



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 31/74

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD A 61 K / 331 408 3	(22)	02.08.89	(44)	31.10.90
(31)	227,700	(32)	03.08.88	(33)	US

(71)	siehe (73)
(72)	Ito, Ralph K.; Logerfo, Frank W., US
(73)	NEW ENGLAND DEACONESS HOSPITAL CORPORATION, Boston, Massachusetts, US
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Biokompatibler, thromboresistenter Stoff und Verfahren zu dessen Herstellung

(55) Stoff, biokompatibel, thromboresistent; Herstellung; Vorrichtungen; Kontakt; Gefäßsystem, implantierbar, extrakorporal

(57) Es wird ein biokompatibler, thromboresistenter Stoff beschrieben, der für implantierbare und extrakorporale Vorrichtungen mit Kontakt zum Gefäßsystem geeignet ist sowie Verfahren zu dessen Herstellung. Der biokompatible, thromboresistente Stoff besteht aus einem synthetischen, biokompatiblen Material, wenigstens einer biokompatiblen Basisschicht, die an wenigstens eine Oberfläche des Materials gebunden ist, und einen Thrombogenese-Inhibitor, der an die Basisschicht über eine Komponente, die zur Bindung des Inhibitors befähigt ist, gebunden ist. Der Thrombogenese-Inhibitor ist Hirudin oder eine aktive, analoge Verbindung oder ein Fragment davon.

Patentansprüche:

1. Ein biokompatibler, thromboresistenter Stoff, **gekennzeichnet dadurch**, daß er aus
 - (a) einem synthetischen, biokompatiblen Material;
 - (b) wenigstens einer biokompatiblen Basisschicht, die an wenigstens eine Oberfläche dieses Materials gebunden ist; und
 - (c) einem Thrombogenese-Inhibitor, der an diese Basisschicht immobilisiert ist, besteht, wobei der Inhibitor Hirudin oder eine aktive analoge Verbindung oder ein Fragment davon ist, wobei die Basisschicht eine Komponente enthält, die in der Lage ist, den besagten Thrombogenese-Inhibitor zu binden und wobei dieser Inhibitor eine die Thrombogenese inhibierende Wirkung aufweist, wenn er immobilisiert ist.
2. Stoff entsprechend Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Stoff ein Polymer ist.
3. Stoff nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Polymer Dacron, Nylon, Polyurethan, vernetztes Kollagen, Polyglykolsäure, Polytetrafluorethylen oder Gemische davon ist.
4. Stoff nach Anspruch 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Polymer Dacron ist.
5. Stoff nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Basisschicht aus einer Komponente aus der folgenden Gruppe oder aus Gemischen davon besteht: Protein, Peptid, Lipoprotein, Glykoprotein, Glycosaminoglycan, Hydrogel, synthetisches Polymer.
6. Stoff nach Anspruch 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Komponente der Basisschicht aus einem Protein besteht.
7. Stoff nach Anspruch 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Protein aus der folgenden Gruppe oder Gemischen davon ausgewählt wurde: Serumalbumin, Fibronectin.
8. Stoff nach Anspruch 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Protein Rinderserumalbumin ist.
9. Stoff nach Anspruch 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Protein Humanserumalbumin ist.
10. Stoff nach Anspruch 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Protein Rinderfibronectin ist.
11. Stoff nach Anspruch 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Protein humanes Fibronectin ist.
12. Stoff nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß er weiterhin ein bifunktionelles Vernetzungsreagens enthält, welches den Thrombogenese-Inhibitor mit der Basisschicht verbindet.
13. Stoff nach Anspruch 12, **gekennzeichnet dadurch**, daß das bifunktionelle Vernetzungsreagens heterobifunktionell ist.
14. Stoff nach Anspruch 12, **gekennzeichnet dadurch**, daß das bifunktionelle Vernetzungsreagens homobifunktionell ist.
15. Stoff nach Anspruch 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß das heterobifunktionelle Vernetzungsreagens SPDP ist.
16. Verfahren zur Herstellung eines biokompatiblen, thromboresistenten Stoffes, **gekennzeichnet dadurch**, daß es in folgenden Schritten durchgeführt wird: -
 - I. (a) Immobilisierung wenigstens einer Basisschicht auf wenigstens einer Oberfläche eines synthetischen, biokompatiblen Materials, wobei diese Basisschicht eine Komponente enthält, die in der Lage ist, einen Thrombogenese-Inhibitor zu binden; und
 - (b) Immobilisierung dieses Thrombogenese-Inhibitors an der Basisschicht, wobei der Inhibitor Hirudin oder eine aktive, analoge Verbindung oder ein Fragment davon ist und der eine Thrombogenese-Inhibitor-Aktivität aufweist, wenn er immobilisiert ist oder
 - II. (a) Immobilisierung eines Thrombogenese-Inhibitors an eine Basisschicht, wobei dieser Inhibitor Hirudin oder eine aktive, analoge Verbindung oder ein Fragment davon ist und dieser in immobilisierter Form eine thrombogeneseinhibierende Wirkung aufweist und die Basisschicht eine Komponente enthält, die in der Lage ist, den Thrombogenese-Inhibitor zu binden; und
 - (b) Immobilisierung der Basisschicht mit daran gebundenem Thrombogenese-Inhibitor an wenigstens eine Oberfläche eines synthetischen, biokompatiblen Materials.
17. Verfahren nach Anspruch 16, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Schritt der Immobilisierung folgendermaßen durchgeführt wird:
 - (a) Aktivierung des Materials, so daß die Bindungsfähigkeit für die Basisschicht vergrößert wird; und
 - (b) In-Kontakt-Bringen dieses aktivierten Materials mit der Basisschicht innerhalb einer Zeit, die ausreichend ist, die Komponente der Basisschicht an das aktivierte Material zu binden.

18. Verfahren nach Anspruch 16, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Immobilisierungsschritt darin besteht, eine Basisschicht an wenigstens eine Oberfläche des Materials zu binden, wobei diese Basisschicht eine Komponente enthält, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt wurde: Protein, Peptid, Lipoprotein, Glykoprotein, Hydrogel, Glucosaminoglykan, synthetisches Polymer sowie Gemischen davon.
19. Verfahren nach Anspruch 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Immobilisierungsschritt weiterhin darin besteht, eine Basisschicht, die ein Protein enthält, an wenigstens eine Oberfläche des Materials zu binden.
20. Verfahren nach Anspruch 19, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Immobilisierungsschritt weiter darin besteht, daß eine Basisschicht an wenigstens eine Oberfläche des Materials gebunden wird, wobei die Basisschicht ein Protein aus der folgenden Gruppe enthält: Serumalbumin, Fibronectin oder Gemische davon.
21. Verfahren nach Anspruch 20, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Immobilisierungsschritt weiter darin besteht, eine Basisschicht, die Humanserumalbumin enthält, an wenigstens eine Oberfläche des Materials zu binden.
22. Verfahren nach Anspruch 20, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Immobilisierungsschritt weiter darin besteht, eine Basisschicht, die Rinderserumalbumin enthält, an wenigstens eine Schicht des Materials zu binden.
23. Verfahren nach Anspruch 20, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Immobilisierungsschritt weiter darin besteht, eine Basisschicht, die humanes Fibronectin enthält, an wenigstens eine Oberfläche des Materials zu binden.
24. Verfahren nach Anspruch 20, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Immobilisierungsschritt weiter darin besteht, eine Basisschicht, die Rinderfibronectin enthält, an wenigstens eine Oberfläche des Materials zu binden.
25. Verfahren nach Anspruch 17, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Aktivierungsschritt aus den folgenden Stufen besteht:
 - (a) Behandlung des Materials mit einer Lösung, die wenigstens eine chemisch reaktive Gruppe zu Bindungszwecken in dem Material zur Verfügung stellt; und
 - (b) In-Kontakt-Bringen des so behandelten Materials mit einer Lösung, die ein bifunktionelles Vernetzungsreagens enthält, wobei dieser Kontakt eine hinreichende Zeit stattfindet, so daß die chemisch reaktive Gruppe an das Reagens gebunden wird.
26. Verfahren nach Anspruch 25, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Behandlungsschritt weiter darin besteht, daß das Material mit einer Lösung behandelt wird, durch die wenigstens eine chemisch reaktive Gruppe in diesem Material zur Verfügung gestellt wird, wobei diese chemisch reaktive Gruppe eine Carbonsäuregruppe ist.
27. Verfahren nach Anspruch 16, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine Vorstufenreaktion durchgeführt wird, in der das Material mit einer Lösung in Kontakt gebracht wird, durch die Verunreinigungen auf diesem entfernt werden, wobei diese Vorstufenreaktion vor dem Immobilisierungsschritt durchgeführt wird.
28. Verfahren nach Anspruch 16, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Immobilisierungsschritt weiter in den folgenden Stufen besteht:
 - (a) Der Thrombogenese-Inhibitor wird mit wenigstens einem Molekül eines bifunktionellen Vernetzungsreagens eine solche Zeit in Kontakt gebracht, daß dieses Reagens mit dem Thrombogenese-Inhibitor umgesetzt wird; und
 - (b) der Komplex aus Thrombogenese-Inhibitor und daran gebundenem Reagens wird an die Basisschicht gebunden, wobei der gebundene Thrombogenese-Inhibitor Thrombogenese-Aktivität aufweist.
29. Verfahren nach Anspruch 28, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Schritt des In-Kontakt-Bringens weiter darin besteht, daß die Basisschicht mit wenigstens einem Molekül des bifunktionellen Vernetzungsreagens eine ausreichende Zeit in Kontakt gebracht wird, so daß dieses Reagens an die Basisschicht gebunden wird und daß der genannte Bindungsschritt weiter die Bindung des Komplexes aus Thrombogenese-Inhibitor und daran gebundenem Reagens an die Basisschicht einschließt.

30. Verfahren nach Anspruch 28, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Schritt des In-Kontakt-Bringens weiter einschließt, daß der genannte Thrombogenese-Inhibitor mit wenigstens einem Molekül des genannten bifunktionellen Vernetzungsreagenzes in Kontakt gebracht wird, wobei das Vernetzungsreagens unter den heterobifunktionellen Vernetzungsreagenzien, homobifunktionellen Vernetzungsreagenzien und Gemischen davon ausgewählt wird.
31. Verfahren nach Anspruch 29, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Schritt des In-Kontakt-Bringens einschließt, daß die Basisschicht mit wenigstens einem Molekül eines bifunktionellen Vernetzungsreagenzes in Kontakt gebracht wird, das unter den heterobifunktionellen Vernetzungsreagenzien, homobifunktionellen Vernetzungsreagenzien und deren Gemischen ausgewählt wird.
32. Verfahren nach Anspruch 31, **gekennzeichnet dadurch**, daß es weiter die folgenden Schritte enthält:
 - (a) Reduktion des an die Basisschicht gebundenen Reagenzes, um darauf Sulfhydrylgruppen zu erzeugen;
 - (b) Zugabe von Inhibitor mit daran gebundenem Reagens an die auf der Basisschicht befindlichen Sulfhydrylgruppen; und
 - (c) Induktion einer Substitutionsreaktion, die diese Sulfhydrylgruppen und das an den Inhibitor gebundene Reagens einschließt, wobei diese Reaktion zu einer Bindung der Basisschicht an den Inhibitor führt.
33. Verfahren nach Anspruch 30, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Schritt des In-Kontakt-Bringens beinhaltet, daß der Thrombogenese-Inhibitor mit dem heterobifunktionellen Vernetzungsreagens SPDP in Kontakt gebracht wird.
34. Verfahren nach Anspruch 31, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Schritt des In-Kontakt-Bringens einschließt, daß der Thrombogenese-Inhibitor mit dem heterobifunktionellen Vernetzungsreagens SPDP in Kontakt gebracht wird.
35. Verfahren nach Anspruch 28, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein zusätzlicher Schritt durchgeführt wird, der darin besteht, den Komplex aus Thrombogenese-Inhibitor und daran gebundenem Vernetzungsreagens einer chromatographischen Prozedur zu unterwerfen, um darin befindliche Verunreinigungen zu entfernen, wobei dieser zusätzliche Schritt nach dem Schritt des In-Kontakt-Bringens und vor dem Bindungsschritt durchgeführt wird.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Das Anwendungsgebiet dieser Erfindung sind Stoffe für Gefäßprothesen und insbesondere biokompatible, thromboresistente Stoffe und Verfahren zu ihrer Herstellung.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Der Kontakt von Blut mit synthetisch hergestellten Oberflächen führt in der Regel zur Ablagerung einer Schicht von daran gebundenen Plättchen, was mit der Aktivierung des inneren Koagulationssystems verbunden ist und schließlich zur Bildung eines Thrombus führt. So kann schon bei einer einzigen Passage von Blut durch eine implantierte Arterienprothese eine signifikante Wechselwirkung zwischen Blut und dem Material eintreten. Die Blutproteintypen, die anfänglich absorbiert oder an die Oberfläche des synthetischen Materials gebunden werden, können Proteine einschließen, die im Zusammenhang mit der Kontakt-Koagulation stehen. Die Kontakt-Koagulation oder der äußere Koagulationsverlauf ist ein komplexer Ablauf biochemische Vorgänge, der unter anderem die Fibrinbildung, die Plättchen- und Komplementäraktivierung, die Chemotaxis, Kininerzeugung und die Aktivierung fibrinolytischer Komponenten einschließt. Zusätzlich dazu schließt jeder dieser Vorgänge nachfolgende biochemische Vorgänge ein, die oftmals durch negative und positive zurückführende Kreisläufe gesteuert werden. So ist die durch den Kontakt mit künstlich hergestellten Stoffen induzierte Thrombose ein Haupthindernis bei der Entwicklung und Verwendung innerer Prothesen und außerhalb des Körpers angeordneter Vorrichtungen, z.B. synthetisch hergestellter Behälter und Organe, sowie von Herz-Lungen-Maschinen-Verbindungen und Ausrüstungen für die Hämodialyse. Stoffe mit einem unterschiedlichen Grad an Thromboresistenz wurden als Gefäßprothesen mit begrenztem Erfolg eingesetzt. Stoffe dieser Art schließen korrodierende (selbstreinigende) Metalle, synthetische Polymere wie Polydimethylsiloxan, Teflon, Acrylate und Methacrylate wie Dacron, Elektrete, anionische Copolymere und Hydrogele ein (als Übersichtsartikel siehe Salzmann et al. [1987] in Hemostasis und Thrombosis, Basis Principles and Clinical Practice [Herausgeber: Coleman et al.], J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, Seiten 1335–1347). Um die Chancen des Auftretens einer Thrombose auf Grund eines über längere Zeit andauernden Kontaktes mit solchen künstlich hergestellten Stoffen zu vermindern, wurden die Patienten mit systemisch verabreichten Antikoagulantien, der Plättchenbildung entgegenwirkenden Mitteln und Thrombose auflösenden Mitteln behandelt. Diese Mittel schließen solche

Verbindungen ein, die selektiv die Thromboxan-Synthese inhibieren, ohne die Prostacyclin-Synthese zu beeinflussen, die die Plättchenadhäsion sowie deren Aggregation und Freisetzung beeinflussen, die die vaskuläre Produktion des PGI₂ verstärken und/oder sowohl die thrombin- als auch die thromboxanbeeinflusste Plättchen-Aggregation inhibieren. Solche Verbindungen sind unter anderem Aspirin, Sulfinpyrazon, Dipyridamol, Ticlopidin und Suloctidil. Die Behandlung mit diesen Medikamenten führt jedoch oftmals zu unerwünschten Nebenwirkungen, einschließlich systematischer Hämorrhagie und zu der Unfähigkeit, innerhalb des Körpers an anderer Stelle eine erwünschte Pfropfbildung von Plättchen zu initiieren und zu komplettieren. Zur Verbesserung der Thromboresistenz synthetisch hergestellter Stoffe wurden biologisch aktive Moleküle mit thrombolytischer, Antikoagulan-, thromboseinhibierender Wirkung und/oder plättcheninhibierender Wirkung an diese gebunden. So wurde z. B. Heparin an künstlich hergestellte Oberflächen gebunden, um die Koagulation durch die Aktivierung der verschiedensten Inhibitoren des inneren Koagulationssystems zu aktivieren (Salzmann et al. [1987] in Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 2nd Ed., [Herausgeber Colman et al.], Lippincott Co., Philadelphia, PA, USA, Seiten 1335–1347). Heparin verstärkt jedoch die Reaktion der Plättchen auf Stimuli wie ADP oder Kollagen und unterstützt zwei entgegengerichtete primäre Reaktionen des Blutes gegenüber synthetisch hergestellten Oberflächen: Plättchenadhäsion und -aggregation. Zusätzlich dazu, obwohl der an der Oberfläche gebundene Heparin-/Antithrombin-Komplex gegenüber Plättchen passiv sein kann, erhebt sich auf Grund einer Vielzahl der Wirkungen, die er auf die Wechselwirkung mit dem Wachstumsfaktor für Endothelzellen, die Inhibierung der Proliferation des glatten Muskelgewebes und der Aktivierung der Lipoprotein-Lipase hat, die Frage, welche negativen Wirkungen er über der Zeit induzieren kann. Gegen die Plättchenhäufung gerichtete Mittel wie PGE₁, PGI₂ (nur in Experimenten), cyclisches AMP und Aspirin wurden ebenfalls an die Oberflächen fester Polymerer gebunden. Diese Mittel wirken der Freisetzung von Plättchenfaktoren entgegen, die der Heilung entgegenwirkende Reaktionen in der Umgebung eines implantierten Gefäßes stimulieren. Sie können auch die durch die Plättchen unterstützte Bildung von Thromben durch Inhibierung der Plättchenadhäsion reduzieren. Eine Vielzahl von synthetisch hergestellten Oberflächen wurde vor dem Kontakt in Gefäßen mit Albumin in Kontakt gebracht, was zu einer verminderten Reaktivität mit den Plättchen führt (NIH Publication No. 85-2185, September 1985, Seiten 19–63). Aus diesem Grunde wurde Albumin zur Beschichtung von extrakorporalen Oberflächen vor der Chirurgie mit Herz-Lungen-Gefäß-Bypass verwendet. Durch dieses Verfahren wurde jedoch keine thermische Stabilität über längere Zeiträume erreicht. Durch Kusserow et al. (Trans. Amer. Soc. Artif. Organs [1971], 17, 1) wurden fibrinolytisch aktive Streptokinase und Urokinase allein oder in Kombination mit Heparin an synthetisch hergestellte Oberflächen gebunden. Diese Enzyme reduzieren übermäßige Fibrinabsonderung und/oder thrombotische Einschlüsse. Bisher wurde jedoch ihre Fähigkeit, über längere Zeiträume Thromboresistenz auf eine synthetisch hergestellte Oberfläche zu übertragen, nicht bestimmt. Weiterhin wurden oberflächenaktive Stoffe wie Pluronic F-68 auf synthetisch hergestellten Oberflächen immobilisiert; es scheint jedoch, daß diese keine Blutkompatibilität über längere Zeiträume ergeben (Salzer et al. [1971], Medical Applications of Plastics, Biomed. Materials Res. Symp. [Herausgeber: Gregor], No. 1, Seite 105 ff.) Deshalb besteht ein Bedarf an verbesserten biokompatiblen Stoffen, die über längere Zeiträume thromboresistent sind und deren aktive Bestandteile zu keinen unerwünschten Nebenreaktionen führen.

Ziel der Erfindung

Durch die Erfindung wird ein synthetischer, biokompatibler, thromboresistenter Stoff zur Verfügung gestellt, der für implantierbare und extrakorporale Vorrichtungen, die im Kontakt mit Körperflüssigkeiten stehen, geeignet ist. Des weiteren wird ein immobilisierter Thrombogenese-Inhibitor zur Verfügung gestellt, der biologisch aktiv ist, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Außerdem wird ein Verfahren zur Inhibierung der Plättchen-Aggregation, der Freisetzung von Plättchen-Faktoren und Thrombogenese am lokalisierten Ort des Transplantats oder an der Prothese-Blut-Grenzfläche zur Verfügung gestellt und damit die systemische Wirkung von gegen die Plättchenhäufung oder die Thrombose gerichtete Medikamente vermieden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, biokompatible, thromboresistente Stoffe aufzufinden und Verfahren zu deren Herstellung zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß werden Stoffe und Verfahren zur Verbesserung von biokompatiblen, thromboresistenten Materialien beschrieben, die als eine Komponente implantierbarer oder extrakorporaler Vorrichtungen, die im Kontakt mit Blut stehen, geeignet sind. Es wurde entdeckt, daß ein synthetisches, biokompatibles Material in einen thromboresistenten Stoff umgesetzt werden kann, wenn auf ihm durch eine aufgebrachte Beschichtung der Thrombogenese-Inhibitor Hirudin oder eine aktive analoge Verbindung oder ein Fragment davon in einer solchen Art und Weise immobilisiert wird, daß dessen, die Thrombogenese inhibierende, Aktivität nicht beeinflußt wird.

Der Begriff „Thrombogenese-Inhibitor“ wird hierin verwendet, um ein natürliches, synthetisches oder rekombinantes Protein oder ein Fragment davon zu beschreiben, das die physikalischen und biochemischen Charakteristika von Hirudin aufweist. Synthetische Stoffe im Sinne dieser Erfindung sind vorzugsweise Polymere wie Dacron, Nylon, Polyurethan, vernetztes Kollagen, Polytetrafluorethylen, Polyglykolsäure und Gemische davon, das am meisten bevorzugte Material ist Dacron. Andere synthetisch hergestellte Stoffe können auch verwendet werden.

Wenigstens eine Schicht eines biokompatiblen Materials wird auf wenigstens einer Oberfläche des synthetisch hergestellten Materials aufgebracht. Diese grundierende Beschichtung (Basisschicht) enthält eine Komponente, die in der Lage ist, den Thrombose-Inhibitor zu binden. Beispiele für solche Beschichtungsmaterialien sind unter anderem Proteine, Peptide, Lipoproteine, Glykoproteine, Glykosaminoglykane, Hydrogele, synthetische Polymere und Gemische davon. In bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung enthält diese Basisschicht eine Proteinkomponente wie Serumalbumin oder Fibrinectin von z. B. humanen oder Rinderseren oder Gemische solcher Proteine. Andere Stoffe können auch zur Herstellung dieser Basisschicht verwendet werden.

Erfindungsgemäß wird der Thrombogenese-Inhibitor auf dem synthetisch hergestellten Material über eine Basisschicht immobilisiert, die wenigstens an eine Oberfläche des synthetisch hergestellten Materials gebunden ist. Diese Basisschicht enthält eine Komponente, die in der Lage ist, den Thrombogenese-Inhibitor zu bilden, ohne die biologische Aktivität des Inhibitors negativ zu beeinflussen.

Beispielhaft für diese Erfindung wird das synthetisch hergestellte Material vor dem Aufbringen der Basisschicht aktiviert, um dadurch seine Fähigkeit zur Bindung der Basisschicht zu erhöhen. So wird z. B. nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung das synthetisch hergestellte Material mit einer Lösung in Kontakt gebracht, durch die wenigstens eine chemisch aktive Gruppe (z. B. eine Carbonsäuregruppe) in dem Material zur Verfügung gestellt wird und dadurch ein bifunktionelles Vernetzungsreagens gebunden wird (z. B. ein Carbodiimid). Das so behandelte Material wird dann mit einer Lösung in Kontakt gebracht, die das als Vernetzungsreagens dienende Carbodiimid enthält, und diese so lange einwirken lassen, daß die chemisch aktiven Gruppen damit eine Bindung ausbilden können.

Entsprechend einer weiteren Ausführungsform kann das synthetisch hergestellte Material mit einer Lösung in Kontakt gebracht werden, die darin und/oder darauf enthaltene Verunreinigungen vor dem beschriebenen Aktivierungsschritt entfernt. Der Immobilisierungsschritt kann so ausgeführt werden, daß zunächst der Thrombogenese-Inhibitor mit wenigstens einem Molekül eines bifunktionellen Vernetzungsreagens innerhalb einer Zeit, die ausreicht, so daß das Reagens mit dem Inhibitor reagieren kann, in Kontakt gebracht wird und anschließend der Komplex aus an den Inhibitor gebundenem Reagens an die Basisschicht gebunden wird. Der gebundene Thrombogenese-Inhibitor behält seine Thrombose inhibierende Aktivität, wenn er an das Reagens gebunden wird. Das bifunktionelle Vernetzungsreagens, das für einen solchen Immobilisierungsschritt geeignet ist, kann ein heterobifunktionelles Reagens (z. B. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat, SPDP), ein homobifunktionelles Reagens (z. B. Ethylenglykol-bis(succinimidylsuccinat, EGS) oder ein Gemisch beider sein.

Der Begriff „bifunktionelles Vernetzungsreagens“ wird hierin als ein Molekül definiert, das die Fähigkeit aufweist, sich an zwei reaktive Gruppen zu binden und diese dadurch zu verbinden, z. B. ein Molekül oder zwei getrennte Moleküle. Wenn das bifunktionelle Vernetzungsreagens durch zwei unterschiedliche Typen von Gruppen bindet, ist es ein „heterobifunktionelles“ Vernetzungsreagens. Wenn jedoch das bifunktionelle Vernetzungsreagens nur zwei gleiche Gruppen miteinander verbindet, ist es ein „homobifunktionelles“ Vernetzungsreagens.

Vor dem Bindungsschritt kann das an den Thrombogenese-Inhibitor gebundene Reagens chromatographischen Verfahren unterworfen werden, um damit vermischte Verunreinigungen abzutrennen. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die an das synthetisch hergestellte Material gebundene Basisschicht zur gleichen Zeit an wenigstens ein Molekül eines bifunktionellen Vernetzungsreagens gebunden sein. Entsprechend dieser Ausführungsform schließt dieses Verfahren weiter die Bindung des Komplexes des an den Thrombogenese-Inhibitor gebundenen Vernetzungsreagens an das an die Basisschicht gebundene Vernetzungsreagens ein, wodurch der Thrombogenese-Inhibitor an die auf dem synthetisch hergestellten Material befindliche Basisschicht gebunden wird.

Entsprechend einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung wird das an die Basisschicht gebundene Reagens vor dem Bindungsschritt reduziert. Durch die Reduktion werden aus dem Reagens auf der Basisschicht Sulfhydrylgruppen gebildet, die mit dem an den Inhibitor gebundenen bifunktionellen Vernetzungsreagens über eine Substitutionsreaktion reagieren können, wodurch eine S-S-Bindung gebildet und wodurch der Thrombogenese-Inhibitor kovalent an die Basisschicht gebunden wird. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Basisschicht an den Thrombogenese-Inhibitor gebunden, bevor diese selbst an das synthetisch hergestellte, biokompatible Material gebunden wird.

Die Erfindung wird im Folgenden im Zusammenhang mit verschiedenen erläuterten Ausführungsformen beschrieben. Es sollte jedoch klar sein, daß die verschiedensten Modifizierungen, Zusätze und Auslassungen vorgenommen werden können, ohne daß vom Geist und vom Umfang dieser Erfindung abgewichen wird.

Die vorstehend genannten sowie weitere Gegenstände dieser Erfindung, sowohl deren verschiedenste Ausführungsformen als auch die darin enthaltenden Erfindungen können vollständiger verstanden werden, wenn die folgende Beschreibung zusammen mit den beigefügten Zeichnungen gelesen wird. In diesen ist

- die Abbildung 1 eine schematische Darstellung der Vorgänge, die bei der Thrombogenese ablaufen;
- die Abbildung 2 eine schematische Darstellung der Beteiligung der Plättchen bei der Thrombogenese; und
- die Abbildung 3 eine schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des natürlichen Hirudins.

Durch diese Erfindung werden biokompatible, thromboseresistente Stoffe zur Verfügung gestellt, die für implantierbare und extrakorporale Vorrichtungen, die im Kontakt mit dem Gefäßsystem stehen, geeignet sind sowie Verfahren zu deren Herstellung. Die durch diese Erfindung zur Verfügung gestellten Stoffe schließen synthetisch hergestellte, biokompatible Materialien ein, an die die Thrombogenese inhibierenden Reagenzien über eine biokompatible Basisschicht, die auf der Oberfläche dieses Stoffes aufgebracht worden ist, gebunden werden.

Ein Stoff, der für eine extrakorporale prothetische Vorrichtung oder für eine implantierbare Vorrichtung geeignet ist, kann aus einem beliebigen biokompatiblen, synthetisch hergestellten Material aufgebaut sein, vorzugsweise aus einem polymeren Material, das eine ausreichende Zugfestigkeit aufweist, um den Belastungen durch den Blutkreislauf zu widerstehen, und das Gruppen aufweist, an die eine Basisschicht direkt oder indirekt gebunden werden kann. Beispiele für solche synthetisch hergestellten Materialien sind Polytetrafluorethylen (Teflon) und Dacron, Nylon und so weiter. Dieses Material kann beliebige Dimensionen aufweisen, die für den vorgesehenen Anwendungszweck geeignet sind. So kann es z. B. ein integraler Teil einer Herzklappe oder einer extrakorporalen Vorrichtung zur Hämodialyse oder für By-passes in der Gefäßchirurgie sein, oder es kann zur Beschichtung von Kathetern oder zur Auskleidung der inneren Oberfläche von Gefäßprothesen verwendet werden.

Das synthetisch hergestellte Material kann durch die Herstellung, durch die Beschichtung oder an sich verschiedene, nicht kovalent gebundene Verunreinigungen enthalten, deren Abtrennung eine Voraussetzung für das Aufbringen der Basisschicht sein kann. So können z. B. Gleitmittel, die auf handelsüblichem Dacron vorhanden sind, dadurch entfernt werden, daß das Dacron mit einer Lösung, die z. B. die unterschiedlichsten oberflächenaktiven Mittel enthält, mit Lösungsmitteln oder Salzlösungen in Kontakt gebracht wird, die diese Verunreinigungen ablösen und/oder in Lösung überführen.

In den Tabellen 1 und 2 werden repräsentative Verfahren zur Herstellung des biokompatiblen, thromboseresistenten Stoffes aufgeführt, worin sich „Da“ auf ein synthetisch hergestelltes Material bezieht, das aus gewebten Dacron-Fasern aufgebaut ist, und worin „HSA“ Humanserumalbumin bedeutet.

Tabelle 1

Stufe	Verfahrensschritt
1	Da. + NaOH — Da-COOH
2	Da-COOH + EDC — Da-EDC
3	Da-EDC + HSA — Da-HSA + Harnstoff (Nebenprodukt aus EDC)
4	Da-HSA + SPDP — Da-HSA-SDPD
5	Da-HSA-SDPD + DTT — Da-HSA-SH + P-2-T
6	Inhibitor + SDPD — Inhibitor-SDPD
7	Da-HSA-SH + Inhibitor-SDPD — Da-HSA-S-S-Inhibitor + P-2-T

Tabelle 2

Stufe	Verfahrensschritt
1	HSA + SPDP — HSA-SDPD
2	HSA-SDPD + DTT — HSA-SH + P-2-T
3	Inhibitor + SPDP — Inhibitor-SDPD
4	HSA-SH + Inhibitor-SDPD — HSA-S-S-Inhibitor + P-2-T
5	Da + NaOH — Da-COOH
6	Da-COOH + EDC — Da-EDC
7	Da-EDC + HSA-S-S-Inhibitor — Da-HSA-S-S-Inhibitor + Harnstoff (Nebenprodukt aus EDC)

Das Material kann in einem ersten Schritt aktiviert werden, um die Bindungsfähigkeit der Basisschicht zu erhöhen. Dieser Aktivierungsschritt erhöht die Anzahl aktiver Gruppen im Material. So kann z. B. eine alkalische Hydrolyse durchgeführt werden, um die Anzahl der reaktiven Carbonsäuregruppen im Dacron zu erhöhen, und an diese Gruppen können dann funktionelle Vernetzungsreagenzien wie Carbodiimide gebunden werden. Schließlich wird die Basisschicht an die an das Material gebundenen Carbodiimidgruppen gebunden. Dieses Verfahren muß jedoch sorgfältig durchgeführt werden, da durch die alkalische Hydrolyse das Dacron teilweise abgebaut wird, wodurch die Fasern dieses Materials äußerlich abgetragen werden. Wenigstens eine Basisschicht wird an wenigstens eine Oberfläche des synthetisch hergestellten Materials gebunden. Diese Schicht, die entweder an das Material gebunden oder nicht gebunden ist, stellt Komponenten zur Bindung des Thrombogene-Inhibitors zur Verfügung. Diese Art von Komponenten weist mehr Bindungsstellen für den Inhibitor auf als das synthetisch hergestellte Material selbst, so daß dadurch die Menge an Inhibitor, die gebunden werden kann, vergrößert wird. Geeignete Komponenten sind u. a. Proteine, Peptide, Lipoproteine, Glykoproteine, Glycosaminoglykane, synthetische Polymere und Gemische davon. Besonders geeignet für diesen Zweck sind Proteine wie Serumalbumin und Fibrinogen, da von ihnen bekannt ist, daß sie selbst antithrombogene Eigenschaften aufweisen und daher als Komponenten in der Basisschicht sehr erwünscht sind (Lyman et al. [1965] Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 11, 301; Falb et al. [1971] Fed. Proc. 30, 1168). Ein HSA-Molekül hat z. B. 65 Aminogruppen, die als Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Die Bindung der Basisschicht an die synthetisch hergestellte Oberfläche kann kovalent sein. Die Verfahren zur kovalenten Bindung von Proteinen an Dacron schließen den Angriff der freien, reaktiven Succinimidestergruppen des Vernetzungsreagenzes auf die primäre Aminogruppe eines Proteins ein. Wie im Beispiel in der Tabelle 1 dargestellt wurde, wird das Dacron zu der kovalenten Bindung der Basisschicht an das Dacron mit 0,5N NaOH behandelt und dann mit Carbodiimid umgesetzt, bevor es mit HSA (Basisschicht) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) beschichtet wird. Anschließend wird ein Thrombogene-Inhibitor, der zur Beschichtung einer Oberfläche, die in Kontakt mit Blut, Körperflüssigkeiten oder Geweben steht, geeignet ist, über die Komponente kovalent an die Basisschicht gebunden. Durch Inhibitoren beschichtete Stoffe sind ideal für die Verwendung als Implantate in Vorrichtungen, die im direkten Kontakt mit Blut stehen. Zum Beispiel füllen sich By-pass-Implantate, die zum Ersetzen von Blutgefäßen verwendet werden, oftmals mit Blutpfropfen oder Thromben, was zu einem eingeschränkten Blutdurchfluß führt. Da das durch einen Inhibitor beschichtete Material gegenüber der Bildung von Blutpfropfen resistent ist, werden Thrombosen und diesen folgende Blockierungen dieses By-pass-Implantates verhindert. Ebenso bilden sich oftmals Blutpfropfen auf der äußeren Oberfläche von Kathetern, wenn diese Katheter in das Gefäßsystem zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken eingeführt werden. Der Blutpfropfen kann durch das fließende Blut vom Katheter abgewaschen oder durch die Manipulationen mit dem Katheter gelöst werden, wodurch die Möglichkeit einer Embolie und einer Blockierung der Blutzirkulation in lebenswichtigen Organen erhöht wird. Durch Inhibitoren beschichtete Stoffe weisen ähnliche Vorteile für künstliche oder implantierte Herzklappen, im Inneren von Aorten angeordnete Ballonpumpen, vollständige oder partiell künstliche Herzen oder Herzschrittmacher, intracavale Vorrichtungen und andere Vorrichtungen, die in Kontakt mit dem Blutkreislauf stehen, auf. Zusätzlich dazu weisen die durch Inhibitoren beschichteten Vorrichtungen Vorteile bei in Körperhölräume eingeführten Vorrichtungen auf, z. B. bei intraperitonealen Dialyse-Kathetern und subcutanen Implantaten, wobei die durch eine Thrombogene induzierten Entzündungsreaktionen vermindert werden können. Für diese Zwecke geeignete Thrombogene-Inhibitoren sind unter anderen Hirudin und aktive analoge Verbindungen, Fragmente, Derivate und Fusionsprodukte davon oder deren Gemische. Hirudin ist ein Protein, das aus der Saliva von Blutegeln gewonnen wird; seine Aminosäuresequenz wird in Abbildung 3 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, daß Hirudin die Adhäsion von Plättchen reduziert, eine Eigenschaft, die möglicherweise der Art seiner Wirkung auf Thrombin zuzuschreiben ist. Allein diese Eigenschaft macht Hirudin zu einem außerordentlich attraktiven Antikoagulant, wenn Oberflächen synthetisch hergestellter Stoffe im Kontakt mit Blut stehen. Es inhibiert auch selektiv die Fähigkeit des Thrombins, proteolytisch, mitogen gegenüber Fibroblasten zu wirken, Plättchen zu aktivieren und weist chemostatische Eigenschaften für Monocyten und polymorphonucleare Leukozyten auf. Zusätzlich dazu kann der immobilisierte Hirudin-Thrombin-Komplex die Ereignisse der durch Thrombin hervorgerufenen Chemotaxis herunterregeln. Das ist ein bedeutungsvoller Vorgang, da sich chronische Entzündungen durch die Freisetzung von abbauenden Enzymen und Peroxiden in dem gesamten Implantat durch polymorphonucleare Leukozyten einstellen können, die ihre Wirkungen an den Anastomose-Orten zeigen und dadurch zu einer anastomotischen Hyperplasie beitragen.

Eine Anzahl synthetischer und rekombinanter Hirudin-Analoga existieren (z. B. CGP39393, das durch Rekombinanten-DNS-Technik von der Ciba-Geigy, Basel, Schweiz, hergestellt wird; PCT WO 79/00.638; PCT WO 86/03.517), die wenigstens gleichermaßen beim Einsatz als Thrombogenese-Inhibitoren geeignet sind. Der Thrombogenese-Inhibitor ist auf der Basisschicht direkt oder indirekt durch die Verwendung eines bifunktionellen Vernetzungsreagenzes gebunden. Insbesondere sind heterobifunktionelle Vernetzungsreagenzien, die zwei unterschiedliche reaktive Gruppen an jedem Ende eines linearen Moleküls aufweisen und deshalb zwei verschiedene reaktive Gruppen an anderen Molekülen oder unterschiedliche Bereiche des gleichen Moleküls binden können, als bifunktionelle Vernetzungsreagenzien am geeignetsten. So besitzen z. B. photoreaktive Vernetzer wie Sulfo-succinimidyl-2-(m-azido-o-nitrobenzamid)ethyl-1,3'-di-thiopropionat (SAND) oder N-Succinimidyl-6-(4-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoat (SANPAH) eine photoreaktive Gruppe, die direkt in C-H-Bindungen der Basisschicht durch photochemische Kopplung eingeführt werden kann, während die zweite Gruppe frei bleibt und dann Proteine binden kann. Weitere geeignete und bevorzugte Vernetzungsreagenzien (z. B. SPDP) und ihre Eigenschaften sind in der Tabelle 3 zusammengestellt. In der Tabelle 3 ist die „Double Agent Number“, die für jedes Reagens aufgeführt ist, die handelsübliche Bezeichnung für das Reagens, wie es von der Firma Pierce Chemical Co. (Rockford, Illinois, USA) vertrieben wird.

Tabelle 3: Vernetzungsreagenzien

Double Agent Number	Double Agent Synonym	Bifunktionalität		Reaktiv gegenüber		photoreaktiv
		Homo	Hetero	NH ₂	SH	
21551	ANB-NOS		x	x		x
20106	APB		x		x	x
20107	APG		x			x
21559	APTP		x		x	x
21579	BS ³	x		x		
22319	BMH	x			x	
21554	BGOCOES	x		x		
21524	DFDNB	x		x		
20047	DIDS	x		x		
20664	DMA	x		x		
20666	DMP	x		x		
20668	DMS	x		x		
22585	DSP	x		x		
21555	DSS	x		x		
20590	DST	x		x		
20665	DTBP	x		x		
22590	DTBPA	x				x
21577	DTSSP	x		x		
21550	EADS		x	x		x
21565	EGS	x		x		
23700	FNPA		x	x		x
21560	HSAB		x	x		x
26095	MABI		x	x		x
22310	MBS		x	x	x	
27715	NHS-ASA		x	x		x
20669	PNP-DTP		x	x		x
21552	SADP		x	x		x
21549	SAND		x	x		x
22588	SANPAH		x	x		x
27716	SASD		x	x		x
22325	SIAB		x	x	x	x
22320	SMCC		x	x	x	
22315	SMPB		x	x	x	
21557	SPDP		x	x	x	
21556	Sulfo-BSOCOES	x		x		
20591	Sulfo-DST	x		x		
21556	Sulfo-EGS	x		x		
22312	Sulfo-MBS		x	x	x	
21553	Sulfo-SADP		x	x		x
22589	Sulfo-SANPAH		x	x		x
22327	Sulfo-SIAB		x	x	x	
22322	Sulfo-SMCC		x	x	x	
22317	Sulfo-SMPB		x	x	x	
26101	TRAU I's	x		x		

Das Vernetzungsreagens wird auf die Basisschicht in einer solchen Menge angewendet, daß die gewünschte Dichte an Bindungsstellen erreicht wird. Die Dichte an Bindungsstellen ist die Menge an Vernetzungsreagens, in Einheiten von Mol/g des synthetisch hergestellten Materials ausgedrückt, die an die Basisschicht gebunden wird und eine zusammenhängende Bedeckung der Oberfläche darstellt.

Um den Inhibitor in einen Zustand zu versetzen, der zur Bindung an die Basisschicht geeignet ist, kann das Vernetzungsreagens zunächst getrennt sowohl an die Basisschicht als auch an den Inhibitor gebunden werden. Die kinetischen Konstanten der Inhibitoren werden vor und nach der Kopplung miteinander verglichen, um die Auswirkungen der Substitutionsreaktion auf ihre kinetischen Konstanten auszuwerten. Nach der Kopplung sollte der Inhibitor biologisch aktiv bleiben. Aus diesem Grunde werden Standard-Aktivitätstests, die spezifisch für den zu immobilisierenden Inhibitor sind, unter Verwendung einer Standard-Thrombinlösung durchgeführt, um seine Kapazität zu bestimmen.

Als Alternative dazu kann die Proteinkomponente der Basisschicht an den Thrombogene-Inhibitor gebunden werden, wodurch vor ihrer Bindung an das synthetisch hergestellte Material ein Konjugat gebildet wird. Dieses Konjugat wird dann an das synthetisch hergestellte Material gebunden, wie es in der Tabelle 2 dargestellt ist. Zusätzlich dazu behält das Thrombogene-Inhibitor-Konjugat seine biologische Aktivität und kann als ein Mittel verwendet werden, um seine Lebensdauer im Blutkreislauf zu erhöhen, da es durch die Nieren nicht leicht abgetrennt wird.

In dem besonderen Fall der Derivatisierung des Hirudins mit SPDP kann durch die Bindung bestimmter Gruppen des Hirudins an das SPDP die biologische Aktivität des Hirudins zerstört werden, da wenigstens einige dieser Gruppen für die Aktivität zur Verfügung stehen müssen. Durch Einstellung des Verhältnisses von Hirudin zu SPDP (1:4, Mol:Mol) und Durchführung der Umsetzung nahe dem physiologischen pH-Wert reagiert SPDP jedoch ziemlich selektiv mit Epsilon-Aminogruppen. Im Ergebnis dieser Umsetzung unter solchen Bedingungen wird ein 1:1 (Mol:Mol) Konjugat-Verhältnis von Hirudin zu SPDP, die kovalent miteinander verbunden sind, begünstigt, wobei die biologische Aktivität des Hirudins nicht zerstört wird.

SPDP reagiert sowohl mit endständigen als auch mit Epsilon-Aminogruppen. Da die Derivatisierung einer endständigen Aminogruppe ein biologisch aktives Protein deaktivieren kann, kann T-BLOCK (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA) dazu verwendet werden, diese Gruppe während der Derivatisierung mit SPDP zu blockieren. Nach der Derivatisierung wird dann der T-BLOCK wieder abgespalten, um die biologische Aktivität wieder herzustellen.

Ausführungsbeispiele

Diese Erfindung wird nun weiter erläutert durch die folgenden, nicht als Begrenzung zu verstehenden Beispiele.

Beispiel 1

A. Vorbehandlung und Aktivierung von Dacron

Dacron Polyester 52 (DuPont) wird in Stücke von 1,0cm Länge geschnitten. Das Gleitmittel, das auf und in der gewebten Oberfläche vorhanden ist, wird durch einstündiges Waschen mit Tetrachlorkohlenstoff und zweimaliges Waschen mit 100% CH₃OH entfernt. Das Methanol wird durch mehrmaliges Waschen mit Wasser und einmaliges Waschen mit durch Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH = 7,4, entfernt.

Das Implantat-Material wird dann einer alkalischen Hydrolyse unterworfen, um die Anzahl zur Verfügung stehender COOH-Gruppen zu erhöhen. Das Material wird eine Stunde bei 50°C mit 0,5M NaOH behandelt. Danach wird es wiederholt mit Wasser gewaschen, und die folgenden Schritte werden unmittelbar danach durchgeführt.

B. Derivatisierung des aktivierten Dacrons mit Carbodilimid

Das aktivierte Material wird in 100,0ml 10mM-Lösung des wasserlöslichen Carbodiimids EDC in entionisiertem Wasser bei einem pH-Wert von 4,6 bis 5,0 eine Stunde bei Zimmertemperatur gelegt und dabei ununterbrochen gerührt. Danach wird das Material entnommen und in PBS gewaschen, um überschüssiges, nicht gebundenes EDC zu entfernen.

C. Herstellung der Basisschicht

Die Basisschicht wird auf die Oberfläche des Implantatmaterials aus Dacron aufgebracht. Das derivatisierte Dacron-Material wird mit einer 5%igen HSA-Lösung in PBS mit einer Menge von 1ml/cm² Implantatmaterial 24 Stunden bei Zimmertemperatur unter ständigem Rühren inkubiert. Das Implantatmaterial wird entnommen und mit PBS gewaschen, um unspezifisch gebundenes HSA zu entfernen. Ungefähr 20mg Protein werden pro mg Dacron kovalent gebunden.

D. Bindung von SPDP an die Basisschicht

Das Dacron-Material mit daran gebundenem HSA wird mit einer 1,0mM Lösung von SPDP in PBS bei einem pH-Wert von 7,4 inkubiert, um SPDP an das HSA zu binden (100mM SPDP/cm² Basisschicht). Die Inkubation wird nach 30 bis 40 Minuten bei Zimmertemperatur beendet. Das Implantat wird dann in PBS gewaschen, um unspezifisch gebundenes SPDP zu entfernen.

E. Aktivierung von SPDP auf der Basisschicht und Messung der Dichte der Bindungsstellen

Das Material mit daran gebundenem SPDP wird getrocknet und ausgewogen, um sein absolutes Gewicht zu bestimmen. Danach wird es 5 Minuten bei Zimmertemperatur in eine 50mM Lösung von Dithiothreitol (DTT) gelegt. Durch diese Umsetzung wird Pyridin-2-thion (P-2-T) aus dem gebundenen SPDP in Freiheit gesetzt und gleichzeitig zu diesem Vorgang freie Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) auf der Basisschicht gebildet. Das freigesetzte P-2-T wird durch Absorptionsspektrometrie bei 343nm unter Verwendung seines Extinktionskoeffizienten ($E = 8,08 \times 10^3$) quantitativ bestimmt. Dieses ist direkt proportional der Menge an gebundenem SPDP oder an Bindungsstellen. Die Anzahl der Bindungsstellen wird berechnet und angegeben in Mol an Bindungsstellen pro g Dacron.

Anschließend wird das Material 5mal in PBS und 4mal in Wasser gewaschen.

F. Bindung von SPDP an Hirudin

Lyophilisiertes Hirudin wird mit einer Konzentration von 1mg/ml wieder in PBS suspendiert. SPDP (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) wird mit einer Konzentration von 10mM in 100% Ethanol gelöst. Ein Teil Hirudin wird mit 4 Teilen SPDP (Mol:Mol) vermischt und bei Zimmertemperatur 30 Minuten inkubiert. Das an SPDP gebundene Hirudin wird dann von freiem Hirudin und

Nebenprodukten aus der Reaktion durch Chromatographie an einer G-25-Säule abgetrennt; dabei wird das derivatisierte Hirudin zuerst eluiert.

G. Bestimmung des an Hirudin gebundenen SPDP

Das Ausmaß der Bindung von SPDP an Hirudin kann durch Zugabe von DTT quantitativ bestimmt werden, da dadurch Pyridin-2-thion (P-2-T) aus dem an Hirudin gebundenen SPDP in Freiheit gesetzt wird, das wiederum bei 343 nm spektrophotometrisch bestimmt werden kann. Durch diese Messung können die Mole an SPDP, die an Hirudin gebunden sind, bestimmt werden. Jedes in Freiheit gesetzte Molekül P-2-T bedeutet ein kovalent an Hirudin gebundenes SPDP-Molekül. Jedes Mol Hirudin bindet in diesen Untersuchungen 1,2 Mol SPDP.

H. Bindung des derivatisierten Hirudins an die Basisschicht

Die reduzierte Basisschicht mit gebundenem SPDP (die freie SH-Gruppen aufweist) wird mit PBS gewaschen, um das DTT zu entfernen. Anschließend wird zu dem Implantat Hirudin mit daran gebundenem SPDP mit 50,0 mg/cm² zugesetzt. Die Lösung wird über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert, um das mit SPDP umgesetzte Hirudin an die SH-Gruppen des Dacrons zu binden. Das Dacron-Material mit dem daran kovalent immobilisierten Hirudin wird dann mit PBS gewaschen und darin aufbewahrt.

I. Analyse

a) Spektroskopische Untersuchung

Um die Menge des mit SPDP umgesetzten Hirudins an die Basisschicht quantitativ zu bestimmen, wird von der Lösung zu dem Zeitpunkt der Zugabe des SPDP-Hirudin-Komplexes zum Dacron die Absorption bei 343 nm bestimmt. Nach der Inkubation über Nacht wird die Absorption wiederum gemessen und die Veränderung in der Absorption auf die Menge des aus dem SPDP-Hirudin-Komplex in Freiheit gesetzten P-2-T zurückgeführt. Die Menge des P-2-T, die freigesetzt worden ist, ist direkt proportional der Anzahl von SPDP-Substitutions-Reaktionen, die zwischen den SH-Gruppen der Basisschicht und dem SPDP-Hirudin-Komplex eingetreten sind.

b) Thrombin-Inhibierungs-Bestimmung

Unter Verwendung einer bekannten Menge Thrombin wird eine Standardkurve mit einer bekannten Menge Hirudin oder eines Hirudin-Analogen konstruiert, indem Hirudin zu Thrombin zugegeben wird und die verbleibende Thrombin-Aktivität unter Verwendung des chromatographischen Substrates S-2238 gemessen wird. Die Inhibierung des Thrombins durch derivatisiertes Hirudin (Hirudin-SPDP) oder immobilisiertes Hirudin (das Dacron-Material mit immobilisiertem Hirudin) wird dann mit den Werten für nicht derivatisiertes Hirudin verglichen, indem die ED₅₀-Werte unter Verwendung von 10 NIH-Einheiten Thrombin/ml berechnet werden und die Restaktivität des Thrombins bestimmt wird.

Diese Erfindung kann in anderen speziellen Formen ohne Abweichung vom Geist oder deren wesentlichen Merkmalen ausgeführt werden. Die vorliegenden Ausführungsformen sollen deshalb in jeder Hinsicht als illustrativ und nicht einschränkend angesehen werden; der Umfang der Erfindung wird durch die angefügten Ansprüche und nicht durch die vorhergehende Beschreibung angegeben und alle Veränderungen, die die Bedeutung und den Bereich der Ansprüche betreffen, sollen deshalb hierin eingeschlossen sein.

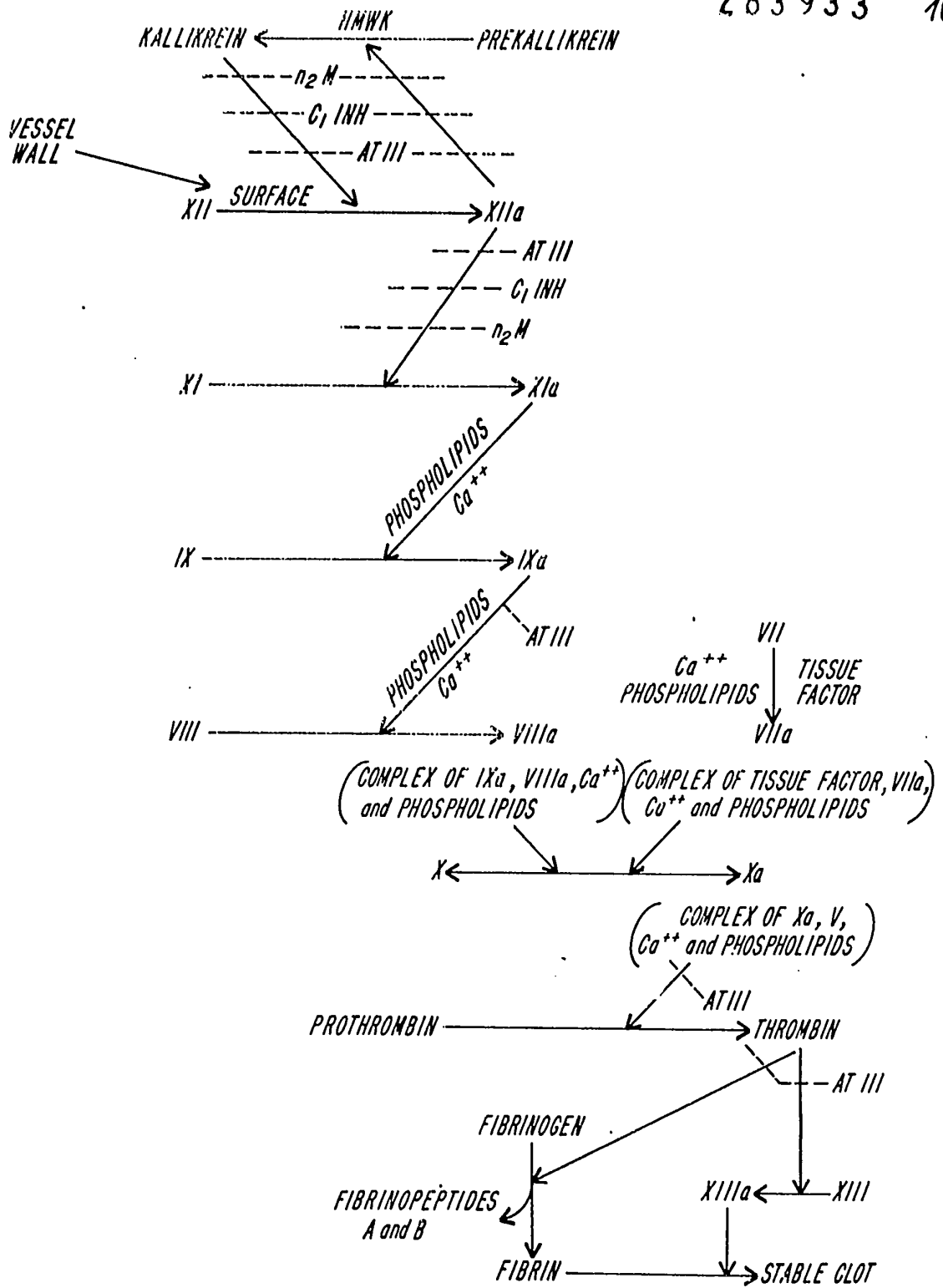


FIG. 1

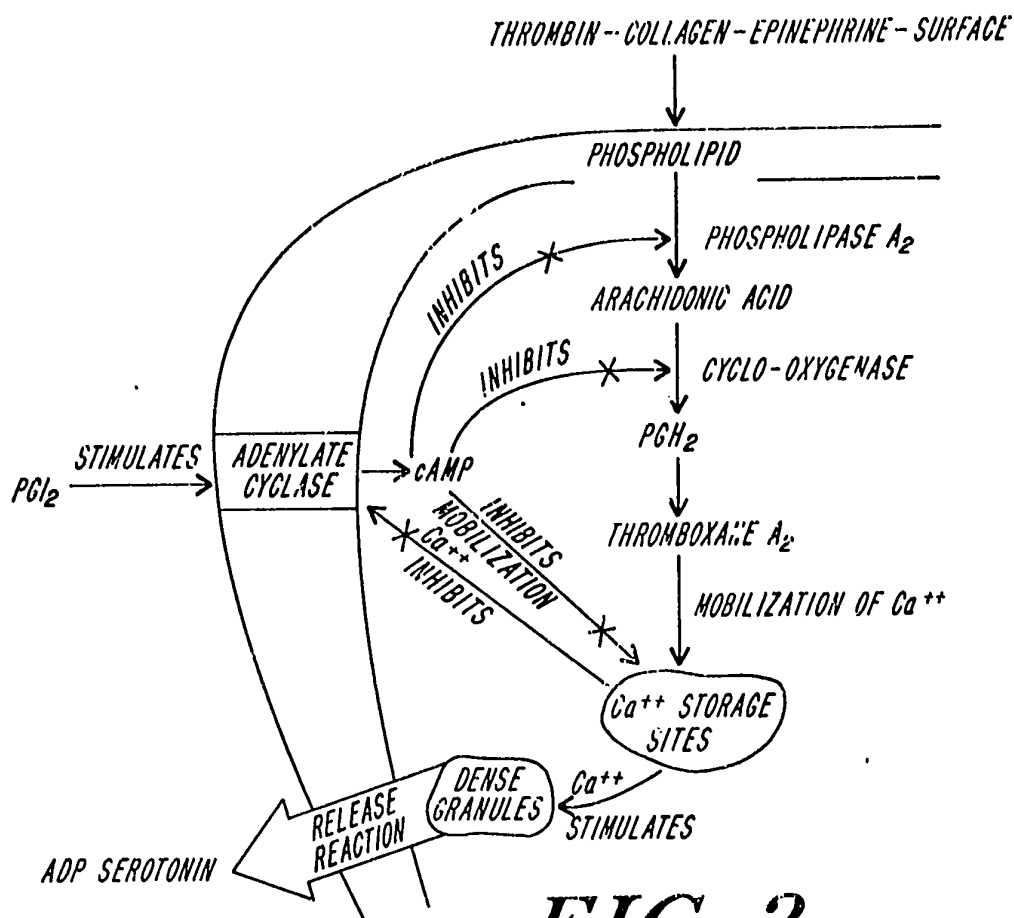


FIG. 2

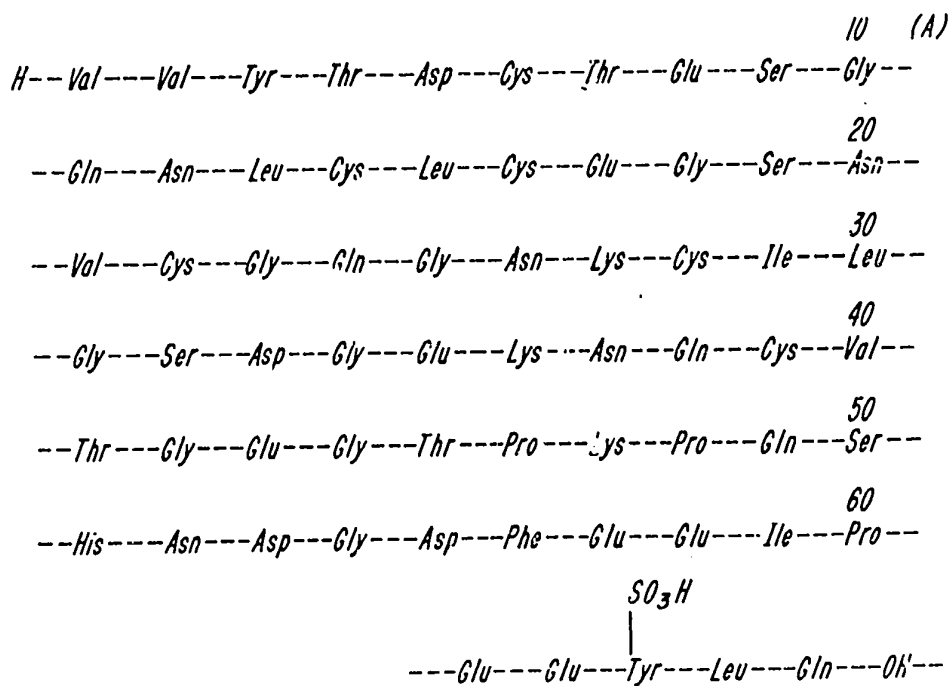


FIG. 3