(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7525664号
(P7525664)

(45)発行日　令和6年7月30日(2024.7.30)

(24)登録日　令和6年7月22日(2024.7.22)

(51)国際特許分類			FI		
C07K	*14/78*	*(2006.01)*	C07K	14/78	ZNA
C09K	*3/00*	*(2006.01)*	C09K	3/00	103L

請求項の数　26　（全35頁）

(21)出願番号	特願2022-577501(P2022-577501)	(73)特許権者	306037311 富士フイルム株式会社 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号
(86)(22)出願日	令和3年2月18日(2021.2.18)		
(65)公表番号	特表2023-530153(P2023-530153A)	(74)代理人	110000109 弁理士法人特許事務所サイクス
(43)公表日	令和5年7月13日(2023.7.13)		
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/006136	(72)発明者	ファン ボクステル ハウベルト アルベルトゥス オランダ王国 エヌエル－５０４７ テーカー ティルブルフ アウデンスタールト １ フジフィルム・マニュファクチュアリング・ヨーロッパ・ベスローテン・フエンノートシャップ内
(87)国際公開番号	WO2021/261008		
(87)国際公開日	令和3年12月30日(2021.12.30)		
審査請求日	令和4年12月16日(2022.12.16)		
(31)優先権主張番号	2009772.1		
(32)優先日	令和2年6月26日(2020.6.26)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(72)発明者	ファン ドンゲン エリーサベト マリアンナ ヴィルヘルミナ マリア オランダ王国 エヌエル－５０４７ テー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　修飾ゼラチン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

（ａ）リシン残基、及び

（ｂ）チオール基を有するペンダント側鎖を含むリシン残基

を含む修飾ゼラチンであって、

修飾ゼラチンが、少なくとも５０μｍｏｌ／ｇの構成成分（ｂ）を含み、総計で少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇの構成成分（ａ）及び（ｂ）を含み、

平均距離が１７アミノ酸であり、距離標準偏差が１２アミノ酸である、構成成分（ａ）及び（ｂ）を含む、

修飾ゼラチン。

【請求項２】

種類（ａ）の構成成分間、種類（ｂ）の構成成分間、並びに種類（ａ）及び（ｂ）の構成成分間の距離の標準偏差が１４アミノ酸残基未満である、請求項１に記載の修飾ゼラチン。

【請求項３】

１５，０００～８０，０００ダルトンの重量平均分子量を有する、請求項１又は２に記載の修飾ゼラチン。

【請求項４】

少なくとも５の等電点を有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の修飾ゼラチン。

【請求項５】

組換えゼラチン中に存在するアミノ酸の総数に対するＲＧＤモチーフのパーセンテージが

少なくとも０．４％である、請求項１～４のいずれか一項に記載の修飾ゼラチン。
【請求項６】
２５０アミノ酸あたり少なくとも２個のＲＧＤ配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の修飾ゼラチン。
【請求項７】
システインを含まない、請求項１～６のいずれか一項に記載の修飾ゼラチン。
【請求項８】
少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇのリシンを含む組換えゼラチンをチオール化剤と反応させることを含む、修飾ゼラチンを調製する方法であって、修飾ゼラチンが、チオール化剤に由来する少なくとも５０μｍｏｌ／ｇのチオール基を含み、
修飾ゼラチンは、平均距離が１７アミノ酸であり、距離標準偏差が１２アミノ酸であり、構成成分（ａ）リシン残基、及び（ｂ）チオール基を有するペンダント側鎖を含むリシン残基を含む、方法。
【請求項９】
チオール化剤が、２－イミノチオラン及び／若しくはＤＬ－Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、並びに／又はそれらの塩を含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
請求項８又は９に記載の方法によって得ることができる修飾ゼラチン。
【請求項１１】
クリック反応を使用して、請求項１～７又は請求項１０のいずれか一項に記載の修飾ゼラチンを架橋剤と反応させることによって得ることができるヒドロゲル。
【請求項１２】
クリック反応がチオール－マイケル付加反応である、請求項１１に記載の修飾ゼラチンを反応させることによって得ることができるヒドロゲル。
【請求項１３】
架橋剤が少なくとも２個のエチレン性不飽和基を含む、請求項１１又は１２に記載のヒドロゲル。
【請求項１４】
架橋剤が少なくとも１個のマレイミド基を含む、請求項１１又は１２又は１３に記載のヒドロゲル。
【請求項１５】
架橋剤が少なくとも１個のマレイミド基及び少なくとも１個のアクリレート基を含む、請求項１１～１４のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項１６】
架橋剤が１個だけのマレイミド基及び１個だけのアクリレート基を含む、請求項１１～１５のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項１７】
架橋剤が２，０００～３０，０００ダルトンのＭｗを有する、請求項１１～１６のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項１８】
修飾ゼラチンに添加される架橋剤のモル数が、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の全てと反応するのに不十分である、請求項１１～１７のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項１９】
修飾ゼラチンに添加される架橋剤のモル数が、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の最大で９５％と反応するのに十分である、請求項１１～１８のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項２０】
０．５～１５μｍｏｌ／ｇのチオール基を含む、請求項１１～１９のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項２１】

６５～９７．５ｗｔ％の水を含む、請求項１１～２０のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項２２】
最大で１０ｗｔ％の固体含有量を有する、請求項１１～２０のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項２３】
クリック反応を使用して、請求項１～７又は請求項１０のいずれか一項に記載の修飾ゼラチンを架橋剤と反応させることを含む、ヒドロゲルを調製する方法。
【請求項２４】
ａ．請求項１～７又は請求項１０のいずれか一項に記載の修飾ゼラチン、及び
ｂ．架橋剤
を含むキット。
【請求項２５】
架橋剤が１個だけのマレイミド基及び１個だけのアクリレート基を含む、請求項２４に記載のキット。
【請求項２６】
修飾ゼラチンを架橋剤で架橋させるための使用説明書を更に含む、請求項２４又は２５に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、修飾ゼラチン、修飾ゼラチンを作製する方法、ヒドロゲル、ヒドロゲルを作製する方法、及びヒドロゲルを作成するために適切なキットに関する。
【背景技術】
【０００２】
ヒドロゲルは、多量の水及び/又は生体液を吸収することができる三次元の親水性のポリマーネットワークである。それらの高い水含有量、多孔性及び軟らかい稠度に起因して、それらは天然の生体組織を密接にシミュレートする。
【０００３】
ヒドロゲルは、コンタクトレンズ、創傷ドレッシング、薬物送達システム、組織工学及び衛生用品の多くの分野において使用され得る。いくつかのヒドロゲルは、３Ｄ細胞培養において細胞を封入するための効果的なマトリックスプラットフォームとして使用することができる。
【０００４】
合成ポリマー及び天然由来バイオポリマーは、幅広く研究されているヒドロゲル前駆体の種類の１つである。一般に、合成ゲルマトリックスは、機械的強度及び分解速度において容易に最適化することができる。しかしながら、ポリ（エチレングリコール）由来ヒドロゲル（ＰＥＧベース）のような合成ポリマースキャフォールドは、生体機能性を欠き、細胞と相互作用しない。対照的に、天然由来生体材料、例えば、コラーゲン、ゼラチン、フィブリン及びヒアルロン酸は、細胞相互作用部位を提供することができるが、ヒドロゲルネットワークにおける広いメッシュサイズ分布に起因して、弱い機械的性質をもたらすことがある。バイオポリマー骨格に沿った架橋接合部間の距離の範囲は、ゼラチンではα１及びα２鎖について幅広く、三次元ネットワークにおける機械的性質を不均一にさせる。明らかに、生物学的機能性及び合成化学制御の両方が組み合わされた材料についての必要性が存在する。組換えゼラチンは、制御及び細胞相互作用の好ましい組合せを提供する。
【０００５】
ヒドロゲルを形成するために幅広く使用されているプロセスは、光開始ラジカル重合に基づく。大部分は、ポリ（エチレングリコール）ジアクリレート、又はゼラチン、ヒアルロン酸及びデキストランのようなメタクリル化バイオポリマー中のアクリレート部分を使用する。光開始剤の添加及び光曝露により、重合が開始され、ヒドロゲルネットワークが形成される。フリーラジカルに曝露されると、（メタ）アクリレートは、鎖成長機構によ

って数百～数千のモノマーの長さの鎖に架橋し、不均一なネットワーク、架橋後のヒドロゲル収縮及び光学的濁度を引き起こす。この重合プロセスの不利益の１つとして、本発明者らは、使用される光曝露強度が、得られるヒドロゲルの機械的性質を厳密に決定していることを見出した。高強度での短い曝露に対する低強度での長い曝露の固定された総光曝露の条件下で、２倍超の差の最終ヒドロゲル圧縮率に対する変動が、メタクリル化（組換え）ゼラチンについて見出される。低強度は、最も柔らかいヒドロゲル、また非常に顕著なヒドロゲル濁度をもたらす。最高の曝露強度は、許容される光透過性と組み合わされた最高の剛性をもたらす。明らかに、細胞を重合前に封入することが必要な場合、高い（ＵＶ）光曝露は好ましくない。細胞生存率は妥協することができる。

【０００６】

あるいは、光開始ラジカル重合プロセスにおける前駆体としてチオール及びオレフィン（１個以上のエチレン性不飽和基を有する、別名「エン」）の混合物を使用することが有益である。チオール前駆体の添加は、（メタ）アクリレート単独のものからの異なる特性及びいくつかの重要な利点を反応に持たせる。チオール－エンフリーラジカル反応は、ヒドロゲル形成の間の酸素阻害に対して敏感ではない。光重合速度はメタクリレートの光重合速度よりも速く、重合は完結するためにより少ない光開始剤を必要とする。アクリレート単独で見られる鎖成長機構とは対照的に、チオール－エンネットワークはステップ成長機構によって形成され、均質なネットワーク及び無視できるほどのゲル化後収縮をもたらす。それがヒドロゲルの機械的キューに応答する細胞のより低い生存率をもたらすはずなので、このことは有益である。さらに、ヒドロゲルに封入されたタンパク質及び／又は成長因子を必要とする適用の場合では、これらの分子は、単独前駆体の種類として（メタ）アクリレートによるよりも、チオール－エン光重合による分解が非常に低い。

【０００７】

しかしながら、光化学架橋が最も好ましい選択肢ではないことについて多数の理由が存在し得る。大量では、光路長が長くなりすぎて、不均質な曝露強度を引き起こす。インビボ適用では、標的部位が、光が試料に到達するのを妨げることがある。封入することが必要な細胞型は必要な過渡的光ラジカルに敏感すぎることがあり、あるいはエンドユーザーは、必要な曝露装置を有していないか、若しくはそれを使用することが好都合であることを見出していないことがある。そのような場合には、同時に細胞適合性であるクリック型反応を使用することが必要である。

【０００８】

ヒドロゲルを形成するために好ましいクリック型反応は、チオール化合物、及びヒドロゲル前駆体としてアクリレートのような電子不足「エン」を有する化合物の組合せを使用することによって得られる。低分子量のチオール含有化合物は、典型的には不愉快な臭いを示し、通常は細胞に対して毒性であるので、臭い及び細胞毒性を防止するために高分子量の（バイオ）ポリマーにチオールを共有結合的に固定することが好ましい。他方で「エン」含有化合物は通常臭いがなく、低分子量前駆体を使用することができる。しかしながら、３，０００ダルトン未満の分子量を有するアクリレート含有化合物は著しい細胞毒性を示すことが公知である。このため、封入された細胞なしでの適用に対するそのような架橋剤の使用は制限される。

【０００９】

いくつかの実施形態においては、ポリ（エチレングリコール）を含む合成架橋剤の使用を回避し、代わりにアクリレート、メタクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、マレイミド又はビニルスルホンのような電子不足「エン」を有するゼラチン又は多糖を修飾することが好ましい。メタクリルアミド又はメタクリレート基の付加は、当技術分野において公知であるように、水溶液中のメタクリル酸無水物を使用して、高収率で行われる。その結果、そのようなバイオポリマー型架橋剤は、典型的には高分子量を有する。そのような架橋剤の例は、組換えゼラチン（ＲＧ）、ヒアルロナン（ＨＡ）、ヘパラン硫酸（ＨＳ）、ヘパリン（ＨＰ）、コンドロイチン硫酸（ＣＳ）、デルマタン硫酸（ＤＳ）及びケラタン硫酸（ＫＳ）のメタクリル化バージョンである。そのようなバイオポリマー架

橋剤の官能性は典型的には４個よりも多い。いくつかの実施形態においては、官能性は少なくとも１０であり得る。

【００１０】

本発明の好ましい実施形態において、ヒドロゲルは、光開始剤を使用せずに、チオールと電子不足「エン」との間のチオール－マイケル付加反応によって形成される。

【００１１】

ＷＯ２００８／１０３０４１号は、例えば細胞培養作業における細胞付着を含む適用、及びアンカー依存性細胞の細胞培養を含む適用、及びまた各種の医学的適用における使用のための組換えゼラチンを記載している。細胞付着は、医学的適用、例えば、創傷の処置（人工皮膚材料を含む）、骨及び軟骨（再）成長、インプラント術、並びに人工血管材料及び細胞の付着受容体の遮断において重要な役割を果たす。

【発明の概要】

【００１２】

組換えゼラチン、例えば、ＷＯ２００８／１０３０４１号に記載されるものを修飾して、新規ヒドロゲルの調製のための水溶性ポリマーとしての使用を含む有用な性質を有する材料を提供することができることをここに見出した。

【００１３】

本発明は以下の発明を提供する。

（１）　（ａ）リシン残基、及び

（ｂ）チオール基を有するペンダント側鎖を含むリシン残基

を含む修飾ゼラチンであって、

修飾ゼラチンが、少なくとも５０μｍｏｌ／ｇの構成成分（ｂ）を含み、総計で少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇの構成成分（ａ）及び（ｂ）を含む、

修飾ゼラチン。

（２）　平均距離が１７アミノ酸であり、距離標準偏差が１２アミノ酸である、構成成分（ａ）及び（ｂ）を含む、（１）に記載の修飾ゼラチン。

（３）　種類（ａ）の構成成分間、種類（ｂ）の構成成分間、並びに種類（ａ）及び（ｂ）の構成成分間の距離の標準偏差が１４アミノ酸残基未満である、（１）又は（２）に記載の修飾ゼラチン。

（４）　１５，０００～８０，０００ダルトンの重量平均分子量を有する、（１）～（３）のいずれか一に記載の修飾ゼラチン。

（５）　少なくとも５の等電点を有する、（１）～（４）のいずれか一に記載の修飾ゼラチン。

（６）　組換えゼラチン中に存在するアミノ酸の総数に対するＲＧＤモチーフのパーセンテージが少なくとも０．４％である、（１）～（５）のいずれか一に記載の修飾ゼラチン。

（７）　２５０アミノ酸あたり少なくとも２個のＲＧＤ配列を含む、（１）～（６）のいずれか一に記載の修飾ゼラチン。

（８）　システインを含まない、（１）～（７）のいずれか一に記載の修飾ゼラチン。

（９）　少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇのリシンを含む組換えゼラチンをチオール化剤と反応させることを含む、修飾ゼラチンを調製する方法であって、修飾ゼラチンが、チオール化剤に由来する少なくとも５０μｍｏｌ／ｇのチオール基を含む、方法。

（１０）　チオール化剤が、２－イミノチオラン及び／若しくはＤＬ－Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、並びに／又はそれらの塩を含む、（９）に記載の方法。

（１１）　（９）又は（１０）に記載の方法によって得ることができる修飾ゼラチン。

（１２）　クリック反応を使用して、（１）～（８）又は（１１）のいずれか一に記載の修飾ゼラチンを架橋剤と反応させることによって得ることができるヒドロゲル。

（１３）　クリック反応がチオール－マイケル付加反応である、（１２）に記載の修飾ゼラチンを反応させることによって得ることができるヒドロゲル。

（１４）　架橋剤が少なくとも２個のエチレン性不飽和基を含む、（１２）又は（１３）に記載のヒドロゲル。

（１５）　架橋剤が少なくとも１個のマレイミド基を含む、（１２）又は（１３）又は（１４）に記載のヒドロゲル。
（１６）　架橋剤が少なくとも１個のマレイミド基及び少なくとも１個のアクリレート基を含む、（１２）～（１５）のいずれか一に記載のヒドロゲル。
（１７）　架橋剤が１個だけのマレイミド基及び１個だけのアクリレート基を含む、（１２）～（１６）のいずれか一に記載のヒドロゲル。
（１８）　架橋剤が２，０００～３０，０００ダルトンのＭｗを有する、（１２）～（１７）のいずれか一に記載のヒドロゲル。
（１９）　修飾ゼラチンに添加される架橋剤のモル数が、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の全てと反応するのに不十分である、（１２）～（１８）のいずれか一に記載のヒドロゲル。
（２０）　修飾ゼラチンに添加される架橋剤のモル数が、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の最大で９５％と反応するのに十分である、（１２）～（１９）のいずれか一に記載のヒドロゲル。
（２１）　０．５～１５μｍｏｌ／ｇのチオール基を含む、（１２）～（２０）のいずれか一に記載のヒドロゲル。
（２２）　６５～９７．５ｗｔ％の水を含む、（１２）～（２１）のいずれか一に記載のヒドロゲル。
（２３）　最大で１０ｗｔ％の固体含有量を有する、（１２）～（２１）のいずれか一に記載のヒドロゲル。
（２４）　クリック反応を使用して、（１）～（８）又は（１１）のいずれか一に記載の修飾ゼラチンを架橋剤と反応させることを含む、ヒドロゲルを調製する方法。
（２５）　ａ．（１）～（８）又は（１１）のいずれか一に記載の修飾ゼラチン、及び
ｂ．架橋剤
を含むキットオブパーツ。
（２６）　架橋剤が１個だけのマレイミド基及び１個だけのアクリレート基を含む、（２５）に記載のキットオブパーツ。
（２７）　修飾ゼラチンを架橋剤で架橋させるための使用説明書を更に含む、（２５）又は（２６）に記載のキットオブパーツ。
【図面の簡単な説明】
【００１４】
【図１】図１は、ＯＰＡアッセイを使用した１グラムあたり６４４．７マイクロモルのリシンを有する未修飾ＲＥＣ１ゼラチンについての検量曲線を示す。
【図２】図２は、ＯＰＡアッセイを使用した１グラムあたり４００．３マイクロモルのリシンを有する未修飾ＣＲＥＣ１ゼラチンについての検量曲線を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
本発明の第１の態様によれば、
（ａ）リシン残基、及び
（ｂ）チオール基を有するペンダント側鎖を含むリシン残基
を含む修飾ゼラチンであって、
修飾ゼラチンが、少なくとも５０μｍｏｌ／ｇの構成成分（ｂ）を含み、総計で少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇの構成成分（ａ）及び（ｂ）を含む、
修飾ゼラチンが提供される。
【００１６】
本明細書において使用される「含む」という用語は、明確に特定されない限り、述べられたパーツ、ステップ又は構成成分の存在を必要とするが、１つ以上の追加のパーツ、ステップ又は構成成分の存在を排除しないとして解釈されるべきである。
【００１７】
不定冠詞「ａ」又は「ａｎ」による要素への言及は、文脈が唯一の要素が存在すること

を明らかに必要としない限り、１つより多くの要素が存在する可能性を排除しない。そのため、不定冠詞「ａ」又は「ａｎ」は、通常「少なくとも１つ」を意味する。

【００１８】

本明細書において、前駆体ゼラチン、修飾ゼラチン及びヒドロゲルのμｍｏｌ／ｇの全ての量は、関連する材料の乾燥重量に基づく。

【００１９】

リシン残基、及びチオール基を有するペンダント側鎖を含むリシン残基のμｍｏｌ／ｇ数は、下記の実施例項に記載される一般的方法によって決定することができる。

【００２０】

第２の態様において、本発明は、少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇのリシンを含む組換えゼラチンをチオール化剤と反応させることを含む、修飾ゼラチンを調製する方法であって、修飾ゼラチンが、チオール化剤に由来する少なくとも５０μｍｏｌ／ｇのチオール基を含む、方法を提供する。

【００２１】

修飾ゼラチン中に存在するチオール化剤に由来するチオール基のμｍｏｌ／ｇ数は、実施例項において下記に記載される方法によって決定することができる。

【００２２】

本発明の第２の態様の方法において使用される少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇのリシンを含む組換えゼラチンは、本明細書において、簡潔さのために「前駆体ゼラチン」と略される。天然ゼラチンは、４５０μｍｏｌ／ｇ未満のリシンを含有する。

【００２３】

前駆体ゼラチンは、当技術分野において公知の一般的方法、例えば、ＥＰ０９２６５４３号、ＥＰ１０１４１７６号、WO０１／３４６４６号及びWO２００８／０３０４１号の特許公開に記載される方法によって得ることができる。組換えゼラチンを調製する方法論は、刊行物「High yield secretion of recombinant gelatins by Pichia pastoris」、M.W.T. Wertenら、Yeast 15巻、1087～1096頁(1999年)にも記載されている。

【００２４】

前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンは、好ましくは１５０～１，０００アミノ酸を含む。本明細書において「アミノ酸」及び「アミノ酸残基」という用語は互換的に使用される。

【００２５】

前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンは、好ましくは１８，０００～９０，０００ダルトンの範囲の設計された分子量を有する。好ましくは、これらの前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンを製造するための生成プロセスは、十分に設計され、最小限の数の高分子開裂のみを引き起こす。結果として、１５，０００～８０，０００ダルトンの範囲の重量平均分子量（「ＷＡＭＷ」）と１．２未満の多分散指数ｐＤが得られた。ＷＡＭＷは、通常、最小限のポリマー鎖開裂の結果として組換えゼラチンについての設計されたＭＷよりも幾分低いだけである。

【００２６】

動物組織から抽出される天然ゼラチンとは対照的に、組換えゼラチンについて、分子量は設計されたアミノ酸配列の結果である。理論では、単分散高分子は、定義された分子量ＭＷで得られる。しかしながら、実際には、極少量の鎖開裂に起因して、理想単分散からのいくらかの偏差が存在する。これは、重量平均分子量（ＷＡＭＷ）を設計されたものよりも幾分低くさせ、かつ１よりもわずかに高い多分散指数（ｐＤ）を引き起こす。１７，０００ダルトン未満又は９０，０００ダルトン超の設計されたＭＷは、低収率の非効率的な生成プロセスを生じさせ、したがってあまり好ましくないことが見出される。加えて、８０，０００ダルトン超の測定されたＷＡＭＷによって特徴付けられる修飾ゼラチンの生成バッチは、ヒドロゲル形成プロセスのための前駆体として修飾ゼラチン溶液を取り扱う間に高い溶液粘度をもたらす。高すぎる粘度は、ヒドロゲル表面の均一な水平化を必要とする適用における適用可能性を制限する。

【００２７】

前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンは、好ましくは少なくとも５の等電点を有する。

【００２８】

好ましくは、前駆体ゼラチンは、少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇのリシンを含むＲＧＤ富化組換えゼラチン、例えばアミノ酸の総数に対するＲＧＤモチーフのパーセンテージが少なくとも０．４である、少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇのリシンを含む組換えゼラチンである（即ち、アルギニン、グリシン及びアスパラギン酸からなるＲＧＤモチーフの順序が「１」としてカウントされ、前駆体ゼラチン中に存在するアミノ酸の総数に対するそのようなＲＧＤモチーフの数が少なくとも０．４である）。そのため、修飾ゼラチンにおいて、アミノ酸の総数に対するＲＧＤモチーフのパーセンテージも、好ましくは少なくとも０．４である。

【００２９】

前駆体ゼラチン又は修飾ゼラチンが３５０アミノ酸以上を含む場合、好ましくは３５０アミノ酸の各区間は少なくとも１個のＲＧＤモチーフを含む。

【００３０】

好ましくは、前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンは、少なくとも４５０μｍｏｌ／ｇのリシン、及び少なくとも０．６％のＲＧＤモチーフ、より好ましくは少なくとも０．８％、特には少なくとも１．０％、より特には少なくとも１．２％、最も好ましくは１．５％のＲＧＤモチーフを含む。０．４のＲＧＤモチーフのパーセンテージは、２５０アミノ酸あたり少なくとも１個のＲＧＤ配列と対応する。ＲＧＤモチーフの数は整数であり、したがって少なくとも０．４％の特徴を満たすために、２５１アミノ酸からなる前駆体ゼラチン又は修飾ゼラチンは少なくとも２個のＲＧＤモチーフを含まなければならない。好ましくは、前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンは、２５０アミノ酸あたり少なくとも２個のＲＧＤモチーフ、より好ましくは２５０アミノ酸あたり少なくとも３個のＲＧＤモチーフ、最も好ましくは２５０アミノ酸あたり少なくとも４個のＲＧＤモチーフを含む。

【００３１】

前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンは、好ましくは少なくとも３個のＲＧＤモチーフを含む。更なる実施形態において、前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンは、少なくとも４個のＲＧＤモチーフ、好ましくは少なくとも６個、より好ましくは少なくとも８個、更により好ましくは少なくとも１２個のＲＧＤモチーフを含む。好ましくは、前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンは、最大で２０個のＲＧＤモチーフを含む。前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンは、好ましくはリシン、グルタミン酸及びアスパラギン酸残基、特にリシン、グルタミン酸及びアスパラギン酸残基の均質な分布を含む。

【００３２】

好ましくは、前駆体ゼラチン（及び結果として得られる修飾ゼラチン）はリシン残基の均一な分布を含む。この方法においては、チオール化剤との反応は、チオール基を有するペンダント側鎖を含むリシン残基の均一な分布を含む修飾ゼラチンを提供する。そのため、修飾ゼラチンが架橋剤と反応すると、修飾ゼラチン分子間で架橋して生じるヒドロゲルは、均一に分布して、より均質で機械的に頑強なヒドロゲルを提供する。

【００３３】

天然ゼラチンの代わりに本発明の方法において組換えゼラチンを使用することによって、ゼラチン中に存在するリシン残基が、天然ゼラチン中で見出されるよりもより多くかつより均一に分布する／間隔をあけることが確実になり得る。ゼラチン鎖中のリシン残基の好ましい量に上限が存在することを考慮すると、高すぎるリシン密度は、他のアミノ酸残基、例えばＲＧＤトリプレットを本質的に量を低下させることを意味するので、ゼラチンの生物学的性質を損なう可能性がある。そのため、ゼラチン中の最適なリシン残基含有量及び骨格に沿ったリシン間の平均距離が存在する。リシン残基はヒドロゲルを形成するようにその後に架橋するチオール化剤についての固定ポイントを提供するので（下記を参照されたい）、本発明の第２の態様の方法における述べられたリシン残基の含有量を有する組換えゼラチンの使用は、架橋後に、強く調節可能な構造を有するヒドロゲルを提供する。更には、天然ゼラチンにおいて見出されるよりもより均一なリシン残基の分布は、頑強

な構造及び比較的均一なメッシュサイズを有する、結果として得られるヒドロゲルを提供する。構造におけるこの改善は、ヒドロゲル内に捕捉された任意の望ましい細胞、医薬、獣医製品等の制御放出を提供するために特に価値がある。

【００３４】

上記に示された理由のために均一な分布のリシン残基を含む前駆体ゼラチンに対する熱望を念頭に置いて、本発明の第２の態様による方法において使用される前駆体ゼラチンは、主鎖に沿って測定されるリシン残基間の平均距離が２４未満であり、距離分布の標準偏差が１４ＡＡ未満である、リシン残基を含むことが好ましい。より好ましくは、リシン残基間のこの平均距離は２０ＡＡ未満であり、標準偏差は１４ＡＡ未満である。最も好ましくは、本発明者らは、平均リシン残基間距離が１７ＡＡであり、標準偏差が１２ＡＡであることを見出した。本発明は、更に、平均距離が１７アミノ酸であり、距離標準偏差が１２アミノ酸である、構成成分（ａ）及び（ｂ）を含む修飾ゼラチンを提供する。

【００３５】

隣接リシン残基間の距離（ΔＬｙｓ）は、リシン残基のうちの１個を含めることによってカウントされる。例えば、配列Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｌｙｓにおいて、２個のリシン残基間の距離は３アミノ酸残基である。前駆体ゼラチン中のリシン残基間の平均距離（ΔＬｙｓ$_{avg}$）は、好ましくは１０～３０、より好ましくは１２～２５、特に１４～１８アミノ酸残基（ＡＡ）である。前駆体ゼラチン中のリシン残基間の距離の標準偏差（ＳＤ$_{Lys}$）は、好ましくは１０～２０アミノ酸残基、より好ましくは１０～１６、特に１０～１３アミノ酸残基である。

【００３６】

前駆体ゼラチンのアミノ酸配列を知ることで、ΔＬｙｓ$_{avg}$及びＳＤ$_{Lys}$は以下の通り算出することができる。左から右へアミノ酸配列を読み取って、第１のリシン（Ｋ$_1$）を見出す。次いで、残基の数をカウントして、第２のリシンのみを含み第１のリシンを含まない、配列中の第１のリシンから次のリシン（Ｋ$_2$）まで（ΔＬｙｓ$_1$）を得る。その配列について第２のリシンから続けて、残基の数をカウントして、第３のリシン（Ｋ$_3$）まで：ΔＬｙｓ$_2$を得る。ΔＬｙｓ$_i$の完全なリストを有するまでカウントを続ける。次いで、リストされた値の数平均ΔＬｙｓ$_{avg}$を算出し、以下の通り標準偏差を算出する。ΔＬｙｓ$_i$の各値について、ΔＬｙｓ$_{avg}$とΔＬｙｓ$_i$の差を算出し、その値の二乗を算出する。全リストについてこれを行い、二乗のそれぞれを総計まで合計し、その総計をリストされた値の数（Ｎ）によって割り、その値の平方根を取って、リシン間距離の標準偏差ＳＤ$_{Lys}$を得る。

【００３７】

【化１】

$$\Delta Lys_{avg} = \sum_i \Delta Lys_i / N$$

$$SD_{Lys} = \sqrt{\left(\sum_i \left(\Delta Lys_i - \Delta Lys_{avg}\right)^2\right)/N}$$

【００３８】

一実施形態において、前駆体ゼラチンは、１０００アミノ酸残基あたり少なくとも３０リシン残基を含む別の組換えゼラチンから調製することができる。

【００３９】

好ましい実施形態において、前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンはシステインを含まない。

【００４０】

別の好ましい実施形態において、前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンはヒドロキシリシンを含まない。

【００４１】

好ましい一実施形態において、前駆体ゼラチンは、配列番号１に対して少なくとも７５％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも７６％、７８％、８０％、８５％、

９０％、９５％、９６％、９８％、９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。特定の好ましい一実施形態において、前駆体ゼラチンは、配列番号１のモノマー又はそのバリアント、例えば上記の配列番号１に対するアミノ酸配列同一性％を含むアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。

【００４２】

配列番号１に対するアミノ酸配列同一性を有する前駆体ゼラチンの調製はＷＯ２００８／１０３０４１号に記載されており、配列は配列番号３としてそこに記載されている。

【００４３】

第２の好ましい実施形態において、前駆体ゼラチンは、配列番号２に対して少なくとも７５％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも７６％、７８％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９８％、９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。特定の好ましい一実施形態において、前駆体ゼラチンは、配列番号２のモノマー又はそのバリアント、例えば上記の配列番号２に対するアミノ酸配列同一性％を含むアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。

【００４４】

配列番号２に対するアミノ酸配列同一性を有する前駆体ゼラチンの調製はＷＯ２００８／１０３０４１号に記載されており、配列は配列番号５としてそこに記載されている。

【００４５】

一実施形態において、前駆体ゼラチンはチオール基を含まない。

【００４６】

チオール化剤として、前駆体ゼラチン上にチオール（－ＳＨ）基を組み込むか、又は前駆体ゼラチン中に存在するチオール基の数を増加させる任意の試薬を使用することができる。典型的には、チオール化剤は、チオール又は保護されたチオール基、及びリシン中に存在するアミノ酸と反応性である基を含む。リシン中のアミノ基は、チオール化剤中に存在する反応性基と典型的には共有結合を形成し、チオール化剤中に存在するチオール基が保護されている場合、保護基は、チオール化剤とリシン中に存在するアミノ基との反応の間又はその後に除去される。

【００４７】

好ましいチオール化剤は、式－Ｓ－Ｃ（＝Ｘ）－（式中、ＸはＳ、Ｏ又はＮＲ^{a}（式中、Ｒ^{a}はＨ又はＣ$_{1}$～$_{4}$－アルキルである）である）の基を含む。好ましくは、－Ｓ－Ｃ（＝Ｘ）－基において示されるＳ及びＣ原子は、環、例えば４、５、６又は７員環の一部である。

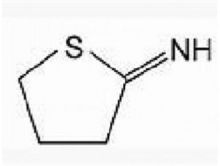
【００４８】

適切なチオール化剤の例としては、以下が挙げられる（第１及び第３の構造の塩の形態、例えば塩酸塩形態を含む）。

【００４９】

２－イミノチオラン：

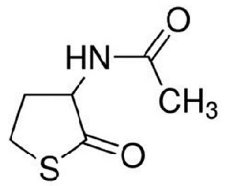
【化２】



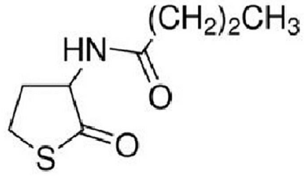
【００５０】

ＤＬ－Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン：

【化３】



【００５１】
Ｎ－ブチリル－ＤＬ－ホモシステインチオラクトン：
【化４】



【００５２】
好ましくは、チオール化剤は、２－イミノチオラン及び／若しくはＤＬ－Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、並びに／又はそれらの塩を含む。
【００５３】
前駆体ゼラチンをチオール化剤と反応させるために使用される条件は、使用されるチオール化剤にある程度依存する。しかしながら、前駆体ゼラチンが、酸素ガスの非存在下、例えば不活性ガス（例えば窒素）のブランケット下でチオール化剤と反応することが好ましい。所望により、反応のために使用される試薬はまた、酸素を除去するために脱気されていてもよい。このようにして、修飾ゼラチン中のチオール基が酸化されるのが回避されるか、又はその程度が低減される。
【００５４】
好ましくは、前駆体ゼラチンは、７～１２、より好ましくは８～１１、特に９～１０．５の範囲のｐＨでチオール化剤と反応する。塩基及び／又はｐＨ緩衝液の存在下で反応を行うことによって所望のｐＨを達成することができる。
【００５５】
必要により、チオール化剤を溶解するために緩衝液を使用してもよい。適切なｐＨ緩衝液は、例えば０．１モルの炭酸ナトリウム溶液（Ａ）を０．１モルの重炭酸ナトリウム溶液（Ｂ）と、６０部のＡ（５９．３ｇ）と４０部のＢ（３９．５ｇ）の体積比で組み合わせることによって調製することができる。そのような緩衝液は２５℃で約１０．０±０．２のｐＨを提供する。
【００５６】
チオール化剤を溶解するために使用することができる別の緩衝液は、リン酸水素ナトリウム及び水から調製されるリン酸緩衝液である。例えば塩酸を使用して、リン酸緩衝液のｐＨは所望の値（例えば８．０）に調整することができる。
【００５７】
好ましくは、前駆体ゼラチンは、昇温して、例えば２５～６０℃、より好ましくは３０～５０℃、特に３５～４５℃の範囲の温度でチオール化剤と反応する。
【００５８】
好ましくは、前駆体ゼラチンは、３０分間～５時間、より好ましくは１時間～４時間、特に１時間～３時間の期間でチオール化剤と反応する。
【００５９】
好ましい実施形態において、前駆体ゼラチンは、金属キレート化剤、例えばエチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩の存在下でチオール化剤と反応する。金属キレート化剤は、

修飾ゼラチン中に存在するチオールの酸化を触媒する可能性がある任意の金属をキレートアウトするために有用である。

【００６０】

好ましくは、本発明の第１の態様による修飾ゼラチンは、本発明の第２の態様による方法によって得られ得るか、又はそれによって得られる。

【００６１】

本発明の第２の態様の方法において使用されるチオール化剤の前駆体ゼラチンに対する好ましいモル比は、チオール化剤及び修飾ゼラチンのために所望されるチオール基の量にある程度依存する。例えば、チオール化剤の前駆体ゼラチンに対する比を増加させると、修飾ゼラチン中で提供されるチオール基の量が増加する場合があり、チオール化剤の前駆体ゼラチンに対する比を減少させると、修飾ゼラチン中で提供されるチオール基の量が減少する場合がある。

【００６２】

前駆体ゼラチン中に存在していたリシン残基がチオール化剤と反応して修飾ゼラチンを与える程度は、本明細書において、修飾ゼラチンのＤＳ％と称される。例えば、前駆体ゼラチン中のリシン残基の半分がチオール化剤と反応した場合、結果として得られる修飾ゼラチンは５０％のＤＳ％を有すると称することとする。前駆体ゼラチン中のリシン残基の全てがチオール化剤と反応する場合、その結果、結果として得られる修飾ゼラチンは１００％のＤＳ％を有すると称することとする。

【００６３】

換言すれば、本発明の第２の態様の方法は、構成成分（ａ）の量が構成成分（ｂ）の量と同一であり、その結果修飾ゼラチンが５０％のＤＳ％を有する場合、本発明の第２の態様に従って修飾ゼラチンを調製するために使用される。

【００６４】

本発明者らは、以下の特定の式によって最大で約１００％までの任意の所望のＤＳ％を有する修飾ゼラチンを作製することができることを見出した。例えば、前駆体ゼラチンを２－イミノチオランと反応させることによってＹ％の所望のＤＳ％を有する修飾ゼラチンを作製する方法を決定するために、以下の算出を行うことができる。

【００６５】

Ｙ％のＤＳ％を達成するために乾燥前駆体ゼラチン１グラムあたりに必要な２－ＩＴのｍｇの質量（$W_{2\text{-}IT}$）は、式（１）によって提供される。

$W_{2\text{-}IT}$＝（Ｙ×Ｌ×Ｍ１）／（７４．８×１０^{6}）　　式（１）

式中、

Ｙはチオール化される所望のリシン残基％であり、

Ｌは１ｇの前駆体ゼラチン中に存在するリシンのμモル数であり、

Ｍ１は２－ＩＴの分子量である。

【００６６】

２－ＩＴがその塩酸塩の形態である場合、Ｍ１は１３７．６の値を有する。

【００６７】

前駆体ゼラチンをＤＬ－Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン（ＮＡＨＣＴＬ）と反応させることによってＹ％の所望のＤＳ％を有する修飾ゼラチンを作製する方法を決定するために、以下の算出を行うことができる。

Ｙ％のＤＳ％を達成するために乾燥前駆体ゼラチン１グラムあたりに必要なＮＡＨＣＴＬのｍｇの質量（$W_{2\text{-}NAHCTL}$）は、式（２）によって提供される。

W_{NAHCTL}＝（Ｙ×Ｌ×Ｍ２）／（５３．９×１０^{6}）　　式（２）

式中、

Ｙはチオール化される所望のリシン残基％であり、

Ｌは１ｇの前駆体ゼラチン中に存在するリシンのμモル数であり、

Ｍ２はＮＡＨＣＴＬの分子量である。

【００６８】

ＮＡＨＣＴＬの分子量（Ｍ２）は１５９．２である。

【００６９】

上記の式（１）及び（２）において、ゼラチンの重量は、当然ながらその乾燥重量（１００％固体）である。

【００７０】

機械的に剛性であるヒドロゲルを作製するために、修飾ゼラチンは高いＤＳ％、例えば３０～１００％のＤＳ％、より好ましくは５０～１００％のＤＳ％、特に７０～１００％のＤＳ％を有することが好ましい。

【００７１】

より柔らかいヒドロゲルを作製するために、修飾ゼラチンはより低いＤＳ％、例えば７～５０％のＤＳ％、より好ましくは１０～４０％のＤＳ％、特に１０～３０％のＤＳ％を有することが好ましい。

【００７２】

上記の２つの範囲の間で重複するＤＳ％（即ち、３０～７０％のＤＳ％）を有する修飾ゼラチンは、中間の柔らかさ及び剛性を有する。

【００７３】

本発明の第３の態様によれば、修飾ゼラチンを架橋剤と反応させることによって得ることができるヒドロゲルが提供される。この本発明の第３の態様において、修飾ゼラチンは本発明の第１の態様に関して定義される通りであるか、及び／又は修飾ゼラチンは本発明の第２の態様の方法によって調製される。

【００７４】

架橋剤は、好ましくは少なくとも２個のエチレン性不飽和基を含む。そのため、好ましい実施形態において、修飾ゼラチン中に存在するチオール基は、架橋剤中のエチレン性不飽和基と共有結合を形成する。このようにして、ヒドロゲルが形成され、ここで、修飾ゼラチンの多数の分子が架橋剤によって一緒に接合されて大きな構造を形成する。修飾ゼラチンが水性条件下で架橋剤と反応する場合、典型的にはヒドロゲルを形成する。

【００７５】

好ましい実施形態において、架橋剤は２～４個のエチレン性不飽和基を含む。

【００７６】

いくつかの実施形態において、ゼラチン又は多糖が（メタ）アクリレート又は（メタ）アクリルアミドで修飾される場合、架橋剤は４～５０個のエチレン性不飽和基を含む。

【００７７】

好ましい実施形態において、架橋剤は、１個以上のポリ（アルキレンオキシド）基、特に１個以上のポリ（エチレンオキシド）基、例えば式－（CH_2CH_2O）$_m$－（式中、ｍは３～１，０００、特に３～２５０の値を有する）のものを含む。

【００７８】

好ましい実施形態において、本発明の第３の態様による方法は、開始剤の非存在下（例えば光開始剤及び熱開始剤の非存在下）で行われる。

【００７９】

架橋剤中に存在するエチレン性不飽和基は、全て化学的に同一であってもよく、又は架橋剤は、２個以上の異なるエチレン性不飽和基、特にチオールと異なる反応性の速度を有する少なくとも２個のエチレン性不飽和基を含んでいてもよい。

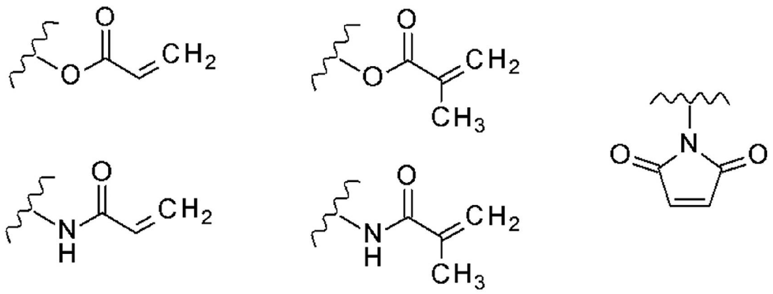
【００８０】

好ましいエチレン性不飽和基は、（メタ）アクリル基、（メタ）アクリルアミド基、アクリロニトリル基、ビニルスルホン基及びマレイミド基である。

【００８１】

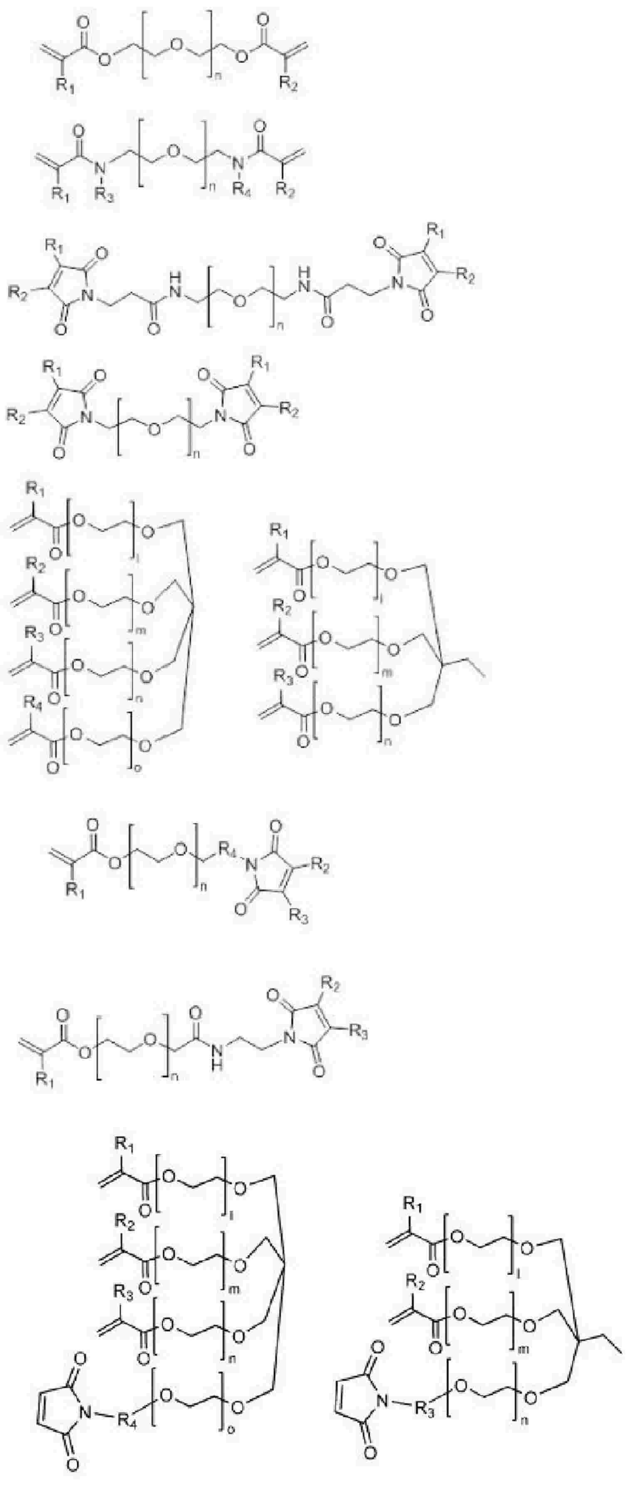
適切な（メタ）アクリル基の例としては、アクリレート（$H_2C=CHCO-$）基、アクリルアミド（$H_2C=CHCONH-$）基、メタクリレート（$H_2C=C(CH_3)CO-$）基及びメタクリルアミド（$H_2C=C(CH_3)CONH-$）基が挙げられる。アクリル基はより反応性であるので、アクリル基はメタクリル基よりも好ましい。

【００８２】
好ましいエチレン性不飽和基は、結果として得られるヒドロゲルの安定性及びｐＨ耐性を改善し得るので、エステル基を含まない。エステル基を含まないエチレン性不飽和基としては、（メタ）アクリルアミド基、ビニルスルホン基及びマレイミド基が挙げられる（（メタ）アクリルアミド基及びマレイミドが特に好ましい）。
【００８３】
エチレン性不飽和基の好ましい例として、以下の式の基が挙げられ得る。
【００８４】
【化５】



【００８５】
好ましい架橋剤は、直鎖状の３－ａｒｍ又は４－ａｒｍのポリ（エチレングリコール）鎖、及び少なくとも２個の電子不足炭素－炭素二重結合を含む。
【００８６】
好ましくは、架橋剤は、２，０００～３０，０００ダルトン、特に３，０００～１０，０００ダルトンのＭｗを有する。好ましい架橋剤の例としては、以下が挙げられ、ここで、ｌ、ｍ、ｎ及びｏはそれぞれ独立して３～２５０の値を有し、$Ｒ_1$、$Ｒ_2$、$Ｒ_3$及び$Ｒ_4$はそれぞれ独立してＨ又は炭素含有部分である。
【００８７】

【化６】



【００８８】

好ましい炭素含有部分は、１～４個の炭素原子、例えばＣ$_{1～4}$－アルキル、特にメチルを含有する。

【００８９】

一実施形態において、架橋剤は、他の構成成分（例えば細胞又は薬学的活性物質）が反応によって形成されるネットワーク内に物理的に捕捉されるのを可能にする速度で、修飾ゼラチンと反応する。そのため、本発明の第１の態様による修飾ゼラチンと架橋剤との間の非常に迅速な反応（例えば１分未満の反応時間）は好ましくない。他方で、非常に遅い反応は、任意の他の構成成分が沈殿する（例えば細胞沈殿）のリスクのために好ましくな

い。そのため、好ましい実施形態において、架橋剤が修飾ゼラチンと完全に反応するためにとられる時間は、１分間～１時間の範囲、より好ましくは５分間～１時間、最も好ましくは１０分間～４５分間の範囲である。

【００９０】

柔らかいヒドロゲルについての実施形態において、架橋剤は２個より多くのエチレン性不飽和基（例えば３個又は４個）を含んでいてもよいが、架橋剤は２個だけのエチレン性不飽和基を含むことが好ましい。そのような架橋剤は、特に有用な性質を有するヒドロゲルをもたらし得る。

【００９１】

特定の好ましい実施形態において、架橋剤は、少なくとも２個の異なるエチレン性不飽和基、例えばチオール基との異なる反応の速度を有する少なくとも２個の異なるエチレン性不飽和基、特にはチオール基と迅速に反応する１個のエチレン性不飽和基（例えばマレイミド基）及びチオール基と比較的ゆっくりと反応する１個のエチレン性不飽和基（例えばアクリレート基）を含む。このようにして、架橋剤が修飾ゼラチンと完全に反応するためにとられる最適な時間を達成することができる。この実施形態において、架橋剤は、好ましくはポリ（エチレングリコール）基、例えば３～５００エチレンオキシド単位を含有するものを含む。

【００９２】

一実施形態において、架橋剤は１個だけのマレイミド基及び１個だけのアクリレート基を含む。

【００９３】

ある特定の実施形態において、架橋剤は、エチレン性不飽和基で修飾された、ポリペプチド、ゼラチン、組換えゼラチン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸又はデルマタン硫酸の群からのバイオポリマーを含む。本発明の実施形態において、この架橋剤は４個より多くのエチレン性不飽和基を含む。本発明の別の実施形態において、架橋剤は１０個より多くのエチレン性不飽和基を含む。

【００９４】

例として、ゼラチンは、メタクリレート基及びメタクリルアミド基を有する修飾ゼラチンを含む架橋剤を生じるように、メタクリル酸無水物で修飾されることができる。

【００９５】

組換えゼラチンＲＥＣ１は、メタクリルアミド基を有する修飾ＲＥＣ１を含む架橋剤を生じるように、メタクリル酸無水物で修飾することができる。

【００９６】

好ましくは、修飾ゼラチンは、５．０～１０．０、より好ましくは６．０～９．０、特に６．８～８．０の範囲のｐＨで架橋剤と反応する。

【００９７】

好ましくは、修飾ゼラチンは、酸素ガスの非存在下で架橋剤と反応する。例えば、修飾ゼラチンは、窒素ガスのブランケット下で架橋剤と反応し、場合により、修飾ゼラチンと接触する状態になる任意の溶媒（水を含む）は、酸素ガスを除去するために処理されている（例えば真空中での脱気によって及び／又は窒素パージによって）。このようにして、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の酸化が回避してもよく、又はその程度を低下させてもよい。

【００９８】

本発明の第３の態様の利点は、修飾ゼラチンと架橋剤の反応が、ヒドロゲルの形成の間にカウンター酸形成のための高濃度のｐＨ緩衝液の存在を必要としないことである。そのため、一実施形態において、修飾ゼラチンは、ｐＨ緩衝液の非存在下、又は０．１Ｍ未満、より好ましくは０．０５Ｍ未満の水中の濃度を有するｐＨ緩衝液の存在下で架橋剤と反応する。好ましくは、ｐＨ緩衝液は、修飾ゼラチンと架橋剤の反応の間に存在する場合、７．０～７．８の範囲にｐＨを維持する。

【００９９】

好ましくは、修飾ゼラチンは、昇温して、例えば３５～３９℃、より好ましくは３６～３０℃、特に３６．５～３７．５℃の範囲の温度で架橋剤と反応する。

【０１００】

好ましい実施形態において、修飾ゼラチンは、金属キレート化剤、例えばエチレンジアミン四酢酸及びその塩の存在下で架橋剤と反応する。金属キレート化剤は、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の酸化を触媒する可能性がある任意の金属をキレートアウトするために有用である。

【０１０１】

架橋剤は、場合により、適した化学量論比で修飾ゼラチンに添加され、その結果、修飾ゼラチン中のチオール基の全てが架橋剤のエチレン性不飽和基と反応する。好ましくは、修飾ゼラチン中のチオール基は、架橋剤の官能基に対して（わずかに）過剰で存在する。そのため、修飾ゼラチンと反応する架橋剤のモル数は、好ましくは、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の全てと反応するのに不十分である。この方法においては修飾ゼラチンから形成される結果として得られるヒドロゲルが（未反応又は「遊離」）チオール基を含むので、後者が好ましい。そのようなチオール基は、それらが抗酸化性を有するので有用であり、それによって、架橋反応の結果として形成されるヒドロゲル内に捕捉される可能性がある任意の「ペイロード」（例えば細胞及び薬学的活性物質）を安定化する。

【０１０２】

一実施形態において、ヒドロゲルがチオール基を含むことを必要とする場合、修飾ゼラチンと反応する架橋剤のモル数は、好ましくは、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の最大で９５％、より好ましくは２０～９０％、特に４０～９０％と反応するのに十分である。

【０１０３】

結果として得られるヒドロゲル中の所望の架橋度を達成するための修飾ゼラチンと反応する架橋剤の量を算出する場合、架橋剤中に存在するエチレン性不飽和基の数が考慮に入れられる。例えば、結果として得られるヒドロゲル中の所望の架橋のレベル（例えば修飾ゼラチン中に存在するチオール基の５０％が架橋する）を達成するために、３個のエチレン性不飽和基を含む架橋剤が使用された場合よりも少ない４個のエチレン性不飽和基を含む架橋剤が必要であろう。同様に、同じ架橋のレベルを達成するために、架橋剤が２個のみのエチレン性不飽和基を含んでいた場合、より多くの架橋剤が必要であろう。

【０１０４】

前述を考慮して、修飾ゼラチンは、好ましくは３００～７００μｍｏｌ／ｇのチオール基、より好ましくは４００～７００、特に４５０～７００μｍｏｌ／ｇのチオール基を含む。

【０１０５】

実際には、所望により、より硬い(より架橋された)又はより柔らかい(あまり架橋されていない)ヒドロゲルを達成するために架橋剤のゼラチンに対する比を合わせることができる。

【０１０６】

典型的には、本発明の第３の態様によるヒドロゲルは、水性条件下で本発明の第１の態様による修飾ゼラチンを架橋剤と反応させることによって得ることができる。

【０１０７】

典型的には、ヒドロゲルは、水、及び所望により他の物質（例えば細胞又は医薬）がネットワーク内に位置する、オープンな架橋ネットワークを形成する。そのようなヒドロゲルは、特にインビボでの、それらのゆっくりとした放出性のために有用である。

【０１０８】

好ましくは、本発明の第３の態様によるヒドロゲルは、修飾ゼラチンの水に対する重量比が、１～３０％、より好ましくは２～１５、特に３～１２％、より特に５～１２％の範囲である方法によって得られる。好ましくは、水は、非常に低含有量の溶存酸素を有し、例えば重量で水百万部あたり１部の酸素を下回る。

【０１０９】
一実施形態において、ヒドロゲルは、最大で８ｗｔ％、より好ましくは３～８ｗｔ％の固体含有量を有する。これは「柔らかい」ヒドロゲルを提供する。「硬い」ヒドロゲルを得るために、ヒドロゲルは、本発明の第２の態様による化合物の、好ましくは８ｗｔ％を上回る、より好ましくは１０～３０ｗｔ％の固体含有量を有する。ヒドロゲルの固体含有量は、以下の算出を行うことによって決定することができる。
ヒドロゲル固体含有量＝［１－［（Ｗ１－Ｗ２）／Ｗ１］］×１００％
【０１１０】
本発明のヒドロゲルは、低分子医薬、高分子医薬、獣医処置及び細胞を含む様々な治療剤の放出に対する空間的及び時間的制御を提供するために使用することができる。前駆体ゼラチン、チオール化剤、架橋剤及び調製条件の選択は、それらの物理的性質、放出速度、並びに分解から細胞及び不安定な薬物を保護する能力の調整を可能にする。ヒドロゲルの性質は、それらの所望の最終使用に対して調整することができる。
【０１１１】
本発明の第２の態様によるヒドロゲルは、典型的には、架橋剤と反応する修飾ゼラチン中のチオール基に由来する親水性ポリマー鎖のネットワークを含む。ヒドロゲルは、好ましくはゼリー様である。ヒドロゲルは、好ましくは、一部分ではそのかなりの水含有量に起因して天然組織の柔軟度に非常に類似する柔軟度を持つ。
【０１１２】
ヒドロゲルは、好ましくは６５～９７．５ｗｔ％、より好ましくは７５～９７ｗｔ％、最も好ましくは８０～９７ｗｔ％の量の水を含む。ヒドロゲルの水含有量は、凍結乾燥前（Ｗ１）及び凍結乾燥後（Ｗ２）のヒドロゲルを秤量し、以下の算出を行うことによって簡単に決定することができる。
ヒドロゲル水含有量＝［（Ｗ１－Ｗ２）／Ｗ１］×１００％
【０１１３】
上記で述べたように、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の全てと反応するのに不十分な可溶剤を使用してヒドロゲルを調製する場合には、チオール基を含むヒドロゲルが生じる。そのようなチオール基は、それらが抗酸化剤として作用して、例えばヒドロゲル中に存在し得る任意の物質（例えば細胞又は医薬）を保護し得るので、有用である。そのため、好ましい実施形態において、ヒドロゲルは、例えば修飾ゼラチンを調製するために使用されたチオール化剤に由来するチオール基を含む。好ましい実施形態において、ヒドロゲルは、ヒドロゲル中に存在する水を含むヒドロゲル１グラムあたり、０．３～６０μｍｏｌのチオール基、より好ましくは０．５～１５μｍｏｌのチオール基を含む。それを小さな塊に切断し、チオール定量化アッセイ、例えばエルマンのアッセイを行うことによって、ヒドロゲルのチオール含有量を決定することができる。
【０１１４】
ヒドロゲルの意図される使用に応じて、機械的に堅いヒドロゲル又は柔らかいヒドロゲルが必要とされる場合がある。例えば、細胞の封入を必要とする医療目的のためには、柔らかい、例えば１００ｋＰａ未満の圧縮率（Ｅ）を有するヒドロゲルであることが好ましい。
【０１１５】
対照的に、使用、例えば角膜組織置き換えについて意図されるヒドロゲルのためには、ヒドロゲルは、好ましくは１１０～６００ｋＰａ、より好ましくは２００～６００ｋＰａの圧縮率（Ｅ）を有する。
【０１１６】
軟組織適用及び細胞治療的適用のために、ヒドロゲルは、好ましくは１００～２０，０００Ｐａ、より好ましくは２００～５，０００Ｐａの圧縮率（Ｅ）を有する。
【０１１７】
圧縮率は、レオメータを使用して、例えば下記の実施例項に記載される方法によって測定することができる。

【０１１８】
好ましい圧縮率は、所望の量のリシン残基を有する前駆体ゼラチンを選択すること、ゼラチン前駆体中のリシン残基がチオール化される程度を制御すること、及び次いで、修飾ゼラチン中のチオール基が架橋剤で架橋する程度を選択することによって達成することができる。一般的に言えば、機械的に堅いヒドロゲルは、高レベルの架橋を有し、そのため、これらを作製するためには、高リシン含有量を有するゼラチン前駆体を選択し、それを多量のチオール化剤と反応させて、高ＤＳ％を有する修飾ゼラチンを作り出し、次いで多量の架橋剤を使用して高ＤＳ％を有する修飾ゼラチンを高度に架橋させる。対照的に、一般的に言えば、柔らかいヒドロゲルは、より低いレベルの架橋を有し、そのため、これらを作製するためには、より低いリシン含有量を有するゼラチン前駆体を選択し、それをより少量のチオール化剤と反応させて、低又は中ＤＳ％を有する修飾ゼラチンを作り出し、次いで架橋剤を使用して低又は中ＤＳ％を有する修飾ゼラチンを架橋させる。或いは、柔らかいヒドロゲルを作製するために、高リシン含有量を有するゼラチン前駆体を選択するが、少ない割合のリシン残基のみをチオール化剤と反応させて、低チオール含有量を有する修飾ゼラチンを作り出し、次いで架橋剤を使用して低チオール含有量を有する修飾ゼラチンを架橋させてもよい。
【０１１９】
機械的に堅いヒドロゲルを作製するために、架橋剤が低分子量Ｍｗ、例えば２５０～１，０００ダルトンの範囲のＭｗ（例えば実施例において記載されるＭＡＬ－ＰＥＧ－ＭＡＬ）を有することが好ましい。
【０１２０】
細胞封入のために有用なヒドロゲルを作製するために、架橋剤は、好ましくは少なくとも２個の異なるエチレン性不飽和基を含み、これは、チオール基と反応することができ（例えば実施例において記載されるＡＣ－ＰＥＧ－ＭＡＬ）、細胞毒性効果を最小化するために少なくとも３，０００ダルトンの分子量を有する。
【０１２１】
本発明のヒドロゲルは、医療分野において、例えば再生細胞適用において使用してもよい。ヒドロゲルそれ自体が細胞及び医薬物質のための安全な環境を提供してもよい。
【０１２２】
本発明のヒドロゲルは、特に良好な光透過性を持ち、コンタクトレンズを調製するため、及びヒトの眼中の組織の修復のために特に価値があり得る。更には、それらは心臓学、腫瘍学、免疫学、創傷修復及び治癒、並びに疼痛管理を含む医学の多くの部門における細胞及び医薬送達のために使用してもよい。
【０１２３】
本発明のヒドロゲルは、優れた光透過性、高い圧縮率、高い剛性及び良好な貯蔵安定性を有する。更には、修飾ゼラチン中に存在するチオール基の全てを架橋しないことによって、抗酸化性を持つヒドロゲルを提供し、それらをある特定の医学的用途、例えば注射による治療用細胞の送達において特に価値があるものにする。
【０１２４】
本発明の第４の態様によれば、本発明の第３の態様によるヒドロゲルを含むコンタクトレンズ又は角膜が提供される。
【０１２５】
本発明の第５の態様によれば、
（ｉ）本発明の第１の態様による修飾ゼラチン、及び
（ｉｉ）架橋剤
を含むキットオブパーツが提供される。
【０１２６】
このキットにおいて、好ましい修飾ゼラチン及び架橋剤は、それぞれ、本発明の第１、第２及び第３の態様に関して上記に記載される通りである。
【０１２７】

好ましくは、キットは、特に修飾ゼラチンと反応する架橋剤のモル数が修飾ゼラチン中に存在するチオール基の全てと反応にするには不十分であるような方法で、修飾ゼラチンを架橋剤で架橋させるための使用説明書を更に含む。

【０１２８】

構成成分（ｉ）は、好ましくは、密閉容器中、特に真空下又は不活性ガス（例えば窒素ガス）のブランケット下で保管される。このようにして、修飾ゼラチン中に存在するチオール基が貯蔵又は輸送の間に酸化されないことを確実にしてもよい。

【０１２９】

本キットの利点は、（ｉ）及び（ｉｉ）の反応が実質的なｐＨ変化を引き起こさないこと、並びに緩衝液が一般にヒドロゲルの調製のために必要とされないことである。これは、ｐＨ感受性物質及び細胞を含有するヒドロゲルの局所調製を容易にする。細胞は、多くの場合高ｐＨ緩衝液濃度で見出される高イオン強度に多くの場合耐性でないことがあり得る。キットは、それらに対する目的の細胞又は物質を含有するヒドロゲルを局所的に調製するために、科学研究者等によって使用され得る。

【０１３０】

本発明のヒドロゲルは、コンタクトレンズ、角膜、創傷ドレッシング、薬物送達システム、細胞送達（注射によるものを含む）、組織工学製品及び衛生用品の製造を含む多くの目的のために有用である。ヒドロゲルは、特に良好な機械的安定性を持つ。

【０１３１】

本発明の更なる利点は、チオール化の度合いを調整して、特定の最終使用に合わせた性質を有するヒドロゲルを提供することができることである。ヒドロゲルは、特定の量の遊離チオール基（例えば抗酸化性を有するヒドロゲルを提供するため）及び所望の架橋度（例えば硬さ、柔らかさ、分解及び放出速度の所望の度合いを有するヒドロゲルを提供するため）を含んで調製され得る。

【０１３２】

本発明を、ここに、以下の非限定的な実施例により説明し、ここで全ての部及びパーセンテージは、他に特定されない限り、重量による。

【実施例】

【０１３３】

以下の略称を実施例において使用する。

ＲＥＣ１は、６４５μｍｏｌ／ｇのリシンを含み、下記に示される配列番号１のアミノ酸配列を有する、５１，２００ダルトンのＭＷを有する組換えゼラチンである。ＲＥＣ１は、国際公開第２００８／１０３０４１号に記載される方法によって得られ、配列番号３としてそこに記載されている。リシン残基間の平均距離は１６．６ＡＡであり、標準偏差は１１．７ＡＡである。

【０１３４】

ＲＥＣ２は、６４６μｍｏｌ／ｇのリシンを含み、下記に示される配列番号２のアミノ酸配列を有する、８１，１００ダルトンのＭＷを有する組換えゼラチンである。ＲＥＣ２は、ＷＯ２００８／１０３０４１号に記載される方法によって得られ、配列番号５としてそこに記載されている。リシン残基間の平均距離は１６．８ＡＡであり、標準偏差は１１．８ＡＡである。

【０１３５】

ＣＲＥＣ１は、４００μｍｏｌ／ｇのリシンを含み、下記に示される配列番号３のアミノ酸配列を有する、４５，０００ダルトンのＭＷを有する比較組換えゼラチンである。ＣＲＥＣ１は、ＥＰ２，９０２，４１３に記載される方法によって得られ、配列番号１としてそこに記載されている。リシン残基間の平均距離は２６．３ＡＡであり、標準偏差は１７．４ＡＡである。

【０１３６】

ＣＲＥＣ２は、４４２μｍｏｌ／ｇのリシンを含み、下記に示される配列番号４のアミノ酸配列を有する、７２，５００ダルトンのＭＷを有する比較組換えゼラチンである。Ｃ

ＲＥＣ２は、ＵＳ８，１０１，２０５に記載される方法によって得られ、配列番号１としてそこに記載されている。リシン残基間の平均距離は２４．７ＡＡであり、標準偏差は１４．５ＡＡである。

【０１３７】

ＥＤＴＡは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから入手したエチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩二水和物（チオール基の金属触媒酸化を低減するための金属イオン封鎖剤）である。

【０１３８】

２－ＩＴは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから入手した２－イミノチオラン塩酸塩（チオール化剤）である（ｍｗｔ＝１３７．６３ｇ／ｍｏｌ）。

【０１３９】

ＮＡＨＣＴＬは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから入手したＤＬ－Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン（チオール化剤）である（ｍｗｔ＝１５９．２１ｇ／ｍｏｌ）。

【０１４０】

ＭＡｎｈは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから入手したメタクリル酸無水物（メタクリル化剤）である（ｍｗｔ＝１５４．１６ｇ／ｍｏｌ）。

【０１４１】

ＣＢ１０は、以下のようにして調製された炭酸塩緩衝液（ｐＨ１０）である。０．１Ｍの炭酸ナトリウム溶液を、２．１３ｇ　Na_2CO_3をフラスコに秤量し、２００ｍｌの体積まで（１９７．４ｇの重量）純水で満たすことによって調製して、「溶液Ａ」を得た。０．１Ｍの重炭酸ナトリウム溶液を、１．７１ｇの無水$NaHCO_3$をフラスコに秤量し、純水を使用して２００ｍｌの体積まで（２００．５ｇの重量）満たすことによって調製して、「溶液Ｂ」を得た。溶液Ａ（１８０cm^3）及び溶液Ｂ（１２０cm^3）を混合し、濾過して、炭酸塩緩衝液ＣＢ１０を準備した。ＣＢ１０は、使用までＣｏｒｎｉｎｇ　５００ｍｌボトル中、室温で保管した。

【０１４２】

ＰＢ８は、無菌精製水（１５０cm^3）中で二塩基性リン酸水素ナトリウム二水和物（５．３７ｇ）を混合し、濃塩酸を使用してｐＨを８．０に調整することによって調製したリン酸緩衝液（ｐＨ８）である。

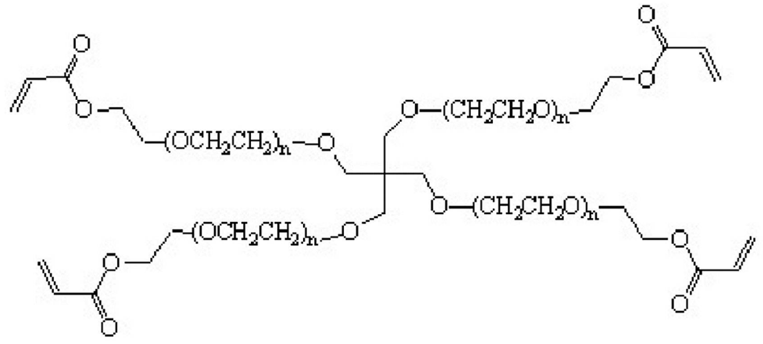
【０１４３】

ＰＢＳは、無菌精製水を使用して市販の「１０倍濃縮」無菌リン酸緩衝生理食塩水（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ製）を１０倍に希釈することによって調製した緩衝液である。

【０１４４】

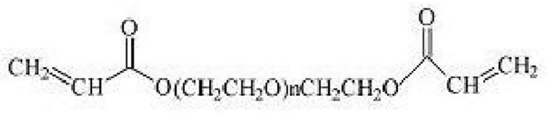
ＰＥＧ－ＡＣ４は、製品名ＰＳＢ－４２３でＣｒｅａｔｉｖｅ　ＰＥＧＷｏｒｋｓ、米国から入手した４個のアクリレート基及び４個のポリ（エチレングリコール）鎖を含む架橋剤である。供給業者によれば、この架橋剤は、Ｍｗ　５，０００を有し、以下の一般構造を有する。

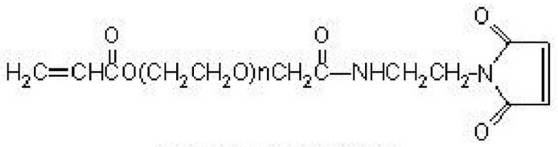
【化７】

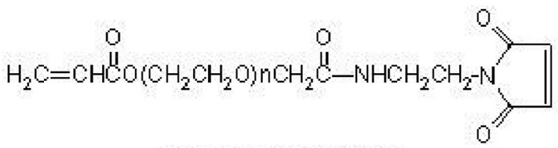


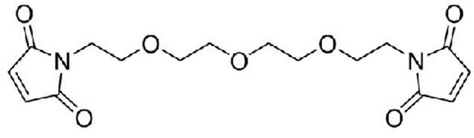
【０１４５】

ＡＣ－ＰＥＧ－ＡＣ　１は、ＡＣＲＬ－ＰＥＧ－ＡＣＲＬ－３４００の商品名でＬａｙ

ｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．から入手した２個のアクリレート基及び１個のポリ（エチレングリコール）鎖を含む架橋剤である。供給業者によれば、この架橋剤は、３，４００のＭｗを有し、以下の一般構造を有する。
【化８】


【０１４６】
　ＡＣ－ＰＥＧ－ＭＡＬ１は、ＡＣＲＬ－ＰＥＧ－ＭＡＬ－３４００の商品名でＬａｙｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．から入手した１個のポリ（エチレングリコール）鎖、１個のアクリレート基及び１個のマレイミド基を含む架橋剤である。供給業者によれば、この架橋剤は、３，４００のＭｗを有し、以下の一般構造を有する。
【化９】


【０１４７】
　ＡＣ－ＰＥＧ－ＭＡＬ２は、ＡＣＲＬ－ＰＥＧ－ＭＡＬ－５０００の商品名でＬａｙｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．から入手した１個のポリ（エチレングリコール）鎖、１個のアクリレート基及び１個のマレイミド基を含む架橋剤である。供給業者によれば、この架橋剤は、５，０００のＭｗを有し、以下の一般構造を有する。
【化１０】


【０１４８】
　ＭＡＬ－ＰＥＧ－ＭＡＬは、以下の構造を有する、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ製のＭｗｔ　３５２ｇ／ｍｏｌの市販の架橋剤である１，１１－ビスマレイミド－トリエチレングリコールである。
【化１１】


【０１４９】
　ＦＩＴＣ－デキストラン　１５０ｋＤ、４ｋＤは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから入手したフルオレセインイソチオシアネート－デキストランである。
【０１５０】
ＲＥＣ１（配列番号１）：
GAPGAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPGAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGL

PGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPGAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPG

【０１５１】

ＲＥＣ２（配列番号２）：

GAPGAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPGAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPGAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPGAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPG

【０１５２】

ＣＲＥＣ１（配列番号３）：

GPQGARGQPGVMGFPGPKGANGEPGKAGEKGLPGAPGLRGLPGKDGEAGAAGPPGPAGPAGERGEQGAPGPPGFQGLPGPPGPPGEGGKPGDQGVPGEAGAPGLVGPRGERGFPGERGAPGAQGLQGPRGLPGAPGPDGPKGAAGPAGPPGAQGPPGLQGMPGERGAAGIAGPKGDRGDVGEKGPEGAPGKDGGRGLGGPIGPPGPAGANGEKGEVGPPGPAGAAGARGAPGERGEAGPPGPAGFAGPPGADGQPGAKGEQGEAGQKGDAGAPGPQGPGGAPGPQGPAGVAGPKGARGAQGPPGAAGFPGAAGRVGPPGLQGNPGPPGPPGPAGKDGPKGARGDAGPPGRAGEPGLQGPAGPPGEKGEPGDDGPPGAEGPPGPQGLAGQRGIVGLPGQRGERGFPGLPGPAGEPGKQGAPGAAGDRGPPGPVGPPGLAGPAGEPGREGGPGADGPPGRDGAAGVKGDRGEAGAVGAPGAPGPPGAPGPAGPPGPQGDRGEAGAQGP

【０１５３】

ＣＲＥＣ２（配列番号４）：

GPPGEPGPTGLPGPPGERGGPGSRGFPGADGVAGPKGPAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPGAKGLTGSPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGARGQAGVMGFPGPKGAAGEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGEAGAQGPPGPAGPAGERGEQGPAGSPGFQGLPGPAGPPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGPAGEPGPTGLPGPPGERGGPGSRGFPGADGVAGPKGPAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPGAKGLTGSPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGARGQAGVMGFPGPKGAAGEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGEAGAQGPPGPAGPAGERGEQGPAGSPGFQGLPGPAGPPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGPAGEPGPTGLPGPPGERGGPGSRGFPGADGVAGPKGPAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPGAKGLTGSPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGARGQAGVMGFPGPKGAAGEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGEAGAQGPPGPAGPAGERGEQGPAGSPGFQGLPGPAGPPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGPAGEPGPTGLPGPPGERGGPGSRGFPGADGVAGPKGPAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPGAKGLTGSPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGARGQAGVMGFPGPKGAAGEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGEAGAQGPPGPAG

ＰＡＧＥＲＧＥＱＧＰＡＧＳＰＧＦＱＧＬＰＧＰＡＧＰＰＧＥＡＧＫＰＧＥＱＧＶＰＧＤＬＧＡＰＧＰＳＧＰＡＧＧ

【０１５４】

測定

前駆体ゼラチン１グラムあたりのリシンのμモル数の算出

組換えゼラチン中に存在するリシンのμモル数は、リシンのμモル数を乾燥ゼラチンのグラムで割ることによって算出することができる。より具体的には、Ｎアミノ酸残基を含有する組換えゼラチンのアミノ酸配列の知識により、以下の算出を行うことができる。

１．最初に、各アミノ酸残基の分子量（$AA_{i,w}$）を、残基組成、及び各アミノ酸の公知の原子量、例えばＣＲＣ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｐｈｙｓｉｃｓ；第７８版；Ｌｉｄｅ，　Ｄ．Ｒ．；　Ｆｒｅｄｅｒｉｋｓｅ，　Ｈ．Ｐ．Ｒ．編；ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ　ＬＬＣ：　Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ、１９９７年において一覧にされた原子量を使用して算出する。

２．次いで、各組換えゼラチンについて、各残基（AA_i）についての残基の数（n_i）をその分子量と掛けて、ゼラチン中の各残基の種類についての総分子量（$n_i\ AA_{i,w}$）を得る。

３．ゼラチン配列中の全ての残基の種類の総分子量を合計して、値Ｗ（$W=\Sigma_i n_i\ AA_{i,w}$）になる。

４．次いで、（Ｎ－１）倍の水の分子量をＷの値から引いて、総ゼラチン分子量W_{rec}（$W_{rec}=W-(N-1)W_{H2O}$）を得る。

５．最後に、１グラムのゼラチンあたりのリシンのモル量を得るために、１モルあたりのゼラチン中のリシンの数n_{lys}をゼラチン分子量W_{rec}によって割る。

【０１５５】

修飾ゼラチン中に存在するリシンのμｍｏｌ／ｇ数は、同様の方法で決定してもよいし、または前駆体ゼラチンおよびチオール化剤中に存在するリシンのμｍｏｌ／ｇ数、及び修飾ゼラチンのＤＳ％を知ることから算出してもよい。

【０１５６】

前駆体ゼラチン１グラムあたりのリシンのμモル数の測定

前駆体ゼラチン中１グラムあたりのリシンの数は、オルトーフタルアルデヒド（ＯＰＡアッセイ）又はトリニトロベンゼンスルホン酸（ＴＮＢＳアッセイ）のいずれかを用いる分光学的アッセイを使用して決定することができる。ＯＰＡアッセイ結果を本文献に示す。ＴＮＢＳアッセイ結果は、ＯＰＡアッセイのものと一致し、示さない。

【０１５７】

チオール化剤に由来するチオール基の量

(チオール基を有するペンダント側鎖を含むリシン残基の量と等しい)

【０１５８】

オルトーフタルアルデヒド（「ＯＰＡ」）アッセイ

修飾ゼラチン中に存在するチオール基の量（μｍｏｌ／ｇ）を、２－メルカプトエタノール及び蛍光検出と類似するオルトーフタルアルデヒド及び低分子量チオールヘルパー化合物を含むアミン定量化アッセイを使用して間接的に決定した。元の前駆体ゼラチン中のリシンのアミン基の量と比較した修飾ゼラチン中のリシンのアミン基の量の低減は、チオール化反応の結果として修飾ゼラチンへのチオール基の組込みの数と相関する。

【０１５９】

前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチン中のアミン基の数の測定値を、Ｓｅｎｓｏｌｙｔｅ（商標）ＯＰＡ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｏｎキット（ＡｎａＳｐｅｃ　カタログ番号ＡＳ－７１０１５）を蛍光プレートリーダー（ＦＬＸ８００、Ｂｉｏｔｅｋ）と組み合わせて使用して決定した。

【０１６０】

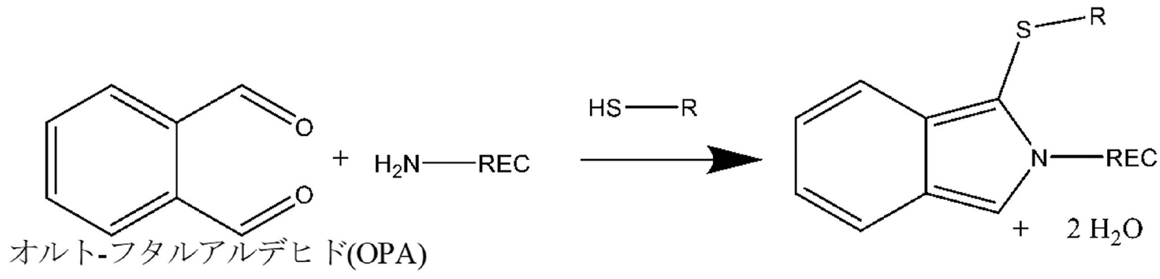
これらの測定において、（ＯＰＡ）は、還元剤の存在下で前駆体ゼラチン及び修飾ゼラチンのリシン残基の第１級アミン（$-NH_2$）基と反応して、非常に強い青色の蛍光生成物を形成した。３４０ｎｍ（バンド幅３０ｎｍ）の励起波長による試験下で試料を励起し、

４６０ｎｍ（バンド幅４０ｎｍ）の波長での結果として起こった放射を記録することによって蛍光をモニターした。所有する無臭の還元剤を使用した。

【０１６１】

アッセイは、製造業者によって提供されたプロトコール（改訂１．１、２０１４年１０月）に従って行った。

【化１２】



【０１６２】

スキーム１．ＯＰＡと組換えゼラチン（「ＲＥＣ」）中の第１級アミン基の化学反応

【０１６３】

ＯＰＡアッセイプロトコール

最初に、前駆体ゼラチンの検量曲線を公開されたプロトコールに従って作製した。蛍光強度を、黒色ウェルプレートを使用し、ＢｉｏｔｅｋプレートリーダーＦＬＸ８００を使用して、Ｅｘ／Ｅｍ＝３４０／４６０ｎｍで測定する。ブランク対照からの蛍光読み取りはバックグラウンド蛍光である。このバックグラウンド読み取りを他のセルの読み取りから引いて、全ての試料についての相対蛍光単位（ＲＦＵ）を得る。

【０１６４】

各ゼラチンについて、検量曲線をアッセイを使用して記録する。次のグラフにおけるＲＥＣ１についての例を参照されたい（図１及び２に示す）。検量曲線から、１モルのリシンあたりの相対蛍光強度がミリモル濃度あたり（１．４４±０．０７）×$１０^{３}$ＲＦＵの値で近似されると推定することができる。その後、未知のチオール化ゼラチンをアッセイし、得られる強度は秤量された量ごとに見出される。

【０１６５】

試料のＤＳ依存性（未知）ＲＥＣ－ＳＨ分子量に起因して、試料重量の試料モルへの直接変換は不可能である。代わりに、我々は、ＲＥＣ－ＳＨ分子量（Ｚ）及びＲＥＣ１分子あたりの修飾リシンの数（ｘ）の２つの未知数を用いる２つの式のセットを有し、これは、両方について解くことができる。

【０１６６】

解くための式：

【化１３】

$$Z = P + xQ \qquad \text{式3}$$

【０１６７】

式中、Ｚは修飾ＲＥＣの分子量であり、Ｐは未修飾ＲＥＣの分子量であり、ＱはＲＥＣ１分子あたりｘ個の官能基のカップリングに起因するＲＥＣの分子量の増加である。これは使用されるチオール化試薬（ＳＨ１又はＳＨ２）に依存する。鎖あたりの残った第１級アミン（N_f）の結果として溶液中の（ＯＰＡ－標識化）アミンの濃度は、以下によって与えられる。

【化１４】

$$N_f = \left(N_{LysNH2,mol} - x\right) \frac{W}{Z\,V} \qquad \text{式4}$$

【０１６８】
式中、Ｗは修飾ＲＥＣの乾燥質量であり、Ｗ／Ｖは最終希釈での１リットルあたりのグラムでの試料濃度であり、$N_{LysNH2,mol}$はＲＥＣ（未修飾）１モルあたりのリシンのアミンの数に等しい。この値は、ＲＥＣのアミノ酸配列に依存する設計されたパラメーターである。ＲＥＣ１について、リストされた配列において見られ得るように、$N_{LysNH2,mol}$は３３に等しい。
【０１６９】
式４は、測定された放射を使用して、以下に再編成される。
【化１５】

$$Em_{460} = \left(N_{LysNH2,mol} - x\right) RFU_{mol} \frac{W}{Z\,V} \qquad \text{式5}$$

【０１７０】
式中、RFU_{mol}はＯＰＡカップリングされたＬｙｓ基のモル放射強度である。Em_{460}はブランク補正された試料の放射（ＲＦＵ）に等しい。未知数は式３及び５におけるＺ及びｘである。
【０１７１】
次いで、一部の試料を介したｘの取り出しは、式６におけるｘについての解の結果と一致する。
【化１６】

$$x = \frac{\left(N_{LysNH2,mol} RFU_{mol} \frac{W}{V} - Em_{460} P\right)}{Em_{460}\, Q + RFU_{mol} \frac{W}{V}} \qquad \text{式6}$$

【０１７２】
ｘを用いて、我々は、ＭＧの修飾レベル（ＤＳ％＝ｘ／$N_{LysNH2,mol}$）を有する。次いで、ｘに対する解を使用して、式３を使用する修飾ＲＥＣの分子量Ｚを見出す。
【０１７３】
ＴＮＢＳアッセイプロトコール
１９６０年のＯｋｕｙａｍａ及びＳａｔａｋｅによるＴＮＢＳの最初の合成以来、大量のＴＮＢＳアッセイプロトコールが公開されている。好ましいプロトコールは、Ｂｕｂｎｉｓ及びＯｆｎｅｒによってＡｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、１９９２年、第２０７巻、１２９～１３３頁に公開されているものである。このプロトコールにおいて、公知の乾燥重量のゼラチンを、過剰のＴＮＢＳ試薬を有する溶液中、ｐＨ８．５のアルカリ性で４０℃で４時間混合する。この時間の間、ＴＮＢＳ試薬は全てのリシンのε－アミン基と反応し、ＵＶ／可視分光光度計を使用して３４６ｎｍの波長で検出及び定量化することができる発色団でそれらを標識する。３個のチオールがＴＮＢＳ標識化剤についてのリシンアミンと競合するので、チオールが存在する場合を除いて、このプロトコールは、リシンを含有する任意のゼラチン又は多糖の分析のために使用することができる。
【０１７４】
ＧＰＣ－ＭＡＬＳによるＭＡＷＭの測定
組換えゼラチンの理論分子量ＭＷは、アミノ酸配列を調べ、全ての残基の合計することによって、当業者によって容易に得ることができる。次いで、修飾ゼラチンのＭＷは、修飾リシン残基の数と使用されたチオール化剤に対してＲＥＣのＭＷを補正することによって誘導することができる。しかし、実際の組換えゼラチン生成プロセスは、わずかな数の切断断片を有する組換えゼラチンを生じ、いくらかの高分子の多分散性をもたらす。この

多分散性は、マルチアングル光散乱検出器（ＭＡＬＳ）を備えたゲル浸透クロマトグラフィー（ＧＰＣ）によって検出及び定量化することができる。そのような検出器は、クロマトグラム中の各構成成分の絶対分子量を測定する。次いで、数平均分子量ＮＡＭＷ及び重量平均分子量ＷＡＭＷを誘導することは当業者にとって簡単である。さらに、ｐＤ＝ＷＡＭＷ／ＮＡＭＷという関係によって定義される指標ｐＤを使用して、多分散性を記載することが一般的な実務である。

【０１７５】

圧縮率

ヒドロゲルの圧縮率Ｅ（ｋＰａ）を、３７℃でのＰＢＳ溶液中での平衡化の後、直径８ｍｍのフラット圧子ヘッドを使用するＡｎｔｏｎ－Ｐａａｒ　ＭＣＲ－３０１レオメータによる圧子試験によって決定した。ギャップサイズは小さな規則的なステップで低下し（歪み）、垂直抗力（応力）を記録した。次いで、応力－応力曲線における直線部分を圧縮率を見出すために使用した。

【０１７６】

実施例１

チオール化剤ＮＡＨＣＴＬを使用する修飾ゼラチンＭＧ１の調製

１グラムあたり４５０μｍｏｌ／ｇより多くのリシンを含む組換えゼラチン（ＲＥＣ１、８．２３ｇ）を１２５ｍｌのＣｏｒｎｉｎｇ（Ｃｏｓｔａｒ）ポリスチレン無菌ボトルに秤量し、ＣＢ１０（８２．２８ｇ）を添加した。混合物を含有しているボトルを激しく振とうした後、５０℃の水浴中に置いた。約１５～２０分以内に組換えゼラチンは完全に溶解し、ボトルを水浴から取り出した。次いで、ＰＢ中の組換えゼラチンの溶液を三口丸底フラスコに移した。移動の結果、２．３２ｇ（２．６ｗｔ％）の溶液を失った。したがって、三口フラスコに移された溶液の量は８８．１９ｇであった。したがって、フラスコに移された組換えゼラチンの実際の量は８．０２ｇであった（初期水分含量は考慮しない）。ＰＢＳ（１．４cm^3）中のＥＤＴＡ（０．０２６ｇ）の溶液を、チオール基の酸化を触媒する可能性がある任意の金属をキレートアウトするために添加した。フラスコを４１℃の温度に設定された水浴に入れ、マグネチックスターラー（Ｋｏｍｅｔ　１５）、温度計、及びガラス栓を有するアダプターによって蓋をされたシュレンク型リービッヒ冷却器を取り付けた。

【０１７７】

フラスコに、４０℃で１時間、連続して窒素ガスをパージした。次いで、チオール化剤（ＮＡＨＣＴＬ、１．５７２ｇ）を、４０℃で、５０００ｒｐｍでフラスコ内容物を撹拌しながら添加し、窒素ガスによるパージを続けた。３時間の反応時間の後、フラスコを水浴から取り出し、フラスコ内容物のｐＨを、塩酸（１Ｍ）を使用してｐＨを５．１まで低下させた（パージを継続しながら）。次いで、フラスコの内容物を精製水（約１５０cm^3）で希釈した。フラスコ内容物を少しの間撹拌し、２５０ｍｌのＣｏｒｎｉｎｇボトルに、無菌０．２２ｍｕ　ＰＥＳボトルトップフィルターを使用して真空濾過して、濾液を得た。

【０１７８】

透析

濾液を透析チューブ（長さ３０ｃｍ、及び１４ｋＤａの分子量カットオフを有する。Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ　ＲＣから入手した）に移し、透析チューブセルロース膜（Ｄ９４０２、平均フラット幅７６ｍｍ（３．０インチ）、Ｓｉｇｍａ）を、３５℃で、１０リットルの窒素パージした脱イオン水を含有する１０Ｌのビーカーに入れた。ビーカー中に存在する水をいくらかの加熱を伴って窒素パージを続けて、およそ３５℃の水温を維持した。総計で２日間、ビーカー中に存在する水を、１０リットルの窒素パージされた水で３時間ごとに置き換えた。

【０１７９】

凍結乾燥

透析チューブの内容物を凍結容器に集め、－４０℃で凍結し、－１５℃で４日間、Ｚｉ

ｒｂｕｓ　Ｓｕｂｌｉｍａｔｏｒにおいて凍結乾燥した。次いで、得られた修飾ゼラチンＭＧ１の乾燥試料を集め、秤量し、いくつかの無菌回転バッグに分け、－２０℃のフリーザー中で保管した。修飾ゼラチンＭＧ１を、９０％の収率で、白色の繊維状のケーキ様材料として得た。

【０１８０】

ＭＧ１は、チオール化剤に由来する５８４．７μｍｏｌ／ｇのチオール基を含有することが分かった。

【０１８１】

実施例２

チオール化剤２－ＩＴを使用した修飾ゼラチンＭＧ２の調製

ＲＥＣ１（８．０６ｇ）を１２５ｍｌのＣｏｒｎｉｎｇボトルに投入した。次いで、緩衝液ＣＢ１０（７６．４５ｇ）を添加し、次いで、ボトルを５０℃の浴中に置いた。緩衝液中のＲＥＣ１の均質な溶液が得られるまで、ボトルを手動で定期的に振とうした。ＥＤＴＡ（０．０２２ｇ）を添加し、次いで混合物を、窒素パージ口を備えた１００ｍｌの三口丸底フラスコに移した。マグネチックスターラー（ｃｏｍｅｔ型）を、温度計と一緒にフラスコに設置した。シュレンク型リービッヒ冷却管をフラスコに取り付け、ガラス栓を有するアダプターで蓋をした。撹拌しながらフラスコを窒素ガスで少なくとも１時間パージした後、緩衝液ＰＢ８（７．０ｇ）中のチオール化剤（２－ＩＴ、８９７．６ｍｇ）の溶液を、４１℃の温度で撹拌しながらフラスコに添加した。湿った窒素ガスによるパージを継続しながら４１℃での１時間の撹拌後、フラスコの内容物（９０．５２ｇ）を集め、室温でN_2パージされた無菌水（２０９．７５ｇ）で希釈し、次いで０．２２ｍｕのＣｏｒｎｉｎｇボトルトップフィルターを使用して真空濾過して、任意の固体を除去した。濾液はおよそ３００ｃm^3の体積を有していた。

【０１８２】

透析

濾液を透析チューブ（長さ３０ｃｍ、及び１４ｋＤａの分子量カットオフを有する。Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ　ＲＣから入手した）に移し、透析チューブセルロース膜（Ｄ９４０２、平均フラット幅７６ｍｍ（３．０インチ）、Ｓｉｇｍａ）を、３５℃で、１０リットルの窒素パージした脱イオン水を含有する１０Ｌのビーカーに入れた。ビーカー中に存在する水をいくらかの加熱を伴って窒素パージを続けて、およそ３５℃の水温を維持した。総計で２日間、ビーカー中に存在する水を、１０リットルの窒素パージされた水で３時間ごとに置き換えた。

【０１８３】

凍結乾燥

透析チューブの内容物を凍結容器に集め、－４０℃で凍結し、－１５℃で４日間、Ｚｉｒｂｕｓ　Ｓｕｂｌｉｍａｔｏｒにおいて凍結乾燥した。次いで、得られた修飾ゼラチンＭＧ２の乾燥試料を集め、秤量し、いくつかの無菌回転バッグに分け、－２０℃のフリーザー中で保管した。修飾ゼラチンＭＧ２を、９３％の収率で、白色の繊維状のケーキ様材料として得た。

【０１８４】

ＭＧ２は、チオール化剤に由来する６０５．２μｍｏｌ／ｇのチオール基を含有することが分かった。

【０１８５】

実施例３～１０及び比較例ＣＥｘ１～ＣＥｘ４

実施例１の一般的方法を、下記の表１に示される組換えゼラチン及びチオール化剤を示された量で使用した以外は繰り返して、修飾ゼラチンＭＧ３～ＭＧ１０及び比較修飾ゼラチンＣＭＧ１～ＣＭＧ４を得た。表１において、ＮＡＨＣＬを使用してチオール化された組換えゼラチンは上記の実施例１の一般的方法に従い、２－ＩＴを使用してチオール化された組換えゼラチンは上記の実施例２の一般的方法に従った。完全性のために、表１はＭＧ１及びＭＧ２も含む。

【０１８６】
【表１】

実施例	組換えゼラチン及び存在するリシンの量(μmol/g)	チオール化剤及び1gの固体の乾燥組換えゼラチンあたりの使用量	得られた修飾ゼラチン中のチオール基の量↵(μmol/g)*	得られた修飾ゼラチンの名称
1	REC1 (644.7)	NAHCTL (204.0mg)	584.7	MG1
2	REC1 (644.7)	2-IT (120.8mg)	605.2	MG2
3	REC2-(646.2)	NAHCTL (204.5mg)	585.9	MG3
4	REC2 (646.2)	2-IT (121.1mg)	606.6	MG4
5	REC1 (644.7)	NAHCTL (102.0mg)	306.6	MG5
6	REC1 (644.7)	NAHCTL (40.8mg)	126.3	MG6
7	REC1 (644.7)	NAHCTL (12.2mg)	38.4	MG7
8	REC1 (644.7)	2-IT (60.4mg)	312.2	MG8
9	REC1 (644.7)	2-IT (24.2mg)	127.3	MG9
10	REC1 (644.7)	2-IT (7.2mg)	38.5	MG10
CEx1	CREC1 (400.3)	NAHCTL (126.7mg)	376.4	CMG1
CEx2	CREC1 (400.3)	2-IT (75.0mg)	384.8	CMG2
CEx3	CREC2 (441.6)	NAHCTL (139.7mg)	412.6	CMG3

【０１８７】
＊これはチオール基を有するペンダント側鎖を含むリシン残基の量でもある。
【０１８８】
実施例１１－ヒドロゲル（ＨＧ１）の調製
ヒドロゲルの調製
段階１－修飾ゼラチンＭＧ１を含有する溶液の調製
ＭＧ１（１１５．６ｍｇ）の試料を、ピンセットを使用して、１５ｃｍ^{3}の容量のＧｒｅｉｎｅｒ遠心分離コニカルチューブに押し下げた。ＰＢＳ緩衝液（０．７５１ｃｍ^{3}）を、ＭＧ１の試料を完全に湿らせるために、チューブに添加した。次いで、ＰＢＳ緩衝液にＭＧ１を完全に溶解し、任意の捕捉された気泡を強制的に押し出すために、チューブを１８，０００Ｇで２分間遠心分離した。次いで、混合物をＩＫＡ Ｖｏｒｔｅｘオービタルシェーカーによって５秒間ボルテックスして、均質な清澄な溶液を得た。水酸化ナトリウム溶液（１．０Ｍ、１８．２μＬ）を添加して、７．２～７．６の範囲のｐＨを有する混合物を得た。架橋するためのＭＧ１の溶液を得るために、再び、混合物をもう一度ボルテックスした（「溶液１」）。
【０１８９】
段階２－架橋剤を含有する溶液の調製
ＰＥＧ－ＡＣ４（８４．５ｍｇ）の試料を、酸素ガスを除去するために窒素ガスでパージされたＰＢＳ緩衝液（１．０２２ｃｍ^{3}）に溶解した。得られた架橋剤の溶液は、本明細書で「溶液２」と称される。
【０１９０】
段階３－ヒドロゲルＨＧ１の調製
溶液２（１．１１１ｇ）を窒素ガス雰囲気下で溶液１（８８９ｍｇ）に添加し、２つの溶液をＩＫＡ Ｖｏｒｔｅｘｅｒを使用して十分に混合した。次いで、得られた混合物を乾燥を防ぐためにカバーされた型に置き、３７℃で１６時間保管した。その後、ヒドロゲルを、３７℃で２４時間超、ＰＢＳ溶液中に浸漬して、平衡化させた。得られたヒドロゲ

ルＨＧ１は下記の表２に示される性質を有していた。

【０１９１】

実施例１２～２６及び比較例ＣＥｘ５～ＣＥｘ１１

更なるヒドロゲルの調製

実施例１１の一般的方法を、下記の表２に示される修飾ゼラチン及び架橋剤を示された量で使用した以外は繰り返して、ヒドロゲルＨＧ２～ＨＧ１３及び最終カラムに示される比較修飾ヒドロゲルＣＨＧ１及びＣＨＧ２を得た。完全性のために、表２はＨＧ１も含む。各ヒドロゲルは、約９０ｗｔ％の水、並びに１０ｗｔ％の関連する修飾ゼラチン及び架橋剤の反応によって形成された化合物を含んでいた。

【０１９２】

【表２－１】

表2-化合物及びヒドロゲルを形成するための修飾ゼラチンと架橋剤の反応

実施例	修飾ゼラチン及び量(mg)	架橋剤及び量(mg)	修飾ゼラチンが架橋剤と反応するのにかかった時間† (ゲル化時間§) (分)	封入されたFITC-デキストラン(150kD)の放出速度R‡	得られたヒドロゲルの名称
11	MG1 (131.1mg)	AC-PEG-MAL 1 (68.6mg)	A	B	HG1
12	MG1 (165.4mg)	AC-PEG-MAL 1 (34.6mg)	A	B	HG2
13	MG5 (144.6mg)	PEG-AC4 (55.4mg)	A	B	HG3
14	MG5 (132.1mg)	AC-PEG-AC 1 (67.9mg)	B	B	HG4
15	MG5 (131.5mg)	AC-PEG-MAL 1 (68.5mg)	A	B	HG5
16	MG5 (173.4mg)	PEG-AC4 (26.6mg)	A	B	HG6
17	MG5 (165.5mg)	AC-PEG-MAL 1 (34.5mg)	A	B	HG7
18	MG6 (172.7mg)	PEG-AC4 (27.3mg)	A	B	HG8
19	MG6 (164.6mg)	AC-PEG-MAL 1 (35.4mg)	A	B	HG9
20	MG6 (188.1mg)	PEG-AC4 (11.9mg)	A	B	HG10
21	MG6 (184.2mg)	AC-PEG-MAL 1 (15.8mg)	A	A	HG11
22	MG6 (177.6mg)	AC-PEG-MAL 1 (22.4mg)	A	A	HG12
23	MG2 (180.7mg)	MAL-PEG-MAL (19.3mg)	B	ND	HG14
24	MG8 (189.6mg)	MAL-PEG-MAL (10.4mg)	B	ND	HG15
25	MG9 (195.6mg)	MAL-PEG-MAL (4.4mg)	A	ND	HG16
26	MG4 (180.7mg)	MAL-PEG-MAL (19.3mg)	B	ND	HG17
CEx5	MG7 (187.7mg)	AC-PEG-MAL 1 (12.3mg)	C	‼	CHG1
CEx6	CMG1 (161.0mg)	PEG-AC4 (39.0mg)	C	C	CHG2

CEx7	CMG1 (176.7mg)	AC-PEG-MAL 1 (23.3mg)	C	!!	CHG3
CEx8	MG10 (198.7mg)	MAL-PEG-MAL (1.35mg)	B	ND	CHG4
CEx9	CMG1 (187.6mg)	MAL-PEG-MAL (12.4mg)	C	ND	CHG5
CEx10	CMG5 (193.4mg)	MAL-PEG-MAL (6.61mg)	C	ND	CHG6
CEx11	CMG4 (186.1mg)	MAL-PEG-MAL (13.9mg)	C	ND	CHG7

【０１９３】
【表２－２】

§: ゲル化時間tの範囲:
A: 10min<t<45min(最も好ましい)
B: 45min<t<2h(好ましい)
C: t<10min又はt>2h(許容されない)。
‡: 37℃での1mm厚さのヒドロゲルからの封入されたFITC-デキストラン 150kDの放出画分
A: R>90%(最も好ましい)
B: 75%<R<90%(好ましい)
C: R<75%(許容されない)
!!: ゲル化なし。
NDは検出なしを意味する。

【０１９４】
ヒドロゲルの試験
透明度
本発明のヒドロゲルは優れた透明度を有することが分かった。
【０１９５】
圧縮率
下記の表３にリストされたヒドロゲルの圧縮率を上記に記載される方法によって決定し、結果を下記の表３に示す。
【０１９６】

【表３】

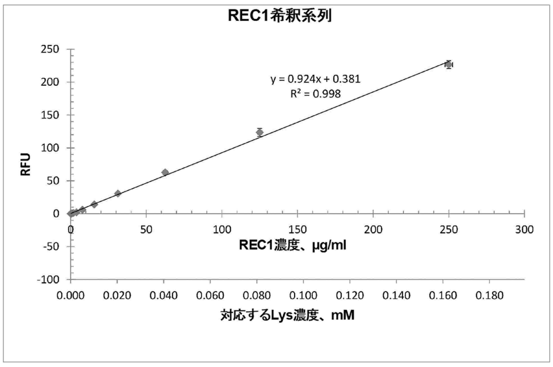
表3-ヒドロゲルの圧縮率

ヒドロゲル	元のゼラチン及びそこに存在するリシンのμモル/g	ヒドロゲルを作製するために使用された修飾ゼラチン中のチオール基の量(μモル/g)*	ゼラチン中のlys-lys距離の標準偏差 SD_{Lys}(AA)	ヒドロゲルの圧縮率E(kPa)
HG14	REC1 (644.7)	605	11.7	A
HG15	REC1 (644.7)	312	11.7	B
HG16	REC1 (644.7)	127	11.7	B
HG17	REC2 (646.2)	607	11.8	A
CHG4	REC1 (644.7)	38	11.7	C
CHG5	CREC1 (400.3)	376	17.4	C
CHG6	CREC1 (400.3)	194	17.4	C

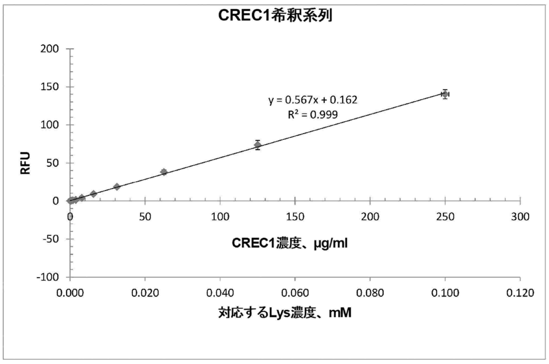
【０１９７】
注１：ゼラチン中のｌｙｓ－ｌｙｓ距離の標準偏差SD_{Lys}（ＡＡ）を明細書において上記に記載されるようにして算出した。
注２：表３において、
Ａ：２００＜Ｅ＜６００ｋＰａ（最も好ましい）、
Ｂ：１１０＜Ｅ＜２００ｋＰａ、及び
Ｃ：Ｅ＜１１０ｋＰａ
注３：これはチオール基を有するペンダント側鎖を含むリシン残基の量でもある。
【０１９８】
本発明及び比較ヒドロゲルの放出性
　上記の表２に記載されるヒドロゲルを水溶性蛍光マーカー（ＦＩＴＣ－デキストラン１５０ｋＤ、４ｋＤ）の存在下で調製した。次いで、マーカーを含むヒドロゲルを３７℃のＰＢＳ溶液中に置き、マーカーがヒドロゲルから経時的に放出された速度を蛍光分光法によって測定した。実験は、本発明によるヒドロゲルが特許請求の範囲に記載された量未満のリシンを含有する組換えゼラチンに由来する比較ヒドロゲルよりも速い放出性を有していたことを示した。これは、本発明のヒドロゲルが、比較例よりもヒドロゲルネットワークを通して溶質の拡散を可能にする点で優れていたことを意味する。このように、本発明のヒドロゲルは、医学的使用、例えば細胞封入のためにより適切である。

【図面】

【図１】



【図２】



【配列表】

<u>0007525664000001.app</u>

フロントページの続き

カー　ティルブルフ　アウデンスタールト　１　フジフィルム・マニュファクチュアリング・ヨーロッパ・ベスローテン・フエンノートシャップ内

審査官　　鈴木　崇之

(56)参考文献　　国際公開第２００８／１０３０４５（ＷＯ，Ａ１）
国際公開第２００８／１０３０４１（ＷＯ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１５／００７１９８５（ＵＳ，Ａ１）
European Polymer Journal，2011年，Vol. 47，pp. 1039-1047

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　１４／７８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）