

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/36613 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 11/08**,
G01N 33/545, A61L 33/00, 33/12, 29/08, 29/16, 31/08,
31/16, 27/28, 27/54

[DE/DE]; Kirchhoffweg 7, 99097 Erfurt (DE). **BUCHA,**
Elke [DE/DE]; Am Kirchberg 9, 99094 Erfurt (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11253

(74) **Anwalt: VOSSIUS & PARTNER**; Siebertstrasse 4,
81675 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. November 2000 (14.11.2000)

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** CA, JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 55 341.6 17. November 1999 (17.11.1999) DE

Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.
— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): HAEMOSYS GMBH** [DE/DE]; Winzerlaer Strasse
2a, 07745 Jena (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): NOWAK, Götz**

(54) **Title: BLOOD-COMPATIBLE POLYMER SURFACES**

(54) **Bezeichnung: BLUTKOMPATIBLE POLYMER OBERFLÄCHEN**

(57) **Abstract:** The invention relates to a blood-compatible surface comprising a polymer surface and a plurality of conjugates made of linkers and active agents immobilised thereon. The polymer surface contains similar or different structural units that carry carbonyl groups. The linkers contain a structural element that is able to form a hydrogen bridge bond. A polyorganosiloxane acting as the active agent is linked to the linkers.

(57) **Zusammenfassung:** Blutkompatible Oberfläche, umfassend eine Polymeroberfläche, sowie eine Vielzahl darauf immobilisierter Linker-Wirkstoff-Konjugate, wobei die Polymeroberfläche gleiche oder unterschiedliche Struktureinheiten enthält, die Carbonylgruppen tragen, die Linker ein Strukturelement enthalten, das zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung fähig ist und wobei als Wirkstoff ein Polyorganosiloxan mit den Linkern verknüpft ist.

WO 01/36613 A1

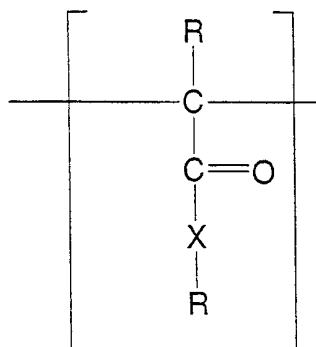
Blutkompatible Polymeroberflächen

Kunststoffe kommen in der Medizin auf vielfältige Art und Weise zum Einsatz. Die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Kunststoffoberflächen und lebenden Zellen sowie die Verbesserung der Biokompatibilität solcher Oberflächen ist daher seit mehr als 30 Jahren Gegenstand intensivster Forschungstätigkeit. Trotzdem ist es bis heute noch nicht gelungen, Polymeroberflächen so zu gestalten, daß Blut bzw. Blutbestandteile nicht daran binden. Dies betrifft vor allem hochaktive Blutzellen, wie z.B. Thrombozyten, die nach der Anlagerung an die Kunststoffoberfläche zu Aktivierungsvorgängen, insbesondere zur Blutgerinnung, führen können.

Durch die Veränderung der Oberflächenladungen, durch Bildung von Mikrodomänenstrukturen, aber auch durch Einführung neuer Polymermischungen und Copolymere sind in diesem Bereich einige Fortschritte erzielt worden. Allerdings konnte ein Durchbruch zur Bereitstellung der benötigten dauerhaft blut- bzw. proteininerten Oberflächen noch nicht erreicht werden.

Um dieses Ziel zu erreichen, bedient sich die vorliegende Erfindung eines in der WO 98/46648 offenbarten Interaktionssystems, das die Anbindung von z.B. bioaktiven Substanzen an geeigneten Kunststoffoberflächen mittels spezieller Linker erlaubt. Dabei konnten durch die Verwendung von Inhibitoren der Blutplättchen- bzw. Zellaktivierung, die unter Einsatz dieser Linker auf Polymermaterialien immobilisiert wurden, wichtige Voraussetzungen für die Bereitstellung solcher blut- bzw. proteinkompatiblen Grenzschichten geschaffen werden. Im Rahmen der Erfindung konnte gezeigt werden, daß insbesondere Polysiloxane als Aktivierungshemmer für diese Anwendung zur Verfügung stehen. Durch das Aufbringen dieser Materialien auf Kunststoffoberflächen werden Blutbestandteile, insbesondere Proteine daran gehindert, ihrerseits Ablagerungen zu bilden. Von Silikonpolymeren ist bekannt, daß sie durch Aufbringen auf Glasoberflächen diesen eine erhöhte Blutkompatibilität verleihen. Versuche, die dabei eingesetzten Silikonöle in wirksamer Form auf Kunststoffoberflächen zu fixieren, schlugen jedoch bislang fehl.

Funktionelle Polymeroberflächen, die die Ausbildung der erfindungsgemäßen Grenzschichten erlauben, sind ebenfalls in WO 98/46648 beschrieben. Zum Einsatz kommen Homo- oder Copolymere, zu deren Herstellung mindestens ein Monomertyp eingesetzt wird, der neben einer polymerisierbaren Doppelbindung oder einer polykondensierbaren funktionellen Gruppe eine weitere Carbonylgruppe in Form eines Ketons oder eines Carbonsäurederivats enthält, die nicht an der Polymerisationsreaktion teilnimmt. Bevorzugt enthält das Polymer ein Strukturelement der Formel (A):



wobei die Reste R gleich oder verschieden sein können und einen Alkyl oder Arylrest oder ein Wasserstoffatom darstellen. Der Alkylrest kann linear oder verzweigt sein und besteht bevorzugt aus 1 bis 20 Kohlenstoffatomen. Der Arylrest besteht bevorzugt aus 6 bis 18, besonders bevorzugt aus 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Der Rest X ist fakultativ und bedeutet O, N oder CH₂. Für den Fall X = N trägt X zusätzlich zu dem in Formel (A) vermerkten einen weiteren Rest R, der unabhängig von den anderen Resten R wie vorstehend definiert ist.

Besonders bevorzugt als Alkylrest ist ein geradkettiger oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter C₁₋₈-Alkylrest, beispielsweise ein Methyl-, Ethyl- oder Propylrest. Beispiele für gegebenenfalls vorhandene Substituenten umfassen ein oder mehrere Halogenatome, z.B. Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatome oder Hydroxylgruppen, C₁₋₆-Alkylreste oder C₁₋₆-Alkoxyreste oder C₁₋₆-Alkylthiolreste. Der Arylrest ist besonders bevorzugt ein monocyclischer oder bicyclischer, gegebenenfalls substituierter Arylrest, der gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome enthalten kann. Beispiele für solche Arylreste sind Phenyl, 1- oder 2-Naphthyl, Indenyl- oder Isoindenylreste. Beispiele für heteroatomhaltige Arylreste sind C₃₋₉-Heteroarylreste, die Heteroatome, ausgewählt aus Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatomen, enthalten. Monocyclische Heteroarylreste umfassen beispielsweise Pyrolyl-, Furyl-, Thienyl-, Imidazolyl-, N-Methylimidazolyl-, N-Ethylimidazolyl-, Benzothiazolyl-, Chinazolinyl-, Naphthylpyridinyl-, Chinolyinyl-, Isochinolinyl- und Tetrazolylreste.

Ein bevorzugtes Polymer, das im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden kann, ist ein Polyalkylmethacrylat (PAMA) mit einem Alkylrest, der vorzugsweise 1-6 C-Atome umfaßt, wie z.B. Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyethylmethacrylat (PEMA) oder Polypropylmethacrylat. Weiterhin können Polyvinylacetat, Polycyclohexylmethacrylate oder Polyphenylmethacrylat eingesetzt werden. Besonders bevorzugt wird jedoch Polymethylmethacrylat mit der erfindungsgemäßen blutinierten Grenzschicht versehen.

Auch Copolymere oder Polymermischungen aus beliebigen Anteilen der vorstehend genannten Polymere untereinander oder mit einer oder mehreren zusätzlichen Polymerkomponente(n), beispielsweise Polystyrol, Polyacrylnitril oder Polyamiden können eingesetzt werden. Bevorzugt beträgt der Anteil der Monomere oder Struktureinheiten, die eine Carbonylgruppe, bevorzugt ein Strukturelement (A) aufweisen an solchen Mischungen oder in solchen Copolymeren mindestens 20 %, besonders bevorzugt mindestens 40 % und ganz besonders bevorzugt mindestens 60 %.

Die Form der eingesetzten Oberfläche ist, wie in der WO 98/46648 beschrieben, in keiner Weise begrenzt, es können, z.B. flächige Strukturen, Hohlkörper sowie Mikropartikel und Kapillarstrukturen zum Einsatz kommen. Bevorzugt werden mikroporöse Kunststoffoberflächen verwendet, die die Bindung der Linker-Wirkstoff-Konjugate erleichtern. Selbstverständlich sollte beim medizinischen Einsatz auf die physiologische Verträglichkeit des eingesetzten Kunststoffs geachtet werden.

Eine Vielzahl von in der Medizin eingesetzten Gegenständen und Instrumenten wird aus den genannten Polymeren erzeugt und kann somit nach Aufbringen der hier offenbarten Grenzschicht in blutkompatibler Form bereitgestellt werden. Die Palette der in Frage kommenden Produkte umfasst dabei Kunststoffpartikel, Blutschlauchsysteme, Kathetermaterialien, Dialysatoren bzw. Dialysatormembranen aber auch Stent- und Implantationsmaterialien, die in der Ersatzchirurgie von Bedeutung sind. Neben Geräten, die innerhalb oder

außerhalb des Körpers der Blutzirkulation ausgesetzt sind, können aber auch vorteilhaft Oberflächen beschichtet werden, die mit Blutproben in Kontakt kommen, oder die bei der Weiterbehandlung solcher Proben eingesetzt werden (z.B. Probengefäße, Rührgeräte). Produkte und Materialien können direkt vor ihrem Gebrauch oder bereits unmittelbar nach ihrer Herstellung mit einer blutinierten Grenzschicht überzogen werden.

Linker, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Immobilisation der Aktivierungs- bzw. Aggregationshemmer eingesetzt werden können, sind Moleküle, die mindestens zwei funktionelle Gruppen L1 und L2 aufweisen, die gleich oder unterschiedlich sein können. Eine dieser funktionellen Gruppen (L1) muss zur Bildung von Wasserstoffbrücken fähig sein und so die Bindung des Linkers an die Polymeroberfläche ermöglichen, was nicht ausschließt, daß sich auch andere Untereinheiten des Linkers, die eine geeignete elektronische oder räumliche Struktur aufweisen, an der Ausbildung dieser Bindung beteiligen. Die funktionelle Gruppe L2 wird so gewählt, dass eine Bindung zwischen dem Linker und der wirksamen Substanz hergestellt werden kann. Um unterschiedliche Wirksubstanzen gleichzeitig auf der Polymeroberfläche immobilisieren zu können, ist die gleichzeitige Verwendung mehrerer Linker mit unterschiedlichen Gruppen L2 möglich. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, Linker eines Typs einzusetzen, die zwei oder mehr Gruppen L2 aufweisen, welche gleich oder unterschiedlich sind. Gleichermaßen können auch Linker eingesetzt werden, die mehrere gleiche oder unterschiedliche Gruppen L1 aufweisen. Bevorzugt sind L1 und L2 durch eine verzweigte oder geradkettige Alkylkette verbunden, die durch Heteroatome, bevorzugt Sauerstoffatome, unterbrochen ist.

Strukturelement L1 ist bevorzugt ein polares Wasserstoffatom, wie es beispielsweise in OH-, SH-, NH- oder PH-Bindungen vorliegt. Bevorzugt tragen die eingesetzten Linker als Strukturelement L1 eine Hydroxylgruppe. Das Strukturelement befindet sich bevorzugt an einer ausreichend wasserlöslichen Verbindung als Linker. Besonders bevorzugt ist L1 endständig am Linker angebracht.

Die funktionelle Gruppe, mittels derer eine Wirksubstanz, bevorzugt kovalent, an den Linker gebunden werden kann (L2) ist beispielsweise eine Hydroxyl- oder Carboxylgruppe, ein Succinimidylsuccinat, Succinimidylpropionat, Nitrophenylcarbonat, Trisylat, Epoxid, Aldehyd, Isocyanat oder ein Maleinimid. Weitere funktionelle Gruppen L2, mittels derer Linker zur Anbindung einer bioaktiven Substanz modifiziert bzw. aktiviert werden können, sind z.B. im Katalog der Firma Shearwater Polymers, Inc., 2307 Spring Branch Rd., Huntsville, AL 35801 (USA) beschrieben.

Anders als z.B. Enzyme als bioaktive Substanzen sind die zum Erreichen der Blutkompatibilität in der vorliegenden Erfindung eingesetzten Polyorganosiloxane vergleichsweise stabil. Sie können mit Linkern, die endständig mit einfachen funktionellen Gruppen versehen sind, wie z.B. Polyalkylenglykolen, ohne deren vorherige Aktivierung kovalent verknüpft werden. Bevorzugt besteht nach Verknüpfung des Linkers mit der bioaktiven Substanz zwischen beiden Komponenten eine Ether- oder eine Esterbindung.

Bevorzugt werden als Linker Polyalkylenglykole, Polyalkylenimine, Polyalkylenamine oder Polyalkylensulfide, sowie Polyoxazilline eingesetzt, wobei Polyalkylenglykole besonders bevorzugt sind. Der mittlere Polymerisationsgrad solcher Verbindungen liegt bevorzugt unterhalb von 50, besonders bevorzugt unterhalb von 30. Die Untergrenze liegt im allgemeinen bei einem Wert von 10, bevorzugt bei 20, wobei die bevorzugten Polymerisationsgrade innerhalb der vorgenannten Bereiche mit der Wahl der Linkergrundbausteine variieren können. Insbesondere bevorzugt werden Polyethylenglykole (PEG) eingesetzt, bei denen sowohl L1 als auch L2 Hydroxylgruppen sind. Die genannten Linker besitzen vorzugsweise ein Molekulargewicht von 1-50 kDa.

Als wirksame Verbindungen, welche die gewünschte Blutkompatibilität der Kunststoffoberfläche gewährleisten, werden im Rahmen der Erfindung Polyorganosiloxane eingesetzt, die linear oder verzweigt sein können. Als vorteilhaft hat sich die Verwendung von Poly(dialkylsiloxan) der Formel $R_3SiO[R_2SiO]_nSiR_3$ erwiesen, wobei die Reste R gleich oder unterschiedlich sein

können, und Wasserstoffatome oder Alkylreste mit 1 bis 8, bevorzugt 1 bis 4, besonders bevorzugt 1 bis 2 C-Atomen darstellen. n stellt eine natürliche Zahl dar, die so gewählt sein sollte, daß sich ein Viskositätsgrad des Siloxans ergibt, der zwischen 10 und 25000, bevorzugt zwischen 500 und 5000 mm²/s liegt. Aufgrund seiner bekannt guten physiologischen Verträglichkeit kommt insbesondere bevorzugt Dimethylpolysiloxan (Dimeticon) zum Einsatz. In diesem Fall ist R in der vorgenannten Formel CH₃, n liegt hier bevorzugt zwischen 1 und 50, besonders bevorzugt zwischen 1 und 20.

Die genannten Inhibitoren der Blutplättchen- bzw. Zellaktivierung werden mit den oben angeführten Linkern verbunden und anschließend als Linker-Wirkstoff-Konjugate mit der Kunststoffoberfläche in Kontakt gebracht. Auch hier bringt der Einsatz von Dimethylpolysiloxan Vorteile mit sich, da Polyethylenglykolverbindungen dieser Verbindung bereits kommerziell erhältlich sind, z.B. bei der Fa. Hüls unter den Produktnamen MN 4221, MN 4217, MN 4205 und MN 4211.

Nach der Verknüpfung des Aktivierungshemmers mit dem Linker wird das entstandene Konjugat mit der Polymeroberfläche verbunden. Die Bindung tritt bei bloßem Kontakt der Linker-Wirkstoff-Konjugate mit geeigneten Polymeroberflächen auf, ohne dass erhöhte Temperaturen oder der Einsatz von Katalysatoren oder anderer reaktionsbeschleunigender Reagentien nötig wäre. Sie kann z.B. durch Inkubation des Polymermaterials in einer bevorzugt wäßrigen Lösung der Konjugate erreicht werden. Die optimale Konzentration der Konjugate in der Lösung hängt z.B. von der Löslichkeit der verwendeten Komponenten und der zu erzielenden Oberflächenbelegung ab. Sie liegt jedoch häufig zwischen 0,1 µg/ml und 100mg/ml, bevorzugt zwischen 1 und 10 mg/ml. Nach einer Einwirkungszeit von wenigen Minuten und gegebenenfalls einer Spülung mit einer physiologischen Kochsalz- oder Pufferlösung ist die Silikonisierung der Oberfläche abgeschlossen.

Die entstehende Bindung der erzeugten Grenzfläche ist von ausgezeichneter Stabilität und kann in wässrigen Lösungen durch Verschiebungen des pH-Werts in einem Bereich von 2 - 13 nicht gelöst werden. Auch gegen das Spülen mit Salzlösungen hoher Ionenstärke (2n Glycin, 2n Harnstoff) ist die Bindung resistent. Sie kann damit unter physiologischen Bedingungen als irreversibel angesehen werden.

Die Bindungsdichte auf der beschichteten Oberfläche ist bereits nach ihrem Inkontaktbringen mit den Linker-Wirkstoff-Konjugaten unter Normalbedingungen, z.B. bei Raumtemperatur, bemerkenswert hoch. Eine derart vorbehandelter Kunststoff ist dazu in der Lage, die Aktivierung von zellulären Blutbestandteilen, speziell von Thrombozyten, aber auch die Bindung von Fibrinogen und anderen Proteinen an seine Oberfläche vollständig zu unterbinden. Weitere Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß durch exogene Zufuhr von Energie, z.B. thermisch, wie durch Behandlung im Autoklaven (erhöhte Temperatur, Heißdampf), durch eine Erhöhung des Druckes oder durch Einwirkung von γ -Strahlen in einem Strahlensterilisationsgerät überraschenderweise die Belegungsdichte und die Festigkeit der Bindung noch einmal signifikant über das bei Normalbedingungen erhaltene Maß hinaus erhöht werden kann.

Weiter zeigte es sich, daß die erfindungsgemäßen Oberflächen auch bei nur teilweiser Belegung mit den Ligand-Wirkstoff-Konjugaten bereits die erforderliche blutneutrale Oberfläche aufweisen, ohne daß die Anbindung anderer mit Liganden versehener Wirksubstanzen nach dem aufgezeigten Prinzip verhindert wird. So ist bei einer Belegungsdichte von höchstens 50% der unter Normalbedingungen zu erzielenden Maximalbelegung eine hervorragende Blutkompatibilität der behandelten Oberfläche gewährleistet. Optimale Ergebnisse können sich, je nach Struktur des eingesetzten Siloxans, jedoch bereits bei deutlich niedrigeren Belegungsdichten von etwa 10% bis 20% zeigen. Durch Verwendung von Konjugatlösungen mit sehr geringen Konzentrationen kann z.B. die Belegungsdichte mittels Konzentrationslimitierung der Beschichtungsreaktion eingeschränkt werden. Dadurch steht eine für die in vivo-Anwendung im Vollblut

wichtige biskompatible Oberfläche zur Verfügung, die dennoch zur in der WO 98/46648 offenbarten Präsentation und/oder Entfernung weiterer Linker-Wirkstoff-Konjugate zur Verfügung steht. So können z.B. pegylierte Wirkstoffe aus dem Blut entnommen werden, ohne daß es zu dessen Gerinnung an der exponierten Oberfläche kommt. Als zusätzliche bioaktive Wirk- oder Erkennungsstrukturen kommen z.B. Proteine, Nukleinsäuren, Oligo- oder Polynukleotide, Hormone, Enzyme, Antigene, Antikörper, Kohlenhydrate oder weitere zelluläre Signalstoffe und Immunbotenstoffe in Frage.

Die erfindungsgemäßen Grenzflächen können aber auch in der Implantationsmedizin zu erheblichen Verbesserungen bei der Verträglichkeit der eingesetzten Materialien beitragen, da damit auch an den Gewebs- und Blutgrenzflächen schädliche Interaktionen, z.B. unspezifische Entzündungen, unterbunden werden können. Die gleichzeitige Möglichkeit, hier trotzdem gezielt mit Linkern verknüpfte Wirkstoffe dem Biomikroenvironment zu präsentieren, ergibt vollkommen neue Ansatzpunkte für eine langfristige Anwendung solcher Materialien.

Die den erfindungsgemäßen Oberflächen eigene Blut- bzw. Proteinresistenz über lange Anwendungszeiträume ist jedoch nicht nur für medizinische Werkstoffe, sondern auch für medizinische Geräte und Werkzeuge von Bedeutung. So erlaubt es die Erfindung, die Proteinisierung solcher Geräte, z.B. von Langzeitkathetern, zu verhindern, die einen idealen Nährboden für Bakterien liefert und so sekundären Infektionen Vorschub leistet. Damit bietet die hier erfindungsgemäße Grenzschicht die Möglichkeit, geeignete Kunststoffmaterialien in antibakteriell bzw. antimikrobiell modifizierter Form einzusetzen.

Neben ihrer vollständigen Kompatibilität mit proteinhaltigen Proben, insbesondere Blutproben oder zirkulierendem Vollblut sind die modifizierten Kunststoffoberflächen der vorliegenden Erfindung für die Präsentation von immobilisierten Wirkstoffen, aber auch für die Anbindung und/oder Entfernung von linker-gekoppelten Wirksubstanzen oder Erkennungsstrukturen geeignet. Wirkstoffe können so unmittelbar in die Blutbahn eingebracht oder

daraus, nach Kopplung mit einem entsprechenden Linker, entfernt werden. Die erfindungsgemäßen Oberflächen eröffnen damit sowohl in der Therapeutik wie auch in der Diagnostik, aber auch in verwandten Gebieten, wie der Diätetik, vielfältige neue Indikationen und Anwendungsbereiche.

Die folgenden Beispiele illustrieren die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Oberflächenbeschichtungen.

Zur Anwendung kommen dabei Polymethylmethacrylatpartikel, monodispers, in der Größe von 5,9 bis 6,1 μm (Microparticles GmbH) Berlin) sowie kommerzielle Dialysatoren der Serie BK 05 der Fa. Toray Industries, Tokio, (OF 0,5 m^2) bzw. hieraus gefertigte experimentelle Mikrodialysatoren mit einer Oberfläche von 100 cm^2 .

Versuchsbeispiel 1:

50 μl einer 5%igen Polymethylmethacrylatpartikellösung (Partikeldurchmesser 5,9-6,1 μm) werden mit PEG-Dimethylpolysiloxan (MN 4205) in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ für 10 min in einem Rollschüttler vermischt. Anschließend werden durch Kurzzentrifugation bei 1000 g für 3 min die Partikel sedimentiert und die überstehende Lösung entfernt. Danach werden die Partikel mit jeweils 1 ml Tyrodelösung aufgenommen, für kurze Zeit geschüttelt und nach Sedimentierung noch einmal mit Tyrode gewaschen und für die weitere Verwendung in Tyrodelösung aufbewahrt. R-Hirudin in einer Konzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$ wird mit 10 ml Vollblut in einem Reagenzglas vermischt. Das frisch abgenommene Humanblut wird mit den sedimentierten Partikeln, welche vorher mit PEG-Dimethylpolysiloxan versetzt wurden, vermischt. Nach 15, 20, 30 und 40 min werden die in einem Rollmischer gut bewegten Proben zur Plättchenmessung in einen CellDyn 2000-Analysator appliziert und die Plättchenzahl ermittelt. Zum Vergleich werden Partikel benutzt, die nicht mit PEG-Dimethylpolysiloxan beschichtet wurden. Es konnte gezeigt werden, daß in der Suspension mit nicht beschichteten Partikeln eine große Anzahl der zirkulierenden Blutplättchen gebunden wird. Es kommt innerhalb der

ersten 10 min in der Probe zu einem steilen Abfall der Plättchenzahl, die nur geringfügig durch gegenläufige Desaggregationsvorgänge nach diesem Zellzahltest wieder steigt. Trotzdem bleibt die größte Anzahl der Plättchen in der Blutprobe an der Polymeroberfläche haften (>90%). Im Gegensatz dazu sind in der Suspension mit den Partikeln, die mit Dimethylpolysiloxan beschichtet wurden, diese Plättchenzahlveränderungen nicht nachweisbar. Während der gesamten Versuchsdauer sind die Plättchenzahlen in Höhe der Ausgangswerte nachzuweisen.

Versuchsbeispiel 2:

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit Versuchsbedingungen durchgeführt, die mit denen des Beispiel 1 identisch sind, mit der Ausnahme, daß das Blut mit PEG-Hirudin antikoaguliert wurde. In Abb. 1 sind die entsprechenden Ergebnisse dargestellt. Die Blutplättchen werden in der Partikelsuspension ohne PEG-Dimethylpolysiloxan-Beschichtung innerhalb von 10-15 min nach Zugabe zum PEG-Hirudin-antikoagulierten Blut nahezu vollständig an den Partikeln adhärirt. Innerhalb von 30 min kommt es zum Gerinnen der Probe, da das PEG-Hirudin komplett an den Partikeln gebunden wurde. Bei Vorbehandlung der Partikel mit PEG-Dimethylpolysiloxan ist der Plättchenabfall total aufzuhalten, aber auch in diesem Versuch ist die gut gemischte Probe nach etwa 40 min geronnen. Bei Messung der Hirudinkonzentration in den Proben ist erkennbar, daß im Gegensatz zu den r-Hirudin-behandelten Proben, in denen während des gesamten Versuchszeitraumes über 60 min eine konstante Hirudinblutkonzentration von 25-30 µg/ml r-Hirudin nachweisbar ist, in den PEG-Hirudin-Proben eine kontinuierliche Abnahme der PEG-Hirudin-Konzentration nachweisbar ist. Nach 30 min ist der PEG-Hirudingehalt auf 3 µg/ml abgefallen, nach 40 min ist in den Proben kein PEG-Hirudin mehr enthalten. Aus den hier vorgestellten Untersuchungen ist klar ersichtlich, daß durch die Vorbehandlung der Mikropartikel mit PEG-Dimethylpolysiloxan in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 1 µg/ml die Adsorption von Plättchen verhindert wird. Trotzdem ist die Bindung von pegyliertem Hirudin an der Partikeloberfläche nicht

gestört. Beim Vergleich mit in vitro-Untersuchungen, bei denen PEG-Hirudin zu den Mikropartikellösungen hinzugegeben wird, ist eine Verminderung der PEG-Hirudinbindungskapazität durch die PEG-Dimethylpolysiloxan-Vorbehandlung nicht nachweisbar. Weiterhin wurde untersucht, ob die Thrombinbindung an den Partikeln, die nach der PEG-Dimethylpolysiloxan-Vorbehandlung zusätzlich PEG-Hirudin gebunden haben, noch erhalten geblieben ist. Ein Versuchsbeispiel hierzu ist in Abb. 2 dargestellt. Es kann zweifelsfrei gezeigt werden, daß die Thrombinaffinität nahezu vollständig erhalten blieb.

Versuchsbeispiel 3:

Experimentelle PMMA-Dialysatoren mit einer Oberfläche von 100 cm² werden mit Dimethylpolysiloxanlösungen in einer Konzentration von 1 µg/ml mit Hilfe einer in vitro-Zirkulationseinrichtung für 10 min gespült und danach mit Tyrodelösung gewaschen. Anschließend werden die mikropapillären Dialysatoren mit PEG-Hirudin-antikoaguliertem Vollblut (50 µg/ml) in einem Rezirkulationsmodell behandelt. Es kann auch in diesem Versuchsansatz zweifelsfrei gezeigt werden, daß trotz Anbindung von PEG-Hirudin an die kapillären Oberflächen eine Verminderung der Plättchenzahlen nicht zustandekommt. Obwohl das PEG-Hirudin zum größten Teil auf der PMMA-Oberfläche der Dialysatoren gebunden ist, sind die Systeme über mehr als 30 min ohne wesentlichen Druckanstieg rezirkulierbar.

Patentansprüche:

1. Blutkompatible Oberfläche, umfassend eine Polymeroberfläche, sowie eine Vielzahl darauf immobilisierter Linker-Wirkstoff-Konjugate, wobei die Polymeroberfläche gleiche oder unterschiedliche Struktureinheiten enthält, die Carbonylgruppen tragen, die Linker ein Strukturelement enthalten, das zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung fähig ist und wobei als Wirkstoff ein Polyorganosiloxan mit den Linkern verknüpft ist.
2. Oberfläche gemäß Anspruch 1, wobei die Polymeroberfläche eine Vielzahl von Struktureinheiten aufweist, die gleich oder unterschiedlich sind, ausgewählt aus Polyalkylmethacrylat-, Polyvinylacetat-, Polycyclohexylmethacrylat- und/oder Polyphenylmethacrylateinheiten.
3. Oberfläche gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Linker gleich oder unterschiedlich sind und ausgewählt sind aus Polyalkylenglykol, Polyalkylenimin, Polyalkylenamin, Polyalkylensulfid und Polyoxazillin.
4. Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei als Wirkstoff Dimethylpolysiloxan eingesetzt wird.
5. Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend zusätzliche freie Koordinationsstellen zur Immobilisation weiterer Linker-Wirkstoff-Konjugate.
6. Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend zusätzliche Linker-Wirkstoff-Konjugate deren Wirkstoffe der Oberfläche neben ihrer Blutkompatibilität weitere Bioaktivität verleihen.
7. Kunststoffgegenstand, umfassend eine blutkompatible Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.

8. Medizinisches Gerät oder Werkzeug, umfassend eine blutkompatible Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
9. Gerät oder Werkzeug nach Anspruch 8 in Form eines Probengefäßes, eines Blutschlauchs, eines Katheders, eines Dialysators oder Bestandteilen davon.
10. Stent- oder Implantationsmaterial, umfassend eine blutkompatible Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
11. Verfahren zur Herstellung einer blutkompatiblen Oberfläche nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend das Inkontaktbringen der Polymeroberfläche mit den Linker-Wirkstoff-Konjugaten.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei die Polymeroberfläche in einer Lösung der Linker-Wirkstoff-Konjugate inkubiert wird.
13. Verfahren gemäß Anspruch 11 oder 12, wobei die Konzentration der Linker-Wirkstoff-Konjugate so begrenzt wird, daß die entstehende blutkompatible Oberfläche freie Koordinationsstellen aufweist.
14. Verfahren gemäß Anspruch 11 oder 12, zusätzlich umfassend die Zufuhr exogener Energie während oder nach der Belegung der Oberfläche, um so die Belegungsdichte zu erhöhen.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei die Energiezufuhr durch hohe Drücke thermisch oder mittels γ -Strahlung erfolgt.
16. Diagnoseverfahren, umfassend das Inkontaktbringen einer Blutprobe mit einer Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.

17. Verwendung eines Materials mit einer blutkompatiblen Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 bei der Lagerung, beim Transport, oder der Untersuchung von Humanblut außerhalb des menschlichen Körpers.
18. Verwendung nach Anspruch 17, zusätzlich umfassend die Zugabe oder Entfernung von Blutbestandteilen oder Wirkstoffen.

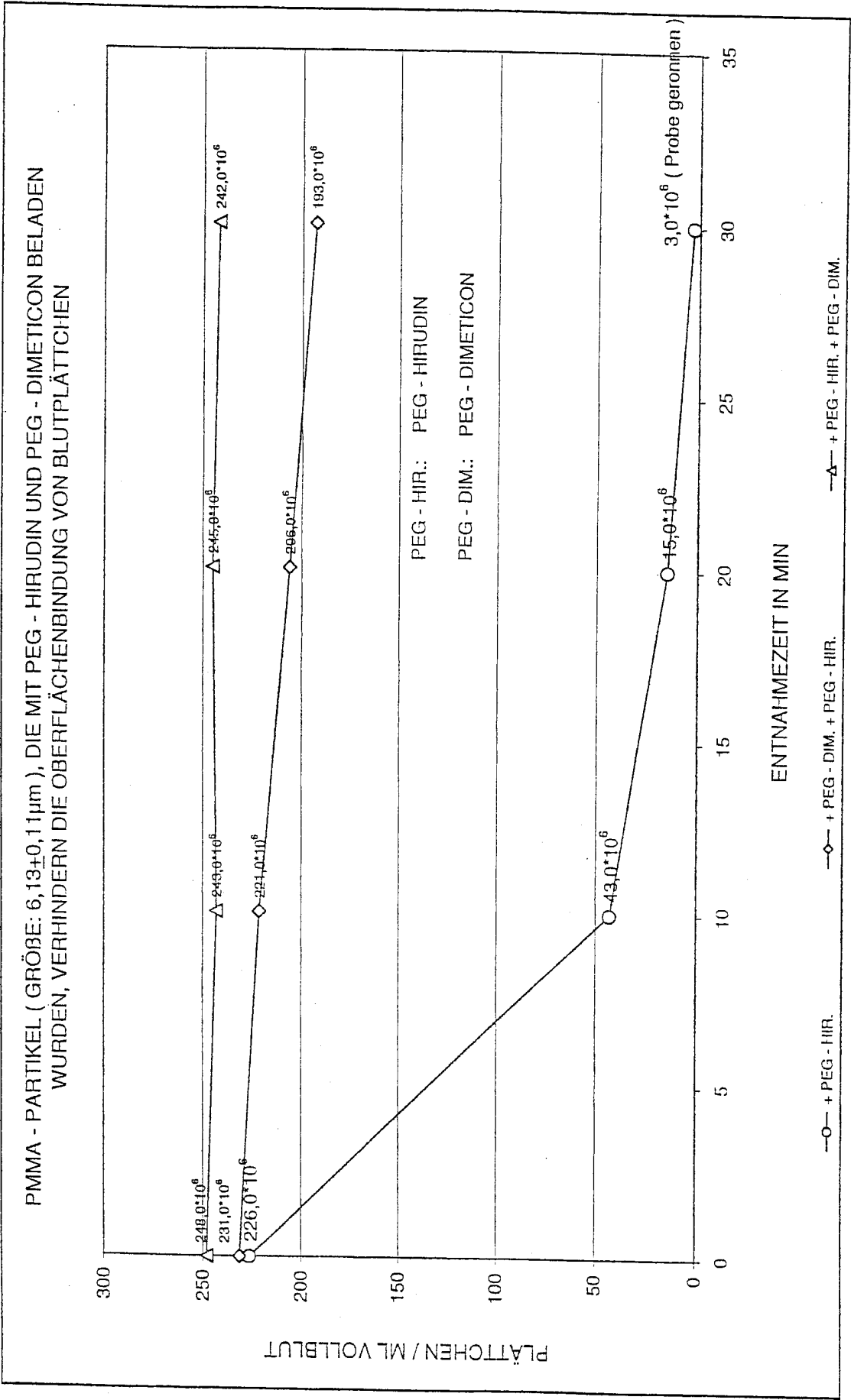


Abb. 1

DIE THROMBINBINDUNG AN PEG - HIRUDIN - BESCHICHTETE PMMA - PARTIKEL (GRÖÖE: $6,13 \pm 0,11 \mu\text{m}$), DIE ZUSÄTZLICH MIT PEG - DIMETICON BELADEN WURDEN, WIRD NUR GERING BEEINFLUSST .

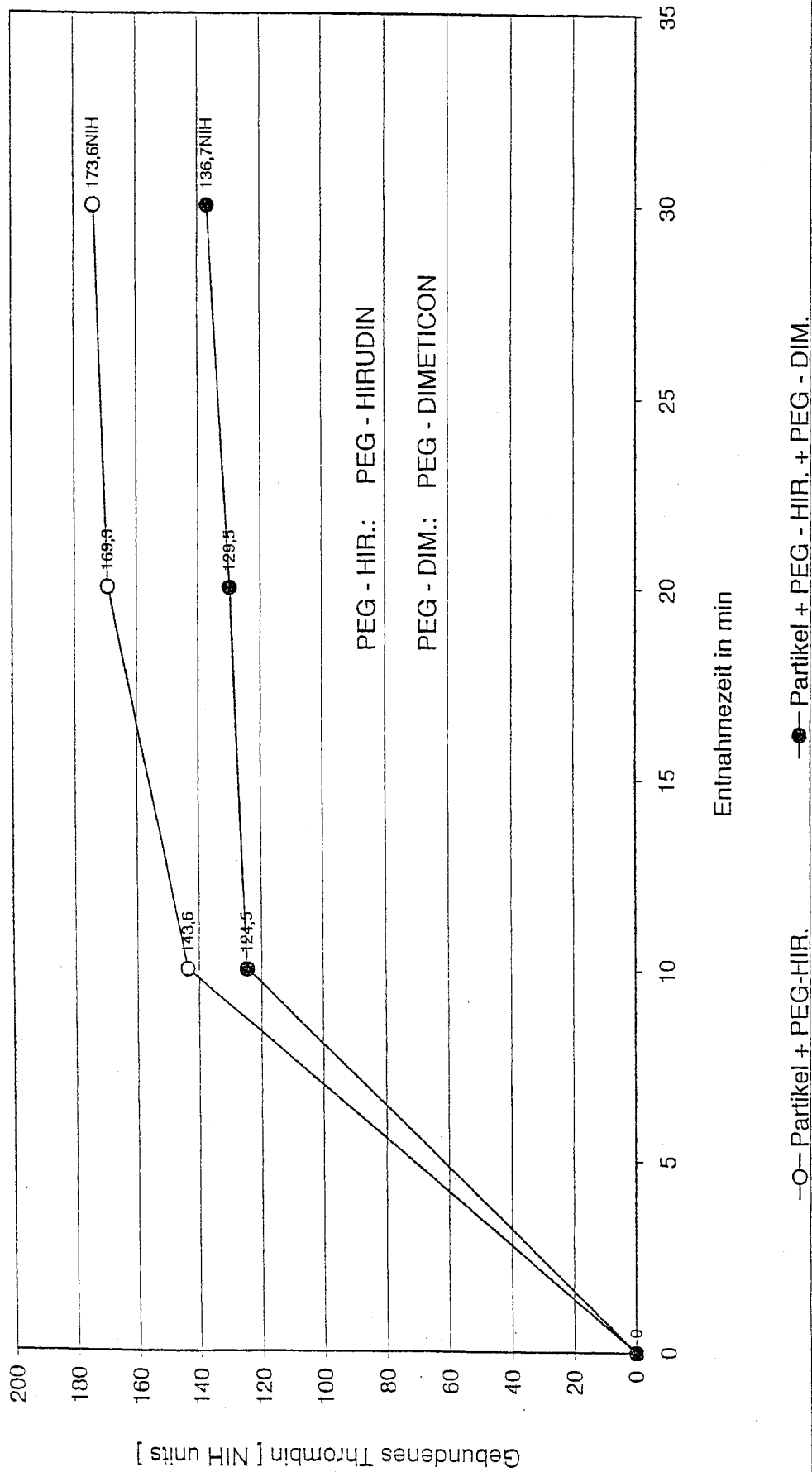


Abb. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N11/08 G01N33/545 A61L33/00 A61L33/12 A61L29/08
A61L29/16 A61L31/08 A61L31/16 A61L27/28 A61L27/54

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)

IPC 7 A61K C12N G01N A61L C07K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 07295 A (BAXTER INT) 16 March 1995 (1995-03-16) page 14, line 16 -page 15, last line example 9 claims	1-13,17, 18
X	US 5 342 693 A (WINTERS SUZANNE ET AL) 30 August 1994 (1994-08-30) examples 74-80 claims	1,3, 5-13,17, 18
A	US 5 053 453 A (KU CECILIA S L) 1 October 1991 (1991-10-01) column 3, line 29 -column 4, line 2 tables 1,2 claims	1-18
	--- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *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)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *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
- *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
- *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.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 2001

Date of mailing of the international search report

02/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thornton, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11253

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 46648 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;NOWAK GOETZ (DE); BUCHA ELKE (DE)) 22 October 1998 (1998-10-22) cited in the application claims -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/11253

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9507295 A	16-03-1995	AU 7721594 A US 6028170 A US 5837808 A	27-03-1995 22-02-2000 17-11-1998
US 5342693 A	30-08-1994	US 4850958 A US 5262451 A AT 110968 T AU 631366 B AU 3771289 A CA 1318560 A DE 68918104 D DE 68918104 T EP 0430953 A JP 7155370 A JP 3500134 T JP 5043389 B WO 8911884 A US 5338770 A US 5182317 A AU 627464 B AU 3685889 A EP 0426686 A JP 3504339 T JP 5023789 B WO 9000343 A	25-07-1989 16-11-1993 15-09-1994 26-11-1992 05-01-1990 01-06-1993 13-10-1994 11-05-1995 12-06-1991 20-06-1995 17-01-1991 01-07-1993 14-12-1989 16-08-1994 26-01-1993 27-08-1992 05-02-1990 15-05-1991 26-09-1991 05-04-1993 25-01-1990
US 5053453 A	01-10-1991	CA 2000887 A EP 0367489 A JP 10151193 A JP 2264664 A JP 2847250 B	01-05-1990 09-05-1990 09-06-1998 29-10-1990 13-01-1999
WO 9846648 A	22-10-1998	DE 19715504 A AU 7525498 A EP 0975680 A	15-10-1998 11-11-1998 02-02-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 00/11253

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N11/08 G01N33/545 A61L33/00 A61L33/12 A61L29/08
A61L29/16 A61L31/08 A61L31/16 A61L27/28 A61L27/54

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C12N G01N A61L C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 07295 A (BAXTER INT) 16. März 1995 (1995-03-16) Seite 14, Zeile 16 -Seite 15, letzte Zeile Beispiel 9 Ansprüche	1-13,17, 18
X	US 5 342 693 A (WINTERS SUZANNE ET AL) 30. August 1994 (1994-08-30) Beispiele 74-80 Ansprüche	1,3, 5-13,17, 18
A	US 5 053 453 A (KU CECILIA S L) 1. Oktober 1991 (1991-10-01) Spalte 3, Zeile 29 -Spalte 4, Zeile 2 Tabellen 1,2 Ansprüche	1-18

	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. April 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/05/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thornton, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/11253

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 98 46648 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;NOWAK GOETZ (DE); BUCHA ELKE (DE)) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche -----	1-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11253

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9507295 A	16-03-1995	AU 7721594 A	27-03-1995
		US 6028170 A	22-02-2000
		US 5837808 A	17-11-1998
US 5342693 A	30-08-1994	US 4850958 A	25-07-1989
		US 5262451 A	16-11-1993
		AT 110968 T	15-09-1994
		AU 631366 B	26-11-1992
		AU 3771289 A	05-01-1990
		CA 1318560 A	01-06-1993
		DE 68918104 D	13-10-1994
		DE 68918104 T	11-05-1995
		EP 0430953 A	12-06-1991
		JP 7155370 A	20-06-1995
		JP 3500134 T	17-01-1991
		JP 5043389 B	01-07-1993
		WO 8911884 A	14-12-1989
		US 5338770 A	16-08-1994
		US 5182317 A	26-01-1993
		AU 627464 B	27-08-1992
		AU 3685889 A	05-02-1990
		EP 0426686 A	15-05-1991
		JP 3504339 T	26-09-1991
		JP 5023789 B	05-04-1993
		WO 9000343 A	25-01-1990
US 5053453 A	01-10-1991	CA 2000887 A	01-05-1990
		EP 0367489 A	09-05-1990
		JP 10151193 A	09-06-1998
		JP 2264664 A	29-10-1990
		JP 2847250 B	13-01-1999
WO 9846648 A	22-10-1998	DE 19715504 A	15-10-1998
		AU 7525498 A	11-11-1998
		EP 0975680 A	02-02-2000