

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-508027

(P2006-508027A)

(43) 公表日 平成18年3月9日(2006.3.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/78 (2006.01)	C07K 14/78	4C084
A61P 17/02 (2006.01)	A61P 17/02	4H045
C07K 17/06 (2006.01)	C07K 17/06	
A61K 38/17 (2006.01)	A61K 37/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2003-584148 (P2003-584148)	(71) 出願人	503345514
(86) (22) 出願日	平成15年4月10日 (2003.4.10)		ケラプラス テクノロジーズ, リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月10日 (2004.12.10)		アメリカ合衆国 テキサス 78258,
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/011102		サン アントニオ, ヒューブナー ロード 19206, スイート 102
(87) 国際公開番号	W02003/087195	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成15年10月23日 (2003.10.23)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	10/119, 477	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成14年4月10日 (2002.4.10)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	10/127, 523		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成14年4月22日 (2002.4.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/133, 885		
(32) 優先日	平成14年4月26日 (2002.4.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シリコン含有結合によって架橋された不均質タンパク質ネットワーク、およびそれらを生成する方法

(57) 【要約】

不均質架橋剤によって架橋された生体適合性不均質タンパク質性ネットワークを生成するための方法、および新規な不均質架橋されたネットワーク。好ましい不均質架橋剤は、シリコンベースである。シリコン含有架橋剤によって連結されたケラチンネットワークを作製するための方法は、反応性ペンダント基を含む複数の - ケラチン分子を、該架橋剤上の第1反応性官能基と該 - ケラチン分子の第1基上の1以上の第1反応性部分を含む第1反応性ペンダント基との間で共有結合的タンパク質間架橋を形成するために有効な条件下で該架橋剤に曝露させる工程を包含し、該条件はまた、該架橋剤上の第2反応性官能基と、 - ケラチン分子の第2基上の1以上の第2反応性部分を含む第2反応性ペンダント基との間で共有結合的タンパク質間架橋を形成するために有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

シリコン含有架橋剤によって連結されたケラチンネットワークを作製するための方法であって、該方法は、反応性ペンダント基を含む複数のケラチン分子を、該架橋剤上の第1反応性官能基と該ケラチン分子の第1基上の1以上の第1反応性部分を含む第1反応性ペンダント基との間で共有結合的タンパク質間架橋を形成するために有効な条件下で該架橋剤に曝露させる工程を包含し、該条件はまた、該架橋剤上の第2反応性官能基と、ケラチン分子の第2基上の1以上の第2反応性部分を含む第2反応性ペンダント基との間で共有結合的タンパク質間架橋を形成するために有効である、方法。

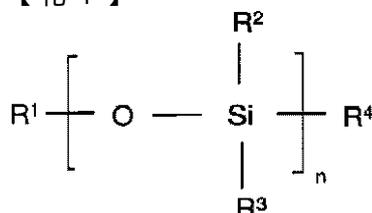
【請求項 2】

ネットワークであって、該ネットワークは、シリコン含有架橋剤の複数の分子上の第1反応性官能基と複数の第1タンパク質分子上の第1反応性ペンダント基との間の第1共有結合、および該架橋剤の複数の分子上の第2反応性官能基と複数の第2タンパク質分子上の第2反応性ペンダント基との間の第2共有結合を含むタンパク質間架橋を含むタンパク質分子から本質的になるタンパク質性材料を含む、ネットワーク。

【請求項 3】

請求項 1 ~ 2 のいずれかに記載の方法またはネットワークであって、ここで、前記架橋剤が、シリコンを含んでおり、以下の一般構造：

【化 1】



を有し、ここで、

n は、約 1 ~ 約 50 であり；そして

R¹、R²、R³ および R⁴ のうちの少なくとも 2 つは、少なくとも 1 つの反応性官能基を含み、該反応性官能基は、反応性不飽和炭素 - 炭素結合、反応性酸素、反応性窒素、反応性硫黄および反応性ハロゲンからなる群から選択される反応性部分を含む、方法またはネットワーク。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法またはネットワークであって、ここで、R¹、R²、R³ および R⁴ が、水素；約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基およびヘテロアルキル基であって、該基は、非置換の基および 1 以上の反応性官能基によって置換された基の両方を含み、ここで、該ヘテロアルキル基は、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される 1 以上のヘテロ原子を含む、基；約 2 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、環状、直鎖状、および分枝鎖状のアルケニル基およびヘテロアルケニル基、ならびにそれらのメルカプト官能基化バージョンならびにそれらの共鳴ハイブリッドであって、該基が、非置換の基および少なくとも 1 つの反応性官能基によって置換された基の両方を含む、基；約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基、ヘテロアルキル基、アルケニル基およびヘテロアルケニル基を含む、カルボキシ基ならびにその塩、エステルおよびアミドであって、ここで、該ヘテロ基が、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される 1 以上のヘテロ原子を含む、基；芳香族基；約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、アルカノールおよびアルケノール；約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、アルカノールアミドおよびアルケノールアミド；ならびにそれらの組み合わせ；合計約 1 個 ~ 約 6 個の、炭素原子、ヒドリド基およびヒドロキシ基を有する 1 以上のアルキル部分を含むアルコキシ基からなる群から選択される、方法またはネットワーク。

【請求項 5】

前記反応性部分が、エポキシ基およびビニル基からなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【請求項 6】

前記架橋剤が、エポキシ基を含む第 1 反応性官能基およびエポキシ基を含む第 2 反応性官能基を少なくとも含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【請求項 7】

R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの少なくとも 2 つが、エポキシ基を含む、請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【請求項 8】

R^1 および R^4 が、前記エポキシ基を含む、請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。 10

【請求項 9】

前記架橋剤が、ビニル基を含む第 1 反応性官能基およびビニル基を含む第 2 反応性官能基を少なくとも含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【請求項 10】

R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの少なくとも 2 つが、前記ビニル基を含む、請求項 3 ~ 5 および請求項 9 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【請求項 11】

R^1 および R^4 が、前記ビニル基を含む、請求項 10 に記載の方法またはネットワーク。 20

【請求項 12】

R^2 および R^3 のうちの少なくとも 1 つが、アルキル基である、請求項 3 ~ 11 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【請求項 13】

R^2 および R^3 のうちの少なくとも 1 つが、メチル基である、請求項 3 ~ 11 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【請求項 14】

前記 - ケラチン分子が、前記架橋剤上の第 1 反応官能基および第 2 反応官能基と前記共有結合的タンパク質間架橋を形成するに有効なエポキシド基を含む、請求項 1 および請求項 3 ~ 4 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。 30

【請求項 15】

前記タンパク質性材料が、ケラチン、コラーゲンおよびエラスチンからなる群から選択される、請求項 2 ~ 14 のいずれかに記載のネットワーク。

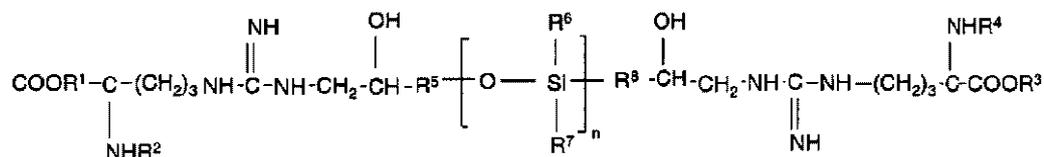
【請求項 16】

前記タンパク質性材料が、ケラチンを含む、請求項 2 ~ 15 に記載のいずれかのネットワーク。

【請求項 17】

請求項 2 ~ 16 のいずれかに記載のネットワークであって、該ネットワークは、以下の架橋：

【化 2】 40



を含み、ここで、

n は、1 ~ 50 であり；

R^1 および R^2 は、第 1 タンパク質分子の残部であり；

R^3 および R^4 は、第 2 タンパク質分子の残部であり；そして

R^5 、 R^6 、 R^7 および R^8 は、水素；約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、環状、直 50

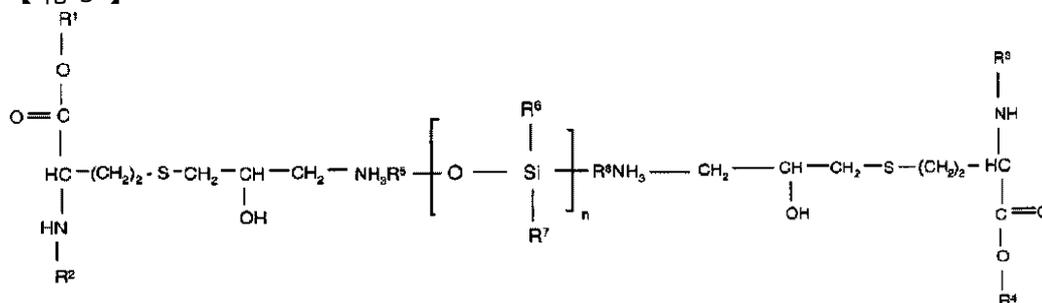
鎖状および分枝状のアルキル基およびヘテロアルキル基であって、該基は、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含み、ここで、該ヘテロアルキル基は、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；約2個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状、および分枝鎖状のアルケニル基およびヘテロアルケニル基、ならびにそれらのメルカプト官能基化バージョンならびにそれらの共鳴ハイブリッドであって、該基が、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含む、基；約1個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基、ヘテロアルキル基、アルケニル基およびヘテロアルケニル基を含む、カルボキシル基およびその塩、エステルおよびアミドであって、ここで、該ヘテロ基が、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；芳香族基；約1個～約6個の炭素原子を有する、アルカノールおよびアルケノール；約1個～約6個の炭素原子を有する、アルカノールアミドおよびアルケノールアミド；ならびにそれらの組み合わせ；合計約1個～約6個の、炭素原子、ヒドリド基およびヒドロキシル基を有する1以上のアルキル部分を含むアルコキシ基からなる群から選択される反応した基である、ネットワーク。

10

【請求項18】

請求項2～16のいずれかに記載のネットワークであって、該ネットワークは、以下の架橋：

【化3】



20

を含み、ここで、

n は、1～50であり；

R^1 および R^2 は、第1タンパク質分子の残部であり；

R^3 および R^4 は、第2タンパク質分子の残部であり；そして

R^5 、 R^6 、 R^7 および R^8 は、水素；約1個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基およびヘテロアルキル基であって、該基は、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含み、ここで、該ヘテロアルキル基は、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；約2個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状、および分枝鎖状のアルケニル基およびヘテロアルケニル基、ならびにそれらのメルカプト官能基化バージョンならびにそれらの共鳴ハイブリッドであって、該基が、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含む、基；約1個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基、ヘテロアルキル基、アルケニル基およびヘテロアルケニル基を含む、カルボキシル基およびその塩、エステルおよびアミドであって、ここで、該ヘテロ基が、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；芳香族基；約1個～約6個の炭素原子を有する、アルカノールおよびアルケノール；約1個～約6個の炭素原子を有する、アルカノールアミドおよびアルケノールアミド；ならびにそれらの組み合わせ；合計約1個～約6個の、炭素原子、ヒドリド基およびヒドロキシル基を有する1以上のアルキル部分を含むアルコキシ基からなる群から選択される反応した基である、ネットワーク。

30

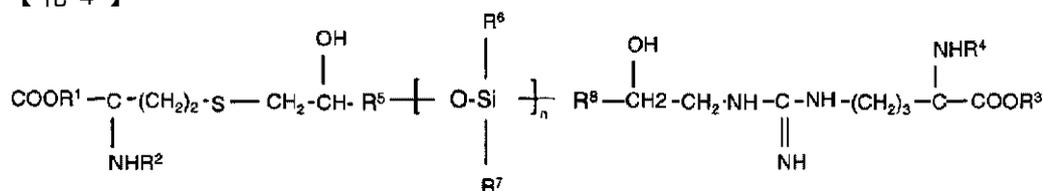
40

【請求項19】

請求項2～17のいずれかに記載のネットワークであって、該ネットワークは、以下の架橋：

50

【化4】



を含み、ここで、

n は、1 ~ 50 であり；

R¹ および R² は、第1タンパク質分子の残部であり；

R³ および R⁴ は、第2タンパク質分子の残部であり；そして

R⁵、R⁶、R⁷ および R⁸ は、水素；約1個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基およびヘテロアルキル基であって、該基は、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含み、ここで、該ヘテロアルキル基は、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；約2個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状、および分枝鎖状のアルケニル基およびヘテロアルケニル基、ならびにそれらのメルカプト官能基化バージョンならびにそれらの共鳴ハイブリッドであって、該基が、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含む、基；約1個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基、ヘテロアルキル基、アルケニル基およびヘテロアルケニル基を含む、カルボキシル基およびその塩、エステルおよびアミドであって、ここで、該ヘテロ基が、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；芳香族基；約1個～約6個の炭素原子を有する、アルカノールおよびアルケノール；約1個～約6個の炭素原子を有する、アルカノールアミドおよびアルケノールアミド；ならびにそれらの組み合わせ；合計約1個～約6個の、炭素原子、ヒドリド基およびヒドロキシル基を有する1以上のアルキル部分を含むアルコキシ基からなる群から選択される反応した基である、ネットワーク。

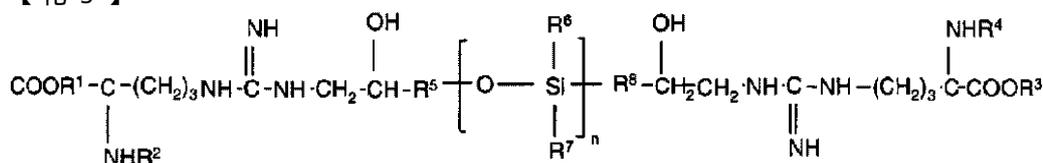
10

20

【請求項20】

請求項2～17に記載のネットワークであって、該ネットワークは、以下の架橋：

【化5】



30

を含み、ここで、

n は、1 ~ 50 であり；

R¹ および R² は、第1タンパク質分子の残部であり；

R³ および R⁴ は、第2タンパク質分子の残部であり；そして

R⁵、R⁶、R⁷ および R⁸ は、水素；約1個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基およびヘテロアルキル基であって、該基は、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含み、ここで、該ヘテロアルキル基は、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；約2個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状、および分枝鎖状のアルケニル基およびヘテロアルケニル基、ならびにそれらのメルカプト官能基化バージョンならびにそれらの共鳴ハイブリッドであって、該基が、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含む、基；約1個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基、ヘテロアルキル基、アルケニル基およびヘテロアルケニル基を含む、カルボキシル基およびその塩、エステルおよびアミドであって、ここで、該ヘテロ基が、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；芳香族基；約1個～約6個の炭素原子を有する、アルカノールおよびア

40

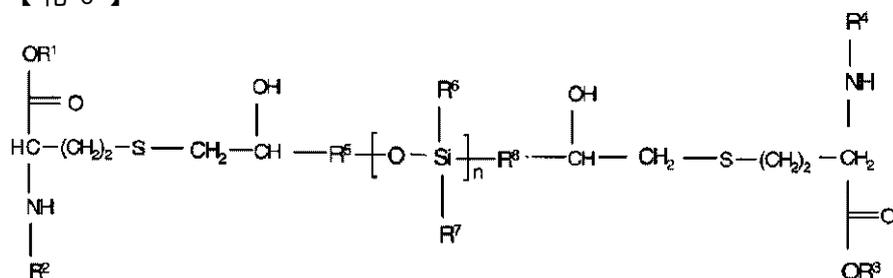
50

ルケノール；約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する、アルカノールアミドおよびアルケノールアミド；ならびにそれらの組み合わせ；合計約 1 個～約 6 個の、炭素原子、ヒドリド基およびヒドロキシル基を有する 1 以上のアルキル部分を含むアルコキシ基からなる群から選択される、ネットワーク。

【請求項 2 1】

請求項 2 ～ 1 7 に記載のネットワークであって、該ネットワークは、以下の架橋：

【化 6】



10

を含み、ここで、

n は、1 ～ 50 であり；

R¹ および R² は、第 1 タンパク質分子の残部であり；

R³ および R⁴ は、第 2 タンパク質分子の残部であり；そして

R⁵、R⁶、R⁷ および R⁸ は、水素；約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基およびヘテロアルキル基であって、該基は、非置換の基および少なくとも 1 つの反応性官能基によって置換された基の両方を含み、ここで、該ヘテロアルキル基は、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される 1 以上のヘテロ原子を含む、基；約 2 個～約 6 個の炭素原子を有する、環状、直鎖状、および分枝鎖状のアルケニル基およびヘテロアルケニル基、ならびにそれらのメルカプト官能基化バージョンならびにそれらの共鳴ハイブリッドであって、該基が、非置換の基および少なくとも 1 つの反応性官能基によって置換された基の両方を含む、基；約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基、ヘテロアルキル基、アルケニル基およびヘテロアルケニル基を含む、カルボキシル基およびその塩、エステルおよびアミドであって、ここで、該ヘテロ基が、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される 1 以上のヘテロ原子を含む、基；芳香族基；約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する、アルカノールおよびアルケノール；約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する、アルカノールアミドおよびアルケノールアミド；ならびにそれらの組み合わせ；合計約 1 個～約 6 個の、炭素原子、ヒドリド基およびヒドロキシル基を有する 1 以上のアルキル部分を含むアルコキシ基からなる群から選択される反応した基である、ネットワーク。

20

30

【請求項 2 2】

請求項 1 7 ～ 2 1 のいずれかに記載のネットワークであって、R⁵ および R⁸ が、独立して、水素、約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する、直鎖状、分枝状または環状のアルキル基、約 2 個～約 6 個の炭素原子を有するアルケニル基、ヒドリド基、合計約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する 1 個以上のアルキル基を含むアルコキシ基、ヒドロキシ基、アルキルアミン基、アルキルメルカプト基、アクリレート基、メタクリレート基、ハロ基、アセトキシ基およびエポキシ基からなる群より選択される、反応した基である、ネットワーク。

40

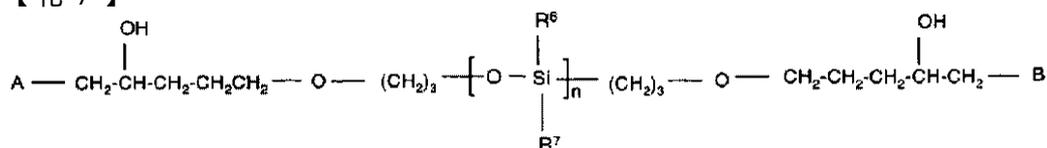
【請求項 2 3】

R⁵ および R⁸ が、n - プロポキシプロピル基を含む、請求項 1 7 ～ 2 2 のいずれかに記載のネットワーク。

【請求項 2 4】

請求項 2 ～ 1 6 のいずれかに記載のネットワークであって、該ネットワークは、以下の架橋：

【化 7】



を含み、ここで、nは、1～50であり；そして

AおよびBは、第1タンパク質分子および第2タンパク質分子の残部である、ネットワーク。

【請求項 25】

請求項17～24のいずれかに記載のネットワークであって、R⁶およびR⁷が、独立して、水素、シクロアルキル基、ビニル基、ヒドリド基、トリフルオロアルキル基、フェニル基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルメルカプト基およびアルキルアミン基からなる群から選択される、反応した基であり；ただし、R⁶またはR⁷の一方がビニル基である場合、R⁶またはR⁷の他方は、ヒドリド基以外の基であり；そして、R⁶またはR⁷の一方がヒドリド基である場合、R⁶またはR⁷の他方はビニル基以外の基である、ネットワーク。

10

【請求項 26】

R⁶およびR⁷のうちの少なくとも1つが、アルキル基である、請求項17～25のいずれかに記載のネットワーク。

【請求項 27】

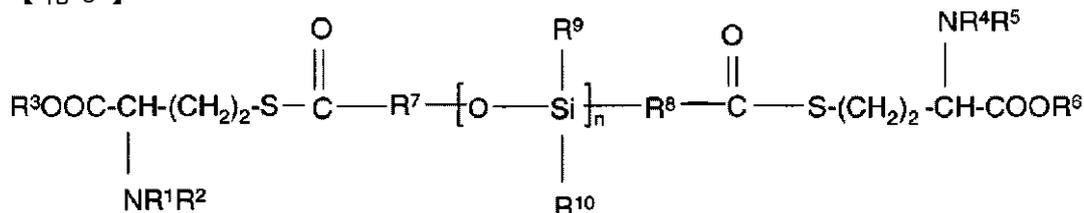
R⁶およびR⁷のうちの少なくとも1つが、メチル基である、請求項17～26のいずれかに記載のネットワーク。

20

【請求項 28】

請求項2～16のいずれかに記載のネットワークであって、該ネットワークは、以下の架橋：

【化 8】



30

を含み、ここで、

nは、1～50であり；

R¹、R²およびR³は、第1タンパク質分子の残部であり；

R⁴、R⁵およびR⁶は、第2タンパク質分子の残部であり；そして

R⁷、R⁸、R⁹およびR¹⁰は、約1個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基およびヘテロアルキル基であって、該基は、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含み、ここで、該ヘテロアルキル基は、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；約2個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状、および分枝鎖状のアルケニル基およびヘテロアルケニル基、ならびにそれらのメルカプト官能基化バージョンならびにそれらの共鳴ハイブリッドであって、該基が、非置換の基および少なくとも1つの反応性官能基によって置換された基の両方を含む、基；約1個～約6個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基、ヘテロアルキル基、アルケニル基およびヘテロアルケニル基を含む、カルボキシル基およびその塩、エステルおよびアミドであって、ここで、該ヘテロ基が、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1以上のヘテロ原子を含む、基；芳香族基；約1個～約6個の炭素原子を有する、アルカノールおよびアルケノール；約1個～約6個の炭素原子を有する、アルカノールアミドおよびアルケノールアミド；ならびにそれらの組み合わせ；合計約1個～約6個の、炭素原子、ヒドリド基およ

40

50

びヒドロキシル基を有する 1 以上のアルキル部分を含むアルコキシ基からなる群から選択される、ネットワーク。

【請求項 29】

前記ヘテロアルキル基が、アセトキシ基、合計約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する 1 以上のアルキル置換基を必要に応じて含むシラン基およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 3～28 のいずれかに記載のネットワーク。

【請求項 30】

R^7 および R^8 が、独立して、水素、約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する、直鎖状、分枝状または環状のアルキル基、約 2 個～約 6 個の炭素原子を有するアルケニル基、ヒドリド基、合計約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する 1 個以上のアルキル基を含むアルコキシ基、ヒドロキシ基、アルキルアミン基、アルキルメルカプト基、アクリレート基、メタクリレート基、ハロ基、アセトキシ基およびエポキシ基からなる基から選択される、反応した基である、請求項 28～29 のいずれかに記載のネットワーク。

10

【請求項 31】

請求項 28～30 のいずれかに記載のネットワークであって、 R^9 および R^{10} が、独立して、水素、シクロアルキル基、ビニル基、ヒドリド基、トリフルオロアルキル基、フェニル基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルメルカプト基およびアルキルアミン基からなる群から選択される、反応した基であり；ただし、 R^2 または R^3 の一方がビニル基である場合、 R^2 または R^3 の他方は、ヒドリド基以外の基であり；そして、 R^2 または R^3 の一方がヒドリド基である場合、 R^2 または R^3 の他方はビニル基以外の基である、

20

【請求項 32】

R^9 および R^{10} のうちの少なくとも 1 つが、アルキル基である、請求項 28～31 のいずれかに記載のネットワーク。

【請求項 33】

R^9 および R^{10} のうちの少なくとも 1 つが、メチル基である、請求項 28～32 のいずれかに記載のネットワーク。

【請求項 34】

R^7 および R^8 が、約 1 個～約 6 個の炭素原子を有するアルキル基およびジメチルシロキシ基からなる群から選択される、請求項 28～33 のいずれかに記載のネットワーク。

30

【請求項 35】

前記タンパク質分子が、ケラチン分子である、請求項 2～34 のいずれかに記載のネットワーク。

【請求項 36】

前記第 1 反応性官能基および前記第 2 反応性官能基が、独立して、アルキルアミン基およびアルキルメルカプト基からなる群から選択され、ここで、該アルキル部分が、約 1 個～約 6 個の炭素原子を有する、請求項 1～35 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【請求項 37】

n が、5～50 である、請求項 1～36 のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

40

【請求項 38】

シリコーン含有架橋剤によって連結されたケラチンネットワークを作製する方法であって、該方法は、以下：

反応性ペンダント基を含む - ケラチン分子を、複数の該反応性ペンダント基と該求核置換剤とが反応し、それによりペンダントエポキシド基を含む複数の - ケラチン分子を生成することを誘導するために有効な条件下で、少なくとも 1 つの末端エポキシドを含む求核置換剤に曝露させる工程；

ペンダントエポキシド基を含む該複数の - ケラチン分子を、シリコーン含有架橋剤で処理する工程であって、該架橋剤は、第 1 反応性官能基および第 2 反応性官能基を少なくとも含み、該処理は、該架橋剤上の第 1 反応性官能基と、 - ケラチン分子の第 1 基上の

50

第1ペンダントエポキシド基との間での共有結合的タンパク質間架橋を形成するために有効な条件下で行われ、該条件はまた、該架橋剤上の第2反応性官能基と、 α -ケラチン分子の第2基上の第2ペンダントエポキシド基との間で共有結合的タンパク質間架橋を形成するために有効である、工程を包含する、方法。

【請求項39】

前記反応性ペンダント基が、チオレートアニオンである、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記核置換剤が、エピクロルヒドリンである、請求項38または39のいずれかに記載の方法。

【請求項41】

前記架橋されたケラチンネットワークが、約7のpHを有する水性緩衝液への少なくとも24時間の曝露の際に、加水分解に抵抗する、請求項1~40のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【請求項42】

前記ケラチン分子が、ヒトの毛由来である、請求項1~41のいずれかに記載の方法またはネットワーク。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の引用)

本出願は、以下の出願の優先日を主張する：2002年4月26日出願の米国特許出願第10/133,885号。必要とされ得る場合、優先権が主張される関連出願は、2002年4月22日出願の米国特許出願第10/127,523号、2002年4月10日出願の米国特許出願第10/119,477号；および2002年7月5日出願の米国仮出願第60/393,958号。関連出願は、米国仮出願第60/324,709号の利益を主張する、2002年9月25日出願の出願番号第10/254,364号である。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、グルタルアルデヒド以外の不均質架橋剤（好ましくは、シリコーンベースの架橋剤）によって架橋された生体適合性不均質タンパク質性ネットワークを生成するための方法に関する。ネットワークを形成するために使用するための好ましいタンパク質は、 α -ケラチン、または高分子量ケラチン（HMWK）である。架橋剤は、好ましくは、ケラチン分子上に存在している反応性ペンダント基と反応し、そして副産物を生じないか、生体適合性副産物（例えば、水素、水および二酸化炭素）を産生するか、またはネットワークから除去され得る副産物を生じるかのいずれかである。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

タンパク質（例えば、ケラチンタンパク質）は、損傷を受けた上皮組織を治癒する際に有益である。残念なことに、ケラチンタンパク質の化学的特性および操作特性は、酸化科学および還元化学、ならびに側鎖タンパク質架橋を使用して達成されるものに比較的限定されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

タンパク質ベースの材料の可能な用途が拡大され得るように、幅広い範囲の化学的特性および操作特性を有するフィルムを形成するための、タンパク質およびタンパク質（好ましくは、 α -ケラチン）を架橋する方法についての必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

10

20

30

40

50

(発明の要旨)

シリコーンベースの架橋剤によって連結されたケラチンネットワークを作製するための方法が提供され、この方法は、反応性ペンダント基を含む複数の - ケラチン分子を、この架橋剤上の第 1 反応性官能基とこの - ケラチン分子の第 1 基上の第 1 反応性ペンダント基との間で共有結合的タンパク質間架橋を形成するために有効な条件下で、多官能性シリコーンベース架橋剤に曝露させる工程を包含し、この条件はまた、この架橋剤上の第 2 反応性官能基と、 - ケラチン分子の第 2 基上の第 2 反応性ペンダント基との間で共有結合的タンパク質間架橋を形成するために有効である。

【 0 0 0 6 】

また提供されるのは、シリコーンベース架橋剤の複数の分子上の第 1 反応性官能基と複数の第 1 - ケラチン分子上の第 1 反応性ペンダント基との間の第 1 共有結合、およびこのシリコーンベース架橋剤の複数の分子上の第 2 反応性官能基と複数の第 2 - ケラチン分子上の第 2 反応性ペンダント基との間の第 2 共有結合を含むタンパク質間架橋を含む - ケラチン分子から本質的になるタンパク質性材料を含むネットワークである。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 0 7 】

(発明の詳細な説明)

本発明は、(好ましくは、不均質タンパク質性ネットワークまたはフィルムを形成するために、グルタルアルデヒド以外の不均質架橋剤を使用して) タンパク質を架橋するための方法に関する。本明細書中で使用される場合、用語「不均質」とは、(好ましくは、少なくとも約 5 0 k D a (好ましくは、約 5 0 k D a ~ 約 8 5 k D a) の比較的高い分子量を有するタンパク質分子またはそれらの誘導体を含む) タンパク質性ネットワークまたはフィルムをいう。このタンパク質分子は、シリコーンベースの架橋剤によって連結される。

【 0 0 0 8 】

本明細書中に記載される方法は、広範な種々のタンパク質を処理してネットワーク構造 (好ましくはエラストマーフィルム) を形成するために用いられ得る。天然に存在する適切なタンパク質の例としては、ケラチン、コラーゲンおよびエラスチンが挙げられるが必ずしもこれらに限定されない。タンパク質は、天然物であっても、合成物であっても、または組換え物であってもよい。好ましいタンパク質は、システイン含有量が比較的高い。最も好ましいタンパク質は、ケラチンタンパク質であり、さらにより好ましくは - ケラチンタンパク質 (時々、高分子量ケラチン (H M W K) と呼ばれる) である。

【 0 0 0 9 】

ケラチンタンパク質の好ましい供給源は、毛または毛皮である。毛は、動物またはヒトの毛であり得る。ケラチンは、脊椎動物の表皮細胞において見出される、硬化および不溶化したタンパク質として、大まかに定義される。ヒトの毛は、ほぼ完全にケラチンから構成される。

【 0 0 1 0 】

ヒトの毛は、小皮を有し、これは、鱗片状の重なり合う外形で配置された平坦な細胞から作製された堅い管状外層である。毛の内側の大部分は、皮質と呼ばれ、そして線維性ケラチンが高密度に充填された細長い細胞から構築される。線維性ケラチンは、細線維といわれる束状に配置され、そしてヘリックス三次構造を保有する。細線維は、無定形ケラチンマトリックスと結合される。

【 0 0 1 1 】

無定形ケラチンマトリックスおよび細線維は、機能および組成が変動する。このマトリックスは、細線維と一緒に保持する「接着剤」である。このマトリックス「接着剤」は、硫黄含有量が高く、そして代表的に約 1 0 k D a ~ 約 1 5 k D a の平均分子量を有する低分子量ケラチン (L M W K) から構成される。細線維は、比較的低い硫黄含有量を有するが、代表的に約 5 0 k D a ~ 約 8 5 k D a のより高い平均分子量を有する高分子量ケラチン (H M W K) から構成される。H M W K および L M W K は、化学的特性 (例えば、反応

10

20

30

40

50

性および溶解度)が変動する。

【0012】

ケラチンは、それらの構造的完全性を、ポリペプチド鎖の三次元ネットワークを形成するジスルフィド架橋の存在によって大部分与えられる。このネットワーク構造によって、ケラチンが不溶性になる。しかし、ケラチンは、ジスルフィド結合切断によりこの三次元構造を破壊することによって水溶性にされ得る。ジスルフィド結合の切断は、酸化的、還元的、または両方の型の結合切断のいくつかの組合せを使用してのいずれかで行われ得る。例えば、過酸化水素を用いた酸化的結合切断により、シスチンから生成されるスルホン酸残部が形成される。ジスルフィド結合の切断のための過酸化水素を使用して産生される材料は、非常にイオン性であり、そして優れた水溶性を有する。例えば、メルカプトエタノールを用いる還元的結合切断により、シスチンから作り出されるシステイン残部が形成される。この還元技術を用いて生成される材料は、非常に反応性であり、そして容易に再架橋される。

10

【0013】

(ジスルフィド結合の切断およびケラチン抽出)

このタンパク質(好ましくは、 α -ケラチン)は、架橋反応を生じるための反応媒体中にこれらを十分に可溶性にする任意の様式で、加工および/または単離され得る。以下に記載の多数の反応は、無水溶媒を必要とする。当業者は、無水溶媒が、1,2-ジメトキシエタン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N-メチルピロリドンなどが挙げられるがこれらに限定されない多数の溶媒を包含することを認識する。一般に、この反応は、少なくともいくつかの水の存在を必要とする。

20

【0014】

(システイン残基の酸化/還元)

原料物質(例えば、ヒトの毛)としてケラチンを使用する好ましい実施形態では、毛は、適切な酸化剤によって酸化される。適切な酸化剤としては、過酸化水素、過酢酸、ペルカルボネート、ペルスルホネート、二酸化塩素、過酸化ナトリウムおよび過酸化カルシウム、ペルボレートおよびハイポクロリドが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。これらのオキシダントは、約35%までの(好ましくは約0.1%~約10%の)濃度で用いられる。酸化は、好ましくは、還流温度で行われる。

【0015】

好ましい実施形態において、毛は、小皮を破壊して、ケラチン原料物質を膨潤させるために、約0.1%~約10%の(最も好ましくは1%の)過酸化水素(H_2O_2)で処理される。このプロセスはまた、シスチン残基のうちの一部をスルホン酸基に変換する。酸化の量は、他の酸化反応条件を一定に保ちながら、酸化時間を(好ましくは、約0時間~約4時間)変動させることによって制御され得る。これらの条件としては、オキシダントの濃度および種類、温度、および抽出媒体のケラチン原料物質に対する比が挙げられる。反応が完了すると、酸化した毛は、濾過され、そして(好ましくは、脱イオン水を用いて)リンスされる。濾液を廃棄し、そして毛を乾燥させる。

30

【0016】

他の酸化条件が一定に保たれる場合、スルホン酸残基へのシスチンの変換速度は、酸化のために使用される時間量にほぼ比例する。得られる酸化したケラチン固体中の残りのシスチンは、還元技術を使用して、他の硫黄含有部分へと変換される。好ましくは、ジスルフィド架橋されたシスチン基は、チオール基に変換され、チオール基は、独自の有用性を有するか、または種々の化学技術を使用して改変され得る。

40

【0017】

(還元剤を用いた反応)

酸化される場合、酸化された毛は、好ましくは、還元剤で処理される。酸化されたケラチンタンパク質の、還元剤を用いた処理は、シスチンからのシステインの形成を促進するが、予め酸化された基を不変のままにする傾向がある。適切な還元剤としては、チオグリコール酸およびその塩、メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、チオグリセロール

50

、チオ乳酸、グルタチオン、システイン、硫化ナトリウムおよび水酸化ナトリウムが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましい還元剤は、チオグリコール酸およびメルカプトエタノールであり、最も好ましくはチオグリコール酸である。

【0018】

酸化された毛を還元剤で処理するために、予め酸化された毛は、代表的には約10Nまでの、好ましくは約0.1N～約1Nの濃度で；pH約7よりも高い、好ましくは9以上の、最も好ましくは9のpHにて；約25～約80、好ましくは約60の温度にて、好ましくは約1～約72時間、最も好ましくは24時間の期間にわたって、還元剤中に懸濁される。この反応は、不活性雰囲気（好ましくは、窒素）の下で生じる。液体画分は、公知の手段（好ましくは、不活性雰囲気下での）濾過またはカニューレ挿入および/もしくは遠心分離が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない）を使用して、あらゆる残りの固体から分離される。好ましい分離方法は、濾過である。一旦固体が除去されると、可溶性ケラチンタンパク質は、水混和性非溶媒の添加によって、または噴霧乾燥によって、溶液から単離される。水混和性非溶媒としては、再度、不活性雰囲気下での、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフラン、アセトン、ジオキサンなどが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましい非溶媒は、エタノールである。沈澱物は、公知の手段（好ましくは、濾過およびさらなる非溶媒アリコートを用いたリンスによる）を使用して、非溶媒から分離される。得られるケラチンタンパク質は、公知の技術（好ましくは、減圧下で、室温にて一晚）を使用して乾燥される。このプロセスは、スルホン酸基およびチオール基の両方を有するケラチンをもたらす。

10

20

【0019】

チオールは、アルコールと類似した反応性を保有し、そして多数の公知の有機化学反応（例えば、本明細書中に参考として援用される、McMurry, J., Organic Chemistry, Brooks/Cole Publishing Co., Monterey, CA (1984); Scudder, P.H., Electron Flow in Organic Chemistry, John Wiley & Sons, New York, NY (1992); Stowell, J.C., Intermediate Organic Chemistry, John Wiley & Sons, New York, NY (1994)に記載される化学反応）を実施するために用いられ得る。チオールに対するスルホン酸の比は、酸化の後に残っている一級反応部位の量によって主に制御される。もちろん、還元率はまた、試薬濃度、反応温度および曝露時間によって影響を受ける。

30

【0020】

（還元的/還元的抽出）

還元化学はまた、ケラチンにおけるジスルフィド結合切断について公知である；本明細書中に参考として援用される、Wardell, J.L., 「Preparation of Thiols」, The Chemistry of the Thiol Group, Patai, S. (編), 163-353頁, John Wiley & Sons, New York, NY (1974)を参照のこと。HMWKはまた、本明細書中に参考として援用されるCrewther, W.G., Fraser, R.D.B., Lennox, F.G., およびLindley, H., 「The Chemistry of Keratins」, Advances in Protein Chemistry, Anfinsen, C.B., Jr., Anson, M.L., Edsall, J.T., およびRichards, F.M. (編), Academic Press, New York, 191-346頁(1965)に記載されるように、少なくとも2つの還元的抽出を用いて、毛から抽出され得る。

40

【0021】

適切な還元剤としては、チオグリコール酸およびその塩、メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、チオグリセロール、チオ乳酸、グルタチオン、システイン、硫化ナトリウムおよび水酸化ナトリウムが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましい

50

還元剤は、チオグリコール酸およびメルカプトエタノールであり、最も好ましくはチオグリコール酸である。

【0022】

所望のタンパク質を選択的に還元および抽出するために、毛（または他のタンパク質供給源）は、約0.1N～約10N（好ましくは1.0N）の濃度で、還元剤中に懸濁される。毛線維の穏やかな膨潤は、約9以上のpHで（好ましくは、約9～約10.5のpHで）達成される。それゆえ、最初の還元は、約20～約100（好ましくは約25）の温度で起こる。最初の還元を達成するために必要な時間は、約4時間～約24時間であり、最も好ましくは約12時間である。この反応は、不活性雰囲気（好ましくは窒素）下で生じる。液体画分は、公知の手段（好ましくは、不活性雰囲気下での）濾過、カニ

10

【0023】

第2抽出は、適切な膨潤剤（好ましくは、尿素、塩基（例えば、水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウム））を使用して、還元した固体について実施される。この第2抽出のための最も好ましい膨潤剤は、濃縮した尿素である。この第2抽出は、還元した線維状 - ケラチンを小皮の内部から効果的に取り出す。この第2抽出は、約1M～約10Mの尿素（好ましくは、約7Mの尿素）にて、少なくとも約1時間（好ましくは、約1時間～約72時間、最も好ましくは約24時間）の期間にわたって行われる。この第2抽出は、室温で行われるが、約20～約100（好ましくは、約25）の

20

【0024】

一旦小皮が除去されると、抽出されたケラチンタンパク質は、さらなる使用のために溶液中で保持され得るか、または、これらは、水混和性非溶媒への添加によって、もしくは噴霧乾燥によって、この溶液から単離され得る。水混和性非溶媒としては、再度、不活性雰囲気下での、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフラン、アセトン、ジオキサンなどが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましい

30

【0025】

（シリコンベースの架橋剤）

最も好ましい実施形態では、架橋剤は、多官能性シリコンベース材料である。シリコンは、多数の医療適用において用いられている生体適合性材料の一ファミリーである。シリコンゲルシーティング（一形態の軽く架橋されたシリコンポリマー）は、創傷治癒を促進して、肥大した瘢痕形成の程度を低下させる。シリコン化学の技術は、多くの架橋様式が開発されているので、特にエラストマー形成に関して、多彩でかつ役立つ。本明細書中に参考として援用される、Thomas, D. R., 「Cross-linking of Polydimethylsiloxanes」, Siloxane Polymers, Clarkson, S. J. および Semlyen, J. A. (編), PTR Prentice Hall, New Jersey, 567-615頁(1993)。これらの架橋化学の多くは、少なくともある程度のシリコンを含むコポリマーおよび互いに浸透しているネットワークが生成されるように、他の系における使用のために適応され得る。シリコン生体材料の有益な創傷治癒の性質は、それらの柔軟な化学とともに、これらを、ケラチンベースの生体材料を架橋するための理想的な候補とする。

40

50

【 0 0 2 6 】

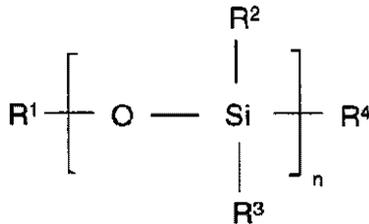
シリコーンは、生物学的系において、生体不活性であり、そして弾性がある。生体不活性な架橋剤は、それが一部である系の生物学的秘密 (biological stealth) を維持するという利点を有する。ケラチンと、シリコーンベースの架橋剤との組合せは、ケラチンの固有の生体適合性を損なうことなく、両方の生体材料の損傷治癒効力を合わせる。

【 0 0 2 7 】

適切なシリコーン架橋剤またはポリシロキサンは、繰り返される Si - O 結合を有する分子である：

【 0 0 2 8 】

【 化 9 】



ここで、n は、約 1 ~ 約 50 であり、そして、R¹、R²、R³ および R⁴ は、非常に多種多様な基であり得、ここで、R¹、R²、R³ および R⁴ のうちの少なくとも 2 つは、連結されるタンパク質分子上の反応性ペンダント基に対して反応性である官能基として定義される「反応性官能基」を含む。適切な反応性官能基は、反応性不飽和炭素 - 炭素結合、反応性酸素、反応性窒素、反応性硫黄および反応性ハロゲンからなる群から選択される 1 以上の反応性部分を含む。好ましい反応性官能基としては、反応性不飽和炭素 - 炭素結合、ヒドリド基、ヒドロキシル基、アルキルアミン基、アルキルメルカプト基、アルコキシ基、トリフルオロアルキル基（ここで、このアルキル部分は、約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を含む）が挙げられるが必ずしもこれらに限定されない。好ましいトリフルオロアルキル基は、トリフルオロプロピル基である；好ましいアルコキシ基は、エポキシ基であり、そして好ましい不飽和炭素 - 炭素結合は、ビニル基である。

【 0 0 2 9 】

適切な R¹ 基、R² 基、R³ 基、および R⁴ 基（これらのうちのいくつかは、反応性官能基であり、これらのうちのいくつかはそうではない）の例としては、以下が挙げられるがかならずしもこれらに限定されない：水素；約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基およびヘテロアルキル基であって、該基は、非置換の基および少なくとも 1 つの反応性官能基によって置換された基の両方を含み、ここで、該ヘテロアルキル基は、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される 1 以上のヘテロ原子を含む、基；約 2 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、環状、直鎖状、および分枝鎖状のアルケニル基およびヘテロアルケニル基、ならびにそれらのメルカプト官能基化バージョンならびにそれらの共鳴ハイブリッドであって、該基が、非置換の基および少なくとも 1 つの反応性官能基によって置換された基の両方を含む、基；約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、環状、直鎖状および分枝状のアルキル基、ヘテロアルキル基、アルケニル基およびヘテロアルケニル基を含む、カルボキシル基およびその塩、エステルおよびアミドであって、ここで、該ヘテロ基が、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される 1 以上のヘテロ原子を含む、基；芳香族基；約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、アルカノールおよびアルケノール；約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する、アルカノールアミドおよびアルケノールアミド；ならびにそれらの組み合わせ；合計約 1 個 ~ 約 6 個の、炭素原子、ヒドリド基およびヒドロキシル基を有する 1 以上のアルキル部分を含むアルコキシ基（本明細書中では時々、「アルキルエーテル」といわれる）。好ましいヘテロアルキル基としては、アセトキシ基、合計約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する 1 以上のアルキル置換基を必要に応じて含むシラン基、およびそれらの組合せが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましいアルコキシ基としては、エポキシ基が挙げられるが、必ずしもこれに限定

10

20

30

40

50

されない。

【0030】

好ましくは、 R^1 および R^4 は、連結されるタンパク質分子（好ましくは、 α -ケラチン分子）上の補完的官能基と反応するのに適合している反応性官能基を含む部分である。好ましい実施形態では、 R^1 および R^4 は、独立して、水素、約1個～約6個の炭素原子を有する、直鎖状、分枝状または環状のアルキル基、約2個～約6個の炭素原子を有するアルケニル基、ヒドリド基、合計約1個～約6個の炭素原子を有する1個以上のアルキル基を含むアルコキシ基、ヒドロキシ基、アルキルアミン基、アルキルメルカプト基、アクリレート基、メタクリレート基、ハロ基、アセトキシ基およびエポキシ基からなる群より選択される。より好ましい実施形態では、 R^1 および R^4 の両方は、ビニル基およびエポキシ基からなる群から選択される部分を含む。最も好ましくは、 R^1 および R^4 は、ビニル基およびエポキシ基からなる群から選択される同じ部分を含む。

10

【0031】

好ましい実施形態では、 R^2 および R^3 は、独立して、水素、シクロアルキル基、ビニル基、ヒドリド基、トリフルオロアルキル基、フェニル基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルメルカプト基およびアルキルアミン基からなる群から選択される；ただし、 R^2 または R^3 の一方がビニル基である場合、 R^2 または R^3 の他方は、ヒドリド基以外の基であり；そして、 R^2 または R^3 の一方がヒドリド基である場合、 R^2 または R^3 の他方はビニル基以外の基である。さらにより好ましい実施形態では、 R^2 および R^3 は、好ましくは、比較的不活性な基である。最も好ましくは、 R^2 および R^3 の少なくとも1つは、アルキル基であり、より好ましくは、メチル基である。

20

【0032】

市販のシリコン製品としては、以下が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない：例えば、Gelest, Inc.、Tullytown, PAから入手可能であるか、または公知の方法（例えば、本明細書中に参考として援用される、Thomas, D. R., 「Cross-linking of Polydimethylsiloxanes」, Siloxane Polymers, Clarson, S. J. および Semlyen, J. A. (編), PTR Prentice Hall, New Jersey, 567-615頁(1993)に記載される方法)を用いて作製され得る、ビニル官能性、アルコキシ官能性（好ましくはエポキシ官能性）、アルキルアミン官能性、ヒドロキシル官能性、およびアルキルメルカプト官能性のポリシロキシポリマーおよびポリシロキシコポリマー。最も好ましい市販のビニル官能性製品は、約363～約5,500の範囲の分子量で一般に入手可能であり、好ましい分子量は、約500～約3500である。

30

【0033】

好ましい架橋剤は、以下でより詳細に考察されるエポキシシクロヘキシルコポリマーである。より好ましいのは、以下でより詳細に考察されるエポキシプロポキシプロピル末端シリコンである。最も好ましい架橋剤は、ビニル末端シリコンである。これらの架橋剤は、例えば、Gelest, Inc., Tullytown, Pa.から入手され得るか、または公知の手順を用いて調製され得る。

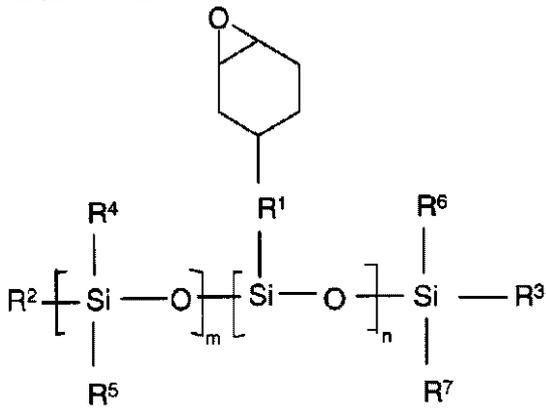
【0034】

(エポキシシクロヘキシル)メチルシロキサン-ジメチルシロキサンのコポリマーは、一般に、約500～約50,000の範囲の分子量で入手可能であり、好ましい分子量は、約650～約3500である。(エポキシシクロヘキシル)メチルシロキサン-ジメチルシロキサンのコポリマーは、以下の一般構造を有する：

40

【0035】

【化 1 0】

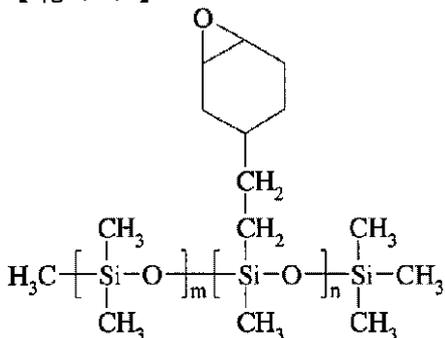


10

ここで、 m および n は、約5～約50の合計に加えられる； R^2 および R^3 は、この節の最初に与えられたシリコン架橋剤についての一般式において末端基 R^1 および R^4 として列挙された基のうちのいずれかであり得、そして R^1 、および $R^4 \sim R^7$ は、この節の最初に与えられたシリコン架橋剤についての一般式においてSi置換基 R^2 および R^3 として列挙された置換基のいずれかであり得る。好ましくは、 R^1 および $R^4 \sim R^7$ は、約1個～約6個の炭素原子までを有するアルキル基からなる群から選択される。 R^1 は、好ましくはメチル基であり； $R^4 \sim R^7$ は、好ましくは、メチル基である。好ましい（エポキシシクロヘキシル）メチルシロキサン-ジメチルシロキサンコポリマー（これは、G 20
e l e s t から市販される）は、以下の一般構造を有する：

【0036】

【化 1 1】



30

好ましいシリコンベースの架橋剤は、タンパク質分子上の反応性基と反応して、生体適合性副産物（好ましくは、水素、水、二酸化炭素および/あるいは容易に代謝もしくは排出されるか、このネットワークから除去されるか、または少なくとも人体に有毒ではない、任意の他の生体適合性副産物）を生成する。適切なシリコンベースの架橋剤は、2以上の同じ反応性官能基、または2以上の異なる反応性官能基のいずれかを有する。好ましいシリコンベースの架橋剤は、2以上の同じ官能基を有する。

【0037】

（ネットワーク形成）

40

アミノ酸残基に含まれる、チオールおよび他の化学的部分は、タンパク質ネットワーク（好ましくは、エラストマーフィルムの特徴を有するネットワーク）を形成するための、架橋反応のための不安定な部位としての有用性を有する。好ましいネットワークは、HMWKタンパク質を使用して作製される。

【0038】

一旦、所望の架橋剤が決定されると、タンパク質（好ましくは、HMWKタンパク質）は、適切な溶媒中に溶解される。大部分の反応については、好ましい溶媒は、水性溶媒である。シリコンベースの架橋剤の場合、好ましい溶媒は、塩基を含む無水溶媒である。好ましくは、約2gのHMWK粉末は、適切な塩基を含む溶媒中で混合され、そしてこの混合は、攪拌され、そしてケラチンを溶解するために有効な温度（代表的には、60を 50

超えない)まで加熱される。この溶液のpHは、適切な塩基を使用して、約9~11に維持される。適切な塩基としては、水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウム(好ましくは、水酸化アンモニウム)が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。ケラチンに対して少なくとも約5wt.% (好ましくは約10wt.%)の多官能性架橋剤がこの混合物に添加され、ネットワーク前駆体溶液が形成される。架橋剤に依存して、触媒またはプロモーターが添加され得る。このネットワーク前駆体溶液は、適切な表面または型に(好ましくは約1mm~約10mmからの厚さになるように)散布され、そして適切なエネルギー(例えば、加熱ランプ、オートクレーブ、マイクロ波またはUVランプ)への曝露によって硬化される。シリコンベースの架橋剤を含むフィルムを製作するための好ましい実施形態では、この溶液は、約1時間~約8時間(好ましくは、約2時間)の期間にわたってUVランプ(=365ナノメートル)下で照射され、次いで約30分~約300分(好ましくは、約4時間)の期間にわたって少なくとも約60の温度を生じるために有効な加熱ランプ下で乾燥される。

10

【0039】

あるいは、このケラチンは、水に溶解され、そしてシリコンは、水混和性有機溶媒の別々の溶液に溶解される。適切な有機溶媒としては、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、テトラヒドロフランおよびジメチルスルホキシドが挙げられる。次いで、これらの2つの溶液は混合され、そしてフィルムが、得られる混合物から成形される。

【0040】

20

(架橋反応)

タンパク質の架橋およびネットワーク形成は、一般に、少なくとも二官能性であるかまたは少なくとも2つの反応性基を有するシリコンベースの架橋剤を用いて、2つの異なるケラチン分子上の反応性ペンダント基間を架橋する場合に生じる。このシリコンベースの反応物は、ケラチン分子間に架橋(すなわち、タンパク質間架橋)をつくり、従って、三次元ネットワークを生成する。

【0041】

タンパク質は、アミノ酸を含み、アミノ酸は、一般に以下の式を有する：

【0042】

【化12】

30

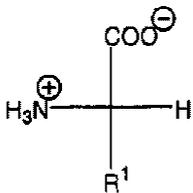


表1は、例えば、ヒトの毛で見出されるアミノ酸残基をまとめ、そして各残基に関連した「R¹」基を示す。

【0043】

【表 1 - 1】

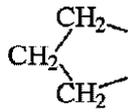
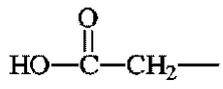
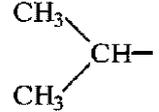
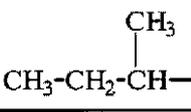
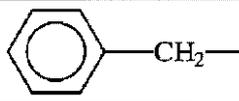
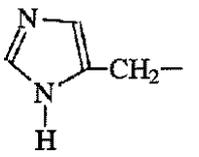
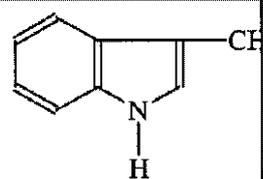
表1.ヒトの毛におけるアミノ酸のランク付け平均量					
アミノ酸	R' 基	性質	pKa	等電点 (pH)	毛中での組成パーセント
システイン	$\text{H}-\text{S}-\text{CH}_2-$	非極性	8.4	5.02	17.3
グルタミン酸	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	極性	4.5	3.22	13.9
アルギニン	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{N}-(\text{CH}_2) \\ \\ \text{H} \end{array}$	極性	12.5	11.15	9.85
セリン	$\text{HO}-\text{CH}_2-$	極性	なし	5.68	9
トレオニン	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}- \end{array}$	極性	なし	5.64	7.75
ロイシン	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2- \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	疎水性	なし	5.98	7.35

10

20

【 0 0 4 4 】

【表 1 - 2】

プロリン		疎水性	なし	6.3	6.95
アスパラギン酸		極性	4.5	2.77	5.8
バリン		疎水性	なし	5.96	5.7
イソロイシン		疎水性	なし	5.94	4.75
グリシン	H—	非極性	なし	5.65	4.15
フェニルアラニン		疎水性	なし	5.48	3
アラニン	CH3—	疎水性	なし	6	2.8
チロシン		疎水性	なし	5.66	2.6
リジン	NH ₂ -(CH ₂) ₄ —	極性	10.4	9.59	2.5
ヒスチジン		芳香族性	6.2	7.47	0.9
メチオニン	CH ₃ —S—CH ₂ —CH	疎水性	なし	5.74	0.85
トリプトファン		疎水性	なし	5.89	0.85

ヒトの毛において最も豊富なアミノ酸はシステインであり、これは、ジスルフィド架橋されたシスチン基の形態で見出される。上記で考察されるように、この基は、他の硫黄含有部分（最も顕著にはチオール）へと変換され得る。チオールは、理論的に、多くの化学技術（例えば、本明細書中に参考として援用される、S. Patai (編), the Chemistry of the Thiol Group, 第1部および第2部, John Wiley & Sons, New York, NY (1974) に記載される技術) を使用して、架橋剤の反応性末端と反応し得る。他の反応シナリオ（例えば、ポリマー合成に関する反応シナリオ）はまた、チオール基および他のペンダント基を所望の官能性残基（本明細書中に参考として援用される、Rempp, P. および Merrill, E. W., Polymer Synthesis, Huethig & Wepf Verlag Basel, Heidelberg, Germany (1986); Young, R. J. および Lovell, P. A., Introduction to Polymers, Chapman & Hall, London (1991); Odian, G., Principles of Polymerization, John Wi

10

20

30

40

50

ley & Sons, New York, NY (1991)に記載される官能性残基を包含する)の組み合わせに変換するために有用である。

【0045】

システインに加えて、以下のアミノ酸は、反応性ペンダント基として有用であり得る、窒素または酸素を含むペンダント基を有する；アルギニン、セリン、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギン酸、リジン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、トリプトファンおよびヒスチジン。このタンパク質が α -ケラチンである場合、架橋するための反応性ペンダント基を含む好ましいアミノ酸残基は、システイン、アルギニン、セリンおよびグルタミン酸であり、最も好ましくはシステインおよびアルギニンである。

【0046】

このシリコーンベースの架橋剤は、少なくとも2つの反応性官能基を含む。便宜のために、本明細書において記載されている架橋剤は、時々、「二」官能性といわれる。しかし、架橋剤が、二官能性のみであると明らかに請求されないかまたは明らかに言及されない場合、これは、本明細書中に記載される架橋剤がまた、多官能性(例えば、二官能性、三官能性、四官能性など)であり得ると理解されるべきである。

【0047】

本発明を特定の理論または作用機構に限定しないが、明確に請求されない限り、以下は、不均質な架橋されたタンパク質ネットワークを生成する際に関与する架橋化学である。

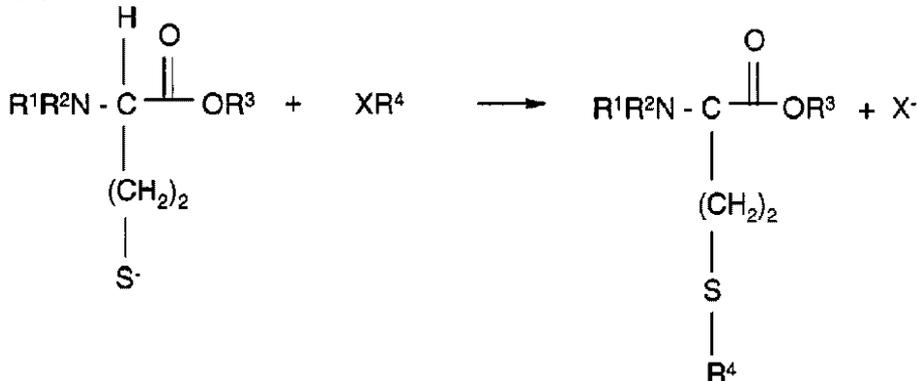
【0048】

(チオエーテルの生成)

好ましい還元的改変は、チオレートアニオンの形成、続いて適切な脱離基を使用した求核置換であり、チオエーテル(好ましくは、アルコキシ官能性チオエーテル(またはチオエステル))を生じる。好ましいアルコキシ官能性チオエーテルは、エポキシ官能性チオエーテルである。一般的反応を以下に示す：

【0049】

【化13】



ここで、 R^1 および R^2 は、水素およびタンパク質分子のN末端部分の残部からなる群から選択される実体を含む； R^3 は、タンパク質分子のカルボキシ末端部分の残部を含む；そして R^4 は、チオエーテル(好ましくは、アルコキシ官能性チオエーテル)を形成するために適合した基である。適切な R^4 基は、「置換末端」を含み、これは、硫黄、および架橋剤と反応する「反応性端」と結合する。適切な置換末端としては、約1個~約8個の炭素原子を有する、非置換のアルキル基、非置換のアルキレン基、八口置換アルキル基および八口置換アルキレン基(共鳴ハイブリッド(例えば、アリル基)が挙げられる)、ならびに非置換のアリール基および八口置換アリール基が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。適切な反応性末端としては、アシル基、および約1個~約50個の繰返し基を含むポリアルキルエーテル、シラン基およびシリコーン基が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましい反応性末端としては、カルボキシル基、ヒドロキシル基およびアルコキシド基が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。最も好ましい反応性末端は、エポキシド基である。上記の式では、Xは、任意の適切な脱離基であり得る。適切な脱離基としては、ハライド基、トシレート基、アセテート基、ヒドロキシル基、

10

20

30

40

50

アルコキシ基、およびアミン基が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましいX基は、ハライドであり、最も好ましくは塩素である。最も好ましい実施形態では、X R⁴ は、エピクロルヒドリンである。

【0050】

チオレートアニオンは、チオールから生成され得るか、または反応性求核剤との反応によって水溶性タンパク質供給原料（好ましくは、ケラチン供給原料）からより直接的に生成され得る。適切な求核剤としては、アルキルおよびアリール官能性の、硫化物塩、スルホネート、イソシアネート、チオシアネート、ハライド、水硫化物、水酸化物、アルコキシド、アジ化合物、およびアセテートが挙げられ、好ましくはアルキルおよびアリールの硫化物塩、水硫化物、水酸化物、アルコキシド、アジ化合物およびアセテートが挙げられる。最も好ましい求核剤は、硫化ナトリウムである。

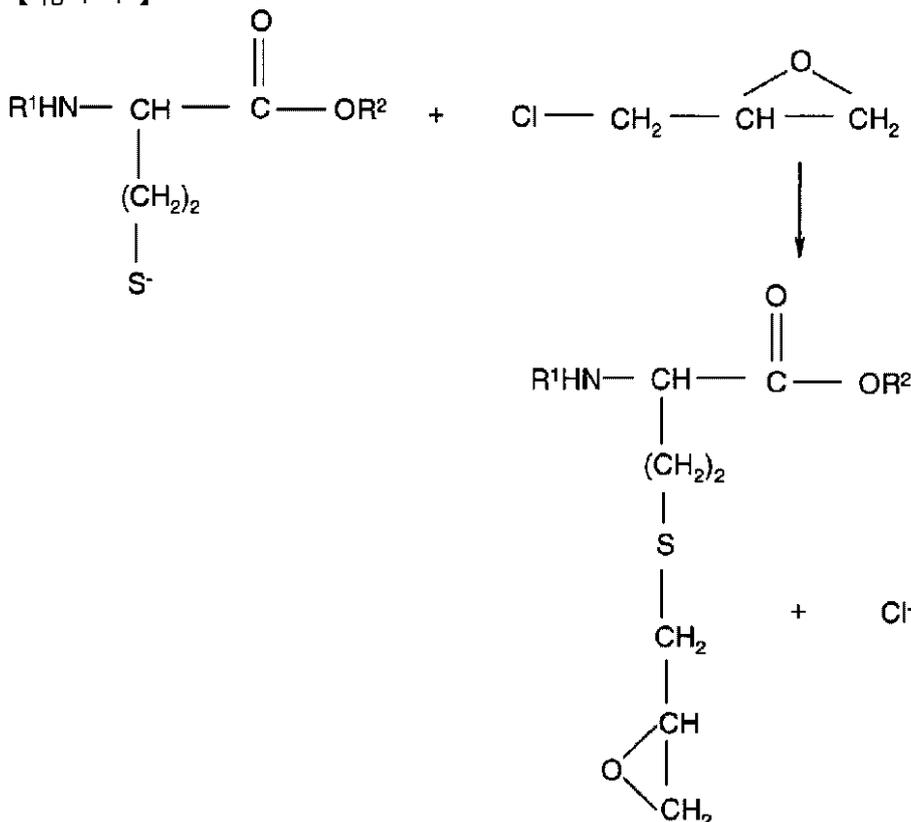
10

【0051】

R Xがエピクロルヒドリンである反応を以下に示す：

【0052】

【化14】



20

30

ここで、R¹ および R² は、システインが一部である水溶性タンパク質分子の残部である。

【0053】

上記のエポキシド官能基化水溶性タンパク質（好ましくは水溶性ケラチン）を形成するために、水溶性ケラチン供給源材料が、（好ましくは、上記の通り）最初に生成される。次いで、水溶性ケラチンは、約9～約11のpHの水溶液中の「RX」（好ましくは、エピクロルヒドリン）の溶液に曝露される。このRXは代表的に、ケラチンに対して約20モルパーセントまで（好ましくは、ケラチンに対して約5～約10モルパーセント、最も好ましくは約10モル%）の濃度である。このpHは、約7より大きく、好ましくは約9より大きい。この温度は、約20～約100であり、好ましくは約60である。この反応は、約1時間～約72時間（最も好ましくは約24時間）の時間にわたって続けられる。この結果は、エポキシ化されたチオール基である。

40

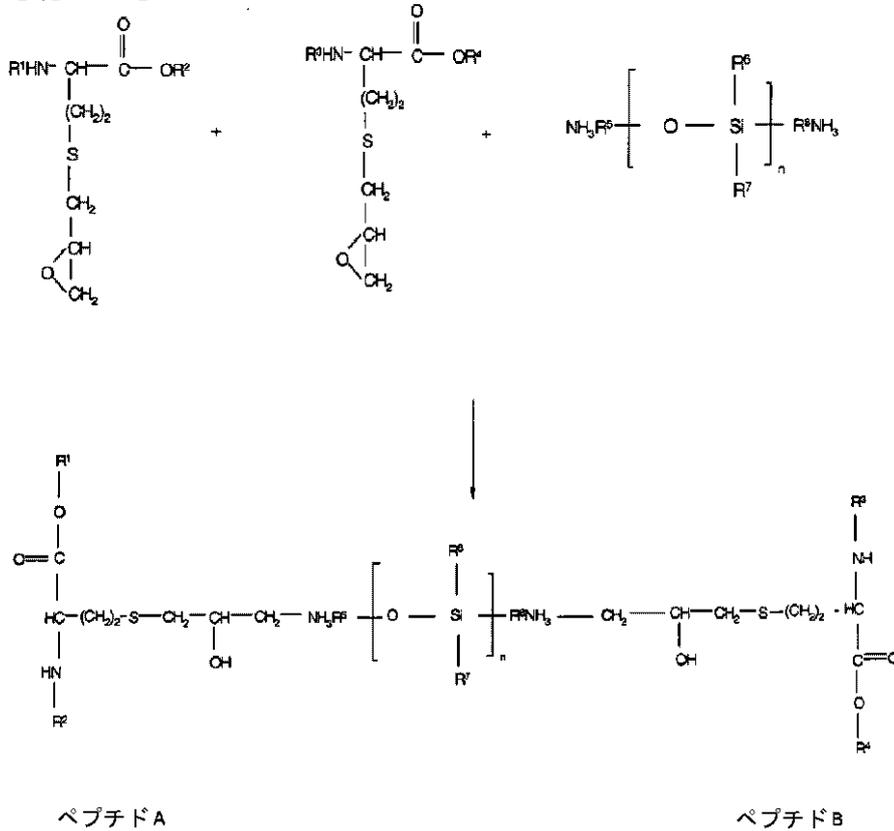
【0054】

50

最も好ましい実施形態では、エポキシ化されたケラチンは、Gelbst, Inc. (Tullytown, PA) から入手可能である、多官能性のシリコーンベースの架橋剤（例えば、アミン官能性シリコーン）を使用して、エラストマーへと硬化される。この反応は、以下の通りである：

【0055】

【化15】



10

20

ここで、 R^1 および R^2 は、エポキシ官能基化システインを保有する水溶性タンパク質「A」の残部であり； R^3 および R^4 は、エポキシ官能基化システインを保有する水溶性タンパク質Bの残部である； R^5 および R^8 は好ましくは、約1個～約6個の炭素原子を有するアルキル基（最も好ましくは、 n -プロピレン基）であり；そして R^6 および R^7 は、独立して、シリコーン架橋剤についての一般式における上記の基（特に、それらの R^2 および R^3 ）から選択される。最も好ましくは、 R^6 および R^7 は、比較的不活性な基（例えば、メチル基）である。水溶性タンパク質分子Aと水溶性タンパク質分子Bとが同じ分子であることは理論的に可能であるが、タンパク質Aとタンパク質Bとが、本明細書中に記載される実施形態の全てにおいて異なる分子（好ましくは、異なる水溶性 - ケラチン分子）であることが好ましい。

30

40

【0056】

この反応を実施するために、ケラチンは水に溶解され、そしてシリコーンは、別の水溶性有機溶媒中に溶解される。適切な有機溶媒としては、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、テトラヒドロフランおよびジメチルスルホキシドが挙げられる。この2つの溶液は、必要な場合、適切な触媒と混合され、そしてこの混合物は、フィルムに成形される。フィルムの乾燥は、風乾によって達成され得るか、または熱もしくは真空の適用によって加速され得る。この硬化は、エネルギー（好ましくは、熱、照射またはそれらの組合せ）源への曝露によって達成される。

【0057】

（反応性ペナント基へのフリーラジカル付加）

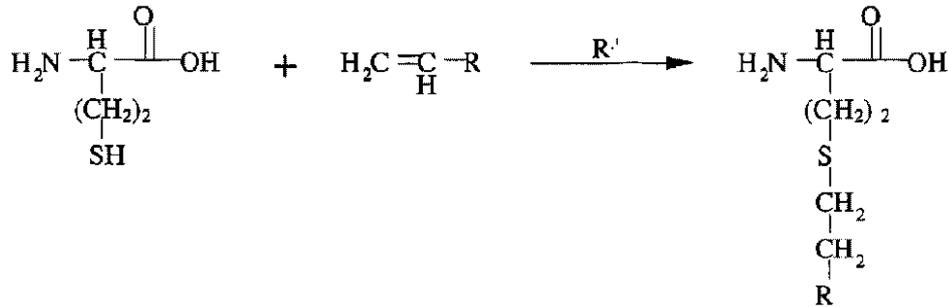
不飽和炭化水素へのフリーラジカル付加のような付加反応は、チオール基の変換のための別の潜在的達成方法を表す。種々のビニル官能性シリコーンは、例えば、適切な触媒の

50

存在下でチオールを改変するために用いられ得る。フリーラジカル触媒は、熱エネルギーまたは電磁エネルギーによって開始され得る。この反応シナリオを以下に示す：

【0058】

【化16】



10

チオールがケラチンの分子に付着する場合、そしてアリル誘導体のR基がシリコンであるならば、ケラチン-シリコンコポリマーが形成される。シリコンが少なくとも二官能性である（例えば、ビニル末端ポリジメチルシロキサンである）場合、ネットワークまたはエラストマーの構造がもたらされる。

【0059】

この反応を実施するために、適切な量のケラチン粉末は、（好ましくは、適切な塩基を含む）無水溶媒中に溶解される。ビニル末端シリコン流体は、適切な量のフリーラジカルイニシエーター（好ましくは、アントラキノン-2-スルホン酸ナトリウム塩一水和物（Aldrich, Milwaukee, WI））とともに、適切な完全な溶解後に添加される。他の適切なフリーラジカルイニシエーターとしては、フリーラジカルフォトイニシエーター（ベンゾインエーテル、ベンジルケタール、 α -ジアルコキシアセトフェノン、 α -ヒドロキシアルキルフェノン、 α -アミノアルキルフェノン、アシルホスフィン酸化物、ベンゾフェノン/アミン、チオキサントン（thioxanthone）/アミン、チタノセン（titanocene）および特定のシランが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない）が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。添加されるビニル官能性シリコン流体の量は、用いられるケラチンの量に対して、約1重量パーセント～約20重量パーセントであり、好ましくは、約10重量パーセントである。粘性溶液は、適切な型において成形される。研究目的のために、適切な型は、テフロン（登録商標）^{T M}でコーティングされたペトリ皿である。粘性溶液は、所望の特性を有するエラストマーフィルムを産生するのに有効な時間にわたって硬化される。硬化は、エネルギー（好ましくは、熱、照射またはそれらの組合せ）源への曝露によって達成される。好ましい実施形態では、粘性流体は、約1時間～約4時間（好ましくは約2時間）の期間にわたって、UVランプ（ $\lambda = 365 \text{ nm}$ ）下で照射され、次いで、少なくとも約60℃の温度を生じるのに有効な加熱ランプ下で約30分間～約300分間（好ましくは4時間）の期間にわたって乾燥される。

20

30

【0060】

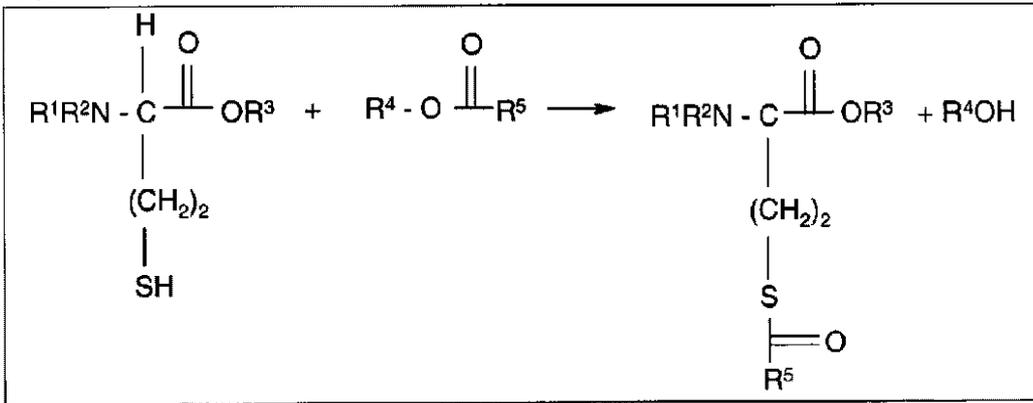
（縮合によるチオールの変換）

例えば、エステル交換のような縮合反応を用いて、シリコンベースの架橋剤のチオエステルを生成し得る。エステル交換反応の例をスキーム3に示す。

40

【0061】

【化17】



10

ここで、 R^1 および R^2 は、水素およびタンパク質分子のN末端部分の残部からなる群から選択される実体を含み； R^3 は、タンパク質分子のカルボキシ末端部分の残部を含み； R^4 は、適切な脱離基であり；そして、 R^5 は、シリコーンベースの実体を含む。適切な R^4 基としては、水素、約1個～約6個の炭素原子を有するアルキル基、およびアリール基（ベンジル基が挙げられる）が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。 R^5 はまた、シリコーン基を含み得る。

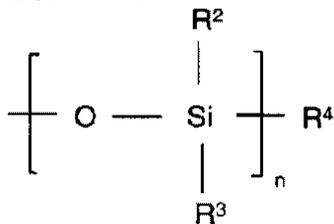
【0062】

R^5 がシリコーン基である場合、その基は、好ましくは以下の一般構造を有する：

20

【0063】

【化18】



ここで、 n 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、シリコーン架橋剤についての一般式における上記の対応する基と同じである。

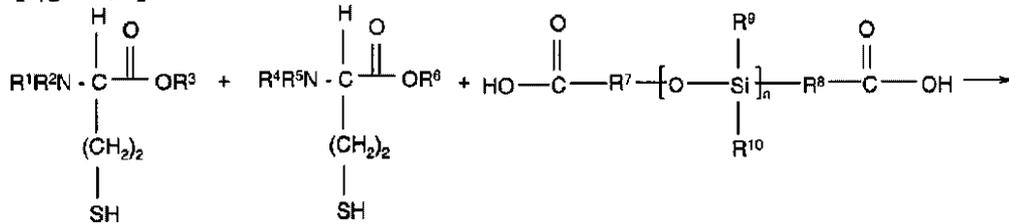
30

【0064】

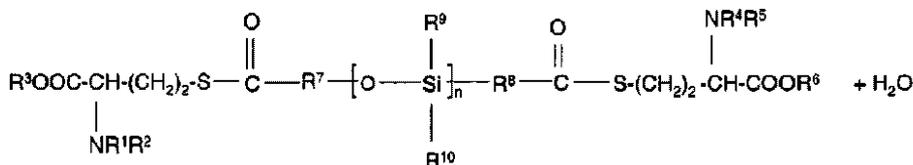
R^5 がシリコーンベースの実体を含む場合、以下は例示的な反応である：

【0065】

【化19】



40



ここで、 n は、約1～約50であり； R^1 、 R^2 、および R^3 は、第1水溶性タンパク質分子の残部であり； R^4 、 R^5 、および R^6 は、第2水溶性タンパク質分子の残部であり； R^7 および R^8 は、好ましくは、約1個～約6個の炭素原子を有するアルキル基、合

50

計約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する 1 以上のアルキル基を含むアルコキシ基、ポリマー鎖 (R^9 および R^{10}) の残部と同じペンダント置換基を有するシリル基、およびそれらの組み合わせからなる群より選択され；そして R^9 および R^{10} は、独立して、適切なシリコーン架橋剤についての一般式中の上記の基 (特に、それらの R^2 および R^3) から選択される。最も好ましい R^2 および R^3 は、比較的不活性な基 (例えば、メチル基) である。

【0066】

この反応を実施するために、ケラチンは水に溶解され、そしてシリコーンは別の水混和性有機溶媒に溶解される。適切な有機溶媒としては、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、およびジメチルスルホキシドが挙げられる。これらの 2 つの溶液は、必要な場合は適切な触媒とともに混合され、そして、この混合物は、フィルムに成形される。フィルムの乾燥は、風乾によって達成され得るか、または熱もしくは真空の適用によって加速され得る。この硬化は、エネルギー (好ましくは、熱、照射またはそれらの組合せ) 源への曝露によって達成される。

10

【0067】

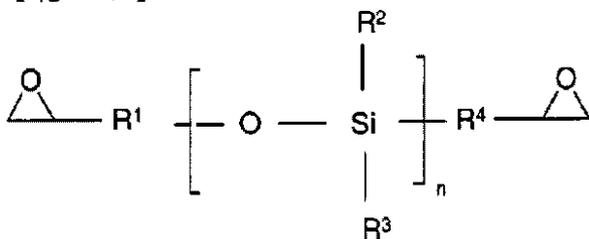
(アミン基の付加)

反応性アミン基とオキシラン化合物との間での付加反応は、触媒の助けを借りずに容易に生じる。好ましいオキシラン化合物は、以下の一般構造を有するジエポキシドである：

【0068】

【化20】

20



ここで、 n は約 5 ~ 約 50 であり； R^2 および R^3 は、独立して、適切なシリコーン架橋剤についての一般式における上記の基 (特に、 R^2 および R^3) から選択される。最も好ましくは、 R^2 および R^3 は、比較的不活性な基 (例えば、メチル基) であり；そして R^1 および R^4 は、このフィルムの所望の特徴を妨害しない実質的に任意の部分である。好ましくは、 R^1 および R^4 は、約 1 個 ~ 約 3 個の炭素原子を有するアルキル基、合計約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する 1 個以上のアルキル基を含むアルコキシ基、および約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する 1 以上のアルキル置換基 (最も好ましくはメチル基) を必要に応じて含むシリル基、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される。

30

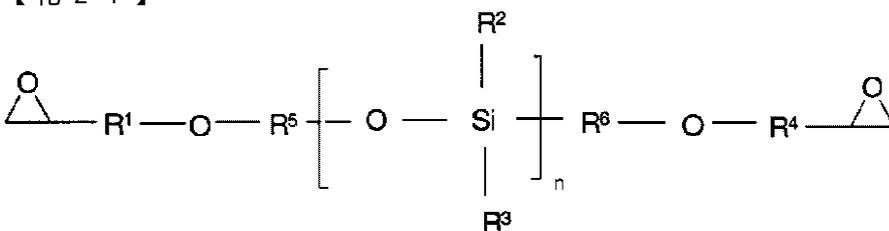
【0069】

より好ましいオキシランは、以下の一般構造を有する：

【0070】

【化21】

40



ここで、 n は約 5 ~ 約 50 であり； R^2 および R^3 は、独立して、シリコーンベースの架橋剤に関して上記の基 (特に、 R^2 および R^3) から選択される。最も好ましくは、 R^2 および R^3 は、比較的不活性な基 (例えば、メチル基) であり；そして R^1 および R^4 は、フィルムの所望の特徴を妨害しない実質的に任意の部分である。好ましくは、 R^1 および R^4 は、約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子 (好ましくは約 1 個 ~ 約 3 個の炭素原子) を有する

50

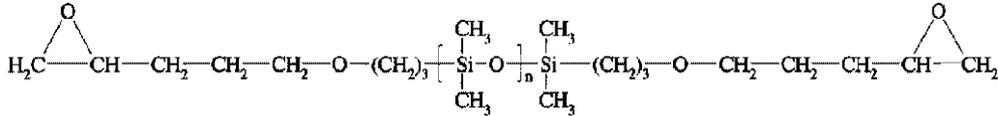
アルキル基からなる群から選択される。R⁵ および R⁶ は、約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子 (好ましくは約 1 個 ~ 約 3 個の炭素原子) を有するアルキル基、約 1 個 ~ 約 6 個の炭素原子を有する 1 以上のアルキル置換基 (最も好ましくは 1 以上のメチル置換基) を必要に応じて含むシラン基、およびそれらの組合せからなる群から選択される。

【0071】

最も好ましいオキシラン化合物は、以下に示す構造を有する、Gelvest, Inc., Tullytown, PA から入手可能な、エポキシプロポキシプロピル末端ポリ(ジメチルシロキサン)である:

【0072】

【化22】

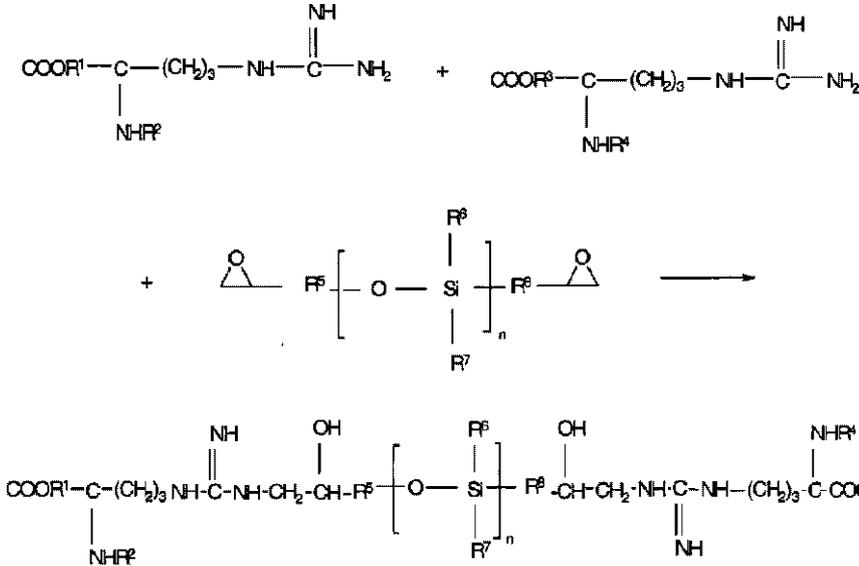


10

ジエポキシ-シリコーンベースの架橋剤とアルギニンとの架橋反応は、以下の通りである:

【0073】

【化23】



20

30

ここで、R¹ および R² は、1 のタンパク質分子の残部を表す; R³ および R⁴ は、別のタンパク質分子 (好ましくは、異なる - ケラチン分子) の残部を表す。

【0074】

この反応を実施するために、可溶化したケラチンは、オキシラン末端シリコーンを含む溶液 (例えば、Gelvest, Inc., Tullytown, PA から入手可能な溶液) に、代表的にはケラチンに関して約 20 モルパーセントまでの濃度 (好ましくは、ケラチンに関して 5 モルパーセントと 10 モルパーセントとの間) にて、7 を超える (好ましくは 9 を超える) かまたは 7 未満 (好ましくは 6 未満) の pH にて、約 0 ~ 約 100 (好ましくは、約 30) の温度にて、好ましくは約 0 時間 ~ 約 72 時間 (最も好ましくは約 24 時間) の期間にわたって曝露される。

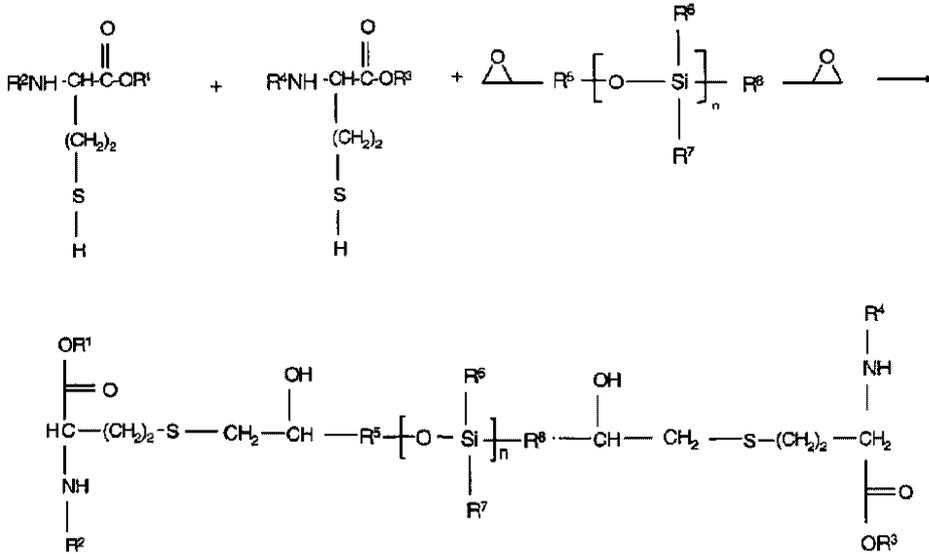
40

【0075】

ジエポキシドがシステイン残基と反応する場合、同様の反応が生じる:

【0076】

【化24】



10

ここで、 R^1 および R^2 は、第1タンパク質分子の残部であり、そして R^3 および R^4 は第2タンパク質分子（好ましくは、異なる - ケラチン分子）の残部である。 R^5 および R^8 は、アルギニンとの反応に関してちょうど記載された対応する部分である。

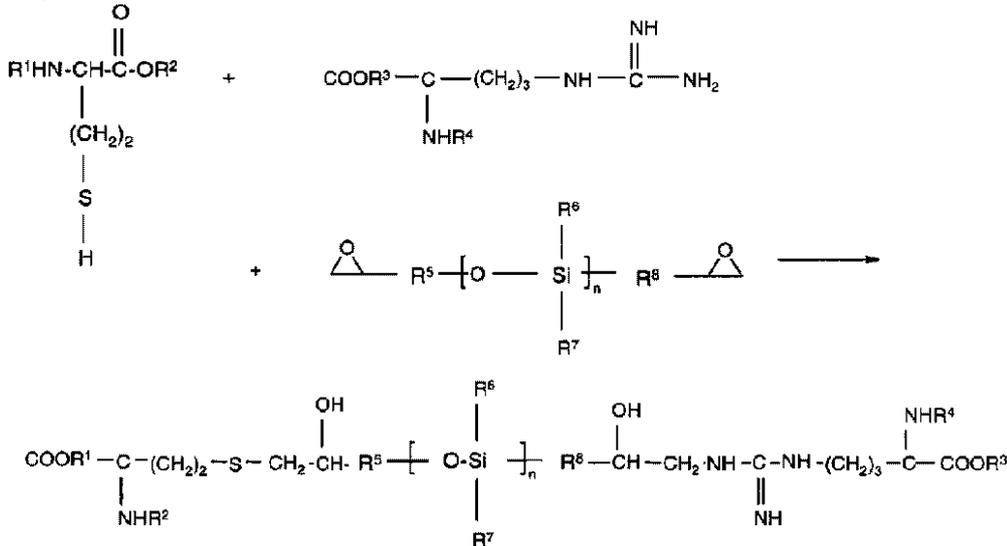
【0077】

20

当業者は、本明細書中に記載された架橋剤の多くが、反応性窒素原子、硫黄原子または酸素原子を含むペンダント基を有する種々のアミノ酸残基と反応すると認識する。それゆえ、ジエポキシドの一方の末端はシステイン残基と反応し得、一方、ジエポキシドの他方の末端は、以下のようにアルギニン残基と反応する：

【0078】

【化25】



30

40

ここで、 R^1 および R^2 は、一方のタンパク質分子の残部を表し； R^3 および R^4 は、別のタンパク質分子（好ましくは、異なる - ケラチン分子）の残部を表し； R^5 および R^8 は、フィルムの所望の特徴を妨害しない任意の部分であり得る。好ましくは、 R^5 および R^8 は、約1個～約6個の炭素原子（より好ましくは、約1個～約3個の炭素原子）を有する、プロポキシプロピル基およびアルキル基からなる群から選択され；そして R^6 および R^7 は、独立して、シリコン架橋剤に関する上記の基（特に、それらの R^2 および R^3 ）から選択される。最も好ましくは、 R^6 および R^7 は、比較的不活性な基（例えば、メチル基）である。

【0079】

50

架橋剤によって連結されるアミノ酸残基の正体は、タンパク質分子の間での十分な量の架橋が生じて所望の特性を有するフィルムを生成するという必要条件ほどには重要ではない。好ましい実施形態において、架橋は、エラストマーフィルムを生成する。

【0080】

(ネットワーク特性)

上記に見られるように、三次元のケラチンベースネットワークは、種々の化学を使用して形成され得る。好ましくは、このようなネットワークの「溶解速度」は、フィルムの架橋密度、ならびに官能基(特に、架橋部位に隣接した官能基)のレベルおよび種類を制御することによって制御可能である。例えば、以下の特徴のうちの1つを有する架橋剤の使用は、得られるネットワークの溶解速度を減らす:より多くの加水分解性結合(例えば、エステル結合)とは反対に、S-C結合を形成する架橋剤;架橋部位に相当な立体障害を導入する架橋剤;疎水性である架橋剤。得られるネットワークまたはフィルムの「溶解速度」は、そのフィルムが、約7のpHを有する水性緩衝液への露出の際に加水分解にどれくらい長く抵抗するかについて決定することで測定される。所望の「溶解速度」は、そのフィルムが用いられる適用に依存する。

10

【0081】

本発明は、以下の実施例を参照してよりよく理解される。以下の実施例は、例示に過ぎない。

【実施例】**【0082】**

20

(実施例1)

500gの清浄な、乾燥ヒト毛を、8.35Lの1w/v% H₂O₂を含む12Lフラスコ中に配置し、そして穏やかに煮沸させた。この反応物を、180分間にわたって、還流して、攪拌せずに加熱した。この毛を濾過し、脱イオン水でリンスし、そして風乾した。

【0083】

100gの酸化した毛を、水酸化アンモニウムを用いてpH9に調整した1Lの1Mチオグリコール酸溶液を含む2Lフラスコ中に配置した。この反応物を、窒素雰囲気下で、攪拌しながら24時間にわたって60℃まで加熱した。

【0084】

30

固体と液体抽出物との混合を、アルゴン雰囲気下の瓶に注いだ。瓶を封止し、遠心分離して、固体を分離した。液体を、窒素下で8倍過剰の冷エタノール中にカニユーレ挿入し、そして沈澱物が形成された。沈澱物を濾過し、エタノールを用いて洗浄し、そして減圧下で乾燥させた。乾燥固体を、乳鉢および乳棒を用いて粉碎して粉末にした。

【0085】

3gのケラチン粉末を、1mLの30%水酸化アンモニウムを含む15mLのジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide)(DMSO)中に溶解した。完全に溶解した後、0.3gのビニル末端シリコーン流体(カタログ番号DMS-V03; Gelest, Inc., Tullytown, PA)および0.1gのアントラキノン-2-スルホン酸ナトリウム塩一水和物(Aldrich, Milwaukee, WI)を添加した。この粘性溶液を、TeflonTMでコーティングしたペトリ皿上で成形し、そしてUVランプ(λ=365nm)下で2時間にわたって硬化させた。このフィルムを、加熱ランプ下で4時間にわたってさらに乾燥させた。このプロセスにより、良質のエラストマーフィルムが得られた。

40

【0086】

(実施例2)

175gの清浄な乾燥毛を、水酸化カリウムを用いてpH10.2に調整した、3.5Lの1Mメルカプトエタノールを含む4Lガラス反応器中に配置した。この溶液を、窒素下で21時間にわたって攪拌し、その後、この固体を濾過によって分離した。次いで、還元した毛を、窒素下で、室温にて24時間、2.3の7M尿素水溶液で抽出した。

50

【0087】

この反応物を遠心分離し、そして液体を濾過し、次いで濃塩酸の添加により、pH7に中和した。中和したケラチン溶液を10倍過剰のエタノールへと滴下して、沈澱させた。沈澱物を濾過し、エタノールでリンスし、そして減圧下で乾燥した。乾燥した固体を、乳鉢および乳棒を使用して粉砕して粉末にした。

【0088】

5gの粉砕したケラチン粉末を、攪拌、超音波処理、およびわずかな加熱の助けを借りて、60gの30%水酸化アンモニウム溶液中に溶解した。完全な溶解後、水酸化アンモニウムを、動的窒素パージの助けを借りてエバポレートした。この溶液の半分に対して、0.05gのアントラキノン-2-スルホン酸ナトリウム塩一水和物および2gのイソプロピルアルコール中の0.5gのビニル末端シリコーン(カタログ番号DMS-V03; Gelest, Inc., Tullytown, PA)の溶液を添加した。約30分間の攪拌後、濃い溶液をTeflon(登録商標)でコーティングしたペトリ皿上で成形し、そしてUVランプ下で約3時間にわたって硬化させた。次いで、このフィルムを、加熱ランプ下で約1時間にわたって乾燥させた。このフィルムを、脱イオン水中に24時間にわたって配置し、そして溶解しなかった。

10

【0089】

当業者は、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、多くの改変が本発明になされ得ることを認識する。本明細書中に記載される実施形態は、例示のみであることを意図し、本発明を限定するとは解釈すべきでない。本発明は、特許請求の範囲において規定される。

20

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 03/11102
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C08H1/06 A61K38/01 C07K14/00 C08H1/00 C08G77/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C08H A61K C08G		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 540 357 A (CRODA INT PLC) 5 May 1993 (1993-05-05) abstract; claims 1-8; examples 1-4 page 2, line 20 page 2, line 50-54 page 3, line 24 -page 4, line 25 --- -/--	1-8, 12-16, 19-23, 25-27, 29,30, 34-42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 January 2004		Date of mailing of the international search report 19. 04. 04
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jenn, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int lional Application No
 PCT/US 03/11102

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 677 693 A (FILLINGHAM STEPHEN HARVEY ET AL) 18 July 1972 (1972-07-18) abstract; claims 3,4 column 2, line 49 - line 56 column 2, line 60 - line 71 column 7, line 5 - line 8 column 8, line 71 -column 9, line 8	1-4, 14-16, 19-23, 25-27, 29,30, 34-42
X	US 5 300 285 A (HALLORAN DANIEL J ET AL) 5 April 1994 (1994-04-05) abstract; claim 1; example 1 column 2, line 49 - line 66	1-5, 9-16, 19-23, 25-27, 29,30, 34-42
A	US 6 352 699 B1 (MONDET JEAN ET AL) 5 March 2002 (2002-03-05) abstract; claims 1-4,19; example 6 column 2, line 34 - line 36 column 2, line 61 -column 3, line 4	1-16, 19-23, 25-27, 29,30, 34-42
A	EP 0 298 684 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 11 January 1989 (1989-01-11) abstract; claims 1-18	1-16, 19-23, 25-27, 29,30, 34-42
A	US 2002/028243 A1 (MASTERS DAVID B) 7 March 2002 (2002-03-07) claims 1,3,4,17,19	1-16, 19-23, 25-27, 29,30, 34-42
A	MENEFEE, E. AND YEE, G.: "Cross - linking in keratins. IV. Thermal cleavage of cross - links" JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE, vol. 9, no. 8, 1965, pages 2847-2853, XP009018496 abstract; table V page 2853, line 1 - line 3 page 2853, line 19 - line 21	1-16, 19-23, 25-27, 29,30, 34-42

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 03/11102

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 19283 A (SILLER JACKSON ARLENE J ;DYKE MARK E VAN (US); SMITH ROBERT A (US)) 22 March 2001 (2001-03-22) claims 14,23,24; example 3	1-16, 19-23, 25-27, 29,30, 34-42
A	US 4 032 676 A (OSBERGHAUS RAINER ET AL) 28 June 1977 (1977-06-28) claim 1 column 2, line 25 - line 30	19,20
A	ALFERIEV I S ET AL: "High reactivity of alkyl sulfides towards epoxides under conditions of collagen fixation-a convenient approach to 2-amino-4-butyrolactones" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 22, no. 18, September 2001 (2001-09), pages 2501-2506, XP004273577 ISSN: 0142-9612 abstract; figure SCHEME1 page 2505, column 1, paragraph 4 page 2505, column 2, paragraph 3 -page 2506, column 1, paragraph 1	19,20
A	EP 0 312 962 A (KAO CORP) 26 April 1989 (1989-04-26) abstract; claims 4-6; example 11	19,21
P,X	US 2003/204037 A1 (VAN DYKE MARK E) 30 October 2003 (2003-10-30) the whole document	1-16, 19-23, 25-27, 29,30, 34-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 03/11102**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT,
no additional fees are to be refunded.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
19-21, 38-40 (all in full), and 1-16, 22, 23, 25-27, 29, 30, 34-37, 41, 42 (all in part)

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

 The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 03 11102

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1, 3-14 and 36-42 all in part

A method for making a keratin network covalently interlinked by a crosslinking agent having the structure as disclosed in claim 3.

2. Claims: 38-40 in full and 1, 5, 6, 9, 14, 36, 41, 42 all in part

A method for making a keratin network covalently interlinked, by exposing alpha-keratin molecules to a nucleophilic substitution agent comprising at least one terminal epoxide, thereby producing alpha-keratins comprising pendant epoxide groups which are treated with a crosslinking agent comprising silicone, excluding the method of claim 3.

3. Claims: 1, 5, 6, 9, 14, 36, 41 and 42 all in part

A method for making a keratin network covalently interlinked by a crosslinking agent comprising silicone, excluding the methods of claims 3 and 38.

4. Claims: 17 in full and 2-16, 22, 23, 25-27, 29, 30, 34-37, 41 and 42 all in part

A network consisting of pluralities of protein molecules covalently crosslinked via the crosslink as disclosed in claim 17.

5. Claims: 18 in full and 2-16, 22, 23, 25-27, 29, 30, 34-37, 41 and 42 all in part

A network consisting of pluralities of protein molecules covalently crosslinked via the crosslink as disclosed in claim 18.

6. Claims: 19 in full and 2-16, 22, 23, 25-27, 29, 30, 34-37, 41 and 42 all in part

A network consisting of pluralities of protein molecules covalently crosslinked via the crosslink as disclosed in claim 19.

International Application No. PCT/US 03 A1102

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. Claims: 20 in full and 2-16, 22, 23, 25-27, 29, 30, 34-37, 41 and 42 all in part

A network consisting of pluralities of protein molecules covalently crosslinked via the crosslink as disclosed in claim 20.

8. Claims: 21 in full and 2-16, 22, 23, 25-27, 29, 30, 34-37, 41 and 42 all in part

A network consisting of pluralities of protein molecules covalently crosslinked via the crosslink as disclosed in claim 21.

9. Claims: 24 in full and 2-16, 25-27, 29, 30, 34-37, 41 and 42 all in part

A network consisting of pluralities of protein molecules covalently crosslinked via the crosslink as disclosed in claim 24.

10. Claims: 28 and 31-33 all in full, and 2-16, 29, 30, 34-37, 41 and 42 all in part

A network consisting of pluralities of protein molecules covalently crosslinked via the crosslink as disclosed in claim 28.

11. Claims: 2-16, 29, 35-37, 41 and 42 all in part

A network consisting of pluralities of protein molecules covalently crosslinked via a silicone-containing crosslink as disclosed in claim 3 and which are not crosslinks as disclosed in either of claims 17-21, 24 or 28.

12. Claims: 2, 5, 6, 9, 14-16, 35, 36, 41 and 42 all in part

A network consisting of pluralities of protein molecules covalently crosslinked via silicone-containing crosslinks wherein the crosslinks are not as disclosed in either of claims 3, 17-21, 24 or 28.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 03/11102

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
EP 0540357	A	05-05-1993	DE 69212430 D1	29-08-1996			
			DE 69212430 T2	20-02-1997			
			EP 0540357 A2	05-05-1993			
			JP 3470813 B2	25-11-2003			
			JP 5148119 A	15-06-1993			
			US 5412074 A	02-05-1995			
			US 3677693	A	18-07-1972	AT 313847 B	11-03-1974
			BE 758986 A1	30-04-1971			
			CA 941558 A1	12-02-1974			
			CH 555927 B	15-11-1974			
			CH 1706870 A	30-04-1974			
			DE 2056083 A1	27-05-1971			
			ES 385864 A1	01-05-1973			
			FR 2067367 A1	20-08-1971			
			GB 1327395 A	22-08-1973			
			HU 162457 B	28-02-1973			
			IE 34717 B1	23-07-1975			
			IL 35647 A	10-09-1974			
			JP 49021280 B	30-05-1974			
			NL 7016661 A	21-05-1971			
			PL 81700 B1	30-08-1975			
			ZA 7007691 A	25-08-1971			
US 5300285	A	05-04-1994	NONE				
US 6352699	B1	05-03-2002	AU 717355 B2	23-03-2000			
			AU 7055398 A	30-10-1998			
			BR 9808454 A	23-05-2000			
			CN 1251519 T	26-04-2000			
			EP 0971685 A1	19-01-2000			
			WO 9844906 A1	15-10-1998			
			HU 0002337 A2	28-12-2000			
			JP 2000510167 T	08-08-2000			
			PL 336001 A1	05-06-2000			
			RU 2179842 C2	27-02-2002			
			EP 0298684	A	11-01-1989	AT 88338 T	15-05-1993
						DE 3880383 D1	27-05-1993
			DE 3880383 T2	29-07-1993			
			EP 0298684 A2	11-01-1989			
			US 4795629 A	03-01-1989			
			US 4793993 A	27-12-1988			
			ZA 8804847 A	28-03-1990			
US 2002028243	A1	07-03-2002	US 6342250 B1	29-01-2002			
			US 2002106410 A1	08-08-2002			
			AU 4907901 A	26-11-2001			
			CA 2401385 A1	22-11-2001			
			EP 1259223 A1	27-11-2002			
			JP 2003533468 T	11-11-2003			
			WO 0187267 A1	22-11-2001			
			US 2003007991 A1	09-01-2003			
WO 0119283	A	22-03-2001	US 6371984 B1	16-04-2002			
			AU 7375000 A	17-04-2001			
			CA 2387522 A1	22-03-2001			
			EP 1274369 A2	15-01-2003			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/US 03/11102

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0119283	A		JP 2003516775 T	20-05-2003
			WO 0119283 A2	22-03-2001
			US 2001032019 A1	18-10-2001
			US 2002029083 A1	07-03-2002
US 4032676	A	28-06-1977	DE 2364525 A1	03-07-1975
			AT 333970 B	27-12-1976
			AT 968174 A	15-04-1976
			BE 823675 A1	20-06-1975
			CH 610293 A5	12-04-1979
			ES 433264 A1	16-09-1976
			FR 2255292 A1	18-07-1975
			GB 1464000 A	09-02-1977
			IT 1027906 B	20-12-1978
			JP 50095201 A	29-07-1975
			NL 7415699 A	26-06-1975
			SE 7415085 A	25-06-1975
			EP 0312962	A
JP 2000023 C	08-12-1995			
JP 7025778 B	22-03-1995			
EP 0312962 A2	26-04-1989			
US 4985412 A	15-01-1991			
US 5071585 A	10-12-1991			
US 2003204037	AI	30-10-2003	US 2003219486 A1	27-11-2003
			WO 03087197 A1	23-10-2003
			WO 03087195 A2	23-10-2003
			WO 03087156 A2	23-10-2003
			WO 03086491 A2	23-10-2003

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/393,958

(32)優先日 平成14年7月5日(2002.7.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 ヴァン ダイク, マーク イー.

アメリカ合衆国 テキサス 78015, フェア オークス ランチ, パーシェロン サーク
ル 8507

Fターム(参考) 4C084 AA07 BA37 BA42 BA43 BA44 DA40 NA14 ZA891 ZA892

4H045 AA10 AA20 BA50 CA40 EA34 FA83