

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5000826号
(P5000826)

(45) 発行日 平成24年8月15日(2012.8.15)

(24) 登録日 平成24年5月25日(2012.5.25)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 L 27/00 (2006.01) A 6 1 L 27/00 U
A 6 1 F 2/82 (2006.01) A 6 1 M 29/02

請求項の数 31 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2001-552962 (P2001-552962)	(73) 特許権者	503248927
(86) (22) 出願日	平成13年1月24日 (2001.1.24)		バイオコンパティブルズ・ユークエイ・リミテッド
(65) 公表番号	特表2003-520107 (P2003-520107A)		イギリス国、サリー・ジー・ユー・9・8・キュー・エル、フアーナム、ウエイドン・レイン、フアーナム・ビジネス・パーク、チャップマン・ハウス
(43) 公表日	平成15年7月2日 (2003.7.2)	(74) 代理人	110000741
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/000281		特許業務法人小田島特許事務所
(87) 国際公開番号	W02001/052915	(72) 発明者	ヒュージェス、ジェラルド・ローレンス
(87) 国際公開日	平成13年7月26日 (2001.7.26)		イギリス・サリー ジーユー9 8キューエル・フアーナム・ウエイドンレイン・フアーナムビジネスパーク・チャップマンハウス・バイオコンパティブルズ・リミテッド
審査請求日	平成19年12月13日 (2007.12.13)		
(31) 優先権主張番号	00300509.7		
(32) 優先日	平成12年1月24日 (2000.1.24)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被覆されたインプラント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 架橋された、生体安定性ポリマーマトリックスと
 b) 核酸である製剤学的に活性な化合物を含む塗膜を
 ステントの外側の上に有し、かつ、該ポリマーがペンダント両性イオン性基とペンダントカチオン性基を有することを特徴とするステント。

【請求項2】

ポリマーが20モル%未満の架橋性モノマーを含むエチレン型不飽和モノマーから形成されている請求項1記載のステント。

【請求項3】

ポリマーが a) 式 I



I

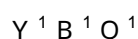
(式中、Bは結合であるか、あるいは直鎖もしくは分岐のアルキレンまたはアルキレン-オキシアルキレン基であって、このいずれかは1つもしくはそれ以上のフッ素置換基を含んでいてもよく、

Xは両性イオン性部分を有する有機基であり、そして

Yはエチレン型不飽和重合性基である)

の両性イオン型モノマーと、

b) 式 I I



I I

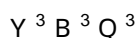
(式中、 B^1 は結合であるか、あるいは直鎖もしくは分岐のアルキレンまたはアルキレン-オキシアルキレン基であって、このいずれかは1つもしくはそれ以上のフッ素置換基を含んでいてもよく、

Y^1 はエチレン型不飽和重合性基であり、そして

Q はカチオン性もしくはカチオン化し得る部分を有する有機基である)

のカチオン性モノマーと、

c) 一般式 I V



I V

(式中、 B^3 は結合であるか、あるいは直鎖もしくは分岐のアルキレンまたはアルキレン-オキシアルキレン基であって、このいずれかは1つもしくはそれ以上のフッ素置換基を含んでいてもよく、

Y^3 はエチレン型不飽和重合性基であり、そして

Q^3 はこのポリマーを架橋することができる反応性基を有する有機基である)

を有する架橋性モノマー

を含むエチレン型不飽和モノマーから形成される請求項1または2記載のステント。

【請求項4】

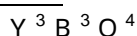
Q^3 が架橋性シンナミル、エポキシ、 $-CHOHCH_2Hal$ (式中、 Hal はハロゲン原子である)、メチロール、または反応性シリル、アセチレン、ジアセチレン、ビニルまたはジビニル基などのエチレン型不飽和架橋性基、またはアセトアセトキシまたはクロロアルキルスルホン基を含有する請求項3記載のステント。

【請求項5】

Q^3 が基 SiR^4_3 (ここで、各 R^4 は C_{1-4} アルコキシ基またはハロゲン原子である) である請求項4記載のステント。

【請求項6】

請求項5記載のステントであって、モノマーとして、式 I V ' である



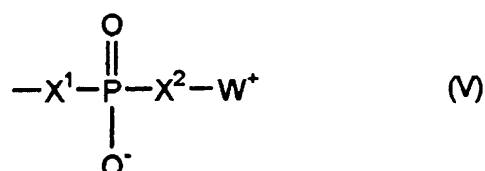
(式中、 $Y^3 B^3$ は化合物 I V について定義したとおりであり、 Q^4 はヒドロキシル基である)

で示される化合物を更に含む、上記ステント。

【請求項7】

Xが式 V

【化1】



(式中、部分 X^1 及び X^2 は、同一もしくは異なり、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ または原子価結合であり、そして

W^+ は、式 $-W^1-N^+R^6_3$ 、 $-W^1-P^+R^7_3$ または $-W^1-Het^+$ であり、かつ、 W^1 は1個もしくはそれ以上のエチレン型不飽和二重結合もしくは三重結合を含有していてもよい1個もしくはそれ以上の炭素原子のアルキレン、二置換アリール、アルキレンアリール、アリールアルキレン、アルキレンアリールアルキレン、二置換シクロアルキル、アルキレンシクロアルキル、シクロアルキルアルキレンまたはアルキレンシクロアルキルアルキレンであり、 W^1 はさらに1つもしくはそれ以上のフッ素置換基及び/又は1つもしくはそれ以上の官能基を含有していてもよく、 R^6 は同一もしくは異なり、そして各々は水素または1から4個の炭素原子のアルキル、またはフェニルであるか、あるいは R^6 の2つが結合する窒素原子と一緒にになって5から7個の原子を含有するヘテロ環を形成するか、あるいは R^6 の3つはそれらが結合する窒素原子と一緒にになって各環中に5から7個の原子

10

20

30

40

50

を含有する縮合環構造を形成し、 R^6 はさらに1つもしくはそれ以上の親水性官能基により置換されていてもよく、 R^7 は同一もしくは異なり、各々は R^6 または基 $O R^6$ (ここで、 R^6 は上で定義されているとおりである)であり、H e tは芳香族の窒素、リンもしくはイオウを含有する環である)

の基である請求項3ないし6のいずれかに記載のステント。

【請求項8】

X^1 及び X^2 が各々Oであり、そして W^1 が C_{1-12} アルキレン基である、請求項7記載のステント。

【請求項9】

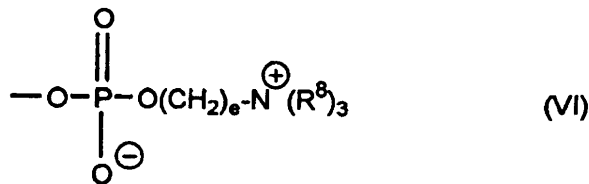
W^1 が直鎖アルキレン基である請求項7または8記載のステント。

10

【請求項10】

Xが式VI

【化2】



(式中、基 R^8 は同一もしくは異なり、各々は水素または C_{1-4} アルキルであり、そしてeは1から6である)

20

の基である請求項7ないし9のいずれかに記載のステント。

【請求項11】

各 R^8 がメチルであり、そしてeが2または3である請求項10記載のステント。

【請求項12】

Q^1 が基 $N^+R^5_3$ 、 $P^+R^5_3$ または $S^+R^5_2$

(ここで、基 R^5 は同一もしくは異なり、そして各々は水素、 C_{1-4} アルキルもしくはアリールであるか、または基 R^5 の2つは、それらが結合するヘテロ原子と一緒にあって5から7個の原子を含有する飽和もしくは不飽和のヘテロ環を形成する)

である請求項3ないし11のいずれかに記載のステント。

30

【請求項13】

モノマーが式III



(式中、 B^2 は結合であるか、あるいは直鎖もしくは分岐のアルキレンまたはアルキレン-オキシアルキレン基であって、このいずれかは1つもしくはそれ以上のフッ素置換基を含んでいてもよく、

Y^2 はエチレン型不飽和の重合性基であり、そして

Q^2 は少なくとも6個の炭素原子を有するアルキル基、フッ素置換アルキル基及び少なくとも一つのシロキサン置換基を有するアルキル基から選ばれる疎水性基を有する有機基である)

40

のモノマーを更に含む請求項3ないし12のいずれかに記載のステント。

【請求項14】

Y、 Y^1 、 Y^2 、 Y^3 及び/または Y^3 は、独立して、 $\text{CH}=\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4)-\text{K}-$ 、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R})\text{C}(\text{O})-\text{A}-$ 、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R})-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R})-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ 、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R})\text{OC}(\text{O})-$ 、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R})\text{O}-$ 、及び $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R})\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-$ 〔ここで、Rは水素または C_1-C_4 アルキル基であり、Aは $-\text{O}-$ または $-\text{NR}^1-$ であり、 R^1 は水素または C_1-C_4 アルキル基であるか、もしくは R^1 は $-\text{B}-\text{X}$ 、 B^1Q^1 、 B^2Q^2 または B^3Q^3 であり、B、 B^1 、 B^2 、 B^3 、 Q^1 、 Q^2 と Q^3 及びXは上で式IないしIVのそれぞれ一つにおいて定義されている通りであることができ、そして

50

Kは基 - (CH₂)_pOC(O)-、-(CH₂)_pC(O)O-、-(CH₂)_pOC(O)O-、-(CH₂)_pNR²-、-(CH₂)_pNR²C(O)-、-(CH₂)_pC(O)NR²-、-(CH₂)_pNR²C(O)O-、-(CH₂)_pOC(O)NR²-、-(CH₂)_pNR²C(O)NR²- (ここで、基R²は同一もしくは異なる)、-(CH₂)_pO-もしくは-(CH₂)_pSO₃-であり、またはKはBと組み合わせる原子価結合であってもよく、そしてpは1から12であり、そしてR²は水素またはC₁-C₄アルキル基である)から選ぶことができる、請求項3ないし13のいずれかに記載のステント。

【請求項15】

一緒に共重合されたすべてのモノマーの該エチレン型不飽和基がアクリレートタイプであるか、またはスチレンタイプ(CH₂=C(R)C(O)A-もしくはCH=CH-(C₆H₄)-K-)である請求項14記載のステント。

10

【請求項16】

エチレン型不飽和基が式CH₂=C(R)C(O)Aであり、そしてRがHもしくはCH₃であり、そしてAが-NH-もしくは-O-である請求項15記載のステント。

【請求項17】

各エチレン型不飽和基においてAが-O-である請求項16記載のステント。

【請求項18】

ポリマーの形成に使用される両性イオン性モノマー対カチオン性モノマーの比が1:10ないし10:1の範囲にある請求項3ないし17のいずれかに記載のステント。

【請求項19】

塗膜が少なくとも0.5 μmの乾燥厚さを有する請求項1ないし18のいずれかに記載のステント。

20

【請求項20】

核酸がDNAまたはRNAであり、そして線状もしくは環状、一本鎖もしくは二本鎖である請求項1ないし19のいずれかに記載のステント。

【請求項21】

核酸が少なくとも15塩基有する請求項1ないし20のいずれかに記載のステント。

【請求項22】

架橋された、水膨潤性ポリマーマトリックスであって、製剤学的活性体を含まない空ポリマーマトリックスの塗膜をステントの外側の上に有する空のステントを核酸である製剤学的活性体の水溶液と接触させて、それによって核酸をポリマーマトリックス中もしくはポリマーマトリックス上に吸着させる請求項1ないし21のいずれかに記載のステントの作製方法。

30

【請求項23】

請求項22記載の方法であって、該ポリマーマトリックスが水膨潤性であり、かつ、水溶液が該方法においてポリマーマトリックスを膨潤させる、上記方法。

【請求項24】

請求項22または23記載の方法であって、ポリマーマトリックスを水溶液と接触させる場合に、該ポリマーマトリックスが溶媒を含まない、上記方法。

【請求項25】

請求項22または23記載の方法であって、ポリマーマトリックスを水溶液と接触させる場合に、該ポリマーマトリックスが膨潤性液体により予め膨潤されている、上記方法。

40

【請求項26】

ステントを多量の水溶液中に浸漬することにより、該ステントを上記溶液と接触させる請求項22ないし25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

ステントを送達器具上に搭載する請求項26記載の方法。

【請求項28】

水溶液とステントの接触時間が少なくとも30秒である請求項22ないし27のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 2 9】

水溶液が 2 0 ないし 4 0 ° C の範囲の温度にある請求項 2 2 ないし 2 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 0】

温度が 3 7 である請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

ステント を架橋性ポリマーにより被覆し、このポリマーを架橋する予備的段階を含む請求項 2 2 ないし 3 0 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、インプラント、特に主として血管の中に導入するためのステントであるが、他の体腔の中に導入するためにも有用であるステントであって、配置する血管壁に薬剤が直接に送達される貯留として使用される、生体適合性ヒドロゲルポリマーの塗膜を有するものに関する。

【0 0 0 2】

優先日には公表されなかった本発明者らの以前の W O - A - 0 1 0 1 9 5 7 において、本発明者らは、患者の中に送達する直前に薬剤含有溶液中で膨潤させる、生体適合性架橋ポリマーの塗膜を有するステントを記述した。薬剤は、膨潤したヒドロゲルの中に吸収され、そしてこの移植ステントから長時間にわたって放出される。これらの出願で述べられた系は、1 2 0 0 D までの分子量を有する薬剤と共に使用するためにヨーロッパで販売することが承認された。このような薬剤の例は、ジピリダモル、ジクロキサシリン、ビタミン B 1 2 及びアンジオペプチンを含む。

【0 0 0 3】

本発明者らの以前の出願 W O - A - 9 8 / 2 2 5 1 6 において、本発明者らは、種々の基材上に生体適合性塗膜を設けるのに有用な、カチオン性モノマーと両性イオン性モノマーを含むエチレン型不飽和モノマーから形成されるポリマーを記述した。このカチオン性ポリマーはアニオン性ムコポリサッカライドを引き付ける。このポリマーにより被覆したステントを捕捉器具として使用して、患者の循環から全身的なヘパリンを除去してもよい。もしくは、この器具に例えばヘパリンを付着することによって、移植ステントから循環のなかへ薬剤を遅延放出することが可能になることが示唆されている。

【0 0 0 4】

E P - A - 0 8 0 9 9 9 9 において、カルメダ (C a r m e d a) C H 5 ヘパリン塗膜系を用いて、ヘパリンがステントに共有結合されている。

【0 0 0 5】

血管形成性化合物をステントから送達して、狭窄性障害が治療されている。W O - A - 9 7 / 4 7 2 5 3 においては、例えば、心臓の放射線治療に続いて血管形成性化合物が送達される。送達はポリマーにより被覆されたステントであってもよい。

【0 0 0 6】

U S - A - 5 9 5 4 7 0 6 においては、アニオン性ヒドロゲルをステント上に被覆し、ベンザルコニウム化合物などの一価のカチオン性化合物をこのヒドロゲルの上に被覆し、そしてヘパリンを接触し、このカチオン性化合物に静電的に結合させている。

【0 0 0 7】

例えば W O - A - 9 8 / 1 5 5 7 5 においては、センス及びアンチセンス D N A をステントから送達した。この D N A が血管形成性タンパク質をコードしていてもよい。

【0 0 0 8】

U S - A - 5 6 7 4 1 9 2 においては、バルーンカテーテル上の膨潤したヒドロゲル塗膜から核酸とモノクローナル抗体を絞り出すことにより、これらを送達する。これらの核酸は、オリゴヌクレオチドまたはウイルス性ベクターであってもよい。このヒドロゲルは、ポリアクリル酸などのポリカルボン酸であってもよい。核酸は血管壁の細胞に送達される。

10

20

30

40

50

【0009】

本発明による新しいインプラントは、

a) 少なくとも0.1 μmの乾燥厚さを有する架橋された、水膨潤性ポリマーマトリックスと

b) 製剤学的に活性な化合物

を含んでなり、ここでこのポリマーがペンダント両性イオン性基とペンダントカチオン性基を有するものである、外部表面上に塗膜を有する。

【0010】

このインプラントは好ましくはステントである。

【0011】

本発明は、生理的な条件下でアニオン性である製剤学的に活性な化合物を送達するのに特に有用である。本発明は、また、特に1000Dより大きい、更に好ましくは1200Dより大きい、例えば5000Dもしくはそれ以上の分子量を有する、高分子量の活性化合物に対して特に価値がある。

【0012】

この製剤学的活性体は、タンパク質、例えば抗体またはこれらのフラグメントであってもよい。このような化合物は、一般的にはそして好ましくは、本発明では生理的環境においてアニオンに荷電している。本発明は、核酸からなる活性化合物に対して特に価値がある。この核酸は、DNAまたはRNAであってもよく、そして線状もしくは環状、一本もしくは二本鎖であってもよい。この核酸は、医薬として有用なポリペプチドまたはタンパク質をコードしてもよく、もしくはこの核酸を送達する細胞中の対象とする遺伝子を調節するのに使用される、アンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。有用なポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸は、制御領域、または他の配列を含んでいてもよく、この遺伝子の発現及び/またはその細胞の中への送達及び/またはこのタンパク質の標的への輸送を可能とせしめてもよい。ターゲティングの目的で他の活性体等にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドもまた本発明により有用に送達される。

【0013】

本発明により送達される遺伝子の一つの特に興味ある類は、血管内皮成長因子または線維芽細胞成長因子などの血管形成性因子、または血小板由来の成長因子をコードする。少なくとも、調節配列は、特に平滑筋細胞における発現を方向付ける。例えば、調節配列は、WO-A-98/15575に記述されている通りであってもよい。本発明で使用されるオリゴヌクレオチドは、例えば、少なくとも5塩基、好ましくは少なくとも15塩基を有する。

【0014】

本発明の第2の局面によれば、新しいインプラントは、

a) 架橋された、生体安定性のポリマーマトリックスと

b) 製剤学的に有用な核酸

を含んでなり、ここでこのポリマーがペンダント両性イオン性基とペンダントカチオン性基を有する塗膜をその外部表面上に有する。

【0015】

本発明の第3の局面によれば、新しいインプラントは、

a) 架橋された、生体安定性のポリマーマトリックスと

b) 生理的なpHでアニオン性に荷電しているタンパク質である製剤学的に活性な化合物を含んでなり、ここでこのポリマーがペンダント両性イオン性基とペンダントカチオン性基を有する、塗膜をその外部表面上に有する。

【0016】

第2及び第3の局面においては、このポリマーマトリックスは少なくとも0.1 μmの乾燥厚さを有することが、必須ではないが好ましい。更には、このポリマーマトリックスは水膨潤性であることが必須ではないとしても好ましい。核酸及びタンパク質などのアニオン性活性体、特に、1KD以上の分子量を有するものは、主としてカチオン性基と両性イ

10

20

30

40

50

オン性基を有するポリマーの表面に吸着されて、ポリマー体の中には僅かしか吸収されないことを本発明者らは見出した。この理由のために、膨潤性と厚さは、第1の局面におけるよりは重要性が少ない。

【0017】

このインプラントは好ましくはステントである。この明細書の以降の部分においては、この器具をステントの形で記述するが、他のインプラントをステントに置き換えてもよいことは理解されるであろう。

【0018】

このポリマーマトリックスの架橋は、ステント上の塗膜を安定化し、塗膜を生体安定性とする。架橋密度の調節は、本来的に概ね水性の膨潤性溶媒中でのこのポリマーの膨潤する程度を若干コントロールする。更に、この架橋密度は、このポリマーマトリックスの孔のサイズに影響する。この孔のサイズは、次には本発明の第1の局面に特に関係するこのマトリックスの中に吸着される製剤学的に活性な化合物の最大分子サイズに影響すると考えられる。このポリマーは、20モル%未満の架橋性モノマーを含むエチレン型不飽和モノマーから形成されるのが好ましい。

【0019】

本発明で使用されるポリマーは、

a) 式 I



(式中、Bは結合である、あるいは直鎖もしくは分岐のアルキレン、アルキレン - オキシアルキレンまたはアルキレン - オリゴ(オキシアルキレン)基であって、このいずれかは1つもしくはそれ以上のフッ素置換基を場合によっては含むものであり、Xは両性イオン性部分を有する有機基であり、そしてYはエチレン型不飽和重合性基である)

の両性イオン性モノマーと

b) 式 I I



(式中、B¹は結合であるか、あるいは直鎖もしくは分岐のアルキレン、アルキレン - オキシアルキレンまたはアルキレン - オリゴ(オキシアルキレン)基であって、このいずれかは1つもしくはそれ以上のフッ素置換基を場合によっては含むものであり、Y¹はエチレン型不飽和重合性基であり、そして

Qはカチオン性もしくはカチオン化し得る部分を有する有機基である)のカチオン性のモノマーと、

c) 一般式 I V



(式中、B³は結合であるか、あるいは直鎖もしくは分岐のアルキレン、アルキレン - オキシアルキレンまたはアルキレン - オリゴ(オキシアルキレン)基であって、このいずれかは1つもしくはそれ以上のフッ素置換基を場合によっては含むものであり、Y³はエチレン型不飽和の重合性基であり、そして

Q³はこのポリマーを架橋することができる反応性基を有する有機基である)

を有する架橋性モノマー

を含むエチレン型不飽和モノマーから好ましくは形成される。

を含むエチレン型不飽和モノマーから好ましくは形成される。

【0020】

このモノマーを架橋するのに使用される好ましい反応性モノマー I V は、Q³が架橋性シンナミル、エポキシ、-CHOHCH₂Hal (式中、Halはハロゲン原子である)、メチロール、反応性シリル、アセチレン、ジアセチレン、ビニルまたはジビニル基などのエチレン型不飽和の架橋性基、またはアセトアセトキシまたはクロロアルキルスルホン、好ましくはクロロエチルスルホン基を含有するものである。最適な架橋のためには、反応性シリル基(例えば、各R⁴がC₁₋₄アルコキシ基またはハロゲン原子である基-SiR₃)を含むモノマーがヒドロキシル基を含むさらなるモノマー、例えば、式 I V '

10

20

30

40

50

$Y^3 B^3 Q^4$

I V'

(式中、 Y^3 及び B^3 は化合物I Vにおいて定義されている通りであり、 Q^4 はヒドロキシル基である)

を有するものと組み合わせて使用される。

【0021】

このポリマーが形成されるエチレン型不飽和モノマーは、式I I I

$Y^2 B^2 Q^2$

I I I

(式中、 B^2 は結合であるか、あるいは直鎖もしくは分岐のアルキレン、アルキレン-オキシアルキレンまたはアルキレン-オリゴ(オキシアルキレン)基であって、このいずれかは1つもしくはそれ以上のフッ素置換基を場合によっては含むものであり、

Y^2 はエチレン型不飽和重合性基であり、

そして Q^2 は少なくとも6個の炭素原子を有するアルキル基、フッ素置換アルキル基及び少なくとも一つのシロキサン置換基を有するアルキル基から選ばれる疎水性基を有する有機基である)

のターモノマーを更に含むことができる。

【0022】

最適の膜形成性と疎水性表面の被覆能力のためには、これらのポリマーは、好ましくは10モル%より多く、更に好ましくは20モル%より多くこのようなターモノマーを含有する。

【0023】

これらのポリマーは希釈剤モノマーを含んでもよい。90モル%までの、通常50モル%未満の量でこのような希釈剤モノマーを使用してもよい。 C_{1-24} アルキル(メタ)アクリレート、及び-(メタ)アクリルアミドとヒドロキシ C_{1-24} アルキル(メタ)アクリレート及び-(メタ)アクリルアミドなどの共重合性の非イオン性モノマーを使用してもよい。

【0024】

モノマーIからI Vの各々においては、このエチレン型不飽和基は、好ましくは $CH=CH-(C_6H_4)-K-$ 、 $CH_2=C(R)C(O)-A-$ 、 $CH_2=C(R)CH_2-O-$ 、 $CH_2=C(R)-CH_2OC(O)-$ 、 $CH_2=C(R)OC(O)-$ 、 $CH_2=C(R)O-$ 及び $CH_2=C(R)CH_2OC(O)N(R')$ から選ばれる。式中、

Rは水素または C_1-C_4 アルキル基であり、

Aは-O-または-NR¹[ここで、R¹は水素または C_1-C_4 アルキル基であるか、もしくは場合によってR¹は-B-X、B¹Q¹、B²Q²またはB³Q³(ここで、B、B¹、B²、B³、Q¹、Q²及びQ³及びXは式IからI Vのそれぞれ一つの中で上で定義されている通りである)である]であり、そしてKは基-(CH₂)_pOC(O)-、-(CH₂)_pC(O)O-、-(CH₂)_pOC(O)O-、-(CH₂)_pNR²-、-(CH₂)_pNR²C(O)-、-(CH₂)_pC(O)NR²-、-(CH₂)_pNR²C(O)O-、-(CH₂)_pOC(O)NR²-、-(CH₂)_pNR²C(O)NR²- (ここで、基R²は同一もしくは異なる)、-(CH₂)_pO-、-(CH₂)_pSO₃-、または場合によってはBと組み合わさって原子価結合であり、そしてpは1から12であり、そしてR²は水素または C_1-C_4 アルキル基である。

【0025】

好ましくは、一緒に共重合されるすべてのモノマーのエチレン型不飽和基は、アクリレートタイプであるか、もしくはスチレンタイプ($CH_2=C(R)C(O)A-$ または $CH=CH-(C_6H_4)-K-$)であり、最も好ましくは各々は同一の式を有する。好ましくは、両性イオン性、カチオン性及び架橋性モノマー及び任意のターモノマーのアクリレートタイプのエチレン型不飽和基の基Aは、同一であり、最も好ましくはすべて-O-である。

【0026】

両性イオン性基Xは、好ましくはアニオンとしてホスフェートエステル基またはチオエス

10

20

30

40

50

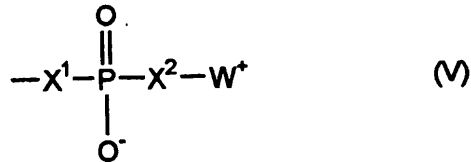
テル類似体またはアミド類似体またはホスホネートを有する。このカチオン性部分は、好ましくは4級アンモニウム基であるが、スルホニウムもしくはホスホニウム基であってもよい。好ましくは、このカチオン性基は、基Bから遠い基Xの末端にある。

【0027】

好ましくは、Xは、式V

【0028】

【化3】



10

【0029】

の基である。式中、部分X¹及びX²は、同一もしくは異なり、-O-、-S-、-NH-または原子価結合、好ましくは-O-であり、そしてW⁺はアンモニウム、ホスホニウムもしくはスルホニウムのカチオン性基とアニオン性及びカチオン性部分を連結する基であって、好ましくはC₁₋₁₂アルキレン基である基を含んでなる基である。

【0030】

好ましくは、Wは、カチオン性基としてアンモニウム基、更に好ましくは4級アンモニウム基を含有する。

20

【0031】

基W⁺は、例えば式-W¹-N⁺R⁶₃、-W¹-P⁺R⁷₃、-W¹-S⁺R⁷₂または-W¹-Hetの基であってもよい。

式中、W¹は場合によっては1個もしくはそれ以上のエチレン型不飽和の二重もしくは三重結合を含有する、1個もしくはそれ以上の、好ましくは2-6個の炭素原子のアルキレン、二置換アリール、アルキレンアリール、アリールアルキレン、またはアルキレンアリールアルキレン、二置換シクロアルキル、アルキレンシクロアルキル、シクロアルキルアルキレンまたはアルキレンシクロアルキルアルキレンであり、基W¹は1つもしくはそれ以上のフッ素置換基及び/または1つもしくはそれ以上の官能基を場合によっては含有し、そして

30

基R⁶は同一もしくは異なり、そして各々は水素または1から4個の炭素原子のアルキル、好ましくはメチル、またはフェニルなどのアリールであるか、もしくは基R⁶の2つが結合する窒素原子と一緒に5から7個の原子を含有するヘテロ環を形成するか、もしくは基R⁶の3つはそれらが結合する窒素原子と一緒に5から7個の原子を含有する縮合環構造を形成し、そして

1つもしくはそれ以上の基R⁶は親水性官能基により場合によっては置換され、そして基R⁷は同一もしくは異なり、各々はR⁶または基OR⁶(ここで、R⁶は上で定義されている通りである)であり、もしくは

Hetは芳香族の窒素、リンもしくはイオウ、好ましくは窒素を含有する環、例えばピリジンである。

40

【0032】

好ましくは、W¹は直鎖アルキレン基、最も好ましくは1,2-エチレンである。

【0033】

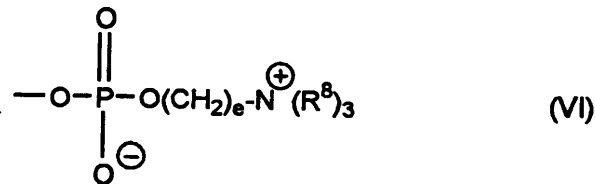
式Vの好ましい基Xは式VIの基である。

【0034】

式(VI)の基は、

【0035】

【化4】



【0036】

であり、式中、基 R^8 は同一もしくは異なり、そして各々は水素または C_{1-4} アルキルであり、そして e は 1 から 6 である。

【0037】

好ましくは、基 R^8 は同一である。また、基 R^8 の少なくとも一つは、メチルであることが好ましく、基 R^8 はすべてメチルであることが更に好ましい。

【0038】

好ましくは、 e は 2 または 3、更に好ましくは 2 である。

【0039】

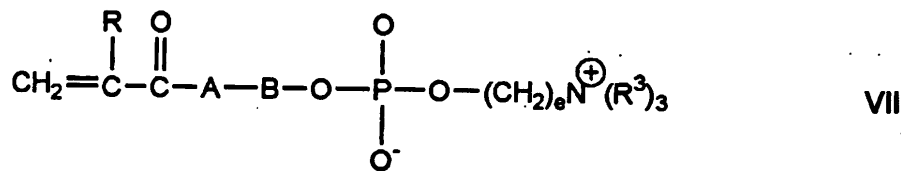
X が式 (VI) の基である場合には、好ましくは、 B は式 $-(\text{CR}^9)_2-$ または $-(\text{CR}^9)_2-$ 、例えば $-(\text{CH}_2)-$ または $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)-$ の基である。

【0040】

好ましくは、この両性イオン性モノマーは、一般式 VII

【0041】

【化5】



【0042】

を有する。

式中、 R 、 A 及び B は上で定義されており、

基 R^3 は同一もしくは異なり、そして各々は水素、 C_{1-1} アルキル、アリール、アルクアリール、アラルキルであるか、もしくは基 R^3 の 2 つまたは 3 つは、それらが結合する窒素原子と共に飽和もしくは不飽和のヘテロサイクル環を形成し、そして e は 1 から 6 まで、好ましくは 2 から 4 までである。

【0043】

基 Q^1 中のカチオン化し得る部分は、概ね容易にプロトン化され、例えば水性の環境中 $\text{pH} 7$ でプロトン化されて、カチオン性になることができる基である。

【0044】

このカチオン性モノマーの基 Q^1 は、好ましくは基 $\text{P}^+ \text{R}^5_3$ または $\text{S}^+ \text{R}^5_2$ である。式中、基 R^5 は同一もしくは異なり、そして各々は水素、 C_{1-4} アルキルまたはアリール（好ましくはフェニル）であるか、もしくは基 R^5 の 2 つはそれらが結合するヘテロ原子と一緒に 5 から 7 個の原子を含有する飽和もしくは不飽和のヘテロ環を形成する。好ましくは、基 Q^1 は永久にカチオン性である。すなわち、各 R^5 は水素以外である。好ましくは、 Q^1 は $\text{N}^+ \text{R}^5_3$ であり、式中、各 R^5 は C_{1-4} アルキル、好ましくはメチルである。

【0045】

両性イオン性モノマー対カチオン性モノマーの分子中における両性イオン性ペンダント基対カチオン性ペンダント基の相対比（当量）は、1 : 100 から 100 : 1（両性イオン性対イオン性）好ましくは 1 : 10 から 10 : 1、更に好ましくは 1 : 2 から 2 : 1 の範囲にある。

【0046】

10

20

30

40

50

一般的に、この架橋性基を含むポリマーは、ステント上に被覆され、塗膜の後、架橋される。架橋は、一般的に、湿気の下、例えば少なくとも40°C、好ましくは少なくとも60°C、例えば70°C近傍で場合によっては加熱することによる。

【0047】

この化合物と架橋性ポリマーの両方を含有する組成物から共被覆されることにより、このポリマーマトリックスの中にこの製剤学的に活性な化合物を装填させてもよい。もしくは、そして好ましくは、このポリマーをステント上に被覆し、架橋した後にこの薬剤をこのマトリックスの中にもしくは上に吸収させる。この装填段階は、場合によっては予備膨潤段階の後に、ポリマーマトリックスに浸透することができる製剤学的に活性な化合物の溶媒中の溶液または分散液とこの被覆されたステントを接触することにより行われる。普通、製薬学的活性体に対する溶媒は、このポリマーを膨潤させる溶媒である。好適な充填用組成物は水を含んでなり、加えてもしくは代わって、アルコールを含んでなる。製剤学的活性体を含有する膨潤したマトリックスからこの溶媒を除去してもよいが、もしくは例えば、貯蔵時には、もしくはこのステントを患者に直ちに送達することによりこのポリマーの中に溶媒を保持させてもよい。

10

【0048】

活性体の適当な装填量を得るように、装填条件が決められる。この温度は、このポリマーに好適な性質をもたらすように選ばれる。この温度は、普通0と60°Cの間、好ましくは室温から約40°C、例えば20から40°Cまで、最も好ましくは37°C近傍である。この溶液または分散液は、この付着温度で適当な流動性を得るように選ばれた溶媒を含有してもよい。

20

【0049】

装填前後で例えばガンマ線照射により、このステントを殺菌してもよい。

【0050】

薬剤の適切な装填量を提供するために、この塗膜ポリマーの塗膜は、少なくとも0.5µm、更に好ましくは少なくとも1µm厚（乾燥厚さ）であることが好ましい。場合によっては、この厚さは少なくとも2µm厚である。このステントをインプラントする血管壁の中に製剤学的活性体を直接に送達するステントの外側の上面にのみ、このポリマー塗膜と製剤学的に活性な化合物を被覆してもよい。しかしながら、好ましくは、更に厚い塗膜を、もしくは好ましくは外部塗膜よりも薄い塗膜をこのステントの腔表面にも付けるように、ポリマーの全体の塗膜をこのステントに付ける。

30

【0051】

このステントは、形状記憶金属ステント、自己膨張性ステントまたはバルーン膨張型ステントでもよい。例えば、自己膨張性ステントは、圧延シート器具または編網器具でもよい。最も好都合には、このステントは、エッチングされた管バルーン膨張型ステントである。送達器具上に搭載した時に本発明における薬剤をこのステントに付着させてもよい。決められた塗膜の上に両性イオン性ポリマーのオーバーコート塗布して、使用時の放出を制御してもよい。

【0052】

【実施例】

次の実施例は本発明を例示する。

40

略号

MPC：2 - メタクリロイルオキシエチル - 2' - トリメチルアンモニウムエチルホスフェート

LM：ラウリルメタアクリレート

HPM：ヒドロキシプロピルメタアクリレート - (70%3 - ヒドロキシプロピル：30%2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエチル)

XL：3 - (トリメトキシシリル)プロピルメタアクリレート

CM：コリンメタアクリレート

DMA：ジメチルアクリルアミド

50

これらのモノマー比は、重合で使用したモノマー量を基準とした重量ベースのものである。

(実施例1)

この目的は、各種ポリマー上への一本鎖のオリゴヌクレオチド (ASON、c-myc) の装填量を比較して、ポリマー膜へのASON装填量に対する疎水性、親水性、架橋密度及びカチオン電荷のレベルの重要性を評価することである。

【0053】

次の薬剤/化合物を評価し、比較した。

(i) アンチセンス一本鎖オリゴヌクレオチド (ASON)

(ii) ジピリダモル - 抗血小板薬剤

(iii) FITC 標識したデキストラン

ポリマー系は2つのタイプをベースとした。

(1) 参照

1.1 EP99304140.9のポリマー MPC₂₉LM₅₁HPM₁₅XL₅

1.2 疎水性のバリエーション品 MPC₁₅LM₆₅HPM₁₅XL₅

1.3 親水性のバリエーション品 MPC₄₅LM₃₅HPM₁₅XL₅

1.4 架橋剤の増加 MPC₃₀QLM₅₀HPM₁₀XL₁₀

1.5 EP99304092.2のポリマー MPC₃₇LM₆₃

(2) 本発明

2.1 標準 MPC₂₉LM₅₀CM₅HPM₁₂XL₄

2.2 電荷の増加 MPC_{21.5}LM_{42.5}CM₂₀HPM₁₂XL₄

2.3 親水性のバリエーション品 MPC₄₈LM₃₀CM₆HPM₁₂XL₄

2.4 架橋剤の低減 MPC₂₅LM₅₀CM₆HPM₁₄XL₂

2.5 親水性ポリマー MPC₂₈LM₂₀CM₆HPM₁₂XL₄DMA₃₀

2.6 高カチオン性 MPC₁₈LM₃₁CM₃₅HPM₁₂XL₄

ポリマー調製

ポリマー1.1を例外としてW098/22516に述べられているようなポンプによる供給方法によりすべてのポリマーを調製した。開始剤としてAIBNを使用してイソプロパノールと酢酸イソプロピル(沸点83°C)の還流するブレンドにイソプロパノール溶液中のモノマーを2時間にわたってポンプ供給した。

スチール片の塗膜

スチール片(1cm x 1.5cm)をジクロロメタン中で10分間超音波浴を用いてクリーニングした。50mg/mlのポリマー溶液200µlをこのスチール片上に均一に被覆した。各ポリマー試料に対して7個のスチール片を被覆した。次に、被覆したスチール片をオープン中で70°Cで一夜乾燥して、このポリマー膜を硬化させた。

ポリマーへの薬剤の装填

1mg/mlの薬剤溶液を入れた穴の中で6個の被覆したスチール片を、ポリマー側を下にして入れた。一つのコントロール試料には薬剤を装填させなかった。このスチール片を1時間浸した。次に、このスチール片を穴から取り出し、表面をティッシュで軽くたたくことにより過剰の薬剤を除去した。次に、このスチール片を室温で更に30分間乾燥した。次に、各試料をきれいなPBS溶液中に迅速に浸漬し、この塗膜から過剰な薬剤を除去した(3秒浸漬)。次に、各スチール片をバイアルに入れた3mlのPBS溶液の中に入れた。次に、この薬剤をこのポリマー塗膜から抽出するために、各バイアルを35°Cの浴温で20分間超音波を照射した。次に、各溶液を蛍光分光法を用いて測定して、薬剤取り込み量を求めた。

【0054】

注 - ジピリダモルの場合、薬剤の溶解度のためにPBSの代わりに50:50PBS/エタノール溶液を使用した。ASONとFITC-デキストランの場合には、3mlのPBSでなく合計60mlのPBS/エタノール溶液の中に試料を抽出した。

実施例1:1 ポリマー膜へのASONの装填

【 0 0 5 5 】

【表 1】

表1-蛍光の読み(励起500nm発光525nm)

ポリマーのタイプ	薬剤の取り込み(μg)
1.2	0.0
1.3	0.0
1.1	0.0
1.4	0.0
2.1	1.8
2.2	1.6

10

【 0 0 5 6 】

A SONを装填した1.1及び1.2ポリマーバリエーション品に対する初期の結果は、ポリマー1.1がいかなるA SONも取り込まず、その一方でポリマー2.1が少量のこの薬剤を取り込むことを示した。第1には、ポリマー2.1の中へのA SONの付着は、このポリマー上の電荷の存在と関連するようと思われる。また、この結果は、電荷レベルを増加する場合に、このポリマー塗膜が更なる量の薬剤を取り込まないように見えることを示す。電荷の増加の主なメリットは、活性化合物(A SON)の放出速度をスローダウンさせることである。

20

【 0 0 5 7 】

ポリマー2.1におけるA SONの取り込みは、A SON分子に関連する負電荷とこのポリマー塗膜中のCmの存在に関連する正電荷の相互作用によるのかもしれない。

【 0 0 5 8 】

試料2.1及び2.2に更に1時間の超音波を照射して、それ以上のA SONがいくらかでも放出されるかどうかを求めた。この結果は、20分後に観測された結果と差異を示さず、恐らく1.6及び1.8μgが全装填量であることを示した。

実施例1:2

A SON分子が大きすぎてこのポリマー塗膜中に浸透することができるかどうかを調べるために、膜厚に対する薬剤取り込みを評価することにより更なる実験を行った。この実験の目的は、ポリマーへのA SONの浸透が起こったかどうかを示すことであった。

30

【 0 0 5 9 】

50mg/mlのポリマーストック溶液200、500、及び800μlで種々の量の2.1及び1.1ポリマーによりスチール片を被覆した。次に、各スチール片を前述の方法によりA SONを付着させた。得られた結果を表2に示す。

【 0 0 6 0 】

【表 2】

表2

ポリマーのタイプ	ポリマー量(μl)	薬剤の取り込み(μg)
1.1	200	0.0
1.1	500	0.0
1.1	800	0.0
2.1	200	3.8
2.1	500	6.3
2.1	800	9.8

40

50

【 0 0 6 1 】

結果は、全体としての電荷を持たないポリマーはA S O Nを吸収せず、カチオン性ポリマーは吸収することを示す。カチオン性ポリマーの場合の薬剤の取り込みは、表面積だけでなくポリマー容積に関係すると思われる。

実施例 1 : 3

これまでの観察は、A S O Nはカチオン性タイプポリマーにより吸収されるのみであることを示した。次のアプローチは、このようなポリマーの疎水性、親水性及び架橋密度の影響を試験して、ポリマー網目の変化がA S O Nの装填度を増加させるかどうかを決めることであった。2 0 0 μ lの塗膜に対して得た結果を表3に示す。

【 0 0 6 2 】

【表3】

表3

ポリマーのタイプ	薬剤の取り込み(μg)
2.3	2.4
2.4	8.3
2.5	0.0
2.1	5.4

【 0 0 6 3 】

得られた結果は、このカチオン性ポリマーはA S O Nを吸収するが、ポリマー組成の変化は低架橋ポリマー系を例外としてポリマー塗膜中の取り込みの度合いを増加させないようであるという点で以前の発見を確認した。この親水性コポリマーは、塗膜性の点で最適でなく、結果として、見かけ上薬剤を吸収できないのかもしれない。

実施例 1 : 4 装填量に及ぼす薬剤分子量の影響

ポリマー塗膜中への薬剤分子量の装填量への影響を試験するために、蛍光により検出することができる種々の分子量の化合物を同定しなければならなかった。このような化合物の一つは、フルオレッセインイソチオシアネートデキストラン(F I T C - デキストラン)であった。これは中性の化合物である。F I T C - デキストランは単純なポリサッカライドであり、ある範囲の分子量、すなわち4 4 0 0 D、9 5 0 0 D、1 9 5 0 0 D、4 2 0 0 0 D、及び7 7 0 0 0 0で入手できる。

【 0 0 6 4 】

これらの化合物のサイズは、5 0 0 0 Dの分子量を有するA S O Nに類似している。

【 0 0 6 5 】

この実験は、いずれのポリマー塗膜においてもこのF I T C - デキストラン(分子量4 4 0 0)を検出することができなかつたことを示した。ポリマー2 . 1はいかなるデキストランも吸収しないという観察は、ポリマー2 . 1塗膜への取り込みに対する分子上の負電荷の重要性と必要性を示す。前にも示したように、ポリマー1 . 1は、分子量 > 4 4 0 0 Dの化合物/薬剤を取り込まない。

実施例 2 二本鎖オリゴヌクレオチド(D S O N)(分子量1 0 0 0 0 D)

この溶液の中にこのステントを数回浸漬し、中間で乾燥し、取り出す自動化ステント塗膜器具の上にB i o d i v Y s i oステントを次の条件を使用して被覆した。

ポリマー：2 5 m g / m l エタノール中

浸漬回数：× 5

空気圧(真空)：6 パール

浸漬速度：5 m m / 秒(電源パック上で2 5 V)

真空下の乾燥時間：浸漬サイクル当り2分

次に、ステントを7 0 ° Cで一夜硬化させた。

10

20

30

40

50

装填試験

リン酸塩緩衝液 (PBS) 中 1 mg / ml の濃度で DSON を入れた穴の中に浸漬することにより、このステントに DSON を装填させた。各ステントに 1 時間付着させた。装填が完了したら、このステントを穴から取り出し、ステントをティッシュで軽くたたきことにより過剰の DSON を除去した。

【0066】

このステントを PBS (2 ml) 中に入れ、1 時間超音波を照射して、ステントから吸収 / 吸着 DSON を除去した。2 つの方法を使用して、充填された材料の量を確認した。

(1) 蛍光 (吸収 500 nm / 発光 525 nm)

全薬剤装填量

2 mg / ml 溶液 (DSON、水中) : 4 μ g

1 mg / ml 溶液 (DSON、水 / PBS 50 : 50 中) : 5 μ g

繰り返し試験 - 1 mg / ml 溶液 (DSON、水 / PBS 50 : 50 中) : 6 μ g

(2) UV (@ 258 nm)

全薬剤装填量

1 mg / ml 溶液 (DSON、PBS 中) : 16 μ g (濾過前)

1 mg / ml 溶液 (DSON、PBS 中) : 12 μ g (濾過後)

装填させたステントを超音波照射浴に約 1 時間入れた後、全装填量に対する値を得た。結果は、超音波照射時にポリマー塗膜の一部がこのステントからはずれて、予想よりも大きな値を生じることを示す。それゆえ、分析の前にこの溶液を濾過することが必要であると 20 感じられた。図 1 のグラフは、PC 被覆の Biodiv Ysio ステントからのオリゴヌクレオチドの放出を示す。

【0067】

この Biodiv Ysio ステントに 1 mg / ml の PBS (50 : 50 水 : PBS) 中から ASON と DSON を付着させた。ほぼ 1 - 2 μ m でポリマー 2.1 により被覆された 15 mm Biodiv Ysio ステントへの取り込みは、ASON 5.3 μ g (10 mg / ml - 52 μ g)、DSON 5 - 10 μ g であった。

【0068】

PBS 中への溶離を上で示した通りに求めた。

【0069】

ガンマ線照射したポリマー 2.1 被覆の 15 mm Biodiv Ysio ステントを用いて、ASON の付着と放出を調べるこの試験を繰り返した。この結果は、ガンマ線照射しないポリマー被覆のステントに対して同じであった。これは、照射後にこのポリマーの化合物の吸収 / 吸着能力に変化がないことを示す。

実施例 3 プラスミド DNA

この試験計画の目的は、ポリマー被覆の円板からのプラスミド DNA (分子量約 50 kDa) の装填と薬剤放出プロフィールを求めることであった。

【0070】

13 mm の直径でスチール円板を切断した。各円板を十分に洗浄した。次に、この円板を空气中で 2 時間乾燥した。ポリマー 2.2 もしくは 1.1 の塗膜溶液 (15 mg ml⁻¹) 20 μ l の容積を各円板の片側に添加し、2 時間乾燥させた。次に、各円板の逆側を同じ方法で被覆した。この被覆した円板を 70 °C で 4 時間加熱架橋した。加えて、塗膜無し 40 のスチール円板を比較のために試験した。

【0071】

DNA - プラスミド溶液 (2.325 μ g / μ l) 20 μ l の容積を各円板の片側に添加した。この円板を 3 時間乾燥した。この手順をもう一方の側で繰り返した。

【0072】

この円板の一部をオーバーコートした。ポリマー被覆し、装填させた円板をエタノール中のポリマー 1.5 の 20 mg / ml 溶液で噴霧塗膜することにより、オーバーコートを行 50 った。

【0073】

この装填させた円板を2mlのPBS中に入れた。一定時間後、1mlの溶液を取り出し、プラスチックバイアルの中に入れた。この1mlの溶液を1mlの新しいPBSで置き換えた。この手順を異なる時間間隔で繰り返した。DNAを紫外/可視分光光度計を用いて定量する。放出データをグラフで表す(図20-22を参照)。図20は、オーバー塗膜の有り及び無しの2つの塗膜からのDNA-プラスミドの放出を示す。このデータは、経時的な損失パーセントの形で表される。ほぼ90-100µgのDNAプラスミドを各円板に装填させた。図21は、オーバー塗膜有り及び無しの2つの塗膜からのDNA-プラスミドの放出を再度示す。このデータは、実際のDNA-プラスミドの経時的な損失量の形で表される。図22は、類似の結果を示すが、ポリマー被覆の円板に比較した非被覆のスチール円板からの放出を示す。

10

【0074】

このDNA-プラスミドは、カチオン性ポリマー塗膜2.2から中性塗膜(ポリマー1.1)よりもゆっくりと放出するように見える。60分後には、ポリマー2.2塗膜上に著しい量のDNA-プラスミドが存在し、この時間の後は、極めて少量しかポリマー1.1塗膜上に残存しないように見える。

【0075】

多分、ポリマー2.2被覆のスチール円板上には、正に荷電した表面と強く相互作用する材料である著しい量のDNA-プラスミドが数時間後に残存する。非被覆のスチール円板に比較して、ポリマー1.1塗膜からの速度と全溶離の間にさほどの差はない。このプラスミドのオーバー塗膜は、両方のポリマータイプに対する溶離の全速度を低減させる。

20

実施例4 被覆したBioDivysioステントを用いるヘパリンの装填と放出

a) ポリマー2.1を装填させたステント

この試験は、ポリマー2.1被覆のステントがほぼ10000Dの平均分子量の未分別ヘパリンを試料を取り込み、放出する能力を調べた。被覆ステントをPBS中のヘパリン溶液の中に浸漬することにより、付着を行った。ある範囲の条件を使用して、このステントの中への装填を調べた。

【0076】

【表4】

表4

30

付着のためのヘパリン濃度/ mg ml ⁻¹	装填時間/分	放出のためのPBSの容積	Tmax* /分	Wmax** /µg	全装填量 /µg
0.2	30	1	15	0.73	3.4
2.0	30	0.5	20	2.07	N/A
10	5	0.5	10	13.93	N/A

【0077】

表6ヘパリンの装填と放出の条件と結果の要約

40

注 - * 放出ヘパリンが最大に達する時間 ; ** 放出実験の間に放出されたヘパリンの最大重量 (放出プロファイルの最大点を参照、図2)

図2 : ヘパリンの装填量に及ぼす装填時間の影響

図3 : ヘパリン2mg/mlを4時間装填させたステントのヘパリン放出プロファイル
ヘパリン試験の結果は、予期した通り、これがポリマー2.1被覆のステントにヘパリンを吸着/吸収することができ、このステントからヘパリンを長時間にわたって放出することを示す。

b) ポリマー2.2を被覆したステント

2mg/mlの水溶液からポリマー2.2により被覆されたステントに放射性標識した(³⁵S)ヘパリン(分子量8-10kDa)を装填させた。全装填量を求めるために、この

50

ステントを液体シンチレーション剤の中に入れ、放射能を測定するために被覆した。ヘパリンの平均取り込み量はステント当たり $11 \mu\text{g}$ であった。このステントを各々多量の PBS の中に入れて、4 時間にわたってヘパリンの溶離速度を求めた。このステントの中に残存するヘパリンのパーセントの形で示される、この結果を図 18 に示す。この結果は、多分ゆるく結合したヘパリンが直ぐに洗い出されることにより、初期にはバーストとしてヘパリンが放出され、それに緩慢な放出相が続くことを示す。放出データの外挿は、恐らく 100% のヘパリンが約 24 時間後に起こることを示す。

実施例 5 装填レベルに及ぼす装填時の時間、温度及びオリゴマーサイズとポリマーのカチオン含量の影響

この試験の目的は、短い DNA オリゴヌクレオチドを PC 被覆の 15 mm の Biodiv Y s i o 薬剤送達ステントに付着させるフィージビリティを試験し、薬剤の装填に影響する種々のパラメーターを最適化することであった。種々の条件を用いて、15 マー及び 32 マーの ^{32}P 放射性標識した一本鎖の DNA オリゴヌクレオチドを $300 \mu\text{l}$ 溶液から PC 被覆ステント（上述のポリマー 2.1、2.2 及び 2.6 を用いた）に装填させた。温度（23、37、45、65 °C）、薬剤溶液への露光時間（5、10、20、30 分）、薬剤活性（濃度）（11 - 500 $\mu\text{Ci} / 300 \mu\text{l}$ ）及びポリマー中のカチオン性モノマー含量（5、20 及び 35 重量%）の影響を試験した。全装填量をシンチレーションカウンター中で評価した。すべての装填実験は成功した。

【0078】

ポリマー 2.1 により被覆されたステント上に 37 °C で装填させた 15 マーに対する露光時間の装填レベルに及ぼす影響を図 4 に示す。

【0079】

装填溶液中の 15 マーの濃度を変える（ポリマー 2.1、30 分の塗膜時間及び 37 °C の温度を用いて）ことの装填レベルに及ぼす影響を図 5 に示す。

【0080】

薬剤溶液の温度を変える（ポリマー 2.1、30 分の塗膜時間及び 75 μCi の 15 マーの濃度を用いて）ことの装填レベルに及ぼす影響を図 6 に示す。

【0081】

このポリマー中のカチオン性モノマーのレベルを変え、この塗膜を脱イオン水により 1 時間前浸漬する（15 マーと 32 マーのオリゴヌクレオチドの両方に対して $300 \mu\text{l}$ 中の 211 pCi の初期濃度の薬剤により 30 分の塗膜時間と 37 °C の温度を用いて）ことの装填レベルに及ぼす影響を図 7 ないし 9 に示す。

【0082】

この溶液にステントを 10 分暴露した後に全薬剤装填量のプラトーが得られ、37 °C ($p, 0.05$) で最大装填量を得た。これらのパラメーターを用いる装填効率は 10% であった。薬剤濃度の増加と共に最適な装填を実現し、458 pCi ($34 \mu\text{g DNA}$) 溶液を用いて、45.8 pCi ($3.27 \mu\text{g DNA}$) を装填させた。また、他の濃度（0 及び 6% に対して $p < 0.05$ ）に比較して、このステント上のこのポリマーの CM 含量を 20% まで増加することは、最大装填量を改善した。

実施例 6 ステントからのオリゴヌクレオチドのインビトロの溶離

ポリマー 2.1、2.2 及び 2.6 により被覆され、15 マーまたは 32 マーの ^{32}P 標識のオリゴマーを装填（37 °C、30 分、脱イオン水中の前浸漬の有りもしくは無しで、浸漬溶液中 $300 \mu\text{l}$ の濃度で 211 μCi で）させたステントをヒトの血液または DMEM 細胞培養媒体中で 37 °C でインキュベーションした。このインキュベーション媒体の試料をある時間にわたって採取し、放射能を評価した。この結果を使用して、ある時間後このステント上に残存する %オリゴマーを計算した。

【0083】

図 10 は、血液と細胞培養媒体中でインキュベーションしたポリマー 2.1 により被覆されたステントからの 15 マーに対する溶離プロフィールを示す。

【0084】

10

20

30

40

50

図 1 1 は、血液と共にインキュベーション時の、異なるポリマーにより被覆されたステントからの 1 5 マーと 3 2 マーの溶離プロファイル及び脱イオン水中で前含浸したポリマー 2 . 1 に対する溶離プロファイルを示す。

実施例 7 インビボのオリゴマーの放出

a) ポリマー 2 . 1 により被覆されたステント (1 5 m m × 3 . 5 m m) にステント当り 1 2 p c i の全標識装填量で³²P 標識した 1 5 マーの A T G C C C C T C A A C G T G (配列 I D 1) を装填させた。次に、装填させたステントをブタの L C × 動脈の中に配備した。このブタを 3 0 分後に屠殺した。血液試料を採取し、このステントを回収し、1 5 マーのレベルをこの血液、ステント、動脈壁及びバルーンに対して求めた。この結果を図 1 2 に示す。

【 0 0 8 5 】

b) ポリマー 2 . 2 により被覆されたステント上の高装填量の 3 2 マーを用いたことを除いて、類似の実験を行った。0 時、配備後 3 0 分、2 4 時及び屠殺時 4 8 時で血液試料を採取した。この結果を図 1 3 に示す。

【 0 0 8 6 】

c) ポリマー 2 . 1 により被覆され、実験 8 c) で使用のと同じ³²P 標識した 3 2 マーを装填させたステントをバルーンカテーテル上に搭載し、インビボでブタの頸動脈の中に送達した。0、3 . 6 及び 7 2 時間と 8 及び 1 4 日の各時点に対して 2 ないし 3 匹の動物を使用した。送達後の特定の時点で、このステント上に残存する³²P 標識のレベルとこのステントから動脈及び心筋の中へのオリゴヌクレオチドの組織取り込みをシンチレーション

【 0 0 8 7 】

この結果を図 1 5 及び 1 6 に示す。

結論

実施例 7 a) - c) の結果は、オリゴヌクレオチドがこのステントを取り囲む血管壁の中にインビボで放出され、このステントを移植した血管に隣接する組織では殆ど検出されないことを示す。このように、実施例 7 c) においては、心筋の中で検出された放射能は殆どなかった。送達効率、局所的な薬剤送達カテーテルの空気入れポンプ (i n f i l t r a t o r) (T M) を使用するよりずっと高い。比較の結果は、1 6 8 0 p c i の³²P 標識 O D N の投与量を送達することは、結果として、3 時間と 6 時間で組織中で同一レベルの標識が得られ、ステントからの投与として僅か 1 0 0 μ g であったことを示す。これらの化合物の更に低い投与量を使用して、標的組織に送達してもよい。

実施例 8 蛍光標識したオリゴヌクレオチド

a) ポリマー 2 . 2 被覆のステント上の取り込みと放出

生理食塩水中の 5 m g / m l の D N A 溶液中に 3 0 分間浸漬することにより、ポリマー 2 . 2 により被覆されたステントに蛍光標識により標識した 1 5 マーの c - m y c アンチセンスオリゴヌクレオチド A A C G T T G A G G G C A T (配列 I D 2) を装填させた。

【 0 0 8 8 】

3 個のステントを各々 3 m l の P B S の中に入れ、3 0 分間超音波照射することにより、全装填量を求めた。この蛍光標識を定量した。この装填量は、ステント当り約 2 0 μ g であることが判明した。P B S の中への放出を図 1 9 に示す。

b) ブタ頸動脈中での放出と取り込み

ポリマー 2 . 1 被覆のステントに 8 a で使用した同じオリゴヌクレオチドを装填させた。このステントをウィック (w i c k) 乾燥した。バルーン上に搭載し、この切片中でバルーンを膨らませることにより、各ステントをブタ頸動脈の 5 0 m m の長さの切片中に配備した。次に、動脈のこの切片を培養媒体を充填した室中でカニューレ上に搭載した。更なる培養媒体をシリコーン管の回路と、それから動脈の切片から 6 0 m l 分⁻¹ の速度で流動させた。1、6、1 2 もしくは 2 4 時間後、ステント移植した切片をこの回路から取り外し、このステントから近位及び遠位の血管の末端を O D N を定量するために取り出した。

10

20

30

40

50

血管のこのステント化セグメントをこのステントから静かに引き離した。3つの血管セグメントすべてを液体窒素中でスナップ (snap) 冷凍し、粉末化し、そして溶解緩衝液中で一夜インキュベーションした。超音波照射と遠心分離に続いて、この上澄みを蛍光について測定して、ODNと結合した状態と考えられる標識濃度を求めた。この結果を図14に示す。この循環液体中の蛍光標識のレベルを各実験の終わりで検出し、これが読み取り器の検出レベル以下であることを見出した。血管の開始切片の一つを全蛍光標識の分析をする代わりに、切片し、そして臭化エチジウム染色の後共焦点顕微鏡下で観察した。この結果は、オリゴヌクレオチドが核の位置を示すと考えられる臭化エチジウムを含有することを示す。

実施例9 Abcixmab装填とインビトロの溶離

10

Abcixmabは、血栓形成を最少化するためのステント術の前後に全身的に投与されるグリコタンパク質IIb/IIIaに対する抗体(分子量、約50kDa)である。Abcixmabは、潜在的に平滑筋細胞上に存在し、そして平滑筋細胞遊走を仲介する役割のV3と反応し、それにより再狭窄にプラスに影響する。これは全体としてアニオン電荷を有する。

【0089】

この試験においては、このステントを0.001%ポリソルベート80を含有するリン酸塩緩衝液中の2mg/mlの薬剤溶液の中に浸漬して、溶解を室温で30分間を助けることにより、¹²⁵I標識したabciximabを、ポリマー2.2により被覆されたステント上に、もしくは比較としてむきだしのステント(ポリマー無し)上に装填させる。このステントを除去し、ウィック乾燥した。次に、アルブミンを含有する再循環(20ml/分)リン酸塩緩衝液の分離した回路の一部を形成するチャンネルの中に37°Cでこのステントを入れる。循環するPBS中の標識のレベルを24または48時間にわたって測定することにより、このステント上に残存する¹²⁵I標識のレベルを求め、パーセントの形で示した。この結果を図17に示す。また、ステント上の薬剤の全装填量を求め、それがポリマー2.2により被覆されたステントに対してステント当たり約5µgであることも判明した。

20

【0090】

この結果は、むきだしのステントからよりもこのカチオン性ポリマーからの方が更に長い時間にわたってこの活性剤を放出することを示す。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例2の結果を示す。

【図2及び3】 実施例4aの結果を示す。

【図4ないし9】 実施例5の結果を示す。

【図10及び11】 実施例6の結果を示す。

【図12及び13】 実施例7a及びbの結果を示す。

【図14】 実施例8bの結果を示す。

【図15及び16】 実施例7cの結果を示す。

【図17】 実施例9の結果を示す。

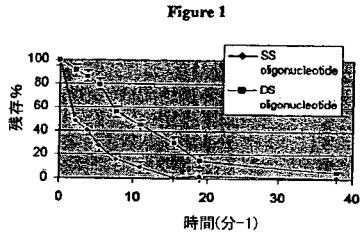
【図18】 実施例4bの結果を示す。

40

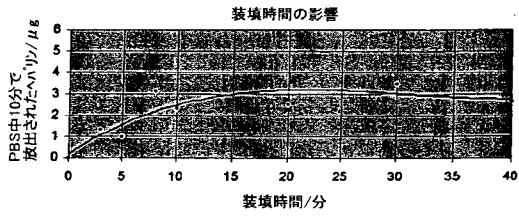
【図19】 実施例8aの結果を示す。

【図20ないし22】 実施例3の結果を示す。

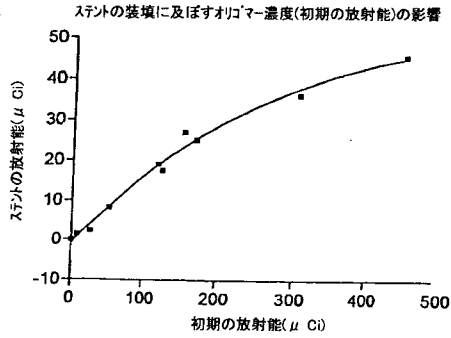
【 図 1 】



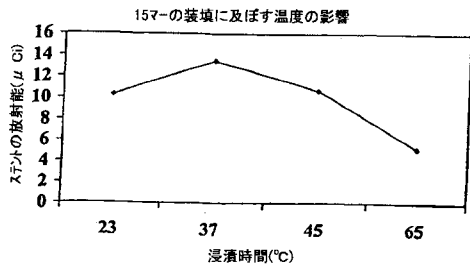
【 図 2 】



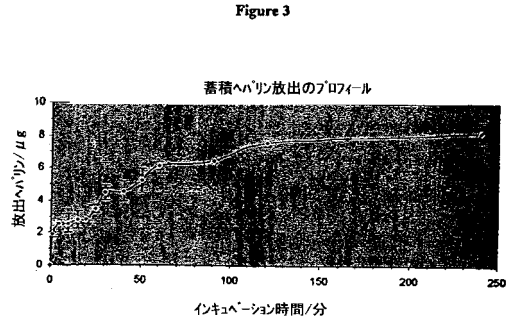
【 図 5 】



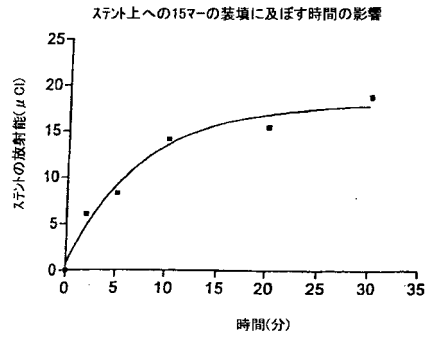
【 図 6 】



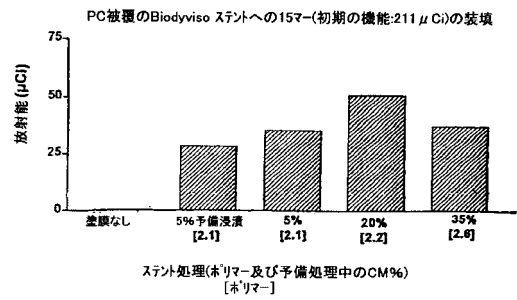
【 図 3 】



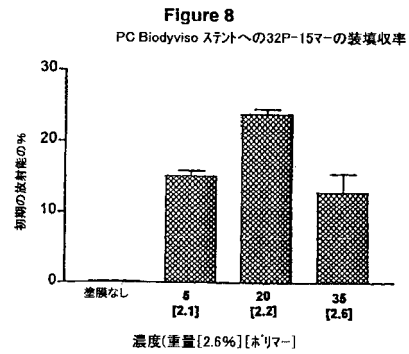
【 図 4 】



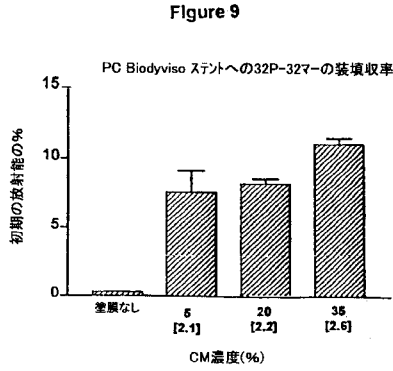
【 図 7 】



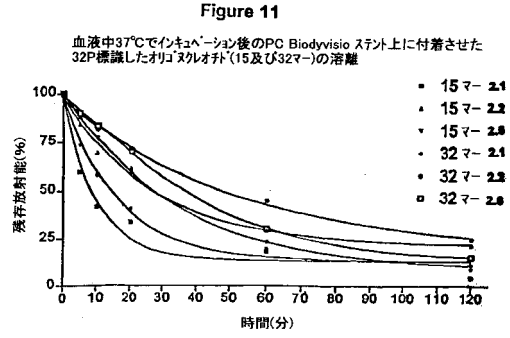
【 図 8 】



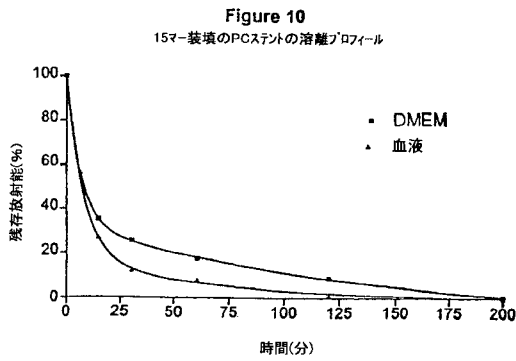
【 図 9 】



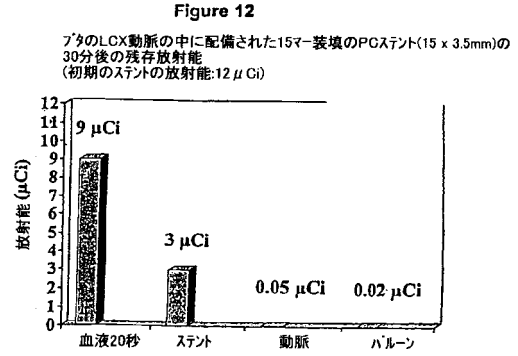
【 図 1 1 】



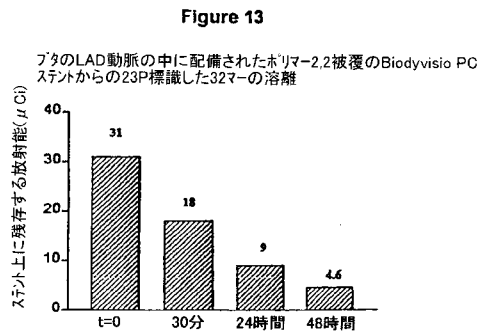
【 図 1 0 】



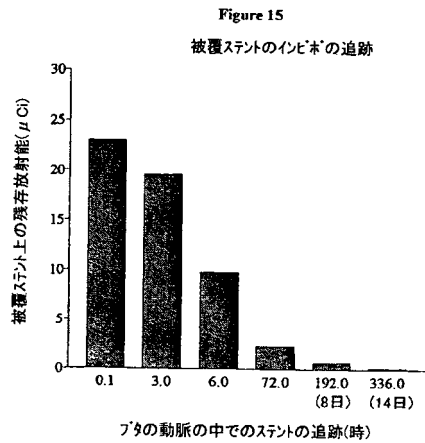
【 図 1 2 】



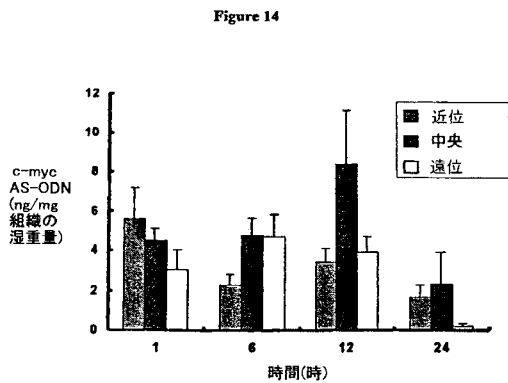
【 図 1 3 】



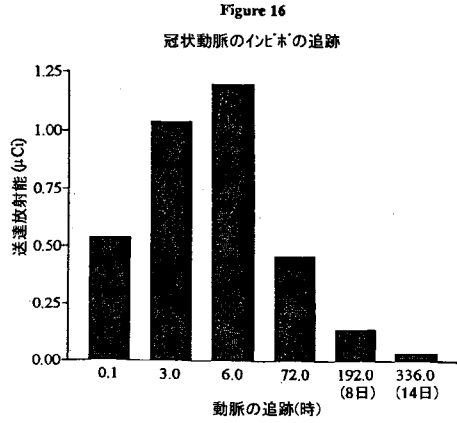
【 図 1 5 】



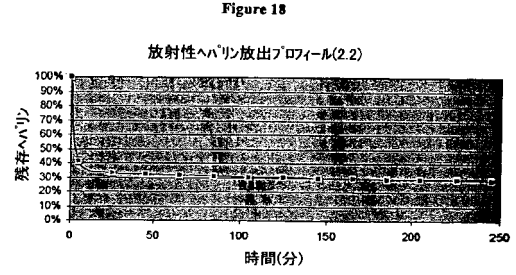
【 図 1 4 】



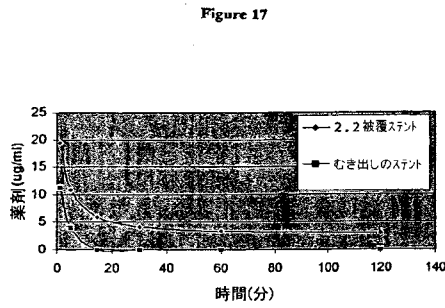
【 図 1 6 】



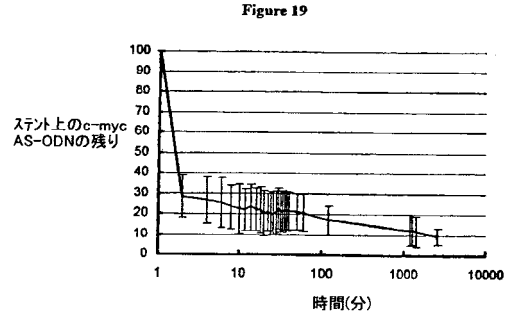
【 図 1 8 】



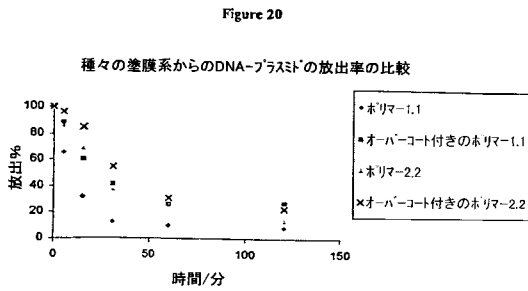
【 図 1 7 】



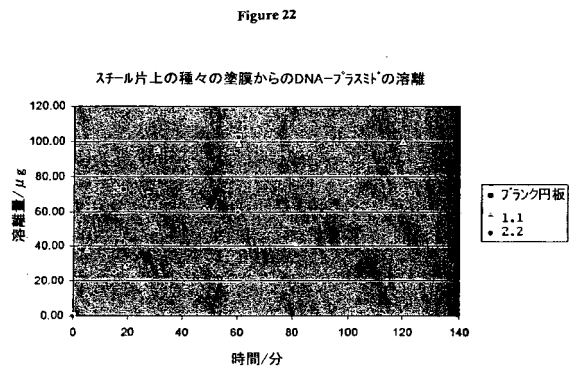
【 図 1 9 】



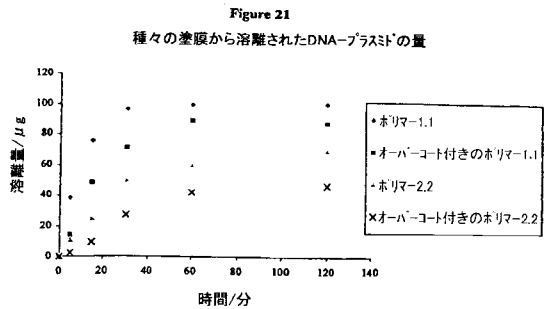
【 図 2 0 】



【 図 2 2 】



【 図 2 1 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ビク, テレンス・アルバート
イギリス・サリー ジーユー9 8キユーエル・フアーナム・ウエイドンレイン・フアーナムビジ
ネスパーク・チャプマンハウス・バイオコンパティブルズ・リミテッド
- (72)発明者 ワング, ジン・ハイ
イギリス・サリー ジーユー9 8キユーエル・フアーナム・ウエイドンレイン・フアーナムビジ
ネスパーク・チャプマンハウス・バイオコンパティブルズ・リミテッド

審査官 横井 宏理

- (56)参考文献 国際公開第98/022516(WO, A1)
国際公開第98/036784(WO, A1)
国際公開第99/055396(WO, A1)
国際公開第99/038546(WO, A1)
国際公開第98/022162(WO, A1)
特表2001-506915(JP, A)
特表平07-502053(JP, A)
特表平09-500561(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61L 15/00-33/18
A61F 2/00-94