

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5816666号
(P5816666)

(45) 発行日 平成27年11月18日(2015.11.18)

(24) 登録日 平成27年10月2日(2015.10.2)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 F	2/07 (2013.01)	A 6 1 F	2/07
A 6 1 M	31/00 (2006.01)	A 6 1 M	31/00
A 6 1 F	2/82 (2013.01)	A 6 1 F	2/82
A 6 1 L	31/00 (2006.01)	A 6 1 L	31/00
C O 8 G	85/00 (2006.01)	C O 8 G	85/00

請求項の数 15 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-190835 (P2013-190835)	(73) 特許権者	513233470 アルシメディク ALCHIMEDICS フランス国グルノーブル、アブニュ、ポール、ペアレヌ、9
(22) 出願日	平成25年9月13日(2013.9.13)	(74) 代理人	100117787 弁理士 勝沼 宏仁
(62) 分割の表示	特願2009-514796 (P2009-514796) の分割	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
原出願日	平成19年6月13日(2007.6.13)	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(65) 公開番号	特開2014-62251 (P2014-62251A)	(74) 代理人	100120617 弁理士 浅野 真理
(43) 公開日	平成26年4月10日(2014.4.10)		
審査請求日	平成25年9月17日(2013.9.17)		
(31) 優先権主張番号	60/812,990		
(32) 優先日	平成18年6月13日(2006.6.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気グラフト化されたプライマー被覆を付け、生物分解性放出層を備えた薬物溶離性ステント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ステント骨格、

内皮細胞の増殖および結合を促進して、内皮細胞による前記ステントの完全な再入植を確実にする、前記ステント骨格上に配置された電気グラフト化された被覆、および

前記電気グラフト化された被覆の上に配置された、薬物を保持する生物分解性重合体被覆であって、前記生物分解性重合体被覆が分解されて、前記ステントの移植後4週間以内に前記薬物を完全に放出する生物分解性重合体被覆を含んでなることを特徴とする、薬物溶離ステント。

【請求項2】

前記ステントが8週間後に内皮細胞によって完全に再入植される、請求項1に記載の薬物溶離ステント。

【請求項3】

前記電気グラフト化された被覆が重合体層である、請求項1または2に記載の薬物溶離ステント。

【請求項4】

前記ステント骨格が金属ベースを含んでなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の薬物溶離ステント。

【請求項5】

前記ステント骨格が、ステンレス鋼、ニチノール、タンタル、コバルト-クロムMP35Nま

たはMP20N合金、白金、チタン、好適な生物相容性合金、好適な生物相容性材料、およびそれらの組合せからなる群から選択された材料を含んでなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の薬物溶離ステント。

【請求項 6】

前記電気グラフト化された被覆の厚さが $10 \text{ nm} \sim 1.0 \text{ ミクロン}$ である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の薬物溶離ステント。

【請求項 7】

前記電気グラフト化された被覆が、ビニル樹脂、エポキシド樹脂および開環重合する環状モノマーおよびアリアルジアゾニウム塩からなる群から選択されたモノマーから製造される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の薬物溶離ステント。

10

【請求項 8】

前記モノマーが、ブチルメタクリレート、メチルメタクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート、イプシロンカプロラクトンおよび4-アミノフェニルジアゾニウムテトラフルオロボレートからなる群から選択される、請求項 7 に記載の薬物溶離ステント。

【請求項 9】

前記薬物が生物活性薬剤を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の薬物溶離ステント。

【請求項 10】

前記生物活性薬剤が、アンチセンス剤、抗新成形剤、抗増殖剤、抗血栓形成剤、抗凝血薬、血小板凝集阻害剤、抗生物質、抗炎症剤、遺伝子治療剤、治療物質、有機薬物、薬学的化合物、組換えDNA製品、組換えRNA製品、コラーゲン、コラーゲン誘導体、タンパク質、タンパク質類似体、多糖、および多糖誘導体からなる群から選択される、請求項 9 に記載の薬物溶離ステント。

20

【請求項 11】

前記重合体被覆が、一種以上の生物分解性重合体、共重合体、およびブロック重合体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の薬物溶離ステント。

【請求項 12】

前記生物分解性重合体が、ポリグリコリド、ポリラクチド、ポリカプロラクトン、ポリグリセロールセバケート、ポリカーボネート、バイオポリエステル、ポリエチレンオキシド、ポリブチレンテレフタレート、ポリジオキサノン、成長モジュレータとのハイブリッド、複合材料、コラーゲンマトリックス、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、真空形成された小腸粘膜下組織、繊維、キチン、デキストランおよびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 11 に記載の薬物溶離ステント。

30

【請求項 13】

前記薬物を保持する重合体被覆の厚さが $1 \sim 200 \text{ ミクロン}$ である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の薬物溶離ステント。

【請求項 14】

生物分解性トップコート層をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の薬物溶離ステント。

【請求項 15】

前記トップコート層が、前記生物分解性重合体被覆の組成物と同じ組成物から製造される、請求項 14 に記載の薬物溶離ステント。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬物溶離性ステントに関する。より詳しくは、本発明は、金属系ステントの表面に塗布する密着性プライマーに関し、該プライマーは、続いて生物分解性重合体で被覆することができ、該生物分解性重合体は、それ自体が薬物を保持し、その薬物を徐放することができる。

【背景技術】

50

【0002】

以前から、医療用装置および薬物送達のために被覆を使用することが、特に医療用装置および内移植物の能力を増大させるために、必要になっている。薬物溶離性医療用装置の被覆は、心臓血管病を処置するための先進的な生物医学手段として開発されている。

【0003】

心臓病および心臓欠陥は、米国および世界中で最も支配的な二種類の健康状態である。冠状動脈病では、心臓上の血管が狭くなる。これが起きると、心臓筋肉への酸素供給が減少する。冠状動脈病の主要な原因は、動脈を閉塞させる脂肪の堆積物(「プラーク」)である。冠状動脈病の処置は、最初は外科手術およびCABG(冠状動脈バイパス組織移植)で行われており、心臓外科医により行われる通常の効果的な手順である。しかし、死亡率および罹患率は高かった。60年代に、何名かの医師が医療用装置を使用して低侵入性処置を開発した。彼等は、大腿部動脈における小さな切開を通して、この病気を処置する、即ちバルーン血管形成術(狭くなった動脈を広くするのに使用し、バルーンカテーテルを使用し、これを拡張して動脈を開くこと、PTCA=経皮的冠動脈内腔拡張術)を冠状動脈病気の患者に使用することができた。バルーン血管形成術に続いて、3~6箇月の間に、血栓症(血管中に凝血が発達し、これが血管を詰まらせ、血流を停止させる)または異常な組織成長により、約40~50%の冠状動脈が再狭窄(通常はバルーン血管形成術により血管を開いた後、血管が再び狭くなること)を起こす。その結果、再狭窄は、PTCAの効果の大きな障害になっている。

【0004】

80年代に、冠状動脈を広げたまま維持するための裸金属ステント(BMS)の導入は、この問題、ならびにPTCA手順でバルーンを拡張する時に動脈を切開する問題を緩和する方向にある程度進んだ。このステントは、バルーンカテーテル上に取り付けたメッシュチューブ(体内に挿入できる、長く、細いたわみ性のチューブであり、この場合、心臓に糸で固定する)である。しかし、BMSには、ステント挿入から6箇月の患者の約25%に再狭窄が起き、ステントの支柱が、成長の際に動脈組織により埋め込まれる。この組織は、実質的に平滑筋細胞(SMC)から形成され、その増殖は、ステントを取り付ける時に動脈の初期損傷を与えることにより引き起こされる。この取付は、事実、内皮細胞(EC)の層を破壊し、内皮細胞は、さらに増殖し、移動し、SMCの上にステント支柱を再入植させ(recolonize)、SMCの増殖を止めなければならない。

【0005】

生物医学業界は、新世代のステントを設計し、再狭窄を阻止するために、選択された薬物(Sirolimus、Paclitaxel、ABT578、Tacrolimus、Everolimus、等)を血管壁中に放出することができる被覆を与えることにより、この欠陥を部分的に解決している。薬物溶離ステント(DES)は、90年代後半に、再狭窄の率を一桁に下げること、より効果的な方法を提供する可能性として非常に注目された。理想的には、内皮細胞は、SMCの増殖を止める信号として作用する小分子である酸化窒素(NO)を自然に生産するので、薬物は、活性ECにより早期に再入植させながら、SMCの増殖を阻止すべきである。

【0006】

市販されているほとんどのDESは、重合体状放出マトリックスを基材とし、そこから薬物を溶離させる。重合体はいわゆる生物安定性である、即ち重合体はステント上に永久的に止まり、炎症反応およびECによる再入植の両方に対してほとんど影響を及ぼさないと推定される。これらのDESの主な欠点は、DESが、それらが保持する薬物の100%を放出できないことである。このことの一つの重大な結果は、(薬物のほとんどがECをSMCと同等に、またはより効率的に、「殺す」ので)再入植過程が被覆中に残留する薬物により阻害されることである。この欠点は、患者に、従って、DES業界にとって致命的な、劇的な結果をもたらす。実際、再狭窄は、BMSによる約20%からDESによる約5%に下げることができるにも関わらず、この業界は、現在のDESによりもたらされる、未解決の主要な脅威、つまり晩発性(late)血栓症の現象、即ちステント内移植から1年以上後の動脈の再凝血に直面している。

【0007】

裸金属ステントの内移植は、再狭窄に加えて、血栓症の源でもあるが、血栓症は、2種類の抗血栓剤、典型的にはアスピリンおよびクロピドグレル(Plavix(登録商標))が関与する系統的な副治療により、容易に対処できることも以前から公知である。従って、典型的には、ステントを取り付けた患者はそのような副治療を1~2箇月指示される。追跡データは、血栓症に関してこの組合せの優れた結果を以前から指摘している。薬物溶離ステントでは、副治療中断の後すぐに起こる凝固(血栓症)により動脈が再凝血する多くの症例が報告されており、そのために心臓学者は、副治療を3、6、9、今や12箇月以上も維持するようになっている。18箇月の副治療を中断した後、僅か数週間で完全ステント血栓症による心筋梗塞が起こり得るといふ、幾つかの症例も報告されている。

10

【0008】

晩発性血栓症は、急な合併症であり、患者がカテーテル室から、または十分な設備のある医療センターから遠く離れている間の、患者が医学的な監視下でない時に、または監視下にあっても、起きた場合には致命的になることがある。その上、副治療は、非常に不快な障害であり、患者によっては、長いと考える期間の後、自分で停止を決断するか、または薬を服用するのを忘れるか、または予期せぬ臨床的処置を受ける必要があり、従って、抗血栓症処置を停止しなければならないことがある。

【0009】

晩発性血栓症の現象を説明する正確な理由は、まだ完全には理解されていない。病理学者は、晩発性血栓症の問題は、ECによるステントの不完全再入植を生じ、金属または重合体状材料を血液と長時間接触させ、その上に血小板の密着が起こり易くなり、血栓の破滅的な析出につながると推定している。ECによる完全再入植は、放出層から薬物が不完全放出される結果であり、これが、該重合体+薬物層の表面上に移動し、その上で増殖しようとして移動するECを「殺す」のであると主張する別の解釈が出てきている。従って、晩発性血栓症の危険性は、既存のDESの深刻な欠点である。

20

【0010】

ステントの製造工程(バルーン上での成形)中、ステントが動脈内(特にカルシウム沈着した病巣の上)を移動する間、およびステントが膨脹する(ステントの直径が3~5のファクターで増加する)際に、ステントが直面する非常に高い機械的束縛のために、制御できない亀裂および剥離が起こることが多い。亀裂および剥離は、数十ミクロン~数ミリメートルの人工的な「粗さ」を引き起こし、これが、ECによるステントの適切な再入植の深刻な障害になり易い。

30

【0011】

しかし、「粗さ」だけではECによる再入植の抑制を説明できない。ブタの動脈における、同じ動脈における2種類の重なり合ったCypher(登録商標)または2種類のTaxus(登録商標)ステントによる28日間で得たECによる再入植の評価を、同じ動脈におけるそれらの対応する裸金属ステント、即ち2種類のBx Velocity(登録商標)または2種類のExpress(登録商標)と比較した研究により、下記のこと立証される、即ち

- ・再入植すべき表面の「粗さ」が、DESおよびBMSの両方でかなり高い(2種類のステント間の重なりのために)としても、再入植は、DESと比較して、BMSの方が常に優れている。

40

- ・DES、Cypher(登録商標)またはTaxus(登録商標)、が何であれ、即ち放出される薬物が何であれ、再入植は、対応するBMSの方が常に優れている。

【0012】

この結果は、配置した後の被覆の、およびステント表面の「粗さ」は別にして、再入植は、薬物の非存在下で常に優れていることを強く示唆している。これは、下記の事実と相関している、即ち

- ・既存のDESは全て生物安定性の層を有する。薬物の放出は、純粋な拡散により得られ、従って、決して完了し得ない、即ち長期間にわたって再入植させる被覆中には、常にある量の薬物が残っている。

- ・既存のDES中に使用される薬物(Sirolimus、Paclitaxel)は全て、SMCと比較して、EC

50

に対して同等または低くさえある闘毒性濃度を有する、即ちこれらの薬物は、SMCと同等に、またはそれより効果的にECを「殺す」ことができる。これは、既存のDESが、ECに対して毒性の薬物を長期間にわたって保持するので、既存のDESの深刻な欠点となる。

【0013】

最後に述べるが、決して軽んずべきではないことは、これらの薬物が、動脈の改造にある効果を有することである。いわゆる「ステントの不完全取付」は、ステント支柱の幾つかが動脈の壁と不完全に接触していることを示す。ステントの不完全取付のほとんどは、特に、動脈のいわゆる「好ましい改造」、即ち漸進的な過剰膨脹を引き起こすSirolimusの場合、薬物の影響によると考えられている、つまりステントが最初は十分に動脈壁と接触しているが、薬物の影響下で動脈の直径が増加し、最終的に「浮き上がる」のである。そのような場合、ステント支柱の一部が、(動脈壁から遠すぎるために)ECにより再入植されずに残り、重合体材料と血液の直接接触により派生する血栓症の源になる場合がある。そのような血栓症は、患者が抗血小板副治療を受けている限りは現れないが、副治療を中断するとすぐに始まることがある(晩発性血栓症)。これは、やはり、既存の薬物溶離ステントの、薬物がステント表面上に長期間止まるための、深刻な欠点を示している。

10

【発明の概要】

【0014】

本発明の目的は、短期間は再狭窄を阻止するためにDESのように挙動し、長期間的には、血栓症を回避し、改造に先立ってECを早期に増殖し、移動させるために、BMSの履歴に類似した長期間履歴を有するステントを提供することである。前に詳細に説明したように、晩発性血栓症は、下記の内容、即ち、

20

- ・薬物の不完全放出
 - ・被覆の、ステント表面上への密着性が不十分であるために、被覆の一体性が乏しく、ECによる再入植を妨害する「粗さ」の潜在的な源である亀裂および剥離につながること、
 - ・不完全ステント取付(ISA)の場合、被覆の、ECを再入植させるための回復に好ましい(pro-healing)(長期間の)挙動が、薬物のために乏しくなること
- に関連すると考えられている。

【0015】

本発明のDESでは、薬物があれば、その薬物は、生物分解性重合体を經由して放出され、その生物分解性重合体は数週間後には消失し、従って、薬物の100%を放出する。そのような生物分解性重合体を使用する被覆の製造は、ステントを適切に取り付ける良好な機械的一体性を強化するために、密着性下側層を使用して進めなければならない。

30

【0016】

そこで、
ステント骨格、
前記ステント骨格上に配置された電気グラフト化された被覆、および
前記電気グラフト化された被覆の上に配置された、薬物を保持する生物分解性重合体被覆、を含んでなる、薬物溶離ステントを提案する。

【0017】

該DESは、生物分解性トップコート層をさらに含んでなることができる。

40

【0018】

電気グラフト化された被覆は、金属ステント表面とそれに続く重合体被覆との間の密着性を強化するための、効果的なプライマー被覆として使用する。電気グラフト化された被覆は、ステントに塗布し、乾燥させ、続いて薬物重合体を塗布する。後に続く重合体被覆は、薬学的特性を薬物溶離ステントに与えるための一種以上の治療用化合物を含むことができる。プライマーである電気グラフト化された被覆は、基材と有機重合体被覆との間の、金属および薬物重合体に対する良好な密着性を備えたブリッジとして作用する。

【0019】

電気グラフト化技術は、表面に共有結合を形成し、数十ナノメートル~数百ナノメートルの層を与え、ナノメートル単位の制御および血管移植に公知の材料、例えばp-BuMA、の

50

堆積を可能にする。さらに、得られる電気グラフト化された層は、一様で、ステント表面に適合する。該電気グラフト化された被覆は、(i)それ自体が消失する、即ちそれ自体が生物分解性であるか、または(ii)細胞の移動および増殖に良好な傾向を示し、特に絶対的に一様であり、亀裂および剥離が無い。生物分解性放出マトリックスが消失するので、この下側層は、ECまたはSMCと、あるいは血液と(不完全再入植、ISA、等)、もしくは両方と接触することになる。従って、該下側層自体ができるだけ一様であること、および特にECによる完全再入植を妨害しそうな亀裂を生じないことが最も重要である。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1Aは、生体外における、PLGAの二重層被覆からの、Sirolimusの累積放出と時間の関係を示したものであり、図1Bは、インビトロの、ポリ(ラクチド)の二重層被覆からの、Sirolimusの累積放出と時間の関係を示したものである。

10

【図2】生体内における、PLGAまたはPLAからの、Sirolimusの僅かな(fractional)放出と時間の関係を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の第一の目的は、

ステント骨格、

該ステント骨格上に配置された電気グラフト化された被覆、および

該電気グラフト化された被覆の上に配置された、薬物を保持する生物分解性重合体被覆を含んでなる、薬物溶離ステント(DES)である。

20

【0022】

ステント骨格

ステント骨格は、金属ベースを含んでなるのが有利である。特に、ステント骨格は、ステンレス鋼、ニチノール、タンタル、コバルト-クロムMP35NまたはMP20N合金、白金、チタン、好適な生物相容性合金、好適な生物相容性材料、およびそれらの組合せからなる群から選択された材料を含んでなる。

【0023】

電気グラフト化された被覆

電気グラフト化された層は、上側の生物分解性層に対する密着プライマーとして作用する(製造、成形およびステント形成工程の際)。電気グラフト化されたプライマー被覆は、一様な層である。この層は、好ましくは厚さが10 nm~1.0ミクロン、特に厚さが10 nm~0.5ミクロン、特に100 nm~300 nmである。そのような、ステント表面のあらゆる点において到達し得る最小曲率半径より小さな厚さのために、被覆が亀裂を生じることは決してない。電気グラフト化された層は、生物分解性重合体の亀裂および剥離を阻止することができ、ステンレス鋼BMSより優れていないとしても、それと同等の再入植を示す。さらに、厚さが数十または数百ナノメートルである電気グラフト化された層を使用することにより、2つの重合体層が噛み合わされる(interdigitation)ことにより、上にある生物分解性層の優れた密着性が確実に強化される。その意味で、電気グラフト化された重合体の性質は、放出マトリックス重合体の性質に基づいて選択し、その放出マトリックス重合体自体は、所望の薬物の装填および放出速度論に基づいて選択する、即ち電気グラフト化された重合体および放出マトリックス重合体は、部分的に混和し、良好な界面を構成する必要がある。これは、例えば2種類の重合体が近接した溶解度またはHildebrandパラメータを有する場合、または重合体の一方の溶剤が、少なくとも他方に対して良好な膨潤剤である場合に当てはまる。この制限とは別に、電気グラフト化された重合体の性質は、生物相容性であることが分かっている重合体の群から選択するのが好ましい。最後に、重合体の全てが電気グラフト化により得られるわけではないが、連鎖成長反応により得られるほとんどの重合体、例えばビニル樹脂、エポキシド樹脂、開環重合する環状モノマー、は好適である。従って、ポリ-ブチルメタクリレート(p-BuMA)、ポリ-メチルメタクリレート(PMMA)またはポリ-イブシロンカプロラクトン(p-ECL)は、電気グラフト化により得られ、疎水性放出

30

40

50

マトリックスと相互作用する、重要な重合体である。ポリ-ヒドロキシ-エチルメタクリレート(p-HEMA)は、電気グラフト化により得られ、親水性放出マトリックスと相互作用する、重要な重合体である。

【0024】

電気グラフト化により得られるが、「真の」重合体性質を有していない他の有機被膜は、放出マトリックス重合体マトリックスにとって非常に効率的なプライマー層になる場合があり、これは、フェニルジアゾニウム塩、特に4-アミノフェニルジアゾニウム塩テトラフルオロホウ酸塩、の電気グラフト化により、ステント表面に、放出マトリックス重合体マトリックスをスプレーする前に得られる、「ポリ」-ニトロ-フェニル被膜の場合に当てはまる。フェニルジアゾニウム塩は、好ましくは式 $Y - ArN_2 + X -$ を有し、式中、Arはアリール基を表し、フェニル基が有利であり、Xは陰イオンを表し、ハロゲン、硫酸塩、リン酸塩、過塩素酸、テトラフルオロホウ酸塩、ヘキサフルオロリン酸塩およびカルボン酸塩の中から選択するのが有利であり、Yは官能基であり、ニトロ、ヒドロキシル、チオール、アミノ、カルボキシル、カルボニル、エステル、アミド、シアノ、アルキルまたは官能化されたアルキル、フェニルまたは官能化されたフェニルの中から選択するのが有利である。

10

【0025】

電気グラフト化された層、特にp-BuMA層は、さらに不動態化挙動を有し、ステンレス鋼表面から重金属イオンが(血液流中または動脈壁中に)放出されるのを阻止することができる。該重金属は、血液液中に金属ステントを導入することにより引き起こされる初期の炎症に寄与すると考えられ、血液は、電解媒体であり、従って、Nernst平衡に達するまで、金属の部分的酸化を引き起こす。特に、縦方向断面で、電気グラフト化された層および本研究の生物分解性(薬物を含まない)ブランチの動脈壁の厚さは、裸金属ステントの動脈壁厚さよりも常に小さいことが観察され、肉芽腫が少ないこと、即ち炎症が少ないことを立証しており、この結果は、28日間のラビット試験で観察された、電気グラフト化されたp-BuMA層だけで被覆されたステントは、BMSと比較して炎症が少ないことを検出した内容を実証している(例11および12参照)。

20

【0026】

本発明の一実施態様では、電気グラフト化された層は、それ自体、生物分解性であり、従って、生物分解性放出層が消失した後は、ステントの表面から消失している。

30

【0027】

電気グラフト化された層は、非血栓症(または抗血栓症)効果を有し、回復にとって好ましい効果を有する(生物分解性放出層が消失した後、活性ECの増殖および密着が促進される)。薬物を含む生物分解性層の上部で、即ちその層が完全には消失する前に、ECの増殖が開始されても、該生物分解性重合体の加水分解の機構はその下で続行され、すぐにECは電気グラフト化された層と接触する。この回復にとって好ましい効果は、電気グラフト化された層自体が生物分解性である場合、ステンレス鋼表面の効果であると期待される。回復にとって好ましい効果は、長期的には、ECによる適切な再入植を確実にする生物安定性電気グラフト化された層で、より大きい。

【0028】

40

例13に記載する60日間のブタによる試験は、電気グラフト化されたp-BuMA(ポリ-ブチルメタクリレート)下層(150 nm)と、その上に被覆したPLGA(ポリ-ラクチド-コ-グリコリド)生物分解性放出層(5 μm)から形成された複合材料層で行った。この研究は、生物分解性放出層が最初の4週間後に消失し、薬物を100%放出したことを示す。この試験は、電気グラフト化された層および生物分解性層で被覆したステントが、8週間で内皮細胞により完全に再入植されたが、これは、生物分解性層は4週間後には消失していることが分かっているので、電気グラフト化された層だけが動脈および血液流と相互作用した結果であることも立証している。電気グラフト化された層および電気グラフト化されたステントの全体的な性能は、統計的に、生物分解性放出層の内側に薬物が無い複合材料2層(電気グラフト化された層+生物分解性貯蔵層)の(困難な)状況でも、BMSより優れている。本発明のDESは

50

、ECによる再入植が優れているために、ステント内移植の後、すぐに抗血小板副治療を中断することができよう。

【0029】

血栓症は、特殊なタンパク質が表面上に付着することにより開始されるので、耐血栓挙動は、表面の、タンパク質吸着を最少に抑えるか、または排除する傾向に関連する。ある種の巨大分子、例えばヘパリン、CMDBS、PC(ホスホリルコリン)系重合体および、より一般的には双生イオン基、ポリエチレンオキシド(PEO)またはポリエチレングリコール(PEG)を有する巨大分子、より一般的にはほとんど全ての高親水性表面が、この汚染防止効果を有することが分かっている。これらの重合体に共通していることは、これらの重合体の表面上にある、タンパク質を結合し易くする反応性官能基が、あるにしても、非常に少ないことである。

10

【0030】

手短に言うと、電気グラフト化された層は、妥当な耐血栓挙動を有するために、さらに、放出マトリックス重合体との良好な界面を可能にする上記の基準と相容れる限り、そのような汚染防止材料から製造することができよう。この必要条件は、ステントの金属表面に対する厚い生物分解性層の密着性を改良するプライマー層として、電気グラフト化された層が十分に満たすべき特性と矛盾するものではない、というのは、上に見てきたように、放出マトリックス重合体への密着性は、主として電気グラフト化された重合体との噛み合わせにより派生するためである。Biocompatible Plc.により開発されたPC重合体は、ビニル系重合体であり、従って、電気グラフト化により得ることができる(p-MPC/BUMA、p-MPC/DMA/TMSPMA、下記参照)。

20

【0031】

電気グラフト化された被覆として使用できる重合体の中で、特にビニル重合体、例えばアクリロニトリル、メタクリロニトリル、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、プロピルメタクリレート、ブチルメタクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、シアノアクリレート、アクリル酸、メタクリル酸、スチレンおよびその誘導体、N-ビニルピロリドン、ビニルハライドの重合体、およびポリアクリルアミド、イソプレン、エチレン、プロピレン、エチレンオキシド、開裂し得る環を含む分子、例えばラクトン、特に ϵ -カプロラクトン、ラクチド、グリコール酸、エチレングリコールの重合体、ポリアミド、ポリウレタン、ポリ(オルトエステル)およびポリアスパルテートが挙げられる。

30

【0032】

電気グラフト化により得られる有機被膜は、ビニル系重合体または共重合体、特にp-BUMA(ポリ-ブチルメタクリレート)、ポリ-HEMA(ポリヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ-MPC/BUMA(ポリ2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン/ブチルメタクリレート)およびポリ-MPC/DMA/TMSPMA(ポリ-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン/ドデシルメタクリレート/トリメチルシリルプロピルメタクリレート)でよい。一実施態様では、有機被膜は、生物分解性重合体、特にポリカプロラクトン、ポリラクチド(PLA)またはポリグリコラクチド(PLGA)である。

40

【0033】

電気グラフト化された被覆と生物分解性層(薬物含有層またはトップコート層)との間の密着

上側の生物分解性層は、電気グラフト化された層に、

- ・電気グラフト化された重合体との化学結合を形成することにより(例えば国際特許出願第W004/005410号を参照。この公報は引用されることにより本明細書の開示の一部とされる)、

- ・電気グラフト化された重合体の中に該生物分解性層の化学的前駆物質を挿入し、電気グラフト化された被膜の内側にその形成を誘発し、次いで電気グラフト化された重合体被膜を該生物分解性層のための固定層として作用させることにより(例えば国際特許出願第W004/074537号および第W004/075248号を参照。これら公報は引用されることにより本明細

50

書の開示の一部とされる)、

・予め形成した生物分解性重合体を電気グラフト化された層の内側に、噛み合わせにより強制的に浸透させることにより、密着することができる。噛み合わせは、該生物分解性重合体の重合体鎖が電気グラフト化された層の内側に「忍び込む」または「入り込む(reptate)」ことができ、電気グラフト化された層の内側に少なくとも一個の「ループ」を形成することに関連する。ある重合体に対して、1個の「ループ」は、不規則な配置にある場合、鎖の典型的なサイズであり、いわゆる重合体の回転半径の測定により、評価することができる。これは、正確な重合体、その分子構造、等にある程度関連しているとしても、重合体の回転半径は、ほとんどの場合、100 nmより小さく、密着性を改良するためには、電気グラフト化された層が、この閾値より厚く、上側層を形成する重合体の少なくとも一個のループを収容できる必要があることを示唆している。

10

【0034】

噛み合わせは、電気グラフト化された層の上に生物分解性層の優れた密着性を得るための方法であるが、但し、電気グラフト化された層は、

- ・約100 nmより厚いか、
- ・上側の生物分解性重合体の湿潤性と同等の湿潤性を有し、2層間で「混合」させるか

・薬物安定性を保存するのに十分に低い温度で熱的な噛み合わせを得るために、上側の生物分解性重合体のガラス転移温度より低いガラス転移温度を有するか、または

・該上側の生物分解性重合体の溶剤により、または該上側の生物分解性重合体の分散液またはその成分を含む溶液により、少なくとも膨潤し、室温で、電気グラフト化された層の表面上にそのような液体の単なる滴を取り付けることにより、噛み合わせを効率的に強制することができる、即ち電気グラフト化された層を膨潤させる液体が溶液または分散液の成分を電気グラフト化された層の中に挿入し、次いで蒸発し、噛み合わされた複合材料を後に残す。

20

【0035】

この最後の条件は、生物分解性放出層と電気グラフト化された層との間に良好で強力な界面形成するのに十分である。

【0036】

噛み合わせは、放出マトリックスと電気グラフト化された層との間に界面を構築するのに、化学結合または層形成と比較して、好ましい本発明の様式であるが、これは、ここでは、放出マトリックスを生物分解性になるように選択し、後に残るのが、既知の構造を有する(電気グラフト化された)重合体である、即ち、電気グラフト化された被膜の、炎症および/または血栓反応を引き起こす傾向がある残留反応を促進するであろう未反応化学基または加水分解された結合が残らないためである。

30

【0037】

噛み合わせには、生物分解性重合体層および所望により薬物を含む溶液を、所望の湿潤性を有するように適切に選択された電気グラフト化された層で被覆されたステントの上に塗布することが必要である。例えば、PLGAは、ほとんどの疎水性薬物、例えばSirolimus、Paclitaxel、ABT-578、と同様に、ジクロロエタン、ジクロロメタンまたはクロロホルムに容易に溶解する。そのような場合、電気グラフト化されたp-BuMAが、クロロホルムまたはジクロロメタンにより容易に膨潤(さらには溶解)するので、所望の噛み合わせ界面を得るのに好適である。

40

【0038】

製造の観点からは、この塗布は、浸漬またはスプレーにより行うことができる。浸漬は、一回あたり約2~3 μmより厚い層を得ることができないので、あまり使用されず、より大きな厚さには、すでに堆積した層が再溶解するのを回避するために、第一の層を完全に乾燥させてから、再度浸漬する必要がある。このために、約2 μmを超える層には、浸漬は非常に不都合である。これに関して、スプレーは、実行するのがより容易である(例14参照)。上記の溶液をスプレーするノズルをステントに向け、外側表面の全てにスプレーす

50

るために、ステントを回転させる。上記の条件で適切な噴み合わせ界面を得るには、いわゆる「湿潤スプレー」または「低圧」条件で作業する、即ちスプレーする溶液が低粘度(典型的には <1 cP、純粋なクロロホルムの粘度は 0.58 cPである)を有し、ノズルが、回転しているステントから短い距離にあり、ノズル中の不活性ベクトルガス(窒素、アルゴン、圧縮空気、等)が、典型的には 1 bar未満であるのが有利である。これらの条件により、液体が液体の小滴に噴霧され、これらの小滴が、スプレーチャンバー雰囲気中を移動し、電気グラフト化されたステントの表面に当たり、電気グラフト化された重合体層およびスプレー溶液は同じ湿潤性を有するので、滴は、非常に低い接触角(=良好な湿潤性)を示し、表面上の滴が集まり、早期に被膜を形成する。生物分解性層と電気グラフト化された層との間に良好な界面を形成することに加え、「低圧」スプレー方式は、支柱間の糸引き(w ebbing)が非常に少ない被覆されたステントを製造することができる。

10

【0039】

ステントに対するノズルの相対的な運動により、まだ大量の溶剤を含む、一様で、比較的薄い(<1 μm)層を一回塗りで堆積させることができる。回転および空気の補充により、層が薄い程、該溶剤をより容易に蒸発させ、重合体層(+薬物)を表面上に残す。次いで、第二の層を第一層の上にスプレーし、これを繰り返し、所望の厚さ(従って、装填量)に到達することができる。所望の厚さに達するまでに何度もスプレーする必要があるので、「低圧」スプレー方式はバッチ式で行い、幾つかのステントを平行に回転させ、一個のノズルが各ステントを順次スプレーし、一個がスプレーされている間に他のステントを蒸発させることができる。これによって、低圧スプレー手法は本来逐次的であっても、この方式の処理量を十分に高く維持することができる。

20

【0040】

そのような低圧スプレー方式を、1バッチあたり20個の回転するステントおよびX-Y走査装置によりステントの上を移動する単一のノズルを取り扱うことができる例14に示すが、この方式の一つの特殊性は、回転するステントが箱の内側にあり(溶剤排出および操作員の安全性を可能にするために)、X-Y装置が箱の外側にあり、ノズルの運動を、箱の天井を通して磁石により操縦し、箱の「閉鎖シェル」構造を保持し、その箱に試料ホルダーを、取り外し可能な試料キャリアを経由して横方向ゲートに差し込み、ゲートを内側から開き、グラブで箱の中にあるローターに挿入および接続することである。

薬物を含む生物分解性層

30

【0041】

生物分解性放出層は、(装填量に応じて)予め決められた期間にわたって薬物放出を達成するために、厚さが $1\sim 200$ μm であるのが有利であり、約 $1\sim 10$ μm であるのがより有利である。

【0042】

薬物-重合体被覆は、一種以上の薬物を包含することができる。各薬物は、生物活性薬剤を包含することができる。生物活性薬剤は、薬理的に活性な薬物または生物活性化化合物でよい。薬物-重合体被覆は、薬物-重合体溶離ステントの加工、包装、滅菌、または貯蔵中に分解にさらされることがある。滅菌の際、例えば、薬物または重合体の酸化が起こり、重合体結合の水解損傷、開裂、重合体および/または薬物の分解、もしくは薬物-重合体被覆の実際の亀裂または剥離を起こすことがある。加工中の、または加工したステントの温度変動により、薬物-重合体被覆の全部または一部が剥離することがある。本発明は、この問題を、薬物-重合体被覆と金属ステントとの間に電気グラフト化されたプライマー被覆を使用し、薬物-重合体剥離を軽減または阻止することにより、解決する。

40

【0043】

薬物は、プライマー被覆されたステントの上に塗布する前に、アルブミン、リポソーム、フェリチンまたは他の生物分解性タンパク質およびリン脂質によるマイクロビーズ、微小粒子またはナノ粒子カプセル封入技術を使用し、薬物-重合体被覆の中にカプセル封入することができる。

【0044】

50

生物活性薬剤は、抗新成形(antineoplastc)剤、例えばトリエチレントリホスホラミド、抗増殖剤、アンチセンス剤、血小板凝集阻害剤、抗血栓形成剤、抗凝血薬、抗生物質、抗炎症剤、遺伝子治療剤、有機薬物、薬学的化合物、組換えDNA製品、組換えRNA製品、コラーゲン、コラーゲン誘導体、タンパク質、タンパク質類似体、多糖、多糖誘導体、またはそれらの組合せを包含することができる。

【0045】

生物活性薬剤は、病気または障害を防止および処置するための治療特性を与える全ての治療物質でよい。抗新成形剤は、ステントの近くにおける癌細胞の成長および拡散を防止する、殺す、または阻止することができる。抗増殖剤は、細胞の成長を防止または停止することができる。アンチセンス剤は、遺伝子レベルで作用し、病気を引き起こすタンパク質が生産される過程を中断する。血小板凝集阻害剤は、血小板に作用し、それらの血液凝固機能を抑制する。抗血栓剤は、血餅形成を積極的に遅延させることができる。抗凝血薬は、ヘパリンおよびクマリンのような化合物を使用し、抗凝血治療で血液の凝固を遅延させるか、または阻止することができる。抗生物質は、微生物の成長を殺すか、または抑制することができる、病気および感染と戦うのに使用できる。抗炎症剤は、ステントの近くにおける炎症に反作用するか、または炎症を軽減するのに使用できる。遺伝子治療剤は、人の遺伝子の発現を変化させ、病気を処置、治癒もしくは最終的に防止することができる。有機薬物は、全ての小分子治療物質でよい。薬学的化合物は、治療効果を与える全ての化合物でよい。組換えDNA製品または組換えRNA製品は、改造されたDNAまたはRNA遺伝子材料を包含することができる。薬学的価値を有する生物活性薬剤は、コラーゲンおよび他のタンパク質、多糖、およびそれらの誘導体も含むことができる。例えば、生物活性薬剤は、血管再狭窄、ステントが配置されている体管腔の直径の狭窄または締め付けに対応する症状を防止するように選択することができる。生物活性薬剤は、一般的に細胞増殖を制御することができる。細胞増殖の制御は、目標とする細胞または細胞種類の成長を強化または抑制することを包含することができる。

【0046】

生物活性薬剤は、冠状動脈再狭窄、心臓血管再狭窄、脈管学的再狭窄、動脈硬化症、過形成、および他の病気または症状の一つ以上の症状に対する薬剤でよい。例えば、生物活性薬剤は、血管再狭窄、ステントが配置されている体管腔の直径の狭窄または締め付けに対応する症状を抑制または防止するように選択することができる。生物活性薬剤は、一般的に細胞増殖を制御することができる。細胞増殖の制御は、目標とする細胞または細胞種類の成長を強化または抑制することを包含することができる。

【0047】

生物活性薬剤は、ポドフィロトキシン、エトプシド、カンプトテシン、カンプトテシン類似体、ミトキサントロン、Sirolimus、およびそれらの誘導体または類似体を包含することができる。ポドフィロトキシンは、抗腫瘍特性を有する有機の高毒性薬物であり、DNA合成を抑制することがある。エトプシドは、ポドフィロトキシンの半合成形態から誘導することができる、単球(monocystic)白血病、リンパ腫、小細胞肺癌、および睾丸癌を治療することができる。カンプトテシンは、トポイソメラーゼ抑制剤として機能し得る抗癌剤である。構造がカンプトテシンに関連するカンプトテシン類似体、例えばアミノカンプトテシン、は、抗癌剤として使用できる。ミトキサントロンも、白血病、リンパ腫、および乳癌の処置に使用する重要な抗癌剤である。Sirolimusは、正常な細胞成長を妨害することがある薬剤であり、再狭窄を軽減させるのに使用できる。生物活性薬剤は、これらの薬剤の類似体および誘導体も包含することができる。酸化防止剤は、それらの抗再狭窄特性および治療効果のために、有益である場合がある。

【0048】

薬物-重合体被覆は、軟化、溶解またはステントから浸食され、少なくとも一種の生物活性薬剤を溶離させることができる。この溶離機構は、薬物-重合体被覆の外側表面が溶解、分解するか、または体により吸収される表面浸食、または薬物-重合体被覆全体が生物分解し、生物活性薬剤を放出する全体浸食と呼ぶことができる。薬物-重合体被覆の浸

10

20

30

40

50

食された部分は、体により吸収、代謝、または他の様式で排除される。

【0049】

薬物-重合体被覆は、重合体状マトリックスも包含することができる。例えば、重合体状マトリックスは、カプロラクトン系重合体または共重合体、もしくは各種の環状重合体を包含することができる。重合体状マトリックスは、様々な合成および非合成または天然の巨大分子およびそれらの誘導体を包含することができる。重合体は、様々な組合せの一種以上の生物分解性重合体、例えば重合体、共重合体、およびブロック重合体、からなる群から選択するのが有利である。そのような生物分解性(生物-再吸収されるか、または生物-吸収される)重合体の例としては、ポリグリコリド、ポリラクチド、ポリカプロラクトン、ポリグリセロールセバケート、ポリカーボネート、例えばチロシン由来、バイオポリエステル、例えばポリ(-ヒドロキシアルカノエート)(PHA)および誘導された化合物、ポリエチレンオキシド、ポリブチレンテレフタレート、ポリジオキサノン、成長モジュレータとのハイブリッド、複合材料、コラーゲンマトリックス、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、真空形成されたSIS(小腸粘膜下組織)、繊維、キチン、およびデキストランが挙げられる。これらの生物分解性重合体は全て、単独で、またはこれらの、もしくは他の生物分解性重合体との、様々な組成における組合せで使用できる。重合体状マトリックスは、好ましくは生物分解性重合体、例えばポリラクチド(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)重合体、ポリ(-カプロラクトン)(PCL)、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、または他の共重合体を包含する。薬学的薬物は、重合体状マトリックス全体にわたって分散させることができる。薬学的薬物または生物活性薬剤は、重合体状マトリックスから外に拡散し、生物活性薬剤を溶離することができる。薬学的薬物は、重合体状マトリックスから外に、ステントを取り囲む生物材料の中に拡散することができる。生物活性薬剤は、薬物-重合体の中から分離し、重合体状マトリックスから外に、周囲の生物材料の中に拡散することができる。別の実施態様では、薬物被覆組成物は、Abbot Laboratories, Abbot Park, IIIに譲渡された米国特許第6,329,386号に記載されている、42-Epi-(テトラゾリル)-Sirolimusを使用して調製し、米国特許第5,648,442号に記載されている、Biocompatibles International P.L.C.のホスホリルコリンから調製された被覆の中に分散させることができる。

【0050】

重合体状マトリックスは、生物活性薬剤の所望の溶離速度を与えるように選択することができる。薬学的薬物は、特定の生物活性薬剤が2種類の異なった溶離速度を有するように合成することができる。2種類の異なった溶離速度を有する生物活性薬剤は、例えば、薬理学的に活性な薬物を手術から24時間以内に急速送達し、次の2~6箇月にわたってその薬物をゆっくり、安定して送達することができよう。電気グラフト化されたプライマー被覆は、重合体状マトリックスをステント骨格に堅く固定するように選択し、重合体状マトリックスが急速に展開される生物活性薬剤およびゆっくり溶離する薬学的薬物を含むことができる。

【0051】

トップコート生物分解性層

DESは、生物分解性被覆放出層の組成物と同じ組成物から製造できるトップコート層をさらに含んでなることができる。特に、トップコート生物分解性層は、生物分解性重合体、例えばポリラクチド(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)重合体、ポリ(-カプロラクトン)(PCL)、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、または他の共重合体を包含することができる。

製造方法

【0052】

重合体の電気グラフト化は、表面上に重合体層を、その場で、即ち予め製造された重合体からではなく、前駆物質の浴から形成する技術である。被覆すべき表面は、電氣的に分極させ、連鎖伝搬反応により表面重合を引き起こす重合開始剤として作用する(仏国特許R2821575号を参照。この文献は引用されることにより本明細書の開示の一部とされる)。

10

20

30

40

50

【0053】

本発明は、容易に調製および制御できる前駆物質溶液から出発し、
(i)グラフト化反応を強制する電位を印加すること、
(ii)形成された重合体の少なくとも良好な膨潤剤、または該重合体の良好な溶剤でさえある電解媒体を使用すること
により、実際の重合体電気グラフト化を容易に行うことができる操作様式を使用する。

【0054】

生物相容性の密着性被膜(例えばポリ-ブチルメタクリレート(p-BuMA))は、ジアゾニウム塩(特にアリールジアゾニウム塩、例えば4-ニトロベンゼンジアゾニウムテトラフルオロボレート)を濃度 $5 \cdot 10^{-4} \sim 10^{-1}$ モル/l(特に 10^{-2} モル/l)で、およびモノマー(p-BuMAを3.5モル/lで)(溶剤=DMF)を含む溶液中で、電位範囲-0.2 V/ECS ~ -3.0 V/ECSにわたって、走査速度100 mV/sで、ステント(ステンレス鋼、コバルトクロム合金、等)をボルタンメトリー走査することにより、得られる。

【0055】

電解溶液は、連鎖重合可能なモノマーを可溶化するための、主として傍観者である(即ち電氣的重合反応に関与しない)溶剤を包含することができる。しかし、モノマーは、溶剤の役割(rule)を果たすこともでき、そのような液体の存在が常に必要である訳ではない。使用する場合、これらの溶剤は、好ましくはジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、酢酸エチル、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、プロピレンカーボネートおよび電気化学で通常使用される他の溶剤、ジクロロエタン、およびより一般的には塩素化溶剤の中から選択する。溶剤は、水およびアルコールからなる群から選択することもできる。溶剤を予め蒸留にかけ、含まれる水を除去することも、反応媒体の上にある雰囲気含水量を厳密に制御する必要もない。従って、この方法は、工業的規模で容易に実行することができる。

【0056】

電解溶液は、電解溶液中の電流通過を確保および/または改良するために、少なくとも一種の支持電解質を含むこともできる。使用する場合、これらの支持電解質は、好ましくは第4級アンモニウム塩、例えば過塩素酸、トシレート、テトラフルオロボレート、ヘキサフルオロホスフェート、第4級アンモニウムハロゲン化物、硝酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムの中から選択する。電解質溶液は、被膜の均質性を改良するための薬剤(界面活性剤)、例えばグリセロール、をさらに含んでなることができる。

【0057】

この被膜は、架橋が、あるにしても、ほんの僅かであり、その表面上の密着性は、その下にある金属との結合形成の結果である。この理由から、ここでは連鎖伝搬反応を受けることができるモノマーおよび好ましくは低濃度で存在するジアゾニウム塩の両方を含む溶液の電氣的還元により得られるグラフト化について述べているが、以下、重合体の電気グラフト化の用語を使用する。そのような方法により、全ての導電性基材、例えばステント、の上に、有機の、特に厚さが数十ナノメートル~数百ナノメートルである重合体状の被膜を電気グラフト化することができる。

【0058】

ステント骨格の上に配置された電気グラフト化された溶液を乾燥させる。過剰の液体は、被膜乾燥の前に、吹き飛ばすとよい。全ての揮発性成分を排除または除去するための重合体溶液の乾燥は、室温または高温で、乾燥した窒素または他の、真空を包含する好適な環境下で行うことができる。被覆されたステントは、真空(約10 mbar)下で、穏やかに加熱した40 °Cのオーダーにある温度で、約60分間焼き付け、プライマー被覆の内側に含まれる溶剤の全てを排除することができる。電気グラフト化されたプライマー被覆の厚さは、ステント骨格を十分に被覆し、その後続く薬物-重合体塗布のための十分な下側層を形成するには、10 nm~1.0ミクロンでよい。プライマー被覆の所望の厚さを達成するために、塗布および乾燥工程を追加することができる。

【0059】

電気グラフト化されたプライマー被覆の上に、スプレーまたは浸漬により、湿式工程を行う。薬物重合体を好適な溶剤と混合し、浸漬、スプレー、塗装またはブラシ塗りのような塗布技術を使用し、プライマーの上に塗布することができる。被覆操作の際、薬物-重合体が電気グラフト化されたプライマー被覆に良く密着する。薬物-重合体被覆は、電気グラフト化されたプライマー被覆の直後に施すことができる。あるいは、薬物-重合体被覆を、電気グラフト化されたプライマー被覆を備えたステントに、後の時点で施すこともできる。

【0060】

薬物重合体は、好適な溶剤と混合し、重合体溶液を形成することができる。薬物重合体は、重合体状マトリックスおよび一種以上の治療化合物を包含することができる。薬物-重合体被覆を形成するには、モノマー、例えば酢酸ビニル誘導体、を、他のモノマーと共に、溶剤、例えばイソプロピルアルコール、中に混合し、重合体溶液を形成することができる。この混合物を反応させ、重合体を形成することができ、一種以上の生物活性薬剤を、重合した混合物と混合し、予め決められた溶離速度を有する薬物重合体を形成することができる。好適な生物活性薬剤または生物活性薬剤を含む溶液を、重合体溶液の中に混合することができる。あるいは、重合体、例えばコポリエステルまたはブロック共重合体、を好適な溶剤に溶解させ、一種以上の生物活性薬剤をこの混合物に加えることができる。混合物を、重合体溶液中で、密着性促進剤と組み合わせることができる。一種以上の密着性促進剤を選択し、混合物に加えることができる。

【0061】

重合体溶液は、電気グラフト化されたプライマー被覆を備えたステント骨格に塗布することができる。重合体溶液は、重合体溶液を塗布するためのいずれかの好適な方法を使用してステントに塗布することができる。

【0062】

過剰の液体を吹き飛ばし、重合体溶液を乾燥させる。全ての揮発性成分を排除または除去するための重合体溶液の乾燥は、室温または高温(約40)で、乾燥室素または他の好適な環境で行うことができる。第二の浸漬および乾燥工程を使用し、被覆を厚くすることができる。薬物-重合体被覆の厚さは、生物活性薬剤で十分な、満足できる薬理学的有益性を得るには、1.0ミクロン~200ミクロン以上でよい。

【0063】

薬物-重合体被覆の処理は、空気乾燥または空気、窒素、もしくは他の調整された環境中での低温加熱を包含することができる。薬物-重合体被覆は、薬物-重合体被覆を予め決められた温度に加熱することにより、処理することができる。

【0064】

より具体的に、本発明の代表的な例を以下に記載する。下記の例は、

- (1) 電気グラフト化された溶液の処方
- (2) ステンレス鋼ステント上への電気グラフト化方法
- (3) コバルトクロムステント上への電気グラフト化方法
- (4) 電気グラフト化されたp-BuMAの腐食バリアー効果
- (5) p-BuMA電気グラフト化およびPLA浸漬被覆したクーポンの腐食バリアー特性
- (6) 貯蔵層を堆積させるためのスプレー方法
- (7) 電気グラフト化された層による密着性強化
- (8) インビトロ薬物放出速度論の例
- (9) 電気グラフト化された被覆の細胞毒性研究
- (10) 電気グラフト化された被覆の溶血性研究
- (11) 局所的に内移植した後の電気グラフト化されたステントの局所的耐性研究
- (12) 電気グラフト化されたBuMA被覆されたステントの、BMSと比較した再入植性能、14および28日間におけるラビットモデル
- (13) ブタにおける完全被覆されたステント後の局所的耐性
- (14) 電気グラフト化された層との良好な界面を備えたDESを製造するための低圧スプレー

10

20

30

40

50

装置、
を例示する。

【実施例】

【0065】

例1 電気グラフト化された溶液の処方

本発明の一実施態様は、DMF溶剤中に溶解させたビニル系モノマー-n-ブチルメタクリレート(BuMA)を基剤とする電気グラフト化溶液の処方により示される。NaNO₃を、電解質支持体として使用する。

【0066】

【表1】

10

ビニル系モノマーの濃度	ジアゾNO ₂ テトラフルオロボレート	NaNO ₃ 濃度	グリセロール	DMF%
30%	10 ⁻³ M	2.5×10 ⁻² M	5%	65%

表1 電気グラフト化溶液の処方

【0067】

例2 ステンレス鋼ステント上への電気グラフト化方法

例1に記載する薬品溶液を使用し、18mmステンレス鋼冠状動脈ステント(ClearStream Technologies)を電気グラフト化p-BuMAで、下記のパラメータで被覆し、すすぎ、10mbar真空下、40℃で60分間乾燥させた。この方法を使用し、得られた被覆厚さは約150nmである。

20

電気グラフト化パラメータ

方法：アルゴン発泡処理(2Lmin⁻¹)しながら、開路電位~-3.2V/CEにサイクル状ポルタンモメトリー

走査数：50走査

走査速度：50mV/s

【0068】

例3 コバルト-クロムステント上への電気グラフト化方法

30

例1に記載する薬品溶液を使用し、18mmコバルト-クロム冠状動脈ステント(Natec-medical)を下記のパラメータでp-BuMA電気グラフト化し、すすぎ、10mbar真空下、40℃で60分間乾燥させた。電気グラフト化の前に、ステント表面をNH₄F 40%溶液で1分間処理する。この方法を使用し、得られた被覆厚さは約150nmである。

電気グラフト化パラメータ

方法：アルゴン発泡処理(2Lmin⁻¹)しながら、開路電位~-3.5V/CEにサイクル状ポルタンモメトリー

走査数：50走査

走査速度：50mV/s

【0069】

40

例4 電気グラフト化されたp-BuMAの腐食バリアー特性

電気グラフト化されたp-BuMAの耐食性を、例2に記載する手順により被覆したステンレス鋼クーボンで査定する。この目的には、電気グラフト化p-BuMA被覆したクーボン(検定)および被覆していないクーボン(比較)を、表面積/体積比1cm²/mlで浸漬した。試料を37℃で穏やかな攪拌下に維持し、放出媒体の試料を定期的に採取することにより、コバルト、ニッケルおよびモリブデンイオン放出の時間経過を査定する。イオンは、Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP-MS)を使用して定量する。

【0070】

【表 2】

	9 g/l NaCl 溶液におけるイオン放出(ng/cm^2)、 37°C、150 日間		
	Cr	Ni	Mo
BMS 316L	28	12	8
BMS 316L 上の p-BuMA (150 nm)	3	7	1

表 2 イオン放出

10

【0071】

金属表面からのイオン放出は、電気グラフト化されたp-BuMA被覆により、大きく軽減され、例えば放出されたニッケル(これは毒性が非常に高い元素である)は、ステンレス鋼クーポンに対する $28 \text{ ng}/\text{cm}^2$ から、電気グラフト化されたp-BuMAクーポンに対する $3 \text{ ng}/\text{cm}^2$ に減少している。

【0072】

例 5 p-BuMA電気グラフト化し、PLA浸漬被覆したクーポンの腐食バリアー特性

p-BuMA電気グラフト化されたステンレス鋼クーポンを、モデル薬物ペントキシフィリン(pentoxifylline)20% (w/w)を含むか、または含まない、ポリラクチド(p-PLA)溶液(クロロホルム中5%w/v)中で浸漬被覆する。浸漬後、被覆を室温で24時間安定化させ、加熱炉中、40 で48時間乾燥させる。イオン放出を、例3に記載する手順に従って行う。316ステンレス鋼クーポン、p-BuMA電気グラフト化+p-PLA浸漬被覆したクーポン、p-BuMA電気グラフト化+p-PLA浸漬被覆し、ペントキシフィリンを含むクーポンからの、NaCl (9 g/l)溶液中、37 で150日間の、Cr (A)、Ni (B)およびMo (C)イオン放出の比較を下記の表3に示す。

20

【0073】

【表 3】

	150 日間におけるイオン放出(ng/cm^2)		
	Cr	Ni	Mo
Inox	18	30	8
Inox + PLA	6	8	1
Inox + PLA + PTX	4	7	1

表 3

30

【0074】

イオン放出の同じ減少が、二重層被覆を施したステンレス鋼クーポンで観察され、Niの量は、 $30 \text{ ng}/\text{cm}^2$ から約 $8 \text{ ng}/\text{cm}^2$ に劇的に減少し、Crイオンの量も $18 \text{ ng}/\text{cm}^2$ から、p-BuMA電気グラフト化/p-PLA被覆およびp-BuMA電気グラフト化/PLA/ペントキシフィリン被覆で、それぞれ $6 \text{ ng}/\text{cm}^2$ および $4 \text{ ng}/\text{cm}^2$ に減少している。

40

【0075】

例 6 スプレー被覆方法

電気グラフト化された金属ステント上に貯蔵重合体被覆を配置するためのスプレー被覆方法は、本発明のもう一つの実施態様を示す。乾燥後、18ミリメートル電気グラフト化されたステントに、Sirolimusを含む生物分解性ポリエステル(ポリラクチド-コ-グリコリド50/50、PLGA)をスプレー被覆する。

【0076】

共重合体(0.25%w/v)をクロロホルム中に溶解させる。次いで、Sirolimusをクロロホルム/重合体マトリックス中に溶解させ、Sirolimus/重合体の最終比30%(w/w)を得る。この

50

混合物を、回転マンドレルに取り付けたp-BuMA電気グラフト化したステントに、下記のパラメータの細いノズルでスプレーすることにより、塗布する。

【0077】

【表4】

スプレー流量($\mu\text{L/s}$)	24
スプレー体積(μL)	192
圧力(bar)	0.3
ステント回転速度(rpm)	2000
ノズル/ステント間隔(mm)	6.5
スプレー回数	50

表4 スプレーパラメータ

10

【0078】

ステンレス鋼ステントの口径(luminal)側および非口径(abluminal)側の両方に2層被覆を、口径表面より非口径表面上でより大きな(および調整可能な)厚さで施す。40における乾燥を真空加熱炉中で行う。上記のパラメータを使用し、ステント上の被覆は、重量が $800 \pm 80 \mu\text{g}$ であり、被覆の厚さが約 $5 \sim 7 \mu\text{m}$ である。薬物装填量は、 $164 \pm 16 \mu\text{g}$ である。

【0079】

20

例7 電気グラフト化されたp-BuMA下層による貯蔵重合体密着性の強化、官能性試験

予め電気グラフト化されたステント上の貯蔵重合体層の密着強度を強調するために、密着性試験を行う。ステンレス鋼ステント(18 mm、Clearstream Technologies)上の二重層は、例1~6により達成する。

【0080】

この試験は、内移植の際に被覆が受けるであろう摩耗を模擬するために行う。そのために、被覆されたステントを、冠状動脈を真似たシリコンチューブの中を数回通過させた後、ステントを広げる。この試験に続いて、ステントの光学的小および走査電子顕微鏡検査を行う。プライマー電気グラフト化されたステントでは、被覆の剥離は観察されず、10個の電気グラフト化被覆されたステント全てが、この模擬損傷摩耗試験に合格したのに対し、電気グラフト化されたp-BuMAプライマーを含まないスプレー被覆したステントは、酷い剥離を示す。

30

【0081】

例8 インビトロ薬物放出の研究

この実施態様では、二重層被覆したステントからのSirolimusの放出時間を、下記の手順により達成する。18 mmステンレス鋼ステントを、電気グラフト化されたp-BuMAに関しては例1に示す手順により、生物分解性重合体スプレー被覆に関しては例5により、被覆する。それぞれの被覆されたステントを放出溶液(99%リン酸塩緩衝液0.01 M、 $\text{pH} = 7.4/1\%$ Tween 20)1 mlを含むバイアル中に浸漬し、37°Cで穏やかな攪拌下に維持する。放出媒体を定期的に除去し、新しい媒体で置き換える。吸収(任意の単位)を、Hitachi 3分光光度計を使用し、 $\lambda = 278 \text{ nm}$ 波長で放出媒体に対して測定する。

40

【0082】

Sirolimus濃度は、校正曲線を使用して3重に決定する。

【0083】

図1(A)および1(B)は、生体外における、二重層被覆からの、Sirolimusの速い放出(A)および遅い放出(B)(累積放出(%))と時間(日)の関係を示す。速い放出に関して、貯蔵層は、ラクチドとグリコリドの共重合体(50/50)PLGA(120000 g/モル)であるのに対し、遅い放出に関しては、生物分解性重合体はポリ(ラクチド)(30000 g/モル)である。

【0084】

薬物放出速度の差は、生物分解性貯蔵層の分解速度に直接関連している。50/50 PLGA重

50

合体はPLAより速く分解する。

【 0 0 8 5 】

腸骨大腿(iliofemoral)モデルにおけるNZラビットから外移植したステントに対する残留薬物の測定から得た、生体内における、対応するプロファイルを図2に示す(僅かな(fractional)放出と時間の関係)。

+ プロファイルは、PLGAのプロファイルである。

× プロファイルは、PLAのプロファイルである。

【 0 0 8 6 】

二つの場合、薬物(Sirolimus)の放出および装填は等しかった。この図は、薬物が完全に放出され、放出された重合体は、速い放出(PLGA)に関しては28日で完全に消失したのに対し、PLAでは28日目で薬物放出が60%だけであり、二ヶ月かけて消失すると考えられる。

10

【 0 0 8 7 】

例9 電気グラフト化された被覆の細胞毒性研究

電気グラフト化された被覆の潜在的細胞毒性研究は、標準ISO 10993-5により行った。

【 0 0 8 8 】

この研究は、96ウェルマイクロプレートに植え付けた細胞に塗布した後の、抽出として試験した、電気グラフト化されたp-BuMAの細胞毒性を定性的および定量的に査定する。

【 0 0 8 9 】

抽出は、滅菌し、閉鎖した、化学的に不活性な容器中で、子牛胎児血清を含む培養基(DMEM)で、37℃で96時間、三重に行った。電気グラフト化されたp-BuMAの表面積と抽出ピヒクル体積の比は3 cm²/mlであった。

20

【 0 0 9 0 】

抽出物および希釈物(50%および10%)を細胞上に載せ、少なくとも24時間接触したままにした。細胞毒性は、生体染料ニュートラルレッドにより測定した。存続細胞の測定手段は、細胞の一般的な形態(定量的評価)であり、540 nmにおける読みにより得られる吸収に基づく細胞生存百分率(定量的評価)は、生きている細胞の数に比例する(定量的分析)。

【 0 0 9 1 】

陽性比較

この比較は、各試験に対して、試験の条件下で再現性のある細胞毒性効果を与える物質、即ち培養基(DMEM)中3.2 g/lのフェノール溶液で行った。この試験は、死亡率が約100%である場合に適用した。

30

【 0 0 9 2 】

陰性比較

この比較は、試験の条件下で細胞毒性効果が無い物質(高密度ポリエチレン)で行った。この試験は、生存率が100%である場合に適用した。

【 0 0 9 3 】

【表5】

試料		定性的評価	540 nm における吸収	生存率	死
DMEM 比較		全細胞がニュートラル レッドにより染色される	0.495±0.016	100%	0%
抽出溶剤		全細胞がニュートラル レッドにより染色される	0.521±0.028	100%	0%
抽出物 1	100%	全細胞がニュートラル レッドにより染色される	0.514±0.019	100%	0%
	50%		0.520±0.030	100%	0%
	10%		0.511±0.030	100%	0%
抽出物 2	100%	全細胞がニュートラル レッドにより染色される	0.497±0.012	100%	0%
	50%		0.507±0.028	100%	0%
	10%		0.517±0.013	100%	0%
抽出物 3	100%	全細胞がニュートラル レッドにより染色される	0.501±0.036	100%	0%
	50%		0.505±0.041	100%	0%
	10%		0.506±0.023	100%	0%
陰性比較		全細胞がニュートラル レッドにより染色される	0.501±0.036	97%	3%
陽性比較		細胞がニュートラル レッドを取り入れない	0.007±0.002	1%	99%

表5 電気グラフト化されたp-BuMAプライマーの細胞毒性の定性的および定量的評価

【0094】

電気グラフト化されたプライマー被覆の抽出物に対して行った試験は、24時間後に細胞毒性の証拠を示さない。

【0095】

例10 溶血性研究、直接接触試験

この例における溶血性とは、電気グラフト化された被覆との直接接触における赤血球の破壊を意味する。溶血性研究は、ISO 10993-4およびASTM F 756-93により、1 cm² のp-BuMAを電気グラフト化し、滅菌したステンレス鋼クーボンに対して行う。

ヒト血液基質の調製

クエン酸で凝固防止したヒトの血液を供与者から無菌状態で得る。血液は1時間以内に使用する。

血液基質の希釈

各血液のヘモグロビン濃度を測定し、97.95±8.32 - 111.86±3.90 - 91.05±0.94 mg/mlであった。

遊離プラズマヘモグロビンは、1 mg/ml未満(0.30 - 0.32 - 0.28 mg/ml)である必要がある。各血液試料の総ヘモグロビン含有量を、適量の規定食塩水で希釈することにより、25.01±2.5 mg/mlに調節する(25.66±0.05 mg/ml - 26.19±1 mg/ml - 25.37±0.69 mg/ml)。

【0096】

ヘモグロビン測定

血液ヘモグロビン 血液20 µlをDrabkin試薬(Sigma-525-2)5 mlと混合する(15分間)。吸収(任意単位)を分光光度計を使用して = 540 nmで測定する。ヘモグロビン濃度は、標準(Hemoglobin標準、Sigma-525-18)を使用して作成した校正曲線0.036 ~ 0.72 mg/mlによ

10

20

30

40

50

り測定する。

【0097】

血漿ヘモグロビン

血漿100 μ lをDrabkin試薬5 mlと溶血管中で混合する(15分間)。吸収(任意単位)を分光光度計(Kontron)を使用して $\lambda = 540$ nm波長でDrabkin試薬に対して測定する。ヘモグロビン濃度は、標準(Hemoglobin標準、Sigma-525-18)を使用して作成した校正曲線0.036~0.720 mg/mlにより三重に測定する。

【0098】

静止試験

無菌状態で、各血液基質5 mlを試験材料を含むネジ栓試験管に移す。試験材料試料の表面積と血液基質の体積との比は、3 cm^2 /mlである。陽性比較は、水10 mlで補足した血液基質200 μ lから構成される。陰性比較は、血液基質のみから構成される。

【0099】

試験管に栓をし、好適な試験管ラック中、37 $^{\circ}\text{C}$ で4時間静止状態に保持する。特定の培養時間の後、全ての試験管を遠心分離する(100 \times G、15分間)。それぞれの上澄み液である細胞を含まない画分を15 ml管(ポリプロピレン、無菌)に移し、遠心分離する(700 \times G、5分間)。上澄み液を慎重に採取し、続いてヘモグロビン分析にかける。ヘモグロビン測定 上澄み液1 mlをDrabkin試薬3 mlと混合する。吸収を $\lambda = 540$ nmで測定する。標準(ヘモグロビン標準、Sigma-525-18)を使用して校正曲線0.03~0.72 mg/ml作成しする。この校正曲線を使用し、血漿ヘモグロビン濃度を各上澄み液で測定する。

【0100】

溶血指数(HI)は、下記の式から計算する。

$$HI(\%) = (\text{上澄み液中の遊離ヘモグロビン} / \text{血液基質中に存在する総ヘモグロビン}) \times 100$$

【0101】

表6は、上澄み液中のヘモグロビンレベルを示し、表7は、対応する溶血指数(HI)を示す。3点の血液を使用し、陰性比較に対して三重に査定して得た平均HIは、 $0.35 \pm 0.04\%$ である。3点の血液を使用し、p-BuMAの存在下で三重に査定した平均HIは、 $0.29 \pm 0.03\%$ である。

【0102】

【表6】

ヘモグロビン(mg/ml)			
S1(基質)	陽性比較	陰性比較	電気グラフト化された p-BuMA 試料
25.66 \pm 0.05	26.60 \pm 0.11	0.09 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01
S2(基質)	陽性比較	陰性比較	電気グラフト化された p-BuMA 試料
26.19 \pm 1.00	26.72 \pm 0.18	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.00
S3(基質)	陽性比較	陰性比較	電気グラフト化された p-BuMA 試料
25.37 \pm 0.69	25.79 \pm 0.33	0.10 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01

表6 上澄み液中のヘモグロビンレベル

10

20

30

40

【表7】

溶血指数(HI)			
S1(基質)	陽性比較	陰性比較	電気グラフト化された p-BuMA 試料
	103.68±0.43	0.35±0.04	0.25±0.04
S2(基質)	陽性比較	陰性比較	電気グラフト化された p-BuMA 試料
	102.01±0.67	0.31±0.05	0.31±0.00
S3(基質)	陽性比較	陰性比較	電気グラフト化された p-BuMA 試料
	101.67±1.30	0.39±0.03	0.031±0.03

10

表7 溶血指数

【0103】

これらの結果は、電気グラフト化被覆された試料には、直接接触で溶血特性が無いことを示している。

【0104】

例11 ラビットに電気グラフト化されたステントを内移植した後の局所的耐性

この研究の目的は、電気グラフト化p-BuMAステントの局所的耐性を裸金属ステントと比較して評価することである。電気グラフト化被覆されたステント(ステンレス鋼、長さ18mm)を、例2に記載する手順により被覆し、有効な標準手順(43℃、相対湿度50%)を使用してエチレンオキシドにより滅菌する。

20

【0105】

実験手順

1 - 内移植箇所

各動物の右および/または左側腸骨動脈箇所中に、被覆された、または被覆されていないステントを4週間内移植した。

【0106】

2 - 動物調製および麻酔

ラビットに、社内標準手順に従って、atropin (atropinum sulfuricum、AGUETTANT、仏国)を予備投薬し、tiletamine-zolazepam (Zoletil(登録商標)100、VIRBAC、仏国)25 mg/kgおよびxylazine (Rompun(登録商標)2% BAYER AG、独国)5 mg/kgにより、筋肉内経路で麻酔した。手術箇所の毛を切り取り、殺菌性石鹼(Vetedine(登録商標)savon、VETOQUINOL、仏国)で洗い、povidone iodine(Vetedine(登録商標)溶液、VETOQUINOL、仏国)で消毒した。各ステントを内移植する前に、下記の処理剤、即ち Aspegic(登録商標)(SYNTHELABO、仏国)、50 mg Heparine Choay(登録商標)(SYNTHELABO、仏国)、50 IU を大腿動脈中に、導入装置を通して投与した。さらに、各血管造影法の前に、下記の血管拡張処理剤、即ち Corvasal(登録商標)(linsidomine、0.06 mg、AVENTIS、仏国)を大腿動脈中に投与した。

30

40

【0107】

3 - 予備血管造影法

1本の頸動脈を露出させ、5または6 Fe導入装置シースを導入した。5または6案内カテーテルおよびガイドワイヤ(GW)をシースを通して末端大動脈まで前進させた。腸骨脈管系の血管造影法マッピングを、Philips BV212装置で造影剤(Hexabrix(登録商標)320、Laboratories GUERBET、仏国)を注入することにより行った。各動脈の直径を記録した。ステント内移植に続く目標とする過剰伸長は約1.2であった。

【0108】

4 - ステントの配置

下記の手順により、ステントを腸骨動脈中に内移植した(動物1匹あたり1または2本のス

50

テント)。

- ・案内カテーテル(GC)およびGWを目標箇所の中に挿入する。
- ・GWを完全に後退させる。
- ・ステント電解質装置を目標箇所に挿入する。
- ・ステントを規定されたバルーン圧(=8気圧)下で展開する。
- ・ステントを共通の腸骨動脈中に内移植する。
- ・送達装置をGCから後退させる。

【0109】

5 - 後血管造影法

内移植した動脈が開通していることを、血管造影法により直ちに評価した。各動脈の直径を記録し、得られた過剰伸長を計算した。 10

【0110】

6 - 薬理学的処置および観察期間

動物の臨床的異常を毎日観察した。抗凝血薬処置を内移植手順の一日前に開始し、毎日、30日間投与した。Aspegic(登録商標)(アスピリン100 mg/ml、SYNTHELABO、仏国)、筋肉内、50 mg/日。

【0111】

7 - 屠殺および試料採取

バルビツール酸塩(Dolethal、Laboratoires VETOQUINOL、仏国)の致死量注射により動物を屠殺した。内移植した動脈の外側表面の全体検査を行い、全ての局所的不耐性基準(炎症、壊死、出血または他のいずれかの病変)を観察し、記録した。巨視的写真撮影を行った。試料を確認し、組織病理学用に10%緩衝ホルマリン溶液中で固定した。 20

【0112】

8 - 組織病理学的試料調製

内移植した箇所を、アルコール溶液の濃度を増加させて脱水し、PMMA(ポリメチルメタクリレート)中に埋め込んだ。Donath(Donath K., Brunner G.: A method for the study of undecalcified bone and teeth with attached soft tissues. J. Oral. Pathol., 11; 318-326, 1982)から採用した微小切断および粉碎技術により一つの末梢部分を得た。この部分を、定性および定量分析用の変性Paragon染料で染色した。 30

【0113】

9 - 解明

組織学的スライドを光学的顕微鏡(NIKON Eclipse E600、x4、x10、x20およびx40レンズを備え、デジタルカメラDN 100 NIKONと接続)下で検査した。半定量的組織学的評価を、ISO 10993-6標準により行った。繊維状組織、フィブリン、変形現象、壊死、平滑筋細胞、弾性層拡張、炎症細胞および材料分解および血栓の存在に特に注目した。組織学的顕微鏡写真撮影を行った。各パラメータを、下記の尺度で等級付けした。

- 0 無し
- 1 少ない
- 2 中程度
- 3 著しい
- 4 深刻

これらのパラメータにより、炎症、異物反応、および免疫学的反応を全て正確に評価することができる。新内膜(neointimal)形成は定性的に査定した。 40

【0114】

結果

1 - 組織病理学的分析

半定量的分析を表?に報告する。

【0115】

2 - 一般的観察

ステント支柱は、丸くなった角度を有する正方形形状を示した。顕微鏡的ステント材料 50

の変性は試料中に観察されなかった。

【0116】

3 - 被覆していないステント(比較用製品)

全てのステントが十分に展開され、血管壁中に良く一体化された。ステント骨格は、中程度の数の平滑筋細胞、線維細胞および僅かなマクロファージ浸潤を含む、中程度の厚さの新内膜組織中に一体化された。一試料(動物番号3右)は、内側突起を含まない、限られた弾性層破壊を示した。限られた量のプロテオグリカン物質の存在が、一試料(動物番号11左)の新内膜組織中に疑われた。血栓は観察されなかった。

【0117】

4 - 被覆されたステント(試験製品)

ステント骨格を覆っている線維筋性新内膜層の厚さは、基準群と同等もしくはそれより僅かに薄かった。この知見は、動物内比較により得た。試料および評価できる観察の数が限られているので、この知見の生物学的重大性に関する結論は引き出せない。マクロファージ反応は、基準群と同等の僅かな程度であった。血栓は観察されなかった。

【0118】

動物14匹の内、合計10匹は、被覆したステント(試験製品)および/または被覆していないステント(比較製品)で効果的に内移植された。ステント内移植後の動脈過剰伸長は、この研究における初期動脈直径の約1.1~1.4倍に達した。内移植1箇月後、目に見える巨視的病変(壊死、炎症、出血)は、生存していた8匹の動物から取り出した試料中には確認されなかった(n=6被覆していないステント、n=7被覆したステント)。屠殺時に閉塞の兆候は観察されなかった。

【0119】

10

20

【表 8】

内移植した装置	動物番号	腸骨箇所	弾性層拡張	壁の血栓	フィブリン堆積	壊死	組織変性	多形核細胞 PMN	リンパ球	血漿細胞	マクロファージ	巨大細胞	線維細胞	新内膜増殖	平滑筋細胞	一体化	動脈壁突起
試験	1	L	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	2	R	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2*	2	4	0
	3	L	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	4	R	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
	11	L	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
	12	R	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	2	4	0
	14	R	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
		M		0	0	0	0	0	0	0	1.3	0.	1.	1.6	1.	4.	0
比較用	3	R	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	4	L	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
	7	R	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
	11	R	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	12	L	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	14	L	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
		M	2.2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1.	1.7	1.	4.	0

表 8 半定量的組織病理学的分析

R = 右、L = 左、M = 中間

【 0 1 2 0 】

内移植一ヶ月後にラビットから回収したステントの組織学的部分の結果は、全ての試験および比較ステント群に対して局所的な不耐性反応の兆候が無く、穏やかな線維筋性新内膜増殖の存在による狭窄症に関しても同等の結果を得た。

【 0 1 2 1 】

結論

主な組織病理学的知見は、下記の通りである。

全ての試験および比較ステントが完全に展開し、血管壁に良く一体化し、血栓は生じなかった。

1箇月の内移植後、全ての試験および比較ステントに局所的な不耐性反応は観察されなかった。

試験および比較ステント群は、穏やかな線維筋性新内膜増殖の存在による狭窄症に関して同等の結果を示した。さらに、電気グラフト化された層は、生物分解性重合体層の亀裂および剥離を防止することができ、ラビットモデル(ISO 10993)でステンレス鋼の裸金属ステントより勝ってはいなくても、同等の再入植を示す。

【 0 1 2 2 】

例 1 2 ラビットにおける14および28日で、BMSと比較した、p-BuMA電気グラフト化されたステントに対する再入植

コバルトクロムステントを、例3の手順により、約200 nm電気グラフト化p-BuMA層で被覆した。10匹のNew Zealand白ラビットに20個のステント(18 mm、裸金属、n = 10、および

10

20

30

40

50

電気グラフト化p-BuMA層で被覆、n = 10)を腸骨大腿動脈中に、全身麻酔下で設置した。5匹の第一群は、14日目に、第二群は28日目安楽死させた。腸骨大腿動脈を摘出し、Finnら Circulation, 112, 270 (2005)に記載されている手順により縦方向断面切断した。断面をSEMにより検査し、内皮被覆をSEM写真(同書)から推定した。結果を下記の表9および10に示す。

【0123】

【表9】

	14日	28日
BMS	98%	93%
BMS上のp-BuMA	88%	100%

10

表9 SEM縦方向断面からの内皮被覆(%）、支柱全体

【0124】

【表10】

	14日	28日
BMS	98%	93%
BMS上のp-BuMA	89%	100%

20

表10 SEM縦方向断面からの内皮被覆(%）、支柱間

【0125】

これらの結果は、支柱全体および支柱間の両方で、内皮被覆(縦方向断面のSEM分析から測定)は、裸金属ステントと比較して、電気グラフト化p-BuMA層で被覆したステントの方が優れているか、または同等であることを示している。特に、再入植は、電気グラフト化ステントの方が、内移植から早くも14日後には効果的であり、この技術による最適ステントは、この効果により、薬物放出期間を最小に短縮し、回復にとって好ましい効果を得ていることが分かる。

30

【0126】

例13 ブタにおける完全被覆されたステント後の局所的耐性

60日間のブタによる試験を、電気グラフト化p-BuMA下側層(150 nm)と、その上に被覆されたPLGA(ポリ-ラクチド-コ-グリコリド)生物分解性層(5 μm)から製造された複合材料で行った。手短に言うと、16匹の家畜雄豚(25~30 kg)に、32個のステント(長さ18 mm、裸金属、n = 16および二重層被覆したステント、n = 16)を、左腹側下降(IVA)または左回旋冠状動脈(Cx)に、全身麻酔で設置した。

【0127】

平均冠状動脈直径2.5 mmの断片を、定量的冠状動脈血管造影法を使用し、ステント：動脈比約1.2で選択した。次いで、ステントに取り付けたバルーンカテーテルを予め選択した冠状動脈断片に前進させ、標準ガイドワイヤの上で展開した。バルーンカテーテルを10気圧で10秒間膨脹させ、次いで徐々に後退させ、ステントを所定の位置に残した(前または後拡張無し)。

40

【0128】

冠状動脈IVUS：

生体内における新内膜形成の程度を査定するために、IVUSをステント内移植の8週間後に行った。

【0129】

動脈試料：

内移植の8週間後に心臓を切除する。IVA、CxおよびCDを除去し、リン酸塩緩衝食塩水(P

50

BS)中ですすぎ、次いで組織形態測定法、免疫化学分析、または電子走査顕微鏡検査に関して指示されているように調製する。

【0130】

組織形態測定法

試料をホルマリン(3%)中、4℃で12時間固定し、一連の濃度勾配エタノール(70°~100°、4℃)およびアセトンで24時間脱水し、次いでグリコメチルメタクリレート(GMA)中に埋め込む。各試料に対して、厚さ50μmの部分を取り取り(Isomet、Buehler France)、分析用にVerhoeff-van Giesonで染色する。組織学的部分を観察し(Nikon E-600、Nikon、仏国)、デジタル化し、形態測定を行う(Metamorph、仏国)。新内膜の厚さ増加を、各動脈断片に対して5つの部分で、形態測定分析により定量する。新内膜面積を、内側弾性層(IEL)から口径境界までの面積として、および媒体面積を、IELと外側弾性層との間の面積として測定する。新内膜の厚さ増加は、[(新内膜面積/新内膜面積+媒体面積)]比として表す。

10

【0131】

免疫化学分析

乾燥工程の後、ステントを除去し、動脈を、厚さ4μmの部分に切断したパラフィンブロックの中に埋め込み、次いで3%過酸化水素水溶液(Sigma、仏国)中に浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制する。非特異性染色を、5%ウシアルブミンPBS中で10分間培養することにより、阻止する。PBS中で2回洗浄後、部分を各種の抗体(抗MIBI、 α -アクチン、因子VIII、マクロファージ(AM-3K))中で培養する。2人の独立した観察者が、新内膜および媒体面積にある染色された細胞を計数する。

20

【0132】

走査電子顕微鏡検査

この目的には、試料を、4%グルタルアルデヒド、0.1 Mリン酸塩緩衝液、pH7.2で、4℃で1時間固定し、PBS中で1時間洗浄する。次に、試料を勾配エタノールおよび純粋アセトンにより脱水し、CO₂(CPD 010 BAL-TEC AG、リヒテンシュタイン)から臨界点乾燥させる。試料を、二次電子による走査電子顕微鏡(JSM 6300 Jeol Tokyo 日本国)観察用に、Au/Pd(Emscope Ashford UK)でスパッタリング被覆する。

【0133】

2.8 統計的分析

実験は全て三重に行い、結果を平均±SDとして表す。ANOVA試験をこれらの値に対して行う(p<抗血小板治療による準備(Plavix 300 Mgおよびアスピリン75 Mg)をカテーテル処理の前日に開始し、試験の全期間中、通常用量(1日あたりPlavix 75 mgおよびアスピリン75 mg)で続行する(6時間、1箇月および2箇月追跡)。ブタに大腿経路によりカテーテルを放射線透視(Seldinger)下で6フレンチ中に挿入する。プローブ「EBU」(Medtronic)を左冠状動脈幹の小孔に配置し、冠状動脈網目の選択的に不透明化させる。50ヘパリン UI/kgの注入後、初期冠状動脈内エコーグラフィ制御(IVUS)を行う(Atlantis Plus 40mhz、ボストン)。

30

【0134】

初期IVUSにより、冠状動脈の直径を推定し、ステント内移植を案内し、ステント/動脈比120%を得ることができる。次いで、ステントを血管の平均断片に配置する(12気圧、10乾燥)。ステントの良好な取付を確認するための新規の冠状動脈造影法制御およびIVUSの後、材料全体を後退させ、ヘスモスタシスを得るまで、大腿穿刺の地点を手で圧迫する。生存2箇月後、冠状動脈造影法用に新規なカテーテル処理を上記のように行う。ステント内狭窄および新内膜増殖の評価を新規なIVUSにより行う。

40

【0135】

この研究は、第一に、生物分解性層が最初の4週間で消失し、それによって、薬物の100%を放出することを示している。事実、SEMにより、「月のような」外観(再現性のある「クレーター」表面不規則性を有するが、均質で、あらゆる所に、「月のような穴」の中にも、重合体を有する)により特徴付けられる「粗い」電気グラフト化p-BuMA層だけが見

50

られる。内移植から30日後に取り出したステントの表面をSEMにより観察すると、電気グラフト化p-BuMAの「月のようなクレーター」特徴が見られ、生物分解性層が完全に消失し、従って、薬物が全て放出された証拠である。生物分解性層の消失は、上記の表面および動脈内側表面の両方に対するToF-SIMS分析によりさらに確認され、生物分解性重合体の薬物が存在しないことを示している。

【0136】

8週間目における再入植観察に関して、電気グラフト化p-BuMAは、内皮細胞による適切な再入植を受け易い。

【0137】

内移植から8週間後に観察された新内膜増殖は非常に僅かであるので、IVUS結果は、二重層被覆されたステントの非常に良好な耐性を立証しており、これは、免疫組織学的研究により確認され、HES染色、完全な内皮化von-(willebrand染色)および非常に少量の平滑筋細胞増殖により示されるように、この被覆は炎症が無く、非常に安全であることを立証している。

【0138】

例14 電気グラフト化された層との良好な界面を有するDESを製造するための「低圧」スプレー装置

この機械は、1枚の透明壁を備えたグローブボックスから製造されている。その最上部のボックスの外側にX-Y走査装置が配置され、外側で磁石を移動させ、その磁石が、ボックス内側の天井にあるもう一つの磁石をさらにX-Y移動させる。内側の磁石はノズルにさら

【0139】

ボックスの遠く離れた壁には雄突起があり、その突起は外側の電氣的エンジンに接続されており、機械の前パネルから該エンジンの電圧を調節することにより、突起を制御可能な速度で回転させることができる。

【0140】

ステントを針の上に配置し、それらの針は、試料ホルダーのチップにさらに差し込まれている。これらのチップは、全て試料ホルダーに対して回転することができる、つまりこれらのチップは、試料ホルダーの内側にある共通の回転棒に接続され、その棒の末端は、試料ホルダーの後部で、ボックスの遠く離れた壁中にある雄突起上に差し込むことができる雌突起を備えている。これによって、ステントを、チップ上に差し込まれた針の上に配置し、試料ホルダーをボックスの遠く離れた壁の上に差し込むと、全てのステントが同時に、同じ回転速度で回転する。

【0141】

X-Y装置は、外部のコンピュータにより制御され、各ステントの上に配置されたノズルの移動およびスプレー順序をそれぞれ駆動し、スプレーを開始し、ステント全長に沿って一方向および逆方向に移動し、スプレーを停止して次のステントに移動し、再びスプレーを開始する。試料ホルダーは1バッチあたり20個のステントを保持することができるので、ノズルは、第二のスプレー順序のためにステント#20からステント#1に戻り、各ステントは、基本的に1個のステントをスプレーする時間 T_s の19倍+試料ホルダー全長にわたってノズルを掃く時間 T_0 の1倍に相当する時間、スプレーを「見ない」ことになる。従って、全てのステントは、正確に同じ手順を受け、被覆単位は非常に再現性が高くなる。

【0142】

質量偏差(上記の機械を使用してスプレーした53個のDESシリーズに対する被覆の質量)は、目標質量(従って、目標薬物量)に対して15%の許容基準で、3個のDESだけが規格外として拒絶され、総収率は94.2%になる。さらに厳密な10%許容を適用しても、この装置は86.5%の収率を与え、既存のほとんどの工業的装置(通常の規格は薬物量に対して約20%である)による収率よりかなり高い。

【0143】

我々は、この品質を、適切な電気グラフト化された層により提供される湿潤のために理

10

20

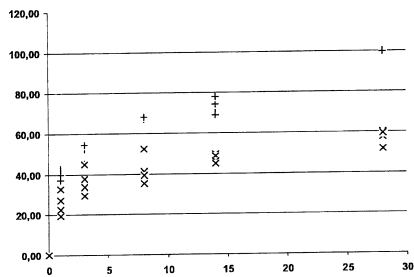
30

40

50

想的に推進される湿式ノズル装置の低い再現性によるものとする。また、低圧、ガス駆動されるノズルに関して、スプレー溶液中の薬物濃度と最後の重合体層中の濃度との間にある相関関係も、厳密に1対1の相関関係ではないにしても、非常に直線的であり、非常に再現性があることを見出した。

【図2】



【 図 1 】

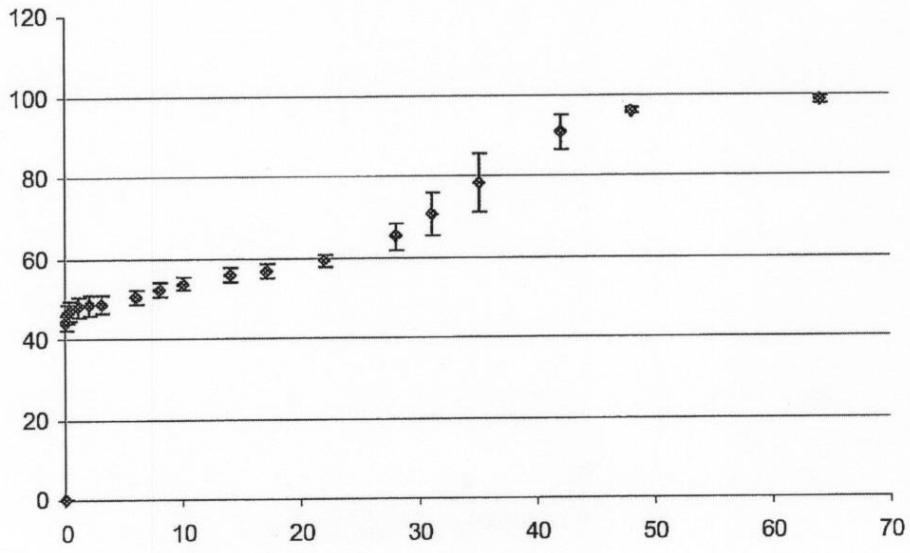


図 1 (A)

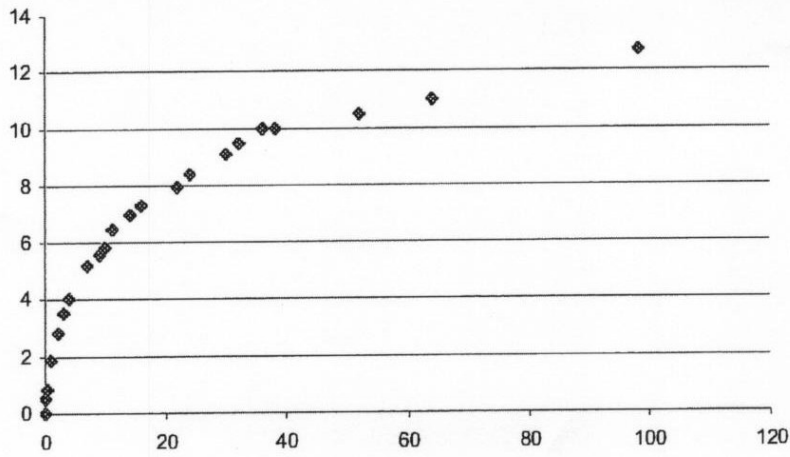


図 1 (B)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 8 F	2/00	(2006.01)	C 0 8 F	2/00	C
C 0 8 F	2/58	(2006.01)	C 0 8 F	2/58	

(72)発明者 クリストフ、ピュロー
フランス国サン マルタン、デュリアジュ、シュマン、デュ、ブレ、バヤル、153

(72)発明者 フェリアル、アルーン
フランス国バレソー、リュ、ジョルジュ、サン、58、バ.デ

(72)発明者 エロディ、エノー
フランス国アントニー、リュ、デ、ラバ、63

審査官 岡 崎 忠

(56)参考文献 特表2005-536601(JP,A)
特表2009-528447(JP,A)
特表2002-529203(JP,A)
国際公開第2004/074537(WO,A1)
特表2005-505782(JP,A)
Christine Je'ro^me, Abdelhafid Aqil, Samue"l Voccia, David-Emmanuel Labaye, Ve'ronique Maquet, Sandrine Gautier, Olivier F. Bertrand and Robert Je'ro^me, You have full text access to this contentSurface modification of metallic cardiovascular stents by strongly adhering aliphatic polyester coatings, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006年 3月 1日, Vol.76A, 521-529

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 F	2 / 0 0 - 2 / 9 7
A 6 1 L	3 1 / 0 0
A 6 1 M	3 1 / 0 0
C 0 8 F	2 / 0 0 - 2 / 6 0
C 0 8 G	8 5 / 0 0