

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7204154号
(P7204154)

(45)発行日 令和5年1月16日(2023.1.16)

(24)登録日 令和5年1月5日(2023.1.5)

| | | | |
|--------------------------|----------------|--|-------|
| (51)国際特許分類 | F I | | |
| C 0 8 F 299/02 (2006.01) | C 0 8 F 299/02 | | Z B P |
| A 6 1 L 27/26 (2006.01) | A 6 1 L 27/26 | | |
| C 0 8 L 101/16 (2006.01) | C 0 8 L 101/16 | | |

請求項の数 15 (全19頁)

| | | | |
|-------------------|----------------------------------|----------|---|
| (21)出願番号 | 特願2020-566940(P2020-566940) | (73)特許権者 | 500454046 ユニベルズィタイト・ヘント ベルギー、ベー - 9 0 0 0 ヘント、シ ント・ピーターズニューストラート、2 5 |
| (86)(22)出願日 | 令和1年5月29日(2019.5.29) | (73)特許権者 | 596099561 ブレイエ・ユニバージテイト・ブリュッ セル V R I J E U N I V E R S I T E I T B R U S S E L |
| (65)公表番号 | 特表2021-525305(P2021-525305 A) | (74)代理人 | 100088904 弁理士 庄司 隆 |
| (43)公表日 | 令和3年9月24日(2021.9.24) | (74)代理人 | 100124453 |
| (86)国際出願番号 | PCT/EP2019/063995 | | |
| (87)国際公開番号 | WO2019/229140 | | |
| (87)国際公開日 | 令和1年12月5日(2019.12.5) | | |
| 審査請求日 | 令和2年12月14日(2020.12.14) | | |
| (31)優先権主張番号 | 18175368.2 | | |
| (32)優先日 | 平成30年5月31日(2018.5.31) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 欧州特許庁(EP) | | |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 二官能性修飾バイオポリマー系ポリマー及びかかる二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーから得られるヒドロゲル

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーであって、少なくとも1つのポリマー鎖を含み、前記少なくとも1つのポリマー鎖が、n個の第1の官能基及びm個の第2の官能基を含み、n及びmはゼロではなく、前記第1の官能基が、フリーラジカル連鎖重合に続いてラジカル架橋され得る基を含み、前記第2の官能基が、チオール-エン架橋が可能な基を含み、前記チオール-エン架橋が可能な基が、少なくとも1つのC-C二重結合を含み、かつ前記第2の官能基が、前記第1の官能基のフリーラジカル連鎖重合中に未反応のまま残る、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマー。

【請求項 2】

前記バイオポリマー系ポリマーが、ポリペプチド、タンパク質、多糖、核酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸塩、デキストラン、アガロース、グリコサミノグリカン、キトサン及びカラギーナン、それらに由来する誘導體、組み換え類縁体及び合成類縁体からなる群から選択される、請求項1に記載の二官能性修飾バイオポリマー系ポリマー。

【請求項 3】

前記第1の官能基が、メタクリルアミド官能基、アクリルアミド官能基、メタクリレート官能基及びノ又はアクリレート官能基を含む、請求項1又は2に記載の二官能性修飾バイオポリマー系バイオポリマー。

【請求項 4】

前記第2の官能基が、ノルボルネン官能基、ビニルエーテル官能基、ビニルエステル官

能基、アリルエーテル官能基、プロペニルエーテル官能基、アルケン官能基及び/又はN-ビニルアミド官能基を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の二官能性修飾バイオポリマー系バイオポリマー。

【請求項5】

前記バイオポリマー系ポリマーが、1つのポリマー鎖を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の二官能性修飾バイオポリマー系ポリマー。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか一項に記載の二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーを製造する方法であって、

a) 一級官能基を含む少なくとも1つのポリマー鎖を含むバイオポリマー系バイオポリマーを準備する工程と、

b) 前記一級官能基の第1の部分を官能化してn個の第1の官能基を導入する工程であって、nはゼロではなく、前記第1の官能基が、フリーラジカル連鎖重合に続いてラジカル架橋され得る、工程と、

c) 前記一級官能基の第2の部分を官能化してm個の第2の官能基を導入する工程であって、mはゼロではなく、前記第2の官能基が、チオール-エン架橋性基を含み、前記第2の官能基が、前記第1の官能基のフリー連鎖重合中に未反応のまま残る、工程と、

を含み、
工程b)及び工程c)を同時に行うことができるか、又は工程b)を工程c)の前若しくは後に行うことができる、方法。

【請求項7】

前記一級官能基が、アミン官能基及び/又はカルボン酸官能基及び/又はヒドロキシル官能基を含み、工程b)が、前記アミン官能基の反応及び/又は前記カルボン酸官能基の反応及び/又は前記ヒドロキシル官能基の反応を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記一級官能基が、アミン官能基及び/又はカルボン酸官能基及び/又はヒドロキシル官能基を含み、工程c)が、前記アミン官能基の反応及び/又は前記カルボン酸官能基の反応及び/又は前記ヒドロキシル官能基の反応を含む、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】

前記アミン官能基の前記反応及び/又は前記カルボン酸官能基との前記反応及び/又は前記ヒドロキシル官能基との前記反応が、カルボジイミドカップリング化学を使用する、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

ヒドロゲルを製造する方法であって、

a) 請求項1～5のいずれか一項に記載の二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーを準備する工程と、

b) 前記n個の第1の官能基の少なくとも一部のフリーラジカル連鎖重合によって前記二官能性修飾バイオポリマー系バイオポリマーを架橋する工程と、

c) 前記m個の第2の官能基の少なくとも一部を架橋及び/又は官能化する工程と、
を含む、方法。

【請求項11】

工程c)が、前記m個の第2の官能基の少なくとも一部を架橋することを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

工程c)が、前記m個の官能基の少なくとも一部を官能化することを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

工程c)が、前記m個の官能基の第1の部分を架橋すること、及び前記m個の官能基の第2の部分を官能化することを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項14】

10

20

30

40

50

請求項10～13のいずれか一項に記載の方法によって得られるヒドロゲル。

【請求項15】

組織工学又はバイオファブリケーションのための請求項14に記載のヒドロゲルの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマー、特に二官能性修飾ゼラチン及び二官能性修飾コラーゲン等の二官能性修飾バイオポリマー、並びにかかる二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーを製造する方法に関する。本発明は、さらに、かかる二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーから開始して得られるヒドロゲル、及びかかるヒドロゲルを製造する方法に関する。さらに、本発明は、例えば組織工学等の生物医学用途におけるかかるヒドロゲルの使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ゼラチンは、優れた細胞相互作用特性及びヒドロゲル形成能を有する天然由来のバイオポリマー材料である。その幅広い適用性及びコスト効率に基づいて、食品及び製薬業界で広く適用されている。その結果、この材料は、組織工学及びバイオファブリケーションの分野におけるベンチマークの1つとなっている。しかしながら、ゼラチンは上限臨界溶液温度が生理的温度(±30)を下回ることを特徴とするため、ゼラチン系ヒドロゲルは組織工学等の生物医学用途には不向きである。生物医学用途に適するようするには、生理学的条件下でのゼラチンの安定性及び機械的特性を高めることが必要である。したがって、ゼラチンを共有結合的に架橋する複数の戦略が浮上している。光架橋戦略の使用は、これらの方法が、一般的に比較的穏やかな条件でヒドロゲル内の細胞カプセル化を可能にすることを特徴とするため、特に関心が高い。加えて、ステレオリソグラフィ及び2光子重合(2PP)を含む或る特定の(高分解能)付加製造技術では、材料を構造化するために光架橋が必要である。

20

【0003】

既知の光架橋戦略は、一般に、連鎖重合及び逐次重合という架橋メカニズムに応じた2つの主要なカテゴリーに大別され得る。歴史的には、光誘起ゼラチン架橋戦略の主要部分は、連鎖重合(ラジカル媒介連鎖光重合)を用いて行われる。この点でしばしば報告されるゼラチン誘導体は、ゼラチン-メタクリルアミド(Gel-MOD又はGel-MA)であり、ゼラチンの一級アミン基は架橋性メタクリルアミドをもたらす無水メタクリル酸を用いて官能化されている。

30

【0004】

過去10年にわたり、チオール-エン(フォト)クリックヒドロゲル等の逐次重合チオール-エンヒドロゲルはますます関心を集めている。逐次重合チオール-エンヒドロゲルは、典型的には、より高い反応性、及びそれらの直交性に起因する、より均質なネットワークの形成を特徴とする。その結果、反応はより低いラジカル濃度を特徴とし、連鎖重合ヒドロゲルとは対照的に、反応は酸素の存在下で効率的に行われ得るため、細胞カプセル化に対して優れた適合性を示す。チオール-エン化学を行うためには、ノルボルネン官能基(functionalities)が特に重要である。一方、それらのヒドロゲルは、競合的な単独重合の影響を受けにくい。一方、チオールとの反応中の環ひずみを緩和することは、高速の後続するプロトン移動と相まって、更にそのチオール-エン反応性を増加させる。

40

【0005】

ゼラチンメタクリルアミドゲル(gel-MOD又はgel-MA)は、架橋の性質上、チオール-エンヒドロゲル(gel-NB)に比べて一般的に硬い。ゼラチンノルボルネンヒドロゲル(gel-NB)等のチオール-エンヒドロゲルは、架橋された官能基の量の制御を可能にし、光ベースの付加製造技術に対して加工能力の改善を示すという利点がある。

【0006】

加えて、一般に、チオール-エンヒドロゲル(gel-NB)は、より疎水性のノルボルネン

50

官能基の存在のため、メタクリルアミドゲル (gel-MOD) と比較して膨張挙動の減少を特徴とする。

【0007】

さらに、チオール - エンの比を変化させることでチオール - エンヒドロゲル (gel-NB) の反応する官能基の数を制御することにより、架橋後に未反応ノルボルネン官能基を得ることができ、これは、その後のチオール化成分 (例えば、細胞相互作用配列、医薬品有効成分、抗酸化物質等) のフォトグラフトに適用することができる。しかしながら、チオール - エン比を減少させることにより、ヒドロゲル材料は、より高い吸水能と相まって、より一層乏しい機械的特性を特徴とする。その結果、製造後の膨潤は構造物の寸法を増加させると同時に、構造物内部の膨潤誘起応力も変形につながる可能性があることから、材料は高分解能の付加製造の利点の一部を失う場合がある。さらに、機械的特性がより乏しいため、より小さな形状サイズの構造物を生成する場合、材料が自重を支持することができなくなる可能性がある。

10

【0008】

チオール - エンヒドロゲル (gel-NB) を使用するもう1つの欠点は、チオール化架橋剤にジスルフィドが形成されるため、細胞カプセル化の有無にかかわらず、押出 / 堆積に基づく付加製造に必要となる場合がある、加工中の高温での貯蔵安定性が制限されることである。その結果、材料は未熟な架橋を示す可能性があるか、又はチオール - エンの比が制御されなくなる。

【0009】

非特許文献1は、カルボン酸の2-アミノエチルメタクリレートとの反応を介して、第1の官能基としてのメタクリルアミド及び第2の官能基としてのメタクリレートを含むGEL-MOD-AEMAと称される特定の二官能性修飾バイオポリマーを記載している。この二官能性修飾バイオポリマーは、当該技術分野で知られているより従来のgel-MOD連鎖重合に基づくバイオポリマーと比較して、より速い架橋速度 (kinetics) を示す。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【文献】Jasper Van Hoorick et al : "Cross-Linkable Gelatins with Superior Mechanical Properties Through Carboxylic Acid Modification : Increasing the Two-Photon Polymerization Potential", Biomacromolecules, vol. 18, no. 10, 29 August 2017, pages 3260-3272

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的は、例えば、従来技術の欠点を回避する修飾ゼラチンのような修飾バイオポリマー系ポリマーを提供することである。

【0012】

本発明の別の目的は、従来のフリーラジカル連鎖重合を可能にする第1の官能基、及び逐次チオール - エンクリック反応、例えばチオール - エンフォトクリック反応の影響を受けやすい第2の官能基という2つの官能基を併せ持つ修飾バイオポリマー系ポリマーを提供することである。

40

【0013】

本発明の更なる目的は、フリーラジカル重合後に架橋後グラフトの制御を可能にする修飾バイオポリマー系ポリマーを提供することである。

【0014】

本発明の更なる目的は、ゼラチン - ノルボルネン (gel-NB) の直交クリック化学によるゼラチンメタクリルアミド (Gel-MOD) の材料操作及び (機械的) 安定性に対する利点を併せ持つ修飾ゼラチンを提供することである。

【0015】

50

本発明の別の目的は、チオール - エンのフォトグラフトを用いた或る特定の官能基の局所的で制御された組み込みを可能にするヒドロゲルを製造するのに適した修飾バイオポリマー系ポリマーを提供することである。

【 0 0 1 6 】

本発明の別の目的は、強度及び剛性等の興味深い機械的特性を有するヒドロゲルを提供することである。特に、チオール - エンのグラフト能を示しながら、チオールエン比に関わらずゼラチン - ノルボルネンと比較して改善された機械的特性を有するヒドロゲルを提供することが目的である。

【 0 0 1 7 】

本発明のまた更なる目的は、制御可能な膨潤及び / 又は吸水能を有するヒドロゲルを提供することである。

【 0 0 1 8 】

加えて、本発明の目的は、特に高温における貯蔵安定性が改善されたヒドロゲルを提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 9 】

本発明の第1の態様によれば、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーが提供される。二官能性ゼラチンは、少なくとも1つのポリマー鎖を含む。少なくとも1つのポリマー鎖は、n個の第1の官能基及びm個の第2の官能基という少なくとも2種類の官能基を含み、n又はmはいずれもゼロではない。第1の官能基は、フリーラジカル連鎖重合に続いてラジカル架橋され得る基を含む。第2の官能基は、上記第1の官能基のフリーラジカル連鎖重合中に未反応のまま残るチオール - エン架橋性基を含む。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、第1の官能基に対して1% ~ 95%、より好ましくは5% ~ 75%、例えば15% ~ 75%、又は15% ~ 50%の範囲の置換度を有する。

【 0 0 2 1 】

例えば、二官能性修飾ゼラチン又は二官能性修飾コラーゲンのような二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、ポリマー鎖ごとに少なくとも1つの第1の官能基を含み、好ましくはポリマー鎖ごとに2つ以上の第1の官能基を含む。例えば、二官能性修飾ゼラチンのような二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、ポリマー鎖ごとに少なくとも1つの第1の官能基を含み、好ましくはポリマー鎖ごとに2つ以上の第1の官能基、例えば、5個、10個、20個、30個、50個、60個、70個、80個、90個、又は100個の第1の官能基を含む。好ましくは、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、第2の官能基に対して5% ~ 95%、より好ましくは5% ~ 75%、例えば15% ~ 75%、又は15% ~ 50%の範囲の置換度を有する。

【 0 0 2 2 】

例えば、二官能性修飾ゼラチン又は二官能性修飾コラーゲンのような二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、ポリマー鎖ごとに少なくとも1つの第2の官能基を含み、より好ましくはポリマー鎖ごとに2つ以上の第2の官能基を含む。例えば、二官能性修飾ゼラチンのような二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、ポリマー鎖ごとに少なくとも1つの第2の官能基を含み、好ましくは2つ以上の第2の官能基、例えば、5個、10個、20個、30個、50個、60個、70個、80個、90個、又は100個の第2の官能基を含む。

【 0 0 2 3 】

本発明による二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、従来のフリーラジカル重合を可能にする第1の官能基、及びチオール - エンクリック反応、例えばチオール - エンフォトクリック反応の影響を受けやすい第2の官能基という2つの官能基を併せ持つ利点を有する。第2の官能基は、フリーラジカル重合中に未反応のまま残り、架橋後グラフトを得ることを可能にする。第2の官能基は、或る特定のチオール化された官能基を導入することを可能にする。第2の官能基は、バイオポリマー系ポリマーを特定のニーズに合わせて更

10

20

30

40

50

に調整するため、例えば、生理活性分子の処理後グラフト等の処理後グラフトを可能にする。

【0024】

本発明による二官能性バイオポリマー系ポリマーは、第1及び第2の官能基で官能化することができる任意の種類バイオポリマー又はポリマー生体分子を含み得る。バイオポリマー及び高分子バイオポリマーには、天然起源に由来するポリマーが含まれる。本発明の目的で、「バイオポリマー」及び「ポリマー生体分子」という用語は同じ意味で使用される。本発明の目的で、「バイオポリマー系ポリマー」という用語は、全ての種類のバイオポリマー、バイオポリマーの誘導体、バイオポリマーの組み換え類縁体、高分子バイオポリマーの合成類縁体を指す。

10

【0025】

バイオポリマーの化学誘導体には、限定されるものではないが、官能化された側鎖を有するバイオポリマーと並んで、バイオポリマーの加水分解生成物が含まれる。

【0026】

バイオポリマーの組み換え類縁体は、生体内の所定の合成DNA配列をコードすることによって得られるバイオポリマーを含み、所定のアミノ酸配列を有するバイオポリマー又はタンパク質の合成をもたらす。

【0027】

バイオポリマーの合成類縁体は、種々のモノマーを互いに連結して合成的に作られたポリマーを含み、その結果、その側鎖に異なる官能基を含むポリマーをもたらす。かかる合成の例として、固相ペプチド合成が挙げられる。

20

【0028】

バイオポリマー系ポリマーの例としては、多糖、核酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸塩、デキストラン、アガロース、グリコサミノグリカン（例えばヒアルロン酸）、キトサン及びカラギーナン、並びに誘導体、組み換え類縁体及び合成類縁体、多糖、核酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸塩、デキストラン、アガロース、グリコサミノグリカン（例えば、ヒアルロン酸）、キトサン及びカラギーナンが挙げられる。

【0029】

本発明の目的では、生体適合性ポリマーもまた、バイオポリマー系ポリマーとみなされる。特に好ましいバイオポリマー系ポリマーは、ゼラチン及びコラーゲン、組み換えゼラチン及び組み換えコラーゲンを含む。

30

【0030】

第1の官能基は、フリーラジカル連鎖重合に続いてラジカル架橋可能な又はラジカル架橋されやすい任意の種類官能基を含むことができる。第1の官能基の好ましい例としては、メタクリルアミド官能基、アクリルアミド官能基、メタクリレート官能基及び/又はアクリレート官能基が挙げられる。特に好ましい第1の官能基は、メタクリルアミド (metacrylamide) 官能基及び/又はアクリルアミド官能基を含む。特定の実施の形態では、例えば二官能性修飾ゼラチンのような二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、例えばメタクリルアミド官能基又はアクリルアミド官能基又はメタクリレート官能基又はアクリレート官能基のような1種類のみ第1の官能基を含む。他の実施の形態では、例えば二官能性修飾ゼラチンのような二官能性能修飾バイオポリマー系ポリマーは、例えばメタクリルアミド官能基とアクリルアミド官能基との組み合わせのような、異なる第1の官能基の組み合わせを含む。

40

【0031】

第2の官能基は、チオール-エン架橋が可能な又はチオール-エン架橋されやすい任意の種類官能基を含み得る。好ましくは、第2の官能基は、競合的な単独重合を受け得ることなく、チオール-エン架橋が可能な又はチオール-エン架橋されやすい官能基を含む。第2の官能基は、例えばノルボルネン官能基、ビニルエーテル官能基、ビニルエステル官能基、アリルエーテル官能基、プロペニルエーテル官能基及び/又はアルケン官能基及び/又はN-ビニルアミド官能基を含む。特に好ましい第2の官能基は、ノルボルネン官能

50

基及び/又はビニルエーテル官能基を含む。特定の実施の形態では、例えば二官能性修飾ゼラチンのような二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、例えばノルボルネン官能基又はビニルエーテル官能基又はビニルエステル官能基又はアルケン官能基又はN-ビニルアミド官能基のような1種類のための第2の官能基を含む。他の実施の形態では、例えば二官能性修飾ゼラチンのような二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、例えばノルボルネン官能基とビニルエステル官能基との組み合わせのような、異なる第2の官能基の組み合わせを含む。

【0032】

好ましい実施の形態では、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、第1の官能基としてメタクリルアミド、及び第2の官能基としてノルボルネン官能基を含む。

10

【0033】

他の実施の形態では、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、第1の官能基としてメタクリルアミド、及び第2の官能基としてビニルエステル官能基を含む。

【0034】

更なる実施の形態では、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、第1の官能基としてアクリルアミド、及び第2の官能基としてノルボルネン官能基を含む。

【0035】

また更なる実施の形態では、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、第1の官能基としてアクリルアミド、及び第2の官能基としてビニルエステル官能基を含む。

【0036】

本発明による二官能性修飾ゼラチンは、好ましくは2%超の第1の官能基及び第2の官能基の総置換度を有する。第1の官能基及び第2の官能基の総置換度とは、第1の官能基の置換度及び第2の官能基の置換度の合計を意味する。総置換度は、2%~100%の範囲、例えば5%~100%、又は5%~95%、例えば20%、40%、50%、60%、70%、又は80%である。

20

【0037】

例えば、二官能性修飾ゼラチンのような二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、ポリマー鎖ごとに少なくとも1つの第1の官能基、好ましくはポリマー鎖ごとに2つ以上の第1の官能基を含み、ポリマー鎖ごとに少なくとも1つの第2の官能基、好ましくはポリマー鎖ごとに2つ以上の第2の官能基を含む。二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、ポリマー鎖ごとに、例えば、5個、10個、20個、30個、50個、60個、70個、80個、90個又は100個の第1の官能基、及び5個、10個、20個、30個、50個、60個、70個、80個、90個又は100個の第2の官能基を含む。

30

【0038】

本発明による二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、単一のポリマー鎖を含む場合もあれば、複数のポリマー鎖を含む場合もある。いずれの場合も、ポリマー鎖は第1の官能基及び第2の官能基の両方を含む。第1の官能基及び第2の官能基を1つのポリマー鎖に導入することにより、バイオポリマー系ポリマーは相分離を受けない。

【0039】

本発明による二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、ヒドロゲルを製造するのに特に重要である。バイオポリマー系ポリマーの2つの官能基は、それらのバイオポリマー系ポリマーを多くの用途に魅力的なものとしている。

40

【0040】

二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、例えば或る特定の官能基を局所的に制御して組み込むことで、天然の細胞外マトリクスのより良好な模倣物を得ることを可能にする。

【0041】

また、この二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、追加のチオール-エン架橋を利用することで、局所的で制御された強度及び/又は剛性のゾーンを導入することができる。

【0042】

さらに、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーにより、簡単な製造後の官能化と併せ

50

て、材料の取り扱いが簡単になる。

【0043】

加えて、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーは、親水性又は疎水性の官能基の架橋後グラフトにより最終材料の吸水能及び溶媒との相溶性を制御することを可能にする。

【0044】

本発明の第2の態様によれば、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーを製造する方法が提供される。本方法は、

a) 少なくとも1つのポリマー鎖を含むバイオポリマー系ポリマーを準備する工程であって、該ポリマー鎖が、一級官能基を含む、工程と、

b) 該一級官能基の第1の部分为官能化してn個の第1の官能基を導入する工程であって、nはゼロではなく、該第1の官能基が、フリーラジカル連鎖重合に続いてラジカル架橋され得る、工程と、

c) 該一級官能基の第2の部分为官能化してm個の第2の官能基を導入する工程であって、mはゼロではなく、該第2の官能基が、チオール-エン架橋性基を含む、工程と、を含み、

工程b)及び工程c)を同時に行うことができるか、又は工程b)を工程c)の前若しくは後に行うことができる。好ましい方法では、工程b)は、工程c)の前に行われる。代替の方法では、工程c)は、工程b)の前に行われる。工程b)の前に工程c)を行う方法には、第1の官能基との反応の前に官能基を導入する利点がある。これは、架橋前の材料の疎水性に影響を与えるか、又は架橋後に切断することができる光可逆基をチオール-エン化学を介して導入して、より低い機械的特性のゾーンを時空間制御によって導入するために重要となる可能性がある。

【0045】

バイオポリマー系ポリマーの一級官能基は、例えばアミン官能基、例えば一級アミン官能基、カルボン酸官能基、ヒドロキシル官能基又はそれらの組み合わせを含む。

【0046】

好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はアミン官能基を含み、工程b)は、これらのアミン官能基又はこれらのアミン官能基の一部の、例えば無水メタクリル酸との反応を含む。

【0047】

他の好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はカルボン酸官能基を含み、工程b)は、これらのカルボン酸官能基又はこれらのカルボン酸官能基の一部の反応を含む。

【0048】

更に好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はヒドロキシル官能基を含み、工程b)は、これらのヒドロキシル官能基又はこれらのヒドロキシル官能基の一部の反応を含む。

【0049】

一級官能基が、例えば、アミン官能基、カルボン酸官能基及び/又はヒドロキシル官能基の組み合わせのような、一級官能基の組み合わせを含む場合、工程b)が、反応の組み合わせ、例えば、アミン官能基若しくはアミン官能基の一部の、例えば、無水メタクリル酸との反応、及び/又はカルボン酸官能基若しくはカルボン酸官能基の一部の反応、及び/又はヒドロキシル官能基若しくはヒドロキシル官能基の一部の反応を含み得ることは明らかである。

【0050】

別の好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はアミン官能基を含み、工程c)は、これらのアミン官能基又はこれらのアミン官能基の一部の、例えば5-ノルボルネン-2-カルボン酸との反応を含む。アミン官能基又はアミン官能基の一部の好ましい反応は、カルボジイミドカップリング化学を用いて(例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)/N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を使

10

20

30

40

50

用する)、5-ノルボルネン-2-カルボン酸をアミン官能基にカップリングする。

【0051】

別の好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はアミン官能基を含み、工程c)は、アミン官能基又はアミン官能基の一部のカルボン酸(carbic)無水物との反応を含む。

【0052】

また更に好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はカルボン酸官能基を含み、工程c)は、これらのカルボン酸官能基又はこれらのカルボン酸官能基の一部の、例えば5-ノルボルネン-2-メチルアミンとの反応を含む。カルボン酸官能基又はカルボン酸官能基の一部の好ましい反応は、カルボジイミドカップリング化学を用いて、5-ノルボルネン-2-メチルアミンをカルボン酸官能基にカップリングする。

10

【0053】

また更に好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はヒドロキシル基を含み、工程c)は、これらのヒドロキシル官能基又はこれらのヒドロキシル官能基の一部の反応を含む。

【0054】

一級官能基が、例えば、アミン官能基、カルボン酸(carboxylic acid)官能基及び/又はヒドロキシル官能基の組み合わせのような、一級官能基の組み合わせを含む場合、工程c)が、反応の組み合わせ、例えば、上記反応の組み合わせ、例えば、アミン官能基若しくはアミン官能基の一部の、例えばカルボジイミドカップリング化学を用いる、例えば5-ノルボルネン-2-カルボン酸との反応、及び/又はカルボン酸官能基若しくはこれらのカルボン酸官能基の一部の、例えばカルボジイミドカップリング化学を用いる、例えば5-ノルボルネン-2-メチルアミンとの反応、及び/又はヒドロキシル官能基若しくはヒドロキシル官能基の一部の反応の組み合わせを含み得ることは明らかである。

20

【0055】

特に好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はアミン官能基を含み、工程b)は、これらのアミン官能基の一部の、例えば無水メタクリル酸との反応を含むが、工程c)は、これらのアミン官能基の一部の、例えば5-ノルボルネン-2-カルボン酸との反応を含むか、又は工程c)は、これらのアミン官能基の一部の、カルボン酸無水物との反応を含む。

30

【0056】

別の特に好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はカルボン酸官能基を含み、工程b)は、これらのカルボン酸官能基の一部の、例えば2-アミノエチルメタクリレートとの反応を含むが、工程c)は、これらのカルボン酸官能基の一部の、例えば5-ノルボルネン-2-メチルアミンとの反応を含む。

【0057】

更に特に好ましい方法では、バイオポリマー系ポリマーの一級官能基はアミン官能基及び/又はカルボン酸官能基を含み、工程b)は、これらのアミン官能基の一部の、例えば無水メタクリル酸との反応、及び/又はこれらのカルボン酸官能基の一部の、例えば2-アミノエチルメタクリレートとの反応を含むが、工程c)は、アミン官能基の一部の、例えば5-ノルボルネン-2-カルボン酸との反応、及びカルボン酸官能基の一部の、例えば5-ノルボルネン-2-メチルアミンとの反応を含む。

40

【0058】

好ましい方法は、二官能性修飾ゼラチンを製造する方法に関する。本方法は、

a)少なくとも1つのポリマー鎖を含むゼラチンを準備する工程であって、該ポリマー鎖が、例えばアミン官能基及び/又はカルボン酸(carboxylic acid)官能基のような一級官能基を含む、工程と、

b)該一級官能基の第1の部分を官能化してn個の第1の官能基を導入する工程であって、nはゼロではなく、該第1の官能基が、フリーラジカル連鎖重合に続いてラジカル架橋され得る、工程と、

50

c) 該一級官能基の第2の部分に官能化してm個の第2の官能基を導入する工程であって、mはゼロではなく、該第2の官能基が、チオール-エン架橋性基を含む、工程と、を含む、

工程b)及び工程c)を同時に行うことができるか、又は工程b)を工程c)の前若しくは後に行うことができる。好ましい方法では、工程b)は、工程c)の前に行われる。代替の方法では、工程c)は、工程b)の前に行われる。

【0059】

ゼラチンの一級官能基は、例えばアミン官能基、例えば一級アミン官能基、カルボン酸官能基、ヒドロキシル官能基又はそれらの組み合わせを含む。

【0060】

好ましい方法では、ゼラチンの一級官能基はアミン官能基を含み、工程b)は、これらのアミン官能基又はこれらのアミン官能基の一部の、例えば無水メタクリル酸との反応を含む。

【0061】

他の好ましい方法では、ゼラチンの一級官能基はカルボン酸官能基を含み、工程b)は、これらのカルボン酸官能基又はこれらのカルボン酸官能基の一部の反応を含む。

【0062】

ゼラチンの一級官能基が、例えばアミン官能基及び/又はカルボン酸官能基及び/又はヒドロキシル官能基のような、異なる官能基の組み合わせを含む場合、工程b)が、反応の組み合わせ、すなわち、アミン官能基若しくはアミン官能基の一部の、例えば無水メタクリル酸との反応、及び/又はカルボン酸官能基若しくはカルボン酸官能基の一部の、例えば2-アミノエチルメタクリレートとの反応を含み得ることは明らかである。ゼラチンが更なる一級官能基を含む場合、工程b)は、これらの更なる一級官能基又はこれらの更なる一級官能基の一部の反応を更に含んでもよい。

【0063】

別の好ましい方法では、ゼラチンの一級官能基はアミン官能基を含み、工程c)は、これらのアミン官能基又はこれらのアミン官能基の一部の、例えば5-ノルボルネン-2-カルボン酸との反応を含む。アミン官能基又はアミン官能基の一部の好ましい反応は、カルボジイミドカップリング化学を用いて(例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)/N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を使用する)、5-ノルボルネン-2-カルボン酸をアミン官能基にカップリングする。

【0064】

更に好ましい方法では、ゼラチンの一級官能基はカルボン酸官能基を含み、工程c)は、これらのカルボン酸官能基又はこれらのカルボン酸官能基の一部の、例えば5-ノルボルネン-2-メチルアミンとの反応を含む。カルボン酸官能基又はカルボン酸官能基の一部の好ましい反応は、カルボジイミドカップリング化学を用いて、5-ノルボルネン-2-メチルアミンをカルボン酸官能基にカップリングする。

【0065】

別の好ましい方法では、ゼラチンの一級官能基はアミン官能基を含み、工程c)は、アミン官能基又はアミン官能基の一部のカルボン酸無水物との反応を含む。

【0066】

一級官能基が、アミン官能基及びカルボン酸官能基の組み合わせを含む場合、工程c)が、反応の組み合わせ、すなわち、反応又は上記反応の組み合わせ、例えば、アミン官能基若しくはアミン官能基の一部の、例えばカルボジイミドカップリング化学を用いる、例えば5-ノルボルネン-2-カルボン酸との反応と、カルボン酸官能基若しくはこれらのカルボン酸官能基の一部の、例えばカルボジイミドカップリング化学を用いる、例えば5-ノルボルネン-2-メチルアミンとの反応との組み合わせを含み得ることは明らかである。ゼラチンが更なる一級官能基を含む場合、工程c)は、これらの更なる一級官能基又はこれらの更なる一級官能基の一部の反応を更に含んでもよい。

【0067】

10

20

30

40

50

特に好ましい方法では、ゼラチンの一級官能基はアミン官能基を含み、工程b)は、これらのアミン官能基の一部の、例えば無水メタクリル酸との反応を含むが、工程c)は、これらのアミン官能基の一部の5-ノルボルネン-2-カルボン酸との反応を含むか、又は工程c)は、これらのアミン官能基の一部の、カルボン酸無水物との反応を含む。

【0068】

別の特に好ましい方法では、ゼラチンの一級官能基はカルボン酸官能基を含み、工程b)は、これらのカルボン酸官能基の一部の反応を含むが、工程c)は、これらのカルボン酸官能基の一部の5-ノルボルネン-2-メチルアミンとの反応を含む。

【0069】

更に特に好ましい方法では、ゼラチンの一級官能基はアミン官能基及びカルボン酸官能基を含み、工程b)は、これらのアミン官能基の一部の、例えば無水メタクリル酸との反応、及びこれらのカルボン酸官能基の一部の、例えば2-アミノエチルメタクリレートとの反応を含むが、工程c)は、アミン官能基の一部の5-ノルボルネン-2-カルボン酸との反応、及びカルボン酸官能基の一部の5-ノルボルネン-2-メチルアミンとの反応を含む。

10

【0070】

更に好ましい方法は、二官能性修飾コラーゲンを製造する方法に関する。二官能性修飾コラーゲンの製造のために、二官能性修飾ゼラチンの製造と同一又は類似の方法を考慮することができる。

【0071】

本発明の第3の態様によれば、ヒドロゲルを製造する方法が提供される。本方法は、
a) 上記した二官能性修飾バイオポリマー系ポリマー、例えば二官能性修飾ゼラチン又は二官能性修飾コラーゲンを準備する工程と、
b) 上記n個の第1の官能基の少なくとも一部のフリーラジカル連鎖重合によって上記二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーを架橋する工程と、
c) 上記m個の第2の官能基の少なくとも一部を架橋及び/又は官能化する工程と、を含む。

20

【0072】

本発明によるヒドロゲルを製造する方法の利点は、二官能性修飾バイオポリマー系ポリマーを、工程c)で定めるように架橋能及び/又は官能化能を維持しながら、工程b)で定めるように架橋することができることである。

30

【0073】

本発明によるヒドロゲルを製造する方法の別の利点は、工程b)でフリーラジカル連鎖重合を用いてチオール化架橋剤がない場合に架橋を得ることができることである。反対に、例えばチオール-エンゼラチンのようなチオール-エンバイオポリマー又はバイオポリマー系ポリマーは、架橋前にチオール化架橋剤を必要とする。

【0074】

本発明による架橋性溶液はチオール化架橋剤を必要としないため、幾つかのバイオポリマー(例えばゼラチン)は、溶液状態で留まるためには30 超又は更には40 超に加熱する必要があることから、チオール-エン架橋性バイオポリマーと比較して架橋性溶液はより安定なままである。30 を超える温度では、チオール化架橋剤によりジスルフィド形成が起こる可能性がある。ジスルフィド形成は、架橋の間に反応した官能基の数に対する制御を低下させ、より一層軟弱なヒドロゲルをもたらすことから、これは、チオール-エン架橋性バイオポリマーの重大な欠点とみなされる。

40

【0075】

チオール-エン架橋性バイオポリマー又はバイオポリマー系ポリマーの更なる欠点は、架橋を必要とするエン官能基の数に対応するように、架橋剤の量を正確に計算する必要があることである。

【0076】

好ましい方法では、工程b)は、例えば幹細胞、軟骨細胞、線維芽細胞等を含む生細胞の存在下での架橋を含む。この目的のため、材料の溶液内に細胞懸濁液を調製し、続いて

50

UV誘導架橋を行うが、それによって懸濁した細胞を殺すことはない。その結果、ヒドロゲル内に均質な細胞分布を得ることができる。

【0077】

ヒドロゲルを製造する方法の工程c)は、架橋若しくは官能化のいずれかを含んでもよく、又はm個の官能基の第1の部分の架橋すること、及びm個の官能基の第2の部分の官能化することによる架橋及び官能化の組み合わせを含んでもよい。

【0078】

特に好ましい種類の官能化は、グラフト、特に例えばリソグラフィ及び/又は多光子アシストフォトグラフト(2光子重合)を用いるフォトグラフトを含む。

【0079】

本発明によるヒドロゲルは、例えば、より高い強度の局所ゾーン及び/又はより高い剛性のゾーンを導入することを可能にし、またこれを制御された方法で導入することを可能にする。これは、例えば、多官能性チオールを含む溶液内で架橋されたヒドロゲルを膨潤させ、続いて局所化されたグラフトを行うことにより達成され得る。局所化されたグラフトは、フォトマスク又は多光子リソグラフィのいずれかを用いて行うことができ、それによってより密度の高い架橋ゾーンを導入することができる。

【0080】

さらに、ヒドロゲルは、増殖因子又は細胞接着のゾーン(例えば、RGD配列)の局所導入を可能にする。

【0081】

この官能化により、例えばチオール-エン機構を用いた活性化合物の共有結合による固定化によって、活性化合物の導入が可能になる。活性化合物は、例えば、ヒドロゲルの分解の際に徐々に放出され得る医薬化合物を含む。

【0082】

さらに、親水性基(例えばPEG)又は疎水性基(例えば7-メルカプト-4-メチルクマリン)をグラフトすることにより、吸水能に影響を与える場合がある。

【0083】

本発明の第4の態様によれば、ヒドロゲル、特に官能化ヒドロゲルが提供される。

【0084】

本発明の第5の態様によれば、ヒドロゲル、特に官能化ヒドロゲルの使用が提供される。

【0085】

本発明による(官能化)ヒドロゲルは、例えば組織工学のような生物医学用途において特に重要である。(官能化)ヒドロゲルは、例えば創傷被覆材として適合される。m個の第2の官能基又はm個の第2の官能基の一部は、さらに、追加の機能を提供することができる。

【0086】

本発明による二官能性修飾ポリマーから得られる架橋性溶液は、高温(30 超又は40 超)でも高い安定性を有するため、二官能性修飾ポリマーは3D印刷に適している。これは、例えば、材料の物性に影響を与える可能性がある高温での安定性が制限されているため、チオール-エンヒドロゲルの3D印刷は困難であることから、当該技術分野で既知のチオール-エンヒドロゲルのようなヒドロゲルに対する重要な利点である。

【0087】

添付の図面を参照して、以下で、より詳細に本発明を検討する。

【図面の簡単な説明】

【0088】

【図1】平衡膨潤状態における異なるゼラチン誘導体の貯蔵弾性率G'(上)及び質量膨潤率(下)を示す図である(全てのヒドロゲルを、2モル%(光架橋性基の量に対して)のLi-TPO-L光開始剤の存在下、10重量/体積%濃度で架橋した)。

【図2】異なる時空間エネルギーにおける架橋gel-MOD-NBペレット内部の蛍光7-メチル-4-メルカプトクマリンの多光子アシストグラフトの蛍光顕微鏡画像(左)及び通常の光学

10

20

30

40

50

顕微鏡画像（右）を示す図である。

【図3】異なるゼラチン誘導体に対して異なるゼラチン濃度を用いた細胞生存率を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0089】

特定の実施形態に関して、或る特定の図面を参照して、本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【0090】

実施例1：調製方法及び二官能性ゼラチン（gel-MOD-NB）

材料

以下の化学物質を使用した：

Roussetot（ベルギー国ヘント）により提供された、牛皮からアルカリ処理で単離されたゼラチンBタイプ。

Sigma-Aldrich（ベルギー国ディーゲム）製の無水メタクリル酸、5-ノルボルネン-2-カルボン酸、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピル)-カルボジイミド塩酸塩（EDC）、D,L-ジチオスレイトール（dithiothreitol）（DTT）。

Acros（ベルギー国ギール）から購入したジメチルスルホキシド（DMSO）（99.85%）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（98%）（NHS）。

BASF製のIrgacure 2959（1-[4-(2-ヒドロキシエトキシ)-フェニル]-2-ヒドロキシ-2-メチル-1-プロパン-1-オン）。

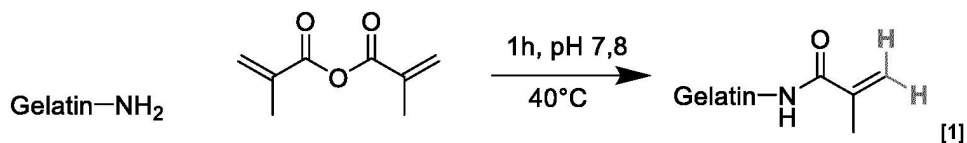
polylab（ベルギー国アントワープ）から透析膜Spectra/por（MWCO 12 kDa ~ 14 kDa）を受け取った。

【0091】

gel-MODの調製

DS（置換度）72%のgel-MODを、A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, and H. Berghmans, "Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 1, no. 1, pp. 31-38, Mar. 2000に記載されるプロトコルに従い、以下の反応により合成した。

【化1】



ゼラチン-NH₂

1時間、pH7.8

ゼラチン

【0092】

簡単に言えば、100 gのゼラチンBタイプを40 のリン酸バッファー（pH7.8）1 Lに溶解した。完全に溶解した後、（ヒドロキシ-）リジン側鎖及びオルニチン側鎖に存在する一級アミンに対して1当量の無水メタクリル酸を添加し、混合物を勢いよく攪拌した。1時間後、再蒸留水（DDW）1 Lを用いて混合物を希釈し、DDWに対して24時間の間、透析膜（Spectra/por MWCO 12 kDa ~ 14 kDa）に導入した。透析後、NaOHを用いて混合物のpHを7.4に調整してより密接に天然ECMを模倣し、凍結乾燥（Christ凍結乾燥装置Alpha 2-4 LSC）を用いてgel-MODを単離した。

【0093】

gel-MOD-NBの調製

10 gのgel-MOD-NBを調製するため、最初に5-ノルボルネン-2-カルボン酸をそのスクシンイミジルエステルへと活性化した。この目的のため、最初に、添加されるEDCに対し

10

20

30

40

50

て1.6倍過剰 (638 mg、4.62 mmol) の5-ノルボルネン-2カルボン酸を乾燥DMSO (乾燥剤としてCaH₂を用いた真空蒸留によって得られる) 50 mlに溶解した。完全に溶解した後、0.75当量のEDC (555 mg、2.9 mmol) (ゼラチン10 g中に存在する元の一級アミンに対して、すなわち0.38 mmol/gゼラチン) 及び1.5当量のNHS (EDCに対して) 添加し、続いて3回脱気した。反応を少なくとも25時間にわたって行い、次の反応工程の間にゼラチン架橋をもたらず可能性がある、あらゆる未反応EDC官能基を排除した。

【0094】

25時間の反応後、既知のDSを有する10 gのgel-MODを、不活性雰囲気 (Ar) 及び還流条件下、50 の乾燥DMSO (乾燥剤としてCaH₂を用いた真空蒸留によって得られる) 150 mlに溶解した。添加後、セットアップを3回脱気し、アルゴン雰囲気下に置いた。完全に溶解した後、調製した5-ノルボルネン-2-スクシンイミジルエステル混合物をゼラチン溶液に添加し、続いて3回脱気した。混合物を、不活性雰囲気及び還流条件下、50 で5時間~20時間反応させた。

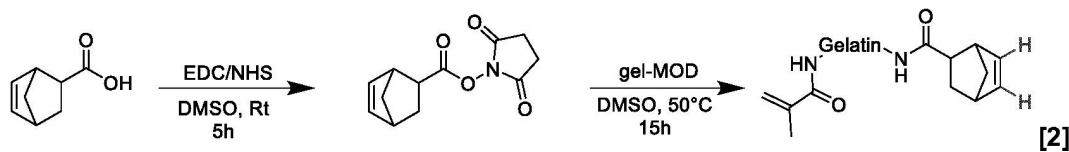
10

【0095】

反応後、混合物を10倍過剰のアセトンで沈殿させ、Buechnerフィルターを使用して濾紙 (VWR、孔径: 12 µm~15 µm) で濾過し、DDWに溶解して、DDWに対して40 で24時間の間透析した (Spectra/por 4: MWCO 12 kDa~14 kDa)。透析後、NaOHを用いてpHを7.4に調整し、続いて凍結及び凍結乾燥した (Christ凍結乾燥装置Alpha2-4 LSC)。gel-MOD-NBの調製を、反応[2]によって説明する:

【化2】

20



DMSO、室温
5時間

ゼラチン
15 時間

【0096】

30

gel-MOD-NBの特性

図1は、異なるゼラチン誘導体の貯蔵弾性率G' (上) 及び質量膨潤率 (下) を示す。貯蔵弾性率G'は、それぞれ、gel-MOD DS 72の場合、gel-NB DS 90 + DTT (チオール/エン: 1)の場合、5 mMのDTTの存在下での追加の30分間の架橋に続く平衡膨潤の前後の、gel-MOD-NB DS 72の場合、及びgel-MOD DS 95の場合の、30分間の架橋 (光開始剤として2モル% (架橋性官能基の量に対して) のLi-TPO-Lを用いる) 及びmilliQ中で24時間のインキュベーションの後の平衡膨潤状態の10重量/体積%の架橋ゼラチンの貯蔵弾性率と一致する。

【0097】

図1の下部パネルに、gel-MOD DS 72、gel-MOD DS 95、及びgel-MOD-NB DS 72の質量膨潤率を示す。

40

【0098】

第1のメタクリルアミド (methacrylamide) 官能基の架橋及び平衡膨潤の後、gel-MOD-NB誘導体は、メタクリルアミドのみが重合されたものの、類似のDSを有するgel-MODと比較してわずかに高い剛性を示す。本発明者らはいかなる理論にも拘束されることを望んでいないが、この機械的特性の増加は、疎水性ノルボルネン官能基の存在の結果であり、図1から分かるように、通常のgel-MODと比較してゲルの吸水能が低くなることが予想される。

【0099】

さらに、gel-MOD-NBは、置換度が高い (例えば90%) 完全架橋gel-NBと比較して高

50

い剛性を示すことに留意されたい。加えて、gel-MOD-NBの機械的特性は、同様のDSを有するgel-MODの機械的特性の間にあるが、完全に官能化されたgel-MODの剛性を下回る（図1を参照されたい）。さらに、二官能性の概念の証明として、平衡膨潤後のDTTの存在下でのUV照射後に追加の剛性を導入することができ、それによってチオール-エンフォトグラフトの恩恵を受ける（図1を参照されたい）。しかしながら、チオール-エン架橋は、従来の連鎖重合ヒドロゲルと比較して低い架橋密度を特徴とするより均質なネットワークとなるため、形成される追加の架橋の性質によって更に低い機械的特性が得られる。

【0100】

図2は、ノルボルネン官能基を活用した、異なる時空間エネルギーにおける本発明による架橋型二官能性修飾ゼラチン（gel-MOD-NB）ペレット内の蛍光7-メチル-4-メルカプトクマリンの2光子重合アシストフォトグラフトの結果を示す。

10

【0101】

図2の左図は、蛍光顕微鏡画像を示す。この画像は、高度の時空間制御を伴うクマリンの存在を示す。

【0102】

図2の右図は通常の顕微鏡画像であり、クマリンのグラフトが局所収縮につながり、屈折率に観察可能な差を生じることを示す。全ての書き込み速度を低レーザー出力（例えば、25 mW）とした場合に屈折率の差が観察されないことに加え、蛍光顕微鏡検査は化合物のグラフトに成功したことを明らかに示していることに留意されたい。

【0103】

20

二官能性修飾ゼラチン（gel-MOD-NB）によって、高度な時空間制御を伴う製造後のグラフトが可能になり、ノルボルネン官能基は最初の架橋工程の影響を受けないことが証明されたということが、図2（左図及び右図）からわかる。

【0104】

高エネルギーでは、局所的に過剰露光されて材料の一部が除去される結果、グラフトはそれほど成功しないことに留意されたい。

【0105】

図3は、presto blueアッセイを使用して、異なる前駆物質の存在下で2時間後、及び異なる前駆物質の不在下で24時間の回復後にコンフルエント脂肪組織由来幹細胞で測定された代謝活性を示す。この目的のため、最初に96ウェル当たり200万細胞/培地mLを100 μ L播種することにより、GFP標識された脂肪組織由来幹細胞（17継代）のコンフルエントの単層を得た。次に、24時間のインキュベーション後、細胞はコンフルエントに達した。次に、ヒドロゲル前駆物質を含む溶液100 μ Lを上に入れ、更に2時間のインキュベーションを行った。24時間のインキュベーション後、presto blueアッセイを用いて代謝活性を測定し、その後、ウェルプレートから材料を除去した。更に24時間のインキュベーションに続いて、ヒドロゲル前駆物質の存在下でのインキュベーションの最初の2時間間に誘発された細胞損傷の指標として、presto blueアッセイを用いて代謝活性を測定した。

30

【0106】

図3は、本発明による二官能性修飾ゼラチン（gel-MOD-NB）が、gel-MODと同等の細胞毒性を示すことを示し、これを組織工学及び再生医学の分野におけるゴールドスタンダードの1つとみなすことができる。加えて、概して、gel-NBと比較すると、より高い細胞生存率が得られ、これは文献では慣習的に細胞適合性とされている。

40

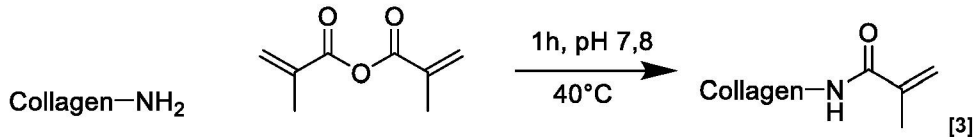
【0107】

実施例2：調製方法及び二官能性コラーゲン（col-MOD-NB）
col-MODの調製

A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, and H. Berghmans, "Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 1, no. 1, pp. 31-38, Mar. 2000に記載されるプロトコルを適合させ、以下の反応に従ってcol-MODを合成した。

50

【化3】



コラーゲン-NH₂ 1時間、pH7.8 コラーゲン

【0108】

簡単に言えば、コラーゲン100 gを40 のリン酸バッファー（pH7.8）1 Lに溶解した。完全に溶解した後、（ヒドロキシ-）リジン側鎖に存在する一級アミンに対して1当量、2当量又は5当量の無水メタクリル酸を添加し、混合物を勢いよく攪拌した。1時間後、再蒸留水（DDW）1 Lを用いて混合物を希釈して、DDWに対して24時間の間、透析膜（Spectra/por MWCO 12 kDa ~ 14 kDa）に導入した。透析後、NaOHを用いて混合物のpHを7.4に調整してより密接に天然ECMを模倣し、凍結乾燥（Christ凍結乾燥装置Alpha 2-4 LSC）を用いてcol-MODを単離した。

10

【0109】

col-MOD-NBの調製

10 gのcol-MOD-NBを調製するため、最初に5-ノルボルネン-2-カルボン酸をそのスクシンイミジルエステル（succinimidyl ester）へと活性化した。この目的のため、最初に、添加されるEDCに対して1.6倍過剰の5-ノルボルネン-2カルボン酸を乾燥DMSO（乾燥剤としてCaH₂を用いた真空蒸留によって得られる）50 mlに溶解した。完全に溶解した後、0.75当量のEDC（コラーゲン10 g中に存在する元の一級アミンに対して）及び1.5当量のNHS（EDCに対して）を添加し、続いて3回脱気した。反応を少なくとも25時間にわたって行い、次の反応工程の間にコラーゲン架橋をもたらす可能性がある、あらゆる未反応EDC官能基を排除した。

20

【0110】

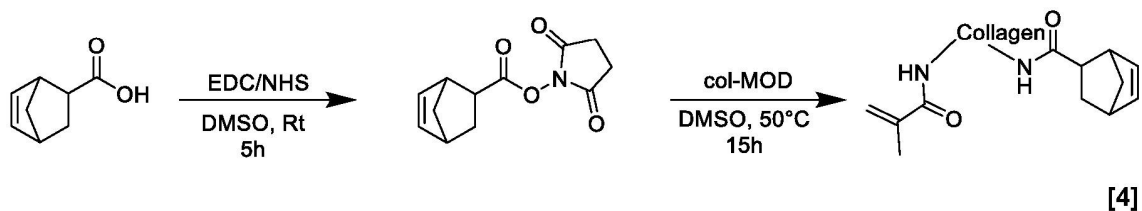
25時間の反応後、既知のDSを有する10 gのcol-MODを、不活性雰囲気（Ar）及び還流条件下、50 の乾燥DMSO（乾燥剤としてCaH₂を用いた真空蒸留によって得られる）150 mlに溶解した。添加後、セットアップを3回脱気し、アルゴン雰囲気下に置いた。完全に溶解した後、調製した5-ノルボルネン-2-スクシンイミジルエステル（succinimidyl ester）混合物をコラーゲン溶液に添加し、続いて3回脱気した。混合物を、不活性雰囲気及び還流条件下、50 で5時間~20時間反応させた。

30

【0111】

反応後、混合物を10倍過剰のアセトンで沈殿させ、Buechnerフィルターを使用して濾紙（VWR、孔径：12 μm ~ 15 μm）で濾過し、DDWに溶解して、DDWに対して40 で24時間の間透析した（Spectra/por 4 : MWCO 12 kDa ~ 14 kDa）。透析後、NaOHを使用してpHを7.4に調整し、続いて凍結及び凍結乾燥した（Christ凍結乾燥装置Alpha 2-4 LSC）。col-MOD-NBの調製を、反応[4]によって説明する。

【化4】



【4】

DMSO、室温
5時間

コラーゲン
15時間

【符号の説明】

40

50

【 0 1 1 2 】

図面記

図1

Storage modulus 貯蔵弾性率

Mass swelling ratio 質量膨潤率

図3

Cell viability (%) 細胞生存率 (%)

Gelatin concentration (w/v%) ゼラチン濃度 (重量/体積%)

gel-MOD 2h gel-MOD 2時間

gel-MOD 24h gel-MOD 24時間

gel-MOD-NB 2h gel-MOD-NB 2時間

gel-MOD-NB 24h gel-MOD-NB 24時間

gel-NB 2h gel-NB 2時間

gel-NB DS90 24h gel-NB DS90 24時間

【 図面 】

【 図 1 】

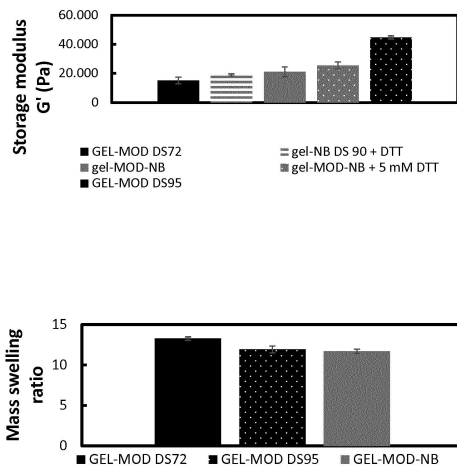


Fig. 1

【 図 2 】

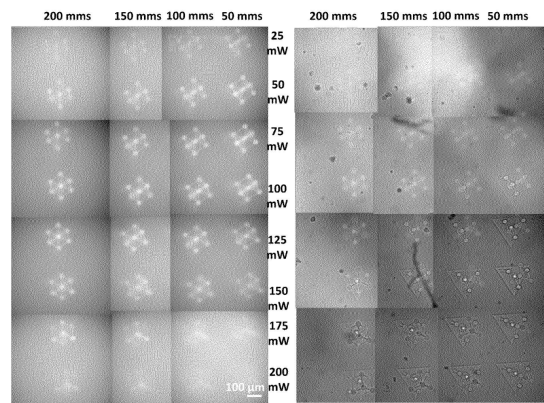


Fig. 2

10

20

30

40

50

【 3 】

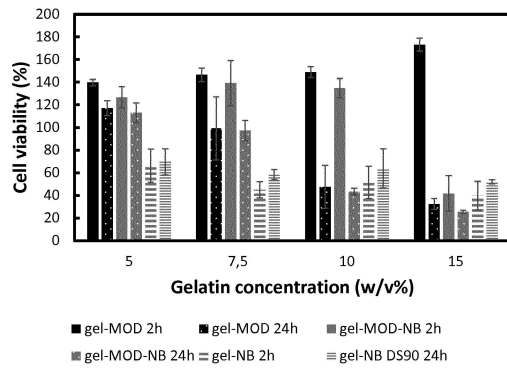


Fig. 3

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 資延 由利子
(74)代理人 100135208
弁理士 大杉 卓也
(74)代理人 100163544
弁理士 平田 緑
(74)代理人 100183656
弁理士 庄司 晃
(72)発明者 ヴァン ホーリック, ジャスパー
ベルギー, 1761 ロースダール, ヘルストストラート 24
(72)発明者 ヴァン プリールベルヘ, サンドラ
ベルギー, 9100 セント - ニクラス, フローテ ハイメリンクストラート 160
審査官 内田 靖恵
(56)参考文献 国際公開第2006/034128(WO, A2)
中国特許出願公開第111378082(CN, A)
中国特許出願公開第107213523(CN, A)
特表2014-531503(JP, A)
特表2014-503017(JP, A)
米国特許出願公開第2017/0183453(US, A1)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C08F299
C08F290