

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6952348号
(P6952348)

(45) 発行日 令和3年10月20日 (2021. 10. 20)

(24) 登録日 令和3年9月30日 (2021. 9. 30)

(51) Int. Cl.	F I	
C O 8 F 220/00 (2006. 01)	C O 8 F 220/00	
A 6 1 L 31/04 (2006. 01)	A 6 1 L 31/04	
A 6 1 L 31/14 (2006. 01)	A 6 1 L 31/14	
A 6 1 L 31/16 (2006. 01)	A 6 1 L 31/16	
A 6 1 L 31/06 (2006. 01)	A 6 1 L 31/04	1 1 0
請求項の数 12 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-503480 (P2018-503480)	(73) 特許権者	519232781
(86) (22) 出願日	平成28年7月22日 (2016. 7. 22)		トリンプ アイビー ピーティーワイ リ
(65) 公表番号	特表2018-523728 (P2018-523728A)		ミテッド
(43) 公表日	平成30年8月23日 (2018. 8. 23)		オーストラリア国 2000 ニューサウ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2016/050653		スウェールズ シドニー, 19-29
(87) 国際公開番号	W02017/015703		マーティン プレイス, レベル 53,
(87) 国際公開日	平成29年2月2日 (2017. 2. 2)		スイート 5307
審査請求日	令和1年5月16日 (2019. 5. 16)	(74) 代理人	110002871
(31) 優先権主張番号	2015902943		特許業務法人坂本国際特許商標事務所
(32) 優先日	平成27年7月24日 (2015. 7. 24)	(72) 発明者	ファティ、アリ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア (AU)		オーストラリア、ニューサウスウェールズ
			2021、パディントン、グレンモア
			ロード 17/400
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 殺菌性ポリマー及びポリマーと細胞との複合体ならびにそれらの合成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリ (N - イソプロピルアクリルアミド - c o - N - アクリロキシスクシンイミド - c o - 2 - ヒドロキシエチルメタクリレート / ポリラクチド - c o - オリゴ (エチレングリコール) モノメチルエーテルメタクリレート - c o - サリチル酸) ポリマーをベースとするポリマーであって、

5 - H M A、4 - H M A、又はそれらの組み合わせから選択されるサリチル酸のメタクリル酸エステル誘導体を含む、少なくとも 1 つの殺菌性 / 鎮痛性 / 抗炎症性モノマー単位 ;

おおよその相対モル比で、約 5 モル % 未満の親水性エチレングリコール (O E G M A) 成分の形態の水溶性モノマー単位 ;

ポリラクチド - c o - 2 - ヒドロキシ - エチルメチルアクリレート (P L A / H E M A) の形態の機械的強度を付与するモノマー単位 ;

N - アクリロキシスクシンイミド (N A S) 成分の形態のタンパク質 / 多糖類反応性モノマー単位 ; 及び

N - イソプロピルアクリルアミド (N I P A A m) 成分の形態の熱硬化性モノマー単位 ;

を含む、5 元系のポリマー。

【請求項 2】

おおよその相対モル比で、N I P A A m (6 8 モル %) ; N A S (1 4 モル %) ; P L

10

20

A / H E M A (8 モル %) ; O E G M A (約 5 モル % 未 満) ; 並 び に 5 - H M A 及 び / 又 は 4 - H M A (5 モル %) を 含 む 、 請 求 項 1 に 記 載 の ポ リ マ ー 。

【請求項 3】

前記ポリマーが、天然及び合成のペプチド又は多糖類と結合することができる、請求項 1 または 2 に記載のポリマー。

【請求項 4】

生物学的組織の修復を補助するための 1 以上の細胞を含む、ポリマーと細胞との複合体であって、

前記ポリマーは請求項 3 に記載のポリマーであって、

前記 1 以上の細胞が前記ポリマー全体にわたって比較的均一に分布し、

ポリマー中の 1 以上の細胞の数が約 10^2 細胞 / mL ~ 約 10^8 細胞 / mL、好ましくは約 10^3 細胞 / mL ~ 約 10^5 細胞 / mL である、ポリマーと細胞との複合体。

【請求項 5】

一定のモル量の殺菌性 / 鎮痛性 / 抗炎症性モノマー単位と ; それぞれ一定のモル量の水溶性モノマー単位 ; 機械的強度を付与するモノマー単位 ; タンパク質反応性モノマー単位 ; 及び熱硬化性モノマー単位のうちの少なくとも 3 種との、一定のモル量の開始剤のフリーラジカル重合を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリマーもしくはポリマーと細胞との複合体の合成方法。

【請求項 6】

約 3 2 で水中でポリマーを沈殿させて未反応モノマーを除去し、濾過する抽出工程をさらに含み、沈殿したポリマーをエタノールに溶解し、約 3 2 で水中に再沈殿させる精製工程をさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

使用前にポリマーを約 4 0 の温度で約 4 8 時間、減圧下で乾燥させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリマーもしくはポリマーと細胞との複合体からなる医薬。

【請求項 9】

約 0 日 ~ 約 2 7 0 日の期間にわたり、サリチル酸のメタクリル酸エステル誘導体からの殺菌性 / 鎮痛性 / 抗炎症性効果のバースト放出を防止するためのビヒクルを提供することによって、手術部位での時間ベースでの感染の発生率を減少させるために使用するための、請求項 8 に記載の医薬。

【請求項 10】

外科用シーラント、創傷治癒被覆剤、充填剤、又は生体内組織再生又は試験管内細胞増殖足場を必要とする医学的状態の治療における使用のための、請求項 8 に記載の医薬。

【請求項 11】

癌を含む医学的状態の治療における使用のための、請求項 8 に記載の医薬。

【請求項 12】

肺癌の治療における使用のための、請求項 8 に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015年7月24日に出願されたオーストラリア仮特許出願第2015902943号の優先権を主張し、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、生物医学用途に有用なポリマーに関する。特に、本発明は、温度活性化、水溶性、機械的強度、生体適合性及び鎮痛 / 抗炎症特性のような所望の臨床特性を生起するために、それらの相対的な割合を調整可能な 5 つまでのモノマー単位を含む新規なポリマーに関する。このタイプの生体適合性ポリマーへ持続的な鎮痛 / 抗炎症特性を組み込むこ

10

20

30

40

50

とは、当該技術分野の目標であり、注目に値するこれまでの欠点である。

【0003】

以下、本発明をその好ましい実施形態を参照して説明するが、本発明の精神及び範囲は多くの他の形態で具体化され得ることが当業者には理解される。

【背景技術】

【0004】

本明細書に含まれている文書、行為、材料、装置、物品等について議論は、これらの事項の一部又は全部が先行技術の基礎の一部を構成するか、本出願の各請求項の優先権の日前に存在していた本開示に関連する分野における共通の一般的知識であると認めるものととらえられるべきではない。

【0005】

ヒドロゲルは、組織工学、創傷治癒及び薬物送達の分野で実用化されていることが知られている。ヒドロゲルの生体内送達では、しかしながら、異物免疫応答及び慢性炎症が重篤な臨床合併症を引き起こすことがある。ヒドロゲル内に殺菌剤/抗炎症剤を物理的に添加することは、手術後の非常に早い段階での薬物のバースト放出による一時的な効果を生起するだけであり、一旦殺菌剤の最初のバーストが枯渇すると、手術部位で感染が起こりやすくなる。

【0006】

したがって、本発明がより完全に評価され得る適切な出発点は、本出願人自身の先行する特許出願である PCT/AU2012/001566 (WO2013/091001) であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる；対応する開示は、以下の文献刊行物、Biomaterials, 35(2014), pp. 5425-5435 (以下、全体を通じて「P1」) に記載されている。

【0007】

P1は、可変な/調整可能なゲル化特性、好都合な機械的特性及び耐荷重用途のための構造安定性を有する、細胞適合性及び注射可能な天然由来のタンパク質ヒドロゲルを開発することを目的としている。熱反応性コポリマー、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド-co-ポリラクチド-2-ヒドロキシエチルメタクリレート-co-オリゴ(エチレングリコール)モノメチルエーテルメタクリレート(「PNPHO」)を、N-アクリロキシスクシンイミドモノマー成分を組み込むことによってスクシンイミドエステル基で官能化した。これらのエステル基は、水性媒体中で第1級アミン基を有する異なるタンパク質(例えば、-エラスチン及びコラーゲン)にPNPHOを共有結合させるために利用された。PNPHOとの共有結合形成によるエラスチンの取り込みは、PNPHO含有ヒドロゲルの構造内での構造安定性、有利な機械的特性及び生細胞増殖を促進した。

【0008】

P1で得られた結果は、エラスチン-co-PNPHO溶液が細かいゲージ針を介して注入され、架橋試薬が存在しない状態で、37℃でその場でヒドロゲルに変換されたことを示している。PNPHO含量及び組成を変えることによって、これらのヒドロゲルのゲル化時間を、外科的要件との適合性を確実にするために2分から15分の範囲内で細かく調整することができる。さらに、これらのヒドロゲルは、以前に開発されたエラスチンベースのヒドロゲルよりも実質的に高い40 kPaから145 kPaの範囲の圧縮率を示した。これらのヒドロゲルは生理学的環境において非常に安定であり、シミュレートされた環境で30日間のインキュベーション後に10重量%の質量損失の証拠を示した。

【0009】

さらに、このクラスのヒドロゲルは、PNPHOコポリマーからのポリラクチドの切断の結果として、コポリマーの下限臨界溶液温度が37℃以上に徐々に上昇するため生体内で生体吸収性であった。さらに、P1は、これらヒドロゲル中に封入された細胞の80%以上が生存可能であり、少なくとも5日間にわたって封入された細胞の数が増加したことを実証している。これらの特有な特性は、広範囲の組織工学用途のための好ましい候補として、エラスチン-co-PNPHOヒドロゲルを特徴づけている。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

特許性の観点から、P 1 と本発明との本質的な相違点は、後者に殺菌性モノマー単位 2 - ヒドロキシ - 5 - N - メタクリルアミド安息香酸 (5 - H M A) 及び / 又は 2 - ヒドロキシ - 4 - N - メタクリルアミド安息香酸 (4 - H M A) が存在することである。P 1 は、他の 4 種のモノマーを含むポリマー (すなわち、「P N P H O」) を開示している。しかし、重要なことは、P 1 は、5 - H M A、又は 4 - H M A (又はそれらの組み合わせ ; 又は、実際に殺菌特性を付与する任意のモノマー) で P N P H O ポリマーを増強しようとするべきであるという教示が全くないことである。このように、P 1 は、当業者が、殺菌成分で増強された P H P H O ポリマーを求めることに対する明らかな動機を与えるものではなく、最初の創傷治癒に対応する期間にわたって徐放性である殺菌成分に関するものである。

10

【 0 0 1 1 】

さらに、ヒドロゲルの体内送達により、異物免疫応答及び慢性炎症が重大な臨床的合併症につながる可能性があるという従来の如何なる知見も、当業者に本発明から逸脱するように仕向けるものと主張することができる。この目的のために、上記のように、ヒドロゲルへの殺菌薬 / 抗炎症薬の物理的添加は、手術後の非常に速い段階で、薬物のバースト放出による一時的な効果を生起するのみであることが知られている点で、殺菌成分を含むことは、いくらか反対の動機づけが与えられるものである。このことから、当業者は、手術の治癒期間にわたって殺菌特性を付与する成分が、所望されているものの、実質的に達成できないと推測する可能性が高いであろう。そのように、受け入れられている知識においては、単に問題が特定されるのみであり、当業者がどのようにそれに対処しなければならないかについての示唆を提供しないように見える。このように、ヒドロゲル担体内にふさわしい殺菌成分が存在しないことは、当該技術分野の既知の欠点として特定されている。

20

【 0 0 1 2 】

従来、サリチル酸は、3 , 5 - ジ (アクリロキシメチル) サリチル酸及び 3 - メチル - S - アクリロキシメチルサリチル酸等の異なるモノマーと化学的に結合していた。しかしながら、天然及び合成ペプチドと結合する能力を有する注射可能なサリチル酸ベースの熱硬化性ヒドロゲルのクラスは決して提供されていなかった。このような特性は、生分解特性及び組織接着挙動と共に、そのような生体材料を未解決の臨床課題に対処するための適切な候補にする。

30

【 0 0 1 3 】

P 1 を越えて、W a r d と G e o r g i o u による「生物医学的応用のための温度応答性ポリマー」(P o l y m e r s , 2 0 1 1 , 3 : 1 2 1 5 - 4 2) (P 2) と題するレビュー論文は、2 0 1 1 年頃までの背景技術の教示に関連性があると考えられる。この文書は、異なる温度応答性ヒドロゲルの特性、化学構造及び用途をまとめたものである。P 2 で指摘されていることだが、いくつかのより顕著なヒドロゲルの主要な成分及び特性を表 1 に要約する。

【 0 0 1 4 】

【表 1】

表 1ーレビュー文献 P 2 によって特徴付けられる先行技術

P 2 により特徴づけられる先行技術		本発明との比較
材料	特性	
ブチルメタクリレートポリ（Nーイソプロピルアクリルアミド	2つの主要成分（a）ブチルメタクリレート及び（b）NIPAAm；約32℃での相転移挙動；及び薬物送達に適している	PASの5つの単量体単位は、P2に提供された実施例のいずれによっても開示も教示もされていない。さらに、P2は、ヒドロゲル担体内に組み込まれたときにポリマーが調整可能であるというヒント又は示唆を提供しない。
ポリ（Nーイソプロピルアクリルアミド及びヒドロキシエチルメタクリレート	2つの成分（a）NIPAAm及び（b）HEMA；約32℃での相転移挙動；機械的特性への制御なし；及びポリマーの分解挙動に関する検討なし	
エラスチン様ポリペプチド	1つの主要セグメント（エラスチンペプチド）；機械的強度の欠如；約30℃でのゲル化；及びナノ粒子の形成	
ポリ（Nーイソプロピルアクリルアミド）ーポリラクチドーデキストラン	2つの成分（a）NIPAAm及び（b）PLAーデキストラン；生分解性及び調整可能な機械的性質	このコポリマーは、合成RGDのような遊離アミン基を有する全てのペプチドとの共有アミド結合を形成することができる。

10

20

【0015】

さらに、出願時に出願人に知られている特許文献のいずれも、そのようなポリマーの商業的形態又は医学的用途を開示していないことはもちろん、殺菌剤／鎮痛剤含有ポリマーを開示又は教示していないようである。代表例は、以下を含む：US 8,741,317；US 2005/0233003；US 3,290,270；KR 2014093349；CN 201310103994；US 2012/0288564；US 2009/0226519；US 2013/0261212；WO 2014/126537；UA 92027；US 2008/0044476；US 2010/0048473；US 2013/0209532；US 2012/0258068；US 2008/0293827；US 2011/0223230；WO 2001/036000；US 2006/0115457；US 2012/0220691；US 2014/302144；WO 2014/041231；及びWO 2014/116187。

30

【0016】

最後に、出願人に知られている科学文献のいずれも、殺菌／鎮痛剤含有ポリマーを教示又は示唆していない。代表的サンプルには以下を含む：Elvira, et al., Polymers, 1997, 38: 4743-50；Elvira, et al., J. Mater. Sci. Mater. Med., 2001, 12: 535-42；Zheng, et al., Biomaterials, 2004, 25: 1339-48；Park, et al., Macromol. Symp., 2007, 249-250: 145-50；Bessa, et al., J. Control Release, 2010, 142: 312-8；Chaipinyo, et al., J. Orthop. Res., 2004, 22: 446-55；Nicodemus & Bryant, J. Biomech., 2008, 41: 1528-36；Eastoe, Biochem J., 1955, 61: 589-600；Ouimet, et al., Macromol. Biosci., 2015, 15: 342-50；and Guan, et al., Sci. World J., 2014, 2014: 1-9.

40

50

【 0 0 1 7 】

先行技術の欠点の少なくとも1つを克服又は改善すること、又は有用な代替物を提供することが、本発明の好ましい目的である。

【 0 0 1 8 】

また、本発明の特に好ましい形態の好ましい目的は、実現可能／持続可能な殺菌成分を含む生物医学的用途のためのポリマーを提供することである。上記のように、このタイプの既知のポリマーは、殺菌成分のバースト放出によって制限される。したがって、本発明の好ましい形態は、温度活性化、水溶性、機械的強度、生体適合性及び鎮痛性／抗炎症特性の所望の臨床特性を生起させるために、その相対的割合を「調整可能」なモノマー単位を含むポリマーを提供することを目的とする。各モノマーの相対的な割合は、その特定の用途に応じてポリマーの「調整可能性」を提供する。例えば、より顕著な殺菌効果が望まれる場合には、より多くの割合の殺菌成分がポリマー内に組み込まれる。以下に記載するように、本発明のポリマーの好ましい実施態様は、約5モル%の殺菌成分(5-HMA、4-HMA、又はそれらの組み合わせ)を含んでいてもよく、この量は求められる正確な臨床結果に応じて変えることができる。

10

【 0 0 1 9 】

本発明を特定の実施例を参照して説明するが、本発明は多くの他の形態で具体化されてもよいことを当業者は理解する。

【 発明の開示 】

【 課題を解決するための手段 】

20

【 0 0 2 0 】

第1の態様では、少なくとも3つのさらなるモノマー単位と組み合わせられる少なくとも1つの殺菌性／鎮痛性／抗炎症性モノマー単位を含むポリマーがここに提供され、前記3つのさらなるモノマー単位は、：温度活性化、水溶性、機械的強度、タンパク質／多糖結合能力、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される特性を生起する。

【 0 0 2 1 】

第2の態様では、第1の態様にしたがって定義されるポリマーの合成方法であって、所定のモル量の開始剤の、所定モル量の殺菌性／鎮痛性／抗炎症性モノマー単位；それぞれ所定のモル量の水溶性モノマー単位；機械的強度付与モノマー単位；タンパク質反応性モノマー単位；及び熱硬化性モノマー単位のうちの少なくとも3つとのフリーラジカル重合を含む方法が提供される。

30

【 0 0 2 2 】

第3の態様では、医療用途において、第1の態様にしたがって定義されたポリマーの使用がここに提供される。

【 0 0 2 3 】

第4の態様では、癌を含む医学的状態の治療における、第1の態様に記載のポリマーの使用がここに提供される。

【 0 0 2 4 】

第5の態様では、外科的シーリング、創傷の被覆形成、空洞の充填、又は生体内での組織発生足場の提供の方法がここに提供され、この方法は、そのような治療を必要とする対象に、第1の態様にしたがって定義された有効量のポリマーを投与することを含む。

40

【 0 0 2 5 】

第6の態様では、癌を含む医学的状態の治療方法であって、そのような処置を必要とする対象に有効量の第1の態様にしたがって定義されたポリマーを投与することを含む方法が提供される。実施形態において、癌は肺癌を含む。

【 0 0 2 6 】

第7に、本明細書においては、第1の態様にしたがって定義されるポリマー；生物学的適合性ヒドロゲルとポリマーとを組み合わせるための指示書；及び場合により注射器を含む、医療キットが提供される。

【 0 0 2 7 】

50

< 定義 >

本明細書に提供される定義に関して、別途明示的に述べられるか、又は文脈から明らかでない限り、定義される用語及び語句は提供された意味を含む。特に断らない限り、又は文脈から明らかでない限り、以下の用語及び語句は、用語又は語句が関連技術分野の当業者によって把握される意味を排除するものではない。本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるので、定義は具体的な実施形態の記述を補助するために提供され、特許請求の範囲に記載された発明を限定するものではない。文脈によって特に要求されない限り、単数形の実語は複数形を含み、複数形の実語は単数形を含むものとする。

【 0 0 2 8 】

本明細書を通して、本発明の様々な態様及び構成要素は、範囲の形式で提示されうる。範囲の形式は便宜上含まれるものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈されるべきではない。したがって、範囲の説明は、具体的に示されていない限り、その範囲内のすべての可能な下位範囲及び個々の数値を具体的に開示しているとみなされるべきである。例えば、1から5のような範囲の記述は、1から3、1から4、1から5、2から4、2から5、3から5等のような下位範囲、並びに引用された範囲内の個々の及び部分的な数値、例えば、1、2、3、4、5、5.5、6を具体的に開示しているものとみなされるべきである。これは、開示された範囲の幅にかかわらず適用される。特定の値が要求される場合、これらは明細書に示される。

【 0 0 2 9 】

文脈が明らかに他に必要としない限り、明細書及び特許請求の範囲を通して、「含む (comprise)」、「含む (comprising)」等の語は排他的又は消耗的な意味と反対の包括的な意味で構築される；例えば、「含むが、これに限定されない」という意味である。

【 0 0 3 0 】

本明細書を解釈する目的のために、単数形で使用される用語は複数形も含み、その逆もまた同様である。

【 0 0 3 1 】

本発明の好ましい実施形態を、添付の図面を参照して、単なる例示として、以下に説明する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 2 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明の P A S ポリマーの模式図である。熱硬化性モノマーは N I P A A m 骨格として表され、水溶性 O E G M A モノマーは「 E 」と示され、機械的強度を付与する P L A / H E M A モノマーは「 L 」と示され、タンパク質反応性 N A S モノマーは「 N 」と示され、殺菌性 5 - H M A モノマーは「 S 」と示される。他においても示されるように、5 - H M A 成分は、4 - H M A と容易に交換可能又は組み合わせ可能である。図中の各モノマーの数は、相対的な割合を表している。

【 図 2 】 図 2 は、P A S ポリマーの ¹ H N M R スペクトルであり、それぞれ割り当てられた共鳴が示されている。スペクトルにより、ポリマー中に 5 つのモノマー単位がすべて組み込まれていることを確認することができ、「 o 」で示される殺菌性 5 - H M A 成分は、予想通り、約 1 . 5 p p m に表れている。

【 図 3 】 図 3 は、ヒドロゲル担体 (P A S G e l) 内に組み込まれた場合の P A S の生物学的有効性を示す。生存細胞数が「 0 」日の約 $6 . 5 \times 10^3$ から「 7 」日の約 9×10^3 に増加した予備的な細胞適合性試験の結果が示されている。1 週間の間に約 5 0 % 増加した。

【 図 4 】 図 4 はまた、ヒドロゲル担体 (P A S G e l) 内に組み込まれた場合の P A S の生物学的有効性を示す。「 2 1 」日の P A S G e l 試料が約 2×10^8 C F U のみに支持されている；これは元の (「 1 」日の) 計数の約 3 分の 1 あるという、予備的な微生物コロニー計数試験の結果が示されている。

【 図 5 】 図 5 は、P A S G e l が、圧縮及び引張強度 (それぞれ 311 ± 47 k P a 及び

10

20

30

40

50

781 ± 116 kPa) 並びに組織接着試験 (970 kPa) によって有利な機械的特性を生じることを示す。

【図6】図6は、PASGelシステムが被験者の出血を防ぐことができるかどうかを決定するための実現可能性試験を実施するために使用される装置の概略図を示す。文字「h」は、システム内の圧力を調整するための変数を表す。

【発明を実施するための形態】

【0033】

ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド-co-N-アクリロキシスクシンイミド-co-2-ヒドロキシエチルメタクリレート/ポリラクチド-co-オリゴ(エチレングリコール)モノメチルエーテルメタクリレート-co-サリチル酸)ポリマーをベースとする同類のポリマーが本明細書に開示されており、以下「PAS」と表示される。PASポリマーは、アスピリンと比較して優れた鎮痛及び抗炎症特性を示すサリチル酸のメタクリル酸エステル誘導体(5-HMA、4-HMA、又はそれらの組み合わせ)を含む。

【0034】

さらに、PASの分子構造は、組織再生、創傷治癒、及び薬物送達のための生体材料の臨床的要件に取り組むことを意図して設計されている。これらの要件は、広く、(a)水溶性、(b)タンパク質/ペプチド反応性、(c)生物学的に無害な架橋メカニズム；及び(d)生分解性である。したがって、開示されたPASポリマーは、それが拡張される正確な臨床用途に応じて調整可能なそのような特性のブレンドを具体化する。

【0035】

水溶性特性を高めるために、PASは、その分子構造中に親水性のエチレングリコール(OEGMA)セグメントを組み込む。PASポリマーは、N-アクリロキシスクシンイミド(NAS)セグメントにより水溶液中のタンパク質と結合することもできる。N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)の形での熱応答性画分の存在は、任意の外部の化学物質(単数又は複数)/試薬(単数又は複数)の添加を必要とせずに、体温でヒドロゲル形成を誘導することができる。さらに、PASポリマーは、ポリマーからのポリラクチド-co-2-ヒドロキシエチルメチルアクリレート(PLA/HEMA)の開裂により、生体吸収性である。最後に、鎮痛/殺菌成分がサリチル酸のメタクリル酸エステル誘導体(5-HMA、4-HMA、又はその組み合わせ)の形態で提供される。PASポリマーの分子構造及び各セグメントの役割が図1に模式的に示されている。各モノマー単位それぞれの相対的な割合は、PASポリマーが適用される臨床用途に応じて、PASポリマーの、調整可能性とされるものを提供するものと評価される。

【0036】

本出願人は、PASポリマーがヒドロゲル担体に組み込まれた場合、1つ以上の特定の臨床的必要性(例えば、温度応答性、生体適合性、機械的特性等)に調整され得る物理化学的特性を有することを予期せずに見出した。特に、PASポリマーは、顕著な鎮痛及び抗炎症特性を示すことが示されているサリチル酸のメタクリル酸エステル誘導体(5-HMA、4-HMA、又はそれらの組み合わせ)を含む。

【0037】

したがって、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド-co-N-アクリロキシスクシンイミド-co-2-ヒドロキシエチルメタクリレート/ポリラクチド-co-オリゴ(エチレングリコール)モノメチルエーテルメタクリレート-co-サリチル酸)の合成が本明細書に開示され、以下、PASと示される。このポリマーは、慢性炎症、低い宿主組織接着性、低い生物学的活性、及び細胞傷害性架橋機構のような既知の物質に関連する現在の欠点の多くに対処する可能性を秘めている。

【0038】

その最も広い形態において、本開示はPASポリマーそれ自体に関する。PASポリマーは、以下の所望の臨床特性、すなわち温度活性化、水溶性、機械的強度、生体適合性、及び鎮痛/抗炎症特性を生起するために、それらの相対的な比率を調整可能なモノマー単位を含む；各モノマーの相対的な割合は、その特定の用途に応じてPASポリマーの調整可

10

20

30

40

50

能性を提供する。

【 0 0 3 9 】

第1の態様では、少なくとも3つのさらなるモノマー単位と組み合わせて少なくとも1つの殺菌性／鎮痛性／抗炎症性モノマー単位を含むポリマーがここに提供され、この3つのさらなるモノマー単位は、温度活性化、水溶性、機械的強度、タンパク質／多糖結合能力、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される特性を生起する。

【 0 0 4 0 】

一実施形態では、殺菌性／鎮痛性／抗炎症性モノマー単位は、サリチル酸のメタクリル酸エステル誘導体（5 - H M A 又は 4 - H M A、又はそれらの組み合わせ）を含む。

【 0 0 4 1 】

一実施形態では、ポリマーは、約2モル％から約10モル％の範囲、例えば：約2モル％、約3モル％、約4モル％、約5モル％、約6モル％、約7モル％、約8モル％、約9モル％、又は約10モル％の量の5 - H M A 又は 4 - H M A、又はそれらの組み合わせを、およそその相対モル比で含む。

【 0 0 4 2 】

一実施形態では、少なくとも3つのさらなるモノマー単位が、親水性エチレングリコール（O E G M A）成分の形態の水溶性モノマー単位；ポリラクチド - c o - 2 - ヒドロキシ - エチルメチルアクリレート（P L A / H E M A）の形態の機械的強度付与モノマー単位；N - アクリロキシスクシンイミド（N A S）成分の形態のタンパク質／多糖反応性モノマー単位；及びN - イソプロピルアクリルアミド（N I P A A m）成分の形態の熱硬化性モノマー単位からなる群から選択される。

【 0 0 4 3 】

一実施形態では、上記少なくとも3つのモノマー単位のそれぞれの相対的な割合により、得られるポリマーが特定の臨床用途のために調整／最適化され、ここで、ある種の物理的／化学的／生物学的性質が他のものよりも好ましい。

【 0 0 4 4 】

一実施形態では、一定の殺菌性／鎮痛性／抗炎症特性が、慢性炎症が臨床的合併症をもたらし得る用途において好ましい。

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、親水性エチレングリコール（O E G M A）成分の形態の水溶性モノマー単位は、一定の水溶性をもたらし、それによってポリマーの調製における有機溶媒の使用を実質的に回避する。

【 0 0 4 6 】

一実施形態では、親水性エチレングリコール（O E G M A）成分の形態の水溶性モノマー単位は、制御可能なゲル化時間を提供し、次いで、表層／外科用シーラントのための比較的早いゲル化、及び／又は深部組織再生のための比較的遅いゲル化を提供する。本明細書において、「速いゲル化」は、37 で1分未満のゲルの形成とみなされる。一実施形態では、親水性エチレングリコール（O E G M A）成分は、速いゲル化時間を提供する。

【 0 0 4 7 】

一実施形態では、機械的強度を与えるモノマー単位は、制御可能な機械的強度、柔軟性及び弾性を与え、ポリマーを所与の用途の特定の要件に調整する。

【 0 0 4 8 】

一実施形態では、機械的強度を与えるモノマー単位は、ポリマーへの組織接着挙動を提供し、それによって、送達部位におけるポリマーの堆積物の保持を容易にする。

【 0 0 4 9 】

一実施形態では、ポリラクチド - c o - 2 - ヒドロキシ - エチルメチルアクリレート（P L A / H E M A）の形態の機械的強度を付与するモノマー単位は、分解特性をもたらし、ここで、段階的なP L Aの開裂により、腎臓を介してヒドロゲルが生体吸収性となり；ヒドロゲルの周囲組織への移動及び漏出を防止するために、組織接着性を有する。P L A単位の長さは、用途に応じて調整できる。一実施形態では、P L A / H E M Aユニットは

10

20

30

40

50

、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のPLA単位を含む。例えば、PLA/HEMAユニットは5つのPLAユニットを含んでいてもよい。

【0050】

一実施形態において、水溶性モノマー単位及び機械的強度を付与するモノマー単位の量は、制御可能な生体吸収挙動を提供する。

【0051】

一実施形態では、N-アクリロキシスクシンイミド(NAS)成分の形態のタンパク質反応性モノマー単位は、異なる生物学的に活性なペプチド及び多糖類のヒドロゲルへの結合によるペプチド反応性をもたらし、細胞シグナル伝達及び組織形成速度を促進する。

【0052】

一実施形態では、ポリマーは、約10モル%から約15モル%の範囲の量、例えば、約10モル%、約11モル%、約12モル%、約13モル%、約14モル%、又は約15モル%のNASを、おおよその相対モル比で含む。

【0053】

一実施形態では、N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)成分の形態の熱硬化性モノマー単位は、約37で、その場で構造形成を誘導することによる熱硬化特性をもたらし。

【0054】

別の実施形態では、ポリマーは、約60モル%から約80モル%の範囲、例えば約60モル%から約70モル%の範囲、又は約70モル%から約80モル%の範囲の量の相対モル比で、NIPAAmをおおよその相対モル比で含む。例示的な値は、約68モル%又は約75モル%を含む。

【0055】

一実施形態において、ポリマーは、0 から35 で10mg/mLから700mg/mLの質量含有量を有する水溶液に溶解し、例えば、質量含有量は0 から35 で、35mg/mLから400mg/mLであってもよい。

【0056】

一実施形態では、ポリマーは、温度を37 以上に上昇させることによって、その場でミクロ又はマクロ構造体を形成する。

【0057】

一実施形態では、ポリマーの生物学的有効性は、細胞適合性及び微生物コロニー計数の試験によって確認可能である。

【0058】

一実施形態では、ポリマーは、約200kPaから約400kPaの範囲の圧縮弾性率を有する。例えば、圧縮弾性率は、約200kPa、約220kPa、約240kPa、約260kPa、約280kPa、約300kPa、約320kPa、約340kPa、約360kPa、約380kPa、又は約400kPaであってもよい。

【0059】

別の実施形態では、ポリマーは、約500kPaから約800kPaの範囲の引張弾性率を有していてもよい。例えば、引張弾性率は、約500kPa、約520kPa、約540kPa、約560kPa、約580kPa、約600kPa、約620kPa、約640kPa、約660kPa、約680kPa、約700kPa、約720kPa、約740kPa、約760kPa、約780kPa、又は約800kPaであってもよい。

【0060】

一実施形態では、圧縮力及び引張り強度によるポリマーヒドロゲルの機械的特性は、それぞれ約 311 ± 47 kPa及び約 781 ± 116 kPaである。

【0061】

別の実施形態では、ポリマーは、約900kPaから約1200kPaの範囲の接着せん断強度を有していてもよい。あるいは、接着せん断強度は、少なくとも約900kPa、少なくとも約920kPa、少なくとも約940kPa、少なくとも約960kPa、

10

20

30

40

50

少なくとも約 980 kPa、少なくとも約 1000 kPa、少なくとも約 1020 kPa、少なくとも約 1040 kPa、少なくとも約 1060 kPa、少なくとも約 1080 kPa、少なくとも約 1100 kPa、少なくとも約 1120 kPa、少なくとも約 1140 kPa、少なくとも約 1160 kPa、少なくとも約 1180 kPa、又は少なくとも約 1200 kPa であってもよい。

【0062】

一実施形態では、ポリマーの組織接着試験は、少なくとも約 970 kPa の接着せん断強度を有していてもよい。

【0063】

一実施形態では、ポリマーは、添付の図面の図 1 に提供される構造によって概略的に表

10

【0064】

一実施形態では、ポリマーは臨床的に有用である。例えば、ポリマーは、外科用シーラント、創傷治癒被覆剤、充填剤及び/又は生体内組織再生足場として使用することができる。

【0065】

一実施形態では、ポリマーは、おおよその相対モル比で、約 5 モル%未満の OEGMA を含み、それによって水溶性を生起する。別の実施形態において、ポリマーは、おおよその相対モル比で、約 2 モル%から約 5 モル%、例えば約 2 モル%、約 3 モル%、約 4 モル%又は約 5 モル%の OEGMA を含む。

20

【0066】

一実施形態では、ポリマーは、約 2 モル%から約 10 モル%の範囲の PLA/HEMA をおおよその相対モル比で含む。例えば、PLA は、以下の量で存在していてもよい：約 2 モル%の PLA/HEMA、約 3 モル%の PLA/HEMA、約 4 モル%の PLA/HEMA、約 5 モル%の PLA/HEMA、約 6 モル%の PLA/HEMA、約 7 モル%の PLA/HEMA、約 8 モル%の PLA/HEMA、約 9 モル%の PLA/HEMA、又は約 10 モル%の PLA/HEMA。

【0067】

一実施形態では、ポリマーは、おおよその相対モル比で、約 8 モル%を超える PLA/HEMA を含む。特に、一実施形態では、ポリマーは、約 8 モル%を超える PLA/HEMA を含み、一実施形態では、それにより、約 37 でのヒドロゲル形成を生起する。例えば、ポリマーは、約 8 モル%を超える PLA/HEMA、約 9 モル%を超える PLA/HEMA、約 10 モル%を超える PLA/HEMA、約 11 モル%を超える PLA/HEMA、約 12 モル%を超える PLA/HEMA、約 13 モル%を超える PLA/HEMA、約 14 モル%を超える PLA/HEMA、又は約 15 モル%を超える PLA/HEMA を含んでいてもよい。

30

【0068】

一実施形態では、ポリマーは、おおよそのモル比で、NIPAAm (68 モル%)、NAS (14 モル%)、PLA/HEMA (8 モル%)、OEGMA (5 モル%)、及び 5-HMA (5 モル%) 含む。別の実施形態では、4-HMA (5 モル%) を殺菌成分として適用した。別の実施形態では、5-HMA (2.5 モル%) と 4-HMA (2.5 モル%) との組み合わせを殺菌成分として適用した。他の特性の中でも、これらの実施形態のポリマーは水溶性であり、約 37 でヒドロゲルを形成する；それはまた、5-HMA (又は 4-HMA、又はそれらの組み合わせ) 成分による所望の抗菌/殺菌特性を生起する。

40

【0069】

一実施形態では、ポリマーは、対象における異物免疫応答及び慢性炎症による臨床合併症なしに、手術部位へのポリマーの比較的安全かつ有効な生体内送達をもたらす。

【0070】

一実施形態では、ポリマーは、サリチル酸のメタクリル酸エステル誘導体からの殺菌性

50

／鎮痛性／抗炎症性作用のバースト放出を、約 0 日から約 270 日の間防止するか、又はそれにより手術部位における時間に基づく感染の発生率を低減する。

【0071】

一実施形態では、約 0 日から約 270 日の期間は、好ましくは約 10 日から約 260 日であり、より好ましくは約 20 日から約 250 日であり、より好ましくは約 30 日から約 240 日であり、より好ましくは約 40 日から約 230 日であり、より好ましくは約 50 日から約 220 日であり、より好ましくは約 60 日から約 210 日であり、より好ましくは約 70 日から約 200 日であり、より好ましくは約 80 日から約 190 日であり、より好ましくは約 90 日から約 180 日であり、より好ましくは約 100 日から約 170 日であり、より好ましくは約 110 日から約 160 日であり、より好ましくは約 110 日から約 150 日であり、より好ましくは約 120 日から約 140 日であり、より好ましくは約 130 日である。

10

【0072】

約 0 日から約 270 日の期間についての定義には、以下の日数を含む：0 日、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、16 日、17 日、18 日、19 日、20 日、21 日、22 日、23 日、24 日、25 日、26 日、27 日、28 日、29 日、30 日、31 日、32 日、33 日、34 日、35 日、36 日、37 日、38 日、39 日、40 日、41 日、42 日、43 日、44 日、45 日、46 日、47 日、48 日、49 日、50 日、51 日、52 日、53 日、54 日、55 日、56 日、57 日、58 日、59 日、60 日、61 日、62 日、63 日、64 日、65 日、66 日、67 日、68 日、69 日、70 日、71 日、72 日、73 日、74 日、75 日、76 日、77 日、78 日、79 日、80 日、81 日、82 日、83 日、84 日、85 日、86 日、87 日、88 日、89 日、90 日、91 日、92 日、93 日、94 日、95 日、96 日、97 日、98 日、99 日、100 日、101 日、102 日、103 日、104 日、105 日、106 日、107 日、108 日、109 日、110 日、111 日、112 日、113 日、114 日、115 日、116 日、117 日、118 日、119 日、120 日、121 日、122 日、123 日、124 日、125 日、126 日、127 日、128 日、129 日、130 日、131 日、132 日、133 日、134 日、135 日、136 日、137 日、138 日、139 日、140 日、141 日、142 日、143 日、144 日、145 日、146 日、147 日、148 日、149 日、150 日、151 日、152 日、153 日、154 日、155 日、156 日、157 日、158 日、159 日、160 日、161 日、162 日、163 日、164 日、165 日、166 日、167 日、168 日、169 日、170 日、171 日、172 日、173 日、174 日、175 日、176 日、177 日、178 日、179 日、180 日、181 日、182 日、183 日、184 日、185 日、186 日、187 日、188 日、189 日、190 日、191 日、192 日、193 日、194 日、195 日、196 日、197 日、198 日、199 日、200 日、201 日、202 日、203 日、204 日、205 日、206 日、207 日、208 日、209 日、210 日、211 日、212 日、213 日、214 日、215 日、216 日、217 日、218 日、219 日、220 日、221 日、222 日、223 日、224 日、225 日、226 日、227 日、228 日、229 日、230 日、231 日、232 日、233 日、234 日、235 日、236 日、237 日、238 日、239 日、240 日、241 日、242 日、243 日、244 日、245 日、246 日、247 日、248 日、249 日、250 日、251 日、252 日、253 日、254 日、255 日、256 日、257 日、258 日、259 日、260 日、261 日、262 日、263 日、264 日、265 日、266 日、267 日、268 日、269 日、及び 270 日、並びに一部の日。

20

30

40

【0073】

一実施形態では、ポリマーは、天然及び合成のペプチド又は多糖と結合する。

【0074】

一実施形態では、ポリマーは、生物学的組織の修復を補助するために、1 つ以上の細胞

50

をさらに含むか、又はそれと適合性である。細胞は、線維芽細胞、内皮細胞、前駆細胞、又はそれらの混合物を含む再生細胞であってもよいが、これらに限定されない。

【0075】

一実施形態では、1つ以上の細胞はポリマー全体にわたって比較的均一に分布する。

【0076】

一実施形態では、ポリマー中の1つ以上の細胞の数は約 10^2 細胞/mLから約 10^8 細胞/mLである。別の実施形態では、ポリマー中の1以上の細胞の数は約 10^3 細胞/mLから約 10^5 細胞/mLである。

【0077】

第2の態様では、第1の態様にしたがって定義されるポリマーの合成方法であって、所定のモル量の開始剤と、所定モル量の殺菌性/鎮痛性/抗炎症性モノマー単位と；それぞれ所定量の水溶性モノマー単位；機械的強度付与モノマー単位；タンパク質反応性モノマー単位；及び熱硬化性モノマー単位のうちの少なくとも3つとのフリーラジカル重合を含む。

10

【0078】

一実施形態において、この方法は、ポリマーを約32℃の水中で沈殿させて未反応モノマーを除去し、濾過して粗PASポリマーを得る抽出工程をさらに含む。

【0079】

一実施形態では、本方法は、沈殿したポリマーをエタノールに溶解し、約32℃の水中に再沈殿させて精製PASポリマーを提供する精製工程をさらに含む。

20

【0080】

一実施形態では、使用前にポリマーを約40℃の温度で約48時間の間、減圧乾燥する。

【0081】

一実施形態では、殺菌性/鎮痛性/抗炎症性モノマー単位は5-HMA、4-HMA、又はそれらの組み合わせであり、存在する場合、水溶性モノマー単位はNIPAAmであり；機械的強度付与モノマー単位はNASであり；タンパク質反応性モノマー単位はPLA/HEMAであり；熱硬化性モノマー単位はOEGMAである。

【0082】

一実施形態では、5-HMA、4-HMA、及びそれらの組み合わせの所定モル量は、約5モル%であり；もし存在する場合、NIPAAmの所定モル量は約68モル%であり；NASの所定のモル量は約14モル%であり；PLA/HEMAの所定モル量は約8モル%であり；OEGMAの所定のモル量は約5モル%である。当業者はこれを代表例としてのみ認識するであろう；相対比率は、臨床的必要性に基づいて変更することができる。

30

【0083】

第3の態様では、医療用途において、第1の態様にしたがって定義されたポリマーの使用がここに提供される。一実施形態では、医療用途は、外科用シーラント、創傷治癒用被覆剤、充填剤等としての用途を含むことができ、ポリマーは生体内での組織再生及び/又は試験管内での細胞増殖足場のために利用することができる。

【0084】

第4の態様では、癌を含む医学的状態の治療における、第1の態様にしたがって定義されたポリマーの使用がここに提供される。一実施形態では、癌は肺癌を含むが、本明細書に開示されたポリマーは外科的シーラント特性を有し、出血しやすい任意の腫瘍除去処置への使用に適している。

40

【0085】

第5の態様では、外科的シーリング、創傷の被覆の形成、空洞の充填の方法、又は生体内での組織発生足場を提供する方法がここに提供され、この方法は、そのような治療を必要とする対象に第1の態様にしたがって定義された有効量のポリマー投与することを含む。

【0086】

50

第6の態様では、癌を含む医学的状態の治療方法であって、そのような処置を必要とする対象に有効量の、第一の態様にしたがって定義されたポリマーを投与することを含む方法が提供される。一実施形態において、癌は肺癌を含む。

【0087】

さらに、第7に、本明細書においては医療キットが提供され、このキットは、第1の態様にしたがって定義されるポリマー；このポリマーと生物学的に適合するヒドロゲルとを組み合わせるための指示書；及び場合によりシリンジを含む。

【0088】

本明細書において特定される本発明の各態様は、PASポリマーそれ自体の特別な技術的特徴によって結び付けられている。したがって、本発明は、PASポリマー、それらの商業的形態及びそれらの使用にある。

【0089】

出願時点で出願人に知られている先行技術の情報に基づき、新規性は、PASによって定義されるモノマー単位の特定の組合せを含むポリマーに存在する。

【0090】

本発明のさらなる新規な態様には、以下のものが含まれる：PAS（一般的かつ特異的な「調整」形態）の合成方法；医療用途（例えば、肺癌）におけるPASの使用；PASを用いた（例えば肺癌の）医学的処置の方法；PAS及び適合性ヒドロゲル（及び任意にシリンジ）を含む医療キット；及びヒドロゲル担体（すなわち、PASGel）内に組み込まれる場合のPAS。

【実施例】

【0091】

出願人は、慢性炎症、低い宿主組織粘着性、低い生物学的活性、及び細胞傷害性架橋メカニズムのような、当技術分野における欠点を同定したため、PASポリマーを求めている。PASポリマーは、それ自体が鎮痛及び抗炎症特性を示すサリチル酸のメタクリル酸エステル誘導体（5-HMA、4-HMA、又はそれらの組み合わせ）を含む。PASは、親水性エチレングリコール（OEGMA）セグメントの存在により水溶性である。このポリマーはまた、N-アクリロキシスクシンイミド（NAS）セグメントを介して水溶液中のタンパク質と結合することができる。熱応答性画分（N-イソプロピルアクリルアミド、NIPAAm）の存在は、さらなる試薬の添加を必要とせずに体温でヒドロゲル形成を誘導する。最後に、PASポリマーは、ポリマーからのポリラクチド-co-2-ヒドロキシ-エチルメチルアクリレート（PLA/HEMA）の開裂により生体吸収性である。

【0092】

本発明のポリマー内に5つのモノマー単位がすべて存在することは、¹H NMR（図2）によって確認されている。

【0093】

PASポリマーの生物学的及び物理的プロファイルが示される。例えば、ヒドロゲル担体（「PASGel」）内に組み込まれた場合のPASの生物学的有効性は、予備的な細胞適合性及び微生物コロニー計数試験によって示されている（それぞれ、図3及び図4）。さらに、PASポリマーの圧縮強度及び引張強度（それぞれ 311 ± 47 kPa及び 781 ± 116 kPa）並びに組織接着試験（図5）を分析することにより、有利な機械的特性が明らかになった。

【0094】

10

20

30

40

【表 2】

表 2 本発明のPASポリマーの各モノマー単位の形態及び機能

モノマー	役割	重要性
5-HMA、 4-HMA又は 組み合わせ	抗炎症性、殺菌性、及び抗菌性	慢性炎症が重度の臨床合併症を引き起こす可能性があるため、慢性炎症を抑制する
OEGMA	水溶性	生体材料の生物学的特性を高めるためのヒドロゲルの調製における有機溶媒の使用を防止する
	制御可能なゲル化時間	様々な用途に存在する臨床ニーズ、表層／外科シーラントのための速いゲル化、及び深部組織再生のための遅いゲル化に対処する
NAS	ペプチド反応性	細胞シグナル伝達及び組織形成速度を促進するためにさまざまな生物活性ペプチドをPASGelに結合させる
NIPAAm	熱硬化特性	好ましくは37℃でその場でヒドロゲルの形成を誘導する；これは、毒性の架橋試薬の使用を防止する
	注入性	ヒドロゲルを低侵襲的に身体のさまざまな部位に送達する
HEMA/PLA	分解	PLAが段階的に切断されることによりPASGelを腎臓から生体吸収性にする
	組織接着	周囲の組織へのヒドロゲルの移動及び漏出を防止する

10

20

【0095】

PASポリマー自体の好ましい形態は、NIPAAm（68モル％）、NAS（14モル％）、PLA/HEMA（8モル％）、OEGMA（5モル％）、及び5-HMA/4-HMA（5モル％）を供給しながら、4,4'-アゾビス-4-シアノ吉草酸のような開始剤の存在下で合成されるPASであってもよい；この組成物は水溶性であり、37

30

【0096】

既知の先行技術との直接的な差異は、サリチル酸が以前は3,5-ジ（アクリロイルオキシメチル）サリチル；3-メチル-S-アクリロイルオキシメチルサリチル酸（例えば、米国特許第3,290,270号参照）等の異なるモノマーと化学的に結合していた点にあり、これが、天然及び合成ペプチドと結合する能力を有する注射可能なサリチル酸ベースの熱硬化性ヒドロゲルのクラスが設計された最初のものである。これらの特性は、PASGelの生分解特性及び組織接着挙動とともに、この生体材料を、現在満足されていない臨床上の課題に対処する適切な候補にする。

【0097】

本出願人は、¹H NMR分析を用いてPASポリマーの形成を確認した。また、試験管での試験により、サリチル酸の段階的な放出及びその生物学的活性が示された。また、出願人は、試験管内で、PASGelの線維芽細胞との細胞適合性を確認した。物理的特徴付けの実験では、また、開発された材料の、創傷治癒及び組織工学のための適切な機械的性能を確認した。

40

【0098】

マウスの皮下モデルを用いた生体内での細胞適合性試験が必要であり、短期間で実施される。この技術の有効性を保証するために、より複雑な動物モデル、例えば羊の肺出血も実施される。

【0099】

<PASポリマー合成と分子特性解析>

50

PASポリマーの合成は、いくつかの予期せぬ課題を生じ、その各々は本出願人により本発明の方法で対処された。例えば、5-HMAモノマーの精製の間の、水とメタノールを使用することによるこのモノマーの再結晶化は、2つの溶媒の特定の体積比率(0.5:2、水:メタノール)を必要とし、これにより生成物の完全な溶解及び再結晶を確実にする。

【0100】

第2に、PASポリマーの合成中に、供給溶液中の開始剤(4,4'-アゾビス-4-シアノ吉草酸)のモル比を変えて、PASポリマーの適切な重合度を保証した。最後に、PASポリマーの合成の間に、5つの異なるモノマーが使用され、それぞれが互いの相溶性によって独特の課題を提示した。

10

【0101】

5つのモノマーの供給量は、ある場合には、水溶性ポリマーを合成するように調整された。本出願人は、5モル%未満のOEGMAで合成されたポリマーは水溶性ではないことを見出した。また、8モル%を超えるOEGMAを含むPASポリマーは、37でヒドロゲルに変換されなかった。したがって、PASポリマーのこれらの製剤は、注射可能な生体材料の製造には適していなかった。複数の製剤を試験することにより、NIPAAm(68モル%)、NAS(14モル%)、PLA/HEMA(8モル%)、OEGMA(5モル%)及び5-HMA/4-HMA(5モル%)を供給して合成されたPASは水溶性であり、37でヒドロゲルを形成したことが実験的に見出された。PASポリマーの組成を変更して、PASGelの物理化学的特性を様々な生物学的用途のために調整するために、さらなる検討が必要である。

20

【0102】

PAS合成には市販のモノマー、例えばNIPAAm、NAS、OEGMA、及び社内ですべて合成したモノマーである、PLA/HEMA、及び5-HMAを使用した。PLA/HEMAの合成方法はDijk-Wolthuls, et al., [Tsanga, Bosch and Dijk-Wolthuls; "A new class of polymerisable dextrans with hydrolysable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer", Polymer, 38, 6235-6242, 1997]により開発され、HEMA分子あたり6つの乳酸塩長を有するPLA/HEMAの形成のために以前に最適化されていた[Fathi, Mithieux, Wei, Chrzanowski, Valtchev and Weiss; "Elastin based cell-laden injectable hydrogels with tunable gelation, mechanical and biodegradation properties", Biomaterials 35(21), 5425-5435, 2014]。

30

【0103】

<5-HMA(殺菌)モノマーの合成>

PASポリマーの合成に使用されるモノマーの1つである5-HMAの調製のための合成方法は、SanRoman, et al. [an initial study is shown in Elvira and San Roman, "Synthesis and stereochemistry of isomeric methacrylic polymers derived from 4- and 5-aminosalicylic acids", Polymer, 38, 4743-4750, 1997; and a follow-up study is disclosed in Elvira, Gallardo, Lacroix, Schacht, San Roman, "Incorporation of salicylic acid derivatives to hydrophilic copolymer systems with biomedical applications", J Mater Sci Mater Med, 12, 535-542, 2001]に記載された方法が

40

50

ら適合できる。

【0104】

簡単に説明すると、5-HMAモノマーの合成方法は、最初にElvira及びSan Romanの引用文献に概説されている。その後、続く試験を通して、このモノマーを2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)で重合させた。本発明におけるPASポリマーの合成において、本出願人は、オリゴ(エチレングリコール)(OEGMA)、N-アクリロキシスクシンイミドエステル(NAS)、N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)、及びポリラクチド(HEMA/PLA)を5-HMAに結合した。得られる分子のそれぞれの及び全てのセグメントは、組織再生、薬物送達のための異なる臨床要求に対処し、手術用シーラントとしてPASGelを使用するために重要な役割を果たす。PASGelの合成におけるこれらの様々なモノマーの機能を表2に要約する。

10

【0105】

2-アミノ-5-ヒドロキシ安息香酸をメタクリロイルクロリドで選択的にアミド化することにより5-HMAを合成した。この目的のために、テトラヒドロフラン(THF)中の50%v/vメタクリロイルクロリド溶液を、0.5mL/分の流速で、10%w/wの2-アミノ-5-ヒドロキシ安息香酸のTHF溶液に加えた。得られた溶液をコンデンサーを備えた窒素ブランケット下で300rpm及び4で6時間攪拌した。得られた官能化モノマー懸濁液を濾過して、懸濁した副生成物塩を除去した。

【0106】

得られた透明な溶液をロータリーエバポレーターで40、減圧下で乾燥させ、粘稠な褐色のペーストを生成させた。次いで、5-HMAモノマーペーストを水/メタノール溶液(4:1の体積比)に溶解し、4で水/メタノール溶液(1:2の体積比)で再結晶して未反応の2-アミノ-5-ヒドロキシ安息香酸、及びメタクリロイルクロライドを除去した。ベージュ色の結晶化モノマーを濾過により分離し、水/メタノールを用いて上記のように再結晶化プロセスを3回繰り返して、高度に精製した5-HMAモノマーを得た。

20

【0107】

本明細書に開示されているように、4-HMAは、5-HMAの代わりに、又は5-HMAと組み合わせて使用することができる；C. Elvira et al., Polymer, 38(18), 4743-4750, 1997に示されているように、殺菌効果はほぼ同じである。

30

【0108】

<PASポリマーの合成>

開始剤として0.3モル%の4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)を用いて70、THF中でNIPAAm(68モル%)、NAS(14モル%)、PLA/HEMA(8モル%)、OEGMA(5モル%)及び5-HMA(5モル%)のフリーラジカル重合によってPASポリマーを合成した。24時間後、得られたポリマー溶液を32の水中で沈殿させて、未反応モノマーを除去した。次いで、沈殿したポリマーをエタノールに溶解し、同じ条件下で水中に再沈殿させた。次いで、得られたポリマーを40で48時間減圧乾燥した。

40

【0109】

図2では、PASの5つの主要セグメントすべてに対応する結合が存在することにより、ポリマーの合成が成功したことが確認された。異なる量の供給モノマーを使用することにより、様々なPASポリマーを合成することができる。したがって、例示したNIPAAm(68モル%)、NAS(14モル%)、PLA/HEMA(8モル%)、OEGMA(5モル%)及び5-HMA(5モル%)ポリマーは単に代表的なものである。特に、4-HMA(5モル%)又は5-HMA(例えば、2.5モル%)と4-HMA(例えば、2.5モル%)との組み合わせを殺菌成分として適用することができる。

【0110】

<ペプチドヒドロゲルの形成及び細胞適合性>

50

OEGMA 含量 5 モル% の合成 PAS ポリマーは水溶性であることが判明した。ポリマーのペプチド反応性を確認するために、GRGDS ({GLY} {ARG} {GLY} {ASP} {SER}) 合成ペプチドをモデルペプチドとして使用した。GRGDS は、細胞外マトリックス中の多くの接着タンパク質の細胞結合部位を模倣し、拡散した細胞を球状にして、剥離を引き起こす。GRGDS ペプチドは、骨機能に関与することが最も報告されているインテグリンである V3 及び I1b3 に対する中間的な親和性を有する。PAS (150 mg / mL) と GRGDS (1 mg / mL) を混合し、4 で 8 時間反応させた。次いで、得られた PAS - co - GRGDS (PASGel) 溶液を、生理学的温度 (例えば、37) まで温度を上昇させてヒドロゲルに変換した。

【 0 1 1 1 】

10

PASGel の細胞適合性特性を試験するために、線維芽細胞 (GM3348) を PASGel ヒドロゲルの構造内に 7 日間まで封入した。図 3 の結果は、生存細胞の数が培養後少なくとも 7 日間連続的に増加しているため、ヒドロゲルの細胞適合性が確認された。

【 0 1 1 2 】

PASGel のユニークな生体分子構造は、(a) 組織特異的細胞シグナル伝達を誘導するための、生物学的に活性なペプチドと、(b) 抗炎症性及び抗菌特性が証明されたサリチル酸の制御された二重送達を可能にする。GRGDS ペプチドは分子構造 PASGel に化学的に結合していた。Bradford タンパク質アッセイを使用して、PAS ポリマーとペプチドとの間の共有結合の形成を確認した。この目的のために、ヒドロゲル形成後直ちに、PASGel を温かいリン酸緩衝食塩水 (PBS) で 3 回完全に洗浄して構造 PASGel から未反応の GRGDS を溶出させた。洗浄媒体中のペプチドの濃度を Bradford タンパク質アッセイによって測定し、PASGel 中の共有結合した GRGDS の量を計算した。これらの結果は、GRGDS のほぼ 94 % が PASGel の構造に共有結合していることを示した。生物学的に活性なサリチル酸を送達し、及び時間の経過に伴い放出する PASGel の能力もまた検討された。

20

【 0 1 1 3 】

化学結合の形成は、生体内での生物活性化合物の制御された送達を可能にするが、化合物の生物学的活性に破壊的に影響し得る。したがって、組み込まれたサリチル酸の活性は非常に重要である。この目的のために、本出願人は、PASGel からの生理活性サリチル酸の段階的放出を確認するための指標として、組み込まれた 5 - HMA / 4 - HMA の抗菌特性を評価した。

30

【 0 1 1 4 】

本出願人は、動的接触条件 (ASTM E 2149) 下で標準試験方法をわずかに改変することによって、PASGel の抗菌特性を PASGel^{neg} (すなわち、PAS ポリマーにサリチル酸を取り込まれていない) と比較した。手短に説明すれば、PASGel 及び PASGel^{neg} ヒドロゲルを無菌条件下で調製し、フィルター滅菌した PBS 中で 21 日間インキュベートした。予備的な結果は、この期間内の PASGel 及び PASGel^{neg} の全体的な分解速度がほぼ 30 重量%であることを示した。異なる時点、例えば 1 日後、7 日後及び 21 日後のインキュベーション培地からのサンプルを使用して、これらのヒドロゲルの抗菌特性を経時的に分析した。

40

【 0 1 1 5 】

3 つの大腸菌コロニーを接種ループで採取し、次いで、1 日目、7 日目、及び 21 日目に PASGel 及び PASGel^{neg} の浸漬溶液 3 mL に添加した。フィルター滅菌した PBS も用いて、対照として 3 つのコロニーを増殖させた。次いで、微生物懸濁液を 37 で 5 時間インキュベートした。連続希釈を行い、 10^{-6} 及び 10^{-7} の希釈細菌懸濁液を栄養寒天プレートに 16 時間接種し、次いでコロニー形成数 (CFU) を計算するためにコロニー数を数えた。

【 0 1 1 6 】

図 4 の微生物コロニー計数の結果は、1 日及び 7 日間の浸漬後、対照群並びに PASGel 及び PASGel^{neg} 試料の洗浄媒体の間に有意差がないことを示した。しかしな

50

がら、21日目の結果は、PASGel[®]試料及びPBS対照と比較して、PASGelのコロニー数が3倍減少することが確認された。これらの結果は、PASGelヒドロゲルの構造から切断されたサリチル酸の生物活性を確認するものである。さらに、経時的なサリチル酸の放出は、PASGelヒドロゲルの構造内でのこの化合物の化学結合を示した。

【0117】

<組織接着>

組織工学、薬物送達及び創傷被覆剤適用において、生体材料の組織接着性は、組織漏出等の臨床的合併症を防止するために非常に重要である。本出願人は、PASGelのこの特性を評価するために、ブタ皮膚を用いたex vivo ASTM D3164-03 (2014) 標準法を使用した。この分析のために、100 μ LのPASGelを用いて、0.5 \times 0.5 cm^2 の領域を充填して、2枚のブタ皮膚を接着させた。

10

【0118】

これらの2つの皮膚片を分離するように動かすための伸び力をインストロン5943で測定し、伸び力は7.5 Nでプラトーに到達した。図5の結果は、PASGelのせん断応力がほぼ1 MPaであることを示した。これらの結果は、PASGelの高い組織接着特性を示した。

【0119】

<物理的特性>

シミュレートされた生理学的条件では、PASGelヒドロゲルがそれぞれ311 \pm 47 kPa及び781 \pm 116 kPaの圧縮及び引張り係数を示した。これらの機械的性能パラメータは、以前に開発された又は市販のヒドロゲルと比較して、最も重要である。例えば、軟骨修復のための臨床試験段階にあるNeocartヒドロゲルは、10 kPa未満の圧縮弾性率を有する[Ahmed and Hinckle, "Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration" Tissue Eng Part B Rev; 16, 305-329, 2010]、BioGlue[CryoLife: BioGlue(R) Summary of Safety and Effectiveness Surgical Adhesive Indications for Use Contraindications; FDA Rep 2013]、ProGel[ProGel summary of Safety and Effectiveness Data; FDA Rep 2008: 1-26]、及びCrossSeal[Crosseal Summary of Safety and Effectiveness Data; FDA Rep 2010]のような、外科的シーラントと比較して、PASGelはより弾性的で機械的に堅牢である。これらの機械的性能の両方は、内外の創傷被覆及び組織再生にとって重要である。

20

30

【0120】

<PASGelを使用して出血を予防する可能性>

PASGelが潜在的に、とりわけ以下のように使用されるかどうかを調べるための試験が行われた：

40

- ・内部出血シーラント；深部組織のための外科用シーラント；及び/又は
- ・欠陥部位の充填又は物理的封じ込めによって血液漏出を防止するために使用されることが意図される物理的凝固剤。

【0121】

出血を防ぐためにPASGelを使用する可能性を決定するために使用した装置の概略図を図6に示す。本出願人は、この正の血圧及び血流に物理的に対処するためにPASGelを使用する可能性を確認するための装置を開発した。このモデルでは、内部欠陥部位の正の血圧は約33 mmHg (= 450 mmH₂O)であり、流速は3.7 ml/分から50.3 ml/分であった(Tondevald & Eliassen, 1982)。以下のパラメータを使用した：直径1 cmの配管、レイノルズ数は42297 (乱流)、流速を

50

調整するためにバルブを使用し、「手術」の温度は約 34 °C であった。

【0122】

PAS ポリマー（75%のNIPAAm、3モル%のPLA/HEMA、3の乳酸塩長、2モル%のOEGMA、14モル%のNAS、及び6モル%のサリチル酸の製剤）をモデルペプチドであるGRGDSと結合させることにより、PASGelのモデル製剤を調整した。表3に示す結果は、最も厳しい条件（最高流速又は最高水圧のいずれか）において、試験したPASGel製剤が血液凝固及び止血の自然形成のための十分な時間である、ほぼ5分間、血液の流れを物理的に止めることができることを示す。この結果は、創傷被覆剤及び外科用シーラント用に開発された生体材料の高い可能性を確認した。

【0123】

【表3】

表3—さまざまな圧力の砂の流量でシミュレートされた血流を止めるためのPASGelの適用。

圧力	流速 (ml/min)	流れ停止の期間 (min)
99 mm Hg(~1.5 m H ₂ O)	10	>15
99 mm Hg(~1.5 m H ₂ O)	35	~8
99 mm Hg(~1.5 m H ₂ O)	50	~5
33 mm Hg (~0.5 m H ₂ O)	50	~5
76 mm Hg(~1 m H ₂ O)	50	~5
99 mm Hg(~1.5 m H ₂ O)	50	~5

【産業上の利用可能性】

【0124】

潜在的な商業的適用に関して、本発明は、固有の抗炎症特性を有する在庫できる接着剤熱硬化性生体材料として訴求する。これらの特性は、つまり、外科用シーラント、創傷治癒被覆剤、充填剤及び生体内組織再生足場等の用途をもたらす。

【0125】

本発明の他の商業形態は、直ちに使用できる液体（6カ月から12カ月の貯蔵寿命で4で貯蔵する必要がある溶液形態のPASGel）及び長持ちする粉末（凍結乾燥したポリマー粉末及び生理食塩水溶液が別々に提供される）を含んでいてもよい。キットは4で4時間、2つの部分を混合することにより、すぐに使用できる。このキットはより長い貯蔵寿命（例えば、2年）を有し、涼しい貯蔵条件の必要はない。

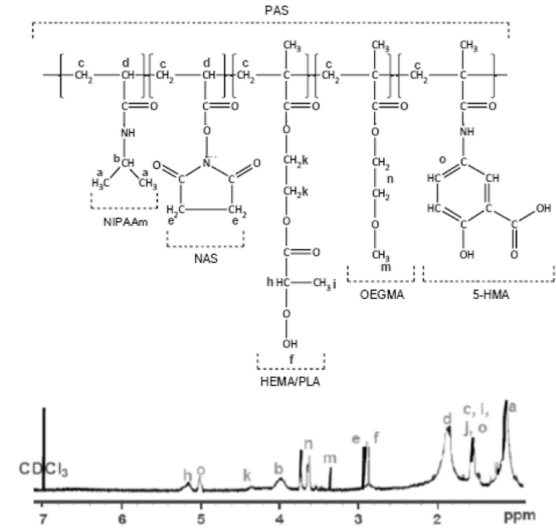
【0126】

当業者であれば、本開示の広範な一般的な範囲から逸脱することなく、上述の実施形態に多くの変形及び/又は修正を行うことができることが理解できよう。したがって、本実施形態は、すべての点で例示的であり、限定的ではないとみなされるべきである。

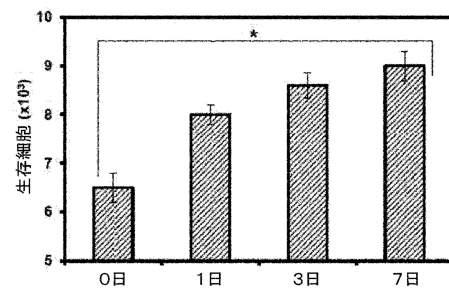
【図1】



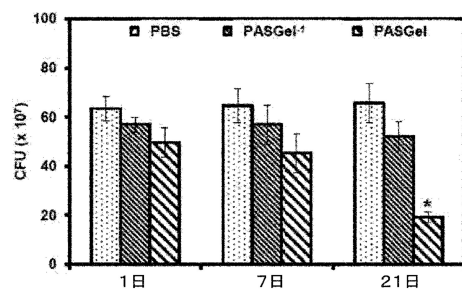
【図2】



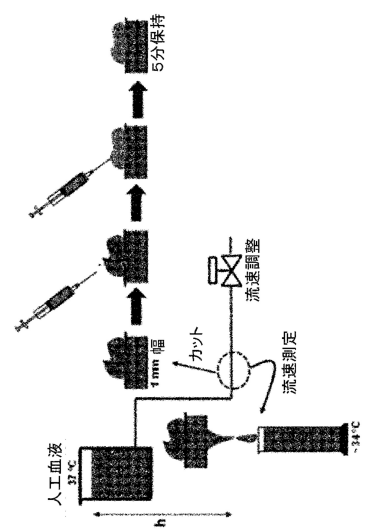
【図3】



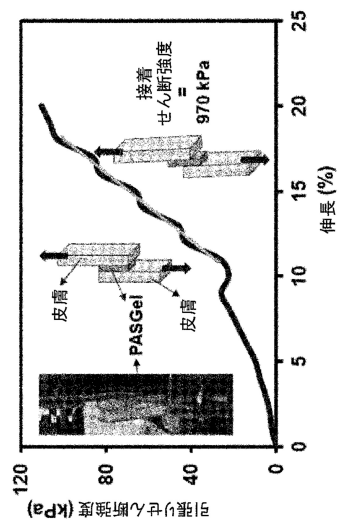
【図4】



【図6】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 L 15/22 (2006.01)	A 6 1 L 31/06	
A 6 1 L 15/24 (2006.01)	A 6 1 L 31/14	5 0 0
A 6 1 L 15/26 (2006.01)	A 6 1 L 31/14	3 0 0
A 6 1 L 15/42 (2006.01)	A 6 1 L 15/22	1 0 0
A 6 1 L 15/44 (2006.01)	A 6 1 L 15/22	1 1 0
A 6 1 L 15/58 (2006.01)	A 6 1 L 15/24	1 0 0
A 6 1 L 15/60 (2006.01)	A 6 1 L 15/24	1 1 0
A 6 1 L 27/14 (2006.01)	A 6 1 L 15/26	1 0 0
A 6 1 L 27/16 (2006.01)	A 6 1 L 15/26	1 1 0
A 6 1 L 27/18 (2006.01)	A 6 1 L 15/42	1 0 0
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L 15/42	1 1 0
A 6 1 L 27/54 (2006.01)	A 6 1 L 15/44	1 0 0
A 6 1 L 27/50 (2006.01)	A 6 1 L 15/44	1 1 0
A 6 1 L 27/52 (2006.01)	A 6 1 L 15/58	1 0 0
A 6 1 K 31/74 (2006.01)	A 6 1 L 15/58	1 1 0
A 6 1 K 31/77 (2006.01)	A 6 1 L 15/60	1 0 0
A 6 1 K 31/78 (2006.01)	A 6 1 L 15/60	1 1 0
A 6 1 K 31/785 (2006.01)	A 6 1 L 27/14	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/16	
	A 6 1 L 27/18	
	A 6 1 L 27/38	
	A 6 1 L 27/54	
	A 6 1 L 27/50	
	A 6 1 L 27/52	
	A 6 1 K 31/74	
	A 6 1 K 31/77	
	A 6 1 K 31/78	
	A 6 1 K 31/785	
	A 6 1 P 35/00	

(72)発明者 デグハニ、ファリバ

オーストラリア、ニューサウスウェールズ 2087、キラニー ハイ츠、メルウッド アベニュー 154

審査官 藤井 勲

(56)参考文献 特開昭63-268780(JP,A)

特開昭64-011113(JP,A)

特開平02-008206(JP,A)

特開平07-097306(JP,A)

特開平08-119822(JP,A)

特開2004-182661(JP,A)

MEHRDAD MAHKAM, Novel pH-sensitive hydrogels for colonspecific drug delivery, DRUG DELIVERY, 米国, 2010年, 17, 158-163

S.DAVARAN et al, Synthesis and characterization of methacrylic derivatives of 5-amino salicylic acid with pH-sensitive swelling properties, AAPS PHARMSCITECH, 2001年, 2, 80

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 8 F 2 2 0 / 0 0 - 2 2 0 / 7 0
C 0 8 F 2 / 0 0 - 2 / 6 0
A 6 1 L 1 5 / 0 0 - 1 5 / 6 4
A 6 1 K 6 / 0 0 - 6 / 9 0
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)