマテリアル足場材料を製造する方法であって、  
 a ) フィブリン網目構造および多糖網目構造を含むヒドロゲルを用意し、  
 b ) 前記工程 a ) のヒドロゲルに凍結・融解プロセスを施して、当該ヒドロゲルを物理的に架橋させ、  
 c ) 前記工程 b ) の実施後に得られた物理的に架橋されたヒドロゲルに凍結乾燥を施すこと  
 を含んでなる、方法。

## 【請求項 2】

前記フィブリン網目構造が、フィブリノーゲン含有材料を重合することによって得られたものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記フィブリノーゲン含有材料が、血漿である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記フィブリノーゲン含有材料の重合が、凝固剤、カルシウム源、および場合により抗線維素溶解剤の存在下において実施される、請求項 2 または 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記カルシウム源がカルシウム塩である、請求項 4 に記載の方法。

10

20

**【請求項 6】**

前記多糖網目構造が、多糖含有材料を重合することによって得られる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記多糖含有材料がアガロースである、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項において定義された方法によって得ることができる、バイオマテリアル足場材料。

**【請求項 9】**

前記バイオマテリアル足場材料の構造中またはその表面上に組み入れられた細胞を含む、請求項 8 に記載のバイオマテリアル足場材料。 10

**【請求項 10】**

相互侵入網目構造を有する物理的に架橋されたヒドロゲルを製造する方法であって、  
a ) フィブリン網目構造および多糖網目構造を含むヒドロゲルを用意し、  
b ) 前記工程 a ) のヒドロゲルに凍結 - 融解プロセスを施すこと  
を含んでなる、方法。

**【請求項 11】**

請求項 10 において定義された方法によって得ることができる、相互侵入網目構造を有する架橋されたヒドロゲル。

**【請求項 12】**

罹患したまたは損傷した軟組織の機能活動を部分的にまたは完全に増加、修復、または置換するために用いられ、前記軟組織が、創傷、潰瘍、火傷、良性または悪性の新生物、感染症、打撲傷、外傷性障害、苛性化、先天性奇形、物質損失または歯周病を含む群から選択される機能不全、傷害または疾患の結果として、損傷または罹患したものである、請求項 8 または 9 において定義されるバイオマテリアル足場材料。 20

**【請求項 13】**

前記軟組織が口腔粘膜である、請求項 12 に記載のバイオマテリアル足場材料。

**【請求項 14】**

請求項 8 または 9 において定義されたバイオマテリアル足場材料を含んでなる、医薬組成物。 30

**【請求項 15】**

請求項 8 または 9 において定義されたバイオマテリアル足場材料を含んでなる、美容用組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、組織工学の分野、より詳細には、軟組織の再生、修復および / または置換に好適なバイオマテリアルに属する。

**【背景技術】****【0002】**

「組織工学」として知られる新しく非常に有望な知識分野は、近年、医学研究および歯科研究において発展してきた。この革新的分野の主な目標は、様々な要因、例えば外傷、火傷によって、癌などの疾患の発症またはある特定の先天性異常などによって損傷した人体の実際の組織および臓器のバイオ人工的再生、修復、または置換に向けられている。組織工学は、主に 3 つの基本的要素：1 ) 細胞、2 ) バイオマテリアル、および 3 ) バイオ分子、誘導因子または成長因子をベースとしている。

**【0003】**

バイオマテリアルの場合、それらは、生体システムの生産において使用され、医療の様々な分科において応用されている。これらの材料は、種々の特性の中でも特に、生きた組織との永久的な接触において生体適合性である。したがって、バイオマテリアルがその機 50

能を果たしている期間を通して、組織 - 材料界面において望ましくない反応が生じるのを防いで、その特性を維持することは必須である。現在の研究は、材料の物理化学的特性と機械的特性との間における特定の相互作用を理解すること、ならびに細胞挙動、例えばサイトカインおよび成長因子の付着、活性化、放出などを観察することに焦点が置かれている。今日、その組成に従い、天然または合成のポリマー性、金属性、またはセラミック性のバイオマテリアルと分類することができる、膨大な量の様々なバイオマテリアルが存在する。

#### 【 0 0 0 4 】

組織工学においてバイオマテリアルは、人工細胞外マトリックスとして機能するためには、細胞の生物学的および機械的機能において有利なものでなければならない。結果として、バイオマテリアルは、細胞に対して、好適な構造および機能を有する新しい組織を形成するための三次元空間を提供する。

10

#### 【 0 0 0 5 】

軟組織不全の中でも特に、口腔粘膜修復は、この組織の複雑な構造から困難かつ必要な使命を代表するものである。様々な外科的処置、外傷、または他の臨床症状の結果としての口腔粘膜の損失は、生じた欠損を効果的に修復する好適な適用範囲を得る必要性を考慮すると、対処するのが難しい問題である。採用されている現在の解決策は、異なるドナー部位および由来元からの移植片を適用することを含むものである。しかしながら、これらの移植は、拒絶反応（同種移植片、異種移植片）などの合併症、ドナー部位の病的状態（自己移植）、元の組織の特性の維持を生じ、組織を取り囲み崩壊を防ぎつつ新しい組織の発育を可能にする十分な構造的特性を提供し、機能が制限され、ならびに美観的魅力を欠く。これらのことから、解剖学的および美観的に被移植部と同様の、機能的で生物学的な代用物の開発が必要とされている。今日、多くの研究グループが、それらの研究の焦点を、本来の組織と同様の組織学的構造を提供する新しいバイオマテリアルの開発に置いており、これらは移植により元の組織に効率的に統合されて、関係部位における損傷した組織を機能的組織で置き換える。そのようなバイオマテリアルの開発は、現在、拒絶反応および組織の量の制限に関連するこれらの問題を解決するための最適の代替手段であると考えられている。

20

#### 【 0 0 0 6 】

口腔粘膜再生のためのバイオマテリアルは、透過性、安定性、弾性、柔軟性、可塑性などの機械的および構造的特性を有しなければならず、ゲルまたは固体の三次元構造体として、様々な所望の形態、すなわち、シート状に適合しなければならない。理想的には、それらは、新しい組織の再構成の進行に伴って分解されつつ、周囲細胞および成長因子が負傷部位に戻るのを促進することによって新しい組織形成も誘発しなければならない。

30

#### 【 0 0 0 7 】

WO 03 / 007873では、トロンビン、第XIII因子、および塩化カルシウムの存在下においてフィブリノーゲンから架橋されたフィブリンを含む、凍結乾燥された生体適合性の多孔質マトリックスを開示している。このマトリックスはさらに、補助成分、例えば多糖などを含み得、移植片として使用することができる。

40

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【 0 0 0 8 】

本発明者らは、高強度を付与するマクロ多孔質スカフォールド（scaffolding）構造を有し、膨潤状態において容易に取り扱われ、そして変形力を加えられた後その形状を回復することができるような、安定性、弾力性、柔軟性、および可塑性を有することによって特徴付けられる新規のバイオマテリアルを開発した。さらに、本発明によるバイオマテリアルは、破壊または崩壊することなく膨潤状態での縫合プロセスに耐えることも示すものであり、これは、損傷した組織への適切な固定を保証する。

#### 【 0 0 0 9 】

生物学的試験も、また、バイオマテリアルと、細胞（特にヒト線維芽細胞、角化細胞、

50

幹細胞ならびに軟組織および口腔粘膜の修復に関する他の細胞タイプ)との適正な相互作用を示し、また細胞に対する細胞毒性がないことを指し示している。

#### 【0010】

さらに、本発明によるバイオマテリアルは、インビボモデルにおいて試験されている。結果は、毒性事象の不在および経時での好ましい分解速度を確認するものであった。その上、このバイオマテリアルは、移植後の早い段階において新生血管形成の明白な徴候を提供し、周囲組織との適切な相互作用を示し、すなわち本発明によるバイオマテリアルにコロニーを形成させることが可能である。

#### 【0011】

本バイオマテリアルは、フィブリン網目構造および多糖網目構造を含むヒドロゲルの凍結乾燥によって合成される。 10

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

したがって、本発明の第一態様は、バイオマテリアル足場材料を製造する方法(以下、「方法1」という)であって、

- a) フィブリン網目構造および多糖網目構造を含むヒドロゲルを用意し、
- b) 工程a)のヒドロゲルに凍結-融解プロセスを施して、当該ヒドロゲルを物理的に架橋させ、
- c) 工程b)の実施後に得られる物理的に架橋されたヒドロゲルに凍結乾燥を施すことを含んでなる方法に関する。 20

#### 【0013】

本発明の第二態様は、上で定義された方法1によって得ることができる、バイオマテリアル足場材料に関する。

#### 【0014】

本発明による方法の工程b)から結果として得られるヒドロゲルは、バイオマテリアルに、凍結-融解プロセスの適用から誘導される物理的架橋の結果として向上した機械的特性を与える。この凍結-融解工程は、相互侵入網目構造を有するヒドロゲルを提供する。

#### 【0015】

したがって、本発明の別の態様は、相互侵入網目構造を有する物理的に架橋されたヒドロゲルを調製するためのプロセス(以下、「方法2」という)であって、 30

- a) フィブリン網目構造および多糖網目構造を含むヒドロゲルを用意し、
  - b) 工程a)のヒドロゲルに凍結-融解プロセスを施すこと
- を含んでなる方法に関する。

#### 【0016】

本発明のさらなる態様は、上で定義された方法2によって得ることができる相互侵入網目構造を有する物理的に架橋されたヒドロゲルに関する。

#### 【0017】

本発明の別の態様は、医薬品として用いられる、上で定義されるバイオマテリアル足場材料に関する。

#### 【0018】

本発明の第四態様は、罹患したまたは損傷した軟組織の機能活動を部分的にまたは完全に増加、修復、または置換するために用いられる、上で定義されるバイオマテリアル足場材料に関する。 40

#### 【0019】

特定の実施形態において、前記軟組織は口腔粘膜である。

#### 【0020】

本発明のさらなる態様は、上で定義されるバイオマテリアル足場材料を含む医薬組成物に関する。

#### 【0021】

本発明の別の態様は、上で定義されるバイオマテリアル足場材料を含む美容組成物に関

50

する。

【0022】

本発明はさらに、罹患したまたは損傷した軟組織の機能活動を部分的にまたは完全に増加、修復、または置換する方法であって、上で定義されるバイオマテリアル足場材料の治療有効量の、ヒトまたは動物への投与を含む方法に関する。

【0023】

本発明の別の態様は、医薬品としての、上で定義されるバイオマテリアル足場材料の使用に関する。

【0024】

本発明はさらに、罹患したまたは損傷した軟組織の機能活動を部分的にまたは完全に増加、修復、または置換するための、上で定義されるバイオマテリアル足場材料の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】種々のアガロース濃度：a) 0.2%。b) 0.4%。c) 0.6%でのフィブリンおよびアガロースゲルの走査電子顕微鏡写真。下付き文字1、2、および3は、それぞれ、異なるスケール  $\times 50$ 、 $\times 150$ 、および  $\times 1500$  に対応する。

【図2】アガロースの種々の組成を有する材料の構造をより詳細に示す走査電子顕微鏡写真。上側：1,500倍。下側：20,000倍。a) 0.2%のアガロース；b) 0.4%のアガロース；c) 0.6%のアガロース。

【図3】(a) 本発明の方法1の工程a)により；(b) 本発明の方法1または2の工程a)およびb)により、得られる本発明によるヒドロゲルの詳細。

【図4】膨潤したバイオマテリアルおよびそのハンドリングの詳細。

【図5】端部を縫合した後のバイオマテリアルの詳細。

【図6】本発明によるバイオマテリアル(0.2%のアガロース)において培養したヒト線維芽細胞の緑色／赤色蛍光顕微鏡写真。A、B、およびC：それぞれ、24、48、および72時間の培養後。A、B、およびCは、a、b、およびcよりも高い倍率の顕微鏡写真に対応している。スケールバーは200マイクロメートルに相当する。

【図7】本発明によるバイオマテリアル(0.4%のアガロース)において培養したヒト線維芽細胞の緑色／赤色蛍光顕微鏡写真。A、B、およびC：それぞれ、24、48、および72時間の培養後。A、B、およびCは、a、b、およびcよりも高い倍率の顕微鏡写真に対応している。スケールバーは200マイクロメートルに相当する。

【図8】本発明によるバイオマテリアル(0.2%および0.4%のアガロース)において培養したヒト線維芽細胞の細胞生存率。当該値は、対照(100%)に対する細胞生存率の百分率を表す。点線は、ISO10993.5に従う細胞毒性限界を示している。

【図9】陽性対照(刺激物)、陰性対照(参考生存率)、および本発明による試料(Biom1およびBiom2)における生存率の百分率。点線は、この刺激モデルにおいて使用した限界を表している。当該線より上の値は、非刺激性であると見なされ、その一方で、この線より下の値は、刺激性であると見なされる。

【図10】ラットにおける当該材料の移植部位の概略図および様々な時点：a) 7日目；b) 14日目；c) 30日目、およびd) 60日目でのバイオマテリアル外植片の画像。

【図11】試験期間を通してのバイオマテリアル外植片の巨視的画像：a) 7日目；b) 14日目；c) 30日目、およびd) 60日目。

【図12】試験期間を通しての外植片の組織画像(7、14、30、および60日)。

【図13】ミニブタモデルでの口腔粘膜の欠損においてのインビボでの概念実証：a) 抜歯後の口腔粘膜の欠損；b) 粘膜欠損の内側への本発明のバイオマテリアルの移植；c) バイオマテリアル移植後の吸収性縫合糸による欠損の縫合；d) 動物の頸によるアルギン酸塩キャストモデルのスキヤニングの例およびOrthoviewer画像解析ソフトウェアによる画像解析。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

## 【0026】

用語「バイオマテリアル」は、本明細書において使用される場合、生きた組織中への移植に好適であって、患者または対象において元の機能を実施、増大、または置換する、天然または合成の生体適合性材料を意味する。本発明によるバイオマテリアルは、病巣の部位に移植された後に当該組織を再生することによって軟組織の欠損または傷害を再生、置換、および／または修復するために特に好適である。

## 【0027】

用語「足場材料（scaffolding）」は、巨大分子の会合によって形成された網目構造によって構成される高度に多孔質の三次元構造体として理解される。巨大分子間のこの会合は、強い相互作用または弱い相互作用（例えば、共有結合など）によって化学的に提供される。この会合は、結果として、化学的架橋網目構造を生じる。方法1の工程b)の実施の結果として、巨大分子間の会合も物理的に提供され、結果として、物理的および化学的架橋網目構造を生じる。

10

## 【0028】

したがって、本発明において、バイオマテリアル足場材料は、scaffolding構造を有する、上で定義されるバイオマテリアルを意味する。

## 【0029】

前記したように、バイオマテリアル足場材料を製造するための本発明の方法1は、  
a) フィブリン網目構造および多糖網目構造を含むヒドロゲルを用意し、  
b) 工程a)のヒドロゲルに凍結・融解プロセスを施して当該ヒドロゲルを物理的に架橋させ、  
c) 工程b)の実施後に得られる物理的に架橋されたヒドロゲルに凍結乾燥を施すことを含んでなる。

20

## 【0030】

本発明による方法1の第一工程は、フィブリン網目構造および多糖網目構造を含むヒドロゲルを用意する工程である。

## 【0031】

用語「ヒドロゲル」は、当技術分野において周知であり、固相として一般的に知られるものの中に捉えられた液相として水を有するゲルとして理解される。この固相は、液相を捉えてそれが流出するのを防ぐ網目構造を構成する。

30

## 【0032】

本発明の方法の第一工程において提供されるヒドロゲルは、フィブリン網目構造を含む。用語「フィブリン網目構造」、「フィブリンマトリックス」、「フィブリンバイオマトリックス」、「フィブリンベースの足場材料」、「フィブリン足場材料」、「フィブリンゲル」、「フィブリン接着剤」、および「フィブリン封着材」は、しばしば、当技術分野において、凝固因子およびCa<sup>++</sup>源の存在下でのフィブリノーゲンの重合生成物から結果として得られる三次元網目構造を意味するために相互互換的に使用される。そのようなフィブリンマトリックスは、損傷後に身体によって自然に提供されるが、組織代用物として設計することもできる。

40

## 【0033】

したがって、特定の実施形態において、フィブリン網目構造は、少なくとも凝固因子およびカルシウム源の存在下においてフィブリノーゲン含有材料を重合することによって得られる。

## 【0034】

好みしい実施形態において、フィブリノーゲン含有材料は、同種異系起源または異種起源のものである。それでもなお、それらは、自己由来のものであってもよい。

## 【0035】

フィブリノーゲンは、血漿中に存在する高分子量タンパク質である。したがって、フィブリン網目構造の生成のために出発材料として使用されるフィブリノーゲン含有材料は、血漿または血漿製剤、例えば、これらに限定されるわけではないが、寒冷沈降物または濃

50

縮フィブリノーゲンなど、であり得る。この場合、凝固因子も血漿中に存在し、特に凝固因子はトロンビンである。

【0036】

トロンビンは、フィブリノーゲン分子を低分子量のポリペプチドおよびフィブリノモノマーへと切断するタンパク質分解酵素である。当該モノマーは、二量体へと重合し、それに続いて、トロンビンによって活性化された第XIII因子の作用により、カルシウムイオンの存在下において、共有結合によってお互いに結合する。

【0037】

フィブリノーゲンの濃度は変わり得、1 mg / mL から最高約 200 mg / mL (ヒドロゲル中における最終濃度) までの範囲の濃度を含む。好ましい実施形態において、当該フィブリノーゲンは、約 1 mg / mL から 5 mg / mL の濃度において加えられる。

10

【0038】

さらに、フィブリノーゲンは、任意の適切な濃度の凝固因子と組み合わされ得る。好ましくは、凝固因子はトロンビンである。

【0039】

トロンビンは、約 0.1 IU / mL から約 300 IU / mL の範囲の様々な濃度において加えられる。

【0040】

好ましくは、フィブリノーゲンに対するトロンビンの比率は、約 0.001 から約 100、より好ましくは約 0.01 から約 10、さらにより好ましくは約 0.1 から約 1 の範囲である。

20

【0041】

特定の実施形態において、ヒドロゲルは、約 1 mg / mL から約 100 mg / mL の最終濃度のフィブリノーゲンと、約 0.5 IU / mL から約 250 IU / mL の最終濃度のトロンビンとを含む。

【0042】

特定の実施形態において、フィブリノーゲン含有材料の重合は、他の凝固因子の存在下においても実施される。

【0043】

30

用語「凝固因子」は、血漿中に存在して凝固を可能にする連鎖反応に関与する成分、通常はタンパク質、を意味する。本発明における使用のための好適な凝固因子としては、これらに限定されるわけではないが、第II因子(組織因子またはトロンボプラスチン)；第IV因子；第V因子；第V因子(プロアクセレリンまたは不安定因子)；第VII因子、第VII因子(安定因子またはプロコンベルチン)；第VIII因子(抗血友病A因子またはフオント・ヴィレブランド因子)；第IX因子(抗血友病B因子またはクリスマス因子)、第X因子(スチュアート・パラウアー因子)、第XI因子(血漿トロンボプラスチン前駆物質)；第XII因子(ハーゲマン因子)、第XIII因子(フィブリノーゲン安定化因子)、フオント・ヴィレブランド因子、高分子量キニノーゲン(HMWKまたはフィッツジェラルド因子)などが挙げられる。

40

【0044】

したがって、フィブリノーゲン含有材料として血漿または血漿製剤を使用する場合、フィブリノーゲンの重合に必要な全ての分子がそこに含まれており、カルシウム源の添加により、血漿からフィブリノーゲンの網目構造を形成させることができる。

【0045】

好ましい実施形態において、カルシウム源は、カルシウム塩、例えば、これらに限定されないが、塩化カルシウム、グルコン酸カルシウム、またはそれらの組み合わせなどである。カルシウム塩の濃度は、フィブリノーゲンの重合を誘起するのに十分であるべきである。より好ましい実施形態において、カルシウム塩は塩化カルシウムである。より好ましい実施形態において、塩化カルシウムの濃度は、0.1 g / L から 3 g / L の間である。

50

しかしながら、より低いまたはより高い濃度も使用することができる。一つの実施形態において、フィブリノーゲン含有材料は、最初に、水または食塩溶液、例えばP B Sなどに希釈される。

【0046】

フィブリノーゲンポリマーは、線維素溶解と呼ばれるプロセスにより分解され得る。線維素溶解の間、プラスミノーゲンは、組織プラスミノーゲン活性化剤(t P A)によって活性酵素プラスミンに転化される。プラスミンは、その結合部位によりフィブリノーゲン表面に結合し、結果としてフィブリノーゲンの分解を生じる。ヒドロゲルの線維素溶解を防ぐために、フィブリノーゲンの重合が、抗線維素溶解剤、例えば、これらに限定されるわけではないが、イプシロンアミノカプロン酸、トラネキサム酸、またはアプロチニンなど、の存在下において、実施され得る。好ましい実施形態において、抗線維素溶解剤はトラネキサム酸である。

【0047】

トラネキサム酸は、プラスミノーゲンにおけるリシン結合部位に対して高い親和性を有するアミノ酸リシンの合成誘導体であり、これらの部位を遮蔽して、フィブリノーゲンの表面へのプラスミノーゲン活性化因子の結合を防ぐことにより、抗線維素溶解性効果を発揮することができる。トラネキサム酸は、疾患を伝染させない点において、動物由来の他の抗線維素溶解剤よりも有利である。好ましい実施形態において、ヒドロゲル中におけるトラネキサム酸の濃度は、0.5 g/Lから2 g/Lの間、好ましくは1 g/Lから2 g/Lである。しかしながら、より低いまたはより高い濃度も使用することができる。

【0048】

フィブリノーゲン網目構造は非常に多能であり、そのため、それらは様々な人工組織の開発のために使用されている。しかしながら、これらの臨床使用は、主に低い稠度、そのハンドリングの難しさ、および非常に脆弱であるという事実から、制限されてきた。この理由から、本発明の工程(a)において提供されるヒドロゲルはさらに、多糖網目構造を含む。一般的に、多糖は、組織の強度および稠度を提供するために使用され、それらに対して可溶性であるべきである。

【0049】

用語「多糖網目構造」は、本明細書において使用される場合、多糖の物理的ゲル化から結果として得られる三次元網目構造を意味する。多糖網目構造は、通常、物理的ゲル、すなわち成分間の化学結合によって安定化されているのではないが低エネルギー結合(ファン・デル・ワールス、水素結合、極性結合、イオン結合など)によって安定化されているゲルを形成する。

【0050】

多糖は、好ましくは温度の変化によって、ゲルを形成することができる任意の多糖であってよく、アガロース、カンテン、セルロース、デキストラン、デンプン、キトサン、コンニャク、カードラン、カラゲナン、ペクチン、ジェラン、およびアルギン酸塩からなる群から選択され得る。当業者であれば理解するであろうように、そのようなゲル化した多糖は、有利には、1種の多糖から構成されるが、本発明は、2種以上の多糖の混合物も包含する。本方法の有利な実施形態において、多糖はアガロースである。

【0051】

当業者であれば、多糖のゲル化および多糖網目構造の形成にとって好適な条件は、その性質に依存するであろうことを理解するであろう。したがって、多糖としてアガロースを使用する好ましい場合では、温度をアガロース濃度のゲル化温度より低く下げることで十分である。この温度は、試料中のアガロース濃度のゲル化温度を相關付ける表(例えば、[http://www.lonzabio.com/uploads/tx\\_mxmarketingmaterial/Lonza\\_BenchGuides\\_SourceBook\\_Appendix\\_B\\_-\\_Agarose\\_Physical\\_Chemistry.pdf](http://www.lonzabio.com/uploads/tx_mxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Appendix_B_-_Agarose_Physical_Chemistry.pdf)において入手可能な表)から、当業者によって容易に特定することができる。

【0052】

別の実施形態において、本発明は、これらに限定されないが、メチルアガロース、ヒド

10

20

30

40

50

ロキシエチルアガロース、ヒドロキシプロピルアガロース、アリルアガロース、アセチルアガロースなどを含む、変性アガロースの使用を含むものである。

【0053】

好ましい実施形態において、アガロースは低融点アガロースである。低融点アガロースは、例えば、Ultra Pure(登録商標)アガロース(Invitrogen)、NuSieve(登録商標)GTG(登録商標)アガロース(Lopza)、LMアガロースおよびLMシーブアガロース(Protonadisa)、アガロースSERVAプレミアム(Serva)など、市販されている。多糖網目構造がアガロースによって形成される事例において、多糖網目構造の形成は、10~37、好ましくは15~25、最も好ましくは20~25の混合物温度において実施される。

10

【0054】

好ましい実施形態において、多糖網目構造はアガロースによって形成される。別の好ましい実施形態において、ヒドロゲル中におけるアガロースの濃度は、約0.05%から1%、好ましくは0.2%から0.6%である。

【0055】

したがって、本発明による方法の工程(a)において提供されるヒドロゲルは、フィブリンへのフィブリノーゲンの架橋反応を実施することによって、ならびに多糖のゲル化を誘導することによって得られる。当業者は、両方の反応を同時にまたは任意の順序に実施できることを、すなわち、フィブリンへのフィブリノーゲンの重合を最初に実施して、それに続いて多糖のゲル化を実施してもよく、または当該多糖のゲル化を最初に実施して、それに続いてフィブリン網目構造へのフィブリノーゲンの重合を実施してもよいことを理解するであろう。

20

【0056】

一つの実施形態において、フィブリノーゲン含有材料をフィブリン網目構造の形成にとって適切な条件下におくことにより、フィブリン網目構造が最初に形成され、次いで、第一網目構造を、多糖を含有する溶液に接触させて、混合物を多糖網目構造の形成によって適切な条件下におくことにより、多糖マトリックスが形成される。多糖網目構造がアガロースによって形成される特定の場合において、当該アガロース網目構造の形成は、当該混合物をアガロースの融点より低い温度に置くことによって達成することができる。当業者であれば、使用される特定のアガロースタイプの融解曲線を参考にすることにより、さらなる実験を行うことなく、そのような温度を特定することができる。

30

【0057】

しかしながら、好ましい実施形態において、フィブリン網目構造および多糖網目構造を含むヒドロゲルは、最初に、フィブリノーゲン含有材料、凝固因子、緩衝生理食塩水(好ましくはPBS)、および場合により抗線維素溶解剤を混合することによって形成される。この混合物に多糖およびカルシウム源を同時に加え、それにより、結果として得られる混合物を多糖のゲル化にとって適切な条件、例えば多糖の融点より低い温度、に晒す際に、フィブリン網目構造と多糖網目構造が同時に形成される。

【0058】

より好ましい実施形態において、フィブリノーゲン含有材料は血漿であり、凝固因子は血漿中に含まれるトロンビンであり、多糖はアガロースであり、カルシウム源は塩化カルシウムである。

40

【0059】

本発明による方法1の第二工程(工程b)は、工程a)のヒドロゲルに凍結-融解プロセスを施すことを含む工程である。

【0060】

この凍結-融解プロセスは、ヒドロゲルの物理的架橋を引き起し、その結果として、ヒドロゲルの機械的特性が向上し、特にヒドロゲルにより高い強度と、ヒドロゲルの取り扱いやすさを提供する。

【0061】

50

凍結 - 融解技術は、ヒドロゲルの凍結および融解による少なくとも1つのサイクルを含むが、好ましくは、ヒドロゲルの物理的架橋は、一連の凍結 - 融解サイクルを使用することによって達成される。

【0062】

ヒドロゲルの凍結、場合により凍結状態での貯蔵、およびその後の融解の結果として、クライオゲルが形成される。このクライオゲルは、巨大多孔質構造を有することを特徴とする。凍結の際、溶媒（水）の主要なバルクの結晶が形成される。融解後、クライオゲルまたはクライオ構造が形成される。水が氷へと転化することによってポリマー濃度が増加するに従い、ポリマー鎖が強制的に揃えられ、それが、横に並んだ会合の形成のためのメカニズムを提供し得、これが、融解の際に、ゲルの接合領域として完全なまま残る。

10

【0063】

物理的に架橋したゲルの三次元構造は、主に、高分子網目構造の接合領域における複数の鎖間水素結合によって安定化される。

【0064】

凍結の温度および持続時間、融解速度、再凍結サイクルの数などの低温処理の手順を変えることにより、最終ゲルの特性およびそのマクロ構造およびミクロ構造を調整および制御することが可能である。特に、クライオゲルの安定性および機械的特性は、凍結時間および凍結 - 融解サイクルの増加に伴って高まる。

【0065】

特定の実施形態において、本発明の方法の工程a)において得られるヒドロゲルは、-30から-15の間の温度、より好ましくは約-20において、少なくとも6時間、より好ましくは少なくとも12時間、それを凍結することにより、凍結工程が施される。それに続いて、当該凍結されたヒドロゲルは、室温、通常は20から25の間、において2~6時間、好ましくは約3時間かけて融解される。

20

【0066】

ヒドロゲルに物理的架橋を提供するには、凍結 - 融解の1サイクルのみで十分であるが、数回の凍結 - 融解サイクル、好ましくは2~5サイクルを実施することが推奨される。

【0067】

特定の実施形態において、本発明の方法1はさらに、本発明の方法1の工程b)から結果として得られる当該物理的に架橋したヒドロゲルを洗浄する工程を含む。

30

【0068】

凍結 - 融解プロセスを実施した後に工程b)の結果として得られるヒドロゲルは、水で簡単に洗浄することにより、当該結果として得られる材料の三次元構造の一部を形成しない任意の化合物または物質を除去することができる。例えば、フィブリノーゲン含有材料として血漿を使用する場合、この洗浄工程は、バイオマテリアルの構造に物理的または化学的に会合しない、血漿中に存在するこれらの物質を除去する。

【0069】

当該洗浄工程の後、結果として得られるヒドロゲルは、白色で無臭である。

【0070】

本発明の方法1の工程c)は、本発明によるバイオマテリアル足場材料を得るための、工程b)の結果として得られる物理的に架橋されたヒドロゲルの凍結乾燥を意味する。

40

【0071】

医薬品の観点から、凍結乾燥形態において利用可能なバイオマテリアルを有することは重要である、というのも、それらは貯蔵期間中の安定性を向上するからである。

【0072】

その上、凍結乾燥は、制御された有孔率、高い強度、膨潤状態での容易なハンドリング、安定性、弾性、柔軟性、ならびに可塑性を有するバイオマテリアルの提供を可能にし、それにより、当該バイオマテリアルは、変形力を加えられた後にその形状を回復することができる。さらに、本発明によるバイオマテリアルは、破壊または崩壊することなく膨潤状態での縫合プロセスに耐えることを示しており、これは、損傷した組織への適正な固定

50

を保証する。

【0073】

当該ヒドロゲルは、例えば5%濃度のグルコース、スクロース、またはトレハロースなどの凍結防止剤の存在下などにおいて、当業者に既知の任意の方法によって凍結乾燥され得る。実際に、本発明によるバイオマテリアルは、その特性を変えることなく、凍結乾燥して再懸濁することができるという追加の利点を有する。

【0074】

しかしながら、凍結乾燥のための凍結方法は、バイオマテリアルの孔径に影響を及ぼす。孔径は、緩やかに凍結された（例えば-1 / 分など）凍結乾燥物では非常に大きく、急速に凍結させた（例えば、室温から直接-80へ）凍結乾燥物ではより小さい。

10

【0075】

凍結乾燥のための凍結方法が同じ場合、高いアガロース濃度、例えば0.4%および0.6%などのゲルは、より小さな構造を有し、その一方で、より低いアガロース濃度、例えば0.2%などの凍結乾燥物は、かなり大きい孔径を有する。

【0076】

アガロース濃度が同じで凍結方法が異なる場合、凍結乾燥における遅い緩やかな凍結は、孔の一様な分布およびより良好な外観を有するバイオマテリアルを提供する。実際に、単位面積あたりの有孔率は異なっており、1:2（遅い凍結：急速な凍結）の比率に相当する。このことは、急速に凍結させた凍結乾燥物は、徐々に凍結された凍結乾燥物と比較して、単位面積あたり2倍の孔を有するという事実を意味する。したがって、孔は、急速に凍結された凍結乾燥物においてより小さい。

20

【0077】

したがって、好ましい実施形態において、凍結乾燥プロセスは、ヒドロゲルに0.5 / 分から5 / 分の間の緩やかな凍結速度を適用することによって実施される。

【0078】

結果として得られる凍結乾燥されたバイオマテリアルは、続いて、その安定性に影響を及ぼすことなく、滅菌プロセスも施され得る。当該プロセスとしては、例えば、凍結乾燥された生成物への-放射線の適用が挙げられる。

【0079】

滅菌プロセスは、当業者に周知であり、本発明の場合のように殺菌処理された生成物を必要とする用途においてバイオマテリアルを使用できるようにする目的において実施される。

30

【0080】

本明細書において説明される製造方法は、軟組織の再生のために使用される他のバイオマテリアル、特に、以下の方法によって得られるコンパクト化されたバイオマテリアル、例えばWO2011/023843およびWO2013/072409に記載されるようなものなどと比べて有利な特性を示すバイオマテリアルを提供する。

【0081】

特に本バイオマテリアルは、栄養補給および細胞老廃物の排除を保証するための好適な相互接続または架橋を有する高い多孔質性の構造を示す。

40

【0082】

さらに、結果として得られるバイオマテリアルは、容易に膨潤させることができ、その初期組成に応じて、その乾燥重量の10倍から30倍の間の比率において液体を吸収することができる。本バイオマテリアルは、その膨潤状態において、高耐性であり、形状を保持し（変形力が加えられた後にその形状を回復する）、容易に管理することができ、さらに術中の操作を容易にし、したがって移植床への縫合およびインビボ移植を容易にする。したがって、膨潤した当該マテリアルは、その特性を失うことなく圧縮および折り畳むことができ、変形後にその初期形状を回復することができる。

【0083】

さらに、本バイオマテリアルの機械的特性は、凍結-融解工程に由来する物理的架橋に

50

よって向上する。

【0084】

本発明の別の態様は、相互侵入網目構造を有する物理的に架橋されたヒドロゲルを調製するための方法（本発明の方法2）であって、

- a) フィブリン網目構造および多糖網目構造を含むヒドロゲルを用意し、
  - b) 工程a)のヒドロゲルに凍結・融解プロセスを施すこと
- を含んでなる方法に関する。

【0085】

方法2の工程a)およびb)は、本発明の方法1の場合について本明細書において既に述べたものと同じ手順に従って実施することができる。

10

【0086】

既に述べたように、本発明の方法2を実施した結果として得られるヒドロゲルは、相互侵入網目構造を有する物理的に架橋されたヒドロゲルである。当該物理的架橋は、向上した機械的特性をヒドロゲルに提供する。

【0087】

本発明によるバイオマテリアル

上で定義された本発明の方法1は、口腔粘膜を再生するために使用することができる、向上した特性を有するバイオマテリアルの製造を可能にするものである。したがって、別の態様において、本発明は、上で定義された方法1によって得ることができるバイオマテリアルに関する。

20

【0088】

別の態様において、本発明は、フィブリン網目構造および多糖網目構造を含む多孔質バイオマテリアル足場材料に関する。

【0089】

本発明によるバイオマテリアル足場材料は、栄養補給および細胞老廃物の排除を保証する高分子鎖の好適な相互接続を有する高多孔質である。

【0090】

一つの特定の実施形態において、本発明によるバイオマテリアル足場材料は、1~500マイクロメートル、好ましくは50~200マイクロメートル、より好ましくは50~100マイクロメートルの範囲の孔径を有する。

30

【0091】

本発明によるバイオマテリアル足場材料の内部構造を、走査電子顕微鏡（SEM）によって分析している。図1および2は、異なる多糖濃度を使用した、異なるスケールにおいて本バイオマテリアル足場材料の内部構造を詳細に示す顕微鏡写真である。

【0092】

概して、孔間の低相互接続を有する橢円形の多孔質構造が観察される。当該細孔は、材料全体において明確な指向を有しているように思えないが、実際のところそれらは、微細領域という指向ではある。

【0093】

既に述べたように、本発明によるバイオマテリアル足場材料は、容易に膨潤することができ、その初期組成に応じてその乾燥重量の10倍から30倍の間の割合において液体を吸収することができる。当該バイオマテリアルは、その膨潤状態において、高耐性であり、形状を保持し（変形力が加えられた後にその形状を回復する）、容易に管理することができ、さらに術中の操作を容易にし、したがって移植床への縫合およびインビボ移植を容易にする。したがって、膨潤した当該マテリアルは、その特性を失うことなく圧縮および折り畳むことができ、変形後にその初期形状を回復することができる。

40

【0094】

好ましい実施形態において、本多孔質バイオマテリアル足場材料は、最初に、多糖の存在下で、当該多糖のゲル化に適切な条件下においてフィブリノーゲン含有材料を架橋されることによって得られる。さらに別の好ましい実施形態において、当該フィブリノーゲン

50

含有材料の架橋は、少なくとも凝固因子、カルシウム源、および場合により抗線維素溶解剤の存在下において実施される。好ましい実施形態において、ゲル化後、結果として得られるヒドロゲルは、既に説明したような凍結・融解法を施され、その後、凍結乾燥工程を施される。

【0095】

別の好ましい実施形態において、本多孔質バイオマテリアル足場材料は、フィブリノーゲン含有材料、凝固因子、緩衝生理食塩水（好ましくPBS）、および場合により抗線維素溶解剤を多糖およびカルシウム源と混合した結果として得られる混合物を、多糖のゲル化にとって適切な条件、例えば、当該多糖の融点より低い温度、に晒した際ににおける、フィブリン網目構造および多糖網目構造の同時形成によって得られる。ゲル化後、結果として得られるヒドロゲルは、既に説明した凍結・融解法を施され、その後、凍結乾燥工程を施される。

10

【0096】

ヒドロゲルが凍結・融解プロセスを施されるこれら好ましい実施形態の結果として得られるバイオマテリアル足場材料は、凍結・融解プロセスを施された結果として出発材料のヒドロゲルが物理的に架橋されることにより、向上した強度を示すことも特徴とする。

【0097】

両方の好ましい実施形態において、フィブリノーゲン含有材料は、好ましくは血漿である。

【0098】

20

さらに、両方の好ましい実施形態において、凝固因子は、好ましくはトロンビンである。さらに別の好ましい実施形態において、カルシウム源は、カルシウム塩、最も好ましくは塩化カルシウムである。さらに別の好ましい実施形態において、抗線維素溶解剤はトランキサム酸である。

【0099】

別の好ましい実施形態において、多糖はアガロースである。さらにより好ましい実施形態において、アガロースは、低融点アガロースである。さらに別の好ましい実施形態において、バイオマテリアル中のアガロースの濃度は、約0.05～1%、より好ましくは0.2～0.6%である。

【0100】

30

本明細書における実施例に示されるように、本発明による多孔質バイオマテリアル足場材料は、高い耐性、容易なハンドリング、変形力を加えられた後その形状を回復する形状記憶を特徴とする。さらに、本発明によるバイオマテリアルは、破壊することなく、膨潤状態での縫合に耐えることも示しており、これは、損傷した組織への適正な固定を保証する。

【0101】

生物学的試験も、当該バイオマテリアルと、細胞、特にヒト線維芽細胞との適正な相互作用を示し、またこれら細胞に対する細胞毒性のないことを指し示している。

【0102】

本発明による多孔質バイオマテリアル足場材料は、場合により、口腔粘膜の再生を促進するため、1種または複数種の有効成分、例えば、1種または複数種の成長因子（例えば、マトリックス組成物の重量に対して0.0000001パーセントから1パーセントもしくは5パーセントの範囲の量において）を含有し得る。好適な有効成分の例としては、これらに限定されるわけではないが、フィプロネクチン、フィブリン、ラミニン、酸性および塩基性の線維芽細胞成長因子、テストステロン、 Ganglioside GM-I、カタラーゼ、インスリン様成長因子-I (IGF-I)、血小板由来の成長因子 (PDGF)、ニューロン成長因子ガレクチン-1、およびそれらの組み合わせが挙げられる。例えば、Hanssonらの米国特許第6,506,727号およびHorieらの米国特許第6,890,531号を参照されたい。本明細書において使用される場合、「成長因子」は、当該粘膜組織の再生、成長、および生存を促進する分子を包含する。本発明のいくつか

40

50

の実施形態において使用される成長因子は、ケラチン抽出物において天然に見出されるものであり得、あるいは、ケラチン抽出物もしくは形成されたケラチンマトリックスに加えられた、添加剤の形態であり得る。成長因子の例としては、これらに限定されるわけではないが、血小板由来の成長因子（P D G F）、エリスロポイエチン（E P O）、トロンボポエチン（T P O）、ミオスタチン（G D F - 8）、成長分化因子-9（G D F 9）、塩基性線維芽細胞成長因子（b F G F またはF G F 2）、上皮成長因子（E G F）、肝細胞成長因子（H G F）、顆粒球-コロニー刺激因子（G - C S F）、および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）が挙げられる。成長因子の大きなファミリーを構成する、多くの構造的および進化的に関連するタンパク質が存在する。

## 【0103】

10

さらに、本発明による多孔質バイオマテリアル足場材料は、場合により、1種または複数種の免疫調節性化合物または生理活性化合物を含んでいてもよい。本明細書において使用される場合、「免疫抑制剤または免疫調整剤」は、全般的にまたは特異的に、哺乳動物の免疫反応を抑制する薬剤である。

## 【0104】

本明細書において使用される場合、用語「免疫調整剤」は、サイトカイン、リンホカイン、モノカイン、幹細胞成長因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子（C S F）、インターフェロン（I F N）、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インスリン、プロインスリン、レラクシン、プロレラクシン、濾胞刺激ホルモン（F S H）、甲状腺刺激ホルモン（T S H）、黄体形成ホルモン（L H）、肝成長因子、プロスタグランジン、線維芽細胞成長因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、O B タンパク質、形質転換成長因子（T G F）、T G F - 、T G F - 、インスリン様成長因子（I G F）、エリスロポイエチン、トロンボポエチン、腫瘍壞死因子（T N F）、T N F - 、T N F - 、ミュラーパン抑制物質、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、インヒビン、アクチビン、血管内皮成長因子、インテグリン、インターロイキン（I L）、顆粒球-コロニー刺激因子（G - C S F）、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子（G M - C S F）、インターフェロン- a、インターフェロン- 、インターフェロン- 、S I 因子、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 13、I L - 14、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18 I L - 21、I L - 25、L I F、k i t リガンド、F L T - 3、アンジオスタチン、トロンボスポンジン、エンドスタチン、L Tなどを包含する。

20

## 【0105】

30

別の特定の実施形態において、本バイオマテリアル足場材料はさらに、骨伝導物質、例えば炭酸カルシウム、ビスホスホネート、ヒドロキシアバタイト、またはコラーゲンなどを含む。この物質の組み込みは、硬組織再構築のために当該バイオマテリアル足場材料が使用される場合に、特に骨再生の誘導に関連するものである。

## 【0106】

40

本発明の特定の実施形態において、本バイオマテリアル足場材料は、さらに当該足場材料の三次元構造中またはその表面に組み込まれた細胞を含む。細胞の組み込みは、このバイオマテリアルが、損傷した組織に存在するのと同じタイプの健康な細胞を含むことにより、著しく損傷しているかまたは患者からのインサイチューでの細胞寄与の可能性がない組織においてのバイオマテリアルの再生活動および組織修復プロセスを高める。

## 【0107】

好ましくは、ヒドロゲルの中に組み込まれる細胞は、線維芽細胞、ケラチン細胞、筋細胞、脂肪細胞、内皮細胞、未分化の間葉系細胞もしくは別の細胞系統に分化した間充織幹細胞および/または未分化造血幹細胞もしくは別の細胞系に分化し造血幹細胞、眼細胞、角膜細胞、網膜細胞、上皮細胞、白血球系由来の細胞、造血系由来の細胞、軟骨細胞、軟骨芽細胞、造骨細胞、骨細胞、末梢神経系および中枢神経系由来のニューロンまたは他の細胞、白血球系およびマクロファージ由来の細胞からなる群から選択される。

## 【0108】

50

### 治療的使用

本発明の別の態様は、医薬品として用いられる、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料に関する。

#### 【0109】

別の態様において、本発明は、ヒトおよび動物の軟組織の機能活動を部分的にまたは完全に増加、修復、または置換するために用いられる、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料に関する。

#### 【0110】

好ましい実施形態において、本発明は、以下：創傷、潰瘍、火傷、良性または悪性の新生物、感染症、打撲傷、外傷性障害、苛性化（caustication）、先天性奇形、物質損失、口腔粘膜疾患、または歯周病、を含む一覧から選択される機能不全、傷害、または疾患の結果として、罹患したまたは損傷した軟組織の機能活動を部分的にまたは完全に増加、修復、または置換するために用いられる、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料に関する。

#### 【0111】

より好ましい実施形態において、本発明は、口腔粘膜の機能活動を部分的にまたは完全に増加、修復、または置換するために用いられる、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料に関する。より詳しくは、当該多孔質バイオマテリアル足場材料は、歯肉炎および歯周病の治療のため、ならびに歯周韌帯を修復するために使用される。

#### 【0112】

別の特定の実施形態において、本発明は、創傷、火傷、潰瘍、熱傷、瘻孔、または他の慢性もしくは壊死性の創傷の治療または治癒に用いられる、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料に関する。

#### 【0113】

別の特定の実施形態において、本発明は、筋骨格損傷の治療に用いられる、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料に関する。

#### 【0114】

別の特定の実施形態において、本発明は、心臓血管疾患の治療に用いられる、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料に関する。

#### 【0115】

別の特定の実施形態において、本発明は、眼科疾患、例えば、角膜の傷害または網膜の傷害などの治療に用いられる、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料に関する。

#### 【0116】

別の特定の実施形態において、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料は、骨関節系を修復するため、より詳細には、椎間板疾患または軟骨組織を修復するため、ならびに骨関節炎、関節周囲炎、または関節症の治療のために使用される。

#### 【0117】

別の特定の実施形態において、上で定義された多孔質バイオマテリアル足場材料は、硬組織再生のため、特に歯周組織の再生のために使用される。

#### 【0118】

本発明の別の態様は、医薬品としての、上で定義されたバイオマテリアル足場材料の使用に関する。

#### 【0119】

本発明はさらに、上で定義された罹患したまたは損傷した軟組織の機能活動を部分的にまたは完全に増加、修復、または置換するための、上で定義されたバイオマテリアル足場材料の使用に関する。

#### 【0120】

本発明のさらなる態様は、本発明による多孔質バイオマテリアル足場材料を含む医薬組成物に関する。

10

20

30

40

50

## 【0121】

好ましい実施形態において、当該医薬組成物は、本発明による多孔質バイオマテリアル足場材料と、さらに薬学的に許容される担体も含んでなる。別の好ましい実施形態において、当該医薬組成物は、本発明による多孔質バイオマテリアルを含み、さらに有効成分を含んでなる。好ましい実施形態において、医薬組成物は、本発明による多孔質バイオマテリアル足場材料と、さらに薬学的に許容される担体と共に有効成分も含んでなる。

## 【0122】

本発明において使用される場合、「有効成分」は、疾患の診断、治癒、緩和、治療、または予防において薬理活性または別の様々な効果を潜在的に提供するかまたはヒトの身体または動物の身体の構造または機能に影響を及ぼす、任意の成分を意味する。

10

## 【0123】

本発明による医薬組成物は、治療方法において、単独でまたは他の医薬化合物もしくは組成物と一緒に使用することができる。

## 【0124】

本発明の別の態様は、本発明による多孔質バイオマテリアル足場材料を含む美容用組成物に関する。

## 【0125】

当該美容用組成物は、本発明による多孔質バイオマテリアル足場材料を含み、かつ局所投与用のゲル、クリーム、軟膏、またはバームの形態である、任意の組成物を含む。当該組成物は、関連する任意の美容的に活性な分子を有していない場合でさえ、皮膚軟化性、保護性、および再生特性を有することを特徴とする。

20

## 【0126】

本発明の変形例において、当該美容用組成物は、活性分子を組み込み得るが、それらは任意の治療効果を有せず、美容用薬剤としての特性を有する。酸化防止組成物に組み込むことができる活性分子の中でも特に、皮膚軟化剤、保存料、芳香物質、抗にきび剤、防かび剤、酸化防止剤、脱臭剤、制汗剤、フケ防止剤、脱色剤、抗脂漏薬、染料、日焼けローション、紫外線吸収剤、酵素、芳香物質を挙げることができる。

## 【0127】

当該美容用組成物はさらに、pH調整剤、例えば当該組成物のpHが5を下回るのを防ぐ緩衝剤、ならびに当該組成物の重要な構造的变化を防ぐ保存料なども含み得る。当業者であれば、追加の成分を使用することができるか否か、ならびにそれらが必要な場合に、それらの多くが美容用組成物において一般的に使用されているか否かを特定することができる。

30

## 【0128】

以下の実施例を参照することにより、本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は、例示目的のみのために提供されるのであって、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 【実施例】

## 【0129】

## 実施例1.バイオマテリアル足場材料の調製

40

ヒト血漿(76ml)、PBS 1倍(16.5ml)、およびAmchafibrin(1.5ml)の混合物を含有する溶液を調製した。アガロース4%(5ml)および塩化カルシウム10%(1ml)を当該溶液に同時に加えた。当該割合は、結果として得られる混合物の総体積に対してv/vにおいて測定される。

## 【0130】

結果として得られる混合物を十分に混合して、鋳型に加えた。当該混合物をそのままゲル化させた。図3(a)は、凍結乾燥される前の、結果として得られるヒドロゲルを示している。

## 【0131】

形成されたヒドロゲルを優しく水で洗浄し、凍結乾燥させた。このために、ヒドロゲル

50

を - 8 0 において凍結させ、その後、水を - 4 8 において 0 . 0 2 4 m b r で昇華させた。

【 0 1 3 2 】

実施例 2 . バイオマテリアル足場材料の調製およびそれらの物理的キャラクタリゼーション

ヒト血漿 ( 7 6 m l ) 、 P B S 1 倍 ( 1 6 . 5 m l ) 、および A m c h a f i b r i n ( 1 . 5 m l ) の混合物を含有する溶液を調製した。アガロース 4 % ( 5 m l ) および塩化カルシウム 1 0 % ( 1 m l ) を当該溶液に同時に加えた。当該割合は、結果として得られる混合物の総体積に対して v / v において測定される。

【 0 1 3 3 】

結果として得られる混合物を十分に混合して、鋳型に加えた。当該混合物をそのままゲル化させた。

【 0 1 3 4 】

次いで、形成されたヒドロゲルを、 - 2 0 で 1 2 時間かけて凍結して、続いて当該凍結したヒドロゲルを室温で 3 時間かけて融解させることによって、当該ヒドロゲルに凍結 - 融解プロセスを施した。

【 0 1 3 5 】

図 3 ( b ) は、凍結乾燥される前の、当該結果として得られるヒドロゲルを示している。

【 0 1 3 6 】

その後、結果として得られるヒドロゲルを優しく水で洗浄し、凍結乾燥させた。このために、ヒドロゲルを - 8 0 において凍結させ、その後、水を - 4 8 において 0 . 0 2 4 m b r で昇華させた。

【 0 1 3 7 】

アガロース濃度を 0 . 2 % 、 0 . 4 % 、および 0 . 6 % と変えたことを除いて、同じ手順に従った。

【 0 1 3 8 】

図 1 は、異なる多糖濃度での、当該バイオマテリアル足場材料の内部構造を詳細に示している。 1 , 5 0 0 倍および 2 0 , 0 0 0 倍の倍率 ( 図 2 ) では、当該構造の細孔を満たすフィブリン網目構造ならびに当該孔の壁を形成するアガロースでおそらく覆われているフィブリン纖維をより詳細に見ることができる。

【 0 1 3 9 】

概して、孔間の低相互接続を有する橈円形の多孔質構造が観察される。当該細孔は、材料全体において明確な方向性を有しているように思えないが、実際にはそれらは、微小領域によって方向付けされている。

【 0 1 4 0 】

より高いアガロース濃度、例えば 0 . 4 および 0 . 6 % など、を有するゲルは、より類似する構造を有するが、より低いアガロース濃度は、結果として、非常に大きな孔径を有するゲルを生じる。

【 0 1 4 1 】

当該材料をさらに、管理容易性についても評価した。研究室において、目視により性能を評価することによって、基本的ハンドリング試験を行った。当該バイオマテリアルを膨潤させたとき、当該材料は、耐性であり、記憶を保有し ( 変形力を加えられた後にその形状を回復する ) 、ならびに容易に管理することができる ( 図 4 参照 ) 。

【 0 1 4 2 】

さらに、外科的処置の際の当該バイオマテリアルの挙動を予測するために、縫合試験を行った。当該バイオマテリアルが、破壊することなく縫合に耐えることが観察され、これは、組織への適正な固定を保証する ( 図 5 参照 ) 。

【 0 1 4 3 】

当該バイオマテリアルが吸収し保持することができる液体の量および体積を評価するた

10

20

30

40

50

めに、異なるアガロース組成物を有する試料を水に浸漬した。

【0144】

結果は、当該バイオマテリアルが、その初期組成に応じて、その乾燥重量の10倍から30倍の間ににおいて吸収することができる事を示している。当該バイオマテリアルは、基本的に最初の24時間において膨潤し、その後はこの膨潤はわずかに増加する。

【0145】

実施例3. 当該バイオマテリアルの生物学的キャラクタリゼーション

生／死

0.2%のアガロース濃度により実施例2で説明される通りに調製した当該バイオマテリアルにおいて、ヒト線維芽細胞を24、48、および72時間培養した。

10

【0146】

細胞生存率を評価するために、生／死アッセイを実施した。このアッセイは、比色分析によって、死んだ細胞と生きている細胞を区別することを可能にする。生きている細胞は、それらのエステラーゼ活性により、緑色の蛍光を放つ。しかしながら、死んだ細胞はこの活性が無いため、緑色の蛍光を放たない。死んだ細胞の存在を確認するために、当該キットは、エチジウムホモ二量体を含んでおり、これは、損傷した膜を有する細胞にのみ染み込む化合物である。

【0147】

図6および7は、様々な時間において評価した当該材料の蛍光結果を示している。当該細胞は、当該三次元構造に広範囲にわたって侵入しており、経時において、培養により増加している。死んだ細胞（赤色）は、どの場合にも全く観察されない。

20

【0148】

この結果は、当該バイオマテリアルとヒト線維芽細胞との良好な相互作用を意味している。

【0149】

細胞毒性

実施例2に従って調製したバイオマテリアルの細胞毒性を、ISO10993-5規格（Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Cytotoxicity Assay in vitro）に従って評価した。

30

【0150】

当該アッセイは、96ウェルプレートにおいて4000細胞／ウェルの播種密度により3回パスにおいて線維芽細胞FA0506007によって行った。

【0151】

当該アッセイにおいて、0.2%および0.4%アガロースを有する2つの異なる組成物によるトリプリケートを使用した。

【0152】

24時間培養後の細胞毒性の結果は、当該材料のいずれも、評価した細胞に対して細胞毒性ではないことを示している（図8参照）。

40

【0153】

血液適合性

ISO10993-4:2002規格（Biological Evaluation of Medical Devices. Part 4: Selection of Tests for Interactions with Blood）に従って、血液適合性も評価した。溶血効果の定量化は、血液中の高い血漿ヘモグロビンレベルに起因する特異的定量法であると考えられ、バイオマテリアルと接触する赤血球膜の脆弱性を特定するものである。

【0154】

刺激試験

バイオマテリアルの刺激性の可能性を分析するために、実施例2による2つの組成物（

50

0.2%および0.4%アガロース)を分析した。両方の場合において、当該材料をトリプリケートにおいて分析した。当該バイオマテリアルは、分析した組成物のいずれに対しても刺激性ではない(図9参照)。

【0155】

実施例3.インビボでの原理証明

最初のアプローチにおいて、実施例2に従って合成されたバイオマテリアルを、ラットモデルの皮下移植し、潜在的毒性事象および分解性に関して、移植されたバイオマテリアルに対する周囲組織の反応を評価した。8週齢を超えるウイスターAGラットを、倫理委員会ルールに従って飼育および管理の後に、この研究に使用した。

【0156】

各動物において、下背の両側においての2つの切開を実施し、1cm<sup>2</sup>のバイオマテリアルを当該切開の一方の皮下に導入し(図10参照)、他方は対照とした(生理食塩水)。バイオマテリアルの移植の7、14、30、および60日後に、ラットを屠殺して、組織学的評価のためにバイオマテリアルおよび周囲組織を得た。

【0157】

周囲組織において、当該実験のどの時点においても、巨視的な外部炎症、紅斑、または水腫の徴候は観察されなかった。新生血管形成の徴候は、7日目および14日目の両方において観察された。本発明によるバイオマテリアルの著しい吸収は、移植の30日後に観察され、これは60日後のアッセイの終了時まで漸進的に続いた。

【0158】

表2.試験期間(60日)を通しての本発明によるバイオマテリアルの進行

日数	面積(cm <sup>2</sup> )			
	7	14	30	60
平均	1.366	0.909	0.789	0.241
偏差	0.107	0.207	0.034	0.035

【0159】

移植サイズの進行の分析は、本発明によるバイオマテリアルのサイズにおけるわずかな初期の増加を示しており、これは、おそらく、本発明によるバイオマテリアルにおける、組織液を吸収する能力によるものであり、その初期サイズを7日から14日の間ににおいて回復している。時間経過と共にそのサイズが徐々に減少し始めた時点から、いかなる周囲組織の反応も無しに、時間と共に再吸収する能力を示している。いずれにしても、見かけ上のバイオマテリアルのへこみは観察されず、それにより、当該マトリックスは、三次元構造を示し続けている。

【0160】

組織学的評価は、対照病巣と比較して、初期段階(7日目)のバイオマテリアルが、外来性物質が移植される全ての場合において生じる、典型的な線維性カプセルおよび免疫体漸増によって囲まれていることを示している。30日目の結果は、既に、この初期応答の総分解を示しているが、その一方で、新しい血管網の形成は続いている。本発明によるバイオマテリアルに接触する規則的な細胞外マトリックスを観察することができる。

【0161】

図11は、試験期間を通しての(7日目、14日目、30日目、および60日目)バイオマテリアルの外植片の巨視的画像を示しており、その一方で、図12は、当該試験期間を通しての当該外植片の組織学的画像を示している。

【0162】

実施例4.インビボでの概念証明

バイオマテリアルの機能性は、ミニブタにおける口腔粘膜欠損モデルでのバイオマテリアル移植後の歯肉体積の増加を評価することによって実施した。

【0163】

10

20

30

40

50

研究は、実験動物の管理と取り扱いについて管理する欧洲規制に従って、ミニブタにおいて実施し、Universitat Autònoma de Barcelonaの動物実験委員会によって承認を受けた。体重35kgの1匹の雄のミニブタを選択し、全ての研究の間、軽食に維持した。

【0164】

門歯3および前臼歯2の抜歯を、下顎の両側において実施した。2ヶ月の治癒期間後、当該下顎の両側からアルギン酸塩印象および3Dスキャニングを得て、バイオマテリアル移植のために新たな外科手術を実施した。4箇所の側方切開およびエンベロープフラップ(1.5×2cm)を、各抜歯の側部歯肉粘膜に形成し、バイオマテリアル(1×1cm)を詰めた。さらに、両側において、P1と犬歯の間の自然な空間に別の切開を行った。切開は、吸収性単糸の縫合糸によって完全に閉じた。バイオマテリアル移植の15、45、および90日後に、3Dアルギン酸塩印象を実施し、最終的に、動物を鎮静させて安樂死させた。各歯肉粘膜ゾーンに対して生検(2×1cm)を採取し、連続的に配置された2mmの部分を、通例通りに10%の中性緩衝ホルマリンに固定し、パラフィン包埋し、ヘマトキシリンおよびエオジンで着色した。組織治癒の巨視的評価および食物摂取の制限を実験に沿って実施した。さらに、アルギン酸塩印象によってマスター・キャストを作製し、キャストモデルをスキャニングし、ならびに、異なる時間モデルの重複画像、縦方向および横方向のセクション選択、およびマスター・差違の検出が可能な画像解析ソフトウェア(3Shape S/LのOrthoViewer 2014)によって処理した。

平均および標準偏差を算出し、体積差を分析した。

10

20

【0165】

バイオマテリアル毒性の徴候またはいかなる有害事象も、ミニブタでの研究の間において観察されなかった。生検は、良好な真皮性および表皮組織を示しており、バイオマテリアルの適用による宿主反応または炎症も全く観察されなかった。重層化し、成熟し、角質化した上皮の存在を伴う完全な上皮再生が生じた。粘膜下層は、厚く、濃く、よく組織化された纖維で構成された成熟したコラーゲンを伴う、よく組織化された結合組織を示した。バイオマテリアルは、ほぼ完全に消失した。

【0166】

キャストモデル体積分析は、表3に示されるように、バイオマテリアルが移植されたときに病巣の体積増加を示した。

30

【0167】

表3. 口腔粘膜欠損へのバイオマテリアル移植によって生じる歯肉粘膜体積の増加ゾーン

ゾーン	最終体積増加 (mm)
切開 1	1,07
切開 2	0,88
切開 3	1,98
切開 4	1,37
平均±SD	1,33±0,5

40

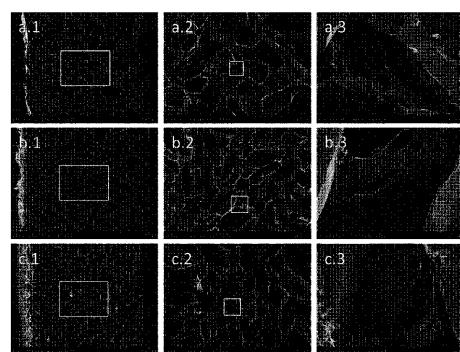
【0168】

バイオマテリアル移植は、自己上皮下結合組織移植片(患者自身の組織のドナー部位からの移植片)が適用された場合に得られる体積増加に非常に類似する、重要な歯肉粘膜体積増分を生じた。

50

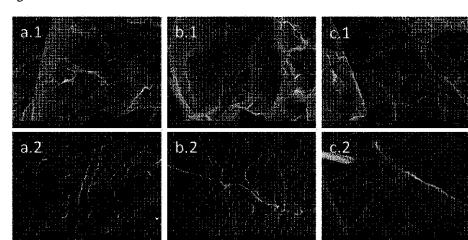
【図1】

Figure 1.



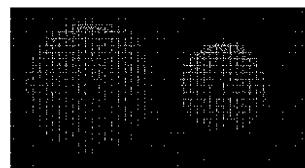
【図2】

Figure 2.



【図3】

Figure 3



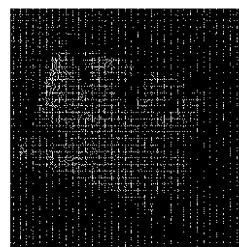
【図4】

Figure 4



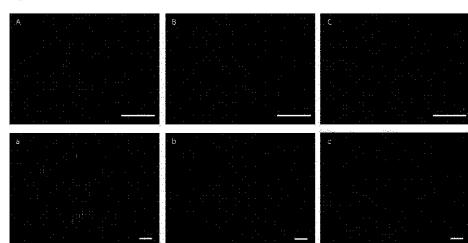
【図5】

Figure 5



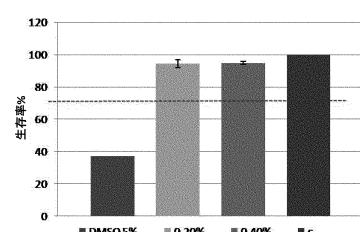
【図6】

Figure 6



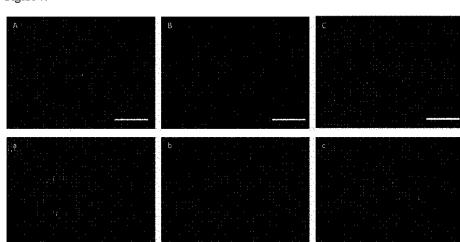
【図8】

Figure 8



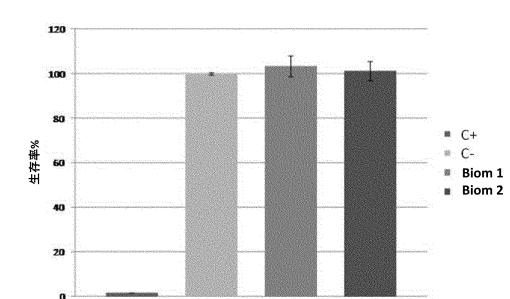
【図7】

Figure 7.



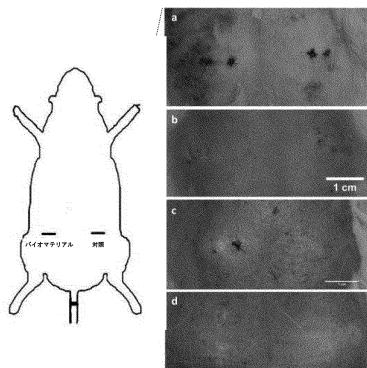
【図9】

Figure 9.



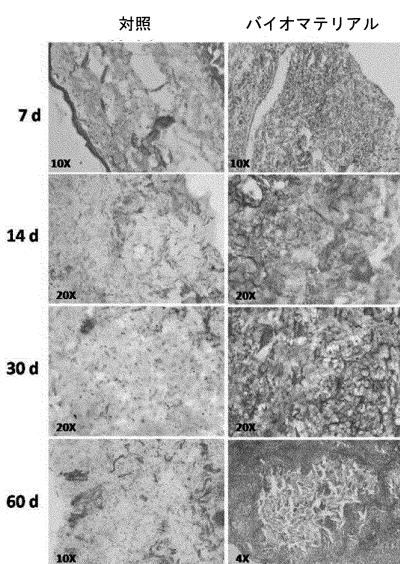
## 【図10】

Figure 10



## 【図12】

Figure 12



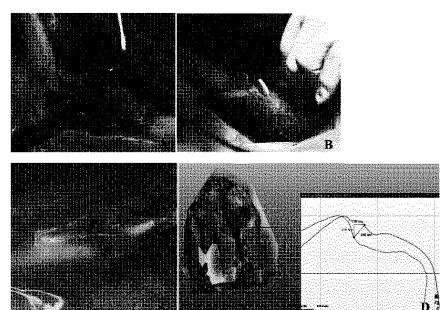
## 【図11】

Figure 11



## 【図13】

Figure 13



---

フロントページの続き

(72)発明者 カストロ フェオ、ベゴーニャ

スペイン国 48490 ビスカヤ レイオア、アルデコアネ 128 セグンド デ

(72)発明者 バイジェト オルト、アンパロ

スペイン国 46183 バレンシア ラ エリアナ、サグラダ ファミリア 17

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開2013-166079(JP, A)

特表2013-502915(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 27/00

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)