

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3602145号
(P3602145)

(45) 発行日 平成16年12月15日(2004.12.15)

(24) 登録日 平成16年10月1日(2004.10.1)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 L 15/44	A 6 1 L 15/03
A 6 1 K 31/74	A 6 1 K 31/74
A 6 1 K 38/16	A 6 1 P 17/00
A 6 1 K 38/22	A 6 1 P 27/02
A 6 1 K 38/27	A 6 1 P 27/16

請求項の数 19 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-501506	(73) 特許権者	399044160
(86) (22) 出願日	平成10年6月3日(1998.6.3)		イノジェネティックス・ナムローゼ・フェ
(65) 公表番号	特表2002-506431(P2002-506431A)		ンノートシャップ
(43) 公表日	平成14年2月26日(2002.2.26)		I N N O G E N E T I C S N. V.
(86) 国際出願番号	PCT/EP1998/003320		ベルギー、ペー—9052ヘント、テヒノ
(87) 国際公開番号	W01998/055161	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成10年12月10日(1998.12.10)		弁理士 青山 稜
審査請求日	平成14年10月2日(2002.10.2)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	97870083.9		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成9年6月3日(1997.6.3)	(72) 発明者	スハフト, エティーンネ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)		ベルギー、ペー—8840スターデン、レ
早期審査対象出願			イセフェルトストラート99番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】メタクリルアミド修飾ゼラチンから構成されるポリマーに基づく新たな医薬品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬剤またはワクチンを制御放出または遅延放出するためのバイオポリマーマトリックス含有組成物であって、架橋メタクリルアミド修飾ゼラチンまたはビニル置換多糖と共重合したメタクリルアミド修飾ゼラチンのいずれかを含む組成物。

【請求項2】

バイオポリマーマトリックスがさらに下記化合物のうち1種あるいは下記化合物のうち2種またはそれ以上の混合物を含むものである請求項1記載の組成物：

- ポリ硫酸化されたオリゴ糖もしくは多糖またはそのフラグメント；
- ヘパリン結合性成長因子に結合しうる生体適合性ポリアニオン；
- ヘパリン結合性成長因子に結合しうるグリコサミノグリカン鎖を含有するプロテオグリカン；
- ヘパリン結合性成長因子に結合しうる、あるいはこれを安定化させうるヘパリンの機能的アナログ
- モノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはファージディスプレイにより得ることのできる微少蛋白であって、創傷治癒プロセスを調節しうる分子性因子に対して高く選択的なアフィニティーを有するもの；
- 治療上有効量の薬剤；
- 含有薬剤に対する実質的なアフィニティーを有して、マトリックスからの薬剤の放出を遅延させ、さらに/あるいは薬剤を安定化させる化合物。

10

20

【請求項 3】

該マトリックスが、水和もしくは乾燥フィルム、または水和もしくは乾燥泡状物質、または水和もしくは乾燥微小ビーズ、または乾燥粉末、または織組織もしくは不織組織として製造されうる水和もしくは乾燥繊維の形態である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】

該バイオポリマーマトリックスで覆われた創傷の湿度を制御するように選択された透過性を有する半透過性フィルムで該マトリックスが覆われている、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 5】

経皮的薬剤デリバリーのための請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む、薬剤またはワクチンを制御放出または遅延放出するためのデバイス。

10

【請求項 6】

静脈注射、皮下注射または筋肉内注射できるデバイスであって、薬剤またはワクチンを含む請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の組成物の微粒子を含有する、薬剤またはワクチンを制御放出または遅延放出するためのデバイス。

【請求項 7】

マトリックスの乾燥を防止するため、あるいは薬剤またはワクチンのデリバリーを制御するために、閉鎖性または半閉鎖性フィルムで該マトリックスが覆われている、薬剤またはワクチンを制御放出または遅延放出するための請求項 5 記載のデバイス。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 3 または 4 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む創傷用包帯。

20

【請求項 9】

下記疾病：

- 皮膚の創傷（熱傷、難治性もしくは慢性の創傷、糖尿病性の足の潰瘍、壊死性および組織脱落性の創傷、外科手術による創傷、とこずれ、圧迫性潰瘍、虚血性創傷等を包含）、
- 瘢痕形成およびケロイド形成、
- 創傷周囲組織の壊死、
- 皮膚収縮、
- 過剰な滲出物またはかさぶた形成
- 角膜の創傷または欠損、
- 鼓膜再形成後のまたは他の中耳再形成後の外科的処置；
- 慢性耳漏、
- 皮膚科学的疾病

30

の 1 つを治療するために用いられる請求項 8 記載の創傷用包帯。

【請求項 10】

メタクリルアミド修飾ゼラチンがビニル置換多糖とともに共重合している請求項 1 記載の組成物。

【請求項 11】

該多糖がビニル置換デキストランである請求項 1 または 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

ポリ硫酸化オリゴ糖もしくは多糖が下記のもの 1 つ又はそれ以上から選択されるものである請求項 2 記載の組成物：

40

— ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、およびデキストラン硫酸。

【請求項 13】

ゼラチンがビニル置換多糖とともに重合している請求項 1 記載の組成物。

【請求項 14】

メタクリルアミド修飾ゼラチンが多糖とともに重合している請求項 1 記載の組成物。

【請求項 15】

薬剤が防腐剤または創傷治癒剤である請求項 2 記載の組成物。

【請求項 16】

50

薬剤がEGF、FGF、TGF - 、IGF、PDGF、およびケラチノサイト細胞溶解物からなる群より選択されるものである請求項15記載の組成物。

【請求項17】

下記工程：

(a) 下記のもの：

(i) メタクリルアミド修飾ゼラチンおよび多糖、ここにゼラチンはラジカル架橋しうるメタクリルアミド側鎖にて修飾されている；または

(ii) メタクリルアミド修飾ゼラチンおよびビニル置換多糖、ここにゼラチンはラジカル架橋しうるメタクリルアミド側鎖にて修飾されており、多糖はラジカル架橋しうるビニル側鎖にて修飾されている

を含む溶液を用意すること；ついで

(b) 側鎖基をラジカル架橋重合またはラジカル架橋共重合させることを特徴とする、バイオポリマーマトリックスの製造方法。

【請求項18】

防腐剤あるいはマイトジェンおよび/またはそのアンタゴニストを含む創傷治癒剤を含有する、請求項17記載の方法により製造されるバイオポリマーマトリックス。

【請求項19】

EGF、FGF、TGF - 、IGF、PDGF、およびケラチノサイト細胞溶解物からなる群より選択される薬剤を含有する、請求項18記載のバイオポリマーマトリックス。

【発明の詳細な説明】

本発明は、架橋メタクリルアミド修飾ゼラチン、またはビニル置換多糖と共重合したメタクリルアミド修飾ゼラチン、または架橋ビニル置換多糖およびゼラチンのいずれかを含む創傷用包帯材料に関するものであり、多糖およびゼラチンは半相互貫入マトリックス中に物理的に捕捉されている。本発明材料は種々のタイプの創傷、特に、慢性的創傷および熱傷の被覆に有用である。また本発明材料は薬剤放出の制御にも適する。適当な成長因子または創傷修復促進物質とともに使用した場合、本発明マトリックスは、種々のタイプの創傷、特に、慢性的創傷および熱傷用の包帯の製造に有用である。

非常に多くの人々が慢性的で難治性の皮膚創傷にかかっている。それらの創傷の治癒における共通した特徴は、最適な治癒のために被覆を要するということである。創傷を被覆することの有益な効果は異なったレベルにあり、使用する包帯材料のタイプに依存する。急性の創傷には、適切な包帯は止血を促進し、かくして、血液の損失を抑制することができる。また、創傷を被覆することは創傷を環境から遮蔽し、かくして、創傷を微生物汚染から防御する。さらにそのうえ、いくつかのいわゆる閉鎖性または半閉鎖性の創傷用包帯は創傷を湿らせておくことができ、そのことは治癒に有益である。結局、いくつかの創傷用包帯はそれ自体、直接的に治癒プロセスを促進する。なぜなら、例えば、それらは、細胞増殖または移動を直接的に促進し、あるいは成長促進物質を分泌する免疫系の細胞を誘引または活性化する成分を含有しているからである。他の包帯は、創傷の感染を抑制するのに有用な抗微生物物質を含有していてもよい。

長年にわたり、驚くほど様々な包帯材料が創傷被覆に使用されており、それらの多くは現在市販されている。それらはそれぞれ独自の特徴を有し、創傷のタイプ、深さ、サイズ、感染の有無、滲出物形成レベルに応じたものとなっている。

例えば綿ガーゼが創傷用包帯として広く使用されている。綿ガーゼは安価であるという長所はあるが、閉鎖性でないという短所であり、時々、創傷に付着する。これを防止するために、時々、パラフィンのごとき油状物質をこれらの包帯に含浸させる。かかる包帯の市販例はJelonet™ (Smith and Nephew, UK) である。

もう1つのタイプの創傷用包帯は吸収性ヒドロゲル包帯である。これらは創傷滲出物の吸収能が高い。それらは、創傷の液体に接触すると膨潤し、それ自体の重量の数倍もの滲出物を吸収しうるゼラチン、多糖、ポリアクリルアミド等のごとき親水性ポリマーからなる。市販ヒドロゲル包帯は、Intrasite gel (Smith and Nephew, UK) およびVigilon (CR Bard, USA) を包含する。特別なタイプのヒドロゲルはアルギン酸塩であり、海草から抽出さ

10

20

30

40

50

れる親水性多糖である。それらは薄い不織布またはローブ状に製造される。創傷の液体に接触すると、それらはゲル化し、創傷の液体に対して高い吸収能を有する。例には、Kaltostat (Brit - Cair, UK) および Sorbsan (Steriseal, UK) が包含される。

もう1つのタイプの包帯は閉鎖性または半閉鎖性包帯である。最も単純な形態において、通常には、それらは、例えばポリウレタンから製造される薄くて柔軟性のあるプラスチック膜として存在する。適用を容易にするために、これらの包帯は、通常には、自己付着性コーティングとともに織造される。これらの包帯は閉鎖性といわれる。なぜなら、それらは創傷表面からの水分の蒸発を抑制し、かくして、創傷を湿潤状態に保つからである。かかる包帯の例はOpsite (Smith and Nephew, UK) および Tegaderm (3M, USA) である。半閉鎖性包帯の例はOmiderm (Iatro Medical Systems, UK) および Exkin (Koninklijke Utermo hlen, The Netherlands) である。後者はわずかに蒸発速度を早めることができ、半乾燥創傷表面を形成する。

より複雑なタイプの閉鎖性包帯は親水コロイド (HCD) 包帯である。これらは、疎水性マトリックス (例えば、ポリイソブチレン、スチレン - イソブレン - スチレン共重合体) に包埋された親水コロイド粒子 (例えば、ゼラチン、ペクチン、カルボキシメチルセルロース等からなる) からできている。これらの包帯を閉鎖性膜および/または発泡プラスチック層で裏打ちしてもよい。閉鎖性であることのほかに、HCD包帯は高い吸収能を有し、多量の滲出物を生じる創傷の治療に非常に好適となっている。これらの有益な特性により、HCD包帯は、とりわけ皮膚の慢性潰瘍の治療に最もうまく使用される包帯となっている。これらの包帯の市販例は、DuoDERM^c (Convatec, UK)、TegasorbTM (3M, USA) および Comfe 20 el (Coloplast, Denmark) である。

非常に成功したといっても、最近の報告によれば、HCD包帯は治療組織において望ましくない副反応を誘発することが示唆されている。例えば、Van Luynは、DuoDERM (Convatec, UK)、Biofilm (Biotrol SPA, France)、Comfeel (Coloplast, Denmark) および Ulcer dressing (Johnson and Johnson, USA) はすべてHCD包帯であり、ヒト皮膚繊維芽細胞を標的細胞として用いるメチルセルロースアッセイにおいて試験した場合、高い毒性のクラスに分類されると報告している (Van Luyn, M. Doctoral Thesis, 1992, State University Groningen, The Netherlands; Van Luyn, M., Abstract Book of the joint WHS/ETRS meeting, Amsterdam, 1993, p114)。この著者により試験されたすべてのHCD包帯は細胞増殖を非常に抑制し (> 70%)、生存細胞において異常な形態形成を誘導した。Leekら (Abstract Book 30 of the Second Annual WHS Meeting, Richmond, VA, USA, p75, 1992) は、ブタにおける全層性の切り傷について4種のHCD包帯を試験した。すべての包帯が創傷後4ないし10日目に肉芽腫性傷害を発生させ、創傷から3カ月たってもほとんど回復の徴候はなかった。最も最大な反応はDuoDERMおよびIntrasite HCD包帯により引き起こされた。RosdyおよびClaus (J. Biomedical Mat. Res. 24, 363 - 377, 1990) は、HCD包帯GranuflexTM (Bristol - Myers Squibb, USA) は、直接接触させた場合、MRC5繊維芽細胞および表皮細胞において細胞変性効果を誘発することを見いだした。Young et al. (J. Invest. Dermatol. 97, 586 - 592, 1991) は、動物モデル系において、HCD包帯により治癒された創傷における深在性異物型反応および肉芽腫の発生を記載している。HCD包帯DuoDERMTMを用いる我々の実験により、この包帯は、ブタの全層性創傷に使用した場合、顕著かつ慢性的な炎症応答を生じさせること 40 が示されている。

上記データは、HCD包帯は短期的には創傷の治療を促進しうるが、それらの使用は、しばしば、望ましくない炎症効果につながることを示唆するものである。それゆえ、HCD包帯の有益な特性を示すが、慢性炎症または異物応答を実質的にほとんど生じさせない創傷用包帯に対する必要性があることは明らかである。かかる創傷用包帯は肉芽組織の形成を促進し、吸収性があり、最終的に限られた時間内で生分解を受けるものである。

蛋白の変性形態であるゼラチンは、種々の創傷用包帯および制御放出系に使用されている。比較的低い融点のため、ゼラチンは体温において非常に安定というわけではない。したがって、創傷治療目的に使用する前にゼラチンゲルを安定化させることが必要である。通常には、ゼラチンをホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒドで処理することにより蛋 50

白鎖間に架橋を形成させることにより安定化を行う。別法として、デキストランのごとき多糖を部分酸化することにより得られるポリアルデヒドとゼラチンとを架橋すること (Schacht EH, Nobels M, Vanteenkiste S, Demeester J, Lemahieu A. Polym Gels Networks 1993; 1:213 - 224) により安定化を行ってもよい。架橋ゼラチンを乾燥スポンジ中に織り込み、出血性創傷の止血誘導において有用ならしめてもよい。かかるスポンジの市販例は Spongostan[®] (Ferrosan, Denmark) および Gelfoam (Upjohn, USA) である。これらのスポンジの大きな短所は、使用架橋剤 (ホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒド) が細胞に対して毒性を有することである。グルタルアルデヒド架橋の負の効果が説明されており、例えば、de Vriesら (Abstract Book of the Second Annual Meeting of the WHS, Richmond, USA, p51, 1992) の知見がある。これらの著者は、グルタルアルデヒド架橋コラーゲン格子が細胞に対して毒性があるが、架橋していないものは毒性がないことを示した。それゆえ、有益な止血特性にもかかわらず、これらの製品は、慢性潰瘍または熱傷のごとき問題のある創傷の治療用包帯としては非常に適したものとはいえない。したがって、別の、より毒性の低い架橋法を用いたゼラチンをベースにした創傷用包帯が非常に望ましい。デキストランは、医療目的に広く使用され、創傷用包帯としても使用しうる多糖である。例えば、PCT特許出願公開第W094/27647号 (Smith and Chakravarty, 1994年12月8日公開) には、架橋デキストランを含有するポリマー組成物の製造が教示されており、架橋基は直鎖状イミドカルボネートまたはカルボネート基からなっている。このポリマーを創傷用包帯に含有させることができる。このポリマー組成物の重要な特徴は、加水分解に対して不安定なことである。このことは、当該材料の水和形態は本質的に不安定であり、脱水した場合にのみそのポリマーを長期保存できることを意味する。

Schachtらは欧州特許出願公開第0308330において、酸化多糖で架橋されたゼラチンを含有するポリマー組成物を開示しており、さらに蛋白、酵素または微生物をこれに固定化することができる。

改良された包帯の開発とは別に、創傷の治癒、特に、熱傷および潰瘍の治癒を促進する成長因子の積極的な使用に対して、近年、注意が向けられている。ヒトにおける創傷治癒促進のための成長因子の使用を記載した科学的報告を少しではあるが以下に示す。上皮成長因子 (EGF) が皮膚移植片ドナー部位の治療 (Brown et al., N. Engl. J. Med. 321, p76 - 79, 1989) および慢性潰瘍 (Brown et al., Plast. Reconstr. Surg. 88, p.189 - 194, 1991) に使用されている。この同じ因子は、外傷性角膜潰瘍の局所的治療のための眼科的方法において (Scardovi et al., Ophthalmologica 206, p.119 - 124, 1993)、さらにヒト角膜の内皮創傷の治癒促進のために (Hoppenreijts et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 33, p1946 - 1957, 1992) にうまく使用されている。EGF点眼薬は GentelR の商標名で Inpharzam S.A. (Cademino, Switzerland) から市販されている。塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) が慢性圧迫性咽喉痛の治療 (Robson et al., Ann. Surg. 216, p.401 - 408, 1992)、および実験的に誘発されたヒトの吸引水泡の治療 (Lyonnet et al., J. Invest. Dermatol. 96, p.1022, 1991) に使用されている。形質転換成長因子 - (TGF) は、ヒトの目の全層性斑状孔の治療に有益な効果を有することがわかった (Glaser et al., Ophthalmology 99, p1162 - 1173)。血小板由来成長因子 (PDGF) は、ヒトの慢性圧迫性潰瘍の創傷治癒促進剤であることが見いだされた (Robson et al., Lancet 339, p.23 - 25, 1992)。ヒト成長ホルモンは、大きな皮膚熱傷を有する小児の創傷治癒を加速することが報告されている (Gilpin et al., Ann. Surg. 220, p.19 - 24, 1994)。数種の成長因子の混合物を含有する粗調合品である血小板溶解物もまた、慢性潰瘍の治癒を促進することが見いだされている (Knighton et al., Surgery Gyn. Obst. 170, 56 - 90, 1990)。後者の調合品は商標名 Procuren として Curative Technologies, Inc (USA) から市販されている。やはり数種の細胞成長促進活性物質を含有する粗ケラチノサイト溶解物を用いた我々の研究により、熱傷治癒速度の上昇ならびに慢性耳漏患者および鼓室形成後の中耳欠損における上皮形成促進が示されている。

上記のすべての研究に共通した課題は、創傷に対する活性物質の制御されたデリバリーのための有効な方法を見いだすことである。たいていの場合、これらの物質は水溶液として適用されるだけであり、あるいは最良の場合でも半液状ゲルまたはクリーム中に処方され

10

20

30

40

50

る。かかる処方を用いると、活性物質の大部分が創傷中に非常に迅速に放出される。それにもかかわらず、多くの成長因子は比較的不安定であることが知られており、創傷環境におけるそれらの半減期は比較的短いと考えられる。このことは、活性物質の制御された放出を長期にわたり行わせるとともに、放出されていない因子を早期分解から防御するデバイスが必要であることを意味する。このようにすれば、必要な用量および適用回数を減少させることにより、コストが低減し、成長因子による創傷治療の効率が上昇するであろう。ペプチド成長因子および類似物質の制御放出についてはいくつかの方法および材料が考えられている。以下に、少数ではあるが、科学文献または特許出願において報告されたアプローチを示す。

1のクラスの制御放出デバイスは合成生分解性ポリマーからなっている。例えば、ポリラクチド-グリコリド(PLG)は加水分解性ポリマーであり、カルシトニン、LHRH、ソマトスタチン、インスリン、インターフェロンおよびワクチンのごとき生体活性高分子を包含する種々の医薬物質を遅延放出させるために使用することができる(Lewis, Pharmaceutical manufacturing International, 1993, p99 - 105)。有機溶媒を使用するため、生物学的に活性のあるペプチドまたは蛋白のPLG中への取り込みは、しばしば、それらの不活性化を引き起こす。このことは、物理的PLG/ペプチド混合物を製造(例えば、粉末混合物を圧縮成形することにより)することにより迂回できるが、これらは硬くてもろいので、創傷用包帯にはあまり適さない。

合成ポリマーとは別に、種々の天然ポリマーまたはその修飾物が生物活性ペプチド因子の制御放出に使用されている。この一例はbFGFを添加したメチルピロリジノンキトサンフリーズである(Berscht et al., Biomaterials 15, 593 - 600, 1994)。特別な制御放出組成物がW092/09301(Greislerによる)に開示されており、それは創傷治癒促進のための成長因子含有フィブリン組織シラントの使用を教示している。市販フィブリン接着剤が高価なため、後者の発明による製品はおそらく高価であろう。

制御放出に頻繁に使用されるバイオポリマーはやはりゼラチンである。蛋白質剤デリバリー用コラーゲン含有ゼラチンスポンジが欧州特許出願第EP第0568334号(1994年11月3日公開)および第W0/93/21908号に開示されている。Golumbek et al., in Cancer Res. 53, p5841 - 5844 (1993)には、潜在的な眼の治療ワクチンとしての、IFN またはGM-CSFを添加したゼラチン微粒子の使用が記載されている。Cortesi et al. (Int. J. Pharm. 105, p. 181 - 186, 1994)には、合成オリゴヌクレオチドおよびPCRにより得られたDNAフラグメントの放出用ゼラチン微粒子の使用が記載されている。インターフェロンを含有するゼラチン微粒子の合成がTabataおよびIkeda (Pharm. Res. 6, p. 422 - 427, 1989)により報告されている。ShindeおよびErhman (Bio - Med. Mat. Eng. 2, p. 127 - 131, 1992)には、インスリン放出用の柔軟性のあるゼラチンフィルムが記載されている。

上記のように、これらのゼラチンをベースにした生体材料の架橋に広く使用されているグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒドは細胞に対して毒性があるという短所を有する。それらの毒性にほかに、生物活性蛋白質物質の系への添加後に架橋を行う場合には、グルタルアルデヒドおよびホルムアルデヒドは添加された生物活性蛋白質物質の生物学的活性に影響すると考えられる。したがって、別の、毒性の低い架橋法を用いたゼラチンをベースとした遅延放出デバイスは、例えば、成長因子を用いた創傷用包帯の製造にとり非常に望ましいものである。

よって、本発明は、適切な創傷用包帯を提供することを目的とする。

また本発明は、適切な遅延放出または制御放出デバイスを提供することを目的とする。

さらに本発明は、該創傷用包帯または該制御放出もしくは遅延放出デバイスの製造方法および使用方法も目的とする。

本発明は、化学修飾され架橋されたゼラチンを用いて製造されたヒドロゲルが優れた医薬品を形成すること、より詳細には、創傷治療および生物活性作用剤放出のための優れた包帯を形成することを見いだしたことに関連する。本発明ゼラチンは、ラジカル的に架橋されるメタクリルアミド基で修飾される、このコンセプトは、ラジカル的にポリマー化する基、例えば、アクリルアミドまたはメタクリレート基を有する多糖および他の水溶液

10

20

30

40

50

ポリマーを包含する。メタクリルアミド修飾多糖を架橋している間にゼラチンを物理的に封入して半相互貫入網状組織 (SPIN) を形成させることにより、あるいはメタクリルアミド修飾した多糖およびゼラチンを架橋させることにより、ヒドロゲルを調製することができる。本発明における使用に特に適した多糖であるデキストランのアクリルアミドまたはメタクリレート誘導体を用いることにより、かかるヒドロゲルの製造可能性が示された。実施例 1 において、ビニル修飾ゼラチン、アクリルアミド修飾デキストラン、デキストランメタクリレートの製造およびヒドロゲルフィルムの製造を説明する。

今回開示した医薬品の 1 の長所は生分解性材料を含むことである。それにもかかわらず、加水分解により開裂可能な結合を使用することによっては生分解性が得られないので、我々の発明の対象物は水和形態において十分に安定であり、長期保存が可能である。また、架橋していないゼラチンとは異なり、本発明対象物は十分に高い融点を有しており、十分に長い時間創傷部位においてもとの形態を維持する。長所は、開示した包帯の 1 の具体例が硫酸化デキストランまたは類似のポリアニオン性分子の包帯中への固定化可能性、ならびに添加された創傷修復調節因子または *in situ* 生成されるヘパリン結合性因子の結合を促進する修飾を提供することである。

第 2 の態様によれば、本発明は、上記架橋ゼラチンが、生物活性ペプチド因子の取り込みおよびその後の制御された放出にとり理想的なバイオポリマーマトリックスを構成するという知見に関連するものである。それゆえ、医薬上活性のあるペプチドまたはポリペプチドを可溶化ゼラチン成分と混合し、ついで、ビニル基のラジカル架橋により放出可能形態のポリペプチドを取り込んだ安定な架橋ゲルを得ることにより、医薬上活性のあるペプチドまたはポリペプチドをマトリックスに取り込ませることができる。ヒドロゲル製造プロセス中におけるポリペプチドの取り込みは、吸収プロセス (例えば、脱水または不完全に脱水されたマトリックスをポリペプチド含有溶液に浸すことによる) によりポリペプチドの取り込みを行う別法よりも迅速で効率がよい。かかる医薬含有架橋ゼラチンマトリックスをいくつかの治療用途に、特に、医薬含有創傷用包帯に製造に使用してもよい。

本発明の用語「バイオポリマーマトリックス」は、上記のごとき、修飾ゼラチン、または修飾ゼラチンおよび修飾多糖、またはゼラチンおよび修飾多糖を含むマトリックスであって、生分解性という基本的特性を有するものをいう。

好ましい具体例において、提案される創傷用包帯は、閉鎖性または半閉鎖性フィルムで裏打ちされた上記のマトリックスの水和シートまたはフィルムからなる。ここで閉鎖性とは、フィルムが水透過性を有するが、創傷の乾燥を防止するには水透過性が十分に低く、創傷用包帯の下の滲出物の過剰蓄積を防止するほど水透過性が高いことを意味する。

もう一つの具体例において、創傷用包帯は脱水もしくは乾燥された微粒子の形態として製造される。これらの微粒子は、深く、浸潤性の創傷への適用に特に適する。微粒子の液体吸収性が非常に高いことにより、創傷には過剰な滲出物およびかさぶたがなく、清潔である。

さらにもう一つの形態において、提案されたポリマーは柔軟性のある脱水された泡状物質として製造される。かかる泡は浅い創傷に容易に適用でき、高い吸収能を有する。しかし、安定性、生分解性および生物活性成長因子の保持といったポリマー特性を重視する他のフォーマットも含まれる。この点において、水和された泡は別の品質を有する可能性がある。

提案したポリマーを、1 種またはそれ以上の創傷修復促進物質を含有する創傷用包帯の製造に使用することもできる。かかる物質の例は、例えば、EGF、TGF - 、FGF 類、PDGF 類、アンフィレギュリン、HB - EGF、ベータセルリン、TGF - 、IGF 類または他のマイトジェンまたはそれらのアンタゴニストのごとき、創傷修復プロセスを調節しうる成長因子である。かかる医薬含有創傷用包帯を異なる形態として製造することができ、柔軟性のあるシート、泡、微粒子、織組織または不織組織を形成する線維等の形態が含まれる。本発明の 1 の具体例は多重層を有する創傷用包帯の製造の製造に関し、各層は異なる活性成分を含有しており、異なる成分のプログラムされたデリバリーが達成される。もう一つの具体例において、適当なアフィニティー物質群がポリマーマトリックスに連結されて、取り込

10

20

30

40

50

まれた活性物質に対するマトリックスのアフィニティーが増大し、かくして活性物質の放出速度が低下し、さらに／あるいはそれらが早期分解または不活性化から防御される。かかるアフィニティー物質群の例は、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトラン硫酸、デキストラン硫酸、またはそれらの機能的アナログもしくはフラグメントのごときポリ硫酸化されたオリゴ糖もしくは多糖が挙げられ、それらはFGF類、アンフィレギュリンおよびHB - EFGのごときヘパリン結合性成長因子に対するアフィニティーを有する。それゆえ、ヘパリン結合性因子に結合しうるグリコサミノグリカンを含むプロテオグリカンも挙げられる。可能なアフィニティー物質群としてはモノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはファージディスプレイにより得られる微小蛋白 (microproteins) も挙げられ、それらは特定の成長因子に対して高く選択的なアフィニティーを有するもの

10

である。本発明は、ゼラチン、またはゼラチンおよび多糖を含む上記ヒドロゲルが、創傷の被覆および治療に適した包帯の製造のための優れた材料を構成するという知見に関する。さらに、該材料は、意外なことに、特に創傷への治療物質のデリバリーにとり好ましい制御された放出特性を示す。可溶化ゼラチンまたはゼラチン誘導体を架橋することによりヒドロゲルを製造する。ゼラチンは結合組織蛋白コラーゲンの変性形態である。使用コラーゲンの源、および使用する抽出および製造方法により、いくつかのタイプのゼラチンが存在する。1のタイプのゼラチンは動物の骨から抽出され、別のタイプのゼラチンは動物の皮膚から抽出される。通常には、動物性材料はウシまたはブタ起源である。抽出方法により、2つのタイプのゼラチンが製造されうる。A (または酸性) タイプはコラーゲンの加水分解により製造され、等電点は約8であり、B (または塩基性) タイプはコラーゲンの塩基加水分解により製造され、等電点は約5である。両方のタイプのゼラチンは上記ヒドロゲルマトリックスの製造に使用可能であり、本発明に適している。ゼラチンの重要な特性は、一定の硬度を有するゲルを形成することである。これらのゲルの硬度はゼラチンのブルーム数 (Bloom number) により示される。本発明の目的からすると、種々のブルーム数を有するゼラチンが使用可能である。しかしながら、少なくとも150、好ましくは少なくとも200、より好ましくは少なくとも250のブルーム数が好ましい。なぜなら、ヒドロゲルマトリックスに高い機械的強度が与えられ、フィルムまたはシート状に製造しやすくなるからである。

20

本発明において、アクリルアミドまたはメタクリレートで修飾されたデキストランが、ビニル置換ゼラチンと共重合されうるビニル置換多糖の例として選択された。しかしながら、適当な粘度、分子量およびビニル含量を有する他の多糖およびビニル置換水溶性ポリマーも使用できることが当業者に明らかなはずである。かかる別の多糖の例はキサンタンである。このように、別の多糖も本発明の目的にかなうものであるが、アクリルアミド置換デキストランの使用について言及する。これは単に明確化のためであり、本発明の骨格において使用可能な多糖の範囲を限定すると解してはならない。本発明創傷用包帯の製造に使用するデキストランの分子量は、好ましくは、500000未満、より好ましくは10000ないし100000の間であり、そのような場合、デキストラン水溶液の粘度は高すぎることはなく、例えば、2%溶液ならば0.1Pa.sないし1Pa.sの間である (Brookfield LTV粘度計を30サイクルで作動させる)。

30

40

文献記載の方法に従ってアクリルアミドまたはメタクリレート基でのデキストランの置換を行った。例えば、多糖を2 - ビニル - 4,4 - ジメチル - 2 - オキサリン - 5 - オン (ビニルジメチルアジラクトン) と反応させることにより、かかる誘導体を得ることができる。ゼラチンを半相互貫入網状組織中に捕捉するための、ゼラチンメタクリルアミドの架橋、またはゼラチンメタクリルアミドとビニル置換多糖との共重合、またはビニル置換多糖の架橋を、水性媒体中、過硫酸アンモニウム + N,N' - テトラメチルエチレンジアミンのごときラジカル反応開始剤の存在下で行う。光誘導ラジカル生成により架橋を行うこともできる。実施例1は、ビニル修飾ゼラチンおよびデキストランの製造、ならびに光開始剤存在下でビニル誘導体をUV光の曝露した後のラジカル架橋によるヒドロゲルフィルムの製造に関する。実施例2は、メタクリルアミド修飾ゼラチンのラジカル架橋により製造された

50

ゼラチンヒドロゲルフィルムの粘弾性を示す。

上記方法が好ましいが、ビニル基を導入する他の方法も可能であることが当業者に明らかであろう。例えば、ジメチルスルホキシドのごとき有機溶媒中において無水メタクリル酸で処理することが挙げられる。その後、便利には、古典的精製方法により修飾デキストランを精製し、低分子反応性成分から分離することができる。これを行うための例としては、沈殿（例えば、アセトン、メタノールまたはイソプロパノールの添加による）または透析、限外濾過またはゲル透過性クロマトグラフィー、ついで凍結乾燥を行うことが挙げられるが、これらに限らない。

架橋の速度および程度は、ゼラチンの濃度、タイプ、およびそのビニル置換率、多糖の分子量、ビニル置換率等のごとき種々のパラメータに依存する。

10

本発明によれば、上記のように製造されるゼラチンヒドロゲルを種々の創傷用包帯の製造に使用することができる。

好ましい具体例によれば、ゼラチンヒドロゲルを創傷表面に適用する薄いシートまたはフィルムとして製造する。これを行うためのいくつかの知られた方法がある。例えば、ビニル置換ゼラチン溶液（使用ゼラチンのゲル化点よりも高温に保つ。通常、 > 30 ）を開始剤溶液と混合し、感知可能な架橋が起こる前に適当な鑄型中に注ぐことができる。架橋プロセス終了後、鑄型からフィルムを取ることができる。フィルム形成の別法は、写真用フィルムおよび印画紙の製造のために写真工業で用いられている方法の1つを用いることである。本発明の目的からすれば、フィルムの厚さは、好ましくは0.1ないし2mmの範囲、より好ましくは0.3ないし1mmの範囲であり、いくつかの用途には異なるサイズのフィルムが

20

適当であるかもしれない。

上記方法により得られたフィルムが長期にわたり創傷上に置かれる場合、液体がフィルム表面から蒸発しうるので脱水が起こる可能性がある。これを防止するために、ゼラチンヒドロゲル創傷用包帯フィルムを、さらに閉鎖性または半閉鎖性創傷用フィルム、例えばOpsiteまたはTegadermのごときポリウレタンでゼラチンヒドロゲル創傷用包帯を覆うことができる。しかしながら、より良い解決策が本発明の好ましい具体例により提供され、該具体例においては製造プロセス中にゼラチンヒドロゲルフィルムが適当な閉鎖性膜上に直接重層される。例えば、特に適当なプラスチックフィルムはPebax 1205のごときPebaxシリーズであり、それらはElfにより製造されている。このタイプのフィルムは水分蒸発透過性が非常に低く、比較的乾燥した創傷に雌黄される創傷用包帯の製造に非常に適したもの

30

となっている。より滲出性の創傷へ適用する場合には、包帯下に過剰な液体を蓄積させないようにするには、より高い蒸発速度のものが好ましいこともあり、例えばオランダのUtermohlenにより製造されているもの（Exkin）またはイギリスのIatro Medical Systemsにより製造されているもの（Omiderm）がある。創傷のタイプ、滲出物発生の程度および包帯交換頻度に応じて、異なる水分蒸発透過性を有する他の裏打ちフィルムを使用して創傷部位における最適な液体バランスを達成することができる。

もう1つの具体例により、脱水もしくは水和された粒子状包帯中にゼラチンヒドロゲルを含有させる。これを行うためのいくつかの方法が知られている。架橋後、固体ゼラチンヒドロゲルマスを脱水することにより乾燥ゼラチン粉末または顆粒を製造し、ついで、脱水した材料を粉末化させてもよい。例えば、乾燥空気の流れ、凍結乾燥、有機溶媒抽出等により脱水を行ってもよい。粉末化または顆粒化工程後、例えば、適当なメッシュサイズの一連のふるいにかけることにより所望サイズの粒子を選択してもよい。球状または実質的に球状のゼラチンヒドロゲル粒子または微小ビーズを製造するためには、新たに調製されたビニル置換ゼラチン（ビニル置換ゼラチンおよびビニル置換多糖の混合物、またはビニル置換多糖およびゼラチンの混合物）の溶液を適当な霧化ノズルから押し出すことによりスプレイすることができる。スプレイの液滴サイズは適用のタイプにより変化させられるであろうし、適切なノズルサイズ、圧力および霧化プロセスの能力を選択することにより決定されるであろうということが理解されるべきである。もう1つの可能な方法は、脂肪族または芳香族炭化水素または油脂のごとき水と混和しない溶媒を用いて上記の新たに調製した溶液を乳化させることである。大きなサイズの球状粒子を得るためには、水と混和

40

50

しない溶媒に溶液を滴下してもよい。水和もしくは脱水されたゲル粒子を製造するための当業者に知られた他の方法を用いて本発明粒子状創傷包帯を製造してもよい。かかる粒子状創傷用包帯は種々の創傷タイプの治療に有用であるが、特に、ある種の慢性潰瘍または床擦れのごとき比較的深く、非常に滲出性の創傷の治療に有用である。脱水形態として適用する場合、本発明粒子状包帯は滲出物吸収特性を有する。これは非常に望ましい特徴である。なぜなら、過剰な滲出物およびかさぶたの除去は、微生物コロニー形成防止の点に関する重要治療目的だからである。かかる粒子状包帯を水和形態で使用することもできる（すなわち、粒子形成後の脱水プロセスを省略することにより、あるいは創傷への適用前に脱水粒子を再水和させることにより）。この後者に形態として、例えば、あまり滲出物を発生しない創傷へのパスタとして適用することができる。個々の創傷タイプの必要性によつては、部分的に水和した形態の粒子状創傷用包帯を使用することができる。後者の形態として、包帯は実質的な液体吸収特性を有するであろうが、特定の厚さとすることにより、容易にパスタとして適用、あるいは薄層として製造されよう。特定のタイプのゲルを適用することにより、角膜の創傷または欠損、鼓膜再形成、または他の中耳再形成、または慢性耳漏のごとき他の創傷の治療に適した創傷用包帯を設計することができる。脱水、部分的に水和、および完全に水和された形態のこれらの粒子状創傷用包帯を適当な水性または有機賦形剤中に懸濁して適用を容易ならしめることができるということも明らかであろう。かかる賦形剤の例はパラフィン油脂、ワセリン、グリセロール等を包含するが、これらに限らない。

10

ゼラチンヒドロゲル創傷用包帯が製造されうるもう1つの物理的形態は、水和もしくは乾燥した泡状物質である。例えば、適当な生体適合性界面活性剤を新たに調製したビニル置換ゼラチン（ビニル置換ゼラチンおよびビニル置換多糖の混合物、またはビニル置換多糖およびゼラチンの混合物）の溶液に添加し、これに適当なラジカル開始剤を添加し、ついで、少量の気泡を溶液に導入することにより、これらを製造することができる。ガスは空気、窒素、ヘリウムまたはアルゴン気体であつてよく、好ましくは、ガスは水不溶性、無毒かつ化学的に不活性なものである。泡状物質の製造の分野において知られた他の方法も適当であるが、生体非適合性成分を導入しない方法、あるいは架橋プロセスを妨害しない方法であることが条件となる。泡状物質を水和泡状物質として、あるいは部分的または完全に脱水された泡状物質として使用できる。それらをシート、棒、栓、パッド等として、あるいは創傷部位への適用に適すると考えられる他の形態として製造することができる。さらなる具体例において、他のビニル置換ポリマー、例えば、SPIN法（半相互貫入ポリマー網状組織法）またはそれと他の方法の組み合わせを用いて、共重合した多糖を本発明ゼラチンヒドロゲルマトリックスに共有結合させ、あるいはその中に含有させてもよい。特別には、高分子成分をポリマーネットワーク中に機械的に含有させることができ、共有結合は常に必要なわけではない。類似の方法で、ゲルの特性を補う他の成分を使用してもよい。これらの成分は、ある種の成長因子または創傷治癒促進物質へのアフィニティーが知られている分子からなつていてもよい。かかる成分の例、ヘパリン結合性蛋白に対してアフィニティーを有する成分、例えばヘパリンまたはヘパラン硫酸のごときその機能的アナログ、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、デキストラン硫酸、または創傷治癒プロセスに関与する1種またはそれ以上の分子性因子に対して十分なアフィニティーを示す他の無毒のポリアニオン性グループ、またはモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはファージディスプレイにより得られ、創傷治癒に関与する分子性因子に対して選択的アフィニティーを示す微小蛋白である（以前の出願EP95-59 GDPも参照）。創傷に適用された場合、かかるアフィニティマトリックスは、局所適用可能な内在性成長因子または他の創傷修復促進因子の蓄積および安定化のためのリザーバーとして潜在能力を有する。その後、これらの因子は徐々に放出され、かくして傷害の治癒を促進する。特定の成長因子に結合し安定化させるヘパリン様分子および類似ポリアニオンの潜在能力は当該分野においてよく知られている。このことにつき議論される科学文献のうち少しの例を以下に示す。Volkinらは、異なるタイプのポリアニオンによる酸性FGFの物理的安定化につき記載している（Arch.Biochem.Biophys., 300, p. 30 - 41, 1993; Biochim.Biophys. Acta 1203,

20

30

40

50

p.18 - 26)。Tomokoらは、デキストラン硫酸を用いる塩基性FGFの安定化について記載している (FEBS Letters, 306, p.243 - 246, 1992)。TurnbellおよびGallagherは、線維芽細胞成長因子活性の機能的モジュレーターとしてのヘパラン硫酸の役割につき説明している (Biochem. Soc. Trans. 21, 477 - 482, 1993)。かかるポリアニオン化合物を本発明ヒドロゲルマトリックスに含有させることにより、マトリックスの好ましい生体適合性および創傷治癒特性がさらに改善されうる。

別法として、アフィニティマトリックス中に含有させられ、あるいはこれに結合させられる成分は、分子性因子に対する十分に高いアフィニティを示すものであってもよく、その結果、結合が安定なプロセスとなる。創傷に適用される場合、かかるアフィニティGDPマトリックスは、コラーゲン組織の調節されない成長または肥大または余分な形成を

10

引き起こす因子、およびケロイド形成を引き起こす可能性のある因子のごとき創傷治癒プロセスに損害を与える分子性因子を特異的に隔離する潜在能力を有するものである。本発明において、我々は、本発明ゼラチンヒドロゲルマトリックスが、薬理的に活性のある物質をデリバリーするための制御放出デバイスの製造のための有効かつ適用範囲の広い材料を構成するという知見を開示する。ペプチドまたはポリペプチド性物質をヒドロゲル材料に含有させ、その後、効果的に放出させることができる。これを実施例3に示し、いくつかのヨウ素化ポリペプチドの効果的な放出を示す。

本発明の薬理的に活性のある因子をいくつかの方法で本発明ヒドロゲルマトリックス中に含有させることができる。最も好ましい方法は、架橋プロセスの前に因子を添加することである。それゆえ、37 以上の温度において活性作用剤の水溶液をゼラチンまたはビニル置換ゼラチンの水溶液と混合し、ついで、ビニル置換ゼラチンをポリマー化させ、あるいはゼラチンをビニル置換多糖とともにSPIN形成させる。その後、得られた混合物を放冷する。ゼラチン溶液は粘度があるので、異なる成分が完全に混合するように注意して、ゼラチンヒドロゲル中に活性作用剤が均一に分布するようにすべきである。もう1つの可能な方法は、架橋プロセス完了後に、吸収手段により、活性因子を本発明ゼラチンヒドロゲルマトリックス中に含有させることである。それゆえ、ゼラチンヒドロゲルマトリックスは部分的または完全に脱水される。マトリックスを、乾燥空気の流れ中での乾燥、凍結乾燥、有機溶媒抽出またはマトリックスから水分を除去する他の適当な手段によってこの脱水を行うことができる。その後、脱水されたマトリックスを活性作用剤含有水溶液に浸す。この浸すプロセスの間にマトリックスは再水和され、同時に活性作用剤を吸収する。

20

30

本発明の1の可能な適用例は、1種またはそれ以上の創傷修復促進因子および/または適当な防腐剤を含有する創傷用包帯の製造への適用である。かかる創傷用包帯に含有させるのに適した創傷修復促進剤は、例えば、EGF、FGF、PDGF、TGF - 、VEGF、PD - ECGFまたはIGFファミリーのクラスに属するもののような成長因子である。もう1つの適当な作用剤はヒト血小板から放出されるものであり、例えば、Curative Technologies IncからProcurenという名称で市販されている。さらなる可能ものとしては、特許出願US9106161 (オレゴン大学)、EP88101576 (Eisinger)、W093/10217 (IG) に開示されたような、ケラチノサイトから得られるならし培地、溶解物または抽出物を含有させることである。適当な防腐剤としては、局所適用に適する抗生物質、抗細菌性スルファミドまたはペプチド、キノロン類、抗カビ剤等が挙げられる。創傷修復促進剤を含有する創傷用包帯を、治癒困難な創傷の治療に使用することができる。かかる治療が望ましい傷害は、慢性潰瘍、床擦れおよび圧迫性潰瘍、足の潰瘍、角膜障害、鼓膜穿孔、外科手術による創傷、皮膚移植片ドナー部位、熱傷等がある。熱傷の場合、創傷用包帯を二度または三度の熱傷に直接適用することができる。しかしながら、程度の重い三度熱傷の場合、メッシュになった自己由来の皮膚を最初に移植するのが好ましい。本発明の医薬含有ゼラチンヒドロゲル創傷用包帯の好ましくは自己由来のメッシュ状移植片上への直接適用は、メッシュ状移植片の隙間の閉塞促進し、早期の創傷閉塞をもたらし、それと同時に感染の危険性を低下させ、治療期間を短縮するであろう。

40

治療部位への適用を容易にするために、本発明の医薬含有ゼラチンヒドロゲル創傷用包帯を異なる形態として製造することができる。例えば、シートまたはフィルム様包帯は、熱

50

傷、浅い潰瘍、皮膚移植片ドナー部位および他のタイプの浅い創傷への適用に便利でありうる。液体の蒸発ならびに包帯およびその下の創傷の脱水を減少させるために、包帯を柔軟性のある膜で覆うことができ、その水分透過性を選択して、創傷を最適湿潤レベルにすることができる。多層ゼラチンヒドロゲルラミネートを製造することもできる。かかるラミネートの各層は異なる放出特性を有し、異なる活性物質を含有することができる。創傷に適用すると、あらかじめ決定された順序および時間のプログラムに沿って、含有されている因子が次々に層から制御放出されるであろう。このプログラムは、一部には、異なる層の放出特性および生分解性、層の厚さ、ならびに含有されている因子の特性に依存するであろう。かかる複数薬剤の制御デリバリーを行うことは望ましいと考えられる。なぜなら、の創傷修復プロセスは異なる段階において生じ、それぞれに異なる因子が必要であることが知られているからである。例えば、1段階の創傷修復は肉芽組織の発達からなる。この段階はPDGFまたはFGFの投与により促進されうる。次の段階において、上皮形成プロセスにより創傷が閉塞し、これはEGFにより促進されうる。VEGFまたはPD-ECGFのごとき因子の使用は、血管新生のごときプロセスを最適化する。かかるプロセスはしばしばうまく行かず虚血性創傷のごとき慢性創傷の温床となりうる。最適な治癒をもたらす時点においていずれの因子が放出されるべきかは、一部には創傷のタイプに依存する。時々、創傷治癒プロセスが持続的に重症の瘢痕またはケロイドを異常に形成しうることも知られている。かかるケロイド形成は2つの主要因により素因が形成される。第1のものは瘢痕位置であり、第2のものは患者の遺伝的背景である。それゆえ、ケロイド形成は、アトピー性または余分なある種の因子の存在により生じるものであり、創傷用包帯中の特定の層を用いてこれらの望ましくない因子を隔離することができると予想される。隔離されうる他の因子は、余分なコラーゲンおよび/またはエラスチン形成を引き起こすものを含み、隔離することにより皮膚収縮またはケロイド形成のごとき現象が防止されうる。1つの包帯のみを用いて、すなわち、包帯を変更せずに、いくつかの薬剤のプログラムされたデリバリーが可能であるということは本発明の1の利点である。

ある種のタイプの圧迫性潰瘍または慢性潰瘍のごときより深い創傷腔の場合、本発明の薬剤含有ゼラチンヒドロゲル創傷用包帯を微粒子、泡状物質、パスタまたは創傷形態に容易に変形しうる他の形態として製造することがより便利でありうる。当該分野で知られた方法により微粒子を製造してもよいが、含有される活性物質の活性が失われないことが条件である。医薬含有粒子の寿命を延ばすには、それらを凍結乾燥することも可能である。得られた粉末または顆粒を創傷に直接適用することができ(その場合、過剰の創傷液体を吸収するというさらなる利益がある)、あるいは先ず適当な水溶液中でインキュベーションすることにより再水和させることもできる。薬剤含有粒子をワセリン、パラフィン油脂等のごとき適当な賦形剤中に処方して、例えば、創傷腔を充填するのに使用できるパスタ得ることもできる。

本発明の1の具体例において、薬理的に活性のある物質が上記のようなアフィニティーゼラチンヒドロゲルマトリックス中に含有される。この場合、マトリックスは、活性物質に対してアフィニティーを有する、架橋された、拡散しない、あるいは固定化された化合物を含有する。このことは、活性作用剤の放出速度を低下させ、時々、それらの作用剤を安定化させうる。

以下に、本発明ゼラチンヒドロゲルマトリックス中に含有されていてもよい、かかるアフィニティーリガンドの例を少し挙げる。

1のクラスは、ヘパリン結合性蛋白に対してアフィニティーを示す分子により構成され、かかる分子としては、例えば、ヘパリンまたはヘパラン硫酸のごときその機能的アナログ、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、デキストラン硫酸、または含有されるヘパリン結合性因子に対して十分なアフィニティーを示す他の無毒のポリアニオン性グループが挙げられる。かかる因子の例は、FGF類、HB-EGF、アンフィレギュリンおよびベータセルリンを包含する。

アフィニティーリガンドのもう1つの例は疎水性鎖からなるものであり、疎水性という性質により、含有されている活性作用剤の放出を遅延させうるものである。例えば、部分的

10

20

30

40

50

に疎水性にされたビニル置換多糖を用いることにより、かかる鎖を本発明ゼラチンヒドロゲル中に含有させることができる。例えば、脂肪酸（例えば、カブロン酸、ステアリン酸）を用いてデキストランを部分的にエステル化させ、ついで、かくして得られたデキストランエステルを無水メタクリル酸と反応させることにより、これらを得ることができる。制御放出特性を有する医薬含有創傷用包帯の製造は本発明の適用の1つにすぎないことが当業者に明らかであろう。制御放出マトリックスとしての本発明ゼラチンヒドロゲルの他の多くの可能な適用が考えられる。以下に示す可能な適用例は説明のみを目的とし、可能な適用の範囲を何ら限定するものではない。

本発明ゼラチンヒドロゲルを、例えば、経皮薬剤デリバリーのためのデバイスの製造に使用することができる。経皮的にデリバリー可能な薬剤を含有するゼラチンヒドロゲルパッチを皮膚に付着させ、長期のわたり薬剤をゆっくりと放出させることができる。かかるデバイスに付着した閉鎖性フィルムは、バイオポリマーの脱水を防止することができる。もう1つの適用例において、特定の薬剤を含有するゼラチンヒドロゲル微粒子を、静脈注射、皮下注射または筋肉注射することができる。タグを付する系を装備して、化合物を含有した微粒子の局所投与のために、かかる注射された微粒子を使用してもよい。原理的には、数日ないし数週間の範囲の長期にわたるゆっくりとした放出が望ましいすべての薬剤は、本発明ゼラチンヒドロゲルの微粒子中に含有させるのに好適である。例としては、抗ガン剤、ホルモン、ワクチン、避妊薬、心臓血管系の薬剤、神経活性薬剤等が挙げられるが、これらに限らない。

図面の説明

図1 ゼラチン、ビニル修飾ゼラチンおよび架橋ビニル修飾ゼラチンヒドロゲルフィルムの粘弾性

実施例2に記載したようにゼラチンヒドロゲルを調製し、LWUV光（365nm, 10mW/cm²）に曝露した。ヒドロゲルフィルムを4で1週間保存後、温度スキャン範囲16ないし50（加温速度1.75 /分）、一定周波数（1Hz）、一定剪断力（ = 0.05, 1.88mrad）として振動剪断変形により保存（弾性）係数を調べた。Gelmod:メタクリルアミド修飾ゼラチン、Gelmod + DMPA:メタクリルアミド修飾ゼラチン + 光開始剤系。

図2 ヒドロゲル保存時間を延長した場合の架橋ビニル修飾ゼラチンヒドロゲルフィルムの粘弾性

ヒドロゲルフィルムを4で1週間保存後、温度スキャン範囲16ないし50（加温速度1.75 /分）、一定周波数（1Hz）、一定剪断力（ = 0.05, 1.88mrad）として振動剪断変形により保存（弾性）係数の温度依存性を調べた。

図3 薬剤放出の研究のためのTranswell - COLシステム

ヒドロゲルフィルム的一方のみの面によりポリペプチドが放出されるように、ヒドロゲルフィルム試料を細胞培養インサートの微小孔コラーゲン処理膜上に乗せ、抽出媒体の体積を調節して微小孔膜の底面と接触させた。

図4 実施例1に記載のごとく製造された、置換率60%（ゼラチンの - アミノ基のうち60%がビニル基で置換されている）のメタクリルアミド修飾ゼラチンから作成されたヒドロゲルフィルムからの¹²⁵I - BSA (A) および¹²⁵I - EGF (B) の放出。同じ単位を挿入図に使用する。

図5 実施例1に記載のごとく製造された、置換率60%（ゼラチンの - アミノ基の60%がビニル基で置換されている）のメタクリルアミド修飾ゼラチンから作成されたヒドロゲルフィルムおよび置換率10%（100個のグルコシド単位につき10個のビニル基）のアクリルアミド修飾デキストランからの¹²⁵I - BSA (A) および¹²⁵I - EGF (B) の放出。同じ単位を挿入図に使用する。

図6 実施例1に記載のごとく製造された、置換率60%（ゼラチンの - アミノ基の60%がビニル基で置換されている）のメタクリルアミド修飾ゼラチンから作成されたヒドロゲルフィルムおよび置換率10%（100個のグルコシド単位につき10個のビニル基）のメタクリレート修飾デキストランからの¹²⁵I - BSA (A) および¹²⁵I - EGF (B) の放出。同じ単位を挿入図に使用する。

10

20

30

40

50

図7 ビニル修飾誘導体の調製

ゼラチン (Gel - NH₂) と無水メタクリル酸との反応によりメタクリルアミド修飾ゼラチンを調製することができる (A)。デキストラン (Dex - OH) と 2 - ビニル - 4,4 - ジメチル - 2 - オキシラン - 5 - オン (ビニルアズラクトン) (B) または無水メタクリル酸 (C) との反応によりビニル修飾デキストランを調製することができる。

図8 ポリマー濃度15% (水中重量%)、開始剤濃度0.006重量% (Irgacure 2959)、UV照射30分 (365nm, 10mW/cm²)、保存温度4℃、保存時間はUV照射後2日間、振動剪断変形 ($\gamma = 0.05$; 周波数 $f = 1\text{Hz}$) とした場合の、DS = 35%, 46% および 60% のゼラチンメタクリルアミドヒドロゲルの保存係数G'の温度依存性。

図9 ポリマー濃度15% (水中重量%)、開始剤濃度0.004重量% 0.05重量% (Irgacure 2959)、UV照射60分 (365nm, 10mW/cm²)、保存温度4℃、保存時間はUV照射後2日間、振動剪断変形 ($\gamma = 0.05$; 周波数 $f = 1\text{Hz}$) とした場合の、DS = 60% のゼラチンメタクリルアミドヒドロゲルの保存係数G'の温度依存性。 10

図10 ポリマー濃度15% (水中重量%)、開始剤濃度0.004重量% 0.05重量% (Irgacure 2959)、線照射量0、3、6、15および25kGy、保存温度4℃、保存時間は線照射前11日間、および線照射後7日間、振動剪断変形 ($\gamma = 0.05$; 周波数 $f = 1\text{Hz}$) とした場合の、DS = 60% のゼラチンメタクリルアミドヒドロゲルの保存係数G'の温度依存性。

図11 ポリマー濃度15% (水中重量%)、開始剤濃度0.004重量% 0.05重量% (Irgacure 2959)、線照射量6kGy、保存温度4℃、保存時間は線照射前11日間、および線照射後4日間、振動剪断変形 ($\gamma = 0.05$; 周波数 $f = 1\text{Hz}$) とした場合の、DS = 16、25および 30% のゼラチンメタクリルアミドヒドロゲルの保存係数G'の温度依存性。 20

実施例

実施例1 ゼラチンヒドロゲルフィルムの調製

ゼラチンメタクリルアミドの調製

ゼラチンを無水メタクリル酸と反応させることによりゼラチンメタクリルアミドを調製することができる (図7A)。10gのゼラチン (約3.28nmolのリジンおよびヒドロキシリジンの - アミノ基に相当) を100mlのPBSバッファ (pH7.4) に溶解し、50℃で攪拌する。ゼラチンが完全に溶解した後、0.5mlの無水メタクリル酸 (3.35mmol) を添加する。ゼラチンおよび無水メタクリル酸の混合物を40~50℃で1時間攪拌する。その後、40℃で2~3日、混合物を水に対して透析し、ついで、凍結乾燥する。トリニトロベンゼンスルホン酸法によるゼラチン中に存在するリジンおよびヒドロキシリジンの遊離 - アミノ基含量の測定により、得られた1gのメタクリルアミドゼラチンが0.284nmolの遊離 - アミノ基を依然として含有していることが示される。この測定により、修飾ゼラチンの - アミノ基のうち55%が依然として遊離状態であり、ゼラチンのアミノ基の45%が修飾されていると計算できる。 30

アクリルアミド修飾デキストランの調製

図7Bに示すように、デキストランを2 - ビニル - 4,4 - ジメチル - 2 - オキサリン - 5 - オン (ビニルアズラクトン) と反応させることによりビニル修飾デキストランを調製することができる。6.2gmeqのグルコシド単位に相当する1gのデキストラン (分子量40000) を20mlのジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解する。ついで、0.26g (1.86mmol) のビニルアズラクトン) および36.4g (0.3mmol) の4 - N,N - ジメチルアミノピリジン (DMAP) を、DMSOに溶解したデキストランに添加し、50℃で24時間攪拌する。過剰のアセトンで沈殿させることによりポリマーを単離する。ポリマーを乾燥させ、水に再溶解後、室温で2日間、水に対して透析し、ついで、凍結乾燥する。NMR測定により、デキストランの30% ビニル置換が達成されたことが示される (100個のグルコシド単位あたり30個のビニル基) 。 40

デキストランメタクリレート調製の調製

デキストランを無水メタクリル酸と反応させることによってもビニル修飾デキストランを調製することができる (図7C)。1g (6.2meqのグルコシド単位) のデキストラン (分子量40000) を20mlのDMSOに溶解する。そのデキストラン溶液に、0.092mlの無水メタクリル酸 50

(0.62mmol) および36.4mg (0.3mmol) のDMPAを添加する。50 で1時間攪拌後、大量のメタノール：アセトン混合物(1:1)でポリマーを沈殿させる。ついで、乾燥した生成物を水に再溶解し、室温で2日間透析し、ついで、凍結乾燥する。置換率をNMR実験により測定する。デキストランの10%ビニル置換が達成される(100個のグルコシド単位あたり10個のビニル基)。

ゼラチンヒドロゲルフィルムの調製

メタクリルアミド修飾ゼラチンの架橋、あるいはゼラチンメタクリルアミドとビニル置換デキストランとの共重合、あるいはゼラチン存在下でのビニル置換デキストランの架橋(これらによりゼラチンは半相互貫入網状組織中に物理的に捕捉される)を、水性媒体中、ラジカル開始剤の存在下で行う。開始剤は過硫酸アンモニウム + N,N,N',N' - テトラメチレンジアミン(ゲル1gあたり1 μ mol)のごとき酸化還元開始システムまたは2,2 - ジメトキシ - 2 - フェニルアセトフェノン(DMPA) + 光処理のごとき光開始剤であってもよい。例えば、ラジカル架橋によりヒドロゲルを調製するためには、光開始剤としてDMPAを含有するビニル修飾誘導体の溶液(40)を、厚さ1mmのスペーサーにより隔てられた2枚のガラス板により形成された鑄型中に注ぎ、LWUVランプ(VL - 400型、Vilber Lourmat, Marn e La Vallée, France)を用いて365nmの光(10mW/cm²)を10分間照射する。ガラス板を除去した後、厚さ1mmの柔軟性のある水不溶性フィルムを得る。

実施例2 架橋メタクリルアミド修飾ゼラチンフィルムの粘弾性

A)ゼラチンメタクリルアミドヒドロゲルフィルムの機械的特性(弾性係数)の特徴づけ
小さな張力下でのダイナミック剪断オシレーション測定(dynamic shear oscillation me 20
asurement)を用いて架橋メタクリルアミド修飾ゼラチンフィルムの粘弾性を特徴づけた。

置換率45%のメタクリルアミド修飾ゼラチン(ゼラチンの - アミノ基の45%がビニル基により置換されている)を実施例1記載のごとく調製した。水性媒体中、光開始剤として使用される2,2 - ジメトキシ - 2 - フェニルアセトフェノン(DMPA)の存在下においてメタクリルアミド修飾ゼラチンの架橋を行った。ゼラチンメタクリルアミド(1g)を、40

に加温した10mlのリン酸塩緩衝セイライン溶液(pH7.4)に溶解した(10重量%)。メタクリルアミド修飾ゼラチン溶液にDMPA(6mg)を添加し、40 で1時間攪拌した。ついで、厚さ1mmのスペーサーにより隔てられた2枚のガラス板により形成された鑄型中に温混合物を注ぎ、LWUVランプ(VL - 400型)を用いて光(365nm、10mW/cm²)を10分間照射する。比較を行う目的で、かつヒドロゲルの弾性係数に対する光架橋の影響および化学的架 30

橋の影響の相違を識別するために、未架橋ゼラチンヒドロゲルフィルムおよびメタクリルアミド修飾ゼラチンヒドロゲルフィルムを、光開始剤(DMPA)不存在下で調製した。ゼラチンヒドロゲルの調製には、40

に加温した10mlのリン酸塩緩衝セイライン溶液(pH7.4)に1gのゼラチンを溶解し(10重量%)、メタクリルアミド修飾ゼラチンヒドロゲルの調製には、40

に加温した10mlのリン酸塩緩衝セイライン溶液(pH7.4)に1gのメタクリルアミド修飾ゼラチンを溶解した(10重量%)。厚さ1mmのスペーサーにより隔てられた2枚のガラス板により形成された鑄型中に各溶液を別個に注いだ。ヒドロゲルフィルムを室温に1時間置き、ついで、4

で1週間保存した。プレート間距離800 μ mの直径40mmの平行ラフプレート(rough plate)を用いるCSL²レオメーター(TA Instruments)により振動剪断変形における流体力学的測定を行った。16ないし50 の温度スキャン(加熱速度 40
毎分1.75)、一定周波数(1Hz)および一定剪断力(=0.05、1.88mrad)として、振動剪断変形により保存(弾性)係数の温度依存性を調べた。ヒドロゲルフィルムの保存(弾性)係数G'の温度依存性を図1に示す。物理的ゲル化のみによってゼラチンヒドロゲルフィルムを得たところ、ゼラチンの融点以下で高いG'値が示された。温度をゼラチンの融点以上に上昇させた場合(ゾル - ゲル遷移温度:28~30)、ゼラチンの物理的な網状組織の分解により弾性係数は急激に非常に低い値にまで下降した。光開始剤を添加せずに調製したメタクリルアミド修飾ゼラチンヒドロゲルは、ゾル - ゲル遷移温度以下においてさ

えも低いG'値を示し、ゼラチンをメタクリルアミド基で修飾した場合には弱い物理的網状構造が形成されることが示された。ゾル - ゲル遷移温度以上において、弾性係数は急激に非常に低い値にまで下降し、光開始剤不存在下においては化学的架橋が形成されないこ 50

とが示された。対照的に、DMPA含有メタクリルアミド修飾ゼラチン溶液を光処理したところ、融点以下および以上の両方において非常に高い保存係数 (G') を有するヒドロゲルフィルムが得られ、光処理される光開始剤システムの存在によりヒドロゲルの化学的架橋が誘導されることが示された。架橋メタクリルアミドゼラチンフィルムの機械的特性 (例えば、弾性係数) はメタクリルアミド修飾ゼラチンの化学的架橋および物理的構造形成により得られると結論づけられた。また、創傷用包帯の製造に適した機械的特性を有する架橋メタクリルアミド修飾ヒドロゲルフィルムを得ることができると結論された。

B) ヒドロゲル保存時間を延長した場合のゼラチンメタクリルアミドヒドロゲルフィルムの機械的特性 (弾性係数) の特徴付け

小規模な変形を加えた場合の振動試験測定を用いて架橋メタクリルアミド修飾ゼラチンヒドロゲルフィルムの保存係数を評価した。置換率60%のメタクリルアミド修飾ゼラチン (ゼラチンの - アミノ基の60%がビニル基で修飾されている) を実施例1記載のごとく調製した。水性媒体中、光開始剤として使用されるDMPAの存在下においてメタクリルアミド修飾ゼラチンの架橋を行った。メタクリルアミド修飾ゼラチン (1.5g) を、40 に加温した10mlのリン酸塩緩衝セイライン溶液 (pH7.4) に溶解し (15重量%)、40 で温めた。DMPA (6mg) をメタクリルアミド修飾ゼラチンに添加し、40 で1時間攪拌した。ついで、厚さ1mmのスペーサーにより隔てられた2枚のガラス板により形成された鋳型中に温混合物を注ぎ、LWUVランプ (VL-400型) を用いて光 (365nm、10mW/cm²) を10分間照射した。架橋ヒドロゲルフィルムを室温に1時間置き、ついで、種々の時間4 で保存した。プレート間距離800 μ mの直径40mmの平行ラフプレート (rough plate) を用いるCSL²レオメーター (TA Instruments) により振動剪断変形における流体力学的測定を行った。16ないし50 の温度スキャン (加熱速度毎分1.75)、一定周波数 (1Hz) および一定剪断力 ($\gamma = 0.05, 1.88\text{mrad}$) として、振動剪断変形により保存 (弾性) 係数の温度依存性を調べた。異なる時間保存された架橋メタクリルアミド修飾ゼラチンからなるヒドロゲルフィルムの保存 (弾性) 係数の温度依存性を図2に示す。ヒドロゲルの機械的特性 (例えば、弾性係数) は、ゼラチン成分の物理的ゲル化およびビニル修飾ゼラチンの化学的架橋により生じる。ゼラチン融点以下および以上におけるヒドロゲル標本の温度スキャンにより、ヒドロゲルの弾性係数に対する化学的および物理的架橋の個々の影響が確認される。メタクリルアミド修飾ゼラチンおよびDMPAの混合物の光処理により、ゼラチン融点以下および以上において高い保存係数 (G') を有するヒドロゲルフィルムが得られ、ゼラチンヒドロゲルフィルム中における化学結合の形成が示された。ヒドロゲルの保存時間を延長した場合、25 未満の温度範囲において G' 値が上昇したが、25 以上の温度範囲においては一定のままであり、保存時間の延長によるヒドロゲル保存係数の上昇は、ゼラチン鎖の物理的構造形成の影響が増大することによってのみ起こることが示された。1週間または2週間ヒドロゲルを保存した後、 G' 値が安定し、ヒドロゲル成熟期間後に安定な機械的特性 (弾性係数) を有する架橋メタクリルアミド修飾ゼラチンヒドロゲルフィルムが得られることが示された。

実施例3 架橋ゼラチンヒドロゲルフィルムからの¹²⁵I-放射性標識ポリペプチド (EGF およびBSA) の制御放出

フィルムの調製

上記と同様の手順を用いてヨウ素化された因子を含有する架橋ゼラチンヒドロゲルフィルムを調製した。ヒドロゲル架橋前にポリペプチドをゼラチンまたは修飾ゼラチンに添加した。ゼラチンヒドロゲルは0.02%のシメロサル (thimerosal) を保存料として含有していた。ゼラチンヒドロゲルマトリックス中のヨウ素化試験蛋白濃度は約5 μ g/mlであった。

創傷模倣系を用いる放出試験

制御デリバリー創傷用包帯の放出動力学を評価するためには、連続的に攪拌されている抽出用液体に包帯試料を浸す溶出試験系は理想的でない。この種の溶出は能動的な抽出手段を用いて行われるので、かかる系での放出は創傷において観察される放出よりもずっと迅速である。ShindeおよびErhan (Bio - Med.Mat.Eng.2:pp.127 - 131,1992) は、インスリン

10

20

30

40

50

を含有した柔軟性のあるゼラチンフィルムの放出特性を調べるためのこのような種類の系について報告している。我々は、創傷状況を模倣する別の試験系を用いることにした。ゼラチンヒドロゲルフィルムからのポリペプチドの放出を定量するために、図3に示す放出系を用いた。ゼラチンヒドロゲルフィルム試料(1.3cm²)を、CostarのTranswell-COL細胞培養チャンバーインサートの微少孔コラーゲン処理膜(孔径3μm)(それ自体6ウェルプレートのウェル中に置かれている)上に置いた。溶出用媒体(0.1%カゼインおよび0.02%シメロサルを含有する1mlのPBS)の体積を調節して微少孔膜の底面と接触するようにした。それゆえ、ヒドロゲルに含有される成分はゼラチンヒドロゲル試料の一方の面からのみ放出されることとなった。解放性創傷中の環境を模倣し、含有された物質より迅速に可溶化される単純な浸漬系よりも現実的な放出動力学の評価を行うためにこの種の放出系が使用された。創傷条件により近似させるために、37℃のサーモスタット付きインキュベーター中で放出試験を行った。個々の時点において、1mlの抽出用液体を取り、1mlの新鮮な液体と置換した。放出された標識蛋白を定量するために、取った抽出用液体の試料中に存在する放射活性をガンマカウンターで測定した。さらに、蛋白含有ゼラチンヒドロゲルフィルムを保存した場合の安定性を評価するために、4℃で1日保存および2カ月保存されたフィルムにおいて放出特性を調べた。抽出用液体の試料を-70℃で保存した。放出実験の終わりに、すべての抽出用液体の試料を融解し、ついで、最初にTCAで沈殿させ、その後放射活性を測定して、蛋白に結合した放射活性のみを確実に定量するようにした。実験の終わりに、ゼラチンヒドロゲルディスクおよびTranswell-COLフィルター中に残存する放射活性も測定した。種々の組成のヒドロゲルフィルムからの¹²⁵I-BSA(分子量68kDa)および¹²⁵I-EGF(分子量6kDa)の放出動力学を図4、5および6に示す。1日または2カ月のヒドロゲルの保存後、評価したすべてのヒドロゲルは、インキュベーション9日目まで持続的な放出を示した。このインキュベーション時間後に、両ペプチドの80~90%が抽出用液体に放出された。プラトー放出(plateau release)に続くバースト放出(burst release)により放出動力学が特徴づけられた。¹²⁵I-EGFは¹²⁵I-BSAよりも迅速に放出されたが、その結果によっても、医薬含有創傷用包帯への適用に好ましい動力学に従って大型蛋白の放出がより効果的に行われることが確認された。さらに、マトリックスの安定性は、長期保存を可能にする十分であることがわかった。なぜなら、ヒドロゲルの保存は放出動力学に影響しないかまたはほとんど影響しなかったからである。ゼラチンおよびデキストランのビニル誘導体から製造される新たなヒドロゲルは中程度の期間にわたるポリペプチドの適当な放出に適することがわかった。

実施例4 ゼラチンメタクリルアミドゲルに対する置換率の影響

材料および方法

Sigmaから得たゼラチンタイプB(G-9382,ロット26H0347)はウシ皮膚のアルカリ処理により製造されている。ゲル強度は225ブルーム(Bloom)である。無水メタクリル酸(MAA)をAldrichから得て、そのまま使用した。1-(4-(2-ヒドロキシエトキシ)-フェニル)-2-ヒドロキシ-2-メチル-1-プロパン-1-オン(Irgacure^R2959)をCibaから得た。トリニトロベンゼンスルホン酸をServaから購入し、アセチルリジンをBachemから購入した。透析膜Spectra/Por^R1(分子量6000~8000)をPolyab(Antwerpen,Belgium)から購入した。

ゼラチンメタクリルアミドの調製

100gのゼラチン(リジンおよびヒドロキシリジンの - アミノ基として32.8mmol)を1リットルのリン酸塩緩衝セイライン(PBS,pH7.4)に溶解し、50℃で保存する。ゼラチンが完全に溶解した後、10mlの無水メタクリル酸(67.1mmol)を添加する。反応混合物を40~50℃で1時間攪拌する。その後、混合物を1リットルの水で希釈し、水に対して40℃で1日透析し、ついで、凍結乾燥する。

無水メタクリル酸量を減少させることによって置換率の低いゼラチンメタクリルアミドを調製することができる。

トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法により修飾ゼラチン中の遊離アミノ基を測定する(Habeeb,Anal.Biochem.,14,328-336,1996)。1mlの蛋白溶液(水中のゼラチンまたは

10

20

30

40

50

ゼラチンメタクリルアミド)を1mlのNaHCO₃バッファー (pH8.5) (0.05M) および1mlのTNBS溶液 (0.1%) と混合する。混合物を遮光し、37 °C で2時間置く。ついで、0.5mlの温HCl (1N) を添加し、345nmにおける吸光度を測定する。すべての試料を3系調製する。

アセチルリジンのキャリブレーション曲線に基づいてこのUV法を行う。ゼラチンの修飾後に残存する遊離 - アミノ基のパーセンテージを評価することにより、ゼラチンメタクリルアミドの置換率 (DS) を計算することができる。

ゼラチンと過剰の無水メタクリル酸との反応により、70%までの置換率のゼラチンメタクリルアミドが得られるが、等当量の無水物との反応ではわずか46%の修飾率となる (100個の - アミノ基あたり46個のビニル基)。

ヒドロゲルフィルムの調製

365nmフードを装備したALWUVランプVL - 400L型 (Vilber Lourmat, Marne La Vallée) を用いて試料に照射する。

ヒドロゲルに対する振動剪断変形における流体力学的測定を、プレート間距離800 μ mの直径40mmの平行ラフプレート (rough plate) を用いるCSL²レオメーター (TA Instrumrnts) を用いて行う。16ないし50 °C の温度スキャン (加熱速度毎分1.75 °C)、一定周波数 (1 Hz) および一定剪断力 (τ = 0.05、1.88mrad) として、振動剪断変形により保存 (弾性) 係数の温度依存性を調べる。

水性媒体中、光開始剤 (Irgacure^R 2959) 存在下においてメタクリルアミド修飾ゼラチンの架橋を行う。1.5gのゼラチンメタクリルアミドを40 °C の10mlの開始剤溶液 (0.006重量%) に溶解する (15重量%)。ついで、厚さ1mmのスペーサーにより隔てられた2枚のガラス板により形成された鑄型中に温混合物を注ぎ、LWUV光 (365nm、10mW/cm²) を30分において30分間照射した。ガラス板を取った後、水不溶性の厚さ1mmの透明フィルムを得る。

ゼラチンメタクリルアミドゲルに対する置換率の影響

メタクリルアミドゼラチン (gelmod) ヒドロゲルを上記のごとく調製する。異なる下図のビニル基を有するゼラチン含有ヒドロゲルフィルムを、振動剪断変形における流体力学的測定により評価する。Habeb法 (TNBS) により決定された置換率 (DS) をビニル基で修飾された - アミノ基のパーセンテージとして表す。30%以上においてDSは保存係数G'にかなりの影響を与える。よって、化学的架橋は反応性ビニル基の下図により強く影響される。DS35%またはそれ以下の修飾ゼラチンゲルは保存係数の大幅な低下を示す。低置換率ゲル (< 35%) 中の化学的架橋の構造は無視できる。強力に化学的架橋されたヒドロゲルを得るためには、約46%以上のDSを有するゼラチンメタクリルアミドが適切である (図8参照)。

実施例 5 開始剤 (IRGACURE^R 2959) 濃度の影響

実施例 4 記載のごとくメタクリルアミド - ゼラチン (gelmod) ヒドロゲルを調製する。保存係数の温度依存性は、ゲル中の開始剤濃度により強く影響される。0.002重量%の開始剤溶液 (10mlのポリマー溶液あたり0.21mgのIrgacure^R 2959) を用いた場合、G'のさらなる低下が観察される。0.003重量%またはそれ以上の開始剤溶液を用いたヒドロゲルは高温において高い保存係数を示し、それゆえ、より高密度に化学的架橋がなされている。ゼラチン - メタクリルアミドヒドロゲルの機械的特性は開始剤濃度が高くなるにつれて向上する。0.025重量%以上の濃度を用いた場合、ヒドロゲルは硬化し、もろくなる (図9参照)。

実施例 6 ゼラチンメタクリルアミドゲルに対する照射量の影響

ゼラチンメタクリルアミドヒドロゲルの粘弾性に対する異なる照射量の影響を評価した。置換率の高い (DS 60%) ゼラチンメタクリルアミドを用いて試験フィルムを調製する。メタクリルアミド - ゼラチン (gelmod) ヒドロゲルを実施例 4 記載のごとく調製する。室温において鑄型中のヒドロゲルフィルム (ガラス板間にある) に照射する。照射の間に強力な化学的架橋が起こり、硬くてもろいヒドロゲルが得られる。低用量 (3kGy) の場合であっても、高い保存係数G'が測定される (図10)。創傷用包帯に適用するためには、より弾性のあるヒドロゲルが必要であり、置換率の低いゼラチン - メタクリルアミドの照射が

10

20

30

40

50

推奨される。

実施例7 異なる置換率のゼラチン - メタクリルアミドゲルに対する照射量6kGyの影響

上記のように、もろくない材料を得るために低置換率のゼラチンヒドロゲルに照射する。実施例4に記載のごとく、さらなるメタクリルアミド - ゼラチン (gelmod) ヒドロゲルを調製する。

ゼラチンメタクリルアミドに照射 (6kGy) した場合、化学的に架橋されていないポリマーの融解により、G'の大幅な低下が観察される (図11)。ゼラチンの物理的なゲル化は30以上で起こる。約25%の置換率を有する、より高密度に化学的架橋されたヒドロゲルが得られ、ゼラチンの融点以上の温度においてさえも丈夫であるが弾性のあるヒドロゲルとなる。

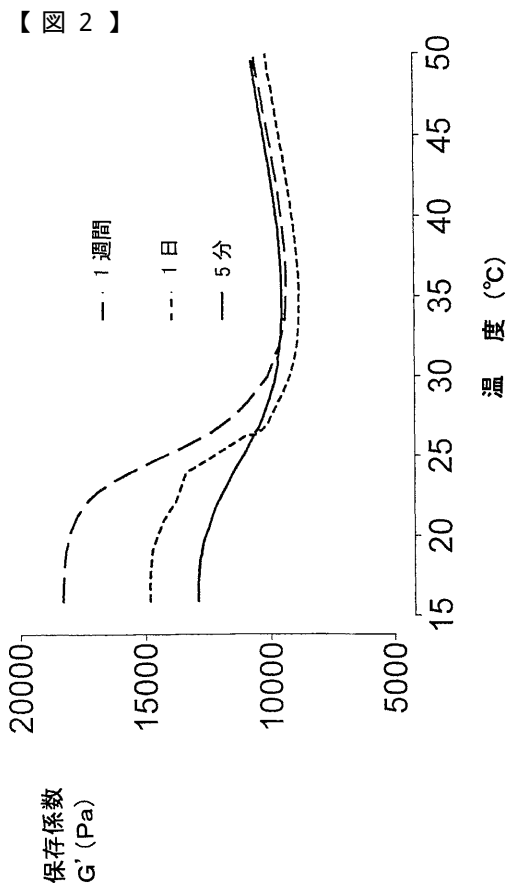


Figure 2

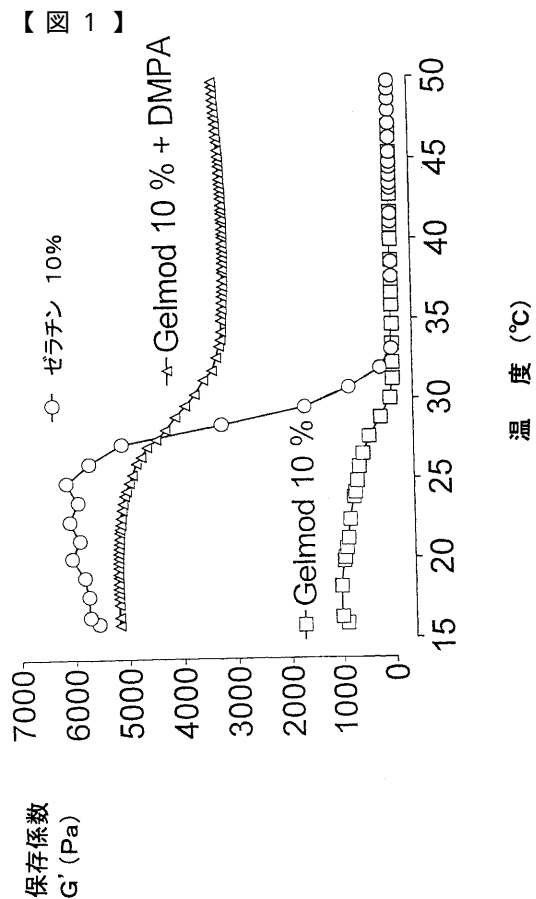


Figure 1

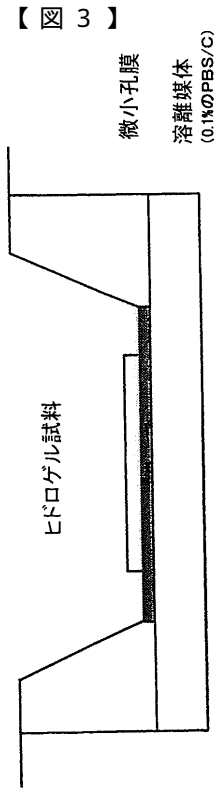


Figure 3

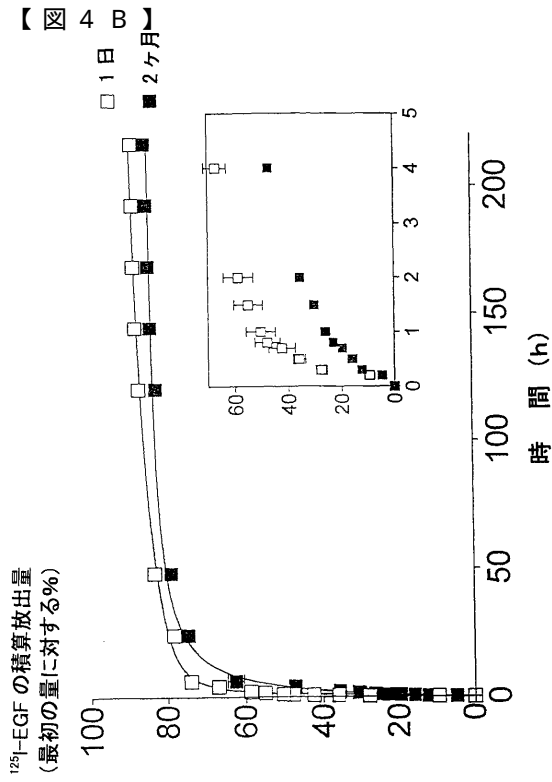


Figure 4 B

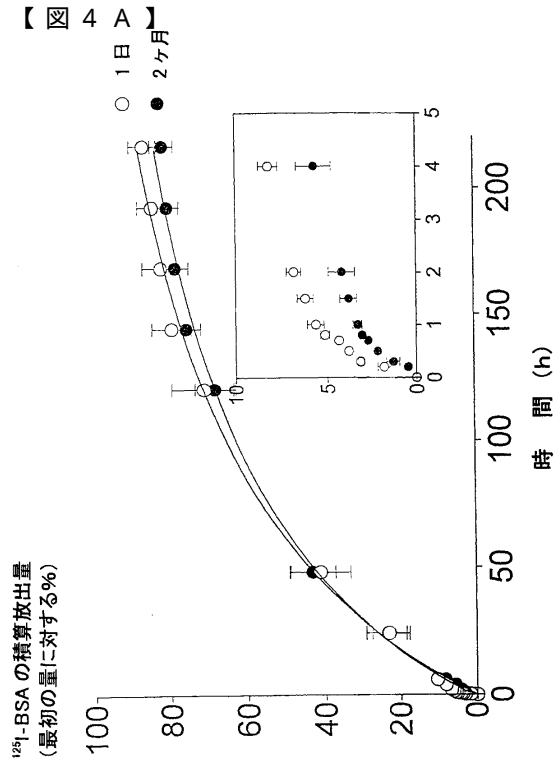


Figure 4 A

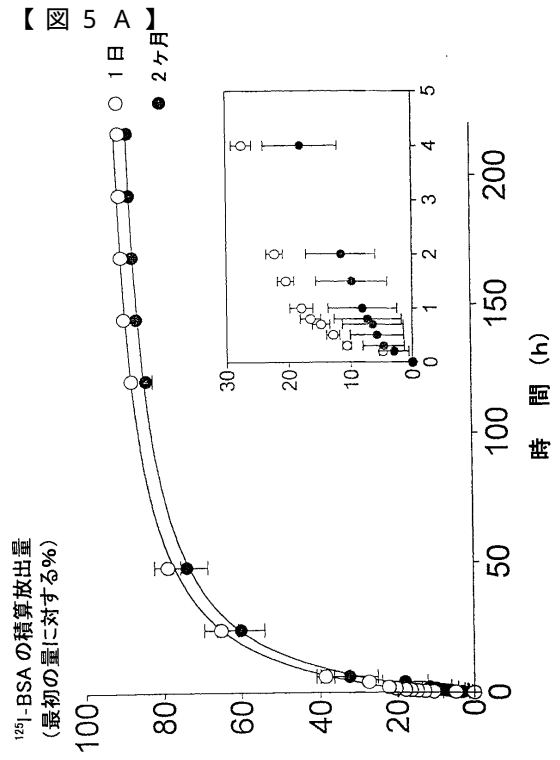


Figure 5 A

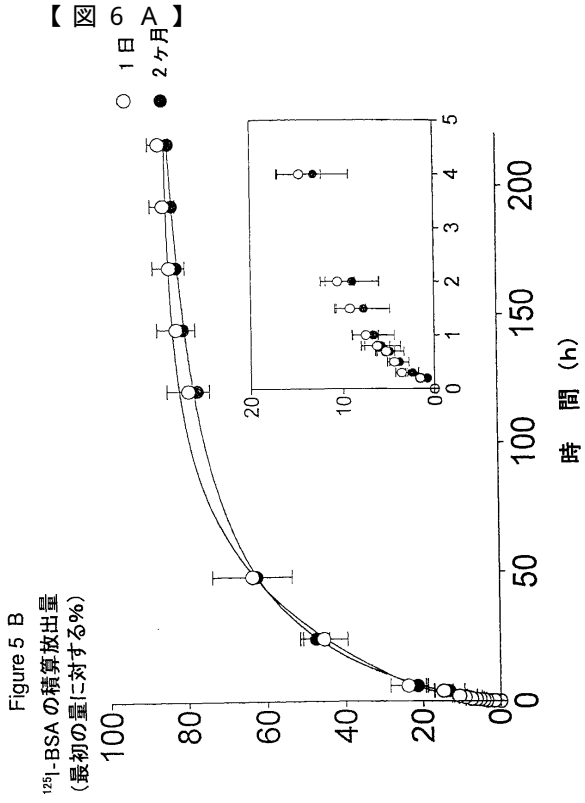
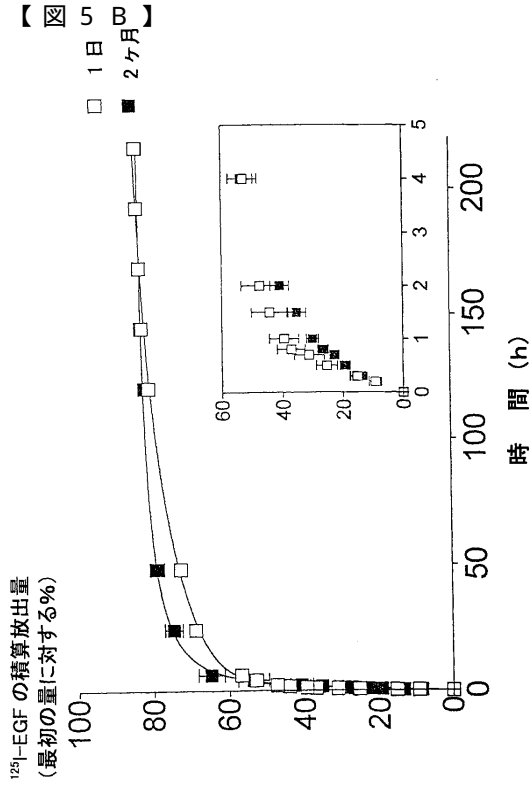


Figure 6 A

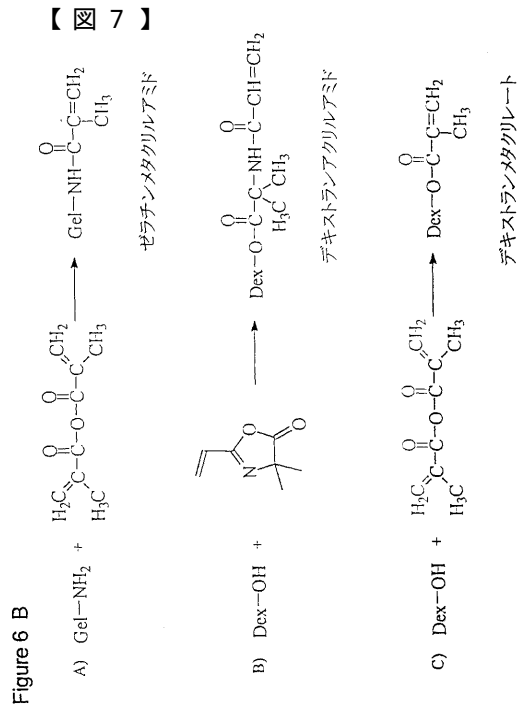
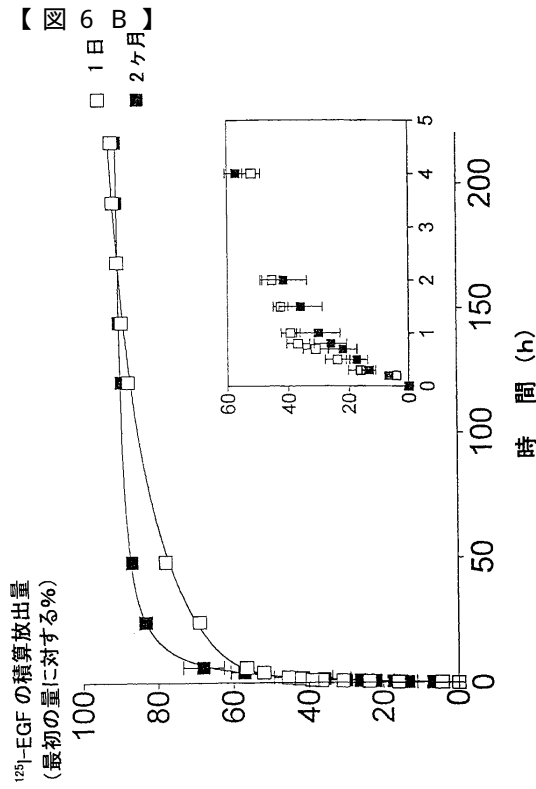
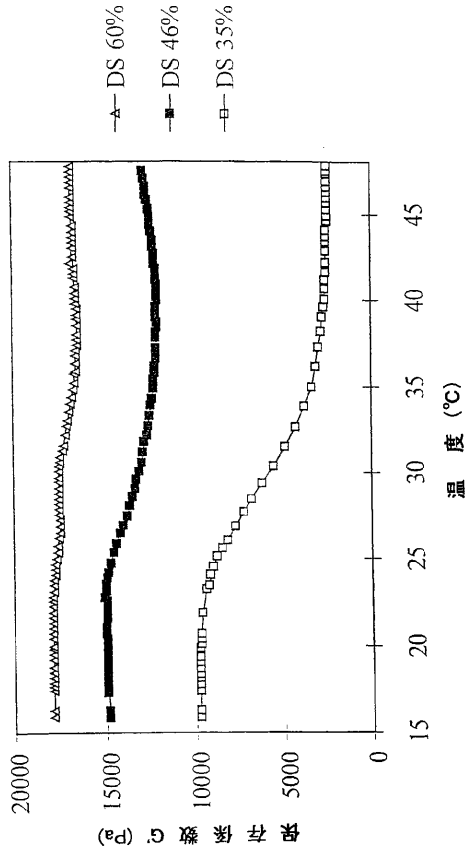


Figure 7

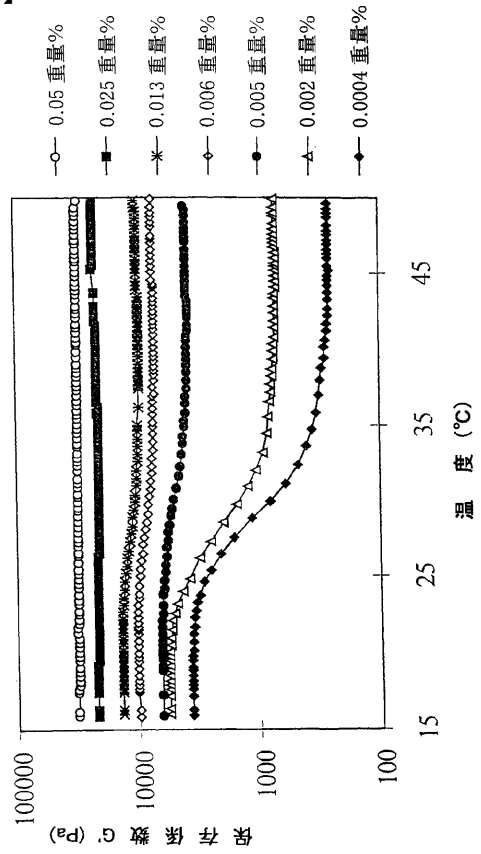
【 図 8 】

Figure 8
ゼラチンメタクリルアミドゲルに
対する置換率の影響



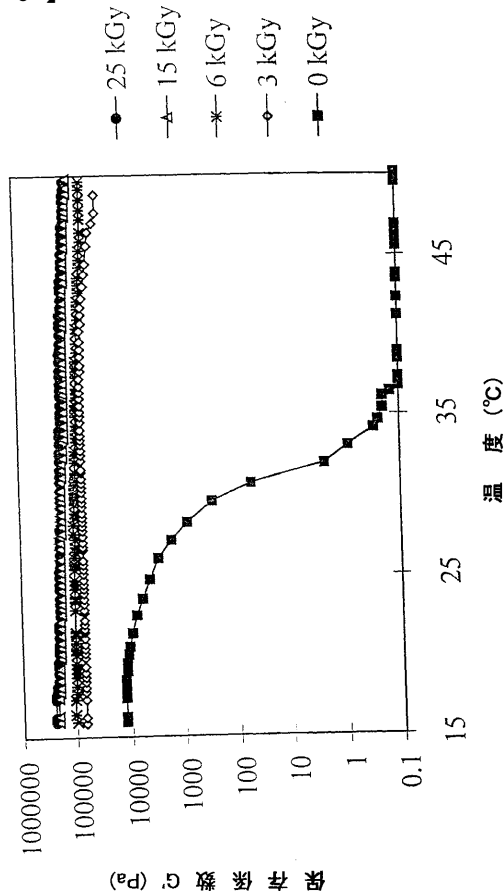
【 図 9 】

Figure 9
開始剤 (IRGACURE® 2959)濃度の影響



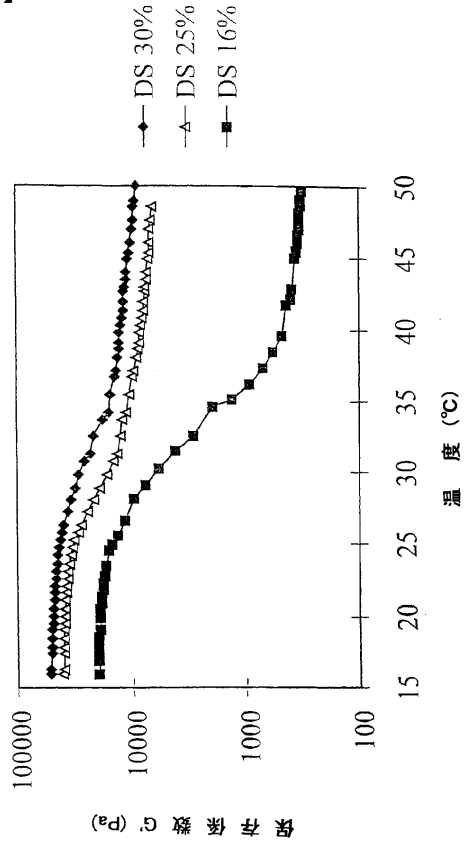
【 図 10 】

Figure 10
ゼラチンメタクリルアミドゲルに対する照射量の影響



【 図 11 】

Figure 11
異なる置換率のゼラチンメタクリルアミドゲルに対する
6KGy 照射量の影響



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

A 6 1 P 17/00

A 6 1 K 37/14

A 6 1 P 27/02

A 6 1 K 37/24

A 6 1 P 27/16

A 6 1 K 37/36

(72)発明者 ファン・デン・ブルケ, アン

ベルギー、ペー 9 0 0 0ヘント、ストロブカーイ 2 6 番

(72)発明者 デレーイ, ベルナルト

ベルギー、ペー 9 7 5 0ジンゲン、スパールストラート 3 8 番

(72)発明者 ドライエ, ジャン - ピエール

ベルギー、ペー 1 4 5 0シャスト、リュ・デ・トルワ・リュイソー 2 番

審査官 安川 聡

(56)参考文献 特表平08 - 500334 (JP, A)

YAMAMOTO, N. et al, Macromol. Rapid Commun., 1996年, Vol. 17, No. 5, p. 313-318

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A61L 15/00 - 33/18

A61K 38/00 - 38/58

CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE(STN)

EUROPAT(QUESTEL)

WPI