

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5570222号  
(P5570222)

(45) 発行日 平成26年8月13日(2014.8.13)

(24) 登録日 平成26年7月4日(2014.7.4)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>CO8G</b>	<b>77/02</b>	<b>(2006.01)</b>	CO8G 77/02
<b>A61P</b>	<b>17/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P 17/02
<b>A61L</b>	<b>27/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61L 27/00
<b>DO1F</b>	<b>9/08</b>	<b>(2006.01)</b>	DO1F 9/08
<b>CO7F</b>	<b>7/04</b>	<b>(2006.01)</b>	CO7F 7/04

請求項の数 6 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2009-545855 (P2009-545855)	(73) 特許権者	504142961
(86) (22) 出願日	平成20年1月10日 (2008.1.10)		バイエル・イノベーション・ゲゼルシャ フト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツ ング
(65) 公表番号	特表2010-520925 (P2010-520925A)		Bayer Innovation Gm bH
(43) 公表日	平成22年6月17日 (2010.6.17)		ドイツ51373レーフェルクーゼン、カ イザー-ヴィルヘルム-アレー20番
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/000124	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02008/086970		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成20年7月24日 (2008.7.24)	(74) 代理人	100101454
審査請求日	平成23年1月7日 (2011.1.7)		弁理士 山田 卓二
(31) 優先権主張番号	102007002896.4	(74) 代理人	100104592
(32) 優先日	平成19年1月15日 (2007.1.15)		弁理士 森住 憲一
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
(31) 優先権主張番号	102007061873.7		
(32) 優先日	平成19年12月19日 (2007.12.19)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物分解性および/または吸収性シリカゲル材料を製造するためのシリカゾル材料、その製造および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 式(I):

【化1】



[式中、X基は、同一または異なって、ヒドロキシル、水素、ハロゲン、アミノ、アルコキシ、アシルオキシ、アルキルカルボニルおよび/またはアルコキシカルボニルを示し、1~20個の炭素原子を有する置換若しくは非置換の直鎖、分岐鎖または環式基を構成するアルキル基から誘導され、酸素もしくはイオウ原子またはアミノ基によって遮断されていてもよい]

で示される1つまたはそれ以上のケイ素化合物の加水分解縮合反応を、酸性触媒作用のもと、初期pH0~<=7で、水溶性溶媒の存在下または不存在下に、温度0~80において、少なくとも16時間にわたって行い;

(b) 次いで水溶性溶媒を蒸発させて、剪断速度10s<sup>-1</sup>、4において粘度が0.5~2Pa・sの範囲内である単一相溶液を生成させ;

(c) 次いでこの溶液を、-20~10の温度まで冷却し;そして

(d) この冷却溶液を、-20~10の温度で10日間~39日間熟成させて、均一な

ゾルを生成させる；  
 ことによって得られるシリカゾル材料。

【請求項 2】

ヒト医学および／または医療技術における生物分解性および／または生物吸収性の繊維および繊維状不織ウェブを製造するための紡糸材料としての、請求項 1 に記載の材料の使用。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のシリカゾル材料を、後に紡糸操作において押出にかけることを特徴とする生物分解性および／または生物吸収性の繊維材料。

【請求項 4】

繊維材料が、繊維、連続フィラメント、繊維状不織ウェブおよび／または織布を含んでなることを特徴とする請求項 3 に記載の生物分解性および／または生物吸収性の繊維材料。

【請求項 5】

シリカゾル材料の製造方法であって、以下による方法：

(a)式 (I)：

【化 2】



[式中、X 基は、同一または異なって、それぞれヒドロキシル、水素、ハロゲン、アミノ、アルコキシ、アシルオキシ、アルキルカルボニルおよび／またはアルコキシカルボニルであり、1～20 個の炭素原子を有する置換若しくは非置換の直鎖、分岐鎖または環式基を構成するアルキル基から誘導され、酸素もしくはイオウ原子またはアミノ基によって遮断されていてもよい]

で示される 1 つまたはそれ以上の Si 化合物を、水溶性溶媒の存在下または不存在下に、少なくとも 16 時間にわたって加水分解縮合反応させ；

(b)反応系を同時に穏やかに混合しながら溶媒を蒸発させて、単一相溶液を生成させ；

(c)単一相溶液を -20～10 の温度まで冷却し；そして

(d)この冷却溶液を、-20～10 の温度で 10 日間～39 日間熟成させてシリカゾル材料を得る。

【請求項 6】

請求項 3 または 4 に記載の繊維材料からなる繊維マトリックスを、細胞によって形成される細胞外マトリックスのための細胞支持物質および／またはガイド構造として使用する細胞のインビトロ増殖方法によって製造する細胞構造、組織または器官。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改善された特性を有する生物分解性および／または吸収性シリカゲル材料を製造するための新規シリカゾル材料、その製造方法およびその使用に関する。また、本発明は、生物分解性および／または生物吸収性シリカゲル繊維材料に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト医学および医療技術における種々の応用のために、生物分解性および／または生物吸収性の材料を開発する様々な努力が進行中である。さらに、これらの分野は、特に材料の生物適合性、生物学的活性および毒性学的特性に関して、ますます高い要求を課す。

【0003】

吸収性シリカゲルは、先行技術において既知である。特許文献 1 は、生物分解性かつ生物吸収性の繊維構造を記載している。これらの繊維は、ゾル-ゲル法において、紡糸液か

10

20

30

40

50

ら糸を引き、必要に応じて該糸を乾燥することによって得られる。この紡糸液は、加水分解縮合によって一般式： $SiX_4$ で示されるモノマーから誘導される、1つまたはそれ以上の部分的または完全に加水分解縮合したケイ素化合物を含有する。これらの繊維は、紡糸操作の直後の分解において、細胞毒性試験で良好な結果を与えず、ある種の場合に細胞毒性と格付けしなければならないという欠点を有する。一般に、このような毒性は、ヒト医学または医療技術において、例えば傷治療の分野において使用するためには歓迎されない。

【0004】

さらに、特許文献1に記載される繊維の製造方法は、加水分解縮合工程における溶媒除去後に得られる混合物が、既に複数相の混合物であり、生成した固体を除去するために濾過にかけなければならないという欠点を有する。加えて、固相の生成および必須の濾過工程は、大きな割合の紡糸可能なゾルが失われることを意味する。また、特許文献1の方法は、熟成中のわずかとは言えない割合の固相の生成(特にゲル生成)を安全に抑制することもない。これは、紡糸可能なゾル液の割合をさらに減少させる。

10

【0005】

これとは関係なく、本発明の繊維および繊維状不織ウェブが改善された傷治療特性を有することを示すことができた。さらに、本発明の繊維および繊維状不織ウェブは、細胞支持構造物として使用するのに特に適している。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0006】

【特許文献1】独国特許発明第19609551号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、生物分解性および/または生物吸収性シリカゲル材料を製造するための新規シリカゾル材料を提供することである。さらに本発明の目的は、改善された細胞毒性および/または傷治療特性を有する生物分解性および/または生物吸収性シリカゲル材料を提供することである。さらなる目的は、例えば皮膚移植片、軟骨および骨のインビトロ製造のための、改善された細胞支持構造物を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

この目的は、請求項1に記載されるシリカゾル材料によって達成される。請求項1によれば、

(a)式(I):

【化1】



40

[式中、X基は、同一または異なって、ヒドロキシル、水素、ハロゲン、アミノ、アルコキシ、アシルオキシ、アルキルカルボニルおよび/またはアルコキシカルボニルを示し、1~20個の炭素原子、好ましくは1~10個の炭素原子を有する所望により置換された直鎖、分岐鎖または環式基を構成するアルキル基から誘導され、酸素もしくはイオウ原子またはアミノ基によって遮断されていてもよい]

で示される1つまたはそれ以上のケイ素化合物の加水分解縮合反応を、酸性触媒作用のもと、初期pH0~ $\leq$ 7で、水溶性溶媒の存在下または不存在下に、温度0~80において、少なくとも16時間にわたって行い;

(b)次いで蒸発させて、剪断速度10s<sup>-1</sup>、4において粘度が0.5~2Pa・sで

50

ある単一相溶液を生成させ；

(c)次いでこの溶液を冷却し；そして

(d)この冷却溶液を、速度論的に制御された熟成にかけて、均一な単一相ゾルを生成させる；

ことによってシリカゾル材料が得られる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】皮膚-表皮の傷治癒の結果を示す写真である(1a：KG211；1b：Promogran<sup>R</sup>)。

【図2】異なるマトリックスにおける皮膚線維芽細胞の活性を、異なる培養時間において比較するグラフである。

【図3】ヒト皮膚線維芽細胞との培養前ならびに4週間の培養時間後の細胞支持構造物を示す写真である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

工程(a)において、以下の式(I)で示される1つまたはそれ以上の異なるケイ素化合物のX基が使用される：

【化2】



[式中、X基は、同一または異なって、それぞれヒドロキシル、水素、ハロゲン、アミノ、アルコキシ、アシルオキシ、アルキルカルボニルおよび/またはアルコキシカルボニルであり、1~20個の炭素原子、好ましくは1~10個の炭素原子を有する所望により置換された直鎖、分岐鎖または環式基を構成するアルキル基から誘導され、酸素もしくはイオウ原子またはアミノ基によって遮断されていてもよい]。

【0011】

本発明の好ましい態様において、式(I)中のXは、1~20個の炭素原子、好ましくは1~10個の炭素原子を有する所望により置換された直鎖、分岐鎖および/または環式アルコキシ基である。より好ましくは、式(I)中のXは、所望により置換された直鎖および/または分岐鎖C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub>アルコキシ基である。特に好ましいのは、置換された、好ましくは置換されていない直鎖および/または分岐鎖C<sub>2</sub>~C<sub>3</sub>アルコキシ基、例えばエトキシ、N-プロポキシおよび/またはイソプロポキシである。

【0012】

本発明によれば、本発明の加水分解縮合反応におけるケイ素化合物として、テトラエトキシシラン(TEOS)を使用するのが特に好ましい。水溶性溶媒として、好ましくはエタノールまたは水/エタノール混合物を使用してよい。ケイ素化合物/エタノールの比は、 $\geq 1$ であることができる。

【0013】

初期pH0~ $\leq$ 7、好ましくは2~5が、硝酸酸性化した水を用いる本発明の好ましい態様において確立された。しかし、NOまたはNO<sub>2</sub>を局所的に生成することができる他の酸性混合物および/または溶液も、本発明の実施に適している。これらは、例えば、生理学的環境において、分子酸素とともに、酵素法(ニトロキシドシンターゼ、NOSによる)によって一酸化窒素(NO)を生成し、次いでこれが身体によって迅速にNO<sub>2</sub>に変換される酸性混合物および/または溶液であってよく、また、これらは、有機硝酸還元酵素の助けを借りてNOを生成する有機ニトレートまたは硝酸エステル(いわゆるNO供与体)、例えば硝酸エチルであってよい。このNOの酵素放出のためには、チオール基(システイン)が必要である。

## 【0014】

従って、希硝酸に加えて、本発明によれば、生理学的に適合する酸(例えば、クエン酸、コハク酸、酒石酸、酢酸またはアスコルビン酸)および少なくとも1つの必須アミノ酸(例えば、L-アルギニン、より好ましくは、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-フェニルアラニン、L-チロキシン、L-メチオニン、L-リジンまたはL-トリプトファン)または非必須アミノ酸(例えば、L-グルタミン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グリシン、L-アラニン、L-プロリン、L-ヒスチジン、L-チロシン)の水性またはアルコール性溶液(より好ましくは水性の希エタノール溶液)も、NOSの基質として、pHを弱酸性ないし並の強酸性の範囲内の所望の値に調節するのに適している。

10

## 【0015】

好ましい態様において、加水分解縮合反応は、ケイ素化合物と硝酸酸性化した水を、1 : 1.7 ~ 1 : 1.9のモル比、より好ましくは1 : 1.7 ~ 1 : 1.8のモル比で用いて行う。硝酸酸性化した水を、0.01N HNO<sub>3</sub>の形態で使用することができる。

## 【0016】

加水分解縮合を、少なくとも16時間、好ましくは少なくとも18時間にわたり、温度0 ~ 80、好ましくは0 ~ 78、より好ましくは20 ~ 60、さらにより好ましくは約20 ~ 約50で、例えば、本発明の材料を傷処置に使用するときには、室温(約20 ~ 約25)または約37で行う。

## 【0017】

本発明の好ましい態様において、加水分解を、室温において、少なくとも16時間、好ましくは少なくとも18時間 ~ 4週間にわたって行うことができる。加水分解時間は、好ましくは24時間 ~ 18日間、より好ましくは3 ~ 8日間である。驚くべきことに、室温で数時間というこれまで普通であった時間と比較して長い加水分解縮合時間は、工程(b)における溶媒除去の後に、工程(d)における熟成の前に濾過を必要としない均一な単一相溶液を得ることを可能にすることがわかった。

20

## 【0018】

最初の加水分解縮合反応は、好ましくは、攪拌容器または攪拌棒を備えた一口丸底フラスコにおいてバッチ式で行う。好ましくは、式(I)で示されるケイ素化合物(例えばTEOS)および溶媒(例えばエタノール)を最初に入れる。次いで、酸を、好ましくは0.01N HNO<sub>3</sub>(例えば、1モルのTEOSに対して0.01モルのHNO<sub>3</sub>)の形態で迅速に添加する。反応混合物中の酸濃度のゆえに、最初の加水分解縮合反応が迅速に進行し、反応時間中に温度が低下し始める前に、容器の内容物を約40まで加熱する[即ち、工程(a)において](周囲温度への自然冷却または媒体温度の加熱の結果として)。

30

## 【0019】

本発明の好ましい態様において、工程(b)における水溶性溶媒(例えば、エタノール、水)の除去は、混合が可能な密閉装置(好ましくは、回転エバポレーターおよび/または攪拌タンク)中で行い、圧力1 ~ 1013 mバール(好ましくは圧力 < 600 mバール)での蒸発による溶媒(水、エタノール)の同時除去を伴い、所望により、蒸発成分の分圧を低下させるための化学的に不活性な連行ガスの連続供給1 ~ 8 m<sup>3</sup>/時(好ましくは2.5 ~ 4.5 m<sup>3</sup>/時)を伴い、反応温度30 ~ 90(好ましくは60 ~ 75、より好ましくは60 ~ 70)であり、好ましくは、反応系の穏やかな混合80 rpmまで(好ましくは20 ~ 60 rpm)を伴い、混合物の粘度を0.5 ~ 30 Pa · s(剪断速度10 s<sup>-1</sup>、4)で、好ましくは0.5 ~ 2 Pa · s(剪断速度10 s<sup>-1</sup>、4)で、より好ましくは約1 Pa · s(4、剪断速度10 s<sup>-1</sup>で測定)まで低下させる。

40

## 【0020】

本発明によれば、「連行(エントレインメント)ガス流」とは、反応系の液相を通してガス体積に供給されるガス流を指す。反応容器中の等圧条件を維持するために、これは、「連行ガス」および蒸発させる成分の両方からなるガス体積流を除去しなければならない。得られる分圧の低下、即ち、ガス空間中に蒸発させる成分または成分混合物の含量の低下

50

は、液体表面における溶媒の蒸発のための原動力を増加させる。

【0021】

特に好ましい態様において、「連行ガス流」は、十分な連行ガス交換が液体表面の真上で確保されるが、直接対流様式で液体表面に向かって流ることがないように、装置のガス空間に適切に配置されたガス分配器によって分配される。極端な場合、後者は局所的なゲル化を導くことがあり、望ましくない。この態様を実施することができるガス分配器は、当業者には既知である。

【0022】

進行する反応/重合(粘度の上昇によって認識することができる)の結果として、相平衡は、蒸気相中の溶媒の対応する平衡圧力が常に低くなるようにシフトする。平衡圧力が気相中の全圧まで低下したときに、蒸発が止まる。

10

【0023】

さらなる溶媒を蒸発させるために、圧力を最適に低下させ、連行ガス流を変動して適合させ、そして/または、温度を高くしなければならない。

本発明の好ましい態様において、圧力、連行ガス流および/または温度の方法パラメータの少なくとも1つを、時間で変動して適合させなければならない。

【0024】

本発明の好ましい態様において、工程(b)における蒸発を、一定温度および時間とともに変動する圧力において行う。

本発明の好ましい態様において、分圧を低下させるために使用する化学的に不活性な連行ガス流は窒素および/または空気である。

20

【0025】

本発明の好ましい態様において、水溶性溶媒を、真空と連行ガス流の組合せによって除去する。本発明のこの態様において、全圧および連行ガス流を、互いに独立して、一定の様式または時間とともに変動する様式で調節することができる。理想的には、本発明のこの態様において、圧力、連行ガス流および/または温度の方法パラメータの少なくとも1つを、時間とともに変動するように調節する。これは、例えば、積分様式で、所望の蒸発度において特定の反応時間を達成することおよび/または蒸発速度を反応速度論に調節することを可能にする。

【0026】

30

本発明の好ましい態様において、工程(b)における蒸発を、一定温度および時間とともに変動する圧力において行い、圧力を第2加水分解縮合反応の最後まで低下させ、標準圧力またはわずかな減圧から、 $< 600$  mバール、好ましくは $< 500$  mバール、より好ましくは $< 100$  mバールまで進行させる。

組合せ法(真空と連行ガス流の組合せ)において、 $< 600$  mバールの一定または変動の減圧が好ましい。

【0027】

$\text{HNO}_3$ の濃縮時の $\text{HNO}_3$ の $\text{NO}$ への還元的変換を有利にするためには、 $60$  以上の温度が特に好ましい(そうしなければ、それが残留溶媒において有意に増大する)。この非常に揮発性の高いガス(通常の沸点は約 $-150$  )は、液相から逃散した後に空気と接触したときに、低沸点の $\text{NO}_2$ (沸点 約 $21$  )に酸化され、これが、廃空気またはガス流とともに系から除去される。このようにして、本発明の材料中の酸濃度が制限されるかまたは低下する。しかし、別法によれば、酸濃度を、後の工程のいずれかにおいて、例えば固体を放出させる(例えば繊維状不織ウェブとして)ことによって低下させることもできる。

40

【0028】

しかし、有機酸/アルギニンの系を硝酸の代わりに使用したときには、所望により、例えば、トリス水溶液中での濯ぎによる適用の直前にトリス溶液(酸、例えば酢酸を追い出すことができないとき)によってpHを高くするかまたは酸濃度を低下させる。

【0029】

驚くべきことに、特許文献1と比較して、 $20 \sim 80$  rpmでの反応系の穏やかな混合

50

は、反応性蒸発(工程 b)中の反応容器内の混合物の高さを超える濃度勾配の生成を妨げることを発見した。少なくとも 16 時間の長い加水分解縮合反応時間とともに、これは、全反応混合物の少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、最も好ましくは少なくとも 90%が本発明の方法において押出可能であることに寄与する。

#### 【0030】

工程(b)は、好ましくは、 $0.5 \sim 2 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ の範囲内の粘度を有する単一相溶液が、剪断速度  $10 \text{ s}^{-1}$ 、4 において得られるまで、好ましくは約  $1 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  (4、剪断速度  $10 \text{ s}^{-1}$ で測定)になるまで行う。

本発明の好ましい態様において、反応の進行を、粘度により工程(b)においてモニターする。

10

#### 【0031】

次いで、工程(b)における加水分解縮合反応によって得られた均一かつ単一相の溶液を冷却し、有利には定量的に、所望により濾過することなく、速度論的に制御された熟成にかけることができる。

#### 【0032】

本発明における冷却[工程(c)]および熟成[工程(d)]は、温度  $-20 \sim 10$ 、好ましくは  $2 \sim 4$  において行うことができる(例えば冷蔵庫において)。熟成を 4 で行うのが特に好ましい。この低い温度は、上記式(I)で示されるケイ素化合物から進行して、熟成時間中に速度論的に制御された条件下に、さらなる縮合が起こりうることを意味する。オリゴマーおよび/またはポリマーのシロキサンおよび/またはシラノールが、この混合物において生成することができる。また、このオリゴマーおよび/またはポリマーは、水素結合によって凝集することができる。本発明によれば、擬似塑性の均一な単一相ゾル液が熟成後に得られる。有利には、本発明によれば、3次元ポリマーゲルネットワークの競合生成を、非常に大きく抑制することができる。従って、固体第2相を持たない、特に非常に実質的にはゲル相を持たない均一なゾル液を回収することができる。

20

#### 【0033】

本発明における工程(d)の熟成時間は、3日間~4週間、好ましくは少なくとも10日間、より好ましくは14~40日間、例えば14~28日間、より好ましくは少なくとも25日間であってよく、特に、本発明の材料を傷処置に使用するときには25~40日間であってよい。本発明に従って好ましくは、工程(d)で得られるゾルは、粘度  $30 \sim 100 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  (剪断速度  $10 \text{ s}^{-1}$ 、4 において)を、損失係数(4、 $10 \text{ L/s}$ 、1%変形において)  $2 \sim 5$ 、好ましくは  $2.5 \sim 3.5$  とともに有する(この損失係数は、動的粘度の粘稠と弾性の割合の商である)。これらの熟成条件は、シリカゾルを、工程(d)の後に繊維に押出しする場合に特に好ましい。

30

#### 【0034】

本発明の繊維/繊維状不織ウェブを傷処置に使用するときには、工程(d)で得られるゾルは、好ましくは粘度  $35 \sim 75 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  (剪断速度  $10 \text{ s}^{-1}$ 、4 において)、より好ましくは  $35 \sim 45 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  (剪断速度  $10 \text{ s}^{-1}$ 、4 において)を、好ましくは損失係数  $2.5 \sim 3.5$  (4、 $10 \text{ L/s}$ 、1%変形において)において有する。

#### 【0035】

高すぎる損失係数は、材料の弾性が高すぎることを意味し、これは、例えば、押出過程における安定な糸の形成を妨げる(ゲル化、糸の引裂)。低すぎる損失係数においては、材料が自由に流れるので、安定な糸の形成が不可能である(したたり落ちる)。

40

#### 【0036】

熟成時間の条件は、本発明のシリカゾルを次に押出可能な繊維ではなく粉末に加工するときに変えることができる。この場合の工程(d)の終了時の動的粘度は、好ましくは約  $60 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  (剪断速度  $10 \text{ s}^{-1}$ 、4 において)である。

#### 【0037】

シリカゾルをモノリスに加工する場合、(d)の終了時の動的粘度は、好ましくは  $70 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  以上(剪断速度  $10 \text{ s}^{-1}$ 、4 において)である。シリカゾルを被覆本体または表面

50

に使用するときには、動的粘度は、所望の層厚みに応じて、 $10 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  以下(剪断速度  $10 \text{ s}^{-1}$ 、4 において)である。

【0038】

好ましくは、得られたゾル液を、少なくともほぼ定量的に、生物分解性および/または吸収性シリカゲル材料のさらなる製造工程および/または製造操作において使用することができる。好ましくは、工程(d)において得られたゾルは紡糸可能である。さらなる工程(d)において、本発明に従って紡糸操作を想定することができる。

【0039】

そのような紡糸法の工程を、通常の下で、例えば、独国特許第19609551号および独国特許出願公開第102004063599号に記載のようにして行うことができる。

10

この工程において、ゾルを、例えば圧力容器から、個々のダイを有するダイプレートを通して噴出させる(容器中の圧力は1~100バール、好ましくは20~30バール)。

【0040】

紡糸チューブは、通常は1~5m、有利には2mの長さを有する。紡糸チューブ中の気候は、温度および湿度に関して制御された様式で設定する。好ましいのは、温度20~30 および露点 -5~10 、および/または、湿度20~40%相対湿度、好ましくは20~25%相対湿度、より好ましくは約20%相対湿度である。

【0041】

紡糸チューブを通して落下した後、繊維は寸法安定性であり、振動テーブル上に並べられる。このように形成させた繊維構造のメッシュサイズを、特に、振動速度によって確立する。これは数cm/sである。2つの軸に沿った運動のゆえに、狭いメッシュ繊維構造(ウェブ)が形成され、Si含有の出発化合物としてのTEOSを基準に、通常はなお25~33%のエトキシ基が存在する。

20

【0042】

特に、本発明の材料を傷処置のために使用するときには、繊維材料の基礎重量は、好ましくは少なくとも $90 \text{ g/m}^2$ 、より好ましくは少なくとも $150 \text{ g/m}^2$ である。傷被覆(スパン不織布からなる)の厚みは、好ましくは少なくとも0.8mm、より好ましくは少なくとも1.5mmである。繊維直径は、好ましくは少なくとも $45 \mu\text{m}$ である。

【0043】

本発明の方法によって得られるシリカゲル繊維材料および製品、即ち、例えばフィラメント、繊維、繊維状不織ウェブおよび/または織布は、優れた生物分解性および生物吸収性を有する。

30

【0044】

本発明のさらなる利点は、本発明に従って製造したシリカゲル繊維材料が、独国特許第19609551号の方法によって得られる繊維と比較したときに、L929マウス線維芽細胞の存在下での試験における細胞毒性試験において明らかに改善された値を有することである(実施例1および比較例を参照)。即ち、本発明のシリカゾル材料から製造した製品は、特に良好な生物適合性が顕著である。従って、本発明のフィラメント、繊維または繊維状不織ウェブを、ヒト医学または医療技術において、生物分解性および/または生物吸収性の材料および製品として有利に使用することができる。

40

【0045】

これとはかわりなく、本発明の繊維および繊維状不織ウェブは、改善された傷治療特性を有することが実験的に示された。即ち、より具体的には、本発明の材料を、傷処置および傷治療の分野において有利に使用することができる。フィラメントを、例えば外科縫合糸または強化繊維として使用することができる。本発明の繊維ウェブを、表面傷の管理において特に有利に使用することができる。

【0046】

本発明の生物分解性および生物吸収性の繊維および繊維状不織ウェブは、以下の工程により、上記したケイ素化合物および硝酸酸性化した水の制御された加水分解縮合反応によ

50



って得られる：

(a)式(I)：

【化3】



[式中、X基は、同一または異なって、ヒドロキシル、水素、ハロゲン、アミノ、アルコキシ、アシルオキシ、アルキルカルボニルおよび/またはアルコキシカルボニルを示し、1～20個の炭素原子、好ましくは1～10個の炭素原子を有する所望により置換された直鎖、分岐鎖または環式基を構成するアルキル基から誘導され、酸素もしくはイオウ原子またはアミノ基によって遮断されていてもよい]

で示される1つまたはそれ以上のケイ素化合物の加水分解縮合反応を、酸性触媒作用のもと、初期pH0～≤7で、水溶性溶媒の存在下または不存在下に、温度0～80℃、好ましくは20～60℃、より好ましくは20～50℃において、例えば室温(約20～約25℃)または約37℃において、少なくとも16時間、好ましくは少なくとも18時間にわたって行い；

(b)次いで蒸発させて、剪断速度10s<sup>-1</sup>、4℃において粘度が0.5～2Pa・sの範囲内である単一相溶液を生成させ；

(c)次いでこの溶液を冷却し；そして

(d)この冷却溶液を、速度論的に制御された熟成にかけて、均一なゾルを生成させ；そして

(e)工程(d)において得られたゾルを、紡糸操作において押出する。

【0047】

例えば、TEOSを、工程(a)の加水分解縮合反応においてケイ素化合物として使用するときには、十分な加水分解時間が与えられる工程(b)における蒸発の後に、均一溶液が得られる。速度論的に制御された反応が、工程(c)において、低温での熟成時間中に起こることができる。次いで、混合物は、工程(d)において、溶解した状態で均一な単一相液として存在することができ、従って、紡糸可能なゾル液として回収することができる。

【0048】

本発明に従って製造した繊維または繊維状不織ウェブは、この点で、ヒト医学、医療技術、濾過技術、生物学または絶縁材料工業において、生物吸収性および/または生物活性の材料として有利に使用することができる。特に、本発明に従って製造した材料を、傷処置および傷治療の分野において有利に使用することができる。例えば、繊維を、外科縫合糸または強化繊維として使用することができる。繊維ウェブを、表面傷の処置において、体液(例えば血液)の濾過において、またはバイオリクター分野(培養補助材として)において、特に有利に使用することができる。

【0049】

本発明のさらなる態様は、薬物供給系および/または医薬配合物、ミクロ粉末および/またはナノ粉末であることができる。

このような粉末形態は、例えば、本発明のシリカゾルを、所望の活性成分と、例えば1つまたはそれ以上の医薬と混合することによって得ることができ(さらなる加水分解縮合反応の結果として、活性成分を、所望により共有結合させることもできる)、均一混合物が得られる。特に、熱的に敏感な活性成分を添加する場合には、ゾルと活性成分の混合物を、穏やかな乾燥工程、例えば噴霧乾燥または凍結乾燥工程にかける。活性成分が熱的に敏感ではないかまたはそれを全く加えないときには、乾燥を、(かなり)高い温度で行うこともできる。これは、好ましくは、活性成分の周りに生物吸収性および/または生物活性シリカゲルマトリックスを形成する。このマトリックスは、特に、液体活性成分の封入にも適している。液体を、長期安定性を伴ってマトリックス中に封入することができ、制御

10

20

30

40

50

された様式で再び放出させることができる。封入は、活性成分の機械的および化学的安定化、液体の活性成分および医薬の改善された取扱いを可能にし、活性成分の未制御の揮発の防止を助ける。勿論、特定の用途に適するさらなる物質および/または助剤を、最終配合物(粉末)中に存在させることもできる。本発明のマイクロ粉末の粒子は、好ましくは0.01~100 $\mu\text{m}$ 、特に0.1~20 $\mu\text{m}$ のサイズ(平均直径)を有する。通常、ナノ粉末粒子は、 $\leq 100\text{nm}$ のサイズ(平均直径)を有する。

#### 【0050】

さらなる態様において、少なくとも1つの活性成分の混合物を、本発明のシリカゾルとともに型中に注入することができる。このようにして、乾燥後にモノリスを得ることができる。このようなモノリスを、例えば、大きな移植片の形態で薬物供給系として皮下に使用することができる。これらは、例えば避妊薬の貯蔵体として使用することができ、長期間にわたり活性成分を放出する。このような本発明の移植片は、良好な生物適合性を有する。モノリスは、好ましくは $\geq 0.5\text{mm}$ の直径を有することができる。別法によれば、モノリスを、粉末に粉碎または粉末化することもできる。

10

#### 【0051】

さらなる態様において、シリカゾルを、通常の被覆方法によって被覆することができる。これは、例えば、被覆する物体をシリカゾル中に浸漬することによって、注型によって、またはシリカゾルの回転被覆もしくは噴霧によって行うことができる。好ましいのは、シリカゾルを被覆錠剤またはカプセル上に被覆することである。この目的のために、圧縮した粉末医薬混合物に、本発明のシリカゾルからなる生物吸収性および/または生物活性の被覆を供する。これは、配合物中の(さらなる)活性成分の放出の制御(例えば、層厚みおよび/または層順序による)を可能にする。しかし、このような被覆を、身体部分移植片に適用することもでき、これが、移植片の(生物学的)適合性を改善し、例えば拒絶反応を軽減または防止する。

20

#### 【0052】

本発明のさらなる態様において、高粘稠ゾル(特にヒドロゲル)を、本発明のシリカゲルによって補足または置換することができる。高粘稠ゾルおよびヒドロゲルは、医学および化粧品において、活性成分または医薬の担体として使用されている。一般に、ヒドロゲルは、多くの場合、大面積の傷の処置(傷処置および傷治療)に使用されている。有利なことに、シリカゾルの追加は、生物適合性(従って傷治療)の改善を可能にする。この点において、本発明のヒドロゲルは、医学(特にヒト医学または医療技術)において、生物吸収性および/または生物活性の生成物として使用することができる。

30

#### 【0053】

さらに本発明は、細胞のインビトロ増殖方法であって、本発明の繊維からなる繊維マトリックスが、細胞によって形成される細胞外マトリックスのための細胞支持物質および/またはガイド構造として働くか、または細胞に3次元配置(これは、細胞が増殖することおよび/またはその遺伝的に決められた分化を達成することを可能にする)を見つける可能性を与えるインビトロ増殖方法に関する。本発明の方法の利点は、例示の目的で、実施例3に示されている。

#### 【0054】

使用する細胞は、例えば、未分化の多能性幹細胞あるいは遺伝的に修飾されたかまたは天然に分化した細胞(分化の種類および程度が異なる)であってよい。

40

#### 【0055】

繊維マトリックスに適用される細胞は、該マトリックスに付着するか、または該マトリックス上で主に2次元的に増殖して、ともに細胞外マトリックスまたはメッセンジャー物質(ホルモン)を生成する。繊維マトリックスは、特に本発明の繊維の不織布または織布の形態で、好ましくは面積要素を形成する。この繊維マトリックスは、好ましくは多孔性であるので、導入/適用された細胞がそれに侵入し、3次元分布し、その遺伝的に決められた分化または添加した分化因子によって誘導される分化に従って、3次元組織および器官の成長を誘導するか、またはメッセンジャー物質を放出することができる。本発明の別の

50

態様において、該マトリックスを、導入/適用された細胞が侵入できない不浸透性繊維メッシュとして、2次元細胞分布および3次元組織および器官の成長の同時可能性(複合移植片の意味において)の手段で形成する。

本発明のインビトロ増殖方法は、好ましくは、細胞複合体、組織および/または器官のインビトロ製造に有用である。

#### 【0056】

本発明は、好ましくは、上記した方法によって製造しうる細胞複合体、組織および/または器官に関する。このような細胞複合体、組織および/または器官は、例えば、医薬-組織-器官相互作用のインビトロモデルとして適している。ヒト身体外側の組織を製造するために、包括的用語「組織工学」のもとで組合せられる様々な方法が使用される。この目的のために、組織種に応じて、既存の組織複合体から細胞を単離し、増殖させる。次いで、細胞を、異なる堅さの平らな材料に適用するか、あるいは、多孔性またはゲル材料に導入し、それによって組織熟成を誘導し、所望により分化因子によって刺激する。この組織熟成は、身体の外側または内側で行うことができる。本発明の繊維マトリックスは、それが、生物分解性および/または生物吸収性ではあるが、実施例3が示すように、インビトロ増殖にもかかわらず、その2次元または3次元形態をある期間にわたって保持するという利点を有する。従って、本発明は、好ましくはポリケイ酸の繊維マトリックス(好ましくは本発明の繊維から製造した繊維マトリックス)を含んでなる細胞複合体、組織および/または器官であって、生物分解性および/または生物吸収性の繊維マトリックスが、最初のインビトロ細胞コロニー形成から4週間後に、最初の2次元または3次元形態の繊維マトリックスに、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%同一である細胞複合体、組織および/または器官に関する。例えば、本発明の繊維マトリックスは、このような態様において、好ましくは、該細胞複合体、組織および/または器官の動物またはヒト身体への適用/導入の後にのみ分解/吸収される。

#### 【0057】

細胞種に応じて、細胞を、予めそのマトリックス複合体から酵素消化または機械的分離によって放出させるか、あるいは、生理学的条件下で栄養培地に適用または導入することによって増殖するように誘導しなければならない。この場合、上記した繊維マトリックスは、細胞増殖のためのガイド構造として、または細胞外マトリックスおよび組織構成成分の蓄積のためのガイド構造として機能する。本発明によれば、繊維材料を、様々な配置で使用することができる。どの配置を選択すべきであるかは、製造する(細胞)組織に依存して、当業者には知られている。可能な配置は以下の通りである。

#### 【0058】

(1)面積要素として、即ち、適用する細胞の寸法を超える侵入が可能であるが、それが制限されてのみ可能である不浸透性繊維メッシュとして(即ち、穴/繊維またはメッシュ隙間の平均サイズは、培養する細胞の平均サイズより大きいことは決してなく、好ましくはそれより小さい;即ち、細胞は、「繊維中に成長」することができるが、繊維基質上に十分に付着するようにしてのみである);これは、本質的に2次元細胞分布ならびに平らな細胞、組織および器官成長の可能性のみ(しかし少なくとも主要な可能性)を有する。

#### 【0059】

(2)3次元要素として、即ち、細胞による侵入が可能な多孔性繊維メッシュとして(即ち、穴/繊維またはメッシュ隙間の平均サイズは、培養する細胞の平均サイズより小さいことは決してなく、好ましくはそれより大きい);これは、3次元細胞分布ならびに空間的な細胞、組織および器官成長の可能性を有する。

#### 【0060】

(3)細胞、組織または器官の組合せによる器官または「複合移植片」および表面被覆組織の意味において、(1)および(2)の組合せとして(例えば器官カプセル);この態様は、いくつかの細胞種から構成される組織構造に対して可能である。例えば、血管は内皮と結合組織からなり、平らな構造を有する内皮は、血管の内側を覆うように働き、一方、結合組織は血管の支持物質として機能し、3次元中空構造を形成する。内皮成長のための面積

10

20

30

40

50

要素としての(1)および結合組織成長のための3次元要素としての(2)の組合せは、最終的に血管の再建を可能にする。

【0061】

上記した3つの態様のいずれかによって増殖/製造するのに特に適しており、かつ本発明に従って好ましいいくつかの組織または細胞種を以下に挙げる。

【0062】

適用(1)のためには、好ましくは以下の組織：上皮、内皮、尿路上皮、粘膜、硬膜、結合組織；および好ましくは以下の細胞：多能性幹細胞、軟骨細胞[軟骨；軟骨細胞増殖のためには、2次元媒体が必要である；軟骨細胞分化および軟骨マトリックス形成のためには、対照的に、3次元媒体が必要である；ここで軟骨に関して、それが意味するものは脱分化および増殖しているときの細胞のみである；分化は適用(2)において引き継ぐ]、骨細胞(骨；2次元または3次元のいずれか、ここで、軟骨細胞についてと同じことが当てはまる)、神経細胞(神経)、毛細胞(内耳聴覚器官)またはこれらのあらゆる分化段階の前駆体細胞(例えば多能性幹細胞)。

【0063】

適用(2)のためには、以下の細胞：適用(1)のために記載した細胞であってその2次元増殖後の細胞、器官特異的な細胞(例えば、肝細胞、腎細胞、心筋細胞、膵細胞)、内分泌機能を有する/有さないCNSの細胞、例えば網膜、神経細胞、松果体、ドーパミン作動性細胞、血管形成細胞(例えば血管細胞)、内分泌または外分泌機能を有する細胞(例えば、島細胞、副腎細胞、唾液腺細胞、上皮小体、甲状腺細胞)、免疫系の細胞(例えば、マクロファージ、B細胞、T細胞またはこれらのあらゆる分化段階の前駆体細胞、例えば多能性幹細胞)。免疫系の細胞は3次元で増殖させるが、これは、組織において、血液-組織関門を通り抜けた後、該細胞が組織種に従う3次元構造を満たし、そこで3次元でその作用を現すためである。

【0064】

適用(3)のためには、以下の細胞/組織/器官：気管、気管支、血管、リンパ組織、尿道、尿管、腎臓、膀胱、副腎、肝臓、脾臓、心臓、血管、甲状腺、扁桃腺、唾液腺、脳、筋肉(平滑、骨格)、椎間円板、半月、心臓、肺、胆嚢、食道、腸、目。

【0065】

欧州特許第1262542号の実施例1~3は、例示の目的で、独国特許第19609551号から知られる繊維を用いる可能な適用を記載している。本発明において使用する材料のさらなる可能な使用は、内分泌または外分泌機能を有し、生物においてまたはその外側で効果を現す活性成分(例えば、ホルモン、インターロイキン、炎症媒介物質、酵素)を放出する細胞を用いる、材料のコロニー形成である。これは、本発明に従って使用する材料は、内分泌または外分泌機能を有する細胞を用いてコロニー形成させたときに、上記活性成分を身体の外側で産生するように働くこともできることを意味する(次いで、該活性成分を、既知の方法によって医薬として身体に利用可能にする)。身体の外側で現される作用は、放出された物質で組織または細胞に影響を与えるように働くことができる。

【0066】

マトリックスのさらなる使用は、皮膚、粘膜のレベルでの、または器官および組織の手術中の体内での、内部からの傷治療のための生物吸収性の生物移植片として、ガイド副子としてである。この目的のために、可能であれば、材料を、例えば手術中に、可能であれば医師により面積要素または3次元要素として、直接または傷治療を促進する物質または医薬と一緒に、傷または器官/組織中に導入する。繊維の形態で本発明に従って使用する生物吸収性の無機材料の特性は、増殖させる細胞のための組織媒体にわずかな変化しか引き起こさない；より具体的には、酸性媒体が生じず、その結果、組織および器官の分化における不都合な影響が妨げられる。さらに、組織のpHとはかかわりなく、材料の完全分解がある。同時の組織または器官形成の結果として、生体組織は、病原体による望ましくないコロニー形成(感染)の場合に、抗感染医薬による浸透の可能性が絶えず利用可能である。さらに、繊維マトリックスを、異なる物質群の活性成分と混合することができ、使

10

20

30

40

50

用部位における能動および受動作用の発現によって、さらには作用除去部位における作用の発現によって、組織および器官の分化における陽性の影響の可能性を有する。これらには、特に、第1に抗感染性の活性成分が含まれるが、第2に傷治療、炎症反応および組織分化を促進および調節する活性成分も含まれ、例えば、第1には成長(増殖)因子(IGF、TGF、FGFなど)、第2にはグルココルチコイドおよびインターロイキンが含まれるが、化学療法薬物および免疫抑制剤も含まれる。

#### 【0067】

本発明に従って使用する生物吸収性の無機繊維は、使用する細胞の付着を可能にし、繊維に沿って細胞が増殖する可能性を伴い、さらには組織または器官マトリックスを形成する可能性を伴う。細胞の増殖または組織または器官マトリックスの形成と同時に、繊維構造が分解する。理想的には、組織構造、器官構造または細胞構造を、繊維の縮合の変動によって繊維材料の分解速度と関連させる。縮合過程(即ち水の脱離、従って重縮合)の進行が少ないほど、より良好に材料を分解させることができる。最高のOH含量、従って最も速く分解しうる繊維は、新鮮に紡糸した繊維(次いで、これをエタノール中に置く)の場合に得られる。また、縮合過程は、紡糸パラメーター、即ち、引き速度、雰囲気、紡糸温度などによっても影響を受ける。このように製造した繊維は、生物分解性および生物吸収性であり、弱塩基性の体液様の液において、1日あたり10~100nmの繊維半径の分解速度で溶解する(この分解速度は、繊維のシラノール基の数に関係する)。本発明のさらなる態様は、医薬-組織-器官相互作用のインビトロモデルとしての、医薬および/または活性成分と混合した後の本発明の細胞、器官および組織の使用に関する。結果として、動物実験を最少にするか、または回避することができる。

#### 【0068】

さらに本発明は、より好ましくは、皮膚移植片の製造方法であって、皮膚細胞を、栄養溶液の表面に適用し、増殖させ、本発明の繊維から構成される面積要素を該栄養溶液上に置くことを含んでなる方法に関する。

#### 【0069】

さらに本発明は、本発明の好ましい対象において、本発明の繊維を含んでなる面積要素および皮膚細胞からなる皮膚移植片に関する。面積要素(好ましくは平面)は、皮膚細胞の平らな、従って迅速な増殖を可能にする(所望により浸透医薬の使用を伴う)。

#### 【実施例】

#### 【0070】

以下において、実施例を参考にして本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

報告した粘度の全ては、Physikaからの粘度計(MCR300およびMCR301)を用いて、剪断速度  $10\text{ s}^{-1}$ 、4 において測定した。

#### 【0071】

本発明の実施例1：シリカゾルならびに生物吸収性および生物分解性のシリカゲル材料加水分解縮合のための反応物質の目的で、TEOS(テトラエトキシシロキサン)(4モル)を、最初の導入としてエタノール中で反応容器に導入し、水(7モル)を、0.01N HNO<sub>3</sub>溶液の形態で添加し、攪拌によって互いに混合した。この混合物を室温で8日間攪拌した。次いで、加水分解縮合反応からの溶液を、ガラスビーカー中、70 において蒸発および濃縮することによって、ほぼ水およびエタノールを含まない溶液に変換した。この溶液は、単一相であり、固体を含まず、粘度が  $1\text{ Pa}\cdot\text{s}$  (剪断速度  $10\text{ s}^{-1}$ 、4 において)であった。この溶液を、4 に冷却し、この温度で熟成にかけた。18日間の熟成時間の後、粘度が  $43\text{ Pa}\cdot\text{s}$  (剪断速度  $10\text{ s}^{-1}$ 、4 において)である均一な単一相ゾル液が得られた。ゾル液は認識できる固相を有していなかった。この均一なゾル液は、繊維に紡糸することが可能であった。これを、紡糸液と称することもある。

#### 【0072】

繊維を、通常の紡糸系において製造した。この目的のために、紡糸液を、-15 で冷却圧力シリンダーに充填し、これを、空気圧力20バールを用いて加圧した。得られた力

は、ゾルをダイに通してフィラメントを形成させた。フィラメントは、ダイ直径に依存して直径が5～100 μmであった。

【0073】

自由流動性の蜂蜜様フィラメントは、それ自体の重量により圧力シリンダー下の紡糸シャフトに落下し、そこで、該フィラメントは反応して、実質的に固体の形態を形成し、寸法安定性のフィラメントを形成した。このフィラメントはその表面においてなお反応性であったので、所望により供した横行テーブル上に到達したときに、該フィラメントの接触領域に沿って互いに付着することができた。横行テーブルの部分における調節可能なストロークサイクルが、繊維間のさらなる架橋を創製して繊維状不織ウェブを形成した。

【0074】

有利には、本発明に従って得られるフィラメントは、独国特許第19609551号の方法において、同等の紡糸条件下で得られる繊維よりも乾いている。その結果、後に行うウェブの二次加工において、架橋が比較的少ない、従ってより柔軟なウェブが、本発明に従って得られた。

【0075】

本発明に従って製造した繊維状不織ウェブを、ISO 10993-5(1999); EN 30993-5(1994)に従う細胞毒性学的試験にかけた。

DMEM(ダルベッコの改良イーグル培地)でウェブ材料の抽出を行った後、抽出物を滅菌濾過し、FCS(ウシ胎仔血清; 抽出物中に10%FCS)と混合した。このFCSと混合した抽出物を、滅菌条件下でL929マウス線維芽細胞に適用し、37 °CおよびCO<sub>2</sub>分圧5%で48時間保存した。

Triton X-100を毒性対照物質として使用し、細胞培養培地を非毒性対照物質として使用した。

【0076】

細胞数を測定するために、細胞を固定し、メチレンブルーで染色した。メチレンブルーの酸性抽出の後、染料含量を測光法によって検出し、吸光度を標準曲線と比較して、染料吸光度を参照して細胞数を決定した。対照と比較した細胞数の測定は、本発明のシリカゲル材料が細胞毒性の性質を有さないことを示した。タンパク質含量の測定(アルカリ性溶解後、Bradford法によるタンパク質含量測定)および乳酸脱水素酵素(LDH; 測光法)の放出により、該結果を確認した。

【0077】

比較例

同じ条件下で、加水分解縮合時間1.5時間を用いて独国特許第19609551号中の実施例と同様にして製造したウェブ材料について、毒性測定を行った。この場合、全反応バッチの50%のみを紡糸することができた。得られた繊維材料は、細胞毒性が陽性であった。

【0078】

実施例2

さらなる研究において、5種類の異なる本発明の繊維ウェブ(KG211、KG226、AEH06KGF553、AEH06KGF563およびAEHKGF565)を、モルモットにおける3ヶ月傷治療研究において、吸収性の対照傷治療系(Promogran<sup>R</sup>)と比較した。

本発明の繊維ウェブ間の相違は、以下の表1に挙げた異なる製造パラメーターによってわかる。

【0079】

10

20

30

40

【表 1 - 1】

パラメーター/記述		KG211	KG226	AEH06KGF553	AEH06KGF563	AEHKGF565
加水分解/縮合						
装置	反応容器の種類	2 L 一口丸底フラスコ	2 L 一口丸底フラスコ	攪拌タンク	攪拌タンク	攪拌タンク
	混合	攪拌棒	攪拌棒	横棒	横棒	横棒
方法	停止基準/工程の目的	反応時間 18時間	反応時間 18時間	反応時間 18時間	反応時間 18時間	反応時間 18時間
	重量測定+TEOSの導入	562.49 g	562.49 g	562.49 g	562.49 g	562.49 g
	重量測定+エタノールの添加	156.8 g	156.8 g	156.8 g	156.8 g	156.8 g
	混合	15分間	15分間	15分間	15分間	15分間
	重量測定+水の供給	60.38 g	60.38 g	60.38 g	60.38 g	60.38 g
	重量測定+1 N HNO <sub>3</sub> の添加	27.81 g	27.81 g	27.81 g	27.81 g	27.81 g
	1 N HNO <sub>3</sub> +水の混合	傾斜	傾斜	傾斜	傾斜	傾斜
	熱処理	自己熱、即ち発熱反応後に室温で行う	自己熱、即ち発熱反応後に室温で行う	最初は自己熱、反応時間3:00時間からはT=25℃	最初は自己熱、反応時間0:20時間からはT=70℃	最初は自己熱、反応時間0:20時間からはT=50℃
反応性蒸発						
装置	反応容器の種類	回転エバポレーター	回転エバポレーター	攪拌タンク	攪拌タンク	攪拌タンク
	混合	回転エバポレーター	回転エバポレーター	横棒	横棒	横棒
	熱処理の種類	水浴	水浴	ジャケット加熱	ジャケット加熱	ジャケット加熱
	連行流の媒体	真空	真空	制御空気	制御空気	制御空気
	連行流の供給	-	-	ガラスフリット	ガラスフリット	ガラスフリット
	エタノールを含む廃空気の除去	回転エバポレーター接続	回転エバポレーター接続	蓋中の開口部	蓋中の開口部	蓋中の開口部
方法	停止基準/工程の目的	重量損失 61.7%	重量損失 61.7%	動的粘度 (4℃, 10 s <sup>-1</sup> ): 1 Pas	動的粘度 (4℃, 10 s <sup>-1</sup> ): 1 Pas	動的粘度 (4℃, 10 s <sup>-1</sup> ): 1 Pas
	混合	25rpm	25rpm	60rpm	45rpm	45rpm
	熱処理	70℃	70℃	60℃	75℃	70℃
	空気流	約400m <sup>3</sup> /h まで真空化	約400m <sup>3</sup> /h まで真空化	3.8 m <sup>3</sup> /h	3.0 m <sup>3</sup> /h	3.0 m <sup>3</sup> /h
	反応性蒸発時間			05:40	05:30	06:30
	濾過	スクリーン	スクリーン	フィルター	フィルター	フィルター

10

20

30

【 0 0 8 0 】

40

【表 1 - 2】

パラメーター/記述		KG211	KG226	AEH06KGF553	AEH06KGF563	AEHKGF565
熟成						
装置	熟成容器	500ml PPカップ	500ml PPカップ	500ml PPカップ	500ml PPカップ	500ml PPカップ
	熟成中の貯蔵	冷蔵庫	冷蔵庫	冷蔵庫	冷蔵庫	冷蔵庫
方法	停止基準/ 工程の目的	動的粘度 39.2 損失係数 3.12	動的粘度 41.2 損失係数 2.69	動的粘度 45 損失係数 2.6	動的粘度 73 損失係数 4.7	動的粘度 44 損失係数 3.6
	熟成温度	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
	熟成カップの貯蔵の形式	静止、垂直	静止、垂直	静止、垂直	静止、垂直	静止、垂直
	熟成時間	28日間	39日間	11日間	10日間	19日間
	(中間)貯蔵					
装置	貯蔵容器	500ml PPカップ	500ml PPカップ	500ml PPカップ	500ml PPカップ	500ml PPカップ
	貯蔵場所	冷凍庫	冷凍庫	冷凍庫	冷凍庫	冷凍庫
	貯蔵温度	-80°C	-80°C	-80°C	-80°C	-80°C
	熟成カップの貯蔵の形式	静止、垂直	静止、垂直	静止、垂直	静止、垂直	静止、垂直
紡糸						
装置	ダイブレード	7ダイ、 D = 150 μm	7ダイ、 D = 150 μm	7ダイ、 D = 150 μm	7ダイ、 D = 150 μm	7ダイ、 D = 150 μm
	紡糸塔	約 2 m	約 2 m	約 2 m	約 2 m	約 2 m
	振動テーブル	単軸	単軸	二軸	二軸	二軸
	冷蔵庫中での凍結試料の解凍	01:30.00時間	01:45.00時間	01:40.00時間	01:30.00時間	02:00.00時間
	紡糸容器の熱処理					
	紡糸容器の充填後の待ち時間	03:30.00時間	03:00.00時間	03:30.00時間	02:10.00時間	03:00.00時間
	紡糸容器中の圧力	20バール	20バール	30バール	20バール	20バール
	紡糸塔中の温度	21°C	22°C	23°C	23°C	22°C
	紡糸塔中の湿度	20%相対湿度	33%相対湿度	34%相対湿度	20%相対湿度	22%相対湿度
	1不織布の紡糸時間	6分間	5分間	6分間	12分間	6分間
	振動テーブルの運動パターン	ストローク 長さ: 28cm ストロークサ イクル: 16/分	ストローク 長さ: 28cm ストロークサ イクル: 16/分	ストローク 長さ: 28cm ストロークサ イクル: 16/分	ストローク 長さ: 28cm ストロークサ イクル: 16/分	ストローク 長さ: 28cm ストロークサ イクル: 16/分
	切断片					
装置	切断片	5×5 cm	5×5 cm	5×5 cm	5×5 cm	5×5 cm
生成物分析						
	基礎重量	185 g/m <sup>2</sup>	165 g/m <sup>2</sup>	約200 g/m <sup>2</sup>	90 g/m <sup>2</sup>	15 g/m <sup>2</sup>
	傷被覆の厚み	1.8 mm	2.1 mm	1.3 mm	0.8 mm	1.4 mm
	繊維直径	44 μm	56 μm	61 μm	45 μm	50 μm
	曲げ試験における挙動	非常に柔軟、 容易に個々の 層に分離	非常に柔軟、 容易に個々の 層に分離	部分的破壊、 最外層の破壊	固有の安定性 なし、 極めて柔軟	非常に柔軟、 破壊なし、 柔らかく、 一部が個々の 層に分離
	遊離エタノールの含量	0.61重量%	0.79重量%	0.87重量%	0.31重量%	0.67重量%
	エトキン基含量	31.3重量%	32.1重量%	27重量%	32.8重量%	33.2重量%

10

20

30

## 【0081】

研究のために、皮膚-表皮の傷を、手術により36匹のモルモットにもたらした。各動物において、真皮および表皮を、脊柱の両側において約6.25 cm<sup>2</sup> (2.5 × 2.5 cm) の面積で除去した。傷を外科用メスによって創製した。皮筋層は傷つかなかった。本発明の傷被覆物およびPromogran<sup>R</sup>を、個々の傷に置いた。これらの材料を、非接着性の傷手当用品(URGOTUL<sup>R</sup>)および半透過接着性のポリウレタンフィルム(TEGADERM<sup>R</sup>またはOPSITE<sup>R</sup>)で覆った。粘着性包帯(ガーゼおよびELASTOPLAST<sup>R</sup>)により、傷上の傷手当用品を保護した。各繊維ウェブまたは対照材料を5匹の動物において試験した(10個の傷に対応する; n = 10)。異なる時間間隔において、傷治療を、肉眼、形態学および組織学的試験によって評価した。

40

## 【0082】

試験した全ての傷被覆物において、局所的な不耐性は観察されなかった。形態学的試験は、Promogran<sup>R</sup>で処置した傷が、ウェブで処置した傷よりも若干早い50%傷閉鎖を達

50



成したことを示した。しかし、完全(100%)または実質的完全(75%、95%)な傷閉鎖を達成するためには、Promogran<sup>R</sup>の時間は、ほとんどのウェブと比較して若干遅かった。100%治癒は、KG211およびKG226については平均して約23日後に、AEH06KGF553、AEH06KGF563およびAEH06KGF565については平均して約24日後に、Promogran<sup>R</sup>については平均して26日後にのみ達成された。

【0083】

傷創製の28日後のKG211動物の組織学的試験は、非常に良好な傷治癒を示した(図1aを参照)。単離されたマクロファージがなお観察されたので、局所的な組織反応だけがなお完全に安定化されていなかった。これにもかかわらず、肉芽組織は目立たず、正常な厚みを示し、新たに形成された連続上皮層によって被覆されていた。

10

【0084】

傷創製の28日後のPromogran<sup>R</sup>動物の組織学的試験は、多形核細胞が浸透した高度に空胞化した肉芽組織を示した(図1bを参照)。KG211とは対照的に、肉芽組織は上皮層によって被覆されていなかった。

【0085】

このように、本発明の傷被覆物は、最初の4週間の傷治癒においてPromogran<sup>R</sup>と比較して、短縮された傷治癒を、より良好な肉芽組織層の同時創製および炎症過程の最少化とともに示す。

【0086】

本発明の実施例3

20

細胞支持物質として生物分解性および/または生物吸収性の繊維から構成される本発明の繊維マトリックスKG119ならびにコラーゲンおよびポリグリコール酸(PGA)を、ガンマ線で滅菌し、インキュベーター中で1時間、完全培地(full medium)に入れた。繊維マトリックスKG119は、面積要素としてウェブに関連する。これは、表2に示す方法パラメーターに従って製造した。切断片を、円の形状で打ち抜いた(図3を参照)。

【0087】

【表2-1】

パラメーター/記述		KG119
加水分解/縮合		
装置	反応容器の種類	2L 一口丸底フラスコ
	混合	攪拌棒
方法	停止基準/工程の目的	反応時間 18時間
	重量測定+TEOSの導入	562.49g
	重量測定+エタノールの添加	156.8g
	混合	15分間
	重量測定+水の供給	60.38g
	重量測定+1N HNO3の添加	27.81g
	1N HNO3+水の混合	傾斜
	熱処理	自己熱
反応性蒸発		
装置	反応容器の種類	開放PPカップ
	混合	なし
	熱処理の種類	水浴
	連行流の媒体	圧縮空気
	連行流の供給	カップを通る横断流
	エタノールを含む廃空気の除去	制御せずに環境へ
方法	停止基準/工程の目的	重量損失 61.7%
	混合	0
	熱処理	70℃
	空気流	制御せずに環境へ
	反応性蒸発時間	重量損失
	濾過	スクリーン

30

40

50

【 0 0 8 8 】

【表 2 - 2】

パラメーター/記述		KG119
熟成		
装置	熟成容器	500ml PPカップ
	熟成中の貯蔵	冷蔵庫
	熟成進行の測定	
	工程管理	スクリーン
方法	停止基準/工程の目的	動的粘度、紡糸前に30Pas、 損失係数 3.22
	熟成温度	4℃
	熟成カップの貯蔵の形式	静止、垂直
(中間)貯蔵		
装置	貯蔵容器	500ml PPカップ
	貯蔵場所	冷凍庫
	貯蔵温度	-80℃
	熟成カップの貯蔵の形式	静止、垂直
紡糸		
	ダイプレート	7ダイ、D=150μm
	スプール処理のためのデバイス	1時間後
	紡糸塔	約2m
	振動テーブル	単軸
	紡糸塔中の温度	室温
	紡糸塔中の湿度	約30%相対湿度
	1ウェブの紡糸時間	6分間
	振動テーブルの運動パターン	ストローク長さ: 28cm ストロークサイクル:
	ウェブのコンディショニング	6分間
切断片	2.5×2.5cm	

10

20

【 0 0 8 9 】

細胞コロニー形成の前に、培地を新しくした。次いで、ヒト皮膚線維芽細胞を加えた。細胞を、24穴のFalcon 351147プラスチックプレートにおいて培養した。

30

【 0 0 9 0 】

培地を毎日交換した。細胞コロニー形成培地は、10%ウシ胎仔血清(FCS)ならびに抗生物質として100単位/mlのペニシリン、0.25μg/mlのアンホテリシンBおよび0.1mg/mlのストレプトマイシンを追加したGibcoのダルベッコ改良イーグル培地 42430-250であった。細胞の増殖中、培地の最初の交換後に、50μg/mlのアスコルビン酸を培地に加えた。さらに、細胞数が増加したときに、培地を重炭酸ナトリウム緩衝溶液(7.5%、Sigma)と混合することが必要になった。細胞標準(細胞支持物質を含まない対照細胞)を、通常の組織培養皿およびガラスに基づくIwakiプレートにおいて培養した。

40

【 0 0 9 1 】

Serotecからの試薬を用いてAlamar Blueアッセイを行った。試薬をHBSS(フェノール不含)緩衝液で10%に希釈し、37℃に調整し、滅菌濾過した。細胞を含む細胞支持物質をPBS中で洗浄し、次いで、該物質の元のプレートから取り出し、組織培養皿およびガラスに基づくIwakiプレート中に置いた。

【 0 0 9 2 】

Alamar Blueアッセイを用いて測定した代謝活性は、細胞数と個々の細胞の代謝活性の関数である。図2は、異なるマトリックスであるコラーゲン、PGAおよび本発明の繊維マトリックスKG119における皮膚線維芽細胞、ならびに、支持構造を含まない細胞(対照培養物、Ctrl)の活性(蛍光測定の状態を示す)を、1週間(Wk1)、2週間(Wk2)および4週間(Wk4)の培養時間において比較するものである。

50

## 【 0 0 9 3 】

K G 1 1 9 への細胞の一次付着は強力であり、コラーゲンへの付着と同等である。K G 1 1 9 およびコラーゲンは、細胞付着に関しては P G A を超えている(データは示していない)。マトリックスにおける細胞増殖が長くなるほど、より明らかに K G 1 1 9 繊維マトリックスの優秀性が示される。図 2 は、K G 1 1 9 が、細胞の代謝活性に関して他の細胞支持構造物を超えていることを示す。この高い代謝活性は、全測定期間(4 週間)にわたって維持される。対照的に、コラーゲン、P G A および細胞支持構造を含まない細胞は、この期間にわたって代謝活性を維持することができない。K G 1 1 9 だけが、高い細胞付着および細胞増殖を示す(全期間にわたって代謝活性を保持する)。

## 【 0 0 9 4 】

図 3 は、ヒト皮膚線維芽細胞との培養前および 4 週間の培養時間後の細胞支持構造物コラーゲン、P G A および K G 1 1 9 を示す。コラーゲンおよび P G A 細胞支持構造物は、緊密な組織ボールに縮小および分解する。K G 1 1 9 だけが、その元の形態を保持する。K G 1 1 9 内で、緊密な皮膚組織が形成され、繊維が組織にしっかりと結合している。

本明細書の当初の開示は、少なくとも下記の態様を包含する。

[ 1 ] (a) 式 (I) :



[ 式中、X 基は、同一または異なって、ヒドロキシル、水素、ハロゲン、アミノ、アルコキシ、アシルオキシ、アルキルカルボニルおよび/またはアルコキシカルボニルを示し、1 ~ 2 0 個の炭素原子、好ましくは 1 ~ 1 0 個の炭素原子を有する所望により置換された直鎖、分岐鎖または環式基を構成するアルキル基から誘導され、酸素もしくはイオウ原子またはアミノ基によって遮断されていてもよい]

で示される 1 つまたはそれ以上のケイ素化合物の加水分解縮合反応を、酸性触媒作用のもと、初期 pH 0 ~ < 7 で、水溶性溶媒の存在下または不存在下に、温度 0 ~ 8 0 において、少なくとも 1 6 時間にわたって行い；

(b) 次いで蒸発させて、剪断速度  $1 0 \text{ s}^{-1}$ 、4 において粘度が  $0.5 \sim 2 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  の範囲内である単一相溶液を生成させ；

(c) 次いでこの溶液を冷却し；そして

(d) この冷却溶液を、速度論的に制御された熟成にかけて、均一なゾルを生成させる；  
ことによって得られるシリカゾル材料。

[ 2 ] 酸性触媒作用のために、硝酸酸性化した  $H_2O$  を、1 : 1.7 ~ 1 : 1.9 の範囲内、好ましくは 1 : 1.7 ~ 1 : 1.8 の範囲内のモル比で使用し、加水分解縮合反応を、少なくとも 1 6 時間、好ましくは 1 8 時間、2 0 ~ 6 0 において、より好ましくは室温(2 0 ~ 2 5 )において行うことを特徴とする前記 [ 1 ] に記載のシリカゾル材料。

[ 3 ] 工程 (a) の加水分解縮合反応を、2 0 ~ 6 0 、好ましくは 2 0 ~ 5 0 、より好ましくは室温(2 0 ~ 2 5 )において、少なくとも 1 6 時間 ~ 4 週間、好ましくは 1 8 時間 ~ 4 週間、より好ましくは 2 4 時間 ~ 1 8 日間、最も好ましくは 3 ~ 8 日間にわたって行うことを特徴とする前記 [ 1 ] または [ 2 ] に記載の材料。

[ 4 ] 工程 (b) を、密閉装置において反応温度 約 3 0 ~ 約 9 0 で行うことを特徴とする前記 [ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれかに記載の材料。

[ 5 ] 工程 (c) の溶液を、2 ~ 4 、好ましくは 4 まで冷却することを特徴とする前記 [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載の材料。

[ 6 ] 工程 (d) の熟成を、温度 2 ~ 4 、好ましくは 4 で行うことを特徴とする前記 [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれかに記載の材料。

[ 7 ] 工程 (d) の熟成を、ゾル粘度  $3 0 \sim 1 0 0 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  (剪断速度  $1 0 \text{ s}^{-1}$ 、4 において) および損失係数 2 ~ 5 (4 、 $1 0 \text{ L} / \text{s}$ 、1 % 変形において) になるまで行うこと

10

20

30

40

50

を特徴とする前記 [ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれかに記載の材料。

[ 8 ] 工程 ( a ) で使用するケイ素化合物がテトラエトキシシランであることを特徴とする前記 [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれかに記載の材料。

[ 9 ] 生物分解性および / または生物吸収性シリカゲル材料を製造するための材料としての、前記 [ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれかに記載の材料の使用。

[ 1 0 ] ヒト医学および / または医療技術における、特に傷処置および / または傷治療のための、生物分解性および / または生物吸収性の繊維および繊維状不織ウェブを製造するための紡糸材料としての、前記 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれかに記載の材料の使用。

[ 1 1 ] 生物吸収性および / または生物活性の粉末、モノリスおよび / または被覆を製造するための材料としての、前記 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれかに記載の材料の使用。

[ 1 2 ] 前記 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれかに記載のシリカゾルから進行する少なくとも 1 つのさらなる工程によって製造されることを特徴とする生物吸収性および / または生物活性の粉末、モノリスおよび / または被覆。

[ 1 3 ] 前記 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれかに記載のシリカゾルを、後に紡糸操作において押出にかけることを特徴とする生物分解性および / または生物吸収性の繊維材料。

[ 1 4 ] 繊維材料が、繊維、連続フィラメント、繊維状不織ウェブおよび / または織布を含んでなることを特徴とする前記 [ 1 3 ] に記載の生物分解性および / または生物吸収性の繊維材料。

[ 1 5 ] 全反応混合物の少なくとも 7 0 % 程度まで押出可能であるシリカゾル材料の製造方法であって、以下による方法：

( a ) 式 ( I ) :



[ 式中、X 基は、同一または異なって、それぞれヒドロキシル、水素、ハロゲン、アミノ、アルコキシ、アシルオキシ、アルキルカルボニルおよび / またはアルコキシカルボニルであり、1 ~ 2 0 個の炭素原子、好ましくは 1 ~ 1 0 個の炭素原子を有する所望により置換された直鎖、分岐鎖または環式基を構成するアルキル基から誘導され、酸素もしくはイ

オウ原子またはアミノ基によって遮断されていてもよい]

で示される 1 つまたはそれ以上の Si 化合物を、少なくとも 1 6 時間にわたって加水分解縮合反応させ；

( b ) 好ましくは反応系を同時に穏やかに混合しながら蒸発させて、単一相溶液を生成させ；

( c ) 単一相溶液を冷却し；そして

( d ) 速度論的に制御された熟成にかけてシリカゾル材料を得る。

[ 1 6 ] 細胞のインビトロ増殖方法であって、前記 [ 1 3 ] および / または [ 1 4 ] に記載の繊維からなる繊維マトリックスを、細胞によって形成される細胞外マトリックスのための細胞支持物質および / またはガイド構造として使用する方法。

[ 1 7 ] 前記 [ 1 6 ] に記載の方法によって製造しうる細胞構造、組織および / または器官。

[ 1 8 ] 生物分解性および / または生物吸収性の繊維マトリックスが、最初のインビトロ細胞コロニー形成から 4 週間後に、最初の 2 次元または 3 次元形態の繊維マトリックスに少なくとも 6 0 % 同一である、ポリケイ酸からなる繊維マトリックスを含んでなる細胞構造、組織および / または器官。

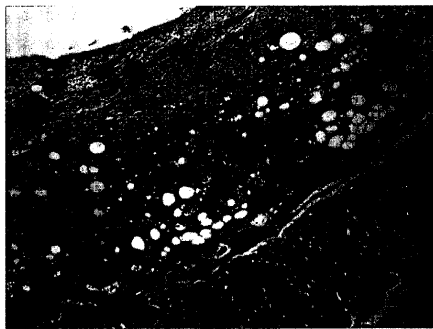
【 図 1 a 】

Figur 1a:



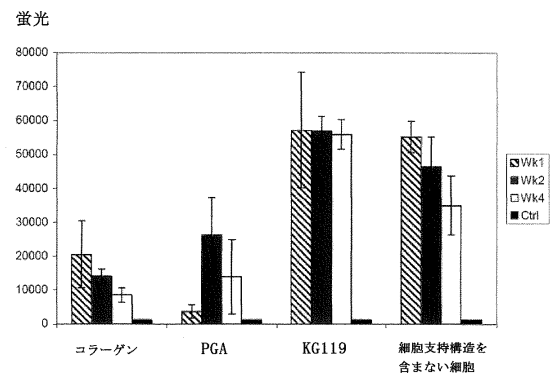
【 図 1 b 】

Figur 1b:



【 図 2 】

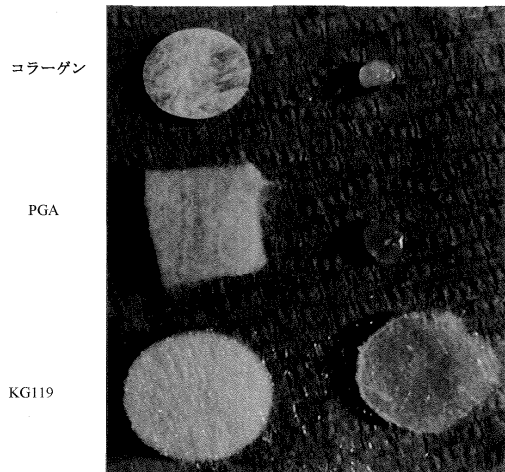
Figur 2:



【 図 3 】

Figure 3:

培養前                      4 週間の培養後



## フロントページの続き

(74)代理人 100083356

弁理士 柴田 康夫

(72)発明者 アクセル・ティーラウフ

ドイツ連邦共和国デー - 9 7 0 7 2 ヴュルツブルク、エグロフシュタインシュトラッセ 9 番

(72)発明者 ヴァルター・グラウビット

ドイツ連邦共和国デー - 9 7 2 7 9 ヴュルツブルク、マルガレテンシュトラッセ 1 2 番

審査官 岡 崎 忠

(56)参考文献 独国特許発明第 1 9 6 0 9 5 5 1 ( D E , C 2 )

特開 2 0 0 5 - 2 5 3 3 0 5 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 8 G 7 7 / 0 0 - 7 7 / 6 2

A 6 1 L 2 7 / 0 0

A 6 1 P 1 7 / 0 0 - 1 7 / 1 8

D 0 1 F 9 / 0 0 - 9 / 3 2

C 0 7 F 7 / 0 0 - 7 / 3 0