



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I454308 B

(45) 公告日：中華民國 103 (2014) 年 10 月 01 日

(21) 申請案號：099106576

(22) 申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 08 日

(51) Int. Cl. : **B01F3/08 (2006.01)****B01F3/12 (2006.01)**

(30) 優先權：2009/03/09 日本

2009-054982

(71) 申請人：美你康股份有限公司 (日本) MENICON CO., LTD. (JP)

日本

(72) 發明人：上杉晃司 UESUGI, KOJI (JP)；永井祐介 NAGAI, YUSUKE (JP)；橫井秀典 YOKOI, HIDENORI (JP)

(74) 代理人：賴經臣；宿希成

(56) 參考文獻：

DE 10247409A1

JP 2007-514629A

JP 2007-217375A

US 5364570A

審查人員：曹世力

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：4 共 0 頁

(54) 名稱

物質混合至膠狀聚集體中之方法

METHOD FOR MIXING OBJECT INTO GELLED ASSEMBLY

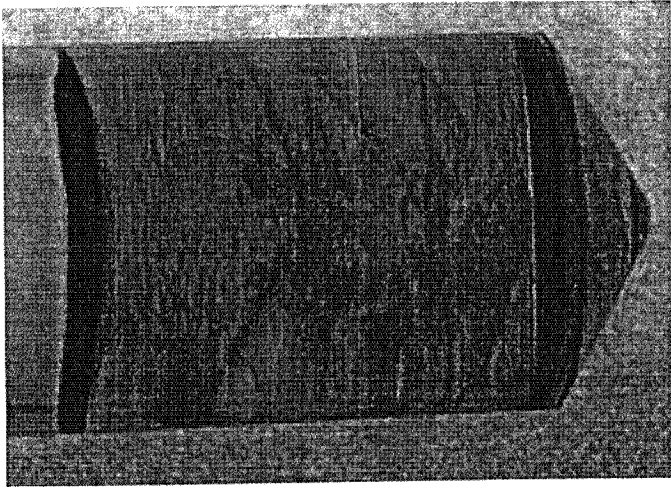
(57) 摘要

本發明提供一種能夠在短時間內，將混合對象物均勻地混合到膠狀聚集體中之混合方法。本發明之方法包含有下述步驟：冷凍膠狀聚集體；溶解已冷凍的聚集體，以獲得溶膠；將所獲得的溶膠與混合對象物混合；以及由已混合有混合對象物的溶膠，再形成膠狀聚集體。

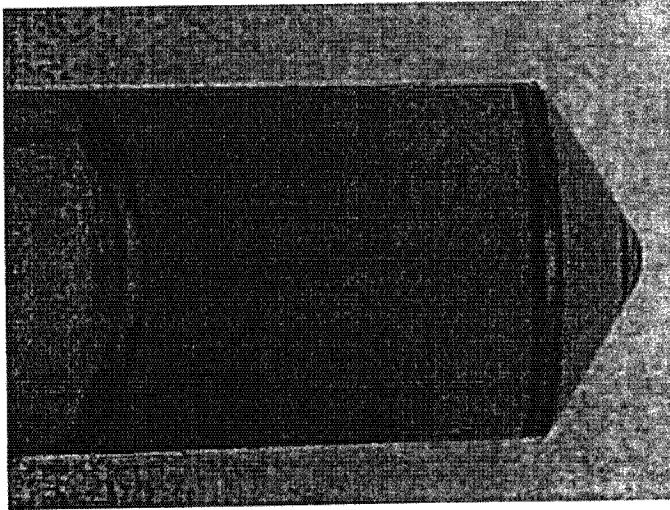
This invention provides a mixing method by which a mixing object can be uniformly mixed into a gelled assembly within a short time period. The method for mixing a mixing object into a gelled assembly comprises freezing the gelled assembly；melting the frozen assembly to obtain a sol；mixing the resultant sol and the mixing object；and reconstituting the gelled assembly from the sol into which the mixing object has been mixed.

圖 1

(b)



(a)



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種物質混合至膠狀聚集體 (gelled assembly) 中之方法。

【先前技術】

近年來，膠狀聚集體受到關注，又以具有自身聚集性之分子進行聚集而形成的膠狀聚集體特別受到關注，並且預計可用於多種應用中。如此之膠狀聚集體可舉例如，自身聚集性肽的分子聚集體之肽凝膠，該肽凝膠可應用於例如再生醫療領域中的細胞支架 (scaffold)。當將肽凝膠用作支架時，在將已膠化的肽凝膠與細胞等物質混合時，採用對該凝膠進行約 30 分鐘的超音波處理，再混合的方法 (非專利文獻 1)。然而，藉由該方法會發生超音波處理需要花時間和精力，且物質不能充分分散等問題。

[先前技術文獻]

非專利文獻 1：Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (24)
8414-8419

【發明內容】

(發明所欲解決之問題)

本發明係為解決上述問題而做成的，且本發明的目的是提供一種可將混合對象物在短時間內均勻地混合(例如，分散)在膠狀聚集體中的混合方法。

(解決問題之手段)

根據本發明，提供一種將混合對象物混合至膠狀聚集體中之方法。該方法包括下述步驟：

冷凍該膠狀聚集體；

溶解業已冷凍的聚集體，以獲得溶膠；

將所獲得的溶膠與混合對象物混合；以及

由已混合有混合對象物的溶膠，再形成膠狀聚集體。

● 較佳的實施形態中，上述膠狀聚集體為藉由自身聚集性分子進行分子聚集而形成的凝膠。

較佳的實施形態中，上述膠狀聚集體，係藉由黏土礦物進行聚集而形成的凝膠。

較佳的實施形態中，上述自身聚集性分子為自身聚集性肽。

● 根據本發明的另一個方面，提供一種混合有混合對象物之膠狀聚集體之製造方法。該方法包括下述步驟：

冷凍該膠狀聚集體；

溶解業已冷凍的聚集體，以獲得溶膠；

將所獲得的溶膠與混合對象物混合；以及

由已混合有混合對象物的溶膠，再形成膠狀聚集體。

(發明效果)

根據本發明，由於可在膠化的狀態下混合膠狀聚集體，故可在短時間內將混合對象物均勻地混合（例如，分散）。

【實施方式】

A. 術語的定義

(1) 膠狀聚集體

「膠狀聚集體」，是指自身聚集性分子、或具有自身聚集性之結晶，在介質中藉由自發聚集而形成的凝膠。

(2) 自身聚集性分子

「自身聚集性分子」，是指在介質中通過分子間的相互作用自發地聚集的分子。這些分子可通過分子間引力而自發地聚集在一起，從而以有秩序、穩定的方式形成分子基團，而不借助於任何共價鍵（所謂的分子聚集）。相互作用不特別地限制，相互作用的例子包括氫鍵、離子-離子相互作用、靜電相互作用諸如凡得瓦力(Van der Waals force)、以及疏水性相互作用。

(3) 凝膠

「凝膠」，是指喪失其流動性的膠體。凝膠同時具有黏性和彈性。具體來說，例如，當進行動態黏度彈性測定來測量凝膠的儲藏彈性模量 G' 和損耗彈性模量 G'' 時，成為 $[G' > G'']$ 的關係。

(4) 溶膠

「溶膠」，是指具有流動性的膠體。具體來說，例如，當進行動態黏度彈性測定來測量溶膠的儲藏彈性模量 G' 和損耗彈性模量 G'' 時，成為 $[G' < G'']$ 的關係。

(5) 溶膠-凝膠轉移

「溶膠-凝膠轉移」，是指儲藏彈性模量 G' 和損耗彈性模量 G'' 從 $[G' > G'']$ 的狀態轉移至 $[G' < G'']$ 的狀態、或從 $[G' < G'']$ 的狀態轉移至 $[G' > G'']$ 的狀態的現象，並且將發生該現象時的溫度稱為溶膠-凝膠轉移點。即，溶膠-凝膠轉移點是 $[G' = G'']$ 時的溫度。

B. 混合方法

● 本發明的混合方法是將混合對象物混合至膠狀聚集體中的方法，該方法包括下述步驟：

冷凍該膠狀聚集體(冷凍步驟)；

溶解已冷凍的聚集體，以獲得溶膠(溶解步驟)；

將所獲得的溶膠與混合對象物混合(混合步驟)；以及

● 由已混合有混合對象物的溶膠，再形成膠狀聚集體(膠化步驟)。該方法可根據需要進一步包括任意步驟。當膠狀聚集體是通過自身聚集性分子進行分子聚集而形成的凝膠時，可藉由冷凍、溶解步驟切斷分子間鍵，以使形成凝膠的三維網路結構崩壞，故可獲得分子均勻分散的溶膠。另外，當膠狀聚集體是通過具有自身聚集性的結晶進行聚集而形成的凝膠時，可藉由冷凍、溶解步驟切斷結晶間鍵結，以獲得結晶均勻分散的溶膠。在本發明中，將由此獲得的具有高均勻性的溶膠與混合對象物混合，因此混合對象物能夠以均勻分散的狀態存在於完成再形成的膠狀聚集體內部。混合對

象物可通過極簡單的操作，即，藉由冷凍、溶解等極為簡單的操作而均勻地分散在膠狀聚集體中，是本發明的主要效果之一。

B-1 · 冷凍步驟

作為膠狀聚集體，只要藉由冷凍、溶解步驟形成溶膠，並且具有可逆的溶膠-凝膠轉移特性，則可採用任意合適的聚集體。從通過冷凍、溶解步驟形成的溶膠後轉移至凝膠，可歸因於時間回應性、溫度回應性和壓力回應性等任一種，或可歸因於上述回應性的2種以上因素。膠狀聚集體含有用於形成聚集體的分子或結晶、介質，及根據需要含有任意的添加劑。

作為上述的自身聚集性分子或具有自身聚集性的結晶，只要可形成具有可逆的溶膠-凝膠轉移特性的膠體，並且通過冷凍、溶解形成溶膠，則可選擇任意合適的分子或結晶。作為自身聚集性分子，較佳為可舉例如，自身聚集性肽。具有自身聚集性的結晶，較佳為可選自例如，黏土礦物。由如此之分子或結晶所形成的凝膠，可不使用交聯劑或凝結劑的膠化劑，而是依賴於自身聚集性分子間或結晶之間所形成相對弱的非共價鍵，因此，該等鍵很容易地通過冷凍、溶解處理而切斷，成為溶膠化。另外，可通過分子聚集自發地進行從溶膠至凝膠的再形成。

自身聚集性肽較佳地是，例如，由下列胺基酸序列形成的

自身聚集性肽。胺基酸序列： $a_1b_1c_1b_2a_2b_3db_4a_3b_5c_2b_6a_4$

(該胺基酸序列中， a_1 至 a_4 為鹼性胺基酸殘基；

b_1 至 b_6 為非電荷極性胺基酸殘基和/或疏水性胺基酸殘基，條件是其中至少 5 個為疏水性胺基酸殘基； c_1 和 c_2 為酸性胺基酸殘基； d 代表疏水性胺基酸殘基。)

具有上述胺基酸序列的自身聚集性肽的具體例子，包括具有下列序列的肽。

● n-RLDLRLALRLDLR-c (序列編號: 1)

n-RLDLRLLLRLDLR-c (序列編號: 2)

n-RLDLRLALRLDLRL-c (序列編號: 3)

自身聚集性肽的其他較佳的具體例子包括例如 WO 2007/000979、和美國專利第 5670483 號中記載的肽。另外，在該等自身聚集性肽進行導入保護基團的修飾而獲得的肽也較佳地應用於本發明的方法。

● 上述自身聚集性肽可通過化學合成方法，如 Fmoc 法等固相法、或液相法來製備，或通過分子生物學方法，如重組基因表達法等來製備。

黏土礦物的較佳具體例子包括，蒙脫石、貝得石、鋰蒙脫石、皂石和滑鎂皂石等膨潤石族礦物。該等物質可以是天然產品，或可以是合成產品。

膠狀聚集體的介質可以依據如，用於形成該聚集體的分子或結晶的種類和濃度等來適當地選擇。例如，對於由自身聚

集性肽或黏土礦物形成的膠狀聚集體，其介質較佳是水。

上述添加劑可依據，例如，用於形成該聚集體的分子或結晶的種類和濃度等來適當地選擇。添加劑的例子包括緩衝劑、界面活性劑和螯合劑。

在膠狀聚集體中添加劑的濃度，可設定為在膠化步驟中對凝膠的再形成不受負面影響的濃度。該濃度可依據如，用於形成膠狀聚集體的分子或結晶的種類和濃度等來適當地設定，但在通常情況下較佳低的濃度。例如，對於自身聚集性肽凝膠，作為緩衝劑的 HEPES 和 Tris-HCl 的終濃度較佳為 50 mM 以下，或更佳 40 mM 以下。碳酸氫鈉溶液和碳酸鈉溶液的終濃度較佳為 5 mM 以下，或更佳 4 mM 以下。且 PBS 的終濃度較佳為 0.5×PBS 以下，或更佳 0.3×PBS 以下。另外，作為除緩衝劑以外的添加劑，生理食鹽水的終濃度較佳為 0.5 wt% 以下，或更佳 0.4 wt% 以下。

上述膠狀聚集體可視用以形成該聚集體的分子或結晶的種類和濃度、以及介質的種類等，且通過任何適當方法來製備。例如，自身聚集性肽凝膠係：可將自身聚集性肽溶解或分散在預定介質中，且濃度較佳為 0.1-5w/v% 或更佳 0.2-3 w/v% 而製備肽溶膠，並靜置該肽溶膠，以使自身聚集性肽進行分子聚集來製備。或者，自身聚集性肽凝膠可獲自商品名為例如「BD™ PuraMatrix™ Peptide Hydrogel」(BD Biosciences Inc.) 等市售產品。另外，由黏土礦物形成的膠

狀聚集體可獲自商品名為例如「Laponite XLG」（由 Laporte-Ind. Ltd. 製造）或「Laponite RD」（由 Laporte-Ind. Ltd. 製造）等市售產品。

冷凍條件，只要膠狀聚集體能冷凍，可採用任意適當的條件。冷凍溫度只要是低於膠狀聚集體冷凍的溫度即可。冷凍速率也不受限制，可以逐漸冷凍，亦可迅速冷凍。例如，對於自身聚集性肽凝膠，可置於較佳 -10°C 以下的溫度條件下適當地冷凍而獲得。

作為冷凍手段，可任意選擇如家用冰箱或商用冰箱、或液氮等適當的冷凍手段。另外，已冷凍的聚集體可在至供溶解步驟的任意期間，以冷凍的形態直接保存。

B-2 · 溶解步驟

溶解溫度，只要是上述已冷凍的聚集體可溶解並形成溶膠之溫度，可設定為任意適當的溫度。聚集體可在恆溫下溶解，或可以以分段的方式在不同溫度下溶解。溶解速率或溶解時間均不受限制，可逐漸溶解，亦可迅速溶解。例如，在獲得自身聚集性肽的溶膠時，已冷凍的自身聚集性肽可於較佳 $5\sim 70^{\circ}\text{C}$ 、或更佳 $15\sim 45^{\circ}\text{C}$ 的溫度條件下而適當地溶解。

溶解手段，可選擇任意適當的手段。溶解手段的具體例子包括水浴、油浴、和恆溫槽等。

如上所述，藉由將膠狀聚集體冷凍、溶解，切斷用以形成凝膠的分子間或結晶間的各種鍵結，因此獲得溶膠。凝膠也

可藉由超音波處理約 30 分鐘以進行溶膠化，但無法切斷分子間或結晶間的各种鍵結，因此在用超音波照射後溶膠迅速地凝膠化。結果，混合對象物不能均勻地分散在溶膠中。相對於此，通過冷凍、溶解步驟獲得的溶膠，可充分切斷分子間或結晶間的各种鍵結，故黏度明顯地降低。在後述混合步驟中，溶膠可與混合對象物均勻地混合。

B-3 · 混合步驟

混合對象物，可依據目的等選擇任意適當的物質。混合對象物的具體例包括：維生素類；單糖；二糖；寡糖；透明質酸、幾丁聚糖、親水性纖維素等多糖類；乙醇；丙三醇、丙二醇等多元醇；如氧化鋯和氧化鈦等金屬氧化物；染料；如激素、細胞因子、造血因子和生長因子等生理活性物質；肽；酶；抗體；DNA；RNA；催化劑；交聯劑；培養溶液；和其他一般的低分子量化合物。或者，混合對象物可以是生物樣品，如細胞、細胞群、組織、微生物或病毒。細胞可以是動物細胞，亦可以是植物細胞。微生物的例子包括細菌、酵母和原生動物。混合對象物可僅使用 1 種，亦可使用 2 種以上。

混合對象物的混合量，只要溶膠可再形成膠狀聚集體，可設為任意適當的量。例如，對於自身聚集性肽溶膠，混合後肽濃度設為較佳 0.1~5 w/v% 或更佳 0.2~3 w/v%。

混合是在上述溶解步驟中獲得的溶膠保持其溶膠狀態的

期間內進行的。例如，對於自身聚集性肽的溶膠，可在較佳 $-2\sim 15^{\circ}\text{C}$ 或更佳 $-2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 適當地進行混合，因為在此溫度範圍內，可防止迅速膠化，結果發現，可確保足夠的混合時間。另外，上述溫度範圍，是含有混合對象物的肽溶膠的溫度範圍，即，與混合對象物混合中的肽溶膠的溫度範圍。

混合最好是在分子或結晶和混合對象物可充分地分散在溶膠中的方式進行，混合時間或混合手段都不受限制。混合手段，可選擇任意適當的手段。在大規模混合中，可使用攪拌棒、混合機等；小規模混合，可通過如吸液的手動操作來進行。

上述的冷凍步驟、溶解步驟和混合步驟，可重複進行 2 次以上。

B-4 · 膠化步驟

凝膠再形成的條件(溫度、時間等)，只要膠狀聚集體可再形成，則不受限制，可視分子或結晶的種類和濃度、以及介質的種類來適當地設定。當溶膠中的分子為自身聚集性分子時，通過將條件設定為適當的條件進行分子聚集，以使凝膠可自發地再形成。

例如，在自身聚集性肽凝膠再形成時，只要靜置在上述混合步驟中獲得混合有混合對象物的溶膠。靜置溫度較佳為 15°C 以上、或更佳 25°C 以上。靜置時間較佳為 1 分鐘以上、或更佳 5 分鐘以上。另外，溶膠靜置的地點不受限制，且地

點的例子包括由玻璃、塑膠等容器內、或如培養皿的細胞培養器具內、注射器等醫療設備內。此外，亦可將混合有上述混合對象物的溶膠在混合後立即注射至活生物體內，並在此進行膠化。

再形成之膠狀聚集體中，可以混合對象物均勻分散的狀態存在。

C. 製造方法

根據本發明的另一方面，能夠提供已混合有混合對象物的膠狀聚集體的製造方法。該製造方法包括下述步驟：冷凍膠狀聚集體；溶解已冷凍的聚集體，以獲得溶膠；將所獲得的溶膠與混合對象物混合；以及由已混合有混合對象物的溶膠，再形成膠狀聚集體。各步驟如上述 B 部分所記載。根據該製造方法，可獲得已均勻地分散有混合對象物的膠狀聚集體。

【實施例】

以下，藉由實施例具體地說明本發明。然而，本發明不限於該等實施例。

[測試例 1]

依一般方法獲得 N-末端乙醯化、且 C-末端醯胺化的自身聚集性肽 1 ($[\text{CH}_3\text{CO}]\text{-RLDLRLALRLDLR-}[\text{NH}_2]$)。將自身聚集性肽 1 溶解在水中，並且將 NaHCO_3 水溶液加入溶液中使得其終濃度為 1.2 mM。得到的肽溶液中肽濃度為 1

w/v%。將肽溶液在室溫下靜置 10 分鐘。結果獲得自身聚集性肽凝膠。

用液氮冷凍所獲得的自身聚集性肽凝膠。下一步，將已冷凍的自身聚集性肽凝膠用 37°C 溫水部分溶解，然後藉由在室溫下靜置並溶解，以獲得溶膠。將 300 μ l 所獲得的溶膠置入儲存有 200 μ l DMEM 培養基的容器中，該培養基中係在 3.25×10^5 細胞/ml 濃度含有 NIH3T3 細胞，並且通過進行 3 次吸液將內容物混合，以獲得混合有細胞的溶膠。

從所獲得的細胞混合溶膠的上層、中層和下層各取樣 100 μ l，且各樣品均用 PBS 稀釋 5 倍。對各個稀釋樣品，通過測量血球計數儀上四個區域的細胞數，來測定細胞混合溶膠中各位置的細胞數。表 1 顯示結果。

[測試例 2]

使用「BD™ PuraMatrix™ Peptide Hydrogel」(BD Biosciences Inc.，肽濃度：1 w/v%，pH 3) 作為自身聚集性肽凝膠。

使用液氮冷凍上述自身聚集性肽凝膠。下一步，將已冷凍的自身聚集性肽凝膠用 37°C 溫水部分溶解，然後在室溫下靜置並溶解，以獲得溶膠。將 300 μ l 所獲得的溶膠置入儲存有 200 μ l DMEM 培養基的容器中，該培養基中係在 5.38×10^5 細胞/ml 濃度含有 NIH3T3 細胞，並且通過進行三次吸液將內容物混合，以獲得混合有細胞的溶膠。

將所獲得的細胞混合溶膠中各位置的細胞數，以與測試例 1 相同的方式測定。表 1 顯示結果。

[比較測試例 1]

使以與測試例 1 相同的方式獲得的自身聚集性肽凝膠經超音波處理（產品名「超音波清洗機 US-4R」（由 AS ONE Corporation 製造，槽容積 9.5 L），160 W，30 分鐘）。結果，獲得溶膠。將 300 μ l 所得溶膠置入儲存有 200 μ l DMEM 培養基的容器中，該培養基中係在 3.25×10^5 細胞/ml 濃度含有 NIH3T3 細胞，並且通過進行三次吸液將內容物混合，以獲得混合有細胞的溶膠。

將所獲得的細胞混合溶膠中各位置的細胞數，以與測試例 1 相同的方式測定。表 1 顯示結果。

[比較測試例 2]

使測試例 2 中使用的相同自身聚集性肽凝膠經超音波處理（產品名「超音波清洗機 US-4R」（由 AS ONE Corporation 製造，槽容積 9.5 L），160 W，30 分鐘）。結果，獲得溶膠。將 300 μ l 所得溶膠置入儲存有 200 μ l DMEM 培養基的容器中，該培養基中係在 5.38×10^5 細胞/ml 濃度含有 NIH3T3 細胞，並且通過進行 3 次吸液將內容物混合，以獲得混合有細胞的溶膠。

將所獲得的細胞混合溶膠中各位置的細胞數，以與測試例 1 相同的方式測定。表 1 顯示結果。

[表 1]

取樣位置	測試例 1	比較測試例 1	測試例 2	比較測試例 2
上層	1.45	1.18	2.28	2.45
中層	1.35	1.33	2.08	0.65
下層	1.12	0.35	2.13	2.25
理論值	1.3		2.15	

(單位：10⁵ 細胞/ml)

如表 1 中所示，相較於以超音波處理獲得的溶膠，以冷凍、溶解步驟所獲得的溶膠中可更均勻地分散混合對象物。

[實施例 1]

將上述自身聚集性肽 1 溶解在水中，並將 NaHCO₃ 水溶液加入至溶液中使得其終濃度為 1.2 mM。所獲得的肽溶液中肽濃度為 0.8 w/v%。將該肽溶液在室溫下靜置 10 分鐘，以獲得自身聚集性肽凝膠。

用液氮冷凍所獲得的自身聚集性肽凝膠。下一步，將已冷凍的自身聚集性肽凝膠用 37°C 溫水部分溶解，然後在室溫下靜置並溶解，以獲得溶膠。將 300 μl 所獲得的溶膠轉移至取樣管中，並加入 450 μl 含有酚紅的 DMEM 培養基，進行 5 次吸液。

下一步，藉由將該取樣管在 25°C 下靜置 5 分鐘。以完成再形成自身聚集性肽凝膠。圖 1 顯示再形成後的凝膠照片。

[實施例 2]

使用「BD™ PuraMatrix™ Peptide Hydrogel」(BD Biosciences Inc.，肽濃度：1 w/v%，pH 3)，作為自身聚集

性肽凝膠。

使用液氮冷凍上述自身聚集性肽凝膠。下一步，將已冷凍的自身聚集性肽凝膠用 37°C 溫水部分溶解，然後在室溫下靜置並溶解，以獲得溶膠。將 300 μ l 所獲得的溶膠轉移至取樣管中，並加入 450 μ l 曙紅水溶液，進行 5 次吸液。

下一步，藉由將該取樣管在 25°C 下靜置 20 分鐘。以完成再形成自身聚集性肽凝膠。圖 2 顯示再形成後的凝膠照片。

[實施例 3]

以與實施例 1 相同的方式再形成自身聚集性肽凝膠，不同之處在於混合 50 μ M FITC 標記的胰島素水溶液，代替含酚紅的 DMEM 培養基。圖 3 顯示再形成後的凝膠照片。

[實施例 4]

以與實施例 2 相同的方式再形成自身聚集性肽凝膠，不同之處在於混合 50 μ M FITC 標記的胰島素水溶液，代替曙紅水溶液。圖 4 顯示再形成後的凝膠照片。

[比較例 1]

以與實施例 1 相同的方式再形成自身聚集性肽凝膠，不同之處在於通過進行超音波處理（產品名「超音波清洗機 US-4R」(由 AS ONE Corporation 製造，槽容積 9.5 L)，160 W，30 分鐘)，代替冷凍、溶解步驟來獲得溶膠。圖 1 顯示該再形成後的凝膠的照片。

[比較例 2]

以與實施例 2 相同的方式再形成自身聚集性肽凝膠，不同之處在於通過進行超音波處理（產品名「超音波清洗機 US-4R」(由 AS ONE Corporation 製造，槽容積 9.5 L)，160 W，30 分鐘)，代替冷凍、溶解步驟來獲得溶膠。圖 2 顯示再形成後的凝膠照片。

[比較例 3]

以與實施例 3 相同的方式再形成自身聚集性肽凝膠，不同之處在於通過進行超音波處理（產品名「超音波清洗機 US-4R」(由 AS ONE Corporation 製造，槽容積 9.5 L)，160 W，30 分鐘)，代替冷凍和溶解步驟來獲得溶膠。圖 3 顯示再形成後的凝膠照片。

[比較例 4]

以與實施例 4 相同的方式再形成自身聚集性肽凝膠，不同之處在於通過進行超音波處理（產品名「超音波清洗機 US-4R」(由 AS ONE Corporation 製造，槽容積 9.5 L)，160 W，30 分鐘)，代替冷凍、溶解步驟來獲得溶膠。圖 4 顯示再形成後的凝膠照片。

如圖 1 至圖 4 中所示，根據本發明的方法，能夠通過使膠化分子聚集體，藉由冷凍、溶解處理並溶膠化，在短時間內使混合對象物均勻地分散。另一方面，當使用通過超音波處理所獲得的溶膠時，經再形成的凝膠變混濁，因此可發現混合對象物分散不均勻。

[參考例 1]

用液氮冷凍含濃度為 6 w/v% 的商品名為「Laponite XLG」(由 Laporte-Ind. Ltd. 製造) 的膠狀聚集體 (介質：水)。下一步，將已冷凍的聚集體用 37°C 溫水部分溶解，然後在室溫下靜置並溶解，以獲得溶膠。藉由將所獲得的溶膠在 25°C 下靜置 5 小時，以完成再形成膠狀聚集體。

[參考例 2]

用液氮冷凍含濃度為 2 w/v% 的商品名為「Laponite XLG」(由 Laporte-Ind. Ltd. 製造) 的膠狀聚集體 (介質：含 0.75 wt% 界面活性劑(商品名「OS-14」，由日光 Chemicals Co., Ltd. 製造)；及含 1.0 wt% EDTA-2Na 的水溶液)。下一步，將已冷凍的聚集體用 37°C 溫水部分溶解，然後在室溫下靜置並溶解，以獲得溶膠。藉由將所獲得的溶膠在 25°C 下靜置 15 分鐘。以完成再形成膠狀聚集體。

(產業上之可利用性)

本發明的混合方法和製造方法適合應用於再生醫療，或藥物遞送系統、化妝品、人造玻璃體、止血藥、美容外科用注射劑、骨充填劑、關節潤滑劑、或增濕用保水材料等的生產或應用。

【圖式簡單說明】

圖 1(a) 是實施例 1 中再形成的凝膠照片，圖 1(b) 是比較例 1 中再形成的凝膠照片。

圖 2(a)是實施例 2 中再形成後的凝膠照片，圖 2(b)是比較例 2 中再形成的凝膠照片。

圖 3(a)是實施例 3 中再形成後的凝膠照片，圖 3(b)是比較例 3 中再形成的凝膠照片。

圖 4(a)是實施例 4 中再形成後的凝膠照片，圖 4(b)是比較例 4 中再形成後的凝膠照片。

[序列表自由文本]

● 序列編號: 1 代表可在本發明中使用的自身聚集性肽。

序列編號: 2 代表可在本發明中使用的自身聚集性肽。

序列編號: 3 代表可在本發明中使用的自身聚集性肽。

序列表

<110> Menicon Co. Ltd.
<120> method for mixing object into gelled assembly
<130> F2P-MNC09021
<150> JP2009-054982
<151> 2009-03-09

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> self-assembling peptide

<400> 1

Arg Leu Asp Leu Arg Leu Ala Leu Arg Leu Asp Leu Arg
1 5 10

<210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> self-assembling peptide

<400> 2

Arg Leu Asp Leu Arg Leu Leu Leu Arg Leu Asp Leu Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> self-assembling peptide

<400> 3

Arg Leu Asp Leu Arg Leu Ala Leu Arg Leu Asp Leu Arg Leu
1 5 10

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：099106576

B01F 3/08 (2010.01)

※申請日：99/03/08

※IPC 分類：B01F 3/12 (2010.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

物質混合至膠狀聚集體中之方法

METHOD FOR MIXING OBJECT INTO GELLED ASSEMBLY

二、中文發明摘要：

本發明提供一種能夠在短時間內，將混合對象物均勻地混合到膠狀聚集體中之混合方法。本發明之方法包含有下述步驟：冷凍膠狀聚集體；溶解已冷凍的聚集體，以獲得溶膠；將所獲得的溶膠與混合對象物混合；以及由已混合有混合對象物的溶膠，再形成膠狀聚集體。

三、英文發明摘要：

This invention provides a mixing method by which a mixing object can be uniformly mixed into a gelled assembly within a short time period. The method for mixing a mixing object into a gelled assembly comprises freezing the gelled assembly ; melting the frozen assembly to obtain a sol ; mixing the resultant sol and the mixing object ; and reconstituting the gelled assembly from the sol into which the mixing object has been mixed.

七、申請專利範圍：

1.一種將混合對象物混合至膠狀聚集體中之方法，其包括下述步驟：

冷凍膠狀聚集體；

溶解已冷凍的聚集體，以獲得溶膠；

將所獲得的溶膠與混合對象物混合；以及

由已混合有混合對象物的溶膠，再形成膠狀聚集體。

2.如申請專利範圍第1項之將混合對象物混合至膠狀聚集體中之方法，其中，上述膠狀聚集體係藉由自身聚集性分子進行分子聚集而形成之凝膠。

3.如申請專利範圍第1項之將混合對象物混合至膠狀聚集體中之方法，其中，上述膠狀聚集體係藉由黏土礦物進行聚集而形成的凝膠。

4.如申請專利範圍第2項之將混合對象物混合至膠狀聚集體中之方法，其中，上述自身聚集性分子為自身聚集性肽。

5.一種混合有混合對象物之膠狀聚集體之製造方法，其包括有下述步驟：

冷凍膠狀聚集體；

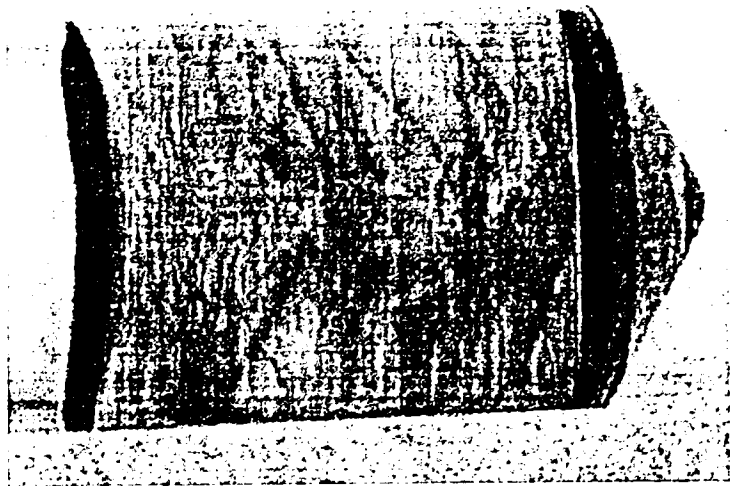
溶解已冷凍的聚集體，以獲得溶膠；

將所獲得的溶膠與混合對象物混合；以及

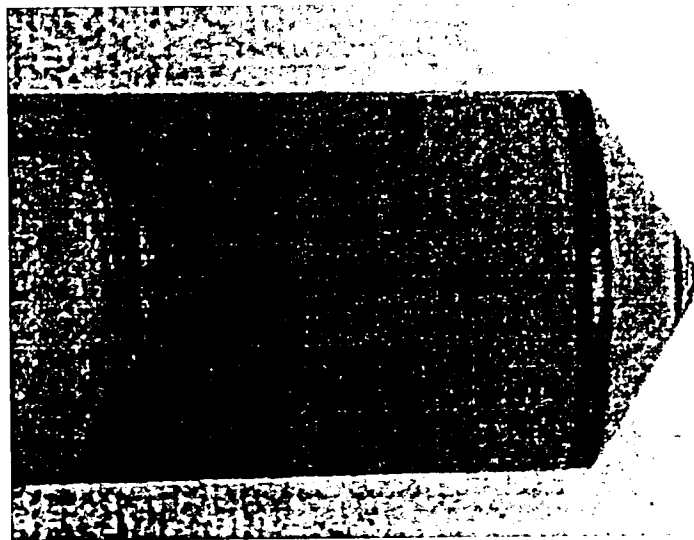
由已混合有混合對象物的溶膠，再形成膠狀聚集體。

心部组织:

31

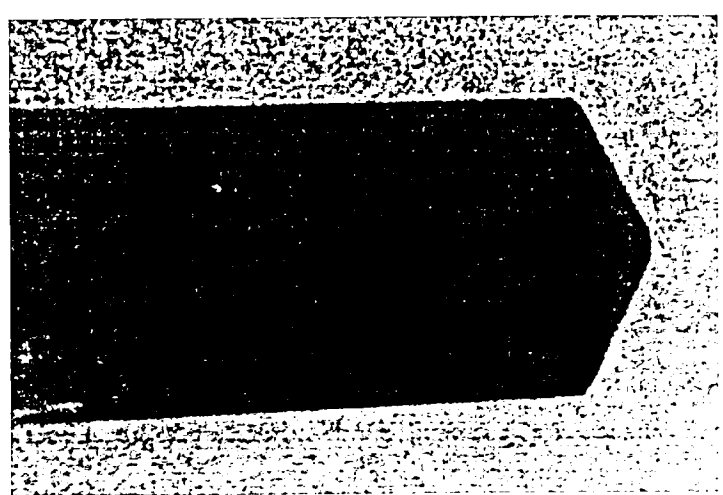
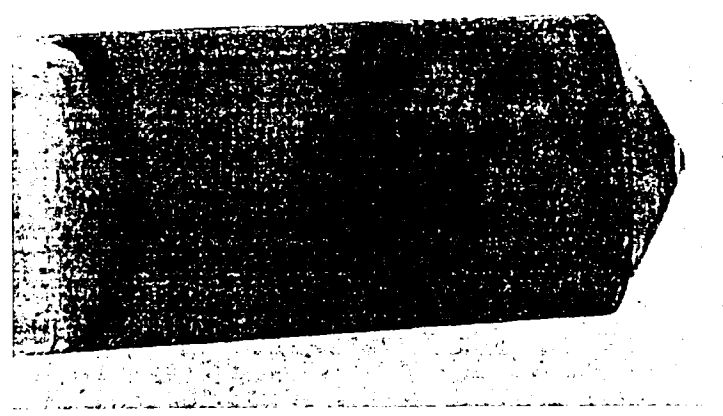


100x

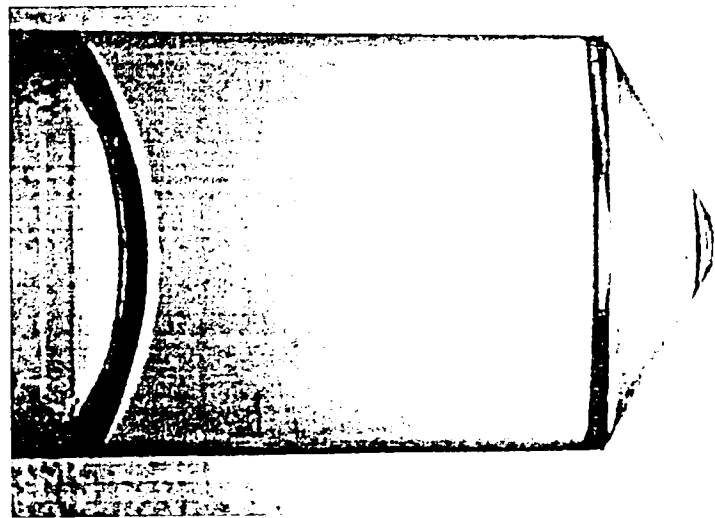
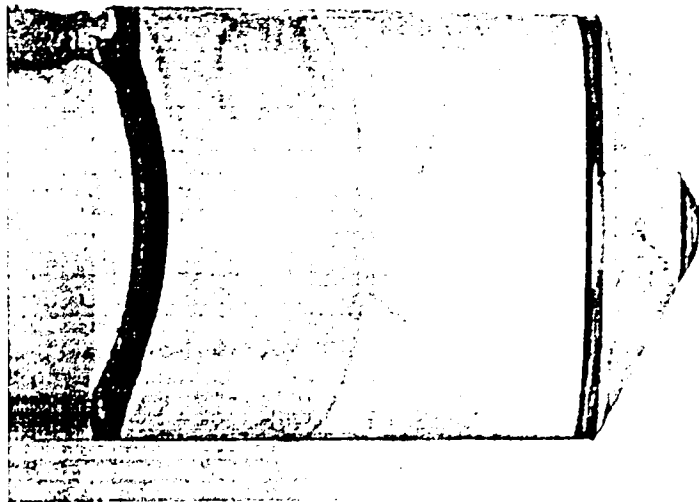


100x

圖 2

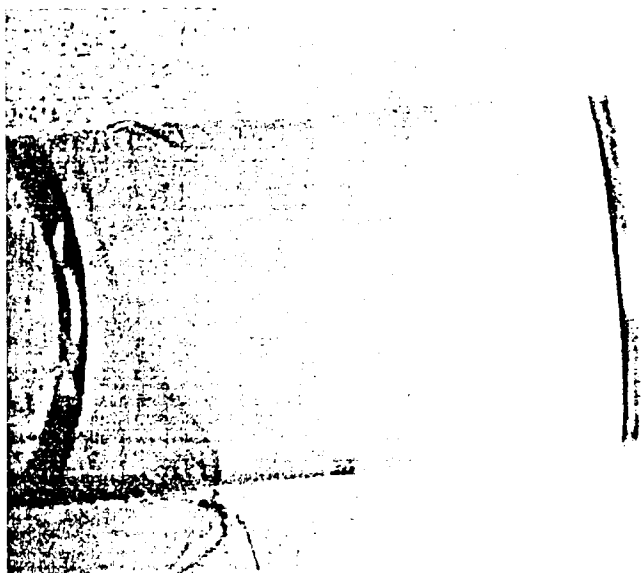


113



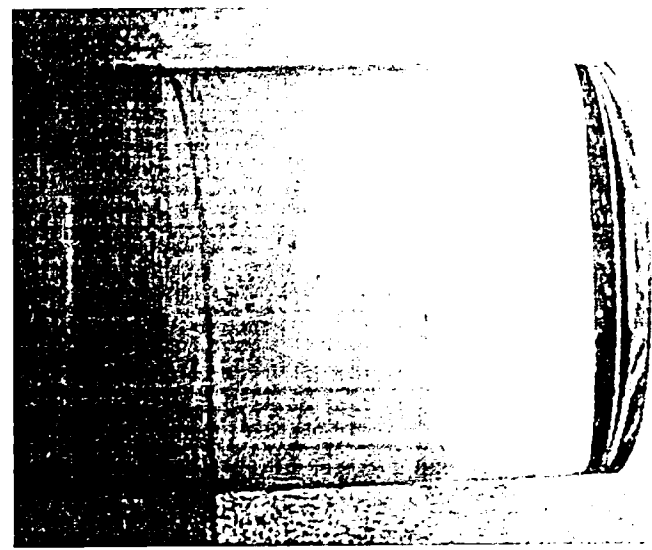
114

(b) 1



(b)

(b)



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無