

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6403754号  
(P6403754)

(45) 発行日 平成30年10月10日(2018.10.10)

(24) 登録日 平成30年9月21日(2018.9.21)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C O 8 G 63/668 (2006.01)</b>	C O 8 G 63/668
<b>A 6 1 L 27/00 (2006.01)</b>	A 6 1 L 27/00
<b>C 1 2 N 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/00 F
<b>C 1 2 N 5/07 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/07

請求項の数 15 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2016-506730 (P2016-506730)	(73) 特許権者	514215701
(86) (22) 出願日	平成26年4月10日 (2014.4.10)		ザ ユニヴァーシティー オブ メルボルン
(65) 公表番号	特表2016-518485 (P2016-518485A)		オーストラリア国 ビクトリア州 3010
(43) 公表日	平成28年6月23日 (2016.6.23)		ザ ユニヴァーシティー オブ メルボルン
(86) 国際出願番号	PCT/AU2014/000391	(74) 代理人	110002147
(87) 国際公開番号	W02014/165917		特許業務法人酒井国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成26年10月16日 (2014.10.16)	(72) 発明者	ブレンコウィ、アントン
審査請求日	平成29年4月7日 (2017.4.7)		オーストラリア国, 3010 ヴィクトリア, ザ ユニヴァーシティー オブ メルボルン, ユー・オー・エム コマーシャル プロプライエタリー リミテッド内
(31) 優先権主張番号	2013901223		
(32) 優先日	平成25年4月10日 (2013.4.10)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 再生医学用及び組織工学用生分解性ネットワークポリマー、当該生分解性ネットワークポリマーを製造するための方法、並びに、当該生分解性ネットワークポリマーを含む眼インプラント、材

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

モノマー組成物で形成される、エステル結合を介して架橋されている生分解性ポリエーテルネットワークポリマーであって、

前記モノマー組成物が、

複数のヒドロキシ官能基を含む分岐状多官能性ポリエーテルモノマーであって、グリセロールエトキシレート及びペンタエリスリトールエトキシレートからなる群より選ばれるポリエーテルモノマーと、

塩化スクシニル、塩化アジボイル、塩化セバコイル、塩化グルタロイル、塩化ピメロイル、塩化スベロイル、及び塩化トリメソイルからなる群より選ばれる多官能性架橋モノマーであって、前記ポリエーテルモノマーの前記ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能な架橋モノマーと、

最大で20% (w/w) の機械特性改質剤であって、ジヒドロキシポリ(カプロラクトン)である機械特性改質剤とを含み、かつ、

前記ポリエーテルモノマーの前記架橋モノマーに対するモル比が、3:1~1:3の範囲内にある、生分解性ポリエーテルネットワークポリマー。

## 【請求項 2】

0.1%~15% (w/w) の量で前記ジヒドロキシポリ(カプロラクトン)を含む、

請求項 1 記載の生分解性ポリエーテルネットワークポリマー。

【請求項 3】

0.5% ~ 10% (w/w) の量で前記ジヒドロキシポリ(カプロラクトン)を含む、請求項 1 又は 2 記載の生分解性ポリエーテルネットワークポリマー。

【請求項 4】

前記ポリエーテルモノマーの前記架橋モノマーに対するモル比が、1:2である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の生分解性ポリエーテルネットワークポリマー。

【請求項 5】

前記架橋モノマーが、塩化スクシニル及び塩化セバコイルからなる群より選ばれる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の生分解性ポリエーテルネットワークポリマー。

【請求項 6】

エステル結合を介して架橋されている生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するための方法であって、当該方法は、

(i) 複数のヒドロキシ官能基を含む分岐状多官能性ポリエーテルモノマーであって、グリセロールエトキシレート及びペンタエリスリトールエトキシレートからなる群より選ばれるポリエーテルモノマーと、

(ii) 塩化スクシニル、塩化アジポイル、塩化セバコイル、塩化グルタロイル、塩化ピメロイル、塩化スベロイル、及び塩化トリメソイルからなる群より選ばれる多官能性架橋モノマーであって、前記ポリエーテルモノマーの前記ヒドロキシ官能基と反応可能な架橋モノマーと、

(iii) 最大で 20% (w/w) の機械特性改質剤であって、ジヒドロキシポリ(カプロラクトン)である機械特性改質剤と

を含むモノマー組成物を、当該ポリエーテルモノマーと当該架橋モノマーとの間でのエステル結合の形成と、前記ジヒドロキシポリ(カプロラクトン)を前記ネットワークポリマーの構成部分としてそのヒドロキシ官能基を介して共有結合で組み入れることとを可能にする条件下で反応させる工程を含み、ここで、前記ポリエーテルモノマーの前記架橋モノマーに対するモル比が、3:1 ~ 1:3 の範囲内にある、方法。

【請求項 7】

前記モノマー組成物が、0.1% ~ 15% (w/w) の量で前記ジヒドロキシポリ(カプロラクトン)を含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記モノマー組成物が、0.5% ~ 10% (w/w) の量で前記ジヒドロキシポリ(カプロラクトン)を含む、請求項 6 又は 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記ポリエーテルモノマーの前記架橋モノマーに対するモル比が、1:2である、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記架橋モノマーが、塩化スクシニル及び塩化セバコイルからなる群より選ばれる、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含むフィルム基材と、当該フィルム基材上に播種された角膜上皮細胞及び角膜内皮細胞からなる群より選ばれる細胞とを含む、眼インプラント。

【請求項 12】

前記フィルム基材が、水和状態である場合、10 ~ 150 μm の範囲での厚さを有する、請求項 11 記載の眼インプラント。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含むフィルム基材と当該フィルム基材上に播種された角膜内皮細胞とを含む眼インプラントを含む、角膜内皮機能障害の治療のための材料。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

前記フィルム基材が、水和状態である場合、 $10 \sim 150 \mu\text{m}$ の範囲での厚さを有する、請求項 13 記載の材料。

## 【請求項 15】

水性溶媒で溶媒和している請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む、ヒドロゲル。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、一般に、生物学的環境に適合する生分解性ネットワークポリマーに関する。特に、本発明は、エステル結合を介して架橋されている生分解性ポリエーテルネットワークポリマーに、当該生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材、インプラント及び足場材に、そのようなネットワークポリマー、インプラント及び足場材を製造するための方法に、並びに、該ネットワークポリマーを含む基材、インプラント及び足場材を特に細胞培養及び組織再生のために使用する方法に関する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

生物学的環境に適合するポリマー材料は、さまざまな生物医学的用途、例えば組織工学でのその利用可能性から、高い関心をもたれている。そのような用途での利用のために研究されてきているポリマー材料は、一般的に、合成由来又は天然起源のものである。

20

## 【0003】

天然ポリマー材料、例えば、コラーゲン、アルギン酸塩、キトサン及びヒドロキシアパタイトは、さまざまな組織を標的とする組織工学用途のための足場材を製造するために利用されてきた。そのような天然材料は、利点が多いものの、その使用に関しては、バッチ間変動、疾病伝播及び免疫原性のリスクといった所定の問題が存在する。さらには、それら天然材料を入手するために要する処理方法が、それら材料の物理的特性に影響を及ぼしかねない。例を挙げると、コラーゲンはインビボで高い機械的強度を示すけれども、採取、単離、及び精製の処理は、天然の架橋が損なわれることに起因して、この特性を著しく低下させる。

## 【0004】

30

それに対して、合成ポリマーは、天然ポリマーに対して所定の利点を提供する。そのような利点には、バッチ間変動の低減、ポリマー構造に対する制御性の高さ、並びに、ポリマー組成物のテイラーメイド性と特定用途への適合性を挙げることができる。

## 【0005】

ポリエーテルポリマー、例えば、ポリ(エチレングリコール)(PEG)をベースとする親水性材料が、生物医学的用途のために模索されてきた。特に、PEGは、それ自体が水溶性、非毒性、最小免疫原性、及び、抗タンパク質汚染性を有するが故に、広く研究されてきており、また、医薬及び化粧品の用途での利用のためにUSの食品医薬品局(FDA)によって承認されてきた。インビボ及びインビトロのさまざまな研究が、PEGが組み込まれた材料の生体適合性が望ましいものであることを実証している。

40

## 【0006】

PEGなどのポリエーテルをベースとする、架橋ポリマーネットワークポリマー及びヒドロゲルは、細胞培養及び組織工学の用途のために模索されてきた。そして、さまざまな研究グループが、さまざまな反応条件を用いたPEGのヒドロゲルの構築を報告している。しかし、PEGポリマー及びヒドロゲルは、一般に生体適合性であるものの、それらはいがい生分解性ではない。

## 【0007】

生分解性PEGヒドロゲルは、ポリ( - ヒドロキシ酸)、例えば、酪酸及びポリ(グリコール酸)をベースとするポリマーセグメントをヒドロゲルに組み入れることで製造されてきた。しかしながら、ポリ( - ヒドロキシ酸)セグメントのPEGヒドロゲルへの

50

組み入れにともなう問題は、ポリ( - ヒドロキシ酸 ) セグメントが非常に疎水性になり得ること、これにより、主要な異物応答を招くことの著しい要因となり得ることにある。ポリ( - ヒドロキシ酸 ) セグメントにともなうさらなる問題は、それらが分解すると、酸濃度が局所的に高めることになりかねず、これにより、炎症応答を招き得るということである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

既存材料に関連する 1 つ以上の欠点若しくは短所を解決又は改善する生分解性ポリエーテルネットワークポリマーが提供されること、並びに / 又は、そのような材料の有用な代替物が少なくとも提供されることが望ましいといえよう。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

ある 1 つの態様では、本発明は、多官能性ポリエーテルモノマーと多官能性架橋モノマーを含むモノマー組成物を重合させることによって製造される、エステル結合を介して架橋されている生分解性ポリエーテルネットワークポリマーであって、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの一方が、ヒドロキシ官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの他方が、前記ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能な相補的な官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマー及び前記架橋モノマーより選ばれる少なくとも 1 つが分岐している、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを提供する。

20

【 0 0 1 0 】

該ポリエーテルネットワークポリマーは、ポリエーテルモノマーと架橋モノマーとの間で形成されるエステル結合を介して架橋されている。該エステル結合は、生理学的条件下で加水分解性であり、かつ、加水分解により、前記ネットワークポリマーの分解を生じさせる。

【 0 0 1 1 】

もう 1 つの態様では、本発明は、エステル結合を介して架橋されている生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するための方法であって、当該方法は、多官能性ポリエーテルモノマーと多官能性架橋モノマーを含むモノマー組成物を、当該ポリエーテルモノマーと当該架橋モノマーとの間でのエステル結合の形成を可能にする条件下で反応させる工程を含み、ここで、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの一方が、ヒドロキシ官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの他方が、前記ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能な相補的な官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマー及び前記架橋モノマーより選ばれる少なくとも 1 つが分岐している、方法を提供する。

30

【 0 0 1 2 】

本発明の 1 以上の態様によれば、ポリエーテルモノマーと架橋モノマーの一方が、ヒドロキシ官能基を含み、一方、ポリエーテルモノマーと架橋モノマーの他方が、ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能な相補的な官能基を含む。一組の実施形態では、該相補的な官能基は、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルボン酸無水物及びカルボン酸ハロゲン化物からなる群より選ばれる。特定の一組の実施形態では、該相補的な官能基はカルボン酸ハロゲン化物である。

40

【 0 0 1 3 】

ポリエーテルネットワークポリマーを形成することを可能にするためには、ポリエーテルモノマー及び架橋モノマーより選ばれる少なくとも 1 つが分岐していなければならない。ある 1 つの実施形態では、ポリエーテルモノマーが分岐している。

【 0 0 1 4 】

本発明の 1 以上の態様に係る実施形態では、ポリエーテルモノマーが複数個のヒドロキシル官能基を含む。したがって、そのような実施形態では、架橋モノマーが上記相補的な

50



官能基を含む。

【0015】

幾つかの実施形態では、ポリエーテルモノマーが、分岐しており、かつ、以下の式(I)：



(式中、

Aは、n価のコアであり、

Bは、ポリエーテルセグメントであり、

Xは、ヒドロキシ官能基であり、かつ、

nは、(BX)基の数を示しており、かつ、少なくとも3である。)

10

の構造を有する。

【0016】

幾つかの実施形態では、ポリエーテルネットワークポリマーの製造に採用されるポリエーテルモノマーが、C2～C3ジオールから誘導されたポリエーテルセグメントを含む。

【0017】

一組の実施形態では、ポリエーテルモノマーにおけるポリエーテルセグメントの各々が、約100～約10,000Da、約150～約5000Da、及び、約200～約1000Daからなる群より選ばれる範囲内の分子量を有する。

【0018】

幾つかの実施形態では、ポリエーテルモノマーが、グリセロールエトキシレート及びペンタエリスリトールエトキシレートからなる群より選ばれる。

20

【0019】

本発明の1以上の態様に係る実施形態では、架橋モノマーが、ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能な相補的な官能基を少なくとも2つ含む。特定の一組の実施形態では、架橋モノマーが、カルボン酸ハロゲン化物の官能基を少なくとも2つ含む。

【0020】

ある1つの形態では、架橋モノマーが、以下の式(II)：



(式中、

Rは、ヒドロカルビル基であり、

30

【0021】

Yは、相補的な官能基であって、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルボン酸無水物及びカルボン酸ハロゲン化物からなる群より選ばれる相補的な官能基(好ましくは、カルボン酸ハロゲン化物の官能基)であり、かつ、

mは、Y基の数を示しており、かつ、少なくとも2である。)

の構造を有していてもよい。

【0022】

幾つかの実施形態では、式(II)の架橋モノマーが、以下の式(IIa)又は式(IIb)：

40

【0023】

【化1】



## 【0024】

(式中、

Rは、ヒドロカルビル基であり、かつ、

## 【0025】

Yは、相補的な官能基であって、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルボン酸無水物及びカルボン酸ハロゲン化物(好ましくは、カルボン酸ハロゲン化物)からなる群より選ばれる相補的な官能基である。)

の構造を有していてもよい。

## 【0026】

式(II)、式(IIa)及び式(IIb)の架橋モノマーに係る実施形態において、Rは、直鎖状、分岐状、環状、又はアリーのヒドロカルビル基であってもよい。幾つかの特定の実施形態では、Rが2~12個の炭素原子を含んでいてもよい。

10

## 【0027】

ある1つの形態では、架橋モノマーが、塩化スクシニル、塩化アジボイル、塩化セバコイル、塩化グルタロイル、塩化ピメロイル、塩化スベロイル、及び塩化トリメソイル、好ましくは、塩化スクシニル及び塩化セバコイルからなる群より選ばれていてもよい。

## 【0028】

上記生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するために用いるモノマー組成物は、ポリエーテルモノマーの架橋モノマーに対するモル比が、およそ5:1~1:5、又は、およそ3:1~1:3からなる群より選ばれる範囲内にあるものを含んでいてもよい。一組の実施形態では、ポリエーテルモノマーの架橋モノマーに対するモル比は、およそ1:2である。

20

## 【0029】

一組の実施形態では、上記生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するために用いるモノマー組成物は、さらに機械特性改質剤を含んでいてもよい。幾つかの実施形態では、モノマー組成物が、該機械特性改質剤を最大で20%(w/w)、最大で15%(w/w)、又は、最大で10%(w/w)含んでいてもよい。該機械特性改質剤が、疎水性高分子又は疎水性オリゴマーであってもよい。

## 【0030】

該機械特性改質剤が疎水性高分子である場合、該高分子は、例えばジヒドロキシポリ(カプロラクトン)のようなポリエステルポリオールであってもよい。

30

## 【0031】

一組の実施形態では、本発明に係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーが多孔性である。そのような実施形態では、該生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは、平均細孔径が約1nm~約3mmの範囲内にあってもよい。

## 【0032】

ある形態では、ポリエーテルモノマーと架橋モノマーとの反応によって、ポリエーテルネットワークポリマー内に細孔を生じるガス状態縮合生成物が生成される。

## 【0033】

一組の実施形態では、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーの製造に用いるモノマー組成物がさらに固形ポロゲン、例えば、ポロゲン粒子を含んでいてもよい。該ポロゲン粒子は、粒径が約50~100µm、約100~700µm、及び、約300~600µmからなる群より選ばれる範囲内にあってもよい。幾つかの実施形態では、該ポロゲン粒子が塩粒子を含んでいてもよい。

40

## 【0034】

本発明に係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは、さまざまな用途において使用されてもよい。

## 【0035】

ある1つの態様では、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含むインビトロ細胞培養基材が提供される。ある

50

1つの形態では、該細胞培養基材がフィルム形状をなしている。

【0036】

もう1つの態様では、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材と、当該基材の上に播種された細胞とを含む移植可能な器具が提供される。

【0037】

あるもう1つの態様では、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む足場材が提供される。幾つかの形態では、該足場材が多孔性スポンジ状をなしている。

【0038】

本発明に係るもう1つの態様では、エステル結合を介して架橋されている多孔性の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するための方法であって、当該方法は、多官能性ポリエーテルモノマーと多官能性架橋モノマーとを含むモノマー組成物を、エステル結合を介して架橋しているポリエーテルネットワークポリマーの形成を可能にし、かつ、前記ネットワークポリマー内部に複数の細孔を生じさせるガス状縮合生成物のインサイチュでの生成を可能にする条件下で反応させる工程を含み、ここで、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの一方が、ヒドロキシ官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの他方が、前記ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能な相補的な官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマー及び前記架橋モノマーより選ばれる少なくとも1つが分岐している、方法が提供される。

【0039】

本発明は、被験体内組織再生方法であって、当該方法が、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む足場材を前記被験体における所望の部位に移植する工程を含む、方法をさらに提供する。一組の実施形態では、前記組織が脂肪組織であり、かつ、前記足場材が前記被験体の胸部領域内に移植される。

【0040】

本発明は、細胞培養方法であって、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材に細胞を細胞培養条件下で接触させる工程を含む方法をさらに提供する。

【0041】

本発明は、移植可能な器具を製造するための方法であって、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材を細胞に提供する工程と、当該基材に細胞を播種する工程とを含む方法をさらに提供する。ある1つの形態では、該器具は、被験体の眼に移植するための眼インプラントであり、かつ、該細胞は、角膜上皮細胞及び角膜内皮細胞からなる群より選ばれる。

【0042】

本発明は、被験体における障害又は状態の治療のための方法であって、当該方法が、本明細書に記載されている実施形態の1つ以上に係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材と、当該基材の上に播種された細胞とを含む移植可能な器具を提供する工程と、当該器具を被験体における治療が望まれる部位に移植する工程とを含む、方法をさらに提供する。幾つかの実施形態では、病気又は障害が角膜内皮機能障害であり、かつ、上記方法は、本明細書に記載されている実施形態の1つ以上に係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材上に播種された角膜内皮細胞を含む器具を被験体の眼に移植する工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0043】

本明細書では、本発明に係る好ましい実施形態は、以下の添付図面を参照しつつ例としてのみ説明されることとなる：

【図1】図1は、本発明の一実施形態に関する、グリセロールエトキシレート（GE）と

10

20

30

40

50

塩化セバコイル ( S e b C l ) とジヒドロキシ P C L との反応を介した生分解性ポリエーテルネットワークポリマーの合成を示す模式図である。

【図 2】図 2 は、本発明の実施形態に関する、機械特性改質剤 ( P C L ) を異なる量で有する生分解性ポリエーテルネットワークポリマーのインビトロでの 8 週間にわたる分解過程を示すグラフを示す図である。

【図 3】図 3 は、本発明の実施形態に関する、P C L を異なる量で含有する生分解性ポリエーテルネットワークポリマーの ( a ) ポリマー馴化培地及び ( b ) 分解生成物の細胞毒性評価結果を示すグラフを示す図である。

【図 4】図 4 は、本発明の一実施形態に関する、( a ) 組織培養プレート上で培養されたヒツジ角膜内皮細胞 ( C E C ) の顕微鏡画像と、( b ) 5 w t % P C L の生分解性ポリエーテルネットワークポリマー上で培養された C E C の顕微鏡画像を示す図である。

【図 5】図 5 は、( a ) コントロール、及び、( b ) 生分解性ポリエーテルネットワークポリマー ( P H F ) が移植されたヒツジ角膜の、移植 2 8 日経過後における H & E 染色切片の顕微鏡画像を示す図である。

【図 6】図 6 は、本発明の一実施形態に関する、ペンタエリスリトールエトキシレート ( P E ) と塩化セバコイル ( S e b C l ) を用いた生分解性多孔 P E G スポンジの製造を示す模式図である。

【図 7】図 7 は、本発明の一実施形態に係る生分解性多孔 P E G スポンジの走査型電子顕微鏡 ( S E M ) 画像を示す図である。

【図 8】図 8 は、( a ) 本発明の一実施形態に係る、ペンタエリスリトールエトキシレート ( P E ) と塩化セバコイル ( S e b C l ) と P C L ( 2 w t % ) とを用いて製造された生分解性多孔 P E G スポンジに関する、圧縮応力対圧縮張力の 3 0 圧縮サイクルにわたるプロファイルを示すグラフ、及び、( b ) 本発明の実施形態に係るさまざまな生分解性多孔 P E G スポンジに関する圧縮弾性率を示すグラフを示す図である。

【図 9】図 9 は、本発明の一実施形態に係る生分解性多孔 P E G スポンジのインビトロでの 8 週間 ( P B S , 3 7 ) にわたる分解を示すグラフである。

【図 1 0】図 1 0 は、( a ) 多孔 P E G スポンジ馴化培地、及び、( b ) 多孔 P E G スポンジ分解生成物の細胞毒性評価結果を示すグラフを示す図である。

【図 1 1】図 1 1 は、( a ) 本発明の一実施形態に係る、ペンタエリスリトールエトキシレート ( P E ) と塩化セバコイル ( S e b C l ) と P C L ( 2 w t % ) とを用いて製造された生分解性多孔 P E G スポンジの移植及び縫合前の画像、( b ) 背面皮下ポケットの用意の画像、( c ) 当該背面ポケットへ挿入されている生分解性多孔 P E G スポンジの画像、( d ) 2 週目の生分解性多孔 P E G スポンジ外植片の巨視的断面の画像、( e ) 8 週目の生分解性多孔 P E G スポンジ外植片の巨視的断面の画像、( f ) 8 週目の生分解性多孔 P E G スポンジ外植片の拡大断面の画像、( g ) 2 週目に取り出された生分解性多孔 P E G スポンジ外植片の H & E 染色切片の 1 . 2 5 倍の画像、( h ) 同 1 0 倍の画像、及び ( i ) 同 2 0 倍の画像、並びに、( j ) 8 週目に取り出された生分解性多孔 P E G スポンジ外植片の H & E 染色切片の 1 . 2 5 倍の画像、( k ) 同 1 0 倍の画像、及び ( l ) 同 2 0 倍の画像を示す図である。

【図 1 2】図 1 2 は、( a ) 本発明の一実施形態に係る、ペンタエリスリトールエトキシレート ( P E ) と塩化セバコイル ( S e b C l ) と P C L ( 2 w t % ) とを用いて製造された生分解性多孔 P E G スポンジを移植した位置の 1 6 週後、( b ) 1 6 週目に取り出された生分解性多孔 P E G スポンジの巨視的断面、( c ) 該生分解性多孔 P E G スポンジを移植した箇所の組織の H & E 染色切片、( d ) 2 週目に取り出された生分解性多孔 P E G スポンジの E D 1 染色切片の 1 . 2 5 倍、( e ) 同 1 0 倍、及び ( f ) 同 2 0 倍、( g ) 8 週目に取り出された生分解性多孔 P E G スポンジの E D 1 染色切片の 1 . 2 5 倍、( h ) 同 1 0 倍、及び ( i ) 同 2 0 倍、並びに、( j ) 1 6 週目における移植部位中の組織の E D 1 染色切片の 1 . 2 5 倍、( k ) 同 1 0 倍、及び ( l ) 同 2 0 倍を示す図である。

【図 1 3】図 1 3 は、本発明の実施形態に係る、塩テンプレートを用いて形成された生分解性多孔 P E G スポンジの E n v i r o - S E M 画像を示す図であり、( a ) は、塩化ス

10

20

30

40

50

クシニル架橋モノマーと2wt%のPCLを用いた場合、(b)は、塩化セバコイル架橋モノマーと2wt%のPCLを用いた場合、(c)は、塩化トリメソイル架橋モノマーと2wt%のPCLを用いた場合を示す。

【図14】図14は、(a)本発明の実施形態に関する、塩テンプレート、及び、異なるwt%のPCLを用いて製造された生分解性多孔PEGスポンジの圧縮弾性率を示すグラフ、並びに、(b)本発明の一実施形態に係る、塩テンプレートと塩化セバコイル架橋モノマーと2wt%のPCLとを用いて製造された生分解性多孔PEGスポンジに関する、圧縮応力対圧縮張力の15圧縮サイクルの間のプロフィールを示すグラフを示す図である。

【図15】図15は、塩テンプレートを用いて製造された、本発明の実施形態に関する、異なる架橋モノマーを用いて製造された生分解性多孔PEGスポンジのインビトロでの8週間(PBS, 37℃)にわたる分解を示すグラフを示す図である。

【図16】図16は、架橋モノマーを異なる量で用いて製造された、本発明の実施形態の多孔性PEGスポンジから得られた(a)馴化培地及び(b)分解生成物の細胞毒性評価結果を示すグラフを示す図である。

【図17】図17は、(a)本発明の実施形態に関する、塩テンプレートと塩化セバコイル架橋モノマーを用いて製造された生分解性多孔PEGスポンジを移植するための用意された皮下ポケット、(b)該生分解性多孔PEGスポンジの移植及び縫合前、(c)該背面ポケットへ挿入されて縫合された生分解性多孔PEGスポンジ、(d)該生分解性多孔PEGスポンジの2週後の移植部位からの切除前、(e)2週目の生分解性多孔PEGスポンジ外植片の巨視的断面、(f)8週目の生分解性多孔PEGスポンジ外植片の巨視的断面、(g)2週目に取り出された生分解性多孔PEGスポンジのH&E染色切片の1.25倍、(h)同10倍、及び(i)同20倍、並びに、(j)8週目に取り出された生分解性多孔PEGスポンジのH&E染色切片の1.25倍、(k)同10倍、及び(l)同20倍を示す図である。

【図18】図18は、(a)本発明の実施形態に関する、塩テンプレートと塩化セバコイル架橋モノマーを用いて製造された生分解性多孔PEGスポンジの16週目に取り出された巨視的断面、(b)該生分解性多孔PEGスポンジが移植された箇所の組織のH&E染色切片の1.25倍、(c)同10倍、(d)2週目に取り出された生分解性多孔PEGスポンジのED1染色切片の1.25倍、(e)同10倍、及び(f)同20倍、(g)8週目に取り出された生分解性多孔PEGスポンジのED1染色切片の1.25倍、(h)同10倍、及び(i)同20倍、並びに、(j)16週目における移植部位中の組織のED1染色切片の1.25倍、(k)同10倍、及び(l)同20倍を示す図である。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0044】

本発明は、エステル結合を介して架橋されている生分解性ポリエーテルネットワークポリマー及びこれらのネットワークポリマーを製造する方法に関する。ポリエーテルネットワークポリマーに含有されるエステル結合は、生物学的環境において生分解性であり、かつ、加水分解で及び/又は酵素によって切断可能であり、架橋されたネットワークポリマーの分解を可能にする。ネットワークポリマーの分解から生じる分解生成物は生体には実質的に非毒性である。

##### 【0045】

用語「分解性」及び「生分解性」は、物質、結合又は基に関連して本明細書で使用されるとき、物質、結合又は基が生理的条件下で又は生物学的環境において経時的な分解、切断又は断片化に感受性であることを意味する。そのような分解、切断又は断片化は、選ばれる生理的条件下又は生物学的条件下で好適に不安定な部分の化学的な分解を介して(例えば、加水分解又は還元を介して)生じ得る。ポリマー物質に関連して使用される場合、用語「分解性」及び「生分解性」は、ポリマーが、そのポリマーの分子構造の一部として好適に不安定な又は分解性の部分を含むことを示す。ポリマーにおける1つ以上の分解性部分の切断又は分解は、ポリマーの、一般的にはモノマー及び/又は低分子量ポリマー断

10

20

30

40

50

片への断片化をもたらす。

【0046】

ある1つの態様では、本発明は、多官能性ポリエーテルモノマーと多官能性架橋モノマーを含むモノマー組成物を重合させることによって製造される、エステル結合を介して架橋されている生分解性ポリエーテルネットワークポリマーであって、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの一方がヒドロキシ官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの他方が前記ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能な相補的な官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマー及び前記架橋モノマーから選ばれる少なくとも1つが分岐している生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを提供する。

10

【0047】

生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを形成するには、多官能性ポリエーテルモノマーと多官能性架橋モノマーを含むモノマー組成物が採用される。モノマー組成物に存在するポリエーテルモノマー及び架橋モノマーはそれぞれ、重合し、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを形成するために共有結合反応することが可能である官能基を含む。重合反応の結果生じるポリエーテルネットワークポリマーは固形であり、不溶性のポリマーマトリクスである。

【0048】

モノマー組成物に含有されるポリエーテルモノマー及び架橋モノマーの少なくとも一方が分岐している。幾つかの実施形態では、ポリエーテルモノマーが分岐する。他の実施形態では、架橋モノマーが分岐する。一方のモノマーが分岐している場合、他方のモノマーは直鎖状であっても分岐状であってもよい。

20

【0049】

幾つかの実施形態では、少なくとも3の分岐度でポリエーテルモノマーが分岐する。そのような実施形態では、架橋モノマーは直鎖状であっても分岐状であってもよい。ポリエーテルモノマーが分岐している一組の実施形態では、架橋モノマーは直鎖状である。

【0050】

モノマー組成物に含有されるポリエーテルモノマー及び架橋モノマーは多官能性であり、モノマーのそれぞれが複数個の官能基を含む。多官能性であるモノマーは2つ以上の官能基を含む。しかしながら、モノマーが分岐している場合、そのモノマーは一般に少なくとも3つの官能基を含む。

30

【0051】

本発明によれば、ポリエーテルモノマー及び架橋モノマーの一方はヒドロキシ官能基を含み、ポリエーテルモノマー及び架橋モノマーの他方は、ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能である相補的な官能基を含む。

【0052】

本明細書で使用されるとき、用語「結合」は、2つの相補的な官能基の間での共有結合化学反応の結果、形成される基を指す。

【0053】

ヒドロキシ基と反応する相補的な官能基は、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルボン酸無水物、及びカルボン酸ハロゲン化物の官能基から成る群より選ばれ得る。一組の実施形態では、相補的な官能基はカルボン酸ハロゲン化物基である。

40

【0054】

以下でさらに説明されるように、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーの製造におけるヒドロキシ官能基とカルボン酸ハロゲン化物官能基とを含むモノマーの使用は、そのようなモノマーの共有結合反応から生じる縮合生成物が多孔性ネットワークポリマー構造の生成に役立ち得るので、有利であり得る。

【0055】

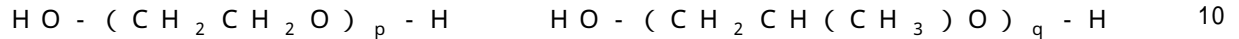
一組の実施形態では、モノマー組成物は複数個のヒドロキシ官能基を含むポリエーテルモノマーを含む。ポリエーテルモノマーに存在する官能基の数は、ポリエーテルモノマー

50

が直鎖状であるか、分岐状であるかどうかに依存し得る。一組の実施形態では、ポリエーテルモノマーは直鎖状ポリエーテルポリオール、分岐状ポリエーテルポリオール、又はそれらの混合物である。

【 0 0 5 6 】

一組の実施形態では、モノマー組成物は2つのヒドロキシ官能基を含む直鎖状ポリエーテルモノマーを含む。そのような直鎖状ポリエーテルモノマーは本明細書では直鎖状ポリエーテルジオールと呼ばれ得る。直鎖状ポリエーテルモノマーは、C 2 ~ C 3 ジオールに由来してもよいポリエーテルセグメントを含んでもよい。好適な直鎖状ポリエーテルモノマーには、以下の一般式：



【 0 0 5 7 】

によって示されるようなポリ(エチレングリコール)及びポリ(プロピレングリコール)が挙げられ、式中、p及びqはそれぞれ、反復エチレンオキシド単位又は反復プロピレンオキシド単位の数を示す。

【 0 0 5 8 】

モノマー組成物に存在する直鎖状ポリエーテルジオールは、約100~10,000Da、約150~5000Da及び約200~1000Daからなる群より選ばれる範囲での分子量を有してもよい。

【 0 0 5 9 】

一組の実施形態では、モノマー組成物は少なくとも3つの官能基を含む分岐状ポリエーテルモノマーを含んでもよい。そのような実施形態では、該ポリエーテルモノマーは式(I)



(式中、

Aはn価のコアであり、

Bはポリエーテルセグメントであり、

Xはヒドロキシ官能基であり、かつ

nは(BX)基の数を示しており、かつ、少なくとも3である)の構造を有してもよい。

【 0 0 6 0 】

式(I)では、Aは分岐状ポリエーテルモノマーを作るのに好適である中心のn価のコア部分を示す。幾つかの実施形態では、ポリエーテルモノマーは星形状であってもよく、その際、複数のアームが中心のコアから放射状に広がる。そのような実施形態では、Aは星のコアを表し、星のアームは基(BX)によって示される。

【 0 0 6 1 】

ポリエーテルモノマーの分岐度(nによって示される)はコア部分Aの性質を変化させることによって変化させることができる。異なる分岐度を用いてポリエーテルネットワークポリマーの機械特性及び物性を制御してもよい。式(I)の幾つかの実施形態では、nは3、4、6及び8からなる群より選ばれる整数である。

【 0 0 6 2 】

式(I)の幾つかの実施形態では、Aは、グリセロール、グリセロールオリゴマー、ペンタエリスリトール、ペンタエリスリトールオリゴマー、ソルビトール、トリメチロイルプロパン及びジ(トリメチロイルプロパン)からなる群より選ばれる多価化合物に由来してもよい。

【 0 0 6 3 】

式(I)では、Bはポリエーテルモノマーのポリエーテルセグメントを示す。ポリエーテルセグメントはC 2 ~ C 3 ジオールに由来してもよい。特定の実施形態では、各ポリエーテルセグメントはポリ(エチレングリコール)(PEG)を含む。

【 0 0 6 4 】

式(I)のモノマーが星形状である場合、星の各アームは、約100~10,000D

10

20

30

40

50

a、約150～5000Da及び約200～1000Daからなる群より選ばれる範囲での分子量を有するポリエーテルセグメントを含んでもよい。幾つかの実施形態では、各ポリエーテルセグメントは、前述のものから選ばれる範囲における分子量を有するポリ（エチレングリコール）を含む。ポリエーテルセグメントの分子量は、アームの長さを決定づけるであろうし、かつ、得られるポリエーテルネットワークポリマーの物性の一部、例えば、水相溶性又は親水性に影響し得る。

#### 【0065】

ポリ（エチレングリコール）（PEG）セグメントを含むポリエーテルモノマーは、ポリ（エチレングリコール）が生体適合性、親水性、非毒性及び非免疫原性であるので、幾つかの実施形態では有利であってもよい。PEGを含むネットワークポリマーの分解の結果生じるポリマー断片は、正常な排泄経路を介して生体から一掃され易くてもよい。

10

#### 【0066】

一組の実施形態では、モノマー組成物はグリセロールエトキシレート及びペンタエリスリトールエトキシレートからなる群より選ばれる分岐状ポリエーテルモノマーを含んでもよい。

#### 【0067】

PEGを含むポリエーテルモノマーと共に製造される生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは生分解性ポリ（エチレングリコール）ネットワークポリマーと見なされてもよい。

#### 【0068】

モノマー組成物が複数個のヒドロキシ官能基を含むポリエーテルモノマーを含む場合、モノマー組成物に同様に存在する架橋モノマーは、ポリエーテルモノマーのヒドロキシ官能基に対して相補的である複数個の官能基を含む。相補的な官能基はヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能である。

20

#### 【0069】

幾つかの実施形態では、架橋モノマーは、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルボン酸無水物及びカルボン酸ハロゲン化物の官能基からなる群より選ばれる複数個の相補的な官能基を含んでもよい。一組の実施形態では、架橋モノマーは少なくとも2つのカルボン酸ハロゲン化物の官能基を含む。

#### 【0070】

ポリエーテルモノマーが分岐している場合、架橋モノマーは直鎖状であっても分岐状であってもよい。

30

#### 【0071】

ポリエーテルモノマーが直鎖状である、例えば、直鎖状ポリエーテルジオールである場合、架橋モノマーは分岐しなければならない。

#### 【0072】

一組の実施形態では、架橋モノマーは式（II）：



（式中、

Rは、ヒドロカルビル基であり、

40

#### 【0073】

Yは、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルボン酸無水物及びカルボン酸ハロゲン化物からなる群より選ばれる相補的な官能基（好ましくはカルボン酸ハロゲン化物）であり、かつ、

mは、Y基の数を示し、かつ、少なくとも2である）の構造を有する。

#### 【0074】

架橋モノマーは少なくとも2つの相補的な官能基を含み、式（II）では、相補的な官能基の数は群mによって示される。式（II）では、mは少なくとも2であり、幾つかの実施形態では、mは3以上であってもよい。

#### 【0075】

50



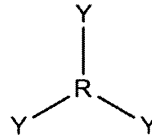
幾つかの実施形態では、式 ( I I ) の架橋モノマーは式 ( I I a ) 又は ( I I b ) の構造を有してもよく、その際、mは式 ( I I ) において2又は3である。

【 0 0 7 6 】

【 化 2 】



(IIa)



(IIb)

10

【 0 0 7 7 】

式 ( I I a ) 及び ( I I b ) のモノマーでは、R及びYは式 ( I I ) について本明細書で定義される基から選ばれてもよい。

【 0 0 7 8 】

ある1つの形態では、式 ( I I ) 、 ( I I a ) 又は ( I I b ) の架橋モノマーにおいてYによって示される相補的な官能基は、存在ごとにカルボン酸ハロゲン化物官能基であってもよい。Yがカルボン酸ハロゲン化物官能基である場合、官能基のハロゲン化物部分は従来使用されているもののいずれか1つから選ばれてもよい。幾つかの実施形態では、カルボン酸ハロゲン化物官能基のハロゲン化物部分は、フッ化物、塩化物、臭化物及びヨウ化物、好ましくは塩化物及び臭化物からなる群より選ばれてもよい。ある1つの形態では、カルボン酸ハロゲン化物官能基は、カルボン酸塩化物官能基又はカルボン酸臭化物官能基であってもよい。

20

【 0 0 7 9 】

式 ( I I ) 、 ( I I a ) 及び ( I I b ) の架橋モノマーに存在するヒドロカルビル基Rは、直鎖状、分岐状、環状又はアリールのヒドロカルビル基からなる群より選ばれてもよい。幾つかの実施形態では、Rは、2～12個の炭素原子を含む直鎖状、分岐状、環状又はアリールのヒドロカルビル基である。幾つかの実施形態では、Rは、8～12個の炭素原子を含む直鎖状、分岐状、環状又はアリールのヒドロカルビル基である。そのような基は幾つかの実施形態では、疎水性のヒドロカルビル基であると見なされてもよい。

30

【 0 0 8 0 】

本発明に係る実施形態では、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するのに使用されるモノマー組成物は、塩化スクシニル、塩化アジポイル、塩化セバコイル、塩化グルタロイル、塩化ピメロイル、塩化スベロイル、塩化トリメソイル、及びそれらの組み合わせからなる群より選ばれる架橋モノマーを含んでもよい。架橋モノマーの選択を用いてポリエーテルネットワークポリマーの膨潤度合い、分解速度及び機械特性を制御してもよい。例えば、疎水性のヒドロカルビル基を含む架橋モノマーを採用して、ポリエーテルモノマーによって提供される親水性とバランスを取ることによって、水膨潤性を低下させ、かつ、ポリマーネットワークの引張特性を改善してもよい。

【 0 0 8 1 】

40

幾つかの実施形態では、塩化スクシニル及び塩化セバコイルから選ばれる架橋モノマーを含むことはモノマー組成物にとって有利であってもよい。塩化スクシニル及び塩化セバコイルのようなモノマーの使用は、ネットワークポリマーの分解の際、そのようなモノマーが生物学的環境においてコハク酸及びセバシン酸に変換されることが可能であるので、有益であってもよい。コハク酸及びセバシン酸は生体適合性であり、かつ、最小毒性である。例えば、セバシン酸は細胞にて天然に存在するジカルボン酸であり、かつ、脂肪酸酸化の中間体であり、一方で、コハク酸はクレブス/クエン酸回路における中間体である。

【 0 0 8 2 】

生分解性ポリエーテルネットワークポリマーの製造で採用されるモノマー組成物は、任意の好適な量のポリエーテルモノマー及び架橋モノマーを含んでもよい。幾つかの実施形

50

態では、モノマー組成物はおよそ 5 : 1 ~ 1 : 5 又はおよそ 3 : 1 ~ 1 : 3 の範囲でのポリエーテルモノマーの架橋モノマーに対するモル比を含んでもよい。一実施形態では、モノマー組成物におけるポリエーテルモノマーの架橋モノマーに対するモル比はおよそ 1 : 2 である。過剰の架橋モノマーを有して、特に直鎖状の架橋モノマーが使用されるのであれば、十分な数の架橋が確実に形成されることが望ましいことがあり得る。

#### 【0083】

一組の実施形態では、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するのに使用されるモノマー組成物はさらに機械特性改質剤を含んでもよい。機械特性改質剤を用いてポリエーテルネットワークポリマーの機械特性、例えば、引張特性を制御するのを助ける。再生医療及び組織工学の適用で使用することが意図される材料の機械特性は、望ましい細胞及び組織の相互作用を促進するのに、かつ、インプラントの機械的完全性を保証するのに重要であり得る。

10

#### 【0084】

機械特性改質剤は、最大で 20 % (w/w)、最大で 15 % (w/w) 及び最大で約 10 % (w/w) からなる群より選ばれる量でモノマー組成物に存在してもよい。

#### 【0085】

幾つかの実施形態では、機械特性改質剤は、疎水性高分子、例えば、疎水性ポリマー又は疎水性オリゴマーであってもよい。疎水性オリゴマーは一般に疎水性ポリマーよりも少ないモノマー反復単位を含むであろう。例えば、疎水性オリゴマーは 10 以下のモノマー反復単位を含んでもよい。疎水性高分子は生物学的環境に対して生体適合性であり、かつ、最小毒性であることが好ましい。

20

#### 【0086】

疎水性高分子は、一般的に親水性であってもよいポリエーテルネットワークポリマーよりも堅くてもよい。従って、疎水性高分子を含むことはネットワークポリマーの機械特性を改質することができる。

#### 【0087】

疎水性高分子は、水性環境にて一般に親水性のポリエーテルネットワークポリマーの膨潤性も改質してもよい。ネットワークポリマーの水膨潤性は、方程式 (1) :

$$\% ESR = ( (W_s - W_d) / W_d ) \times 100 \% \quad (1)$$

に従って算出される平衡膨潤率 (% ESR) として測定されてもよく、式中、 $W_s$  及び  $W_d$  はそれぞれ、ネットワークポリマーの膨潤重量及び乾燥重量を指す。

30

#### 【0088】

疎水性高分子を含むことは、ポリエーテルネットワークポリマーについて得られる % ESR を限定することができる。幾つかの実施形態では、最小膨潤 (低 % ESR) を示すことは、ポリエーテルネットワークポリマーにとって有利であり得、というのも、これにより、ポリエーテルネットワークポリマーを用いて製造される任意のインプラントが水性の生物学的環境にさらされた場合に、物理的寸法に最小の変化を示すのを保証することができることとなるからである。

#### 【0089】

一組の実施形態では、機械特性改質剤として採用される疎水性分子は、生分解性であり、かつ、生物学的環境において分解することが可能である官能基を含む。このことは、疎水性高分子が、生物学的環境にて加水分解及び/又は酵素による切断等であって、生物学的環境にて低分子量の分解生成物に分解する高分子の能力をもたらず切断等に感受性であってもよいことを意味する。一組の実施形態では、機械特性改質剤は、エステル、アミド、ウレタン (カルバメート) 及びジスルフィド官能基、及びそれらの混合物からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの官能基を含む疎水性分子である。

40

#### 【0090】

一組の実施形態では、疎水性高分子は疎水性のポリエステルポリオールであってもよい。例となる疎水性のポリエステルポリオールはジヒドロキシポリ (カプロラクトン) である。ポリエステルポリオールはヒドロキシ官能基を含むので、ポリエステルポリオールは

50

、相補的な官能基を含むモノマーと共有結合反応することが可能であり、従ってポリエステルポリオールをポリエーテルネットワークポリマーの構成部分として共有結合で組み入れることにつながる。さらに、ポリエステルポリオールにおけるエステル基は加水分解又は酵素による切断に感受性であってもよく、それによって、ネットワークポリマーが分解するにつれて低分子量断片の生成を介して疎水性高分子が除かれるのを可能にする。一組の実施形態では、ポリエステルポリオールはまたジスルフィド基を含んでもよい。ジスルフィド基は、生物学的環境にて還元又は酵素による切断に感受性であってもよく、ポリエステルポリオールの分解を促進してもよい。

【0091】

一組の実施形態では、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは、0～20% (w/w)、0.1～15% (w/w) 及び約0.5%～10% (w/w) からなる群より選ばれる量でポリエステルポリオールを含んでもよい。一実施形態では、ポリエステルポリオールはジヒドロキシポリ(カプロラクトン)である。

【0092】

生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは、多官能性ポリエーテルモノマーと多官能性架橋モノマーを含む混合物を形成し、次いでモノマーの混合物をポリエーテルネットワークポリマーを形成するのに十分な時間、共有結合反応させる1工程反応にて製造され得る。

【0093】

もう1つの態様では、本発明は、エステル結合を介して架橋されている生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造する方法であって、当該方法は、多官能性ポリエーテルモノマーと多官能性架橋モノマーとを含むモノマー組成物を、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの間でのエステル結合の形成を可能にする条件下で反応させる工程を含み、ここで、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの一方がヒドロキシ官能基を含み、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの他方が前記ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能な相補的な官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマー及び前記架橋モノマーより選ばれる少なくとも1つが分岐している、方法を提供する。

【0094】

モノマー組成物は、本明細書に記載されているもののいずれか1つより選ばれる、ポリエーテルモノマーと架橋モノマーとを含んでもよい。

【0095】

モノマー組成物はさらに、本明細書に記載されているような機械特性改質剤も含んでもよい。

【0096】

幾つかの実施形態では、モノマー組成物は溶媒を含む。溶媒は有機溶媒であってもよい。溶媒は、ポリエーテルモノマー及び架橋モノマーを可溶化するのを助けてもよいので、均質なモノマー組成物を得ることができる。例えば、グリセロールエトキシレート及びペンタエリスリトールエトキシレートのようなポリエーテルモノマーが水溶性である一方で、例えば、ジカルボン酸ハロゲン化物のような架橋モノマーが水不溶性であるので、これが有用であってもよい。添加される溶媒の非存在下では、結果として、モノマーと一緒に混合することにおいて困難さに遭遇し得る。他の実施形態では、モノマー組成物は添加される溶媒を含まない。

【0097】

当業者は、ヒドロキシ官能基と相補的な官能基との間での共有結合反応が一般に縮合生成物を生じることを理解するであろう。縮合生成物は一般に、官能基間の共有結合反応の副産物として除去される小分子である。

【0098】

一実施形態では、相補的な官能基はカルボン酸塩化物であり、カルボン酸塩化物とヒドロキシ官能基との間での反応は縮合生成物として塩酸(HCl)を生じる。ポリエーテル

10

20

30

40

50

ネットワークポリマーを形成するのにカルボン酸塩化物/ヒドロキシ化学反応を使用する利点の1つは、生分解性のエステル結合を生じる反応に加えて、反応も相対的に速くかつ高い効率で進み、ポリマー形成を促進するために従来技術の方法で使用され得るようなカップリング剤又は他の添加剤を用いる必要性が低くなることである。しかも、カルボン酸塩化物/ヒドロキシの反応は、ラジカル重合によって形成されるネットワークポリマーには必要とされ得る特殊な反応条件（例えば、酸素を含まない環境）を必要としない。

#### 【0099】

生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造する方法は室温で又は温度を高めて実施されてもよい。ポリエーテルモノマーと架橋モノマーとの間での反応は発熱性であってもよく、モノマー間の反応が進んで、ポリエーテルネットワークポリマーが形成されるにつれて温度が上昇する。モノマー間の反応はガス状態の縮合生成物の生成を促進し得る。例えば、カルボン酸塩化物官能基とヒドロキシ官能基とを含むモノマー間の反応はガス状態での塩酸を生成することができる。ガス状縮合生成物はポリエーテルネットワークポリマーにて細孔を生じる。

#### 【0100】

一組の実施形態では、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは多孔性であってもよく、細孔は、約1nm～約3mmの範囲での平均細孔直径を有する。幾つかの実施形態では、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは、互いにつながった細孔を含む構造を有してもよい。

#### 【0101】

細孔は、モノマー組成物の重合の間にインサイチュで生成されるガス状縮合生成物の泡の周りで形を成すネットワークポリマーの結果として作出されてもよい。インサイチュで生成されたガスが、栄養素移動を可能にし、かつ、細胞増殖、組織浸透及び血管新生を可能にするのに十分に大きい細孔を含む多孔性構造を生成するために界面活性剤のような作用因子を使用する必要性を排除することができることは利点である。

#### 【0102】

細孔はまた、ポロゲンの使用を介してポリエーテルネットワークポリマーにて作出されてもよい。従って、多孔性の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーが望まれる幾つかの実施形態では、ポリマーを製造するのに使用されるモノマー組成物はさらに固形ポロゲンを含んでもよい。従って、ポリエーテルモノマーの架橋モノマーとの共有結合反応は、多孔性のポリエーテルネットワークポリマーを形成するようにポロゲンの存在下で起きる。ポロゲンを取り除いた後、多孔性のネットワークポリマーが得られる。ポロゲンはネットワークポリマーにて作出される細孔径に対してさらに大きな制御を提供するであろうから、ポロゲンを採用して多孔性のネットワークポリマーを形成するのは利点であり得る。

#### 【0103】

一実施形態では、モノマー組成物はさらにポロゲン粒子を含む。該粒子は、約50～1000µm、約100～700µm、又は約300～600µmからなる群より選ばれる範囲での粒径を有してもよい。幾つかの実施形態では、ポロゲン粒子は水溶性である。一実施形態では、ポロゲン粒子は塩粒子である。塩粒子は一般に、好適な塩、例えば、塩化ナトリウムを含むであろう。塩粒子は、湿った環境で形成され得る溶融塩粒子であってもよい。溶融塩粒子を使用する利点の1つは、それらが大きな粒径（例えば、およそ100～700µm）の水溶性ポロゲン粒子を形成することができるということである。溶融塩粒子は、ポリエーテルネットワークポリマーにて互いにつながった細孔を形成するのも助けてもよい。

#### 【0104】

ポリマー形成の後、続いてポロゲン粒子を取り除いて、多孔性の架橋ポリエーテルネットワークポリマーを得てもよい。ポロゲン粒子は、ネットワークポリマーに適当な溶媒を導入し、次いでポロゲンを溶媒に溶解させ、それによってポリマーから絞り出すことにより取り除かれてもよい。ポロゲン粒子が水溶性である場合、粒子除去用の溶媒として水が

10

20

30

40

50

使用されてもよい。ポリエーテルネットワークポリマーは三次元で架橋された高分子構造であるので、溶媒には可溶性ではない。

【0105】

生分解性ポリエーテルネットワークポリマーはさまざまな溶媒にて一般に不溶性である三次元で架橋された高分子構造である。幾つかの実施形態では、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは選ばれた溶媒にて膨潤することが可能であってもよい。幾つかの実施形態では、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは水性溶媒にて膨潤することが可能である。これは、ネットワークポリマーの製造で採用されるポリエーテルモノマーの親水性の性質及び/又はネットワークポリマーの多孔性のせいでもよい。水性溶媒にて膨潤する際、ネットワークポリマーはゲルに似てもよい。その結果、そのような実施形態では、生分解性ポリエーテルネットワークポリマーはヒドロゲルであると見なされてもよい。

10

【0106】

多孔性ネットワークポリマーの細孔径は、機械特性に対して影響を及ぼすことができる。さまざまな方法条件によって異なる弾性率を持つ多孔性の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを作出することができる。多孔性を変化させることによって多孔性ネットワークポリマーの圧縮弾性率をテイラーメイドする可能性は、ネットワークポリマーの機械特性並びにネットワークポリマーによって製造される移植可能な器具及び足場材の特性がさまざまな組織型、例えば、脂肪、腎臓や前立腺の組織及び心筋に適合するように調整されるのを可能にすることになる。

20

【0107】

本発明の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーはさまざまな応用で使用されてもよい。

【0108】

ある1つの態様では、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含むインビトロの細胞培養基材が提供される。ある1つの形態では、該細胞培養基材がフィルム形状をなしている。フィルムは、ナノメートル範囲での細孔直径を持つ細孔を有するナノ多孔性フィルムであってもよい。ナノ多孔性フィルムは細胞増殖を支えるのに必要とされる栄養素及び流体の移動を可能にするであろう。

30

【0109】

もう1つの態様では、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材と、該基材に播種される細胞とを含む移植可能な器具が提供される。

【0110】

所望であれば、移植可能な器具は、特定の種類の細胞の成長又は増殖を促進する因子及び/又は他の生物学的な及び化学的な実体物も含んでもよい。

【0111】

ある1つの形態では、移植可能な器具は、被験体の眼に移植するための眼科用器具であり、かつ、細胞は角膜上皮細胞及び角膜内皮細胞からなる群より選ばれる。

40

【0112】

従って、幾つかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材と、該基材上に播種される角膜上皮細胞及び角膜内皮細胞からなる群より選ばれる細胞とを含む眼インプラントを提供する。

【0113】

眼インプラントの基材は好ましくは、可視光に対して98%を超える透明性を有し、かつ、フィルム形状をなしてもよい。ある1つの形態では、基材はナノ多孔性フィルム形状をなしてもよい。基材は、被験体の眼における所望の部位での器具の操作及び器具の移植を円滑にする好適な厚さであってもよい。基材の厚さは、生分解性ポリエーテルネットワ

50

ークポリマーを製造するのに使用されるモノマー組成物に存在するモノマーの量を変化させることによって調整されてもよい。一組の実施形態では、基材は、水和状態である場合、約10～150 μmの範囲での厚さを有する。ネットワークポリマーの機械特性が、ネットワークポリマーを用いて相対的に薄いフィルムを製造することが可能であるほどのものであるということは、本発明の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーの利点である。このことは、移植可能な器具における基材としてフィルムが使用される場合、フィルムが極めて低い侵襲性の外科処置で楽に使用することができるので、有益であり得る。

#### 【0114】

もう1つの態様では、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む足場材が提供される。幾つかの実施形態では、足場材は本明細書に記載されているような多孔スポンジ形状をなしている。以下でさらに議論されるように、足場材は、組織工学の応用、特に軟組織工学にて採用されてもよい。

#### 【0115】

本発明のもう1つの態様では、エステル結合を介して架橋されている多孔性の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するための方法であって、当該方法は、多官能性ポリエーテルモノマーと多官能性架橋モノマーを含むモノマー組成物を、エステル結合を介して架橋されているポリエーテルネットワークポリマーの形成を可能にし、かつ、前記ネットワークポリマー内部にて複数の細孔を生じさせるガス状縮合生成物のインサイチュでの生成を可能にする条件下で反応させる工程を含み、ここで、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの一方がヒドロキシ官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーの他方が前記ヒドロキシ官能基と反応してエステル結合を形成することが可能な相補的な官能基を含み、かつ、前記ポリエーテルモノマーと前記架橋モノマーより選ばれる少なくとも1つが分岐している、方法が提供される。

#### 【0116】

上記方法のある1つの形態では、インサイチュで生成されるガス状縮合生成物は、それが生じるにつれてポリエーテルネットワークポリマーを膨張させ、それによってネットワークポリマーの発泡を生じる。膨張した多孔性のポリエーテルネットワークポリマーは、ある1つの形態では、多孔スポンジに似てもよいし、又は多孔スポンジであってもよい。ポリマーのスポンジは生分解性であり、かつ、ポリエーテルモノマーと架橋モノマーとの間で形成されたエステル結合の結果、架橋されている。

#### 【0117】

多孔性の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するための方法の一組の実施形態では、ポリエーテルモノマーと架橋モノマーを含有するモノマー組成物を有限の空隙容量の容器にて反応させる。有限の空隙容量の容器は密封された反応容器であってもよい。有限の空隙容量の容器におけるモノマーの反応は細孔の径又は構造に影響を及ぼし得る。例えば、大きな有限の空隙容量の容器におけるモノマー組成物の反応は、同じモノマー組成物をさらに小さな有限の空隙容量の容器で反応させる場合に比べて、多孔性ポリエーテルネットワークポリマーにて大きな細孔を生成するであろう。細孔径の差異は、ガス状縮合生成物のインサイチュでの生成の結果生じる容器内の圧力に関係すると考えられる。細孔径における類似の変化は、モノマー組成物におけるモノマーの量を変化させることによって得ることができる。

#### 【0118】

多孔性の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを製造するための方法の他の実施形態では、モノマー組成物を無限の空隙容量の容器で反応させる。例えば、モノマー組成物を開放容器で反応させてもよい。この例では、得られる多孔性のポリエーテルネットワークポリマーは大きな細孔径を有するであろう。

#### 【0119】

モノマー組成物におけるポリエーテルモノマーと架橋モノマーの反応は、室温で又は温度を高めて進行されてもよい。

## 【 0 1 2 0 】

多孔性の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーの製造にて採用されるモノマー組成物は、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つのポリエーテルモノマー及び架橋モノマーを含んでもよい。

## 【 0 1 2 1 】

ある1つの形態では、ポリエーテルモノマーは複数個のヒドロキシ官能基を含み、かつ、架橋モノマーは複数個のカルボン酸ハロゲン化物官能基を含む。

## 【 0 1 2 2 】

特定の形態では、ポリエーテルモノマーは複数個のヒドロキシ官能基を含み、かつ、架橋モノマーは複数個のカルボン酸塩化物官能基を含む。そのような実施形態では、ヒドロキシ官能基とカルボン酸塩化物官能基が反応してエステル結合を形成する場合にインサイチュで生成されるガス状縮合生成物はガス状の塩酸 ( H C l ) である。

10

## 【 0 1 2 3 】

幾つかの実施形態では、多孔性の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーの製造で採用されるモノマー組成物はさらに、本明細書に記載されているような機械特性改質剤を含んでもよい。一組の実施形態では、モノマー組成物は、最大で20% ( w / w )、最大で15% ( w / w ) 及び最大で10% ( w / w ) からなる群より選ばれる量で機械特性改質剤を含んでもよい。

## 【 0 1 2 4 】

機械特性改質剤は疎水性高分子であってもよい。例となる疎水性高分子は、ポリエステルポリオール、例えば、ジヒドロキシポリ ( カプロラクトン ) である。一組の実施形態では、モノマー組成物は0 ~ 20% ( w / w )、0 . 1 ~ 15% ( w / w ) 及び約0 . 5 ~ 10% ( w / w ) からなる群より選ばれる量でポリエステルポリオールを含んでもよい。

20

## 【 0 1 2 5 】

幾つかの実施形態では、多孔性の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーの製造で採用されるモノマー組成物はさらに、ポロゲン、例えば、本明細書に記載されているようなポロゲン粒子を含んでもよい。一実施形態では、ポロゲン粒子は塩粒子、例えば、熔融塩粒子である。ポロゲンは、約50 ~ 1000  $\mu$ m、約100 ~ 700  $\mu$ m、又は約300 ~ 600  $\mu$ mからなる群より選ばれる範囲での粒径を有してもよい。ポロゲンは、ポリエーテルネットワークポリマーにおいてさらに大きな細孔を作出するのに役立ってもよく、かつ/又は、生成される細孔のサイズ及び構造を制御するのに役立ってもよい。

30

## 【 0 1 2 6 】

生分解性の多孔性ポリエーテルネットワークポリマーは、ポリエーテルモノマーと架橋モノマーとの間での反応の結果インサイチュで形成される互いにつながった細孔構造と、該反応から生じるガス状縮合生成物とを有してもよい。多孔性ネットワークポリマーを製造するのに使用されるモノマー組成物がポロゲンを含むのであれば、大きな細孔を有する互いにつながった細孔構造が作出されてもよい。

## 【 0 1 2 7 】

互いにつながっている流路と共に大きな細孔を含む互いにつながった細孔構造は、組織工学の応用に有利であってもよい。大きな細孔は、組織及び血管新生が浸透するのを可能にし、かつ、組織の増殖及び発達を促進するのを可能にする。しかも、互いにつながっている流路は、多孔性構造の中での細胞の移動、組織の拡張、及び血管系の形成のための手段を提供することができる。多孔性構造の互いにつながった性質は、細胞性の老廃物のクリアランスと同様に栄養素及び流体の輸送も可能にすることになる。

40

## 【 0 1 2 8 】

本明細書に記載されているポリエーテルネットワークポリマーは、生体適合性で、かつ、生分解性のポリマーが望まれるさまざまな応用での使用に好適である。

## 【 0 1 2 9 】

生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは、インビトロ及びインビボで非毒性及び最小免疫原性と共に優れた機械特性及び分解特性を示す。これらの特徴によって結局のと

50

ころ、ネットワークポリマーが組織工学応用における足場材として、かつ、細胞培養及び移植可能な器具のための基材として使用するのに優れた候補であることが可能になる。ポリエーテルネットワークポリマーの生分解性は、外来性の材料が移植部位に蓄積しないことを意味し、そうして、これにより、周囲の組織が本来の構造に戻るのを可能にする。

#### 【0130】

本発明はさらに被験体にて組織を再生する方法であって、当該方法が、被験体の所望の部位に、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む足場材を移植する工程を含む、方法を提供する。一組の実施形態では、組織は脂肪組織であり、かつ、足場材は被験体の胸部領域に移植される。足場材は、組織の再生が望まれる再構成処置又は美容目的の処置にて使用することができる。

10

#### 【0131】

本発明は、さらに、細胞培養方法であって、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材に細胞培養条件下で細胞を接触させる工程を含む方法を提供する。方法は、細胞培養で増殖することが可能である増殖性細胞と共に使用されてもよい。方法の一組の実施形態では、細胞は内皮細胞及び上皮細胞、特に角膜内皮細胞及び角膜上皮細胞からなる群より選ばれる。

#### 【0132】

本発明は、さらに、移植可能な器具を製造するための方法であって、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材に細胞を提供する工程と、当該基材に細胞を播種する工程とを含む方法をさらに提供する。ある1つの形態では、該器具は被験体の眼に移植するための移植可能な眼科用器具であり、かつ、該細胞は、角膜上皮細胞及び角膜内皮細胞からなる群より選ばれる。

20

#### 【0133】

本発明は、さらに、被験体における障害又は状態の治療のための方法であって、当該方法が、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つに係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材と当該基材上に播種された細胞を含む移植可能な器具を提供する工程と、当該器具を被験体の治療が望まれる部位に移植する工程とを含む、方法をさらに提供する。幾つかの実施形態では、病気又は障害は角膜内皮機能障害であり、かつ、上記方法は、被験体の眼に眼インプラントを移植する工程を含み、当該眼インプラントは、本明細書に記載されている1以上の実施形態に係る生分解性ポリエーテルネットワークポリマーを含む基材と、基材上に播種された角膜内皮細胞とを含む。本発明者らは、角膜透明性は、眼インプラントによって数週間にわたって有利に維持され得ることを観察している。

30

#### 【0134】

本発明のポリエーテルネットワークポリマーは、生物学的環境にて分解することが可能であり、かつ、非毒性の分解副産物を生じることが可能である。生分解の速度は数日から数週で変化してもよく、ポリエーテルネットワークポリマーにおける不安定なエステル結合の量を変化させることによって調整することができる。幾つかの実施形態では、ポリエーテルネットワークポリマーの分解は約2週間から約20週間の時間で起き得る。

#### 【0135】

40

幾つかの実施形態では、ポリエーテルネットワークポリマーの生分解性は、ネットワークポリマーの形態を調整することによって改変されてもよい。例えば、多孔スポンジの形態でのポリエーテルネットワークポリマーは、生物学的環境にさらすことができるさらに大きな表面積を提供するポリマーの多孔性構造の故にさらに速い分解速度を示してもよい。

#### 【0136】

本発明の生分解性ポリエーテルネットワークポリマーは、生体適合性であり、非毒性で、かつ、最小免疫原性であることが分かっている合成ポリマーである。ネットワークポリマーの分解性、機械特性及び透過性を制御する能力によって、これらのポリマーが再生医療及び組織工学の応用のために多用途の基材及び足場材に製作されるのが可能になる。

50



## 【 0 1 3 7 】

以下の実施例は、本発明の範囲を説明し、再現及び比較を可能にするように意図される。それらは、本開示の範囲を限定することを決して意図するものではない。

## 【実施例】

## 【 0 1 3 8 】

[ 生分解性ポリ ( エチレングリコール ) ( PEG ) フィルム ]

## 【 0 1 3 9 】

< 材料 >

## 【 0 1 4 0 】

グリセロールエトキシレート ( $M_n$  約 1 kDa)、塩化セバコイル ( 95 % )、リン酸緩衝化生理食塩水 ( PBS ) 錠剤、 $\epsilon$ -カプロラクトン ( 97 % )、2, 2'-ジチオジエタノール ( 90 % )、オクタン酸第一スズ ( 約 95 % )、トルエン ( 無水、99.8 % )、Costar 超低結合プレート、インスリン、トランスフェリン、セレンウム、4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール ( DAPI ) 蛍光染色、Triton X-100、及びデキストラン  $M_r$  約 500000、グルコースアッセイキット ( Sigma、GAGO-20: グルコースオキシダーゼ / ペルオキシダーゼ試薬及び O-ジアニジン二塩酸塩 ) 及びウシ由来のアルブミン-フルオレセインイソチオシアネート抱合体 ( アルブミン-FITC ) は Sigma-Aldrich から入手し、受け取ったまま使用した。Dulbecco の改変イーグル培地 ( DMEM )、ウシ胎児血清 ( FBS )、L-グルタミン、トリプシン-EDTA ( 0.05 % )、トリパンプルー ( 0.4 % ) 及びペニシリン-ストレプトマイシンは GIBCO から入手した。細胞生存率アッセイでの使用の前に、DMEM を 10 % v/v の FBS、1 % v/v の L-グルタミン及び 1 % v/v のペニシリン-ストレプトマイシンで補完した。NUNC T225 カントネックのフラスコは Thermo Fisher Scientific から入手した。Thermanox 組織培養用プラスチック ( TCP ) カバースリップは NUNC から入手した。Dulbecco の改変イーグル培地: 栄養混合物 F12 ( DMEM: F12 )、抗生剤-抗真菌剤、表皮増殖因子 ( EGF )、ウシ胎児血清 ( FCS )、Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG、トリプシン、及び EDTA は Invitrogen から入手した。マウスクローン M17-P5-F11 にて産生された抗-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPアーゼ ( 2-サブユニット ) モノクローナル IgG は Santa Cruz Biotechnology から入手した。マトリクス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分光分析 ( MALDI-TOF MS ) マトリクストランス-2-[3-(4-tert-ブチルフェニル)-2-メチル-2-プロペニリデン] マロノニトリル ( DCTB ) ( 99.0 ) 及びカチオン化剤 ( NaTFA ( 99.999 % ) ) は Aldrich から購入し、受け取ったまま使用した。テトラヒドロフラン ( THF ) ( Honeywell, 99.99 % )、D-グルコース ( 99.5 % )、ジクロロメタン ( 99.5 % ) は Chem-Supply から供給され、受け取ったまま使用した。細胞生存率アッセイのための Cell titer Aqueous One 溶液は Promega から入手し、受け取ったまま使用した。

## 【 0 1 4 1 】

< ,  $\epsilon$ -ジヒドロキシルポリカプロラクトン ( 機械特性改質剤 ) の合成 >

## 【 0 1 4 2 】

$\epsilon$ -カプロラクトンの開環重合 ( ROP ) を介して ,  $\epsilon$ -ジヒドロキシルポリカプロラクトン ( ジヒドロキシ PCL ) を製造した。 $\epsilon$ -カプロラクトン ( 20.0 g、175 ミリモル ) と 2, 2'-ジチオジエタノール ( 1.08 g、7.00 ミリモル ) とオクタン酸第一スズ ( 0.95 g、2.34 ミリモル ) を無水トルエン ( 45 mL ) に溶解し、アルゴンのもとで 110 ° で 24 時間加熱した。混合物を室温に冷却し、THF ( 50 mL ) で希釈し、冷メタノール ( -18 °C、1 L ) 中にて沈殿させた。濾過により沈殿物を回収し、真空 ( 0.1 ミリバール ) で乾燥させて白色粉末として ,  $\epsilon$ -ジヒドロキシル PCL を得た。18.8 g ( 94 % ) ;  $M_n$  ( NMR ) = 3.2 kDa,  $M_n$  ( MALD

10

20

30

40

50

I T o F ) = 3 . 3 k D a ( P D I = 1 . 0 7 ) 。

【 0 1 4 3 】

< 生分解性 P E G フィルムの製造 >

【 0 1 4 4 】

所望の量のジヒドロキシ P C L (それぞれ 5 w t % 又は 1 0 w t % の P C L 含量) をジクロロメタン ( D C M ) ( 1 5 m L ) に溶解した。グリセロールエトキシレート ( 0 . 7 0 ミリモル) と塩化セバコイル ( 1 . 4 2 ミリモル) をジヒドロキシ P C L 溶液に加え、それを十分に混合し、時折攪拌しながら、室温で 1 時間静置した。P C L を含まない試料も製造した。P E G フィルムを製造するのに使用したモノマー溶液を表 1 に詳述する。

【 0 1 4 5 】

【表 1】

実施例 番号	グリセロール エトキシレート (mL)	塩化セバコイル (mL)	ジヒドロキシ PCL(g)	PCL含量 (wt%)
1	0.62	0.30	0.0	0
2	0.62	0.30	0.052	5
3	0.62	0.30	0.104	10

【 0 1 4 6 】

それぞれの容量 ( 7 . 5 m L ) の上記モノマーをガラス製のペトリ皿 ( 直径 1 0 c m ) にてピペットでかき混ぜた。各皿を次いで 6 0 〃 の真空オープンに 2 0 分間入れ、その後、真空 ( 2 0 ミリバール) を適用した。さらに 3 0 分後、皿を取り出し、室温に冷却した。フィルムの周囲に外科用メスで刻み目を入れ、ペトリ皿に脱イオン水を満たした ( 2 0 m L ) 。 1 5 分後、水を取り除き、1 : 1 の T H F : 脱イオン水 ( 4 0 m L ) を加えた。フィルムをペトリ皿表面から剥離し、水 ( 2 5 0 m L ) に入れた。1 5 分ごとに水を新鮮な水と交換し ( 2 5 0 m L で 3 回 ) 、真空下 ( 2 0 ミリバール、3 0 〃 ) でフィルムを 2 4 時間乾燥させた。乾燥させたフィルムはさらなる使用までデシケータにて保存した。

【 0 1 4 7 】

環境走査電子顕微鏡 ( E n v i r o - S E M ) 及びスペクトル反射解析を用いて架橋 P E G フィルムの厚さを測定した。水和フィルムはおよそ 5 0 μ m の平均厚さを有すると測定された。

【 0 1 4 8 】

フィルムの薄さ及び成形条件 ( 2 0 ミリバール、6 0 〃 ) の結果、成形工程の間に揮発性溶媒ジクロロメタン及び形成された H C l ガスは容易に取り除かれる。その後、洗浄及び水によるヒドロゲルフィルムの膨潤を行って H C l の完全な除去を確保した。テトラヒドロフラン ( T H F ) による水の置き換えによって、フィルム内での水と T H F の間での溶媒交換が可能になり、かつ、その結果生じる膨潤によってフィルムがペトリ皿表面から容易に剥離するのが可能になるが、それは乾燥状態では成形フィルムを損傷することなく達成することはできない。

【 0 1 4 9 】

< 平衡膨潤率及び接触角の測定 >

【 0 1 5 0 】

膨潤特性を観察するために、上記で製造した P E G フィルムを 1 × P B S にて 2 4 時間膨潤させた。方程式 % E S R = ( ( W <sub>s</sub> - W <sub>d</sub> ) / W <sub>d</sub> ) × 1 0 0 % ( 式中、W <sub>s</sub> 及び W <sub>d</sub> はそれぞれ、膨潤重量及び乾燥重量を指す ) を用いて、さまざまなフィルムの平衡膨潤率 ( % E S R ) を算出した。解析は各種フィルムについて 3 つ組で行い、結果を平均した

。

## 【0151】

水接触角の測定は、Data PhysicsのOCA20張力計で実施した。測定は、0、5 wt %及び10 wt %のPCL含量を伴った完全に膨潤したフィルムにて液滴法（10  $\mu$  lの液滴）を用いてOCAソフトウェアで記録された。測定は、フィルム表面に水滴を載せた60秒後に行った。

## 【0152】

上記実験の結果を表2にて示す。

## 【0153】

## 【表2】

10

試料	PCL含量(%)	%ESR	接触角(度)
実施例1	0	118 $\pm$ 4	44 $\pm$ 0.4
実施例2	5	109 $\pm$ 5	58 $\pm$ 0.7
実施例3	10	100 $\pm$ 4	67 $\pm$ 0.4

## 【0154】

表2に示すように、PCL含量が増加する（0、5及び10 wt %）のに伴ってフィルムの%ESRはやや低下した（それぞれ118、109、100 %）。これは、PEGフィルムの膨潤能を低下させる疎水性PCL成分の撥水効果の結果である。上昇するPCL含量はまた、それぞれ44°から58°及び67°への接触角の増大ももたらすということは、PEGフィルムの疎水性の軽い上昇を示している。

20

## 【0155】

<光線透過率の評価>

## 【0156】

水和PEGフィルムを1  $\times$  PBS溶液に1時間入れ、次いでUV-Vis評価に供した。紫外光及び可視光のスペクトル（290～750 nm）についてフィルムの透過率を25で記録した。結果は、0 %、5 %及び10 %のPCLを含有するPEGフィルムがすべての波長（400～700 nm）で可視光線の>98 %を透過することができることを明らかにした。

30

## 【0157】

<引張の評価>

## 【0158】

引張試験を行ってさまざまな量のPCL（0、5及び10 wt %）で製造したPEGフィルムの引張能を測定し、ヒトの角膜との比較を可能にした（表3）。脱水したフィルムを1  $\times$  PBSで膨潤させ、引張特性の評価のために2  $\times$  2 cmのゲージ領域と2 cmのタブを伴った犬用の骨（ドッグボーン型）の形状に切断した。Instronマイクロテスターの金属クランプの中で木製タブの間にフィルムを固定し、フィルムのズレ及び押さえる部分での引裂きを防いだ。引張試験に先立って応力の前提条件についてフィルムを調整しなかった。フィルムの引張の評価は1  $\times$  PBS溶液にて35で温度を制御したマイクロテスターの水槽において実施した。各種類のフィルム（0、5又は10 wt %のPCL）で最低3回繰り返して調べた。クランプで固定した試料を0.1 mm / 秒の速度で50 Nのロードセルにてゲージ領域でのフィルムの破損が生じるまで引っ張った。ゲージ領域内で破損しなかったフィルムは生データの複雑さのために無視した。Bluehillソフトウェアから得たデータをグラフ作成とカギとなるパラメータ、例えば、最終的な引張応力 / 張力及び引張弾性率の決定のためにOrigin Pro 7.5ソフトウェアにエクスポートした。結果を表3にて要約する。

40

## 【0159】

50

【表 3】

試料	PCL含量 (wt%)	極限応力 (MPa)	極限張力%	引張弾性率 (MPa)
実施例1 (0% PCL)	0	1.5 ± 0.2	33 ± 5.0	3.3 ± 0.6
実施例2 (5% PCL)	5	3.7 ± 0.7	71 ± 17	3.8 ± 0.8
実施例3 (10% PCL)	10	5.2 ± 0.2	61 ± 3.0	6.3 ± 0.8
ヒト角膜	--	3.3 ± 0.2	60 ± 15	15.9 ± 2.0
デスメ膜	--	0.3 ± 0.01	1.7 ± 0.2	2.6 ± 0.4

10

## 【0160】

上記の結果から、疎水性PCLの添加は得られたPEGフィルムの機械特性を改善することができることを示している。さらに、0及び5wt%PCL含量のPEGフィルムは、デスメ膜に匹敵する引張弾性率を示し、それは、角膜内皮細胞の再生のための移植可能な器具を開発する場合、役に立ち得る。

20

## 【0161】

<インビトロの分解試験>

## 【0162】

0、5及び10%PCL含量を伴った水和フィルムを2×2cm四方に切断した。5分間隔にて水(20mL)で3回洗浄した後、40℃にて真空(20ミリバール)で24時間フィルムを乾燥させた。乾燥させたフィルムを秤量し、バイアル(28mL)に移し、1×PBS(20mL)を加えた。その後、角膜前房の自然温度である35℃で温度制御したオービタルシェーカーに容器を入れた。フィルムを伴った3つの容器を1、2、4及び8週目の時点でオービタルシェーカーから取り出した。取り出したフィルムを時折穏やかに撹拌しながら15分間水(20mLで3回)で洗浄し、40℃にて真空(20ミリバール)で24時間乾燥させた。乾燥させたフィルムを秤量し、時間に対して質量をプロットしてフィルムの分解プロフィールを得た。0%、5%及び10%のPCL含量を持つフィルムの分解の程度の計算は、8週目にてそれぞれ約24%、15%及び10%の質量損失を示した。結果を図2に示す。

30

## 【0163】

<PEGフィルムのインビトロでの透過性の評価>

## 【0164】

5mLのセル容量を持つサイドバイサイド型拡散セル(米国ペンシルベニア州ベスレハムのPermeGear)にてグルコース及びアルブミンの拡散性測定を行った。フィルム(5wt%のPCL)を拡散セル間に配置し、きつく締めて漏出を防いだ。グルコースの測定については、一方のセル(供給源)をグルコースのPBS溶液(0.05g/mL、4mL)で満たし、他方のセル(標的)をPBS緩衝液(4mL)のみで満たした。アルブミンの測定については、アルブミン-フルオレセインイソチオシアネート抱合体(アルブミン-FITC)のPBS溶液(50μM、4mL)を供給源セルに入れ、PBS緩衝液を標的セルに入れた。グルコース及びアルブミン双方の測定について、各セルにて磁気撹拌しながら、チャンバーを35℃で維持した。設定した時間(30、45、60、80及び100分)にアリコート(2mL)を標的セルから取り出し、PBS(2mL)で

40

50

置き換えた。グルコースの測定については、グルコースアッセイキット (Sigma GAGO-20: グルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ試薬及びジヒドロ塩化O-ジアニシジン試薬) を用いて分光光度分析用に試料を調製し、島津UV-1800分光光度計を540 nmで用いて分析した。アルブミンの測定については、島津UV-1800分光光度計を用いて495 nmでのアルブミン-FITCの吸光度を測定した。

#### 【0165】

インビトロの透過性試験は、5% PCLを伴ったフィルムがグルコース及びアルブミンについてそれぞれ  $2.3 (\pm 0.3) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{秒}$  及び  $1.0 (\pm 0.2) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{秒}$  の拡散性を有することを示した。比較すると、文献の報告は、ヒト角膜がそれぞれ  $2.6 (\pm 0.3) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{秒}$  及び  $1.0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{秒}$  のグルコース及びアルブミンの拡散性を有することを示唆している (Rafat M, Li F, Fagerholm P, Lagali NS, Watsky MA, Munger R, Matsuura T, Griffith M “角膜組織工学のためのPEGで安定化したカルボジイミド架橋のコラーゲン-キトサンヒドロゲル” *Biomaterials*, 2008; 29: 3960-3972)。インビトロの拡散性試験は、PEGフィルムが、例えば、ヒト角膜のような組織の生存及び機能にとって重要である大分子及び小分子双方に対して透過性であることを実証している。

#### 【0166】

< PEGフィルムのインビトロの細胞毒性の評価 >

#### 【0167】

フィルムの細胞毒性を評価するために、脱水したフィルム (5 wt % の PCL、100 mg) を 80 % v / v エタノール溶液に 30 分間入れた。次いでフィルムを洗浄し、10 分間隔で無菌の PBS にて再水和した (20 mL で 3 回)。その後、再水和したフィルムを無菌の補完 DMEM (2 mL) に入れ、その後 37 °C で 72 時間インキュベートした。溶液からフィルムを取り出し、馴化培地を細胞生存率アッセイに使用した。細胞の生存率に対するフィルム分解生成物の影響を検討するために、脱水フィルム (500 mg) を 1 M の HCl (5 mL) で 30 分間にわたって分解させた。真空中で溶液を濃縮し、残留物を水で共沸させ (20 mL で 5 回)、次いで真空 (0.1 ミリバール) で乾燥させた。分解生成物 (100 mg) を無菌の DMEM (2 mL) に溶解した。次いで、毒性試験における使用に先立って、溶液を紫外光のもとで 30 分間滅菌し、0.22 µm のナイロンフィルターを介して濾過した。T225 フラスコにて補完された DMEM 中で 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> の雰囲気中で 95 ~ 100 % の湿度で NIH 3T3-L1 細胞を集密まで増殖させた。0.05 % トリプシン-EDTA (GIBCO) を用いて細胞をトリプシン処理し、生/死の染色としてトリパンブルーを用いて手動で数を数え、新鮮な培地で希釈して  $1.25 \times 10^5$  個 / mL の播種密度を得て、それを 96 穴プレート (80 µL / ウェル) に入れた。一部のウェルはブランクのままにして細胞 / ブランクコントロールとして役立てた。フィルムで馴化した培地及びフィルム分解生成物溶液の添加に先立ってプレートを 4 時間インキュベータに戻した。調製したストック溶液 (500 mg / mL) を、新鮮な完全培地を用いて 10 倍で 2 回希釈した。20 µL のストック溶液及びその 2 つの希釈を 3 つ組で 96 穴プレートに加え (100、1000 及び 10000 ppm の濃度を得て)、プレートの攪拌揺動運動によって穏やかに混合し、次いでプレートをインキュベータに戻し、さらに 72 時間インキュベートした。その後、Cell titer Aqueous One 溶液をプレートに加え (20 µL / ウェル)、プレートを穏やかに揺り動かして混合を促進し、次いで 30 分間 ~ 4 時間インキュベータに戻した。周期的な間隔で、マイクロプレートリーダーを装備した Cary 50 Bio 紫外-可視分光光度計を用いて 490 nm 及び 700 nm にてプレートの紫外光-可視光の吸光度を読み取った。約 2 時間のインキュベートの後、溶液の色は平衡化した。490 nm での吸光度の値をバックグラウンドの吸光度 (700 nm) 及び培地のみ (細胞 / ブランクコントロール) の吸光度について補正し、次いで増殖コントロールに対して基準化した。

#### 【0168】

さまざまな濃度（100、1000及び10000 ppm）のPEGフィルムで馴化した培地及び分解生成物の存在下で72時間細胞をインキュベートした後、図3（a）及び（b）にて見られるように最小毒性が認められた。

#### 【0169】

分解生成物（加速された酸触媒の加水分解を介して得られた）の存在下では、10000 ppmの極度に高い濃度においてさえ、細胞はコントロール（分解生成物なし）に比べて生存可能のままであり、かつ、代謝上活発であり続けた（図3（b））。エステル結合の加水分解を介したPEGフィルムの分解は、PEG、セバシン酸及び6-ヒドロキシヘキサン酸（PCLの分解に由来する）のような毒性の低い化合物を生じる。

#### 【0170】

PEGフィルムで馴化した培地に関して、100 ppm及び1000 ppmの濃度では細胞の生存性及び代謝活性に対して否定的な効果は認められなかった。10000 ppmの非常に高い濃度では細胞の代謝活性にて軽度の低下が認められたが（図3（a））、このデータの標準偏差は十分にコントロールデータの範囲内にあり、統計的に無視できると見なすことができる。細胞毒性試験の結果は、PEGフィルム及びそれらの分解生成物が、細胞の増殖を損傷せず、かつ、無害であり、このことは、それらが、組織再生のための及び移植可能な基材としての好適な構築基盤になることを示唆している。

#### 【0171】

<角膜内皮細胞（CEC）の採取及びインビトロでのPEGフィルム基材の細胞播種>

#### 【0172】

脱水したフィルム（5 wt %のPCL）をPBS（20 mL）で再水和し、丸穴穴開け機を用いて円板状（直径16 mm）に切断した。その後、フィルムを80 % v / vのエタノール（20 mL）に1時間入れた。次いで15分間隔で無菌PBS溶液にてフィルムを洗浄した（20 mLで3回）。次いでフィルムを24穴プレートに入れ、フィルムの上に無菌のガラスリング（外径15 mm）を置いた。フィルムを含有するウェルにPBS（2 mL）を加え、細胞培養試験に先立ってウェルプレートを冷蔵庫にて8 で保存した。細胞培養試験に先立ってフィルムにて表面修飾もタンパク質抱合も行わなかった。

#### 【0173】

ヒツジの角膜内皮細胞（CEC）をインビトロの細胞播種試験のために選んだ。メリノ種のヒツジの新しく捕集した実験死体に由来する眼球をプロピオジン（1：50、8分）、メタノール（20 % v / v、60秒）、過酢酸（0.1 % v / v、5分）及び抗生剤 - 抗真菌剤を伴ったPBSで洗浄した。次いで角膜を切り離し、薄化（thinning）培地（1：1のDMEM：F12、インスリン（0.5 µg / mL）、トランスフェリン（0.275 µg / mL）、セレニウム（0.25 ng / mL）、EGF、2 % FCS、抗生剤 - 抗真菌剤及びデキストラン）に16時間移した。デスメ膜を角膜組織から切り離し、コラゲナーゼ（2 mg / mL）で60分間、及びトリプシン（0.05 %） / EDTA（0.02 %）で5分間処理した。次いで試料におけるデスメ膜を小片に切断し、粉碎して単個細胞浮遊液を作製し、その後、脱細胞化したデスメ断片を取り出した。角膜培地（1：1のDMEM：F12、インスリン0.5 µg / mL、トランスフェリン0.275 µg / mL、セレニウム0.25 ng / mL、EGF、10 % FCS、及び抗生剤 - 抗真菌剤）におけるフィルム又はThermanox組織培養プラスチック（TCP）カバースリップの上に50000個の細胞を播種した。標準の条件下（37、5 % CO<sub>2</sub>）にて細胞培養を行った。

#### 【0174】

免疫蛍光試験については、ヒツジの角膜から切り離したデスメ膜を陽性コントロールとして用いた。試験試料は、フィルム上で培養したヒツジのCECだった。試料はすべて4 % パラホルムアルデヒド（PFA）で10分間固定し、その後PBSで洗浄し、使用まで4 で保存した。免疫蛍光法は以下のように行った。0.3 % Triton X - 100で15分間試料を透過処理し、その後PBSで洗浄した。3 % の正常ヤギ血清で30分間ブロッキングを行った。加湿チャンバーにて2時間、PBS中の一次抗体（抗Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>

10

20

30

40

50

A T P アーゼ I g G 抗体)とともに試料をインキュベートした。陰性コントロールは一次抗体を含まずにインキュベートした。P B S による洗浄の後、試料を二次抗体と共に1時間インキュベートした(A l e x a F l o u r 4 8 8)。P B S による洗浄の後、試料を4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール(D A P I)と共に5分間インキュベートした。最後のP B S による洗浄の後、試料を水性媒体と合わせた。O l y m p u s B X 6 1 を用いて画像を得た。

#### 【0175】

コンピュータを使った立体画法断層撮影法(C A S T、O l y m p u s)を用いてヘマトキシリン標識した核から細胞密度を測定した。比較のために、新しく切り離したヒツジの角膜の細胞密度を位相差顕微鏡によって測定した(L i o n s E y e D o n a t i o n S e r v i c e, C E R A)。

10

#### 【0176】

< P E G フィルムを伴った基材上でのインビトロのC E C の付着及び増殖 >

#### 【0177】

培養したC E C は図4(a)及び(b)で見られるようにその天然のインビボでの多角形の形態を保持した。P E G フィルム基材上で培養した細胞のC A S T による計数によって3150細胞/mm<sup>2</sup>の細胞密度が得られた(標準誤差 = 459、n = 4)。この細胞密度はスペキュラーマイクロスコープによって測定したヒツジC E C のインビボのそれである3150細胞/mm<sup>2</sup>(標準誤差 = 88、n = 3)と同一である。免疫蛍光法は、培養した細胞がNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>A T P アーゼに対して陽性であることを示している。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>A T P アーゼはポンプ機能の調節因子であり、C E C のマーカーとして使用されている。C E C の外側末端部でのNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>A T P アーゼの観察は完全なままのポンプ機能を示している。ヒツジC E C はP E G フィルム基材上で容易に増殖した。P E G フィルムは、例えば、コラーゲンやR G D のような付着リガンドを抱合しないでC E C の付着及び増殖を支えることが可能だった。14ヵ月齢の老齢のメリノ種のヒツジに由来する角膜における3150細胞/mm<sup>2</sup>(S E M 88、n = 3)の密度と比べて、フィルム上で培養した細胞は3150細胞/mm<sup>2</sup>(S E M 459、n = 4)の細胞密度を提供した。これらの細胞密度は健常なヒト角膜のそれに匹敵し、眼球提供事業の品質管理基準(一般に>2500細胞/mm<sup>2</sup>)には十分である。

20

#### 【0178】

< インビボでの毒性及び免疫応答の評価 >

30

#### 【0179】

穴開け機を用いて水和フィルム(5wt%のP C L)を円板状(直径10mm)に切断し、40℃で24時間乾燥させ、二重試料バッグに封じ込めた。S t e r i t e c h (オーストラリア、ビクトリアのD a n d e n o n g)にて25kGyの最少線量でフィルムを滅菌した。滅菌したフィルムをフィルムのインビボでの毒性及び免疫応答の評価に使用した。

#### 【0180】

手順はすべてオーストラリアの国立保健医療研究審議会(N H M R C)の指針に従って実施され、メルボルン大学獣医学部動物倫理委員会によって認可された。外科的処置に先立って、メリノ種のヒツジ(n = 4)を24時間絶食させた。処置の1時間前に局所1%の硫酸アトロピン1滴と10%粘性塩酸フェニルエフリン1滴によって手術される眼の瞳孔を拡張させた。外頸静脈への静脈内での25mg/kgのチオペントンナトリウムによって麻酔を誘導し、2:1の空気/酸素にて1.5%のハロタンによる気道の挿管の後、維持した。眼科用スリットナイフを介して角膜に3mmのスリットを作り、微小鉗子を用いてフィルムを挿入した。フィルム挿入に先立って前房に作った切開を縫合し、ヒツジを回復させた。

40

#### 【0181】

手術に続いて、手で持って操作できるスリットランプを用いて2~3日ごとに角膜の形態を調べ、検証された形式を用いて清澄性、浮腫及び炎症の指標についてスコア化した。

50

具体的には、清澄性及び浮腫はそれぞれ 0 ~ 4 の尺度でスコア化し、0 は完全に透明（清澄性について）又は薄い（浮腫について）及び 4 は完全に不透明（清澄性について）又は最大に厚い（浮腫について）となる。

#### 【 0 1 8 2 】

移植の 2 8 日後、頸静脈内リーサバルブ注射を介してヒツジを安楽死させ、眼球を採取した。評価項目（エンドポイント）の組織学のために、組織を緩衝化ホルマリンで固定し、パラフィンワックスに包埋し、5  $\mu$ m で切断し、ヘマトキシリンとエオシン（H & E）で染色した。切片を調べて免疫反応、フィルムの分解、C E C 単層の維持及び小柱網の閉塞を見つけ出した。

#### 【 0 1 8 3 】

< 結果 >

#### 【 0 1 8 4 】

インビボの移植試験で使用した 5 w t % を伴った P E G フィルムは処置の間、その完全性を維持し、その弾性特性によって手術の全体を通して容易な取り扱いが可能になった。

#### 【 0 1 8 5 】

2 8 日間にわたるスリットランプでの観察では、試験（P E G フィルム - P H F と示した）角膜はその光学的透明性を維持し、コントロール角膜（P E G フィルムを含まない）に比べて視覚的に有意差は指摘されなかった。浮腫又は不透明性の証拠は観察されなかった。巨視的には、有害効果はスリットランプでの観察を介しては識別できなかった。微視的レベルで否定的な効果が生じたかどうかを見つけ出すために、組織学的な分析を行った。

#### 【 0 1 8 6 】

移植の 2 8 日後にヒツジの眼球を採取し、組織学的な評価のために準備した。切片作製及びヘマトキシリン & エオシン（H & E）による染色に続いて、コントロール角膜及び試験角膜の組織学的な分析は、ストロマ、デスメ膜及び角膜内皮の自然な形態を明らかにした（図 5）。P E G フィルムは毒性を持たずに一部の領域では角膜の内部表面に付着したことも観察された。C E C の上の角膜の内部表面への P E G フィルムの付着は、試験全体を通して角膜がその光学的な透明性を維持していたので、生来の C E C 機能を損なわなかった。フィルムの付着は、C E C がフィルムを横切ってポンプ作用し、かつ、角膜が角膜透明性を維持することを可能にするのに必要であるので、このことは有利である。それは、その付着によって外科医が所定の位置でインプラントを維持するのが容易になるので外科的処置についても有用である。

#### 【 0 1 8 7 】

< ヒツジのモデルにおける組織工学で作製した角膜内皮（T E C E）のインビボ安全性試験 >

#### 【 0 1 8 8 】

外科的方法を確立するための一連の予備実験の一部として、最初に内在性の O C E C を取り除かずに、1 匹の動物に組織工学で作製した角膜内皮（T E C E）（培養した同種のヒツジの角膜内皮細胞（O C E C）単層を伴った P E G キャリアフィルム）を移植し、5 1 日間（5 1 d）維持した。角膜は透明のままであり、浮腫は生じなかった。5 1 日目で毒性又は免疫拒絶の証拠はなかった。組織学によって眼球内でポリマーフィルムを見いだすことができなかったということは、5 1 日目までにそれが完全に生分解されたことを示している。

#### 【 0 1 8 9 】

< C E C 喪失のヒツジモデルの確立及び T E C E 移植による治療 >

#### 【 0 1 9 0 】

角膜内皮を手動ではぎ取ることによって角膜内皮細胞喪失のヒツジモデルを確立した。D S E A K 様の手順を用いて T E C E を移植することができた。T E C E は移植の容易さのための十分な引張強度を有し、角膜の後面に対して平滑かつ平坦に容易に広がった。D M E K ドナーはきつく巻き、角膜の後面に対して広げ、平坦に置くのが難しい。創傷上に

10

20

30

40

50



置かれた T E C E が存在しない状態での実験的角膜内皮喪失を伴った動物は治癒しない角膜浮腫を有した。T E C E を創傷領域に置くと、浮腫は弱まった。ストロマの傷による試験動物の角膜の小さな領域での軽い混濁（1 症例における観察及び組織学により確認された）。手術後 6 2 日間維持された動物では、組織学によって眼球内に P E G フィルムの痕跡が見いだされなかったということは、フィルムが前房内で完全に生分解することを裏付けている。

#### 【 0 1 9 1 】

[ 多孔性の生分解性ポリ（エチレングリコール）（ P E G ）スポンジ ]

< 材料 >

#### 【 0 1 9 2 】

ペンタエリスリトールエトキシレート（ $M_n$  約 7 9 7 D a）、塩化セバコイル（ 9 5 %）及びリン酸緩衝化生理食塩水（ P B S）錠剤は S i g m a - A l d r i c h から入手し、受け取ったまま使用した。D u l b e c c o の改変イーグル培地（ D M E M）、ウシ胎児血清（ F B S）、L - グルタミン、トリプシン - E D T A（ 0 . 0 5 %）、トリパンブルー（ 0 . 4 %）及びペニシリン - ストレプトマイシンは G I B C O から入手した。細胞生存率アッセイでの使用に先立って、1 0 % v / v の F B S、1 % v / v の L - グルタミン、及び 1 % v / v のペニシリン - ストレプトマイシンで D M E M を補完した。N U N C T 2 2 5 カントネックのフラスコは T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c から入手した。ジクロロメタン（ 9 9 . 5 %）、エタノール（未変性 1 0 0 %）、炭酸ナトリウム（ 9 9 . 2 %、無水）は C h e m - S u p p l y から入手し、受け取ったまま使用した。S e l l e y s Q u i c k F i x S u p a G l u e（シアノアクリル酸エチル / ポリ（メタクリル酸メチル））はオーストラリアの W o o l w o r t h s から入手した。細胞生存率アッセイ用の C e l l t i t e r A q u e o u s O n e 溶液は P r o m e g a から入手し、受け取ったまま使用した。

#### 【 0 1 9 3 】

< 多孔性の生分解性 P E G スポンジの製造 >

#### 【 0 1 9 4 】

ペンタエリスリトールエトキシレート（ P E）と塩化セバコイル（ S e b C l）を 1 : 2 のモル比（表 4 に示す量）でポリエチレンのバイアル（ 2 8 m L の総容量）にピペットで入れた。

#### 【 0 1 9 5 】

実施例 4 ~ 7 については、P E と S e b C l の容量（モノマー容量）を変化させて異なる前駆体占有容量（ % P O V）を得たが、それは容器の総容量の百分率として示される。実施例 8 ~ 1 1 については、モノマー容量を一定のままにしたが、さまざまな量のジクロロメタン（ D C M）を加えて % P O V を変化させた。次いでフタをきつく締めつけ、バイアルを直ちに 1 5 秒間ボルテックスした後、ドラフト装置の中に入れた。さらに 6 0 秒後、フタを外してドラフト装置にて 1 5 分間バイアルを放置した。実施例 1 2 は実施例 6 と同一であるが、ボルテックスの後、フタを外した。

#### 【 0 1 9 6 】

得られたスポンジをバイアルから取り出し、底の均一ではない区分を外科用メスで取り除いた。その後、スポンジを 3 0 m M の炭酸ナトリウム溶液（ 1 0 0 m L / スポンジ）に 1 時間入れて H C l を中和し、その後、脱イオン水に 3 0 分間浸した（ 2 0 0 m L で 3 回）。エタノールに 2 0 分間浸す（ 1 0 0 m L で 2 回）ことによってスポンジを脱水し、真空で 2 4 時間乾燥させ（ 3 0 、 2 0 ミリバール）、次いでさらなる使用までデシケータに保存した。

#### 【 0 1 9 7 】

10

20

30

40

【表 4】

実施例 番号	PE		SebCl		DCM (v/v %)	空隙 容量 (%)	前駆体 容量 (mL)
	容量 (mL)	物質質量 (mmol)	容量 (mL)	物質質量 (mmol)			
4	4.87	7.33	3.13	14.7	—	71.5	8
5	3.65	5.50	2.35	11.0	—	78.6	6
6	2.44	3.67	1.57	7.33	—	85.7	4
7	1.22	1.83	0.78	3.67	—	92.9	2
8	2.31	3.48	1.49	6.97	5	85.7	4
9	2.19	3.30	1.41	6.60	10	85.7	4
10	1.95	2.93	1.25	5.87	20	85.7	4
11	1.22	1.83	0.78	3.67	50	85.7	4
12*	2.44	3.67	1.57	7.33	—	—	4

\* ボルテックスの直後にフタを外した。

## 【 0 1 9 8 】

密封した容器での制約された容量の条件下におけるペンタエリスリトールエトキシレート（PE）と塩化セバコイル（SebCl）との間の反応は多孔ポリ（エチレングリコール）スポンジの形成を生じた。SebCl 架橋剤の酸塩化物基とPEのヒドロキシル末端基との間の反応は、エステル結合の形成と同時に塩化水素（HCl）ガスの放出をもたらした。反応は発熱性であり、非常に素早く気体としてHClを放出する。PEとSebClとの間での迅速な架橋反応の結果としてのHClガスの生成及び溶液の粘性の上昇の組み合わせは混合物の発泡を招き、ゲル化はボルテックスに続いて20秒以内に起きる（図6）。架橋及びゲルの形成は所定の位置でガス泡を捕捉し、互いにつながった多孔性のネットワークを生じる。

## 【 0 1 9 9 】

< 多孔性構造のSEM評価 >

## 【 0 2 0 0 】

多孔PEGスポンジを半分に切り、炭素タブに載せた。低真空条件下でFEI QuantafEG200E-SEMを用いて、さらされた内面を分析してスポンジの多孔性構造を観察した。ImageJ（米国、国立衛生研究所）ソフトウェアを利用して平均細孔径を測定した。結果を表5に示す。

## 【 0 2 0 1 】

【表 5】

多孔PEGスポンジの平均細孔径及び平均流路径

実施例番号	細孔径 ( $\mu\text{m}$ )	流路径 ( $\mu\text{m}$ )
4	571 $\pm$ 205	222 $\pm$ 81
5	908 $\pm$ 209	302 $\pm$ 90
6	1000 $\pm$ 433	445 $\pm$ 182
7	1387 $\pm$ 337	647 $\pm$ 226
8	965 $\pm$ 166	367 $\pm$ 91
9	940 $\pm$ 220	361 $\pm$ 143
10	—	—
11	—	—
12	1539 $\pm$ 297	632 $\pm$ 233

## 【0202】

S E Mによる評価の結果は、空隙容量、溶媒含量及び圧力解放が細孔の特質に影響を有することが分かることを示した。一般に、H C Lガス形成を伴った酸塩化物／アルコールの反応はS E M画像によって示されるように小さな丸みを帯びた流路を介して内部で接続される大きな丸みを帯びた細孔をもたらすことが観察された（図7）。大きな細孔は、発熱反応の間に核となり、そして、拡大するH C L気泡のせいで形成されるようである。架橋の間に拡大し、一緒につながる隣接H C L気泡の間での接触が、細孔間の互いにつながる流路をもたらす。これらの流路はその後、S E M画像から観察することができる多孔P E Gスポンジの相互接続性をもたらす。

## 【0203】

架橋反応の間のH C Lの放出は容器内での圧力増加をもたらす。さまざまな前駆体（モノマー）容量を調べる試験では、より大きな前駆体容量は、発砲の間でのH C Lガスの生成の上昇に伴ってそれぞれのその後、空隙容量を減らすようになることが観察された。さらには、前駆体量の増加のために、発熱反応の間に生成される熱も増加する。熱及び気体から生じる圧力増加を確保することは、溶液内でのH C L気泡の拡張に抵抗することになり、このことは、さらに小さな細孔径をもたらす。逆に、容量が少ないほど、さらに少ないH C Lが形成され、圧力増加がさらに小さくなる。このことは、気泡の拡張に対する抵抗がさらに小さくなり、その後、観察されるさらに大きな細孔と流路の形成につながる。

## 【0204】

モノマー組成物への溶媒の添加によって一定の空隙容量（85.7%）での細孔径分布に対する前駆体（モノマー）濃度の効果を調べた。従って、溶媒としてさまざまな量のジクロロメタン（DCM）（5、10、20及び50% v / v）を用いて実施例8～11を調製し、その原液相当物である実施例6と比較した。

## 【0205】

実施例8及び9については、溶媒の非存在下で調製した実施例6に比べて細孔径及び流路径の双方で軽い低下が認められた。実施例10及び11については、発泡は観察されず、多孔性ではない架橋ゲルが得られた。さらに低い前駆体濃度（さらに高い希釈）では、反応速度は、低下した温度変化速度から明らかなように低下する。同時にH C Lの形成速度も低下することになる。H C Lガスはさらにゆっくり生成されているので、気泡もさらに遅い速度で核となり、拡大し、これにより、実施例6に比べてさらに小さい細孔を生じる。DCM含量を20% v / v及び50% v / vに増加させたら、スポンジ形成はなかった。これらの低い濃度では、反応速度及びその後のH C L形成の速度はさらに低下する。結果的には、生成された熱及び気体は発泡させることなくさらに容易に消える。高めた反

応速度によるさらに高い濃度では、温度はさらに迅速に高められる。次いで温度のこの上昇は迅速な気泡の形成及び拡張をもたらす。

#### 【0206】

密封されない容器にて反応を行うことによって細孔径に対する開放環境の効果も調べた。得られたスポンジである実施例12は、拡張した細孔を伴った大きな開放細孔構造とあまり球形ではない形態を持つ流路を有することが分かった。これは、フタが密閉された場合に得られるさらに小さな流路と接続した大きな細孔の区分化された構造（実施例6）とは対照的な分岐するネットワークを形成するはるかに薄い壁を生じた。細孔径及び流路径にも有意な増大があった。フタの取り外しによって、容器で圧力を上昇させることなくH<sub>2</sub>C<sub>1</sub>ガスが自由に逃げるのが可能になる。従って、ガスの気泡は容易に拡張することができ、このことは、観察された大きな細孔径をもたらす。

#### 【0207】

全体としては、多孔PEGスポンジすべて（実施例9及び10を除く）の細孔の評価は高い相互接続性を持つ大きな細孔径を明らかにした。これは組織工学の応用に好適であり、それによって、大きな径の細孔は組織及び血管新生が容易に足場材に浸透するのを可能にすることになる。大きな細孔は組織の増殖及び発達に必要とされる空間を提供することになる一方で、互いにつながった流路は足場材の中での細胞の移動、組織の拡張及び血管系の形成のための手段を提供する。多孔PEGスポンジの高度に互いにつながった性質は細胞老廃物のクリアランスと同様に容易な栄養素及び流体の輸送も可能にすることになる。

#### 【0208】

< 機械的評価 >

#### 【0209】

従って、多孔PEGスポンジの移植可能な組織工学の足場材としての機械的完全性を、圧縮試験を介して検討した。試験に先立って多孔PEGスポンジを円筒状（直径 = 15 mm、高さ = 10 mm）に切断した。圧縮評価に先立ってスポンジを応力前提条件調整に供さなかった。Instronマイクロテスター5848（50 N負荷セル）の金属板の間に円筒状試料を置き、最大で80%張力の圧縮に供した。得られた応力対張力のプロフィールを用いて圧縮弾性率を決定した。結果を表6に示す。

#### 【0210】

#### 【表6】

多孔PEGスポンジの圧縮弾性率

実施例番号	圧縮弾性率 (MPa)
4	0.381 ± 0.05
5	0.212 ± 0.03
6	0.055 ± 0.01
7	0.044 ± 0.02
8	0.054 ± 0.01
9	0.022 ± 0.01
12	0.011 ± 0.01

#### 【0211】

実施例4～9及び12の機械的試験は、調べた多孔PEGスポンジすべてが80%の圧縮張力まで弾性変形を示し、元々の寸法に完全に戻る前に繰り返し圧縮することができることを明らかにした。例えば、最大80%の実施例5の反復圧縮は、圧縮粉砕が存在することなく同じ応力対張力のプロフィールを示した（図8（a））。

## 【0212】

その弾性特性に加えて、多孔PEGスポンジの圧縮特性に対する製作条件の影響を検討した。実施例4が約380kPaの最高の圧縮弾性率を有することが認められたのに対して、実施例5、6及び7の圧縮弾性率はそれぞれ低下した(図8(b)及び表6)。この傾向は前駆体容量が低下するにつれて得られる細孔径が大きくなることに起因し得る。さらに大きな細孔はさらに小さな細孔を持つ同じ容量の足場材と比べて容量当たりの足場材の材料を少なくすることにつながる。溶媒の存在下で製造された実施例8及び9もその原液の対応物(実施例6)に比べてやや低下した圧縮弾性率を示した。硬化過程の間での溶媒の添加は反応の速度を低下させるので、架橋密度を低下させ、圧縮弾性率を低下させるようになる。実施例12の圧縮評価は、調べた多孔PEGスポンジすべてのうちでそれが最も低い圧縮弾性率(0.011MPa)を持つことを示した。このことは、他の多孔PEGスポンジと矛盾せず、かつ、細孔径と圧縮弾性率の間での相関を示し、それによってさらに大きな細孔はさらに低い圧縮弾性率をもたらし、逆もまた同様である。実施例10及び11は、それらがSEMを介して測定されたように均一の多孔スポンジを形成しなかったもので機械的試験には供さなかった。

10

## 【0213】

多孔PEGスポンジについて得られた圧縮弾性率は、例えば、脂肪、腎臓、前立腺組織及び心筋のような組織についての範囲内にある。

## 【0214】

<インビトロでの分解試験>

20

## 【0215】

実施例5で脱水した多孔PEGスポンジの加水分解の分解率の指標を提供するために、試料を立方体(5×5×5mm)に切断し、秤量し、1×PBS(20mL、0.01% w/vのアジ化ナトリウム)に入れた。バイアルにキャップをして、温度を制御したオービタルシェーカー(37、100rpm)に入れた。各時点(1、2、4及び8週目)で3つの試料をオービタルシェーカーから取り出し、30分間脱イオン水に浸した(20mLで3回)。その後、エタノールに1時間浸し(20mLで2回)、次いで真空中で乾燥させる(60、24時間)ことによってスポンジを脱水した。次いでスポンジを秤量し、得られた質量値を時間に対してプロットして分解プロフィールを得た。

## 【0216】

インビトロでの分解試験は8週で約20%の質量損失を伴う線形の分解プロフィールを明らかにした(図9)。

30

## 【0217】

<多孔PEGスポンジ及び分解生成物のインビトロでの細胞毒性の評価>

## 【0218】

多孔PEGスポンジの細胞毒性を評価するために、脱水したスポンジ(100mg)を80% v/vエタノール溶液に30分間入れた。次いでスポンジを無菌PBSで30分間洗浄し(20mLで3回)、無菌DMEM(2mL)に入れ、37で72時間インキュベートした。次いで多孔PEGスポンジを取り出し、馴化培地を細胞生存率アッセイに使用した。細胞生存率に対する分解生成物の影響を検討するために、脱水したスポンジ(500mg)を1MのHCl(5mL)中で分解させた。HClを真空中で取り除き、残留物を水と共沸し(20mLで5回)、その後真空中で乾燥させた(0.1ミリバール、50、3時間)。分解生成物(100mg)を無菌のDMEM(2mL)に溶解/再懸濁し、紫外光照射のもとで溶液を30分間滅菌し、次いで毒性試験での使用に先立って0.22µmのフィルターを介して濾過した。T225フラスコにて95~100%の湿度の5% CO<sub>2</sub>の雰囲気中で37でのDMEM中でNIH3T3-L1細胞を集密まで増殖させた。トリプシン-EDTAを用いて細胞をトリプシン処理し、生/死の染色としてトリパンブルーを用いて手で数を数え、DMEMで希釈して1.25×10<sup>5</sup>個/mLの播種密度にし、96穴プレート(80µL/ウェル)に入れ、一部のウェルはブランクのままにして細胞ブランクコントロールとして役立てた。次いでプレートをインキュベータに4時

40

50

間入れ、その後、多孔PEGスポンジで馴化した培地又は分解生成物を加えた。製造したストック溶液(50 mg/mL)を、新鮮な培地を用いて2回10倍希釈した。その2回の希釈液の20 µLを3つ組で96穴プレートに加え(100、1000 ppmの濃度を得)、プレートの攪拌揺動運動によって穏やかに混合し、次いでプレートをさらに72時間インキュベータに戻した。3日間のインキュベータに続いてCell titer Aqueous One (CAO) 溶液をプレートに加えた(20 µL/ウェル)。プレートを穏やかに揺り動かして混合を促進し、次いで30分間~4時間インキュベータに戻した。マイクロプレートリーダーを備えたCary 50 Bio 紫外-可視分光光度計を用いて490 nm (CAO試薬の添加の際に代謝上活性のある細胞によって生成される生成物の吸光度)及び700 nmにて周期的な間隔でプレートの紫外光-可視光の吸光度を読み取った。普通、色はおおよそ2時間のインキュベータの後平衡化した。490 nmでの吸光度の値をバックグラウンドの吸光度(700 nm)及び培地のみ(細胞ブランクコントロール)の吸光度について補正し、次いで増殖コントロールに対して基準化した。

10

#### 【0219】

さまざまな濃度(100、1000 ppm)の実施例5の馴化培地の存在下での72時間のインキュベータの後、細胞生存率に対して最少限の影響が認められた(図10(a))。実施例5の100 ppmの分解生成物(加速された酸触媒の加水分解を介して得られた)の存在下で細胞の代謝活性に対する影響は認められなかった。しかしながら、1000 ppmでは、細胞の代謝活性の低下が認められたが、それは培地のpHを下げることになる、分解生成物中の高濃度のセバシン酸から生じると考えられる(図10(b))。分解生成物について採用された濃度は一例としてスポンジの完全な分解に基づくので、そのような高濃度はインビボでは見られないと予想される。

20

#### 【0220】

<多孔PEGスポンジのインビボでの評価>

#### 【0221】

皮下ポケットモデルを用いて実施例5をラットにおけるインビボアッセイに供した。移植された際、外力の結果としての圧縮破損にそれが耐えるのを可能にする、その高度に互いにつながった細孔構造、圧縮弾性率及び高い剛性の結果として試験には実施例5が選ばれた。

#### 【0222】

30

実施例5の試料を円板状(10×4 mm、直径×高さ)に切断し、線滅菌に先立って二重密封したジッパーの付いた袋の中のプラスチックのバイアルに入れた。オーストラリア、ビクトリアのSteritechで線滅菌を行った(最低25 kGy)。滅菌に続いて、移植の前にスポンジを1×無菌のPBSに3時間入れた。3つの時点で12匹のラットにスポンジを移植した。手順はすべてオーストラリアの国立保健医療研究審議会(NHMRC)の指針に従って実施され、メルボルンのSt. Vincent's病院の動物倫理委員会によって認可された。スプラグドローリー系のオスラット(The Animal Resources Centre (Murdoch, Western Australia)、体重350 g±50 g)を認可された施設で飼育し、標準のラット用の餌と水を自由摂取で与えた。抗生剤であるエンロフロキサシン(Baytril 50、Bay 40 er)を25.5 mg/kg/日の用量で手術の前2日間と手術後2日間飲水で投与し、傷の感染を回避した。手術については、イソフルランを用いて動物を麻酔し、麻酔状態で維持した。背面の皮膚で被毛を刈り、消毒し、正中に沿って約1.5 cmの長さで1.5 cm離して4つの別々の長手方向の切開を作った。主切開のいずれかの側で慎重な剥離によって各足場材用の個々の皮下ポケットを準備し、各ポケットにスポンジを挿入し、3-0のプロリーン縫合糸を用いて中心孔を介して周囲の筋膜に適所で係留した。傷クリップを用いて傷を閉じ、加熱パッド上で動物を30分間回復させた。移植に続いて2、8及び16週の期間の後、ラットを上記で記載したように麻酔し、元々の傷を再び開け、足場材及び周囲の組織を取り出し、次いでリーサバルブの心臓内注射によってラットを安楽死させた。取り出したスポンジを球状面に対して垂直で半分に切り、4%パラホルムアルデヒ 50

ド溶液で4 時間で48時間固定し、パラフィン処理まで処理した。処理の後、完全な断面及び周囲の組織を見て分析することができるよう外植片を包埋した。試料の中点を通して厚さ5  $\mu$ mの切片を切り、ポリリジンを被覆したスライドに載せた。切片をヘマトキシリンとエオシン(H & E)で染色し、マクロファージ及び巨細胞についてはED1に対する抗体を用いて免疫組織化学的に染色した。

#### 【0223】

2週目の摘出試料は、スポンジの組織への統合が明らかな、移植した多孔PEGスポンジの周りでの薄い繊維性カプセルの形成を示した(図11(d))。二等分後のスポンジの巨視的観察は、黄色の着色が認められ、それは分解過程を示し得たが(図11(e))、2週後のスポンジの大きさに関して最少限の変化があり、スポンジは無傷のままであり、明らかに眼に見えることを示した。パラフィン処理への処理に続いて、スポンジを切片にし、その後ヘマトキシリンとエオシン(H & E)で染色して多孔PEGスポンジへの細胞及び組織の浸透を観察した(図11(g)~(i))。染色した切片は、周りの組織からの密な細胞の及び高度に血管新生した組織のスポンジへの浸潤を示した。血管新生は、血管の位置を示す染色した赤血球から明瞭に見ることができる(図11(h)及び(i))。組織の大きな浸透があったとしても、切片の中央の空隙から明かなように、多孔PEGスポンジは2週目では組織によって完全に満たされることはなかった(図11(g))。多孔PEGスポンジの断片を、スポンジの細孔の壁の位置を示している染色した組織間でも見ることができた(図11(h))。

#### 【0224】

8週目での採取もまた、周辺組織への統合を伴った多孔PEGスポンジを取り囲む薄い繊維性カプセルを示した。2週目で採取した多孔PEGスポンジとは対照的に、二等分した外植片の巨視的分析は、均一な組織の完全な浸潤を明らかにした(図11(f))。移植片のサイズにも最少限の変化も認められたということは多孔PEGスポンジが収縮することなくその完全性を維持したことを示している。2週目の切片とは対照的に、8週目の切片のH & E染色は、多孔PEGスポンジが右から中心まで血管新生した組織で完全に満たされることを明らかにした(図11(j))。8週後に存在する組織は、2週目で存在する密な細胞性組織ではなく、緩んだ結合組織であることも言及された(図11(k)、(l))。スポンジが統合した組織内で見られる血管系は、多孔PEGスポンジが細胞と共に播種されなかった又はバイオ因子を負荷されなかったので、周辺組織に由来する新生血管系の誘導による可能性が最も高い。足場材の多孔性構造内におけるそのような血管新生は再生組織の増殖及び生存に極めて重要である。

#### 【0225】

完全な組織浸潤は、多孔PEGスポンジの孔の高度に互いにつながった性質を明らかにしている。多孔PEGスポンジに細胞は播種されず、かつ、バイオ因子は組み入れられなかったので、多孔PEGスポンジ内で発達した組織は周辺組織から浸潤したにちががなく、従って2週目までの細胞及び血管組織の浸透並びに8週目までの完全な浸潤は、細胞組織及び血管新生に対する多孔PEGスポンジの浸透性を実証している。従って、多孔PEGスポンジは、細胞及び血管の統合に好適である3D環境を提供して、浸潤組織の生存を保証することができる。

#### 【0226】

16週目では、インプラントの回収は、インプラントを探すことが非常に難しいことを巨視的に明らかにした。2週目及び8週目とは対照的にインプラントの突出の証拠がなかった。代わりに、多孔PEGスポンジの位置はそれらを所定の位置に固定するように元々使用された縫合糸の存在によって識別された。縫合糸に隣接した有害効果の巨視的な証拠はなかった。縫合糸に付着して少量の固形組織の存在が認められた(図12(a))。縫合糸に付着し、それを取り囲む組織を切り離し、組織学検査用に処理した。

#### 【0227】

H & E染色を行って組織の形態を判別し、多孔PEGスポンジの存在を認めることができるかどうか見た。H & E染色した切片の分析は、16週までにインプラント部位のいず

10

20

30

40

50

れにても多孔 P E G スポンジが残っている証拠はないことを明らかにした（図 1 2（c））。周囲の組織は、平凡な密度の細胞性及び血管性の組織だった。これは、16 週では多孔 P E G スポンジは完全に分解されていることを示し、このことは、そのインビボでの生分解性を実証している。

#### 【0228】

インプラントに向けられた先天性の免疫応答は、マクロファージ及び異物巨細胞（F B G C）の存在を観察することを介して認識することができる。マクロファージ及び F B G C の浸潤を判定する手段として、3 つの時点での切片すべてにて E D 1 免疫染色を行った（図 1 2（d）～（l））。2 週目の試料の分析は予想どおりマクロファージの存在を明らかにした。2 週目における E D 1 染色によって観察されたマクロファージは主として足場材 / 組織の界面に存在するのに対して、中心組織は非炎症性細胞が多数を占めた（図 1 2（d）～（f））。E D 1 染色した 8 週目の切片の分析は、マクロファージの応答が有意に低下し、大きさはるかに小さかったことを明らかにした（図 1 2（g）～（i））。染色された組織は足場材 / 組織の界面でさえ非炎症性細胞が多数を占めたということは、スポンジ材に向かった応答の低下を実証している。16 週までに、多孔 P E G スポンジは完全に分解したので、E D 1 染色は多孔 P E G スポンジ及び最終的には分解生成物に対する主要な応答があったかどうかを明らかにすることになる。E D 1 染色した 16 週目の切片はマクロファージがほとんど存在しないことを示した（図 1 2（j）～（l））。このことは、全般的に見れば、多孔 P E G スポンジ及びその分解生成物は当初、軽微な炎症性反応を生じ、この反応は経時的に衰えることを実証している。

#### 【0229】

インビボの試験は、多孔 P E G スポンジに向けられた組織の応答及び相互作用は非常に有益であり、成果は高度に有望であることを明らかにした。多孔性の 3 D 構造内部での浸潤、血管新生及び組織の生存を可能にすることによって、多孔 P E G スポンジは組織再生のための優れた候補である。16 週での毒性を伴わない最小免疫原性、組織の浸潤及び完全な生分解と一緒に、多孔 P E G スポンジは組織工学のための足場材として高度に望ましい特性を持つ。

#### 【0230】

< 制御された物性を持つ多孔性の生分解性ポリ（エチレングリコール）（P E G）スポンジ >

#### 【0231】

本明細書で我々は、塩浸出法を介して作出される制御可能な細孔径を有する多孔 P E G ヒドロゲルの製作及び性状分析を記載する。さらには、3 つの架橋剤：塩化セバコイル、塩化スクシニル及び塩化トリメソイルを利用して、得られるネットワークポリマーの機械的特性及び分解特性を制御した。

#### 【0232】

< 材料 >

#### 【0233】

ペンタエリスリトールエトキシレート（ $M_n$  約 797 Da）、ポリ（エチレングリコール）（ $M_n$  約 600 Da）、塩化セバコイル（95%）、塩化スクシニル（95%）、三塩化 1, 3, 5 - ベンゼントリカルボニル（塩化トリメソイル）（98%）、 $\gamma$  - カプロラクトン（97%）、2, 2' - ジチオジエタノール（90%）、オクタン酸第一スズ（約 95%）、トルエン（無水、99.8%）及びリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）錠剤は、Sigma - Aldrich から入手し、受け取ったまま使用した。Dulbecco の改変イーグル培地（DMEM）、ウシ胎児血清（FBS）、L - グルタミン、トリプシン - EDTA（0.05%）、トリパンブルー（0.4%）及びペニシリン - ストレプトマイシンは GIBCO から入手した。細胞生存率アッセイでの使用に先立って 10% v/v の FBS、1% v/v の L - グルタミン及び 1% v/v のペニシリン - ストレプトマイシンによって DMEM を補完した。NUNC T225 カントネックのフラスコは Thermo Fisher Scientific から入手した。ジクロロメタン（99



、5 % )、テトラヒドロフラン ( T H F ) ( H o n e y w e l l、99.99 % )、エタノール ( 未変性、100 % )、炭酸ナトリウム ( 99.2 %、無水 ) は C h e m - S u p p l y から入手し、受け取ったまま使用した。細胞生存率アッセイのための C e l l t i t e r A q u e o u s O n e は P r o m e g a から入手し、受け取ったまま使用した。マトリクス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分光分析 ( M A L D I T o F M S ) のマトリクスであるトランス - 2 - [ 3 - ( 4 - t e r t - ブチルフェニル ) - 2 - メチル - 2 - プロペニリデン ] マロノニトリル ( D C T B ) ( 99.0 ) 及びカチオン化剤 ( N a T F A ( 99.999 % ) ) は A l d r i c h から購入し、受け取ったまま使用した。

【0234】

< 溶融塩テンプレートの製造 >

【0235】

先ず、結晶性塩化ナトリウム ( N a C l ) を乳鉢と乳棒で粉碎し、篩にかけて ( E n d e c o t t s L t d . ( 英国、ロンドン )、標準の研究室の試験篩のセット )、300 ~ 600  $\mu$ m の大きさの塩粒子を得た。4 g の塩粒子を秤量し、ポリエチレンバイアル ( 28 mL ) の中に入れ、円筒状の金属圧縮器によって穏やかに圧縮した。次いでバイアルを加湿器に移し、室温 ( 80 % 湿度 ) にて24時間、加湿器にて維持して溶融塩テンプレートを作成した。次いで溶融テンプレートを作り付けの減圧器 ( ハウスバキューム ) で18時間 ( 100 、20ミリバール ) 乾燥させ、キャップをしてさらなる使用までデシケータに入れた。

【0236】

< , - ジヒドロキシル P C L ( 機械特性改質剤 ) の合成 >

【0237】

開環重合 ( R O P ) によって , - ジヒドロキシル P C L を製造した ; - カプロラクトン ( 20.0 g、175ミリモル ) と 2 , 2' - ジチオジエタノール ( 1.08 g、7.00ミリモル ) とオクタン酸第一スズ ( 0.95 g、2.34ミリモル ) とを無水トルエン ( 45 mL ) に溶解し、アルゴンのもとで24時間110 で加熱した。混合物を室温に冷却し、T H F ( 50 mL ) で希釈し、冷メタノール ( - 18 、1 L ) に沈殿させた。濾過によって沈殿物を回収し、真空 ( 0.1ミリバール ) で乾燥させて白色粉末 18.8 g ( 94 % ) として , - ジヒドロキシル P C L を得た ;  $M_n$  ( N M R ) = 3.2 k D a ,  $M_n$  ( M A L D I T o F ) = 3.3 k D a ( P D I = 1.07 )。

【0238】

< 塩がテンプレートになる生分解性多孔ポリ ( エチレングリコール ) ( P E G ) スポンジの製造 >

【0239】

ポリ ( エチレングリコール ) ( P E G 600 ) ( 0.75 g、1.255ミリモル ) とペンタエリスリトールエトキシレート ( P E ) ( 0.50 g、0.63ミリモル ) と 0 m g、33 m g 又は 82 m g のジヒドロキシル - P C L ( それぞれ 0、2 又は 5 w t % の P C L に相当する ) とをジクロロメタン ( D C M、10 % v / v ) に溶解した ( 表 7 )。その後、塩化セバコイル ( S e b C l ) ( 0.60 g、2.51ミリモル )、塩化スクシニル ( S u c C l ) ( 0.39 g、2.51ミリモル ) 又は塩化トリメソイル ( T m s C l ) ( 1.27 g、4.77ミリモル ) を加えた。モノマー組成物を10秒間ボルテックスし、直ちに1.2 mL のこの溶液を、溶融塩テンプレートを含むバイアルにピペットで入れ、30秒間遠心分離した。次いでバイアルを60 のオープンに1時間入れ、真空オープンで24時間減圧した ( 20ミリバール、60 )。架橋されたゲルをバイアルから取り出し、穏やかに攪拌しながら脱イオン水 ( 100 mL ) に入れた。30分ごとに2時間、水を交換し、次いで1時間ごとに3時間水を交換し、その後24時間で最後の交換を行った。次いで膨潤したポリマーを炭酸ナトリウム溶液に入れて穏やかに2時間攪拌し、30分間脱イオン水で洗浄して ( 100 mL で3回 ) H C l を中和した。次いで、生じた多孔 P E G スポンジを性状分析に先立って P B S にて保存した。

10

20

30

40

50

【 0 2 4 0 】

【表 7】

実施例 番号	PE (g)	PEG <sub>600</sub> (g)	ジヒドロキシ PCL (mg)	10% (v/v) DCM (μl)	SucCl (g)	SebCl (g)	TmsCl (g)
13	0.50	0.75	0	151	0.39	—	—
14	0.50	0.75	33	151	0.39	—	—
15	0.50	0.75	82	151	0.39	—	—
16	0.50	0.75	0	180	—	0.60	—
17	0.50	0.75	37	180	—	0.60	—
18	0.50	0.75	93	180	—	0.60	—
19	0.50	0.75	0	170	—	—	0.67
20	0.50	0.75	38	170	—	—	0.67
21	0.50	0.75	96	170	—	—	0.67

10

【 0 2 4 1 】

組織の浸透及び血管新生のために互いにつながった多孔性構造を作製するのに犠牲的な溶融塩化ナトリウムテンプレートを使用した。架橋に続いて、多孔 P E G スポンジを 6 0 にて 2 4 時間真空下に置き、脱イオン水に入れて多孔 P E G スポンジを膨潤させ、塩テンプレートを取り除いた。

20

【 0 2 4 2 】

塩化スクシニル ( S u c C l )、塩化セバコイル ( S e b C l ) 及び塩化トリメソイル ( T m s C l ) と共に作製した多孔 P E G スポンジをそれぞれ S u c - S P H、S e b - S P H 及び T m s - S P H と呼ぶ。

【 0 2 4 3 】

&lt; 膨潤試験 &gt;

【 0 2 4 4 】

膨潤試験を行って多孔 P E G スポンジの水の取り込みを測定した。脱水した多孔 P E G スポンジ (  $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$  ) を秤量し、次いで M i l l i Q 水に 4 8 時間浸した。方程式  $\% E S R = ( ( W_s - W_d ) / W_d ) \times 100 \%$  ( 式中、 $W_s$  及び  $W_d$  はそれぞれ膨潤重量及び乾燥重量を指す ) を用いてヒドロゲルの百分率での平衡溶媒比 (  $\% E S R$  ) を算出した。各型のポリマーについて 3 つ組で分析を行い、結果を平均した。結果を表 8 にて示す。

30

【 0 2 4 5 】

【表 8】

実施例番号	PCL含量 (wt%)	%ESR	平均細孔径 ( $\mu\text{m}$ )
13	0	1209 $\pm$ 65	—
14	2	1184 $\pm$ 56	456 $\pm$ 114
15	5	1139 $\pm$ 52	—
16	0	327 $\pm$ 4.5	—
17	2	310 $\pm$ 2.1	467 $\pm$ 118
18	5	301 $\pm$ 2.3	—
19	0	370 $\pm$ 6.3	—
20	2	340 $\pm$ 0.9	477 $\pm$ 102
21	5	321 $\pm$ 5.5	—

10

## 【0246】

異なる架橋モノマーである *Sebc1*、*Succ1* 及び *Tmsc1* によって製造されたポリマーにおける差異は測定された平衡膨潤比（%ESR）において明らかだった。*Succ1* で製造した実施例 13～16 はすべて、*Sebc1* 及び *Tmsc1* の相当物に比べてはるかに高い ESR を示した。このことは、*Sebc1* 及び *Tmsc1* の疎水性を証明することができる。*Sebc1* のさらに長いアルキル骨格及び *Tmsc1* のベンゼン環が、架橋されたポリマーのネットワークの中で *Succ1* に比べてさらに疎水性の環境を創るので、多孔 PEG スポンジの吸水能を低下させる。*Succ1* はさらに短いアルキル骨格を有するので作製される多孔 PEG スポンジはさほど疎水性ではなく、さらに多くの水を吸収する。

20

## 【0247】

多孔 PEG スポンジの PCL 含量も 0 wt % から 2 wt % 及び 5 wt % に変化させると、架橋剤すべてから製造されたヒドロゲルについて PCL 含量の増加に伴って %ESR が低下することが観察された。このことは、*Sebc1* 及び *Tmsc1* で観察された疎水性の効果に一致する。PCL は疎水性ポリマーなので PCL 量の増加もさらに低い %ESR につながる。

30

## 【0248】

< 細孔径の分析 >

## 【0249】

2 wt % の PCL を伴った多孔 PEG スポンジを 1 × PBS で膨潤させ、次いで半分に切り、炭素タブに載せた。低真空条件下で FEI Quanta FEG 200 E-SEM を用いて、さらされた内側面を分析し、ヒドロゲルの多孔性構造を観察した。ImageJ（米国、国立衛生研究所）ソフトウェアを利用して平均細孔径を測定した。

## 【0250】

40

SEM は、さまざまな架橋モノマーと共に製造された多孔 PEG スポンジ内で観察された細孔径が準備された溶解塩テンプレートとよく相関し、かつ、互いにつながっていると認められることを明らかにした（図 13）。得られた平均細孔径を表 8 に示す。準備された塩粒子のサイズは 300～600  $\mu\text{m}$  に及ぶので、多孔 PEG スポンジについて得られる平均径は準備された塩粒子に非常によく相関する。

## 【0251】

また、ポリマー間で膨潤に差異があったとしても、さまざまな架橋剤と共に製造された多孔 PEG スポンジ間での細孔径に有意な差異は認められなかった。このことは、膨潤特性にかかわらず、細孔径は影響を受けないままであることを実証している。多孔 PEG スポンジすべてについてのこれらの細孔の径を大きくすることは、組織及び血管新生が足場

50

材に容易に浸透するのを可能にすることになる。大きな互いにつながった細孔は、足場の中で組織の増殖や成長及び血管系の形成に必要とされる空間を提供することになる。多孔 P E G スポンジの互いにつながった性質は細胞老廃物のクリアランスと同様に栄養素や流体の輸送も可能にすることになる。

#### 【 0 2 5 2 】

塩テンプレート化法に関して、ポロゲン（塩）の粒径はそのまま特定の範囲にテイラーメイドできるのでヒドロゲルの細孔径を制御することは可能である。これは、特定の細孔径が特定の組織又は細胞の種類にさらに良好に適合することが分かった場合、特定の組織の種類について有利であり得る。

#### 【 0 2 5 3 】

< 多孔 P E G スポンジの機械的評価 >

#### 【 0 2 5 4 】

圧縮試験に先立って、膨潤させた多孔 P E G スポンジを立方体（ $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ ）に切断した。圧縮評価に先立って多孔 P E G スポンジを応力前提条件調整に供さなかった。I n s t r o n マイクロテスター 5 8 4 8（50 N 負荷セル）の金属板の間に立方体試料を置き、最大で 80 % 張力の圧縮に供した。得られた応力対張力のプロファイルを多孔 P E G スポンジの圧縮弾性率の測定に用いた。一部の多孔 P E G スポンジを最大で 80 % 張力の繰り返し圧縮にも供してその弾性特性を測定した。結果を表 9 に示す。

#### 【 0 2 5 5 】

#### 【表 9】

実施例 番号	PCL 含量 (wt%)	極限応力 (MPa)	極限伸長 (%)	圧縮弾性率 (kPa)
13	0	33 ± 3.4	46 ± 2.0	81.0 ± 11
14	2	51 ± 5.3	58 ± 2.1	89.0 ± 0.1
15	5	63 ± 4.2	75 ± 4.1	81.0 ± 10
16	0	—	—	183 ± 28
17	2	—	—	250 ± 20
18	5	—	—	330 ± 5.7
19	0	124 ± 18	60 ± 9.2	192 ± 6..0
20	2	—	—	148 ± 3.0
21	5	—	—	193 ± 6.0

#### 【 0 2 5 6 】

使用したさまざまな架橋剤については、さまざまな圧縮挙動が観察された。弾性「J」形状の圧縮応力対圧縮張力のプロファイルは S e b C l 及び T m s C l と共に製造した P C l を含有するポリマーネットワークすべてについて得られた。S e b C l ポリマー及び P C l を含有する T m s C l ポリマーはその弾性構造を維持した。S e b C l ポリマーは最大で 80 % の反復圧縮の後でさえ裂け目なしで弾性のままだった（図 1 4（a））。S e b C l ポリマーの圧縮弾性率は、ジヒドロキシ P C l の含量が 0 w t % から 2 w t % 及び 5 w t % に増加するのに伴ってそれぞれ約 1 8 0 k P a から約 2 5 0 k P a 及び 3 3 0 k P a に上昇した。

#### 【 0 2 5 7 】

一方、S u c C l と共に製造した多孔 P E G スポンジは「N e w r o n i a n」の線形の応力対張力の挙動を示し、P C l 含量の増加に伴って約 4 5 ~ 7 0 % の間の圧縮張力で破砕した（表 9）。これらのポリマーは P C l 含量が増大するにつれて改善された破壊応力及び破壊張力を示した。にもかかわらず、圧縮弾性率は有意に影響されなかった（図 1 4（b））。

## 【0258】

T m s C l と共に製造した多孔 P E G スポンジは当初、P C L を組み入れるまで S e b C l と共に製造した P E G スポンジの弾性の高い性質を持たなかった。P C L の組み入れに続いて、T m s C l スポンジも最大で 80 % の圧縮に耐性を示す弾性構造を維持した ( 図 14 ( b ) 、表 9 ) 。

## 【0259】

< 多孔 P E G スポンジのインビトロの分解試験 >

## 【0260】

多孔 P E G スポンジを立方体 ( 5 × 5 × 5 m m ) に切断し、エタノールで脱水し、真空オーブン ( 60 ) で一晩乾燥させた。乾燥させた試料を秤量し、1 × P B S ( 20 m L 、 0 . 01 % w / v のアジ化ナトリウム ) に入れた。バイアルを密封し、温度制御したオービタルシェーカー ( 37 、 100 r p m ) に入れた。各時点 ( 1、2、4 及び 8 週目 ) でオービタルシェーカーから 3 つの試料を取り出し、脱イオン水で 30 分間洗浄した ( 20 m L で 3 回 ) 。その後、エタノールに 1 時間浸した ( 20 m L で 2 回 ) 後、真空中で乾燥させる ( 60 で 24 時間 ) ことによってポリマーを脱水した。次いで乾燥させた試料を秤量し、得られた質量値を時間に対してプロットして分解プロフィールを得た。

10

## 【0261】

分解試験は、T m s C l と共に製造した多孔 P E G スポンジが 8 週で約 40 % の質量損失を有する一方で、S e b C l と共に製造したものは 8 週を超えて約 35 % の質量損失を有することを明らかにした。S u c C l と共に製造した多孔 P E G スポンジは 4 週までに完全に分解した ( 図 15 ) 。

20

## 【0262】

< 多孔 P E G スポンジのインビトロでの細胞毒性の評価 >

## 【0263】

多孔 P E G スポンジの細胞毒性の評価については、2 種類の試料を製造した。多孔ヒドロゲルの細胞毒性を評価するために、乾燥させた多孔 P E G スポンジを秤量し、100 m g を 80 % v / v のエタノール溶液に 30 分間入れた。次いで多孔 P E G スポンジを洗浄し、無菌 P B S で再水和し ( 20 分間で 3 回 ) 、2 m L の無菌 D M E M に入れ、その後 37 で 72 時間インキュベートした。次いで多孔 P E G スポンジを取り出し、馴化培地を細胞生存率アッセイに用いた。ヒドロゲルの分解生成物の細胞生存率に対する影響を検討するために、乾燥させたヒドロゲル ( 500 m g ) を 1 M の H C l 溶液 ( 5 m L ) で分解させた。真空中の水 ( 20 m L で 5 回 ) との共沸で H C l を取り除き、高真空下で最終的に乾燥させた。100 m g の分解生成物を秤量し、2 m L の無菌 D M E M にて溶解 / 再懸濁した。次いで、毒性試験で使用するのに先立って、溶液を紫外線のもとで 30 分間滅菌し、0 . 22 μ m のフィルターで濾過した。95 ~ 100 % の湿度での 5 % C O<sub>2</sub> の雰囲気 37 にて T 225 フラスコ内の D M E M 中で N I H 3 T 3 - L 1 細胞を集密まで増殖させた。0 . 05 % トリプシン - E D T A を用いて細胞をトリプシン処理し、生 / 死の染色としてトリパンブルーを用いて手動で数を数え、新鮮な培地で希釈して 1 . 25 × 10<sup>5</sup> 個 / m L の播種密度にし、96 穴プレートに入れ ( 80 μ L / ウェル ) 、一部のウェルはブランクのままにして細胞 / ブランクコントロールとして役立てた。プレートをインキュベータに 4 時間戻した後、多孔 P E G スポンジで馴化した培地及び分解生成物を加えた。製造したストック溶液 ( 50 m g / m L ) を、新鮮な完全培地を用いて 2 回 10 倍希釈した。その希釈液の 20 μ L を 3 つ組で 96 穴プレートに入れ ( 100 p p m 及び 1000 p p m の濃度を得た ) 、プレートの攪拌揺動運動によって穏やかに混合し、次いでプレートをインキュベータに戻し、さらに 72 時間インキュベートした。インキュベータに続いて C e l l t i t e r A q u e o u s O n e 溶液をプレートに加えた ( 20 μ L / ウェル ) 。プレートを穏やかに揺れ動かして混合を促進し、次いで 30 分間 ~ 4 時間インキュベータに戻した。周期的な間隔で、マイクロプレートリーダーを装備した C a r y 50 B i o 紫外 - 可視分光光度計を用いて 490 n m 及び 700 n m にてプレートの紫外光 - 可視光の吸光度を観察した。約 2 時間のインキュベートの後、色は平衡化した。4

30

40

50

90 nmでの吸光度の値をバックグラウンドの吸光度(700 nm)及び培地のみ(細胞 - ブランクコントロール)の吸光度について補正し、次いで増殖コントロールに対して基準化した。

#### 【0264】

さまざまな濃度(100 ppm及び1000 ppm)の多孔PEGスポンジで馴化した培地の存在下で72時間インキュベートした後、架橋剤すべてについて細胞生存率に対する最小効果が認められた(図16(a))。酸が介在する迅速な分解を介して得られた分解生成物の存在下では、100 ppmにて細胞の代謝活性に対して有意な効果は観察されなかった(図16(b))。一方、1000 ppmでは代謝活性における小さな低下が観察されたが、コントロールに比べてこの差異は最小である。

10

#### 【0265】

<多孔PEGスポンジのインビボでの評価>

#### 【0266】

塩化セバコイルと共に製造した膨潤させた多孔PEGスポンジ(2%wt PCL)(実施例17)を10×4 mm(直径×高さ)の円板状に切断し、真空で乾燥させ(20ミリバール、60)、プラスチックのバイアルに入れ、滅菌のための線照射に先立ってしたジッパーの付いた袋にて二重密封した。オーストラリア、ビクトリアのSteritechで線滅菌を行った(最低25 kGy)。滅菌に続いて、移植の前にヒドロゲルを1×無菌PBSに3時間入れた。3つの時点で12匹のラットに多孔PEGスポンジを移植した。手順はすべてオーストラリアの国立保健医療研究審議会(NHMRC)の指針に従って実施され、メルボルンのSt. Vincent's病院の動物倫理委員会によって認可された。スプラーグドローリー系のオスラット(The Animal Resource Centre (Murdoch, Western Australia)、体重350±50 g)を認可された施設で飼育し、標準のラット用の餌と水を自由摂取で与えた。抗生剤であるエンロフロキサシン(Baytril 50, Bayer)を25.5 mg/kg/日の用量で手術前2日間と手術後2日間飲水で投与し、傷の感染を回避した。手術については、イソフルランによって動物を麻酔し、麻酔状態で維持した。背面の皮膚で被毛を刈り、消毒し、正中に沿って約1.5 cmの長さで1.5 cm離して4つの別々の長手方向の切開を作った。主切開のいずれかの側で慎重な剥離によって各足場材用の個々の皮下ポケットを準備し、各ポケットにヒドロゲルを挿入し、3-0のプロリーン縫合系を用いて中心孔を介して周囲の筋膜に適所で係留した。傷クリップを用いて傷を閉じ、加熱パッド上で30分間動物を回復させた。移植に続いて2、8及び16週間後、ラットを上記で記載したように麻酔し、元々の傷を再び開け、ヒドロゲル足場材及び周囲の組織を取り出し、次いでリーザバルブの心臓内注射によってラットを安楽死させた。取り出した多孔PEGスポンジを球状面に対して垂直で半分に切り、4にて4%パラホルムアルデヒド溶液で48時間固定し、パラフィン処理まで処理した。処理の後、完全な断面及びその周囲の組織を見て分析することができるよう外植片を包埋した。試料の中心点を通して厚さ5 µmの切片を切り、ポリリジンを被覆したスライドに載せた。切片をヘマトキシリンとエオシン(H&E)で染色し、マクロファージ及び巨細胞についてはED1に対する抗体を用いて免疫組織化学的に染色した。

20

30

40

#### 【0267】

移植の2週間後、多孔PEGスポンジは薄いカプセルの形成のみを伴って組織に上手く統合した(図17d)。2週間後、ヒドロゲルのサイズに関して最少限の変化が認められ；ポリマースポンジは無傷のままであり、明瞭に眼に見えるままだった(図17e)。パラフィン処理への処理に続いてポリマースポンジを切片にし、その後、H&Eで染色してポリマースポンジへの細胞及び組織の浸透を観察した(図17g~i)。H&E染色した切片は、周辺組織からのヒドロゲルへの密な細胞の及び高度に血管化した組織の浸潤を示した。血管系の位置を示している染色された赤血球から血管を明瞭に見ることができる(図17h~i)。H&E染色された切片からも明らかなように周辺組織から血管化した組織がポリマースポンジの中心に浸透することができるのを見るのが可能だった。染色され

50

た切片で観察された大きなギャップは、パラフィン処理への処理が原因で生じた脱水による多孔 P E G スポンジの細孔壁及び浸透した組織の収縮によると思われる。

【 0 2 6 8 】

8 週目の回収も、周辺組織に統合した多孔 P E G スポンジを取り囲む薄い線維性カプセルを示した。回収した組織の二等分は外植片のサイズの厚さの低下を示し、ポリマースポンジ材の黄変が観察された。足場材の中心への組織の浸潤は H & E 染色によって確認されたが、浸透した組織の量における有意差は認められなかった（図 1 7 j）。とはいえ、8 週後に存在する組織は、2 週目で存在する密な細胞組織ではなく緩い結合組織であることが言及された（図 1 7 k、l）。多孔 P E G スポンジの血管化は、細胞又はバイオ因子の負荷を行わなかったため、周辺組織からの新血管形成による可能性が最も高い。

10

【 0 2 6 9 】

血管化組織のポリマースポンジの中心への浸透は、多孔 P E G スポンジの細孔の互につながった性質を実証している。2 週までの細胞及び血管の浸透は多孔 P E G スポンジが細胞組織及び血管新生に対して浸透性であることを実証している。従って、多孔 P E G スポンジは細胞及び血管の統合に適する 3 D 環境を持ち、浸潤した組織の生存を保証する。

【 0 2 7 0 】

切除の間に観察されるインプラントの突起部が最小化されるので 2 週目及び 8 週目に比べて 1 6 週目でインプラントを探すのははるかに困難だった。2 週目及び 8 週目と同様、周辺組織に有害効果の巨視的証拠はなかった。少量の固形組織が存在し、縫合糸に付着していた。縫合糸に付着し、それを取り囲む組織を切除し、組織学検査のために処理した。回収した組織の二等分は、インプラントのサイズが非常に小さく、非常に少量の多孔 P E G スポンジが残っていることを明らかにした（図 1 8 a）。

20

【 0 2 7 1 】

H & E 染色を行って組織の形態を識別し、多孔 P E G スポンジの存在を観察した。H & E 染色した切片の分析は、1 6 週までに最少量の多孔 P E G スポンジが残っていることを明らかにした（図 1 8 b、c）。多孔 P E G スポンジの残部があった場合、周辺組織は平凡な密度の細胞組織及び血管組織だった。このことは、1 6 週では、ポリマースポンジはそのインビボでの生分解性を実証する主要な分解を受けていることを示している。

【 0 2 7 2 】

マクロファージ及び異物巨細胞（F B G C）の存在はインプラントに向けられた先天性の免疫応答の指標である。マクロファージ及び F B G C の応答を測定する手段として切片すべてについて E D 1 免疫染色を行った（図 1 8 d ~ l）。2 週目の試料の E D 1 染色は予測どおりマクロファージの存在を明らかにした。2 週目での E D 1 染色によって観察されるマクロファージは主として浸透した組織の中心に存在し、一部は組織 / ポリマーの界面に位置していた（図 1 8 d ~ f）。8 週目の切片の分析は、マクロファージの応答が有意に低下したこと、及びマクロファージのサイズが非常に小さいことを示した（図 1 8 g ~ i）。染色された組織は非炎症性細胞が優勢であり、かつ、最少の数で足場材 / 組織の界面に存在するということは、ヒドロゲル材に向けた最少の応答を実証している。非常に少ない量の足場材が残っていることから明らかなように 1 6 週までにポリマースポンジは主要な分解を受けていた。E D 1 染色した 1 6 週目の切片は最少数のマクロファージを示した（図 2 0 j ~ l）。E D 1 染色を介した切片の分析は、多孔 P E G スポンジ及びその分解生成物が当初軽微な炎症性反応を生じ、この反応は 1 6 週間かけて有意に低下することを示した。

30

40

【 0 2 7 3 】

インビボの試験は、移植の 1 6 週間後、多孔 P E G スポンジ及びその分解生成物に関して有害効果は観察されないことを明らかにした。多孔 P E G スポンジは最小免疫原性を伴った血管組織の浸透、及び 1 6 週までの主要な分解を可能にすることによって足場材としての望ましい特性を実証している。

【 0 2 7 4 】

本明細書で要点が述べられているような本発明の精神から逸脱することなくさまざまな

50

他の改変及び／又は変更が為されてもよいことが理解されるべきである。

【0275】

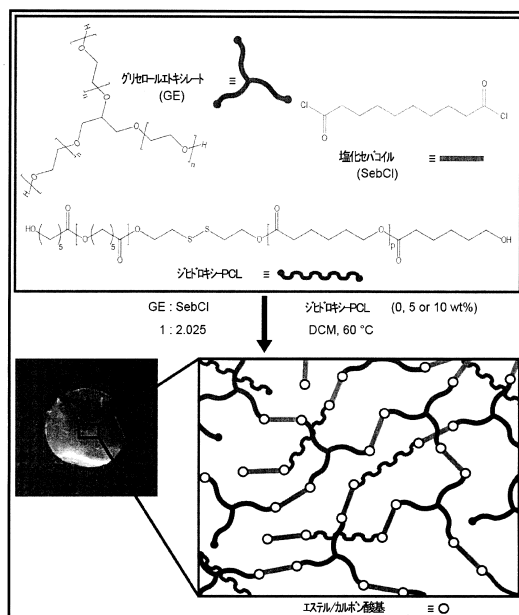
本明細書及び後に続く特許請求の範囲の全体を通して、文脈が特に要求しない限り、単語「comprise」及び、たとえば、「comprises」や「comprising」のような変形は、言及される整数又は工程又は整数若しくは工程の群の包含を暗示するが、他の整数又は工程又は整数若しくは工程の群の排除を暗示しないように理解されるであろう。

【0276】

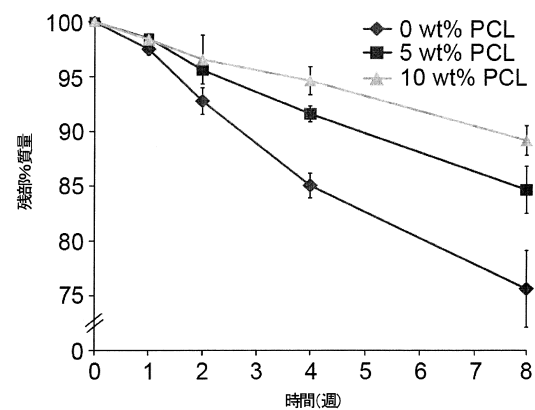
先行公開（又はそれに由来する情報）又は既知である事項に対する本明細書における参照は、先行公開（又はそれに由来する情報）又は既知の事項が、本明細書が関連する試みの分野における一般常識の一部を形成するという認識又は承認又は任意の形態の示唆として解釈されない、かつ、解釈されるべきではない。

10

【図1】

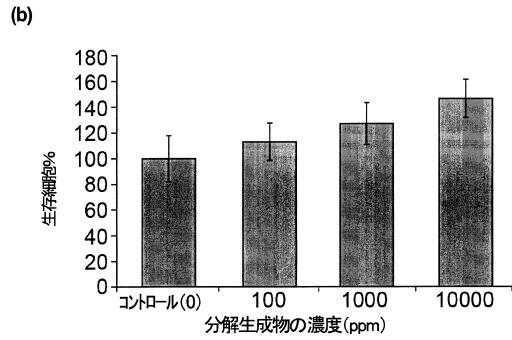
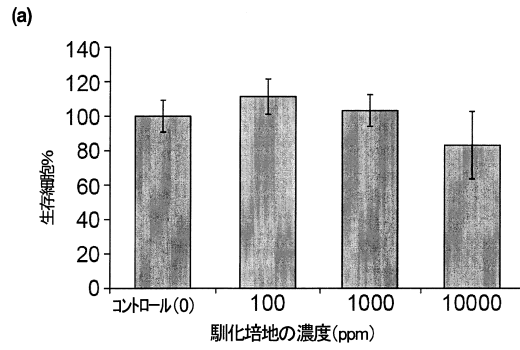


【図2】

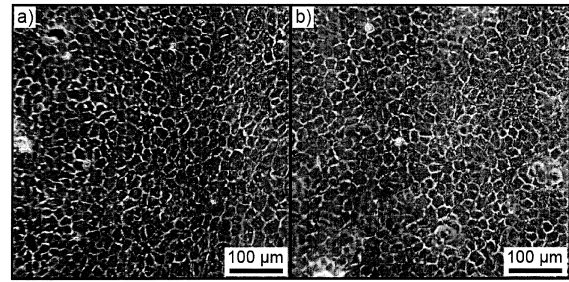




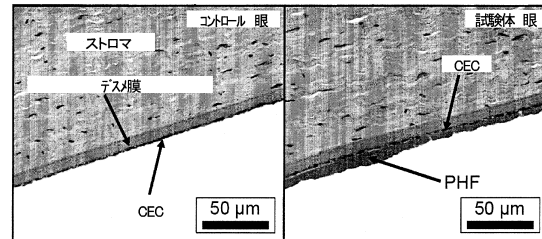
【図 3】



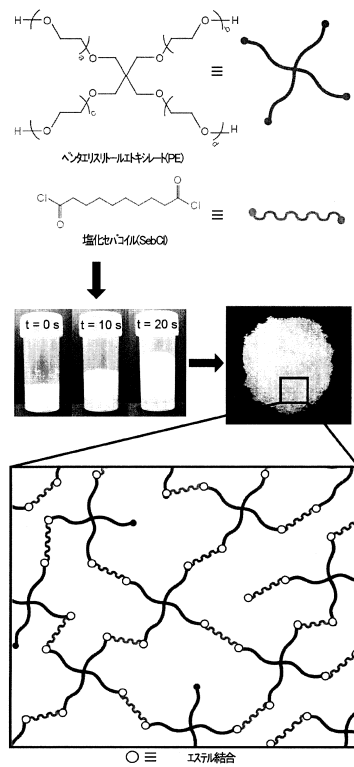
【図 4】



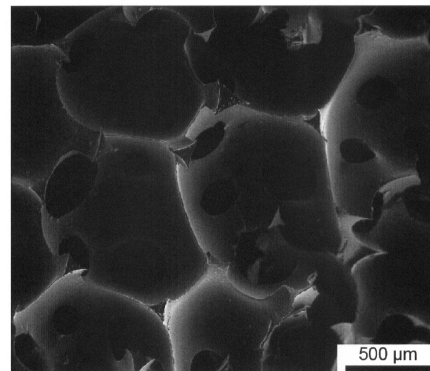
【図 5】



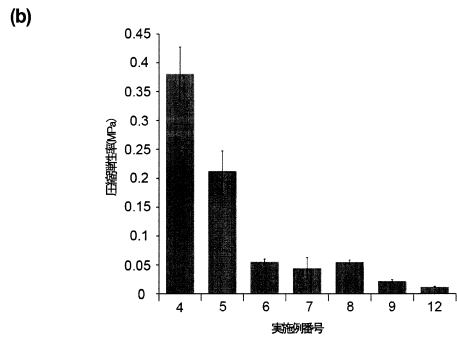
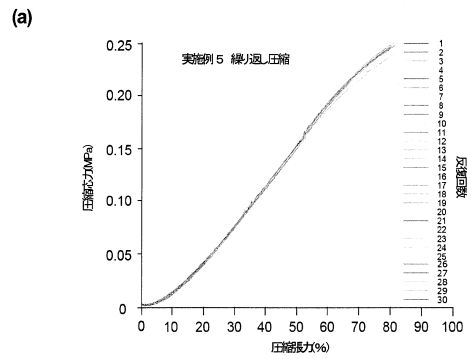
【図 6】



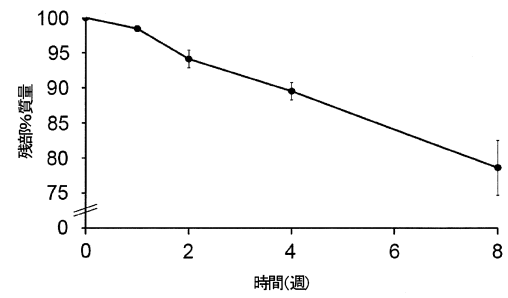
【図 7】



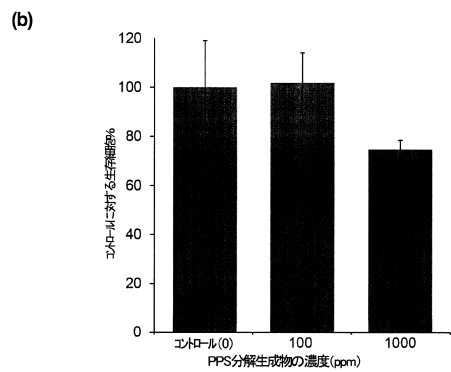
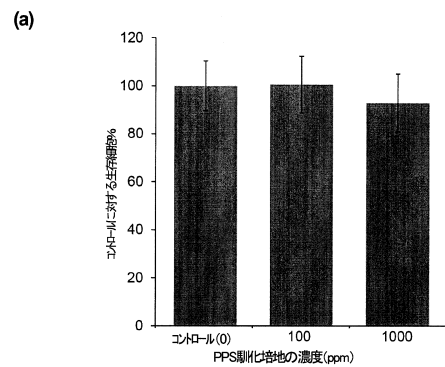
【図 8】



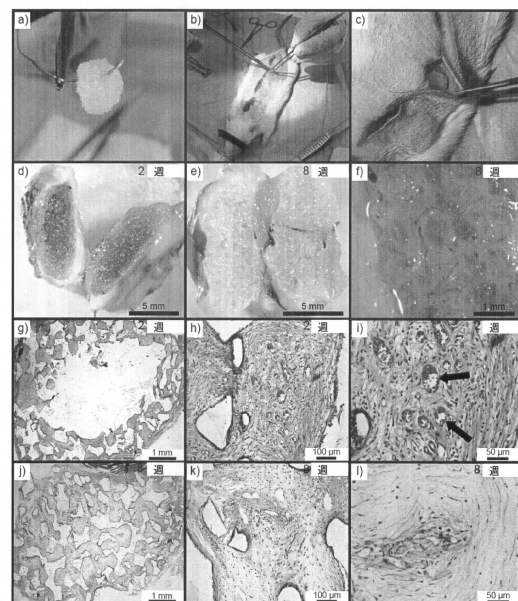
【図 9】



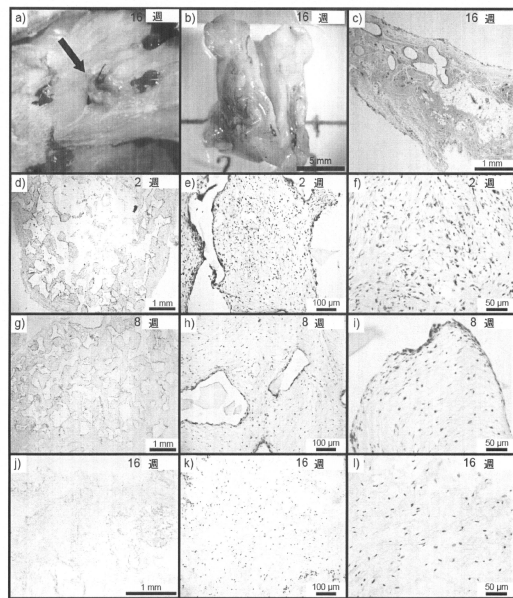
【図 10】



【図 11】

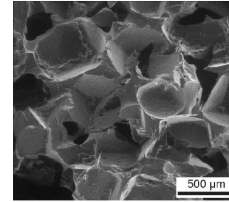


【図 1 2】

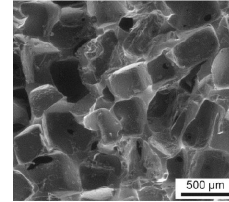


【図 1 3】

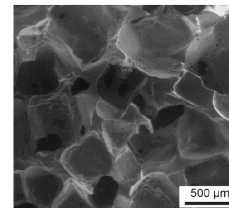
(a)



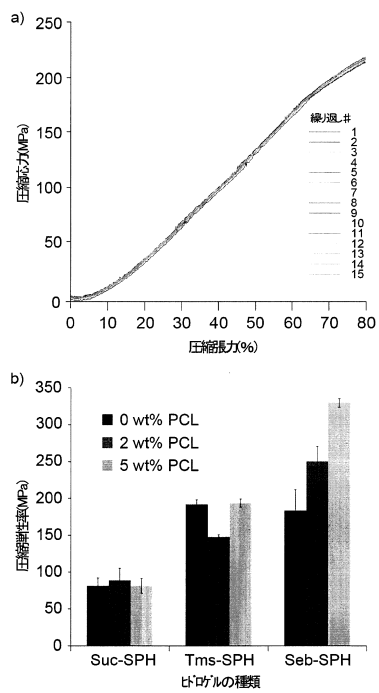
(b)



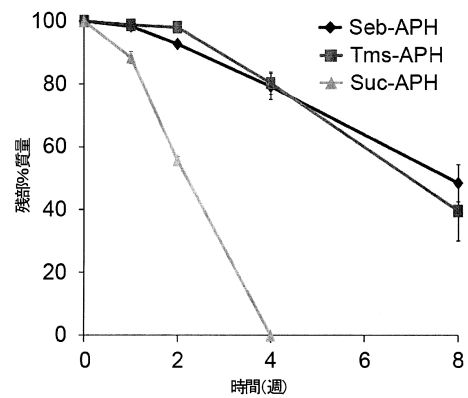
(c)



【図 1 4】

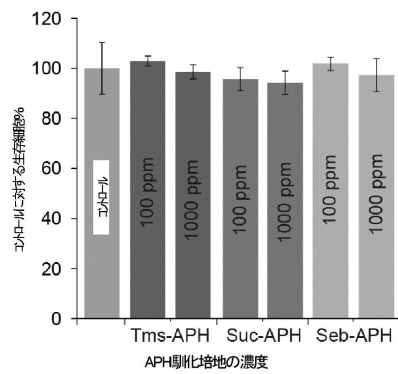


【図 1 5】

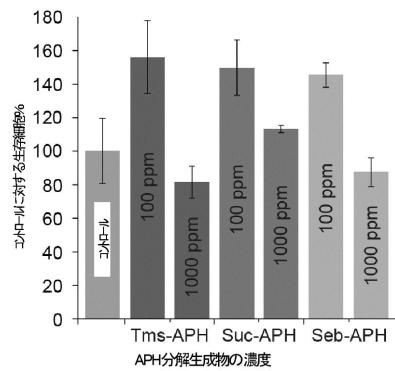


【図 16】

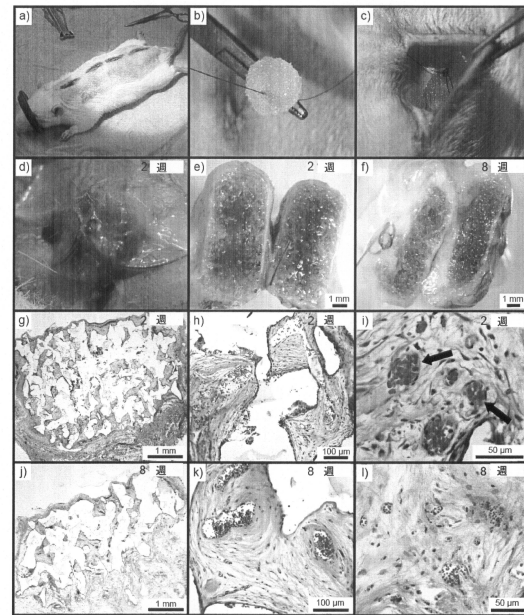
(a)



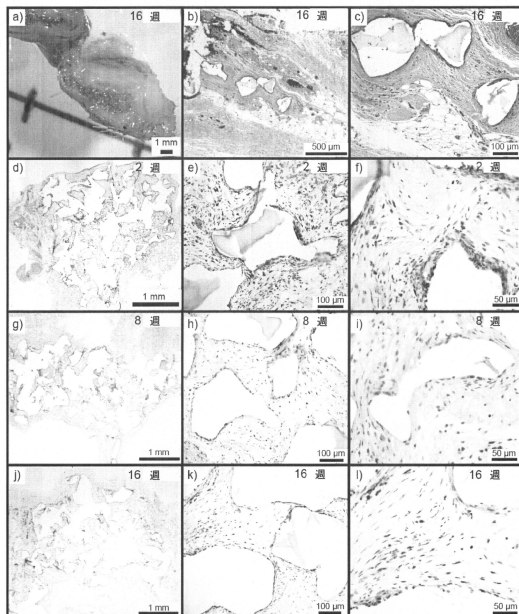
(b)



【図 17】



【図 18】



## フロントページの続き

- (72)発明者 オズセリック, ベルケイ  
オーストラリア国, 3 0 1 0 ヴィクトリア, ザ ユニヴァーシティー オブ メルボルン, ユー  
・オー・エム コマーシャル プロプライエタリー リミテッド内
- (72)発明者 チャオ, グレグ, グアンハ  
オーストラリア国, 3 0 1 0 ヴィクトリア, ザ ユニヴァーシティー オブ メルボルン, ユー  
・オー・エム コマーシャル プロプライエタリー リミテッド内

審査官 三原 健治

- (56)参考文献 特表2007-517543(JP, A)  
特開昭58-160316(JP, A)  
特開2007-204614(JP, A)  
特開平08-059811(JP, A)  
特表2006-517842(JP, A)  
Acta Biomater., 2013, Vol. 9, No. 5, p. 6594-6605 (Available Online Jan. 29, 2013)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 0 8 G  
A 6 1 L

- (54)【発明の名称】再生医学用及び組織工学用生分解性ネットワークポリマー、当該生分解性ネットワークポリマーを製造するための方法、並びに、当該生分解性ネットワークポリマーを含む眼インプラント、材料、及びヒドロゲル