

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3549110号
(P3549110)

(45) 発行日 平成16年8月4日(2004.8.4)

(24) 登録日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 L 33/00
C 0 8 J 7/04

A 6 1 L 33/00 T
C 0 8 J 7/04 Z

請求項の数 13 (全 7 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平6-516911 (86) (22) 出願日 平成6年1月14日(1994.1.14) (65) 公表番号 特表平8-508896 (43) 公表日 平成8年9月24日(1996.9.24) (86) 国際出願番号 PCT/SE1994/000022 (87) 国際公開番号 W01994/016750 (87) 国際公開日 平成6年8月4日(1994.8.4) 審査請求日 平成12年11月6日(2000.11.6) (31) 優先権主張番号 9300140-2 (32) 優先日 平成5年1月19日(1993.1.19) (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)</p>	<p>(73) 特許権者 メデイカーブ・アクチエボラーク スウェーデン国エスー161 71 プロ ンマ. アンネダールス ヴエイエン37 (74) 代理人 弁理士 高木 千嘉 (74) 代理人 弁理士 佐藤 辰男 (74) 代理人 弁理士 西村 公佑 (72) 発明者 ガウダ, イブラヒーム スウェーデン国エスー191 41 ソツ レントウナ. ボーグヴェイエン14</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固体基体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一の多糖はビシナルヒドロキシル基又はビシナル位のアミノ及びヒドロキシル基を持つ過ヨウ素酸酸化された第二の多糖であって、過ヨウ素酸酸化されて少なくとも1対のジアルデヒド官能基が形成されている前記第二の多糖によって架橋されて安定化されており、反応性基としてアミノ及びヒドロキシル基を含む第一の多糖からなるプライマーにより得られる、その表面が、親水性を有する反応性基がその上に導入されるように修飾されている固体基体。

【請求項2】

第一の多糖がキトサンである請求項1記載の固体基体。

【請求項3】

キトサンが多くて約90%のN-アシル化度を持つ請求項2記載の固体基体。

【請求項4】

キトサンが多くて約50%のN-アシル化度を持つ請求項3記載の固体基体。

【請求項5】

第二の多糖がその生分解生成物がD-グルコースアミン及びD-グルコースのように無毒性である多糖類から選ばれる請求項1~4のいずれか一項記載の固体基体。

【請求項6】

第二の多糖がキトサン、アミロース及びグルコースアミノグリカンからなる群より選ばれる請求項5記載の固体基体。

10

20

【請求項 7】

疎水性である請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の固体基体。

【請求項 8】

ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリビニルクロリド、ポリスチレン、シリコン及びポリテトラフルオロエチレンからなる群より選ばれる請求項 7 記載の固体基体。

【請求項 9】

ポリエチレン又はポリプロピレンのようなポリオレフィンである請求項 8 記載の固体基体。

【請求項 10】

医薬的に許容される金属及びガラスからなる群より選ばれる請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の固体基体。 10

【請求項 11】

a) その表面が修飾されるべき基体を準備し、
 b) ビシナルヒドロキシル基又はビシナル位のアミノ及びヒドロキシル基を持つ第二の多糖であって、過ヨウ素酸酸化されて少なくとも 1 対のジアルデヒド官能基が形成されている前記第二の多糖も含む第一の多糖の溶液を準備し、前記第二の多糖によって前記第一の多糖を架橋して安定化し、
 c) 前記表面を段階 b) で得られる溶液で被覆し、そして
 d) 前記表面上に前記第一の多糖を沈澱させ、前記表面の特性を修飾する
 各段階からなる、反応性基としてアミノ及びヒドロキシル基を含む第一の多糖からなるブ
 ライマーにより得られる、その表面が、親水性を有する反応性基がその上に導入されるよ
 うに修飾されている固体基体の製造方法。 20

【請求項 12】

第一の多糖がキトサンである請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

段階 c) の前に、表面への第一の多糖の付着性を改良するエッチング段階を行なう請求項 11 又は 12 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明はその表面が、親水性の反応性基がその上に導入されるように修飾されている固体
 基質に関する。本発明は又、そのような固体基質を製造する方法をも包含する。 30

発明の背景

医療技術、例えば移植用用具又は生体組織に直接接触する装置のような医療装置を含む技
 術においては直接接触する表面を周囲と適合するようにすることがしばしば望ましい。こ
 れはしばしば、直接接触する表面上に生物学的に活性な化合物を固定化することによりな
 される。これは通常 2 段階に分けてなされ、すなわち問題の表面を活性化する第一段階及
 び活性化された表面に生物学的活性化合物を結合させる第二段階である。

しばしばポリマー化合物を使用する処理によって起こる活性化にある第一段階においては
 、導入される反応性基及び官能基は強い結合により基体に結合すべきである。結合させる
 ことにある第二段階においても、その結合は可及的強くあるべきである。しかしながら、
 固定化された基体の生物活性が損なわれることがあってはならない。 40

生物学的活性化合物の例えば病院で使用される器材の表面への固定化のための技術的方法
 の例は、例えば眼内レンズ、ある種の創傷用包帯、整形外科用インプラントなどへのグル
 コースアミノグリカン (GAG) の固定化である。そのような GAG の固定化は通常 2 段階で実
 行され、すなわち表面をより反応性及び / 又は親水性にするための前処理及びイオン結合
 又は共有結合による分子の固定化である。そのような前処理の手順においては、反応性ア
 ミノ官能基を含む試薬又はプライマーを表面に接着させる。この試薬はさらに架橋剤通常
 は官能性有機物質の添加により安定化することができる。

背景技術

従来使用されてきたプライマー及び架橋剤は非生物学的起源の物質から作られ、そして非 50

生分解型のものである。試薬の例はポリエチレンイミン及び塩化トリドデシルメチルアンモニウムである。この固定化方法について、よりいっそう詳しくはHoffman J.、Larm O.及びSholander S.、「ヘパリン及び他のグリコサミノグリカン在第一級アミノ基を含む物質に共有結合させるための新しい方法」、Carbohydrate Research (1983) 117、328;Larm O.、Larsson R.及びOlsson P.、「修飾された還元性末端残基によるヘパリンの選択的共有結合により作られる新しい非トロンボゲン性表面」、Biomaterials,Medical Devices and Artificial Organs (1983) 11、161に記載されている。

本発明の主要な目的は親水性の反応性基をそのような表面に導入し得るように修飾する新しい方法を提供することである。

本発明の別の目的は生物起源の物質でありそして生分解型でもある物質を使用してそのような修飾を実行する新しい方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は生物学的活性物質を関係する表面に共有結合させるために適当な反応性アミノ及び/又はヒドロキシル基を導入することである。

本発明のさらに別の目的は生物学的活性物質を表面に共有結合させるために使用することができる官能基の導入により前記表面をより親水性に表面を修飾することのできる新しい方法を提供することである。

発明の要約

従って、本発明はその表面が、親水性の反応性基がその上に導入されるように修飾されている固体基質に関する。表面の修飾は反応性基としてアミノ及び/又はヒドロキシル基を含む第一の多糖からなるプライマーにより得られる。従って、驚くべきことにそのような第一の多糖が固体支持体の表面に効果的に結合し、そして特に好ましい本発明の実施態様では前記第一の多糖がキトサンであることを見出した。

キトサンは、1,4-β-結合のD-グルコサミンユニットからなる。この多糖類は線状であり、そしてその性質はN-アシル化度によって異なる。事実上すべてのアミノ基がアセチル化されると、この多糖類はキチンと称する。主にカニ及びエビの殻から得られる。

キトサンは多くて約90%のN-アシル化度であるのが好ましい。好ましいN-アシル化度は多くて約50%であり、そして好ましくは約25%より少ない。

本発明の好ましい態様においては、前記第一の多糖はビシナルヒドロキシル基又はビシナル位のアミノ及びヒドロキシル基を持つ過ヨウ素酸酸化された第二の多糖であって、過ヨウ素酸酸化されて少なくとも一対のジアルデヒド官能基が形成されている前記第二の多糖を使用する架橋により安定化される。

架橋による安定化に使用される前記第二の多糖はその生分解生成物がD-グルコースアミン及びD-グルコースのように無毒性である多糖類から選ばれるのが好ましい。前記第二の多糖はキトサン、アミロース及びグリコサミノグリカンからなる群より選ばれるのが特に好ましい。

本発明により修飾された表面を持つ基体は通常性質が疎水性か又は不活性であり、そしてポリオレフィン、ポリウレタン、ポリビニルクロリド、ポリスチレン、シリコン及びポリテトラフルオロエチレンからなる群又は医薬的に許容される金属及びガラスからなる群より選ぶことができる。ポリマー物質中ではポリエチレン又はポリプロピレンのようなポリオレフィンが好ましい。

本発明はその表面が、親水性の反応性基がその上に導入されるように修飾されている固体基質の製造方法も提供する。この方法は次の段階

- a) その表面が修飾されるべき基体を準備し、
- b) 第一の多糖の溶液を調製し、
- c) 前記表面を段階b)で得られる溶液で被覆し、そして
- d) 前記表面の前記第一の多糖を沈澱させて前記表面の特性を修飾することを含む。

このような方法においては、前記第一の多糖としてキトサンを使用するのが好ましい。

本発明の方法の好ましい実施態様によれば、上の段階b)で調製された溶液に、ビシナルヒドロキシル基又はビシナル位のアミノ及びヒドロキシル基を持ち、そして過ヨウ素酸酸

10

20

30

40

50

化されて少なくとも一対のアルデヒド官能基が形成されている第二の多糖を補う。前記第二の多糖の機能は架橋により前記第一の官能基を安定させることである。

前記第二の多糖はその生分解生成物がD - グルコースアミン及びD - グルコースのように無毒性である多糖類から選ばれるのが好ましい。前記第二の多糖を構成する多糖類の内特に好ましいのはキトサン、アミロース多びグルコースアミノグリカンである。ここで、本発明は下記の添付の図面を参照して、実施例によりさらに詳しく説明するがこれらに限定されるものではない。

図1及び2は第一級アミノ基を含む表面上への炭酸脱水素酵素の共有結合を化学式で示しており、そして

図3は修飾された基体表面に生物学的活性物質の共有結合が生じるに至る考えられる結合反応の略図である。 10

共有結合に至る化学反応の説明

図3はアミノ及び/又はヒドロキシル基を含む基体に生物学的活性物質を共有結合させるため本発明に関連して使用することができる若干の反応を例示する。例示する反応は単なる例と解すべきであり、そして本発明の範囲を限定しようとするものではない。アミノ又はヒドロキシル基への共有結合を例示する図3においてEDCは水溶性カルボジイミドであり、そしてZはO又はNRに等しく、R、R₁及びR₂は場合により固定化された有機基である。

疎水性のポリマー例えばポリエチレン又はポリプロピレンからなる基体については、第一の多糖を施用する前に表面をエッチングするのが好ましい。そのようなエッチングは酸溶液中の酸化剤例えば硫酸中の過マンガン酸カリウムを使用して実行することができる。そのようなエッチングは第一の多糖の、それが架橋により安定化されているか否かにかかわらず付着性を改善する。 20

下記の実施例において、百分率及び部は別記しない限り重量による。

実施例1

ポリエチレン表面のエッチング

ポリエチレンフィルム又はチューブを濃硫酸H₂SO₄中2%の過マンガン酸カリウム(KMnO₄)溶液(w/v)を用いて室温で2分間インキュベートし、そして蒸留水で注意深くすすいだ。

実施例2 30

キトサンの過ヨウ素酸酸化

単糖残基の約10%が酸化された代表的な実施例においては、15%のN - アセチル基を含む多糖キトサンを水(100mL)に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム(0.5g)を添加する。溶液を室温で暗所に24時間保つ。次いで反応混合物を蒸留水で透析し、そして凍結乾燥してジアルデヒド官能基を含むキトサン4.1gを得る。

実施例3

キトサンの代わりにアミロースを使用して実施例2を繰り返す。同様の結果が得られる。

実施例4

キトサンの代わりにヒアルロン酸を使用して実施例2を繰り返す。同様の結果が得られる。 40

実施例5

キトサンによるアミノ化及び架橋

実施例1で得られる表面を、上の実施例2に記述のように調製した架橋剤(0.015% w/v)と一緒に、水中15%のN - アセチル基を含むキトサンの溶液(0.25% w/v)を用いて室温で処理する。表面をエタノール(80%)で注意深くすすぎ、次いでナトリウムシアノボロヒドリド(0.15MのNaCl中0.00025% w/v, pH3.9)で50℃で2時間反応させて安定させる。表面を水ですすぎ、0.15M NaCl中硫酸デキストラン(Pharmacia AB, Uppsala Sweden) 0.1g/Lの溶液、pH3.0を用いて55℃で10分間処理する。大量の蒸留水ですすぎ後、表面を水溶液中0.25%のキトサンの溶液を用いて、pH9.0、室温で10分間処理し、上述のように洗浄する。アミノ基の存在を指示薬(ponceau S, Sigma)を用いて証明する。 50

実施例 6

実施例 5 を繰り返すが、但し実施例 3 の架橋剤を使用する。

実施例 7

実施例 5 を繰り返すが、但し実施例 4 の架橋剤を使用する。

実施例 8

キトサンのみによるアミノ化

実施例 1 で得られる表面を水中15%のN - アセチル基を含むキトサンの溶液 (0.25% w/v) を用いて室温で処理する。

実施例 9

修飾された表面への生物学的活性物質の共有結合

ポリエチレンビーズを上の実施例 1 におけるようにエッチングし、実施例 5 におけるように架橋剤でアミノ化する。アミノ化されたビーズはさらにホウ酸塩緩衝液 (50mL、pH9.0)、エタノール (10mL) 及びクロロアセトアルデヒド・ジメチルアセタール (1mL) の溶液で処理することによりさらに活性化する。透明な溶液に別のホウ酸塩緩衝液40mLを添加し、そして懸濁液を室温で一晩攪拌する。顆粒をHCl水 (100mL, 0.05M) 中で70 °Cで25分間加水分解する。これまでの記述に含まれる反応を添付の図 1 で示す。

大量の水で洗浄した後、ウシ赤血球起源の炭酸脱水酵素 (CA) (Sigma) を還元的アミノ化により結合させる。顆粒をCA (128mg) 及びNaBH₃CN (40mg) を含む水溶液 (200mL, pH6.1) 中で室温で24時間攪拌する。この反応を添付の図 2 で説明する。

水で洗浄しそして乾燥後、結合収率を固定化酵素の p - ニトロフェニルアセテートを加水分解する能力に関連して比色計を用いて測定する。結合収率は5mg/cm²である。

実施例 10

ヒアルロン酸のカルボジイミド結合

ポリエチレンフィルムを実施例 1 におけるようにエッチングし、実施例 5 におけるようにアミノ化し、そしてヒアルロン酸の溶液 (Pharmacia, 100mLの水中に0.195mg) で処理する。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の溶液 (EDC, Merck, 1.0mLの水中0.5g) を0.5時間の間徐々に添加する。pHを4.75に調節 (0.1M HCl) した後、反応を一晩進行させる。フィルムを大量の超純水で注意深くすすぎそして乾燥する。FTIRにより測定した結合収率は1.8 μg/cm²である。

実施例 11

カルボジイミド結合による炭酸脱水酵素 (CA) の固定化

ポリエチレンビーズ (直径3mm、40mL) を実施例 1 におけるようにエッチングし、そして実施例 5 におけるようにアミノ化する。ビーズをCAの水溶液 (100mL, 1M HClでpH5.5に調節) に懸濁する。EDC (5mLの水中2g、実施例 8 参照) を攪拌している懸濁液に徐々に添加する。pH値を室温で24時間、5.5に維持する。ビーズを大量のNaCl (5L) で洗浄し、実施例 9 におけるように分析する。結合収率は2 μg/cm²である。

実施例 12

ヘパリン硫酸のカルボジイミド結合

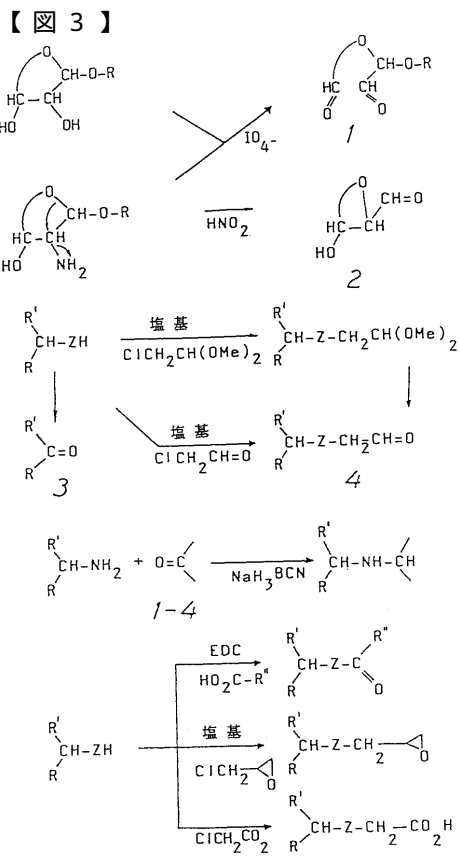
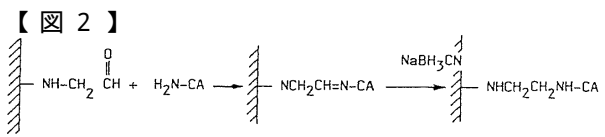
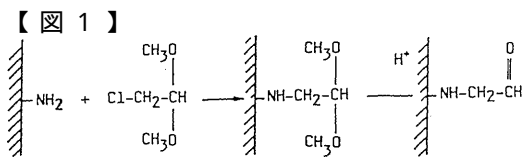
ポリエチレンを実施例 1 におけるようにエッチングし、そしてヘパリン (50mLの水中35mL) で処理する。結合手順は1.0mLの水中0.2gのEDCを結合手順の中で使用する変更を加えて実施例 10に記述したように実行する。結合収率はライラック色を生じるトルイジンブルーを用いて半定量的にそしてFTIRを用いて定量的に求められる (1.6 μg/cm²) 。

10

20

30

40



フロントページの続き

(72)発明者 ラーム, オツレ
スウェーデン国エス 1 6 1 3 9 ブロンマ . ニューエンクス ヴエイエン 8 6

審査官 田名部 拓也

(56)参考文献 特開平 0 6 - 0 8 6 8 0 8 (J P , A)
特開昭 5 7 - 0 8 9 8 6 8 (J P , A)
特開平 0 4 - 2 7 5 3 4 6 (J P , A)
特開昭 6 3 - 3 0 1 2 3 4 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B 名)
A61L 33/00
C08J 7/04