

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-521492

(P2014-521492A)

(43) 公表日 平成26年8月28日(2014.8.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00	Z
A 6 1 L 31/00 (2006.01)	A 6 1 L 31/00	T
	A 6 1 L 31/00	P
	A 6 1 L 31/00	C
		4 C 0 8 1

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 54 頁)

(21) 出願番号 特願2014-526281 (P2014-526281)
 (86) (22) 出願日 平成24年11月11日 (2012.11.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年2月13日 (2014.2.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/064586
 (87) 国際公開番号 W02013/071216
 (87) 国際公開日 平成25年5月16日 (2013.5.16)
 (31) 優先権主張番号 61/558,669
 (32) 優先日 平成23年11月11日 (2011.11.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/301,785
 (32) 優先日 平成23年11月22日 (2011.11.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514014975
 エムアイビーエイ メディカル インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95071, サラトガ, ピーオー ボックス 68
 (74) 代理人 100091683
 弁理士 ▲吉▼川 俊雄
 (74) 代理人 100179316
 弁理士 市川 寛奈
 (72) 発明者 グエン, フィー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95071, サラトガ, ピーオー ボックス 68

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 注入充填剤 (フィラー) {INJECTABLE FILLER}

(57) 【要約】

システム及び方法は、下記の目的で公開される。

- ・ヘテロ多糖類を架橋して単一架橋材料を形成することで、相互貫通高分子網目 (IPN) を有する生体適合性の架橋高分子を形成する

- ・単一架橋材料に加えて追加の架橋を行って多重架橋材料を形成する。その中に、多重架橋材料は、単一架橋材料より、人体内で生分解に耐える1つ以上のIPN領域を有し、1つ以上の単一架橋拡張がIPNから広がる。また、IPNと拡張の組合せは、生分解耐性、柔らかな肌触り、体内に導入する容易さを提供する。

【選択図】 図1

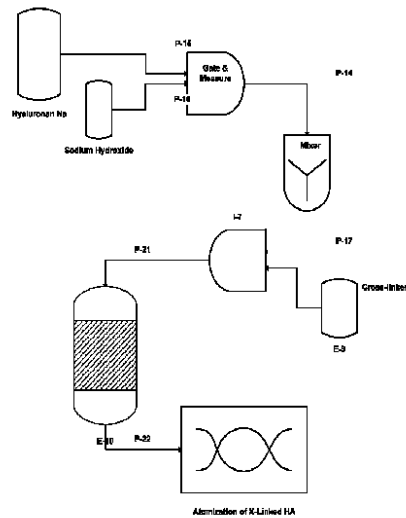


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘテロ多糖類を架橋して単一架橋材料を形成するのと単一架橋材料上で1つ以上の追加架橋を行って多重架橋材料を形成するのを備え、多重架橋材料が、単一架橋材料より、人体内で生分解に耐える1つ以上のIPN領域を有し、1つ以上の単一架橋拡張がIPNから広がり、IPNと拡張の組合せは、生分解耐性、柔らかな肌触り、体内に導入する容易さを提供する(ことを特徴とする)、相互貫通高分子網目(IPN)を有する生体適合性架橋高分子を形成する方法。

【請求項 2】

低侵襲で生体適合性架橋高分子を注入することを含む、請求項1に記載の方法

10

【請求項 3】

低侵襲で生体適合性架橋高分子を皮膚に注入することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

低侵襲で注射器を用いて生体適合性架橋高分子を皮膚の下に注入することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

低侵襲で注射器を用いて生体適合性架橋高分子を乳房又は臀部、或いは軟部組織の下に注入することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

低侵襲で機械式ポンプを用いて生体適合性架橋高分子を軟部組織の下に注入することを含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 7】

高分子がコラーゲン、ヒアルロン酸、セルロース、タンパク質、糖類、生物系の細胞外マトリックスのいずれ1つを含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

高分子が高分子を熱硬化性樹脂に変換する熱可塑性物質を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

架橋剤を使用したり熱硬化高分子を形成したりし、多官能性モノマーを用いて他の高分子一種と架橋共重合体を形成することを含む、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 10】

2相混合物を含む生体適粘弾性ゲルスラリとの組成物を移植することを含み、前記2相は下記のとおりである：

第1相は、微粒子生体適合ゲル相であり、前記ゲル相が化学架橋グリコサミノグリカンを含み、前記グリコサミノグリカンが多糖とたんぱく質から成る群から選択される少なくとも1つの他の高分子と化学的に共架橋し、前記ゲル相が生理学許容される水性媒体中に膨潤され、第2相に均一に分布される；

前記第2相は、前記生理学許容される水性媒体中の多糖、ポリビニルピロリドン、ポリエチレンオキッドから成る群から選択される親水性生体適合高分子の高分子溶液を含；

2相混合物中の高分子溶液が0.01%から99.5%までの構成となり、ゲル相が、増強が望まれる生体の部分にその残りの分を構成する；

40

請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

生体適合性のために組成物に1つの物質を添加することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

生理学的事象に従って所定のタイミングで、薬剤放出を制御することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

生体適合性且つ性分解性の薬剤を持つことを含む、請求項1に記載の方法。

50

【請求項 14】

生分解性高分子の材料マトリックス全体にわたって均一に薬剤を調剤することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

薬剤をコアシェル構造に収納し、薬剤放出が拡散及び溶解性に基づくことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

非構造性薬剤送達の高分子用途から生分解性のネジやアンカーの用途までの応用に必要となる機械的性能及び再吸収率を満たすように調整される、ポリラクチド (PLA) ・ポリグリコリド (PGA) ・ PLA / PGA の共重合体のいずれか 1 つを含む薬剤を持つ高分子を提供することを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 17】

高分子の分解速度及び高分子マトリックスから拡散する薬剤の速度と同じ速度で、生物環境に薬剤を放出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

薬剤担体高分子組成物及び充填剤高分子組成物を所定の比率で混合することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

麻酔薬、
リドカイン、
急性炎症反応を低下させ又は除去する合成物、
ステロイド・コルチコステロイド・デキサメタゾン・トリアムシノロンから成る群から
選択される組成物
のいずれかを添加することを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 20】

徐放性物質又は速放物質を提供することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

軽度に架橋した拡張が組成物を小さなゲージ針を通して注入できるようにし、第 2 の直列架橋センターが生物学的過程による吸収に耐性がある特徴とし、

軽度の架橋を有する第 1 高分子の第 1 の部分；

30

第 1 の部分を重なった第 1 の直列架橋センター及び、直列架橋センターに隣接した 1 以上の軽度架橋した拡張を有する高分子の第 2 の部分；

第 2 の部分を重なった第 2 の直列架橋センター及び、直列架橋センターに隣接した 1 以上の軽度架橋した拡張を有する高分子の第 3 の部分

を含む組成物。

【請求項 22】

高分子が、コラーゲン、ヒアルロン酸、セルロース、タンパク質、糖類、生物系の細胞外マトリックスを含む特徴とする請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

高分子が、フリーラジカル捕捉剤及び / 又は抗酸化物質及び / 又はビタミン及び / 又は酵素阻害薬のいずれかを含有する請求項 21 に記載の組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2011年11月11日出願された仮出願第61/558669号、2011年11月22日出願された実用出願第13301785号に基づく優先度を主張し、当該出願に記載された全ての記載内容を援用するものである。

【背景技術】

【0002】

50

本発明は、生体適合性粘弾性ポリマーゲルスラリー、それらの調製法及びそれらを含む製剤に関する。

【0003】

人の年齢としては、顔面脂肪の損失と肌の弾力性の低下に応じて、顔のしわや折り目が発展していく。医師たちは、長年にわたって、顔の軟部組織の顔のボリュームの損失を戦うために、様々な方法および材料を試してきた。最も一般的な方法の一つは自家脂肪転送というものである。この外科手技を用いて、人自身の脂肪は腹部など身体の別の部分から採取された後、その脂肪が処理され、しわや折り目を減らしてより若々しい外見を遂げるようにボリュームの復元を要求している顔の皮膚及び軟部組織領域に注射するために用意される。自家脂肪転送は良好且つ望ましい結果をもたらすが、病人にとって高価で、痛みを伴う、時間が係る、回復時間も長い、いずれの外科手術に伴う合併症と関連している手術法である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、従来のような問題点を解決する装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

以下はいくつかの詳細な態様である。

【0006】

20

- I . 連続架橋結合
- II . HA 分子量マニピュレーション
- III . 遊離基捕捉剤：ビタミン、酵素やその類
- IV . 抗ヒアルロニダーゼと抗エラスターゼ

連続架橋結合

一態様において、各システムと各方法は、下記向けに最適化された架橋結合HAを使って、軟部組織の美容増強のために開示される。

【0007】

- 1 . 商品配送の安易さ
- 2 . 局部組織準拠
- 3 . インプラント素材の移動を制御するためのより大きな凝集性
- 4 . 生物分解プロファイル

30

独特な架橋HA、およびそれらの更なる架橋による架橋HAの相互貫通網目(IPN)の領域を形成することによる架橋の使用。IPN構造は、この架橋結合HAに対し、この美容増強出願のみに向けのこれらのユーティリティを提供する。IPNコア(タピオカボールと想像)は人間の体内では、同じ架橋結合レベルのために正常化される単一架橋結合素材よりも生分解への抵抗が強い。その上、連続的にコアから放射に変化させるさまざまな物理的性質はポリマーを丈夫にし、より良い組織・デバイスの生体適合性のために同時に局部組織に準拠し、手触りがより自然に感じられる。

【0008】

40

上記のHA架橋結合方法は、ポリマーへの局部組織の反応を調整するには医薬物質を制御する必要がある特定の場合に、美容増強のために最適化された。医薬成分は多相混合物を他の相と一緒に調合して架橋結合HAポリマーを形成する。

【0009】

上記態様の実施は以下の一つ以上を含むであろう。システムは生体適合性があり、規制医薬品が主要整理学的事実と同時に戦略的タイミングに解放されるようにする。例えば、遅滞なく速やかな薬物放出プロファイルは、外科手術と関連する患者が経験する激しい痛みを緩和するように、リドカイン等のような麻酔薬の制御放出に適しているだろう。システムは、生理学的炎症性異物反応と同時に起きるために、デキサメタゾン又はトリウムシノロン等、コルチコステロイド又はステロイドの媒体放出プロファイル及び媒体遅延でも

50

ある。システムは、コントロール不良 治癒及びパクリタキセル、シロリムス、5 - フルオロウラシル等のような抗増殖剤の放出を開始する前に放出プロファイル及びより長い遅延を遅らせる媒体を持つようにカスタマイズされ、醜い瘢痕形成又はカプセル形成を引き起こすコントロール不良治癒と過剰リモデリングを停止する。

【0010】

1. 分子量マニピュレーション

本発明の別の態様は、生分解プロファイルの最適化及び様々な種類の分子量のマニピュレーションを貫くインプラント材料の移動制御のための方法が含まれる。システムは生分解プロファイルを最適化し、インプラント材料の移動を制御する。システムは、生分解プロファイルを *hypervolumic* から *isovolumic* (等容性) そして *hypovolumic* に最適化するように、*M_n*、*M_w*、*M_z* 等のような分子量の様々な種類とその多分散性指数 (*PDI*) の周りに公式化することができる。

10

【0011】

2. フリーラジカル捕捉剤のビタミンや酵素

体内の *HA* は酸化と加水分解という2つの主な機構によって生分解される。これらの機構は、哺乳類の細胞内では、ヒアルロニダーゼ (*hyase*)、*BD* - グルクロニダーゼ、*N* - アセチル - ヘキソサミニダーゼという3つの酵素による酵素加水分解であり、細胞外では、酸素由来のフリーラジカル (時には活性酸素種 (*ROS*) とも呼ばれる) による酸化である。これらは、電子の奇数 (不対原子) の原子又は原子のグループであり、酸素が特定の分子と相互作用することにより形成され得る。

20

【0012】

ROS は細胞代謝の正常な生成物として生成される。特に、酸化的障害に繋がる主な要因の1つは、ミトコンドリアから漏れた超酸化物から変換された過酸化水素 (H_2O_2) である。カタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼは、これらの合成物を良性の分子とした酸素と水に変換することで、過酸化水素とスーパーオキシドの損傷効果をこれらの化合物に変換することによって良性分子を過酸化水素とスーパーオキシドの障害効果を向上させる。しかし、この変換は効率100%とならず、残留過酸化物が細胞内で保持される。*ROS* は、正常な細胞機能の生産物として生産されているが、過剰な量は、有害な影響を引き起こす可能性がある。記憶力は、酸化的損傷の蓄積を伴ったアルツハイマー病などのような人間変性疾患で明らかに見えるように、加齢とともに低下していく。酸化的損傷が老化の一員であるため、*ROS* の蓄積が生物の適応度を低下する可能性があることは現在の研究で証明されている。特に、年取ったネズミがミトコンドリアの代謝産物そして認知テストを与えられた研究で実証されたように、酸化的損傷の蓄積が認知機能障害につながる可能性がある。その結果によると、代謝産物を受けた後のネズミの行動がより良くなるようにでき、代謝産物が酸化的損傷を低下し、ミトコンドリア機能を向上させたことを示唆している。酸化的損傷の蓄積はその後ミトコンドリアの効果に影響を与え、さらに *ROS* 生産の割合を亢進することができる。酸化的損傷の蓄積と、老化に対するその影響は、損傷が発生した特定の組織型によって異なる / 次第です。更なる実験の結果は、酸化的損傷が脳機能における加齢に伴う低下に關与することを示唆している。年取ったスナネズミは、子スナネズミと比べれば酸化タンパク質がより高いレベルを持っていることが分かった。スピントラッピング化合物で年取ったスナネズミと子スナネズミに対する治療の結果、年取ったスナネズミには、酸化タンパク質のレベルを減少したが、子スナネズミには効果がなかった。その上、年取ったスナネズミは治療中は認知タスクに対する能力が向上してきたが、治療を中止すると、機能的能力もなくなってしまった。

30

40

【0013】

さらに、一旦これらの反応性の高いラジカルが形成されたら連鎖反応を開始することができる。

DNA や細胞膜などのような重要な細胞成分と反応したときに発生させる損傷はそれらの主な危険につながる。これが発生した場合、細胞が不十分に働いたり、死んだりするかもしれない。体は、フリーラジカル損傷を防止するために、抗酸化物質の防御体制を有し

50

ている。フリーラジカルと抗酸化物質は早速且つ簡単に反応する。

【0014】

HAの酸素由来のフリーラジカルによる分解反応は、滑液中のHAを用いた研究の結果であった。HAはスーパーオキシドのフリーラジカルによって安易に分解されたことを示している。この反応は第2級フリーラジカルの場合には最も好ましい。好中球（polymorphonuclear leukocytes - 多形核白血球）が酸素由来のフリーラジカルの種類を生産し、HA分子を摂取できるようにする。これらのWBCs（白血球）は、酸素由来のフリーラジカルの機構での、はるかにHAの排他的破壊者である。従って、本発明の1つの態様は、フリーラジカルが抗酸化ビタミン等のようなフリーラジカル捕捉剤を用いてHAを分解する前に、フリーラジカルの効果を抑制する。

10

【0015】

抗酸化剤は、癌や老化や種々の疾患につながる共通経路とする細胞損傷の防止に密接に関連している。抗酸化物質は、安全にフリーラジカルと相互作用し、重要な分子が損傷される前に連鎖反応を終了させることができる分子である。体内にフリーラジカルを捕捉するいくつかの酵素系があるにもかかわらず、微量栄養素（ビタミン）の抗酸化物質がビタミンE、ベータカロチンであり、HAの場合、ビタミンCであるという原理は例外とされる。さらに、身体の抗酸化酵素システムの一つの適切な機能に必要な微量元素というセレンは、時にはこのカテゴリに含まれる。身体自身は微量栄養素を製造できないため、食事に供給されなければならない。

20

【0016】

以下は、例の抗酸化ビタミン、それぞれの役割及び1日当たりの推奨投与量である。

【0017】

ビタミンE：d-アルファトコフェロールはナッツ、種子、植物油、魚油全、全粒穀物（特に小麦胚芽）、強化穀物、アプリコットの中に存在する脂溶性ビタミンである。一日の推奨摂取量（RDA）は、男性は15IUで、女性は12IUである。

【0018】

ビタミンC：HAの長寿に有害である場合以外では、ビタミンCはアスコルビン酸で、かんきつ類とそのジュース、ピーマン、キャベツ、ほうれん草、ブロッコリー、ケール、マスクメロン、キウイ、イチゴの中に存在する水溶性ビタミンである。RDAは、一日あたり60ミリグラムである。2000mgより上の摂取量は人によっていくつかの副作用を伴う可能性がある。

30

【0019】

ビタミンA：ベータカロチンは、ビタミンAの前駆体（レチノール）で、肝臓、卵黄、牛乳、バター、ほうれん草、ニンジン、カボチャ、ブロッコリー、山芋、トマト、カンタループ、桃、穀物の中に存在する。ベータカロチンは体内でビタミンAに変換されるので特に要件がないである。代わりに、RDAは、関係を明確にするために、レチノール当量（RE）として表される。（注：ビタミンAは抗酸化特性を有しなく、過剰に服用するとかなり有毒になることがある）

グルタチオン：（GSH）は、グリシンに垂直なペプチド結合によって結合されているシステインのアミン基とグルタミン酸側鎖のカルボキシル基との間のガンマペプチド結合を有するペプチドである。これは、フリーラジカルや過酸化物などの活性酸素種により引き起こされる重要な細胞成分の損傷を防止する抗酸化剤である。チオール基は、動物細胞では約5mMの濃度で存在する還元剤である。グルタチオンは電子供与体として機能することでシステインに細胞質タンパク質内に形成されたジスルフィド結合を還元する。このプロセスでは、グルタチオンは、L(-)-Glutathione（L(-)-グルタチオン）とも呼ばれるグルタチオンジスルフィド（GSSG）というその酸化型に変換される。

40

【0020】

一旦酸化されたグルタチオンは、NADPHを電子供与体として使用して、グルタチオン還元酵素によって再び還元される可能性がある。細胞内の酸化型グルタチオンの還元グ

50

ルタチオンの比率は、しばしば細胞毒性の測定として使用される。

【0021】

尿酸：これは、人間における最も重要な血漿抗酸化物質、および化学式 $C_5H_4N_4O_3$ という炭素・窒素・酸素・水素の複素環化合物である。尿酸は、酸性尿酸アンモニウムなどのように尿酸塩と尿酸ナトリウムとして知られているイオンと塩を形成する。尿酸はプリンヌクレオチドの代謝分解の生成物である。血液中の尿酸の高濃度は痛風として知られている、関節炎の一種に繋がることのできる。化学物質は、糖尿病や酸性尿酸アンモニウムの腎臓結石の形成を含む他の医学的疾患と関連している。

【0022】

本発明の別の態様は、HAの寿命を保護するための、抗酸化酵素の使用である。これらの酵素は、フリーラジカルを減少させ、ROSから防御することができます。それらは：

- 1 - ミクログロブリン、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ペルオキシレドキシニンである。

【0023】

3. 抗ヒアルロニダーゼおよび抗エラスターゼ

架橋結合HAを使用して老化皮膚に若々しさを取り戻すための美容増強の分野に関して、本発明の態様の一つは、ヒアルロニダーゼ阻害剤（抗HA）を使用して特にヒアルロニダーゼでHAの解重合を防止し、そしてHAの長寿を維持する。HAの長寿の維持は望ましくないしわのすることと老化の兆候と直接に関連するため重要である。

【0024】

この地球に住んでいるすべてのものにとって、HAは重要な分子である。この点で、それは、動物界中、特に軟部結合組織の細胞外マトリックス（ECM）の中で発見される多機能の分解高分子量多糖類である。HAは、多くの生物学的過程に関与し、そのレベルは、胚形成、細胞遊走、創傷治癒、悪性転換、組織代謝回転の間に著しく上昇すると考えられている。HA、ヒアルロニダーゼ（HAases）を分解する酵素は原核生物と真核生物の両方で表現されている。これらの酵素は、受精から老化まで、生理学および病理学的過程に関与することが知られている。HAのヒアルロニダーゼ媒介性分解は、結合組織の浸透性を増加させ、体液の粘度を低下させ、また細菌性病因、毒素・毒液の広がり、先体反応/卵子受精、癌の進行に関与している。さらに、これらの酵素は、病原体と宿主細胞表面との間の直接的な接触を促進することができる。またHAの解重合はECMの役割に悪影響を及ぼし、シグナル伝達に関与する成長因子、サイトカイン、種々の酵素の保有宿主としての活動を弱める。従って、HA分解の阻害は、疾患（の）進行と毒素・毒液、細菌性病因の広がりを抑えるのに重要なことかもしれない。ヒアルロニダーゼ阻害剤は、HAの同化と異化のバランスを維持することに関与している強力な普遍的な調整液である。ヒアルロニダーゼ阻害剤は避妊薬と抗腫瘍剤として機能し、抗菌活性・抗毒液活性・抗毒素活性を及ぼす可能性があります。さらに、これらの分子はHAとヒアルロニダーゼの生理学および病態生理学的役割を研究する薬理的ツールとして使用することができる。

【0025】

HA分解におけるヒアルロニダーゼの機構は、一般的に下記5ステップに従う。

【0026】

10

20

30

40

【表 1】

ステップ 1.	酵素は、疎水性パッチを構成する陽性の残基を用いた結合溝で負に帯電した基質を結合する。
ステップ 2.	これは、Asn 349、His 399、Tyr 408 という触媒残基と関与し、二糖最終生産物の生成と接着する β 1-4 の開裂をもたらす触媒のステップである；
ステップ 3.	次回の触媒作用（反応）を準備するように、酵素をその自然な状態に戻すための、酵素と水の微小環境との間の水素交換触である；
ステップ 4.	裂け目に負のパッチを利用することによって二糖生産物のリリースの不可逆ステップである。
ステップ 5.	基質の還元末端に向かっての、1 二糖単位によるの、残存 HA の転座である。

10

20

【 0 0 2 7 】

以下の表は、ヒアルロニダーゼ阻害剤の例を示す。

【 0 0 2 8 】

【表 2】

List of different class of hyaluronidase inhibitors

Type of compound	Compounds	Source of hyaluronidase
Alkaloids	Aristolochic acid, ajmaline, reserpine	Snake venom
Antioxidants	Ascorbic acid, NDGA, <i>N</i> -propyl gallate, BHT, chlorogenic acid, curcumin, tannic acid	Snake venom, microbial
Anti-inflammatory drugs	Dexamethasone, indomethacin, sodium cromoglycate, salicylates, tranilast, sodium aurothiomalate, myocerin, gossypol,	Snake venom, bee venom, testis
Terpenoids/ flavonoids	Flavone, Fenoprofen, Quercetin, Apigenin, Kaempferol, Silybin, Luteolin, Hesperidin, Triterpenes, Rutin, Myricetin, Glycyrrhizin, Glycyrrhetic acid	Snake venom, testis, microbial
Synthetic compounds	PS ₅₃ (Hydroquinone-sulfonic acid-formaldehyde polymer), phosphorylated hesperidin, polymer of poly (styrene-4-sulfonate), sodium cellulose sulfate, 1-tetradecane sulfonic acid, L-arginin derivatives, traxanox, norlignane, urolithin B, aescin, diphenylacrylic acids, diphenyl propionic acids, indole derivatives, chalcone derivatives.	Snake venom, bee venom, testis, Hyal-1
Glycosaminoglycans and glycosides,	Heparin, heparan sulfate, dermatan sulfate, chondroitin sulfate (A, C, D), O-sulfated HA, linamarin, amygdalin,	Snake venom, human serum, bee venom, testis
Fatty acids	Saturated (C _{10:0} to C _{22:0}), <i>cis</i> -unsaturated fatty acids (C _{14:1} to C _{24:1})	Microbial, testis
Polysaccharides/ oligosaccharides	Chitosans, dextran sulfate, sodium alginate, plantose derivatives, hydrochinone digalactoside, 2-hydroxyphenyl manolactobioside, sulphated neomycin, verbascode, lanostanoids	Snake venom, testis, bee venom, HA lyase
Other proteins	<i>Withania somnifera</i> glycoprotein (WSG), Serum hyaluronidase inhibitor	Snake venom, bee venom, Hyal-1, testis
Other reagents	HCN, L-NAME, L-arginine, Guanidium HCl	HA lyase

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 9 】

【図 1】多重架橋 HA を直列に製造する模範的なシステムを示す。

40

【図 2】多重架橋 HA を直列に製造する別の模範的なシステムを示す。

【図 3】結果として得られる多重架橋 HA の模範的な図を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 0 】

まず、ヒアルロン酸の準備が相談され、そして、皮膚又は皮下の使用のためのヒアルロン酸の使用を高める追加化学物質の追加が相談される。

【 0 0 3 1 】

組換えパチルス細胞のヒアルロン酸が培地に直接表現されるので、簡単な処理は、培地からヒアルロン酸を単離するために使用することができる。まず、パチルス細胞及び細胞残屑は物理的に培地から除去される。必要に応じて媒体の粘度を低減するために、培地が

50

最初に希釈されることもある。例えば、遠心分離または精密濾過等のように、培地から細胞を除去する多くの方法は、当業者によく知られている。必要に応じて、残りの上清は、ヒアルロン酸から小分子汚染物質を濃縮して除去するために、例えば、限外濾過などによって濾過される可能性がある。細胞と細胞残屑の除去に続いて、培地からのヒアルロン酸の簡単な沈殿は既知の機構によって実行される。塩、アルコール、又はその塩とアルコールの組み合わせは、濾液からヒアルロン酸を沈殿させるために使用することができる。一度沈殿物に還元されたら、ヒアルロン酸は容易に物理的手段により溶液から単離される可能性がある。ヒアルロン酸は、例えば凍結乾燥または噴霧乾燥などの当業者にはよく知られている蒸発技術を用いて、濾液溶液から乾燥又は濃縮させられることができる。

分子量

ヒアルロン酸の含有量は、修正カルパゾール法に従って決定されることができる (Bitter と Muir, 1962, Anal Biochem. 4: 330-334)。そのうえ、ヒアルロン酸の数平均分子量は、例えば、上野ら、1988、Chem. Pharm. Bull. 36, 4971-4975; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272: 1-40; Wyatt Technologies, 1999, "Light Scattering University DAWN Course Manual" and "DAWN EOS Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, Califなどによって記述されたように、当該技術分野において標準方法を用いて決定することができる。

一実施形態では、1つの実施形態のヒアルロン酸またはその塩は、約10,000~約10,000,000 Daの分子量を有する。より好ましい実施形態では、約25,000~約5,000,000 Daの分子量を有する。最も好ましい実施形態では、ヒアルロン酸は、約50,000~約3,000,000 Daの分子量を有する。

【0032】

他の実施形態では、ヒアルロン酸またはその塩は、300,000~3,000,000の範囲内の分子量を有する。好ましいのは400,000~2,500,000の範囲内であり、より好ましいのは500,000~2,000,000の範囲内であり、最も好ましいのは600,000~1,800,000の範囲内である。

【0033】

さらに別の実施形態において、ヒアルロン酸又はその塩は、10,000~800,000 Daの範囲の低い数平均分子量を有する。好ましいのは20,000~600,000 Daの範囲内であり、より好ましいのは30,000~500,000 Daの範囲内であり、さらにより好ましいのは40,000~400,000 Daの範囲内であり、最も好ましいのは50,000~300,000 Daの範囲内である。

【0034】

実例

例1・エマルジョンにおけるDVS架橋結合微粒子の調製

この例では、DVS架橋結合微粒子の調製を例示する。ヒアルロン酸ナトリウム (HA、580 kDa 1.90 g) は、室温で3時間、均質な溶液が得られるまで強く攪拌され、NaOH水溶液 (水酸化ナトリウム) (0.2 M、37.5 mL) で溶解させられた。塩化ナトリウム (0.29 g) 添加されて短い時間で混ぜられた。鉱油 (10.0 g) 及びABIL (登録商標) EM 90界面活性剤 (Cetyl PEG/PPG-10/1 Dimethicone, 1.0 g) は攪拌によって混合された。

【0035】

ジビニルスルホン (DVS、320マイクロリットル) は、水性アルカリHA溶液に添加され、液相で均一な分布を得るように1分間で混合された。次いで、水相は、低速で機械的に攪拌されることで油相に2分以内に添加された。エマルジョンは直ちに形成され、攪拌は室温で30分間で継続された。エマルジョンは室温で夜通しで放置された。エマルジョンは、水溶液HCl (4 M, 約2.0 mL) を添加することによってpH7.0

10

20

30

40

50

に中和され、約40分間攪拌された。

【0036】

例2・pH指示薬使用の中和されたエマルジョンにおけるDVS架橋結合微粒子の調製

この例では、pH指示薬を用いた中和法でDVS-架橋結合微粒子の調製を例示する。ヒアルロン酸ナトリウム(HA、580 kDa、1.88 g)は、室温で2時間、均質な溶液が得られるまで強く攪拌され、NaOH水溶液(水酸化ナトリウム)(0.2 M、37.5 mL)で溶解させられた。プロモチモールブルーのpH指示薬(6.6-6.8のpH範囲相当)は添加された(15滴、溶液中の青色)。塩化ナトリウム(0.25 g)が添加して短い時間で混ぜられた。

【0037】

鉱油(10.0 g)およびABIL(登録商標)EM90界面活性剤(セチルPEG/PPG-10/1ジメチコン、1.0 g)は攪拌で混合された。

【0038】

ジビニルスルホン(DVS、320マイクロリットル)は水性アルカリHA溶液に添加され、液相で均一な分布を得るように30~60秒間で非常に強く混合された。その後、水相は、機械的に400 RPMで攪拌されることで、30秒以内油相に添加された。エマルジョンは直ちに形成され、攪拌は室温で30分間で継続された。中和は水溶液HCl(4 M、1.6 mL)を添加することにより行われ、エマルジョンは4時間の磁気攪拌で室温で放置した。ゲル粒子の中に含まれるpH指示薬の色が緑に変わった。エマルジョンのpHは3-4のpHスティックで測定された。エマルジョンは夜通しで冷蔵庫に残された。ゲル粒子中に含まれるpH指示薬は黄色に変わった。

【0039】

例3・エマルジョンの相分離及び微粒子の膨潤・単離

この例では、W/Oエマルジョン(油中水滴型エマルジョン)の切断、そして相分離と透析について例示する。架橋結合HA微粒子は有機溶媒抽出によってW/Oエマルジョンから分離された。W/Oエマルジョン(5 g)はn-ブタノール/クロロホルムの混合物(1/1 v%、4.5 mL)と共に、室温で試験管の中での旋回混合によって強く混合された。余分なMQ-水(20 mL)を添加されて相分離を得た。試験管が遠心分離され、有機相の下相、ゲル粒子の中相、透明な水溶液の上相という3つの相が得られた。上相と下相は廃棄され、ゲル粒子の中相は透析管(MWCO12-14, 000、直径29 mm、体積/長さ6.4 mL/cm)の中に移した。試料はMilliQ(登録商標)水で室温で夜通しで透析された。透析液はさらに2回変更され、夜通しで放置された。得られたゲルは厚くて粘性で、0.004 g HA/cm³相当約50 mLの体積に膨潤されていた。

【0040】

例4・エマルジョン内のDVS架橋結合の調製及び微粒子の分離

この例では、DVS架橋結合HA微粒子の調製を例示する。ヒアルロン酸ナトリウム(HA、580 kDa、1.89 g)はNaOH水溶液(0.2 M、37.5 mL)で溶解させられた。塩化ナトリウム(0.25 g)が添加され、均質な溶液が得られるまでその溶液を室温で1時間で磁気攪拌した。TEGOSOFT(登録商標)M(10.0 g)油及びABIL(登録商標)EM90界面活性剤(セチルPEG/PPG-10/1ジメチコン、1.0 g)は攪拌で混合された。

【0041】

ジビニルスルホン(DVS、320マイクロリットル)は水性アルカリHA溶液に添加され、液相で均一な配布を得るように1分間で混合された。次いで、水相は、機械的に攪拌される(300 RPM)ことで油相に2分以内に添加された。エマルジョンが直ちに形成され、攪拌は室温で30分間で継続された。

【0042】

エマルジョンは、当量のHCl(4 M、1.8 mL)を添加して約40分間で攪拌することで中和された。エマルジョンは、n-ブタノール/クロロホルムの混合物(1/1

10

20

30

40

50

v % 90 mL) 及び余分の Milli Q (登録商標) - 水 (100 mL) を添加してから磁気攪拌することによって壊された。上相は約 175 mL の体積に分離された。有機相は最終洗浄として mQ 水 (30 mL) と一緒に混合された。結合の水/ゲル相 (205 mL) を透析管 (MWC012-14, 000、直径 29 mm、体積/長さ 6.4 mL/cm) に移され、室温で Milli Q (登録商標) 水に対して夜通しで透析された。導電率は、水の後の変更 (3 回) 及び夜通しの透析 (2 夜) の後、0.67 micro-Siever t/cm に減少した。微粒子は顕微鏡法 (DIC 200 倍) により評価された。図 1 を参照してください。1 つの微粒子の断面が “21, 587.92 nm” とし示され、標識された。

【0043】

10

例 5・エマルションの相分離及び微粒子の単離

この例では、W/O エマルション (油中水滴型エマルション) の破損及びゲル微粒子の単離を例示する。ゲル微粒子を有機溶媒抽出法によって W/O エマルションから分離された。この抽出に使用した有機溶媒の例は、それぞれ 75 : 20 ~ 20 : 80 の体積比 (v %) でのブタノール/クロロホルムの混合物である。W/O エマルションと有機溶媒との重量比 (w %) は約 1 : 1 となる。

小規模での分離 : W/O エマルション (5 g) はを遠心分離管 (50 mL) で秤量された。ブタノール/クロロホルムの混合物が調製され (1 : 1 v %)、この中から 4.5 mL (5 g 相当) の混合物を試験管に添加された。エマルション全体が溶解されたことを確保するために試験管が慎重に混合された。試験管が旋回混合により混合され、相分離のために室温で放置された。水相の上相、エマルション相の中相、有機相の下相のある相分離はしばしば観察された。より多くの水相と有機相の添加は分離を向上させる。水相は上澄みの液を静かに移すことで分離され、更に精製され、又は特徴付けられた。

20

【0044】

例 6・W/O エマルション (油中水滴型エマルション) の調製

この例では HA 微粒子が形成された組成物を例示する。

【0045】

熱油相の中に冷たい水相 B を取り込む冷温手順は使用でき、製造時間が短くなります。公式化の非限定例は、次のとおりである。

【0046】

30

A 相 :

2.0 % ABIL (登録商標) EM 90 (セチル PEG / PPG - 10 / 1 ジメチコーン)

20.0 % 鉱油 (又は TEGOSOFT (登録商標) M)

B 相 :

0.5 % 塩化ナトリウム

3.8 % ヒアルロン酸

0.2 M NaOH (水溶液) 最大 100 % まで

C 相 :

約 0.6 % ジビニルスルホン

40

調製 :

1 . A 相を室温で混合する。

【0047】

2 . B 相 : ヒアルロン酸 (Hycare (登録商標)) を NaOH 水溶液の中で攪拌で可溶化し、NaCl を添加して攪拌する。

【0048】

3 . 相 B に DVS を添加して 1 分間で攪拌する。

【0049】

4 . 相 B をゆっくりと相 A に添加しながら攪拌する。

【0050】

50

5 . 短時間で均質にする、或いは攪拌してから反応させるためにそのまま放置する。

【0051】

6 . 攪拌と膨潤。

【0052】

7 . 30 未満の状態では攪拌を続ける。

【0053】

8 . 中和する。

【0054】

例7・DVS架橋結合微粒子の調製及び分離

ヒアルロン酸ナトリウム (HA、580 kDa、1.88 g) は NaOH 水溶液 (0.2 M、37.5 mL) の中で溶解させられた。塩化ナトリウム (0.25 g) が添加され、均質な溶液が得られるまでその溶液を室温で1時間で磁気攪拌した。TEGOSOFT (登録商標) M (10.0 g) の油及びABIL (登録商標) EM 90 (セチル PEG / PPG - 10 / 1ジメチコン、1.0 g) の界面活性剤は攪拌で混合された。ジビニルスルホン (DVS, 320 microliter) は水性アルカリ HA 溶液に添加され、液相で均一な分布を得るように1分間で混合された。次いで、水相は、機械的に攪拌される (300 RMP) ことで油相に2分以内に添加された。エマルジョンは直ちに形成され、攪拌は室温で30分間で継続された。

【0055】

エマルジョンは、当量の HCl (4 M、1.8 mL) を添加して約40分間で攪拌することで中和された。エマルジョンは、分液漏斗に移され、n-ブタノール/クロロホルム混合物 (1:1 v%, 90 mL) 及び余分の Milli Q (登録商標) 水 (100 mL) を添付してから強く振り混ぜることによって壊された。上相は約175 mL の体積に分離された。有機相は Milli Q (商標) 水 (100 mL) と一緒に混合されて洗浄された。結合の水/ゲル相を透析管 (MWCO 12 - 14, 000、直径 29 mm、体積/長さ 6.4 mL / cm) に移され、室温で Milli Q (登録商標) 水に対して夜通しで透析された。導電率は、水の後の変更 (3回) 及び夜通しの透析 (2夜) の後、10 micro-Siever / cm に減少した。

【0056】

例8・微粒子精製用の洗浄法

この例では微粒子の最終単離及び精製を例示する。

【0057】

以前に分離された 100 mL の粒子が Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ 緩衝液 (0.15 M、400 mL) の中に再懸濁され、0.5 時間でゆっくり攪拌された。懸濁液は5の状態では2時間で放置され、固まった油が除去された。次いで、溶液がメッシュを通して濾過され、緩衝液の 2 x 50 mL でさらに洗浄された。粒子は、特性化の前に、ドリップドライすることができた。

【0058】

例9・微粒子のレオロジー特性の調査

この例では粒子に関するレオロジー的な研究の実施を例示する。粒子試料は、50 mm² のコーンプレート形状を用いて、Anton Paar レオメータ (アントンパール有限責任会社、グラーツ・オーストリア、Physica MCR 301、ソフトウェア: Rheoplus) で分析される。まずは、素材の粘弾性模型 G' (貯蔵弾性率) と G'' (損失弾性率) の線形範囲が可変歪み で振幅掃引によって決定される。次は、調波数掃引が行われ、粘弾性模型値及び G' と G'' の値に基づいて、タンジェント が強い・弱いゲル挙動の値として算出されることが出来る。

【0059】

例10・テクスチャ解析での注射器能力実験の調査

この例では、試料の均質性の機能として、一定の速度で注入するために加えられた力の調査 を実施することを例示する。粒子試料は、27 G x 1 / 2 " 又は 30 G x 1 / 2

10

20

30

40

50

”の針を付けた注射器に移され、テクスチャ解析装置（ステイブル、マイクロシステムズ Stable Micro Systems, Surrey, UK, TA.XT Plus, Software: Texture Component 32）で試料の用具の中に置かれる。実験は、一定の距離で12.5mm/分の射出速度で行われる。

【0060】

例11・DVS架橋結合HAヒドロゲルの調製

この例では、同時膨潤及びpH調整でDVS架橋結合HAヒドロゲルを調製することを例示する。

【0061】

ヒアルロン酸ナトリウム（HA、770 kDa、1g）は、0.2M NaOHで溶解させられて、1時間で約20の室温で攪拌された4%（体重/体積）の溶液を得た。3つの反復が調製された。次いで、それぞれ10:1、7:1、5:1のHA/DVSの重量比を得られるように、十分な量のジビニルスルホン（DVS）がHA溶液に添加され。これらの混合物は5分間で室温で攪拌された後、1時間で室温で放置された。次いで、ゲルは表1に示すように、160mLのリン酸緩衝液（pH4.5又は6.5）の中で24時間で膨潤された。

10

【0062】

【表3】

表1		
DVS-HAヒドロゲルの調製の条件		
ゲルID	HA/DVS 重量比	膨潤用のリン酸緩衝液
1	5:1	160mL (pH 4.5)
2	7:1	80mL (pH 4.5) + 80mL (pH 6.5)
3	10:1	160mL (pH 6.5)

20

【0063】

ゲルのpHは、膨潤工程中に安定化させていた。膨潤された後、余分な緩衝液は濾過により除去され、ヒドロゲルはIKA（登録商標）ULTRA-TURRAX（登録商標）T25ホモジナイザー（Ika Labortechnik, DE）を用いて簡単に均質化された。ゲルの体積とpHは測定された。（表2参照）

30

【0064】

【表4】

DVS-HAヒドロゲルの特徴						
ゲル	HA/DVS	膨潤ゲルの体積	HA濃度 (con c.)	pH	状態	柔らかさ
ID	重量比		体重/体 積 (w/ v)			
1	5:01	70 mL	1.40%	7.1	透明、均 質	+
2	7:01	70 mL	1.40%	7.6	透明、均 質	++
3	10:1	70 mL	1.40%	7.5	透明、均 質	+++

10

【0065】

ヒドロゲルのpHは、7.1から7.6の範囲にあった(表2)。これは、膨潤工程がこのプロセスでのpHを調整するために使用できることを確認しました。全てのヒドロゲルは、HA濃度の約1.4%(重量/体積(w/v))に相当する70mLの体積を占めていた。これらは透明で均質で粘着性があった。柔らかさは、架橋度の減少と共に増加した(表2参照)。

20

【0066】

例12・均質DVS架橋結合HAヒドロゲルの調製

この例では、非常に均質なDVS架橋結合HAヒドロゲルの調製を例示する。

【0067】

ヒアルロン酸ナトリウム(770 kDa、2g)は約1時間で室温で0.2MのNaOHに溶解されて8%(体重/体積)の溶液を得た。HA/DVSの重量比が7:1になるように、DVSが添加された。5分間で室温で攪拌された後、試料の1つは、2時間で50で攪拌なしで熱処理され、夜通しで室温で放置された。出来上がった架橋結合ゲルは、42又は55時間で37で200mLのリン酸緩衝液(pH 5.5)に膨潤されてから、最終的に廃棄された100mLの水で2回洗浄された。また、その体積、pH、及び27G*1/2の注入針を通して注入するために必要な圧力は測定された。(表3参照)

30

この例に従って調製された架橋結合HAヒドロゲルは、熱処理されていない対照ヒドロゲルに比べてより高い膨潤比及び増加した柔らかさを得たことを示した(表3)。27G*1/2の針を通しての注入中に加えた圧力は後者の試料のそれよりも安定であり、架橋結合HAヒドロゲルがより均質であることを示す。

40

【0068】

DVS-HAヒドロゲルの特徴

【0069】

【表 5】

熱処理	膨潤ゲルの体積	HA濃度	pH	状態	柔らかさ	注入中の圧力の安定性
有り	145 mL	1.40%	6.1	透明、均質	+++	+++
無し	90 mL	1.10%	6.7	透明、均質	+	+

【0070】

例 13・DVS 架橋結合 HA ヒドロゲルの生物学的安定性

この例では、酵素分解を用いた DVS 架橋結合 HA ヒドロゲルのインビトロ生物学的安定性を例示する。

【0071】

ウシ睾丸ヒアルロニダーゼ (HAase) 溶液 (100 U/mL) が 30 mM のクエン酸、150 mM の Na_2HPO_4 、150 mM の NaCl (pH 6.3) で調製された。DVS-HA 架橋結合ヒドロゲルの試料 (約 1 mL) は安全ロックのガラスバイアルに入れられ、凍結乾燥され、秤量された (W_0 ; 公式 1)。酵素溶液 (4 mL、400 U) は各資料毎に添加され、バイアルは軽く揺することで (100 - 200 rpm) 37 で培養された。一定時間ごとに、上清は除去され、そして試料は残留塩を除去するように蒸留水で完全に洗浄された。その後凍結乾燥され、そして最後に秤量された (W_t 、公式 1)。

【0072】

生分解は、試料の重量損失と初期重量との比率として表される (公式 1)。重量損失は酵素分解テストの前後の各試料毎の重量の減少から算出された。生分解実験はそれぞれ 3 回繰り返された。例 2 で述べたように調製された DVS-HA ヒドロゲル ('熱処理有り') は、熱処理されていない DVS-HA ヒドロゲル ('処理熱無し') と比較された。ゲルの両方のタイプは、分解が最初の 4 時間の間に速かったが、その後 24 時間で完了するまでだんだん遅くなってきた。重要なことには、例 2 で述べたように熱処理工程を用いて調製されたヒドロゲルと比較して、熱処理されていない試料の重量損失の著しい変動があった。これは非常に均質な DVS 架橋結合ヒドロゲルが例 2 で述べた方法を持ち言えて得られることを明らかに示している。

【0073】

例 14・化粧品用 W/O エマルション (油中水滴型エマルション) の調製

この形態及び以下の例では、DVS 架橋結合 HA ヒドロゲルは、肌へのばすと肌の湿潤性と弾力性を増加させるクリームと血清の中に配合された、即時の老化防止効果及び塗膜形成効果をもとらす。

【0074】

W/O エマルションの典型的な製剤は、2% の DVS 架橋 HA を含む。各相 (A ~ E) は、それぞれ確定した成分を混合することによって別々に調整された (表 4 参照)。次いで、相 B は相 A に添加され、40 未満で機械力で推進する攪拌装置で攪拌された。相 C、そして相 D と相 E は添加され、攪拌された。HA ヒドロゲルの濃度がそれぞれ 4%、6%、8% の製剤も W/O 製剤の範囲を与えるように相 D で作製された。

【0075】

【表 6】

相	成分	割合 (w/w)	機能	
A	シクロペンタシロキサン、ジメチ コーン	10%	皮膚軟化剤	
	シクロペンタシロキサン	15%	皮膚軟化剤	
	シクロペンタシロキサンと	4%	乳化剤	10
	PEG/PPG-20/15ジ メチコーン			
	水添ポリデセン	8%	皮膚軟化剤	
B	水	49.3%		20
	塩化ナトリウム	0.2%		
C	酢酸トコフェロール	0.5%	抗酸化物質	
D	DVS架橋結合			
	ヒアルロン酸ナトリウム	2%		
	水	10%		30
E	フェノキシエタノール、エチルヘ キシルグリセリン	1%	防腐剤	

【0076】

2%のDVS架橋HAを含む、W/Oエマルジョンの別の典型的な製剤は、表5に示される。表5での各相(A~F)はそれぞれ確定した成分を混合することによって別々に調整された。相Bは相Aと一緒に混合され、その得られた油相は75で加熱された。相Cも75まで加熱された。油相は75で相Cに添加されて機械力で推進する攪拌装置で攪拌された。次いで、このエマルジョンは40未満に冷却された。相D、そして相Eと相Fは添加され、攪拌された。HAヒドロゲルの濃度がそれぞれ4%、6%、8%の製剤もW/O製剤の範囲を与えるように相Eで作製された。

40

【0077】

【表 7】

相	成分	割合 (w/w)	機能	
A	水添ポリデセン	18%	皮膚軟化剤	
	アクリレート/C10-30			
	アクリル酸	1%	増粘剤	10
	アルキルクロスポリマー			
B	ココイルグルタミン酸ナトリウム	10%	乳化剤	
C	水 (溶液)	53.5%		
D	リン酸架橋デンプン	2%	テクスチャ 物質	
	酢酸トコフェロール	0.5%	抗酸化物質	
	シクロペンタシロキサン、ジメ チコーン	2%	感剤・展着剤	20
E	架橋ヒアルロン酸 ナトリウム	2%		
	水 (溶液)	10%		
F	フェノキシエタノール、 エチルヘキシルグリセリン	1%	防腐剤	

30

【0078】

例 15・シリコン血清の調製

表 6 に示されるように、2%の DVS 架橋 HA を含むシリコン血清の典型的な製剤は調製された。全ての成分は、40 未満で高速攪拌で同時に混合された (表 6 参照)。HA ヒドロゲルの濃度がそれぞれ 4%、6%、8% の製剤も血清の範囲を与えるように相 E で作製された。

【0079】

【表 8】

表 6

成分	割合 (w/w)	機能
シクロペンタシロキサン	60%	シワぼかし効果
アルキル (C30-45) セテア リルジメチコンクロスポリマー クロスポリマー		増粘剤、賦形剤
シクロペンタシロキサン	34.5%	賦形剤、皮膚軟化剤
ポリメチルシルセスキオキサン	2.5%	柔らかい粉末状の感触
架橋ナトリウム ヒアルロン酸塩	2%	
フェノキシエタノール、エチルヘ キシルグリセリン	1%	防腐剤

10

20

【0080】

例 16・膨潤中の pH 平衡；速度論研究

速度論研究は、中性 pH の DVS 架橋結合 HA ヒドロゲルが架橋度に応じて、8 ~ 14 時間でリン酸緩衝液 (pH 7.0) での膨潤後得られることを示した。DVS 架橋結合 HA ヒドロゲルのセットは、上記で説明したように、4% ~ 8% の HA 溶液及び DVS 架橋剤の種々の量を用いて調整され、表 7 に示される。

【0081】

【表 9】

表 7

エントリー	初期の HA 濃度 (w/v)	HA/DVS 重量比
1	4%	2.5 : 1
2	6%	1.5 : 1
3	8%	1.5 : 1
4	6%	1.0 : 1

30

【0082】

定期的に (2 時間毎)、ヒドロゲルは、熱処理中に除去されて上澄みの液を静かに移され、そして pH は測定された (図 2 参照)。新鮮膨潤緩衝液は毎回の測定後に使用された。結果として、全てのヒドロゲルの pH は、膨潤の 2 時間後の場合は 1.1 ~ 1.2 の間であり、その後は徐々に 7.2 ~ 7.5 に低下してきた。

40

【0083】

ヒドロゲルの架橋結合は緩ければ緩いほど、言い換えれば、HA/DVS の比率が高ければ高いほど、その低下が早いであった。HA 6% の溶液の場合及び、HA・DVS の 2 つの異なる比率の場合の pH の低下は、図 2 のように示されている。その中で、HA/DVS 比率が 1.0 : 1 の場合は三角で標識され、HA/DVS 比率が 1.5 : 1 の場合は四角で標識される。これらの 2 つ場合では、pH は 8 時間内で中和された。それに対して、

50

中性 pH には、より高い HA 濃度（例えば 8%）又はより高い架橋度（例えば 2.5 の HA / DVS 比率）のヒドロゲルの膨潤の 14 時間後達成できた。これらの観察は、低い架橋結合ヒドロゲルでの HA 分子がより大きな自由度と柔軟性を示し、十分な水分補給とそれによってより高速な pH 平衡をもたらすことができる。

【0084】

例 17・DVS 架橋結合 HA に基づくヒドロゲルの粘弾性模型の属性

レオロジー測定は、ある一定の温度下でプレートプレート形状を用いて Physica MCR レオメータ（Anton Paar、オストフィルデルン、ドイツ）で行われた。試料の粘弾性挙動は、素材が正弦波せん断歪みを受けた、動的振幅せん断振動のテストで調査された。まず、歪み・振幅掃引の実験は、線形粘弾性が有効の変形の領域を評価するために実施された。歪みの典型的な範囲は 0.01 ~ 200% であり、周波数は 1 Hz に設定された。次に、線形粘弾性の領域において、せん断貯蔵（弾性）率（又は弾性率 G' ）及びせん断損失弾性率（又は粘性率 G'' ）の値は、一定せん断歪み（10%）と 0.1 ~ 10 Hz の間の周波数として、周波数掃引の実験から記録された。形状、NF、ギャップはそれぞれ PP25、2、1 mm であった。

10

【0085】

G' は、変形中の素材に蓄えられた弾力性又はエネルギーに関する情報を提供するのに対し、 G'' は、粘性特徴又は熱として消費したエネルギーについて説明する。特に、弾性率は、試料が荷重を持続して負担ストレス又は変形の後、初期構成に戻すその能力についての情報を提供する。全ての実験では、各資料は少なくとも 3 回測定された。

20

【0086】

より高い架橋度のあるヒドロゲル（即ちより低い HA / DVS 比：10 / 1）の場合、 G' が G'' より 1 桁高いである。これは、この試料が強いゲル素材として挙動することを示す。簡単に言えば、全体的なレオロジー応答は、物理架橋と化学架橋の貢献、及び高分子間の位相的な相互作用によるものです。チェーンの間での相互作用は、ストレスを解消できないその固有移動度の還元をもたらし、その結果、素材は、負荷ストレスの適応（調節）の基本モードがネットワークの変形によって行われる 3 次元ネットワークとして挙動する。更に、このヒドロゲルは、より低い架橋度のあるヒドロゲル（即ちより高い HA / DVS 比：15 : 1）よりも弾力性がある。実際に、永久的な共有結合性の架橋結合の数及びエンタングルメントの数が高ければ高いほど、ヒドロゲルの弾性応答も高いである。

30

【0087】

例 18・防腐剤での架橋結合 HA / DVS ヒドロゲル

DVS 架橋結合 HA ヒドロゲルは、6% (w/v) の溶液を得るように、0.2 M NaOH 中の 1.5 g のナトリウム HA を用いて調製された。HA / DVS 重量比は、10 : 1 であった。ヒドロゲルは、例 2 に記載された手順の膨潤ステップまで、3 つの反復で調製された。その後、次のように処理された。2 時間で 50 のオープンでの定温放置の後、ヒドロゲルは防腐剤（2-phenoxylethanol / 3 [(2-ethylhexyl)oxy] 1, 2-propanediol）が入っている $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液（1 L, 50 mM, pH 7.0）に浸漬された。

【0088】

防腐剤の濃度は 10 mL / mL であって、膨潤されたヒドロゲル中に 1% (v/v) の最終濃度を対象とする。防腐剤が定温放置中に、ヒドロゲルの中に拡散することが予想され、同時に、緩衝液内の微生物汚染を防止することができる。

40

容器はパラフィルムで覆われて、37 のオープンで入れられた。1 時間後、膨潤浴は除去され、ヒドロゲルは、6 ~ 7 時間で 10 mL / mL の防腐剤が入っている新鮮リン酸緩衝液で膨潤された。この工程は、膨潤時間が 12 時間になるまで繰り返され、6 - 7 時間で 10 mL / mL の防腐剤を含有する新鮮なリン酸緩衝液中で膨潤された。膨潤時間が 12 時間になるまでこの工程を繰り返し、その後 pH が測定された。膨潤は、中性の pH に達するようにさらに 2.5 時間続けた。

【0089】

50

ヒドロゲルに組み込まれた防腐剤の量は、UV - 分光光度計 (Thermo Electron, Nicolet, Evolution 900, equipment nr. 246-90) により決定された。リン酸緩衝液中の防腐剤の A1% (v/v) の溶液はまず、分析されて波長を選択した。約 5 mL のヒドロゲルをピペットを用いて採取された。試料は通常、膨潤された丸いヒドロゲルの中心及び、丸いゲルの北、東、南、西の「側」に採取される。

【0090】

次いで、試料はキュベットに移され、吸光度は 292 nm で読み取られた。各試料はそれぞれ 3 回読み取られ、吸光度は、防腐剤を含まないブランク DVS 架橋結合 HA ヒドロゲルに対してゼロにした。

10

【0091】

その結果、DVS - HA ヒドロゲルに組み込まれた防腐剤の量が 0.91% ~ 1.02% の間の範囲であったことを示した (表 10 参照)。複製の間に非常に良好な再現性があった。重要なのは、同じヒドロゲルからの試料の間の有意差が観察されなく、ヒドロゲル中に防腐剤の均一な拡散を示している。

【0092】

【表 10】

表 8

14. 5 時間で 1% 防腐剤入りのリン酸緩衝液中で膨潤された上で DVS-HA ヒドロに組み込まれた防腐剤の量

20

試料 ID	試料サイト	吸光度*	防腐剤濃度	平均濃度
		(292nm)	(%, v/v)	(%, v/v)
反復 1	中心	0.072	1.02	0.91
	側	0.058	0.82	
	側	0.066	0.94	
	側	0.057	0.81	
反復 2	側	0.068	0.97	1.02
	真ん中	0.076	1.08	
	側	0.069	0.98	
	側	0.082	1.17	
反復 3	側	0.071	1.01	1.02
	側	0.062	0.88	
	真ん中	0.083	1.18	
	側	0.074	1.05	
反復 3	側	0.069	0.98	1.02
	側	0.066	0.94	
	側	0.068	0.97	

30

40

【0093】

例 19・生分解性の高分子の選択肢

__ 分解時間は下記の表 1 中での高分子混合物に基づいて調整することができる。以下の例 1 及び例 2 は、薬物のリリースを制御するための生分解性高分子への、薬物又は薬物のマトリックス組み込みの例である。

【0094】

50

表 1：生分解の時間と成分

高分子分解時間

(mos)

50 : 50	DL - PLG 1	-	2	
65 : 35	DL - PLG			3 - 4
75 : 25	DL - PLG 4	-	5	
85 : 15	DL - PLG			5 - 6
DL - PLA		12	-	16
L - PLA		> 24		
PGA		6	-	12
PCL		> 24		

10

生分解性の高分子の様々な種類は、分解時間の制御及び / 又は分解副産物の制御のために使用することができる。以下は幾つかの生分解高分子である。

【0095】

・ PGA、PLAとそれらの共重合体は、基本PLA / PGAテーマ内の高分子の組成物を変更することによって調整できるそれらの属性のため、程度最もよく利用される生分解性の高分子素材である。

【0096】

o ポリグリコール酸 (Polyglycolic acid - PGA) は加水分解が起こりやすい

20

o ポリ乳酸 (Polylactic acid - PLA) は、加水分解度を制限する混合物中にある時に形成する結晶領域様のため様々な生分解タイミングでのこれらの結果のD及び / 又はL光学異性体の混合物に存在する。

【0097】

・ Polydioxanone (PDS) ポリジオキサノン (PDS)

・ Poly (- caprolactone) ポリ (- カプロラクトン)

・ Poly (DL - lactide - co - - caprolactone) ポリ (DL - ラクチド - co - - カプロラクトン)

30

界面活性剤選択肢：

マイクロカプセルの粒径は有機相と水相の界面化学によって直接に制御される。界面活性剤はしばしば、油性物質と水性環境との間の界面化学を仲介するために使用される。界面活性剤は水溶液の中にある洗剤である。界面活性剤は、極性と無極性の両方の末端を持つ巨大分子である。分子の極性末端、また極性分子は水にくっつく。分子の無極性末端はNAPL (非水相の液体) 合成物を引き付ける。

【0098】

可溶化に使用される界面活性剤の例は下記のとおりである。

【0099】

1 . Sioponic 25 - 9 : 直鎖アルコールであり、2 . 75 g / g の可溶化のある直鎖アルコール

40

2 . Tergitol : 1 . 21 g / g の可溶化のあるエチレンオキシド / 酸化プロピレン

3 . Tergitol XL - 80N : 第一級アルコールの、1 . 022 g / g の可溶化のあるエチレンオキシド / 酸化プロピレンアルコキシレート

4 . Tergitol N - 10 : 0 . 964 g / g の可溶化のあるトリメチルnonalエトキシレート

5 . Rexophos 25 / 97 : 0 . 951 g / g の可溶化のあるリン酸化ノニルフェノールエトキシレート

例 20 ・ 抗炎症性且つ副腎皮質ステロイドを含む生分解性微粒子

50

- a . 30日遅延
 b . 120日リリース制御

有機相：

- ・塩化メチレンで20%DLPLGポリマーを作る
- ・DLPLAポリマーは、65%DLと35%PLGを含む
- ・0.02gのトリアムシノロンを秤量してガラスバイアルに入れる
- ・トリアムシノロンを含むバイアルに20%DLPLGポリマー溶液の2mLを分注する

る

- ・軌道混合器を使用して完全に薬物を溶解させる

水相：

- ・DI水中で、0.1モル濃度のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の100mLを作る

る

- ・薬物/ポリマー溶液中にSDS 0.1モルの溶液の8mLを分注する

溶媒蒸発：

- ・羽根車混合器の下で、反応混合物を含むガラスバイアルを置く
- ・1200 RPMまで混合器立ち上げる
- ・望ましい粒子サイズを製造するために必要な速度が知られている限り、ゆっくり開始して望ましい粒径サイズを製造できるような羽根車の速度を徐々に上げていく
- ・望ましい粒径サイズを製造するための速度に達したら、80 の水浴中で容器を連続して混合しながら加熱し始める

- ・有機相のすべての塩化メチレンがボイルオフされたら、加熱を停止する。（この場合の時間は45分）

- ・混合し続け、反応を室温へゆっくり冷却する

- ・冷却と混合の率は粒子間の相互の凝集をもたらす

- ・SDSは、DI水と混合物溶液を連続的に交換することによって洗浄することができる。

【0100】

- ・濾過により粒子を収集する

- ・真空オープン中80 で粒子を乾燥させる

流動床のカプセル化

- ・3%および5%の、PL:PLG 50:50の高分子組成物を塩化メチレン中に作る

- ・乾燥粒子を含む薬物を流動床に入れる

- ・5%ポリマー溶液を用いて粒子を含む薬物へ、ポリマーの均一層を堆積させる。最適化された粒子床を取得するように、溶射速度と空気の流れを調整する。

【0101】

- ・3%のポリマー溶液を使用して、薬物の望ましくない早めのリリースを引き起こすピン穴がないことを最終的な原因は不要な早期解放へのピンホールがないことを確保するプロセスを終了させる。

【0102】

例21・抗増殖性の薬剤を含む生分解性微粒子

- a . 60日遅延
 b . 365日リリース制御

有機相：

- ・塩化メチレンで20%DLPLGポリマーを作る

- ・DLPLAポリマーは、100%PLAを含む

- ・0.02gのシロリムスを秤量してガラスバイアルに入れる

- ・トリアムシノロンを含むバイアルに20%DLPLGポリマー溶液の2mLを分注する

る

- ・軌道混合器を使用して完全に薬物を溶解させる

10

20

30

40

50

水相：

・ D I 水中で、 0 . 1 モル濃度の S D S (ドデシル硫酸ナトリウム) の 1 0 0 m L を作る

・ 薬物 / ポリマー溶液中に S D S 0 . 1 モルの溶液の 8 m L を分注する

溶媒蒸発：

・ 羽根車混合器の下で、反応混合物を含むガラスバイアルを置く。

【 0 1 0 3 】

・ 1 2 0 0 R P M まで混合器立ち上げる。

【 0 1 0 4 】

・ 望ましい粒子サイズを製造するために必要な速度が知られている限り、ゆっくり開始して望ましい粒径サイズを製造できるような羽根車の速度を徐々に上げていく。

10

【 0 1 0 5 】

・ 望ましい粒径サイズを製造するための速度に達したら、 8 0 の水浴中で容器を連続して混合しながら加熱し始める。

【 0 1 0 6 】

・ 有機相のすべての塩化メチレンがボイルオフされたら、加熱を停止する。(この場合の時間は 4 5 分)

・ 混合し続け、反応を室温へゆっくり冷却する。

【 0 1 0 7 】

・ 冷却と混合の率は粒子間の相互の凝集をもたらす。

20

【 0 1 0 8 】

・ S D S は、 D I 水と混合物溶液を連続的に交換することによって洗浄することができる。

【 0 1 0 9 】

・ 濾過により粒子を収集する

・ 真空オープン中 8 0 で粒子を乾燥させる

流動床のカプセル化

・ 3 % および 5 % の、 P L : P L G 6 5 : 3 5 の高分子組成物を塩化メチレン中に作る

30

・ 乾燥粒子を含む薬物を流動床に入れる

・ 5 % ポリマー溶液を用いて粒子を含む薬物へ、ポリマーの均一層を堆積させる。最適化された粒子床を取得するように、溶射速度と空気の流れを調整する。

【 0 1 1 0 】

・ 3 % のポリマー溶液を使用して、薬物の望ましくない早めのリリースを引き起こすピン穴がないことを最終的な原因は不要な早期解放へのピンホールがないことを確保するプロセスを終了させる。

【 0 1 1 1 】

例 2 2 ・ 麻酔薬、副腎皮質ステロイド及び抗増殖性の薬剤を含む皮膚充填剤組成物

a . 3 0 日遅延、 1 2 0 日リリース制御の、副腎皮質ステロイドを含む生分解性のマイクロカプセル

40

b . 6 0 日遅延、 3 6 5 日リリース制御の、抗増殖性の薬剤を含む生分解性のマイクロカプセル

組成の混合物 (乾燥)

・ ヒアルロン酸、架橋結合 6 0 % - 9 5 %

・ 微粒子を含む抗炎症性 5 % - 2 0 %

・ 微粒子を含む抗増殖剤 5 % - 2 0 %

・ 麻酔薬 (塩酸リドカイン) 0 . 1 % - 5 %

0 . 0 2 4 g / m L の濃度のリン酸緩衝生理食塩水の中で再構成する。

【 0 1 1 2 】

例 2 3 ・ 抗増殖剤、生分解性アクリル酸共重合体のカプセル化

50

卵殻形成相

有機相を構成するように、下記を溶解させる。

【0113】

- ・生分解性のアクリル酸共重合体の 0.25 g
- ・シロリムスの 0.75 g
- ・塩化メチレンの 2 mL
- ・エタノールの 0.1 mL

水相

- ・室温で維持した 0.5% ポリビニルアルコール溶液の 75 mL

1200 rpm 又は望ましい粒子サイズを得られる適切な速度で機械的混合機を使用し 10
て 2 相を分散させる

アミンの適切な量を追加する（この場合はトリエチルアミン）

80 の水浴中での反応槽で 2 時間で混合し続ける

ジェファミン（T-403）の 0.1 mL を追加してカプセル表面を硬化する

混合し続け、反応を室温へゆっくり冷却する

冷却と混合の率は粒子間の相互の凝集をもたらす

ポリビニルアルコールは、新鮮な DI 水と混合物溶液を連続的に交換することによって
洗浄することができる。

【0114】

濾過により粒子を収集する

20

真空オープン中 80 で粒子を乾燥させる

流動床のカプセル化

・3% および 5% の、PL : PLG 65 : 35 の高分子組成物を塩化メチレン中に作
る。

【0115】

- ・乾燥粒子を含む薬物を流動床に入れる。

【0116】

・5% ポリマー溶液を用いて粒子を含む薬物へ、ポリマーの均一層を堆積させる。最適
化された粒子床を取得するように、溶射速度と空気の流れを調整する。

【0117】

30

・3% のポリマー溶液を使用して、薬物の望ましくない早めのリリースを引き起こすピン
穴がないことを最終的な原因は不要な早期解放へのピンホールがないことを確保するプ
ロセスを終了させる。

【0118】

生体適合性に加えて、様々な医療分野においてゲルスラリーの有用性を決定する一実施
形態に係るゲルスラリーの他の重要な特徴は、それらのレオロジー属性の複雑な組み合わ
せである。これらの属性には、粘度とそのせん断率の依存、動的モードでの弾性と粘性の
特性間の比、緩和挙動及び以下に詳細に記述される幾つかの要素が含まれている。一般的
に、一実施形態の生産物のレオロジーは、基本的に、2つの方法によって、非常に広い範
囲にわたって制御されることができる。第一の方法では、粘弾性ゲルスラリーを形成する
2つの相のそれぞれのレオロジー特性は、最終生産物の望ましいレオロジーを与えるよう
に制御される。ゲルスラリーのレオロジーを制御するという第二の方法は、2つの相の適
切な比率の選択から成る。しかし、これらのパラメータ、すなわち、2つの相のレオロ
ジーとその比率は、一実施形態の生産物のいくつかの他の重要な特性を決定するため、レ
オロジーを制御する最良の方法はそれぞれの特定の場面に依りてその場しのぎで選択す
べきである。

40

【0119】

一実施形態に従って製品に用いるのに適したゲルは、硬くて割れやすいゲルから流体の
ように非常に柔らかくて変形可能なゲルまで変化する、レオロジー体の様々な異なる種類
を表すことができる。通常、架橋反応なしで形成されたゲル、例えば従来型のゼラチンの

50

場合は、硬度と弾性が高分子の密度の増加と共に増加する。架橋ゲルのレオロジー特性は、通常、ゲル中の架橋密度、高分子濃度、架橋高分子が膨潤される溶媒の組成物などのようないくつかのパラメータの関数である。ヒアルロン酸とhylanに基づいた異なるレオロジー特性を有するゲルは上述した米国特許第4,605,691号、第4,582,865号、第4,713,448号に記載されている。これらの特許によれば、ゲルのレオロジー特性は主に、最初の反応混合物中の高分子濃度、高分子とビニルスルホンの架橋剤の比率を変更することによって制御できる。これら2つのパラメータは、得られたゲルの平衡膨潤の比率を決定し、従って、最終生成物中の高分子濃度とそのレオロジー特性も決定する。

【0120】

溶媒の実質的な量は、ゲルの機械的圧縮で、予め平衡膨潤状態に達するようになったゲルから除去することができる。圧縮は、溶媒を通すがゲルを通さないスクリーンのある密閉容器の中でのゲルに圧力を加えることで得られる。圧力は、いずれかの適切な装置で、又はガス層或いは空気を通して便利に、直接にゲルに加えられる。ゲルを圧縮するには、下部に上述した半透膜がある容器内のゲルに遠心力を加えることによる方法もある。高分子ゲルスラリーの圧縮率は、ゲルの化学性質、ゲル粒子のサイズ、高分子濃度およびゲルスラリー中の自由溶媒の存在等、多くの要因によって決まる。一般に、ゲルスラリーは、スラリー中の自由溶媒の除去が迅速に進行するように圧力を受けるときに、ゲル粒子からの溶媒のずっと遅い除去が続く。ゲルスラリーからの溶媒除去の速度論は、圧力、温度、装置の構成、ゲル粒子の大きさ、およびゲルの最初の高分子濃度などのパラメータによって決まる。通常、圧力、温度、および濾過表面積の増加およびゲル粒子サイズ、最初の高分子濃度の減少は溶媒除去速度の増大につながる。

【0121】

ゲルスラリーからの溶媒の部分的な除去は、スラリーの粘着性をより高くするようにし、スラリーのレオロジー特性を実質的に変更する。変化の大きさは、以下スラリーの最初の体積と圧縮された材料の体積の比率と定義される圧縮の程度に依存する。

【0122】

圧縮の達成可能な程度、即ちゲルスラリーの圧縮は、ゲルによって異なる。例えば、生理食塩水でのhylanゲルスラリーは、20以上の圧縮比に達することが容易である。

【0123】

最初の高分子濃度と同じ溶媒での圧縮されたゲルの再構成は、元のものと同じのゲルを生成する。これは、レオロジー特性を測定することと、ゲルから遠心分離による溶媒除去の速度論で証明されている。

【0124】

なお、一実施形態に係る粘弾性混合物のゲル相中の高分子濃度は、順番に混合物の最終用途によって決定される混合物の望ましい特性により広範囲にわたって変化することができる。しかし、一般に、ゲル相中の高分子濃度は、0.01から20%、できれば0.05から20%とすることができる。hylanとヒアルロン酸の純粋または混合ゲルの場合には、ゲル中の高分子濃度は、0.1~10%の範囲であることが好ましいである。また、さらに好ましいのは、膨潤溶媒が生理食塩溶液(0.15M含水塩化ナトリウム)の場合0.15から5%である。

【0125】

上述したように、一実施形態による粘弾性ゲルスラリーの第2相のための可溶性高分子の選択は、生産物の最終用途で決定される多くの考察によって支配される。可溶性高分子の相中の高分子濃度は、最終混合物の好ましい特性およびゲル相の特性次第で広い範囲を超えて変化する場合がある。粘弾性ゲルスラリーのレオロジー特性が最大関心事に属する場合、可溶性高分子濃度は、それ相応に高分子の化学的性質とその分子量に十分に配慮することで選択することができる。一般に、可溶性相中の高分子濃度は0.01%~70%の間である。また、好ましくは0.02%~40%である。hylanまたはヒアルロン酸は可溶性高分子として使用される場合には、その濃度は0.01~10%の範囲内で

10

20

30

40

50

あり、好ましくは0.02～5%の範囲内である。コンドロイチン硫酸やデルマトン硫酸等のような他のグリコサミノグリカンが可溶性高分子として使用される場合は、はるかに低い分子量を有するため、その濃度は大幅に高くなる場合もある。

【0126】

一実施形態による粘弾性ゲルスラリーを形成する2つの相は、攪拌器や混合器のようないかなるの従来の方法で混合されることがある。ポリマー溶液の中のゲル相の一様分布を達成するために、混合は十分な時間で続くべきである。上述したように、ゲル相は既に、ゲルをメッシュ又は開口部のあるプレートで押す、又は適当な攪拌器で高速で攪拌するといういかなるの従来方法で崩壊させて取得するスラリーになっている可能性がある。その他にも、粘弾性の混合ゲルスラリーは、ポリマー溶液で大きなゲルを混合し、その後、上述のいかなるの従来の方法による粘弾性スラリーの形成との混合物で崩壊させることによって調製することができる。一実施形態によって混合ゲルスラリーを調製される前者のケースでは、ゲルスラリー相は平衡膨潤のゲルで作成され、この場合、ゲル粒子間の自由溶媒がないか又はいくつかの自由溶媒がある。後者のケースでは、この自由溶媒は、第二相として使用されるポリマー溶液の濃度を希釈する。混合物中のゲル相として使用されるゲルスラリー第三のタイプは、特性が上述された圧縮ゲルである。圧縮ゲルがポリマー溶液と混合されたとき、各成分とそれらの混合物の熱力学によって、溶液相からの溶媒がゲル相に入ってゲル相を平衡へさらに膨潤させる場合がある。

10

【0127】

一実施形態による粘弾性混合ゲルスラリーの組成物は広い範囲内で変化することができる。混合物中で、ポリマー溶液は0.1～99.5%、好ましくは0.5～99%、さらに好ましくは1～95%を占め、残りはゲル相となる。混合物の適切な組成物の選択は、2つの成分の特性とその組成物に依存し、スラリーの望ましい特性とその最終用途によって支配される。

20

【0128】

ポリマーゲルスラリー及びポリマー溶液の2つの主要成分に加えて、一実施形態による粘弾性ゲル混合物は、2つの主要コンポーネントに加えて、生産物の最終用途に応じて、微結晶性セルロース、金属粉末、無機塩類、不溶性無機塩類、染料、界面活性物質、油、粘度調整剤、安定剤等のような薬剤、充填剤を含む様々な生理活性物質など多くの他の成分が含まれる可能性がある。

30

【0129】

一実施形態による粘弾性ゲルスラリーは、本質的に、規則形状又は不規則形状の個別粘弾性ゲル粒子が均一に分布されて流体として流動的に作用する連続的ポリマー溶液マトリックスを表す。言い換えれば、それらの粘弾性ゲルスラリーは特定の粘度、弾性、可塑性を示す。スラリーの組成パラメータ、即ち、ゲル相と溶液相中の高分子濃度及び2つの相間の比率を変化させることで、定常流での粘度、動的モードでの弾性、緩和特性、粘性挙動と弾性挙動の比率など、スラリーのレオロジー特性を制御することができる。

【0130】

一実施形態による粘弾性ゲルスラリーの組成パラメータにの影響を強く受ける他の特性のグループは、スラリー中へ及びスラリーから周辺環境への様々な物質の拡散に関連する。拡散過程は、より詳細に後述するように、組織と薬物送達間の癒着形成の防止などのように医療分野では、粘弾性ゲルスラリーのいくつかの特定応用に極めて重要である。

40

【0131】

組織間の癒着形成は、全ての手術の後のもっとも一般的且つ非常に望ましくない合併症の一つであることがよく知られている。癒着形成の機構は、通常分離されるべき2つの異なる組織を結合する癒着組織に最終的に変形するフィブリン血栓の形成を含む。癒着は不快感や痛みのような多数の望ましくない症状を引き起こし、特定の場合には生命を脅かす状況をもたらす。たとえ再手術後の癒着形成に対する保証がないとしても、癒着形成は、単に癒着を除去するために別の手術をかなり頻繁に必要とする。癒着を除去する手段の一つは、組織間の間隔へのフィブリノゲンの拡散を防止するいくつかの材料で手術中に影響

50

を受けた組織を分離してその間隔での連続フィブリン塊の形成を除去することである。しかし、プレインゲルスラリーの場合の低分子量及び分子量物質は、特にスラリーが体液と混合してゲル粒子が相互に分離されたときにゲル粒子間に容易に現れる。一方、一実施形態による粘弾性混合ゲルスラリーは体内に注入された（埋め込まれた）とき、ゲル粒子間に位置する高分子溶液相は体液での希釈後でも拡散を制限し続けて癒着を防止する。さらに、この効果は、高分子溶液相の高分子濃度の増加に伴ってより顕著になる。

【0132】

一実施形態による粘弾性混合ゲルスラリーが薬物送達ビヒクルとして使用される場合も同様である。スラリーの各相または両方の相は、体内へ注入した後の粘弾性スラリーからゆっくり拡散する生理作用を持つ薬剤又は任意の他の物質で負荷できる。拡散率は、スラリーの組成パラメータの変更で便利に制御することができる。

10

【0133】

一実施形態による粘弾性混合ゲルスラリーの成分は、培地を通る生細胞の移動速度を落とし、様々の表面へのそれらの癒着を防止することで生細胞の挙動に影響を及ぼす。これらの効果の表明の程度は、混合物の2つの成分の組成物とそれらの比率、表面の性質と粘弾性ゲルスラリーとの相互作用、細胞型などのような要素に強く依存する。しかし、どんな場合でも、粘弾性ゲルスラリーのこの特性は、癌の増殖と転移などのような場合に細胞移動と細胞接着の調節が最も重要である医学障害の治療に使用することができる。

【0134】

一実施形態による生体適合性の粘弾性ゲルスラリーの上記の二つの応用に加えて、他の可能な応用は、軟部組織増強、眼科や耳鼻咽喉科などの分野における粘性手術用具としての材料の使用、創傷管理、整形外科における変形性関節症の治療等となる。これらの応用の全てにおいては、混合ゲルスラリーの次の基本的な特性が利用される：生体適合性、制御粘弾性と拡散特性、注入部位での容易な制御滞留時間、認められた材料の容易な取り扱い（例えば小径針を通すその注入）。以下の方法は、一実施形態によって得られる生産物の特徴づけのために使用された。溶液中のhylan又はヒアルロン酸の濃度は、自動化されたカルバゾール法（E. A. Balazs, et al, Analyt. Biochem. 12, 547-558, 1965）を使用してヘキサロン酸分析試験によって決定された。ゲル相でのhylan又はヒアルロン酸の濃度は、米国特許第4, 582, 865号の実施例1に記載したように、修飾ヘキサロン酸分析試験によって決定

20

30

【0135】

粘度測定、振動とリラクゼーション：レオロジー特性は、制御されたせん断速度と3つのモードで動作することができますと、コンピュータ化レオデスポーリンレオメータシステムで評価した。レオロジー特性は、制御せん断率のコンピュータ化レオメータであり、粘度測定、振動、緩和の3つのモードで動作することができるBohlinレオメータシステムで評価された。低・高せん断率（速度）での剪断粘度の測定は、粘弾性ゲルスラリー及び、生産物の多くの応用にとって重要であるそれらの擬似塑性（異なるせん断率での粘度の比）を特徴づける。様々な周波数での粘弾性特性の測定は、弾性（貯蔵弾性率 G' ）の特性と粘性（損失弾性率 G'' ）の特性間のバランスを特徴づけた。緩和特徴は、時間に対するせん断弾性率 G の変化として評価され、異なる緩和時間での2つの弾性率の値の比率として表された。

40

【0136】

次に、様々なHAの架橋のアプローチについて説明される。以下の反応は主に、ヒドロキシル基及びカルボキシル基という最も反応性のある2つの官能基に重点を置く。

【0137】

1. ビスエポキシド、(Bisepoxide)

エチレングリコールジグリシジルエーテル(Ethyleneglycol diglycidyl ether)

1,4ブタンジオールジグリシジルエーテル(butane diol diglyci

50

dyl ether)

この方法は、もともとアガロースを架橋結合するために開発された。現在、HAを架橋結合するために、反応が bisepoxybutane と水素化ホウ素ナトリウムを用いた希釈な NaOH 中である。60 のエタノール 0.1 N NaOH 中エチレングリコールジグリシジルエーテルとヒアルロン酸との反応もヒドロゲルが得られた。その結果生まれるゲルは、含水率が高く (> 95%)、炎症 (刺激)・注射方薬物送達のための応答性分解可能なマトリックスとしての使用のために調査された。

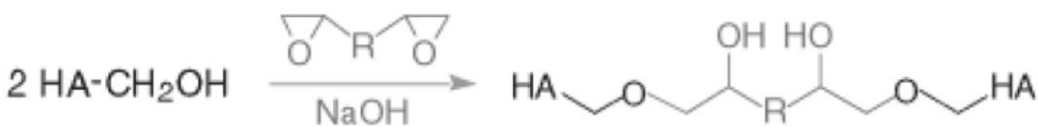
【0138】

ヒアルロン酸とアルカリ性の 1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテルから調製されたヒドロゲルは高度に多孔質であった。そして、この材料は peroxidate で活性化された後、Arg-Gly-Asp (RGD) という細胞接着ドメインを含む 18 アミノ酸ペプチドで修飾されてヒドロゲルとの細胞接着を高める。アルカリ性媒体中で、ジビニルスルホンも、多分ヒドロキシル基との反応を經由してヒアルロン酸と架橋結合する。

10

【0139】

【化1】



20

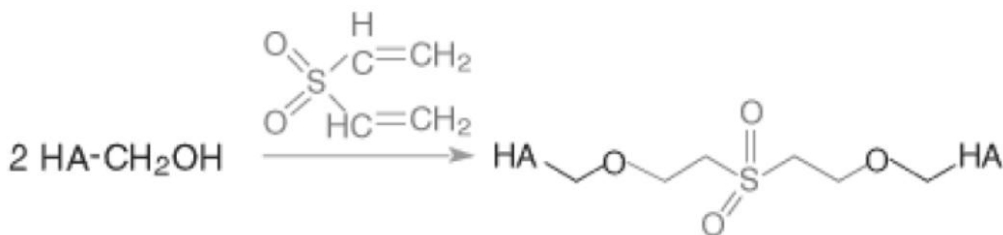
【0140】

2. ジビニルスルホン (DVS)

アルカリ性媒体中で、多分ジビニルスルホンも、ヒドロキシル基との反応を經由してヒアルロン酸と架橋結合する。

【0141】

【化2】



30

【0142】

3. Intern 内部エステル化

自動架橋 (ACP (商標), Fidia) は、ヒアルロン酸のヒドロキシル基とカルボキシル基の間にある分子間・分子内の両方の結合の、ヒアルロン酸の内部エステル化誘導体である。ACP (商標) は、白い粉に凍結乾燥させ、透明ゲルに水和させることができる。この新しい種類の生体材料は術後の。。。を減少させる障壁として使用されている。

40

【0143】

4. 光架橋

ヒアルロン酸のメタクリル酸誘導体は、ヒアルロン酸ブチラートの上述のように、過剰のメタクリル酸無水物での水酸基のエステル化により合成された。この誘導体は、514 nm のアルゴンイオンレーザ照射下での開始剤として、1-ビニル-2-ピロリドン及びトリエタノールアミンの中のエチルエオシンを使用して安定ヒドロゲルを形成するために、光架橋結合された。障害組織を囲む粘着ゲルの形成をもたらすヒアルロン酸誘導体の場合光重合の使用は、周囲の器官からの分離を提供して癒着の形成を防止することができる。予備細胞カプセル試験は、ランゲルハンス島を用いて順調に行ってインスリンのバイオ人工の源を開発する。

50

【0144】

5. グルタルアルデヒド架橋

このプロセスの化学的性質が確認されなかったが、陽イオン交換ヒアルロン酸ナトリウム (1.6MDa) から押し出されたヒアルロン酸ストランドは、グルタルアルデヒド水溶液中で架橋された。次にストランドの表面は、ポリ-D-リジンとポリ-L-リジンの付着で再構築された。ポリペプチド再浮上のヒアルロン酸ストランドは良好な生体適合性を示し、細胞接着を促進した。

【0145】

6. 金属陽オン媒介架橋

Interge1 (登録商標) (FeHA、LifeCore) は水酸化第二鉄とのキレート化によって形成されたヒアルロン酸のヒドロゲル製剤である。ヒアルロン酸の同様の架橋は、銅、亜鉛、カルシウム、バリウム、およびその他のキレート化金属を使用する製剤の基礎となっている。赤みがかったFeHAゲルは手術後の癒着を防止するための開発中です。

10

【0146】

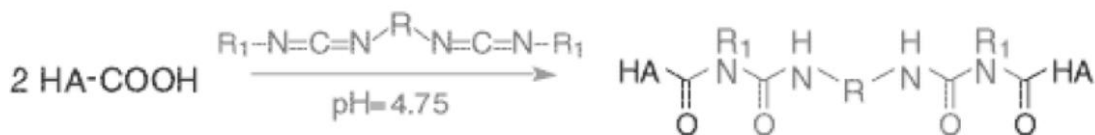
7. カルボジイミド架橋

Incert (登録商標) は、含水イソプロパノール中でビスカルボジイミドとヒアルロン酸を架橋することにより調製された生体吸収性スポンジ (Anika治療法) である。この方法は、ヒアルロン酸と反応してN-アシル尿素 (N-acylureas) を形成するために、カルボジイミドの望ましくない傾向を利用する。この応用では、2つのN-アシル尿素結合の形成は、化学的な安定性及び副産物のない架橋を提供する。疎水性ビスカルボジイミドが使用されたため、Incert (登録商標) は、血液の存在でさえその効き目を縫合・保持する必要なく組織に付着する。最近では、ウサギ糞便摩擦の研究で術後癒着を防止するのに有効であることが分かった。

20

【0147】

【化3】



30

【0148】

低含水ヒアルロン酸ヒドロゲル膜は、水溶性カルボジイミドと一緒にヒアルロン酸 (1.6MDa) 膜をヒアルロン酸の水混和性非溶媒を含む水性混合物中のカップリング剤として架橋する。低含水ヒドロゲル酸が得られた最も高い架橋度は80%エタノールの中で得られた。含水率60%のこの膜は、緩衝液への浸漬後2週間わたって安定した状態を保つ。L-リジンメチルエステルの存在下で、水溶性カルボジイミドとヒアルロン酸膜との架橋は、さらにヒアルロン酸膜の生体内分解を延長させた。

【0149】

8. ヒドラジド架橋

上述したヒドラジド化学を使用することで、ヒドロゲルは、ビスヒドラジド (bishydrazide)、トリスヒドラジド (trishydrazide)、多価ヒドラジド化合物を用いて調製されている。試薬の反応条件及びモル比を調整することで、軟質且つ注入可能なゲルから機械的硬質且つ砕けやすいゲルまでの範囲の、物理化学的特徴のあるゲルを得ることができる。HA-ADHは、販売の小分子ホモバイファンクショナル架橋剤を用いて架橋結合することができる。

40

【0150】

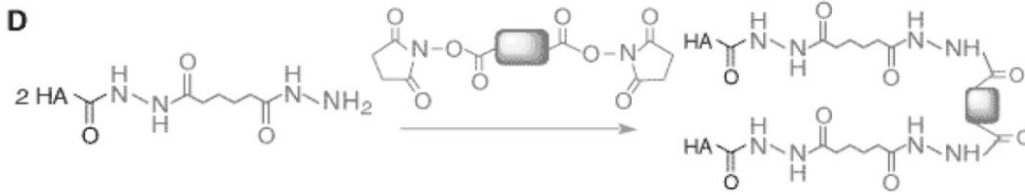
最近になって、その場重合技術は、生理学的条件下でPEG-ジアルデヒドの高分子架橋剤を用いてHA-ADHを架橋結合することで開発された。明確に定義された機械的強度を持つ、生体適合性且つ生分解性のヒアルロン酸ヒドロゲル膜は、溶媒の蒸発後得られ

50

た。高分子薬物はこれらのヒアルロン酸ハイドロゲル膜からゆっくり放出され、これらの新しい材料は創傷治癒中に再上皮化を促進した。

【 0 1 5 1 】

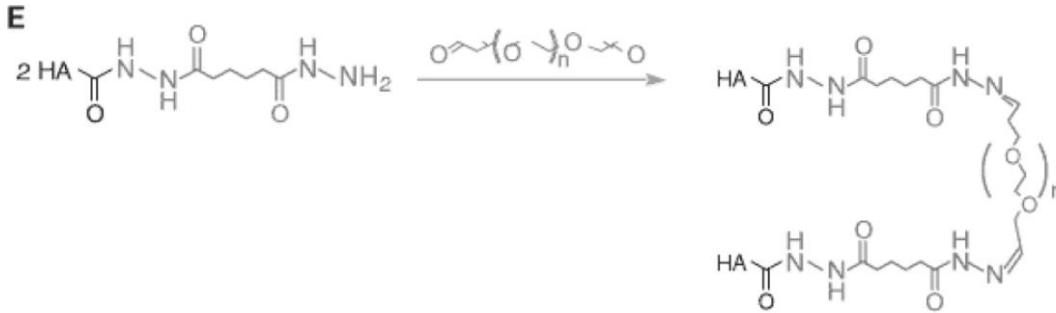
【 化 4 】



10

【 0 1 5 2 】

【 化 5 】



20

【 0 1 5 3 】

1 . 残余蛋白質での架橋

この例はHyl an (生物基質)である。これらは、塩基性溶液中でホルムアルデヒドとヒアルロン酸含有の残余蛋白質を架橋することで形成されたヒドロゲル又はヒドロゾルである。13可溶性hyl anは、ヒアルロン酸と比較してより強化レオロジー特性を示すヒアルロン酸の高分子量型(8 - 23MDa)である。Hyl anゲルは、可溶性hyl an材料より弾性と粘性が高いし、自然ヒアルロン酸の高い生体適合性を維持できる。Hyl anは数多くの医学的応用において研究されている。

【 0 1 5 4 】

2 . 多成分反応

(1)パセリーニ 反応及び(2)ウギ反応として知られている3~4成分反応がある。

30

【 0 1 5 5 】

パセリーニ 反応では、ヒアルロン酸の水溶液が含水グルタルアルデヒド(又は他の水溶性ジアルデヒド)と混合され、反応性の高いイソシアヌ化物、例えば、シクロヘキシルイソシアニドの既知量に添加される。

【 0 1 5 6 】

4成分反応のウギ反応では、ジアミンがこの3成分混合物に添加される。

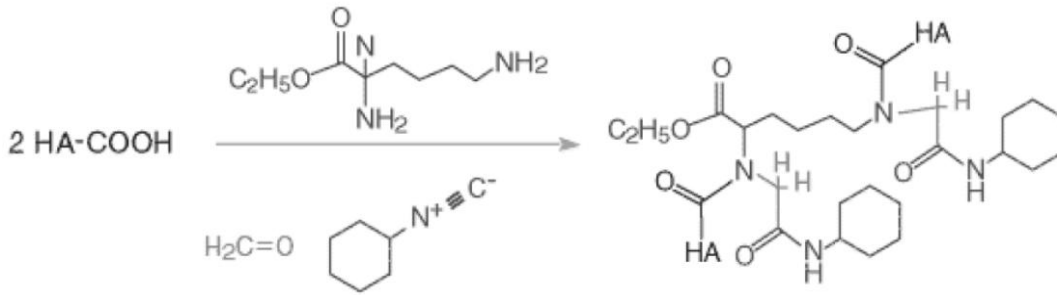
【 0 1 5 7 】

架橋度は、アルデヒドとジアミンの量によって制御される。

40

【 0 1 5 8 】

【化6】



【0159】

10

3. 表面修飾

一例では、高分子表面を発散するようにアルゴンガスとアンモニアガスプラズマで活性化されたポリプロピレン（PP）、ポリスチレン（PS）の表面で行うべきである。次に、表面のペンダントカルボン酸官能基を得るために、発散された表面は無水コハク酸で修飾された。その後、このペンダントカルボン酸官能基は、カルボジイミドの存在したでHA-ADHと一緒に凝縮されて、親水性、非粘着性且つ滑らかなプラスチック表面を得た。金属表面とガラス表面は、表面活性化、その後適切なヒアルロン酸誘導体の共有結合性科学的付着によって修飾することができる。

【0160】

2. 以下に示すように、HAの4つの異なる治療的修飾のオプションがある。

20

【0161】

1. A: HAは、(1)ヒドロキシル基の位置と(2)カルボキシル基の位置の2つの箇所です架橋することができる。

【0162】

2. B: ヒドロキシル基及び/又はカルボキシル基と反応しやすい官能基を持つ薬剤はHA分子上に結合され、HA分子は薬剤の担体として作用することができる。

【0163】

3. C: 個別HA分子は、ヒドロキシル基及び/又はカルボキシル基と反応しやすいペンダント官能基を有するポリマー鎖に移植又は共有結合することができる。

30

【0164】

4. D: HA分子は、それらの官能基が反応しやすい提供されたりポソームに移植することができる。

【0165】

HA治療修飾のオプションは、架橋HAヒドロゲル、HA薬剤バイオコンジュゲート（biocjugate）、HA移植共重合体、HAリポソームを含む。

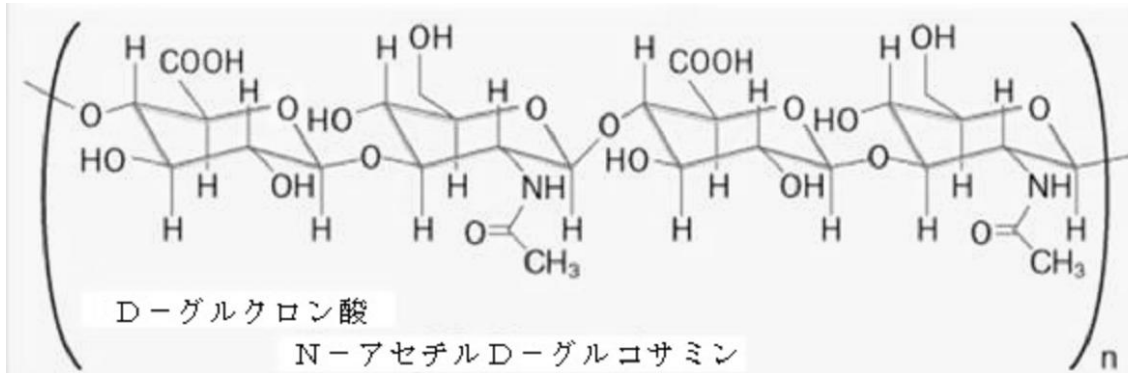
【0166】

HA反応部位

40

【0167】

【化7】



10

【0168】

5. カルボキシル基化学反応
1. エステル化

【0169】

【化8】



20

【0170】

エステル化ヒアルロン酸の生体材料は、ジメチルホルムアミド（DMF）溶液中でハロゲン化アルキルとヒアルロン酸のテトラ（n-ブチル）アンモニウム塩とのアルキル化によって調製されている。これらのヒアルロン酸エステルは、膜および繊維生成するために押し出したり、スポンジを得るために凍結乾燥したり、微小球を生産するために噴霧乾燥・抽出・蒸発で処理したりすることができる。これらの高分子は、乾燥時は優れた機械的強度を示すが、水和したものはそれほど丈夫ではない。エステル化度は、酵素分解に対して剛性と安定性がより高く感受性がより低いポリマー鎖ネットワークを生成する疎水性パッチのサイズに影響を与える。

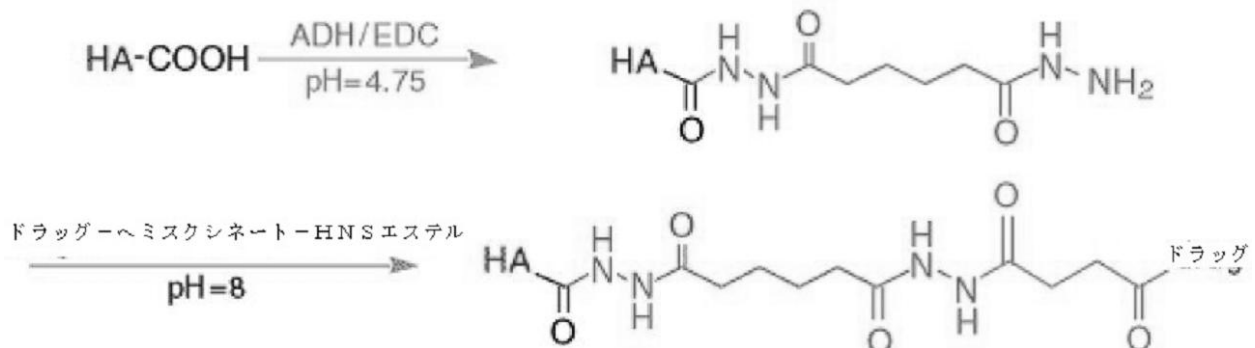
【0171】

2. カルボジイミド媒介反応

30

【0172】

【化9】



40

3. カルボジイミド化合物によるヒアルロン酸のカルボキシル官能基の化学的修飾は一般的に pH 4.75 で水中で行われる。

【0173】

6. ヒドロキシル基化学反応
i. 硫酸化

DMF中で、ピリジン - 三酸化硫黄 コンプレックスとのヒアルロン酸の硫酸化は、 HyalS_x という異なる程度の硫酸化を生産する（二糖当りに $x = 1 - 4$ ）

50

)。次に、硫酸化ヒアルロン酸 H y a l S 3 . 5 は、ジアミンポリエチレングリコール誘導体及び水溶性カルボジイミドを用いてプラズマ処理ポリエチレン (P E) 上に固定された。トロンビン時間試験及び血小板粘着の挙動は、この方法で血液適合性且つ抗血栓の P E 表面の調製が期待できることを示された。また、H y a l S x は、光解離性アジドフェニルアミノ誘導体に変換され、テレフタル酸ポリエチレン (P E T) 膜上に光固定化された。硫酸化ヒアルロン酸でコーティングされた 9 表面は、コーティングされていない表面と比較して、細胞付着、汚染、細菌増殖の顕著な減少を示す。コーティングはコンドロイチナーゼとヒアルロニダーゼによる分解に対して安定であった。

【 0 1 7 4 】

ヒアルロン酸ブチレートは、特に、腫瘍細胞への標的薬剤送達システムとして用いられる。酪酸は、細胞の分化を誘導し、DMF 含有ジメチルアミノピリジン中での、無水酪酸と低分子量ヒアルロン酸の s y m - c o l l i d i n i u m 塩との反応を介して、ヒアルロン酸と共役させられたヒト腫瘍の種々の増殖を阻害することが知られている。

10

【 0 1 7 5 】

i i . イソ尿素共役又は臭化シアン活性化

アントラサイクリン系抗生物質アドリアマイシン及びダウノマイシンは、臭化シアン (C N B r) 活性化を介してヒアルロン酸と共役させられた。この反応スキームは、一般に、オリゴ糖蓄積を活性化して反応性の高いイソ尿素中間対を介して親和マトリックスを生成するために使用される。治療薬はオリゴ糖蓄積又は、ウレタン結合を介してグリコサミノグリカンのヒドロキシル官能基の 1 つに付着するが、分光検証はなかった。さらに、

20

【 0 1 7 6 】

【 化 1 0 】



30

i i i . ペルオキシダーゼ酸化

反応性ビスアルデヒド官能基は、ペルオキシダーゼナトリウムの酸化で、ヒアルロン酸上の近接第 2 級アルコールから生成することができる。

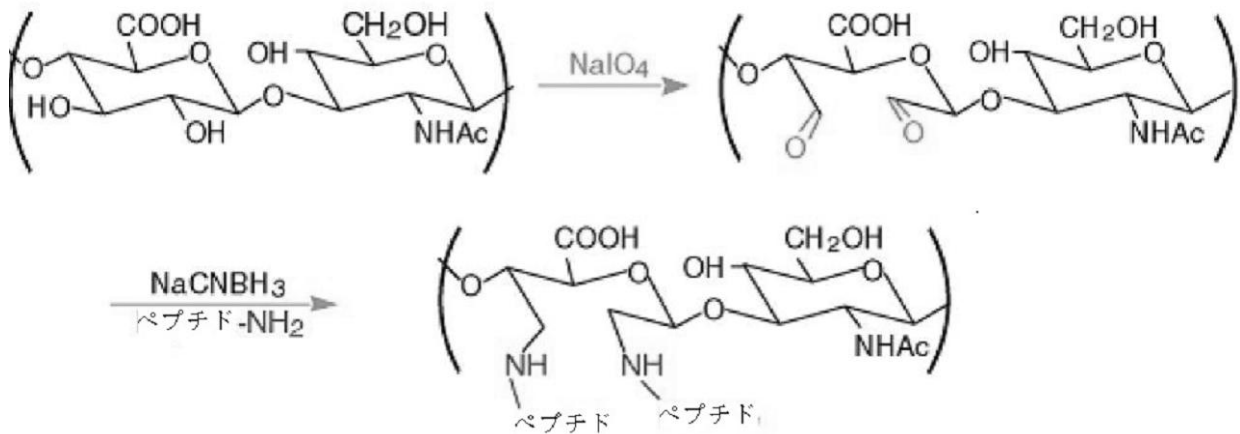
【 0 1 7 7 】

反応性官能基 b i s a l d e h y d e ナトリウムペルオキシダーゼによる酸化によってヒアルロン酸に隣接第二級アルコール関数から生成することができる。この化学的性質 (現象・作用) は、親和固定化又は蛍光プローブへの変換のための、糖タンパク質の化学活性化の標準方法である。ペルオキシダーゼ活性化されたヒアルロン酸で、第 1 級アミノと共役させることで、架橋、細胞付着ドメインを含むペプチドの付着、固定化材料を得ることができる。厳しい酸化処理は、鎖切断及び潜在的且つ免疫原性結合をヒアルロン酸生体

40

【 0 1 7 8 】

【化 1 1】



i v . 還元末端修飾

ヒアルロン酸の還元末端の還元的アミノ化は、親和マトリックス、フルオロフォアで標識した材料、ヒアルロン酸リン脂質を調製してヒアルロン酸リボソーム内へ挿入するために使用されている。例えば、低分子量ヒアルロン酸はホスファチジル・エタノールアミンに共有結合され、この複合体は、低密度リポタンパク質 (LDL) 粒子の表面上の保護用「砂糖の装飾」のために使用されている。グリコサミノグリカン毎に1つだけの付着店

20

【0 1 7 9】

v . アミド修飾

幾つかの調剤では、天然ヒアルロン酸は、誘導体化され得る多くの自然脱アシル化グルコサミン単位を持つ。還元末端修飾と同様に、これは非常に低い修飾率を提供する。しかし、一般的に使われているヒドラジン分解法が使用される場合、N - アセチル基の修飾は重要になることもある。ヒアルロン酸の限られたヒドラジンは、ヒアルロン酸上でフリーグルコサミン残留物を作成するだけでなく、塩基誘導主鎖分解及び還元末端修飾をもたらすことがある。

30

【0 1 8 0】

更に他の実験では、材料は以下のような方法を含むことがある。

【0 1 8 1】

1 . 実験的方法

1 . 実験 0 0 1 - 1 2 : 油中水乳剤架橋反応

【0 1 8 2】

【表 1 1】

水相混合	
成分	量
ヒアルロン酸ナトリウム (Hyaluronic acid sodium)	6.5%
NaOH	2M
最終全体積	0.54mL

40

【0 1 8 3】

【表 1 2】

油相混合	
成分	量
イソオクタン (Isooctane)	13 mL
ソジウムービスースルホサクシネート (Sodium-bis-sulfosuccinate) 0.2M	1 mL
トリメチルペンタン (Trimethylpentane) 0.04M	1 mL
DVS	45 μL

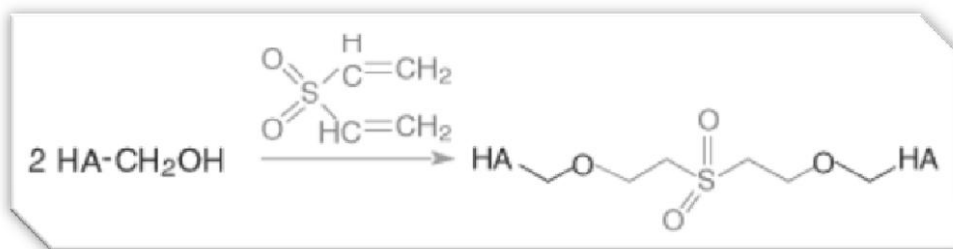
10

【0184】

1. 反応は油中水乳剤反応である
2. 室温で1時間で反応させる
3. 遠心分離機でゲル粒子を収集する
4. アセトンで洗浄する

【0185】

【化 1 2】



20

【0186】

2. 実験 001 - 14

【0187】

【表 1 3】

反応混合物	
成分	量
ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid)	0.105 g
X-リンカー (X-Linker) 混合物: a、b、c、d、e	0.775 g

30

【0188】

【表 1 4】

X-リンカー (X-Linker) 混合					
成分	量				
	a	b	c	d	e
NaOH 1%	9.99	9.98	9.97	9.96	9.95
BDDE	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05

40

【0189】

- 1.

最初に X - Linker 混合を調合

50

する。

【0190】

2.

次に、反応混合物する。

【0191】

3.

「a」～「e」のX-Linker

r 混合をHAに添加する。反応が起こる。

【0192】

4.

X-Linker 混合をHAの中

にうまく入り込むようにヘラでよく混ぜる。

【0193】

5.

30～60分おきに混ぜながら、

各反応が室温で起こるようにする。

【0194】

6.

反応の8時間後の生産物は架橋ヒ

アルロン酸ゲルである。

【0195】

7.

30分おきに混ぜながら、52

で、3時間で置いておく。

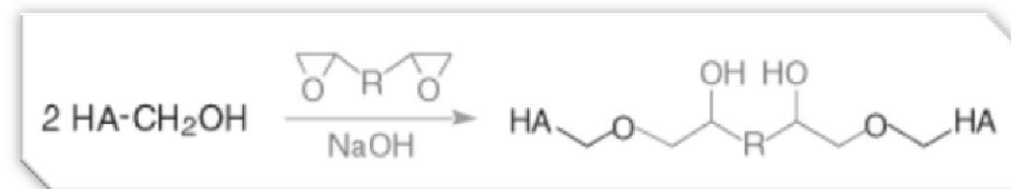
【0196】

8.

PBSで3X洗浄する。

【0197】

【化13】



【0198】

3.

HA X-linking 過程の中の成分の境界条件

30

実験001-16: X-linker 混合保管期間及び反応温度

1.

X-linker 混合は調合してから24時間内で使用、室温条件で保管しなければならない。

【0199】

1.

50 の反応温度は1時間以上保持するには高すぎる。

【0200】

実験001-17: 1% NaOHの保管期間

2.

X-linker を含むNaOH溶液は調製してから1時間ないで使用すべきである。

【0201】

3.

1. でのNaOH濃度は、完全的反應生産物を得るには低すぎる。

40

【0202】

1.

X-Linker 保管期間 - BDDE

1.

実験001-18: 一旦BDDEを含む混合物がNaOHと混合されたら、3時間内で使用すべきであることが分かる。

【0203】

4.

X-Linker 保管期間 - DVS "TBD"

5.

実験001-19

【0204】

50

【表 15】

混合物 A	
成分	量
空の培養管	8.755 g
HA	0.105 g
NaOH 1N	0.5mL
混合物 B	
NaOH 1N	2mL
BDDE	0.02m L

10

【0205】

【表 16】

最終混合物	
成分	量
混合物 A	全て
混合物 B	0.5mL

20

【0206】

1 .
する。

A と B を一緒に添加してよく混合

【0207】

2 .
、2 時間で置いておく。

30 分おきに混ぜながら、室温で

30

【0208】

3 .
で、1 時間で置いておく。

30 分おきに混ぜながら、50

【0209】

4 .
う商品に非常によく似ている。

生産物は、Juvedermとい

【0210】

6 .

実験 001 - 21

40

【0211】

【表 17】

混合物 A	
成分	量
空の培養管	10.510g
HA	0.105g
NaOH 1%	0.5mL
混合物B	
NaOH 1%	9.9
DVS (ジビニルスルホン, divinyl sulfone)	0.01

10

【0212】

【表 18】

最終混合物	
成分	量
混合物A	全て
混合物B 1-B5	0.775mL

20

【0213】

1. AとB 1～B 5のそれぞれと一緒に添加してよく混合する。

【0214】

2. 30分おきに混ぜながら、室温で、2時間で置いておく。

【0215】

3. 30分おきに混ぜながら、50℃で、1時間で置いておく。

【0216】

4. 生産物は、Juvedermという商品に非常によく似ている。

【0217】

7. X-Linkingレベルの効果

30

1. 実験001-22: BDDE (1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル)

【0218】

【表 19】

(HA 混合) x 4	
成分	量
HA	0.105 g
X-リンカー (X-Linker) 混合	0.775 mL
BDDE 混合 A	
NaOH 1%	9.99 mL
BDDE	0.01 mL
BDDE 混合 B	
BDDE 混合 A	1 mL
NaOH 1%	1 mL
BDDE 混合 C	
BDDE 混合 A	1 mL
NaOH 1%	2 mL
BDDE 混合 D	
BDDE 混合 A	1 mL
NaOH 1%	3 mL

10

20

30

【0219】

1. 実験
001-25 : DVS (ジビニルスルホン)
- 2.

【0220】

40

【表 20】

(HA 混合) x 4	
成分	量
HA	0.130g
X-リンカー (X-Linker) 混合	0.800mL
DVS 混合 A	
NaOH 1%	9.99mL
DVS (divinyl sulfone)	0.01mL
DVS 混合 B	
DVS 混合 A	1mL
NaOH 1%	1mL
DVS 混合 C	
DVS 混合 A	1mL
NaOH 1%	2mL
DVS 混合 D	
DVS 混合 A	1mL
NaOH 1%	3mL

10

20

【0221】

一実施形態では、HAは、単相の特性を有するシステムを形成するために、直列に架橋することができる。IPNのような生体適合性架橋高分子は、ヘテロ多糖類を架橋して単一架橋材料を形成し、単一架橋材料の上に1つ以上の追加架橋を行って多重架橋材料を形成する。多重架橋材料は、前記単一架橋材料より、人体内で長く持続できるコアを有している。その結果、少しされたところから高度に架橋されたコアまで、スムーズな連続体の材料が形成される。少し架橋材料は、小さなゲージ注射器でHAを人体内に簡単に入り込ませることができるが、このような少し架橋材料が人体内で長く持続しない。しかし、従来のHA皮膚充填剤と異なって、高度架橋材料は、人体内に長く持続して身体増強の定期的なタッチアップが要らないである。

30

【0222】

好適な実施形態による遅延架橋剤の、安定且つ非水の懸濁液は、以下のいずれかを変化させることによって制御することができる。

【0223】

- 1) 使用された架橋化合物
- 2) 懸濁液中のHAの粒径
- 3) HAを含む流体のpH
- 4) HA懸濁液の濃度(すなわち、負荷)
- 5) 溶液の温度

40

実例として、同様の条件下で使用された場合、HA化合物の分子量の種類は、水溶性溶液正確な架橋時間を制御するように効果的に用いることができる。より具体的には、よりゆっくりと低分子量酸の懸濁液よりも大きい分子量HAは、クロスリンクの懸濁液。

【0224】

懸濁(した)ヒアルロン酸の粒径に関して、粒径が大きくなるにつれて、水溶性高分子溶液の架橋のために必要となる時間が増加していく。逆に、粒径が小さくなるにつれて、水溶性高分子溶液の架橋のために必要となる時間が減少していく。

【0225】

50

水溶性高分子溶液の架橋の前の pH は、架橋時間を制御するために使用することができる。水溶性高分子溶液の pH は、遅延架橋剤の安定且つ非水性の懸濁液の溶解速度に影響を及ぼす。具体的に言うと、懸濁液には HA 粒子の大部分が含まれている場合、水溶性高分子溶液の pH が高くなるにつれて、架橋剤懸濁液の溶解速度が増加していくのに対し、懸濁液にはホウ砂粒子の大部分が含まれている場合、水溶性高分子溶液の pH が低くなるにつれて、架橋剤懸濁液の溶解速度が減少していく。逆に、懸濁液にはホウ砂粒子の大部分が含まれている場合、水溶性高分子溶液の pH が低くなるにつれて、架橋剤懸濁液の溶解速度が減少していくのに対し、懸濁液には HA 粒子の大部分が含まれている場合、水溶性高分子溶液の pH が高くなるにつれて、架橋剤懸濁液の溶解速度が増加していく。

【0226】

水溶性高分子溶液中の遅延 HA 架橋剤の安定且つ非水の懸濁液の濃度（即ち負荷）及びの懸濁液の含有量の両方は、水溶性高分子溶液の架橋時間に同様に影響を与える。水溶性高分子溶液中の遅延 HA 架橋剤の懸濁液の濃度、或いは、架橋剤懸濁液の含有量のいずれかが高くなるにつれて、水溶性高分子溶液の架橋時間が減少していく。逆に、水溶性高分子溶液中の遅延ホウ素架橋剤の懸濁液の濃度、或いは、架橋剤懸濁液の含有量のいずれかが低くなるにつれて、水溶性高分子溶液の架橋時間が増加していく。

【0227】

温度は、水溶性高分子溶液の架橋時間を変更するために使用することができる。水溶性高分子溶液の温度が上がるにつれて、その架橋時間が減少する。逆に、水溶性高分子溶液の温度が下がるにつれて、その架橋時間が増加する。更に、水溶性高分子溶液の架橋時間の増加又は減少は、遅延 HA 架橋剤の安定且つ非水の懸濁液の形成に用いられる粘土の種類によって決まる。

【0228】

その上、分子微小球、高分子ミセル、可溶性高分子、ヒドロゲル形式材料のような材料は、生化学的分解から薬剤を保護するために使用され、生物医学的応用、特に薬物送達装置の成分として用いられるのように、大きな可能性を示している。医用高分子のデザインとエンジニアリング（例えば、生理学的条件下での使用のための高分子）は、一般的に特殊且つ厳密な要件の対象となっている。特に、このようなポリマー材料は、それらが使用される生物学的環境と互換でなくてはならない。即ち、それらが親水性のある特徴を示すということである。それらはまた、適切な生分解性（即ち、それらは、低分子量種に分解する。高分子フラグメントは、痕跡を残さずに、順番に体内で代謝されか、または排泄される）。を証明しなければならない。生分解性は、典型的には、主鎖に加水分解に不安定な結合を有する高分子を合成するか、または使用することによって達成される。この特徴を持つ最も一般的な化学官能基は、エステル、無水物、オルトエステル、及びアミドである。加水分解に不安定な主鎖の化学的加水分解は、高分子の分解のために一般的な機構である。生分解性高分子は、天然または合成のいずれかのものである。医学的応用及び生物医学研究に一般的に使用される合成高分子は、ポリエチレングリコール（薬物動態および免疫応答調整剤）、ポリビニルアルコール（薬剤担体）、およびポリ（ヒドロキシプロピルメタクリルアミド）（薬剤担体）を含む。また、天然高分子は、生物医学的用途にも使用される。例えば、デキストラン、ヒドロキシエチル澱粉、アルブミン、及び一部加水分解されたタンパク質は血漿代用薬から、放射性医薬品、非経口栄養までの用途において有用であることが分かる。一般的に、合成高分子は、天然材料より、広い範囲の特性及び予測可能なロット間一様性を提供するように調整することができる大きな利点を持つ。

【0229】

一実施形態では、リンカーは、カルボニル間で少なくとも3個の原子のあるジカルボン酸であり、エステルを形成するカルボニルへのヘテロ原子アルファを含む；リンカーが、カルボニル間で少なくとも3個の原子のあるジカルボン酸であり、エステルを形成するカルボニルへのヘテロ原子アルファを含まない場合、放出半減期は約100時間強である；リンカーが、カルボニル間で2個の原子のあるジカルボン酸であり、テザーが窒素と反応性水素を含む場合、HAの放出半減期は約0.1～約20時間である；放出半減期は、複

10

20

30

40

50

合体が P H F - S A - G l y - C P T、P H F - (m e t h y l) S A - G l y - C P T、P H F - (2 , 2 - d i m e t h y l) S A - G l y - C P T、P H F - (2 - n o n e n - 2 - y l) S A - G l y - C P T、P H F - S A - G l y - T a x o l、又は P H F - S A - G l y - I l l u d i n ではないという条件で、37 で、0.05 M リン酸緩衝液、0.9%生理食塩水 (p H 7.4) の中で測定される。

【0230】

いくつかの実施形態において、p o l y a l がアセタールである。他の実施形態では、p o l y a l がケタールである。いくつかの実施形態において、アセタールが P H F。いくつかの実施形態において、R i が H。他の実施形態では、R i が C H 3。いくつかの実施形態において、R 2 が - C H (Y) - C (O) - である (式中、Y は天然に存在するアミノ酸の側鎖の一つである)。いくつかの実施形態において、R 2 がアリアル基である。いくつかの実施形態において、R 2 がヘテロアリアル基である。他の実施形態において、R 2 が脂肪族環である。いくつかの実施形態において、R i 及び R 2 が窒素と一緒に結合したら、環を形成する。他の実施形態は当業者によく知られている。例えば、いくつかの実施形態は、U S 2 0 1 0 / 0 3 6 4 1 3 に記載され、その内容は参考として包含される。

10

【0231】

図1は、多重架橋 H A を直列に製造する模範的なシステムを示す。図1において、H A 材料 P - 1 5 及び水酸化ナトリウム P - 1 6 は、ゲート及び測定単位 P - 1 4 に提供される。そのアウトプットは混合器 P - 1 7 に提供される。架橋剤ソース E 9 は化学反応炉 I - 7 に提供され、そのアウトプットはタンク P 2 1 に格納される。その後、格納された架橋 H A は霧化することができる (噴霧される?)。

20

【0232】

図2は、多重架橋 H A を直列に製造する別の模範的なシステムを示す。図2において、H A 及び水酸化ナトリウムは、P V S 1、P V S 2、P V S 3 ソースのように複数の架橋剤ソースを受け取る化学反応炉に提供される。化学反応炉は直列に多重架橋 H A を生成し、その後多重架橋 H A は、残留物を除去し、p H を約 7.4 に変更するためにチャンパーで洗浄される。チャンパーは蒸留水及び p H の約 7.4 の P B S (リン酸緩衝生理食塩水) を受け取る。洗浄されたアウトプットは最終組み立てそして放送装置に送付される。

30

【0233】

図3は、結果として得られる多重架橋 H A の模範的な図を示す。軽度架橋した拡張が組成物を小さなゲージ針を通して注入できるように、第2の直列架橋センターが生物学的過程による吸収に耐性がある特徴とし、

軽度に架橋した拡張又は腕を有する第1高分子の第1部分 300 ;

第1部分と重複する第1の直列架橋センター及び、直列架橋センターに隣接した1以上の軽度架橋した拡張を有する高分子の第2部分 310 ;

第2部分と重複する第2直列架橋領域及び、直列架橋センターに隣接した1以上の軽度架橋した拡張を有する高分子の第3部分 320

を含む組成物である。

40

【0234】

領域 350 は、生分解耐性のための多重架橋になることがある。高分子は、コラーゲン、ヒアルロン酸、セルロース、タンパク質、糖質、生物系の細胞外マトリックス：ポリマーは、のいずれかである。

【0235】

他の実施形態において、生体適合性の架橋された I P N 高分子は、ヘテロ多糖類を架橋して第1架橋材料を形成したり ; 第1の架橋材料の1つ以上の追加架橋を行って多重架橋材料を形成したりすることで実施することができる。結果単相 H A は、生体適合性架橋高分子で軟組織を増強させるために使用することができる。

【0236】

ブレンドの成分の両方を架橋して I P N 及びセミ I P N を得る前述の方法の他に、セミ

50

IPNは、ブレンドの成分の両方は、架橋剤の存在下及び、天然酸性多糖の存在下でのモノマーの重合又はその半合成エステル系誘導体により得ることもできる。

【0237】

以下の実施例では、HA組成物の割合は組成物全体の75%から99%まで変化させ、架橋剤の割合は以下のように1%から25%まで変化させる。

【0238】

【表21】

HA	組成物 %	99	90	85	80	75	99	90	85	80	75
HA	化学式 %	9	9	8.5	8	7.5	19.8	18	17	16	15
0.5M NaOH	化学式 %	90	90	90	90	90	80	80	80	80	80
X-リンカー (X-Linker)	化学式 %	1	1	1.5	2	2.5	0.2	2	3	4	5
X-リンカー (X-Linker)	組成物 %	1	10	15	20	25	1	10	15	20	25

10

20

【0239】

HAの割合が増加するにつれて、材料が柔らかいが生分解に対する耐性が減っていく。より多くの架橋剤が導入されるにつれて、材料がより硬くなり長持ちしていく。多重直列架橋過程は手触りが柔らかいが、長持ちするという利点をもたらす。IPNから放射状に広がり続けながらも絶えず柔らかくなる機械的・物理的性質の変化は、高分子が硬くなり、同時に周囲に準拠になって生体適合性がより良くなるようにし、自然な触りが感じられる。

【0240】

【表22】

			1st	2nd	3rd	4th			
	Composition %	99							
HA	Formula %	9.9							
0.5M	NaOH	90							
X-Linker	Formula %	0.1							
X-Linker	Composition %	1	SERIAL X-L VARIATIONS FOR A COMPOSITION (% of X-Linker in total)						
	XL Type	XL-1, 2, 3 or 4	XL-1, 2, 3 or 4	XL-1, 2, 3 or 4	XL-1, 2, 3 or 4	XL-1, 2, 3 or 4			
	A	33.3	33.3	33.3					100
	B	20	30	50					100
	C	10	20	30	40				100
	D	25	25	25	25				100
	E	10	20	30	40				100
X-LINKER TYPES									
XL-1	divinyl sulfone								
XL-2	1,4-butane dioldiglycidyl ether								
XL-3	1,2,3,4-diepoxybutane								
XL-4	bis-or poly-epoxy								

30

40

【0241】

多重架橋プロセスは、HAが一回目、そして2回目、3回目架橋されてから直列架橋の追加を形成する、個別又はデジタルプロセスと似ている。この個別又はデジタルプロセスは、従来の連続的なプロセスとはの比較した場合である。一実施形態では、IPNセンターは、相対的な水性フロントが存在するところにある。

【0242】

なお、HAの長寿の目的で、加水分解が好まれていないため、より疎水性の架橋剤のが

50

優れていることに言及すべきである。立体的に込み合った架橋剤も挙げられた同じ理由で望ましいである。但し、この場合の疎水性は、HA高分子の生体適合性を低下させ、不正且つ不要な異物反応になる可能性が高い。プロセスの全ての部に使用される架橋剤も、長寿・生体適合性・物理的性質という特性に変化をもたらす。アプリケーション要件は、それらの特性のバランスを与える理想的な高分子組成物を決定する。

【0243】

直列架橋の工程を経て、架橋HA（ヒアルロン酸）分子マクロ構造は、基本水性媒体と接続する表面では最も高く、中心コアに向かっては最も低く相互貫通架橋される。初期の架橋反応工程の後、架橋HA連鎖は重要な移動性を失った。従って、IPN（相互貫通網目）高分子は後続の順次的な架橋反応で安易に形成される。

10

【0244】

架橋HAのレオロジーは、非ニュートン流体の挙動を有するものとして特徴付けられる。二次元空洞流れでの混合に関する理論によれば、効果的な混合の鍵は、「馬蹄マップ」と呼ばれる操作である、反復的な伸縮及び折り畳みを生産することにある。混合は、Chavanらによる「Mixing of Viscous Newtonian and Non-Newtonian Fluids」（粘性ニュートン及び非ニュートン流体の混合）のページ211～252に記載されたように、粘性ニュートン及び非ニュートン流体を混合することででき、当該資料の内容は参考することにより組み込まれる。もう一つの方法として、Paulo E. Arratiaによる「Stretching and mixing of non-Newtonian fluids in time-periodic flows」（時間周期的なフローでの非ニュートン流体伸縮及び折り畳み）に記載されたように混合することもでき、当該資料の内容は参考することにより組み込まれる。混合工程のスケリングは、Wilkenらによる「How to Scale Up Mixing Processes in Non-Newtonian Fluids」（非ニュートン流体中の混合工程のスケールアップ方法）に記載されたように行うことができ、当該資料の内容は参考することにより組み込まれる。

20

【0245】

最終生成物において、架橋レベルは、HA高分子マトリックス全体にわたって不均一となり、高分子連鎖は2軸配向（2軸延伸）になる。配向はHA高分子が存在する極性媒体の結果である。

30

【0246】

反応物を混合する様々な実装は以下に記載される。

【0247】

1. 手動の混合：

この例では、混合は手動である。この方法では、組み立てが簡単で、高価な機器を必要としない。架橋剤*の種類と様々な工程で使用する架橋剤の量**は望ましい特性に最適化される事がある。

【0248】

a. HAを水酸化ナトリウムの中で溶解させる（pHが高くなるにつれて、反応の反応性が増加していく）

40

b. 架橋反応

i. 架橋剤を添加する

ii. 混合物を機械的に混合する

iii. 架橋ステップの数は、望ましい特性に応じて変化することがある

c. 同じ架橋剤及び/又は別の架橋剤の種類で「b」ステップを繰り返す。架橋剤の量は、望ましい物理的な特性に応じて同じ又は違う場合がある。

【0249】

d. 反応生成物の精製：主生成物が干渉されることなくその機能を実行できるように、加工助剤、未反応の反応物、不純物を除去するように反応性生物を洗浄することが重要である。

50

【0250】

この反応で使用される全ての化学成分が水溶性であり、反応生成物は水溶性ではないので、架橋HA高分子はDI水を用いて精製することができる。更に、水は反応生産物を膨潤させ、不純物を簡単に高分子から拡散させて除去する多くの折り目を作り出す。さらに、水は不純物が簡単にポリマーから拡散し、排除することができ、反応生成物の多くのひだを膨潤します。DI水での連続洗い流しは、精製プロセスをスピードアップし、反応生成物から効果的に望ましくない不純物を取り除く。

【0251】

架橋HAと混合する前及び、架橋HAと混合した後の水のpHがプロセスを通じての洗浄効果のための良好な間接的指示薬である。The of the water pH before and after should not significantly changed.

e. リン酸緩衝生理食塩水を釣り合わせ、pHが約7.4であるレベルを平均させる：架橋HAから全ての水を排出する。少なくとも架橋HAのポリウムの3倍までの新鮮なPBSを添加し、混合物溶液が約2時間で釣り合うようにする。pHが7.4 ± 0.7程度になるまで、更にプロセスを2回繰り返す。

【0252】

2. 機械的圧力ポンプ：この取り組み方の利点はその連続的な性質である。連続的な処理の利点は、製造できる生成物の量での柔軟性である。上限はあるが、定量のバッチ処理とは違っている。

【0253】

a. HAをNaOHに溶解させ、NaOHの濃度はHAポリマー鎖の反応性OH端子に直接的な影響を与える。

【0254】

b. 架橋反応は、NaOH溶液中のHAが架橋剤と接触したとたん、すぐに行われる。

【0255】

i. 架橋剤の種類が変化することがある。

【0256】

ii. 架橋剤の量が変化することがある。

【0257】

c. 混合が迅速且つ効率的に行われることは、最終生成物の再現性にとって重要である。

【0258】

i. 図2に示されるように、この方法での混合は、反応混合物が変化する様々なパイプ内径の中で移動する間に行われる。

【0259】

ii. 反応混合物が混合管装置に移動する回数は、望ましい物理的特性が達成されるように最適化することができる。

【0260】

3. 機械的蠕動ポンプ：この取り組み方は機械的圧力ポンプの方法と比べてこの方法では混合成分が異なる。機械的圧力の方法では、混合機構は混合管装置(図1)で、蠕動ポンプの方法では、混合機構はローラの中である(ポンピング機構も同様)。

【0261】

4. 分子マクロ構造の2軸配向のある架橋HA

a. 界面活性剤

本実施形態では、HA分子は、ビニルの機能的終端分子とエーテル結合を安易に形成するなどのようなアルカリ媒体の中の反応性ヒドロキシルであろういくつかのヒドロキシル末端を有する。そのアルカリ媒体は多くのHA修飾物を一段の反応にする。

【0262】

10

20

30

40

50

1, 4 - butanediol dimethacrylate ,
 1, 4 - butanediol diacrylate ,
 1, 6 - hexanediol diacrylate ,
 1, 6 - hexanediol dimethacrylate ,
 Ethylene glycol dimethacrylate
 Ethylene glycol diacrylate
 Poly(ethylene glycol) * diacrylate
 Poly(ethylene glycol) * dimethacrylate
 * は、分子量ポリエチレングリコールの多様な種類を示す。

【0263】

10

これらの疎水性架橋剤は通常、水溶性 / 水混和性ではありません。各分子が合わせる好ましい環境を作り出し、化学反応を起こすための界面活性剤は必要とされる。極性のスペクトルは界面活性剤および媒体によって媒介されて作成されるため、架橋 HA 生成物は高い 2 軸配向性である。極性及び非極性分子の配向マクロ構造は、生成物が入っている媒体の極性の配向に従う。

【0264】

反対分子マクロ構造は媒体の表面から離れて移動し、分子の中心コアに集まる。この場合には、より疎水性相貫通互架橋 HA 網目。分子は元の柔らかさ及び生体適合性を維持する。

【0265】

20

さらに、分子マクロ構造架橋 HA は、同様の物理的性質を有する隣接分子種に配向される。この特性は、物理的性質が自動調整であるという点で独特である。

【0266】

b . 独立架橋前 HA の使用

一実施形態に係る生成物の特徴付けに使用される他の方法は、その制限にならず実施形態の好適な実施形態を解説する以下の例に記載されている。変形及び修正は、もちろん、本発明の精神と範囲から逸脱することなく行われることができる。例えば、HA は、顔面充填剤、皮膚充填剤、お尻充填剤、胸充填剤及び他の身体部分の充填剤として使用することができる。本発明の移植組織は、移植の前か後に、指定薬物及び他の化学薬品又は診断用薬で点滴することができる。このような薬剤の例としてはこれらに限定されないが、抗生物質、化学療法、他のがん治療学、照射効果のための小線源治療的材料、領域の同定のための X 線不透過性材料又は金属材料、出血抑制のための止血剤、成長因子ホルモン、免疫系因子、遺伝子治療、生化学的指標又はベクター、患者の治療効果を高め得る治療用物質又は診断材料の他の種類が挙げられる。

30

【0267】

1 IPN 実施形態の利点は、次の一つ又はそれ以上を含む。自然な感じは、既存の組織と移植組織の間の特性の粘弾性調和によって得られる。これは、粒径及び粒度分布の比率を介して流動特性を通して移植組織の粘性成分を操作することによって行うことができる。弾性成分は、材料三次構造（分子量及び立体障害）及び架橋密度の中に固有である。相互貫通高分子網目ヒドロゲルは、多くの望ましい特性を有する。これらは、高含水率の

40

【0268】

本発明は、特に胸、お尻、又は身体の移植組織に関して解説していたが、本発明は、顔など他の身体部分へ適用できることは当業者なら言うまでもない。従って、本発明は、欠落した又は損傷した軟部組織・構造組織・骨の取換え、或いは、化粧組織又は骨材の交換にも適用可能である。

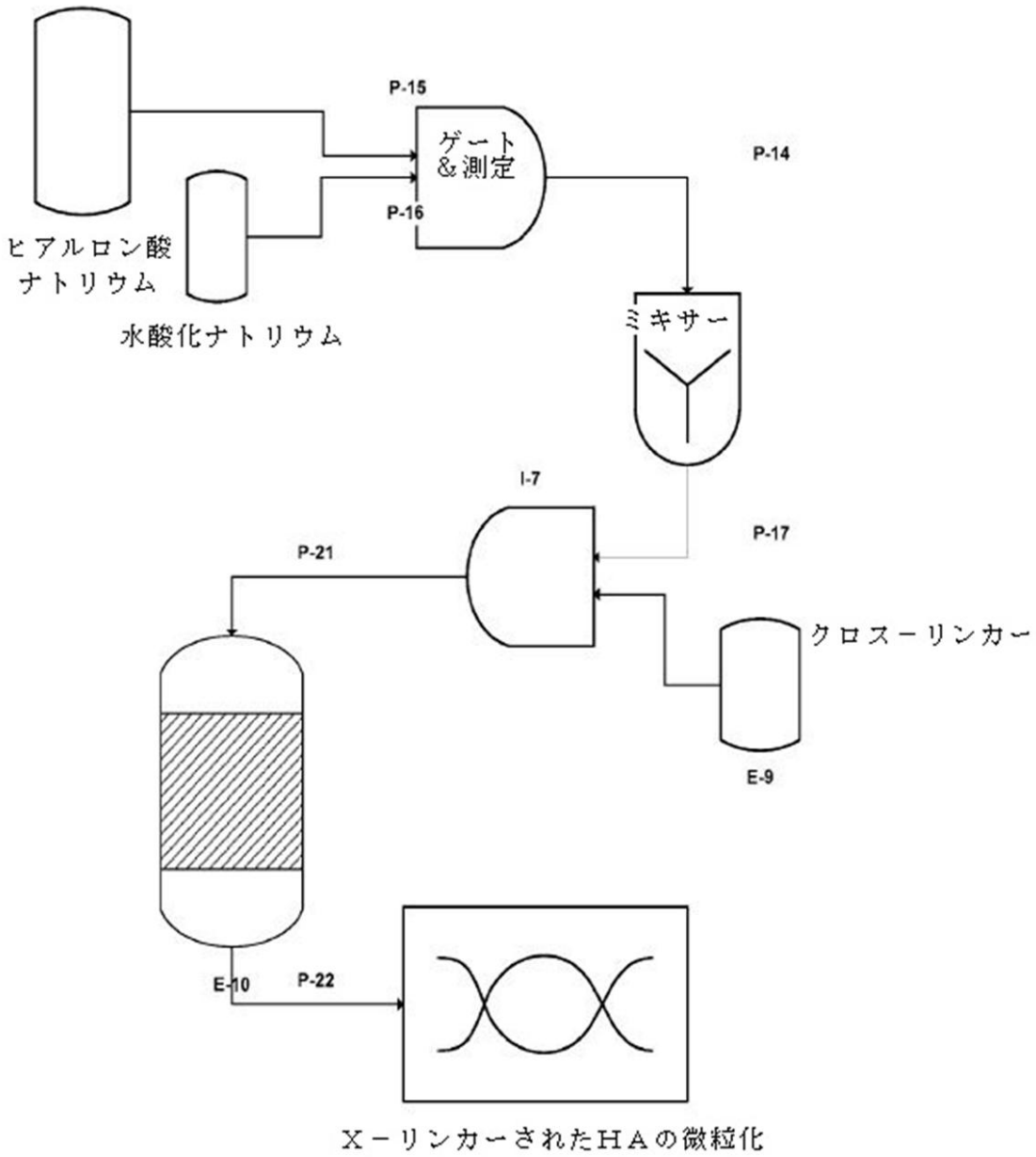
【0269】

本発明はその特定の実施形態に関して説明されていたが、多くの変形・修正及び他の用

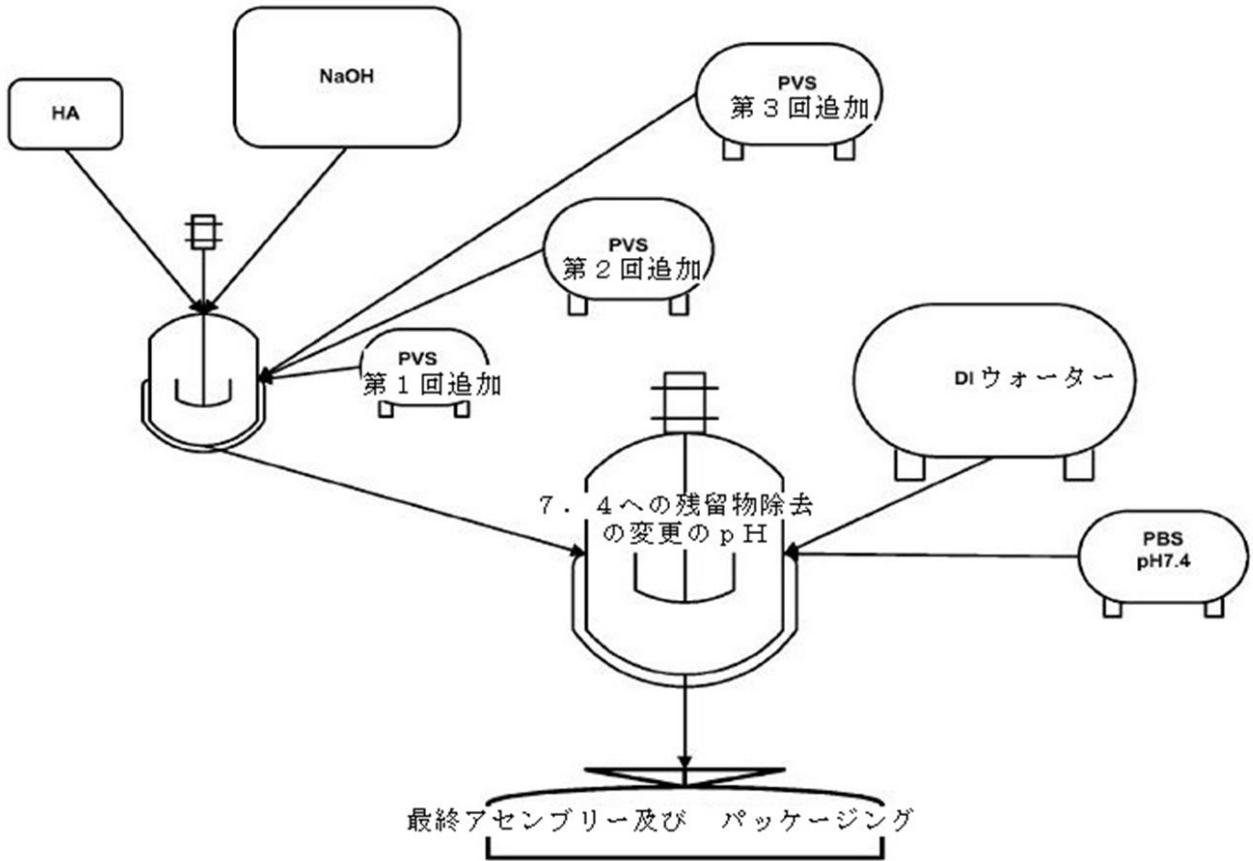
50

途は当業者には明らかになるであろう。従って、本発明がここの特定の開示ではなく、添付の特許請求範囲だけによって制限されることが望ましいである。一実施形態による生成物の特徴付けのために使用される他の方法は、その制限にならない一実施形態の好ましい実施形態を解説する以下の例で述べられる。本発明の範囲及び趣旨から逸脱せずに、変化及び修飾は、言うまでもなく、実施できるであろう。

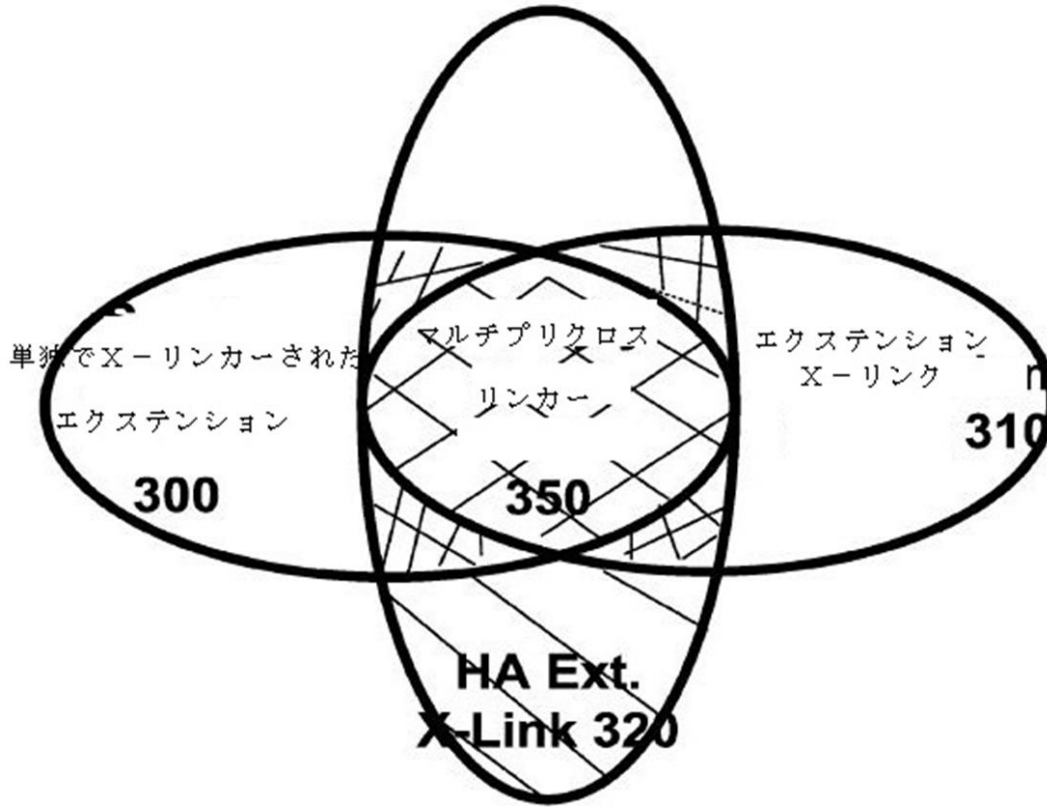
【図1】





【 図 2 】



【 図 3 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/064586
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61L 27/14(2006.01)i, A61L 27/20(2006.01)i, A61L 27/24(2006.01)i, A61L 2/10(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61L 27/14; A61K 9/14; A01N 63/00; A61B 17/03; C08G 83/00; C12N 5/08; A61K 47/42; C08G 63/91; A61K 9/08; C08F 283/12		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: interpenetrating polymer network(IPN), fillle		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007-0026518 A1 (HEALY et al.) 1 February 2007 See paragraphs [0012], [0044], [0071], [0073], [0081], [0208].	1,7-9,11-23
A	US 6281341 B1 (MARES-GUIA et al.) 28 August 2001 See column 4, lines 24-58; column 5, lines 16-26.	1,7-9,11-23
A	US 6224893 B1 (LANGER et al.) 1 May 2001 See column 3, lines 5-15; claim 11.	1,7-9,11-23
A	EP 1167405 A2 (DOW CORNING CORPORATION et al.) 2 January 2002 See abstract; claims 1-7.	1,7-9,11-23
A	US 2010-0256671 A1 (FALUS, GEORGE) 7 October 2010 See abstract; figure 34	1,7-9,11-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March 2013 (27.03.2013)		Date of mailing of the international search report 01 April 2013 (01.04.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, Dong Wook Telephone No. 82-42-481-8163 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/064586

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 2-6,10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 2-6 and 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/064586

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007-0026518 A1	01.02.2007	CA 2603116 A1 EP 1869169 A2 US 2004-0001892 A1 US 2009-0123412 A1 US 7985601 B2 US 8298606 B2 WO 2006-105278 A2 WO 2006-105278 A3	05.10.2006 26.12.2007 01.01.2004 14.05.2009 26.07.2011 30.10.2012 05.10.2006 09.04.2009
US 6281341 B1	28.08.2001	AT 275585 T BR 9809326 A DE 69826119 D1 DE 69826119 T2 EP 0977780 A1 EP 0977780 A4 EP 0977780 B1 WO 98-49202 A1	15.09.2004 04.07.2000 14.10.2004 15.09.2005 09.02.2000 27.02.2002 08.09.2004 05.11.1998
US 6224893 B1	01.05.2001	AU 1998-75956 B2 CA 2290743 A1 CA 2290743 C EP 1011633 A1 JP 04343274 B2 JP 2002-503230 A KR 10-0537907 B1 WO 98-52543 A1	23.11.2000 26.11.1998 20.10.2009 28.06.2000 17.07.2009 29.01.2002 21.12.2005 26.11.1998
EP 1167405 A2	02.01.2002	EP 1167405 A3 JP 2001-316589 A	27.03.2002 16.11.2001
US 2010-0256671 A1	07.10.2010	KR 10-2013-009826 A US 2011-0066182 A1 US 8314211 B2 WO 2011-123346 A1	23.01.2013 17.03.2011 20.11.2012 06.10.2011

フロントページの続き

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

(72)発明者 ファン, ロク

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95071, サラトガ, ピーオー ボックス 68

(72)発明者 トラン, パオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95071, サラトガ, ピーオー ボックス 68

(72)発明者 グエン, トゥアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95071, サラトガ, ピーオー ボックス 68

Fターム(参考) 4C081 AB37 AB38 BA17 CA072 CA161 CA182 CB011 CB02 CC05 CD011

CD012 CD021 CD051 CD081 CD111 CD121 CD31 CE02 DA12