

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-533153

(P2014-533153A)

(43) 公表日 平成26年12月11日(2014.12.11)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01) A 6 1 L 27/00 D 4 C 0 8 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2014-539042 (P2014-539042)	(71) 出願人	506049172
(86) (22) 出願日	平成24年10月26日 (2012.10.26)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月30日 (2014.6.30)		ザ ユニヴァーシティー オブ イリノ
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/062116		イ
(87) 国際公開番号	W02013/063390		アメリカ合衆国 イリノイ州 61801
(87) 国際公開日	平成25年5月2日 (2013.5.2)		、アーバナ、サウス ライト ストリート
(31) 優先権主張番号	13/284,301		506、アドミニストレーション ビル
(32) 優先日	平成23年10月28日 (2011.10.28)		ディング 352
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102842
			弁理士 葛和 清司
		(72) 発明者	チョ, マイケル
			アメリカ合衆国 イリノイ州 60563
			、ネイパービル、イー. アンバーウッド
			サークル 1015

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 角膜のための縫合可能なハイブリッド超多孔質ヒドロゲル人工角膜

(57) 【要約】

本発明は、角膜再生のためのハイブリッド超多孔質ヒドロゲル骨格およびその製造方法の特徴とする。ハイブリッドヒドロゲルは、コラーゲンと混合した、超多孔質ポリ(メタクリル酸2-ヒドロキシエチル)(PHEMA)およびポリ(メタクリル酸メチル)(PMMA)コポリマーで構成される。ハイブリッド骨格は、縫合可能なハイブリッド角膜インプラントまたは人工角膜として用いることができる。

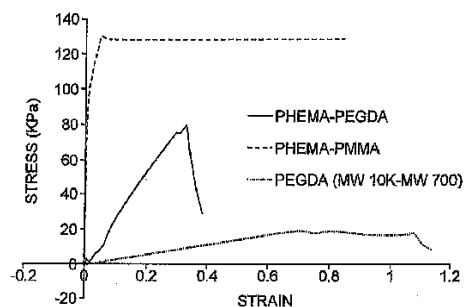


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

超多孔質ヒドロゲルコポリマーを含む、角膜再生のためのハイブリッド骨格であって、前記超多孔質ヒドロゲルコポリマーが、ポリ(メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル)(PHEMA)およびポリ(メタクリル酸メチル)(PMMA)、ならびに前記超多孔質ヒドロゲルコポリマーの細孔中のコラーゲンを含む、前記ハイブリッド骨格。

【請求項 2】

PHEMA - PMMA コポリマー、および前記 PHEMA - PMMA コポリマーの細孔中のコラーゲンを含む、縫合可能なハイブリッドインプラント。

【請求項 3】

インプラントが角膜への移植のためのコア - スカート人工角膜のスカートを形成する、請求項 1 に記載の縫合可能なハイブリッドインプラント。

【請求項 4】

水溶液中で、メタクリル酸メチル、メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル、脱イオン水、テトラアクリル酸ペンタエリスリトール、およびジメチルホルムアミドを混合して超多孔質 PHEMA - PMMA ヒドロゲル溶液を形成すること；超多孔質 PHEMA - PMMA ヒドロゲル溶液を冷却すること；コラーゲンを、冷却した超多孔質 PHEMA - PMMA ヒドロゲル溶液へと添加してコラーゲン - ヒドロゲル溶液を形成すること；およびコラーゲンヒドロゲル溶液を 37 で培養して縫合可能なハイブリッドインプラントを作り出すことを含む、請求項 2 に記載の縫合可能なハイブリッドインプラントの製造方法。

【請求項 5】

溶液中で、メタクリル酸メチル、メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル、脱イオン水、テトラアクリル酸ペンタエリスリトール(PETA)、およびジメチルホルムアミド(DMF)を混合して超多孔質 PHEMA - PMMA ヒドロゲルを形成することを含み、ここで DMF は MMA および HEMA のゲル溶液への溶解を促進し、および PETA は PHEMA - PMMA コポリマーの架橋を促進する、超多孔質 PHEMA - PMMA ヒドロゲルの製造方法。

【請求項 6】

溶液が、メタクリル酸メチルを 10 % v / v の濃度で、メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチルを 45 % v / v の濃度で、5 mg の PETA、2 mg 過硫酸アンモニウム、10 μl N, N, N', N' - テトラメチルエチレンジアミン、DMF を 6 % v / v の濃度で、および 22 % 脱イオン水を含む、請求項 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****イントロダクション**

本願は、その全体を参照により本明細書中に組み込まれる、米国特許出願シリアル番号 13 / 284,301、出願日 2011 年 10 月 28 日に対する優先権を主張する。

【背景技術】**【0002】****発明の背景**

角膜は、光線を、眼への進入前に、屈折およびフィルターする、血管のないかつ光学的に透明な組織である。クリアな角膜は、クリアな視覚のために必須である。角膜は、損傷、変性および感染後に不透明になり得る。Vision Share Consortiumは、角膜性失明が毎年、世界で 1000 万人以上の患者を侵すと推定している(Carlsson, et al. (2003) Curr. Opin. Ophthalmol. 14(4):192-7)。ゴールドスタンダードな処置は、新たに提供された死体ヒト角膜を用いる、角膜の外科的置換である。現在、約 4 万件の角膜移植が米国で毎年行われ(Eye Bank Association of America. Statistical report 2000)、血管新生なしの「低リスク」患者で行われた、合併症なしの最初の移植に対し、90%もの高い 2 年成功率である(Council on Scientific Affairs (1988) JAMA 259:719; The Collabo

10

20

30

40

50

rative Corneal Transplantation Research Group. (1992) Arch. Ophthalmol. 110:1392)。

【0003】

しかし、低リスク角膜移植における成功は、拒絶率が、最大局所 (maximal local) 免疫抑制および全身免疫抑制を以ってしてもさえ、50～70%にまで増加し得る、いわゆる「高リスク」患者において起こる角膜移植の結果と著しく対照的である (Mader & Stulting (1991) Ophthalmol. Clin. North Am. 4:411; Foulks & Sanfilippo (1982) Am. J. Ophthalmol. 94(5):622-9)。免疫性拒絶は未だに、角膜移植不全の主要な原因となっている (Ing, et al. (1998) Ophthalmology 105(10):1855-65)。

【0004】

免疫性拒絶の危険因子は、既往移植片拒絶、角膜血管新生、および幼齢を含む。これらの「高リスク」患者は典型的には繰り返し手術を受け、過度の疼痛、コスト、および限られた資源の使用という結果となる。例えば、角膜性疾患を持って生まれた小児が成人に達する前に15～20回の角膜移植を受けることは、それぞれの移植片が拒絶に陥るまでに3～6カ月しか持続しないため珍しくない。それゆえ、これらの高リスク患者における拒絶を回避する、代替の処置に対するはっきりとした要求が存在する (Coster & Williams (2003) Eye 17(8):996-1002)。

【0005】

人工角膜または人工角膜移植術が、角膜置換に対する満たされない要求を充足するために設計されていた。人工角膜の主な利点は、免疫性拒絶の欠如である。2つの人工角膜、Boston人工角膜 (KPro) およびAlphaCorが、移植に利用可能である。Boston KProは、生物学的に一体化可能な (biointegrable) スカートが光学的にクリアなコアを取り囲む、最新のコア-アンド-スカート設計を開発した (Chirila & Crawford (1996) Gesnerus 53(3-4):236-42)。のちにAlphaCorは、Boston KProの剛性に伴う合併症を回避するために、軟らかいポリマーを用いることにより、この設計を修正した。両方のデバイスは、高い生着率を有する: AlphaCorは6ヶ月後92%を報告し (Hicks, et al. (2006) Cornea 25(9):1034-42)、Boston KProは8.5ヶ月後95%を示す (Zerbe, et al. (2006) Ophthalmology 113(10):1779.e1,1779.e7)。

【0006】

しかし、安定な宿主一体化 (host integration) の欠如により結果的に溶解、押し出し (extrusion)、および拒絶が生じるため、いずれも広くは受け入れられていなかった (Chirila (2001) Biomaterials 22(24):3311-7)。加えて、前面の上皮化の欠如のため、保護されていないかつ感染を受けやすい眼となってしまう (Myung, et al. (2007) Biomed. Microdevices 9:911-922)。他の設計もまた、理想的な人工角膜のための致命的なパラメーター、つまり宿主一体化、物質移行、組織上皮化または神経分布の1つまたは2つ以上を対処し損なっている。不適切な人工角膜設計は、押し出し、組織壊死、上昇眼圧または感染を引き起こし得る。

【0007】

かかる限界を克服するために、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリ(メタクリル酸2-ヒドロキシエチル) (Carlsson, et al. (2003) supra)、およびポリ(エチレングリコール) (Myung, et al. (2007) supra) などの他の多孔質なポリマーが、調査されてきた。多孔質は宿主からインプラントへの細胞移動のための物理的な経路を提供するが、細胞が接着し、生存しおよび細胞外マトリクスを分泌するための生物学的な指示を出さない。2次元 (2-D) 背景に対し、3次元 (3-D) 背景において提示される細胞外性指示に関し、細胞が異なって応答することは自明である。空気-基質接触面により作り出される人工的な極性のため、細胞接着は2-Dにおいて著しく変化する。3-D細胞外環境は、組織人工骨格の成功に貢献する、鍵となるコンポーネントである。

【0008】

しかし、かかる証拠は3-D組織人工骨格を促進させるものであるにもかかわらず、拡

10

20

30

40

50

散能力により大いに限定される。それゆえ、多孔質系は、構築物にわたって、栄養および老廃物交換を促進するために必要である (Karande, et al. (2004) *Ann. Biomed. Eng.* 32(12):1728-43; Karageorgiou & Kaplan (2005) *Biomaterials* 26(27):5474-91)。細孔はまた、移植後において、宿主細胞固定のための導管としての役割をし、有利である。血管およびニューロンなどの周囲組織は、相互接続した細孔ネットワークを介して骨格中へ遊走でき、さらには組織内において構築物を固める。

【 0 0 0 9 】

塩リーチング、凍結乾燥、および熱、接着剤、光、または型を用いる層ごとのリソグラフィなどの多くの方法が、人工 3 - D 多孔質骨格を設計するために用いられてきた。これらの方法は多くの利点を有するが、相互接続した細孔を達成する際の困難性、毒性副産物、細胞を相互接続する困難性、または長い加工時間などの不利を含む (Tsang & Bhatia (2004) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56(11):1635-4)。

【 0 0 1 0 】

米国特許番号 6 , 9 6 0 , 6 1 7 は、向上した弾性および機械的強度を有するヒドロゲルの使用を記載する。ヒドロゲルの教示は多孔質であり、ポリマー鎖のネットワークを形成するために用いられる。該特許は、ポリマーの機能または生物学的適合性を改善するための、該ヒドロゲルといかなる他の化合物を混合することを教示も示唆もしない。

【 0 0 1 1 】

角膜組織エンジニアリングは、異なった層においていくつかの細胞型を組み込むことを要するため、困難である。表皮は、扁平表皮細胞で構成される角膜の最外層である。表皮の主な機能は、異物が眼に進入するのを阻害し、角膜のための酸素および栄養分を吸収することである。ポーマン層は、表皮を実質から分離するコラーゲンの無細胞シートである。実質は、ポーマン層下に配置され、水、コラーゲン、および角化細胞で構成され、血管を欠如する。実質下に、実質を内皮から分離する無細胞層である、デスメ膜が置かれている。内皮は、角膜の水分補給レバーを制御するポンプの役割を果たす最内層である。

【 0 0 1 2 】

コラーゲンマトリクスは、細胞成長および分化を支持する (Sun, et al. (2004) *Tissue Eng.* 10(9-10):1548-57; Yoneno, et al. (2005) *J. Biomed. Mater. Res. A* 75(3):733-41; Reyes & Garcia (2004) *J. Biomed. Mater. Res. A* 69(4):591-600)。コラーゲンは人間の細胞外マトリクスの天然成分であり、哺乳類組織において最も豊富なタンパク質である。加えて、コラーゲンは、非毒性、生分解性および安価である。細胞外マトリクス (extracellular matrix (ECM)) タンパク質として、コラーゲンは細胞接着のためのインテグリン結合部位の配列を提供する。これは、機械的および生物学的特性の多くを媒介する細胞と ECM との間の伝達の双方向の流れを許容する (Pampaloni, et al. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(10):839-45)。残念ながら、*in vitro* で作られるコラーゲンゲルは長きにわたって、脆弱な機械的特性に関して批判されてきた。コラーゲンの機械的強度を増加させるために、化学的架橋または脱水が試みられてきた (Drury & Mooney (2003) *Biomaterials* 24(24):4337-51)。しかし、かかる方法は、大抵は細胞に有毒であり、細胞のマトリクス内での 3 - D 封入を妨げる。

【 0 0 1 3 】

多くの異なる種の生合成マトリクスが、他者により記載されている。例えば、US 2004/0048796 は、医療用途および外科用途のためのコラーゲンバイオ繊維の使用を教示している。コラーゲンバイオ繊維は、羊膜を脱細胞化することにより、好ましくはヒトの、胎盤膜から製造される。US 2006/0083773 は、角膜を置換するようにまたは補強するように設計された人工角膜インプラントを開示している。開示されるインプラントは、生体適合性ポリマーからなるダブルネットワークヒドロゲルから製造され、ここで該ネットワークポリマーの少なくとも 1 つは親水性ポリマーに基づき、ここで該インプラントは、該ダブルネットワークヒドロゲルの表面に共有結合した上皮化促進生体分子を有する。該インプラントはまた、接着した細胞への栄養素の移動を可能とする生理学的拡散係数である。

【 0 0 1 4 】

US 2006/0246113は、合成ポリマーおよびバイオポリマーを化学的に架橋させることにより形成されるヒドロゲルから構成される生合成マトリクスの使用を教示している。EP 1 741 457は同様に、合成ポリマーおよびバイオポリマーを架橋することにより形成されるヒドロゲルを含む生合成マトリクスを開示している。しかし先行技術に記載されるマトリクスはいずれも、角膜置換手術のための十分な強度および生体適合性を有する角膜インプラント材料を製造するために成功的には用いられていない。角膜置換手術に用いることができる材料に対する必要性が未だに存在する。

【発明の概要】

【0015】

本発明は、多孔性ヒドロゲルコポリマーを含む角膜再生のためのハイブリッド骨格であって、該超多孔質ヒドロゲルコポリマーがポリ(メタクリル酸2-ヒドロキシエチル)(PHEMA)およびポリ(メタクリル酸メチル)(PMMA)、ならびに該超多孔質ヒドロゲルコポリマーの細孔中のコラーゲンを含む、前記ハイブリッド骨格である。

【0016】

本発明のもう1つの目的は、PHEMA-PMMAコポリマー、および該PHEMA-PMMAコポリマーの細孔中のコラーゲンを含む、縫合可能なハイブリッドインプラントである。一態様において、縫合可能なハイブリッドインプラントは、角膜への移植のためのコア-スカート人工角膜のスカートを形成する。

【0017】

本発明のもう1つの目的は、水溶液中で、メタクリル酸メチル、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル、脱イオン水、テトラアクリル酸ペンタエリスリトール、およびジエムチルホルムアミドを混合して超多孔質PHEMA-PMMAヒドロゲル溶液を形成すること；超多孔質PHEMA-PMMAヒドロゲル溶液を冷却すること；コラーゲンを、冷却した超多孔質PHEMA-PMMA溶液へと添加してコラーゲン-ヒドロゲル溶液を形成すること；およびコラーゲンヒドロゲル溶液を37℃で培養して縫合可能なハイブリッドインプラントを作り出すことによる、縫合可能なハイブリッドインプラントの製造方法である。

【0018】

本発明のさらにもう1つの目的は、溶液中で、メタクリル酸メチル、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル、脱イオン水、テトラアクリル酸ペンタエリスリトール(PETA)、およびジメチルホルムアミド(DMF)を混合して超多孔質PHEMA-PMMAヒドロゲルを形成することによる、ここでDMFはMMAおよびHEMAのゲル溶液への溶解を促進し、およびPETAはPHEMA-PMMAコポリマーの架橋を促進する、超多孔質PHEMA-PMMAヒドロゲルの製造方法である。好ましい態様において、溶液は、メタクリル酸メチルを10% v/vの濃度で、メタクリル酸2-ヒドロキシエチルを45% v/vの濃度で、5mgのPETA、2mg過硫酸アンモニウム、10μl N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン、DMFを6% v/vの濃度で、および22%脱イオン水を含有する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、本発明のポリマーでの引張強度試験の結果を示すグラフである。

【図2】図2は、本発明のポリマーでの引張強さ試験の結果を示すグラフである。

【図3】図3は、本発明のポリマーの最適透明度を示すグラフである。

【0020】

図1は、本発明のポリマーでの引張強さ試験の結果を描く。多孔質PHEMA-PMMAコポリマー、多孔質PHEMA-PEGDAコポリマーおよび多孔質PEGDAポリマーを本試験で比較した。全ての材料は、これらの水和状態で試験した。PHEMA-PMMAコポリマーは、PEGDAポリマーならびにPHEMA-PEGDAのコポリマーと比較して、顕著に大きな引張強さを示した。

【0021】

図 2 は、本発明のポリマーの引張強さ試験の結果を描く。多孔質塩ボロゲン P H E M A - P M M A コポリマー、多孔質ガス発泡 P H E M A - P M M A コポリマー、多孔質 P H E M A - P M M A コポリマーおよび多孔質 P E G D A ポリマーを、本試験で比較した。全ての材料は、これらの水和状態で試験した。

【 0 0 2 2 】

図 3 は、本発明のポリマーの最適透明度を示す。P M M A (3 . 5 、 7 、 1 4 、または 2 1 %) の場合のさまざまな量での多孔質 P H E M A - P M M A コポリマーを分析した。ガスまたは重炭酸ナトリウムで製造した構築物 (塩構築物) を示す。

【 0 0 2 3 】

発明の詳細な説明

本発明は、ポリ (メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル) または P H E M A ベースの、あるいは代替的にポリ (メタクリル酸メチル) または P M M A ベースの超多孔質ヒドロゲル (S P H) 中により合わされるコラーゲンから構成され、完全な 3 D 細胞接着を提供し、細胞内部成長もまた促進し、一方で S P H の全体の機械強さを維持する、ハイブリッド骨格である。この骨格を用いて、本発明はまた、縫合可能なハイブリッドインプラントを包含する。縫合可能なハイブリッドインプラントは、P H E M A - P M M A コポリマーおよびコラーゲンから構成される。ハイブリッドインプラントは、in vivo で宿主一体化および大量輸送の促進を提供し、角膜移植のためのコア - スカート人工角膜におけるスカートとして用いることができる。角膜インプラントのためのスカート - コア人工角膜は、コアが視覚を許容する一方で、スカートが安定した宿主一体化を促進するものである。

【 0 0 2 4 】

この方法によりまた、水溶液中で、メタクリル酸メチル (M M A) 、メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル (H E M A) 、脱イオン水、テトラアクリル酸ペンタエリスリトール、およびジメチルホルムアミドを混合して、超多孔質 P H E M A - P M M A ヒドロゲル溶液を形成すること ; 該超多孔質 P H E M A - P M M A ヒドロゲル溶液を冷却すること ; コラーゲンを該冷却した超多孔質 P H E M A - P M M A ヒドロゲルへと添加すること ; および 3 7 ° C で該コラーゲン - ヒドロゲル溶液を培養して縫合可能なハイブリッドインプラントを作り出すことを包含する縫合可能なハイブリッドインプラントの製造方法が提供される。

【 0 0 2 5 】

現在利用可能な人工角膜スカートは、長期インプラント使用および完全な視野領域の維持の両方を達成する、十分な宿主一体化を提供し損ねている。例えば、あるプロテアーゼ、歯根部利用人工角膜 (O O K P) において、自己の歯から作られたウエハにより囲まれた P M M A の中心コアは、全体で 6 2 % の 1 0 年平均解剖学的生存率を示すが、限定された視野領域を提供するのみである (Griffith, et al. (2005) In Essentials in Ophthalmology: Cornea and External Eye Disease, Chapter 3. T. Rheinhard (ed). Springer; Jun, et al. (2010) In Cornea and External Eye Disease: Essentials in Ophthalmology, Chapter 10. Weinreb and Krieglstein (eds.), pp. 137-144) 。

【 0 0 2 6 】

十分な宿主一体化および完全な視野領域の両方を提供し損なっているデバイスのもう 1 つの例は、P M M A の目およびポリウレタンまたはポリプロピレンのいずれかでつくられたスカートで構成される、Seoul タイプ人工角膜である。このデバイスを用いることにより、6 8 ヶ月において 6 6 . 7 % の生着率がもたらされる。これらのデバイスの全ては角膜融解に進展してしまい、スカートが完全に露出されることになってしまう。全ての所望の品質を欠損するデバイスのさらにもう 1 つの例は、その目のコンポーネントの中心にポリ (エチレングリコール) およびポリ (アクリル酸) (P E G / P A A) のハイブリッドネットワークを構成する、Stanford 人工角膜である。このプロテアーゼは、動物モデルにおいて 6 週間までもの間、良好に耐容された (Griffith, et al. (2005) In Essentials in Ophthalmology: Cornea and External Eye Disease, Chapter 3. T. Rheinhard (ed). Springer) ; しかし、宿主一体化の形跡は存在しなかった。

【 0 0 2 7 】

P H E M A ベースの人工角膜、A l p h a c o r は、現在臨床使用に承認されている (Griffith, et al. et al. (2005) supra; Jun, et al. (2010) supra)。2 年追跡における A l p h a c o r の生着は、6 2 % にまで報告されており、メドロキシプロゲステロン (M P G) の術後の局所使用が、最も頻度の高い合併症である、角膜実質溶解がより少なくなることに関連すると所見された (Gomaa (2010) Clin. Exp. Ophthalmol. 38:211-224)。さらに、他の A l p h a c o r 合併症は、プロテアーゼ後の膜形成、目の損傷、および生体一体化不良を含む (Sheardown (2008) In Regenerative Medicine in the Cornea, p. 1060-1071)。さらに A l p h a c o r が縫合を保持できないがゆえの創傷離開は、前臨床試験期間における一般的な様式の失敗である (Hicks, (1997) Austral. NZ J. Ophthalmol. 25:S50-S52)。

【 0 0 2 8 】

最終的に、3 ~ 1 4 K P a の範囲の引張係数が、人工角膜設計の好ましい形態において用いられる、ジメチルアクリル酸エチレン (E D M A) などの、さまざまな架橋剤を用いて作られる P H E M A スポンジに対して観察された (US Patent No. 5,458,819; Lou (2000) J. Mater. Sci. 11:319-325)。現存の人工角膜設計および in vivo での使用との問題を考慮すると、新しい設計が必要であった。これらの問題に対処するために、本発明は、縫合を維持し、細胞遊走を推進し、ひいては組織成長および宿主の眼組織へのスカートの一体化を導くように設計されたハイブリッド構築物 (コラーゲン I 型注入多孔質 P H E M A - P M M A) である。

【 0 0 2 9 】

本発明は、まずジアクリル酸ポリエチレングリコール (P E G D A) ベース超多孔質ヒドロゲル (S P H) により合わされたコラーゲンで構成されるハイブリッド骨格の使用を検討することにより、発展した。本発明は、細胞内部成長もまた促進し、一方で S P H の全体的な機械強さを維持する、完全な 3 - D 細胞接着方法を提供する、他の S P H ポリマーの使用を含む。ハイブリッド骨格は、S P H を脱水し、次いでコラーゲン細胞溶液中で膨張させ、材料間の共有結合または密接な相互作用のないハイブリッド骨格を作り出すことにより、製造される。この方法は、コラーゲンと P E G D A ポリマー鎖との密接にからませることを以って作られた骨格と比較して、より良好な 3 - D 細胞接着をもたらす。細胞は完全にコラーゲン部分に包埋され、S P H の壁へと曝露されないため、正確な制御または孔径の均一性は不要である。さらに、細胞は、取り込みおよびゲル化前に P E F D A ベース骨格中のタンパク質内に包埋されるため、この方法は 3 - D 環境を作り出し、不自然な細胞極性を回避する。

【 0 0 3 0 】

本発明の方法により製造された骨格は、強力なバルク特性、およびなおも天然の 3 - D 細胞接着特性を有するものである。用いられる特定のゲルにかかわらず、本ハイブリッド骨格の天然ゲルおよび合成ゲルは、非共有様式、非接着様式でより合わされる。これに関して、ハイブリッド骨格のコラーゲンは超多孔質ヒドロゲルの壁に結合せず、そのためコラーゲンゲルが引き受けることを許容する。このため、コラーゲンに包埋された細胞は 3 - D でコラーゲンゲルに浸入し、超多孔質ヒドロゲルの壁へと曝露されない。コラーゲンは細胞接着、生着および内部成長を増加させるが、ハイブリッドの全体的なメカニズムはコラーゲンに依存せず、超多孔質ヒドロゲルに大いに類似する。それゆえ、ハイブリッド超多孔質ヒドロゲルは、機械安定性を提供し、内部接続させた細孔を提供する一方で、3 - D コラーゲンマトリクスは 3 - D 接着部位を提供する。初期のハイブリッド骨格はコラーゲンと P E G D A とで構成されたが、この汎用的方法が多く異なる天然材料および合成材料を好適に特定の組織タイプへと組み込むようになっていいると考えられた。実際、本ハイブリッド骨格は、所望の用途に基づき、播種前の細胞とともに、または、なしで、効果的に用いられると考えられる。

【 0 0 3 1 】

P E G D A ベースのハイブリッドで実験を実行し、本発明のハイブリッド骨格がうまく

in vivoで用いることができることを実証した。これらの実験において、2匹のラットにハイブリッド骨格（SPHおよびコラーゲン）またはコラーゲンなしのヒドロゲルの骨格（非ハイブリッド）のいずれかを含有する人工角膜を移植した。ハイブリッド骨格を用いて作られた人工角膜の新規の性質は、インプラントのハイブリッドスカート（外側）に関連していた。それゆえ、インプラントの中心部分はクラリティを維持する一方で、周囲スカートは眼の組織との一体化を促進するように設計されていた。この種の角膜インプラントのin vivo一体化の程度を試験するために、周囲スカートをラット角膜へと移植し、2週間後に観察した。インプラントの試験により、インプラントの性質に依存する差異は示された。ハイブリッド材料（SPHおよびコラーゲン）を含有する周囲スカートを有するインプラントは、2週間後において、眼においてより目立たなかった。ハイブリッドスカートインプラントは良好に耐容され、生体適合性であった。さらに、結果により、ハイブリッドスカートインプラントは、コラーゲンなしのインプラントと比較して、周囲眼組織とより良好に一体化したことが示された。

10

20

30

40

50

【0032】

代替の構築物で、本発明は、PHEMA-PMMAコポリマーで構成される超多孔質ヒドロゲルである。このコポリマーは、人工角膜に組み込まれる場合、PEGDAベースの超多孔質ヒドロゲルと比較して、予想外にも改善された特性を有することが今、示された。本発明はまた、人工角膜としての用途のための超多孔質ヒドロゲルの新規の形成方法を提供する。本発明の該方法において、超多孔質ヒドロゲルは、PHEMA-PMMAハイブリッドコポリマーとして処方される。本発明の該方法は、メタクリル酸メチル（MMA）、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル（HEMA）、テトラアクリル酸ペンタエリスリトール（PETA）、過硫酸アンモニウム、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）、ジメチルホルムアミド（DMF）、および脱イオン水を混合してゲル溶液を形成することを含む。ゲル溶液中のPETAの使用により、PHEMA-PMMAコポリマーの架橋が所望の強度および機械特性を有するゲルを作り出すことが提供され、本発明の超多孔質ヒドロゲルの形成方法の新規の特徴である。ゲル溶液中のPHEMA-PMMAを溶解させるためのDMFの使用は、PHEMAおよびPMMAの溶解を提供する一方で、PHEMA-PMMAコポリマーの重要な特徴である大きな孔を破壊しないため、本発明の超多孔質ヒドロゲルの本形成方法のもう1つの新規の特徴である。

【0033】

重合化の間の攪拌は、大きな孔の形成を導くカギとなるステップである。混合物をしきい値温度まで攪拌することにより、孔をより大きくすることができる。いったんしきい値温度に達すると、本発明の方法からもたらされるゲル溶液は、コンタクトレンズ形状の方へと配置され、角膜の屈曲を模倣するのに十分な柔軟性である粘度へと進展する。いったんゲルが作りだされると、多孔質PHEMA-PMMAコポリマーにおける内部浸透性コラーゲンネットワークの形成は、水溶液中でのPHEMA-PMMAのゆっくりとした拡張のために36時間までもの時間がかかり得る。いったんPHEMA-PMMAコポリマーが完全にコラーゲン溶液中で拡張すると、得られる構築物は移植のための縫合可能なハイブリッド人工角膜となる。本発明のコポリマーの縫合可能性は、他の材料に対する重要な利点である。実験が実行され、PHEMA-PMMAコポリマーは、脱イオン水およびリン酸緩衝食塩水（PBS）などの溶液中で機械的に安定である一方、コポリマーは適度な力での材料上の押し出しを供するに十分に弾性であることが示された。さらに、本発明のハイブリッド縫合可能な人工角膜のコラーゲンネットワークは、宿主からの構築物への細胞の遊走を促進する。モノクローナル抗コラーゲンI型抗体での染色により試験すると、コラーゲン繊維はPHEMA-PMMAインプラントの細孔内で形成されたことが示されていた。生細胞（カルセイン-AM染色）を死細胞（エチジウムホモ二量体-1）に対して同定するために染色する場合、縫合可能なハイブリッド人工角膜への細胞遊走は明らかに自明であった。

【0034】

実験を実行して、PHEMA-PMMAコポリマーの引張強さを他のポリマーと比較し

た。全ての材料は、それらの水和状態で試験した。図 1 に示されるとおり、本発明の P H E M A - P M M A コポリマーの引張強さは、P E G D A ポリマーよりも 1 ~ 2 オーダー規模の大きな引張強さを有する。材料強さに関するこれらの所見に基づき、P E G D A ポリマー (M W 1 0 K ~ M W 7 0 0) は細胞内部成長を収容できる細孔を作るがうまく縫合することができない、軟らかい材料である。P H E M A - P E G D A コポリマーは P E G D A よりも機械的に安定だがまた、縫合可能性に対する強さを欠如する；この材料は曲げることができ、破裂させることなく伸長することができる。対照的に、P H E M A - P M M A コポリマーは、適度 ~ 弱い力の張力下でその完全性を維持し、また針の挿入および引き続く加力後の破裂に対抗する。したがって、本発明の P H E M A - P M M A コポリマーは、安定な宿主一体化もまた実現可能な縫合可能な人工角膜を提供する。

10

【 0 0 3 5 】

したがって、本発明の構築物に包埋されたコラーゲン I 型ネットワークとの多孔質な P H E M A - P M M A コポリマーは、広汎に改善された人工角膜（角膜移植術）を示す。本発明は、既存の人工角膜には充足されない 2 つの主な基準、つまりプロテーゼの縫合を許容する遊走 / 宿主一体化および構造的 / 機械的安定性を充足する。データにより、本発明のハイブリッド人工角膜は細胞内部成長を促進し、また縫合および移植に必要な引張強さを呈することが示される。結果として、本発明は、全層角膜置換手術を支持することができ得る新規の人工角膜を提供する。したがって本発明は、超多孔質ヒドロゲルの細孔へと組み込まれたコラーゲンおよび細胞から構成されるハイブリッド骨格およびその製造方法を提供する。

20

【 0 0 3 6 】

本明細書で用いられる、超多孔質ヒドロゲルマトリクスは、約 1 0 0 n m ~ 約 3 0 0 n m の平均径サイズの複数の内部接続マクロ孔の存在のために相当量の水を吸収することができる、準固体の 3 次元構造に言及する。超多孔質ヒドロゲルは本明細書に開示されるように、つまり同時重合化に最適化された発泡反応、または業界で用いられるあらゆる他の好適な方法で製造することができる。当業者が理解するように、例えばマクロ孔のサイズはゲルが形成される溶媒（単数）または溶媒（複数）の性質および / または重合開始剤または触媒の量など、多数の因子に依存し得る。

【 0 0 3 7 】

「超多孔質」は、材料の取り込みが拡散よりもむしろ毛細管作用に基づく限りにおいて、マトリクスが溶液中で膨張することを意味することを意図し (Gemeinhart, et al. (2000) J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 11(12):1371-80; Gemeinhart, et al. (2001) J. Biomed. Mater. Res. 55(1):54-62)、本発明の超多孔質ヒドロゲルは、多種の可溶性物質、例えば細胞およびタンパク質を、骨格マトリクスの細孔内へと急速に取り込むことができる。超多孔質ヒドロゲルは、水中または他の生物学的液体中に配置されるとき、溶解することなく、膨張するポリマーで構成される。ヒドロゲルは、一般的に大量の流体を吸収し、平衡において、典型的には 6 0 ~ 9 0 % の流体およびたった 1 0 ~ 3 0 % のポリマーで構成される。ヒドロゲルは、架橋したポリマーネットワークの生来の生体適合性のため、とくに有用である (Hill-West, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5967-5971)。ヒドロゲルの生体適合性は、親水性および多量の生物学的流体を吸収する能力に起因し得る (Brannon-Peppas. Preparation and Characterization of Cross-linked Hydrophilic Networks in Absorbent Polymer Technology, Brannon-Peppas and Harland, Eds. 1990, Elsevier: Amsterdam, pp 45-66; Peppas and Mikos. Preparation Methods and Structure of Hydrogels in Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Peppas, Ed. 1996, CRC Press: Boca Raton, FL, pp 1-27)。またヒドロゲルは、天然生存細胞外マトリクスに近接に類似する (Ratner and Hoffman. Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications in Hydrogels for Medical and Related Applications, Andrade, Ed. 1976, American Chemical Society: Washington, DC, pp 1-36)。

30

40

【 0 0 3 8 】

本発明のヒドロゲルマトリクスは、合成的に製造され、親水性であるが必ずしも水溶性

50

ではない、合成親水性ポリマーで構成される。本発明の実施において用いることができる合成親水性ポリマーの例は、ポリエチレングリコール（PEG）；ポリオキシエチレン；ポリメチレングリコール；ポリトリメチレングリコール類；ポリビニルピロリドン類；ポリ（アクリル酸）；ポリ（イタコン酸）；ポリ（メタクリル酸）；ポリ（ヒドロキシプロピルアクリルアミド）（HPMA）；ポリ（ペプチド類）例えばポリグルタマート、ポリリシン、ポリアスパルタート、ポリセリン、ポリトレオニン、ポリシステイン；およびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロック重合体類；およびそのコポリマー、および誘導体および混合物である。

【0039】

天然海洋バイオポリマー、例えばアガロース、チトサン、およびアルギン酸塩もまた本発明に包含される一方、ある態様において、親水性マトリクスはタンパク質、デンプン、セルロース、ヘパリン、またはヒアルロン酸などの天然発生ポリマーではない。好ましい態様において、ヒドロゲルマトリクスはポリ（メタクリル酸）ポリマーである。より好ましい態様において、ポリ（メタクリル酸）ポリマーは、PHEMA-PMMAコポリマーである。

10

【0040】

異なる合成親水性ポリマーおよび選択されたバイオポリマーが本発明の親水性マトリクスを形成するに関連して用いることができるが、ポリマーは生体適合性かつ親水性でなければならないが、物理的にまたは化学的に架橋されて溶解を妨げている。特に好適なポリマーは、生物学的に活性のある分子の変更において広範囲にわたって使用されるものを含み、なぜなら毒性、抗原性および免疫原性を欠損し、広範な溶解度を有し、一般に非生分解性であり、ヒトを含むほとんどの生物から容易に抽出されるためである。

20

【0041】

ジアクリル酸ポリ（エチレングリコール）（PEGDA）およびポリ（メタクリル酸）ヒドロゲル類は、多くの生物医学的用途において幅広く受け入れられてきた（Peppas, et al. (1999) J. Controlled Release 62:81-87）。かかるヒドロゲル類は、親水性、生体適合性、非毒性であり、およびマクロマの長さに応じて変化する網目サイズを示す。本明細書中で例示するように、PEGDAおよびポリ（メタクリル酸）から製造された超多孔質ヒドロゲルは、細胞毒性でなく、ガス発泡方法を使用して簡単に製造できる。さらに、本発明のヒドロゲル類は、光学的に透明であり、in vivoで理想的な透明度になる。したがって、本発明の特定の態様は、PEGDAまたは、PHEMAおよびPMMAなどのポリ（メタクリル酸）ポリマーで製造される超多孔質ヒドロゲル類を包含する。

30

【0042】

本発明の超多孔質ヒドロゲル類は、架橋した親水性の剤、例えばアルギン酸ナトリウム、ペクチン、キトサンなど、またはマトリクスが形成された後に架橋できる（ポリビニル）アルコールを組み込むことによってさらに修飾し、高度な機械強さを有することができる（Omidian, et al. (2006) Macromol. Biosci. 6:703-10）。ヒドロゲル類はまた、PLA、PLGAまたはPGAポリマー類を組み込むことにより、in vivoで分解性となすことができる。さらに、超多孔質ヒドロゲル類は、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンまたは、例えば細胞接着および増殖を促進できる表面修飾のためのRGD、によって修飾され得る（Heungsoo Shin (2003) Biomaterials 24:4353-4364; Hwang, et al. (2006) Tissue Eng. 12:2695-706）。実際、分子量、ブロック構造、分解可能な結合および架橋様式を変更することは、本ヒドロゲル類の強度、弾性および分解性質に影響し得る（Nguyen & West (2002) Biomaterials 23(22):4307-14; Ilkovits & Burckick (2007) Tissue Eng. 13(10):2369-85）。

40

【0043】

超多孔質ヒドロゲル類はまた、様々なタンパク質（例えばコラーゲン）または治療剤などの化合物と共有結合するための官能基で修飾され得る。マトリクスに結合され得る治療剤は、鎮痛剤、麻酔剤、抗真菌剤、抗生剤、抗炎症剤、駆虫剤、解毒剤、制吐剤、抗ヒスタミン剤、抗高血圧剤、抗マラリア剤、抗菌剤、抗精神病薬、解熱剤、消毒剤、抗関節炎

50

剤、抗結核剤、鎮咳剤、抗ウイルス剤、心臓作用剤、下剤、化学療法剤、着色または蛍光造影剤、コルチコイド類（ステロイドなど）、抗うつ剤、抑制剤、診断補助剤、利尿剤、酵素、去痰薬、ホルモン、睡眠剤、ミネラル、栄養補給剤、副交感神経作動剤、カリウム補給剤、放射線増感剤、放射性同位体、鎮静剤、サルファ剤、覚せい剤、交感神経作用剤、精神安定剤、抗尿路感染剤、血管収縮剤、血管拡張剤、ビタミン類、キサンチン誘導体などを含むがこれに限定されない。治療剤は、他の小さい生体分子、天然に単離された物質またはそのアナログ、有機金属剤、キレート金属または金属塩、ペプチドベースの薬剤、またはペプチド性もしくは非ペプチド性受容体標的化剤もしくは結合剤でもあり得る。治療剤のマトリクスへの結合は、プロテアーゼ感受性リンカーまたは他の生分解性結合によってであることができると考えられている。

10

【0044】

官能基に加えて、本ヒドロゲル類のポリマーは、処置されている対象からのマトリクスポリマーの除去を促進する制御された生分解のための手段をさらに含み得る。例えば、ヒドロゲル類は、修飾によって、迅速に生分解され得る（Sawhney, et al. (1994) J. Biomater. Res. 28:831-838）。ヒドロゲル類は、生分解性の架橋剤を組み込むことにより、または、生分解性のコポリマーを利用することにより、生分解性とすることができる（Sawhney, et al. (1993) Macromolecules 26:581-587; Park, et al. Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery. 1993, Lancaster, PA: Technomic Pub. ix, 252; Watanabe, et al. (2002) Biomaterials 23:4041-4048; Yamini, et al. (1997) J. Macromol. Sci. A34:2461-2470）。例えば、特に、プラスミンか、自然のままのコラゲナーゼのいずれかによって分解される、テレキリック（telechelic）な生分解性ブロックコポリマーは、架橋されたヒドロゲル類に用いられてきた（West, et al. (1999) Macromolecules, 32:241-244）。程度および速度、または分解は、移植部位でのマトリクスの蓄積の制限する、使用される特定の分解機構によって制御される。

20

【0045】

前述のように、本発明のヒドロゲルは、ヒドロゲル前駆溶液を調製し、発泡剤をそこに添加して発泡体を製造し、これをゲル化または重合化して複数の微細孔がそこに分散するマトリクスを形成する、ガス発泡法により製造することができる。前駆溶液は、超多孔質ヒドロゲル構造を製造するように混ぜ合わされているが、発泡体形成およびヒドロゲルのゲル化または重合化を促進する発泡剤を欠損する成分の混合物として定義される。本発明の前駆溶液は、親水性ポリマー、開始剤および泡安定剤を含み得るが、これに限定されない。好適な親水性ポリマーは、本明細書中に開示されている。好適な開始剤は、例えばAPS / TEMEDなどであり、好適な泡安定剤は、PLURONIC F-127などのブロックコポリマーであり得る。発泡剤は、化学発泡剤または物理発泡剤であり得る。ある態様において、発泡剤は、重炭酸ナトリウムなどの塩である。他の態様において、発泡剤は、ガス、例えば圧縮空気または窒素である。ガス発泡法において使用される発泡剤は、当業者に知られている。

30

【0046】

本発明の超多孔質ヒドロゲルの製造方法に従って、超多孔質ヒドロゲルマトリクスは脱水される。ヒドロゲルマトリクスは、任意の好適な化学的手段および/または物理的手段によっても脱水され得る。例えば、脱水は、アルコール（例えばエタノール）および乾燥機の組み合わせを使用して達成され得る。

40

【0047】

好ましい態様において、本発明は、超多孔質PHEMA - PMMAヒドロゲルの製造方法であって、溶液中で、メタクリル酸メチル（MMA）、メタクリル酸2 - ヒドロキシエチル（HEMA）、脱イオン水、テトラアクリル酸ペンタエリスリトール（PETA）およびジメチルホルムアミド（DMF）を混合して超多孔質PHEMA - PMMAヒドロゲルを形成することを含み、ここでDMFはMMAおよびHEMAのゲル溶液への溶解を促進し、およびPETAはPHEMA - PMMAコポリマーの架橋を促進する、前記方法である。より好ましい態様において、本発明の方法は、10% v / vのMMA、45% v /

50

v の H E M A、5 m g の P E T A、2 m g の過硫酸アンモニウム、1 0 μ l の N , N , N ' , N ' - テトラメチルエチレンジアミン (T E M E D)、6 % v / v の D M F、および 2 2 % 脱イオン水を混合することを含む。

【 0 0 4 8 】

そこに包埋されている細胞とともにまたはなしで、興味分子 (例えばコラーゲン) を組み込むために、ヒドロゲルマトリクスは、細胞とともにまたはなしで興味分子を含む溶液中で再膨張または再水和される。超多孔質ヒドロゲルの細孔に組み込むことができる分子は、ビタミン類および他の栄養補給剤、糖タンパク質 (例えばコラーゲン)、フィブロネクチン、ペプチドおよびタンパク質、炭水化物 (単純および / または複合の両方)、プロテオグリカン、抗原、オリゴヌクレオチド (センスおよび / またはアンチセンス D N A および / または R N A)、抗体 (例えば、感染性因子、腫瘍、薬剤またはホルモンに対する) および遺伝子治療試薬を含むが、これに限定されない。ある態様において、興味分子はコラーゲンである。特定の態様において、コラーゲンは I 型コラーゲンである。望ましくは、興味分子は、生物学的に適合する溶液中、つまり、in vivo で非毒性の溶液中にある。好適な溶液は、水、生理食塩水、緩衝液などを含むが、これに限定されない。

10

【 0 0 4 9 】

I 型コラーゲンは人体のもっとも豊富なコラーゲンである。それは、瘢痕組織、腱および骨の有機部分に存在する。I I 型コラーゲンは、関節軟骨の成分であり、I X 型コラーゲンに結合していると発見されており、一方、I I I 型コラーゲンは肉芽組織のコラーゲンであり、より頑丈な I 型コラーゲンが合成される前に、若い線維芽細胞によって迅速に製造される。X I I 型コラーゲンは、I 型および I I I 型コラーゲンと相互作用することが発見されている。I V 型コラーゲンは、基底膜の一部である。V 型および V I 型コラーゲンは、大部分の間質組織の成分であり、I 型コラーゲンと結合する。V I I 型コラーゲンは、V I I I 型コラーゲンのように上皮の成分である。X 型コラーゲンは、肥大型であり、かつ石灰化する軟骨の一部であり、一方で、X I 型コラーゲンは軟骨の成分である。

20

【 0 0 5 0 】

それゆえ、移植部位および意図される治療結果に依存して、1 または 2 以上のコラーゲンを、超多孔質ヒドロゲルマトリクスの細孔に組み込むことができる。コラーゲンは、酸に溶解したペプシン可溶性コラーゲンでの溶液中で得ることができる (例えば、Vitrogen ; ANGIOTECH (登録商標) Biomaterials, Palo Alto, CA)。コラーゲンは中和でき (例えば、NaOH で pH 7 . 0 ~ pH 7 . 4 に)、超多孔質ヒドロゲルマトリックスの中に直接取り込まれ得、または、興味細胞と組み合わせられて超多孔質ヒドロゲルマトリックスの中に取り込まれ得る。コラーゲンはむしろ、細胞をそこに懸濁させて、原線維形成によって凝固することができる (例えば、2 4 ~ 3 7 で、CO₂ 存在下または非存在下で)。好ましい態様において、I 型コラーゲンは、本発明の超多孔質 P H E M A - P M M A ヒドロゲルの細孔中に取り込まれる。これは、冷却した P H E M A - P M M A ヒドロゲル溶液 (およそ 2 ~ 8) にコラーゲンを添加することによって達成され、ここで溶液は、コラーゲン吸収過程にわたって冷却され続ける。いったんコラーゲンが P H E M A - P M M A 溶液の中に取り込まれたら、コラーゲン溶液を細胞培養器の中で 3 7 で 1 時間培養する。結果物は縫合可能なハイブリッドインプラントまたは縫合可能なハイブリッド人工角膜である。

30

40

【 0 0 5 1 】

本超多孔質ヒドロゲルの中に細胞が組み込まれることが所望される場合は、ヒドロゲルの再膨張または再水和のために溶液が使用される前あるいは後に、細胞を興味分子を含んだ溶液と混ぜ合わせることができる。特定の態様において、ヒドロゲルの再膨張の前に、細胞は溶液に添加される。本発明において、特定の使用の細胞のタイプは、幹細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、間葉細胞、インスリン分泌膵島細胞、肝細胞、筋細胞、神経細胞、軟骨細胞、皮膚細胞、骨髄細胞などを含むが、これに限定されない。

【 0 0 5 2 】

細胞は、本ハイブリッド超多孔質ヒドロゲルを受容する対象に関し、自己増殖性、同種

50

異系または異種であり得る。細胞は、生検試料から単離、または、慣用の方法を使用した幹細胞の分化および増殖により生じ得る。ヒドロゲルマトリクスの細孔に組み込まれることに加えて、いくつかの態様は、例えば重合化の前に細胞をヒドロゲル前駆溶液に添加することによって、ヒドロゲル自体の中に細胞を封入することを含む。ヒドロゲルマトリクスおよびヒドロゲル孔内に封入された細胞は、同一または異なり得る。例えば、幹細胞をヒドロゲルマトリクスに封入し、成長因子または分化因子を産生できる細胞を細孔に封入でき、その逆も同様である。

【0053】

ハイブリッド超多孔質ヒドロゲルの細孔に細胞を組み込むことに加えて、本発明はさらに、ハイブリッド超多孔質ヒドロゲルマトリクスの1または2以上の表面を、本明細書中に開示される1または2以上の細胞型でコーティングすることを含む。特に、本発明は、コラーゲンの層を介して上皮細胞をハイブリッドヒドロゲルマトリクスに接着することを含む。さらに、本発明は、1または2以上の光学的にクリアなマクロマで満たされたハイブリッドヒドロゲルの中の中心のコアの包含を含む。本発明の目的に対し、マクロマは、200nm~1000nmの範囲の波長の光を透過させることができ、1以上の、より望ましくは1.3以上の屈折率を有する場合、光学的にクリアである。好適なマクロマは、例えば、本明細書中に開示される親水性ポリマーを含む。特定の態様において、光学的にクリアなマクロマは、PEGDAである。

【0054】

本明細書中で例示するように、本発明の成分および製造方法は、細胞に対し毒性ではなく、超多孔質ヒドロゲルの細孔の中に細胞を組み込むことができる。かかるヒドロゲル類は、細胞の維持または成長のための、および、傷ついたまたは損傷した体内の器官の機能的置換における、生物学的骨格として用途を見出す。ある態様において、本ハイブリッド超多孔質ヒドロゲルは、医療用途における使用のためのさまざまな成形されたインプラントの製造において使用される。有利には、超多孔質ヒドロゲルは、損傷したまたは傷ついた部位へ細胞を提供して再生を促進するように設計される。したがって、本組成は、対象への細胞の局所的送達を提供するために有用である。かかる送達は、例えば、創傷治癒を促進するように、および組織再生または組織置換において使用され得る。特定の態様において、本発明のヒドロゲルは、組織工学または再生医療において、薬剤試験のためのモデル器官システムとして、または細胞増殖における使用のために、使用される。

【0055】

本発明の特定の態様において、本ハイブリッド超多孔質ヒドロゲルは、人工角膜の製造に用いられる。この点について、特定の態様は、超多孔質ヒドロゲルの細孔へのコラーゲンおよび角膜線維芽細胞の取り込みを含む。

【0056】

用途に依存して、本発明の超多孔質ヒドロゲルは、単独で、または、医薬組成物中における薬学的に許容可能な担体との混合物として使用され得る。本発明の使用における好適な処方は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro, editor, 20th ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000において見出される。例示的な担体は、例えば、水、生理食塩水、緩衝液などを含む。組成物はまた、pH調整剤および緩衝剤、等張調整剤、湿潤剤、洗浄剤などの、近似的な生理学的状態に必要とされる薬学的に許容可能な補助物質を含み得る。

【0057】

本発明の組成物は、細胞が送達されるべき部位および処置されるべき触感または状態に依存して、例えば、局所、皮下移植または筋肉内移植を含む、任意の適切な投与様式のために処方され得る。

【0058】

ハイブリッド超多孔質骨格の本製造方法は、単純、安価かつ多用途である。それゆえ、骨格組織および軟組織への用途を含む、多くの組織工学の用途に適用し得る。例えば、角膜再生に加え、ハイブリッド超多孔質ヒドロゲルは、骨組織工学において使用し得る。実

10

20

30

40

50

際、特定の組織に合わせて、開示されたヒドロゲルに多くの修飾がなされ得る。長きにわたる分解性および製品による非毒性を作り出すために、加水分解性結合が S P H の中に組み込まれ得る。薬剤または分子は、制御された放出状況のために、S P H に積み込まれ得る。天然材料および合成材料の両方を変更して、特別に望まれた特性を作り出すことができる。例えば、P E G D A ベースのポリマーは、縫合などの張力に耐えることができない。しかしながら、本発明の P H E M A - P M M A コポリマーは、縫合に対して十分な引張強度を有する。それゆえ、当業者は所望の性質に基づいて、本発明の超多孔質ヒドロゲルを選択するであろう。

【0059】

本発明は、以下の非限定的な例によってさらに詳細に記載される。

10

【0060】

例 1：材料と方法

細胞培養。2細胞型、幹細胞および委任細胞が分析された。ヒト間葉幹細胞 (M S C s) は、15%ウシ胎仔血清 (F B S)、1% L - グルタミン、および 1% 抗生物質を含有する G i b c o の - 最小必須培地 (L - グルタミン含有、リボヌクレオシド非含有、デオキシリボヌクレオシド非含有) 中で維持された。H T - 1080 ヒト線維肉腫細胞株は、A T C C (Manassas, VA) から購入した。線維芽細胞は、10%ウシ胎仔血清 (F B S) および 1% 抗生物質 / 抗かび剤添加ダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) に浸けた。培地は、老廃物を取り除き、新鮮な栄養分を供給するために、2 ~ 3 日ごとに交換した。細胞は、5% C O₂ および 95% 空気の下で 37 °C で維持された。細胞は、75 ~ 80% コンフルエント単層が形成されるまで、組織培養フラスコ内に 3×10^3 細胞 / c m² の密度でプレートした。細胞は、0.25 mg / m l トリプシンで 5 分間培養し、上記の密度に再度プレートすることによって継代した。本明細書中の実験で使用した全ての細胞は、3 ~ 6 回継代した。本明細書中に提示される方法は、他の細胞型に拡張できる。細胞は、移植に先立って骨格の中に積み込まれ得るか、移植後に骨格の中に遊走することを促進され得るかのいずれかである。

20

【0061】

コラーゲンゲル調製。ラット尾コラーゲン I 型 (BD Biosciences, San Diego, CA) を、0.1 N N a O H、10 × ハンクス平衡塩類溶液 (H B S S)、および 0.1 N 酢酸と、容積比 3 : 2 : 1 : 1 で混合した。これにより、1 mg / m l の濃度の中性 p H コラーゲン溶液を作り出された。細胞播種が望ましい場合は、3 D ネットワークに封入するため、細胞は、100 万細胞 / m l の濃度にコラーゲン溶液中に懸濁した。脱水した S P H をこの溶液に浸すことにより、細孔内に細胞およびコラーゲンの取り込みができるようにした。コラーゲンのゲル化は、37 °C で 30 分間加温することによって開始した。前もっての細胞播種が望ましくない場合、S P H を細胞なしのコラーゲン溶液中に浸した。37 °C で 30 分間加温することによって、再度ゲル化が生じた。

30

【0062】

超多孔質 P E G D A ヒドロゲル作製。20% (w / v) P E G D A 溶液 (500 μ l) を以下の試薬と混合した。：60 μ l の 10% P L U R O N I C P F - 127、30 μ l の 20% T E M E D (テトラメチルエチレンジアミン)、20 μ l のアクリル酸および 23 μ l の A P S (過硫酸アンモニウム)。最終体積は、脱イオン水の添加によって 1 m l へと調整した。溶液を、37 °C で 2 分間加熱した。次に、200 mg の重炭酸ナトリウムを溶液に混合し、それにより泡反応が引き起こされ、結果として細孔構造となった。重炭酸ナトリウムの量は 100 mg ~ 300 mg で変化させて、細孔構造の差異が作り出されるようにした。S P H s は水でリンスして、未反応の重炭酸ナトリウム結晶を取り除いた。細孔の崩壊を防ぐため、骨格はエタノール中で一晚脱水した。それから骨格はさらに食品乾燥機で 45 分間脱水した。切断片は殺菌のために 20 分間紫外光線下に置いた。

40

【0063】

超多孔質 P H E M A - P M M A ヒドロゲルコポリマー作製。多孔質 P H E M A - P M M A コポリマーを作り出すために使用したゲル溶液は、以下のものを含んだ：10% v / v

50

メタクリル酸メチル (MMA) (Aldrich M55909)、45% v/v メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル (HEMA) (Aldrich 525464)、5 mg テトラアクリル酸ペンタエリスリトール (PETA)、2 mg APS、10 μ l TEMED、6% v/v ジメチルホルムアミド、および 22% 脱イオン水。ゲルは、やわらかいチューイングガムに相当する粘度を達成するまで混合した。次に、ゲルを、型に入れた。生成物は、37 の乾式加熱で 24 時間重合化した。重合化に続いて、ゲルは、最大 1 週間まで、脱イオン水でリンスした。長期保存のために、水でリンスしたゲルは、37 の乾式加熱で 1 日乾燥させた。

【0064】

細孔形成。PHEMA スポンジ (US 5,458,819) は、多孔質 PHEMA 骨格を作り出すために開発されてきた。多孔質 PHEMA スポンジは、溶解したモノマーがポリマーになり、溶液から抽出するときの層分離に由来する。PHEMA - PMMA 構築物のために、ジメチルホルムアミド (DMF) およびテトラアクリル酸ペンタエリスリトールを、MMA および HEMA モノマーの混合物に添加した。DMF は、PHEMA - PMMA ポリマーの溶解を促進する重要な過程であることが見出された。DMF の誤った使用は、細孔の破壊をもたらした。架橋剤としてのテトラアクリル酸ペンタエリスリトールの使用は、PHEMA - PMMA が所望の機械的特性で架橋することを可能にすることにおいて独特である。重合化の間に行う攪拌は、大きな細孔形成をもたらすもう一つのキーステップであった。ゲル様溶液は、糖液に相当し、角膜の屈曲を模倣するコンタクトレンズ形の型に配置するのに十分に柔軟である粘度を発達させる。

【0065】

縫合可能なハイブリッドインプラントの創作。多孔質 PHEMA - PMMA における内部浸入性コラーゲンネットワークの形成過程は、水溶液中での PHEMA - PMMA のゆっくりとした拡張のために 36 時間までもの時間がかかり得る。初めに、ポリマー構築物を、30 分間紫外光線下で殺菌された。コラーゲングル (1 ~ 5 mg/ml) は、BD Bioscience プロトコールに従って、ラット尾コラーゲン I 型 (BD Bioscience) を使用して作られた。ヒトコラーゲンは、容易に組み込まれ、1 ~ 5 mg/ml の濃度のコラーゲンは、細胞播種および細胞接着を支持するようであった。コラーゲングル溶液を、冷却した脱水 PHEMA - PMMA に添加した。試料とアイスパックとを覆い、冷温を維持した。PHEMA - PMMA 試料は、コラーゲン吸収過程にわたって、約 2 ~ 8 の冷却を維持しておかなければならない。PHEMA - PMMA がコラーゲン溶液内で完全に拡張した後は、今や縫合可能なハイブリッドインプラントとして言及される構造は、コラーゲングルを作り出すために、細胞培養器内で 37 で 1 時間培養した。

【0066】

細孔の構築物および膨潤測定。走査型電子顕微鏡を使用して、SPH の細孔構築物の写真を撮影した。重炭酸ナトリウムの量を変化させて作製された SPH を画像化した。大容量への迅速な膨張は、この用途のために重要な特徴である。膨潤比、Q は、膨張した SPH の質量の、脱水した SPH の質量に対する比較によって決定された。さまざまな孔径の脱水化構造は、少なくとも 20 分間、水中に浸した。全ての SPH を 1000 rpm で 3 分間遠心分離して、気泡を除去した。SPH は、ふるいでろ過して過剰な水を除去し、重量測定した。この質量は、細孔中ならびにヒドロゲル構造そのもののものに蓄積した水を表す。次に、SPH を穏やかに絞り、ふき取ることにより、細孔中の水を除去したが、ヒドロゲル構造中の水は維持した。膨張した重量を当初の重量で割ることによって、2 つの膨張比、 $Q_{\text{全量水}}$ および $Q_{\text{ヒドロゲル水}}$ が得られた。

$$Q_{\text{全量水}} = \frac{\text{重量}_{\text{全量水}}}{\text{重量}_{\text{脱水水}}}$$

$$Q_{\text{ヒドロゲル水}} = \frac{\text{重量}_{\text{ヒドロゲル水}}}{\text{重量}_{\text{脱水水}}}$$

【0067】

細胞染色。コラーゲンありおよびなしの SPH 構築物を、3D 線維芽細胞骨格として使用した。細胞は前述のように積み込まれ、24 時間および 48 時間培養した。接着班キット (Chemicon, Temecula, CA) を使用して、細胞の接着と保持を可視化した。ローダミンファロイジンは微細線維を赤く染色し、DAPI は核を青く染色した。live / dead

d v i a b i l i t y キット (Molecular Probes, Eugene, OR) を使用して、死細胞 (赤) に対し、生細胞 (緑) を示した。B I O - R A D の共焦点顕微鏡を使用して、これらの構造のそれぞれを画像化した。

【0068】

細胞遊走。前もっての細胞播種が望ましくない場合、ハイブリッド骨格が骨格内への細胞遊走が好ましいかどうか決定された。コラーゲンありおよびなしの無細胞 S P H 骨格は、細胞の単層の上に配置した。骨格内への細胞遊走は、3 週間にわたって観察された。細胞は l i v e / d e a d v i a b i l i t y で染色し、共焦点顕微鏡で可視化した。

【0069】

圧縮測定。S P H 骨格の圧縮率は、圧縮試験によって決定された。水で膨張した S P H を V E L C R O で裏打ちした (ずれを防ぐために) 2 片のガラスの間に挟み、コラーゲン膨張 S P H と比較した。漸増の重量を上配置し、それぞれの S P H が耐えた負荷量を記録した。圧力対重圧曲線をプロットして、推定圧縮率を決定した。

【0070】

目の中央のヒドロゲル合成。殺菌した P B S 中に 5 % (w / v) の P E G D A を混合して、ヒドロゲル溶液を調製した。光開始剤、I G R A C U R E 2959 (CIBA, Tarrytown, NY) を、最終濃度が 0 . 0 2 5 % w / v となるよう P E G D A 溶液に添加した。細胞の生存能力は、光開始剤、U V 光曝露、および P E G D A 濃度に応じて評価した。I G R A C U R E 2959 は、哺乳動物細胞への毒性が最も少ない光開始剤であった。0 . 0 3 % (w / v) 以下の濃度が、最適と考えられた (Williams, et al. (2005) Biomaterials 26(11):1211-8)。この溶液を U V 光 (365 nm、4 mW) 下に 10 分間置くことにより、クリアな重合化したゲルが作り出された。ゲルを新鮮な P B S に浸し、未反応のモノマーおよび開始剤を取り除いた。

【0071】

例 2 : 膨張率

p H 中和後、コラーゲンは直ちにゲル化し始めるため、S P H にわたって均一な分布を促進するためには、直ちに S P H に移すことが必要であった。S P H 作製方法は、内部接続したマクロ孔を作り出したので、膨張は 1 分未満で生じた。コラーゲン溶液中に S P H を浸すことによって、天然材料が毛細管現象によって容易かつ迅速に細孔に入り込むことが可能であった。それゆえ、ここで、前もっての細胞播種が望ましい場合、取り込みの直前に細胞をコラーゲン溶液へ懸濁させ得る。膨張は、内部接続した細孔の程度と孔径によって決定された。100 mg、200 mg および 300 mg の重炭酸ナトリウムによって作られた 3 つの S P H における細孔構造の S E M 分析により、2 種の細孔が明らかとなった : それぞれの S P H における孔径および形状において類似するより大きな細孔、および内部接続経路を形成した、より小さな細孔。

【0072】

重炭酸ナトリウムの量を増やすと、内部接続した細孔の数も増える結果となることは明らかであった。このことにより、細孔構造における違いは、膨張率における違いをもたらすことが示された。膨張率、Q は、様々な孔径の S P H に対して決定した (つまり、100 mg、200 mg または 300 mg の重炭酸ナトリウムを使用して)。この分析により、より多くの重炭酸ナトリウムを使うほど $Q_{全量水}$ が増大することが示された。しかしながら、 $Q_{ヒドロゲル水}$ には、孔径の違いによる、さほどの違いはなかった。このことにより、重炭酸ナトリウムの量を変化させると細孔構造は変わるが、それぞれの S P H 中のヒドロゲルの量は同じままであることが示された。この現象は、ヒドロゲル構造自体内に分子を積みこむことが望ましいであろう用途に対し留意しなければならない。さらに $Q_{全量水}$ はおよそ 100 前後であり、S P H はその乾燥重量の約 100 倍を取り込むことができることを示している。それゆえ、細胞増殖または細胞外マトリクス産生による長期間の重量増加は、長期安定性の障壁とはならないであろう。

【0073】

S P H への迅速な取り込みは細胞障害を招かなかった。実際、細胞の積み込みの 1 日後

10

20

30

40

50

に行われた live / dead viability 染色により、MSC 細胞は生存しており、拡散していることが示されていた。カルセイン AM は、生細胞の細胞膜を横断して緑色に蛍光し、一方でエチジウムホモ二量体は死細胞に侵入するのみであり、赤色に蛍光した。最小の死細胞が検出された。これらの結果により、本方法が、外部からの力の使用を必要とせず、細胞の生存能力を落とさない、効果的かつ効率的な細胞の積み込み方法であることが実証された。

【0074】

狭い範囲内の小さな孔径は、骨格内での 3D 細胞挙動にと必須であることが示唆されている一方で、本明細書中における結果により、SPH ハイブリッド技術は 3D 細胞接着に関する孔径または形状の緻密な制御に対する必要性を除外することが示されている。本方法は、その非共有結合および骨格材料間の密接な接触の欠如により支持している SPH から細胞微小環境を分離する点において独特である。コラーゲンが存在しているにも関わらず、細胞が PEGDA と接触していると、細胞は拡散できない。それゆえ、2 材料の空間的および時間的な分離は、最適な細胞挙動に必要である。

10

【0075】

細孔構造の SEM 画像において明らかなように、形状および孔径は均一でない。しかしながら、SPH - コラーゲンゲルにおける細胞形態および細胞接着の観察により、純粋な 3D コラーゲン像と類似することが示された。この理由のため、細胞が SPH に接触していないので、SPH 細孔構造は細胞挙動における要因でない。ハイブリッドマトリクス内の細胞は、コラーゲン部分にのみ組み込まれるようである。均一な分布ならびに栄養素および老廃物の拡散を確保するように細孔が内部接続している限り、本ハイブリッド超多孔質ヒドロゲルは、他のシステムが天然 3D 細胞微小環境を作り出すための厳しい要求を必要としない。それゆえ、本発明のハイブリッドヒドロゲルは、より使いやすく、人工の構造による場合は押し付けられてしまう均一性を一般に欠如する自然生物系を、より良好に模倣している。

20

【0076】

例 3：接着染色

予め播種した骨格において、コラーゲンが 3D で線維芽細胞拡散および張線維の形成を促進することが観察された。コラーゲンのない骨格は、骨格に結合することができないかたまりの、丸い細胞団を収容した。PEGDA は本質的に、接着に抵抗性であった。それゆえ、非コラーゲン性骨格における ECM 細胞結合部位の欠如は、丸い形態の原因となると考えられた。48 時間後、コラーゲンなしの骨格は完全に非細胞性であった。結合しているものがないと、細胞は骨格外に遊走し、下方の組織培養プレートに結合する傾向にあった。

30

【0077】

対照的に、コラーゲン担持骨格は骨格内で細胞保持し、下方のプレートに結合する細胞はあったとしてもわずかであると示された。ヒドロゲル孔内のコラーゲンは、3D 様式での細胞拡散および保持を大いに促進した。微細線維の張線維がはっきりと観察されたところ、細胞接着がコラーゲン内で利用可能なインテグリン結合部位により媒介され、ひいては接着斑の形成させることが示された。角膜線維芽細胞は、コラーゲンへと結合することができる、多様な $\alpha 1$ ファミリーインテグリンを発現することが示された。コラーゲンなしの骨格において、 $\alpha 1$ - インテグリンは細胞表面周囲に均一に分布した。しかし、コラーゲン充填骨格において、 $\alpha 1$ - インテグリンは接着斑部位において切断され、凝集する。抗 $\alpha 1$ - インテグリン抗体の添加により、細胞がコラーゲンに接着および拡散することが阻害される。

40

【0078】

細孔のコラーゲン中の組み込みの際、細胞拡散および保持が促進されるのに加えて、このハイブリッド骨格はまた、開口した細孔構造およびコラーゲン結合のおかげで、周囲細胞の骨格中への遊走を促進する。コラーゲンを有するおよび有しない無細胞の SPH 骨格を、線維芽細胞の単層の上に配置した。3 週間にわたって、コラーゲンを有する骨格中へ

50

の凄まじい細胞内部成長が観察された。コラーゲンを有しない骨格は、無細胞のままであった。このことにより、細孔単独では細胞内部成長に十分ではなく、コラーゲンの組み込みにより理想的な組織工学骨格としてこの骨格を大いに強化することが実証された。良好な細胞内部成長は、宿主細胞が骨格中に遊走し、周囲組織との強い一体化を形成するようにするために、in vivo移植に必要である。これはまた、インプラントの長期生存に必要であり得る神経および血管内部成長のための導管である。

【0079】

例4：機械的測定

圧縮率を決定するための圧縮試験により、SPHが非多孔質PEGDA単独よりも顕著により圧縮性であることが示された。コラーゲンなしのSPHに対する平均圧縮率は、1 kPaであった。非多孔質PEGDAと比較する場合、SPHははるかに高い圧縮率に耐えることができることが観察された。これは、インプラントが高い圧縮力を受ける状況において重要であり得る。SPHにおいてコラーゲンを添加しても、体積弾性率に大きな影響は与えなかった。それゆえ、本ハイブリッドヒドロゲルは、はるかに柔らかいコラーゲン微小環境にさらされるのみであるため、細胞にこれらの条件を与えることなく、全般にわたって高い圧縮率を維持することができる。

【0080】

機械的測定もまた実施して、多孔質PHEMA-PMMAハイブリッド骨格の強度を試験した。水和した多孔質PHEMA-PMMA構築物を張力に関し、特注設計した試験デバイス (Test Resources, Shakopee, MN) を用いて試験した。張力において75 gの応力 (0.735 N) に対する疲労速度であるロードセルを用いて試験した。応力は較正おもりを用いて較正した (Rice Lake Weighing System, Fisher Scientific)。応力測定を観察し、販売者の100 LMソフトウェアにより報告した。0.3 ~ 0.735 N範囲において、1%未満の誤差が測定された。それぞれの試料は、0.1 Hzの歪み速度で30サイクル測定した。5%の歪みを用いて試料を慣らした。弾性率は20%歪みを用いて計算した。150%までの歪みを用いて試料を測定した。試験機の負荷出力を応力が適用された試料の断面面積で割ることにより圧力を計算した (圧力 = 応力 / 面積)。弾性率は、圧力対歪み曲線の直線部の傾きを決定することにより推定した。標準偏差を用いて、弾性率の誤差を決定した。

【0081】

ガス発泡PHEMA-PMMAと、塩ポロゲンPHEMA-PMMA、すなわちガス発泡剤としての重炭酸ナトリウムで製造されたPHEMA-PMMAとの機械的特性を比較する、PHEMA-PMMA構築物のさらなる分析を実行した。この分析の結果を、表1に示す。

【表1】

表1

特性	塩ポロゲン PHEMA-PMMA	ガス発泡 PHEMA-PMMA
弾性率 (E, kPa)	398±68	3557±536*
絶対引張強さ (UTS, kPa)	143±9	273±31*
破壊時の歪み (%)	84±15	113±29

歪み速度 = 0.2 mm/s

*T検定により統計学的に有意 ($\alpha=0.5$)。

【0082】

ガス発泡PHEMA-PMMA、塩ポロゲンPHEMA-PMMAまたはPHEMA-PMMAで構成されスカートの機械的特性の類似の分析を実行した。この分析の結果を表2および図2に示す。

【表 2】

表1

特性	塩ポロゲン PHEMA-PMMA	ガス発泡 PHEMA-PMMA	PHEMA-PMMA
E (kPa)	678±72	4081±808*	299±10
UTS (kPa)	125±25	263±66	147±7
破壊時の歪み (%)	44±3	64±9	94±4

歪み速度 = 0.2 mm/s

*ANOVAにより統計学的に有意 ($\alpha=0.5$).

10

【0083】

例 5：光学的特性

人工角膜の中心眼部はクリアで、適切な屈折率を有するべきである。人工角膜の中心コアにおける PEGDA の使用を実証するために、5%の PEGDA の定性分析および定量分析を実行した。定性分析のために、記入テキストを、被せたヒドロゲルありおよびなしで見た。中心コアの光学特性、例えば光透過および屈折率を、UV-Vis 分光光度計および屈折計をそれぞれ使用して決定した。光透過の百分率を、PBS を参照にして、200nm ~ 1000nm の範囲の波長で測定した。全ての測定は3回繰り返した。中心眼部の屈折率は、屈折計を用いて測定した。

20

【0084】

これらの分析の結果により、5%ヒドロゲルは中心眼部としての使用のための優れた光学特性を得たことを示した。例えば、被せたヒドロゲルありでまたはなしで見た記入テキストの鮮明さは、類似して観察された。UV-Vis 分光光度計を用いた定量分析により、広汎な範囲の波長にわたって高度な光透過が明らかになった。例えば、550nm における平均透明度は90%であった。加えて、屈折率はおおよそ 1.34 (~ 5brix) であったところ、天然角膜の 1.37 よりもわずかに低いのみである。

【0085】

類似の分析を PHEMA-PMMA 構築物に対し、PMMA の量を変化させて実行した。構築物の光学的透明度を決定し、結果を表3に示す。

30

【0086】

例 6：人工角膜製造

天然角膜アーキテクチャに基づき、ハイブリッドヒドロゲルマトリクスの前面を上皮細胞で被覆し、上皮の保護および栄養吸収の質を再生する宿主上皮形成を促進させる。上皮下で、ボーマン層に類似して、非多孔質 PEGDA の薄層を用いて上皮を下方の虹彩から分離した。PEGDA は細胞が結合するのを妨げ、細胞種の局在を維持する。虹彩スカート内において、コラーゲンおよび細胞は大量の水を保持できるヒドロゲル、PEGDA により囲まれ、好適な形状および水和レベルを維持する。ハイブリッド超多孔質スカートは、細孔および細胞接着部位への付着により、最大の宿主細胞一体化を許容するように設計される。中心コアはコラーゲンフリーに保たれ、光学的透明性を維持する。

40

【0087】

生分解可能な、多孔質、細胞ベースの、組織工学角膜の製造が今、達成された。かかる人工角膜の製造における第1ステップとして、SPH ディスクを線維芽細胞コラーゲン溶液に浸した。コントロールとして、SPH をまたコラーゲンなし細胞溶液中に浸した。液体中への浸漬により、SPH の迅速な膨張、およびコラーゲンおよび細胞の細孔ネットワーク内への取り込みが生じた。コラーゲン線維を次いで、熱的ゲル化した。その結果、機械的に安定なヒドロゲルにわたって分散したコラーゲン性微小環境となった。中心孔は5mmトレフィンで切り分けた。中心孔は、非多孔質で、光学的にクリアな PEGDA マクロマ溶液で満たした。非多孔質 PEGDA 溶液は直近部へと拡散し、SPH の底部表面に沿って広がり、前面の非多孔質 PEGDA の薄層に沈着した。非多孔質 PEGDA は、こ

50

の非規則的な形状へと光重合した。次いで前面はコラーゲンで修飾し、上皮細胞が結合して上面で増殖できるようにした。

【0088】

ハイブリッドヒドロゲルの表面を上皮化するために、水溶性ヘテロ二官能性架橋剤、例えば *sulfonate*-SPNPAH (PierceNet) などを使用してコラーゲン I 型を PEGDA の表面へと接着させることができる。N-ヒドロキシスクシンイミド基はコラーゲンタンパク質に接着し、一方でフェニルアジド基は光反応的に PEGDA 内へと挿入される。共有結合したコラーゲンの存在により、多光子顕微鏡を用いて第二高調波発生で画像化することができる。虹彩と比較して、表面のコラーゲンは薄層となるであろう (1/10 の濃度)。コラーゲンのこの薄層は、例えば中間径フィラメントケラチン 3 およびケラチン 12 発現により決定されるように、角膜上皮細胞の成長を支持すると期待される。この層は、十分な細胞接着に最適化されることができ、一方で、鮮明さを維持することができると考えられる。コラーゲン層の鮮明さは、UV-vis 分光光度計により評価することができる。

10

【0089】

角膜上皮培養物は、手術時に、およそ 3×2 mm のウサギ角膜輪部組織から獲得することができる。組織を 4 オーバーナイトでディスパーゼ (10 mg/ml) で処理し、基底膜を破壊させる。上皮シートを剥がし、0.25%トリプシン-EDTA で 37、5 ~ 10 分間で消化させる。細胞を洗浄し、角化細胞血清フリー培地 (KSF, Invitrogen) 中に再懸濁し、コラーゲンコート組織培養プレート上にプレートする。細胞が 80%コンフルエントに達成したときに、上皮細胞をトリプシン化し、ハイブリッド骨格上にプレートする。

20

【0090】

5つの主要な応力がコンタクトレンズに作用すると示されている (つまり、大気圧、レンズ下の涙液膜の静水圧、レンズ上の涙液膜の表面張力、レンズ重量および瞼の力 (Leonardi, et al. (2004) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45(9):3113-7)。それゆえ、人工角膜は移植後に類似の応力にさらされるであろうと想定することができる。この論理に基づき、超多孔質ハイブリッド骨格の機械的特性の評価を決定することができる。例えば、ヤング率は、原子間力顕微鏡 (AFM) およびヘルツモデルを使用して測定することができる。

30

【0091】

ヤング率は、ヘルツモデルを用いて計算される：

【数1】

$$F_{sphere} = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \delta^{3/2} \cdot \sqrt{R} = k \cdot d$$

式中、F は、圧入力を示し；R は、結合したビーズ径であり； δ は、R と過程する場合の圧入を示し；E はヤング率であり、 ν はポアソン比であり (非圧縮性サンプルに対し 0.5)；k はカンチレバーのパネ定数であり、および d はカンチレバーの偏向である。このモデルは、均質で、等張性の、半無限の弾性材料を想定する。また、表面は平坦であるべきであり、円錐状または球状のチップを用いるべきであり、圧子材料は試料よりもずっと硬質であるべきである。

40

【0092】

ヒトドナー角膜のヤング率は、1.3 MPa と報告されている (Wollensak, et al. (2003) J. Cataract. Refract. Surg. 29(9):1780-5)。人工角膜のそれぞれのコンポーネントのヤング率が測定され、5%PEGDA ゲルに関し 2 MPa であり、1 mg/mL コラーゲンゲルに関し ~ 1 kPa であることが分かった。しかし、コラーゲンの全般の機械的特性に対する貢献は、最小限であると期待される。

【0093】

50

加えて、ハイブリッド骨格の剛性率は、エラストグラフィーを用いて決定することができる。エラストグラフィーは、材料にわたって電磁波を伝播することにより機械的特性を測定する、磁気共鳴ベースの技術である (Zerbe, et al. (2006) supra)。該システムは軟性組織の機械的測定に理想的であり、A F M測定を補完する。この非破壊的3D画像化技術はまた水の拡散を測定することができ、このことにより組織構造および生存能力が直接的に示される。例えば細胞が膨張するとき、または細胞膜が破壊されるとき、物理的障壁はより少ないため、水の拡散はより急速である。

【0094】

例7：多孔質PHEMA-PMMAハイブリッド骨格への細胞遊走

多孔質PHEMA-PMMAハイブリッド骨格の細胞遊走および細胞生存能力を、商業的に利用可能な生/死細胞アッセイを使用して試験した。細胞遊走試験のために、コラーゲンありおよびコラーゲンなしの無細胞多孔質PHEMA-PMMA骨格を線維芽細胞の単層の上に配置した。予め決められた期間の培養時間後、骨格を除去し、骨格中の細胞をアッセイした。骨格中にコラーゲンネットワークが内部貫入させなかったコントロール実験において、細胞は見つけれなかった。このことにより、骨格への細胞遊走が欠如することが示された。

【0095】

対照的に、コラーゲンネットワークを骨格中に内部貫入させるとき、細胞遊走の強い証拠が即座に得られた。細胞が骨格内へと内部貫入されただけでなく、細胞はまた生存しているものと染色され、細胞を骨格内へと移入させ、コラーゲンネットワークに接着させて生存させることによる、多孔質PHEMA-PMMAハイブリッド骨格の生物活性をはっきりと実証した。骨格内に遊走した細胞はタンパク質および自体の細胞外マトリクスを構築するために必要な他の分子を分泌し、組織一体化の決定的なマーカーの役割を果たすことが期待される。

【0096】

in vivoでの細胞遊走を実証するために、PHEMA-PMMA構築物をマウスへと皮下で移植した。内部接続した細孔は脱水PHEMA-PMMAのSEM画像では容易には明らかではなかった；しかし、構造の本体への少量の細胞内部成長が、マウス皮膚下移植の8日後に観察された。このことにより、追加の細孔により、より多量の細胞内部成長がもたらされることを示す。

【0097】

例8：動物モデルにおける人工角膜の生体適合性

ウサギモデルにおけるin vivo生体適合性を用いて、人工角膜の宿主/プロテアーゼ一体化、上皮化、安定性、および透明度を評価した。コラーゲンおよび線維芽細胞とともに多孔質スカートの前播種すると、一体化の速度および程度を向上させ、インプラントの長期安定性をもたらすことが期待される。

【0098】

人工角膜を移植する前の第1のステップは、ウサギから自家角膜線維芽細胞を獲得することである。これは、角膜周囲からの小さな角膜生検によりなされる。角膜生検組織を次いで、37℃で終夜、1mg/mlのコラゲナーゼで消化する。細胞を洗浄し、次いで10% FCS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、4mM L-グルタミンおよび1% 抗生物質溶液 (Invitrogen-GIBCO) 添加DMEM中にプレートする。培養物中での10~14日の期間後、線維芽細胞をトリプシン化してコラーゲン溶液中に分散させ、人工角膜の超多孔質スカートへと組み込む。

【0099】

線維芽細胞とともに播種した、または播種しない(コントロール)のいずれかである人工角膜を、2ステージの手順でウサギ角膜へと外科的に移植する。第1のステージにおいて、人工角膜を部分厚さ置換で移植し、ウサギの下部角膜は保護フラップで維持する。具体的には、Morrisマイクロ角膜切開刃(LASIKフラップを作製するために設計された)を用いて、およそ10mm径の130μmフラップを作る。これは効果的に、角膜

10

20

30

40

50

を水平にスライスする。いま露出された角膜の下方面を 8 mmトレフィンを用いて切り出し、4 mmコアおよび 2 mmスカートで構成される角膜インプラントを切断した 10 - 0 ナイロン縫合を用いて定位置に縫合した。コントロールのウサギは同じ移植を受けたが、スカートに細胞は包埋されていなかった。下部フラップをインプラントの上部に戻して配置し、切断した非吸収 10 - 0 バイクリル縫合を用いて縫合した。

【0100】

ステージ 2 において、インプラントのクリアなゾーンを覆う下方フラップの部分が除去され、人工角膜は全厚置換として機能する。このステージ化手順の合理性は、角膜の一体性を維持する一方で、一体化が生じる時間を許容することである。具体的には、動物を、最初の移植の 2 カ月後に手術室に戻す。ウサギを一般的な麻酔下で配置し、インプラントのクリアなゾーンを覆う下方フラップの中央 4 mm を穿孔し、除去する。

10

【0101】

合併症、例えば溶解、水分流出、噴出、感染、プロテアーゼ下方膜形成、網膜剥離、または増殖性硝子体網膜症などの合併症の兆候に関し、経過観察を術後 1 週はそれぞれのウサギに対し 1 日毎に、次いで週 2 ~ 3 回行った。検査は、角膜が光学的にクリアであることを保証するスリットランプ生体顕微鏡検査、および一体化および障壁機能を評価するナトリウム蛍光染色などである。眼球内圧測定もまた行い、インプラントが房水流を阻害しているかどうかを決定する。間接検眼検査を用いて、後部を検査する。全ての動物は 6 週間の追跡をして短期結果を決定し、次いで 6 カ月までの追跡をして長期検査を決定する。

【0102】

20

人工角膜の生体一体化および生体適合性を、組織学的に 1 週、2 週、6 週、3 月、および 6 月で評価する。3 対のウサギ (1 匹は実験的に、および 1 匹はコントロール) を用いて、組織病理学に対し、それぞれのタイムポイントで用いる。眼を定常の組織学および免疫染色を施し、コア上の上皮化の程度、スカートへの線維芽細胞内部成長、およびデバイス周囲の封入形成を評価する。平滑筋アクチンに対する免疫染色を用いて、細孔性スカート中の線維芽細胞を同定する。インプラントへの線維芽細胞侵入の数および程度を、周囲から開始して中央部への連続切片を用いて、盲検化した観察者により格付けする。コラーゲン I 型、1 - インテグリンおよび局所接着複合体の発現を同様に評価する。結果を 2 群で比較する。

【0103】

30

人工角膜の一体化を、慣用の方法により機械的に評価する (Lee, et al. (2000) Arch. Ophthalmol. 118(12):1673-8)。これらの測定は、安楽死後に摘出された無傷の眼 (intact eye) で実行する。眼圧は内部で次第に増加し、宿主 - プロテアーゼが漏れ始める圧力を記録する。これらの測定を、6 週に開始し、次いで 3 月、および 6 月の各タイムポイントに対して、3 対の眼 (1 つはコントロール、1 つは実験的) で行う。

【0104】

40

全てのプロテアーゼデバイスと同様に、続発性組織壊死または噴出を伴う非一体化の可能性が存在する。細胞で予め播種した構築物は顕著に一体化を向上させるであろうと考えられる。一体化を促進する代替の方策は、スカートに持続放出性成長因子、例えば TGF- β などを組み込んで線維血管性内部成長を促進することを含む。もう 1 つの潜在的な問題は、デバイス周囲、特にコア後部での膜形成である (Hicks & Hamilton (2005) Cornea 24(6):692-8)。臨床設定において、これらの膜は典型的には YAG レーザーにより除去することができるが、表面修飾のための追加の方策もまた用いて、膜形成を阻害してもよい。

【図 1】

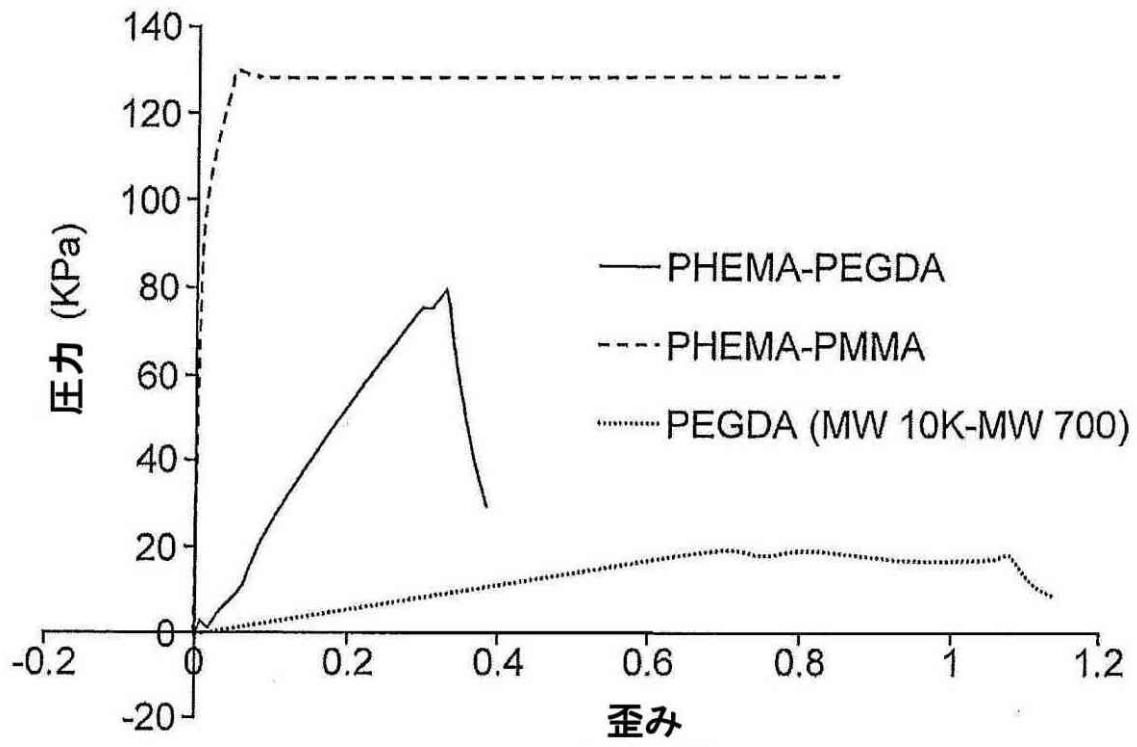


図 1

【図 2】

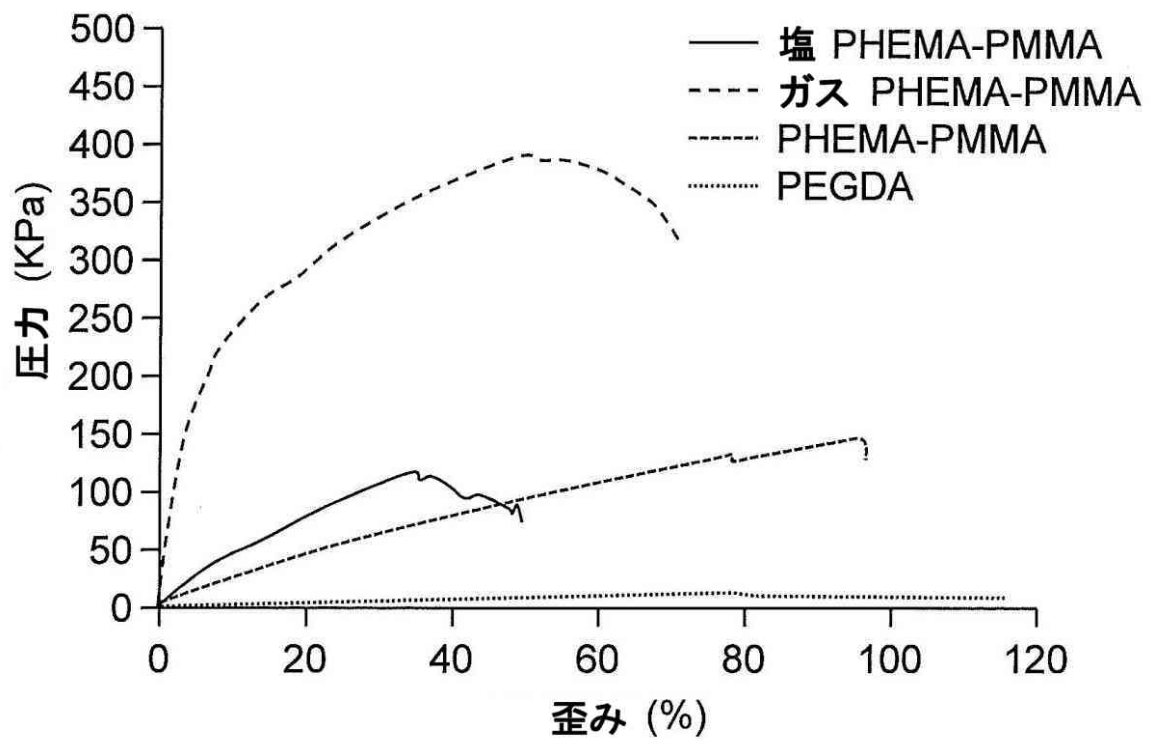


図 2

【図 3】

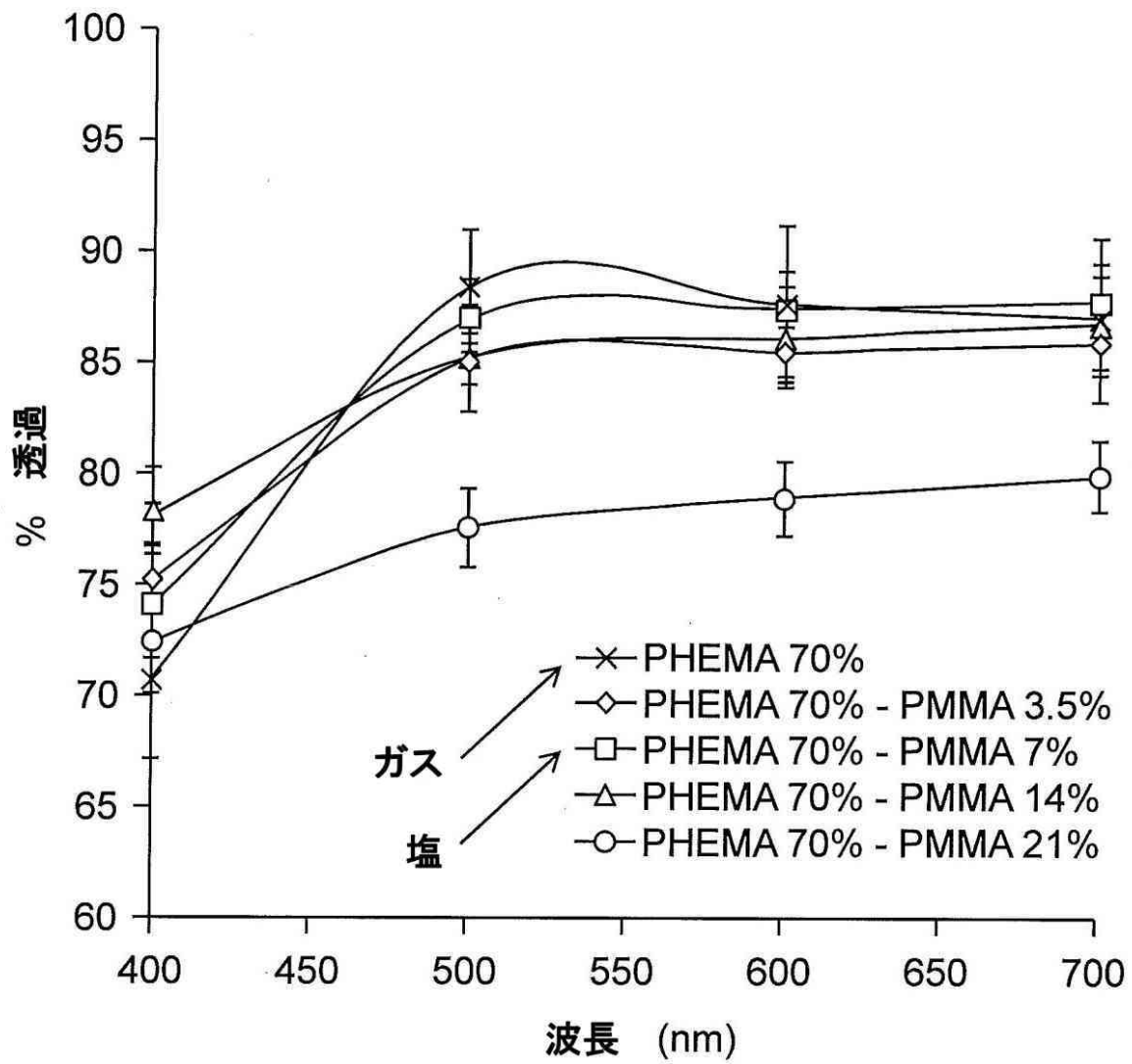




図 3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/062116
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61L 27/56(2006.01)i, A61L 27/14(2006.01)i, A61L 27/52(2006.01)i, A61F 2/14(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61L 27/56; A61F 2/14; A61K 9/00; A61F 2/16; A61F 2/00; A61K 35/12		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: superporous, hydrogel, poly(2-hydroxyethyl methacrylate), poly(methylmethacrylate)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007-0233240 A1 (FRANK et al.) 4 October 2007	2,3
Y	See claims 1,12.	1
A		4-6
Y	US 2008-0089940 A1 (OMIDIAN et al.) 17 April 2008 see paragraphs [0044]-[0045], [0047]-[0048].	1
A	US 2010-0080840 A1 (CHO et al.) 1 April 2010 See paragraphs [0010], [0018]; claims 1-2.	1-6
A	US 5300116 A (CHIRILA et al.) 5 April 1994 See column 8, lines 8-11; claims 1-8.	1-6
A	US 2006-0287721 A1 (MYUNG et al.) 21 December 2006 See abstract; claims 1, 13-14.	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 March 2013 (28.03.2013)		Date of mailing of the international search report 29 March 2013 (29.03.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer CHANG, Bong Ho Telephone No. 82-42-481-3353 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/062116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007-0233240 A1	04.10.2007	AU 2006-239919 A1	02.11.2006
		EP 1809207 A2	25.07.2007
		EP 1809207 A4	28.04.2010
		EP 1874234 A2	09.01.2008
		JP 2008-538523 A	30.10.2008
		US 2006-0083773 A1	20.04.2006
		US 2006-0287721 A1	21.12.2006
		US 2007-0126982 A1	07.06.2007
		US 2007-0179605 A1	02.08.2007
		US 2008-0269370 A1	30.10.2008
		US 2010-0174021 A1	08.07.2010
		US 2010-0280147 A1	04.11.2010
		US 2011-0166247 A1	07.07.2011
		US 7857447 B2	28.12.2010
		US 7857849 B2	28.12.2010
		US 7909867 B2	22.03.2011
		WO 2006-042272 A2	20.04.2006
		WO 2006-042272 A3	08.02.2007
		WO 2006-116137 A2	02.11.2006
		WO 2007-108842 A2	27.09.2007
		WO 2007-133266 A2	22.11.2007
		WO 2010-068295 A2	17.06.2010
US 2008-0089940 A1	17.04.2008	CA 2686927 A1	06.01.2008
		CN 101588790 A	25.11.2009
		EP 2073792 A2	01.07.2009
		JP 2009-542895 A	03.12.2009
		MX 2009000046 A	05.06.2009
		US 7988992 B2	02.08.2011
		WO 2009-029087 A2	05.03.2009
		WO 2009-029087 A3	04.06.2009
US 2010-0080840 A1	01.04.2010	None	
US 05300116 A	05.04.1994	AU 2082492 A	10.02.1994
		AU 650156 B2	09.06.1994
		US 05300116 A	05.04.1994
		US 05458819 A	17.10.1995
US 2006-0287721 A1	21.12.2006	AU 2006-239919 A1	02.11.2006
		EP 1809207 A2	25.07.2007
		EP 1874234 A2	09.01.2008
		EP 1874234 A4	04.06.2008
		JP 2008-538523 A	30.10.2008
		US 2006-0083773 A1	20.04.2006
		US 2007-0126982 A1	07.06.2007
		US 2007-0179605 A1	02.08.2007
		US 2007-0233240 A1	04.10.2007
		US 2008-0269370 A1	30.10.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/062116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2010-0174021 A1	08.07.2010
		US 2010-0280147 A1	04.11.2010
		US 2011-0166247 A1	07.07.2011
		US 7857447 B2	28.12.2010
		US 7857849 B2	28.12.2010
		US 7909867 B2	22.03.2011
		WO 2006-042272 A2	20.04.2006
		WO 2006-116137 A2	02.11.2006
		WO 2006-116137 A3	22.11.2007
		WO 2007-108842 A2	27.09.2007
		WO 2007-133266 A2	22.11.2007
		WO 2010-068295 A2	17.06.2010

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . V E L C R O

(72)発明者 ジッランダー , アメリア

アメリカ合衆国 イリノイ州 60613、シカゴ、ダブリュー . デイキン ストリート 916、アパートメント 316

Fターム(参考) 4C081 AB21 BA03 BA13 BB01 BB02 BB03 BB07 CA081 CB011 CC04

CD122 DA12 DB03 EA02 EA06