

(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2021-514820

(P2021-514820A)

(43) 公表日 令和3年6月17日(2021.6.17)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|---------------------|-------------|
| A 6 1 L 27/36 (2006.01) | A 6 1 L 27/36 1 3 0 | 4 B 0 6 5 |
| A 6 1 L 27/28 (2006.01) | A 6 1 L 27/36 4 1 0 | 4 C 0 8 1 |
| A 6 1 L 27/40 (2006.01) | A 6 1 L 27/36 3 1 1 | 4 F 2 1 3 |
| C 1 2 N 5/0775 (2010.01) | A 6 1 L 27/28 | |
| B 2 9 C 64/165 (2017.01) | A 6 1 L 27/40 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-568008 (P2020-568008)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月26日 (2019. 2. 26)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月23日 (2020. 10. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/BR2019/000008
 (87) 国際公開番号 W02019/161465
 (87) 国際公開日 令和1年8月29日 (2019. 8. 29)
 (31) 優先権主張番号 1020180037269
 (32) 優先日 平成30年2月26日 (2018. 2. 26)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 ブラジル (BR)

(71) 出願人 520326105
 ユニヴェルシダージ フェデラウ ド エ
 スピリト サント - ウエフェエエセ
 UNIVERSIDADE FEDERA
 L DO ESPIRITO SANTO
 - UFES
 ブラジル、 29075-910 エスピ
 リト サント、 ヴィトリア、 ファ
 フェルナンド フェハリー 514
 Rua Fernando Ferrar
 i, 514, 29075-910 V
 itoria - ES, BRAZIL
 (74) 代理人 110000785
 誠真 I P 特許業務法人

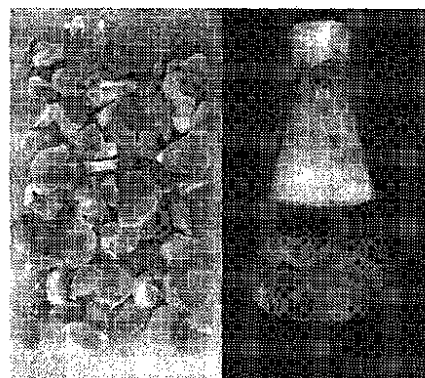
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料

(57) 【要約】

骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料は、脱細胞化された動物の骨組織から開発され、ゲル状の骨組織外マトリックスでコーティングされた生体材料であり、効率的な機械的および生物学的サポートを付与することができ、また、治療、研究、および他の生体材料の開発において骨移植片、バイオリアクタ、またはキャリアとして使用される場合、細胞株、ナノコンポジット、または薬物でさらに強化することができる。すなわち、この生体材料は、脱細胞化、凍結乾燥された、多孔性および剛性の、操作可能で、安全かつ非免疫原性の骨生体材料から排他的に開発された、骨組織に特異的な刺激物質でコーティングおよび強化された、粒子状またはブロック状で提供/使用されたものであり、したがって、バイオリアクタとして使用した場合、インビトロで成熟細胞株または前駆細胞株の発達を促進する能力があり、インビボで移植片として使用した場合、高い一体化能力や速い骨欠陥の治癒および充填速度を示す。また、この生体材料は、骨組織の有機細胞外マトリックスの完全性の維持することで、細胞の発達を促進し、

FIGURA 01



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料であって、浄化、選択、粉碎、浸漬、洗浄、乾燥、凍結乾燥、および凍結の複数の工程後、化学的および酵素的脱細胞化プロセスを行った、天然の動物またはヒトの成年、若年、新生児または胎児の骨から得られることを特徴とする、脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

【請求項 2】

特定の年齢のドナーから収集された材料を用いた脱細胞化プロセスにより得られることを特徴とする、請求項 1 に記載の脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

10

【請求項 3】

骨膜、骨内膜、成長領域、骨化の様々な領域、関節面、緻密骨、海綿骨、または骨髄管などの骨組織の特定の領域から収集された材料を用いた脱細胞化プロセスにより得られることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

【請求項 4】

組織の細胞外マトリックスを保存するために、T r i t o n、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S)、酢酸アビエタミドメチルジエチルアンモニウムなどの界面活性剤を、単独でまたは組み合わせて、異なる濃度で用いた脱細胞化プロセスにより得られることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

20

【請求項 5】

ゲル化または乾燥した脱細胞化細胞外マトリックスヒドロゲルコーティングから得られることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

【請求項 6】

粉末、様々な粒度分布の顆粒、ブロック、またはゲル形態で提供され骨移植片として使用される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

30

【請求項 7】

動物および / またはヒトの歯科治療、抜歯、根切断、3 壁性骨欠損、クレーター状骨欠損、深くて狭い半敗血症、歯根間欠損、または抽出、骨増強、もしくはインプラントの他の技術と組み合わせて使用される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

【請求項 8】

動物および / またはヒトの整形外科手術、骨増強、骨折の矯正、および / または骨格の様々な領域の骨欠陥に使用される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

40

【請求項 9】

示唆された適応症への使用に適したナノコンポジット、合成薬、および / または他の賦形剤と組み合わせられる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

【請求項 10】

間葉系幹細胞、前駆細胞、または成熟細胞の培養または系譜の開発および確立における組織工学用途のバイオリアクタまたはフレームワークとして使用される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

【請求項 11】

3 D プリンタの材料として使用される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の脱細胞

50

化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料、より具体的には、脱細胞化、凍結乾燥された、多孔性および剛性の、操作可能で、安全かつ非免疫原性の骨生体材料から排他的に開発された、骨組織に特異的な刺激物質でコーティングおよび強化された、粒子状またはブロック状で提供/使用される天然の生体材料に関する。したがって、バイオリアクタとして使用した場合、インビトロで成熟細胞株または前駆細胞株の発達を促進する能力があり、インビボで骨移植片として使用した場合、高い一体化能力や速い骨欠陥の治癒および充填速度を示す。

10

【背景技術】

【0002】

これまで、骨組織の再生では、自家骨移植（自家移植）や、死体骨（同種移植）または動物の骨（異種移植）の使用が、骨不全の治療や矯正に最良の結果をもたらす最も一般的な選択である。同種移植片および異種移植片の臨床的有効性を改善する新しい方法の探索は、組織生体工学にとって依然として課題である（SHRIVATS；MCDELMOTT；HOLLINGER，2014）。

【0003】

理想的な骨組織フレームワークを作成するための最も重要な基準の1つは、製品が、細胞移動、体液交換、延いては組織成長と血管新生に十分な大きさの高度に相互接続された多孔質ネットワークで構成されていることである。しかし、細胞の発達を促進するだけでは不十分であり、骨組織の生理学的役割は、欠陥部位に移植された生体材料が、免疫応答を起こさないことに加えて、骨の機能的圧縮刺激に関連する機械的負荷に耐えられることも必要となる（GRUSKIN et al. 2012）。

20

【0004】

除タンパクおよび/または凍結乾燥された生体材料は、天然の骨やサンゴから製造され、大規模に使用されてきた。これらは、細孔構造として元の材料の特性を引き継ぐという利点があるが、有機材料は全て段階的な熱処理（最大300）によって除去され、その後凍結乾燥されるため、組織再生のための多くの重要物質や刺激因子が失われる。このタイプの無機多孔質材料は、歯科および整形外科の用途で広く受け入れられているが、純ミネラルで骨伝導能を有するフレームワークであるものの、関連する骨誘導能を示さないため、骨再生を改善することができない。これに関して、Bio-oss（登録商標）などの脱灰された骨修復材料は、「クリーニング置換」細胞プロセスによる比較的弱い臨床効果を示し、大きな骨欠陥への適用は制限される（LEI et al. 2015）。しかしながら、米国でのみ、これらの従来骨移植製品の使用が集中する市場で、年間10億米ドル以上が取引されている（GRUSKIN et al. 2012）。

30

【0005】

現在、骨代替物として使用するために様々な生体材料が開発されており、それらは、天然由来または合成成分を含む無機および有機材料に広く分類される。ベータリン酸三カルシウム（ β -TCP）、ヒドロキシアパタイト（HA）、生物活性ガラスセラミック（Bioglass（登録商標）、BonAlive（登録商標）などの無機材料は、骨自体の無機要素と構造や組成が類似しているため、骨組織工学の目的で使用されてきた。これらの無機生体材料は、骨組織と同等以上の骨伝導能と圧縮強度を有し得る利点があるが、自然に壊れやすい構造であるため、高荷重耐性が必要な生物学的用途には常に大きな懸念が生じる（FERNANDEZ-YAGUE et al. 2015）。

40

【0006】

無機材料の代替として、天然又は科学的に合成された有機ポリマーが用いられる。これらの代替材料は、組織工学用途に適した特性を持つ。コラーゲン、ヒアルロン酸、セルロース、シルク、アルギン酸塩、キトサンなどの天然由来の生体材料は、一般に生体適合性

50

を特徴とし、構造内の細胞の接着と移動を可能にする。特にコラーゲンスポンジは、成長因子を提供し、骨の再生を促進するために使用されてきた。天然ポリマーの主な難点としては、様々あるが、処理と精製の難しさ、免疫原性に関する懸念などがある。また、生成物や材料のバッチにバラツキがある可能性があるため、臨床結果の予測性が低下する。さらに、天然由来の有機生体材料では、有機成分と無機成分の両方を含む骨組織の機械的特性を組み合わせることができない (SHRIVATS ; MCDERMOTT ; HOLLINGER, 2014)。

【0007】

組織工学を目的とした有機ポリマーの合成分野は、主にバッチのバラツキを最小限に抑えるフレームワークの重合技術に関連して大幅に発展してきた。特定のマイクロおよびマクロスケールの特徴を備えた合成生体材料が開発されている。マイクロスケールの特徴には、組成、構造、および結合基が含まれる。マクロスケールの特徴には、多孔性、剛性、および弾性が含まれる。組成に関して、骨組織再生生体材料のために広く合成されるポリマーとして、ポリ乳酸 (PLA)、ポリグリコール酸 (PGA)、PLGA、ポリカプロラクトン (PCL)、ポリエチレン (PE)、ポリエチレングリコール (PEG)、およびメチルポリメタクリレート (PMMA) が挙げられる。しかしながら、合成ポリマーは、生物学的に着想を得て非常に多用途であるものの、組織工学のモデルとしては欠陥も示す。その生物活性の欠如は、組織細胞外マトリックス (ECM) の結合ドメインを生来有する天然由来のポリマーで観察されるのとは逆に、生体材料と宿主の間のポジティブな相互作用を制限する。また、合成ポリマーの分解生成物は、一般に、再生プロセスを妨げる可能性のある PLA や PGA などの酸性副産物を含む (SHRIVATS ; MCDERMOTT ; HOLLINGER, 2014)。

【0008】

より近年では、骨再生用フレームワークの開発に基づくいくつかの研究の臨床的成功は、無機および有機生体材料の相乗的組み合わせの開発を通じた、単相の生体材料により生じる欠点の改善と関連しているようである。この意味で、ハイブリッド製品の研究においては、既に興味深い進歩がなされている。有機材料と無機材料を組み合わせることで、有望な足場材料の作成が達成され、骨欠陥領域に必要な圧縮強度を持つ骨伝導能のみを有する材料に、ある程度の骨誘導能力を付与する生体適合性モデルの作成が可能である。例えば、コラーゲンナノファイバとポリカプロラクトンマイクロファイバ (PCL) の組み合わせは、コラーゲンの接着特性や PCL の機械的抵抗を損なうことなく達成されている。バイオモールドでのキトサンとヒドロキシアパタイトの混合により、Infuse (登録商標) の製品に見られるように、細胞成長と新骨形成をサポートする機械的特性、多孔性、生物活性を備えた材料が得られ、生体材料と成長因子の組み合わせに成功している。コラーゲン、成長因子、または骨形成タンパク質 (BMP)、特に骨形成分化を促進する BMP-2 のソースで強化されたミネラル材料が既に存在する。しかしながら、BMP は、有効性は証明されているが、生物学的半減期が短く、全身性の副作用があり、損傷部位で迅速に除去されるため、その臨床応用は依然として複雑である。より最近では、骨形成を改善するだけでなく、望ましくない反応を抑制するため、治療標的から離れた BMP の拡散を最小限に抑える送達システムの研究が注目されている。製品を組み合わせた生体材料の他の例としては、コラーゲンと HA、PGA と -TCP、特に興味深いものとして PEG、PCL、コラーゲン、ナノHA の組み合わせが挙げられる (SHRIVATS ; MCDERMOTT ; HOLLINGER, 2014)。

【0009】

組織再生用生体材料を製造する主な目的の 1 つは、損傷部位で必要な生理学的機能を補助および促進することである。これには、一般に、再生細胞集団の移動および特殊化、ならびに、細胞外マトリックス成分 (ECM) と局所成長因子の隔離のための理想的なフレームワークの提供が含まれる。この多方面のサポートは、固定、定着、分化、増殖、および細胞機能に有利に働く。哺乳動物組織の細胞外マトリックスを単離し、脱細胞化し、足場として使用できることが知られており、これは、異なる組織の機能回復を促進すること

10

20

30

40

50

が既に示されている。ECMによる建設的リモデリングメカニズムには、前駆細胞の動員、細胞移動と増殖の促進、局所血管新生、および宿主組織界面と生物学的足場での好ましいM2マクロファージの発現の促進が含まれる。ECMは非相同部位でよく使用されるが、最近の研究では、生物学的マトリックスが特定の組織に由来する場合の特異性、すなわち追加機能の発生と複雑な組織形成が示されている (Sawkins et al. 2013)。他の組織と同様に、準備、処理、調達場所の違いの他に、ドナーの年齢もECMの特性とその臨床成績に大きな影響を与えることも報告されている (Benders et al. 2013; Sawkins et al. 2013; Williams et al. 2014)。

【0010】

これに関連して、脱灰骨基質 (DBM) は、従来の移植片の欠点を克服し、移植部位での組織特異性が高い骨代替物として開発された。導電性耳小骨DBMは、同種異系または異種骨のミネラル成分の酸抽出によって生成され、成長因子、非コラーゲンタンパク質、およびI型コラーゲンを含む (Sawkins et al. 2013)。パラツキはあるものの、DBMの骨誘導効果は動物実験で十分に説明されているが、ヒトでの臨床研究に関する同様の情報は不足している。脱灰プロセスの最終生成物は、一般に粘性キャリアと組み合わされるDBM粉末であり、欠陥修復において継続性や必要な物理的サポートを提供するには効果的ではなく、操作性や配合の容易化や最小限の臨床使用が意図されている。粘性担体は、一般に、ヒアルロン酸ナトリウムやカルボキシメチルセルロースなどの水溶性ポリマー、またはグリセロールなどの無水混和性溶媒であり、腎毒性作用を有し得る。DBMの有効性についてキャリアの使用を試験するよう設計された研究は限られている。これまでに知られているのは、異なるキャリアの使用、また、懸濁液中のDBMの量、骨再生を促進するのに十分な期間DBM粒子を骨欠陥部位に伝達するキャリアの能力により、骨再生活性に差が表れることである。最近の研究では、4つの市販の骨移植片代替物に対する炎症反応に関し、3つのDBM材料が合成ヒドロキシアパタイト化合物より多くの炎症を引き起こすことがわかった。しかしながら、DBM材料またはキャリアのどちらが炎症反応を引き起こしたかはわかっていない (Gruskin et al. 2012; Cheng; Solario; Alsborg, 2014)。

【0011】

より特異的な足場の開発が組織工学の臨床的成功に重要であるのと同様に、時間的、空間的、および生物学的刺激投与パラメータを有する複数の成長因子の利用可能性が、再生療法の開発にとって重要であることは明らかである。適切な用量での薬物送達および成長因子の連続送達を可能にする、より強化された生体材料の改善は、胚発生および骨折の治療中に自然発生する骨再生プロセスを再現するための鍵となり得る (Shrivats; Mc Dermott; Hollinger, 2014)。

【0012】

今日まで、組織生体工学では、骨組織再生のための有力な治療法を生み出せておらず、細胞使用を生体材料と統合した製品は存在しない (Shrivats; Mc Dermott; Hollinger, 2014)。骨再生のための新しい効果的な代替物の研究は、臨床的に影響のあるいくつかの可能性を生み出してきたが、いずれも、組織工学の治療可能性および潜在的副産物として、高度に保存された脱細胞化骨細胞外マトリックスの使用および/または細胞での強化を優先していない (Li et al. 2015)。骨再生のための次世代の生体材料は、骨欠陥を物理的にサポートするだけでなく、成長因子と細胞を化学的および生物学的に維持する必要がある (Paul et al. 2016)。

【0013】

制御された環境で操作される幹細胞、成長因子、足場の3要素を加えるバイオリアクタなどの技術の開発は、エクスピボでの組織の作成に貢献してきた。3次元培養で与えられる刺激により、細胞の分化と行動を誘導し、インピボでの移植に特化した組織を生成できる可能性がある。技術と製品品質の標準化に関しては依然として課題に面しているが、バイオリアクタ技術によって提供される利点、特に移植片の血管新生の知識がより有望な製

10

20

30

40

50

品と治療法の作成の鍵となる可能性があるため、バイオリアクタの臨床使用が進展することが期待される (BARTNIKOWSKI et al. 2014)。

【0014】

バイオリアクタ技術より先を見据えると、次世代のエクスピボ組織生成は、熱可塑性樹脂やヒドロゲル、より複雑な複合材料フレームワークを含む、天然・合成ポリマーと無機材料を組み合わせて生体材料を生成可能な、コンピュータ製造によるファブリック技術の進歩による可能性がある。これにより、配信技術の解像度によってのみ制限される、構造および組成の正確な制御が可能になる。これにより、各患者特有の幾何学的パラメータを備えた足場や組織を製造することができるようになる可能性があるが、現在の方法では達成できない事柄である。作製サイズ、また組織工学の3要素の機能的融合について、基礎研究の絶え間ない進歩が不可欠である (FERNANDEZ-YAGUE et al. 2015)。

10

【0015】

最後に、骨の成長を促進する生体材料の開発の研究では、需要にかかわらず、研究においていくらかの臨床的成功を示す注目すべき製品があったとしても、今日まで、そのどれもが、重大な欠陥治療では、自家移植片、同種移植片、または異種移植片の有効性を克服することができなかった。生体適合性を有するように開発された生体材料のいくつかは、天然の骨細胞外マトリックスの多孔質ネットワークに可能な限り近いように設計されているため、構造と機能の点で天然の骨とは比較できない (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014)。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

上述した現在使用されている技術から、次のような制限および欠点を特定することができる。

- ・自家移植のドナーのモビリティが高く利用可能性が限られる。
- ・骨バンク材料の入手可能性と品質が低い。
- ・免疫原性拒絶の可能性ならびに凍結/凍結乾燥同種移植片および異種移植片による疾患の伝播の潜在的リスクがある。
- ・従来の治療法では不十分で臨床結果が悪い可能性がある。
- ・無機生体材料の臨床効果が比較的弱く骨誘導能が低い。
- ・一部の材料の機械的圧縮および脆弱性に対するサポート能力が低い。
- ・製品の調製技術とバッチ品質の標準化の欠如。
- ・成長因子の適切な品質と可用性を保証する製品の欠如。
- ・細胞を内包可能な技術による一体製品の欠如。
- ・複数の成長因子を含む複合製品の欠如。
- ・骨組織の特定起源の製品の安全性の欠如。
- ・骨組織の特定領域から生成された製品の安全性の欠如。
- ・特定の年齢の骨組織から生成された製品の安全性の欠如。
- ・脱細胞化骨マトリックスの製品の安全性の欠如。
- ・患者、損傷、または生物学的目的ごとにカスタマイズされた製品の欠如。
- ・試験された既存のバイオリアクタモデルの効率が低い。
- ・インビトロ研究を目的とした製品の欠如。
- ・特に成長因子と組み合わせた場合、ハイブリッド製品のコストが高い。

30

40

【課題を解決するための手段】

【0017】

この意味で、上述の欠点を解決または克服するために、骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨の生体材料が開発された。これは、脱細胞化された動物の骨組織から開発され、ゲル状の骨細胞外マトリックスでコーティングされた生体材料であり、効率的な機械的および生物学的サポートを付与することができ、また、治療、研究、およ

50

び他の生体材料の開発において骨移植片、バイオリアクタ、またはキャリアとして使用される場合、細胞株、ナノコンポジット、または薬物でさらに強化することができる。本特許の製品は、他の技術とは異なり、骨組織の有機細胞外マトリックスの完全性を維持することで、細胞の発達を促進するため、その発端以来開発されたものであり、治癒時間を改善し、コストを削減し、生体材料における脱細胞化有機マトリックスの生物工学的な重要性、調査、および適用可能性を実証する基礎研究に科学的に貢献する。

【0018】

骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材について、以下の添付の図を参照する詳細な説明により理解することができる。

【図面の簡単な説明】

10

【0019】

【図1】骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材の脱細胞化プロセス中の、溶液への浸漬前（左）と浸漬後（右）の骨組織の断片の写真を示す。

【図2】骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材の脱細胞化骨マトリックスの凍結乾燥粒子（左）とヒドロゲル（右）の写真を示す。

【図3】骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材の8倍（a）、12.5倍（b）、20倍（c）の倍率での脱細胞化骨生体材の立体顕微鏡画像を示す。

【図4】骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材の50倍（A）、100倍（b）、200倍（c）、350倍（d）の倍率での脱細胞化骨生体材の走査型顕微鏡画像である。

20

【発明を実施するための形態】

【0020】

上記の図によると、脱細胞化骨細胞外マトリックスヒドロゲルで強化された脱細胞化骨生体材料は、脱細胞化、凍結乾燥された、多孔性および剛性の、操作可能で、安全かつ非免疫原性の骨生体材料から排他的に開発された、骨組織に特異的な刺激物質でコーティングおよび強化された、粒子状またはブロック状で提供/使用される、健康科学（医学、獣医学および歯科）および生物工学分野における工業生産および基礎科学によって活用され得る、天然の生体材料に相当する。これは、バイオリアクタとして使用した場合、インビトロで成熟細胞株または前駆細胞株の発達を促進する能力があり、インビボで骨移植片として使用した場合、高い一体化能力や速い骨欠陥の治癒および充填速度を示す。

30

【0021】

この生体材料のため、収集された動物の骨は、規制された起源のものまたは認められたもの（農牧食糧供給省の連邦検査サービス、MAPA/SIF、ブラジル）であり、畜殺場から収集され、研究所に送られる。収集された骨の浄化および解剖後、存在する有機細胞外マトリックスと組織の物理的、生物学的および形態機能的特徴を最大限に保存するため、骨組織の特定の領域を選択および処理する。選択された組織は、材料のサンプルDNAの量が50ng未満となるまで、24~96時間、200~500rpmで撹拌しながら、界面活性剤溶液（Triton 1~3%、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）0.1~2.5%等）に浸漬処理される。脱細胞化後、得られた固体マトリックスを緩衝液（PBS pH 7.4~7.8等）で繰り返し洗浄し、25~50の制御温度で少なくとも12~48時間オープン乾燥し、凍結乾燥し、エチレンオキシドで滅菌し、ゲルコーティング用に保存する。

40

【0022】

脱細胞化骨細胞外マトリックスゲルは、収集された同じ材料から生成される。骨組織の選択後、液体窒素で凍結された材料を、小さな断片に、または粉末になるまで粉砕する。その後、酸性溶液（0.1~2.5N、HCl等）中で、室温で24~96時間、200~500rpmで撹拌しながら脱塩を行い、蒸留水で完全に洗浄する。乾燥後、材料をクロロホルム/メタノール溶液中で、200~500rpmで撹拌しながら、室温で1~3時間脱脂し、蒸留水で十分に洗浄する。乾燥後、材料のサンプルDNAの量が50ng未満となるまで、37で12~48時間、200~500rpmで撹拌しながら、酵素溶

50

液（0.01%～0.5%トリプシンおよび0.01～0.2%EDTA等）に浸漬処理し、材料を脱細胞化する。その後、1%の抗生物質および抗真菌溶液（ストレプトマイシン/ペニシリン、ゲンタマイシン等）を、200～500rpm、4℃で12～48時間撹拌しながら添加する。

【0023】

その後、内容物は、汚染に対する培養試験が行われ、凍結乾燥され、-80℃の冷凍庫に保管される。滅菌された凍結乾燥物から、ペプシン0.5～2.5mg/mLの酸性溶液（HCl 0.01～0.1N）を用いて、室温で48時間～120時間、磁気撹拌しながら、酵素消化を行う。その後、消化マトリックスと呼ばれる材料を-80℃の冷凍庫に保管する。消化マトリックスに対し、0.05～0.5NのNaOH溶液と緩衝液（PBS pH7.4～7.8等）により4℃で中和を行う。ヒドロゲルを形成するため、材料を37℃で少なくとも1～6時間静置する。

10

【0024】

生成された脱細胞化材料である固体マトリックスとゲルを用い、脱細胞化マトリックス自体から生じるゲルに固体マトリックスを浸漬することによって生体材料が生成され、その結果、ヒドロゲルが細孔に充填され、材料全体をコーティング可能になる。その後、生体材料は、使用されるまで、-80℃の冷凍庫で凍結乾燥および保存できる。

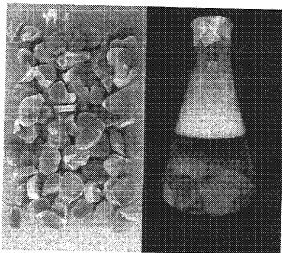
【0025】

上記の技術の説明、好ましい実施形態、および特許出願後に可能な形態を考えると、これを制限しない方法で、本発明の保護する範囲から逸れることなく、同等の建設的な変更例を施すことができる。

20

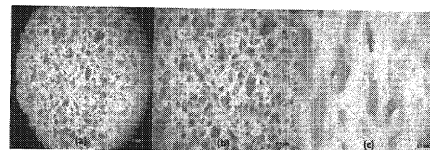
【図1】

FIGURA 01



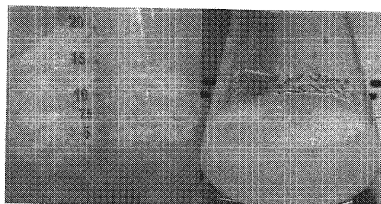
【図3】

FIGURA 03



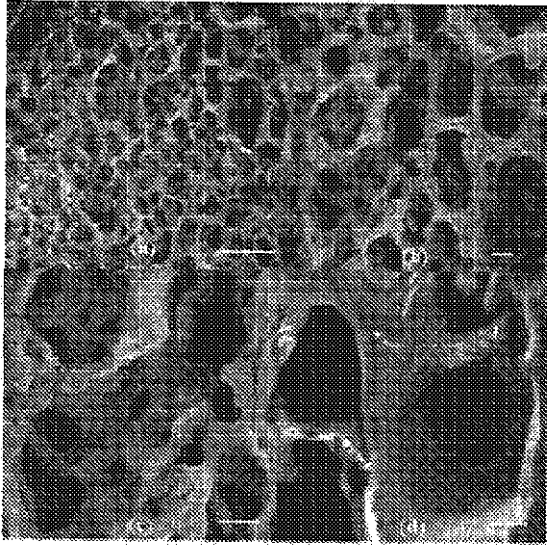
【図2】

FIGURA 02



【 図 4 】

FIGURA 04



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/000008

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61L 27/36 (2006.01), A61L 27/38 (2006.01), A61L 27/54 (2006.01), A61K 35/32 (2015.01) 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) A61L27 and A61K35 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Portal Capes , Base de Patentes do INPI-BR (SINPI) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Derwent Innovation, Google Patent, Espacenet | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | US 2017021059 A1 (INCI ILYAS [TR]) 26 January 2017 (26.01.2017) (abstract, paragraphs [0015], [0067] to [0069]) | 1 a 11 |
| Y | US 2015010510 A1 (UNIV NOTTINGHAM [GB]) 08 January 2015 (08.01.2015) The whole document | 1 a 11 |
| Y | WO 2008116096 A2 (TROXEL KAREN [US]) 25 September 2008 (25.09.2008) (Abstract, pages 6 (lines 2 to 11) and 10 (lines 20 to 25)) | 1 a 11 |
| A | MAISANI, Mathieu et al. Cellularizing hydrogel-based scaffolds to repair bone tissue: How to create a physiologically relevant micro-environment?. Journal of tissue engineering, v. 8, p. 2041731417712073, 2017. | --- |
| <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 another 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 11 June 2019 (11.06.2019) | Date of mailing of the international search report 17 June 2019 (17.06.2019) | |
| Name and mailing address of the ISA/ BR | Authorized officer | |
| Facsimile No. | Telephone No. | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.


PCT/BR2019/000008

| | | | |
|------------------|------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| US 2017021059 A1 | 2017-01-26 | US 9968707 B2 EP 3095469 A1 | 2018-05-15 2016-11-23 |
| US 2015010510 A1 | 2015-01-08 | US 9861662 B2 | 2018-01-09 |
| WO 2008116096 A2 | 2008-09-25 | WO 2008116096 A3 EP 2139536 A2 US 2015174295 A1 US 9849214 B2 | 2009-11-26 2010-01-06 2015-06-25 2017-12-26 |
| | | US 2008233203 A1 US 2018104382 A1 | 2008-09-25 2018-04-19 |

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2019/000008

| A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO A61L 27/36 (2006.01), A61L 27/38 (2006.01), A61L 27/54 (2006.01), A61K 35/32 (2015.01) | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC | | |
| B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação) | | |
| A61L27 e A61K35 | | |
| Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados | | |
| Portal Capes , Base de Patentes do INPI-BR (SINPI) | | |
| Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa) | | |
| Derwent Innovation, Google Patent, Espacenet | | |
| C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES | | |
| Categoria* | Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado | Relevante para as reivindicações Nº |
| Y | US 2017021059 A1 (INCI ILYAS [TR]) 26 janeiro 2017 (2017-01-26) (Resumo, parágrafos [0015], [0067] a [0069]) | 1 a 11 |
| Y | US 2015010510 A1 (UNIV NOTTINGHAM [GB]) 08 janeiro 2015 (2015-01-08) Todo o documento | 1 a 11 |
| Y | WO 2008116096 A2 (TROXEL KAREN [US]) 25 setembro 2008 (2008-09-25) Resumo, páginas 6 (linhas 2 a 11) e 10 (linhas 20 a 25) | 1 a 11 |
| A | MAISANI, Mathieu et al. Cellularizing hydrogel-based scaffolds to repair bone tissue: How to create a physiologically relevant micro-environment?. Journal of tissue engineering, v. 8, p. 2041731417712073, 2017. | --- |
| <input type="checkbox"/> Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C <input checked="" type="checkbox"/> Ver o anexo de famílias das patentes | | |
| * Categorias especiais dos documentos citados: "A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância. "E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional "I" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial "O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios. "P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada. "T" documento publicado depois de data de depósito internacional, ou de prioridade e que não confira como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção. "X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente. "Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto. "&" documento membro da mesma família de patentes. | | |
| Data da conclusão da pesquisa internacional | | Data do envio do relatório de pesquisa internacional: |
| 11/06/2019 | | 17/06/2019 |
| Nome e endereço postal da ISA/BR  INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Marink Velga nº 9, 8º andar cep: 20080-910, Centro - Rio de Janeiro/RJ Nº de fax: +55 21 3037-3663 | | Funcionário autorizado Maria Hercília Paim Fortes Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742 |

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
 Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional N°

PCT/BR2019/000008

| Documentos de patente citados no relatório de pesquisa | Data de publicação | Membro(s) da família de patentes | Data de publicação |
|--------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| US 2017021059 A1 | 2017-01-26 | US 9968707 B2 EP 3095469 A1 | 2018-05-15 2016-11-23 |
| US 2015010510 A1 | 2015-01-08 | US 9861662 B2 | 2018-01-09 |
| WO 2008116096 A2 | 2008-09-25 | WO 2008116096 A3 EP 2139536 A2 US 2015174295 A1 US 9849214 B2 US 2008233203 A1 US 2018104382 A1 | 2009-11-26 2010-01-06 2015-06-25 2017-12-26 2008-09-25 2018-04-19 |

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
B 3 3 Y 70/10 (2020.01) C 1 2 N 5/0775
 B 2 9 C 64/165
 B 3 3 Y 70/10

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

- (72) 発明者 シルバ バロス、ロドルフォ ホセ ダ
 ブラジル、 エスピリト サント 2 9 1 0 1 - 0 9 4 ヴィラ ヴェリャ、 プライラ ダ コ
 スタ、 エデ プライラ ダ コスタ、 レジデンシアウ クルベ、 ファ イナーシオ イジノ
 1 1 7 0、 アプト 1 6 0 2 ベー
- (72) 発明者 ノグエイラ、ブレノ ヴァレンティム
 ブラジル、 エスピリト サント 2 9 0 6 0 - 1 1 0 ヴィトリア、 ジャルダン ダ ペーニ
 ャ、 エデ リオ レノ、 ファ アメリア タルトウーチェ ナセール 5 8 4、 アプト 3
 0 3
- (72) 発明者 ソウサ、アレックス バルドゥイーノ デ
 ブラジル、 リオデジャネイロ 2 7 0 5 2 - 8 6 0 ニテロイ、 イカライ、 ファ ジェネラ
 ウ ペレイラ ダ シウヴァ 8 7、 アプト 2 2 0 4
- (72) 発明者 マランドゥバ、カルロス マグノ ダ コスタ
 ブラジル、 ミナスジェライス 3 6 0 1 5 - 3 5 0 ジュイス デ フォラ、 バイーロ サン
 タ エレナ、 ファ オレガーリオ マシエウ 7 8、 アプト 2 0 2
- (72) 発明者 ソアレス ド アマルル ダニエル ルチアナ オーロロ
 ブラジル、 ミナスジェライス 3 6 0 3 8 - 5 1 0 ジュイス デ フォラ、 ファ ダス ロー
 ザス 5 0、 アプト 2 0 4 - ブロッコ 1、 ノーヴォ オリゾンテ
- (72) 発明者 ピント デ オリヴェイラ、 ジャイロ
 ブラジル、 エスピリト サント 2 9 1 6 5 - 8 0 0 セー八、 アヴェニータ イリリ 3 9
 9、 アプト 3 0 4 ベー 2

F ターム (参考) 4B065 AA93X BC46 BD10 BD11 BD14 CA44
 4C081 AB02 AB04 AB05 AB06 CD34 DA11 DA12 DC03
 4F213 AB10 WA25 WB01 WL24

【要約の続き】

治療時間を改善し、コストを削減し、生体材料における脱細胞化有機マトリックスの生物工学的な重要性、調査、および適用可能性を実証する基礎研究に科学的に貢献する。

【選択図】 図 1