

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 2 区分

【発行日】平成25年1月24日(2013.1.24)

【公表番号】特表2009-529974(P2009-529974A)

【公表日】平成21年8月27日(2009.8.27)

【年通号数】公開・登録公報2009-034

【出願番号】特願2009-500520(P2009-500520)

【国際特許分類】

A 6 1 L 27/00 (2006.01)

A 6 1 F 2/24 (2006.01)

A 6 1 F 2/08 (2006.01)

A 6 1 F 2/28 (2006.01)

A 6 1 M 1/12 (2006.01)

【F I】

A 6 1 L 27/00 V

A 6 1 F 2/24

A 6 1 F 2/08

A 6 1 F 2/28

A 6 1 F 2/22

【誤訳訂正書】

【提出日】平成24年11月26日(2012.11.26)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物組織とヘパリンとを含む、化学的に殺菌されたバイオインプラントであって、当該ヘパリンが当該生物組織に共有結合しており、当該バイオインプラントがカルボジイミドを用いて殺菌されたものである、バイオインプラント。

【請求項 2】

前記生物組織が、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンポジット又は複合コンポジットを含む、請求項 1 記載のバイオインプラント。

【請求項 3】

(1) 天然組織には、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜、並びにこれらの組み合わせ物が含まれ、(2) 天然型処理組織には、架橋組織、脱細胞化 (decellularized) 粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び / 又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜若しくは骨結合組織組み合わせ物が含まれ、(3) 非天然型処理組織には、結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨が含まれ、(4) コンポジットには、天然組織、天然型処理組織及び / 又は非天然型処理組織の組み合わせ物が含まれ、(5) 複合コンポジットには、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、若しくは天然組織、天然型処理組織及び / 又は非天然型処理組織と生体適合性材料とのコンポジットが含まれる、請求項 2 記載のバイオインプラント。

【請求項 4】

アルコールの存在下でカルボジイミドを用いて殺菌されたものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のバイオインプラント。

【請求項 5】

前記アルコールが $C_2 \sim C_4$ アルカノールである、請求項 4 記載のバイオインプラント

。

【請求項 6】

前記カルボジイミドが 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のバイオインプラント。

【請求項 7】

前記ヘパリンが、その天然活性の少なくとも一部を維持する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のバイオインプラント。

【請求項 8】

前記ヘパリンがインビボで放出されるようになされ、当該ヘパリンはインビボでひとたび放出されると、その天然活性の少なくとも一部を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のバイオインプラント。

【請求項 9】

(a) 生物組織をヘパリンと接触させて、組み合わせ物を形成するステップと、
(b) 当該組み合わせ物を、カルボジイミドを用いて殺菌するステップと
を含む、請求項 1 記載のバイオインプラントの作製方法。

【請求項 10】

ステップ (a) と (b) の間に、前記組み合わせ物を凍結乾燥するステップを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記生物組織が、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンボジット又は複合コンボジットを含む、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記カルボジイミドが EDC である、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記殺菌がアルコールの存在下で行われる、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記アルコールが $C_2 \sim C_4$ アルカノールである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記アルコールがイソプロパノールである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記天然組織が、骨結合組織組み合わせ物を含む、請求項 3 に記載のバイオインプラント。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】活性補助剤が結合した、安定化殺菌コラーゲン足場

【技術分野】

【0001】

関連出願の優先権主張及び相互参照

本出願は、35・U・S・C 119 条に基づき、2006 年 3 月 17 日提出の米国特許仮出願第 60 / 743, 542 号の優先権を主張するものであり、参照によりその全体を本明細書に組み込む。

【背景技術】

【0002】

多くの外科的手法で、合成インプラントに対する有利な選択肢として、天然組織のバイオインプラントが許容されている。他の有利な選択肢の中で、バイオインプラントは、交換のために設計された生物学的構造に、大きさ、形及び性能の点で合成インプラントよりも非常に似ている。したがって、バイオインプラントは多くの状況で、内部組織及び臓器の交換又は構造拡張のために最適な装置と考えられる。

【 0 0 0 3 】

バイオインプラントの供給源としては、非ヒト及びヒトのドナーがあげられる。一般的にドナーの選択は、ドナーと受容者の相対的大きさを含む多くの要素に左右される。例えば、ヒトの死体に代わり、ヒツジ、ブタ、ウシ又はウマがドナーとして機能しうる。一部の例としては、ドナーと受容者が同じであってもよい。免疫原性の制限は、組織を架橋し、組織で抗原分子を隠すことによって克服する。殺菌は一般的に、組織を化学的殺菌剤と接触させて行う。多くの場合、架橋し、殺菌したバイオインプラントは、天然組織の多くの特徴を提供し、一方で生組織の移植の特徴である、異種組織の拒絶反応の問題を大きく回避している。

【 0 0 0 4 】

多くの場合、バイオインプラントは、合成インプラントを超えたさらなる利点を提供する。例えば、多くのバイオインプラントは、受容者自身の細胞をバイオインプラントに浸潤させることができる。具体的には、浸潤する細胞が、受容者自身の細胞を含む臓器又は組織の構造を再構築するための鋳型又は足場として、バイオインプラントを使用できる。一部の例では、バイオインプラントの全体又は一部を、受容者自身の体細胞と交換できる。リモデリングというこの方法は、移植部位へのバイオインプラントの統合が改善できる点で有利である。当該利点により、バイオインプラント組織のリモデリングを促進することは有利であると考えられる。

【 0 0 0 5 】

一部のバイオインプラントは、天然起源及び組織再生のために足場の役割を果たすコラーゲン基質を有して単独でリモデリングを促進できるが、場合によっては、組織の成長を促す1又はそれ以上の薬剤をバイオインプラントの受容者に投与して、リモデリングを促進することも有利であると考えられる。例えば、骨形成タンパク質 (B M P) は、脊椎固定手術で骨の再生を促進するために実験的に使用されている。例えば、組換え骨形成タンパク質 - 2 (r h B M P - 2) を注入した再吸収性コラーゲンスポンジは、脊椎手術で使用が承認されている。スポンジからの r h B M P - 2 の放出は、骨芽細胞の浸潤、増殖及び組織化を促進すると考えられる。コラーゲンスポンジは再吸収できるため、最終的に、再生した宿主組織はスポンジと置き換わる。 r h B M P - 2 を注入したコラーゲンスポンジの脊椎手術への使用により、脊椎手術の失敗率が大幅に減少したという功績がある。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

すでに提供されている、成長因子を注入したバイオインプラントによる、外科手術の成果における改善にもかかわらず、多くの克服すべき課題が残されている。例えば、バイオインプラントの注入は、バイオインプラントが吸収性である場合のみ有用であり、つまり、成長因子を含む溶液に組織を浸漬する場合、組織へ注入した成長因子が十分に存在し、受容者への移植後に組織の成長を促す。したがって、注入方法は、心臓弁、植皮、腱、骨及び靱帯の修復組織等の多孔質ではないバイオインプラント装置は、有効とは考えられない。別の制限は、拡散による成長因子の放出である。拡散は、ある場合には放出の有用な方法であり得るが、他の状況では、拡散は放出の初速度が高すぎて放出の後期の速度が低すぎる結果になり得る。それ故、拡散放出の1つの欠点は、過剰な成長因子が初めからバイオインプラントに注入されていなければ、有効な放出期間は所望より短いと思われることである。しかし、これは必ずしも実現可能又は実行可能でさえないであろう。さらに、過剰な成長因子がバイオインプラントに注入できたとしても、この取り組みの範囲外で、成長因子の局所濃度が、成長因子の毛細血管、静脈及び動脈を含む周囲の組織への拡散を

起こす可能性があり、有害な局所又は全身性の効果をもたらすという不都合が生じると思われる。一部の場合では、当該拡散により、新規の成長が望まれる範囲とは離れた範囲で、新組織の成長が起こると思われる。

【 0 0 0 7 】

したがって、先行技術の成長因子注入コラーゲンスポンジの制限を克服する装置が必要である。所望の範囲に成長因子を送達できる、先行技術の成長因子注入コラーゲンスポンジからの放出拡散速度より遅い速度で、成長因子がバイオインプラント装置から放出されるバイオインプラント装置が必要である。同様に、成長因子を注入した先行技術のコラーゲンスポンジより、成長因子の分解度が低い成長因子を伴うバイオインプラント装置が必要である。さらに、バイオインプラントと共有結合している成長因子を伴う、バイオインプラント装置が必要である。同様に、当該バイオインプラント装置の製造方法が必要である。これら及び他の必要性は、本発明の実施形態で説明する。

【 0 0 0 8 】

さらに、補助剤を担持するバイオインプラント装置が必要である。また、所望の範囲に補助剤を送達することができ、補助剤が、注入コラーゲンスポンジから、補助剤の拡散放出速度よりも低い速度でバイオインプラントから放出される、バイオインプラント装置が必要である。同様に、補助剤注入コラーゲンスポンジ中の補助剤より分解度の低い補助剤を伴ったバイオインプラント装置が必要である。さらに、バイオインプラントと共有結合している補助分子を伴う、バイオインプラント装置が必要である。同様に、当該バイオインプラント装置の製造方法が必要である。これら及び他の必要性は、本発明の実施形態で説明する。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

前記及び他の必要性を、化学的に殺菌した生物組織及び生物組織と共有結合している少なくとも1種の補助剤を含むバイオインプラントを提供する、本発明の実施形態で説明する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、EDCのような水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に1～約6個の炭素原子及び少なくとも1個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルカノール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。

【 0 0 1 0 】

前記及び他の実施形態を、さらに(a)生物組織を補助剤と接触させて、組み合わせ物を作製するステップと、(b)組み合わせ物を化学的殺菌剤と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、バイオインプラントの製造方法を提供する、本発明の実施形態で説明する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、EDC等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に1～約6個の炭素原子及び少なくとも1個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルカノール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。

【 0 0 1 1 】

一部の実施形態では、本発明は、(a)出発組織を補助剤と接触させて、中間体を形成するステップと、(b)(a)の中間体産物を凍結させて、凍結中間体を製造するステップと、(c)(b)の凍結中間体を凍結乾燥させて、凍結乾燥中間体を製造するステップと、(d)凍結乾燥中間体を、カルボジイミド殺菌剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供することによって、前記及び関連する必要性をさらに説明する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、EDC等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に1～約6個の炭素原子及び少なくとも1個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルカノール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、最も具体的にはイ

ソプロパノール等のアルコールである。

【 0 0 1 2 】

本発明は、(a) 出発組織を含む組成物を調製するステップと、(b) (a) の組成物を凍結させて、凍結組成物を形成するステップと、(c) (b) の凍結組成物を凍結乾燥させて、凍結乾燥組成物を形成するステップと、(d) (c) の凍結乾燥組成物を、殺菌剤及び補助剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供して、前記及び関連する必要性をさらに説明する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、E D C 等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に 1 ~ 約 6 個の炭素原子及び少なくとも 1 個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルコール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルコール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、本発明は、(a) 出発組織を架橋剤と接触させ、出発組織を少なくとも部分的に架橋させて、架橋組織を製造するステップと、(b) (a) の架橋組織を、殺菌剤及び補助剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供して、前記及びさらなる必要性をさらに説明する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、E D C 等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に 1 ~ 約 6 個の炭素原子及び少なくとも 1 個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルコール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルコール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。

【 0 0 1 4 】

本発明は、(a) 出発組織を架橋剤及び補助剤と接触させ、出発組織を少なくとも部分的に架橋させて、架橋組織補助剤結合組織を製造するステップと、(b) (a) の架橋組織を、殺菌剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供して、前記及び関連する必要性にさらに取り組む。一部の実施形態では、バイオインプラントは、E D C 等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に 1 ~ 約 6 個の炭素原子及び少なくとも 1 個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルコール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルコール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。

【 0 0 1 5 】

本発明は、(a) 出発組織を、殺菌剤を含む殺菌溶液と接触させて、殺菌中間体を製造するステップと、(b) (a) の殺菌中間体を補助剤と接触させて、バイオインプラントを製造するステップと、(c) 場合により、インプラントを別の殺菌ステップに供するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供して、前記及び関連する必要性をさらに満たす。一部の実施形態では、バイオインプラントは、E D C 等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に 1 ~ 約 6 個の炭素原子及び少なくとも 1 個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルコール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルコール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。一部の実施形態では、任意選択の最終殺菌ステップ (c) は、E D C 等の水溶性カルボジイミドの存在の下で実施する。他の実施形態では、グルタルアルデヒド等の別の殺菌剤を使用するが、一方さらなる実施形態では、殺菌ステップ (c) は 線照射又は電子ビーム照射を用いて実施できる。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、本発明は化学的に殺菌された生物組織と、少なくとも 1 種の補助剤を含み、該補助剤が生物組織と共有結合しているバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、化学的に殺菌された生物組織を、E D C 等のカルボジイミドを用いて、

場合により $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、特にイソプロパノール等のアルカノールの存在の下で殺菌する。一部の実施形態では、化学的に殺菌された生物組織は、カルボジイミドと、場合により二官能性架橋剤の存在の下で架橋する。一部の実施形態では、生物組織は天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンボジット又は複合コンボジットを含む。一部の実施形態では、(1) 前記天然組織は、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜並びに骨-腱組み合わせ物及び骨-靱帯-骨組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、これらの組み合わせ物を含み、(2) 前記天然型処理組織は、架橋組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び/又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜若しくは骨-靱帯-骨又は骨-腱組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含み、(3) 前記非天然型処理組織は、結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨を含み、(4) 前記コンボジットは、天然組織、天然型処理組織及び/又は非天然型処理組織の組み合わせ物、例えば心膜とゼラチン、骨とゼラチン、精製コラーゲンとゼラチン若しくは脱塩した骨と可溶化又は精製したコラーゲンとを含み、(5) 前記複合コンボジットは、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織若しくは天然組織、天然型処理組織及び/又は非天然型処理組織と、ヒドロゲル、アルギネート及び/又はキトサン等の生体適合性材料とのコンボジットを含む。一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン(GAG)又は抗生物質である。一部の実施形態では、補助剤は(1) 形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリー及びプロテオグリカンのいかなるメンバーをも含む、1又はそれ以上のプロテオグリカン、グリコサミノグリカン、成長因子(2) デオキシリボ核酸、(3) 低分子干渉RNA又はミクロRNA等のリボ核酸、(4) アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン、及びキシベルノール(xibernol)から選択される抗生物質を含む。一部の実施形態では、補助剤は、(1) 1又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2) (a) BMP-2、BMP-4及びBMP-7、形質転換成長因子(TGF-)等の形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b) 血小板由来成長因子(PDGF)、(c) 線維芽細胞成長因子(FGF)、(d) インスリン様成長因子(IGF)、(e) 軟骨由来成長因子(CDGF)等の1又はそれ以上のタンパク質、(3) 遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、(4) 低分子干渉RNA(sRNA)又はミクロRNA等のリボ核酸、又は(5) 1又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含む。一部の実施形態では、生物組織としては、コラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンがあげられる。一部の実施形態では、バイオインプラントは、縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態である。

一部の実施形態では、補助剤は生物組織に結合された後、その天然活性の少なくとも一部を維持する。一部の実施形態では、補助剤はインビボで放出されるようになされ、補助剤はインビボでひとたび放出されると、その天然活性の少なくとも一部を有する。

【0017】

一部の実施形態では、本発明は、化学的に殺菌された生物組織及び少なくとも1種の補助剤を含み、該補助剤が該生物組織と共有結合しており、(a) 生物組織を補助剤と接触させて、組み合わせ物を形成するステップと、(b) 組み合わせ物を化学的殺菌剤と接触させて、バイオインプラントを形成するステップとを含む、バイオインプラントの製造方

法を提供する。一部の実施形態では、殺菌剤はEDC等のカルボジイミドであり、場合により $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、特にイソプロパノール等のアルカノールが存在する。一部の実施形態では、生物組織としては天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンポジット又は複合コンポジットがあげられる。一部の実施形態では、(1)前記天然組織は、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜を含み、前記天然組織は、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜並びに骨-腱組み合わせ物及び骨-靱帯-骨組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、これらの組み合わせ物を含み、(2)前記天然型処理組織は、架橋組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び/又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜若しくは骨-靱帯-骨又は骨-腱組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含み、(3)前記非天然型処理組織は、結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨を含み、(4)前記コンポジットは、天然組織、天然型処理組織及び/又は非天然型処理組織の組み合わせ物、例えば心膜とゼラチン、骨とゼラチン、精製コラーゲンとゼラチン若しくは脱塩した骨と可溶化又は精製したコラーゲンとを含み、(5)前記複合コンポジットは、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織若しくは天然組織、天然型処理組織及び/又は非天然型処理組織と、ヒドロゲル、アルギネート及び/又はキトサン等の生体適合性材料とのコンポジットを含む。一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン(GAG)又は抗生物質である。一部の実施形態では、補助剤は(1)1又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2)(a)BMP-2、BMP-4及びBMP-7、形質転換成長因子-(TGF-)等の形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b)血小板由来成長因子(PDGF)、(c)線維芽細胞成長因子(FGF)、(d)インスリン様成長因子(IGF)、(e)軟骨由来成長因子(CDGF)等の1又はそれ以上のタンパク質、(3)遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、(4)低分子干渉RNA(sRNA)又はマイクロRNA等のリボ核酸、又は(5)1又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、-ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含む。一部の実施形態では、補助剤は(1)1又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2)(a)BMP-2、BMP-4及びBMP-7、形質転換成長因子-(TGF-)等の形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b)血小板由来成長因子(PDGF)、(c)線維芽細胞成長因子(FGF)、(d)インスリン様成長因子(IGF)、(e)軟骨由来成長因子(CDGF)等の1又はそれ以上のタンパク質、(3)遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、(3)1又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、-ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質である。一部の実施形態では、生物組織としては、コラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンがあげられる。一部の実施形態では、本方法は、生物組織を縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップを含む。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のように、生物組織を殺菌剤の存在下で補助分子と接触させるステップを含む方法により製造されるバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、補助剤は生物組織に結合された後、その天然活性の少なくとも一部を維持する。一部の実施形態では、補助剤はインビボで放出されるようになされ、補助剤はインビボでひとたび放出されると、その天然活性の少なくとも一部を有する。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、本発明は、(a) 出発組織を補助剤と接触させて、中間体を形成するステップと、(b) (a) の中間体産物を凍結させて、凍結中間体を製造するステップと、(c) (b) の凍結中間体を凍結乾燥させて、凍結乾燥中間体を製造するステップと、(d) 凍結乾燥中間体を、カルボジイミド殺菌剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、殺菌剤は EDC 等のカルボジイミドであり、場合により C₂ ~ C₄ のアルカノール、特にイソプロパノール等のアルカノールが存在する。一部の実施形態では、出発組織は天然組織、天然型処理組織又は複合組織である。一部の実施形態では、出発組織は、(1) 骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜並びに骨 - 腱組み合わせ物及び骨 - 靱帯 - 骨組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、これらの組み合わせ物を含む、天然組織、(2) 前記天然型処理組織は、架橋組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び / 又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜若しくは骨 - 靱帯 - 骨又は骨 - 腱組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含み、又は (3) 天然組織、天然型処理組織及び / 又は非天然型処理組織の組み合わせ物、例えば心膜とゼラチン、骨とゼラチン、精製コラーゲンとゼラチン若しくは脱塩した骨と可溶化又は精製したコラーゲンとを含む、コンポジットである。一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン (GAG) 又は抗生物質である。一部の実施形態では、補助剤は (1) 1 又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2) (a) BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7、形質転換成長因子 - (TGF -) 等の形質転換成長因子 (TGF) スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b) 血小板由来成長因子 (PDGF)、(c) 線維芽細胞成長因子 (FGF)、(d) インスリン様成長因子 (IGF)、(e) 軟骨由来成長因子 (CDGF) 等の 1 又はそれ以上のタンパク質、(3) 遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンス DNA から選択されるデオキシリボ核酸、(4) 低分子干渉 RNA (siRNA) 又はマイクロ RNA 等のリボ核酸、又は (5) 1 又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含む。一部の実施形態では、補助剤は (1) 1 又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2) (a) BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7、形質転換成長因子 - (TGF -) 等の形質転換成長因子 (TGF) スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b) 血小板由来成長因子 (PDGF)、(c) 線維芽細胞成長因子 (FGF)、(d) インスリン様成長因子 (IGF)、(e) 軟骨由来成長因子 (CDGF) 等の 1 又はそれ以上のタンパク質、(3) 1 又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質である。一部の実施形態では、生物組織としては、コラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンがあげられる。一部の実施形態では、本方法は、生物組織を縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップを含む。一部の実施形態では、本発明は、上記方法により作製されるバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、補助剤は生物組織に結合された後、その天然活性の少なくとも一部を維持する。一部の実施形態では、補助剤はインビボで放出されるようになされ、補助剤はインビボでひとたび放出されると、その天然活性の少なくとも一部を有する。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、本発明は、(a) 出発組織を含む組成物を調製するステップと、

(b)(a)の組成物を凍結させて、凍結組成物を形成するステップと、(c)(b)の凍結組成物を凍結乾燥させて、凍結乾燥組成物を形成するステップと、(d)(c)の凍結乾燥組成物を、殺菌剤及び補助剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、殺菌剤はEDC等のカルボジイミドであり、場合により $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、特にイソプロパノール等のアルカノールが存在する。一部の実施形態では、出発組織は天然型処理組織又は複合コンポジットである。一部の実施形態では、出発組織は(1)架橋組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び/又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜若しくは骨-靱帯-骨又は骨-腱組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、天然型処理組織若しくは(2)天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織若しくは天然組織、天然型処理組織及び/又は非天然型処理組織と、ヒドロゲル、アルギネート及び/又はキトサン等の生体適合性材料とのコンポジットを含む複合コンポジットである。一部の実施形態では、補助剤はタンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン(GAG)又は抗生物質である。一部の実施形態では、補助剤は(1)1又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2)(a)BMP-2、BMP-4及びBMP-7、形質転換成長因子-(TGF-)等の形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b)血小板由来成長因子(PDGF)、(c)線維芽細胞成長因子(FGF)、(d)インスリン様成長因子(IGF)、(e)軟骨由来成長因子(CDGF)等の1又はそれ以上のタンパク質、(3)遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、(4)低分子干渉RNA(sRNA)又はマイクロRNA等のリボ核酸、又は(5)1又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含む。一部の実施形態では、補助剤は(1)1又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2)(a)BMP-2、BMP-4及びBMP-7、形質転換成長因子-(TGF-)等の形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b)血小板由来成長因子(PDGF)、(c)線維芽細胞成長因子(FGF)、(d)インスリン様成長因子(IGF)、(e)軟骨由来成長因子(CDGF)等の1又はそれ以上のタンパク質、(3)遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、(3)1又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質である。一部の実施形態では、生物組織としては、コラーゲン、精製コラーゲン又は可溶性コラーゲンがあげられる。一部の実施形態では、本方法は、生物組織を縫合系、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップをさらに含む。一部の実施形態では、本発明は、本明細書記載の方法により作製されるバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、補助剤は生物組織に結合された後、その天然活性の少なくとも一部を維持する。一部の実施形態では、補助剤はインビボで放出されるようになされ、補助剤はインビボでひとたび放出されると、その天然活性の少なくとも一部を有する。

【0020】

一部の実施形態では、本発明は(a)出発組織を架橋剤と接触させ、出発組織を少なくとも部分的に架橋させて、架橋組織を製造するステップと、(b)(a)の架橋組織を、殺菌剤及び補助剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、殺菌剤

は EDC 等のカルボジイミドであり、場合により $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、特にイソプロパノール等のアルカノールが存在する。一部の実施形態では、出発組織は、天然組織又は天然型処理組織である。一部の実施形態では、出発組織は (1) 骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜又は骨 - 腱 組み合わせ物 及び骨 - 靱帯 - 骨 組み合わせ物 等の骨結合組織 組み合わせ物 を含むそれらの 組み合わせ物 を含む天然組織、(2) 架橋組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び / 又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜若しくは骨 - 靱帯 - 骨又は骨 - 腱 組み合わせ物 等の骨結合組織 組み合わせ物 を含む、天然型処理組織である。一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン (GAG) 又は抗生物質である。一部の実施形態では、補助剤は (1) 1 又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2) (a) BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7、形質転換成長因子 - (TGF -) 等の形質転換成長因子 (TGF) スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b) 血小板由来成長因子 (PDGF)、(c) 線維芽細胞成長因子 (FGF)、(d) インスリン様成長因子 (IGF)、(e) 軟骨由来成長因子 (CDGF) 等の 1 又はそれ以上のタンパク質、(3) 遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンス DNA から選択されるデオキシリボ核酸、(4) 低分子干渉 RNA (siRNA) 又はマイクロ RNA 等のリボ核酸、又は (5) 1 又はそれ以上のアミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含む。一部の実施形態では、補助剤は (1) 1 又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2) (a) BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7、形質転換成長因子 - (TGF -) 等の形質転換成長因子 (TGF) スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b) 血小板由来成長因子 (PDGF)、(c) 線維芽細胞成長因子 (FGF)、(d) インスリン様成長因子 (IGF)、(e) 軟骨由来成長因子 (CDGF) 等の 1 又はそれ以上のタンパク質、(3) 遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンス DNA から選択されるデオキシリボ核酸、(4) 1 又はそれ以上のアミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質である。一部の実施形態では、生物組織としては、コラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンがあげられる。一部の実施形態では、本発明の方法は、生物組織を縫合系、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップをさらに含む。一部の実施形態では、本発明は、本明細書記載の方法により作製されるバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、補助剤は生物組織に結合された後、その天然活性の少なくとも一部を維持する。一部の実施形態では、補助剤はインビボで放出されるようになされ、補助剤はインビボでひとたび放出されると、その天然活性の少なくとも一部を有する。

【0021】

一部の実施形態では、本発明は (a) 出発組織を架橋剤及び補助剤と接触させ、出発組織を少なくとも部分的に架橋させて、架橋組織補助剤結合組織を製造するステップと、(b) (a) の架橋組織を、殺菌剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、殺菌剤は EDC 等のカルボジイミドであり、場合により $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、特にイソプロパノール等のアルカノールが存在する。一部の実施形態では、出発組織は非天然型処理組織である。一部の実施形態では、出発組織は結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨を含む、非天然型処理組織である。一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸

、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン（GAG）又は抗生物質である。一部の実施形態では、補助剤は（１）１又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、（２）（a）BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7、形質転換成長因子 - （TGF - ）等の形質転換成長因子（TGF）スーパーファミリーのいかなるメンバー、（b）血小板由来成長因子（PDGF）、（c）線維芽細胞成長因子（FGF）、（d）インスリン様成長因子（IGF）、（e）軟骨由来成長因子（CDGF）等の１又はそれ以上のタンパク質、（３）遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、（４）低分子干渉RNA（siRNA）又はマイクロRNA等のリボ核酸、又は（５）１又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含む。一部の実施形態では、補助剤は（１）１又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、（２）（a）BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7、形質転換成長因子 - （TGF - ）等の形質転換成長因子（TGF）スーパーファミリーのいかなるメンバー、（b）血小板由来成長因子（PDGF）、（c）線維芽細胞成長因子（FGF）、（d）インスリン様成長因子（IGF）、（e）軟骨由来成長因子（CDGF）等の１又はそれ以上のタンパク質、（３）遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、（４）１又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質である。一部の実施形態では、生物組織としては、コラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンがあげられる。一部の実施形態では、本発明の方法は、生物組織を縫合系、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップを含む。一部の実施形態では、本発明は、本明細書記載の方法により作製されるバイオインプラントをさらに提供する。一部の実施形態では、補助剤は生物組織に結合された後、その天然活性の少なくとも一部を維持する。一部の実施形態では、補助剤はインビボで放出されるようになされ、補助剤はインビボでひとたび放出されると、その天然活性の少なくとも一部を有する。

【0022】

一部の実施形態では、本発明は（a）出発組織を、殺菌剤を含む殺菌溶液と接触させて、殺菌中間体を製造するステップと、（b）（a）の殺菌中間体を補助剤及び結合剤と接触させて、インプラントを作製するステップと、（c）場合により、インプラントを別の殺菌ステップに供するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供し、それにより殺菌バイオインプラントを作製する。一部の実施形態では、殺菌剤はEDC等のカルボジイミドであり、場合によりC₂ ~ C₄のアルカノール、特にイソプロパノール等のアルカノールが存在する。一部の実施形態では、出発組織は非天然型処理組織である。一部の実施形態では、出発組織は、（１）骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜、及び骨 - 腱組み合わせ物及び骨 - 靱帯 - 骨組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、これらの組み合わせ物等の天然組織、（２）結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨等の非天然型処理組織若しくは（３）心膜とゼラチン、骨とゼラチン、精製コラーゲンとゼラチン若しくは脱塩した骨と可溶化又は精製したコラーゲン等の天然組織、天然型処理組織及び／又は非天然型処理組織の組み合わせ物である。一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン（GAG）又は抗生物質である。一部の実施形態では、補助剤は（１）１又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、（２）（a）BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7、形質転換成長因子 -

(T G F -) 等の形質転換成長因子 (T G F) スーパーファミリーのいかなるメンバー、 (b) 血小板由来成長因子 (P D G F)、 (c) 線維芽細胞成長因子 (F G F)、 (d) インスリン様成長因子 (I G F)、 (e) 軟骨由来成長因子 (C D G F) 等の 1 又はそれ以上のタンパク質、 (3) 遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンス D N A から選択されるデオキシリボ核酸、 (4) 低分子干渉 R N A (s i R N A) 又はマイクロ R N A 等のリボ核酸、又は (5) 1 又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含む。一部の実施形態では、補助剤は (1) 1 又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、 (2) (a) B M P - 2、B M P - 4 及び B M P - 7、形質転換成長因子 - (T G F -) 等の形質転換成長因子 (T G F) スーパーファミリーのいかなるメンバー、 (b) 血小板由来成長因子 (P D G F)、 (c) 線維芽細胞成長因子 (F G F)、 (d) インスリン様成長因子 (I G F)、 (e) 軟骨由来成長因子 (C D G F) 等の 1 又はそれ以上のタンパク質、 (3) 遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンス D N A から選択されるデオキシリボ核酸、 (4) 1 又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質である。一部の実施形態では、生物組織としては、コラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンがあげられる。一部の実施形態では、本発明の方法は、生物組織を縫合系、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップを含む。一部の実施形態では、本発明は、本発明の方法により作製されるバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、補助剤は生物組織に結合された後、その天然活性の少なくとも一部を維持する。一部の実施形態では、補助剤はインビボで放出されるようになされ、補助剤はインビボでひとたび放出されると、その天然活性の少なくとも一部を有する。

【 0 0 2 3 】

本発明の他の利点は、当業者であれば、以下の記述及び特許請求の範囲を考慮すれば明らかになるであろう。

参照による組み込み

本明細書中で言及される全ての出版物及び特許出願は、個々の出版物又は特許出願が具体的かつ個別に参照により組み込まれることが示されているのと同様に、参照により本明細書に組み込まれる。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 4 】

本発明は、バイオインプラント及びそれらのバイオインプラントの製造方法を提供する。一般的に言えば、バイオインプラントとしては、殺菌し、好ましくは化学的に殺菌し、共有結合 (c o v a l e n t l y a t t a c h e d , c o n j u g a t e d) している補助剤分子を有する生物組織があげられる。当該バイオインプラントには、創傷治癒の改善、組織のリモデリング、組織成長及び組織再生等の先行技術の生物組織を超える明らかな利点がある。さらに、補助剤が生物組織と結合しているため、一部の実施形態では、補助剤は、補助剤が生物組織に単に注入されている同様の生物組織からの拡散速度より、全般に低い速度で放出される。これは、成長因子及び非常に低濃度で活性があるが長期にわたり有利に送達される他の補助剤に特に有利である。これは、単に注入された場合、比較的分子量が低く、組織外で相対的に早く拡散する低分子にとってもまた有利である。低分子が生物組織に共有結合すると、より遅く、より規則的に補助剤を放出することができ、その結果長期にわたり補助剤の有効な局所活性を提供できる。一部の実施形態では、生物

組織に共有結合している場合、補助剤分子は天然活性を維持し、一部の実施形態では、生物組織から放出された場合、補助剤分子は天然活性を回復する。本発明のバイオインプラントの他の利点は、当業者であれば本明細書の開示を考慮すれば明らかになるであろう。

【0025】

本明細書中で使用する場合、「バイオインプラント」という用語は、移植しやすいように1つ又は複数のステップに供与された生物組織を含む装置をいう。一般にバイオインプラントは、少なくとも1種の補助剤と結合し、化学的に殺菌されたバイオインプラントである。特定の実施形態では、バイオインプラントは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)等の水溶性のカルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、生物組織は、ジアミン又は他の二官能性の架橋剤等の適当な架橋剤を用いて、場合によりカップリング剤及び/又はカップリング促進剤の存在下で架橋する。カルボジイミドが仲介する架橋は、米国特許第5,733,339号及び米国特許公開番号第2004253291号に詳細に記載され、これら各々の全体を参照により本明細書に組み込む。一部の特定の実施形態では、本発明は、グルタルアルデヒド、特にグルタルアルデヒドの溶液又は蒸気を用いて処理された生物組織を含むバイオインプラントは明らかに除外する。

【0026】

本発明のバイオインプラントとしては、殺菌、特に化学的に殺菌した生物組織があげられる。具体的には、本発明は、生物組織中の細菌及び/又は孢子の数を、少なくとも3 log、特に少なくとも約4 log、より特には少なくとも5 log、及び特別には約6 logに減少できる化学物質を用いて殺菌された生物組織を含むバイオインプラントを提供する。例示的殺菌剤には、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)等のカルボジイミドがあげられる。殺菌剤としてのEDCの使用は、例えば米国特許第5,911,951号に詳細に記載されており、この全体を本明細書中に参照により組み込む。一部の特定の実施形態では、本発明は、線を用いて殺菌されたバイオインプラントを、明確に除外する。他の特定の実施形態では、本発明は、線のみを用いて殺菌された組織を除外する。

【0027】

本発明のバイオインプラントは、少なくとも1種の「補助分子」(本明細書中では単に「補助剤」とも称する)と共有結合している。補助分子は、組織の治癒、リモデリング、成長又は再生を、受容者の体内で促進する非内在性分子である。補助分子は、この組織の治癒、リモデリング、成長又は再生の活性を、結合状態で(つまり、バイオインプラントに結合したままで)、又はバイオインプラントの周辺環境へ放出して発揮する。補助分子は、非内在性(バイオインプラントの受容者の体外にあるという意味)であり、結合された場合、バイオインプラントの一部となる。したがって、補助分子は、成長因子及び移植時にバイオインプラントの受容者の体内にあり、単なる偶然で、バイオインプラントの移植の時又はその後初めてバイオインプラントに共有結合する、他の分子は明確に排除する。しかし補助分子は、受容者の体外で生物組織に結合される前に、単離、精製又はそれらの濃度、純度、活性又はこれらの組み合わせを増強するために処理された、対象となる受容者の体内由来の分子を明確に含む。

【0028】

本明細書中で使用する場合、「結合した(conjugated)」又は「結合した(attached)」という用語及びそれらの様々な言語形式は、補助剤が生物組織に、直接又は間接的のどちらかで共有結合しているという意味である。補助剤と生物組織との直接共有結合は、生物組織の側鎖と、補助剤の側鎖との間に形成される共有結合である。間接共有結合は中間体である「リンカー」を介して形成される。リンカーは、生物組織と補助剤の両方の側鎖と共有結合を形成できる、多官能性(例えば二官能性)分子の残基の部分である。したがって、生物組織と補助剤との間接共有結合は、補助剤の側鎖と結合部分の反応基との第1の共有結合及び結合部分と生物組織の側鎖との第2の共有結合を含む。適当な共有結合は、アミド、エステル、エーテル、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、無

水物及び他の共有結合として形成される。特に適当な共有結合は、アミドである。アミドは、補助剤の酸性基と、タンパク質のアミン又は生物組織のグリコサミンとの間に若しくは補助剤のアミンと、生物組織におけるタンパク質の酸性基との間に直接形成できる。アミド結合を含む間接的共有結合は、例えば二価酸のリンカー、アミノ酸のリンカー又はジアミンのリンカーを介して、結合剤を使用して形成できる。

【0029】

一部の実施形態では、補助剤は、以下により詳細に記載のように、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)、多糖類、プロテオグリカン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸等のグリコサミノグリカン(GAG)若しくは抗生物質である。当該補助剤の供給源は、生物組織(特にタンパク質、低分子ペプチド、RNA及びDNAの場合)、細胞培養物(特に組換えタンパク質、低分子ペプチド、RNA、DNA及び抗生物質の場合)又は合成の供給源(特に特定の抗生物質及び低分子RNA、DNA及びペプチドの場合)であり得る。補助剤は、バイオインプラントに結合している間(結合状態)、バイオインプラントから放出された後、又は両方で、組織の治癒、リモデリング、成長又は再生を促進する。

【0030】

本発明の一部の実施形態では、バイオインプラントとしては、タンパク質、特に成長因子又はプロテオグリカンである補助剤があげられる。言及できる適当な成長因子は、BMP-2、BMP-4、BMP-7及びBMP-13などを含む、形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリーの全てのメンバーを含む。他の適当なタンパク質としては、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸等のグリコサミノグリカン(GAG)を伴うプロテオグリカンを含むプロテオグリカンがあげられる。

【0031】

一部の実施形態では、補助分子は、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)若しくはDNA又はRNAの模倣体である。デオキシリボ核酸は、細菌又はウィルスの遺伝子等の1又はそれ以上の遺伝子に結合でき、これらをサイレンシング及び/又は制御できる、遺伝子及び遺伝子断片並びにアンチセンス分子を含む。リボ核酸は、細菌又はウィルスの遺伝子等の遺伝子をサイレンシングできる、低分子干渉RNA(siRNA)及びマイクロRNA並びに構造的に改変されたsiRNA及びマイクロRNAの変形を含む。RNA及びDNAは、細菌を侵し、静菌性の遺伝子産物又は細菌又はウィルスにとって致命的な遺伝子産物を発現できる1又はそれ以上のプラスミドを、さらに含む。DNA及びRNAは、細菌内又はウィルス、同時形質移入細菌若しくは他の病原微生物内で、1又はそれ以上の遺伝子をサイレンシング及び/又は制御するsiRNA又はマイクロRNAを発現できるプラスミドをさらに含む。特定の実施形態では、DNA及びRNA補助剤は、DNA又はRNAと、バイオインプラントとの結合が、例えばDNA又はRNAと、生物組織との、1つ又は複数の共有結合が加水分解により破壊された後、インビボで活性になる。一部の実施形態では、DNA又はRNAは、生物組織と結合している間活性がある。

【0032】

一部の実施形態では、補助分子は抗生物質である。補助剤は生物組織に共有結合するので、例えば加水分解による共有結合の切断によってのみ、補助剤は環境に放出される。これにより、同様の量の遊離の抗生物質又は組織に注入された抗生物質の拡散性放出速度より場合によっては遅い速度で、抗生物質の放出が提供される。適当な抗生物質補助剤としては、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノールがあげられる。抗生物質は、受容者の体内への移植後、バイオインプラントに近接する細菌の成長に干渉することにより、組織の治癒、リモデリ

ング、成長又は再生に関するそれらの活性を発揮する。具体的には、抗生物質は、バイオインプラントに近接する細菌に関して、殺菌効果又は静菌効果を発揮することにより、組織の治癒、リモデリング、成長又は再生に関するそれらの活性を発揮する。当該抗生物質の一部は、バイオインプラントに結合している間、殺菌性又は静菌性である。他の当該抗生物質は、抗生物質とバイオインプラントとの1又はそれ以上のアミド、エステル、尿素又は無水の結合を、例えば加水分解することにより、抗生物質と組織との結合が破壊した後に、殺菌状態又は静菌状態に活性化される。抗生物質を生物組織に結合させて、バイオインプラントとして使用するいくつかの利点は、抗生物質の全身濃度が低いにもかかわらず、局所濃度を高くでき、したがって、抗生物質の抗菌効果を局在させて、全身毒性を低減できる；生物組織から抗生物質を緩慢に放出することにより、長期にわたって抗菌活性を維持する；非病原性の共生細菌、特に腸内細菌に関する有害効果を低減できる；細菌における抗生物質耐性の誘導を大いに低減できる；ということである。

【0033】

生物組織

本発明は、1又はそれ以上の補助分子が結合した、殺菌生物組織を含むバイオインプラントを提供する。適当な生物組織は、損傷又は除去した宿主の組織を修復又は交換する若しくは宿主の組織の治癒、リモデリング、成長又は再生を促進するために、宿主の体内に移植しやすい組織である。一部の実施形態では、生物組織は天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンポジット又は複合コンポジットである。組織は、起源が自己生成、同種又は異種であってよい。「天然組織」という用語は、インプラントの調製源の組織（「出発組織」）が、補助剤への結合前に処理されていないことを意味する。具体的には、「天然組織」は、補助剤への結合前に脱脂、脱細胞化又は架橋されていない。適当な天然組織としては、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜並びに骨-腱組み合わせ物及び骨-靱帯-骨組み合わせ物を含む、骨結合組織組み合わせ物等のこれらの組み合わせ物があげられる。「天然型処理組織」という用語は、出発組織が1つ又は複数の処理ステップ、例えば組織に補助剤が結合する前に、脱細胞化、脱脂又は架橋に供されたが、それにもかかわらず実質的に天然組織と同じ形態を維持することを意味する。適当な天然型処理組織としては、架橋組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び/又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜及び、骨結合組織組み合わせ物、例えば骨-腱又は骨-靱帯-骨組み合わせ物等のこれらの組み合わせ物があげられる。「非天然型処理組織」という用語は、組織がもはや天然型でないような方法、例えば可溶化、再構築又は天然型からその型を変化させるいくつかの他の方法を介して、処理された組織を意味する。非天然型の適当な処理組織としては、結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨があげられる。「コンポジット」は、天然組織、天然型処理組織及び非天然型処理組織の群の2以上のメンバーの組み合わせ物である。適当なコンポジットとしては、心膜とゼラチン、骨とゼラチン、精製コラーゲンとゼラチン若しくは脱塩した骨と可溶化又は精製したコラーゲン等の天然組織、天然型処理組織及び/又は非天然型処理組織との組み合わせ物があげられる。「複合コンポジット」は、天然組織、天然型処理組織及び非天然型処理組織の1種又は複数と、合成又は非哺乳動物（例えば、甲殻類又は植物由来）の生体適合性材料等の生体適合性材料のコンポジットとの組み合わせ物である。適当な複合コンポジットとしては、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織若しくは天然組織、天然型処理組織及び/又は非天然型処理組織と、ヒドロゲル、アルギネート及び/又はキトサン等の生体適合性材料とのコンポジットがあげられる。

【0034】

組織は、トリプシン又はドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いた処理等の当分野で認められている方法により、脱細胞化してよい。Riederらの「ブタの心臓弁の脱細胞化プロトコルは、細胞除去の効果及びヒト血管細胞の再細胞化に対する基質の感受性で、大いに異なる（Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells）」J.Thorac.Cardiovasc.Surg.,127,399-405(2

004) ; K a s i m i r らの「ブタ心臓弁脱細胞化手順の違いの比較(Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves)」、Int.J.Artif.Organs ,26(5),421-427(2003)。一部の実施形態では、S D S 処理は、いくつかの細胞を足場上に残す可能性がある。R e i d e r ら 2 0 0 3。一部の実施形態では、架橋及び/又は殺菌により当該残存構造が中和されると期待されるので、当該残存細胞又は細胞断片は、有害ではないであろう。いずれにしても、トリブシン及び/又はS D S を用いた処理は、適当な出発物質を作製できないはずであり、脱細胞化は別の公知の脱細胞化法、例えば t e r t - オクチルフェニルポリオキシエチレンと、デオキシコール酸ナトリウムとの併用 (R i e d e r et al.,2003) 若しくはトリトン X - 1 0 0 等の非イオン性界面活性剤など (Kasimir,2003) を用いた処理が有効であると思われる。他の脱細胞化法を用いることもでき、当業者であれば当該方法も本発明の範囲内であることを認識するであろう。

【 0 0 3 5 】

固形の骨及び骨片等の骨組織は、当分野で認められた方法により脱塩化できる。当該脱塩化は、上記のような脱細胞化と共に、又は脱細胞化とは独立してできる。当該脱塩化は、部分的又は完全であり得る。部分的脱塩化は多くの場合、皮質骨移植片を改変し、それらの骨誘導性を増強するために使用する。D a n i l c h e n k o ら「酸性脱塩化における骨アパタイトのX線回折研究(X-ray diffraction studies of bone apatite under acid demineralization)」、Cryst.Res.Technol.,39(1),71-77(2004)。骨組織は、酢酸等の弱酸を用いて処理することによってもまた脱塩化できる。脱塩化により、骨の無機成分(炭酸カルシウムなど)が除去され、脱塩化した骨の基質に骨誘導物質が無傷で残る。L a u r e n c i n 「骨移植片代用材料(Bone Graft Substitute Materials)」、eMedicine(オンラインでの利用のみ)、<http://www.emedicine.com/orthop/topic611.htm>, アップデート 2 0 0 5 年 3 月 1 5 日。脱塩化された骨の基質が、インビボで新しい骨の形成を誘導することが観察された。S a l i h ら「軟組織及び骨環境で脱塩化骨基質により誘導される、インビボにおける新しい骨の形成に応じた、骨リントタンパク質のリン酸化範囲の自然変動(Natural variation in the extent of phosphorylation of bone phosphoproteins as a function of in vivo new bone formation induced by demineralized bone matrix in soft tissue and bony environments)」、Biochemical Journal,364,465-474(2002),accessed at <http://www.biochemj.org/364/0465/bj3640465.htm>。したがって、全骨又は骨片等の骨組織は、0 . 0 5 ~ 0 . 5 M H C l 又は他の無機酸等の弱酸溶液の存在下で若しくは酢酸等の弱酸の存在下で脱塩化できる。得られた部分的脱塩化骨又は完全に脱塩化した骨の基質(D B M)を、以下により詳細に記載のように、その後補助分子に結合し、殺菌し、場合により架橋できる。

【 0 0 3 6 】

バイオインプラント

本発明は、化学的に殺菌した生物組織と少なくとも1種の補助剤とを含み、補助剤が生物組織に共有結合しているバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、E D C 等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に1 ~ 約6個の炭素原子及び少なくとも1個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、C₁ ~ C₆ のアルカノール、特にC₂ ~ C₄ のアルカノール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。これに関連する他のアルコールとしては、メタノール、エタノール、n - プロパノール、n - ブタノール、i - ブタノール、t - ブタノール、及びs - ブタノール並びにn - ペタノール、n - ヘキサノール、シクロプロパノール、シクロブタノール、シクロペンタノール及びシクロヘキサノールがあげられる。一部の実施形態では、化学的に殺菌した生物組織は、カルボジイミドを用いて、場合により二官能性架橋剤及び/又はカップリング促進剤(N - ヒドロキシスクシンイミド(N H S)又はN - ヒドロキシ - 2 - スルホスクシンイミド(スルホ - N H S)など)の存在下でさらに架橋する。

【 0 0 3 7 】

バイオインプラントに使用する生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンポジット又は複合コンポジットを含み得る。好ましい実施形態では、生物組織は、天然組織、非天然型処理組織、又はコンポジットである。特定の実施形態では、生物組織は、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜又は骨 - 腱組み合わせ物及び骨 - 靱帯 - 骨組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、これらの組み合わせ物を含む天然組織である。他の実施形態では、生物組織は、架橋した組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び / 又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜、並びに骨 - 靱帯 - 骨又は骨 - 腱組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、天然型処理組織である。他の実施形態では、生物組織は、結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨を含む、非天然型処理組織である。さらなる実施形態では、前記組織としては、心膜とゼラチン、骨とゼラチン、精製コラーゲンとゼラチン若しくは脱塩した骨と可溶化又は精製したコラーゲン等の天然組織、天然型処理組織及び / 又は非天然型処理組織の組み合わせ物を含む、混合材料があげられる。さらなる実施形態では、生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織若しくは天然組織、天然型処理組織及び / 又は非天然型処理組織のコンポジットと、ヒドロゲル、アルギネート及び / 又はキトサン等の生体適合性材料とを含む複雑な複合組織である。好ましい実施形態では、本発明は、生物組織がコラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンを含む、バイオインプラントを提供する。

【 0 0 3 8 】

一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン (G A G)、グリコサミノグリカン (G A G) 又は抗生物質である。特定の実施形態では、補助剤は、(1) 形質転換成長因子 (T G F) スーパーファミリー及びプロテオグリカンのいかなるメンバーをも含む、1 又はそれ以上のプロテオグリカン、グリコサミノグリカン、成長因子 (3) デオキシリボ核酸、(4) 低分子干渉 R N A 又はミクロ R N A 等のリボ核酸、(3) アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノールから選択される抗生物質を含む。特定の実施形態では、本発明は補助剤が (1) 1 又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2) (a) B M P - 2、B M P - 4 及び B M P - 7、形質転換成長因子 - (T G F -) 等の形質転換成長因子 (T G F) スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b) 血小板由来成長因子 (P D G F)、(c) 線維芽細胞成長因子 (F G F)、(d) インスリン様成長因子 (I G F)、(e) 軟骨由来成長因子 (C D G F) 等の 1 又はそれ以上のタンパク質、(3) 遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンス D N A から選択されるデオキシリボ核酸、(4) 低分子干渉 R N A (s i R N A) 又はミクロ R N A 等のリボ核酸、又は (5) 1 又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含むバイオインプラントを提供する。特に好ましい実施形態では、バイオインプラントは、縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態である。

【 0 0 3 9 】

本発明の好ましい実施形態では、補助剤は生物組織に結合された場合、その天然活性の少なくとも一部を維持する。他の好ましい実施形態では、補助剤はインビボで、又はインビボ状態を模倣して設計されたインビトロ状態で、放出される。当該好ましい実施形態では、放出された補助剤は天然活性の少なくとも一部を有する。本明細書中で使用する場合、「少なくとも一部」という用語は、少なくとも約 5 % を意味する。したがって、本発明

の実施形態では、生物組織に結合した場合若しくは生物組織からインビボで周辺の組織に、又はインビボ環境を模倣して設計されたインビトロ環境に放出された場合のいずれの場合にも、結合した補助剤は、その天然活性の少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、具体的には約５％～１００％、約１０％～９５％、約１５％～約９０％又は約２０％～約８０％を有する。本明細書中で使用する場合「天然活性」という用語は、生物組織に結合される前から補助剤が所与する活性を意味する。一般に、天然活性はインビボ状態又はインビボ状態を模倣するように設計されたインビトロ状態で試験する。

【００４０】

一般的方法

一部の実施形態では、本発明は（ａ）生物組織を補助剤と接触させて、組み合わせ物を形成するステップと、（ｂ）組み合わせ物を化学的殺菌剤と接触させて、バイオインプラントを形成するステップとを含むバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、ＥＤＣ等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に１～約６個の炭素原子及び少なくとも１個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルカノール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。これに関連した他のアルコールとしては、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノール、*i*-ブタノール、*t*-ブタノール及び*s*-ブタノール並びに*n*-ペンタノール、*n*-ヘキサノール、シクロプロパノール、シクロブタノール、シクロペンタノール及びシクロヘキサノールがあげられる。一部の実施形態では、化学的に殺菌した生物組織は、カルボジイミドを用いて、場合により二官能性架橋剤及び／又はカップリング促進剤（*N*-ヒドロキシスクシンイミド（*NHS*）又は*N*-ヒドロキシ-２-スルホスクシンイミド（スルホ-*NHS*）など）の存在下でさらに架橋する。

【００４１】

生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンポジット又は複合コンポジットを含み得る。特定の実施形態では、生物組織は、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜又は骨-腱組み合わせ物及び骨-靱帯-骨組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、これらの組み合わせ物を含む天然組織である。他の実施形態では、生物組織は、架橋した組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び／又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜、並びに骨-靱帯-骨又は骨-腱組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、天然型処理組織である。他の実施形態では、生物組織は、結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨を含む、非天然型処理組織である。さらなる実施形態では、前記組織としては、心膜とゼラチン、骨とゼラチン、精製コラーゲンとゼラチン若しくは脱塩した骨と可溶化又は精製したコラーゲン等の天然組織、天然型処理組織及び／又は非天然型処理組織の組み合わせ物を含む、混合材料があげられる。さらなる実施形態では、生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織若しくは天然組織、天然型処理組織及び／又は非天然型処理組織のコンポジットと、ヒドロゲル、アルギネート及び／又はキトサン等の生体適合性材料とを含む複雑な複合組織である。好ましい実施形態では、生物組織としては、コラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンがあげられる。

【００４２】

一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン（*GAG*）又は抗生物質である。特定の実施形態では、補助剤は、（１）形質転換成長因子（*TGF*）スーパーファミリー及びプロテオグリカンのいかなるメンバーをも含む、１又はそれ以上のプロテオグリカン、グリコサミノグリカン、成長因子（３）デオキシリボ核酸、（４）低分子干渉*RNA*又はマイクロ*RNA*等のリボ核酸、（３）アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 - ラ

クタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノールから選択される抗生物質を含む。特定の実施形態では、本発明は補助剤が (1) 1 又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2) (a) BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7、形質転換成長因子 - (TGF -) 等の形質転換成長因子 (TGF) スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b) 血小板由来成長因子 (PDGF)、(c) 線維芽細胞成長因子 (FGF)、(d) インスリン様成長因子 (IGF)、(e) 軟骨由来成長因子 (CDGF) 等の 1 又はそれ以上のタンパク質、(3) 遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンス DNA から選択されるデオキシリボ核酸、(4) 低分子干渉 RNA (siRNA) 又はマイクロ RNA 等のリボ核酸、又は (5) 1 又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 - ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含むバイオインプラントを提供する。特に好ましい実施形態では、バイオインプラントは、縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態である。一部の実施形態では、本方法は、生物組織を縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップをさらに含む。さらに本発明は、生物組織を殺菌剤の存在下で補助分子と接触させるステップを含む方法により製造したバイオインプラントを含む。

【 0 0 4 3 】

本発明の好ましい実施形態では、補助剤は生物組織に結合された場合、その天然活性の少なくとも一部を維持する。他の好ましい実施形態では、補助剤はインビボで、又はインビボ状態を模倣して設計されたインビトロ状態で、放出される。当該好ましい実施形態では、放出された補助剤は天然活性の少なくとも一部を有する。この方法の一部の実施形態では、生物組織に結合した場合若しくは生物組織からインビボで周辺の組織に、又はインビボ環境を模倣して設計されたインビトロ環境に放出された場合のいずれの場合にも、結合した補助剤は、その天然活性の少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、具体的には約 5 % ~ 約 100 %、約 10 % ~ 約 95 %、約 15 % ~ 約 90 % 又は約 20 % ~ 約 80 % を有する。

【 0 0 4 4 】

凍結乾燥 - 変形 1 : 凍結前の補助剤添加

一部の実施形態では、本発明は、(a) 出発組織を補助剤と接触させて、中間体を形成するステップと、(b) (a) の中間体産物を凍結させて、凍結中間体を製造するステップと、(c) (b) の凍結中間体を凍結乾燥させて、凍結乾燥中間体を製造するステップと、(d) 凍結乾燥中間体を、カルボジイミド殺菌剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、EDC 等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に 1 ~ 約 6 個の炭素原子及び少なくとも 1 個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルカノール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。これに関連した他のアルコールとしては、メタノール、エタノール、*n* - プロパノール、*n* - ブタノール、*i* - ブタノール、*t* - ブタノール及び *s* - ブタノール並びに *n* - ペタノール、*n* - ヘキサノール、シクロプロパノール、シクロブタノール、シクロペタノール及びシクロヘキサノールがあげられる。一部の実施形態では、化学的に殺菌した生物組織は、カルボジイ

ミドを用いて、場合により二官能性架橋剤及び／又はカップリング促進剤（N - ヒドロキシスクシンイミド（NHS）又はN - ヒドロキシ - 2 - スルホスクシンイミド（スルホ - NHS）など）の存在下でさらに架橋する。

【0045】

生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンポジット又は複合コンポジットを含み得る。好ましい実施形態では、生物組織は、天然組織又はコンポジットである。特定の実施形態では、生物組織は、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜又は骨 - 腱組み合わせ物及び骨 - 靱帯 - 骨組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、これらの組み合わせ物を含む天然組織である。他の実施形態では、前記組織としては、心膜とゼラチン、骨とゼラチン、精製コラーゲンとゼラチン若しくは脱塩した骨と可溶化又は精製したコラーゲン等の天然組織、天然型処理組織及び／又は非天然型処理組織の組み合わせ物を含む、混合材料があげられる。一部の好ましい実施形態では、本発明は、生物組織がコラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンを含む、バイオインプラントを提供する。

【0046】

一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン（GAG）又は抗生物質である。特定の実施形態では、補助剤は、（1）形質転換成長因子（TGF）スーパーファミリー及びプロテオグリカンのいかなるメンバーをも含む、1又はそれ以上のプロテオグリカン、グリコサミノグリカン、成長因子（3）デオキシリボ核酸、（4）低分子干渉RNA又はマイクロRNA等のリボ核酸、（3）アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキサジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノールから選択される抗生物質を含む。特定の実施形態では、本発明は補助剤が（1）1又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、（2）（a）BMP - 2、BMP - 4及びBMP - 7、形質転換成長因子 - （TGF - ）等の形質転換成長因子（TGF）スーパーファミリーのいかなるメンバー、（b）血小板由来成長因子（PDGF）、（c）線維芽細胞成長因子（FGF）、（d）インスリン様成長因子（IGF）、（e）軟骨由来成長因子（CDGF）等の1又はそれ以上のタンパク質、（3）遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、（4）低分子干渉RNA（siRNA）又はマイクロRNA等のリボ核酸、又は（5）1又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキサジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含むバイオインプラントを提供する。

【0047】

特に好ましい実施形態では、バイオインプラントは、縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態である。一部の実施形態では、本方法は、生物組織を縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップをさらに含む。さらに本発明は、生物組織を殺菌剤の存在下で補助分子と接触させるステップを含む方法により製造したバイオインプラントを含む。

【0048】

本発明の好ましい実施形態では、補助剤は生物組織に結合された場合、その天然活性の少なくとも一部を維持する。他の好ましい実施形態では、補助剤はインビボで、又はインビボ状態を模倣して設計されたインビトロ状態で、放出される。当該好ましい実施形態では、放出された補助剤は天然活性の少なくとも一部を有する。本発明の一部の実施形態で

は、生物組織に結合した場合若しくは生物組織からインビボで周辺の組織に、又はインビボ環境を模倣して設計されたインビトロ環境に放出された場合のいずれの場合にも、結合した補助剤は、その天然活性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には約5%～約100%、約10%～約95%、約15%～約90%又は約20%～約80%を有する。

【0049】

凍結乾燥 - 変形2：補助剤及び殺菌剤の同時添加

一部の実施形態では、本発明は、(a) 出発組織を含む組成物を調製するステップと、(b) (a) の組成物を凍結させて、凍結組成物を形成するステップと、(c) (b) の凍結組成物を凍結乾燥させて、凍結乾燥組成物を形成するステップと、(d) (c) の凍結乾燥組成物を、殺菌剤及び補助剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、EDC等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に1～約6個の炭素原子及び少なくとも1個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルカノール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。これに関連した他のアルコールとしては、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノール、*i*-ブタノール、*t*-ブタノール及び*s*-ブタノール並びに*n*-ペンタノール、*n*-ヘキサノール、シクロプロパノール、シクロブタノール、シクロペンタノール及びシクロヘキサノールがあげられる。一部の実施形態では、化学的に殺菌した生物組織は、カルボジイミドを用いて、場合により二官能性架橋剤及び/又はカップリング促進剤(N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)又はN-ヒドロキシ-2-スルホスクシンイミド(スルホ-NHS)など)の存在下でさらに架橋する。

【0050】

生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンポジット又は複合コンポジットを含み得る。好ましい実施形態では、生物組織は、天然型処理組織又は複合コンポジットである。一部の実施形態では、生物組織は、架橋した組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び/又は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜、並びに骨-靱帯-骨又は骨-腱組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、天然型処理組織である。他の実施形態では、生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、又は天然組織、天然型処理組織及び/又は非天然型処理組織のコンポジットと、ヒドロゲル、アルギネート及び/又はキトサン等の生体適合性材料とを含む複雑な複合組織である。好ましい実施形態では、本発明は、生物組織がコラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンを含む、バイオインプラントを提供する。

【0051】

一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン(GAG)又は抗生物質である。特定の実施形態では、補助剤は、(1) 形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリー及びプロテオグリカンのいかなるメンバーをも含む、1又はそれ以上のプロテオグリカン、グリコサミノグリカン、成長因子(3) デオキシリボ核酸、(4) 低分子干渉RNA又はミクロRNA等のリボ核酸、(3) アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキソリン、タウロリジン及びキシベルノールから選択される抗生物質を含む。特定の実施形態では、本発明は補助剤が(1) 1又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2) (a) BMP-2、BMP-4及びBMP-7、形質転換成長因子-(TGF-)等の形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリーのいかなるメン

パー、(b)血小板由来成長因子(PDGF)、(c)線維芽細胞成長因子(FGF)、(d)インスリン様成長因子(IGF)、(e)軟骨由来成長因子(CDGF)等の1又はそれ以上のタンパク質、(3)遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、(4)低分子干渉RNA(sRNA)又はマイクロRNA等のリボ核酸、又は(5)1又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキサジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含むバイオインプラントを提供する。特に好ましい実施形態では、バイオインプラントは、縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態である。一部の実施形態では、本方法は、生物組織を縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップをさらに含む。さらに本発明は、生物組織を殺菌剤の存在下で補助分子と接触させるステップを含む方法により製造したバイオインプラントを含む。本発明の好ましい実施形態では、補助剤は生物組織に結合された場合、その天然活性の少なくとも一部を維持する。他の好ましい実施形態では、補助剤はインビボで、又はインビボ状態を模倣して設計されたインビトロ状態で、放出される。当該好ましい実施形態では、放出された補助剤は天然活性の少なくとも一部を有する。本発明の一部の実施形態では、生物組織に結合した場合若しくは生物組織からインビボで周辺の組織に、又はインビボ環境を模倣して設計されたインビトロ環境に放出された場合のいずれの場合にも、結合した補助剤は、その天然活性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には約5%~約100%、約10%~約95%、約15%~約90%又は約20%~約80%を有する。

【0052】

架橋した生物組織を使用する方法

一部の実施形態では、本発明は、(a)出発組織を架橋剤と接触させ、出発組織を少なくとも部分的に架橋させて、架橋組織を製造するステップと、(b)(a)の架橋組織を、殺菌剤及び補助剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、EDC等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に1~約6個の炭素原子及び少なくとも1個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルカノール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。これに関連した他のアルコールとしては、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノール、*i*-ブタノール、*t*-ブタノール及び*s*-ブタノール並びに*n*-ペンタノール、*n*-ヘキサノール、シクロプロパノール、シクロブタノール、シクロペンタノール及びシクロヘキサノールがあげられる。一部の実施形態では、化学的に殺菌した生物組織は、カルボジイミドを用いて、場合により二官能性架橋剤及び/又はカップリング促進剤(N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)又はN-ヒドロキシ-2-スルホスクシンイミド(スルホ-NHS)など)の存在下でさらに架橋する。

【0053】

生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンポジット又は複合コンポジットを含み得る。好ましい実施形態では、生物組織としては、天然組織、又は天然型処理組織があげられる。特定の実施形態では、生物組織は、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜又は骨-腱組み合わせ物及び骨-靱帯-骨組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、これらの組み合わせ物を含む天然組織である。他の実施形態では、生物組織は、架橋した組織、脱細胞化粉碎骨片、脱細胞化コラーゲン若しくは他の脱細胞化及び/又

は脱脂した骨、腱、靱帯、筋膜、並びに骨 - 靱帯 - 骨又は骨 - 腱組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、天然型処理組織である。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン (G A G) 又は抗生物質である。特定の実施形態では、補助剤は、(1) 形質転換成長因子 (T G F) スーパーファミリー及びプロテオグリカンのいかなるメンバーをも含む、1又はそれ以上のプロテオグリカン、グリコサミノグリカン、成長因子 (3) デオキシリボ核酸、(4) 低分子干渉RNA又はミクロRNA等のリボ核酸、(3) アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノールから選択される抗生物質を含む。特定の実施形態では、本発明は補助剤が (1) 1 又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2) (a) B M P - 2、B M P - 4 及び B M P - 7、形質転換成長因子 - (T G F -) 等の形質転換成長因子 (T G F) スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b) 血小板由来成長因子 (P D G F)、(c) 線維芽細胞成長因子 (F G F)、(d) インスリン様成長因子 (I G F)、(e) 軟骨由来成長因子 (C D G F) 等の1又はそれ以上のタンパク質、(3) 遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、(4) 低分子干渉RNA (s i R N A) 又はミクロRNA等のリボ核酸、又は (5) 1 又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2, 4 - ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含むバイオインプラントを提供する。特に好ましい実施形態では、バイオインプラントは、縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態である。一部の実施形態では、本方法は、生物組織を縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップをさらに含む。さらに本発明は、生物組織を殺菌剤の存在下で補助分子と接触させるステップを含む方法により製造したバイオインプラントを含む。

【 0 0 5 5 】

本発明の好ましい実施形態では、補助剤は生物組織に結合された場合、その天然活性の少なくとも一部を維持する。他の好ましい実施形態では、補助剤はインビボで、又はインビボ状態を模倣して設計されたインビトロ状態で、放出される。当該好ましい実施形態では、放出された補助剤は天然活性の少なくとも一部を有する。本発明の一部の実施形態では、生物組織に結合した場合若しくは生物組織からインビボで周辺の組織に、又はインビボ環境を模倣して設計されたインビトロ環境に放出された場合のいずれの場合にも、結合した補助剤は、その天然活性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には約5%～約100%、約10%～約95%、約15%～約90%又は約20%～約80%を有する。

【 0 0 5 6 】

方法 - 架橋剤及び補助剤の同時添加

一部の実施形態では、本発明は、(a) 出発組織を架橋剤及び補助剤と接触させ、出発組織を少なくとも部分的に架橋させて、架橋組織補助剤結合組織を製造するステップと、(b) (a) の架橋組織を、殺菌剤を含む殺菌溶液と接触させて、バイオインプラントを製造するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、E D C 等の水溶性カルボジイミドを用いて化学的に殺

菌する。一部の実施形態では、殺菌は、浸透促進剤、特に1～約6個の炭素原子及び少なくとも1個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルカノール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。これに関連した他のアルコールとしては、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノール、*i*-ブタノール、*t*-ブタノール及び*s*-ブタノール並びに*n*-ペンタノール、*n*-ヘキサノール、シクロプロパノール、シクロブタノール、シクロペンタノール及びシクロヘキサノールがあげられる。一部の実施形態では、化学的に殺菌した生物組織は、カルボジイミドを用いて、場合により二官能性架橋剤及び/又はカップリング促進剤（*N*-ヒドロキシスクシンイミド（*NHS*）又は*N*-ヒドロキシ-2-スルホスクシンイミド（スルホ-*NHS*）など）の存在下でさらに架橋する。

【0057】

生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンボジット又は複合コンボジットを含み得る。一部の好ましい実施形態では、生物組織は、非天然型処理組織である。一部の好ましい実施形態では、生物組織は、結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨を含む、非天然型処理組織である。好ましい実施形態では、本発明は、生物組織がコラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンを含む、バイオインプラントを提供する。

【0058】

一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン（*GAG*）又は抗生物質である。特定の実施形態では、補助剤は、（1）形質転換成長因子（*TGF*）スーパーファミリー及びプロテオグリカンのいかなるメンバーをも含む、1又はそれ以上のプロテオグリカン、グリコサミノグリカン、成長因子（3）デオキシリボ核酸、（4）低分子干渉RNA又はマイクロRNA等のリボ核酸、（3）アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノールから選択される抗生物質を含む。特定の実施形態では、本発明は補助剤が（1）1又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、（2）（a）*BMP*-2、*BMP*-4及び*BMP*-7、形質転換成長因子-（*TGF*-）等の形質転換成長因子（*TGF*）スーパーファミリーのいかなるメンバー、（b）血小板由来成長因子（*PDGF*）、（c）線維芽細胞成長因子（*FGF*）、（d）インスリン様成長因子（*IGF*）、（e）軟骨由来成長因子（*CDGF*）等の1又はそれ以上のタンパク質、（3）遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、（4）低分子干渉RNA（*siRNA*）又はマイクロRNA等のリボ核酸、又は（5）1又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含むバイオインプラントを提供する。特に好ましい実施形態では、バイオインプラントは、縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態である。一部の実施形態では、本方法は、生物組織を縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップをさらに含む。さらに本発明は、生物組織を殺菌剤の存在下で補助分子と接触させるステップを含む方法により製造したバイオインプラントを含む。

【0059】

本発明の好ましい実施形態では、補助剤は生物組織に結合された場合、その天然活性の

少なくとも一部を維持する。他の好ましい実施形態では、補助剤はインビボで、又はインビボ状態を模倣して設計されたインビトロ状態で、放出される。当該好ましい実施形態では、放出された補助剤は天然活性の少なくとも一部を有する。本発明の一部の実施形態では、生物組織に結合した場合若しくは生物組織からインビボで周辺の組織に、又はインビボ環境を模倣して設計されたインビトロ環境に放出された場合のいずれの場合にも、結合した補助剤は、その天然活性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には約5%～約100%、約10%～約95%、約15%～約90%又は約20%～約80%を有する。

【0060】

方法 - 補助剤添加前の殺菌

他の実施形態では、本発明は、(a)出発組織を、殺菌剤を含む殺菌溶液と接触させて、殺菌中間体を製造するステップと、(b)(a)の殺菌中間体を補助剤と接触させて、バイオインプラントを製造するステップと、(c)場合により、インプラントを別の殺菌ステップに供するステップとを含む、殺菌バイオインプラントの製造方法を提供する。本方法は、殺菌された補助剤結合バイオインプラントを作製する。一部の実施形態では、第1の殺菌ステップ(a)はEDC等の水溶性カルボジイミドを含む殺菌溶液を用いて実施する。一部の実施形態では殺菌ステップ(a)は、浸透促進剤、特に1～約6個の炭素原子及び少なくとも1個の極性基を有する水溶性浸透促進剤の存在の下で実施する。好ましい実施形態では、浸透促進剤は、 $C_1 \sim C_6$ のアルカノール、特に $C_2 \sim C_4$ のアルカノール、最も具体的にはイソプロパノール等のアルコールである。これに関連した他のアルコールとしては、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノール、*i*-ブタノール、*t*-ブタノール及び*s*-ブタノール並びに*n*-ペンタノール、*n*-ヘキサノール、シクロプロパノール、シクロブタノール、シクロペンタノール及びシクロヘキサノールがあげられる。一部の実施形態では、化学的に殺菌した生物組織は、カルボジイミドを用いて、場合により二官能性架橋剤及び/又はカップリング促進剤(*N*-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)又は*N*-ヒドロキシ-2-スルホスクシンイミド(スルホ-NHS)など)の存在下でさらに架橋する。一部の実施形態では、任意選択の第2の殺菌(c)ステップは、殺菌ステップ(a)と同じ方法で実施するが、一部の実施形態では、第2の殺菌ステップは、例えば線又はガス殺菌による別の方法で実施する。一部の好ましい実施形態では、第2の殺菌は、本明細書中記載のように、カルボジイミド、特にEDC等の水溶性カルボジイミドの存在下で実施する。

【0061】

生物組織は、天然組織、天然型処理組織、非天然型処理組織、コンポジット又は複合コンポジットを含み得る。一部の好ましい実施形態では、生物組織としては、天然組織、非天然型処理組織又はコンポジットがあげられる。特定の実施形態では、生物組織は、骨、腱、靱帯、真皮、筋膜、心膜、又は骨-腱組み合わせ物及び骨-靱帯-骨組み合わせ物等の骨結合組織組み合わせ物を含む、これらの組み合わせ物を含む天然組織である。他の実施形態では、生物組織は、結合組織由来の可溶化又は精製コラーゲン、哺乳動物又は魚由来のゼラチン若しくは脱塩した骨を含む、非天然型処理組織である。さらなる実施形態では、前記組織としては、心膜とゼラチン、骨とゼラチン、精製コラーゲンとゼラチン若しくは脱塩した骨と可溶化又は精製したコラーゲン等の天然組織、天然型処理組織及び/又は非天然型処理組織の組み合わせ物を含む、混合材料があげられる。好ましい実施形態では、本発明は、生物組織がコラーゲン、精製コラーゲン又は可溶化コラーゲンを含む、バイオインプラントを提供する。

【0062】

一部の実施形態では、補助剤は、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン(GAG)又は抗生物質である。特定の実施形態では、補助剤は、(1)形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリー及びプロテオグリカンのいかなるメンバーをも含む、1又はそれ以上のプロテオグリカン、グリコサミノ

グリカン、成長因子(3)デオキシリボ核酸、(4)低分子干渉RNA又はミクロRNA等のリボ核酸、(3)アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキサジン、メテナミン、ニトロキソリン、タウロリジン及びキシベルノールから選択される抗生物質を含む。特定の実施形態では、本発明は補助剤が(1)1又はそれ以上のプロテオグリカン又はグリコサミノグリカン、(2)(a)BMP-2、BMP-4及びBMP-7、形質転換成長因子-(TGF-)等の形質転換成長因子(TGF)スーパーファミリーのいかなるメンバー、(b)血小板由来成長因子(PDGF)、(c)線維芽細胞成長因子(FGF)、(d)インスリン様成長因子(IGF)、(e)軟骨由来成長因子(CDGF)等の1又はそれ以上のタンパク質、(3)遺伝子、遺伝子断片及びアンチセンスDNAから選択されるデオキシリボ核酸、(4)低分子干渉RNA(sRNA)又はミクロRNA等のリボ核酸、又は(5)1又はそれ以上の、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン、2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキサジン、メテナミン、ニトロキソリン、タウロリジン及びキシベルノール等の抗生物質を含むバイオインプラントを提供する。特に好ましい実施形態では、バイオインプラントは、縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態である。一部の実施形態では、本方法は、生物組織を縫合糸、シート、インプラント可能な弁、インプラント可能なスポンジ又はインプラント可能なペーストの形態に成形又は形成するステップをさらに含む。さらに本発明は、生物組織を殺菌剤の存在下で補助分子と接触させるステップを含む方法により製造したバイオインプラントを含む。本発明の好ましい実施形態では、補助剤は生物組織に結合された場合、その天然活性の少なくとも一部を維持する。他の好ましい実施形態では、補助剤はインビボで、又はインビボ状態を模倣して設計されたインビトロ状態で、放出される。当該好ましい実施形態では、放出された補助剤は天然活性の少なくとも一部を有する。本明細書中で使用する場合、「少なくとも一部」という用語は、少なくとも約5%を意味する。したがって、本発明の実施形態では、生物組織に結合した場合若しくは生物組織からインビボで周辺の組織に、又はインビボ環境を模倣して設計されたインビトロ環境に放出された場合のいずれの場合にも、結合した補助剤は、その天然活性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、具体的には約5%~約100%、約10%~約95%、約15%~約90%又は約20%~約80%を有する。本明細書中で使用する場合「天然活性」という用語は、生物組織に結合される前から補助剤が所有する活性を意味する。一般に、天然活性はインビボ状態又はインビボ状態を模倣するように設計されたインビトロ状態で試験する。

【0063】

補助分子

本発明は、少なくとも1種の補助分子が、例えば生物組織のタンパク質の側鎖を介して結合した、殺菌生物組織を含むバイオインプラントを提供する。補助分子は、生物組織の治癒、リモデリング、成長及び/又は再生を促進する。適当な補助分子としては、タンパク質、低分子ペプチド、核酸(リボ核酸、デオキシリボ核酸並びにそれらの誘導体及び模倣体など)及び抗生物質があげられる。一部の実施形態では、補助タンパク質は、成長因子又はプロテオグリカンである。特定の実施形態では、タンパク質は、形質転換成長因子-(TGF-)、血小板由来成長因子(PDGF)、インスリン様成長因子(IGF)、軟骨由来成長因子(CDGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)及び骨成長因子(BGF)等の成長因子である。特定の実施形態では、本発明のバイオインプラントは、TGF-、PDGF、IGF、CDGF、FGF及びBGFから選択される、表面に共有結

合した１種、２種、３種又はそれ以上の成長因子を有する。一部の実施形態では、本発明は、組織に１種、２種又はそれ以上の骨成長因子（ＢＭＰ）が結合したバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、成長因子は生物組織に結合した状態で活性を維持し、及び／又は生物組織から切断されても活性を維持する。一部の実施形態では、本発明は、軟骨形成補助剤（例えばＧＡＧ又は成長因子）等の補助分子の放出制御を提供する。一部の実施形態では、本発明は、軟骨形成補助剤等の補助分子の放出制御を、殺菌により補助剤の活性を実質的に損なうことなく提供する。

【００６４】

さらなる実施形態では、本発明は、組織に結合した、少なくとも１種のグリコサミノグリカン（ＧＡＧ）、低分子ペプチド、遺伝子又は遺伝子断片を有するバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、ＧＡＧは生物組織に結合した状態で活性を維持し、及び／又は生物組織から切断されても活性を維持する。

【００６５】

さらなる実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも１種の抗生物質を有するバイオインプラントを提供する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、 β -ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン並びに２，４-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の合成抗菌化合物から選択される少なくとも１種の抗生物質を有する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、組織に単体又は β -ラクタム抗生物質、クラバン酸等の β -ラクタマーゼ阻害を伴ってのいずれかで共有結合している。一部の実施形態では、抗生物質は生物組織に結合した状態で活性を維持し、及び／又は生物組織から切断されても活性を維持する。

【００６６】

骨成長因子（ＢＧＦ）

骨形成（又は形態形成）成長因子（ＢＭＰ）を含む、様々な骨成長因子が特定されている。

【００６７】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも１種の骨成長因子（ＢＧＦ）を有する殺菌組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またＢＧＦにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したＢＧＦを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、ＢＧＦは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではＢＧＦは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、ＢＧＦ及び生物組織を結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばＥＤＣ）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、ＢＧＦと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、ＢＧＦは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【００６８】

骨形成成長因子（ＢＭＰ）

骨形成タンパク質としては、骨の形成及び骨折の修復を促進する関連タンパク質のスーパーファミリーがあげられる。ＢＭＰ-１から始まる番号がついた、多くの骨形成タンパク質がある。ＢＭＰ-１以外の全てのＢＭＰは、骨髄等の造血組織で発見された癌抑制タンパク質である形質転換成長因子- β （ＴＧＦ- β ）に、構造的に関連するタンパク質のファミリーのメンバーである。骨形成タンパク質２（ＢＭＰ-２）は、骨及び軟骨の成長を促進するＴＧＦ- β に関連する１つのＢＭＰである。ＢＭＰ-２はヒトの骨芽細胞、ヒト骨髄骨芽細胞及びＵ２-ＯＳ細胞の移動を促進することが示されている。Ｌｉｎｄら「

骨形成タンパク質 - 2 は、ヒト骨芽細胞、ヒト骨髓骨芽細胞及び U 2 - O S 細胞の走化性移動を促進するが、骨形成タンパク質 - 4 及び 6 は、促進しない (Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells)」、Bone, 18(1), 53-57(1996)。C H O 細胞由来の組換えヒト B M P - 2 は、コラーゲンスポンジと組み合わせて使用し、脊椎固定手術で脊椎円板の固定を促進し、脊椎固定手術の結果改善で高く評価されている。B u r k u s ら「組換えヒト骨形成タンパク質 2 型を使用した体内固定のレントゲン評価 (Radiographic Assessment of Interbody Fusion Using Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein Type 2)」、Spine, 28(4), 372-377(2003)。B M P - 4 は骨折後のカルス形成に関与すると思われるので、骨の治癒にかかわっている。H i t o s h i Y a o i t a ら「ラットの大腿骨骨折の後の、骨形成タンパク質及びラットのディスタルレス相同遺伝子の発現 (Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture)」、J. Bone and Mineral Metabolism, 18(2), 63-70(2000)。骨形成タンパク質 - 1 (o s t e o g e n i c p r o t e i n - 1) (O P - 1 又は B M P - 7) は、ヒトの腓骨欠損で脱塩化骨と同時投与した場合、骨の成長を促進することが示された。G e e s i n k ら「ヒトの腓骨欠損における O P - 1 骨形成タンパク質 (B M P - 7) の骨形成活性 (Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect)」、J. Bone Joint Surgery Br., 81(4), 710-718(1999)。したがって、B M P - 2、B M P - 4 及び B M P - 7 は、インビボで軟骨内の骨形成を各々誘導する。R a m o s h e b i ら「組織工学: T G F - スーパーファミリーメンバー及び骨再生における送達システム (Tissue engineering: TGF- superfamily members and delivery systems in bone regeneration)」、Exp. Rev. Mol. Med., 2 September 2002, <http://www.expertreviews.org/02004969h.htm>。

【 0 0 6 9 】

一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも 1 種の B M P (例えば B M P - 2、B M P - 4 及び / 又は B M P - 7) を有する架橋組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また B M P にも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した B M P を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、B M P は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では B M P は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、B M P と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド (例えば E D C) 等の殺菌剤を用いて、場合によりアルカノール (例えば イソプロパノール) 等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、B M P と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、B M P は、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び / 又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【 0 0 7 0 】

形質転換成長因子 -

形質転換成長因子 - (T G F -) は、T G F - 及び B M P - 2 を含むタンパク質のスーパーファミリーに属する形質転換成長因子である。T G F - は、骨幹細胞からの骨芽細胞分化の定常状態速度を直接増加し、その結果骨基質内に組み込んだ骨細胞の最終密度を増加するので、骨のリモデリングで重要な役割を果たす。E r l e b a c h e r ら「骨のリモデリングにおける T G F - に対する骨芽細胞の反応 (Osteoblastic response to TGF-beta during bone remodeling)」、Mol. Biol. Cell., 9(7), 1903-1918(1998)。T G F - は、哺乳動物で 3 種のアイソフォーム (1、 2 及び 3) で存在する。チャクマヒヒ (霊長類) で試験した T G F - のアイソフォームは、軟骨内骨形成の強力な誘導物質である。R a m o s h e b i ら 2 0 0 2。

【 0 0 7 1 】

したがって、一部の実施形態では、本発明は組織に結合した少なくとも 1 種の形質転換

成長因子 (T G F) を有する殺菌組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また T G F にも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した T G F を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、T G F は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では T G F は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、T G F と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド (例えば E D C) 等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール (例えばイソプロパノール) 等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、T G F と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、T G F は、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び / 又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【 0 0 7 2 】

線維芽細胞成長因子

線維芽細胞成長因子 (F G F) のファミリーは、胚発生期に成長誘導効果を発揮する。F G F は、どの細胞が中胚葉になるかの決定、とりわけ四肢の伸長、並びに他の発生過程に關与する。哺乳動物で、9種のF G F 遺伝子及び4種のF G F 受容体 (F G F R) がある。実在するF G F 及びF G F R の数は、F G F 受容体に関する多数のスプライシング型及びF G F に関する代替の翻訳開始部位が存在するので、実際はもっと多い。ヒト塩基性線維芽細胞成長因子 (b F G F) の静脈内投与は、若いラット及び高齢のラットの両方で、様々な骨格の骨の骨芽細胞増殖及び新生骨形成を促進する。Mayahara H ら「塩基性線維芽細胞成長因子による、ラットの骨内膜骨形成のインビボ促進 (In vivo stimulation of endosteal bone formation by basic fibroblast growth factor in rats)」、Growth Factors, 9(1), 73-80 (1993)。

【 0 0 7 3 】

したがって、一部の実施形態では、本発明は組織に結合した少なくとも1種のF G F を有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またF G F にも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したF G F を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、F G F は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではF G F は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、F G F と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド (例えば E D C) 等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール (例えばイソプロパノール) 等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、F G F と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、F G F は、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び / 又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【 0 0 7 4 】

血小板由来成長因子

血小板由来成長因子 (P D G F) は、2本のA鎖及び / 又はB鎖からなる、3種のアイソフォーム (P D G F - A A 、 - A B 、 - B B) が発生する二量体糖タンパク質である。P D G F は、走化性、創傷治癒及び骨修復に關して研究されている。P D G F の作用に対する増殖反応は、多くの間葉細胞型に対して発揮される。P D G F に対する他の成長関連反応は、細胞骨格再構成及びポリホスホイノシトールの代謝回転の増加を含む。T G F - の第1の効果は、T G F - によるP D G F 発現の誘導に起因すると思われる。3種の形態の中でP D G F - B B が、頭蓋冠モデルにおける細胞複製を最も大きく増加させる骨細胞効果の点で最も活性がある。胎児の頭蓋由来の、骨芽細胞に富む培養物でP D G F - B B は、P D G F - A A よりもおおよそ8倍細胞分裂を促進し、P D G F - A B よりも3倍細胞分裂を促進する。P D G F - B B 処理した基質と共にインキュベートした骨芽細胞は、対照の基質単体を上回る有意な増殖の増加を示した。Bateman ら「2種の異質プラスチック骨基質の血小板由来成長因子の増強 (Platelet-Derived Growth Factor Enhanc

ement of Two Alloplastic Bone Matrices)」、J.Periodontology,76(1 1),1833-1841(2005)。

【 0 0 7 5 】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも１種の P D G F (P D G F - B B など)を有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また P D G F にも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した P D G F を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、P D G F は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では P D G F は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、P D G F と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド(例えば E D C)等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール(例えばイソプロパノール)等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、P D G F と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、P D G F は、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び/又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【 0 0 7 6 】

インスリン様成長因子(I G F)

その名前が示すように、インスリン様成長因子(I G F)はインスリンに構造的に似ている。それらは、インスリンにより誘導される応答(有糸分裂誘発など)に似た細胞内の応答を誘発することが示されている。I G F - I I は胚発生で活性であり、一方肝臓により主に分泌される I G F - I は筋肉、軟骨、骨、肝臓、腎臓、神経、皮膚及び肺に作用すると考えられている。I G F - I は、細胞で細胞成長及び発生を制御できる。I G F - I は筋芽細胞をアポトーシスから保護し、インビトロで筋芽細胞の増殖を共促進(ウマの血清と共に)することが示されている。N a p i e r ら「インスリン様成長因子 - I は、筋芽細胞をアポトーシスから保護するが、増殖を促進するためには他の因子を必要とする(Insulin-like growth factor-I protects myoblasts from apoptosis but requires other factors to stimulate proliferation)」、J.Endocrinology,163(1),63-68(1999)。I G F - I はさらに、2 - デオキシグルコース及び L - アラニン(筋芽細胞の成長を示す)の取り込みを、異なる発達段階で促進し、筋芽細胞の増殖に有意な効果を有する。C a s t i l l o ら「ニジマスの筋細胞に対する I G F - 1 及びインスリンの代謝効果及び細胞分裂促進効果(Metabolic and mitogenic effects of IGF-1 and insulin on muscle cells of rainbow trout)」、Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.,286,R-935-R941(2004)。脳下垂体摘出ラットにおける I G F - 1 の減少により、創傷の傷ついたタンパク質、DNA 及びヒドロキシプロリンの含有量は 5 0 % に減少し、一方脳下垂体摘出ラットへの I G F - 1 の注入により、創傷治癒のこれらの兆候は部分的に回復される。M u e l l e r ら「ラットにおける、創傷治癒変数及びマクロファージに関するインスリン様成長因子 I の効果(The effect of insulin-like growth factor I on wound healing variables and macrophages in rats)」、J.Am.Med.Assoc.,129(3),1265-1270(1994)。

【 0 0 7 7 】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも１種の I G F (I G F - I など)を有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また I G F にも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した I G F を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、I G F は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では、I G F は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、I G F と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド(例えば E D C)等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール(例えばイソプロパノール)等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、I G F と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。

一部の好ましい実施形態では、IGFは、生物組織に結合している間は生物活性を維持及び/又は宿主内に配置された後、生物組織からの放出後に生物活性を回復する。

【0078】

軟骨由来成長因子(CDGF)

軟骨由来成長因子(CDGF)は、分子量およそ18000の陽イオン性ポリペプチドである。研究により、CDGFが、培養したマウスの線維芽細胞並びに様々な供給源からの軟骨細胞及び内皮細胞の増殖を促進することが示されている。CDGFはまた、ラットの胚線維芽細胞及び肉芽組織由来の線維芽細胞集団によるDNA及びコラーゲンの蓄積を、用量依存的に促進することが示されている。CDGFはさらに、培養したウシの毛細血管内皮細胞の増殖を、用量依存的に促進することが示されている。Davidsonら「軟骨由来成長因子による、創傷修復、細胞増殖及びコラーゲンの蓄積の促進(Accelerated wound repair, cell proliferation, and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor)」、J. Cell. Biol., 100(4), 1219-1227(1985)。軟骨由来成長因子(CDGF)は、微小血管内皮細胞で細胞分裂促進性及び化学運動性の両方を有することで知られる、塩基性線維芽細胞成長因子と密接な関係があるタンパク質である。CDGFはまた、血管形成及び創傷修復の促進で役割を果たすことが公知である。

【0079】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種のCDGFを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またCDGFにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したCDGFを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、CDGFは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではCDGFは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、CDGFと生物組織とを結合した後、水溶性カルボジミド(例えばEDC)等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール(例えばイソプロパノール)等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、CDGFと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、CDGFは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び/又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0080】

グリコサミノグリカン(GAG)

グリコサミノグリカンは、アミノ糖とウロン酸との二糖類の線状ポリマーであり、プロテオグリカンの糖部分を形成する。グリコサミノグリカンは、様々なタンパク質と相互に作用し、基質構成、細胞接着、分化及び組織の成長に関与できる。ヒアルロン酸等の一部のグリコサミノグリカンは、特に手術後の創傷治癒を増強する物質として提唱されている。例えば、コラーゲン-グリコサミノグリカン混合のナノ線維性の足場が、天然の細胞外基質の模倣体として開発されている。コラーゲン-グリコサミノグリカンの足場の組み込みによりインビトロの細胞成長が促進されることが発見された。Zhongら「コラーゲン-グリコサミノグリカン混合のナノ線維性足場の形成及びそれらの生物特性(Formation of Collagen-Glycosaminoglycan Blended Nanofibrous Scaffolds and Their Biological Properties)」、Biomacromolecules, 6(6), 2998-3004(2005)。したがって、一部の実施形態では、本発明は、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸等の1又はそれ以上のグリコサミノグリカンに共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該グリコサミノグリカン結合架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織とグリコサミノグリカン及び適当な結合剤を、グリコサミノグリカンと生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況の下で接触させるステップを含む。必要に応じて、グリコサミノグリカンのエステル結合又はアミド結合を破壊し、得られた部分を生物組織及び結合剤と接触させる。

【0081】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種のGAG

(ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸など)を有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またGAGにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したGAGを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、GAGは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではGAGは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、GAGと生物組織とを結合した後、水溶性カルボジイミド(例えばEDC)等の殺菌剤を用いて、場合によりアルカノール(例えばイソプロパノール)等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、GAGと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、GAGは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び/又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0082】

抗生物質

細菌感染、特に黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*(*S. aureus*))等の常在細菌による細菌感染は、多くの場合治癒過程を遅らせる。したがって、術後の患者に1又はそれ以上の抗生物質を施すことが多くの場合望ましい。例えば、重篤なブドウ球菌感染の予防又は治療における、チカルシリン(-ラクタム抗生物質)及びクラバン酸(-ラクタマーゼ阻害剤)の併用の臨床的可能性を実証するために、チカルシリン及びクラバン酸の有効性を、心内膜炎の実験モデルで、黄色ブドウ球菌感染に対して試験した。Catherallら「ラットの実験的黄色ブドウ球菌心内膜炎の治療に関するチカルシリン-クラバン酸の有効性(Efficacy of ticarcillin-clavulanic acid for treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats)」、*Antimicrob. Agents and Chemother.*, 36(2), 458-462(1992)。クラバン酸はまた、-ラクタマーゼが起こす細菌感染の治療用にアモキシリンと組み合わせる。米国特許第4,525,352号、第4,529,720号、第4,560,552号。様々な抗生物質治療の有効性にもかかわらず、可能であれば、特定の抗生物質剤の毒性副作用を避ける又は改善し、細菌の抗生物質耐性株の発達の可能性を減少させるために、抗生物質の全身性投与は避けることが望ましいと考えられる。したがって、本発明は、少なくとも1種の抗生物質がバイオインプラントに共有結合しているバイオインプラント、及びそれらのバイオインプラントの製造方法を提供することによってこの問題を扱う。

【0083】

構造的に関連のある抗生物質の様々なファミリーが開発されており、本発明のバイオインプラントを調製する実施形態では有用であると思われる。当該抗生物質ファミリーとしては、アミノグリコシド、アンフェニコール、アンサマイシン類、-ラクタム、リンコサミド、マクロライド、ポリペプチド抗生物質、テトラサイクリン、シクロセリン、ムピロシン、チュベリン並びに2,4-ジアミノピリミジン類、ニトロフラン類、キノロン類、スルホンアミド、スルホン、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシベルノール等の合成抗菌化合物があげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して抗生物質のファミリーの1又はそれ以上のメンバーと共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織を抗生物質及び適当な結合剤と、抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。

【0084】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種の抗生物質を有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また抗生物質にも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した抗生物質を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、抗生物質は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では抗生

物質は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、抗生物質と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、抗生物質と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥した後、殺菌する。一部の好ましい実施形態では、抗生物質は、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0085】

アミノグリコシド

本発明のバイオインプラントの調製で有用と思われる１種の抗生物質としては、アミノグリコシドである。適当なアミノグリコシドは、アミカシン、アブラマイシン、アルベカシン、バンベルマイシン、ブチロシン、ジベカシン、ジヒドロストレプトマイシン、フォルチマイシン、ゲンタマイシン、イセパマイシン、カナマイシン（A、B又はC）、ミクロノマイシン、ネオマイシン（A、B又はC）、ネチルマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、シソマイシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン及びトロスペクトマイシンがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して１又はそれ以上の上記アミノグリコシド抗生物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該アミノグリコシド抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織をアミノグリコシド及び適当な結合剤と、アミノグリコシド抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、アミノグリコシド抗生物質のエステル結合又はアミド結合を破壊し、得られた部分を生物組織及び結合剤と接触させる。

【0086】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも１種のアミノグリコシドを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またアミノグリコシドにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したアミノグリコシドを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、アミノグリコシドは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではアミノグリコシドは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、アミノグリコシドと生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、アミノグリコシドと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、アミノグリコシドは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0087】

- ラクタム

様々な - ラクタム抗生物質が開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に適切であると思われる。適当な - ラクタム抗生物質としては、カルバセフェム、カルバペネム、セファロスポリン、セファマイシン、モノバクタム、オキサセフェム、ペニシリン及びリタペネム（*ritapenem*）c。

【0088】

適当なカルバセフェムとしてはロラカルベフがあげられる。

適当なカルバペネムとしては、ピアペネム、イミペネム、メロペネム及びパニペネムがあげられる。

【0089】

適当なセファロスポリンとしては、セファクロール、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジン、セファゼドン、セファゾリン、セフカペンピボキシル、セフクリ

ジン、セフジニル、セフジトレン、セフェピム、セフェタメット、セフィキシム、セフメノキシム、セフォジジム、セフォニシド、セフォペラゾン、セフォラニド、セフォタキシム、セフォチアム、セフォゾプラン、セフピミゾール、セフピラミド、セフピロム、セフポドキシム、プロキセチル、セフプロジル、セフロキサジン、セフソルジン、セフタジジム、セフテラム、セフテゾール、セフチブテン、セフチオフル、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフロキシム、セフゾナム、セファセトリルナトリウム、セファレキシン、セファログリシン、セファロリジン、セファロスボリンC、セファロチン、セファマイシン、セファピリンナトリウム、セファラジン及びピブセファレキシン (p i v c e f a l e x i n) があげられる。

【0090】

適当なセファマイシンとしては、セフペラゾン、セフメタゾール、セフミノクス、セフォタン及びセフォキシチンがあげられる。適当なモノバクタムとしては、アズトレオナム、カルモナム及びチゲモナムがあげられる。

【0091】

適当なオキサセフェムとしては、フロモキセフ及びモキサラクタムがあげられる。適当なペニシリンとしては、アムジノシリン、アモキシシリン、アンピシリン、アパルシリン、アスポキシシリン、アジドシリン、アズロシリン、バカンピシリン、ベンジルペニシリン酸、カルペニシリン、カリダシリン (c a r i d a c i l l i n)、クロメトシリン、クロキサシリン、シクラシリン、ジクロキサシリン、エピシリン、フェンペニシリン、フロキサシリン、ヘタシリン、レナンピシリン、メタンピシリン、メチシリン、メズロシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペナメシリン、ペントメート、ペニシリンG、ペニシリンN、ペニシリンO、ペニシリンV、ペニメピサイクリン、フェネチシリン、ピペラシリン、ピバンピシリン、プロピシリン、キナシリン、スルベニシリン、スルタミシリン、タランピシリン、テモシリン及びチカルシリンがあげられる。

【0092】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種の - ラクタムを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また - ラクタムにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した - ラクタムを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、 - ラクタムは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では - ラクタムは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、 - ラクタムと生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド (例えばEDC) 等の殺菌剤を用いて、場合によりアルカノール (例えばイソプロパノール) 等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、 - ラクタムと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、 - ラクタムは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び/又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0093】

リンコサミド

本発明によるバイオインプラントを調製するために適切であると思われるリンコサミドとしては、クリンダマイシン及びリンコマイシンがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して1又はそれ以上の上記リンコサミド抗生物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該リンコサミド抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織をリンコサミド及び適当な結合剤と、リンコサミド抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、リンコサミドのエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られたリンコサミドを生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【0094】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種のリンコサミドを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またリンコサミドにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したリンコサミドを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、リンコサミドは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではリンコサミドは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、リンコサミドと生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルカノール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、リンコサミドと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、リンコサミドは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0095】

マクロライド

様々なマクロライドが開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に関して適していると思われる。適当なマクロライドとしては、アジスロマイシン、カルボマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ジョサマイシン、ロイコマイシン、ミデカマイシン、ミオカマイシン、オレアンドマイシン、プリマイシン、ロキタマイシン、ロサラマイシン、ロキシスロマイシン、スピラマイシン及びトロレアンドマイシンがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して1又はそれ以上の上記マクロライド抗生物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該マクロライド抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織を、マクロライド及び適当な結合剤とを、マクロライド抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、マクロライドのエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られたマクロライドを生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【0096】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種のマクロライドを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またマクロライドにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したマクロライドを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、マクロライドは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では、マクロライドは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、マクロライドと生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルカノール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、マクロライドと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、マクロライドは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0097】

ポリペプチド

様々なポリペプチドが開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に関して適していると思われる。適当なポリペプチドとしては、アンホマイシン、バシトラシン、カプレオマイシン、コリスチン、エンドウラシジン（*enduracidin*）、エンビオマイシン、ポリミキシン、リストセチン、テイコブラニン、チオストレプトン、ツベラクチノマイシン、チロシジン及びバンコマイシンがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して1又はそれ以上の上記ポリペプチド抗生

物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該ポリペプチド抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織をポリペプチド及び適当な結合剤と、ポリペプチド抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、ポリペプチドのエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られたポリペプチドを生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【 0 0 9 8 】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも１種の補助ポリペプチドを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またポリペプチドにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したポリペプチドを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、ポリペプチドは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではポリペプチドは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、ポリペプチドと生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばＥＤＣ）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、ポリペプチドと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、ポリペプチドは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【 0 0 9 9 】

テトラサイクリン

様々なテトラサイクリンが開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に適していると思われる。適当なテトラサイクリンとしては、アピサイクリン、クロルテトラサイクリン、クロモサイクリン、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、グアメサイクリン、ライムサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、ペニメピサイクリン、ピバサイクリン、ロリテトラサイクリン、サンサイクリン及びテトラサイクリンがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して１又はそれ以上の上記テトラサイクリン抗生物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該テトラサイクリン抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織をテトラサイクリン及び適当な結合剤と、テトラサイクリン抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、テトラサイクリンのエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られたテトラサイクリンを生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【 0 1 0 0 】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも１種のテトラサイクリンを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またテトラサイクリンにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したテトラサイクリンを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、テトラサイクリンは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では、テトラサイクリンは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、テトラサイクリンと生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばＥＤＣ）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、テトラサイクリンと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、テトラサイクリンは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【 0 1 0 1 】

2, 4 - ジアミノピリミジン類

様々な2, 4 - ジアミノピリミジン類が開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に関して適していると思われる。適当な2, 4 - ジアミノピリミジン類としては、プロジモプリム、テトロキソプリム及びトリメトプリムがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して1又はそれ以上の上記2, 4 - ジアミノピリミジン抗生物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該2, 4 - ジアミノピリミジン抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織を2, 4 - ジアミノピリミジン類及び適当な結合剤と、2, 4 - ジアミノピリミジン抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、2, 4 - ジアミノピリミジン類のエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られた2, 4 - ジアミノピリミジン類を生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【0102】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種の2, 4 - ジアミノピリミジン類を有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また2, 4 - ジアミノピリミジン類にも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した2, 4 - ジアミノピリミジン類を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、2, 4 - ジアミノピリミジン類は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では2, 4 - ジアミノピリミジン類は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、2, 4 - ジアミノピリミジン類と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルカノール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、2, 4 - ジアミノピリミジン類と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、2, 4 - ジアミノピリミジン類は、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び/又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0103】

キノロン類及びキノロン類似体

様々なキノロン類及びキノロン類似体が開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に関して適していると思われる。本発明の範囲内の適当なキノロン類及びキノロン類似体補助剤としては、シノキサシン、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、ジフロキサシン、エノキサシン、フレロキサシン、フルメキン、グレパフロキサシン、ロメフロキサシン、ミロキサシン、ナジフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オキシリン酸、パズフロキサシン、ペフロキサシン、ピペミド酸、ピロミド酸、ロソキサシン、ルフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン及びトロパフロキサシンがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して1又はそれ以上の上記キノロン類及びキノロン類似体抗生物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該キノロン類及びキノロン類似体抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織をキノロン類及びキノロン類似体並びに適当な結合剤と、キノロン類及びキノロン類似体抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、マクロライドのエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られたキノロン類及びキノロン類似体を生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【0104】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種のキノロン類又はキノロン類似体を有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またキノロン類又はキノロン類似体にも結合している。一部の

実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したキノロン類又はキノロン類似体を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、キノロン類又はキノロン類似体は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではキノロン類又はキノロン類似体は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、キノロン類又はキノロン類似体と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、キノロン類又はキノロン類似体と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、キノロン類又はキノロン類似体は、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び/又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0105】

スルホンアミド

様々なスルホンアミドが開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に関して適していると思われる。適当なスルホンアミドとしては、アセチルスルファメトキシピラジン、ベンジルスルファミド、クロラミン-B、クロラミン-T、 N^4 -D-グルコシルスルファニルアミド、マフェナイド、4'-（メチルスルファモイル）スルファニルアニリド、ノプリルスルファミド（noprilsulfamide）、フタリルスルファセタミド、フタリルスルファチアゾール、サラゾスルファジミジン、スクシニルスルファチアゾール、スルファベンズアミド、スルファセタミド、スルファクロルピリダジン、スルファクリソイジン、スルファシチン（sulfacytine）、スルファジアジン、スルファジクラミド、スルファジメトキシシ、スルファドキシシ、スルファエチドール、スルファグアニジン、スルファグアノール、スルファレン、スルファロクス酸、スルファメラジン、スルファメータ、スルファメサジン、スルファメチゾール、スルファメトミジン（sulfamethomidine）、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメトロール、スルファミドクリソイジン（sulfamidochrysoidine）、スルファモキソール、スルファニルアミド、4-スルファニルアミドサリチル酸、 N^4 -スルファニリルスルファニルアミド、スルファニル尿素、N-スルファニリル-3,4-キシラミド、スルファペリン、スルファフェナゾール、スルファプロキシリン、スルファピラジン、スルファピリジン、スルファキノキサリン、スルファソミゾール、スルファシマジン、スルファチアゾール、スルファチオ尿素、スルファトラミド、スルファザメット（sulfazamet）、スルフィソミジン及びスルフィソキサゾールがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して1又はそれ以上の上記スルホンアミド抗生物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該スルホンアミド抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織をスルホンアミド及び適当な結合剤と、スルホンアミド抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、スルホンアミドのエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られたスルホンアミドを生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【0106】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種のスルホンアミドを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またスルホンアミドにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したスルホンアミドを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、スルホンアミドは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではスルホンアミドは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、スルホンアミドと生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下

で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、スルホンアミドと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、スルホンアミドは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0107】

スルホン

様々なスルホンが開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に関して適していると思われる。適当なスルホンとしては、アセジスルホン、アセトスルホンナトリウム、ダブソン、ジアチモスルホン、グルコスルホン、ソラスルホン、スクシスルホン、スルファニル酸、2 - p - スルファニルアニリノエタノール、p - スルファニルベンジルアミン及びチアゾールスルホンがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して1又はそれ以上の上記スルホン抗生物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該スルホン抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織をスルホン及び適当な結合剤と、スルホン抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、スルホンのエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られた部分を生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【0108】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種のスルホンを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、またスルホンにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合したスルホンを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、スルホンは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態ではスルホンは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、スルホンと生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルカノール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、スルホンと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥した後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、スルホンは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0109】

他の合成抗生物質

様々な他の合成抗生物質が開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に関して適していると思われる。適当な抗生物質としては、クロホクトール、ヘキセジン、メテナミン、ニトロキシリン、タウロリジン及びキシボルノールがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して1又はそれ以上の上記抗生物質と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該抗生物質が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織を抗生物質及び適当な結合剤と、抗生物質と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、抗生物質のエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られた部分を生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【0110】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種の合成抗生物質を有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また合成抗生物質にも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した合成抗生物質を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、合成抗生物質は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では合成抗生物質は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合

と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、合成抗生物質と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、合成抗生物質と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、合成抗生物質は、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0111】

抗菌補助剤

様々な抗菌補助剤が開発されており、本発明によるバイオインプラントの調製に関して適していると思われる。適当な抗菌補助剤としては、
- ラクタマーゼ阻害剤があげられ、
- ラクタマーゼ阻害剤は1又はそれ以上のラクタム抗生物質と同時投与した場合に、
- ラクタム抗生物質耐性菌（- ラクタマーゼを発現する菌など）による細菌感染の治療で、当該- ラクタム抗生物質の有効性を増強する。適当な- ラクタマーゼ阻害剤としては、クラブラン酸、スルバクタム、スルタミシリン及びタゾバクタムがあげられる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、適当なリンカーを介して1又はそれ以上の上記抗生物質補助剤と共有結合した、架橋した生物組織を提供する。本発明はまた、当該抗生物質補助剤が結合した、架橋生物組織の製造方法を提供する。当該方法は、生物組織を抗生物質補助剤及び適当な結合剤と、抗生物質補助剤と生物組織との間に共有結合を形成するために適当な状況下で接触させるステップを含む。必要に応じて、本発明は、抗生物質補助剤のエステル結合又はアミド結合をまず切断し、その後得られた部分を生物組織に結合させて、本発明のバイオインプラントを形成する方法を提供する。

【0112】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種の抗生物質補助剤（クラブラン酸など）を有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また抗生物質補助剤にも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した抗生物質補助剤を有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、抗生物質補助剤は殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では抗生物質補助剤は、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、抗生物質補助剤と生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルコール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、抗生物質補助剤と生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、抗生物質補助剤は、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。

【0113】

低分子ペプチド

一部の実施形態では、本発明は、低分子ペプチドである補助分子に結合しているバイオインプラントを提供する。タンパク質と低分子ペプチドとの境界線は任意であり、一般的に成長因子等のタンパク質を生物組織に結合させるために使用する方法は、低分子ペプチドにも同様に用いられる。一般的に、低分子ペプチドは50、45、40、35、30又は25未満のアミノ酸があると考えられる。上記抗生物質低分子ペプチドは別として、本発明の範囲内で企図される具体的なペプチドとしては、アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）より得られる、22アミノ酸の抗菌性ペプチドであるマゲイニン（例えばマゲイニンI及びマゲイニンII）があげられる。マゲイニンはリジンに富んでおり、したがって適当なカルボン酸、アミノ酸又はカルボン酸無水試薬と容易にアミド結合を形成する。

【0114】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、組織に結合した少なくとも1種の低分子

ペプチドを有する、架橋し、殺菌した組織を提供する。一部の実施形態では、組織は内部で架橋し、また低分子ペプチドにも結合している。一部の実施形態では、本発明は、生物組織に共有結合した低分子ペプチドを有する、化学的に殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、低分子ペプチドは殺菌の前に生物組織に結合し、他の実施形態では低分子ペプチドは、殺菌後に生物組織に結合し、さらなる実施形態では、結合と殺菌は同一処理ステップで起こる。一部の好ましい実施形態では、低分子ペプチドと生物組織とを結合し、その後水溶性カルボジイミド（例えばEDC）等の殺菌剤を用いて、場合によりアルカノール（例えばイソプロパノール）等の浸透促進剤の存在下で殺菌する。一部の特に好ましい実施形態では、低分子ペプチドと生物組織とを結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後殺菌する。一部の好ましい実施形態では、低分子ペプチドは、生物組織に結合している間は生物活性を維持し、及び／又は宿主内に配置された後、生物組織から放出された後で生物活性を回復する。一部の実施形態では、生物組織に結合したペプチドは、以下のうちの1つである：マゲイニンI、マゲイニンII、Arg-Asp-Gly (RGD) ペプチド、骨形成ペプチド（副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP)、骨形成成長ペプチド (OPG)、TP508、P-15など）若しくは他の成長調節ペプチド及び／又は細胞分化誘導ペプチド。一部の実施形態では、以下の群の2種以上のペプチドが生物組織に結合している：マゲイニンI、マゲイニンII、Arg-Asp-Gly (RGD) ペプチド、骨形成ペプチド（副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP)、骨形成成長ペプチド (OPG)、TP508、P-15など）若しくは他の成長調節ペプチド及び／又は細胞分化誘導ペプチド

本発明のバイオインプラントの製造方法

本発明は、補助分子が結合している、殺菌されたバイオインプラントの製造方法を提供する。本方法は、生物組織に補助分子を結合するステップと、生物組織を殺菌するステップとを含む。一般的に、結合と殺菌はいかなる順番で又は好ましくは同時に行うことができるが、殺菌ステップはバイオインプラントの包装、例えばポリマーの袋への密封前の最終ステップであることが好ましい。

【0115】

殺菌は化学的殺菌剤の存在下で、場合により殺菌促進剤及び／又は浸透促進剤の存在下で実施する。一部の実施形態では、好ましい殺菌剤は水溶性殺菌剤、具体的には水溶性カルボジイミド（例えばEDC）である。殺菌剤は少なくとも約1 mM、特に約5 mMから約100 mM、より具体的には約15 mMから約50 mM、最も好ましくは約20 mMから約40 mMの濃度で使用されることが好ましい。

【0116】

一部の実施形態では、殺菌剤は、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 又はN-ヒドロキシ-2-スルホスクシンイミド (スルホ-NHS) 等の殺菌促進剤を伴う。一部の実施形態では、殺菌促進剤と殺菌剤との比は、約1:100から約1:1の範囲、特に約1:50から1:1、好ましくは約1:20から1:1の範囲、最も好ましくは約1:10から1:1の範囲である。特に、殺菌促進剤は約0.5 mMから約30 mM、好ましくは約1 mMから約5 mMの濃度である。

【0117】

一部の実施形態では、殺菌剤の微生物への浸透を促進し、殺すために、殺菌過程で浸透促進剤を使用することが好ましいと思われる。適当な浸透促進剤は、短鎖又は小さい環のアルカノール等のアルカノール、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、n-プロパノール、イソブタノール、n-ブタノール、s-ブタノール、t-ブタノール、n-ペンタノール、n-ヘキサノール、シクロプロパノール、シクロブタノール、シクロペンタノール、シクロヘキサノール、シクロヘブタノール、シクロオクタノール又は上記いずれかの組み合わせである。この点に関して、イソプロパノールは、特に好ましい。一部の実施形態では、浸透促進剤の好ましい濃度は、約1% (vol/vol) から約50% (vol/vol)、特に約5% (vol/vol) から約40% (vol/vol) 及びさらにより好ましくは約10%、約15%、約20%、約30%、約35%又は約4

0 % (v o l / v o l) である。特に好ましい浸透促進剤は、イソプロパノールの約 2 0 % (v o l / v o l) である。

【 0 1 1 8 】

一部の好ましい実施形態では、殺菌剤の存在下で、好ましくは殺菌促進剤及び／又は浸透促進剤の存在下で、殺菌と結合を同時に実施する。本発明の一部の実施形態では、結合剤として二官能性の結合分子が使用できるが、一部の好ましい実施形態では、殺菌剤及び場合により殺菌促進剤及び／又は浸透促進剤は、生物組織に補助剤を結合し、結合した組織と補助剤とを殺菌し、場合により生物組織を架橋するために十分であると思われる。一部の好ましい実施形態では、生物組織と補助剤とを結合し、中間体を形成し、その後凍結させて、凍結乾燥させる。得られた凍結乾燥中間体をその後殺菌剤、場合により殺菌促進剤及び／又は浸透促進剤（結合剤を伴い、又は好ましくは伴わないで）と接触させる。一部の実施形態では、生物組織を凍結し、凍結乾燥する。凍結乾燥した中間体をその後、補助分子及び殺菌剤、並びに場合により殺菌促進剤、浸透促進剤及び／又は二官能性結合剤の群の 1 又はそれ以上のメンバーを含む溶液と接触させる。

【 0 1 1 9 】

一部の実施形態では、補助剤を殺菌前に生物組織に結合する。当該実施形態では、生物組織と補助剤とを結合溶液と接触させて、結合させる。結合溶液としては、結合剤（例えば水溶性カルボジイミド又は N H S など）があげられる。結合溶液はさらに、場合により結合促進剤（例えばスルホ - N H S など）があげられる。さらに結合溶液はまた、場合により二官能性結合剤（例えば低級アルカン、ジアミン、二価酸又はアミノ酸など）を含む。

【 0 1 2 0 】

本発明のバイオインプラントの使用

本発明のバイオインプラントは、術後の組織の治癒、リモデリング、成長及び／又は再生を促進することで、特に有利である。一部の実施形態では、バイオインプラントは、組織の治癒、リモデリング、成長及び／又は再生を直接促進する補助剤を、その表面に呈し、又は放出する。一部の実施形態では、バイオインプラントは、バイオインプラントの周辺の 1 又はそれ以上の微生物の生物活性を阻害することによって、組織の治癒、リモデリング、成長及び／又は再生を間接的に促進する補助剤を、その表面に呈し、又は放出し、その結果 1 又はそれ以上の微生物による干渉をなくして、又は軽減して、受容者の身体を、治癒、リモデリング、成長又は再生可能にする。

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態では、バイオインプラントは術後の組織の治癒、リモデリング、成長及び／又は再生を、活性成長因子等の 1 又はそれ以上のタンパク質（組織の治癒、リモデリング、成長及び／又は再生を促進する、バイオインプラントの宿主分子又は細胞を取り入れる）をその表面に呈する、又は放出することによって、直接促進する。特定の実施形態では、バイオインプラントは T G F - 、 P D G F 、 F G F 、 I G F 、 C D G F 又は B M P をその表面に呈し、又は放出し、これらは、受容者で組織の治癒、リモデリング、成長又は再生をもたらす 1 又はそれ以上の分子又は細胞を、バイオインプラントの部位に取り入れることにより、組織の治癒、リモデリング、成長及び／又は再生を促進する。

【 0 1 2 2 】

一部の実施形態では、バイオインプラントは、そうしなければ組織の治癒、リモデリング、成長及び／又は再生に干渉するであろう、1 又はそれ以上の微生物に干渉することによって、術後の組織の治癒を間接的に促進する。バイオインプラントはしたがって、少なくとも 1 種の微生物（例えば黄色ブドウ球菌など）で微生物活性に干渉する、1 又はそれ以上の補助剤をその表面に呈する、又はバイオインプラントの周囲に放出する。特定の実施形態では、当該補助剤は、D N A 、 R N A 、抗生物質若しくは静菌効果又は殺菌効果をバイオインプラントの周辺の少なくとも 1 種の細菌に発揮するペプチドを含む。一部の実施形態では、当該補助剤としては、D N A 、 R N A 若しくはウィルスのライフサイクルの 1 つ又は複数の段階に干渉し、その結果ウィルスに対して抗ウィルス効果を発揮するペプ

チドがあげられる。

【0123】

特定の実施形態では、バイオインプラントは補助分子をその表面に呈し、その結果呈された補助分子は、その組織の治癒、リモデリング、成長又は再生の活性を提供する。一部のそのような実施形態では、このように呈された補助剤は成長因子であり、これらは1又はそれ以上のバイオインプラントの受容者の分子又は細胞を、例えば当該分子を結合する、又は当該細胞上の受容体に結合することによってバイオインプラント部位に取り込む。他のそのような実施形態では、このように呈された補助剤は、その組織の治癒、リモデリング、成長又は再生の活性を、細菌細胞でアポトーシス又は細胞溶解の誘導に関連する、細菌細胞表面上の受容体に相互に作用にすることによって発揮する。

【0124】

他の特定の実施形態では、バイオインプラントは、補助剤と生物組織とを結合している1つ又は複数の共有結合を、例えば加水分解により（酵素が仲介して、又は酵素は仲介せずに）切断することによって、補助分子をバイオインプラントの周辺に放出する。こうして切断された共有結合は、補助分子と生物組織とを結合するために使用される結合剤次第で、アミド、エステル無水物又は尿素の結合であってよい。特定の実施形態では、結合剤はジアミンであり、共有結合はアミド結合であり、加水分解により切断され遊離のアミン鎖とカルボキシル基を形成する。

【0125】

本発明のバイオインプラントは、様々な外科的手法で有用である。一部の実施形態では、バイオインプラントは、縫合、外科創傷の閉鎖若しくは腱、靱帯、皮膚等の修復又は交換等の修復を増大するために使用できる軟組織である。一部の実施形態では、バイオインプラントは、血管又は動脈弁の閉塞（狭窄）若しくは他の弁の機能不全の緩和に有用な心臓弁である。一部の実施形態では、バイオインプラントは、骨の修復、生体移植（*biointplantation*）（例えば、股関節、膝関節又は他の関節の移植）又は脊椎固定手術で有用な、部分的又は完全に脱塩された骨又は骨片である。当業者であれば、他の生体移植法が本発明に包含され、関連のある外科分野の技術者の十分技術内であることを理解するであろう。

【0126】

調製方法

以下の項で、生物組織の殺菌、補助分子の生物組織への結合及び任意選択の組織架橋の手法をより詳細に記載する。

【0127】

生物組織の架橋

本発明のバイオインプラントとしては、天然源由来の生物組織があげられる。複合コンポジットの場合、さらに、非天然源由来の他の材料があげられる。一部の実施形態では、使用する組織型としては、真皮、心膜、腱、靱帯、筋膜及び再構築したコラーゲンの足場並びに骨片及び脱塩した骨があげられる。一部の実施形態では、軟組織としては、複数の要素（例えば生細胞とコラーゲンなど）があげられる。コラーゲンは、軟組織に構造完全性を提供する基質を形成する、線維状タンパク性生体高分子（足場）である。コラーゲンはまた、軟骨及び骨の線維状タンパク質構成要素である。軟組織は脱細胞化でき、主にコラーゲンで構成された脱細胞化した足場を提供できる。石灰化組織（骨）は、脱塩でき、場合により脱細胞化したコラーゲンの足場を提供できる。いずれの場合も、コラーゲン及び軟組織の他のタンパク質は、他の官能基と結合を形成する反応を引き起こすことができる多数の官能基を有する。

【0128】

天然発生生物組織（例えば、ヒト、ブタ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ネズミ、イヌ、ネコ又は他の供給源から取り出した組織）を含むバイオインプラントは、天然状態のままでは一般的に不安定である。体内の生活環境から取り出されると、当該組織は安定化させなければすぐに分解されるであろう。生物組織内に天然に発生する微生物若しくは摘出後に生物

組織に出没した微生物は、生物組織を食物としてすぐに破壊し始めるであろう。さらに、組織の、特にバイオインプラントを囲む間質液に曝された組織部分の天然発生抗原は、受容者の体の免疫系の構成要素を引きつけ、組織を徐々に破壊し、最終的には組織の拒絶反応を引き起こす。また、未処理（新鮮な）生物組織の表面にあるタンパク質は容易に変性し、受容者の体内で徐々に腐敗を引き起こし得る。脱細胞化していない軟組織で、組織内の細胞は、溶解（細胞膜の破裂）されることがあり、その結果組織の構造完全性は乱れ、様々な抗原がバイオインプラント表面に対して曝される可能性がある。したがって、本発明のバイオインプラントの調製過程の間、生物組織を殺菌することが望ましい。当該殺菌により、生物材料に伴う微生物は殺され、一部の実施形態では抗原部位は隠され、バイオインプラントの構造完全性が提供される、及び／又はバイオインプラントはその天然形態を維持する。

【0129】

本発明の実施形態では、バイオインプラントはヒト又は動物の全体又は部分に由来する臓器又は組織であり若しくは他の有機組織から作製され、単独又はバイオプロテゼの一部としてのいずれかで、ヒト又は動物に移植される。したがって、バイオインプラントとしては一般に、心臓、心臓弁及び他の心臓構成要素、心膜、血管移植片、尿道及び膀胱構成要素、腱、腸並びに皮膚、コラーゲン等の一般的軟組織があげられる。特定の実施形態は、バイオインプラントは脱細胞化コラーゲン基質、精製コラーゲン基質及び精製コラーゲン基質があげられる。一部の実施形態では、バイオインプラントは、異種移植片、同種移植片又は自家移植片であり得る。一部の実施形態では、バイオインプラントとしてはまた、骨組織、特に骨片及び脱塩した骨組織があげられる。バイオインプラントは、限定するものではないが、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ及び場合によりヒトの組織をも含む、天然組織から非常に頻繁に製造されるであろうが、当分野の普通の技術者に周知の他の天然材料も使用できる。当該追加の材料としては、ヒドロゲル（例えば、ヒアルロン酸ヒドロゲル）、アルギネート及びキトサンがあげられる。

【0130】

本明細書で使用する「架橋」という用語は、組織内、すなわち組織の分子内及び／又は分子間（特にタンパク質）の様々な長さの結合の形成を指し、当該結合は（a）組織の2つの反応性部分間、したがって組織の分子内及び分子間の短い共有結合の形成若しくは（b）組織の反応性部分と二官能性架橋剤との共有結合、のいずれかの結合形成により得られる。架橋及び「結合」は、異なる事象であるが（前者は生物組織内で結合を形成し、後者は生物組織と補助分子との間で結合を形成する）、本明細書でより詳細に述べるように、多くの場合架橋と結合は同一処理ステップで実施することができる。

【0131】

本明細書で使用する「架橋剤」という用語は、生物組織で2つ以上の官能基と反応できる二官能性試薬を表す。二官能性試薬は、生物組織で反応基と反応できる官能基を有少なくとも2個有する試薬である。当該官能基としては、アミン、酸又はヒドロキシル及びチオール（スルフヒドリル基）があげられる。したがって、二官能性試薬としては、ジアミン、二価酸又は -、 -、 -、 -、 - 又はより位置の高いアミノ酸若しくは無水物（例えば無水コハク酸）等の他の二官能性薬剤があげられる。二官能性試薬は、生物組織で反応基と反応するために選択される。当該反応基としては、アミン（例えばN-末端アミン及び一般的にどこにでもあるリジン基）、他のNH₂基（アルギニン残基のグアニニル基上のものなど）、遊離のカルボキシル基（例えば、C-末端並びにアスパラギン酸及びグルタミン酸の基にあるもの）、ヒドロキシル基（例えばセリン、スレオニン及びチロシンに見出されるもの）、及びチオール（例えばシステイン残基に見出されるもの）があげられる。したがって、一部の実施形態では、架橋はアミド（生物組織で二官能性試薬アミンとカルボキシル基との間に形成される、又は二官能性試薬酸又は無水物とタンパク質アミンとの間に形成される）等の共有結合を含む。一部の実施形態では、架橋としてはエステル（二官能性試薬のカルボキシル基とタンパク質のヒドロキシル基の間に形成されるもの、又は二官能性試薬のヒドロキシル基とタンパク質のカルボキシル基との間に形成

されるものなど)があげられる。さらなる実施形態では、架橋としては、例えば二官能性試薬のチオールとタンパク質のシステインとの間の、ジスルフィド結合があげられる。本明細書により詳細に記載のように、場合によりカップリング促進剤を併用してカップリング剤を使用する、本明細書記載の方法を使用して容易に形成できるので、形成可能な結合型のうち、アミドは特に有利である。

【0132】

一部の実施形態では、架橋剤は、4から12個の炭素原子を有する、直鎖又は分岐型の化合物である。一部の実施形態では、架橋剤は、反応性官能基が炭素環上にある、又は炭素環に人工的な介在炭素鎖によって結合している、炭素環式化合物である。一部の実施形態では、反応性官能基は、アミン、ヒドロキシル基、カルボン酸、無水物、酸塩化物、チオールなどを含み得る。特定の実施形態では、架橋剤は、 $C_4 \sim C_{12}$ のアルカンジアミン、アルケンジアミン、アルキンジアミンアルカン、アミノアルカン酸、アミノアルケン酸又はアミノアルキン酸である。具体的な実施例で、架橋剤は、1,6-ジアミノヘキサン、1,7-ジアミノヘプタン、コハク酸(C_4)、グルタル酸(C_5)、アジピン酸(C_6)又はピメリン酸(C_7)若しくは無水コハク酸、無水グルタル酸、無水アジピン酸又は無水ピメリン酸から選択される無水物の1つである。他の特定の実施形態では、架橋剤は、2,4,6-トリアミノベンゼン、1,4-ジアミノベンゼン、o-フタル酸、p-フタル酸、4-アミノ安息香酸及び無水フタル酸である。一部の実施形態では、新鮮な組織に確実に十分浸透するように、分子量約190以下及び約150以下のジアミノ又はトリアミノ架橋剤を用いた。特定の実施形態では、架橋剤は、各末端に位置する1つの反応性アミンを有する、長さが炭素原子6~8個の直鎖である。架橋剤はその長さに沿って任意に置換してよく、具体的な実施形態では、反応性アミン、例えば各先端にアミンを有する直鎖アルカンのみで置換した炭化水素である。例示的な架橋剤は、1,6-ヘキサジアミン及び1,7-ヘプタンジアミンである。

【0133】

本明細書で使用する「カップリング剤」及び「カップリング促進剤」という用語は、結合、特にバイオインプラント組織内のタンパク質と架橋剤との間又はタンパク質の官能基と(例えば、アミン又はカルボキシル)と架橋剤との間のアミド結合の形成をそれぞれ促進する及び増強する試薬を指す。これらの結合は、組織の反応性アミンと反応性カルボキシル($COOH$ 又は COO^-)との間(したがって2つの当該近接した反応基を結合する)、又は架橋剤の反応性アミン又はカルボキシルと、組織内の反応性カルボキシル又はアミンとの間に形成され得る。ペプチド合成及び関連分野の技術者は、当該試薬、例えばカルボジイミド及びスクシイミド、特にこれらの水溶性種を熟知していると思われる。

【0134】

一部の実施形態では、架橋反応は、カップリング剤の使用により容易である。一部のより特定の実施形態では、カップリング剤は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)であるが、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)等の他の適当なカップリング剤もまた使用できる。特定の実施形態では、カップリング剤は、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(スルホ-NHS)のようなカップリング促進剤と併用して使用されるが、1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール(HOBt)及びジメチルアミノピリジン(DMAP)等の他の適当なカップリング促進剤もまた使用できる。カップリング剤の濃度及びカップリング促進剤の濃度は変更可能である。しかし、適当な濃度は当業者により容易に決定できる。一部の実施形態では、カップリング剤は約10 mMから500 mMの濃度内で、100 mM以下の濃度で、特に約20 mMから50 mMの間の濃度で使用する。一部の実施形態では、カップリング促進剤は0.5 mMから約50 mMの間の濃度、特に約10 mM以下の濃度で用いる。

【0135】

本発明の一部の実施形態では、架橋剤、カップリング剤及びカップリング促進剤並びにそれらの反応産物は水溶性である。特定の実施形態では、選択された架橋剤、カップリング剤及びカップリング促進剤は組織の架橋を最適化し、一方架橋過程における生物組織の

損傷、及び移植後の毒性、炎症、石灰化等の危険性を最小にする。特定の実施形態では、架橋に使用する全溶液を、例えば $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 以下のフィルターを通して使用前に濾過し、微生物の汚染を取り除き、その結果架橋及び / 又は殺菌における組織の汚染の危険性を軽減する。

【0136】

生物組織の架橋のための反応条件は、用いる架橋剤、カップリング剤及び促進剤により、変更できる。一般的に、架橋過程は当分野の普通の技術者に周知のバッファーの中から選択された水性バッファーで、最も有効な架橋反応を提供し、一方石灰化の危険性を最小化するように実施する。適当なバッファーの例は、限定するものではないが、N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N' - エタンスルホン酸 (HEPES) 及び 3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS) などがあげられる。

【0137】

バッファー溶液の pH 及び濃度は、用いる架橋剤、カップリング剤及び促進剤により、再度変更できる。バッファーの濃度及び pH は最も有効な架橋反応を提供し、一方生物組織に最も害が少ないように選択する。例えばカップリング剤として EDC、カップリング促進剤としてスルホ - NH S を用いた場合、処理溶液の pH は約 6.0 から約 7.4 に維持する。反応温度は、約 40 から 0、例えば約 21 から 25 であってよい。本発明の実施形態では使用するための許容し得る pH バッファーとしては、通称 HEPES、TRIS 及び MOPS の pH バッファーがあげられる。

【0138】

一般的に、本発明により架橋した、新鮮な、又は補助剤が結合した生物組織を、氷冷した 0.85% の生理食塩水又はいくつかの他の適当な溶液で数回すすぐことができるまで氷上に保存する。一般に、当該洗浄及びすすぎは、新鮮な生物組織をドナーの動物から摘出後すぐに、又はその後 48 時間以内に実施する。補助剤に結合した生物組織の場合、補助剤を生物組織に結合した後、組織を直ちに架橋するならば、すすぎのステップは省いてもよい。さらに保存時間が必要な場合、すすいだ組織は、適当なバッファーで、約 4 程度の低温で、24 時間未満なら保存できる。

【0139】

一部の実施形態では、ジアミン架橋剤の濃度は、約 80 から約 135 ミリモル、約 90 から 130 ミリモル、約 95 から 125 ミリモル、又は約 100 から 125 ミリモルである。特定の実施形態では、ジアミン架橋剤は炭素原子 12 個以下、例えば炭素原子 4 から 8 個の炭素鎖長を有する。具体的な実施形態では、架橋剤は、それぞれの末端にアミン基を有する直鎖アルカン、特に 1, 6 - ヘキサンジアミンである。生物組織の処理は、組織を、カップリング剤、カップリング促進剤及び架橋ジアミンを含む溶液、特に水溶液と接触させるステップにより実施する。カップリング剤の EDC 及びカップリング促進剤のスルホ - NH S の濃度は、あらかじめ述べたように、例えば EDC が約 10 mM から約 100 mM、スルホ - NH S は約 0.5 mM から約 10 mM である。

【0140】

補助分子の生物組織への結合

上記のように、本発明のバイオインプラントは、真皮、心膜、腱、靱帯、筋膜等の天然発生的生物組織並びに精製コラーゲン、再構築したコラーゲン及び可溶化コラーゲン等のコラーゲン並びに骨片及び脱塩した骨から製造する。本発明の範囲内で企図される全組織は、1 又はそれ以上のタンパク質、例えばコラーゲンを有する。脱細胞化をしていない組織としてはさらに、様々な細胞表面タンパク質、例えば受容体、イオンチャネル及び様々な試薬との反応を引き起こし、共有結合を形成できる多くの官能基を有する他のタンパク質を有する生細胞等の他の構成要素があげられる。

【0141】

様々な補助分子はまた、試薬との反応を引き起こし、共有結合を形成できる 1 又はそれ以上の官能基を有する。例示的補助分子としては、タンパク質、低分子ペプチド、リボ核酸、デオキシリボ核酸、多糖類、グリコサミノグリカン (GAG) 及び抗生物質があげら

れる。補助分子のこれらの種類のそれぞれは、補助分子と生物組織のタンパク質との間に分子間共有結合 (attachment) (結合 (conjugation)) を形成できる、少なくとも1種の反応基を有するメンバーを保有する。当該反応基としては、カルボキシル基、スルホン酸、アミン、尿素、カルバミン酸、グアニジル、チオール (スルフィドリル) 及びヒドロキシルの各基があげられる。これらの反応基のうち、本発明のバイオインプラントの調製のために最も好ましいものは、タンパク質又は二官能性架橋剤上に不安定なアミド基と、カルボキシル基とをインビボで形成するために使用できるので、カルボキシル基及びアミン基であると考えられる。

【0142】

特定の型の官能基が、当分野で公知の方法によって異なる型に変換できることは理解されるであろう。例えば、アミン基はアミンを、例えば二価酸又は二価酸無水物と反応させてカルボキシル基に変換できる。アミンと二価酸の1個のカルボキシル基との反応、又は二価酸無水物の、無水物の開環により、試薬分子とアミンの間に形成されるアミド結合並びに別の試薬との反応を引き起こし得る遊離酸基がもたらされる。別の例として、システイン基は、チオールアルカン酸をシステイン基にカップリングさせて、その結果補助分子と試薬の間にジスルフィド架橋を形成し、同時に補助分子上に官能基としての酸基を提供することによってカルボン酸反応部位に変換できる。一部の実施形態では、補助分子は、遊離の酸を作製するためのエステル結合の加水分解により解放され得る、酸のエステルである官能基を有することができ、これらはその後アミン結合剤を介して結合できる。この取り組みは、遊離の酸がインビボで活性代謝産物に相当する場合に特に有用である。したがって、本明細書で使用する場合、「補助分子」という用語は、特に移植後の補助分子の放出が、インビボで試薬と補助剤によって形成される結合の切断、その結果の活性分子の放出によってもたらされる場合、当該誘導体化された分子を含む。

【0143】

一般的に、結合は少なくとも1種の結合剤を用いて補助剤と接触することを必要とする。当該結合剤は、以下のうちの1種又は複数を含む：架橋剤、カップリング剤及び/又はカップリング促進剤。一部の実施形態では、結合剤としては、架橋剤のみがあげられる。他の好ましい実施形態では、結合剤としては、カップリング剤 (EDC など) があげられる。さらに好ましい実施形態では、結合剤としてはカップリング剤 (EDC など) 及びカップリング促進剤 (NHS 又はスルホ-NHS など) があげられる。一部の実施形態では、結合剤は、カップリング剤及びカップリング促進剤を含むが、架橋剤は含まない。一部の実施形態では、結合剤としては、カップリング剤、カップリング促進剤及び架橋剤があげられる。一部の実施形態では、架橋剤、カップリング剤及びカップリング促進剤は、生物組織の架橋に関する上記のものと同じである。

【0144】

一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤と、場合によりカップリング促進剤を含む。一部の特に好ましい実施形態では、カップリング剤はEDC等のカルボジイミドである。一部の特に好ましい実施形態では、カップリング促進剤は、NHS 又はスルホ-NHS である。カップリング剤及びカップリング促進剤は、上にさらに詳細に記載している。カップリング剤単独の使用又はカップリング促進剤と併用した使用により、補助分子と生物組織のタンパク質の間に直接アミド結合がもたらされる。

【0145】

当業者は、補助剤と生物組織をカップリングするための、本明細書中に開示したカップリング剤及びカップリング促進剤が、一部の実施形態では上記のように殺菌剤及び殺菌促進剤とそれぞれ同一であることを認識するであろう。当業者は、好ましい実施形態が、殺菌と結合を、殺菌剤をカップリング剤として、場合により殺菌促進剤をカップリング促進剤として使用して、同一ステップで伴うことを認識するであろう。一部の好ましい実施形態では、その後、上記のように浸透促進剤の存在下でさらにカップリングを実施する。一部の実施形態では、組織と補助剤とを結合し、その後殺菌剤並びに場合により殺菌促進剤及び/又は浸透促進剤を含む殺菌溶液と接触させる。特定の好ましい実施形態では、組織

と補助剤を結合し、凍結し、凍結乾燥し、その後前記殺菌溶液と接触させる。他の好ましい実施形態では、組織を、補助分子及び殺菌剤並びに場合により殺菌促進剤及び／又は浸透促進剤を含む殺菌溶液と接触させる。特定の好ましい実施形態では、組織をまず凍結し、凍結乾燥し、その後補助分子及び殺菌剤並びに場合により殺菌促進剤及び／又は浸透促進剤を含む殺菌溶液と接触させる。

【0146】

一部の実施形態では、架橋剤を使用する。当該場合、架橋剤の少なくとも1個の官能基は、補助分子の官能基と共有結合を形成できる。他の少なくとも1個の官能基は、生物組織のタンパク質の官能基と共有結合を形成できる。当該場合、補助分子の活性基は架橋剤の官能基と共有結合を容易に形成できる基である。補助分子に見出すことのできる例示的な活性基としては、カルボキシル基、スルホン酸、アミン、グアニン、尿素、カルバミン酸、アミド、イミド及びチオール（例えば、成長因子タンパク質等のタンパク質のシステイン基）があげられる。特に適当な活性基は、カルボキシル基及びアミンがあげられる。

【0147】

一部の実施形態では、適当な架橋剤の反応基としては、補助剤の少なくとも1個のカルボキシル基とアミド結合又はエステル結合を形成する官能基があげられる。当該官能基としては、アミン及びヒドロキシルがあげられる。一部の実施形態では、適当な結合剤の官能基としては、補助分子の少なくとも1個のアミン又はヒドロキシルとアミド結合又はエステル結合を形成する官能基があげられる。当該官能基としては、カルボキシル基及び酸無水物があげられる。

【0148】

生物組織で補助剤をタンパク質に結合するために使用できるいくつかの架橋剤としては、ホモ二官能性、水溶性試薬：ビス-（スルホスクシンイミジル）スベラート、ジスルホスクシンイミジルトルトレート及びエチレングリコール-ビス-（スルホスクシンイミジルスクシネート）があげられる。他の結合剤としては、ヘテロ二官能性、水溶性試薬：N-スルホスクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート、スルホスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホスクシンイミジル-4-（p-マレイミドフェニル）ブチレート、3-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステルがあげられる。水溶性試薬は非水溶性試薬より優れると思われるが、ビス-（スクシンイミジルスクシネート）等の非水溶性、二官能性架橋剤もまた使用できる。言及できる他の架橋剤としては、ジメチル-3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート、ジメチル-4,4'-ジチオビスブチルイミデート及びジメチル-6,6'-ジチオビスカプロイミデート（dimethyl-6,6'-dithiobiscaproimide）があげられる。

【0149】

いくつかの特に適当な二官能性架橋剤としては、ジアミン、二価酸及びアミノ酸、具体的には官能基との間に4から12個の炭素を有するジアミン、二価酸及びアミノ酸があげられる。ジアミン、二価酸又はアミノ酸を結合剤として使用する場合、本明細書中により詳細に記載のように、カップリング剤（カルボジイミド又は環状イミドなど）及び／又はカップリング促進剤（環状イミド、HOBt又はDMAPなど）の使用は有利である。

【0150】

タンパク質の生物組織への結合

本発明の範囲内であると考えられるタンパク質としては、成長因子及びプロテオグリカンがあげられる。タンパク質は、組換えタンパク質又は天然に発現する元の組織から単離されたタンパク質であってよい。本発明の範囲内であると考えられる成長因子としては、形質転換成長因子-、血小板由来成長因子、線維芽細胞成長因子、インスリン様成長因子、軟骨由来成長因子及び骨形成タンパク質等の骨成長因子があげられる。本発明の範囲内であると考えられるいくつかの骨形成タンパク質としては、骨形成タンパク質-1、骨形成タンパク質-2、骨形成タンパク質-4及び骨形成タンパク質-7があげられる。本

発明の範囲内であると考えられる例示的プロテオグリカンとしては、グリコサミノグリカンがあげられる。上記タンパク質はそれぞれ、N末端、C末端及び/又は補助タンパク質と生物組織内のタンパク質との間に分子間結合をもたらす反応を、カップリング剤を用いて引き起こすことができる側鎖官能基を有する、1又はそれ以上のアミノ酸をその一次構造内に有する。特定の実施形態では、本発明の範囲内のタンパク質は、補助タンパク質と生物タンパク質に属するタンパク質との間の分子間結合を形成するための試薬を用いた反応を引き起こせる、少なくとも1つの側鎖カルボキシル基（例えばアスパルギン酸又はグルタミン酸の側鎖）又はアミン（例えばアルギニン又はリジンの側鎖）を有する。一部の好ましい実施形態では、結合剤はカップリング剤及び場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これは、補助タンパク質と生物組織との間に直接結合をもたらす。他の実施形態では、結合剤としては、ジアミンがあげられる。他の実施形態では、結合剤はジアミンを含み、EDC等のカップリング剤の存在下で、場合によりスルホ-NHS又はNHS等のカップリング促進剤の存在下で、タンパク質にカップリングする。一部のそのような実施形態では、結合剤は、-アミノ酸、-アミノ酸、-アミノ酸、-アミノ酸等のアミノ酸若しくは-アミノ酢酸、-アミノ酪酸、-アミノ吉草酸又は-アミノカプロン酸等のより順位の高いアミノ酸である。生物組織を補助タンパク質と接触させると、アミノ酸結合剤及びEDC等のカップリング剤、場合によりNHS等のカップリング促進剤の存在下で、補助タンパク質とアミノ酸の間及びアミノ酸と生物組織のタンパク質との間に形成されたアミド結合を介した、補助タンパク質と生物組織内のタンパク質とを結合させる。

【0151】

低分子ペプチドの生物組織への結合

本発明はさらに、低分子ペプチドが生物組織に結合したバイオインプラントの製造方法を提供する。一部の実施形態では、低分子ペプチドは、成長タンパク質の結合ドメイン若しくは組織の治癒、リモデリング、成長又は再生を促進する所望の特性を有するプロテオグリカンの一部である。組織の治癒、リモデリング、成長又は再生を促進する所望の特性を有する他の低分子ペプチドは公知であり、本発明の範囲内に企図される。一般的に、低分子ペプチドの生物組織への結合は、タンパク質の生物組織への結合と完全に類似している。一部の特定の実施形態では、ペプチドは遊離のカルボキシル基（例えばC末端カルボキシル基又はアスパラギン酸又はグルタミン酸の側鎖等の側鎖カルボキシル基）、遊離のアミノ基（N末端のNH₂又はリジンの側鎖アミンなど）、システイン側鎖若しくはペプチドと生物組織内の1個又は複数のタンパク質との間の結合を形成しやすい他の反応性官能基を有する。一部の例示的实施形態では、補助分子は少なくとも1個の遊離のアミノ基（例えばN末端のNH₂基、アルギニンのグアニジニル基又はリジンの側鎖NH₂基）を有するペプチドであり、これらは、-アミノ酸、-アミノ酸、-アミノ酸、-アミノ酸、-アミノ酸の存在下で若しくは-アミノ酢酸、-アミノ酪酸、-アミノ吉草酸又は-アミノカプロン酸等のより順位の高いアミノ酸の存在下で、EDC等のカップリング剤の存在下で、場合によりNHS等のカップリング促進剤の存在下で、新鮮な、又は架橋した生物組織と接触する。他の例示的实施形態では、ペプチドは少なくとも1個の遊離のカルボキシル基（例えばC末端若しくはアスパラギン酸又はグルタミン酸の側鎖カルボキシル）を有し、結合剤はジアミン（例えば1,5-ペンタンジアミン、1,6-ヘキサンジアミン、又は1,7-ヘプタンジアミン）である。当該場合、生物組織を補助ペプチド、ジアミン及びEDC等のカップリング促進剤と、場合によりさらにスルホ-NHS又はNHS等のカップリング促進剤の存在下で接触させる。

【0152】

適当なアミンを担持する補助剤としては、タンパク質及びペプチド並びに特定の抗生物質があげられる。利用可能なアミノ基を有すると言える特定のタンパク質は、形質転換成長因子-(TGF-)、血小板由来成長因子(PDGF)、インスリン様成長因子(IGF)、軟骨由来成長因子(CDGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)並びに骨形成タンパク質(bone morphogenic protein)(BMP)、特にB

MP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7、同様に骨形成タンパク質 - 1 (osteogenic protein - 1) 等の骨成長因子 (BGF) である。

【0153】

本発明の範囲内の特定のアミンを担持するペプチドは、マゲイニン (例えば、マゲイニン I 及びマゲイニン II) を含み、これらはそれらのペプチド鎖にいくつかのリジン残基を有する。

【0154】

一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び / 又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助ペプチドと生物組織との間に直接結合がもたらされる。他の実施形態では、結合剤としてはジアミンがあげられる。これにより、ペプチドと生物組織との間に間接的な共有結合ができる。

【0155】

核酸の生物組織への結合

本発明の一部の実施形態では、補助分子は、リボ核酸、デオキシリボ核酸又は核酸模倣体等の核酸である。当該核酸は、公知の方法、例えば 1 つの末端にホスホロアミダイト官能性を、他方の末端にアミン等のタンパク質反応官能性を有する試薬を使用するホスホロアミダイト法などを介してタンパク質に結合できる。ホスホロアミダイトは核酸の遊離ヒドロキシル基 (5' - OH、3' - OH など)、例えばテトラゾール又はジシアノチミダゾール (dicyanotimidazole) 等の触媒の存在下で反応し、亜リン酸中間体を形成し、これをその後、酸素、硫黄若しくは過酸化水素又はフェニルアセチルジスルフィド等の酸素試薬又は硫黄試薬を用いて酸化し、試薬分子と核酸との間にリン酸結合を形成する。この誘導体はその後タンパク質とカップリングすることができる。例えば、アミノアルキルホスホロアミダイトを使用する場合、リン酸結合を形成した後、アミノ基は遊離であり、タンパク質表面の反応性カルボキシル基と反応する。アミン基とカルボキシル基とのカップリングは、上の架橋の項に記載したように、カップリング剤及び場合によりカップリング促進剤の存在下でもたらされ得る。特定の実施形態では、カップリング剤は EDC 等のカルボジイミドであり、カップリング促進剤はスルホ - NHS 又は NHS である。

【0156】

抗生物質の生物組織への結合

本発明はさらに、結合した補助剤が抗生物質である、補助剤が結合したバイオインプラントを提供する方法を提供する。タンパク質の場合、適当な抗生物質は遊離のアミン、カルボキシル又は他の官能基を有するもの、並びに遊離カルボキシル及び / 又は遊離アミン活性代謝産物のエステル又はアミドのプロドラッグであると考えられるものである。後者は結合の前に脱エステル化又は脱アミド化しなければならない。適当なアミン官能基は、結合剤の適当な官能基とアミド結合又はスルホンアミド結合を形成するために利用可能な、少なくとも 1 個の - NH₂ 又は - NH₃⁺ 基を有する。当業者は、様々な官能基が、アミン (- NH₂ 又は - NH₃⁺)、アミド (- CONH₂)、スルホンアミド (- SO₂NH₂)、尿素 (- NHCONH₂)、チオ尿素 (- NHCSNH₂)、カルバミン酸 (- OCONH₂)、グアニジン (- N - (C = NH) - NH₂) などを含み、- NH₂ 及び / 又は - NH₃⁺ 官能基などを有することを認識するであろう。一部の例示的实施形態では、補助分子は、少なくとも 1 個の遊離アミン基 (例えば N 末端の NH₂ 基、又はリジンの側鎖 NH₂ 基) を有する抗生物質であり、これらは、- アミノ酸、- アミノ酸、- アミノ酸、- アミノ酸の存在下で若しくは- アミノ酢酸、- アミノ酪酸、- アミノ吉草酸又は- アミノカプロン酸等のより順位の高いアミノ酸の存在下で、EDC 等のカップリング剤の存在下で、場合により NHS 等のカップリング促進剤の存在下で、新鮮な、又は架橋した生物組織と接触する。他の例示的实施形態では、抗生物質は少なくとも 1 個の遊離のカルボキシル基 (例えば C 末端若しくはアスパラギン酸又はグルタミン酸の側鎖カルボキシル) 又は亜硫酸基 (- SO₃H) を有し、結合剤はジアミン (例えば 1, 5 - ペンタンジアミン、1, 6 - ヘキサンジアミン、又は 1, 7 - ヘ

ブタンジアミン)である。当該場合、生物組織を、補助抗生物質、ジアミン及びEDC等のカップリング促進剤と、場合によりさらにNH₂S等のカップリング促進剤の存在下で接触させる。さらなる実施形態では、抗生物質は、コハク酸、無水コハク酸又は5-アミノペンチルスルホン-1-酸等の適当な架橋剤を用いて、エステル結合又はホスホジエステル結合を形成できる、少なくとも1個の遊離の-OH基を有する。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助抗生物質と生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0157】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基(例えば-NH₂又は-NH₃⁺)を有するアミノグリコシドとしては、アミカシン、アブラマイシン、アルベカシン、バンベルマイシン、ブチロシン、ジベカシン、ジヒドロストレプトマイシン、フォルチマイシン、ゲンタマイシン、イセパマイシン、カナマイシン(A、B又はC)、ミクロノマイシン、ネオマイシン(A、B又はC)、ネチルマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、シソマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン及びトロスペクトマイシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助アミノグリコシドと生物組織が直接共有結合する。

【0158】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基(例えば-NH₂又は-NH₃⁺)を有するβ-ラクタム抗生物質としては、抗生物質ファミリーのメンバー:セファロsporin、セファマイシン、モノバクタム、ペニシリン及びリタペネム(ritapenem)があげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤はカップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助β-ラクタムと生物組織が直接共有結合する。

【0159】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基(例えば-NH₂又は-NH₃⁺)を有するセファロsporinとしては、セファクロール、セファドロキシル、セファトリジン、セフカペンピボキシル、セフクリジン、セフジニル、セフジトレン、セフェピム、セフェタメット、セフィキシム、セフメノキシム、セフォジジム、セフォラニド、セフォタキシム、セフォチアム、セフォゾبران、セフピロム、セフポドキシム、プロキセチル、セフプロジル、セフロキサジン、セフソルジン、セフトアジジム、セフテラム、セフチブテン、セフチオフル、セフトリアキソン、セフロキシム、セフゾナム、セファレキシン、セファログリシン、セファロsporin C、セファマイシン、セファラジン及びピブセファレキシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助セファロsporinと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0160】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基(例えば-NH₂又は-NH₃⁺)を有するセファマイシンとしては、セフォテタン及びセフォキシチンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助セファマイシンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0161】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基(例えば-NH₂又は-NH₃⁺)を有するモノバクタムとしては、アズトレオナム、カルモナム及びチゲモナムがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤はカッ

ブリッジ剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助モノバクタムと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0162】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基（例えば $-NH_2$ 又は $-NH_3^+$ ）を有するペニシリンとしては、アモキシシリン、アンピシリン、アスポキシシリン、バカンピシリン、シクラシリン、エピシリン、レナンピシリン、ペニシリンN、ピバンピシリン、スルタミシリン及び、タランピシリンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助ペニシリンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0163】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基（例えば $-NH_2$ 又は $-NH_3^+$ ）を有するマクロライドとしては、プリマイシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助マクロライドと生物組織との間に直接共有結合がおこる。

【0164】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基（例えば $-NH_2$ 又は $-NH_3^+$ ）を有するポリペプチドとしては、バシトラシン、カプレオマイシン、コリスチン、エンドウラシジン（*enduracidin*）、エンピオマイシン、ポリミキシン、リストセチン、テイコプラニン、チオストレプトン、ツベラクチノマイシン、チロシジン及びバンコマイシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助ポリペプチドと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0165】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基（例えば $-NH_2$ 又は $-NH_3^+$ ）を有するテトラサイクリンとしては、クロルテトラサイクリン、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、グアメサイクリン、ライムサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、サンサイクリン及びテトラサイクリンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助テトラサイクリンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0166】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基（例えば $-NH_2$ 又は $-NH_3^+$ ）を有する2,4-ジアミノピリミジン類としては、プロジモプリムがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助2,4-ジアミノピリミジン類と生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0167】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基（例えば $-NH_2$ 又は $-NH_3^+$ ）を有するキノロン類及びキノロン類似体補助剤としては、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、エノキサシン、グレバフロキサシン、ロメフロキサシン、ノルフロキサシン、ピペミド酸、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン及びトロバフロキサシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助キノロン類又はキノロン類似体と生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0168】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基（例えば $-NH_2$ 又は $-NH_3^+$ ）を有するスルホンアミドとしては、アセチルスルファメトキシピラジン、ベンジルスルファミド、クロラミン-B、クロラミン-T、 N^4 -D-グルコシルスルファニルアミド、マフェナイド、4'-（メチルスルファモイル）スルファニルアニリド、ノプリルスルファミド（noprilsulfamide）、スルファベンズアミド、スルファセタミド、スルファクロルピリダジン、スルファクリソイジン、スルファシチン（sulfacytine）、スルファジアジン、スルファジクラミド、スルファジメトキシ、スルファドキシ、スルファエチドール、スルファグアニジン、スルファグアノール、スルファレン、スルファメラジン、スルファメータ、スルファメサジン、スルファメチゾール、スルファメトミジン（sulfamethomidine）、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメトロール、スルファミドクリソイジン（sulfamidochrysoidine）、スルファモキサゾール、スルファニルアミド、4-スルファニルアミドサリチル酸、 N^4 -スルファニルスルファニルアミド、スルファニル尿素、N-スルファニル-3,4-キシラミド、スルファペリン、スルファフェナゾール、スルファプロキシリン、スルファピラジン、スルファピリジン、スルファキノキサリン、スルファソミゾール、スルファシマジ、スルファチアゾール、スルファチオ尿素、スルファトラミド、スルファザメット（sulfazame）、スルフィソミジン及びスルフィソキサゾールがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助スルホンアミドと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0169】

アミド結合又はスルホンアミド結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個のアミン基（例えば $-NH_2$ 又は $-NH_3^+$ ）を有するスルホンとしては、アセチルスルホン、アセトスルホンナトリウム、ダブソン、スクシスルホン、スルファニル酸、2-p-スルファニルアニリノエタノール、p-スルファニルベンジルアミン及びチアゾールスルホンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助スルホンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0170】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば $COOH$ 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するアミノグリコシドとしては、バンベルマイシンがあげられる。

【0171】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば $COOH$ 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するβ-ラクタムとしては、β-ラクタムファミリーのメンバー：カルバセフェム、カルバペネム、セファロsporin、セファマイシン、モノバクタム、オキサセフェム、ペニシリン、クラブラン酸及びリタペネム（ritapenem）があげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助β-ラクタムと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0172】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば $COOH$ 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）があるカルバペネムとしては、ロラカルベフがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤はカップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助カルバペネムと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【 0 1 7 3 】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するカルバペナムとしては、ピアペナム、イミペナム、メロペナム及びパニペナムがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助カルバペナムと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【 0 1 7 4 】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するセファロスポリンとしては、セファクロール、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジン、セファゼドン、セファゾリン、セフクリジン、セフジニル、セフジトレン、セフェピム、セフェタメット、セフィキシム、セフメノキシム、セフォジジム、セフォニシド、セフォペラゾン、セフォラニド、セフォタキシム、セフォチアム、セフォゾプラン、セフピミゾール、セフピラミド、セフピロム、セフプロジル、セフロキサジン、セフソルジン、セフトジジム、セフテラム、セフテゾール、セフチブテン、セフチオフル、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフロキシム、セフゾナム、セファセトリルナトリウム、セファレキシン、セファログリシン、セファロリジン、セファロスポリンC、セファロチン、セファマイシン、セファピリンナトリウム、セファラジン及びピブセファレキシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助セファロスポリンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【 0 1 7 5 】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するセファマイシンとしては、セフブペラゾン、セフメタゾール、セフミノクス、セフォテタン及びセフォキシチンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤はカップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助セファマイシンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【 0 1 7 6 】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するモノバクタムとしては、カルモナム及びチゲモナムがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤はカップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助モノバクタムと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【 0 1 7 7 】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するオキサセフェムとしては、フロモキシセフ及びモノキサラクタムがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び／又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助オキサセフェムと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【 0 1 7 8 】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するペニシリンとしては、アムジノシリン、アモキシシリン、アンピシリン、アパルシリン、アスポキシシリン、アジドシリン、アズロシリン、ベンジルペニシリン酸、カルベニシリン、カリダシリン（caridacillin）、クロメトシリン、クロキサ

シリン、シクラシリン、ジクロキサシリン、エピシリン、フェンベニシリン、フロキサシリン、ヘタシリン、メタンピシリン、メチシリン、メズロシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペナメシリン、ペンタメート、ペニシリンG、ペニシリンN、ペニシリンO、ペニシリンV、ペニメピサイクリン、フェネチシリン、ピペラシリン、プロピシリン、キナシリ、スルベニシリン、テモシリ、及びチカルシリ、があげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助ペニシリと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0179】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するポリペプチドとしては、アンホマイシン、バシトラシン、テイコブラニン、チロシジン及びバンコマイシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助ポリペプチドと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0180】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するテトラサイクリンとしては、アピサイクリン、ライムサイクリン及びペニメピサイクリンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助テトラサイクリンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0181】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するキノロン類及びキノロン類似体補助剤としては、シノキサシン、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、ジフロキサシン、エノキサシン、フレロキサシン、フルメキン、グレパフロキサシン、ロメフロキサシン、ミロキサシン、ナジフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オキシソリン酸、パズフロキサシン、ペフロキサシン、ピベミド酸、ピロミド酸、ロソキサシン、ルフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン及びトロバフロキサシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助キノロン類又はキノロン類似体と生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0182】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するスルホンアミドとしては、フタリルスルファセタミド、フタリルスルファチアゾール、サラゾスルファジミジン、スクシニルスルファチアゾール、スルファロクス酸及び4-スルファニルアミドサリチル酸があげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤はカップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助スルホンアミドと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0183】

アミド（若しくは SO_3H 又は SO_3^- の場合、スルホンアミド）結合の形成のために利用可能な、少なくとも1個の酸性基（例えば COOH 、 COO^- 、 SO_3H 、 SO_3^- ）を有するスルホンとしては、アセジスルホン、ソラスルホン、スクシスルホン及びスルファニル酸があげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。

これにより、補助スルホンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0184】

エステル結合又はホスホジエステル結合を形成できる、少なくとも1個のヒドロキシル基(-OH)を有するアミノグリコシドとしては、スペクチノマイシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助アミノグリコシドと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0185】

エステル結合又はホスホジエステル結合を形成できる、少なくとも1個のヒドロキシル基(-OH)を有するリンコサミドとしては、クリンダマイシン及びリンコマイシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助リンコサミドと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0186】

エステル結合又はホスホジエステル結合を形成できる、少なくとも1個のヒドロキシル基(-OH)を有するマクロライドとしては、アジスロマイシン、カルボマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ジョサマイシン、ロイコマイシン、ミデカマイシン、ミオカマイシン、オレアンドマイシン、プリマイシン、ロキタマイシン、ロサラマイシン、ロキシスロマイシン、スピラマイシン及びトロレアンドマイシンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助マクロライドと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0187】

エステル結合又はホスホジエステル結合を形成できる、少なくとも1個のヒドロキシル基(-OH)を有するテトラサイクリンとしては、クロモサイクリン、ピパサイクリン、ロリテトラサイクリンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助テトラサイクリンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0188】

エステル結合又はホスホジエステル結合を形成できる、少なくとも1個のヒドロキシル基(-OH)を有するスルホンとしては、ジアチモスルホン及びグルコスルホンがあげられる。一部の好ましい実施形態では、結合剤は、カップリング剤並びに場合によりカップリング促進剤及び/又は浸透促進剤を含むが、架橋剤は含まない。これにより、補助スルホンと生物組織との間に直接共有結合ができる。

【0189】

エステル結合又はホスホジエステル結合を形成できる、少なくとも1個のヒドロキシル基(-OH)を有する他の抗生物質としては、クロホクトール及びキシボルノールがあげられる。

【0190】

殺菌

哺乳動物、特にヒトにバイオインプラントを移植する前に、殺菌を行わなければならない、これは通常包装前に行う。殺菌条件は、上記に詳細に記載した。一部の好ましい実施形態では、殺菌と結合は同一処理ステップで行い、具体的には、殺菌剤並びに場合により殺菌促進剤及び/又は浸透促進剤を含む、同じ試薬溶液を使用する。一部の特に好ましい実施形態では、殺菌溶液としては、殺菌剤及び浸透促進剤並びに場合により殺菌促進剤があげられる。一部の他の好ましい実施形態では、殺菌溶液としては、殺菌剤、殺菌促進剤及び浸透促進剤があげられる。他の実施形態では、殺菌溶液としては、殺菌剤、架橋剤及び場合により殺菌促進剤及び/又は浸透促進剤があげられる。

【0191】

調製スキーム

以下は、本発明の、補助剤が結合し、架橋し、殺菌したバイオインプラントの調製に関する、特定のスキームの説明である。当業者は、本発明の範囲内で他の実施形態が開発でき、これらの例示的实施例の提示によって、当該広範囲の発明の放棄を意図するものではないことが認識されるであろう。

【0192】

EDCにより促進される架橋/結合

上述のように、生物組織の架橋及び補助分子の生物組織への結合は、様々な架橋剤の存在下で実施できる。一部の実施形態では、本発明は、生物組織とジアミン、例えば、間に少なくとも約4個の炭素があるアミン基を有する、 $C_4 \sim C_{12}$ の線状ジアミンとの架橋ステップを含む。特定の実施形態では、ジアミンは水溶性であるが、界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤を、ジアミンの可溶化を助けるために使用するならば、非水溶性又はわずかに水溶性のジアミンも、一部の実施形態では使用できる。本発明の範囲内で企図される例示的水溶性ジアミンとしては、1,5-ペンタンジアミン、1,6-ヘキサジアミン及び1,7-ヘプタンジアミンがあげられる。

【0193】

一部の実施形態では、本発明は、生物組織と二価酸、例えば、間に少なくとも約4個の炭素があるカルボキシル基を有する $C_4 \sim C_{12}$ の線状二価酸との架橋ステップを含む。特定の実施形態では、二価酸は水溶性であるが、界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤を、二価酸の可溶化を助けるために使用するならば、非水溶性又はわずかに水溶性の二価酸も、一部の実施形態では使用できる。本発明の範囲内で企図される例示的水溶性二価酸としては、1,5-ペンタンジカルボン酸、1,6-ヘキサジカルボン酸及び1,7-ヘプタンジカルボン酸があげられる。

【0194】

二価酸の代わりに、二価酸無水物、例えば、間に少なくとも約4個の炭素があるカルボキシル基を有する $C_4 \sim C_{12}$ の二価酸無水物で代用することができる。特定の実施形態では、二価酸無水物は水溶性であるが、界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤を、二価酸無水物の可溶化を助けるために使用するならば、非水溶性又はわずかに水溶性の二価酸無水物も、一部の実施形態では使用できる。本発明の範囲内で企図される例示的水溶性二価酸無水物としては、1,5-ペンタンジカルボン酸無水物、1,6-ヘキサジカルボン酸無水物及び1,7-ヘプタンジカルボン酸無水物があげられる。

【0195】

二価酸又はジアミンの代わりに、アミノ酸、例えば、間に少なくとも約4個の炭素があるカルボキシル基とアミンとを有する $C_4 \sim C_{12}$ のアミノ酸で代用することができる。特定の実施形態では、アミノ酸は水溶性であるが、界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤を、アミノ酸の可溶化を助けるために使用するならば、非水溶性又はわずかに水溶性のアミノ酸も、一部の実施形態では使用できる。本発明の範囲内で企図される例示的水溶性アミノ酸としては、5-アミノペンタン-1-酸、6-アミノヘキサン-1-酸及び7-アミノヘプタン-1-酸があげられる。上記のように他のアミノ酸も使用できる。

【0196】

ジアミンは、生物組織内のカルボキシル基との間にアミド結合を形成し、したがってカルボキシル基を、アルキレンリンカーを介して結合する。二価酸及び二価酸無水物は、生物組織内のタンパク質のアミン(グアニンを含む)基と、アミド結合を形成する。同様に、アミノ酸のアミン機能は、タンパク性カルボキシル基とアミド結合を形成し、一方アミノ酸のカルボキシル基は、生物組織のアミン基とアミド結合を形成する。

【0197】

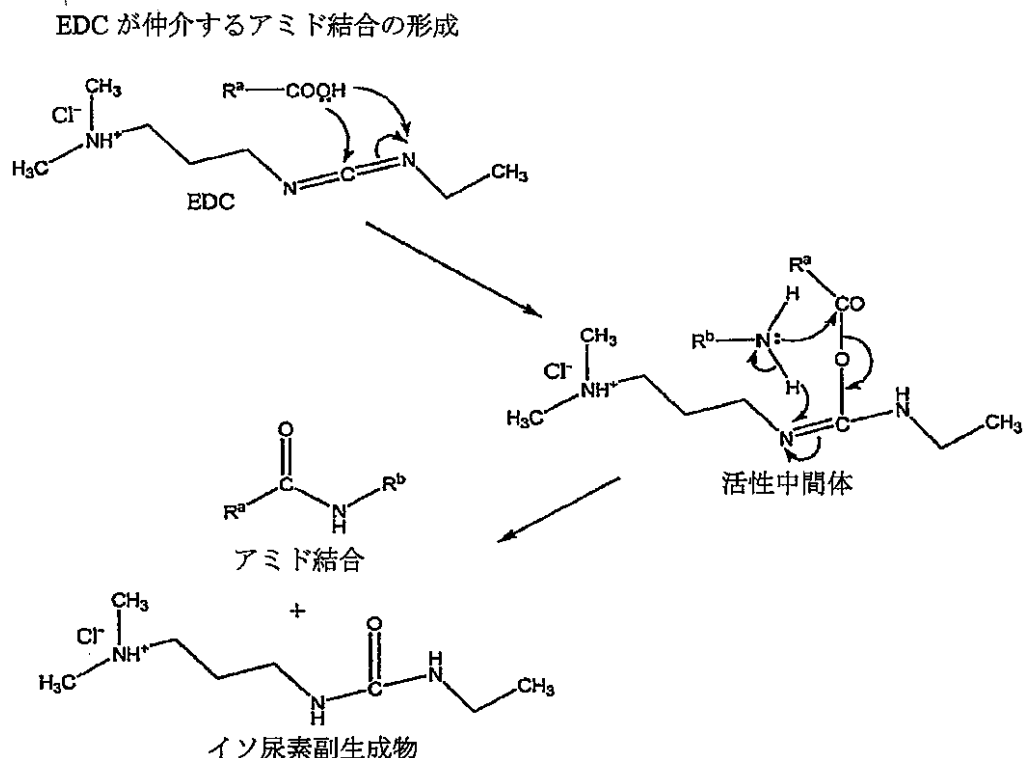
カップリング剤の使用は、生物組織内及び生物組織間の、アミド結合の形成を助けるために有利であると考えられる。適当なカップリング剤は、EDC又はN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含み、これらはジアミン、二価酸又はアミノ酸と共に使用した場合、アミド結合の形成を促進する。カップリング促進剤のEDCは、アミンとカルボキシル基の反応速度を活性中間体の形成によって加速し、アミド結合形成の反応エネルギー障

壁を低くすると考えられている。EDCを使用したアミド結合の形成を、以下のスキーム1に示す。

【0198】

【化1】

スキーム1



【0199】

スキーム1に見られるように、アミド結合の形成は活性中間体を介して始まる。具体的には、 $R^a - \text{COOH}$ で表される分子のカルボン酸部分が、ジイミド炭素を攻撃し、比較的不安定なo-アシルイソ尿素中間体を形成する。 $R^b - \text{NH}_2$ のアミン官能基の遊離の1組の電子によるカルボニル炭素の攻撃により、 R^a と R^b との間にアミド結合の形成もたらされる。さらに、副生成物として水溶性イソ尿素が形成され、これは結合及び/又は架橋の後で生物組織から洗い流す。

【0200】

一部の実施形態では、 R^a は生物組織のタンパク質を表し、 R^b はアミンを担持する補助剤を表す。一部の具体的な実施形態では、 R^a は1個又は複数の遊離のカルボキシル(COOH 又は COO^-)を有する生物組織のタンパク質を表し、一方 R^b は、タンパク質、ペプチド、抗生物質、遊離のアミンを有するRNAもしくはDNA又は多糖類、グリコサミノグリカン(GAG)若しくは遊離アミンを有するように誘導体化されたものを表す。一部の実施形態では、 R^a は補助剤のカルボキシル又は他の酸性基を表し、 R^b は生物組織のタンパク質の遊離のアミン(リジンの側鎖など)を表す。一部の特定の実施形態では、 R^a は、タンパク質、ペプチド、抗生物質又はDNA、RNAの遊離カルボキシル若しくは遊離カルボキシルを有するように誘導体化された多糖類、グリコサミノグリカン(GAG)であり、 R^b は生物組織のタンパク質におけるリジン側鎖の遊離アミンを表す。

【0201】

一部の実施形態では、生物組織は、架橋剤を介して補助剤とカップリングする。一部の当該実施形態では、酸性の R^a は、タンパク質、特に反応に利用可能な1個又は複数のカルボン酸部分を有する生物組織のタンパク質(例えば、C末端 COOH 又はアスパルギン酸及び/又はグルタミン酸の残基のカルボキシル基)である。一部の当該実施形態では、 R^a はタンパク質、ペプチド又は抗生物質等の酸を担持する補助剤の残基であり若しくは

誘導体化された多糖類、グリコサミノグリカン (GAG)、DNA 又は RNA であり得る。さらに、一部の当該実施形態では、 R^a は二価酸、二価酸無水物又はアミノ酸等の酸性架橋剤であり得る。 R^a がタンパク質である場合、 R^b は、一部の実施形態では、ジアミン架橋剤等のアミノ架橋剤である。 R^a が架橋剤である場合、 R^b は、一部の実施形態では、露出したアミン基 (例えば、N 末端のアミン又はリジン残基の側鎖アミン) を有するタンパク質である。 R^a が酸を担持する補助剤の残基を表す場合、 R^b は、一部の実施形態では、アミンを担持する架橋剤又はカップリング剤であり若しくは R^b はアミンを担持するタンパク質であり得る。

【0202】

架橋、結合又は両方は、所望の材料とアミド結合を形成できる二官能性試薬 (架橋 / 結合) を使用して実施できるので、一般的に、EDC が仲介する架橋及び結合は、理論的には非常に似ている。

【0203】

一部の実施形態では、1つのステップで生物組織を架橋し、もう1つのステップで補助分子と生物組織とを結合することが有利であると考えられる。一部の当該実施形態では、架橋剤として、ジアミン、二価酸また二価酸無水物等のホモ二官能性結合剤の使用が有利であると考えられる。一部の特定の実施形態では、ホモ二官能性結合剤は、ジアミンであり、これは EDC 及び場合によりスルホ - NH₂ 又は NH₂ 等のカップリング促進剤と併用して使用する。当該場合、ジアミンと生物組織との架橋は、組織タンパク質のカルボン酸基を閉鎖し、適当な結合リンカーを介した補助分子の結合に利用可能な、組織タンパク質のアミン基は残しておく。当該結合は、少なくとも2個の官能基を有する結合剤を用いて実施する。第1の官能基は、組織タンパク質のアミンと反応し、アミド結合を形成できる官能基でなければならない。適当な結合剤としては、二価酸、二価酸無水物及びアミノ酸、特に、二個の官能基が少なくとも4個の炭素原子によって隔てられている、4 ~ 12 個の炭素を有するような結合剤があげられる。結合剤が二価酸又は二価酸無水物である場合、補助剤は、結合剤とアミド結合を形成するための、少なくとも1個の遊離のアミンを有する、又は有するように改変されているものでなければならない。結合がアミノ酸である場合、補助剤は、結合剤とアミド結合を形成するために利用可能な、少なくとも1個のカルボン酸部分を有する、又は有するように改変されているものでなければならない。いずれの場合にも結合は、補助剤、架橋生物材料及び結合剤、場合によりカップリング剤 (例えば EDC 又は NH₂) 及び / 又はカップリング促進剤 (例えば、NH₂ 又はスルホ - NH₂) と共に接触させて有利に行うことができる。

【0204】

図1及び2に描いたスキーム2及び2Aは、補助剤の結合の前の架橋を、生物組織でどのように行うかを示す。図1のスキーム2を参照すると、第1のステップで、複数のカルボキシル部分と少なくとも1個のアミン部分とを有するタンパク質 Pr を示してある。タンパク質を、架橋剤 diam (ジアミンである) と、カップリング剤 (EDC) 及びカップリング促進剤 (スルホ - NH₂) の存在下で接触させて架橋し、これにより架橋タンパク質 XLPr を作製する。

【0205】

スキーム2に示した第1の代替の反応 (A) で、架橋タンパク質 XLPr を、遊離カルボキシル基を有する補助分子 a - adj ($R^1CO_2^-$) と、カップリング剤 (EDC) 及びカップリング促進剤 (スルホ - NH₂) の存在下で反応させて、これにより補助剤が結合した架橋タンパク質 1 を作製する。当業者は、 $R^1CO_2^-$ が天然状態で遊離カルボキシル基を有する補助分子 (タンパク質、ペプチド又は抗生物質、例えばペニシリン又はセファロsporin の1つなど) であってよいが、さらに上記のように、例えばアミンを担持する補助剤と二価酸、二価酸無水物などとを反応させて、カルボキシル基を有するように改変されている補助分子もまた表し得ることを認識するであろう。一部の実施形態では、補助剤は、カルボキシル基の代わりにスルホン酸基 (SO_3^-) を有していてもよく、この場合予想される結果はタンパク質と補助剤との間のスルホンアミド結合であろう。

【0206】

スキーム2に示す別の代替の反応(B1)で、架橋タンパク質XLP_rを、アミノ酸架橋剤aa($\text{H}_2\text{N}-\text{R}^2-\text{CO}_2^-$)と、カップリング剤(EDC)及びカップリング促進剤(スルホ-NHS)の存在下で反応させて、これにより中間体架橋タンパク質2を作製する。次いでこの中間体2を、カルボキシル基を担持する補助分子a-adj(R^3-CO_2^-)と反応させ(B2)、補助剤の結合した架橋タンパク質3を形成させる。当業者は、図2のスキーム2Aに示した第1の反応順序(B)に例示したように、2つの反応ステップは1つのステップにまとめることができ、架橋タンパク質XLP_rをアミノ酸aa及びカルボキシルを担持する補助剤a-adjと、EDC及びスルホ-NHSの存在下で反応させて、補助剤の結合した架橋タンパク質3を形成できることを認識するであろう。

【0207】

スキーム2に示したさらに別の代替の反応で、架橋タンパク質XLP_rを、二価酸dia又は二価酸無水物dianと、EDC及びスルホ-NHSの存在下で反応させ(C1)、中間体4を形成し、この中間体4は、さらなる反応に利用可能な遊離のカルボキシル基を有する。この遊離のカルボキシル基は、補助分子b-adj(R^5-NH_2)のアミンと、例えばEDC及びスルホ-NHSの存在下でアミド結合を形成でき(C2)、補助剤が結合した架橋タンパク質5を形成する。当業者は、図2のスキーム2Aに示した第2の反応順序(C)に描いたように、これらの2つのステップを同じ反応混合物で実施できることを認識するであろう。

【0208】

図3及び4に描いたスキーム3及び3Aはそれぞれ、補助剤の結合の前の架橋を、生物組織でどのように行うかを示す。まず図3のスキーム3を参照すると、第1のステップで、複数のアミン部分と少なくとも1個のカルボキシル部分とを有するタンパク質Prを示す。次いでタンパク質を、架橋剤diacid(二価酸である)(又は当業者により認められるような二無水物)とカップリング剤(EDC)及びカップリング促進剤(スルホ-NHS)の存在下で接触させて架橋し、これにより架橋タンパク質XLP_rを作製する。

【0209】

スキーム3に示した第1の代替の反応(A)で、架橋タンパク質XLP_rを、補助分子b-adj(R^1-NH_2)と、カップリング剤(EDC)及びカップリング促進剤(スルホ-NHS)の存在下で反応させて、これにより補助剤が結合した架橋タンパク質6を作製する。当業者は、 R^1-NH_2 が天然状態で遊離アミンを有する補助分子(タンパク質、又はペプチドなど)であってよいが、さらに上記のように、例えばカルボキシルを担持する補助剤(ペニシリン又はセファロスポリンなど)とジアミンとを反応させて、アミン基を有するように改変されている補助分子もまた表し得ることを認識するであろう。

【0210】

スキーム3に描いた別の代替の反応で、架橋タンパク質XLP_rを、アミノ酸架橋剤aa($\text{H}_2\text{N}-\text{R}^2-\text{CO}_2^-$)と、カップリング剤(EDC)及びカップリング促進剤(スルホ-NHS)の存在下で反応させ(B1)、これにより中間体架橋タンパク質7を作製する。次いでこの中間体7を、補助分子b-adj(R^3-NH_2)と反応させ(B2)、補助剤の結合した架橋タンパク質8を形成させる。当業者は、図4のスキーム3Aに示した第1の反応順序(B)に例示したように、2つの反応ステップを1つのステップにまとめることができることを認識するであろう。

【0211】

スキーム3に描いたさらに別の代替の反応で、架橋タンパク質XLP_rを、ジアミンdiamと、EDC及びスルホ-NHSの存在下で反応させ(C1)、中間体9を形成させて、この中間体9は、さらなる反応に利用可能な遊離アミン基を有する。この遊離アミン基は、補助分子a-adj(R^5-NH_2)のカルボキシル基と、例えばEDC及びスルホ-NHSの存在下でアミド結合を形成でき(C2)、補助剤が結合した架橋タンパク質10を形成する。当業者は、図4のスキーム3Aの第2の反応順序(C)に描いたように

、これらの２つのステップを同じ反応混合物で実施できることを認識するであろう。

【０２１２】

好ましい実施形態では、組織の架橋及び補助剤の組織への結合は同じステップで行う。架橋剤は、当該方法に使用できるが、一部の実施形態では、補助剤をタンパク質に直接結合することが好ましいと考えられる。組織のタンパク質は遊離カルボキシル基と遊離アミンとの両方を有する傾向があるので、少なくとも１個のカルボキシル、少なくとも１個のアミン又は少なくとも１個のカルボキシルと少なくとも１個のアミンとの両方を側鎖として有する補助剤を結合することは可能であると考えられる。

【０２１３】

[実施例]

以下の実施例を、本発明の例示的な、限定されない実施形態として提示する。これらの実施例は具体的な補助剤、組織型及び補助剤の組織への結合方法を対象とするが、当業者であれば本発明がこれらの例示の実施例に限定されず、本明細書記載のように、追加の補助剤、組織型及び結合方法を用いて実践できることを認識するであろう。

【実施例１】

【０２１４】

グリコサミノグリカンの心膜組織への結合

心膜組織を、米国特許第 5,447,536 号、及び、2006 年、2 月 27 日提出の米国特許出願第 11/276,398 号（参照によりその各々の全体を本明細書に明確に組み込む）に規定された技術を使用して安定化（架橋）させた。架橋ステップに続いて、心膜組織をグリコサミノグリカン（GAG）コンドロイチン硫酸（0.5%～2.0%）の溶液に、EDC の存在下で、規定の時間（2 時間～一晚）曝した。その後組織をすすぎ、米国特許第 6,521,179 号、第 6,506,339 号及び第 5,911,951 号（参照によりその各々の全体を本明細書に明確に組み込む）記載の方法を使用して殺菌した。組織における GAG（グリコサミノグリカン）結合の濃度を、組織学的手法（PAS - アルシアンブルーを用いた、切片の分染法。GAG は青く染まり、コラーゲンはピンクに染まる）により評価した。図 5A～5C の画像は、GAG の心膜にわたる結合を示す。図 5A は、基本的に青く染まっていないことを示し、このことは、GAG が心膜に結合していないことと一致する。図 5B は、青とピンクの染色が混合していることを示し、これは、GAG が部分的に心膜に結合していることと一致する。図 5C は、ほぼ完全に青く染まっていることを示し、これは GAG が心膜に完全に結合したことを示す。

【実施例２】

【０２１５】

結合ステップの評価

様々な処理ステップ（架橋、殺菌など）をその後評価し、その間に補助剤が組織に結合できる組織処理ステップを決定した。具体的には、この実施例は、補助剤が安定に結合した殺菌組織の様々な生成方法を示す。様々な中間処理ステップに供した 1 型コラーゲンスポンジを、コンドロイチン硫酸（補助剤の例として）及び EDC の溶液と接触させた。図 6A 及び 6B は、GAG の結合を組織の殺菌の間に実施した、GAG 結合 1 型コラーゲンスポンジの組織切片の低倍率及び高倍率の拡大図を示す。図 7B は、GAG が架橋の間に組織に結合した、GAG 結合 1 型コラーゲンスポンジを示す。図 6A、6B 及び 7B から明らかなように、殺菌の間のコラーゲンスポンジへの GAG の結合は、拡散した結合をもたらすが、架橋の間の組織への GAG の結合は、緊密な結合をもたらす。

【実施例３】

【０２１６】

異なる組織型への補助剤の結合

コラーゲンをベースとした様々な組織型に対する、本発明の方法の適用性を実証するために、３種の異なる組織型を、本発明に従って処理した。３種の異なる組織型（心膜、脱塩した海綿骨及び可溶化した 1 型コラーゲンから製造したコラーゲンスポンジ）をまず架橋し、次いで EDC の存在下でコンドロイチン硫酸に曝した。組織を、その後すすぎ、米

国特許第 6, 5 2 1, 1 7 9 号、第 6, 5 0 6, 3 3 9 号及び第 5, 9 1 1, 9 5 1 号記載の方法を使用して殺菌した。組織における G A G の結合濃度を、組織学的手法 (P A S - アルシアンブルーを用いた、切片の分染法) により評価した。図 7 A 及び 7 B の画像は、は、海綿骨及びコラーゲンスポンジ組織で、G A G の結合が均一であることを示す。

【実施例 4】

【0217】

ヒアルロン酸の生物組織への結合

本発明の方法が、様々な補助剤の組織への結合に使用できることを実証するために、コンドロイチン硫酸及びヒアルロン酸 (H A) を殺菌したコラーゲン基質に結合した。コンドロイチン硫酸のコラーゲン基質への結合の結果は、図 5 A ~ 7 B を参照して、上述した。基本的にコンドロイチン硫酸に関する実施例 1 ~ 3 で上述のように、ヒアルロン酸をコラーゲン基質に結合し、結合ステップで、ヒアルロン酸をコンドロイチン硫酸に置換した。ヒアルロン酸がコラーゲンスポンジに結合したことを示す組織切片を、図 8 A 及び 8 B に示し、図 8 B は、図 8 A に示した結果の高倍率拡大図を表す。ヒアルロン酸が心膜に結合した組織切片を図 8 C に示す。

【実施例 5】

【0218】

コラーゲンスポンジへの I G F - 1 の結合

コラーゲン基質への補助剤の結合のさらなる実施例として、成長因子の代表と考えられる I G F - 1 をコラーゲンスポンジに、基本的に実施例 1 ~ 3 におけるコンドロイチン硫酸に関する上記の方法により結合した。コラーゲンスポンジへの I G F の良好な結合を、逆 E L I S A 検査を使用して測定した。このモデルで、抗 I G F - 1 抗体溶液を、非 I G F - 1 結合 (対照) コラーゲンスポンジと I G F - 1 結合コラーゲンスポンジと接触させてインキュベートした。コラーゲンスポンジへの I G F - 1 の良好な結合を、インキュベート期間の後の、抗 I G F - 1 抗体溶液に関する E L I S A シグナルの減少によって示した。図 8 D に見られるように、逆 E L I S A 検査により、対照のスポンジと比較して、I G F - 1 が結合したスポンジに関する I G F - 1 シグナルが減少したことを実証する。したがって、図 8 D に示す結果により、I G F - 1 が E D C の存在下でコラーゲンスポンジに良好に結合したことを実証する。

【実施例 6】

【0219】

補助剤により改変された組織の安定性

本発明による補助剤を用いて改変したコラーゲン組織の安定性を実証するために、架橋し、殺菌した心膜 (基本的に、上記の実施例 1 におけるように調製した) に結合したコンドロイチン硫酸の安定性を、室温で 2 カ月保存した後で評価した。G A G に特異的な組織学的染色 (すなわち、P A S - アルシアンブルー) により、架橋し、殺菌した膜に結合した G A G が良好に維持されていることが示される。これにより、本発明による方法 (m e t h o d 、 m e t h o d s) が、室温で水和物の形態で安定である補助剤が結合したコラーゲン組織の調製、殺菌及び保存を可能にすることが実証される。これらの結果を図 5 A ~ 5 C に示す。

【実施例 7】

【0220】

補助剤により改変された組織の生体適合性

以下の実験を実施し、本発明の方法により調製した組織の生体適合性を実証した。具体的には、生体適合性を、本発明による方法によって結合した補助剤を有する殺菌したコラーゲンスポンジに関して評価した。コンドロイチン硫酸が結合した、架橋し、殺菌したコラーゲンスポンジを、本発明の方法によって作製し、細胞培養に基づく評価に供した。初代軟骨細胞を、補助剤 (コンドロイチン硫酸) が結合した、又は補助剤が結合していない殺菌コラーゲンスポンジに播種した。播種したコラーゲンスポンジをその後、加湿インキュベーター (3 7 ° C 、 5 % C O ₂ 、 1 0 % ウシ胎児血清添加基本 M E M 培地) で、インキ

ュベートした。播種した細胞の生存能力及び代謝活性を、MTT検査により、その後規定された時間で評価した。図9は、結合細胞の有糸分裂活性（したがって生存能力）を測定した、MTT検査の結果を示す。図9の結果により、コンドロイチン硫酸の存在により与えられる、細胞成長における認識可能な利点を実証される（ヒト及びウシ両方の軟骨細胞を用いて、それぞれ培養7日目及び14日目）。

【0221】

図10A及び10Bは、それぞれMTTの添加後の培養物の低倍率及び高倍率の拡大顕微鏡画像を示す。生存細胞は紫に染まり、新しく合成された基質の存在が、薄い線維性の層として細胞の周りに見られる。図10Cは、播種した軟骨細胞により作製された新しい合成基質の出現を示す、スポンジの高倍率拡大画像である。

【実施例8】

【0222】

補助剤により改変された組織の、生きた動物への移植

補助剤を加えた組織の安定性及び適合性を、さらに小動物への移植後試験した。簡潔に言うと、上記実施例から選択した試料を、ラットに皮下移植した。4週間後、移植片を取り出し、移植片から切片を調製した。これらの切片を組織学的に処理し、染色し、補助剤の存在、並びに細胞浸潤物の特性に関して評価した。図11Aは、コンドロイチン硫酸により改変されたコラーゲンスポンジからの応答を実証する。PAS-アルシアンブルーによる分染法により、移植4週間後でもGAGの存在が維持されていることが示される。選択した範囲が拡散して青く染色されていることにより、GAGの遅延放出は明らかである（図11A）。試料への細胞浸潤物の特性により、宿主からの生体適合性応答（すなわち、明らかかつ活性の炎症の不在、組織のコラーゲン鎖の間の新しい基質及び血管の出現）が示される（図11B）。

【0223】

上記実施例からわかるように、本発明は様々な補助剤の様々な型の生物組織への共有結合（bonding、attachment）を可能にする。生物組織は、完全に、部分的に架橋されている、又は架橋されていなくてもよい。補助剤が結合した生物組織は、時間が経過しても安定であり、生体適合性である。補助剤が結合した生物組織は、組織のリモデリング、再生及び治癒を促す。したがって、本発明による補助剤が結合した生物組織は、様々な治療使用のためのインプラントとして有用である。本発明による生物組織への補助剤の結合方法は、したがって様々な治療背景における使用を見出される。

【0224】

本発明の好ましい実施形態が本明細書中に示され、記載されているが、当該実施形態は実施例の目的でだけ提供されていることは、当業者には明らかであろう。当業者であれば、多くの改変、変更及び置換を本発明から逸脱せずに想到できるであろう。本明細書中に記載された本発明の実施形態を様々に変更して本発明の実践に用いることができることは理解されるべきである。したがって、以下の特許請求の範囲により、本発明の範囲が規定され、当該請求の範囲内の方法及び構造並びにそれらと同等のものは対象となることが意図される。

【0225】

本発明の新規な特徴を、添付の特許請求の範囲で具体的に説明する。本発明の特徴及び実施形態の利点は、本発明の原理を利用した例示的实施形態を説明する、以下の詳細な記述及び添付の図面を参照することにより、さらに詳細に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0226】

【図1】本発明のバイオインプラントの調製に関する、3種の異なる化学反応のスキームを示す図である。

【図2】本発明のバイオインプラントの調製に関する、2種の代替となる化学反応のスキームを示す図である。

【図3】本発明による、3種の追加反応のスキームを示す図である。

【図 4】本発明による、2 種の追加の代替反応のスキームを示す図である。

【図 5】図 5 A は、対照の心膜の光学顕微鏡画像である。図 5 B は、部分的に G A G により改変された心膜の光学顕微鏡画像である。図 5 C は、完全に G A G 改変された心膜の光学顕微鏡画像である。組織の切片を、P A S - アルシアンブルーを用いて染色した（G A G はブルーに染まり、コラーゲンはピンクに染まる）。これらの図は、本発明の方法により架橋し、殺菌した心膜組織に、G A G が良好に結合したことを示す。

【図 6】図 6 A は、殺菌の間に G A G をコラーゲンスポンジに結合させた、1 型コラーゲンスポンジの、低倍率拡大画像である。図 6 B は、殺菌の間に G A G をコラーゲンスポンジに結合させた、1 型コラーゲンスポンジの、高倍率拡大画像である。図 6 A 及び 6 B よりわかるように、殺菌の間に G A G をコラーゲンスポンジに結合させることにより、G A G はコラーゲンスポンジに拡散して結合する。

【図 7】図 7 A は、G A G が結合した海綿骨の組織切片の画像である。図 7 B は、本発明の方法により、架橋の間に G A G を結合させた 1 型コラーゲンスポンジの組織切片の画像である。

【図 8】図 8 A は、本発明の方法によってヒアルロン酸を結合させた、コラーゲンスポンジの組織切片の画像である。図 8 B は、本発明の方法によりヒアルロン酸を結合させた、コラーゲンスポンジの組織切片の画像である。図 8 C は、本発明の方法によりヒアルロン酸を結合させた、心膜の組織切片の画像である。図 8 D は、本発明の方法によりコラーゲンスポンジに結合させた I G F - 1 に関する、逆 E L I S A 法の結果のグラフである。対照の検査に対して、I G F F X / S T E R の検査で E L I S A シグナルが減少していることは、抗 I G F 抗体が I G F F X / S T E R 試料で I G F に結合し、したがって対照試料と接触した抗 I G F 抗体溶液におけるシグナルと比較して、I G F F X / S T E R 試料と接触した抗 I G F 抗体溶液で E L I S A シグナル低下したことを示している。

【図 9】細胞生存率アッセイの結果のグラフである。対照及びコンドロイチン硫酸塩結合コラーゲンスポンジを、初代軟骨細胞に播種し、インキュベートした。ヒト軟骨細胞を播種したコラーゲンスポンジを、7 日目に評価し、一方ウシ軟骨細胞を播種したコラーゲンスポンジを 14 日目に評価した。細胞生存率アッセイ（M T T）の結果により、対照（未処理）コラーゲンスポンジ（青）に対して、コンドロイチン硫酸塩結合コラーゲンスポンジ（赤）で細胞の生存率が増加していることが明らかになった。

【図 10】本発明の、軟骨細胞を播種した、G A G 結合コラーゲンスポンジの組織切片の M T T アッセイの画像である。図 10 A は、軟骨細胞を播種した、M T T 処理済 G A G 結合コラーゲンスポンジの低倍率拡大画像である。生存細胞は紫色に染まり、新規に合成された基質の存在が、薄い線維素性の層として細胞の周りに見られる。図 10 B は、軟骨細胞を播種した、M T T 処理済の G A G 結合コラーゲンスポンジの高倍率拡大画像である。生存細胞は紫色に染まり、新規に合成された基質の存在が、薄い線維素性の層として細胞の周りに見られる。図 10 C は、新規に合成された基質の出現を示す、軟骨細胞を播種した、G A G 結合コラーゲンスポンジの高倍率の拡大画像である。

【図 11】図 11 A は、G A G 結合セルローススポンジの組織切片である。G A G 結合コラーゲンスポンジの中から選択した試料を、その後ラットに移植した。4 週間後に移植片を摘出し、切片を、P A S アルシアンブルーを用いて染色した。図 11 A からわかるように、青く染色されたことから、4 週間後でも G A G はセルロース基質に結合したままであることが明らかである。図 11 B は、G A G 結合セルローススポンジの組織切片である。G A G 結合コラーゲンスポンジの中から選択した試料を、その後ラットに移植した。4 週間後に移植片を摘出し、切片を、ヘマトキシリン・エオシン（H & E）を用いて染色した。明白な活動性の炎症がないこと、及び新規の基質及び血管が、組織のコラーゲン鎖の間に出現していることにより、宿主からの反応が生体適合性であることが示される。