

(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2010-511461

(P2010-511461A)

(43) 公表日 平成22年4月15日(2010.4.15)

(51) Int.Cl.

**A61L 27/00** (2006.01)  
**A61L 31/00** (2006.01)

F 1

A 6 1 L 27/00  
A 6 1 L 27/00  
A 6 1 L 31/00

テーマコード(参考)

4 C 0 8 1

M  
Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2009-539813 (P2009-539813)  
 (86) (22) 出願日 平成19年12月5日 (2007.12.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年6月26日 (2009.6.26)  
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2007/050741  
 (87) 國際公開番号 WO2008/068531  
 (87) 國際公開日 平成20年6月12日 (2008.6.12)  
 (31) 優先権主張番号 0624423.0  
 (32) 優先日 平成18年12月6日 (2006.12.6)  
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(71) 出願人 506214954  
 ユニヴァーシティ オブ ブライトン  
 イギリス、 ブライトン サセックス ビー  
 エヌ2 4エイティー, ルイス ロー  
 ド, ミトラス ハウス  
 (74) 代理人 100103816  
 弁理士 風早 信昭  
 (74) 代理人 100120927  
 弁理士 浅野 典子  
 (72) 発明者 ロイド, アンドリュー, ウィリアム  
 イギリス, イースト サセックス ビー  
 エヌ2 6 5ユーワイ, アルフリストン  
 , ウエスト ストリート, ヘーゼルデ  
 ン

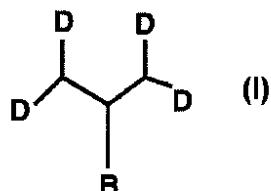
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】機能化された表面を有する生体適合材料

## (57) 【要約】

二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料が提供される。生体適合材料は、セラミック材料、金属材料、および/または高分子材料であることができる。それは通常固体の形態であるが、半固体またはヒドロゲルであることもできる。二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料を作製する方法もまた提供され、前記方法は、生体適合材料の表面上に、二機能性セミデンドリマーを吸着すること、接合すること、またはその場で合成することを含む。二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料でコーティングされるか、または二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料から形成される生物医療装置がさらに提供される。生物医療装置は、例えば、ステント、人工股関節、または代替心臓弁のような医療用インプラントであることができる。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料。

**【請求項 2】**

セミデンドリマーは、PAMAM、ポリリシンまたは炭水化物から形成される、請求項1に記載の生体適合材料。

**【請求項 3】**

生体適合材料は、セラミック材料、金属材料、または高分子材料である、請求項1または2に記載の生体適合材料。

**【請求項 4】**

機能化された表面は3Dナノ構造を有する、請求項1～3のいずれかに記載の生体適合材料。

**【請求項 5】**

機能化された表面は、生物学的環境の化学的成分、生化学的成分、および/または細胞成分と相互作用することができる、請求項1～4のいずれかに記載の生体適合材料。

**【請求項 6】**

二機能性デンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料を作製する方法であって、生体適合材料の表面上に二機能性セミデンドリマーを吸着すること、接合すること、またはその場で合成することを含む方法。

**【請求項 7】**

二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料でコーティングされているか、または二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料から形成される、生物医療装置。

**【請求項 8】**

インプラントである、請求項7に記載の生物医療装置。

**【請求項 9】**

機能化された表面は3Dナノ構造を有する、請求項7または8に記載の生物医療装置。

**【請求項 10】**

機能化された表面は、生物学的環境の化学的成分、生化学的成分、および/または細胞成分と相互作用することができる、請求項7～9のいずれかに記載の生物医療装置。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、生体適合材料の機能化に関し、特に、二機能性セミデンドリマー(bi-functional semi-dendrimer)の使用による、インプラントのような、生体適合材料から作製された生物医療装置の表面の機能化に関する。

**【背景技術】****【0002】**

生体適合材料は、生物医療的な用途において身体組織に接触されることを意図される高分子材料、金属材料、および/またはセラミック材料である。それらは、損傷された組織と置換するためにヒトまたは動物の身体に移植される医療装置の製造のために使用される。多くの臨床用途において、医療装置の移植の成功は、医療装置の周囲組織との融合に依存する。インプラントの生体適合材料の固体表面と、インプラントを囲む生物学的環境の化学的成分、生化学的成分、および細胞成分との間の相互作用の制御は、この融合プロセスの主要な工程である。実際に、生物医療的なインプラントは、インプラント/組織界面において組織の再生を担う組織細胞の接着、増殖、および分化を可能にすることのみによって周囲組織と融合することができる[1]。さらに、骨性組織のためのインプラントの場合、融合はまた、インプラント表面に対する鉱化された細胞外マトリクスの結合によって達成される[2]。

**【0003】**

10

20

30

40

50

細胞の接着または鉱物相の付着を促進するため [ 5 , 6 , 7 ] 、特定のタンパク質に結合することができる分子で生物医療的なインプラントの表面を機能化する [ 3 , 4 ] 方法が開発されている。例えば、生体適合材料の表面の鉱化は、エッチング法によって [ 6 ] 、または表面をホスファチジルセリンのようなカルシウム結合リン脂質でコーティングすることによって [ 7 ] 実行されている。これらの方法は、線状のスペーサによる、または表面の化学的処理 [ 6 ] による、生体適合材料の表面上への関連する生体分子の吸着 [ 7 ] または接合 [ 3 , 4 , 5 ] に依存する。より最近では、特定の細胞受容体によって認識されるアミノ酸配列（例えば、RGDドメイン）を模倣することができるアグマチンのような合成分子が使用されている [ 8 ] 。

## 【0004】

10

生体適合材料の他の表面処理は、組織の細胞外マトリクスのナノトポグラフィを模倣することができるナノトポグラフィを作製するために開発されている [ 9 , 10 ] 。しかしながら、これらの処理のほとんどは、天然に存在する組織の細胞外マトリクスに典型的な、規則正しい三次元 (3D) 分子ナノ構造および / または分子柔軟性を欠く生体適合材料の表面修飾を生成する。

## 【0005】

実際に、生体認識プロセスの特異性は、周囲環境に対する機能性の呈示を向上しかつ / または特定の生物相互作用を促進するように自然に進化した生物学的構造の構成を模倣する適当なナノ構造に付随して根本的な化学的または生化学的な相互作用が起こる場合に高められることは広く認識されている [ 1 ] 。

20

## 【0006】

デンドリマーおよびセミデンドリマーは、高度にかつ 3D に配列された、高度に枝分かれしたポリマーであり、制御可能な物理化学的性質を有するナノ構造を形成する [ 11 , 12 ] 。それらは、枝分かれする高分子へと発展する能力を共有する種々のタイプのモノマー分子から得られることができる。デンドリマーは、合成分子（例えば、ポリアミドアミン、PAMAM）から、ならびにアミノ酸（例えば、ポリリシン）および炭水化物から得られている [ 11 , 12 , 13 ] 。デンドリマーを合成するための 2 つの主要な方法が存在する [ 11 ] :

( i ) 分岐合成 - この合成では、多数の反応性部位を有するコア分子が、反応物と化学的結合を形成するために使用され、形成された複合体はその後、別の分岐点を生成することができる分子と反応させられる。

30

( ii ) 収束合成 - この合成では、デンドリマーのフラグメントがコア分子に付加され、そして組み立てられる。

## 【0007】

合成が液相において実施されるとき、デンドリマーの形状および対称性はその合成のために使用される分子の物理化学的性質に依存するが、ポリマーの枝分かれは一般的に、開いたボール (open ball) である球状の構造を導く [ 11 ] 。逆に、合成が固相において実施されるとき、枝分かれポリマーは、ドーム様（半球状）または樹状様の構造であるセミデンドリマーを展開する [ 12 ] 。

## 【0008】

40

方法 ( i ) と方法 ( ii ) の両方によって、いくつかの枝分かれレベル（世代 (G<sub>n</sub>) として示される）を有するデンドリマー（またはセミデンドリマー）を得ることが可能である。第 9 世代 (G<sub>9</sub>) までのデンドリマーの合成が実際に報告されている。

## 【0009】

生物工学的な観点から、デンドリマーとセミデンドリマーの両方が、有利な生物相互作用に好適な機能性を呈示する特有の機会、および距離および立体構造の特異性を制御するナノ構造を提供する [ 14 ] 。

## 【0010】

デンドリマーは、核酸および薬物の送達のためのキャリアとして主に提案されている [ 15 ] 。特に、PAMAM デンドリマーは、核酸の負電荷とイオン相互作用を確立するそ

50

れらの全体的な正電荷のためにDNAに結合することができる[15]。しかしながら、デンドリマーのナノ構造もまた、それらのDNA結合可能性にも寄与することが示されている[16]。PAMAMデンドリマーがDNAに結合する能力は、DNAおよび他の核酸を捕捉するために利用されている。これらの用途のために、マイクロチャネル表面がその目的のためにデンドリマーで機能化されている[17]。セミデンドリマーは、デンドリマーの最後の枝分かれ世代を標的化されたバイオリガンドで機能化することによって、細胞受容体に対する特定のバイオリガンドの親和性を増大するための考えられる方法として研究されている[14]。

#### 【0011】

固体表面に対するデンドリマーの結合は、通常、アミノ基をその末端に呈示する線状分子を接合させるシラン化反応による表面の先行する機能化によって得られる[3, 4, 17]。その後、アミノ基はグルタルアルデヒドによってデンドリマーに架橋され；グルタルアルデヒドのアルデヒド基は、シラン化分子およびPAMAMのようなデンドリマーの両方のアミノ基と反応する[17]。

10

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

本発明によれば、二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料が提供される。生体適合材料は、セラミック材料、金属材料、および／または高分子材料であることができる。それは通常は固体の形態であるが、半固体またはヒドロゲルであることもできる。

20

#### 【0013】

本発明の別の実施形態によれば、二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料を作製する方法が提供され、前記方法は、生体適合材料の表面上に二機能性セミデンドリマーを吸着すること、接合すること、またはその場で合成することを含む。

#### 【0014】

本発明のさらに別の実施形態によれば、二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料でコーティングされるか、または二機能性セミデンドリマーを含む機能化された表面を有する生体適合材料から形成される生物医療装置が提供される。生物医療装置は、例えば、ステント、人工股関節、または代替心臓弁のような医療用インプラントであることができる。

30

#### 【0015】

本発明の生体適合材料は、インプラントおよび組織工学的構造物に関連するヒトおよび動物の生物学的な系の化学的成分、生化学的成分、および細胞成分と特定の生体相互作用をすることができる。生体適合材料の機能化された表面、および／または生体適合材料でコーティングされるかまたは生体適合材料から形成される生物医療装置の機能化された表面は、組織の細胞外マトリクスの表面を模倣する3Dナノ構造表面であることができる。セミデンドリマー構造における二機能性（または二重機能性）は、セミデンドリマーの最後の枝分かれ世代上で呈示されるものとは異なる化学基または生化学基を呈示するコア分子によって生成される。一般的に、コア分子によって分子樹の根元において呈示される化学基または生化学基（第一機能性）は、生体適合材料の表面に対するセミデンドリマーの接合を促進し、一方、最後の枝分かれ世代で呈示される機能性（二機能性セミデンドリマーの第二機能性）はその生体相互作用を調節するであろう。

40

#### 【0016】

本発明は、以下の実施例および付随する図面を参照することによってより詳細に説明されるだろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図1】図1は、本発明による生体適合材料の機能化のために好適な二機能性デンドリマ

50

ー構造の概略図である。Bは、デンドリマーを生体適合材料に架橋する機能性を有する基を示し；Dは、生体適合材料の生体認識または生体適合材料の生体認識が関連する他の生体活性プロセスを促進する機能性を有する基を示す。D基の例は、ペプチド、アミノ酸、炭水化物、抗生物質などを含む。

【図2】図2は、生体適合材料表面の走査電子顕微鏡によって生成された画像である；ここで、(a)は非機能化表面であり、(b)は本発明によるセミデンドリマー機能化された表面である。

【図3】図3は、ホスホセリン基を呈示する二機能性G<sub>3</sub>セミデンドリマーの分子構造である。

【図4】図4は、ホスホセリン基を呈示する二機能性G<sub>3</sub>セミデンドリマーでの機能化後の、生体適合材料の表面の鉛化の異なる段階の走査電子顕微鏡像である；ここで、(a)は疑似体液中の48時間のインキュベーション後の、鉛化ナノ構造化セミデンドリマーネットワークであり、(b)は疑似体液中の48時間のインキュベーション後の、セミデンドリマーネットワーク上の離散的なリン酸カルシウム結晶の形成を示し、(c)はコーティング表面に形成された結晶種であり、(d)は組織化された鉛化した3D構造を示す。

【図5】図5は、図4の鉛化されたホスホセリンセミデンドリマーコーティングの典型的なエネルギー分散型X線(EDX)分析であり、疑似体液への曝露後のカルシウムおよびリンの存在を示す。

【図6】図6は、本発明による(a)非特異的(例えば、静電的)相互作用によって、(b)共有結合によって、(c)包み込みによって、および(d)それらの組合せによって、抗菌剤を呈示する二機能性セミデンドリマーで機能化された生体適合材料の表面の略図である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0018】

##### 実施例1 - 二機能性セミデンドリマー

方法 - ポリリシンセミデンドリマーおよびPAMAMセミデンドリマーは、市販の固相マトリクスを使用して合成される。PAMAMセミデンドリマーの場合、合成は、Micheleの付加反応の後にジアミド付加による分子枝の伸長が行われる従来のデンドリマー合成法に基づく。根元に-NH<sub>2</sub>、-SH、および-OHのような好適な機能基を呈示するセミデンドリマーを得るために、種々のアミノ酸がコア分子として使用される。そのような機能基は、セミデンドリマーが固相合成マトリクスから開裂された後に呈示されるようになり、そして生体適合材料の表面上への接合のために利用できるようになる。第二の機能性は、特定の生体相互作用を支えることができるアミノ酸または他の分子を付加することによって得られる。セミデンドリマーの最後の枝分かれ世代に呈示される生体分子の典型的な例は、表1において報告され、例えば、カルシウムに結合することができるホスホセリン基の付加を含む(実施例3を参照のこと)。

10

20

30

## 【表1】

表1 セミデンドリマー上に呈示される典型的な生体機能性。脚注は、生体適合材料分野における生体特異的分子の使用の例に言及する。

機能基	タイプ	機能
ホスホセリン <sup>a</sup>	アミノ酸	鉱化
RGD <sup>b</sup>	ペプチド	細胞認識
FHRIKA	ペプチド	骨芽細胞遊走
KRSR	ペプチド	骨芽細胞認識
スペルミジン	ポリアミン	凝固酵素に対する基質
アグマチン <sup>c</sup>	合成モノマー模倣RGD mimicking RGD	細胞認識
ガラクトース	糖	細胞認識
グルコサミン	糖	細胞認識
グルタチオン	トリペプチド	酸化防止

10

<sup>a</sup>参考文献7を参照のこと

<sup>b</sup>参考文献3, 4, 6を参照のこと

<sup>c</sup>参考文献8を参照のこと

## 【0019】

二機能性PAMAMセミデンドリマーについての合成の典型的なプロトコルは、以下の工程を含む。

20

## 【0020】

Rink-Amide-Linkerとコア分子(Fmoc-Gly)またはペプチド(Fmoc-末端ペプチド)の連結

- DMF(15ml)中のRink-Amide-Linker(0.2g, 0.4mmol)、TCTU(0.14g, 0.4mmol)、およびDIPEA(0.11ml, 0.4mmol)を室温で12時間インキュベートし、次いで、DMFで洗浄する。
- DMF中の20%ピペリジンで2×15分インキュベートし、次いで、DMFで洗浄する。

30

- DMF(10ml)中のFmoc-Gly-OHまたはFmoc-ペプチド-OH(0.1g, 0.4mmol)、TCTU(0.14g, 0.4mmol)を室温で2時間インキュベートし、次いで、DMFで洗浄する。

30

- DMF中の20%ピペリジンで2×15分インキュベートし、次いで、DMFおよびメタノールで洗浄する。

40

## 【0021】

## デンドリマー合成

- アクリル酸メチル(10ml)およびMeOH(20ml)(比=1:2)を、60度24時間インキュベートし、メタノールで洗浄する。

40

- 1,3-ジアミノプロパン(20ml)(DAP)およびMeOH(20ml)(比=1:1)を、60度24時間インキュベートし、メタノールで洗浄する。

## 【0022】

## デンドリマーの生体機能化

関連する機能分子(例えば、アミノ酸、ペプチド、炭水化物など)は、従来のかつ適切な化学的方法[13, 14]によって、セミデンドリマーの最上層の世代に共有結合される。

## 【0023】

二機能性ポリリシンセミデンドリマーの場合、方法は、従来の固相ポリペプチド合成からなり、一連のアミノ酸配列の保護/脱保護工程によってポリリシン分子が5つの枝分かれ世代までの枝分かれしたポリマー構造を形成するために付加される。合成は、以下のプロトコルに従って実施された。

50

## 【0024】

自動ペプチドシンセサイザを使用するポリリシンセミデンドリマーの合成

- ・ペプチド合成樹脂(0.5 g、0.1 mmol(-NH<sub>2</sub>))は、ペプチドシンセサイザ上でDMFによって膨潤された。

## 【0025】

バイアルは、次いで、以下のようにペプチドシンセサイザ上に充填された：

- ・1個のバイアルは、Rink Amideリンカー(215.8 mg、0.4 mmol)およびTCTU(142.2 mg、0.4 mmol)を含有する。
- ・1個のバイアルは、Fmoc-Cys(Trt)-OH(234.3 mg、0.4 mmol)およびTCTU(142.2 mg、0.4 mmol)を含有する。
- ・必要とされるポリリシンの世代に依存するFmoc-Lys(Fmoc)-OH(236.3 mg、0.4 mmol)およびTCTU(142.2 mg、0.4 mmol)(例えば、G<sub>3</sub>ポリリシンに対して11個のバイアルが必要とされる)
- ・次いで、各バイアルは順に以下の手順に従った：

(i) DMFでの内容物の溶解。

(ii) ペプチド合成樹脂での反応。

(iii) DMFでの樹脂の洗浄。

(iv) アミノ酸を脱保護するためのDMF中の20%ピペリジンでの樹脂の洗浄。

(v) 次のバイアルに対する工程(i)～(iv)の繰り返し。

(vi) 工程(iv)を含まない最終アミノ酸の添加。

10

20

20

## 【0026】

ペプチド合成樹脂からのペプチドの開裂

- ・樹脂をフリットのシリングに移す。
- ・樹脂を5×8 cm<sup>3</sup>のジクロロメタン、メタノール、および最終的にはジエチルエーテルで洗浄し、窒素流下で乾燥する。
- ・洗浄された樹脂は、次いで、合成の全体にわたって使用される保護基に依存して標準的な脱保護方法を使用して脱保護され、質量分析によって分析される前に精製された。

## 【0027】

結果 - 図1は、本発明において使用される典型的な二機能性セミデンドリマーの概略的構造を示す。表2は、分子根においてチオール基を呈示するシステインコア分子から得られた典型的なポリリシンG<sub>3</sub>二機能性セミデンドリマーの質量分析データを示す。ホスホセリン末端機能化の場合、最終セミデンドリマーの質量は4683.1であった。

30

40

## 【表2】

表2 G<sub>3</sub>ポリリシンセミデンドリマーの質量分析データ

K's	M	M+H	M+2H	M+3H	M+4H	M+5H
1	249.1317	250.1397	125.5739	84.0519	63.29093	50.83434
2	377.2267	378.2347	189.6214	126.7502	95.31468	76.45334
3	505.3217	506.3297	253.6689	169.4486	127.3384	102.0723
4	633.4167	634.4247	317.7164	212.1469	159.3622	127.6913
5	761.5117	762.5197	381.7639	254.8452	191.3859	153.3103
6	889.6067	890.6147	445.8114	297.5436	223.4097	178.9293
7	1017.702	1018.71	509.8589	340.2419	255.4334	204.5483
8	1145.797	1146.805	573.9064	382.9402	287.4572	230.1673
9	1273.892	1274.9	637.9539	425.6386	319.4809	255.7863
10	1401.987	1402.995	702.0014	468.3369	351.5047	281.4053
11	1530.082	1531.09	766.0489	511.0352	383.5284	307.0243
12	1658.177	1659.185	830.0964	553.7336	415.5522	332.6433
13	1786.272	1787.28	894.1439	596.4319	447.5759	358.2623
14	1914.367	1915.375	958.1914	639.1302	479.5997	383.8813
15	2042.462	2043.47	1022.239	681.8286	511.6234	409.5003

50

## 【0028】

実施例2 - 二機能性セミデンドリマーによる表面の機能化

方法 - 実施例1の二機能性セミデンドリマーは、実施例1に記載されるように、生体適合材料の表面上でその場で合成される。その場での合成の前に、生体適合材料の表面は、コア分子またはペプチドの接合のために必要とされる-OH、-NH<sub>2</sub>、または-SH基のような機能基を得るために従来の化学的方法によって活性化されることができる。活性化方法は、例えば、シラン化反応、ジアルデヒドの使用、および表面エッティング（例えばアルカリエッティングおよびプラズマエッティングなど）を含む。

## 【0029】

文献[3, 4, 6]において報告されるような生体適合材料の表面の活性化の典型的な例を以下に挙げる：

## シラン化反応

- トルエン(100ml)中の0.1%3-アミノプロピルトリメトキシシラン(APTMS)または3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)溶液を110℃で2時間還流し、トルエンまたはメタノールで洗浄する。
- シラン化はまた、真空下で適用される3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)または3-アミノプロピルトリメトキシシラン(APTMS)を使用して気体状態においても実施されることができる。

## 【0030】

## ジアルデヒド活性化

- ジアルデヒド表面活性化は、蒸留水中の種々の濃度（例えば、0.1%、0.5%、および2.5%（v/v））のグルタルアルデヒドまたはゲニピン(genipin)溶液のようなジアルデヒドで清潔な表面を、20~30分間インキュベーションすることによって得られた。あるいは、生体適合材料の表面は、室温で種々の時間、飽和されたジアルデヒドの環境に曝される。
- 活性化された表面は、蒸留水で完全に洗浄された。

## 【0031】

## アルカリエッティング

- 生体適合材料の表面は、室温で1時間、0.1~5Mの範囲の種々の濃度でアルカリ(NaOH、KOH)で処理される。

## 【0032】

活性化後、生体適合材料の表面は、室温で30分間メタノールで平衡化される。二機能性セミデンドリマーのその場での固相合成は、次いで、実施例1において報告されるように実施される。

## 【0033】

あるいは、二機能性セミデンドリマーは、種々の化学反応によって生体適合材料の固体表面上に接合され、このような化学反応は、(i)セミデンドリマー-OHまたは-NH<sub>2</sub>に対するジアルデヒド（例えば、グルタルアルデヒドおよびゲニピン）のアルデヒド基の使用、(ii)固体表面上ならびにセミデンドリマーのコア構造上に呈示される-SH基の反応の使用を含む。金属酸化物および金の表面、ならびに高分子材料は、これらの方針によって機能化されることができる。接合プロトコルの典型的な例は以下の工程を含む：

- 活性化された生体適合材料の表面は、温かい(40℃)蒸留水、次いで安定された温度(25℃)の蒸留水で完全に洗浄された。
- 表面は、10mMトリスHCl、20mM MgSO<sub>4</sub>(pH=7.0~7.5)[Tris-Mg]のような緩衝液で平衡化された。
- セミデンドリマー溶液(30μl+120μlトリス緩衝液)は、次いで、反応容器に入れられた。機能化された表面をセミデンドリマーで飽和するために、反応は、非結合材料を緩衝液で洗浄しながらセミデンドリマー溶液のアリコートで10~15分インキュベーションする工程を挿入することによって実施された。

10

20

30

40

50

## 【0034】

第3の方法において、生体適合材料の機能化は、呈示された表面上における実施例1のセミデンドリマーの物理的な吸着によって達成されることがある。これは、室温で種々の時間、セミデンドリマー溶液中で生体適合材料の表面をインキュベートすることによって達成される。種々のインキュベーション時間およびセミデンドリマー溶液濃度は、異なる厚みのコーティングをもたらすだろう。静電結合および／または疎水結合、ならびに水素結合は、呈示された表面および吸着するセミデンドリマーの物理化学的特徴に依存してこのプロセスを進める。形成されたセミデンドリマーの単層または多層はまた、架橋剤でのその処理によって安定化されることができ、それによって表面上にナノ構造化されたネットワークを形成する。架橋剤は、例えば、ジアルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、ゲニピンなど）を含む。架橋は、セミデンドリマーでコーティングされた生体適合材料を、架橋剤溶液（例えば、2.5容量%のグルタルアルデヒド）中でまたはその飽和された雰囲気下でインキュベーションすることによって得られることがある。凝固酵素第XII因子によって基質として認識されるペプチド配列で機能化されたセミデンドリマーの架橋はまた、この酵素の溶液でのインキュベーションによって、または血液との直接接触によって得られることがある。

10

## 【0035】

結果 - セミデンドリマーは、生体特異性を高めるために、高分子および金属の生体適合材料のような生体適合材料の表面上にその場で合成されるか、または接合される。機能化されていない表面（図2a）と比較すると、セミデンドリマーの均質なナノ構造化されたネットワークがこれら的方法によって形成される（図2b）。

20

## 【0036】

実施例3 - 二機能化されたホスホセリン呈示セミデンドリマーによって機能化された生体適合材料の表面鉱化

方法 - 二機能化セミデンドリマーは実施例1に記載されるように合成され、それらの最上層の枝分かれ世代は、図3において示されるようにホスホセリンアミノ酸の付加によって機能化される。ホスホセリン呈示セミデンドリマーは、実施例2に記載されるように生体適合材料の表面上でその場で合成されるか、または接合される。鉱化実験は、コーティングされていない生体適合材料（例えば、酸化チタン）の表面とホスホセリン呈示セミデンドリマーでコーティングされた表面とを疑似体液中で48時間および72時間、37の静的条件でインキュベートすることによって実施された。疑似体液の組成は、pH 7.2の0.05M TES緩衝液中に溶解された、71mM NaCl、5mM KCl、1.64mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.36mM CaCl<sub>2</sub>を含んでいた。

30

## 【0037】

結果 - 図4a～dは、ホスホセリンベースのG<sub>3</sub>セミデンドリマーで予め機能化され、続いてカルシウムおよびリン濃度をヒト体液と同様にした疑似体液中でインキュベートされた固体表面上での、規則正しいリン酸カルシウムベースの鉱物相の漸進的な形成を示す。実施例2に記載される物理的な吸着方法の後にホスホセリンコーティングが多層コーティングとして適用された場合、高度に組織化された3Dナノ構造が得られた（図4d）。全ての場合において、EDXはリン酸カルシウムに富んだ鉱物相の存在を示した（図5）。

40

## 【0038】

実施例4 - 二機能性の細胞受容体結合セミデンドリマーによって機能化された生体適合材料上の細胞接着

方法 - 二機能性セミデンドリマーは、実施例1に記載されるように合成され、それらの最上層の枝分かれ世代は、例えばインテグリンを含む細胞受容体によって認識されるバイオリガンドを呈示する。セミデンドリマーは、実施例2に記載されるように生体適合材料の表面上で、その場で合成されるか、または接合される。

## 【0039】

結果 - 細胞は、二機能性セミデンドリマーで機能化された滑らかなチタン表面上では接

50

着しきつ均一に分散することができたが、機能化されていない滑らかな金属表面上ではクラスターを形成する。

【0040】

実施例5 - 抗菌剤を呈示する二機能性セミデンドリマーによる表面の機能化

方法 - 二機能性セミデンドリマーは、実施例1に記載されるように合成され、それらの最上層の枝分かれ世代は、抗生物質分子のような抗菌剤を呈示する。セミデンドリマーは、細菌感染を予防するために、実施例2に記載されるように生体適合材料の表面上に、その場で合成されるか、または接合される。抗菌剤は、例えば抗生物質イオンおよび銀イオンを含み、これらは、非特異的相互作用（例えば、静電的相互作用および／または疎水的相互作用）または共有結合、またはセミデンドリマーの分岐中への包み込みのいずれかによって、二機能性セミデンドリマーを呈示した表面に結合された。

10

【0041】

結果 - 図6a～dは、種々の方法によって結合され、かつ移植するときに放出された抗菌性分子を呈示する二機能性デンドリマーで機能化された生体適合材料の表面の略図を示す。

【0042】

### 参考文献

1. Castner, D.G., Ratner, B.D (2002) Biomedical surface science: foundation to frontiers. *Surf. Sci.* 500, 28-60.
2. Takeshita F. ら (1997) Study of bone formation around dense hydroxyapatite implants using light microscopy, image processing and confocal light microscopy. *Biomaterials*, 18, 317-322.
3. Nanci A., Wuest J.D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S. および McKee M.D. (1998) Chemical Modification of Titanium Surfaces for Covalent Attachment of Biological Molecules. *Journal of Biomedical Materials Research*. 40, 324-335.
4. Nanci ら 米国特許第 5,824,651 号 (1998)
5. Rammelt S ら (2006) Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulphate. *Biomaterials* 27, 5561-5571
6. Kokubo ら 米国特許第 5,609,633 号 (1997)
7. Lloyd ら (2000) Bioimplant coatings PCT/GB00/03290
8. Franchini J ら (2006). Synthesis, physico-chemical properties, and preliminary biological characterizations of a novel

20

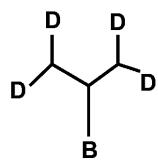
30

40

- amphoteric agmatine-based poly(amidoamine) with RGD-like repeating units. *Biomacromolecules* 7, 1215-1222.
9. Parker JATC ら (2002). The effect of bone anchoring and micro-grooves on the soft tissue reaction to implant. *Biomaterials* 23, 3887-3896
10. 10 Sandrini E. ら (2005). In vitro assessment of the osteointegrative potential of a novel multiphase anodic spark deposition coating for orthopaedic and dental implants. *J Biomed Mater Res B. – Appl Biomat.* 73B, 392-399.
11. Hobson L. J., Feast W.J.. (1999) Poly(amidoamine) hyperbranched systems: synthesis, structure and characterization. *Polymer* 40, 1279-1297
12. N. J. Wells ら Solid-phase dendrimer synthesis. *Biopolym.* 47, 381-396 (1998).
- 20 13. Dubber M., Lindhorst, T.K. (2001) Trehalose-Based Octopus Glycosides for the Synthesis of Carbohydrate-Centered PAMAM Dendrimers and Thiourea-Bridged Glycoclusters. *Organic Letters.* 3, 4019-4022.
14. Monaghan S. (2001) Solid-Phase Synthesis of Peptide-Dendrimer Conjugates for an Investigation of Integrin Binding. *ARKIVOC.* 46-53.
- 30 15. Tang M.X. ら (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chemistry* 7, 703-714.
16. Tang M.X., Szoka, F.C. (1997) The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy.* Vol.4 . pp.823-832.
- 40 17. F. Kazuhisa ら (2005) Dendrimer-based DNA extraction methods and biochips. 米国特許出願 第 200513019 号 .

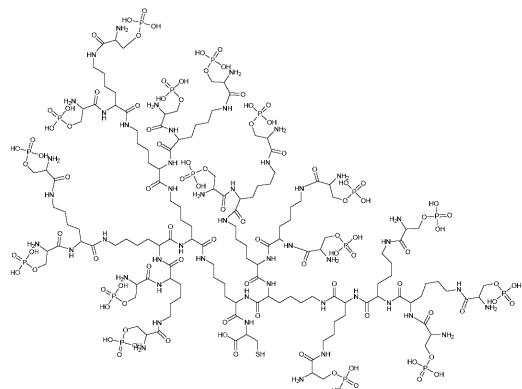
【図1】

Figure 1



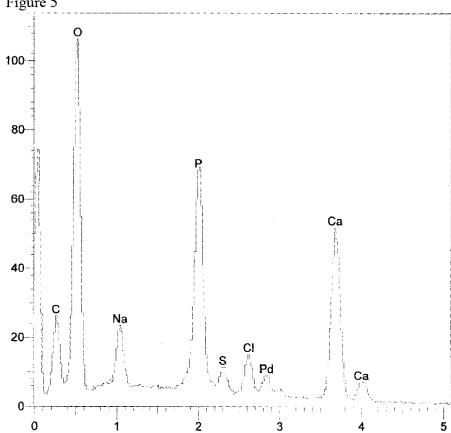
【図3】

Figure 3



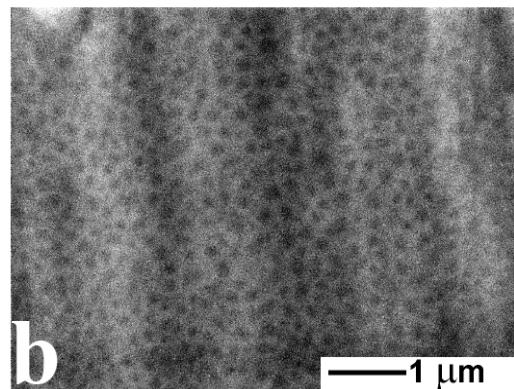
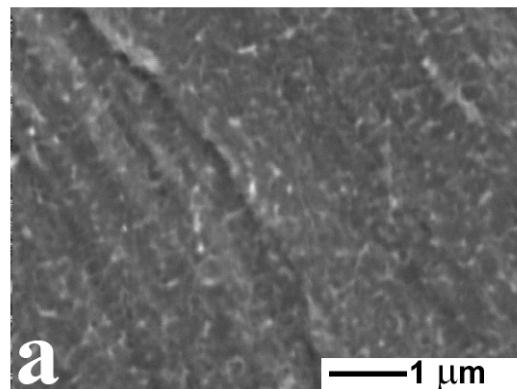
【図5】

Figure 5



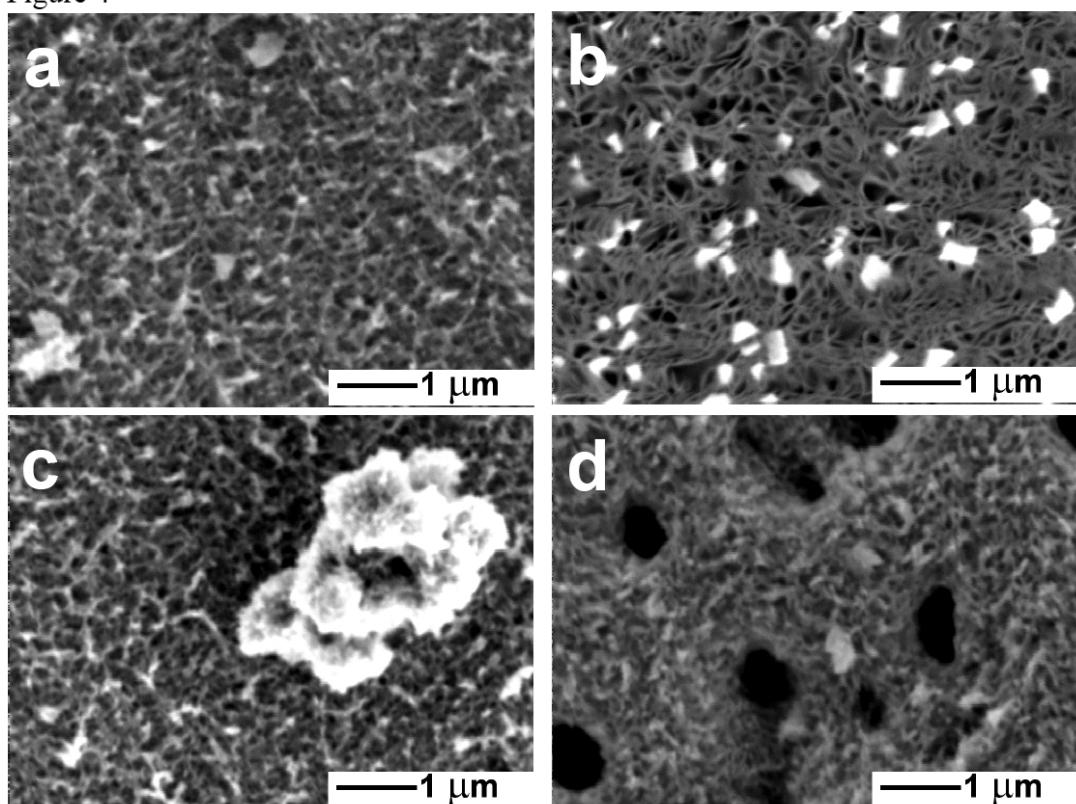
【図2】

Figure 2



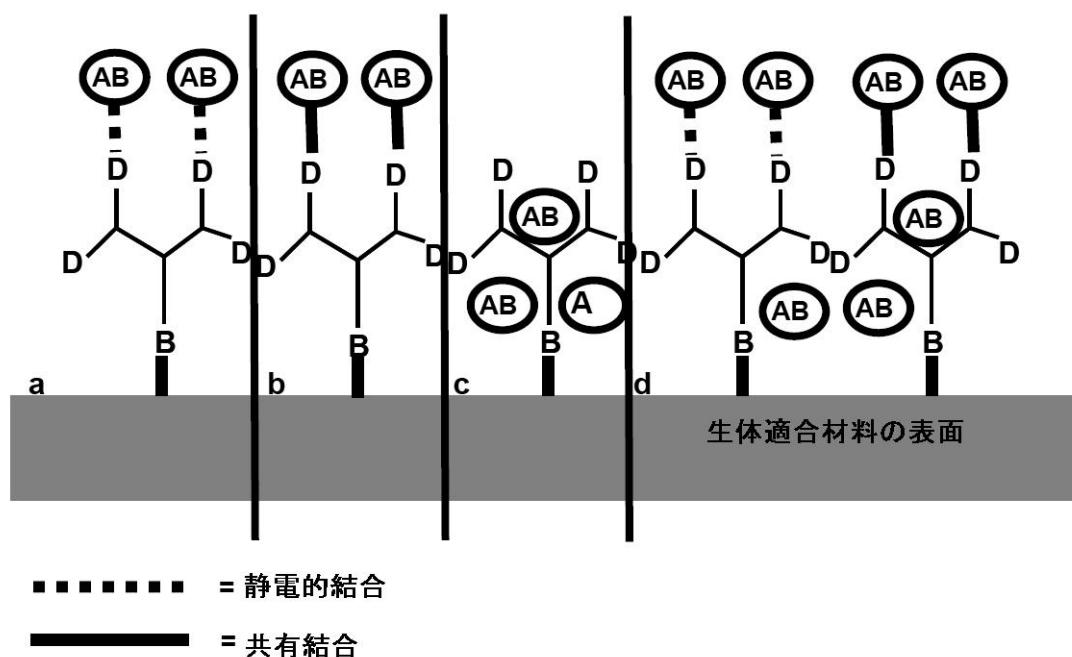
【図4】

Figure 4



【図6】

Figure 6



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2007/050741						
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61L27/34 A61L27/54 A61L31/10 A61L31/16								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61L								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data								
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">         AUERNHEIMER J RG ET AL: "Titanium implant materials with improved biocompatibility through coating with phosphonate-anchored cyclic RGD peptides"  <i>CHEMBIOCHEM - A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY</i>, WILEY VCH, WEINHEIM, DE,          vol. 6, no. 11,          1 November 2005 (2005-11-01), pages 2034-2040, XP009093477          ISSN: 1439-4227          page 2035, left-hand column          page 2035; figures 1,3          page 2036, left-hand column, paragraph 2            -/-/       </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">1-10</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	AUERNHEIMER J RG ET AL: "Titanium implant materials with improved biocompatibility through coating with phosphonate-anchored cyclic RGD peptides" <i>CHEMBIOCHEM - A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY</i> , WILEY VCH, WEINHEIM, DE, vol. 6, no. 11, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 2034-2040, XP009093477 ISSN: 1439-4227 page 2035, left-hand column page 2035; figures 1,3 page 2036, left-hand column, paragraph 2  -/-/	1-10
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	AUERNHEIMER J RG ET AL: "Titanium implant materials with improved biocompatibility through coating with phosphonate-anchored cyclic RGD peptides" <i>CHEMBIOCHEM - A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY</i> , WILEY VCH, WEINHEIM, DE, vol. 6, no. 11, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 2034-2040, XP009093477 ISSN: 1439-4227 page 2035, left-hand column page 2035; figures 1,3 page 2036, left-hand column, paragraph 2  -/-/	1-10						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed								
Date of the actual completion of the international search  4 February 2009		Date of mailing of the international search report  11/02/2009						
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  López García, Mónica						

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No PCT/GB2007/050741
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 876 916 A (MIDI PYRENEES INCUBATEUR [FR]) 28 April 2006 (2006-04-28) page 3, line 27 – page 5, line 2 page 7, line 5 – page 9, line 11 page 16, lines 28-31 claims 1-4,13-16	1,3-10
X	FR 2 734 268 A (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 22 November 1996 (1996-11-22) figures 3-18	1,3-10
A	DE 198 49 464 A1 (SCHERING AG [DE]) 27 April 2000 (2000-04-27) the whole document	1-10
A	MONAGHAN S ET AL: "Solid-Phase Synthesis of peptide-dendrimer conjugates for an investigation of integrin binding" ARKIVOC,, 30 October 2001 (2001-10-30), pages 46-53, XP002472135 ISSN: 1424-6376 the whole document	1-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/GB2007/050741

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2876916	A 28-04-2006	NONE	
FR 2734268	A 22-11-1996	NONE	
DE 19849464	A1 27-04-2000	NONE	

---

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,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 オリヴィエ， ジョージ， ウィリアム， ジョン  
イギリス， サセックス アールエイチ16 1キュー・キュー， ヘイワーズ ヒース， リンド  
フィールド， スケインズ ヒル ロード， グランジ コテージ

(72)発明者 スタンデン， ガイ  
イギリス， ウェスト サセックス ピーエヌ44 3ワイアール， スティニング， キングズ  
バーン レーン 11

(72)発明者 サンティン， マッテオ  
イギリス， サセックス ピーエヌ2 4ジージェー， ブライトン， クレイフォード ロード  
18

(72)発明者 メイクル， スティーヴン， トーマス  
イギリス， サセックス ピーエヌ2 3エービー， ブライトン， ウェリントン ロード 1  
エフ

Fターム(参考) 4C081 AB05 AB17 AC09 BA12 BA14 CA23 CA24 CD01 DA01 DA12  
DC05 EA05 EA06