(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월27일
(11) 등록번호 10-1933237
(24) 등록일자 2018년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/34 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01) *A61L 33/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7026084
(22) 출원일자(국제) 2012년03월09일
심사청구일자 2017년03월08일
(85) 번역문제출일자 2013년10월02일
(65) 공개번호 10-2014-0015429
(43) 공개일자 2014년02월06일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/054179
(87) 국제공개번호 WO 2012/123384
국제공개일자 2012년09월20일
(30) 우선권주장
61/451,732 2011년03월11일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2001041827 A1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
더블유.엘. 고어 앤드 어소시에이트스, 인코포레이티드
미국 델라웨어 (우편번호 19714) 뉴와크 페이퍼 밀 로드 555 (피.오.박스 9329)
(72) 발명자
레온테인 카린
스웨덴 에스-19461 업란즈 바스비 카날바겐 3비 카르메다 에이비 내
안토니 페르
스웨덴 에스-19461 업란즈 바스비 카날바겐 3비 카르메다 에이비 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김태홍, 김진희

전체 청구항 수 : 총 51 항 심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 **고정화된 생물학적 실체의 개선**

(57) 요 약

적층 코팅을 포함하는 표면을 구비한 장치로서, 외부 코팅층이 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 80: 1 이상의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 1 이상의 작용성 말단기가 이에 공유 결합된 항응고체를 갖는 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 복수개의 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함하는 장치를 기술한다.

(72) 발명자

니스트롬 다니엘

스웨덴 에스-19461 업란즈 바스비 카날바겐 3비 카르메다 에이비 내

베고박 파울

미국 86018 애리조나주 플래그스태프 이. 레인지 레인 3901

피트르잭 크르지즈토프

미국 86001 애리조나주 플래그스태프 폰데로사 파크웨이 760

(56) 선행기술조사문헌

WO2010029189 A2

US5527524 A

WO2008063157 A2

US20080267903 A1

명 세 서

청구범위

청구항 1

적층된 코팅을 포함하는 표면을 구비하는 장치(device)로서, 외부 코팅층은 (i) 분자량이 14~1,000 Da인 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 80:1 이상의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 작용성 말단기를 갖고, 1 이상의 작용성 말단기는 이에 공유 결합된 항응고체를 갖는 것을 특징으로 하는 복수개의 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함하고,

상기 항응고체는 헤파린 모이어티이고,

상기 헤파린 모이어티는 과분지형 중합체 분자에 부착된 단일 지점인 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 헤파린 모이어티는 전체 길이 헤파린 모이어티인 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 헤파린 모이어티는 아질산 분해된 헤파린 모이어티인 장치.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 헤파린 모이어티는 헤파린 모이어티의 환원성 말단을 통해 과분지형 중합체 분자에 결합되는 것인 장치.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 과분지형 중합체는 폴리아미도아민, 폴리프로필렌이민, 폴리에틸렌이민 및 폴리아민 중합체, 및 폴리아미도아민, 폴리프로필렌이민, 폴리에틸렌이민 및 폴리아민 과분지형 중합체 중 1 이상을 포함하는 공중합체에서 선택되는 것인 장치.

청구항 6

제5항에 있어서, 과분지형 중합체는 폴리아미도아민인 장치.

청구항 7

제5항에 있어서, 과분지형 중합체는 폴리에틸렌이민인 장치.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 작용성 말단기는 1차 아민 기인 장치.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 코어 모이어티는 분자량이 50~130 Da인 장치.

청구항 10

제9항에 있어서, 과분지형 중합체는 코어 모이어티로서 에틸렌디아민을 갖는 것인 장치.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 과분지형 중합체는 덴드라이머인 장치.

청구항 12

제11항에 있어서, 덴드라이머는 PAMAM 덴드라이머인 장치.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 과분지형 중합체는 분자량이 25,000~200,000 Da인 장치.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량의 비율은 100:1 이상인 장치.

청구항 15

제14항에 있어서, 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량의 비율은 200:1~5000:1인 장치.

청구항 16

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 과분지형 중합체 분자는 직경이 5~30 nm인 장치.

청구항 17

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 과분지형 중합체 분자는 가교되어 2 이상의 과분지형 중합체 분자의 응집체를 형성하는 것인 장치.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항응고체는

i. 2차 아민 결합;

ii. 아미드 결합;

iii. 티오에테르 결합; 또는

iv. 1,2,3-트리아졸 결합

을 포함하는 링커를 통해 과분지형 중합체 분자에 공유 결합되는 것인 장치.

청구항 19

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항응고체는 자유 라디칼 개시 반응을 통해 형성된 링커를 통해 과분지형 중합체 분자의 작용성 말단기에 공유 결합되는 것인 장치.

청구항 20

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 스페이서는 링커를 과분지형 중합체 분자 및/또는 항응고체로부터 분리시키는 것인 장치.

청구항 21

제20항에 있어서, 스페이서는 PEG 사슬을 포함하는 것인 장치.

청구항 22

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적층된 코팅은 양이온성 중합체 및 음이온성 중합체의 코팅 이중층을 하나 이상 포함하는 것인 장치.

청구항 23

제22항에 있어서, 최내층이 양이온성 중합체 층인 장치.

청구항 24

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 외부 코팅층 이외의 적층된 코팅 중 1 이상의 층은 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 80:1 이상의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량의 비율, 및 (iv) 1 이상의 항응고체 모이어티로 유도체화되거나 또는 유도체화되지 않은 작용성

말단기를 가지는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함하고, 상기 항응고체 모이어티는 헤파린 모이어티이고, 상기 헤파린 모이어티는 과분지형 중합체 분자에 부착된 단일 지점인 장치.

청구항 25

제22항에 있어서, 음이온성 중합체는 음이온성 다당류인 장치.

청구항 26

제22항에 있어서, 음이온성 중합체는 순(net)음전하를 갖는 작용성화된 과분지형 양이온성 중합체인 장치.

청구항 27

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 외부 코팅층의 과분지형 중합체 분자는 외부 코팅층의 다른 과분지형 중합체 분자에 가교결합되거나 또는 하층의 분자에 가교결합되는 것인 장치.

청구항 28

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 의료 장치인 장치.

청구항 29

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 분석 또는 분리 장치인 장치.

청구항 30

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 장치의 적층된 코팅은 항응고체 이외에 1 이상의 유익제를 포함하고, 상기 1 이상의 유익제는 약물 분자 및 윤활제에서 선택되는 것인 장치.

청구항 31

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 장치의 제조 방법으로서, 임의의 순서로,

i. 각 과분지형 중합체 분자가 다수개의 항응고체에 공유 결합되도록 과분지형 중합체 분자의 다수개 작용성 말단기를 항응고체와 반응시키는 단계; 및

ii. 과분지형 중합체 분자를 장치 표면에 부착시키는 단계

를 포함하고,

상기 항응고체는 헤파린 모이어티이고,

상기 헤파린 모이어티는 과분지형 중합체 분자에 부착된 단일 지점인 제조 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 과분지형 중합체 분자와 항응고체 사이에 공유 결합을 형성하기 위한 적절한 작용기를 도입하기 위해 단계 (i) 전에 과분지형 중합체 분자 및/또는 항응고체를 개질시키는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 제조 방법의 제1 단계는 단계 (i)이고 용액에서 수행되는 것인 제조 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, 제조 방법의 제1 단계는 단계 (ii)이고 장치의 외부 코팅층을 항응고체 용액과 접촉시키는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 35

제31항에 있어서, 외부 코팅층의 과분지형 중합체 분자는 외부 코팅층의 다른 과분지형 중합체 분자에 가교결합되는 것인 제조 방법.

청구항 36

제31항에 있어서, 외부 코팅층의 과분지형 중합체 분자는 하층의 분자에 가교결합되는 것인 제조 방법.

청구항 37

(i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 80:1 이상의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량의 비율, 및 (iv) 1 이상의 작용성 말단기가 이에 공유 결합된 항응고체를 갖는 작용성 말단기를 가지며,

상기 항응고체는 헤파린 모이어티이고,

상기 헤파린 모이어티는 과분지형 중합체 분자에 부착된 단일 지점인 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 38

제37항에 있어서, 헤파린 모이어티는 전체 길이 헤파린인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 39

제37항에 있어서, 헤파린 모이어티는 아질산 분해 헤파린인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 헤파린 모이어티는 헤파린 모이어티의 환원성 말단을 통해 과분지형 중합체 분자에 부착되는 것인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 41

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 작용성 말단기는 1차 아민 기인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 42

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 과분지형 중합체는 코어 모이어티로서 에틸렌디아민을 갖는 것인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 43

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 과분지형 중합체는 덴드라이머인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 44

제43항에 있어서, 덴드라이머는 PAMAM 덴드라이머인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 45

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 과분지형 중합체는 분자량이 25,000~200,000 Da인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 46

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 과분지형 중합체의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량의 비율은 200:1~5000:1인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 47

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 순양전하를 갖는 것인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 48

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 순음전하를 갖는 것인 양이온성 과분지형 중합체 분자.

청구항 49

(a) 장치를 처리하여 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, 및 (iii) 80:1 이상의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량의 비율을 가지며 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함하는 외부 코팅층을 포함하는 표면 코팅을 나타내는 단계;

(b) 1 이상의 상기 작용성 말단기를, 과분지형 양이온성 중합체 상의 반응성 작용기와 반응할 수 있는 기를 보유하도록 작용화시킨 항응고체 분자와 반응시켜 이를 통해 과분지형 양이온 중합체에 항응고체를 부착시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 획득될 수 있고,

상기 항응고체는 헤파린 모이어티이고,

상기 헤파린 모이어티는 과분지형 중합체 분자에 부착된 단일 지점인 비혈전형성 장치.

청구항 50

(a) 장치를 처리하여 양으로 하전된 중합체 표면층을 나타내는 단계;

(b) (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, 및 (iii) 80:1 이상의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량의 비율을 갖고 복수개의 음으로 하전된 항응고체를 갖는 것을 특징으로 하는 작용화된 양이온성 과분지형 중합체 분자를 상기 중합체 표면층과 회합시키는 단계로서, 상기 작용화된 과분지형 양이온성 중합체는 순음전하를 갖는 것인 단계

를 포함하는 방법으로 획득될 수 있고,

상기 항응고체는 헤파린 모이어티이고,

상기 헤파린 모이어티는 과분지형 중합체 분자에 부착된 단일 지점인 비혈전형성 장치.

청구항 51

(a) 장치를 처리하여 음으로 하전된 중합체 표면층을 나타내는 단계;

(b) (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, 및 (iii) 80:1 이상의 총분자량 대 코어 모이어티 분자량의 비율을 가지며 1 이상의 음으로 하전된 항응고체를 갖는 것을 특징으로 하는 작용화된 양이온성 과분지형 중합체 분자를 상기 중합체 표면층과 회합시키는 단계로서 상기 작용화된 양이온성 과분지형 중합체는 순양전하를 갖는 것인 단계를 포함하는 방법으로 획득될 수 있고,

상기 항응고체는 헤파린 모이어티이고,

상기 헤파린 모이어티는 과분지형 중합체 분자에 부착된 단일 지점인 비혈전형성 장치.

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고정화된 생물학적 실체를 포함하는 표면 코팅을 갖는 장치(device)에 고정된 생물학적 실체, 이를

제조하는 방법 및 중간체에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 고정화된 항응고체 예컨대 헤파린 및 장치, 예를 들면, 고정화된 헤파린을 포함하는 표면 코팅을 갖는 의료, 분석 및 분리 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 의료 장치가 신체 내에 존재하거나, 또는 체액과 접촉할 경우, 다수의 상이한 반응들이 일어나게 되고, 그 중 일부는 장치 표면과 접촉하는 혈액의 응고를 초래한다. 이러한 심각한 부작용에 대응하기 위해, 공지의 항응고 화합물인 헤파린을 의료 장치를 그 체내에 위치시키기 전에, 또는 그 체액과 접촉시킬 때, 항혈전 효과를 제공하기 위해 장기간 전신 투여해 왔다.

[0003] 트롬빈은 모두 함께 작용하여 혈액과 접촉시 표면에서 혈전을 형성시키는, 몇몇 응고 인자 중 하나이다. 항트롬빈(항트롬빈 III이라고도 알려짐)("AT" 또는 "ATIII")은 가장 유명한 응고 억제제이다. 이는 트롬빈 및 다른 응고 인자의 작용을 중화시켜서 혈액 응고를 제한하거나 또는 국한시킨다. 헤파린은 항트롬빈이 응고 인자를 억제하는 속도를 극적으로 증강시킨다.

[0004] 그러나, 고용량의 헤파린을 전신 치료하는 것은 흔히 출혈이 두드러진 심각한 부작용과 결부된다. 다른 드물지만, 심각한 헤파린 요법의 합병증은 혈전증(정맥 및 동맥 모두)을 초래할 수 있는 헤파린 유도 혈소판감소증(HIT)이라 불리는 면역 반응이다. 예를 들어 수술 동안 고용량 전신 헤파린 치료도 역시(헤파린 요법을 모니터링 및 가이드하는데 사용되는) 활성화 응고 시간의 빈번한 모니터 및 필요에 따라 상응하는 용량 조정이 요구된다.

[0005] 그러므로 환자의 전신 헤파린 치료 요구가 불필요하거나 또는 제한될 경우 해결책이 추구되었다. 이는 헤파린의 항응고성을 이용하는 의료 장치의 표면 개질을 통해 달성할 수 있다고 여겨졌다. 따라서, 의료 장치표면 비혈전형성성이 생성되도록 헤파린층이 의료 장치 표면에 부착되는 경우 수많은 보다 더 또는 보다 덜한 성공적인 기술들이 개발되어 왔다. 장기간 생활성이 요구되는 장치의 경우, 바람직하게 헤파린층은 침출 및 분해에 내성이 있어야 한다.

[0006] 헤파린은 사카라이드 유닛 상에 음으로 하전된 설페이트 및 카르복실산 기를 보유하는 다당류이다. 다중양이온 표면에 헤파린의 이온 결합이 시도되지만, 이들 표면 개질은 시간 경과에 따라 안정성 결핍을 겪게 되는 경향이 있어 표면으로부터 헤파린이 침출됨에 따라 비혈전형성성 기능 부족이 야기된다.

[0007] 그 후 헤파린을 표면 상의 기에 공유 결합시킨 다양한 표면 개질이 실시되었다.

[0008] 비혈전형성성 의료 장치를 만드는데 있어 가장 성공적인 방법들 중 하나는 장치의 개질 표면에 헤파린 단편을 공유 결합시키는 것이었다. 일반적인 방법 및 그 개선법이 유럽 특허 EP-B-0086186, EP-B-0086187, EP-B-0495820 및 US 6,461,665에 기술되어 있다.

[0009] 이들 특허는 먼저, 예를 들면, 아질산 분해법을 이용해 헤파린 다당류 사슬을 선택적으로 절단하여 말단 알데히드 기를 형성시키는 것에 의해 표면 개질 기재를 제조하는 방법을 기술하고 있다. 다음으로, 의료 장치의 표면 상에 1차 아미노 기를 보유하는 1 이상의 표면 개질층을 도입시킨 후, 다당류 사슬 상의 알데히드 기와 표면 개질층 상의 아미노 기를 반응시키고 나서 중간체 쉬프 베이스의 환원이 후속되어 안정한 2차 아민 결합이 형성된다.

[0010] 다른 표면 개질법도 알려져 있다. 예를 들면, US 2005/0059068은 마이크로어세이에 사용되는 기재에 관한 것이다. 활성화된 폴리아민 덴드라이머(dendrimer)를 실란 함유 모이어티(moiety)를 통해 기재 표면에 공유 결합시킨다. 덴드라이머는 NH_2-, OH, COOH 또는 SH 기 등의 말단 잔기 및 3차 아민인 분지점을 갖는다. OH 또는 NH_2 작용기를 포함하는 분자는 덴드라이머의 말단 잔기를 통해 덴드라이머에 결합할 수 있다. 기재가 마이크로어세이에 사용되며, 일반적으로 슬라이드, 비드, 웰 플레이트이므로, OH 또는 NH_2 기를 포함하는 모이어티는 핵산, 단백질 또는 펩타이드이다.

[0011] WO 03/057270는 장치, 예를 들면, 표면 친수성이 높은 매끄러운 코팅을 갖는 콘택트 렌즈를 기술하고 있다. 글리코사미노글리칸(예를 들면, 헤파린 또는 콜드로이틴 설페이트) 및 PAMAM 덴드라이머를 포함하여 코팅 재료에 대한 수많은 예들이 제시되어 있다. PAMAM 덴드라이머는 바람직한 코팅들 중 하나라고 언급된다. 이 문헌은 PAMAM 덴드라이머 및 폴리아크릴아미드-코-폴리아크릴산 공중합체(PAAm-코-PAA)의 다중층을 갖는 콘텍트 렌즈를 예시하고 있다. 이 코팅은 콘택트 렌즈를 2종의 코팅 재료 용액에 연속적으로 침지시켜서 형성되고, 외층은 PAAm-코-PAA이다.

[0012] US 2003/0135195는 콜로이드 지방족 폴리우레탄 중합체, 폴리(1-비닐피롤리돈-코-2-디메틸아미노에틸메타크릴레이트)-PVP의 수성 희석물 및 덴드라이머의 혼합물로 형성된 고도의 매끄러운 친수성 코팅이 구비된 카테터 등의 의료 장치를 교시하고 있다. 이 문헌은 덴드라이머, 물, N-메틸-2-피롤리돈 및 트리에틸아민의 혼합물 중 폴리(1-비닐피롤리돈-코-2-디메틸아미노에틸메타크릴레이트)-PVP 및 활성제(예를 들면, 헤파린)의 용액 내 지방족 폴리우레탄 중합체의 콜로이드 분산물에 장치를 침지시켜 그 장치에 코팅을 도포하는것에 대해 교시하고 있다. 이 문헌은 헤파린이 덴드라이머 내 공극에 포함될 수 있다고 교시하고 있다. 이 문헌은 또한 충전된 헤파린이 예정 속도로 친수성 중합체 메트릭스로부터 용리된다고 교시한다.

[0013] US 2009/0274737는 임플란트 예컨대 적심각(wetting angle)이 80° 인 친수성 표면을 구비한 스텐트를 교시한다. 여기에는 표면에 영구적으로 결합된 1, 2 또는 그 이상의 항응고 성분이 존재할 수 있고, 항응고 성분의 예에는 헤파린 및 일부 덴드라이머, 특히 황산화 덴드라이머가 포함된다. 표면은 항응고제가 부착되도록 작용화될 수 있고 작용화의 예에는 실란화 및 1,1'-카르보닐디이미다졸(CDI)와의 반응이 포함된다.

[0014] US 4,944,767은 많은 양의 헤파린을 흡착할 수 있는 중합성 재료에 관한 것이다. 이 재료는 폴리우레탄 사슬이 폴리아미도아민 사슬과 상호연결된 블록 공중합체이다.

[0015] 본 발명자들의 이전 국제출원 WO 2010/029189은 1,2,3-트리아졸 결합을 통해 코팅에 공유 부착된 헤파린 등의 항응고 분자로 코팅된 의료 장치에 관한 것이다. 이 문헌은 폴리아민의 아자이드 또는 알킨 작용화; 알킨 또는 아자이드 작용화된 헤파린(천연 및 아질산 분해 헤파린 둘 모두)의 제조법; 및 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 유도제화된 중합체에 유도체화된 헤파린을 연결하는 방법을 기술하고 있다.

[0016] WO 2010/029189에 기술된 생성물은 유용하지만 본 발명자들은 헤파린 또는 다른 부착된 항응고 분자의 생체이용률을 증가시키고, 노화에 높은 안정성을 가지며 탄에 탄한 제조법으로 제조할 수 있고 일관성이 높은 제품을 생산할 수 있는 개선된 재료를 개발하고자 하였다.

[0017] 헤파린은 효소, 세린 프로테아제 억제제(예컨대 항트롬빈), 성장 인자 및 세포외 매트릭스 단백질, DNA 변형 효소 및 호르몬 수용체를 포함한 광범위한 생분자에 결합하는 능력을 갖는다. 크로마토그래피에 사용하게 되면, 헤파린은 친화성 리간드뿐만 아니라 높은 전하 밀도의 이온 교환제이다. 따라서 생분자가 불용성 지지체 상에 고정된 세파린에 의해 특이적이고 가역적으로 흡착될 수 있다. 그러므로 고정화된 헤파린은 수많은 유용한 비의료 용도, 특히 분석 및 분리 용도를 갖는다.

발명의 내용

[0018] 본 발명에 따르면, 상기 기술한 바와 같이, 외부 코팅층이 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총분자량, (iii) 80: 1 이상(예를 들면, 100: 1 이상)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자링 비율, 및 (iv) 그 1 이상의 작용성 말단기에 항응고제가 공유 결합된 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 복수의 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함하는, 적층 코팅을 포함하는 표면을 구비한 장치를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 다양한 유형의 과분지형 중합체의 2-D를 개략적으로 표시한 도면으로, A는 모든 단량체 유닛에 (이론적으로) 분지점을 갖는 중합체를 나타내고; B는 선형 골격 및 이에 부착된, 덴드론이라 하는 분지된 웻지를 갖는 분지형 중합체를 나타내며; C는 선형 절편에 도입된 분지 유닛을 갖는 중합체를 나타내고; 및 D는 덴드라이머를 나타낸다.

도 2는 3세대를 갖는 2-D의 예시적인 PAMAM 덴드라이머를 도시한 도면이다(3-D 구조는 대략 구형임).

도 3은 코어가 모두 치환된, 3종의 반응성 작용기를 갖고, 제1층은 모두 치환된 6종의 반응성 작용기를 가지며, 제2 층은 12종의 반응성 작용기를 갖는 예시적인 제2 세대 덴드라이머의 2-D를 개략적으로 도시한 도면이다. 이러한 덴드라이머는 3-D 구조에서 실질적으로 구형을 채택하게 된다.

도 4는 헤파린 모이어티(또는 다른 항응고체) 상의 제1 작용기가 어떻게 덴드라이머 또는 다른 고분지형 중합체의 말단 기인 제2 작용기와 반응하게 되는지를 도시한 도면이다.

도 5는 몇몇 덴드라이머 또는 다른 과분지형 중합체가 어떻게 헤파린 또는 다른 항응고체에 의해 작용화되지 전각각에 가교되는지 도시한 도면이다.

도 6는 헤파린 또는 다른 항응고체에 의해 작용화시킨 몇몇 덴드라이머 또는 다른 과분지형 중합체가 어떻게 각각에 대해 가교되는지 도시한 도면이다.

도 7은 본 발명의 성분을 개략적으로 나타낸 도면이다. 이 도면에서는 외부 코팅층 내 항응고체를 보유하는 과분지형 중합체가 어떻게 외부 코팅층의 다른 과분지형 중합체 및 하층과 상호작용(공유 결합 및/또는 이온 상호작용 포함)하는지 보여준다.

도 8은 다양한 비혈정형성성 코팅과 접촉 후 혈중에 잔류하는 혈소판의 비율을 도시한 도면이다(실시예 6 참조).

도 9는 본 발명에 따라 헤파린-함유 코팅으로 코팅하기 전 및 후 PVC 튜브를 톨루이딘 블루로 염색한 예시적인 도면이다(실시예 3.2 및 실시예 6.3 참조). 도 9에서; 플레이트 A: 전; 플레이트 B: 후.

도 10은 다양한 비혈전형성 코팅으로 접촉한 후 혈중에 잔류하는 혈소판의 비율을 도시한 도면이다(실시예 11 참조).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 항응고체

[0021] 항응고체는 응고 또는 혈전 형성을 방지하도록 포유동물 혈액과 상호작용할 수 있는 실체이다.

[0022] 항응고체는 당분야의 숙련가에게 잘 알려져 있으며 이들 대부분은 올리고당이거나 다당류이다. 이들 실체 중 일부는 글루코사민, 갈락토사민, 및/또는 우론산을 함유하는 화합물을 포함하는 글리코스아미노이 "헤파린 모이어티"이고 특히 전체 길이 헤파린(즉, 천연 헤파린)이다.

[0023] 용어 "헤파린 모이어티"는 헤파린 분자, 헤파린 분자의 단편, 또는 헤파린의 유도체 또는 유사체를 의미한다. 헤파린 유도체는 헤파린의 임의의 기능적 또는 구조적 변형체일 수 있다. 대표적인 변형체에는 헤파린의 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염, 예컨대 나트륨 헤파린(예를 들면, 헵살 또는 폴라린), 칼륨 헤파린(예를 들면, 클라린), 리튬 헤파린, 칼슘 헤파린(예를 들면, 칼시파린), 마그네슘 헤파린(예를 들면, 쿠트헤파린), 저분자량 헤파린(산화 탈중합 또는 탈아민 절단에 의해 제조, 예를 들면, 아르데파린 나트륨 또는 달테파린)이 포함된다. 다른 예에는 헤파란 설페이트, 헤파리노이드, 헤파린 기반 화합물 및 소수성 반대이온을 갖는 헤파린이 포함된다. 다른 바람직한 항응고체에는 인자 Xa의 항트롬빈-매기 억제성을 포함하는 "폰다파리눅스(fondaparinux)" 조성물(예를 들면, GlaxoSmithKline의 Arixtra)이라고 하는 합성 헤파린 조성물이 포함된다. 헤파린의 부가 유도체는 예를 들면 약한 아질산 분해(US 4,613,665) 또는 페리오데이트 산화(US 6,653,457) 및 헤파린 모이어티의 생활성이 보존된 당분야의 공지된 다른 개질 반응을 통해 개질된 헤파린 및 헤파린 모이어티를 포함한다.

[0024] 헤파린 모이어티는 또한 이하 기술되는 바와 같은 링커 또는 스페이서에 결합된 이러한 모이어티를 포함한다. 탈황산화 헤파린, 또는 예를 들면 우론산 모이어티의 카르복실산 기를 통해 작용화된 헤파린은 다른 형태의 헤파린 보다 덜 적합한데 이들이 대체로 다른 형태의 헤파린에 비해 항응고성이 떨어지기 때문이다. 헤파린 생활성이 보존되는 한 카르복실산 기의 단작용화 또는 저 작용화도가 허용될 수 있다.

[0025] 적절하게, 각 항응고체는 과분지형 중합체 분자에 부착된 단일 지점이고, 특히 말단 지점에 부착된다. 이러한 부착은 이하 기술되는 바와 같이 과분지형 중합체 분자 상의 작용성 말단기를 통해서 이루어진다. 항응고체가 말단 지점 부착된 헤파린 모이어티인 경우, 그 환원성 말단(때때로 환원성 말단의 C1 위치라고 함)을 통해 과분지형 중합체 분자에 적절하게 연결된다. 말단 지점 부착, 특히 환원성 말단 지점 부착의 장점은 항응고체(예를 들면, 헤파린 모이어티)의 생물학적 활성이 항응고체(예를 들면, 헤파린 모이어티)의 다른데 부착된 것과 비교하여 항트롬빈 상호작용 부위의 강화된 이용성 덕분에 극대화된다는 것이다.

[0026] 다수의 항응고체, 예를 들면 헤파린 모이어티가 존재하는 경우, 이들의 일부분 또는 모두가 다른 유형인 것이 가능하지만, 대체로 모두 동일한 유형이다. 항응고체는 보통 음이온성이다(헤파린 모이어티의 경우와 같음).

[0027] 다른 항응고체 예컨대 히루딘, 쿠마딘(와파린과 같은 4-히드록시쿠마린 유형의 비타민 K 길항제), 항혈소판 약물(예컨대 클로피도그렐 및 압식시맙), 아르가트로반, 트롬보모듈린 또는 항응고 단백질(예컨대 단백질 C, S 또는 항트롬빈)이 또한 사용에 고려될 수 있다. 항응고체는 또한 효소 예컨대 아피라아제를 포함한다. 이러한 물질들은 하전(예를 들어, 음이온성)되거나 또는 비하전될 수 있다. 그 생활성이 보존되도록 과분지형 중합체에 부착되는 방법은 당분야의 숙련가가 디자인할 수 있다.

[0028] 과분지형 중합체

[0029] 도 1에 다양한 유형의 과분지형 중합체의 예, A~D 유형을 개략적으로 도시하였다. 도 1에서, A는 모든 단량체 유닛에 분지점(이론적)을 갖는 중합체를 도시하였고; B는 선형 골격 및 이에 부착된, 덴드론이라 불리는 분지된 웻지를 갖는 분지형 중합체를 나타내며; C는 선형 절편에 도입된 분지 유닛을 갖는 중합체를 나타내고; D는 덴드라이머를 나타낸다. 이들 중합체는 코어 절편이 분자의 전체 크기에 대해 충분하게 작은 경우 본 발명의 내용에서 유용한 과분지형 중합체의 예이다.

[0030] 용어 "과분지형 중합체 분자"는 전형적으로 중심에서의 코어 모이어티로부터 뻗어나온 나무와 같은 분지 구조를 갖는 분자를 의미하는 것으로 당분야에서는 충분히 이해되고 있다. 본 발명에서, 이 용어는 또한 잘 알려져 있으며 분지도가 100%(경우에 따라 본원에서는 "완벽하게 분지된"이라고 하며, 다시 말해서 분지될 수 있는 작용기의 100%가 분지됨을 의미함)이고, 따라서 코어에 대해 고도로 대칭성인 덴드라이머를 포함한다.

[0031] 과분지형 중합체는 3가지의 기본 구조 성분, (i) 코어, (ii) 내부 및 (iii) 작용성 말단기로 이루어진다. 코어는 분자의 중심에 위치하고 덴드론이라고 하는 분지된 웻지가 이에 부착되어 있다. 덴드론은 완벽하게 분지되거나 또는 덜 완벽하게 분지된다.

[0032] 과분지형 중합체 분자의 코어는 다작용성(몇몇 동일한 유형이거나 또는 몇몇 상이한 유형의 작용성)이고 그것이 보유하는 작용기 개수는 분자에 도입되는 것이 가능한 분지의 개수를 의미한다. 전형적으로 코어의 모든 작용기가 분지화에 이용된다. 유사하게, 과분지형 중합체 분자의 형상은 코어 형상에 의해 결정되는데, 실질적으로 사면체 코어는 실질적으로 구형 과분지형 중합체 분자를 이루게 되고 보다 신장된 코어는 난원형 또는 타원형 과분지형 중합체 분자를 형성하게 된다.

[0033] 본 발명에 따라서, 코어 모이어티는 중합체의 전체 크기에 대해 비교적 작은 것이며, 분자량이 14~1,000 Da, 보다 일반적으로는 40~300 Da, 예를 들면 50~130 Da이다.

[0034] 덴드라이머는 분지도가 100%인 완벽하게 분지된 분자이므로, 이들 구조는 고도로 규칙적이고 따라서, 소정의 출발 재료의 경우, 유일하게 가변적인 것은 덴드라이머의 층 또는 세대의 수이다. 세대(generation)는 통상적으로 코어로부터 외쪽을 향해 번호 매겨진다. 예를 들면, 이하 표 2-4를 참조한다. 도 2는 제3 세대 덴드라이머를 도시하였고 도 3은 제2 세대 덴드라이머를 도시하였다. 이들의 고도로 일관적이고 대칭적인 구조때문에, 소정 세대의 덴드라이머에 대한 분자량 분포는 극도로 지협적이고, 이는 매우 일관적인 제품을 만들므로 매우 이롭다.

[0035] 다른 분지형 분자도 역시 다수의 분지를 포함하지만, 예를 들어, 분지도는 일반적으로 적어도 30%, 40% 또는 50%, 예를 들면 적어도 60%, 70%, 80% 또는 90%가 되게 된다. 덴드라이머와 달리, 이러한 과분지형 분자의 구조는 완벽하게 규칙적이지 않고 또한 대체로 둥근 구조를 채택할 수도 있다.

[0036] 전형적으로 코어는 중합체의 반복 유닛(들)과 동일하지 않는 분자 모이어티이다. 그러나, 일 구체예에서, 코어는 중합체의 반복 유닛(또는 반복 유닛 중 하나)와 동일한 유형의 모이어티이다.

[0037] 과분지형 중합체 분자는 대체로 층들을 코어로부터 구축하는, 분기식(divergent) 방법을 사용하거나, 또는 단편들을 구축하고 압축시키는 집중식(convergent) 방법을 사용하여 제조한다. 덴드라이머는 보다 일반적으로는 분기식 방법을 사용해 제조한다.

[0038] 덴드라이머의 합성에서, 매 분지 유닛의 부가 반응 동안 고도의 제어성이 필수적이고 최종 생산물은 1.00~1.05의 다분산 지수(PDI)를 보인다. 덴드론 크기는 단량체층의 수에 따라 좌우되고 매 부가되는 층은 세대(G)로 표시된다. 내부는 Abx 작용성(x = 2)을 갖는 분지 단량체로 이루어진다. 분지 유닛의 조심스러운 제조는 만약 B'이 B의 활성화 상태인 경우 A와 B'간 반응을 제어가능하게 만든다. 보다 거대한 덴드라이머는 둥근 형태의, 나노규모 크기인, 결과적으로 낮은 고유 점도를 갖는 구조를 만들게 된다.

[0039] 전통적으로, 덴드라이머는 ABx 단량체가 성장하는 종에 교대로 부가된 후 활성화/탈보호 단계가 후속되는 반복 기술을 이용해 합성된다. 이러한 프로토콜들은 말단 기 B'의 완전한 치환을 보장하는 효율적인 반응에 의존적이다. 임의의 탈선은 덴드라이머 성장 동안 축적되는 구조적 결함을 부여하여 지루하거나 또는 불가능한 정제 과정을 초래하게 된다.

[0040] 다음의 문헌 [Aldrichimica Acta(2004) 37(2) 1-52 "Dendrimers: building blocks for nanoscale synthesis"]을 참조하며, 이를 전체로 참조하여 본원에 포함시키며 예를 들여 덴드라이머 합성 및 명명법에 대한 추가 기술에 대한 42-43페이지를 참조한다.

[0041] 이러한 유형의 구조적 결합을 갖는 덴드라이머인 과분지형 중합체를 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0042] 덴드라이머가 아닌 과분지형 중합체는 예를 들면, 반응성 단량체 또는 1 보다 많은 반응성 단량체의 중합에 의해 형성될 수 있다. 예를 들면, 폴리아민인 과분지형 중합체는 예를 들어 염기를 처리하는 것에 의해 아지리딘의 중합으로 제조할 수 있다.

[0043] 예시적인 코어 모이어티에는 아민 예컨대 암모니아(Mw 14 Da), 디아민(예를 들어, 에틸렌 디아민(Mw 56 Da), 프로필렌 디아민(Mw 70 Da) 또는 1,4-디아미노부탄(Mw 84 Da)), 및 트리아민(예를 들어, 디에틸렌트리아민($NCH_2CH_2NHCH_2CH_2N$)(Mw 99 Da) 또는 1,2,3-트리아미노프로판(89Da))의 모이어티가 포함된다. 다른 코어는 산소 포함 $C(Me)(CH_2O)_3$(Mw 117 Da) 또는 황 포함 ($NCH_2CH_2S-SCH_2CH_2N$)(Mw 148 Da)일 수 있다.

[0044] 양이온성 과분지형 중합체는 약 pH 7에서 주로 양전하를 갖게 되는데 이는 즉 오직 pH 7에서 양전하를 갖는 하전된 기 및 미전하 기를 갖거나 아니면(덜 바람직함) 양으로 하전된 기보다 우세한 pH 7에서 음으로 하전된 기를 갖는다는 것이다. 본 발명의 양이온성 과분지형 중합체는 전형적으로 작용성 말단기로서 1차 아민을 갖게 된다.

[0045] 본 발명에 따라 사용되는 과분지형 중합체는 많은 작용성을 포함하게 되는데 예를 들면 폴리아민(전체적으로 또는 실질적으로 2차 및 3차 아민 기를 포함하고 작용성 말단기로서 1차 아민을 가짐), 폴리아미도아민(아미드 기 및 2차와 3차 아민 기 및 작용성 말단기로서 1차 아민을 가짐) 또는 아민 작용성을 갖는 폴리에테르(예를 들어, 폴리에테르 예컨대 말단기가 1차 아민으로 변형된 PEG 등)일 수 있다.

[0046] 과분지형 중합체의 예시적인 패밀리에는 암모니아 또는 디아민 또는 트리아민(예를 들어, 에틸렌디아민)의 모이어티가 코어 모이어티로 사용될 수 있고 분지형 분자의 세대 추가가 암모니아 또는 자유 아민 기를 예를 들어, 메틸 아크릴레이트와 반응시킨 후 에틸렌 디아민을 반응시켜 외표면 상에 다수의 자유 아민 기를 갖는 구조를 만들게 하는 것에 의해 구축할 수 있는 폴리아미도아민(PAMAM)이 있다. 후속 세대는 메틸 아크릴레이트 및 에틸렌 디아민과의 추가 반응에 의해 구축할 수 있다. 내부층들의 모든 1차 아민 기가 메틸 아크릴레이트 및 에틸렌 디아민과 반응된 구조가 덴드라이머가 된다. PAMAM 덴드라이머는 Dendritech Inc.에서 제조한, 상품명 Starburst®로 입수가능하다. Starburst 덴드라이머는 Dendritech Inc., Sigma Aldrich 및 Dendritic Nanotechnologies(DNT)에서 판매한다.

[0047] 다른 예시적인 과분지형 중합체는 폴리아민 예컨대 개별 빌딩 블록의 중합에 의해 형성된 폴리프로필렌이민(PPI) 및 폴리에틸렌이민(PEI) 중합체가 포함될 수 있다. PPI 기반 과분지형 중합체는 또한 코어 예컨대 디아미노부탄으로부터 합성될 수 있고 1차 아민 기와 아크릴로니트릴과의 반응과 후속 수소화에 의해 구축될 수 있다. PPI 덴드라이머는 상품명 Astramol™으로 입수할 수 있고 DSM 및 Sigma Aldrich에서 판매한다. 폴리에틸렌이민(PEI) 중합체는 예를 들어, BASF, Nippon Shokubai 및 Wuhan Bright Chemical에서 입수할 수 있다.

[0048] 따라서, 과분지형 중합체는 폴리아미도아민, 폴리프로필렌이민, 폴리에틸렌이민 및 다른 폴리아민 중합체, 및 폴리아미도아민, 폴리프로필렌이민, 폴리에틸렌이민 및 폴리아민 과분지형 중합체 중 1 이상을 포함하는 공중합체에서 선택될 수 있다.

[0049] 대체로, 작용성 말단기로서 1차 아민을 갖는 양이온성 과분지형 중합체, 예를 들면 PAMAM 또는 폴리에틸렌이민 또는 폴리프로필렌이민이 본 발명에서 사용하기에 특히 적합하다.

[0050] 에스테르, 카르보네이트, 무수물 및 폴리우레탄을 포함하는 과분지형 아민화 중합체는 이들이 분해되는 경향이 있어서 덜 적합하다. 하지만, 생체안정성은 생분해성 기의 수 및 비율에 따라 좌우될 수 있고 따라서 일부는 본 발명 내에서 적합할 수 있다.

[0051] 일부 과분지형 중합체의 특성을 이하 표 1에 기술한다.

표 1

[0052]

적절한 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율의 과분지형 중합체의 예					
유형	공급처	상표명	코어	분자량 [Da]	비율
PEI	BASF	Lupasol®WF	에탄-1,2-디아민 (Mw 56 Da)	25,000	~450:1

PAMAM	Dendritech DNT Sigma Aldrich	Starburst® G3-G10	에탄-1,2-디아민 (Mw 56 Da)	7,000 -935,000 (e.g. 7,000-900,000)	~125:1 - 16,700:1
PPI	DSM Sigma Aldrich	Astramol™ Am-64	부탄-1,4-디아민 (Mw 84 Da)	7,000	~85:1
PEI	Nippon Shokubai	Epomin-P-1050	에탄-1,2-디아민 (Mw 56 Da)	70,000	~1250:1
PEI	Wuhan Bright Chemical	G-35	에탄-1,2-디아민 (Mw 56 Da)	70,000	~1250:1
다른 유형의 구조를 갖는 중합체의 예(본 발명의 범주 내에서 적합하지 않은 과분지형 중합체)					
유형	제조사	상표명	코어	분자량 [Da]	비율
PEI	BASF	Lupasol®SN	미지정, 중합성	1,000,000	N/A
PEI	BASF	Lupasol®SK	미지정, 중합성	2,000,000	N/A
PEI	Wuhan Bright Chemical	G-35	에탄-1,2-디아민 (Mw 56 Da)	1,500	~25:1
PAMAM	Dendritech DNT Sigma Aldrich	Starburst® G1	에탄-1,2-디아민 (Mw 56 Da)	1,430	~26:1
PPI	DSM	Astramol™ Am-8	부탄-1,4-디아민 (Mw 84 Da)	316	~4:1

[0053] 도 2에 도시된 PAMAM은 코어 모이어티로서 에틸렌디아민을 기반으로 한다. 구축된 세대수에 따른 특성은 하기 표 2에 기술한다.

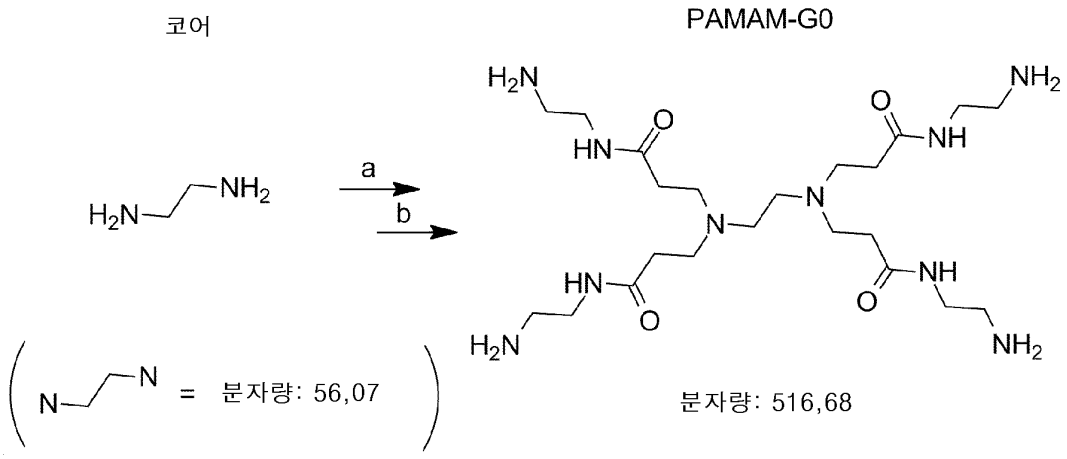
표 2

[0054]

세대	Mw(Da)	측정 직경/ 옴스트롬	표면 기의 수	총 Mw 대 코어 Mw의 비율
코어/G0	56 / 517*	15	4	~9:1
1	1,430	22	8	~26:1
2	3,256	29	16	~58:1
3	6,909	36	32	~125:1
4	14,215	45	64	~250:1
5	28,826	54	128	~515:1
6	58,048	67	256	~1,040:1
7	116,493	81	512	~2,080:1
8	233,383	97	1,024	~4,170:1
9	467,162	114	2,048	~8,340:1
10	934,720	135	4,096	~16,700:1

[0055] [Aldrichimica Acta(2004) 37(2) 1-52 "Dendrimers: building blocks for nanoscale synthesis"] 참조

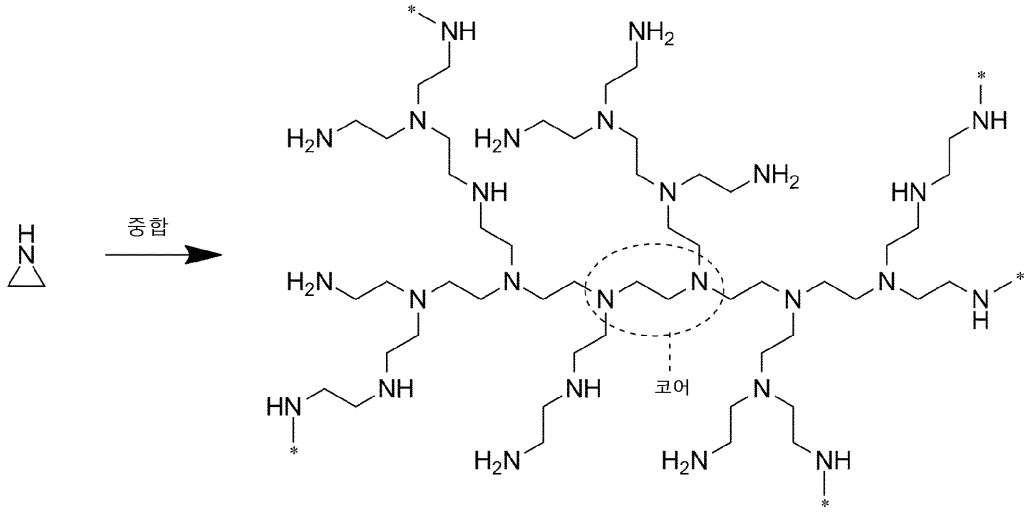
[0056] *구조, 반응식 1 참조



[0057]

[0058] **반응식 1**. PAMAM-G0 덴드라이머의 합성. 반응식 1에서: a는 메틸 아크릴레이트, b는 에탄-1,2-디아민임.

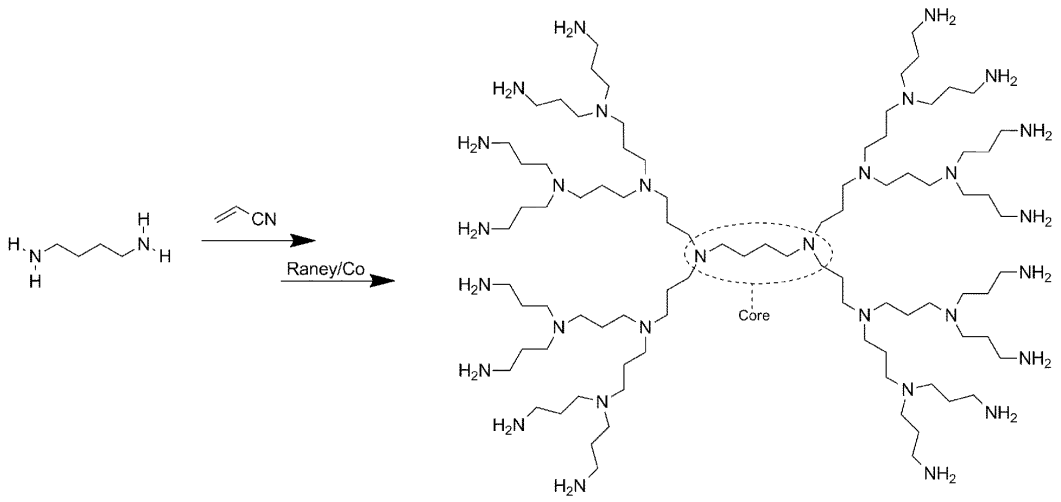
[0059] 아지리딘의 중합에 의한 에틸렌디아민 코어 기반의 예시적인 PEI 과분지형 중합체의 합성은 아래 반응식 2에 도시하였다.



[0060]

[0061] **반응식 2**. PEI 과분지형 중합체의 합성. 반응식 2에서: PEI 과분지형 중합체는 에탄-1,2-디아민 코어(Mw = 56 Da)를 갖는 제4 세대이다. *는 추가의 아지리딘 단량체가 부가될 수 있는 예시적인 위치를 의미한다.

[0062] 아크릴로니트릴의 중합에 의해 부탄, 1,4-디아민 코어 기반의 예시적인 PPI 덴드라이머의 합성을 하기 반응식 3에 도시하였다.



[0063]

[0064] 반응식 3. PPI 덴드라이머의 합성. 반응식 3에서: PPI 덴드라이머는 부탄-1,4-디아민 코어(Mw = 84 Da)를 갖는 제3 세대이다.

[0065] 본 발명에서 유용한 과분지형 중합체 분자는 전형적으로 분자량이 약 1,500~ 1,000,000 Da, 보다 전형적으로는 약 10,000~300,000 Da, 예를 들어, 약 25,000~200,000 Da이다. 본 발명에서 유용한 과분지형 중합체 분자는 적절하게 실질적으로는 형태가 구형이다. 전형적으로 이들은 레이저 광산란법으로 측정한 직경이 약 2~100 nm, 예를 들어, 2~30 nm, 특히 약 5~30 nm이다.

[0066] 과분지형 중합체가 PAMAM 덴드라이머인 경우, 전형적으로 분자량은 약 5,000~1,000,000 Da, 보다 전형적으로 약 12,000~125,000 Da이고 직경은 약 1~20 nm, 예를 들어, 2~10 nm, 특히 약 4~9 nm이다.

[0067] 본 발명에 따라 사용되는 과분지형 중합체에서, 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량의 비율은 적어도 80:1, 예를 들면 적어도 100:1, 예를 들면 적어도 200:1 예를 들어, 적어도 500:1 예를 들어, 적어도 1000:1이다. 이 비율은 전형적으로 20,000:1 보다 작고, 예를 들어, 10,000:1 보다 작으며, 예를 들어, 5,000:1 보다 작다. 예를 들면 이 비율은 80:1~20,000:1, 예를 들어, 200:1~5,000:1 예를 들어, 200:1~1600: 1 예를 들어, 400:1~1600:1이다.

[0068] 의심을 피하기 위해, 본원에서 언급하는 과분지형 중합체의 총분자량은 임의의 공유 결합된 항응고체 또는 임의의 유익제의 질량은 배제한다.

[0069] 이 비율은 코어의 분자량 및 과분지형 중합체의 총 분자량을 의미한다. 산출된 비율은 코어가 다양(화학 조성 및 분자량 면에서)하므로 가변적이고 세대의 분자량이 다양(단량체의 분자량 및 각 세대에 부착된 단량체의 수 면에서)하므로 가변적이게 된다.

[0070] PAMAM 덴드라이머의 경우, 에탄-1,2-디아민에서 유도된 코어가 바람직하고 세대의 수는 바람직하게는 3~10, 보다 바람직하게는 4~7, 즉 4, 5, 6 또는 7이다.

[0071] PAMAM 과분지형 중합체의 경우, 에틸렌디아민에서 유도된 코어가 바람직하고 과분지형 중합체에 도입되는 반응성 단량체(메틸아크릴레이트, Mw = 56 Da 및 에틸렌디아민, Mw = 57 Da)의 수는 각 단량체가 예시적으로 50~9,000, 예를 들어 100~5,000, 예를 들어, 100~2,000이다.

[0072] PEI 과분지형 중합체의 경우, 에틸렌디아민에서 유도된 코어가 바람직하고 과분지형 중합체에 도입된 아지리딘 단량체(Mw = 42 Da)의 수는 예시적으로 110~20,000, 예를 들면 110~10,000, 예를 들어 110~3,000 단량체이다.

[0073] PPI 과분지형 중합체의 경우, 부탄-1,4-디아민에서 유도된 코어가 바람직하고 과분지형 중합체에 도입되는 아크릴로니트릴 단량체(Mw = 56 Da)의 수는 예시적으로 120~17,000, 예를 들면 120~4,000, 예를 들어 120~1,000 단량체이다.

[0074] 본 발명의 장치에서 다수의 양이온성 과분지형 중합체 분자는 선택적으로 장치 표면 상의 다른 것과 가교될 수 있다. 가교는 과분지형 중합체 분자가 장치 표면에 도포되기 전이나 후 및 항응고체가 부착되기 전 또는 후에 일어날 수 있다(또 5, 6 참조).

[0075] 과분지형 중합체 분자가 가교되는 경우, 응집 과분지형 중합체를 형성하도록 가교될 수 있는 분자의 수는 2 또는 그 이상, 예를 들면 2-500 예를 들어, 2-10 예컨대 2-5이고; 각 분자는 1 이상의 가교(cross-linkage), 예를 들여 최대 10 가교에 의해 응집체 내 다른 분자에 부착될 수 있다.

[0076] 본 발명에서 유용한 2 이상의 과분지형 중합체 분자의 응집체는 전형적으로 분자량이 약 3,000~2,000,000 Da, 보다 전형적으로 약 50.000~500,000 Da이다. 본 발명에서 유용한 과분지형 중합체 응집체는 전형적으로 직경이 약 5~100 nm, 특히 약 20~100 nm이다.

[0077] 항응고체를 사용한 과분지형 중합체 분자의 유도체화

[0078] 과분지형 중합체 분자는 항응고체 예컨대 헤파린과 반응할 수 있는 다수의 작용성 말단기를 갖는다(도 4 참조). 작용성 말단기는 적절하게, 동일 유형이거나 또는 몇몇 다른 유형일 수 있다. 따라서, 본 발명의 장점 중 하나는 특이적 작용기의 작용성 말단기를 필요한 수로 갖도록 분자를 디자인하는 것이 가능하다는 것이다. 이는 아래층의 구축을 방해하지 않고 장치 표면 상에 원하는 양의 항응고체를 선택적으로 고정화시키는 것을 가능하게 만든다.

[0079] 과분지형 분자의 분지 구조는 본질적으로 선형 중합체 구조를 사용해 가능했던 것 보다 보다 고밀도의 표면 항응고체를 획득가능하게 하는 한편, 각 항응고체의 생체이용률이 이전 공지된 코팅을 사용해 달성된 것과 비교하여 감소되지 않고 실질적으로 증가할 수 있는 것을 보장하도록 항응고체의 충분한 간격을 여전히 이룰 수 있다.

[0080] 과분지형 중합체의 다른 유용한 특징은 반응성 작용성 말단기의 대부분이 과분지형 분자의 표면 상에 존재하므로 실질적으로 모든 항응고체가 과분지형 중합체의 표면 상에서 이용가능하다는 것이다. 이러한 효과는 특히 모든 이용가능한 작용기가 표면 상에 존재하는, 덴드라이머의 경우에 특히 두드러진다. 이러한 특징은 많은 반응성 작용성 말단기가 표면 보다는 내부에 숨어 있을 수 있는 통상의 코팅 중합체에 비해 특별한 장점을 제공한다. 이는 통상의 코팅 중합체에서 작용기와 반응하는 항응고체가 중합체 표면의 작은틈에 고정화될 수 있고 생체이용할 수 없게됨을 의미한다.

[0081] 유도체화된 과분지형 중합체 구조양식은 항응고체가 도입된 층, 예컨대 외부 코팅층 전반에 항응고체의 보다 균질하게 분포할 수 있게 하여, 원리적으로, 노화 안정성을 증가시키게 된다. 또한, 과분지형 중합체 상에 항응고밀도를 선택 및 조정하는 가능성은 장치 상에 보다 강건하고 예측가능한 항응고성 분포를 가능하게 한다. 과분지형 중합체-항응고체 접합체의 사전 제작은 또한 뱃치 간 가변성을 낮출 수 있는데, 표면 상에서 보다는 용액 중 항응고체(예를 들어, 헤파린)에 의해 과분지형 중합체의 치환도를 조정하는 것이 보다 용이하기 때문이다.

[0082] 본 발명의 추가 측면에서, (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 적어도 80: 1(예를 들어, 적어도 100: 1)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 1 이상의 작용성 말단기가 공유 결합된 항응고체를 갖는 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자를 제공한다.

[0083] 작용성 말단기에 결합된 항응고체의 수, 및 그 전하(예를 들어, 항응고체로서 헤파린의 경우 음으로 하전)에 좌우되어, 양이온성 과분지형 중합체는 순(net)양전하 또는 순음전하를 가지게 된다.

[0084] 적합하게 항응고체는 하나의 과분지형 중합체 분자 상의 단일 작용성 말단기에만 공유 결합을 가지며 임의의 다른 분자에는 그렇지 않다. 항응고체의 커플링은 과분지형 중합체의 코어가 아니라 과분지형 중합체의 오직 작용성 말단기에서만 일어난다.

[0085] 항응고체가 공유 결합되는 작용성 말단기의 수는 1 또는 그 이상, 예를 들면 2 또는 그 이상, 예를 들면 2~200, 예를 들어 10~100이지만 특별한 상한치는 없다. 결합될 수 있는 수는 양이온성 과분지형 중합체 분자의 크기 함수인, 이용가능한 말단 기의 수에 따라 좌우된다. 항응고체가 공유 결합하게 되는 작용성 말단기의 수는 이용가능한 작용성 말단기의 예를 들면 1~95%, 예를 들어 5~95%, 예를 들어, 10~80%, 예를 들어, 10~50%이다. 항응고체가 공유 결합하는 작용성 말단기의 수는 이용가능한 작용성 말단기의 예를 들면 5~50%, 예를 들어, 5~40%, 예를 들어 5~30%, 예를 들어 약 25%이다. 항응고체가 음이온성(예를 들어, 헤파린 모이어티의 경우)인 경우, 결합될 수 있는 수는 또한 최종 유도체화된 과분지형 중합체가 순양전하(너무 많은 음이온성 항응고체가 공유 결합되면 안되는 경우) 또는 순음전하를 갖는 것이 바람직한지 여부에 따라 좌우된다.

[0086] 양이온성 과분지형 중합체와 항응고체의 커플링

[0087] 전형적으로, 각 항응고체는 링커 및 경우에 따라 1 이상의 스페이서를 통해 양이온성 과분지형 중합체에 공유 결합된다. 링커는 항응고체 상의 작용기와 과분지형 중합체 상의 작용성 말단기의 반응에 의해 형성된다. 표 3 및 반응식 4는 사용된 반응 유형 및 공유 링커가 형성되는 작용기와 함께 과분지형 중합체에 항응고체를 결합시키는데 적합한 일부 링커 유형의 예를 보여준다. 예를 들어, 참조 문헌 [ISBN: 978-0-12-370501-3, Bio접합체 techniques, 2nd ed. 2008]을 참조한다. 그러나, 라디칼 커플링 반응도 고려될 수 있다.

[0088] 각 링커에 대해, 작용성 말단기 중 하나는 과분지형 중합체 상에 존재하고 다른 것은 항응고체 상에 존재한다. 대체적으로 어떠한 방식도 가능한데, 즉 표 3을 참조하며, 작용기 1 및 2는 각각 과분지형 중합체 및 항응고체 상에 존재할 수 있거나 또는 각각 항응고체 및 과분지형 중합체 상에 존재할 수 있다.

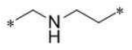
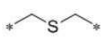
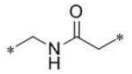
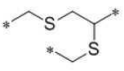
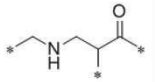
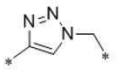
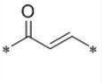
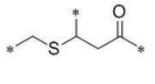
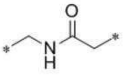
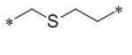
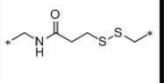
[0089] 일부 경우에서, 항응고체 및 과분지형 중합체는 1 보다 많은 작용기를 포함하는 링커에 의해 연결될 수 있다. 예를 들면, 링커가 티오에테르인 경우, 2작용성 분자(예를 들면, 각 말단에 SH 기를 가짐)는 개별적으로, 각 말단에서 알킨/알켄 작용화 항응고체 및 알킨/알켄 작용화 과분지형 중합체 분자에 연결되어 2개의 티오에테르를 포함하는 링커를 만들게 된다. 다르게, 비스-알킨/알켄 분자는 개별적으로 각 말단에서, 티올 작용화 항응고체 및 티올 작용화 과분지형 중합체에 연결되어 또한 2개의 티오에테르를 포함하는 링커를 형성하게 된다. 유사한 가능성이 표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 다른 링커 유형에 대해서도 존재한다. 과분지형 중합체는 또한 2

이상의 상이한 작용기, 예를 들면 아민 알킨 작용성을 보유하여, 항응고체가 1 보다 많은 링커 유형을 통해 과분지형 중합체의 작용성 말단기에 결합하게 될 수 있지만, 본 발명자들은 한가지 유형의 링커를 이용해 항응고체를 결합시키는 것을 선호한다.

[0090] 링커 모이어티는 전형적으로 분자량이 대략 14~200, 예를 들어 14~100 Da이다.

표 3

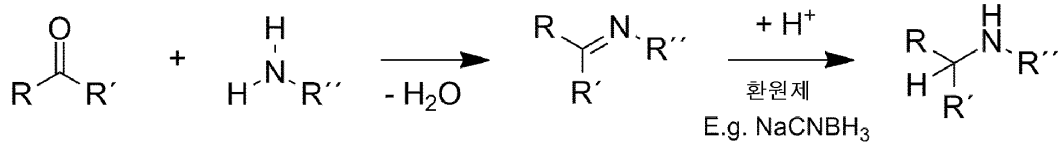
[0091]

반응 유형	작용기 1	작용기 2	링커	반응 유형	작용기 1	작용기 2	링커
환원성 아민화				티오-브로모			
아미드화				티올-아인 클릭			
미카엘 부가				CuAAC 클릭			
미카엘 부가				아미드화 (NHS-활성화)			
티올-엔 클릭				아미드화/ 이황화물 (SPDP)			

[0092] 표 3 및 반응식 4에 도시한 예시적인 화학적 구조는 이하 설명한다.

[0093] -C-NH-C- 결합

[0094] 환원성 아민화: 환원성 알킬화라고도 알려진, 환원성 아민화는 중간체 이민(쉬프 염기)를 통해 카르보닐 기를 아민 링커로 전환시키는 반응을 포함하는 아민화 형태이다. 카르보닐 기는 가장 일반적인 케톤 또는 알데히드이다.

[0095] 

[0096] **반응식 4**. 환원성 아민화

[0097] -C-NH-CHR-CHR-C(=O)- 결합

[0098] 미카엘 부가: 미카엘(Michael) 반응 또는 미카엘 부가는 알파, 베타 불포화 카르보닐 화합물에 카바니온 또는 다른 친핵체(예를 들면, 1차 아민 또는 티올)을 친핵성 부가하는 것이다. 보다 큰 공액 부가 범주에 속한다. C-C 결합을 가볍게 형성시키는 가장 유용한 방법 중 하나이다.

[0099] -C-S-C- 결합

[0100] 티오-브로모: 티오에테르 결합은 전형적으로 티올의 알킬화에 의해 제조된다. 티올은 브롬화물 화합무로가 반응하여 티오에테르 결합을 생성시킬 수 있다. 이러한 반응은 일반적으로 티올을 보다 친핵성 티올레이트로 전환시

키는, 염기 존재하에 수행된다.

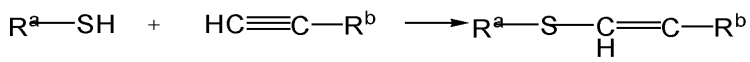
[0101] 티올-엔(thiol-Ene) 및 티올-아인(thiol-Yne): 다르게, 티올에테르 결합은 티올기 함유 제1 화합물을 알켄 또는 알킨 기 포함 제2 화합물과 반응시켜 제 조할 수 있다. 제1 및 제2 화합물은 각각 적절하다면 과분지형 중합체 분자 및 항응고체일 수 있다.

[0102] 적절하게, 반응은 환원제 예컨대 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드, 또는 다르게 디티오트레이톨 또느 나트롬 보로하이드라이드 존재하에 수행하여, 산화를 통한 2 티올 기의 바람직하지 않은 커플링 효과를 피하거나 반전시킨다.

[0103] 일 구체예에서, 반응은 라디칼 개시제를 사용해 개시한다. 라디칼 개시제의 예에는 4,4'-아조비스(4-시아노발레르산)이 있다. 추가 예로는 과황산칼륨, 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판] 디히드로클로라이드, 아조비스이소부티로니트릴(AIBN), 1,2-비스(2-(4,5-디히드로-1H-이미다졸-2-일)프로판-2-일)디아젠 디히드로클로라이드, 2,2'-(디아젠-1,2-디일)비스(2-메틸-1-(피롤리딘-1-일)프로판-1-이민) 디히드로클로라이드, 3,3'-((디아젠-1,2-디일비스(1-이미노-2-메틸프로판-2,1-디일))비스(아잔디일))디프로판산 테트라하이드레이트, 벤조페논 및 벤조페논의 유도체 예컨대 4-(트리메틸 암모늄메틸) 벤조페논 클로라이드가 있다. 추가 예에는 과황산암모늄이 있다.

[0104] 다른 구체예예서, 반응은 라디칼 개시제에 의해 개시되지 않는다. 대신 높은 pH(예를 들어, pH 8-11)의 조건이 사용된다. 이러한 유형의 반응은 활성화된 알켄 또는 알킨이 티올과의 반응에 사용시 보다 적합하다.

[0105] 티올기 함유 제1 화합물 및 알킨 기 함유 제2 화합물 간 반응은 다음과 같이 표시할 수 있다:

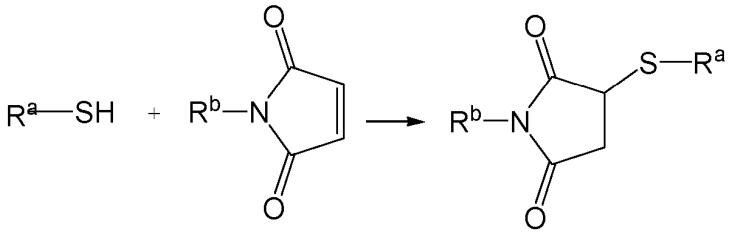
[0106] 

[0107] 상기 식에서, R^a 및 R^b는 과분지형 폴리아민이고 R^a 및 R^b 중 나머지는 항응고체이다.

[0108] 알켄 함유 링커를 형성할 경우, 이 화합물은 예를 들어, 티올(표 3에 도시) 또는 아민을 사용한 추가 화학적 변형을 겪을 수 있다.

[0109] 제2 화합물이 알켄으로 유도체화되는 경우, 일 구체예에서, 알켄이 사용된다. 적절한 활성화 알켄의 예는 말레이미드 유도체이다.

[0110] 티올 기 함유 제1 화합물 및 말레이미드 기 함유 제2 화합물 간 반응은 다음과 같이 나타낼 수 있다:

[0111] 

[0112] 상기 식에서, R^a 및 R^b는 중합체이고 R^a 및 R^b 중 나머지는 항응고체이다. 반응은 대체로 환원제로서 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드, 및 라디칼 개시제로서 4,4'-아조비스(4-시아노발레르산) 존재 하에서, 그리고 산성 조건 하에서 수행된다.

[0113] 트리아졸 결합(CuAAC 커플링)

[0114] 아지드-알킨: 1,2,3-트리아졸 결합은 알킨 및 아지도 화합물의 반응에 의해 제조된다. 링커를 형성하는 반응은 항응고체 및 과분지형 중합체 중 하나의 알킨 기와 항응고체 및 과분지형 중합체 분자 중 나머지의 아지드 기 간에 일어나게 된다. 이러한 반응을 수행하는 방법은 WO 2010/029189에 기술된 방법과 유사하다.

[0115] 아지드와 알킨 기 사이의 반응은 고온(T > 60℃)에서 또는 금속 촉매, 예를 들면 구리, 예컨대 Cu(I) 촉매 존재하에, 휘스겐 환첨가반응(1,2,3-트리아졸을 형성하기 위한 아지드 및 말단 알킨의 1,3-양극성 환부가)에서 통상적으로 사용하는 반응 조건을 사용해 수행될 수 있다. Cu(I) 촉매는 바람직하다면, 인 시츄(in situ), 예를 들어, 아스코르브산나트륨을 사용해 상응하는 Cu(II) 화합물을 환원시켜 제조할 수 있다. 반응은 또한, 바람직하

다면 유동식 조건 하에서 수행할 수 있다.

[0116] CuAAC 반응은 예를 들면, 약 5~80℃, 바람직하게는 대략 실온에서 수행할 수 있다. 반응에 사용되는 pH는 약 2-12, 바람직하게는 약 4-9, 가장 바람직하게는 약 7이다. 적합한 용매는 아자이드 또는 알킨에 결합되는 존재가 가용성인 것들, 예를 들어 디메틸설폭시드, 디메틸포름아미드, 테트라히드로퓨란, 바람직하게는 물 또는 이들 중 하나와 무르이 혼합물을 포함한다. 표면 상에 실체의 비율은 표면상에 원하는 밀도의 실체를 제공하도록 조정할 수 있다.

[0117] -C(=O)-N- 결합

[0118] 아미드와: 아미드는 카르복실산과 아민의 반응을 통해 통상 형성된다. 카르복실산 및 카르복실산 유도체는 일반적으로 카르보닐 이중 결합을 파괴하고 사면체 중간체를 형성하는 카르보닐 상의 공격을 통해, 많은 화학적 변형을 겪을 수 있다. 티올, 알콜 및 아민은 모두 친핵체로서 제공되는 것으로 알려져 있다. 아미드는 에스테르보다 생리학적 조건 하에서 덜 반응성이다.

[0119] 활성산을 이용한 아미드화: 활성화된 산(기본적으로는 우수한 이탈기를 갖는 에스테르, 예를 들어 NHS-활성화산)은 보통의 카르복실산이 단지 염을 형성하게 되는 조건 하에서 아민과 반응하여 아미드 링커를 형성할 수 있다.

[0120] -C-S-S-CH_2-CH_2-C(=O)-N- 결합

[0121] SPDP 시약을 이용한 커플링: N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP) 및 이의 유사체는 이황화 함유 결합을 생성하는 아민- 및 티올-반응성 이종이작용성 연결 형성 시약의 고유 군에 속한다.

[0122] 환원성 아미드화, 미카엘 부가, 티오-브로모 반응, NHS-활성산 이용 아미드화, SPDP 시약을 이용한 커플링, CuAAC 및 티올-엔 커플링은 모두 온화한 커플링 조건 및 고수율의 링커 형성성을 제공하는데 적합하다.

[0123] 표 3에 도시한 그룹들은 모두 단지 예시를 위한 목적이며 대체물 또는 가변적 작용성이 물론 이용될 수 있다. 예를 들면, 아민기는 예시된 제2 탄소 상에 위치할 수 있거나 또는 예시된 지방족 사슬은 방향족 기로 치환될 수 있다.

[0124] 자유 라디칼 개시 반응

[0125] 상기에 간략하게 언급한 바와 같이, 과분지형 중합체 분자의 작용성 말단기는 자유 라디칼 개시 반응을 통해 형성된 링커에 의해 항응고체에 커플링될 수 있다. 라디칼은 예를 들면, 열, 광분해(예를 들면, I형 노리쉬 및 II형 노리쉬 반응), 이온화, 산화, 플라즈마 또는 전기화학 반응을 통해 생성시킬 수 있다. 예를 들면 자유 1차 아민기를 갖는 과분지형 중합체 분자가 벤조페논으로 처리되는 경우, 자유 라디칼 개시 반응(예컨대 알켄과의 반응)에 참여할 수 있는 라디칼 예컨대 탄소 또는 수소 라디칼이 생성된다.

[0126] 일 구체예에서, 공유 링커는 2차 아민 결합을 포함한다. 구체적으로 링커는 -NH- 기를 포함할 수 있다.

[0127] 다른 구체예에서, 공유 링커는 아미드 결합을 포함한다. 구체적으로 링커는 -NH-C(O)- 기를 포함할 수 있다.

[0128] 다른 구체예예서, 공유 링커는 티오에테르 결합을 포함할 수 있다.

[0129] 다른 구체예에서, 공유 링커는 "설파이드"라고 한다. 황은 2개의 포화된 탄소 원자(즉, -C-S-C-)에 결합되거나 또는 포화 및 불포화 탄소 원자(즉, -C-S-C=)에 부착될 수 있다.

[0130] 용어 "티올"은 -S-H 모이어티를 의미한다.

[0131] 용어 "2차 아민 결합"은 NH 기와 2개 탄소 원자간 연결, 즉 -C-NH-C-를 의미한다.

[0132] 용어 "아미드 결합"은 -C-C(O)NH-C- 유형의 2개 탄소 원자 간 연결을 의미한다.

[0133] 일 구체예에서, 항응고체 예컨대 헤파린 모이어티와 과분지형 중합체 분자의 작용성 말단기 간 링커는 미분지형 링커이다.

[0134] 링커는 생분해성이거나 생분해성이 아닐 수 있지만 보다 적합하게는 코팅된 장치가 장기간 동안 비혈전형성성이어야 하므로 생분해성이 아닌 것이다.

[0135] 복수의 링커가 존재하는 경우 이들 중 일부 또는 모두는 상이한 유형인 것이 가능하다.

[0136] 일 구체예에서, 모든 링커가 동일한 유형이다.

[0137] 스페이서

[0138] 가장 단순하게 과분자형 중합체 분자의 작용성 말단기와 항응고체 간 공유 연결은 링커, 예를 들어 표 3에 도시된 바와 같은 링커를 통해서이다. 그러나, 경우에 따라 링커는 표면 또는 항응고체 모이어티 또는 둘 모두로부터 스페이서에 의해 분리되어 질 수 있다.

[0139] 사용하는 경우, 스페이서의 목적은 일반적으로 과분지형 중합체 분자와 항응고체 간 분리성을 증가시키는 것인데, 즉 장치의 표면과 항응고체 간 분리성을 유의하게 증가시키는 효과이다. 예를 들면, 스페이서의 분자량은 50~10^6 Da, 전형적으로 100~10^6 Da, 예를 들어 100~10^4 Da이다. 스페이서의 길이는 예를 들면 10~10^3 Å이다. 본 발명자들은 스페이서가 직쇄인 것을 선호한다. 일부 구체예에서, 스페이서는 친수성이고, 예를 들면 PEG 사슬을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 과분지형 중합체 분자의 작용성 말단기 및 항응고체 간 공유 연결은 3부분 - 과분지형 중합체 분자의 작용성 말단기와 링커 모이어티간 "스페이서 A", 링커 모이어티, 및 링커 모이어티와 실체 간 "스페이서 B"를 갖는 것으로 볼 수 있다. 일 구체예에서, 스페이서 A의 분자량은 50~10^3 Da이다. 다른 구체예에서, 스페이서 B의 분자량은 50~10^3 Da이다. 일 구체예에서, 스페이서 A는 1 이상의 방향족 고리를 포함한다. 다른 구체예에서, 스페이서 A는 임의의 방향족 고리를 포함하지 않는다. 일 구체예에서, 스페이서 B는 1 이상의 방향족 고리를 포함한다. 다른 구체예에서, 스페이서 B는 임의의 방향족 고리를 포함하지 않는다. 일 구체예에서, 스페이서 A는 친수성이다. 다른 구체예에서, 스페이서 B는 친수성이다. 일 구체예에서, 스페이서 A는 PEG 사슬을 포함한다. 다른 구체예예서, 스페이서 B는 PEG 사슬을 포함한다. 일 구체예에서, 스페이서 A 및 B는 둘 모두 친수성이고, 예를 들면 이들 각각은 PEG 사슬을 포함한다. 본원에서 사용하는, PEG 사슬은 전형적으로 분자량이 100~10^6 Da인, 산화에틸렌의 중합으로 얻을 수 있는 중합 사슬을 의미한다. 다른 측면에서, 공유 연결은 2 이상의 트리아졸 고리를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 공유 연결은 5 부분 - 표면과 제1 링커 모이어티 간 "스페이서 A", 제1 링커 모이어티, 제1 링커 모이어티와 제2 링커 모이어티 간 "스페이서 B", 제2 링커 모이어티, 및 제2 링커 모이어티와 실체 간 "스페이서 C"를 갖는 것으로 볼 수 있다. 일 구체예에서, 스페이서 A의 분자량은 50~10^3 Da이다. 일 구체예에서, 스페이서 B의 분자량은 100~10^6 Da이다. 일 구체예에서, 스페이서 C의 분자량은 50~10^3 Da이다. 일 구체예에서, 스페이서 A 및/또는 스페이서 B 및/또는 스페이서 C는 친수성이고 예를 들면 PEG 사슬을 포함한다. 예를 들면 스페이서 B(적어도)는 PEG 사슬을 포함할 수 있다.

[0140] 스페이서가 존재할 수 있으나 이들은 전형적으로 필수적이지는 않은데, 그 크기 및 형태 면에서, 과분지형 중합체의 구조는 장치의 표면과 항응고체의 일부 분리성을 제공함을 주목해야하기 때문이다.

[0141] 스페이서가 존재하는 경우, 이들은 예를 들면 약 10~10^3 Å의 직쇄 스페이서이다.

[0142] PEG 사슬(또는 다른 친수성 중합체)를 포함하는 스페이서를 갖는 특별한 장점은 윤활성을 갖는 장치를 제공한다는 것이다.

[0143] 스페이서는 생분해성이거나 또는 생분해성이 아닐 수 있지만 코팅된 장치가 장기간 동안 비혈전형성성이어야 하므로 보다 적절하게는 생분해성이 아니다(즉, 코팅된 장치는 비혈전형성성을 보존한다).

[0144] 코팅된 빌딩 블록의 작용화

[0145] i. 과분지형 중합체 분자 또는 항응고체의 사전 개질이 요구되지 않는 링커 형성

[0146] 상기 표 3에 도시된 몇몇 링커는 과분지형 중합체, 예를 들면 알데히드를 포함하는 항응고체를 갖는 과분지형 폴리아민의 작용성 말단기의 반응에 의해 직접 형성될 수 있다.

[0147] 따라서, 표 3에 도시된 반응성 아미드화, 미카엘 부가, SPDP 반응 및 아미드화 반응은 1차 아민 작용성 말단기의 존재를 필요로 한다. 과분지형 분자 예컨대 과분지형 폴리아민, 예를 들어, PAMAM 덴드라이머는 이러한 결합 형성 반응에 사용되는 적절한 자유 1차 아민 기를 보유하고 따라서 추가적인 개질을 필요로 하지 않는다.

[0148] 그러므로, 일 구체예에서, 과분지형 중합체 분자는 복수개의 자유 1차 아민 작용기를 작용성 말단기로 보유하고, 예를 들면, PAMAM, PPI 또는 PEI 과분지형 중합체 분자이다.

[0149] 아질산 분해 헤파린 및 천연 헤파린은 반응성 기, 알데히드 기 및 헤미-아세탈 작용성을 각각 이들의 환원 말단

에 보유하고 따라서 아질산 분해 헤파린 또는 천연 헤파린은 환원성 아미드 반응으로 자유 1차 아민 기를 갖는 과분지형 중합체와 반응하여 상기 표 3 및 반응식 4에 도시된 바와 같은 2차 아민 기를 함유하는 링커를 형성할 수 있다.

[0150] 아민 작용화 표면 및 헤파린 유도체 간 2차 아민 결합을 형성하는 방법은 예를 들면 EP-B-0086186, EP-B-0086187, EP-B-0495820 및 US 6,461,665에 기술되어 있다.

[0151] ii. 과분지형 중합체 및/또는 항응고체가 필요한 결합 형성

[0152] 다르게, 항응고체 및 과분지형 중합체 중 하나 또는 둘 모두가 개질되어 이하 상세하게 기술하는 바와 같이 적합한 작용기를 보유할 수 있다.

[0153] 예를 들어 알킨 및 아지드 기를 도입하기 위한, 헤파린 및 다른 항응고체의 유도체화 방법이 WO2010/029189에 기술되어 있으며, 그 내용을 전체로 참조하여 본원에 편입시킨다.

[0154] 따라서, 표 3에 기술된 일부 링커의 경우, 과분지형 중합체 분자 및 항응고체 둘 모두 또는 그 중 하나의 작용화 유도체를 사전제조하는 것이 필요하다.

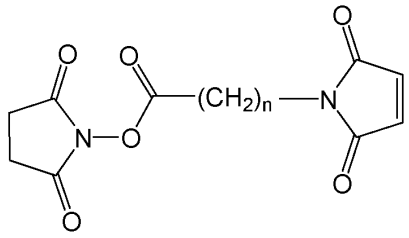
[0155] 과분지형 중합체 분자는 당분야의 공지 방법을 사용해 작용화시킬 수 있다. PAMAM 덴드라이머 또는 유사한 과분지형 중합체 상의 1아 아미노 기는 선택된 공유 결합을 형성하기 위해 적절한 작용기, 예를 들면 알켄, 알킨, 티올, 할로 또는 아지도 기에 대한 결합점으로서 사용될 수 있다. 그러므로 과분지형 폴리아민은 통상의 방법, 예를 들면 폴리아민 상에 매달린 1차 아미노 기를 알켄, 알킨, 티올, 할로 또는 아지도 기를 포함하는 활성화 카르복실산(예를 들어, 카르복실산의 N-히드록시 숙신이미드 유도체)과 반응시켜, 알켄, 알킨, 티올, 할로 또는 아지도를 보유하도록 작용화시킬 수 있다.

[0156] 따라서, 적합한 알켄 또는 알킨 기를 도입하기 위해, 다수의 1차 아민기를 보유하는 과분지형 폴리아민 분자는 다음과 같이 나타낼 수 있다:

[0157] $R"-NH_2$

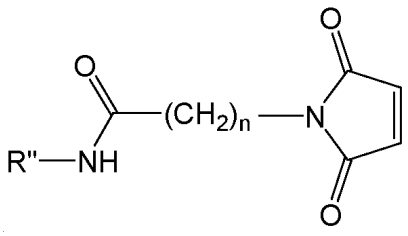
[0158] (상기 식에서, R"은 과분지형 폴리아민 잔기이다)

[0159] 이는 하기 화학식의 화합물과 반응하여

[0160] 

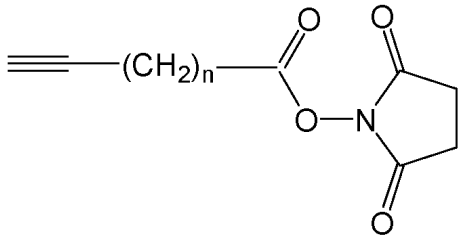
[0161] (이 식에서 n은 1~8의 정수, 예를 들어 1~4의 정수임)

[0162] 하기 화학식의 말레이미드 작용화 폴리아민을 생성시킨다:

[0163] 

[0164] (이 식에서, R" 및 n은 상기 정의된 바와 같음)

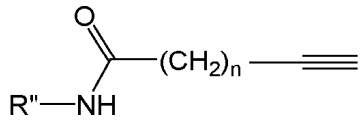
[0165] 다르게, 과분지형 폴리아민은 하기 화학식의 활성화 알킨-함유 기와 반응할 수 있고:



[0166]

[0167] (이 식에서 n은 1~8의 정수, 예를 들어 1~4의 정수임)

[0168] 하기 화학식의 알킨 작용화 과분지형 폴리아민을 생성시킨다:



[0169]

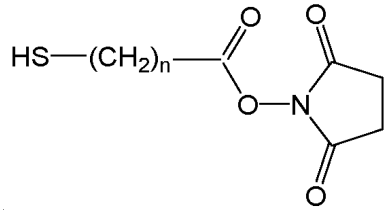
[0170] (상기 식에서, R" 및 n은 상기 정의된 바와 같음).

[0171] 유사하게, 작용성 말단기로 자유 1차 아민을 갖는 과분지형 중합체는 티올 기를 이용해 유도체화시킬 수 있다. 이러한 경우, 다수의 1차 아민 기를 보유한 과분지형 폴리아민 예컨대 PAMAM 덴드라이머는 다음의 식으로 표시된다:

[0172] $R"-NH_2$

[0173] (상기 식에서, R"은 상기 정의된 바와 같음)

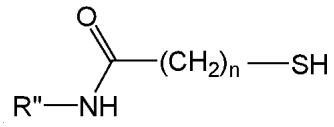
[0174] 이는 예를 들면 하기 화학식의 화합물인, 티올 함유 활성화 카르복실산과 반응하여:



[0175]

[0176] (이 식에서 n은 1~8의 정수, 예를 들어 1~4의 정수임)

[0177] 하기 화학식의 유도체화 중합체를 생성시킨다:



[0178]

[0179] (이 식에서 R" 및 n은 상기 정의된 바와 같음).

[0180] 할로 기는 유사한 방식으로 과분지형 중합체 분자에 도입시킬 수 있다.

[0181] 동일한 작용성을 얻기 위해 SPDP 또는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)를 포함하는 다른 아미드 반응을 사용하는 것을 고려할 수도 있다.

[0182] 알켄, 알데히드, 알킨, 티올, 아조, 아민, 할라이드, 활성화 카르복실산, 말레이미드 에스테르 또는 α,β-불포화 카르보닐 기를 보유하는 항응고체, 예를 들어 헤파린은 당분야에 공지된 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들면 알킨/알켄 기를 보유하는 항응고체, 예를 들어 헤파린은 공지된 통상의 방법을 사용해 하기 화학식의 알콕시아민을 항응고체 상의 알데히드 또는 헤미-아세탈 기와 반응시켜 만들 수 있다:

[0183] R^1-O-NH_2

[0184] (상기 식에서, R^1은 알킨/알켄-함유 기임).

[0185] 예를 들어, WO2010/029189의 실시예 3a, 3b 및 3c를 참조한다. 이러한 유형의 반응은 옥시-이민 작용성의 형성을 통해 하기 화학식의 화합물을 제공하는 것이 진행된다:

[0186] R^1-O-N=R'

[0187] (이 식에서, R^1은 상기 정의된 바와 같고, R'은 항응고체의 잔기임)

[0188] 아질산 분해 헤파린 및 천연 헤파린은 이러한 방식으로 결합될 수 있는 이들의 환원성 말단에, 개별적으로 반응성 기, 알데히드 기 및 헤미-아세탈 작용성을 보유한다.

[0189] 유사하게, 티올 기로 유도체화된 항응고체는 하기 화학식의 화합물과 항응고체 상의 알데히드 또는 헤미-아세탈 기를 반응시켜 형성될 수 있고:

[0190] HS-X-NH_2

[0191] (이 식에서, X는 탄화수소 스페이서 예를 들면 $(CH_2)_n$(여기서, n은 1~8, 예를 들어, 1~4이고, 여기서 1 이상(예를 들어, 1 또는 2)의 메틸렌 기는 경우에 따라 O로 치환되거나, X는 1~100(예를 들어, 1~50, 예컨대 1~10)의 에틸렌글리콜 유닛을 포함하는 PEG 사슬을 포함함)

[0192] 하기 화학식의 생성물을 제공한다:

[0193] R'-CH_2-NH-X-SH

[0194] (이 식에서, X는 상기 정의된 바와 같고, R'-CH_2-는 항응고체의 잔기임).

[0195] 이러한 과정의 예는 하기 실시예 4.2에 나타냈다.

[0196] 유사한 방법이 아지도 기 또는 할로 기 예컨대 플루오로, 클로로 또는 브로모를 도입하는데 사용될 수 있다.

[0197] 상기 기술된 바와 같이, 과분지형 중합체를 개질시키는 이유는 항응고체와의 커플링을 허용하는 일정 작용기를 도입하기 위한 것이다. 과분지형 중합체가 일부 존재하는 작용성 말단기, 예를 들어 1차 아민 기를 갖는 경우, 이들은 다른 작용기, 예를 들어 아지드 또는 알킨 기로 전환될 수 있다. 작용기의 모두 또는 (보다 일반적으로) 일부(예를 들어, 0.5~25%)는 이러한 목적을 위해 전환될 수 있다.

[0198] 다른 목적을 위해 새로운 작용기를 도입하는 것이 바람직할 수도 있다. 예를 들면, 일부(예를 들어, 0.5~25%) 존재하는 작용성 말단기(예를 들어, 1차 아민 기)는 유익제, 예를 들어 이하 언급하는 윤활제의 부착을 허용하도록 다른 작용기, 예를 들면 아지드 또는 알킨 기로 전환될 수 있다.

[0199] 표면 코팅

[0200] 장치는 1 이상의 층으로 형성된 적층 코팅을 포함하는 표면을 구비한다. 이 장치는, 특히 의료 장치인 경우, 공극 공간, 또는 포어를 포함하는 1 이상의 부분을 가질 수 있다. 포어는 장치 내 및/또는 적어도 장치의 한 표면의 일부분일 수 있다. 다공성 의료 장치의 예는 확장형 폴리테트라플루오로에틸렌(ePTFE)이다. 포어는 코팅층을 갖거나 또는 그렇지 않을 수도 있다.

[0201] 바람직하게 표면의 일부분(비혈전형성성인 것이 바람직함) 또는 장치 표면 전체가 코팅으로 덮힌다.

[0202] 장치 표면은 1 이상의 코팅층(예를 들면, 2 또는 그 이상, 3 또는 4 또는 5, 예를 들어 최대 20개 코팅층)을 구비할 수 있고 용어 "외부 코팅층"은 의료 장치에서, 환자의 조직과 접촉하거나 체액과 접촉하거나, 또는 분석 또는 분리 장치에서, 분석, 분리 또는 취급하려는 물질과 접촉하는 코팅층을 의미한다. 따라서, 외부 코팅층은 중공 장치 또는 스텐트와 같은 개방식 구조의 장치의 외부 및/또는 내부 표면 상의 코팅층일 수 있다. 외부 코팅층이 아닌 층을 본원에서는 "하층"이라고 한다.

[0203] 본 발명에 따라서, 외부 코팅층은 작용성 말단기를 통해 1 이상의 항응고체가 공유 결합된 복수의 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함한다.

[0204] 대체로, 외부 코팅층의 양이온성 과분지형 중합체 분자의 대부분, 또는 심지어 모두는 이들의 작용성 말단기를 통해 공유 결합된 복수의 항응고체를 가지게 된다.

[0205] 최적의 층 수는 장치가 제조되는 재료의 유형, 및 표면 코팅의 용도에 따라 좌우된다. 장치 표면의 전체적인 포괄성을 제공하는데 필요한 층의 성질 및 수는 당분야의 숙련가가 쉽게 결정할 수 있다. 표면 코팅은 필요하면 자기조립식(layer-by-layer)으로 제조할 수 있다.

[0206] 예를 들면, 코팅층(들)은 장치 표면 상에서 양이온성 중합체를 흡착하고, 이어서 음이온성 중합체, 예를 들어 음이온성 다당류, 덱스트란 설페이트 또는 순음전하를 갖는 작용화 양이온성 과분지형 중합체를 도포하여, 적어도 하나의 음이온 중합체의 흡착층을 얻도록 하여 형성시킬 수 있다. [Multilayer Thin Films ISBN: 978-3-527-30440-0]를 참조한다. 따라서, 표면은 양이온 중합체 층 및 음이온 중합체 층, 예를 들어 순음전하의 작용화 양이온성 과분지형 중합체 또는 다당류를 포함할 수 있다. 보다 일반적으로, 표면 코팅은 양이온성 중합체 및 음이온성 중합체의 1 이상의 코팅 이중층을 포함할 수 있다. 전형적으로, 최내층(즉, 아무것도 덮히지 않은 장치 표면, 예를 들면 금속, 플라스틱 또는 세라믹 표면에 적용되는 층)은 양이온성 중합체 층이다.

[0207] 이하 보다 상세하게 기술하는 바와 같이, 작용성 말단기를 통해 1 이상의 항응고체가 공유 결합된 복수의 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함하는 외부 코팅층은 2 방식 중 하나로 적용될 수 있다. 제1 방식에 따라서, 일반적인 양전하를 갖는 양이온성 과분지형 중합체 분자는 장치의 표면 상의 음이온성 중합체에 적용될 수 있다. 이어서 과분지형 중합체 분자는 이들을 항응고체에 연결하도록 개질된다. 제2 방식에 따라서, 작용성 말단기를 통해 1 이상의 항응고체가 공유 결합된 양이온성 과분지형 중합체 분자는 작용화된 과분지형 중합체 분자가 전체적으로 양전하 또는 음전하를 보유하는지 여부에 따라서 장치 표면 상의 음이온성 또는 양이온성 중합체에 적용될 수 있다.

[0208] 일부 경우에서, 양이온성 과분지형 중합체 분자는 반응성 작용기를 통해 중합체 표면 코팅에 가교될 수 있다. 양이온성 과분지형 중합체는 항응고체와 반응 전에 장치 표면 또는 하부 코팅층에 가교되는 경우, 외부 코팅층에 원하는 양의 항응고체를 연결시킬 수 있는 충분한 수의 아미노 기(또는 다른 도입된 반응성 기)가 이용가능하도록 보장할 필요가 있다. 다르게, 양이온성 과분지형 중합체 분자는 장치 표면 또는 코팅층에 도포되기 전에 항응고체와 반응할 수 있고 이어서 가교된다. 전형적으로, 항응고체 및 표면 코팅 간에 가교가 존재하지 않는다.

[0209] 다양한 양이온성 중합체가 하층에 사용될 수 있다. 예시적인 양이온성 중합체는 폴리아민(예를 들어, EP 0086187 Larsson 및 Golander에 기술된 것)이 있다. 이러한 중합체는 직쇄일 수 있지만 보다 일반적으로는 분지쇄 중합체이거나 다르게는 과분지형 중합체이고, 경우에 따라 가교된다. 다르게 외부 코팅층 이외의 1 이상(예를 들어, 모든) 양이온성 중합체층은 외부 코팅층에서 사용된 거소가 동일하거나 또는 유사한 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함한다(예를 들어, 형성된다). 경우에 따라, 이들은 또한 가교될 수 있다.

[0210] 코팅 과정은 본질적으로 EP-B-0495820에 기술된 대로 수행할 수 있고, 이러한 경우, 항응고체를 포함하는 것은 오직 외부 코팅층이다.

[0211] 그러나 EP-B-0495820의 방법은 이하에 기술되는 바와 같이 상기 기술된 바와 같이 외부층이, 공유 링커 모이어티를 형성하도록 항응고체 상의 작용기와 반응할 수 있는 작용성 말단기(들)을 갖는 양이온성 과분지형 중합체와 커플링하거나 또는 1 이상의 항응고체(그러나 여전히 순양전하 보유)가 부착된 양이온성 과분지형 중합체와 커플링된 음이온성 중합체이도록 개질될 수 있다.

[0212] 일 구체예에 따라서, 외부 코팅층 이외에 적층된 1 이상의 층이 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 적어도 80: 1(예를 들어 적어도 100: 1)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 경우에 따라 예를 들어 1 이상의 항응고체로 유도체화된 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함하는 장치를 제공한다.

[0213] 본 발명의 일 구체예에 따라서, 하층이 양이온성 중합체를 포함하는 경우, 이들은 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 적어도 80: 1(예를 들어 적어도 100: 1)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함할 수 있다. 이러한 구체예에 따라서, 이들 양이온성 과분지형 중합체 분자는 외부 코팅층(그러나 항응고체가 부착되지 않음)에 사용되는 것과 동일하거나 또는 상이한 과분지형 중합체 분자일 수 있다. 임의의 경우에서 예시적인 양이온성 과분지형 중합체 분자는 외부 코팅층 제조에 사용할 수 있는 양이온성 과분지형 중합체 분자에 대해 본원에서 기술한 것들을 포함한다.

[0214] 예를 들면, 양이온성 중합체를 포함하는 모든 하층은 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 적어도 80: 1(예를 들어 적어도 100: 1)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자

량 비율, 및 (iv) 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함할 수 있다.

[0215] 음이온성 중합체는 또한 순음전하를 갖는 작용화 양이온성 과분지형 중합체일 수 있다.

[0216] 일 구체예에 따라서, 하층이 음이온성 중합체를 포함하는 경우, 이들은 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 적어도 80: 1(예를 들어 적어도 100: 1)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함할 수 있고, 여기서 상기 1 작용성 말단기의 1 이상은 이에 공유 결합된 음이온성 항응고체를 가져서 분자 상에 순음전하를 부여한다.

[0217] 예를 들면, 음이온성 중합체를 포함하는 모든 하층은 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 적어도 80: 1(예를 들어 적어도 100: 1)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함할 수 있고, 상기 작용성 말단기 중 1 이상은 이에 공유 결합된 음이온성 항응고체를 가져서 분자 상에 순음전하를 부여하게 된다.

[0218] 일 구체예에 따라서, 장치 표면 상의 코팅층은 모두 (a) (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 적어도 80: 1(예를 들어 적어도 100: 1)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자 또는 (b) (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 적어도 80: 1(예를 들어 적어도 100: 1)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 1 이상의 작용성 말단기가 이에 공유 결합된 음이온성 항응고체를 가져서 분자 상에 순음전하를 부여하게 되는 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자이다.

[0219] 이의 장점은 코팅층의 상이한 성분의 수를 최소화시킨다는 것이다.

[0220] 제1 코팅층(즉, 최내층)을 도포하기 전에, 장치 표면을 세척하여 부착 및 표면 피복성을 개선할 수 있다. 적절한 세척제는 용매 예컨대 에탄올 또는 이소프로판올(IPA), 수산화화합물(수산화나트륨) 수용액 및 알콜의 혼합물을 포함하는 용액과 같은 고 pH 용액, 수산화나트륨 용액 예컨대 테트라메틸 수산화암모늄(TMAH) 함유 용액, 염기성 피라나(Piranha, 암모니아 및 과산화수소), 산성 피라나(황산 및 과산화수소의 혼합물) 및 황산 및 과망간칼륨 복합물을 포함하는 다른 산화제 또는 상이한 유형의 과산화황산 또는 과산화이황산 용액(암모늄, 나트륨 및 칼륨 염으로서도 가능)을 포함한다.

[0221] 따라서, 본 발명의 측면은 표면 코팅이 양이온성 중합체 및 음이온성 중합체의 1 이상의 코팅 이중층을 포함하는 표면 코팅을 갖는 장치이고, 여기서 코팅의 외부 코팅층은 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량, (iii) 적어도 80: 1(예를 들어 적어도 100: 1)의 총 분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율, 및 (iv) 1 이상의 작용성 말단기에 항응고체가 공유 결합된 작용성 말단기를 갖는 것을 특징으로 하는 복수의 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함한다.

[0222] 외부 코팅층의 형성

[0223] 상기 간략하게 기술한 바와 같이, 헤파린 모이어티 또는 다른 항응고체는 장치 표면에 과분지형 중합체 분자가 도포되기 전 또는 이후에 과분지형 중합체 분자에 부착될 수 있다. 외부 코팅층이 도포된 장치 표면은 경우에 따라 1 이상의 하층을 포함할 수 있다. 도 7을 참조한다.

[0224] 따라서, 본 발명의 추가 측면에서, 상기 기술된 바와 같은 장치를 제조하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은, 임의의 순서로,

[0225] i. 과분지형 중합체 분자의 복수개의 작용성 말단기를 항응고체와 반응시켜 각 과분지형 중합체 분자가 복수개의 항응고체에 공유 결합되도록 하는 단계; 및

[0226] ii. 과분지형 중합체 분자를 장치 표면에 부착시키는 단계

[0227] 를 포함한다.

[0228] 상기 기술된 바와 같이, 항응고체는 공유 결합을 통해 과분지형 중합체 분자에 부착되고, 일부 경우에서는 과분지형 중합체 분자 및 항응고체 간에 공유 결합을 형성하기 위해 적절한 작용기를 도입하기 위해 i) 단계 전에 과분지형 중합체 분자 및/또는 항응고체를 개질시키는 추가 단계를 수행하는 것이 필요할 수 있다.

[0229] 과분지형 중합체 및/또는 항응고체를 개질하기 위한 방법 및 적절한 공유 결합은 상기 상세히 기술하였다. 상기 언급한 바와 같이, 링커는 경우에 따라 스페이서에 의해 항응고체 모이어티 및/또는 표면으로부터 분리될 수 있다. 따라서, 이 방법은 경우에 따라 스페이서를 제공하여 표면 및/또는 항응고 모이어티를 개질시키는 것을 포함한다.

[0230] 상기 방법의 제1 단계가 단계 i)인 경우, 과분지형 중합체 분자에 항응고체를 부착시키는 공정은 적절한 용매, 예를 들면 그 혼합물을 포함하여 THF, DCM, DMF, DMSO, IPA, 메탄올, 에탄올 및 물과 함께 적절한 반응 조건 하에 용액 중에서 수행할 수 있다.

[0231] 이 방법의 제2 단계가 단계 i)인 경우(즉, 방법의 제1 단계가 단계 ii)인 경우), 장치의 외부 코팅층은 일반적으로 적절한 반응 조건 하에서 항응고체의 용액과 접촉된다. 항응고체에 적합한 용매는 예를 들면, 그 혼합물을 포함하여, IPA, 에탄올, THF, DMF, DMSO, DCM 및 특히 물을 포함한다.

[0232] 일 구체예에서, 이미 언급한 바와 같이, 1 이상의 과분지형 중합체 분자는 가교에 의해 응집될 수 있다.

[0233] 따라서 상기 방법은 서로 2 이상의 과분지형 중합체 분자를 가교하는 추가 단계를 더 포함할 수 있다. 2 이상의 과분지형 중합체 분자는 과분지형 중합체 분자를 1 이상의 항응고체로 작용화시키기 전 또는 그 이후에 가교에 의해 응집될 수 있다. 가교가 수행되는 순서는 장치, 예를 들어 장치 기하학에 따라 좌우된다. 바람직하게 가교는 작용화 이후 수행된다. 또한, 이러한 가교 단계는 장치 표면에 과분지형 중합체 분자를 부착시킨 후 또는 그 전에 수행될 수 있다.

[0234] 이 방법은 또한 장치 표면에 1 이상의 과분지형 중합체 분자를 가교시키는 단계를 포함한다. 예를 들면, 외부 코팅층 상에 1 이상의 항응고체가 부착되는 과분지형 중합체 분자는 외부 코팅층 아래 층의 양이온성 또는 음이온성 중합체에 가교될 수 있다.

[0235] 이러한 가교 단계는 상기 단계 ii)의 일부분이거나, 또는 다르게 가교 단계는 장치 표면에 과분지형 중합체 분자의 부착을 강화시키고 코팅의 안정성을 증강시키기 위해 단계 ii) 이후에 수행될 수 있다.

[0236] 2 이상의 과분지형 중합체 간 또는 과분지형 중합체 분자와 표면 간에 임의의 필요한 가교가 유도체화 전에 수행되면, 적합한 수의 항응고체가 부착될 수 있게 과분지형 분자 상에 충분한 자유 작용기가 잔류하도록 보장하는 것이 필요하다. 다르게, 유도체화가 먼저 수행되면, 이어 유도체화 정도는 자유 작용기가 필요한 임의의 가교를 위해 남아있도록 되어야 한다.

[0237] 대체로, 단계 i)이 단계 ii) 전에 수행되는 것이 바람직한데, 과분지형 중합체 분자에 부착되는 항응고체의 양을 제어하는 것이 용이하고, 또한 특히 반응이 상기 기술된 바와 같은 용액에서 수행될 경우 항응고체의 낭비를 최소화하기 때문이다.

[0238] 본 발명의 일 측면으로서 본 발명자들은 상기 언급한 방법으로 획득할 수 있는 장치를 제공한다.

[0239] 본 발명의 다른 측면은

[0240] (a) 장치를 처리하여 (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총분자량 및 작용성 말단기 보유, 및 (iii) 적어도 80:1(예를 들어, 적어도 100:1)의 총분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율을 갖는 것을 특징으로 하는 양이온성 과분지형 중합체 분자를 포함하는 외부 코팅층을 포함하는 표면 코팅을 나타내는 단계;

[0241] (b) 과분지형 양이온성 중합체 상의 반응성 작용기와 반응할 수 있는 기를 보유하도록 작용화된 항응고체 분자와 상기 작용성 말단기 중 1 이상을 반응시키는 단계

[0242] 를 포함하는 방법으로서, 이 방법에 의해, 과분지형 양이온 중합체에 항응고체를 부착시켜 획득할 수 있는 비혈전형성 장치이다.

[0243] 본 발명의 다른 측면은

[0244] (a) 장치를 처리하여 양으로 하전된 중합체 표면층을 나타내는 단계;

[0245] (b) (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총분자량 및 (iii) 적어도 80:1(예를 들어, 적어도 100:1)의 총분자량 대 코어 모이어티 분자량 및 복수개(예를 들어,이용가능한 작용성 말단기의 개수에 따라서 2 또는 10 또는 50 또는 100 또는 500 또는 그 이상)의 음으로 하전된 항응고체 예컨대 헤파린 모이어티를 갖는 것을 특징으로하는 작용화 양이온성 과분지형 중합체 분자를 상기 중합체 표면층과 회합

시키는 단계로서, 상기 작용화 과분지형 중합체는 순음전하를 갖는 것인 단계를 포함하는 방법으로 획득할 수 있는 비혈전형성 장치이다.

[0246] 본 발명의 다른 측면은

[0247] (a) 장치를 처리하여 음으로 하전된 중합체 표면층을 나타내는 단계;

[0248] (b) (i) 분자량 14~1,000 Da의 코어 모이어티, (ii) 1,500~1,000,000 Da의 총 분자량 및 (iii) 적어도 80:1 (예를 들어, 적어도 100:1)의 총분자량 대 코어 모이어티 분자량 비율을 가지며 1 이상의 음으로 하전된 항응고체 예컨대 헤파린 모이어티를 보유하는 것을 특징으로 하는 작용화된 양이온성 과분지형 중합체 분자를 상기 중합체 표면과 회합시키는 단계로서, 상기 작용화 과분지형 중합체는 순양전하를 갖는 것인 단계를 포함하는 방법으로 획득할 수 있는 비혈전형성 장치이다.

[0249] 예를 들면, 장치는 음이온성 중합체 예를 들면 다당류 예컨대 덱스트란 설페이트, 이의 유도체 또는 순음전하를 갖는 작용화 양이온성 과분지형 중합체를 포함하는 표면을 갖도록 처리된다.

[0250] 가교 반응

[0251] 본원에 기술된 바와 같이, 외부 코팅층의 과분지형 중합체 분자는 경우에 따라서 외부 코팅층의 다른 과분지형 중합체 분자와 가교되거나 또는 하층의 분자(예를 들어, 과분지형 중합체 분자)에 가교될 수 있다. 하층의 중합체 분자는 경우에 따라 가교될 수 있다.

[0252] 적합하게 이러한 목적에 사용될 수 있는 가교제는 필요한 커플링 화학법에 따라 선택된다. 임의의 이중, 삼중 또는 다중 작용성 가교제가 사용될 수 있는데 예컨대 작용화 PEG 및 제파민 등이 있다. 아민의 가교를 위해, 이작용성 알데히드 예컨대 크로톤알데히드 또는 글루타르알데히드가 사용되는 것이 적절하다. 일부 경우에서, 에피클로로히드린이 유용할 수 있다.

[0253] 가교는 외부 코팅층의 과분지형 중합체 분자의 작용성 말단기 및 외부 코팅층의 다른 과분지형 중합체 분자 또는 하층의 분자(예를 들어, 과분지형 중합체 분자 또는 양이온성 또는 음이온성 중합체 분자)의 작용성 말단기 간에 공유 결합을 생성할 수 있다. 이러한 가교는 적절하게는 항응고체를 포함하지 않는다. 따라서 적절하게 항응고체는 임의의 다른 분자가 아닌 오직 하나의 과분지형 중합체 분자와 공유 결합된다. 적절하게 하나의 과분지형 중합체 분자와 다른 과분지형 중합체 분자의 가교는 항응고체와의 결합에 포함되지 않는 과분지형 중합체 분자 상의 작용성 말단기의 사용을 포함한다. 일 구체예에서, 가교에 사용된 상기 작용기는 과분지형 중합체 분자의 원래 작용성 말단기의 재작용화에 의해 형성된다.

[0254] 장치

[0255] 장치는 항응고체를 부착시키는데 바람직한 임의의 장치, 예를 들면 의료 장치, 분석 장치 또는 분리 장치일 수 있다.

[0256] 본 특허 출원의 목적을 위해, "의료 장치"는 이식가능하거나 또는 이식이 가능하지 않은 장치이지만 보다 일반적으로는 이식가능한 의료 장치를 의미한다. 영구적 또는 일시적 이식가능한 의료 장치일 수 있는 이식가능한 의료 장치의 예에는 카테터, 양분화 스텐트를 포함한 스텐트, 벌룬 확장성 스텐트, 자가 확장성 스텐트, 양분 스텐트-그라프트를 포함하는 스텐트-그라프트, 혈관 그라프트를 포함한 그라프트, 양분식 그라프트, 인공 혈관, 혈관 내재 모니터링 장치, 인공 심장 밸브, 페이스메이커 전극, 가이드와이어, 심장 리드, 심폐 우회로, 플러그, 약물 전달 장치, 벌룬, 조직 팻치 장치 및 혈관 펌프를 포함한다. 이식이 가능하지 않은 의료 장치의 예에는 체외 장치, 예를 들어 체외 혈관 치료 장치, 및 수혈 장치가 있다.

[0257] 장치는 신경학적, 말초, 심장, 정형외과, 피부 및 부인과학 용도일 수 있다.

[0258] 의료 장치는 1 또는 많은 코팅층을 가질 수 있으며 용어 "외부 코팅층"은 장치가 환자에 이식되거나 또는 사용중일 경우, 환자의 조직과 접촉하거나 또는 체액, 예를 들어 혈액과 접촉하는 코팅층을 의미한다. 따라서, 외부 코팅층은 개방 구조 장치 예컨대 스텐트 또는 중공 장치의 외부 및/또는 내부 표면 상의 코팅층일 수 있다.

[0259] 분석 장치는 예를 들면, 분석 과정을 수행하기 위한 고상 지지체, 예컨대 크로마토그래피 또는 면역학적 어세이, 반응성 화학 또는 촉매를 수행하기 위한 고상 지지체일 수 있다. 이러한 장치의 예에는 슬라이드, 비드, 웰 플레이트 멤브레인 등이 포함된다. 분리 장치는 예를 들어 예컨대 단백질 정제, 친화성 크로마토그래피 또는 이온 교환 등의 분리 과정을 수행하기 위한 고상 지지체일 수 있다. 이러한 장치의 예에는 필터 및 컬럼 등이 포함된다. 의료 장치와 같이, 분석 또는 분리 장치는 또한 많은 코팅층을 가질 수 있고, 용어 "외부 코

팅층"은 분석, 분리 또는 취급하려는 물질과 접촉하는 코팅층을 의미한다.

[0260] 일부 경우에서, 코팅의 성질을 조정하는 것이 바람직할 수 있고, 이러한 경우, 1 이상의 추가적인 실체가 항응고체 이외에도 과분지형 중합체에 부착될 수 있다. 예를 들면, 과분지형 중합체의 친수성을 증가시키는 것이 바람직한 경우, 추가적인 실체가 1 이상의 PEG 사슬을 포함할 수 있다.

[0261] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "PEG 사슬"은 전형적으로 10^2 ~10^6 Da 분자량의 산화에틸렌을 중합시켜 얻을 수 있는 중합 사슬을 의미한다.

[0262] 장치의 코팅은 양이온성 중합체 및 음이온성 중합체의 교대층을 포함할 수 있다. 양이온 중합체는 직쇄 중합체이지만 보다 일반적으로는 분지쇄 중합체, 과분지형 중합체 또는 복수의 (양이온성) 과분지형 중합체 분자를 포함하는 중합체일 수 있고, 여기서 외부 코팅층에는 작용성 말단기를 통해 상기 과분지형 중합체 분자에 공유 결합된 항응고체가 존재한다.

[0263] 따라서, 본 발명의 일 구체예에서, 외부층 이외에, 1 이상의 코팅층은 외부층과 동일하거나 또는 유사한 과분지형 중합체 분자로 형성될 수 있다. 이러한 하위층의 특징은 외부층에 대해 기술된 바과 같고, 실시예 2.2 및 3.3을 참조한다.

[0264] 장치는 금속 또는 합성 또는 천연 발생 유기 또는 무기 중합체 또는 특히, 세라믹 물질을 포함하거나 이들 물질로로 형성될 수 있다.

[0265] 따라서, 예를 들면, 합성 또는 천연 발생 유기 또는 무기 중합체 또는 재료 예컨대 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리카르보네이트, 다당류, 폴리아미드, 폴리우레탄(PU), 폴리비닐클로라이드(PVC), 폴리에테르에테르케톤(PEEK), 셀룰로스, 실리콘 또는 고무(폴리이소프렌), 플라스틱 재료, 금속, 유리, 세라믹 및 다른 공지의 의료 재료 또는 이러한 재료의 조합으로 형성될 수 있다. 다른 적합한 기재 재료는 플루오로중합체, 예를 들면, 확장성 폴리테트라플루오로에틸렌(ePTFE), 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 불소화 에틸렌-프로필렌(FEP), 퍼플루오로카본 공중합체, 예를 들어, 테트라플루오로에틸렌 퍼플루오로알킬비닐 에테르(TFE/PAVE) 공중합체, 테트라플루오로에틸렌(TFE) 및 퍼플루오로메틸 비닐 에테르(PMVE)의 공중합체, 및 중합체 사슬 사이에 가교가 있고 없는 상기 물질들의 조합을 포함한다.

[0266] 적절한 금속은 니켈 티타늄 합금(Nitinol), 스테인레스 강, 티타늄, 코발트 크롬, 금 및 백금을 포함한다. 니티놀 및 스테인레스 강이 바람직하다. 티타늄도 바람직하다.

[0267] 보다 일반적으로 적절한 금속은 금속성 재료 및 합금 예컨대 코발트 크롬 합금(ELGILOY), 스테인레스 강(316L), 고 질소 스테인레스 강, 코발트 크롬 합금 L-605, MP35N, MP20N, 탄탈륨, 니켈-티타늄 합금, 니티놀, 백금-이리듐 합금, 금, 마그네슘 및 이의 조합을 포함한다.

[0268] 본 발명자들은 항응고체(예를 들어, 헤파린 또는 다른 헤파린 모이어티)가 부착되어 멸균 이후 예를 들어 산화에틸렌(EO) 멸균 이후 비혈전형성성이 보유되는 코팅 표면을 선호한다.

[0269] 멸균은 당분야의 숙련가에게 공지된 방법으로 수행할 수 있다. 바람직한 멸균 방법은 산화에틸렌 가스를 사용하는 것이다. 다르게, 다른 방법 예컨대 조사, 예를 들어, e-빔 또는 감마선 조사가 이러한 조사가 물체나 코팅 또는 둘 모두를 분해하지 않는 경우에 사용될 수 있다.

[0270] 본 발명의 바람직한 구체예는 이식용, 예를 들어 영구 이식용, 또는 해부적 위치에서의 다른 배치용 코팅 의료 장치에 관한 것이다. 다른 바람직한 구체예는 일시적 용도의 장치 예컨대 카테터 및 체외 회로를 포함한다. 예로는 해부학적 구조를 강화하거나 또는 빈 공간을 유지하기 위해, 빈 공간, 또는 내강의 범위를 정하는 해부학적 구조의 내부에 위치시키기 위한 멸균(예를 들어, 멸균된) 의료 장치가 있다. 적절하게 부착된 항응고체, 예를 들어 헤파린 또는 다른 헤파린 모이어티는 임의의 실질적인 정도로 용리되지 않고 장치에 잔류하게 된다. 예를 들면, 보유하는 AT 결합능을 테스트하기 전에 NaCl(0.15 M)로 15시간 세정 후 적절하게(예를 들어, 1 또는 2 또는 4 또는 5 또는 10 pmol/㎠ 초과) 잔존하고/하거나 건강한 공여자로부터 신선한 혈액으로 혈액 루프 평가 테스트(실시예 6 참조)하는 경우, 테스트 후 혈액의 혈소판 계측치 감소가 실질적으로 미코팅된 대조군에서 보다 본 발명에 따른 코팅 표면에 노출된 혈액에서 더 낮았다(예를 들어, 코팅된 표면에 노출된 혈액에 대한 테스트 후 혈소판 계측치 감소는 20% 미만, 바람직하게는 15% 미만 보다 바람직하게는 10% 미만).

[0271] 본 발명에 따른 장치의 비혈전형성 특징은 다수의 방법으로 테스트할 수 있다. 예를 들면, 비혈전형성 특징은 미처리 표면을 구비한 장치와 특히 비교하여, 높은 항트롬빈 결합능을 갖는 것과 연관있었다.

[0272] 본 발명자들은 항트롬빈(AT) 결합능이 표면 평방 센티미터(pmol/㎠) 당 적어도 1(예를 들어, 적어도 5) 피코몰인 장치 예를 들면 의료 장치의 표면을 선호한다. 다른 구체예에서, AT 결합능은 적어도 6 pmol/㎠, 적어도 7 pmol/㎠, 적어도 8 pmol/㎠, 적어도 9 pmol/㎠, 또는 적어도 10 pmol/㎠이다. 일부 구체예에서, AT 결합능은 적어도 100 pmol/㎠이다. AT 결합능은 당분야의 공지 방법, 예를 들어, [Pasche., et al., "Binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" Artif. Organs 15:481-491(1991)] 및 US 2007/0264308에 기술된 방법으로 측정할 수 있다. 비교로서 [Sanchez et al(1997) J. Biomed. Mater. Res. 37(1) 37-42]에서 도 1을 참조하면 실험에 따라 대략 2.7-4.8 pmol/㎠의 AT 결합 수치 또는 그 이상의 수치는 혈장과 첩촉시 유의한 혈전형성성 효소 활성을 일으키는 것으로 보이지 않는다는 사실로 결론을 낼 수 있다.

[0273] 다르게 또는 부가적으로 본 발명자들은 실시예 6에 기술된 바와 같은 혈액 루프 평가 테스트에 도시된 바와 같이 응고 및 다른 방어계를 억제하는 높은 능력 때문에 표면이 비혈전형성성인 것을 선호한다. 테스트에 따라, 조사하려는 표면은 신선한 혈액으로 테스트 전에 0.15 M NaCl로 15시간 동안 세정한 PVC 튜브에 적용시킨다.

[0274] 미코팅 대조군 표면의 혈전형성성은 테스트 후 측정된, 노출 혈액의 혈소판 계측치 감소로 표시한다. 본원에 기술된 방법에 따라 제조된 표면의 비혈전형성성은 실질적으로 보다 낮은 정도로 혈액의 혈소판 계측치가 감소됨을 의미한다(예를 들어, 코팅 표면에 노출된 혈액에 대한 테스트 후 혈소판 계측치의 감소는 20% 미만, 바람직하게는 15% 미만 보다 바람직하게는 10% 미만임).

[0275] 혈액 루프 모델과는 상이한 다른 유사한 혈액 평가 방법을 혈전형성성/비혈전형성성을 평가하기 위해 당분야의 숙련가가 수행할 수 있다.

[0276] 특정 표면적에 결합된 항응고체의 양은 코팅을 위한 과분지형 분자의 특정량 및 특정 크기를 선택하여 쉽게 제어 및 조정할 수 있다.

[0277] 표면 상에 항응고체의 분포는 공지된 통상의 염색법으로 확인할 수 있는데, 예를 들어 헤파린의 분포는 톨루이딘 블루를 사용해 확인할 수 있다.

[0278] 코팅내 유익제

[0279] 장치, 특히 의료 장치의 적층 코팅은 항응고체 이외에도 1 이상의 유익제를 포함할 수 있다. 예시적인 유익제는 약물 분자 및 윤활제를 포함한다. 유익제는 하층에 도입되거나 또는 외부 코팅층에 도입될 수 있다.

[0280] 유익제는 중합제 표면으로부터 유익제의 이동(즉, 용리)가 허용되게 분해될 수 있는, 공유 결합에 의해 코팅에 부착되거나 또는 장기간 지속되는 작용이 필요한 경우에는 분해성이 아닐 수 있다. 다르게, 이들은 공유 결합없이 코팅 표면(예를 들어, 임의의 그 층 내) 내에 도입되거나 또는 그 위에 흡착될 수 있다.

[0281] 의료 장치에서, 항응고체 이외에 적층 코팅의 과분지형 중합체(예를 들어, 외부 코팅층의 과분지형 중합체)에 약물 분자를 부착시키는 것이 적절할 수 있다. 일 구체예에서, 약물 분자와 코팅 사이의 결합은 중합체 표면으로부터 약물의 이동(즉, 용리)가 허용되도록 분해성 공유 결합이다. 다르게, 약물은 공유 결합없이 코팅 표면 내에 도입되거나 또는 그 위에 흡착될 수 있다. 약물은 또한 코팅을 구축하는데 사용되기 전에 과분지형 중합체의 공극에 도입될 수도 있다. 소수성 약물은 구체적으로, 과분지형 중합체의 소수성 공극에 도입될 수 있다. 이의 특정 용도 는 약물 용리 스텐트에 있다. 이러한 구체예에 사용될 수 있는 예시적인 약물은 재협착을 방지하는 약물 예컨대 항혈관생성 또는 항증식성 약물 예컨대 파클리탁셀 및 시롤리무스를 포함한다. 다른 용도는 용리성 헤파린 또는 다른 항응고체의 사용이다. 다른 구체예에서, 항균 약물을 항응고체 이외에도 코팅에 부착할 수 있다.

[0282] 유익제가 코팅의 분자에 공유 결합된 경우, 항응고체와의 부착에 포함되지 않은 작용성 말단기를 통해서 본원에 기술된 바와 같은 양이온성 과분지형 중합체 분자에 유익제(들)을 공유 결합시켜 달성할 수 있다. 이들 작용성 말단기는 원래의 작용성(예를 들면, 1차 아민)이거나 또는 작용성이 유익제 결합 전에 변화될 수 있다. 유익제의 커플링은 항응고체의 커플링에 대해 앞서 기술된 바와 같은, 유사한 방식으로 수행될 수 있다.

[0283] 유익제는 항응고체의 커플링 전에 본 발명의 과분지형 중합체에 결합될 수 있지만, 보다 일반적으로는 이후에 커플링된다.

[0284] 보다 일반적으로, 장치(예를 들면, 의료 장치)의 적층 코팅은 경우에 따라 파클리탁셀, 탁산 또는 다른 파클리탁셀 유사체; 에스트로겐 또는 에스트로겐 유도체; 헤파린 또는 다른 트롬빈 억제제, 히루딘, 히룰로그, 아피라아제, 아르가트로반, D-페닐알라닐-L-폴리-L-아르기닐 클로로메틸 케톤, 또는 다른 항혈전형성제, 또는 이의 혼합물; 우로키나아제, 스트렙토키나아제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 또는 다른 혈전용해제, 또는 이의

혼합물; 섬유소 용해제; 혈관경련 억제제; 칼슘 채널 차단제, 나이트레이트, 산화질소, 산화질소 촉진제 또는 다른 혈관확장제; 아스피린, 티클로피딘 또는 다른 항혈소판제; 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 또는 이의 유사체; 콜키신 또는 다른 세포분열 억제제 또는 다른 마이크로튜블 억제제; 사이토칼라신 또는 다른 액틴 억제제; 리모델링 억제제; 데옥시리보핵산, 안티센스 뉴클레오타이드 또는 다른 분자 유전자 개재용 제제; 세포 주기 억제제(예컨대 레티노블라스토마 종양 억제 유전자의 단백질 산물), 또는 이의 유사체 GP IIb/IIIa, GP Ib-IX 또는 다른 억제제 또는 표면 당단백질 수용체; 메토트렉세이트 또는 다른 항대사산물 또는 항증식성 제제; 항암 화학요법제; 덱사메타손, 덱사메타손 나트륨 포스페이트, 덱사메타손 아세테이트 또는 다른 덱사메타손 유도체, 또는 다른 항염증성 스테로이드; 프로스타글란딘, 프로스타사이클린 또는 이의 유사체; 면역억제제(예컨대 사이클로스포린 또는 라파마이신(시롤리무스라고도 함) 및 이의 유사체); 항균제(예를 들어, 디아미딘, 아이오딘 및 아이오도포어, 페록시겐, 페놀, 비스페놀, 할로페놀, 비구아니드, 은 화합물, 트리클로산, 클로르헥시딘, 트리클로카르반, 헥사클로로펜, 디브로모프로파미딘, 클로록실레놀, 페놀 및 크레솔 또는 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 화합물) 항생제, 에리트로마이신 오르반코바이신; 도파민, 브로모크립틴 메실레이트, 퍼골리드 메실레이트 또는 다른 도파민 효현제; 또는 다른 방사선요법제; 요오딘 함유 화합물, 바륨 함유 화합물, 금, 탄탈륨, 텅스텐 또는 방사선 불투과제로서 작용하는 다른 중금속; 펩타이드, 단백질, 효소, 세포외 매트릭스 성분, 세포성분 또는 다른 생물학적 제제; 캡토프릴, 에날라프릴 또는 다른 안지오텐신 전환 효소(ACE) 억제제; 아스코르브산, 알파토코페놀, 수퍼옥시드 디스뮤타아제, 데페록시아민, 21-아미노스테로이드(라사로이드) 또는 다른 자유 라디칼 스캐빈저, 철 킬레이트 또는 항산화제; 안지오펩틴; ^{14}C-, ^{3}H-, ^{131}I-, ^{32}P 또는 ^{36}S-방사성표지 형태 또는 다른 임의의 전술한 것의 방사선표지형; 또는 임의의 이들의 혼합물에서 선택된 1 이상의 유익제를 포함할 수 있다.

[0285] 장치 표면에 도입할 수 있는 추가적인 유익제는 물에 가용성이 되게 하는 극성 또는 하전된 작용기를 포함하는 친수성 또는 히드로겔 중합체 등과 같은 중합체를 포함하는 윤활제를 포함한다. 이들 제제는 용액 중에서 물 분자에 친수성을 갖는 극성 기를 도입하고 광범위하게는 히드로겔로 분류된다. 또한 항응고체 이외에도 코팅에 윤활제를 부착시키는 것이 적절할 수 있다. 일 구체예에서, 윤활제와 외부 코팅층 사이의 연결은 공유 결합일 수 있다. 다르게, 윤활제는 공유 결합없이 코팅 표면 내에 도입되거나 그 위에 이온적으로 또는 물리적으로 흡착될 수 있다. 윤활제의 예에는 제한없이, 히알루론산, 히알루론산 유도체, 폴리-N-비닐피롤리돈, 폴리-N-비닐피롤리돈 유도체, 산화폴리에틸렌, 산화폴리에틸렌 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 유도체, 폴리비닐알콜, 폴리비닐알콜 유도체, 폴리아크릴산, 폴리아크릴산 유도체, 실리콘, 실리콘 유도체, 다당류, 다당류 유도체, 폴리스티렌, 술폰화 폴리스티렌 유도체, 폴리알릴아민, 폴리알릴아민 유도체, 폴리에틸렌이민, 폴리에틸렌이민 유도체, 폴리옥사졸린, 폴리옥사졸린 유도체, 폴리아민, 폴리아민 유도체 및 이의 조합이 포함된다. 이러한 유익제는 예를 들면 외부 코팅층 내 과분지형 중합체 분자에 공유 결합될 수 있다.

[0286] 장치가 몇몇 표면을 갖는 경우, 유익제(들)은 유익한 효과를 달성하는데 적합하면 그 표면에 도입될 수 있다. 예를 들면, 유익제(들)은 외강 및 외강외 면 둘 모두 또는 그중 하나 상의 관형 장치 표면에 도입될 수 있다. 1보다 많은 유익제가 도입되는 경우, 상이한 유익제가 동일 표면, 또는 표면의 일부, 또는 다른 표면 또는 표면의 일부분에 도입될 수 있다.

[0287] 본 발명의 장치는 적어도 일부 구체예에서 하기 장점 중 1 이상을 가지게 된다:

[0288] - 최외층에 커플링되는 실체의 양을 제어할 수 있다;

[0289] - 실체, 예를 들어 헤파린의 양 말단(한쪽 지점) 부착 및 복수지점 부착을 수행할 수 있지만, 말단 지점(특히 환원성 말단 지점) 부착이 바람직하다;

[0290] - 실체 및 과분지형 중합체 간 공유 결합(링커(들) 및 스페이서(들))의 길이가 제어될 수 있다;

[0291] - 전체 길이 헤파린을 사용하여 헤파린의 절단을 피하고 따라서 헤파린 원료의 사용을 최적화한다;

[0292] - 스페이서를 통해 연결된 헤파린 또는 전체 길이 헤파린의 사용은 결합된 헤파린의 생활성을 개선시킬 수 있다;

[0293] - 외부 코팅층 전반에 실체의 균일한 분포가 달성될 수 있다;

[0294] - 그 제조 재료와 무관한 장치의 고유 특성을 차폐, 예를 들면 혈전형성성을 저하시키는 균일한 코팅을 얻을 수 있다;

[0295] - 비교적 평활하고/하거나 매끄러운 코팅을 얻을 수 있다;

[0296] - 항응고체의 생체이용률을 제어할 수 있고 개선할 수 있다;

[0297] - 헤파린을 침출시키지 않아서 수명이 긴 비혈전형성성 코팅을 얻을 수 있다;

[0298] - 노화시 특성이 보존되는 코팅을 얻을 수 있다;

[0299] - 멸균(예를 들면, EO 사용) 시 특성이 보존되는 코팅을 얻을 수 있다;

[0300] - 층간 이온 상호작용의 가역적 형성 가능성 덕분에 자기치유 코팅을 얻을 수 있다;

[0301] - 코팅 제조를 위한 단계 수가 사전제작된 성분의 이용에 의해 최소화될 수 있다;

[0302] - 사전제작된 성분을 이용하여 강건한 제조 과정이 획득될 수 있다;

[0303] - 공유 결합된 헤파린과의 사전제조 접합체를 코팅 구축 공정에서 사용할 수 있는 코팅을 제조할 수 있다;

[0304] - 제조된 코팅의 상용성이 향상될 수 있다;

[0305] - 본 발명에 따른 코팅은 전신 헤파린에 대한 요구도를 저하시킬 수 있고, 접촉 활성화 가능성을 줄일 수 있다;

[0306] - 일부 용도, 예를 들면 신경혈관 용도에서 유용할 수 있는 윤활성 및 내혈전형(thromboresistance) 조합을 갖는 의료 장치를 얻을 수 있다;

[0307] - 일부 용도, 예를 들여 약물 용리 스텐트 및 약물 용리 벌룬에서 유용한, 약물 용리성 및 내혈전형성성의 조합을 갖는 의료 장치를 얻을 수 있다.

[0308] - 일부 용도, 예를 들어 심혈관 용도에서 유용한 항염증성 및 내혈전형성성의 조합을 갖는 의료 장치를 얻을 수 있다;

[0309] - 생분자에 대한 결합능이 개선된 분석 또는 분리 장치를 얻을 수 있다;

[0310] - 연장된 헤파린 활성 수명을 갖는 분석 또는 분리 장치를 얻을 수 있다.

[0311] 본 발명을 제한없이, 이하 실시예를 통해 예시적으로 설명한다.

[0312] **실시예**

[0313] 모든 루파솔(Lupasol) 샘플은 BASF에서 구매하였다. Lupasol®WF(에틸렌 디아민 코어)는 광산란법으로 측정한 평균 분자량이 25 kDa이다. 덱스트란 설페이트는 pK Chemicals A/S(PKC)에서 구매하였고 PAMAM 덴드라이머(에틸렌 디아민 코어)는 Sigma Aldrich 및 Dendritech에서 구매하였다. PAMAM-G6.0-NH_2는 PAMAM 덴드라이머(제6 세대)이고 분자량이 대략 60 kDa이다. PAMAM-G8.0-NH_2는 PAMAM 덴드라이머(제8 세대)이고 분자량이 대략 230 kDa이다. PPI G5 덴드라이머(부탄-1,4-디아민 코어)는 Aldrich에서 구매하였다. PPI G5는 덴드라이머(제5 세대)이고 분자량이 대략 7 kDa이다. 폴리아민 Epomin P-1050(에틸렌 디아민 코어)은 Nippon Shokubai에서 구매하였고 평균 분자량이 70 kDa이다. 폴리아민 G-35는 Bright Chemicals에서 구매하였고 평균 분자량은 70 kDa이다. 모든 폴리아민 스톡 용액은 물 중 5 중량%이다. 덱스트란 설페이트 스탁 용액은 물 중 6 중량%이다. 용액은 사용전 적절하게 후속 희석하였다. 물 세척을 적절하게 각 공정 단계 사이에 수행하였다.

[0314] **실시예 제목**

[0315] 1. 하층의 제조

[0316] 2. 외부 코팅층에 과분지형 중합체를 포함하는 비혈전형성성 코팅의 제조

[0317] 3. 외부 코팅층에 사전제조된 헤파린 작용성 과분지형 중합체를 포함하는 비혈전형성성 코팅의 제조

[0318] 4. 유도체화된 헤파린 실체

[0319] 5. 유도체화된 과분지형 중합체

[0320] 6. 헤파린 밀도 및 혈소판 손실 평가

[0321] 7. 중간체의 제조

[0322] 8. 친수성 및 윤활성 코팅의 제조

[0323] 9. 약물 용리 코팅의 제조

[0324] 10. 생체적합성 연구

[0325] 11. 과분지형 중합체를 포함하는 EO 멸균된 코팅의 혜모-적합성

[0326] **실시예 1. 하층의 제조**

[0327] **실시예 1.1: Lupasol®SN을 포함하는 하층의 제조**

[0328] PVC 표면은 황산화 다당류층으로 종결된 [Larm et al in EP-B-0086186 및 EP-495820(자기조립식; 다전해질 전하 상호작용)]에 기술된 방법을 사용해 전처리하였다.

[0329] PVC 관(I.D. 3 mm)의 내강 표면은 이소프로판올 및 산화제를 사용해 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®SN, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이중작용화 알데히드(크로톤알데히드)를 사용해 가교하였다. 모든 폴리아민 및 설페이트 다당류의 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 황화 다당류로 종결된 3 이중층으로 프라이밍하였다.

[0330] **실시예 1.2: Lupasol®WF을 포함하는 하층의 제조**

[0331] PVC 표면은 황화 다당류 층으로 종결되는 [Larm et al in EP-B-0086186 및 EP-495820(자기조립식; 다전해질 전하 상호작용)]에 기술된 방법을 사용해 전처리하였다.

[0332] PVC 관(I.D. 3 mm)의 내강 표면은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®WF, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착으로 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)와 가교하였다. 폴리아민과 황화 다당류의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 황화 다당류로 종결된 3 이중층으로 프라이밍하였다.

[0333] **실시예 1.3: PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 하층의 제조**

[0334] 금으로 피복된 QCM(Quartz Crystal Microbalance)(QSX 301, Q-Sense)를 were coated according to 실시예 1.1 using 5wt% in MeOH PAMAM-G6.0-NH_2(1 mL/L) 중 5 wt%를 사용해 실시예 1.1에 따라 코팅하여 PAMAM-G6.0-NH_2 및 황화 다당류(물 중 6 wt%)의 교대층으로 이루어진 3 이중층 코팅을 얻었다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 금 표면은 황화 다당류로 종결된 3 이중층으로 프라이밍하였다.

[0335] **실시예 1.4: Lupasol®SK 및 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 하층의 제조**

[0336] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)을 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®SK, 물 중 5 wt%, 10분) 및 음으로 하전된 PAMAM-헤파린 접합체(400 mg/L, 실시예 5.2 유래, 20분)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 모든 폴리아민 및 PAMAM-헤파린 접합체 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 실시예 5.2 유래의 PAMAM-헤파린 접합체로 종결된 3 이중층으로 프라이밍하였다.

[0337] **실시예 1.5: Lupasol®WF 및 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 사용한 하층의 제조**

[0338] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®WF, 물 중 5 wt%, 10분) 및 음으로 하전된 PAMAM-헤파린 접합체(400 mg/L, 실시예 5.2 유래, 20분)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 PAMAM-헤파린 접합체의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 실시예 5.2 유래의 PAMAM-헤파린 접합체로 종결시킨 3 이중층으로 프라이밍하였다.

[0339] **실시예 1.6: G-35를 포함하는 하층의 제조**

[0340] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민

(G-35, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 황화 다당류의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 황화 다당류로 종결시킨 3 이중층으로 프라이밍하였다.

[0341] **실시예 1.7: Lupasol®SK를 이용한 하부층의 제조**

[0342] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®SK, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 황화 다당류의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 황화 다당류로 종결된 3 이중층으로 프라이밍하였다.

[0343] **실시예 1.8: Epomin P-1050을 사용한 하부층의 제조**

[0344] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Epomin P-1050, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 황화 다당류의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 황화 다당류로 종결된 3 이중층으로 프라이밍하였다.

[0345] **실시예 2. 외부 코팅층에 과분지형 중합체를 포함하는 비혈전형성성 코팅의 제조**

[0346] **실시예 2.1: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 Lupasol®WF를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0347] Lupasol®WF(5 wt%) 용액을 실시예 1.1 유래의 사전제작된 코티 표면에 10분간 흡착시킨 후 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액으로 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0348] **실시예 2.2: Lupasol®WF를 포함하는 하층 상에 Lupasol®WF를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0349] Lupasol®WF(5 wt%)의 용액을 실시예 1.2 유래의 사전제작 코팅 표면에 10분간 흡착시킨 후 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액을 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0350] **실시예 2.3: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0351] PAMAM-G6.0-NH_2(5 wt%) 용액을 실시예 1.1 유래의 사전제작 코팅 표면에 10분간 흡착시킨 후, 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액을 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0352] **실시예 2.4: PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 하층 상에 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0353] PAMAM-G6.0-NH_2(5 wt%) 용액을 실시예 1.3 유래의 사전제작 코팅 표면 상에 30분간 흡착시킨 후 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액을 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0354] **실시예 2.5: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 G-35를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0355] G-35(5 wt%) 용액을 실시예 1.1 유래의 사전제작 코팅 표면에 10분간 흡착시킨 후 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계

를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액을 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0356] **실시예 2.6: G-35를 포함하는 하층 상에 G-35를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0357] A 용액 of G-35(5 wt%) 용액을 실시예 1.6 유래의 사전제작 코팅 표면에 10분간 흡착시킨 후, 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액을 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0358] **실시예 2.7: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 10 wt% Lupasol®WF 및 90 wt % Lupasol®SN을 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0359] 10 wt% Lupasol®WF(5 wt% 용액) 및 90 wt % Lupasol®SN(5 wt% 용액)의 혼합물을 실시예 1.1 유래의 사전제작 표면에 10분간 흡착시킨 후 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액을 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0360] **실시예 2.8: Lupasol®SK를 포함하는 하층 상에 10 wt% Lupasol®WF 및 90 wt % Lupasol®SK를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0361] 10 wt% Lupasol®WF(5 wt% 용액) 및 90 wt % Lupasol®SK(5 wt% 용액)의 혼합물을 10분간 실시예 1.7 유래의 사전제작 코팅 표면에 흡착시킨 후 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액을 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0362] **실시예 2.9: Lupasol®SK를 포함하는 하층 상에 Lupasol®WF를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0363] Lupasol®WF(5 wt%) 용액을 10분간 실시예 1.7 유래의 사전제작 코팅 표면에 흡착시킨 후, 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액을 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0364] **실시예 2.10: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 Epomin P-1050을 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0365] Epomin P-1050(5 wt%) 용액을 실시예 1.1 유래의 사전제작 코팅 표면에 10분간 흡착시킨 후 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 수행하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 비혈전형성성 코팅은 보레이트/포스페이트 용액을 처리하여 그 비혈전형성성을 평가하기 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다.

[0366] **실시예 2.11: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 헤파린화 Lupasol®WF를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0367] Lupasol®WF(물 중 5 wt%)를 실시예 1.1에서 처럼 실질적으로 기술된 하층 상에 흡착시켜서 양으로 하전된 표면을 얻었다. Na 헤파린(325 mg/L)을 후속하여 실온에서 60분간 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드(EDC)(23.35 mg/L)를 사용해 양으로 하전된 층에 커플링시킨 후 보레이트/포스페이트 세척을 후속하여 코팅의 비혈전형성능을 평가하기 전에 임의의 느슨하게 결합된 헤파린을 제거하였다.

[0368] **실시예 2.12: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 아피라아제 작용화 Lupasol®WF를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0369] 감자에서 유래된, 아피라아제, ≥200 units/mg 단백질을 Sigma-Aldrich에서 구매하였다. 아피라아제의 카르복실 함량은 Aminosyraanalyscentralen, Sweden을 기초로 아피라아제 1 mole 당 대략 90 moles의 COOH인 것으로 계산되었다. 실질적으로 실시예 2.11에 기술된 바와 같은, EDC, 또는 EDC 유사 시약을 이용하여 아민 함유 과분지

형 중합체에 연결시키기 위해 비혈전형성성 제제, 예컨대 아피라아제 중 카르복실 기를 사용할 수 있다.

[0370] **실시예 3. 외부 코팅층에 사전 제조된 헤파린 작용화 과분지형 중합체를 포함하는 비혈전형성성 코팅의 제조**

[0371] **실시예 3.1: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0372] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®SN, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 황화 다당류의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 Lupasol®SN의 한 층 및 3 이중층으로 프라이밍하였다. 실시예 5.2 유래의 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머(150 mg/L)를 1시간 동안 양으로 하전된 Lupasol®SN 코팅 상에 침착시킨 후 보레이트/포스페이트 세척을 수행하여 코팅의 비혈전형성능을 평가하기 전 임의의 느슨하게 결합된 헤파린 접합체를 제거하였다.

[0373] **실시예 3.2: Lupasol®SK, Lupasol®WF 및 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 하층 상에 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0374] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®SK, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 PAMAM-헤파린 접합체(400 mg/L, 실시예 5.2 유래)의 교대식 흡착으로 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 PAMAM-헤파린 접합체의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 기술된 바와 같이(또한, 실시예 1.4 참조) 3 이중층으로 프라이밍한 후 Lupasol®WF의 한 층으로 프라이밍하였다. 실시예 5.2 유래의 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머(400 mg/L)를 20분간 양으로 하전된 Lupasol®WF 코팅 상에 침착시킨 후 물 세척하여 코팅의 비혈전형성능을 평가하기 전에 임의의 느슨하게 결합된 헤파린 접합체를 제거하였다.

[0375] **실시예 3.3: Lupasol®WF 및 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 하층 상에 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0376] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®WF, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 PAMAM-헤파린 접합체(400 mg/L, 실시예 5.2 유래)의 교대식 흡착으로 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 PAMAM-헤파린 접합체의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 기술된 바와 같이(실시예 1.5도 참조) 3 이중층으로 프라이밍한 후 Lupasol®WF의 한 층으로 프라이밍하였다. 실시예 5.2 유래의 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머(400 mg/L)를 20분간 양으로 하전된 Lupasol®WF 코팅 상에 침착시키고 코팅의 비혈전형성능을 평가하기 전에 물 세척으로 임의의 느슨하게 결합된 헤파린 접합체를 제거하였다.

[0377] **실시예 3.4: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0378] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®SN, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 황화 다당류의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 Lupasol®SN의 한 층 및 3 이중층으로 프라이밍하였다. 실시예 5.2 유래의 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머(425 mg/L)를 1시간 동안 양으로 하전된 Lupasol®SN 코팅 상에 침착시킨 후보레이트/포스페이트 세척하여 코팅의 비혈전형성능을 평가하기 전에 임의의 느슨하게 결합된 헤파린 접합체를 제거하였다.

[0379] **실시예 3.5: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 헤파린 작용화 Lupasol®WF를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0380] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®SN, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 황화 다당류의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 Lupasol®SN의 한 층 및 3 이중층으로 프라이밍하였다. 실시예 5.3 유래의 헤파린 작용화 Lupasol®WF(425 mg/L)를 1시간 동안 양으로 하전된 Lupasol®SN 코팅 상에 침착시킨 후 보레이트/포스페이트 세척하여 코팅의 비혈전형성능을 평가하기 전에 임의의 느슨하게 결합된 헤파린 접합체를 제거하였다.

[0381] **실시예 3.6: Lupasol®SN을 포함하는 하층 상에 헤파린 작용화 PAMAM-G8.0-NH_2 덴드라이머를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

[0382] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®SN, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 황화 다당류의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 Lupasol®SN의 한 층 및 3 이중층으로 프라이밍하였다. 실시예 5.6 유래의 헤파린 작용화 PAMAM-G8.0-NH_2 덴드라이머(425 mg/L)를 1시간 동안 양으로 하전된 Lupasol®SN 코팅 상에 침착시킨 후 보레이트/포스페이트 세척하여 코팅의 비혈전형성능을 평가하기 전에 임의의 느슨하게 결합된 헤파린 접합체를 제거하였다.

[0383] **실시예 3.7: upasol®SN을 포함하는 하층 상에 헤파린 작용화 PPI G5 덴드라이머를 포함하는 외부 코팅층의 제조**

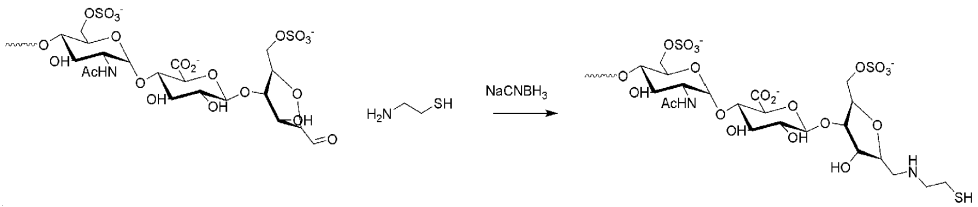
[0384] PVC 관의 내강 표면(I.D. 3 mm)은 이소프로판올 및 산화제로 세척하였다. 프라이밍은 양으로 하전된 폴리아민(Lupasol®SN, 물 중 5 wt%) 및 음으로 하전된 황화 다당류(덱스트란 설페이트, 물 중 6 wt%)의 교대식 흡착에 의해 구축하였다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교하였다. 폴리아민 및 황화 다당류의 모든 쌍은 하나의 이중층이라 한다. PVC 표면은 Lupasol®SN의 한 층 및 3 이중층으로 프라이밍하였다. 실시예 5.7 유래의 헤파린 작용화 PPI G5 덴드라이머(425 mg/L)는 1시간 동안 양으로 하전된 Lupasol®SN 코팅 상에 침착시킨 후 보레이트/포스페이트 세척하여 코팅의 비혈전형성능을 평가하기 전에 임의의 느슨하게 결합된 헤파린 접합체를 제거하였다.

[0385] **<u>실시예 4. 유도체화된 헤파린 실체</u>**

[0386] **실시예 4.1: 알데히드 말단 지점 작용화 헤파린의 제조**

[0387] 알데히드 작용화 헤파린은 USP 4,613,665의 실시예 2에 따라 실질적으로 제조하였다.

[0388] **실시예 4.2: 티올 말단-지점 작용화 헤파린의 제조**

[0389] 

[0390] 알데히드 기를 갖는 아질산 분해 헤파린(US 4,613,665의 실시예 2처럼 실질적으로 제조)(5.00 g, 1.0 mmol), 시스테아민 히드로클로라이드(0.57 g, 5.0 mmol) 및 염화나트륨(0.6 g)을 순수에 용해시켰다. 1 M NaOH(aq) 및 1 M HCl(aq)을 사용해 pH를 6.0으로 조정하였다. 용액에 3.1 ml의 5 %(aq) $NaCNBH_3$(0.16 g, 2.5 mmol)를 부가하고 반응물을 밤새 실온에서 교반하였다. 1 M NaOH(aq)을 사용해 pH를 11.0으로 맞추고 얻어진 생성물을 3일 동안 SpectraPor 투석막(MWCO 1kD, 평면 너비 45mm)을 사용해 순수에 대해 투석하였다. 반응 혼합물을 이후 농축 및 동결 건조하여 백색의 솜털같은 분말 2.6 g을 얻었다.

[0391] **실시예 4.3: 알킨 말단-지점 작용화 헤파린의 제조**

[0392] 알킨 작용화 아질산 분해 헤파린은 WO2010/029189의 실시예 3a처럼 실질적으로 제조하였다.

[0393] **실시예 4.4: 알킨 말단-지점 작용화 천연 헤파린의 제조**

[0394] 알킨 작용화 천연 헤파린은 WO2010/029189의 실시예 3b처럼 실질적으로 제조하였다.

[0395] **실시예 4.5: 아지드 말단-지점 작용화 헤파린 및 아지드 작용화 천연 헤파린의 제조**

[0396] 아지드 작용화 아질산 분해 헤파린 및 아지드 작용화 천연 헤파린은 WO2010/029189의 실시예 4처럼 실질적으로 제조하였다.

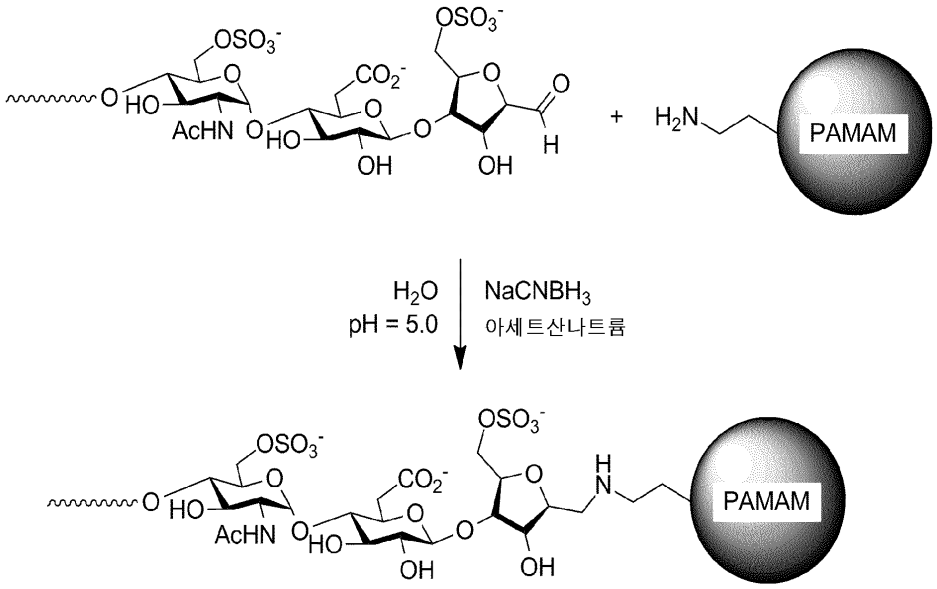
[0397] **실시예 5. 유도체화 과분지형 중합체**

[0398] **실시예 5.1: 알켄 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머의 제조**

[0399] 3.75 mg의 NHS 활성화 5-헥센산/mL MeOH로 스톡 용액을 제조하였다. NHS 활성화 알켄 제조에 대한 실시예 7.1을 참조한다.

[0400] 2 mL의 MeOH 중 5 wt% PAMAM-G6.0-NH_2 용액을 1 mL의 스톡 용액(3.75 mg의 NHS 활성화 5-헥센산) 및 9 mL의 MeOH(0℃)에 부가하였다. 밤새 반응이 진행되도록 하였다. 회전 증발기 및 진공 오븐을 사용해 용매를 증발시켰다. 얻어진 재료의 고순도는 ^{1}H 및 ^{13}C NMR로 확인하였다. 2%의 작용화도가 얻어졌다(5-6 알켄/덴드라이머).

[0401] **실시예 5.2: 비활성이 보존된 헤파린 작용화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머의 제조**



[0402]

[0403] 실시예 4.1 유래의 알데히드 말단-지점 작용화 헤파린(5.0 g, 0.56 mmol)을 강하게 교반하면서 15 mL 아세테이트 완충액(pH=5.0)에 용해시켰다. 2 mL의 MeOH 중 5 wt% PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머(에틸렌 디아민 코어)(80.6 mg, 1.39 □mol)의 용액을 헤파린 용액에 부가하고 10 mL 나트륨 시아노보로하이드라이드(H_2O 중 2.5 wt%)를 부가하였다. 용액을 퓸 후드 중에 교반하여 밤새 실온에 두었다. 용액을 투석백(MWCO 50,000 Da)에 옮기고 완전하게 투석하였다. 투석백의 내용물을 이후 둥근 바닥 플라스크로 옮기고 밤새 동결건조시켰다. 플라스크 내 내용물의 건조 중량은 830 mg(~60 헤파린 사슬/PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머 또는 PAMAM-G6.0-NH_2 중 1차 아민의 23% 작용화). 접합체 중 PAMAM 결합된 헤파린의 비활성은 >100 IU/mg으로 확인되었다. 커플링 전에, 제조에 사용된 헤파린은 비활성이 대략 100 IU/mg이었다.

[0404] **실시예 5.3: 비활성이 보존된 헤파린 작용화 Lupasol®WF의 제조**

[0405] 헤파린 작용화 Lupasol®WF는 실시예 5.2에 기술된 대로 제조하였다.

[0406] **실시예 5.4: 아지드 작용화 Lupasol®WF의 제조**

[0407] 아지드 작용화 Lupasol®WF는 WO2010/029189의 실시예 2a에서 Lupasol®SN에 대해 기술된 대로 실질적으로 제조할 수 있다

[0408] **실시예 5.5: 알킨 작용화 Lupasol®WF의 제조**

[0409] 알킨 작용화 Lupasol®WF는 WO2010/029189의 실시예 2b에 Lupasol®SN에 대해 기술한 바와 실질적으로 같게 제조할 수 있다.

[0410] **실시예 5.6: 비활성이 보존된 헤파린 작용화 PAMAM-G8.0-NH_2 덴드라이머의 제조**

[0411] 헤파린 작용화 PAMAM-G8.0-NH_2는 실시예 5.2에 기술된 대로 실질적으로 제조하였다.

[0412] **실시예 5.7: 비활성이 보존된 헤파린 작용화 PPI G5 덴드라이머의 제조**

[0413] 헤파린 작용화 PPI G5 덴드라이머는 실시예 5.2에 기술된 대로 실질적으로 제조하였다.

[0414] **실시예 5.8: 작용화 과분지형 중합체의 제조**

[0415] 표 3(작용기 1 및 작용기 2)에서 선택된, 화학기, 또는 작용성을 갖는 과분지형 중합체는 당분야의 숙련가에 의해 제조할 수 있다.

[0416] 표 3(작용기 1 및 작용기 2)에서 선택된, 화학기, 또는 작용성을 갖는 비혈전형성성 실체(예를 들어, 헤파린)은 당분야의 숙련가가 제조할 수 있다.

[0417] 작용화 과분지형 중합체는 당분야의 숙련가에 의해 작용화 비혈전형성 실체(예를 들어, 헤파린)과 반응시켜 비혈전형성 실체(예를 들어, 헤파린)으로 유도체화된 과분지형 중합체를 생성시킬 수 있다.

[0418] **실시예 6. 세파린 밀도 및 혈소판 손실 평가**

[0419] 헤파린 밀도 테스트(코팅 내 헤파린 함량 측정용)

[0420] 표면 고정된 헤파린의 정량은 [Smith R. L. and Glikerson E(1979), Anal. Biochem., 98, 478-480]에 기술된 대로 실질적으로 수행하였다.

[0421] 톨루이딘 블루 염색 테스트(헤파린 분포 평가용)

[0422] 헤파린 분포는 톨루이딘 블루 염색 용액을 사용해 평가하였다. 이 용액은 1 L의 물에 200 mg의 톨루이딘 블루를 용해시켜 제조하였다. 샘플에 대해 2분간 염색 용액을 가한 후 광범위하게 물 세척하였다. 블루/바이올렛 염색은 음으로 하전된 헤파린 분자가 도 9의 플레이트 B에 예시한 바와 같이 외부 코팅층에 균질하게 분포됨을 의미한다.

[0423] 혈액 루프 평가 테스트(혈소판 감소 측정용)

[0424] 혈액 루프 평가는 코팅함에 따라, 비혈전형성성 표면의 보존된 헤파린 생활성을 보여주도록, 샘플 상에서 수행하였따. 먼저 코팅관의 내강면을 모든 느슨하게 결합된 헤파린이 세척되고 안정한 표면이 남게 보장하도록 1 mL/분의 유속으로 15시간 동안 0.15 M NaCl로 세척하였다. 이어서 세척된 튜브를 [Andersson et al.(Andersson, J.; Sanchez, J.; Ekdahl, K. N.; Elgue, G.; Nilsson, B.; Larsson, R. J Biomed Mater Res A 2003, 67(2), 458-466)]에 따라 실질적으로 수행된 Chandler 루프 모델에서 20 rpm을 항온반응시켰다. 신선한 혈액 및 루프에서 회수한 혈액 유래의 혈소판을 세포 계측기에서 계측하여 혈전증을 의미하는 혈소판의 손실을 측정하였다.

[0425] **실시예 6.1: 혈액 노출 후 비혈전형성성 표면의 헤파린 밀도 및 혈소판 손실면에서 코팅성**

표 4

[0426]

실시예 번호	하층 내 폴리아민	하층 내 음으로 하전된 중합체	외부 코팅층의 과분지형 중합체	헤파린 밀도[a] [mg/㎠]	톨루이딘 블루 염색[b]	혈소판 손실 [%]
1.1	Lupasol®SN	PS*	N/A**	N/A**	No	N/A**
1.2	Lupasol®WF	PS*	N/A**	N/A**	No	N/A**
2.1	Lupasol®SN	PS*	Lupasol®WF	4.7	Yes	0
2.2	Lupasol®WF	PS*	Lupasol®WF	5.3	Yes	0
2.3	Lupasol®SN	PS*	PAMAM-G6.0-NH_2	1.4	Yes	8
2.4	PAMAM-G6.0-NH_2	PS*	PAMAM-G6.0-NH_2	5.1	Yes	N/T***
2.5	Lupasol®SN	PS*	G-35 [70kDa]	7.6	Yes	0
2.6	G-35 [70kDa]	PS*	G-35 [70kDa]	3.9	Yes	1
2.7	Lupasol®SN	PS*	Lupasol®WF	5.5	Yes	N/T***
2.8	Lupasol®SK	PS*	Lupasol®WF	3.5	Yes	3
2.9	Lupasol®SK	PS*	Lupasol®WF	8.6	Yes	1
2.10	Lupasol®SN	PS*	Epomin P-1050	8.4	Yes	N/T***
2.11	Lupasol®SN	PS*	Lupasol®WF	5.1	Yes	0
3.1	Lupasol®SN	PS*	PAMAM-G6.0-NH_2[c]	0.6	Yes	5
3.2	Lupasol® SK and Lupasol® WF	PAMAM-G6.0-NH_2[c]	PAMAM-G6.0-NH_2[c]	3.8	Yes	1
3.3	Lupasol® WF	PAMAM-G6.0-NH_2[c]	PAMAM-G6.0-NH_2[c]	4.0	Yes	1
3.4	Lupasol® SN	PS*	PAMAM-G6.0-NH_2[c]	0.9	Yes	14
3.5	Lupasol® SN	PS*	Lupasol WF[c]	3.5	Yes	7
3.6	Lupasol® SN	PS*	PAMAM-G8.0-NH_2[c]	0.6	Yes	12
3.7	Lupasol® SN	PS*	PPI G5[c]	1.7	Yes	15
미코팅 PVC	** N/A	** N/A	** N/A	** N/A	No	94
응고 대조군	** N/A	* PS	** N/A	** N/A	*** N/T	95

[a] 2값의 평균

[b] Yes는 블루/바이올렛 염색을 의미하고, No는 전혀 염색되지 않음을 의미함

[c] 사전제조된 헤파린 과분지형 접합체의 침착

* PS = 다당류

** N/A = 적용안됨

*** N/T = 테스트 안함

[0427] 혈액을 비혈전형성성 표면 코팅에 노출시킨 후 존재하는 혈소판의 수를 비혈전형성 표면 코팅에 혈액을 노출시키기 전에 존재한 혈소판 수의 비율로 계산하고 도 8에 다양한 샘플에 대해 그래프로 나타내었다.

[0428] 상기 표 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 테스트한 헤파린 함유 코팅의 경우 실질적으로 어떠한 혈소판 손실(혈소판 손실은 혈전증을 의미함도 보이지 않았다. 미코팅 PVC 관 및 황화 다당류의 외층을 갖는 표면("응고 대조군")은 이러한 실험에서 유의한 혈전증을 보였다.

[0429] **실시예 6.2: 톨루이딘 블루를 사용한 비혈전형성성 표면의 염색**

[0430] 실시예 2.2 유래의 관에 대해 2분간 용액에 함침시킨 후 광범위한 물 세척을 후속하여 톨루이딘 블루 염색 용액(물 중 200 mg/L)을 가하였다. 블루/바이올렛 색상이 관의 내강면 표면 상에서 관찰되었고 말단-지점 작용화 헤

파린의 공유 결합을 의미한다.

[0431] **실시예 6.3: 톨루이딘 블루를 사용한 비혈전형성 표면의 염색**

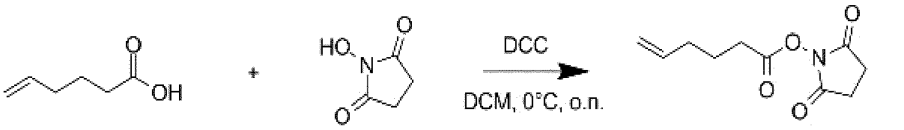
[0432] 실시예 3.2 유래의 관에 대해서 2분간 톨루이딘 용액에 침지시킨 후 광범위한 물 세척을 후속하여 톨루이딘 블루 염색 용액(물 중 200 mg/L)을 가하였다. 블루/바이올렛 색상이 관 내강면의 표면 상에서 관찰되었고 이는 PAMAM-헤파린 접합체의 말단-지점 작용화 헤파린의 공유 결합을 의미한다. PVC-관의 내강면 염색은 도 9에 도시하였다.

[0433] **실시예 6.4: 톨루이딘 블루를 사용한 비혈전형성 표면의 염색**

[0434] 실시예 3.3 유래의 관을 2분간 톨루이딘 블루 용액에 침지시키고 광범위한 물 세척을 후속하여 톨루이딘 블루 염색 용액(물 중 200 mg/L)을 가하였다. 블루/바이올렛 색상은 관 내강면 표면 상에서 관찰되었고 이는 PAMAM-헤파린 접합체의 말단-지점 작용화 헤파린의 공유 부착을 의미한다.

[0435] **실시예 7. 중간체의 제조**

[0436] **실시예 7.1: NHS-활성화 5-헥센산의 합성**



화학식: $C_6H_{10}O_2$ 분자량: 114,14

화학식: $C_4H_5NO_3$ 분자량: 115,09

화학식: $C_{10}H_{13}NO_4$ 분자량: 211,21

[0437]

[0438] 헥센산(1.00 g, 8.76 mmol) 및 히드록시숙신이미드(1.01 g, 8.76 mmol)를 10 mL의 DCM에 용해시키고 0℃에서 교반하였다. DCM(3 mL) 중 DCC(1.81 g, 8.76 mmol) 용액을 서서히 0℃엣 반응 혼합물에 점적하였다. 반응물을 밤새 교반시키고 부산물을 여과하였고 잔류 용액을 회전 증발기를 이용해 농축하고 진공 오븐 하에서 건조하였다. 얻어진 물질의 고순도는 ^{1}H 및 ^{13}C NMR로 확인하였다.

[0439] **실시예 8. 친수성 및 윤활성 코팅의 제조**

[0440] **실시예 8.1: Lupasol® SK 및 Lupasol® WF를 포함하는 친수성 및 윤활성 코팅**

[0441] QCM 결정을 Lupasol®SK를 사용해 실시예 1.7에 따라 코팅하여 Lupasol® SK 및 황화 다당류의 대체 층으로 이루어진 3 이중층을 얻었다. 최외층으로서 양이온성 과분지형 중합체를 사용한 코팅을 얻기 위해서 Lupasol® WF 층을 이어서 황화 다당류에 흡착시켰다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 이들 코팅은 접촉각(CA) 측정을 사용해 분석하였다. 53.0° 의 정적 CA(2 샘플의 평균)은 친수성 및 윤활성 코팅이 얻어졌음을 보여주었다.

[0442] **실시예 8.2: Lupasol® SK, Lupasol® WF 및 헤파린을 포함하는 친수성 및 윤활성 함유 코팅**

[0443] QCM 결정을 Lupasol®SK을 사용해 실시예 1.7에 따라 코팅시켜서 Lupasol®SK 및 황화 다당류의 다른 층으로 이루어진 3 이중층 코팅을 얻었다. Lupasol® WF 층을 후속하여 황화 다당류에 흡착시키고, 환원제(나트륨 시아노보로하이드라이드, 물 중 2.5 wt%)를 사용해, 실시예 4.1 유래의 아질산 분해 헤파린(325 mg/L)의 1시간 커플링 단계를 후속하였다. 2분 물 세척을 각 흡착 단계 사이에 수행하였다. 제작된 윤활성 코팅을 보레이트/포스페이트 용액으로 처리하여 접촉각(CA) 측정을 이용한 평가 전에 임의의 가능한 이온 결합 헤파린을 제거하였다. 23.5° 의 정적 CA(2 샘플의 평균)은 친수성 및 윤활성 코팅이 얻어졌음을 의미한다.

[0444] **실시예 9. 약물 용리 코팅의 제조**

[0445] **실시예 9.1: 헤파린화 코팅으로 독소루비신의 도입**

[0446] QCM 결정을 독소루비신 수용액(물 25 mL 당 1 mg)에 위치시켜서, 실시예 2.3에서 실질적으로 제조된, QCM 결정 상의 코팅에 독소루비신을 도입시켰다. 로딩 단계 후 조심스럽게 물을 이용해 약물 로딩된 코팅을 세척하고 코팅의 형광성을 평가하였다. 결정을 진공 오븐에서 건조시키고 형광성을 측정하였다. 강한 적색 형광이 검출되었

고 이는 독소루비신이 성공적으로 코팅에 도입되었음을 의미하는 것이다.

[0447] **실시예 9.2: 헤파린화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머, Lupasol® SK 및 Lupasol® WF를 포함하는 코팅에 독소루비신의 도입 및 후속 방출**

[0448] 독소루비신(1 mg/25 mL의 물) 수용액에 QCM 결정을 넣어서, 실시예 3.2에 따라 실질적으로 제조된, QCM 결정 상에 독소루비신을 도입시켰다. 로딩 단계 후 조심스럽게 물을 사용해 약물 로딩된 코팅을 세척한 후 코팅의 형광성을 평가하였다. 결정은 진공 오븐에서 건조하고 형광성을 평가하였다. 강한 적색 형광이 관찰되었고, 독소루비신이 코팅에 성공적으로 도입되었음을 의미하였다. 약물이 로딩된 코팅에 대해서 2M NaCl-용액 및 최종 물 세척을 수행한 후 진공 오븐에서 건조하고 추가적인 형광 현미경 평가를 수행하였다. 적색 형광성 결핍은 독소루비신이 코팅으로부터 용리되었음을 의미한다.

[0449] **실시예 9.3: 헤파린화 PAMAM-G6.0-NH_2 덴드라이머 및 Lupasol® WF을 포함하는 코팅에 독소루비신 도입 및 후속 방출**

[0450] 독소루비신(1 mg/25 mL의 물) 수용액에 QCM 결정을 넣어서, 실시예 3.2에 따라 실질적으로 제조된, QCM 결정 상에 독소루비신을 도입시켰다. 로딩 단계 후 조심스럽게 물을 사용해 약물 로딩된 코팅을 세척한 후 코팅의 형광성을 평가하였다. 결정은 진공 오븐에서 건조하고 형광성을 평가하였다. 강한 적색 형광이 관찰되었고, 독소루비신이 코팅에 성공적으로 도입되었음을 의미하였다. 약물이 로딩된 코팅에 대해서 2M NaCl-용액 및 최종 물 세척을 수행한 후 진공 오븐에서 건조하고 추가적인 형광 현미경 평가를 수행하였다. 적색 형광성 결핍은 독소루비신이 코팅으로부터 용리되었음을 의미한다.

[0451] **실시예 10: 생체적합성 연구**

[0452] **HDPE(고밀도 폴리에틸렌) 상에 생체적합성 표면의 제조**

[0453] HDPE 시트(30 ㎠, USP 참고 표준)를 이소프로판올 및 산화 방법으로 세척하였다. 이 시트는 황화 다당류로 종결된 3 이중층을 갖는 실시예 1에서 처럼 프라이밍하였다. 프라이밍층은 실시예 2에서와 같이 과분지형 폴리아민과 반응시킨 후 작용화 헤파린이 부착하거나 또는 실시예 3에서 처럼 먼저 폴리아민층 이어 순음전하를 갖는 헤파린 작용화 과분지형 중합체가 오는 커플링 단계가 후속되었다. 코팅은 재료들을 코팅 용액에 침지시켜 수행하였다. 코팅은 ISO10993(실시예 10.1 참조)에 기술된 바와 같은 최소 필수 배지(MEM) 용래 테스트를 사용해 세포독성 테스트에서 비독성인 것으로 확인되었다.

[0454] 이러한 결과들은 평가한 표면의 비독성 생체적합성을 검증해 준다.

[0455] **실시예 10.1: 생체적합성 표**

표 5

[0456]

실시예 No.	하층의 폴리아민	하층의 음으로 하전된 중합체	외부 코팅층의 과분지형 중합체	통과	미통과
2.2	Lupasol®WF	PS*	Lupasol®WF	예	
3.6	Lupasol®SN	PS*	PAMAM-G8.0-NH_2[a]	예	
3.7	Lupasol®SN	PS*	PPI G5[a]	예	
* PS = 다당류 [a] 사전 제조된 헤파린 과분지형 접합체의 침착					

[0457] **실시예 11: 과분지형 중합체를 포함하는 EO 멸균 코팅의 혜모-적합성**

[0458] **EO 멸균**

[0459] 실시예 2 또는 3에 기술된 대로 제조한 외부 코팅층의 헤파린 작용화 과분지형 중합체로 상이하게 코팅된 기재에 대해 산화에틸렌(EO) 노출을 통해 멸균을 수행하였다. EO-멸균은 의료 장치에 사용되는 표준 멸균법을 사용해 수행하였다.

[0460] 혈액 루프 평가 테스트(혈소판 손실 측정용)

[0461] EO-멸균하고 세척한 관을 [Andersson et al.(Andersson, J.; Sanchez, J.; Ekdahl, K. N.; Elgue, G.; Nilsson, B.; Larsson, R. J Biomed Mater Res A 2003, 67(2), 458-466)]에 따라 실질적으로 수행된 Chandler 루프 모델에서 항온반응시켰다. 실시예 6을 참조한다.

[0462] 하기 표에 나타낸 바와 같이, 실시예 2 및 3에 따라 제조된 과분지형 헤파린 접합체를 사용해 제조된 EO 멸균 헤파린 코팅에서는 실질적으로 어떠한 혈소판 손실(혈소판 손실은 혈전증을 의미함)도 보이지 않았다. 미코팅 PVC 관 및 응고 대조군(항트롬빈이 결합하지 않은 황화 다당류의 외부층을 갖는 포면)은 이 실험에서 유의하게 혈전증을 보였다.

[0463] **실시예 11.1 EO 멸균 후 혈소판 손실 면에서 코팅 안정성의 제시**

표 6

[0464]

실시예 No.	하츠의 폴리아민	하층의 음으로 하전된 중합체	외부 코팅층의 과분지형 중합체	혈소판 손실 [%] EO-멸균 전	혈소판 손실 [%] EO-멸균 후
2.1	Lupasol®SN	PS*	Lupasol®WF	0	6
2.7	Lupasol®SN	PS*	Lupasol®WF	N/T**	8
3.4	Lupasol®SN	PS*	PAMAM-G6.0-NH_2[a]	14	6
3.5	Lupasol®SN	PS*	Lupasol WF[a]	7	0
3.6	Lupasol®SN	PS*	PAMAM-G8.0-NH_2[a]	12	8
3.7	Lupasol®SN	PS*	PPI G5[a]	15	7
미코팅 PVC	N/A***	N/A***	N/A***	97	N/T**
응고 대조군	N/A***	N/A***	N/A***	96	N/T**

* PS = 다당류 ** N/T = 테스트 안함 *** N/A = 적용 안됨

[a] 사전 제조된 헤파린 고분지형 접합체의 침착

[0465] 이러한 결과들은 본 발명에 따라 제조된 안정한 표면의 비혈전형성성이 강한 멸균 조건에 노출됨에도 불구하고 유지된다는 것을 보여준다.

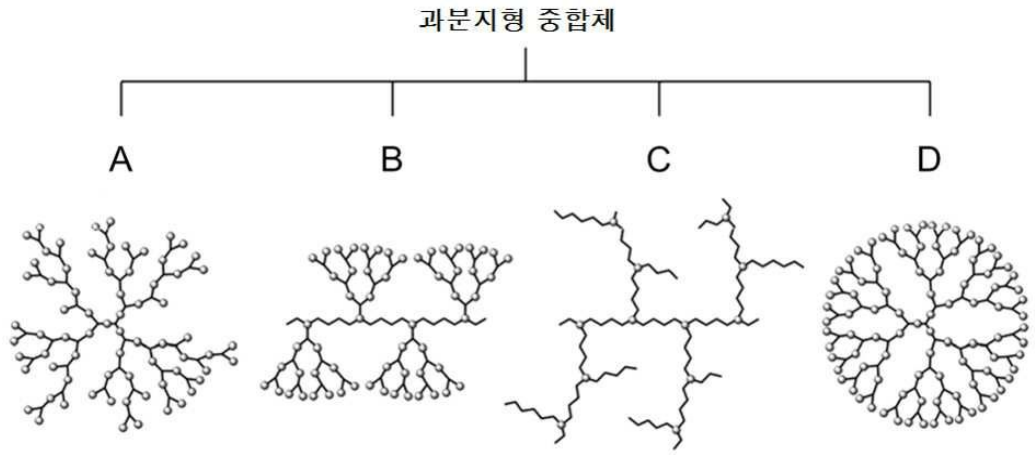
[0466] 달리 요구하지 않으면, 명세서 및 이하 청구항 전반에서, 단어 "포함하다", 및 "포함하는" 등의 이의 변이형은 언급한 정수, 단계, 정수군, 단계군을 포함하려는 의도로 이해하며, 임의의 다른 정수, 단계, 정수군 또는 단계군을 배제하려는 것이 아님을 이해한다.

[0467] 본 발명의 명세서 전반에서 언급한 모든 특허 및 특허 출원은 전체로 참조하여 본원에 편입시킨다.

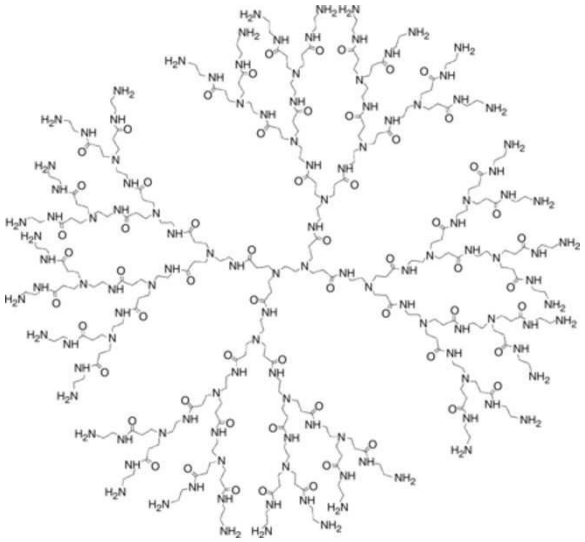
[0468] 본 발명은 상기 언급한 바람직한, 보다 바람직한 군, 및 적합한, 보다 적합한 군 및 군의 구체예의 모든 조합을 포괄한다.

도면

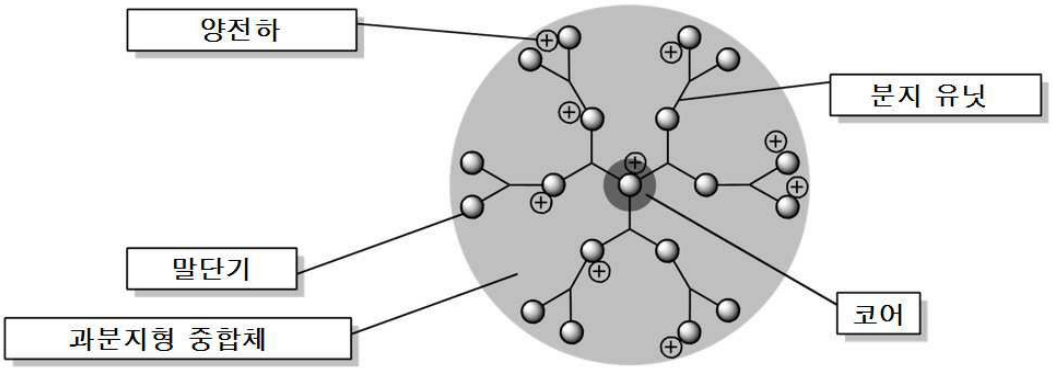
도면1



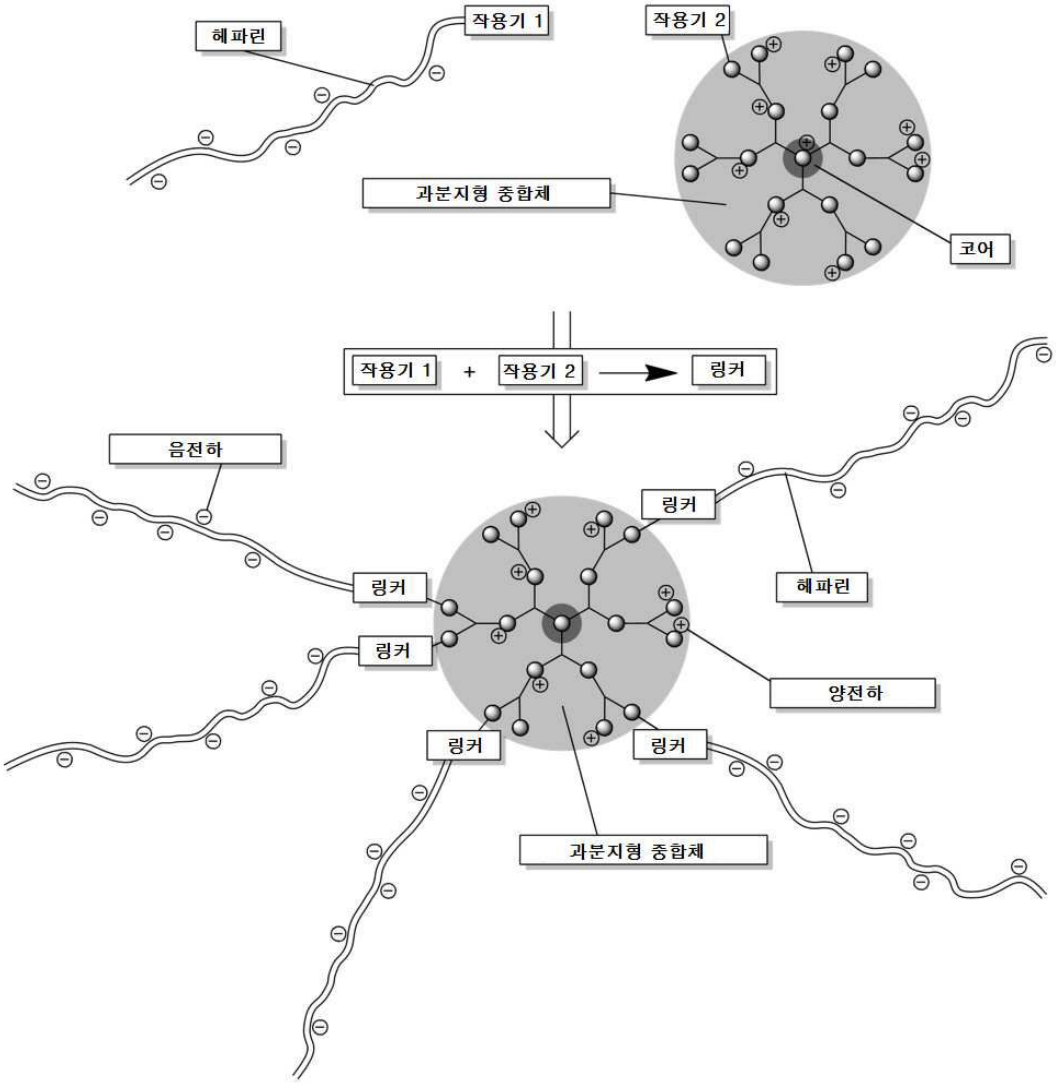
도면2



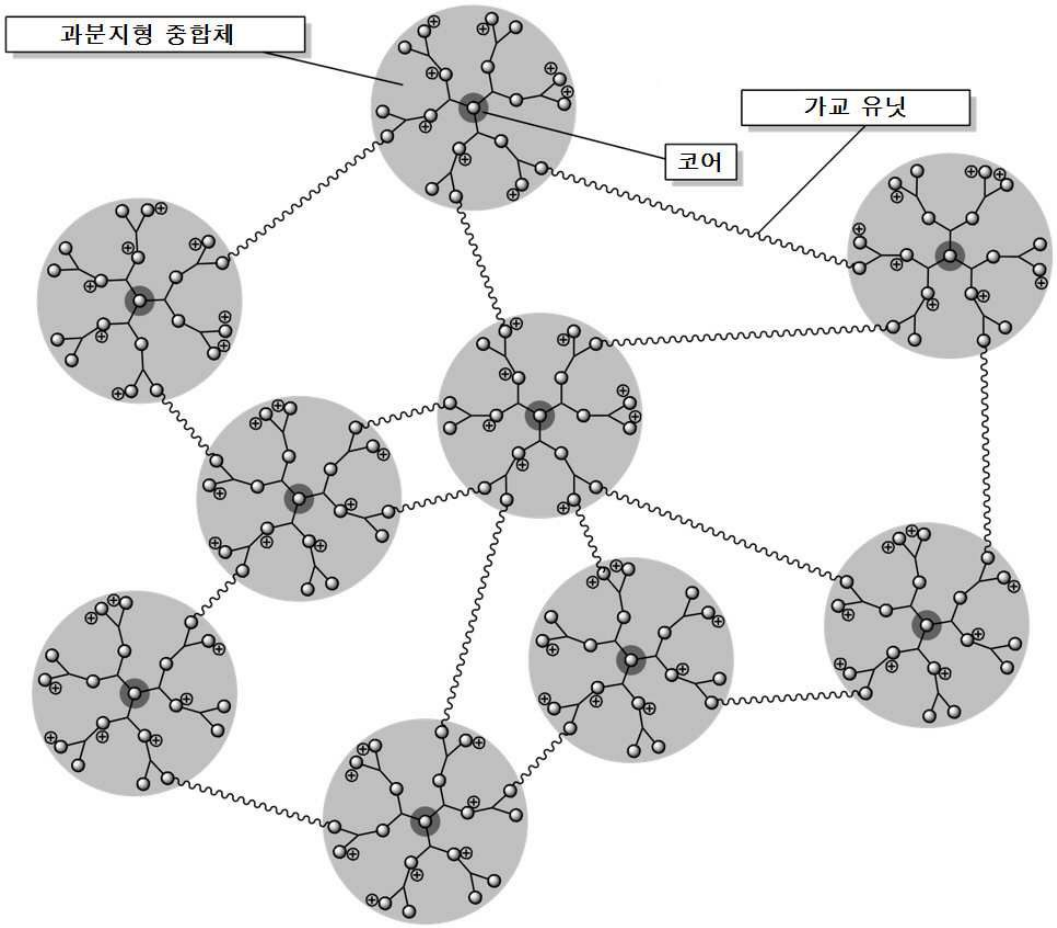
도면3



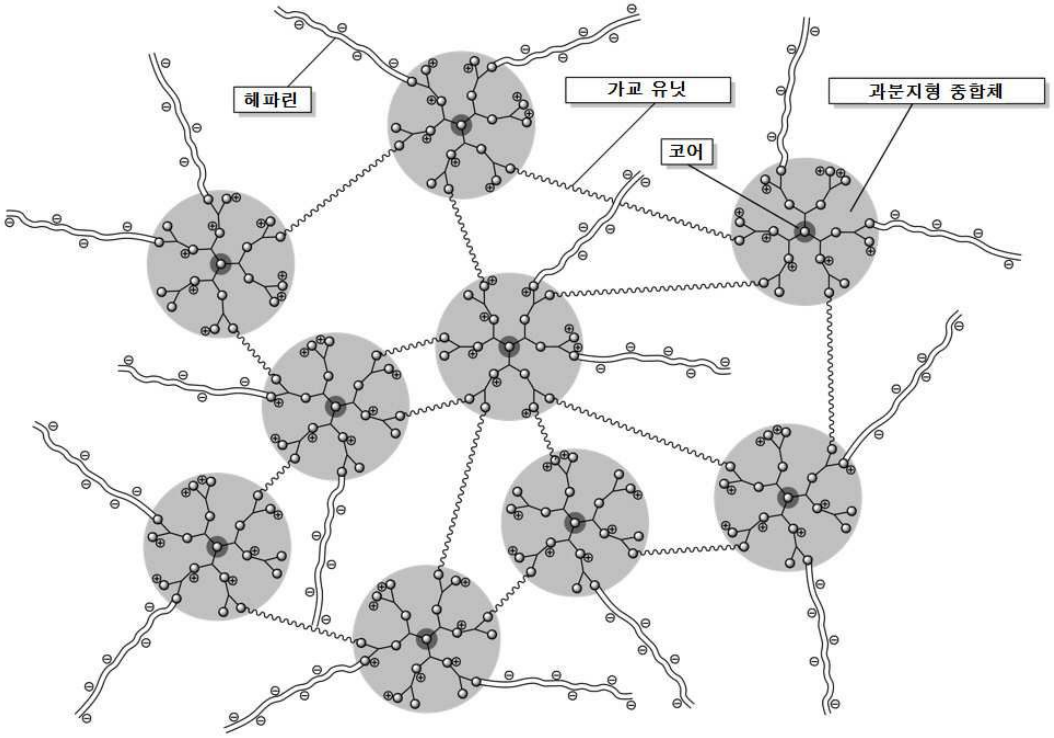
도면4


헤파린
작용기 1
작용기 2
과분지형 중합체
코어
작용기 1
+
작용기 2
링커
음전하
링커
링커
링커
링커
링커
헤파린
양전하
과분지형 중합체

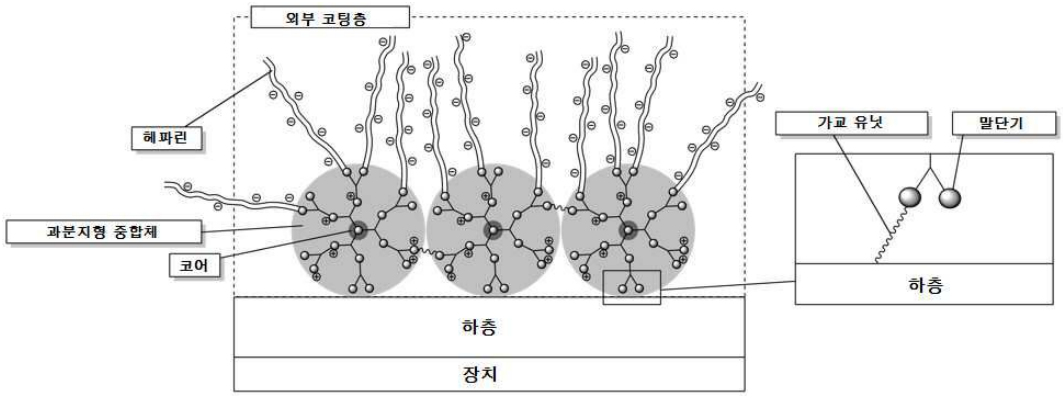
도면5



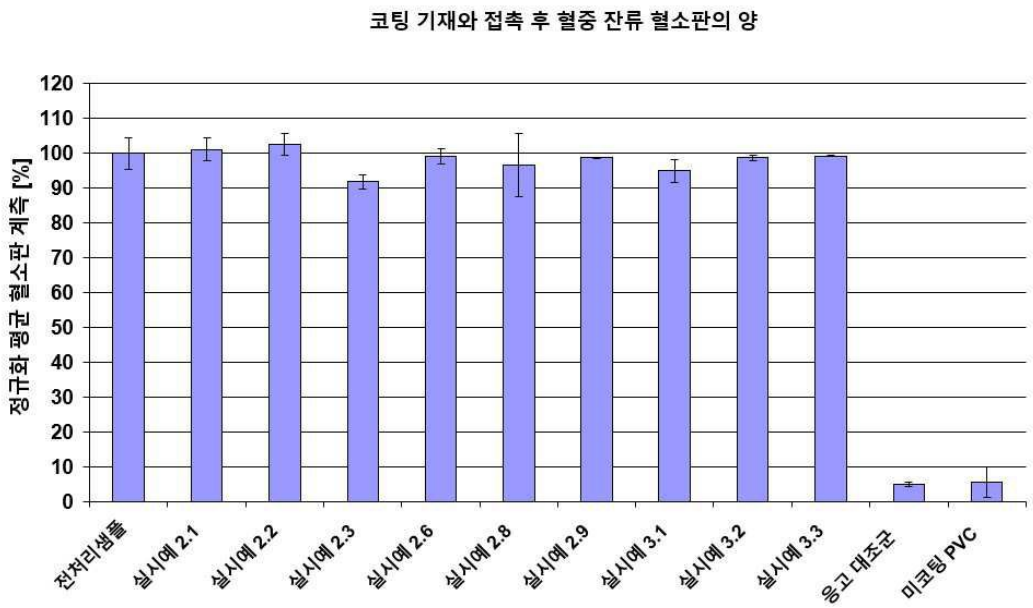
도면6



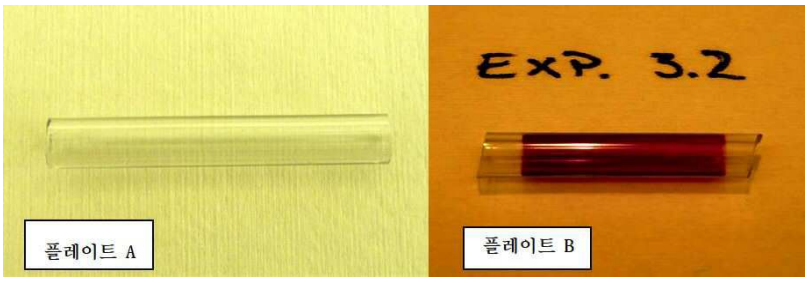
도면7


외부 코팅층
헤파린
과분지형 중합체
코어
가교 유닛
말단기
하층
하층
장치

도면8


코팅 기재와 접촉 후 혈중 잔류 혈소판의 양
정규화 평균 혈소판 계측 [%]
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
전처리샘플
실시예 2.1
실시예 2.2
실시예 2.3
실시예 2.6
실시예 2.8
실시예 2.9
실시예 3.1
실시예 3.2
실시예 3.3
음고 대조군
미코팅 PVC

도면9


EXP. 3.2
플레이트 A
플레이트 B

도면10

코팅 기재와 접촉 수 혈중 잔류 혈소판의 양
정규화 평균 혈소판 계츠치 [%]
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
전처리샘플
실시예 2.1
실시예 2.7
실시예 3.4
실시예 3.5
실시예 3.6
실시예 3.7
옹고 대조군
미코팅 PVC