

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3574933号
(P3574933)

(45) 発行日 平成16年10月6日(2004.10.6)

(24) 登録日 平成16年7月16日(2004.7.16)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 L 24/00

F I

A 6 1 L 25/00

A

請求項の数 21 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平6-18912	(73) 特許権者	591007804
(22) 出願日	平成6年1月19日(1994.1.19)		メドトロニック・インコーポレーテッド
(65) 公開番号	特開平7-51353		アメリカ合衆国ミネソタ州55432, ミ
(43) 公開日	平成7年2月28日(1995.2.28)		ネアポリス, メドトロニック・パークウェ
審査請求日	平成13年1月19日(2001.1.19)		イ 7 1 0
(31) 優先権主張番号	08/006, 218	(74) 代理人	100069866
(32) 優先日	平成5年1月19日(1993.1.19)		弁理士 小林 十四雄
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	100091328
			弁理士 岡村 信一
		(72) 発明者	パトリック ティー. カーラン
			オランダ国 スケベルスガッツ 6 スタ
			イン ヴィエム 6 1 7 1
		審査官	油科 壮一
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 固体表面に生体分子を結合させるスペーサーを有する固体の製造方法及び固体表面に生体分子を共有結合させた固体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のステップからなる、表面に生体分子を結合させるスペーサーを有する固体の製造方法。

(a) 固体表面上へ、部分的に加水分解されたアクリルアミドをグラフト重合することによって、上記固体表面をアミノ化し、

(b) 該アミノ化された固体表面に、カルボジイミド結合により上記スペーサーを共有結合させ、

(c) 上記スペーサーを二官能価のアルデヒドにより活性化し、ポリアルキルイミンを結合させ、上記二官能価のアルデヒドにより架橋させる。

【請求項 2】

上記ポリアルキルイミンがポリエチレンイミンである請求項 1 の方法。

【請求項 3】

上記二官能価のアルデヒドが、グルタルアルデヒド、グリオキサール、マロンアルデヒド、琥珀酸アルデヒド、アジピン酸アルデヒド及びジアルデヒドデンプンからなるグループから選択される請求項 1 の方法。

【請求項 4】

上記ポリアルキルイミンに上記活性化されたスペーサーを接触させる請求項 1 の方法。

【請求項 5】

上記二官能価のアルデヒドを希釈水溶液中で加える請求項 1 の方法。

10

20

【請求項 6】

上記二官能価のアルデヒドを 0.0005～0.005M の濃度範囲とする請求項 5 の方法。

【請求項 7】

上記希釈水溶液が、pH 7～10 である請求項 5 の方法。

【請求項 8】

上記二官能価のアルデヒドによる活性化を水溶液中で行なう請求項 4 の方法。

【請求項 9】

上記二官能価のアルデヒドを 0.0005～0.005M の濃度範囲とする請求項 8 の方法。

10

【請求項 10】

上記希釈水溶液が、pH 7～10 である請求項 8 の方法。

【請求項 11】

上記スペーサー分子が少なくとも 1 つの第一アミン基を有する請求項 1 の方法。

【請求項 12】

上記スペーサー分子がジアミンとアミノエチルアルコールからなるグループから選択される請求項 11 の方法。

【請求項 13】

上記アクリルアミドを放射線グラフトによって固体表面上へグラフト重合させる請求項 11 の方法。

20

【請求項 14】

上記スペーサー分子の共有結合を以下のステップによって行う請求項 11 の方法。

(a) 部分加水分解によってグラフト重合された表面にカルボン酸基を添加し、

(b) カルボジイミド結合によって部分的に加水分解された表面に上記スペーサー分子を結合する。

【請求項 15】

上記ポリアルキルイミンに細胞接着性分子を結合させるステップを含む請求項 14 の方法。

【請求項 16】

細胞接着性分子がフィブロネクチンと RGD ペプチドからなるグループから選択される請求項 15 の方法。

30

【請求項 17】

上記細胞接着性結合を以下のステップによって行う請求項 15 の方法。

(a) 細胞性接着剤の溶液に処理されたポリアルキルイミンを接触させ、

(b) 接触している細胞性接着剤に弱還元剤を加える。

【請求項 18】

以下の要件からなり、請求項 1 ないし 17 のいずれかの方法で形成された固体であって、その表面に共有結合的に生体分子を結合させてなる固体。

(a) 上記固体表面に共有結合させたアクリルアミドのグラフト重合体を含む第 1 層、

(b) 架橋されたポリアルキルイミンを含み上記第 1 層に共有結合させた第 2 層。

40

【請求項 19】

上記第 1 層と上記第 2 層の間の上記共有結合が、共有結合的に上記第 1 層へ第 1 の終端で結合しかつ共有結合的に上記第 2 層へ第 2 の終端で結合したスペーサー分子を含む請求項 18 の固体。

【請求項 20】

上記生体分子が上記第 2 層に共有結合した請求項 18 の固体。

【請求項 21】

上記生体分子が細胞接着性分子である請求項 20 の固体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

50

【産業上の利用分野】

この発明は、活性化した表面にカルボキシ基を結合することによって種々の表面の生体適合性を増強する方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

人間の体内或いは体表面において使用する代用血管、合成の眼球内レンズ、電極、カテーテル等、或いは体外の装置として人体に接続して手術や透析を援助する医療用装置がよく知られている。しかしながら、医療用装置中での上記のような生体材料の使用が、急速なトロンボゲンの作用のような不利な人体反応を刺激することがある。種々の血漿たんぱくは、可塑性の表面で血小板と線維素析出を開始させる役割をする。これらの作用が血流を妨げるために、血管の収縮をもたらし、後に続く炎症性反応が、医療用装置の機能の減少をもたらす。

10

【0003】

「生体材料」は、体液に対してほぼ完全に不溶性であり、人体内或いは体表面上に置くか、体液に接触するように考えられかつ製造される材料として定義される。理想的には、生体材料は、血液凝固、組織死亡、腫瘍形成、アレルギー反応、異物反応（拒絶反応）、炎症性反応のような人体内で望ましくない反応を誘発せず、意図した目的のために機能するように必要とされた強度、弾性、透過性、適応性のような物理的性質を持ち、容易に浄化、製造、滅菌でき、人体に皮下埋設されてかなり時間に渡りその物理的性質と機能を保持するものである。

20

【0004】

ここで使用されているように、もし生物にとってまさに有益な効果を有する生物学的な液体及び／又は組織と接触して機能する能力があれば、生体材料の固体表面は「生物学的適応性」を有するものとして特徴付けられる。長期の生体適合性は、宿主有機体の障害を減少させるために望まれる。生体材料のための改良された生体適合性への1つのアプローチはそれが正常の細胞層の結合と発育を促進し、人体が細胞結合素子を人体の正常の部分として受け入れるようにすることである。素子表面に結合された発育因子と細胞結合プロテインのような生体分子が、この目的に使用できる。それに加えて、抗トロンボゲン剤、血小板凝集抑制剤及び消炎剤等のような生体分子を、表面の生体適合性を改良するために使用できる。

30

【0005】

そのような生体分子を結合するために多くのアプローチが提案されてきた。1つのそのようなアプローチが、Dekker氏等の「Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum protein on gas plasma-treated polytetrafluoroethylene」(Biomaterials誌、第12巻(1991年3月12日発行)に記載されている。このアプローチは、PTFE基質を表面の湿潤性を改良するために、高周波プラズマによって変性するものであった。ヒト血清アルブミン、ヒトフィブロネクチン、ヒト免疫グロブリン及びヒト高密度リポタンパク質は、ヒト内皮細胞への播種に続いてプラズマ処理された基質に吸収される。別のアプローチが、Hoffman氏等の米国特許第5,055,316号に開示されており、アルブミン、免疫グロブリン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、プロテイン-A或いは糖タンパク質などの漿液プロテインを、プラズマ析出表面を与えるためにまずプラズマ重合可能フッ素化炭化水素ガスの存在下でプラズマガス放電を使用して表面に結合させ、次いでプロテイン溶液へさらすようになっている。また例えば、そのような生体分子の共有結合形の結合が、Ito氏等の論文「Materials for Enhancing Cell Adhesion by Immobilization of Cell-Adhesive Peptide」(Journal of Biomedical Materials Research誌、第25巻、1325-1337頁、1991年発行)に記載されており、ここではフィブロネクチン或いはRGDペプチドを水溶性カルボジイミドを使用して結合さ

40

50

せている。しかしながらこれらの方法は、生体材料表面に密接に生体分子を固定し、従って、例えば、生体分子に付着させようとする細胞との相互作用のための生体分子の利用可能性を減少させる。

【0006】

スパーサー分子がこの問題のために使用されていた。スパーサー分子は、固体表面に結合可能な分子或いは化合物であり、上記表面の表面から突きだし、生体分子を固定できる。スパーサーは生体分子の活性部位を支持材から外側へ向けて保持し、能率的に体液に接触させる。スパーサーは、それは分子の終端に対向して位置する少なくとも2つ反応性官能基を有する有機的な分子から得る。そのような基は、結合能力がある結合媒体として固体表面へのそして生体分子へのスパーサーの役目を果たす。例えば、N a r a y a n a n 氏等の米国特許第5, 132, 108号では、共重合体表面を水蒸気プラズマ媒体の存在下で高周波電場にさらすことによって高周波プラズマ処理を行なっている。ポリエチレンイミン (P E I) と1-(3-ジメチルプロピル)-3-カルボジイミド (E D C) カップリング剤の水溶液が、高周波プラズマ放電変性ポリウレタン表面に加えられる。それから、表面に抗トロンボゲン剤を固定した高分子物質の表面とするために、ヘパリンの水溶液とE D CがP E I処理した表面に加えられる。しかしながら、そのようなスパーサー分子を皮下埋設された医療用装置の表面に取り付けると、その表面が不安定性になり、そしてスパーサー層中の結合された生体分子が埋め込まれる公算が増し、また装置の取扱や皮下埋設につれて表面に損傷を生じさせてしまうものとなっていた。

【0007】

補助的安定の供給が、例えばG o l a n d e r氏等の米国特許第4, 565, 740号やL a r s氏等の米国特許第5, 049, 403号に開示されている。米国特許第4, 565, 740号では、高分子物質の陽イオン界面活性物質(ポリアルキルアミン)とジアルデヒド(グルタルアルデヒド)の複合体を支持材料の上へ吸着させる。米国特許第5, 049, 403号では、ポリアミンを基質表面に吸着させ、クロトンアルデヒドで架橋している。しかしながら、これらの架橋されたコーティングは、表面への吸着と表面へのイオン化結合に基づき、表面への十分なコーティングの結合ができていなかった。陰イオンの物質の中間の層を含む複数のコーティングが、有効なコーティングとするために必要であろう。

【0008】

それゆえに本発明は、取り扱いの間と皮下埋設可能な医療用装置の皮下埋設のために改良された安定性を有するスパーサーの生体分子との結合表面を供給することを目的とする。また本発明は、生体分子の結合のために安定したプラットフォームとなり、それによってスパーサー層に結合生体分子が埋もれてしまうことを防ぐことが可能なスパーサーを供給することを目的とする。さらに本発明は、素材表面に強く結合させ得るスパーサーを供給することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

我々は改良されたスパーサーとその製造方法を発明した。スパーサーは、アミノ化された基質、アミノ化された基質に共有結合的に結合させるポリアルキルイミン、そしてアルデヒド基中において少なくとも二官能価の架橋剤からなる、例えば、ポリアルキルイミンはポリエチレンイミンであり、架橋剤はグルタルアルデヒドである。このスパーサーは、固体表面にポリアルキルイミンを加え、それからアルデヒド基中で少なくとも二官能価の架橋剤と一緒に加えられたポリアルキルイミンを処理することによって製造できる。好ましくは、ポリアルキルイミンの架橋結合に使用される架橋剤は、稀釈溶液中に加えられ、適当なp Hでポリアルキルイミンの軽架橋をなし、また十分なアルデヒド結合と共に生体分子とポリアルキルイミンの間の界面で結合させた生体分子と軽架橋をなすものとする。ポリアルキルイミンは、例えば、少なくとも2つのアルデヒド基を含む活性剤と共に固体表面でアミン基と接触することによって固体表面を活性化し、そしてポリアルキルイミンと共に活性化された表面に接触することによって、共有結合的に固体表面に結合される。も

し所望であるならば、ポリアルキルイミンを共有結合するために使用された活性化剤は、ポリアルキルイミンを架橋するために使用された架橋剤と同一とすることができる。活性化される固体表面上のアミン基の濃度がアルデヒド活性化剤に対して不十分な場合、アミン含有化学成分を公知の方法で表面にグラフト重合することによってそのようなアミン基を供給できる。

【0010】

本発明の他の態様においては、固体表面へポリアルキルイミンを共有結合させる方法が使用され、この方法では、表面から突出する少なくとも1つの第一級或いは第二級アミン基を有する第2スペーサー分子を固体表面に結合させ、アルデヒド基中で少なくとも二官能価である活性化剤とともに第2のスペーサー分子にアミン基を接触させることによって第2のスペーサーを活性化させ、活性化したスペーサーをポリアルキルイミンに接触させる。この第2のスペーサー分子は、例えばジアミンかアミノエチルアルコールである。スペーサー分子は、当業者に公知のいかなる方法でも固体表面に結合できる。結合の望ましい方法では、第一に活性化した表面がグルタルアルデヒドのようなアルデヒド活性化剤との接触によって活性化され、続いて活性化された表面をジアミンスペーサーに接触させて表面にジアミンを結合し、表面から突出するアミン基を供給する。

10

【0011】

好ましい実施例では、本発明のスペーサー分子は、固体表面に細胞接着性の分子を結合するために使用される。第一にポリアルキルイミンが固体表面に印加されて、アルデヒド基中で少なくとも二官能価の架橋剤で処理される。それから細胞接着性分子は、処理されたポリアルキルイミンに結合される。例えば細胞接着性分子は、細胞接着性を改良するためによく知られているフィブロネクチンかRGDペプチドである。架橋されたポリアルキルイミンスペーサーの効果は、細胞接着性分子がグラフトに埋もれて生体活性を失うことを防ぐことである。さらに、ポリアルキルイミンと細胞接着性分子層の2つの層は混合しないように親水性に差がある。細胞接着性結合は、好ましくは細胞接着剤の溶液で処理されたポリアルキルイミンと接触させ、細胞接着剤にシアノボロボランのような弱還元剤を印加することによって完結される。還元剤と細胞接着剤は処理されたポリアルキルイミンにも同時に加えることができる。この弱還元処理の効果は、架橋剤のアルデヒド基と細胞接着剤のアミン基とポリアルキル基スペーサーの間の不安定な化学結合を安定化することである。

20

30

【0012】

本発明では、アルデヒド基で少なくとも二官能価のポリアルキルイミンと架橋剤が共有結合的にアミノ化された表面に結合される。それらは固体表面の生体適合性を改良するスペーサーを供給するために採用されたものである。生物学的適応性を与えられた固体表面は、合成或いは自然の材料で、生理的な液体に不溶性であって、そして第一級或いは第二級アミン基を含むものが望ましい。表面は、生物の組織及び／又は液体と接触して機能するために作られている素子の一個以上の表面である。この素子の固体表面のための基質は、例えば磨かれたチタンかステンレス鋼のような種々の適当な金属、或いはポリウレタン、ポリビニルピロリドン、シリコーンエラストマー、ポリエチレン、ポリプロピレンなどのポリオレフィン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、フルオロポリマー、ポリアクリレート（ポリメタクリレートを含む）のようなポリマー、無機質或いは水酸化リン灰石などのセラミックス、骨、皮膚、歯などの人間や動物組織、木材、繊維素、圧縮炭素などの有機物質そしてガラス、ゴム、木材などの他の自然の及び合成の材料である。この発明に従って生物学的適応性表面と共に供給され得る素子には、人工血管、分離管や膜、血液酸素付加器管や膜、限外濾過膜、大動脈内バルーン、血液嚢、カテーテル、縫合、柔軟な或いは剛性の組織人工補装具、合成人工補装具、人工臓器、そしてコンタクトレンズのような目のために水晶体を含む。

40

【0013】

例えばポリアルキルイミンは、ポリエチレンイミンか他の枝分れポリアミンである。ポリアルキルイミンによって、アジリジンとアゼチジンモノマーから放出される、例えば1-

50

非置換イミン、1-置換塩イミン、活性イミン、(1-アシル置換イミン)、異性体のオキサゾリン/オキサジン等の水溶性親水性ポリアミンを含む。本発明で採用するポリアルキルイミンは、極めて好ましくは枝分れしたもので、それによって第一級と第二級と第三級アミン基を有する。従って本発明では、単独で或いはエチレンイミンとの共重合化に適する他のモノマーと伝統的な陽イオンの連鎖生長反応重合作用によって重合させたエチレンイミンを使用できる。

【0014】

本発明で採用する架橋剤は、アルデヒド基中で少なくとも二官能価のいかなる架橋剤でもよい。例えば、グルタルアルデヒド、グリオキサール、マロンアルデヒド、琥珀酸アルデヒド、アジピン酸アルデヒド及びジアルデヒドデンプンを使用できる。それゆえに本発明のスペーサーは、架橋剤と共に固体表面にポリアルキルイミンを加え、加えられたポリアルキルイミンを処理することによって製造できる。好ましくは、ポリアルキルイミンの架橋結合に使用される架橋剤は、稀釈溶液中加入され、適当なpHでポリアルキルイミンの軽架橋をなし、ポリアルキルイミン表面にアルデヒド機能性を供給し、生体分子がスペーサーに容易に結合するのを許す。例えば、およそ0.0005~0.05Mの範囲の濃度を有するアルデヒド溶液を使用できるが、およそ0.0005~0.005Mの範囲の濃度が望ましい。また例えば、アルデヒド溶液のpHはおよそ7~10の範囲が望ましい。軽架橋反応を完結させるのに要する時間は、一般的には2、3分である。

【0015】

ポリアルキルイミンは、例えば、アルデヒド基中で少なくとも二官能価の活性剤を有する固体表面上のアミン基との接触によって固体表面を活性化し、そしてポリアルキルイミンを有する活性化された表面と接触することによって共有結合的に固体表面に結合される。もし所望であるならば、ポリアルキルイミンを共有結合するために使用された活性化剤は、固体表面に印加されたあとのポリアルキルイミンを架橋するために使用された架橋剤と同一とすることができる。その場合には、共有結合を行なうための処置は、活性化された表面上の十分なアルデヒド機能性の存在を確実にするために使用されたアルデヒド濃度及び/又は反応時間がより大きく或いは長くなる点を除き、上述の架橋反応のために必要な処置と事実上同一である。活性化される固体表面上のアミン基の濃度がアルデヒド活性剤に対して不十分な場合、例えばアクリルアミドを公知の方法で表面にグラフト重合し、続いて化学的改質によってアミン基を添加することによって、そのようなアミン基を供給できる。ポリビニールアミンかポリアルキルイミンは、Solomon氏等への米国特許第4,521,564号に開示された方法でポリウレタンに共有結合させることができる。また例えば、アミノシランは、Pinchuk氏の米国特許第5,053,048号に開示されているように結合させることができる。また例えば、グラフト重合されたアクリルアミド含有ポリマーは、Hoffman氏等の米国特許3,826,678号に開示されているように放射線グラフトで結合させることができる。

【0016】

本発明の他の実施例においては、固体表面へポリアルキルイミンを共有結合させる方法が使用され、この方法では、表面から突出する少なくとも1つのアミン基を有する第2のスペーサー分子を固体表面に結合させ、アルデヒド基中で少なくとも二官能価である架橋剤とともに第2のスペーサー分子にアミン基を接触させることによって第2のスペーサーを活性化させ、活性化したスペーサーをポリアルキルイミンに接触させる。スペーサーは、反応可能な少なくとも2つの基を含む物質で、どちらか1つがアミン基である。2つの基が使用されると、直鎖が形成される。反応可能な基を三個以上含む物質が含まれるとき、分子鎖は枝別れする。この目的のために特に適当な物質は、芳香族或いは脂肪族の飽和或いは不飽和ジアミン、アミノエチルアルコール或いはアミノチオールである。明らかに第2のスペーサーのために選ばれる物質は、疎水基を含むべきではない。短い鎖長と2つの基を含有している反応可能な飽和脂肪族炭化水素が望ましい。例えば、ジアミン、エチレンジアミン、テトラメチレンジアミン或いは1,5-ジアミン-3-アザペンタンを使用できる。スペーサー分子は、当業者に公知の方法で固体表面に結合できる。結合の望ま

10

20

30

40

50

しい方法では、第一に活性化した表面がアルデヒド活性化剤との接触によって活性化され、続いて活性化された表面をジアミンスペーサーに接触させて表面にジアミンを結合し、表面から突出するアミン基を供給する。アルデヒド活性化剤と処置は、上述と同一である。

【0017】

本発明のポリアルキルイミンスペーサーは、固体表面に細胞接着性の分子或いは他の生体分子を結合するために使用される。生体分子は、生体材料の生体適合性を改良するために生体材料の固体表面に結合させることができるものであればいかなるものでもよい。生体分子は、内皮細胞発育因子、上皮細胞発育因子、骨芽細胞発育因子、繊維芽細胞発育因子、血小板由来発育因子、神経性の発育因子或いは血管形成発育因子のような発育因子、或いはリゾチーム或いはペニシリンのような抗菌物質、ヘパリン、分別されたヘパリン（例えばA T - I I I 列で）、ヘパラン、ヘパラン硫酸塩エステル、コンドロイチン硫酸塩エステル、変性デキストラン、アルブミン、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン賦活物質（T P A）、或いはウロキナーゼのような抗トロンボゲン剤フィブロンネクチンやラミニンのような細胞結合プロテイン、コラーゲンのようなトロンボゲン物質、或いはヒアルロン酸、キトサン、メチルセルロースのような親水性ポリマー、及び他のプロテイン、炭水化物、脂肪酸であり得る。好ましい実施例で生体分子は、細胞接着性分子である。

【0018】

第一にポリアルキルイミンが固体表面に印加されて、アルデヒド基中で少なくとも二官能価の架橋剤で処理される。それから細胞接着性分子は、架橋されたポリアルキルイミンに結合される。例えば細胞接着性分子は、細胞接着性を改良するためによく知られているフィブロンネクチンかR G D ペプチドである。架橋されたポリアルキルイミンの効果は、細胞接着性分子がグラフトに埋もれて生体活性を失うことを防ぐことである。さらに、ポリアルキルイミンと細胞接着性分子層の2つの層は混合しないように親水性に差がある。細胞接着性結合は、好ましくは細胞接着剤の溶液で処理されたポリアルキルイミンと接触させ、細胞接着剤にシアノボロボランのような弱還元剤を印加することによって完結される。この弱還元処理の効果は、架橋剤のアルデヒド基と細胞接着剤のアミン基とポリアルキル基スペーサーの間の不安定な化学結合を安定化することである。それから内皮細胞は公知の方法で細胞接着性コート面に接種される。

【0019】

【実施例】

以下の例は、本発明の特定の実施例である。

【0020】

【実施例1】

ポリウレタンサンプルを、グラフト重合されたアクリルアミド表面に供給した。サンプルは、S h e r m a n T r e a t e r s コロナ試験機（型式H T 3）を使用してコロナ処理した。処理されたシートは、アクリルアミド溶液100 g 毎に1.75 ml のセリウムイオン溶液（水に13.7 g のセリウム硝酸と15.75 g の発煙硝酸（C A N）を混合して250 ml の水溶液とした）を加えて攪拌した脱泡していないアクリルアミドの40重量%溶液に入れた。試験試料はそれから、モノマー溶液と室温で1時間に渡って反応させた。その後、試験試料をモノマー溶液から取り除いて、徹底的に脱イオン水ですすいだ。それから、緩く結合されたポリマー分子鎖を取り除くために、試験試料を60℃の水の中一晩培養した。それからグラフト重合されたゲルでカルボン酸基を添加するために、サンプルを60℃において3時間に渡って0.2 M の炭酸塩緩衝液（p H = 10.5）に浸した。

【0021】

【実施例2】

実施例1で述べたような部分的に加水分解されたアクリルアミドグラフト重合されたポリウレタンサンプルに、第1のスペーサー分子をカルボジイミド結合によって共有結合させた。スペーサー（0.5モル濃度のエチレンジアミン）を含む緩衝液（0.5 M の4-モ

10

20

30

40

50

ルホルノエタンスルホン酸、 $\text{pH} = 5.0$) 中にサンプルを入れた。 0.05 M 濃度に達するまで、水溶性カルボジイミド (1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩) を加えた。試験試料は振り混ぜられ、そして室温で30分間溶液中で反応させた。それから溶液を静かにデカンターに移し、サンプルを徹底的に脱イオン水と 0.2 M の酢酸エステル緩衝剤 ($\text{pH} = 4.6$) と 1 M の NaCl ですすぎ、脱イオン水で再びすすいだ。

【0022】

【実施例3】

実施例2により製造した試験試料を、共有結合させたエチレンジアミンスペーサーを活性化するために処理した。試験試料は、二官能価のアルデヒド (グルタルアルデヒド、 0.5 重量%濃度、 $\text{pH} 9.0$) の 0.1 M ホウ酸塩緩衝溶液に入れた。試験試料を溶液内で振り混ぜ、そして室温で1時間反応させた。それから溶液をデカンターに移し、サンプルを徹底的に脱イオン水で水洗した。

【0023】

【実施例4】

実施例3により活性化された試験試料に、ポリアルキルイミンのコーティングを施した。試験試料は、二官能価のポリアルキルイミン (ポリエチレンイミン、 1 重量%濃度、 $\text{pH} 9.0$) の 0.1 M ホウ酸塩緩衝溶液に入れた。試験試料を溶液内で振り混ぜ、そして室温で15分反応させた。それから溶液をデカンターに移し、サンプルを徹底的に脱イオン水で水洗した。

【0024】

【実施例5】

実施例4により製造されたポリアルキルイミンを結合させた試験試料を、二官能価のアルデヒドを有する弱架橋/活性化処理剤にさらした。試験試料は、二官能価のアルデヒド (グルタルアルデヒド、 0.05 重量%濃度、 $\text{pH} 9.0$) の 0.1 M ホウ酸塩緩衝溶液に入れた。試験試料を溶液内で振り混ぜ、そして室温で15分反応させた。それから溶液をデカンターに移し、サンプルを徹底的に脱イオン水で水洗した。

【0025】

【実施例6】

実施例5により製造された架橋/活性化したポリアルキルイミンスペーサーを持つ試験試料を細胞接着性分子に結合させた。 0.01 g の親和物質 (4.556 重量%フィブロネクチン) を、 1 ml の脱イオン水に溶解させた。親和物質溶液に、リン酸塩緩衝された食塩水 7 ml (PBS : 脱イオン水 $1,000 \text{ ml}$ 中に、 NaCl 9.0019 g 、 KH_2PO_4 1.1833 g 、 NaH_2PO_4 4.3195 g 、 $\text{pH} = 7.27$) を加えて混合した。この溶液の 1 ml を、試験試料の表面を湿潤させるために使用した。それから表面を室温において45分間培養した。サンプルは、徹底的に脱イオン水で水洗した。

【0026】

【実施例7】

実施例6により細胞接着性分子と結合した試験試料を、弱還元によって安定化させた。フィブロネクチンでコーティングした試験試料を、弱還元剤 (0.1 M のナトリウムシアノボロボラン、 $\text{pH} 4.62$) からなる 0.2 M の酢酸エステル緩衝溶液に入れた。試験試料を溶液内で振り混ぜ、そして室温で1時間反応させた。そして、試験試料を十分な量の脱イオン水ですすぎ、それは 0.075 重量%の NaN_3 を含む $\text{pH} = 6.8$ の 0.2 M リン酸塩緩衝液中に室温で貯蔵した。

【0027】

【発明の効果】

本発明方法及び基質は、皮下埋設可能な医療用装置等の装置の取り扱いの間と皮下埋設のために改良された安定性を有しかつ生体分子の結合のために安定したプラットフォームとなるスペーサーの生体分子との結合表面を実現でき、それによってスペーサー層に結合生体

10

20

30

40

50

分子が埋もれてしまうことを防ぐことを可能とするという効果がある。

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平06-239943 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61L 25/00