

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4796261号
(P4796261)

(45) 発行日 平成23年10月19日(2011.10.19)

(24) 登録日 平成23年8月5日(2011.8.5)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 L 27/00 (2006.01)

A 6 1 L 27/00

G

請求項の数 6 外国語出願 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2002-259518 (P2002-259518)	(73) 特許権者	503009018
(22) 出願日	平成14年9月5日(2002.9.5)		タイペイ バイオテクノロジー リミテッ
(65) 公開番号	特開2003-175098 (P2003-175098A)		ド インコーポレイテッド
(43) 公開日	平成15年6月24日(2003.6.24)		Taipei Biotechnology
審査請求日	平成17年9月5日(2005.9.5)		y Ltd., Inc.
(31) 優先権主張番号	09/946914		台湾 100 タイペイ チナン ロード
(32) 優先日	平成13年9月5日(2001.9.5)		ナンバー7 セカンド フロアー
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100068755
			弁理士 恩田 博宣
		(74) 代理人	100105957
			弁理士 恩田 誠
		(74) 代理人	100142907
			弁理士 本田 淳
		(74) 代理人	100149641
			弁理士 池上 美穂

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 再生骨インプラント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の孔を有する生体適合性かつ生分解性でポリマーを含まない、官能基で修飾されたハイドロキシアパタイトを主成分とする無機化合物のマトリックスと、

前記孔内に配置されたコラーゲンと、を含み、

前記無機化合物のマトリックス中の官能基は、前記コラーゲン中の官能基と直接または架橋剤を介して共有結合を形成している、
再生骨インプラント。

【請求項 2】

前記孔に配置された骨形成促進剤をさらに含む請求項 1 に記載の再生骨インプラント。

【請求項 3】

前記骨形成促進剤は、オステオプロテジェリンである請求項 2 に記載の再生骨インプラント。

【請求項 4】

再生骨インプラントを製造する方法であって、

複数の孔を有する生体適合性かつ生分解性でポリマーを含まない、官能基で修飾されたハイドロキシアパタイトを主成分とする無機化合物のマトリックスを提供する工程と、

生体適合性かつ生分解性の生体ポリマーであるコラーゲンを含む液体を提供する工程と、

、

前記マトリックスを前記液体に浸漬し、それによって前記孔内に生体ポリマーを配置す

10

20

る工程と、

前記ハイドロキシアパタイトを主成分とするマトリックス中の前記官能基を前記コラーゲン中の官能基と直接または架橋剤を介して共有結合で結合させる工程と、
から成る方法。

【請求項 5】

液体は、前記孔内に配置される骨形成促進剤をさらに含む請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記骨形成促進剤はオステオプロテジェリンである請求項 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【従来の技術】

骨が正常な速度でそれ自体を修復しない場合や、骨折または疾病の結果として骨損失が生じた場合には、骨移植が必要である。骨折の治癒を支援するための内固定物として金属インプラントを使用することができるが、金属インプラントはその変異原性および機械的性質のため使用が制限されている。例えば L a f t m a n (1 9 8 0) A c t a O r t h o p S c a n d 5 1 (2) : 2 1 5 - 2 2 ; L a f t m a n (1 9 8 9) A c t a O r t h o p S c a n d 6 0 (6) : 7 1 8 - 2 2 ; v a n d e r L i s t r a (1 9 8 8) A c t a O r t h o p S c a n d 5 9 (3) : 3 2 8 - 3 0 ; および P e n m a n r a (1 9 8 4) J B o n e J o i n t S u r g B r 6 6 (5) : 6 3 2 - 4 。骨インプラントはさらに、自家移植片、同種移植片、または異種移植片のよ
うな移植片であり得る。

20

【0002】

【発明が解決しようとする課題】

1 人の患者のある部位から別の部位へと移植された組織である自家移植片の使用は、免疫反応の回避という利点を有する。しかしながら、それには別の外科手術が必要とされるため、より高い伝染の危険がある。同種移植片は、同じ種の異なる生物体から得られる組織であり、異種移植片は、異なる種の生物体から得られる組織である。同種移植片と異種移植片は、いずれも免疫反応を誘発する。

【0003】

【課題を解決するための手段】

30

本発明は、孔（隙間を有する）を有するマトリックスと、孔内に配置され、共有結合でマトリックスに結合された生体ポリマーを含む再生骨インプラントをその特徴とする。マトリックスと生体ポリマーはいずれも、生体適合性かつ生分解性である。インプラントは、同様に孔内に配置され、好ましい場合には同様に共有結合でマトリックスに結合された骨形成促進剤を含をさらに含んでもよい。

【0004】

本明細書において用語「マトリックス」とは、無機化合物（例えばヒドロキシアパタイト）または有機ポリマー（例えばポリ乳酸またはポリグリシル酸）から製造することができ、交換される骨の代わりとなる機械的強度を有する材料のことを指す。本明細書において用語「生体ポリマー」とは、新たな骨組織の再生を促進するための細胞接着および細胞移動用の足場として機能することができるタンパク質（例えばコラーゲン）またはタンパク質を含む巨大分子（例えばムコ多糖タンパク質）のことを指す。より効率的な細胞移動および成長のために、生体ポリマーはマトリックスの孔内に配置される。骨形成促進剤は、骨組織の成長および骨量の維持を促進する作用物質（例えばオステオプロテジェリン）である。

40

【0005】

本発明はさらに、再生骨インプラントを製造する方法もその特徴とする。該方法は、複数の孔を有する上述のマトリックスを提供することと、上述の生体ポリマーを含む液体を提供することと、マトリックスを該液体に浸漬することと、それによって孔の中に生体ポリマーを配置することとから成る。該方法はさらに、生体ポリマーをマトリックスに共有結

50

合で結合させることを含み得る。液体はさらに、マトリックスの孔の中に配置される骨形成促進剤を含み得る。任意選択で、骨形成促進剤は共有結合でマトリックスに結合される。

【0006】

さらに、骨欠陥を上述の再生骨インプラントと取り替えることにより、患者の骨欠陥を治療する方法も、本発明の範囲内にある。

本発明の他の特徴または利点は、いくつかの実施例の詳細な説明および特許請求の範囲から明白になるであろう。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明は、生体適合性かつ生分解性の再生骨インプラントをその特徴とする。より詳細には、インプラントは、多孔性マトリックス、生体ポリマー、および任意選択で骨形成促進剤を含む。生体ポリマーはマトリックスの孔の中に配置され、マトリックスに共有結合で結合される。骨形成促進剤は、もし存在するとすれば、やはり同様にマトリックスの孔の中に配置され、マトリックスに共有結合で結合されてもされなくてもよい。

【0008】

本発明のインプラントを製造するために使用されるマトリックスの例は、主成分としてヒドロキシアパタイトを含む、ヒドロキシアパタイトベースのマトリックスである。ヒドロキシアパタイトは、骨、エナメル質、または象牙質に自然に生じるものであるが、多年にわたって、骨代用品またはコーティング材料として使用されている。例えば Frame (1987) Int. J. Oral Maxillofacial Surgery 16; 642-55, および Parsonsら (1988) Annals N.Y. Academy of Sciences 523: 190-207を参照されたい。ヒドロキシアパタイトは、公知の方法により製造することもできるし、または民間の供給業者から購入することもできる。それは、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の純合成物であるか、あるいは炭酸塩、フッ化物、塩化物またはバリウムのような他のイオンを含む組成物である。本発明の骨インプラントを製造するためにヒドロキシアパタイトベースのマトリックスを使用する場合、 $150\mu\text{m} \sim 350\mu\text{m}$ または $200\mu\text{m} \sim 300\mu\text{m}$ のような所望の孔径を得るためにマトリックスを熱水で処理することができる。生体ポリマーを共有結合でヒドロキシアパタイトベースのマトリックスに結合させるため、まず始めに、アミノ基やヒドロキシル基などの官能基でマトリックスの表面（特に孔の内表面）を改変する。官能基はプラズマ蒸着か化学プライミングにより導入することができる。プラズマ蒸着に使用される材料には、アンモニアプラズマ、アリルアミンプラズマ、アリルアルコールプラズマおよびアミノ基、ヒドロキシル基、または他の反応基を含む任意のガスのプラズマが含まれるが、それらに限定されるわけではない。化学プライミングに使用される化合物には、アミノシラン、ヒドロキシシランまたはアミノ基、ヒドロキシル基、または他の反応基を含む他のシランが含まれる。例えば Sanoら (1993) Biomaterials 14: 817-822; および Wangと Hsue (1993) J. Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry 31: 2601-2607を参照されたい。

【0009】

本発明のインプラントを製造するために使用される生体ポリマーの例は、コラーゲンである。コラーゲン（例えばI型コラーゲン）は、腱、皮膚、骨または靱帯のようなヒト組織または動物組織から単離することができる。例えば Millerと Rhodes, (1982) Methods in Enzymology 82: 33-64を参照されたい。コラーゲンは、テロペプチドを保持する方法（例えば米国特許第3,114,593号）か、代わりに、テロペプチドを除去する方法（例えば米国特許第4,233,360号）によって精製することができる。さらに、コラーゲンは、化学試薬を用いて架橋することによるか（例えば米国特許第5,876,444号および第6,177,514号）、他の手段（例えば紫外線）により、再構成することができる。コラーゲンは、共有結

10

20

30

40

50

合でハイドロキシアパタイトベースのマトリックスに結合することができる。コラーゲン中の官能基（例えばカルボキシル基）と改変ハイドロキシアパタイト中の官能基（例えばアミノ基）との間に共有結合を直接形成してもよいし、あるいは第3の分子（例えば架橋剤）によって間接的に形成してもよい。架橋剤は2つの官能基を有する作用物質である。それらのうちの1つは、生体ポリマーと結合を形成し、もう1つはマトリックスと結合を形成することができる。架橋剤の例には、グルタルアルデヒド、塩化トレシルおよびN-ヒドロキシスクシンイミドが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0010】

オステオプロテジェリンは骨形成促進剤の例であり、上述のマトリックスの孔に配置され得る。オステオプロテジェリンはTNF受容体スーパーファミリーのタンパク質である。それは、骨代謝に関する活性、特に、骨密度を増加させる骨吸収阻害活性を有する。Simonetら(1997)Cell 89(2):309-19。ラットオステオプロテジェリンは、マウスおよびヒトオステオプロテジェリンにそれぞれ85%および94%相同な401個のアミノ酸から成るタンパク質である。本明細書において用語「オステオプロテジェリン」とは、ラット、マウスまたはヒトのオステオプロテジェリンの完全なまたは部分的アミノ酸配列（例えば米国特許第6,015,938号を参照）を有し、かつ骨吸収阻害活性を有する、ポリペプチドまたはその誘導体のことを指す。

10

【0011】

骨欠陥の交換のためにインプラントを使用する場合、インプラントは、骨成長を促進すると共に骨吸収を阻害するのに十分な量（例えば0.02重量%~0.1重量%）の骨形成促進剤を含むことが好ましい。当該技術分野において周知の方法により、共有結合形成により骨形成促進剤はマトリックスに取り付けられる。

20

【0012】

本発明の骨インプラントは以下のように製造することができる。多孔性ハイドロキシアパタイトを、例えばRoyとLinnehan(1974)Nature 247:220-222に記述されているような熱水プロセスにより、あるいは、例えばLiu(1996)Biomaterials 17:1955-57;およびLiu(1997)Ceramic International 23:135に記述されているような有機粒子を使用するプロセスにより、製造する。製造プロセスの間、多孔性ハイドロキシアパタイトは、設計した形状に形成され、ハイドロキシアパタイトベースのマトリックスが得られる。その後、成形されたマトリックスを、少なくとも2つの官能基を有する架橋剤を含む溶液に浸漬する。2つの官能基のうちの1つはマトリックスと反応し、架橋剤とマトリックス間に共有結合が形成される。生体ポリマーと、任意選択で骨形成促進剤とを含む別の溶液が調製される。すなわち、生体ポリマーを含む溶液を骨形成促進剤を含む溶液と混合して、均質な溶液を得ることができる。次に、架橋剤と生体ポリマーとの間（ならびに存在する場合には骨形成促進剤との間）に架橋剤中の第2の官能基を介した別の共有結合を形成するのに十分な期間の間、架橋剤を含むマトリックスを上述の溶液に浸漬する。その後、溶液からマトリックスを取り出し、凍結乾燥する。

30

【0013】

このようにして得られた骨インプラントに骨形成促進剤が含まれていない場合には、骨形成促進剤を含む溶液に骨インプラントを浸漬し、その後空気乾燥または凍結乾燥することにより、マトリックスに骨形成促進剤を取り付けることができる。いずれの方法によっても、多孔性マトリックスの外表面と内表面の両方に、骨形成促進剤が配置される。

40

【0014】

このようにして製造された再生骨インプラントは、骨欠陥に置き換わるために、後の標準的な外科手術により、使用することができる。

以下の特定の例は、単なる例であって、本開示の残りを如何様にも限定するものではないものと解釈すべきである。これ以上詳述しなくても、当業者には本明細書の説明に基づいて、本発明を最大限の程度にまで利用できるものと考えられる。本明細書に引用した特許を含めたすべての刊行物は、引用によりその全体が組み込まれる。

50

【 0 0 1 5 】

(材料の調製)

多孔性ハイドロキシアパタイトベースのマトリックスの調製 ハイドロキシアパタイト粉末は、以下の反応を伴う湿性化学法により調製される： $10\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + 6(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 + 2\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} = \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 20\text{NH}_4\text{NO}_3$
) 多孔性ハイドロキシアパタイトベースのマトリックスは、以下の工程により調製される：
 (i) ハイドロキシアパタイト粉末、炭化ケイ素、マグネシアおよび水を含むスラリーを調製する工程；
 (i i) ネットワーク基板（例えばポリウレタン、ポリ塩化ビニルまたはポリエチレングリコール）を所望の形に成形する工程；
 (i i i) ネットワーク基板上にスラリーを被覆する工程；および
 (i v) 遠心分離により余分なスラリーを除去する工程。必要に応じて、ステップ (i) (i v) を繰り返す。そのようにして得られたハイドロキシアパタイトを含む基板を、 1200 の温度で焼結させ、次に、冷却する。ネットワーク基板が徐々に分解し、クラックが生じないように、温度をゆっくり上昇させる。かくして、 $200 \sim 350 \mu\text{m}$ の平均孔径を有する多孔性ハイドロキシアパタイトベースのマトリックスが得られる。洗浄後、マトリックスを 線照射 (20 kGy) により殺菌する。

10

【 0 0 1 6 】

I 型コラーゲンの抽出および精製 ニュージーランドホワイトウサギの腱から I 型コラーゲンを抽出・精製する。腱を切開、スライスし、血漿タンパク質を除去するために冷蒸留水を何度か変えて洗浄し、次に、 0.5 M NaCl の 50 mM Tris-HCl 液 ($\text{pH } 7.4$) で 40°C で一晩攪拌して抽出した。上清をデカンテーションで除去し、塩類を除去するために残りを冷蒸留水を何度か変えて洗浄し、次に、水性抽出液を得るために 0.5 M エタノール ($\text{pH } 2.5$) で 40°C で一晩インキュベートする。抽出液に塩溶液 (0.9 M NaCl) を加え、沈殿を生じさせる。 $13,000\text{ rpm}$ 、 30 分遠心して沈殿を集め、 0.05 M エタノールに溶かし、コラーゲンを含有溶液を形成する。さらなる塩溶液 ($0.02\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$) を、 $24 \sim 48$ 時間にわたってコラーゲンを含有溶液に 2 回加え、沈殿を生じさせる。遠心して沈殿を集め、 50 mM エタノールに溶かし、別のコラーゲンを含有溶液を得る。このコラーゲンを含有溶液を 5 mM エタノールに対して透析し、最後に凍結乾燥する。

20

【 0 0 1 7 】

組み換えオステオプロテジェリンの発現 発現プラスミドの構築は当該技術分野において周知である。 Sirnonet ら (1997) Cell $89(2):309-19$ を参照されたい。例えば、ヒト完全長 (2.4 kb) オステオプロテジェリン (OPG) - Fc 融合タンパク質を、PCR 増幅により構築し、プラスミドベクター pCEP4 (Invitrogen 社、カリフォルニア州サンディエゴ) に入れてクローニングする。その後、この pCEP4 OPG - Fc ベクタを、製造業者が推奨する方法を用いて、細胞（例えば 293-EBNA-1 細胞）(Invitrogen 社、カリフォルニア州サンディエゴ) またはチャイニーズハムスター卵巣細胞にリポフェクトする。OPG - Fc 融合タンパク質を発現させ、タンパク質 A/G アフィニティクロマトグラフィによりさらに精製する。

30

40

【 0 0 1 8 】

(骨インプラントの調製)

コラーゲン (I 型) を精製し、テロペプチドを除去するためにペプシンで消化し、いくつかの改変工程によって再構成して、グルタルアルデヒド - ポリマーアミン複合体を形成する (例えば米国特許第 $5,876,444$ 号参照)。コラーゲンとオステオプロテジェリンをいずれも、線 で殺菌し、 5 mM エタノールおよびリン酸緩衝液の塩性緩衝液にそれぞれ溶解する。必要な場合、混合を促進するために、コラーゲンを含有溶液およびオステオプロテジェリンを含有溶液を、 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ で穏やかに混合加熱する。再構成コラーゲンおよびオステオプロテジェリンを含有溶液を得るが、この溶液は、 $0.2 \sim 1$ 重量% のオステオプロテジェリンと、 $99 \sim 99.8$ 重量% のコラーゲンとを含む。

50

【 0 0 1 9 】

上述されるように多孔性ハイドロキシアパタイトベースのマトリックスが調製される。アミノ基は、アンモニアプラズマにより、多孔性ハイドロキシアパタイトベースのマトリックスの表面へ導入される。その後、アミノ基とグルタルアルデヒドとの間に共有結合を形成するために、グルタルアルデヒドを含む溶液にマトリックスを浸漬する。このようにして得られたマトリックスを、グルタルアルデヒドとコラーゲン間、およびグルタルアルデヒドとオステオプロテジェリン間に別の共有結合を形成するのに十分な期間の間、再構成コラーゲンおよびオステオプロテジェリンを含む上述の溶液にさらに浸漬する。最後に、マトリックスを溶液から取り出し、凍結乾燥して、骨インプラントを生成する。骨インプラント中のコラーゲンの孔径は $50\ \mu\text{m} \sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲にある。

10

【 0 0 2 0 】

(他の実施形態)

本明細書に開示したすべての特徴は、いかなる組み合わせで組み合わせてもよい。本明細書に開示した各特徴は、同一か、等価か、または類似の目的に叶う代替特徴と置き換えることができる。従って、特に明記しない限り、開示した各特徴は、等価または類似の特徴の一連の包括的なものの例にすぎない。

【 0 0 2 1 】

上記の説明から、当業者は本発明の本質的な特性を容易に確認することができ、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な用途および条件に適合させるために本発明に様々な変更および改変を加えることができる。したがって、他の実施形態も特許請求の範囲内に包含される。

20

 フロントページの続き

- (72)発明者 ヴェン - フ トマス ライ
アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州 ベルモント ウィンスロー ロード 1 9
- (72)発明者 ヴェン - ピン トン
台湾 タオ - イン ルン - タン フテ ストリート 3 2
- (72)発明者 ウィン ピー . チャン
台湾 タイペイ ニイ フ チョンキン ロード セクション ファイブ フォースフロア 4 4
2
- (72)発明者 ウィ - チュン ヤン
台湾 1 1 7 タイペイ シン ハイ ロード セクション ファイブ 9 2 - 3 エフ 7
- (72)発明者 ウェリントン ファム
アメリカ合衆国 4 3 6 1 4 オハイオ州 トレド リース ドライブ 1 3 4 1
- (72)発明者 ユ - フィ ツァイ
台湾 タイペイ ユンヘ シティ ガンフ ストリート アレー 1 フォースフロア 5

審査官 馬場 亮人

- (56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 1 6 4 7 8 (WO , A 1)
特開平 1 1 - 2 6 7 1 9 3 (JP , A)
特表平 1 0 - 5 1 3 3 7 8 (JP , A)
特開 2 0 0 1 - 1 3 7 3 2 8 (JP , A)
特開 2 0 0 1 - 2 3 9 4 6 1 (JP , A)
特開平 1 1 - 0 5 8 0 6 7 (JP , A)
国際公開第 9 8 / 0 5 2 6 2 0 (WO , A 1)
Cell , 1 9 9 7 年 , vol.89 , p.309-319
Biomaterials , 1 9 9 3 年 , Vol.14 , No.11 , p.817-822

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
A61L 27/00-60