

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4126095号  
(P4126095)

(45) 発行日 平成20年7月30日(2008.7.30)

(24) 登録日 平成20年5月16日(2008.5.16)

(51) Int.Cl. F 1  
A 6 1 N 1/30 (2006.01) A 6 1 N 1/30

請求項の数 19 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願平10-503480	(73) 特許権者	500555789
(86) (22) 出願日	平成9年6月23日(1997.6.23)		ジェネトロニクス、インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2000-515400(P2000-515400A)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 - 1 3 3 4
(43) 公表日	平成12年11月21日(2000.11.21)		カリフォルニア州、サン ディエゴ、ソレ
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/010975		ント ヴァレー ロード 1 1 1 9 9
(87) 国際公開番号	W01997/049450	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成9年12月31日(1997.12.31)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成16年6月15日(2004.6.15)	(74) 代理人	100096183
(31) 優先権主張番号	08/668,725		弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成8年6月24日(1996.6.24)	(74) 代理人	100118773
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気穿孔法媒介脈管内送達

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの膨脹可能なバルーン部分(102)を有するカテーテル(100)；  
被験体の脈管中に治療薬を含む組成物を導入するためのカテーテルにおける少なくとも1つの注入開口部(120)；  
該注入開口部に隣接してまたは一体になって配置されたカテーテル上の第1の電極(110)；および  
第1の電極と第2の電極との間に電圧を加えた時に脈管中の細胞を電気穿孔するのに十分な強さの電界が発生し得るような距離に配置されたカテーテル上の第2の電極(112)；  
を含まずなる電気穿孔装置。

【請求項 2】

少なくとも1つの膨脹可能なバルーン部分(102)を有するカテーテル(100)；  
該バルーン部分に対して近位にある、被験体の脈管中に治療薬を含む組成物を導入するためのカテーテルにおける少なくとも1つの注入開口部(120)；  
該注入開口部に隣接してまたは一体になって配置されたカテーテル上の第1の電極(110)；および  
第1の電極と第2の電極との間に電圧を加えた時に脈管中の細胞を電気穿孔するのに十分な強さの電界が発生し得るような距離に配置され、その際、該注入開口部は第1の電極と第2の電極との間に位置するように配置されている、カテーテル上の第2の電極(112)

);

を含んでなる電気穿孔装置。

【請求項 3】

カテーテルの遠位端以外の位置に少なくとも 1 つの膨脹可能なバルーン部分 ( 1 0 2 ) を有するカテーテル ( 1 0 0 ) ;

該バルーン部分に対して近位にある、被験体の脈管中に治療薬を含む組成物を導入するためのカテーテルにおける注入開口部 ( 1 2 0 ) ;

該注入開口部に隣接してまたは一体になって配置されたカテーテル上の第 1 の電極 ( 1 1 0 ) ; および

第 1 の電極に対して近位ではあるが、第 1 の電極と第 2 の電極との間に電圧を加えた時に脈管中の細胞を電気穿孔するのに十分な強さの電界が発生し得るような距離で第 1 の電極から間を開けて配置され、その際、第 1 の電極と第 2 の電極の両方が該バルーン部分の近位に配置されている、カテーテル上の第 2 の電極 ( 1 1 2 ) ;

を含んでなる、被験体の脈管中の少なくとも 1 つの細胞中に組成物を導入するための電気穿孔装置。

【請求項 4】

カテーテルの遠位端近くに位置する、少なくとも 1 つの膨脹可能な第 1 のバルーン部分 ( 1 0 2 ) ;

第 1 のバルーン部分と第 2 のバルーン部分の膨脹によって該バルーン部分間の脈管が塞がれる、膨脹可能な第 1 のバルーン部分に対して近位にある、少なくとも 1 つの膨脹可能な第 2 のバルーン部分 ( 1 0 2 ) ;

第 1 のバルーン部分と第 2 のバルーン部分との間に配置されている、治療薬を含む組成物を被験体に導入するための少なくとも 1 つの注入開口部 ( 1 2 0 ) ;

該注入開口部に隣接してまたは一体になって配置された第 1 の電極 ( 1 1 0 ) ; および第 1 の電極に対して近位ではあるが、第 1 の電極と第 2 の電極との間に電圧を加えた時に脈管中の細胞を電気穿孔するのに十分な強さの電界が発生し得るような距離で第 1 の電極から間を開けて配置されたカテーテル上の第 2 の電極 ( 1 1 2 ) ;

を含んでなる、バルーンカテーテルを含む電気穿孔装置。

【請求項 5】

電極間に電圧を加えるために第 1 の電極と第 2 の電極に接続された電源 ( 1 1 4 ) をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 6】

脈管が血管である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 7】

第 1 の電極が少なくとも部分的には生物学的に不活性な材料により形成される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 8】

カテーテルが 2 つの膨脹可能なバルーン部分 ( 1 0 2 ) を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 9】

第 1 の電極が注入開口部と一緒に位置する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 10】

第 1 の電極と第 2 の電極がそれぞれ独立して単一の電極または複数の電極から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 11】

第 1 の電極と第 2 の電極が互いに噛み合った電極であるかまたは同心環状電極である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 12】

被験体の少なくとも 1 つの細胞の電気穿孔を引き起こすのに十分な量で電極間に電圧を加えるための第 1 および第 2 の電極に接続された電源 ( 1 1 4 ) をさらに含む、請求項 1 ~

10

20

30

40

50

11のいずれか1項に記載の装置。

【請求項13】

電源が約100V/cm～約5kV/cmの強さの電界を発生させることができる、請求項12に記載の装置。

【請求項14】

電源が約10ボルト～約200ボルトの電圧を発生させることができる、請求項12に記載の装置。

【請求項15】

電源が約100μs～約100msの長さのパルスを発生させることができる、請求項12に記載の装置。

【請求項16】

第1の電極が環状電極であり、注入開口部を同心状に完全に取り囲んでいる、請求項1～15のいずれか1項に記載の装置。

【請求項17】

第2の電極がカテーテル内のガイドワイヤーである、請求項1～16のいずれか1項に記載の装置。

【請求項18】

注入開口部が複数の注入開口部からなる、請求項1～17のいずれか1項に記載の装置。

【請求項19】

第2の電極が被験体と接触して配置される形状の銀プレートである、請求項1～18のいずれか1項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、一般的には電気穿孔法の分野に関し、具体的には抗血栓剤および抗凝固剤のような組成物の持続的脈管内送達法に関する。

発明の背景

細胞に永久的な傷害を与えることなく細胞に小孔をあけるために、電界が使用できることが、最近知られている。この発見は、細胞質への巨大分子の挿入を可能にした。遺伝子および薬剤化合物のような他の分子を、電気穿孔として知られている方法により、生きた細胞中に取り込むことができることが知られている。

電気穿孔法による細胞の処理は、患者に組成物を注入し、一对の電極の間の所望の処理部位に電界をかけることにより行われる。正常または健康な細胞へ傷害を与えることなく、または少なくとも最小の傷害で細胞の電気穿孔が起きるように、電界強度は合理的に正確に調整されなければならない。次に電極間の距離を測定し、式  $E = V / d$  に従う適切な電圧を電極にかけることができる ( $E =$  電界強度、 $V/cm$ ;  $V =$  電圧、ボルト; および  $d =$  距離、 $cm$ )。

サイズの大きいヌクレオチド配列 (630kbまで) は、電気穿孔法により哺乳動物細胞中に導入することができることが、研究により証明されており (Eanault, et al., Gene (アムステルダム), 144(2):205, 1994; Nucleic Acids Research, 15(3):1311, 1987; Knutson, et al., Anal. Biochem., 164:44, 1987; Gibson, et al., EMBO J., 6(8):2457, 1987; Dower, et al., Genetic Engineering, 12:275, 1990; Mozo, et al., Plant Molecular Biology, 16:917, 1991)、従って、例えば遺伝子治療の効率的な方法を与える。

イオントフォーシスは電流を使用して、濃度勾配下の受動的拡散と同様の方法で、しかしより速い速度で、生体膜 (例えば、皮膚) を通過する荷電分子の拡散を活性化し調節する。一般的に、イオントフォーシス技術は、半透膜バリアを通過する電位または電流を利用する。患者へのヘパリン分子の送達が、イオントフォーシス (IO) (これは、荷電した分子種を動脈壁に向かわせるために低電流 (d.c.) を使用する技術) を使用して証明されている。ブタの動脈へのヘパリン (1000U/ml) のイオントフォーシス送達は、冠動脈造影や血圧および心拍リズムのような正常な生理学的パラメータの変化がな

10

20

30

40

50

く、安全であり許容できるものであることが証明された。受動的送達に比較してI O送達後は、1000U ~ 20,000U/mlの可変濃度のヘパリンは血管中に比較的高濃度で残存させるが、ヘパリンの送達の約1時間後、96%の薬剤は流れ去る(Mitchel, et al., ACC 44th Annual Scientific Session, 抄録#092684, 1994)。ブタのバルーン傷害モデルでは、ヘパリンのI O送達後の血小板沈着は低下していることも報告されている。<sup>125</sup> I - 標識ヒルジンはまた、イオントフォレーシスによりブタの頸動脈中に送達されている(Fernandez-Oritz, et al., Circulation, 89:1518, 1994)。ヒルジンの局所的濃縮はI Oにより達成されるが、ヘパリンを用いる上記実験のように、1時間で薬剤の80%は流れ去り、3時間後は、受動的送達と同じレベルになる。

ヘパリンは、静脈血栓症を防止および治療するために、広く使用されている。アンチトロンピンIIIやヘパリンコファクターIIのような血漿成分との相互作用とは別に、血液や血管壁細胞との相互作用が、その治療作用の根底にあるかも知れない。ヘパリンという用語は、ウロン酸(L - イズロン酸またはD - グルクロン酸)およびD - グルコサミンの交互の1 - 4結合残基からなる、非分岐多糖分子種のファミリーを包含する。通常ウシおよびブタの供給源から調製される粗ヘパリン画分は、サイズ(5,000 ~ 40,000ダルトン)、単糖配列、硫酸基の位置、および抗凝固活性について不均一である。哺乳動物ヘパリンは、結合組織の肥満細胞から合成され、顆粒として蓄えられ、これらの細胞の活性化後に細胞外スペースに放出される。全体に、ヘパリンは、関連する硫酸化多糖(例えば、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、およびコンドロイチン硫酸)(これらは、脊椎動物のほとんどすべての組織中で合成される)ほど豊富には存在しない。ヘパリンおよびこれらの他の構造体は、一般的にグリコサミノグリカンと呼ばれる。

ヘパリンの抗凝固活性は、主に、ブタの小腸粘膜から精製された市販のヘパリン鎖の約3分の1中に存在する特異的五炭糖配列に由来する。この五炭糖、- GlcNR16S(1-4)GlcA(1-4)GlcNS3S6R2(1-4)IdoA2S(1-4)GlcNS6S(ここで、R1 = -SO<sub>3</sub>-または-COCH<sub>3</sub>であり、R2 = -Hまたは-SO<sub>3</sub>である)は、循環血漿タンパク質であるアンチトロンピン(アンチトロンピンIII、AT-III)の高親和性リガンドであり、これは結合するとコンフォメーションの変化を誘導し、これが、凝固因子であるトロンピン、Xa、IXa、VIIa、XIaおよびXIIaに結合し不活性化するアンチトロンピンの能力を大幅に増強する。トロンピンに対するアンチトロンピンの活性をヘパリンが促進するためには、ヘパリンが特異的に認識される五炭糖を含有し、少なくとも18個の糖単位の長さがなければならない。この追加の長さは、アンチトロンピンとトロンピンの橋渡しをし、こうしてその相互作用を最適化するために、必要であると考えられている。ヘパリン中に存在する他のポリマーは、血小板阻害作用または繊維素溶解作用を有する。低分子量ヘパリン(LMW)が臨床開発されている。このヘパリン化合物は、アンチトロンピンIII活性化に必要な特定のポリマーのみを含有する。これは、特異的な抗血栓活性が大きく、抗血小板活性が小さい。これはまた、投与が容易であり、より安全であるという特徴を有する。

多くのバイオテクノロジー会社および医薬品業界の大きな目的は、薬剤および遺伝子の送達のための安全、容易かつ効果的な方法を見いだすことである。具体的には心臓学の分野では、種々の手段により動脈壁に薬剤や遺伝子を送達することに大きな関心が持たれている。心臓学に関連する遺伝子導入法についての簡単な総説が現れた(Dzau, et al., TIB TECH, 11:205, 1993; Nabel, et al., TCM, 1月 - 2月号:12, 1991)。ウイルスの面では、レトロウイルスはその高い導入効率にもかかわらず、例えば1)サイズ(< 8 kb)、2)癌遺伝子を活性化する可能性、3)ランダムな組み込み、および4)分裂しない細胞にトランスフェクションできないこと、などの多くの限界を有する。アデノウイルスのような他のウイルスベクターは、効率的ではあるが、感染および炎症のリスクがある。HVJ媒介トランスフェクションは非常に効率的であるが、非特異結合を示す。非常にポピュラーになったリポソームは安全で扱いが簡便であるが、効率が悪く、長いインキュベーション時間を必要とする。しかしリポソームの調製法の最近の変化は、その効率を数倍上昇させた。

10

20

30

40

50

多くの異なるバルーン構造を有するカテーテル送達系も、遺伝子および/または薬剤を局所送達するのに使用されている。これらには、ハイドロゲルバルーン、レーザー穿孔 (Wolinskyバルーン)、「ウィーピング (weeping)」チャンネルおよび「ディスパッチ (Dispatch)」バルーン、およびこれらの変法がある (Azrin, et al., Circulation, 90:433, 1994; Consigny, et al., J. Vasc. Interv. Radiol., 5:553, 1994; Wolinsky, et al., JACC, 17:174B, 1991; Riessen, et al., JACC, 23:1234, 1994; Schwartz, Restenosis Summit VII, オハイオ州クリーブランド, 1995, pp 290-294)。ハイドロゲルバルーンによる送達能力は限定されており、設置中にカテーテルは、導入すべき薬剤または物質の実質的な量を喪失することがある。Wolinskyバルーンの高圧ジェット作用は、血管傷害 (これは、多くの  $< 1 \mu$  の穴 (ウィーピング型) を作ることで避けられる) を引き起こすことがある。「ディスパッチ」カテーテルは、薬剤送達について大きな興味を引きだし、これは環状チャンネルを作成し、連続的血液流を可能にする灌流装置として使用することができる。

10

内皮および血管平滑筋細胞への遺伝子導入、およびレトロウイルスやリポソームによる部位特異的遺伝子発現は、実現可能であることが証明されており、血管プロテーゼやステントの細胞接種も記載されている (Nabel, et al., JACC, 17:189B, 1991; Nabel, et al., Science, 249:1285, 1990)。遺伝子送達の理想的な方法は、妥当な期間にわたり高レベルの遺伝子発現を与えるための、核酸配列 (例えば、プラスミド DNA) の局所的な細胞内導入であろう。

#### 発明の要約

20

本発明は、パルス電界または電気穿孔法による、被験体中への組成物の局所および持続的脈管内送達の方法を提供する。本明細書に記載の送達方法は、被験体の脈管中での長時間の組成物の保持を可能にする。この方法は、例えば脈管壁の細胞へ直接治療薬を送達するためのカテーテル型のシステムである。本発明の方法を使用して、組成物の持続的な高局所濃度が達成される。

本発明の方法は、抗増殖剤、抗凝固剤、抗血栓剤、抗再狭窄剤および抗血小板剤のような組成物の脈管内送達に有用である。この方法は、深部静脈血栓 (DVT)、非遮断性頸動脈閉塞、末梢動脈疾患および心血管再狭窄の治療のような心臓病的応用に有用である。

本発明はまた、被験体の脈管の少なくとも1つの細胞に組成物を導入するためのカテーテル装置を提供する。

30

#### 好適な実施態様の説明

本発明は、電気穿孔法を用いる、被験体の脈管への治療用組成物の局所的、制御的および持続的脈管内送達のための方法を提供する。この方法は、パルス電界を利用し、受動的送達法で典型的に使用される高用量に対して、より低濃度の組成物を使用するという利点を有する。

本発明の方法は、制御的、持続的な高局所濃度の薬剤を、全循環系を薬剤に曝露することなく、一部位へ直接送達することを可能にする。例えば平滑筋細胞移動および増殖を抑制するための薬理学的アプローチは、動物実験では生理学的用量以上の濃度で有効に使用されてきた。しかしそのような高濃度は、全身的副作用のリスクがあり、そのような高用量で全身に投与された薬剤の特異的ターゲティングが欠如するため、ヒトへの臨床的使用には非現実的である。本発明は、カテーテルに基づいた介入 (例えば、血管形成、動脈切除、ロタブレイティング (rotablation) またはステンティング (stenting)) を受けている動脈の局所的治療に臨床的に関連する。

40

好適な実施態様において本発明は、被験体への組成物の持続的脈管内送達法を提供する。この方法は、被験体に組成物を投与し、電気穿孔法により脈管に電気インパルスを適用することからなり、このインパルスが、脈管の内部の少なくとも1つの細胞の電気穿孔を引き起こし、その結果、脈管内の細胞に組成物が送達され、脈管内で保持されて、こうして持続的送達が達成されるように、十分な強度および時間、電気インパルスが与えられる。本発明の1つの面において、電気穿孔法の前、と同時にまたは、の後に細胞に組成物をさらに送達するために、イオントフォレーシスを使用することができる。

50

本明細書において「持続的」という用語は、脈管にいったん組成物が送達されると、これは、24～36時間まで、典型的には12時間、脈管内に保持されることを意味する。すなわち、従来の送達法（例えば、受動的拡散、またはIO）で送達された組成物の濃度と比較して、組成物の認めうる流出はない。

「脈管内」および「脈管」という用語は、電気パルスが適用されかつ組成物が送達される被験体の身体、動脈、静脈、または他の「管腔」を意味する。管腔は当該分野で、管または管状器官内のチャンネルとして知られている。本発明の方法において好適な脈管の例は、冠動脈、頸動脈、大腿動脈、および回腸動脈がある。特定の理論に拘泥されるつもりはないが、脈管に適用される電気インパルスは、主に脈管の内側領域の細胞への組成物の送達を可能にするが、内膜の細胞へも送達し、そして外膜細胞への送達はより少ないと考えられる。

本発明の方法により送達される組成物は、電気穿孔の部位で所望の生物学的作用を有する任意の組成物を含む。例えば、好適な組成物は、抗血栓組成物、抗再狭窄組成物、抗血小板組成物、および抗増殖組成物である。他の組成物には、血小板受容体およびメディエーターインヒビター、平滑筋細胞増殖インヒビター、増殖因子インヒビター、GpIIb/IIIaアンタゴニスト、細胞接着と凝集を阻害する物質、トロンボキサン受容体を阻害する物質、フィブリノゲン受容体を阻害する物質などを含む。このような組成物の具体的な例には、ヘパリン（その高分子量および低分子量ヘパリン、およびその断片を含む）、ヒルログ（hirulog）、組織プラスミノゲンアクチベータ（tPA）、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、ワーファリン、ヒルジン、アンジオテンシン変換酵素（ACE）インヒビター、PDGF-抗体、プロテアーゼ（例えば、エラスターゼおよびコラゲナーゼ）、セロトニン、プロスタグランジン、血管収縮物質、血管拡張物質、血管形成因子、第VIII因子、または第IX因子、TNF、組織因子、VLA-4、増殖停止ホメオボックス遺伝子、gax、L-アルギニン、GR32191、スロトロバン、ケタンセリン、魚油、エノキサプリン、シラザプリル、ホリノプリル、ロバスタチン、アンジオペプチン、シクロスポリンA、ステロイド、トラピジル、コルヒチン、DMSO、レチノイド、トロンビンインヒビター、フォンウィルブラント因子の抗体、グリコプロテインIIb/IIIaの抗体、カルシウムキレート物質などを含む。他の治療用物質（例えば、遺伝子治療に使用されるもの、化学療法剤、核酸（例えば、アンチセンスを含むポリヌクレオチド、例えばc-mycおよびc-myb）、抗体を含むペプチドおよびポリペプチド）もまた、本発明の方法により投与される。

治療用組成物は、単独でまたは互いに組合せてまたは他の物質とともに投与することができる。このような物質には、例えばtPA、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、ヘパリン、およびストレプトキナーゼの組合せがある。ヘパリンを組織プラスミノゲンアクチベータとともに投与すると、必要な組織プラスミノゲンアクチベータの投与量が減少し、従って組織プラスミノゲンアクチベータや他の血栓溶解療法または繊維素溶解療法の結末にしばしば関連した血餅形成のリスクが低下する。

本発明の方法において使用される組成物には、本明細書に記載の組成物の生物学的に機能性の類似体がある。例えば、そのような修飾には、硫酸基の付加または除去、リン酸基の付加、および脂肪族または芳香族アグリコンのような疎水性基の付加がある。ヘパリンの修飾には、例えば非ヘパリン糖鎖（例えば、シアル酸、ガラクトース、フコース、グルコース、およびキシロース）の付加がある。ヘパリンが組成物として使用される時、これは天然に存在するヘパリンの断片またはヘパリン様分子（例えば、ヘパラン硫酸または他のグリコサミノグリカン）を含有するか、または合成断片を含有してもよい。セレクチン結合のより有効なブロッカーを得るために、合成断片は、糖結合において修飾してもよい。そのような糖を生産するための方法は、当業者に公知である（例えば、Heparin, Chemical and Biological Properties, Clinical Applications, 1989, CRC Press Boca Raton, FL, D.A. LaneとV. Lindahl編、pp. 65-79中のM. Petitou, Chemical Synthesis of Heparin）。

本発明の方法により投与される組成物は、1つまたはそれ以上の組成物の混合物（例えば

10

20

30

40

50

へパリンとtPA)でもよい。さらに、へパリンのような組成物は、約2~約50の糖単位を含有する分子の混合物、または糖単位の数が2またはそれ以上であるが約50以下であるなら、均一な断片であってもよい。

障害が遺伝子の発現に関連している場合(例えば、IGF-1、内皮細胞増殖因子)、翻訳レベルで遺伝子の発現を妨害する核酸配列を送達することができる。このアプローチは、特異的mRNAの転写または翻訳を阻止するために、例えばアンチセンス核酸、リボザイム、または3重らせん物質を使用し、mRNAをアンチセンス核酸または3重らせん物質でマスクするかまたはリボザイムで切断する。

好ましくは被験体はヒトであるが、本明細書に記載の電気穿孔法による組成物の持続的in vivo送達の方法は、任意の動物について行われることが企図される。

10

好ましくは治療用組成物は、電気穿孔処理の前、またはこれと実質的に同時に投与される。「実質的に同時に」という用語は、治療用組成物の投与と電気穿孔処理が、時間に関して妥当に近接して行われることを意味する。薬剤の化学的組成は、電気パルスの適用に対して薬剤を投与するのに最も適切な時間を指令するであろう。組成物は、例えば臨床的状況、患者の状態、組成物のサイズと化学的特徴、および組成物の半減期などの要因に応じて、任意の間隔で投与することができる。

本発明の方法で投与される組成物は、注射または経時的漸増灌流により非経口的に投与することができる。組成物は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、体腔内、または経皮的に投与することができる。好ましくは電気穿孔の部位またはその近くで脈管内に投与される。

投与のための調製物は、無菌の水性または非水性溶液、懸濁液、およびエマルジョンを含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油(例えば、オリーブ油)、および注射可能な有機エステル(例えば、オレイン酸エチル)がある。水性担体には、水、アルコール性/水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液があり、食塩水および緩衝化媒体を含む。ビヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、または固定油がある。静脈内ビヒクルには、流体や栄養補充液、電解質補充液(例えば、リンゲルのブドウ糖に基づくもの)、などがある。保存剤や他の添加物、例えば抗生物質、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガスなども存在してもよい。さらに血管収縮剤は、パルス化の前に治療用組成物を局在化するために使用することができる。

20

もう1つの具体例において、本発明は、本明細書中に記載されているように変更できる本発明の方法において有用なカテーテル装置100を提供し、それは図1、6、および7に示されている。該カテーテルは、例えば、改変されたベルマン(Berman)カテーテル(Arrow International, Inc., Reading, PA)であってもよい。当業者にとっては、本発明に従って変更できる管腔内電気穿孔による薬剤送達用の他のバルーンカテーテル装置は公知である。

30

該カテーテル100には、従来のように、カテーテル100の遠位端近傍に少なくとも1個の膨張式バルーン102と、各バルーン102をふくらませるための少なくとも1個の膨張口104が含まれてよい。該カテーテル100にはまた、例えばGenetronics, Inc., San Diego, Californiaの一部門であるBTX社製のECM 600指数発電器であってよい発電器114にワイヤーにより結合されている第1の電極110と第2の電極112とが含まれる。第1の電極110は、好ましくは少なくとも1個の注入開口部120の近くに配置されている。1つの具体例において、注入開口部120を第1の電極110と合体させて、第1の電極110が完全に少なくとも1つの注入開口部120を取り囲むようにしてもよい。

40

第1の電極110は、患者と生物学的に適合する、例えば生物学的に不活性である電導性部材からなることが好ましい。かかる部材の例としては、カテーテル100の表面を覆った、またはその上もしくはその付近に配置された銀またはプラチナのワイヤー;カテーテル100の一部にメッキまたは塗料した、銀塗料のような電導性部材の被膜;あるいは粉末金属または電導性繊維のような電導性部材の(製造中または製造後の例えばイオン注入による)注入によって電導性となったカテーテル100の領域がある。導体を金属に限定する必要はなく、半導体または電導性プラスチックもしくはセラミックであってもよい。製造を

50

容易にするために、図6および7に示した具体例では、カテーテル100の注入開口部120近傍にある長さ約2.5cmの部分の被膜として第1の電極110用の電導性銀塗料を用いている。

第2の電極112も同様に電導性部材を含んでなり、第1の電極110と同じタイプの電導部材でもよいし、異なるタイプの電導性部材であってよい。図6中に示す具体例において、第2の電極は、患者の身体の一部に適用するように構成した銀メッキ112aを有してなり、その結果、電源114からの電圧を第1の電極110および第2の電極112に印加した場合に、血管内の少なくとも1つの細胞の電気穿孔を引き起こすに十分な電界が生じる。第2の電極を外部に置く場合には、より良い接触のために好ましくは電導性ゲルを用いて、露出した皮膚（例えば、患者の剃毛した腹筋）上に置くことが好ましい。図7は、第2の電極112がカテーテル100用の電導性ガイドワイヤーであってもよいことを示すものである。

第1の電極110および第2の電極112は、例えば銀またはプラチナ製ワイヤーであってよい導体によって電源114に結合されているが、第1の電極110と結合するためのカテーテル100内の軟質電導性インクのような、いずれの電導性構造であってもよい。

注入開口部120はカテーテル100の製造中または製造後に形成し、第1の電極110の片側もしくは両側に、または第1の電極110の境界内に置くことができる。

別の具体例では、第2の電極112は第1の電極110と同様に形成し、第1の電極110と注入開口部120との間に配置するか、または第1の電極110と第2の電極112との間にある注入開口部120とともに配置するかすればよい。電極の噛み合った「指」の付近または間に注入開口部120を備えた噛み合った電極、あるいは最も中央の環内に、最も中央の環と最も外側の環との間に、および/または最も外側の環の外部に注入開口部を備えた同心環など、第1の電極110および第2の電極112の他の形状も利用することができる。電源114から電圧が印加される場合にそれらが血管内の少なくとも1つの細胞の電気穿孔を引き起こすに十分な電界を発生させる構造を提供する限りは、その他の形状も本発明の範囲内にある。

操作の際には、カテーテル100を、例えば、バルーン102が狭窄病巣を横切るまたは交差するように配置し、バルーン102を膨張させて血管（例えば、動脈または静脈）を拡張させ、それによって血管の管腔を拡大する。医薬組成物を注入開口部120を経て血管へと送達し、少なくとも注入を行う前、その最中、またはその後の時間の間に、電源114から電気パルス第1の電極110および第2の電極112に与えることによって、血管内の少なくとも1つの細胞の電気穿孔を誘導する。かかる細胞への医薬組成物の送達後、さらなる組成物の送達および電気穿孔が所望でなければ、カテーテルを外せばよい。

前記の方法はまた、金属ステントと併用できる。ステント自身が1組の電極を形成し、一方、ガイドワイヤーは第2の電極として作用する。ステントは、単独で、あるいはヘパリンで被覆された形態で再狭窄の軽減に有用である。パルス電界と組み合わせれば、かかる結果はさらに増強できる。これは、ステントを配備する血管形成術に特に適している。（詳細な総説は、de Jaegere, P.P.ら, Restenosis Summit Proc. VIII, 1996, 82-109頁を参照）。パルス電界による再狭窄防止剤の局所送達を行うとともにステントを移植すれば、再狭窄率が低下する。通常ステントのほかにも、退縮性または生分解性ステントをこの送達様式と併用することもできる。

本発明のもう1つの態様において記載された方法はバイパス移植 (bypass grafts) に有用である。これらには、大動脈冠動脈、大動脈回腸動脈、腎大動脈、大腿膝窩におけるものが挙げられる。自己組織または異種組織を用いた移植の場合には、組織の細胞を目的のタンパク質をコードする核酸でex vivoにおいて電気穿孔できる。電気穿孔は相対的に速いので、所望の核酸は伏在静脈、例えば体外で移植させることが可能であり、患者の体外循環は心肺機械によって維持され、続いて標準法によりこの静脈を移植する。合成物質を移植片として用いる場合には、それはex vivoにおいて電気穿孔された目的の核酸配列を含む適切な細胞を植え込むことができる足場材料として役立つ。

本発明の方法を用い、本明細書中に記載されたようにカテーテルであらゆる組成物、例えば薬剤または遺伝子を送達することにより、障害を治療することができる。例えば、末梢動脈疾病、例えば重症の四肢貧血症 (Isner, J.M.ら, Restenosis Summit VIII, Clevel

10

20

30

40

50



and, OH, 1996, 208-289頁)を患う患者を、本明細書に記載したように治療することができる。ウイルスのおよび非ウイルス的手法の遺伝子送達の両方が、本発明の方法を用いて達成することができる。これらには、ネイキッドDNA、DNA-リボソーム複合体、紫外線により不活性化したHVJ(日本凝血性ウイルス)リボソームベクターの送達、DNAを不活性ビーズなどに被覆したパーティクル・ガン(例えばバイオリスティクス(biolytics))による送達が含まれる。目的のタンパク質をコードする種々の核酸配列を、例えば心臓血管障害の治療に用いることができる。成長因子PDGF-B、FGF-1およびTGF 1の発現は、脈管内膜過形成と関連しており、それゆえにかかる遺伝子の発現を高める(センス構築体を送達する)かまたは低下させる(アンチセンスを送達する)かのいずれかであることが望ましいと考えられる。例えば、PDGF-Bは平滑筋細胞(SMC)の増殖および移行

10

に関連しているが、FGF-1は脈管血成を刺激し、またTGF 1はプロコラーゲンの合成を促進する。SMCの増殖および移行、血小板凝縮および細胞外モデリングを抑制するいずれの組成物も、本発明の電気穿孔による送達法の使用に望ましい。かかる組成物には、動脈SMC中の平滑筋アクチンの増殖および発現を抑制するインターフェロン、ならびにE系列のプロスタグランジンのような非タンパク質メディエーターが含まれる。

本発明の方法によって送達される他の遺伝子例としては、脈管血成を刺激し、生理学上および病理学上の脈管血成の双方を調節可能な脈管内皮成長因子(VEGF)および内皮特異的有糸分裂促進因子が挙げられる。

本発明の方法における組成物の投与は、例えば再灌流後の損傷を改善するために使用され得る。動脈血栓症を治療する場合に、組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)のような凝血溶解剤による灌流の誘導は組織の損傷を伴うことが多い。

20

単独でまたは例えば受動的に投与し得る他の組成物と組み合わせた本発明の方法による組成物の投与は、種々の臨床状況において有用である。それらには、限定されるものではないが、1)冠動脈、大脳または末梢動脈を含む急性動脈血栓閉塞;2)血管形成術後の急性血栓閉塞または再狭窄;3)血栓症治療後の(例えば虚血組織中の)再閉塞または再狭窄;4)脈管移植片閉塞;5)血液透析;6)心肺バイパス術;7)左心室補助装置;8)全人工心臓および左心室補助装置;9)敗血症性ショック;および10)他の動脈血栓症(例えば、現行の治療尺度が禁忌を示すかまたは効果的でないかのいずれかである血栓症または血栓塞栓症)が含まれる。

30

本発明の方法はまた、微生物感染症の治療に有用である。細菌、リケッチア、種々の寄生菌、およびウイルスなどの多くの微生物は、脈管内皮や白血球と結合する。かくして、本発明の方法を用いて患者に組成物を投与してその結合標的分子として特定の受容体(例えばセレクチン)を使用する微生物の結合を妨げ、それによって微生物感染の過程を変調することができる。

本発明の方法を用い、前記組成物を患者に投与することにより、血管炎を治療することができる。血管内皮の内側への白血球の焦点接着に関連した組織損傷は、例えばP-およびL-セレクチン受容体をブロックすることによって抑制される。

本発明の方法における組成物の投与に関する用量範囲とは、疾患/損傷の症状が改善されるという望ましい効果を生ずるに十分な量のことである。用量は、有害な副作用を引き起こすほど多くあってはならない。一般に、用量は患者の年齢、病状、性別および疾患の程度によって異なり、当業者であれば決定することができる。何か合併症がある場合には、用量はそれぞれの医師によって調整することが可能である。例えば、炎症、再灌流後損傷、微生物/ウイルス感染症、もしくは血管炎の治療、または腫瘍細胞の転移性拡散の抑制に用いる場合には、この医薬組成物を、1回または複数回の投与で、約1mg/kg~約1000mg/kg、好ましくは約1mg/kg~約50mg/kgの用量で投与することができる。

40

送達の制御は、適切な高分子、例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、エチレン-ビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン、またはラクチド/グリコリド共重合体を選択することにより達成できる。医薬組成物の放出速度は、高分子の濃度を変化させることによって制御することが可能

50

である。

作用時間を制御する別の方法は、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリラクチド/グリコリド共重合体、またはエチレンビニルアセテート共重合体のようなポリマー物質の粒子中に組成物を配合することを含む。あるいは、例えばコアセルベーション法によってまたは界面重合によって、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルまたはポリ(メチルメタクロレート)マイクロカプセルを使用して、あるいはコロイド薬剤送達系によって調製したマイクロカプセル内に組成物を保持させることも可能である。コロイド分散系には、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、および水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む液体ベース系が含まれる。

10

公知の任意の細胞の電気穿孔に必要な電場強度を含む各種パラメーターは、通常、被験体に対して報告されている多くの調査書類から、また被験体申請の代理人であるGenetronics社, San Diego, Californiaによって管理されているデータベースから入手することができる。in vivoでの細胞電気穿孔に必要な電場は、in vitroにおいて細胞に必要な電場と同様の大きさである。この電場強度は、100V/cm~数kV/cmの範囲である。このことは、発明者ら自身の実験および科学関連の刊行物で報告された他者の実験より実証されている。本明細書中に記載された手法を実施するためのパルス発生器は、ここ数年市販のものを入手できるようになっている。適切なシグナル発生器の一例は、San Diego, California, U.S.A.のGenetronics社の一部門であるBTXから市販されているELECTRO CELL MANIPULATOR Model ECM 600である。ECM 600シグナル発生器は、指数関数的に波形を減衰させるコンデンサーの完全な放電からパルスを発生させる。このシグナル発生器によって発生した電気シグナルは、急速な立上り時間と指数関数的なテーリングを特徴とする。ECM 600シグナル発生器では、R1~R10と記された10個のタイムレジスターのうち1個を選択することによって、電気穿孔パルス長を設定する。このタイムレジスターは、高電圧モード(High Voltage Mode, HVM)(静電容量を50マイクロファラデーに固定)および低電圧モード(Low Voltage Mode, LVM)(25~3.175マイクロファラデーの範囲の静電容量を有する)の双方で稼働する。

20

細胞膜を横切るように電場をかけることによって、電気穿孔工程で重要である一時的な細孔が形成される。ECM 600シグナル発生器は、電極の間隙(cm)に電圧(kV)を発生させる。この電位差は、電場強度( $E=kV/cm$ )と呼ばれるものである。各細胞は、最適な電気穿孔に対する固有の臨界場強度を有する。これは、細胞の大きさ、膜の形成および細胞壁自身の個々の特徴による。例えば、哺乳動物細胞は典型的には、細胞死および/または電気穿孔が引き起こされるまでに0.5~5.0kV/cmの範囲を必要とする。一般に、必要な電場強度は、細胞の大きさと反比例して変化する。

30

ECM 600シグナル発生器は、内部コンデンサーにLVMでは50~500ボルト、HVMでは0.05~2.5kVで印加できるように、設定充電電圧の振幅が調節できる制御つまみを有する。電気シグナルの最大振幅は、ECM 600シグナル発生器内に組み込まれたディスプレイに表示される。この装置にはさらに、LVMモードにおいて、同時に出力を行う抵抗器と7個の選択可能な付加的コンデンサーの貯蔵庫を同時に組み合わせることによって、パルス長を制御する複数の押しボタンスイッチが含まれる。

40

ECM 600シグナル発生器にはまた、1つの自動充電・パルス押しボタンが含まれる。このボタンを押すと、内部コンデンサーの充電が開始されて設定電圧となり、5秒間未満の自動サイクルで外部電極にパルスが送られる。手動ボタンを順次押して、所定の電場を繰り返し印加する。

パワーパック内の発生器によって与えられた電圧パルスの波形は、例えば、指数関数的に減衰するパルス、矩形パルス、単極振動パルス列または双極振動パルス列であり得る。好ましくは、本発明の方法に用いられる波形は指数関数的パルスである。少なくとも第1の電極と第2の電極との間かけられる電圧は、前記のように、脈管に送達された組成物がある時間保持されるよう脈管の電気穿孔を引き起こすのに十分なものである。電圧を電極間の距離(1cm離れたものとして計算し、cmで表す)で割って電場強度を計算する。例え

50

ば、1/2cm離れている2つの電極面の間の電圧が500Vである場合には、電場強度は500/(1/2)、すなわち1000V/cmまたは1kV/cmである。好ましくは、電極間にかかる電圧の大きさは約10ボルト~200ボルトの範囲内であり、好ましくは約50~90ボルトである。

パルス長は100マイクロ秒( $\mu s$ )~100ミリ秒(ms)、好ましくは約500 $\mu s$ ~10msであればよい。細胞の領域または細胞群に対しては約1~10パルスをかければよい。波形、電場強度およびパルス維持時間は、カテーテル装置の厳密な構成や電気穿孔によって細胞または脈管に移行させるべき組成物中の分子の種類に依存する。当業者であれば、適当なパルス長およびパルス数を容易に決定することができる。

以下の実施例は説明のためのものであって、本発明を限定するものではない。

以下の実施例は、使用される可能性のある例のうちの代表的なものであるが、当業者に公知の他の方法を用いてもよい。

10

#### 実施例 1

#### 自発呼吸ウサギにおけるフルオレセイン化ヘパリンの管腔内注入および頸動脈のパルス電気刺激

##### 1. 方法

実験は、雄および雌の12匹のニュージーランド白ウサギ(2.5-3.4kg)を、キシラジン(2mg/kg)およびケタミン(50mg/kg)の筋肉内投与および耳静脈へのアルファクロラロース(30mg/kg)の静脈内投与により予め麻酔して行った。追加用量として10mg/kgのクロラロースを毎時間投与した。足指をつねることに對する反射および角膜反射が起こらないように、麻酔状態を維持した。

20

すべての実験は、アメリカ生理学会により採用された、研究のための動物の使用に関する指針に従って行った。

動物を仰向けに置き、ひもで手術台に固定した。外気の自発呼吸ができるように、気管に挿管した。第II誘導を用い、示差モードにて動物の心電図(EKG)を得た。呼吸終期(end-tidal)のCO<sub>2</sub>圧は、CO<sub>2</sub>アナライザー(Datex, Puritan-Bennett)を用いて監視した。体温は、輻射暖房により38~38.5の範囲に維持した。

##### 2. 外科手術および実験のプロトコール

ウサギの頸部を長軸方向に切開し、両側の総頸動脈を露出させた。各側の頸動脈を約6cm、周囲組織および迷走交感神経幹から分離した。頸部と胸部の間の結接部において、片側の頸動脈の尾側末端を一時的に脈管クリップで閉塞した。次いで、動脈の頭側末端(横行静脈の直下)を小さく切開し、切開口からエレクトロポレーターカテーテル(図1)を押し入れた。カテーテルを挿入した後、内皮細胞の内層を露出させるため、カテーテルバルーンを動脈管腔で繰り返し30秒間膨張させた。動脈の膨張部分に、消えないインクで印を付けた。次いでバルーンを収縮させ、カテーテルの先端を脈管クリップのすぐ上まで引き寄せた。

30

新たに調製した0.2mlの希釈ヘパリン(167単位/mgの活性を有するフルオレセイン化ヘパリン(F-ヘパリン)[Molecular Probe, Inc.]1mgを4mlに溶解)を、両管腔カテーテルの片方のポートから約10秒間にわたって注入した。次いで、カテーテルを動脈から引き抜き、尾側末端から脈管クリップを取り去り、動脈の血流を回復させた。全く同じ手法を、反対側の頸動脈にも適用した(試験動脈)。唯一の例外は、該試験動脈においては、プラチナまたは銀電極を用いて頸動脈内腔を刺激することである。バルーンのすぐ上で、内部電極との距離2~3mmで長さ約10mmにわたり、2本のプラチナまたは銀のワイヤーをカテーテルに巻き付けた。

40

第II誘導心電図は特異的に増幅し、拍出量はオシロスコープ(Tektronix)を用いて連続的に監視し、評価のためにGould TA-2000サーマルアレイ・レコーダーで記録した。ヘパリン注入後1~12時間後、両方の頸動脈を切除し、液体窒素中で予冷しておいたイソペンタン中で直ちに急速冷凍した。動脈は、次に処理するまで-70にて保存した。

続いて動脈部分の横断面の凍結切片(10ミクロン)を作製した。動脈切片を含む顕微鏡スライドをZeiss共焦レーザー(アルゴン-クリプトン)走査顕微鏡(LSM 410 Invert)(495nmにて励起、515nmにて発光)下で観察し、蛍光のビデオ画像を得た(倍率40倍)。続

50

いて、市販のソフトウェア (Image 1:Universal Imaging Corp.) を用い、動脈壁の異なる深さで、ライン強度スキャン (Line Intensity Scan) による蛍光強度を分析することにより、対照と試験サンプルを比較した。

### 3. パルス刺激のプロトコール

損傷を与えないように管腔表面に対して置かれたプラチナまたは銀の双極電極を用いて頸動脈の管腔壁を刺激した。管腔表面のパルスによる活性化は、指数関数的パルス発生器 (Model ECM 600, Genetronics 社, San Diego, CAの一部門であるBTX) を用いて行った。50~60V振幅、パルス幅約500 $\mu$ sのパルスを4回60秒間にわたってかけた。このプロトコールを左右の頸動脈に適用した。

### 4. 観察およびデータ分析

頸動脈のパルス刺激中、頸部における軽い攣縮が見られたが、全実験期間にわたって、EK G力学において感知できる変化は認められなかった。

顕微鏡スライド標本では、(動脈壁の種々の層における) 動脈壁の緑色蛍光ヘパリンを明確に見ることができた。動脈壁の共焦走査画像は、対照および試験サンプル双方においてF-ヘパリンの浸透を示した。しかしながら、試験サンプルにおける蛍光強度の方がより強く、動脈壁のより深い領域へ到達していることが明らかであった (図2~図5)。

パルス電気刺激は、生理学的に正常な実験動物において、少量 (~50 $\mu$ g) のF-ヘパリンの動脈壁のより深い領域への効果的な導入を容易にする。ヘパリンは概して血管壁の中膜に存在するが、内膜にも存在する。しかしながら、この強度は外膜に近づくにつれ、顕著に低下する。内腔壁と接触する電極部のみが隣接する空間よりもより強い蛍光を示し得る。組織切片からは、内腔壁サンプルの組織切片のどの部分が電極と接触していたのかをいうことは不可能である。しかしながら、もし試験サンプルのうちのいくつかの切片がその他のものよりもより強い浸透度および強度を示した場合、それらの切片がおそらく内腔壁と接触した部分である可能性がある。また、もし両側の動脈のバルーンの膨張が同程度の内皮の露出を起こし、その変化がサンプル間でF-ヘパリンの浸透度を変え得る場合、蛍光画像は確認することができない。

図1は、前記実施例において使用されたカテーテルの概要図である。フルオレセイン化ヘパリンを用いる上での問題の1つは、組織サンプルのコラーゲンおよびエラスチンからのかなりの量の自己蛍光が存在することにある。絶対的な蛍光強度という点から言えば、これらは、ヘパリンのみによる血管壁中の蛍光の真のパターンを歪める傾向がある。しかしながら、本実施例では全ての場合において、相対蛍光強度は、常にパルスをかけない動脈よりもパルスをかけた処置血管で強かったことは明らかである。写真術に関しては、全ての写真は同倍率 (40倍) であり、明るさとコントラストは同一レベルに設定した (図2~図5)。すべてのエピフルオレスセンス画像は、Hamamatsu CCDカメラに取り付けたソニービデオモニターで監視した。

しかしながら、該サンプルを高いpH (9.0) で処理することにより、干渉性自己蛍光をかなり減らすか、または除去することさえも可能であった。図2~図5の写真は、血管内の局部送達ヘパリンが2時間以内に完全に洗い去られることを示す一方、パルスをかけた動脈におけるヘパリン送達は少なくとも12時間は維持されていたことを示している。

### 実施例 2

図6は、本発明の方法において有用な、導電性の銀塗装または同様の導電性部材をカテーテルの周囲に約2.5cmの長さを覆うように配した、他の構造のカテーテルを示している。該カテーテルのこの部分を銀製ワイヤーに取り付け、そのワイヤーを今度は発生器、例えばECM 600エキスポネンシャル発生器 (Genetronics社の一部門であるBTX, San Diego, CA) の一つの端子に接続する。第2の電極は好ましくはよりよい接触のためのゲルを用いて外部、すなわち腹筋上に置く (図6、剃毛部位)。この第2の電極はアノードとして働き、次に発生器のもう一方の端子に接続される。

カテーテルのもう1つの具体例は、2つのバルーンの間配置した1つの電極と、第2のカテーテルとして働くガイドワイヤーを有してなる。かかる構造は図7に示されている。このカテーテルは以下の実験において使用される。体重4kg以下の3匹のウサギをキシラ

10

20

30

40

50

ジン (0.1ml/kg) およびケタミン (0.5ml/kg 筋肉内投与) で麻酔した。全身麻酔は - クロロコース (30mg/kg 静脈内投与) により維持した。実施例 1 に記載したように、気管内挿管を行った。ウサギの片側の脚部の大腿動脈を露出させた。5F シースを導入し、X 線透視のガイドのもと、カテーテルを右または左頸動脈へ押し入れた。一連の X 線写真、図 8、パネル a~c は、成功したカテーテルの展開を示している (パネル a、挿入)。放射線コントラスト溶液を注入して (パネル b)、カテーテル位置、患者の動脈、バルーンおよび X 線不透過性の内蔵マーカー、並びに側鎖における色素の存在の確認を可能にした。バルーンの膨張の後 (パネル c)、1ml のフルオレセイン化ヘパリン (濃度 2ml に 1mg 溶解: 製造業者によるヘパリンの生物学的活性: 167U) を、薬物ポートを通して閉塞された部分との間に注入し、直ちにその動脈に膨張状態のバルーンによってパルスをかけた。最初に試験されたパラメーターは 60V 以下であり、各 600  $\mu$ s 以下のパルス長の 4 パルスであった。これらの設定下で、処置動脈においてごくわずかなヘパリンの取り込みが認められた。それに続く実験においては、電圧とパルス長は 57V と 22ms にそれぞれ変更した。以前のように、4 パルスを ECM600 パルスエクスポネンシャル発生器から送った。バルーンはカテーテルが引き抜かれた後直ちに収縮させたが、切開した大腿動脈からの出血を防ぐため、シースは後に残した。F-ヘパリン注入から 2 時間後、両動脈 (処置および反対側の未処置動脈) を処理のために取り出した。処置動脈の顕微鏡画像は、広範囲にわたるヘパリンの取り込みを示していた。動脈の蛍光画像は非常に強力であり、分離された動脈切片は不能であった。対照動脈もまた蛍光を示したが、視覚的にはそれはかなり微弱なものであった。ヘパリンは、対照動脈には送達されなかったにもかかわらず、処置動脈におけるヘパリンの注入からの全身循環があり、その一部分が対照動脈に取り込まれたことは明白である。加えて、コラーゲンおよびエラスチンによる蛍光もまた存在する。しかしながら、前記したような高 pH による自己蛍光の補正および処置動脈の蛍光から対照動脈の蛍光をコンピューターにより減じる方法の双方ともに、パルスをかけた動脈における F-ヘパリンの深い浸透と取り込みを示した。

同様のカテーテル (図 7 に表されているような) もまた、ウサギ頸動脈における遺伝子標識実験のために使用した。体重 3.5kg のニュージーランド白ウサギをケタミン / キシレンカクテル (筋肉内投与) により麻酔した。挿管は、1% ハロタンを用いて行った。中線切開の後、右総頸動脈を結紮絹糸を用いて分離した。動脈への最初のはさみの刻み目を入れた後、ガイドワイヤーを越えて、5F シースを右総頸動脈中に挿入した。014" シュナイダーガイドワイヤーを、該シースを通して左腸骨動脈中に置いた。エレクトロポレーション (EP) カテーテルを、ガイドワイヤーを越えて左腸骨動脈へ進めた。注入ポートを通した、膨張させたバルーンによる 50% コントラストの注入は、側枝を避けての配置をガイドした。注入スリーブに生理食塩水を流し、バルーンを 2 気圧で膨張させた。プラスミド (150  $\mu$ l) (CMV プロモーターによって作動する標準標識遺伝子 lacZ) を注入ポートに注入し、次いで生理食塩水を注入した。腸骨には BTX ECM 600 エクスポネンシャルパルス発生器によりパルスをかけた。76V および 758  $\mu$ s で、3 個のパルスを約 10 秒間隔で与えた。対照動脈に対しては、バルーンは収縮させ、ワイヤーは右腸骨へ設置した。その手順は前記した通りであるが、例外としてパルスは適用されなかった。滞留時間は 30 秒以下であった。この手順の後、バルーンは収縮させ、カテーテルとワイヤーは除去した。頸動脈は近位および遠位から挿入口まで結紮し、切開口は 2 層で閉じた。シースを設置した後に 1500 単位のヘパリンを投与した。

プラスミド DNA をウサギ腸骨動脈にエレクトロポレートし (前記したように、カテーテルは頸動脈を通して腸骨動脈まで誘導)、次いで 5 日後に動脈の標準 x-gal 処理を用い、遺伝子発現を確認した。これに対し、対照動脈は検出可能な遺伝子発現を示さなかった。

### 実施例 3

さらなる薬物送達試験のために、実施例 1 に詳細に記載されたものと同様のプロトコールが用いられる。40 匹のニュージーランド白ウサギをこれらの試験に使用する。本明細書に記載されたように、約 2 時間および 24 時間 (第 1 群) の時点で、バルーンカテーテルを用いて試験を行う。

10

20

30

40

50

各時点について第1群の20匹、10匹の動物を使用する。左および右の両動脈を、処置(T)および対照(C)として供する。これらは無作為に選択するが、TおよびCの数は同じである。指数関数パルスを送達する、前記した結果を得るために使用したECM 600パルス発生器もまた、これらの実験のために使用する。

BTX T820スクエアウェーブパルサーからのスクエアウェーブパルスを用いて10匹の動物を試験し、その後の試験のために2時間後に動脈を切除する。TまたはCとして使用する動脈は無作為抽出される。BTX T820はスクエアウェーブパルスを送達し、パルス数、電圧およびパルス長は調整することができる。電圧は約60Vで、パルスパラメーターは：40msごとに1Hzで4個のパルスを送達(in vitroにおけるラット血管平滑筋細胞の実験に基づく)。

スクエアウェーブパルスはある種の細胞に対してはより穏やかであることが知られている。この群において、処置および対照それぞれのカテゴリーの5つの動脈が使用される。バルーンの膨張ならびにパルス電場の適用による血管炎症反応も評価する。20匹のウサギを使用し、カテーテルは経皮的にまたは大腿部を小さく切開して挿入する。結果として処置動脈が20、対照動脈が20得られる。動脈は8時間後に処理する。指数関数パルスを送達するためにECM 600を使用する。本明細書で使用される管腔バルーンカテーテルは2個のバルーンの間1個の電極を有し、一方、ガイドワイヤーは第2の電極として働く(設計の一例)。X線透視ガイダンスのもとで、バルーンの膨張および収縮の様子の正確な調査を容易にするために、放射線不透過性の標識を適切な部位に付ける。電極は動脈と直接的には接触しないが、計算の結果より薬物送達のために十分な、動脈への電場浸透が示唆される。

前記のそれぞれの特定の目的のために、市販のソフトウェアパッケージEMP(Field Precision, Albuquerque, New Mexico)を用いて、電場プロットを作製する。この、ポアソンの式を解くパッケージは、有限要素法により数的に解くものである。初期パラメーターには、電極の形状寸法、動脈の内腔側および結合組織側からの抵抗および調査される電場の強さの範囲がある。

各場合において血管中に残存するヘパリンの量は、Molecular Probe社により推奨される手順に従って定量する。インスペック顕微鏡画像強度検定キットを用いる。最初に、キット中のビーズ(小球)で顕微鏡を検定し、フルオレセイン化ヘパリン溶液を100%小球のレベルまで平衡化する。あるいは、異なるサイズの小球のために、「小球ごとのフルオレセイン等価物(fluorescein equivalent per microsphere)」に利用可能な形状を使用することができる。

動脈壁からのコラーゲンおよびエラスチンによる自己蛍光を減少させるプロトコルを以下に示す：トリス緩衝化グリセロールを調製する(グリセロール90mlおよび0.5Mトリス-塩酸5ml、pH9.0)。この溶液19mlをガラス製シンチレーションバイアルに分取し、4にて保存する。2% n-プロピルガレート(npg:抗退色物質)を、トリス緩衝液を用いて用事調製し(npg 2mgおよび0.5Mトリス-塩酸1.0ml、pH9.0)、遮光保存する。2% npg溶液1mlを、19mlのトリス緩衝化グリセロールに加え、遮光保存する。この溶液は、動脈切片を顕微鏡ガラススライドに固定する際に用いる。この溶液が変色した場合には処分するよう注意する必要がある。全ての画像は液浸オイル(Plan-Neofluor対物レンズ)を用いて、倍率40倍で得る。写真に関しては全て、同一の明るさおよびコントラストを設定する。

以上、好ましい実施態様を参照して本発明を説明してきたが、本発明の思想を逸脱することなく種々の変更が可能であることが理解されるべきである。

従って、本発明は以下の請求の範囲によってのみ限定される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、管腔内カテーテルの略図である。

【図2】図2の上は、パルスしたウサギの動脈のフルオレセイン化ヘパリンのコンピューター画像であり、下は非パルス動脈のコンピューター画像である。

【図3】図3は、フルオレセイン化ヘパリン処理後の、ウサギの動脈の共焦点顕微鏡画像である。R 1 L 1は、左の動脈、パルス無し；R 1 R 1は、右の動脈、パルス有り；R 2 L 1は、左の動脈、パルス有り；そしてR 2 E 1は右の動脈、パルス無しを示す。

【図4】図4は、ヘパリン処理後の、ウサギの動脈の共焦点顕微鏡蛍光画像である。4 L 2は、左の動脈、パルス有り；4 R 2は、右の動脈、パルス無し；4 L 1は、左の動脈、パルス有り；そして1 L 3は左の動脈、パルス無しを示す。

【図5】図5は、ヘパリン処理後の、ウサギの動脈の共焦点顕微鏡蛍光画像である。1 2 R 1は、右の動脈、パルス有り、そして1 2 L 1は左の動脈、パルス無しを示す。

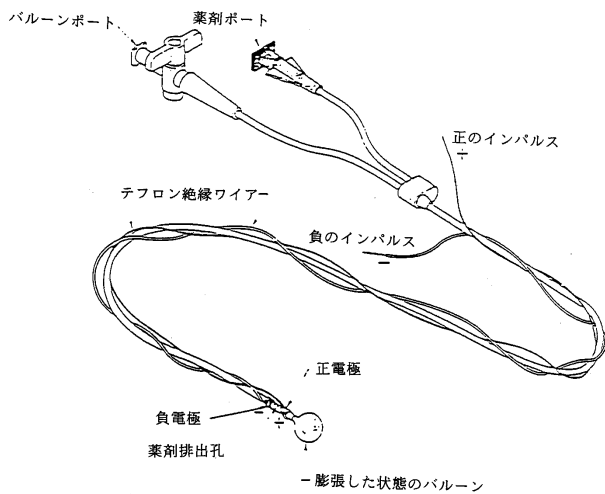
【図6】図6は、本発明の方法により処理したウサギの略図であり、カテーテルも示す。

【図7】図7は、本発明の管腔内電気穿孔法カテーテルの例の略図である。

【図8】図8のパネルa～cは、それぞれ頸動脈へのカテーテルの挿入（a）、放射性造影色素の注入（b）、およびバルーン膨張（c）のX線像を示す。

【図1】

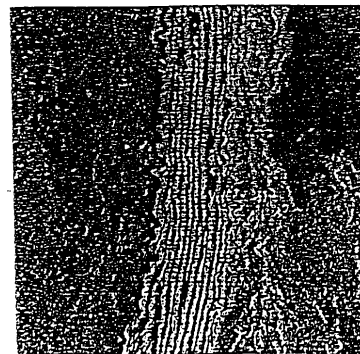
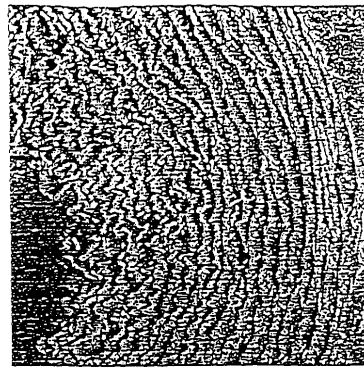
FIGURE 1



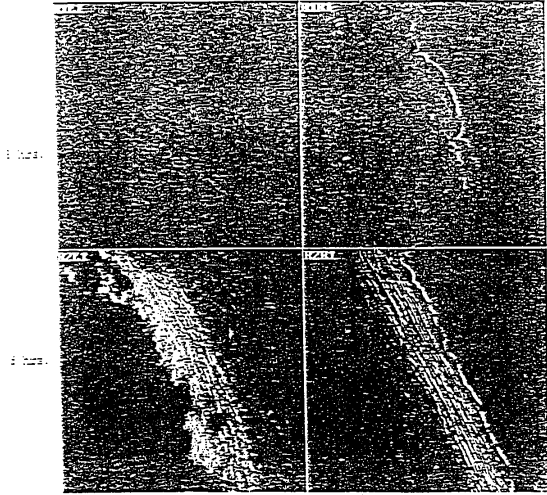
電気穿孔法介在薬物送達のための管腔内カテーテル

【図2】

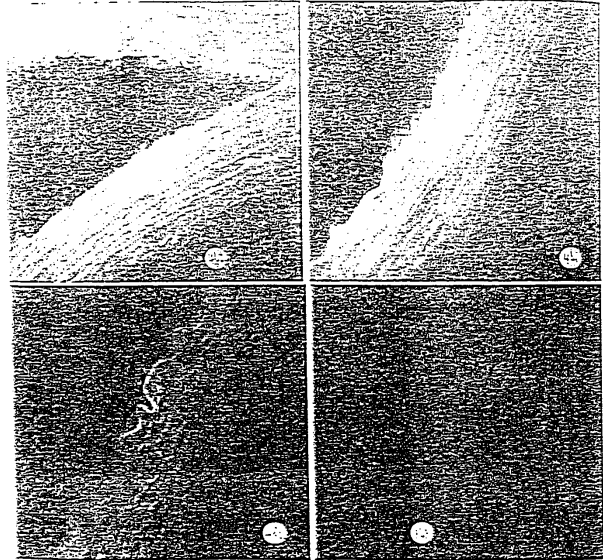
Fig. 2



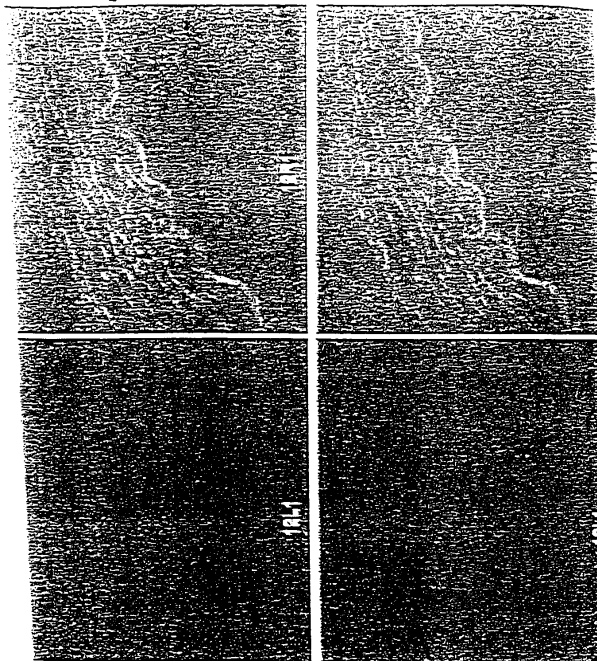
【 図 3 】



R1L1 : ヘパリン、パルス無し (左の動脈)  
 R1R1 : ヘパリン、パルス有り (右の動脈)  
 R2L1 : ヘパリン、パルス有り (左の動脈)  
 R2E1 : ヘパリン、パルス無し (右の動脈)

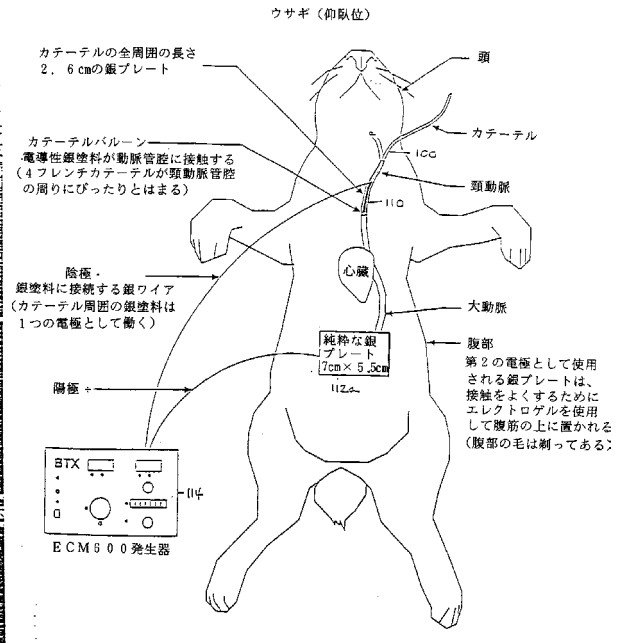


4L2 : ヘパリン、パルス有り (左の動脈)  
 4R2 : ヘパリン、パルス無し (右の動脈)  
 4L1 : ヘパリン、パルス有り (左の動脈)  
 1L3 : ヘパリン、パルス無し (左の動脈)



12R1 : ヘパリン、パルス有り、右の動脈  
 12L1 : ヘパリン、パルス無し、左の動脈

【 図 6 】



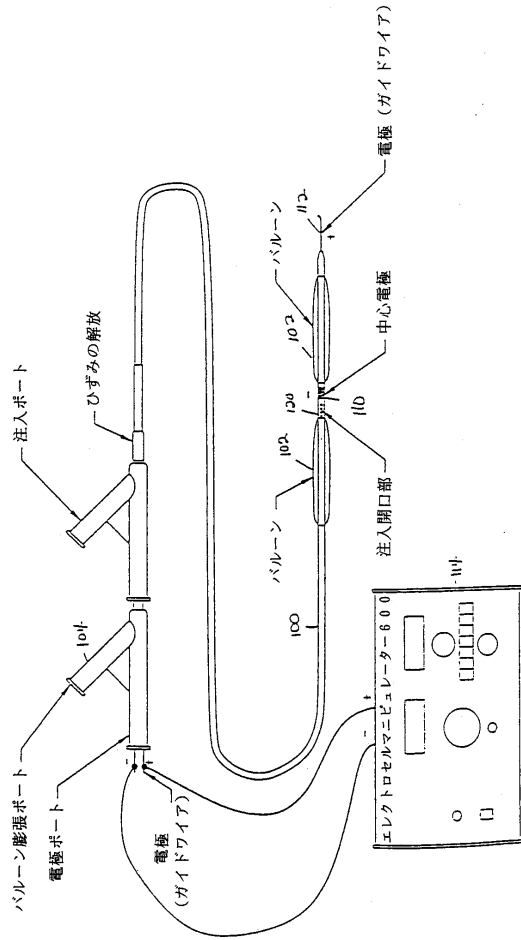
単極電極配置

FIGURE 6



【図7】

FIGURE 7  
管内電気穿孔カテーテル



【図8a】

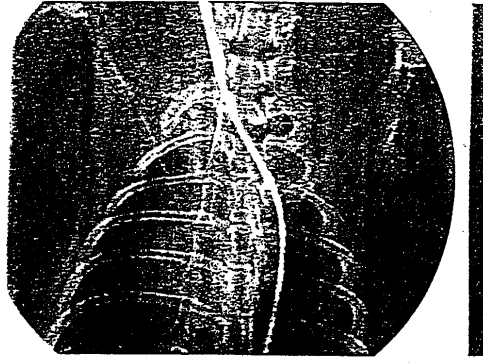


Figure 8a

【図8b】

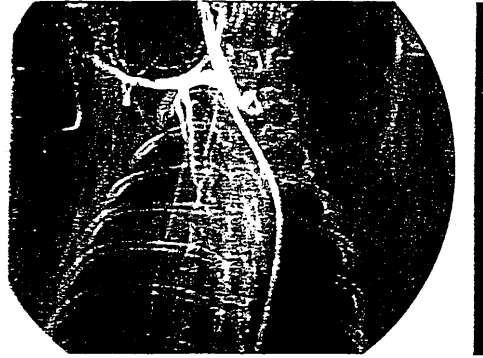


Figure 8b

【図8c】

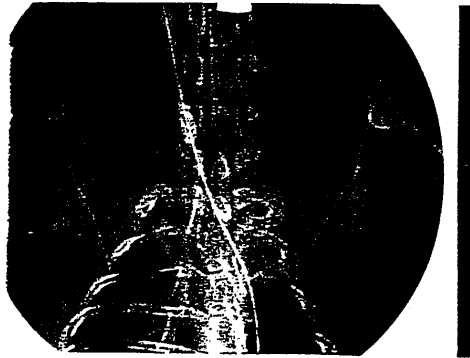


Figure 8c

---

フロントページの続き

- (72)発明者 デブ, サクヘンドゥ, ビー.  
アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州, サン ディエゴ, フィオアー テラス ナンバ  
ービー 2 1 5 5 2 0 5
- (72)発明者 デブ, ナジェンドゥ, ビー.  
アメリカ合衆国 4 4 1 0 6 オハイオ州, クリーブランド, ランドム ナンバー 6 2 0 6 5
- (72)発明者 ホフマン, グンター, エイ.  
アメリカ合衆国 9 2 1 0 9 カリフォルニア州, サン ディエゴ, リビエラ ドライブ ナンバ  
ー 6 3 7 5 0

審査官 内藤 真徳

- (56)参考文献 米国特許第0 5 3 0 4 1 2 0 (US, A)  
国際公開第9 5 / 0 1 9 8 0 5 (WO, A 1)  
国際公開第9 5 / 0 1 8 6 4 9 (WO, A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A61N 1/30