

(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2004-534103

(P2004-534103A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/06	A 6 1 K 9/06	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/32	A 6 1 K 47/32	4 C O 8 4
A 6 1 K 47/36	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/46	A 6 1 K 47/46	
A 6 1 P 5/50	A 6 1 P 5/50	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 94 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-512710 (P2003-512710)	(71) 出願人	504014750
(86) (22) 出願日	平成14年7月10日 (2002.7.10)		デ・モントフォート・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月13日 (2004.1.13)		イギリス国、エルイー1・5エックスワイ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/003183		、レイセスター、オックスフォード・スト
(87) 国際公開番号	W02003/006993		リート、イノベーションズ・センター、イ
(87) 国際公開日	平成15年1月23日 (2003.1.23)		ンテレクチュアル・プロパティ・アドバ
(31) 優先権主張番号	0116860.8		イス・センター (番地なし)
(32) 優先日	平成13年7月10日 (2001.7.10)	(74) 代理人	100058479
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 鈴江 武彦
		(74) 代理人	100091351
			弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100108855
			弁理士 蔵田 昌俊
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲル組成物

(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】 本発明は、互いに可逆的に結合してゲルを形成する第一及び第二のゲル形成成分を含むゲル組成物に関する。前記成分の結合は、分析物のレベルに感受性を有し、架橋された粒状要素間の間隙がゲル-ゾル転移及びゾル-ゲル転移を行えるが、前記分析物が前記間隙を通じて拡散することができない程には小さくないように、前記ゲル形成成分の一方又は双方は架橋された粒状要素に付着される。本発明は、薬物送達システム及びこのようなゲルを用いて分析物を検出するためのセンサーも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

互いに可逆的に結合してゲルを形成する第一及び第二のゲル形成成分を含んだゲル組成物であって、前記結合が分析物のレベルに対して感受性を有し、架橋された粒状要素間の間隙がゲルーゾル転移及びゾルーゲル転移を行うことができるが、前記分析物が前記間隙を通じて拡散することができない程には小さくないように、架橋された粒状要素に前記ゲル形成成分の一方又は双方が付着されている、ゲル組成物。

【請求項 2】

前記粒状要素が局所的に架橋されたポリマーである、請求項 1 に記載のゲル組成物。

【請求項 3】

前記ポリマーがアクリル酸ポリマー又はコポリマーである、請求項 2 に記載のゲル組成物。

【請求項 4】

前記ポリマーが架橋されたカルボマーである、請求項 3 に記載のゲル組成物。

【請求項 5】

前記カルボマーがカルボポール 974 P 又はカルボポール 934 P である、請求項 4 に記載のゲル組成物。

【請求項 6】

前記第一及び／又は前記第二の成分が前記粒状要素に直接的に付着されている、先行する請求項の何れか 1 項に記載のゲル組成物。

【請求項 7】

前記第一及び／又は前記第二の成分がポリマーを介して前記粒状要素に間接的に付着されている、先行する請求項の何れか 1 項に記載のゲル組成物。

【請求項 8】

前記第一の部分が互いに結合するとゲルを形成する高分子であり、前記第二の成分が前記高分子の少なくとも一部に結合してこのような結合を与える分子である、先行する請求項の何れか 1 項に記載のゲル組成物。

【請求項 9】

前記第二の成分がレクチンであり、前記第一の成分が前記レクチンに結合するゲル形成高分子である、先行する請求項の何れか 1 項に記載のゲル組成物。

【請求項 10】

前記第一の成分がデキストランであり、前記第二の成分がコンカナバリン A である、請求項 9 に記載のゲル組成物。

【請求項 11】

前記第二の成分が抗体である、請求項 8 に記載のゲル組成物。

【請求項 12】

前記第一及び前記第二の成分がコポリマーの形態である、先行する請求項の何れか 1 項に記載のゲル組成物。

【請求項 13】

互いに可逆的に結合してゲルを形成する第一及び第二のゲル形成成分を含んだゲル組成物であって、前記結合が分析物のレベルに対して感受性を有し、前記ゲル形成成分が共重合されている、ゲル組成物。

【請求項 14】

請求項 1 乃至 11 の何れか 1 項の特徴によって修飾を受けた、請求項 13 に記載のゲル組成物。

【請求項 15】

半透膜又は透過膜と組み合わされた、先行する請求項の何れか 1 項に記載のゲル組成物。

【請求項 16】

先行する請求項の何れか 1 項に記載のゲル組成物と薬物とを備えた薬物送達システムであって、前記薬物が、(a) 前記ゲル組成物の中に含有されているか、又は (b) 貯蔵部の

10

20

30

40

50

中に含有され、前記ゲル組成物が前記貯蔵物と前記薬物が放出されるべき領域との間の境界を成している、薬物送達システム。

【請求項 17】

分析物のレベルを検出するためのセンサーであって、請求項 1 乃至 15 の何れか 1 項に記載のゲル組成物と該ゲルの粘度を検出するための手段とを備えたセンサー。

【請求項 18】

ゲル組成物を製造する方法であって、第一及び／又は第二のゲル形成成分を架橋された粒状要素に付着させることを備え、前記第一及び第二のゲル形成成分は互いに可逆的に結合してゲルを形成することができ、前記結合が分析物のレベルに対して感受性を有し、架橋された粒状要素間の間隙がゲルーゾル転移及びゾルーゲル転移を行うことができるが、前記間隙を通じて前記分析物が拡散することができない程には小さくない、方法。 10

【請求項 19】

請求項 1 乃至 12 の何れか 1 項の特徴によって修飾を受けた、請求項 18 に記載のゲル組成物。

【請求項 20】

活性物質を経皮投与するための薬学的組成物であって、(a) 前記活性物質を含有する担体か、又は (b) 前記活性物質と前記活性物質が放出されるべき領域との間に障壁を形成する担体を備え、前記活性物質が前記酵素の作用によって前記組成物から放出されるように、前記担体の少なくとも一部が 1 以上の皮膚酵素によって消化され得る、薬学的組成物。 20

【請求項 21】

活性物質に共有結合した担体を含む、医薬に用いるための、とくに、前記活性物質を経皮投与するための組成物であって、前記担体と前記活性物質との結合が、1 以上に皮膚酵素によって消化され得る、組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

本発明は、互いに結合してゲルを形成するゲル形成成分を含むゲル組成物に関する。前記ゲル形成成分の結合は、特定の分析物のレベルに依存し、可逆的とすることができる。このようなゲルは、試料中の分析物のレベルをモニタリングすること、及び異常なレベルの分析物に応じて薬物を送達することに用途が見出される。 30

【0002】

従来技術では、W093/13803号が、ある実施形態において、デキストランとコンカナバリン A (Con A) を含むゲルを開示している。デキストランの末端グルコース残基が Con A に結合しているため、粘度が増加したゲルが形成される。遊離のグルコースが、Con A への結合に関してデキストラングルコース残基と競合すると、この結合は解離する。このため、前記ゲルは、接触する遊離のグルコースの量に影響を受ける。このため、前記ゲルは、インシュリン等の抗高血糖薬を用いた薬物送達システムとして使用することができる。グルコースのレベルが正常な場合、デキストランは Con A に結合し、インシュリンはゲルの中に保持される。しかし、グルコースのレベルが上昇すると、結合度が下落してインシュリンを放出する。生理的な条件下では、インシュリンの放出によってグルコースレベルが下落し、結合度が増加することによって更なるインシュリンの放出は抑えられるであろう。このように、前記薬物送達システムは正常に機能している膵臓と同一の効果を有する「閉鎖環(closed loop)」系を形成し、必要時にはインシュリンが放出され(グルコースによって、ゲルにゲルーゾル遷移が引き起こされる場合)、不要時にはインシュリンが保持される(グルコースの欠如によって、ゲルにゾルーゲル遷移が引き起こされる場合)。 40

【0003】

Obaidat & Park, Biomaterials 18(11 1997):801-806; Obaidat & Park, Pharmaceutical Research 12 (9 SUPPL 1995); Obaidat & Park, Pharmaceutical Research 13 (7 1996) 50

: 989-995; and Valuev, et al, Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya A & Seriya B (1997): 751-754に、類似のゲルが開示されている。

【0004】

DE-A-4203466号には、このタイプのゲルをグルコースセンサーとして使用することが開示されている。可逆的なゲル-ゾル変化によってもたらされるゲルの粘度の変化が、周期変動シグナルにゲル表面を応答させるように、半透過性のチューブにゲルを入れる。反応の程度はゲルの粘度に依存し、従って、グルコースの濃度に依存する。その後の研究は、粘度そのものではなく応答の速度論を測定する表面プラズモン共鳴 (SPR) によって測定したときの、このようなゲルのグルコースに対する応答について記載している (Ballersta 10
dt & Schultz, Sensors and Actuators B Chemical, (1998), 46: 557-567)。ゲルを作製するのではなく、表面にレクチンを固定化し、蛍光標識されたレクチンの置換をレーザー光学で測定した。このように、この最近の研究では、グルコースレベルの指標として粘度の変化を用いなかった。同様に、DE-A-4034565号は、架橋されたデキストランビーズからの放射性レクチンの測定について記載している。

【0005】

最後に、W099/48419号は、可逆的なゲル (具体的には、Ficoll-ConAゲル) の粘度の変化を測定して分析すべき試料中のグルコースのレベルを測定するために、粘度感受性のチップを使用することについて記載している。

【0006】

このタイプのゲルの問題は、水と混和するために、分散してしまいがちなことである。ゲルの成分が望ましくない免疫反応を引き起こすことがあるので、ある分析物を検出するためにインビボでこの種のゲルを使用すると、この問題が特に先鋭化する。実際に、ConAは有糸分裂促進作用を有する。このために、分析物を透過させてゲルと接触できるような半透膜にゲルを封入することがある。しかしながら、適当な時間内に、分析物のレベルの変化に対してゲルが反応するためには、分析物は半透膜をすばやく通過することができなければならない。加えて、薬物が放出されるべき状況の下では、前記膜は、素早く放出させなければならない。このような素早い通過を確保するためには、膜は、相対的に大きな開口部を有する必要がある、及び／又は比較的薄くなければならず、その結果、ゲルの成分は、半透膜から浸出することができる。例えば、W0 93/13803号に記載されているタイプのゲルは、水に対して混和性であり、とりわけグルコースレベルの上昇によって誘導 30
されたゾル型において、ゲル形成成分の急速な分散を妨げるために、小孔膜の中にゲルを閉じ込めなければならない。しかしながら、36 kDのインシュリンヘキサマーの放出にとって律速とならない孔サイズ (例えば、0.1 μm) は、110 kDのConAテトラマーを逸出させ、これより程度は低い、デキストランも逸出させてしまう。

【0007】

従って、分散しにくい上記のタイプのゲルを得ることが望ましい。

【発明の開示】

【0008】

本発明によれば、互いに可逆的に結合してゲルを形成する第一及び第二のゲル形成成分を含んだゲル組成物であって、前記結合が分析物のレベルに対して感受性を有し、架橋された粒状要素間の間隙がゲル-ゾル転移及びゾル-ゲル転移を行うことができるが、前記分析物が前記間隙を通じて拡散することができない程には前記間隙が小さくないように、前記ゲル形成成分の一方又は双方が前記架橋された粒状要素に付着されている、ゲル組成物が提供される。 40

【0009】

添付の図面を参照しながら、本発明の説明を行う。

【0010】

本発明は、相互作用するリガンド対 (第一及び第二の成分) がゲル内に保持された (すなわち、前記成分を周囲に浸出されない) 可逆的ゲルを提供する。さらに、ゲル-ゾルサイクルの液体段階時での成分の相分離も抑えられ、このため、前記第一及び第二の成分が近 50

接するようになり、組成物の寿命が延びる。相分離の抑制によって、関連するリガンド間の相互作用の継続的確率が増加するので、相分離の抑制も重要である。

【0011】

好ましい粒状要素(particulate entities)は、粒状要素が粒子を形成するように局所的に架橋されたポリマーであり(「ミクロゲル」、「ミニゲル」、又は「ファズボール」と呼ばれることがある)、その中で、各粒子は、水性間隙領域によってほとんど又は完全に囲まれた離散的なハイドロゲル構造を採る。架橋度がCarbopol 941の架橋度(3300モノマーごとに1つのリンカーを有する(Carnali & Naser, 1992, Colloid Polymer Sci. 270:183-193))より大きければ好ましい。

【0012】

本発明のある実施形態では、前記粒状要素は、150又は100 μm 以下であり、好ましくは、10乃至80又は20乃至70 μm の範囲の平均直径を有する。これによって、0.1 mm以上の孔径を有する膜を前記組成物が通過できなくなり、且つ、分析物は容易に通過することが可能であるからであり、組成物を通り抜けなければならないことがある薬物が存在するときには、薬物も容易に通過することができる。

【0013】

好ましい実施形態では、前記架橋されたポリマーは、アクリル酸ポリマー又はコポリマーであり、架橋されたカルボマー(Carbopol(BFGoodrich(USA)、ポリカルボフィル、カルボキシビニル又はカルボキシポリメチレンポリマー)としても知られる)であることが好ましい。

【0014】

アクリル酸は、残存するイオン化可能なカルボキシル基が各モノマーから懸垂した直線的配置になるように重合することができる反応性の二重結合を有する小分子である。これによって、多価電解質として振舞うことができる親水性産物が得られる。この種の直鎖誘導体(Carbopol 907等)は、500,000の平均分子量を有し、水溶性であると報告されている。様々な程度の架橋も起こり得る。架橋の程度とタイプによって、広範なポリマーが生じ、その多くは、酸に加えて他のモノマーを取り込む。例えば、CarbopolとPemulens(BFGoodrich)の中には、長鎖アルキル残基と共重合されたアクリル酸からなり、アリルペンタエリスリトールと架橋されているものがある。ポリカルボフィル(商品名Noveon)は、ジビニルグリコールと緩く架橋されたアクリル酸のホモポリマーである。

【0015】

架橋されたカルボマーのホモポリマーは、様々な程度で、ポリアルキルポリエーテルと架橋されていることを特徴とする。重合に用いる溶媒系のために、又は分散促進因子を含有しているために、薬学的な許容性がより優れているものも存在するが、既述のように、目的の有用性は架橋特性の機能である。多くのタイプは、水の中に分散されたときにも完全性を保つ粒子を備えた乾燥粉末として製造される。各粒子は、分離不能なさらに小さい成分の凝集物であるが、実際には、一次粒子の分子量は何十億(billion)にも達し、各直鎖は、架橋剤の配列によって他の多くの直鎖に結合されて、一つの大きな分子を形成している。乾燥した集合体(aggregate)の平均直径は、概ね2乃至7 μm であるが、水和及び中和によって構造が膨張すると、10倍増加する。後者の過程によって、均一にみえるが、実際には、水性間隙領域によって隔てられた個々の膨張した粒子を備えるゲル状産物が生成する。

【0016】

溶解した物質は、前記ゲルのゲル状粒子の中及び間を浸透する。網の目が細かい粒子の内部は、ビーズが小さく且つより柔らかいことを除けば、慣用されているSephadex等のビーズを用いたゲル透過システムとほぼ同様に、サイズに基づいて溶質の拡散を排除するので、カルボマーゲル分散物の中を溶質が透過する度合いは、架橋密度の関数となる。多くの物質は、従って、巨視的粘度が合致している場合でも、ヒプロメロース等の他の均一なゲルの中を通過する場合に比べて、ずっと速くカルボマーゲルの中を移動する。このため、含水層を通過する多くの溶質の輸送を調節するために、カルボマーが広く使用さ

10

20

30

40

50

れており、浸食によって放出する直鎖ポリマーと比較して、しばしば、かかる用途のために多くの錠剤調合物に加えられる。さらに、カルボマーは粘液に強く接着することが判明しており、薬を長時間与えるために、腸、眼、及び鼻粘膜への薬物送達構造の結合に関して研究が行われてきた。

【0017】

好ましいカルボマーは、（アリルペンタエリスリトールと）強固に架橋した構造を有することによって、各水和粒子が比較的堅固であり、隣接する粒子から離散した状態を保っているCarbopol 974P、及び（アリスクロースとの）架橋がこれより少ないCarbopol 934Pである。これらのカルボマーは大規模に架橋されているが、架橋が局所的であるために粒子状であり、水和された場合でも、柔軟な小ビーズ（ H_2O 中で $20-70\mu m$ ）を形成する。巨大分子は、これらのビーズの中を通過して拡散することができず、ビーズの周囲を拡散することができるにすぎないであろう。

【0018】

架橋されたカルボマー粒子は、タンパク質及びその他の生物学的に活性な成分用の担体として魅力的な多くの特質を有する。

【0019】

・カルボマー粒子は、多くが外向きに配位した懸垂状カルボキシル基を有する。これにより、カルボジイミド化学反応を含む包括的及び特異的手段によって、タンパク質、ペプチド、及びアミン基等の活性部分を有する他の物質を含む活性要素を共有接合させることが可能となる。

【0020】

・カルボマー粒子は多価電解質であり、中性pHでは高度にイオン化されており、適切な陽イオンリガンドを静電的に付着させることが可能となる。

【0021】

・タンパク質の中には、ポリアクリル酸に対して非特異的な親和性を有するものがあるので、共有接合させる必要性がない場合がある。例えば、低pH（ <4 ）では、共有結合が不要で（溶液の混合によって沈殿物が形成される）、グルコース受容体に依存しない極めて強固な物理的付着がコンカナバリンAとカルボマーとの間に存在する。低pHが必要とされるので、ゲル形成成分の一方又は両方を粒子に共有接合することが好ましい。本発明の好ましい実施形態では、コンカナバリンA／デキストランゲル中での担体として、架橋されたカルボマーが添加物として使用される。これによって、極めて良好に反応するが、上述したように、タンパク質の浸出を効果的に抑制する透明なゲルが得られる。

【0022】

・カルボキシルが数多く存在するために、極めて多数のリガンドの共有接合と静電的接合を行うことができる。

【0023】

・カルボマーがポリ陰イオン性であることは、低pH溶媒中で脱水可能なことを意味する。このため、遠心が可能となり、カップリング操作から残存した無用の物質から分離できる。この形態で繰り返し洗浄し、回転させることができ、適切な緩衝液又はその他の水性溶媒中で中和することによって最終的に再水和することができる。

【0024】

・外部表面上に存在する同一要素又は異なる要素の他に、カルボマーは、粒子の内部に一定のタイプの溶質を担持することができる。このため、例えば、そこで結合していると否にかかわらず、外表面上に標的誘導要素及び／又はステルス型の要素を植設可能としつつ、治療剤を粒子内に保持することができる。

【0025】

・カルボマーは、他の担体に比べて極めて大きい、このために、ある種の治療用途には適していないが（例えば、滲出しないうであろう）、その他の治療用途には、さらに有用なものとなる可能性がある。このため、さらに小さな要素を用いた場合と比べて、排出、代謝、分解の進行が遅いので、送達された後、接合体は標的部位にさらに長く留まることが

できる。このような担体は、例えば、サイズが同様で、実験的な薬物送達因子として長く用いられてきたリポソームと共通点が多いといえる。但し、カルボマーは、リポソームの場合と比べて、共有接合能力が大きい。リポソームと同様に、カルボマーは、（とりわけ、親水性中性ポリマーの中でも）ポリエチレングリコールを付加することによって共有結合的に修飾して、肝臓及び脾臓の大血管中のマクロファージによる取り込みを阻止する立体特性及びその他の特性を表面に付与することができる。

【0026】

・粒状であるために、架橋されたカルボマーは、排除ゲルのように機能することができ、従って、多くの溶質は、ハイドロゲルの粒子（又はビーズレット）の中を通らずに、その周囲を浸透する。従って、間隙領域中の水性溶媒の微視的粘度によって支配され、粘度が同等であるが均一に架橋されたハイドロゲルに比べて（この場合、溶質移動は巨視的粘度の関数である）、カルボマーゲルの中を通じた拡散は、多くの溶質対してずっと速い。次いで、共有結合したリガンド用の担体のように、ビーズレットの表面を修飾する場合には、リガンドは間隙領域の微視的粘度に影響を与え得る。この領域は、従って、溶質と化学的又は物理的に相互作用することができる。このように、ゲルベッドは、クロマトグラフィーによる分離、基質センサー、インテリジェント送達装置用にデザインされた溶質に対するアフィニティー基質として作用することができるであろう。

10

【0027】

前記第一及び第二の成分を粒子に付着させることができる方法は数多く存在する。例えば、粒子には、前記第一又は第二の成分を（共有結合又はその他の方法で）直接付着させることもできるし、前記第一及び第二の両成分を（共有結合又はその他の方法で）直接付着させることもできる。これに代えて又はこれに加えて、直接付着させるのではなく、ポリマーを介して前記第一及び／又は第二の成分を間接的に付着させることができる。適切なポリマーは当業者に公知であり、アクリル系骨格ポリマー、デキストラン、セルロース、及びその他の糖ポリマーが含まれる。一方又は他方を前記粒子に直接又は間接的に付着させつつ、（例えば、W095/01186号に記載されている態様で）前記第一及び第二の成分を互いに付着させることができる。

20

【0028】

前記第一及び第二の成分は、互いに可逆的に結合してゲルを形成することができる任意の成分であり得る。前記第一の成分は互いに結合するとゲルを形成する高分子であり、前記第二の成分は前記高分子の少なくとも一部に結合してこのような結合を与える分子であることが好ましい。しかしながら、第一の成分と第二の成分の両方が等しくゲル形成に寄与してもよい。前記第二のゲル形成成分も前記分析物に結合ので、前記分析物のレベルに対して前記ゲルが感受性を生じることが好ましい。このように、分析物は前記第一のゲル形成成分と競合するので、分析物の濃度が十分に高ければ、第一及び第二のゲル形成成分の結合が抑えられ、ゲルの粘度が減少する。以下でさらに詳細に記載されているように、薬物を放出させるために又は分析物のレベルの指標を与えるために、この粘度の減少を使用することができる。

30

【0029】

第一及び第二の成分間の結合は、疎水性、イオン性、水素結合力等の非共有結合力によって生じる。これらの相互作用は本分野において詳しく研究されており、分子親和性と分子認識に対するその影響は、例えば、Korolkovas et al, "Essentials of Medicinal Chemistry", pp 44-81 Wiley 1976に記載されている。このような可逆的相互作用の例として、酵素とその基質間又はその拮抗阻害剤との相互作用、及び抗体とその抗原との相互作用、又は薬物受容体部位とその薬物との相互作用が挙げられる。

40

【0030】

前記第二の成分は、分子認識及び小分子又は高分子の可逆的結合を生じせしめる、数多くの公知のあらゆる要素であり得る。前記第二の成分は、抗体、酵素、制御タンパク質、薬物受容体部位等の天然の結合タンパク質であり得る。化学的に修飾されたタンパク質等の合成によって修飾された結合分子を使用することも可能である。このような修飾タンパク

50

質は、修飾が施されていない対応する天然のタンパク質に比べて、それらの基質に対する親和性が増減することがある。前記第二の成分は、インプリンティング及び類似の技術によって構築された受容体であり得る (Andersson, J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000 Aug 4 : 745 (1) : 3-13; Bruggemann et al, J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000 Aug 11; 889 (1-2) : 15-24; Haupt & Mosbach, Trends Biotechnol 1998 Nov; 16 [(11)] : 468-75)。

【0031】

前記第二の成分はレクチンであることが好ましい。レクチンは、炭水化物に対して様々な特性を有する植物及び動物の炭水化物結合タンパク質である (Lis et al, Ann. Review of Biochemistry, 42, 541 (1973); Goldstein & Hayes, Adv. in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 35, Tipson and Horton, eds. (Academic Press, New York, 1978, pp. 128-341)。例えば、ConA (タチナタマメのレクチン) は、 α -Dマンノピラノースと α -Dグルコピラノースに対して特異性を有し、大豆レクチンは、 α -及び β -D-N-アセチルガラクトサミンと α -D-ガラクトースユニットに対して、麦芽レクチンは、 β -D-N-アセチルグルコサミンに対して特異的である。本発明に使用し得る別のレクチンは、エンドウマメ (*Pisium sativum*) のレクチンである。好ましい実施態様では、前記第二の成分はレクチンであり、前記第一の成分は該レクチンに結合するゲル形成高分子であって、炭水化物ポリマー、好ましくは、分枝したデンプン、デキストラン、マンナン、レバン等のグルコース、フルクトース、若しくはマンノース成分を含有する炭水化物ポリマー、又はフィコール-400、合成ポリスクロース、若しくは懸垂状炭水化物 (pendant carbohydrate) 又は糖成分を有する合成ポリマー等の合成炭水化物であり得る。

【0032】

ある実施態様では、ブルーデキストラン (Sigma) が使用される。これには、2つの分子量 (40Kと2M) のものが存在し、反応性の青に共有結合されたデキストランを備える。各デキストラン分子は、該分子に結合した多くの色素成分を有しており、前記分子は青であり、カップリングに利用できる前記色素由来の遊離アミン基を有している。ブルーデキストランを用いてカップリングを行うと、産物は青になる。これによって、カップリングの成功が定性的且つ定量的に評価される。

【0033】

前記第一及び第二の成分は、コポリマーの形態で与えることもできる。前記第一及び第二の成分の調製された誘導体を重合させることによって、これを行うことができる。最も単純には、これによって、両成分を有する直鎖ポリマーが作られる。任意の適切な重合化技術によって作成された任意のタイプのポリマー骨格は、本発明の該実施形態で使用するのに適している。

【0034】

第二の側面において、本発明は、互いに可逆的に結合してゲルを形成する第一及び第二のゲル形成成分を含んだゲル組成物であって、前記結合が分析物のレベルに対して感受性を有し、前記ゲル形成成分が共重合されている、ゲル組成物を提供する。

【0035】

ある実施形態において、コンカナバリンAとデキストランのメタクリル酸誘導体 (メタクリル酸無水物との反応を用いて、まず、未加工のレクチンと多糖から合成される) を重合させて、コンカナバリンAとデキストランを懸垂物 (pendant) として担持するアクリル酸骨格ポリマーを作る (図1参照)。

【0036】

デキストランは、その長さ方向に沿った多数の点で、メタクリル酸誘導化 (すなわち、メタクリル酸無水物を用いて前重合化段階において) を行うことができ、デキストラン鎖中の全てのグルコースユニットの各ヒドロキシル基は、メタクリル酸化に感受性を有し得るので、その数は条件に依存する。従って、デキストラン成分は直鎖コポリマーを恒久的に架橋することができ、メタクリル酸修飾を有する任意の点で、ポリマー鎖の形成を開始することができるので、広範な三次元ネットワークが作られる。架橋度が極めて高くなければ

ば、デキストランの長さで可動性のために、得られる産物は柔軟でゲル状であろう。コンカナバリンAには、複数のメタクリル酸化を為し得るが、この分子は球状なので、産物は集合体となり、柔軟なネットワークが全体に広がったゲルにはならない可能性がある（図2参照）。

【0037】

上記したプロセス等の重合化プロセスによって作製された産物の基本的な特徴は、親水性であるが、重合産物が極めて大きく且つ複雑になりすぎ、可溶性を失う場合には、産物は水の中で単に膨張するだけで、溶液を形成しない（ソフトコンタクトレンズは、誘導化されていない様式のこのようなアクリルからできている）。恒久的な結合が、粘弾性的性質に関する前記産物の主な特徴を決定し、デキストランとコンカナバリンA（例えば）の誘導化の度合いが少ない産物は粘性のある液体となるのに対して、修飾が著しく、そのために、複雑に架橋される産物は、固形のハイドロゲルとなるであろう。

【0038】

しかし、相互作用性のリガンドは、重合化の間に為された任意の恒久的結合に加えて、ポリマー鎖全体に、非共有結合による一時的な結合を接続することができる（図2参照）。分析物（例えば、遊離のグルコース）と接触したときに、一時的な結合は解裂するはずなので、ゲルの可逆的結合の見地から、これらは決定的に重要である。これが起こると、産物の特性に変化が生じ、格子全体の理論上の孔が開いて、恒久的架橋のみを残すので、より透過性が高くなるであろう。誘導体化及びこれに続くゲルの恒久的架橋が適度に低ければ、恒久的な連結と一時的な連結の全てが整ったときに、粘性のある液体が得られる。分析物を付加すると、この液体は粘度を失い、反応が可逆的なので、このゲル-ゾル変化は、ゲルの中に拡散した分析物の濃度に依存し得る。

【0039】

前記第一及び第二のゲル形成要素が共重合されていない場合には、三次元ネットワーク又はマトリックスが生じるように、各成分は多価である（2つの二価反応体は直鎖配置を生成するので、少なくとも1つの成分は2を超える価数を有していなければならない）。これは、図3に示されている。

【0040】

互いに付着されていない又は他の粒子に付着されていないレクチンとデキストランを含むゲルでは、レクチンは、あるpH値において、安定な二量体へと解離し得る天然の四価形態を採っている。これらの二量体は、明らかにより小さく、ゲルから喪失するリスクがより大きい。四価のコンカナバリンAと多価の（分枝）デキストランの組合せによって、一時的結合のみによって安定化された三次元ネットワークからなるゲルが生じる。しかしながら、前記成分は、ゾル状態にあるときに、徐々に浸出することがあり、相分離は明瞭でないかもしれないが、複数のサイクルを経た後の作用の段階的な喪失に寄与する可能性がある。

【0041】

しかし、相互作用性成分が共重合されているか、又は粒子に付着(attach)されている場合には、各成分は一価であってもよく、図4に示されているように、これは、なおゲルを形成するであろう。従って、本発明のゲルは、多価である第一及び第二のゲル形成成分を必要としない。好ましい実施形態では、レクチン二量体（又は前記フレームワーク上に結合することによって安定化された四量体）を使用することができる。デキストランは、単純な懸垂状グルコースを含む他の様々なグルコース保有要素で置換してもよい。しかし、単一の懸垂状グルコースは、生じたゲルの柔軟性を減少させることがあり、実際、デキストリンを用いた恒久的架橋の中には、柔軟性を与え、ゾル相での浸出を抑えるのになお有用な場合がある。これは、図5に示されている。

【0042】

先述したように、前記第二の成分は抗体であり得る。抗体は、標準的な様式で(Eisen, H.N. "Immunology", Harper & Row, 1974)、動物から調製し精製することができ、適切な抗原性物質による誘発によって、動物内に誘導可能であるという利点を有している。この物質

は、任意の化学物質群（例えば、アミノ酸、炭水化物、それらの対応するポリマー性誘導体等）から選択することができるので、得られた抗体は、広範な結合特異性と親和性を有し得る。

【0043】

ポリクローナル抗体は、適切な動物宿主（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、又はサル）の中で、それらの産生を刺激することによって生成させることができる。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマから産生することができる。これらは、骨髄腫細胞と所望の抗体を産生して不死化細胞株を形成する脾臓細胞とを融合することによって形成することができる。これは、周知のKohler & Milstein技法である(Nature 256 52-55(1975))。現在では、あるタンパク質に結合するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を製造する技術は、本分野において、目覚ましい発展を遂げている。それらの技術は、標準的な免疫学の教科書（例えば、Roitt et al, Immunology second edition (1989), Churchill Livingstone, London中）に論述されている。完全な抗体に加えて、本発明は、抗体断片や合成構築物を含む抗体の誘導体を使用することもできる。抗体断片及び合成構築物の例は、Dougall et al in Tibtech 12 372-379 (September 1994)によって挙げられている。抗体断片には、例えば、F a b、F (a b ')₂ 及びF_v断片(Roitt et al [上記] 参照)が含まれる。F_v断片は、一本鎖F_v (s c F_v) 分子として知られる合成構築物が得られるように修飾することができる。これには、該分子の安定性に寄与するV_H とV_L を共有結合で連結するペプチドリンカーが含まれる。

10

【0044】

他の合成構築物には、C D R ペプチドが含まれる。これらは、抗原結合決定基を備える合成ペプチドである。ペプチド模倣体(peptide mimetics)も使用し得る。これらの分子は、C D R ループの構造を模倣し、抗原相互作用性側鎖を含む立体構造的に制約された有機環であるのが通常である。合成構築物には、キメラ分子が含まれる。このように、例えば、ヒト化（又は霊長類化）抗体又はそれらの誘導体を使用することもできる。ヒト化抗体の例は、ヒトのフレームワーク領域を有するが、齧歯類の超可変領域を有する抗体である。

20

【0045】

適切な抗原及び抗体の例は、アンギオテンシン(Peeters, et al, J Immunol Methods 120 (1 1989): 133-43)と抗アンギオテンシン抗体（例えば、S i g m a から入手可能）である。これらによって形成されたゲルは、高血圧緊急症に關与する遊離のアンギオテンシンに反応性を有するであろう。このように、前記ゲルは、遊離のアンギオテンシンのレベルをモニターし、及び／又は、高血圧緊急症を治癒し、継続的な薬物療法の必要性を回避するエナラプリル等のアンギオテンシン転換酵素 (A C E) 阻害剤の放出を支配するために使用することができる。

30

【0046】

ホルモン依存性腫瘍の中には、タモキシフェンやシプロテロンのようなホルモンアンタゴニストで治療されるものがある。内在性ホルモンのピークに依りて、このような薬物を自動制御して送達することは、毒性効果と強く関連する無差別的な使用やゴセレリン等の物質（ホルモン生合成における天然のフィードバックを妨害し、それによって、皮肉にも症候を悪化させ得る）の使用に代えることができるであろう。このように、テストステロン及び抗テストステロン抗体から形成されるゲル(Miyake, et al, Chem Pharm Bull 38 (4 1990): 951-5)を用いて、前立腺癌用のシプロテロンを送達することができる。

40

【0047】

別の例は、依存症療法が存在しない場合に、ヘロイン等の外来モルフィン様物質の流入に依りて、モルフィンアンタゴニストを送達するために用いることができるモルフィンと抗モルフィン抗体である(Kussie, et al, J Immunol 146 (12 1991): 4248-57)。

【0048】

本発明の前記第一及び第二の側面のゲルは、半透膜又は透過性膜と組み合わせて提供してもよい。適切な膜は、例えば、10K-500Kの分子量カットオフを有する透析タイプの膜か、又はセルロース若しくはポリカーボネート製であり得る、例えば、0.025乃

50

至 0.1 μm の孔径を有する精密濾過タイプの膜であり得る。本発明のゲルをセンサーとして用いる場合には前者の膜が好ましく、ゲルを薬物送達系で使用する場合には後者が好ましい。

【0049】

本発明の前記第一及び第二の側面に係る前記ゲル組成物の分析物レベルの上昇に反応するゲルゾル遷移は、薬物（好ましくは、前記分析物のレベルを低下させるように作用する薬物）を放出させるために使用することができる。このため、本発明の第三の側面によれば、本発明の前記第一及び第二の側面に記載したゲル組成物と薬物とを備えた薬物送達システムであって、前記薬物が、（a）前記ゲル組成物内に含有されている薬物送達システム、又は（b）貯蔵部(reservoir)の中に含有されており、前記ゲル組成物が前記貯蔵部と前記薬物が放出されるべき領域との障壁(barrier)を成している、薬物送達システムが提供される。

10

【0050】

第三の側面において、「薬物(drug)」とは、送達することによって所望の治療的又は予防的効果を与える任意の活性物質を意味するものとする。

【0051】

先述したように、前記第一及び第二のゲル形成成分の結合は、分析物のレベルに感受性を有し、それ故、ゲル組成物の粘度も分析物のレベルに感受性を有する。この粘度の変化は、その中の溶質の透過性を調節するために使用することができる。このため、本発明のゲル組成物は、薬物を含有する貯蔵部又は容器(container)への封鎖を形成することができる。容器からの薬物の放出は、ゲルの粘度（すなわち、分析物のレベル）によって支配されている。あるいは、前記薬物は、ゲル自体の中に含有させることもできる。ゲル組成物がグルコースに対して感受性であり（例えば、ConA/デキストランベースのゲル）、放出すべき薬物がインシュリン等の抗高血糖薬であれば好ましい。グルコース感受性ゲルは、患者へのグルコースの投与によってその放出が調節される薬物の放出を調節するために用いることも可能である。

20

【0052】

インシュリンを送達するために本発明の薬物送達システムを使用する場合には、該システムを皮下で用いたときに比べて、グルコースが該システムに素早く到達して、インシュリンが迅速に放出されるので、腹腔内に用いることが好ましい。さらに、腹腔液は血中グルコースレベルを反映するグルコースレベルを有する。もちろん、前記システムが皮下から、あるいは体外から使用できないという意味ではなく、治療すべき症状と放出されるべき薬物に適合するように、その位置を選択すべきである。

30

【0053】

本発明の別の側面によれば、分析物のレベルを検出するためのセンサーであって、本発明の前記第一又は第二の側面に記載のゲル組成物と該ゲルの粘度を検出するための手段とを備えたセンサーが提供される。

【0054】

分析物のレベルの変化に応じて、本発明のゲル組成物の粘度が変化するということは、分析物のレベルをモニターするために、本発明のゲル組成物を使用できることを意味する。

40

【0055】

ゲルの粘度は、DE-A-4203466号、Ballerstadt & Schultz, Sensors and Actuators B Chemical, (1998), 46:557-567、DE-A-4034565号、又はW099/48419号に記載されているように、検出することができる。

【0056】

分析物レベルの変化がほぼリアルタイムでモニターできるためには、分析物が、ゲル組成物と（存在すれば）膜を容易に通過して拡散することができなければならない。先述したように、本発明のゲル組成物は、ゲル成分を逸出させずにこれを可能とする。反応時間をさらに早くするためには、極めて薄い（例えば、4 mm 以下、好ましくは 0.1 - 2 mm、但し、単一層も本発明の範囲に属する。）層のゲルの粘度を検出することが望ましい。

50

このような例では、ゲルの喪失を防ぐことが特に重要である。

【0057】

本発明のさらなる側面によれば、本発明の第一の側面に係るゲル組成物を製造する方法であって、

第一及び／又は第二のゲル形成成分を架橋された粒状要素に付着させることを備え、前記第一及び第二のゲル形成成分は互いに可逆的に結合してゲルを形成することができ、前記結合が分析物のレベルに対して感受性を有し、前記要素間の間隙がゲルゾル転移及びゾルゲル転移を行うことができるが、前記分析物が前記間隙を通じて拡散することができない程には小さくない、方法が提供される。

【0058】

さらに別の側面では、本発明は、活性物質を経皮投与するための薬学的組成物であって、
(a) 前記活性物質を含有するか、又は (b) 前記活性物質と前記活性物質が放出されるべき領域との間に障壁を形成する担体を備え、前記活性物質が前記酵素の作用によって前記組成物から放出されるように、前記担体の少なくとも一部が1以上の皮膚酵素によって消化され得る、薬学的組成物が提供される。

【0059】

本発明は、(a) 医療におけるこのような組成物の使用、(b) 活性物質を経皮投与するための医薬の製造におけるこのような組成物の使用、(c) 活性物質を投与するための方法であって、かかる投与を必要としている患者の皮膚にかかる組成物を付与することを備えた方法も提供する。

【0060】

本発明の該側面では、多様であるが、放出を制御した態様で治療剤を放出させることができる。薬物の強度は、その時点での症状の重さに対して適切なものとし、放出増加の誘導は皮膚症状に依存する。とりわけ、前記組成物は、性状が一定せずに、既存の薬物を用いると治療過度又は治療不足となってしまうことが知られた皮膚疾患（特に、炎症性皮膚疾患）の治療に用いる薬物を放出させるのに有用である。例えば、乾癬の間には、乾癬性角質層は、肥厚したプラーク状態のときに比べて、静止状態のときの方が透過性が高いことがある (Tang, et al. (1999). Clin Pharmacokinet 37(4):273-87)。それ故、この症例では、取り込みを遅くするための治癒に依存することは、乾癬における用量を自己調節するための有用な機序ではない。このため、薬物を含む調剤からの排出に基づいた制御系が、生理的取り込み機構に依拠するものより、優れていると一般に考えられている。

【0061】

前記活性物質は前記担体に共有接合されず、前記担体は、単に、前記活性物質を含有する（すなわち、前記活性物質は前記担体内に分散される）か、拘束する（すなわち、前記担体は、前記活性物質の放出に対して障壁を形成する）ように作用する。この配置は、一般的ではないが、前記活性物質の共有修飾を何ら必要としないので、数多くの薬物候補に広く適用できるという利点を有している。

【0062】

前記担体は、各要素がポリマーの周縁 (fringe) を有するように、直鎖又は（おそらくは）分枝ポリマーが結合された上述の架橋粒状要素を備えてもよい。粒状要素間の間隙領域はポリマーによって占拠されており、薬物を拡散させるために、レオロジー的に活性な溶媒を与える。上述のように、これらの領域は、均一に網の目が形成された直鎖ポリマーで作製されたゲルに比べて、薬物の透過を比較的妨害せずに、薬物を輸送することができる。前記ポリマーは、これらの間隙領域の粘度に影響を与えるので、ポリマーのない間隙領域に比べて、遊離薬物の拡散係数を減少させる。皮膚酵素の作用によってポリマーが消化されるために、調合物中に保持された薬物の拡散係数が上昇する。酵素が存在すれば、長鎖が壊れて小断片になるように、前記ポリマーは、その構造中の多くの場所に脆弱な地点を有することが好ましい。カルボマー自体は、酵素活性に対して極めて耐性があり、その本来の状態では、タンパク質分解を受け易いタンパク質に対して実際に保護を与える (Hutton, et al. (1990). Clin Sci (COLCH) 78(3): 265-71; Luessen,

10

20

30

40

50

et al. (1995). Pharm Res 12(9): 1293-8; Walker, et al. (1999). Pharm Res 16(7): 1074-80)。酵素がポリマーに強い影響を与える場合でも、その安定性によって、非滴下式 (non-drip) 皮膚用調製物に適した最小限の粘度を維持することができるが、その保護効果は、表面の修飾のために低下する。

【0063】

明らかに、前記ポリマーは、これを分解して活性物質を放出させる皮膚酵素の能力に応じ
て選択される。当業者であれば、以下の皮膚酵素の1以上によって分解されるポリマー又
は分子を選択することができる。老化過程におけるエラスチン繊維の分解に必要とされる
リソゾームのプロテイナーゼであるが、乾癬中にも見出されるエラスターゼ(Chandler, e
t al.(1996).Biochem Biophys Res Commun 228(2):421-9)、細胞表面の脱粒(shedding)に
関与することが知られており、乾癬への関与が推測されているセリンプロテアーゼである
SCCE、すなわち(stratum corneum chymotryptic enzyme)(Exholm & Egelrud(1999).A
rch Dermatol Res 291(4):195-200)、LTA4から異常なロイコトリエンLTB4を生成
する(乾癬でも発生することが観察されているプロセス)ことができるLTA4ヒドロラ
ーゼ。これらの3つの酵素は、本来の生理的基質に対して必ずしも特異的でないエステラ
ーゼ及び/又はアミダーゼ活性を有する。実験的な病変中に形成された外被(crust)
は、プロテアーゼを豊富に生ずる発生源であることが示されており(Higuchi,et al.(19
88).Inflammation 12(4):311-34)、汗の中にも存在する(Horie et al.(1986).Am J Physi
ol:R691-8)。さらに、角質層チオールプロテアーゼ(SCTP)は、角質層の上部領域中
に最近見出されたシステインプロテアーゼである。SCTPは、酵素電気泳動法で測定した
ところによると、ゼラチン溶解活性を示し、皮膚より若干酸性のpHで最もよく機能する
(Watkinson,(1999).Arch Dermatol Res 291(5):260-8)。コラーゲナーゼは、とりわけ結
合組織、臓器組織、骨及び軟骨中でのコラーゲンの代謝回転を調節するメタロプロネアー
ゼ(MMP)酵素に属する。コラーゲナーゼは、創傷の治癒など、正常な皮膚及び異常な
皮膚において重要である(Simeon et al.(1999).J Invest Dermatol 112(6):957-64)。

【0064】

サブセットのIV型である、ゼラチナーゼMMP-2とMMP-9が、それらの特異的阻
害剤とともに、真皮と表皮中に見出されており、ケラチン生成細胞とランゲルハンス細胞
に付随しているが、皮膚機能中に、マトリックス内でのこれらの細胞移動をモジュレート
する(Kobayashi, Y. (1997). Immunology 90 (4):496-501; Makela, et al. (1999). Exp
Cell Res 251(1):67-78)。タンパク分解活性は、きわめてよく理解されている(Seltzer,
et al.(1990). J Biol Chem 265(33):20409-13; Seltzer, et al.(1989). J Biol Chem
264(33):19583-6)が、病気におけるその役割については十分理解されているわけではない
。技術文献では、その詳細に関して幾分混乱がみられるが、炎症性皮膚疾患においてはb
、MMP、mRNA、及びそれらの天然阻害物質のレベルは常に上昇している(Feliciani
, et al.(1997). Exp Dermatol 6(6):321-7; Buisson, et al. (2000). J Invest Dermat
ol 115 (2): 213-8; Fleischmajer, et al.(2000). J Invest Dermatol 115(5):771-7)。
乾癬性真皮-表皮の構築の誤りが、酵素の過剰発現の原因とされており、本酵素は、表面
近くの角質化された層にも見出されている。乾癬では、特に関与している皮膚領域中で、
ゼラチナーゼが上昇していることがある。

【0065】

好ましくは、前記ポリマーは、アミノ酸(すなわち、合成ポリペプチド類縁体)、ムチン
、コラーゲン、及びゼラチンの可溶性合成ホモポリマー及びコポリマーから選択される。
標準的なカルボジイミド法を用いて、カルボマーのカルボキシレート基にポリマーを付着
できるように、これらは全てアミン基を含有しているが、シッフ塩基接合体を形成しても
よい。生分解性の多糖であるキトサンを使用してもよい。

【0066】

アミノ酸の可溶性合成ホモポリマー及びコポリマーが可溶性を有するためには、懸垂状ア
ミン、ヒドロキシル、及びカルボキシレート等の親水性基を必要とする。例えば、ポリア
スパラギン酸及びポリグルタミン酸等のこれらの化合物は、高分子量になると粘性を生じ

10

20

30

40

50

る場合がある。これらの中には、既に薬物送達において使用されているものもある(Singer, et al.(2000).Ann N Y Acad Sci 922(136):136-50;Yi et al.(2000).Pharm Res 17(3):314-20)が、極めて高価である。

【0067】

ムチンは、かなりの粘度を有する糖タンパク質であり、I型(12%の結合シアル酸を有する最高純度)、II型、及びIII型(徐々に精製度が低くなり、各々1%のシアル酸を有する)様々な精製度のものを購入することができる(Sigma)。

【0068】

コラーゲンとゼラチンは、上述した皮膚コラーゲナーゼに関連するものを含む、数多くの好ましい特徴を有する。コラーゲンそのものは高価なので、現在では、これより安価な誘導体であるゼラチンを用いることが好まれている。 10

【0069】

ゼラチンは、コラーゲンの可溶性タンパク質性誘導体である。ゼラチンは、濃度が十分に高ければ、臨界温度(幾つかの品質等級では、36℃付近である。)を超えると自由流動性で且つ粘度があるが、この温度を下回ると弾性のある固体になるという著名なレオロジー特性を有している。ゼラチンは無毒性であり、少なくとも実験及び開発研究において局所的調製物中に用いられているとともに、重い創傷の包帯及び静脈内血漿エキスパンダとして、口、直腸用、皮膚注射用に用いている。ゼラチンの中にはウシ由来のものがあり、理論的にはプリオンに汚染している危険性があるが、別の採取源も存在する。世界保健機構は、BSEが発生していない国からの供給品から、ゼラチンを含有する医薬品を製造すべきであると指示している(WHO/EMC/DIS/96.147)。 20

【0070】

親物質のコラーゲンと同様に、ゼラチンは、7つの主要なアミノ酸(さらに、少ない割合でこれ以外の幾つかのアミノ酸)を含有している。コラーゲンでの三重螺旋構造の形成を促進するプロリンツイストのために、分子配置は普通ではない。主要なアミノ酸残基のうち4つは、これに対して共有接合を行うことができる親水性の懸垂を含有している。これらの基を利用できるので、上述のような間隙のフリンジにゼラチンは適している。実際に、ゼラチンは、リシン及びヒドロキシリシン並びにアルギニン残基中の末端アミン基を介してカルボマーに結合させることができる。ゼラチンは、コラーゲナーゼの他に、複数のキモトリプシン及びエラスターゼを含む、他の様々なプロテアーゼによって分解される。ゼラチン基質の液状化は、嚢胞性繊維症及びある種の細菌の同定用検便でキモトリプシンの指標として用いられる。 30

【0071】

乾癬を治療するために、本発明の該側面で使用することができる活性物質は、

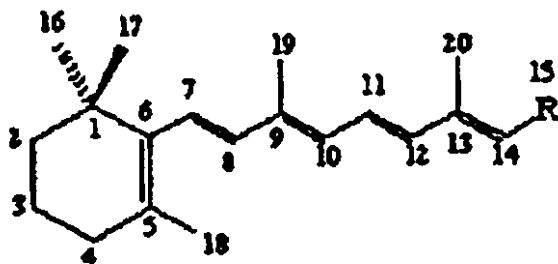
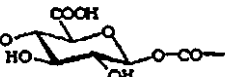
- ・シアル酸、タール、ジスラノール(アンスラリン)
- ・ステロイド、ビタミンD類縁体、レチノイド(ビタミンA類縁体)
- ・ソラーレン、メトトレキサート、シクロスポリン

モメタゾンやフルチカゾン等のステロイドは、単独で、又はタザロテン等のレチノイド類とともに若しくはビタミンDの類縁体であるカルシポトリオールとともに処方されることが多い。ステロイド類、ビタミンDの類縁体、さらに最近では、レチノイド類は、軟膏、クリーム、及びゲルなどの直接的局所適用物として、ここ何年も販売されている。これらは、少なくとも効果があり、使い易いので、タールやジスラノールよりも、患者には、これらの治療の方が好まれる(Poyner, et al.(2000).J Eur Acad Dermatol Venereol 14(3):153-8)。以下では、下記のような利点を有すると考えられるレチノイドに焦点を当てるが、上記の3つの集団全てが、本発明の本側面である。 40

【0072】

レチノイド類は、ビタミンA化合物が下位集団を形成する一群の化合物群を形成し、レチノールというアルコールによって代表される生物活性を有する。レチノール(1)自身は、レチナルデヒド(レチナール)(2)へと可逆的に代謝された後、ビタミンAではないが、治療的な活性を有するレチノイン酸へと代謝される。 50

【化 1】

(1) $R = CH_2OH$ (6) $R = CH_2NH_2$ (2) $R = CHO$ (7) $R = CH=NOH$ (3) $R = CO_2H$ (8) $R = CH=N[CH_2]_4CHNH_2CO_2H$ (4) $R = CH_3$ (9) $R = CO_2C_2H_5$ (5) $R = CH_2OCOCH_3$ (10) $R =$ 

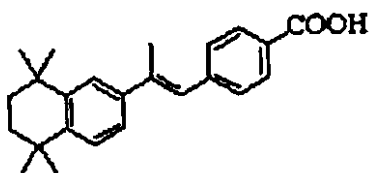
10

【0073】

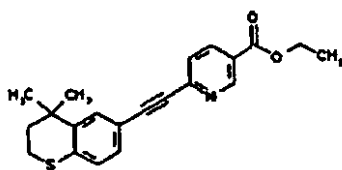
レチノイドの命名法は、生物学的に類縁のアロチノイド類（このうち、最近導入された物質であるタザロテンは、乾癬の治療に用いられる、さらに修飾を施された類縁体である）のような他の物質を含むように拡張されることが多い。アダパレンは、薬学的に類似しているが、構造的には全く異なる。

20

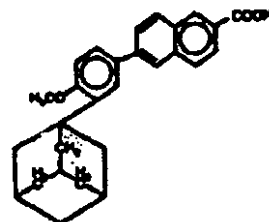
【化 2】



アロチノイド構造



タザロテン(EN:145711)



アダパレン

30

【0074】

レチノイド類は、視覚信号の伝達、並びに細胞の増殖及び分化において重要である。これらの化合物の立体化学には、オールトランスとなるか、あるいは、様々なシス異性化を示すポリプレノイド側鎖の関与が重要である。キラル中心は、1及び3位の環の中にも存在する。立体化学は、レチノイド類の幾つかの生物活性にとって重要である。哺乳類の網膜では、例えば、タンパク質ロドプシンは、そのアルデヒド色素体であるレチナールが、オールトランスと11-シス型の間を変換するにつれて、光によって可逆的に転換される。

40

【0075】

皮膚では、レチノイン酸の異性体(Vahlquist, (1999). *Dermatology* 1(3):3-11)及びそれらの近縁体を含む幾つかのレチノイド類が、ケラチン生成細胞中のあるタイプの核受容体（この中には、立体感受性のものもあり得る）を活性化し、遺伝子発現を誘発する。これは、受容体の誘導に適したmRNAとタンパク質の産生、表皮の増殖、及び角質化プロセスの変化を含む少なくとも3つの効果を有している(Didierjean, et al. (1999). *Exp Dermatol* 8(3):199-203)。しかしながら、乾癬の治療におけるこれらの化合物及び類縁化合物の作用機序は明らかでなく(Saurat, (1999). *J Am Acad Dermatol*:S2-6)、証拠も若干矛盾し

50

ている。第一に、アセトレチン(acetretin)は結合せずに受容体を活性化するのに対して、タザロテンは3つの受容体サブタイプへの結合が異なるように、観察される受容体への結合と治療活性との間には相関がないことが明らかである。これは、3つの受容体サブセット内での変動に起因する一時的な混乱なのかもしれない。第二の謎は、病変が、既にレチノイン酸(イソトレチノイン)の形成(Arechalde & Saurat(2000). *Biodrugs* 13:327-333)の増加を示すが、本化合物とアシトレチン(エステル)は極めて効果があり、細胞の分化と連続的な化生性(metaplastic)変化を調節することが示されている。最近の研究は、受容体の活性化の後に、病変皮膚中でmRNAの発現が減少することを指摘しているが(Torma, et al. *Acta Derm Venereol* 80(1):4-9)、この発見に対する1つの説明となろう。

乾癬を治療するために、経口イソトレチノインとアシトレチン(最近のエトレチネート代替物)が20年以上も用いられてきたが、かなりの禁忌と注意が存在する。レチノイン酸の局所適用はニキビの治療に用いられ、抗乾癬活性についてはBNFに収載されていない。しかしながら、タザロテンがこの適応症に収載された(Tang, et al. (1999). *Clin Pharmacokinetics* 37(4):273-87)ことは、優れた安全特性も有する(Marks, R. (1998). *J Am Acad Dermatol* : S134-8)タザロテンに対して受容体サブセットの特異性が主張されるにもかかわらず、乾癬に他のレチノイド類を局所的に使用できる可能性があることを示している。しかしながら、おそらく経口イソトレチノインの粘膜皮膚に対する対抗手段として、受容体サブセット特異的な新しいレチノイド類が開発中であると報告されている(Nagpal & Chandraratna (2000). *Curr Pharm Des* 6 (9): 919-31)。酒さ(rosacea)(Vienne, et al. (1999). *Dermatology* 1(53): 53-6)及び光損傷(Katsambas & Katoulis (1999). *Adv Exp Med Biol* 455(477): 477-82; Sorg, et al. (1999). *Dermatology* 1(13): 13-7)も、局所レチノイド類に反応するかもしれないが、局所的に運ばれたレチノイド類は、局所ステロイドの萎縮性効果から皮膚を保護する可能性がある。McMichael, et al. (1996). *Br J Dermatol* 135(1) : 60-4)。

【0076】

タザロテンが、アダパレンのように、にきびに用いられているので、この用途は拡張される。局所的に与えられたレチノイン酸は、経口レチノイド類より毒性は弱い、なお炎症と紅斑を引き起こす。しかし、副作用が弱く、ケラチン生成細胞中で活性種に転換されて効果を発揮し、その後に受容体相互作用が起こるので、アルデヒド型のプロドラッグレチナールを用いるのが、特に興味深いと報告されている(Didierjean, et al. (1999). *Exp Dermatol* 8(3): 199-203; Sorg, et al. (1999). *Dermatology* 1(13): 13-7)。多くはエステル化されており、貯蔵用リザーバとして働く。残りは、少量の生物活性アルコールと酸の形態へ代謝される。後者は、細胞の酸化能(それ自体、細胞集団の分化に関連しており、そのため、おそらく、明白な発病状態に関連している)に依存した速度で起こる(Sorg, et al. (1999). *Dermatology* 1(13): 13-7)。生物学的な結果の見地からすれば、オールトランスレチナール(オールトランスレチノイン酸(トレチノイン)に代謝される)は、9-シス類縁体(対応するレチノイン酸異性体を形成したものと思われる)より優勢であることが見出された(Didierjean, et al. (1999). *Exp Dermatol* 8(3): 199-203)。

【0077】

レチノイド類は、催奇形性であることが知られている。レチノイド類は、遍在的なシグナル伝達分子であり、レチノイド類の欠乏及び利用の異常は、ともに発育不全の原因となる(Kubota, et al. (2000). *Eur J Pediatr Surg* 10(4): 248-51)。頭蓋顔面、肢、及び神経系の異常を含む様々な効果が文献に記載されている(Kubota, et al. (2000). *Eur J Pediatr Surg* 10(4): 248-51)。主なリスクは、経口調製物にあるが、局所調製物のリスクも無視できない。但し、動物モデルを用いたテストでは、胎児に害を与えることなく、局所濃度の何倍ものイソトレチノインを使用している。

【0078】

レチノイド類は、以下のように調合された産物中に含まれる。

【0079】

チガソン(Roche) エトレチナート 製造中止

ネオチガソン(Roche) アシトレチン 10mg経口

ロアキュテイン(Roche) イソトレチノイン (13-シスレチノイン酸) 5mg経口

イソトレックス(Stiefel) イソトレチノイン 0.05%ゲル (にきび用)

レチン A(Janssen Cilag) トレチノイン (オールトランスレチノイン酸)

0.01%ゲル (にきび用)

0.025%クリーム (にきび用)

0.025%ローション (にきび用)

レチノーバ(Janssen Cilag) 0.05%クリーム (にきび用)

ゾラック(Bioglan) タザロテン

0.05%ゲル (にきびと乾癬用)

0.1%

ダイフェリン(Galderma) アダパレン 0.1%ゲル (にきび用)

レチノイド類は、極めて疎水性の化合物である。室温及びpH7.3の緩衝液中（抗酸化剤あり）での水への溶解度は、以下のように文献に記載されている(Szuts & Harosi (1991). Arch Biochem Biophys 287(2):297-304)。

【0080】

レチノール 0.06 μ M

レチナール 0.11 μ M

レチノイン酸 0.21 μ M

すなわち、0.000002と0.000006% w/vの間である。

【0081】

本発明の該側面で使用するときには、有効量を送達可能とするために、薬物の水溶性は十分でなければならない。上記の溶解特性は、例えば、前記リスト中の0.01% w/vのトレチノインゲルは、混合溶剤(cosolvent)を含有していなければならないことを示唆している。何れも、ヒドロキシプロピルセルロースやカルボマーなどのゲル化ポリマーに加えて、イソトレックス(Isotrex)やアクチシン(Acticin)などのレチノイド調製物はエタノールを含有しているが、ダイフェリン(Differin)等の他のレチノイド調製物はポリエチレングリコールとポロキシマー(poloxomer)を含有している。別の方法としては、Zorac中のポリソルベート40などの界面活性剤とともにゲルを調合することであり、静脈内投与やその他の用途のために、レチノイン酸をシクロデキストリンと錯化させることが技術文献に示されている(Botella, et al. (1996). Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis 14:909-915; Lin, et al.(2000). J Clin Pharm Ther 25(4):265-9)。リポソーム又は類似の脂質集合体成分は、ゲル中でも機能して、コロイド状に分散された濃度を上昇させることができる(Li, et al. (1999). Photochemistry And Photobiology 69: 500- 504)。

【0082】

このように、本発明の本側面の一実施形態によれば、皮膚酵素依存的にレチノイドを送達するために、カルボマー-ゼラチン接合体を使用することができる。レチノイドは、インシチュで変換される不活性なプロドラッグである旧来のトレチノイン、タザロテン、又はレチナールであり得る。これらは全て溶解度が低い、混合溶剤、界面活性剤、又はリポソーム中に可溶化することができる。

10

20

30

40

50

【0083】

レチナールとレチノイン酸（イソトレチノインとトレチノイン）は、接合体への転換を可能とする基を有している。これによって、水での溶解度が増大するのみならず、酵素依存的な放出（それ自体で使用してもよいし、あるいは、上述の活性物質を経皮投与するための薬学的組成物とともに使用してもよい）を与える。

【0084】

本発明のさらなる側面では、活性物質に共有結合した担体を含む、医薬に用いるための、とくに、前記活性物質を経皮投与するための組成物であって、前記担体と前記活性物質との結合が、1以上に皮膚酵素によって消化され得る組成物が提供される。本発明は、活性物質を投与する方法であって、活性物質に共有結合された担体を含む組成物を、このよう

10

【0085】

本発明の本側面では、前記活性物質は、前記担体に（直接又は間接に）共有結合されている。前記組成物に接触させ、混合される酵素は、物質－担体接合体を切断して、薬剤を放出することが可能でなければならない。この接合体は、皮膚内ではなく、皮膚外で代謝を活性化させるプロドラッグと考えることができる。前記担体は、皮膚用調合物に現在用いられている様々なポリマーのうちの1つであり得、前記組成物は単一相且つ水性であることが好ましい。カルボマー、ポリビニルピロリドン、又はセルロース誘導体等の、例えば、直鎖構造又はより複雑な構造を有するポリマーは、水性溶媒中に溶けて、適切な特性を

20

【0086】

このような接合体は公知であるが、これまでは、経皮投与用には用いられていなかったようである。光によって活性化される神経伝達物質としてロドプシンがどのように作用するかを解明する目的で、レチナールとのシッフ塩基接合体が研究されてきた。このため、デキストラン、ポリリジン、ポリエチレングリコールと接合したレチナールが水溶性接合体として記載されていたが、ホスファチジルエタノールアミン及びアルキルアミンとのレチナールのシッフ塩基接合体は、ミセル化した集合体を与えた(De Pont, et al. (1969). Exp Eye Res 8(2): 250-1; Adams, et al.(1974). Exp Eye Res 18(1) :13-7; Pitha, et al. (1980). J Natl Cancer Inst 65(5):1011-5; Freedman, et al. (1986). Photochem Photobiol 43(3):291-5; Singh, et al.(1990). Biochim Biophys Acta 1036(1): 34-40; Viguera, et al. (1990). J Biol Chem 265(5): 2527-32)。従って、このような接合体は、有用な水への溶解度を与えるかもしれない。

30

【0087】

本発明の本側面の好ましい特徴は、上述した活性物質を経皮投与するための薬学的組成物と同様である。本発明の各側面の好ましい特徴は、相互に、別の各側面について当てはまる。本明細書に記載した従来技術の文献は、法によって許容される最大限まで、本明細書に組み込まれる。ここで、以下の非限定的な実施例において、本発明をさらに説明する。

40

【実施例】

【0088】

序論

コンカナバリンA (conA) とデキストランの調合物は、グルコース感受性であることが以前に示されている。ConAは、構造に寄与する各サブユニット中にグルコース受容体を有するタンパク質である。本タンパク質は、pH 5.8を下回ると二量体となるが、

50

pH 5.8と7.0の間では四量体であり、これを超えるとさらに大きな集合体を形成し始める。前記受容体は遊離のグルコースのみならず、デキストランのような多糖上の末端グルコースユニットも収容する。このような末端の相補物の中で、デキストランは多価なので、レクチンとの混合によって、沈殿物かゼラチン状の何れかとなり得る複雑な構造が生成される。受容体部位の占有を競合する遊離のグルコースを添加することによって、前記構造は不安定化される。前記混合物のゼラチン状調合物にグルコースを加えた環境下では、粘度が鋭く減少するが、グルコースを透析除去すると、元に戻る。この機序は、周囲のグルコースレベルが低ければゲルを通じた拡散が遅いが、グルコースとの接触によって、粘度が減少すれば、送達速度の増加を誘発することができる、インシュリン等の低血糖剤用送達装置の基礎を成す。

10

【0089】

このデザインに伴う問題は、ゲルから成分が浸出する傾向があることである。ゲルが破壊されると前記成分は水に分散されるので、ゾル型を安定化させて調合物からの喪失を妨げるが、前記デザインが依存する粘度変化は妨げない何らかの手段が必要とされる。以下では、工業生産されているタイプのカルボマーであるCarbopol 974と934（C974及びC934と称される）に共有結合させる操作を、レクチンに対して行った。これらの物質は、三次元的に架橋されて、ゼラチン状であるが、粒状の要素（それぞれ、数十億の分子量を有する）を与えるポリアクリル酸誘導体である。EDACとカルボキシル成分（本ケースでは、カルボマー部位に由来する（図6参照））との間に一時的な中間構造を与えるように作用する1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩化水素物（EDAC）を用いて、結合を行った。続いて、この中間体は、conAを含むタンパク質の末端及びリシン部位に存在するアミン基と結合することができる。これによって、アミド結合の形成とEDAC残基の喪失とがもたらされる。ConAは、カルボマー粒子の表面がレクチンによって恒常的に被覆された状態になるように、カルボマーと効果的に接合され得る。

20

【0090】

カルボマーC934とC974は、ともに架橋されているが、何れも完全な(integral)構造でないという点で多くのポリマー性ゲルとは異なる。水和された各粒子は、実際には、分画されたハイドロゲルであり、間隙の水性領域は各粒子を隣接粒子から隔てる。このことは、直鎖ポリマー（直鎖カルボマータイプを含む）から作製されたゲルや普通のハイドロゲルに比べて、この種のカルボマーゲルを通じて、インシュリンのような巨大分子が素早く拡散できることを意味している（図7a）。後者は何れも、構造全体にわたって、それぞれ物理的及び化学的なもつれ(entanglement)が生じ、インスリンの輸送に対して十分律速となり得るので、障害がより大きい。

30

【0091】

試薬

カルボポール974（C974）、カルボポール934（C934） BF Goodrich

EDAC [1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩化水素]、Sigma

40

MES [2-（N-モルフォリノ）エタンスルホン酸]、Sigma

PBS（リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4及び5.9）

NaOH（粒及び1M溶液）、Fisher Scientific

デキストラン（RMM 2,000,000）、Sigma

アジ化ナトリウム、Sigma

コンカナバリンA、Sigma

蒸留水

1M HCl（塩化水素酸）、BDH。

【0092】

実施例1-ゲルの作製と粘度の測定

50

0. 1 M M E S 緩衝液中に 1 % w / w のカルボマー分散液を作製し、中性になるように調整し、透明になるまで攪拌した。次いで、最終濃度も約 1 % w / w で、p H が中性に保たれるように、これに C o n A を添加した。続いて、5 0 m M E D A C を用いて、この系を接合させ、室温で 3 時間攪拌した後に p H 5 . 9 の P B S で希釈し且つさらなる c o n A が洗浄物から上清中に現れなくなるまで、一部脱水されたカルボマー接合体から得られた洗浄物を遠心することによって反応を停止させた。除去された総タンパク質は、全洗浄物と濾過された洗浄物とを 2 7 6 n m でアッセイすることによって求めた。カップリング効率は、9 0 % を上回った。続いて、中和されたカルボマー - c o n A 接合体に P B S (p H 7 . 4 、 0 . 0 1 % のアジ化ナトリウムを加えて保存) 中の 2 0 % w / w デキストラン D 2 M (分子量二百万) 溶液 1 g を加え、十分に混合した。従って、最終産物には、それぞれ 2 0 0 m g のカルボマーとデキストラン D 2 M が含有されている。次いで、1 M N a O H とスティフ(stiff)を用いて、ゲルの p H を 7 . 4 に調整し、グルコース反応性のゲルを得る。最終の p H 調整に応じて最終重量は若干変化し、含量はこれに従って計算する。 10

【0093】

C 9 7 4 と C 9 3 4 の両者をこのように接合し、様々な濃度のグルコースの存在下での粘度試験に供した。粘度の測定値は、Haake Rheostress RS75 cone and plate viscometer を用いて、連続回転モードで得た(剪断(shear)の速度は、0 乃至 5 s^{-1} に増減した)。 5 s^{-1} の剪断速度値に対応する粘度の値を用いて、0 乃至 5 % w / v のグルコース濃度でゲルを比較した。ゲルは 2 0 °C で比較し、C 9 3 4 産物も 3 7 °C で測定した。 20

【0094】

粒状カルボマー C 9 7 4 及び C 9 3 4 から産生された接合体は、以下の組成を有すると計算された。

【表 1】

	C934 (フォーミュラコート'E100)	C974 (フォーミュラコート'E87-5)
カルボマー	2.6w/w	2.7w/w
デキストラン D2M	2.6w/w	2.7w/w
conA	2.4w/w	2.5w/w

30

【0095】

調合物は、元のカルボマーゲルが極めて透明であるのに比べると、若干不透明であった。過剰の E D A C の存在下で c o n A を加えるプロトコールは、様々な産物(カルボマーに加えられたレクチンの繊維(strings)を含むことがある)を生じるものと思われる。これは、c o n A が E D A C の作用に対して脆弱なカルボキシル基も有しているからである。しかしながら、この方法では、c o n A が高い割合で結合した結果が得られ、この段階では、c o n A を添加する前にカルボマー - E D A C 反応を停止させる方法より優先的に用いられた。 40

【0096】

前記調合物の性能を評価する見地からは、これらの生成物を、カルボマーを加えないデキストラン 2 D M と c o n A のみの水性混合液と比較することが有用である。しかしながら、カルボマーを含まない水性混合液中で低濃度のデキストランを用いると、2 . 5 % の c o n A は沈殿物のみを形成するので、直接的な類推は不可能であった。このため、2 . 5 % の c o n A を 1 0 % w / w の D 2 M と組み合わせて、低粘度のゲルを形成させた。カルボマーの存在下におけるこの濃度のデキストランは、極めて粘度の高い生成物を与え、本研究に用いることができなかったもので、それらの中のデキストラン含量は約 3 % w / w である。

50

【0097】

図8は、グルコースの添加によって、主に、糖尿病の抑制において有用な製品をデザインするのに適した範囲である0-0.5% w/wのグルコース濃度にわたって（グラフ上で強調表示されている）、水性調合物の粘度が段階的に下落することを示している。この反応は、上述した置換機序の化学量論に依存しており、従って、デキストラン及びグルコースの相対濃度の関数である。保持に重要なのはこの反応である。

【0098】

図9の結果は、前記水性調合物と同様のグルコース範囲にわたる粘度の下落を示しており、カルボマー粒子に対してグルコース感受性が負荷されたことを実証している。しかしながら、レクチン-デキストリン結合がグルコースによって元に戻るベースライン粘度レベルは、このポリマーの粘度故に、カルボマーが存在するときにはずっと高くなる。

10

【0099】

図9は、カルボマー含有調合物中に用いられているデキストラン含量がさらに低いにもかかわらず、デキストランとcon Aの付加によって、単なる水系よりも、カルボマー系の方が、無グルコース産物の粘度がずっと多量に上昇することも示している。図9にも示されているように、このことは、グルコース応答の規模が、粘度変化に関しては、水性調合物に比べてカルボマー調合物の方が大きいことを意味している。カルボマーへのレクチンの共有結合が存在しなくても、これは起こるので（図示せず）、デキストラン-con A系上のカルボマーの存在の機能である。これに対する説明は、上述したカルボマー分散物の不均一性である。デキストランとcon Aは、そのサイズ（それぞれ、2百万と100,000）がC974及びC934粒子内部からそれらを排除するはずなので、間隙に拘束される。間隙は、全容量の一部なので、それらの局所濃度は、それ故、総濃度よりずっと高くなければならない。先述したように、完全な水系と比べて、カルボマー系で用いた極めて低濃度のデキストランとcon Aの間で形成される複合体の物理特性の差は、これによって説明される。カルボマー系では、間隙領域の微視的粘度が、調合物のグルコース感受性に対して、明らかにずっと大きな寄与をする。しかしながら、グルコースによって誘発された巨視的粘度の変化は、均一な水系よりずっと大きいので、本実験で判明したように、グルコースによって引き起こされたマクロ粘度の変化は、活性な間隙と不活性な粒状区画に対する単純な平均ではないようである。このことは、間隙の粘度が本系のグルコース感受性の増加の唯一の理由ではなく、その存在がゲル中に存在する粒子の動きの自由

20

30

【0100】

C934接合体について図10に示されているように、同様の粘度の下落が37℃で生じる。カルボマーとデキストラン及びcon Aの水性無カルボマー調合物とがともに類似の挙動を示すことから予想され得るように（何れも図示せず）、37℃での粘度値と変化は何れも、20℃のものを下回る。しかしながら、この系は、生理的な温度で明らかに鋭敏なグルコースセンサーとなる。

【0101】

20℃で調べた本系では、初期値に対する割合として表示すると、図11に示されているように、絶対値が高いにもかかわらず、水系よりカルボマー系の方が、粘度変化が小さい。

40

【0102】

レクチンをカルボマーに共有結合させたい主な理由は、活性を損なわずに、レクチンが調合物から失われるのを防ぐことである。グルコースによって誘発された粘度変化は、そこから得られた上清を遠心することによってカルボマーを数回洗浄した後でも、グルコース感受性を有することを示している。このことは、EDACを結合剤として用いて、カルボマー粒子の表面にレクチンを繋着できることを示唆している。カルボマーとレクチンを単に混合したものは、このように洗浄すると、活性を保持しない（図示せず）。

【0103】

50

実施例 2 - インシュリンの拡散

実施例 1 に記載されているゲルを、37℃でのインシュリン拡散試験にも供した。これらの実験では、各々が0.5mLのインシュリン溶液又は緩衝対照溶液を保有することができ、6つの小さな送達細胞を使用した。10mLの緩衝液を有し、且つ10分間隔で250乃至500nmの間で各受容体溶液を順次スキャンようにプログラムされたPerkin Elmer Lambda 40分光光度計に各フロースルーシステムによって接続された、温度制御を行った受容体容器の中に、それぞれの細胞を空の状態で載せた。所定の時点でシリンジによって細胞を充填した後、タップアレンジメントを用いて密封し、水が漏れないようにした。各細胞の中では、インシュリンが貯蔵部からゲルを通過して拡散し、受容体溶液に到達するように、ゲルの薄層を2つのフィルター膜の間に挟んだ。実験中の任意の時点で、必要な濃度でグルコースを各受容体溶液に加えることができた。グルコースを除去するためには、測定の間、受容体液を37℃の新しい緩衝液と入れ替え、フロースルー回路に水を流し、次の測定が行われるまでに、再度緩衝液を入れ替えた。

10

【0104】

インシュリンを含有する拡散細胞の場合には、図12aに示されている時点でグルコースを添加すると、0.5%のグルコースを加えてから約60分以内に排出が増加した。図12bは、緩衝液を含有する細胞から得られた結果を示しており、グルコースによって誘発されたconAの放出を表している。水性分散液の中では、インシュリンと同様のグルコース誘発性遊離が起こったと思われるので（図示せず）、このことは、ゲル層からのconAの喪失が最小化されたことを示している。従って、conAの喪失はほとんど無視できることが示されたが、図12aの結果は、さらにこの効果に関して補正されている。加えて、460nmで測定した光学密度に関して、インシュリン系と対照系の両者に補正を行った。光学密度は、原繊維の産生を含むタンパク質沈殿の指標である。本実験では、conAに比べてインシュリンの場合に、原繊維の形成がずっと大きな問題となる。これは、蠕動式ポンプの中を溶液が循環することによって起こる剪断力が加えられることによって生じる。この問題を小さくするために、装置からの放出過程を律速段階に保ちながら、本実験では、受容体から分光光度計への循環系中の流速を可能な限り小さく保った（装置からの放出プロセスを律速段階として維持することと同じ）。液体の入れ替えによってグルコースが除去されるため実験を通じて一定ではないし、タンパク質濃度の不定関数なので、この効果は、276nmのプロフィールから差し引くことによって補正する必要がある。

20

30

従って、カルボマーC934とC974にレクチンを共有結合し、これをデキストランと連結した結果、グルコース含量の関数としてのインシュリンの拡散制御に関して、グルコース依存性のデキストランとconAの混合物の活性が維持された。これは、かなり重い糖尿病の状態に相当するグルコースの濃度で作用した。この方法は、ゲル層中にカルボマーを保持する孔より小さな孔を通じてconAが滲出することができない調合物も与えた。C934やC974のようなカルボマーは10億単位の分子量（及びμm程度の粒子サイズ）を有するので、これによって、本実施例に記載した状況下で、極めて巨大な孔の拘束膜を用いることが効果的に可能となる。この利点は、ゲル自体がインシュリンに関して律速になり、その間にゲルを挟んだセルロース膜は律速とはならないということである。レクチンを保持するために、インシュリンのサイズに近い分子カットオフを有する有孔膜を必要とする、接合されていない混合物では、これが課題となっていた。

40

【0105】

実施例 1 と実施例 2 に示されたデータは、C974又はC934等の粒子状カルボマーとタンパク質等の第二の成分との間に、タンパク質の化学的特性の一部を維持することが可能な、一般的でない接合体を作製することが可能であることを示している。この場合には、その中で調合物の間隙領域がグルコース感受性になる系を与えるように、conAは架橋されたカルボマーに結合されてきた。EDAC法が用いられたが、代替法も可能である。この接合体にデキストランを加えれば、レクチンとデキストラン上の分枝末端との間に形成された一時的な連結のために、系は粘性になる。レクチン中のグルコース受容体を競

50

合するために、次いで、この系の粘度は、遊離グルコース含量の関数となる。この機序は、c o n A とデキストランの単純な混合物中で有効に機能するが、共有結合で接合された調合物の中では、さらに有効に作用する。この増強は、粒子間に存在する前記系の画分中にレクチン-デキストラン複合体が形成され、高い局所濃度のグルコース感受性成分が作り出される粒子状カルボマーゲルの不均一な構造に関係しているようである。これらの接合された調合物は、グルコース依存的な巨視的粘度の減少をもたらすことが示された。遊離のレクチンを喪失させずに、グルコースが関与した態様で、インシュリンを伝達することもできた。後者はカルボマー粒子に共有結合した状態を保つので、カルボマー粒子を保持できるのに十分且つ必要な膜孔径によって制約される。

【0106】

10

実施例3-共重合されたゲル
方法

コンカナバリンAのメタクリル酸化

7. 4のリン酸緩衝生理食塩水中のメタクリル酸無水物とともに、コンカナバリンAを2-3時間、50℃で還流した。50mLの丸底フラスコに入れた10mLのリン酸緩衝生理食塩水中に、500mgのC o n Aを溶かし、これに、0.05mLの蒸留したメタクリル酸無水物を加えた。還流後、蒸留水(20mL)を用いて反応を停止させ、分子量が12-14,000未満の産物を除去するために、溶液全部を蒸留水に対して2時間透析した。この工程によって、未結合のc o n Aを除去することはできない。

【0107】

20

デキストランのメタクリル酸化

10g量のD500(分子量500,000のデキストラン)を秤量し、五酸化リン上で乾燥させた。別個に、ジメチルスルホキシド(DMSO)を水素化カルシウム上で乾燥させた後、蒸留した。次いで、乾燥させたデキストランに100mLの量の蒸留したDMSOを加え、油槽上、50℃で、得られた混合物を攪拌して溶解させた。これに、200mgのジメチルアミノピリジン(DMAP)と2.77mLの蒸留したメタクリル酸無水物を加えた。次いで、24時間還流しながら、油槽上、50℃で、この混合物を攪拌した。1Lのアセトン中に滴下させることによって沈殿させて、メタクリル酸デキストランの白片を得た。次いで、500mLの蒸留水中にこの産物を溶かし、蒸留水に対して透析し、DMSO、DMAP、メタクリル酸無水物等の小分子量の生成物を除去した。

30

【0108】

メタクリル酸誘導体のuv架橋

イニシエータであるIrgacure(フォトイニシエータ、Ciba Speciality Chemicals)を用いて、uv硬化プロセスを開始した。40mg/5mLのIrgacureの水溶液20μLを加えた。次いで、365nm、10mW/cm²で、所定の時間、サンプルを照射し、間隔を置いたフィルムの両面が等しく照射されるように、ガラスプレートの間に分配した。

【0109】

この系における変数は、

成分の濃度

40

イニシエータの濃度

デキストラン及びc o n A置換の程度

照射時間

である。

【0110】

これらの変数によって、様々なゲルを作製することが可能となる。以下のケースでは、照射時間は、2乃至50分の間を変化させた。

【0111】

拡散試験

次いで、実施例2と同一の拡散試験に上述のように作製したゲルを供した。結果は以下の

50

とおりであった。

【0112】

結果

図13aには、グルコースによる誘発前と誘発後における、タンパク質 c o n A の重合可能なメタクリル酸化誘導体からの浸出がプロットされている（実験は、0.2 μm の孔径のフィルター、及び1% w/v のグルコース誘発濃度を用いて、37℃で行った）。ゲルがグルコースと接触すると柔らかくなるにつれて、uv にゲルを当てる照射時間と適切なイニシエータの増加によって、ゲルとして生成されるタンパク質のピークが減少する。短い照射時間（例えば、5分—三角）ではこのようなことが起こらないのに対して、20分の硬化時間（菱形）は、僅かな浸出のみをもたらす。従って、重合によって、これらのより長時間照射したが、なお硬直していないゲルの中にタンパク質を閉じ込めるという目的が達成された。しかし、ゲルなしの対照（黒四角）との比較は、20分の照射によって、僅かではあるが、何らかのタンパク質の放出が全体に起こることを示している。

10

【0113】

図13bは、照射時間をずっと長くすることによってこの問題が解決され、50分の照射によって、グルコース添加前、添加中、添加後の何れの場合にも、タンパク質をほとんど失わない産物が得られるようである。これも硬直していないので、前記の目的に適している。

【0114】

図14は、成分の浸出を最少に抑えたこれらの条件下では、正確に相似した設定で、ゲルの層の後ろに保持された貯蔵物からグルコースがインシュリンの放出を誘発できることを示している。従って、インシュリンが放出されるが、成分タンパク質 c o n A を浸出させないように、ゲルは反応することができる。グルコースを除去すると、ゲルは矯正され、インシュリンの流入が前グルコースレベルまで復活する。このことは、それが真に可逆的であり、何れのゲル成分も失われていないことを示唆している。

20

【0115】

結論

重合化は、単純な混合物と同程度の反応性を示すが、成分を失う傾向がないゲルを製造する有効な方法である。

【0116】

実施例4—EDACを用いたゼラチン：カルボマー接合体

ゼラチンとカルボマーの接合は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩化水素物（EDAC）を用いて行い、EDAとカルボマーのカルボキシル部分との間に一時的な中間構造を与える。前記中間体は、とりわけ、ゼラチンの末端及びヒドロキシリジン部位に存在するようなアミン基と結合する。カルボマー粒子の表面がゼラチンで恒久的にコートされる一方、EDAC残基が恒久的結合部位を離すように、ゼラチンはカルボマーと効果的に接合される。ゼラチンの中にはカルボキシルとアミンがともに存在するので、この方法では、カルボマー—ゼラチン結合に加えて、ゼラチン—ゼラチン結合が幾分発生する。極めて高濃度になった場合でも、加えたゼラチンは、たとえ遠くであってもカルボマー担体に全て結合するので（単純な単層ではなく、各マイクロ（又はミニ）ゲルの水和されたカルボマー粒子に結合した複層を有するかもしれない）、これは不利益ではない。

30

40

【0117】

しかしながら、（カルボマーとEDACとの）中間体を産生し、過剰なEDACを除去するために洗浄した後、ゼラチンを結合するように本方法を改変してもよく、この場合には、ゼラチン含量が最少となるであろう（単層のみ）。

【0118】

水和されたカルボマー974又は934各粒子は、分断されたハイドロゲルであり、間隙の水性領域によって他から分離されている。これは、表面に結合されたゼラチンが、酵素又は化学作用によって水和されるまで、間隙の粘度を上昇させ得ることを意味している。

50

【0119】

試薬

カルボポール 974 (C974)、カルボポール 934 (C934) B F G o o d r i c h

E D A C [1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩化水素]、S i g m a

M E S [2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸]、S i g m a

P B S (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4 及び 5.9)

N a O H (粒及び 1 M 溶液)、F i s h e r S c i e n t i f i c

デキストラン (RMM 2, 000, 000)、S i g m a

アジ化ナトリウム、S i g m a

ゼラチン、S i g m a

蒸留水

1 M H C l (塩化水素酸)、B D H

方法

0.1 M の M E S 緩衝液中で、1 % w / w のカルボマー分散液を作製し、中性に調整し、透明になるまで攪拌した。望む産物に応じて最終濃度が 0 乃至 8 % w / w となるようにこれにゼラチンを加え、pH は中性に保った。次いで、50 mM の E D A C を用いて、この系を接合し、pH 5.9 の P B S で希釈し、洗浄しても上清中にさらなる c o n A が現れないようになるまで、一部脱水したカルボマー接合体から得られた洗浄物を遠心することによって、室温で 3 時間攪拌した後に反応を停止させた。除去された総タンパク質は、総洗浄物と濾過した洗浄物を 276 nm でアッセイすることによって算出した。次いで、1 M の N a O H を用いて、ゲルの pH を調整し、ゼラチンの影響のために、著しく柔らかくさせることによって、37 °C を上回る温度に対して応答する硬化されたゲルが得られる。

【0120】

レオロジー試験

8 % のゼラチン含量と 2 % のカルボマー 974 のゲルに対して、レオロジー試験を行った。適切な試験は、本明細書に、t a n デルタ又はロスタングメントとして報告されている、振動する (oscillatory) 非破壊的な試験である。このパラメータは、粘性及び弾性係数の比であり、従って、1 の値は、これらの各々からの寄与が等しいことを示す。1 より大きな値は、物質の特性がより液状となったことを意味する。従って、t a n デルタプロフィールを評価する目的で、圧力 (stress) 及び周波数掃引を行う。

【0121】

図 15 a - f に結果が示されている。これらのグラフでは、圧力と周波数の両方にわたってプロフィールが測定されており、t a n デルタの上昇に照らすと、特に高い圧力値におけるキモトリプシン活性を明らかに示す 3 次元プロットが得られ、これらは、酵素含量がないとずっと低くなる。これに対する例外は、温度を 37 °C より上げたとき (ゼラチンが融解する温度) である。このため、37 °C では、酵素なしでも、物質が既に極めて柔らかくなっているので、この系は有効でない。幸運にも、皮膚の温度は 32 °C 前後であり、この場合、その効果は 20 °C と同程度に明白である。

【0122】

乾癬プラーク中に過剰発現されることが明らかとなっている角質層キモトリプシン酵素 (S C C E) と極めて類似した酵素を用いたこの試験によって、これらの人工的な条件におけるとほぼ同様に、本物質は、プラーク上で選択的に粘性を失うが、正常な組織上では粘性を失わないことが示唆される。ゼラチンに富む相 (すなわち、前記物質の間隙領域) を通じた薬物の分散可能性は、相の粘性に環レしており、異常な皮膚上の領域において、薬物の輸送が上昇すると結論付けられる。

【図面の簡単な説明】

【0123】

【図 1】図 1 は、デキストランと c o n A のメタクリル酸誘導体の重合を示している。

【図 2】図 2 は、デキストランと c o n A のメタクリル酸誘導体の重合から得られるデキストラン-c o n A コポリマーの模式図である。

【図 3】図 3 は、マトリックスの成分のうち少なくとも 1 つが少なくとも三価である場合に、マトリックスがどのように形成され得るかを示している。

【図 4】図 4 は、本発明のゲルの模式図である。

【図 5】図 5 は、本発明に係る別のゲルの模式図である。

【図 6】図 6 は、アミン含有要素 (c o n A 等) のカルボキシル保有担体へのカルボジイミド (カルボマー等) 付加を表している。

【図 7】図 7 は、カルボマー粒子表面に c o n A を植設する前後の構造とインシュリン拡散経路を示している。

10

【図 8】図 8 は、デキストランと c o n A を用いて調合された水性ゲルにグルコースを付加することによって、粘度が喪失することを示すグラフである。

【図 9】図 9 は、デキストランと c o n A を用いて調合されたカルボマー含有ゲルにグルコースを付加することによって、水性製剤と同じグルコース濃度域で粘度が喪失することを示すグラフである。

【図 10】図 10 は、デキストランと c o n A を用いて調合されたカルボマー含有ゲルにグルコースを付加することによって、20℃と 37℃の何れにおいても、粘度が喪失することを示すグラフである。

【図 11】図 11 は、デキストランと c o n A を用いて調合されたカルボマー含有ゲル、及びデキストランと c o n A を用いて調合された水性ゲルにグルコースを付加したときの粘度の減少を表すグラフである (最初の粘度に対するパーセントとして示されている)。

20

【図 12】図 12 a と 12 b は、本発明のゲルからのタンパク質の放出を表すグラフである。

【図 13 a】図 13 a と 13 b は、様々な程度の重合を施した C o n A の重合可能なメタクリル酸化誘導体からの C o n A の放出を表すグラフである。

【図 13 b】図 13 a と 13 b は、様々な程度の重合を施した C o n A の重合可能なメタクリル酸化誘導体からの C o n A の放出を表すグラフである。

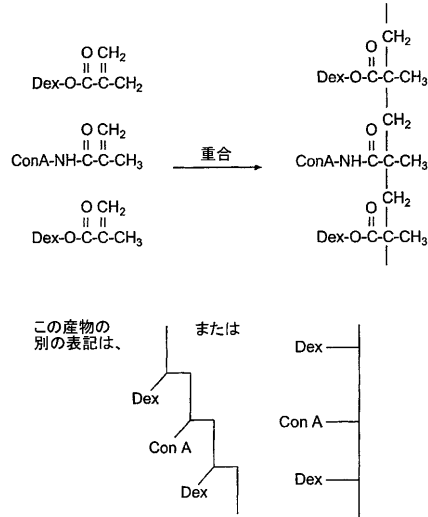
【図 14】図 14 は、グルコースの存在下又は不存在下における、本発明のコポリマー化されたゲルによるインシュリンの放出を表すグラフである。

【図 15-1】図 15 a-c は、キモトリプシンの不存在下において、それぞれ、20℃、32℃、及び 37℃で、本発明の組成物の正接値 (t a n g e n t v a l u e) が喪失されることを示すグラフである。

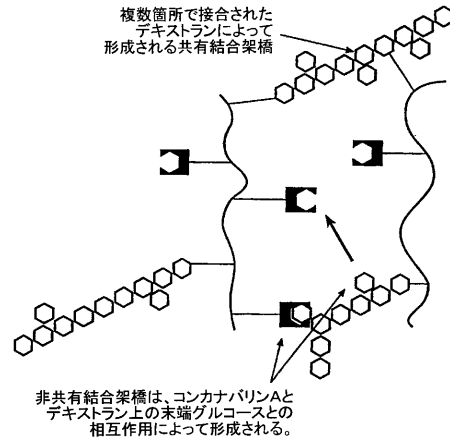
30

【図 15-2】図 15 d-f は、キモトリプシンの存在下において、それぞれ、20℃、32℃、及び 37℃で、前記組成物の正接値が喪失されることを示すグラフである。

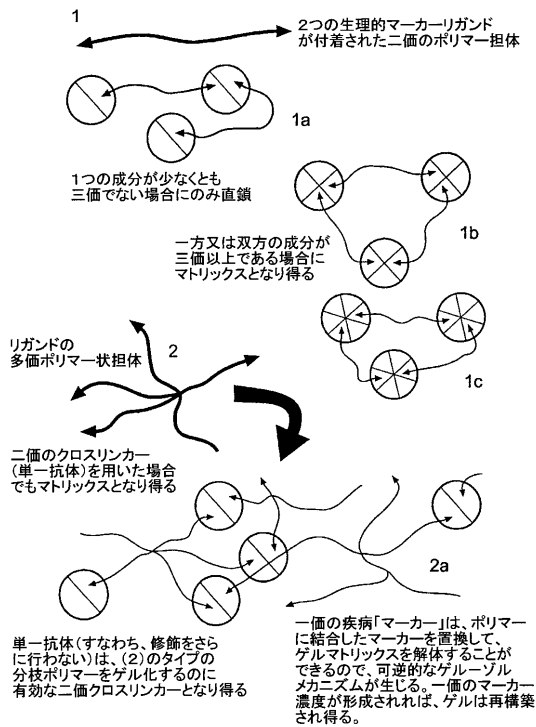
【図 1】



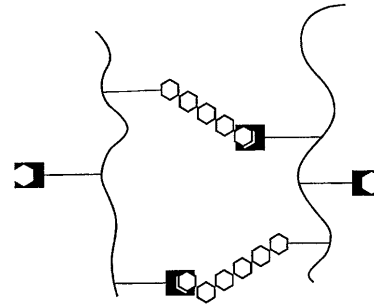
【図 2】



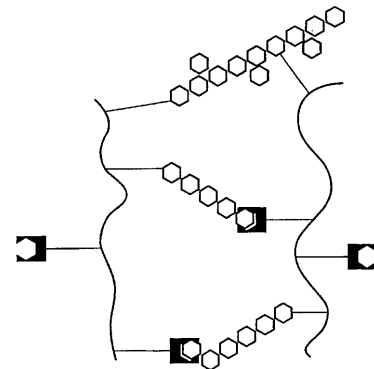
【図 3】



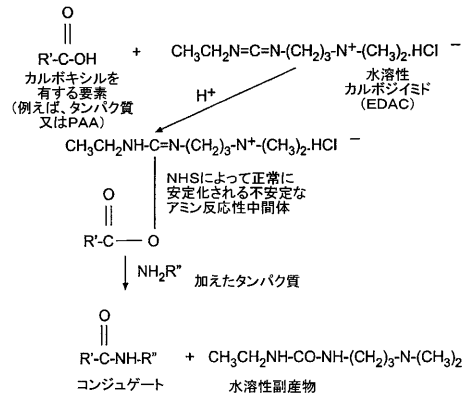
【図 4】



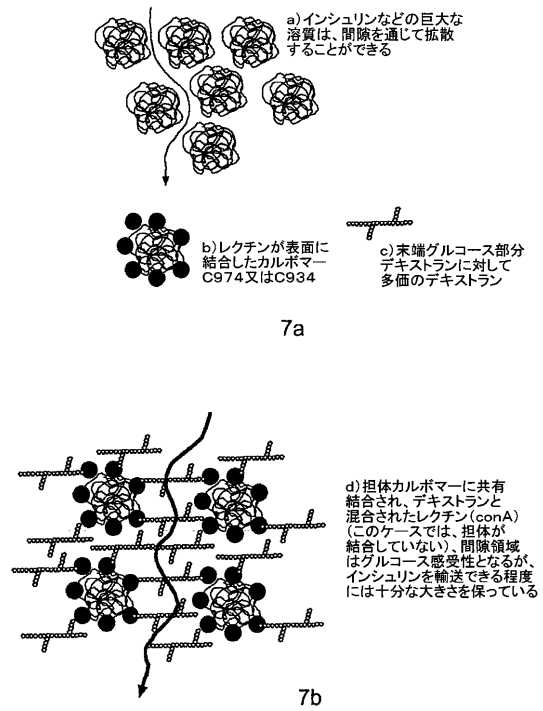
【図 5】



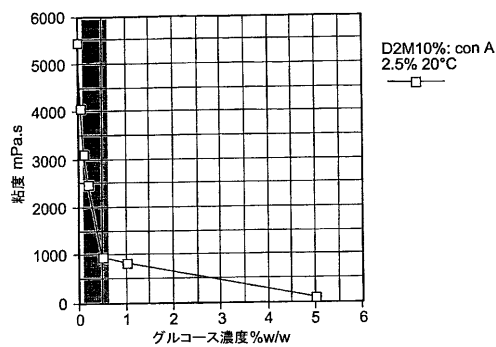
【図 6】



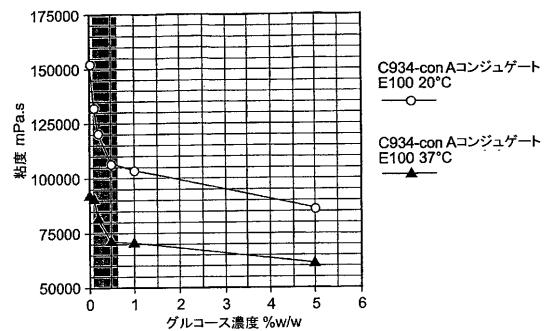
【図 7】



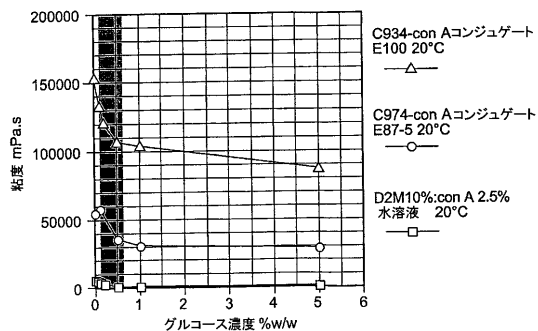
【図 8】



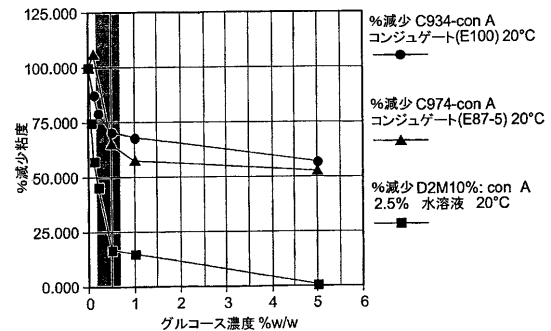
【図 10】



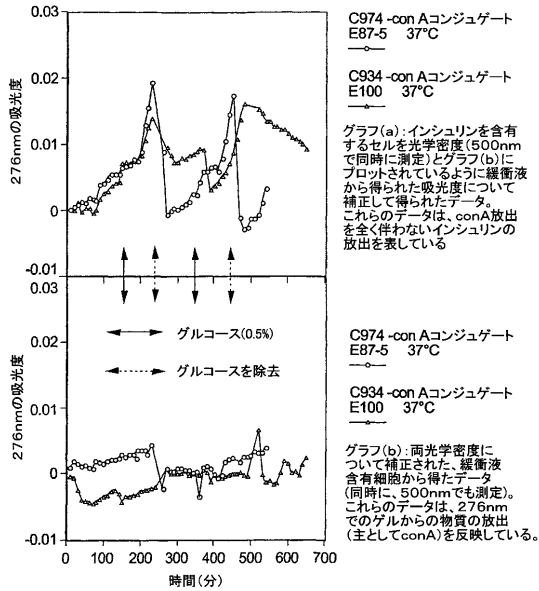
【図 9】



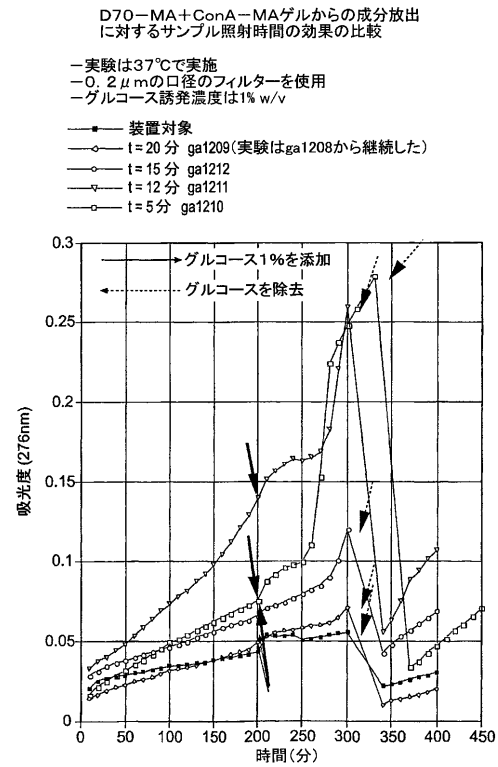
【図 11】



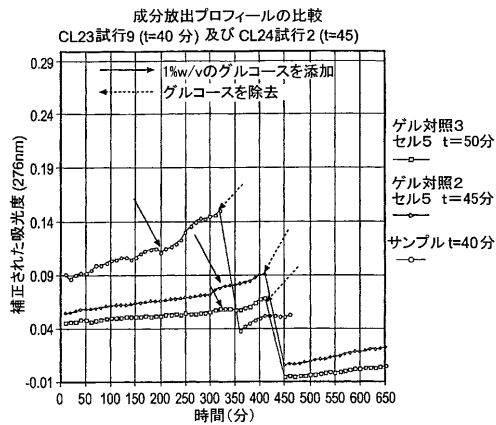
【図 1 2】



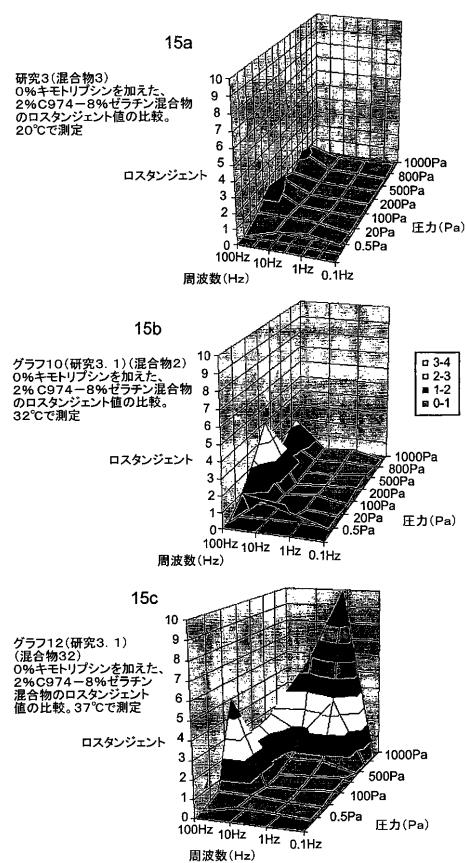
【図 1 3 a】



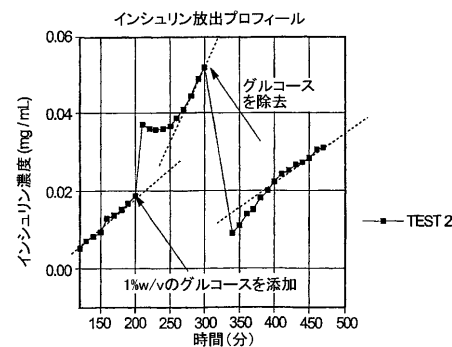
【図 1 3 b】



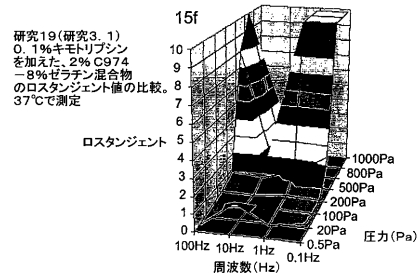
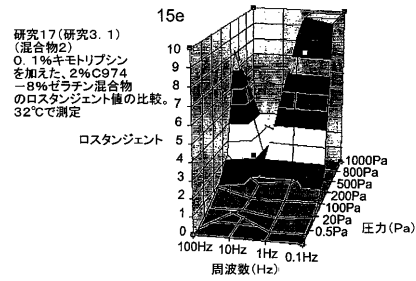
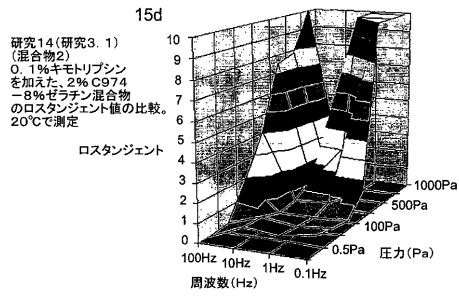
【図 1 5 - 1】



【図 1 4】



【図 15 - 2】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/006993 A2(51) International Patent Classification: G01N 33/543,
A61K 9/00, G01N 33/559, A61K 47/06

(21) International Application Number: PCT/GB02/03183

(22) International Filing Date: 10 July 2002 (10.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0116860.8 10 July 2001 (10.07.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): DE
MONTFORT UNIVERSITY [GB/GB]; Intellectual
Property Advice Centre, Innovations Centre, Oxford
Street, Leicester LE1 5XY (GB).(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): TAYLOR, Margaret,
Joan [GB/GB]; De Montfort University, Intellectual Prop-
erty Advice Centre, Innovations Centre, Oxford Street, Le-
icester LE1 5XY (GB).(74) Agents: LEE, Nicholas, John et al.; Kilburn & Strose, 20
Red Lion Street, London WC1R 4PJ (GB).(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SI, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/006993 A2

(54) Title: GEL COMPOSITIONS

(57) Abstract: The present invention relates to a gel composition, comprising first and second gel-forming moieties which bind reversibly to one another to form a gel. The binding of the moieties is sensitive to the level of an analyte, and either or both of the gel-forming moieties are attached to cross-linked particulate entities such that the interstices between the entities allow gel-sol and sol-gel transformation, and yet are not so small that the analyte cannot diffuse therethrough. The invention also provides drug delivery systems and sensors for detecting an analyte utilising such a gel.

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-1-

GEL COMPOSITIONS

5 The present invention relates to gel compositions which comprise gel-forming moieties which bind to one another to form a gel. The binding of the gel-forming moieties is dependent on the level of a specific analyte and may be reversible. Such gels find use in monitoring the level of the analyte in a sample and delivering drugs in response to abnormal levels of the analyte.

10 In the prior art, WO 93/13803 discloses a gel which, in one embodiment, comprises dextran and concanavalin A (ConA). Terminal glucose residues of dextran bind to ConA, resulting in the formation of a higher viscosity gel. Reversal of this binding occurs when free glucose competes with the dextran glucose residues for binding to ConA. Thus, the gel is sensitive to the amount of free glucose with which it is brought into contact. As such, the gel can be used as a drug delivery system using an anti-
15 hyperglycaemic drug such as insulin. In normal levels of glucose, dextran binds ConA and the gel retains the insulin therein. However, when the level of glucose rises, the degree of binding falls, releasing the insulin. In a physiological situation, the release of insulin will result in the level of glucose falling and the degree of binding will increase, thereby preventing release of further insulin. Thus, the drug delivery system forms a
20 "closed loop" system which has the same effect as a normally-functioning pancreas, with insulin being released when required (when glucose causes the gel to undergo gel-sol transition) and retained when not required (when the lack of glucose causes the gel to undergo sol-gel transition).

25 Similar gels are disclosed in Obaidat & Park, *Biomaterials* **18** (11 1997): 801-806; Obaidat & Park, *Pharmaceutical Research* **12** (9 SUPPL 1995); Obaidat & Park, *Pharmaceutical Research* **13** (7 1996): 989-995; and Valuev, *et al*, *Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya A & Seriya B* (1997): 751-754.

30 A gel of this type is disclosed for use as a glucose sensor in DE-A-4203466. The gel is located in a semi-permeable tube such that the change in viscosity of the gel resulting from the reversible gel-sol change causes the gel surface to respond to an oscillation signal. The degree of response depends on the viscosity of the gel and hence the

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-2-

concentration of glucose. Later work describes the response of such a gel to glucose as measured by surface plasmon resonance (SPR) to measure the kinetics of the response rather than the viscosity itself (Ballerstadt & Schultz, *Sensors and Actuators B Chemical*, (1998), **46**: 557-567). Rather than producing a gel, a lectin was immobilised on a surface and the displacement of fluorescent labelled lectin was measured with laser optics. Thus, this later work did not use the change in viscosity as a measure of glucose levels. Similarly, DE-A-4034565 describes the measurement of radioactive lectin from cross-linked dextran beads.

Finally, WO99/48419 describes the use of a viscosity-sensitive chip to measure the change of viscosity of a reversible gel (specifically a Ficoll-ConA gel) to determine the level of glucose in a sample to be analysed.

A problem of gels of this type is that they are water-miscible and hence are prone to dispersal. This problem becomes particularly acute if they are used *in vivo* to detect a particular analyte, because the components of the gel could cause an unwanted immune reaction: indeed, ConA is mitogenic. For this reason, the gels may be enclosed by a semi-permeable membrane which will allow passage of the analyte into contact with the gel. However, in order for the gel to react to changed levels of analyte within a reasonable time, the analyte must be able to pass quickly through the semi-permeable membrane. In addition, in those situations where a drug is to be released, the membrane must allow quick release. To ensure such quick passage, the membrane needs to have relatively large openings and/or be relatively thin, with the result that the components of the gel can leach through the semi-permeable membrane. For example, a gel of the type described in WO 93/13803 is water-miscible and must be confined in a small pore membrane to prevent rapid dispersal of the gel-forming components, especially in the sol form induced by raised levels of glucose. However, pore sizes (e.g. 0.1 μm) which are not rate-limiting for release of the 36 kD insulin hexamer still allow the 110 kD ConA tetramer and, to a lesser extent, dextran to escape.

It is therefore desirable to produce a gel of the type described above which is less prone to dispersal.

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-3-

According to the present invention, there is provided a gel composition comprising first and second gel-forming moieties which bind reversibly to one another to form a gel, wherein said binding is sensitive to the level of an analyte, and either or both of the gel-forming moieties are attached to cross-linked particulate entities such that the
5 interstices between the entities allow gel-sol and sol-gel transformation, and yet are not so small that the analyte cannot diffuse therethrough.

The invention will be described with reference to the accompanying drawings, in
10 which:

Figure 1 illustrates the polymerisation of methacrylate derivatives of dextran and con
A;

Figure 2 is a diagrammatic representation of a dextran-con A copolymer resulting from
15 the polymerisation of methacrylate derivatives of dextran and con A;

Figure 3 illustrates how a matrix can be formed when at least one of the components of
the matrix is at least trivalent;

Figure 4 is a diagrammatic representation of a gel in accordance with the present
20 invention;

Figure 5 is a diagrammatic representation of another gel in accordance with the present
invention;

25 Figure 6 illustrates the carbodiimide addition of amine containing entity, such as con A,
to a carboxyl bearing carrier, such as carbomer;

Figure 7 illustrates structures and insulin diffusion pathways before and after grafting
30 con A to carbomer particles surfaces;

Figure 8 is a graph illustrating that addition of glucose to an aqueous gel formulated
with dextran and con A leads to a loss in viscosity;

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-4-

- Figure 9 is a graph showing that the addition of glucose to carbomer-containing gels formulated with dextran and con A leads to a loss in viscosity in the same range of glucose concentrations as an aqueous formulation;
- 5 Figure 10 is a graph showing that the addition of glucose to a carbomer-containing gel formulated with dextran and con A leads to a loss in viscosity at both 20°C and 37°C;
- 10 Figure 11 is a graph illustrating the viscosity reduction on addition of glucose for carbomer-containing gels formulated with dextran and con A, and an aqueous gel formulated with dextran and con A, shown as a percentage of the original viscosity;
- Figures 12a and 12b are graphs which illustrate the release of protein from a gel in accordance with the present invention;
- 15 Figures 13a and 13b are graphs illustrating release of ConA from polymerable methacrylated derivatives of ConA having been subjected to varying degrees of polymerisation;
- 20 Figure 14 is a graph illustrating insulin release by a copolymerised gel according to the present invention in the presence or absence of glucose; and
- Figures 15a-c are graphs illustrating the loss of tangent values for a composition of the present invention in the absence of chymotrypsin at 20 °C, 32 °C and 37 °C respectively, and Figures 15d-f are graphs illustrating the loss of tangent values for the composition in the presence of chymotrypsin at 20 °C, 32 °C and 37 °C respectively,
- 25
- The present invention provides a reversible gel in which the interactive ligand pair (the first and second moieties) are retained within the gel (i.e. their leach to the surroundings is prevented). In addition, the phase separation of the components during the liquid stages of the gel-sol cycles is prevented, thus ensuring the juxtaposition of the first and second moieties and increasing the life of the composition. Preventing
- 30

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-5-

phase separation is also important because it fosters the continuing probability of interaction between the relevant ligands.

5 Preferred particulate entities are polymers which are locally cross-linked such that they form particles, sometimes known as "microgels", "minigels" or "fuzzballs", in which each particle is a discrete hydrogel structure which is substantially or completely surrounded by an aqueous interstitial region. It is preferred if the degree of cross-linking is greater than that in Carbopol 941, which has 1 linker for every 3300 monomers (Carnali & Naser, 1992, *Colloid Polymer Sci.* **270**: 183-193).

10

In certain embodiments of the invention, the particulate entities have a mean diameter of 150 or 100 μm or less, preferably in the range of from 10 to 80 or 20 to 70 μm , as this may prevent the composition from crossing a membrane with pore sizes of 0.1 μm and above, and yet allows easy passage of the analyte and, when present, a drug which may have to pass through the composition.

15

In a preferred embodiment, the cross-linked polymer is an acrylic acid polymer or copolymer and is preferably a cross-linked carbomer (also known as Carbopol (BFGoodrich (USA), polycarbophil, carboxyvinyl or carboxypolyethylene polymer).

20

Acrylic acid is a small molecule with a reactive double bond capable of polymerising into linear arrangements with pendant ionisable carboxyl groups remaining from each monomer. This produces hydrophilic products capable of behaving as polyelectrolytes. The linear derivatives of this type (such as Carbopol 907) are reported as having an average molecular weight of 500,000 and are water soluble. Various degrees of cross linking can also occur. Both the degree and type of cross linking has given rise to a large range of polymers, many of which incorporate other monomers besides the acid. For example, some Carbopols and Pemulens (BFGoodrich) consist of acrylic acid copolymerised with long chain alkyl residues and are cross linked with allyl pentaerythritol. Polycarbophils (marketed as Noveon) are homopolymers of acrylic acid loosely cross linked with divinyl glycol.

25

30

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-6-

- Cross-linked carbomer homopolymers are characterised by being cross linked to various extents with polyalkyl polyethers. Some are pharmaceutically more acceptable either because of the solvent system used in polymerisation or because they contain dispersal facilitators, but the intended utility is a function of cross link characteristics as described. Most types are produced as dry powders which comprise particles which maintain their integrity when dispersed in water. Each particle is an agglomerate of inseparable smaller components but the molecular weight of the primary particles is, in effect, in billions, with each linear chain being connected by the cross linker arrangements, to many others, forming one large molecule. The average diameter of the dry aggregate is generally 2-7 μm , which increases tenfold as the structures swell on hydration and neutralisation. The latter process produces a gelatinous product which appears to be homogeneous but in fact comprises the individual swollen particles separated by aqueous interstitial regions.
- Dissolved material percolates both through and between the gelatinous particles of the gel. Permeability of a solute through carbomer gel dispersions is a function of the cross-linking density because the more tightly meshed particle interiors exclude diffusing solutes on a size basis much like a conventional beaded gel permeation system like Sephadex, except that the beads are smaller and less rigid. Many substances travel through carbomer gels much faster, therefore, than through other homogeneous gels, such as hypromellose, even when macroviscosity is matched. Carbomers have therefore been used widely to control the delivery of many solutes through a hydrated layer and are included in many tablet formulations for this purpose often as comparisons with linear polymers which release by erosion. In addition, carbomers have been found to adhere strongly to mucus and have been investigated for binding drug delivery structures to the gut, the eye and the nasal mucosa in order to prolong dosage.
- Preferred carbomers are Carbopol 974P, which has a tightly cross-linked structure (with allyl pentaerythritol) causing each hydrated particle to be relatively rigid and to remain discrete from its neighbours, and Carbopol 934P, which is less cross linked (with allyl sucrose). Because these carbomers are cross-linked extensively but regionally, they are particulate; even when they are hydrated they form flexible, small

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-7-

(20-70 μm in H_2O) beads. These beads will not allow the diffusion of large molecules through them but only around them.

Cross-linked carbomer particles have many qualities that make them attractive as carriers for proteins and other biologically active moieties.

- 5 • the particles have pendant carboxyl groups, many of which are externally oriented. These enable the covalent attachment of active entities including proteins, peptides and other agents bearing active moieties such as amine groups by generic and specific means including carbodiimide chemistry.
- 10 • the particles are polyelectrolytes and are highly ionised at neutral pH, enabling electrostatic attachment of suitable cationic ligands.
- some proteins have non-specific attraction for polyacrylic acid and hence may not have to be covalently attached. For example, at low pH (<4), there is a very strong physical attachment between concanavalin A and carbomers which needs no
- 15 covalent bonding (mixtures of solutions form a precipitate) and which is independent of the glucose receptor. Because of the low pH required, it is preferred that one or both of the gel-forming moieties is/are attached covalently to the particles. In a preferred embodiment of the invention, cross-linked carbomers are used as carriers in concanavalin A/dextran gels as an additive. This produces a
- 20 clear gel which responds very well and yet effectively prevents the leach of protein as outlined above.
- the covalent and electrostatic attachment of ligands can be in very large numbers, again because of the high incidence of carboxyls.
- the polyanionic nature of carbomer means that it can be dehydrated in low pH
- 25 media. This allows it to be centrifuged and thus separated from extraneous material left from coupling procedures. It can be repeatedly washed and spun in this form and finally rehydrated by neutralising in suitable buffer or other aqueous media.
- carbomers can carry certain types of solutes inside the particle in addition to the same or other entities being present on the external surface. Thus, for example, a
- 30 therapeutic agent can be held within the particle, whether bonded there or not, while a targeting and/or stealth-type entity could be grafted onto the exterior surface.

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-8-

- carbomers are very large by comparison with other carriers and although unsuitable for some therapeutic purposes for this reason (for example it would not extravasate), becomes more potentially useful for others. Thus, following delivery, the conjugate may remain longer at the target site as excretion, metabolism and degradation proceed more slowly than with smaller entities. Such a carrier could, for example, have much in common with liposomes, which are of similar size and have long been used as experimental drug delivery agents. Carbomers offer a greater capacity for covalent attachment than is the case for liposomes, however. As with liposomes, carbomers could be modified covalently by the addition of polyethylene glycol (among other hydrophilic neutral polymers) to provide a surface with steric and other properties which prevent uptake by macrophages in the large vessels of the liver and spleen.
 - being particulate, cross-linked carbomers can function in the manner of an exclusion gel and therefore many solutes percolate around rather than through the particles (or beadlets) of hydrogel. Diffusion through carbomer gels is therefore governed by the microviscosity of the aqueous medium in the interstitial regions and is much faster for many solutes than for similar consistency but homogeneously cross-linked hydrogels, where the solute migration is a function of the macroviscosity. Where beadlets have then been surface-modified as carriers for covalently bound ligands, the ligands can affect the microviscosity of the interstitial regions. This region can therefore interact with solutes chemically or physically. Thus, a gel bed could act as an affinity substrate for solutes in designs for chromatographic separation, substrate sensors and intelligent delivery devices.
- There is a number of variations in which the first and second moieties can be attached to the particles. For example, the particles can have either the first or the second moieties attached (covalently or otherwise) directly thereto, or can have both the first and second moieties directly attached (covalently or otherwise) thereto. Alternatively or additionally, instead of being directly attached, the first and/or second moieties can be indirectly attached via a polymer. Suitable polymers are known to the skilled person and include acrylic backbone polymers, dextrans, celluloses and other sugar polymers. The first and second moieties can be attached to each other (e.g. in the manner

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-9-

described in WO95/01186) with one or other being directly or indirectly attached to the particles.

5 The first and second moieties can be any moieties which can bind reversibly together to form a gel. It is preferred if the first moiety is a macromolecule which, when bound together, forms a gel and the second moiety is a molecule which binds to at least a part of the macromolecule to provide such binding. However, both the first and second moieties could contribute equally to gel formation. Preferably, the sensitivity of the gel to the level of said analyte arises because the second gel-forming moiety also binds to
10 the analyte. Thus, the analyte competes with the first gel-forming moiety and, when the concentration of the analyte is sufficiently high, will prevent binding of the first and second gel-forming moieties, resulting in a decrease in the viscosity of the gel. As is described in more detail below, this decrease in viscosity can be used to release a drug or to provide an indication of the level of the analyte.

15 Bonding between the first and second moieties is caused by non-covalent forces such as hydrophobic, ionic, hydrogen bonding forces and the like. These interactions have been well studied in the art and their effects on molecular affinity and recognition are described, for example in Korolkovas *et al*, "Essentials of Medicinal Chemistry", pp
20 44-81 Wiley, 1976. Such reversible interactions are exemplified by the interaction between an enzyme and its substrate or a competitive inhibitor thereof; and antibody with its antigen, or a drug receptor site and its drug.

The second moiety may be any of a number of well-known entities which exhibit
25 molecular recognition and reversible binding of micro-or macromolecules. The second moiety may be a natural binding protein, such as an antibody, an enzyme, a regulatory protein, a drug receptor site or the like. It is also possible to use synthetically modified binding molecules, such as chemically modified proteins. Such modified proteins sometimes have increased or decreased affinities for their substrates when compared to
30 their natural unmodified counterparts. The second moiety may be a receptor built by imprinting and similar techniques (Andersson, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000 Aug 4;745(1):3-13; Bruggemann *et al*, *J Chromatogr A.* 2000 Aug 11;889(1-2):15-24; Haupt & Mosbach, *Trends Biotechnol* 1998 Nov;16(11):468-75).

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-10-

It is preferred is the second moiety is a lectin. Lectins are carbohydrate-binding proteins of plants and animals with a wide variety of specificities for carbohydrates, (Lis *et al*, *Ann. Review of Biochemistry*, **42**, 541 (1973); Goldstein & Hayes, *Adv. in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 35, Tipson and Horton, eds. 5 (Academic Press, New York, 1978, pp. 128-341). For example, ConA, a Jack Bean lectin, has specificity for α -D mannopyranose and α -D glucopyranose; soybean lectins are specific for α - and β -D-N-acetylgalactosamine and α -D-galactose units, and wheat germ lectin is specific for β -D-N-acetyl glucosamine. Another lectin that may be used 10 in the present invention is the pea (*Pisium sativum*) lectin. In a preferred embodiment, the second moiety is a lectin, and the first moiety is a gel-forming macromolecule which binds to the lectin and which may be a carbohydrate polymer, preferably containing glucose, fructose or mannose moieties, such as branched starches, dextrans, mannans, and levans, or synthetic carbohydrates such as ficoll-400, a synthetic 15 polysucrose, or a synthetic polymer with pendant carbohydrate or sugar moieties.

In one embodiment, blue dextran is used (Sigma). This is available in two molecular weights (40 K and 2 M), and comprises dextran covalently bonded to reactive blue. Each dextran molecule has many dye moieties bonded to it, and the molecule is blue 20 and has free amine groups from the dye which are available for coupling. When coupling is done with blue dextran, the product is blue. This provides a qualitative and quantitative assessment of the success of coupling.

The first and second moieties may be provided in the form of a copolymer. This may 25 be made by polymerising prepared derivatives of the first and second moieties. At its simplest, this can make a linear polymer bearing both moieties. Any type of polymer backbone produced by any relevant polymerisation technique is suitable for use in this embodiment of the present invention.

30 In a second aspect, the invention provides a gel composition comprising first and second gel-forming moieties which bind reversibly to one another to form a gel,

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-11-

wherein said binding is sensitive to the level of an analyte, and the gel-forming moieties are copolymerised.

5 In one embodiment, the methacrylate derivatives of concanavalin A and dextran (synthesised first from the raw lectin and polysaccharide, using a reaction with methacrylic anhydride) are polymerised to make an acrylic backbone polymer, carrying the concanavalin A and dextran as pendants (see Figure 1).

10 Dextran is capable of methacrylate derivatisation (i.e. in the pre-polymerisation stage with methacrylic anhydride) at many points along its length, the number depending on conditions, since each hydroxyl group of every glucose unit in the dextran chain, is potentially susceptible to methacrylation. Accordingly, dextran moieties can permanently cross link the linear copolymer, producing a range of three-dimensional networks simply because it can start forming polymer chains at any point at which it has a methacrylate modification. Unless the degree of cross linking is very high, the
15 ensuing products are likely to be flexible and gelatinous because of the length and mobility of dextran. Concanavalin A can also be multi-methacrylated, but because this molecule is globular, the product may be an aggregate and not a gel in which flexible networking extends throughout (see Figure 2).

20 The fundamental character of products made by a polymerisation process such as the one described above is hydrophilic, but, in cases where the polymerisation product becomes too large and complicated to remain soluble, the product merely swells in water and does not form a solution (soft contact lenses are made from a non-derivatised version of such an acrylic). The permanent links dictate the major characteristics of the
25 product in terms of its viscoelastic qualities, and so those products which have less derivatisation of the dextran and concanavalin A (for example) will be viscous liquids, while those which have extensive modification and thus allow complicated cross linking, will be solid hydrogels.

30 However, the interactive ligands are able to connect across the polymer chains non-covalently producing temporary bonding additional to any permanent bonds made during polymerisation (see Figure 2). It is these which are crucial in terms of the

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-12-

reversible binding of the gel because, when in contact with the analyte, e.g. free glucose, the temporary bonds will be dismantled. When this happens, there will be a change in the properties of the product and it will become more permeable, as the notional pores throughout the lattice open up and leave only the permanent cross links.

5 If the derivatisation and consequent permanent cross linking of the gel has been appropriately low, a viscous liquid can result when all of the permanent and temporary linking is in place. When the analyte is added, this liquid will lose viscosity and, because the reaction is reversible, this gel-sol change can be dependent on the concentration of analyte that has diffused into the gel.

10

Where the first and second gel-forming entities are not copolymerised, each component is multivalent in order that a three dimensional network or matrix results (and at least one component must have a valency greater than two, since two divalent interactants produce a linear arrangement). This is illustrated in Figure 3.

15

In a gel comprising lectin and dextran which are not attached to one another or to other particles, the lectin is in its naturally tetravalent form which can dissociate into stable dimers at some pH values. These dimers are obviously smaller and are at a greater risk of loss from the gel. The combination of the tetravalent concanavalin A and the multivalent (branched) dextran produces a gel, which consists of a three dimensional network stabilised with only temporary bonds. However, the components can gradually leach away when in the sol state: phase separation may not be obvious but may contribute to progressive loss of action after several cycles.

20

25

However, when the interactive components are copolymerised or attached to particles, each component could be monovalent, and this would still form a gel, as illustrated in Figure 4. Accordingly, the gel of the present invention does not require first and second gel-forming moieties which are multivalent. In a preferred embodiment, lectin dimers (or tetramers stabilised by binding onto the framework) can be used. Dextran may be substituted with a variety of other glucose bearing entities, including simple pendant glucose. However, single pendant glucose may reduce the flexibility of the resulting gel and in fact, some permanent cross linking with dextran might be remain

30

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-13-

useful to give flexibility and prevent leaching away in the sol phase. This is shown in Figure 5.

As mentioned, the second moiety may be an antibody. Antibodies can be prepared and purified from animals in standard fashion (Eisen, H. N. "Immunology", Harper & Row, 1974), and have the advantage of being inducible in an animal by challenge with an appropriate antigenic agent. Since this agent can be chosen from any chemical family e.g., amino acids, carbohydrates, their respective polymeric derivatives, or the like, the resulting antibodies may have a wide range of binding specificity and affinity.

Polyclonal antibodies can be raised by stimulating their production in a suitable animal host (e.g. a mouse, rat, guinea pig, rabbit, sheep, goat or monkey). Monoclonal antibodies can be produced from hybridomas. These can be formed by fusing myeloma cells and spleen cells which produce the desired antibody in order to form an immortal cell line. This is the well known Kohler & Milstein technique (*Nature* **256** 52-55 (1975)). Techniques for producing monoclonal and polyclonal antibodies which bind to a particular protein are now well developed in the art. They are discussed in standard immunology textbooks, for example in Roitt *et al*, *Immunology* second edition (1989), Churchill Livingstone, London. In addition to whole antibodies, the present invention may use derivatives thereof, including antibody fragments and synthetic constructs. Examples of antibody fragments and synthetic constructs are given by Dougall *et al* in *Tibtech* **12** 372-379 (September 1994). Antibody fragments include, for example, Fab, F(ab')₂ and F_v fragments (see Roitt *et al* [supra]). F_v fragments can be modified to produce a synthetic construct known as a single chain F_v (scF_v) molecule. This includes a peptide linker covalently joining V_H and V_L regions which contribute to the stability of the molecule.

Other synthetic constructs include CDR peptides. These are synthetic peptides comprising antigen binding determinants. Peptide mimetics may also be used. These molecules are usually conformationally restricted organic rings which mimic the structure of a CDR loop and which include antigen-interactive side chains. Synthetic constructs include chimaeric molecules. Thus, for example, humanised (or primatised) antibodies or

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-14-

derivatives thereof could be used. An example of a humanised antibody is an antibody having human framework regions, but rodent hypervariable regions.

5 An example of a suitable antigen and antibody is angiotensin (Peeters, *et al*, *J Immunol Methods* **120** (1 1989): 133-43) and an anti-angiotensin antibody (available from Sigma, for example). A gel formed by these would be responsive to free angiotensin, which is involved in hypertensive crises. Thus, the gel could be used to monitor levels of free angiotensin and/or govern the release of angiotensin conversion enzyme (ACE) inhibitors, such as enalapril, which would treat the hypertensive crises, avoiding the
10 need for continuous medication.

Some hormone-dependent tumours are treated with hormone antagonists like tamoxifen and cyproterone. The automatically-regulated delivery of such drugs in response to endogenous hormone peaks might offer an alternative to either their blanket use, which
15 is strongly linked to toxic effects, or to the use of agents such as goserelin (which interfere with natural feedback in hormone biosynthesis and can paradoxically increase symptoms by doing so). Thus, a gel formed from testosterone and anti-testosterone antibody (Miyake, *et al*, *Chem Pharm Bull* **38** (4 1990): 951-5) could be used to deliver cyproterone for prostate cancer.

20 Another example is morphine and anti-morphine antibody (Kussie, *et al*, *J Immunol* **146** (12 1991): 4248-57) which could be used to deliver a morphine antagonist in response to influxes of exogenous morphine-like substances, such as heroin, in default of addiction therapy.

25 The gel of the first and second aspects of the invention may be provided in combination with a semi-permeable or permeable membrane. Suitable membranes may be of the dialysis type, e.g. with molecular weight cutoffs of 10K-500K or may be microfiltration type membranes, e.g. with pore sizes of 0.025 to 0.1 μm which may be of cellulose or
30 polycarbonate. The former membranes are preferred when the gel of the present invention is used as a sensor and the latter are preferred when the gel is used in a drug delivery system.

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-15-

5 The gel-sol transition of the gel composition of the first and second aspects of the invention in response to raised levels of the analyte can be used to release a drug, preferably which acts to lower levels of the analyte. Thus, according to a third aspect of the invention, there is provided a drug delivery system comprising a gel composition in accordance with the first or second aspects of the invention and a drug, the drug being contained either (a) within the gel composition or (b) in a reservoir with the gel composition forming a barrier between the reservoir and the area to which the drug is to be released.

10 In the third aspect, "drug" is intended to mean any active agent, the delivery of which has a desired therapeutic or prophylactic effect.

As mentioned previously, the binding of the first and second gel-forming moieties, and hence the viscosity of the gel composition, is sensitive to the level of an analyte. This change in viscosity can be used to control the permeability of a solute within it. Thus, gel compositions of the present invention can form a closure to a reservoir or container containing a drug. Release of the drug from the container is governed by the viscosity of the gel, i.e. the level of the analyte. Alternatively, the drug can be contained within the gel itself. It is preferred if the gel composition is sensitive to glucose (e.g. a ConA/dextran-based gel) and the drug to be released is an anti-hyperglycaemic drug such as insulin. It is also possible for a glucose-sensitive gel to be used to control the release of any drug, the release of the drug being controlled by the administration of glucose to the patient.

25 When the drug delivery system of the present invention is used to deliver insulin, it is preferred if it is used intraperitoneally because this allows glucose to reach the system quickly and for insulin to be released quickly, than say if the system were used subcutaneously. In addition, peritoneal fluid has a glucose level which mirrors blood glucose levels. That is not to say that the system cannot be used subcutaneously or even externally – the location should be selected so as to suit the condition to be treated and the drug to be released.

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-16-

According to another aspect of the invention, there is provided a sensor for detecting the level of an analyte, the sensor comprising a gel composition in accordance with the first or second aspect of the invention and means for detecting the viscosity of the gel.

- 5 The change in viscosity of the gel compositions of the present invention in response to altered levels of analyte means that they can be used to monitor analyte levels.

The viscosity of the gel may be detected in the manner described in DE-A-4203466, Ballerstadt & Schultz, *Sensors and Actuators B Chemical*, (1998), 46: 557-567, DE-A-
10 4034565 or WO99/48419.

In order to be able to monitor changes in analyte levels in close to real time, the analyte must be able to diffuse easily through the gel composition and, when present, the membrane. As mentioned previously gel compositions of the present invention allow
15 this without escape of the gel components. In order to increase response times further, it is desirable to detect the viscosity of a very thin (e.g. 4 mm or less, preferably 0.1-2 mm, although a monolayer is also contemplated within the invention) layer of gel. In such instances, it is particularly important to prevent loss of gel.

- 20 According to a further aspect of the invention, there is provided a method for the production of a gel composition of the first aspect of the invention, the method comprising:

causing first and/or second gel-forming moieties to become attached to cross-linked particulate entities, the first and second gel-forming moieties being capable of
25 binding reversibly to one another to form a gel, wherein said binding is sensitive to the level of an analyte, and the interstices between the entities allow gel-sol and sol-gel transformation, and yet are not so small that the analyte cannot diffuse therethrough.

- In a still further aspect, the invention provides a pharmaceutical composition for
30 transdermal administration of an active agent, the composition comprising a carrier which either (a) contains the active agent or (b) forms a barrier between the active agent and the area to which the active agent is to be released, wherein at least a part of

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-17-

the carrier is digestible by one or more skin enzymes such that the active agent is released from the composition by the action of said enzymes.

5 The invention also provides (a) the use of such a composition in medicine, (b) the use of such a composition in the manufacture of a medicament for transdermal administration of an active agent, and (c) a method for administration of an active agent, comprising applying to the skin of a patient in need of such administration such a composition.

10 In this aspect of the invention, a therapeutic agent can be released variably but in a controlled manner: the intensity of medication is appropriate for the seriousness of the symptoms appertaining at the time, the trigger for increased release being a function of the skin condition. The composition is particularly useful for releasing a drug used in the treatment of skin diseases, particularly inflammatory skin diseases, which are
15 known to be of an inconstant nature and have sequelae of under- and over-mediation using acknowledged drugs. For example, in the course of psoriasis, psoriatic stratum corneum may be more permeable when quiescent than in its thickened plaque state (Tang, *et al.* (1999). *Clin Pharmacokinet* 37(4): 273-87). Therefore, relying on healing to slow uptake in this case is not a useful mechanism for self-adjustment of dose in
20 psoriasis. Thus, a control system based on output from the formulation comprising the drug is in general considered superior to one that relies on a physiological uptake mechanism.

The active agent is not covalently attached to the carrier, and the carrier merely acts to
25 contain (i.e. the active agent is dispersed within the carrier) or restrain (i.e. the carrier forms a barrier to the release of the active agent) the active agent. This arrangement has the advantage that it is widely applicable to a number of potential drugs because it does not require any covalent modification of the active agent, however minor.

30 The carrier may comprise cross-linked particulate entities as defined above with a linear or possibly branched polymer bonded to them so that each entity has a fringe of polymer. The interstitial regions between the particulate entities are occupied by the polymer, providing a rheologically-active medium for drug diffusion. As discussed

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-18-

above, these regions have the ability to transport drugs through them relatively unhindered compared to gels made with homogeneously meshed linear polymers. The polymer affects the viscosity of these interstitial regions, reducing the diffusion coefficient of free drug compared with interstitial regions without polymer. The action of skin enzymes digest the polymer and thus raise the diffusion coefficient of the drug held in the formulation. Preferably, the polymer has vulnerable points at many places in its structure so that the long chain is broken into small fragments if the enzymes are present. Carbomer itself is quite resistant to enzyme activity and in its native state is actually protective towards proteins vulnerable to proteolysis (Hutton, *et al.* (1990). *Clin Sci (Colch)* **78**(3): 265-71; Luessen, *et al.* (1995). *Pharm Res* **12**(9): 1293-8; Walker, *et al.* (1999). *Pharm Res* **16**(7): 1074-80). Its stability can maintain a minimum viscosity appropriate to a non-drip dermatological preparation, even when enzymes actively affect the polymer, but its protective effect lessened due to the modification of the surface.

Clearly, the selection of the polymer depends on the ability of skin enzymes to degrade it to release the active agent. Polymers or molecules which are degraded by one or more of the following skin enzymes can be selected by those skilled in the art: elastase (Chandler, *et al.* (1996). *Biochem Biophys Res Commun* **228**(2): 421-9) which is a lysosomal proteinase responsible for the breakdown of elastin fibres in the ageing process, but also found in psoriasis; SCCE or stratum corneum chymotryptic enzyme (Ekholm & Egelrud (1999). *Arch Dermatol Res* **291**(4): 195-200), a serine protease known to participate in surface cell shedding and to be implicated in psoriasis; and LTA4 hydrolase which can produce the abnormal leukotriene LTB4 from LTA4, a process also observed to occur in psoriasis. These three enzymes have esterase and/or amidase activities which are not necessarily specific for their original physiological substrates. It has been shown (Higuchi, *et al.* (1988). *Inflammation* **12**(4): 311-34) that crusts formed in experimental lesions are rich sources of proteases and they have also been found in sweat (Horie, *et al.* (1986). *Am J Physiol* : R691-8). Furthermore, stratum corneum thiol protease (SCTP) is a cysteine protease recently found in the upper regions of stratum corneum. It is gelatinolytic as measured by zymography and functions best at the slightly acidic pH of the skin (Watkinson, (1999). *Arch Dermatol Res* **291**(5): 260-8). Collagenases belong to the metalloprotease (MMP) enzymes

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-19-

which control collagen turnover in connective tissue, organ tissue, bones and cartilage among other locations. They are important in normal and abnormal skin including the healing of wounds (Simeon, *et al.* (1999). *J Invest Dermatol* **112**(6): 957-64). A subset, type IV, the gelatinases MMP-2 and MMP-9 plus their specific inhibitors, are found in the dermis and epidermis, often associated with the keratinocytes and the Langerhans cells for which they modulate cell migration within the matrix during skin function (Kobayashi, Y. (1997). *Immunology* **90**(4): 496-501; Makela, *et al.* (1999). *Exp Cell Res* **251**(1): 67-78). The proteolytic activity is well understood (Seltzer, *et al.* (1990). *J Biol Chem* **265**(33): 20409-13; Seltzer, *et al.* (1989). *J Biol Chem* **264**(33): 19583-6) but the role in disease less so. There is some confusion in the technical literature about the detail but there are always raised levels of MMPs, m-RNA and their natural inhibitors in inflammatory skin diseases (Feliciani, *et al.* (1997). *Exp Dermatol* **6**(6): 321-7; Buisson, *et al.* (2000). *J Invest Dermatol* **115**(2): 213-8; Fleischmajer, *et al.* (2000). *J Invest Dermatol* **115**(5): 771-7). Faults in the construction of the psoriatic dermal-epidermal have been attributed to the overexpression of the enzyme and the enzyme has also been found in keratinised layers near the surface. In psoriasis, gelatinase may be raised in those skin areas that are particularly involved.

Preferably, the polymer is selected from soluble synthetic homo- and co-polymers of amino acids (i.e. synthetic polypeptide analogues), mucin, collagen and gelatin. These all contain amine groups so that the attachment of polymer to the carbomer carboxylate groups can be accomplished using a standard carbodiimide method, but could also form Schiff base conjugates. Chitosan, a biodegradable polysaccharide may also be used.

Soluble synthetic homo- and co-polymers of amino acids need hydrophilic groups, such as pendant amines, hydroxyls and carboxylates, to have solubility. These compounds, such as e.g. polyaspartate and polyglutamate, can be viscous at high molecular weight. Some have previously been used in drug delivery (Singer, *et al.* (2000). *Ann N Y Acad Sci* **922**(136): 136-50; Yi, *et al.* (2000). *Pharm Res* **17**(3): 314-20) but are very expensive.

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-20-

Mucin is a glycoprotein with a substantial viscosity and can be purchased (Sigma) in various degrees of purification: Type I (the purest with 12% bound sialic acid), type II and III (progressively more crude and each with 1% sialic acid).

- 5 Collagen and gelatin have a number of favourable characteristics, including a relevance to skin collagenases as discussed above. Collagen itself is expensive, and therefore it is currently preferred to use its cheaper derivative, gelatin.

- 10 Gelatin is a soluble proteinaceous derivative of collagen. It has well known rheological properties such that it is free flowing and viscous above a critical temperature (which in some grades is around 36°C), and an elastic solid below this temperature, provided the concentration is high enough. It is not toxic and has been used in topical preparations, at least in experimental and development work as well as for buccal application, rectal use, dermal injections, as deep wound dressings and as an iv plasma expander. Some
15 gelatin is of bovine origin and carries theoretical risks of prion contamination but there are alternative sources. The World Health Organisation has dictated that pharmaceuticals containing gelatin should be made from supplies from BSE-free countries (WHO/EMC/DIS/96.147).

- 20 Like the parent collagen, gelatin contains seven main amino acids (plus several others in small percentage). The molecular arrangement is unusual because of the proline twist which promotes the formation of the triple helix structure in collagen. Four of the main amino acid residues contain hydrophilic pendants to which covalent attachments can be made. The availability of groups makes gelatin suitable for interstitial fringes as
25 described above. Indeed, it can be bonded to a carbomer via the terminal amine groups in lysine and hydroxylysine and arginine residues. Gelatin is degraded by collagenases as well as a variety of other proteases, including some chymotrypsins and elastases. The liquefaction of a gelatin substrate is used to indicate chymotrypsins in stool tests for cystic fibrosis and for the identification of certain bacteria.

- 30 Active agents that can be used in this aspect of the invention for the treatment of psoriasis include:

- salicylic acid, tars, dithranol (anthralin)

WO 03/006993

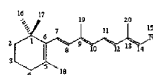
PCT/GB02/03183

-21-

- steroids, vitamin D analogues, retinoids (vitamin A analogues)
- psoralens, methotrexate, ciclosporin (cyclosporin)

Steroids such as mometasone and fluticasone are often prescribed alone or in combination with retinoids such as tazarotene or with vitamin D analogue calcipotriol. Steroids, vitamin D analogues and more recently, retinoids, have been marketed for some years as straightforward topical applications such as ointments, creams and gels. Patients have a preference to these treatments over tars and dithranol because they are at least as effective and easy to use (Poyner, *et al.* (2000). *J Eur Acad Dermatol Venereol* **14**(3): 153-8). The following will focus on the retinoids which may have particular appeal as discussed below, but this aspect of the present invention is all three of the above groups.

Retinoids form a group of compounds of which vitamin A compounds form a subgroup and have the biological activity typified by the alcohol retinol. Retinol (1) itself is metabolised reversibly to retinaldehyde (retinal) (2) and thence to the non-vitamin A but therapeutically active, retinoic acid (3)



- | | |
|--|---|
| (1) R = CH ₂ OH | (6) R = CH ₂ NH ₂ |
| (2) R = CHO | (7) R = CH=NOH |
| (3) R = CO ₂ H | (8) R = CH=N[(CH ₂) ₄]CHNH ₂ CO ₂ H |
| (4) R = CH ₃ | (9) R = CO ₂ C ₂ H ₅ |
| (5) R = CH ₂ OCOCH ₃ | (10) R = |

20

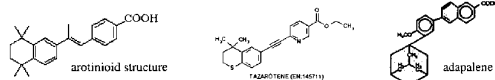
The retinoid nomenclature is often stretched to include other biologically related materials such as the arotinoids, of which the recently introduced agent tazarotene is a further modified analogue, used for treatment of psoriasis. Adapalene is pharmacologically similar but structurally distant.

25

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-22-



The retinoids are important in the transmission of visual signals, and in the growth and differentiation of cells. The stereochemistry of these compounds importantly involves the polyphenoid side chain that can be all-trans or exhibit various cis isomerisations. Chiral centres also exist in the ring at the 1 and 3 positions. The stereochemistry is important for some of the biological activity of retinoids. In the mammalian retina, for example, the protein rhodopsin, is reversibly transformed by light as its aldehydic chromophore retinal converts between the all-trans and 11-cis forms.

In the skin, some retinoids, including retinoic acid isomers (Vahlquist, (1999). *Dermatology* 1(3): 3-11) and their relatives, activate particular nuclear receptor types in keratinocytes, some of which may be stereosensitive, triggering gene expression. This has at least three effects including the production of mRNA and protein pertinent to receptor induction, proliferation of epidermis and changes in the keratinisation processes (Didierjean, *et al.* (1999). *Exp Dermatol* 8(3): 199-203). The mechanism of action of these and related compounds in the treatment of psoriasis is, however, not clear (Saurat, (1999). *J Am Acad Dermatol* : S2-6) and the evidence is somewhat paradoxical. First, there is apparently no correlation between the observed binding to the receptors and therapeutic activity such that acetretin activates receptors without binding while tazarotene shows differential binding to three receptor subtypes. This may be a temporary confusion resulting from the variations within the three receptor subsets. The second puzzle is that lesions already show increased retinoic acid (isotretinoin) formation (Arechalde & Saurat (2000). *Biodrugs* 13: 327-333), yet orally this compound and acitretin (an ester) work well and have been shown to control cell differentiation and sequential metaplastic changes. Recent work points to a decreased mRNA expression in lesional skin following receptor activation (Torma, *et al. Acta Derm Venereol* 80(1): 4-9), possibly partially explaining this finding. Oral isotretinoin and acitretin (a recent replacement for etretinate) have been used for more than two decades to treat psoriasis but involve a significant list of contraindications and

- precautions. The application of retinoic acid topically is used to treat acne and not listed in the BNF for antipsoriatic activity. However, the introduction of tazarotene (Tang, *et al.* (1999). *Clin Pharmacokinet* 37(4): 273-87) for this indication shows that it may feasible to use other retinoids topically for psoriasis, despite the receptor subset
- 5 specificity claimed for tazarotene, which also has an excellent safety profile (Marks, R. (1998). *J Am Acad Dermatol* : S134-8). However, it is reported that new receptor subset-specific retinoids are under development possibly as an antidote to the mucocutaneous toxicity of oral isotretinoin (Nagpal & Chandraratna (2000). *Curr Pharm Des* 6(9): 919-31). Rosacea (Vienne, *et al.* (1999). *Dermatology* 1(53): 53-6)
- 10 and photodamage (Katsambas & Katoulis (1999). *Adv Exp Med Biol* 455(477): 477-82; Sorg, *et al.* (1999). *Dermatology* 1(13): 13-7) may also respond to topical retinoids, while retinoids delivered topically may protect skin against the atrophic effects of topical steroids (McMichael, *et al.* (1996). *Br J Dermatol* 135(1): 60-4). The applications extend as tazarotene is also used for acne, as is adapalene.
- 15 Locally applied retinoic acid is less toxic than oral retinoids but nevertheless produces irritation and erythema. However, use of the aldehydic prodrug retinal, has been reported as particularly attractive because it is less aggravating and exerts its effects by conversion within keratinocytes, to active species, after which receptor interaction occurs (Didierjean, *et al.* (1999). *Exp Dermatol* 8(3): 199-203; Sorg, *et al.* (1999).
- 20 *Dermatology* 1(13): 13-7). Much is esterified and acts as a storage reservoir. The remainder is metabolised to small quantities of bioactive alcohol and acid forms. The latter occurs at a rate dependent on the oxidation capability of cells, which itself is related to the differentiation and thus possibly overt disease status of the cell population (Sorg, *et al.* (1999). *Dermatology* 1(13): 13-7). In terms of biological results, the all-
- 25 trans retinal, which is metabolised to the all-trans retinoic acid (tretinoin) was found superior to a 9-cis analogue, which is likely to have formed the corresponding retinoic acid isomer (Didierjean, *et al.* (1999). *Exp Dermatol* 8(3): 199-203).
- The retinoids are known to be teratogenic. Retinoids are ubiquitous signalling
- 30 molecules and their deficiency and inappropriate availability both cause developmental faults. A variety of effects has been documented including craniofacial, limb and nervous system defects (Kubota, *et al.* (2000). *Eur J Pediatr Surg* 10(4): 248-51). The major risks may be for oral preparations but cannot be ignored for topicals, although

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-24-

tests with an animal model have used many times the topical concentration of isotretinoin without harm to the foetus.

The retinoids are in formulated products as follows:

5

Tigason	(Roche)	etretinate		Discontinued
Neotigason	(Roche)	acitretin		10mg oral
Roaccutane	(Roche)	isotretinoin	(13-cis retinoic acid)	5mg oral
Isotrex	(Stiefel)	isotretinoin		0.05% gel (for acne)
Retin A	(Janssen-Cilag)	tretinoin	(all-trans retinoic acid)	0.01% gel (for acne)
				0.025% cream (for acne)
				0.025% lotion (for acne)
Retinova	(Janssen-Cilag)			0.05% cream (for acne)
Zorac	(Bioglan)	Tazarotene		0.05% gel (for acne and psoriasis)
				0.1%
Differin	(Galderma)	Adapalene		0.1% gel (for acne)

The retinoids are very hydrophobic compounds. The water solubilities at room temperature and pH 7.3 buffer (with antioxidants) are documented as follows (Szuts &

10 Harosi (1991). *Arch Biochem Biophys* **287**(2): 297-304):

retinol	0.06 μ M
retinal	0.11 μ M
retinoic acid	0.21 μ M

i.e. they lie between 0.000002 and 0.000006%w/v.

15

When used in this aspect of the invention, there must be sufficient water solubility of the drug to make it feasible to deliver an effective dose. The solubility figures above imply for example that the 0.01%w/v tretinoin gel in the list must contain a co-solvent. Retinoid preparations such as Isotrex and Acticin contain ethanol while others such as

20 Differin contain propylene glycol and poloxomer, all in conjunction with gelling polymers such as hydroxypropylcellulose and carbomers. Alternatives are to formulate

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-25-

the gel with surfactants, such as the polysorbate 40 in Zorac and the technical literature shows complexation of retinoic acid with cyclodextrin for iv administration and other uses (Botella, *et al.* (1996). *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis* **14**: 909-915; Lin, *et al.* (2000). *J Clin Pharm Ther* **25**(4): 265-9). A liposomal or similar
5 lipid aggregate component could also function in a gel to increase the colloidal dispersed concentration (Li, *et al.* (1999). *Photochemistry And Photobiology* **69**: 500-504).

Thus, in accordance with one embodiment of this aspect of the invention, a carbomer-gelatin conjugate can be used to deliver a retinoid in a skin enzyme-dependent manner.
10 The retinoid may be conventional tretinoin, tazarotene or retinal, which is an inactive prodrug converted *in situ*. All of these have low solubility but may be solubilised in cosolvents, surfactants or liposomes.

Retinal and retinoic acids (isotretinoin and tretinoin) have groups which allow their conversion to conjugates. This can not only increase their water solubility but provide an enzyme-dependent release which could be used *per se* or alternatively in tandem
15 with a pharmaceutical composition for transdermal administration of an active agent as described above.

20 In a still further aspect of the invention, there is provided a composition comprising a carrier which is covalently bonded to an active agent, wherein the bond between the carrier and the active agent is digestible by one or more skin enzymes, for use in medicine, in particular for transdermal administration of the active agent.

25 The invention also provides a method for administration of an active agent, comprising applying to the skin of a patient in need of such administration a composition comprising a carrier which is covalently bonded to an active agent, wherein the bond between the carrier and the active agent is digestible by one or more skin enzymes

30 In this aspect of the invention, the active agent is covalently bonded (directly or indirectly) to the carrier. Enzymes making contact and mixing with the composition must be capable of cleaving this agent-carrier conjugate to release the medication. The

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-26-

- conjugates can be considered to be prodrugs that undergo activating metabolism outside rather than inside the skin. The carrier could be one of a variety of polymers currently used in dermatological formulation, and it is preferable that the composition is single phase and aqueous. Polymers such as carbomer, polyvinylpyrrolidone or
- 5 cellulose derivative, for example, with linear or more involved construction dissolve in an aqueous medium to give suitable properties. The connection between the drug and polymer may be direct or indirect. In the latter case, the connection may be via a bridging molecule. This molecule may also be polymeric in which case enzymes can release the drug by attacking bonds in the bridge. The molecule may be a peptide or
- 10 polypeptide. Polymer bridges can be used to introduce enzyme specificity in conjugates used systemically. In either case, many drug molecules can be attached to various parts of the polymer structures, provided of course that the drug is undamaged by the conjugation and cleavage.
- 15 Such conjugates are known but do not appear to have been used for transdermal administration before. Schiff's base conjugates with retinal have been studied in an attempt to elucidate how rhodopsin operates as an optically-activated neurotransmitter. Thus, retinal conjugated with dextran, polylysine, polyethylene glycol have been described as water soluble conjugates, while Schiff base conjugates of retinal with
- 20 phosphatidylethanolamine and with alkylamines produced micellised aggregates (De Pont, *et al.* (1969). *Exp Eye Res* **8**(2): 250-1; Adams, *et al.* (1974). *Exp Eye Res* **18**(1): 13-7; Pitha, *et al.* (1980). *J Natl Cancer Inst* **65**(5): 1011-5; Freedman, *et al.* (1986). *Photochem Photobiol* **43**(3): 291-5; Singh, *et al.* (1990). *Biochim Biophys Acta* **1036**(1): 34-40; Viguera, *et al.* (1990). *J Biol Chem* **265**(5): 2527-32). Such conjugates
- 25 could therefore confer useful water solubility.

Preferred features of this aspect of the invention are as for the pharmaceutical composition for transdermal administration of an active agent described above.

- 30 Preferred features of each aspect of the invention are as for each of the other aspects *mutatis mutandis*. The prior art documents mentioned herein are incorporated to the fullest extent permitted by law.

The invention will now be described further in the following non-limiting examples.

Examples

5 *Introduction*

Formulations of concanavalin A (con A) and dextran have been shown previously to be glucose sensitive. Con A is a protein with a glucose receptor in each of the subunits contributing to the structure. The protein is dimeric below pH 5.8 but tetrameric
10 between pH 5.8 and 7.0, above which point it begins to form larger aggregates. The receptors accommodate free glucose but also terminal glucose units on polysaccharides such as dextran. Because dextran is multivalent in its complement of such terminals, an admixture with the lectin produces complex structures which can be either a precipitate or gelatinous. The structures are destabilised by the addition of free glucose
15 which competes for occupation of the receptor sites. Under circumstances where glucose is added to a gelatinous formulation of the mixture, the viscosity falls sharply but is regained if glucose is dialysed out. This mechanism forms the basis of a delivery device for hypoglycaemic agents such as insulin which would diffuse more slowly through the gel if ambient glucose levels were low but could be triggered into a higher
20 delivery rate if the viscosity was reduced by contact with glucose.

A problem with this design is the tendency of the components to leach away from the gel. The components are water dispersible when the gel becomes dismantled and some means is required by which the sol form is stabilised to prevent loss from the
25 formulation but which will not prevent the viscosity change upon which the design depends. In the following, the lectin was exposed to a procedure to bond it covalently to commercially-produced carbomer types Carbopol 974 and 934 (referred to as C974 and C934). These materials are polyacrylic acid derivatives which have been three-dimensionally cross-linked to produce gelatinous, but particulate, entities, each with a
30 molecular weight of several billion. The bonding has been done with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC), which operates to give a temporary intermediate structure between the EDAC and a carboxyl moiety (in this case from the carbomer sites (see Figure 6)). The intermediate can then bond with

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-28-

amine groups, such as are found in proteins including con A at terminal and lysine sites. This results in the formation of an amide linkage and the loss of the EDAC residue. The con A can become effectively conjugated with the carbomer such that the surface of the carbomer particles becomes permanently coated with lectin.

5

The carbomers C934 and C974 differ from many polymeric gels in that, although they are both cross-linked, neither is an integral structure. Each hydrated particle is in effect a discrete hydrogel and interstitial aqueous regions separate it from neighbouring particles. This means that large molecules like insulin can diffuse through a carbomer gel of this type more rapidly (Fig 7a) than through gels made from linear polymers (including linear carbomer types) or through regular hydrogels. In both the latter, the obstructions are greater since physical and chemical entanglements respectively occur throughout the structures and could well be rate-determining for insulin transport.

10

15

Reagents

Carbopol 974 (C974), Carbopol 934 (C934) BF Goodrich
EDAC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride], Sigma
MES [2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], Sigma
PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4 & 5.9)

20

NaOH (pellets and 1M solution), Fisher Scientific
dextran (RMM 2 000 000), Sigma
sodium azide, Sigma
concanavalin A, Sigma
distilled water

25

1M HCl (hydrochloric acid), BDH

Example 1 – Production of gel and measurement of viscosity

A 1%w/w carbomer dispersion was made in 0.1M MES buffer, adjusted to neutral and stirred until clear. Con A was then added to this such that the final concentration was also approximately 1% w/w and the pH kept at neutral. The system was then conjugated using 50mM EDAC, the reaction being quenched after stirring for three hours at room temperature by diluting with PBS at pH 5.9 and centrifuging washings from the partially-dehydrated carbomer conjugate until washings revealed no further

30

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-29-

- con A in the supernatant. The total protein removed was calculated by assaying bulked and filtered washings at 276nm. The coupling efficiency was greater than 90%. A 1 g quantity of a 20%w/w dextran D2M (mw 2 million) solution in PBS (pH 7.4, preserved with 0.01% sodium azide) was then added to the neutralised carbomer- con A
- 5 conjugate and mixed thoroughly. The final product therefore contains 200mg each of carbomer and dextran D2M. The pH of the gel was then adjusted to 7.4 using 1M NaOH and a stiff, glucose responsive gel results. The final weight is slightly variable, depending on the final pH adjustments and the contents are calculated accordingly.
- 10 Both C974 and C934 were conjugated in this way and subjected to viscosity testing in the presence of varying concentrations of glucose. The viscosity measurements were obtained using a Haake Rheostress RS75 cone and plate viscometer in continuous rotation mode where rate of shear was ramped between 0 and $5s^{-1}$. The viscosity values corresponding to a shear rate value of $5s^{-1}$ were used to compare the gels at the glucose
- 15 concentrations between 0 and 5%w/v. The gels were compared at 20°C and the C934 product was also measured at 37°C.

The conjugates produced from the particulate carbomers, C974 and C934, were calculated to have compositions as follows:

20

	<i>C934 (formula code E100)</i>	<i>C974 (formula code E87-5)</i>
Carbomer	2.6%w/w	2.7%w/w
Dextran D2M	2.6%w/w	2.7%w/w
Con A	2.4%w/w	2.5%w/w

- The formulations were rather opaque in comparison with the extreme clarity of carbomer gels from which they are derived. The protocol in which the con A was added in the presence of excess EDAC is likely to have produced a variety of products
- 25 which might include strings of lectin added to the carbomer. This is because con A also has carboxyl groups which are vulnerable to the action of EDAC. However, this method gave a result in which the con A was bonded in high proportion and it was used

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-30-

in preference, at this stage, to one in which the carbomer-EDAC reaction was quenched prior to adding the con A.

5 In terms of assessing the performance of the formulations, it is useful to compare these products with simple aqueous combinations of dextran 2DM and con A without carbomer. However, a direct analogy was not possible, because 2.5% con A forms only precipitates with low concentrations of dextran in carbomer free aqueous admixtures. Accordingly, 2.5% con A was combined with 10%w/w D2M to form a low viscosity gel. This concentration of dextran in the presence of carbomer gave too
10 viscous a product to be useful in the study and the dextran content in them is about 3%w/w.

Figure 8 shows that the addition of glucose produces a progressive drop in the viscosity of the aqueous formulation mainly over the glucose concentrations 0-0.5%w/w
15 (highlighted on the graph), which is a range relevant for the design of products useful in the control of diabetes mellitus. The response is dependent on the stoichiometry of the displacement mechanism described above and is therefore a function of the relative concentrations of dextran and glucose. It is this response which it is important to conserve.

20 The results in Figure 9 show a drop in viscosity over a similar glucose range to the aqueous formulation, demonstrating that glucose sensitivity has been imposed on the carbomer particles. However, the baseline viscosity levels, at which the lectin-dextran linkages have been reversed with glucose, are much higher when carbomer is present
25 because of the viscosity of this polymer.

Figure 9 also indicates that the addition of dextran and con A has raised the viscosity of the glucose-free product by a much greater amount in carbomer systems than in plain aqueous ones, despite the lower dextran content used in the carbomer-containing
30 formulations. This means that the glucose response, in terms of the viscosity change, is of a greater magnitude in the carbomer formulations than in the aqueous one, as is also shown in Figure 9. This also happens to be the case if there is no covalent bonding of the lectin to the carbomer (not shown) and is therefore a function of the presence of the

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-31-

carbomer on the dextran-con A system. An explanation for this relates to the heterogeneity of the carbomer dispersion discussed above. The dextran and con A are restricted to the interstices because their size (mw 2 million and 100,000 respectively) must exclude them from C974 and C934 particle interiors. Their localised concentrations must therefore be much higher than the total concentrations because the interstices form a fraction of the total volume. This explains the difference in the physical properties of the complex formed between dextran and con A at the very low concentrations used in carbomer systems compared with entirely aqueous systems, as described earlier. In the carbomer systems, the microviscosity of the interstitial region clearly contributes much to the glucose sensitivity of the formulation. However, the macroviscosity changes caused by glucose, as sensed in this experiment, do not appear to be simply an average for an active interstitial and an inert particulate compartment because the glucose-induced changes are so much larger than in the homogeneous aqueous system. This seems to imply that the interstitial viscosity is not the sole reason for the increased glucose sensitivity of this system but probably that its presence influences the freedom of movement of the particles in the gel as a whole and thus has an additional effect on its macroviscosity.

A similar viscosity fall occurs at 37°C, as shown in Figure 10 for the C934 conjugate. The viscosity values and the changes at 37°C are both lower than for 20°C as might be anticipated from the similar behaviours of both carbomers and the aqueous, carbomer-free formulations of dextran and con A (neither shown). However, the system is clearly a sensitive glucose sensor at physiological temperature.

In the systems examined at 20°C, the viscosity change when expressed as a fraction of the original value is lower for the carbomer systems than for the aqueous systems, as is shown in Figure 11, despite the higher absolute values.

The main reason for wishing to covalently bond the lectin to the carbomer is to prevent its escape from the formulation without sacrificing activity. The viscosity changes induced by glucose show that, after washing the carbomer several times by centrifuging the supernatant from it, it has glucose sensitivity. This suggests that the lectin has been successfully anchored to the carbomer particle surface using EDAC as the bonding

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-32-

agent. A plain mixture of carbomer and the lectin does not retain activity when washed in this way (not shown).

Example 2 - Insulin diffusion

5 The gels described in Example 1 were also subjected to insulin diffusion tests at 37°C. In these experiments, six small delivery cells were used, each capable of holding 0.5mL of insulin solution or a buffer control solution. They were each mounted empty into temperature regulated receptor vessels, holding 10mL of buffer and were connected by individual flow through systems to a Perkin Elmer Lambda 40 spectrophotometer, 10 programmed sequentially to scan each receptor solution between 250 and 500nm at ten minute intervals. The cells were filled by syringe at the required time and then sealed using a tap arrangement to make them watertight. In each cell, a thin layer of the gel was sandwiched between two filter membranes such that the insulin diffused through 15 the gel from the reservoir in order to reach the receptor solution. Glucose could be added to individual receptor solutions in the concentration required at any time during the experiment. To remove the glucose, the receptor fluid was replaced between readings with new buffer at 37°C, the flow through circuit flushed and the buffer replaced again before the next reading was due.

20 For those diffusion cells containing insulin, the addition of glucose at the points shown on Figure 12a has resulted in increased output within about 60 minutes of the addition of 0.5% glucose. Figure 12b shows the results from buffer-containing control cells and represents the glucose provoked release of con A. This indicates that the con A loss 25 from the gel layer has been minimised because, in aqueous dispersions, glucose-induced liberation similar to that of the insulin would have occurred (not shown). Although the loss of con A has therefore been shown to be almost negligible, the results in Figure 12a have nevertheless been corrected for this effect. In addition, a correction has been made in both the insulin and the control systems, for optical density 30 as measured at 460nm. The optical density is a measure of protein precipitation, including the production of fibrils. Fibrillation is a much greater problem with insulin than with con A in this experiment. It results from the application of shear forces such as would be experienced by solutions circulating through a peristaltic pump. The flow

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-33-

rate in the circulation system from the receptor to the spectrophotometer was kept as low as possible in this experiment to reduce the problem, consistent with maintaining the release process from the device as the rate-determining process. The effect needs to be compensated for by subtraction from the 276nm profile, however, because it does not remain a constant throughout the experiment as the glucose is removed by fluid replacement and because it is a non-constant function of protein concentration.

The result of covalent bonding of the lectin to the carbomers C934 and C974 and its combination with dextran has therefore maintained the activity of the glucose-dependent mixture of dextran and con A in terms of controlling the diffusion of insulin as a function of glucose content. This has operated at a concentration of glucose that represents a fairly severely diabetic state. The method has also has created a formulation from which con A cannot leach through apertures smaller than that which retains carbomers in the gel layer. Since carbomers like C934 and C974 have molecular weights in billions (and a particle size in the micrometre range), this effectively allows the use of very large pore restraining membranes in the set-up described in this example. The advantage of this is that the gel itself – and not the cellulose membranes between which the gel is sandwiched – will be rate-determining for the insulin. This has been a problem in unconjugated mixtures which require pore membranes with a molecular cut-off close to the size of insulin in order to retain the lectin.

The data presented in Examples 1 and 2 indicate that it is possible to produce unusual conjugates between particulate carbomers, such as C974 or C934, and a second component, such as a protein, in which some of the chemical characteristics of the protein can be preserved. In this case, con A has been bonded to cross-linked carbomers to produce systems in which the interstitial regions of the formulations become glucose sensitive. The EDAC method has been used but alternatives are possible. If dextran is added to this conjugate, the system becomes viscous because of the temporary links formed between the lectin and the branch ends on the dextran. The viscosity of this system is then a function of the free glucose content because of the competition for the glucose receptors in the lectin. This mechanism works well in the simple mixtures of con A and dextran but operates in an enhanced way in the

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-34-

covalently-conjugated formulation. This enhancement appears to be related to the heterogeneous structure of particulate carbomer gels in which the lectin-dextran complexes are formed in that fraction of the system between particles, creating high localised concentrations of the glucose-sensitive components. These conjugated formulations have been shown to produce glucose dependent reductions in macroviscosity. They have also have been able to transmit insulin in a glucose-related manner without the loss of free lectin. The latter remains covalently bound to the carbomer particles and therefore restrained by membranc pore sizes that need be small enough only to retain the carbomer particles, thus not compromising the rate-determining process in this glucose dependent transport system.

Example 3 – Copolymerised Gels

Methods

Concanavalin A methacrylation

Concanavalin A was refluxed at 50°C for 2-3 hours with methacrylic anhydride in phosphate buffered saline at 7.4. 500mg of ConA was dissolved in 10mL phosphate buffered saline in a 50mL round bottomed flask and to it was added 0.05mL distilled methacrylic anhydride. After refluxing, the reaction was quenched with distilled water (20mL) and the whole solution dialysed against distilled water for 2 days to remove products of mw <12-14,000. This process cannot remove unbonded con A.

Dextran methacrylation

A 10g quantity of D500, dextran of mw 500,000, was weighed and dried over phosphorus pentoxide. Separately dimethylesulphoxide (DMSO) was dried over calcium hydride and then distilled. A 100mL quantity of distilled DMSO was then added to the dried dextran and the resulting mixture stirred to dissolve at 50°C over an oil bath. To this was added 200mg of dimethylaminopyridine (DMAP) and 2.77mL of distilled methacrylic anhydride. The mixture was then stirred at 50°C on the oil bath for 24 hours under reflux. Precipitation was achieved by adding dropwise into 1L acetone to give white flakes of dextran methacrylate. The product was then dissolved in 500mL of distilled water and

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-35-

dialysed against distilled water to remove small mw products such as DMSO, DMAP, methacrylic anhydride.

uv cross-linking of the methacrylated derivatives

- 5 An initiator, Irgacure (photoinitiator, Ciba Speciality Chemicals), was used to start a *uv* curing process. 20 μ L of a 40mg/5mL aqueous solution of Irgacure was added. The sample was then irradiated at 365nm at 10mWatts/cm² for a predetermined time, split for equal irradiation of both sides of a spaced film between glass plates.

- 10 The variables in the system are:
 concentration of components
 concentration of initiator
 degree of dextran and con A substitutions
 irradiation time

- 15 These variables allow gels of a wide variety to be made. In the following case, the irradiation time was varied between 2 and 50 minutes.

Diffusion tests

- 20 The gels made as described above were then subjected to the same diffusion tests as referred to Example 2 and the results were as follows:

Results

- 25 In Figure 13a, the leach from polymerable methacrylated derivatives of the protein con A is plotted before and after the provocation with glucose (experiment conducted at 37 °C, using 0.2 μ m pore size filters, and glucose trigger concentration of 1% w/v). The increase in radiation time of a gel subjected to *uv* and an appropriate initiator, leads to a reduction in the peak of protein produced as the gel softens on contact with glucose.
- 30 Short irradiation times (eg 5 min – triangle symbols) do not achieve this, whereas the 20 minute cure time (diamond symbols) produces only a slight leach. The polymerisation has therefore achieved the aim of locking in the protein within these longer-irradiated but still non-rigid gels. However, the comparison with the gel-free

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-36-

control (filled square symbols) shows that some protein release occurs throughout, albeit slight, even with 20 minute irradiation.

5 Figure 13b shows that much longer irradiation times solve this problem and 50 minutes seems to give a product that hardly loses protein at all, either before, during or after glucose addition. This is also non-rigid and thus suitable for the purpose.

10 Figure 14 indicates that under these conditions of minimised component leach, glucose can be shown to provoke a release of insulin from a reservoir held behind a layer of gel in an exactly analogous set up. The gel is therefore capable of response, such that insulin is released, but it will not leach out the component protein con A. The gel seems to reform after glucose removal, so that the insulin flux is restored to pre-glucose levels. This means it is truly reversible, implying that neither gel component is lost.

15 Conclusion

Polymerisation is an effective method for producing gels that are as responsive as the plain mixtures but resist the tendency to lose components.

20 Example 4 - Gelatin:carbomer conjugation with EDAC

Conjugation between gelatin and carbomer has been done with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC), which gives a temporary intermediate structure between the EDAC and the carbomer carboxyl moiety. The intermediate bonds with amine groups, such as are found in gelatin at terminal and hydroxylysine sites, among others. The gelatin is effectively conjugated with the carbomer such that the surface of the carbomer particles becomes permanently coated with gelatin while the EDAC residue leaves the permanent bond site. The method here fosters some gelatin-gelatin bonding in addition to carbomer-gelatin bonding since carboxyls and amines both occur in gelatin. This is of no disadvantage since it means that all gelatin added, even to quite high concentrations is likely to be bonded, even distantly, to the carbomer carrier, which therefore may have not simply monolayers but multilayers of gelatin bonded to each micro- (or mini-) gel hydrated carbomer particle.

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-37-

However, the method can be modified to produce the intermediate (between the carbomer and EDAC), wash to remove excess EDAC and then bond gelatin, in which case, the gelatin content will be minimised (monolayer only).

- 5 Each hydrated carbomer 974 or 934 particle is a discrete hydrogel and separated from others by interstitial aqueous regions. This means that the gelatin bonded to the surface can raise the viscosity of the interstices until hydrolysed by enzyme or chemical action.

Reagents

- 10 Carbopol 974 (C974), Carbopol 934 (C934) BF Goodrich
EDAC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride], Sigma
MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid], Sigma
PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4 & 5.9)
NaOH (pellets and 1M solution), Fisher Scientific
15 sodium azide, Sigma
gelatin, Sigma
distilled water
1M HCl (hydrochloric acid), BDH

Method

- 20 A 1%w/w carbomer dispersion was made in 0.1M MES buffer, adjusted to neutral and stirred until clear. Gelatin was then added to this such that the final concentration was between 0 and 8%w/w, depending on the desired product and the pH kept at neutral.
The system was then conjugated using 50mM EDAC, the reaction being quenched after
25 stirring for three hours at room temperature by diluting with PBS at pH 5.9 and centrifuging washings from the partially-dehydrated carbomer conjugate until washings revealed no further con A in the supernatant. The total protein removed was calculated by assaying bulked and filtered washings at 276nm. The pH of the gel was then
adjusted to 7.4 using 1M NaOH and a stiffened gel results than responds to
30 temperatures above 37°C by softening significantly, because of the gelatin influence.

Rheology testing

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-38-

Gels of 8% gelatin content and 2% carbomer 974 were subjected to rheological testing. The appropriate tests are the oscillatory, non-destructive tests which are reported here in terms of the tan delta or loss tangent. This parameter is the ratio of the viscous and elastic moduli and consequently a value of unity indicates that the contributions from each of these is equal. A value of greater than one means that the material has become more liquid in character. Therefore stress and frequency sweeps are done with the intention of assessing the tan delta profiles.

Results are shown in Figures 15a-f. In these graphs, the profiles have been measured across both stress and frequency giving three-dimensional plots that clearly indicate chymotrypsin activity in terms of raised tan deltas, particularly at higher stress values, these being very much lower at zero enzyme content. The exception to this is at temperatures are raised above 37°C, the temperature at which gelatin melts. Thus, at 37°C, this system would be ineffective since the material would already be very softened without enzyme. Fortunately, skin temperature is around 32°C, where the effect is as visible as at 20°C.

This test, with an enzyme very similar to stratum corneum chymotryptic enzyme (SCCE) found over-expressed in psoriatic plaque, suggests that the material would lose viscosity selectively over plaque and not over normal tissue, much as it has done in these artificial conditions. The diffusibility of drugs through the gelatin-rich phase (i.e. the interstitial regions of the material), is related to the viscosity there and the conclusion is that delivery of drug would be raised in areas over abnormal skin.

25

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-39-

Claims

1. A gel composition, comprising first and second gel-forming moieties which bind reversibly to one another to form a gel, wherein said binding is sensitive to the level of an analyte, and either or both of the gel-forming moieties are attached to cross-linked particulate entities such that the interstices between the entities allow gel-sol and sol-gel transformation, and yet are not so small that the analyte cannot diffuse therethrough.
2. A gel composition as claimed in claim 1, wherein the particulate entities are polymers which are locally cross-linked.
3. A gel composition as claimed in claim 2, wherein the polymer is an acrylic acid polymer or copolymer.
4. A gel composition as claimed in claim 3, wherein the polymer is a cross-linked carbomer.
5. A gel composition as claimed in claim 4, wherein the carbomer is Carbopol 974P or Carbopol 934P.
6. A gel composition as claimed in any preceding claim, wherein the first and/or the second moieties is/are attached directly to the particulate entities.
7. A gel composition as claimed in any preceding claim, wherein the first and/or the second moieties is/are attached indirectly to the particulate entities via a polymer.
8. A gel composition as claimed in any preceding claim, wherein the first moiety is a macromolecule which, when bound together, forms a gel and the second moiety is a molecule which binds to at least a part of the macromolecule to provide such binding.

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-40-

9. A gel composition as claimed in any preceding claim, wherein the second moiety is a lectin, and the first moiety is a gel-forming macromolecule which binds to the lectin.
- 5 10. A gel composition as claimed in claim 9, wherein the first moiety is dextran and the second moiety is concanavalin A.
11. A gel composition as claimed in claim 8, wherein the second moiety is an antibody.
- 10 12. A gel composition as claimed in any preceding claim, wherein the first and second moieties are in the form of a copolymer.
13. A gel composition comprising first and second gel-forming moieties which bind reversibly to one another to form a gel, wherein said binding is sensitive to the level of an analyte, and the gel-forming moieties are copolymerised.
- 15 14. A gel composition as claimed in claim 13, modified by the features of any one of claims 1 to 11.
- 20 15. A gel composition as claimed in any preceding claim, in combination with a semi-permeable or permeable membrane.
16. A drug delivery system comprising a gel composition as claimed in any preceding claim and a drug, the drug being contained either (a) within the gel composition or (b) in a reservoir with the gel composition forming a barrier between the reservoir and the area to which the drug is to be released.
- 25 17. A sensor for detecting the level of an analyte, the sensor comprising a gel composition as claimed in any one of claims 1 to 15, and means for detecting the viscosity of the gel.
- 30

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

-41-

18. A method for the production of a gel composition, the method comprising:
causing first and/or second gel-forming moieties to become attached to cross-
linked particulate entities, the first and second gel-forming moieties being capable of
binding reversibly to one another to form a gel, wherein said binding is sensitive to the
5 level of an analyte, and the interstices between the entities allow gel-sol and sol-gel
transformation, and yet are not so small that the analyte cannot diffuse therethrough.
19. A method as claimed in claim 18 modified by the features of any one of claims
1 to 12.
- 10 20. A pharmaceutical composition for transdermal administration of an active agent,
the composition comprising a carrier which either (a) contains the active agent or (b)
forms a barrier between the active agent and the area to which the active agent is to be
released, wherein at least a part of the carrier is digestible by one or more skin enzymes
15 such that the active agent is released from the composition by the action of said
enzymes.
- 20 21. A composition comprising a carrier which is covalently bonded to an active
agent, wherein the bond between the carrier and the active agent is digestible by one or
more skin enzymes, for use in medicine, in particular for transdermal administration of
the active agent.

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

1/14

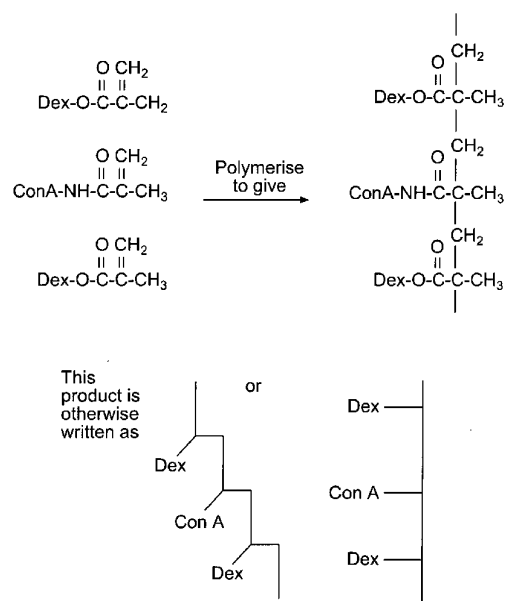


Fig. 1

2/14

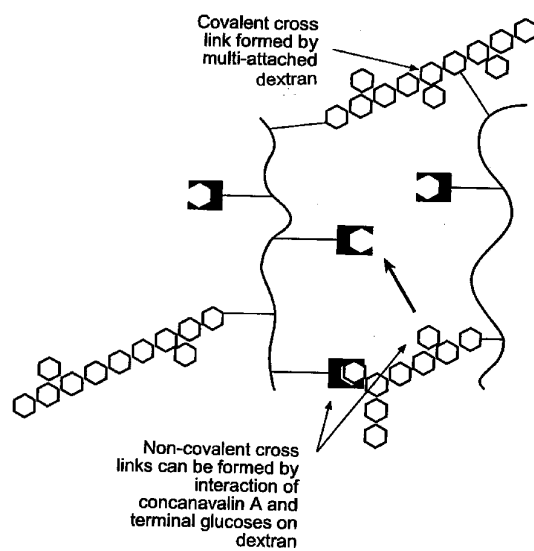


Fig. 2

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

3/14

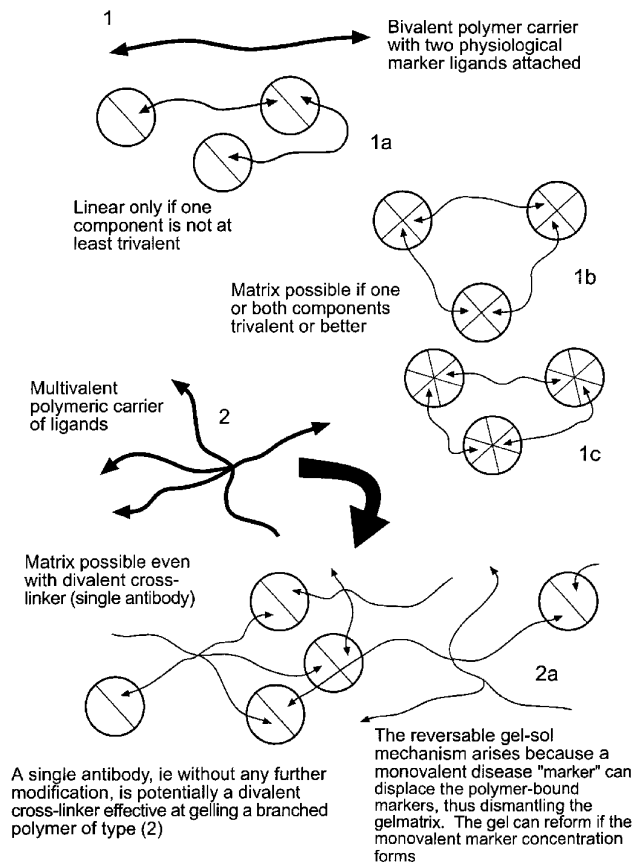


Fig. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

4/14

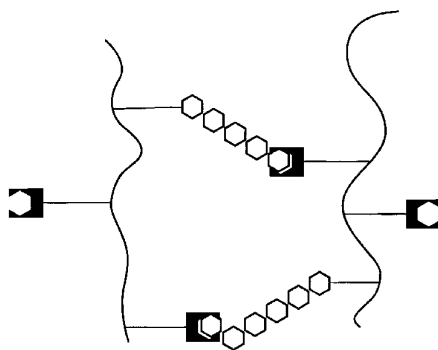


Fig. 4

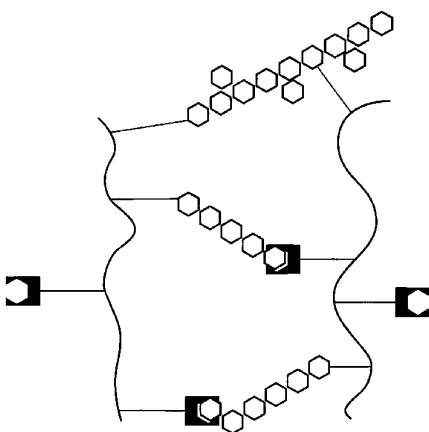


Fig. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

5/14

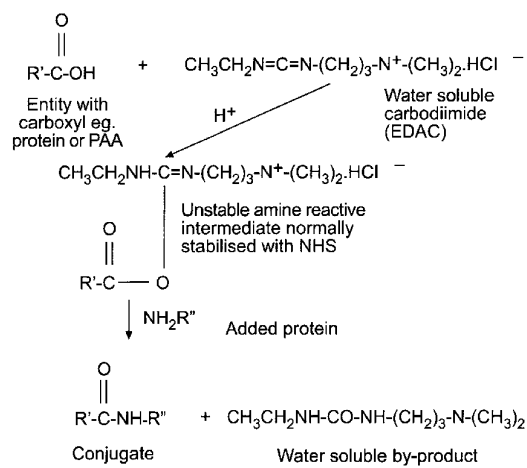


Fig. 6

6/14

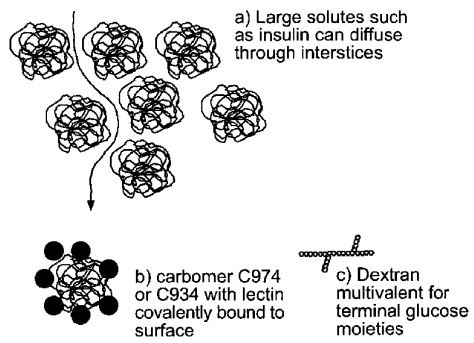


Fig. 7a

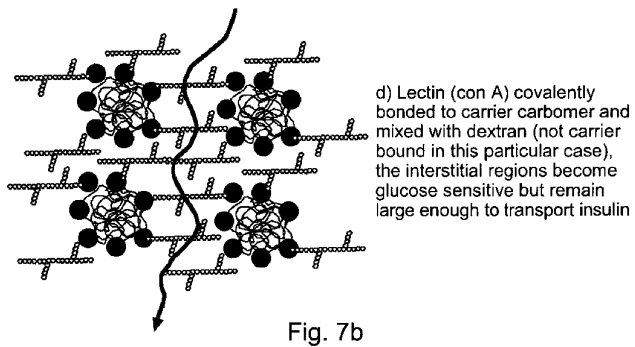
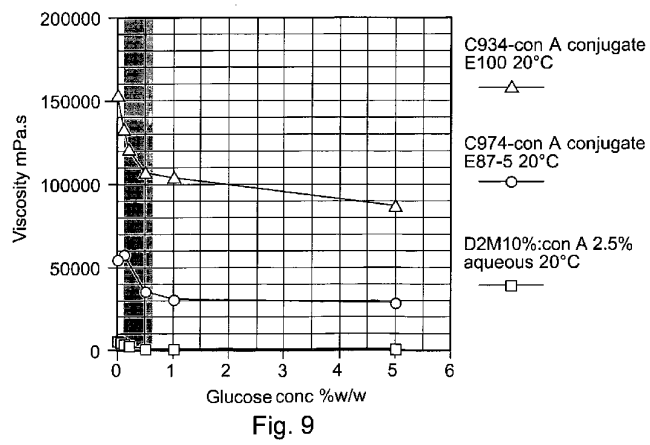
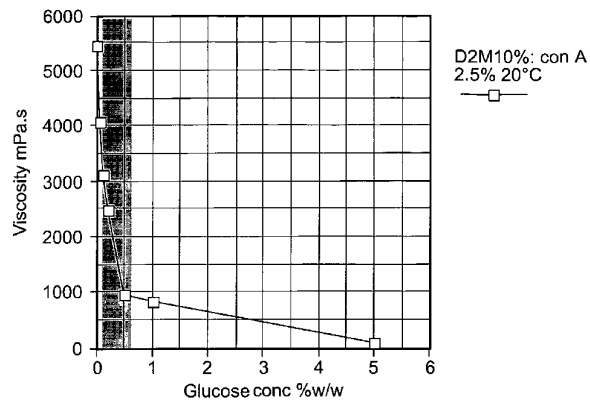


Fig. 7b

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

7/14



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

8/14

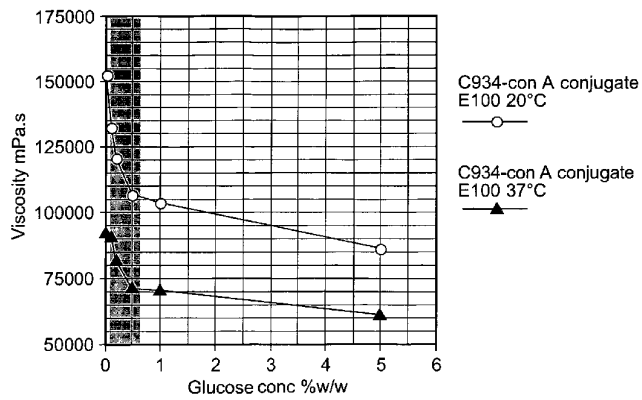


Fig. 10

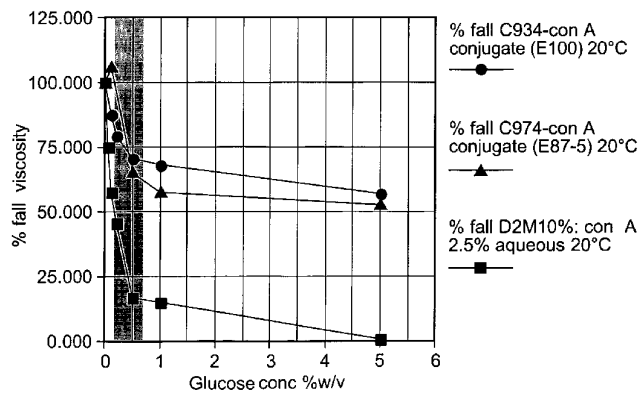


Fig. 11

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

9/14

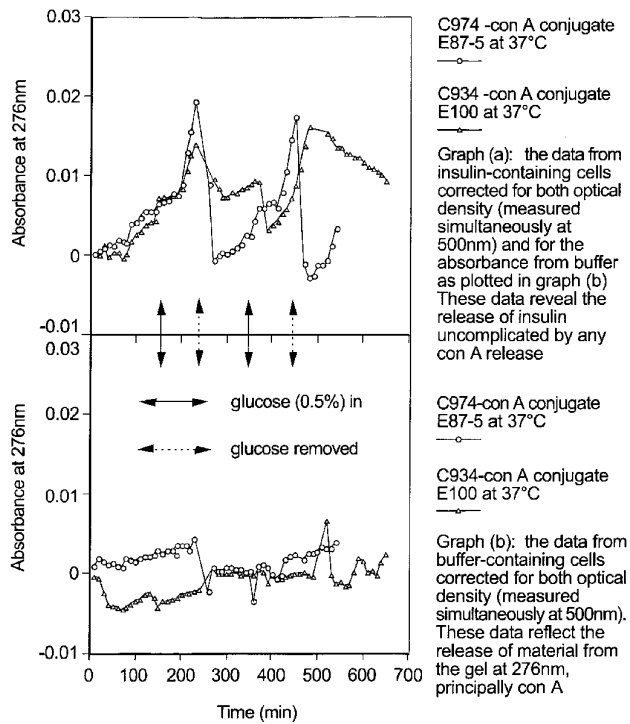


Fig. 12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

10/14

A comparison of the effect of sample irradiation time on the component release from D70-MA+ConA-MA gels

- Experiment conducted at 37°C
- 0.2 µm pore size filters used
- Glucose trigger concentration is 1% w/v

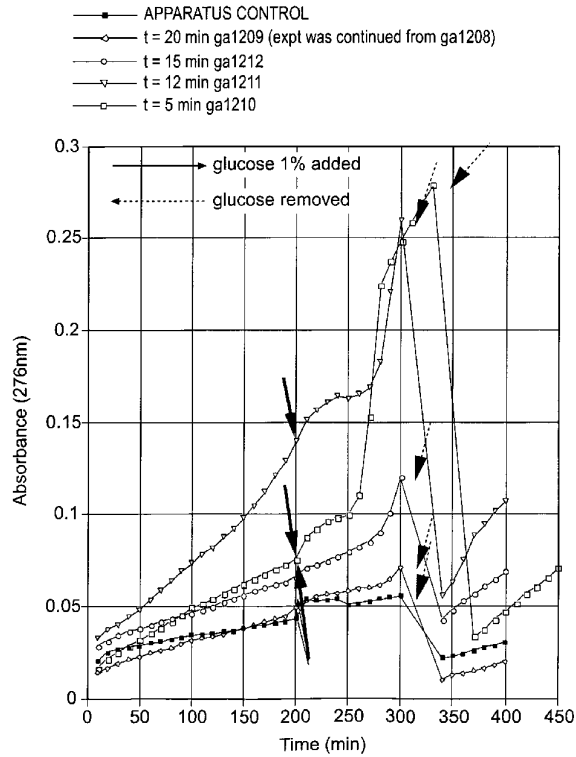


Fig. 13a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

11/14

A comparison of the component release profiles
CL23 trial 9 (t=40 min) and CL24 trial 2 (t=45)

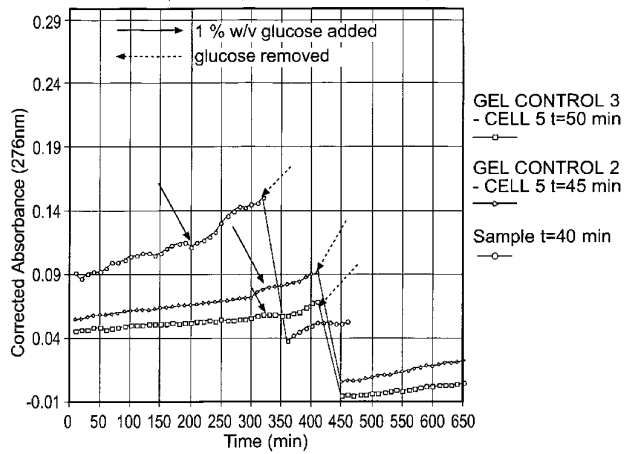


Fig. 13b

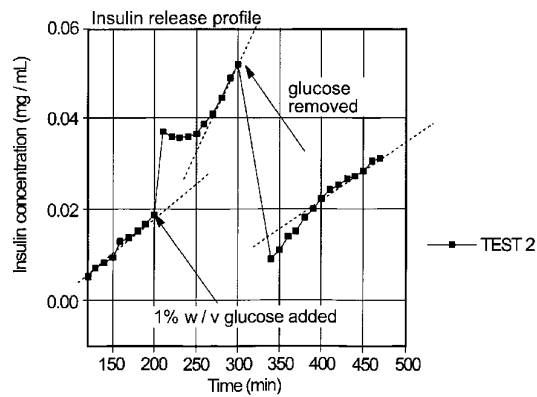


Fig. 14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

12/14

Study 3 (mixture 2) Comparison
of loss tangent values for the
2%C974-8% gelatin mixture
with 0% chymotrypsin.
Measured at 20°C

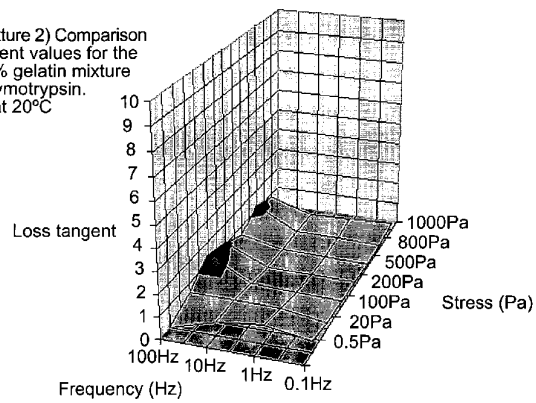


Fig. 15a

Graph 10 (study 3.1) (mixture 2)
Comparison of loss tangent values
for a 2% C974-8% gelatin mixture
with 0% chymotrypsin. Measured
at 32°C

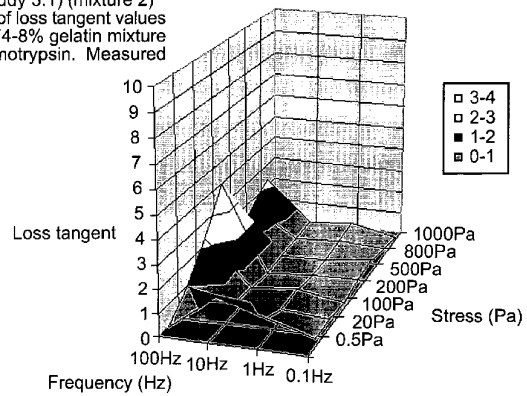


Fig. 15b

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

13/14

Graph 12 (Study 3.1)
(mixture 32) Comparison of
loss tangent values for the
2%C974-8% gelatin mixture
with 0% chymotrypsin.
Taken at 37°C

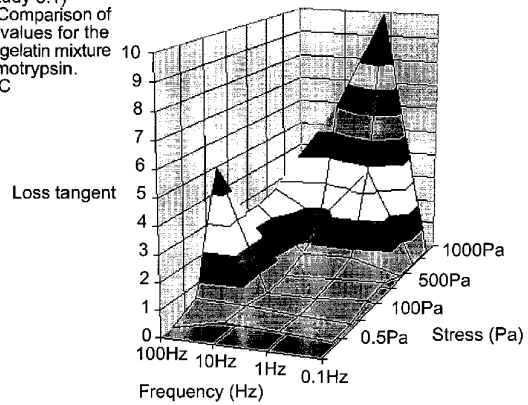


Fig. 15c

Study 14 (Study 3.1)
(mixture 2) Comparison
of loss tangent values
for the 2%C974-8%
gelatin mixture with
0.1% chymotrypsin.
Measured at 20°C

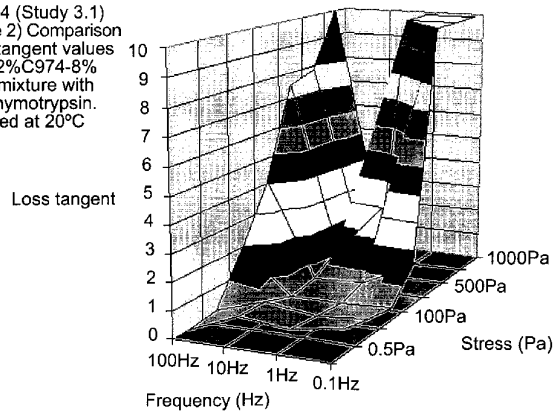


Fig. 15d

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/006993

PCT/GB02/03183

14/14

Study 17 (Study 3.1)
(mixture 2) Comparison of
loss tangent values for the
2%C974P-8% gelatin
mixture with 0.1%
chymotrypsin. Taken at 32°C

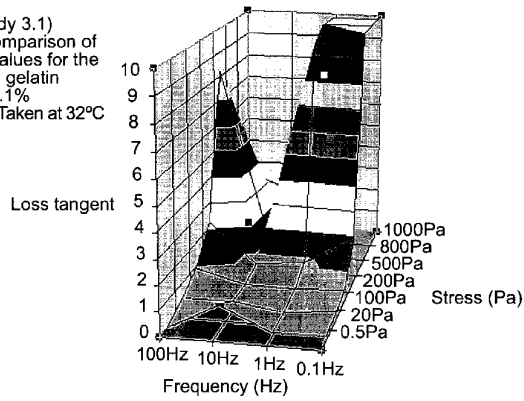


Fig. 15e

Study 19 (Study 3.1)
Comparison of loss tangent
values for the 2%C974-8%
gelatin mixture with 0.1%
chymotrypsin. Taken at 37°C

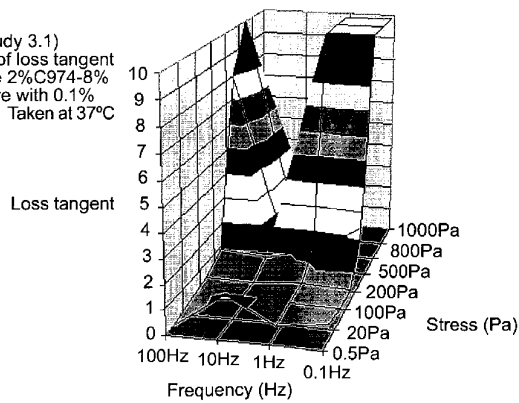


Fig. 15f

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/006993 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543, A61K 9/00, G01N 33/559, A61K 47/06
- (21) International Application Number: PCT/GB02/03183
- (22) International Filing Date: 10 July 2002 (10.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0116860.8 10 July 2001 (10.07.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): DE MONTFORT UNIVERSITY [GB/GB]; Intellectual Property Advice Centre, Innovations Centre, Oxford Street, Leicester LE1 5XY (GB).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): TAYLOR, Margaret, Joan [GB/GB]; De Montfort University, Intellectual Property Advice Centre, Innovations Centre, Oxford Street, Leicester LE1 5XY (GB).
- (74) Agents: LEE, Nicholas, John et al.; Kilburn & Strode, 20 Red Lion Street, London WC1R 4PJ (GB).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 25 September 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/006993 A3

(54) Title: GEL COMPOSITIONS

(57) Abstract: The present invention relates to a gel composition, comprising first and second gel-forming moieties which bind reversibly to one another to form a gel. The binding of the moieties is sensitive to the level of an analyte, and either or both of the gel-forming moieties are attached to cross-linked particulate entities such that the interstices between the entities allow gel-sol and sol-gel transformation, and yet are not so small that the analyte cannot diffuse therethrough. The invention also provides drug delivery systems and sensors for detecting an analyte utilising such a gel.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. application No. PCT, JP 02/03183
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543 A61K9/00 G01N33/559 A61K47/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N A61K		
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, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 705 503 A (DORMAN FRANK D ET AL) 10 November 1987 (1987-11-10) column 6, line 60 -column 7, line 30 column 8, line 24 -column 9, line 10	1-3, 6-10, 13-16, 18,19
X	WO 01 16575 A (BAE YOU HAN ;BIOTECH INC M (US); HAN IN SUK (US); JUNG DAL YOUNG () 8 March 2001 (2001-03-08)	1-3, 6-10, 13-16, 18,19
Y	page 9, line 5 -page 13, line 5 --- -/--	17
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 June 2003		Date of mailing of the international search report 27/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentstr 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 940-3016		Authorized officer Diez Schlereth, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat. application No. PCT/JP 02/03183
G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 830 506 A (TAYLOR MARGARET JOAN) 3 November 1998 (1998-11-03) cited in the application column 2, line 15-37 column 3, line 9-31 ---	1-3, 6-10, 13-16, 18,19
X	TANNA S ET AL: "Characterization of model soluble and insulin delivery across covalently modified lectin-polysaccharide gels sensitive to glucose." PHARMACY AND PHARMACOLOGY COMMUNICATIONS, vol. 4, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 117-122, XP009012222 ISSN: 1460-8081 abstract ---	1,2, 6-10, 12-14, 16,18,19
X	TANNA S ET AL: "Insulin delivery governed by covalently modified lectin-glycogen gels sensitive to glucose." JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, vol. 51, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 1093-1098, XP009012207 ISSN: 0022-3573 abstract ---	1,2,6-9, 12-14, 16,18,19
X	US 5 889 028 A (EVANS BRIAN KENNETH ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) column 5, line 55-65 ---	20
X	WO 98 22097 A (BIO ADVANCES LLC) 28 May 1998 (1998-05-28) the whole document ---	20
X	WO 00 09165 A (AMGEN INC) 24 February 2000 (2000-02-24) page 18, line 30 -page 19, line 25 ---	20,21
X	US 5 939 094 A (DURIF FRANCK ET AL) 17 August 1999 (1999-08-17) examples 1,2 ---	20
Y	DE 42 03 466 A (EHWALD RUDOLF PROF DR ;BALLERSTAEDT RALPH (DE)) 5 August 1993 (1993-08-05) cited in the application column 1, line 30 -column 2, line 23 ----- -/-	17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (4-9/1995)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internationa PCT/JP 2004/03183
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KIN J J ET AL: "Modulated insulin delivery from glucose-sensitive hydrogel dosage forms" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 77, no. 1-2, 9 November 2001 (2001-11-09), pages 39-47, XP004311661 ISSN: 0168-3659 the whole document -----	1-3, 6-9, 16-19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP 02/03183
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see additional sheet		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/GB 02/03183

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

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

1. Claims: 1-21

gel composition

1.1. Claims: 1-12,18-19(complete) and 14-17,19(partially)
gel composition in which one or both gel-forming moieties are attached to cross-linked particulate entities; method for its production, and drug delivery system and biosensor comprising said composition.

1.2. Claims: 13-14(complete) and 14-17,19(partially)
Gel composition in which the gel-forming moieties are copolymerised and which binding is sensitive to the level of glucose; method for its production and drug delivery system and biosensor comprising said gel composition.

1.3. Claims: 20-21

Compositions comprising a carrier and an active agent, wherein a part of the carrier is digestible by one or more skin enzymes.

It would appear that there is no common concept within the sense of Rule 13.1 PCT linking the subject-matter of the above mentioned separate groups of claims, which gives rise to a lack of unity "a priori" (Rule 13.2 PCT).

Please note that all inventions mentioned under item 1, although not necessarily linked by a common inventive concept, could be searched without effort justifying an additional fee.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4705503		A	10-11-1987	NONE
WO 0116575		A	08-03-2001	AU 6931500 A EP 1212601 A1 WO 0116575 A1
US 5830506		A	03-11-1998	AT 183927 T AU 3263093 A DE 69326234 D1 DE 69326234 T2 DK 626862 T3 EP 0626862 A1 ES 2135458 T3 WO 9313803 A1 GR 3031479 T3 JP 7507268 T US 2002168409 A1
US 5889028		A	30-03-1999	US 5846983 A US 6166044 A AT 237330 T AU 718971 B2 AU 1729497 A CA 2246235 A1 CN 1210466 A CZ 9802451 A3 DE 69720985 D1 EP 0893998 A1 WO 9728801 A1 HU 9900950 A2 JP 2000505430 T PL 328430 A1 SK 106898 A3 ZA 9701020 A
WO 9822097		A	28-05-1998	AU 7298198 A WO 9822097 A2
WO 0009165		A	24-02-2000	AU 5347099 A CA 2337667 A1 EP 1107793 A1 JP 2002522512 T WO 0009165 A1
US 5939094		A	17-08-1999	US 5562917 A DE 69530004 D1 EP 0800364 A1 WO 9619956 A1
DE 4203466		A	05-08-1993	DE 4203466 A1

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 11/14	G O 1 N 11/14	B
// A 6 1 K 38/28	A 6 1 K 37/26	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎

(72)発明者 テイラー、マーガレット・ジョアン
イギリス国、エルイー1・5エックスワイ、レイセスター、オックスフォード・ストリート、イノ
ベーションズ・センター、インテレクチュアル・プロパティー・アドバイス・センター(番地なし
)、デ・モントフォート・ユニバーシティ内

Fターム(参考) 4C076 AA09 AA95 BB31 CC30 EE09A EE38A EE56A FF31 FF35 FF68
4C084 AA03 BA44 DB34 MA01 MA05 MA28 MA63 NA13 ZC022 ZC352