



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103608047 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 26

(21) 申请号	201280030837. X	<i>A61K 47/34</i> (2006. 01)
(22) 申请日	2012. 06. 22	<i>A61K 47/48</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据		<i>A61M 1/18</i> (2006. 01)
	2011-139268 2011. 06. 23 JP	<i>A61P 7/02</i> (2006. 01)
		<i>A61K 38/55</i> (2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日		
	2013. 12. 23	
(86) PCT国际申请的申请数据		
	PCT/JP2012/065947 2012. 06. 22	
(87) PCT国际申请的公布数据		
	W02012/176862 JA 2012. 12. 27	
(71) 申请人	东丽株式会社	
	地址 日本东京都	
(72) 发明人	棚桥一裕 坂口博一 阪口有佳	
(74) 专利代理机构	中国专利代理(香港)有限公司	
	司 72001	
	代理人 蔡晓菡 孟慧岚	
(51) Int. Cl.		
	<i>A61L 31/00</i> (2006. 01)	
	<i>A61K 31/80</i> (2006. 01)	

权利要求书1页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

具有抗凝血作用的疏水性高分子化合物

(57) 摘要

本发明提供疏水性高分子化合物,其能够阻碍血小板参与的一次止血阶段和凝血因子参与的凝血血栓形成阶段这两个阶段的凝血反应,其能够在保持抗凝血活性的状态下稳固地固定在医疗器材或医疗材料的表面。本发明提供阻碍血小板附着的高分子化合物与阻碍凝血反应的化合物键合而成的疏水性高分子化合物。

1. 疏水性高分子化合物,其键合阻碍血小板附着的高分子化合物和阻碍凝血反应的化合物而成。

2. 根据权利要求1所述的疏水性高分子化合物,其中,所述阻碍血小板附着的高分子化合物是由疏水性高分子和亲水性高分子组成的共聚物,其对聚甲基丙烯酸甲酯的吸附量为 $0.1\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 以上。

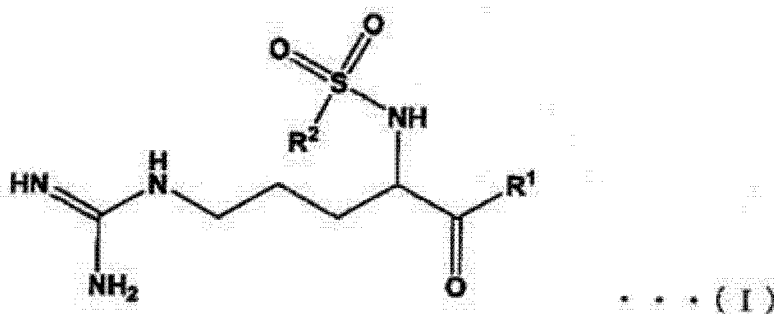
3. 根据权利要求2所述的疏水性高分子化合物,其中,所述共聚物是选自乙二醇、醋酸乙烯酯、氯乙烯、苯乙烯、丙烯酸、丙烯酸盐、丙烯酸烷基酯、丙烯酸羟基烷基酯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸盐、甲基丙烯酸烷基酯、甲基丙烯酸羟基烷基酯、丙烯酰胺、N-烷基酰胺、N,N-二烷基丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、N-烷基甲基丙烯酰胺、N,N-二烷基甲基丙烯酰胺、丙烯腈、乙烯基吡咯烷酮、丙二醇、乙烯醇、乙烯、丙烯、乙烯亚胺、烯丙胺、乙烯胺以及硅氧烷中的单体的共聚物,或者是该单体的共聚物与选自聚酯、聚酰胺、聚氨酯、聚砜、聚醚砜、聚碳酸酯、聚苯硫醚以及聚醚醚酮中的聚合物的嵌段共聚物。

4. 根据权利要求2或3所述的疏水性高分子化合物,其中,所述共聚物是聚醚改性有机硅。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的疏水性高分子化合物,其中,所述阻碍凝血反应的化合物是具有抗凝血酶活性的化合物。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的疏水性高分子化合物,其中,所述阻碍凝血反应的化合物是下述通式(I)所示的化合物,

[化1]



式中, R^1 表示(2R, 4R)-4-烷基-2-羧基哌啶基, R^2 表示苯基或稠合多环式化合物残基,该稠合多环式化合物残基可以被低级烷基或低级烷氧基或者氨基取代,所述氨基被低级烷基取代。

7. 根据权利要求6所述的疏水性高分子化合物,其中,通式(I)的化合物为(2R, 4R)-4-甲基-1-((2S)-2-{[(3RS)-3-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉-8-基]磺酰基}氨基-5-胍基戊酰基)哌啶-2-羧酸。

8. 医疗器材或医疗材料的表面处理剂,其含有权利要求1~7中任一项所述的疏水性高分子化合物,具有抗凝血作用。

9. 医疗器材或医疗材料,其利用权利要求8所述的表面处理剂进行了处理。

具有抗凝血作用的疏水性高分子化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及具有抗凝血作用的疏水性高分子化合物。

背景技术

[0002] 用于将血液凝固所需的凝血反应是多种凝血因子参与的极其复杂的反应,可以认为血小板参与的一次止血阶段和凝血酶之类的凝血因子进行参与而将纤维蛋白稳定强化的凝血血栓形成阶段是特别重要的。

[0003] 凝血反应对于止住由受伤等引起的出血而言是不可或缺的,另一方面,在人工透析中,通过血液与体外循环回路等医疗器材、医疗材料的接触而使凝血反应推进时,还存在因所形成的凝血血栓而产生循环压力的上升、血管的闭塞的危险性。

[0004] 作为减轻这些危险性的方法,已知有对要接受人工透析的患者预先施予作为抗凝血剂的肝素从而防止凝血的方法,但存在过量施予肝素时有副作用、给药量的管理繁杂、对于具有出血倾向的患者无法适用等多个问题。

[0005] 最近,为了规避这些问题,报告有如下尝试:将包括肝素在内的具有抗凝血作用的化合物固定在血液回路等医疗器材、医疗材料的表面,用以防止治疗中的凝血(专利文献1~9)。

[0006] 现有技术文献

专利文献

专利文献1:日本特表2003-507082号公报

专利文献2:日本特开2001-213984号公报

专利文献3:日本特表2004-525888号公报

专利文献4:日本特开2006-291193号公报

专利文献5:国际公开第08/032758号公报

专利文献6:日本特开2009-225824号公报

专利文献7:日本特开2010-082067号公报

专利文献8:日本特开2007-181691号公报

专利文献9:日本特开2007-181692号公报。

发明内容

[0007] 发明要解决的问题

然而,现状是:作为在血液回路等医疗器材、医疗材料的表面固定的具有抗凝血作用的化合物,尚未开发出能够阻碍血小板参与的一次止血阶段和凝血因子参与的凝血血栓形成阶段这两个阶段的凝血反应的具体化合物。另外,即使将以往的具有抗凝血作用的化合物固定在医疗器材、医疗材料的表面也难以在保持充分的抗凝血活性的状态下进行固定,即使在成功地进行固定的情况下也存在所固定的化合物在治疗中离开医疗器材、医疗材料而向血液中溶出的问题。进而,为了阻碍血小板参与的一次止血阶段和凝血因子参与的凝

血血栓形成阶段这两个阶段的凝血反应而使用多个化合物时,需要控制化合物间的竞争吸附、固定化比率,其操作极其繁杂。

[0008] 因而,本发明的目的在于提供疏水性高分子化合物,其能够阻碍血小板参与的一次止血阶段和凝血因子参与的凝血血栓形成阶段这两个阶段的凝血反应,其能够在保持抗凝血活性的状态下稳固地固定在医疗器材或医疗材料的表面。

[0009] 用于解决问题的手段

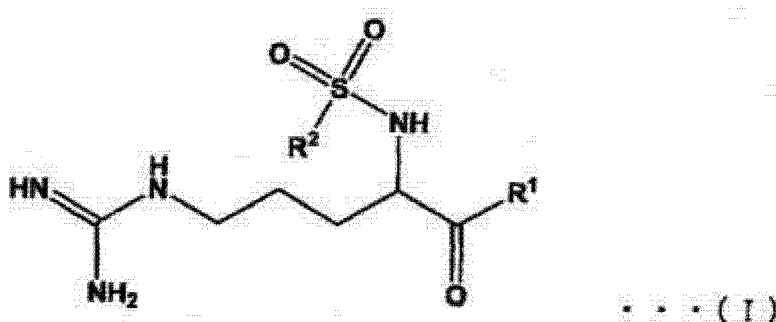
本发明人等为了解决上述课题而进行深入研究,结果发现:将阻碍血小板附着的高分子化合物与阻碍凝血反应的化合物键合而成的疏水性高分子化合物显示显著的抗凝血作用,且能够对医疗器材、医疗材料的表面实现稳固的固定化。

[0010] 即,本发明提供疏水性高分子化合物,其是阻碍血小板附着的高分子化合物与阻碍凝血反应的化合物键合而成的。

[0011] 优选的是,上述阻碍血小板附着的高分子化合物是由疏水性高分子和亲水性高分子组成的共聚物,其对聚甲基丙烯酸甲酯的吸附量为 $0.1\text{pg}/\text{mm}^2$ 以上,更优选的是,选自乙二醇、醋酸乙烯酯、氯乙烯、苯乙烯、丙烯酸、丙烯酸盐、丙烯酸烷基酯、丙烯酸羟基烷基酯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸盐、甲基丙烯酸烷基酯、甲基丙烯酸羟基烷基酯、丙烯酰胺、N-烷基酰胺、N,N-二烷基丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、N-烷基甲基丙烯酰胺、N,N-二烷基甲基丙烯酰胺、丙烯腈、乙烯基吡咯烷酮、丙二醇、乙烯醇、乙烯、丙烯、乙烯亚胺、烯丙胺、乙烯胺以及硅氧烷中的单体的共聚物或者该单体的共聚物与选自聚酯、聚酰胺、聚氨酯、聚砜、聚醚砜、聚碳酸酯、聚苯硫醚以及聚醚醚酮中的聚合物的嵌段共聚物,进一步优选为聚醚改性有机硅。

[0012] 上述阻碍凝血反应的化合物优选具有抗凝血酶活性,更优选为下述通式(I)所示的化合物,进一步优选为(2R, 4R)-4-甲基-1-((2S)-2-{[(3RS)-3-甲基-1, 2, 3, 4-四氢喹啉-8-基]磺酰基}氨基-5-胍基戊酰基)哌啶-2-羧酸。

[0013] [化1]



[式中, R1 表示(2R, 4R)-4-烷基-2-羧基哌啶基, R2 表示苯基或稠合多环式化合物残基,该稠合多环式化合物残基可以被低级烷基或低级烷氧基或者氨基取代,所述氨基被低级烷基取代。]。

[0014] 另外,本发明提供医疗器材或医疗材料的表面处理剂,其含有上述疏水性高分子化合物,具有抗凝血作用。

[0015] 进而本发明提供医疗器材或医疗材料,其利用上述表面处理剂进行了处理。

[0016] 发明的效果

根据本发明,能够显著地阻碍血小板参与的一次止血阶段和凝血因子参与的凝血血栓

形成阶段这两个阶段的凝血反应,能够在保持抗凝血活性的状态下稳固地固定在医疗器材或医疗材料的表面。另外,本发明的疏水性高分子化合物能够作为对医疗器材或医疗材料赋予抗凝血作用的表面处理剂进行利用。

附图说明

[0017] 图 1 是表示实施例中制作的微型组件的简图。

[0018] 图 2 是体外血液循环试验的封闭体系回路的简图。

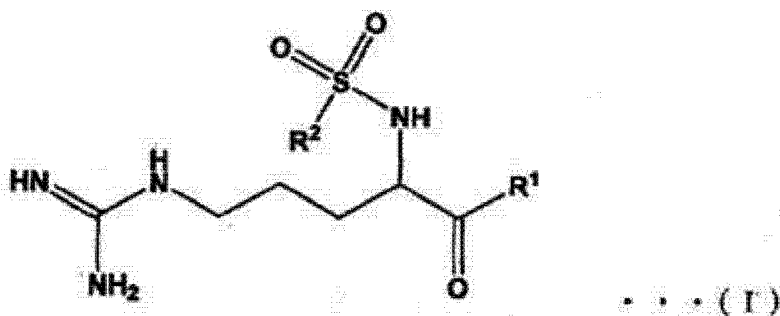
[0019] 图 3 是疏水性高分子化合物的溶出量的测定中的人血浆循环回路的简图。

具体实施方式

[0020] 本说明书中使用的用语在没有特别说明的情况下如下定义。

[0021] 本发明的“疏水性高分子化合物”的特征在于,其是阻碍血小板附着的高分子化合物与阻碍凝血反应的化合物键合而成的。此处的“疏水性”是指化合物为非水溶性的,不会因静电相互作用或氢键而与水分子相互作用。需要说明的是,作为本发明的“疏水性高分子化合物”,例如可列举出选自乙二醇、醋酸乙烯酯、氯乙烯、苯乙烯、丙烯酸、丙烯酸盐、丙烯酸烷基酯、丙烯酸羟基烷基酯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸盐、甲基丙烯酸烷基酯、甲基丙烯酸羟基烷基酯、丙烯酰胺、N-烷基酰胺、N,N-二烷基丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、N-烷基甲基丙烯酰胺、N,N-二烷基甲基丙烯酰胺、丙烯腈、乙烯基吡咯烷酮、丙二醇、乙烯醇、乙烯、丙烯、乙烯亚胺、烯丙胺、乙烯胺以及硅氧烷中的单体的共聚物或者该共聚物与选自聚酯、聚酰胺、聚氨酯、聚砜、聚醚砜、聚碳酸酯、聚苯硫醚以及聚醚醚酮中的聚合物的嵌段共聚物与下述通式(I)所示的化合物键合而成的疏水性高分子化合物。

[0022] [化 2]



[式中, R^1 表示 (2R, 4R) -4- 烷基 -2- 羧基哌啶基, R^2 表示苯基或稠合多环式化合物残基, 该稠合多环式化合物残基可以被低级烷基或低级烷氧基或者氨基取代, 所述氨基被低级烷基取代。]。

[0023] “阻碍血小板附着的高分子化合物”是指具有血液适应性、且通过使该高分子化合物存在于医疗器材、医疗材料的表面而能够抑制血小板附着于基材或材料的表面的、数均分子量为 1000 以上的高分子化合物。

[0024] 作为“阻碍血小板附着的高分子化合物”,例如可列举出由聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙二醇、聚丙二醇、疏水性高的聚硅氧烷与聚醚组成的高分子化合物、聚乙烯亚胺、聚烯丙胺、聚乙烯胺、聚醋酸乙烯酯、聚丙烯酸、聚丙烯酰胺或聚甲基丙烯酸羟基乙酯或者这些高分子化合物的单体与其它单体的共聚物或其它聚合物的嵌段共聚物,为了键合

阻碍凝血反应的化合物,优选具有氨基、羧基、羟基、环氧基、异氰酸酯基、异硫氰酸酯基或巯基,为了附着于医疗器材、医疗材料的表面,更优选由疏水性高分子与亲水性高分子组成的共聚物,进一步优选由疏水性高的聚硅氧烷和聚醚组成的高分子化合物、部分皂化聚乙烯醇或乙烯基吡咯烷酮与醋酸乙烯酯的共聚物。

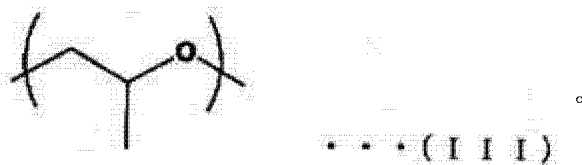
[0025] 作为“由疏水性高的聚硅氧烷与聚醚形成的高分子化合物”,例如可列举出疏水性高的聚硅氧烷与聚醚的共聚物、聚合物复合物(polymer complexes)或聚合物共混物。疏水性高的聚硅氧烷与聚醚的共聚物由聚醚单元和聚硅氧烷单元组成,这些共聚形态可以是无规共聚物、嵌段共聚物或接枝共聚物中的任意种,其中,优选为疏水性高的聚醚改性有机硅。

[0026] “聚醚”是指例如可列举出源自聚环氧乙烷或聚环氧丙烷的结构。此处,“聚醚”是指通式(II)所示的结构(R^3 表示碳原子数为6以下的烷基),聚醚的一例即“源自聚丙二醇的结构”是指通式(III)所示的结构。

[0027] [化3]



[化4]



[0028] “聚醚改性有机硅”是指有机硅链的侧链键合有聚醚单元的有机硅,也可以是侧链进一步键合有氨基或羧基的、进行了氨基改性或羧基改性的聚醚改性有机硅。

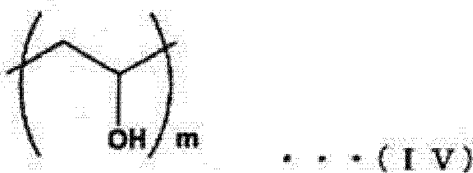
[0029] 阻碍血小板附着的高分子化合物为部分皂化聚乙烯醇时,从使处理容易性或疏水性变得适合的观点出发,其皂化度优选为10~不足65mol%,更优选为15~60mol%,进一步优选为15~55mol%。此处,“皂化度”是指通过式1算出的数值。

$$\text{皂化度} = m / (n + m) \times 100 \quad \text{式 1}$$

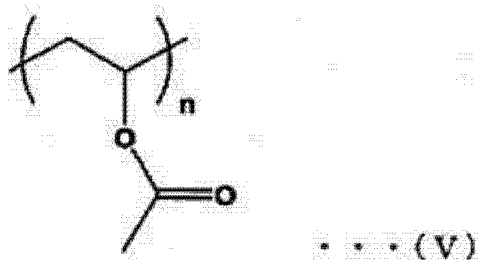
m:聚乙烯醇中的、通式(IV)所示的结构的数量

n:聚乙烯醇中的、通式(V)所示的结构的数量。

[0030] [化5]



[化6]



阻碍血小板附着的高分子化合物为乙烯基吡咯烷酮与醋酸乙烯酯的共聚物时,从使处理容易性、对基材的吸附性或疏水性变得适合的观点出发,乙烯基吡咯烷酮单元优选不足50单元摩尔%,更优选为20~不足49.9单元摩尔%。需要说明的是,在乙烯基吡咯烷酮与醋酸乙烯酯的共聚物中,乙烯基吡咯烷酮单元所占的比例(单元摩尔%)可以通过对共聚物进行 $^1\text{H-NMR}$ 测定(溶剂: CDCl_3)来算出。

[0031] 阻碍血小板附着于医疗器材或医疗材料等的基材的高分子化合物的吸附量优选为 $0.1\text{pg}/\text{mm}^2$ 以上、更优选为 $1\text{pg}/\text{mm}^2$ 以上、进一步优选为 $10\text{pg}/\text{mm}^2$ 以上。

[0032] 上述吸附量通过以下方法进行测定。首先,将未处理的传感器芯片(Sensor Chip Au;GE Healthcare)用表面等离子共振装置(以下记为“SPR”) (BIACORE3000;GE Healthcare)进行前处理(25℃的蒸馏水、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、10分钟),测定其信号值(RU:共振单元)。

[0033] 将“基材”、即被吸附原材料溶解在溶剂中,制备0.5重量%的被吸附原材料溶液。将1滴该被吸附原材料溶液滴加至安装于旋涂机的进行了前处理的传感器芯片的金膜部分的中心,使其在室温下立即以3000rpm旋转1分钟,使被吸附原材料被覆传感器芯片。

[0034] 确认在传感器芯片上没有液滴后,用SPR对传感器芯片进行蒸馏水洗涤(25℃、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、10分钟),进而用0.025重量%Triton-X100溶液洗涤3次(25℃、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、1分钟),测定洗涤结束10分钟后的信号值。

[0035] 从进行上述操作而得到的传感器芯片之中,选择旋涂前后的信号值之差在3000~8000的范围内的芯片,用蒸馏水进行洗涤(25℃、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、10分钟),进而用0.025重量%Triton-X100溶液洗涤3次(25℃、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、1分钟)。

[0036] 在洗涤结束10分钟后,注入要吸附于基材的疏水性高分子化合物甲醇溶液(浓度: $100\mu\text{g}/\text{ml}$)(25℃、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、1分钟),用蒸馏水进行洗涤(25℃、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、3分钟)。求出刚开始注入前的信号值(以下记为“信号值A”)和注入结束3分钟后的信号值(以下记为“信号值B”)之差,以 $1\text{RU}=1\text{pg}/\text{mm}^2$ 的形式进行换算。

[0037] 接着,用蒸馏水进行洗涤(25℃、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、2分钟),进而用0.025重量%Triton-X100溶液洗涤3次(25℃、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、1分钟),再次注入要吸附的疏水性高分子化合物甲醇溶液(浓度: $100\mu\text{g}/\text{ml}$)(25℃、流速 $20\mu\text{l}/\text{min}$ 、1分钟)。以后,重复同样的操作,求出共计5次的信号差(信号值A与信号值B之差),将其平均值作为“阻碍血小板附着于基材的高分子化合物的吸附量”。

[0038] “阻碍凝血反应的化合物”是指具有抗凝血酶活性之类的抗凝血能力的化合物,更具体而言,是指以浓度达到 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的方式向血液中添加该化合物时,与空白血液相比凝血酶原时间延长30%以上的化合物。

[0039] “凝血酶原时间”通过公知的文献(金井正光等、“臨床検査法提要 改訂第30版(临

床检查法概要 第 30 版修订)”,金原出版株式会社、1993 年、p. 416-418)中记载的方法进行测定。具体而言,将 3.2% 柠檬酸钠 1 容积与血液 9 容积混合,将分取的柠檬酸血浆 0.1mL 置于小试验管(内径 8mm、长度 7.5cm)中,放入 37℃ 的恒温水槽中加热 3 分钟,然后添加保温至 37℃ 的组织凝血激酶·钙试剂 0.2mL,轻轻振荡小试验管后,静置边使其倾斜,边使纤维蛋白析出。此处,测定从加入组织凝血激酶·钙试剂开始至纤维蛋白析出为止的时间,将其记作“凝血酶原时间”。

[0040] 作为“阻碍凝血反应的化合物”,例如可列举出肝素、甲磺酸萘莫司他(nafamostat mesilate)、柠檬酸钠、草酸钠、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶($\alpha 1$ -antitrypsin)、 $\alpha 2$ 巨球蛋白($\alpha 2$ -macroglobulin)、C1 抑制剂(C1 inhibitors)、血栓调节蛋白(thrombomodulin)、蛋白质 C、具有胍基结构的化合物、前列腺素(prostaglandin)、水蛭素(hirudin)、Xa 抑制剂(Xa inhibitors)、组织因子抑制剂(tissue factor inhibitors)、尿激酶(urokinase)或者抗凝血酶(antithrombin),优选为具有抗凝血酶活性的化合物。

[0041] “具有抗凝血酶活性的化合物”是指与凝血酶的键合亲和性高的化合物。

[0042] 作为评价化合物的抗凝血酶活性的指标,例如可列举出基于被检溶液的吸光度值由米氏方程与双倒数作图(Lineweaver-Burk plot)算出的阻碍常数(以下记为“ K_i ”)。 K_i 越小则表示与凝血酶的键合亲和性高、抗凝血酶活性越高。

[0043] 作为“具有抗凝血酶活性的化合物”,例如可列举出具有胍基结构的化合物,优选为(2R, 4R)-4-甲基-1-((2S)-2-{[(3RS)-3-甲基-1, 2, 3, 4-四氢喹啉-8-基]磺酰基}氨基-5-胍基戊酰基)哌啶-2-羧酸(以下记为“阿加曲班”)。阿加曲班是 1978 年合成的精氨酸衍生物的具有选择性抗凝血酶活性的医药化合物。

[0044] 另外,本发明的医疗器材或医疗材料的表面处理剂的特征在于,其含有上述疏水性高分子化合物,具有抗凝血作用。

[0045] 作为“医疗器材或医疗材料”,例如可列举出嵌入型人工器官、人工血管、导管、支架、血袋、隐形眼镜、人工晶体或手术用辅助器具或者在生物体成分分离用组件或血液净化用组件等中内置的分离膜或吸附剂。

[0046] 作为使用上述表面处理剂对医疗器材或医疗材料进行表面处理的方法、即将作为其有效成分的上述疏水性高分子化合物固定在医疗器材或医疗材料的表面的方法,例如可列举出使医疗器材或医疗材料与上述表面处理剂接触,并向其照射放射线的方法。需要说明的是,作为放射线的种类,优选为电子束、 γ 射线。

[0047] 作为“医疗器材或医疗材料”的原材料,例如可列举出纤维素、纤维素醋酸酯、聚碳酸酯、聚砜、聚醚砜、聚甲基丙烯酸甲酯(以下记为“PMMA”)等聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚酰胺、聚偏二氟乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯腈、聚酯、聚氨酯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚偏二氟乙烯、聚甲基戊烯、聚醚醚酮、硅或聚酰亚胺。

实施例

[0048] 以下,列举出实施例来详细说明本发明,但本发明不受它们的限定。

[0049] (实施例 1:聚醚改性有机硅与阿加曲班的键合)

将 15.4g 氨基改性有机硅(KF-865;Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.)溶解在 50mL 无水二甲基甲酰胺(以下记为“无水 DMF”)中,制备了氨基改性有机硅 / 无水 DMF 溶液。另外,

将 0.3g 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(以下记为“EDC”)溶解在 5mL 无水 DMF 中,制备了 EDC/ 无水 DMF 溶液。进而,将 0.3g 4-羟基苯并三唑(以下记为“HOBt”)溶解在 5mL 无水 DMF 中,制备了 HOBt/ 无水 DMF 溶液。

[0050] 边将所制备的所有氨基改性有机硅 / 无水 DMF 溶液进行冰冷,边分别添加全部的 ED/ 无水 DMF 溶液和 HOBt/ 无水 DMF 溶液,进而添加 2.1g N-羟基琥珀酰亚胺化聚乙二醇(SUNBRIGHT ME-020AS;日油株式会社),使其以室温反应 3 天。接着,将反应液投入透析管(Spectra/Por RC Pore 6 MWC0=1000)中,在超过反应液的 10 倍体积量的蒸馏水中边适当交换蒸馏水边进行 3 天透析。将透析后的反应液过滤,使不溶物在真空干燥机中干燥一晚,从而得到聚醚改性有机硅(以下记为“聚醚改性有机硅 A”)。

[0051] 取阿加曲班 5mmol 置于茄形烧瓶中,添加 10mL 无水 DMF 并溶解后,边将茄形烧瓶进行冰冷边滴加 10mL 4N 盐酸 /1, 4-二噁烷(东洋化成株式会社),搅拌 1 小时。接着,用旋转蒸发仪蒸馏去除溶剂,进而在真空干燥机中干燥一晚,向其中添加无水 DMF 25mL,从而制备了阿加曲班盐酸盐 / 无水 DMF 溶液。

[0052] 以表 1 所示的量向两口烧瓶中采取阿加曲班盐酸盐 / 无水 DMF 溶液,边在冰冷下搅拌边分别添加 EDC/ 无水 DMF 溶液和 HOBt/ 无水 DMF 溶液,进而添加聚醚改性有机硅 A,在室温下反应 3 天。接着,将反应液投入透析管(Spectra/Por RC Pore 6 MWC0=1000)中,在超过反应液的 10 倍体积量的蒸馏水中边适当交换蒸馏水边进行 3 天透析。将透析后的反应液过滤,使不溶物在真空干燥机中干燥一晚,从而得到疏水性高分子化合物(以下记为“实施例 1 化合物”)。

[0053] (实施例 1 化合物的抗凝血酶活性的测定)

测定使用 ECA-T 试剂盒(HaemoSys 公司)。向将 0.5g 实施例 1 化合物溶于 1mL 甲醇而制备的实施例 1 化合物 / 甲醇溶液 100 μ L 中添加蒸馏水 900 μ L,制备了实施例 1 化合物分散液。采取实施例 1 化合物分散液 30 μ L,与 ECA 凝血酶原缓冲液 100 μ L 和 ECA-T 底物 25 μ L 混合,在 37℃下孵育 60 秒钟,然后置于装置(COATRON M1(编号 80 800 000);Production 公司)中,进一步添加 ECA ecarin 试剂 50 μ L 并进行测定。

[0054] 用使用乙醇 / 盐酸(体积比率 4/1)混合溶剂制备成任意浓度的阿加曲班溶液 20 μ L 与人血浆 80 μ L 混合而成的液体、或者将空白的蒸馏水 20 μ L 与人血浆 80 μ L 混合而成的液体来代替上述实施例 1 化合物分散液,使用 ECA-T 试剂盒分别进行测定,由它们的结果制作标准曲线。将基于标准曲线算出的实施例 1 化合物分散液的以阿加曲班计浓度 1450 重量 ppm 作为实施例 1 化合物分散液的显示抗凝血酶活性的值。

[0055] (实施例 2~6)

除了变更 EDC、HOBt、KF-861 以及 SUNBRIGHT ME-020AS 相对于阿加曲班盐酸盐的摩尔比、以及无水 DMF 相对于聚醚改性有机硅 A 的体积比之外,用与实施例 1 同样的方法分别得到实施例 2~6 化合物,测定它们的抗凝血酶活性。EDC、HOBt、KF-861 以及 SUNBRIGHT ME-020AS 相对于阿加曲班盐酸盐的摩尔比以及实施例 2~6 化合物各自的抗凝血酶活性的测定结果示于表 1。

[0056] [表 1]

[表1]

化合物	相对于阿加曲班盐酸盐 1.00的摩尔比				无水DMF相 对于聚醚改 性有机硅1的 体积比	以阿加曲班 计浓度 (重量ppm)
	EDC	HOBt	KF- 861	ME- 020AS		
实施例1	1	1	0.3	0.3	—	850
实施例2	1	1	0.2	0.2	—	660
实施例3	1	1	0.1	0.1	—	500
实施例4	1	1	0.5	0.5	4	440
实施例5	1	1	0.2	0.2	4	480
实施例6	1	1	0.1	0.1	4	720

[0057] 需要说明的是,针对实施例1中记载的聚醚改性有机硅A也同样地测定抗凝血酶活性,其值与空白的蒸馏水没有区别,可以确认聚醚改性有机硅A自身不具有抗凝血酶活性。

[0058] (实施例1化合物的凝血酶阻碍常数的测定)

将牛凝血酶液(Ito Life Science Inc.)10000U溶于生理盐水1mL中,制备牛凝血酶水溶液。

[0059] 将S-2238原液(Sekisui Medical Co., Ltd.)25mg溶于蒸馏水40mL中,制备S-2238原液水溶液。

[0060] 使用稀释缓冲液(0.05M Tris、0.1M NaCl、1mg/mL牛血清白蛋白(BSA)、pH 7.4),分别稀释牛凝血酶水溶液、S-2238原液水溶液以及上述实施例1化合物/甲醇溶液。

[0061] 向96孔板中分配S-2238原液水溶液的稀释液100 μ L和实施例1化合物/甲醇溶液的稀释液50 μ L,进行密封然后用设定为37℃的恒温干燥机加热30分钟。接着,进一步分配以37℃加热30分钟的牛凝血酶水溶液的稀释液50 μ L,立即用酶标仪(测定波长405nm、参照波长595nm)测定其吸光度。

[0062] 第一次吸光度测定结束后,立即进行第二次吸光度测定。第三次及以后的吸光度测定分别在注入牛凝血酶水溶液的稀释液开始4、6、8、10、12、14、16、18、20分钟后进行。由所得各吸光度的值利用米氏方程与双倒数作图算出 K_i 。实施例1化合物的 K_i 为36nM。

[0063] 需要说明的是,针对聚醚改性有机硅A也同样地算出 K_i ,但不具有抗凝血酶活性的聚醚改性有机硅A的 K_i 果然与空白呈现同样的值。

[0064] 进而,针对阿加曲班也同样地算出 K_i ,结果 K_i 为46nM,与实施例1化合物的 K_i 相比时,呈现1.3倍的数值。

[0065] 由这些结果可以明确:上述的疏水性高分子化合物与凝血酶的键合亲和性极高,能够对以中空纤维型透析器为首的医疗器材或医疗材料赋予明显超过已知具有抗凝血酶活性的阿加曲班的显著的抗凝血酶活性。

[0066] (PMMA中空纤维膜微型组件的制作)

将等规-PMMA 5重量份和间规-PMMA 20重量份添加至二甲基亚砜75重量份中,以110℃搅拌8小时而得到制膜原液。将该制膜原液从口型双层圆筒型管头喷出,在空气中通

过 300mm 后,导入水 100% 的凝固浴中,得到内径 0.2mm、膜厚 0.03mm 的 PMMA 中空纤维。需要说明的是,作为内部注入气体使用干燥氮气。

[0067] 准备内径 10mm、长度 120mm 的组件盒,其与通常的中空纤维型透析器同样地分别具有通向中空纤维的内侧的端口(血液端口)和通向外侧的端口(透析液端口)各 2 个。

[0068] 将 50 根上述 PMMA 中空纤维成束而制成 PMMA 中空纤维膜,边留意不使 PMMA 中空纤维膜的中空部闭塞边将其两末端用环氧系灌封剂固定于上述的组件盒,然后将 PMMA 中空纤维膜和组件盒内部用蒸馏水洗涤,得到图 1 所示的微型组件 6。

[0069] (实施例 1 化合物对 PMMA 中空纤维膜的固定)

利用压缩空气去除所制作的微型组件 6 的血液接触侧(PMMA 中空纤维膜内侧)与血液非接触侧(PMMA 中空纤维膜外侧)残留的蒸馏水。接着,制备以阿加曲班计浓度为 4000 重量 ppm 的实施例 1 化合物的丙二醇溶液,制成填充液。

[0070] 将上述填充液 400 μ L 使用注射器仅填充于微型组件 6 的血液接触侧。其后,利用压缩空气去除填充液,然后对将血液端口 1a、1b 和透析液端口 2a、2b 全部密封了的微型组件 6 照射约 3 小时的吸收剂量为 25kGy 的 γ 射线。

[0071] 使用蠕动泵 8,向 PMMA 中空纤维膜 4 和微型组件 6 的内部以 10mL/min 的流速通液 8 小时的 0.025 重量 % 聚氧乙烯辛基苯基醚水溶液,洗涤 PMMA 中空纤维膜 4 和微型组件 6 的内部。其后,将甲醇、蒸馏水以及生理盐水均以 10mL/min 的流速各通液 30 分钟,进一步进行洗涤,得到固定有实施例 1 化合物的微型组件(以下记为“实施例 1 微型组件”)。

[0072] 另一方面,除了使用聚醚改性有机硅 A 来代替以阿加曲班计浓度为 4000 重量 ppm 的实施例 1 化合物的丙二醇溶液以外,进行与上述同样的操作,得到固定有聚醚改性有机硅 A 的微型组件(以下记为“比较例 1 微型组件”)。

[0073] (体外血液循环试验)

将志愿者提供的血液与柠檬酸以体积比率 9/1 进行混合,得到柠檬酸加血。将相对于柠檬酸加血 1mL 添加了作为促凝剂的葡萄糖酸钙(calcicol) 43.6 μ L 而成的液体作为被检血液。

[0074] 将硅管 7a、7b 连接于实施例 1 微型组件,在硅管 7b 的途中设置蠕动泵 8。从与血液端口 1a 连接的硅管 7a 以 0.9mL/min 的流量通液 5 秒钟的被检血液,将从血液端口 1b 流出的被检血液从硅管 7b 废弃,去除 PMMA 中空纤维膜内部的气泡。接着,将硅管 7a 与 7b 用包接部 9 连接,制作图 2 所示的封闭体系回路。

[0075] 以 0.9mL/min 的流量开始被检血液的循环,由于回路内生成的凝血血栓,回路内压上升,测定截止至硅管 7a 或 7b 离开包接部 9 为止的循环持续时间。使用实施例 1 微型组件时的循环持续时间为 37 分钟。

[0076] 准备 PMMA 中空纤维膜中未固定任何化合物的微型组件 6 (以下记为“比较例 2 微型组件”),进行与上述同样的血液循环试验。此时的循环持续时间为 20 分钟,为使用实施例 1 微型组件时的 60% 以下的值。由这些结果可以明确:上述疏水性高分子化合物能够对以中空纤维型透析器为首的医疗器材或医疗材料赋予优异的抗凝血作用。

[0077] 需要说明的是,使用比较例 1 微型组件进行与上述同样的血液循环试验时的循环持续时间为 20 分钟,与使用 PMMA 中空纤维膜中未固定任何化合物的比较例 2 微型组件时没有区别。

[0078] (实施例 1 化合物的溶出量的测定)

将另行制作的实施例 1 微型组件的血液端口 1b 与内径 0.8mm、长度 520mm 的硅管 7b 连接,其途中设置蠕动泵 8。血液端口 1a 与内径 0.8mm、长度 160mm 的硅管 7a 连接。其后,将硅管 7a 和 7b 各自的另一端插入放有 5mL 人血浆的聚苯乙烯圆管(编号:352054;BECTON, DICKINSON 公司)10 中,制作图 3 所示的循环回路。

[0079] 使用蠕动泵 8,将人血浆以 0.5mL/min 的流速循环 4 小时,然后使用 ECA-T 试剂盒测定聚苯乙烯圆管 10 内的人血浆中的实施例 1 化合物浓度。然而,循环后人血浆中的实施例 1 化合物浓度在 ECA-T 试剂盒的检测限以下,未从实施例 1 微型组件中确认到实施例 1 化合物的溶出。该结果表明,上述疏水性高分子化合物能够对以中空纤维型透析器为首的医疗器材或医疗材料进行稳固的固定。

[0080] (具有抗血小板附着能力的高分子化合物的吸附量评价)

作为构成上述疏水性高分子化合物的、阻碍血小板附着的高分子化合物之一即乙烯基吡咯烷酮与醋酸乙烯酯的共聚物(以下记为“VA 系共聚物”),准备了 VA37(均为 BASF 公司)。同样地,准备了作为阻碍血小板附着的高分子化合物之一的部分皂化聚乙烯醇。进而,准备了实施例 1 中得到的聚醚改性有机硅 A。需要说明的是,所准备的 VA 系共聚物、部分皂化聚乙烯醇以及聚醚改性有机硅 A 均用甲醇进行稀释而制备成 10000 重量 ppm 的甲醇溶液。

[0081] 部分皂化聚乙烯醇如下所示地进行制备。将醋酸乙烯酯(和光纯药)20g 与偶氮二丁腈(和光纯药)20mg 溶解在无水 DMF 中,以 70℃搅拌 5 小时。将反应液添加至碳酸氢钠(和光纯药)中,采取所析出的聚合物,用水洗涤并进行减压干燥。将干燥聚合物 5g 溶解在甲醇(和光纯药)15mL 中后,添加氢氧化钠 0.05g,以 60℃进行搅拌,进行水解反应。将所析出的聚合物用玻璃过滤器进行过滤后,去除滤液的甲醇,将所得残渣减压干燥,得到皂化度为 16%的部分皂化聚乙烯醇 2.1g。通过变更氢氧化钠的量和水解反应时间来得到各种皂化度的部分皂化聚乙烯醇。

[0082] 作为比较对象,作为构成上述疏水性高分子化合物的、阻碍血小板附着的高分子化合物中未包含的高分子化合物,准备了 PEG2000、PEG4000、PEG6000、PEG20000(均为 Nacalai Tesque, Inc)以及 PEG 甲基醚(PEG-em)、PEG 二甲基醚(PEG-dm)(均为 Sigma-Aldrich Corporation.)。需要说明的是,所准备的高分子化合物均用蒸馏水进行稀释而制备成 10000 重量 ppm 的水溶液。

[0083] 作为吸附阻碍血小板附着的高分子化合物的被吸附原材料的 0.5 重量%溶液,分别制备了 PMMA(重均分子量 93000;Sigma-Aldrich Corporation.)/甲苯溶液、聚氨酯/二甲基乙酰胺溶液、聚砜(Solvay S.A. 制造的 Udel(注册商标)P-3500)/二甲基乙酰胺溶液、聚氯乙烯(重均分子量 80000;Sigma-Aldrich Corporation.)/四氢呋喃溶液、聚苯乙烯(Wako)/氯仿溶液和聚碳酸酯(重均分子量 20000;Teijin Limited)/氯仿溶液。

[0084] 测定各种阻碍血小板附着的高分子化合物对各个被吸附原材料的吸附量。结果示于表 2。

[0085] [表 2]

[表2]

		信号值B-信号值A [$\mu\text{g}/\text{mm}^2$]					
		被吸附原材料					
		PMMA	聚砒	聚氨酯	聚氯乙烯	聚苯乙烯	聚碳酸酯
阻碍血小板附着的高分子化合物	VA37	2760	—	—	—	—	—
	PVA (16%)	2229	2586	1635	2468	2377	2356
	PVA (23%)	2360	2642	1611	2330	2168	2346
	PVA (38%)	2273	2130	1411	1796	1989	1819
	PVA (52%)	2120	2117	1267	1890	1530	2013
	聚醚改性有机硅A	1920	1730	1210	1890	1330	1220
	PEG 2000	2	—	—	—	—	—
	PEG 4000	2	—	—	—	—	—
	PEG 6000	5	—	—	—	—	—
	PEG 20000	113	—	—	—	—	—
	PEG -me	5	—	—	—	—	—
	PEG -dm	67	—	—	—	—	—

PVA : () 内表示皂化度。

[0086] 由表2的结果可以明确:构成上述疏水性高分子化合物的、阻碍血小板附着的高分子化合物不限于聚醚改性有机硅,其能够对以中空纤维型透析器为首的医疗器材或医疗材料进行稳固的吸附。

[0087] (抗血小板附着能力的评价)

将另行制作的实施例1微型组件的组件盒用超声波切割机切断,取出固定有实施例1化合物的PMMA中空纤维膜(以下记为“实施例1中空纤维膜”)。

[0088] 在直径18mm的聚对苯二甲酸乙二醇酯制的圆形膜的单面粘贴双面胶,向其中固定实施例1中空纤维膜,然后将已固定的PMMA中空纤维膜横切(そぎ切り)成半圆筒状,使其露出内表面。在切成筒状的Falcon(注册商标)圆筒管(18mm ϕ 、No. 2051)的内部放入固定于圆形膜的实施例1中空纤维膜,将圆筒管与圆形膜的间隙用封口膜密封。其后,将该圆筒管内用生理盐水充满。

[0089] 向预先采取了肝素的采血管中倒入刚采取完成的志愿者的静脉血,倒置混合,制备肝素加血。需要说明的是,肝素加血的肝素浓度达到50U/mL。

[0090] 废弃上述圆筒管内的生理盐水,然后加入肝素加血1.0mL,以37℃振荡1小时。接着,将上述圆筒管内的实施例1中空纤维膜用10mL生理盐水洗涤,然后添加含有2.5体积%

的戊二醛的生理盐水进行血液成分的固定,进而用蒸馏水进行洗涤。其后,从上述圆筒管中取出固定有实施例 1 中空纤维膜的圆形膜,将固定有实施例中空纤维膜的圆形膜以常温、0.5Torr 绝对压进行 12 小时减压干燥。

[0091] 将减压干燥后的固定有实施例 1 中空纤维膜的圆形膜用双面胶粘贴在扫描型电子显微镜的试样台上,通过溅射在实施例中空纤维膜表面形成铂/钯薄膜。使用场发射型扫描型电子显微镜(S800;日立制作所)以 1500 倍的倍率观察表面形成有铂/钯薄膜的实施例中空纤维膜的长度方向的中央附近的内表面,数出 1 个视野中($4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$)的附着血小板数。

[0092] 将不同的 5 个视野中的附着血小板数的平均值的整数记作血小板附着数(个/ $4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$)时,附着于实施例 1 中空纤维膜的血小板数为 15 个。

[0093] 另一方面,将另行制作的比较例 2 微型组件的组件盒用超声波切割机切断,取出未固定任何化合物的中空纤维膜(以下记为“比较例 2 中空纤维膜”),对其也同样地确认血小板附着数时,比较例 2 中空纤维膜的附着血小板数为 100 个以上。

[0094] 由这些结果可以明确:上述疏水性高分子化合物能够对以中空纤维型透析器为首的医疗器材或医疗材料赋予显著的抗血小板附着能力。

[0095] (全血凝固时间的测定)

将采取的自志愿者的血液和柠檬酸以体积比率 9/1 进行混合,制备了柠檬酸加血。

[0096] 向比色皿(cuvette)(NON-ACTIVATED CLOTTING TEST KIT)中采取生理盐水 18 μL ,向其中添加葡萄糖酸钙 14.8 μL ,进而加入柠檬酸加血 342 μL ,然后用 Sonoclot 凝血/血小板机能分析装置(IMI Co., Ltd)进行测定,将所得 ACT ONSET 值作为全血凝固时间。采取的自志愿者的血液的全血凝固时间为 545 秒。

[0097] 分别使用 2、10、20 μM 的阿加曲班溶液(溶剂为甲醇/盐酸(体积比率 4/1))代替生理盐水并进行同样的测定时,全血凝固时间分别为 520、734、893 秒。

[0098] 分别使用 1、2、5 μM 的实施例 1 化合物分散液代替生理盐水并进行同样的测定时,全血凝固时间分别为 590、780、910 秒。

[0099] (实施例 14:醋酸乙烯酯-乙烯基吡咯烷酮共聚物与化合物 1 的键合)

向螺纹小瓶(screw vial)中采取四氢呋喃 14.9g、醋酸乙烯酯 23.0g、N-乙烯基吡咯烷酮 10.8g、2-氨基乙硫醇 0.028g 以及偶氮二异丁腈 0.016g,密闭后照射 10 分钟的超声波。先将螺纹小瓶开封一次,用氩气鼓泡 10 分钟,再次密闭后,边搅拌边将螺纹小瓶在 60℃ 的热水浴中浸渍 1 小时,进而在 70℃ 的热水浴中浸渍 6 小时,使醋酸乙烯酯与乙烯基吡咯烷酮发生共聚反应。将向该反应液中添加甲醇 80mL 而得到的产物添加至约 5 倍量的醚中,去除上清液。将重新添加醚并去除上清液这一洗涤操作重复 3 次,进行减压干燥,得到醋酸乙烯酯-乙烯基吡咯烷酮共聚物。对所得醋酸乙烯酯-乙烯基吡咯烷酮共聚物进行 $^1\text{H-NMR}$ 测定(溶剂: CDCl_3)时,乙烯基吡咯烷酮单元为 28.6 单元摩尔 %。

[0100] 将所得醋酸乙烯酯-乙烯基吡咯烷酮共聚物 4.6g 溶于无水 DMF 20mL 中,制备醋酸乙烯酯-乙烯基吡咯烷酮共聚物/无水 DMF 溶液。向两口烧瓶中采取所制备的醋酸乙烯酯-乙烯基吡咯烷酮共聚物/无水 DMF 溶液的总量以及阿加曲班盐酸盐/无水 DMF 溶液(0.49M)0.5mL,边在冰冷下搅拌,边分别添加 EDC/无水 DMF 溶液(1.04M)0.5mL 和 HOBt/无水 DMF 溶液(1.02M)0.5mL,在氮气气氛下以室温反应 3 天。接着,将反应液投入透析管

(Spectra/Por RC Pore 6 MWC0=1000) 中,边在超过反应液的 10 倍体积量的蒸馏水中适当交换蒸馏水边进行 3 天透析。将透析后的反应液过滤,用旋转蒸发仪蒸馏去除滤液的溶剂后,在真空干燥机中干燥一晚,得到疏水性高分子化合物(以下记为“实施例 7 化合物”)。

[0101] (实施例 7 化合物的抗凝血酶活性的测定)

利用与实施例 1 化合物的抗凝血酶活性的测定同样的方法,测定实施例 7 化合物 / 甲醇溶液(浓度 20 重量 %),将算出的实施例 7 化合物 / 甲醇溶液的化合物 1 相当浓度 87ppm 记为实施例 7 化合物 / 甲醇溶液的显示抗凝血酶活性的值。

[0102] 由这些结果可以明确:上述疏水性高分子化合物与已知具有抗凝血酶活性的阿加曲班相比即使为极低的浓度也能够延长全血凝固时间,能够对以中空纤维型透析器为首的医疗器材或医疗材料赋予优异的抗凝血作用。

[0103] 产业上的可利用性

本发明能够用于对以中空纤维型透析器为首的医疗器材或医疗材料赋予优异的抗凝血作用。

[0104] 附图标记说明

1a, 1b 血液端口、2a, 2b 透析液端口、3 组件盒、4 PMMA 中空纤维膜、5 灌封剂、6 微型组件、7a, 7b 硅管、8 蠕动泵、9 包接部、10 聚苯乙烯圆管

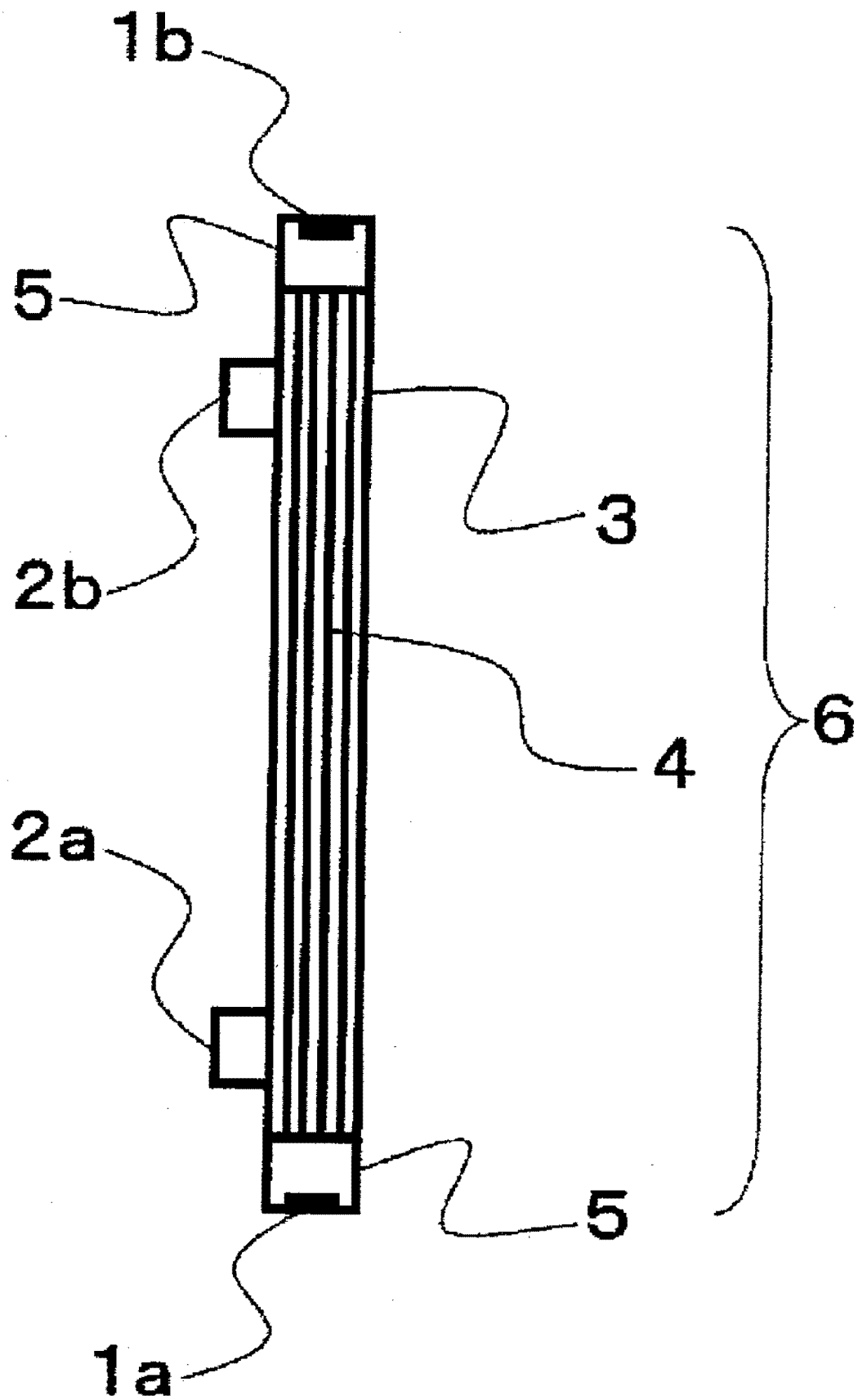


图 1

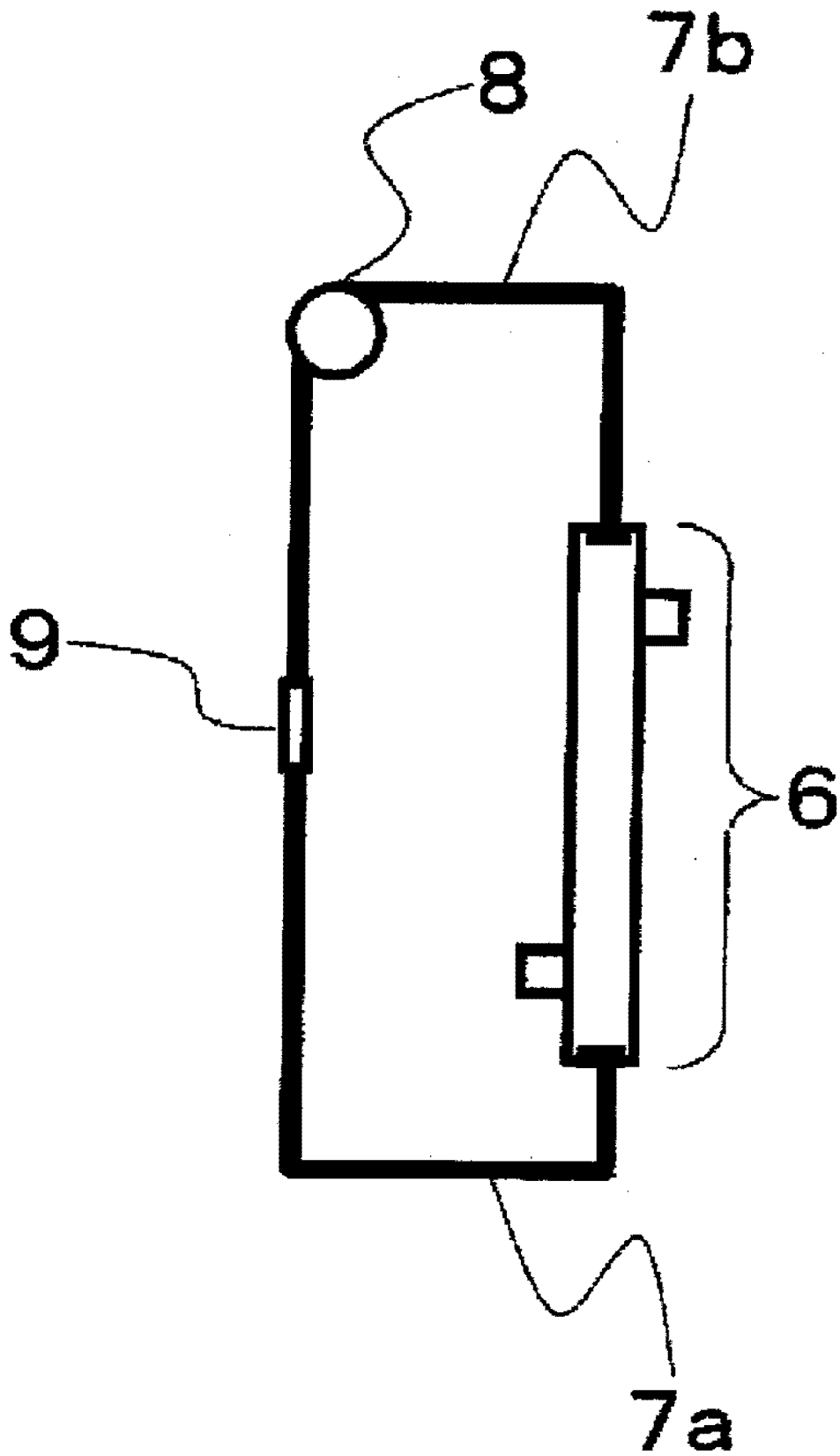


图 2

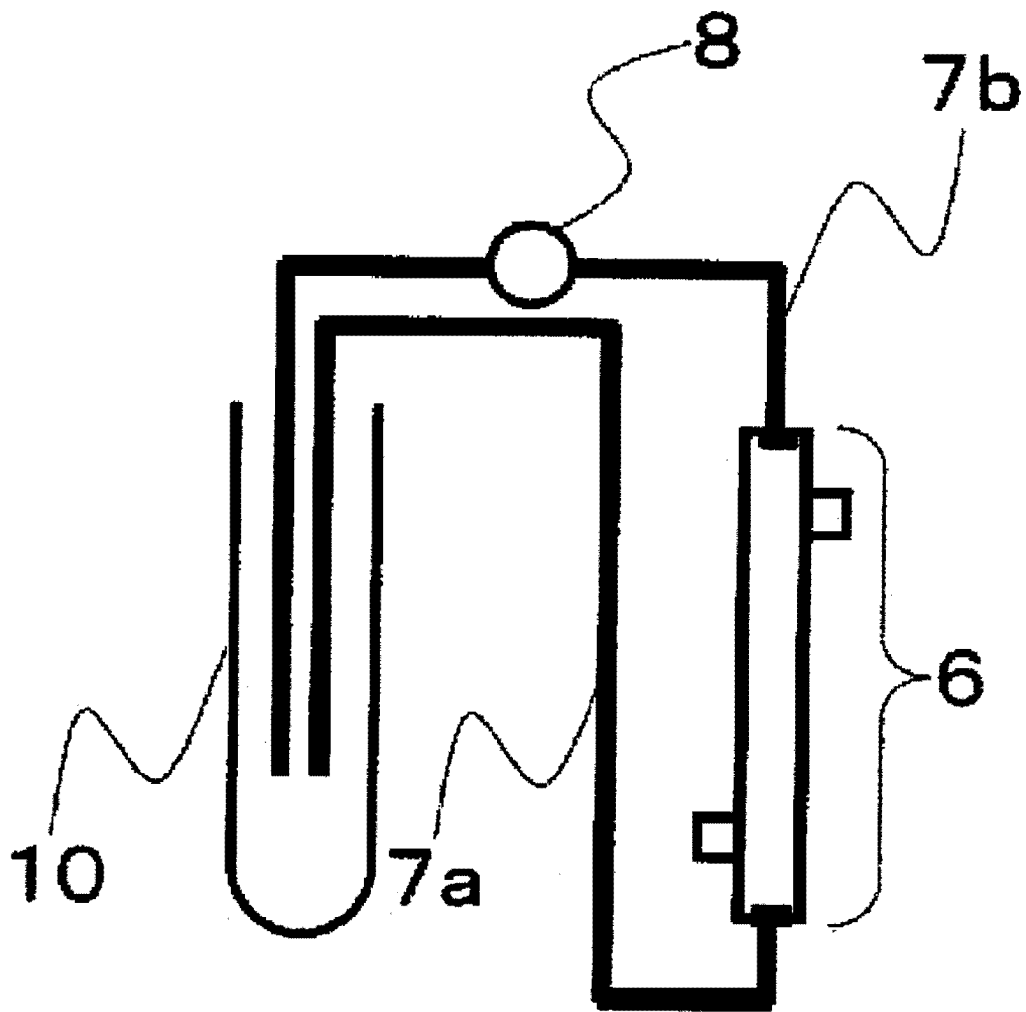


图 3