

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3634748号

(P3634748)

(45) 発行日 平成17年3月30日(2005.3.30)

(24) 登録日 平成17年1月7日(2005.1.7)

(51) Int.Cl.⁷

F I

A 6 1 L 27/00

A 6 1 L 27/00

Y

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/36

A 6 1 L 26/00

A 6 1 L 25/00

Z

請求項の数 33 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2000-507002(P2000-507002)
 (86) (22) 出願日 平成10年4月6日(1998.4.6)
 (65) 公表番号 特表2001-513367(P2001-513367A)
 (43) 公表日 平成13年9月4日(2001.9.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA1998/000326
 (87) 国際公開番号 WO1999/007416
 (87) 国際公開日 平成11年2月18日(1999.2.18)
 審査請求日 平成12年2月4日(2000.2.4)
 (31) 優先権主張番号 2,212,300
 (32) 優先日 平成9年8月4日(1997.8.4)
 (33) 優先権主張国 カナダ(CA)

前置審査

(73) 特許権者 503287650
 バイオ・シンテック・カナダ・インコーポ
 レーテッド
 カナダ国ケベック エイチ7ヴィ 4エイ
 7, ラヴァル, パルク・サイエンティフィ
 ック・エ・ドゥ・オート・テクノロジー,
 ブールヴァール・アルマン・フラッピエ
 4 7 5
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠武
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イオン性ポリサッカライドゲルの温度制御pH依存性形成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

キトサンまたはキトサン誘導体に基づくゲルであって、

a) 0.1から5.0重量%のキトサンまたはキトサン誘導体; および

b) 1.0から20重量%の、グリセロリン酸二塩基塩

からなり、20から70℃の範囲内で上記(a)および(b)がゲル化され且つ安定であり、そして動物またはヒトの組織、器官または空洞内でインサイチュにおいて成形されお
 よび/またはゲル化されるために適合される、上記ゲル。

【請求項2】

ゲルが、キトサン-β-グリセロリン酸塩、キトサン-α-グリセロリン酸塩、キトサン-
 グルコース-1-グリセロリン酸塩、およびキトサン-フルクトース-6-グリセロリン
 酸塩からなる群から選択される、請求項1記載のゲル。

【請求項3】

固形微粒子または水溶性付加物が、ゲル化前にゲルと共に取り込まれた、請求項1記載の
 ゲル。

【請求項4】

薬剤、ポリペプチドまたは非生存の薬学上の薬剤が、ゲル化前にゲルと共に取り込まれた
 、請求項1記載のゲル。

【請求項5】

生きた微生物、植物細胞、動物細胞またはヒト細胞が、ゲル化前にゲルと共に封入された

10

20

、請求項 1 記載のゲル。

【請求項 6】

ゲルが、インサイチュにおいて、皮下、腹腔内、筋肉内または生物の結合組織、骨欠損、骨折、間接空洞、体内の導管または空洞、眼の盲嚢、または固形の腫瘍内に形成される、請求項 1 記載のゲル。

【請求項 7】

ゲルが、インサイチュにおいて薬学上の薬剤を含む担体として使用される、請求項 6 記載のゲル。

【請求項 8】

以下の工程：

a) 0.1 から 5.0 重量%の濃度のキトサンまたはキトサン誘導体を有する水性組成物を得るために、2.0 から 5.0 の pH の水性酸性溶液内でキトサンまたはキトサン誘導体を溶解し；そして

b) グリセロリン酸二塩基塩を 1.0 から 20 重量%、工程 a) の水性組成物中に溶解することにより、ゲル溶液を得るが、その際ゲルは 0.1 から 5.0 重量%の濃度のキトサンまたはキトサン誘導体および 1.0 から 20 重量%の濃度のグリセロリン酸二塩基塩を有し、そして 6.4 から 7.4 の pH を有すること

からなる、請求項 1 記載のキトサンまたはキトサン誘導体に基づくゲル溶液を生産するための方法。

【請求項 9】

工程 b) の後に、工程 c)：

c) ゲルの形成まで 20℃から 80℃の範囲の固形化温度において上記ゲル溶液を加熱すること

を含む、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

薬学上の薬剤を、工程 b) のゲル溶液に加える、請求項 8 または 9 記載の方法。

【請求項 11】

上記方法は、工程 b) の後に、工程 i)：

i) 成型内またはヒト以外の動物の組織、器官あるいは体内空洞の何れか内において、上記ゲル溶液のゲル化のために所望の受容器へ分配すること

をさらに含む、請求項 9 または 10 記載の方法。

【請求項 12】

水性酸性溶液を、酢酸、アスコルビン酸、サリチル酸、リン酸、塩化水素酸、プロピオン酸、ギ酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される有機酸または無機酸から製造する、請求項 8、9 または 10 記載の方法。

【請求項 13】

グリセロリン酸塩が、グリセロリン酸二ナトリウム、グリセロリン酸二カリウム、グリセロリン酸カルシウム、グリセロリン酸バリウムおよびグリセロリン酸ストロンチウムからなる群から選択される、請求項 8 記載の方法。

【請求項 14】

ゲル溶液を安定な非ゲル化液体形態にて 0℃から 20℃の範囲の温度にて保持する、請求項 8 記載の方法。

【請求項 15】

固形化温度が 37℃から 60℃の範囲である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 16】

固形化温度が 37℃である、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

キトサンの分子量が 10,000 から 2,000,000 の範囲である、請求項 8、9 または 10 記載の方法。

【請求項 18】

ゲルが、ゲルの pH を調整することにより温度不可逆性あるいは温度可逆性である、請求項 8、9 または 10 記載の方法。

【請求項 19】

ゲル溶液の pH が 6.9 より大きい場合にゲルが温度不可逆性である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

ゲル溶液の pH が 6.9 より小さい場合にゲルが温度可逆性である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 21】

微粒子負荷物が工程 b) のゲル溶液に加えられる、請求項 8、9 または 10 記載の方法。 10

【請求項 22】

ゲル溶液を注射または内視鏡投与により動物あるいはヒト以外の動物の体内に導入し、そして 37℃ の温度にてインサイチュにてゲル化する、請求項 11 記載の方法。

【請求項 23】

化粧品、薬理学、薬物および／または外科手術において使用される生物適合性分解性物質を生成するために使用される、請求項 1 記載のゲル。

【請求項 24】

全体としてあるいは成分として、組織および／または器官の修復、再構成および／または置換の為に動物またはヒトの何れかにおいて移植可能な装置または移植物中へ取り込まれる、請求項 23 記載のゲル。 20

【請求項 25】

移植可能か、経皮か、または皮膚のドラッグデリバリーシステムの全体としてまたは成分として使用される、請求項 23 記載のゲル。

【請求項 26】

眼科移植物またはドラッグデリバリーシステムの全体としてまたは成分として使用される、請求項 23 記載のゲル。

【請求項 27】

生物工学ハイブリッド物質および組織均等物の工学および培養に適用される細胞負荷人工マトリックスを製造するために使用される、請求項 23 記載のゲル。

【請求項 28】

上記負荷された細胞が、軟骨細胞（間接軟骨細胞）、繊維軟骨細胞（メニスカス）、靱帯繊維芽細胞（靱帯）、皮膚繊維芽細胞（皮膚）、腱細胞（tenocyte）（腱）、筋繊維芽細胞（筋肉）、間葉幹細胞およびケラチノサイト（皮膚）からなる群から選択される、請求項 27 記載のゲル。 30

【請求項 29】

細胞負荷されたゲルおよび誘導された産物が、人工間接軟骨細胞および軟骨細胞様組織および器官の培養または工学に、外科手術上または実験室試験の応用の何れかのために捧げられる、請求項 28 記載のゲル。

【請求項 30】

細胞負荷されたゲルおよび誘導された産物が、靱帯、腱、皮膚、骨筋肉およびあらゆる代謝器官のための生きた人工代替物の加工または工学に、外科手術上または実験室試験の応用の何れかのために捧げられる、請求項 28 記載のゲル。 40

【請求項 31】

細胞負荷されたゲルおよび誘導された産物が、間接軟骨細胞、繊維軟骨細胞、軟骨細胞様器官、靱帯、腱、骨組織または皮膚の置換のための生きた代替物として適用される、請求項 28 記載のゲル。

【請求項 32】

細胞負荷ヒドロゲルが、インサイチュにおいてゲル化することにより、繊維軟骨細胞様または軟骨細胞様組織の異所形成を誘導される、請求項 29 乃至 31 のいずれか 1 項記載のゲル。 50

【請求項 33】

ヒト以外の動物の生理学上の位置において骨様、繊維軟骨細胞様または軟骨細胞様組織のインサイチュの成形のための支持体、担体、再構成装置または代替物として作用する注射可能または移植可能なゲル状バイオマテリアルとしての、請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項記載のキトサンまたはキトサン誘導体に基づくゲルの使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景(a) 発明の分野

本発明は、イオン性ポリサッカライドゲル、例えばキトサン／有機ーリン酸塩水性系の温度制御 pH 依存性形成、およびそれらの製造方法に関する。 10

(b) 従来技術の記載

キトサンは、市販の安価なポリマー、キチンまたはポリ（N-アセチルグルコサミン）物質の誘導体である。キトサンは、海洋性動物（魚、甲殻類、エビ、カニ、等）の硬い殻から抽出されるか、または天然生物（接合菌、カビ等）から合成される不溶性バイオポリマーであるキチンの触媒化 N-脱アセチル化を通して生じる D-グルコサミンユニットから主になる。キトサンは、良好な粘弾性を有すると期待され、そして生物活性であり再吸収可能な移植体に理想的とさせる十分な組織適合性および生物分解性を有する。ポリ-D-グルコサミン鎖は、多数のプロテオグリカン分子に付着する能力を有し、そして水性ゲルを形成する繊維状コラーゲンと共存することも知られている。ゲル中のプロテオグリカンの役割は、水を保持して適切な粘弾性を供給することであると信じられる。その結果の細胞外マトリックスは細胞増殖並びに組織形成、特に皮膚、靱帯、骨および軟骨細胞のための適合性環境を提供することが期待される。結果として、キトサンは、生物工学化人工組織の足場または支持材料として多大な興味を引き付ける。 20

【0002】

さらに、キチンおよび部分アセチル化キトサンは、治療用物質または移植可能な材料に関して広範囲に調査されてきた。キトサンをベースにした材料の生物適合性は、特に、血液、創傷および骨に関して検討されてきた。免疫学上および遺伝毒性活性並びにマクロファージ作用に対する刺激効果も様々なキトサン物質を用いて研究されてきた。

【0003】

キトサンおよびその誘導体はゲルを通したドラッグデリバリーシステムに関して探索されてきた（Ohy a Y. et al. (1993) J. Micro-encapsulat ion, 10 (1) : 1-9）。キトサンを用いたペプチドのデリバリーは、鼻内において作用すると提案された。カチオン性コロイド薬剤担体はキトサンーポリカプロラクトンシステムから提案された。キトサン材料により作成された創傷治癒および再構成の装置は、開いた創傷または角膜の創傷、歯周組織および皮膚のために提案されてきた。キトサンは、骨および硬膜物質においておよび止血剤として特に検討されてきた。 30

【0004】

生きたバイオリジカル（細胞、酵素等）の取り込み（entrapment）を、別々のキトサン生成物を用いて調査してきたが、しかしながら、ほとんど全ての細胞において、生きた生物はアルギン酸／キトサンマイクロビーズ中に封入されてきた。軟骨細胞（cartilage cells）の封入はカルシウム-アルギン酸／キトサンビーズ中で提案された。 40

【0005】

ポリリン酸塩を通したキトサンのゲル化が、細胞例えば神経または筋肉スクエトル（squel et al）組織を封入するために奨励されてきた。一般に、酸／水性媒体中のキトサンは細胞懸濁液により負荷され、そしてその結果の混合物を緩衝化五ナトリウム三ポリリン酸中に滴下することにより、細胞負荷キトサンビーズおよびカプセルを形成させた。ポリリン酸塩-ゲル化されたキトサンビーズ内の神経細胞の取り込みは、良好な細胞生存性を導いたが、低い増殖速度を導いた（Zielinski B. A. et al. (1 50

994) *Biomaterials*, 15 (13) : 1049-1056)。大きいかまたは特定の3次元形態の物質は提案されなかった (*Zielinski B. A. et al.* (1994) *Biomaterials*, 15 (13) : 1049-1056)。ポリサッカライドカプセルは生理学上活性な細胞例えばランゲルハンス島を取り込むために提案されてきた (米国特許第4, 391, 909号)。キトサン／塩化水素シスプラチン (*cisplatin*) 混合物を架橋結合してドラッグデリバリーシステムとして提案した。

【0006】

キトサン誘導体は多くの担体組成物または薬剤製剤中に取り込まれた。キトサン物質例えば創傷充填物質または避妊生成物も提案された (米国特許第4, 956, 350号および第4, 474, 769号)。キトサンゲルは再び生きたバイオマテリアル、例えば細胞、バクテリアおよびカビを固定化して封入するための支持体として提案された (米国特許第4, 647, 536号)。キトサンにより作成された眼のドラッグデリバリーシステムも、インサイチュゲル化および成形に関して提案された (米国特許第5, 422, 116号)。

10

【0007】

米国特許第4, 659, 700号において、キトサンゲルがグリセロール／酸／水系からドラッグデリバリーのための生物分解性担体として製造された。その結果のキトサンゲルは、長期間にわたり、そして広範囲の温度、特に4から40℃において、完全な3次元形態を保持して全く安定であると報告された。ゲルおよびゲル様物質は酸－水－グリセロール溶液中で1.1から4.0% w/vのキトサンを溶解することにより加工されたが、その際、酢酸、ギ酸またはプロピオン酸および10-90%グリセロール比率を用いることが好ましく、そして液体塩基例えば水酸化ナトリウム、アンモニウムおよびカリウムまたはアンモニア蒸気を用いて中和する。その結果のキトサン－グリセロールゲル物質のpHは約pH7.0である。中和後に、その結果の物質を静置するとゲルに変わり、そのようなゲルは、見かけ上、キトサン、グリセロールおよび水の相互作用によりもたらされる。遊離のグリセロールまたは水は、見かけ上、報告されなかった。注目すべきは、しかしながら、そのような3次元形態のキトサン－グリセロールゲルは、溶液が予め塩基により中和された場合にのみ生じることである。1片の3次元形態ゲルは容易に積層することができ、並びにゲル様の膜でありうる。グリセロール成分およびキトサン－グリセロールの相互作用の役割は、明らかにされていない。

20

30

【0008】

インサイチュにて成形されたゲルは、米国特許第5, 587, 175号においてイオン性ポリサッカライドと共に提案された。組成物は、ドラッグデリバリー、診断剤の適用、または術後接着の予防のための医学装置として使用することができ、そしてインサイチュにおいてゲル化されうる水性液体媒体からなる。それは、少なくとも一つのイオン性ポリサッカライド、少なくとも一つのフィルム形成ポリマー、および薬物または薬学上の薬剤、水、および任意に、イオン性ポリサッカライドをゲル化できるカウンターイオンを含む (米国特許第5, 587, 175号)。しかしながら、ゲル化は、イオン性ポリサッカライドとフィルム形成ポリマーの間の相互作用によるか、あるいはイオン性ポリサッカライドのカウンターイオン誘導架橋結合により達成される。別のインサイチュ成形ゲルは、ポリオキシアルキレン組成物 (米国特許第4, 185, 618号) またはポリオキシアルキレン／ポリサッカライド混合物 (米国特許第5, 126, 141号) またはインサイチュにおけるアルギン酸／カチオン混合物 (米国特許第4, 185, 618号および第5, 266, 326号) に基づく。

40

【0009】

それらの生物活性を保持しながら細胞および細胞物質を封入するために用いることができる、温度制御pH依存性の成形されたポリサッカライドゲルを提供することが強く望まれる。

【0010】

50

生理温度または 37℃においてその固形状態またはゲル状態を保持するそのようなポリサッカライドゲルを提供することが強く望まれる。

発明の概要

本発明の一つの目的は、それらの生物活性を保持しながら細胞および細胞物質を封入するために用いることができる、温度制御 pH 依存性の成形された (formed) ポリサッカライドゲルを提供することである。

【0011】

本発明の別の目的は、生理温度または 37℃においてその固形状態またはゲル状態を保持するそのようなポリサッカライドゲルを提供することである。

本発明の別の目的は、そのようなポリサッカライドゲルの製造方法を提供することである 10

【0012】

本発明によれば、

a) 0.1 から 5.0 重量%のキトサンまたはキトサン誘導体；および

b) 1.0 から 20 重量%の、ポリオールまたは糖の一リン酸二塩基塩、一硫酸塩およびモノカルボキシル酸塩からなる群から選択されるポリオールまたは糖の塩からなるポリサッカライドに基づくゲルが提供され；

但し、上記ゲルは、20 から 70℃の範囲内で誘導されて安定であり、そして動物またはヒトの組織、器官または空洞 (cavities) 内でインサイチュにおいて成形され (formed) および／またはゲル化されるために適合される。 20

【0013】

塩は以下のいずれかまたは以下の組み合わせのいずれかであってよい：

a) グリセロール-2-リン酸、sn-グリセロール-3-リン酸およびL-グリセロール-3-リン酸の塩を含むグリセロールからなる群から選択される一リン酸二塩基塩；

b) 一リン酸二塩基塩および上記ポリオールは、ヒスチジン、アセトール、ジエチルスチルベストロール、インドール-グリセロール、ソルビトール、リビトール、キシリトール、アラビニトール、エリスリトール、イノシトール、マニトール、グルシトールおよびそれらの混合物からなる群から選択され；

c) 一リン酸二塩基塩および上記糖は、フルクトース、ガラクトース、リボース、グルコース、キシロース、ラムヌロース、ソルボース、エリスルロース、デオキシリボース、ケトース、マンノース、アラビノース、フクロース、フルクトピラノース、ケトグルコース、セドヘプツロース、トレハロース、タガトース、シュクロース、アロース、スレオース、キシルロース、ヘキソース、メチルチオオリボース、メチルチオデオキシリブ 30
ロースおよびそれらの混合物からなる群から選択され；

d) 一リン酸二塩基塩および上記ポリオールは、パルミトイル-グリセロール、リノレオイル-グリセロール、オレオイル-グリセロール、アラキドノイル-グリセロール、およびそれらの混合物からなる群から選択され；そして

e) グリセロリン酸塩は、グリセロリン酸二ナトリウム、グリセロリン酸二カリウム、グリセロリン酸カルシウム、グリセロリン酸バリウムおよびグリセロリン酸ストロンチウムからなる群から選択される。 40

【0014】

本発明の一つの態様による好ましいゲルは、キトサン-β-グリセロリン酸塩、キトサン-α-グリセロリン酸塩、キトサン-グルコース-1-グリセロリン酸塩、およびキトサン-フルクトース-6-グリセロリン酸塩からなる群から選択される。

【0015】

固形微粒子または水溶性付加物を、ゲル化前に上記ポリサッカライドゲルと共に取り込んでよい。

薬剤、ポリペプチドまたは非生存の薬学上の薬剤を、ゲル化前に上記ポリサッカライドゲルと共に取り込んでよい。

【0016】

生存する微生物、植物細胞、動物細胞またはヒト細胞を、ゲル化前に上記ポリサッカライドゲルと共に封入してよい。

ゲルは、インサイチュにおいて、皮下、腹腔内、筋肉内または生物の結合組織、骨欠損、骨折、間接空洞、体内の導管または空洞、眼の盲嚢、または固形の腫瘍内で成形してよい。

【0017】

本発明のゲルは、インサイチュにおいて薬学上の薬剤を送達するための担体として使用してよい。

本発明によれば、本発明のポリサッカライドゲル溶液を生産するための方法も提供され、以下の工程：

a) 0.1 から 5.0 重量%の濃度のキトサンまたはキトサン誘導体を有する水性ポリサッカライド組成物を得るために、約 2.0 から約 5.0 の pH の水性酸性溶液内でキトサンまたはキトサン誘導体を溶解し；そして

b) ポリオールまたは糖の塩であって、一リン酸二塩基塩、一硫酸二塩基塩およびモノカルボキシル酸塩からなる群から選択される塩を 1.0 から 20 重量%、工程 a) の水性ポリオール組成物中に溶解することにより、ポリサッカライドゲル溶液を得るが、その際ポリサッカライドゲルは 0.1 から 5.0 重量%の濃度のキトサンまたはキトサン誘導体および 1.0 から 20 重量%の濃度のポリオールまたは糖の塩を有し、そして約 6.4 から約 7.4 の pH を有すること

からなる。

【0018】

この方法は、工程 b) の後に、工程 c)：

c) ポリサッカライドゲルの形成まで約 20℃から約 80℃の範囲の固形化温度において上記ポリサッカライドゲル溶液を加熱すること

を含んでよい。

【0019】

薬学上の薬剤を、工程 b) のポリサッカライドゲル溶液に加えてよい。

上記方法は、工程 b) の後に、工程 i)：

i) 成型内または組織、器官あるいは体内空洞の何れか内において、上記ポリサッカライドゲル溶液のゲル化のために所望の受容器へ分配すること

をさらに含んでよい。

【0020】

水性酸性溶液は、酢酸、アスコルビン酸、サリチル酸、リン酸、塩化水素酸、プロピオン酸、ギ酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される有機酸または無機酸から製造してよい。

【0021】

上記ポリサッカライドゲル溶液は、約 0℃から約 20℃の範囲の温度において安定な非ゲル化液体形態において保持してよい。

固形化温度は約 37℃から約 60℃、好ましくは約 37℃の範囲である。

【0022】

キトサンの分子量は、約 10,000 から 2,000,000 の範囲である。

ポリサッカライドゲルは、上記ポリサッカライドゲル溶液の pH が > 6.9 である場合、あるいは上記ポリサッカライドゲル溶液の pH が < 6.9 である場合に、ポリサッカライドゲルの pH を調整することにより温度不可逆性あるいは温度可逆性になる。

【0023】

固形の微粒子付加物を、工程 b) のポリサッカライドゲル溶液に加えてよい。

ポリサッカライドゲル溶液は、注射または内視鏡投与により動物またはヒトの体内に導入するか、または約 37℃の温度においてインサイチュでゲル化してよい。

【0024】

本発明によれば、化粧品、薬理学、薬物および／または外科手術において使用される生物

10

20

30

40

50

適合性分解性物質を生成するためのポリサッカライドゲルの使用も提供される。

【0025】

上記ゲルは、全体としてあるいは成分として、組織および／または器官の修復、再構成および／または置換の為に動物またはヒトの何れかにおいて移植可能な装置または移植植物中へ取り込んでよい。

【0026】

上記ゲルは、移植可能か、経皮か、または皮膚のドラッグデリバリーシステムの全体としてまたは成分として、使用してよい。

上記ゲルは、眼科移植植物またはドラッグデリバリーシステムの全体としてまたは成分として使用してよい。

10

【0027】

上記ゲルは、生物工学ハイブリッド物質および組織均等物の工学および培養に適用される細胞負荷人工マトリックスを製造するために使用してよい。

上記負荷された細胞は、軟骨細胞（間接軟骨細胞）、繊維軟骨細胞（メニスカス）、靱帯繊維芽細胞（靱帯）、皮膚繊維芽細胞（皮膚）、腱細胞（tenocyte）（腱）、筋繊維芽細胞（筋肉）、間葉幹細胞およびケラチノサイト（皮膚）からなる群から選択してよい。

【0028】

細胞負荷されたゲルおよび誘導された産物は、人工間接軟骨細胞および軟骨細胞様組織および器官の培養または工学に、外科手術上または実験室試験の応用の何れかのために、捧げられる。

20

【0029】

細胞負荷されたゲルおよび誘導された産物は、靱帯、腱、皮膚、骨筋肉およびあらゆる代謝器官のための生きた人工代替物の加工または工学に、外科手術上または実験室試験の応用の何れかのために、捧げられる。

【0030】

細胞負荷されたゲルおよび誘導された産物は、間接軟骨細胞、繊維軟骨細胞、軟骨細胞様器官、靱帯、腱、骨組織または皮膚の置換のための生きた代替物として適用される。

【0031】

細胞負荷ヒドロゲルは、インサイチュにおいてゲル化されることにより、繊維軟骨細胞様または軟骨細胞様組織の異所形成を誘導する。

30

本発明によれば、動物またはヒトの生理学上の位置において骨様、繊維軟骨細胞様または軟骨細胞様組織のインサイチュの成形のための支持体、担体、再構成装置または代替物として作用する注射可能または移植可能なゲル状バイオマテリアルも提供される。

【0032】

上記ポリサッカライドゲル溶液は、1) 上記ポリサッカライドゲル溶液中で少なくとも一つの相補ポリマーを取り込んで溶解し、そして2) 20℃から60℃の範囲の温度内で透明な3次元ゲルを形成するのに十分な時間、上記ポリサッカライドゲル溶液と相補ポリマーを相互作用させることにより、誘導化ゲルまたはヒドロゲルを製造するために使用してよい。

40

【0033】

相補ゲルは、非イオン性水溶性ポリサッカライドまたはヒドロキシルアルキルセルロースである。

本発明の目的のためには、以下の用語および表現を以下のとおりに定義する。

【0034】

用語「ポリサッカライドゲル溶液」は、ゲル化温度において加熱された場合にゲル化するかまたはゲル状態に変化することができる約0℃から約15℃の範囲の温度において安定な非ゲル化液体形態におけるポリサッカライド溶液を意味することを意図する。

【0035】

用語「ゲル化温度」は、約20℃から約80℃の範囲のあらゆる温度を意味することを意

50

図し、好ましくは約 37℃から約 60℃、そしてより好ましくはおおよそ生理学上の温度または 37℃である。

【0036】

表現「ポリオールまたは糖の塩」は、ポリオールまたは糖の一リン酸二塩基塩、一硫酸二塩基塩およびモノカルボキシル酸塩を意味することを意図する。

本発明は、別々のゲル化物質を成形する方法を包含し、それらの物質は、成型される（カスタム化形態、チューブ、膜、フィルム等）か、または生物環境内でインサイチュにて成形される（組織の欠陥の充填）。

【0037】

好ましい態様によれば、キトサン／有機リン酸塩水性溶液は、キトサンの pK_a より大きい pH を有し、そして温度刺激に際して固形ゲルに変わる。このポリオールゲルは、薬剤の担体としてまたは非生存治療用デリバリーシステムとして、組織および器官の置換物質として、および生存細胞または微生物の封入体として使用することができる。キトサン／有機一リン酸塩ゲルマトリックスは、30から60℃の間の温度において成形される。キトサン／有機一リン酸塩水性系は、注射可能な充填物質として使用され、組織の欠陥を充填して修復するためにインサイチュにおいて注射されて充填される。

【0038】

グリセロールー2ーリン酸、グリセロールー3ーリン酸およびグルコースー1ーリン酸に基づく塩が、本発明による、開示された好ましい塩である。

キトサン／ポリオールーまたは糖ーリン酸塩およびキトサン／ポリオールーまたは糖ー硫酸塩ゲルは、外科手術の再構成および再生用途並びにドラッグデリバリーの目的に応用することができる。それらは、温度可逆性または不可逆性の生物受食性なポリマー性ゲルに、広い範囲の医学／生物技術応用のための生物学上よく知られた適合性の成分を提供する。

発明の詳細な説明

キトサンを酸性水性溶液に溶解することにより、4.3から5.6の範囲の pH レベルを有する透明な水性キトサン溶液を得る。このキトサン溶液を濾過または蒸気オートクレーブにより滅菌し、そして低いプラス温度（4℃）において保存する。有機一リン酸塩成分を好ましくは低いプラス温度（4℃）においてキトサン溶液に加え、次に、吸熱機構を通して30から60℃の範囲の温度において、水性キトサン／有機一リン酸塩混合物を温度によりゲル化する。ひとたび成形されたら、その結果のキトサン／有機一リン酸塩ゲルは180℃までの加熱に対してさえも（オートクレーブにおいて）、特に細胞培養培地中において温度上安定である。キトサン／有機一リン酸塩ゲルの生物封入は、低温（4℃）において非ゲル化水性キトサン／有機一リン酸塩溶液中に生存細胞を取り込むことにより得られる。次に、その結果の混合物のキトサン／有機一リン酸塩／細胞の温度を37℃に上げて維持すると、ゲル化は1時間以内に起こる。ポリオールまたは糖の有機一硫酸塩あるいはモノカルボキシル酸塩は、有機一リン酸塩と同様な役割を有する。

【0039】

キトサンとその誘導体は相対的に安価に市販されている材料であって、生物適合性で分解性のポリマーの引き付けられる群を代表する。それらは、それらの化学組成および／または物理ー化学特性を変化させることにより修飾可能な個体または溶液特性を有する。脱アセチル化の程度および分子量は、溶液の特性、酵素分解性および生物活性に多大に影響することが示されてきた。化学修飾は、例えば、カルボキシル酸、酢酸塩、グルタミン酸、カルボキシメチルまたは硫酸基を取り込むことによりキトサン鎖を中和するかまたは修飾することが提唱されてきた。キトサンのマクロ分子の化学架橋（無水物、グルタルアルデヒド、グルタミン酸スクシニミドーPEG等）は共有結合を誘発することにより、ブランチ化またはグラフト化のネットワークを創製する。

【0040】

キトサンとその誘導体の物理によるゲル化は、別の技術：

a) キトサン鎖の間の水素結合を誘発する中和（NaOH, KOH, NH_4OH . . . ）

;

b) 純粋な静電相互作用を誘発する、二価性アニオン（硼酸塩、モリブデン酸塩、ポリリン酸塩、硫酸塩および硫酸化マクロ分子．．．）を用いたイオン性複雑化；

c) 静電相互作用および界面活性剤－界面活性剤の疎水性相互作用を誘発するアニオン性界面活性剤（アルキル硫酸ナトリウム．．．）を用いた複雑化を用いることにより得ることができる。

【0041】

本発明によれば、水素結合、静電相互作用およびキトサン－キトサン疎水性相互作用を組み合わせた新規なゲル化機構が提唱される。それは、キトサン分子、水分子およびポリオールまたは糖の一リン酸二塩基塩の間の複雑な相互作用を通してのみ達成できる。

10

【0042】

ポリオールは、ゲル特性を改善するために頻繁に組成物に加えられる。ソルビトールおよびマニトールは、張度を増強する薬剤として現在使用されている。グリセロールおよびポリエチレングリコールは、可塑剤として提案される。ポリオール（－ol：グリセロール、ソルビトール．．．）および糖（－ose：フルクトース、グルコース、ガラクトース．．．）は、溶液中の蛋白質の温度安定剤として使用された（Back J. F. et al. (1979) Biochemistry, 18 (23) : 5191-5196）。選択された分子に依存して、それらは、水の構造を作るかまたは破壊し、水素結合を創製し、静電的または疎水的に相互作用し、そして吸熱遷移を表すことが見いだされた（Back J. F. et al. (1979) Biochemistry, 18 (23) : 5191-5196）。ポリオールと糖は、それらの水に対する構造上の効果並びに疎水性相互作用の強化により熱変性に対して蛋白質を安定化する。

20

【0043】

ベータ－グリセロリン酸二ナトリウムまたはカルシウム塩、あるいはグリセロール－2－リン酸二ナトリウムまたはカルシウム塩は、生物科学においてよく研究された分子である。それは、アルカリホスファターゼ（AL）の基質と考えられる。グリセロリン酸塩は筋骨格組織から単離された細胞を培養するための細胞培養培地付加物として広く使用され、そして培養に際して骨／軟骨細胞に送達された場合には、特定のマトリックス成分の合成を誘発するかまたは維持することが示されてきた（Chung C. -H. et al. (1992) Calcif. Tissue Int., 51 : 305-311; Bellow 30
s C. G. et al. (1992) Bone and Mineral, 17 : 15-29）。キトサンのゲル化は如何なる等級または純度のグリセロリン酸塩を用いても起こるが、生きたバイオロジカルな封入は細胞培養試験されたグリセロリン酸塩を必要とする。アルファ－グリセロリン酸二ナトリウムまたはカルシウム塩、またはグリセロール－3－リン酸二ナトリウムあるいはカルシウム塩も、生物学上重要な有機塩である（Chung C. -H. et al. (1992) Calcif. Tissue Int., 51 : 305-311）。グリセロリン酸塩は、卵、大豆および魚のよく知られた生物分子であるホスファチドであるレシチンの加水分解を通して得られるグリセロリン酸から得られる。グリセロリン酸は2つの異性体構造、アルファとベータとして存在し、ベータ－グリセロリン酸は光学上は不活性であり、アルファ－グリセロリン酸は光学上活性である。グリセ 40
ロリン酸は生理学上活性な化合物であり、炭水化物の代謝に関与する。グリセロリン酸塩デヒドロゲナーゼも神経組織中では活性であることが見いだされたが、グリセロリン酸塩はモルモットの神経によるメチレンブルーの脱定着速度を加速することが報告された。アルファ－グリセロリン酸塩は新鮮な筋肉抽出物中において乳酸を生成するために酸化－還元反応を通してピルビン酸と相互作用する。グリセロリン酸は、現在、二ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、二カリウム、ストロンチウムおよびバリウム塩として、相対的に強塩基性の特性を有すものとして市販されている。アルファおよびベータ－グリセロリン酸塩の両者は、ポリオールまたは糖リン酸塩の間で、有機一リン酸二塩基塩の安価な容易に利用可能な源である。

【0044】

50

水性溶液中のキトサンの可溶化は、3.0から5.0の範囲のpHを有する酸性水性溶液内に達するキトサン鎖のアミン基のプロトン化を必要とする。可溶化された場合、pHが約6.2になるまでキトサンは可溶性のままである。アルカリによる酸性キトサン溶液の中和は、pHの上昇並びにアミン基の脱プロトン化をもたらす。約6.3-6.4におけるキトサンのpKaを超えるpHへのキトサン溶液の中和は、水和された3次元ネットワークであるキトサングルを誘発する、OH-HNおよびO-HN内部鎖をもたらす。6.3-6.4を超えるpHにおいては、キトサン溶液は通常の温度範囲において(0-60℃)系統的にキトサングルをもたらす。しかしながら、有機リン酸塩のキトサン水性溶液への添加はキトサン/有機リン酸塩溶液のpHを上昇させ、6.5を超えて7.2まででさえも長期間ゲル化されず液体のままである。この新-中性キトサン/有機リン酸塩水性溶液(pH6.5-7.2)は、十分な温度により刺激された場合に、ゲルになる。ゲル化の時間は温度により制御される。例えば、37℃において約30分でゲル化するキトサン/有機リン酸塩溶液は、60℃においてはゲルを形成するのにほんの2分を要求するのみである。

【0045】

ゲル化の機構並びにゲルの特性は、全てのキトサン/有機リン酸塩系に関するのと同様であることが期待される。即ち、より詳細に調査されてきたキトサン/β-グリセロリン酸塩溶液のゲル化は典型的な例であると考えることができる。キトサン/β-グリセロリン酸塩溶液に関するゲル化のpH依存性および温度依存性を示す結果は、図1および2に示されるゾル-ゲルダイアグラムに要約される。ゲル強度に加えて、図3に示される流動実験は、明瞭に、加熱に際してキトサン/β-グリセロリン酸塩溶液のゲル化が生じることを示す。約60℃において出現する率の変化は、ゾルからゲルへの遷移およびゲル形成の前兆である。ゲル形成のためのこの温度は、溶液の特性および加熱速度(必要な活性化のエネルギー)に依存することになる。

【0046】

キトサン/β-グリセロリン酸塩ゲルの孔構造は、図4に示すとおり、走査型電子顕微鏡により証明された。該ゲルは、約100ミクロンのチェンバーと約10ミクロンの孔を有する典型的なミクロ構造を有する。それらのミクロ構造は、ラメラ立体構造が存在した場合の、単純な中和により加工されたキトサングルにおいて観察された構造とは異なる。

【0047】

他の重要な特性は、キトサン/β-グリセロリン酸塩が溶液の注射可能性およびインビボゲル化に関係する。注射とゲルは典型的に図5Aおよび5Bに示される。図5A中の黒い矢印は、側副靱帯と下腿(patellar tendon)の間の膝の間接内ゾーンにおいてインサイチュに成形されたゲルを示す。他のゲルは皮膚と脚部筋肉の間において皮下にて成形する。図5B中の黒い矢印は、胴領域においてインサイチュにて皮下にて成形されたゲルを示す。

【0048】

キトサン/有機リン酸塩ゲルにおいて、有機リン酸塩アニオンは、キトサンマクロ分子鎖の架橋結合に寄与するが、無機二価アニオン、例えば硫酸塩、シュウ酸塩、リン酸塩またはポリリン酸塩(ピロリン酸塩、メタリン酸塩またはトリポリリン酸塩)によるキトサンのゲル化の間に生じる純粋なイオン性架橋結合における様式とは異なる。キトサン水性溶液は、無機二価アニオンの存在下、そして溶液のpH値とは独立に、即座にゲルに変わる。さらに、温度の上昇は、この種の系のゲル化のための都合の悪い因子を構成する。対照的に、キトサン/有機リン酸塩溶液のゲル化は、キトサン/有機リン酸塩溶液の最終pHおよび温度の両方に依存する。キトサン/有機リン酸塩の如何なる溶液も、そのpHが6.45未満にある限り如何なる温度においてもゲル化できず、そして6.45を超えるpHを有するキトサン/有機リン酸塩の如何なる溶液も即座のゲル化無しに20℃において製造することができ、そしてゲルに変わることなく4℃において長期間保存できる。37℃においては、6.9を超えるpHを有するキトサン/有機リン酸塩溶液のみがいくぶん迅速にゲル化されうる。キトサン溶液中の有機リン酸塩分子の存在がキ

トサン鎖の静電相互作用、疎水性相互作用および水素結合に直接影響することが予測される。即ち、キトサン／有機リン酸塩ゲルの形成に関与する主な相互作用は本質的に：1) キトサン／キトサン内部鎖水素結合 ($\text{CHITOSAN}-\text{CHITOSAN}$)；2) マクロ分子鎖のアモニウム基と有機リン酸分子のリン酸基の間のキトサン／有機リン酸塩静電引力 ($\text{CHITOSAN}-\text{PHOSPHATE}$)；3) 水分子上のポリオールまたは糖部分の構造作用を通して誘発されたキトサンーキトサン疎水性相互作用になる。水のポリオール部分の構造作用はキトサンー水の相互作用を減じ、よって、キトサンーキトサン相互作用を増強する。そのようなゲル化の重要な側面は、温度を上昇させるに際して増強される、のちのポリオールー水誘発キトサン疎水性引力を本質的には起源とする（温度制御ゲル化）。低い温度においては、キトサンー水の強い相互作用が水和キトサンマクロ分子を凝集から防御する。水分子のシースの加熱に際しての除去は、キトサンーキトサン相互作用を援助して増強し、よって、マクロ分子の対合を誘発する。しかしながら、2つの第1の引力 ($\text{CHITOSAN}-\text{CHITOSAN}$ および $\text{CHITOSAN}-\text{PHOSPHATE}$) がキトサン／有機リン酸塩溶液中で完全に使用不可能であるなら、決してゲル化は起こらない。これは、キトサン／有機リン酸塩系の温度制御ゲル化をなおも統括するpH依存性を説明する。そのような $\text{CHITOSAN}-\text{PHOSPHATE}$ 静電引力は存在するが、非適合性ステアリン酸の妨害のために、リン酸基はキトサン鎖の唯一の架橋剤となりえない。これは、このゲル化機構を、リン酸またはポリリン酸塩二価アニオンによるキトサンの純粋なイオン性のゲル化と、意味深長に区別させる。純粋なイオン性架橋結合は温度制御性または刺激性ではないはずである。

【0049】

この種の温度制御pH依存性ゲル化は、キトサン溶液中の有機リン酸二塩基塩により特別に誘発されるが、しかしながら、それは、他の有機塩類、例えばポリオールまたは糖の一硫酸塩類、例えばポリオールー硫酸塩または糖一硫酸塩、あるいはポリオールまたは糖のモノカルボキシル酸塩により同じく誘発される。例えば、本発明によれば、キトサン／グルコースー1ー硫酸塩溶液はゲル化されることによりキトサン／グルコースー1ーリン酸塩溶液投薬量となることが期待される。

【0050】

低温において（4℃）成形できて保存でき、そして生理学上の温度において3次元の安定なキトサン／有機リン酸塩ゲルヘトランスフォームされうる水性キトサン／有機リン酸塩溶液を提供することも、本発明の目的である。それは、生きたバイオロジカルに対して低い毒性を有し且つ細胞生存性を保持する、成分およびプロセスの両方を有する、哺乳類またはヒト環境のための非毒性生物適合性成分を含む。該ゲルは、生理学上の温度において長期間並びにアミノ酸、イオンおよび蛋白質を含む生理水性媒体中において、良好な機械的／操作上の性能をも提供する。キトサン誘導体は、キトサン／有機リン酸塩ゲルを加工するのと同様に選択されてよく、そしてキトサンのN、Oー置換体を含む。

【0051】

表現「有機リン酸（塩）」は、本明細書において、限定ではないが、ポリオールまたは糖の一リン酸二塩基塩、例えば、ポリオールーリン酸二塩基塩または糖一リン酸二塩基塩を意味する。有機硫酸（塩）も、本明細書においては、ポリオールまたは糖の一硫酸塩、例えばポリオールー硫酸塩あるいは糖一硫酸塩を意味する。好ましい有機一硫酸塩は、グリセロールの一リン酸二塩基塩から選択してよく、グリセロールー2ーリン酸、snーグリセロールー3ーリン酸および1ーグリセロールー3ーリン酸の塩（アルファーグリセロリン酸またはベーターグリセロリン酸）、ヒスチジノール、アセトール、ジエチルスチルベストロール、インドールグリセロール、ソルビトール、リビトール、キシリトール、アラビニトール、エリスリトール、イノシトール、マニトール、グルシトールお、パルミトイルーグリセロール、リノレオイルーグリセロール、オレイルーグリセロールまたはアラキドノイルーグリセロールの一リン酸二塩基塩、およびフルクトース、ガラクトース、リボース、グルコース、キシロース、ラムヌロース、ソルボース、エリスルロース、デオキシリボース、ケトース、マンノース、アラビノース、フクロース、フルクトピラノース

、ケトグルコース、セドヘプツロース、トレハロース、タガトース、シュクロース、アロース、スレオース、キシロース、ヘキソース、メチルチオオリボースまたはメチルチオデオキシリブロースの一リン酸二塩基塩を意味する。他の興味のある一塩（硫酸塩、カルボキシリン酸塩）を同じポリオールまたは糖から誘導してよい。

【0052】

表現「グリセロリン酸塩」は、本明細書においては、アルファグリセロリン酸塩またはベータグリセロリン酸塩の異性体両方を意味する。アルファグリセロリン酸塩はグリセロール-3-リン酸塩（全ての光学エニアンタマー（enantiomer））に関して区別なく呼ばれ、ベータグリセロリン酸塩は同様にグリセロール-2-リン酸塩に関して呼ばれる。

10

【0053】

表現「3次元」は、本明細書においては、溶液が最初に注入され、ポリマー溶液が同時にゲル化して成型により造形される事実を意味する。ゲルは、ガラスまたはプラスチックのビーカー、皿、チューブ中または2つのプレート間に生成することにより、あらゆる期待された形態を得ることができる。

【0054】

表現「インサイチュゲル化」は、本明細書においては、哺乳類またはヒト環境、例えばあらゆる組織（筋肉、骨、靱帯、軟骨細胞）および器官の特定の部位内への液体キトサン／グリセロリン酸塩溶液の注入による、キトサン／有機一リン酸塩ゲルの形成を意味する。インサイチュのゲル化は組織の欠損または体内の空洞の完全且つ正確な充填を可能にする。キトサン／有機一リン酸塩混合物のゲル化は生理学上の温度において誘発される。

20

【0055】

表現「吸熱ゲル化」は、本明細書において、所望の温度において静置に際して溶液のゲル化を可能にするキトサン／有機一リン酸塩溶液の温度機構を意味する。キトサン／有機一リン酸塩系のゾルからゲルへの遷移の誘発は、例えば温度を解したエネルギーを必要とする。

【0056】

表現「細胞または細胞物質（cellular matters）」は、本明細書において、生きたバイオロジカル、例えば単離細胞、細胞分散物、細胞凝集物、細胞スフェロイドまたは固形ミクロスフェア粒子に接着された細胞を意味し、それらはキトサン／有機一リン酸塩ゲル中に封入される。

30

【0057】

表現「インサイチュ成形（forming）」は、本明細書において、非ゲル化キトサン／有機一リン酸塩液体溶液を体内部位（例えば、結合組織、体内の導管、間接空洞、骨折、骨欠損．．）に投与し、そして該体内部位において生理学上の温度においてポリサッカライド溶液のゲルへの完全なゲル化を誘発して保証する方法を意味する。

キトサン／有機一リン酸塩ゲルの形成

選択された有機一リン酸塩は、本明細書においてグリセロリン酸塩であったが、同様な結果はポリオールまたは糖の他の一リン酸二塩基塩を用いて達せられた。粉末形態のキトサンを、透明な溶液が得られるまで、水性酸性溶液に溶解する。キトサンの比率は、0.5から5.0% w/v、好ましくは1.0から3.0% w/vに変わる。水性キトサン溶液のpHは、4.5から5.5の範囲である。水性キトサン溶液を、インライン滅菌フィルター（0.22マイクロメートル）を用いた濾過によるか、または蒸気オートクレーブ（120℃）によるかのいずれかにより、滅菌することができる。キトサン／グリセロリン酸塩ゲルの滅菌は、粘度のために濾過することができないかまたは温度感受性のために蒸気オートクレーブできないが、ガンマ照射により実施できるかまたは厳密な滅菌手法により達せられうる。新しく調製された水性キトサン溶液は低いプラス温度（4℃）にて保存することが好ましい。微粉末の形態になったグリセロリン酸塩を、4から15℃の範囲の温度、好ましくは10℃において水性キトサン溶液に加えてその中に溶解する。6.5から7.2の範囲のpHを有する透明で均一なキトサン／グリセロリン酸塩水性溶液が達成

40

50

されたら、上記溶液を所望の受容器に注入して、適切な温度で維持してゲルにする。水性溶液の形態のグリセロリン酸塩を使用してもよい。

【0058】

それらの最終 pH に依存して、キトサン／グリセロリン酸塩溶液は温度可逆性あるいは不可逆性ゲルの何れかを導くと予測される。可逆性ゲルは 6.5 から 6.9 の範囲の pH を有するキトサン／グリセロリン酸塩溶液から生じ、不可逆性ゲルは 6.9 を超える pH を有するキトサン／グリセロリン酸塩溶液から生じる。酸性キトサン溶液のために使用される酸の性質は、キトサン／グリセロリン酸塩系のゾルからゲルへの遷移に根本的には影響しない。キトサン／グリセロリン酸塩溶液の最終 pH は、水／酸溶液の pH 並びにキトサンとグリセロリン酸塩の濃度に依存する。キトサンとグリセロリン酸塩は 2 つのアルカリ性成分であるとおおり、それらは、溶解されれば酸性溶液を pH を上昇させる傾向にある。キトサンとグリセロリン酸塩の濃度のバランスをとることによりキトサン／グリセロリン酸塩溶液の適切な pH を達成できるが、その際両成分の溶解性の限度、特にキトサンの溶解性限度を考慮する。

10

3次元の一体構造のゲル

選択された有機ーリン酸塩は本明細書においてグリセロリン酸塩であったが、同様な結果は、ポリオールまたは糖の他のーリン酸二塩基塩、一硫酸塩またはモノカルボキシル酸塩を用いて達せられた。キトサン／グリセロリン酸塩溶液を満たした受容器または成型を 30 から 60℃ の範囲の温度、好ましくは 37℃ において加熱する。37℃ におけるキトサン／グリセロリン酸塩溶液のゲル化は、標準の細胞培養インキュベーター中で実施することができる。数日から 1 週間（30℃ において）から数分（60℃ において）の範囲の期間の後にゲルに変わるまで、該溶液を所望の温度に維持する。37℃ においては、キトサン／グリセロリン酸塩溶液のゲル化は約 1 時間で起こる。3次元キトサン／グリセロリン酸塩ゲルの形成があれば、上記ゲルは型から取り出して蒸留水中で洗浄する。キトサン／グリセロリン酸塩ゲルは安定なままであり、そして高温の 120℃（オートクレーブ中）においてさえも 3次元の形状を保持する。

20

ゲルのインサイチュ成形

選択された有機ーリン酸塩は本明細書においてグリセロリン酸塩であったが、同様な結果は、ポリオールまたは糖の他のーリン酸二塩基塩、一硫酸塩またはモノカルボキシル酸塩を用いて達せられた。キトサン／グリセロリン酸塩溶液のインサイチュのゲル化は、皮下注射シリンジから上記溶液を分配することにより実施できる。必要であれば、上記溶液は、ゲル化の最初のサインが出現するまで所望の温度、理想的には 37℃ において上記シリンジと上記キトサン／グリセロリン酸塩溶液を維持することにより予めゲル化してよい（温度によるゲル化を開始する）。できたキトサン／グリセロリン酸塩混合物を次に投与することにより、組織の欠損または空洞を満たしてインサイチュのゲル化プロセスを完了する（37℃ において）。キトサン／グリセロリン酸塩溶液の注射は、しかしながら、該溶液の注射可能性または押し出し特性を制御する上記溶液の粘度により制限される。20 またはそれ未満のゲージを有する針は、そのようなゲル溶液の注射のための理想的な材料である。体内の空洞および組織の欠損は該溶液の受容物として作用するが、上記液体物質は開かれた水性環境内に残る。上記キトサン／グリセロリン酸塩溶液の適合性および分散性は、溶液および材料の特性に依存する。増大した粘度は、よりコンパクトでより低い適合性のゲルのインサイチュ成形をもたらす。

30

40

キトサン／グリセロリン酸塩ゲルによる生きたバイオロジカルの封入

選択された有機ーリン酸塩は本明細書においてグリセロリン酸塩であったが、同様な結果は、ポリオールまたは糖の他のーリン酸二塩基塩、一硫酸塩またはモノカルボキシル酸塩を用いて達せられた。生きた細胞または細胞物質は現在の細胞培養技術を用いて調製した。細胞または細胞物質は低いプラス温度、4 から 20℃、理想的には 20℃ において、上記水性キトサン／グリセロリン酸塩溶液中に取り込まれて均質化した。上記キトサン／グリセロリン酸塩混合物を負荷した細胞または細胞物質を所望の皿またはウェル中に注入して、37℃ においてインキュベートした。最少培地または添加された細胞培養培地を、キ

50

トサン／グリセロリン酸塩物質を負荷された上記細胞または細胞物質を含む上記皿またはウェルに加えることにより、生きたまま保持し、そして生きた封入バイオロジカルの代謝活性を保持した。キトサン／グリセロリン酸塩ゲルの形成後は、細胞培養培地を2日ごとに新しくした。

【0059】

上記溶液およびゲル中の細胞の生存性は、異常なモル浸透圧濃度 (osmolality) により減じられる可能性がある。キトサン／グリセロリン酸塩系は、イオン性グリセロリン酸塩成分に依存して、変わったモル浸透圧濃度を有する。もっとも高いのはグリセロリン酸塩成分であり、もっとも高いのは上記溶液のモル浸透圧濃度であり、そしてもっとも大きいのは細胞生存性の悪化である。生物学上の封入のための理想的なモル浸透圧濃度は270から340 mOsmol/kg付近である。生きた細胞または細胞物質を負荷されたキトサン／グリセロリン酸塩物質の注射およびインサイチュゲル化は同様な様式において検討することができる。細胞または細胞物質は、注射およびゲル化前に、上記水性キトサン／グリセロリン酸塩溶液内で低いプラス温度において導入される。グリセロール-2-リン酸二ナトリウム塩の含有量とモル浸透圧濃度の間に直接の関係が存在する。そのようなモル浸透圧濃度の問題を減じるためには、グリセロリン酸塩含有量をできるかぎり低く保持しながら、上記キトサン／グリセロリン酸塩の最終pHをその所望の値に調節する。しかしながら、低い含有量のグリセロリン酸塩の制限は、温度制御pH依存性ゲル化を処理するために達成せねばならない。

キトサンに基づくゲルの治療用途と他の用途

前記のとおり、キトサン／有機リン酸塩または有機硫酸塩ゲルは、ドラッグデリバリーシステムの理想的な材料である。ゲル化前に固形微粒子または水溶性添加物を取り込んだ、インサイチュゲル様形成媒体は、治療または診断される体内部位に局所的に直接投与することができる。抗バクテリア性、抗カビ性、ステロイドあるいは非ステロイド抗炎症性、抗癌性、抗繊維症性、抗ウイルス性、抗グルコーマ性、縮瞳性および抗コリン性、抗精神性、抗ヒスタミン性およびうっ血性、麻酔性および抗寄生虫性薬剤を上記組成物およびゲル中に取り込んでよい。同様な様式において、ポリペプチドまたは非生存薬剤を、回復、再構成または再生の目的で上記組成物およびゲル中に取り込んでよい。

【0060】

生きた微生物、植物細胞、動物細胞またはヒト細胞を、ゲル化の前に、導入により上記ポリサッカライドゲル内に全く同じくトラップしてよい。細胞または微生物を負荷されたゲルは薬物中において生物工学の目的または他の工業上のエリア内で適用してよい。キトサンに基づくインサイチュ形成ゲルは、皮下、筋肉内、腹腔内または生物学上の結合組織、骨の欠損、骨折、間接空洞、体内の導管または空洞、眼の盲嚢、または固形の腫瘍内等に成形することができる。

【0061】

本発明は、本発明の範囲を限定するよりも本発明を例示するために提供される以下の実施例を参照することにより、より容易に理解されることになる。

実施例 I

キトサン／有機リン酸塩系の典型的なゲル化

実験1:

典型的な実験は、水性酢酸溶液 (0.1 M) 10 ml 中に0.2 gのキトサンを溶解することにより実施した。酢酸溶液のpHは水酸化カリウム溶液 (1 M) を滴下することにより、前もって4.0に調節した。そうして得られた2% (w/v) のキトサン溶液は約5.6のpHを有した。次に、0.800 gのグリセロリン酸二ナトリウム塩5水和物を該キトサン溶液に加えて10℃において溶解した。その結果の均質な液体混合物のpHは7になる。この混合物を、37℃において、バルクゲル化プロセスを達成するのに十分な時間である2時間の間、インキュベーター中においてガラス製シンチレーションバイアルに滴下した。その結果のバルクゲルを蒸留水の新たなバスに浸すことにより、過剰なグリセロリン酸塩を除去した。

【0062】

同様な結果は、グリセロリン酸二ナトリウム塩（またはグリセロール-2-リン酸二ナトリウム塩）をアルファ-グリセロリン酸二ナトリウム塩（またはグリセロール-3-リン酸二ナトリウム塩）に代えた場合に達せられた。

実験2：

均質なキトサン／グリセロリン酸塩溶液を実験1におけるとおりに調製して、1.6 mm の中間スペースを有するガラスプレートゲルサンドイッチを有する、二元（dual）ゲルキャスターに入れ、そして該系をオープン中で37℃に維持した。ゲルの膜の形成は2時間以内に達せられ、そして該膜は上記ゲルキャスターから取り出した。

実験3：

固形粒子形態の0.110 gのヒュームドシリカを、10 mlの水性酢酸溶液中に0.200 gのキトサンを溶解して調製された溶液中に分散させた。0.800 gのグリセロリン酸二ナトリウム5水和物を、上記キトサンシリカ分散液に加えた。その結果の組成物を、37℃に維持した水浴中のガラス製シンチレーションバイアル中に入れた。キトサン／グリセロリン酸塩成分のゲル化は2時間以内に観察され、そして該キトサン／グリセロリン酸塩ゲルは分散した固形のシリカ粒子を含む。

実験4：

0.200 gのキトサンを実験1におけるとおりに酢酸溶液中に溶解した。1.239 gのグルコース-1-リン酸二ナトリウム塩4水和物を加えて溶解することにより、透明なキトサン／グルコース-1-リン酸塩溶液を達成した。ガラスシンチレーションバイアル中に置いたこのキトサン／グルコース-1-リン酸塩溶液を37℃に保持した。ゾルからゲルへ遷移は37℃において3時間以内に起こる。その結果のバルクゲルを蒸留水の新たなバス中に浸すことにより、過剰なグルコース-リン酸塩を除去した。

【0063】

実験4に記載されたとおりに実験を実施したが、但し、1.239 gのグルコース-1-リン酸塩を0.100 gのフルクトース-6-リン酸二ナトリウム塩2水和物に代えた。

【0064】

実施例 I I

溶液のpHに対する組成物の効果とゲル化の発生

水／酢酸から作成した母液の酸溶液を全ての実験のために調製した。この母液の酸溶液のpHは4.0に調整した。高分子量（M. w. 2,000,000）のキトサン粉末を多量の上記母液酸溶液に加えて溶解することにより、0.5から2.0 % w/vの範囲のキトサン比を有するキトサン溶液を生成した（表1）。表1は、異なるサンプルのための測定されたpHを報告する。

【0065】

【表1】

表 1

キトサン水性溶液とpHレベル

キトサン濃度 (w/v)	0.5	1.0	1.5	2.0
キトサン溶液のpH	4.68	4.73	5.14	5.61

【0066】

グリセロリン酸塩を上記キトサン溶液に加えてpHの上昇を誘発する。表2は、グリセロリン酸塩濃度の、異なるキトサン溶液に対する効果を示す。グリセロリン酸塩の濃度は0.065から0.300 mol/Lの範囲である。ガラスバイアル中のキトサン／グリセロリン酸塩溶液は60℃と37℃において保持し、そしてバルクおよび均一のゲル化が60℃において30分以内および37℃において6時間以内に記録された（表2および図1

10

20

30

40

50

）。キトサンとペーターグリセロリン酸塩成分は水性溶液中において個々にpHの上昇に影響し、そして結果としてゾルからゲルへの遷移に影響する。溶解した物質と同様に、母液の水／酢酸溶液の初期pHもゾルからゲルへの遷移に影響するはずであるが、この可能性のある効果はこの溶液のpHに依存するキトサンの溶解性のカウンター作用により制限されるらしい。

【0067】

【表2】

表 2

キトサン／グリセロリン酸塩組成物のゲル化

キトサン濃度(w/v)	1. 5			2. 0		
キトサン溶液のpH	5. 14			5. 61		
GP濃度(mol/L)	0.130	0.196	0.260	0.130	0.196	0.260
キトサンGP溶液のpH	6.64	6.83	6.89	6.78	6.97	7.05
ゲル化						
60℃	<30分	<30分	<30分	<30分	<30分	<30分
37℃	なし	なし	なし	なし	<6時間	<6時間

【0068】

実施例III

キトサン／グリセロリン酸塩系のゲル化の温度可逆性

第1のキトサン／グリセロリン酸塩溶液は、0.200gのキトサンと0.800gのグリセロリン酸二ナトリウム塩5水和物を加えて溶解することによりpH4.0の母液水／酢酸溶液10mlから調製した。その結果のキトサン／グリセロリン酸塩溶液は、約7.05のpHを有し、そして迅速にゲル化する60℃において加熱する。該キトサン／グリセロリン酸塩ゲルを約0-4℃の温度において冷却するが、時間とともに遷移は観察されず、ゲルは4℃において安定なままである。このキトサン／グリセロリン酸塩ゲルは温度不可逆性である。

【0069】

第2のキトサン／グリセロリン酸塩溶液は、0.100gのキトサンと0.800gのグリセロリン酸二ナトリウム塩5水和物を加えて溶解することによりpH4.0の母液水／酢酸溶液10mlから調製した。該キトサン／グリセロリン酸塩溶液は約6.78のpHを有し、そしてゲル化のために60℃において加熱する。その結果のキトサン／グリセロリン酸塩ゲルを次に約0-4℃の温度に冷却すると、一定期間後にゲルからゾルへの遷移が観察される。ゲルは低いプラスの温度、例えば4℃において液体溶液に戻る。この溶液を再び60℃において加熱すると、逆の機構（ゾルからゲルへの遷移）が再び出現し、ゲルが再形成される。ゾルからゲルそしてゾルへの遷移は温度4℃と60℃の間で再現性がある。このキトサン／グリセロリン酸塩ゲルは温度可逆性である。上記キトサン／グリセロリン酸系のゾルからゲルへの温度可逆性は、該キトサン／グリセロリン酸塩溶液のpHに圧倒的に依存することがわかった。pHおよび観察された可逆性の例を表3に提供する。キトサン／グリセロリン酸塩系の実験観察は、ゾルからゲルへの機構の温度可逆性がキトサン／グリセロリン酸塩溶液のpHにて6.9の近傍において変化することを示す。pHが6.5と6.9の間に含まれる場合、キトサン／グリセロリン酸塩溶液の可逆性ゲル化が生じる。極めて類似の結果は、ポリオールまたは糖の他の一リン酸二塩基塩、例えばグルコース-1-リン酸塩を用いて、観察された。

【0070】

【表 3】

表 3

2. 0%w/vキトサン濃度に関する
ゾルからゲルへの可逆性に対するpHの効果

GP濃度 (モル/L)	0.130	0.163	0.196	0.260
キトサン-GPゾルpH	6.78	6.87	6.97	7.05
4℃-60℃における ゾルからゲルへの 可逆性	可逆性、循環	可逆性、循環	不可逆性	不可逆性

10

【0071】

実施例 I V

キトサン／グリセロリン酸塩物質のインサイチュゲル化

成体ニュージーランドホワイトラビットを、ペントソルビタールナトリウムの静脈内投与（1ml/kg）により麻酔して、3時間麻酔したまま保持した。3時間後、麻酔剤の過剰投与により犠牲にして、死後も実験を継続した。動物を仰向けに保ち、上部四肢の局所ゾーンおよび胴領域を剃毛した。皮膚を切開して四肢の皮下繊維膜および筋肉を遊離させた。

20

【0072】

2つのキトサン／グリセロリン酸塩溶液を予め調製し、皮下注射用シリンジに入れて低温（4-10℃）に維持した：溶液 I は2.7%w/v低分子量キトサンおよび9.0%w/vグリセロリン酸塩であり、溶液 II は2.5%の中分子量キトサンおよび9.0%w/vグリセロリン酸塩であった。シリンジに21番の針を装備した。該キトサン／グリセロリン酸塩溶液は厳密な滅菌条件下では製造または保管しなかったが、なぜならば、動物実験は約4-5時間の期間内で実施されるからである。多量の溶液 I の1.0-1.5mlの（a）を繊維膜内に皮下注射し、一方、溶液 I の2.0mlの（b）を膝間接カプセルを通して間接空洞に注射した。溶液 II の1.0mlの（c）を胴領域において皮下注射した。全ての注射部位は、必要とされる切り出された組織とともに回収された。インサイチュのゲル化は3時間許容され、次に、上記部位を再度開くかまたは切り出してインサイチュにて形成されたゲルを回収した。

30

【0073】

【表 4】

表 4

ゲルの注射とインサイチュ形成

40

	[キトサン] % w/v	体積	注釈
皮下、脚部	2.7	1.5	ゲルは伸長して組織表面に適合
間接内部、膝間接	2.7	2.0	ゲルは伸長して間接体積輪郭に適合
皮下、胴	2.5	1.0	ゲルは伸長せず滴下形状のまま保持

50

【0074】

実施例 V

哺乳類細胞の封入

2. 5% w/v のキトサン水性溶液を前記のとおり製造した。1.98 g のキトサン溶液を 0.18 g のベーターグリセロリン酸二ナトリウム塩、0.4 ml のダルベッコ修飾イーグル培地 F12 であって但し動物軟骨細胞が分散した培地、および 0.2 ml のダルベッコ修飾イーグル培地 F12 と混合した。軟骨細胞はウシの肩の軟骨細胞表面から単離して初期単層培養物から回収した。ダルベッコ修飾イーグル培地 F12 は、デキサメタゾン、アスコルビン酸および 10% の胎子ウシ血清を含む。全部のキトサン溶液、キトサン／グリセロールー２ーリン酸溶液および手順 (procedures) は滅菌した。キトサン／グリセロールー２ーリン酸塩分散中の軟骨細胞が注がれたら、ゲル化まで 37℃ においてインキュベーター中に置かれる。キトサン／グリセロールー２ーリン酸塩系のゲル化は 2 時間以内に観察される。軟骨細胞を負荷したキトサン／グリセロールー２ーリン酸塩ゲルの生存可能性試験は、10% から 70% の範囲の生存軟骨細胞を示唆する。微生物、植物細胞、動物細胞またはヒト細胞のキトサン／グリセロールー２ーリン酸塩ゲルへの封入は、期待された生存可能性に依存する特性を変化させることにより実施できる。

10

【0075】

本発明はそれらの特定の態様に関連して記載されてきたが、さらに修飾可能であり、そして本出願は本発明のあらゆる変更物、用途、または適合を包含することを意図し、一般には本発明の原理に従い、そして発明が属する技術分野内の既知のあるいは習慣的な実務の範囲にあり、そして上記の本質的な特徴に適用してよく、そして請求の範囲に従う、本発明のそのような逸脱を含むと認識されることになる。

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、キトサン濃度 (重量%)、グリセロリン酸塩濃度 (重量%) およびキトサン／グリセロリン酸塩水性溶液の pH により特徴付けされるキトサン／グリセロリン酸塩水性溶液の pH に依存した、温度制御されたゾルからゲルへの遷移 (ゲル形成) の発生を例示する。

【図 2】図 2 は、グリセロリン酸塩中のモル含有量と、グルコサミンユニットのモル含有量によるグリセロリン酸塩のモル含有量の比率の間の関係として表された、キトサン／グリセロリン酸塩系のゾル／ゲルダイアグラムを例示する。

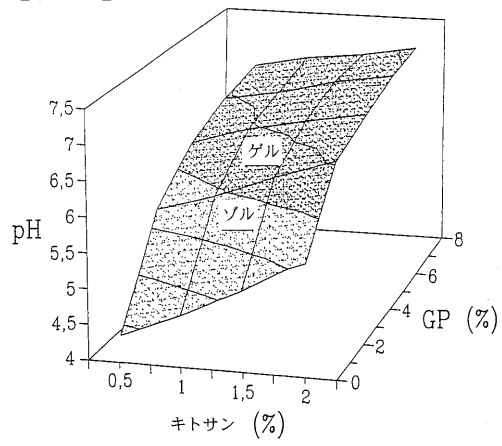
30

【図 3】図 3 は、熱により誘発され、そして弾性および粘性パラメーターの流動測定による温度に対して続けたゾルからゲルへの遷移 (ゲル形成) を例示する。

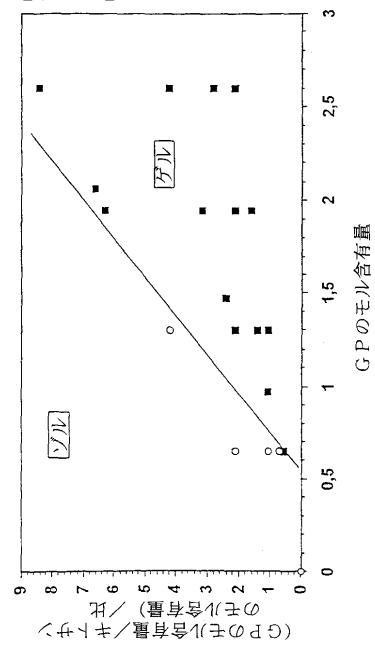
【図 4】図 4 は、-30℃ においておよび 8 時間の間フリーズドライされたゲルサンプルに対しての走査型電子顕微鏡により観察されたとおりのインビトロにて形成されたキトサン／グリセロリン酸塩のミクロ構造を例示する。

【図 5】図 5 は、ウサギにおいて脚部において皮下および間接内にてあるいは胴において皮下注射され、そして体温においてインサイチュでゲル化を許容されたキトサン／グリセロリン酸塩溶液を例示する。

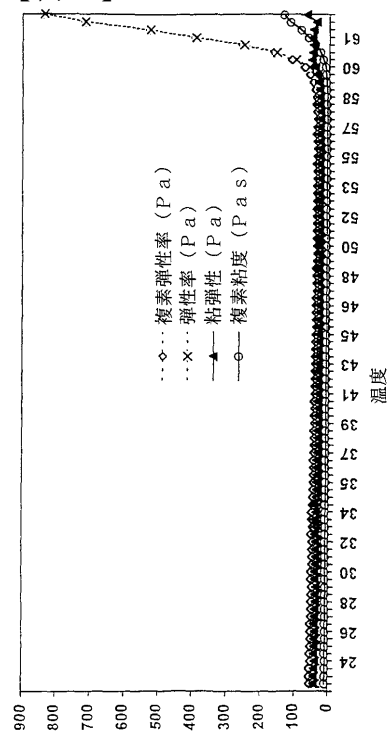
【図 1】



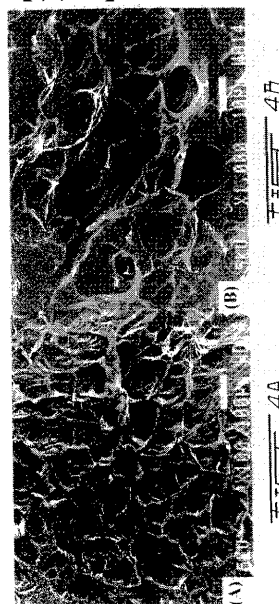
【図 2】



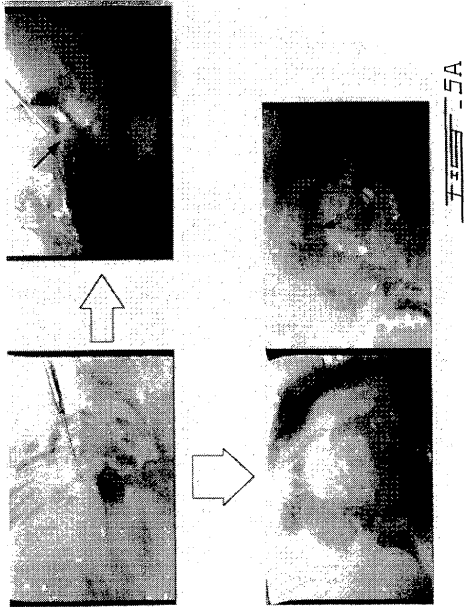
【図 3】



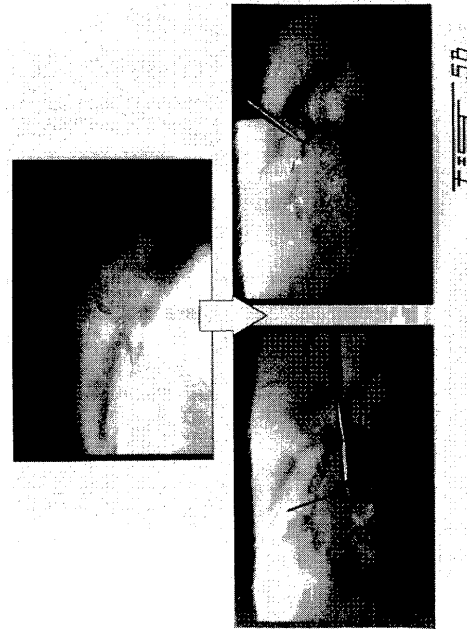
【図 4】



【図 5 A】



【図 5 B】



フロントページの続き

- (74)代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男
- (74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
- (72)発明者 シュニト, アブデラティフ
カナダ国ケベック エイチ9エイチ・4エイチ6, カークランド, リュー・ベテューム 28
- (72)発明者 シャビユー, シリル
カナダ国ケベック エイチ3ティー・1ケイ4, モントリオール, エドゥアール・モンブティ 3
333-44
- (72)発明者 コンブ, クリステル
フランス共和国エフー31250 ラモンヴィル・サン・タニユ, アヴニュー・ドゥ・シュイス
32, アパルトマン 6
- (72)発明者 ジャラル, ファイルー
カナダ国ケベック エイチ3ブイ・1ジー7, モントリオール, コート・デ・ネージュ 309-
4850
- (72)発明者 セルマニ, アミース
カナダ国ケベック エイチ7エス・1エックス1, ラヴァル, ジェソップ 2084

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 米国特許第04659700 (US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61L 27/00