

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-510076
(P2025-510076A)

(43)公表日 令和7年4月14日(2025.4.14)

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 6/884(2020.01) A 6 1 K 6/884 4 C 0 8 9

A 6 1 K 6/838(2020.01) A 6 1 K 6/838

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全24頁)			
(21)出願番号	特願2024-556322(P2024-556322)	(71)出願人	503083421
(86)(22)出願日	令和5年3月23日(2023.3.23)		ユニベルシテ ドゥ ジュネーブ
(85)翻訳文提出日	令和6年11月12日(2024.11.12)		スイス国, 1 2 1 1 ジュネーブ 4, リ
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/057545		ュ デュ ジェネラル デュフル, 2 4
(87)国際公開番号	WO2023/180479	(71)出願人	594016872
(87)国際公開日	令和5年9月28日(2023.9.28)		サントル、ナショナル、ド、ラ、ルシ
(31)優先権主張番号	PCT/IB2022/000166		ェルシュ、シアンティフィク、(セーエ
(32)優先日	令和4年3月23日(2022.3.23)		ヌエルエス)
(33)優先権主張国・地域又は機関	国際事務局(IB)		フランス国パリ、リュ、ミケ、ランジュ
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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 最終頁に続く	(71)出願人	518059934
			ソルボンヌ・ユニヴェルシテ
			SORBONNE UNIVERSITE
			フランス国、7 5 0 0 6 パリ、リュ・
			ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥシーヌ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 象牙質代用物としての使用のための組成物

(57)【要約】

本開示は、象牙質修復における使用のための、90重量%超のコラーゲンを含むコラーゲン微粒子と、生体模倣ヒドロキシアパタイトまたは生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体と、生理学的に適合性の水性溶媒とを含んでなる組成物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

象牙質の修復および再生における使用のための組成物であって、

- ・ 90重量%超のコラーゲンを含む非架橋かつ非変性のコラーゲン微粒子；
- ・ 生体模倣ヒドロキシアパタイトまたは生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体；および
- ・ 生理学的に適合性の水性溶媒

を含んでなる、使用のための組成物。

【請求項 2】

前記コラーゲン微粒子が、電子顕微鏡法によって測定される0.05～20 μmの範囲での直径を有する、請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 3】

前記コラーゲン微粒子がⅠ型コラーゲンの微粒子である、請求項 1 または 2 に記載の使用のための組成物。

【請求項 4】

前記生理学的に適合性の水性溶媒が、生理学的な血清、リン酸緩衝液、重炭酸ナトリウムまたは血液である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

1つまたは複数の治療剤または生物活性剤をさらに含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

コラーゲン微粒子の生体模倣ヒドロキシアパタイトに対する重量比またはコラーゲン微粒子の生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体に対する重量比が10：90～90：10の範囲であり、好ましくは30：70～80：20の範囲であり、より好ましくは30：70である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 7】

水性溶媒の、高密度コラーゲン微粒子およびヒドロキシアパタイトまたは非晶質リン酸カルシウムの混合物に対する重量比が典型的には1.8～10の範囲であり、好ましくは2～9の範囲であり、より好ましくは3～8の範囲である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

歯の象牙質に対する損傷を修復する際の使用のための、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

空洞が既に形成されている場合の象牙質修復における使用のための、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、象牙質の修復および再生の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

世界人口の長寿命は、自分の歯を生涯にわたり保ちたいという患者の願望と一緒にあって、歯科専門家が如何にしてう蝕プロセスに対処するかという方法に影響を与えている。

「う窩修復－新たなう蝕修復 代替歯 弱化歯の抜歯」からなる歯科治療のための従来の外科的なモデルアプローチは、最小限に浸襲性の歯科学が広く行われているはるかにより保守的な医療モデルによって徐々に置き換えられている。これに関連して、歯科医は、エナメル質および象牙質をできる限り多く保存することにますます関心がある。そのうえ、歯基質の再石灰化が、虫歯についての防止および非外科的な治療戦略のための基礎である

10

20

30

40

50

と考えることができる。

【0003】

象牙質は主に、ヒドロキシアパタイト（HAp）結晶と、I型コラーゲンとから構成される。う蝕疾患は、HAp結晶を溶解し、コラーゲン線維を破壊する酸を産生する細菌に起因する。脱灰プロセスが、象牙質での無機質沈着に有利である局所的pHを増大させることによって石灰化に向かって反転しない限り、う蝕プロセスは、歯の空洞が形成されるまで進行するであろう。この空洞は、異なるタイプの材料によって充填されることを必要とし、このことが、最初は歯の表面からの単純な脱灰とともに始まった疾患の後期症状にすぎない空洞を充填するための、歯科医の日々の臨床作業の基礎である。時には、う窩の広がりおよび深さが歯の機械的完全性および歯髄（神経）の活力度を損なうであろう。

10

【0004】

国際公開第2007/009477号には、医療用途用の生体材料（例えば、骨インプラント材料または歯科用セメントなど）としてヒドロキシアパタイト粒子（上記粒子の50%が5nm以下のサイズを有する）を含んでいることによるマトリックス構築ポリマー（すなわち、コラーゲン）を含む骨修復組成物が開示される。国際公開第2007/009477号において使用されるヒドロキシアパタイトは、少なくとも化学組成、サイズおよび形状の点で、生体模倣ヒドロキシアパタイトとは異なる。また、組成物は、液晶組織を得るようにコラーゲンが十分に高濃度でない。加えて、国際公開第2007/009477号は、コラーゲンがゼラチンによって置き換えられることがあること、または組成物が45℃までの温度で調製されることがあること、したがって、このことは、40℃を超えて、すなわち、コラーゲンが生体外では不可逆的に変性して、ゼラチン化した材料に変わる温度を超えて作業することを認めることを教示する。最後に、国際公開第2007/009477号において例示される組成物はすべて、粉末を形成するために使用前に乾燥され、その結果、コラーゲンが、縞状原線維を含んでいるヒドロゲルではなく、脆弱なスポンジ様材料になっている。

20

【0005】

これに関連して、う蝕の象牙質を「修復」することができる歯様材料が望ましい。特に、脱灰象牙質をう蝕疾患の後期段階で、すなわち、空洞が既に形成されているときに修復することができる歯様材料が求められている。

【発明の概要】

30

【0006】

本発明は、象牙質の修復および再生における使用のための組成物であって、
・90重量%超のコラーゲンを含む非架橋かつ非変性のコラーゲン微粒子；
・生体模倣ヒドロキシアパタイトまたは生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体；および
・生理学的に適合性の水性溶媒
を含んでなる組成物に関する。

【0007】

本発明はまた、本明細書中に開示されるような組成物を含んでなる予備成形された埋め込み可能なマトリックスに関する。

【0008】

40

本発明のさらなる局面は、本明細書中および請求項において開示されるとおりである。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】初期重量（コラーゲン微粒子は約10重量%の水を含有する）と、測定された有機含有量および無機含有量（1：1の初期コラーゲン／ヒドロキシアパタイト比）との間における良好な一致を示すハイブリッドコラーゲン材料のTGAサーモグラム。

【図2】コラーゲン変性に典型的な類似した吸熱ピークを表す、生理食塩水溶液を用いて調製される異なるコラーゲン材料のDSC分析。

【図3】ハイブリッドコラーゲン溶液のPLM観察：明るい複屈折構造が異方性組織を証明している。

50

【図４】部分溶解したコラーゲン微粒子を表す、原線維形成前（左）の石灰化コラーゲン材料のＳＥＭ顕微鏡写真。原線維形成後（右）、材料は、より明確になったコラーゲン原線維を呈する。

【図５】高密度マトリックスにおける原線維の整列ドメインを表す、石灰化コラーゲングル（１：１のコラーゲン／ヒドロキシアパタイト比）のＳＥＭ顕微鏡写真。

【図６】コラーゲン原線維およびヒドロキシアパタイトナノプレートレットの共整列を表す、高い乾燥物含有量を有するコラーゲン／ＨＡ（５０：５０）マトリックスの非染色超薄切片のＴＥＭ顕微鏡写真。

【図７】象牙質／混合物の境界におけるエネルギー分散型Ｘ線分光法（ＥＤＳ）化学的プロファイル（それぞれの場合において、右側棒：平均Ｃ；中央棒：平均Ｐ；左側棒：平均Ｃａ）。

10

【図８】脱灰象牙質に接する実施例２の組成物の断面走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）マイクロモルフォロジー。生体修飾層の存在が２本の白線の間を示される。

【図９】脱灰象牙質に接する実施例３の組成物の断面ＳＥＭマイクロモルフォロジー。生体修飾層の存在が２本の黒線の間を示される。

【図１０】混合物３の密な有機・無機の一体化を表す、実施例４の真空乾燥された注入可能なハイブリッド材料のＳＥＭ顕微鏡写真。

【図１１】混合物３の密な有機・無機の一体化を表す、実施例４の真空乾燥された注入可能なハイブリッド材料のＳＥＭ顕微鏡写真。

【図１２】脱灰象牙質に塗布される実施例４の真空乾燥された注入可能なハイブリッド材料の断面ＳＥＭマイクロモルフォロジー。生体修飾層の存在が２つの白矢印の間を示される。

20

【図１３】象牙質を覆って塗布されたときのミックス３の生体模倣性質を示す、実施例４の真空乾燥された注入可能なハイブリッド材料の断面ＳＥＭマイクロモルフォロジー。

【図１４】脱灰象牙質に塗布される実施例４の真空乾燥された注入可能なハイブリッド材料の断面ＳＥＭマイクロモルフォロジー。生体模倣境界が白矢印により示される。生体模倣混合物が下地の象牙質に対して非常によく一体化されていることが分かる。

【発明の具体的説明】

【００１０】

発明の詳細な説明

30

本発明者らは、生体模倣ヒドロキシアパタイトまたは非晶質リン酸カルシウムおよび高密度コラーゲン微粒子を含む組成物が脱灰象牙質を修復することができることを発見している。注入後、組成物は微細構造の面で生体模倣的であり、象牙質修復を促進させるための足場として役立つことができる。そのような組成物の主要な利点が、象牙質に対するその類似した組成のために、この組成物が象牙質接着のためのネオ基質として役立つということである。

【００１１】

したがって、本発明は、象牙質の修復および再生における使用のための、特に歯の象牙質に対する損傷を修復する際における使用のための、本明細書中、下記で開示されるような組成物に関する。

40

【００１２】

組成物

本発明による使用のための組成物は、

- ・高密度コラーゲン微粒子（すなわち、９０重量％超のコラーゲンを含む微粒子）；
 - ・生体模倣ヒドロキシアパタイトまたは生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体または非晶質リン酸カルシウム；および
 - ・生理学的に適合性の水性溶媒
- を含んでなる。

【００１３】

本組成物は、注入および／または埋め込みのために好適である。本組成物はその場合、

50

注入可能および／または埋め込み可能であるとして定義されることがある。

【0014】

本組成物の成分は、本明細書中、下記において詳細に説明されたとおりである。

【0015】

高密度コラーゲン微粒子

用語「高密度コラーゲン微粒子」は、本明細書中で使用される場合、90重量%超のコラーゲン、特に91重量%超、92重量%超、93重量%超、94重量%超、95重量%超、96重量%超、97重量%超、98重量%超のコラーゲンを含んでなり、残部が水であるコラーゲン微粒子を示す。

【0016】

高密度コラーゲン微粒子は、国際公開第2016／146954号に開示されたとおりである。

【0017】

高密度コラーゲン微粒子は、非変性かつ非架橋のコラーゲンから形成される固体の球状粒子または回転楕円状粒子の形態である。粒子の直径が典型的には0.05～20μmの範囲であり、特に0.25～10μmの範囲であり、より具体的には0.4μm～3μmの範囲である。粒子直径範囲とは、直径分布を示すことが理解されなければならない。粒子は典型的には、0.05μmの最小直径から20μmの最大直径にまで及ぶ直径を有する。

【0018】

用語「回転楕円状」は、本明細書中で使用される場合、その形状が球体の形状に似ている固体物を示す。

【0019】

用語「直径」は球体の直径または回転楕円体の最大直径を示す。直径は、例えば、電子顕微鏡法によって、または動的光散乱によって測定することができる。

【0020】

用語「非変性（時の）」は、本明細書中で使用される場合、α-三重らせんの二次構造が保存されるコラーゲンを示す。コラーゲンの非変性時または変性時の性質を、例えば、比色分析によって観察することができる。変性コラーゲンは、組織化された巨大分子ドメインの兆候を何ら伴わない変性タンパク質（ゼラチン）に特徴的な比色分析プロファイルを有する。乾燥させたコラーゲン（これは、どのような綿状原線維も伴わないスポンジ様材料をもたらす）およびゼラチン化コラーゲンは「変性」コラーゲンと見なされる。非変性コラーゲンの使用は、生体模倣的足場として挙動する組成物の能力を改善し、象牙質形成を刺激するために、したがって再生を刺激するために硬組織形成細胞の動員および活性化を可能にするであろうという点で有利である。

【0021】

用語「非架橋（の）」は、本明細書中で使用される場合、様々な架橋結合が、これらの結合が化学的修飾（例えば、グルタルアルデヒドによる処理など）または酵素的修飾または物理的修飾の結果であるかどうかによらず、存在しないコラーゲンを示す。架橋の非存在を、例えば、電気泳動によって判定することができる。

【0022】

高密度コラーゲン微粒子は様々なコラーゲンから調製されることがある。したがって、コラーゲンの供給源は問題とならない。コラーゲンは下記のプロトコルに従って得ることができる：I型コラーゲンの溶液がウイスターラットの尾の腱から調製される。層流キャビネットにおける切除の後、腱は無菌の生理食塩水リン酸緩衝液において洗浄される。その後、腱は、残存する無傷の細胞を除き、高分子量のタンパク質の一部を沈殿させるために、4MのNaClの溶液に浸漬される。生理食塩水リン酸緩衝液による洗浄の後、腱は無菌の500mM酢酸溶液において可溶化される。得られる溶液が、41000gでの2時間にわたる遠心分離によって清澄化される。コラーゲン以外のタンパク質が、300mMのNaClの水溶液において選択的に沈殿させられ、41000gでの3時間にわたる

10

20

30

40

50

遠心分離によって除かれる。コラーゲンが、600mMのNaClの溶液における沈殿化、続いて3000gでの45分間にわたる遠心分離によって上清から回収される。得られるペレットが500mMの酢酸の水溶液において可溶化され、その後、NaClイオンを除くために同じ溶媒において透析される。溶液は4℃で保持され、使用前に41000gで4時間にわたって遠心分離される。この詳細なプロトコルは他のタイプのコラーゲンに対して適用することができる。

【0023】

高密度コラーゲン微粒子のコラーゲンは典型的には、200～450kDaの範囲での分子量を有する。

【0024】

高密度コラーゲン微粒子のコラーゲンは典型的にはI型コラーゲンである。それにもかかわらず、コラーゲンは、代替的にはII型、III型、V型、XI型、XXIV型、XXVII型、およびそれらの混合物であることがある。

【0025】

高密度コラーゲン微粒子は、国際公開第2016/146954号に開示されるような噴霧加工技術によって調製されることがある。簡単に言うと、この噴霧加工技術は、酸可溶性コラーゲン溶液（非変性かつ非架橋のコラーゲン）を、（小液滴の大きい溶液／空気界面面積のために）制御された雰囲気での溶媒の蒸発によって直ちに乾燥される非常に薄い小液滴のミストを形成するために微粒化することにある。酸性コラーゲン溶液におけるコラーゲンの濃度は典型的には0.1～10mg/Lの範囲である。酸性コラーゲン溶液は7未満のpHを有する。酸は典型的には酢酸である。酸性コラーゲン溶液における酢酸濃度は典型的には0.1～1000mMの範囲である。微粒化は、粉末化された組成物を得るために、典型的には約40℃よりも低い温度で、特に約39℃未満、38℃未満または37℃未満の温度で実施される。コラーゲン液滴における濃度は、コラーゲン分子の自己集合およびそれに続く液晶秩序（例えば、ネマチック配向ドメイン）を誘導するために十分に高い。この方策は、非常に濃縮されたコラーゲン微粒子を、通常の場合にはこのタンパクの迅速な加工を妨げるI型コラーゲン溶液の粘度の大きい増大を回避して数秒以内に得ること、そして結果として生物学的濃度でのその使用を可能にする。

【0026】

したがって、有利には、組成物は組成物の総重量に対して40mg/mLのコラーゲンを含む。

【0027】

生体模倣ヒドロキシアパタイト

生体模倣ヒドロキシアパタイトの化学式は $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ （式中、 $0 \leq x \leq 2$ ）である。

【0028】

用語「生体模倣ヒドロキシアパタイト」は、透過電子顕微鏡法によって測定されるように、典型的には長さがおおよそ10～200nmであり、幅が25～100nmであり、厚さが1～10nmである骨様ヒドロキシアパタイトプレートレットを示す。

【0029】

生体模倣ヒドロキシアパタイトは典型的には粉末の形態である。

【0030】

生体模倣ヒドロキシアパタイト粉末は、Nassif et al., Chemistry of Materials, 22(12), pp3653-3663, 2010によって記載される手順に従って合成されることがある。手短かに言えば、生体模倣ヒドロキシアパタイトが、他のリン酸カルシウム相の沈殿形成を避けるための熱力学的条件に基づくアンモニア（ NH_3 ）の酸性リン酸カルシウム（ $\text{CaCl}_2 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ -、または場合によっては他の塩を伴う、特に NaHCO_3 を伴う）溶液への蒸気拡散により合成される。例えば、生体模倣ヒドロキシアパタイトが、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$ の式を有するヒドロキシアパタイトの形成と一致しているカルシウム対リン酸（Ca/P）モル比を有する $\text{CaCl}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 酸性溶

10

20

30

40

50

液（酢酸、500mM）の沈殿形成によって、または $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ （式中、 $0 \leq x \leq 2$ ）の式を有するヒドロキシアパタイトの形成と一致しているカルシウム対リン酸+炭酸（ $\text{Ca} / [\text{P} + \text{C}]$ ）モル比を有する $\text{CaCl}_2 / \text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{NaHCO}_3$ 酸性溶液（酢酸、500mM）の沈殿形成によって調製されることがある。沈殿形成がアンモニア水溶液（30%、w/w）の添加によって誘発される。

【0031】

この沈殿法は、どのような有機添加物も含まないので、直接的なpH制御を伴うことなく、室温で数時間以内に遂行されるという利点を有しており、副生成物または望まれない（すなわち、非生理学的な）相をどのようなものであれ生じさせない。

【0032】

Nassif et al., 2010によって開示されるような生体模倣ヒドロキシアパタイトの合成は、天然骨アパタイトと類似した水中での自己集合特性を呈するナノプレートレットをもたらすことが示された（Wang, et al., “Water-mediated structuring of bone apatite”, Nature materials 12.12(2013):1144-1153）。ナノプレートレットは、JCPDS N 9-0432のX線回折パターンと一致するX線回折パターンを有する結晶性コアおよび非晶質外殻を有することが示されている。ナノプレートレットは典型的には、 $200 \times 100 \times 5 \text{ nm}^3$ の平均サイズ、および骨塩について認められるような炭酸置換を有する。そのような自己集合特性は、非生体模倣ヒドロキシアパタイト、しかも、特に、非晶質層を示さないヒドロキシアパタイト粒子を有する非生体模倣ヒドロキシアパタイトによっては示されない。

【0033】

ヒドロキシアパタイトの組成はまた、抗骨粗鬆症効果を併せ持つために改変され、特にストロンチウム（10%にまで達するカルシウム置換）により富化されることが可能であることは注目されなければならない（Tovani et al., ‘Formation of stable strontium-rich amorphous calcium phosphate: Possible effects on bone mineral’, Acta biomaterialia, 2019）。そのような場合において、ストロンチウム富化された生体模倣ヒドロキシアパタイトは典型的には下記の式を有する： $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x\text{Sr}_y(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ （式中、 $0 \leq x \leq 2$ 、および $0 \leq y \leq 10-x$ 、ただし、 y は、例えば、 $0.1 * (10-x)$ に等しい）。

【0034】

生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体

用語「生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体」は、生体模倣ヒドロキシアパタイトの形成を、例えば、Nassif et al., Chemistry of Materials, 22(12), pp3653-3663, 2010に記載される条件下で引き起こす前駆体イオンを示す。

【0035】

好適な生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体には、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 NaH_2PO_4 および NaHCO_3 、ならびにマグネシウム、亜鉛、フッ素およびストロンチウムの塩を含んでいる無機骨組成において見出されることがある塩が含まれる。

【0036】

Ca / P モル比が典型的には1.5~2の範囲である。

【0037】

カルシウム対リン酸+炭酸比（ $\text{Ca} / [\text{P} + \text{C}]$ ）モル比が、好ましくは $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ （式中、 $0 \leq x \leq 2$ ）（Von Euw, scientific reports 2019）の式を有するヒドロキシアパタイトの形成と一致している（典型的には1.67；骨組織についてはおよそ1.2~1.5）。

【0038】

非晶質リン酸カルシウム

用語「非晶質リン酸カルシウム」は非晶質のリン酸カルシウム粒子を示す。

【0039】

10

20

30

40

50

非晶質リン酸カルシウムは典型的には粉末の形態である。

【0040】

非晶質リン酸カルシウム粉末は、国際公開第2016/146954号に開示されるような噴霧加工技術を使用する生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体酸性溶液の微粒化によって合成されることがある。非晶質リン酸カルシウム粉末は、透過型電子顕微鏡法によって測定されるように、典型的には3～6 μmの範囲にある平均サイズを有する。

【0041】

水性溶媒

水性溶媒は、生理学的に適合性の水性溶媒がどのようなものであれ挙げられることがある。好適な水性溶媒の限定されない例には、生理学的な血清、リン酸緩衝液、重炭酸ナトリウム、無菌水、通常生理食塩水、血液または血漿が含まれる。

【0042】

有利には、水性溶媒の、高密度コラーゲン微粒子およびヒドロキシアパタイトまたは非晶質リン酸カルシウムの混合物に対する重量比が典型的には1.8～10の範囲であり、好ましくは2～9の範囲であり、より好ましくは3～8の範囲である。

【0043】

生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体が使用されるとき、重量比は、水性溶媒の、高密度コラーゲン微粒子と、当該生体模倣前駆体を用いて得られる同等のヒドロキシアパタイトとの混合物に対する重量比に対応する。

【0044】

この濃度は、組成物が乾燥しておらず（したがって、このことはコラーゲン変性を回避する）、かつ組成物が、注入可能なままでありながら、コラーゲン分子の自己集合およびそれに続く（ネマチック配向ドメインを伴う）液晶秩序を保つために十分に濃縮されるという点で有利である。

【0045】

任意の治療剤または生物活性剤

組成物は、1つまたは複数の治療剤または生物活性剤、例えば、抗炎症剤、唾液、抗生物質、骨形成タンパク質、ヒアルロン酸および抗骨粗鬆症剤（例えば、塩）などを含むことがある。

【0046】

本発明による使用のための組成物は典型的には、1 mLの組成物あたり20 mg～100 mgの高密度コラーゲン微粒子、好ましくは40 mg～80 mgの高密度コラーゲン微粒子、より好ましくは50 mg～70 mgの高密度コラーゲン微粒子を含む。

【0047】

いくつかの実施形態において、高密度コラーゲン微粒子の生体模倣ヒドロキシアパタイトまたは非晶質リン酸カルシウムに対する重量比が、（プロセス1に従って調製されることがある）組成物において10：90～90：10の範囲であり、好ましくは30：70～80：20の範囲であり、より好ましくは50：50または30：70である。

【0048】

当業者は、高密度コラーゲン微粒子の生体模倣ヒドロキシアパタイトまたは非晶質リン酸カルシウムに対する重量比を、組成物の配合を想定された使用および投与部位に適合させるために容易に調節するであろう。

【0049】

本発明の組成物は、象牙質修復についての必要性がある部位に容易に埋め込むことができ、または注入することができ、またはそうでない場合には塗布することができる。例えば、組成物は好適には、修復されることになる欠損の部位において直接、シリンジにより注入することができる。組成物は、対象となった欠損部を満たし、同じ3D形状を取る能力を有する。組成物は、外部の補助または媒介物を用いることなく欠損部において固定されて持続するために十分に接着性／粘着性である。

【0050】

10

20

30

40

50

代替的には、組成物は、予備成形されたマトリックスを形成するために鋳型に注入することができる。予備成形されたマトリックスは埋め込み可能である。本発明はまた、象牙質修復における使用のための、特に歯の象牙質に対する損傷を修復する際における使用のための、より具体的には空洞が既に形成されている場合の象牙質修復における使用のための、本明細書中に開示されるような組成物を含む予備成形された埋め込み可能なマトリックスに関する。

【0051】

本発明による使用のための組成物は好適には、本明細書中、下記で開示されるように調製されることがある。

【0052】

組成物がプロセス1に従って調製されるとき、組成物は、より具体的には、

- ・高密度コラーゲン微粒子（すなわち、90重量%超のコラーゲンを含んでなる微粒子）；
 - ・生体模倣ヒドロキシアパタイトプレートットまたは非晶質リン酸カルシウム；および
 - ・生理学的に適合性の水性溶媒
- を含んでなるとして定義されることがある。

【0053】

組成物がプロセス2に従って調製されるとき、組成物は、より具体的には、

- ・ハイブリッド高密度コラーゲン微粒子（すなわち、生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体を含む高密度コラーゲン微粒子）；および
 - ・生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体を必要に応じて含む生理学的に適合性の水性溶媒
- を含んでなるとして定義されることがある。

【0054】

組成物がプロセス3に従って調製されるとき、組成物は、より具体的には、

- ・高密度コラーゲン微粒子（すなわち、90重量%超のコラーゲンを含んでなる微粒子）；および
 - ・生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体を含む生理学的に適合性の水性溶媒
- を含んでなるとして定義されることがある。

【0055】

組成物を調製するためのプロセス

プロセス1：高密度コラーゲン微粒子およびヒドロキシアパタイトまたは非晶質リン酸カルシウムを混合すること

組成物が、所望重量の高密度コラーゲン微粒子（典型的には粉末の形態でのもの）を所望重量のヒドロキシアパタイトまたは非晶質リン酸カルシウムの粉末と混合することによって調製されることがある。高密度コラーゲン微粒子、ヒドロキシアパタイト粉末および非晶質リン酸カルシウム粉末は、本明細書中上記のように調製されることがある。高密度コラーゲン微粒子と、ヒドロキシアパタイト粒子または非晶質リン酸カルシウム粉末とが典型的には乳鉢において混合される。高密度コラーゲン微粒子と、ヒドロキシアパタイト粉末または非晶質リン酸カルシウム粉末とを混合することが典型的には、対象となった組織を再現するように好適に選ばれ、かつ対象となった適用に合わせる重量比でなされる。高密度コラーゲン微粒子のヒドロキシアパタイト粉末または非晶質リン酸カルシウム粉末に対する好適な重量比の限定されない例には、下記の比率が含まれる：10／90～90／10、好ましくは30：70～80：20、より好ましくは50：50または30：70。

【0056】

高密度コラーゲン微粒子と、ヒドロキシアパタイト粉末または非晶質リン酸カルシウム粉末とが好適な重量比で混合された後、本明細書中上記のように水性溶媒が混合物に加えられる。水性溶媒の、高密度コラーゲン微粒子と、ヒドロキシアパタイト粉末または非晶質リン酸カルシウム粉末との混合物に対する重量比が典型的には1．8～10の範囲であり（すなわち、高密度コラーゲン微粒子と、ヒドロキシアパタイト粉末または非晶質リン

10

20

30

40

50

酸カルシウム粉末との混合物の100mgあたり溶媒が0.18mL~1mLの範囲であり、好ましくは2~9の範囲であり、より好ましくは3~8の範囲である。

【0057】

混合物はその後、1つまたは複数の治療剤または生物活性剤、例えば、抗炎症剤または抗骨粗鬆症剤などが補われることがある。

【0058】

混合後、得られた組成物は、ペーストまたは液状形態であるので、無菌シリンジに入れられることがある。

【0059】

開示されたプロセスのすべての工程が好ましくは無菌条件で実施される。

10

【0060】

シリンジはその後、乾燥した場所において、コラーゲンの変性温度より低い温度で、好ましくは冷蔵庫において4℃で貯蔵されることがある。

【0061】

代替的には、上記組成物が、生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体と、コラーゲンとを含む酸性溶液を微粒化することによって調製されることがあり（プロセス2）、または高密度コラーゲン微粒子が、生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体を含有する水溶液と混合されることがある（プロセス3）。

【0062】

プロセス2：生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体含有コラーゲン溶液の微粒化

20

上記組成物が、ヒドロキシアパタイト前駆体と、コラーゲンとを含有する溶液の微粒化の工程を含むプロセスによって調製されることがある。この溶液は典型的には酸性pH（すなわち、厳密には7未満のpH）を有する。

【0063】

噴霧加工技術が、国際公開第2016/146954号に開示されるように実施される。微粒化が、酸可溶コラーゲン溶液（非変性かつ非架橋のコラーゲン）を用いて実施される。酸性コラーゲン溶液におけるコラーゲンの濃度は典型的には0.1~10mg/Lの範囲である。酸性コラーゲン溶液は7未満のpHを有する。酸は典型的には酢酸である。酸性コラーゲン溶液における酢酸濃度は典型的には0.1~1000mMの範囲である。コラーゲン溶液は所望体積／濃度の生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液と混合される（すなわち、酸性コラーゲン溶液は、ヒドロキシアパタイトのイオン性前駆体が補われる）。好ましい構成において、生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液は、生体模倣ヒドロキシアパタイトプレートットを酸性溶液に溶解することによって作製される。

30

【0064】

微粒化が典型的には、非変性の粉末化組成物を得るために、約40℃未満の温度で、特に約39℃未満、38℃未満または37℃未満の温度で実施される。

【0065】

微粒化から生じる微粒子が本明細書中では「ハイブリッド高密度コラーゲン微粒子」として示される。ハイブリッド高密度コラーゲン微粒子は、生体模倣性のイオン性前駆体（例えば、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 NaH_2PO_4 および NaHCO_3 ）を含有する高密度コラーゲン微粒子である。異なるイオン組成を有するハイブリッド微粒子が得られることがある。酢酸カルシウムが、 NaCl 沈殿を回避するために塩化カルシウムの代替物として使用されることが可能である。

40

【0066】

ハイブリッド高密度コラーゲン微粒子と、（生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体を含有する、または含有しない）生理学的に適合性の水性溶媒とを混合することが典型的には、対象となった組織を再現するように好適に選ばれ、かつ対象となった適用に合わせるができる重量比でなされる。

【0067】

混合後、得られた組成物は、ペーストまたは液状形態であるので、無菌シリンジに入れ

50

られることがある。

【0068】

開示されたプロセスのすべての工程が好ましくは無菌条件で実施される。

【0069】

シリンジはその後、乾燥した場所において、コラーゲンの変性温度より低い温度で、好ましくは冷蔵庫において4℃で貯蔵されることがある。

【0070】

プロセス3：高密度コラーゲン微粒子を生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液と混合すること

組成物が、所望重量の高密度コラーゲン微粒子（典型的には粉末の形態でのもの）を所望体積の生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液と混合することによって調製されることがある。高密度コラーゲン微粒子および生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液は、本明細書中上記で記載されるように調製されることがある。高密度コラーゲン微粒子と、生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液とが典型的には乳鉢において混合される。高密度コラーゲン微粒子と、生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液とを混合することが典型的には、対象となった組織を再現するように好適に選ばれ、かつ対象となった適用に合わせることができる重量比でなされる。高密度コラーゲン微粒子に加えられる生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液の体積が典型的には、80mg/mLのコラーゲンの最終濃度をもたらす。

10

20

【0071】

混合後、得られた組成物は、ペーストまたは液状形態であるので、無菌シリンジに入れられることがある。

【0072】

開示されたプロセスのすべての工程が好ましくは無菌条件で実施される。

【0073】

シリンジはその後、乾燥した場所において、コラーゲンの変性温度より低い温度で、好ましくは冷蔵庫において4℃で貯蔵されることがある。

【0074】

以下、実施例により本発明の実施形態を説明するが、それらは説明のためのものであって、本開示の範囲を限定するものではない。

30

【実施例】

【0075】

実施例1：0.9%生理食塩水における注入可能なハイブリッド材料（コラーゲン／ヒドロキシアパタイト比、50：50）

炭酸塩添加ヒドロキシアパタイトの合成

炭酸塩添加ヒドロキシアパタイトの合成を、Nassif et al., Chemistry of Materials, 22(12), pp.3653-3663, 2010によって記載される手順に従って実施した。

【0076】

110mMのCaCl₂・2H₂O、33mMのNaH₂PO₄および33mMのNaHCO₃の溶液を500mMの酢中に調製した。pHを37%でのHCl溶液により2.2に調整した。2つのフラスコ（35mL）を20mLのこの溶液で満たし、8mLのNH₃水溶液（28～30質量%）を含有する第3のフラスコの存在下、密封されたチャンバーに置いた（すなわち、パラフィンで覆われる1Lのビーカーに入れた）。閉じる前に、これら3つのフラスコを、アンモニアの気相拡散を遅くするために、ニードルを使用して6つの穴が開けられるパラフィルムで覆った。その後、デバイスを6日間にわたって放置した。その後、沈殿物を室温での遠心分離（6000rpmで20分）によって集め、上清のpHが洗浄水のpHに近くなるまで超純水により洗浄した。最後に、得られる白色粉末をオープン中、37℃で7日間乾燥した。その後、乾燥粉末を、微細な粉末を得るために、乳棒を用いて乳鉢中で微粉碎した。

40

【0077】

50

エアロゾルによるコラーゲン微粒子の合成

コラーゲン微粒子の合成を、Nassif et al, Paris, 2018:Injectable collagen suspensions, the preparation method thereof, and the uses thereof, particularly for forming dense collagen matrices ; 米国特許出願公開第 1 5 / 5 5 8 , 7 8 7 号明細書およびLama et al, Self-Assembled Collagen Microparticles by Aerosol as a Versatile Platform for Injectable Anisotropic Materials, Small, p.1902224, 2019によって記載される手順に従って実施した。

【 0 0 7 8 】

1 . 2 m g / m L に濃縮されるコラーゲン溶液を、コラーゲンのストック溶液（通常 1 . 3 ~ 5 m g / m L ）を酢酸（ 5 0 0 m M ）で希釈することによって得た。2 5 0 m L の上記溶液を噴霧乾燥機（B u c h i B 2 9 0 ）において乾燥した。噴霧乾燥機を換気フード内、移動可能な可逆的空調装置の隣に置いた。換気フード内の温度は理想的には 1 9 ° C ~ 2 1 ° C の間で維持されなければならない（ 2 5 ° C を超えることは好ましくない）。コラーゲン溶液の（ 1 . 2 m g / m L での）注入速度が微粒化装置の蠕動ポンプによって制御され、 0 . 6 m L / 分 に等しかった。ノズルの設定温度が 3 0 ° C で維持される。ノズルの実際の温度は、真空での 1 時間の安定化の後で、（蠕動ポンプを始動する前において） 3 4 ° C ~ 3 5 ° C の間で揺れ動く。システムの内部温度が乾燥カラムと粒子収集サイクロンとの間で測定されて、 1 9 ° C ~ 2 5 ° C の間である。ノズル出口での小液滴の剪断を担う空気が 4 1 4 L / h である。ノズル出口とコレクターとの間における小液滴の乾燥を制御する吸引力が、乾燥システムの最大能力の 5 0 % で、すなわち、 2 0 m 3 / h で設定される。ノズルの終端における溶液の凝集を防止するために使用される「ノズル」パラメーターが 2 で設定される。アルミニウムが、熱損失をできる限り避けるために、カラムとサイクロンとの間の接合部の両側に設置される。形成された粒子が、フラスコに接続される高性能サイクロンによって集められる。サイクロンの壁に残留する粉末のすべてを回収し、収量を最大にするために、温度設定点が微粒化の終了時に切られ、吸引が、段階あたり 5 分待つことによって、 1 0 % の段階で、 5 0 % （ 2 0 m 3 / h ）から 1 0 0 % （ 4 0 m 3 / h ）にまで増大される。プロセス効率が 5 0 % ~ 6 0 % の間である。無菌条件を保証するために、B E K O t e c h n o l o g i e s によって販売される異なるサイズのフィルターの市販デバイスを使用することができる。構成全体を、コラーゲンを噴霧する前に 9 4 ° 超のエタノールにより滅菌することもまた推奨される。

【 0 0 7 9 】

注入可能な組成物の調製

6 0 m g の本明細書中上記で開示されるようにして得られるコラーゲン粉末と、 6 0 m g の本明細書中に開示されるようにして得られるヒドロキシアパタイト粉末とを乳鉢で混合した。 1 m L の無菌生理食塩水（ 0 . 9 % の N a C l ）を乳鉢内に加えた。全体を約 1 分間混合して、均質なペーストを得た。ペーストを空の 1 m L シリンジの中に移した。プランジャーを所定位置に戻した。その後で、ペーストは、欠損部に注入する準備ができた。

【 0 0 8 0 】

予備成形されたマトリックスの調製

上記プロトコルを繰り返す。混合物をシリンジにより、所望の大きさおよび 1 m L の総容量のシリコン鑄型に注入する。原線維形成（ゲル化）を、アンモニア蒸気下、一晩にわたって実施する。その後、ゲルを鑄型から取り出し、中性 p H に達するまで生理食塩水によりすすぐ。その後で、材料は、鑄型の形状に対応する窩洞に埋め込むことができる。

【 0 0 8 1 】

注入可能な材料および予備成形された材料の特徴づけ

方法：

熱重量分析（T G A）：実験を、酸化性雰囲気下、 5 ° C / 分の加熱速度により室温 ~ 8 5 0 ° C まで熱微量天秤で、N I E T Z S C H S T A 4 0 9 P C 計器を用いて実施した。

【 0 0 8 2 】

示差走査熱量測定 (DSC) : 実験を、TA Q-20 装置を用いて実施した。加熱速度を 5℃/分で設定し、温度範囲を 20℃~80℃まで設定した。約 20mg の材料片を秤量し、密閉アルミニウムパンに置いた。空の密封アルミニウムパンを参照として使用した。

【0083】

偏光顕微鏡法 (PLM) : 材料を、処理を行うことなく、スライドガラスとカバーガラスとの間に置いた。観察を、透過型 Zeiss AxioImager A2 POL を使用して行った。顕微鏡は、複屈折試料を偏光下で調べるための標準的な付属品 (すなわち、交差偏光子) と、AxioCam CCD カメラとを備える。

【0084】

走査型電子顕微鏡法 (SEM) : 試料を 2.5% グルタルアルデヒド溶液において固定処理した。カコジル酸塩/サッカロース緩衝溶液における洗浄の後、試料をエタノール浴 (30%~100% エタノール) に通して脱水した。超臨界 CO₂ 乾燥を CPD-300 (Leica) によって実施した。乾燥させた試料を小片に切断し、試料ホルダーを覆うカーボンテープの上に置き、15nm の金層で覆った。3kV および 30pA で稼働する Hitachi S-3400N 顕微鏡を使用することによって観察を行った。

【0085】

材料の最終組成は、コラーゲン微粒子における水の存在 (約 10%) を考慮すると、最初の混合物の組成と一致している (図 1)。

【0086】

コラーゲンの変性温度は約 48℃ である。これは、コラーゲンゲルについて報告される変性温度 (Tiktopulo and Kajava, 1998) に近く、このことは、生理食塩水の添加が原線維形成を促進し得ることを示している。実際、原線維形成がアンモニア蒸気によって誘導されるとき (石灰化コラーゲンゲル)、変性温度は変化しないままである。コラーゲン微粒子および生理食塩水の混合物へのヒドロキシアパタイトの添加は、有利な相互作用を誘導するようである：変性エンタルピーが大きくなっており、吸熱の中間高さでの幅はあまり重要でない (図 2)。このことは、HA の添加は、コラーゲン原線維 (または細線維) 集団を均質化する傾向があることを意味する。

【0087】

PLM (図 3) によって観察されるように、溶液は、材料の異方性を証明し、かつこれらの条件下でのヒドロキシアパタイトの添加が液晶相におけるコラーゲンの自己集合を妨げないことを確認する複屈折のドメインを示す。

【0088】

この局所的異方性を、整列した石灰化コラーゲン原線維群の観察を通して SEM によって見ることができる (図 4)。原線維形成の前において、材料はまた、部分溶解したコラーゲン微粒子を示す。微粒子の溶解を注入前の混合時間によって調節することができる。原線維形成の後において、より明確な原線維が観察される。

【0089】

実施例 2 : 2mM 酢酸における注入可能なハイブリッド材料 (コラーゲン/ヒドロキシアパタイト比、50 : 50)

注入可能なハイブリッド材料の調製

40mg の本明細書中上記で開示されるようにして得られるコラーゲン粉末と、40mg の本明細書中上記で開示されるようにして得られるヒドロキシアパタイト粉末とを乳鉢で混合する。0.15mL の 2mM 酢酸を乳鉢に加える。全体を約 1 分間混合して、均質なペーストを得る。ペーストを空の 1mL シリンジに移した。プランジャーを所定位置に戻した。その後で、ペーストは、欠損部に注入する準備ができた。

【0090】

材料の特徴づけ

SEM 観察は原線維の整列したドメインを示す (図 5)。材料は高密度であるようである。

10

20

30

40

50

【0091】

SEMでは、緻密骨において認められるものに似ているコラーゲン原線維およびヒドロキシアパタイトナノプレートレットの共整列の領域が明らかにされる（図6）。

【0092】

実施例3：2 mM酢酸における注入可能なハイブリッド材料（コラーゲン／ヒドロキシアパタイト比、30：70）

注入可能なハイブリッド材料の調製

24 mgの本明細書中上記で開示されるようにして得られるコラーゲン粉末と、56 mgの本明細書中上記で開示されるようにして得られるヒドロキシアパタイト粉末とを乳鉢で混合する。0.15 mLの2 mM酢酸を乳鉢に加える。全体を約1分間混合して、均質なペーストを得る。ペーストを空の1 mLシリンジに移した。プランジャーを所定位置に戻した。その後で、ペーストは、欠損部に注入する準備ができた。

【0093】

実施例4：2 mM酢酸における注入可能なハイブリッド材料（コラーゲン／非晶質リン酸カルシウム比、30：70）

非晶質リン酸カルシウムの調製

非晶質リン酸カルシウム粉末を、国際公開第2016/146954号に開示されるような噴霧加工技術を使用する、110 mMの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、33 mMの NaH_2PO_4 および33 mMの NaHCO_3 の、500 mM酢酸中の生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体酸性溶液の微粒化によって合成する。

【0094】

予備成形されたハイブリッド材料の調製

40 mgの本明細書中上記で開示されるようにして得られるコラーゲン粉末と、40 mgの本明細書中上記で開示されるようにして得られる非晶質リン酸カルシウム粉末とを乳鉢で混合する。0.15 mLの2 mM酢酸を乳鉢に加える。全体を約1分間にわたって混合して、均質なペーストを得る。ペーストは1 mLのシリンジを介して鑄型に注入することができ、またはスパチュラにより鑄型の中に広げることができる。原線維形成をアンモニア蒸気下、3時間実施する。その後、ゲルを鑄型から出し、中性pHに達するまでPBSによりすすぐ。その後で、材料は、鑄型の形状に対応する窩洞に埋め込むことができる。

【0095】

実施例5：注入可能かつ予備成形可能な材料（生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液と混合される高密度コラーゲン微粒子）

注入可能な組成物の調製

90 mgの本明細書中上記で開示されるようにして得られるコラーゲン粉末を1 mLの本明細書中に開示されるようにして得られる生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液と混合した。全体を約1分間混合して、均質なペーストを得た。ペーストを空の1 mLシリンジに移した。プランジャーを所定位置に戻した。その後で、ペーストは、欠損部に注入する準備ができた。

【0096】

予備成形されたマトリックスの調製

上記プロトコルを繰り返す。混合物をシリンジにより、所望の大きさおよび1 mLの総容量のシリコン鑄型に注入する。原線維形成（ゲル化）をアンモニア蒸気下、一晚実施する。その後、ゲルを鑄型から取り出し、中性pHに達するまで生理食塩水によりすすぐ。その後で、材料は、鑄型の形状に対応する窩洞に埋め込むことができる。

【0097】

実施例6：エアロゾルによるハイブリッドコラーゲン微粒子の合成

コラーゲン微粒子の合成を、Nassif et al, Paris, 2018:Injectable collagen suspensions, the preparation method thereof, and the uses thereof, particularly for forming dense collagen matrices；米国特許出願第15/558,787号明細書およびLama et al., Self-Assembled Collagen Microparticles b

10

20

30

40

50

y Aerosol as a Versatile Platform for Injectable Anisotropic Materials, Small, p.1902224, 2019によって記載される手順に従って実施した。加えて、生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体に存在する塩を、最終的な組成（2 mg/mLのコラーゲン、500 mMの酢酸、110 mMの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、33 mMの NaH_2PO_4 、および33 mMの NaHCO_3 ）に至る微粒化の前の低濃度コラーゲンの酸性コラーゲン溶液に加えた。イオン性前駆体の組成を、異なる無機質／コラーゲン比を有し、異なる治療用イオン（例えば、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} ）が負荷されるハイブリッドコラーゲン微粒子を形成するために改変することができる。

【0098】

例えば、 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ が、 Ca^{2+} に関連して10%の Sr^{2+} （mol/mol）を得るために生体模倣ヒドロキシアパタイト前駆体溶液に加えられることがある。

【0099】

注入可能な組成物の調製

90 mgの本明細書中上記に開示されるようにして得られるコラーゲン粉末を1 mLの500 mM酢酸と混合した。全体を約1分間混合して、均一なペーストを得た。ペーストを空の1 mLシリンジに移した。プランジャーを所定位置に戻した。その後で、ペーストは、欠損部に注入する準備ができた。異なる重量のイオン性前駆体が、異なる無機質／コラーゲン比を得るために使用されることがある。

【0100】

予備成形されたマトリックスの調製

上記プロトコルを繰り返す。混合物をシリンジにより、所望の大きさおよび1 mLの総容量のシリコン鑄型に注入する。原線維形成（ゲル化）をアンモニア蒸気下、一晚実施する。その後、ゲルを鑄型から取り出し、中性pHに達するまで生理食塩水によりすすぐ。その後で、材料は、鑄型の形状に対応する窩洞に埋め込むことができる。

【0101】

実施例7：実施例2および実施例3の組成物による、クラスI窩洞からの脱灰した深い象牙質へのCaイオン回復およびPイオン回復の研究

歯窩洞の調製

深いクラスI窩洞を、匿名で集められる抜歯された大白歯において調製した。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）およびウマ血清の溶液による管内流体流動を、Bortolotto T, Onisor I, Krejci I, Proximal direct composite restorations and chairside CAD/CAM inlays: Marginal adaptation of a two-step self-etch adhesive with and without selective enamel conditioning, Clin Oral Invest, 2007; 11:35-43において開示されるように、生歯の生物学的環境をシミュレーションするために実施した。

【0102】

窩洞調製後、4つの象牙質処置を検討した。

【0103】

健全な象牙質に対する陽性対照

健全な象牙質に設けられる調製されたままの歯窩洞をグラスアイオノマーセメント（Fuji IX、GC）により充填し、象牙質灌流下、37°Cで15日間貯蔵した。

【0104】

脱灰象牙質に対する陰性対照

調製されたままの歯窩洞を37%の H_3PO_4 水溶液により20秒間エッチングし、その後、グラスアイオノマーセメントにより充填し、象牙質灌流下、37°Cで15日間貯蔵した。

【0105】

実施例2または実施例3の組成物で被覆される脱灰象牙質の調製

調製されたままの歯窩洞を37%の H_3PO_4 水溶液により20秒間にわたってエッチングした。その後、実施例2または実施例3の組成物の層を塗布した。混合物層をセメン

10

20

30

40

50

トから隔離し、どのような化学的相互作用も回避するために、光硬化結合剤（Optibond FLのボンド）の薄い層を上部に設置した。グラスアイオノマーセメントを塗布した後、歯を象牙質灌流下、37℃で15日間貯蔵した。

【0106】

材料の特徴づけ

歯試料を切片化し、研磨し、象牙質／混合物の境界における走査電子顕微鏡法（SEM）マイクロモルフォロジー評価およびエネルギー分散分光法（EDS）化学的プロファイルを得た。

【0107】

EDSによって評価されるように、カルシウム（Ca）、リン（P）および炭素（C）のピークが、象牙質表面処理のタイプに応じて変化した。Caのピーク（8）およびPのピーク（2）が最も低いときには、41にまで達するピークが脱灰象牙質（DD）において認められるため（図7）、Cのピークが露出コラーゲンの量と関連づけられた。

【0108】

実施例2の組成物（HAp colミックス1）および実施例3の組成物（HAp colミックス2）は、健全な象牙質に最も近いピークを与えた。このことは、生物学的修飾が脱灰象牙質表面で起こったことを示している。SEM顕微鏡写真から、象牙質表面に十分に一体化された層のモルフォロジーに照らして、これらの仮定が確認された（図8および図9）。

【0109】

したがって、脱灰象牙質の回復が、とりわけ実施例3の組成物（30：70のコラーゲン／ヒドロキシアパタイト比；「HAp colミックス2」）による、健全な象牙質において認められる特徴と類似する特徴を有する新しく形成されたヒドロキシアパタイト／コラーゲン層の一体化によって可能であったと思われる。

【0110】

実施例8：実施例4の組成物（酢酸（2mM）における非晶質リン酸カルシウム（40mg）＋コラーゲン／非晶質リン酸カルシウム（44.4mg）（70／30の比）：ミックス3）を用いた、クラスI窩洞からの脱灰した深い象牙質のCaイオンおよびPイオンのマッピング研究

下記工程は実施例7と同一であった：歯窩洞の調製、健全な象牙質に対する陽性対照、脱灰象牙質に対する陰性対照、実施例4の組成物で被覆される脱灰象牙質の調製、および材料の特徴づけ。

【0111】

SEM顕微鏡写真は、両方の成分の間における非常に緊密な一体化を表す石灰化コラーゲン材料を示した（図10および図11）。象牙質とミックス3との間における界面特徴が、下地の象牙質と非常に類似した構造を有する生体模倣ネオ層に典型的であった（図12～図14）。

10

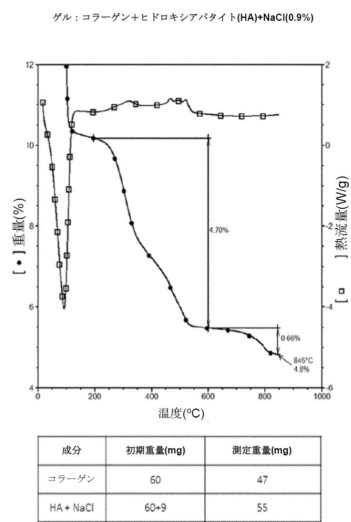
20

30

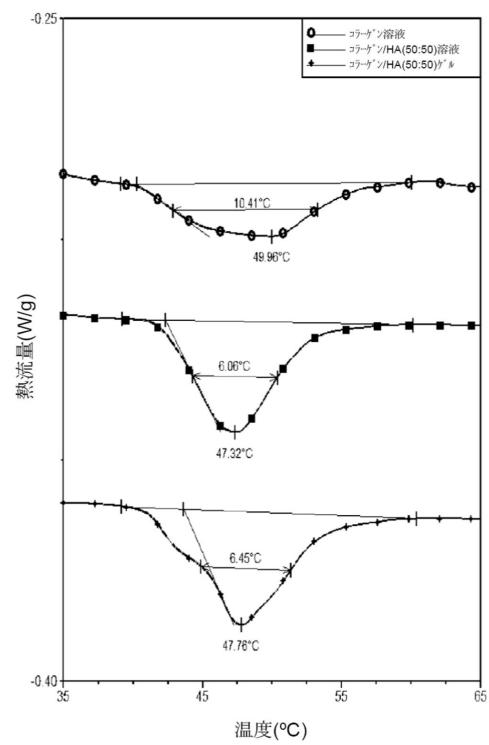
40

50

【図面】
【図 1】



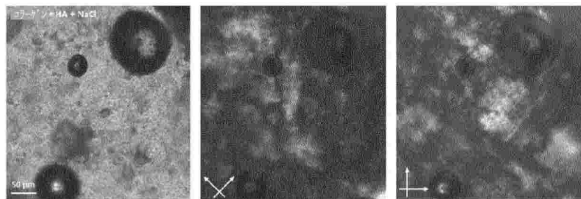
【図 2】



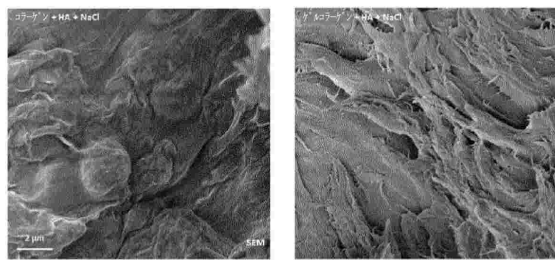
10

20

【図 3】



【図 4】



30

40

50

【図 5】



Fig. 5

【図 6】

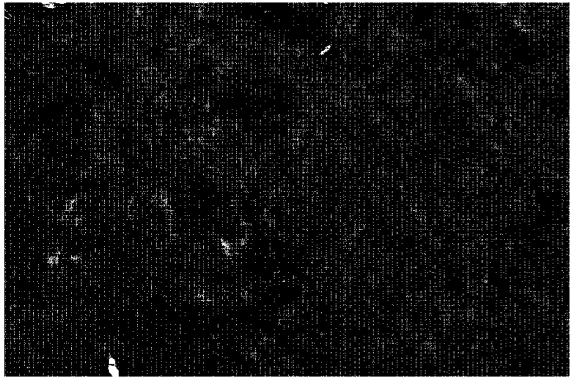
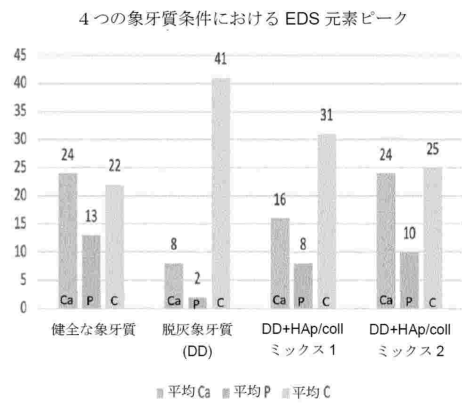
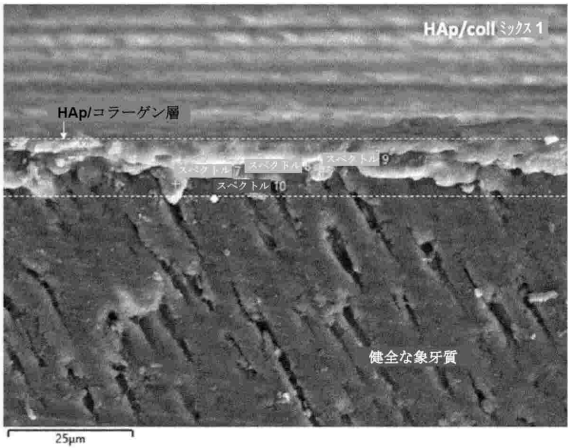


Fig. 6

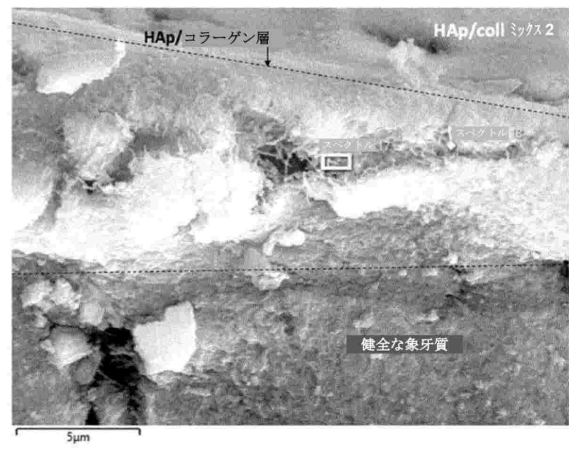
【図 7】



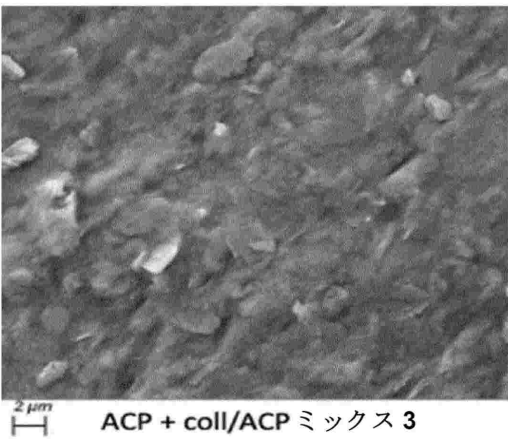
【図 8】



【図 9】

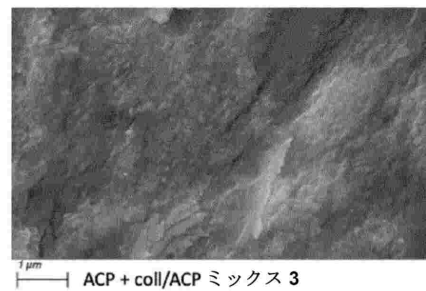


【図 10】

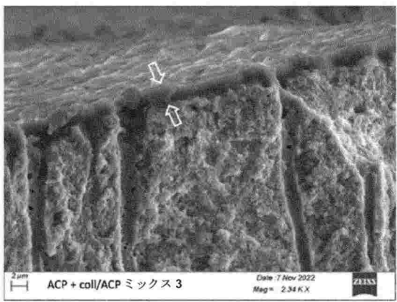


10

【図 11】



【図 12】



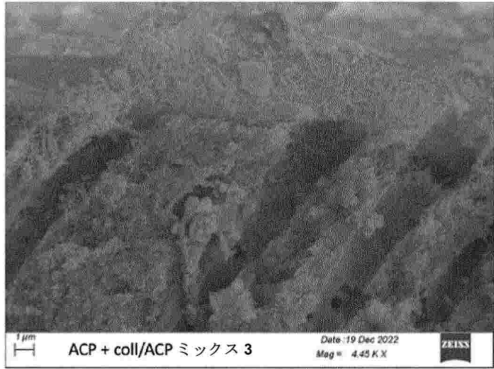
20

30

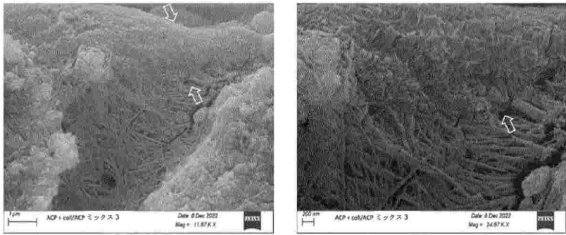
40

50

【図 1 3】



【図 1 4】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/057545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K6/17 A61K6/60 A61K6/74 A61K6/75 A61K6/838 A61K6/891 ADD. 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) A61K 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) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/009477 A1 (LISOPHARM AG [LI]; RUDIN VSEVOLOD NIKOLAEVICH [RU] ET AL.) 25 January 2007 (2007-01-25) page 19, line 6 - page 20, line 13; figures 1-4; examples 1,2	1-9
Y	US 2018/071430 A1 (NASSIF NADINE [FR] ET AL) 15 March 2018 (2018-03-15) cited in the application paragraphs [0092] - [0094], [0139] - [0152], [0162] - [0165]; figures 1,2; examples 1,2	1-9
☒ 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 "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 "Y" 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 12 July 2023		Date of mailing of the international search report 20/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Barenbrug-van Druten

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/057545

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GHEORGHE TOMOAIA ET AL: "On the Collagen Mineralization. A Review", MEDICINE AND PHARMACY REPORTS, vol. 88, no. 1, 28 January 2015 (2015-01-28), pages 15-22, XP055631099, ISSN: 2602-0807, DOI: 10.15386/cjmed-359 "Different ways of preparing mineralized collagen" -----	1-9
A	JP 2019 163215 A (AIST) 26 September 2019 (2019-09-26) paragraphs [0064] - [0065] -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No	
Information on patent family members				PCT/EP2023/057545	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2007009477	A1	25-01-2007	EP 1909859	A1	16-04-2008
			US 2009155320	A1	18-06-2009
			WO 2007009477	A1	25-01-2007
US 2018071430	A1	15-03-2018	EP 3270882	A1	24-01-2018
			FR 3033697	A1	23-09-2016
			JP 6892387	B2	23-06-2021
			JP 2018513845	A	31-05-2018
			US 2018071430	A1	15-03-2018
			WO 2016146954	A1	22-09-2016
JP 2019163215	A	26-09-2019	NONE		

10

20

30

40

50

フロントページの続き

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

21

(74)代理人 100120031

弁理士 宮嶋 学

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(74)代理人 100210675

弁理士 下山 潤

(72)発明者 ティシアナ、ボルトロット

スイス国ジュネーブ、4、リュ、ミッシェルーセルベ、ユニバーシティ、オブ、ジュネーブ、1、ディビジョン、オブ、カリオロジー、アンド、エンドドントロジー、ユニバーシティ、クリニクス、オブ、デンタル、メディシン、(シーユーエムディー)、ファカルティ、オブ、メディシン

(72)発明者 イボ、クレイチ

スイス国ジュネーブ、4、リュ、ミッシェルーセルベ、ユニバーシティ、オブ、ジュネーブ、1、ディビジョン、オブ、カリオロジー、アンド、エンドドントロジー、ユニバーシティ、クリニクス、オブ、デンタル、メディシン、(シーユーエムディー)、ファカルティ、オブ、メディシン

(72)発明者 ナディーヌ、ナシフ

フランス国パリ、セデックス、05、プラス、ジュシュー、4、カズ、クーリエ、174、ソルボンヌ、ユニベルシテ

(72)発明者 ミレナ、ラマ

フランス国パリ、セデックス、05、プラス、ジュシュー、4、カズ、クーリエ、174、ソルボンヌ、ユニベルシテ

(72)発明者 カミラ、ブソラ、トバーニ

フランス国パリ、セデックス、05、プラス、ジュシュー、4、カズ、クーリエ、174、ソルボンヌ、ユニベルシテ

Fターム(参考) 4C089 AA06 BA16 BE17 CA03