

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-536403
(P2024-536403A)

(43)公表日 令和6年10月4日(2024.10.4)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/28 (2006.01)	A 6 1 L 27/28	4 C 0 8 1
A 6 1 L 17/14 (2006.01)	A 6 1 L 17/14	1 0 0
A 6 1 L 27/52 (2006.01)	A 6 1 L 27/52	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全27頁)			
(21)出願番号	特願2024-520991(P2024-520991)	(71)出願人	521509608
(86)(22)出願日	令和4年10月6日(2022.10.6)		バイオコンパティビリティ・イノベーション・ソチエタ・ア・レスポンサビタ・リミタータ
(85)翻訳文提出日	令和6年5月31日(2024.5.31)		BIOCOMPATIBILITY I
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/059550		NNOVATION SRL
(87)国際公開番号	WO2023/057947		イタリア、イー35042エステ (パドヴァ)、ヴィア・ロレンツォ・デ・アン
(87)国際公開日	令和5年4月13日(2023.4.13)		トーニ17/19
(31)優先権主張番号	21201230.6	(74)代理人	100145403
(32)優先日	令和3年10月6日(2021.10.6)		弁理士 山尾 憲人
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100156144
(31)優先権主張番号	63/252,728		弁理士 落合 康
(32)優先日	令和3年10月6日(2021.10.6)	(74)代理人	100103230
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 高山 裕貢
(31)優先権主張番号	102021000025796		
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 特に心臓プロテアーゼの表面を調製する方法

(57)【要約】

「特に心臓プロテアーゼの表面を調製する方法」
本発明は、生体液と接触されるプロテアーゼの初期の能動的変性および受動的変性を防止する方法を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体液と接触される表面を処置する方法であって、前記表面を、フェノール性化合物またはフェノール性化合物の混合物を含む溶液と接触させる工程を含む方法。

【請求項 2】

前記表面が、医療機器の表面である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記表面が、生物学的プロテアーゼの表面である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記表面が、心臓プロテアーゼまたは心臓弁または心膜組織パッチまたは外科用心臓弁の表面である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記生体液が、血液、血清、血漿、硝子体ゲル、涙、尿、唾液、大便、滑液、腹膜液、心膜液、胸膜液および羊水を含む群から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記フェノール性化合物または前記フェノール性化合物の混合物が、フェノール、フェノールアルデヒド、フェノール酸、フェニルアミン、フェノール性化合物、フラボノイド、フェニルプロパノイドおよびタンニンを含む群から選択される、前項の請求項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記フェノール性化合物または前記フェノール性化合物の混合物が、バニリン、ケイ皮酸、フェニルアラニン、クマリン、キサントン、カテキン、フラボノン、フラボン、カルコン、フラバノノール、フラバノール、ロイコアントシアニジン、アントシアニジン、ヒドロキシケイ皮酸を含む群から選択される、前項の請求項に記載の方法。

【請求項 8】

前記フェノール性化合物または前記フェノール性化合物の混合物が、レスベラトロール、アロイン、シナリン、エピガロカテキン、タンニン酸、コーヒー酸、クロロゲン酸、ヒドロキシチロソール、ロスマリン酸、ナリンゲニン、没食子酸、ヘスペリチン、キナ酸、エレノール酸、ピノレジノール、ルテオリン、アピゲニン、タンゲレチン、イソラムネチン、ケンフェロール、ミリセチン、エリオジクチオール、ヘスペレチン、ナリンゲニン、テアフラビン、テアルビジン、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、プテロスチルベン、デルフィニジン、マルビジン、ペラルゴニジン、ペオニジン、チコリ酸、フェルラ酸、サリチル酸を含む群から選択される、前項の請求項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記表面を、前記フェノール性化合物または前記フェノール性化合物の混合物の溶液と 2 時間未満の時間接触させる工程を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

第 1 の接触工程および第 2 の接触工程を含み、該第 1 の接触工程と第 2 の接触工程との間に洗い流し工程が行われる、前記請求項いずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、ケルセチンまたはゲニピンを含む群から選択される 1 つまたはそれ以上の化合物による前処置工程を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記前処置工程が、リン脂質の除去をさらに含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記前処置工程が、キャッピング剤の使用を含む準備工程をさらに含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 14】

適切な構造的生体力学性質を保持および維持する方法、処置された表面の適切な生理学的血行力学および流体力学性質を維持するための保護方法、処置された表面を殺菌するための抗微生物および抗ウイルスの方法の1つまたはそれ以上である、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

請求項1～14のいずれか一項に記載の方法により得られる、生体液と接触される表面。

【請求項 16】

請求項15に記載の表面を含む医療機器または生物学的プロテアーゼ。

【請求項 17】

心臓弁、腱、靱帯、心膜、筋膜、硬膜、鼓膜、腸粘膜下組織、軟骨、脂肪組織および骨組織、骨盤組織、腹部組織、乳房組織および真皮組織を含む群から選択される、前項の請求項に記載の医療機器。

【請求項 18】

請求項16に記載の医療機器または生物学的プロテアーゼの使用を含む、疾患を処置する方法。

【請求項 19】

前記疾患が、心臓疾患である、請求項18に記載の疾患を処置する方法。

【請求項 20】

前記疾患が、ヒトまたは動物における疾患である、請求項18または19に記載の疾患を処置する方法。

【請求項 21】

バルブ・イン・バルブアプローチを含む、請求項18～20のいずれか一項に記載の疾患を処置する方法。

【請求項 22】

生体液と接触される表面を処置するための殺菌方法であって、前記表面を、フェノール性化合物またはフェノール性化合物の混合物と接触させることを含む方法。

【請求項 23】

前記表面が、医療機器の表面である、請求項22に記載の殺菌方法。

【請求項 24】

前記表面が、生物学的プロテアーゼの表面である、請求項22または23に記載の殺菌方法。

【請求項 25】

前記表面が、心臓プロテアーゼまたは心臓弁または心膜組織パッチまたは外科用心臓弁の表面である、請求項22～24のいずれか一項に記載の殺菌方法。

【請求項 26】

前記生体液が、血液、血清、血漿、硝子体ゲル、涙、尿、唾液、大便、滑液、腹膜液、心膜液、胸膜液および羊水を含む群から選択される、請求項22～25のいずれか一項に記載の殺菌方法。

【請求項 27】

前記フェノール性化合物または前記フェノール性化合物の混合物が、フェノール、フェノールアルデヒド、フェノール酸、フェニルアミン、フェノール性化合物、フラボノイド、フェニルプロパノイドおよびタンニンから選択される、前項の請求項に記載の殺菌方法。

【請求項 28】

前記フェノール性化合物または前記フェノール性化合物の混合物が、バニリン、ケイ皮酸、フェニルアラニン、クマリン、キサントン、カテキン、フラボノン、フラボン、カルコン、フラバノノール、フラバノール、ロイコアントシアニジン、アントシアニジン、ヒドロキシケイ皮酸を含む群から選択される、前項の請求項に記載の殺菌方法。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

前記フェノール性化合物または前記フェノール性化合物の混合物が、レスベラトロール、アロイン、シナリン、エピガロカテキン、タンニン酸、コーヒー酸、クロロゲン酸、ヒドロキシチロソール、ロスマリン酸、ナリングニン、没食子酸、ヘスペリチン、キナ酸、エレノール酸、ピノレジノール、ルテオリン、アピゲニン、タンゲレチン、イソラムネチン、ケンフェロール、ミリセチン、エリオジクチオール、ヘスペレチン、ナリングニン、テアフラビン、テアルビジン、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、プテロスチルベン、デルフィニジン、マルビジン、ペラルゴニジン、ペオニジン、チコリ酸、フェルラ酸、サリチル酸を含む群から選択される、前項の請求項に記載の殺菌方法。

【請求項 30】

前記表面を、前記フェノール性化合物または前記フェノール性化合物の混合物の溶液と2時間未満の時間接触させる工程を含む、請求項22～29のいずれか一項に記載の殺菌方法。

10

【請求項 31】

第1の接触工程および第2の接触工程を含み、前記第1の接触工程と前記第2の接触工程との間に洗い流し工程が行われる、請求項22～30のいずれか一項に記載の殺菌方法。

【請求項 32】

グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、ケルセチンまたはゲニピンを含む群から選択される1つまたはそれ以上の化合物による前処置工程を含む、請求項22～31のいずれか一項に記載の殺菌方法。

【請求項 33】

前記前処置工程が、リン脂質の除去をさらに含む、請求項22～32のいずれか一項に記載の殺菌方法。

20

【請求項 34】

前記前処置工程が、キャッピング剤の使用を含む準備工程をさらに含む、請求項22～33のいずれか一項に記載の殺菌方法。

【請求項 35】

前記殺菌活性が、心内膜炎の発症の原因である微生物に対抗するものである、請求項22～34のいずれか一項に記載の殺菌方法。

【請求項 36】

前記微生物が、グラム⁺細菌、グラム⁻細菌、酵母、カビまたはウイルスである、請求項22～35のいずれか一項に記載の殺菌方法。

30

【請求項 37】

前記微生物が、マイコバクテリアである、請求項22～36のいずれか一項に記載の殺菌方法。

【請求項 38】

前記ウイルスが、ピコルナウイルス科、アデノウイルス科およびカリシウイルス科に属す、請求項22～37のいずれか一項に記載の殺菌方法。

【請求項 39】

請求項22～38のいずれか一項に記載の殺菌方法により得られる表面。

【請求項 40】

前項の請求項に記載の表面を含む生物学的プロテアーゼ、医療機器および心臓プロテアーゼ。

40

【請求項 41】

心血管プロテアーゼによって代表される、前項の請求項に記載の生物学的プロテアーゼ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療分野、特に体液と接触する生物学的表面の調製に適用できる。

【0002】

グルタルアルデヒド固定化バイオプロテアーゼ心臓弁(bioprosthetic heart valve, B

50

HV)は、ヒトに中長期間埋め込まれると、ジストロフィー性石灰化を起こしやすく、これがBHVの寿命に影響を与える主な制限因子であることが報告されている。石灰化は、未だに完全には理解されていない複雑かつ多因子のプロセスであり、これにはアテローム性動脈硬化症様組織リモデリングや機械的応力への長期曝露などがある。石灰性組織ジストロフィーの原因の中で、グルタルアルデヒド(GLU)による処置も考慮されるに値する。

【0003】

GLUは、多くの市販のバイオプロテゼ製品(生物補綴製品)、特に外科的な経カテーテル移植可能心臓弁(THV)のための好ましい定着性滅菌剤として使用されることが多い。THV移植片は、そのプロテゼの位置決めのためのガイドカテーテルを使用する、心臓切開術を回避した、侵襲性が低い処置と考えられる。THVは、心臓弁置換手術による合併症の危険性が中程度または高度な人のための選択肢となるかもしれない。残念ながら、GLUは化学的に不安定であり、このことは、潜在的なカルシウム結合部位(残留アルデヒド、酸、シッフ塩基等)の確実な曝露に関係している。組織のアミノ酸残基とGLUとが相互作用する結果、負に荷電したカルボン酸基が生じ、これが正に荷電した Ca^{2+} イオンと静電的に相互作用し、結果、カルシウムが驚異的に引き寄せられる部位となる。さらに悪いことに、自由に反応するアルデヒド基でさえ、空気、インビボ血液およびマクロファージ酸化を介して容易に酸化し、カルボン酸残基となる。

【0004】

石灰化プロセスへの影響を減少させるため、BHV製造業者は、反応性アルデヒド基とカルボン酸基の化学的安定化を目的とした新規工程の追加を含む、GLU固定プロトコルのいくつかの変更を提案している。ウラゾールによるGLUの無毒化、ジアミン・スパーサーの延長、2-アミノオレイン酸による処置、またはエタノール中でのインキュベーションなどは、GLUを安定化させるために開発されたプロセスのほんの一部であり、石灰化組織のジストロフィーを遅らせることが期待される。

【0005】

BHVの石灰化変性は一般に、このような生物医学的機器の決定的な故障の原因となる長期的な事象であるが、移植後わずか数時間でプロテゼに影響を及ぼし始める一連の変性プロセスが存在し、主に機器の構造的側面を損なうことを忘れてはならない。

【0006】

初期の構造的BHV変性は、互いに密接に関連する複数の能動的メカニズムと受動的メカニズムによる複雑な経路である。変形性の能動的メカニズムは、移植後数時間以内の宿主の初期応答によって引き起こされ、多くの場合、炎症、無症候性弁血栓症(subclinical leaflets thrombosis)および/または細菌感染と相関していることが、現在では十分に確立されている。他方、受動的劣化は、移植片疲労に厳密に関連しており、結果として、弁尖の穴の形成、引裂き、磨耗が生じる。

【0007】

初期の構造的変性-受動的因子

よく知られているように、市販のBHVは、生存可能な組織を構成しておらず、定義上、細胞外マトリックスの再生およびリモデリングができないため、サイクル負荷に起因するコラーゲン網目状構造(層間剥離、構造再配列および破壊)の変化は不可逆性損傷と考えられる。加速摩耗試験中の長期サイクル負荷は、有効なコラーゲン線維ネットワークの硬化のため、半径方向伸長性の顕著な減少を強調させる。弁尖の経時的な硬化は、機械的応力の分布の異常を引き起こし、これは、特に、ステント周囲の屈曲領域および縫合領域への過負荷につながる。埋め込まれたBHVの組織学的評価では、弁尖の引裂きおよびコラーゲン線維束の破壊が、関連する石灰化が存在しなくても、高ひずみ領域の特徴であることが示された。

【0008】

初期の構造的変性-能動的因子

無症候性弁血栓症はBHV置換術で頻繁に発生し、外科的BHV(4%)よりもTHV(頻度13%)でより一般的であった。移植後1年で、BHVの30%が関わっている。このような病

10

20

30

40

50

理は、移植後30日以内に臨床徴候を示し、弁尖の可動性の低下を引き起こさせる。弁尖の動きが低下した患者(HALT-低減衰弁肥厚(hypoattenuating leaflet thickening))では、弁尖の厚みが著しく変化し、少なくとも1つの弁が完全に動かなくなる。HALTの発生は、弁尖の血栓、初期の石灰化および/または変性に関連する軽度の弁機能不全を示す。

【0009】

抗凝固療法(新規の経口抗凝固薬NOACおよびワルファリンの両方)は、HALT合併症の軽減に有効であるが、抗凝固療法を中止した患者の50%でHALTが再発した。経カテーテル弁移植の標準治療である二重抗血小板療法は、無症候性弁血栓症の防止または処置には有効ではなかったことに注意することが重要である。

10

【0010】

細菌感染は、特にTHVの場合、早期のBHV変性に寄与するもう一つの心配の側面である。感染性心内膜炎(IE)は、個体群と患者管理の両方に大きな影響を与える。米国では、年間40,000~50,000例の新規症例があり、平均入院費は120,000ドル/患者を超える。診断と外科的介入の改善にもかかわらず、IEによる1年死亡率は20年以上変わっていない。長期の抗生物質処置が十分でない場合には、外科的弁置換術が必要である。

【0011】

THVは中リスクおよび低リスク患者においても良好な結果を示しており、この種の低侵襲介入を受ける人々の数を著しく拡大しているため、特定の細菌のBHVに定着する能力は、心臓弁置換術の将来にとって重要な側面である。変性した外科的BHVの置換は、バルブ・イン・バルブ(valve-in-valve)アプローチを採用して行われることが多い。この場合、THVは、その予備的除去なしに、機能不全外科的BHVの内部に配置される。これは潜在的に、機能不全のBHVから新しいTHVへの細菌の移動につながり得て、結果として細菌の成長や組織のコロニー形成が生じる。

20

【0012】

最後に、規制機関は医療機器に対して、「ISO 10993-11:2017 医療機器の生物学的評価-第11部：全身毒性試験」にしたがって材料介在発熱性を試験することを求めている。ピロゲン(ギリシャ語 pyros: 火)という用語は、発熱を誘発する物質を定義している。医療機器によって誘発される発熱性反応は、いわゆる「材料介在ピロゲン」の存在に応じて、いくつかの原因に起因することがある。よく知られているよく特性化された外因性ピロゲンの1つのクラスは、内毒素のクラスである。内毒素は、グラム陰性菌の細胞壁に存在するリポ多糖成分である。外因性ピロゲンのもう1つの広いクラスは、グラム陽性細菌由来のリポテイコ酸などの物質や、真菌、酵母、ウイルス、細菌、寄生虫由来の他の化合物を含む非内毒素ピロゲンである。非内毒素性ピロゲンの第3のクラスは、材料介在性ピロゲンである。材料介在性ピロゲンは正式な定義が存在しないが、医療機器の材料または表面から浸出すると考えられている。材料介在性ピロゲンは、切削液、離型剤、洗浄剤および加工助剤からの残留物など、製造や包装中に混入された汚染に起因することもある。したがって、発熱性反応を上昇させる化学物質または汚染物質を持ち込むことなく、BHVの治療成績を改善できる治療法を開発することは、基本的に重要である。

30

【発明の概要】

40

【0013】

本特許出願の発明者らは、驚くべきことに、生物学的マトリックス(詳細には医療機器、さらに詳細には心臓プロテーゼ)における能動的および受動的早期変性発生の両方を防止する方法を見出し、該方法は、前例のないGLUの安定化、表面血小板接着およびフィブリン放出の両方に対する抵抗性ならびに微生物の表面コロニー形成を達成する方法である。結果的に、このような方法は、処置した生物学的マトリックスの生体力学的特性に対する興味深い改善効果を示した。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】ポリフェノール処置GLU固定心膜パッチにおいて自由に反応するアルデヒド基

50

とカルボン酸基の減少のパーセンテージ(各種類の化学基測定についてn=16)。

【0015】

【図2】ポリフェノール処置および未処置(GLU)の心膜試料における血栓蓄積のパーセンテージ(各種類の化学基測定についてn=16)。

【0016】

【図3】ポリフェノール処置試料と未処置試料との間の引張強度の比較(GLU、各種類の化学基測定についてn=36)。

【0017】

【図4】ポリフェノール処置試料と未処置試料との間の伸長のパーセンテージの比較(GLU、各種類の化学基測定についてn=36)。

【0018】

【図5】Fポリフェノール処置試料と未処置試料との間のヤング率相関性(GLU、各種類の化学基測定についてn=36)。

【0019】

本発明の目的

第1の目的において、本発明は、生体液と接触する表面を処置する方法を開示する。

【0020】

好ましい態様に関して、前記表面は医療機器の表面である。

【0021】

より好ましい態様に関して、前記表面は生物学的プロテアーゼ(心臓プロテアーゼであり得る)の表面である。

【0022】

第2の目的において、本発明は、本発明の方法で得られた、生体液と接触される表面を開示する。

【0023】

好ましい態様に関して、前記表面は医療機器の表面である。

【0024】

より好ましい態様に関して、前記表面は生物学的プロテアーゼ(心臓プロテアーゼであり得る)の表面である。

【0025】

本発明による表面を含む医療機器、生物学的プロテアーゼおよび心臓プロテアーゼは、本発明のさらなる目的を代表する。

【0026】

第3の目的において、本発明は、本発明の医療機器、生物学的プロテアーゼまたは心臓プロテアーゼの使用を含む、疾患の処置方法を開示する。

【0027】

好ましい態様に関して、前記疾患は心臓疾患である。

【0028】

ある態様に関して、前記疾患はヒトにおける疾患であり、別の態様に関して、前記疾患は動物における疾患である。

【0029】

本出願の方法に使用される、フェノール性化合物またはフェノール性化合物の混合物を含む溶液は、本発明のさらなる目的を代表する。

【0030】

本発明の別の目的によれば、フェノール性化合物またはフェノール性化合物の混合物を含む本発明の溶液の調製方法が開示される。

【0031】

さらに別の目的において、本発明は、本発明の方法を実施するためのキットを開示する。

【0032】

10

20

30

40

50

本発明の詳細な説明

第1の目的によれば、本発明は、生体液と接触される表面の処置方法を開示する。

【0033】

本発明の目的の範囲内の生体液は、血液、血清、血漿、硝子体ゲル、涙、尿、唾液、大便によって代表され、滑液、腹膜液、心膜液、胸膜液および羊水を含む。

【0034】

生物学的表面は、ヒトまたは動物由来の表面で示され得る。

【0035】

特に、動物由来の表面は、ウマ、ブタまたはウシ由来の表面であり得て、好ましくはブタまたはウシ由来の表面であり、このような表面は生物学的マトリックスとみなすことができる。

【0036】

特に、前記表面は医療機器の表面である。

【0037】

本発明による医療機器は、心臓弁、腱、靱帯、心膜、筋膜、硬膜、鼓膜、腸粘膜下組織、軟骨、脂肪組織、骨組織、骨盤組織、腹部組織、乳房組織および真皮組織で示され得る。

【0038】

本発明のもう一つの態様に関して、前記表面は生物学的プロテアーゼの表面である。

【0039】

本発明による生物学的プロテアーゼは、血管、心臓弁、腱、靱帯、心膜、筋膜、硬膜、鼓膜、腸粘膜下組織、軟骨、脂肪組織および骨組織、骨盤組織、腹部組織、乳房組織および真皮組織で示され得る。

【0040】

好ましい実施態様において、本発明による生物学的プロテアーゼは、心臓弁または心膜組織パッチなどの心血管プロテアーゼで示され得る。

【0041】

より好ましい実施態様において、本発明に従って処置できる心臓弁は、外科用心臓弁で示される。

【0042】

さらに好ましい実施態様において、本発明に従って処置できる心臓弁は、経カテーテル埋め込み可能な心臓弁で示され、前記弁はカテーテルを通して埋め込まれる必要があり、カテーテル内に収容されるように折り畳まれている。

【0043】

本発明の方法によれば、前記の開示されている表面を、フェノール性化合物またはフェノール性化合物の混合物を含む溶液と接触させる。

【0044】

本発明の目的のために、フェノール性化合物(phenolic compound)は、フェノール、フェノールアルデヒド、フェノール酸、フェニルアミン、フェノール化合物(phenol compound)、フラボノイド、フェニルプロパノイドおよびタンニンを含む群から選択されるフェノール性化合物またはポリフェノール性化合物(いくつかの例において、これら両方を「フェノール」または「ポリフェノール」と称し、ここでは同義語として使用する)として意図されるものとする。

【0045】

特に、フェノール性化合物は、バニリン、ケイ皮酸、フェニルアラニン、クマリン、キサントン、カテキン、フラボノン、フラボン、カルコン、フラバノール、フラバノール、ロイコアントシアニン、アントシアニン、ヒドロキシケイ皮酸を含む群から選択される。

【0046】

さらに、特に、フェノール性化合物は、レスベラトロール、アロイン、シナリン(cyan

10

20

30

40

50

arin)、エピガロカテキン、タンニン酸、コーヒー酸、クロロゲン酸、ヒドロキシチロソール、ロスマリン酸、ナリングニン、没食子酸、ヘスペリチン、キナ酸、エレノール酸(eleonolic acid)、ピノレジノール、ルテオリン、アピゲニン、タンゲレチン、イソラムネチン、ケンフェロール、ミリセチン、エリオジクチオール、ヘスペレチン、ナリングニン、テアフラビン、テアルビジン、ダイゼイン、ゲニス테인、グリシテイン、プテロスチルベン、デルフィニジン、マルビジン、ペラルゴニジン、ペオニジン、チコリ酸、フェルラ酸、サリチル酸を含む群から選択され得る。

【0047】

本発明の目的のためには、上記に開示されているフェノール性化合物またはポリフェノール性化合物の誘導体も包含され、例えば、塩またはエステルまたは異性体もまた使用され得る。

【0048】

本発明の一実施態様において、本発明の溶液は、2種以上の上記に開示されているフェノール性化合物またはポリフェノール性化合物の混合物を含む。

【0049】

好ましい実施態様に関して、本発明の溶液は、2種以上の上記に開示されているフェニルプロパノイドの混合物を含み得る。

【0050】

以下に、本発明によるいくつかの成分およびいくつかの溶液を報告する：

【表1】

溶液	成分A	成分B
1	レスベラトロール	タンニン酸
2	レスベラトロール	シナリン(Cynarin)
3	アロイン	エピガロカテキン
4	アロイン	クロロゲン酸
5	コーヒー酸	タンニン酸
6	コーヒー酸	ヒドロキシチロソール
7	ロスマリン酸	シナリン(Cynarin)
8	ナリングニン	没食子酸
9	ヘスペレチン	没食子酸

【0051】

本発明の溶液の調製に関して、フェノール性化合物またはポリフェノール性化合物をアルコール溶媒に可溶化する。

【0052】

フェノール性化合物またはポリフェノール性化合物の混合物を調製する場合は、それぞれの化合物の溶液を別々に調製し、それを混ぜ合わせる。

【0053】

本発明の好ましい実施態様によれば、前記溶液は、フェノール性化合物の混合物、より好ましくはフェニルプロパノイド化合物の混合物を含む。

【0054】

前記目的について、第1の成分はアルコール溶液(成分A)、好ましくは前記溶液の最終体積の10%に可溶化される。

【0055】

本発明によるアルコール溶媒は、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノールなどを含み得て、好ましくは、エタノールを含むか、またはエタノールによって代表される。

【0056】

本発明の溶液中で、第2の成分は、等張緩衝溶液(成分B)中に、好ましくは前記溶液の最終体積の90%に可溶化される。

【0057】

本発明の一実施態様において、最終溶液はヒドロアルコール溶液である。

【0058】

本発明によれば、開示されている方法において、フェノール性化合物またはフェノール性化合物の混合物の溶液は、好ましくは5~7のpH値を有する。

【0059】

溶液は、調製されたら、場合により0.22 μ mフィルターで濾過されてもよい。

【0060】

本発明に関して、開示されている方法において、表面をフェノール性化合物またはフェノール性化合物の混合物の溶液と2時間未満の時間接触させる。

【0061】

好ましくは、接触は約1時間継続される。

【0062】

より好ましくは、接触は約30分間継続される。

【0063】

さらにより好ましい実施態様において、接触は第1工程および第2工程を含む。

【0064】

好ましい実施形態において、第1接触工程は30分間行われ、第2接触工程は30分間行われる。

【0065】

場合により、2つの接触工程の間に、すすぎ工程(洗浄工程とも称される)を行ってもよい。

【0066】

本発明の好ましい実施態様によれば、前記方法は暗所で行われ、より好ましくは完全に暗所で(すなわち、光への曝露を避ける)行われる。

【0067】

好ましい実施態様によれば、前記方法は、溶液を攪拌しながら行われる。

【0068】

接触工程の温度に関して、好ましくは、約+20℃±10℃の温度で行われる。

【0069】

本発明の好ましい実施態様において、接触工程の後、処置された表面、医療機器、生物学的プロテアーゼまたは心臓プロテアーゼを、1つまたはそれ以上の洗浄工程にかけてもよい。

【0070】

好ましくは、前記洗浄工程はそれぞれ、適当な緩衝液を用いて行われ、例えば、適当な緩衝液は、リン酸緩衝液で示され得る。

【0071】

一実施態様において、洗浄工程はそれぞれ、約15~30分間行われ得る。

【0072】

もう一つの実施態様において、洗浄工程はそれぞれ、約12~48時間行われ得る。

【0073】

開示されている方法が生物学的表面上で行われる、本発明の一実施態様によれば、前記生物学的表面は前もって前処置工程にかけてもよい。

【0074】

特に、前記前処置工程は、以下の効果の1つまたはそれ以上を有し得る：

- タンパク質の安定化、
- 脂質の安定化または除去、
- 細胞構造の安定化または除去、

10

20

30

40

50

-抗原性の低下。

【0075】

本発明の目的のために、前記前処置工程は、1つまたはそれ以上のグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、ケルセチンまたはゲニピンによる前処置工程、ならびにリン脂質の除去のための処置を含み得る。

【0076】

本発明の特定の実施態様によれば、生物学的表面を前処置工程にかける前に、グリセロール、ヘパリン、アミン(すなわち、アルキルアミン、アミノアルコール、エタノールアミン)、アミノ酸(リシン、ヒドロキシリシン、アミノスルホネート、タウリン、アミノスルフェート、デキストランスルフェート、コンドロイチンスルフェート)、親水性多機能性ポリマー(すなわち、ポリビニルアルコール、ポリエチレンイミン)、疎水性多機能性ポリマー(すなわち、アルファ-ジカルボニル、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソン、グリオキサール)、ヒドラジド(すなわち、アジピンヒドラジド)、N,N-ジスクシンイミジルカーボネート、カルボジイミド(すなわち、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロライド-EDC、N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-CMC、1,3-ジ-シクロヘキシルカルボジイミド-DCC、2-クロロ-1-メチルピリジニウムアイオダイド-CMPI、2-クロロ-1-メチルピリジニウムアイオダイド-CMPI)、抗生物質、細胞リクルート剤(cell recruiting agent)、血液適合性剤、抗炎症剤、抗増殖剤、還元剤(すなわち、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム+アセチルアセトン、ギ酸-ホルムアルデヒド、モノ-、ジ-またはポリエポキシアルカン)を含む群から選択されるカップリング剤を用いて準備工程にかけてもよい。

【0077】

本発明に関して、本発明による、生体液と接触される表面を処置する方法は安定化方法である。

【0078】

特に、前記安定化方法により、前処置された表面上の利用可能な反応基を不活性化する。

【0079】

より具体的には、前記安定化方法により、前処置された表面上の利用可能なアルデヒド基およびカルボン酸基を不活性化する。

【0080】

本発明に関して、開示されている方法は抗石灰化方法である。

【0081】

本発明の方法により得られる表面は、本出願のもう一つの目的を代表する。

【0082】

本願の方法に従って得られる表面を含む生物学的プロテアーゼ、医療機器、特に心臓プロテアーゼは、本発明のさらなる目的を代表する。

【0083】

本発明の前処置および処置方法により得られる表面は、本出願のもう一つの目的を代表する。

【0084】

本願の前処置および処置方法に従って得られる表面を含む生物学的プロテアーゼ、医療機器、特に心臓プロテアーゼは、本発明のさらなる目的を代表する。

【0085】

本発明に関して、本発明による、生体液と接触される表面の処置方法は、保護方法である。

【0086】

特に、前記保護方法は、無症候性血栓症の発生を防止する。

【0087】

10

20

30

40

50

より具体的には、本発明の方法は、抗血小板接着性方法である。

【0088】

さらに具体的には、本発明の方法は、フィブリンの合成を防止する。

【0089】

フィブリンの合成は、可溶性フィブリノゲンが不溶性フィブリンポリマーへと活性化されることに関連している。このようなポリマーは横方向に凝集して繊維を作り、それが枝分かれして三次元のネットワークを形成して、循環血小板と相互作用して、止血と創傷凝固に不可欠なフィブリン凝塊の形成につながる。凝塊が血流に入ると血栓と称され、中小血管を閉塞させて虚血、卒中および心臓発作を引き起こすことができる。

【0090】

特に、本発明の保護方法は、本発明に従って処置および／または前処置された生物学的表面への循環血小板の固定を防止および回避することが証明されている。

【0091】

本発明の方法で得られる表面は、本出願のもう一つの目的を代表する。

【0092】

本出願の方法に従って得られる表面を含む生物学的プロテアーゼ、医療機器、特に心臓プロテアーゼは、本発明のさらなる目的を代表する。

【0093】

本発明の前処置および処置方法によって得られる表面は、本出願の別の目的を代表する。

【0094】

本発明の前処置および処置方法に従って得られる表面を含む生物学的プロテアーゼ、医療機器および心臓プロテアーゼは、本発明のさらなる目的を代表する。

【0095】

本発明に関して、生体液と接触させる表面を処置する方法は、適切な構造的生体力学的特性を保持および維持する方法である。

【0096】

特に、本発明の方法は、生物学的処置組織の伸長特性を向上させることが証明されている。

【0097】

特に、前記方法により、BHV弁尖のコラーゲン構造を保持する。

【0098】

従って、本発明による、生体液と接触される表面を処置する方法は、処置されたBHVの適切な生理学的血液学的特性および流体力学的特性を維持するための保護方法である。

【0099】

本発明の方法で得られる表面は、本出願のもう一つの目的を代表する。

【0100】

本出願の方法に従って得られる表面を含む生物学的プロテアーゼ、医療機器および心臓プロテアーゼは、本発明のさらなる目的を代表する。

【0101】

本発明の前処置および処置方法によって得られる表面は、本出願のもう一つの目的を代表する。

【0102】

本発明の前処置および処置方法に従って得られる表面を含む生物学的プロテアーゼ、医療機器および心臓プロテアーゼは、本発明のさらなる目的を代表する。

【0103】

本発明の、生体液と接触される表面を処置する方法は、処置された表面の消毒方法であるという点で、抗微生物および抗ウイルス方法である。

【0104】

特に、本発明の抗微生物方法は殺菌作用を有する。

10

20

30

40

50

【0105】

より詳細には、本発明の抗微生物方法は、心内膜炎の発症の原因となる微生物に対して活性である。

【0106】

ある実施態様において、前記微生物は、グラム⁺細菌、グラム⁻細菌、酵母およびカビである。

【0107】

もう一つの実施態様において、前記微生物は、マイコバクテリア、例えばマイコバクテリウム・シェロナエ(*Mycobacterium chelonae*)である。

【0108】

従って、本発明による、生体液と接触される表面を処置する方法は、抗グラム⁺法、抗グラム⁻法、抗酵母法、抗カビ法、抗マイコバクテリア法である。

【0109】

特に、本発明の抗ウイルス方法は、ウイルスに対して殺ウイルス作用を有する。

【0110】

より詳細には、前記殺ウイルス作用は、EN 14476規格によるものである。

【0111】

特に、前記ウイルスは、ピコルナウイルス科(ピコルナビリダエ、*Picornaviridae*)、アデノウイルス科(アデノビリダエ、*Adenoviridae*)およびカリシウイルス科(カリシビリダエ、*Caliciviridae*)に属する。

【0112】

より詳細には、前記微生物は、ポリオウイルス1型LSc-2ab(RVB-1260)、アデノウイルス5型(ATCC VR-5)およびマウスノロウイルス株S-99(RVB-651)である。

【0113】

本発明の方法で得られる表面は、本願のもう一つの目的を代表する。

【0114】

本出願の方法に従って得られる表面を含む生物学的プロテアーゼ、医療機器および心臓プロテアーゼは、本発明のさらなる目的を代表する。

【0115】

本発明の前処置および処置方法によって得られる表面は、本出願のもう一つの目的を代表する。

【0116】

本願発明の前処置および場合により処置方法に従って得られる表面を含む生体プロテアーゼ、医療機器および心臓プロテアーゼは、本発明のさらなる目的を代表する。

【0117】

より詳細には、前記生物学的プロテアーゼは、本発明の前処置および場合により処置方法によって得られる心血管プロテアーゼで示され得る。

【0118】

本発明の第3の目的によれば、上記に開示されている医療機器、生物学的プロテアーゼまたは心臓プロテアーゼの使用を含む、疾患を処置する方法が開示される。

【0119】

好ましい態様に関して、前記疾患は心臓疾患である。

【0120】

ある態様でに関して、前記疾患はヒトにおける疾患であり、もう一つの態様に関して、前記疾患は動物における疾患である。

【0121】

特定の実施態様において、本発明による疾患を処置する方法は、弁を予備的に除去することなく、機能不全の弁の内側に弁を配置する、バルブ・イン・バルブ(valve-in-valve)アプローチを含む。

【0122】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる目的として、本出願の方法に使用される、フェノール性化合物またはフェノール性化合物の混合物を含む溶液が開示される。

【0123】

特に、前記溶液の調製は、フェノール性化合物をアルコール溶媒に可溶化する第1工程を含む。

【0124】

例えば、上記リストAのフェノール性化合物は溶解され得る。

【0125】

必要であれば、さらに、フェノール性化合物は等張緩衝液に可溶化され得る。

【0126】

例えば、上記リストBのフェノール性化合物は溶解され得る。

【0127】

好ましい実施態様によれば、化合物Aの溶液は最終溶液の10%(体積)を示し、化合物Bの溶液は最終溶液の90%(体積)を示す。

【0128】

好ましい態様によれば、溶液の調製は、暗所で、好ましくは完全な暗所で、すなわち光への曝露を避けて行われる。

【0129】

本発明は、以下の実験セクションに関連してさらに説明される。

【0130】

以下の実験セッションでは、本発明に従って処置された表面で実施されたアッセイの結果を示している。

【0131】

ポリフェノール溶液

以下の表では、本発明によるポリフェノール溶液のいくつかの例を報告している。

【表2】

溶液	成分A	成分B
1	レスベラトロール 3±2mg/ml	タンニン酸 4±3.5mg/ml
2	レスベラトロール 3 ± 2 mg/ml	シナリン(Cynarin) 2±1.5mg/ml
3	アロイン 1.5±1mg/ml	エピガロカテキン 2±1mg/ml
4	アロイン 1.5±1mg/ml	クロロゲン酸 4±3mg/ml
5	コーヒー酸 2±1.5mg/ml	タンニン酸 4±3.5mg/ml
6	コーヒー酸 2±1.5mg/ml	ヒドロキシチロソール 4±2.5mg/ml
7	ロスマリン酸 2.5±2mg/ml	シナリン(Cynarin) 2±1mg/ml
8	ナリンゲニン 1±0.5 mg/ml	没食子酸 1.5±1mg/ml
9	ヘスペレチン 2±1.5mg/ml	没食子酸 1.5±1mg/ml

【0132】

特に、表面は上記の開示に従って溶液5で処置されている。

【0133】

ポリフェノール溶液5の調製

成分Aとしてのコーヒー酸を、指示された濃度に従って秤量し、ポリフェノール混合物の最終体積の10%になるようにエタノールに可溶化する。成分Bカラムとしてのタンニン酸を、指示された濃度に従って秤量し、ポリフェノール混合物の最終体積の90%になるように変性リン酸緩衝液に可溶化する。両方の工程は暗闇で行う。可溶化が完了したら、2つの溶液を混合する。pHは5〜7に調整する。溶液を0.22 μmフィルターで濾過する。この溶液を、溶液5またはポリフェノール溶液と称する。

【0134】

本発明による他の溶液は、上記の開示と同様に調製することができる。

【0135】

グルタルアルデヒドの安定化

組織処理

いくつかのウシ心膜を注意深く選択して長方形のパッチ($n=32$)を得に。すべてのパッチを予備的なGLU架橋処置にかけた。簡単に説明すると、心膜組織を、暗室で、緩衝化GLU溶液中で24時間ずつ3段階インキュベートした。この例では、GLU溶液は第1工程および第2工程では $0.6\% \pm 0.5\% v/v$ であり、第3工程では $0.2\% \pm 0.15\% v/v$ である。GLUで処置心膜パッチを、リン酸緩衝液中で2回、それぞれ15分間ずつ洗浄した。

【0136】

16個のパッチを、上記のように調製した本発明の溶液5とともに、暗所で適度に、しかし一定に攪拌しながら、室温(RT)で、 25 ± 10 分間ずつ2段階インキュベートした。

インキュベーションの終わりに、処置したパッチを、リン酸緩衝液で15~30分間ずつ5回洗浄にかけた。試料はTREATEDと称する。

【0137】

残りのGLU固定心膜パッチは対照として採用した(GLU、 $n=16$)。

【0138】

遊離カルボン酸基含有量の測定

心膜パッチをOCT(最適切断温度)に入れ、液体窒素で予冷したイソペンタンに浸漬することによって凍結させた。次に、赤外線反射率研究に適したMirrIRスライドを支持体として、厚さ $7\mu m$ の凍結切片を作製し、選択した領域ごとに反射率およびモザイクモードで64回のスキャンを行うFT-IR顕微鏡によって分析した。検出器には $4cm^{-1}$ 分解能のFPAを使用した。処置した組織では、GLUのみで固定した試料と比較して、波数 $1233cm^{-1}$ (カルボン酸基のC-O結合伸展に対応)のカルボン酸基の濃度が低いことが示された。

【0139】

GLU固定試料で定量された遊離カルボン酸基の合計を利用可能な基の100%と考えると、処置した試料では全体の76%に相当する減少が報告された。

【0140】

遊離アルデヒド基含有量の測定

0.2Mクエン酸、0.5M水酸化ナトリウムおよび8mM塩化第二スズを超純水に溶解した溶液Aを150ml調製する。0.22Mニンヒドリンを25mlのエチレングリコールモノメチルエーテル(セロソルブ)に溶解した溶液Bを25ml調製した。溶液Aの1体積を同容量の溶液Bと組み合わせ、暗所で45分間混合して、溶液Cを得る。分析する各試料に2mlの溶液Cが必要であることに注意すること。

【0141】

組織試料は、それぞれ約20mgの湿重量になるように調製すべきである。各試料を2mlの溶液C中で $100^{\circ}C$ 、暗所で20分間インキュベートし、水で冷却し、15mlの50%イソプロパノールで希釈する。発色した色を30分以内に570nmで読み取る。アルデヒド基のnmoleは、グリシン標準を基準として決定する。

【0142】

GLU固定試料で定量された遊離アルデヒドの総量を100%とすると、処置された試料では合計の56.3%に等しい減少が報告された。

【0143】

図1は、処置された心膜組織パッチにおける自由に反応するアルデヒド基およびカルボン酸基の減少のパーセンテージを示している(各種の化学基の測定について $n=16$)。

【0144】

血小板接着性の評価

組織処理

流動条件下での血小板接着性およびフィブリン放出の傾向を評価するために、インビトロ血流モデルを採用した。いくつかのウシ心膜を慎重に選択して、長方形のパッチ($n=1$

10

20

30

40

50

2)を得た。すべてのパッチを予備的なGLU架橋処置にかけた。簡単に説明すると、暗室で、心膜組織を緩衝化GLU溶液中で24時間ずつ3段階インキュベートした。この例では、GLU溶液は第1工程および第2工程では0.6%±0.5% v/vであり、第3工程では0.2%±0.15% v/vである。GLUで処置した心膜パッチを、リン酸緩衝液中で15分間ずつ2回洗浄にかけた。

【0145】

上記のように調製した本発明の溶液5を、6個のパッチとともに、室温(RT)で、暗所で適度に、しかし一定に攪拌しながら、25±10分間ずつ2段階インキュベートした。

インキュベーションの終わりに、処置したパッチを、リン酸緩衝液中で15～30分間ずつ5回洗浄にかけた。試料はTREATEDと称する。

【0146】

残りのGLU固定心膜パッチは対照(GLU、n=6)として採用した。

【0147】

血小板接着性の定量化

3頭の異なる動物からヘパリン化ウシ血液を採取し、血栓定量化に放射性同位元素を添加した。心膜組織ストリップを25.4mmの導管に配置し、蠕動ポンプで2.5L/分の血流を1時間流した。ストリップを食塩水ですすぎ、ガンマカウンターに入れて放射線を定量化した(相対的血栓症の反映)。放射線の平均値は、Gluでは73.133カウント/分(cpm)であり、処置した試料では35.165cpmであった。図2では、GLU試料を100%として、ポリフェノール処置組織における血小板傾向減少のパーセンテージとして結果を示している。

【0148】

処置した組織の機械的特性

組織処理

ウシ心膜の72本の長方形ストリップ(長さ約10mm、幅約8mm)を、上記に開示したようにGLU溶液で処理した(「組織処理」)。GLU処置心膜ストライプは、リン酸緩衝液中で15分間ずつ2回洗浄工程にかけた。室温で、36個のパッチを上記で開示した溶液5とともに、暗所で中程度であるが一定の攪拌下で、25±10分間ずつ2段階インキュベートした。インキュベーションの終わりに、処置したパッチをリン酸緩衝液中で15～30分間ずつ5回洗浄にかけた。試料はTREATEDと称する。

【0149】

残りのGLU固定心膜ストライプは対照として採用した(GLU、n=36)。

【0150】

機械的特性の評価

各ストライプを引張装置に取り付け、ゴム製グリッパ(100N/500Nロードセルを装備したThumler Z3-X500)で固定して一軸引張試験を行った。試料の初期長さ(グリッパ間の距離)は50mmとした。引張試験は50mm/分で行った。

【0151】

各ストライプは、長さ(有用長さ50mm)、幅および厚さ(測定値の平均値)に関して寸法特性を測定し、断面積を計算した(厚さxで)。各引張曲線から以下のパラメーターを得た：

- ・破断強度[N]：破損前の最大強度の観点から；
- ・引張強度[MPa]：最大強度を断面積(UTS)で割った値の観点から；
- ・破損歪[%]：最大強度でのひずみの観点から；
- ・ヤング率[MPa]：応力-ひずみ曲線の直線領域(弾性相)の勾配の観点から；

各パラメーターについて、各パッチから1つの値を得て、試料から平均値を計算した。パッチから再度平均値を算出し、各試験群につき1つの値を得た。

【0152】

図3は、処置試料と未処置試料(GLU)の引張強度の比較を示している。引張強度(UTS)は、抗張力(TS)と略されることもあり、破断前に引き伸ばされている間に材料が耐える

10

20

30

40

50

ことができる最大応力である。ポリフェノール処置は対照試料(GLU)との統計的有意差を報告していない。

【0153】

図4は、処置試料と未処置試料(GLU)の伸長のパーセンテージの比較である。

【0154】

図5は、処置試料と未処置試料(GLU)のヤング率の相関性を示している。伸長のパーセンテージはヤング率と厳密に関連している。ヤング率または弾性率は、材料の特徴であり、一軸荷重条件下での引張と変形の関係、および材料の弾性(可逆)挙動を表す。ヤング率は、適用した応力と得られた変形との比として定義される。ヤング率が増加すると、材料の剛性も増加する。処置組織の弾性レベルが上昇すると、未処置心膜(GLU)と比較してヤング率が低下する。

10

【0155】

弾性が増すことで、機械的負荷がより分散され、特に大きな圧力がかかるBHV領域に有利である。これにより、引裂きの形成が回避され、弁のコラーゲン構造が保持される。

【0156】

ポリフェノール溶液の殺菌潜在力

本発明のポリフェノール溶液の殺菌活性(BA)を、以下のさまざまな微生物に関して評価した:黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC 6538、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)ATCC 9027、エンテロコッカス・ファエカリス(*Enterococcus faecalis*)ATCC 29212、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)ATCC 19111、サルモネラ・エンテリカ・チフィムリウム(*Salmonella enterica typhimurium*)ATCC 14028、ストレプトコッカス・ビリダンス(*Streptococcus viridans*)ATCC 6249、非結核性マイコバクテリウムであるマイコバクテリウム・シェロナエ(*Mycobacterium chelonae*)ATCC 35752、酵母であるカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)ATCC 10231および真菌であるアスペルギルス・ブラシリエンシス(*Aspergillus brasiliensis*)ATCC 16404。

20

【0157】

BAアッセイは、既知濃度の本発明の溶液5(接種物)を用いて細菌を24時間一回インキュベーションを含む懸濁法からなる。インキュベーション時間終了時に、各試験管の内容物を、トリプトン・ソルトブロス(MRDブロス)で希釈した後、試験する微生物に応じて、流しプレート法またはスプレッドプレート法で、特定の寒天培地中の90mm無菌ペトリ皿に播種する。次に、得られたプレートを、各微生物の成長要件に従って、特定の条件と温度でインキュベートする。

30

【0158】

接種物の調製

微生物の各種類について、MRDブロス中の微生物懸濁液を、使い捨ての10mm光路長キュベット内で分光光度計を介して620nmの波長で定量した。懸濁液のアリコート部分の吸光度を測定する:0.150~0.460の範囲は、 1×10^8 CFU/ml~ 3×10^8 CFU/mlの細胞の濃度に対応する(1×10^7 CFU/ml~ 3×10^7 CFU/mlのカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)を有する)。ストレプトコッカス・オラリス(*Streptococcus oralis*)については、吸光度測定と細菌濃度の間に相関性がなかったため、定量化顕微鏡での細胞数で行った。

40

【0159】

データは、成長促進または阻害の効果を見るために、t0時点の細菌濃度と試料上の成長を比較し、殺菌活性のパーセンテージで示した。結果は対照試料(抗生物質およびエタノール溶液)と比較した。

【0160】

以下の表では、標準抗体およびエタノール溶液と比較した殺菌活性のパーセンテージを報告している。

【0161】

50

【表 3】

微生物	ATCCコード	ファミリー	殺菌活性%		
			溶液5	抗生物質	エタノール
緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	9027	グラム ⁻	99.999	99.999	99.99
サルモネラ・エンテリカ・チフィムリウム (<i>Salmonella enterica typhimurium</i>)	14028	グラム ⁻	99.999	99.999	90
エンテロコッカス・ファエカリス (<i>Enterococcus faecalis</i>)	29212	グラム ⁺	99.99	99.999	0
リステリア・モノサイトゲネス (<i>Listeria monocytogenes</i>)	19111	グラム ⁺	99.999	99.999	0
黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	6538	グラム ⁺	99.999	99.999	99
ストレプトコッカス・ビリダンス (<i>Streptococcus viridans</i>)	6249	グラム ⁺	99.999	99.999	90
カンジダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>)	10231	酵母	99.999	99.999	99.9
アスペルギルス・ブラシリエンシス (<i>Aspergillus brasiliensis</i>)	16404	真菌	99.9	99.999	90
マイコバクテリウム・シェロナエ (<i>Mycobacterium chelonae</i>)	35752	マイコバク テリウム	99.999	99.999	99

10

20

30

【0162】

ポリフェノール溶液の殺ウイルス潜在力

ポリフェノール溶液5の殺ウイルス活性をガイドラインに従って評価した：試験方法および要求事項欧州規格EN 14476:2013+A2:2019/UNI EN 14476:2019-化学消毒剤および防腐剤。医療分野における殺ウイルス活性評価のための定量的懸濁試験。試験方法および要求事項(2相/1工程)。殺ウイルスアッセイは、以下のウイルス株について実施した：ポリオウイルス1型LSc-2ab(RVB-1260)、アデノウイルス5型(ATCC VR-5)およびマウスノロウイルスS99(RVB-651)。以下の表では、80%に希釈したポリフェノール溶液5の殺ウイルス活性のパーセンテージを報告している(方法に従って評価可能な最高濃度に相当)。

40

【表 4】

	ウイルス不活化のパーセンテージ
ポリオウイルス1型LSc-2ab-RVB1260	99.00±3.20
アデノウイルス5型-ATCC VR5	99.70±1.02
マウスノロウイルス S99-RVB651	99.48±1.54

【0163】

様々な菌株の微生物に対するポリフェノール溶液の抗接着効果

50

処置した表面の抗接着活性を、以下の様々な微生物を基準として評価した：黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 9027、エンテロコッカス・ファエカリス(*Enterococcus faecalis*) ATCC 29212、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*) ATCC 19111、サルモネラ・エンテリカ・チフィムリウム(*Salmonella enterica typhimurium*) ATCC 14028、ストレプトコッカス・ビリダンス(*Streptococcus viridans*) ATCC 6249、非結核性マイコバクテリウムであるマイコバクテリウム・シェロナエ(*Mycobacterium chelonae*) ATCC 35752、酵母であるカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*) ATCC 10231および真菌であるアスペルギルス・ブラシリエンシス(*Aspergillus brasiliensis*) ATCC 16404。

10

【0164】

各微生物株を37℃で、専用ブロスで一晩成長させた。インキュベーションの終了時に、コロニー形成単位(UFC)をカウントして、微生物の有効濃度を決定した。

【0165】

組織処理

約2cm²のウシ心膜試料90個をそれぞれ、上記に開示したようにGLU溶液で処理した(「組織処理」)。GLU処置心膜試料を、リン酸緩衝液中で15分間ずつ2回洗浄にかけた。インキュベーションの終わりに、45個のパッチを開示した方法に従って本発明の溶液5で処置し、次に、リン酸緩衝液中で15～30分間ずつ5回洗浄にかけた。これらの試料をTREATEDと称する。

20

【0166】

残りのGLU固定心膜検体をコントロール(GLU)として採用した。

【0167】

抗接着効果の評価

ポリフェノール処置パッチと未処置のパッチをPBSで洗浄し、PBS+抗生物質(300 μg/mL)中で室温で一晩インキュベートした。各種の微生物株に特異的なさまざまな種類の抗生物質を使用した(ネオマイシン、ペニシリン、セファロスポリン、ポリミキシン、リファマイシン、リピアルマイシン、キノロン、スルホンアミド、マクロライド、リンコサミド、テトラサイクリン、アミノグリコシド、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、アンピシリン、アモキシシリン/クラバン酸、アジスロマイシン、カルバペネム系薬、ピペラシリン/タゾバクタム、キノロン類、クロラムフェニコール、チカルシリン、トリメトプリム/スルファメトキサゾール)。一晩のインキュベーション後、組織パッチをPBSで十分に洗浄して、結合していない抗生物質の痕跡を除去した。その後、処置試料と未処置試料を、適度であるが一定の攪拌下、室温で90分間、様々な菌株の微生物(微生物負荷量 1×10^7 CFU/mL)に単独で暴露した。インキュベーションの終わりに、組織試料を3回適度なボルテックス通過(vortexing passage)にかけて、緩く結合している細菌の剥離を促進させた。最後に、試料をStomacher(登録商標)400でホモジナイズし、得られたホモジネートの連続希釈液を、適切な選択的成長培地を入れたペトリ皿にプレーティングした。37℃で24時間インキュベーション後、試料の種類ごとにコロニー形成単位をカウントした。

30

40

【0168】

結果は、処置心膜パッチを未処置GLU固定心膜パッチと比較して評価した、付着微生物減少のパーセンテージで示した(各微生物株についてn=5)。

【0169】

以下の表は、処置心膜パッチで評価した付着微生物の減少パーセンテージを報告するものである。パーセンテージ値は、処置心膜パッチと未処置GLU固定心膜パッチを比較して決定した(各微生物株についてn=5)。

【0170】

50

【表 5】

微生物	ATCCコード	ファミリー	微生物の%
緑膿菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	9027	グラム ⁻	90.4±1.2
サルモネラ・エンテリカ・チフィムリウム (<i>Salmonella enterica typhimurium</i>)	14028	グラム ⁻	93.2±2.3
エンテロコッカス・ファエカリス (<i>Enterococcus faecalis</i>)	29212	グラム ⁺	92.8±4.6
リステリア・モノサイトゲネス (<i>Listeria monocytogenes</i>)	19111	グラム ⁺	94.4±4.8
黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	6538	グラム ⁺	95.3±3.8
ストレプトコッカス・ビリダンス (<i>Streptococcus viridans</i>)	6249	グラム ⁺	96.1±7.2
カンジダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>)	10231	酵母	91.7±3.2
アスペルギルス・ブラシリエンシス (<i>Aspergillus brasiliensis</i>)	16404	真菌	93.6±4.8
マイコバクテリウム・シェロナエ (<i>Mycobacterium chelonae</i>)	35752	マイコバクテ リウム	92.9±1.1

10

20

【0171】

ポリフェノール処置組織の非発熱性

単球活性化試験(MAT)は、2005年に欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM, European Center for the Validation of Alternative Methods)により、2008年に代替法バリデーション機関間調整委員会(ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)により、ピロゲン検出について認定および検証されている。ECVAMは2010年以降、欧州薬局方におけるピロゲン検出のための準拠法に含まれ(第2.6.30章)、FDAの“Guidance For Industry - Pyrogen and Endotoxins testing: Guidance For Industry - Pyrogen and Endotoxins testing: Questions and Answers”に記載されている。単球活性化試験(MAT)は、ウサギピロゲン試験(RPT)に代わるヒトのインビトロ試験法であり、内毒素および非内毒素ピロゲン(NEP)を含む全てのピロゲンの検出が可能である。

30

【0172】

組織処理

約2cm²のウシ心膜試料18個をそれぞれ、上記に開示したようにGLU溶液で処理した(「組織処理」)。GLU処置心膜試料を、リン酸緩衝液中で15分間ずつ2回洗浄にかけた。9個のパッチを、溶液5を用いて、暗所で、25±10分間ずつ2段階インキュベートした。インキュベーションの終了時に、処置したパッチをリン酸緩衝液中で15～30分間ずつ5回洗浄にかけた。試料はTREATEDと称する。

40

【0173】

残りの9個のGLU固定心膜検体を対照(GLU、n=9)として採用した。

【0174】

発熱性評価

試料を40mlの内毒素を含有しない水に、37℃で適度に振盪しながら1時間入れた。この水をMAT試験で分析した。簡単に言うと、水をヒトの単球細胞と接触させることで、ピロゲンが存在すると、単球は活性化され、インターロイキン-6(IL6)を含む数種類のサイトカインを産生するといった人体で起こることを模倣した。次に、このサイトカインは、特異的抗体と酵素的発色反応に関与する免疫学的アッセイ(ELISA)を用いて検出する。

50

【0175】

以下の表は、処置および未処置 (GLU) の心膜パッチにおける内毒素単位の評価を報告したものである。発熱性とみなされる基準値: NMT 20 EU / 機器。

【表 6】

組織の種類	内毒素の段位/試料
GLU	< 0.666
TREATED	< 0.666

【0176】

上述の開示を考慮すると、本発明の方法の利点は明らかであろう。

【0177】

特に、本発明の方法は、上記の開示に従って処置され、場合により前処置されていてもよい表面、および前記表面を含む医療機器、生物学的プロテアーゼ、特に心臓プロテアーゼの他の特性を変更しないことが証明されている。

【0178】

別の利点として、開示された方法は、処置または前処置された表面上の利用可能なアルデヒドおよびカルボン酸反応基を不活性化することを示した。

【0179】

さらに、フィブリンネットワーク上の血小板沈着が無症候性弁血栓症 (SLT, subclinical leaflets thrombosis) の発症の原因となり、それが弁の可動性を変化させる原因となるので、本発明の方法は BHV の機能障害を防止する。

【0180】

本発明の方法の保護作用は、機械的負荷のより良好な分散に寄与し、それは、引裂き、摩耗および穴の形成を回避することが見出された。

【0181】

さらなる利点として、本発明の方法は、処置された表面および任意に前処置された表面上の微生物の接着およびバイオフィルムの形成を防止する。

【0182】

ここでも、開示された方法は、本発明に従って処置され、場合により前処置されていてもよい表面の細菌およびウイルス汚染を回避する。

10

20

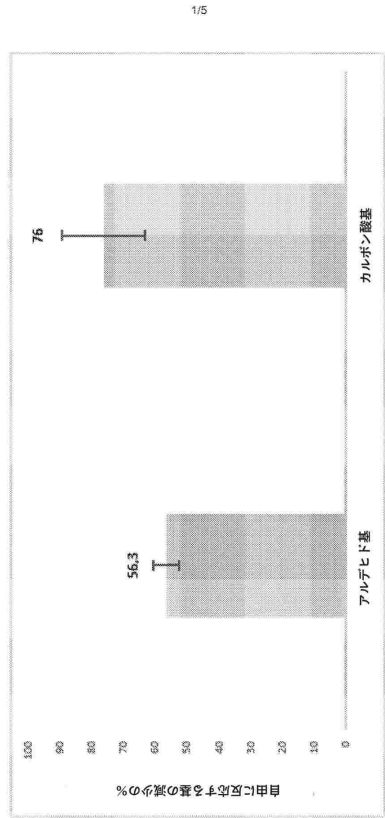
30

40

50

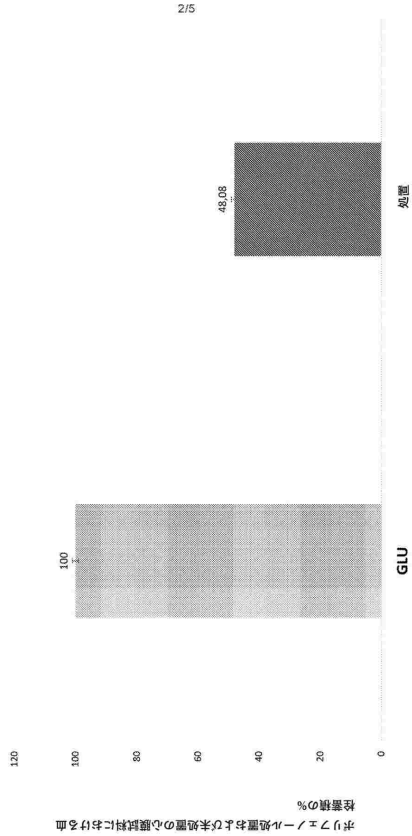
【図面】
【図 1】

Fig. 1



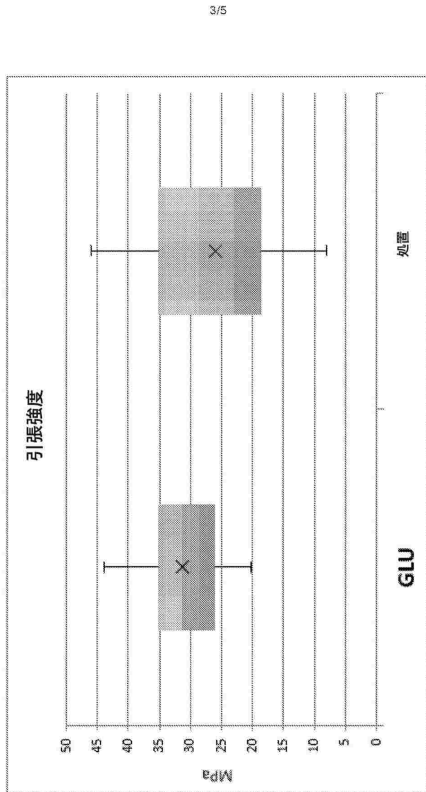
【図 2】

Fig. 2



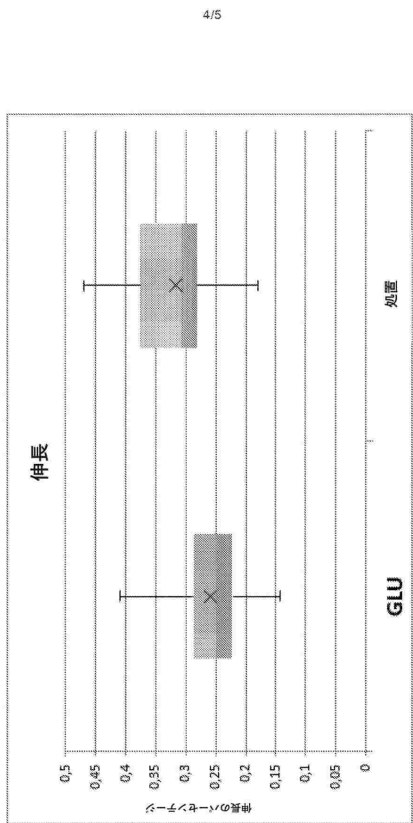
【図 3】

Fig. 3



【図 4】

Fig. 4



10

20

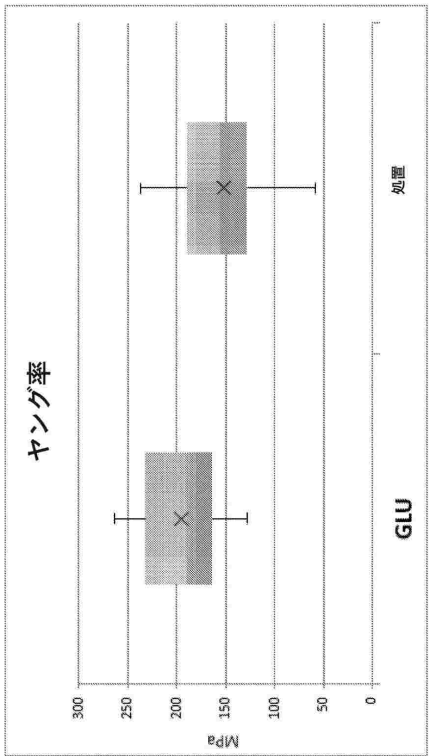
30

40

50

【 図 5 】

Fig. 5



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/059550

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61L27/50	A61L2/00
	A61L27/54	A61L29/16
	A61L31/16	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/368178 A1 (NASO FILIPPO [IT] ET AL) 26 November 2020 (2020-11-26) page 3, paragraph 52 - page 4, paragraph 93 claims	1-41
X	WO 2007/133479 A2 (COOK INC [US]; MED INST INC [US] ET AL.) 22 November 2007 (2007-11-22) page 13, line 1 - page 14, line 7 page 20, lines 4-24 page 43, line 3 - page 44, line 25 page 52, lines 15-26 page 54, line 11 - page 57, line 13 claims	1-3, 5-8, 14-20, 22-24, 26-29, 35-40
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 November 2022		07/12/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Van den Bulcke, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/059550

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/088671 A1 (QUAVE CASSANDRA L [US] ET AL) 12 April 2012 (2012-04-12) page 4, paragraph 46-48 page 5, paragraph 63 page 6, paragraph 83 - page 7, paragraph 90 claims -----	1-8, 14-20, 22-29, 35-41
X	WO 2020/201055 A1 (EVONIK OPERATIONS GMBH [DE]) 8 October 2020 (2020-10-08) page 1, lines 19-41 claims -----	1,2,5-8, 14-16, 18,20, 22, 26-29, 35-40
X	US 6 350 251 B1 (PROSL FRANK R [US] ET AL) 26 February 2002 (2002-02-26) column 17, lines 38-56 column 18, lines 62-67 claims -----	1,2,5,6, 14-16, 18,20, 22,23, 26,27, 35-40
A	US 2009/164005 A1 (DOVE JEFFERY [US] ET AL) 25 June 2009 (2009-06-25) claims -----	13,34
A	WO 2020/208644 A1 (MERIL LIFE SCIENCES PVT LTD [IN]) 15 October 2020 (2020-10-15) page 15, line 19 - page 16, line 7 -----	12,33

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/059550

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020368178 A1	26-11-2020	NONE	
WO 2007133479 A2	22-11-2007	US 2007282422 A1 WO 2007133479 A2	06-12-2007 22-11-2007
US 2012088671 A1	12-04-2012	EP 2624702 A2 ES 2568730 T3 PL 2624702 T3 US 2012088671 A1 US 2014271777 A1 WO 2012048119 A2	14-08-2013 04-05-2016 30-09-2016 12-04-2012 18-09-2014 12-04-2012
WO 2020201055 A1	08-10-2020	NONE	
US 6350251 B1	26-02-2002	NONE	
US 2009164005 A1	25-06-2009	CA 2710366 A1 CN 101965205 A CN 103705980 A EP 2234657 A2 EP 2647393 A1 EP 3453409 A1 US 7972376 B1 US 2009164005 A1 US 2013134064 A1 US 2014200659 A1 US 2015238659 A1 US 2016235528 A1 US 2019151083 A1 WO 2009085199 A2	09-07-2009 02-02-2011 09-04-2014 06-10-2010 09-10-2013 13-03-2019 05-07-2011 25-06-2009 30-05-2013 17-07-2014 27-08-2015 18-08-2016 23-05-2019 09-07-2009
WO 2020208644 A1	15-10-2020	CN 113646015 A EP 3952936 A1 US 2022176018 A1 WO 2020208644 A1	12-11-2021 16-02-2022 09-06-2022 15-10-2020

フロントページの続き

(32)優先日 令和3年10月8日(2021.10.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
イタリア(IT)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ナーゾ, フィリッポ
イタリア、イー 3 5 0 4 2 パドヴァ、エステ、ヴィア・ロレンツォ・デ・アントーニ 1 7 / 1 9、
バイオコンパティビリティ・イノベーション・ソチエタ・ア・レスポンサビリティ・リミタータ内

(72)発明者 ガンダリア, アレッサンドロ
イタリア、イー 3 5 0 4 2 パドヴァ、エステ、ヴィア・ロレンツォ・デ・アントーニ 1 7 / 1 9、
バイオコンパティビリティ・イノベーション・ソチエタ・ア・レスポンサビリティ・リミタータ内

(72)発明者 ステファネッリ, ウーゴ
イタリア、イー 3 5 0 4 2 パドヴァ、エステ、ヴィア・ロレンツォ・デ・アントーニ 1 7 / 1 9、
バイオコンパティビリティ・イノベーション・ソチエタ・ア・レスポンサビリティ・リミタータ内

F ターム (参考) 4C081 AA01 AA07 BB08 CE11 DA15