

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-508060

(P2007-508060A)

(43) 公表日 平成19年4月5日(2007.4.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 U	4 C 0 8 1
	A 6 1 L 27/00 W	
	A 6 1 L 27/00 F	
	A 6 1 L 27/00 G	
	A 6 1 L 27/00 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)		

(21) 出願番号 特願2006-534380 (P2006-534380)
 (86) (22) 出願日 平成16年10月9日 (2004. 10. 9)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年6月9日 (2006. 6. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/033244
 (87) 国際公開番号 W02005/034875
 (87) 国際公開日 平成17年4月21日 (2005. 4. 21)
 (31) 優先権主張番号 10/681, 752
 (32) 優先日 平成15年10月9日 (2003. 10. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

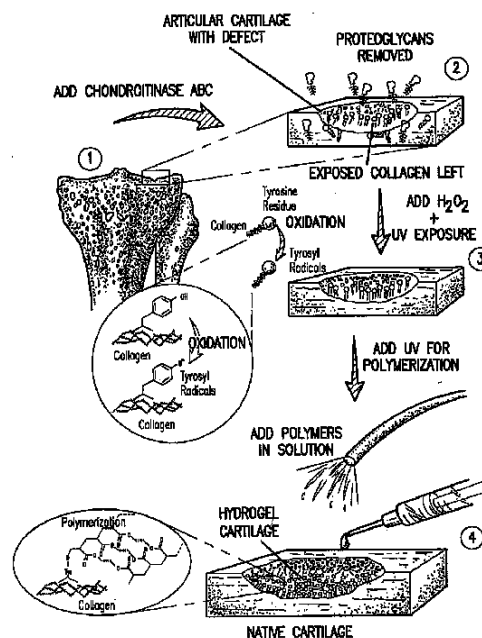
(71) 出願人 506120828
 シンタソーム, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
 14, デルマー, ボーキータ
 ドライブ 13673
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ラトクリフ, アンソニー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 09, サンディエゴ, バンカー ヒル
 ストリート 3030

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織-生体材料の一体化

(57) 【要約】

本発明は、ヒドロゲルを細胞外マトリックス (ECM) に共有結合させるための組成物および方法を提供する。治療用適用は、組織修復および薬物もしくは細胞の送達を含む。本発明は、細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルを作製する方法に関する。より具体的には、本発明は、細胞外マトリックスに共有結合されたポリマーヒドロゲル、およびそのようなヒドロゲルを組織開始重合で作製するための方法に関する。細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルを作製することが、本発明の全体的な目的である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒドロゲルを細胞外マトリックスに一体化させる方法であって、該方法は、以下：

(a) 複数のアミノ基を含む露出された細胞外マトリックスを提供する工程；

(b) 該細胞外マトリックスを、アルデヒド基を有する化合物およびアミノ基を有するキャリア化合物を含むプライミング因子と反応させて、該細胞外マトリックスと該プライミング因子とを共有結合させ、それによって、プライミングされた細胞外マトリックスを作製する工程；

(c) 該プライミングされた細胞外マトリックスに重合可能因子の溶液を添加する工程；ならびに

(d) 該プライミングされた細胞外マトリックスと重合可能因子とを反応させて、該重合可能因子を該プライミングされた細胞外マトリックスに共有結合させ、そして該重合可能因子を架橋して、該細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルを作製する工程を包含する、方法。

10

【請求項 2】

前記細胞外マトリックスが、生体内に配置される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記体が、哺乳動物の体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記体が、ヒトの体である、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記重合可能因子が、アクリレート、ジアクリレート、オリゴアクリレート、ジメタクリレートおよびオリゴメタクリレートからなる群より選択される少なくとも 1 つのフリーラジカル重合可能基を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記反応工程が、前記細胞外マトリックスおよび前記重合可能因子を紫外線放射源に曝露する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記反応工程が、レドックス開始剤を使用することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記反応工程が、イオン架橋反応を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記反応工程が、酵素的架橋反応を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

経皮的に行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

拡散性薬物材料が前記重合可能因子とともに添加される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

複数の生細胞が、前記重合可能因子とともに添加される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の方法であって、それによって、組織における固体修復が生じる、方法。

40

【請求項 14】

以下の工程：

(e) 露出された細胞外マトリックスを提供する工程；

(f) プライミング因子を用いて処理することによって該細胞外マトリックスをプライミングして、プライミングされた細胞外マトリックスを作製する工程；

(g) 該プライミングされた細胞外マトリックスに重合可能因子の溶液を添加する工程；および

(h) 該プライミングされた細胞外マトリックスと重合可能因子とを反応させて、該細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルを作製する工程

50

を包含する方法によって生成されるヒドロゲルであって、
ここで、該細胞外マトリックスは複数のアミノ基を含み、該プライミング因子はアルデヒド基を有する化合物およびアミノ基を有するキャリア化合物を含み、該プライミングする工程は、該プライミング因子を該細胞外マトリックスと反応させて、該細胞外マトリックスと該プライミング因子とを共有結合する工程を包含し、該プライミングされた細胞外マトリックスは、該プライミング因子に共有結合された該細胞外マトリックスからなり、そして該反応工程は、該重合可能因子を該プライミングされた細胞外マトリックスに共有結合させる工程および該重合可能因子を架橋する工程からなる、ヒドロゲル。

【請求項 15】

細胞外マトリックスにおける複数のアミノ基においてプライミング因子を介して該細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲル。 10

【請求項 16】

第 1 の組織表面を第 2 の組織表面と接着させる方法であって、該方法は、以下：

プライミング因子を用いて処理することによって該第 1 の組織表面および第 2 の組織表面をプライミングして、プライミングされた第 1 の組織表面およびプライミングされた第 2 の組織表面を作製する工程；

該プライミングされた第 1 の組織表面およびプライミングされた第 2 の組織表面に重合可能因子の溶液を添加する工程；ならびに

該プライミングされた第 1 の組織表面およびプライミングされた第 2 の組織表面と重合可能因子とを反応させて、該第 1 の組織表面および第 2 の組織表面に共有結合され、かつ該第 1 の組織表面と第 2 の組織表面を架橋するヒドロゲルを作製する工程を包含する、方法。 20

【請求項 17】

前記第 1 の組織表面および第 2 の組織表面が軟骨である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 の組織表面および第 2 の組織表面が靱帯である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 1 の組織表面および第 2 の組織表面が腱である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 の組織表面および第 2 の組織表面が半月板である、請求項 16 に記載の方法。 30

【請求項 21】

前記第 1 の組織表面および第 2 の組織表面が骨膜である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記第 1 の組織表面および第 2 の組織表面が骨である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 23】

前記第 1 の組織表面および第 2 の組織表面が回旋腱板の少なくとも 1 つの腱である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 24】

前記重合可能因子が、アクリレート、ジアクリレート、オリゴアクリレート、ジメタクリレートおよびオリゴメタクリレートからなる群より選択される少なくとも 1 つのフリーラジカル重合可能基を有する、請求項 16 に記載の方法。 40

【請求項 25】

前記反応工程が、前記細胞外マトリックスおよび前記重合可能因子を紫外線放射源に曝露する工程を包含する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 26】

前記反応工程が、レドックス開始剤を使用することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 27】

前記反応工程が、イオン架橋反応を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 28】

前記反応工程が、酵素的架橋反応を含む、請求項 16 に記載の方法。 50

【請求項 29】

拡散性薬物材料が前記重合可能因子とともに添加される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 30】

複数の生細胞が前記重合可能因子とともに添加される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 31】

前記重合可能因子とともに添加される前記複数の生細胞が、治療タンパク質を分泌するように遺伝的に操作される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記重合可能因子とともに添加される前記複数の生細胞が、脈管形成因子を分泌するように遺伝的に操作される、請求項 30 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本出願は、米国仮特許出願番号第 60 / 416 , 881 号および同第 60 / 416 , 882 号 (2002 年 10 月 9 日出願) の米国特許法第 119 条 (e) の下の利益を主張する米国出願番号第 10 / 681 , 752 号 (2003 年 10 月 9 日出願) (この全体の開示は、本明細書により参考として援用される) の一部継続出願である。

【0002】

本出願は、「Cross-linked polymer matrices, and methods of making and using same」という名称で 2003 年 9 月 25 日出願された、米国仮特許出願番号第 60 / 413 , 152 号 (2002 年 9 月 25 日出願) に対する優先権を主張する一般の特許 (この全体の開示は、本明細書により参考として援用される) に関連する。

20

【0003】

本出願はまた、「Multilayered polymerizing hydrogels for tissue regeneration」という名称で 2003 年 10 月 9 日出願された、米国仮特許出願番号第 60 / 416 , 882 号 (2002 年 10 月 9 日出願) に対する優先権を主張する一般の特許 (この全体の開示は、本明細書により参考として援用される) に関連する。

30

【0004】

(1. 発明の分野)

本発明は、細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルを作製する方法に関する。より具体的には、本発明は、細胞外マトリックスに共有結合されたポリマーヒドロゲル、およびそのようなヒドロゲルを組織開始重合 (tissue-initiated polymerization) で作製するための方法に関する。

【背景技術】

【0005】

(2. 背景技術)

生体材料の体との一体化 (integration) は、医学において長年にわたる問題である。体との適切な一体化に欠けると、移植の寿命および機能が犠牲になる。軟骨および骨のような硬質な組織は、一体化のために特定の課題を示す。

40

【0006】

軟骨は、それ自体で修復する能力を欠き、体重を支える機能を有する滑面を提供する高密度な細胞外マトリックスを有し、これが他の材料と一体化するために極度なチャレンジを軟骨にもたらす。軟骨マトリックスおよび全身に存在するコラーゲン線維は、構造的な完全性を有し、それゆえ固定および生体材料一体化のための標的である。

【0007】

ポリマーの生物学的用途における以前の研究 (例えば、Langer ら、特許文献 1 ; Hubbell ら、特許文献 2 ; Hubbell ら、特許文献 3) は、光エネルギーを捕

50

捉しポリマー前駆物質の重合を開始するためのフリーラジカルを形成するための光開始剤に依存していた。例えば、特許文献2および特許文献3では、エチルエオシンの使用が推奨されている。適切なフリーラジカルが組織の局所的な穏やかな酸化の後に生成される本発明の特定の実施形態の利点は、光開始剤が不必要であり、複雑さを減少させ費用を節約し、光開始剤の毒性に関するいかなる問題を軽減するということである。

【0008】

最も顕著には、先行技術のポリマー（例えば、Langerら、特許文献1；Hubbellら、特許文献2；Hubbellら、特許文献3）は、組織に共有結合しない。このことは、本発明のポリマーが可能なほどにこれらの発明のポリマーが組織と一体化しないのと同様に、これらの発明の強さおよび永続性を限定する。

10

【特許文献1】米国特許第6224893号明細書

【特許文献2】米国特許第6258870号明細書

【特許文献3】米国特許第6465001号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルを作製することが、本発明の全体的な目的である。

【課題を解決するための手段】

【0010】

20

（発明の要旨）

本発明の第1の好ましい実施形態において、方法は、以下の工程を包含する：

（a）露出された細胞外マトリックスを提供する工程；

（b）その細胞外マトリックスを、プライミング因子（priming agent）を用いる処理によってプライミングして、プライミングされた細胞外マトリックス（primed extracellular matrix）を作製する工程；

（c）そのプライミングされた細胞外マトリックスに重合可能因子（polymerizable agent）の溶液を添加する工程；ならびに

（d）そのプライミングされた細胞外マトリックスと重合可能因子とを反応させて、その細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルを作製する工程。

30

【0011】

この説明および添付の特許請求の範囲で使用される場合、「溶液」とは、溶液、懸濁液またはコロイドを意味する。

【0012】

本発明の第2の好ましい実施形態において、細胞外マトリックスは複数のチロシン残基を含み、プライミング工程は、細胞外マトリックスを酸化する工程を包含し、プライミング因子は酸化因子を含み、プライミングされた細胞外マトリックスは複数のチロシルラジカルを含み、重合可能因子はチロシルラジカルと反応し得るアクリレート基を含み、そして反応工程は重合可能因子をチロシルラジカルに結合させる工程および重合可能因子を架橋する工程を包含する。

40

【0013】

さらなる実施形態において、第2の実施形態の細胞外マトリックスは、生体内、好ましくは哺乳動物の生体、または最も好ましくはヒトの体内にある。

【0014】

さらに別の好ましい実施形態において、第2の実施形態の細胞外マトリックスは、コンドロイチン分解酵素ABCを用いる処理によって露出される。

【0015】

なおさらに好ましい実施形態において、第2の実施形態の細胞外マトリックスは、コラーゲンを含む。なおさらなる実施形態において、そのコラーゲンは軟骨にある。

【0016】

50

さらに別の好ましい実施形態において、第2の実施形態の酸化因子は、過酸化水素溶液である。代替的な酸化因子が使用され得、ビタミンCが挙げられる。

【0017】

なおさらに好ましい実施形態において、第2の実施形態のプライミング工程は、上記細胞外マトリックスおよび上記重合可能因子を電磁放射源に曝露する工程をさらに包含する。さらにより好ましい実施形態において、その電磁放射源は、紫外線放射源である。

【0018】

さらに別の好ましい実施形態において、第2の実施形態の重合可能因子は、アクリレート、ジアクリレート、オリゴアクリレート、ジメタクリレートおよびオリゴメタクリレートからなる群より選択される少なくとも1つのフリーラジカル重合可能因子を有する。

10

【0019】

なおさらに好ましい実施形態において、第2の実施形態の反応工程は、上記細胞外マトリックスおよび上記重合可能因子を紫外線放射源に曝露する工程を包含する。

【0020】

さらに別の好ましい実施形態において、第2の実施形態の架橋は、レドックス開始剤を使用することによる。なおさらに好ましい実施形態において、イオン架橋反応が使用される。さらに別の好ましい実施形態において、酵素的架橋反応が使用される。

【0021】

なおさらに好ましい実施形態において、第2の実施形態の方法は、経皮的に行われる。

【0022】

20

さらに別の好ましい実施形態において、拡散性薬物材料が第2の実施形態の上記重合可能因子とともに添加される。

【0023】

なおさらに好ましい実施形態において、複数の生細胞が第2の実施形態の上記重合可能因子とともに添加される。

【0024】

さらに別の好ましい実施形態において、組織における固体修復が第2の実施形態によって生じる。

【0025】

第3の好ましい実施形態は、以下の工程：

30

(a) 露出された細胞外マトリックスを提供する工程；

(b) その細胞外マトリックスをプライミング因子で処理することによってプライミングして、プライミングされた細胞外マトリックスを作製する工程；

(c) そのプライミングされた細胞外マトリックスに重合可能因子の溶液を添加する工程；および

(d) そのプライミングされた細胞外マトリックスと重合可能因子とを反応させて、その細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルを作製する工程

を包含する方法によって生成されるヒドロゲルであって、

ここで、上記細胞外マトリックスは複数のチロシン残基を含み、上記プライミング工程は上記細胞外マトリックスを酸化する工程を包含し、上記プライミング因子は酸化因子を含み、上記プライミングされた細胞外因子は複数のチロシルラジカルを含み、上記重合可能因子は上記チロシルラジカルと反応し得るアクリレート基を含み、そして上記反応工程は上記重合可能因子をチロシルラジカルに結合させる工程および上記重合可能因子を架橋する工程を包含する。

40

【0026】

第4の好ましい実施形態は、細胞外マトリックスの複数のチロシン残基においてそのマトリックス共有結合されたヒドロゲルである。さらに別の好ましい実施形態は、第3の実施形態のヒドロゲルであって、ここで、その細胞外マトリックスは、軟骨マトリックス中の複数のコラーゲン線維からなる。

【0027】

50

第5の好ましい実施形態は、軟骨組織に共有結合されたヒドロゲルを形成する方法であり、その方法は、以下：

(a) 軟骨組織中に配置される複数のコラーゲン線維中に配置される複数のチロシン残基を、グリカナーゼで処理することにより露出して、複数の多糖類を除去する工程；

(b) そのチロシン残基を過酸化水素溶液および紫外線光源で処理することによって酸化して、コラーゲン中に複数のチロシル基を生成する工程；

(c) 1以上のアクリレート基を含む重合可能因子を添加する工程；ならびに

(d) チロシル基と重合可能因子とを反応させて、コラーゲンに共有結合されたヒドロゲルを作製する工程

を包含する。

10

【0028】

第6の好ましい実施形態において、方法は、最初に列挙された実施形態の方法であり、ここで：細胞外マトリックスは複数のアミノ基を含み、プライミング因子はアルデヒド基を有する化合物およびアミノ基を有するキャリア化合物を含み、プライミング工程はプライミング因子を細胞外マトリックスと反応させて細胞外マトリックスとプライミング因子とを共有結合させる工程を包含し、プライミングされた細胞外マトリックスはプライミング因子に共有結合された細胞外マトリックスからなり、そして反応工程は重合可能因子をプライミングされた細胞外マトリックスに共有結合させる工程および重合可能因子を架橋する工程からなる。

【0029】

20

さらに好ましい実施形態において、第6の実施形態の細胞外マトリックスは生体内にあり、好ましくは哺乳動物の生体内、または最も好ましくはヒトの体内にある。

【0030】

さらに別の好ましい実施形態において、第6の実施形態の重合可能因子は、アクリレート、ジアクリレート、オリゴアクリレート、ジメタクリレートおよびオリゴメタクリレートからなる群より選択される少なくとも1つのフリーラジカル重合可能基を有する。

【0031】

なおさらに好ましい実施形態において、第6の実施形態の反応工程は、上記細胞外マトリックスおよび上記重合可能因子を紫外線放射源に曝露する工程を包含する。

【0032】

30

さらに別の好ましい実施形態において、第6の実施形態の架橋は、レドックス開始剤を使用することによる。なおさらに好ましい実施形態において、イオン架橋反応が使用される。さらに別の好ましい実施形態において酵素的架橋反応が使用される。

【0033】

なおさらに好ましい実施形態において、第6の実施形態の方法は、経皮的に行われる。

【0034】

なお別の好ましい実施形態において、拡散性薬物材料が第6の実施形態の上記重合可能因子とともに添加される。

【0035】

なおさらに好ましい実施形態において、複数の生細胞が第6の実施形態の上記重合可能因子とともに添加される。

40

【0036】

さらに他の好ましい実施形態において、組織における固体修復が第6の実施形態によって生じる。

【0037】

第7の好ましい実施形態は、以下の工程：

(a) 露出された細胞外マトリックスを提供する工程；

(b) その細胞外マトリックスをプライミング因子で処理することによってプライミングして、プライミングされた細胞外マトリックスを作製する工程；

(c) プライミングされた細胞外マトリックスに重合可能因子の溶液を添加する工程；

50

および

(d) プライミングされた細胞外マトリックスと重合可能因子とを反応させて、細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルを作製する工程を包含する方法によって生成されたヒドロゲルであって、

ここで、上記細胞外マトリックスは複数のアミノ基を含み、上記プライミング因子はアルデヒド基を有する化合物およびアミノ基を有するキャリア化合物を含み、上記プライミング工程は上記プライミング因子を上記細胞外マトリックスと反応させて上記細胞外マトリックスと上記プライミング因子とを共有結合させる工程を包含し、上記プライミングされた細胞外マトリックスは上記プライミング因子に共有結合された上記細胞外マトリックスからなり、そして上記反応工程は上記重合可能因子を上記プライミングされた細胞外マトリックスに共有結合させる工程および上記重合可能因子を架橋する工程を包含する。

10

【0038】

第8の好ましい実施形態は、細胞外マトリックス中の複数のアミノ基においてプライミング因子を介してその細胞外マトリックスに共有結合されたヒドロゲルである。

【0039】

別の実施形態において、本発明は、組織外植片を接着し、同時に移植片を形成するために使用される。広範な組織が接着され、同時に処置を可能にするのに十分な固有の粘着性を有する組織が提供される。組織としては、軟骨、骨、靱帯および腱が挙げられ得る。さらなる組織としては、肝臓、膵臓および筋肉が挙げられ得る。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0040】

(発明の詳細な説明)

生体材料は、医療用デバイスから人工移植植物、薬物送達コーティング、および組織再生の骨格に及ぶ用途に伴い、今日の医学において重要な役割を果たす。生体材料設計の戦略は、体に対して「不可視」である材料を作製する理念から、細胞を補充すること、再生を刺激すること、または組織の再構築を導くことによって周りの組織と積極的に相互作用する生体材料の開発へと発展した。従って、体は、反応を静めるように移植植物を線維性被膜で「取り囲む」のではなく、生体材料とポジティブに一体化するように促される。生体材料と周りの組織との間の界面は、その機能性および長期間の性能、特に、筋骨格移植植物に不可欠である。硬質の組織（例えば、軟骨および骨）との生体材料の一体化は、高密度な細胞外マトリックスの性質およびその組織が抵抗しなければならない強力な機械的な力に起因して、特に取り組み甲斐がある。さらに、軟骨組織は、治癒能力に欠き、天然もしくは人工的な軟骨、まして生体材料と一体化することの困難性を有し、それゆえ、本発明者らのモデル系として選択された。

30

【0041】

これまで、細胞外マトリックスへの生体材料の共有結合による生体材料の真の一体化は、達成されていない。

【0042】

本発明は、細胞外マトリックスへのバイオゲルの共有結合に関する。基礎的なタンパク質生化学の原理が、生体材料と組み合わせられて、生体材料の誘導された一体化のための一般系が作製され、これは、複数の組織型および生体材料用途に適用され得る。

40

【0043】

用語「ヒドロゲル」とは、本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、水の大容量画分を含み得る親水性架橋ポリマーをいう。本発明に従うより好ましいヒドロゲルは、約70体積%~90体積%を上回る水を含み得る。親水性ポリマーがインサイチュで形成される場合、その親水性ポリマーはそのヒドロゲルを作製するために使用された環境または溶液から、本質的に水を獲得し得る。

【0044】

用語「架橋」とは、本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、共有結合、イオン結合、水素結合またはそれらの任意の組み合わせの形成から生じる分子間架橋お

50

よび必要に応じて分子内架橋を含む組成物をいう。「架橋可能な」とは、架橋組成物を形成するための反応を行い得る成分または化合物をいう。

【0045】

本発明の重合可能因子は、モノマー、マクロマー、オリゴマー、ポリマーまたはそれらの混合物を含み得る。ポリマー組成物は、共有結合で架橋可能なポリマー、またはイオン架橋可能なポリマー、またはレドックス化学により架橋可能なポリマー、または水素結合により架橋可能なポリマー、またはそれらの任意の組み合わせから単独でなり得る。重合可能因子は、実質的に親水性かつ生体適合性であるべきである。

【0046】

用語「生体適合性」は、ポリマーに関連して使用される場合、当該分野で認識される。例えば、生体適合性ポリマーとしては、宿主（例えば、動物またはヒト）に対してそれ自体毒性でもなく、（そのポリマーが分解する場合）その宿主における毒性濃度でモノマーもしくはオリゴマーのサブユニットもしくは他の副産物を生成する速度で分解もしないポリマーが挙げられる。本発明の特定の実施形態において、生分解は、一般的に、ある生物におけるポリマーの（例えば、そのモノマーサブユニットへの）分解を含み、これは効果的に非毒性であることが公知であり得る。そのような分解から生じる中間体オリゴマー生成物は、異なる毒物学的特性を有し得るが、そうでなければ生分解は、酸化またはポリマーのモノマーサブユニット以外の分子を生成する他の生化学反応に参与し得る。結果的に、特定の実施形態において、インビボでの使用（例えば、患者への移植または注入）を意図される生分解性ポリマーの毒性学は、1以上の毒性分析後に決定され得る。目的のいづれの組成物も、生体適合性であるとみなされるために100%の純度を有することは必要ではない；実際には、その目的の組成物が上記のように生体適合性であることのみが必要である。それゆえ、目的の組成物は、生体適合性ポリマーの99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%またはそれ以下を含むポリマー（本明細書中に記載されるようなポリマーおよび他の材料および賦形剤が挙げられる）を含み得る。

10

20

【0047】

ポリマーまたは他の材料が生体適合性であるかを決定するために、毒性分析を行うことが必要であり得る。そのような分析は、当該分野で公知である。そのようなアッセイの一例は、生きた癌細胞（例えば、GT3TKB腫瘍細胞）を用いて、以下の様式で行われ得る：サンプルは、1M NaOH中37℃にて完全な分解が観察されるまで分解される。次いで、その溶液は、1M HClで中和される。約200mLの種々の濃度の分解サンプル生成物が、96ウェルの組織培養プレートに置かれ、ヒト胃癌細胞（GT3TKB）とともに1ウェルあたり104の密度で播種される。分解サンプル生成物は、GT3TKB細胞とともに48時間インキュベートされる。アッセイの結果が、相対増殖% 対組織培養ウェル中の分解サンプル濃度としてプロットされ得る。さらに、本発明のポリマー、ポリマー材料および処方物もまた、周知のインビボ試験（それらが、皮下移植部位において刺激または炎症の有意なレベルを引き起こさないことを確認するための、ラットにおける皮下移植）によって評価される。

30

【0048】

適切な親水性ポリマーとしては、合成ポリマー（例えば、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、部分的加水分解ポリ（ビニルアルコール）もしくは完全加水分解ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（エチルオキサゾリン）、ポリ（エチレンオキシド）-コ-ポリ（プロピレンオキシド）ブロックコポリマー（ポロキサマーおよびメロキサポル）、ポロキサミン）、カルボキシメチルセルロース、およびヒドロキシアルキル化セルロース（例えば、ヒドロキシエチルセルロースおよびメチルヒドロキシプロピルセルロース）、および天然のポリマー（例えば、ポリペプチド、ポリ多糖類または炭水化物（FicollTM）、ポリショ糖、ヒアルロン酸、デキストラン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリンまたはアルギネート）、およびタンパク質（例えば、ゼラチン、コラーゲン、アルブミンまたはオボアルブミンあるいはそれ

40

50

らのコポリマーまたはブレンド)が挙げられる。本明細書中で使用される場合、「セルロース」は、セルロースおよび上で記載される型の誘導体を包含する；「デキストラン」は、デキストランおよびその類似の誘導体を包含する。

【0049】

ヒドロゲルを形成するために使用され得る材料の例としては、改変アルギネートが挙げられる。アルギネートは、海藻から単離された炭水化物ポリマーであり、これは、例えば、WO 94/25080 (この開示は本明細書中に参考として援用される)に記載されるように、カルシウムのような二価カチオンに曝露することによって架橋してヒドロゲルを形成し得る。アルギネートは、水中で室温にて、二価カチオンの存在下でイオン架橋して、ヒドロゲルマトリックスを形成する。改変アルギネート誘導体は合成され得、ヒドロゲルを形成するための改良された能力を有する。出発物質としてのアルギネートの使用は有利である、なぜなら、アルギネートは、1よりも多い供給源から利用可能であり、十分な純度および特徴で利用可能である。本明細書中で使用される場合、用語「改変アルギネート」とは、改変されたヒドロゲル特性を有する化学的に改変されたアルギネートをいう。天然に存在するアルギネートは、化学的に改変されてより迅速に分解するアルギネートポリマー誘導体を生成し得る。例えば、アルギネートは、化学的に切断されてゲル化可能な多糖ブロックのより小さいブロックを生成し得、直鎖状コポリマーが別の予め選択された部分(例えば、乳酸または ϵ -カプロラクトン)とともに形成され得る。得られるポリマーとしては、イオン触媒ゲル化を可能にするアルギネートブロック、および合成の設計に依存してより迅速な分解を生じるオリゴエステルブロックが挙げられる。あるいは、アルギネートポリマーが使用され得、ここで、マンヌロン酸対グルロン酸の比は、フィルムゲルを生成せず、このアルギネートポリマーは疎水性の水不安定鎖(ϵ -カプロラクトンのオリゴマー)で誘導体化される。疎水性相互作用は、体内で分解するまでゲル化を誘導する。

【0050】

あるいは、一価カチオン(細菌の多糖類(例えば、ジェランガム)および植物性多糖類(例えば、カラゲナン)が挙げられる)に曝露することによってゲル化する多糖類は、上で記載されたアルギネートの架橋に利用可能な方法と類似の方法を用いて架橋して、ヒドロゲルを形成し得る。一価カチオンの存在下でゲル化する多糖類は、例えば、生理学的レベルのナトリウムを含む溶液に曝露される際に、ヒドロゲルを形成する。ヒドロゲル前駆物質溶液はまた、非イオン(例えば、マンニトール)で浸透圧的に調節され得、次いで、注入されてゲルを形成する。

【0051】

非常に粘性の液体または揺変性であり、構造のゆっくりとした進化により長時間にわたってゲルを形成する多糖類もまた有用である。例えば、整髪用ジェルのような一貫性有する注入可能なゲルを形成するヒアルロン酸が使用され得る。改変ヒアルロン酸誘導体が特に有用である。本明細書中で使用される場合、用語「ヒアルロン酸」とは、天然のヒアルロン酸および化学的に改変されたヒアルロン酸をいう。改変ヒアルロン酸は、架橋および生分解の速度および程度を調節するように予め選択された化学改変とともに設計されて合成され得る。例えば、改変ヒアルロン酸が設計されて合成され得、ポリマーにより疎水性およびゲル形成性を与えるために相対的に疎水性の基(プロピオン酸およびまたはベンジル酸)でエステル化されるか、あるいはアミンとともに移植されて静電的自己集合を促進する。従って、改変ヒアルロン酸が合成され得、応力下で流動するという点で注入可能であるが、応力下でない場合はゲル様構造を維持しない。ヒアルロン酸およびヒアルロン誘導体は、Genzyme Cambridge, Mass. および Fidia, Italy から利用可能である。

【0052】

他のポリマーヒドロゲル前駆物質としては、ポリエチレンオキシド-ポリプロピレングリコールブロックコポリマー(例えば、PluronicTM および TetronicsTM)が挙げられ、これらは、Steinleitnerら、Obstetrics

10

20

30

40

50

& Gynecology, vol. 77, pp. 48 - 52 (1991); および te inleitnerら、Fertility and Sterility, vol. 57, pp. 305 - 308 (1992)に記載されるように水素結合によって、および/または温度変化によって架橋される。使用され得る他の材料としては、フィブリン、コラーゲンおよびゼラチンのようなタンパク質が挙げられる。ポリマー混合物がまた使用され得る。例えば、混合の際に水素結合によってゲル化するポリエチレンオキシドとポリアクリル産との混合物が使用され得る。1つの実施形態において、ポリアクリル酸の5% w/w溶液と5% w/wポリエチレンオキシド(ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン)100,000との混合物が組み合わせられて、時間の経過に伴って(例えば、数秒間以内に急速に)ゲルを形成する。

10

【0053】

荷電した側鎖を有する水溶性ポリマーは、ポリマーを反対の荷電のイオン(ポリマーが酸性の側鎖を有する場合はカチオン、またはポリマーが塩基性側鎖を有する場合はアニオン)を含む水溶液と反応させることによって架橋され得る。ヒドロゲルを形成するために酸性の側鎖を有するポリマーを架橋するためのカチオンの例は、一価カチオン(例えば、ナトリウム)、二価カチオン(カルシウム、および多価カチオン(例えば、銅、カルシウム、アルミニウム、マグネシウム)、ストロンチウム、バリウム、およびスズ、ならびに二官能性有機カチオン、三官能性有機カチオン、または四官能性有機カチオン(あるきるアンモニウム塩))である。これらのカチオンの塩の水溶液がポリマーに添加されて、軟性の高度に膨張したヒドロゲルおよび膜を形成する。カチオンの濃度が高くなるか、または原子価が高くなるほど、ポリマーの架橋の程度が大きくなる。さらに、ポリマーは酵素的に架橋され得る(例えば、フィブリンとトロンビン)。

20

【0054】

適切なイオン架橋可能基としては、フェノール基、アミン基、イミン基、アミド基、カルボン酸基、スルホン酸基およびリン酸基が挙げられる。負に帯電した基(例えば、カルボン酸イオン、スルホン酸イオンおよびリン酸イオン)は、カルシウムイオンのようなカチオンと架橋され得る。アルギネートのカルシウムイオンとの架橋は、このタイプのイオン架橋の例である。正に帯電した基(例えば、アンモニウムイオン)は、負に帯電したイオン(例えば、カルボン酸イオン、スルホン酸イオンおよびリン酸イオン)と架橋され得る。好ましくは、負に帯電したイオンは、1より多いカルボン酸基、スルホン酸基またはリン酸基を含む。

30

【0055】

ヒドロゲルを形成するためのポリマーの架橋のための好ましいアニオンは、低分子量ジカルボン酸(例えば、テレフタル酸、硫酸イオンおよび炭酸イオン)のような一価アニオン、二価アニオンまたは三価アニオンである。これらのアニオンの塩の水溶液がポリマーに添加されて、カチオンに関して記載されるように、軟質の高度に膨張したヒドロルおよび膜を形成する。

【0056】

種々のポリカチオンが錯体を形成するために使用され、それによって、ポリマーヒドロゲルが半透過性の表面膜に安定化される。使用され得る材料の例としては、基礎的な反応基(例えば、アミン基またはイミン基)を有し、3,000と100,000との間の好ましい分子量を有するポリマー(例えば、ポリエチレンイミンおよびポリリジン)が挙げられる。これらは、市販されている。ポリカチオンのひとつはポリ(L-リジン)である; 合成ポリアミンの例は以下である: ポリエチレンイミン、ポリ(ビニルアミン)およびポリ(アリルアミン)。また、多糖類、キトサンのような天然のポリカチオンが存在する。

40

【0057】

ポリマーヒドロゲルにおける基礎的な表面基を用いる反応によって半透過性膜を形成するために使用され得るポリアニオンとしては、アクリル酸のポリマーおよびコポリマー、メタクリル酸、ならびにアクリル酸の他の誘導体、スルホン化ポリスチレンのようなペン

50

ダントSO₃H基を有するポリマー、ならびにカルボン酸基を有するポリスチレンが挙げられる。これらのポリマーは、改変されて活性種重合可能基および/またはイオン架橋し得る基を含み得る。これらの基を含むために親水性ポリマーを改変するための方法は、当業者に周知である。

【0058】

ポリマーは、内因的に生分解性であり得るが、好ましくは、（溶解の予測性に対して）生体適合性は低いが排泄を可能にするのに十分に低分子量である。ヒト（または使用が意図される他の種）において排泄を可能にするための最大分子量は、ポリマーの型に伴って変わるが、多くの場合、約20,000ダルトン以下である。内因的に生体適合性なので、使用可能であるが一般的な使用にはあまり好ましくないものは、水溶性の天然ポリマーおよび合成等価物または誘導体であり、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、および分解性多糖類が挙げられる。

10

【0059】

ポリマーは、少なくとも600、好ましくは2000以上、そしてより好ましくは少なくとも3000の分子量を有する単一のブロックであり得る。あるいは、ポリマーは、他の基によって結合された2以上の水溶性ブロックを含み得る。そのような結合基としては、生分解性結合、重合可能な結合、またはそれら両方が挙げられ得る。例えば、不飽和ジカルボン酸（例えば、マレイン酸、フマル酸またはアスコルビン酸）は、ヒドロキシ基を含む親水性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）を用いてエステル化されても、アミン基を含む親水性ポリマー（例えば、ポロキサミン）を用いてアミド化されてもよい。

20

【0060】

（共有結合で架橋可能なポリマー溶液）

共有結合で架橋可能なヒドロゲル前駆物質もまた有用である。例えば、キトサンのような水溶性ポリアミンは、ポリエチレングリコールジイソチオシアネートのような水溶性ジイソチオシアネートと架橋し得る。ジイソチオシアネートはアミンと反応して、化学的に架橋されたゲルを形成する。アミン（例えば、ポリエチレングリコールジアルデヒド）とのアルデヒド反応もまた使用され得る。水溶性ヒドロキシル化ポリマーもまた使用され得る。

【0061】

あるいは、ポリマーが使用され得、そのポリマーは、ラジカル開始剤と接触する際にラジカル反応によって架橋する置換基を含む。例えば、光化学的に架橋され得るエチレン不飽和基を含むポリマーが、WO 93/17669（その開示は、本明細書に参考として援用される）に開示されるように使用され得る。この実施形態において、少なくとも1つの水溶性領域、生分解性領域および少なくとも2つのフリーラジカル重合可能領域を含む

30

水溶性マクロマーが提供される。マクロマーは、重合可能領域を生成されたフリーラジカルに曝露することによって（例えば、感光性化学物質および/または光によって）重合される。これらのマクロマーの例は、PEG-オリゴラクチル-アクリレートであり、ここで、アクリレート基はラジカル開始系（例えば、エオシン色素）を用いて、または紫外光もしくは可視光に対する簡潔な曝露によって重合される。さらに、光化学的に架橋され得るシンナモイル基を含む水溶性ポリマーは、Matsudaら、ASAIO Trans, vol. 38, pp. 154-157 (1992)に開示される用に、使用され得る。

40

【0062】

用語「活性種重合可能基」は、活性種への曝露の際のポリマー連結から生じるさらなる共有結合を形成する能力を有する反応性官能基として定義される。活性種としては、フリーラジカル、カチオン、およびアニオンが挙げられる。適切なフリーラジカル重合可能基としては、ビニルエーテルのようなエチレン不飽和基（すなわち、ビニル基）、アリル基、不飽和モノカルボン酸、不飽和ジカルボン酸、および不飽和トリカルボン酸が挙げられる。不飽和モノカルボン酸としては、アクリル酸、メタクリル酸およびクロトン酸が挙げ

50

られる。不飽和ジカルボン酸としては、マレイン酸、フマル酸、イタコン酸、メサコン酸またはシトラコン酸が挙げられる。1つのジにおいて、活性種重合可能基は、好ましくは、親水性ポリマーの1以上の末端に位置される。別の実施形態において、活性種重合可能基は、1以上の親水性ポリマーを含むブロックコポリマー内に位置され、個々のブロックを形成する。好ましい重合可能基は、アクリレート、ジアクリレート、オリゴアクリレート、ジメタアクリレート、オリゴメタアクリレートおよび他の生物学的に受容可能な光重合可能基である。アクリレートは、最も好ましい活性種重合可能基である。

【0063】

一般的に、ポリマーは、水性溶液（例えば、水、緩衝化塩溶液または水性アルコール溶液）中で少なくとも部分的に可溶性である。上記の他のポリマーの合成方法は、当該分野で公知である。例えば、「Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymerics Amines and Ammonium Salts」、E. Goethals 編（Pergamon Press、Elmsford、N.Y. 1980）を参照のこと。ポリ（アクリル酸）のような多くのポリマーが、市販されている。

10

【0064】

天然に存在するポリマーおよび合成ポリマーは、当該分野で利用可能で、例えば、March「Advanced Organic Chemistry」、第4版、1992、Wiley-Interscience Publication、New York に記載される化学反応を使用して、改変され得る。そのような方法は、本明細書中に記載されるように、例えば、アクリレート基を導入するために使用され得る。

20

【0065】

好ましくは、活性種または架橋可能基を含む親水性ポリマーは、平均で、少なくとも1.02の重合可能基または架橋可能基を含み、そしてより好ましくは、各々が平均で2以上の重合可能基または架橋基を含む。各々の重合可能基は鎖状に重合されるので、架橋ヒドロゲルは、1つのポリマーあたり1よりごくわずかに多い反応基（すなわち、平均で1.02重合可能基）を用いて生成され得る。しかし、より高い割合が好ましく、優れたゲルは、ほとんどもしくはすべての分子が2以上の反応性二重結合を有するポリマー混合物中で得られ得る。親水性ポリマーの一例であるポロキサミンは、4つの腕（arm）を有し、それゆえ、容易に改変されて4つの重合可能基を含み得る。

30

【0066】

（細胞の供給源）

ヒドロゲルは細胞の送達に使用され得る。細胞は、ドナーから、ドナー由来の細胞の細胞培養物から、または確立された細胞培養系統から得られ得る。好ましい実施形態において、同一の種および好ましくは同一の免疫学的プロファイルの細胞が、生検によって、患者または近親者のいずれかから得られ、次いで、その細胞は、標準的な条件を使用して培養物中でコンフルエンスまで増殖され、そして必要とされるときに使用される。免疫反応を誘発する可能性が高い細胞（例えば、免疫学的に異なる個体由来のヒト筋細胞）が使用される場合、レシピエントは、必要に応じて、例えば、ステロイドおよび他の免疫抑制剤（例えば、シクロスポリン）のスケジュールを使用して免疫抑制され得る。しかし、最も好ましい実施形態において、細胞は自系である。細胞はまた、例えば、アフエレーシスによって、患者の血液から得られ得る。

40

【0067】

好ましい実施形態において、細胞は、ドナーから直接得られ、洗浄され、ポリマー材料と組み合わせて直接移植される。細胞は、組織培養の分野の当業者に公知の技術を使用して培養される。生検によって得られた細胞は、収集されて培養され、汚染細胞を除去する必要がある場合は継代される。軟骨細胞および筋細胞の単離は、WO 94/25080 に示され、この開示は本明細書中に援用される。

【0068】

細胞接着および生存度は、走査型電子顕微鏡、組織学、および放射性同位体による定量

50

的評価を使用して評価され得る。移植された細胞の機能は、上記の技術と機能的アッセイとを使用して決定される。例えば、肝細胞の場合、インビボでの肝機能研究は、カニユーレをレシipientの総胆管に置くことによって行われ得る。次いで、胆汁が徐々に収集され得る。胆汁色素が、非誘導体化テトラピロールを探すために高速液体クロマトグラフィーによって分析されるか、またはP-グルクロニダーゼによる処理を伴うかもしくはは処理を伴わないかのいずれかのジアゾ化アゾジピロールアントラニル酸エチルを用いる反応によってアゾジピロールに変換した後に薄層クロマトグラフィーによって分析され得る。二抱合型(diconjugated)ビリルビンおよび一抱合型(monocjugated)ビリルビンもまた、抱合型胆汁色素のアルカリメタノール分解後に、薄層クロマトグラフィーによって決定され得る。一般的には、機能する移植肝細胞の数が増加するにつれて、抱合型ビリルビンのレベルが増大する。単純な肝機能試験もまた、血液サンプル(例えば、アルブミン生成物)で行われ得る。

10

【0069】

異種臓器機能研究は、移植後の細胞機能の程度を決定するために必要とされるように、当業者に公知の技術を使用して行われ得る。例えば、膵臓の膵島細胞は、肝細胞を移植するために特異的に使用される様式と類似の様式で送達されて、糖尿病を治癒するためのインスリンの適切な分泌によるグルコース調節を達成し得る。他の内分泌組織もまた移植され得る。標識したグルコースを使用する研究、ならびにタンパク質アッセイを使用する研究は、ポリマー骨格における細胞の質量を定量するために行われ得る。次いで、細胞の質量に関するこれらの研究は、適切な細胞の質量がどれだけかを決定するために、細胞の機能研究と関連付けられ得る。軟骨細胞の場合、機能は、周りに付着する組織に対して適切な構造的サポートを提供することと定義される。

20

【0070】

この技術は、多数の細胞の効率的な移動および新たな組織もしくは組織等価物を生じる目的での移植片移植の促進のために、三次元骨格内で、複数の細胞型(遺伝的に変化された細胞が挙げられる)を提供するために使用され得る。この技術はまた、細胞移植片の免疫保護のために使用され得、一方で新たな組織もしくは組織等価物は宿主免疫系を排除することによって成長する。

【0071】

本明細書中に記載されるように移植され得る細胞の例としては、軟骨細胞および軟骨を形成する他の細胞、骨芽細胞および骨を形成する他の細胞、筋細胞、線維芽細胞、ならびに臓器細胞が挙げられる。本明細書中で使用される場合、「臓器細胞」は、肝細胞、膵島細胞、腸起源の細胞、腎臓由来の細胞、ならびに物質を合成して分泌するため、または物質を代謝するために主として作用する他の細胞を包含する。

30

【0072】

別の実施形態において、本発明は、移植片を作製するために使用され得、ここで、細胞は治療タンパク質を分泌するように遺伝的に改変されている。次いで、細胞構造物が、分泌されたタンパク質から利益を受け得る部位に移植される。例えば、脈管形成因子を分泌する細胞は、増大した脈管形成から利益を受け得る創傷または損傷組織に対して近位に置かれる移植片を形成するために使用され得る。そのような遺伝的に操作された細胞を調製するための適切な技術は、当業者の範囲内にあり、米国特許第6、398、816(この内容は、本明細書中に参考として援用される)に開示される技術が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0073】

(添加される生物学的に活性な材料)

ヒドロゲルは、薬物送達に使用され得る。ヒドロゲルに組み入れられる材料の例は、タンパク質、多糖類、核酸分子、および合成有機分子または合成無機分子である。これらは、治療目的、予防目的または診断目的に有用であり得る。薬物としては、抗生物質、抗ウイルス剤、化学療法剤、抗脈管形成剤、ホルモン、血流に効果を有する薬物、抗炎症剤、および慣用的に使用される多くのその他のものが挙げられ得る。

50

【 0 0 7 4 】

ポリマーマトリックスは、体液性因子と組み合わせられて、細胞移植および細胞移植を促進し得る。例えば、ポリマーマトリックスは脈管形成因子、抗生物質、抗炎症剤、成長因子、分化を誘導する化合物、および細胞培養の分野で当業者に公知である他の因子と組み合わせられ得る。

【 0 0 7 5 】

例えば、体液性因子は、移植片の形成または移植術の前に、細胞ポリマー懸濁液とともに徐放性形態中に混合され得る。あるいは、ヒドロゲルは、単離された細胞懸濁液と組み合わせられる前に、体液性因子またはシグナル認識配列に結合するように改変され得る。

【 0 0 7 6 】

(イオン架橋可能なポリマーと共有結合で架橋可能なポリマーとのブレンド)

好ましい実施形態において、ポリマー溶液は、架橋して半相互貫入ネットワークを形成する2以上のポリマーから形成される。例えば、そのブレンドは、イオン架橋可能なPEOおよびジメタクリレート化PEOを、好ましい実施形態における共有結合で架橋可能なポリマーの重量で10%と40%との間の範囲で含み得る。あるいは、2つの共有結合で架橋可能なポリマーのブレンドは、それらが互いではなく架橋ホモポリマーを形成することに基づいて使用され、選択され得る。半相互貫入ネットワークの利点としては、特に形成外科で使用するために、非架橋ポリマーの拡散が分解特性の利点を提供し、機械的特性を高めることが挙げられる。

【 0 0 7 7 】

(細胞懸濁液)

好ましくは、ポリマーは、水溶液、好ましくは0.1Mリン酸カリウム溶液に、生理学的pHで、ポリマーヒドロゲルを形成する濃度まで溶解される。単離された細胞は、100万細胞/mlと5千万細胞/mlとの間の濃度、好ましくは1千万細胞/mlと2千万細胞/mlの濃度まで、その溶液に懸濁される。

【 0 0 7 8 】

(移植方法)

好ましい実施形態において、送達されるべき分子または細胞は、重合可能因子と混合され、その分子または細胞を移植することが望ましい部位に直接注入され、その後、ポリマーが架橋してヒドロゲルを形成する。当然のことながら、生物学的に活性な分子または細胞を含まない重合可能因子を含有する組成物が、所望の部位に直接注入し得ることが理解されるべきである。

【 0 0 7 9 】

分子または細胞が注入される部位は、分子の必要量または細胞数のように個々の必要性に基づいて決定される。臓器機能を有する細胞(例えば、肝細胞または膵島細胞)について、混合物は、腸間膜、皮下組織、腹膜後腔、腹膜前腔、および筋肉内腔に注入され得る。軟骨の形成のために、細胞は、軟骨形成が所望される部位に注入される。また、注入溶液を成形するために外部モールド(external mold)を適用し得る。さらに、重合の速度を制御することによって、粘度で成形されたような細胞-ヒドロゲル注入移植片を成形し得る。あるいは、混合物がモールドに注入され、ヒドロゲルが固められ、次いで、材料が移植され得る。

【 0 0 8 0 】

懸濁液は、シリンジおよび針を介して特定の領域(膨張性因子(bulking agent)が所望される領域、すなわち、軟部組織変形(例えば、先天性疾患もしくは後天性疾患に起因するかまたは外傷、火傷などに続く筋萎縮領域とともに見られる変形))に直接注入され得る。この例は、神経損傷に続く筋萎縮を有する患者の胴体の上部への懸濁液の注入である。

【 0 0 8 1 】

懸濁液はまた、先天性疾患病状もしくは後天性疾患病状または外傷もしくは火傷に続く硬組織欠損(例えば、骨欠損または軟骨欠損)に対する膨張性薬剤として注入され得る。

10

20

30

40

50

この例は、外傷に続いて骨変形が存在する頭蓋周囲の領域への注入である。これらの事例での注入は、局部麻酔もしくは全身麻酔下で、針およびシリンジを使用して必要とされる領域へ直接行われる。

【0082】

懸濁液はまた、直接的触診によって、例えば、精管の内部に針を置き、注入された膨張性材料 (bulking substance) でそれを閉鎖することによって、経皮的に注入され、それによって患者を不妊にし得る。この懸濁液はまた、X線透視コンピュータ連動断層撮影 (fluoroscopic computed tomography)、超音波コンピュータ連動断層撮影 (sonographic, computed tomography)、磁気共鳴画像法、または他の型の放射線誘導装置を用いて、カテーテルまたは針を通して注入され得る。このことは、膨張性因子を必要とするいずれかの体内の特定の器官または他の組織領域への、血管性の接近または経皮的な接近のいずれかによる、この物質の配置または注入を可能にする。

10

【0083】

さらに、この物質は、腹腔鏡または胸腔鏡を通じて、任意の腹膜内もしくは腹膜外器官または胸部器官へ注入され得る。例えば、懸濁液は、胃食道逆流を矯正するため、胃食道接合部の領域に注入され得る。これは、胃食道領域の食道部分に物質を注入する胸腔鏡によってか、または腹腔鏡を介して胃食道領域の胃部分に物質を注入することによって、あるいは組み合わせたアプローチによって行われ得る。

【0084】

20

物質はまた、膀胱尿管逆流を処置するために使用され得る。逆流の内視鏡的処置のためのその使用に加えて、注入可能な自家筋肉細胞の系もまた、他の医学的状態 (例えば、尿失禁および直腸の失禁、発声障害、形成性の再構成 (plastic reconstruction)、および注入可能な永久的に生体適合性の材料が必要とされるいずれかの場所) の処置のために適用可能であり得る。単離された細胞を注入を介して送達するための、注入可能なポリマーを使用するための方法は、例えば、WO 94/25080に記載されている。

【0085】

逆流および失禁を処置するための細胞 - ポリマー懸濁物の使用に加えて、上記懸濁液はまた、生体適合性の永久的に注入可能な材料を必要とするヒトの身体のいずれかの場所におけるその適用と同様に、再建手術に適用され得る。懸濁液は、内視鏡的に注入され得る (例えば、発声障害の処置のための声帯への注入のために喉頭鏡を通じて、または患者を不妊にさせる方法としてのファローピウス管への注入のために子宮鏡を通じて、または直腸周囲の括約筋領域へ物質を注入し、それによって括約筋領域の抵抗性を増加させて患者に便通を節制させるために直腸鏡を通じて、注入され得る)。

30

【0086】

この技術は、例えば、注文成形した細胞インプラントが、3次元な組織欠損を再構成するために使用され得る。例えば、ヒトの耳の型が作製され得、そして軟骨細胞 - ヒドロゲルレプリカが形成、移植されて失った耳を再構成し得る。細胞はまた、注入を通じて送達される3次元構造の形態で移植され得る。

40

【0087】

特定の有用な実施形態において、線維軟骨および軟組織、特に半月板の断裂 (末梢半月板の断裂を含む) が、断裂部位への本開示の組成物の適用、およびそれによってヒドロゲルを線維軟骨または軟組織に共有結合させることによって、修復される。代表的に、半月板の脈管領域の断裂は、関節鏡技術を用いることによって修復される。本発明の組成物の適用のための機器は、前膝部の門 (anterior knee portal) として働く小さな切開部を通じて挿入され得る。縫合糸またはクリップが、補足的な支持体として半月板修復装置および半月板を通過して、見積もられた場所において断裂した縁部を維持し得る。重合可能な因子および必要に応じて細胞 (例えば、軟骨細胞) を含有する本発明の組成物の使用は、半月板の断裂の縁部に再度近づき、その断裂の治癒を可能にする。

50

【 0 0 8 8 】

別の実施形態において、本発明の組成物は、骨膜の断裂または欠損を修復するために使用される。このような骨膜の欠損は、骨折部位の周りにしばしば生じる、ここでは骨膜は通常破壊され、そして骨部分脱臼に対する膜障壁として働くことができない。断裂または欠損の部位に対する本開示の組成物（例えば、細胞 - ポリマー懸濁物）の適用、およびそれによって、骨膜に対してヒドロゲルが共有結合することによって、骨膜の修復および/または再増殖が達成され得る。骨マトリックス内に由来する形態形成タンパク質は、骨膜由来の間葉幹細胞を誘引する。誘引された構成要素は、次いで、患者による新たな骨形成のために必須である骨形成細胞へと分化するように方向付けられる。したがって、骨膜を修復することによって、本発明の組成物および方法はまた、骨における欠損の再生を支援する。

10

【 0 0 8 9 】

別の実施形態において、本発明の組成物は、軟骨修復法の一部として、骨膜および他の細胞外マトリックスを軟骨に結合するために使用される。軟骨の欠損は、しばしば、滑膜性の連結内に起こり、そしてこれらを修復することを試みるために使用される方法は、欠損部位への細胞の移植および所定の位置における縫合による、欠損部位にわたる骨膜または他の細胞外マトリックスの結合を包含する。縫合法は、困難であり、周辺の関節軟骨を損傷する可能性がある。本開示の組成物の適用、そしてそれによる骨膜および軟骨に対するヒドロゲルの共有結合ならびに移植された細胞の欠損部位への封入により、関節軟骨の修復が達成され得る。

20

【 0 0 9 0 】

別の実施形態において、本発明の組成物は、腸管下の粘膜下組織および他の細胞外マトリックスの調製物を腱または靱帯に結合するために（これらの組織の修復を増強するために使用される場合に）使用され得る。腱および靱帯の断裂は、例えば、回旋腱板においてしばしば起こり、そして外科的修復が使用されて、修復部位にわたって腸管下の粘膜下組織および他の細胞外マトリックス調製物を封入して、回旋腱板と一緒におよび骨に縫合して、修復部位を増強する。しかし、これらの材料は、所定の位置に縫合され、修復領域の多くにわたっての物理的接触は乏しい。本開示の組成物を適用し、それによってヒドロゲルが腸管下の粘膜下組織または他の細胞外マトリックスの調製物、および回旋腱板に共有結合することによって、結合の増強が達成され得、そして修復の改善が達成される。

30

【 0 0 9 1 】

別の実施形態において、本発明の組成物は、回旋腱板の修復に使用される。突然の衝撃または一貫した摩耗および断裂によって引き起こされる肩の傷害は、多くの場合、回旋腱板における部分的断裂もしくは完全断裂を修復するための手術を必要とする。肩関節の一部として、回旋腱板は、4つの筋の腱から作られ、上腕骨または上腕の骨に結合する。回旋腱板手術の間、回旋腱板の断裂の縁部は、上腕骨に再結合される。欠損または損傷された腱を強化するため、外科医は、伝統的に、患者自身の体由来またはドナーの体由来の自家移植片または同種異系移植組織片に頼ってきた。本開示の別の実施形態において、腱に共有結合されるようになる本発明の組成物の適用は、骨格として働き得、かつ新たな組織が成長するに従って徐々に消失する、強靱な、吸収可能なフレームを提供することによって回旋腱板の腱を再生させるための方法を提供する。本発明の組成物は、任意の外科的技術（経皮的または腹腔鏡的アプローチが挙げられる）を使用して導入され得る。1つの送達機構として、肩を通して通路が形成され得、その通路を通して本発明の組成物が導入される。

40

【 実施例 】

【 0 0 9 2 】

本発明はここで、特定の教示的、非限定的な実施例を参照して記載される。

【 0 0 9 3 】

（チロシル媒介性一体化の実施例および試験）

本実施形態は、組織開始光重合（t i s s u e - i n i t i a t e d p h o t o p o 50

l y m e r i z a t i o n) に関する。ここで組織は、活発に光誘導性のゲル化または光重合を引き起こし、そして真の組織 - 生体材料一体化を生じる。

【0094】

ポリマーを細胞外マトリックスに共有結合するための本発明の例示的方法は、以下に考察される。具体的に、ポリマーを軟骨に共有結合するための方法、またはアクリレート - チロシル化学を用いた「組織開始光重合」は、図1に示される。この方法は、以下の工程を包含する：(1) 酵素処理によって軟骨中の多糖を除去して、コラーゲンネットワークを露出する工程；(2) 低強度のUV照射下での、 H_2O_2 を用いたコラーゲン上のチロシン残基の光酸化による、チロシルラジカルのインサイチュ生成と、それにより細胞外マトリックスをプライミングする工程；ならびに(3) 重合可能な因子のマクロマー溶液の導入、そしてチロシンラジカル開始およびUV励起を介したインサイチュ光ゲル化。上記反応は、組織成分によって開始されるので、上記マクロマーは、組織に移植 (g r a f t) (共有結合) され、加えて架橋形成 (ゲル化) し、固体の架橋されたネットワークを形成する。酵素処理または酸化的処理が単独で行われた場合、マクロマーおよび軟骨が光に曝露された場合、ヒドロゲルは形成されない。しかし、ある環境において、組織は、最低限にグリコシル化され、そして組み込みが、いくつかの場合、酵素処理な必要性なしで進行し得る。

10

【0095】

コラーゲンは、身体における遍在性タンパク質であり、構造的役割および生物学的役割の両方を果たし、したがって本発明の生体材料一体化のための理想の標的である。軟骨中の架橋されたII型コラーゲンは、組織の優れた張力および動的な機械的特性に関与し、このことは、このII型コラーゲンをポリマー移植体に反応開始させ、そして固定するための理想的な標的とする。しかし、コラーゲンは、本発明の方法のための唯一の適切な細胞外マトリックスタンパク質ではない：多くの数の露出可能なチロシン残基を有する任意のタンパク質が適切である。

20

【0096】

(実施例I)

例示的なインビトロプロトコールが以下に考察される。新鮮なウシ胎仔軟骨チップの表面を、コンドロイチン分解酵素ABC (5単位/ml、Tris (pH 8.1) 中) で、37 で1時間処理した。これらの表面の光酸化を、 H_2O_2 (5%) およびUV照射 (365 nm ; 3 mW / cm²) を用いて5分間行った。過剰の H_2O_2 を除去した。予めアルゴンでバブリングしたPEODM (ポリ [エチレングリコール] ジメタクリレート、15% および20% w/v) を、光開始剤なしで軟骨表面に添加した。この反応物を、30分間UV照射 (365 nm ; 8 mW / cm²) した。

30

【0097】

軟骨 - 生体材料構築物において化学的および形態学的分析を行い、組織開始重合およびゲル化を確認した (図2)。ネイティブ軟骨の表層は、フーリエ変換赤外分光 (ATR - FTIR) によって化学的に見られるように、タンパク質、プロテオグリカン、および結合した水の混合物である (スペクトルd)。コンドロイチン分解酵素ABCによる軟骨表面の酵素処理の後、多糖類のピークは消失し、一方、代表的アミドタンパク質のバンドはさらに明らかであり (FTIR スペクトルc)、このことは、軟骨表面上でのコラーゲンの露出を示唆する。ヒドロゲルを、組織開始光重合と標準的光開始重合システムとの両方を用いて、軟骨表面で合成した。次いで、界面における軟骨表面を、凍結破碎後に分析した。標準的光開始システムを用いた軟骨表面の化学的および形態学的分析は、酵素処理された表面と比較してほとんど差がないことを示した。しかし、組織開始光重合に供された軟骨表面の化学的分析 (スペクトルa) は、標準的光重合システム (スペクトルb) と比較した場合、架橋されたネットワークのエステル基およびエステルカルボニル基由来の強いシグナルおよびポリ (エチレンオキシド) (PEO) マクロマーの、945 cm⁻¹ における特徴的バンドを示した。

40

【0098】

50

制御された共有結合性一体化 (covalent integration) は、より安定な生体 - 組織界面を提供する可能性があり、したがって、結合の機械的機能性を検査した。リン酸緩衝化生理食塩水中での 24 時間の平衡化の後、チロシル - (「Cart Gel」) を用いて作製された組織開始軟骨 - ヒドロゲル複合体を、図 3 に示すように 2 つの片に分割した。ゲル層の上半分を分割し、そして「Gel - 1」と名付けた；同じ大きさの下半分のゲルを、その結合した軟骨マトリックスと一緒に (複合体で)、「Cart - Gel - 2」と名付けた。PEODMゲル (15% および 20% w/v) をまた、コンドロイチン分解酵素 ABC (しかし H_2O_2 処理なし) のみで処理した軟骨表面上で、0.05% 光開始剤 Irgacure (登録商標) D-2959 (Ciba-Giegy) によって作製し、「Cart - Gel - 3」と名付けた。(半径/厚さ) × ラジアン × 100% のパーセンテージを、回転性ねじれ - ひずみとして記録した。この回転速度は、 $3.75 \times 10^{-4} \text{ rad/秒}$ (ひずみ: 0.02%/秒) で 500 秒間、次に $-3.75 \times 10^{-4} \text{ rad/秒}$ で 500 秒間逆転、最後に 0 速度緩和を 500 秒間維持、としてプログラムした。応力 - ひずみ - 時間プロファイルを、コンピュータにより自動的に記録した。

【0099】

機械的機能性試験の結果を図 3 に示す。図 3 A は、試験手順の模式図である。図 3 B ~ D は、15% ゲルおよび 20% ゲルの応力 - ひずみ - 時間挙動を表す。図 3 E ~ H は、「Gel - 1」(四角)、「Cart - Gel - 2」(丸)、および「Cart - Gel - 3」(三角)の流体力学的挙動を表す。図 3 E および 3 G は、サンプルの長期にわたる応力を示す。図 3 F および 3 H は、図の種々の応力点およびひずみ点の交点をプロットする。図 3 I は、適用されたひずみ - 時間条件を示す。

【0100】

Gel - 1 は、高弾性を有し、そして結果としての可塑性のひずみを有する、標準的な粘弾性挙動を示した。組織開始重合によって作製されたヒドロゲル - 軟骨構築物 Cart - Gel - 2 は、滑りまたは破損の形跡なしで、同様の粘弾性挙動を示した。しかし、標準的光開始システムを用いて軟骨表面上で合成されたヒドロゲル Cart - Gel - 3 は、ねじれ応力をほとんど必要とせずに軟骨表面上での滑りを引き起こした。対照的に、一体化したゲルは、組織表面に強く結合され、それによって、ゲルは、軟骨表面から滑る前に可塑性の変形の限界に達した。

【0101】

(実施例 II)

本発明の組織開始重合および直接共有結合性一体化の機構の分析を、純粋なコラーゲンタンパク質とヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) とを用いた単純化した系で実施した。その普遍的存在および機械的安定性に起因して、反応のための標的としてコラーゲンを選択した。コラーゲンは、酸化されて重合のための開始ラジカルを生成し得る、チロシン残基を含有する。チロシンは、ヒト II 型コラーゲンの 0.6% のみを構成する一方、これらの残基の 90% はタンパク質の C 末端に位置しており、重合のためのラジカルの濃縮された供給源を提供する。

【0102】

II 型コラーゲンを、 H_2O_2 (1%) と 15 分間反応させた。未反応の H_2O_2 を除去した後、HEMA (250 mM) を添加し、UV 照射 (365 nm ; 3 mW/cm^2) を 5 分間行った。生成物の溶液を Sephadex (登録商標) (Amersham) G-25 サイズ排除カラムにローディングし、過剰の HEMA モノマーおよび可能性のある副生成物のオリゴ HEMA を除去した。コントロールとして、 H_2O_2 酸化のない反応もまた行った。精製された生成物を ATR - FTIR 分析のために凍結乾燥した。この実験に使用された全ての溶液を、予めアルゴンバブリングした。

【0103】

II 型コラーゲンと HEMA との共役を ATR - FTIR によって特徴付けた (図 4)。左にモデル反応を示し、そして右に ATR - FTIR スペクトルを示す。II 型コラー

10

20

30

40

50

ゲン（曲線「1」）、UV照射下で、前酸化あり（曲線「2」）またはなし（曲線「3」）でHEMAと反応した、II型コラーゲンの生成物。この結果は、 H_2O_2 酸化およびUV照射によって、コラーゲン-HEMAの共役が、HEMAに由来するピーク（ 1718 cm^{-1} におけるエステルカルボニルのピークおよび 1150 cm^{-1} における $-C-O-$ のピーク）、ならびにタンパク質に由来するピーク（ 1650 cm^{-1} 、 1550 cm^{-1} 、および 245 cm^{-1} に存在するアミドのピーク、I、II、およびIII）の存在を伴って達成されることを示す（曲線3）。酸化処理なしで、光共役は生じなかった（曲線2）。

【0104】

組織開始重合の機構を確認するため、重合のためのタンパク質に集中するチロシルラジカル供給源を単離および確認するために、電子スピン捕捉戦略が開発された。Qianらは、タンパク質上におけるチロシン残基の、穏やかな酸化の後にチロシルラジカルを形成する能力を示した（*Biochemical Journal*, vol. 363; pp. 281-288, (2002)）。

10

【0105】

MNP（2-メチル-2-ニトロソプロパン）をスピン捕捉剤として利用し、そして電子スピン共鳴（ESR）を用いてチロシルラジカルについて探索した。 100 KHz の変調を伴って 9.47 GHz で作動する分光光度計を用いて、ESRプロファイルを記録した。この実験で使用される溶液の全てを予めアルゴンバブリングした。ウシコラーゲン（II型、 2 mg/ml ）、MNP（ 100 mM ）および H_2O_2 （ 0.5% ）を混合し、10分間反応させた。 H_2O_2 またはMNPを含まない同様の混合物を同時に調製した。生成物をSephadex（登録商標）（Amersham）G-25サイズ排除カラム（SEC）にローディングし、過剰な H_2O_2 、未反応MNPおよび非タンパク質スピン生成物を除去した。サンプルの一部を、ESRによって直接的に特徴付けた；他を、最初にプロナーゼによって非特異的に消化し、次いで、ラジカル付加の部位を決定するためにESRに供した。表層由来の軟骨粉末を、コンドロイチン分解酵素ABCで処理した。この粉末を、MNPの存在下で $5\% H_2O_2$ 中に浸漬し、そしてUV照射（ 365 nm ； 8 mW/cm^2 ）に5分間曝すことによって、光酸化を実施した。精製された生成物の一部を、ESRに供した；他を、コラゲナーゼII/トリプシンによって消化し、次いでESRに供した。

20

30

【0106】

ESRスピン捕捉の結果を模式的に図5に示す。MNP/チロシルESRスピン捕捉の模式図は左側に、そしてESRスペクトルは右側にある。チロシン、MNP、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、および H_2O_2 の組み合わせは、チロシルラジカルの特徴的な超微細結合（ α^N ）、 15.5 G を有するESRスペクトルを生じた（スペクトルg）。大きな分子回転相関時間（molecular rotational correlation time）（ τ_c ）を有する幅広いESRライン（ $>10\text{ G}$ ）は、コラーゲンが H_2O_2 およびMNPで処理される場合に検出され（スペクトルc）、このことは、MNP捕捉が高分子上に位置することを示す。プロナーゼによる消化の後（スペクトルd）、ESRラインは、明確にされ、スペクトルaにおけるように、純粋なチロシルラジカルによる 15.5 G の α^N を示す。軟骨組織をMNPおよび酸化剤で処理する場合（スペクトルe）およびその後酵消化する場合（II型コラゲナーゼおよびトリプシンによる、スペクトルf）において、同様の現象が観察される。得られたESR曲線は、スペクトルaに提示される特徴的チロシルラジカル（II型コラーゲンおよび H_2O_2 、MNPなし）と等価である。II型コラーゲンおよびMNP、 H_2O_2 なしの条件は、スペクトルbに示される。ラジカルは、 H_2O_2 なし、またはMNPラジカルトラップ剤なしで処理されたコラーゲンからのコントロール曲線においては、検出されなかった。この単純化されたモデル系におけるESRデータは、穏やかな酸化反応後の、軟骨中のコラーゲンにおけるチロシルラジカルの仮説的生成を確認した。

40

【0107】

50

有向共有結合の適合性は、宿主組織の損傷を防止するため、および生体材料への細胞の送達および封入が所望される適用のために重要である。処置手順および有向生体材料組織結合の生体適合性を、組織におけるインサイチュでの細胞の生存度、および結合された生体材料中に封入された細胞の生存度を決定することによって調べた。組織の酵素処理および酸化処理の適合性を、最初に蛍光生 - 死細胞アッセイを用いて調べた。発明者らは、軟骨の酵素処理が細胞生存度に影響しない一方、組織の切断のみが隣接する細胞の死を引き起こすことに気づいた。

【0108】

新鮮ウシ胎仔軟骨の欠損表面における1時間(37)のコンドロイチン分解酵素ABC酵素分解に続いて、光酸化を、それぞれ2%、5%および10% H_2O_2 を用いて、UV照射(365nm; 3mW/cm²; 5分)下で行った。過剰の H_2O_2 を除去した後、予めアルゴンバブリングしたPEODM溶液(15%、w/v)を、軟骨欠損部に、光開始剤なしで添加した。光移植反応を10分間進行させた(365nm UV、8mW/cm²)。次いで、粘着性の液体様未成熟ゲルを吸引して除き、PBS(pH7.4)中の、200万/mlの継代第4代のウシ軟骨細胞および0.05%(w/w)光開始剤D-2959と合わせたマクロマー(15% PEODM)の混合物に置き換えた。UV照射(365nm、3mW/cm²)の下で5分間、光重合/細胞封入を行った。この方法を図6に模式的に示す。上記各工程からの軟骨スライスまたは軟骨 - ヒドロゲルスライスを、Live/Deadアッセイ(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)による定性的細胞毒性評価のために調製した。共有結合性一体化のための酵素処理の生体適合性は、さらなる細胞死が観察されないことを確認させた。細胞死の用量 - 反応効果は、酸化処理とともに観察された。したがって、細胞死の増加は H_2O_2 濃度の増加とともに観察された。2%の H_2O_2 濃度は、組織開始光重合および一体化が、生体適合性の様式で、過剰な細胞死なしで進行することを可能にする。

【0109】

(アルデヒド媒介性一体化の実施例および試験)

以下の例は、本発明の方法を示す。

【0110】

(実施例III)

図7は、本発明のアルデヒドプライミングの実施形態を示す。以下に記載される方法は、Liら, *Macromolecules* vol. 36, pp. 2556 - 2562 (2003) (この開示の全体は、本明細書において参考として援用される)においてより詳細に見出され得る。

【0111】

コンドロイチン硫酸Aナトリウム塩(CS、10g、約20mmol 二糖反復単位)を100mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH7.4)に溶解し、続いてグリシジルメタクリレート(GMA、3g、約20mmol)を、室温で1~15日間、激しく攪拌しながら添加した。2回の無水アセトン抽出によって精製を行い、CS鎖上への共有結合性移植をしなかった全ての化合物を除去した。精製された生成物を48時間凍結乾燥した。コンドロイチン硫酸メタクリレート(CS-MA)の最終収量は、全て7~8gであった。

【0112】

600mgのCS-MA(0.8~1.2mmolの隣接ジオール(adjacent diol)、70% CS-A, Sigma)および616mgの過ヨウ素酸ナトリウム(約2.88mmol、 $NaIO_4$ 、Sigma)を、10mLの脱イオン水中に一緒に溶解させ、遮光した。この反応物を、激しく攪拌しながら14時間暗もとどめた。不溶性の副生成物を0.22μmフィルターを用いて除去し、そしてこの生成物をSephadex(登録商標)G-25サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)カラムにローディングし、これによって、生成物を水溶性の副生成物および未反応の低分子から精製した。生成物、コンドロイチン硫酸 - アルデヒド - メタクリレート(CS-ald-MA)を

10

20

30

40

50

、凍結乾燥によって、90%の収量で得た。アルデヒド置換度の決定を、ヒドロキシルアミン塩酸滴定を介して行った。結果は、60~70%であった。組織接着剤を、等量(20 μ l)の25%CS-a1dおよび40%のウシ血清アルブミン(BSA、Sigma)を混合することによって配合した。この接着剤を、配合直後に使用し、反応物は、シッフ塩基機構によって2~5分で完成した。

【0113】

得られた化合物は、図7に示されるように細胞外マトリックスの表面と光重合性ポリマーとを一体化し、それによってプライミング因子として働くための、アルデヒド基とメタクリレート基とを有するコンドロイチンを提供する。

【0114】

(動物モデルの実施例および試験)

(実施例IV)

本発明の方法のさらなるインビトロの例において、屠殺場から得られたウシ膝部の内側および外側脛骨表面に、軟骨(n=4)および骨軟骨(n=4)の欠損を作製した。軟骨欠損および骨軟骨欠損(d=1cm)を、鋭匙およびドリルを用いて、それぞれ約2mmおよび約5mmの深さで作製した。関節および周辺組織に生理食塩水を注入し、刺激中、屍体の脚において水分を維持した。1ポンドの重りを脚の上に置き、自然の力および動きをさらに模倣した。

【0115】

ヒドロゲル移植物を適用した。ヒドロゲル溶液を、100U/mlのペニシリンおよび100 μ g/mlのストレプトマイシン(Gibco)を含む滅菌PBS中において、10%w/vのポリ(エチレン)オキシドジアクリレート(Shearwater, PEO DA)と、光開始剤Irgacure(登録商標)2959(Ciba、最終濃度0.05%w/v)とを徹底的に混合することによって調製した。TGF- β 3(RDI, 150ng/ml)をヒドロゲル溶液に添加した。

【0116】

全ヒドロゲル移植物は、機械的ストレスに対して一晩曝露した後に、軟骨欠損中にとどまっていた(n=4)。関節腔中にヒドロゲルの残屑は観察されなかった。骨軟骨欠損中のヒドロゲルの50%は、刺激後に所定の位置に残っていた。より大きな骨軟骨欠損中のヒドロゲルは、膨張し、それらを欠損から突出させたように見えた。したがって、ヤギにおいて軟骨再生を調べるためのモデルとして、軟骨欠損を使用した。

【0117】

(実施例V)

間葉幹細胞(MSC)を、3~3.5歳のヤギの大腿吸引物から単離し、間葉幹細胞培地(CloneTics, MSCGM)中で増殖させた。継代第3代の細胞をトリプシン処理し、無血清培地で洗浄し、次いで移植直前にヒドロゲル溶液中に再懸濁した。

【0118】

ヒドロゲル溶液を、100U/mlのペニシリンおよび100 μ g/mlのストレプトマイシン(Gibco)を含む滅菌PBS中において、10%w/vのポリ(エチレン)オキシドジアクリレート(Shearwater, PEO DA)と光開始剤Irgacure(登録商標)2959(Ciba、最終濃度0.05%w/v)とを徹底的に混合することによって調製した。TGF- β 3(RDI, 150ng/ml)をヒドロゲル溶液に添加し、MSCを2000万細胞/mlの濃度でポリマー溶液に再懸濁し、そして穏やかに攪拌して均一な懸濁液を作製した。

【0119】

2つの欠損を、鋭匙を用いて2頭のヤギ(2~3歳)の後肢の内側脛骨プラトー(medial tibial plateau)および大腿骨外側顆に作製した。欠損は、自然な修復は起こらない臨界的大きさ(5mm径)であった。実験的欠損(n=4)を、ポリマー、MSC(同種異系)、ヒアルロン酸(粘度を増強するため)およびTGF- β 3で充填した。細胞ポリマー懸濁液を添加し、欠損が完全に充填されるまで重合した。サン

10

20

30

40

50

ブルを、 4 mW/cm^2 の長波長 (365 nm) の UV 光 (*Acticure*) への 5 分間の曝露によって光重合した。コントロール欠損は、空の欠損およびポリマーのみを含む欠損を含んだ ($n = 2$) 。創傷を閉じた後、脚を 2 週間ギプス固定し、その後動物は自由に動くことを許可された。サンプルを、移植の 2 週および 4 週後に肉眼観察および組織学的観察のために採取した。

【 0 1 2 0 】

移植 2 週間後にギプスを外した後、膨張または感染は観察されなかった。1 ヶ月において採取する前に、ヤギは、脚をいたわることやまたは脚の不自由さなしで、活発な動きを示した。2 週間後に採取したサンプルは、肉眼で、再生の最低限の証拠を示した。しかし、移植の 1 ヶ月後に採取したサンプルは、再生の顕著な証拠を示した。重合性 MSC - ヒドロゲル構築物が配置された実験的欠損は、ゲルを含まないコントロール欠損と比較して、欠損腔においてより多くの軟骨組織を有意に示した。大腿の欠損もまた、1 ヶ月後に修復組織を含んだ。

10

【 0 1 2 1 】

この研究は、大型動物モデルにおける、本発明の、軟骨修復のための光重合性ヒドロゲルシステムの適用を示す。軟骨を、ヒドロゲル中に光封入してインピトロでインキュベートしたヤギ MSC から発生させた。光重合性ヒドロゲルシステムを、マウスおよびラットにおいてインピボで適用したが、関節環境中には導入しなかった。最近、同種異系 MSC を心臓修復系に成功裏に適用した。このことは、これらの、軟骨修復に対する使用可能性を示唆する。同種異系 MSC は、理想的な細胞供給源である。なぜなら、ヒドロゲル処置の前に、細胞を得るための付加的な外科的手順を必要としないからである。このインピボ研究は、どのような一体化方法も特別には使用しなかったが、これは、我々がそれを使用する場合の一例である。

20

【 0 1 2 2 】

本発明は、特定の好ましい実施形態を参照して記載されたが、当業者は、添付の特許請求の範囲によって規定された本発明の精神および範囲内にとどまりながら、追加、削除、置き換え、改変および改良がなされ得ることを認識する。

【 0 1 2 3 】

軟骨は、実施例 I および II においてモデル組織として使用されたが、これらの実施例に関する実施形態は、チロシン残基を含む他の組織において機能し、チロシン残基は、コラーゲンまたは細胞外マトリックスの別のタンパク質のいずれかに配置されている。同様に、実施例 I および II において H_2O_2 が酸化剤として使用されたが、他の酸化剤 (例えば、ビタミン C) が使用され得る。実施例 I は、ポリ (エチレングリコール) ジメタクリレート (PEO DM) を使用し、そして実施例 II は、ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) を使用したが、本明細書において開示されるように、アクリレートを含む任意の重合可能な因子がこれらの実施形態において使用され得る。

30

【 0 1 2 4 】

実施例 III は、アルブミンをキャリアとして使用したが、アルブミン以外に他の因子が使用され得る。例えば、ポリヌクレオチド (PEI) またはアミノ基を含有する別の因子が使用され得る。さらに、実施例 III に関して、コンドロイチン硫酸が修飾されて、アルデヒド基およびメタクリレート基を有する因子を生成したが、他の糖類もまた使用され得る。なおさらに実施例 III に関して、プライミング因子は重合因子に結合するためにメタクリレートを含むが、他の化学基が代わりに使用され得る。

40

【 0 1 2 5 】

実施例 IV および V は光開始剤を使用した、本明細書において記載されるチロシル - アクリレートまたはアルデヒドの実施形態が使用され得る。さらに、生組織における本発明の使用は、これらの実施例において記載される厳密な組成物に限定されない。

【 0 1 2 6 】

本実施例全体にわたる種々の例において紫外 (UV) 光が使用されるが、可視光または他の電磁放射の形態もまた、関与する化学に依存して同じ目的を達成するために使用され

50

得る。

【0127】

(実施例V I)

(重合を開始するために紫外光を用いる、関節軟骨移植物を形成するための結合性軟骨外植片)

関節軟骨の小片を結合して、関節軟骨欠損を修復するために使用され得る粘着性の移植物を形成するために、本発明の使用は有利である。関節軟骨チップは、ウシ膝部の関節軟骨表面から単離され、そしてコンドロイチン分解酵素A B C (5単位/ml Tris (pH 8.1)) で、1時間、37 で処理されて、プロテオグリカンを経験的に分解する。リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で洗浄された後、コンドロイチン分解酵素消化されたチップは、0.5%過酸化水素とともにインキュベートされ、そして紫外(UV)光(365ナノメートル、5mW/cm²)にX分間曝露されて、過酸化水素を除去される。このチップは、密接して固定され、次いで、PBSに20%(w/w)で溶解されたポリエチレングリコール-ジアクリレート(PEG-DA)の溶液が添加される。この懸濁液は、UV光(8mW/cm²)に30分間曝露される。得られた関節軟骨生成物は、物理的検査および機械的試験デバイスを用いたシングルラップせん断試験(single-lap shear test)によって接着の質に関して評価される。

【0128】

(実施例V I I)

(重合を開始するために還元および酸化を用いる、関節軟骨移植物を形成するための結合性軟骨外植片)

関節軟骨の小片を結合して、関節軟骨欠損を修復するために使用され得る粘着性の移植物を形成するために、本発明の使用は有利である。関節軟骨チップは、ウシ膝部の関節軟骨表面から単離され、そしてコンドロイチン分解酵素A B C (5単位/ml Tris (pH 8.1)) で、1時間、37 で処理されて、プロテオグリカンを経験的に分解する。PBSで洗浄された後、コンドロイチン分解酵素消化されたチップは、0.5%過酸化水素とともにインキュベートされ、還元開始剤および酸化開始剤のチオ硫酸ナトリウムおよび過硫酸ナトリウムを含有する、PBSに20%(w/w)で溶解された、ポリエチレングリコール-ジアクリレート(PEG-DA)溶液に曝露され、そして37 で2時間インキュベートされる。得られた関節軟骨生成物は、物理的検査および機械的試験デバイスを用いたシングルラップせん断試験によって接着の質に関して評価される。

【0129】

(実施例V I I I)

関節軟骨チップを、ウシ膝部から単離し、コンドロイチン分解酵素A B C (5単位/ml、pH 8.1)で1時間、37 で処理した。PBSで洗浄した後、チップを、過酸化水(H₂O₂、水中0.5%)とともにインキュベートし、そしてUV光(365nm、5mW/cm²)に5分間曝露した。過剰なH₂O₂を除去し、そしてチップを一時的に密接して固定した。ポリエチレングリコールジアクリレート(PEG-DA)を、PBSに20%(w/w)で溶解し、この軟骨チップに添加した。軟骨チップをUV光(8mW/cm²)に30分間曝露した。その結果、この軟骨チップは、ヒドロゲルを介して結合した。

【0130】

(実施例I X)

以下の手順は、2片の軟骨の結合を記載する。新鮮な胎仔ウシ軟骨チップの表面は、コンドロイチン分解酵素A B C (5単位/ml Tris (pH 8.1)、Sigma)で、37 で1時間処理される。これらの表面の光酸化は、H₂O₂ (1~2%)およびUV照射(365nm; 3mW/cm²; EXFO Acticure (登録商標) 4000)によって、5分間行われる。過剰なH₂O₂は除去される。レドックス開始接着性溶液が、上記のように前処理された2片の軟骨チップの表面の間適用される。接着性ゲル化は、37 において、30分(インヒビターを含有しない内部で作製されたPEGDAを

10

20

30

40

50

使用する場合) ~ 90分(インヒビターを含有する市販のPEGDAを使用する場合)で完了される。

【0131】

接着性溶液の配合は、以下である：

1. Red開始剤：チオ硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、1.7M(268.77mg/mL)；
2. Ox開始剤：過硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$)、1.8M(428.58mg/mL)；
3. モノマー：99+% 2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)、50ppmのMEHQを含有；
4. 架橋剤：15%(w/v)ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート(PEGDA)溶液。

10

配合1：300μL HEMA、200μL、PEGDA、50μL Red、および50μL Ox；

配合2：200μL HEMA、300μL、PEGDA、50μL Red、および50μL Ox；

配合3：100μL HEMA、400μL、PEGDA、50μL Red、および50μL Ox。

【0132】

RedおよびOxの最終濃度は、0.15Mおよび0.15Mに常に維持される。全ての組成物は、順に(上記リストのように)添加され、そして各々の添加の後に激しく攪拌することによって十分混合される。

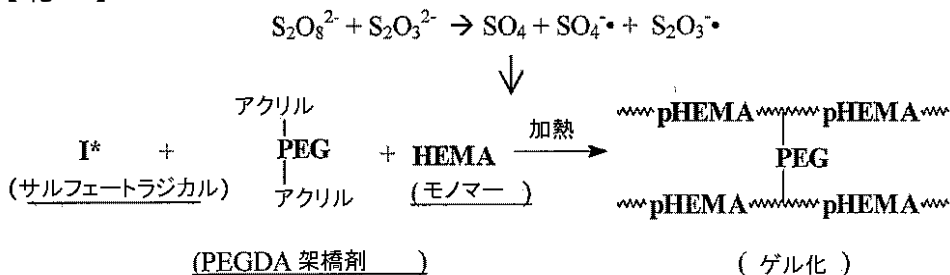
20

【0133】

ゲル化は、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ との間のレドックス反応から発生するフリーラジカルによって開始される熱重合を受ける。全ての手順は、以下に模式的に示される。

【0134】

【化1】



30

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】図1は、アクリレート-チロシル化学を用いて軟骨に適用されるような方法の模式的な説明である。

40

【図2】図2は、全反射フーリエ変換赤外分光(ATR-FTIR)を使用する手順の種々の段階における、処置した軟骨の一連のスペクトログラムである。

【図3A】図3は、軟骨表面におけるヒドロゲル単独、および2種のヒドロゲルの機械的機能性試験の結果を示す。図3Aは、試験手順の概略である。

【図3B】図3は、軟骨表面におけるヒドロゲル単独、および2種のヒドロゲルの機械的機能性試験の結果を示す。図3B~図3Dは、応力ひずみ-時間の挙動を表す。

【図3C】図3は、軟骨表面におけるヒドロゲル単独、および2種のヒドロゲルの機械的機能性試験の結果を示す。図3B~図3Dは、応力ひずみ-時間の挙動を表す。

【図3D】図3は、軟骨表面におけるヒドロゲル単独、および2種のヒドロゲルの機械的機能性試験の結果を示す。図3B~図3Dは、応力ひずみ-時間の挙動を表す。

50

【図 3 E】図 3 は、軟骨表面におけるヒドロゲル単独、および 2 種のヒドロゲルの機械的機能性試験の結果を示す。図 3 E ~ 図 3 H は、流体学的な挙動を表す。

【図 3 F】図 3 は、軟骨表面におけるヒドロゲル単独、および 2 種のヒドロゲルの機械的機能性試験の結果を示す。図 3 E ~ 図 3 H は、流体学的な挙動を表す。

【図 3 G】図 3 は、軟骨表面におけるヒドロゲル単独、および 2 種のヒドロゲルの機械的機能性試験の結果を示す。図 3 E ~ 図 3 H は、流体学的な挙動を表す。

【図 3 H】図 3 は、軟骨表面におけるヒドロゲル単独、および 2 種のヒドロゲルの機械的機能性試験の結果を示す。図 3 E ~ 図 3 H は、流体学的な挙動を表す。

【図 3 I】図 3 は、軟骨表面におけるヒドロゲル単独、および 2 種のヒドロゲルの機械的機能性試験の結果を示す。図 3 I は、適用した応力 - 時間の条件を示す。

【図 4】図 4 は、A T R - F T I R 分析を示し、これは、コラーゲンとヒドロキシエチルメタクリレートとの間の共有結合の形成を示す。

【図 5】図 5 は、電子スピン捕獲を用いるアクリレート - チロシン反応機構の分析を示す。

【図 6】図 6 は、プロセスの生体適合性を測定するための手順を示す。

【図 7】図 7 は、本発明のアルデヒドプライミング実施形態の実施例を示す。

10

【図 1】

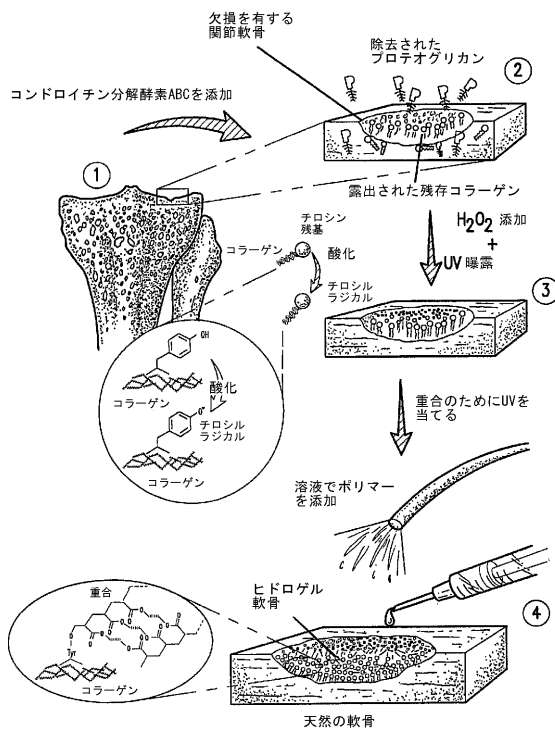


FIG.1

【図 2】

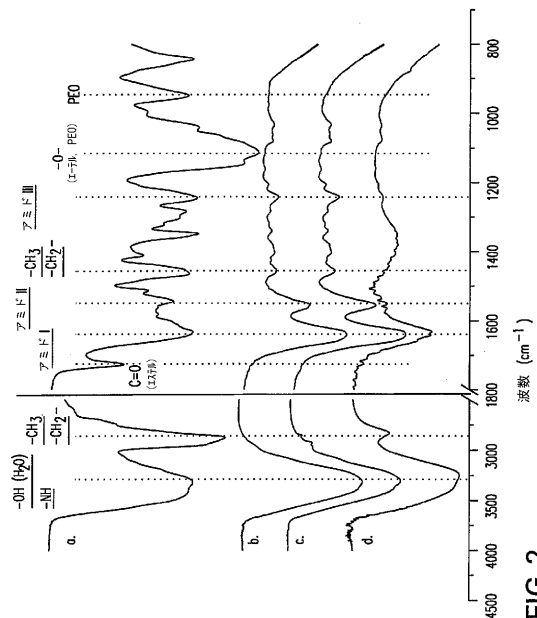


FIG.2

【図 3 A】

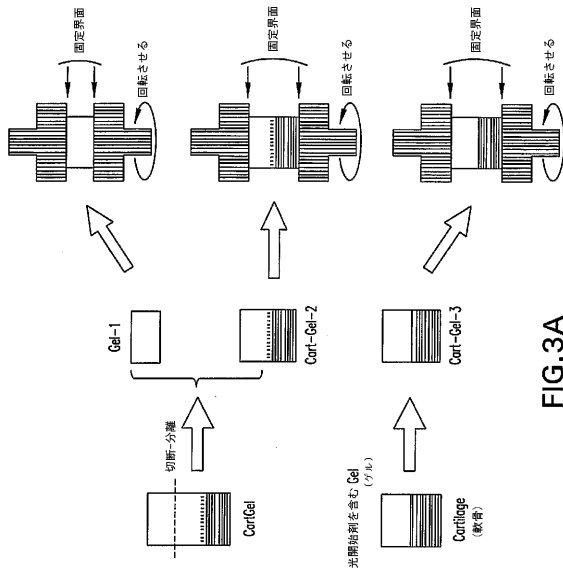


FIG.3A

【図 3 B】

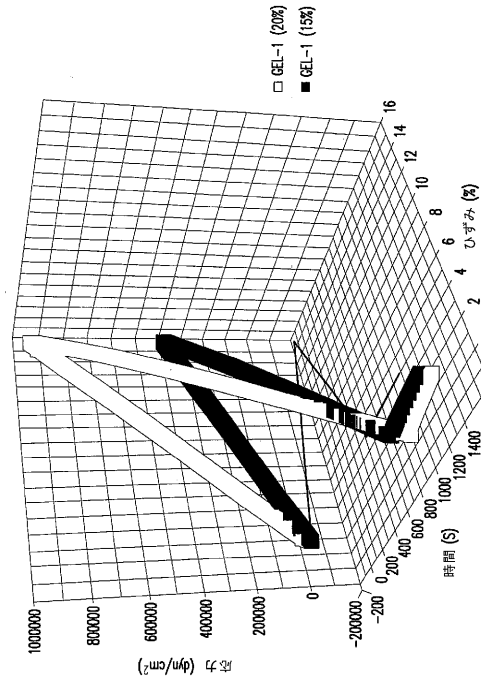


FIG.3B

【図 3 C】

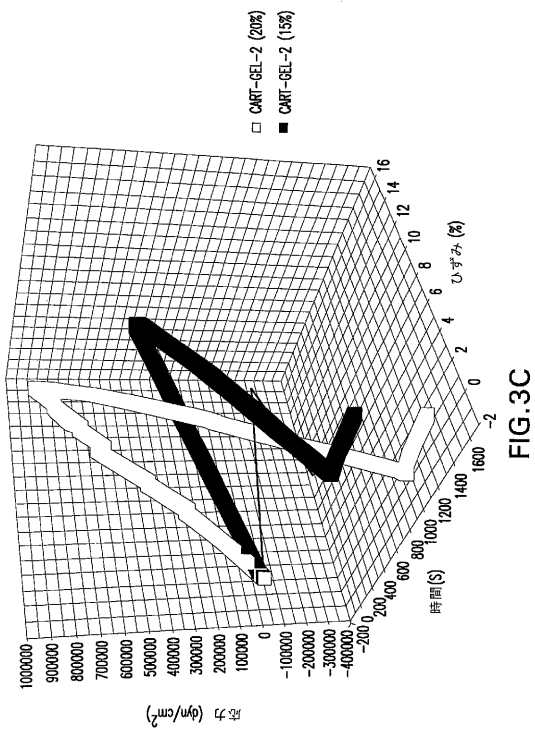


FIG.3C

【図 3 D】

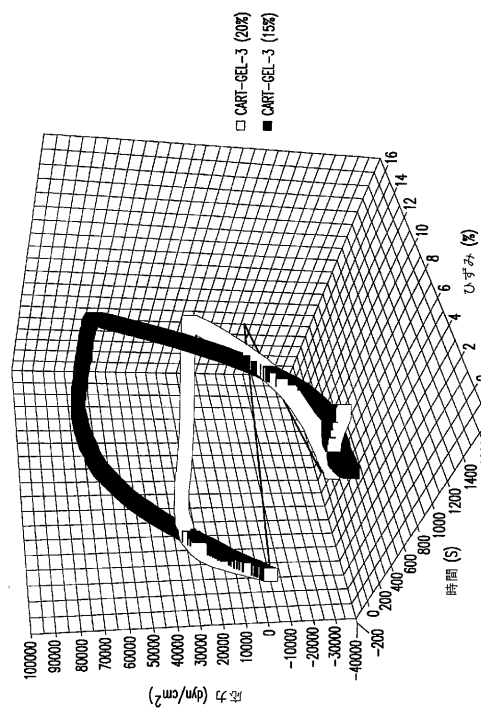
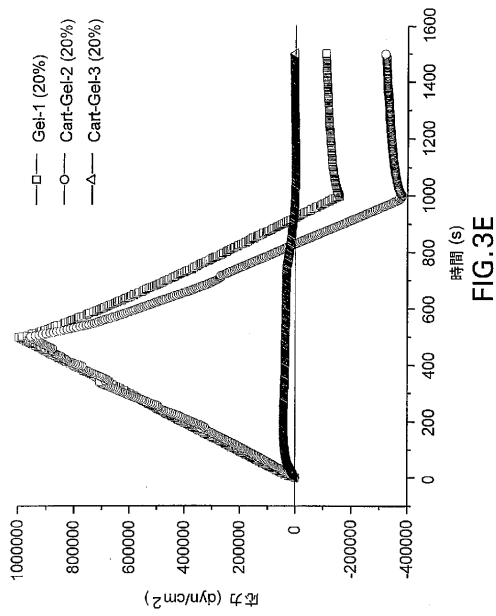
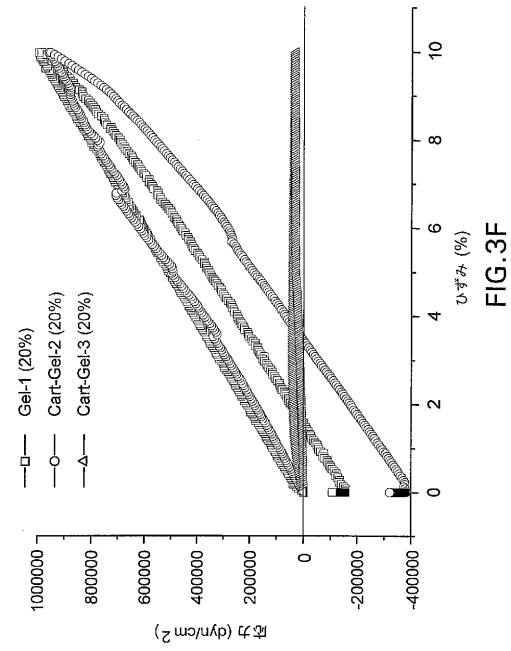


FIG.3D

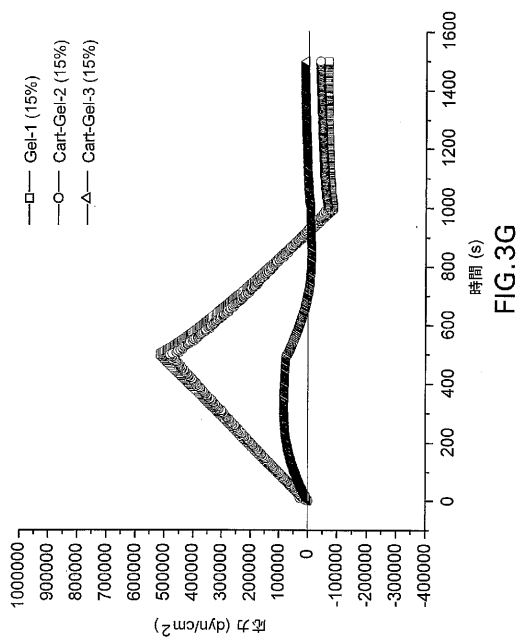
【図 3 E】



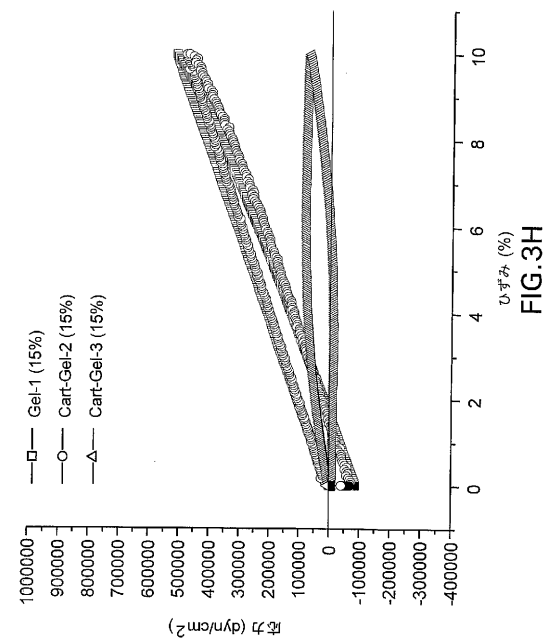
【図 3 F】



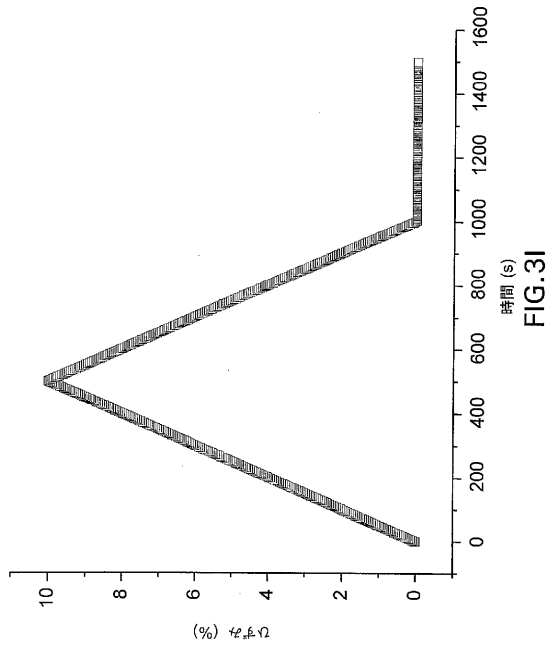
【図 3 G】



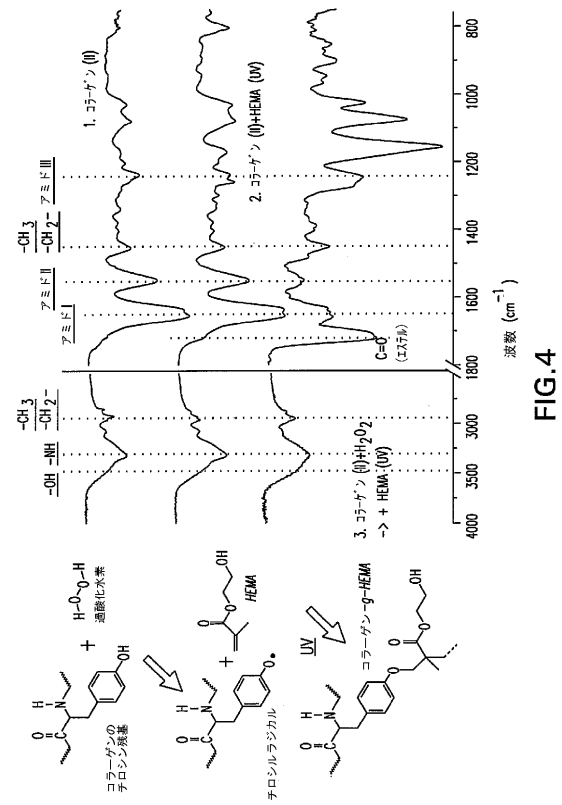
【図 3 H】



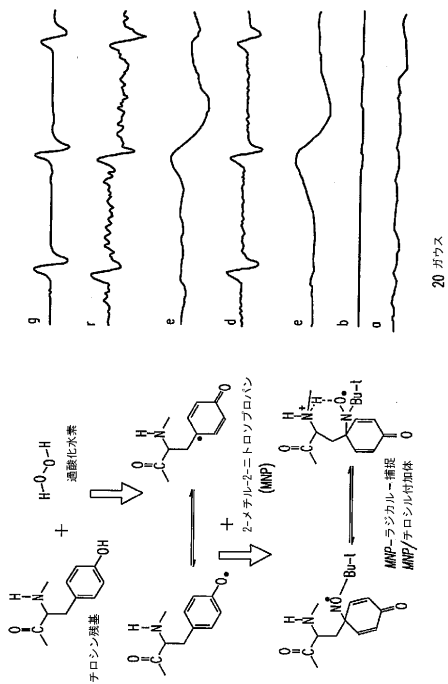
【図 3 I】



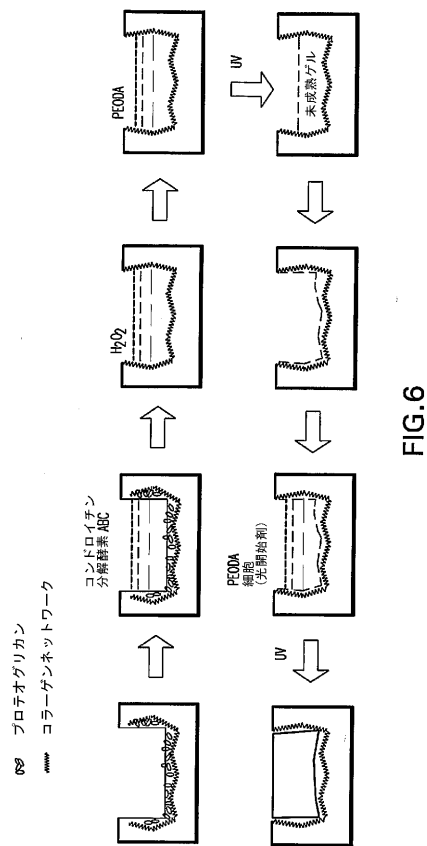
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【 図 7 】

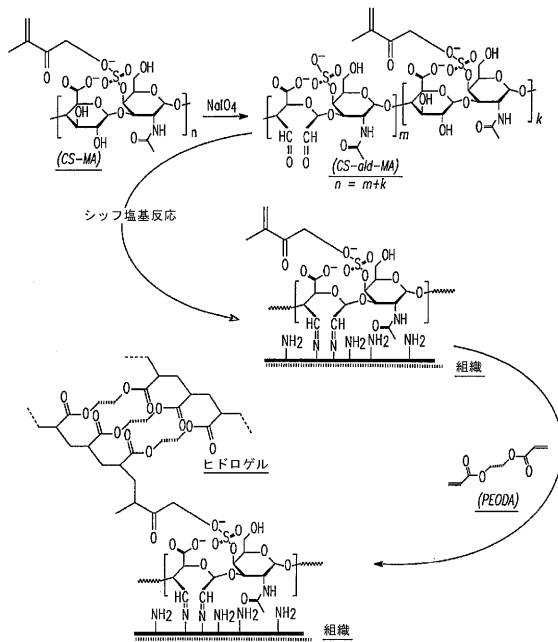


FIG.7

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US04/33244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) : A61F 2/00 US CL : 424/423 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/423 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,458,889 B1 (TROLLSAS et al) 01 Oct 2002 (01.10.2002), abstract, summary of the invention, and columns 27-28.	1-32
A	US 6,624,245 B2 (WALLACE et al) 23 Sept 2003 (23.09.2003), abstract, summary of the invention, and column 32.	1-32
A	US 6,497,729 B1 (MOUSSY et al) 24 Dec 2002 (24.12.2002), abstract, summary of the invention, and claims.	1-32
A	US 5,900,245 (SAWHNEY et al) 04 May 1999 (04.05.1999), abstract, summary of the invention, and claims.	1-32
A	US 6,924,370 B2 (CHUDZIK et al) 02 Aug 2005 (02.08.2005), abstract, summary of the invention, and examples.	1-32
A	US 6,129,761 (HUBBELL) 10 Oct 2000 (10.10.2000), abstract, summary of the invention, and columns 7-10.	1-32
A	US 5,906,934 (GRANDE et al) 25 May 1999 (25.05.1999), abstract, summary of the invention, and columns 3-6.	1-32
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 29 January 2006 (29.01.2006)		Date of mailing of the international search report 24 FEB 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Satyendra K. Singh Telephone No. (571) 273-8796

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/33244

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST:
USPAT, USOCR, PG-PUB, JPO, EPO, AND DERWENT.
STN:
CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, SCISERACH.

SEARCH STRATEGY:
tissue repair or engineering
hydrogel or polymer and crosslink?
acrylat? or acrylic? and polymer? and crosslink?
cartilage or bone and chondroitinase and collagen or ecm or matrix
peroxide and uv or irradiat? and polymer
drugs and cells and polymer or hydrogel and deliver? or releas?
peg or polyethyleneglycol and acrylat? and polymer? and hydrogel and cartilage
photopolymer? and hydrogel and cartilage or ecm or collagen.

フロントページの続き

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

(72)発明者 エリセーエフ, ジェニファー エイチ.
アメリカ合衆国 メリーランド 21218, ボルティモア, エヌ. チャールズ ストリー
ト 3400

Fターム(参考) 4C081 AB01 AB05 AB11 AB18 BA12 BA13 CA081 CC05 CC06 CD27
CD28