

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7137213号

(P7137213)

(45)発行日 令和4年9月14日(2022.9.14)

(24)登録日 令和4年9月6日(2022.9.6)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 L	24/04	(2006.01)	A 6 1 L	24/04	1 0 0
A 6 1 L	24/00	(2006.01)	A 6 1 L	24/00	2 4 0
A 6 1 L	24/06	(2006.01)	A 6 1 L	24/04	2 0 0
A 6 1 L	24/08	(2006.01)	A 6 1 L	24/06	
			A 6 1 L	24/08	

請求項の数 54 (全49頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-549573(P2018-549573)

(86)(22)出願日 平成29年3月22日(2017.3.22)

(65)公表番号 特表2019-509138(P2019-509138 A)

(43)公表日 平成31年4月4日(2019.4.4)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/023538

(87)国際公開番号 WO2017/165490

(87)国際公開日 平成29年9月28日(2017.9.28)

審査請求日 令和2年3月19日(2020.3.19)

(31)優先権主張番号 62/311,646

(32)優先日 平成28年3月22日(2016.3.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/356,939

(32)優先日 平成28年6月30日(2016.6.30)

最終頁に続く

(73)特許権者 507044516

プレジデント アンド フェローズ オブ
ハーバード カレッジ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
1 3 8, ケンブリッジ, クインシー
ストリート 1 7

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 リ, ジアンユ

カナダ国 エイチ3イー 1ダブリュ3
ケベック, ベルダン, リュ ベルリオ
ーズ 6

(72)発明者 セリズ, アダム ディー.

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体適合性接着剤およびその使用の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、前記第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、前記第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、ヒドロゲル；

b) 高密度一級アミンポリマー；および

c) カップリング剤

を含む、生体適合性接着剤システムであって、前記高密度一級アミンポリマーは、モノマー単位当たり少なくとも1つの一級アミンを含む、かつ／またはキトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアルリルアミン、ポリリシンおよびポリエチレンイミンからなる群から選択される、システム。

【請求項2】

前記第1のポリマーネットワークが、ポリアクリルアミド、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）（PHEMA）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリホスファゼン、コラーゲン、ゼラチン、ポリ（アクリレート）、ポリ（メタクリレート）、ポリ（メタクリルアミド）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAM）、ポリ（N,N-ジメチルアクリルアミド（dimethylacrylamide））、ポリ（アリルアミン）およびそれらのコポリマーからなる群から選択される、請求項1に記載のシステム。

【請求項3】

前記第 1 のポリマーネットワークが、ポリエチレングリコール（PEG）である、請求項 2 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記第2のポリマーネットワークが、アルギネート、ペクテート、カルボキシメチルセルロース、酸化カルボキシメチルセルロース、ヒアルノナート、キトサン、 κ -カラゲナン、 ι -カラゲナンおよび λ -カラゲナンからなる群から選択され、前記アルギネート、カルボキシメチルセルロース、ヒアルノナート、キトサン、 κ -カラゲナン、 ι -カラゲナンおよび λ -カラゲナンの各々が任意選択で酸化され、前記アルギネート、カルボキシメチルセルロース、ヒアルノナート、キトサン、 κ -カラゲナン、 ι -カラゲナンおよび λ -カラゲナンが、メタクリレート、アクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、チオール、ヒドラジン、テトラジン、ノルボルネン、トランスシクロオクテンおよびシクロオクチンからなる群から選択される1つまたは複数の基を任意選択で含む、請求項1から3のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 5】

前記第 2 のポリマーネットワークがアルギネートを含む、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 6】

前記アルギネートが高分子量アルギネートおよび低分子量アルギネートの混合物で構成される、請求項5に記載のシステム。

【請求項 7】

前記高分子量アルギネート対前記低分子量アルギネートの比が約 5 : 1 ~ 約 1 : 5 である、請求項 6 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記第 1 のポリマーネットワークおよび前記第 2 のポリマーネットワークが共有結合している、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 9】

前記ヒドロゲルが約30%～約98%の水を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 10】

前記ヒドロゲルがパッチの形態で作製される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 1 1】

前記カップリング剤が第 1 のカルボキシル活性化剤を含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 1 2】

前記第 1 のカルボキシル活性化剤がカルボジイミドである、請求項 1 1 に記載のシステム。

【請求項 13】

前記カルボジイミドが、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC、EDACまたはEDCI)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)およびジイソプロピルカルボジイミド(DIC)からなる群から選択される、請求項12に記載のシステム。

【請求項 14】

前記カップリング剤が第2のカルボキシル活性化剤をさらに含む、請求項11から13のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 15】

前記第2のカルボキシル活性化剤が、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド（スルホ-NHS）、ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）、ジメチルアミノピリジン（DMAP）、ヒドロキシ-3，4-ジヒドロ-4-オキソ-1，2，3-ベンゾトリアジン（HOObt/HODhbt）、1-ヒドロキシ-7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール（HOAt）、エチル2-シアノ-2-（ヒド

ロキシイミノ) アセテート、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリス (ジメチルアミノ) -ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (BOP)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、7-アザ-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシートリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)、エチルシアノ (ヒドロキシイミノ) アセタト-O2) -トリ- (1-ピロリジニル) -ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、3- (ジエトキシ-ホスホリルオキシ) -1, 2, 3-ベンゾ [d] トリアジン-4 (3H) -オン、2- (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テトラメチルアミニウムテトラフルオロボレート/ヘキサフルオロホスフェート、2- (6-クロロ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート)、N- [(5-クロロ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -ジメチルアミノ-モルホリノ] -ウロニウムヘキサフルオロホスフェートN-オキシド、2- (7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート、1- [1- (シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチリデンアミノオキシ) -ジメチルアミノ-モルホリノ] -ウロニウムヘキサフルオロホスフェート、2- (1-オキシ-ピリジン-2-イル) -1, 1, 3, 3-テトラメチルイソチオウロニウムテトラフルオロボレート、テトラメチルフルオロホルムアミジニウムヘキサフルオロホスフェート、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン、2-プロパンホスホン酸無水物、4- (4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル) -4-メチルモルホリニウム塩、(ビス-トリクロロメチルカーボネート、1, 1'-カルボニルジイミダゾールである、請求項14に記載のシステム。

10

20

【請求項16】

前記高密度一級アミンポリマーおよび前記カップリング剤が別々にパッケージされる、請求項1から15のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項17】

前記高密度一級アミンポリマーが溶液中にあり、前記カップリング剤が固体形態である、請求項1から16のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項18】

前記カップリング剤が高密度一級アミンポリマー溶液に加えられる、請求項1から17のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項19】

溶液中の前記高密度一級アミンポリマーの濃度が約0.1%~約50%である、請求項1から18のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項20】

前記カップリング剤が、少なくとも第1のカルボキシル活性化剤、および任意選択で第2のカルボキシル活性化剤を含み、溶液中の前記第1のカルボキシル活性化剤の濃度が約3mg/mL~約50mg/mLである、請求項1から19のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項21】

前記高密度一級アミンポリマーが溶液中にあり、前記カップリング剤が高密度一級アミンポリマー溶液に加えられ、前記溶液が前記ヒドロゲルに付与される、請求項1から20のいずれか一項に記載のシステム。

40

【請求項22】

第1の治療的活性薬剤をさらに含む、請求項1から21のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項23】

前記第1の治療的活性薬剤が、前記ヒドロゲルに封入されるかまたはその表面に付着している、請求項22に記載のシステム。

【請求項24】

前記第1の治療的活性薬剤が、前記高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはそ

50

の表面に付着している、請求項 22 または 23 に記載のシステム。

【請求項 25】

第 2 の治療的活性薬剤をさらに含む、請求項 22 から 24 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 26】

前記第 2 の治療的活性薬剤が、前記ヒドロゲルに封入されるかまたはその表面に付着している、請求項 25 に記載のシステム。

【請求項 27】

前記第 2 の治療的活性薬剤が、前記高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着している、請求項 25 または 26 に記載のシステム。

【請求項 28】

前記第 1 および第 2 の治療的活性薬剤が、独立して、小分子、生物製剤、ナノ粒子および細胞からなる群から選択される、請求項 22 から 27 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 29】

前記生物製剤が、増殖因子、抗体、ワクチン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、タンパク質および核酸からなる群から選択される、請求項 28 に記載のシステム。

【請求項 30】

デバイスが前記ヒドロゲルに封入され、前記高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤が前記デバイスを封入する前記ヒドロゲルの外面に付与される、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 31】

前記デバイスが、除細動器、ペースメーカー、ステント、カテーテル、組織インプラント、ネジ、ピン、プレート、棒、人工関節、空気圧アクチュエータ、センサー、エラストマーをベースにしたデバイス、およびヒドロゲルをベースにしたデバイスからなる群から選択される医療デバイスである、請求項 30 に記載のシステム。

【請求項 32】

約 100 J/m^2 から 5000 J/m^2 の界面強靱性を特徴とする、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 33】

透明である、請求項 1 から 32 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 34】

濡れているか、動的であるか、または濡れておりかつ動的である表面への付与に適する、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 35】

対象への注射に適する、請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 36】

a) 第 1 のポリマーネットワークおよび第 2 のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、前記第 1 のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、前記第 2 のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含み、前記第 1 のネットワークは、ポリアクリルアミド、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)、ポリエチレングリコール(PEG)およびポリホスファゼンからなる群から選択されるポリマーを含み、前記第 2 のネットワークはアルギネートポリマーを含む、ヒドロゲル；

b) キトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチルアミンからなる群から選択される高密度一級アミンポリマー；ならびに

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(EDC、EDAC または EDCI) および任意選択で N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含むカップリング剤

を含む、生体適合性接着剤システム。

【請求項 37】

ヒドロゲルを表面に接着する方法において使用するための、高密度一級アミンポリマー

10

20

30

40

50

およびカップリング剤を含む溶液であって、前記方法は、

a) 前記溶液を前記ヒドロゲルに付与するステップ；ならびに

b) 前記ヒドロゲルを表面に置くステップ

を含み；

前記ヒドロゲルは第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含み、前記第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、前記第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含み、

ここで、前記高密度一級アミンポリマーは、モノマー単位当たり少なくとも1つの一級アミンを含む、かつ／またはキトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチレンイミンからなる群から選択される、
溶液。

10

【請求項38】

前記表面が組織である、請求項37に記載の溶液。

【請求項39】

前記組織が、心臓組織、皮膚組織、血管組織、腸組織、肝臓、腎臓、脾臓、肺、気管、目、軟骨組織および腱組織からなる群から選択される、請求項38に記載の溶液。

【請求項40】

前記表面が医療デバイスである、請求項37に記載の溶液。

【請求項41】

ステップb)が、前記医療デバイスを封入するように前記ヒドロゲルを置くステップである、請求項40に記載の溶液。

20

【請求項42】

前記デバイスが、除細動器、ペースメーカー、ステント、カテーテル、組織インプラント、ネジ、ピン、プレート、棒、人工関節、空気圧アクチュエータ、センサー、エラストマーをベースにしたデバイス、およびヒドロゲルをベースにしたデバイスからなる群から選択される医療デバイスである、請求項41に記載の溶液。

【請求項43】

前記ヒドロゲルが創傷を閉じるために表面に接着される、請求項37に記載の溶液。

【請求項44】

前記ヒドロゲルが心臓の欠損を修復するために表面に接着される、請求項37に記載の溶液。

30

【請求項45】

治療的活性薬剤を対象に送達する方法において使用するための、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤を含む溶液であって、前記方法が、

a) 前記溶液をヒドロゲルに付与するステップ；ならびに

b) ヒドロゲルを表面に置くステップ

を含み；

前記ヒドロゲルは第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含み、前記第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、前記第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含み、少なくとも1つの治療的活性薬剤が前記ヒドロゲルおよび／または高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着しており、それによって治療的活性薬剤を前記対象に送達し、

40

ここで、前記高密度一級アミンポリマーは、モノマー単位当たり少なくとも1つの一級アミンを含む、かつ／またはキトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチレンイミンからなる群から選択される、
溶液。

【請求項46】

a) 第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、前記第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、前記第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、ヒドロゲル；b) 高密度一級アミンポリマー；

50

および c) カップリング剤を含み、ここで、前記高密度一級アミンポリマーおよび前記カップリング剤は前記ヒドロゲルの 1 つの面に付与されており、ここで、前記高密度一級アミンポリマーは、モノマー単位当たり少なくとも 1 つの一級アミンを含む、かつ／またはキトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチレンジアミンからなる群から選択される、生体適合性接着剤システム。

【請求項 47】

予め形成されたパッチの形態である、請求項 1 から 36 および 46 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 48】

注射可能な溶液の形である、請求項 1 から 36 および 46 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 49】

前記第 1 のポリマーネットワークが 2 つの反応性部分で修飾され、前記反応性部分が、各々独立して、メタクリレート、アクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、チオール、ヒドラジン、テトラジン、ノルボルネン、トランスシクロオクテンおよびシクロオクテンからなる群から選択される、請求項 1 から 36 および 46 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 50】

前記第 2 のポリマーネットワークがアルギネートである、請求項 49 に記載のシステム。

【請求項 51】

前記第 1 のポリマーネットワークが、ノルボルネンで修飾されたポリエチレングリコール (PEG) およびテトラジンで修飾されたポリエチレングリコール (PEG) である、請求項 49 または 50 に記載のシステム。

【請求項 52】

前記 2 つの反応性部分が Ca^{2+} の存在下で反応する、請求項 49 から 51 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 53】

前記 2 つの反応性部分が紫外線の存在下で反応する、請求項 49 から 51 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 54】

前記第 1 のポリマーネットワークはポリアクリルアミドであり、前記第 2 のポリマーネットワークはアルギネートであり、前記高密度一級アミンポリマーはキトサンである、請求項 1 に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2016 年 6 月 30 日に出願された米国仮出願番号第 62/356,939 号；および 2016 年 3 月 22 日に出願された米国仮出願番号第 62/311,646 号に基づく優先権を主張している。これら仮出願の各々の全体の内容は、参考として援用される。

【0002】

政府援助

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた R01DE0130333 の下の政府援助でなされた。政府は、本発明におけるある特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

組織接着剤は、最小侵襲性の手術の後に使用することができる。しかし、現在の組織接着剤の多くは、クリニックにおける必要条件を満たさない。例えば、シアノアクリレー

10

20

30

40

50

トのような現在の臨床で利用可能な組織接着剤は、有毒であるか、または血液で濡れた表面で接着性が不十分であり、そのため *in vivo* 動的環境の下でそれらは容易に脱離する。組織接着の形成は、液体（例えば、血液）への曝露および組織の動的運動のために、*in vivo* 条件下でしばしば複雑である。理想的な組織接着剤は、（１）血液とは無関係に濡れた生体組織に強く付着すること；（２）有意な機械的負荷に不具合なく耐えること；（３）望ましくない接着を防止するために選択的に接着すること；（４）生体適合性で無毒で分解速度が調整可能であることが必要である。

【０００４】

したがって、所望の表面、特に生物組織の濡れた表面への強力な接着を示し、有意な機械的ストレスおよび歪みに耐えることができ、生体適合性である、組織接着剤への満たされていない必要性が今もなおある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

発明の要旨

本発明は、生物学的表面（例えば、組織またはデバイス）に接着して、濡れた動的環境においてさえも所定の位置に留まることが可能である、ある特定の新規生体適合性接着剤（すなわち、生体適合性接着剤システム）の発見に少なくとも一部基づく。特に、驚くべきことに、本発明者らは、本明細書に開示される無毒の生体適合性接着剤が、濡れたおよび／または動的な環境においてさえも、標的表面（例えば、組織またはデバイス）への強力に選択的な接着を示すことを発見した。さらに、本明細書に開示される生体適合性の接着剤は、有意な機械的負荷に不具合なく耐えることができ、接着剤の大きな変形を可能にするエラストメリック界面を有する。さらに、生体適合性の接着剤は調整可能な分解特性を有し、材料の分解が自然に起こることを可能にする。本発明に開示される生体適合性の接着剤は、生物学的組織のような濡れた表面で、全ての既存の接着剤より極めて高い接着エネルギー（ $>1000 \text{ J/m}^2$ ）をもたらす。接着は血液曝露に関係なしに速く（数分以内）、*in vivo* の動的運動（例えば、拍動する心臓）に適合する。生体適合性の接着剤は、標的表面において *in situ* で硬化することができる（例えば、縫合なしの接着剤を提供する外科的糊として働くことができる）、予め形成されたパッチまたは注射可能な溶液の形態であってよい。

【０００６】

したがって、一態様において、本発明は、a) 第１のポリマーネットワークおよび第２のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、第１のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第２のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、ヒドロゲル；b) 高密度一級アミンポリマー；およびc) カップリング剤を含む、生体適合性接着剤システムを提供する。３つの構成成分による相乗作用は、丈夫なバルクマトリックスと極めて接着性の表面を合わせ持つ、生体適合性の接着剤をもたらす。

【０００７】

一部の実施形態では、本発明は、a) 第１のポリマーネットワークおよび第２のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、第１のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第２のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、ヒドロゲル；b) 高密度一級アミンポリマー；およびc) カップリング剤を含み、ここで、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤はヒドロゲルの１つの面に付与されている、生体適合性接着剤システムを提供する。

【０００８】

一部の実施形態では、第１のポリマーネットワークは、ポリアクリルアミド、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリホスファゼン、コラーゲン、ゼラチン、ポリ（アクリレート）、ポリ（メタクリレート）、ポリ（メタクリルアミド）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N,N-ジメチルアクリルアミド（*dimethylacrylamide*））、ポリ（

10

20

30

40

50

アリルアミン) およびそれらのコポリマーからなる群から選択される。特定の実施形態では、第1のポリマーネットワークはポリエチレングリコール (PEG) である。

【0009】

一部の実施形態では、第1のポリマーネットワークは、ポリアクリルアミド、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート) (HEMA)、ポリ(ビニルアルコール) (PVA)、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリホスファゼン、コラーゲン、ゼラチン、ポリ(アクリレート)、ポリ(メタクリレート)、ポリ(メタクリルアミド)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM)、ポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド (dimethylacrylamide))、ポリ(アリルアミン) およびそれらのコポリマーからなる群から選択される。特定の実施形態では、第1のポリマーネットワークはポリエチレングリコール (PEG) であり、それは、フリーラジカル重合、クリック化学等を通して共有結合により架橋されたポリマーネットワークを形成することができる。

【0010】

一部の実施形態では、第2のポリマーネットワークは、アルギネート、ペクテート、カルボキシメチルセルロース、酸化カルボキシメチルセルロース、ヒアルノナート、キトサン、κ-カラゲナン、ι-カラゲナンおよびλ-カラゲナンからなる群から選択され、アルギネート、カルボキシメチルセルロース、ヒアルノナート、キトサン、κ-カラゲナン、ι-カラゲナンおよびλ-カラゲナンの各々は任意選択で酸化され、アルギネート、カルボキシメチルセルロース、ヒアルノナート、キトサン、κ-カラゲナン、ι-カラゲナンおよびλ-カラゲナンが、メタクリレート、アクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、チオール、ヒドラジン、テトラジン、ノルボルネン、トランスシクロオクテンおよびシクロオクテンからなる群から選択される1つまたは複数の基を任意選択で含む。特定の実施形態では、第2のポリマーネットワークは、アルギネートを含む。一部の実施形態では、アルギネートは高分子量アルギネートおよび低分子量アルギネートの混合物で構成される。ある特定の実施形態では、高分子量アルギネート対低分子量アルギネートの比は約5:1~約1:5である。

【0011】

一部の実施形態では、第1のポリマーネットワークおよび前記第2のポリマーネットワークは共有結合している。

【0012】

一部の実施形態では、ヒドロゲルは約30%~約98%の水を含む。

【0013】

一部の実施形態では、ヒドロゲルはパッチの形態で作製される。

【0014】

一部の実施形態では、高密度一級アミンポリマーは、モノマー単位当たり少なくとも1つの一級アミンを含む。ある特定の実施形態では、高密度一級アミンポリマーは、キトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチレンジアミンからなる群から選択される。

【0015】

一部の実施形態では、カップリング剤は第1のカルボキシル活性化剤を含む。ある特定の実施形態では、第1のカルボキシル活性化剤はカルボジイミドである。特定の実施形態では、カルボジイミドは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC, EDCI または EDCI)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) およびジイソプロピルカルボジイミド (DIC) からなる群から選択される。一部の実施形態では、カップリング剤は第2のカルボキシル活性化剤をさらに含む。一部の実施形態では、第2のカルボキシル活性化剤は、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド (スルホ-NHS)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、ジメチルアミノピリジン (DMAP)、ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン (HOBt/HODbt)、1-ヒドロキ

シー７－アザ－１Ｈ－ベンゾトリアゾール（HOAt）、エチル２－シアノ－２－（ヒドロキシイミノ）アセテート、ベンゾトリアゾール－１－イルオキシートリス（ジメチルアミノ）－ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（BOP）、ベンゾトリアゾール－１－イルオキシートリピロリジノ－ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、７－アザ－ベンゾトリアゾール－１－イルオキシートリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート）、エチルシアノ（ヒドロキシイミノ）アセタト－O2）－トリ－（１－ピロリジニル）－ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、３－（ジエトキシ－ホスホリルオキシ）－１，２，３－ベンゾ[d]トリアジン－４（３H）－オン、２－（１H－ベンゾトリアゾール－１－イル）－N，N，N'，N'－テトラメチルアミニウムテトラフルオロボレート／ヘキサフルオロホスフェート、２－（６－クロロ－１H－ベンゾトリアゾール－１－イル）－N，N，N'，N'－テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート）、N－〔（５－クロロ－１H－ベンゾトリアゾール－１－イル）－ジメチルアミノ－モルホリノ〕－ウロニウムヘキサフルオロホスフェートN－オキシド、２－（７－アザ－１H－ベンゾトリアゾール－１－イル）－N，N，N'，N'－テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート、１－〔１－（シアノ－２－エトキシ－２－オキソエチリデンアミノオキシ）－ジメチルアミノ－モルホリノ〕－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート、２－（１－オキシ－ピリジン－２－イル）－１，１，３，３－テトラメチルイソチオウロニウムテトラフルオロボレート、テトラメチルフルオロホルムアミジニウムヘキサフルオロホスフェート、N－エトキシカルボニル－２－エトキシ－１，２－ジヒドロキノリン、２－プロパンホスホン酸無水物、４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウム塩、（ビス－トリクロロメチルカーボネート、１，１'－カルボニルジイミダゾールである。

【0016】

一部の実施形態では、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤は別々にパッケージされる。ある特定の実施形態では、高密度一級アミンポリマーは溶液中にあり、カップリング剤は固体形態である。一部の実施形態では、カップリング剤は高密度一級アミンポリマー溶液に加えられる。一部の実施形態では、溶液中の高密度一級アミンポリマーの濃度は約０．１％～約５０％である。ある特定の実施形態では、カップリング剤は、少なくとも第１のカルボキシル活性化剤、および任意選択で第２のカルボキシル活性化剤を含み、溶液中の第１のカルボキシル活性化剤の濃度は約３mg/mL～約５０mg/mLである。一部の実施形態では、高密度一級アミンポリマーは溶液中にあり、カップリング剤は高密度一級アミンポリマー溶液に加えられ、溶液はヒドロゲルに付与される。

【0017】

一部の実施形態では、システムは、第１の治療的活性薬剤をさらに含む。ある特定の実施形態では、第１の治療的活性薬剤は、ヒドロゲルに封入されるかまたはその表面に付着している。一部の実施形態では、第１の治療的活性薬剤は、高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着している。ある特定の実施形態では、システムは、第２の治療的活性薬剤をさらに含む。一部の実施形態では、第２の治療的活性薬剤は、ヒドロゲルに封入されるかまたはその表面に付着している。一部の実施形態では、第２の治療的活性薬剤は、高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着している。一部の実施形態では、第１および第２の治療的活性薬剤は、独立して、小分子、生物製剤、ナノ粒子および細胞からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、生物製剤は、増殖因子、抗体、ワクチン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、タンパク質および核酸からなる群から選択される。

【0018】

一部の実施形態では、デバイスはヒドロゲルに封入され、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤がデバイスを封入するヒドロゲルの外面に付与される。ある特定の実施形態では、デバイス、除細動器、ペースメーカー、ステント、カテーテル、組織インプラント、ネジ、ピン、プレート、棒、人工関節、空気圧アクチュエータ、センサー、エラストマーをベースにしたデバイス、およびヒドロゲルをベースにしたデバイスからなる群

10

20

30

40

50

から選択される医療デバイスである。

【0019】

一部の実施形態では、システムは、約 100 J/m^2 から 5000 J/m^2 の界面強靱性によって特徴付けられる。

【0020】

一部の実施形態では、システムは透明である。

【0021】

一部の実施形態では、システムは、濡れているか、動的であるか、または濡れておりかつ動的である表面への付与に適する。

【0022】

一部の実施形態では、システムは、対象への注射のために適する。

【0023】

一部の実施形態では、本発明は、a) 第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含み、第1のネットワークは、ポリアクリルアミド、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)、ポリエチレングリコール(PEG)およびポリホスファゼンからなる群から選択されるポリマーを含み、第2のネットワークはアルギネートポリマーを含む、ヒドロゲル；b) キトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチルアミンからなる群から選択される高密度一級アミンポリマー；ならびに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(EDC、EDACまたはEDCI)および任意選択でN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含むカップリング剤を含む、生体適合性接着剤システムを目的とする。

【0024】

別の態様では、本発明は、表面(例えば、組織またはデバイス)にヒドロゲルを接着する方法であって、a) 高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤を含む溶液をヒドロゲルに付与するステップ；ならびにb) ヒドロゲルを表面に置くステップ；を含み、ヒドロゲルは第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含み、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む方法を提供する。一部の実施形態では、表面は、組織である。ある特定の実施形態では、組織は、心臓組織、皮膚組織、血管組織、腸組織、肝臓、腎臓、脾臓、肺、気管、目、軟骨組織および腱組織からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、表面は、医療デバイスである。一部の実施形態では、ヒドロゲルは医療デバイスを封入する。一部の実施形態では、医療デバイスは、除細動器、ペースメーカー、ステント、カテーテル、組織インプラント、ネジ、ピン、プレート、棒、人工関節、空気圧アクチュエータ、センサー、エラストマーをベースにしたデバイス、およびヒドロゲルをベースにしたデバイスからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、ヒドロゲルは、創傷を閉じるために表面に接着される。一部の実施形態では、ヒドロゲルは、心臓の欠損を修復するために表面に接着される。

【0025】

別の態様では、本発明は、治療的活性薬剤を対象に送達する方法であって、a) 高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤を含む溶液をヒドロゲルに付与するステップ；ならびにb) ヒドロゲルを表面(例えば、組織またはデバイス)に置くステップを含み、ヒドロゲルは第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含み、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含み、少なくとも1つの治療的活性薬剤はヒドロゲルおよび/または高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着しており、それによって治療的活性薬剤を対象に送達する、方法を提供する。

【0026】

一部の実施形態では、第1のポリマーネットワークは、2つの反応性部分によって修飾

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

10

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

20

を含む、生体適合性接着剤システム。

30

40

50

(項目 7)

前記高分子量アルギネート対前記低分子量アルギネートの比が約 5 : 1 ~ 約 1 : 5 である、項目 6 に記載のシステム。

(項目 8)

前記第 1 のポリマーネットワークおよび前記第 2 のポリマーネットワークが共有結合している、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 9)

前記ヒドロゲルが約 30 % ~ 約 98 % の水を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 10)

前記ヒドロゲルがパッチの形態で作製される、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 11)

前記高密度一級アミンポリマーが、モノマー単位当たり少なくとも 1 つの一級アミンを含む、項目 1 から 10 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 12)

前記高密度一級アミンポリマーが、キトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチレンジイミンからなる群から選択される、項目 1 から 11 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 13)

前記カップリング剤が第 1 のカルボキシル活性化剤を含む、項目 1 から 12 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 14)

前記第 1 のカルボキシル活性化剤がカルボジイミドである、項目 13 に記載のシステム。

(項目 15)

前記カルボジイミドが、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC、EDAC または EDCI)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)およびジイソプロピルカルボジイミド(DIC)からなる群から選択される、項目 14 に記載のシステム。

(項目 16)

前記カップリング剤が第 2 のカルボキシル活性化剤をさらに含む、項目 1 から 15 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 17)

前記第 2 のカルボキシル活性化剤が、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(スルホ-NHS)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、ジメチルアミノピリジン(DMAP)、ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン(HOBT/HODHBT)、1-ヒドロキシ-7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール(HOAT)、エチル2-シアノ-2-(ヒドロキシイミノ)アセテート、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、7-アザ-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、エチルシアノ(ヒドロキシイミノ)アセタート-O2-トリ(1-ピロリジニル)-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、3-(ジエトキシ-ホスホリルオキシ)-1,2,3-ベンゾ[d]トリアジン-4(3H)-オン、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルアミニウムテトラフルオロボレート/ヘキサフルオロホスフェート、2-(6-クロロ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート、N-[(5-クロロ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-ジメチルアミノ-モルホリノ]-ウロニウムヘキサフルオロホスフェートN-オキシド、2-(7-アザ-1

10

20

30

40

50

Hーベンゾトリアゾールー1ーイル)ーN, N, N', N'ーテトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート、1ー[1ー(シアノー2ーエトキシー2ーオキソエチリデンアミノオキシ)ージメチルアミノーモルホリノ]ーウロニウムヘキサフルオロホスフェート、2ー(1ーオキシーピリジンー2ーイル)ー1, 1, 3, 3ーテトラメチルイソチオウロニウムテトラフルオロボレート、テトラメチルフルオロホルムアミジニウムヘキサフルオロホスフェート、Nーエトキシカルボニルー2ーエトキシー1, 2ージヒドロキノリン、2ープロパンホスホン酸無水物、4ー(4, 6ージメトキシー1, 3, 5ートリアジンー2ーイル)ー4ーメチルモルホリニウム塩、(ビスートリクロロメチルカーボネート、1, 1'ーカルボニルジイミダゾールである、項目16に記載のシステム。

(項目18)

前記高密度一級アミンポリマーおよび前記カップリング剤が別々にパッケージされる、項目1から17のいずれか一項に記載のシステム。

(項目19)

前記高密度一級アミンポリマーが溶液中にあり、前記カップリング剤が固体形態である、項目1から18のいずれか一項に記載のシステム。

(項目20)

前記カップリング剤が高密度一級アミンポリマー溶液に加えられる、項目1から19のいずれか一項に記載のシステム。

(項目21)

溶液中の前記高密度一級アミンポリマーの濃度が約0.1%~約50%である、項目1から20のいずれか一項に記載のシステム。

(項目22)

前記カップリング剤が、少なくとも第1のカルボキシル活性化剤、および任意選択で第2のカルボキシル活性化剤を含み、溶液中の前記第1のカルボキシル活性化剤の濃度が約3mg/mL~約50mg/mLである、項目1から21のいずれか一項に記載のシステム。

(項目23)

前記高密度一級アミンポリマーが溶液中にあり、前記カップリング剤が高密度一級アミンポリマー溶液に加えられ、前記溶液が前記ヒドロゲルに付与される、項目1から22のいずれか一項に記載のシステム。

(項目24)

第1の治療的活性薬剤をさらに含む、項目1から23のいずれか一項に記載のシステム。

(項目25)

前記第1の治療的活性薬剤が、前記ヒドロゲルに封入されるかまたはその表面に付着している、項目24に記載のシステム。

(項目26)

前記第1の治療的活性薬剤が、前記高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着している、項目1から25のいずれか一項に記載のシステム。

(項目27)

第2の治療的活性薬剤をさらに含む、項目1から26のいずれか一項に記載のシステム。

(項目28)

前記第2の治療的活性薬剤が、前記ヒドロゲルに封入されるかまたはその表面に付着している、項目1から27のいずれか一項に記載のシステム。

(項目29)

前記第2の治療的活性薬剤が、前記高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着している、項目1から27のいずれか一項に記載のシステム。

(項目30)

前記第1および第2の治療的活性薬剤が、独立して、小分子、生物製剤、ナノ粒子および細胞からなる群から選択される、項目24から29のいずれか一項に記載のシステム。

(項目31)

前記生物製剤が、増殖因子、抗体、ワクチン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、タンパク質および核酸からなる群から選択される、項目 30 に記載のシステム。

(項目 32)

デバイスが前記ヒドロゲルに封入され、前記高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤が前記デバイスを封入する前記ヒドロゲルの外面に付与される、項目 1 から 31 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 33)

前記デバイスが、除細動器、ペースメーカー、ステント、カテーテル、組織インプラント、ネジ、ピン、プレート、棒、人工関節、空気圧アクチュエータ、センサー、エラストマーをベースにしたデバイス、およびヒドロゲルをベースにしたデバイスからなる群から選択される医療デバイスである、項目 32 に記載のシステム。

10

(項目 34)

約 100 J/m^2 から 5000 J/m^2 の界面強靱性を特徴とする、項目 1 から 33 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 35)

透明である、項目 1 から 34 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 36)

濡れているか、動的であるか、または濡れておりかつ動的である表面への付与に適する、項目 1 から 35 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 37)

20

対象への注射に適する、項目 1 から 36 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 38)

a) 第 1 のポリマーネットワークおよび第 2 のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、前記第 1 のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、前記第 2 のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含み、前記第 1 のネットワークは、ポリアクリルアミド、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)、ポリエチレングリコール(PEG)およびポリホスファゼンからなる群から選択されるポリマーを含み、前記第 2 のネットワークはアルギネートポリマーを含む、ヒドロゲル；

b) キトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチルアミンからなる群から選択される高密度一級アミンポリマー；ならびに

30

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(EDC、EDACまたはEDCI)および任意選択でN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含むカップリング剤

を含む、生体適合性接着剤システム。

(項目 39)

ヒドロゲルを表面に接着する方法であって、

a) 高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤を含む溶液を前記ヒドロゲルに付与するステップ；ならびに

b) 前記ヒドロゲルを表面に置くステップを含む；

40

前記ヒドロゲルは第 1 のポリマーネットワークおよび第 2 のポリマーネットワークを含み、前記第 1 のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、前記第 2 のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、方法。

(項目 40)

前記表面が組織である、項目 39 に記載の方法。

(項目 41)

前記組織が、心臓組織、皮膚組織、血管組織、腸組織、肝臓、腎臓、膵臓、肺、気管、目、軟骨組織および腱組織からなる群から選択される、項目 40 に記載の方法。

(項目 42)

前記表面が医療デバイスである、項目 39 に記載の方法。

50

(項目 4 3)

前記ヒドロゲルが前記医療デバイスを封入している、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記デバイスが、除細動器、ペースメーカー、ステント、カテーテル、組織インプラント、ネジ、ピン、プレート、棒、人工関節、空気圧アクチュエータ、センサー、エラストマーをベースにしたデバイス、およびヒドロゲルをベースにしたデバイスからなる群から選択される医療デバイスである、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記ヒドロゲルが創傷を閉じるために表面に接着される、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記ヒドロゲルが心臓の欠損を修復するために表面に接着される、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 7)

治療的活性薬剤を対象に送達する方法であって、

a) 高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤を含む溶液をヒドロゲルに付与するステップ；ならびに

b) 前記ヒドロゲルを表面に置くステップ
を含み；

前記ヒドロゲルは第 1 のポリマーネットワークおよび第 2 のポリマーネットワークを含み、前記第 1 のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、前記第 2 のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含み、少なくとも 1 つの治療的活性薬剤が前記ヒドロゲルおよび／または高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着しており、それによって治療的活性薬剤を前記対象に送達する、方法。

(項目 4 8)

a) 第 1 のポリマーネットワークおよび第 2 のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、前記第 1 のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、前記第 2 のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、ヒドロゲル； b) 高密度一級アミンポリマー；および c) カップリング剤を含み、ここで、前記高密度一級アミンポリマーおよび前記カップリング剤は前記ヒドロゲルの 1 つの面に付与されている、生体適合性接着剤システム。

(項目 4 9)

予め形成されたパッチの形態である、項目 1 から 3 8 および 4 8 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 5 0)

注射可能な溶液の形である、項目 1 から 3 8 および 4 8 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 5 1)

前記第 1 のポリマーネットワークが 2 つの反応性部分で修飾され、前記反応性部分が、各々独立して、メタクリレート、アクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、チオール、ヒドラジン、テトラジン、ノルボルネン、トランスシクロオクテンおよびシクロオクテンからなる群から選択される、項目 1 から 3 8 および 4 8 のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 5 2)

前記第 2 のポリマーネットワークがアルギネートである、項目 5 1 に記載のシステム。

(項目 5 3)

前記第 1 のポリマーネットワークが、ノルボルネンで修飾されたポリエチレングリコール (P E G) およびテトラジンで修飾されたポリエチレングリコール (P E G) である、項目 5 1 または 5 2 に記載のシステム。

(項目 5 4)

前記 2 つの反応性部分が Ca^{2+} の存在下で反応する、項目 5 1 から 5 3 のいずれか一項に記載のシステム。

10

20

30

40

50

(項目 5 5)

前記 2 つの反応性部分が紫外線の存在下で反応する、項目 5 1 から 5 3 のいずれか一項に記載のシステム。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図 1】図 1 は、EDC/NHS（カップリング剤）の存在および不在下における高密度一級アミンポリマー（「架橋ポリマー」、キトサン）の界面強靱性を比較するチャート（上）、および、生体適合性の接着剤の界面強靱性における経時的な増加を示すチャート（下）である。エラーバーは、標準偏差を示す；サンプルサイズ $n = 4$ 。

【0030】

【図 2】図 2（A）は、ハイブリッドのイオン性および共有結合性の結合（青色および黒色の線）のヒドロゲルで作製された消散性マトリックス（淡い青色の領域）からなる、本発明の例示的な生体適合性接着剤（強靱な接着剤、「TA」）、ならびに、正電荷の一級アミン（緑色の線）による高密度一級アミンポリマーを含有する接着性表面（淡緑色の領域）の概略図である。（B）および（C）は、提案された接着機構の概略図である。（D）は、バックグラウンドヒステリシスの概略図である。（E）は、ポリアリルアミン（PAA）、キトサン、ポリエチレンイミン（PEI）、コラーゲンおよびゼラチンを含む、5 つの代表的な高密度一級アミンポリマーの界面強靱性（接着エネルギー）を示すチャートである。エラーバーは、標準偏差を示す；サンプルサイズ $n = 4$ 。

【0031】

【図 3】図 3 は、共有結合性架橋による第 1 のポリマーネットワーク（上左）、イオン性架橋による第 2 のポリマーネットワーク（上中央）、ならびに第 1 および第 2 のポリマーネットワークを含む IPN（上右）の概略図である；第 1 のポリマーネットワーク（PAA のみ）、第 2 のポリマーネットワーク（アルギネートのみ）および IPN（PAA/アルギネート）の界面強靱性が比較される（一番下）。エラーバーは、標準偏差を示す；サンプルサイズ $n = 4$ 。

【0032】

【図 4】図 4 は、異なる分子量の、アルギネートをベースとした IPN の界面強靱性を比較するプロットである。エラーバーは、標準偏差を示す。

【0033】

【図 5】図 5（A）は、TA を付与する前のブタ皮膚の上への血液の散布を示す概略図である；（B）は、接着が起こることを可能にするために圧縮される検体の概略図および写真である；（C）は、 180° 剥離試験で試料を剥離した後の、TA/皮膚界面に残っている多少の血液残留物を示す写真である；（D）は、本明細書に記載される接着剤の界面強靱性を測定するために使用された剥離試験の概略図である。

【0034】

【図 6】図 6 は、本発明の生体適合性の接着剤の界面強靱性のプロットである。

【0035】

【図 7】図 7 は、血液の存在下または不在下において測定された、本発明の生体適合性の接着剤の界面強靱性のプロットである。

【0036】

【図 8】図 8 は、血液の存在下または不在下において測定された、市販接着剤シアノアクリレートの界面強靱性のプロットである。

【0037】

【図 9】図 9 は、市販接着剤シアノアクリレートの界面強靱性を本発明の生体適合性の接着剤と比較したプロットである。エラーバーは、標準偏差を示す。

【0038】

【図 10】図 10 は、比較のためにシアノアクリレート（右）と一緒に、細胞培養培地 DMEM（左および中央）に浸漬した、活性化薬剤（キトサンおよび EDC/スルホ-NHS）の有る無しの IPN ヒドロゲルの一連の写真である。生細胞の百分率（生存率）を数

10

20

30

40

50

量化することによって、細胞生存率を条件間で比較した。スカラーバー、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 。エラーバーは、標準偏差を示す；サンプルサイズ $n = 5$ 。

【0039】

【図11】図11は、心臓の欠損の形成および閉鎖の概略図である。

【0040】

【図12】図12は、付与した本発明の生体適合性接着剤なしの（上）、および付与した本発明の生体適合性接着剤のある（中央および下）、欠損のある心臓を示す一連の写真である。

【0041】

【図13】図13は、本発明の生体適合性接着剤に封入した（上）、および心臓の表面に接着した（中央および下）デバイスを示す、一連の写真である。

【0042】

【図14】図14は、本発明の注射可能な生体適合性接着剤の貯蔵弾性係数（各プロットの上の線）および損失弾性係数（各プロットの下）のプロットである。

【0043】

【図15】図15は、本発明のUV活性な注射可能な生体適合性接着剤の貯蔵弾性係数（各プロットの上の線）および損失弾性係数（各プロットの下）のプロットである。

【0044】

【図16】図16は、本発明のUV活性な注射可能な生体適合性接着剤の貯蔵弾性係数のプロットである。

【0045】

【図17】図17は、共焦点蛍光顕微鏡検査法を使用して、生体適合性の接着剤（「TA」、アルギネート／PAAM IPN（ヒドロゲル）／キトサン（高密度一級アミンポリマー）／EDC／NHS（カップリング剤）と基質、皮膚（中央）またはPAAMヒドロゲル（右）のいずれかとの間の、高密度一級アミンポリマー（すなわち、キトサン）によって形成された界面架橋を示すFITC標識キトサンの図表示および写真；スカラーバー、 $50\text{ }\mu\text{m}$ （上）；ならびに、ナノ粒子接着剤、シアノアクリレート、イガイ類啓発接着剤および軟骨－骨関節の文献からのデータと一緒に、基質のバルク強靱性の関数としてプロットされた、TA（アルギネート／PAAM IPN（ヒドロゲル）／キトサン（高密度一級アミンポリマー）／EDC／NHS（カップリング剤）を様々な組織およびヒドロゲルに接着することからもたらされた接着エネルギーを比較したプロットである。試験されたヒドロゲルには、PAAMのみのヒドロゲル、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）（PHEMA）のみのヒドロゲル、およびアルギネート－ポリアクリルアミドIPNヒドロゲルが含まれる。

【0046】

【図18】図18は、生体適合性接着性とポリアクリルアミドヒドロゲル（PAAM）（A）、およびブタの皮膚（B）の間の界面にわたる蛍光強度プロファイルを示すプロットである。（C）。共焦点蛍光画像に基づいて測定されたTAとPAAMヒドロゲルおよびブタの皮膚の間のFITC標識キトサンの相互貫入深度、エラーバーは標準偏差を示す。

【0047】

【図19】図19は、齧歯動物肝臓の2つの断片を一緒に接着するために使用された生体適合性接着剤（「TA」と呼ぶ）を示す写真である。生体適合性接着剤の2つの断片を齧歯動物の肝臓を介して架橋し、インストロン試験機で次に引き伸ばした。生体適合性接着剤は肝臓に強く接着し、脱離する前にその初期の長さの14倍まで持ちこたえた。スカラーバー、 20 mm 。

【0048】

【図20】図20は、ラット心筋に1週間付着させたときに最小限の線維形成を示す生体適合性接着剤（「TA」と呼ぶ）（A）、および、シアノアクリレート（「CA」と呼ぶ）によって誘発されるラット心筋の上の有意な線維形成（B）を示す一連の写真；スケラーバー、 $100\text{ }\mu\text{m}$ ；ならびに、組織切片に基づいて測定された炎症領域の厚さのプロ

10

20

30

40

50

ット（C）、および全ての3つの実験について判定された炎症程度のプロットであり、シアノアクリレートは最も大きな程度の炎症（1＝炎症なし、2＝軽度、3＝中等度、4＝重度）を引き起こした（D）。エラーバーは、標準偏差を示す；サンプルサイズ $n = 5$ 。

【0049】

【図21】図21（A）は、バルクマトリックス（消散性マトリックス）への高密度一級アミンポリマーの物理的相互貫入を示す図表示である：消散性マトリックスを含むアルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲルにFITC-キトサンを付与し、ゲルに拡散させた；（B）は、FITC-キトサンの拡散を経時的に示す共焦蛍光顕微鏡検査法によって画像化された写真である；（C）は、異なるインキュベーション時間でのFITC-キトサンを含有する接着表面の画像である。（D）は、インキュベーション時間に伴って増加したキトサン相互貫入の深度を示すプロットである。

10

【0050】

【図22】図22（A）は、消散性マトリックス（アルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲル）または高密度一級アミンポリマー（キトサンプラスEDC）をDMEM中でインキュベートしたことからもたらされた、馴化培地において24時間培養したヒト皮膚線維芽細胞の一連の写真である。緑色の伸長形の生細胞、および赤色点状の死細胞。（B）は、生細胞の百分率（生存率）を数量化することによって、条件間の細胞生存率の比較を示すプロットである。スケールバー、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 。エラーバーは、標準偏差を示す；サンプルサイズ $n = 5$ 。

【0051】

【図23】図23（A）は、 500 nm 直径（赤色の点）の蛍光性マイクロスフェアが、FITC-キトサン相互貫入接着表面（緑色）からなる強靱な接着剤の上に拡散していること、ならびに、PBSで反復洗浄した後に、静電引力およびアミド結合の形成を通してマイクロスフェアが強靱な接着剤の上に残っていることを示す概略図である。（B）は、サンドイッチ構造の2D断面画像である：蛍光性マイクロスフェア（赤色）、FITC-キトサン相互貫入接着表面（緑色）および強靱な接着剤のバルクマトリックス（上から下に）。マイクロスフェアサイズは強靱な接着剤のメッシュサイズ（およそ 10 nm ）より大きいので、マイクロスフェアは外部表面に残る。（C）は、強靱な接着剤に付着した蛍光性マイクロスフェアの3D構築物である。

20

【0052】

【図24】図24は、1つの面がポリエチレンテレフタレートフィルムに結合している、強靱な接着剤およびヒドロゲルからなる検体の概略図である。試験における寸法は、表示通りである；脱離が起こる前後の検体のデジタル写真。

30

【0053】

【図25】図25は、肝臓裂傷モデルにおける止血ドレッシングとしての生体適合性接着剤の使用の概略図である。生体適合性接着剤は、創傷形成の直後に病変部位に付与される。血液喪失は、時間の関数として測定される。生体適合性接着剤は、いかなる処置のない陰性対照と比較して、SURGIFLO止血マトリックスと類似して血液喪失を劇的に低減する。

【0054】

【図26】図26は、皮膚創傷管理のための包帯としての生体適合性接着剤の使用の概略図である。水分蒸散のためにそれは蒸発乾燥するが、生体適合性接着剤は皮膚に付着したままだった。

40

【0055】

【図27】図27は、皮膚創傷管理のためのPNIPAM-アルギネートマトリックスに基づく感熱型接着剤の使用の実証である。この接着剤は、創傷閉鎖を加速するために、創傷の端と一緒に効果的に引き合わせることができる。

【0056】

【図28】図28は、PEGおよびアルギネートに基づく注射可能な生体適合性接着剤の使用の実証であり、それは関節軟骨ディスクの欠損を修復することができる。回復は、2

50

0 %の圧変形率のストレスレベルで評価される。

【0057】

【図29】図29は、*ex vivo*でブタの肺に付着させるための、および肺欠損を密封するための生体適合性接着剤の使用を示す。

【発明を実施するための形態】

【0058】

発明の詳細な説明

高い接着エネルギーを達成することは、2つの効果の相乗効果を必要とする。第1に、接着剤は基質と強力な接着を形成するべきである。第2に、接着剤もしくは基質（または両方）の内部の材料は、ヒステリシスによってエネルギーを消散するべきである。生物組織のための接着剤は、さらなる必要条件、例えば、体内の血液および体液との適合性、ならびに細胞および組織との生体適合性を満たさなければならない。本発明は、それらの必要条件を満たす生体適合性接着剤（強靱な接着剤またはTAとも呼ぶ）を開示する。本発明は、濡れた動的環境においてさえも生物学的表面（例えば、組織またはデバイス）に接着することが可能である生体適合性接着剤の発見に少なくとも一部基づく。したがって、本発明は、生物学的表面（例えば、組織またはデバイス）に生体適合性接着剤を接着するための方法およびシステムを提供する。

【0059】

本明細書に記載される生体適合性接着剤は、特に、創傷ドレッシング、薬物送達、組織修復および組織への生医学的デバイスの接着を含む、医学的応用において有意な利点を提供する。例えば、筋肉または心臓などの濡れた動的組織の上で使用されるヒドロゲルは、反復ストレスおよび歪みの作用を受ける。本明細書に記載されるヒドロゲルは、機械的により強健で、より耐久性であり、より高い界面強靱性を特徴とするので、それらはそのような用途のためにより適する。

【0060】

I. 定義

本発明をより容易に理解できるように、ある特定の用語を先ず定義する。さらに、パラメータの値または値の範囲が列挙されるときはいつでも、値および列挙される値の中間の範囲も本発明の一部であることが意図されていることに注意すべきである。

【0061】

以下の記載では、説明を目的として、本発明の完全な理解を提供するために、具体的な数、材料および構成が示される。しかし、これらの具体的な詳細なしで本発明を実施することができることは、当業者に明らかになる。一部の場合には、本発明を不明瞭にしないように、周知の特徴は省略または単純化することができる。さらに、この明細書での「一実施形態」または「実施形態」などの語への言及は、その実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造または特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。明細書の様々な場所における「一実施形態では」などの語の出現は、同じ実施形態を必ずしも全て指すとは限らない。

【0062】

冠詞「a」および「an」は、本明細書でその冠詞の文法上の対象物の1つまたは1つよりも多く（すなわち、少なくとも1つ）を指すために使用される。例として、「要素」は1つの要素または1つよりも多くの要素を意味する。

【0063】

本明細書で用いるように、用語「含んでいる（*comprising*）」または「含む（*comprises*）」は、必須であるにせよないにせよ指定されていない要素の組入れに開放的である、組成物、方法および本発明に必須であるそのそれぞれの構成成分（単数または複数）に関して使用される。

【0064】

用語「からなる」は、本明細書に記載される組成物、方法およびそのそれぞれの構成成分を指し、それらは、実施形態のその記載に列挙されていない、いかなる要素も排除する。

10

20

30

40

50

【0065】

疾患または障害の「処置」、「予防」または「寛解」は、そのような疾患または障害の発症を遅延もしくは予防すること、そのような疾患または障害に伴う状態、例えば創傷または心臓の欠損の進行もしくは重症度を好転、緩和、改善、阻止するか、その進行、悪化または劣化を減速もしくは停止することを意味する。一実施形態では、疾患または障害の症状は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%緩和される。

【0066】

本明細書で用いるように、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、霊長類、齧歯動物、家畜または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類には、チンパンジー、カニクイザル、クモザルおよびマカク、例えばアカゲザルが含まれる。齧歯動物には、マウス、ラット、マーモット、フェレット、ウサギおよびハムスターが含まれる。家畜および狩猟動物には、雌ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ科の種、例えばイエネコ、イヌの種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類の種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、ならびに魚類、例えば、マス、ナマズおよびサケが含まれる。患者または対象には、上記の任意のサブセット、例えば上の全てが含まれるが、ヒト、霊長類または齧歯動物などの1つまたは複数の群または種が排除される。ある特定の実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば霊長類、例えばヒトである。用語「患者」および「対象」は、本明細書で互換的に使用される。好ましくは、対象は哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、ヒト以外の霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたは雌ウシであってよい。組織または器官損傷または他の関連した病状の動物モデルを表す対象として、ヒト以外の哺乳動物を有利に使用することができる。対象は、雄または雌であってよい。対象は、成体、青年または子供であってよい。対象は、組織損傷、組織損傷に関連した疾患または状態と以前に診断されたかまたはそれを患っているかもしくはそれを起こすリスクを有すると同定されたもの、または対象の体の中もしくはその上に付着させるデバイスを必要とするものであってよい。

【0067】

II. 発明のシステム

本発明は、a) 第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、ヒドロゲル；b) 高密度一級アミンポリマー；およびc) カップリング剤を含む、生体適合性接着剤システムを提供する。

【0068】

特に、生体適合性接着剤システムは、ヒドロゲルに接着性表面を提供する。図2Aに図示されるように、接着性表面は相互貫入性の正電荷のポリマーを含み、ヒドロゲルは変形下でエネルギーを効果的に消散することができるバルクマトリックス（消散性マトリックスとも呼ぶ）を提供する。接着性表面は、基質（例えば、組織、細胞またはデバイス）の粘着性の表面と静電的相互作用、共有結合および物理的相互貫入を形成することができ、バルクマトリックスは変形下でヒステリシスを通してエネルギーを消散する。例えば、アミンおよびカルボン酸のような官能基を有する基質のために、TAと基質の間の静電的相互作用および共有結合を通して接着を形成することができる（図2B）。親水性で巨大分子に透過性である基質のために、高密度一級アミンポリマー（本明細書で「架橋ポリマー」とも呼ぶ）は、基質に相互貫入して物理的絡み合いを形成することができ、TAマトリックスと共有結合を形成することもできる（図2C）。界面がストレス下にあるとき、マトリックスはイオン架橋を切断することによってエネルギーを消散する（図2D）。組合せは、高い接着エネルギーおよびバルク強靭性を同時に達成するように設計される。

【0069】

特に、生体適合性接着剤システム（本明細書で強靭な接着剤（TA）とも呼ぶ）は、高密度一級アミンポリマーおよび活性化剤（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（EDC）および、任意選択で、N-ヒドロキシスクシンイ

ミド（NHS））で選択的に活性化することができるヒドロゲルを含む。理論に束縛されることを望まないが、アルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲル（例えば、アルギネートをベースとしたヒドロゲル）の表面は、高密度一級アミンポリマー（例えば、キトサン）およびカップリング剤（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（EDC））によって活性化されると考えられる。特に、高密度一級アミンポリマーの上の正電荷はヒドロゲルの上の負電荷と釣り合い、一方でカップリング剤は高密度一級アミンポリマーとヒドロゲルの間のアミド結合の形成を触媒する。また、活性化表面は、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤が化学結合を形成して、ヒドロゲルと基質（例えば、組織、細胞またはデバイス）の表面の間の界面を架橋することを可能にする。

10

【0070】

本明細書で用いるように、用語「接触させる」（例えば、表面を接触させる）は、ヒドロゲルおよび表面（例えば、組織またはデバイス）の任意の形の相互作用（例えば、直接的または間接的な相互作用）を含むものである。表面を組成物と接触させることは、*in vivo*または*in vitro*で実行することができる。ある特定の実施形態では、表面を生体適合性接着剤と*in vitro*で接触させ、その後、*ex vivo*の投与方法で対象に移す。表面を生体適合性接着剤と*in vivo*で接触させることは、例えば、表面に生体適合性接着剤を注射することによって、または表面もしくはその周囲に生体適合性接着剤を注射することによって実行することができる。

【0071】

20

一部の実施形態では、本発明の生体適合性接着剤で使用されるヒドロゲルは、相互貫入ネットワーク（IPN）ヒドロゲルである。本明細書で用いるように、IPNは、分子スケールで少なくとも部分的に交錯しているが互いと共有結合しておらず、化学結合が切断されない限り分離することができない2つまたはそれより多いネットワーク（例えば、第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワーク）を含むポリマーである。IPNヒドロゲルは、共有結合架橋およびイオン架橋ポリマーネットワークを組み合わせることによって作製される。あるいは、第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークは、共有結合している。

【0072】

本発明で用いられるヒドロゲルは、エネルギーを消散することが可能である。例えば、一例として、アルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲルは、アルギネートとカルシウムイオンの間で静電的相互作用を通して形成される、変形下で切断されてエネルギーを消散することができるイオン架橋を有する。

30

【0073】

特に、第1のポリマーネットワークは、共有結合性の架橋を含み、ポリアクリルアミド（PAAm）、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）（PHEMA）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリホスファゼン、コラーゲン、ゼラチン、ポリ（アクリレート）、ポリ（メタクリレート）、ポリ（メタクリルアミド）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAM）、ポリ（N,N-ジメチルアクリルアミド（*dimethylacrylamide*））、ポリ（アリルアミン）およびそれらのコポリマーからなる群から選択されるポリマーを含む。特定の実施形態では、第1のポリマーネットワークは、ポリエチレングリコール（PEG）である。一部の実施形態では、第1のポリマーネットワークは、ポリアクリルアミド（PAAm）である。

40

【0074】

第2のポリマーネットワークは、イオン性の架橋を含み、アルギネート（アルギン酸またはアライン（*align*））、ペクテート（ペクチニン酸またはポリガラクトロン酸）、カルボキシメチルセルロース（CMCまたはセルロースガム）、ヒアルノナート（ヒアルロン酸またはヒアルロナン）、キトサン、 κ -カラゲナン、 ι -カラゲナンおよび λ -カラゲナンからなる群から選択されるポリマーであり、アルギネート、ヒアルノナート、

50

キトサン、 κ -カラゲナン、 ι -カラゲナンおよび λ -カラゲナンの各々は任意選択で酸化され、アルギネート、カルボキシメチルセルロース、ヒアルノナート、キトサン、 κ -カラゲナン、 ι -カラゲナンおよび λ -カラゲナンが、メタクリレート、アクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、チオール、ヒドラジン、テトラジン、ノルボルネン、トランスシクロオクテンおよびシクロオクチンからなる群から選択される1つまたは複数の基を任意選択で含む。

【0075】

特定の実施形態では、第2のポリマーネットワークはアルギネートであり、それは、ポリマー鎖に沿って量および一連の分布が異なる、(1-4)-連結b-D-マンヌロン酸(M)およびa-L-グルロン酸(G)モノマーで構成される。アルギネートは、一連のM単位(Mブロック)、一連のG単位(Gブロック)の領域ならびにその特異な特性を分子に提供する交互のMおよびG単位(M-Gブロック)の領域で構成されるブロックコポリマーとも考えられている。アルギネートは、隣接したアルギネート鎖のGブロックの間で Ca^{+2} などの二価カチオンに結合する能力を有し、Mブロックの可動領域の間でイオン性の鎖間架橋を形成する。一部の実施形態では、アルギネートは、高分子量アルギネートおよび低分子量アルギネートの混合物である。例えば、高分子量アルギネート対低分子量アルギネートの比は、約5:1から約1:5;約4:1から約1:4;約3:1から約1:3;約2:1から約1:2;または約1:1である。高分子量アルギネートは、約100kDaから約300kDa、約150kDaから約250kDaの分子量を有するか、または約200kDaである。低分子量アルギネートは、約1kDaから約100kDa、約5kDaから約50kDa、約10kDaから約30kDaの分子量を有するか、または約20kDaである。

【0076】

本発明のヒドロゲルは、高度に吸収性であり、約30%から約98%の水(例えば、約40%、約、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、約40から約98%、約50から約98%、約60から約98%、約70から約98%、約80から約98%、約90から約98%または約95から約98%の水)を含み、その顕著な水含量に起因して天然の組織に類似の柔軟性の程度を有する。特に、本発明のヒドロゲルは、その初期の長さの最大20倍延伸することができ、例えば、本発明のヒドロゲルは、クラックすることも裂けることもなくその初期の長さの2から20倍、その初期の長さの5から20倍、その初期の長さの10から20倍、その初期の長さの15から20倍、その初期の長さの2から10倍、その初期の長さの10から15倍、およびその初期の長さの5から15倍延伸することができる。

【0077】

一部の実施形態では、ヒドロゲルはパッチの形態で製作される。パッチを予め形成し、表面に即時に付与することが可能であるか、または、付与の前にパッチを所望のサイズおよび形状に切断することができる。

【0078】

あるいは、一部の実施形態では、本発明の生体適合性のシステムは、注射によって送達することができる。水溶性アルギン酸ナトリウムは、カルシウムに容易に結合して不溶性アルギン酸カルシウム親水コロイドを形成する(Sutherland、1991年、Biomaterials、Palgrave Macmillan UK:307~331頁)。これらの弱いゲル化状態は、アルギネートを注射可能な細胞送達ビヒクルとして人気の材料にした(Atallaら、1994年、J. Urol. 152巻(2号、第2部):641~3頁)。このように、一部の実施形態では、生体適合性接着剤は、対象への注射のために適する。注射可能な接着剤は、注射の後に反応して第1のポリマーネットワークを形成する少なくとも2つの反応性部分を含むポリマーを含むことができる。2つの反応性部分は各ポリマーの上に存在することができるか、または、ポリマーは、各々異なる反応性部分を有するポリマーの2つの集団で作製される。例示的な反応性部分には、メタクリレート、アクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、チオール、ヒドラジ

ン、テトラジン、ノルボルネン、トランスシクロオクテンおよびシクロオクチンが含まれる。特定の実施形態では、PEGをベースとしたポリマーは、ノルボルネン官能基を含有するPEGおよびテトラジン官能基を含有するPEGを反応させて、第1のポリマーネットワークを形成することによって調製される。特定の実施形態では、2つの反応性部分は、紫外線の存在下で反応する。特定の実施形態では、2つの反応性部分は、 Ca^{2+} （例えば、 CaSO_4 ）の存在下で反応する。

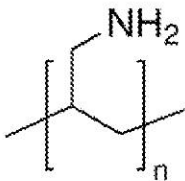
【0079】

生体適合性接着剤は、高密度一級アミンポリマー（本明細書で「架橋ポリマー」とも呼ぶ）を含む。高密度一級アミンポリマーは、ヒドロゲルと表面の両方と共有結合を形成して、この2つを架橋する。高密度一級アミンポリマーは、生理的条件下で正電荷の一級アミン基を有する。一部の実施形態では、高密度一級アミンポリマーは、静電的相互作用を通して表面（例えば、組織、細胞またはデバイス）に吸収させることができ、ヒドロゲル中および表面上のカルボン酸基と共有結合する一級アミン基を提供することができる。表面が透過性である場合は、高密度一級アミンポリマーは表面を透過して、物理的絡み合いを形成し、次にヒドロゲルを化学的に固着させることもできる。

【0080】

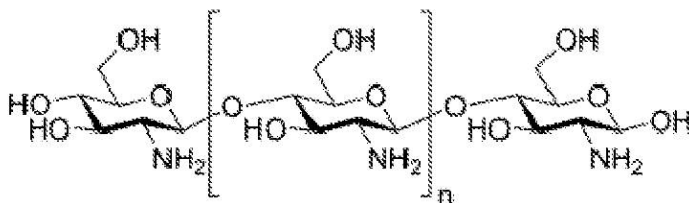
本明細書で用いる場合、高密度一級アミンポリマーは、モノマー単位当たり少なくとも1つの一級アミンを含む。一部の実施形態では、高密度一級アミンポリマーは、キトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチレンジアミンからなる群から選択される。特に、ポリアリルアミン（ Poly NH_2 またはPAA）は、以下の構造式によって表される。

【化1】



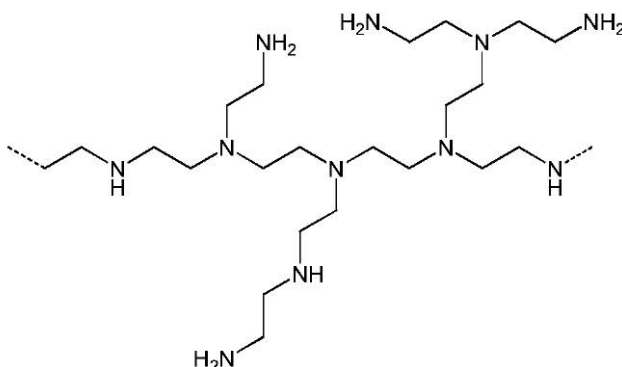
特に、キトサンは以下の構造式によって表される。

【化2】



特に、ポリエチレンジアミン（PEI）は以下の構造式によって表される。

【化3】



10

20

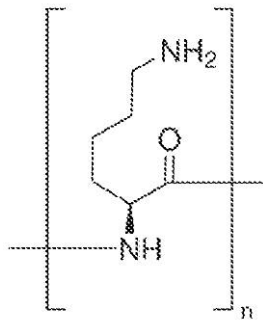
30

40

50

特に、ポリリシンは以下の構造式によって表される。

【化 4】



10

コラーゲンおよび／またはゼラチンは、一級アミンを有する概ね約 10 % のアミノ酸（例えば、A r g アルギニン、リシン）を含む。例示的な高密度一級アミンポリマーの界面強靱性の比較を、実施例 3 および図 2（E）に記載する。

【0081】

生体適合性接着剤は、カップリング剤も含む。本明細書で用いるように、カップリング剤は、高密度一級アミンポリマーに存在する一級アミンの 1 つまたは複数を活性化する。カップリング剤で活性化されると、一級アミンはヒドロゲルおよび標的表面（例えば、組織、器官または医療デバイス）とアミド結合を形成する一部の実施形態では、カップリング剤は第 1 のカルボキシル活性化剤を含み、第 1 のカルボキシル活性化剤はカルボジイミドである。例示的なカルボジイミドは、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC、EDAC または EDCI）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）およびジイソプロピルカルボジイミド（DIC）からなる群から選択される。一部の実施形態では、第 1 のカルボキシル活性化剤は EDC である。

20

【0082】

一部の実施形態では、カップリング剤は第 2 のカルボキシル活性化剤をさらに含む。例示的な第 2 のカルボキシル活性化剤としては、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド（スルホ-NHS）、ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）、ジメチルアミノピリジン（DMAP）、ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン（HOBt/HODbt）、1-ヒドロキシ-7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール（HOAt）、エチル 2-シアノ-2-（ヒドロキシイミノ）アセテート、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（BOP）、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、7-アザ-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、エチルシアノ（ヒドロキシイミノ）アセタート-O2-トリ（1-ピロリジニル）-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、3-（ジエトキシ-ホスホリルオキシ）-1, 2, 3-ベンゾ[d]トリアジン-4（3H）-オン、2-（1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）-N, N, N', N'-テトラメチルアミニウムテトラフルオロボレート／ヘキサフルオロホスフェート、2-（6-クロロ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）-N, N, N', N'-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート、N-〔（5-クロロ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）-ジメチルアミノ-モルホリノ〕-ウロニウムヘキサフルオロホスフェート N-オキシド、2-（7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）-N, N, N', N'-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート、1-〔1-（シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチリデンアミノオキシ）-ジメチルアミノ-モルホリノ〕-ウロニウムヘキサフルオロホスフェート、2-（1-オキシ-ピリジン-2-イル）-1, 1, 3, 3-テトラメチルイソチオウロニウムテトラフルオロボレート、テトラメチルフルオロホルムアミジニウムヘキサフルオロホスフェート、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキ

30

40

50

ノリン、2-プロパンホスホン酸無水物、4-(4,6-ジメトキシー-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウム塩、(ビス-トリクロロメチルカーボネート、1,1'-カルボニルジイミダゾールが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、第1のカルボキシル活性化剤はNHCである。

【0083】

一部の実施形態では、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤は、別々にパッケージされる。

【0084】

一部の実施形態では、高密度一級アミンポリマーは溶液中にあり、カップリング剤は固体の形態である。特定の実施形態では、カップリング剤は高密度一級アミンポリマー溶液に加えられる。一部の実施形態では、高密度一級アミンポリマーは溶液中にあり、カップリング剤は高密度一級アミンポリマー溶液に加えられ、溶液はヒドロゲルに付与される。

【0085】

一部の実施形態では、溶液中の高密度一級アミンポリマーの濃度は、約0.1%から約50%、例えば、約0.2%から約40%、約0.5%から約30%、約1.0%から約20%、約1%から約10%、約0.2%から約10%、約10%から約20%、約20%から約30%または約40%から約50%である。一部の実施形態では、カップリング剤は、少なくとも第1のカルボキシル活性化剤を含み、任意選択で第2のカルボキシル活性化剤を含み、溶液中の第1のカルボキシル活性化剤の濃度は、約3mg/mLから約50mg/mL、例えば、約5mg/mLから約40mg/mL、約7mg/mLから約30mg/mL、約9mg/mLから約20mg/mL、約3mg/mLから約45mg/mL、3mg/mLから約40mg/mL、3mg/mLから約35mg/mL、約3mg/mLから約30mg/mL、3mg/mLから約25mg/mL、約3mg/mLから約20mg/mL、3mg/mLから約15mg/mL、約3mg/mLから約10mg/mL、約5mg/mLから約50mg/mL、約10mg/mLから約50mg/mL、約15mg/mLから約50mg/mL、約20mg/mLから約50mg/mL、約25mg/mLから約50mg/mL、約30mg/mLから約50mg/mL、約35mg/mLから約50mg/mL、約40mg/mLから約50mg/mLまたは約3mg/mLから約45mg/mLである。

【0086】

一部の実施形態では、システムは、第1の治療的活性薬剤を含む。第1の治療的活性薬剤は、ヒドロゲルに封入されてもよいし、その表面に付着していてもよい。あるいは、第1の治療的活性薬剤は、高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着している。ある特定の実施形態では、システムは、第2の治療的活性薬剤をさらに含む。第2の治療的活性薬剤は、ヒドロゲルに封入されるかまたはその表面に付着している。あるいは、第2の治療的活性薬剤は、高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着している。第1および第2の治療的活性薬剤は、独立して、小分子、生物製剤、ナノ粒子および細胞からなる群から選択される。生物製剤は、増殖因子、抗体、ワクチン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、タンパク質および核酸からなる群から選択される。本発明の組成物に含まれる治療的活性薬剤の量は、例えば、具体的な薬剤；それが実行すべき機能；薬剤の放出のために要求される時間；投与される量を含む、様々な因子に依存する。一般的に、治療的活性薬剤の投薬量、すなわち、システムの中の治療的活性薬剤の量は、約0.001% (w/w) ~ 約10% (w/w)；約1% (w/w) ~ 約5% (w/w)；または約0.1% (w/w) ~ 約1% (w/w) の範囲から選択される。

【0087】

本発明は、デバイスを封入するか、またはデバイスの表面をコーティングするためのシステムも提供する。特に、ヒドロゲルおよび高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤はヒドロゲルの外面に付与され、その後、ヒドロゲルはデバイスの表面に付与される。カップリング剤および高密度一級アミンポリマーは、ヒドロゲルをデバイスの表面に接着する。所望の転帰によって、デバイスをヒドロゲルによって完全に封入することができ

るか、または部分的に封入してデバイスの一部の表面を露出させることができる。具体的には、「部分的に封入された」デバイスは、デバイスの1つの表面（例えば、デバイスの後面、正面または側面）またはデバイスの1つの部分（例えば、下半分または上半分）においてデバイスをコーティングすることを指す。特定の実施形態では、ヒドロゲルがデバイスおよび別の表面（例えば、組織または器官）に接着することができるように、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤は、ヒドロゲルの多部位に付与することができる。例示的な医療デバイスには、限定されるものではないが、除細動器、ペースメーカー、ステント、カテーテル、組織インプラント、ネジ、ピン、プレート、棒、人工関節、エラストマーをベースとした（例えば、PDMS、PTU）デバイス、ヒドロゲルをベースとしたデバイス（例えば、薬物もしくは細胞の送達またはセンサーのための足場）、ならびに、例えば温度、pHおよび局所組織の歪みを測定するためのセンサーが含まれる。

10

【0088】

表面は、官能基（例えば、アミンまたはカルボン酸基）を有することができ、または化学的に不活性であることもできる。本発明の生体適合性接着剤システムは、粘着性表面と静電的相互作用、共有結合および物理的相互貫入を形成することができる。アミンおよびカルボン酸のような官能基を有する基質のために、TAと基質の間の静電的相互作用および共有結合を通して接着を形成することができる。親水性で巨大分子に透過性である基質のために、高密度一級アミンポリマーは、基質に相互貫入して物理的絡み合いを形成することができ、TAマトリックスと共有結合を形成することもできる。

【0089】

ヒドロゲルと表面（例えば、組織またはデバイス）の間の界面接着は、ヒドロゲルの機械的強度および信頼性に影響を与え、それは接着剤としてのヒドロゲルの性能に対応する。この相互作用の性質は、界面破壊靱性として測定することができる。界面破壊靱性を測定する方法は、当業者に公知である。界面破壊靱性を測定する例示的な方法は、実施例4で提供する。本発明のシステムは、約 100 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、例えば、約 100 J/m^2 から約 4500 J/m^2 、約 100 J/m^2 から約 4000 J/m^2 、約 100 J/m^2 から約 3500 J/m^2 、約 100 J/m^2 から約 3000 J/m^2 、約 100 J/m^2 から約 2500 J/m^2 、約 100 J/m^2 から約 2000 J/m^2 、約 100 J/m^2 から約 1500 J/m^2 、約 100 J/m^2 から約 1000 J/m^2 、約 100 J/m^2 から約 500 J/m^2 、約 500 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、約 1000 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、約 1500 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、約 2000 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、約 2500 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、約 3000 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、約 3500 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、約 4000 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、約 4500 J/m^2 から約 5000 J/m^2 、約 2000 J/m^2 から約 3000 J/m^2 、約 1000 J/m^2 から約 3000 J/m^2 、約 2000 J/m^2 から約 3000 J/m^2 、約 200 J/m^2 から約 1000 J/m^2 、約 500 J/m^2 から約 1500 J/m^2 、約 1500 J/m^2 から約 3000 J/m^2 、約 2500 J/m^2 から約 3000 J/m^2 または約 200 J/m^2 から約 1500 J/m^2 の界面靱性によって特徴付けられる。

20

30

【0090】

一部の実施形態では、生体適合性接着剤は透明であり、下の表面またはその中に封入されたデバイスのモニタリングの容易さを可能にする。本発明のシステムの写真を、図12および13に示す。

40

【0091】

一部の実施形態では、生体適合性接着剤は、濡れているか、動的であるか、または濡れておりかつ動的である表面への付与に適する。

【0092】

本発明の特定の実施形態は、a) 第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含み、第1のネットワークは、ポ

50

リアクリルアミド、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリエチレングリコール（PEG）およびポリホスファゼンからなる群から選択されるポリマーを含み、第2のネットワークはアルギネートポリマーを含む、ヒドロゲル；b）キトサン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアリルアミン、ポリリシンおよびポリエチルアミンからなる群から選択される高密度一級アミンポリマー；ならびに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（EDC、EDACまたはEDCI）および任意選択でN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を含むカップリング剤を含む、生体適合性接着剤システムである。

【0093】

一部の実施形態では、生体適合性接着剤システムは、層状接着剤である。本明細書で用いるように、「層状接着剤」は、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤がヒドロゲルの1つまたは複数の面に付与されることを意味する。例えば、生体適合性接着剤システムは、a）第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、ヒドロゲル；b）高密度一級アミンポリマー；およびc）カップリング剤を含み、ここで、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤はヒドロゲルの全ての面に付与されている。高密度アミンポリマーおよびカップリング剤がヒドロゲルの全ての面に付与される生体適合性接着剤システムは、ヒドロゲルの全ての面が接着性であるヒドロゲルをもたらす。あるいは、生体適合性接着剤システムは、a）第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、ヒドロゲル；b）高密度一級アミンポリマー；およびc）カップリング剤を含み、ここで、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤はヒドロゲルの面のうちの全て未満に付与されている。高密度アミンポリマーおよびカップリング剤がヒドロゲルの全て未満の面に付与される生体適合性接着剤システムは、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤が付与されたヒドロゲルのその面のみが、接着性であるヒドロゲルをもたらす。特に、生体適合性接着剤システムは、a）第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含むヒドロゲルであり、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、ヒドロゲル；b）高密度一級アミンポリマー；およびc）カップリング剤を含み、ここで、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤はヒドロゲルの1つの面に付与されている。高密度アミンポリマーおよびカップリング剤がヒドロゲルの1つの面だけに付与された生体適合性接着剤システムは、「二層接着剤」と呼ばれる。高密度アミンポリマーおよびカップリング剤がヒドロゲルの全ての面より少ない面に付与される生体適合性接着剤システムは、面への接着が必要とされるときに使用することができる。特に、接着性の面（すなわち、高密度アミンポリマーおよびカップリング剤が付与された面）を表面（例えば、組織）に置いて、表面にヒドロゲルを接着することができる。高密度アミンポリマーおよびカップリング剤がヒドロゲルの残部に付与されなかったので、表面に接着されないヒドロゲルの面は接着性ではなく、それによっていかなる望ましくない接着も回避する。

【0094】

生体適合性接着剤は、生分解性であるように工学操作することができ（その教示が参照により本明細書に組み込まれる、Freier, T., Koh, H. S., Kazarian, K. および Shoichet, M. S., Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation, Biomaterials 26巻、5872～5878頁（2005年）；および、Gong, J. P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T. および Osada, Y., Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength, Advanced Materials 15巻、1155頁～+、d

10

20

30

40

50

o i : D o i 1 0 . 1 0 0 2 / A d m a . 2 0 0 3 0 4 9 0 7 (2 0 0 3 年) を 参 照) 、 薬物制御放出のために薬物を封入するために使用することができる；ある特定の付与におけるこのシステムのさらなる利点は、容易な視覚的モニタリングを可能にする透明性である。

【0095】

III. 発明の方法

本発明はまた、表面にヒドロゲルを接着する方法であって、a) 高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤を含む溶液をヒドロゲルに付与するステップ；ならびにb) ヒドロゲルを表面に置くステップを含み；ヒドロゲルは第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含み、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、方法も提供する。ある特定の実施形態では、表面は、組織である。システムは、限定されるものではないが、心臓組織、皮膚組織、血管組織、腸組織、肝臓組織、腎臓組織、脾臓組織、肺組織、気管組織、目組織、軟骨組織、腱組織を含む、任意の組織に付与することができる。あるいは、表面は、医療デバイスである。システムは、限定されるものではないが、除細動器、ペースメーカー、ステント、カテーテル、組織インプラント、ネジ、ピン、プレート、棒、人工関節、エラストマーをベースとした（例えば、PDMS、PTU）デバイス、ヒドロゲルをベースとしたデバイス（例えば、薬物もしくは細胞の送達またはセンサーのための足場）、ならびに、例えば温度、pHおよび局所組織の歪みを測定するためのセンサーからなる群を含む、任意の組織に付与することができる。

【0096】

本発明は、医療デバイスを封入するか、またはデバイスの表面をコーティングするための方法も含む。特に、ヒドロゲルおよび高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤はヒドロゲルの外面に付与され、その後、ヒドロゲルはデバイスの表面に付与される。カップリング剤および高密度一級アミンポリマーは、ヒドロゲルをデバイスの表面に接着する。所望の転帰によって、デバイスをヒドロゲルによって完全に封入することができるか、または部分的に封入してデバイスの一部の表面を露出させることができる。具体的には、「部分的に封入された」デバイスは、デバイスの1つの表面（例えば、デバイスの後面、正面または側面）またはデバイスの1つの部分（例えば、下半分または上半分）においてデバイスをコーティングすることを指す。特定の実施形態では、ヒドロゲルがデバイスおよび別の表面（例えば、組織）に接着することができるように、高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤は、ヒドロゲルの多部位に付与することができる。

【0097】

本発明は、創傷または損傷を閉じ、創傷治癒を促進する方法も含む。特に、ヒドロゲルおよび高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤はヒドロゲルの外面に付与され、その後、ヒドロゲルは創傷または損傷の位置に付与される。特定の実施形態では、ヒドロゲルは、心臓の欠損を修復するために心臓に付与される。

【0098】

本発明はまた、治療的活性薬剤を対象に送達する方法であって、a) 高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤を含む溶液をヒドロゲルに付与するステップ；ならびに

b) ヒドロゲルを表面に置くステップを含み；ヒドロゲルは第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含み、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含み、少なくとも1つの治療的活性薬剤がヒドロゲルおよび／または高密度一級アミンポリマーに封入されるかまたはその表面に付着しており、それによって治療的活性薬剤を前記対象に送達する、方法も含む。

【0099】

本発明の方法は、表面を生体適合性接着剤と接触させることを含む。表面は、当技術分野の任意の公知の経路によって組成物と接触させることができる。本明細書で用いるように、用語「送達」は、所望の効果が生まれるように、所望の部位への組成物の少なくとも

部分的な局在化をもたらす方法または経路によって、対象に組成物を置くことを指す。

【0100】

送達の例示的な様式には、限定されるものではないが、本発明の組成物を標的表面、例えば、組織または器官に封入する足場の中への、注射、挿入、埋め込みまたは送達が含まれる。本発明の組成物が溶液に溶解される場合、それらはシリンジによって表面に注射することができる。

【0101】

本発明の方法は、医療目的、例えば対象における創傷閉鎖、治療剤の送達または医療デバイスの付着のために適し、ここで対象は哺乳動物である。一部の実施形態では、哺乳動物は、霊長類、例えば、ヒト、または動物である。通常、動物は、霊長類、齧歯動物、家畜または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類には、チンパンジー、カニクイザル、クモザルおよびマカク、例えばアカゲザルが含まれる。齧歯動物には、マウス、ラット、マーモット、フェレット、ウサギおよびハムスターが含まれる。家畜および狩猟動物には、雌ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ科の種、例えばイエネコ、イヌの種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類の種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、ならびに魚類、例えば、マス、ナマズおよびサケが含まれる。一部の実施形態では、対象は、ヒト、イヌ、ブタ、雌ウシ、ウサギ、ウマ、ネコ、マウスおよびラットからなる群から選択される。好ましい実施形態では、対象は、ヒトである。

【0102】

送達の例示的な様式には、限定されるものではないが、本発明の組成物を標的組織に封入する足場の中への、注射、挿入、埋め込みまたは送達が含まれる。一部の実施形態では、組成物は、対象の歯の天然または人工の腔または房に注射によって送達される。本発明の組成物が溶液に溶解される場合、それらはシリンジによって組織に注射することができる。

【0103】

別の態様では、本発明は、表面（例えば、組織またはデバイス）にヒドロゲルを接着する方法であって、a) 高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤を含む溶液をヒドロゲルに付与するステップ；ならびにb) ヒドロゲルを表面に置くステップを含み；ヒドロゲルは第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークを含み、第1のポリマーネットワークは共有結合性の架橋を含み、第2のポリマーネットワークはイオン性の架橋を含む、方法を提供する。

【0104】

特に、固体の形態のカップリング剤は、高密度一級アミンポリマーの水溶液に加えられ、指定された時間、例えば、10秒、30秒、60秒、2分、5分または10分の間混合される。この溶液は、ヒドロゲルに付与される。ヒドロゲルの処理表面は表面の上に次に置かれ、ヒドロゲル、高密度アミンポリマーと表面の間の共有結合の形成によってヒドロゲルを接着させる。

【0105】

IV. キット

本発明は、キットも提供する。そのようなキットは、本明細書に記載される生体適合性接着剤、および、ある特定の実施形態では投与のための説明書を含むことができる。そのようなキットは、本明細書に記載される方法の実行を促進することができる。キットとして供給されるとき、生体適合性接着剤システムの異なる構成成分を別個の容器にパッケージして、使用直前に混合してもよい。構成成分には、限定されるものではないが、予め形成されたヒドロゲル、高密度一級アミン成分を含有する溶液、および固体の形態のカップリング剤が含まれる。特定の実施形態では、本発明は、予め形成されたアルギネートをベースとしたヒドロゲル；EDC/NHSの乾燥粉末混合物；および高密度一級アミンポリマーの水溶液を含む三成分システムに関する。構成成分のそのようなパッケージングは、所望により、組成物を含有する1つまたは複数の単位剤形を含むことができるパックまたはディスペンサーデバイスで別々に提供することができる。パックは、例えば、ブリスタ

10

20

30

40

50

ーパックなどの金属またはプラスチックのホイルを含むことができる。構成成分のそのようなパッケージングは、ある特定の場合には、構成成分の活性を失うことなく長期保存を別々に許すこともできる。

【0106】

ある特定の実施形態では、キットには、本発明の方法の実行を記載する説明資料を補充することができる。キットに、詳細な説明書が物理的に付随していなくてもよい；代わりに、キットの製造業者または卸売業者によって指定されるインターネットウェブサイトにユーザーを誘導してもよい。

【0107】

本発明を以下の実施例によってさらに例示するが、それらはいかなる限定も意図するものではない。本出願全体で引用される全ての参考文献、特許および公開特許出願の全内容、ならびに図面は、ここに参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0108】

(実施例1) 生体適合性接着剤の合成

材料。グルロン酸含有量の高い高分子量アルギン酸ナトリウム ($M_w = 265 \text{ kDa}$) (Protanol LF20/40; FMC Technologies) を、全ての接着および *in vitro* 実験のために使用した。その全教示が本明細書に参照により組み込まれる、Kong, H. J., Kaigler, D., Kim, K. および Mooney, D. J., Controlling rigidity and degradation of alginate hydrogels via molecular weight distribution, *Biomacromolecules* 5 巻、1720~1727 頁 (2004 年) に記載されているプロトコルに従って、5 Mrad の線量の γ 線で高分子量アルギン酸ナトリウム (Protanol LF20/40; FMC Technologies) に照射することによって、低分子量アルギン酸ナトリウムを調製した。エンドトキシンレベルの低い超高純度のアルギン酸ナトリウム (MVG アルギネート、ProNova Biomedical AS) を、*in vivo* 接着測定のために使用した。ProNova Biomedical AS から購入した *in vivo* 実験のための超高純度のキトサンを除く、低、中および高分子量のキトサンは、Sigma から購入した。高密度アミンポリマーポリアリルアミン、ゼラチンおよびポリエチレンイミンは Sigma から購入し、I 型コラーゲンは Advanced BioMatrix から購入した。カップリング剤 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) および N-ヒドロキシスルホスクシンイミド (スルホ-NHS) は、ThermoFisher Scientific から購入した。医療グレードのシアノアクリレート (Loctite 4541 Prism) は、Henkel Corporation から購入した。アクリルアミド (AAM)、N, N'-メチレンビス (アクリルアミド) (MBAA)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) を含むモノマー、フリーラジカル開始剤過硫酸アンモニウム (APS) および重合促進剤テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) は、Sigma から購入した。ポリエチレングリコールジアクリレート (PEGDA-20 kDa) は、その全教示が参照により本明細書に組み込まれる、Nemir, S., Hayenga, H. N. および West, J. L., PEGDA hydrogels with patterned elasticity: Novel tools for the study of cell response to substrate rigidity, *Biotechnology and Bioengineering* 105 巻、636~644 頁 (2010 年) に記載されるプロトコルに従って合成した。フルオレセインイソチオシアネート標識キトサン (FITC-キトサン) は、その全教示が参照により本明細書に組み込まれる、Qaqish, R. B. および Amiji, M. M. Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chito

10

20

30

40

50

san-mucin interactions. Carbohydrate Polymers 38巻、99～107頁（1999年）に記載されるプロトコルに従って合成した。カルボン酸官能基を有する直径500nmの蛍光性マイクロスフェアは、ThermoFisher Scientificから購入した。ブタの皮膚および肝臓は、地元の食料品店から購入した。

【0109】

合成。生体適合性接着剤を調製するために、バルクヒドロゲルを予め形成し、次に、その表面をカルボジイミドカップリング反応のために高密度一級アミンポリマーおよびカップリング剤の水溶液で処理した。アルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲルは、その教示が参照により本明細書に組み込まれる、Li, J., Illeperuma, W. R. K., Suo, Z. および Vlassak, J. J., Hybrid Hydrogels with Extremely High Stiffness and Toughness, ACS Macro Lett. 3巻、520～523頁（2014年）に記載されるプロトコルに従って調製した。高分子量および低分子量アルギネートの比は、50:50に固定された。高密度一級アミンポリマーポリアリルアミン、キトサン、ゼラチンおよびポリエチレンジアミンを、2.0重量%でMES緩衝液に溶解し、pHを6に調整した。コラーゲンは、保存溶液（1.0重量%およびpH=2.0）として使用した。使用したカップリング剤は1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）、硫酸化されたまたは硫酸化されていないN-ヒドロキシスクシンイミド（hydroxysuccinimide）（NHS）であり、架橋ポリマーの溶液中のEDCおよび硫酸化されたNHSの最終濃度は両方とも12mg/mLであった。生体適合性接着剤を目的の表面に付与する1分前に、架橋ポリマーおよびカップリング剤の溶液（約250μL）をバルクマトリックス（15×70mm²）の表面に付与した。機械的試験の前に、特に明記しない限り一般的に30分間、弱い圧縮を加えた。

【0110】

（実施例2）生体適合性接着剤

ヒドロゲルと比較して優れた本発明の生体適合性接着剤システムの接着性を、図1に示す。キトサンは、代表的な高密度一級アミンポリマーである。キトサンの接着特性を、本発明で使用する代表的なカップリング剤の組入れの有る無しで比較する。EDC/NHSによるキトサンの処理は、キトサン単独またはEDC/NHS単独と比較してより強力な接着をもたらす（図1、上）。EDCおよびスルホ-NHSの両方を12mg/mLまで2重量%キトサン水溶液に溶解し、次に、混合液の0.2mLを25mm×75mmの組織表面（ブタの皮膚など）に付与した。

【0111】

図1に示すように、カップリング試薬EDC/スルホ-NHSだけの使用は、非常に低い接着エネルギーにつながった；高密度一級アミンポリマー（すなわち、キトサン）なしでは、ヒドロゲルマトリックスは、負荷電した組織表面によって静電的に反発される可能性がある。C. K. Royら, Adv. Mater. 27巻、7344～7348頁（2015年）。カップリング試薬のない架橋ポリマーも、低い接着エネルギーにつながった。この状況における純静電引力は、2つの表面を架橋する共有結合ほど強力でない。対照的に、架橋ポリマーおよびカップリング試薬からなる強靱な接着剤は、極めて高い接着エネルギーにつながった。これらの結果は、強力な接着のための静電引力および共有結合の両方の重要性を強調した（図23）。この知見は、ヒドロゲル表面に架橋ポリマーを選択的にパターン化することによって、接着性および非接着性の領域を有する接着剤を設計することが実行可能であることも示した。この結果は、ヒドロゲル表面に高密度一級アミンポリマーを選択的にパターン化することによって、ヒドロゲルの表面を接着性および非接着性の領域で選択的に修飾することができることも示す。ヒドロゲル表面の接着性部分の選択的パターン化は、ある特定の状況における組織の間の望ましくない接着を防止するために使用することができる。界面強靱性によって測定される接着は5分以内に形成し、時間と共により強力になる（図1、下）。生体適合性接着剤は、ブタの皮膚に対し

て接着エネルギーの急速な経時的増加を示し、1分以内に 300 J m^{-2} の値である；それは、30分以内に 1000 J m^{-2} までさらに増加した。この急速であるが即時でない接着は、容易な方法で材料を付与することを可能にするので、これらの組織接着剤の臨床への移転および採択を助ける可能性がある。対照的に、シアノアクリレートは組織と接触すると凝固し、それは取扱いおよび再配置を困難にする。

【0112】

（実施例3）高密度一級アミンポリマーの界面強靱性

5つの代表的な高密度アミンポリマーの界面強靱性を、図2Eで比較する。ブタの皮膚を、モデル組織として使用した。高密度アミン基を有する5つのポリマーを、2重量%まで水に溶解した。各溶液をEDCおよびスルホ-NHSと混合し、それらはそれぞれ12 mg/mLの最終濃度であった。これらの混合液は、アルギネートポリアクリルアミドヒドロゲルを15分の間活性化し、その後、界面強靱性を測定するために標準の剥離試験を実行するために使用した。

【0113】

（実施例4）生体適合性接着剤の接着強度

第1のポリマーネットワークおよび第2のポリマーネットワークの相互貫入ネットワーク（IPN）をベースにしたヒドロゲルは、単独の第1のポリマーネットワークまたは第2のポリマーネットワークのいずれと比較しても優れた接着を提供する。試験した3つのヒドロゲルの概略図を、図3に示す。共有結合性架橋だけを含む第1のポリマーネットワークを、図3の左上に表す。イオン性架橋だけを含む第2のポリマーネットワークを、図3の中央上に表す。第1と第2のポリマーネットワークを含むIPNネットワークを、図3の右上に表す。

【0114】

単一ネットワークポリアクリルアミド（PAAm）ヒドロゲルおよびアルギネートヒドロゲル、または両方のポリマーネットワークで構成されるヒドロゲルのいずれかで形成される接着剤を比較した。PAAmヒドロゲルは、アクリルアミドおよびN, N'-メチレンビスアクリルアミドのフリーラジカル共重合によって調製した。アルギネートヒドロゲルは、アルギン酸ナトリウム水溶液および硫酸カルシウムスラリーを混合することによって調製した。2つの反応の組合せは、IPNヒドロゲルにつながった。測定において、ヒドロゲルの表面は、キトサンが2重量%であり、EDCおよびスルホ-NHSが12 mg/mLであった活性化薬剤で処理し；次に、活性化ヒドロゲルをブタの皮膚に付着させ、その後、力-伸長曲線を測定するための標準剥離試験が続いた。界面強靱性の値は、定常状態における力対試料幅の比の2倍であった。

【0115】

図3の下に示すように、単一ネットワークヒドロゲルから製作された接着剤は界面を強靱にすることができる有効なエネルギー消散機構が欠如しているので、低い接着エネルギーを示した。アルギネートおよびポリアクリルアミド（PAAm）をベースにしたIPNヒドロゲルの界面強靱性は、PAAm単独を、またはアルギネートだけをベースにしたヒドロゲルより大きかった。これらの結果は、静電および共有結合性接着、ならびにバルクヒドロゲルのバックグラウンドヒステリシスを組み合わせることが、高い接着エネルギーに寄与するという仮説を支持する。

【0116】

（実施例5）アルギネートの分子量の影響

第1および第2のネットワークポリマーの分子量は、接着剤システムの界面強靱性をモジュレートするように調整することができる。強靱なヒドロゲルのモデルとして、アルギネートポリアクリルアミドIPNヒドロゲルが選択された。第2のネットワークを形成するために使用したアルギネートの分子量を除いて、3つのヒドロゲルは同じ組成を含む。アルギネートは高分子量および低分子量の鎖を混合することによって調整し、アルギネートの全体の濃度は2重量%前後に固定した。高分子量のアルギネート（約200 kDa）はLF2040と表し、低分子量のアルギネート（約20 kDa）は5MRadと表し

た。測定において、ヒドロゲルの表面は、キトサンが2重量%であり、EDCおよびスルホ-NHSが12mg/mLであった活性化薬剤で再び処理し；次に、活性化ヒドロゲルをブタの皮膚に付着させ、その後界面強靭性を判定するための標準剥離試験が続いた。最適な値は、50%の低分子量アルギネート（約20kDa）および50%の高分子量アルギネート（約200kDa）に存在する（図4）。

【0117】

（実施例6）接着剤剥離試験

接着エネルギー測定。強靭な接着剤の接着特性は、接着エネルギー、すなわち、界面クラックの単位面積を増加させるために必要とされたエネルギー量として数量化した。接着エネルギーは、接着剥離試験、または基質が低いバルク強靭性を有するときの二層接着試験のいずれかで判定した。

【0118】

接着剥離試験。接着エネルギーは、180度剥離試験で測定した。強靭な接着剤のリボン（ $15 \times 1.5 \times 80 \text{ mm}^3$ ）は一端が開放されて基質に接着し、端のクラックを有する二層を形成した。クラック先端への変形を制限するために、強靭な接着剤の後ろはKrazy糊によって強固なポリエチレンテレフタレートフィルムにも接着しており、したがって、機械で実行される全ての作業はクラック先端で消散したエネルギーに等しくなる。強靭な接着剤および基質の自由な末端をプラスチックシートに取り付け、それに機械のグリップを取り付けた。一方向性引張試験を実施するためにインストロン試験機を使用し、その間、力および伸長を記録した。負荷速度は、100mm/分の一定に保った。接着エネルギーは、力および幅の比のプラトー値の2倍であった。R. S. Rivlin, A. G. Thomas, J. Polym. Sci. 10巻、291~318頁（1953年）

【0119】

二層接着試験。低いバルク強靭性のヒドロゲルを試験したとき、接着エネルギーを測定するために二層接着試験を使用した。試験したヒドロゲルには、アルギネート-ポリアクリルアミド、ポリアクリルアミドおよびポリメタクリル酸ヒドロキシエチルヒドロゲルが含まれる。45mm×20mm×1.5mmのヒドロゲルの上に45mm×20mm×1.5mmの強靭な接着剤を圧縮することによって、二層検体を調製した。厚さ120μmの強固なポリエチレンテレフタレート（PET）薄膜（Transparency Copy Film, PP2500、3M）を、Krazy糊によって試験ヒドロゲルに裏張り層として接着した。検体は、0.5mm/秒の一定の負荷速度で、インストロン試験機で延伸させ、その間、力-延伸曲線を記録した。接着エネルギーは、 $G = P(\lambda - 1) - U_s(\lambda)$ によって計算することができ、ここで、Pおよびλは、単位幅当たりの限界力（未変形状態における試料の幅で割った現在の状態における力）および脱離が起こるときの臨界延伸である（J. Tang, J. Li, J. J. Vlassak, Z. Suo, Soft Matter 12巻、1093~1099頁（2016年））。 U_s は、脱離が起こるときの未変形状態における基質の面積で割った基質中に保存されている歪みエネルギーであり、これは、1からλへの延伸による、記録された力-延伸曲線の下

【0120】

本発明のシステムの接着特性を評価するために、システムおよびブタの皮膚の二層で剥離試験を実行した。接着特性を数量化するために界面強靭性を採択し、それは、標準の剥離試験（上記）で測定した。界面強靭性は、界面でのクラックの単位面積を拡張するのに必要とされるエネルギーと規定され、界面がどれくらい強力に脱離に抵抗するかを反映する。市販の接着剤および糊の接着性能を評価するために、剥離試験が広く使われている。試験の概略図を、図5Dに示す。特に、検体は、一般的に、ブタの皮膚およびプラスチックフィルムではさまれた接着性ヒドロゲルの断片であった。ヒドロゲルの接着性の面を組織に付着させ、特に、ヒドロゲル、高密度アミンポリマーおよびカップリング剤を含むシステムをブタの皮膚に付与した。界面での消散するエネルギー濃度を制限するために、プ

ラスチックフィルムを強固な裏張りとして使用した。ブタの皮膚からシステムを剥離するのに必要とされた力およびヒドロゲルの伸長を、イントロン機で次に測定した。測定した力-伸長曲線から、定常状態での力対試料幅の比の2倍は、界面強靱性の値を与える。

【0121】

（実施例7）血液曝露の影響

組織接着の形成は、液体（例えば、血液）への曝露および組織の動的運動のために、*in vivo*条件下でしばしば複雑である。N. Langら、*Sc. Transl. Med.* 6巻、218ra216、1～10頁（2014年）を参照。血液曝露による接着性能を評価するために、ブタ皮膚の表面を血液の有る無しで最初に覆い（図5A～5C）、その後、本発明の生体適合性接着剤および市販の接着剤（シアノアクリレート）の実施が続いた。IPNヒドロゲル（25mm×75mm）の表面に、活性化薬剤（キトサンおよびEDC／スルホ-NHS）またはシアノアクリレートのいずれかの0.2mLの量を投入した。これらの測定では、ヒドロゲルはアルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲルであって、高密度一級アミンポリマーはキトサンであって、カップリング剤はEDCおよびスルホ-NHSである。

【0122】

接着の後、および機械的伸張の後、皮膚と生体適合性接着剤の間の界面は原線維構造を示し、接着の断裂なしで大きな変形がなお可能であったことを示した。血液の存在下または不在下において測定された、本発明の生体適合性接着剤および市販の接着剤（シアノアクリレート）の界面強靱性のプロットを、図6～9に示す。図9に実証されるように、接着剤-皮膚界面は、約1200 Jm⁻²の極めて大きな接着エネルギーを示し、血液に非感受性であり、生体適合性接着剤が血液曝露の下でも強固な接着が可能なことを示した。対照的に、広く使われているシアノアクリレートにより提供される接着は、約300 Jm⁻²の大いにより低い接着エネルギーにつながり、血液への曝露によってかなり劣化した。接着エネルギーは、300 Jm⁻²から50 Jm⁻²に減少した（図9）。

【0123】

つまり、本発明の生体適合性接着剤は、血液曝露の中でも皮膚および心臓などの組織の表面に強く接着し、有意な機械的負荷および歪みに耐える。

【0124】

（実施例8）生体適合性

本発明における接着性ヒドロゲルの生体適合性を評価するために、成体および新生児組織（Lonza）からの正常なヒト皮膚線維芽細胞（HDF）で*in vitro*細胞生存率試験を実行した。活性化薬剤（キトサンおよびEDC／スルホ-NHS）の有る無しのIPNヒドロゲルを、比較のためのシアノアクリレートと一緒に細胞培養培地DMEMに浸漬した。24時間後に、培地を収集し、細胞培養で馴化培地として使用した。100 μLの馴化培地を各ウェルに加え、そこに、HDFを1ウェル当たり12kで播種した。24時間の培養の後、製造業者の説明書によりLive／Dead Viability／Cytotoxicityキット（Life Technologies）で生／死染色を実行した（図10）。元のIPNおよび接着性のIPNヒドロゲルは、非常に高い細胞生存率（>95%、生細胞は緑色の細長い形、図10、左および中央）および優れた増殖につながった。しかし、シアノアクリレートは、細胞生存率および増殖の有意な低減を引き起こした（図10、右、死細胞は赤色点状）。

【0125】

（実施例9）心臓の欠損の修復

本発明は、心臓の欠損を修復するシーラントとして使用することができる。本発明の生体適合性のシステムは非常に追従的であり、心臓などの器官の曲面に従う。本発明で 사용되는ヒドロゲルの延伸性および強力な接着は、大きな静的および動的変形の下でさえ完全な密封を保証する。

【0126】

心臓の欠損の形成および閉鎖の概略図を、図11に表す。心臓に形成された穴を通して

液体が流れる（図12、上）。心臓に圧が加えられるときでさえ、生体適合性のシステムの付与は穴を通る液体の流れをブロックし、大きな歪みの下での穴の密封を示している（約100%）（図12、中央）。高頻度の動的変形の下でさえ、穴は密封されたままである（図12、下）。さらに、本発明の生体適合性のシステムは透明であり、ヒドロゲルの除去を必要とすることなく表面の連続的モニタリングを可能にする（図12、上、中央および下）。

【0127】

ブタ心筋の心室壁に直径7mmの円形欠損を形成し、次に、本発明の生体適合性接着剤（PAA／アルギネート／キトサン／EDC）をパッチとして心筋に接着することによってこれを密封した（図12、中央および下に示す）。生体適合性接着剤は追従的であって、心筋の幾何構造に厳密に従った。密封の質を判定するために、PBSを心臓に流した。心臓を膨張させた間、ヒドロゲルは心臓の変形とともに拡張し、100%までの歪みの下で漏出は観察されなかった（図12、中央）。複数の膨張－収縮サイクルの間に実証されたように、生体適合性接着剤パッチは心臓の高頻度運動にも順応した（図12、下）。作動中の心臓の一般的な生理的歪みは、10～30%前後であり（その教示が参照により本明細書に組み込まれる、Aletas, A. H., Balaban, R. S. およびWen, H., High-resolution strain analysis of the human heart with fast-DENSE, Journal of Magnetic Resonance 140巻、41～57頁（1999年）を参照）、生体適合性接着剤はこの範囲よりかなり上でも接着性のままだった。

【0128】

組織接着剤としての生体適合性接着剤の潜在能力をさらに評価するために、ブタ心臓へのその接着をin vivoで試験した。採血された新鮮なブタの血液を心臓の表面の付与部位に散布し、続いて生体適合性接着剤を付与した。引張る間の力を記録して剥離試験を実行し、結果は、強力な接着が心臓の動的な曲がった表面に形成されることを実証し、ここでピーク強度は83.5kPaであって、それは、全ての現在の市販されている組織接着剤（一般的に、約10kPa）を超える。（市販の接着剤については、その教示が参照により本明細書に組み込まれる、Lang, N.ら、A blood-resistant surgical glue for minimally invasive repair of vessels and heart defects, Science translational medicine 6巻、218ra216-218ra216（2014年）を参照）。

【0129】

方法。体重が60～75kgの雌のヨークシャーブタを使用した。全ての動物は、米国国立衛生研究所によって推奨される1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsによって、人道的扱いを受けた。実験プロトコルは、Boston Children's Hospital Institutional Animal Care and Use Committeeによって承認された。ブタはチレタミン／ゾラゼパム（7mg/kg）およびキシラジン（4mg/kg）の筋肉内注射によって麻酔をかけ、カフス付きの気管内チューブを挿管し、量調節ベンチレータ（Hallowell EMCモデル2000、Hallowell EMC、Pittsfield, MA）によって1分当たり10～20呼吸の速度で通気した。麻酔は、イソフルラン（1～2%）で維持した。鎮痛のために、フェンタニルおよびブプレノルフィンを使用した。1時間当たり150～300mlの維持IV注入を、投与した。胸部腔には正中胸骨切開を通してアクセスし、心臓の表面を曝露させるために心膜を切開した。生体適合性接着剤を拍動している心臓の表面に付与し、アプリケーションャーを使用して所定の位置に3分まで保持した。この付与は、心臓の機能に影響しなかった。実験の一部では、血液の存在の影響を評価するために、生体適合性接着剤を付与する前に心臓の表面に血液を加えた。

【0130】

したがって、強力な接着、大きな延伸性、透明性および生体適合性の組合せは、心臓欠損の創傷閉鎖、治癒および修復などの多くの生医学的付与に関して、本発明の生体適合性のシステムを現在の生物学的接着剤より優れたものにする。

【0131】

（実施例10）医療テープ／包帯

本発明の生体適合性のシステムは、封入アクチュエータデバイス（図13、上）に接着させ、それらを心臓の表面に付着させて（図13、中央および下）、創傷を閉鎖および治癒し、本発明の生体適合性のシステムで吻合において使用される縫合を置き換えるために、医療テープとして使用することができる。

【0132】

（実施例11）注射可能な生体適合性接着剤

注射可能な接着性ヒドロゲルを作製するために、PEGおよびクリック化学を使用して、IPNヒドロゲルの第1の架橋ネットワークとしてポリアクリルアミドを置き換えた。注射可能な接着剤は、アルギネートの存在下において、ノルボルネンで修飾したPEGおよびテトラジンで修飾したPEGで調製した。PEG-ノルボルネンは、各末端にノルボルネン基を有する4本の腕を有する。PEG-テトラジンは、二官能性であり、末端にテトラジンを有する。PEG-アルギネートIPNは、CaSO₄の追加によって形成された（図14）。あるいは、生体適合性のシステムは、紫外線の曝露により調製することができる。チオール末端基を有する二官能性PEGを、PEG-テトラジンの代わりに使用した。PEG-アルギネートIPNは、アルギネートの存在下でPEG-ノルボルネンおよびPEG-チオールで調製した（図15および16）。

【0133】

（実施例12）接着界面の共焦画像化

生体適合性接着剤システムは、高密度一級アミンポリマーとしてFITC-キトサンを、およびヒドロゲルとしてPAAM-アルギネートIPNを使用して調製し、ブタの皮膚、ブタの筋肉またはヒドロゲルに接着した。接着は暗所で実行し、1時間発色させた。試料は室温の20%スクロース／PBS中で凍結保護し、OCTに包埋してからドライアイスの上で凍結させた。クリオスタット（Leica CM1950）を使用して横断凍結切片（50 μm）を切り、共焦蛍光顕微鏡検査法（Zeiss LSM710）によって画像化した。FITCの励起波長は490 nmに設定し、明視野像も収集した。

【0134】

生体適合性接着剤は化学的に不活性の表面への接着さえも潜在的に提供することができるので、それへの接着が所望される表面との高密度一級アミンポリマーの物理的相互貫入を研究した。組織と異なって、ある特定のヒドロゲル（例えば、ポリアクリルアミドまたはポリメタクリル酸ヒドロキシエチル）は、界面で化学結合を形成するためにここで利用される官能基（例えば、アミンまたはカルボン酸）を欠くが、興味深いことに、それらはなおTAによく接着する（図24）。代表的な組織である皮膚、および化学的に不活性のヒドロゲルであるポリアクリルアミドへの生体適合性接着剤の接着を研究した。両方への生体適合性接着剤の強力な接着が見出され、図17の上に示す。高密度一級アミンポリマーは様々な基質に相互に貫入することが見出されたが、所与の時間における相互貫入の距離は基質透過性に依存した；ヒドロゲルは皮膚より透過性であるので、所与の時間でのヒドロゲルにおける物理的相互貫入の深度は皮膚において見出されるより大きかった（図18）。

【0135】

生体適合性接着剤は各種の生物組織およびヒドロゲルに付与可能であり、それが接着する基質の強靭性は接着エネルギーの上限を示す。実際は、アルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲルが基質として使用されたとき（Sun, J. Y.ら、Highly stretchable and tough hydrogels、Nature 489巻、133～136頁、doi: Doi 10.1038/Nature11409（2012年）、およびLi, J.、Illeperuma, W. R.、Suo, Z.

およびVlassak, J. J., Hybrid Hydrogels with Extremely High Stiffness and Toughness, ACS Macro Letters 3巻、520～523頁(2014年)を参照、両方の全教示は参照により本明細書に組み込まれる)、接着剤は、およそ 1000 Jm^{-2} の極めて高い接着エネルギーを達成した。この状況で、生体適合性接着剤の性能は、骨または筋肉への軟骨の接着と類似していた。あるいは、基質強靱性が生体適合性接着剤それ自体のものより大きくない場合は(例えば、PHEMAへの接着)、接着強度は基質のバルク強靱性と類似していた(図17、下)。

【0136】

本発明の生体適合性接着剤を他の既存の接着剤と比較すると、シアノアクリレートは高いバルク強靱性を提供するが、接着エネルギーは制限される(Stefanov, T., Ryan, B., Ivankovic, A. およびMurphy, N., Mechanical bulk properties and fracture toughness of composite-to-composite joints of an elastomer-toughened ethyl cyanoacrylate adhesive, International Journal of Adhesion and Adhesives 68巻、142～155頁(2016年)を参照、その全教示は参照により本明細書に組み込まれる); ポリエチレングリコールヒドロゲルに基づくナノ粒子およびイガイによって啓発された接着剤は、比較的もろく、組織への接着エネルギーは低い(図17、下)。Rose, S.ら、Nanoparticle solutions as adhesives for gels and biological tissues. Nature (2013年); Barrett, D. G., Bushnell, G. G. およびMessersmith, P. B., Mechanically robust, negative-swelling, mussel-inspired tissue adhesives, Advanced healthcare materials 2巻、745～755頁(2013年); ならびにYuk, H., Zhang, T., Lin, S., Parada, G. A. およびZhao, X., Tough bonding of hydrogels to diverse non-porous surfaces, Nature materials 15巻、190～196頁(2016年)を参照、全ての全教示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明の生体適合性接着剤は特別な接着特性を実証し、それが接着することができる広範囲の濡れた表面が存在する。

【0137】

(実施例13) 肝臓組織および皮膚への接着

組織接着剤としての生体適合性接着剤の潜在能力をさらに試験するために、それを肝臓の組織および皮膚に接着した。肝臓のスライスを2つの生体適合性接着剤に接着し、それをその後引張試験に付した。生体適合性接着剤は高度に延伸可能のままで、肝臓組織から脱離することなくその初期の長さの14倍にも耐えた(図19)。さらに、生体適合性接着剤はマウスのインタクトな表皮に強力に接着し、生きている動物の上のこの組織の動的運動に容易に順応した。

【0138】

方法。全ての作業はC57BL/6Jマウスで実行し(雌、6～8週齢; Jackson Laboratories)、Institute for Animal Care and Use Committee, Harvard University、および米国国立衛生研究所および施設のガイドラインに従って実行した。マウスに麻酔をかけ、背中の一部を剃り、そこに、直径6mmの2片の強靱な接着剤をカスタム設計のアプリケーションによって2分の間付与した。麻酔は、イソフルラン(1～2%)で維持した。麻酔から回復の後、マウスをそれらのケージに戻した。マウスの運動の下での接着を評価するために、ビデオを記録した。

【0139】

(実施例14) *in vivo* 生体適合性試験

生きているラット心筋に2週間接着することによって、生体適合性接着剤の *in vivo* 生体適合性を試験した。生体適合性接着剤は、標準のシアノアクリレート接着剤より劇的に低い炎症につながった(図20)。これらの所見は、生体適合性接着剤が心臓のような組織の上へのアクチュエータなどの生医学的デバイスの固定化も可能にすることを示唆する。

【0140】

雌Sprague Dawleyラット(225~275g)が関与したこの研究は、Institute for Animal Care and Use Committee (Harvard University)に従って実行した。簡潔には、心外膜表面を曝露させ、前述の通りに心臓を操作した。(その教示が参照により本明細書に組み込まれる、Roche, E. T., Hastings, C. L., Lewin, S. A., Shvartsman, D. E., Brudno, Y., Vasilyev, N. V., O'Brien, F. J., Walsh, C. J., Duffy, G. P., Mooney, D. J., Comparison of biomaterial delivery vehicles for improving acute retention of stem cells in the infarcted heart, *Biomaterials* 35巻、6850~8頁(2014年)を参照)。接着剤の硬化を可能にするために、カスタムメイドのアプリケーターを使用して、生体適合性接着剤またはシアノアクリレートとアルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲルを心外膜表面に対して圧迫した。動物の切り口は縫合により閉鎖し、麻酔から回復の後に動物をそれらのケージに戻した。2週後に、心臓を外植し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)に固定し、組織像およびヘマトキシリン-エオジン(H&E)染色のために処理した。組織学的切片はNikon E800直立顕微鏡で画像化し、そこから、炎症性領域の厚さを判定した。炎症の程度は、盲検化された組織病理学の専門家によってその後評価された。

【0141】

(実施例15) 架橋ポリマーの物理的相互貫入

TAのバルクマトリックスへの高密度一級アミンポリマーの相互貫入は、FITC標識キトサンおよび共焦点顕微鏡検査を使用して画像化した。pHを6に調整したMES緩衝液にFITC-キトサンを2重量%まで溶解し、次に、20 μ Lの混合液をEDC/NHSの有る無しで直径6mmのヒドロゲルディスクの表面に分配した。過剰なFITC-キトサン溶液を吸引する前に、インキュベーション時間を2から30分まで変動させた。20 μ L量の蛍光性マイクロスフェアを同じヒドロゲル表面に加え、その後DI水で30秒間十分水洗した。蛍光性マイクロスフェアは、FITC-キトサン上の一級アミンと結合することができるカルボン酸基をそれらの表面に有し、カルボジイミド化学を通してアミド結合を形成する。ゲル表面を画像化するために、FITCのためには490nmに、蛍光性マイクロスフェアのためには588nmに励起波長を設定して、共焦蛍光顕微鏡検査法(Zeiss LSM710)を使用した。

【0142】

図21(A)は、消散性マトリックスを含むアルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲルにFITC-キトサンを加え、ゲルに拡散させたことを示す。共焦蛍光顕微鏡検査法によって画像化された写真を、図21(B)および(C)に示す。図21(D)において実証されるように、高密度一級アミンポリマーは、インキュベーション時間にわたってヒドロゲルと相互に貫入して接着性表面を形成するので、高い可動性を示した。

【0143】

(実施例16) *in vitro* 細胞適合性試験

10%のFBSを含有する1mLのDMEMに、強靱な接着剤およびシアノアクリレートを37℃で24時間別々にインキュベートし、インキュベーション下の強靱な接着剤およびシアノアクリレートの質量は約22mgで固定した。強靱な接着剤は、20mgのアルギネート-ポリアクリルアミドヒドロゲルをキトサンおよびEDC/硫酸化NHSの2

μLの溶液によって表面修飾することによって調製し、ここで、キトサン濃度は2重量%であって、高密度一級アミノポリマー（すなわち、キトサン）の溶液中のEDCおよび硫酸化NHSの最終濃度は、共に12mg/mLであった。強靱な接着剤の化合物の細胞適合性をさらに評価するために、培地中で20mgのアルギネートポリアクリルアミドヒドロゲルとキトサンおよびEDC/硫酸化NHSの2μLの溶液をインキュベートすることによって馴化培地も調製した。ヒト皮膚線維芽細胞を96ウェルプレートに平板培養した（ウェル当たり細胞数 1.2×10^4 、実験条件ごとに $n=5$ ）。細胞を各馴化培地（ウェル当たり200μL）で処理し、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。細胞生存率は、哺乳動物細胞のためのLIVE/DEAD生存率/細胞毒性キット（ThermoFisher Scientific）で判定した；生細胞を495nm/515nmの励起/放射で、および死細胞を495nm/635nmで別々に画像化するために、Olympus IX81倒立顕微鏡を使用した。

【0144】

図22において実証されるように、本in vitro細胞研究では、ヒト皮膚線維芽細胞は、TA-馴化培地における24時間の培養の後にも完全な生存率を維持することができた。

【0145】

（実施例17）出血を止める止血ドレッシング

生体適合性接着剤は、無制御の出血状態の下で重い出血を止めるための止血ドレッシングとして使用することができる。止血ドレッシングとしての強靱な接着剤の使用を試験するために、齧歯動物の肝臓裂傷モデルを選択した。この実施例は、雌Sprague Dawleyラット（およそ175g）で実行した。動物は、イソフルランにより、房内で吸入（4%）、次に換気（2%）によって麻酔をかけた。腹側の正中開腹切開口を形成し、左の肝臓小葉を曝露させ、ここに6mmの生検パンチで部分厚創傷を形成し、続いてはさみで裂傷を形成した。負傷直後に、強靱な接着剤またはSURGIFLO止血マトリックス（陽性対照として）を病変部位に付与した（ $n=4$ ）。無処置の陰性対照も、比較のために含まれた（ $n=4$ ）。処置の間、2、5および10分時に濾紙で血液を注意深く収集し、各時点の血液の総量を計量した（図25）。創傷形成の15分後に腹部を閉じた。動物は、ケージに戻る前に麻酔から回復させた。2週時に、CO₂吸入によって動物を安楽死させ、インプラントならびに周囲の組織を外植し、組織学的分析のためにさらに処理した。切片作製、パラフィン包埋およびヘマトキシリン-エオジン（H&E）染色を、Harvard Medical SchoolのRodent Pathology Coreで実行し、ここでは、委員会認定の病理学者が組織学的切片を調べた。

【0146】

（実施例18）創傷管理のための包帯

全ての作業はC57BL/6Jマウスで実行し（雌、6～8週齢；Jackson Laboratories）、Institute for Animal Care and Use Committee、Harvard University、および米国国立衛生研究所および施設のガイドラインに従って実行した。マウスに麻酔をかけ、背中領域を剃った。直径6mmの2片の強靱な接着剤を、カスタム設計のアプリーターによって2分の間付与した。麻酔は、イソフルラン（1～2%）で維持した。創傷ドレッシングの使用のために、背中に4mmの生検パンチで皮膚創傷を形成した。弱い圧迫により直径10mmの強靱な接着剤を、2分の間付与した。水分蒸散を遅くするために、縫合または創傷ステープルを使用してTegadermフィルム（3M）を背中にさらに付着させ、固定した。麻酔から回復の後、マウスをそれらのケージに戻した。マウスの運動の下での接着を評価するために、ビデオを撮った。強靱な接着剤の付着を、1日目および7日目にモニタリングした（図26）。PNIPAMおよびアルギネートのIPNに基づく感熱型生体適合性接着剤も、創傷管理のために試験した。感熱型接着剤は皮膚温度で縮むことができ、創傷端をさらに収縮させて創傷を能動的に閉じることができる。この能動的包帯の効力は、齧歯動物の皮膚においてin vitroで実証された（図27）。麻酔から

10

20

30

40

50

回復の後、マウスをそれらのケージに戻した。マウスの運動の下での接着を評価するために、ビデオを記録した。

【0147】

(実施例19) 軟骨修復のための注射可能な接着剤

この研究は、UV硬化可能なPEG-ジアクリレートポリマーおよびアルギネートからなる生体適合性接着剤の注射可能な製剤に基づいた。ブタの関節軟骨から外植した軟骨板に円柱状欠損をパンチすることによって、組織モデルを作製した。軟骨欠損の内部表面を一級アミンポリマーおよびカップリング剤の混合物（すなわち、キトサンおよびEDCブラスルホ-NHS）で処置し、その後注射可能な接着剤の注射が続いた。接着剤を硬化させるために5分間の紫外線曝露を付与し、修復された軟骨を形成した。効力は圧縮試験によって評価し、それは、注射可能な接着剤で修復された軟骨板が20%の歪みでおよそ80%のストレスを回復したことを示した（図28）。

10

【0148】

(実施例20) 肺シーラント

予め形成されたパッチの形の生体適合性接着剤は、肺欠損を修復するために使用することができる。肺表面への接着はブタの肺で実証され、ここで、接着剤の薄膜は強力に接着し、高い変形性を示した（図29）。接着剤は肺の上の欠損を密封すること、および生理機能周期の下で肺の大きな変形に順応することができた。

【0149】

均等物

20

当業者は、単にルーチンの実験操作を使用して、本明細書に記載された発明の特定の実施形態の多くの均等物を認識し、または確認することができる。そのような均等物は、以下の請求項に包含されるものである。本出願全体で引用される全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

50

【図面】

【図 1】

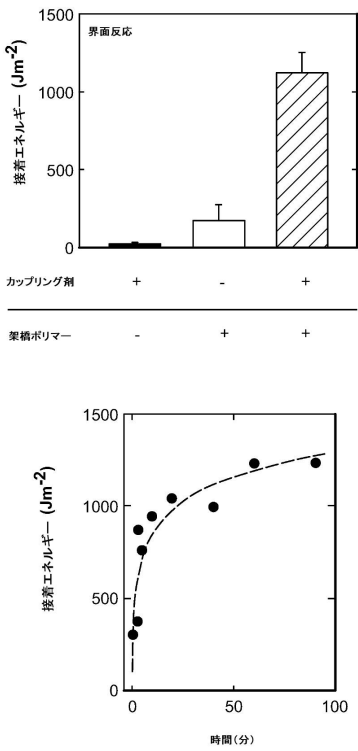


Figure 1

【図 2】

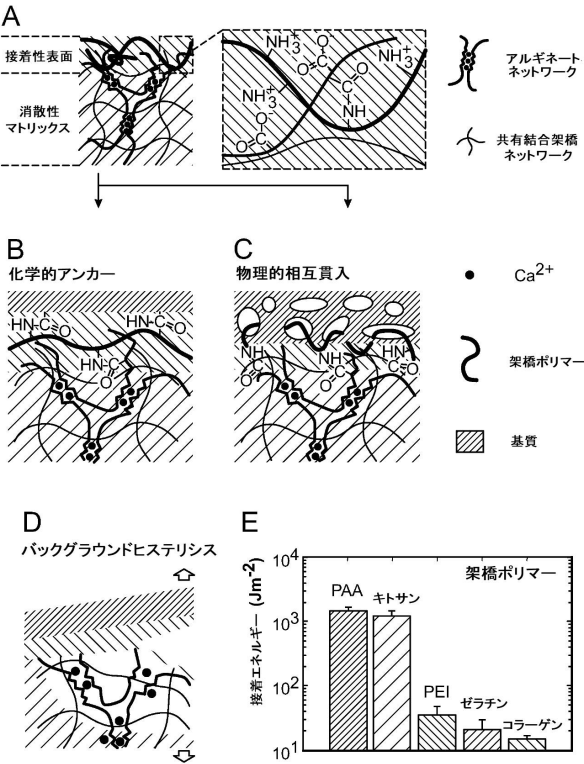


Figure 2

【図 3】

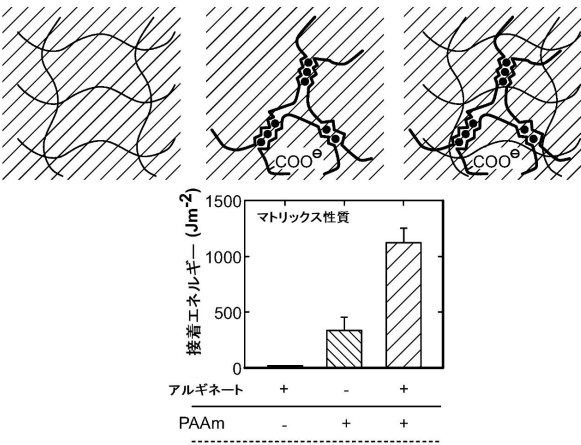


Figure 3

【図 4】

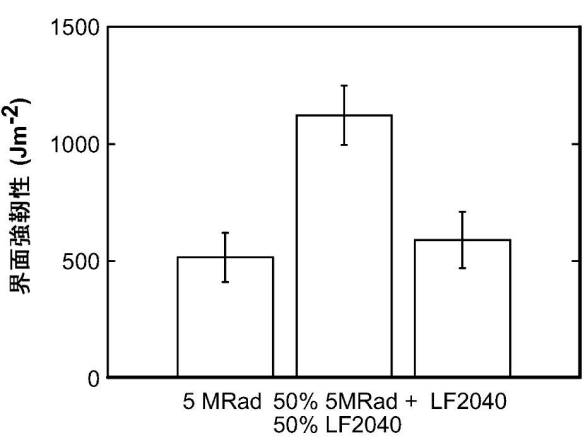


Figure 4

10

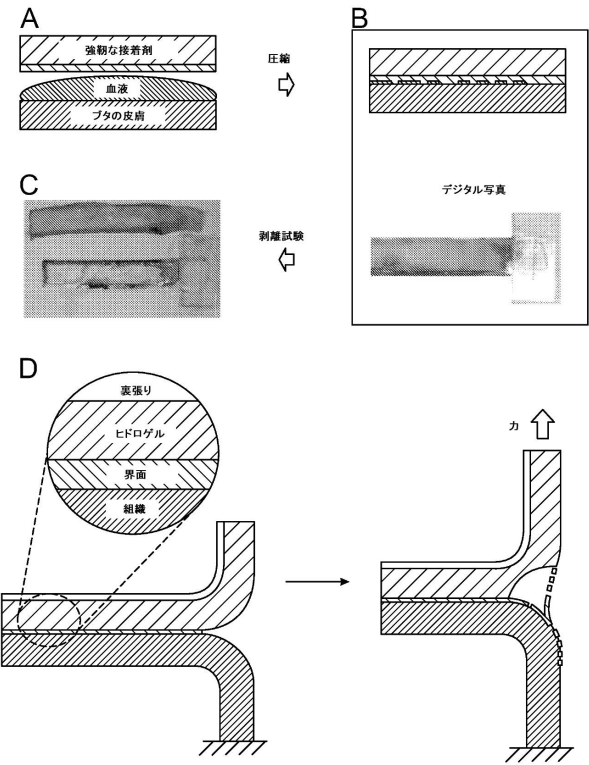
20

30

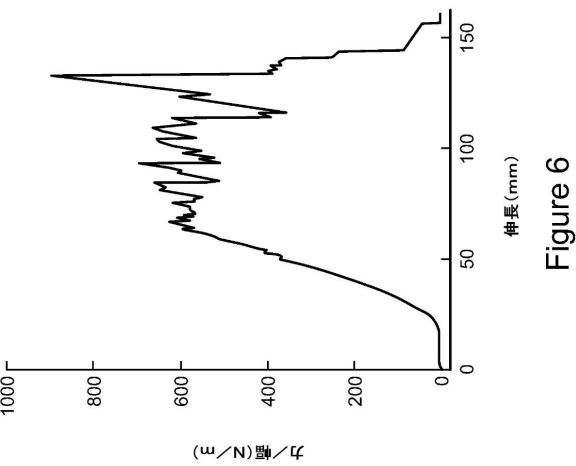
40

50

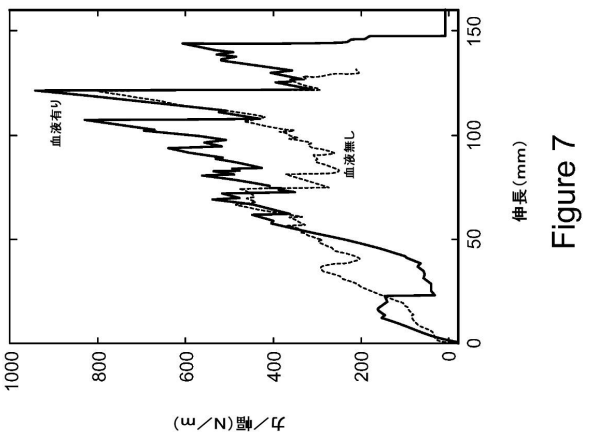
【図 5】



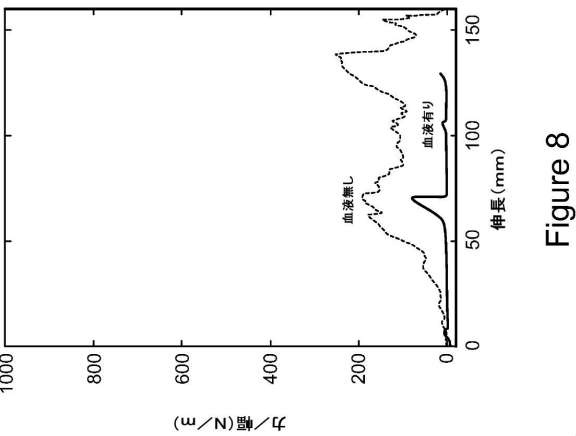
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

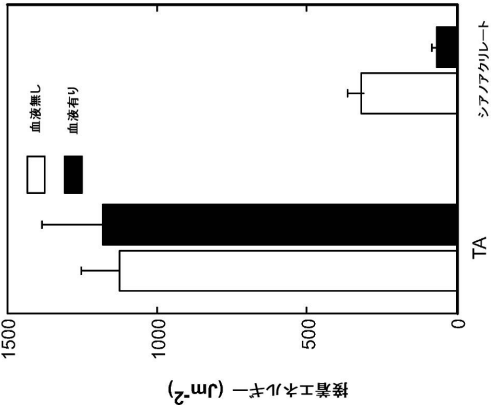
20

30

40

50

【図 9】



【図 10】

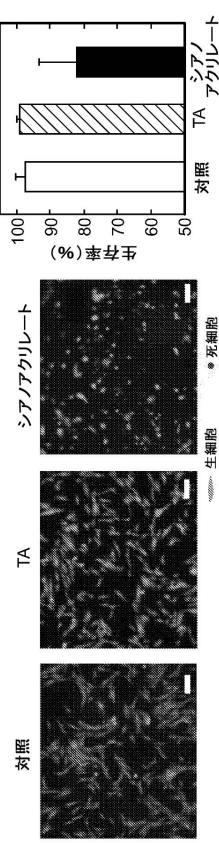


Figure 9

Figure 10

【図 11】

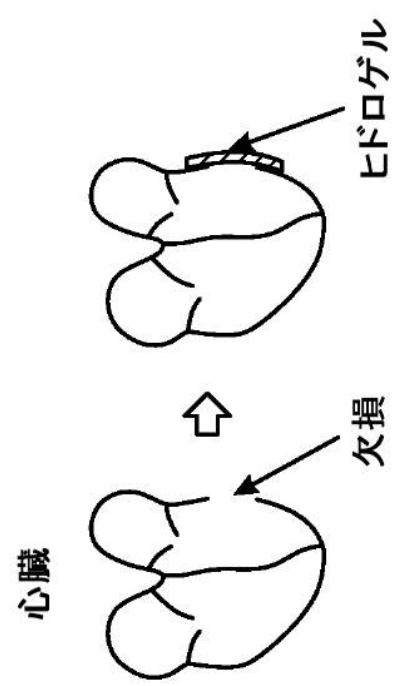


Figure 11

【図 12】

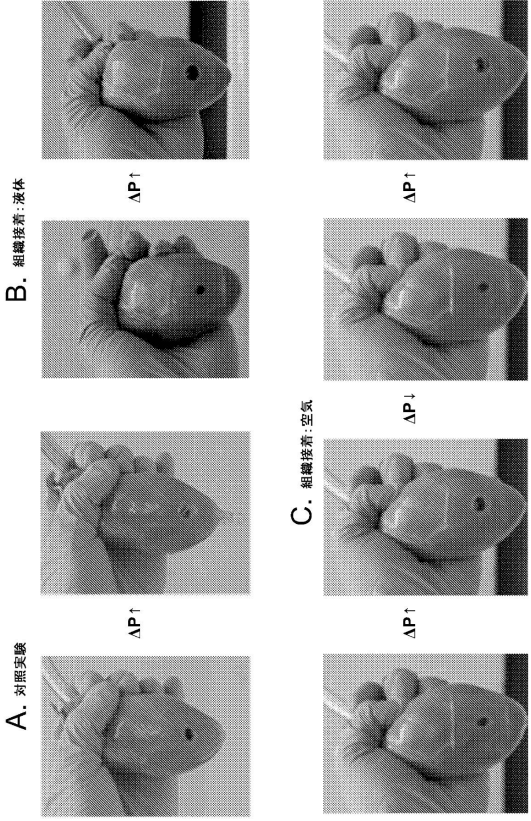


Figure 12

【図 1 3】

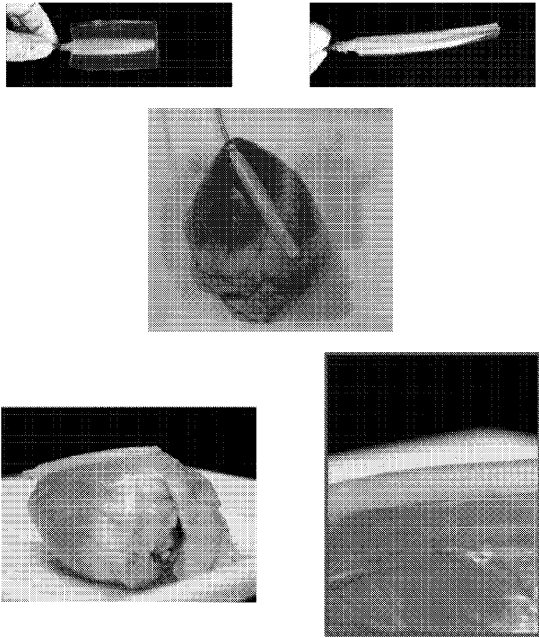


Figure 13

【図 1 4】

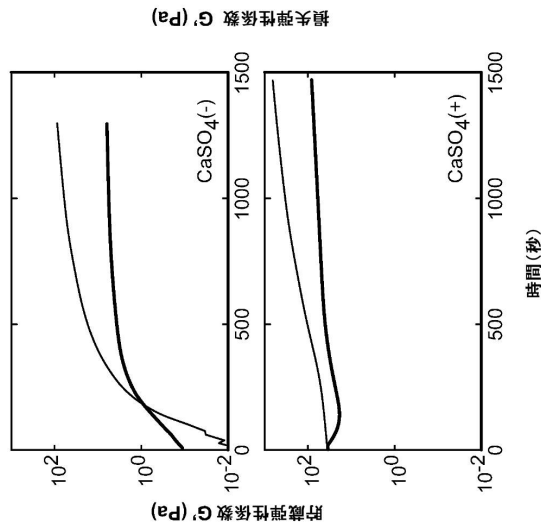


Figure 14

10

20

【図 1 5】

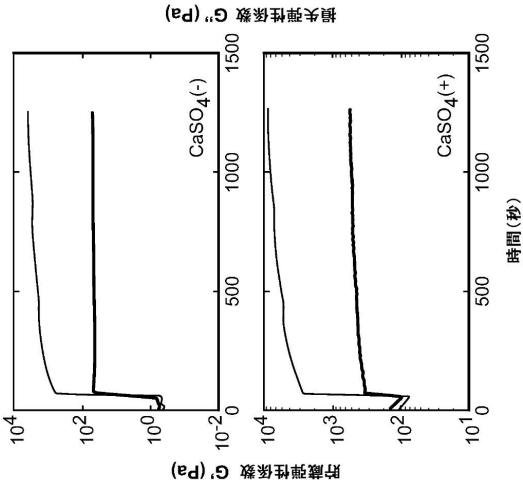


Figure 15

【図 1 6】

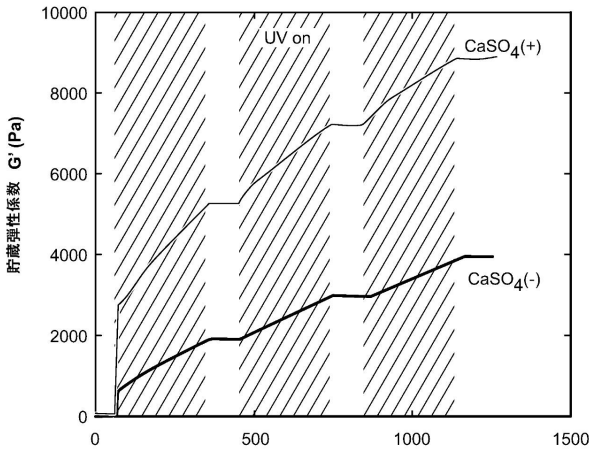


Figure 16

30

40

50

【図 2 1】

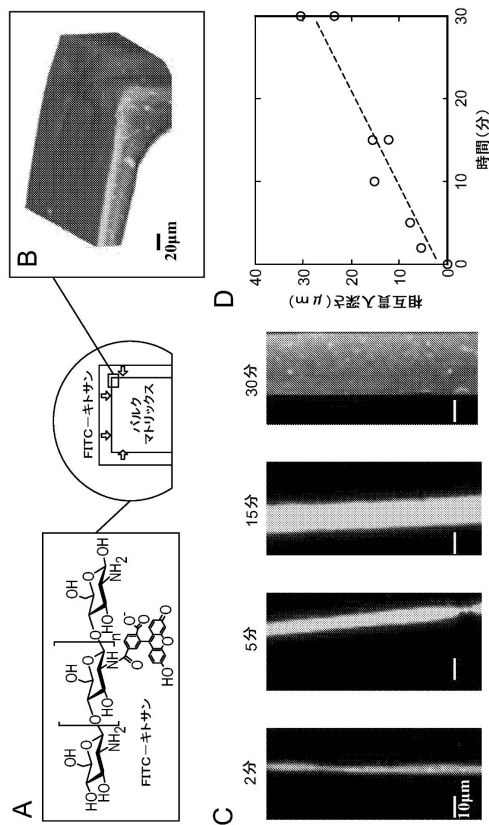


Figure 21

【図 2 2】

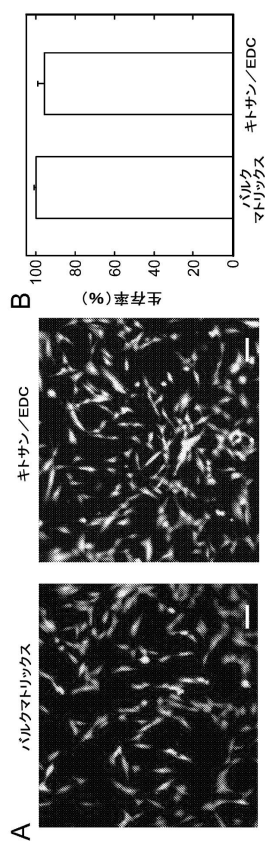


Figure 22

【図 2 3】

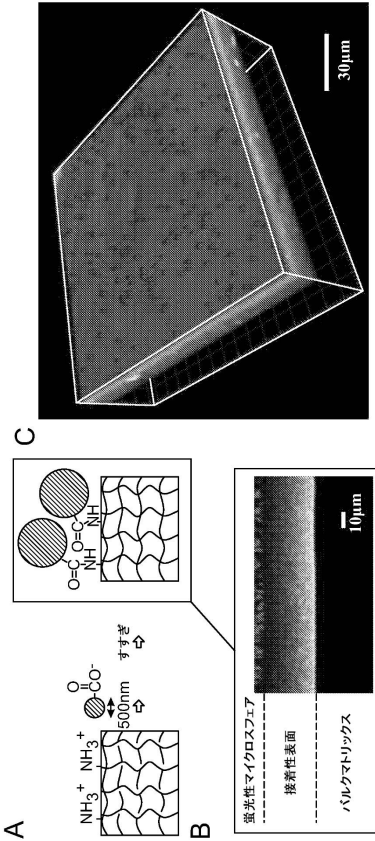


Figure 23

【図 2 4】

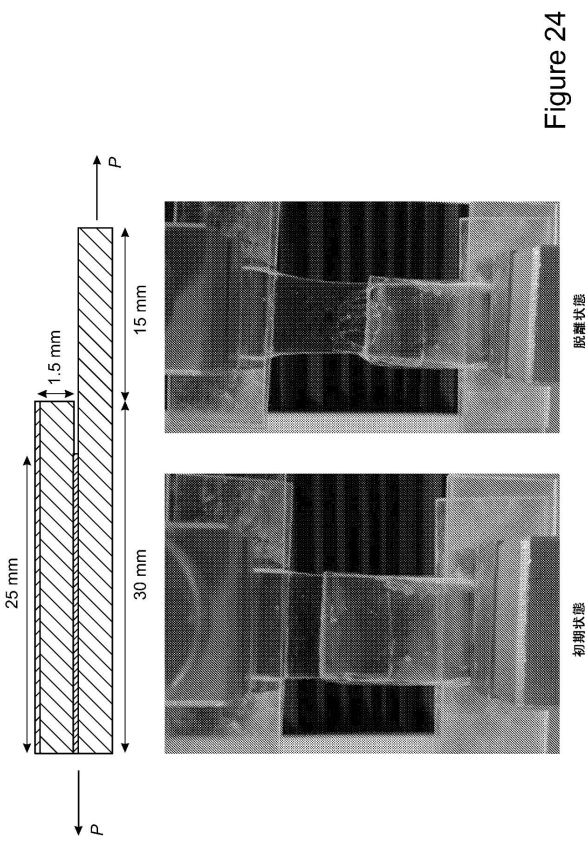


Figure 24

【図 25】

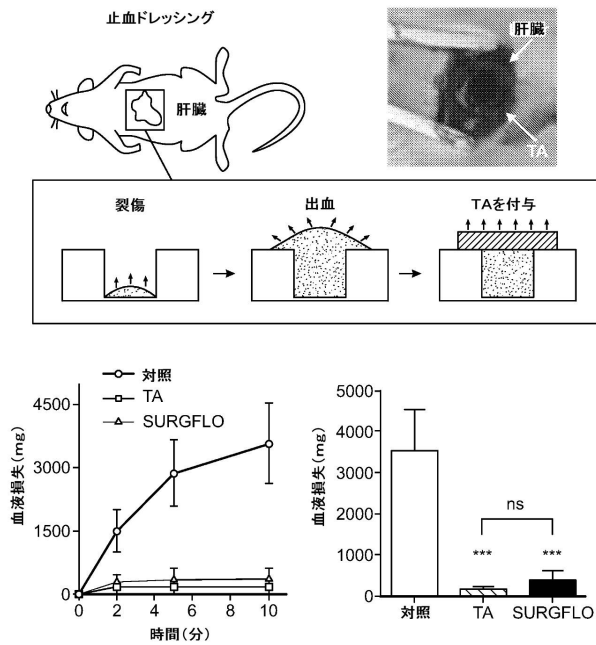


Figure 25

【図 26】

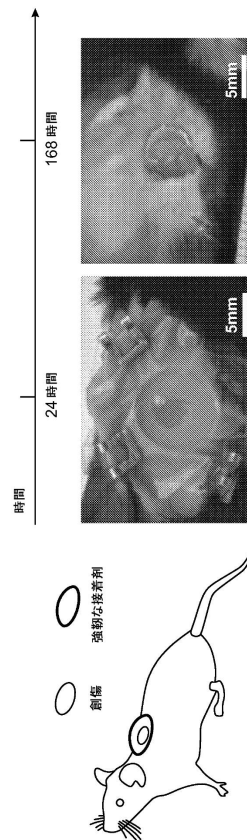


Figure 26

【図 27】

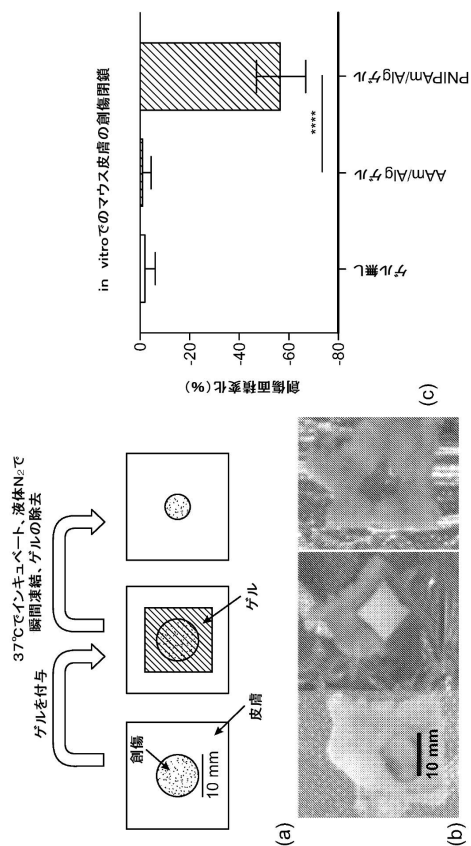


Figure 27

【図 28】

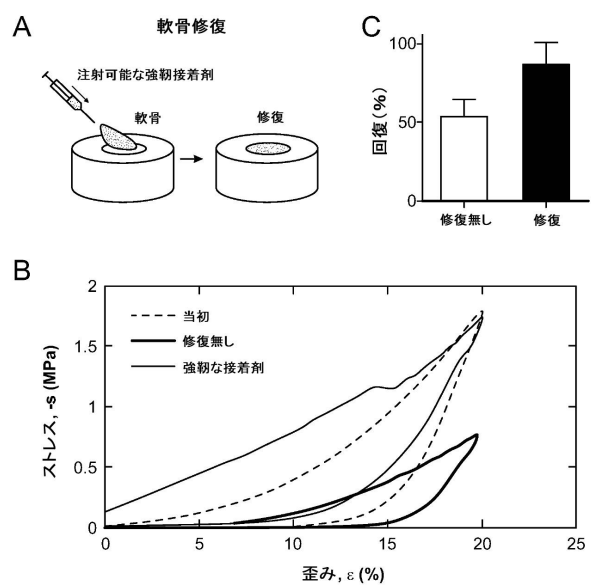


Figure 28

10

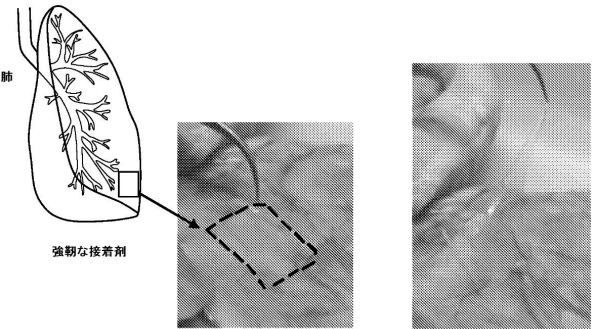
20

30

40

50

【図 29】



10



20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
A 6 1 L 24/00 2 1 0

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

イギリス国 シーエム 7 9 アールエイチ エセックス, ブレインツリー, エリザベス ロックハート ウェイ 1 9

(72)発明者 ムーニー, デイビッド ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 6, サドベリー, パワーズ ロード 2 7

審査官 松本 淳

(56)参考文献

特開 2 0 0 9 - 1 2 0 8 5 5 (J P , A)

特表 2 0 0 9 - 5 0 7 1 1 0 (J P , A)

特開 2 0 0 5 - 1 1 0 5 3 7 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 4 3 0 7 8 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 3 / 0 2 5 7 6 3 (W O , A 1)

Highly stretchable and tough hydrogels, Nature, 2012年, 489, p.133-136

Mechanical properties of interpenetrating polymer network hydrogels based ionically and covalently crosslinked networks, Journal of Applied Polymer Science, 2013年, 130, p.2504-2513

Recovery from applied strain in interpenetrating polymer network hydrogels with ionic and covalent cross-links, Soft Matter, 2012年, 8, p.9985-9988

Hybrid hydrogels with extremely high stiffness and toughness, ACS Macro Lett. , 2014年, 3, p.520-523

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 L 1 5 / 0 0 - 3 3 / 1 8