(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3647465号
(P3647465)
(45)発行日　平成17年5月11日(2005.5.11)　(24)登録日　平成17年2月18日(2005.2.18)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
A61L 27/00	A61L	27/00	V
C08L 89/00	C08L	89/00	
D01F 4/00	D01F	4/00	A

請求項の数 20　(全 13 頁)

(21)出願番号	特願平9-502056
(86)(22)出願日	平成8年6月7日(1996.6.7)
(65)公表番号	特表平11-508782
(43)公表日	平成11年8月3日(1999.8.3)
(86)国際出願番号	PCT/US1996/009861
(87)国際公開番号	WO1996/040216
(87)国際公開日	平成8年12月19日(1996.12.19)
審査請求日	平成15年3月10日(2003.3.10)
(31)優先権主張番号	08/483,092
(32)優先日	平成7年6月7日(1995.6.7)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
オーガノジェネシス　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　０２０２１　マサチューセッツ州　カントン　ダン　ロード　１５０
(74)代理人
弁理士　谷　義一
(74)代理人
弁理士　阿部　和夫
(72)発明者　カー，ロバート，エム．，ジュニア
アメリカ合衆国　０２１３２　マサチューセッツ州　ウエスト　ロクスベリー　マウント　ヴァーノン　ストリート　３１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】再構成コラーゲン線維セグメント組成物およびその製法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

テロペプチドを有する酸抽出コラーゲンから作られた再構成コラーゲン線維セグメントを生体適合性担体中に含んでなる注射用コラーゲン組成物であって、組成物中のコラーゲン濃度が200mg/mL以下の範囲であることを特徴とする注射用コラーゲン組成物。

【請求項２】

再構成コラーゲン線維セグメントが架橋していることを特徴とする請求項１記載の注射用コラーゲン組成物。

【請求項３】

架橋剤がカルボジイミドであることを特徴とする請求項１記載の注射用コラーゲン組成物。

【請求項４】

カルボジイミドが１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸（EDC）であることを特徴とする請求項３記載の注射用コラーゲン組成物。

【請求項５】

コラーゲン線維セグメントが、薬剤、増殖因子、ホルモン、細胞外基質成分、遺伝物質および細胞からなる群から選択される作用物質でコーティングされていることを特徴とする請求項１記載の注射用コラーゲン組成物。

【請求項６】

コラーゲン組成物が薬剤、増殖因子、ホルモン、細胞外基質成分、遺伝物質および細胞か

らなる群から選択される作用物質を含むことを特徴とする請求項１記載の注射用コラーゲン組成物。
【請求項７】
生体適合性担体が等張性培地であることを特徴とする請求項１記載の注射用コラーゲン組成物。
【請求項８】
再構成コラーゲン線維セグメントが一部変性していることを特徴とする請求項１記載の注射用コラーゲン組成物。
【請求項９】
テロペプチドを有する酸抽出コラーゲンから作られ、等張培地中でカルボジイミドで架橋された再構成コラーゲン線維を含む注射用コラーゲン組成物であって、組成物中のコラーゲン濃度が200mg/mL以下の範囲であることを特徴とする注射用コラーゲン組成物。
【請求項１０】
再構成コラーゲン線維セグメントが、再構成コラーゲン糸を細切りして再構成コラーゲン線維セグメントを形成することによって生成することを特徴とする請求項１または請求項９記載の注射用コラーゲン組成物。
【請求項１１】
細切りが再構成コラーゲン糸をホモジナイズすることによって行われることを特徴とする請求項10記載の注射用コラーゲン組成物。
【請求項１２】
テロペプチドを有する酸抽出コラーゲンから作られた再構成コラーゲン線維セグメントを生体適合性担体中に含んでなる注射用コラーゲン組成物であって、組成物中のコラーゲン濃度が200mg/mL以下の範囲であり、再構成コラーゲン線維セグメントが、前記コラーゲンを脱水および／または中和して再構成コラーゲン線維セグメントを形成せしめる作用物質を含む再循環浴中に、コラーゲン含有溶液を断続的に押出すことによって生成することを特徴とする注射用コラーゲン組成物。
【請求項１３】
脱水および／または中和剤がポリエチレングリコール溶液であることを特徴とする請求項12記載の注射用コラーゲン組成物。
【請求項１４】
脱水および／または中和剤がアセトンであることを特徴とする請求項12記載の注射用コラーゲン組成物。
【請求項１５】
脱水および／または中和剤がイソプロパノールであることを特徴とする請求項12記載の注射用コラーゲン組成物。
【請求項１６】
脱水および／または中和剤がリン酸緩衝食塩液であることを特徴とする請求項12記載の注射用コラーゲン組成物。
【請求項１７】
（ａ）テロペプチドを有する酸抽出コラーゲンを含む溶液を、コラーゲンを脱水および／または中和する作用物質を含む再循環浴中に断続的に押し出す工程、および
（ｂ）循環浴を、押出されたコラーゲンが再構成コラーゲン線維セグメントを形成できるような条件下に保持する工程
を含む方法によって作られたことを特徴とする再構成コラーゲン線維セグメント。
【請求項１８】
線維を架橋する工程をさらに含む方法によって製造されることを特徴とする請求項17記載の再構成コラーゲン線維セグメント。
【請求項１９】
前記線維を、薬剤、増殖因子、ホルモン、細胞外基質成分、遺伝物質および細胞からなる群から選択される作用物質でコーティングする工程をさらに含む方法によって製造される

ことを特徴とする請求項17記載の再構成コラーゲン線維セグメント。
【請求項２０】
（ａ）テロペプチドを有する酸抽出コラーゲンを含む溶液を、調節可能混合量の、前記コラーゲンを脱水および／または中和する作用物質に加える工程、および
（ｂ）前記コラーゲン含有溶液と前記作用物質とを、前記コラーゲンが再構成コラーゲン線維セグメントを形成し得る条件下で混合する工程
を含んでなる方法によって作られることを特徴とする再構成コラーゲン線維セグメント。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明はコラーゲン線維セグメント、このようなコラーゲン線維セグメントの製法、およびこのようなコラーゲン線維セグメントを挿入した製品、例えば組織増強およびドラッグデリバリーのための注射用コラーゲン組成物に関するものである。
発明の背景
コラーゲンはからだの主要構造蛋白質であり、全身の蛋白質の約1/3を構成する。それは皮膚、腱、骨および歯の有機物の大部分を構成し、大部分のその他の身体構造には線維性封入体として存在する。コラーゲンの特性の幾つかを挙げると、高い引張り強度；イオン交換能力（それは一部には電解質、代謝産物及び薬剤の結合による）；その低い抗原性（一部には潜在的抗原決定基がらせん構造によって隠蔽されることによる）；および低伸展性、半透過性、および溶解性がある。さらにコラーゲンは細胞の接着を役割とする天然物質である。これらの特性および他の多くの特性のおかげで、この蛋白質は細胞増殖基質としい医療製品への加工、例えば移植用人工器官の製造、および細胞性－および非細胞性組織均等物の製造などに適した材料にする。
コラーゲン組成物は一般には皮膚または腱から、分散、消化または溶解によって作られる。分散は組織を機械的に破砕してコラーゲン線維の懸濁液を作ることを含む。消化は、コラーゲン分子の非らせん形テロペプチド部分の酵素分解を含み、その結果アテロペプチド・コラーゲン溶液を生成する。溶解は、新たに生成したコラーゲン線維における酸不安定性架橋の切断を含み、その結果コラーゲンモノマーおよびポリマーの溶液が生成する。これらの方法は酸または酵素抽出を含む。多くの場合酵素抽出が好ましい。なぜならばその方法は収量増加をもたらし、より高純度のコラーゲンを生成するからである。しかし酵素抽出は部分的に分解したコラーゲンを生成するので不都合である。すなわち抽出酵素はコラーゲン分子を、分子内架橋結合を含む末端非螺旋領域で切断する。
注射用組成物は、この分野では、組織膨張（tissue bulking）組成物として特に泌尿器科および成形手術に使用されてきた。ダニエル（Daniels）の米国特許第3,949,073号公報には、酵素抽出コラーゲンからなる水性の注射用コラーゲンが開示されている。注射プロセスで用いる酵素としては、アテロペプチド・コラーゲンを与えるペプシンがある。最終産物の濃度は約20mg/mLまでであるが、不溶性コラーゲン原線維（フィブリル）をその組成物に加えてもよい。しかし患者に注入する場合、インプラントの容量の永続性が低下するが、それは一部は水性担体の体内への吸収によって、一部はコラーゲンが低濃度であるためである。そのため、当該部位に後続して注射が必要となるのが普通である。
注射用コラーゲン・インプラントには容量の永続性および形の保持が望まれる。当業者に公知のコラーゲン組成物を注射した後は、その組成物の液体成分が体内吸収されるために容量は減少する。コラーゲンの濃度を高くすると容量の永続性のためには役立つが、同時に、組成物の押出適性および押込適性が低下する。
Nguyenらの米国特許第4,642,117号公報には、再構成された機械破砕アテロペプチドコラーゲン線維からなる注射用コラーゲン材料が開示されている。コラーゲン線維を硬質スクリーンメッシュを用いて機械的に破砕し、比較的大きい線維の大きさを約50～150ミクロンに減らす。開示された組成物は最終濃度が約35～65mg/mLであるが、押出適性および押込適性がよくないことがわかった。スメスタッド（Smestad）の米国特許第4,582,640号公報には、グルタールアルデヒドで架橋した同様な組成物が開示されている。臨床試験において、ウォラス（Wallace）らの米国特許第4,803,075号公報には、生体適合性液体滑剤を

添加して押出適性および押込適性の問題を克服した同様な注射用組成物が開示されている。

容量永続性だけでなく、形の永続性も当業者に公知の注射用コラーゲン組成物には望まれる。注射するとコラーゲンは組織中を移動する傾向がある。そこで、もしも特異的および局所的組織増強または膨張（bulking）が必要ならば、そのような移動のせいでその後の注射が必要となる。

本発明は再構成された、コラーゲン線維セグメントの形のコラーゲン組成物、コラーゲン線維セグメントの製法、および公知の注射用コラーゲン組成物の欠点を克服する注射用コラーゲン組成物としてのそれらの使用について述べる。

発明の概要

本発明はコラーゲン線維セグメントおよびコラーゲン線維セグメントを含む注射用コラーゲン組成物、およびそのようなコラーゲン線維セグメントの製法および使用法を提供する。

本発明は公知の注射用コラーゲン組成物に対して改良された特性を有する注射用コラーゲン組成物を提供する。本発明によって作られる好適な注射用コラーゲン組成物は高濃度のコラーゲンを含む。この注射用組成物は組織増強、組織修復およびドラッグデリバリーのために有用である。それらは生体リモデリングのためにも、その他の公知の組成物より改善された特性を有する。

図の簡単な説明

図１は再構成コラーゲン線維セグメントの製法に使用するための一装置を示す概略図である。

発明の詳細な説明

本発明に使用するコラーゲンはあらゆる適した供給源から、典型的には皮膚および腱から得ることができる。コラーゲンを採取し精製する多くの方法は、典型的には酸または酵素抽出を含め、当業者には公知であり、本発明に使用するコラーゲンを作るために用いることができる。酸抽出法を用いて得られるコラーゲンは酵素抽出法より好ましい。なぜならば酸抽出法を用いるときには非螺旋テロペプチド領域がコラーゲン分子内に保持されるからである。本発明に使用する好適なコラーゲン組成物は米国特許第5,106,949号公報（これは引用によりここに挿入される）に開示されている酸抽出ウシ腱コラーゲンである。

ここに記載される方法によるコラーゲン糸セグメントを作るためのコラーゲンを含むコラーゲン溶液は、一般に最低約1mg/mLないし約10mg/mL、好適には約4mg/mLないし約6mg/mL、より好適には4.5ないし5.mg/mLの濃度で、pHは約２ないし４である。コラーゲンに好適な溶媒は約0.05ないし0.1%、より好適には約0.05%の希酢酸である。使用できるその他の希酸性溶媒は塩酸、クエン酸および蟻酸である。コラーゲン溶液は任意に薬剤；増殖因子；ホルモン；その他の細胞外基質成分；その他のコラーゲン型；または遺伝物質、例えばベクターまたはその他の遺伝構成物、またはアンチセンス・オリゴヌクレオチドなどの物質を溶液中に含んでいてもよい。コラーゲン線維セグメントがコラーゲン溶液中にこれらの物質が共存して形成されると、これらの物質は前記セグメントに組み込まれる。

本発明の好適な方法において、コラーゲン線維セグメントは、コラーゲンを含む溶液をコラーゲン溶液を中和および／または脱水することができる中和および／または脱水剤（“凝固剤”と呼ばれることがある）中に断続的に押出してコラーゲン線維セグメントを形成し；生成したコラーゲン線維セグメントを集めることを含んでなる方法によって作られる。

脱水剤はコラーゲン溶液から水を除去しコラーゲンを濃縮する溶液でなければならない。コラーゲンが濃縮されると、それはより固くなる。一つの好適な脱水浴は、コラーゲン溶液の浸透圧より高い浸透圧、好適には約500m0sm以上の浸透圧、および約５ないし10のpH、より好適には約７ないし９のpHを有する脱水剤を含んでいる。その他の好適な脱水剤には水溶性の生体適合性ポリマー、例えばデキストラン（DEXTRAN（登録商標））およびポリエチレングリコール（PEG）などが含まれる。塩溶液、例えば燐酸緩衝食塩液（PBS）が好ましい。この場合、燐酸塩濃度は約0.001ないし約0.02Mで、塩濃度は約0.07ないし約0.

3Mである。その他の好適な脱水剤はイソプロピルアルコールとアセトンである。好適な実施形態において、燐酸緩衝液中20％w/vポリエチレングリコール、MW8000（PEG－8000）を使用する。
コラーゲン溶液は貯蔵容器から少量を取って供給する。供給法は注射器を用いて手動で行われるか、またはコラーゲン溶液を含む注射器またはカートリッジに結合したポンプを用いて自動制御してもよい。
本発明のその他の好適な方法において、コラーゲン線維セグメントの製法は、さらに、生成した線維セグメントを緩衝液中ですすいで残留する脱水／中和剤を除去することを含む。
その他にコラーゲン線維セグメントを架橋することが望ましい。架橋するとコラーゲン線維が強くなり、患者に注入したとき、そのコラーゲンの細胞による生体リモデリングを規制する。架橋は、コラーゲン線維セグメントをすすがないで行ってもよいが、好適な実施形態ではコラーゲン線維セグメントをすすいでから架橋する。
したがって、ここに使用する用語“コラーゲン線維セグメント”は、コラーゲン溶液から、線維セグメントとして再構成されるように作られた加工コラーゲンを意味するものとする。
本発明の好適な実施形態を説明する目的のために、だが本発明を制限する目的ではなく、本発明の方法を図１に示される装置を用いコラーゲン線維セグメントを作ることによって説明する。
図１は貯蔵カートリッジ２に結合した圧縮空気源１、高圧管３、供給バルブ４、および管系８を通して挿入された針７を含む。圧縮空気源１は、空気圧調節器５にも連結し、管系６を介して供給バルブ４にも連結する。中和および脱水浴９は、蠕動ポンプ12、およびその底部に出口をもち、メッシュバッグ10を含むフラスコ11に管系８を介して結合している。
一つの好適な実施形態においては、0.05％酢酸中5mg/mLのコラーゲンを含むカートリッジ２が、調節された空気圧源１によって供給される圧縮空気により、一定圧下に置かれる。コラーゲンは供給バルブ４から高圧管３を経て放出される。バルブ４は管系６を経て空気圧調節器５に連結する。管系６はバルブ４に反復空気パルスを与える。バルブ４は先端の鈍い針７とフィットし、その針は、先端が管腔の大体中心に位置するように管系８の壁に置かれる。管系８は循環する中和および／または脱水浴９を構成し、その浴には蠕動ポンプ12によって約520mL/分の速度の循環がおきる。再循環浴９はコラーゲン溶液を中和および／または脱水してコラーゲン線維セグメントを生成する機能を持つ。回路では、供給針７の下流に、多孔性バッグ10を含むフラスコ11があり、フラスコ内の管末端で再循環浴と直列に結合している。この回路はフラスコ底部の出口から蠕動ポンプ12に続き、浴の流れを作り出し、供給針７に戻す。
貯蔵カートリッジ２中で加圧下にあるコラーゲンは、空気が調節器５から供給バルブ４にパルスとなって放出されると、供給バルブ４から針７を通って再循環浴９に漸増量が放出される。浴９の流速は、放出されたコラーゲンが引かれて大体円柱状セグメントになるように調節される。コラーゲン放出を停止する、そのセグメントは針先端７から切り取られ、再循環浴９によって、多孔性バッグ10を含むフラスコ11に運ばれる。セグメントは多孔性バッグ10に捕捉されるが、浴９の方はフラスコ11底部の出口にあるバッグを通過して出口に至り、回路に入る。
上記の装置に好適な材料はコラーゲン線維形成、コラーゲン線維の所望の特徴およびコラーゲン線維形成に使用する材料に適合する。若干の例では、装置は滅菌に耐えなければならない。装置および方法を変更して、コラーゲン線維セグメントを静止製造（still produce）してもよい。
他の実施形態では、注射器プランジャーに直接少しずつ圧を加えることによって供給を制御する。もう一つの実施形態では、注射器プランジャーは存在せず、注射カートリッジに含まれるコラーゲン溶液に空気のパルスを直接与えることによって制御する。しかしバルブ制御が好ましい。なぜならばそれは溶液の供給の一貫性および調節を可能にするからで

ある。少量のコラーゲン溶液を制御するその他の手段が熟練せる当業者によって用いられる。
バルブを用いない場合はカートリッジから導かれる管から、またはバルブから導かれる管から、供給コラーゲン溶液を脱水浴に導入する短い導管が取り付けられる。その導管は少なくとも１つの開口をもっていなければならず、好適には先端の鈍い針または類似の形のものであるのが好ましい。針または開口のゲージは12～30ゲージであるのが好ましく、より好適には14～21ゲージである。開口の形は丸くても楕円形でもその他の形でもよい。楕円形開口はリボン様コラーゲン線維セグメントを与える。開口は脱水浴に沈められているのが好ましいが、浴上の領域にあって、溶液が浴に滴下するようになっていてもよい。開口が沈んでいる場合には生成するコラーゲン線維セグメントの形はより容易に制御される。コラーゲン溶液を脱水浴中に運搬するための当業者に公知のその他の手段を用いてもよい。熟練せる当業者は装置および方法の変更を行って効果的に同じ結果を得ることができる。
脱水浴９は供給口７に対して動いていなければならない。コラーゲン溶液が開口から放出する速度に対する脱水浴の速度が生成コラーゲン線維セグメントの形を決める。浴の速度の方が遅いと球状またはコンマ形のセグメントを形成する。同様な速度の場合、概して円柱形状が形成される。浴速度の方が速いと末端に行くにつれてだんだん細くなる長細い形を形成する。浴速度は所望の線維形状にしたがって調節することができる。
本発明の脱水浴は、製品の無菌性を保持するために閉鎖回路であるのが好ましい。サイズ17ネオプレン（NEOPRENE）管系が用いられるが、いかなる管系を使用してもよい。上述の管系をトラフ用管系または液体を導くその他の導管と交換することによって、開放浴に置き換えることができよう。
収集フィルターはコラーゲン線維セグメントの通過を許さない十分程小さいが、浴を流れさせるためには十分大きい穴（aperture）をもたねばならない。管系に結合し、フラスコ内に包囲された250μｍの孔を含むナイロンメッシュバッグを用いるが、フィルターおよび出口を有するいかなる収集容器でも代わりに使用できる。
浴は供給針から上流に位置する蠕動ポンプの使用によって再循環される。いかなるポンプ手段でも代用できるが、系の無菌性を維持するものが好ましい。
フラスコから取り出したバッグに集められているコラーゲン線維セグメントは、好ましいならば、精製水または燐酸緩衝食塩液ですすぐ。すすぎによって材料に残っている中和および／または脱水剤はすべて除去される。
コラーゲン線維セグメントの性質は次の容量に依存する：コラーゲン濃度；コラーゲンが押出される口；コラーゲンが押出される速度；各パルスで押出されるコラーゲン溶液の容量；および浴の循環速度である。湿潤糸におけるコラーゲンの最大濃度は約325mg/mLである。最終製品のコラーゲン濃度範囲はコラーゲン線維セグメントと周囲液体との容量比に依存する。上記の変量を変えることによって、直径0.05～2.5mmの範囲、長さ最低2mmのコラーゲン線維セグメントが作られる。その上、先端を切ったセグメントは糸の機械的均質化（ホモジナイゼーション）によって生成できる。熟練せる当業者はパラメーターを変えて、その他の寸法のコラーゲン線維セグメントを生成することができる。
コラーゲン線維セグメントをその後任意に架橋剤で架橋する。コラーゲン架橋剤にはグルタールアルデヒド、ホルムアルデヒド、カルボジイミド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ビスイミデート、グリオキサール、ポリグリセロールリグリシジルエーテル、塩化アジピル、デヒドロサーマル（dehydrothermal）、UV照射、および糖仲介性などが含まれる。コラーゲンは室温で放置すると自然に架橋する。しかし架橋剤をこれらの例に限定する必要はない、というのは熟練せる当業者に公知のその他の架橋剤および方法も用いられるからである。架橋剤はホスト細胞によりリモデリング可能の生体適合性材料を生成するように選択すべきである。好適な架橋剤は１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸（EDC）である。EDCおよび水を含む架橋剤溶液はアセトンも含むことができる。
コラーゲン線維セグメントは中性pHを有する希過酢酸溶液中で滅菌することもできる。コ

ラーゲンの滅菌法は米国出願番号第08/177,618号、現在米国特許第5,460,962号に記載されており、引用によってここに挿入される。
コラーゲン線維セグメントは薬剤；増殖因子；ホルモン；その他の細胞外基質成分；または遺伝物質などの作用物質でコーティングしてもよい。作用物質のコーティングは浸漬または化学的結合によって実現することができる。コラーゲンは細胞が結合する天然基質であるから、細胞をこのセグメント上に培養してもよい。
注射用組成物として用いられるコラーゲン線維セグメントは注射器に移される。注射用製剤は開放浴は、200mg/mL以下のコラーゲンの等張食塩液で作られる。熟練せる当業者は等張食塩液の代わりにその他の生体適合性担体を用いることができる。
コラーゲン線維セグメントを患者に注入するために外科的処置に用いることができる。コラーゲン・インプラントの適応症は組織増強、組織修復、またはドラッグデリバリーである。コラーゲン・インプラントは括約筋、例えば尿道括約筋に組織を増量するために、または美容整形に用いられる。組織修復は、罹患した－、受傷した－または切除した組織領域にこの組成物を与えることによって達成される。薬剤をその組成物に加えると、薬剤は運ばれて組織修復を高め、または治療薬となる。細胞がコラーゲン線維セグメントに導入されると、それら細胞を損傷または罹患した組織に運びその組織に再定着させる手段が提供される。
インプラントのデリバリーは、コラーゲン線維セグメントの或る量を組織間に置くか、または単一組織の隙間または欠陥部を埋めるというやり方で手動で行うことができる。好適なデリバリー手段は、注射器を用いて注射することである。組成物中のコラーゲン濃度は適応症に依存する。コラーゲン線維セグメント組成物へ他の成分を添加したり他の末端処理をすると、最終的組成物の濃度が変わることがある。
コラーゲン線維セグメントのその他の好適な製法において、コラーゲン溶液と凝固剤とのコントロールド・ミキシングが行われる。コントロールド・ミキシングは回転振盪台、磁気撹拌機の撹拌棒、またはキッチンブレンダーを用いて行った。熟練せる当業者は、多量の液体を調節可能に混合できるその他の手段を評価し、決定する。その好適な方法では、速度調節器および刃に若干の変更を加えた、典型的キッチンブレンダーに似た装置を使用する。速度調節器の変更により、標準的器具によっては与えられない速度で混合することができる。ブレンダーの刃は、生成したコラーゲン線維セグメントがコントロールド・ミキシング中に切られないように、ブレンダーの細切り刃の端を丸くするために、ブレンダーの刃は管で覆われる。あるいは、細切り刃を混合へら、または熟練せる当業者には公知のその他の手段に代えても所望の力を生み出すことができよう。
ブレンダーのチェンバーに或る量の脱水および／または中和剤を入れる。ブレンダーをその後作動させ、前記脱水／中和剤を所望速度で混合する。その後好適には希酢酸中、最低1mg/mLのコラーゲン溶液を混合中の前記作用物質中に注入する。コラーゲンと作用物質をその後、コラーゲン溶液が脱水および／または中和によって凝固するために十分な時間混合させて、コラーゲン線維セグメントを生成する。ひとたび生成すると、ブレンダーを停止し、混合物をそのコラーゲン線維セグメントが沈降するのに十分な時間放置する。線維セグメントを作用物質から取り出すために、混合物を遠心分離するか濾過する。遠心分離を用いる場合は、混合物を遠心管に傾瀉し、線維セグメントがペレットを形成し作用物質、上澄液、を注ぎ去る。線維セグメントをすすぐのが好ましい。この場合も遠心分離法を用い、線維セグメントを水または緩衝食塩液に再懸濁し、再び遠心分離して線維セグメントをペレット化する。必要に応じてすすぎ段階を繰り返す。その後の架橋剤を用いる架橋段階も遠心分離法を用いて行う。ペレットを架橋剤、好適には水およびアセトン中のEDCに再懸濁し、架橋剤とコラーゲン線維セグメントとを接触させる。架橋反応を行った後、すすぎ段階を繰り返して過剰の架橋試薬と反応副産物とを除去するのが好ましい。脱水剤の除去、コラーゲン線維セグメントのすすぎ、および架橋のためのその他の手段を熟練せる当業者は決めることができる。コラーゲン線維セグメントをひとたび作ったならば、いくらか遠心分離した後、それらを押出し－および押し込み可能濃度にまで希釈することができる。

コラーゲン溶液を凝固剤と共にコントロールド・ミキシングする方法によって作られるコラーゲン線維セグメントは約0.001mm～約20mm、より好適には0.1～2.0mmの長さを有する。コントロールド・ミキシング法を用いて作られたコラーゲン線維セグメントにおいて1mm以上の長さのセグメントは分岐構造またはフォーク形構造を有する傾向がある。コラーゲン線維セグメントを作るもう一つのその他の実施形態は、コラーゲン糸が細切りされまたは均質化（ホモジナイズ）されるものである。注射用コラーゲン組成物は均質化されたコラーゲン糸からも作られる。コラーゲン糸を作る方法は米国特許第5,378,469号公報に開示されている。これは引用によってここに導入される。酸抽出ウシ腱コラーゲン5mg/mLの溶液を、コラーゲン溶液より高い浸透圧および約５～９のpHを有する中和および／または脱水剤中に押出し、その中和および／または脱水剤をコラーゲン糸が生成し得る条件下に維持する。糸は任意に架橋してもよい。その糸をその後培養管に移し、精製水を加えて糸を濡らす。組織ホモジナイザーを用いてその糸を切り刻み、小さいコラーゲン線維セグメントにする。その混合物をフィルター付き漏斗に移し、過剰の水を除去する。こうして生成したコラーゲン線維セグメントを注射器に移すことによって、注射用組成物として用いることができる。糸をコラーゲン線維セグメントに切り刻んで細かくするその他の方法、例えばカッティングまたはチョッピングなどである。

下記の例は本発明の実施をよりよく説明するためのものであり、決して本発明の範囲を制限するものではない。熟練せる当業者には、ここに記載の方法には、本発明の精神および範囲から逸脱することなく種々の変更がなされ得るものであることが理解される。

実施例

実施例1:供給バルブを用いるパルス状押出し法によるコラーゲン線維セグメントの製造

0.05%酢酸中5mg/mLのコラーゲンを含むカートリッジを、調節された加圧空気源から供給される20psi（138kPa）の圧縮空気によって一定圧下に置いた。１本の管が連結され、コラーゲンをEFD752供給バルブ（EFD、E.Providence、RI）に流れ込ませる。バルブには、スイッチを有するEFD900空気圧調節器から来る管も連結した。前記空気圧調節器には80psi（552kPa）の一定圧下の空気が供給され、反復空気パルスをバルブに供給する。バルブは21ゲージの鈍い先端をもち、サイズ17ネオプレン管系の壁に突き通った針を取り付けられている。針の先端は管腔内のほぼ中心にある。

その管系は、pH7.6の燐酸緩衝液中20%（w/v）ポリエチレングリコールMW8000（PEG－8000）の回路を形成し、それは蠕動ポンプの使用によって約200mL/分の速度で循環する。そのPEG浴はコラーゲン溶液の中和および脱水に役立ち、コラーゲン線維セグメントを形成する。回路において、供給針の下流には真空フラスコが、その口のところでストッパーおよびそれを貫通する管と結合しており、250ミクロン多孔性ナイロンバッグがそのフラスコ内の管の末端に固定されている。回路はフラスコ底部の出口から蠕動ポンプに続き、浴の流れを作り出し、供給針に戻る。

ディスペンサーから或る量の空気がパルスとなって放出されるとき、加圧下のコラーゲン溶液は供給バルブから針を通って放出され、量を増加しながら浴に入る。流れる浴の速度を調節して、放出されたコラーゲンが大体円柱状のセグメントになるようにする。コラーゲン放出を停止したとき、そのセグメントはバルブ先端から切られ、再循環浴によって、多孔性バッグを含むフラスコに運ばれる。セグメントは多孔性バッグに捕捉されるが、PEG浴の方はフラスコ底部のバッグを通過して出口に行き、回路に入る。バッグに多くのコラーゲン線維セグメントが集まったとき、そのバッグをフラスコから取り出す。

実施例2:パルス状押出し法によるコラーゲン線維セグメントの生成

別の装置アセンブリを用いて、パルス状押出し法によってコラーゲン線維セグメントを製造した。

EFD900空気圧調節器および供給装置に、調節加圧空気源によって供給される50psi（345kPa）の一定圧の空気を与えた。調節器および供給装置は反復空気パルスを、１本の管を介して、0.05%酢酸中5mg/mLの酸抽出コラーゲンを含む30cc注射カートリッジに送り込んだ。そのカートリッジの先端には、サイズ17ネオプレン管系の壁に突き通った30ゲージの先端の鈍い針が取り付けられ、その針の先端はネオプレン管のほぼ中心にある。その管系は

pH7.6の燐酸緩衝液（w/v）中20％ポリエチレングリコールMW8000（PEG－8000）の回路を形成し、それを蠕動ポンプの使用によって約520mL/分の速度で蠕動ポンプの使用によって再循環させた。PEG浴はコラーゲン溶液を中和および脱水し、コラーゲン線維セグメントを形成するのに役立った。回路において、供給針の下流では真空フラスコがその出口でストッパーおよびそれを貫通する管と結合し、250ミクロンのナイロンメッシュバッグがフラスコ内の管末端に固定されている。回路はフラスコ底部の出口から蠕動ポンプに流れ続け、浴の流れを作り出し、供給針に戻る。

コラーゲン溶液を含むカートリッジは圧縮空気のパルスを受け、漸増量のコラーゲンをカートリッジから押出し、針を通って再循環脱水浴中に出る。流れる浴の速度は、放出されるコラーゲンが大体円柱状セグメントになるように調節した。コラーゲン放出を停止したとき、セグメントは針先端から切られ、再循環浴によって多孔性バッグを含むフラスコに運ばれた。セグメントは多孔性バッグによって捕捉されるが、PEG浴の方はフラスコ底部のバッグを通って出口に行き、回路に入った。多数のコラーゲン線維セグメントがバッグに集まったとき、そのバッグをフラスコから取り出した。

実施例3:その他の脱水組成物中にパルス状押出しする方法によるコラーゲン線維セグメントの製造

実施例２の装置アセンブリを用いて、コラーゲン線維を生成できる量の他の組成物中にパルス状押出しする方法によって、コラーゲン線維セグメントを生成した。

別個に、PEG－8000脱水浴の代わりにイソプロパノールまたはアセトンを使った。コラーゲン線維セグメントを実施例２の方法によって形成し、多孔性バッグに集め、一方イソプロパノールまたはアセトン浴はフラスコ底部のバッグを通って出口に流れ、回路に入る。多数のコラーゲン線維セグメントがバッグに集まったとき、そのバッグをフラスコから取り外した。

実施例4:パルス状押出し法によって製造したコラーゲン線維セグメントの注射用コラーゲン組成物の製造

臨床前試験のために、コラーゲンを含む多数の組成物を作り、コラーゲンの生体適合性を調べた。コラーゲン線維セグメントを作るために用いたコラーゲン溶液を変化させるか、または生成したコラーゲン線維セグメントを生成後さらに処理するかした。

組成物１は実施例２の方法により5mg/mL酸抽出ウシ腱コラーゲンを用いて作ったコラーゲン線維セグメントの組成物であった。コラーゲン線維セグメントは精製水中ですすいだ。

組成物２は架橋コラーゲン線維セグメントの組成物であった。コラーゲン線維セグメントを、実施例２の装置および方法を用いし、5mg/mL酸抽出ウシ腱コラーゲンを用いて作った。線維セグメントを含む収集バッグを精製水ですすいだ後、そのバッグを5mM水中EDCに４時間浸すことによって線維セグメントを架橋した。

組成物３は、コラーゲン線維セグメントが一部熱変性したコラーゲンから作られた組成物であった。カートリッジに入れる前に、5mg/mL酸抽出ウシ腱コラーゲンを50℃で30分間加熱することによって変性させた。変性コラーゲンを非変性5mg/mL酸抽出ウシ腱コラーゲンと1:1の比で混合し、一部変性したコラーゲン混合物を形成した。一部変性コラーゲン線維セグメントは実施例２の装置および方法を用いて作られた。コラーゲン線維セグメントは精製水ですすいだ。

組成物４は、酵素抽出コラーゲンから作ったコラーゲン線維セグメントの組成物であった。6.7mg/mLのペプシン抽出コラーゲン（Pentapharm.Basel,Switzerland）をコラーゲン溶液として用い、この溶液から実施例２の方法によってコラーゲン線維セグメントが生成された。

組成物５は、酵素抽出コラーゲンから作られたコラーゲン線維セグメントの組成物であった。培養細胞からコラーゲンを得る方法は米国出願第08/240,16号に記載されており、ここに導入される。ヒトコラーゲン5mg/mLをコラーゲン溶液として用い、それからコラーゲン線維セグメントを実施例２の方法によって生成した。

組成物１、２および３を、コラーゲン線維セグメントを含むバッグを0.1％中和過酢酸を含む燐酸緩衝食塩液に16時間置くことによって滅菌し、最後に滅菌燐酸緩衝食塩液ですす

いだ。組成物のコラーゲン濃度を測定した。組成物１の最終濃度は69.4mg/mLであった。組成物２の最終濃度は88.8mg/mLであった。組成物３の最終濃度は88.1mg/mLであった。

実施例5:均質化（homogenization）によるコラーゲン線維セグメントの注射用コラーゲン組成物の製造

組成物６を、5mg/mL酸抽出ウシ腱コラーゲンを用いてコラーゲン糸から作った。コラーゲン糸の製法は米国特許第5,378,469号公報に記載されている。1.0gの乾燥した経時架橋した糸を鋏で小片に切った。その糸を培養管に移し、精製水10mLを加えてその糸を濡らした。組織ホモジナイザーを高速度で２分間用いて糸を細砕し、約150mg/mLのペースト状にする。その混合物をフィルター付き漏斗に置き、過剰の水を約10分間除去し、４℃で保存した。

組成物７は、コラーゲン糸から、5mg/mL酸抽出ウシ腱コラーゲンを用いて、これも米国特許第5,378,469号公報に開示された方法によって作られた。1.0g量の乾燥糸をレザーの刃で細かく切った。その糸を培養管に移し、精製水10mLを加えて糸を濡らした。その混合物をフィルターつき漏斗に置き、過剰の水を約10分間除去し、その後４℃で保存した。

実施例6:TGFβのコラーゲン線維セグメントへの挿入

ドラッグデリバリーのためのコラーゲン線維セグメントの使用を研究した。コラーゲン線維セグメントに放射性［I^{125}］TGFβ（コラボラティブ　リサーチ（Collaborative Research））を２方法で挿入した：生成したコラーゲン線維セグメントの表面を［I^{125}］TGFβでコーティングする；または［I^{125}］TGFβを挿入したコラーゲン線維セグメントを生成する。

コラーゲン線維セグメントを実施例２の方法によって作った。0.05%酢酸中5mg/mLのコラーゲン溶液を全部で10mL用いた。コラーゲン線維セグメントを含むバッグをフラスコから取り出した。コラーゲン線維セグメントの表面コーティングをするために、コラーゲン線維セグメントをバッグから取り出し、その後４℃で一晩0.8μCiの［I^{125}］TGFβに浸漬した。

TGFβを挿入したコラーゲン線維セグメントも作った。0.05%酢酸中5mg/mLのコラーゲン溶液10mLに0.8μCi［I^{125}］TGFβを加えて混合した。コラーゲン線維セグメントを実施例２の方法によって作った。

［I^{125}］TGFβの溶出研究を約100mgのアリコートで行った;2つの処理法を３回ずつ行った。コラーゲン糸セグメントの各部分を、燐酸緩衝食塩液（PBS）中0.4%ウシ血清アルブミン（BSA）溶液5mLに浸し、振盪台上で37℃で混合した。BSA/PBSの放射能を２～500時間にわたって測定した。

溶出研究の結果は、［I^{125}］TGFβで被覆したコラーゲン線維セグメントは放射性増殖因子を［I^{125}］TGFβを挿入して含むコラーゲン線維セグメントより速く溶出することを示した。

実施例7:パルス状押出し法によるコラーゲン線維セグメントの注射用コラーゲン組成物の臨床前研究

動物モデルを用いて注射用組成物の安全性および効果を証明した。ニュージーランド白ウサギを動物モデルとして選んだ。それは、この動物が組成物を皮下注射するための広い耳表面積を有するからである。この研究には11匹のウサギを用いた。

実施例４で作った組成物１、２、および３を多数の3cc注射器に、注射器あたり0.5mLずつ無菌的に入れた。比較として、コンチゲン（CONTIGEN）（Bard,billerica,MA）、ペプシン抽出グルタールアルデヒド架橋ウシ皮膚コラーゲン35mg/mLの無線維懸濁液、も用いた。

すべてのウサギに黒いいくつかの点を入れ墨して注射部位を記録し、耳の成長および注射組成物の持続性を測定するための対照点を用意した。入れ墨をする前に、全動物を20ccアセプロマジン（Schein）で麻酔した。コラーゲン注射の前の26日間入れ墨を治癒させ、入れ墨によるすべての炎症が鎮まったことを確認した。

全コラーゲン注射は無菌的手法を用いて行われた。全動物に注射前に100mg/mLキシラジン（Miles）0.3mLおよび100mg/mLケタミン（Fort Dodge）3.0mg/mLを投与して麻酔した。イ

ンプラントとして動物に0.5mg/mLの組成物を１インチ18G針で皮下投与した。
入れ墨点の測定を０、２、４、７、10、14、21日目、その後は７日ごとに研究の続く間行った。全入れ墨点をマイクロメーターで測定し、結果をミリメートルで記録した。ウサギを６週間目と12週間目に0.3mLの100mg/mLキシラジン（Miles）および3.0mLの100mg/mLケタミン（Fort Dodge）、加えて5ccの1.5M KCl（Sigma）を用いて殺した。殺した後、すべての耳を切り取り、インプラント周囲の余計な皮膚を除去し、ホルマリンに24時間固定してから組織検査のための処理をした。
組成物１、２および３は注射部位に局所的に残ったが、CONTIGENは注射組織中に広がった。
実施例8:コラーゲン溶液と凝固剤とのコントロールド・ミキシングによって製造されるコラーゲン線維セグメント
コラーゲン溶液と凝固剤とのコントロールド・ミキシングによってコラーゲン線維セグメントの懸濁液を作ったるコントロールド・ミキシングは電圧調節器（Variac）で改良したキッチンブレンダー（Oster）の使用によって行った。電圧調節器は、その装置によって提供される標準的速度では不可能だった可変速度を与えることができた。ブレンダーの刃は、ネオプレン管系で刃の長さカバーすることによってそれぞれ変更された。
体積400mLの8000MWポリエチレングリコール（PEG－8000）溶液（燐酸緩衝液20％PEG－8000、pH7.6－7.8）をブレンダー室に入れ、ブレンダーのスイッチを入れて脱水剤の乱流を作り出す。0.05％酢酸中コラーゲン濃度1mg/mLの溶液200mLをブレンダー室に加えた；その添加は約10秒以内に完了した。混合物を約60～70秒間混合し、その混合物を約４～５分間静置する。混合物をそれから遠心分離管に移し、約1000×ｇで約４～５分間遠心分離した。上澄液を傾瀉し、捨てた。各管に精製水を充填し、短時間振盪し、さらに約４～５分間遠心分離した。ペレットを集め、精製水ですすぎ段階を繰り返した。その後上澄液を傾瀉し、或る量のPBSを加え、ペレット化したセグメントを所望濃度に懸濁した。
実施例9:コラーゲン溶液と凝固剤とのコントロールド・ミキシングによって生成したコラーゲン線維セグメントの注射用コラーゲン組成物の臨床前研究
動物モデルを用いて実施例８の方法によって作った注射用組成物の安全性および効果を証明した。ニュージーランド白ウサギを動物モデルとして使用した。それは組成物の皮下注射のための耳の表面積が大きいからである。10匹のウサギを研究に用いた。
非架橋組成物33.3、55.1および58.6mg/mLおよび5mM EDC架橋組成物58.6mg/mLを無菌的に多数の3cc注射器に、注射器１本あたり0.5mLずつ入れた。
すべてのコラーゲン注射は無菌的方法を用いて行った。コラーゲン注射前に、全動物を体重に応じて10mg/kgの100mg/mLキシラジン（Miles）、40mg/kgの100mg/mLケタミン（Fort Dodge）、および0.4mg/kgのアセプロマジン マレエート（Henry schein）で麻酔した。注入のためには１－インチ20ゲージ針を用いて動物の皮下に0.5mLの組成物を投与した。測定は０、１、７、21日目に、その後は21日ごとに研究期間中行われた。注入厚さは厚さゲージで測定し、注入幅はカリパスを用いて測定した。ウサギを６週間目および12週間目に0.3mLの100mg/mLキシラジン（Miles）および3.0mLの100mg/mLケタミン（Fort Dodge）、加えて2mL/kg体重の1.5M KCl（Sigma）を用いて殺した。殺した後、すべての耳を切り開き、インプラントの周囲の過剰の皮膚を除去し、72時間ホルマリンに固定し、その後組織検査のための処理をした。試験組成物はすべて、注射部位に局所的に残っていた。
前記の発明を明確にし理解する目的で、説明および実施例によって若干詳細に述べたが、添付の請求のの範囲内で若干の変化および変更が実施可能であることは熟練せる当業者には明らかである。

【図１】

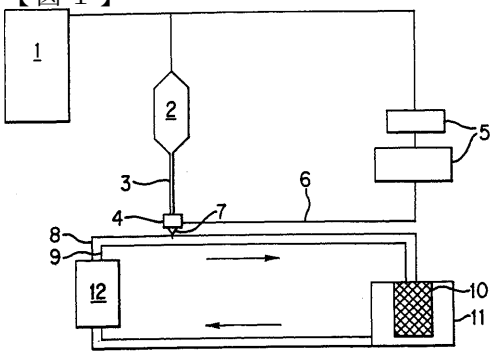


FIG. 1

フロントページの続き

(72)発明者 カヴァラーロ，ジョン，エフ.
アメリカ合衆国 ０２１７３ マサチューセッツ州 レキシントン ウィンター ストリート ７７
(72)発明者 ブライアント，リサ，エム.
アメリカ合衆国 ０２１６９ マサチューセッツ州 クインシー ウィラード ストリート ４５９ ナンバー１０５
(72)発明者 ドノヴァン，デイヴィッド，ダブリュ.
アメリカ合衆国 ０２１４４ マサチューセッツ州 サマーヴィル ベイ ステート ストリート ９１
(72)発明者 ケンプ，ポール，ディー.
アメリカ合衆国 ０１８９０ マサチューセッツ州 ウインチェスター メドウ クロフト ロード ７

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 特表平０７－５００００３７（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－２２６０５２（ＪＰ，Ａ）
特開平０３－１７０５７１（ＪＰ，Ａ）
特開昭６４－０６１５０６（ＪＰ，Ａ）
Atul KG et al., Atul KG et al., PROCEEDINGS OF THE ANNUAL NORTHEAST BIOENGINEERING CONFERENCE, １９８８年, Vol. Conf.14, pp 84-87

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
A61L 27/00
D01F 4/00