

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4993465号
(P4993465)

(45) 発行日 平成24年8月8日(2012.8.8)

(24) 登録日 平成24年5月18日(2012.5.18)

(51) Int. Cl.

F 1

C 0 8 B 37/08	(2006.01)	C 0 8 B 37/08	
C 0 8 B 37/10	(2006.01)	C 0 8 B 37/10	
A 6 1 K 31/726	(2006.01)	C 0 8 B 37/08	Z
A 6 1 K 31/727	(2006.01)	A 6 1 K 31/726	
A 6 1 K 31/728	(2006.01)	A 6 1 K 31/727	

請求項の数 25 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-542843 (P2006-542843)
 (86) (22) 出願日 平成16年12月6日 (2004.12.6)
 (65) 公表番号 特表2007-520589 (P2007-520589A)
 (43) 公表日 平成19年7月26日 (2007.7.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/040726
 (87) 国際公開番号 W02005/056608
 (87) 国際公開日 平成17年6月23日 (2005.6.23)
 審査請求日 平成19年12月5日 (2007.12.5)
 (31) 優先権主張番号 60/526,797
 (32) 優先日 平成15年12月4日 (2003.12.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506051429
 ユニバーシティ オブ ユタ リサーチ
 ファウンデーション
 アメリカ合衆国 ユタ 84108, ソ
 ルトレークシティ, アラバマ州 ドライ
 ブ 615, スイート 310
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

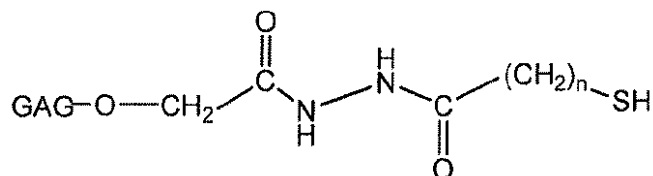
(54) 【発明の名称】 変性された高分子ならびにその製造方法および使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

変性グリコサミノグリカンであって、以下の構造：

【化1】



に相当し、ここで、

「GAG」は、複数の一級水酸基を有するグリコサミノグリカンであり、

「GAG-O」は、該グリコサミノグリカン上の水酸基の残基を表し、

nは、2または3であり、そして

該グリコサミノグリカンの1個の一級水酸基から100%の一級水酸基が、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$ で置換される、
 変性グリコサミノグリカン。

【請求項2】

0.1%~40%のグリコサミノグリカンの一級水酸基が、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$ で置換される、請求項1に記載の変性グリコサミノグリカン。

10

20

【請求項 3】

前記グリコサミノグリカンが、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン、デルマタン硫酸、ヘパリンまたはヘパラン硫酸からなる群より選択される、請求項 1 または 2 に記載の変性グリコサミノグリカン。

【請求項 4】

前記グリコサミノグリカンがヒアルロン酸である、請求項 1 または 2 に記載の変性グリコサミノグリカン。

【請求項 5】

「GAG-O-」が、前記ヒアルロン酸に存在する N - アセチルグルコサミン残基内の一級 C - 6 水酸基である水酸基の残基を表す、請求項 4 に記載の変性グリコサミノグリカン。

10

【請求項 6】

複数の二級水酸基をさらに含み、ヒアルロン酸の少なくとも 1 つの二級水酸基が -CH₂C(O)NH-NHC(O)(CH₂)_n-SH で置換される、請求項 5 に記載の変性グリコサミノグリカン。

【請求項 7】

「GAG-O-」が、前記グリコサミノグリカンの繰返し二糖の非ウロン酸糖成分の一級 C - 6 水酸基である水酸基の残基を表す、請求項 3 に記載の変性グリコサミノグリカン。

【請求項 8】

前記 GAG が硫酸グリコサミノグリカンを含む、請求項 1 に記載の化合物。

20

【請求項 9】

前記 GAG が、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、およびヘパラン硫酸からなる群より選択される、請求項 8 に記載の化合物。

【請求項 10】

n が 2 である、請求項 1 または 2 に記載の変性グリコサミノグリカン。

【請求項 11】

n が 3 である、請求項 1 または 2 に記載の変性グリコサミノグリカン。

【請求項 12】

n が 2 である、請求項 4 に記載の変性グリコサミノグリカン。

【請求項 13】

n が 3 である、請求項 4 に記載の変性グリコサミノグリカン。

30

【請求項 14】

生細胞および請求項 1 に記載の変性グリコサミノグリカンを含む医薬組成物であって、該変性グリコサミノグリカンが架橋され得る、医薬組成物。

【請求項 15】

請求項 1 または請求項 2 に記載の変性グリコサミノグリカンを含む、医薬組成物。

【請求項 16】

前記変性グリコサミノグリカンの n の値が 2 に等しい、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記変性グリコサミノグリカンが、チオール化された化合物で架橋されている、請求項 15 に記載の組成物。

40

【請求項 18】

前記チオール化された化合物が、チオール化されたコラーゲンまたはチオール化されたゼラチンである、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記チオール化された化合物がチオール化されたゼラチンであり、さらに、該チオール化されたゼラチンが、3,3'-ジチオビス(プロパン酸ジヒドラジド)-変性ゼラチン(ゼラチン-DTPH)である、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記変性グリコサミノグリカンが、ポリエチレングリコールジアクリレート(PEGDA

50

)で架橋されている、請求項15に記載の組成物。

【請求項21】

一次細胞または不死化細胞の増殖を支援するのに有効な、請求項1に記載の変性グリコサミノグリカンまたは請求項15に記載の組成物。

【請求項22】

前記細胞が、腫瘍細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、幹細胞、上皮細胞、神経細胞、肝臓から誘導された細胞、内皮細胞、心細胞、筋肉細胞および骨芽細胞からなる群より選択される、請求項21に記載の変性グリコサミノグリカンまたは組成物。

【請求項23】

移植可能な物品であって、該移植可能な物品が、該移植可能な物品の表面上にコーティングを含み、該コーティングが、請求項1に記載の変性グリコサミノグリカンを含み、該物品が、縫合糸、クラップ、ステント、プロテアーゼ、カテーテル、金属ネジ、骨プレート、ピン、または包帯である、移植可能な物品。

10

【請求項24】

外科的処置後の癒着を妨げるための組成物であって、請求項1に記載の変性グリコサミノグリカンまたは請求項15に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項25】

骨または軟骨を修復するための組成物であって、請求項1に記載の変性グリコサミノグリカンまたは請求項15に記載の組成物を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

(謝辞)

本発明への研究の先導は、国立衛生研究所、助成金番号第N I H 5 R 0 1 D C 0 4 6 6 3、R 4 1 D C 0 0 7 0 1 5、およびR 4 1 E B 0 0 4 2 2 6により、一部援助された。米国連邦政府は、本発明において特定の権利を有し得る。

【0002】

(関連出願の相互参照)

本出願は、米国特許仮出願番号第60/526,797号(2003年12月4日出願)に対する優先権を主張する。この出願は、その教示のすべてについて、その出願の全体が本明細書中に参考として援用される。

30

【背景技術】

【0003】

(背景)

薬学的用途で高分子を使用することは、大いに注目されている。時によっては、2以上の高分子を組合せ、複数の活性を持つ新しい高分子骨格を製造することが望ましい場合もある。しかし、2または高分子を組み合わせる既存の技術には数多くの困難が存在する。たとえば、高い機械的強度を持つヒドロゲルを製造するために必要なアルカリ性条件あるいは高温は、厄介でかつ過酷である。架橋剤を使用して高分子骨格を造り出すことはある程度の成功を収めているが、架橋剤は比較的小さく、細胞毒性分子であることが多く、また得られる骨格は、微量の未反応試薬および副生物を取り除くために、抽出または広範に渡って洗浄しなければならず(非特許文献1)、したがって多く医療用途において使用されていなかった。容易な方法で製造することのできる生理学的適合性のある高分子骨格は、治療的補助として有益になる前に必要である。本明細書には、化合物および2以上の高分子のような分子を穏やかな条件で結合することのできる方法が記載されている。

40

【非特許文献1】Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F. Adv. Drug. Del. Rev. 2002年, 第54巻, 13-36頁

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

50

(要旨)

本明細書には、架橋を促進するために変性された高分子のような化合物が記載されている。一態様では、該高分子は、アルコキシアミノ化反応によって変性され、得られたアルコキシアミノ化高分子は、それ自身または他の高分子との架橋に供することができる。別の態様では、該高分子はヒドラジド化合物と反応することができる基で変性され、これは架橋を促進する。また本明細書には、変性高分子の製造方法および使用方法も記載されている。

【0005】

ここで記載される利点は、一部は以下に記載され、一部は該記載から明らかになり、あるいは以下に記載される態様の実施によって分かるものもある。以下に記載する利点は、構成および特に添付の請求の範囲での指摘と組み合わせることによって、実現され到達されるであろう。今まで記載した一般的説明およびこれから記載する詳細な説明はどちらも例示であり説明のためのものであり、これらに限定されるものではないことは理解すべきである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

(詳細な説明)

本発明の化合物、複合体、組成物および/または方法を開示し、説明する前に、以下に記載の態様は、具体的な化合物、合成方法、または用途に限定されるのではなく、当然変更しうることを理解すべきである。さらに、本明細書で使用される専門用語は、特定の態様を記載する目的のためだけに使用するものであり、限定することを意図するものではないことも理解すべきである。

【0007】

本明細書およびこれに続く請求の範囲において、数多くの定義されている用語に関して以下の意味を持つことを参考にされたい。

【0008】

本明細書および添付の請求の範囲で使用される、単数形「a」、「an」および「the」は、他に明らかに記載のない限り、複数形を含むものであることに注意しなければならない。従って、たとえば、「医薬担体」という記載にはそのような担体などのを2以上含む混合物も含む。

【0009】

「任意の」あるいは「任意に」は、続いて記載される出来事または状況が、起こるかもしれないし、起こらないかもしれないことを意味し、また、出来事または状況が起こる事例およびそれが起こらない事例も意味する。たとえば、句「任意に置換された低級アルキル」は、低級アルキル基が置換されたまたは置換されていないことを意味し、これは置換されていない低級アルキルと置換されている低級アルキルの両方を含む記載であることを意味する。

【0010】

範囲は、本明細書では、1つの特定の値「約」からおよび/または他の特定の値「約」として表される。そのような範囲で表される場合、別の態様は、1つの特定の値からおよび/または別の特定の値までを含む。同様に、先行詞「約」を使用して、値を近似値として表現する場合、特定の値は別の態様を形成すると理解される。さらに、各範囲の終点は、もう一方の終点との関係において、およびもう一方の終点とは独立して重要であると理解される。

【0011】

組成物または物品における特定の要素または組成の重量の、明細書および最終的な請求項における基準である重量部は、要素または組成と重量部が表記されているその組成物または物品の他の品の要素または組成との間の重さ関係を表す。したがって、2重量部の成分Xと5重量部の成分Yとを含む化合物において、XおよびYは2:5の重量比で存在し、かつ該化合物中に他の成分が含まれているかどうかに関わりなく、そのような比で存在

10

20

30

40

50

する。

【0012】

成分の重量パーセントは、特に断らない限り、その成分を含む製剤または組成物の全体の重量に対するものである。

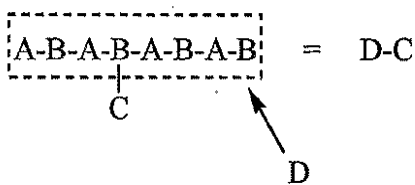
【0013】

本明細書および最終的な請求の範囲で使用される化学種の「残基」は、その化学種から実際に得られるものであるかどうかにかかわらず、化学種、特に反応スキームまたは後続の製剤や化学製品の結果として得られる生成物の部分を言う。繰返し単位 A - B のポリマーで単位 B の 1 つが C で変性されると、得られるポリマーは、式 D - C (式中、D は A - B ポリマーの残りの部分 (すなわち残基) である) で表すことができる。

10

【0014】

【化31】



本明細書および最終的な請求の範囲で使用されるフラグメントは、高分子の部分あるいは高分子全体を言う。たとえば、繰返し単位 A - B を持つポリマーは、以下のように描かれ、繰返し単位の 1 つは C で変性されている。B - C 単位は、以下に描かれる繰返し単位 A - B を構成するポリマーのフラグメント E である。

20

【0015】

【化32】



本出願の全体を通して使用される $R^1 - R^5$ 、 R^7 、 R^8 、 R^{20} 、 $R^{25} - R^{30}$ 、 n 、 n' 、LG、AE、L、J、G、M、Q、U、V、W、X、X'、X''、Y および Z のような変数は、断らない限り、先に定義した変数と同じである。

30

【0016】

本明細書で使用する用語「アルキル基」は、分岐状のまたは分岐していない、炭素数 1 ~ 24 個の飽和炭化水素であり、たとえば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、デシル、テトラデシル、ヘキサデシル、エイコシル、テトラコシルなどが挙げられる。「低級アルキル」基は、1 ~ 6 個の炭素を含むアルキル基である。

【0017】

本明細書で使用する用語「ポリアルキレン基」は、互いに結合する 2 以上の CH_2 基を有する基である。ポリアルキレン基は、式 $-(CH_2)_n-$ によって表すことができ、式中 n は 2 ~ 25 の整数である。

40

【0018】

本明細書で使用する用語「ポリエーテル基」は、式 $-(CHR)_nO)_m-$ (式中、R は水素または低級アルキル基であり、 n は 1 ~ 20 の整数であり、 m は 1 ~ 100 の整数である) で表される基である。ポリエーテル基の例として、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、およびポリブチレンオキシドが挙げられる。

【0019】

本明細書で使用する用語「ポリチオエーテル基」は、式 $-(CHR)_nS)_m-$ (R は水素または低級アルキル基であり、 n は 1 ~ 20 の整数であり、 m は 1 ~ 100 の整数

50

である)で表される基である。

【0020】

本明細書で使用する用語「ポリイミノ基」は、式 $-(CHR)_nNR_m-$ (式中、Rはそれぞれ独立して、水素または低級アルキル基であり、nは1~20の整数であり、mは1~100の整数である)で表される基である。

【0021】

本明細書で使用する用語「ポリエステル基」は、少なくとも2個のカルボン酸基を有する化合物と少なくとも2個の水酸基を有する化合物との反応によって製造される基である。

【0022】

本明細書で使用する用語「ポリアミド基」は、少なくとも2個のカルボン酸基を有する化合物と少なくとも2個の置換されていないまたはモノ置換されたアミノ基を有する化合物との反応によって製造される基である。

10

【0023】

本明細書で使用する用語「アリール基」は、任意の炭素系芳香族基であり、ベンゼン、ナフタレンなどが挙げられるが、これらに限定されない。また、用語「芳香族」は、芳香族基の環内に少なくとも1個のヘテロ原子を有する芳香族基として定義される「ヘテロアリール基」も含む。ヘテロ原子の例として、窒素、酸素、イオウ、およびリンが挙げられるが、これらに限定されない。アリール基は、置換されてもよく、また置換されていなくてもよい。アリール基は、アルキル、アルキニル、アルケニル、アリール、ハライド、ニトロ、アミノ、エステル、ケトン、アルデヒド、ヒドロキシ、カルボン酸またはアルコキシ(しかしこれらに限定されない)などの基の1以上によって置換されてもよい。

20

【0024】

本明細書で使用する用語「ヒドロカルビル基」は、親炭化水素から水素原子が除かれて得られる1価の部分の意味する。ヒドロカルビルの代表例として、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、ウンデシル、デシル、ドデシル、オクタデシル、ノナデシル、エイコシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル、ペンタコシルなどの1~20個の炭素原子を持つアルキル、およびその異性体；フェニル、トリル、キシリル、ナフチル、ビフェニル、テトラフェニルなどの6~12個の炭素原子を持つアリール；ベンジル、フェネチル、フェンプロピル、フェンブチル、フェンヘキシル、ナフトオクチルなどの7~12個の炭素原子を持つアラルキル；シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチルなどの3~8個の炭素原子を持つシクロアルキル；ビニル、アリル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、ウンデセニル、ドデセニル、トリデセニル、ペンタデセニル、オクタデセニルおよびペンタコシニルのような2~10個の炭素原子を持つアルケニルおよびその異性体が挙げられる。ヒドロカルビル基としては、1~20個(両端を含む)の炭素原子を有するのが好ましい。

30

【0025】

本明細書で使用する用語「置換されたヒドロカルビルおよびヘテロカルビル」は、先に定義したヒドロカルビルまたはヘテロカルビル部分であって、そこに含まれる1以上の水素原子が、変性多糖類の望ましい製造に悪影響を与えない化学基と置き換わった部分の意味する。そのような基の代表的なものとして、アミノ、ホスフィノ、四級窒素(アンモニウム)、四級リン(ホスホニウム)、ヒドロキシ、アミド、アルコキシ、メルカプト、ニトロ、アルキル、ハロ、スルホン、スルホキシド、リン酸塩、亜リン酸塩、カルボキシレート、カルバメート基などが挙げられる。

40

【0026】

本明細書で使用する用語「ヒドラジド化合物」は、式 $NH_2NRC(O)-$ (式中、Rは水素、低級アルキル基、アミド基、カルバメート基、水酸基またはハロゲン基である)で表されるヒドラジド基を少なくとも1個有する任意の化合物である。

【0027】

50

本明細書で使用する用語「ヒドラジド反応性基」は、ヒドラジド基の一級または二級アミノ基と反応し、新しい共有結合を造ることのできる任意の基である。ヒドラジド反応性基の例として、ケトン、アルデヒドまたは活性化カルボキシレート基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

本明細書で使用する用語「アミノオキシエーテル化合物」は、式 $RONHR'$ (式中、Rは置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリアル基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカアリアル基、またはこれらの組合せであり、R'は水素または低級アルキル基である) で表される任意の化合物である。-ONHR'基は本明細書ではアミノオキシ基と言う。

10

【0029】

本明細書で使用する用語「アミノオキシ反応性基」は、アミノオキシ基のアミノ基と反応して、新しい共有結合を造ることのできる任意の基である。アミノオキシ反応性基の例として、ケトン、アルデヒドまたは活性化カルボキシレート基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0030】

(A.材料)

開示される方法および組成物用に使用することができ、それと併用することができ、その製造において使用することができる材料を記載し、あるいは開示される方法および組成物の生成物も記載する。これらのおよび他の材料が本明細書で開示され、これらの材料の組合せ、サブセット、相互作用、基などが開示され、これらの化合物の種々の単独および集団的な組合せおよび置換の具体的な参考は明示的に開示されないかもしれないが、各々、本明細書で具体的に想定され説明されることが理解される。したがって、もし分子A、BおよびCのクラスが開示され、分子D、EおよびFのクラスと組合せ分子A-Dの例が開示されれば、たとえそれぞれが個々に挙げられていなくても、それぞれ、個々に集合的に想定される。したがって、この例では、組合せA-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-EおよびC-Fはそれぞれ具体的に想定され、A、BおよびC；D、EおよびF；および例示組合せA-Dの開示から開示されたものと考えべきである。同様に、これらの任意のサブセットまたは組合せも具体的に想定され、開示される。したがって、たとえば、A-E、B-FおよびC-Eのサブグループは具体的に想定され、A、BおよびC；D、EおよびF；および例示的組合せA-Dの開示から開示されると考えるべきである。この概念は、開示される組成物の製造および使用方法のステップ(これらに限定されない)を始めとして全ての態様に適用される。したがって、もし、実施することができる種々の追加のステップがある場合、これらの各追加のステップは、開示された方法の任意の具体的な実施形態または実施形態の組合せで実施することができ、そのような組合せのそれぞれは具体的に想定され、開示されていると考えるべきであると理解される。

20

30

【0031】

本明細書で記載される任意の化合物、組成物および複合体は、もしそれらが塩またはエステルに変換しうる基を有していれば、医薬的に許容しうるまたはそのエステルでもある。医薬的に許容しうる塩は、遊離の酸を適量の医薬的に許容しうる塩基で処理することによって製造する。医薬的に許容しうる塩基の代表例として、水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、水酸化第一鉄、水酸化亜鉛、水酸化銅、水酸化アルミニウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、リジン、アルギニン、ヒスチジンなどが挙げられる。

40

【0032】

別の態様では、もし化合物が塩基性基を有する場合は、たとえばHClまたはH₂SO

50

4のような酸でプロトン化し、カチオン性塩を製造することができる。一態様では、化合物を酒石酸でプロトン化し酒石酸塩を製造することができる。一態様では、化合物と酸または塩基との反応を、水単独または不活性な水混和性有機溶剤との組合せ中で、室温のような約0 ~ 約100の温度で行う。適用可能なある態様では、ここに記載の化合物の使用する塩基に対するモル比は、任意の特定の塩に望ましい比が提供されるように選択される。たとえば、出発材料が遊離酸のアンモニウム塩を製造する場合は、該出発材料を約1当量の医薬的に許容しうる塩基で処理して塩を得ることができる。

【0033】

エステル誘導体は、一般的に前駆体として製造され、化合物の酸の形とされる。したがってプロドラクとして作用できる。通常、これらの誘導体は、メチル、エチルなどの低級アルキルエステルである。

10

【0034】

(1. 高分子)

ここで開示の高分子は、少なくとも1個のヒドラジド反応性基および/またはアミノオキシ反応性基を持つ任意の化合物である。ヒドラジド反応性基およびアミノオキシ反応性基の例として、塩またはそのエステルを含むカルボキシル基またはアミド基が挙げられるが、これらに限定されない。ヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基は、高分子上に自然に存在する、または高分子を化学的に変性してヒドラジド反応性基またはアミノアルコキシ反応性基を高分子上に導入することもできる。

【0035】

一態様では、該高分子は、オリゴヌクレオチド、核酸またはその代謝的に安定な類縁体、ポリペプチド、脂質、糖タンパク質または糖脂質である。別の態様では、該高分子は、多糖類、タンパク質または合成ポリマーである。

20

【0036】

(a) オリゴヌクレオチド)

用語「オリゴヌクレオチド」は、リボ核酸またはデオキシリボ核酸のオリゴマーまたはポリマーを言う。この用語は、天然の核酸塩基、糖類および共有結合糖間(骨格)結合から構成されるオリゴヌクレオチド、同様に機能する、天然でない部分を持つ変性オリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、総称的にヌクレオチドまたはヌクレオシドとして知られている繰返し単位のポリマーである。変性(天然の)ヌクレオチドは3つの成分、すなわち(1)その窒素原子の1つによって結合する窒素含有塩基、(2)5-炭素環状糖および(3)糖の炭素5とエステル結合しているリン酸塩を持つ。オリゴヌクレオチド鎖に導入されると、第一ヌクレオチドのリン酸塩は、隣の第二ヌクレオチドの糖の炭素3ともエステル結合する。未変性オリゴヌクレオチドの「骨格」は、(2)および(3)、すなわち、第一ヌクレオチドの糖のC5(5')位置と隣の第二ヌクレオチドのC3(3')位置との間にあるリン酸ジエステル結合によって互いに結合する糖類からなる。オリゴヌクレオチドは、特定の核酸との特異なハイブリド化を行うのに十分な同一性と数を持つヌクレオシドまたはヌクレオチド配列から構成されてもよい。

30

【0037】

((1) 核酸)

デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)およびペプチド核酸(PNA)のような核酸は、ある条件で水溶液に溶解するポリマー、ポリイオン性分子である。溶液における核酸の想定される三次元構造のイオン強度、対イオン、電荷中和、水和反応、有機沈殿剤、分子組成物などの機能は、当業者に公知である。一態様では、核酸は1本鎖または2本鎖DNAまたはRNAであってもよい。

40

【0038】

本明細書では、たとえば、核酸、本明細書で開示する別の任意のタンパク質、種々の機能性核酸を含む種々の分子を含む、核酸をベースとする種々の分子が開示される。開示される核酸は、たとえば、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体で造られている。本明細書で検討されるこれらのおよび他の分子の例示に限定はない。たと

50

えば、ベクターが細胞内で発現した場合、発現RNAは一般的にA、C、GおよびUで造られていると理解される。

【0039】

((2)ヌクレオチドおよび関連分子)

ヌクレオチドは、塩基部分、糖部分およびリン酸塩部分を含む分子である。ヌクレオチドはリン酸塩部分を介して互いに結合することができ、糖部分はヌクレオシド間結合を造る。ヌクレオチドの塩基部分は、アデニン - 9 - イル (A)、シトシン - 1 - イル (C)、グアニン - 9 - イル (G)、ウラシル - 1 - イル (U)、およびチミン - 1 - イル (T) であることが可能である。ヌクレオチドの糖部分は、リボースまたはデオキシリボースである。ヌクレオチドのリン酸塩部分は、5 価のリン酸塩である。ヌクレオチドの例として、3' - AMP (3' - アデノシンモノリン酸塩) または 5' - GMP (5' - グアノシンモノリン酸塩) が挙げられるが限定されない。

10

【0040】

ヌクレオチド類縁体は、塩基、糖またはリン酸塩部分のいずれかにある種の変性が加わったヌクレオチドである。ヌクレオチドへの変性は業界でよく知られ、たとえば、5 - メチルシトシン (5 - me - C)、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシンおよび 2 - アミノアデニン、また糖またはリン酸塩部分での変性も挙げられる。

【0041】

ヌクレオチド置換体は、ヌクレオチドと類似の機能的特性を持つが、リン酸塩部分を含まない分子データたとえばペプチド核酸 (PNA) がある。ヌクレオチド置換体は、ワトソン - クリックまたはフーグスティーン法において核酸を認識するが、リン酸塩部分以外の部分を介して互いに結合する分子である。ヌクレオチド置換体は、適正な標的核酸と相互作用した場合、二重らせん型構造を満たすことができる。

20

【0042】

また、他のタイプの分子 (共役体) をヌクレオチドまたはヌクレオチド類縁体と結合し、たとえば細胞の摂取を高めることができる。共役体は、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類縁体に化学的に結合することができる。そのような共役体として、コレステロール部分のような脂質部分が挙げられる (Lettinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553 - 6556) が、これらに限定されない。

30

【0043】

ワトソン - クリック相互作用は、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体のワトソン - クリック面との少なくとも 1 つの相互作用である。ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体のワトソン - クリック面として、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体に基づくプリン C2、N1 および C6 位置、およびヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体に基づくピリミジン C2、N3、C4 位置が挙げられる。

【0044】

フーグスティーン相互作用は、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類縁体のフーグスティーン面上で起こる相互作用であり、二重鎖 DNA の主溝中に現われる。フーグスティーン面として、プリンヌクレオチドの N7 位置および C6 位置での反応性基 (NH₂ または O) が挙げられる。

40

【0045】

このように、核酸は、ヌクレオチドで構成されたポリマーで、総称的に塩基類と呼ばれる。核酸分子は、核酸を構成する塩基類の番号によって特徴づけることができる。たとえば、ある実施形態で核酸被検体は、少なくとも 100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144

50

、 145、146、147、148、149、150、155、160、165、170
 、 175、180、185、190、195、200、210、220、230、240
 、 250、260、270、280、290、295、300、320、340、360
 、 380、400、425、450、475、500、550、600、650、700
 、 750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300
 、 1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100
 、 2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900
 、 3000、3200、3400、3600、3800、4000、4500、5000
 、 5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000
 、 9500、10000、11000、12000、13000、14000、1500
 0、16000、17000、18000、19000、20000、25000、50
 000、100000、200000、300000、400000、500000およ
 び1000000塩基または塩基ペアの長さである。別の態様では、DNAまたはRNA
 は少なくとも1、500塩基または塩基ペアである。

10

【0046】

(b) 医薬的に許容しうる化合物)

一態様では、高分子は、医薬的に許容しうる化合物でありえる。本明細書の一部を構成
 するものとしてその全内容を援用する米国特許第6,562,363号明細書に開示され
 る、生物学的に活性な任意の化合物を、医薬的に許容しうる化合物として使用すること
 ができる。一態様では、医薬的に許容しうる化合物として、生体系において全身的にまた
 障害部位で局所的に感染を予防しうる物質を含み、たとえば、ピロカルピン、ヒドロコ
 ルチゾン、プレドニゾン、コルチゾン、ジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、6
 oc-メチルプレドニゾン、コルチコステロン、デキサメタゾン、プレドニゾンなど
 (これらに限定されない)の抗炎症剤；ペニシリン、セファロsporin、バシトラシン、テ
 トラサイクリン、ドキシサイクリン、ゲンタマイシン、クロロキン、ビダラビンなど
 (これらに限定されない)を含む抗菌剤；サリチル酸、アセトアミノフェン、イブプロフェン
 、ネプロキセン、ピロキシカム、フルルビプロフェン、モルヒネなど(これらに限定され
 ない)を含む鎮痛剤；コカイン、リドカイン、ベンゾカインなど(これらに限定され
 ない)の局所麻酔薬；肝炎、インフルエンザ、はしか、風疹、破傷風、ポリオ、狂犬病など
 に対する抗体を刺激するイムノゲン(ワクチン)；酢酸ロイプロリド(LH-RHアゴニ
 スト)、フナファレリンなど(これらに限定されない)を含むペプチドが挙げられる。全
 ての化合物は、シグマ化学社(ミルウォーキー、ウィスコンシン州)から入手可能である。

20

30

【0047】

別の態様では、医薬的に許容しうる化合物は、細胞および組織の成長および生き残りを
 助長し、細胞の機能を増強しうる物質または代謝前駆体である。たとえば、ガングリオシ
 ド、神経発育因子などの神経成長助長物質；フィブロネクチン(FN)、ヒト成長ホルモ
 ン(HGH)、コロニー刺激因子、骨形態形成タンパク質、血小板由来増殖因子(PDGF)、
 インシュリン由来増殖因子(IGF-I、IGF-II)、トランスホーミング増
 殖因子-(TGF-)、トランスホーミング増殖因子-(TGF-)、上皮増殖
 因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、インターロイキン-1(IL-1)、
 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)およびケラチノサイト増殖因子(KGF)、乾燥骨材
 料などの硬組織または軟組織成長助長剤；メトトレキサート、5-フルオロウラシル、ア
 ドリアマイシン、ピンラスチン、シスプラチン、毒素に共役する腫瘍特異抗体、腫瘍壊
 死因子などの抗腫瘍剤が挙げられる。

40

【0048】

別の態様では、医薬的に許容しうる化合物は、プロゲステロン、テストステロン、およ
 び卵胞刺激ホルモン(FSH)(パースコントロール、受胎率強化)、インシュリンなど
 のホルモン；ジフェンヒドラミンなどの抗ヒスタミン薬；パパペリン、ストレプトキナー
 ゼなどの心臓血管剤；ヨウ化イソプロパミドなどの潰瘍治療剤；メタプロターナルサルフ
 ェイト、アミノフィリンなどの気管支拡張薬；テオフィリン、ナイアシン、ミノキシジル

50

などの血管拡張薬；トランキライザー、B - アドレナリン遮断薬、ドーパミンなどの中枢神経系作用薬；リスペリドンのような抗精神病薬、ナルトレキソン、ナロキソン、ブプレノルフィンのような抗麻酔薬；他の類似の物質を含みうる。全ての化合物は、シグマ化学社（ミルウォーキー、ウィスコンシン州）から入手可能である。

【0049】

(c) 脂質)

一態様では、中性脂質として合成または天然リン脂質を含むことができるが、これらに限定されない。必要ではないが、中性脂質は、一般的に2個の炭化水素鎖、たとえば、アシル鎖と極性、非極性または双極性ヘッド基とを有する。該2個の炭化水素鎖はどのような長さであってもよい。一態様では、炭化水素鎖は、約14～約22個の炭素原子の長さであり、不飽和度は様々に変わりうる。別の態様では、中性脂質は高分子量であり、高い融解温度を有する。

10

【0050】

中性リポソームを造るためにここで記載する方法および組成物において使用することができる中性脂質として、フォスファチジルコリン(PC)、フォスファチジルエタノールアミン(PE)、スフィンゴミエリン(SPM)、ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC)、ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)、ジミリストイルフォスファチジルコリン(DMPC)、ジアラキドノイルフォスファチジルコリン(DAPC)、卵フォスファチジルコリン、水添ダイズフォスファチジルコリン(HSPC)、グリコスフィンゴ脂質およびグリコグリセロ脂質、およびコレステロールのようなステロールが挙げられるが、これらに限定されない。これらは単独あるいは他の脂質との混合物として用いられる。一態様では、中性脂質は、ジステアロイル - フォスファチジルコリンである。そのような中性脂質は、市場で得ることができ、または当業者に公知の方法によって製造することができる。

20

【0051】

適切なアニオン脂質として、フォスファチジルグリセリン、フォスファチジルセリンまたはホスファチジン酸ヘッド基と、2個の約14～約22個の炭素原子を含む飽和脂肪酸鎖とを含むリン脂質が挙げられるが、これに限定されない。他の適切なアニオン脂質として、フォスファチジルセリン(PS)、フォスファチジルグリセリン(PG)、ホスファチジン酸(PA)、フォスファチジルイノシトール(PI)、カルジオリピン、ジミリストイルフォスファチジルグリセリン(DMPG)およびジパルミトイルフォスファチジルグリセリン(DPPG)が挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、アニオン脂質は、ジミリストイルフォスファチジルグリセリンである。このようなアニオン脂質は、市場で得ることができ、または当業者に公知の方法によって製造することができる。

30

【0052】

一態様では、脂質は、イノシトールヘッド基が0, 1または2個のリン酸塩を有する任意のホスホイノシチドでもよい。別の態様では、脂質はリゾ脂質であってもよく、リゾホスファチジン酸(LPA)、リゾフォスファチジルコリン(LPC)およびリゾフォスファチジルイノシトール(LPI)が挙げられるが、これらに限定されない。別の態様では、脂質は、スフィンゴ脂質であってもよく、スフィンゴシン - 1 - リン酸塩(SIP)またはスフィンゴファチジルコリン(LPC)が挙げられるが、これらに限定されない。別の態様では、脂質はセラミドであってもよい。

40

【0053】

(d) 多糖類)

本発明では業界で公知の任意の多糖類を使用することができる。多糖類の例として、デンプン、セルロース、グリコーゲンまたはアルギン酸、ペクチンまたはカルボキシメチルセルロースのようなカルボキシル化多糖類が挙げられる。一態様では、多糖類はグリコサミノグリカン(GAG)である。GAGは多くの交代性サブユニットを持つ一分子である。たとえば、HAは(GlcNAc - GlcUA -)_xである。他のGAGは異なる糖で硫酸化している。GAGは総称的に式A - B - A - B - A - B (式中、Aはウロン酸であ

50

り、BはO-またはN-硫酸化されているアミノ糖であり、AおよびB単位はエピマー含量または硫酸化に関し異質性でありえる)で表される。

【0054】

GAGは、たとえば、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン、デルマトン硫酸、ヘパリン、またはヘパリン硫酸のような開示された組成物に包含される、通例理解されている構造を持つ多くの異なるタイプがある。業界で知られている任意のGAGを、ここで記載される任意の方法で使用することができる。グリコサミノグリカンはシグマおよび多くの別の生化学供給者から購入することができる。多糖類を含むカルボン酸の中でも、アルギン酸、ペクチンおよびカルボキシメチルセルロースは、ここに記載される方法において有用である。

10

【0055】

一態様では、多糖類はヒアルロン酸(HA)である。HAは非硫酸化GAGである。ヒアルロン酸はよく知られており、2個の交互結合した糖、D-グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンで構成される天然の水溶性多糖類である。ポリマーは、親水性で、比較的低い溶質濃度の水溶液中で高い粘性を示す。自然にはしばしばナトリウム塩、ヒアルロン酸ナトリウムとして存在する。市販のヒアルロン酸およびその塩を製造する方法は、よく知られている。ヒアルロン酸は、生化学社、クリアソリューションズバイオテック社、ファルマシア社、シグマ社および他の多くの供給者から購入することができる。高分子量ヒアルロン酸は、しばしば100~10,000個の二糖単位の範囲内である。別の態様では、ヒアルロン酸の分子量の下限は、1,000Da、2,000Da、3,000Da、4,000Da、5,000Da、6,000Da、7,000Da、8,000Da、9,000Da、10,000Da、20,000Da、30,000Da、40,000Da、50,000Da、60,000Da、70,000Da、80,000Da、90,000Daまたは100,000Daからであり、上限は、200,000Da、300,000Da、400,000Da、500,000Da、600,000Da、700,000Da、800,000Da、900,000Da、1,000,000Da、2,000,000Da、4,000,000Da、6,000,000Daまたは10,000,000Daである。どの下限も、任意の上限と組み合わせることができる。別の態様では、式I I I中のYはヒアルロン酸ではない。

20

30

【0056】

((1)変性グリコサミノグリカン)

一態様では、業界における任意のグリコサミノグリカンは、化学的に変性され、グリコサミノグリカン上に存在する水酸基の少なくとも1個がヒドラジド反応性基で置換され、変性グリコサミノグリカンを生成することができる。グリコサミノグリカンは通常、複数の水酸基を有する。本明細書で使用する句「グリコサミノグリカン上に存在する水酸基の少なくとも1個がヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基と化学的に置換された」は、グリコサミノグリカン上に存在する水酸基の化学的操作により、水酸基の水素をヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基と置き換えるまたは置換することを言う。

【0057】

一態様では、変性グリコサミノグリカンは(a)グリコサミノグリカンと塩基とを反応させ、脱プロトン化グリコサミノグリカンを生成し、(b)該脱プロトン化グリコサミノグリカンをヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基を少なくとも1つ含む化合物と反応させることによって生成する。理論に縛られるつもりはないが、塩基が少なくとも1個の水酸基を脱プロトン化し、グリコサミノグリカンの対応アルコキッドを生成すると考えられている。元来一過性であるアルコキッドは、次いで少なくとも1個のヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基を持つ化合物と反応し、変性グリコサミノグリカンを生成する。脱プロトン化グリコサミノグリカンは、反応条件に応じて、ヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基と反応させてもよいし、させなくてもよい。ステップ(a)および(b)は、ステップ(a)の後脱プロトン化グリコサミノグリカンを単離し、

40

50

次いでステップ (b) 進むように、段階的に行うこともでき、あるいはステップ (a) および (b) をそのまま順番に行うこともできる。

【 0 0 5 8 】

p H、反応温度、溶剤および塩基のような反応条件に依るが、グリコサミノグリカン上に存在する水酸基はどれもヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基で置換することができる。さらに、ヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基で置換される水酸基の数は、反応条件によって変化する。変性グリコサミノグリカンの合成を行うための反応条件を以下に検討する。

【 0 0 5 9 】

脱プロトン化グリコサミノグリカンを生成するために、業界で知られている任意の塩基を使用することができる。有用な塩基の例として、水酸化物、アルコキシド、炭酸塩、アミン、リン酸塩またはアミドを含む塩基が挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、ナトリウム、カリウムまたは水酸化アンモニウムである。アルコキシドおよび炭酸塩も使用することができる。本発明で有用なアミドの例として、カリウムヘキサメチルジシラジド、ナトリウムヘキサメチルジシラジド、リチウムジイソプロピルアミド、リチウムヘキサメチルジシラジド、およびリチウム 2 , 2 , 6 , 6 - テトラメチルピペリジンが挙げられるがこれらに限定されない。塩基がアミドの場合、非水性溶剤を使用すべきことは、当業者には理解される。二級アミンの例として、モルフォリン、ジイソプロピルアミン、ピロリジン、2 , 2 , 6 , 6 - テトラメチルピペリジンが挙げられるがこれらに限定されない。三級アミンの例として、ジメチルエチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ジイソプロピルエチルアミン、コリジン、またはジアザピシクロノナン (D A B C O) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 0 】

グリコサミノグリカン脱プロトン化のために使用される塩基の量も、所望の置換の程度によって変化する。一態様では、脱プロトン化を水溶液中で行う場合、十分な脱プロトン化を確保するために、グリコサミノグリカンに対し過剰の塩基を使用する。

【 0 0 6 1 】

変性グリコサミノグリカンの合成は、通常、溶剤の存在下で行う。水、有機溶剤またはこれらの組合せを反応溶剤として使用することができる。一態様では、有機溶剤として、アルコール、エーテルまたはハロゲン化溶剤を使用することができる。本発明で有用な有機溶剤の例として、ジクロロメタン、ジメチルフォルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジオキサン、N - メチルモルフォリン、スルホラン、N - メチルピロリドン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、トルエン、ジメトキシエタン、t - ブチルメチルエーテル、またはこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 2 】

反応温度および時間は、塩基をグリコサミノグリカンに加える場合、変化しうる。一態様では、塩基はグリコサミノグリカンに - 5 ~ 8 0 で加えられる。別の態様では、反応温度の下限は - 4 5 、 - 4 0 、 - 3 5 、 - 3 0 、 - 2 5 、 - 2 0 、または - 1 5 であり、上限は、 - 5 、 - 1 0 、 - 1 5 、 - 2 0 、 - 2 5 、 0 、 2 0 、 4 0 、または 6 0 である。ここで、いずれの下限温度も任意の上限温度と組み合わせることができる。塩基はグリコサミノグリカンと 3 0 秒 ~ 1 0 0 時間の間で反応させられる。他に、時間の下限は、1、5、10、15 分であってもよく、上限は 1 0 0 時間、9 0 時間、8 0 時間、7 0 時間、6 0 時間、5 0 時間、4 0 時間、3 0 時間、2 0 時間、1 0 時間、5 時間、2 時間、1 時間、3 0 分、1 5 分、1 0 分または 5 分であってもよい。ここで、いずれの下限の時間も任意の上限時間と組み合わせることができる。

【 0 0 6 3 】

脱プロトン化グリコサミノグリカン生成した後、少なくとも 1 個のヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基を有する化合物を、脱プロトン化グリコサミノグリカンと反応させる。ヒドラジド反応性基および/またはアミノオキシ反応性基を持つ、脱プロトン化グリコサミノグリカンと反応しうる任意の化合物を、変性グリコサミノグリカンを生

10

20

30

40

50

成するために使用することができる。一態様では、少なくとも1個のヒドラジド反応性基および/またはアミノオキシ反応性基を持つ化合物は、脱プロトン化グリコサミノグリカンとの反応の場合、脱離基と化合物との間の結合が破壊され、脱プロトン化グリコサミノグリカンの酸素と脱離基に結合する原子、普通炭素、との間に新しい結合を形成する脱離基を有する。脱離基は、化合物を求核試薬と反応させる場合、化合物から容易に遊離する任意の基である。脱離基の例として、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素のようなハロゲン、炭酸塩、アンモニウム基、トシレート、メシレート、リン酸塩、またはトリフラートなどの活性化脱離基が挙げられるが、これらに限定されない。求核置換によって新しい結合を形成するために脱離基を使用することは、業界では広く知られている。別の態様では、ヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基がエステルである場合、該エステルはアンモニウム基、またはトシレート、メシレート、リン酸塩またはトリフラートなど（これらに限定されない）、の、脱離基がカルボニル炭素に結合する脱離基で活性化することができる。

10

【0064】

一態様では、少なくとも1個のヒドラジド反応性基またはアミノオキシ基を持つ化合物は、式 $LG-L-G$ （式中、 LG は脱離基であり； L は、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せであり； G は、先に定義したヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基である）で表される。一態様では、 LG はハロゲンでありうる。別の態様では、 L は式 $(CH_2)_n$ （式中、 n は1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である）で表されるポリアルキレン基でもよい。別の態様では、 G は CO_2H またはその塩またはエステルでもよい。式 $LG-L-G$ で表される化合物が脱プロトン化グリコサミノグリカンと反応すると、水酸基の脱プロトン化酸素と L との間に共有結合が形成され、 LG^- が生成する。

20

【0065】

先に記載したように、グリコサミノグリカンの選択性および置換の程度は、選択される反応条件によって変化する。たとえば、選択されるグリコサミノグリカンに依って、或るヒドロキシルプロトンは他のものよりより酸性になる。したがって、脱プロトン化ステップにおいて pH （すなわち、塩基の量およびタイプ）を変化させることによって、1つのクラスの水酸基を他のものより優先的に脱プロトン化することが可能である。

30

【0066】

一態様では、グリコサミノグリカン上に存在する100%の水酸基に対する単一ヒドロキシルを脱プロトン化し置換することができる。一態様では、グリコサミノグリカンの一級水酸基を、ヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基で化学的に置換する。グリコサミノグリカンがヒアルロン酸以外の任意の化合物である場合、グリコサミノグリカンの一級水酸基は、グリコサミノグリカンの繰返し二糖の非ウロン酸糖成分のC-6水酸基である。グリコサミノグリカン上に存在する他の全てのの水酸基を本明細書では、二級水酸基と言う。

【0067】

一態様では、グリコサミノグリカンがヒアルロン酸である場合、少なくとも1個の一級水酸基がヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基で化学的に置換される。ヒアルロン酸である場合、一級水酸基はN-アセチルグルコサミン残基のC-6水酸基である。一級水酸基でない、ヒアルロン酸中に存在する他の全てのの水酸基を、本明細書では、二級水酸基と言う。

40

【0068】

一態様では、グリコサミノグリカンの1個の一級水酸基から100%の一級水酸基をヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基で置換することができる。一態様では、ヒアルロン酸の0.1%~40%、0.1%~30%、0.1%~20%、0.1%~10%または0.1%~5%の一級水酸基を置換することができる。別の態様では、ヒアルロ

50

ン酸の0.1%、0.5%、1%、2%、3%、5%、10%、15%、20%、25%または30%の一級水酸基から40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%の一級水酸基を置換することができる。ここで、いかなる下限も任意の上限と組み合わせることができる。別の態様では、グリコサミノグリカンの1以上の一級水酸基が置換されている場合、反応条件によっては、1以上の二級水酸基もヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基で置換されうる。

【0069】

一態様では、変性グリコサミノグリカンは、 $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ またはその塩またはエステルで置換された一級水酸基を少なくとも1つ持ち、 CH_2 基が脱プロトン化グリコサミノグリカンの酸素と共役的に結合しているヒアルロン酸でもありえる。

10

【0070】

((2) 糖脂質および糖タンパク質)

一態様では、高分子は、少なくとも1個のヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基を持つ糖脂質でありえる。糖脂質の例として、MGDG、ジアシルグルコピラノシルグリセリンおよび脂質Aが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第6,635,622号明細書(これは本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する)に開示されている糖脂質は本発明で使用することができる。

【0071】

別の態様では、高分子として、少なくとも1個のヒドラジド反応性基またはアミノオキシ反応性基を持つ糖タンパク質もありえる。糖脂質の例として、オルソムコイド-1-酸糖タンパク質(AAG)および-1-糖タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第6,617,450号明細書および第6,656,714号明細書(これらは本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する)に開示する糖脂質を本発明で使用することができる。

20

【0072】

(e) 合成ポリマー)

業界で知られている任意の合成ポリマーを、本明細書に記載される組成物および方法において使用することができる。一態様では、合成ポリマーはグルクロン酸、ポリアクリル酸、ポリアスパラギン酸、ポリ酒石酸、ポリグルタミン酸またはポリフマル酸である。

30

【0073】

(f) タンパク質)

任意のタイプのタンパク質を、本明細書に記載する組成物および方法において使用することができる。たとえば、タンパク質として、ペプチドまたはタンパク質またはペプチドのフラグメントを挙げることができる。タンパク質は任意の長さのものを使用することができ、1以上のアミノ酸またはその変形体を含むことができる。タンパク質(複数を含む)は、分析の前に、タンパク質分解酵素消化などによってフラグメント化することができる。

【0074】

本明細書に記載する方法において有用なタンパク質としては、細胞外マトリクスタンパク質、化学的に変性された細胞外マトリクスタンパク質、または部分加水分解された細胞外マトリクスタンパク質誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質は、細胞双方向性ドメインを有する天然または組み換えポリペプチドであってもよい。また、タンパク質は1以上のタンパク質が変性されている、タンパク質の混合物もありえる。タンパク質の具体的な例として、コラーゲン、エラスチン、デコリン、ラミニンまたはフィブロネクチンが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0075】

((1) タンパク質の変形体)

本明細書で検討したように、公知であり、ここで想定される数多くのタンパク質変形体が存在する。タンパク質変形体および誘導体は、当業者によく理解されており、アミノ酸

50

配列変性も含まれる。たとえば、アミノ酸配列変性は一般的に、置換型、挿入型、または削除方変形体の3つのクラスの1以上に分類される。挿入型には、アミノおよび/またはカルボキシル末端融合と、単一または多重アミノ酸残基の配列内挿入とが含まれる。通常の挿入は、アミノまたはカルボキシル末端融合の挿入より小さな挿入であり、たとえば、1個から4個の残基オーダーで行われる。実施例に記載するような免疫原性融合タンパク質誘導体は、試験管内での架橋または融合をエンコードするDNAで転換された組み換え細胞培養物によって標的配列に免疫抗原性を確認できるのに十分な大きさを持つポリペプチドを融合することによって造られる。削除は、タンパク質配列から1以上のアミノ酸残基が除去されることで特徴付けられる。一般的に、約2個～6個以下の残基がタンパク質分子内の任意の1部位で除去される。これらの変形体は通常、タンパク質をエンコードするDNA内のヌクレオチドの部位特異的突然変異によって生成され、これによって変形体をエンコードするDNAが造られ、その後、組み換え細胞培養物内にDNAが発現する。公知の配列を持つDNAにおいて、所定の部位で置換変異を起こす技術は公知であり、たとえば、M13プライマー変異誘発およびPCR変異誘発がある。アミノ酸置換は、一般的に単一残基に関するものであるが、多くの異なる位置で、一度に行うこともでき、挿入は、普通、約1～約10個のアミノ酸残基のオーダーで行われるが、削除は、約1～約30個の残基の範囲内で行われる。削除または挿入は、隣り合うペアで行われること、すなわち2残基の削除または2残基の挿入が好ましい。置換、削除、挿入またはこれらの任意の組合せは、最終生成物に到達するように組み合わせよう。突然変異体は、読み取り枠の外にその配列を置いてはならない。また、二級mRNA構造を造りうる相補領域を造らないのが好ましい。置換変形体は、少なくとも1個の残基が取り除かれ、その場所に異なる残基が挿入された変形体である。そのような置換は、通常、以下の表1および2に従って行われ、保守的置換と言う。

【0076】

(表1：アミノ酸略称)

【0077】

10

20

【表 1】

アミノ酸	略称
アラニン	Ala (A)
アロイソロイシン	AlIe
アルギニン	Arg (R)
アスパラギン	Asn (N)
アスパラギン酸	Asp (D)
システイン	Cys (C)
グルタミン酸	Glu (E)
グルタミン	Gln (Q)
グリシン	Gly (G)
ヒスチジン	His (H)
イソロイシン	Ile (I)
ロイシン	Leu (L)
リジン	Lys (K)
フェニルアラニン	Phe (F)
プロリン	Pro (P)
ピログルタミン酸	Glu
セリン	Ser (S)
トレオニン	Thr (T)
チロシン	Tyr(Y)
トリプトファン	Trp (W)
バリン	Val (V)

10

20

30

40

【 0 0 7 8 】

【表 2】

表2: アミノ酸置換	
元の残基の例示的な保守的置換、他は業界で公知である。	
Ala	↔ ser
Arg	↔ lys or gln
Asn	↔ gln or his
Asp	↔ glu
Cys	↔ ser
Gln	↔ asn or lys
Glu	↔ asp
Gly	↔ pro
His	↔ asn or gln
Ile	↔ leu or val
Leu	↔ ile or val
Lys	↔ arg or gln;
Met	↔ Leu or ile
Phemet	↔ leu or tyr
Ser	↔ thr
Thr	↔ ser
Trp	↔ tyr
Tyr	↔ trp or phe
Val	↔ ile or leu

10

20

機能または免疫学的な一致における実質的な変化は、表 2 にある置換より保守的でない置換を選択することによって、すなわち、(a) 置換の区域にあるポリペプチド骨格の構造、たとえば、シートまたはヘリカル構造として、(b) 標的部位での分子の変化または疎水性、または (c) 側鎖の高を保持する効果において、より大きく相違する残基を選択することによって行われる。通常、タンパク質特性において最も大きな変化がよそうされる置換は、(a) 親水性残基、たとえば、セリルまたはスレオニルが疎水性残基、たとえば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリル、またはアラニルで置換される；(b) システインまたはプロリンが他の任意の残基で置換される；(c) 電気陽性鎖を持つ残基、たとえば、リシル、アルギニル、またはヒスチジルが、電気陰性残基、グルタミンルまたはアルパラチルで置換される；または (d) 高い側鎖を持つ残基、たとえばフェニルアラニンがそれを持たない側鎖、たとえばこの場合グリジンを置換する置換であり、(e) 硫酸化および / またはグルコシル化のために部位の数を増やすことによって行われる。

30

【 0 0 7 9 】

たとえば、生物学的および / または化学的に類似した、アミノ酸残基を他のものと置き換えることは、保守的置換として、当業者に知られている。たとえば、保守的置換は、1 個の疎水性残基を他のものと置き換え、または 1 個の極性残基を他のものと置き換える。置換は、たとえば、G l y および A l a ; V a l , I l e および L e u ; A s p および G l u ; A s n および G l n ; S e r および T h r ; L y s および A r g ; P h e および T y のような組合せを含む。明示的に開示する各配列のこのような保守的に置換された変形は、ここで提供されるモザイクポリペプチドの範囲内に包含される。

40

【 0 0 8 0 】

置換型または削除型変異誘発は、N - グルコシル化 (A s n - X - T h r / S e r) または O - グルコシル化 (S e r または T h r) のための部位を挿入するために使用することができる。システインまたは他の不安定な残基の削除も望ましい。潜在的なタンパク質分解部位、たとえば A r g の削除または置換は、たとえば、塩基性残基のそれを削除また

50

はグルタミンルまたはヒスチジル残基でそれを置換することによって達成する。

【0081】

ある翻訳後誘導体形成は、発現したポリペプチド上の組み換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミンルおよびアスパラギンル残基は、頻繁に翻訳後脱アミノ化し、対応するグルタミンルおよびアスパリル残基となる。あるいは、これらの残基は弱酸性条件下で脱アミノ化する。他の翻訳後変性として、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基の水酸基のリン酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の *o*-アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp79 - 86 (1983))、N-末端アミンのアセチル化、およびある場合は、C-末端カルボキシルのアミノ化が上げられる。

10

【0082】

本明細書で開示されるタンパク質の変形体および誘導体を定義する1つの方法は、具体的な公知の配列に対する相同性/同一性の用語で、変形体および誘導体を定義することによって行われることが理解される。2つのタンパク質の相同性をどのようにして決定するかは、当業者であれば、簡単に理解する。たとえば、相同性は、2つの配列を相同性が最も高いレベルになるように配列した後計算することができる。

【0083】

相同性を計算する別の方法は、刊行されたアルゴリズムによって行うことができる。比較のための配列の最適な整列化は、Smith and Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981) の局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970) の相同性整列化アルゴリズム、Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 2444 (1988) の類似法の調査、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実施 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, WI)、または検査によって行ってもよい。

20

【0084】

相同性が同じタイプは、たとえば、核酸に関して、Zuker, *M. Science* 244: 48 - 52, 1989, Jaeger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7706 - 7710, 1989, Jaeger et al. *Methods Enzymol.* 183: 281 - 306, 1989 (これらは本明細書の一部を構成するものとして少なくとも核酸整列化に関連する内容を援用する) で開示するアルゴリズムによって得ることができる。

30

【0085】

保守的突然変異および相同性の記載は、変形体が保守的突然変異である特定の配列に対して少なくとも70%相同性を持つ実施形態のように、任意の組合せで組み合わせることができる。と理解される。

【0086】

この明細書で種々のタンパク質およびタンパク質配列を検討するように、それらのタンパク質配列をエンコードすることのできる核酸もまた開示されていると理解される。これは、特定のタンパク質配列に関連する全ての変質した配列、すなわち、1つの特定のタンパク質配列をエンコードする全ての核酸とともに、変質した核酸を含み、タンパク質配列の開示された変形体および誘導体をエンコードする全ての核酸も含む。したがって、たとえば特定の各核酸配列が本明細書に記載されていなくても、各および全ての配列が、開示されたタンパク質配列を通して、実際、本明細書に開示され、記載されていると理解される。また、アミノ酸配列が、特定のDNA配列がそのそのタンパク質を生体内にエンコードしていることを示唆されていなくても、開示されたタンパク質の特定の変形体が本明細書で開示されいる場合、そのタンパク質が発生する該タンパク質をエンコードする公知の核

40

50

酸配列もまた公知で、本明細書に開示され、記載されていると理解される。

【0087】

開示される組成物に導入することのできる数多くのアミノ酸およびペプチド類縁体が存在すると理解される。たとえば、数多くのDアミノ酸または表1および表2に示されたアミノ酸とは異なる機能的置換基を持つアミノ酸がある。天然のペプチドとは反対の立体異性体、およびペプチド類縁体の立体異性体が開示される。これらのアミノ酸は、選択されたアミノ酸でtRNA分子を荷電し、たとえばアンバーコドンを利用するように遺伝子構築物を設計することで、類縁体アミノ酸をペプチド鎖に部位特定法(Thorson et al., *Methods in Molec. Biol.* 77:43-73(1991), Zoller, *Current Opinion in Biotechnology*, 3:348-354(1992); Ibbá, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 13:197-216(1995), Cahill et al., *TIBS*, 14(10):400-403(1989); Benner, *TIB Tech*, 12:158-163(1994); Ibbá and Hennecke, *Bio/technology*, 12:678-682(1994)(これらは全て本明細書の一部を構成するものとして少なくともアミノ酸類縁体に関連する内容を援用する)によって挿入することで、ポリペプチド鎖に簡単に導入することができる。

10

【0088】

分子は、類似の、しかし天然のペプチド結合を介して結合していないペプチドを生成することができる。たとえば、アミノ酸またはアミノ酸類縁体用の結合として、 CH_2NH - -、 - - CH_2S - -、 - - CH_2 - - CH_2 - -、 - - $\text{CH}=\text{CH}$ - - (シスおよびトランス)、 - - COCH_2 - -、 - - $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ - - および - - CHH_2SO - があり、これらおよび他の結合を、Spatola, A.F. in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p.267(1983); Spatola, A.F., Vega Data(March 1983), Vol. 1, Issue 3, *Peptide Backbone Modifications*(general review); Morley, *Trends Pharm Sci*(1980) pp. 463-468; Hudson, D. et al., *Int J Pept Prot Res* 14:177-185(1979)(- - CH_2NH - -、 CH_2CH_2 - -); Spatola et al. *Life Sci* 38:1243-1249(1986)(- - CHH_2 - - S); Hann J. *Chem. Soc Perkin Trans.* 1307-314(1982)(- - CH - - CH - -、 cisおよびtrans); Almquist et al. *J. Med. Chem.* 23:1392-1398(1980)(- - COCH_2 - -); Jennings-White et al. *Tetrahedron Lett* 23:2533(1982)(- - COCH_2 - -); Szelke et al. 欧州特許出願第45665CA号(1982):97:39405(1982)(- - $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ - -); Holladay et al. *Tetrahedron Lett* 24:4401-4404(1983)(- - $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$ - -); および Hruby *Life Sci* 31:189-199(1982)(- - CH_2 - - S - -)(これらはそれぞれ本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する)中に見出すことができる。特に好ましい非ペプチド結合は、 - - CH_2NH - - である。ペプチド類縁体は、b-アラニン、g-アミノ酪酸などの結合原子の間に1以上の原子を持つことができることは理解される。

20

30

40

【0089】

アミノ酸類縁体および類縁体およびペプチド類縁体は、しばしば、さらに経済的な生成、さらに高い化学的安定性、強化された薬理学的特性(半減期、吸収力、力価、効能、その他)、特異性変化(たとえば生物学的活性の広いスペクトラム)、抑えられた抗原性な

50

どの強化されたまたは望ましい特性を持つ。

【0090】

D - アミノ酸は、D - アミノ酸はペプチダーゼなどによって認識されないので、さらに適切なペプチドを生成するために使用することができる。同じタイプD - アミノ酸（たとえばL - リジンの代わりにD - リジン）によるコンセンサス配列の1以上のアミノ酸の系統的な置換は、より適切なペプチドを生成するために使用することができる。システイン残基は、2以上のペプチドを互いに環化しまたは結合するために、使用することができる。これは、ペプチドを特定の配置に制御するために有益である（Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992) ,これは本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する）。

10

【0091】

(2. 高分子の変性)

以下に、本明細書に記載する方法および組成物に使用される高分子の変性を記載する。変性は、通常、高分子のアルコキシアミノ化によるアミノオキシ変性高分子の生成、高分子のヒドラジド変性によるヒドラジド変性高分子の生成、またはこれらの組合せが含まれる。変性グリコサミノグリカンを含む上記の任意の高分子を、以下に記載する方法および組成物を用いて変性することができる。

【0092】

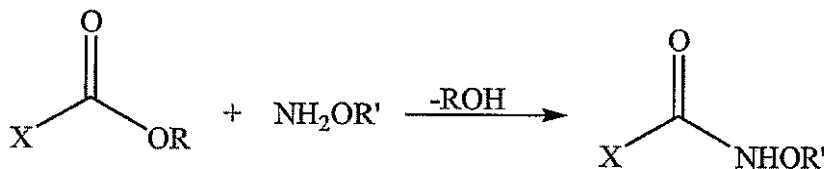
(a) アルコキシアミノ化)

アルコキシアミノ化は、任意の前記高分子と、少なくとも1個のアミノオキシ基を持つ化合物との反応を含む。アミノオキシ反応性基である高分子Xのカルボン酸基とアミノオキシエーテル化合物との間の反応を示す一般的な反応スキームをスキーム1に記載する。

20

【0093】

【化33】



スキーム 1

30

アミノオキシ基は、高分子上に存在する任意のアミノオキシ反応性基と反応しうる。したがって、一態様では、アミノオキシ基は、高分子上の天然のアミノオキシ反応性基と反応することができる。たとえば、ヒアルロン酸は複数のアミノオキシ反応性基として行動しうるCOOH基を複数持つ。別の態様では、高分子が任意の前記変性グリコサミノグリカンである場合、アミノオキシ基は、変性グリコサミノグリカン上に存在する天然のアミノオキシ反応性基および/またはグリコサミノグリカンに化学的に導入された新しいアミノオキシ反応性基と反応することができる。たとえば、図3では、化合物Fは、RONH₂と反応して、グルクロン酸単位の天然のCOOH基と反応したアミノオキシエーテル化合物である化合物Iと、N - アセチルグルコサミン単位のC - 6カルボキシメチル基と反応したアミノオキシエーテル化合物である、化合物Jとを生成することができる。

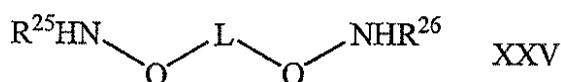
40

【0094】

一態様では、アミノオキシエーテル化合物は、式XXV

【0095】

【化34】



(式中、Lは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは

50

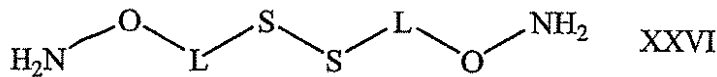
置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せであってもよく、 R^{25} および R^{26} は、独立して、水素、アルキルまたはアリールであってもよい) で表される。

【0096】

一態様では、Lは、ジスルフィド結合(-S-S-)を持つポリアルキレンでもよい。別の態様では、アミノオキシエーテル化合物は、式XXVI

【0097】

【化35】



10

(式中、Lは、独立して、ポリアルキレン基またはアリール基でもよい) で表される。本明細書に記載する方法および組成物において有用なアミノオキシエーテル化合物を造る反応スキームを、図1および2に記載する。

【0098】

一態様では、ポリマーに共有結合で結合する少なくとも1個の-ONHR基(式中、Rは水素、前記アルキル基またはアリール基である)を含むポリマーを本明細書に記載する。一態様で、ポリマーは、ポリマーに結合する-ONHR基を1個持つ。別の態様では、該ポリマーは、ポリマーに結合する-ONHR基を2個持つ。一態様で、ポリマーは、ポリマーに結合する-ONH₂基を1個持つ。別の態様では、ポリマーは、ポリマーに結合するONH₂基を2個持つ。ポリマーは、対応する-ONHR基に変換することができる水酸基を少なくとも1つ持つ任意の化合物である。そのようなポリマーの例として、ポリエチレングリコール(たとえば、直鎖、分岐状または dendrimer)、ポリプロピレンオキシドまたはポリビニルアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。少なくとも1個の水酸基を持つ他の分子は、アミノオキシ基で誘導することができる。そのような分子の例示として、糖、サッカライド(たとえば、モノサッカライド、オリゴサッカライドまたはポリサッカライド)、脂肪族アルコールまたはステロールが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0099】

一態様で、ポリマーは、ポリ(エチレンオキシド)-ポリ(プロピレンオキシド)-ポリ(エチレンオキシド)のトリブロックポリマーである。これらのポリマーを、プルロニクス(登録商標)と言う。プルロニクスは、BASFから市販され、食品中の乳化剤および界面活性剤として、および医療機器中の疎水性表面に対するタンパク質吸着のゲルおよびブロッカーとして、数多くの用途に使用されてきた。これらの材料は、低急性経口および経皮毒性であり、目への刺激またはヒトの内部組織に炎症を起こさない。疎水性PPOブロックは、疎水性(たとえばポリスチレン)表面に対し吸着し、一方、PEOブロックは、タンパク質をはじく親水性膜を提供する。プルロニクス(登録商標)は低毒性で、FDAによって、医療用途への直接使用および食物添加剤としての使用が認められている。また、プルロニクス(登録商標)による表面処理は、血小板癒着、タンパク質吸着および細菌の癒着を減少させることができる。

40

【0100】

一態様では、ポリマーは、ポリ(エチレンオキシド)-ポリ(プロピレンオキシド)-ポリ(エチレンオキシド)のトリブロックポリマーであって、1,000Da~100,000Daの分子量を持つポリマーである。別の態様では、ポリマーは、ポリ(エチレンオキシド)-ポリ(プロピレンオキシド)-ポリ(エチレンオキシド)トリブロックであって、下限が1,000Da、2,000Da、3,000Da、5,000Da、10,000Da、15,000Da、20,000Da、30,000Daであり、上限が5,000Da、10,000Da、15,000Da、20,000Da、2

50

5,000 Da、30,000 Da、40,000 Da、50,000 Da、60,000 Da、70,000 Da、80,000 Da、90,000 Daまたは100,000 Daである分子量を持つポリマーである。ここで、いかなる下限も任意の上限と組み合わせることができ、また低い終点は高い終点より小さくなる。別の態様では、ポリマーはポリ(エチレンオキサイド)-ポリ(プロピレンオキサイド)-ポリ(エチレンオキサイド)のトリブロックポリマーであって、分子量が5,000 Da~15,000 Daのポリマーである。一態様では、ポリ(エチレンオキサイド)-ポリ(プロピレンオキサイド)-ポリ(エチレンオキサイド)のトリブロックポリマーが、PEO₁₀₃-PPO₃₉-PEO₁₀₃、PEO₁₃₂-PPO₅₀-PEO₁₃₂、またはPEO₁₀₀-PPO₆₅-PEO₁₀₀である。さらなる態様では、ポリマーは、PEO₁₀₃-PPO₃₉-PEO₁₀₃、PEO₁₃₂-PPO₅₀-PEO₁₃₂、またはPEO₁₀₀-PPO₆₅-PEO₁₀₀であり、ポリマーはそれに共有結合で結合する1個または2個の-OH₂基を有する。

10

【0101】

ポリマーが、ポリ(エチレンオキサイド)-ポリ(プロピレンオキサイド)-ポリ(エチレンオキサイド)のトリブロックポリマーである場合は、末端ヒドロキシ基の一方または両方が、アミノオキシ基に共有結合することができる。たとえば、図32で記載される合成スキームは、モノ-およびビス(アミノオキシ)-ポリ(エチレンオキサイド)-ポリ(プロピレンオキサイド)-ポリ(エチレンオキサイド)ポリマーの合成を示す。反応は、通常、ヒドロキシ基の一方または両方を保護し(たとえば、N-ヒドロキシフタルイミドによって)、次いで、脱保護(たとえばヒドラジンによって)を行うことを含む。モノ(アミノオキシ)ポリマーの場合は、業界で知られている技術を使用して他の水酸基を変種の基(たとえばアルコキシ)に変換することができる。

20

【0102】

一態様では、アミノオキシエーテル化合物と高分子との間の反応を、pHが約0~約8、約1~約7または約2~約6または約3~約5で、穏やかな条件下で行う。一態様では、高分子を水、またはジメチルフォルムアミド、ジメチルスルホキシドおよびヒドロカルビルアルコール、ジオールまたはグリセリン(これらに限定されない)を始めとする水混和性溶剤を含む水に溶解する。

【0103】

アミノオキシ変性高分子上に存在するアミノオキシ基の数は、使用するアミノオキシエーテル化合物および高分子の量に依って変化する。一態様では、高分子上に存在するアミノオキシ反応性基の1%~99%、10%~90%、20%~80%、30%~70%、または40%~50%が、アミノオキシ基に変換される。一態様では、高分子1モル等量当たり1モル当量以上のアミノオキシエーテル化合物が加えられる。他の態様では、最大比率官能化に関し、水または水性有機混合物に溶解した大過剰モルのアミノオキシエーテル化合物(たとえば10~100倍)を加え、反応混合物のpHを、希薄な酸たとえばHClを加えて調整する。一態様では、縮合剤を使用して、高分子とアミノオキシエーテル化合物との間の反応を促進することができる。本発明で有用な縮合剤の例として、1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミド(EDCI)のような水溶性カルボジイミドが挙げられるが、これに限定されない。別の態様では、縮合剤はヒドロキシベンゾトリアゾールでもよい。別の態様では、N-ヒドロキシスルフォサクシンイミド(スルフォ-NHS)またはN-ヒドロキシサクシンイミド(NHS)のような活性エステル形成剤を縮合剤と組み合わせて使用することができる。米国特許第6,630,457号明細書(ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する)に開示する活性エステル形成剤をここで使用することができる。次いで、水、水性有機混合物に溶解または細粉砕固体の状態にした十分に過剰なモル(たとえば2~100倍)のカルボジイミド試薬を反応混合物に加える。

30

40

【0104】

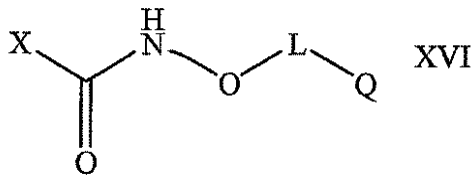
一態様では、高分子をアミノオキシエーテル化合物と反応させた後、得られた変性高分

50

子は、式 X V I

【 0 1 0 5 】

【 化 3 6 】



(式中、

X は高分子の残基でもよく；

Q は生物活性剤、アミノオキシ基、S H 基、またはチオール反応性求電子性官能基でもよく；

L は置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい) で表されるフラグメントを少なくとも 1 つ持つ。

【 0 1 0 6 】

式 X V I において、X は本明細書に記載する任意の高分子の残基でもよい。一態様では、X は本明細書に記載する変性グリコサミノグリカンの残基である。別の態様では、L は式 $(CH_2)_n$ (式中、n は 1 ~ 10、1 ~ 8、1 ~ 6、1 ~ 4、1 ~ 3 または 2 である) で表されるポリアルキレン基でもよい。

【 0 1 0 7 】

一態様では、式 X V I 中の Q は、生物活性剤でもよい。本明細書で使用する用語「生物活性剤」は、任意の治療用、予防用、薬理的または生理学的活性物質、またはこれらの混合物であって、被験体に送達され所望の、普通、有益な効果を造り出すものである。一態様では、それが元来、治療用、診断用または予防用であるかどうかは関係なく、局所的または全体的な薬理的応答を生み出すことができる任意の活性剤を、ここで記載するいかなる方法および組成物において、生物活性剤として使用することができる。生物活性剤は単独でまたは 2 以上の活性剤の混合物として使用することができることに注意すべきである。したがって、アミノオキシエーテル化合物を介して高分子に共有結合で結合する 2 以上の生物活性剤を持つことも可能である。一態様では、前記高分子の任意のものを生物活性剤として使用することができる。別の態様では、生物活性剤は、染料、プローブ、核酸、酵素、オリゴヌクレオチド、標識、タンパク質、ポリペプチド、脂質、糖タンパク質、糖脂質または医薬的に許容しうる化合物でもよい。別の態様では、米国特許第 6, 562, 363 B 1 号明細書(ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する)に開示される生物活性剤のいかなるものもここで使用することができる。

【 0 1 0 8 】

一態様では、生物活性剤は結合を介してアミノオキシエーテル化合物に結合することができる。結合の例として、エーテル、イミデート、チオイミデート、エステル、アミド、チオエーテル、チオエステル、チオアミド、カルバメート、エーテル、ジスルフィド、ヒドラジド、ヒドラゾン、オキシムエーテル、オキシムエステルおよびアミンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 9 】

別の態様では、式 X V I 中の Q は、チオール反応性求電子性官能基である。本明細書で使用する用語「チオール反応性求電子性基」は、チオール基のイオウ原子上の孤立電子対またはチオレートアニオンによる求核攻撃に敏感な任意の基である。チオール反応性求電子性基の例として、良好な脱離基を持つ基が挙げられる。たとえば、それに結合するハライドまたはアルコキシ基を持つアルキル基、または - ハロカルボニル基は、チオール反応性求電子性基の例である。

10

20

30

40

50

【0110】

別の態様では、チオール反応性求電子性基は、電子不足ビニル基である。本明細書で使用する用語「電子不足ビニル基」は、炭素-炭素二重結合を持つ基であり、炭素原子の一つに結合する電子吸引性基である。電子不足ビニル基は、式 $C=CX$ (式中、 X は電子吸引性基である) で表される。電子吸引性基が C に結合している場合、ビニル基の他の炭素原子 (C) は、チオール基による求核攻撃に対しさらに敏感である。このタイプの活性化炭素-炭素二重結合への付加をマイケル付加と言う。別の態様では、チオール反応性化合物は、式 $C=CW$ (式中、 W はチオール反応性求電子性官能基である) で表すことができる。一態様では、 W は $OC(O)R^{20}$ (式中、 R^{20} は置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基またはこれらの組合せである) でもよい。

10

【0111】

電子吸引性基の例として、ニトロ基、シアノ基、エステル基、アルデヒド基、ケト基、スルホン基またはアミド基が挙げられるが、これらに限定されない。チオール反応性求電子性基を持つ化合物の例として、マレイミド、ビニルスルホン、アクリロニトリル、メチレンエステル、キノンメチド、アクリロイルエステルまたはアミド、または α -ハロエステルまたはアミドが挙げられるが、これらに限定されない。

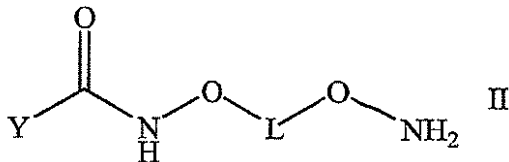
【0112】

別の態様では、式 XVI 中の Q は、アミノオキシ基である。一態様では、2 以上のアミノオキシ基を持つ化合物であって、アミノオキシ基の 1 つは高分子上のアミノオキシ反応性基と反応しない化合物は、遊離のアミノオキシ基 Q となりえる。式 XVI 中の L の同一性に依り、式 XVI 中に存在する 2 以上の遊離のまたは反応したアミノオキシ基を持つことが可能である。一態様では、変性高分子は、式 II

20

【0113】

【化37】



30

(式中、 Y は、それぞれ本明細書に記載する、任意の変性グリコサミノグリカンおよびリンカーである) で表されるフラグメントを少なくとも 1 つ有する。

【0114】

別の態様では、式 XVI 中の Q は SH でもよい。図 2 に、式 XVI (式中、 Q は SH である) で表される化合物を生成する、前記方法の 1 態様を示す。第一ステップは、式 $HA-COOH$ で表される高分子ヒアルロン酸 (A) を、アミノオキシエーテル化合物 B と反応させ、化合物 C を生成することを含む。一態様では、反応は縮合剤の存在下で行うことができる。一態様では、縮合剤は、化合物 B のアミノオキシ基と高分子 A 上の $COOH$ 基との間の反応を促進する任意の化合物である。前記縮合剤の任意のものをこの態様で使用することができる。一態様では、縮合剤は、これに限定されないが 1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミド ($EDCI$) である。化合物 C 内のジスルフィド結合は、還元剤で開裂することができる。一態様では、還元剤はジチオトレイトールである。化合物 C 中のジスルフィド結合の開裂は、式 XVI に該当するチオール化合物 D を生成する。一態様では、 Q が式 XVI の SH である場合、 L は、 CH_2 、 CH_2CH_2 、 $CH_2CH_2CH_2$ またはフェニルでもよい。

40

【0115】

一態様では、少なくとも 1 個のアミノオキシ基を含むポリマーが 1 以上の高分子と反応し、自己重合的細胞外マトリクス (ECM) を生成できることが想定される。本明細書に記載される任意の高分子がこの態様で使用することができる。たとえば、高分子として、

50

コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、アルギン酸、ペクチンまたはヒアルロン酸を挙げることができる。別の態様では、ポリマーは、1個または2個のONH₂基を含むポリ(エチレンオキシド)-ポリ(プロピレンオキシド)-ポリ(エチレンオキシド)のトリブロックポリマーであり、高分子はヒアルロン酸である。図34および35は、自己重合的ECMの態様を示す。図37では、モノ-およびビス(アミノオキシ)プルロニックスがヒアルロン酸とカップリングし、アミノオキシ-変性バイオポリマーを生成する。図35では、アミノオキシ変性バイオポリマーが、それ自身(すなわち自己会合)または異なるアミノオキシ変性バイオポリマーと反応し、ヒドロゲルを生成することができる。理論に縛られるつもりはないが、プルロニックの疎水性PPOブロックが、アミノオキシ変性バイオポリマーの組織化および集合を起こし、化学的な反応性架橋剤を必要とすることなく、ヒドロゲルにすることを可能にすると考えられる。

10

【0116】

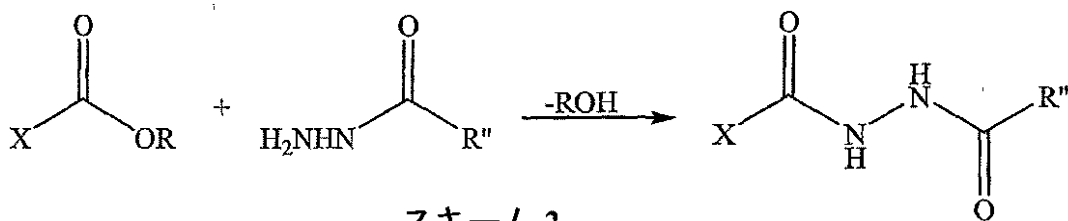
(b) ヒドラジド変性)

高分子のヒドラジド変性は、本明細書に記載される任意の高分子と、少なくとも1個のヒドラジド基を持つ化合物を反応させ、ヒドラジド変性高分子を生成することを含む。メカニズムは、アミノオキシエーテル化合物と高分子との間の反応であるスキーム1と類似している。反応スキーム2は、ヒドラジド反応性基である高分子Xの化合物のカルボン酸とヒドラジド化合物との間の反応を示す。

【0117】

【化38】

20



スキーム2

アミノオキシ基と同様に、ヒドラジド基は、高分子上の任意のヒドラジド反応性基と反応することができる。したがって、一態様では、ヒドラジド基は高分子上に存在する天然のヒドラジド反応性基と反応することができる。別の態様では、高分子が前記変性グリコサミノグリカンの任意のものである場合、ヒドラジド基は、変性グリコサミノグリカン上に存在する天然のヒドラジド反応性基および/またはグリコサミノグリカンに化学的に導入された新しいヒドラジド反応性基と反応する。

30

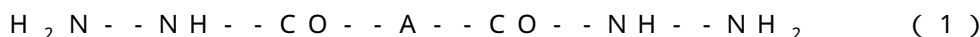
【0118】

一態様では、ヒドラジド化合物は、本明細書に記載する任意の変性グリコサミノグリカンと反応して、ヒドラジド変性高分子を生成することができる。米国特許第5,874,417号明細書「ヒドラジドによるヒアルロン酸の機能化」(これは本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する)に開示された任意の技術および手順を、本明細書に記載するの任意の高分子をヒドラジド変性するために使用することができる。たとえば、変性グリコサミノグリカンはモノヒドラジド(すなわち、ただ1個のヒドラジド基を持つ化合物)またはポリヒドラジド(すなわち2個以上のヒドラジド基を持つ化合物)と反応することができる。米国特許第5,874,417号明細書に開示された任意のヒドラジド化合物をこの態様で使用することができる。

40

【0119】

一態様では、ジヒドラジドは本明細書の任意の高分子を変性するために使用することができる。一態様では、ジヒドラジドは、式1:



(式中、Aはアルキル、アリール、アルキルアリールまたはアリールアルキルのようなヒドロカルビルであり、あるいはAは、炭素原子に加え酸素、イオウおよび/または窒素原

50

子も含むヘテロヒドロカルビルである)で表される。この態様では、アルキル基は、分岐してなくてもよく、また、1~20個の炭素または他の炭素サイズの原子を、好ましくは2~10個、さらに好ましくは4~8個の炭素または酸素、イオウまたは窒素のような炭素サイズのヘテロ原子を含む。アルキル基は、完全に飽和でもあるいは1以上の多重結合を含んでもよい。アルキルの炭素原子は、連続しても、あるいは1以上の酸素原子、ケト基、アミノ基、オキシカルボニル基などの官能基の1以上によって分断されてもよい。アルキル基は、1以上のアリール基で置換され手もよい。アルキル基は、全部があるいは一部が、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのような環を形成してもよい。前記した任意のアルキル基は、二重結合または三重結合を持っていてもよい。

【0120】

10

任意のヒドロカルビル基は、アルキルまたはアリール基が鎖または環内に導入された酸素、イオウまたは窒素のようなヘテロ原子を含むヘテロカルビル基として使用することができる。さらに、アルキル基の任意の炭素原子は、1以上のカルボニル、オキシカルボニル、アミノのような基、または酸素およびイオウ原子の単独または - - S - - S - - 、 - - O - - C H ₂ - - C H ₂ - - O - - 、 S - - S - - C H ₂ - - C H ₂ - - および N H (C H ₂) _n N H - - (式中nは1~20である)のような構造によって、互いにあるいはジヒドラジド部分から分離されていてもよい。

【0121】

アリール置換基としては、一般的に置換されたまたは置換されていないフェニルであるが、さらにピロリル、フラニル、チオフェニル、ピリジル、チアゾイルなどの任意の他のアリール基であってもよい。さらに、ハロ、ヒドロキシ、アミノ、チオエーテル、オキシエーテル、ニトロ、カルボニルなどを含む無機、アルキルまたは他のアリール基もアリール基の置換体である。

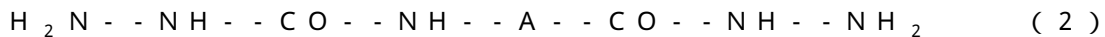
20

【0122】

アルキルアリールまたはアリールアルキル基は、前記アルキルおよびアリール基と組み合わせてもよい。これらの基は、さらに先に記載するように置換されてもよい。

【0123】

別の態様では、ジヒドラジドは式(2)



で表される。

30

【0124】

この態様では、式2中のAは、ヒドロカルビル、ヘテロカルビル、置換されたヒドロカルビル、置換されたヘテロカルビルなどでありうる。別の態様では、Aは、本出願を通してLと記載するリンカーのいかなるものでもありうる。

【0125】

通常、ジヒドラジドを得るためにジカルボン酸の2個のヒドロキシ基をNH₂NH₂で置換し、ジヒドラジドを得る。ジカルボン酸の例として、マレイン酸、フマル酸およびテレフタル酸およびイソフタル酸のような芳香族ジカルボン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0126】

40

一実施形態において、式3(式中、Aがアルキル基である)で表される脂肪族ジヒドラジドでもよい。

【0127】



(式中、n'は任意の長さであるが、好ましくは1~20である)本発明で有用な脂肪族ジヒドラジドとして、コハク(ブタン二酸)(n'=2)、アジピン(ヘキサン二酸)(n'=4)、スベリン(オクタン二酸)(n'=6)、オキサリック(エタン二酸)(n'=0)、マロン(プロパン二酸)(n'=1)、グルタル(ペンタン二酸)(n'=3)、ピメリック(ヘプタン二酸)(n'=5)、アゼライン(ノナン二酸)(n'=7)、セバシン(デカン二酸)(n'=8)、ドデカン二酸(n'=10)、ブラシル(トリ

50

デカン二酸) ($n' = 11$)、(その他 $n' = 20$ まで) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0128】

一態様では、アジピン酸ジヒドラジド、スベリン酸ジヒドラジドおよびブタン二酸ジヒドラジドが変性多糖類を生成するために使用される。アジピン酸ジヒドラジドは、アルドリッチケミカル社(ミルウォーキー、ウィスコンシン州)から購入することができる。別の態様では、フタル酸ジヒドラジドおよびオキサ、チオ、アミノ、ジスルフィド($- - CH_2 - - S - - S - - CH_2 - -$)、 $- - S(CH_2)_2 S - -$ 、 $- - O(CH_2)_n O - -$ または $- - NH(CH_2)_n NH - -$ (式中、 $n = 2 \sim 4$) 基を含むAを持つジヒドラジド。

10

【0129】

一態様では、ジヒドラジドは、水に少なくとも部分的に溶解している。また、ジヒドラジドは、プロトン化形態での pK_a が約8未満、好ましくは1~7の範囲内、最も好ましくは2~6である弱塩基または弱酸である。用語 pK_a は使用されるものと理解されるであろう。解離性の度合いまたは弱酸の強さを表現するものデータとえば、ここで有用なジヒドラジドのプロトン化アミノ基の pK_a は約7未満であるのに対し、アミノ酸のプロトン化アミノ基の pK_a は、約12~13の範囲内である。

【0130】

先に記載したように、ヒドラジド化合物は、高分子上に存在するヒドラジド反応性基と反応する。一態様では、反応は pH 約0~約8、約1~約7または約2~約6または約3~約5で穏やかな条件下で行われる。一態様では、高分子は水、あるいは、ジメチルフォルムアミド、ジメチルスルホキシドおよびヒドロカルビルアルコール、ジオールまたはグリセリンのような(これらに限定されない)水混和性溶剤を含む水中に溶解させる。

20

【0131】

アミノオキシエーテル化合物に関する前の記載と同様に、変性高分子上に存在するヒドラジド基の数は、使用するヒドラジド化合物および高分子の量によって変化する。一態様では、高分子上に存在するヒドラジド反応性基の1%~99%、10%~90%、20%~80%、30%~70%または40%~50%が、ヒドラジド基に変換する。一態様では、高分子1モル当量当たり1モル当量以上のヒドラジド化合物が加えられる。他の態様では、最大比率官能化に関し、水または水性有機混合物に溶解した大過剰モルのヒドラジド化合物(たとえば10~100倍)を加え、反応混合物の pH を、希薄な酸たとえば HCl を加えて調整する。次いで、水、水性有機混合物に溶解または細粉碎固体の状態にした十分に過剰なモル(たとえば2~100倍)のカルボジイミド試薬を反応混合物に加える。

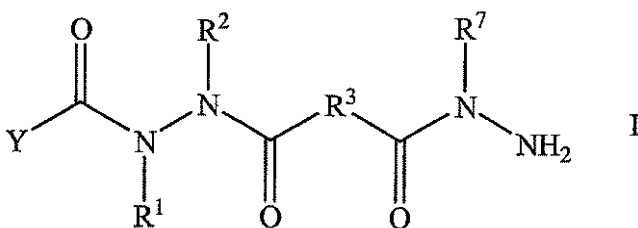
30

【0132】

一態様では、ヒドラジド変性高分子は式I

【0133】

【化39】



40

(式中、Yはここで記載する任意の変性グリコサミノグリカンの残基でもよく、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^7 は、独立して、水素、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基またはポリエーテル基でもよく、 R^3 は水素ではない)で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。一態様では、 R^1 、 R^2 および R^7 は水素である。別の態様では、 R^3 は、 $(CH_2)_n$ (式

50

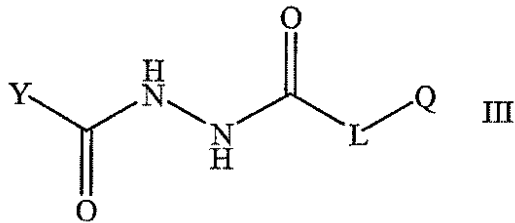
中、 n は1～20、1～15、1～10、1～8、1～6または2～4である)のようなアルキル基である。

【0134】

一態様では、ヒドラジド変性高分子は、式III

【0135】

【化40】



10

(式中、Yは、ここで記載する任意の変性グリコサミノグリカンの残基でもよく；Qは、生物活性剤、SH基またはチオール反応性求電子性官能基の残基でもよく；Lは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい)で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。前記生物活性剤およびチオール反応性求電子性官能基の任意のものがこの態様で使用することができる。

20

【0136】

一態様では、式III中のQはSHである。図4は、式III(式中、QはSHである)で表される化合物を造る一態様を示す。変性ヒアルロン酸化合物F(式中、前記一級水酸基がカルボキシメチル基に変換されている)が、たとえばEDC1のような縮合剤の存在下で3,3'-ジチオビス(プロパン酸ジヒドラジド)(DTP)と反応させる。ヒドラジド化合物は、ヒアルロン酸のグルクロン酸単位上のカルボン酸基および/またはヒアルロン酸のN-アセチルグルコサミン単位のC-6カルボキシメチル基と反応することができる。この反応は、単離することのできるまたはさらにその場で処理することのできるジヒドラジド/ジスルフィドヒアルロン酸を生成する。ジヒドラジド/ジスルフィドヒアルロン酸のジスルフィド結合は、たとえば、ジチオトレイトール(DTT)のような還元剤で開裂され、ヒドラジド/チオール化合物Gおよび/またはHを生成することができる。一態様では、式III中のQはSH基であり、LはCH₂、CH₂CH₂またはCH₂CH₂CH₂でもよい。

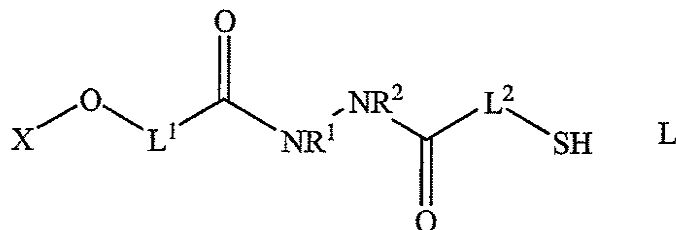
30

【0137】

別の態様では、ヒドラジド変性高分子は、式L

【0138】

【化41】



40

(式中、
Xは、高分子の残基を含み；
R¹およびR²は、独立して、水素、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基またはポリエーテル基を含み；
L¹およびL²は、独立して、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置

50

換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、分岐状のまたは直鎖アルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せを含む)を含む少なくとも1個の単位を含む。

【0139】

式Lの一態様では、 R^1 および R^2 は水素である。式Lの別の態様では、 L^1 および L^2 はアルキレン基である。アルキレン基の例は、式 $-(CH_2)_n-$ (式中、 n は、1~20、1~15、1~10、1~8、1~6または1~4の整数である)で表すことができる。別の態様では、 L^1 は CH_2 であり、 L^2 は CH_2CH_2 である。一態様では、式L中のXは、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、アルギン酸、ペクチンまたはヒアルロン酸を含む。式Lの別の態様では、Xはヒアルロン酸であり、 R^1 および R^2 は水素であり、 L^1 は CH_2 であり、 L^2 は CH_2CH_2 である。この化合物は、本明細書では、カーベラン(登録商標)-Sと言う。

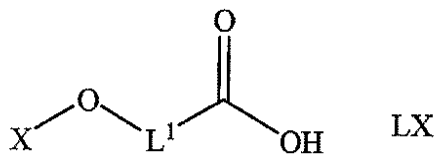
10

【0140】

別の態様では、式Lの単位を少なくとも1つ持つ化合物を、(1)式LX

【0141】

【化42】



20

(式中、

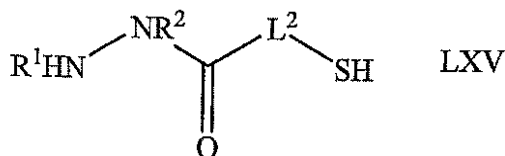
Xは、高分子の残基を含み；

L^1 は、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、分岐状のまたは直鎖アルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せを含む)を含む化合物を、式LXV

30

【0142】

【化43】



(式中、

R^1 および R^2 は、独立して、水素、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基またはポリエーテル基であり、

40

L^2 は、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、分岐状のまたは直鎖アルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せである)を含む化合物と反応させることを含むプロセスによって生成することができる。

【0143】

本願を通して記載する方法は、前記プロセスにおいて使用することができる。式LXの一態様では、 R^1 およびWは水素である。式LXおよびLXVの別の態様では、 L^1 および L^2 は、アルキレン基である。アルキレン基の例は、式 $-(CH_2)_n-$ (式中、 n は

50

、1～20、1～15、1～10、1～8、1～6または1～4の整数である)で表すことができる。別の態様では、 L^1 は CH_2 であり、 L^2 は CH_2CH_2 である。一態様では、式LX中のXは、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、アルギン酸、ペクチンまたはヒアルロン酸を含む。式LXおよびLXVの別の態様では、Xはヒアルロン酸であり、 R^1 および R^2 は水素であり、 L^1 は CH_2 であり、 L^2 は CH_2CH_2 である。この化合物は、本明細書では、カーベラン(登録商標)-Sと言う。

【0144】

(3. 架橋高分子)

以下に、本明細書で記載する変性高分子を架橋し、治療補助として有用な生理学的適合性のある高分子骨格を生成する方法および組成物を記載する。「架橋」は、本明細書において、孔含有マトリックスを製造する2以上の高分子の能力として定義し、ここで、高分子は本明細書に記載する任意の方法および組成物を使用して変性させることのできる同じまたは異なる1以上高分子でもよい。架橋を促進する付加的な化合物もまた想定される。

10

【0145】

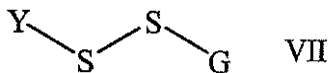
(a) 酸化架橋

通常、酸化架橋は、それぞれSH基を持つ2以上の化合物を、酸化剤の存在下で反応させることを含む。また、チオール化された化合物をそれ自身、同様に他のチオール化された化合物と結合できることも想定する。2個のSH基の間の反応は、新しいジスルフィド結合(-S-S-)を生み出す。一態様では、第一のチオール化された化合物Y-SHと第二のチオール化された化合物G-SHとの酸化架橋によって、フラグメントVII

20

【0146】

【化44】



(式中、yは、変性グリコサミノグリカンのような、本明細書に記載する任意の高分子の残基でもよく、Gは、チオール化された化合物の残基である)を持つ化合物を生成する。高分子の選択により、該高分子を、少なくとも1個のSH基を持つように化学的に変性することができる。たとえば、任意の天然のCOOH基または高分子に結合するCOOH基を、本明細書に記載するヒドラジドおよびアミノオキシ方法(これらに限定されない)を含む、本明細書に記載する技術を使用して、チオール基に変換することができる。

30

【0147】

第二のチオール化された化合物G-SHは、少なくとも1個のチオール基を持つ任意の化合物である。第一および第二のチオール化された化合物は、同じまたは異なる化合物であってもよい。一態様では、第二のチオール化された化合物は、前記の高分子のいかなるものでもありうる。一態様では、第二のチオール化された化合物は、少なくとも1個のSH基を持つ多糖類である。前に記載した任意の多糖類を、第二のチオール化された化合物として使用することができる。別の態様では、第二のチオール化された化合物は、硫酸化されたグリコサミノグリカンでもよい。別の態様では、第二のチオール化された化合物は、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、アルギン酸、ペクチン、またはカルボキシメチルセルロース、またはヒアルロン酸であって、これらの化合物はそれぞれ少なくとも1個のSH基を持つ化合物が含まれる。

40

【0148】

第一および第二のチオール化された化合物の間の反応は、酸化剤の存在下で行われる。一態様では第一および第二のチオール化された化合物の間の反応は、酸素を含む任意の気体の存在下で行うことができる。一態様では、酸化剤は空気である。この態様は、また、第二の酸化剤を加え、反応を促進することも想定する。別の態様では、反応を不活性雰囲気

50

気（すなわち酸素がない状態）で行うことができ、酸化剤を反応に加える。この方法で有用な酸化剤の例として、ヨウ素分子、過酸化水素、アルキルヒドロペルオキシド、ペルオキシ酸、ジアルキルスルホキシド、 Co^{+3} および Ce^{+4} のような多価金属、マンガ、鉛、およびクロムの金属酸化物、およびハロゲン移動剤が挙げられるが、これらに限定されない。Capozzi, G.; Modena, G. In *The Chemistry of the Thiol Group Part II*; Patai, S., Ed.; Wiley: New York, 1974; pp 785 - 839 (ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する) に開示される酸化剤は、本明細書に記載する方法において有用である。

【0149】

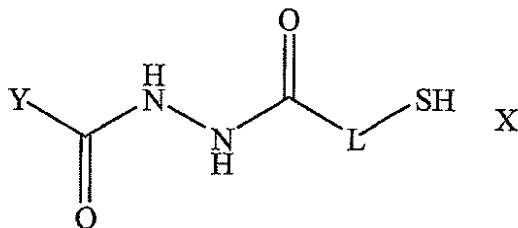
第一および第二のチオール化された化合物の間の反応は、弱塩基性の緩衝液中で行うこともできる。第一のチオール化された化合物の第二のチオール化された化合物に対する量は変化しうる。一態様では、第一のチオール化された化合物の第二のチオール化された化合物に対する体積比は、99:1、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80、10:90または1:99である。一態様では、第一および第二のチオール化された化合物は空气中で反応し、室温で乾燥させる。この態様では、乾燥材料は、過酸化水素のような第二の酸化剤に暴露される。次いで、得られた化合物は水で濯ぎ、未反応第一および/または第二チオール化された化合物および使用されたなかった酸化剤はどれも取り除かれる。本明細書に記載する酸化架橋手順によって、カップリング化合物を生成する場合の1つの利点は、架橋を水性媒体中で、生理学的に良性的条件下、追加の架橋試薬を必要とすることなく行うことができることである。

【0150】

一態様では、ここで、式 X

【0151】

【化45】



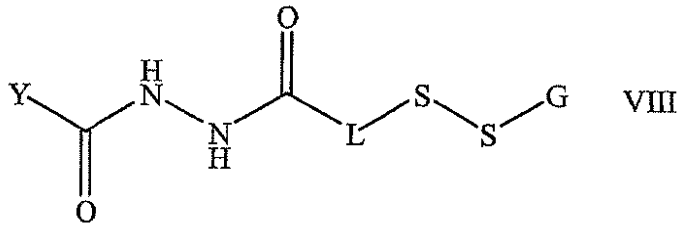
(式中、Yは、本明細書に記載する任意の変性グリコサミノグリカンの残基でもよく、Lは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい) で表される第一のチオール化された化合物と、少なくとも1個のSH基を持つ第二のチオール化された化合物(ここで、第一のチオール化された化合物および第二のチオール化された化合物は同一または異なる化合物である)とを、酸化剤の存在下で反応させることによって、2以上のチオール化された化合物をカップリングする方法を記載する。一態様では、第二のチオール化された化合物は、式Xで表される。別の態様では、第一および第二のチオール化された化合物は同じ化合物である。

【0152】

式Xで表されるチオール化された化合物と第二のチオール化された化合物との間の反応によって、フラグメントVII I

【0153】

【化46】



(式中、YおよびLは、前に記載した通りである)を持つ架橋化合物を生成する。一態様では、式VIII中のLは、 CH_2 、 CH_2CH_2 、または $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ でもよい。別の態様では、Gは、たとえば、硫酸化されたグリコサミノグリカン残基のような多糖類残基でもよい。別の態様では、Gは、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、アルギン酸、ペクチン、またはカルボキシメチルセルロース、またはヒアルロン酸の残基でもよい。

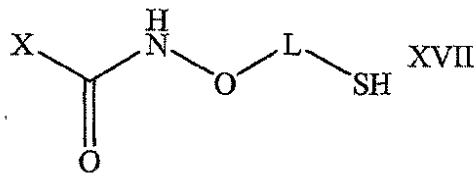
10

【0154】

別の態様では、ここで、式XVII

【0155】

【化47】



20

(式中、Xは、本明細書に記載する任意の高分子の残基でもよく、Lは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい)で表される第一のチオール化された化合物と、少なくとも1個のSH基を持つ第二のチオール化された化合物(ここで、第一のチオール化された化合物および第二のチオール化された化合物は同じまたは異なる化合物である)とを、酸化剤の存在下で反応させることにより、2以上のチオール化された化合物をカップリングする方法を記載する。

30

【0156】

一態様では、Xは、本明細書に記載する任意の変性グリコサミノグリカンの残基である。別の態様では、Xは、ヒアルロン酸の残基でもよい。一態様では、第二のチオール化された化合物は式XVIIで表される。別の態様では、第一および第二のチオール化された化合物は同じ化合物である。

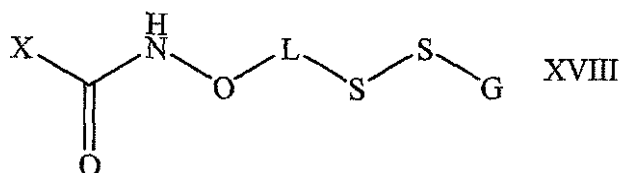
【0157】

式XVIIで表されるチオール化された化合物と第二のチオール化された化合物との間の反応によって、フラグメントXVIII

40

【0158】

【化48】



(式中、XおよびLは、それぞれ、本明細書で記載する任意の高分子およびリンカーでもよい)を持つ架橋化合物を生成する。一態様では、Xは、本発明で記載する変性グリコサ

50

ミノグリカンである。別の態様では、XおよびGは、ヒアルロン酸の残基である。

【0159】

(b)チオール化合物とチオール反応性化合物との間の反応によるカップリング化合物)

別の態様では、ここに、第一の少なくとも1個のSH基を持つチオール化された化合物と、少なくとも1個のチオール反応性求電子性官能基を持つ化合物の少なくとも1つとを、反応させることによって、2以上の化合物をカップリングする方法を記載する。一態様では、化合物は少なくとも2個のチオール反応性官能基を持つ。

【0160】

前記チオール化された高分子またはチオール化されることのできる高分子の任意のものが、この態様において、第一のチオール化された化合物として、使用することができる。2以上の異なる高分子をこの方法で使用することができる。たとえば、第二のチオール化された化合物は、第一のチオール化された化合物と組み合わせて使用することができる。この態様では、第一および第二のチオール化された化合物は同じまたは異なる化合物であってもよい。

10

【0161】

一態様では、第一および第二のチオール化された化合物は多糖類でもよい。この態様では、多糖類は、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、アルギン酸、ペクチン、またはカルボキシメチルセルロース(これらに限定されない)を含む硫酸化されたグリコサミノグリカンである。

20

【0162】

別の態様では、第一のチオール化された化合物は、ヒアルロン酸である。別の態様では、第一のチオール化された化合物は、前記式XVIIで表される。この態様では、Xはヒアルロン酸の残基であり、Lは、 CH_2 、 CH_2CH_2 または $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ である。別の態様では、Xは変性グリコサミノグリカンの残基である。

【0163】

別の態様では、第一のチオール化された化合物は、前記式Xで表される。一態様では、式X中のYは、変性グリコサミノグリカンである。

【0164】

一態様では、チオール反応性化合物は、前記チオール反応性求電子性官能基を1以上含む。一態様では、チオール反応性化合物は、2個の電子不足ビニル基が同じものである、2個の電子不足ビニル基を持つ。別の態様では、チオール反応性化合物は、ジアクリレート、ジメタクリレート、ジアクリルアミド、ジメタクリルアミドまたはこれらの組合せである。別の態様では、チオール反応性化合物は、複数のチオール反応性基を持つデンドリマーでもよい。一態様では、チオール反応性化合物は、2~100、2~90、2~80、2~70、2~60、2~50、2~40、2~30、2~20または2~10個のチオール反応性基を持つことができる。

30

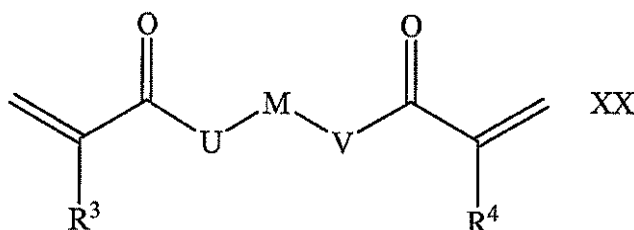
【0165】

別の態様では、チオール反応性化合物は、式XX

【0166】

40

【化49】



(式中、

R^3 および R^4 は、独立して、水素または低級アルキルであり；

50

UおよびVは、独立して、Oまたは NR^5 （式中、 R^5 は、独立して、水素または低級アルキルである）であり；

Mは、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、ポリエステル、アリール基、またはポリチオエーテル基である）で表される。

【0167】

一態様では、 R^3 および R^4 は水素であり、UおよびVは酸素であり、Mはポリエーテル基である。この化合物は、本明細書では、ポリエチレングリコールジアクリレートまたはPEGDAと言う。別の態様では、 R^3 および R^4 は水素であり、UおよびVはNHであり、Mはポリエーテル基である。さらなる態様では、 R^3 および R^4 はメチルであり、UおよびVは酸素であり、Mはポリエーテル基である。別の態様では、 R^3 および R^4 はメチルであり、UおよびVはNHであり、Mはポリエーテル基である。

10

【0168】

別の態様では、チオール反応性化合物は、少なくとも1個のチオール反応性求電子性基を含む前記生物活性剤の任意のものである。たとえば、マイトマイシンC（MMC）は、対応するアクリレート（MMC-アクリレート）に変換することができる。次いで、MMCアクリレートは、本明細書に記載の任意のチオール化された高分子とカップリングさせることができる。

【0169】

別の態様では、第一のチオール化された化合物は、前記式XまたはXVII（式中、Lは CH_2CH_2 または $CH_2CH_2CH_2$ である）で表され、チオール反応性化合物は、前記式XX（式中、 R^3 および R^4 は、独立して、水素または低級アルキルであり；UおよびVは、独立して、Oまたは NR^5 （式中、 R^5 は独立して、水素または低級アルキルである）であり；Mはポリエーテル基である）で表される。

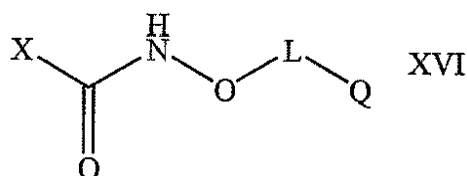
20

【0170】

別の態様では、ここで、少なくとも1個のチオール反応性求電子性官能基を持つ、第一のチオール化された化合物と、少なくとも2個のチオール基を持つ化合物の少なくとも1つとを反応させることによって、化合物をカップリングする方法を記載する。前記チオール化された高分子およびチオール反応性求電子性官能基の任意のものをこの態様で使用することができる。一態様では、式XVI

【0171】

【化50】



30

（式中、

Xは本明細書に記載する任意の高分子の残基でもよく；

Qはチオール反応性求電子性官能基であり；

Lは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい）で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ、チオール反応性化合物と、少なくとも2個のチオール基を持つ化合物の少なくとも1つとを反応させる。

40

【0172】

一態様では、式XVIのQがチオール反応性求電子性官能基である場合、Xはヒアルロン酸のような多糖類であり、Lは、 CH_2CH_2 または $CH_2CH_2CH_2$ である。別の

50

態様では、Qは、アクリレート、メタクリレート、アクリルアミドまたはメタクリルアミドである。

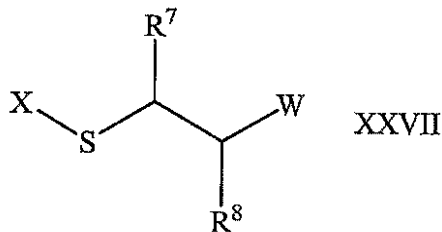
【0173】

一態様では、少なくとも2個のチオール基を持つ化合物の例示として、プロパン-1,3-ジチオール、ポリエチレングリコール-、-ジチオール、パラ、オルソ、またはメタ-ビスベンジルチオール、ジチオトレイトール、2個以上のシステイン残基を含むペプチド、またはデンドリマーチオールが挙げられるが、これらに限定されない。

チオール化された化合物と、少なくとも1個のチオール反応性求電子性官能基を持つ化合物とをカップリングすることによって生成した化合物は、式XXVII

【0174】

【化51】



(式中、

R⁷およびR⁸は、独立して、水素または低級アルキルであり；

Wは前記電子吸引性基であり；

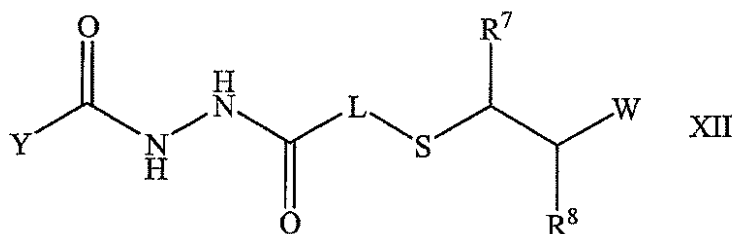
Xは、本明細書に記載する任意の高分子の残基である(える)のフラグメントを少なくとも1つ持つ。一態様では、Xは、ヒアルロン酸または硫酸化されたグリコサミノグリカンのような多糖類の残基でもよい。別の態様では、Xは変性グリコサミノグリカンの残基でもよい。別の態様では、R⁷は水素であり、R⁸は水素またはメチルである。別の態様では、Xは変性グリコサミノグリカンの残基であり；R⁷は水素であり；R⁸は水素またはメチルであり；Wはエステル基またはアミド基である。

【0175】

一態様では、チオール化された化合物とチオール反応性化合物との間の反応生成物は、式XII

【0176】

【化52】



(式中、

R⁷およびR⁸は、独立して、水素または低級アルキルでもよく；

Wは、本明細書に記載する任意の電子吸引性基でもよく；

Yは、本明細書に記載する任意の変性グリコサミノグリカンの残基でもよく；

Lは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリアル基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せを含む)で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。

【0177】

10

20

30

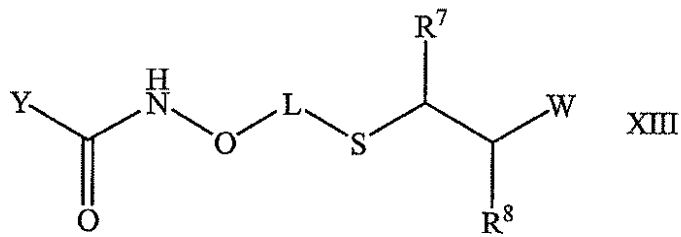
40

50

別の態様では、チオール化された化合物とチオール反応性化合物との間の反応生成物は、式XIII

【0178】

【化53】



10

(式中、

R⁷ および R⁸ は、独立して、水素または低級アルキルでもよく；

Wは、本明細書に記載する任意の電子吸引性基でもよく；

Yは、本明細書に記載する任意の変性グリコサミノグリカンの残基でもよく；

Lは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せを含む)で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。

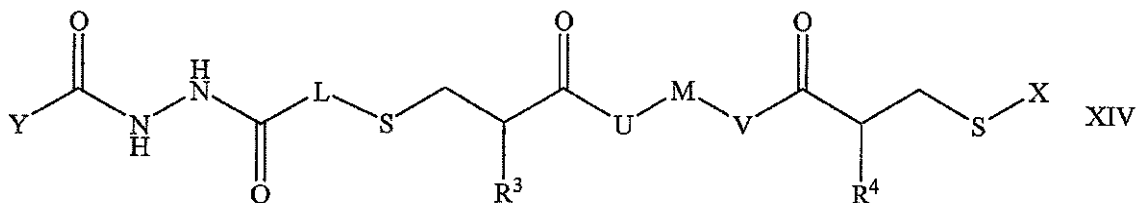
20

【0179】

別の態様では、チオール化された化合物とチオール反応性化合物との間の反応生成物は、式XIV

【0180】

【化54】



30

(式中、

R³ および R⁴ は、独立して、水素または低級アルキルでもよく；

UおよびVは、独立して、OまたはNR⁵ (式中、R⁵ は、独立して、水素または低級アルキルである)でもよく；

Yは、本明細書に記載する任意の変性グリコサミノグリカンの残基でもよく；

Xは、本明細書に記載する任意の高分子の残基でもよく；

LおよびMは、独立して、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい)で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。

40

【0181】

一態様では、式XIV中のYはX' OCH₂ - (式中、X' は、高分子の残基を含む)である。高分子X'の例として、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、アルギン酸またはペクチンが挙げられるが、これらに限定されない。別の態様では、X'はヒアルロン酸である。式XIVの別の態様では、R³ および R⁴ は水素であり、UおよびVは酸素であり、Mはポリエーテル基である

50

。さらなる態様では、式XIV中のLは、 CH_2CH_2 基である。式XIVの別の態様では、Yは $\text{X}'\text{OCH}_2-$ （式中、 X' はヒアルロン酸であり、 R^3 および R^4 は水素であり、UおよびVは酸素であり、Mはポリエーテル基であり、Lは CH_2CH_2 基であり、Xは $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHNHC}(\text{O})\text{X}''$ （式中、 X'' はヒアルロン酸の残基である）である。また、この化合物は、ここで、カーベラン（登録商標）-SXと言う。式XIVのさらに他の態様では、Yは $\text{X}'\text{OCH}_2-$ （式中、 X' はヒアルロン酸である）であり、 R^3 および R^4 は水素であり、UおよびVは酸素であり、Mはポリエーテル基であり、Lは CH_2CH_2 基であり、Xは $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHNHC}(\text{O})\text{X}''$ （式中、 X'' はゼラチンの残基である）である。またこの化合物は、ここで、カーベラン（登録商標）-GSXと言う。

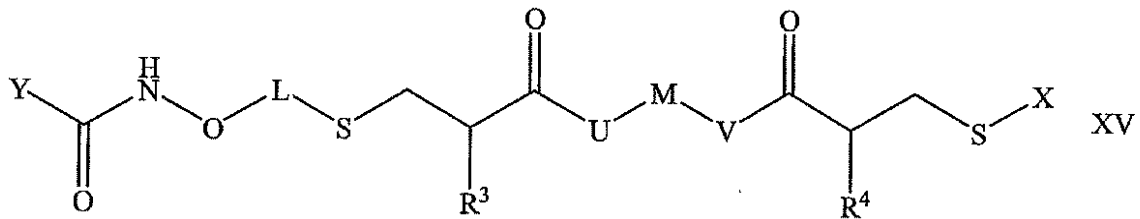
10

【0182】

別の態様では、チオール化された化合物とチオール反応性化合物との間の反応生成物は、式XV

【0183】

【化55】



20

(式中、

R^3 および R^4 は、独立して、水素または低級アルキルでもよく；

UおよびVは、独立して、Oまたは NR^5 （式中、 R^5 は、独立して、水素または低級アルキルである）でもよく；

Yは、本明細書に記載する任意の変性グリコサミノグリカンの残基でもよく；

Xは、本明細書に記載する任意の高分子の残基でもよく；

LおよびMは、独立して、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい）で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。

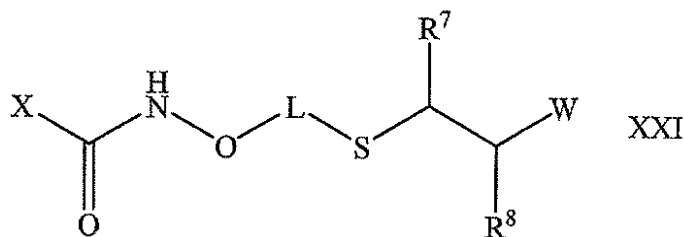
30

【0184】

別の態様では、チオール化された化合物とチオール反応性化合物との間の反応生成物は、式XXI

【0185】

【化56】



40

(式中、

R^7 および R^8 は、独立して、水素または低級アルキルでもよく；

Wは、本明細書に記載する任意の電子吸引性基でもよく；

Xは、本明細書に記載する任意の高分子の残基でもよく；

50

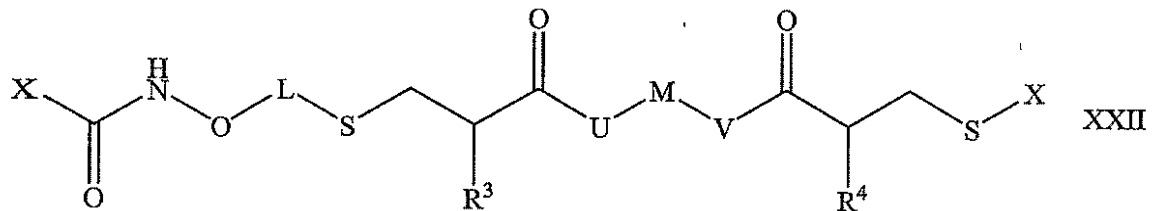
Lは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい。で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。

【0186】

別の態様では、チオール化された化合物とチオール反応性化合物との間の反応生成物は、式XXI

【0187】

【化57】



10

(式中、

R³およびR⁴は、独立して、水素または低級アルキルでもよく；

UおよびVは、独立して、OまたはNR⁵（式中、R⁵は、独立して、水素または低級アルキルである）でもよく；

20

Yは、本明細書に記載する任意の変性グリコサミノグリカンの残基でもよく；

Xは、本明細書に記載する任意の高分子の残基でもよく；

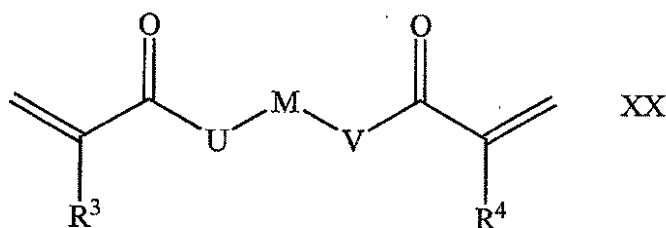
LおよびMは、独立して、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい）で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。

【0188】

別の態様では、式Lで表される、任意のチオール化された化合物と、式XX

【0189】

【化58】



(式中、

R³およびR⁴は、独立して、水素または低級アルキルを含み；

UおよびVは、独立して、OまたはNR⁵（式中、R⁵は、独立して、水素または低級アルキルである）を含み；

40

Mは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せを含む）を含む化合物とを反応させることを含むプロセスによって生成される化合物。

【0190】

一態様では、式XX中のR³およびR⁴は、水素であり、UおよびVは酸素であり、M

50

はポリエーテル基である。別の態様では、 R^3 および R^4 は水素であり、U および V は NH であり、M はポリエーテル基である。さらなる態様では、 R^3 および R^4 はメチルであり、U および V は酸素であり、M はポリエーテル基である。別の態様では、 R^3 および R^4 はメチルであり、U および V は NH であり、M はポリエーテル基である。

【0191】

一態様では、チオール化された化合物は、式 L (式中、X はヒアルロン酸であり、 R^1 および R^2 は水素であり、 L^1 は CH_2 であり、 L^2 は CH_2CH_2 である) で表される。別の態様では、チオール化された化合物は、式 L (式中、X はヒアルロン酸であり、 R^1 および R^2 は水素であり、 L^1 は CH_2 であり、 L^2 および式 XX で表される化合物は、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレートである) で表される。この反応を図 8 に示す。また、反応生成物は、ここでカーベラン(登録商標) - SX と言う。

10

【0192】

チオール化された分子が、2 以上の異なるチオール化された分子でもよいことも想定される。一態様では、チオール化された分子は、第一のチオール化された分子は、式 L (式中、X はヒアルロン酸であり、 R^1 および R^2 は水素であり、 L^1 は CH_2 であり、 L^2 は CH_2CH_2 である) で表される化合物であり、第二のチオール化された分子はチオール化された高分子である、2 個のチオール化された分子を含み、式 XX で表される化合物はポリ(エチレングリコール)ジアクリレートである。チオール化された高分子の例として、コンドロイチン硫酸、チオール化されたデルマトン、チオール化されたヘパラン、チオール化されたヘパリン、チオール化されたデルマトン硫酸、チオール化されたヘパリン硫酸、チオール化されたアルギン酸、またはチオール化されたペクチンが挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、チオール化された高分子は、本明細書に記載する技術を使用して、チオール基を持つヒドラジド基で変性することができる。一態様では、第二のチオール化された分子は、ゼラチンがチオール基を持つヒドラジド基で変性されている、チオール化されたゼラチンである。

20

【0193】

一態様では、チオール化された分子は、第一のチオール化された分子は、式 L (式中、X はヒアルロン酸であり、 R^1 および R^2 は水素であり、 L^1 は CH_2 であり、 L^2 は CH_2CH_2 である) で表される化合物であり、第二のチオール化された分子はチオール化されたゼラチンである、2 個のチオール化された分子を含み、式 XX で表される化合物はポリ(エチレングリコール)ジアクリレートである。この反応を図 8 に示し、反応生成物を本明細書ではカーベラン(登録商標) - GSX と言う。

30

【0194】

一態様では、チオール反応性化合物とチオール化合物との間の反応は、通常、7 ~ 12、7.5 ~ 11、7.5 ~ 10、または 7.5 ~ 9.5 の pH、または pH 8 で行われる。一態様では、溶剤として、水(単独)または有機溶剤を含む水性液を使用することができる。一態様では、混合溶剤系で使用される場合、一級、二級、または三級アミンのような塩基を使用することができる。一態様では、反応中にチオール反応性化合物が全て消費されることを確実にするために、チオール反応性化合物に対して過剰のチオール化合物を使用する。チオール反応性化合物、チオール化合物、反応の pH の選択および選択された溶剤に依るが、カップリングは数分以内から数日起こる。もし反応が空気のような酸化剤の存在下で行われる場合は、チオール化合物は、酸化付加反応を介してそれ自身または他のチオール化合物と反応し、チオール反応性化合物との反応に加えて、ジスルフィド結合も形成する。

40

【0195】

(c) ポリカルボニル架橋剤を介する架橋)

一態様では、ポリカルボニル架橋剤は、本明細書に記載する任意の変性高分子と反応することができる。用語「ポリカルボニル架橋剤」は、本明細書では、式 $C(O)R$ (式中、R は水素、低級アルキルまたは OR' (式中、 R' は活性化エステルを形成することになる基である) である) で表される基を 2 個以上持つ化合物と定義する。一態様では、任

50

意のヒドラジド変性高分子およびアミノオキシ変性高分子を、ポリアルデヒドで架橋することができる。ポリアルデヒドは、アルデヒド基 [C (O) H] を 2 個以上持つ化合物である。一態様では、ポリアルデヒドはジアルデヒド化合物である。

【 0 1 9 6 】

一態様では、2 個以上のアルデヒド基を持つ任意の化合物を、ポリアルデヒド架橋剤として使用することができる。一態様では、ポリアルデヒドは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビルまたは置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビルでもよい。他の実施形態では、ポリアルデヒドはポリサッカリル基またはポリエーテル基を含むことができる。さらなる態様では、ポリアルデヒドは、デンドリマーまたはペプチドでもよい。一態様では、ポリ(エチレングリコール)プロピオンジアルデヒド(PEG)のようなポリエーテルジアルデヒドは、本明細書に記載する組成物および方法において有用である。PEGは、シェアウォーターポリマーズ社(ハンツビル、アラバマ州)のような多くの商業的供給元から購入することができる。別の態様では、ポリアルデヒドはグルタルアルデヒドである。

10

【 0 1 9 7 】

別の態様では、ポリカルボニル化合物がポリアルデヒドの場合、ポリアルデヒドは、それぞれ 2 個以上のヒドロキシ基またはエポキシ基を持つ末端ポリオールまたはポリエポキシドを、業界で公知の技術を用いて酸化することによって、生成することができる。

【 0 1 9 8 】

架橋の方法は、通常、変性高分子とポリカルボニル架橋剤とを溶剤の存在下で反応させることを含む。一態様では、ポリカルボニルのカルボニル基を変性高分子のアミノオキシ基のヒドラジド基またはアミノ基と反応させ、新しい炭素 - 窒素二重結合を造る。

20

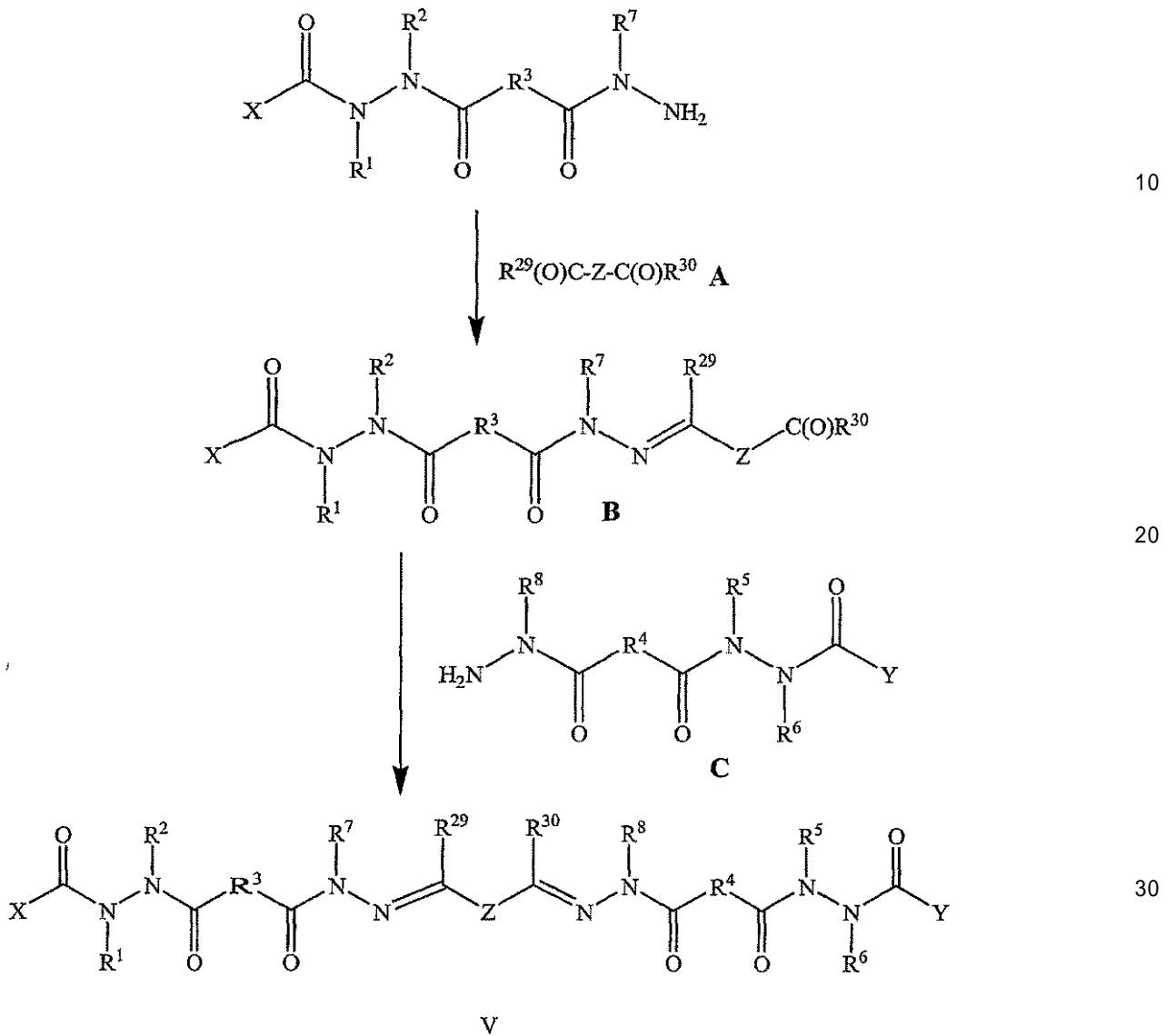
【 0 1 9 9 】

スキーム 3 は、ジカルボニル化合物 A (式中、 R^{29} および R^{30} は、独立して、水素、低級アルキルまたは前記 OR' でもよい) を架橋剤として使用する一態様を示す。第一ヒドラジド変性高分子とジカルボニルとの間の縮合反応の結果である、化合物 B のカルボニル基は、第二ヒドラジド変性多糖類 C のヒドラジド基と反応し、別の炭素 - 窒素二重結合を造り、式 V で描かれる単位を形成する。

【 0 2 0 0 】

【化59】

スキーム 3



スキーム 3 を考慮すると、2 つ以上の変性高分子を架橋して、マトリックスを造ることが可能である。ポリカルボニル架橋剤は異なる変性高分子上のヒドラジド基またはアミノオキシ基と反応することが意図されるが、ポリカルボニル架橋剤は、また、同じ変性高分子上に存在する 2 個以上のヒドラジド基またはアミノオキシ基と反応することも可能である。

40

【0201】

また、スキーム 3 において、変性高分子は異なっても同じでもよいことは明らかである。したがって、一態様では、式 V 中の X および Y は、同じ高分子残基でもよい。別の態様では、X および Y は異なる高分子残基でもよい。一態様では、X および Y は、独立して、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、アルギン酸、ペクチンまたはカルボキシメチルセルロースの残基である。別の態様では、X および Y は、ヒアルロン酸の残基である。別の態様では、X および Y または Y は、変性グリコサミノグリカンの残基である。

【0202】

一態様では、式 V 中の Y が変性グリコサミノグリカンの場合、Z はポリエーテルでもよ

50

い。別の態様では、式V中のYが変性グリコサミノグリカンの場合、 R^1 、 R^2 、 R^5 、 R^6 、 R^7 および R^8 は水素である。別の態様では、式V中のYが変性グリコサミノグリカンの場合、 R^3 および R^4 は、たとえば、 $(CH_2)_n$ （式中、 n は、1~20、1~18、1~16、1~14、1~12、1~10、1~8、2~6または2~4である）のようなアルキル基でもよい。別の態様では、架橋高分子は、（1）アジピンジヒドラジドと変性グリコサミノグリカンとの間に反応生成物を含む変性高分子と、（2）ポリ（エチレングリコール）プロピオンジアルデヒドとを反応させることによって生成することができる。別の態様では、架橋高分子は、（1）2個以上のアミノオキシ基を持つアミノオキシエーテル化合物と高分子との間に反応生成物を含む変性高分子と、（2）ポリ（エチレングリコール）プロピオンジアルデヒドとを反応させることによって生成することが

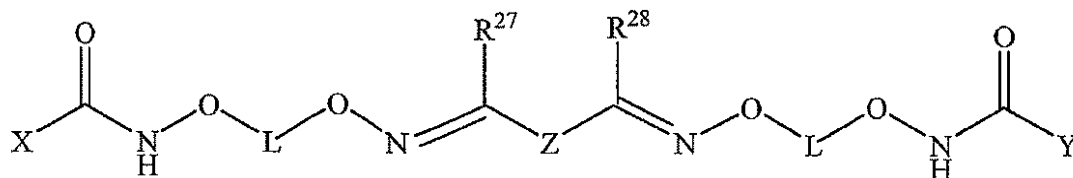
10

【0203】

別の態様では、反応生成物は、ポリカルボニル架橋剤とアミノオキシ変性高分子との間に、式VI

【0204】

【化60】



VI

20

（式中、

XおよびYは、本明細書に記載する任意の高分子の残基でもよく；

R^{27} および R^{28} は、独立して、水素または低級アルキルでもよく；

LおよびZは、独立して、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリール基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよい）で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。

30

【0205】

一態様では、XおよびYは、サルフェート-グリコサミノグリカンまたはヒアルロン酸のような多糖類の残基である。別の態様では、Yは変性グリコサミノグリカンでもよい。

【0206】

別の態様では、高分子上に存在する1以上の水酸基を酸化して対応するアルデヒドとし、これを、次いで、ヒドラジド化合物またはアミノオキシエーテル化合物と架橋することもできる。一態様では、過ヨウ素酸を使用して高分子を酸化することもできる。

40

【0207】

架橋の全体数および互いに架橋する異なる変性高分子の数は、ポリカルボニル架橋剤中の反応性カルボニル基および変性高分子上に存在するジヒドラジド基またはアミノオキシ基の数に依って変化する。一態様では、最小限で、式VまたはVIで表される架橋（すなわち単位）が少なくとも1つある。一態様では、1%~100%、10%~90%、30%~80%、または40%~70%のジヒドラジド基またはアミノオキシ基が、ポリカルボニル架橋剤で架橋している。別の態様では、化合物は、式VまたはVIで表される単位を、10~10,000単位、10~9,000単位、10~8,000単位、10~7,000単位、10~6,000単位、10~5,000単位、10~4,000単位、10~3,000単位、10~2,000単位、または10~1,000単位持つ。

50

【0208】

一態様では、アジピンジヒドラジド (ADH) は、それがウロン酸を変性する場合、1% ~ 99%、または1 ~ 50%のグリコサミノグリカンを架橋する。一態様では、グリコサミノグリカン (たとえばHA) のような多糖類を含むカルボン酸の変性によって、10 ~ 90%、20 ~ 80%、30 ~ 70%、40 ~ 60%、または約50%の誘導体化を行うことができ、誘導体化された多糖類は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または99%を超える架橋を含むことができる。たとえば、5,000個の二糖単位 (通常の高分子量HA) を持つヒアルロン酸は、5,000個の利用可能なカルボン酸基を持つ。1%変性とはHA分子当たり50個のADH g aあり、10%は500個のADH/HAであることを意味する。したがって、たとえ低い変性レベルであっても変性されたGAG分子当たり、数多くの部位があり、架橋を形成する。

10

【0209】

国際公開第02/06373号パンフレット (ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する) に開示される、任意のポリアルデヒドを多糖類で架橋する技術および手順は、本発明に記載する方法において使用することができる。一態様では、ポリカルボニル架橋剤と変性高分子との間の反応が完了した後、架橋高分子内に存在する溶剤は、空気乾燥、低圧での回転蒸発および/または凍結乾燥のような業界で知られている任意の方法によって蒸発することができる。一態様では、架橋高分子内に含まれる少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、および少なくとも98%の溶剤を蒸発すべきである。

20

【0210】

一態様では、反応溶剤は水である。さらに、同様に、アルコール、DMFまたはDMSOのような水混和性有機溶剤を少量使用することもできる。一態様では、架橋は室温、たとえば25 °Cで行うことができる。架橋反応は、4 °C未満から90 °Cを超える温度範囲で行うことができ、一般的には4 °Cと60 °Cとの間、さらに一般的には4 °Cと50 °Cとの間、さらに好ましくは4 °C、30 °Cまたは37 °Cで行われる。また、反応は、種々のpH、たとえばpH 3 ~ 10、pH 4 ~ 9、pH 5 ~ 8、または好ましくは自然のpHで起こる。

【0211】

(4. 抗癒着複合体)

一態様では、ここに、第一抗癒着支持体に共有結合で結合する第一抗癒着化合物を含む (1) 第一化合物と、(2) 第一プロヒーリング化合物とを含む複合体を記載する。

30

【0212】

本明細書に記載される用語「抗癒着化合物」は、細胞結合、細胞拡散、細胞成長、細胞分裂、細胞移動または細胞増殖を予防する任意の化合物と定義する。一態様では、アポトーシスを誘発し、細胞周期を停止し、細胞分裂を阻害し、または細胞運動性を止める化合物を、抗癒着化合物として使用することができる。抗癒着化合物の例として、抗癌薬、抗増殖薬、PKC抑制剤、ERKまたはMAPK抑制剤、cdc抑制剤、コルヒチンまたはタキソールのような抗有糸分裂薬、アドリアマイシンまたはカンプトテシンのようなDNA挿入剤、またはウォルトマンニンまたはLY294002のようなPI3キナーゼの抑制剤が挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、抗癒着化合物は、マイトマイシンCのようなDNA反応性化合物である。別の態様では、米国特許第6,551,610号明細書 (ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する) に開始される任意のオリゴヌクレオチドを、抗癒着化合物として使用することができる。別の態様では、以下に記載する任意の抗炎症薬を、抗癒着化合物として使用することができる。抗炎症薬化合物の例として、メチルプレドニゾン、少量のアスピリン、メドロキシプロゲステロンアセテートおよび酢酸ロイプロリドが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0213】

本明細書に記載する用語「抗癒着支持体」は、細胞に接着しない、または細胞を拡散または増殖しない抗癒着化合物と共有結合を形成することのできる任意の化合物と定義する。一態様では、抗癒着支持体は、親水性の天然または合成ポリマーである。米国特許第6

50

、521、223号明細書（ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する）に開示される任意のポリアニオン性多糖類を抗癒着支持体として使用することができる。ポリアニオン性多糖類の例として、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸マグネシウム、ヒアルロン酸カルシウム、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、またはヒアルロン酸とカルボキシメチルセルロースとの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0214】

第一化合物の形成は、抗癒着化合物を抗癒着支持体と反応させ、新しい共有結合を形成することを含む。一態様では、抗癒着化合物は、抗癒着支持体と反応することができる基を持つ。抗癒着支持体と反応することのできる、抗癒着化合物上の基は、天然のものでよく、あるいは抗癒着化合物はそのような基を付加するため化学的に変性されたものでもよい。別の態様では、抗癒着支持体は、抗癒着化合物との反応性をさらに上げるように、化学的に変性することができる。

10

【0215】

一態様では、第一化合物は抗癒着化合物を抗癒着支持体と架橋することによって形成することができる。一態様では、抗癒着化合物および抗癒着支持体はそれぞれ、次にたとえば少なくとも2個のヒドラジド反応性基または少なくとも2個のアミノオキシ反応性基を持つポリカルボニル架橋剤のような架橋剤と反応することができる、少なくとも1個のヒドラジド基またはアミノオキシ基を持つ。前記ヒドラジド反応性基、アミノオキシ反応性基およびポリカルボニル架橋剤のいずれのものも、態様で使用することができる。一態様では、架橋剤はポリエチレングリコールジアルデヒドである。さらに、前記ヒドラジド変性高分子およびアミノオキシ変性高分子のいずれのものも、第一抗癒着支持体として使用することができる。

20

【0216】

別の態様では、第一化合物は、抗癒着化合物と抗癒着支持体との酸化架橋によって形成することができる。一態様では、抗癒着化合物および抗癒着支持体がそれぞれ、チオール基を持つ場合、該抗癒着化合物および抗癒着支持体は、酸化剤の存在下で互いに反応し、新しいジスルフィド結合を形成する。前記した任意の酸化剤をこの態様で使用することができる。さらに、前記チオール化されたヒドラジド変性高分子およびチオール化されたアミノオキシ変性高分子の任意のものを、第一抗癒着支持体として使用することができる。たとえば、少なくとも1つのフラグメントXまたはXVIIを持つ化合物を、第一抗癒着支持体として使用することができる。

30

【0217】

抗癒着化合物と抗癒着支持体との間の反応は、弱塩基性の緩衝液中で行うことができる。抗癒着支持体の量に対する抗癒着化合物の量は、様々に変わる。一態様では、抗癒着化合物の抗癒着支持体に対する体積比は、99:1から、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80、10:90または1:99である。一態様では、抗癒着化合物および抗癒着支持体は大気中で反応し、室温で乾燥させる。この態様では、乾燥材料を過酸化水素のような第二酸化剤に曝露することができる、次いで得られた化合物を水で濯ぎ、未反応抗癒着化合物および抗癒着支持体、および使用されたなかった酸化剤のいかなるものも取り除く。本明細書に記載する酸化架橋手順によって第一化合物を生成する利点は、架橋を水性媒体中で、生理学的に良性的条件下、追加の架橋試薬を必要とすることなく行うことができることである。

40

【0218】

別の態様では、第一化合物を、少なくとも1個のSH基を持つ抗癒着支持体と少なくとも1個のチオール反応性求電子性官能基を持つ抗癒着化合物の少なくとも1つとを反応させることによって生成する。一態様では、抗癒着化合物は、アクリレート基を持つマイトマイシンCである。

【0219】

別の態様では、第一化合物を、少なくとも1個のチオール反応性求電子性官能基を持つ

50

抗癒着支持体と、少なくとも2個のチオール基を持つ抗癒着化合物の少なくとも1つとを反応させることによって生成する。チオール反応性求電子性官能基を持つ前記化合物のいずれも、この態様で使用することができる。たとえば、式 I I I または X V I で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ化合物を第一癒着支持体として使用することができる。

【0220】

一態様では、チオール反応性化合物（抗癒着化合物または抗癒着支持体）とチオール化合物（抗癒着化合物または抗癒着支持体）との間の反応は、通常、7～12から7.5～11、7.5～10または7.5～9.5のpH、またはpH8で行われる。一態様では、使用される溶剤として、水（単独）または有機溶剤を含む水性液を使用することができる。一態様では、混合溶剤系で使用される場合、一級、二級、または三級アミンのような塩基を使用することができる。一態様では、反応中にチオール反応性化合物が全て消費されることを確実にするために、チオール反応性化合物に対して過剰のチオール化合物を使用する。チオール反応性化合物、チオール化合物、反応のpHの選択および選択された溶剤に依るが、カップリングは数分以内から数日起こる。もし反応が空気のような酸化剤の存在下で行われる場合は、チオール化合物は、酸化付加反応を介してそれ自身または他のチオール化合物と反応し、チオール反応性化合物との反応に加えて、ジスルフィド結合も形成する。

10

【0221】

状況に応じて、複合体は未反応（すなわち遊離の）抗癒着化合物を含むことができる。該未反応抗癒着化合物は、抗癒着支持体に共有結合で結合する、同じまたは異なる抗癒着化合物でもよい。

20

【0222】

複合体は、プロヒーリング化合物で構成される。本明細書に記載される用語「プロヒーリング薬」は、細胞成長、細胞増殖、細胞移動、細胞運動性、細胞癒着または細胞拡散を助長する化合物はいかなるものも言う。一態様では、プロヒーリング化合物はタンパク質または合成ポリマーを含む。本明細書に記載する方法で有用なタンパク質は、細胞外マトリクスタンパク質の細胞外マトリクスタンパク質、化学的に変性された細胞外マトリクスタンパク質または部分加水分解された誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質は、細胞双方向性ドメインを持つ天然または組み換えポリペプチドでもよい。タンパク質は、1以上のタンパク質が変性されているタンパク質の混合物でもよい。タンパク質の具体的な例として、コラーゲン、エラスチン、デコリン、ラミニンまたはフィブロネクチンが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0223】

一態様では、合成ポリマーは、少なくとも1個のカルボン酸基を持つもの、あるいはその塩またはエステルであって、ヒドラジドまたはアミノオキシエーテル化合物と反応することのできるものである。一態様では、合成ポリマーは、グルクロン酸、ポリアクリル酸、ポリアスパラギン酸、ポリ酒石酸、ポリグルタミン酸またはポリフマル酸を含む。

【0224】

別の態様では、プロヒーリング化合物は、米国特許第6,548,081B2号明細書（ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する）に開示される任意の支持体でもよい。一態様では、プロヒーリング化合物には、架橋アルギネート、ゼラチン、コラーゲン、架橋コラーゲン、サクシニル化コラーゲンまたはメチル化コラーゲンのようなコラーゲン誘導体、架橋ヒアルロン酸、キトサン、メチルピロリドン・キトサンのようなキトサン誘導体、セルロースおよび酢酸セルロースまたはカルボキシメチルセルロースのようなセルロース誘導体、カルボキシメチルデキストランのようなデキストラン誘導体、デンプンおよびヒドロキシエチルデンプンのようなデンプンの誘導体、他のグリコサミノグリカンおよびその誘導体、他のポリアニオン性多糖類またはその誘導体、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ乳酸およびポリグリコール酸のコポリマー（PLGA）、ラクチド、グリコリド、および他のポリエステル、ポリオキサノンお

40

50

よびポリオキサレート、ポリ(ビス(p-カルボキシフェノキシ)プロパン)アンハイドライド(PCPP)およびセバシン酸のコポリマー、ポリ(L-グルタミン酸)、ポリ(D-グルタミン酸)、ポリアクリル酸、ポリ(DL-グルタミン酸)、ポリ(L-アスパラギン酸)、ポリ(D-アスパラギン酸)、ポリ(DL-アスパラギン酸)、ポリエチレングリコール、先に列挙したポリアミノ酸とポリエチレングリコールとのコポリマー、コラーゲン様、シルク様、シルク-エラスチン様タンパク質のようなポリペプチド、ポリカプロラクトン、ポリ(アルキレンスクシネート)、ポリ(ヒドロキシブチレート)(PHB)、ポリ(ブチレンジグリコレート)、ナイロン-2/ナリロン-6-共ポリアミド、ポリジヒドロピラン、ポリフォスファゼン、ポリ(オルソエステル)、ポリ(シアノアクリレート)、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリカゼイン、ケラチン、ミオシン、およびフィブリンが含まれる。別の態様では、高度に架橋されたHAをプロヒーリング化合物として使用しえる。

10

【0225】

別の態様では、プロヒーリング化合物は、多糖類でもよい。一態様では、多糖類はカルボン酸基のような基を少なくとも1個持ち、またはその塩あるいはエステルであり、ジヒドラジドと反応することができる。一態様では、多糖類は、グリコサミノグリカン(GAG)である。前記任意のグリコサミノグリカンをこの態様で使用することができる。別の態様では、プロヒーリングはヒアルロン酸である。

【0226】

場合によっては、複合体は、第二プロヒーリング化合物を含むことができる。一態様では、第二プロヒーリング化合物は、増殖因子でもよい。細胞および組織の増殖および生き残りを助長し細胞の機能化を増強することのできる物質または代謝前駆体は、いかなるものも増殖因子として有用である。増殖因子の例として、ガングリオシド、神経発育因子などのような神経増殖助長物質；フィブロネクチン(FN)、ヒト成長ホルモン(HGH)、コロニー刺激因子、骨形態形成タンパク質、血小板由来増殖因子(PDGF)、インシュリン由来増殖因子(IGF-I、IGF-II)、トランスホーミング増殖因子-(TGF-)、トランスホーミング増殖因子-(TGF-)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、インターロイキン-1(IL-1)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)およびケラチノサイト増殖因子(KGF)、乾燥骨材料などのような硬または柔組織増殖助長剤；メトトレキサート、5-フロロウラシル、アドリアマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、毒素に共役する腫瘍特異抗体、腫瘍壊死因子などのような抗腫瘍剤が挙げられるが、これらに限定されない。複合体に導入される増殖因子の量は、選択される増殖因子およびプロヒーリング化合物と、複合体の意図される最終用途とによって変化する。

20

30

【0227】

米国特許第6,534,591B2号明細書(ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する)に開示される任意の増殖因子を、この態様で使用することができる。一態様では、増殖因子として、トランスホーミング増殖因子(TGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮増殖因子(EGF)、結合組織活性化ペプチド(CTAP)、骨形成因子、およびそのような増殖因子の生物学的に活性な類縁体、フラグメントおよび誘導体が含まれる。トランスホーミング増殖因子(TGF)超遺伝子弔意電子ファミリのメンバーは、多機能型調節タンパク質である。TGF超遺伝子弔意電子ファミリのメンバーには、トランスホーミング増殖因子(たとえば、TGF-1、TGF-2、EGF-3)；骨形成タンパク質(たとえば、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9)；ヘパリン結合性増殖因子(たとえば、線維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮増殖因子(EGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、インシュリン様増殖因子(IGF))；インヒピン(たとえば、インヒピンA、インヒピンB)；増殖分化因子(たとえば、GDF-1)；およびアクチビン(たとえば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB)が含まれる。

40

50

【 0 2 2 8 】

増殖因子は、哺乳類細胞のような天然または自然供給源から単離することができ、また組み換えDNA技術や種々の化学的プロセスによる合成で生成することができる。さらに、これらの因子の類縁体、フラグメントまたは誘導体は、元の分子の生物学的活性の少なくともいくらかを発揮するのであれば、使用することができる。たとえば、類縁体は、部位特異的突然変異または他の遺伝子工学的技術によって変化させられた遺伝の発現によって生成することができる。

【 0 2 2 9 】

別の態様では、架橋剤の付加を、第一化合物とプロヒーリング化合物とをカップリングするために使用することができる。一態様では、第一化合物とプロヒーリング化合物とが遊離のチオール基を持つ場合、少なくとも2個のチオール反応性求電子性基を持つ架橋剤を、2個の化合物をカップリングするために使用することができる。さらに、架橋剤は、2個の第一化合物または2個のプロヒーリング化合物をカップリングすることができる。

10

【 0 2 3 0 】

一態様では、架橋剤は、2個の電子不足ビニル基を持つチオール反応性化合物であって、該2個の電子不足ビニル基は同一の化合物である。別の態様では、チオール反応性化合物は、ジアクリレート、ジメタクリレート、ジアクリルアミド、ジメタクリルアミドまたはこれらの組合せである。別の態様では、チオール反応性化合物は、先に検討した、式Xで表される。

【 0 2 3 1 】

本明細書に記載される複合体は、意図される最終用途に依って、種々の形であることが想定される。一態様では、複合体は、積層体、ゲル、ビーズ、スポンジ、フィルム、メッシュ、またはマトリックスである。米国特許第6,534,591B2号明細書および第6,548,081B2号明細書（これらは本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する）に開示された手段を、異なる形をもつ複合体を製造するために、使用することができる。

20

【 0 2 3 2 】

一態様では、複合体は積層体である。一態様では、積層体は、第一層および第二層を含み、(1)第一層は、第一表面および第二表面を持つ第一抗癒着支持体に共有結合で結合する第一抗癒着化合物を含む第一化合物を含み、(2)第二層は、第一プロヒーリング化合物を含み、第一表面および第二表面を持つものであって、第一層の前記第一表面は、第二層の第一表面となりある積層体である。この態様では、第一層は第二層に隣接する。第一化合物およびプロヒーリング化合物の選択に依り、2つの化合物の間にどのような化学反応を起こすことがなく、第一化合物およびプロヒーリング化合物はどちらかが他のどちらかに共有結合で結合するか、または単なる物理的接触をする。一態様では、第一化合物およびプロヒーリング化合物は遊離のチオール基を持ち、これは酸化剤の存在下で新しいジスルフィドを形成する。

30

【 0 2 3 3 】

一態様では、プロヒーリング化合物の第二層を第一層のフィルムに塗布する。一態様では、第一および第二層の間の界面の幅は、一層のキャスト時間によって変化する。たとえば、第一層のキャスト時間が長ければ、第二層の塗布時に形成する界面の幅は減少するであろう。同様に、もし第一層のキャスト時間が短かければ、より広い界面を造るであろう。第一および第二層の間の界面の幅が変化することによって、細胞増殖を早急に（狭い界面）またはゆっくりと（広い界面）予防する勾配を造ることが可能である。別の態様では、プロヒーリング化合物の別の層を第一層の別の表面に塗布し、プロヒーリング化合物ですっぽり包まれたサンドイッチ構造の第一層を造ることができる。図4に、このサンドイッチ積層体の一態様を示す。

40

【 0 2 3 4 】

一態様では、複合体は、被験体への送達の前に成型され任意の所望の形態とすることができる。別の態様では、第二層（プロヒーリング化合物）を被験体に塗布し、次いで第一

50

化合物を曝露された第二層へ塗布することもできる。さらなる態様では、プロヒーリング化合物を含む他の層を、第一層の曝露された表面に塗布することもできる。この態様ではサンドイッチ積層体が被験体内のその場で形成される。

【0235】

一態様では、第一化合物およびプロヒーリング化合物は、キットとして使用することができる。たとえば、第一化合物およびプロヒーリング化合物は、別々のシリンジ中に詰め、被験体に送達する直前にシリンジ - ツウ - シリンジ法を使用して中身を混合する。この態様では、第一化合物およびプロヒーリング化合物を、押し出し器具によってシリンジの開口部から押し出すことができ、ついでへらで混合物を広げることができる。

【0236】

別の態様では、第一化合物およびプロヒーリング化合物は、スプレー缶、ノズル付きボトル、または他のスプレー道具に別々につめる。この態様では、スプレー道具のノズルから互いに出されるまで、第一化合物およびプロヒーリング化合物は、実際に混合しない。

【0237】

(5. 架橋タンパク質)

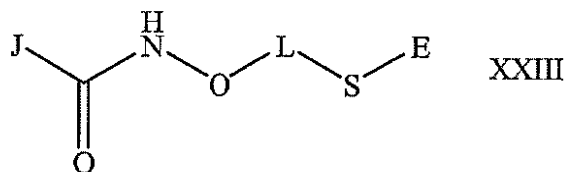
本明細書に、アミノオキシエーテル化合物を使用して、タンパク質を他の分子でカップリングする方法を記載する。一態様では、少なくとも1個のアミノオキシ反応性基を持つタンパク質と、少なくとも1個のアミノオキシ基を持つ化合物とを反応させる。別の態様では、少なくとも1個のアミノオキシ基を持つタンパク質と、少なくとも1個のアミノオキシ反応性基を持つ化合物とを反応させる。一態様では、ヒドラジド反応性基は、a - C O O H基(またはその塩あるいはエステル)、アルデヒド基またはケトン基でもよい。この態様では、国際公開第02/06373号パンフレットおよび02/090390号パンフレット(ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する)に開示される技術を使用することができる。

【0238】

一態様では、カップリングされたタンパク質は、式XXIII

【0239】

【化61】



(式中、

Jは、任意のタンパク質残基でもよく；

Lは、置換されたまたは置換されていないヒドロカルビル基、置換されたまたは置換されていないヘテロヒドロカルビル基、ポリアルキレン基、ポリエーテル基、ポリアミド基、ポリイミノ基、アリアル基、ポリエステル、ポリチオエーテル基、ポリサッカリル基またはこれらの組合せでもよく；

Eは、蛍光タグ、放射性標識、標的部分、脂質、ペプチド、放射性核種を持つ放射性核種キレート化剤、スピン標識、PEGカモフラージュ、金属表面、ガラス表面、プラスチック表面、またはこれらのこれらの組合せでもよい)で表されるフラグメントを少なくとも1つ持つ。

【0240】

タンパク質残基は、少なくとも1個のアミノオキシ反応性基または少なくとも1個のアミノオキシ基を持つ任意のタンパク質でもよい。ここでは、アミノオキシ基で変性することのできる、業界で知られた任意のタンパク質を使用することができる。一態様では、タンパク質は、細胞外マトリクスタンパク質、部分加水分解された細胞外マトリクスタンバ

10

20

30

40

50

ク質、または化学的に変性された細胞外マトリクスタンパク質でもよい。別の態様では、タンパク質は、コラーゲン、エラスチン、デコリン、ラミニンまたはフィブロネクチンである。

【0241】

一態様では、式X X I I I中のEは、レポーター基である。レポーター基の例として、MRI画像用のキレート化常磁性イオン、陽電子断層撮影法用のチオール反応性基を持つ¹⁸F-標識化合物、蛍光タグ、放射性標識、標的部分、脂質、ペプチド、放射性核種を持つ放射性核種キレート化剤、スピン標識、PEGカモフラージュ、ガラス表面、プラスチック表面、またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。スピン標識の例として、プロキシルまたはドキシシル基が挙げられるがこれらに限定されない。ガラス表面の例として、エポキシ、活性化エステル、チオール反応性求電子性官能基でシラン処理したガラス、ビーズまたはガラススリップが挙げられるが、これらに限定されない。プラスチックとして、プラズマでエッチングされたポリプロピルまたは他の任意のプラスチック材料が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0242】

別の態様で、ここに記載するキットは、(1)少なくとも1個のアミノオキシ基を持つ化合物と；(2)縮合剤と；(3)緩衝試薬と；(4)精製カラムとを含む。一態様では、該化合物は、少なくとも1個のアミノオキシ基と少なくとも1個の前記レポーター基を持つ任意の化合物である。通常のキットの使用は、成分(1)~(3)を、少なくとも1個のアミノオキシ反応性基を持つタンパク質とともに混合することを含む。成分(1)~(3)およびタンパク質は、どの順番でも加えることができる。タンパク質と、少なくとも1個のアミノオキシ基を持つ化合物とを互いに反応させたカップリングしたタンパク質を生成した後、カップリングされたタンパク質を含む混合物を精製カラムを通すことによって、カップリングしたタンパク質を精製する。精製カラムおよびそれを使用するための技術は業界で公知である。

20

【0243】

(B. 医薬組成物)

一態様では、前記方法によって製造された化合物、複合体および組成物の任意のものは、高分子に共有結合で結合していない前記生物活性剤を少なくとも1つ含むことができる。得られる医薬組成物は、薬物および他の生物学的に活性な剤を、適用部位の隣のあるいは適用部位から離れた組織に送達する持続性の連続システムを提供することができる。生物活性剤は、それが適用された生体系において、局所または全身的な生物学的、生理学的または治療的効果を提供することができる。たとえば、剤は、他の機能の中でも、感染を炎症調整する、細胞増殖および組織再生を増強する、腫瘍増殖を調整するために作用することができる、鎮痛剤として作用でき、抗細胞結合を助長でき、および骨成長を増強することができる。さらに、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物の任意のものは、2以上の生物活性剤の組合せを含むことができる。

30

【0244】

一態様では、生物活性剤は、生体系中で全身的にまたは障害部位で局所的に感染を予防することができる、たとえば、ピロカルピン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、コルチゾン、ジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、6-メチルプレドニゾン、コルチコステロン、デキサメタゾン、プレドニゾンなど(これらに限定されない)のような抗炎症剤；ペニシリン、セファロsporin、バシトラシン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ゲンタマイシン、クロロキン、ビダラピンなど(これらに限定されない)を含む抗菌剤；サリチル酸、アセトアミノフェン、イブプロフェン、ネプロキセン、ピロキシカム、フルルビプロフェン、モルヒネなど(これらに限定されない)を含む鎮痛剤；コカイン、リドカイン、ベンゾカインなど(これらに限定されない)を含む局所麻酔薬；肝炎、インフルエンザ、はしか、風疹、破傷風、ポリオ、狂犬病などに対する抗体を刺激するイムノゲン(ワクチン)；酢酸ロイプロリド(LH-RHアゴニスト)、フナファレリンなど(これらに限定されない)を含むペプチドのような物質を含むことができる。全て

40

50

の化合物は、シグマ化学社（ミルウォーキー、ウィスコンシン州）から入手することができる。

【0245】

さらに、細胞および組織の増殖および生き残りを助長し、細胞の機能化を増強することのできる物質または代謝前駆体が、たとえば、ガングリオシド、神経発育因子などのような神経増殖助長物質；フィブロネクチン（FN）、ヒト成長ホルモン（HGH）、コロニー刺激因子、骨形態形成タンパク質、血小板由来増殖因子（PDGF）、インシュリン由来増殖因子（IGF-I、IGF-II）、トランスホーミング増殖因子（TGF- β ）、トランスホーミング増殖因子（TGF- α ）、上皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、インターロイキン-1（IL-1）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）およびケラチノサイト増殖因子（KGF）、乾燥骨材料などのような硬または軟組織増殖助長剤；メトトレキサート、5-フロロウラシル、アドリアマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、毒素に共役する腫瘍特異抗体、腫瘍壊死因子などのような抗腫瘍剤として有用である。

10

【0246】

他の有用な物質として、プロゲステロン、テストステロンおよび卵胞刺激ホルモン（FSH）（バースコントロール、受胎率強化）、インシュリンなどのようなホルモン；ジフェンヒドラミンなどのような抗ヒスタミン薬；パパベリン，ストレプトキナーゼなどのような心臓血管剤；ヨウ化イソプロパミドなどのような潰瘍治療剤；メタプロターナルサルフェイト、アミノフィリンなどのような気管支拡張薬；テオフィリン、ナイアシン、ミノキシジルなどのような血管拡張薬；トランクライザー、B-アドレナリン遮断薬、ドーパミンなどのような中枢神経系作用薬；リスベリドンのような抗精神病薬、ナルトレキソン、ナロキソン、ププレノルフィンなどのような抗麻酔薬、その他の物質が挙げられる。全ての化合物は、シグマ化学社（ミルウォーキー、ウィスコンシン州）から入手可能である。

20

【0247】

医薬組成物は、業界で公知の技術を使用して生成することができる。一態様では、該組成物は、本明細書に記載する変性または架橋高分子と生物活性剤とを混合することによって生成する。用語「混合すること」は、化学反応も物理的相互作用も起こさないように、2成分を互いに混ぜ合わせることを言う。また、用語「混合すること」は化合物および薬的に許容しうる化合物との間の化学反応または物理的相互作用も含む。反応性治療薬物、反応性カルボキシル基を含む薬物への共有結合は、化合物上で行われる。たとえば、先ず、抗炎症薬薬物イブプロフェンまたはヒドロコルチゾン-ヘミコハク酸のようなカルボキシレート含有化学薬品を、対応するN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）活性エステルに変換し、さらに、ジヒドラジド変性多糖類のNH₂基と反応させることができる。第二に、本明細書に記載する任意の化合物、複合体および組成物の生物活性剤の非共役エンタラップメントも可能である。第三に、静電性または疎水性相互作用は、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物における生物活性剤の保持を促進することができる。たとえば、ヒドラジノ基は、たとえば、カルボン酸含有ステロイドおよびその類縁体、イブプロフェン（2-（4-イソブチルフェニル）プロピオン酸）のような抗炎症薬薬物と、非共有結合的に作用しあう。プロトン化ヒドラジノ基は、タンパク質、ヘパリンまたはデルマタン硫酸、オリゴヌクレオチド、リン酸エステルなどのような多種多様なアニオン性物質と塩を形成することができる。

30

40

【0248】

具体的な場合において、生理活性化合物の実際に好ましい量は、利用される具体的な化合物、製剤化される特定の組成物、適用のモード、特定の部位、および標的となる態様によって変化することは理解されるであろう。特定の宿主への投与量は、適正な従来の薬理学的プロトコルによって、従来の考え、たとえば、対象化合物および公知の剤の識別的活性の慣習的な比較を使用して、決定することができる。医薬化合物の用量を決定する当業界で熟練した医者や配合者であれば、標準の推奨（Physicians Desk

50

Reference, Barnhart Publishing (1999) にしたがって、決定するのに何の問題もない。

【0249】

本明細書に記載される医薬組成物は、生体系または実体が許容できる任意の賦形剤中に配合することができる。そのような賦形剤の例として、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、ハンク溶液、およびその他、生理学的に釣り合いのとれた塩の水溶液が挙げられる、これらに限定されない。不揮発油、オリーブ油およびごま油のような食物油、トリグリセリド、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、およびオレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルのような非水性ビヒクルも使用することができる。他の有用な製剤として、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランのような粘度増強剤を含む懸濁液も含む。また、賦形剤は、等張性および化学的安定性を増強する物質のような添加剤を少量含むことができる。緩衝液の例として、リン酸塩緩衝液、二炭酸塩緩衝液およびトリス緩衝液が挙げられ、防腐剤の例として、チメロサル、クレゾール、ホルマリン、およびベンジルアルコールが挙げられる。

10

【0250】

医薬担体は当業者に知られている。これらの最も一般的なものは、生理学的 pH での無菌水、食塩水および緩衝液などの溶液を含む、ヒトに投与するための標準的担体である。

【0251】

医薬的送達を意図する分子は、医薬組成物中に製剤化することができる。医薬組成物は、選ばれた分子に加えて、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝液、防腐剤、界面活性剤などを含むことができる。また、医薬組成物は抗菌剤、抗炎症剤、麻酔薬などのような活性成分を 1 以上含むことができる。

20

【0252】

医薬組成物は、局部的かあるいは全身的な治療が望まれるのか、および治療すべき箇所に依って、数多くの方法で投与することができる。局所的（眼科的、経膣的、直腸を經由して、鼻腔内的も含む）に投与することもできる。

【0253】

投与のための調剤は、無菌水性または非水性溶液、懸濁液および乳液を含む。非水性担体の例として、食塩水および緩衝性媒体を含む水、アルコール性/水性溶液、乳液、または懸濁液が挙げられる。開示される組成物および方法に平行する使用が必要とされる場合は、非経口的ビヒクルとして、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、または不揮発油が挙げられる。開示される組成物および方法に平行する使用が必要とされる場合は、静脈内ビヒクルとして、栄養補充液、電解質補充液（リンゲルデキストロース液に基づくもののような）などが挙げられる。防腐剤および他の添加物も含むことができ、たとえば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどである。

30

【0254】

局所的投与用の製剤には、軟膏剤、ローション、クリーム、ゲル、液滴、座薬、スプレー、液剤および散剤が挙げることができる。従来の医薬担体、水性、粉末あるいは油状基剤、増粘剤などが、必要あるいは望ましい場合もある。

40

【0255】

投薬は、治療すべき状態の深刻度および応答能に依るが、数日から数ヶ月またはを費やす治療期間の間、あるいは当業者が中止すべきと決定するまで、1日1回以上の投薬が普通であろう。当業者は、最適投与量、投薬の方法論的および繰返し数を容易に決定することができる。

【0256】

一態様では、本明細書に記載する任意の化合物、複合体および組成物は、生細胞を含むことができる。生細胞の例として、線維芽細胞、肝細胞、軟骨細胞、幹細胞、骨髄、筋肉細胞、心筋細胞、神経細胞または膵臓島細胞が挙げられるがこれらに限定されない。

【0257】

50

(C . 使用方法)

本明細書に記載される任意の化合物、複合体、組成物および方法は、薬物送達、小分子送達、創傷治癒、火傷治癒および組織再生に関連する種々の用途に使用することができる。開示される化合物、複合体、組成物および方法は、他のマトリックス成分の集合、増殖および分化因子の存在、細胞移動または組織再生が望まれる水和した、細胞周囲の環境から恩恵を受ける状況において有用である。

【 0 2 5 8 】

本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、生体適合性材料で構成されているので、直接任意の生体系上または内に配置することができる。化合物、複合体および組成物を置くことができる部位の例として、筋肉または脂肪のような柔組織；骨または軟骨のような硬組織；組織再生区域；歯周ポケットのような空間；外科切開部または他の形成されたポケットまたは空洞；口、膣、肛門または鼻腔、目の盲嚢などのような自然の空洞；化合物をその中に置くことのできる腹腔および組織、および中または上に置くことのできる、きり傷、引っかき傷またはやけどの箇所などのような皮膚表面の障害を含む他の部位が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、皮膚損傷の生存度を延ばすために使用することができる。本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は生物分解性でもよく、天然酵素も時間をかけてそれらを分解するように作用する。化合物、複合体および組成物の成分は、化合物、複合体および組成物の成分が破壊され、たとえば、細胞、組織などによって、生体系内に吸収される「生体吸収性」であってもよい。さらに化合物、複合体および組成物、特に再水和していない化合物、複合体および組成物は、生体系に適用され、興味部位から液体を吸収することもできる。

【 0 2 5 9 】

本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、数多くの異なる外科的処置において使用することができる。一態様では、化合物、複合体および組成物は、米国特許第 6 , 5 3 4 , 5 9 1 B 2 号明細書および第 6 , 5 4 8 , 0 8 1 B 2 号明細書（これらは本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する）に開示する外科的処置のいかなるものにおいても使用することができる。一態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、心臓外科および外科手術；腸または腸間膜の癒着を予防することが重要な開腹手術；尿管および膀胱、および卵管および雌雄の機能に悪影響を及ぼすことのないようにすることが重要な、尿生殖部で行われる手術；および肉芽組織の発現を最小限にすることが重要な神経外科手術において、使用することができる。腱に関する外科手術においては、通常、手術の後の固定期間に、腱とその周りの腱鞘または他の周辺組織との間に癒着の傾向がある。

【 0 2 6 0 】

別の態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、腹腔鏡外科手術、骨盤外科手術、腫瘍外科手術、空洞および頭蓋顔面外科手術、E N T 外科手術後または骨髄硬膜修復を含む処置において、癒着を予防するために、使用することができる。別の態様では、該化合物、複合体および組成物は、眼科的外科手術において使用することができる。眼科的外科手術では、角膜と虹彩との間のシネキアの発現を予防する目的で、生物分解性移植片を前眼房の角度に適用することができ、これは、重篤な障害事象の後の最構築にの場合において特に適用される。さらに、分解性または永久移植片は、緑内障外科手術および斜視外科手術の後の癒着を予防するために、しばしば望まれる。

【 0 2 6 1 】

別の態様では、化合物、複合体および組成物を、鼓膜穿孔 (T M P) の修復において使用することができる。鼓膜 (T M) は、中耳および内耳が外部環境から隔離された三層構造である。これらの層は、角化型扁平上皮で構成される外郭外胚葉、中胚葉線維成分および内胚葉粘膜層を含む。この膜は、僅か 1 3 0 μ m の厚さだが、中耳および内耳の構造および聴覚増幅に重要な保護を提供する。

【 0 2 6 2 】

TMPは、通常、外傷、慢性中耳炎に起因し、またはPEチューブ挿入で、普通に起こることである。縦方向の側頭骨骨折となる閉塞性外傷は、古くからTMPと関係がある。さらに一般的な原因として、綿棒(Qチップ(登録商標))や鋭い道具によって耳をきれいにすることによる耳の裂けおよび不適切な処置がある。

【0263】

本明細書に記載する任意の化合物、複合体および組成物を、一般の麻酔薬なしで鼓膜を通して投与することができ、創傷治癒特性を増強することさえできる。一態様では、化合物、複合体および組成物を、シリンジに接続するカニューレによって、鼓膜を通して注射することができる。

【0264】

別の態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、内視鏡空洞外科手術の後の手術後の創傷バリアとして使用することができる。機能的内視鏡空洞外科手術(FESS)における成功は、しばしば、外科的に大きくした開口を狭めたり、閉じたりすることさえある癒着化によって制限される。スパーサーおよびチューブ状ステントは、開口を一時的に保持するために使用されてきたが、創傷治癒を阻害し、長時間の治療成績を良くないものとする。本明細書に記載の任意の化合物、複合体および組成物を使用することにより、上顎骨空洞外科手術の後の癒着拘縮を大きく減らすことができる。

【0265】

別の態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、軟または硬組織の増強のために使用することができる。別の態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物を、たとえば、外科手術用道具、人口器官または移植片(たとえばステント)のような用具に塗布するために使用することができる。別の態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、動脈瘤を処置するために使用することができる。

【0266】

本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、ヒトまたはヒトでない動物に対し治療的価値を持つ多種多様な放出性生物活性剤用の担体および送達道具として使用することができる。前記生物活性剤の任意のものを、この態様で使用することができる。化合物、複合体および組成物によって運ばれるこれらの物質の多くは、先に検討している。

【0267】

生物活性剤の選択によるが、生物活性剤は、第一化合物またはプロヒーリング化合物として存在することができる。本明細書に記載する化合物、複合体および組成物に導入されるのに適切な医薬的に許容しうる化合物の中に含まれるものとして、たとえば、抗炎症剤、解熱剤、抗炎症薬用のステロイドおよび非ステロイド薬物、ホルモン、増殖因子、妊娠剤、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌剤、鎮痛剤、鎮静剤、鎮痛剤、トランキライザー、抗けいれん剤、筋肉弛緩剤、局所麻酔薬、鎮痙薬、潰瘍薬、ペプチドアゴニスト、交換神経擬似薬剤、心臓血管剤、抗腫瘍剤、オリゴヌクレオチドおよびこれらの類縁体などの治療用薬物が挙げられる。医薬的に許容しうる化合物を医薬的に活性な量加える。

【0268】

薬物送達速度は、放出すべき分子の疎水性に依る。たとえば、デキサメタゾンおよびプレドニゾンのような、疎水性分子は、これが水性環境中で膨張するにしたがって、化合物からゆっくりと放出される。水性環境で膨張し、一方、ピロカルピン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、コルチゾン、ジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、6-メチルプレドニゾロンおよびコルチコステロンのような親水性分子は、素早く放出される。ステロイド系抗炎症剤の放出をゆっくりとした持続性のあるものとする化合物の能力は、外傷または外科手術処置の後の創傷治癒に対し、本明細書に記載する化合物を非常に有用なものとする。

【0269】

ある方法では、新脈管形成および血管新生に関する分子または試薬の送達を達成する。毛細血管新生を刺激するVEGFのような剤を送達する方法を開示する。また、これらに限定されないが、米国特許第6,174,861号明細書「エンドスタチンタンパク質の

10

20

30

40

50

濃度を生体内で増やすことによる新脈管形成を抑制する方法」、第6,086,865号明細書「新脈管形成誘発病を値用する方法およびその医薬組成物」、第6,024,688号明細書「アンジオスタチンフラグメントおよびその使用方法使用方法」、第6,017,954号明細書「O-置換フマギロール誘導体を使用する腫瘍を治療する方法」、第5,945,403号明細書「アンジオスタチンフラグメントおよび使用方法」、第5,892,069号明細書「抗有糸分裂剤としてのエストロゲン化合物類」、第5,885,795号明細書「血管抑制タンパク質を発現する方法」、第5,861,372号明細書「凝集アンジオスタチンおよび使用方法」、第5,854,221号明細書「内皮細胞増殖抑制剤および使用方法」、第5,854,205号明細書「治療用抗血管新生組成物および方法」、第5,837,682号明細書「アンジオスタチンフラグメントおよび使用方法」、第5,792,845号明細書「ヌクレオチドをエンコードするアンジオスタチンタンパク質および使用方法」、第5,733,876号明細書「新脈管形成を抑制する方法」、第5,698,586号明細書「新脈管形成抑制剤」、第5,661,143号明細書「抗有糸分裂剤としてのエストロゲン化合物」、第5,639,725号明細書「アンジオスタチンタンパク質」、第5,504,074号明細書「抗血管新生剤としてのエストロゲン化合物」、第5,290,807号明細書「O-置換フマギロール誘導体を使用する、新脈管形成を退行する方法」および第5,135,919号明細書「新脈管形成を抑制するための方法および医薬組成物」(これらは、本明細書の一部を構成するものとしてその新脈管形成抑制分子に関する箇所を援用する)に開示されるこのもくのためには有用な化合物および試薬のような、新脈管形成および毛細血管新生を抑制することのできる剤を送達する方法を開示する。

10

20

【0270】

一態様では、医薬的に許容しうる化合物は、ピロカルピン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、コルチゾン、ジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、6 α -メチルプレドニゾロン、コルチコステロン、デキサメタゾンおよびプレドニゾンである。しかし、妊娠剤の送達、手術後癒着の治療、皮膚増殖助長、瘢痕化の予防、創傷の包帯、粘性外科手術の実施、粘性補充の実施および組織のエンジニアリングの群から選択される医療的目的のために、医薬的に許容しうる化合物を送達する方法も提供する。

【0271】

一態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、生細胞を被験体へ送達するために使用することができる。この態様では、前記任意の生細胞を使用することができる。一態様では、生細胞はプロヒーリング化合物の一部である。たとえば、複合体が積層体である場合、生細胞は、プロヒーリング層中に存在する。別の態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、腫瘍細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、幹細胞(たとえば、胎芽、プレ脂肪細胞、間葉細胞、じん帯血由来、骨髄)、上皮細胞(たとえば、胸上皮細胞、腸上皮細胞)、神経直系からの細胞(たとえば、ニューロン、星状細胞、膠細胞およびグリア)、肝臓由来の細胞(たとえば肝細胞)、内皮細胞(たとえば血管内皮)、心細胞(たとえば心筋細胞)、筋肉細胞(たとえば、骨格または血管平滑筋細胞)、または骨芽細胞(これらに限定されない)など、種々の細胞の増殖を支援するために使用することができる。あるいは、細胞は、細胞株または一次供給源(たとえば、ヒトまたは動物)、生検サンプルまたは死体に由来するものでもよい。

30

40

【0272】

一態様では、化合物、複合体および組成物は、増殖因子に関連する増殖因子および分子の送達に使用することができる。前記任意の増殖因子がこの態様において有用である。一態様では、増殖因子は、プロヒーリング化合物の一部である。

【0273】

一態様では、本明細書に記載する任意の化合物、複合体および組成物を、被験体の創傷に接触させることによって、被験体の外科手術的創傷における2つの組織の癒着を減少させ、または抑制する方法を記載する。理論に縛られるつもりはないが、第一化合物は、2つの異なる組織(たとえば器官と皮膚組織)の間の組織癒着を予防するものと考えられる

50

。ある術後創傷において、将来の合併症を避けるために、組織の癒着を予防することが記載される。第二層および場合によっては第三層が、組織の治癒を助長するであろう。

【0274】

別の態様では、複合体が積層体の場合、該積層体は、抗癒着化合物/支持体の第一層と、プロヒーリング化合物で構成される第二層とを含み、積層体は組織の周りを巻いているたとえば、積層体は、腱の周りに巻きつき、第一層が腱と接触し、第二層が筋肉組織を取り囲んで接触している。この態様では、積層体は、円筒状材料の内側層によって腱の治癒を助長しながら、腱の周りの円筒状の抗癒着層に寄与している。

【0275】

本明細書に記載する化合物、複合体および組成物数多くの利点を提供する。たとえば、複合体は、少なくとも実質的に再吸収性であり、したがって、後に外科的に取り除く必要のない、手術後の癒着バリアを提供する。また、別の利点として、化合物、複合体および組成物は比較的使用しやすく、縫合可能であり、それを適用した後しっかり留まりやすい。

10

【0276】

別の態様では、ここで、本明細書に記載する任意の化合物、複合体および組成物を、創傷治癒好転が必要な被験体の創傷に接触させることによる、創傷治癒の好転が必要な被験体において創傷治癒を好転させる方法を記載する。また、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物を、該生物活性剤を受け取ることでできる組織の少なくとも1つに接触させることによって、少なくとも1つの生物活性剤をその送達を必要とする患者に送達する方法を提供する。

20

【0277】

開示された化合物、複合体および組成物は、動物における多種多様な組織障害、たとえば、歯周ポケット、浅いまたは深い皮膚創傷、外科切開部、骨または軟骨障害、骨または軟骨修復、声帯ひだ修復などの空洞のある組織の治療のために使用することができる。たとえば、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、ヒドロゲルフィルムにすることができる。ヒドロゲルフィルムは、腕または足の骨の骨折のような、骨組織における障害、歯の障害、関節、耳、鼻、のどの軟骨障害などに適用することができる。また、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物で構成されるヒドロゲルフィルムは、表面にまたは細胞が増殖することができる中に提供することによって、組織再生を誘導するためのバリアシステムとしても機能することができる。マトリックスは体液によって徐々に吸収または腐食し始めるので、骨組織のような硬組織の再生を増強するために、ヒドロゲルフィルムは、マトリックスを置き換える新しい細胞成長の支持体を提供するのが好ましい。

30

【0278】

本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、たとえば注射したり、スプレーしたり、吹きかけたり、刷毛で塗ったり、塗布したり、覆ったりすることで、細胞、組織および/または器官の上に送達することができる。また、送達は、針、加圧器またはポンプなどが付いたまたはついていないカニューレ、カテーテル、シリンジを使用して行うこともできる。本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、他の適用の中でも、たとえば、組織の表面を包帯で巻くフィルムを提供するおよび/または一組織を他の組織またはヒドロゲルフィルムに接着するなど、フィルムの形で組織の上に適用することができる。

40

【0279】

一態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、注射によって投与される。多くの臨床用途に関し、化合物および複合体がヒドロゲルフィルムの形である場合は、注射可能なヒドロゲルが3つの主な理由により好ましい。第一は、注射可能なヒドロゲルは、損傷部位で所望のどのような形にも形成することができる。最初のヒドロゲルはゾルまたは成型可能なパテであるので、該システムは、複雑な形にも置くことができ、次いで、架橋して要求される形に合致させることができる。第二に、ヒドロゲルは成形の間

50

、組織に付着するので、表面の微細粗面度に起因する、結果として得られる機械的な絡み合いが、組織とヒドロゲルとの間の界面を強くする。第三に、自己架橋性ヒドロゲルの導入は針を用いて、または腹腔鏡方法によって成し遂げられ、それによって、外科手術技術の進入は最小限にされる。

【0280】

本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、歯根にかぶさる歯肉組織を切除し、袋またはポケットを形成し、ポケットおよび向きだしになった根に組成物を送達して、歯周病を治療するために使用することができる。また、化合物、複合体および組成物は、歯肉組織を通して切開部を造り、根をむき出しにし、次いで材料を、切開部を通して根の表面に置いたり、刷毛で塗ったり、吹きかけたり、または他の手段で歯の障害にも送達することができる。

10

【0281】

皮膚または他の組織にある障害を治療するために使用する場合は、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物を、ヒドロゲルフィルムの形にして、所望の区域の頂部におくことができる。この態様では、ヒドロゲルフィルムは展性があり、組織障害の外形に合わせるように操作することができる。

【0282】

本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は縫合、クランプ、ステント、プロテーゼ、カテーテル金属スクリュー、骨板、ピン、ガーゼのような包帯などのような移植可能道具に適用し、適合性および/または性能または機能を増強することができる。化合物、複合体および組成物は、移植可能な道具に塗布することもできる。たとえば、化合物、複合体および組成物は、使用することができる。移植可能な道具の粗表面に塗布し、粗い端部と隣り合う組織の接触から吸収が起こるのを減少させる、生体適合的平滑な表面を提供することによって、道具の適合性を増強する。また、化合物、複合体および組成物は、移植可能な道具の性能または機能を増強するために、使用することもできる。たとえば、化合物、複合体および組成物がヒドロゲルフィルムの場合、該ヒドロゲルフィルムをガーゼ包帯に適用し、それが適用される組織適合性や癒着を増強する。ヒドロゲルフィルムは、また、開口部を介して体内に挿入され、カテーテル/人口肛門を定位置に確実に置くおよび/または道具と組織との間の空間を埋め、しっかりとした密封状態にし、細菌の感染および体液の損失を減少させるカテーテルや人口肛門のような道具の周りに適用することもできる。

20

30

【0283】

一態様では、たとえば、プルロニックのようなアミノオキシ誘導ポリマーをカップリングし、たとえば、ヒアルロン酸やヘパリンのようなGAGとし、自己会合でヒドロゲルとなりうる。あるいは、アミノオキシ誘導ポリマー-GAGの溶液を、たとえば医療機器のような疎水性表面上に塗布することもできる。たとえば、ヘパリンをアミノオキシ誘導プルロニックとカップリングすれば、得られたゲルは、所望の増殖-結合能を持つが、ヘパリンが持つ抗凝固特性は持たない。理論に縛られるつもりはないが、ヒドロゲルのプルロニック部分は、ヘパリンの望ましくない副作用である凝集を予防することができる。一態様では、アミノオキシ誘導ポリマー-ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸は道具に表面に対する細菌の癒着をブロックすることができるので、表面でのバイオフィルムの形成を予防することができる。

40

【0284】

開示する化合物、複合体および組成物は、組織再生を必要とする被験体に適用することができる。たとえば、細胞は、移植のために、本明細書に記載する複合体内に導入することができる。本明細書に記載する化合物、複合体および組成物で治療することができる被験体の例として、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、およびサル、チンパンジー、オラウータンおよびヒトを含む霊長類のような哺乳類が含まれる。別の態様では、本明細書に記載する化合物、複合体および組成物は、トリに適用することができる。

50

【0285】

創傷や火傷治癒のような組織再生に関する領域に使用される場合、開示された化合物、複合体および組成物、および方法は、1以上の関連する受け入れられる治療法を必要としないわけではない。開示する化合物、複合体、組成物および方法の受容者によって得られる、回復にかかる時間の減少または回復の質における増加はどれもいくつかの利点を持つことが理解される。開示される化合物、複合体および組成物、および方法のいくつかは、外科手術のような外傷の結果に近い創傷の結果としておこる線維症性癒着を癒着を予防あるいは減少させるために使用することができることもまた理解される。また、開示された化合物、複合体および組成物、および方法によって起こる付帯情動は望ましいが、改善された細菌耐性や痛みの軽減などのように必要なものではないことも理解される。

10

【0286】

一態様では、本明細書に記載される化合物や組成物は、軌道狭窄を予防するために使用することができる。声門下狭窄(SGS)は、世界中で数百万人の大人と子供が影響されている状態である。後天的なSGSの原因は、気道上皮の粘膜損傷から持続性の挿管までの範囲に広がる。挿管されている患者における知られている危険因子としては、持続性の挿管、高圧バルーンカフ、過剰サイズの気管内(ET)チューブ、複数の抜管または再挿管、および胃・食道逆流が挙げられる。また、外科手術、放射線、自己免疫疾患、腫瘍、または他の予期しえぬ理由の結果、管狭窄が発現した個人もある。

【0287】

非常に広範囲ではあるが、SGSの発病因子の全てが、共通した1つの態様、すなわち気道が狭くなる結果閉塞症を起こす。この最も通例である狭化は、周囲特性および硬直性による環状軟骨のレベルで起こる。そのような発病因子は、種々のSGSモデル、すなわち、軟骨細胞の活性および線維性癒着の形成、多核白血球の進入および扁平化性を伴う慢性炎症細胞、および気道ルーメンにおける形態変化において見られている。それぞれ応急手当を必要とする問題が存在する。

20

【0288】

別の態様では、本明細書に記載される任意の化合物や組成物を、3-D細胞培養物として使用することができる。一態様では、ヒドロゲルは凍結乾燥され、接着、増殖および増殖のために細胞が接種される多孔性スポンジを造る。想定される3-Dヒドロゲルまたはスポンジのミニ配列およびマクロ配列が、たとえば、ガラスなどの表面に造られ、得られたゲルまたはスポンジは、本明細書に記載される化合物や組成物から誘導されると想定される。培養は、試験的治療の効き目および毒性の測定など(これらに限定されない)、数多くの実施形態で使用することができる。

30

【0289】

開示された組成物および方法の任意の所定の特定の態様は、実施例で検討する、非多糖類系試薬を含む、本明細書で開示する具体的な例および実施形態と、容易に比べることができる。このような比較を行うことによって、それぞれの特定実施形態の相対効果を容易に測定することができる。種々の用途のために特に好ましいアッセイは、本明細書に開示される実施例でのアッセイであり、これらのアッセイは、必ずしも限定されるものではないが、本発明で開示される組成物および方法の任意のものを用いて行うことができる。と理解される。

40

【実施例】

【0290】

以下の実施例は、本明細書に記載され要求される化合物、組成物および方法が、どのようにして、製造され評価されたかに関し、完全な開示および説明を当業者に提供するために置かれるもので、単に例示的なものであって、発明者が彼らの発明を限定するためのものではない。数字(たとえば、量、温度など)に関し、精度を確保するための努力がなされたが、いくつかの誤差や偏差は是認すべきである。他に示さなければ、部は重量部であり、温度は摂氏、または室温であり、圧力は大気圧またはそれに近い気圧である。反応条件、たとえば、成分の濃度、所望の溶剤、溶剤混合物、温度、圧力および他の反応

50

範囲、および記載するプロセスから得られる生成物の純度および収率を最適化するために使用することができる条件の数多くの変形および組合せがある。合理的で慣用の実験だけがそのようなプロセス条件を最適化するために必要となるだろう。

【0291】

(I. ヒアルロン酸のカルボキシメチル誘導体の合成)

(1. 材料)

発酵で誘導されたヒアルロン酸 (HA、ナトリウム塩、Mw: 1.5 MDa) を、クリアソリューションズバイオテクノロジー社 (ストーニーブルック、ニューヨーク) から購入した。1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミド (EDCI) およびクロロ酢酸を、アルドリッチケミカル社 (ミルウォーキー、ウィスコンシン州) から購入した。ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート (Mw: 3400 Da) は、ネクター・セラピューティックス社 (以前はシェアウォーター社) (ハンツビル、アラバマ州) から購入した。ダルベッコリン酸塩緩衝液食塩水 (DPBS)、システインおよびウシ鞣丸ヒアルウロニダーゼ (Hase, 330 U/mg) は、シグマ化学社 (セントルイス、ミズリー州) から入手した。ジチオトレイトール (DTT) は、ダイアゴニステックケミカル社 (オックスフォード、コネチカット州) から購入した。3,3'-ジチオビス(プロパノイックジヒドラジド) (DTP) は、先に記載したように合成した (Vercauteren, K. P.; Marecsek, D. M.; Marecek, J. F.; Prestwich, G. D. *Synthesis and in vivo degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid. Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 686-694; Shu, X. Z.; Liu, Y.; Luo, Y.; Roberts, M. C.; Prestwich, G. D. *Disulfide crosslinked hyaluronan hydrogels. Biomacromolecules* 2002, 3, 1304-1311)

(2. 分析機械装置)

プロトンNMRスペクトルデータを、バリアンINOVA 400を使用して、400 MHzで得た。UV-visスペクトルデータを、ヒューレット・パッカード8453紫外可視分光光度計 (パロアルト、カリフォルニア州) を使用して記録した。ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 分析を、以下のシステム、すなわちウォーターズ515 HPLCポンプ、ウォーターズ410示差屈折計、ウォーターズ (登録商標) 486 可変同調型吸光度検出計、ウルトラヒドロゲル250または1000カラム (7.8 mm i.d. x 130 cm) (ミルフォード、マサチューセッツ州) を使用して行った。溶離液は200 mMのリン酸塩緩衝液 (pH 6.5): MeOH = 80:20 (v/v) で、フロー速度は0.3または0.5 ml/minであった。システムは、Dr. U. Wick (ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン) から提供された標準HAサンプルを用いて検量化した。生細胞の蛍光画像は、共焦顕微鏡 (LSM 510 カールツァイスマイクロイメージング社、トーンウッド、ニューヨーク州) を使用して記録した。細胞増殖はMTSアッセイによって550 nmで計測し、これをオプティマックスマイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイスズ、サニーベール、カリフォルニア州) に記録した。

【0292】

(3. カルボキシメチルHA (CM-HAまたはカーベラン3 (図5) の合成)

HA粉末 (20 g) をビーカーに加えた。NaOH水溶液 (200 ml、45% w/v) を前記ビーカーに加え、室温でペーストが形成するまで機械的に攪拌 (へらを使って) した。ペーストが形成するまで約5分以下かかった。2時間放置した後、HAペーストを1,500 mlのイソプロパノールおよびテフロン (登録商標) が塗布されたマグネット攪拌バーが入った5,000 mlビーカーに移し、ここに20 gのクロロ酢酸の500 mlイソプロパノール溶液をマグネットで攪拌しながら加えた。室温で1時間攪拌した後、生成物を、磁性ろ過器で紙フィルターを使用したろ過で集めた。ビーカーを少量のイソプロパノールで洗浄し、変性されたペースト状の生成物を回収した。次いで、粗ろ液を2,

10

20

30

40

50

000 ml の蒸留水に溶解した。溶液 pH を、6.0 N の HCl を加えて約 pH 7.0 に調整した。次に、溶液を精製した。広い範囲での（現在は 2 日間、水溶液外で 8 回の変化を伴う）透析（透析チュービング、Mw 切捨て：3,500）によって溶液を精製し、凍結乾燥して固体の白色カーベラン（約 15 g）を白色形態で得た。

【0293】

（4. カルボキシメチル HA（CM-HA-DTPH またはカーベラン（登録商標）-S）の合成（図 5））

HA 粉末（20 g）を 500 ml ビーカーに加えた。NaOH 水溶液（200 ml、45% w/v）を該ビーカーに加え、室温でペーストが形成するまで機械的に攪拌（へらを使って）した。ペーストが形成するまで約 5 分以下かかった。2 時間放置した後、HA ペーストを 1,500 ml のイソプロパノールおよびテフロン（登録商標）が塗布されたマグネット攪拌バーが入った 5,000 - ml ビーカーに移し、ここに 20 g のクロロ酢酸の 500 ml イソプロパノール溶液をマグネットで攪拌しながら加えた。室温で 1 時間攪拌した後、生成物を磁性ろ過器で紙フィルターを使用したろ過で集めた。ビーカーをイソプロパノールで洗浄し生成物を回収した。次いで、粗る液を 2,000 ml の蒸留水に溶解した。溶液 pH を 6.0 N の HCl を加えて約 pH 7.0 に調整した。次に、溶液を透析（透析チュービング、Mw 切捨て：3,500）によって 24 時間水を 4 回変えて精製した。

10

【0294】

カーベランの透析溶液は以下のステップの直接使用することができ、あるいは、分解でき以下に記載する低分子量になる（分子量を減らす任意酸分解）。精製した溶液を 500 ml ビーカーに移し、6.0 N の HCl 80 ml を加え、溶液を室温で磁気的に攪拌した。次いで、混合物を回転式インキュベーター（37、150 rpm）に所定の時間移した。一般的に、24 時間この条件で攪拌し、分子量が約 100 ~ 150 kDa のカーベランを得た。

20

【0295】

DTP（16.7 g、0.07 mol）を該カーベラン（登録商標）溶液に加え、HCl または NaOH 溶液を加えることによって、溶液の pH を 4.75 に調整した。次いで、6.72 g（0.035 mol）の EDCI を加え、室温で磁気的な攪拌を続けながら、1.0 N の HCl を加えることによって溶液の pH を 4.75 に調整した。4 時間後、50 g の DTT を加え、濃 NaOH 溶液を加えることによって溶液の pH を 8.5 に調整した。室温で磁気的な攪拌を 12 ~ 24 時間続けた後、1.0 N の HCl を加えることにより、反応混合物の pH を pH 3.5 に調整した。酸性化された溶液を透析チュービング（Mw 切捨て：3,500）へ移し、100 mM の NaCl を含む希 HCl（pH 3.5）に対して徹底的に透析し、次いで、希 HCl に対して pH 3.5 で透析した。次いで、溶液を遠心分離し、上澄み液を凍結乾燥し、固体の白色カーベラン（登録商標）-S（約 13 g）を得た。

30

【0296】

（5. カーベランおよびカーベラン（登録商標）-S の特徴評価）

（a. カーベラン（登録商標）およびカーベラン（登録商標）-S の D₂O 中の ¹H NMR スペクトラム）

40

カーベランおよびカーベラン（登録商標）-S を D₂O に溶解し、¹H-NMR スペクトルデータを、バリアン INOVA 400 を使用し、400 MHz で得た。HA（HA の N-アセチルメチルプロトンは、1.95 で）のスペクトラムと比べると、カーベランの新しい共振が 4.05 - 4.20 に現われ、これは側鎖メチレン（CH₂OCH₂COO⁻Na⁺）に対応した。カーベラン z-S の他の 2 個の新しい共振は、2.72 および 2.58 に現われ、これらは DTPH 変性中の 2 個の側鎖メチル（CH₂CH₂SH）に対応した（図 6）。

【0297】

（b. カーベランおよびカーベラン（登録商標）-S の試験管内細胞毒性の測定）

50

カーベランおよびカーベラン（登録商標）- Sを10%新しいウシ胎児血清、2mM Lのグルタミンおよび100単位/mlの抗血栓-抗真菌（ギブコ・BRLライフテクノロジ社、グランドアイランド、ニューヨーク州）が加えられた完全DMEM/F-12培地中に溶解し、1、2.5、5および10mg/mlの溶液を得た。NIH3T3線維芽細胞を96-ウェルプレートで24時間（5,000個の細胞/ウェル）培養し、次いで、0.2mlの前記溶液を各ウェルに加えた。試験管内で2時間および24時間培養した後、CyQUANT（登録商標）細胞増殖アッセイおよびMTSアッセイを使用して、生きている細胞の数を測定した（図7）。CyQUANT（登録商標）細胞増殖アッセイは、細胞核酸測定方法であり、培養体中の細胞の密度に対し直線性を有する。このアッセイで、カーベラン（登録商標）およびカーベラン（登録商標）- Sは完全に細胞適合性があることが明らかになった。すなわち、1mg/ml、2.5mg/ml、5mg/mlおよび10mg/mlのカーベラン（登録商標）またはカーベラン（登録商標）- Sを含む培地中で線維芽細胞を培養した後の細胞密度は、コントロール培地（結果は示さず）中で培養された細胞の細胞密度に匹敵するものである。MTSアッセイは、培養体中の生細胞の数を測定する比色定量方法である。このアッセイでは、テトラゾリウム塩（MTS）の生細胞のミトコンドリアによる還元が始まり、着色したホルマザン生成物となり、その存在が分光光度計で測定可能となる。図7中の結果は、カーベラン（登録商標）およびカーベラン（登録商標）- Sは完全に細胞適合性であったことを示唆しており、実際それらはミトコンドリア機能さえ増強しうる。

10

【0298】

20

（c. 大気中でのカーベラン（登録商標）- Sゲル化）

濃度が1.25%の高、中、低分子量カーベラン-S各2mLを出発材料として使用した。一連の希釈操作を通して、4個の異なる濃度（1.25%、0.625%、0.3125%および0.15625%）300Lを大気中（架橋剤なし）でゲル化に要する時間について試験した。表3~5中の時間が記されている箇所は材料がゲルを形成した時間である。時間が記録されていない箇所は、まだゲルを形成していない材料である。全3分子量の0.3125%と0.15625%濃度のカーベラン-Sを、pH5.5でのゲル化に関して試験した。3種の材料のどれもまだゲルを形成していなかった。

【0299】

【表3】

表3(25°C;pH7.4)

1.25% hmw カーベラン-S II. 8時間	0.625% hmw カーベラン-S III. 22時間	0.3125% hmw カーベラン-S IV. 42時間	0.15625% hmw カーベラン-S V. ゲルは形成せず
1.25% mmw カーベラン-S VI. 36時間	0.625% mmw カーベラン-S VII. 57時間	0.3125% mmw カーベラン-S VIII. 153時間	0.15625% mmw カーベラン-S ゲルは形成せず
1.25% lmw カーベラン-S IX. 63時間	0.625% lmw カーベラン-S X. 131時間	0.3125% lmw カーベラン-S XI. 244時間	0.15625% lmw カーベラン-S ゲルは形成せず

10

表4(37°C;pH6.5)

1.25% hmw カーベラン-S XII. 77時間	0.31% hmw カーベラン-S XIII. 103時間	0.125% hmw カーベラン-S ゲルは形成せず	0.031% hmw カーベラン-S ゲルは形成せず
1.25% mmw カーベラン-S XIV. 128時間	0.31% mmw カーベラン-S 114時間	0.125% mmw カーベラン-S ゲルは形成せず	0.031% mmw カーベラン-S ゲルは形成せず
1.25% lmw カーベラン-S 222時間	0.31% lmw カーベラン-S 279時間	0.125% lmw カーベラン-S ゲルは形成せず	0.031% lmw カーベラン-S ゲルは形成せず

20

表5 (37°C;pH5.5)

1.25% hmw カーベラン-S XV. 279時間	0.31% hmw カーベラン-S XVI. 307時間	0.125% hmw カーベラン-S ゲルは形成せず	0.031% hmw カーベラン-S ゲルは形成せず
1.25% mmw カーベラン-S XVII. 291時間	0.31% mmw カーベラン-S 322時間	0.125% mmw カーベラン-S ゲルは形成せず	0.031% mmw カーベラン-S ゲルは形成せず
1.25% lmw カーベラン-S XVIII.>400 時間	0.31% lmw カーベラン-S >400時間	0.125% lmw カーベラン-S ゲルは形成せず	0.031% lmw カーベラン-S ゲルは形成せず

30

(6. カーベラン(登録商標)-Sおよびゼラチン-DTPHのPEGDAによる架橋により、カーベラン(登録商標)-SXおよびカーベラン(登録商標)-GSXを得る(図8))

国際公開第2004/037,164号パンフレット(ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する)に記載する技術を使用して、カーベラン(登録商標)-Sのポリ(エチレングリコール)ジアクリレートPEGDAへのマイケル型共役体付加反応により、ヒドロゲル(カーベラン(登録商標)-SX)を得た。ゲル化時間は、主に、カーベラン(登録商標)-SおよびPEGDAの濃度、チオール:アクリレート比およびpHに依存した。これらのパラメーターを最適化することにより、カーベラン(登録商標)-SXを、種々の医療用途に用いられる自己架橋製の注射可能な生成物として製剤

40

50

化することができる。カーベラン（登録商標）-GSXを、カーベラン（登録商標）-S、ゼラチン-DTPHおよびPEGDAを反応させることにより生成した（図8）。図8中の標識化されたリンカーはPEGDAから誘導する。

【0300】

（a.カーベラン（登録商標）-SXの動的機械的特性）

リンカーの長さ、架橋比および濃度が異なるヒドロゲルのゲル化を、動的レオロジー（モデルAR550；TAインスツルメンツ；ニューキャッスル、デラウェア州）を使用し、ASTM D4473-01に従って、量的に試験した。与えられた負荷に対するヒドロゲルの応答を測定し、貯蔵弾性率（ G' ）、損失弾性率（ G'' ）および動的粘度（ η^* ）を、時間をかけて試験した。ゲル化点は、貯蔵弾性率（ G' ）および損失弾性率（ G'' ）が曲線交差する時間で複素粘度において劇的な増加がある場所と規定し、これは、ヒドロゲル挙動がより粘性のあるものからより弾性のあるものへ変化したことを表す（Peter, Kim et al. 1999；Nowak, Breedveld et al. 2002；Au, Ha et al. 2003）。この試験では、設定された平行板として、直径20mmの板を用い、0.8mmの間隔であった。カーベラン（登録商標）-SおよびPEGDAは渦混合し、懸濁物は、レオメーターのテフロン（登録商標）板上に素早く置いた。ステンレス鋼の平行板の幾何学的配置は、サンプル中に約0.2mm沈め、 G' 、 G'' および η^* における時間依存性変化を、タイムスイープを伴う、振動性応力制御実験の間記録した。全てのテストは、サンプルの構造が破壊されるのを避けるため、室温で周波数1Hz、0.25%ひずみに制御されて行われた。 G' および G'' 曲線が交差および複素粘度曲線の勾配はレオロジー・アドバンテージデータ解析ソフト（バージョン4.1.2；TAインスツルメンツ）を使用して分析した。

【0301】

図9のデータによれば、ゲル化点は約10分からほぼ170分の範囲であることが示されている。両出発材料、カーベラン（登録商標）-Sおよび架橋剤PEGDAに関し、通常、分子量が高くなれば速いゲル化時間の材料となる。図10において、グラフは、ゲル化点からゲル化の開始後約10分までの複素粘度 η^* 曲線の勾配を示す。この曲線の勾配は、材料の粘度増加の速度を記載する。2種の材料は類似のゲル化点を持つようだが、それらの粘度の増加は異なる速度であり、材料はゲル化の後の異なる時間で異なる特性を示す。

【0302】

（b.カーベラン（登録商標）-SXの試験管内での酵素的分解）

ヒドロゲル生成 カーベラン（登録商標）-Sの1.25%（w/v）溶液をDPBS中で調製し、次いで0.1NのNaOHを加えることによって溶液のpHを7.4に調整した。次いで、カーベラン（登録商標）-SXヒドロゲルを、ペトリ皿（直径3.5cm）中で、DPBS中の1.2mlの4.5%（w/v）PEGDAを4.8mlのカーベラン（登録商標）-S水溶液に加えることによって生成した。ヒドロゲルを完了するまで4~12時間反応させた。

【0303】

次いで、直径3.0mmの生検パンチを使用して、ペトリ皿中のゲルからヒドロゲルの円筒状片を切り取った。この円盤を、30mMのクエン酸、150mMの Na_2HPO_4 、150mMのNaCl（pH6.3）中で調製した、2.0mlのヒアルウロニダーゼ（Hase）溶液（0、0.5U/mlおよび2U/ml）を含む小さなガラスバイアル中に置いた。バイアルを、150rpmの軌道攪拌を行いながら37℃で培養した。各サンプルの重さを、デジタルスケールを使用してモニタリングし、24時間ごとに5日間測定した。サンプルをインキュベーターから取り除き、酵素溶液を廃棄した。次いで、ヒドロゲル円筒をろ紙上に置き、数秒間プロット乾燥した。次いで、サンプルを、デジタルスケールを使用して計り、新しいHase溶液でガラスバイアルに戻した。

【0304】

重量損失画分を、 $1 - W_t / W_0$ （式中、 W_t は時間tの時のサンプルの重さであり、

10

20

30

40

50

W₀はサンプルの元の重さである)で規定した。重量損失パーセントの値は、図11に示すように、時間の機能としてプロットした。結果によれば、消化は酵素濃度に依存することが示された。37で5日間、穏やかに攪拌した後、約63%のヒドロゲルを、使用したHaseの最も高い濃度(20U/ml)で消化した。Haseが加えられない状態では、大きな分解は起こらなかった。結果から、カーベラン(登録商標)-SXはゆっくりと生体内で加水分解され、この分解速度は、先のPEGDA-架橋HA-DTPHで見られたものと類似していることが明らかになった。

【0305】

(II.カーベラン(登録商標)-SXおよび(登録商標)-GSXの適用)

(1.カーベラン(登録商標)-SXヒドロゲルによる細胞外マトリクス(ECM)に基づく発声障害の予防)

意図的に切除された時に、注射可能なメーカー製の化学的変性HA誘導体を利用することによって、ECMに基づく発声障害予防のための創傷修復が促進された。33個のウサギの声帯ひだを生検とした。ウサギの2つの群のうち、一方だけを切除時に2種の異なるHA-系ヒドロゲル(カーベラン(登録商標)-SXおよびHA-DTPH-PEGDA)で処置した。始め、1.5%(w/v)のカーベラン(登録商標)-S(平均分子量、50%の置換度)溶液と1.5%(w/v)のHA-DTPH(平均分子量、50%の置換度)溶液とをDPBS中で調製した。次いで、0.1NのNaOHをくわえることによって、溶液のpHを7.4に調整した。次いで、0.45μmフィルターを通して溶液をろ過することによって滅菌した。最後に、4.5%のPEGDA(MW:3400)を対応するカーベラン(登録商標)-SまたはHA-DTPH溶液に、体積比1~4で加えることによって、カーベラン(登録商標)-SXおよびHA-DTPH-PEGDAのヒドロゲルを調製した。ゲル化の直前、すなわち5~10分以内に、部分的にゲル化したヒドロゲルをウサギの1個の声帯ひだに注射し、一方、食塩水を反対側の湾曲部に注射した。切除および注射後3週間で、動物を致死させた。処置された声帯ひだのHAのレベルは、ELISAによって測定されたコントロール(結果は示さず)と、大きな違いはなかった。

【0306】

カーベラン(登録商標)-SXの注射を受けた声帯ひだの生体力学的特性は、コントロールと比較して、大きく改善していた。弾性および粘弾性のいずれも改善され、ポリーンCVOレオメーターで測定する(図12)と、正常な声帯ひだの特性に非常に近かった。HA-DTPH-PEGDA注射によって、粘性は非常に改善されたが、弾性は改善されなかった。我々の注射可能なカーベラン(登録商標)-SXヒドロゲルによる予防的生体内操作は、組織再生を誘発し、最適な組織組成物と生体力学的特性とを与えるようである。

【0307】

(2.軌道狭窄の予防におけるカーベラン(登録商標)-SXの使用)

(材料および方法)

24個の白い、メスニュージールランドウサギを被験体として選んだ。それらは、体重が3.0~4.5kgの範囲であった。ウサギを無作為に4つの異なる群に分けた。群1:追加の処置をしていない気道損傷を患った6匹のウサギ、群2:気道損傷を患い、乾燥(被覆なし)ステントを直ちに埋め込まれた6匹のウサギ、群3:気道損傷を患い、HA-ゲルが被覆されたステントを直ちに埋め込まれた6匹のウサギ、群4:気道損傷を患い、HA-フィルムで覆われたステントを直ちに埋め込まれた6匹のウサギ

(ステント調製)

1.5%(w/v)カーベラン(登録商標)-S(平均分子量、50%の置換度)溶液をDPBS中で調製した。次いで、0.1NのNaOH溶液を加えることによって、溶液のpHを7.4に調整し、次いで、0.45μmフィルターを通して、ろ過することによって滅菌した。その後、DPBS中の4.5%PEGDA(MW:3400)溶液をカーベラン(登録商標)-S溶液に、体積比が1~4で加えた。ゲル化の直前、ゲル化して

いるヒドロゲルを、ポリ塩化ビニル (PVC) 気管内 (ET) チューブの 1 cm のセグメントで造った気管ステントの外側に塗布した。ステントは、群 3 用に 3.0 mm I D E T チュービングに切断し、群 2 および 4 用に 3.5 mm I D E T チュービングに切断した。該ステントは、ウサギモデルにおける先の成功に基づいて、長さを 1 cm とした。次いで、塗布されたチューブを、無菌培養通気部屋で乾燥した。カーベラン (登録商標) - S ゲル塗布ステントを移植の直前に処置場所で調整した。

【0308】

(処置)

処置の前に全動物に筋肉内麻酔を行った。気管損傷およびステント設置を前面側まで行った。中央線切開口を輪状甲状部の下縁から第三気管リングの上縁まで開け、輪状軟骨を完全に 2 等分した。気道を開いた後、輪状軟骨位置で、j キューレットを使用して、気管粘膜の全周囲の 3/4 を裸出した。上皮擦過標本は、縦の長さを 6 mm に限定した。

10

【0309】

次いで、ステントを実験群 2 ~ 4 に移植し、1 本のナイロン縫合糸で止めて、首の皮の外側にくくりつけた。次いで、気管および首をバイクリル縫合糸で塞ぎ、ウサギを 3 週間で回復させた。

【0310】

3 週間回復の後、トランス - オーラル内視鏡技術を用いて気管ステントを取り除いた。次いで、動物をさらに安楽死の前に 3 週間かけて回復させた。次いで、動物を致死させ、気道を組織学および形態学的測定のために収獲した。

20

【0311】

(結果)

一次結果を示した。気道断面区域は、実験群 1 および 2 においては、非常に小さい。群 2 の平均内腔区域は 37,904 と測定された。一方、群 3 および 4 は 296,024 および 186,444 であった (図 13A)。これらは画像ソフト (イメージプロプラス) によって特定されたので、その数値には単位はない。

【0312】

より大きな断面区域を持つ他に、群 3 および 4 は、また、最小径 (~463 および ~315) と比べた時、より大きな直径の測定結果を持つようである (図 13B)。同様に、これらの測定は画像ソフトを使用して行い、したがって単位がない。

30

【0313】

(3. 空洞外科手術後の大開口癒痕化予防)

(材料)

カーベラン (登録商標) - S を、3 種の異なる分子量 (低 (LMW)、中 (MMW) および高 (HMW)) で前記技術を使用して調製した。2 種の異なる出発濃度 (1.25 および 1.75 mg/ml) のものを架橋させ、異なる架橋比 (PEGDA : チオール = 1 : 2、1 : 3 および 1 : 4) で、3 種の異なる大きさの PEGDA (1000、3400 および 10,000 Da) を持つカーベラン (登録商標) - SX を形成した。

【0314】

好適なレオロジー特性を持つゲルを使用して、ウサギ空洞小孔モデルで、生体内空洞癒痕化の予防における、ナノステント留置カーベラン (登録商標) - SX ゲルの効能を実証した。つまり、動物に麻酔をかけ、上顎空洞を覆う柔組織および骨膜を上げた。顕微鏡手術ドリルで上顎空洞の前方壁を取り除き、4 mm の全貫通創傷を前記空洞の内壁内に造った。ゲルを片側 (無作為に選んだ) に注入し、反対側の空洞創傷は処置をしなかった。このようにして、各動物は実験部位とコントロール部位を持った。14 日後、動物を安楽死させ、創傷を試験した。各ウサギ大開口の直径を測定し、処置していない群と実験群とを、ステューデントの両側で対応のある t 検査を使用し、有意差 $p < 0.05$ で比較した。

40

【0315】

(結果)

簡単に適用するために、理想的な材料は、医者がカーベラン (登録商標) - S と PEG

50

DAとを混合し、患者に長く置くことなく注射する意図がある場合、速いゲル化時間と早急に増す粘度を発現し、材料は空洞中に留まる。レオロジーデータの検討によると、ナノステント留置のために最も適する出発材料、リンカー長さおよび架橋比の6つの組合せが、もとの54から選択され、それを表6に示す。

表6：動物実験で用いるために選ばれたカーベラン（登録商標）-SXの6種の組合せ

【0316】

【表4】

出発物質	クロスリンカー / 比
1.75% HMWカーベラン(登録商標)-S	3400 Da PEGDA, 1:4
1.75% HMWカーベラン(登録商標)-S	10 kDa PEGDA, 1:4
1.25% HMWカーベラン(登録商標)-S	3400 Da PEGDA, 1:2
1.25% HMWカーベラン(登録商標)-S	3400 Da PEGDA, 1:4
1.75% HMWカーベラン(登録商標)-S	10 kDa PEGDA, 1:4
1.75% HMWカーベラン(登録商標)-S	3400 Da PEGDA, 1:4

10

これらの6種の材料を、さらなる動物実験使用することにする。3400 DaのPEGDAと比1:4で架橋したMMWカーベラン（登録商標）-Sに関して行われた動物実験からの一次結果を、図14に示す。未処置の部位に関しては、8匹の動物の大開口の直径が0.6 mmであり、この開口は次のカーベラン（登録商標）-SXの処置で2.2 mmに大きく広がった。データは、空洞外科手術の後のカーベラン（登録商標）-SX適用が、癒痕拘縮を著しく減らしていることを示す。

20

【0317】

(4. 細胞成長用マトリックスとしての共架橋ゼラチン-DTPHとカーベラン（登録商標）-SX)

(a. ヒドロゲル表面上でのNIH3T3の細胞骨格組織化)

溶液調製 カーベラン（登録商標）-Sとゼラチン-DTPHとを細胞培養培地に溶解し、1.5% (w/v) および3.0% (w/v) の溶液をそれぞれ得た。溶液のpHを0.1NのNaOHで7.4に調整した。PEGDA (MW: 3400) をDPBSに溶解し、4.5% (w/v) のストック溶液を得、カーベラン（登録商標）-GSXを生成した(図8)。3種の溶液をそれぞれ45 μmのフィルターを通してろ過することにより滅菌した。

30

【0318】

ブレンド カーベラン（登録商標）-S溶液およびゼラチン-DTPH溶液を体積比100/0、85.7/14.3、66.3/33.3、31.5/68.5および0/100（これらはそれぞれ重量比100/0、75/25、50/50、25/75および0/100に相当する）に従って混合した。

【0319】

ヒドロゲルの調製 4体積のブレンド溶液を、1体積のPEGDAストック溶液を加え、混合し、プレーシングして架橋し、0.3 ml アリコートをして24ウェルプレートの各ウェルに注入してゲル化させた。

【0320】

細胞培養 1時間後、30,000個のNIH3T3線維芽細胞を各ヒドロゲルの表面に接種した。試験管内で24時間培養した後、細胞をホルマリンで固定し、オレゴングリーンで着色した。

40

【0321】

図15の結果は、線維芽細胞は結合していない(図15a)ので、カーベラン（登録商標）-SXは抗癒着の優れた候補であることを示唆していた。対照的に、ブレンドカーベラン（登録商標）-SX/ゼラチン-DTPH(カーベラン（登録商標）-GSX)は、ジスルフィド架橋HA-ゼラチンゲルおよびスポンジで得られた結果と同じように、細胞結合および拡散にとって良好なマトリックスであり、細胞成長助を長した(図15b、c、d)。ゼラチン-DTPHヒドロゲル単独およびコントロール単独(組織培養プレート

50

) より多くのアクチンフィラメントが、ブレンドヒドロゲル中に形成されていた (図 1 5 g)。

【 0 3 2 2 】

(b . ヒドロゲル表面上の細胞増殖)

セクション i で記載する 9 6 ウェルプレートの底でブレンドヒドロゲルを調整し、次いで、2, 5 0 0 個の N I H 3 T 3 線維芽細胞を、各ウェルのヒドロゲル表面に接種した。試験管内で 2 4 時間、4 8 時間および 9 6 時間培養した後、細胞数を M T S アッセイで測定した (図 1 6)。結果は、また、カーベラン (登録商標) - S X / ゼラチン - D T P H ブレンドヒドロゲル (カーベラン - G S X) は、細胞増殖を支持するには、ゼラチン - D T P H 単独およびコントロール (組織培養プレート) よりさらに良好なマトリックである

10

【 0 3 2 3 】

(5 . 鼓膜穿孔修復)

(方法)

以下の材料を T M P 修復の分析のために準備した。すなわち、カーベラン (登録商標) - S、ゼラチン - D T P H、カーベラン (登録商標) - S / ゼラチン - D T P H (カーベラン (登録商標) - G S X)、ゲルフォーム (登録商標) およびエピフィルム (登録商標)。つまり、カーベラン (登録商標) - S を D B P S 緩衝液に溶解し、1 . 5 % (w / v) 溶液を形成した。数アリコートの N a O H を使用して、p H を 7 . 4 に調整した。ゼラチン - D T P H を D P B S 緩衝液に溶解し、3 . 0 % (w / v) 溶液を形成し、数アリコートの N a O H を使用して、p H を 7 . 4 に調整した。P E G D A (ネクター) を D B P S 緩衝液に溶解し、4 . 5 % (w / v) 溶液を形成した。次いで、溶液を、滅菌フード中で、0 . 4 5 μ m の酢酸セルロース膜を持つポルトトップフィルター (コーニング) を使用して滅菌した。滅菌後、溶液を、0 . 4 m l のカーベラン (登録商標) - S、0 . 4 m l のカーベラン (登録商標) - S / ゼラチン - D T P H (1 : 1 w / w)、0 . 4 m l のゼラチン - D T P H、および 0 . 1 m l の P E G D A を含む 1 . 0 m l の無菌遠心チューブ中に、架橋剤に対する G A G が 4 : 1 の適正な混合物として、置いた。次いで、材料を後の使用のために、- 8 0 で凍結した。エピフィルム (登録商標) (メドトロニック) およびゲルフォーム (ファイザー) を実験用として、すでに滅菌されているものを購入した。ハートリーで着色した ギニアピッグ (エルムヒル) を入手し、イソフルランガスを使用して、麻酔をかけた。次いで、インテリジェント・ヒヤリング・システム (スマート E P) ソフトを使用して聴性脳幹反応 (A B R) テストを行なった。次いで、臍の直前方で両耳の鼓膜切開 (穿孔) を行った。1 つの耳をコントロールとして残し、一方反対側の耳に鼓膜切開部を通して注射した。約 0 . 4 m l のカーベラン (登録商標) - S、カーベラン (登録商標) - S / ゼラチン - D T P H およびゼラチン - D T P H を 0 . 1 m l の架橋剤 P E G D A とともに 1 m l シリンジに吸引させた。次いで材料を充分混合し、鼓膜切開部位を介して中耳に注射し、数分でゲル化させた。ヒドロゲルは 7 ~ 1 4 分で形成した。T M P が完全に塞がるまで動物を検査した。

20

30

【 0 3 2 4 】

(結果)

実験の結果を図 1 7 に示す。カーベラン (登録商標) - S X / ゼラチン - D T P H - P E G D A (カーベラン (登録商標) - G S X) が、1 . 8 ± 0 . 4 5 日間という最も速い時間であり、次いでゲルフォーム (登録商標) の 3 . 5 ± 0 . 7 1 日間、カーベラン (登録商標) - S X が 3 . 7 ± 2 . 5 日間、そしてコントロールが 4 . 2 ± 1 . 1 日間であった。エピフィルム (登録商標) およびゼラチン - D T P H は、コントロールより高い、それぞれ 4 . 7 ± 1 . 5 および 4 . 7 ± 1 . 2 という値であった。手術前後の A B R データで、大きな違いは観察されなかった。この実験で、再上皮形成を助長し、T M P を 2 日以内で完全に閉塞する (図 1 8) 材料として、カーベラン (登録商標) - S X / ゼラチン - D T P H - P E G D A の有効性が実証された。これは診療所での処置を可能にし、現在の処置に関連する麻酔状態の病的状態を解消する。

40

50

【 0 3 2 5 】

(6 . ラット子宮角モデルにおいてカーベラン (登録商標) - S X フィルムを使用する腹腔内癒着の予防 (試験的実験))

組み分け : 1 群当たり 4 匹のラット (1) 処置なし ; (2) カーベラン - S - P E G D A (カーベラン - S X) フィルム ; および (3) 0 . 5 % の M M C を持つカーベラン - S X フィルム

ラットは、外科手術後 2 週間で致死させた。2 つの負傷した子宮角の間の癒着を、マクログラフィ的に評価した。次いで、回りの組織とともに子宮角を切除し、マッソントリクローム染色を行った。結果を図 1 9 および 2 0 に示す。

【 0 3 2 6 】

図 1 9 は、異なる処置後の子宮角のマクログラフィ的な観察結果を示す。処置がされていないパネル a は、2 つの子宮角の間に非常に硬い癒着を形成した。癒着は、子宮角と周囲の腹腔内脂肪との間にも見られた。カーベラン - S - P E G D A フィルムで処置されたパネル b は、2 つの子宮角の間に癒着は形成されなかったが、子宮角と周囲の腹腔内脂肪との間に或る程度の癒着が形成された。カーベラン - S - M M C (0 . 5 %) - P E G D A フィルムで処置されたパネル c については、2 つの子宮角の間に癒着は形成されず、子宮角と周囲の腹腔内脂肪との間にも癒着は形成されなかった。

【 0 3 2 7 】

図 2 0 に、処置後の子宮角の組織学的観察を示す。処置がされていないパネル a は、2 つの子宮角の間に非常に硬い癒着を形成した。癒着は、子宮角と周囲の腹腔内脂肪との間にも見られた。カーベラン (登録商標) - S X フィルムで処置されたパネル b は、2 つの子宮角の間に癒着は形成されなかったが、子宮角と周囲の腹腔内脂肪との間に或る程度の癒着が形成された。カーベラン - S - M M C (0 . 5 %) - P E G D A フィルムで処置されたパネル c は、2 つの子宮角の間に癒着は形成されなかった。さらに、子宮角と周囲の腹腔内脂肪との間にも癒着は形成されなかった。マッソントリクローム染色、スケールバー : 4 0 0 μ m

M M C のない架橋されたカーベラン - S X フィルムフィルムを挿入することによって、2 つの子宮角の間に形成される癒着は予防されたが、子宮角と周囲の腹腔内脂肪との間の癒着は予防できなかった。共重合的に架橋された 0 . 5 % M M C を含む、架橋されたカーベラン - S X フィルムを挿入することによって、2 つの子宮角の間の癒着は予防され、宮角と周囲の腹腔内脂肪との間の癒着も予防された。

【 0 3 2 8 】

(7 . ノードマウスにおける胸、結腸および卵巣ガンの動物モデルの構築)

ヒトの胸ガン細胞株 (M D A - M B - 2 3 1、M D A - M B - 4 6 8、S K - B r - 3 および M C F - 1 0 A)、結腸ガン株 (C a c o - 2、H C T - 1 1 6 および H C A - 7)、および 1 個の卵巣ガン細胞株 (S K - O V - 3) に、カーベラン (登録商標) - G S X および H A - D T P H - ゼラチン - D T P H - P E G D A ヒドロゲル中、5 0 x 1 0 6 個の細胞 / m l の濃度で負荷をかけ、ノードマウスの背中に皮下注射した。さらに、カーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲルに負荷された C a c o - 2 細胞を、ノードマウスの盲腸の漿膜下層に注射した。カーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲルに負荷された S K - O V - 3 細胞を、ノードマウスの卵巣のきょう膜に注射した。コントロールとして、同じ濃度で、D P B S に懸濁させた細胞を、ノードマウスに皮下注射または腹腔内注射した。注射した後 1 ヶ月、注射をした部位をマクログラフィ的、組織学的に調べた。結果を図 2 1 ~ 2 8 に示す。

【 0 3 2 9 】

図 2 1 は、(a) D P B S 緩衝液に負荷された M D A - M B - 4 6 8 細胞および (b) カーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲルに負荷された M D A - M B - 4 6 8 細胞の皮下注射後の腫瘍のマクログラフィ図を示す。パネル c は皮膚を取り除いた後の腫瘍を示す。図 2 2 は、(a) D P B S 緩衝液中に負荷されたおよび (b) カーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲル中に負荷された M D A - M B - 4 6 8 細胞の皮下注射後、新しく形成さ

10

20

30

40

50

れた腫瘍の組織学的検査を示す。H E 染色、スケールバー：0.5 mm。図 2 3 (パネル a および b) は、D P B S 緩衝液 (左)、カーベラン (登録商標) - S (真ん中)、および H A - D T P H - P E G D A ヒドロゲルに負荷された C a c o - 2 細胞の皮下注射後の腫瘍のマクログラフ図を示す。パネル c は、皮膚を取り除いた後の腫瘍の断面を示す。細胞だけの腫瘍の異常な壊死の中心部および E C M ヒドロゲル中で増殖した健康的なより「正常」な腫瘍に注意すべきである。

【 0 3 3 0 】

図 2 4 は、(a) D P B S 緩衝液中および (b) カーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲル中に負荷された C a c o - 2 細胞の皮下注射後、新しく形成された腫瘍の組織学的検査を示す。H E 染色、スケールバー：0.5 mm。図 2 5 は、D P B S 緩衝液に懸濁された C a c o - 2 細胞の腹腔内注射の 1 ヶ月後のマウスを示す。胴回りが顕著に増えている。腹膜腔内に形成された複数の腫瘍があった。図 2 6 は、カーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲル内にカプセル化された C a c o - 2 細胞の結腸注射の 1 ヶ月後のマウスを示す。マウスの全身状態は良好であり、注射後、胴回りが顕著に増加することはなかった。腫瘍は、結腸の表面に個々に分散していた。図 2 7 は、D P B S 緩衝液に懸濁された C a c o - 2 細胞の腹腔内注射の 2 ヶ月後のマウスを示す。胴回りは顕著に増加していた。腹膜腔内に形成された複数の腫瘍があった。図 2 8 は、カーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲル中にカプセル化された C a c o - 2 細胞の結腸注射の 1 ヶ月後のマウスを示す。マウスの全身状態は良好であり、注射後、胴回りが顕著に増加することはなかった。腫瘍は、結腸の表面に個々に分散していた。

【 0 3 3 1 】

上に示した結果に基づいて、以下の結論が導き出せる。

【 0 3 3 2 】

(1) D P B S およびカーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲル中の M D A - M B - 4 6 8 細胞の皮下注射に続いて、胸の腫瘍が形成されたが、形成された腫瘍の質が異なっていた。D P B S 緩衝液に懸濁された M D A - M B - 4 6 8 細胞の注射から形成された腫瘍には壊死が見つかったが、s E C M - 増殖腫瘍中には見られなかった。

【 0 3 3 3 】

(2) D P B S およびカーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲル中の C a c o - 2 細胞の腹腔内注射により、腹膜腔に複数の腫瘍が形成され、該腫瘍は、結腸および腸から離れていた。マウスの体重および胴回りは顕著に増加し、より多くの血の腹水が腹膜腔に見出された。腫瘍転移が肝臓内に見られた。同じ現象が D P B S 緩衝液に懸濁された C a c o - 2 細胞の結腸注射においても見出された。カーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲルに負荷された C a c o - 2 細胞を結腸の漿膜下の層に注射した後、個々の腫瘍が結腸上に形成された。肝臓転移は観察されず、体重や胴回りの顕著な増加もなかった。血の腹水は見出せなかった。

【 0 3 3 4 】

(3) C a c o - 2 結腸ガン細胞に関し、H C T - 1 1 6 結腸ガン細胞を使用して、前記と同じ結果が見られた。

【 0 3 3 5 】

(4) D P B S およびカーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲル中の S K - O V - 3 細胞の腹腔内注射によって、腹膜腔ないに複数の腫瘍が形成され、該腫瘍は、結腸および腸から離れていた。マウスの体重および胴回りが顕著に増え、より多くの血の腹水が腹膜腔内に見出された。肝臓への腫瘍の転移が観察された。カーベラン (登録商標) - G S X ヒドロゲルに負荷された S K - O V - 3 細胞の卵巣包膜への注射において、腫瘍は形成されなかった。

【 0 3 3 6 】

(5) 総合すれば、s E C M (カーベラン (登録商標) - G S X) ヒドロゲル中で培養された腫瘍のほうが、マウス異種移植片モデルにおいて腹腔内または皮下注射された腫瘍細胞株より、ヒト患者に似通った腫瘍ができる。

【0337】

(8.3-D培地(カーベラン(登録商標)-GSXヒドロゲル)中で培養されたガン細胞を使用した、PI3K抑制剤およびタキソールの効果)

(a.細胞株および培養)

ヒト胸ガン細胞株(MDA-MB-231およびMDA-MB-468)、結腸腺癌細胞株(Caco2、HCT116およびHCA7)、および卵巣ガン細胞(SK-OV-3)をアメリカンタイプカルチャーコレクションズ(ATCC)から入手し、10mMのHEPES、10%の胎児ウシ血清(ハイクローン)、0.4mMのプルピン酸ナトリウムおよび0.5mg/mlのヒドロコルチゾン、100U/mlのペニシリン、および100ug/mlのストレプトマイシンを追加したRPMI1640培地(GIBCO)中に保った。

10

【0338】

(b.細胞株の公知のPI3K抑制剤およびタキソールに対する感受性)

密集度が80~90%に達したとき、前記細胞株を1mMのEDTAを含む0.25%トリプシンでトリプシン化し、無血清RPMI培地(pH7.4)中の1.25%(w/v)カーベラン(登録商標)-Sおよび3%(w/v)ゼラチン-DTPH(比50:50(v/v))に懸濁し、次いで、DPBS緩衝液中のPEGDA4%(w/v)溶液を、カーベラン(登録商標)-S/ゼラチン-DTPH溶液に4:1(カーベラン(登録商標)-S:PEGDA、v:v)で加え、ボルテックスにより30秒間混合した。カーベラン(登録商標)-GSX溶液中の細胞の最終濃度は、 $2.0 \times 10^6 / \text{ml}$ であった。細胞を負荷した各反応混合物のアリコート(100ml)を、ピペットで、直径6.5mm孔径8.0mmの24-ウェル細胞培養インサート(コーニング社、コーニング、ニューヨーク州)に移した。細胞負荷インサートを、インキュベーター(37、5%CO₂)で2時間培養し、次いで、10%のFBSを含む2mlのRPMI1640培地を各インサートに加えた。培地を2日毎に変えた。培養を始めて2週間後、培地をインサートから取り除き、10mMのLY-294002(シグマ)および1mg/mlの0.5%のFBSを含むRPMI1640培地中のパクリタキセル(シグマ)に変更した。各試薬各細胞株につき、合計8個のインサートがあった。また、培地は2日毎に変えた。培地をLY-294002および培地を含むパクリタキセルに変更して2週間後、培地をインサートから取り除き、5%FBSを含むRPMI1640培地1.5mlと15%(v/v)のセルタイター96水性一溶液細胞増殖アッセイ(プロメガ、マジソン、ウィスコンシン州)に変更し、インキュベーター(37、5%CO₂)内で3時間培養し、次いで反応溶液を96-ウェルプレート(150ml/ウェル)に移し、OPTIMAックスマイクロプレートリーダー(モレキュラーデバイシーズ)を用い、550nmの吸光度を読んだ。インサートを2回DPBS緩衝液で濯ぎ、FDAおよびPIを用い、室温で5分間染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡(LSM510、カールツァイスマイクロイメージング社、トーンウッド、ニューヨーク州)を使用して、観察した。

20

30

【0339】

(c.結果)

図29は、LY294002およびパクリタキセルの存在下での異なる細胞株の増殖を示す。図30は、通常の媒体における各細胞株の特異的反応を同じ2つの薬物と比較したデータを報告する。図30の各バーのペアに関し、正の吸光度差は薬物が細胞毒性であることを示し、一方負の値は、薬物が、使用した用量での処置した細胞に殆どあるいは全く効果がないことを示す。MDA-MB-468、Caco-2、HCT116およびHCA7細胞株の増殖は、LY294002およびパクリタキセルによって抑制され、MDA-MB-468がLY294002およびパクリタキセルに対する最も強い反応を明らかにした。また、抗チューブリン薬物、パクリタキセルは、PI3-K抑制剤、LY294002よりいくらか強い抑制効果を示すことが実証された。LY294002もパクリタキセルも、使用した用量ではMDA-MB-231およびSK-OV-3細胞株にいかなる抑制効果も示さなかった、図31は、FDA(生細胞、緑)およびPI(死細胞、赤

40

50

）で染色した後（スケールバーは200 μm である）の、通常培地中（AおよびD）、LY294002存在下（BおよびE）、およびパクリタキセル存在下（CおよびF）でのCaco-2およびSK-OV-3の3-D形状を示す。FDA/PI染色（図31）によって、sECMヒドロゲル中のCaco-2細胞密度は、通常培地中で培養された細胞と比べて、LY294002およびパクリタキセル存在下で減少することが明らかになった。また、LY294002およびパクリタキセル処置サンプル中に、死細胞（赤色）および生細胞破片が観察された（図31A、31Bおよび31C）。対照的に、通常培地中またはLY294002およびパクリタキセルの存在下で培養した時は、SK-OV-3細胞中には差は観察されなかった（図31D、31Eおよび31F）。

【0340】

（9.3-Dカーベラン（登録商標）-GSXヒドロゲル中および2-Dポリスチレンプレート中の肝細胞の単離と培養）

（a.肝細胞の単離）

ラットに抱水クロラルを（360 mg/kg）腹腔内注射によって麻酔をかけた。ラットの腹部を剃り、70%エタノールで洗浄した。次いで、腹腔を開き、腸を右に静かに動かし、門脈を切開し、縫合糸（4/0）を門脈の周りに置き、縛った。次に、別の4/0縫合糸を縛った場所の上の門脈の周りに置き、縛り、小さな切開口を門脈上に造り、PEチューブを門脈内に差し込み、縫合糸で縛った。次に、下方の腹部大動脈を切開し、血管鉗子を血管の周りに置いた。横隔膜を切断して下大動脈を露出させ血管を切断した。

【0341】

次いで、肝臓を、ハクス溶液で4分（40 ml/min、合計約160 ml）還流し、次いで酵素溶液で約10分（20 ml/min、合計約200 ml）還流した。肝臓を体から切除し、15 mlのコラーゲナーゼ還流液を含むペトリ皿（100 mm）に移した。次いで、余分な組織および破片を肝臓から刈り取った。胆汁が漏れるのを予防するために、胆嚢を注意深く取り除くことができる。

【0342】

肝細胞を、ステンレス鋼イヌ用櫛を使って、新しい、室温のコラーゲナーゼ中で、結合性組織ストローマから引き剥がし、残った白い繊維組織は廃棄した。広口ピペットで繰返しピペッティング（10回）し、細胞を分離した。1%子ウシ血清を加えた同体積のL15倍血を細胞懸濁物に加えることができる。細胞を細胞ストレーナー（70 μm ）に通し、50 ml遠心管に入れ、該管を50 \times gで5分間、10 で遠心分離した。細胞を10%の熱活性化胎児ウシ血清およびゲンタマイシン（50 $\mu\text{g/ml}$ ）を含む変性L15培地中で再懸濁した。細胞を0.4%トリパンブルー中で5分間培養した後、生細胞を数え、細胞の全数を計算した。

【0343】

（b.肝細胞の培養）

細胞を2-Dまたは3-D中で培養した。2つの培地、すなわち、ライボピッツ変性培地（L15）およびウィリアム培地E（MWE）を肝細胞培養用にテストした。L15は肝細胞培養用に良好であった。さらに、コラーゲンが塗布されたポリスチレンプレートは、肝細胞付着に有用であった。図32は、L15培地中のポリスチレンプレート上で培養された肝細胞を示す。左側の写真は透過光で撮影された。右側の写真は二重蛍光染色（FDA/PI染色）の後撮影された。図33は、MTSによって評価した時、3Dカーベラン（登録商標）-GSX上の肝細胞の増殖は2-Dポリスチレンプレート上の増殖と類似したことを示す。また、3日間培養した後の3D-カーベラン（登録商標）-GSX上の肝細胞の細胞形態も、2-Dポリスチレンプレート上の細胞形態と類似した（図34、FDA/PIで二重染色）

（III.ヒアルロン酸誘導体の合成）

（1.置換されていないアミノオキシ誘導体の合成）

この実験のため、F88（PEO₁₀₃-PPO₃₉-PEO₁₀₃）（1a）、F108PEOP₁₃₂EO₁₃₂）（1b）、およびF127（PEO₁₀₀-PPO₆₅

10

20

30

40

50

- PEO₁₀₀) (1c)、それぞれ異なる PPO / PEO 比および分子量、すなわち 1, 400、14, 600 および 12, 600 kDa で特徴付けられる、3 種類の異なる プロニックを選択した。該アミノオキシ誘導体を生成するための反応スキームは、図 35 に示す。

【0344】

プロニック F88 のビス - アミノオキシ誘導体 (1a) を、ミツノブ反応条件 (Ishikawa, T., Kawakami, M., Fukui, M., Yamashita, A., Urano, J., Saito, S. J. MA. Chem. Soc. 2001, 123, 7734 - 7735) 下、大過剰のトリフェニルフォスフィン (Ph₃P)、N - ヒドロキシフタルイミドおよびジエチルアゾジカルボキシレート (DEAD) の存在化で合成した。粗生成物 (2a) を石油エーテルで反応混合物から析出させ、2 種の溶剤システム、THF / ジエチルエーテルおよび THF / 石油エーテルを用いて 4 回再結晶させた。精製された生成物を CDCl₃ 中の ¹H NMR 400 MHz で分析した。溶剤は、ビス - フタルイミドフタルイミド誘導体の末端メチレンピークを完全に溶解するものを選択した。末端メチレンピークトリプレット (4.33 ppm, 4H, J = 4.4) は、同定され、フタルイミド芳香族環 (7.81 - 7.73 ppm, 8H) の複数のシグナルに対して一体化され、認められたプロニック誘導体 2a はフタルイミドによって、二重に保護されたことを確認した。次に、結晶化後に、メチレンクロライド中でフタルイミドとヒドラジーン水和物との脱保護反応を行い、ビスアミノオキシプロニックを良好な全収率で得た。3 種のプロニックス F88、F108 および F127 を全て、同じ一般的な方法でビス AO 誘導体に変換した。提示した合成経路は、単純な化学的変換および精製方法に基づき、その種の誘導体を高収率で製造することができる。

【0345】

(実験の項)

(一般的方法)

試薬は、アルドリッチ、アクロスおよび BASF から入手し、さらに精製することなく使用した。溶剤は試薬級のものであり、使用の前に蒸留した。THF はナトリウム線から蒸留し、CH₂Cl₂ は CaH₂ から蒸留した。無水条件を必要とする反応は、別段の記載がない限り、不活性雰囲気 (Ar) 下、オープンで乾燥したガラス製品 (2 時間、120 °C) 上で行った。真空中の濃度は、溶剤を除くため回転上蒸発器を使用したことを意味し、NMR スペクトルは、室温、400 MHz (¹H) および 101 MHz (¹³C) で記録した。化学シフトは、¹H に関して内部標準のクロロホルム (H 7.24)、¹³C に関してクロロホルム (C 77.0) に対して報告する。

【0346】

(プロニック F88 ビス - O - フタルイミド誘導体 (2a))

プロニック F88 (13.98 g, 1.16 mmol) および Ph₃P (6.1 g, 23.3 mmol)、N - ヒドロキシフタルイミド (3.78 g, 23.2 mmol) の THF (75 ml) 溶液を攪拌しながら、そこに DEAD (3.5 ml, 23.2 mmol) を 10 °C で加えた。反応を室温で一晩攪拌しながら行い、石油エーテルを加えて生成物を析出させて終わらせた。粗 2a を 2 種の溶剤システム：THF / 石油エーテルおよび THF / ジエチルエーテル (各システムで 2 回) を使用し、4 回再結晶させた。精製生成物 2a を白色の緩い固体状で得た (12.28 g, 86%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.80 - 7.78 (4H, m), 7.72 - 7.69 (4H, m), 4.32 (t, 4H, J = 4.4 Hz), 3.83 - 3.68 (m, 9H), 3.60 - 3.27 (m, 1052H), 2.21 (s, 9H), 1.10 - 1.08 (m, 123H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) 134.2, 123.2, 75.2, 75.0, 74.8, 73.1, 72.6, 70.26, 33.2, 17.2, 17.1。

【0347】

(プロニック F88 ビス - アミノオキシ誘導体 (3a))

2 a (1 2 . 3 8 g) の CH_2Cl_2 (5 0 m l) 溶液を攪拌しながら、そこにヒドラジン-水和物 (0 . 7 1 m l) を 0 で加えた。それを室温で 1 . 5 時間攪拌し、析出物をろ出した。濃縮した後、残基を T H F に溶解し、ジエチルエーテルを使用して析出させた。T H F / 石油エーテルを使用して再結晶を行い、精製化合物 3 a を白色の緩い固体として得た (1 1 g , 9 0 %) 。 ^1H N M R (4 0 0 M H z , \text{CDCl}_3) 3 . 8 1 - 3 . 7 8 (m , 8 H) , 3 . 7 1 - 3 . 3 0 (m , 8 7 4 H) , 2 . 0 2 (s , 1 0 H) , 1 . 2 4 - 0 . 9 8 (m , 1 0 0 H) ; ^{13}C N M R (1 0 1 M H z , \text{CDCl}_3) 7 5 . 5 , 7 5 . 3 , 7 5 . 2 , 7 3 . 3 , 7 2 . 9 , 7 0 . 5 , 3 3 . 3 , 1 7 . 4 , 1 7 . 3 。

【 0 3 4 8 】

10

(2 . 置換されたアミノオキシ誘導体の合成)

低分子量 H A (1 9 0 K D a) (0 . 4 5 8 g , 1 . 1 4 5 m m o l) を 4 6 m l の蒸留水に溶解した。次いで、0 . 5 g の O - フェニルヒドロキシルアミン塩酸塩 (O P H) (3 . 4 3 4 m m o l) を加え、1 . 0 N の H C l を加えることによって、溶液の p H を 4 . 7 5 に調整した。次に、0 . 1 1 g の E D C I (0 . 0 5 7 m m o l) を磁気的に攪拌する中加え、0 . 1 N の H C l を加えることによって、溶液の p H を 4 . 7 5 に 4 時間保った。溶液を 1 0 0 m M の N a C l に対して十分に透析し、次いで蒸留水に対して透析した。溶液をろ過して異物を取り除いた後、凍結乾燥して H A - O P H 生成物を白色粉末として得た。

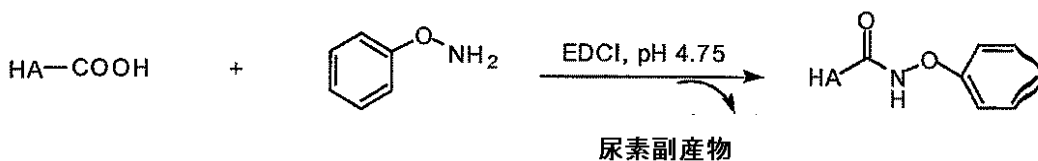
【 0 3 4 9 】

20

7 . 3 0 (2 プロトン) および 7 . 0 5 (3 プロトン) のピーク (図 3 6) は、フェニル基から来ており、置換度はプロトン N M R 共振の集積に基づいて約 2 1 % であった。N - アセチル尿素変性ヒアルロン酸に関し、予想される共振は、1 . 1 0 および 2 . 7 8 と検出された。

【 0 3 5 0 】

【 化 6 2 】



30

(3 . アミノオキシ誘導ポリマーとヒアルロン酸とのカップリング)

実験は、プルロニック F 1 0 8 のアミノオキシ (A O) 誘導体が共有結合カップリングし、その結果 H A の表面固定化のために使用できるかどうかをテストするために設計された。プルロニック F 1 0 8 は、通例、P E O - P P O - P E O トリブロックの P P O ブロックの疎水性吸着剤を介してプラスチック表面に塗布し、タンパク質吸着に対する表面抵抗を与えるために使用される。さらに、アミン反応性プルロニック誘導体は、アルピボ社から市販され、表面に特定の増殖因子およびタンパク質を固定するために使用することができる。この実験では、H A の蛍光誘導体、フルオレシン - H A が、表面吸着性ビスアミノオキシ誘導プルロニックに共役結合で結合することができることを実証した。

40

【 0 3 5 1 】

(材料および方法)

F 1 0 8 - ビス A O を蒸留水に溶解し 0 . 5 % (w / v) 溶液を得た。次いで、0 . 1 m l の溶液を 9 6 - ウェルプレートの各ウェルに加えた。1 2 時間後、プレートを蒸留水で 5 回洗浄した。次いで、0 . 1 m l の E D C I (0 . 1 N の M O P S 中 1 0 m g / m l) (p H 4 . 7) を各ウェルに加え、次いで、0 . 1 m l のフルオレシン - H A (M W : 1 5 0 k D a) (0 . 1 N の M O P S 中 2 m g / m l) (p H 4 . 7) を加えた。(注：フルオレシン - H A は、標準ヒドラジドカップリングプロトコルの後、p H 4 . 7 5 でフルオレシンヒドラジド (モレキュラープローブ社)、E D C I、1 5 0 k D a の H A を

50

使用して別々に精製した。)この表面反応を、暗い中で3日間進めた。つきに、プレートをDPBSで5回洗浄し、蛍光強度を蛍光強度プレートリーダーで $\lambda_{ex} = 496 \text{ nm}$ および $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ を使用して測定した。

【0352】

(結果)

図39に、(A)ビスアミノオキシ誘導プルロニック、(B)ビスアミノオキシ誘導プルロニックおよびEDCI、および(C)ビスアミノオキシ誘導プルロニックなしに関する固定フルオレシン-HAの蛍光強度を示す。実験群(A)の蛍光吸収は、コントロール群(B:EDCIなし、およびC:プルロニックなし)より顕著に高かった。この結果は、F-108ビスAOは、疎水性相互作用を介して96-ウェルプレートに吸収され、F-108ビスAOアミノオキシを介した、HAカルボキシレート凝集物へのフルオレシン-HAのEDCI-関連カップリングは、プレート表面上で達成されたことを示唆していた。コントロール群Bにおける高吸収は、表面における、フルオレシン-HAのF-108ビスAOに対する疎水性および電荷相互作用の結果であろう。

10

【0353】

(4.一官能性プルロニック-AOによる自己重合的ヒアルロン酸ヒドロゲル形成)

プルロニックのHAへの結合は、HAに結合する複数のPEO-PPO-PEOトリブロックポリマーの分子間および分子内疎水性相互作用に基づく自己重合的ヒドロゲルとなるという仮説をテストした。また、実験では、低分子アミノオキシ化合物に関し要求し、有効にするように、アミノオキシ縮合を使用することが、HAカルボキシレート基の溶液中のアミノオキシ含有ポリマーによる化学変性の新しい化学としての実施可能性もテストした。

20

【0354】

(材料および方法)

HA(830kDa)のサンプル50mgを20mlの蒸留水に溶解し、0.5%(w/v)溶液を得、1.5gのモノメトキシ、モノアミノオキシプルロニックF88誘導体、MeO-F88-AOを加えた。次に、溶液のpHを約4.7に調整し、50mgのEDCIを加えた。15分後、ゲルが形成された。2時間後、ゲルを透析チュービング(MW切捨て、50,000)に置き、0.1NのNaCl溶液に対する透析を3日間続け、水に対する透析を1日行った。ゲルは、現段階で0.3%HA w/vしかなく、室温でも4°Cでもゲルの状態であった。

30

【0355】

(結果)

プルロニックF88も化学的に合成されたMeO-F88-AOも濃度が5mg/mlまででは、20°Cまたは4°Cでゲルを形成しなかった。対照的に、カルボキシレートの1以上のMeO-F88-AO分子のアミノオキシ基へのカルボジイミド関連カップリングを介するMeO-F88-AOの共有結合カップリングでHAを造ることにより、物理ゲルが形成した。理論に縛られるつもりはないが、この物理的な架橋ゲルを形成した原動力は、共有結合的に変性された高分子中に存在する複数のPPOブロックの提案されている疎水性相互作用と一致する。分子間および分子内疎水性相互作用は両方とも、このゲル化効果に影響を及ぼしているかもしれない。緩い物理ゲルは、新規な、超粘稠でゆっくり劣化するHA材料として、癒着予防、皮膚フィラーとして注射、局所的化粧または薬物送達製剤における取り込み、骨関節炎における痛みおよび炎症の軽減のための注射における用途、眼科外科手術、整形外科手術における柔組織バルキング、声帯ひだへの注射、発声障害の予防または処置、および他の臨床的応用に大きな可能性を持つ。

40

【0356】

(5.ヘパリンのビスアミノオキシ誘導プルロニック材料との共役結合)

(材料および方法)

水(5mg/ml)中のビスAO-F108を0.1ml/ウェルで負荷し、96-ウェルプレート上で一晩培養した。ウェルを蒸留水(5x)で洗浄し、次いで0.1/ウェ

50

ルのEDCI (10 mg/ml) のMOPS (0.1 N、pH 4.7) 溶液を加え、MOPS (0.1 N、pH 4.7) 中の0.1 ml/ウェルのヘパリンナトリウム塩 (平均 Mw: 15 kD、1:2、4 mg/ml から0.25 mg/ml の段階希釈) を加えた。不均質反応を室温で3日間続けた。プレートをトリスHCl緩衝液 (TBS, 20 mM, pH 7.5) で5回洗浄し、スタビルガード液 (スマディクス) 200 µl/ウェルで1時間ブロックした。

【0357】

プレート上に固定したヘパリンを、刊行された方法 (S. Cai, J. L. Duffner-Beattie, and G. D. Prestwich, 「A Selective Protein Sensor for Heparin Detection», *Analyt. Biochem.*, 26, 33-41 (2004)) に基づいてELISAを使用して評価した。つまり、プレートをブロックし、3回洗浄した後、ヘパリンを結合するタンパク質GST-HB3 (100 µg/ml) を100 µl/ウェル加えた。プレートを1時間培養し、TBSで再び洗浄し、1:1000のTBS中の抗GST (シグマ) を100 µl/ウェル加え、1時間培養した。次に、1:3000のTBS中の抗マウスIgG-HRP共役体 (シグマ) を100 µl/ウェル加え、さらに1時間培養した。最後に、基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB、シグマ) を100 µl/ウェル加え、色の発現が安定になるように、反応物を1MのH₂SO₄で急冷した。プレートを450 nmで読み、GST-HB3で負荷したブランクウェルを差し引くことによって吸光度を補正し、同じようにELISA手順 (バックグラウンド読み取り値) を行った。

【0358】

(結果)

図40に、ヘパリン単独でもヘパリン+EDCIでも、ヘパリンを表面に固定することにはならなかったことが明らかに示されている。(注: これらの2つの群、HPおよびEDCI+HPに関し、テストしたヘパリン濃度は2 mg/mlであった。) しかし、この予備テストにおいては、EDCIおよびF108単独の使用により、ELISA試薬に対しある比特定な結合が示されるような表面を造る。表面上でF108-ピスAOへのフルオレシン-HAの疎水性および電荷相互作用の組合せから同様の効果が観察された。

【0359】

それにもかかわらず、概念実験のこの証拠におけるヘパリンの共役および吸収は、GST-HB3タンパク質検出が、最高結合能であり、その動的領域のトップであるという事実にもかかわらず、ヘパリン用量依存性に対する傾向を示す。我々の実験では、洗浄条件を変えることと固定化量および検出試薬の量を調整することで、いっそう低いバックグラウンドを造り、感受性を改善し、この方法に基づく定量アッセイを得ることができる。

【0360】

種々の変性および変化を本明細書に記載する化合物、組成物および方法に加えることができる。ここに記載する化合物、組成物および方法の他の態様は、明細書の熟考およびここに開示する化合物、組成物および方法の実施により明らかになるであろう。明細書および実施例は例示として考えるべきものである。

【図面の簡単な説明】

【0361】

この明細書に組み入れられ、その一部を構成する添付の図面は、以下に記載する数種の態様を示す。

【図1】図1は、ピス(アミノオキシ)エーテル化合物生成の反応スキームを示す。

【図2】図2は、アミノオキシエーテル化合物およびチオール化されたアミノオキシ変性ヒアルロン酸生成の反応スキームを示す。

【図3】図3は、アミノオキシ変性ヒアルロン酸生成の反応スキームを示す。

【図4】図4は、チオール化されたヒドラジドカルボキシメチルヒアルロン酸の反応スキームを示す。

【図5】図5は、カルボキシメチルヒアルロン酸（カーベラン（登録商標））およびチオール化されたヒドラジド変性カルボキシメチルヒアルロン酸（カーベラン（登録商標）-S）生成の反応スキームを示す。

【図6】図6は、カーベラン（登録商標）-Sの¹H NMRスペクトラムを示す。

【図7】図7は、MTSアッセイ（n = 6）を使用した、カーベラン（登録商標）（白丸）およびカーベラン（登録商標）-S（白三角）の細胞毒性を示し、グラフAは培養から2時間後のもので、パネルBは培養から24時間後のものである。

【図8】図8は、カーベラン（登録商標）-SXおよびカーベラン（登録商標）-GSX生成の反応スキームを示す。

【図9】図9は、異なる製剤に関し、カーベラン（登録商標）-SXのゲル化時間を示す。

10

【図10】図10は、異なる製剤に関し、カーベラン（登録商標）-SXのゲル化速度を示す。

【図11】図11は、カーベラン（登録商標）-SXの重量損失画分対HA分解時間を示す。キー：ダイヤモンド、酵素なしのコントロール；円：0.5 U/ml；四角：2.0 U/ml；三角：20 U/ml

【図12】図12は、カーベラン（登録商標）-SXおよびHA-DTPH-PEGDAヒドロゲルを注射されたウサギの声帯ひだの粘弾性を示す。

【図13】図13は、異なるステントを除去した後のウサギの気管の気道内腔区域および最小気道径を示す。

20

【図14】図14は、カーベラン（登録商標）-SXの適応ありおよびなしのウサギモデルにおける空洞外科手術の14日後に測定した大開口直径を示す。

【図15】図15は、カーベラン（登録商標）-GSXヒドロゲル表面上で24時間培養されたNIH3T3線維芽細胞のFITC-ファロイジン染色を伴うF-アクチンの可視化を示す。カーベラン（登録商標）-S/ゼラチン-DTPHの比：（a）100/0、（b）75/25、（c）50/50、（d）25/75、（e）組織培養プレート（コントロール）および（e）パネル（b）の拡大写真

【図16】図16は、24、48および96時間試験管内培養された後の、カーベラン（登録商標）-GSXヒドロゲル表面上のNIH3T3線維芽細胞増殖を示す。

【図17】図17は、ギニアピッグモデルにおける時間の関数としての鼓膜閉鎖を示す。

30

【図18】図18は、鼓膜切開2日後の術後治癒およびカーベラン（登録商標）-GSXを示す。

【図19】図19は、異なるフィルムで処置した後のラット子宮角のマクログラフィ的観察を示す。

【図20】図20は、異なるフィルムで処置した後のラット子宮角の組織学的観察を示す。

【図21】図21は、（a）DPBS緩衝液中に負荷されたMDA-MB-468細胞および（b）カーベラン（登録商標）-GSXヒドロゲル中に負荷されたMDA-MB-468細胞の皮下注射の後の腫瘍のマクログラフィ的図を示す。パネルcは皮膚を除去した後の腫瘍を示す。

40

【図22】図22は、（a）DPBS緩衝液中に負荷されたおよび（b）カーベラン（登録商標）-GSXヒドロゲル中に負荷されたMDA-MB-468細胞の皮下注射後に新しく形成した腫瘍の組織学的評価を示す。HE染色、スケールバー：0.5 mm

【図23】図23は、DPBS緩衝液（左）、カーベラン（登録商標）-GSX（中央）およびHA-DTPH-PEGDA/ゼラチンDTPHヒドロゲル注に負荷されたCaco-2細胞の皮下注射後の腫瘍のマクログラフィ的図を示す。

【図24】図24は、（a）DPBS緩衝液および（b）カーベラン（登録商標）-GSXヒドロゲルに負荷されたCaco-2細胞の皮下注射後に新しく形成された腫瘍の組織学的評価を示す。HE染色、スケールバー：0.5 mm

【図25】図25は、DPBS緩衝液に懸濁されたCaco-2細胞の腹腔内注射から月

50

後のマウスを示す。

【図26】図26は、カーベラン（登録商標）-GSXヒドロゲルでカプセル化されたCaco-2細胞の結腸注射から1ヶ月後のマウスを示す。

【図27】図27は、DPBS緩衝液に懸濁されたCaco-2細胞の腹腔内注射から1ヶ月後の腫瘍細胞を示す。

【図28】図28は、カーベラン（登録商標）-GSXヒドロゲルでカプセル化されたCaco-2細胞の結腸注射から1ヶ月後の腫瘍細胞を示す。

【図29-1】図29A~29Cは、LY294002およびパクリタキセルの存在下、カーベラン（登録商標）-GSX上で培養された異なる細胞株の増殖を示す。

【図29-2】図29D~29Fは、LY294002およびパクリタキセルの存在下、カーベラン（登録商標）-GSX上で培養された異なる細胞株の増殖を示す。

【図30】図30は、処置されていないコントロールと比べた異なる細胞株の増殖を示す。（相違=コントロール-処置）

【図31】図31は、FDA（生細胞、緑）およびPI（死細胞、赤）で染色した後、通常薬物のない培地（AおよびD）、LY294002存在下（BおよびE）およびパクリタキセル存在下（CおよびF）で、カーベラン（登録商標）-GSX中で増殖したCaco-2およびSK-OV-3細胞の3-D形態を示す。スケールバー：200 μm

【図32】図32は、L15培地中ポリスチレンプレート上で培養された肝細胞を示す。

【図33】図33は、MTSで評価した2D-ポリスチレンプレートおよび3-Dカーベラン（登録商標）-GSX上の肝細胞の増殖を示す。

【図34】図34は、3日目のカーベラン（登録商標）-GSX中の肝細胞の3-D培養を示す。

【図35】図35は、モノおよびビスアミノオキシプルロニック生成の反応スキームを示す。

【図36】図36は、HA-アミノオキシエーテルの¹H NMRスペクトラムを示す。

【図37】図37は、アミノオキシポリマーとヒアルロン酸とのカップリングの反応スキームを示す。

【図38】図38は、アミノオキシポリマー/ヒアルロン酸の自己集合でヒドロゲルになる反応スキームを示す。

【図39】図39は、固定フルオレシン-HAと（A）ビスアミノオキシ誘導プルロニック、（B）ビスアミノオキシ誘導プルロニックおよびEDCI、および（C）ビスアミノオキシ誘導プルロニックなしとの蛍光強度を示す。

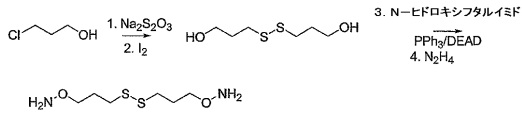
【図40】図40は、ヘパリンとビスAO-プルロニックとの表面固定化に関するELISA結果を示す。

10

20

30

【 図 1 】

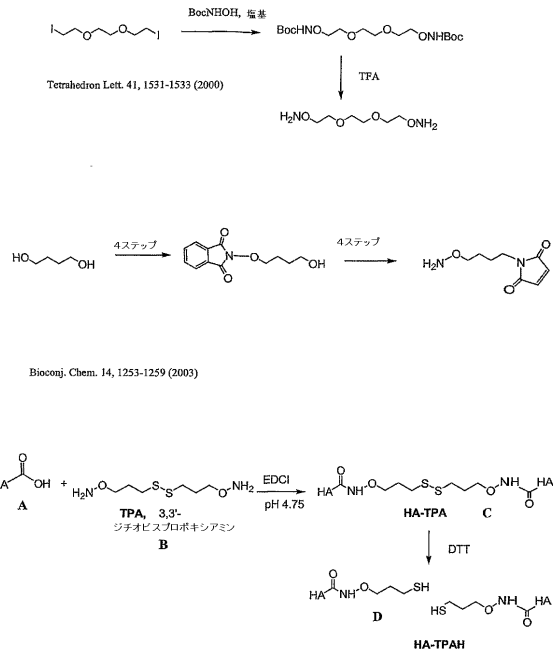


ステップ1-2, Journal of Organic Chemistry, 55(9), 2580-6; 1990

ステップ3-4, Journal of the American Chemical Society, 123(31), 7734-7735; 2001

FIGURE 1

【 図 2 】



Tetrahedron Lett. 41, 1531-1533 (2000)

Bioconj. Chem. 14, 1253-1259 (2003)

FIGURE 2

【 図 3 】

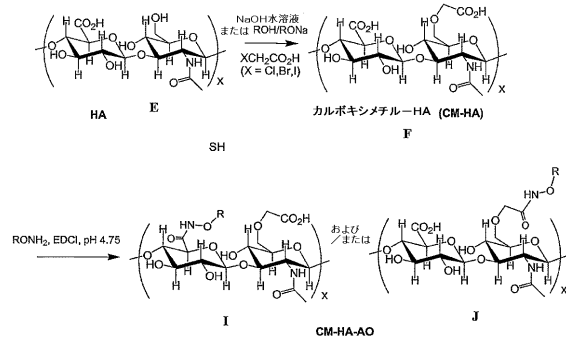


FIGURE 3

【 図 5 】

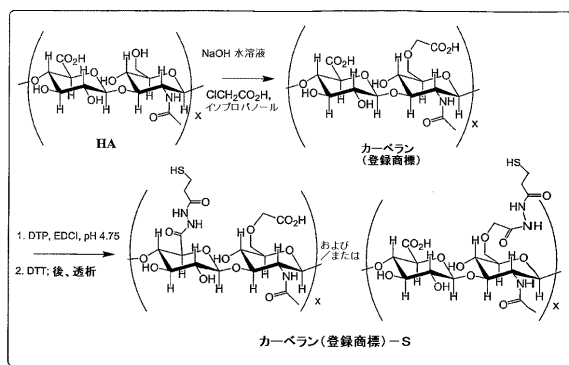


FIGURE 5

【 図 4 】

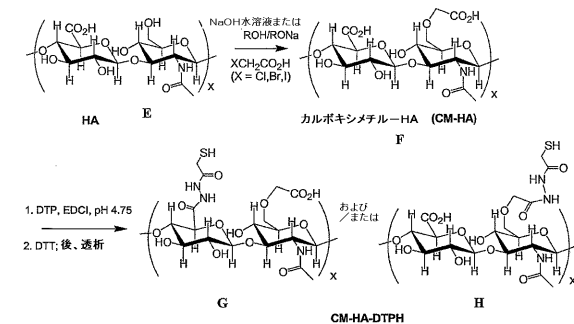


FIGURE 4

【図6】

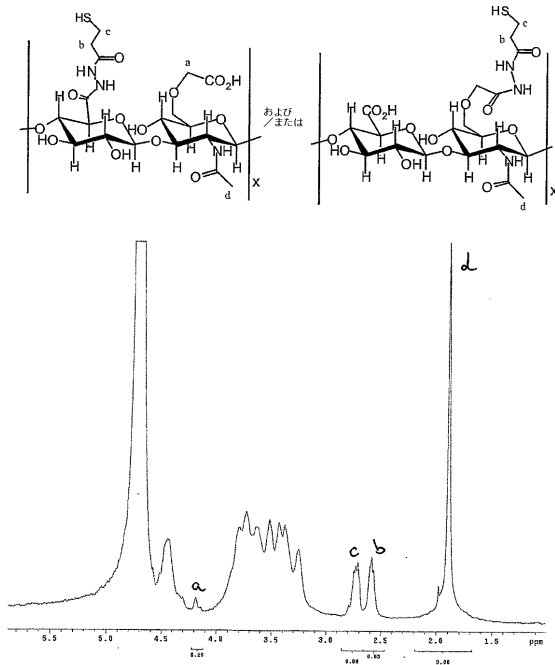
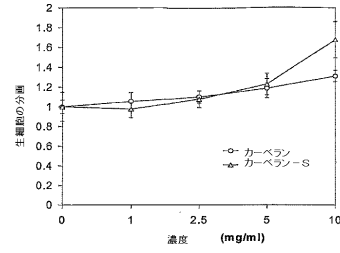
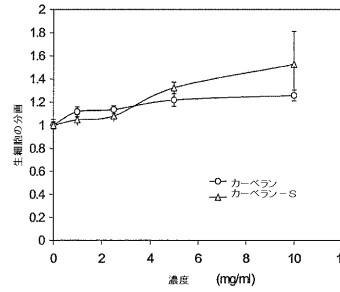


FIGURE 6

【図7】



A



B

FIGURE 7

【図8】

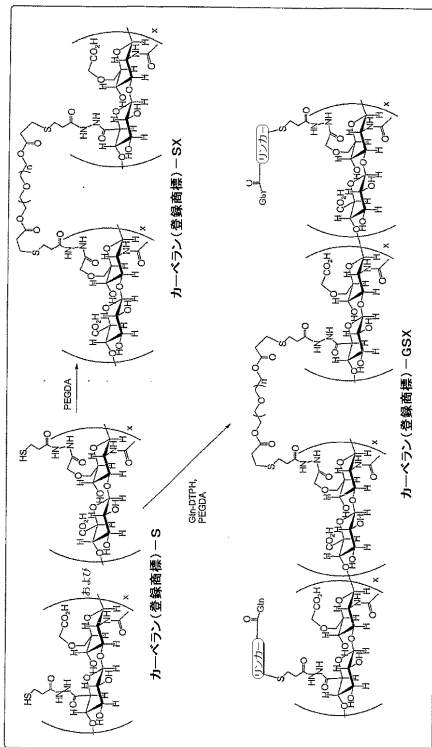


FIGURE 8

【図9】

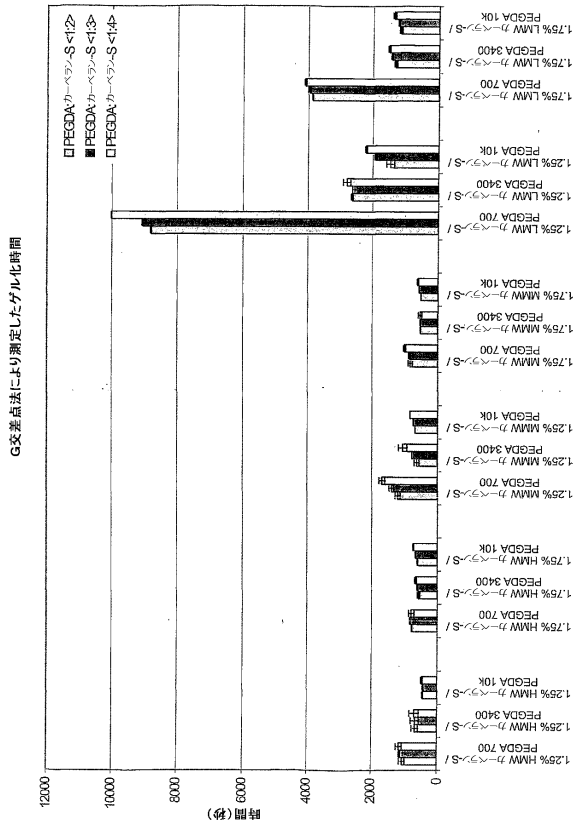
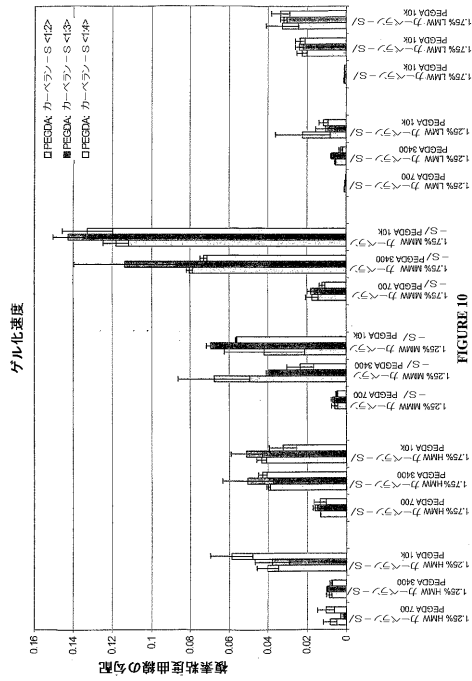


FIGURE 9

【図10】



【図11】

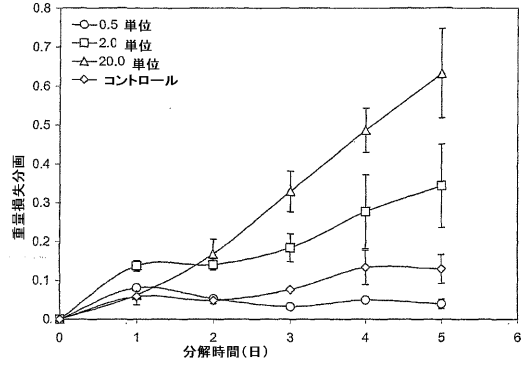


FIGURE 11

【図12】

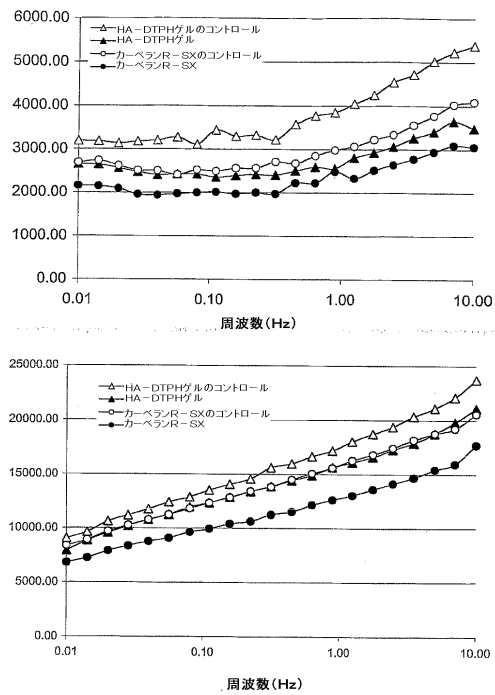


FIGURE 12

【図13】

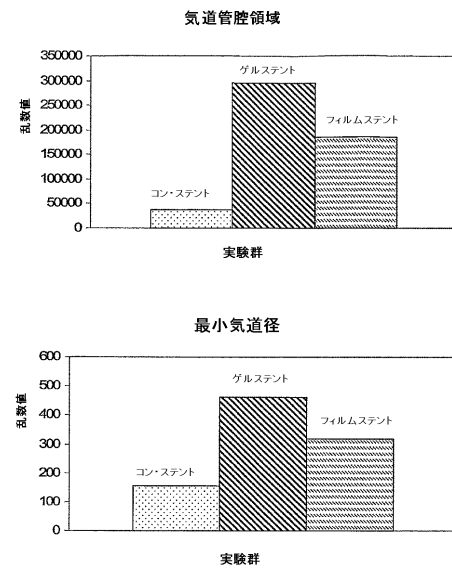
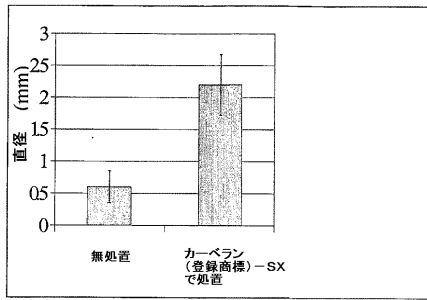


FIGURE 13

【 図 1 4 】

FIGURE 14



【 図 1 5 】

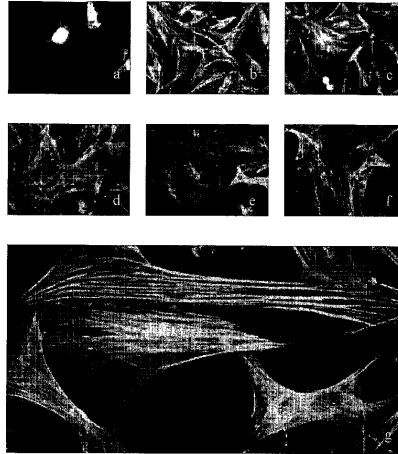


FIGURE 15

【 図 1 6 】

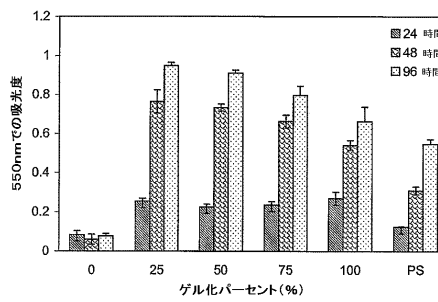
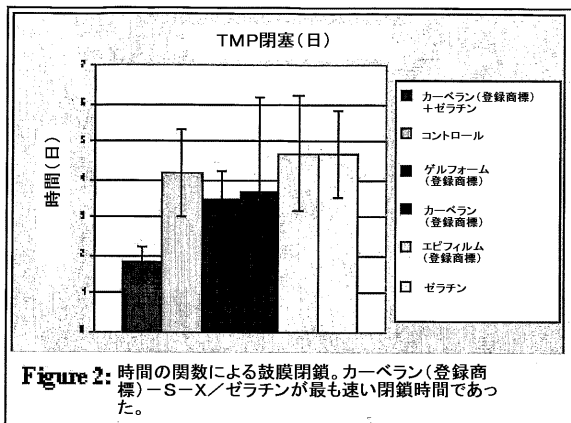


FIGURE 16

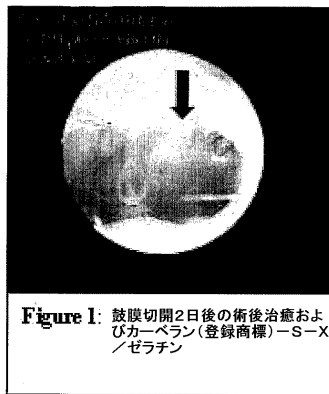
【 図 1 7 】

FIGURE 17



【 図 1 8 】

FIGURE 18



【 図 1 9 】



FIGURE 19

【 図 2 0 】

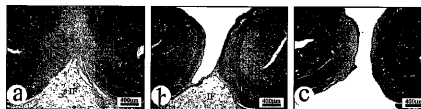


FIGURE 20

【 図 2 1 】

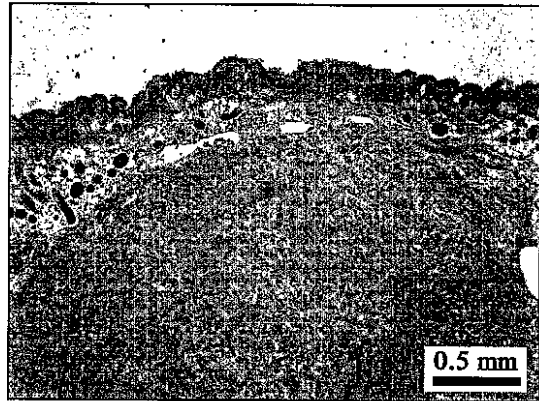


FIGURE 21

【 図 2 2 】



A



B

FIGURE 22

【 図 2 3 】



FIGURE 23

【 図 2 6 】



FIGURE 26

【 図 2 4 】

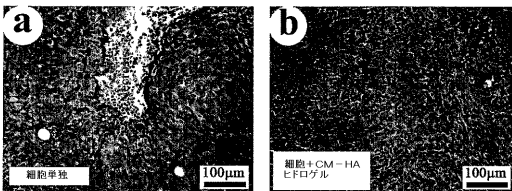


FIGURE 24

【 図 2 7 】



FIGURE 27

【 図 2 5 】



FIGURE 25

【 図 2 8 】

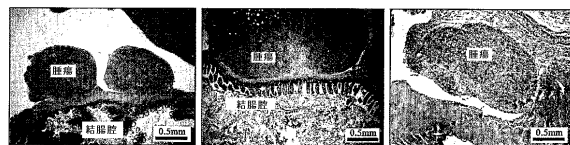
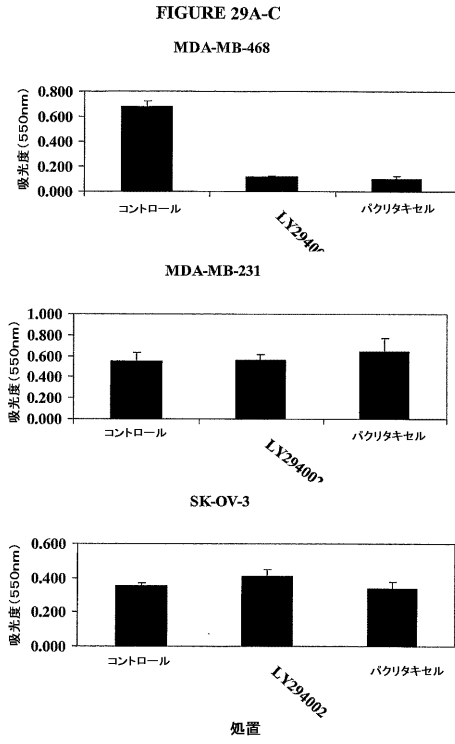
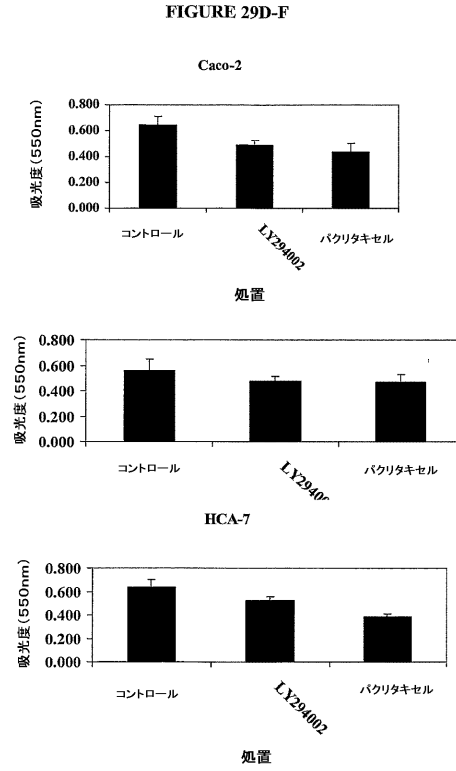


FIGURE 28

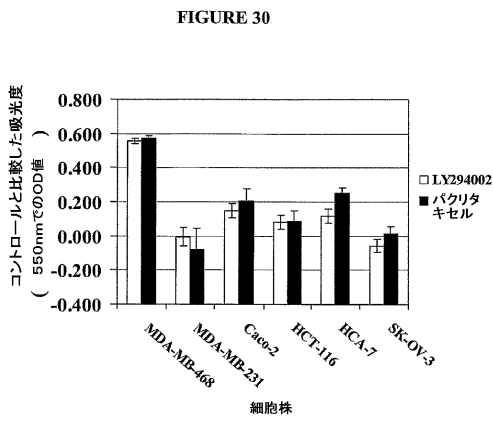
【 図 29 - 1 】



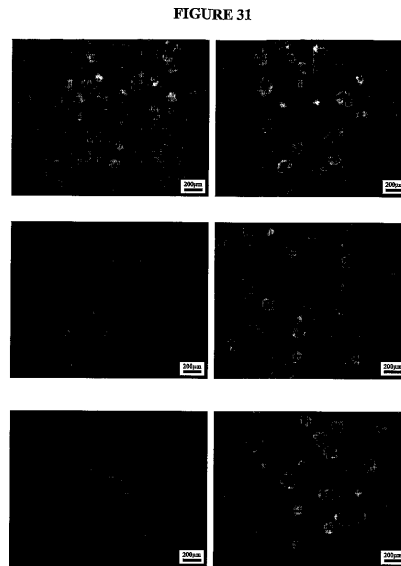
【 図 29 - 2 】



【 図 30 】

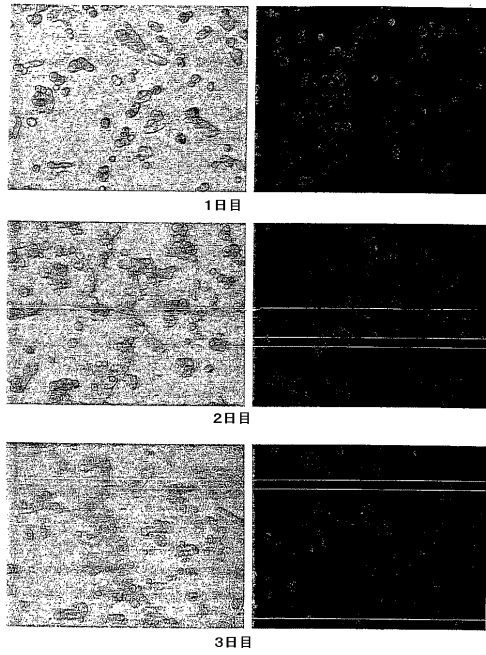


【 図 31 】



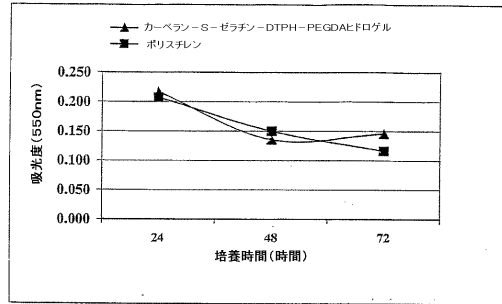
【 図 3 2 】

FIGURE 32



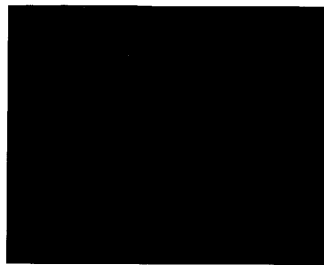
【 図 3 3 】

FIGURE 33



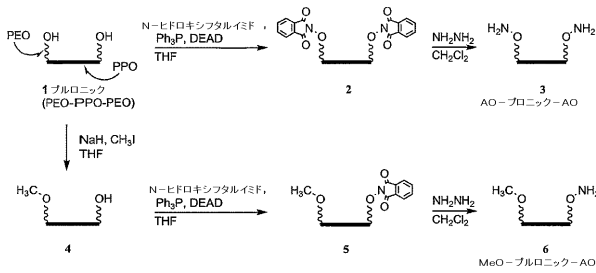
【 図 3 4 】

FIGURE 34



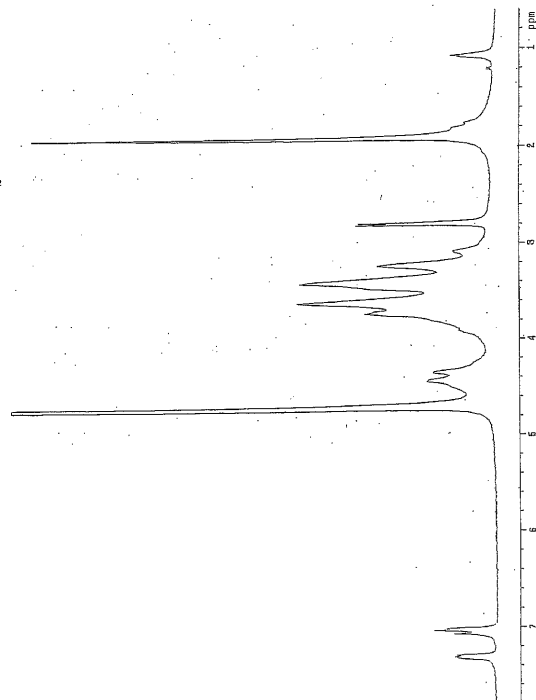
【 図 3 5 】

FIGURE 35

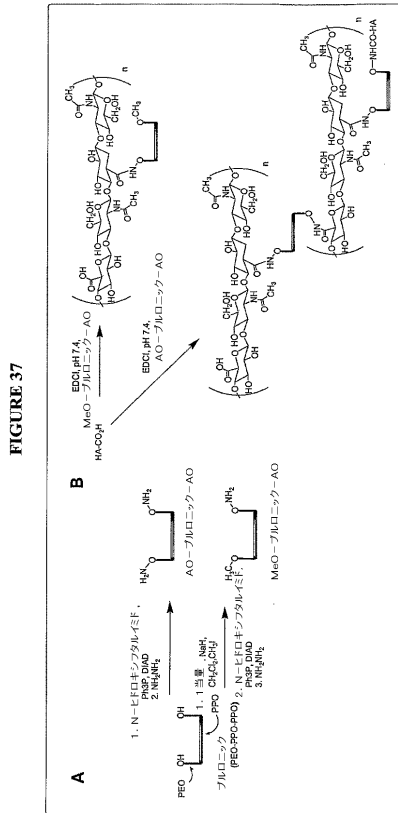


【 図 3 6 】

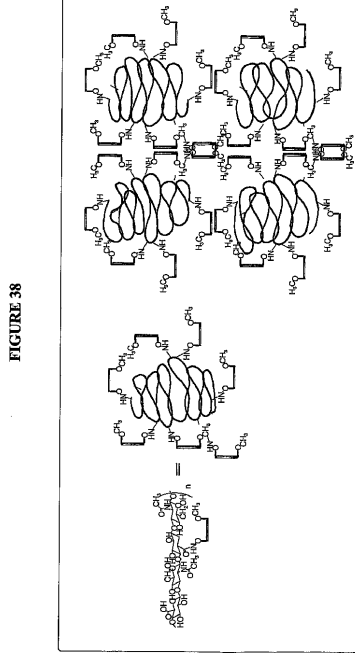
FIGURE 36



【 37 】

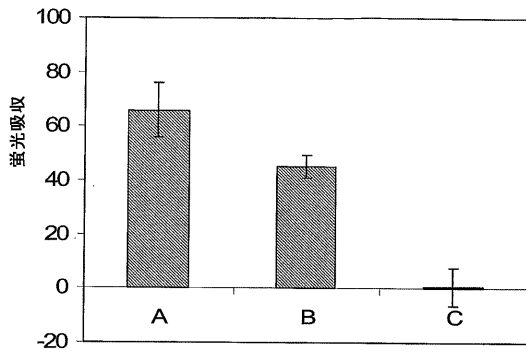


【 38 】



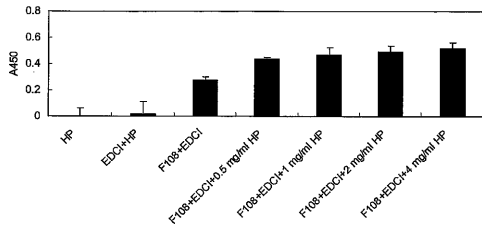
【 39 】

FIGURE 39



【 40 】

FIGURE 40



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 K	31/728	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 L	27/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 L	31/00	(2006.01)	A 6 1 L	27/00	V
A 6 1 L	15/16	(2006.01)	A 6 1 L	31/00	T
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 L	27/00	G
A 6 1 P	41/00	(2006.01)	A 6 1 L	27/00	C
A 6 1 K	47/48	(2006.01)	A 6 1 L	15/01	
C 0 8 L	101/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
C 0 8 L	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	41/00	
			A 6 1 K	47/48	
			C 0 8 L	101/02	
			C 0 8 L	5/00	

- (72)発明者 プレストウィッチ, グレン ディー,
アメリカ合衆国 ユタ 84108, ソルトレークシティー, サニーデール レーン 1500
- (72)発明者 シュー, シャオ チェン
アメリカ合衆国 ユタ 84102, ソルトレークシティー, サウス 25 イースト 1100, ナンバー 15
- (72)発明者 リュー, ヤンチュン
アメリカ合衆国 ユタ 84103, ソルトレークシティー, ノース エフ. ストリート 230, アpartment 19

審査官 井上 典之

- (56)参考文献 特開2004-033135(JP,A)
特開2004-141053(JP,A)
国際公開第02/006373(WO,A1)
国際公開第2004/037164(WO,A1)
米国特許第05874417(US,A)
米国特許第05880270(US,A)
米国特許第06630457(US,B1)
特表2004-513071(JP,A)
国際公開第2003/053489(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B
A61K
A61L
C08L
CA/REGISTRY(STN)