(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2006-519086
(P2006-519086A)
(43)公表日　平成18年8月24日(2006.8.24)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61L 27/00	(2006.01)	A61L 27/00	V	4C081

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 25 頁）

(21)出願番号	特願2006-508893 (P2006-508893)
(86)(22)出願日	平成16年2月27日 (2004.2.27)
(85)翻訳文提出日	平成17年10月18日 (2005.10.18)
(86)国際出願番号	PCT/US2004/005966
(87)国際公開番号	WO2004/078120
(87)国際公開日	平成16年9月16日 (2004.9.16)
(31)優先権主張番号	60/450,989
(32)優先日	平成15年2月28日 (2003.2.28)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/510,619
(32)優先日	平成15年10月10日 (2003.10.10)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人　501093088
ファイブローゲン、インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　９４０８０　カリフォルニア州、サウス　サン　フランシスコ、ゲートウェイ　ブールバード　２２５
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(72)発明者　ヒラス，パトリック，ジェイ
アメリカ合衆国　９４１２２　カリフォルニア州，サン　フランシスコ，８ティーエイチ　アベニュー　１３７８，ナンバー５
最終頁に続く

(54)【発明の名称】コラーゲン組成物および生体材料

(57)【要約】
本発明は生体材料、特にコラーゲンを含有する生体材料に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
コラーゲン1g当たり約2.3m^2よりも大きい表面積を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項２】
コラーゲン1g当たり約2.5、2.75、3.0、3.25、3.5、3.75、3.8、4.0、および4.4m^2からなる群から選択されるか、またはそれより大きい表面積を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項３】
コラーゲン1g当たり約4.0m^2以上の表面積を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項４】
コラーゲン1g当たり約3.8m^2以上の表面積を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項５】
コラーゲン1g当たり約4.4m^2以上の表面積を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項６】
約40μm未満の平均孔径を有する、ヒトコラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項７】
約35μmの平均孔径を有する、ヒトコラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項８】
約32μmの平均孔径を有する、ヒトコラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項９】
約28μmの平均孔径を有する、ヒトコラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項１０】
約10～55μmの範囲の孔径を有する、ヒトコラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項１１】
約15～60μmの範囲の孔径を有する、ヒトコラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項１２】
約1.5Nより大きい引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項１３】
膜およびシートからなる群から選択される、請求項１２に記載の生体材料。
【請求項１４】
約2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、および5.5Nからなる群から選択されるか、またはそれより大きい引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項１５】
約4.0Nの引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項１６】
約0.0088N/mm^3より大きい引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項１７】
約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、および0.13N/mm^3からなる群から選択されるか、またはそれより大きい引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項１８】
約0.1333N/mm^3以上の引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項１９】
約5.8Nの引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料膜。
【請求項２０】
約1.2Nの引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料膜。

【請求項２１】
約36.9℃より高い変性温度を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項２２】
約37℃、37.3℃、40℃、42℃、50℃、および55℃からなる群から選択される温度より高い変性温度を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項２３】
コラゲナーゼ耐性である、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項２４】
約10%より高い、約20%より高い、約30%より高い、約40%より高い、約50%より高い、約60%より高い、および約70%より高いコラゲナーゼ耐性からなる群から選択されるコラゲナーゼ耐性度を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項２５】
約80%より高い、約85%より高い、約90%より高い、約95%より高い、約96%より高い、約97%より高い、約98%より高い、約99%より高い、および約100%のコラゲナーゼ耐性からなる群から選択されるコラゲナーゼ耐性度を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料。
【請求項２６】
膜である、請求項２３に記載の生体材料。
【請求項２７】
組換えヒトコラーゲンを含んでなる生体材料を製造する方法であって、
(a)組換えヒトコラーゲンモノマーを用意すること；
(b)組換えヒトコラーゲンモノマーを含んでなる組換えヒトコラーゲン原繊維を形成すること；
(c)前記組換えヒトコラーゲン原繊維を架橋して組換えヒトコラーゲンオリゴマーを形成すること；
(d)前記組換えヒトコラーゲンオリゴマーを鋳型内で架橋すること；および
(e)前記材料を凍結乾燥させて組換えヒトコラーゲンを含んでなる生体材料を形成すること
を含む、方法。
【請求項２８】
請求項２７に記載の方法に従って製造された生体材料。
【請求項２９】
前記コラーゲンが組換えコラーゲンである、請求項１～５および１２～２６のいずれか１項に記載の生体材料。
【請求項３０】
前記コラーゲンがヒトコラーゲンである、請求項１～５および１２～２６のいずれか１項に記載の生体材料。
【請求項３１】
前記コラーゲンが組換えヒトコラーゲンである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の生体材料。
【請求項３２】
コラーゲンがI型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型、XX型、XXI型、XXII型、XXIII型、XXIV型、XXV型、XXVI型、およびXXVII型コラーゲンからなる群から選択される、請求項１～２６のいずれか１項に記載の生体材料。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、2003年2月28日に出願された米国仮出願番号60/450,989、および2003年10月10日に出願された米国仮出願番号60/510,619（各々参照によりその全開示内容を本明細書に組み入れる）の利益を主張するものである。

【０００２】
この研究の一部は、米国国立衛生研究所のRO1助成金AR45879により支援されたものである。
【０００３】
発明の分野
本発明は、コラーゲン組成物および生体材料、ならびに種々の生体医療適用におけるコラーゲン組成物および生体材料の使用に関する。
【背景技術】
【０００４】
発明の背景
種々の医療適用または医療装置に用いられる生体材料は、それらの使用および実施の一部として患者の生細胞、組織、もしくは器官、または体液と接触する。生体材料としては、金属および合金、ガラスおよびセラミックス、天然または合成高分子、バイオミメティクス、混成材、および／または天然由来もしくは工学材料が挙げられる。生体材料は、組織工学、薬物送達およびインプラントデバイスの領域での近年の進歩の中心となってきた。
【０００５】
マトリックスタンパク質であるコラーゲンは生体材料の領域で広く用いられ、埋め込まれるかまたは貼り付ける種々のマトリックス、膜、スポンジ、スキャフォールド、ステントおよびその他のデバイス中に、またはそれらそのものとして、見出される。コラーゲンの構造的および機能的特性はこれらの多様な適用に独自の適合を示す。例えば、インプラントデバイスが適切な組織再生を誘導する働きをし、細胞および組織の増殖／再増殖に適した構造支持体および表面を提供する組織工学的手法において、コラーゲンは有用である。コラーゲンの被吸着性は、インプラント材料に関連する感染およびその後の他の有害な免疫反応の可能性を最小限にする。コラーゲンは止血性があり、そのため医療用スポンジ、帯布、包帯、縫合糸などにおける使用に好適である。コラーゲンは、細胞の接着および移動のための場を提供することにより、創傷治癒、組織再生などを促進する。コラーゲンの三次元構造は周囲環境との有効な薬物および栄養素交換を可能とし、老廃物などの蓄積を防ぎ、種々の薬物送達デバイスおよびシステムにおけるその使用を可能とし、工学用途などにおける細胞／組織増殖／再増殖を促進する。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
従って、当技術分野では、コラーゲンを含み、生体材料が用いられる広範な用途において向上した性能を付与し得る生体材料が必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明は、コラーゲンを含有し、特別に定めた構造的および機能的特徴、例えば表面積、引張強さ、変性温度、細胞密度、コラゲナーゼ耐性などを有する生体材料を提供することによりこの必要性を満たすものである。
【０００８】
発明の要旨
本発明は、生体材料、特にコラーゲンを含有する生体材料に関する。特定の実施形態では、このコラーゲンがそれぞれ組換えコラーゲン、ヒトコラーゲン、または組換えヒトコラーゲンである。種々の実施形態では、このコラーゲンは、I型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型、XX型、XXI型、XXII型、XXIII型、XXIV型、XXV型、XXVI型、およびXXVII型コラーゲンからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、このコラーゲンは、１つのコラーゲン型のコラーゲンであって他のいかなるコラーゲン型も含まないものであり；他の実施形態では、このコラーゲンは2以上のコラーゲン型の特定または非特

定の混合物である。具体的には、いくつかの実施形態において、この生体材料は、スポンジ；マトリックス；膜；シート；インプラント；スキャフォールド；バリア；ステント；移植片、例えば組織移植片；封止材、例えば血管封止材、組織封止材など；角膜シールド；人工組織、例えば人工皮膚；止血材；帯布；包帯、例えば創傷帯；被覆材、例えばステント被覆材、移植片被覆材など；接着剤；縫合糸；および薬物送達デバイスからなる群から選択される生体材料であることが意図される。さらに、これらの生体材料は、限定されるものではないが、以下：組織工学、組織増大、誘導組織再生；薬物送達；回復術、再生術および美容術を含む種々の外科術；血管術；骨形成および軟骨形成術、軟骨再構築、骨補綴材；止血材；創傷処置および管理；組織の補強および支持；失禁などを含む種々の適用および手法に使用できると考えられる。

【０００９】

一態様では、本発明は、表面積が約2.3m^2/gコラーゲンよりも大きい、コラーゲンを含んでなる生体材料を提供する。他の態様では、この生体材料は約2.5、2.75、3.0、3.25、3.5、3.75、3.8、4.0、および4.4m^2/gコラーゲンまたはそれより大きい表面積からなる群から選択される表面積を有する。特定の態様では、本発明は、約4.0m^2/gコラーゲンまたはそれより大きい表面積を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料を包含する。さらなる態様では、このコラーゲンはそれぞれヒトコラーゲン、組換えコラーゲン、組換えヒトコラーゲン、およびI型コラーゲンである。好ましい一実施形態では、コラーゲンは組換えヒトI型コラーゲンである。いくつかの実施形態では、このコラーゲンはI型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型、XX型、XXI型、XXII型、XXIII型、XXIV型、XXV型、XXVI型、およびXXVII型コラーゲンからなる群から選択される。

【００１０】

約4.0m^2/gコラーゲン以上の表面積を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料が提供される。ある種の実施形態では、このコラーゲンはそれぞれ組換えコラーゲン、ヒトコラーゲン、組換えヒトコラーゲン、およびI型コラーゲンである。特定の実施形態では、このコラーゲンは組換えヒトI型コラーゲンである。

【００１１】

また、約3.8m^2/gコラーゲン以上の表面積を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料も提供される。ある種の実施形態では、このコラーゲンはそれぞれ組換えコラーゲン、ヒトコラーゲン、組換えヒトコラーゲン、およびII型コラーゲンである。特定の実施形態では、このコラーゲンは組換えヒトII型コラーゲンである。

【００１２】

また、約4.4m^2/gコラーゲン以上の表面積を有する、コラーゲンを含んでなる生体材料も提供される。ある実施形態では、このコラーゲンはそれぞれ組換えコラーゲン、ヒトコラーゲン、組換えヒトコラーゲン、およびIII型コラーゲンである。特定の実施形態では、このコラーゲンは組換えヒトIII型コラーゲンである。

【００１３】

一態様では、本発明は、約40μm未満の平均孔径を有する、ヒトコラーゲンを含んでなる生体材料を提供する。ある態様では、このヒトコラーゲンは組換えヒトコラーゲンである。いくつかの実施形態では、このコラーゲンはI型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型、XX型、XXI型、XXII型、XXIII型、XXIV型、XXV型、XXVI型、およびXXVII型コラーゲンからなる群から選択されるコラーゲンである。特に、ヒトコラーゲンを含んでなり、約35μmの平均孔径を有する生体材料が提供される。一態様では、このコラーゲンは組換えヒトコラーゲンである。さらなる態様では、このヒトコラーゲンはI型コラーゲンである。好ましい一実施形態では、このヒトコラーゲンは組換えヒトI型コラーゲンである。

【００１４】

また、ヒトコラーゲンを含んでなり、かつ約32μmの平均孔径を有する生体材料も提供

される。一態様では、このコラーゲンは組換えヒトコラーゲンである。さらなる態様では、このヒトコラーゲンはII型コラーゲンである。好ましい一実施形態では、このヒトコラーゲンは組換えヒトII型コラーゲンである。

【００１５】

さらにまた、ヒトコラーゲンを含んでなり、かつ約28μmの平均孔径を有する生体材料も提供される。一態様では、このコラーゲンは組換えヒトコラーゲンである。さらなる態様では、このヒトコラーゲンはIII型コラーゲンである。好ましい一実施形態では、このヒトコラーゲンは組換えヒトIII型コラーゲンである。

【００１６】

種々の実施形態では、本発明は、ヒトコラーゲンを含んでなり、かつ約10～55μmの範囲の孔径を有する生体材料を提供する。ある実施形態では、このヒトコラーゲンは組換えコラーゲンであり、さらなる実施形態では、このヒトコラーゲンは組換えヒトII型コラーゲンおよび組換えヒトIII型コラーゲンである。また、ヒトコラーゲンを含んでなり、かつ約15～60μmの範囲の孔径を有する生体材料も意図される。ある実施形態では、このヒトコラーゲンは組換えコラーゲンであり、さらなる実施形態では、このヒトコラーゲンは組換えヒトI型コラーゲンである。

【００１７】

一態様では、本発明は、約1.5Nより大きい引張強さを有する、組換えコラーゲンを含んでなる生体材料を包含する。いくつかの実施形態では、このコラーゲンはI型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型、XX型、XXI型、XXII型、XXIII型、XXIV型、XXV型、XXVI型、およびXXVII型コラーゲンからなる群から選択される。もう1つの態様では、この生体材料は膜またはシートである。本発明はさらに、コラーゲンを含んでなり、かつ約2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、および5.5N以上の引張強さを有する生体材料を提供する。

【００１８】

特定の実施形態では、本発明は、約4.0Nの引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料を包含する。さらなる実施形態では、このコラーゲンはそれぞれヒトコラーゲン、組換えコラーゲン、組換えヒトコラーゲン、またはIII型コラーゲンである。ある実施形態では、このコラーゲンは組換えヒトIII型コラーゲンである。

【００１９】

一態様では、本発明は、約0.1333N/mm^{3}の引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料を提供する。もう1つの態様では、本発明は、コラーゲンを含んでなり、かつ約0.0088N/mm^{3}より大きい引張強さを有する生体材料を提供する。さらなる態様では、本発明は、約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、および0.13N以上の引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料を提供する。種々の態様では、このコラーゲンはそれぞれヒトコラーゲン、組換えコラーゲン、組換えヒトコラーゲン、またはIII型コラーゲンである。特定の態様では、このコラーゲンは組換えヒトIII型コラーゲンである。

【００２０】

約5.8N以上の引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料も提供される。種々の態様では、このコラーゲンはそれぞれヒトコラーゲン、組換えコラーゲン、組換えヒトコラーゲン、またはI型コラーゲンである。特定の態様では、このコラーゲンは組換えヒトI型コラーゲンである。

【００２１】

また、約1.2N以上の引張強さを有する、コラーゲンを含んでなる生体材料も提供される。種々の態様では、このコラーゲンはそれぞれヒトコラーゲン、組換えコラーゲン、組換えヒトコラーゲン、またはI型コラーゲンである。特定の態様では、このコラーゲンは組換えヒトI型コラーゲンである。

【００２２】

一態様では、本発明は、約36.9℃より高い変性温度を有する、組換えヒトコラーゲンを含んでなる生体材料を提供する。本発明はさらに、約37℃、37.3℃、40℃、42℃、50℃、および55℃より高い変性温度を有する、組換えヒトコラーゲンを含んでなる生体材料を包含する。種々の態様では、このコラーゲンはヒトコラーゲン、組換えコラーゲン、組換えヒトコラーゲなどである。特定の態様では、このコラーゲンは組換えヒトI型コラーゲンである。

【００２３】

本発明はさらに、コラゲナーゼ耐性である、コラーゲンを含んでなる生体材料を提供する。本発明の目的では、「コラゲナーゼ耐性」である生体材料は、所定の期間コラゲナーゼに曝した後に、その生体材料中のコラーゲンの約10%を超える量が例えば消化されていないかまたは分解されずに残っている生体材料である。従って、一態様では、本発明は、コラゲナーゼ耐性である、コラーゲンを含んでなる生体材料を提供する。好ましい態様では、この生体材料は膜またはシートである。

【００２４】

種々の実施形態では、この生体材料はそれぞれヒトコラーゲン、組換えコラーゲン、または組換えヒトコラーゲンである。いくつかの実施形態では、このコラーゲンはI型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型、XX型、XXI型、XXII型、XXIII型、XXIV型、XXV型、XXVI型、およびXXVII型コラーゲンからなる群から選択される。このコラーゲンは、１つの型のコラーゲンであって他のいかなるコラーゲン型をも含まないコラーゲンであってよいし、あるいは、コラーゲン型の混合物であってもよい。

【００２５】

ある実施形態では、この生体材料は、約10%より高い、約20%より高い、約30%より高い、約40%より高い、約50%より高い、約60%より高い、または約70%より高いコラゲナーゼ耐性からなる群から選択されるコラゲナーゼ耐性度を有する。他の実施形態では、この生体材料は、約80%より高い、約85%より高い、約90%より高い、約95%より高い、約96%より高い、約97%より高い、約98%より高い、約99%より高い、または約100%のコラゲナーゼ耐性からなる群から選択されるコラゲナーゼ耐性度を有する。好ましい実施形態では、この生体材料は膜またはシートである。種々の実施形態では、このコラーゲンはヒトコラーゲン、組換えコラーゲン、または組換えヒトコラーゲンである。

【００２６】

組換えヒトコラーゲンを含んでなる生体材料を製造する方法が提供され、この方法は、(a)組換えヒトコラーゲンモノマーを用意すること；(b)組換えヒトコラーゲンモノマーを含んでなる組換えヒトコラーゲン原繊維を形成すること；(c)前記組換えヒトコラーゲン原繊維を架橋して組換えヒトコラーゲンオリゴマーを形成すること；(d)前記組換えヒトコラーゲンオリゴマーを鋳型内で架橋すること；および(e)前記材料を凍結乾燥させて組換えヒトコラーゲンを含んでなる生体材料を形成することを含む。本発明はさらに、上記の方法によって製造された生体材料も提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２７】

発明の詳細な説明

本組成物および方法を記載する前に、記載されている特定の方法論、プロトコール、細胞系、アッセイ、および試薬は異なってもよく、本発明はこれらに限定されるものではないことは理解されるべきである。また、本明細書で用いる技術用語は本発明の特定の実施形態を記載することを意図しており、付属の特許請求の範囲で示される本発明の範囲を何ら限定するものではないと理解すべきである。

【００２８】

本明細書において、また、付属の特許請求の範囲において用いる単数形「a」、「an」および「the」は本明細書においてそうではないことが明示されない限り、複数のそのものも含むことに注意しなければならない。よって、例えば、「a fragment」という場合に

は複数のそのような断片を含み、「a compound」という場合には1以上の化合物、および本明細書に記載されているような、また、当業者に公知のその等価物をさすなどである。

【００２９】

特に断りのない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語および科学用語は本発明が属する分野の当業者に共通に理解されているものと同じ意味を有する。本発明の実施および試験には本明細書に記載のものと類似または同等のいずれの方法および材料を用いてもよいが、以下、好ましい方法、デバイスおよび材料を記載する。本明細書に引用されている刊行物は全て、本明細書に関連して用い得る刊行物で報告されている方法論、試薬およびツールを記載および開示する目的で、参照によりその全開示内容を本明細書に組み入れる。本明細書では、先行発明により本発明がその開示に先行する権利が無いことを認めるものではない。

【００３０】

本発明の実施は、特に断りのない限り、当業者の範囲内で化学、生化学、分子生物学、細胞生物学、遺伝学、免疫学および薬理学の従来の方法を用いる。このような技術は文献で十分に説明されている。例えば、Gennaro, A.R.編(1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co.; Hardman, J.G., Limbird, L.E.,およびGilman, A.G.編(2001) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第10版, McGraw-Hill Co.; Colowick, S.ら編, Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir, D.M., およびBlackwell, C.C.編(1986) Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatis, T.ら編(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版,第I-III巻, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M.ら編(1999) Short Protocols in Molcular Biology, 第4版, John Wiley & Sons; Reamら編(1998) Molcular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press; Newton, C.R.,およびGraham, A.編(1997) PCR (Introduction to Biotechniques Series),第2版, Springer Verlag参照。

【００３１】

発明

本発明は、コラーゲンを含有する組成物、およびコラーゲンを含んでなる生体材料を形成する方法を提供し、このような生体材料は種々の医療適用およびデバイスにおける使用に適当である。これらの生体材料としては、例えば、コラーゲンを含有するスポンジ、マトリックス、膜、シート、止血材、包帯、抗菌包帯、スキャフォールド、バリア、ステント、組織移植片、組織および血管封止材、角膜シールド、人工皮膚、インプラント、被覆材、接着剤、縫合糸などが挙げられる。特に本発明は、独特な微細構造と特異的な構造特性を有する生体材料に関する。これらの物理的パラメーターは、例えば、増加した表面積、より大きな引張強さ、より高い変性温度、コラゲナーゼによる分解に対する耐性の劇的な増加をはじめとする、現在利用できるデバイスによって得られるものとは異なる特性を有する材料およびデバイスをもたらす。

【００３２】

一実施形態では、本発明の生体材料は大きな表面積を有する。これらの生体材料は、例えば、薬物および生物製剤の高い充填能力をもたらす。従って、本発明の生体材料およびそれらを含むデバイスは薬物および生物製剤のより良好な制御および改良された放出速度をもたらす。送達ビヒクルの表面に接着する薬物または生物製剤を、その表面に結合する細胞に付与することができる。例えば、本発明の生体材料上に沈着したDNA遺伝子構築物は、次にその生体材料に結合した細胞によって取り込まれる。表面積が大きいほど、より多量の薬物および生物製剤を生体材料に付加することができ、それに伴い、より多くの細胞がその生体材料内に含まれているより多くの薬物または生物製剤と結合し、相互作用し、それを取り込むことができる。大きな表面積はまた、生体材料内に含まれている薬物および生物製剤の、細胞外液への拡散速度の制御を強め、表面と周辺環境との接触を増加させる上でも有益である。よって、表面積を増大させるように特にデザインされた材料を製造することができれば、最適な治療効果が得られるように作製した生体材料の開発が可能

となる。

【００３３】

もう1つの実施形態では、本発明の生体材料の増大した表面積は細胞マトリックス（例えば、コラーゲン）相互作用を増加させ、その結果、細胞の増殖、移動、分化および生存を増大させる。細胞と種々のコラーゲンとの相互作用は細胞表面にある2つのクラスの受容体、すなわちインテグリン(Heino (2000) Matrix Biol 19:319-323)およびジスコイジンドメイン受容体(Vogel (2001) Eur J Derm 11:506-514)により媒介される。本発明の生体材料により提供されるようなより大きな表面積は、これらの受容体に接近できるようなコラーゲン分子の提示を可能とし、それにより細胞との相互作用を増加させ、例えば細胞の接着、増殖、分化および生存の増加をはじめとする細胞の生理および機能に対し相応の効果をもたらす。よって、ある態様では、本デバイスは、例えば創傷治癒および組織工学適用において性能の向上をもたらす。

【００３４】

一態様では、本発明は、薄いコラーゲンマトリックスシートと相互連結した孔を含む均一な微細構造を有する生体材料を提供する。この構造は生体材料に高い透過性を与えることから、生体材料内にあるかまたはそれと結合している細胞への栄養素の拡散およびそれらの細胞からの老廃物の拡散を容易にする。さらなる態様では、本発明の生体材料は、高い引張強さと向上した構造的および機械的完全性を有する。

【００３５】

本発明の生体材料はコラゲナーゼ耐性であり、例えば細菌または哺乳類コラゲナーゼ消化に対して耐性である。コラゲナーゼ耐性生体材料は、例えば組織再生増強または誘導組織再生などの様々な医療適用のための、より有効で長期安定性を有するバリアを提供する。

【００３６】

「コラゲナーゼ耐性」とは、コラゲナーゼ消化に耐える生体材料の能力をさす。コラゲナーゼ耐性の程度は種々のコラゲナーゼに曝された後に残存しているコラーゲンの量、または暴露中に分解されたコラーゲンの量として表すことができる。本願の目的では、コラゲナーゼ耐性は、試験材料を所定の期間にわたり特定のコラゲナーゼに曝すことにより測定した。コラゲナーゼ残存％および分解％を測定した。

【００３７】

本発明の生体材料は、細菌および哺乳類コラゲナーゼの双方に対する暴露を含む、適用した各試験において、著しく高レベルのコラゲナーゼ耐性を示した。供試コラゲナーゼに曝した後に、本発明の生体材料に含まれているコラーゲンの80%を超える量、場合によっては90%を超える量が残存していた。これに対し、試験した市販のウシコラーゲン膜は、その暴露期間の終了時に、その材料中に含まれているコラーゲンの約10%未満しか残っていなかったことから、コラゲナーゼ耐性は低いレベルであった。

【００３８】

本発明の目的では、「コラゲナーゼ耐性」である生体材料は、例えば、その生体材料中の約10%を超えるコラーゲンが、特定の期間コラゲナーゼに曝した後に消化されないかまたは分解されない生体材料である。従って、一態様では、本発明は、コラゲナーゼ耐性である、コラーゲンを含んでなる生体材料を提供する。好ましい態様では、この生体材料は膜またはシートである。

【００３９】

種々の実施形態では、この生体材料はそれぞれヒトコラーゲン、組換えコラーゲン、または組換えヒトコラーゲンである。いくつかの実施形態では、このコラーゲンはI型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型、XX型、XXI型、XXII型、XXIII型、XXIV型、XXV型、XXVI型、およびXXVII型コラーゲンからなる群から選択される。このコラーゲンは１つの型のコラーゲンであって、他のいかなるコラーゲン型も含まないコラーゲンであってもよいし、あるいは、コラーゲン型の混合物であってもよい。

【００４０】
好ましくは、本発明は、例えば、これらの生体材料を特定の期間コラゲナーゼに曝した後に、これらの生体材料中のコラーゲンの10%より多い量、20%より多い量、30%より多い量、40%より多い量、50%より多い量、60%より多い量、または70%より多い量が残存するようなコラゲナーゼ耐性度を有する生体材料を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、例えば、その生体材料を特定の期間コラゲナーゼに曝した後に、その生体材料に含まれていたコラーゲンの80%より多い量、85%より多い量、90%より多い量、95%より多い量、96%より多い量、97%より多い量、98%より多い量、99%より多い量、または100%量が残存するコラーゲン含有生体材料などの、コラゲナーゼ耐性度が高い生体材料を提供する。
【００４１】
生体材料のコラゲナーゼ耐性度は、所定の期間コラゲナーゼに曝した後に、消化されないかまたは分解されないコラーゲンのパーセンテージ、例えば残存しているコラーゲンのパーセンテージとして表すことができる。よって、例えば、コラゲナーゼに曝した後にその生体材料中に含まれていたコラーゲンの80%より多い量が残存する、コラーゲンを含んでなる本発明の生体材料は、コラゲナーゼ耐性80%の生体材料であり；コラゲナーゼに曝した後にその生体材料中に含まれていたコラーゲンの90%より多い量が残存する、コラーゲンを含んでなる本発明の生体材料は、コラゲナーゼ耐性90%の生体材料、などとなる。
【００４２】
コラゲナーゼ耐性、例えば細菌または哺乳類コラゲナーゼ消化に対する耐性は、当業者に周知の種々の方法によって容易に決定することができる。例えば、1つの方法では、コラーゲン組成物または生体材料の細菌コラゲナーゼに対する耐性は次のようにして決定される。コラーゲン組成物または生体材料を、消化バッファー(21mM TRIS、pH7.45中、110mM NaCl、5.4mM KCl、1.3mM $MgCl_2$、および0.5mM $ZnCl_2$)中に、コラーゲン乾重1mg当たり消化バッファー0.2mlの割合で混合する。細菌コラゲナーゼ(ヒストリチクス菌(Clostridium histolyticum)由来のIII型)をこのコラーゲン組成物または生体材料の溶液に、終濃度がコラーゲン乾重1mg当たりコラゲナーゼ50ユニットとなるように加える。この混合物を37℃で6時間インキュベートする。コラゲナーゼ消化の後、残存しているコラーゲン組成物または生体材料を遠心分離によりペレットとし、ペレットおよび上清の双方を取得する。コラーゲンペレットは、30分間70℃に加熱することで0.5ml NaOHに溶解した後、等量の0.5M HClを加えることで中和する。上清と可溶化したペレットの双方のタンパク質濃度を、BCAアッセイなどの任意の標準的なタンパク質測定アッセイを用いて測定する。上清（消化された材料を示す）と可溶化ペレット（コラゲナーゼ耐性材料を示す）の全タンパク質含量を決定し、消化されていないかまたは残存しているコラーゲンのパーセンテージおよび／または消化または分解されたコラーゲンのパーセンテージを決定する。
【００４３】
別法では、コラーゲン組成物または生体材料の哺乳類コラゲナーゼに対する耐性は次のようにして決定される。コラーゲン組成物または生体材料をバッファー溶液(pH7.0)中、哺乳類コラゲナーゼ（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ-1(MMP-1)またはマトリックスメタロプロテアーゼ-8(MMP-8)）と、コラーゲン乾重2.0～2.5mgに対して哺乳類コラゲナーゼ約0.5μgの割合で混合する。この混合物を37℃で1、3および6日間インキュベートする。各時点で、消化混合物の測定画分を遠心分離し、得られた上清のタンパク質濃度をBCAアッセイなどの任意の標準的なタンパク質測定アッセイを用いて測定する。上清のタンパク質含量は消化された材料を示しており、消化されていないかまたは残存しているコラーゲンのパーセンテージ、および／または消化もしくは分解されたコラーゲンのパーセンテージが決定される。
【００４４】
他の態様では、本発明の生体材料は種々の生体医療用途のための純粋、均質、かつ、一貫した材料を提供する。この材料は1つの特定のコラーゲン型を含んでもよいし、あるいは、特定のコラーゲン型の混合物を含んでもよい。組換えヒトコラーゲン生体材料、例えば、膜、マトリックスなどは、独特の、所定の組成と構造を有する。一態様では、本デバ

イスは、例えば、三次元プリンティングならびにミクロおよびナノパターニングを含む用途に使用できる。

【００４５】

本発明の生体材料は、例えばスポンジ；マトリックス；膜；シート；インプラント；スキャフォールド；バリア；ステント；移植片、例えば組織移植片；封止材、例えば血管封止材、組織封止材など；角膜シールド；人工組織、例えば人工皮膚；止血材；帯布；包帯、例えば創傷帯；被覆材、例えばステント被覆材、移植片被覆材など；接着剤；縫合糸；および薬物送達デバイスをはじめとする、この分野で標準的かつ広く用いられているいずれの形態の生体材料も含み得ると考えられる。さらに、本生体材料は、限定されるものではないが、以下：組織工学、組織増大、誘導組織再生；薬物送達；回復術、再生術および美容術をはじめとする種々の外科術；血管術；骨形成および軟骨形成術、軟骨再構築、骨補綴材；止血剤；創傷処置および管理；組織の補強および支持；失禁などを含む種々の適用および手法のいずれにも使用できることが意図される。

【００４６】

進行した歯周病症例のための外科術である誘導組織再生（Guided tissue regeneration）は、歯肉線の下にある欠損を治療する。GTR法の際、歯根から歯垢を除去し、欠損部にバリア膜を入れ、空隙を組織浸潤から保護し、骨と靱帯に再生に十分な時間を与える。

【００４７】

歯科におけるGTR用のコラーゲン膜の性能は、上皮細胞増殖を妨げる膜の能力および細菌コラゲナーゼ消化に対する膜の耐性に依存する。本発明の膜生体材料は歯科でGTRに現在用いられている市販の動物コラーゲンBIOMEND吸着性コラーゲン膜より孔が少なく、細胞の内部増殖を防ぐのにより有効であり得る。本発明の膜生体材料は細菌コラゲナーゼ消化に耐性である。口腔環境では、細菌コラゲナーゼはコラーゲンインプラントの分解に関与する可能性がある。細菌コラゲナーゼに対する耐性は膜生体材料の有用性にとっての重要な性能パラメーターである。コラゲナーゼ耐性膜生体材料は、より優れた再生結果のためにより長期にわたって有効なバリアを提供する。本発明の膜生体材料は、例えば、硬膜閉合材、創傷包帯、脆弱組織の補強および支持体などの他の種々の医療用途においても有用である。

【実施例】

【００４８】

本発明は単に本発明の例示を意図する以下の実施例を参照することでさらに理解される。これらの実施例は特許請求する本発明を単に説明するために示すものである。本発明は、例示の実施形態により範囲を限定されるものではなく、その実施形態は本発明の一態様を示すに過ぎない。機能的に同等な方法はいずれも本発明の範囲内にある。当業者ならば、本明細書に記載されているものの他、本発明の種々の改変が以上の記載および添付の図面から明らかであろう。このような改変は付属の特許請求の範囲内に入るものとする。

【００４９】

実施例１：組換えヒトコラーゲン原繊維の製造

組換えヒトコラーゲンは、例えば、米国特許第5,593,859号（参照によりその全開示内容を本明細書に組み入れる）に記載のようにして得る。本明細書では例として組換えヒトI型、II型およびIII型コラーゲンが挙げられているが、本明細書では全ての種類のコラーゲンの使用を明確に意図している。一般に、記載されている組換えヒトコラーゲン組成物および生体材料が、組換えヒトコラーゲンモノマーからのオリゴマーの製造および鋳型内原繊維形成／架橋法とその後の凍結乾燥に関連する。

【００５０】

組換えヒトI型、II型、またはIII型コラーゲン原繊維は次のように製造した。原繊維形成バッファー(0.2M Na_2HPO_4、pH11.2)を組換えヒトI型、II型、またはIII型コラーゲンの0.3%(10mM HCl中、3mg/ml)の溶液に、1:10(v/v)比で加えた。この溶液を室温で4℃～一晩インキュベートした。原繊維形成後、次に、組換えヒトコラーゲン原繊維を10℃、15,000 x gで30分間の遠心分離により回収した。

【００５１】

実施例２：組換えヒトコラーゲンオリゴマーの製造

組換えヒトコラーゲンオリゴマーを組換えヒトコラーゲン原繊維から製造した。また、本明細書では、組換えヒトコラーゲンモノマーからの組換えヒトコラーゲンオリゴマーの製造も意図される。組換えヒトコラーゲン原繊維を上記実施例1に記載のようにして製造した。使用直前に水で調製したEDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)の20%溶液(w/v)を、組換えヒトコラーゲン原繊維の溶液に、終濃度0.15%EDC（組換えヒトI型およびIII型コラーゲン原繊維の場合）または0.075%EDC（組換えヒトII型コラーゲン原繊維の場合）になるように加えた。これらの溶液を十分混合し、室温で16時間インキュベートした。

【００５２】

得られた架橋組換えヒトコラーゲン原繊維（すなわち、組換えヒトコラーゲンオリゴマー）を次に、ベックマンJ2-21m遠心機にてベックマンJA-14ローター中、10,000rpm（およそ9,000 x g）、20℃で30分間遠心分離した。上清をエルレンマイヤーフラスコ中へデカントすることにより注意深く除去した。このペレットを、水に再懸濁して元の体積とし、その後激しく攪拌することにより、洗浄した。上記のようにこの溶液を遠心分離し、得られた上清を除去した。このペレットを、組換えヒトコラーゲン終濃度が30mg/mlとなるように、水または10mM HClに再懸濁させた。この組換えヒトコラーゲンオリゴマー水懸濁液を、このコラーゲン／水再懸濁液に1/10容量の100mM HClを加えることにより再溶解した。得られた組換えヒトコラーゲンオリゴマーを4～20%ポリアクリルアミド勾配ゲル上でSDS-PAGEにより評価したところ、組換えヒトコラーゲンのより高い分子量のオリゴマーが製造されたことが示された。組換えヒトI型、II型、および型コラーゲンモノマーから、それぞれ組換えヒトI型、II型、およびIII型コラーゲンオリゴマーが首尾よく形成された（データは示していない）。

【００５３】

実施例３：組換えヒトI型コラーゲンモノマーおよびオリゴマーのロータリーシャドーイング電子顕微鏡法

組換えヒトコラーゲンオリゴマーの形成をさらにロータリーシャドーイング電子顕微鏡法により確認した。上記実施例2に記載のように製造した組換えヒトI型コラーゲンオリゴマーを4℃で16時間、0.05%酢酸中50%のグリセロール溶液に対して透析した。透析後、新しく切断した雲母基板上にエアブラシを用いてサンプルを噴霧した。この雲母上の液滴を、バキュームコーター(Edwards 306)中、室温にて、10^{-6}mmHgで12時間、乾燥させた。乾燥させたサンプルに、雲母表面に対して6°に配置した電子銃を用いて白金でロータリーシャドーイングを行った後、雲母表面に対して90°に配置した電子銃により形成される炭素フィルムでコーティングした。これらのレプリカを蒸留水に浮かべ、フォルムバール（formvar）コーティンググリッド上に回収した。次に、これらのレプリカをZeiss 109透過型電子顕微鏡で観察した。

【００５４】

ロータリーシャドーイング電子顕微鏡分析は、組換えヒトI型コラーゲンモノマーがロッド型の構造の原繊維コラーゲン形態を呈することを示した。組換えヒトI型コラーゲン分子の、より高次のオリゴマーへの会合がはっきりと可視化された。組換えヒトII型およびIII型コラーゲンから製造したオリゴマーでも同様の結果が見られた（データは示していない）。

【００５５】

実施例４：組換えヒトI型、II型、およびIII型コラーゲンマトリックスの製造

組換えヒトコラーゲンIII型マトリックスを次のように製造した。上記実施例2に記載のように製造した組換えヒトIII型コラーゲンオリゴマーを、終濃度10mM HClとなるようにHClを加えることで再び可溶化した。組換えヒトIII型コラーゲン原繊維を、原繊維形成バッファーを1:10比(v/v)で加えて再構成した後、終濃度0.25%EDCとなるようにEDCで架橋した。この溶液をステンレス鋼鋳型内で6時間インキュベートした後、Virtis Genesis 25EL

凍結乾燥機を用いて凍結乾燥した。

【００５６】

組換えヒトI型コラーゲンマトリックスを次のように製造した。上記実施例2に記載のように製造した組換えヒトI型コラーゲンオリゴマーを、1/10容量の0.2M NaH_2PO_4、pH7.3および1/10容量の水と混合した。この溶液に新しく調製した10%EDC水溶液を加え、最終コラーゲン濃度20mg/mlおよび0.25%EDCとした。この溶液をよく混合し、ステンレス鋼鋳型に移し（深さ3mm）、室温で6時間インキュベートした。鋳型内組換えI型コラーゲンマトリックスを-30℃で凍結乾燥した。

【００５７】

組換えヒトII型コラーゲンマトリックスを、組換えヒトI型コラーゲンおよび組換えヒトIII型コラーゲンマトリックスに関する上記プロトコールに従って、以下のような種々の改変を行いながら、製造した。要するに、組換えヒトII型コラーゲンの溶液を0.22mmのPESバキュームフィルターを用いて濾過した。その体積を重量から算出し、10mM HClを用いてコラーゲン濃度を3.0mg/mlに調整した。原繊維形成バッファーを1:10(v/v)比で加えた。このコラーゲン溶液のpHを測定し、必要に応じて0.5N NaOHでpH7.2に調整した。室温で6時間、原繊維の形成を進行させた後、架橋剤1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を終濃度0.075%となるように加えた（組換えヒトI型コラーゲンおよび組換えヒトIII型コラーゲンマトリックスの製造に関しては0.15%EDCを用いたことに注意）。このコラーゲン／架橋剤混合物を室温で一晩インキュベートした。

【００５８】

組換えヒトII型コラーゲン原繊維を、ベックマンJLA-16ローターを用い、4℃、15,000rpmで60分間の遠心分離によりペレットとした。上清を除去し、ペレットを元の反応量と同量の水で洗浄した。この組換えヒトII型コラーゲン原繊維を再び遠心分離によりペレットとした。上清を取り出し、BCAによるタンパク質濃度の測定のために保存した。ペレット濃度は約30mg/mlであった。架橋組換えヒトII型コラーゲン原繊維を10mM HClに溶解し、上記のような鋳型内原繊維形成／架橋法に従ってマトリックスに配合した。

【００５９】

実施例５：組織学的染色による組換えヒトI型コラーゲンマトリックスの微細構造

組換えヒトI型コラーゲンマトリックスの微細構造を、コンゴーレッドで染色した組織切片を偏光下で顕微鏡観察することにより、市販のウシコラーゲンスポンジであるINSTATコラーゲン吸着性止血材(Ethicon, Inc., Somerville, New Jersey)の場合と比較した。（例えば、Sweatら(1964) Arch Pathol 78:69-72参照。）上記実施例4で記載したように製造および凍結乾燥した3mm x 3mm組換えヒトコラーゲンI型マトリックスを蒸留水中で15～30分間にわたり再水和した。次に、この組換えI型ヒトコラーゲンマトリックスを、各15分間、ゆっくり攪拌しながら、一連の暫増量のアルコール濃度（70%、80%、95%、100%）中でマトリックスを連続的にインキュベートすることにより脱水した。その後、この組換えヒトI型コラーゲンマトリックスをキシレン中でゆっくり攪拌しながら15分間洗浄した。この組換えヒトI型コラーゲンマトリックスをパラフィン中に包埋し、5μmの厚さの切片とし、コンゴーレッドで染色し、偏光を用いて顕微鏡下で観察した。

【００６０】

結果は、組換えヒトI型コラーゲンオリゴマーから形成されたマトリックスは、INSTATコラーゲン吸着性止血材に比べてより完全で均一な孔腔ネットワークを持っていることを示した。組換えヒトII型およびIII型コラーゲンマトリックスでも同様の微細構造が観察された（データは示されていない）。

【００６１】

実施例６：組換えヒトI型コラーゲンマトリックスの走査電子顕微鏡分析

組換えヒトI型コラーゲンマトリックスを走査電子顕微鏡(SEM)分析を用いて観察した（例えば、Yangら(1994) Matrix Biology 14:643-651; Areidaら(2001) J Biol Chem 276:1594-1601参照）。組換えヒトI型コラーゲンマトリックスを液体窒素中で1分間凍結させた後、低却剃刀で切断した。得られた組換えヒトI型コラーゲンマトリックス断片を、両側

導電性タブを備えた標準的なSEMアルミニウムスタブ(12mm OD)にマウントした。次に、サンプルを入れたこのスタブを厚さ40nmの金でスパッタ・コーティングした（Biorad Palaron Division製のコーターE5000M, S.E.M.をこれらの作製に用いた。）。調製したスタブをPersonal SEM (ASPEX Instruments, Inc.)を用いて特性決定した。目的構造を、100倍～1000倍の倍率で写真撮影した。

【００６２】

SEM分析は、INSTATコラーゲン吸着性止血材（図1B）と比べた場合の、組換えヒトI型コラーゲンマトリックス（図1A）の異なる構造的特徴を示した。この組換えヒトI型コラーゲンマトリックスは、組換えヒトコラーゲン繊維と原繊維とから構成される薄いシートによって相互連結した孔微細構造を有していた。INSTATコラーゲン吸着性止血材は、遙かに厚く十分均一でないシートおよび繊維を示した。組換えヒトII型コラーゲンおよび組換えヒトIII型コラーゲンマトリックスは、組換えヒトI型コラーゲンマトリックスと同様の形態を示した（データは示していない）。

【００６３】

実施例７：組換えヒトI型、II型、およびIII型コラーゲンマトリックスの表面積および孔径

組換えヒトコラーゲンマトリックス調製物を、水銀細孔分布測定(porisometry)を用いて表面積および孔径を測定することにより特性決定した。水銀細孔分布測定試験は、Pore Master33水銀細孔分布測定装置を用い、QuantaChrome Instument (Boynton Beach, FL)により行った。要するに、20℃、接触角140°、圧入圧力範囲0.806psi～49.825psiを用いて水銀の圧入を行った。低圧水銀圧入法を、各スポンジにつき2サンプルに対して行った。水銀の押出は49.381psi～0.822psiの範囲で行った。水銀の圧入と押出を時間の関数としてモノタリングし、そのデータを用い、Washburnの式を用いて孔径を求めた。各組換えヒトコラーゲンマトリックスのサンプル重はおよそ23mgであり、INSTATコラーゲン吸着性止血材はおよそ15mgであった。

【００６４】

組換えヒトI型コラーゲン、組換えヒトII型コラーゲン、組換えヒトIII型コラーゲン、およびINSTATコラーゲン吸着性止血材を用いて製造したマトリックスについて表面積を求め、その結果を下の表１に示す。

【表１】

表1

サンプル	表面積 (m^2/g)	INSTATに対する増分%
組換えヒトI型コラーゲンマトリックス	4.0	74%
組換えヒトII型コラーゲンマトリックス	3.8	65%
組換えヒトIII型コラーゲンマトリックス	4.4	91%
INSTAT	2.3	N/A

【００６５】

上記の表１に示されるように、組換えヒトI型コラーゲンマトリックス、組換えヒトII型コラーゲンマトリックス、および組換えヒトIII型コラーゲンマトリックスはINSTATコラーゲン吸着性止血材よりも大きな表面積を示した。組換えヒトコラーゲンを用いて製造したマトリックスの総表面積は$3.8m^2/g$以上であったが、INSTATコラーゲン吸着性止血材の総表面積は$2.3m^2/g$であった。

【００６６】

組換えヒトI型コラーゲン、組換えヒトII型コラーゲン、組換えヒトIII型コラーゲン、およびINSTATコラーゲン吸着性止血材を用いて製造したマトリックスの孔径を求め、結果を下の表２に示す。

【表２】

表２

サンプル	孔径 (μm)
組換えヒトI型コラーゲンマトリックス	35
組換えヒトII型コラーゲンマトリックス	32
組換えヒトIII型コラーゲンマトリックス	28
INSTAT	40

【００６７】

上記の表２に示されるように、組換えヒトI型コラーゲンマトリックス、組換えヒトII型コラーゲンマトリックス、および組換えヒトIII型コラーゲンマトリックスはINSTATコラーゲン吸着性止血材よりも小さな孔径を有していた。組換えヒトコラーゲンを用いて製造したマトリックスの孔径は35μm以下であったが、INSTATコラーゲン吸着性止血材の孔径は40μmであった。

【００６８】

組換えヒトIII型コラーゲンマトリックスで測定された孔径の範囲はおよそ10～55μmであり、INSTATコラーゲン吸着性止血材で測定された孔径範囲（およそ25～90μm）よりも小さかった。組換えヒトIII型コラーゲンマトリックスの孔径の最大集団はおよそ28μmであったが、INSTATコラーゲン吸着性止血材ではおよそ40μmであった。組換えヒトI型コラーゲンマトリックスおよび組換えヒトII型コラーゲンマトリックスで測定された孔径の範囲はそれぞれ、15～60μmおよび10～55μmであった。

【００６９】

実施例８：組換えヒトコラーゲンマトリックスの引張強さおよび変性温度

組換えヒトコラーゲンマトリックス調製物の引張強さおよび変性温度を測定した。引張強さはテクスチャーアナライザーを用いて間接的に測定した。組換えヒトIII型コラーゲンおよびINSTATコラーゲン吸着性止血材の引張強さ（ニュートン(N)）を下の表３に示す。

【表３】

表３

サンプル	引張強さ (N)	引張強さ (N/mm^3)
組換えヒトIII型コラーゲンマトリックス	4.0+/-0.2	0.1333
INSTAT	1.5+/-0.5	0.0088

【００７０】

上記の表３に示されるように、組換えヒトIII型コラーゲンマトリックスはINSTATコラーゲン吸着性止血材(1.5+/-0.5N)よりも高い引張強さ(4.0+/-0.2N)を持っていた。各マトリックスの引張強さを面積(mm^3)に対して標準化し、その結果を上記表３に示す。データ

からは、組換えヒトコラーゲンマトリックスの引張強さは0.1333N/mm^3であったが、INSTATコラーゲン吸着性止血材の引張強さは0.0088N/mm^3であったことが示された。

【００７１】

組換えヒトI型コラーゲン膜（下記実施例１０に記載のように製造したもの）の引張強さを、テクスチャーアナライザーを用いて間接的に測定した。組換えヒトI型コラーゲン膜は、使用の前にまずホルムアルデヒド蒸気（37%ホルムアルデヒド溶液、真空下、室温で60分）で架橋した。組換えヒトI型コラーゲン膜を5mm x 20mm片に切断し、乾燥させるかまたは30分間水で湿らせ、バイクリル(vicryl)6.0縫合糸に取り付け、引張強さを試験した。結果を下に表４に示す。

【表４】

表４

サンプル	引張強さ (N)
組換えヒトI型コラーゲン膜(乾燥)	5.8+/-0.4
組換えヒトI型コラーゲン膜(湿潤)	1.2+/-0.2

【００７２】

上記の表４に示されるように、乾燥組換えヒトI型コラーゲン膜の引張強さは5.8+/-0.4Nであったが、湿潤組換えヒトI型コラーゲン膜の引張強さは1.2+/-0.2Nであった。また、組換えヒトI型コラーゲン膜の湿潤伸張率（厚さ）も測定した。結果は湿潤膜が50～60%伸張したことを示した（データは示されていない）。

【００７３】

組換えヒトI型コラーゲンマトリックスおよび組換えヒトII型コラーゲンマトリックスの変性温度(T_d)を測定した。組換えヒトII型コラーゲンマトリックスの変性温度は乾燥状態または溶液(PBS 30μl)中で測定した。乾燥窒素環境中、1分間に5℃の昇温率で25℃～90℃まで各サンプルを加温することで変性温度を測定した。これらの実施形態の結果を下の表５に示す。

【表５】

表５

サンプル	変性温度(T_d) (℃)
組換えヒトI型コラーゲンマトリックス（乾燥）	58.1
組換えヒトII型コラーゲンマトリックス（湿潤）（サンプル1)	56.6
組換えヒトII型コラーゲンマトリックス（湿潤）（サンプル2)	58.9
組換えヒトIII型コラーゲンマトリックス	56.9+/-0.1
INSTAT（乾燥）	36.9+/-0.4
INSTAT（湿潤）	40.2

【００７４】

これらの結果は、本発明の組換えヒトコラーゲンマトリックスおよび生体材料が、INSTATコラーゲン吸着性止血材よりも高い変性温度を持っていることを示した。

【００７５】

実施例９：組換えヒトI型コラーゲンマトリックスの細胞接着アッセイ

以下に記載するような組換えヒトI型コラーゲンマトリックスに対する細胞接着を評価するための実験を行った。本発明の組換えヒトI型コラーゲンマトリックスを半分に切断した。この組換えヒトI型コラーゲンマトリックスを無血清培地(4.5mg/mlグルコースを含むDMEM)に浸漬し、37℃で1時間かけて平衡化し、媒体を一度交換した。この組換えヒトI型コラーゲンマトリックスを、3mmバイオプシーパンチャーを用いて切り取り、無菌濾紙で軽くたたいて水を切った。それらの手順の間、組換えヒトI型コラーゲンマトリックスが乾燥してしまわないようにした。アッセイに用いるヒト包皮繊維芽細胞をトリプシン処理し、カウントし、無血清培地で二度洗浄し、$5x10^6$/mlまたは$2.5x10^6$/mlの終濃度となるように希釈した。この半乾燥組換えヒトI型コラーゲンマトリックスを3mm無菌ペトリ皿に入れ、組換えヒトI型コラーゲンマトリックスの同じ端から細胞を加えた。細胞を37℃で2時間、接着させた。

【００７６】

無血清培地に既知量の細胞を含む別の組織培養プレートを調製し、37℃でインキュベートした。3mmプレートに4mlの無血清培地を加え、プレートをインキュベートし、円を描くようにゆっくり混合し、組換えヒトI型コラーゲンマトリックスから非接着細胞を洗い流した。培地を吸引することにより、非接着細胞および死細胞を除去した。各組換えヒトI型コラーゲンマトリックスを、ピペットチップを用いて新しい組織培養プレートに穏やかに移した（1ウェル当たり1マトリックス）。各ウェルに200μlの無血清培地と20μlのWSTを加えた。これらのプレートを30分、1時間、および2時間インキュベートした。

【００７７】

これらのプレートを穏やかに軽くたたき、各組織培養ウェルから110μlのアリコートを新しい組織培養プレートに加えた。450nmで吸光度を読みとった。吸光度を測定した後、110μlアリコートを元のプレートに戻し、他の時点までさらにインキュベートした。

【００７８】

組換えヒトI型コラーゲンマトリックスはヒト包皮繊維芽細胞の接着を支持するための三次元スキャフォールドとして試験した。この組換えヒトコラーゲンマトリックスに、以下の群で播種した：低密度（$5x10^4$細胞／マトリックスを含有）；中密度（$1x10^5$細胞／マトリックスを含有）；および高密度（$2x10^5$細胞／マトリックスを含有）。その結果は、組換えヒトI型コラーゲンマトリックスが、試験した最大細胞密度($2x10^5$細胞／マトリックス)でさえ、細胞で飽和していなかったことを示した。

【００７９】

実施例１０：組換えヒトI型コラーゲン膜の形成

組換えヒトI型コラーゲン膜は次のようにして調製した。JA14遠心ボトル中、血清用ピペットを用いて、原繊維形成バッファー(0.2M NaH_2PO_4, pH11.2)と組換えヒトI型コラーゲンを1:10の比率で10mM HClに混合した。この溶液混合物を原繊維形成のため、室温で4時間インキュベートした。20%EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)溶液(水溶液)を、組換えヒトI型コラーゲン原繊維を含有する溶液に加える直前に調製した。このEDC溶液を組換えヒトI型コラーゲン原繊維溶液に加えてEDC終濃度を0.15%とし、十分混合し、室温で一晩インキュベートした。

【００８０】

混合物をベックマンJ2-21M遠心機にて、20℃、10,000rpmで30分間遠心分離した。上清をエルレンマイヤーフラスコ中に注意深くデカントすることにより除去した。ペレットを水に再懸濁して元の体積とし、激しく攪拌して混合した。溶液を遠心分離し、得られた上清を上記のようにデカントした。ペレットを、組換えコラーゲン終濃度が30mg/mlとなるように水に再懸濁した。このペレット再懸濁液に1/10容量の100mM HClと1/10容量の水を加え、この溶液をよく混合した。このペレット溶液に1/10容量の0.2M NaH_2PO_4、pH7.3と1

/10容量の水を加え、この溶液をよく混合した。この溶液に、組換えコラーゲン濃度が20mg/ml、かつ、EDCの終濃度が0.25%となるように新しく調製した10% EDCと水を加えた。次に、この組換えコラーゲン溶液をステンレス鋼の鋳型に移し(深さ3mm)、室温で風乾し、70%エタノールで洗浄することによりEDC架橋の副生成物を除去した。

【００８１】

得られた組換えヒトI型コラーゲン膜は厚さおよそ100μmであり、約6mg/cm^{2}の組換えヒトI型コラーゲンを含んでいた。この組換えヒトI型コラーゲン膜は37℃、PBS中で一晩のインキュベーション後もその物理的に完全な状態を維持していた。

【００８２】

実施例１１：組換えヒトI型コラーゲン膜の特性決定

組換えヒトI型コラーゲン膜、および市販のウシコラーゲン膜であるBIOMEND吸着性コラーゲン膜(Sulzer Calcitek, Inc., Carlsbad, CA)の微細構造を、以下の手順を用いて処理した後、組織学的分析により調べた。上記実施例１０に記載のように調製した3mm x 3mm組換えヒトI型コラーゲン膜を蒸留水中で15～30分間再水和させた後、ゆっくり攪拌させながら、70%、80%、95%、および100%エタノールとともに各15分ずつ、一連の連続的インキュベーションを用いて脱水し、その後、ゆっくり攪拌させながらキシレン中で15分間洗浄した。この組換えヒトI型コラーゲン膜をパラフィンに包埋し、厚さ5μmの切片とし、H&Eで染色し、顕微鏡下で観察した。

【００８３】

図２Ａおよび２Ｂに示されるように、組換えヒトI型コラーゲンオリゴマーを用いて製造した組換えヒトI型コラーゲン膜は、BIOMEND吸着性コラーゲン膜（図２Ｂ）に比べ、膜の表面に対して平行方向に密に詰まった微細線維を形成していた（図２Ａ）。

【００８４】

実施例１２：組換えヒトI型コラーゲン膜の細菌コラゲナーゼ耐性

マトリックスおよび膜などのコラーゲンベースの生体材料の長期安定性は、それらのプロテイナーゼによる酵素消化、特にコラゲナーゼによる消化に対する耐性と相関しうる。上記の方法によって調製した組換えヒトI型コラーゲン膜のコラゲナーゼ耐性をBIOMEND吸着性コラーゲン膜と比較した。

【００８５】

約2.0～2.5mgの組換えヒトI型コラーゲン膜を予め秤量した0.5ml微量遠心管に加えた。このサンプルに消化バッファー(110mM NaCl、5.4mM KCl、1.3mM $MgCl_2$、および0.5mM $ZnCl_2$を含む21mM Tris、pH7.45)を、乾燥組換えヒトI型コラーゲン1mg当たり0.2mlの比率で加えた。細菌コラゲナーゼ（Clostridium histolyticum由来のIII型）を、この組換えヒトI型コラーゲン膜に、終濃度が乾燥コラーゲン1mg当たり50ユニットとなるように加えた。対照サンプルにはバッファーだけを加えた。サンプルを37℃で6時間インキュベートした。

【００８６】

残存するコラーゲンをペレット化し、上清を遠心分離により回収した。コラーゲンペレットを、0.5mlの0.5M NaOH中に、70℃で30分間加熱することにより溶解した。このペレットを、等量の0.5M HClを加えることで中和した。上清およびペレット双方のタンパク質濃度をBCAアッセイにより測定した。これらの結果から総タンパク質含量を算出し、消化率を求めた。

【００８７】

図３Ａおよび３Ｂに示されるように、組換えヒトI型コラーゲン膜は、BIOMEND吸着性コラーゲン膜よりもコラゲナーゼ消化耐性が高かった。用いたアッセイでは、80%を超える膜が細菌コラゲナーゼによって消化されたBIOMEND吸着性コラーゲン膜に比べ、組換えヒトI型コラーゲン膜では15%未満が細菌コラゲナーゼにより分解されたに過ぎなかった。細菌コラゲナーゼに対する優れた耐性は、組換えヒトI型コラーゲン膜が種々の適用にとって有効かつ長期安定性のある膜をもたらすことを示した。

【００８８】

実施例１３：組換えヒトI型コラーゲン膜の哺乳類コラゲナーゼ耐性

組換えヒトI型コラーゲン膜とBIOMEND吸着性コラーゲン膜との哺乳類コラゲナーゼ耐性の比較を行った。要するに、2.0～2.5mgの乾燥コラーゲン材料をバッファーpH7.0中、37℃で、0.5μgの哺乳類コラゲナーゼ（MMP-1またはMMP-8のいずれか）とともにインキュベートした。1、3および6日目にアリコートを取り出した。上清のコラーゲン濃度をBCAアッセイにより測定した。反応は2反復で行った。

【００８９】

図４はこれらの実験の結果を示し、上清中のタンパク質濃度を時間の関数としてプロットしたものである。図４に示されるように、組換えヒトI型コラーゲン膜(rhcI)は、BIOMEND吸着性コラーゲン膜(bcI)に比べ、MMP-1およびMMP-8の双方による消化に高い耐性を示した。BIOMEND吸着性コラーゲン膜はMMP-1消化反応溶液中で6日までに目に見えなくなった。これらの結果は、組換えヒトI型コラーゲン膜が哺乳類コラゲナーゼ消化に優れた耐性を有することを示した。従って、組換えヒトコラーゲンを用いて製造した膜はコラゲナーゼ耐性であり長期安定性のある組成物であり、例えば、歯科における誘導組織再生などの種々の適用において有用な、より効果の高いバリアを提供する。

【００９０】

本明細書に示され、記載されたものの他、本発明の種々の変更が、当業者には以上の記載から明らかとなろう。そのような変更も添付の特許請求の範囲内に入ることが意図される。

【００９１】

本明細書に引用されている参照文献は全て、参照によりその全開示内容が本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【００９２】

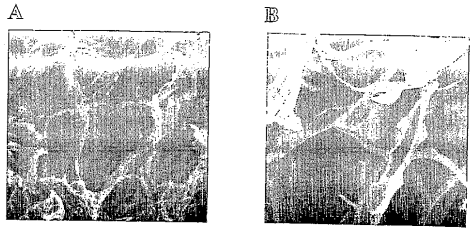
【図１】図１Ａおよび１Ｂは、コラーゲン生体材料の走査電子顕微鏡写真分析を示す。

【図２】図２Ａおよび２Ｂは、コラーゲン膜生体材料の顕微鏡分析を示す。

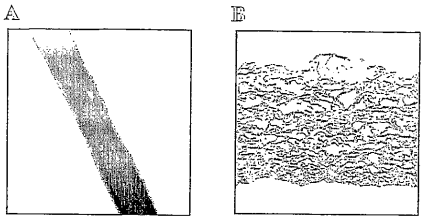
【図３】図３Ａおよび３Ｂは、コラーゲン膜生体材料の細菌コラゲナーゼ消化に対する耐性を示す。

【図４】コラーゲン膜生体材料の哺乳類コラゲナーゼ消化に対する耐性を示す。

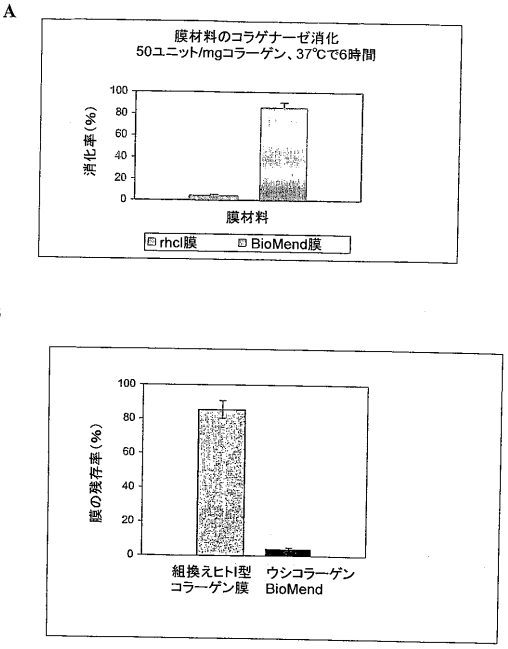
【図１】


A
B

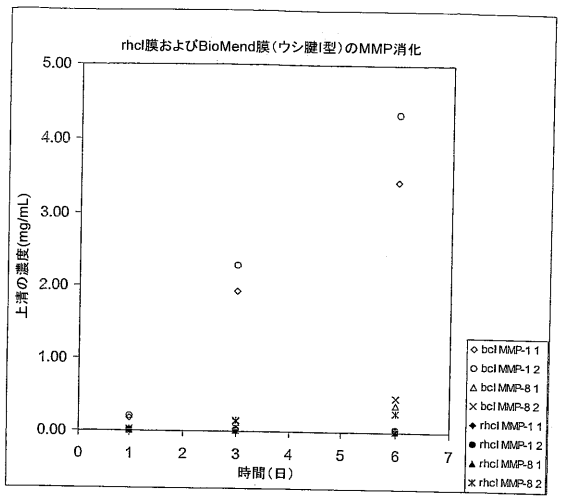
【図２】


A
B

【図３】


A
膜材料のコラゲナーゼ消化
50ユニット/mgコラーゲン、37℃で6時間
消化率(%)
100
80
60
40
20
0
膜材料
rhcl膜
BioMend膜
B
膜の残存率(%)
100
80
60
40
20
0
組換えヒトI型
コラーゲン膜
ウシコラーゲン
BioMend

【図４】


rhcl膜およびBioMend膜（ウシ腱I型）のMMP消化
上清の濃度(mg/mL)
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0
1
2
3
4
5
6
7
時間（日）
bcl MMP-1 1
bcl MMP-1 2
bcl MMP-8 1
bcl MMP-8 2
rhcl MMP-1 1
rhcl MMP-1 2
rhcl MMP-8 1
rhcl MMP-8 2

【手続補正書】
【提出日】平成17年10月26日(2005.10.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
１つのコラーゲン型のコラーゲンを含み、他のいかなるコラーゲン型も含まない生体材料であって、そのコラーゲン型が、ヒトI型コラーゲン、ヒトII型コラーゲン、およびヒトIII型コラーゲンからなる群から選択されるものであり、さらに、該生体材料がコラーゲン1g当たり約2.3m^2よりも大きい表面積を有する、生体材料。
【請求項２】
コラーゲン1g当たり約4.0m^2の表面積を有する、請求項１に記載の生体材料。
【請求項３】
コラーゲン型がヒトI型コラーゲンからなる、請求項２に記載の生体材料。
【請求項４】
コラーゲン1g当たり約3.8m^2の表面積を有する、請求項１に記載の生体材料。
【請求項５】
コラーゲン型がヒトII型コラーゲンからなる、請求項４に記載の生体材料。
【請求項６】
コラーゲン1g当たり約4.4m^2の表面積を有する、請求項１に記載の生体材料。
【請求項７】
コラーゲン型がヒトIII型コラーゲンからなる、請求項６に記載の生体材料。
【請求項８】
１つのコラーゲン型のコラーゲンを含み、他のいかなるコラーゲン型も含まない生体材料であって、コラーゲン型がヒトI型コラーゲン、ヒトII型コラーゲン、ヒトIII型コラーゲンからなる群から選択されるものであり、さらに、該生体材料が約40μm未満の平均孔径を有する、生体材料。
【請求項９】
約35μmの孔径を有する、請求項８に記載の生体材料。
【請求項１０】
コラーゲン型がヒトI型コラーゲンからなる、請求項９に記載の生体材料。
【請求項１１】
約32μmの孔径を有する、請求項８に記載の生体材料。
【請求項１２】
コラーゲン型がヒトII型コラーゲンからなる、請求項１１に記載の生体材料。
【請求項１３】
約28μmの孔径を有する、請求項８に記載の生体材料。
【請求項１４】
コラーゲン型がヒトIII型コラーゲンからなる、請求項１３に記載の生体材料。
【請求項１５】
１つのコラーゲン型のコラーゲンを含み、他のいかなるコラーゲン型も含まない生体材料であって、コラーゲン型がヒトI型コラーゲン、ヒトII型コラーゲン、ヒトIII型コラーゲンからなる群から選択されるものであり、さらに、該生体材料が約1.5Nより大きい引張強さを有する、生体材料。
【請求項１６】
膜およびシートからなる群から選択される、請求項１５に記載の生体材料。
【請求項１７】

１つのコラーゲン型のコラーゲンを含み、他のいかなるコラーゲン型も含まない生体材料であって、コラーゲン型がヒトI型コラーゲン、ヒトII型コラーゲン、ヒトIII型コラーゲンからなる群から選択されるものであり、さらに、該生体材料が約0.0088N/mm^3より大きい引張強さを有する、生体材料。

【請求項１８】

１つのコラーゲン型のコラーゲンを含み、他のいかなるコラーゲン型も含まない生体材料であって、コラーゲン型がヒトI型コラーゲン、ヒトII型コラーゲン、ヒトIII型コラーゲンからなる群から選択されるものであり、さらに、該生体材料が約10%より高いコラゲナーゼ耐性度を有する、生体材料。

【請求項１９】

膜およびシートからなる群から選択される、請求項１８に記載の生体材料。

【請求項２０】

１つのコラーゲン型のコラーゲンを含み、他のいかなるコラーゲン型も含まない生体材料であって、コラーゲン型がヒトI型コラーゲン、ヒトII型コラーゲン、ヒトIII型コラーゲンからなる群から選択されるものであり、さらに、該生体材料が約36.9℃より高い変性温度を有する、生体材料。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/05966

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61F 2/00
US CL : 424/423
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)
U.S. : 424/423; 530/356.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 4,863,856 A (DEAN JR. et al) 5 September 1989 (05.09.1989), column 4, lines 39-43, 55-66; Example 1, column 11, lines 11-15 and 44-51.	1-5. --- 6-11, 29-32
A	US 4,837,285 A (BERG et al) 6 June 1989 (06.07.1989), entire document.	1-32
A	US 4,703,108 A (SILVER et al) 27 October 1987 (27.10.1987) entire document.	1-32
X --- Y	US 5,024,841 A (CHU et al.) 18 June 1991 (18.07.1991), abstarct, column 1, lines 58-62.	1-5 --- 6-12, 29-32
X --- Y	NOKELAINEN. M. Recombinant Human Collagens Oulu University Press. August 2000, pages 37-38 and page 47, lines 1-5.	21-22, 27-28. --- 6-12, 29-32

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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

"B" earlier application or patent 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
19 July 2005 (19.07.2005)

Date of mailing of the international search report
02 AUG 2005

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
Robert B. Mondesi

Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/05966

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
USPATENTS, MEDLINE, WIPO
Search terms: recombinant, human, collagen, surface area, tensile strength, pore size.

フロントページの続き

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

(72)発明者 ポラレック，ジェームス，ダブリュ．
アメリカ合衆国 ９４９６５ カリフォルニア州，サウサリト，ウォルド ポイント ハーバー，エイ ドック，ナンバー３
(72)発明者 ヤン，シュンリン
アメリカ合衆国 ０８８４４ ニュージャージー州，ヒルズバーロー，カプリコーン ドライブ １７１，ナンバー５

Ｆターム(参考) 4C081 AB11 BA12 BA13 BB07 BB08 CD121 DA02 DA12 DB06 DB07